

生物大分子药物纳米递送系统在罕见病治疗中的研究进展

魏淑洁^{1#}, 何函星^{2#}, 郝锦涛¹, 吕芊芊¹, 刘丁阳¹, 杨少坤¹, 张会丰³,
何朝星^{1*}, 向 柏^{1*}

(1. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017; 2. 石家庄市人民医院泌尿外科, 河北 石家庄 050011;
3. 河北医科大学第二医院儿科, 河北 石家庄 050000)

摘要: 目前罕见病仍缺乏有效的治疗方法, 罕见病药物 (称孤儿药) 的研发是亟需解决的医学难题。一些生物大分子药物作为生物体内的天然活性成分, 具有良好的生物相容性、低免疫原性、高靶向性, 已成为21世纪药物研发中极具前景的领域之一, 但在体内递送方面仍存在诸多障碍, 鉴于由聚合物、脂质、有机仿生和无机材料等制备的纳米载体在药物递送方面的独特优势, 研究者致力于构建多功能性与协同作用的高效递送系统, 以解决罕见病治疗中生物大分子药物目前存在的瓶颈问题。因此, 本文对近10年来纳米载体递送蛋白、多肽及核酸等药物在罕见病治疗领域的研究进展进行系统综述, 为基于生物大分子药物纳米递送系统的罕见病干预研究提供思路。

关键词: 罕见病; 纳米载体; 生物大分子; 高效递送; 治疗

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-1952-10

Progress of biomacromolecule drug nanodelivery systems in the treatment of rare diseases

WEI Shu-jie^{1#}, HE Han-xing^{2#}, HAO Jin-tao¹, LV Qian-qian¹, LIU Ding-yang¹, YANG Shao-kun¹,
ZHANG Hui-feng³, HE Chao-xing^{1*}, XIANG Bai^{1*}

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Urology, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang 050011, China; 3. Department of Pediatrics, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Rare diseases still lack effective treatments, and the development of drugs for rare diseases (known as orphan drugs) is an urgent medical problem. As natural active ingredients in living organisms, some biomacromolecule drugs have good biocompatibility, low immunogenicity, and high targeting. They have become one of the most promising fields in drug research and development in the 21st century. However, there are still many obstacles in terms of *in vivo* delivery. In view of the unique advantages of nanocarriers prepared from polymers, lipids, organic biomimetic and inorganic materials in drug delivery, researchers are committed to building an efficient delivery system with versatility and synergy to solve the bottleneck issues in treating rare diseases with biomacromolecule drugs. Therefore, this article reviews the research progress of nanocarrier delivering proteins, peptides and nucleic acids in the field of rare disease treatment in the past ten years, which provides ideas for researches on biomacromolecule drug nanosystems in the field of treatment of rare diseases.

Key words: rare disease; nanocarrier; biomacromolecule drug; efficient delivery; treatment

收稿日期: 2023-12-22; 修回日期: 2024-05-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973251); 河北省引进留学人员资助项目 (C20230351); 河北医科大学大学生创新性实验计划项目 (USIP2023008).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-311-86265591, E-mail: chaoxinghe@hebm.edu.cn; baixiang@hebm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1432

罕见病是指发病率较低的疾病,大部分属于遗传病^[1],具有病情严重、诊断困难、死亡率高等特点^[2],迄今大部分罕见病尚无有效的治疗药物,目前临床用药以改善患者健康状况,延长存活期为主要目的。随着科学技术的进步及多学科的融合,新的筛选技术与合成化学、计算筛选和结构生物学正在加快新的生物活性分子的发现和设计,生物大分子药物(多肽、蛋白质、抗体、聚糖与核酸等)在21世纪药物研发中具有无限潜力,但仍存在亟待解决的难题与障碍:如稳定性低,选择性差,难以穿透生物屏障^[3,4],需经胞内转运和胞内释放才能发挥作用。为此,科研工作者通过构建生物大分子药物纳米递送系统来提高基因疗法、酶替代疗法和免疫疗法等在罕见病治疗中的疗效(图1)。

