

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00321

肿瘤的主动靶向给药系统研究现状

丁宝月^{1,2}, 敖雷², 丁雪鹰³, 高静³, 范伟¹, 高申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433
2. 嘉兴学院医学院药剂教研室, 嘉兴 314001
3. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] 主动靶向给药系统能使抗肿瘤药物选择性地与靶组织在细胞或亚细胞水平上结合并起作用, 可使药物能够可控性地分布于靶区并持续缓慢地释放药物, 在提高药物抗癌效果的同时可降低其对正常组织的不良反应。尽管开发研究主动靶向给药系统还有许多问题有待解决, 广泛应用于临床尚需时日, 但它们对于克服肿瘤治疗中的不良反应, 提高疗效具有不可忽视的作用, 是抗肿瘤药物的理想剂型, 具有良好的应用前景。本文通过查阅大量近年来国内外主动靶向给药系统在肿瘤治疗中的相关研究文献, 进行分析、归纳和总结, 综述了在研并取得一定进展的抗肿瘤主动靶向给药系统的作用、特点、存在的问题及可能的解决方法, 为肿瘤的靶向给药研究提供思路和方法。

[关键词] 肿瘤; 主动靶向; 给药系统; 抗体; 受体

[中图分类号] R 730.53 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0321-08

Active tumor targeting drug delivery system: the current status

DING Bao-yue^{1,2}, AO lei², DING Xue-ying³, GAO Jing³, FAN Wei¹, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmaceutics, Medical School of Jiaying College, Jiaying 314001, Zhejiang, China
3. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Active tumor targeting drug delivery system(ATTDDS) can selectively combine with and react to the target tissue at the cellular or sub-cellular level, making it possible for drugs to be distributed in a controlled manner and released in a slow and continuous manner, subsequently resulting in enhanced anti-cancer drugs effects and reduced adverse effects on normal tissues. Although there are many problems need to be solved in research on ATTDDS, and there is still a long way to go before it can be used clinically, its roles in overcoming adverse effects of cancer treatment and improving the therapeutic effect are valuable. Generally, ATTDDS is an ideal anti-tumor drug dosage and has a promising prospect. This paper introduces the effects and characteristics of various types of ATTDDS as well as their problems and countermeasures, hoping to provide research ideas and methods for the anti-tumor targeted drug delivery.

[Key words] neoplasms; active targeting; drug delivery systems; antibodies; receptors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3): 321-328]

肿瘤的非手术治疗包括放疗和化疗等, 均以杀死肿瘤细胞为目的, 但都缺乏对肿瘤细胞的特异性。目前, 临床常用的抗肿瘤药物有 70 种左右, 已进入临床试验的抗肿瘤新药就有 400 多种, 大多数药物由于缺乏对肿瘤细胞的特异性, 常规治疗剂量即会对正常组织器官产生显著的毒副作用。肿瘤靶向治疗是利用具有一定特异的载体, 将药物或其他杀伤肿瘤细胞的活性物质定向作用于肿瘤组织, 而不影响正常组织细胞功能, 从而提高疗效、减少毒副作用的一种方法。

靶向给药系统是指一种采用新技术、新工艺制备而成,

能将药物最大限度地输送至并选择性浓集于靶器官、靶组织、靶细胞的给药系统, 可达到低毒高效的治疗效果, 被认为是抗肿瘤药的理想剂型^[1]。靶向制剂与普通制剂和缓控释制剂相比, 具有以下特点: (1) 靶向性, 药物集中于靶区; (2) 减少用药剂量; (3) 提高疗效; (4) 减少药物的毒副作用。按药物所到达的靶部位可将靶向制剂分为 3 类: (1) 可以到达特定靶组织或靶器官的靶向制剂, 即一级靶向; (2) 可以到达特定靶细胞的靶向制剂, 即二级靶向; (3) 可以到达细胞内某些特定靶点的靶向制剂, 即三级靶向。靶向肿瘤细胞的细胞

[收稿日期] 2009-07-29 **[接受日期]** 2009-10-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30973459), 上海市科委纳米技术专项基金(0952nm02800). Supported by National Natural Science Foundation of China(30973459) and Nano-tech Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(0952nm02800).

[作者简介] 丁宝月, 博士生, 讲师, E-mail: lena_310@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873715, E-mail: ggss99@126.com

靶向给药系统可使药物在细胞水平上发挥作用,药物选择性攻击病变细胞,对正常细胞没有或几乎没有不良影响,可使药物起到理想的治疗效果,从而为患者尤其是癌症患者带来福音。目前,研究较多的是靶向肿瘤细胞的主动靶向给药系统,即利用肿瘤细胞表面的特异性抗原或受体作为作用靶点的给药系统。本文就近年来主动靶向肿瘤细胞的给药系统在肿瘤治疗中的研究工作作一简要综述。

1 受体介导内化的肿瘤靶向给药系统

受体介导内化的肿瘤靶向给药系统就是以肿瘤细胞表面特异性或过度表达的受体为靶点,以受体对应的配体或配体结合物为载体,利用受体和配体的特异性反应,将药物递送至受体表达阳性的肿瘤细胞的一种治疗系统。随着对肿瘤分子水平研究的深入,发现在肿瘤细胞表面或肿瘤相关血管表面的系列受体与肿瘤生长增殖密切相关,并在肿瘤组织中过度表达。而受体与其配体的结合具有特异性、选择性和饱和性,且亲和力强、生物效应明显。因此,将配体作为药物载体,通过受体的介导作用,可增加病灶区的药物浓度、提高疗效、降低毒副作用,从而达到靶向治疗的目的^[2]。目前研究较多的受体主要有表皮生长因子受体、唾液酸糖蛋白受体、低密度脂蛋白受体、转铁蛋白受体、叶酸受体等,有些受体已证实可作为特定肿瘤靶向的靶点,提高主动靶向效率。

1.1 表皮生长因子受体

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是具有酪氨酸激酶活性的多功能跨膜蛋白,广泛分布于哺乳动物的上皮细胞,所有鳞癌细胞都有表达,65%以上的大细胞癌和腺癌也有过度表达,它与新生血管形成、侵袭、转移及抗凋亡等有关。因此,在多种恶性肿瘤如神经胶质细胞瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、头颈部鳞癌、宫颈癌、食管癌、前列腺癌、肝癌、结肠癌、胃癌中EGFR都呈现过度表达^[3]。

Gijssens等^[4]利用表皮生长因子(EGF)可与肿瘤细胞表面过度表达的EGFR结合的特点,分别使用2种水溶性载体葡聚糖和血清白蛋白(HSA)将光敏感体锡(IV)二氢卟吩₆(ED)和EGF连接,考察所得复合物的光动力学活性。结果表明,以HSA为连接体形成的复合物对EGFR的亲合性较强(IC₅₀为63 nmol/L),在27 kJ/cm²光照条件下,细胞内蓄积量增加5倍,对肿瘤细胞的光毒性增强。

