

pH 值敏感型脂质体表面修饰技术的研究进展

孙歆慧^{1,2}, 王 征², 曾婧婷³

1. 天津康鸿医药科技发展有限公司, 天津 300193

2. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072

3. 天津市第一中心医院, 天津 300192

摘要: pH 值敏感型脂质体表面修饰已成为脂质体制剂的研究热点, 经过表面修饰的 pH 值敏感型脂质体进入人体后, 在此特异性片段的介导下, 被靶细胞识别, 达到在靶细胞有针对性地释放药物和减少对机体正常组织损害的目的。对 pH 值敏感型脂质体进行表面修饰的主要目的有 3 个: 延长体循环时间、增强 pH 值敏感性和提高靶向性。主要从这 3 方面综述近十年来 pH 值敏感型脂质体表面修饰的研究进展, 为 pH 值敏感型脂质体表面修饰的进一步研究提供参考。

关键词: pH 值敏感型脂质体; 表面修饰; 靶向性; 释药机制

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2012)06-0619-05

Research progress in surface-modified technology of pH-sensitive liposomes

SUN Xin-hui^{1,2}, WANG Zheng², ZENG Jing-ping³

1. Tianjin Kanghong Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Tianjin 300193, China

2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3. Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

Abstract: The surface-modified technology of pH-sensitive liposomes has become the hot topic in the research of liposomes preparation. The pH-sensitive liposomes after being surface-modified could be recognized by target cells *in vivo* mediated by the specific segments so as to targetedly release the drugs and reduce the damage to human normal tissues. The surface-modified technology has three main purposes: prolonging drug *in vivo* circulation duration, increasing the pH-sensitivity, and enhancing the targeting. This paper reviews the recent ten-year progresses in the surface-modified technology of pH-sensitive liposomes on these three aspects, providing the reference for further study on the surface modification of pH-sensitive liposomes.

Key words: pH-sensitive liposomes; surface-modification; targeting; release mechanism

脂质体从 1965 年被 Bangham 正式发现的半个世纪以来, 不论在功能上还是在应用上都有了很大的进展。在功能上, 其由原来的普通脂质体发展到现在的长循环脂质体、pH 值敏感型脂质体、热敏型脂质体、免疫脂质体和磁性脂质体等; 在应用上, 其由最初简单的生物膜模型发展到现在的商品化的药物制剂。将这些不同功能的脂质体技术进行两两组合所得到的新型脂质体不仅综合了两者的优势, 更弥补了彼此的缺点, 由此将多种脂质体技术联合应用所得到的新型脂质体也就成为了脂质体技术研究的又一热点。如长循环脂质体技术与 pH 值敏感型脂质体技术相结合、pH 值敏感型脂质体技术与免疫脂质体技术相结合、热敏型脂质体与免疫脂质体

技术相结合等。因人体内的肿瘤区、发炎区和感染区的 pH 值较其他正常组织的 pH 值偏低, 且细胞囊泡的 pH 值也较低^[1-3]。所以在 pH 值敏感型脂质体的基础上, 再结合另一种脂质体技术所形成的复合脂质体, 因其稳定的性质和独特的生理特点, 在缓释与控释药物和抗肿瘤药物的创新及应用上存在巨大潜力, 也是近十年来各国学者在脂质体技术上的研究热点之一。

现在学术界将这种把 pH 值敏感型脂质体和另一种脂质体技术相结合的技术, 叫做 pH 值敏感型脂质体的表面修饰。本文先简单介绍 pH 值敏感型脂质体技术的发展概述, 然后从其延长体循环时间、增强 pH 值敏感性和提高靶向性 3 方面阐述 pH 敏感