纳米药物系指利用纳米制备技术将原料药等制成的具有纳米尺度的颗粒或以适当载体材料与原料药结合形成的具有纳米尺度的颗粒等,及其最终制成的药物制剂。不同纳米载体因其结构、性质等的差异,在递送药物时可表现出不同的性能,聚合物和脂质等有机纳米载体具有良好的生物相容性和生物可降解性,毒性比其他载体低,其特殊的疏水结构利于药物装载和控制释放;而有机仿生纳米载体是通过设计仿生或利用生物内源性材料作为递送载体,具有良好的生物膜转运特性、高生物相容性和特异靶向机制,通过载体的结构修饰和转化,可将药物输送到靶部位^[5]。与传统的有机纳米载体相比,无机纳米载体不仅具有独特的光、磁、电等物理学性能,而且其在水溶液中具有高分散性和物理稳定性、粒子大小及形态简单可控、易于表

面修饰,因此在药物载体方面展现出良好的前景^[6]。纳米载体材料在形状、大小、疏水性和表面电荷等方面的高度可调节性,有望将生物大分子药物高效递送到靶部位,改变罕见病治疗领域缺药和费用高的现状。本文以罕见病种类为分类依据,着重介绍纳米载体类型、相关制备技术、作用机制和疗效评价,为罕见病的治疗提供新思路。

1 神经系统罕见病

1.1 多发性硬化(multiple sclerosis, MS)

1.1.1 聚合物纳米载体

MS是由自身反应性T细胞功能障碍引起的免疫反应,与髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)、髓鞘蛋白脂蛋白(proteolipid protein, PLP)和髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)受损有关。免疫抑制剂常用于控制此类疾病,但长期给药带来的非特异性免疫抑制等不良反应限制了其使用,目前出现的抗原特异性免疫疗法,能够诱导对疾病特异性自身抗原的耐受性,而不抑制全身免疫系统。有研究团队以聚乙丙交酯(poly(L-lactide-co-glycolide), PLGA)为载体,负载PLP^[7,8]或MOG^[9],通过间接调节自身反应性T细胞来诱导免疫耐受,降低自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型小鼠的严重程度。与间接诱导耐受策略不同,Pei等^[10]采用溶剂蒸发法制备出偶联MOG、抗Fas、细胞程序性死亡-配体1的Fc段(programmed cell death 1 ligand 1-fragment crystallizable, PD-L1-Fc)和簇分化抗原47的Fc段

