

ICS 11.120.10

CCS C 48



# 团 体 标 准

T/CEATEC XXX—2025

## 智能响应型载体递送系统评价通则

General principles for the evaluation of intelligent responsive carrier

delivery systems

(征求意见稿)

2025-X-XX 发布

2025-X-XX 实施

中国欧洲经济技术合作协会 发布

# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 评价原则与要求 .....	1
4.1 评价原则 .....	1
4.2 评价要求 .....	2
5 评价指标 .....	2
5.1 响应特性指标 .....	2
5.2 递送效率指标 .....	3
5.3 靶向性指标 .....	3
5.4 安全性指标 .....	3
5.5 稳定性指标 .....	4
6 试验方法 .....	4
6.1 响应特性试验 [7, 9-11, 18-20, 25-28] .....	4
6.2 递送效率试验 [7, 9-11, 18-20, 29-35, 56, 57] .....	5
6.3 靶向性试验 [18-20, 36-41, 53-63] .....	5
6.4 安全性试验 [42-55, 64-68] .....	5
6.5 稳定性试验 .....	6
7 取值规则 .....	6
7.1 分值设定 .....	6
7.2 单项指标计算 .....	7
7.3 总分计算 .....	8
8 评价结果 .....	9
8.1 评价等级划分 .....	9
8.2 评价结果公布 .....	9
8.3 评价结果有效期 .....	9
附录 A      (规范性) 不同响应型系统分类、响应机制、特异性指标 .....	10
附录 B      (规范性) 不同响应型系统特异性试验方法 .....	15
参 考 文 献 .....	25

## 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国欧洲经济技术合作协会提出并归口。

本文件主要起草单位：。

本文件主要起草人：。

本文件为首次编制。

# 智能响应型载体递送系统评价通则

## 1 范围

本文件规定了智能响应型载体递送系统的评价原则与要求、评价指标、试验方法、取值规则、评价结果。

本文件适用于医疗领域中用于药物、基因、疫苗等活性物质递送的智能响应型载体系统。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 27417 合格评定 化学分析方法确认和验证指南

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 智能响应型载体递送系统 intelligent responsive carrier delivery system

一类由智能型材料构建的纳米级载体，能够感知外界或体内特定刺激信号（如pH、酶、氧化还原、温度、光、磁、超声等），并据此发生结构或性质的可逆/不可逆变化，从而实现其负载的药物、基因、疫苗等活性物质在时间、空间与剂量上的精准释放与递送[1, 2]。该系统的核心是“刺激-响应-释药”的智能化行为，旨在实现“按需给药”，最终达到提高治疗效果并显著降低毒副作用的目的[3, 4]。

### 3.2

#### 响应灵敏度 response sensitivity

智能响应型载体递送系统对特定刺激信号做出的有效响应（如开始释放药物、发生相变、表面电荷反转、配体暴露等）所需的最低刺激强度、最短作用时间或最低刺激物浓度[5]。它是衡量系统对刺激信号的识别能力与响应效率的关键参数，通常以单位刺激强度下响应参数的变化率，或达到特定响应阈值所需的时间来量化。灵敏度越高，表明系统对目标刺激的识别与响应能力越强。

## 4 评价原则与要求

### 4.1 评价原则

#### 4.1.1 科学性原则

评价体系的设计应遵循药剂学、材料及生物学等多学科理论基础。所有评价方法按照GB/T 27417的规定进行验证，评估结论应基于真实、可靠、可追溯的试验数据，确保其符合科学规律[6]。

#### 4.1.2 系统性原则

评价应涵盖载体的响应特性、递送效率、靶向能力、生物安全性及理化稳定性等多个关键维度，以此构建完整、综合的评价体系[7]。

#### 4.1.3 动态性原则

评价应模拟体内复杂的生理/病理微环境，重点关注载体在动态过程中的行为与性能演变，避免仅依赖静态表征数据[8]。

#### 4.1.4 可操作性原则

评价指标应可量化、可重现，试验方法应标准化，以确保不同实验室间评价结果具备可比性与参考价值。

#### 4.1.5 风险-获益平衡原则

评价应在确保载体基本安全性的前提下，综合权衡其临床治疗潜力与潜在风险，科学评估其整体应用价值[9]。

### 4.2 评价要求

#### 4.2.1 载体表征要求

应提供载体详尽、可量化的理化性质数据，至少应包括粒径及其分布、Zeta电位、形态学表征、载药量、包封率、稳定性（如在不同介质中的粒径与载药量的变化）及释放动力学曲线[9-17]。

#### 4.2.2 响应机制阐明

应明确界定系统响应的刺激类型（如pH、酶、活性氧等）及其理论响应阈值（如特定pH值、酶浓度），应详细说明其化学或物理响应机制。对于多重响应系统，应明确其响应逻辑关系（如“AND”或“OR”逻辑门控），并提供相应的验证数据[1-4, 18-22]。

#### 4.2.3 对照设置要求

所有功能验证（如靶向、疗效、安全性）研究应设立科学、合理的对照组，通常情况下，应包含非响应型载体对照与游离药物对照[11, 18-22]。

#### 4.2.4 研究规范性要求

所有关键临床前试验，特别是药效学与安全性评价研究，应在符合《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）的体系下开展[23]。

#### 4.2.5 动物实验伦理要求

所有涉及动物的实验研究，其方案应预先获得所在机构实验动物福利与伦理审查委员会的批准。实验过程应严格遵循国际公认的“3R”原则（替代、减少、优化），并完整记录伦理审查批号及动物使用情况[24]。

## 5 评价指标

### 5.1 响应特性指标

#### 5.1.1 响应能力评价

用于定量评价系统对目标刺激信号的识别与响应能力[17-20, 25-28]。

#### 5.1.2 响应阈值

引发预设显著性响应（如药物累积释放率 $>50\%$ ）所需的最小刺激强度、最短作用时间或最低刺激物浓度。应报告其半数有效浓度（ $EC_{50}$ ）或等效量化值。

#### 5.1.3 响应速率

在达到触发条件后，系统达到特定响应幅度（如50%或90%的最大释放量）所需的时间。应采用释放半衰期（ $t_{1/2}$ ）等动力学参数进行表征。

#### 5.1.4 响应特异性

系统在目标刺激条件下的响应程度与在非目标（或正常生理）条件下的响应程度的比值，通常以特定时间点的药物释放率、荧光强度变化或粒径变化等可量化参数进行衡量和计算。该比值应显著大于1，值越高特异性越优。

### 5.1.5 不同响应型系统指标分类

不同响应型系统响应性指标见附录A。

## 5.2 递送效率指标

### 5.2.1 递送效率评价

用于综合评价系统装载、运输及释放药物的效率[7, 9, 10, 11, 18–20, 29–35]。

### 5.2.2 载药量与包封率

载药量指载体中药物的质量百分比，包封率指制备过程中被成功包封的药物占总投药量的百分比。二者均为载体基础质量属性，应在申报资料中明确提供。

### 5.2.3 体外释药行为

应在模拟目标病理刺激条件与正常生理条件的释放介质中分别进行释药测定。应提供完整的释放曲线，并计算特定时间点的累积释放度、突释效应等关键参数；宜采用合适的数学模型（如Higuchi、Korsmeyer-Peppas模型）进行释放动力学拟合。