收稿日期: 2012-08-22

作者简介: 孙歆慧, 女, 高级工程师, 研究方向为化学药新药研发。Tel: (022)23003022 E-mail: sunxinhui@sina.com

型脂质体表面修饰技术的分类,最后介绍提高靶向性的表面修饰片段,为该技术的进一步研究提供参考。

1 pH 值敏感型脂质体技术的发展概述

普通脂质体因其类细胞结构,具有被动靶向性,进入人体后主要被网状内皮系统吞噬,使药物主要分布于肝、脾、肺和骨髓等组织器官中^[4]。如阿斯特拉公司的抗真菌药 AmBisome 能被巨噬细胞吞噬而多分布于肝、脾、肺、肾、心、脑和甲状腺等组织器官。然而此种脂质体也存在一些缺点:一方面易被巨噬细胞吞噬,而造成在体内分布的时间短;另一方面其靶向性的针对性并不高^[5]。

人体内的肿瘤区、发炎区和感染区的 pH 值较其他正常组织的 pH 值偏低,就此生理特点 pH 值敏感型脂质体应运而生。pH 值敏感型脂质体,一般是由带负电荷的脂类,如胆甾醇半琥珀酸酯(NIPAM)和两亲性的脂类,如二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE),混合而成^[6]。此种脂质体在正常 pH 值条件下,DOPE 具有疏水性,有助于脂质体形成稳定的双分子层结构,保持稳定的双分子层结构,将药物包裹于其内;但在酸性条件下(pH 4.5~6.5),DOPE 被质子化,从而导致脂质体双分子层的排列空缺,脂质体由紧密的双分子层结构变成疏松的六角型结构,从而释放其内包裹的活性物质,达到治疗的目的^[7-12]。

尽管 pH 值敏感型脂质体的靶向性相较于普通脂质体已经有了很大程度上的提高,但其针对性仍然不强。一方面,细胞囊泡的 pH 值较正常组织低,因此 pH 值敏感型脂质体只要被细胞吞噬,就会在囊泡的酸性环境下释放活性物质,而 pH 值敏感型脂质体究竟被什么样的细胞摄取并没有精确到细胞水平。另一方面,脂质体制剂主要被应用在肿瘤的治疗中^[13-14],而抗肿瘤药的细胞毒性往往较大^[15],不仅能对肿瘤细胞产生细胞毒性,一旦被正常细胞摄取还会对机体的其他正常组织造成损害。这就给 pH 值敏感型脂质体制剂带来了新的问题,即怎样进一步提高 pH 值敏感型脂质体的靶向性,使其有针对性地在靶组织或靶细胞内释放其内包含的活性物质,减少其对机体其他正常组织的伤害。pH 值敏感型脂质体的表面修饰技术因此诞生。表面修饰技术就是在 pH 值敏感型脂质体的表面接载某种或某几种具有特异性的片段,此片段能被特定细胞识别。

2 pH 值敏感型脂质体表面修饰技术的分类

近十年来,对 pH 值敏感型脂质体的表面修饰的研究报道有很多,依据其目的可分为 3 类:延长

体循环时间的表面修饰、增强 pH 值敏感性的表面修饰和提高靶向性的表面修饰。

2.1 延长体循环时间的表面修饰

脂质体,因其类细胞结构,进入人体后易被网状内皮系统识别并吞噬,很快就会被代谢出体外^[1]。然而,若要制备出能应用于临床的脂质体制剂,必须要提高脂质体的体循环时间,聚乙二醇(PEG)的加入解决了这一难题。PEG 一端连接于脂质体表面,亲水端则在体液中呈伸展状态,“掩盖”了脂质体的类细胞结构及其表面能被巨噬细胞识别的配体,从而“逃脱”巨噬细胞的吞噬,延长了体循环时间^[16-18]。

2.2 增强 pH 值敏感性的表面修饰

有些 pH 值敏感型脂质体的 pH 值敏感性并不仅仅是依靠其脂质体膜本身,还依靠膜表面接载的具有 pH 值敏感性的高分子聚合物或肽类等。以聚乙烯丙烯酸(PEAA)为例,PEAA 接载于脂质体的表面,因其亲水,在碱性或中性条件下呈伸展状态;在酸性条件下 PEAA 失去其亲水性,紧紧吸附于类脂膜上,此时类脂膜为了容纳 PEAA 链,脂质双分子层重排为胶团,释放其内包裹的活性物质^[19]。