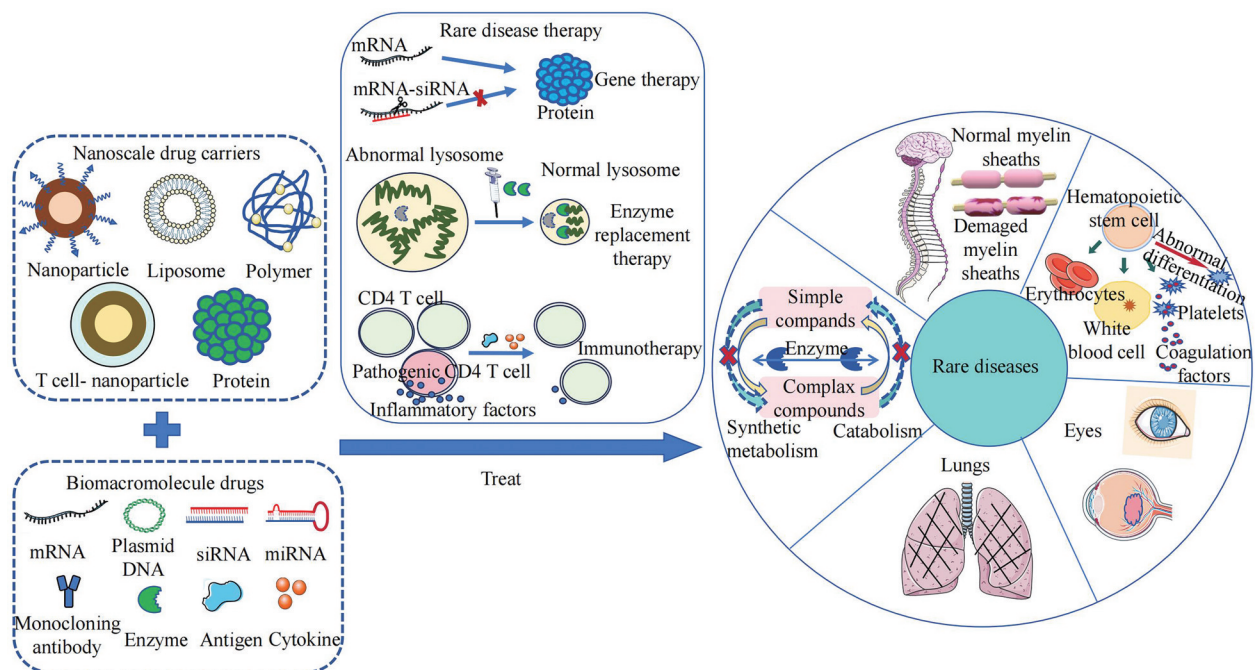


Figure 1 Schematic diagram of biomacromolecule drug nanodelivery systems in the treatment of rare diseases

(cluster of differentiation 47-Fc, CD47-Fc) 的 PLGA 纳米粒 (nanoparticles, NPs), 用于包封转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), 结果显示, 载药纳米粒平均尺寸为 (217 ± 4.5) nm, zeta 电位为 (35.8 ± 8.8) mV, 通过多种配体的表面呈递和细胞因子旁分泌释放直接调节自身反应性 T 细胞, 持久地改善 EAE。

通过不同策略抑制富含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白结构域的 Nogo 受体作用蛋白 -1 (leucine-rich repeat and Ig domain containing 1 gene, LINGO-1), 与不同中枢神经系统脱髓鞘动物模型中髓鞘再生的增强相关, Youssef 团队^[11]制备出 LINGO-1 定向 siRNA 负载的壳聚糖 (chitosan, CS) NPs, 鼻内给药沿细胞外途径直接将药物输送到中枢神经系统 (central nervous system, CNS), 通过 RNA 干扰抑制脑桥中 LINGO-1 的表达。与未治疗组相比, 使用 siRNA NPs 治疗导致 MBP mRNA 和蛋白表达显著升高, 改善了脱髓鞘大鼠的运动性能和组织髓鞘再生。干扰素 β (interferon- β , IFN- β) 作为治疗 MS 的一线疗法, 半衰期短, CNS 通路有限, González 等^[12]将 CS/磺基丁基醚- β -环糊精 (sulfobutylether- β -cyclodextrin, SBE- β -CD) 两种水溶液与 IFN- β 高效混合制备 IFN- β -NPs, 在 MS 临床前模型中, 尽管每周 IFN- β -NPs 鼻内给药的 IFN- β 总量减少了 78%, 药效却明显优于游离 IFN- β 全身给药, 临床症状显著改善, 运动障碍和神经损伤恢复。

1.1.2 脂质体 (liposome, LIP)

Krienke 等^[13]把含有 1-甲基假尿苷 (m1 Ψ) 的 mRNA 装载到缺乏佐剂能力的 LIP 中, 以将 mRNA 编码的抗原全身递送到淋巴组织驻留的 CD11c 抗原呈递细胞。m1 Ψ mRNA-LIP 不会诱导炎症细胞因子或激活免疫细胞, 并允许更高和更长的抗原表达, 通过减少效应 T 细胞和调节性 T 细胞群体的发育来发挥免疫抑制作用。

1.1.3 有机仿生纳米载体

Carnasciali 等^[14]开发了一种基于纳米技术的细胞介导的药物传递系统, 在抗原特异性 T 细胞中装载具有抗 CD20 的功能化磁性氧化铁纳米颗粒 (iron-oxide nanoparticles, NBR)。在 EAE 动物模型中发现, 单独注射抗 CD20 只会耗尽小鼠脾脏中的 B 细胞, 而这种 T 细胞-NBR-抗 CD20 复合物可跨越血脑屏障, 同时消耗小鼠外周和中枢神经系统的 B 细胞, 从而改善病程和病理。