EGFR酪氨酸激酶活性的升高是肿瘤恶化的重要原因。利用单抗和酶抑制剂封闭EGFR的酪氨酸激酶活性,是靶向研究卓有成效的领域之一,已有多种药物进入临床试验,在治疗实体瘤方面取得了确切疗效,如ZD-1839和OSI-774等。ZD-1839(Iressa[®] gefitinib)由英国AstraZeneca公司研制开发,2004年作为治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的药物在瑞士、美国、日本等国家上市,是第一批用于临床试验的EGFR抑制剂之一^[5]。I期临床研究发现ZD-1839对NSCLC患者最有效。ZD-1839对头颈癌的治疗研究已经进入III期临床。OSI-774(Tarceva, Erlotinib)由美国OSI、Roche、Genentech等公司联合开发研制,对EGFR过度表达的肿瘤细胞有显著抑制作用(IC₅₀为20 nmol/L)。10 μmol/L的OSI-774对乳腺

癌细胞的抑制率为63%,NSCLC细胞为75%,卵巢癌细胞为83%^[6]。OSI-774作为治疗NSCLC的药物已于2004年被批准在美国上市,其治疗胰腺癌得研究处于III期临床试验阶段,治疗卵巢癌、头颈癌、脑癌、肾癌处于II期临床试验阶段,治疗结肠癌和乳腺癌处于I期临床试验阶段^[6]。

1.2 转铁蛋白受体

转铁蛋白(transferrin, TF)是一类II型跨膜糖蛋白家族,由2个单体(90 000)经二硫键交联而成。转铁蛋白受体(transfer-receptor, TFR)在分裂活跃的细胞上表达水平很高,如在肿瘤细胞上每个细胞能达到1万~10万个分子,而在非增殖细胞上很少表达,甚至检测不到。TF/TFR系统在转运抗癌药、蛋白质以及基因治疗药物上显示出了很大潜能^[7-9]。

Ishida等^[10]利用二硬酯酰磷脂(DSPC)、胆固醇(CH)、二硬酯酰乙醇胺-PEG(DsP-PEG)和DSPE-PEG-COOH的混合物,在DSPE-PEG-COOH的羧基末端连接TF制备了TL-PEG-小单室脂质体(100~140 nm),并进行了体外及Colon26荷瘤小鼠的体内实验,测定其靶向肿瘤细胞的能力。1分子脂质体结合约25分子TF后,在外周循环的滞留时间长达72 h,是PEG-脂质体的3倍,被单核巨噬系统(RES)吞噬的量减少一半,可使更多的脂质体靶向进入实体瘤细胞。电镜显示,TF-PEG-脂质体经受体介导的内吞作用进入了肿瘤细胞。说明TF-PEG-脂质体可作为化疗药或DNA质粒靶向肿瘤细胞的载体。佟豪等^[11]用EDC法制备了抗TFR的抗体与多聚左旋赖氨酸(PLL)的复合物,并根据DNA阻滞实验结果将Survivin反义RNA重组质粒与Ab-PLL按1:3混合,形成Ab-pLL-Survivin反义RNA(质粒DNA)复合物,将此复合物转染人肝癌细胞株HepG2,观察其对HepG2细胞的杀伤效应及细胞凋亡的影响。发现转染复合物组HepG2细胞的增殖受抑制、凋亡明显增多。实验结果表明,该TFR介导的基因转移系统具有很好的靶向性及抑制癌细胞生长、促癌细胞凋亡作用。

辣根过氧化物酶HRP是最常见的酶促发光或显色的交联酶,由于HRP具有比活高、特异性强、相对分子质量小、稳定性好和作用底物范围广等优点而得到广泛使用。Visser等^[12]先通过偶联反应制备出T_f修饰的聚乙二醇亲水性链段(PEG-T_f),再分别将PEG、PEG-T_f嵌入预先制备好的HRP脂质体中,制备出普通脂质体(Lipo C)和修饰脂质体(lipo T)。2种脂质体粒径均小于100 nm,但lipo T对脑血管内皮细胞的结合能力却高达lipo C的2~3倍。该结果表明TF聚合物可以借助于对TFR的高度识别,定位于脑血管内皮细胞表面,为细胞毒性成分的脑部靶向性递送提供一种可能。

除了脑血管上皮细胞,Anabousia等^[13]对TFR在肺上皮细胞系的分布情况也进行了研究。共聚焦显微镜观察发现:不同细胞系的TFR表达和分布存在着明显的差异,如TFR高度表达于支气管上皮细胞系,而在肺泡上皮细胞系的分布则十分保守。TFR主要位于细胞的基底层,当细胞发生病变而异常增殖时,TFR会大量出现在细胞顶侧。体外实验中,TFR的高水平表达和TF化脂质体的摄取和细胞毒性表现出明显的相关性,TF-脂质体的摄取可以被游离的TF所抑

制,确证了TF聚合物的摄取机制主要为TFR介导的内吞作用。因此,TF-TFR系统也可能是肺部靶向给药的一种理想选择。

1.3 唾液酸糖蛋白受体 唾液酸糖蛋白受体(sialoglycoprotein receptor)又称肝细胞半乳糖受体(H-Gal-R),仅存在于哺乳动物肝细胞中的跨膜蛋白。半乳糖受体能够与特异性配体结合并将其内吞进入肝细胞,再在溶酶体作用下断裂为配体和H-Gal-R,H-Gal-R不再发生降解,转运至细胞膜参与下一轮循环。将抗肿瘤药物与含半乳糖残基载体偶联,即将其作为药物进入体内后靶向作用的导向基团,它能特异性地识别末端糖基D-半乳糖或N-乙酰-D-半乳糖胺的复合物,是现今了解得最透彻的肝主动靶向受体。

Diza等^[14]分别以葡萄糖-鞘氨基醇、半乳糖-鞘氨基醇为原料,以全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA),13cis维甲酸(13cis retinoic acid,13cis RA)为模型药物,制备出糖酯类修饰脂质体,并对其进行了研究。结果发现,对于肝癌细胞系HepG2,半乳糖化脂质体和葡萄糖化脂质体的细胞毒性并未表现出明显差异;而对于肝癌细胞系Hep3B,ATRA半乳糖阳离子脂质体则明显强于葡萄糖组,表明在Hep3B细胞系中,糖酯化脂质体给药系统对细胞的毒性受到了唾液酸糖蛋白受体系统的调控。