像 PEAA 这样的可接载于 pH 值敏感型脂质体表面增强其 pH 值敏感性的聚合物还有 3,3'-二硫代二辛基丙酰胺-N-异丙基丙烯酸酯与甲基丙烯酸的共聚物[DODA-P(NIPAM-co-MAA)]^[16]、N-异丙基丙烯酸酯(NIPAM)^[20-22]、异丁烯酸与甲基丙烯酸十八烷醇酯的共聚物^[22-23]、琥珀酰甘油聚合物(SucPG)和 3-甲基戊二酰甘油聚合物(MGluPG)等^[24-25]。

2.3 提高靶向性的表面修饰

提高脂质体靶向性能使药物更准确地到达特定靶细胞,提高药效,减少毒副作用,更符合研究者对现代药物的追求。经过表面修饰的 pH 值敏感型脂质体进入人体后,在此特异性片段的介导下,被靶细胞识别,介导细胞内吞,在细胞囊泡的酸性环境中,pH 值敏感型脂质体构相发生改变,释放活性物质,从而达到在靶细胞有针对性地释放药物和减少对机体正常组织损害的目的。因此现在大多数研究更倾向于通过表面修饰技术来提高 pH 值敏感型脂质体的对不同癌细胞的靶向性。研究较多的几种提高 pH 值敏感型脂质体靶向性的表面修饰片段包括半乳糖残基、转铁蛋白、叶酸和上表皮生长因子受体(EGFR)。

3 提高靶向性的表面修饰片段

表面修饰技术在 pH 值敏感型脂质体应用中占有重要地位,下面主要介绍研究较多的几种提高 pH 值敏感型脂质体靶向性的表面修饰片段,并对其应用范围、作用机制和作用效能等进行综述。

3.1 半乳糖残基

肝细胞表面大量地表达高亲和性的唾液酸糖蛋白受体,此受体能特异性地识别半乳糖残基,从而引导细胞内吞,因此用半乳糖残基修饰 pH 值敏感型脂质体,就可以肝癌靶向。Wen 等^[26]用 18-半乳糖残基对由胆固醇和 DOPE 组成的 pH 值敏感型脂质体进行表面修饰,脂质体内包裹荧光素,然后对修饰脂质体和未修饰脂质体进行以下考察:在肝细胞靶向性试验中,修饰有 18-半乳糖的脂质体的荧光素在人肝癌细胞中的表达明显比在人肺癌细胞中高,两者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在 pH 值敏感性试验中,修饰有 18-半乳糖的 pH 敏感脂质体在酸性条件下的释放曲线与未修饰 18-半乳糖的 pH 敏感脂质体的释放曲线一致。说明在 pH 值敏感型脂质体的表面修饰 18-半乳糖残基,不仅能提高该制剂的肝靶向性,还不影响其 pH 敏感性。

3.2 转铁蛋白

转铁蛋白可协助血浆糖蛋白转载铁离子至细胞中,肿瘤细胞对铁离子的需求较正常细胞大,所以转铁蛋白受体 (TFR) 在癌变细胞和突变细胞表面表达较多;除此之外,人 T 淋巴细胞和脑组织的毛细血管内皮细胞也表达有大量的 TFR^[27]。由此若在脂质体表面接载转铁蛋白,就可达到癌靶向、脑靶向和淋巴靶向等目的。已有大量实验证明在装载 DNA 的脂质体表面修饰转铁蛋白能明显提高其转染率^[28-31]。

Kakudo 等^[32]证明当转铁蛋白和 pH 值敏感性肽 GALA 联合用于对脂质体进行表面修饰时,脂质体在转铁蛋白的作用下,被恶性肿瘤细胞特异性识别,进入囊泡。然后在囊泡的酸性环境下, GALA 转变为螺旋体结构,进一步介导脂质体膜和囊泡膜之间的融合,从而有效地将活性物质释放到恶性肿瘤细胞中,达到治疗的目的^[33]。