1.1.4 无机纳米载体

Rezaei 等^[15]将软骨素酶 ABC I (chondroitinase ABC, ChABC) 固定多孔硅纳米颗粒 (porous silicon nanoparticles, Psi NPs) 上制得 ChABC@Psi, 以提高酶

在体内的稳定性和功能, 减少注射次数。在脱髓鞘小鼠模型体内, ChABC@Psi 通过去除体内硫酸软骨素蛋白聚糖、募集少突胶质前体细胞来增强髓鞘再生, 减少脱髓鞘面积。

1.2 其他

杜氏肌营养不良症 (duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种遗传性疾病, 由肌营养不良蛋白基因的无义或移码突变引起。Hersh 团队^[16]开发了一种用骨骼肌靶向肽、用于细胞内转运的动力蛋白轻链 8 (dynein light chain 8 protein, DLC8) 结合肽和用于核摄取的核定位信号肽修饰的 G5 聚酰胺 (G5 polyamidoamine, G5 PAMAM) 树突状聚合物-DNA 复合物, 筛选出多链体为 200 nm 的处方, 可将微肌营养不良蛋白基因靶向递送到骨骼肌细胞, 并有效表达蛋白质, 进而改善 DMD 的肌肉功能。

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是一类由脊髓前角运动神经元和脑干运动神经核变性导致肌无力和肌萎缩的疾病。Kim 等^[17]报告了一种自组装人工 pri-miRNA, 将其包封到脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 中, 通过基因沉默和剪接调节来提供多模态基因调控可为治疗 SMA 提供协同治疗效果。

角鲨烯 (squalenoyl, SQ) 是一种天然和生物相容的脂质, 且药物-SQ NPs 的合成和制备很容易, 是一个灵活的药物递送平台。Boutary 团队^[18]将针对外周髓磷脂蛋白 22 (peripheral myelin protein 22, PMP22) 的 siRNA 与 SQ 进行生物偶联, 对偶联物进行 HPLC 纯化后在丙酮:水 (体积比 1:2) 中通过纳米沉淀制备 NPs 来治疗由 PMP22 的过表达引起的 1A 型腓骨肌综合征 (Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1A)。其剂量给药使 CMT1A 转基因小鼠模型的 PMP22 蛋白水平正常化, 改善了运动和神经肌肉活动, 恢复电生理终点并触发轴突髓鞘再生。

视神经脊髓炎 (neuromyelitis optica, NMO) 的发病机制与自身免疫反应和抗水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) 自身抗体的产生有关, 有研究者^[19]用羧化聚缩水甘油 (carboxylated polyglycidol, PG8MG) LIP 包封 AQP4 肽 201~220, 以诱导 AQP4 抗原肽免疫耐受。结果发现, PG8MG LIP 的粒径为 164.4 nm, zeta 电位为 -45.7 mV, 分布到淋巴结, 且可以将抗原肽递送至树突状细胞, 进而诱导免疫耐受。

2 代谢缺陷罕见病

2.1 溶酶体贮积症 (lysosomal storage disorder, LSD)

2.1.1 黏多糖贮积症 (mucopolysaccharidosis, MPS)

MPS 根据患者症状和影像学表现不同, 分为 MPS I 至 MPS IX 型, 有团队对 I 型、II 型和 IV 型进行了纳米

药物递送的研究。

2.1.1.1 聚合物纳米粒 Salvalaio 等^[20]制备了负载异硫氰酸荧光素结合物 (fluorescein isothiocyanate conjugate, FITC)-白蛋白的 PLGA NPs, 并用 7-氨基酸糖肽 (7-aminoacid glycopeptide, g7) 修饰以靶向递送到大脑。MPS I 和 MPS II 小鼠的体内实验首次证明 g7-NPs 可以携带高分子质量的分子跨过血脑屏障, 向大脑输送。该研究结果鼓励使用酶负载的 g7-NPs 进行实验, 以将足量药物输送到 LSD 的大脑区域, 进而纠正病理表型。