### 5.2.4 细胞摄取效率

应在体外细胞模型中，采用流式细胞术、共聚焦显微镜等技术，定量或定性评估载体被靶细胞摄取的程度与速率。

### 5.2.5 相对生物利用度

指与参比制剂（如普通制剂或溶液）相比，智能载体递送系统在体内的相对吸收程度，通常以血药浓度-时间曲线下面积（AUC）的比值表示。

## 5.3 靶向性指标

### 5.3.1 靶向能力评价

用于评价系统将药物选择性递送至预期靶组织或细胞的能力[18–20, 36–41]。

### 5.3.2 靶向选择性指数

指靶组织（或细胞）中的药物浓度与非靶组织（或细胞）中的药物浓度之比值，该值应显著大于1，值越高，靶向选择性越优。

### 5.3.3 靶向效率

指分布于靶组织的药量占全身总暴露量或总给药量的百分比，用于评估药物在靶区的整体富集效能。

### 5.3.4 体外靶向验证

应通过共培养实验或竞争性抑制实验，验证载体对靶细胞的结合与内吞特异性。应采用流式细胞术等方法进行定量分析，证实其与靶细胞的特异性结合率与内吞效率均显著高于非靶细胞（ $p < 0.05$ ），或在竞争性抑制实验中，游离靶向配体可显著抑制其结合与内吞。

### 5.3.5 体内分布

应采用活体成像（如荧光、生物发光、放射性标记或磁共振成像等技术），直观示踪载体/药物在动物体内的分布与靶区富集情况；或通过采集不同组织样本进行生物分析，以定量评估其分布特征。

## 5.4 安全性指标

### 5.4.1 安全性评价

用于系统评估载体系统、其所负载的药物、载体材料本身及其降解产物的生物安全性[43–56]。

### 5.4.2 细胞毒性

应采用规范的细胞活力测定法（如MTT法、CCK-8法），评估空白载体及载药制剂对正常细胞与靶细胞系的毒性作用。应以细胞存活率进行量化表征，并报告半数抑制浓度（ $IC_{50}$ ），以综合评价其毒性强度及细胞选择性。

#### 5.4.3 血液相容性

应全面评估系统对血液成分的影响，检测指标至少包括溶血率、凝血功能（如凝血酶原时间PT、活化部分凝血活酶时间APTT）以及血小板与补体系统的激活情况，相关实验方法应参照现行有效的技术指导原则。

#### 5.4.4 免疫原性

应评估载体引发非预期免疫反应的风险。检测内容应包括细胞因子释放谱、补体激活程度及特异性抗体产生等关键指标。

#### 5.4.5 急性与长期毒性

应在适宜的动物模型中分别开展单次给药（急性毒性）和重复给药（长期毒性）试验。观察指标应涵盖动物一般状态、血液学、血清生化、组织病理学变化，并确定最大耐受剂量（MTD）。

#### 5.4.6 载体材料安全性

应提供载体材料及其在生物体内预期降解产物的已知毒理学数据。如无可供参考的完整数据，应进行必要的毒理学测试予以证实。

#### 5.4.7 局部刺激性

应评估经注射或黏膜给药后，在给药局部可能引起的刺激、炎症或损伤反应。

#### 5.4.8 遗传毒性与生殖毒性

应根据产品研发阶段、临床适用人群及给药周期，依据相关非临床研究技术指导原则，决定是否开展遗传毒性及生殖发育毒性评价。

### 5.5 稳定性指标

#### 5.5.1 稳定性评价

用于评价系统在规定储存与运输条件下，维持其物理、化学及功能特性的能力[7, 9–11]。

#### 5.5.2 物理稳定性

在确定的储存条件（如温度、湿度、光照）与时间点下，定期考察并记录载体的外观、粒径与分布（PDI）、Zeta电位，以及是否出现析出、沉淀或分层等现象。

#### 5.5.3 化学稳定性

在确定的储存条件与时间点下，定期考察并记录载体中药物的泄漏率、载体材料及药物的化学降解情况（如有关物质的变化）。

#### 5.5.4 功能稳定性

在确定的储存条件与时间点下，定期考察系统关键的“智能”功能属性，如响应灵敏度（响应阈值）、响应速率等，确认其在货架期内未发生显著性漂移。

#### 5.5.5 口服制剂胃肠环境稳定性

在体外模拟空腹（餐前）状态下的胃肠液环境，考察系统能否在抵达靶点前保持结构完整与功能“沉默”，并在靶点处有效触发响应。必要时，可根据制剂特点补充餐后状态模拟研究。

## 6 试验方法

### 6.1 响应特性试验[7, 9–11, 18–20, 25–28]

#### 6.1.1 试验目的

用于验证和量化系统的“刺激-响应”行为。

#### 6.1.2 体外模拟释放试验

应在体外模拟目标病理微环境（如特定pH、酶浓度、氧化还原电位、温度）与正常生理环境，采用透析袋法或流通池法测定药物释放曲线。通过释放曲线计算累积释放度、释放速率及突释效应等关键参数，并与预设的响应阈值、响应速率等量化参数进行比对；宜采用适宜的数学模型对释放动力学进行拟合。

### 6.1.3 刺激-响应动力学分析

应采用动态光散射（DLS）、透射/扫描电子显微镜（TEM/SEM）、荧光光谱等技术，实时监测并记录载体在目标刺激触发下粒径、Zeta电位、微观形态或荧光信号的动态变化过程，以直观证实其响应机制。

### 6.1.4 响应特异性验证

应在多种可能的非目标刺激（或正常生理条件）下开展平行试验，观测并记录系统是否发生显著的非特异性响应（如药物释放、结构解离）。应通过计算响应特异性比值（按5.1.3中公式），定量评估其识别准确性。

### 6.1.5 不同响应型系统试验

不同响应型系统的具体试验方法参见附录B。

## 6.2 递送效率试验[7, 9-11, 18-20, 29-35, 56, 57]

### 6.2.1 试验目的

用于评估系统从载药到体内递送的全过程效率。

### 6.2.2 载药量与包封率测定

应使用超滤离心法、透析法或凝胶柱色谱法等已验证方法分离游离药物与载药载体。采用高效液相色谱法（HPLC）或紫外-可见分光光度法（UV-Vis）测定药物浓度，并按规定公式计算载药量（DL）与包封率（EE）。

### 6.2.3 体外释放试验

应在模拟目标病理刺激条件与正常生理条件的释放介质中，采用透析袋法、流通池法或样品分离法测定药物的累积释放曲线。

### 6.2.4 细胞摄取试验

应使用荧光标记的载体，与靶细胞及非靶细胞共孵育。采用流式细胞术进行定量分析，或采用共聚焦激光扫描显微镜（CLSM）进行定性观察与定位，以评估细胞对载体的摄取效率与内化行为。

### 6.2.5 药代动力学研究

应在适当的动物模型（如大鼠、小鼠）上，经静脉或目标途径给药后，于不同时间点采集血浆样本。采用LC-MS/MS等方法测定血药浓度，绘制血药浓度-时间曲线，并计算药时曲线下面积（AUC）、达峰浓度（ $C_{max}$ ）、半衰期（ $t_{1/2}$ ）等关键参数，以评估其体内过程并计算相对生物利用度。