为了躲避肝细胞的快速清除,Terada等^[15]建立了一种“隐形”的具有肝癌细胞系识别功能的主动靶向给药系统。他们先在金属蛋白酶MMP-2底物肽(Gly-Pro-Lcu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gin)上接入具有亲水性的聚乙二醇链段,再将二棕榈磷脂酰基乙醇胺(DOPE)与聚乙二醇化的底物肽连接,即获得可被MMP-2切割的聚乙二醇-底物肽-DOPE,再与半乳糖苷脂质体(Gal-liposomes)偶合,最终获得的聚乙二醇修饰的MMP-2底物肽-半乳糖苷-阿霉素脂质体(PEG-PD-Gal-liposomes)复合物由于聚乙二醇的亲水性和空间屏蔽作用,可以长时间停留在循环系统中,而不被正常肝细胞摄取。在肝癌细胞周围有肿瘤细胞分泌的高浓度基质金属蛋白酶,这些金属酶可以水解脂质体复合物中的底物肽,从而解除聚乙二醇的空间位阻效应,暴露脂质体表面的半乳糖残基,使脂质体被肝癌细胞识别和摄取,达到特异性靶向肝癌细胞的给药目的。

1.4 低密度脂蛋白受体 低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)是正常血浆的组成部分,在体内主要负责运输胆固醇。低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的活性及数量在某些癌细胞中明显高于正常细胞,如恶性胶质瘤、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、白血病及妇科肿瘤等。

LDL是体内胆固醇的转运蛋白,因此,以胆固醇为主要基团而制备的乳剂有望经LDLR途径而进入细胞。Rodrigues等^[16]制备了抗肿瘤药物的胆固醇富集乳剂(cholesterol-rich emulsion, LDE),由于处方中的胆固醇能够特异性识别LDL受体结构,与市售制剂组相比,胆固醇组对NCI-H292细胞的抗增殖活性明显增强;大鼠的半数致死量LD₅₀为324 mg/kg,几乎达市售制剂(LD₅₀ = 31.8 mg/kg)的10倍。表明胆固醇富集乳剂可作为一种新型载体而用于肿瘤

主动靶向治疗。

载脂蛋白也是LDL的天然配体之一。Nikanjam等^[17]以肽段为桥链,将载脂蛋白apoB-100偶联至制备好的紫杉醇油酸酯微乳上,制备了一种具有LDL受体识别功能的纳米粒(nLDL-PO)。体外毒性实验发现:LDL受体抑制剂可明显改善多形性胶质母细胞瘤(GBM)的细胞存活率。实验表明,纳米粒的摄取机制可能为LD介导的内吞作用,nLDL-PO有望发展成为一种靶向LDLR表达阳性肿瘤细胞的药物载体。

1.5 叶酸受体 叶酸受体(folate receptor, FR)是一类包括 α 、 β 和 γ 3种亚型的糖蛋白,其中 α 和 β 亚型(FR- α 、FR- β)通过聚糖磷脂酰肌醇锚着在细胞膜上,是机体主动摄取叶酸的高亲和力载体蛋白。FR在上皮系肿瘤细胞中呈高水平表达,如卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌及鼻咽癌细胞等,使得FR成为值得期待的肿瘤治疗靶点。近年来,越来越多的国内外学者对FR介导的靶向给药系统开展了研究。

Bae等^[18]研制了具有叶酸靶向与pH敏感控释双重功能的嵌段共聚物载药纳米胶束。他们将叶酸与亲水性PEG链段连接,将抗肿瘤药物DOX与疏水性的聚门冬氨酸链段连接,通过FR的特异性识别作用,将该胶束选择性地引入肿瘤细胞。由于细胞包涵体偏酸性(pH 5~6)的环境,DOX从聚合物胶束的疏水链端解离下来,从而提高了药物在肿瘤细胞中的浓度。这种叶酸靶向的药物传递与pH敏感的药物释放机制使得其绕过p-糖蛋白药物输出泵,产生强抗肿瘤活性。该研究说明FR介导的靶向药物输送和pH敏感的药物控释双重策略在癌症靶向治疗中的联合应用具有一定的可行性。Yu等^[19]以肝素-胆酸结合物(HL)为活性成分,通过偶联叶酸分子得到了一种具有叶酸导向功能的FHL结合物。结果发现,HL和FHL的抗凝活性分别为38%和28%,这种低抗凝血活性、高抗肿瘤活性的FHL有望成为一类新型叶酸靶向的抗肿瘤辅助药物。

文献^[20-21]设计合成了叶酸连接丝裂霉素和长春碱2种药物的偶联物EC0225,其中丝裂霉素和长春碱都是先通过二硫键与亲水的肽链Spacer相连,再与叶酸偶联。体外活性测试结果表明,它对FR表达呈阳性的肿瘤细胞具有很强的抑制作用,并有剂量依赖效应。其中对KB细胞的IC₅₀为5 nmol/L,而对FR呈阴性的肿瘤细胞4T1(murine breast carcinoma)没有活性,说明它是FR介导进入肿瘤细胞的。EC0225已于2007年3月进入针对难治愈的实体瘤(refractory solid tumors)的I期临床试验。

FR介导的靶向给药系统具有许多独特的优点,如相对分子质量小、无免疫原性、廉价易得、稳定性好、与药物分子或载体之间的化学键合简单易行等。此外,在所有的体外实验中,叶酸介导的给药系统几乎都能增加大分子向FR阳性的肿瘤细胞的转运。但体内实验的结果却一直不够理想,这主要是因为大分子在实体瘤中的穿透能力较弱,但也有明显改善疗效甚至完全治愈的报告。

1.6 胰岛素样生长因子受体 胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)又称生长素介质,它是生长激素(GH)诱导靶细胞产生的一种具有促生长作用的肽类物质,

因其化学结构和胰岛素相近所以称之为胰岛素样生长因子。IGF及其受体(IGFR)参与细胞的恶性转化、增殖和转移,保护细胞免于凋亡。在多种肿瘤细胞中,细胞膜上胰岛素样受体的密度和亲和力增加,并有实验证明胰岛素与多种化合物共价连接后仍具有与胰岛素样受体结合的活性。因此,IGF作为肿瘤细胞主动靶向给药系统的导向分子,有可能通过IGFR介导将药物定向转运并导入肿瘤细胞及细胞核内,从而增加抑瘤效果,减少毒副作用。

Liu等^[22]采用米托蒽醌为抗肿瘤模型药物,以胰岛素为导向载体,制备了米托蒽醌-胰岛素偶联物,并以荷肝癌小鼠为肿瘤模型,研究了胰岛素受体高表达的肿瘤细胞主动靶向给药系统的性质。在H22荷瘤小鼠体内的分布及动力学的研究表明,偶联物较原药在血液中清除要慢,血浆中AUC是游离药物的717倍, $t_{1/2\beta}$ 是原药的3.4倍,并对肿瘤组织具有一定的靶向性。体外药理学评价显示,偶联物较原药进入肿瘤细胞快,进入细胞后所释原药的抑瘤活性无改变,保证了偶联物的主动靶向抑瘤效果,且对正常肝细胞的毒性小于原药,从而达到了低毒高效的靶向效果。