2.1.1.2 脂质体 (LIP) MPS I 是一组由 α -L-艾杜糖苷酶 (alpha-L-iduronidase gene, IDUA) 缺乏引起的遗传性 LSD, 其特征是糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAG) 的积累。Vera 等^[21]将编码 Cas9 核酸酶 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas9) 系统和编码靶向 Rosa26 位点的 IDUA 基因的两个质粒 (pDNA) 与添加了 1,2-二油酰基-*sn*-甘油-3-三甲基丙烷铵 (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-trimethylammonium propane, DOTAP) 的 LIP 络合得到黏膜黏附复合物, 能够有效渗透猪鼻黏膜, 与未治疗组相比, MPS I 小鼠心脏 IDUA 活性显著增加, 血清、尿液、组织和大脑皮层中的 GAG 水平降低, 小鼠行为改善。

2.1.1.3 纳米乳 (nanoemulsions, NM) Fraga 团队^[22]先将编码 IDUA 基因的质粒 (pIDUA) 与 DOTAP 以不同电荷比络合, 采用高压均质法制备由中链甘油三酯 (medium chain triglycerides, MCT)、1,2-二硬脂酰基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺-*N*-[氨基(聚乙二醇)-2000](1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino (polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG)、DOTAP 和 1,2-二油酰-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺 (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE) 组成的 NM, 再将预制的 pIDUA-DOTAP 络合物吸附或包裹到 NM 的油芯中, 得到不同处方的含药 NM。MPS I 基因敲除小鼠中静注后, 发现较高电荷比 +4/-1 的 pIDUA NM 在肺和肝中 IDUA 活性 (荧光测定) 和表达 (RT-qPCR) 显著增加。另有团队^[23]采用同法获得了电荷比为 +4/-1 的 pIDUA/NM, 鼻腔给药后 MPS I 小鼠大脑、肾脏和脾脏组织中的 IDUA 表达和活性增强。此后, 该团队又制备 NM 共载 CRISPR/Cas9 质粒和供体寡核苷酸, 成功转染 MPS I 患者的成纤维细胞并产生 IDUA^[24]。

2.1.1.4 纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carriers, NLC) IVA 黏多糖贮积症 (mucopolysaccharidosis IVA, Morquio A) 由溶酶体酶 *N*-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶 (*N*-acetylgalactosamine-6-sulfate-sulfatase, GALNS) 缺乏引起, 目前, 临床上的治疗以静脉注射重

组 GALNS 酶和造血干细胞移植为主, 但酶在进入体内会快速降解和清除, Álvarez 等^[25]通过快速化和低温固化技术发明了一种带有凝胶核心的聚乙二醇化 NLC 来封装 elosulfase α (一种重组 GALNS 酶), 体外细胞实验证实了包封在 NLC 中的酶能被溶酶体内化, 酶活性和稳定性得到保留; 小鼠体内生物分布研究表明, NLC 能够到达脑、软骨和骨骼等不易接近的组织。

2.1.2 尼曼-匹克病 (Niemann-Pick disease, NPD)

NPD 主要分为 A、B、C 三型, B 型尼曼-匹克病由酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, ASM) 缺乏引起, 导致鞘磷脂在全身细胞中大量积累, 主要在肝脏、脾脏和肺中。

2.1.2.1 聚合物纳米载体 Garnacho 等^[26]使用 PLGA/聚苯乙烯 (polystyrene, PS) 纳米载体负载 ASM, 在表面偶联细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 抗体以实现靶向递送, 增加肺对酶的摄取。与裸酶相比, ASM 敲除小鼠单次静脉注射抗 ICAM/ASM 纳米载体后, 肺、肝和脾中的 ASM 活性增强, 肺鞘磷脂储存和巨噬细胞浸润减少, NPD-B 炎症表型减弱。

2.1.2.2 LIP Aldosari 团队^[27]将重组人酸鞘磷脂酶 (Olipudase alfa, rhASM) 装载到 LIP 制剂中, 递送到细胞内。相对于游离 rhASM, 鞘磷脂的细胞外降解减少了 61%, 大大降低了由于 rhASM 在细胞外降解鞘磷脂时神经酰胺的全身释放而表现出剂量依赖性毒性; NPD-B 成纤维细胞中累积的溶血鞘磷脂降低了 71%, 而使用游离 rhASM 酶时为 55%, 证明 rhASM-LIP 的有效和安全性。