## 6.3 靶向性试验[18-20, 36-41, 53-63]

### 6.3.1 体外靶向结合试验

应在靶细胞与非靶细胞的共培养体系或平行实验中，通过流式细胞术或荧光成像，比较荧光标记载体的细胞结合率差异。

### 6.3.2 体内分布研究

体内分布研究步骤如下：

a) 活体成像：对载有近红外荧光染料或放射性同位素标记的载体，通过小动物活体光学成像系统或显微CT（PET/CT/SPECT）进行扫描。

b) 组织分布定量：在预定时间点处死动物，采集主要组织与器官，采用HPLC-MS/MS或 $\gamma$ -计数器测定各组织中的药物或标记物浓度。

### 6.3.3 靶向效率计算

基于组织分布数据，按规定公式计算靶向选择性指数（TSI）与靶向效率（TE%）。

## 6.4 安全性试验[42-55, 64-68]

### 6.4.1 体外安全性试验

体外安全性试验步骤如下：

- a) 细胞毒性：应采用MTT法、CCK-8法或其他规范的细胞活力测定法检测细胞存活率，并计算半数抑制浓度（ $IC_{50}$ ）；
- b) 血液相容性：体外溶血试验应采用分光光度法测定游离血红蛋白并计算溶血率；凝血功能检测应采用凝血分析仪测定凝血酶原时间（PT）和活化部分凝血活酶时间（APTT）；
- c) 免疫原性筛查：应采用酶联免疫吸附测定法（ELISA）等检测细胞培养上清液或动物血清中的关键细胞因子（如TNF- $\alpha$ ，IL-6）水平。

#### 6.4.2 动物毒性试验

所有动物试验方案必应通过伦理审查并遵循动物福利原则。试验设计应参考ICH、OECD等国际通用的药物非临床研究指导原则，具体步骤如下：

- a) 急性毒性试验：采用单次给药，至少观察14天，记录动物死亡率、临床症状、体重变化及病理学改变。
- b) 重复给药毒性试验：应设置合理剂量组及对照组，连续给药28天或与临床拟用周期相匹配。监测指标应包括体重、摄食量、血液学、血清生化和组织病理学检查。

### 6.5 稳定性试验

#### 6.5.1 试验原则

稳定性研究应遵循药物稳定性试验的通用科学原则。试验设计宜参考ICH Q1A(R2)等国际指导原则。

#### 6.5.2 试验类型

应开展影响因素试验（强光、高温、高湿）、加速试验、长期试验及体外模拟胃肠环境试验。

#### 6.5.3 测试指标

在规定的试验时间点，取样检测并记录至少以下指标：外观性状、粒径与多分散指数（PDI）、Zeta电位、载药量、包封率及药物含量。同时应考察其功能稳定性，即系统的响应阈值与响应速率等关键特性在货架期内的变化。

## 7 取值规则

### 7.1 分值设定

采用百分制综合评价体系，各项指标分值根据其重要性分配见表1。

表1 指标分值

评价指标	分值	核心考量
响应特性	30	系统的智能化水平，重点关注其响应的精准度、灵敏度与效率。
递送效率	23	药物从装载到释放全过程的效率与可控性。
靶向性	20	药物在体内向靶组织/细胞选择性递送的能力与准确性。
安全性	20	载体系统、药物及降解产物的整体生物安全性，是临床应用的先决条件。

稳定性	7	产品在贮存与运输过程中维持其理化性质及关键功能的一致性与持久性。
-----	---	----------------------------------

## 7.2 单项指标计算

各单项指标按表2进行分值计算。

表2 单项指标计算

一级指标与分值	二级指标	评分标准
响应特性 (30分)	响应特异性 (10分)	目标/非目标响应比值 > 15: 10分 目标/非目标响应比值 10~15: 8分 目标/非目标响应比值 5~10: 5分 目标/非目标响应比值 < 5: 0分
	响应速率 ( $T_{50\%}$ ) (10分)	$T_{50\%} \leq 0.5$ h: 10分 $0.5$ h < $T_{50\%} \leq 2$ h: 8分 $2$ h < $T_{50\%} \leq 6$ h: 5分 $T_{50\%} > 6$ h: 0分
	病理微环境匹配度 (10分)	响应阈值与病理条件高度吻合, 窗口精准: 10分 基本吻合, 但安全窗口 (治疗窗) 适中: 7分 匹配度一般, 存在脱靶风险: 4分 阈值设定不合理, 无法有效区分病理/正常状态: 0分
递送效率 (23分)	载药量 (5分)	> 40%: 5分 25%~40%: 3分 10%~25%: 1分 < 10%: 0分
	包封率 (3分)	> 90%: 5分 80%~90%: 4分 70%~80%: 2分 < 70%: 0分
	体外累积释放度 (5分)	目标条件下释放 > 80%: 5分 目标条件下释放 60%~80%: 3分 目标条件下释放 < 60%: 1分 目标条件下释放 < 40%: 0分
	细胞摄取效率 (5分)	显著高于游离药物或对照 (> 200%): 5分 有所提高 (150%~200%): 3分 无显著改善: 1分

	相对生物利用度 (5分)	与对照相比提高>3倍: 5分 提高2~3倍: 3分 提高1~2倍: 1分 无提高: 0分
靶向性 (20分)	靶细胞摄取率 (5分)	>80%: 5分 50~80%: 3分 20~50%: 1分 <20%: 0分
	靶向选择性指数 (5分)	>5倍: 5分 3~5倍: 4分 2~3倍: 3分 1~2倍: 1分 无提高: 0分
	体内靶向效率 (5分)	>30%: 5分 5%~30%: 3分 2~5%: 1分 <1%: 0分
	体内分布 (5分)	与对照相比靶器官富集: 3分 与对照相比预期降低作用器官浓度明显降低: 2分 与对照相比基本一致: 0分
安全性 (20分)	细胞毒性 (对正常细胞, $IC_{50}$ ) (4分)	$IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ : 4分 $100 < IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ : 2分 $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ : 0分
	血液相容性 (溶血率) (4分)	<5%: 4分 5%~10%: 2分 >10%: 0分
	最大耐受剂量 (MTD, 4分)	与游离药相比提高>3倍: 4分 提高2~3倍: 3分 提高1~2倍: 1分 未提高或有降低: 0分
	长期毒性 (3分)	对对照比毒性明显改善: 3分 对对照比毒性基本一致: 0分
	免疫原性/补体激活 (3分)	无显著激活: 3分 有轻微激活: 1分 有显著激活: 0分
	局部刺激性 (2分)	无显著刺激: 2分 有轻微刺激: 1分 有显著刺激: 0分
稳定性 (7分)	储存稳定性 (6个月) (7分)	各项关键理化指标变化<5%: 7分 变化5%~10%: 4分 变化>10%: 0分

## 7.3 总分计算

取单项指标得分之和为总分。

## 8 评价结果

### 8.1 评价等级划分

综合评分等级划分应按照表3进行。

表3 综合评分等级划分

得分范围	评价等级	含义
总分 $\geq$ 90分	优秀	系统性能卓越，各项指标均衡且突出，智能响应特性明确，具有明确的临床转化优势和前景。
$75 \leq$ 总分 $<$ 90分	良好	系统性能良好，主要指标表现优异，具备较好的开发潜力。
$60 \leq$ 总分 $<$ 75分	合格	系统基本达到智能响应系统的要求，但部分关键指标有待优化。
总分 $<$ 60分	不合格	系统存在明显缺陷，未能体现智能响应递送的优势，或不满足基本的安全性要求。

### 8.2 评价结果公布

8.2.1 评价结果由具备资质的第三方药品评价机构出具正式评价报告，内容包括各维度得分明细、主要优势与缺陷分析、改进建议、最终评价等级。

8.2.2 报告应向社会公开摘要版本，详细数据依保密协议管理。

### 8.3 评价结果有效期

评价结果有效期规定如下：

- a) 有效期为3年，自评价报告签发之日起计算；
- b) 有效期内若发生处方、工艺、适应症或靶向机制重大变更，需重新评价；
- c) 有效期届满前6个月可申请复评，通过后可延长有效期。

## 附录 A

(规范性)