Fonseca 等^[34]在由 DOPE、PEG 和磷脂酰乙醇胺 (DSPE) 组成的 pH 值敏感型脂质体表面以羟硫键结合转铁蛋白作为表面修饰。并在体外实验中应用荧光技术结合共焦显微镜检查技术,结果相比于普通脂质体制剂,表面修饰有转铁蛋白的脂质体与

人 T 淋巴细胞反应更剧烈。另外,细胞机械学研究还表明此种脂质体能与转铁蛋白受体特异性结合,并通过受体介导的细胞内吞途径进入细胞内。由此可知,应用转铁蛋白对 pH 敏感脂质体进行表面修饰能增强其对入 T 淋巴细胞等表达 TFR 的特殊细胞的靶向性。

3.3 叶酸

许多癌细胞表面都有表达叶酸受体,如人类口腔癌细胞^[35-37]、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌等,由此在脂质体表面修饰叶酸,能提高脂质体对多种癌细胞的靶向性^[38-40]。

Sudimack 等^[41]以人口腔表皮样癌细胞 (KB 细胞) 为实验对象,考察活性物质为阿糖胞苷的表面修饰叶酸的 pH 值敏感型脂质体制剂和表面未修饰叶酸 pH 值敏感型脂质体制剂的细胞毒性。结果表面修饰叶酸的 pH 值敏感型脂质体制剂相对于表面未修饰 pH 值敏感型脂质体制剂对 KB 细胞的细胞毒性有显著提高。

3.4 抗 EGFR 抗体

大多数固体肿瘤 (如非小细胞肺癌) 其癌细胞表面大量地表达上表皮生长因子受体 (EGFR),若在脂质体表面引入抗 EGFR 抗体,就能达到肺癌靶向,从而减轻抗肿瘤药对其他正常组织的损害^[42-43]。Kim 等^[44]以 DOPE 和半琥珀酸胆固醇 (CHEMS) 为主要膜材制备 pH 值敏感型脂质体,并在其表面修饰抗 EGFR 抗体。在 23 d 内对小鼠连续静脉注射 8 次。结果注射修饰了 EGFR 的 pH 值敏感型脂质体组的小鼠比未修饰组小鼠的肿瘤体积小 1/2~1/3;且在最后一次静脉注射后 1 周再考察肿瘤体积,只有修饰了 EGFR 脂质体组小鼠的肿瘤体积不变,其他组小鼠均呈上升趋势。说明表面修饰抗 EGFR 抗体的 pH 值敏感型脂质体能对非小细胞肺癌等固体肿瘤达到靶向治疗的作用。

除了以上提到的特异性修饰片段,还有靶向肺部的抗 $\beta 1$ 连铁蛋白 Fab 片^[18]和支链淀粉糖链、靶向肝细胞的甘草次酸、靶向巨噬细胞的甘露醇链等特异性片段。

4 结语

表面修饰 PEG 的脂质体可成为一种更具前景的综合型脂质体。脂质体是靶向给药系统的一种非常有前途的新制剂,pH 值敏感型脂质体是基于肿瘤间质液的 pH 比正常组织低和细胞内吞空泡的 pH 值为 5.0~6.5 而设计的。因此,对于治疗肿瘤类疾病

的药物,特别是治疗肝、脾和肾肿瘤的药物尝试制备成 pH 值敏感型脂质体将会有较好的治疗前景。但是作为新型释药系统,pH 值敏感型脂质体在制备过程中也会遇到许多技术难点,如脂质体对有些药物,尤其是某些水溶性药物包封率较低,会从脂质体中渗漏出来。此外脂质体制剂的长期稳定性问题是制约该制剂发展的一个重要方面,再者对于 pH 值敏感型脂质体的药物的辅料大多数是经过表面修饰的全新辅料,其用药安全性需要得到临床验证。