1.7 血管内皮生长因子受体 新血管生成是肿瘤形成和转移的基础,它不仅为肿瘤提供必要的养分,还向机体其他组织输送肿瘤细胞,导致肿瘤的恶化和转移。因此,抑制肿瘤血管形成一直是预防和治疗肿瘤的研究热点。血管内皮生长因子(VEGF)是目前研究最多的一种血管分裂原,可促进血管内皮细胞分裂,并增加血管通透性。目前采用多种途径来抑制VEGF信号通路,其中较为成熟的方法是应用单抗封闭VEGF的生物学活性。VEGF与gelonin毒素融合表达得到的嵌合毒素,能够特异靶向血管内皮生长因子受体(VEGFR)过度表达的肿瘤血管,破坏肿瘤细胞,而且不会引起毛细血管渗漏综合征,为其他毒素所不及^[23]。

VEGFR主要在内皮细胞表达,并特异刺激内皮细胞增殖。VEGFR在许多种肿瘤血管内皮细胞中都高度表达,是治疗实体瘤的良好靶标。有关VEGFR的研究主要集中在封闭其激酶活性,阻止VEGF诱导的信号通路,已有几种激酶抑制剂在大量的动物模型和临床试验中取得了较好的疗效。PTK787/ZK-222584^[24]是一种氨基噁嗪类化合物,是VEGFR-2的特异性强力抑制剂,并对血小板衍生生长因子受体(PDGFR)酪氨酸激酶有一定的抑制性。在体内和体外模型中,该药均能干扰VEGF和PDGF介导的血管新生作用。2-羟基喹啉衍生物SU5416^[25]同样对VEGFR-2和PDGFR有很强的抑制力。

1.8 白介素受体 白介素(IL)家族是一类能够激活淋巴细胞的细胞因子,具有广泛的活性。但IL在体内会被快速清除,高剂量使用时又会招致细胞毒性,直接用于免疫治疗效果不佳。为改善IL在体内的药代动力学和药效,有人设计了杂合细胞因子运输系统,提高IL的稳定性和选择性。Konigsberg等^[26]通过化学键将重组人IL-2连接到脂质体外表面,脂质体内包裹免疫抑制剂氮甲嘌呤,结果发现脂质体可特异性地聚集到表达高亲和力IL-2受体的活性T细胞上。由IL和蛋白毒素交联而成的嵌合毒素在临床上也表现出很大的潜力,用完整的IL-2取代白喉毒素受体结合结构域

所得的嵌合毒素DAB(389)IL-2(denileukin diftitox, ON-TAK)对T细胞淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤有很好的疗效,因而获得FDA的批准,进入临床试验^[27]。嵌合毒素IL-4/PE(假单胞菌外毒素)^[28]对肿瘤细胞有很强的杀伤力,而对表达IL-4受体的正常淋巴细胞没有毒性,目前也正处于临床试验中。

2 抗体介导的肿瘤靶向给药系统

抗体作为肿瘤的靶向治疗得益于抗体两个关键性技术的突破:可大规模生产抗体的杂交瘤技术;克服鼠源性抗体在人体内产生抗抗体(HAMA)问题(如:人鼠嵌合抗体、人源化抗体和人抗体技术)。在人体内的半衰期从鼠源性抗体小于20h到人源化抗体和人抗体的半衰期为数天、甚至21d之久。抗体库的建立和筛选以及多价重组抗体制备技术的发展使人们能够直接获得特异性强和亲和力高的单克隆抗体^[29]。

抗体介导的肿瘤靶向给药系统是指利用抗原-抗体之间的特异性识别机制发挥主动靶向到特定细胞作用的给药系统。许多抗体对大多数肿瘤如卵巢癌、前列腺癌、结肠癌等的特异性抗原具有识别作用,重组细胞工程的发展也使肿瘤抗体的低成本工业化生产成为可能。自1975年单克隆抗体首次被发现可以与肿瘤细胞的抗原结合治疗肿瘤后,极大地促进了靶向药物的发展,许多常用抗肿瘤药物被用于制备单克隆抗体-药物的偶联物^[30]。

2.1 单克隆抗体 单克隆抗体具有靶点特异性高、不良反应较低、患者治疗依从性好,可有效携带化疗药物、放射性物质、毒素等各种“武器”到达靶目标,可诱导针对疾病的免疫反应等许多突出的优点,是生物制药研究中备受关注的对象。专家们认为,以单抗药物治疗肿瘤将引领未来的市场,作为抗肿瘤药物的载体亦具有较好的应用前景。

研究表明,单抗与药物偶联物或与毒素偶联物对肿瘤靶细胞具有选择性杀伤作用,对表达有关抗原的肿瘤细胞作用强,而对抗原性无关细胞的作用弱或无作用,选择性杀伤作用是单抗药物用于肿瘤治疗的重要基础。单抗的主要作用机制是抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用和补体介导的细胞毒作用,其他机制可能还有诱导细胞凋亡、阻碍细胞周期从G期向S期过渡、抑制信号转导以及化疗增敏等。

在目前美国批准上市的8个靶向肿瘤的单抗中5个用来治疗血液系统恶性肿瘤,3个针对实体瘤,其针对的靶标包括:(1)靶向白血病细胞表面表达的抗原,如针对抗原分子CD20、CD33、CD52的单抗或者耦合抗体;(2)以细胞表面Her家族为靶点的单抗,如针对Her2阳性的Herceptin和针对HER1的MC-C225;(3)以VEGF/VEGFR为靶点,如作为晚期直肠癌一线用药的bevacizumab(avastin)。单抗联合化疗,疗效明显优于单一的化疗。尤其是抗肿瘤新生血管生成的bevacizumab,在和化疗药联用时表现出化疗增敏作用,其可能的机制是:抗血管生成药物使肿瘤的血管正常化,提高了化疗药的疗效;抗血管生成的单抗阻止了细胞毒性化疗药治疗后的肿瘤细胞快速再增殖;抗血管生成药物增强了化疗药的抗血管生成作用^[29]。