## 不同响应型系统分类、响应机制、特异性指标

## A.1 不同响应型系统分类、响应机制、特异性指标

不同响应型系统分类、响应机制、特异性指标见表A.1。

表A.1 不同响应型系统分类、响应机制、特异性指标

分类	响应机制	特异性指标
生理微环境响应型	pH 响应型  利用病灶部位的异常酸性微环境与正常生理环境 ( $\text{pH} \sim 7.4$ ) 的差异, 通过酸敏化学键或基团的断裂或质子化, 引发载体结构变化, 从而实现药物的靶向释放。 主要机制有三类: 1. 酸敏化学键断裂; 2. 质子化导致物化性质改变; 3. 基于 pH 的构象变化。	1. pH 响应特异性比值。 2. 触发 pH 阈值。 3. 释放速率变化倍数。
	氧化还原响应型  利用病灶部位 (如肿瘤细胞质、炎症部位) 与细胞外/正常组织间巨大的还原性物质浓度差异 (主要是谷胱甘肽 GSH)。 核心机制是载体中的二硫键在细胞内高浓度 GSH 环境下被还原断裂, 导致载体结构解体, 释放药物。	1. 还原响应特异性比值: (高 GSH 浓度/低/正常 GSH 浓度下释放率比值)。 2. 触发 GSH 阈值: 引发显著性响应 (如释放率 $> 50\%$ ) 所需的最低 GSH 浓度。 3. 响应速率: 在触发条件下, 达到特定释放幅度 (如 $T_{50\%}$ ) 所需的时间。
	酶响应型  利用病灶部位 (如肿瘤、炎症组织) 特异性高表达的酶 (如基质金属蛋白酶 MMPs、组织蛋白酶、酯酶等)。 核心机制是载体中嵌入的特异性酶底物 (如多肽链、酯键) 被目标酶识别并切割, 导致载体结构解体或表面修饰脱落, 从而实现药物的靶向释放	1. 酶响应特异性比值: (目标酶存在下的累积释放率)/(无酶或非目标酶存在下的累积释放率)。 2. 触发酶浓度阈值: 引发显著性响应所需的最低酶浓度。 3. 酶切动力学常数: 通过 Michaelis-Menten 方程拟合得到的酶切速率 ( $V_{\text{max}}/K_m$ ), 量化响应效率。
外源性物	光响应型  利用特定波长外部光源 (如紫外光、近红外光) 作为可控刺激。核心机制是载体中的光敏基团在吸收光子后发生光化学反应, 例如: 光裂解 (化学键断	1. 光响应特异性比值: (光照条件下的累积释放率) / (黑暗条件下的累积释放率)。 2. 触发能量阈值: 引发显著性

理 信 号 响 应 型		裂)、光异构化(如偶氮苯的顺反异构)、光热效应(产生局部热量),从而导致载体结构破坏或性质改变,实现药物的时空精准释放。	响应所需的最低光能量密度。 3. 响应速率:从开始照射到达到特定释放幅度(如 $T_{50\%}$ )所需的时间,或单位时间的释放量。
	温度响应型	利用载体材料自身的临界相转变温度以及病灶局部与正常组织的温差。核心机制是当环境温度达到临界值(如 LCST)时,温敏聚合物(如聚 N-异丙基丙烯酰胺, pNIPAM)的链构象发生急剧变化,从亲水性伸展状态转变为疏水性收缩状态,导致纳米载体解体、胶束破裂或水凝胶收缩,从而释放药物。	1. 温度响应特异性比值:(临界温度以上的累积释放率)/(临界温度以下的累积释放率)。 2. 临界相转变温度:引发载体性质发生突变的特定温度点,可通过浊度、粒径等方法测定。 3. 响应速率:温度跨越临界点后,达到特定释放幅度(如 $T_{50\%}$ )所需的时间。
	磁响应型	利用载体中负载的超顺磁性纳米颗粒(如 $Fe_3O_4$ )与外部施加的磁场之间的相互作用。核心机制包括: 1. 磁靶向:在静磁场(如永磁体)作用下,载体在血流中受到磁力,被物理富集至靶组织区域。 2. 磁热效应:在交变磁场下,磁性纳米颗粒产生热量(如奈尔弛豫、布朗弛豫),导致局部升温,从而触发温敏载体释放药物或直接进行热疗。	1. 磁靶向富集效率:(靶组织药物浓度 with MF)/(靶组织药物浓度 without MF),其中 MF 为磁场。 2. 磁热升温速率/精度:单位时间内升高的温度( $^{\circ}C/min$ )及达到的目标温度与控制温度的偏差。 3. 磁场触发释放比值:(交变磁场下的累积释放率)/(无磁场下的累积释放率)。
	超声响应型	利用外部施加的超声波的物理能量,通过以下机制触发药物释放: 1. 空化效应:超声在液体中产生微泡的振荡、生长和剧烈崩溃,产生极强的局部剪切力,破坏载体结构(尤其是微泡、脂质体等)。 2. 机械效应:超声波的辐射力与声流能直接对载体施加物理作用,导致膜穿孔或结构变形。 3. 热效应:超声能量被吸收后转化为热能,可引起局部升温,辅助触发温敏载体释放药物。	1. 超声响应释放比值:(超声辐照下的累积释放率)/(无超声辐照下的累积释放率)。 2. 声能触发阈值:引发显著性响应所需的最低超声能量(通常以机械指数(MI)或声功率/强度表征)。 3. 响应速率:在超声触发期间,达到特定释放幅度(如 $T_{50\%}$ )所需的时间或单位时间的释放量。
	电场响应型	利用外部施加的电场作为刺激信号,主要通过以下机制实现药物释放: 1. 电泳与电渗效应:带电载体或药物分子在电场作用下定向移动(电泳),或溶液整体流动(电渗),从而改变其在载体内的分布和跨膜传输速率。	1. 电场响应释放比值:(施加电场下的累积释放率)/(无电场下的累积释放率)。 2. 电场强度/电压阈值:引发显著性响应所需的最低电场强度或工作电压。