C1 型 NPD (NPC1) 是一种溶酶体胆固醇贮积症, 由 NPC1 基因突变引起, 有研究者^[28]将表达 NPC1 的质粒封装在 100 nm 聚乙二醇化的特洛伊木马脂质体 (trojan horse liposomes, THLs) 中, 在表面偶联受体特异性单克隆抗体 (monoclonal antibody, MAb), 以靶向表达转铁蛋白受体的器官。NPC1 小鼠体内试验显示, THLs 静脉内给药减少了大脑和外周器官中的由胆固醇蓄积而产生的组织包涵体, 但小鼠寿命并未延长, 可能需要早期干预。

2.1.3 法布雷病 (Fabry disease, FD)

FD 是由编码溶酶体酶 α -半乳糖苷酶 A (α -galactosidase A, α -Gal A) 的基因突变引起, 酶的缺乏导致鞘糖脂 (主要是三酰神经酰胺球蛋白 (globotriaosylceramide, Gb3)) 在溶酶体中积累, 目前采用 α -Gal A 替代疗法来阻止疾病进展。

2.1.3.1 固体脂质纳米颗粒 (solid lipid nanoparticles, SLN) Rodríguez-Castejón 等^[29]采用热熔乳化技术制

备了一种 SLN, 负载编码 α -Gal A 的质粒 DNA, 并用半乳糖甘露聚糖 (galactomannan, GM) 修饰以靶向肝脏来表达 α -Gal A。肝细胞体外研究显示 GM-SLN 载体能有效被细胞摄取并转染; 与未治疗组相比, 静脉给药后 FD 小鼠心脏和肾脏中的酶活性分别提高 6 倍和 2 倍。

2.1.3.2 白蛋白纳米粒 人血清白蛋白上有许多药物结合位点, 并且表面具有多功能基团, 可用配体进行修饰, 成为优异的仿生型药物递送载体。Lee 团队^[30]来自家蚕的 30Kc19 蛋白和人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 作为载体, 通过脱溶剂化法制备了负载有 α -Gal A 的 30Kc19-HSA NPs, 在 FD 成纤维细胞中显示出增强的 Gb3 降解, 30Kc19 含量占 50% 时 Gb3 降解量达 47%, 比 HSA NPs 高 3.8 倍, 比 α -Gal A 本身高 1.6 倍。

2.2 氨基酸代谢缺陷

2.2.1 LNP

苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU) 是由肝脏中促进苯丙氨酸 (phenylalanine, PHE) 分解代谢的苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 基因突变引起的, 血液和组织中的 PHE 水平升高。目前可用的 LNP 会诱导肝损伤并引发强烈的免疫反应, Perez-Garcia 团队^[31]开发出一种名为 LUNAR (lipid-enabled and unlocked nucleic acid modified RNA) 的 LNP, 由 4 种脂质成分组成 [Arcturus 专有可电离阳离子脂质 (Arcturus' proprietary ionizable cationic lipid, ATX)、胆固醇、1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱 (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DSPC) 和聚乙二醇化脂质], 是一种安全、可重复和有效的 mRNA 递送平台, 可用于治疗需要蛋白质替代的疾病。该团队利用微流体装置将密码子优化的编码人类 PAH 的全长 mRNA 封装在专有的 LUNAR 中, 静注后递送给 PAH 基因错义突变小鼠模型, 在肝细胞中高水平表达 PAH 蛋白并恢复 PHE 的代谢。有研究团队^[32]采用同样的方法分别将 3 种植物来源的 PHE 解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) mRNA 负载到 LNP 上, 产生的 PAL 蛋白成功降低血清 PHE 水平, 证明了植物性 PAL 蛋白可替代细菌性 PAL 来降低免疫原性反应。

精氨酸酶缺乏症 (arginase deficiency, hyperargininemia, HA) 由尿素循环的最后一步精氨酸酶 1 (arginase 1, ARG1) 的双等位基因突变引起, 生化结果为高精氨酸血症和胍基化合物的存在。Truong 等^[33]将密码子优化的 hARG1 mRNA 包封在可生物降解的肝脏靶向 LNP 中, 静脉注射到 ARG1 缺陷小鼠模型体内, 存活率延长 8 周, 生化指标表现出良好的控制。后来, 在 ARG1 敲除小鼠模型体内发现, ARG1 mRNA LNP