利妥昔单抗(rituximab)是一种针对 CD20 的人鼠嵌合单抗,部分可变区为鼠源,其他部分和稳定区为人源,与 B 淋巴瘤细胞高表达的 CD20 抗原有很强的特异性结合力,进入人体后,可与 CD20 特异性结合,导致 B 细胞溶解,从而抑制 B 细胞增殖,诱导 B 细胞凋亡并提高肿瘤细胞对化疗的敏感性。1997 年 11 月美国 FDA 批准利妥昔单抗用于某些复发、难治、CD20 阳性的惰性 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤。利妥昔单抗与 CHOP 方案(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、泼尼松)联用治疗低度恶性 B 细胞淋巴瘤,总有效率达 95%,其中完全缓解率为 55%,聚合酶链反应技术显示,此联合方案可清除 bcl-2 阳性细胞。在治疗慢性淋巴细胞白血病的进程中,利妥昔单抗的剂量和治疗效果呈现良好的量效关系。利妥昔单抗被证明是治疗非霍奇金淋巴瘤的有效药物,对未经治疗、复发或难治非霍奇金淋巴瘤的有效率分别达到 73% 和 48%,利妥昔单抗联合 CHOP 方案治疗非霍奇金淋巴瘤有效率达到 95%^[31]。Kirchner 等^[32]对 25 例乳腺癌患者的骨髓做肿瘤微转移的检测,其中 17 例检出肿瘤微转移,进行辅助化疗后,仍有 9 例 17-1A 抗原阳性。继而对这 9 例患者进行了依决洛单抗的治疗,初次剂量 500 mg,静脉注射,然后每月 1 次,100 mg,静脉注射×4 个月,停药 6 周后检测骨髓 17-1A 抗原:7 例阴性,2 例表达明显降低。笔者认为,乳腺癌患者在辅助化疗后应用依决洛单抗能明显降低骨髓中的肿瘤细胞,清除 17-1A 抗原阳性肿瘤细胞的微转移灶。

曲妥珠单抗(herceptin)是一种针对 HER-2 原癌基因产物的人鼠嵌合单抗,能特异地作用 HER-2 受体过度表达的乳腺癌细胞。于 1998 年 9 月经美国 FDA 批准上市,是第一个以癌基因为靶点的 HER-2 阳性乳腺癌转移患者的治疗药物,在人体内可选择性的与细胞核内 HER-2 原癌基因调控的 p185 糖蛋白结合,后者为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性介质,本身就具有抗肿瘤的特性,同时,还可以提高肿瘤细胞对化疗的敏感性。单独应用曲妥珠单抗时,HER-2 高表达的乳腺癌患者也获得了客观缓解和临床疗效,并具有较好的耐受性。曲妥珠单抗有望作为高表达 HER-2 的高转移趋势乳腺癌的一线治疗药物^[33]。

贝伐珠单抗(bevacizumab)是针对血管内皮生长因子的人源化单抗,通过抑制可刺激新血管形成的血管内皮生长因子起效,美国 FDA 在 2004 年已经批准其用于结直肠癌的一线治疗。Ⅲ期临床试验显示,贝伐珠单抗主要通过抑制 VEGF 使肿瘤组织无法获得所需的血液、氧和营养成分而达到抗癌效果,适用于联合以氟尿嘧啶为基础的化疗方案,如转移性结直肠癌等恶性肿瘤^[34]。

2.2 免疫脂质体 免疫脂质体(immunoliposomes)系由抗体直接或间接连于脂质体表面构成。Lopes de Menezes 等^[35]研究表明,连接 CD-19 抗体的多柔比星免疫脂质体对 ARH77 细胞的毒性作用比非靶向性脂质体更强,并可选择性作用于 B 淋巴细胞,而游离药物对 B 细胞或 T 细胞均不具有特异性的细胞毒性。Moos 等^[36]以大鼠为模型研究抗转铁蛋白受体 IgG2a(OX26)靶向脑组织的机制。结果表明,OX26 可与血脑屏障上的 TFR 结合转运入脑,脑毛细血管内皮细胞对 OX26 的摄取是同型非免疫 IgG2a 的 10 倍以上。

Huwyler 等^[37]在载放射性标记地高辛脂质体的表面连接 OX26 后在细胞内蓄积可达 55%,远高于游离药物。Völkel 等^[38]在脂质体上连接单链 Fv 片断(scFvA5)构成的免疫脂质体,可与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)上的内皮因子 endoglin(又称 CD105)特异性结合。体外试验表明,该脂质体在血浆中可稳定存在数小时,同等条件下负载多柔比星后对内皮细胞的毒性是非靶向性脂质体的 3 倍和游离药物的 3~10 倍。

2.3 单抗偶联物

2.3.1 化学免疫偶联物 细胞毒性抗肿瘤药物主要通过抑制细胞 DNA 或蛋白质合成、抑制细胞有丝分裂等方式来杀伤肿瘤细胞。但这些药物对正常的细胞同样具有较大杀伤力,从而极大的限制了该类药物的进一步应用和发展。将细胞毒性药物通过化学、生物方法与单抗偶联,利用抗原抗体特异性结合的能力,将其“精确”地运送到靶细胞,可有效地提高肿瘤局部的药物浓度,极大地降低药物在体内其他组织、器官的浓度,从而起到增效减毒的作用。

Del Governatore 等^[39]用聚 L-赖氨酸将不同数量的光敏物质二氢卟吩分子和抗结肠癌单抗(17.1A)连接形成阳离子型或阴离子型光免疫复合物。体外试验表明,阳离子型光免疫复合物的释药效率是阴离子型的 5 倍。在 3 J/cm²(666 nm)的光照条件下将结肠癌细胞与 2 种免疫复合物(相当于 1 mmol/L 二氢卟吩)培养,阳离子型复合物可使增殖的细胞数量减少 90%以上,阴离子型复合物为 73%,等剂量的游离药物仅为 35%,表明离子型光免疫复合物对结肠癌抗原阳性细胞具更强的选择性和光毒性。Yasukawa 等^[40]用葡聚糖连接丝裂霉素(MMC)和抗 CD105 单抗制得的免疫复合物可克服全身给药不良反应大且须频繁给药以保持有效血药浓度的缺点。体外细胞毒性评价试验表明,与 HUVEC 接触 1 h 后,该复合物的细胞毒性是 MMC-葡聚糖复合物(MMCD)的 10 倍;加入游离的抗 CD105 抗体或 MMCD-IgG 复合物可降低该免疫复合物的细胞毒性,但对 MMCD 的细胞毒性则无显著影响。说明只有连接抗 CD105 单抗的免疫复合物才表现出对 HUVEC 的特异性主动靶向作用。Lu 等^[41]将抗肿瘤药 mesochlorin e6 通过四肽(Gly-Phe-Leu-Gly)与聚合的抗体 Fab'片段连接,再与 N-(2-羟丙基)甲酰胺(HPMA)相连形成免疫复合物。通过 Fab'片段与人卵巢癌细胞中过度表达的 OA-3 抗原结合,使复合物主动靶向至卵巢癌细胞,其中 HPMA 可维持 Fab 抗体的生物活性,四肽则使药物可在溶酶体中特异性释放。Dubowchik 等^[42]将多柔比星与单抗 BR96 通过二肽连接形成免疫复合物,并以 IgG 代替单抗 BR96 制备的免疫复合物为对照。结果表明,2 种复合物进入细胞后均通过溶酶体蛋白酶使二肽降解释放药物。2 种复合物分别在体外转染抗原阳性细胞 L2987 肺癌细胞系,前者 IC₅₀ 为 0.2 nmol/L,肺癌细胞杀伤活性可达后者的 25 倍。