			<p>2. 膜电穿孔/电增渗：电场脉冲使细胞膜或载体囊泡的脂质双分子层形成瞬态或永久的亲水性孔道，极大增加其通透性，促进药物释放。</p> <p>3. 电化学响应：载体中的电活性材料（如导电聚合物）在特定电压下发生氧化还原反应，引起其体积、亲疏水性或离子结合能力的改变，从而导致药物释放。</p>	<p>3. 响应速率：从施加电场开始，达到特定释放幅度（如 <math>T_{50\%}</math>）所需的时间。</p>
生物分子识别响应型	传统生物分子响应型	抗体介导型	<p>利用载体表面修饰的抗体或抗体片段对靶点（如肿瘤细胞表面特异性抗原）的高亲和力与高特异性识别实现主动靶向。</p> <p>其“响应”体现在：抗体-抗原结合后，触发受体介导的内吞作用，使载体进入细胞；随后在内涵体/溶酶体的低 pH 环境或特定蛋白酶作用下，载体结构中的可裂解连接子断裂，实现药物的特异性胞内释放。</p>	<p>1. 靶向结合特异性指数：（靶细胞结合量）/（非靶细胞结合量）。</p> <p>2. 抗原结合亲和力：平衡解离常数（KD），数值越低，亲和力越高。</p> <p>3. 内化效率：单位时间内被靶细胞摄取并内化的载体比例。</p> <p>4. 条件性释放比值：（模拟溶酶体环境下的释放率）/（血浆环境下的释放率）。</p>
		配体介导型	<p>利用载体表面修饰的特异性配体（如小分子、多肽、糖类、适体等）与靶细胞表面过度表达或特异性表达的受体（如叶酸受体、整合素、转铁蛋白受体等）之间的高亲和力结合，实现主动靶向。</p> <p>其“智能响应”体现在：配体-受体结合后，触发受体介导的内吞作用，使载体被高效摄取进入细胞；随后在内涵体/溶酶体的低 pH 环境或特定酶作用下，载体解体或通过可裂解连接子释放药物。</p>	<p>1. 靶向结合特异性指数：（靶细胞结合量）/（非靶细胞或受体阻断后的结合量）。</p> <p>2. 受体结合亲和力：平衡解离常数（KD），数值越低，亲和力越高。</p> <p>3. 内化效率：单位时间内被靶细胞摄取并内化的载体比例。</p> <p>4. 条件性释放比值：（模拟胞内环境下的释放率）/（细胞外环境下的释放率）。</p>
		适配体介导型	<p>利用载体表面修饰的核酸适配体（Aptamer）——一段经 SELEX 技术筛选出的单链 DNA 或 RNA 分子，通过其形成的特定三维结构与靶标（如细胞膜蛋白、小分子等）进行高亲和力、高特异性结合，实现主动靶向。</p> <p>其“智能响应”体现在：适配体-靶标结合后，可触发受体介导的内吞作用，使载体被高效摄取进入细胞；随后在内涵体/溶酶体的低 pH 环境或特异性核酸酶作用下，载体结构发生变化或通过可裂解连接子释放药物。</p>	<p>1. 靶向结合特异性指数：（靶细胞结合量）/（非靶细胞或靶标阻断后的结合量）。</p> <p>2. 适配体-靶标结合亲和力：平衡解离常数（KD），通常为 nM-pM 级别。</p> <p>3. 内化效率：单位时间内被靶细胞摄取并内化的载体比例。</p> <p>4. 血清/核酸酶稳定性：适配体在生物环境中保持结构和功能完整性的时间，是其在体功效的关键。</p>
	疾病	ROS/RN	<p>利用病灶部位（如肿瘤、炎症部位）异常高水平的活性氧/活性氮作为刺激信</p>	<p>1. ROS/RNS 响应特异性比值：（高 ROS/RNS 条件下的累积</p>

标志物响应型	S 介导型	号。 核心机制是载体中嵌入的 ROS/RNS 敏感化学键或基团（如硫醚、硼酸酯、硒/碲元素、芳基硼酸、硫缩酮等）与过量的 ROS/RNS（如 $H_2O_2$ 、OH、 $ONOO^-$ 、HOCl）发生特异性氧化反应，导致化学键断裂或载体材料亲疏水性发生改变，从而引发载体结构解体或表面修饰脱落，实现药物的靶向释放。	释放率）/（低/正常 ROS/RNS 条件下的累积释放率）。 2. 触发 ROS/RNS 浓度阈值：引发显著性响应所需的最低 ROS/RNS 浓度（如 $H_2O_2$ 浓度）。 3. 响应速率：在触发条件下，达到特定释放幅度（如 $T_{50\%}$ ）所需的时间。 4. 氧化产物验证：通过色谱或质谱确认特征性氧化产物的生成。
	能量代谢标志物介导型（ATP）	利用细胞质内（ $\sim 1-10$ mM）与细胞外（ $< 10$ nM）或正常组织间巨大的 ATP 浓度差异作为刺激信号。核心机制是载体中引入的 ATP 亲和配体或 ATP 敏感性材料，通过以下方式响应： 1. 竞争置换型：载体通过核酸适配体与药物非共价结合；当进入高 ATP 环境时，ATP 与适配体的结合竞争性置换出药物，实现释放。 2. 结构解体型：载体中含有苯硼酸类等基团，与 ATP 的邻位二醇结构发生高亲和力、化学计量比的可逆结合，导致载体表面电荷、亲疏水性或交联密度改变，引发结构解体。	1. ATP 响应特异性比值：（高 ATP 浓度下的累积释放率）/（低 ATP 浓度下的累积释放率）。 2. 触发 ATP 浓度阈值：引发显著性响应（如释放率 $> 50\%$ ）所需的最低 ATP 浓度。 3. 响应速率：在达到触发条件后，系统达到特定释放幅度（如 $T_{50\%}$ ）所需的时间。 4. 选择性系数：（ATP 触发下的释放率）/（其他三磷酸核苷如 GTP/CTP/UTP 触发下的释放率）
	核酸标志物介导型（miRNA/mRNA）	利用疾病细胞中特异性过表达或突变的关键信使 RNA 或 microRNA 作为内源性触发信号。 其核心机制是链置换反应或核酶激活：载体中预设了一段与目标核酸标志物完全互补的核酸序列。当载体进入细胞后，目标 mRNA/miRNA 与该序列发生杂交，通过链置换作用，破坏载体结构的稳定性（如使连接臂打开、或使核酶构象激活从而切割载体），从而导致药物或基因的释放。	1. 核酸响应特异性比值：（目标核酸存在下的释放率/效应）/（非目标核酸存在下的释放率/效应）。 2. 触发核酸浓度阈值：引发显著性响应所需的最低目标核酸浓度。 3. 序列错配敏感性：系统对目标序列中单个或多个碱基突变的识别严格程度，通常以信噪比下降程度表示。 4. 功能效应强度：如下调靶蛋白或诱导细胞凋亡的幅度。
	糖类标志物介导型	利用病灶细胞表面特异性过表达或异常分布的糖类标志物（如唾液酸、甘露糖-6-磷酸、半乳糖、透明质酸受体等）作为识别靶点。其核心机制是载体表面修饰的糖类配体或其模拟物（如凝集素、苯硼酸等）与靶细胞表面的糖蛋白、糖脂或糖识别受体发生特异性结合，触发受体介导的内吞作用。进入细胞后，在内涵体/溶酶体的低 pH 或特定糖苷酶	1. 糖结合特异性指数：（靶细胞结合量）/（非靶细胞或糖竞争抑制后的结合量）。 2. 糖结合亲和力：平衡解离常数（KD）或半数抑制浓度（ $IC_{50}$ ）。 3. 内化效率：单位时间内被靶细胞摄取并内化的载体比例。 4. 糖酶/酸触发释放比值：（模

		作用下，载体结构解体或通过酸敏/酶敏连接子释放药物。	拟溶酶体环境下的释放率) / (细胞外环境下的释放率)
多重逻辑响应型	多重响应/逻辑门型	<p>整合两种或多种前述的单一响应机制（如 pH、酶、ROS、ATP 等），通过精巧的化学或结构设计，使这些机制之间产生布尔逻辑关系，实现对复杂病理微环境的更精准识别与响应。主要逻辑类型包括：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•AND（与）门：仅当所有预设刺激同时存在时，才触发显著响应/释放。</li> <li>•OR（或）门：只要任一预设刺激存在，即触发响应。</li> <li>•NOR（或非）门：在缺乏特定抑制性刺激时触发响应。</li> <li>•更复杂的时序门、级联门等。</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 逻辑保真度：系统行为与预设逻辑真值表的符合程度，是核心指标。</li> <li>2. 协同释放指数：（多重刺激下的释放率）/（各单一刺激下释放率之和）。AND 门该值远大于 1。</li> <li>3. 信噪比：（正确逻辑条件下的响应输出）/（错误逻辑条件下的背景输出）。</li> <li>4. 各单一响应通道的特性指标：对构成逻辑门的每个单一响应单元，仍需测定其各自的阈值、速率等。</li> </ol>

## 附录 B

(规范性)