可以预防与精氨酸酶缺乏相关的髓鞘形成异常^[34]。

1 型肝肾酪氨酸血症 (hepatorenal tyrosinemia type 1, HT-1) 由延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (fumarylacetoacetate hydrolase, FAH) 突变引起, Cheng 等^[35]筛选出一种名为 5A2-SC8 的树枝状大分子脂质聚合物, 装载 FAH mRNA 成功制备树枝状脂质纳米颗粒 (mRNA-loaded dendrimer lipid nanoparticles, mDLNP)。肝功能受损的 HT-1 小鼠模型静脉给药后, 通过流式细胞术发现转染了肝脏 > 44% 的肝细胞, mRNA 的递送效力提高, 在低 mRNA 剂量下可产生高 FAH 蛋白水平, 并且在小鼠模型中耐受性良好, 体重和肝功能持续正常化。

2.2.2 融合蛋白载体

瓜氨酸血症 I 型 (citrullinemia type I, CTLN-I) 由于精氨酸琥珀酸合成酶 (argininosuccinate synthetase, AS) 的缺失或缺乏所致, 会导致尿素循环异常, 氨在血液和脑脊液中有害地积聚。大多数治疗性外源性蛋白质不能到达细胞质, 酶替代疗法受限, Knox 等^[36]把细胞通透性微型蛋白 ZF5.3 (ZF) 和 AS 融合得到一种融合蛋白, 并成功转运到培养细胞的细胞质, AS 浓度为内源性的 3~10 倍。结果显示, 融合蛋白 ZF-AS 在体外具有催化活性, 在血浆中稳定, 并能成功转运到 Saos-2 和人肝癌细胞 (human hepatocarcinoma cells, SK-HEP-1) 的细胞质中, 作为在细胞质中起作用的治疗性蛋白质。相应地, 通过静脉给药也能将 AS 递送到健康小鼠肝脏, 且肝脏中浓度比基线高出近 200 nmol·L⁻¹。

2.2.3 双纳米颗粒

鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症 (ornithine transcarbamylase deficiency, OTCD) 是由尿素循环中主要在肝脏中表达的关键酶丢失引起的, 导致血液中氨水平升高。Prieve 等^[37]描述了一种新的双纳米颗粒 mRNA 传递系统, 由两部分组成: 一部分为惰性 LNP, 它可以保护 mRNA 免受血液中核酸酶的影响; 另一部分为靶向肝细胞并触发 mRNA 内吞体释放的二嵌段聚合物胶束, 将 mRNA/LNP 和聚合物溶液混合, 静脉注射至 OTCD 小鼠模型, 导致肝脏中 mRNA 表达急剧增加, 酶活性提高 2 倍, 肝脏中所需蛋白质高水平合成, 且血浆氨和尿乳清酸水平正常化, 生存期延长。

2.3 其他

有不同的研究团队分别用 LNP 负载编码人线粒体酶丙酰辅酶 A 羧化酶 (propionyl-CoA carboxylase, PCC) PCCA 和 PCCB 的双 mRNA^[38]、编码人甲基丙二酰辅酶 A 变位酶 (human methylmalonyl-CoA mutase, hMUT) 的 mRNA^[39]、Galnac 偶联修饰 siRNA^[40]、编码人类半乳糖-1-磷酸: 尿苷基转移酶 (galactose-1-

phosphate: uridylyltransferase, GALT) 的 mRNA^[41], 通过促进或抑制特定蛋白的表达来改善丙酸血症 (propionic acidemia/aciduria, PA)、甲基丙二酸血症 (isolated methylmalonic acidemia/aciduria, MMA)、急性肝卟啉病 (acute hepatic porphyrias, AHP) 和经典半乳糖血症 (classic galactosemi, CG) 的症状。

3 眼及附器罕见病

3.1 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB)