表面修饰 pH 值敏感型脂质体具有很多优势,但这种制剂的表面修饰的收率、表面修饰对脂质体稳定性的影响等还有待进一步研究。此外,现在已上市的脂质体制剂多为普通脂质体制剂,另外还有少许长循环脂质体制剂(Doxil),而 pH 值敏感型脂质体制剂和表面修饰的 pH 值敏感型脂质体制剂绝大多数还停留在体外实验阶段,所以该制剂的疗效、安全性的评价、不良反应的考察也有待研究。只有这些问题得到有效解决,表面修饰 pH 值敏感型脂质体才有望商品化,投入药物市场。

参考文献

- [1] 邓英杰. 脂质体技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 74-80.
- [2] Huth U S, Schubert R, Peschka-Süss R. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging [J]. *J Controlled Release*, 2006, 110(3): 490-504.
- [3] Kim M J, Lee H J, Lee I A, et al. Preparation of pH-sensitive, long-circulating and EGFR-targeted immunoliposomes [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(4): 539-546.
- [4] Leite E A, Giuberti Cdos S, Wainstein A J, et al. Acute toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration [J]. *Life Sci*, 2009, 84(19/20): 641-649.
- [5] FDA. AmBisome(amphotericin B) liposome for injection [EB/OL]. (2008-10-08) [2010-07-22]. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050740s0161bl.pdf
- [6] Hafez I M, Ansell S, Cullis P R. Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids [J]. *Biophys J*, 2000, 79(3): 1438-1446.
- [7] Simoes S, Slepishkin V, Duzgunes N, et al. On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1515(1): 23-37.
- [8] Bergstrand N, Arfvidsson M C, Kim J M, et al. Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes [J]. *Biophys Chem*, 2003, 104(1): 361-379.
- [9] Ishida T, Okada Y, Kobayashi T, et al. Development of pH-sensitive liposomes that efficiently retain encapsulated doxorubicin (DXR) in blood [J]. *Int J Pharm*, 2006, 309(1/2): 94-100.
- [10] Onaca O, Enea R, Hughes D W, et al. Stimuli-responsive polymersomes as nanocarriers for drug and gene delivery [J]. *Macromol Biosci*, 2009, 9(2): 129-139.
- [11] Skalko-Basnet N, Tohda M, Watanabe H. Uptake of liposomally entrapped fluorescent antisense oligonucleotides in NG108-15 cells: Conventional versus pH-sensitive [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(12): 1583-1587.
- [12] Drummond D C, Zignani M, Leroux J. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery [J]. *Prog Lipid Res*, 2000, 39(5): 409-460.
- [13] Jaracz S, Chen J, Kuznetsova L V, et al. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(17): 5043-5054.
- [14] Costin G E, Trif M, Nichita N, et al. pH-sensitive liposomes are efficient carriers for endoplasmic reticulum-targeted drugs in mouse melanoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(3): 918-923.
- [15] Junior A D, Mota L G, Nunan E A, et al. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice [J]. *Life Sci*, 2007, 80(7): 659-664.
- [16] Simoes S, Moreira J N, Fonseca C, et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(7): 947-965.
- [17] Abra R M, Bankert R B, Chen F, et al. The next generation of liposome delivery systems: Recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients [J]. *J Liposome Res*, 2002, 12(1/2): 1-3.
- [18] Roux E, Passirani C, Scheffold S, et al. Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes [J]. *J Controlled Release*, 2004, 94(2/3): 447-451.
- [19] Kost J. *Pulsed and Self-regulated Drug Delivery* [M]. New York: CRC Press, 1990: 129-157.
- [20] Roux E, Francis M, Winnik F M, et al. Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs [J]. *Int J Pharm*, 2002, 242(1/2): 25-36.
- [21] Meyer O, Papahadjopoulos D, Leroux J C. Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes [J]. *FEBS Lett*, 1998, 421(1): 61-64.
- [22] Zignani M, Drummond D C, Meyer O, et al. *In vitro* characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive

- liposome system [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1463(2): 383-394.
- [23] Cho E C, Lim H J, Kim H J, *et al.* Role of pH-sensitive polymer-liposome complex in enhancing cellular uptake of biologically active drugs [J]. *Mater Sci Eng*, 2009, 29(3): 774-778.
- [24] Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, *et al.* The correlation between fusion capability and transfection activity in hybrid complexes of lipoplexes and pH-sensitive liposomes [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(29): 4029-4036.
- [25] Yuba E, Kojima C, Sakaguchi N, *et al.* Gene delivery to dendritic cells mediated by complexes of lipoplexes and pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes [J]. *J Controlled Release*, 2008, 130(1):77-83.
- [26] Wen S Y, Wang X H, Lin L, *et al.* Preparation and property analysis of a hepatocyte targeting pH-sensitive liposome [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(2): 244-249.
- [27] Penacho N, Rosa M, Lindman B, *et al.* Physicochemical properties of transferrin-associated lipopolyplexes and their role in biological activity [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 76(1): 207-214.
- [28] Rosa M, Penacho N, Simoes S, *et al.* DNA pre-condensation with an amino acid-based cationic amphiphile. A viable approach for liposome-based gene delivery [J]. *Mol Membr Biol*, 2008, 25(1): 23-34.
- [29] Neves S, Faneca H, Bertin S, *et al.* Transferrin lipoplex-mediated suicide gene therapy of oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent murine model and mechanisms involved in the antitumoral response [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(1): 91-101.
- [30] da Cruz M T G, Cardoso A L C, de Almeida L P, *et al.* Tf-lipoplex-mediated NGF gene transfer to the CNS: neuronal protection and recovery in an excitotoxic model of brain injury [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(16): 1242-1252.
- [31] Neves S S, Sarmiento-Ribeiro A B, Simoes S P, *et al.* Transfection of oral cancer cells mediated by transferrin-associated lipoplexes: Mechanisms of cell death induced by herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(11): 1703-1712.
- [32] Kakudo T, Chaki S, Futaki S, *et al.* Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(19): 5618-5628.
- [33] Kobayashi S, Nakase I, Kawabata N, *et al.* Cytosolic targeting of macromolecules using a pH-dependent fusogenic peptide in combination with cationic liposomes [J]. *Bioconjug Chem*, 2009, 20(5): 953-959.
- [34] Fonseca C, Moreira J N, Ciudad C J, *et al.* Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59(2): 359-366.
- [35] Garin-Chesa P, Campbell I, Saigo P E, *et al.* Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein [J]. *Am J Pathol*, 1993, 142(2): 557-567.
- [36] Ross J F, Chaudhuri P K, Ratnam M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues *in vivo* and in established cell lines. Physiologic and clinical implications [J]. *Cancer*, 1994, 73(9): 2432-2443.
- [37] Ohguchi Y, Kawano K, Hattori Y, *et al.* Selective delivery of folate-PEG-linked, nanoemulsion-loaded aclacinomycin A to KB nasopharyngeal cells and xenograft: effect of chain length and amount of folate-PEG linker [J]. *J Drug Target*, 2008, 16(9): 660-667.
- [38] Turk M J, Reddy J A, Chmielewski J A, *et al.* Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1559(1): 56-68.
- [39] Shi G, Guo W, Stephenson S M, *et al.* Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations [J]. *J Controlled Release*, 2002, 80(1/3): 309-319.
- [40] Hoier-Madsen M, Holm J, Hansen S I. alpha Isoforms of soluble and membrane-linked folate-binding protein in human blood [J]. *Biosci Rep*, 2008, 28(3): 153-160.
- [41] Sudimack J J, Guo W, Tjarks W, *et al.* A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1564(1): 31-37.
- [42] Spicer J F, Rudman S M. EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): the emerging role of the dual irreversible EGFR/HER2 inhibitor BIBW 2992 [J]. *Target Oncol*, 2010, 5(4): 245-255.
- [43] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, *et al.* Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [44] Kim I Y, Kang Y S, Lee D S, *et al.* Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice [J]. *J Controlled Release*, 2009, 140(1): 55-60.