## 不同响应型系统特异性试验方法

## B.1 不同响应型系统特异性试验方法

不同响应型系统特异性试验方法见表B.1。

表B.1 不同响应型系统特异性试验方法

分类		特异性试验方法			
		方法名称	试验目的	检测的关键指标	方法推荐强度
生理微环境响应型	pH 响应型	体外 pH 梯度释放试验	定量评价系统在不同 pH 下的药物释放行为, 评估其释放特异性和效率。	1. pH 响应特异性比值 2. 触发 pH 阈值 3. 释放速率/动力学	必备核心
		Zeta 电位-pH 滴定分析	验证“质子化”电荷反转机制, 确定系统发生电荷反转的精确 pH 点。	1. 电荷反转点 2. pH-Zeta 电位曲线	强推荐
		动态光散射粒径分析	监测 pH 变化引发的载体粒径变化, 证实结构解体或聚集。	1. 流体动力学粒径 2. 多分散指数	强推荐
		荧光探针法	提供高灵敏度、实时的响应动力学监测, 适用于机制深入研究。	1. 荧光强度/比率变化 2. 实时响应动力学曲线	补充推荐
		体外 GSH 梯度释放试验	定量评价系统在不同 GSH 浓度下的药物释放行为, 评估其还原响应特异性。	1. 还原响应特异性比值 2. 触发 GSH 阈值 3. 释放动力学	必备核心
		二硫键断	直接验证核心响	1. 二硫键断裂率	强推荐

		裂验证	应机制—二硫键的断裂。通常使用 HPLC 或 Ellman's assay。	/时间 2. 游离巯基生成量		
		动态光散射粒径分析	监测 GSH 触发导致的载体粒径变化，证实其结构解体或聚集。	1. 流体动力学粒径 2. 多分散指数	强推荐	
		荧光探针法	提供高灵敏度、实时的响应动力学监测。常用 FRET 或硫醇敏感性荧光染料。			
	酶响应型	体外酶浓度梯度释放试验	定量评价系统在不同目标酶浓度下的药物释放行为，评估其酶响应特异性与灵敏度。	1. 酶响应特异性比值 2. 触发酶浓度阈值 3. 释放动力学	必备核心	
		酶切产物验证	直接验证核心响应机制——酶底物键的断裂。通常使用 HPLC-MS 或 SDS-PAGE 分析裂解产物。	1. 底物断裂率/时间 2. 特征性裂解产物生成	强推荐	
		动态光散射粒径分析	监测酶触发导致的载体粒径变化，证实其结构解体或聚集。	1. 流体动力学粒径 2. 多分散指数	强推荐	
		荧光探针法	提供高灵敏度、实时的酶切动力学监测。常用 FRET 探针（两端分别标记供/受体荧光基团的多肽底物）。	1. 荧光强度/比率变化 2. 实时酶切动力学曲线	补充推荐	
	外源性物理信号	光响应型	体外光照/黑暗释放试验	定量评价系统在光照与黑暗条件下的药物释放行为，评估其光控释放的特异性和效率。	1. 光响应特异性比值 2. 触发能量阈值 3. 释放动力学	必备核心

响应型		光敏基团变化验证	直接验证核心响应机制——光敏基团的化学变化。使用紫外-可见光谱或 HPLC 监测特征吸收峰或产物。	1. 特征吸收峰变化 2. 光解/异构化产物	强推荐	
		动态光散射与粒径分析	监测光照触发导致的载体粒径或微观形态变化，证实其结构解体或聚集。	1. 流体动力学粒径 2. 多分散指数	强推荐	
		荧光探针法	提供高灵敏度、实时的响应动力学监测。常用基于光致电子转移或 FRET 原理的探针。	1. 荧光强度/比率变化 2. 实时响应动力学曲线	补充推荐	
	温度响应型		体外温度梯度释放试验	定量评价系统在不同温度下的药物释放行为，验证其温度触发的特异性和释放效率。	1. 温度响应特异性比值 2. 临界相转变温度 3. 释放动力学	必备核心
			相转变温度验证	直接验证并精确测定系统的临界相转变温度。使用紫外-可见分光光度法监测溶液透光率（浊度）随温度的变化。	1. 最低临界溶解温度 2. 相变曲线	强推荐
			动态光散射粒径分析	监测温度变化触发的载体粒径与分布的突变，证实其相变行为。	1. 流体动力学粒径 2. 多分散指数	强推荐
			荧光探针法	利用对微环境极性敏感的荧光染料（如尼罗红），通过荧光强度变化高灵敏度地监测聚合物链的塌缩与聚集	1. 荧光强度变化 2. 相变温度曲线	补充推荐

磁响应型	体外磁场靶向测试	定量模拟并评估系统在磁场作用下于流动介质中的富集能力。	1. 捕获效率 2. 富集倍数	必备核心
	体外磁热释放试验	定量评价系统在交变磁场下的药物释放行为与磁热控释特性。	1. 磁场触发释放比值 2. 释放动力学	强推荐(针对磁热系统)
	磁热升温曲线测定	直接测量系统在不同参数的交变磁场下的升温性能, 验证其磁热效应。	1. 饱和温度 2. 升温速率 3. 比吸收率	强推荐(针对磁热系统)
	体内磁共振成像	利用其 T <sub>2</sub> 加权成像对比度, 无创、实时示踪载体在活体内的磁靶向与分布情况。	1. 靶区信号衰减 2. 分布范围	补充推荐
超声响应型	体外超声辐照释放试验	定量评价系统在超声辐照与静置条件下的药物释放行为, 评估其超声触发的特异性和效率。	1. 超声响应释放比值 2. 释放动力学	必备核心
	空化效应检测与成像	直接验证和观测超声触发的主要物理机制—空化效应。使用高速摄像机或被动空化探测系统。	1. 空化强度(频谱) 2. 空化阈值 3. 微泡动力学	强推荐
	动态光散射与粒度分析	监测超声辐照前后载体粒径与分布的变化, 证实其结构破坏或解体。	1. 流体动力学粒径 2. 多分散指数	强推荐
	体内外超声成像与分布研究	利用载体自身的超声造影能力或结合其他成像技术, 验证其在超声	1. 超声图像灰度/信号强度 2. 体内分布与富集度	补充推荐(诊疗一体化系统必备)

			引导下的靶向富集与触发释放			
		电场响应型	体外电场刺激释放试验	定量评价系统在施加电场与静置条件下的药物释放行为，评估其电控释放的特异性和效率。	1. 电场响应释放比值 2. 电场强度/电压阈值 3. 释放动力学	必备核心
			电化学性质表征	直接验证电活性载体（如导电聚合物）的氧化还原响应机制。使用循环伏安法等技术。	1. 氧化还原电位 2. 电流-电压曲线	强推荐 （针对电化学机制系统）
			电穿孔效应验证	验证电场对载体结构或细胞膜通透性的影响。使用动态光散射、荧光染料渗漏实验或电子显微镜。	1. 粒径/结构变化 2. 膜通透性变化	强推荐
			实时荧光监测法	利用对电场敏感或可指示载体通透性的荧光染料，实时监测电场触发下的释放或孔道形成过程。	1. 荧光强度/比率实时变化 2. 响应动力学曲线	补充推荐
生物分子识别响应型	传统生物分子响应型	抗体介导型	靶向结合特性验证	定量表征抗体与靶抗原的相互作用，验证其结合能力与特异性。	1. 平衡解离常数(KD) 2. 结合/解离速率 3. 靶向结合特异性指数	必备核心
			内化与胞内定位分析	评估载体被靶细胞特异性摄取、内化并转运至目标细胞器的效率与过程。	1. 内化效率与速率 2. 溶酶体共定位系数	强推荐
			条件性释放试验	在体外模拟溶酶体等胞内环境，验	1. 条件性释放比值	必备核心