Sapra 等^[43]将紫杉醇与抗表皮生长因子受体单抗 Erbitux(C225)相偶联后作用于研究较多的细胞系 A431。偶联药物对肿瘤细胞的细胞毒性强于单纯的紫杉醇、单抗以及单抗与紫杉醇的简单混合物(对照组),可诱导 25.2%左右的肿瘤细胞凋亡,而对照组几乎未见凋亡发生。该共价偶联物

可特异性靶向肿瘤细胞,而且既不影响紫杉醇本身的抗肿瘤效应,也不降低单克隆抗体的抗原结合能力及其原有的生物学功能,可起到靶向及双重治疗效果。

2.3.2 生物毒素偶联物 生物毒素对细胞具有强烈的杀伤作用,但其杀伤作用没有选择性,对正常细胞伤害也很大。将其与单抗结合后,可有效地靶向定位并杀伤肿瘤细胞。通过基因工程技术可以将生物毒素与单克隆抗体融合,有效降低整个融合分子的大小,增加其对肿瘤组织的穿透力,从而提高疗效。较早研究的蓖麻毒素,相对分子质量约为64 000,呈以二硫键相连的A、B双链结构,A链为抗癌活性链(相对分子质量3 100),B链(相对分子质量为3 300)没有抗癌特异性,不良反应大,可引起正常细胞的损伤,因而限制了其应用。有报道将A链与直肠癌单抗HCM-c Ab83相连组成免疫毒素偶联物,该偶联物对外培养的直肠癌细胞具有强烈的杀伤作用(半数致死量为 5×10^{-10} mol/L),而对正常细胞没有影响。此类毒素还有相思豆毒素、榭寄生毒素和绿脓杆菌外毒素等。

2.3.3 放射性元素偶联物 放射性元素偶联物是利用对肿瘤具有特异性亲和力的抗体作为载体,携带高活性放射性核素,在肿瘤组织聚集,借助放射性核素的电离辐射作用于DNA分子,导致其损伤或断裂,它在生物体内电离水分子可产生自由基,自由基再损伤生物大分子,导致细胞损伤,从而达到杀伤肿瘤细胞或抑制其生长的目的。Kaminski等^[44-45]用¹³¹I标记的托西莫单抗对59名非霍奇金淋巴瘤患者和76名滤泡性淋巴瘤(Ⅲ、Ⅳ期)患者进行治疗。结果显示,具有良好的肿瘤细胞靶向性,疗效和随访均比较满意。

3 前体药物的肿瘤靶向给药系统

简单前体药物肿瘤靶向给药系统是利用肿瘤中某些酶的水平升高,活化前体药物,从而释放出具有活性的原药。前体药物与酶-单克隆抗体偶联物也可用于肿瘤细胞的靶向治疗,被称作抗体导向酶的前体药物疗法(antibody-directed enzyme pro-drug therapy, ADEPT)。ADEPT是近年来发展起来的颇具应用前景的肿瘤导向治疗新方法,该方法以巧妙的设计克服了单抗作为药物载体的一些缺陷,开拓了靶向抗癌药物研究的新方向,日益受到人们的广泛关注。它的基本思想是:通过将特异性抗体与一种药物活化酶在体外经交联剂结合成抗体-酶偶联物,偶联物中的酶、抗体仍保持各自的活性,治疗时将此偶联物静脉注入体内,借助抗体识别肿瘤表面抗原的特性,将酶带到肿瘤靶位,然后再静脉注入无抗癌活性或低活性的前体药物,通过抗体结合到肿瘤细胞表面的酶会特异性地将其转化成活性药物,作用于结合抗体的肿瘤细胞及邻近未与抗体结合的肿瘤细胞,从而实现肿瘤细胞的杀伤作用。由于使用了酶-单克隆抗体偶联物,此前体药物的靶标是肿瘤相关抗原,其在靶位被活化,随后释放活性药物,并分布到邻近肿瘤细胞,导致细胞死亡^[2]。该方法有如下优点:(1)显著降低药物毒性:由于前药本身为低毒或无毒性,只有被定位于靶部位的酶激活后,才能转化为具有细胞毒性的药物,降低了对正常组织的损伤。研究表明,人卵巢癌荷瘤裸鼠对阿霉素(DOX)的最大耐受剂量为8 mg/kg,

单对前药DOX-GA3的最大耐受剂量可达500 mg/kg,在单抗与葡萄糖醛酸酶偶联物的作用下,给予单一剂量可获得87%的肿瘤抑制率^[46]。(2)提高肿瘤局部的药物浓度:由于酶分子作用机制的特殊性,单一酶分子具有水解多个前药分子的潜能,以羧肽酶G为例,每个酶分子每秒钟可作用于800个苯甲酸氮芥类底物分子,产生一种放大效应,使活性药物以高浓度定位于肿瘤局部,改善了抗体-药物偶联物携带药物分子有限、肿瘤细胞摄入药物量少而难以达到有效的细胞毒剂量等不足。(3)提供旁观者效应。由于ADEPT方法所使用的前药分子多为分子量较小的小分子化合物,在被酶激活后,可扩散到相邻细胞,杀伤远离靶细胞的肿瘤细胞,有效解决肿瘤细胞表面抗原表达异质性的问题。Cheng等^[47]将葡萄糖醛酸酶ADEPT系统作用于抗原阴性的N1S1和阳性的AS-30D两种鼠肝癌细胞,在20 μmol/L前药浓度下,对AS-30D的杀伤率为99%,对N1S1无毒性;而将2%的AS-30D细胞与N1S1细胞混合后,98%的N1S1被杀伤,可见旁观者效应显著。

由大肠埃希菌中分离复制的需氧型硝基还原酶(NTR)正用于ADEPT的研究中。Asche等^[48]将前体药物CB1954的2-位、4-位的硝基酶解后,成了一种高活性的交联剂,对NTR转染的细胞活性可提高 1×10^3 倍。Satchi等^[49]在抗体介导的酶-前体药物给药系统(ADEPT)的基础上,提出了聚合物介导的酶-前体药物给药系统(PDEPT)。给药时,先将羟丙基甲基丙烯酸酰胺(HPMA)聚合物-酶(如cathepsin B)复合物注入体内,然后给予具有酶可降解间隔基的HPMA聚合物-抗肿瘤药物接合物。聚合物载带酶及药物到达体内靶部位,酶作用于抗肿瘤药物复合物使药物释放,从而起到抗肿瘤的作用。这不但能够减少系统的免疫原性及非均一性,而且可评价酶及前体药物在体内的分布。并以HPMA聚合物-阿霉素复合物为模型药物,HPMA聚合物-组织蛋白酶为模型酶进行研究。研究发现,组织蛋白酶与聚合物连接后其活性可保持20%~25%。将药物复合物静脉注入B16F10荷瘤小鼠体内,5 h后给予酶复合物,肿瘤部位阿霉素的释放速率明显增加,AUC为单独给予阿霉素复合物的3.6倍。