			证“连接子-药物”结构在特定条件下的断裂与药物释放特性。	2. 释放动力学 3. 连接子断裂效率	
		体外杀伤特异性验证	在细胞水平最终确认其生物功能（如杀伤效应）是否严格依赖于靶抗原的表达。	1. 半数抑制浓度（IC50） 2. 杀伤选择性指数	强推荐
	配体介导型	靶向结合特性验证	定量表征配体与靶受体的相互作用，验证其结合能力与特异性。	1. 平衡解离常数（KD） 2. 靶向结合特异性指数 3. 竞争性结合曲线与 IC50	必备核心
		内化与胞内定位分析	评估载体被靶细胞特异性摄取、内化并转运至目标细胞器的效率与过程。	1. 内化效率与速率 2. 溶酶体共定位系数	强推荐
		条件性释放试验	在体外模拟内涵体/溶酶体等胞内环境，验证载体在特定条件下的药物释放特性。	1. 条件性释放比值 2. 释放动力学	必备核心
		体外功能特异性验证	在细胞水平最终确认其生物功能（如杀伤、基因转染）是否严格依赖于靶受体的表达。	1. 功能选择性指数（如 IC50 比值） 2. 受体阻断对照实验的效果	强推荐
		适配体介导型	靶向结合特性验证	定量表征适配体与靶标的相互作用，验证其结合能力、特异性与亲和力。	1. 平衡解离常数（KD） 2. 靶向结合特异性指数 3. 结合动力学
	内化与胞内定位分析		评估载体被靶细胞特异性摄取、内化并转运至目标细胞器的效率与过程。	1. 内化效率与速率 2. 溶酶体共定位系数	强推荐

疾病标志物响应型		血清稳定性测试	评估适配体在模拟体内环境中的稳定性，为其体内应用提供依据。	1. 半衰期 2. 完整率	强推荐
		体外功能特异性验证	在细胞水平最终确认其生物功能（如杀伤、基因沉默）是否严格依赖于适配体靶向。	1. 功能选择性指数 2. scramble 序列（乱序适配体）对照实验的效果	必备核心
	ROS/RNS 介导型	体外 ROS/RNS 梯度释放试验	定量评价系统在不同浓度 ROS/RNS 氧化剂（如 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ）下的药物释放行为，评估其氧化响应的特异性与灵敏度。	1. ROS/RNS 响应特异性比值 2. 触发 ROS/RNS 浓度阈值 3. 释放动力学	必备核心
		氧化产物分析与化学验证	直接验证核心响应机制——ROS/RNS 敏感键的氧化断裂或转化。使用高效液相色谱、质谱或核磁共振分析反应产物。	1. 敏感键断裂率 2. 特征性氧化产物	强推荐
		动态光散射与粒度分析	监测 ROS/RNS 触发导致的载体粒径与分布的变化，证实其结构解体或聚集。	1. 流体动力学粒径 2. 多分散指数	强推荐
		荧光探针法	提供高灵敏度、实时的氧化响应动力学监测。常用 ROS 敏感性荧光染料或 FRET 探针。	1. 荧光强度/比率变化 2. 实时响应动力学曲线	补充推荐
		体外 ATP 浓度梯度释放试验	定量评价系统在不同 ATP 浓度下的药物释放行为，评估其对 ATP 浓度的响应特异性与灵敏度。	1. ATP 响应特异性比值 2. 触发 ATP 浓度阈值 3. 释放动力学	必备核心
	能量代谢标志物介导型（ATP）				

		核苷酸选择性测试	验证系统对 ATP 的选择性，排除其他高能磷酸化合物（如 GTP, CTP, UTP）的非特异性干扰。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 选择性系数</li> <li>2. 竞争性释放曲线</li> </ol>	强推荐
		相互作用与结构变化验证	直接验证载体与 ATP 的相互作用及由此引发的结构变化。使用等温滴定量热法、动态光散射或 HPLC。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 结合常数/化学计量比</li> <li>2. 粒径/电位变化</li> <li>3. 复合物解离</li> </ol>	强推荐
		细胞质微环境模拟释放	在更接近真实的细胞质复杂环境中（含多种生物大分子和离子），验证其响应性，评估实际应用潜力。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 模拟环境下的释放效率</li> <li>2. 与非模拟环境的释放对比</li> </ol>	补充推荐
	核酸标志物介导型(miRNA/mRNA)	体外核酸梯度响应试验	在无细胞体系中，定量评价系统在不同浓度目标核酸触发下的药物释放或报告基因激活效率。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 核酸响应特异性比值</li> <li>2. 触发核酸浓度阈值</li> <li>3. 响应动力学</li> </ol>	必备核心
		序列特异性验证	验证系统对目标序列的高度依赖性，排除非特异性序列或单碱基错配序列的干扰。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 序列错配敏感性</li> <li>2. 与非目标 miRNA/mRNA 的交叉反应性</li> </ol>	强推荐
		细胞内响应验证	在培养的细胞中，直接证实系统能被内源性的目标核酸有效激活，并产生预期功能。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 功能效应强度</li> <li>2. 目标基因敲低/表达效率</li> <li>3. 与目标核酸表达量的相关性</li> </ol>	必备核心
		机制验证	通过直接检测载体在细胞内的断裂或结构变化，证实其响应机制。使用 RT-qPCR、Northern	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 载体断裂产物</li> <li>2. 目标核酸与载体的结合情况</li> </ol>	强推荐

				Blot 或凝胶电泳。		
	糖类标志物介导型	糖结合特异性验证	定量表征载体与靶细胞表面糖结构的结合能力与特异性。	1. 糖结合特异性指数 2. 平衡解离常数 (KD) 3. 竞争性结合曲线与 IC50	必备核心	
		内化与胞内定位分析	评估载体被靶细胞特异性摄取、内化并转运至目标细胞器的效率与过程。	1. 内化效率与速率 2. 溶酶体共定位系数	强推荐	
		糖酶/酸触发释放试验	在体外模拟溶酶体环境 (低 pH、特定糖苷酶)，验证载体在特定条件下的药物释放特性。	1. 糖酶/酸触发释放比值 2. 释放动力学	必备核心	
		体外功能特异性验证	在细胞水平最终确认其生物功能 (如杀伤、基因转染) 是否严格依赖于靶糖结构的表达。	1. 功能选择性指数 2. 糖竞争剂或糖苷酶预处理对照实验的效果	强推荐	
多重逻辑响应型	多重响应/逻辑门型	体外多重刺激组合释放试验	系统测试系统在所有可能刺激组合条件下的输出行为，绘制其逻辑真值表，验证其逻辑功能。	1. 逻辑保真度 2. 协同释放指数 3. 信噪比	必备核心	
		通道独立性验证	验证各个响应通道是否独立工作、互不干扰，即改变一个刺激条件不应影响对其他刺激的响应阈值。	1. 各通道的触发阈值 2. 响应动力学的独立性	强推荐	
		细胞内逻辑功能验证	在复杂的细胞模型中，使用药理抑制剂、基因敲低、外源添加等方式操控刺激信号，验证其	1. 细胞水平下的逻辑保真度 2. 与细胞命运的关联性	强推荐	

			逻辑行为是否在生理环境下依然成立。		
		机理验证与结构分析	使用前述各种表征技术（DLS，HPLC，荧光等），逐步跟踪并证实在不同逻辑刺激下，载体的结构变化路径是否符合设计预期。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 中间体与最终产物的鉴定</li> <li>2. 结构变化的时序</li> </ol>	补充推荐（机制研究必备）