连彦军等^[50]利用毒性很低的苦杏仁苷作为前体药物,体外实验发现,苦杏仁苷被一种癌胚抗原单抗与葡萄糖苷酶偶联物活化后,靶向肿瘤细胞后的毒性作用增加了约40倍。说明酶类偶联物疗法可明显降低化疗的毒副作用。

4 肿瘤主动靶向给药系统存在问题及前景展望

肿瘤靶向给药系统的研究目前已取得了较大进展,从第一种靶向药物用于临床起,便显示了在肿瘤治疗方面的巨大潜力。抗体和配体介导的给药系统为肿瘤细胞的主动靶向给药提供了有效手段。当然,很多体外有效的靶向药物还不能应用于临床,还有许多问题有待解决,如:工艺复杂、载药量小、稳定性差;适用于临床给药的制剂学以及体内代谢动力学模型缺乏完整的质量评价和标准;受体在正常细胞中也有少量的表达,可能引起不良反应;配体的修饰率不高等;抗体治疗要求抗体的剂量大、纯度高,生产成本和价格非常昂贵,对于实体瘤而言,由于其内部间质的压力较高,使部分大

分子单抗难以进入肿瘤内部发挥疗效等。

综上所述,虽然靶向抗肿瘤药物的研究发展迅速并取得了一定的成效,但还需解决以下几个方面问题:(1)载体的筛选,以获得合适的释药速度和良好的缓释功能;(2)提高载体的载药量,减少药物在体循环中的降解,降低其对正常组织的不良反应;(3)改善载体的表面性质,增强其主动靶向性,以减少网状内皮细胞的吞噬作用;(4)抗人源化、单抗药物的高效化、偶联物分子的小型化;(5)利用DNA重组技术制备具有抗体功能的融合蛋白;(6)寻找新的分子靶点;(7)深入了解肿瘤的发病机制及肿瘤部位特殊的生理生化改变;(8)肿瘤基因分型对多药耐药的影响;(9)抗肿瘤药物细胞和动物模型的发展评价。

尽管肿瘤主动靶向给药系统目前还很不完善,广泛应用于临床尚需时日,但它们对于克服肿瘤治疗中的不良反应,提高疗效具有不可忽视的作用,是抗肿瘤药物的理想剂型,是未来抗肿瘤治疗研究的重要方向。目前欧美等发达国家已有相关产品问世,配套的工业化生产设备也在不断诞生。且随着对配体和受体认识的深入、分子生物学和分子医学的发展,必将加速从细胞与分子水平对疾病的理解,从而推进肿瘤主动靶向给药系统的进一步发展。相信在不久的将来,肿瘤主动靶向给药系统一定会成为肿瘤治疗的主流给药系统。

[参考文献]

- [1] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. *J Contr Rel*, 2000, 65(1-2): 271-284.
- [2] 颜秋平, 李富荣, 周汉新. 肿瘤特异靶向性药物载体的研究进展[J]. *国外医学: 药学分册*, 2005, 32: 151-155.
- [3] de Jong J S, van Diest P J, van der Valk P, Baak J P. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in in vasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis[J]. *J Pathol*, 1998, 184: 53-57.
- [4] Gijssens A, Missiaen L, Merleve W, de Witte P. Epidermal growth factor mediated targeting of chlorin e₆ selectively potentiates its photodynamic activity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2197-2202.
- [5] Cohen M H, Williams G A, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. FDA drug approval summary: gefitinib(ZD1839)(Iressa) tablets[J]. *Oncologist*, 2003, 8: 303-306.
- [6] Comis R L. The current situation, erlotinib (Tarceva) and gefitinib(Iressa) in non-small cell lung cancer[J]. *Oncologist*, 2005, 10: 467-470.
- [7] Xia Q, Yang X W, Yang X D, Qian Z M, Wang K. Drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway[J]. *J Chin Pharmaceut Sci*, 2009, 18: 7-13.
- [8] Tanaka T, Shiramoto S, Miyashita M, Fujishima Y, Kaneo Y. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis(RME)[J]. *Int J Pharm*, 2004, 277(1-2): 39-61.
- [9] Shen X, Zhu H F, He F R, Xing W, Li L, Liu J, et al. An anti-transferrin receptor antibody enhanced the growth inhibitory effects of chemotherapeutic drugs on human non-hematopoietic tumor cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(13-14): 1813-1820.
- [10] Ishida O, Mamyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, Eriguchi M, et al. Liposomes bearing polyethyleneglyco-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumor *in vivo* [J]. *Pharmac Res*, 2001, 18: 1042-1048.
- [11] 佟 豪, 巴雅尔, 王晓娟. 转铁蛋白受体介导的 Survivin 反义 RNA 基因转移系统的构建及体外效应研究[J]. *内蒙古医学杂志*, 2008, 40: 142-144.
- [12] Visser C C, Stevanović S, Voorwinden L H, van Bloois L, Gailard P J, Danhof M, et al. Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier *in vitro* [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 25(2-3): 299-305.
- [13] Anabousia S, Bakowskyb U, Schneidera M, Huwer H, Lehr CM, Ehrhardt C. *In vitro* assessment of transferrin-conjugated liposomes as drug delivery systems for inhalation therapy of lung cancer[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29: 367-374.
- [14] Diaz C, Vargas E, Gätjens-Boniche O. Cytotoxic effect induced by retinoic acid loaded into galactosyl-sphingosine containing liposomes on human hepatoma cell lines[J]. *Int J Pharm*, 2006, 325(1-2): 108-115.
- [15] Terada T, Iwai M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Novel PEG-matrix metanoproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting[J]. *J Contr Rel*, 2006, 111: 333-342.
- [16] Rodrigues D G, Covolan C C, Coradi S T, Barboza R, Maranhão R C. Use of a cholesterol rich emulsion that binds to low density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54: 765-772.
- [17] Nikanjam M, Gibbs A R, Hunt C A, Budinger T F, Forte T M. Synthetic nano-LDL with paclitaxel oleate as a targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme [J]. *J Contr Rel*, 2007, 124: 163-171.
- [18] Bae Y, Jang W D, Nishiyama N, Fukushima S, Kataoka K. Multifunctional polymeric micelles with folate mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery[J]. *Mol Biosyst*, 2005, 1: 242-250.
- [19] Yu M K, Lee D Y, Kim Y S, Park K, Park S A, Son D H, et al. Antiangiogenic and apoptotic properties of a novel amphiphilic folate heparin lithocholate derivative having cellular internality for cancer therapy[J]. *Pharm Res*, 2007, 24: 705-714.
- [20] Leamon C P, Reddy J A, Vlahov I R, Westrick E, Dawson A, Dorton R, et al. Preclinical antitumor activity of a novel folate-targeted dual drug conjugate[J]. *Mol Pharm*, 2007, 4: 659-667.
- [21] Vlahov I R, Santhapuram H K, Wang Y, Kleindl P J, You F, Howard S J, et al. An assembly concept for the consecutive introduction of unsymmetrical disulfide bonds: synthesis of a releasable multidrug conjugate of folic acid[J]. *J Org Chem*, 2007, 72: 5968-5972.
- [22] Liu W S, Huang Y, Zhang Z R. Synthesis and characterization of the tumor targeting mi toxantrone-insulin conjugate[J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26: 892-897.
- [23] Veenendaal L M, Jin H, Ran S, Cheung L, Navone N, Marks J