## 参 考 文 献

- [1] Torchilin, V. P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(11), 813 - 827.
- [2] Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*, 12(11), 991 - 1003.
- [3] Mitchell, M. J., et al. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101 - 124.
- [4] Fleige, E., Quadir, M. A., & Haag, R. (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 866 - 884.
- [5] 程巴雪. 刺激响应型药物递送系统. 中国大百科全书. <https://www.zgbk.com/ecph/words?SiteID=1&ID=537846&Type=bkzyb#section1-2>.
- [6] International Council for Harmonisation (ICH). (2009). ICH Harmonised Guideline: Pharmaceutical Development Q8(R2).
- [7] FDA. (2022). Guidance for Industry: Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials.
- [8] Karimi, M., et al. (2016). Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*, 45(5), 1457 - 1501.
- [9] EMA. (2013). Reflection Paper on the Data Requirements for Intravenous Liposomal Products.
- [10] 《中华人民共和国药典》. (2025). 第四部, 通则 9014 微粒制剂指导原则.
- [11] 国家药品监督管理局. (2021). 《纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行)》.
- [12] GB/T 39261-2020 纳米技术 纳米材料毒理学评价前理化性质表征指南
- [13] FDA. (2018). Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation
- [14] Zhibin Guo, Xiaoguang Li. A Practical Guide to Nanoparticle Characterization by Light Scattering Techniques.
- [15] K. Sreelatha., et al. (2025). A Comprehensive Review of Nanoparticle Characterization Techniques. *International Journal of Research and Review*, 12(1), 194-200.
- [16] Danaei, M., et al. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- [17] Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. *Methods in Molecular Biology*, 697, 63 - 70.

- [18] Anupam D. T., et al. (2022). Advances in Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems. DOI:10.1016/C2020-0-02009-8.
- [19] Abdel Salam Hamdy Makhlouf and Nedal Y. Abu-thabit .(2018). Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1. DOI:10.1016/C2016-0-00601-0.
- [20] Amit Singh and Mansoor M. Amiji. (2018). Stimuli-responsive Drug Delivery Systems. 1st. Royal Society of Chemistry. DOI: 10.1039/9781788013536
- [21] De la Rica, R., et al. (2012). Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(11), 967 - 978.
- [22] Wilhelm, S., et al. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1(5), 16014.
- [23] 国家药品监督管理局. (2017). 《药物非临床研究质量管理规范》.
- [24] ISO 10993-2:2022. Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements.
- [25] Du, J. Z., et al. (2010). A tumor-acidity-activated charge-conversional nanogel as an intelligent vehicle for promoted tumoral-cell uptake and drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 142(1), 40 - 46.
- [26] Wei C., et al. (2010). pH-Sensitive degradable polymersomes for triggered release of anticancer drugs: A comparative study with micelles, *Journal of Controlled Release*, 142(1), 40-46.
- [27] Shinn, J., et al. (2022). Smart pH-responsive nanomedicines for disease therapy. *J. Pharm. Investig.* 52, 427 - 441.
- [28] Hu, Q., et al. (2015). Anticancer Platelet-Mimicking Nanovehicles. *Advanced Materials*, 27(44), 7043 - 7050.
- [29] Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2011). Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), 6 - 12.
- [30] Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 16071.
- [31] He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., & Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657 - 3666.
- [32] Behzadi, S., et al. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218 - 4244.
- [33] 王心怡,等. (2024). 纳米药物递送系统体内命运分析新方法与新技术研究进展[J]. 药学

进展, 48(10): 747-760.

[34] Su C., et al. (2019), Absorption, distribution, metabolism and excretion of the biomaterials used in Nanocarrier drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 143, 97-114.

[35] 国家药品监督管理局. (2021). 《纳米药物非临床药代动力学研究技术指导原则(试行)》.

[36] Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 175 - 187.

[37] Sindhvani, S., et al. (2020). The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nature Materials*, 19(5), 566 - 575.

[38] Peer, D., et al. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751-760.

[39] Weissleder, R., Kelly, K., Sun, E. Y., Shtatland, T., & Josephson, L. (2005). Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*, 23(11), 1418 - 1423.

[40] Maya Thanou, (2018). Theranostics and Image Guided Drug Delivery, <https://doi.org/10.1039/9781788010597>.

[41] Lammers, T., Rizzo, L. Y., Storm, G., & Kiessling, F. (2012). Personalized nanomedicine. *Clinical Cancer Research*, 18(18), 4889 - 4894.

[42] ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

[43] Dobrovolskaia, M. A., Clogston, J. D., Neun, B. W., Hall, J. B., Patri, A. K., & McNeil, S. E. (2008). Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Letters*, 8(8), 2180 - 2187.

[44] Neun BW, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. Updated Method for In Vitro Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties. *Methods Mol Biol.* 2018;1682:91-102

[45] Ilinskaya, A. N., & Dobrovolskaia, M. A. (2013). Nanoparticles and the blood coagulation system. Part I: benefits of nanotechnology. *Nanomedicine*, 8(5), 773 - 784.

[46] Szebeni, J., et al. (2002). Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic PEG liposomes: experimental and clinical studies. *Journal of Liposome Research*, 12(1-2), 165 - 172.

[47] Dobrovolskaia MA, Shurin M, Shvedova AA. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 May 15;299:78-89.

[48] ICH M3(R2) (2009). Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals.

- [49] OECD Guideline for Testing of Chemicals. (2018). \*Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Test No. 407.
- [50] Keck, C. M., & Müller, R. H. (2013). Nanotoxicological classification system (NCS) – a guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(3), 445 – 448.
- [51] ISO 10993-10:2010. Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for irritation and skin sensitization.
- [52] ICH S2(R1) (2011). Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.
- [53] Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical Research*, 33(10), 2373 – 2387.
- [54] 国家药品监督管理局. (2021). 《纳米药物非临床安全性研究技术指导原则（试行）》.
- [55] GBZ 16886.22-2022 医疗器械生物学评价 第22部分 纳米材料指南
- [56] Stefanos Mourdikoudis. et al. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties .<https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>.
- [57] Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328 – 343.
- [58] Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klumperman, J., & Zhong, Z. (2013). Bioresponsive polymeric nanotherapeutics for targeted cancer chemotherapy. *Nano Today*, 8(5), 482 – 498.
- [59] Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., & Amiji, M. (2008). A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 126(3), 187 – 204.
- [60] Callmann, C. E., et al. (2015). Therapeutic enzyme-responsive nanoparticles for targeted delivery and accumulation in tumors. *Advanced Materials*, 27(31), 4611 – 4615.
- [61] Pankhurst, Q. A., Thanh, N. T., Jones, S. K., & Dobson, J. (2009). Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42(22), 224001.
- [62] Alvarez-Lorenzo, C., & Concheiro, A. (2014). Light-sensitive intelligent drug delivery systems. *Photochemistry and Photobiology*, 90(5), 1 – 17.
- [63] Fomina, N., Sankaranarayanan, J., & Almutairi, A. (2012). Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(11), 1005 – 1020.
- [64] 《中华人民共和国药典》. (2025). 第四部 通则 1148 溶血与凝聚检查法.

- [65] 《中华人民共和国药典》. (2025). 第四部 通则 1147 过敏反应检查法.
- [66] OECD Guideline for Testing of Chemicals. (2001). Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Test No. 423.
- [67] Kundan K., et al. (2021). Assessment of Toxicity and Safety Profiles of Nanoparticles. Letters in Applied NanoBioScience.10(1), 1877 - 1888.
- [68] Henriqueta Louro, Maria João Silva. (2022). Nanotoxicology in Safety Assessment of Nanomaterials. DOI:10.1007/978-3-030-88071-2.
- [69] 《中华人民共和国药典》. (2020). 第四部 通则 9001 原料药物与制剂稳定性试验指导原则.