- W, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of a VEGF₁₂₁/r Gelonin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 7866-7871.
- [24] Hess C, Vuong V, Hegyi I, Riesterer O, Wood J, Fabbro D, et al. Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth[J]. Br J Cancer, 2001, 85: 2010-2016.
- [25] Giles F J, Cooper M A, Silverman L, Karp J E, Lancet J E, Zangari M, et al. Phase II study of SU5416— α small-molecule, vascular endothelial growth factor tyrosine-kinase receptor inhibitor—in patients with refractory myeloproliferative diseases[J]. Cancer, 2003, 97: 1920-1928.
- [26] Konigsberg P J, Godtl R, Kissel T, Richer L L. The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1370: 243-251.
- [27] Frankel A E, Fleming D R, Hall P D, Powell B L, Black J H, Leftwich C, et al. A phase II study of DT fusion protein denileuk in diftitox in patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9 (10 Pt 1): 3555-3561.
- [28] Kawakami K, Kawakami M, Puri RK. Overexpressed cell surface integrin-4 receptor molecules can be successfully targeted for antitumor cytotoxin therapy[J]. Crit Rev Immunol, 2001, 21 (1-3): 299-310.
- [29] Kerbel R S. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer[J]? Science, 2006, 312: 1171-1175.
- [30] Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies[J]. Nat Rev Cancer, 2001, 1: 118-129.
- [31] Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trnecny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group[J]. Lancet Oncol, 2006, 7: 379-391.
- [32] Kirchner E M, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells[J]. Ann Oncol, 2002, 13: 1044-1048.
- [33] Arteaga C L. Trastuzumab, an appropriate first line single agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2003, 5: 96-100.
- [34] Sandier A, Gray R, Perry M C, Brahmer J, Schiller J H, Dowlati A, et al. Pemetrexed carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2006, 355: 2542-2550.
- [35] Lopes de Menezes D E, Pilarski L M, Belch A R, Allen T M. Selective targeting of immunoliposomal doxorubicin against human multiple myeloma *in vitro* and *ex vivo* [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1466(1-2): 205-220.
- [36] Moos T, Morgan E H. Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody(OX26) through the blood-brain barrier in the rat[J]. J Neurochem, 2001, 79: 119-129.
- [37] Huwyler J, Cerletti A, Fricker G, Eberle A N, Drewe J. Bypassing of P-glycoprotein using immunoliposomes[J]. J Drug Target, 2002, 10: 73-79.
- [38] Völkel T, Hölig P, Merdan T, Müller R, Kontermann R E. Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105) [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1663(1-2): 158-166.
- [39] Del Governatore M, Hamblin M R, Piccinini E E, Ugolini G, Hasan T. Targeted photodestruction of human colon cancer cells using charged 17. 1A chlorin e6 immunoconjugates[J]. Br J Cancer, 2000, 82: 56-64.
- [40] Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Miyamoto H, Honda Y, Ikada Y, et al. Active drug targeting with immunoconjugates to choroidal neovascularization[J]. Curr Eye Res, 2000, 21: 952-961.
- [41] Lu Z R, Shiah J G, Sakuma S, Kopecková P, Kopecek J. Design of novel bioconjugates for targeted drug delivery[J]. J Contr Rel, 2002, 78(1-3): 165-173.
- [42] Dubowchik G M, Radia S, Mastalerz H, Walker M A, Firestone R A, Dalton King H, et al. Doxorubicin immunoconjugates containing bivalent, lysosomally-cleavable dipeptide linkages [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2002, 12: 1529-1532.
- [43] Sapra P, Stein R, Pickett J, Qu Z, Govindan S V, Cardillo T M, et al. Anti-CD74 antibody doxorubicin conjugate, IMM-110, in a human multiple myeloma xenograft and in monkeys[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 5257-5264.
- [44] Kaminski M S, Estes J, Zasadny K R, Francis I R, Ross C W, Tuck M, et al. Radioimmunotherapy with iodine ¹³¹I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience[J]. Blood, 2000, 96: 1259-1266.
- [45] Kaminski M S, Tuck M, Estes J, Kolstad A, Ross C W, Zasadny K, et al. ¹³¹I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma[J]. N Engl J Med, 2005, 352: 441-449.
- [46] Houba P H, Boven E, van der Meulen-Muileman I H, Leenders R G, Scheeren J W, Pinedo H M, et al. Pronounced antitumor efficacy of doxorubicin when given as the prodrug DOX-GA3 in combination with a monoclonal antibody beta-glucuronidase conjugate[J]. Int J Cancer, 2001, 91: 550-554.
- [47] Cheng T L, Wei S L, Chen B M, Chern J W, Wu M F, Liu P W, et al. Bystander killing of tumor cells by antibody-targeted enzymatic activation of a glucuronide prodrug[J]. Br J Cancer, 1999, 79(9-10): 1378-1385.
- [48] Asche C, Dumy P, Carrez D, Croisy A, Demeunynck M. Nitrobenzylcarbamate prodrugs of cytotoxic acridines for potential use with nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16: 1990-1994.
- [49] Satchi R, Connors T A, Duncan R. PDEPT: polymer-directed enzyme prodrug therapy. I. HPMA copolymer-cathepsin B and PK1 as a model combination[J]. Br J Cancer, 2001, 85: 1070-1076.
- [50] 连彦军, 陈道达, 许天文, 郑勇斌, 黄 韬, 柯茂林. 抗-CEA 单抗- β -葡萄糖苷酶偶联物特异性激活苦杏仁苷对 LoVo 细胞的细胞毒作用研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2005, 12: 138-141.