3.1.1 LNP

Tabatabaei 等^[42]使用 pH 敏感的阳离子脂材通过薄膜水化法制备 LNP, 共同包封马法兰 (melphalan) 和 miR-181a, 以特异地递送到 RB 细胞质中。发现其转染 Y-79 细胞的能力极强, 且与空白 LNP 相比, 用 LNP/miR-181a 处理的细胞活力降低 27%, 当 LNP/miR-181a 与 LNP/melphalan 共处理使活力降低 33%, 当两种活性物质在同一 LNP 内递送时活力再降 10%。在 RB 大鼠模型中, 也同样证明这种联合治疗的效力, 允许减少 melphalan 的给药剂量。存活蛋白 (Survivin) 是迄今为止发现的具体的癌症靶标之一, 有研究团队^[43]利用微流控方法制备直径 (133 ± 2) nm、zeta 电位 (31.5 ± 4.1) mV、包封率 96.37% ± 1.35% 的负载 Survivin siRNA 的 LNP, 发现其在人乳腺癌细胞 (Michigan Cancer Foundation-7, MCF7) (84%)、A549 细胞 (78%) 和 HeLa 细胞 (92%) 中有更好地沉默存活蛋白基因的作用, 具有细胞系依赖性。还探索了永生化的 Y79 细胞和原代 RB 人细胞体外模型中 Survivin 沉默和化疗药物之间的协同作用, Survivin siRNA 处理的选择是减少治疗剂量和减轻对健康细胞毒性的一种有希望的策略。

3.1.2 配体修饰纳米粒

纳米级基因递送系统的使用很有吸引力, 因为它们具有高度可调的结构, 可以携带治疗剂和成像剂。有研究报道了一种叶酸 (folic acid, FA) 修饰的相变阳离子 NPs, 包封液全氟戊烷 (perfluoropentane, PFP) 和吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 得到 FA-CN-PFP-ICG, 其表现出良好的靶向能力, 能在相当长的时间内提供最佳光声和超声对比度, 且 FA-CN-PFP-ICG/pD-NA + 激光系统在体内也表现出最佳的治疗效果, 为 RB 的临床检测和治疗奠定了实验基础^[44]。

3.2 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP)

3.2.1 壳聚糖纳米粒

RP 由 60 多个基因的突变引起, 通过外源性施用睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 和抑瘤素 M (oncostatin M, OSM) 来治疗, 以保留现有的视网膜解剖结构和视觉功能, 是一种合理的策略, 但

直接给药会迅速降解, Yang 等^[45]首先合成硫酸葡聚糖-壳聚糖纳米粒 (dextran sulfate-chitosan nanoparticles, DSCS NPs), 核心部位将壳聚糖与丁二酸交联后, 将 CNTF 或 OSM 负载到外壳上得到 CNTF/OSM-NPs, 粒径在 317~338 nm, zeta 电位在 -39 mV 左右。两种营养因子-NPs 的单次玻璃体内递送在 RP 动物模型中提供了神经保护。

3.2.2 硅基纳米颗粒

Valdés-Sánchez 等^[46]采用溶胶-凝胶法合成负载质粒 DNA 的胺化介孔二氧化硅基纳米颗粒 (amino-functionalized mesoporous silica-based nanoparticles, N-MSiNPs), 通过表面胺化修饰来改善与带负电荷的核酸的结合。结果表明, N-MSiNPs 能够在体外将外源性 pre-mRNA 加工因子 31 (pre-mRNA processing factor 31, PRPF31) 基因递送到人体细胞, 在体内通过视网膜下注射能够递送到小鼠视网膜的色素上皮细胞层且安全性良好。

4 呼吸系统罕见病

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性和进行性致命的间质性肺疾病, 其特征是成纤维细胞的异常转化和增殖, 巨大的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积在肺实质中, 导致气体交换逐渐失败和患者死亡。尽管 FDA 批准的新的抗纤维化药物尼达尼布和吡非尼酮改善了患者的健康状况, 但预后仍然很差, 5 年死亡率仍在 70%~80% 之间, 迫切需要开发有效的 IPF 治疗方法。

4.1 LIP

Wang 等^[47]证实肺纤维化的发病机制 Srxp2 过表达有关, 并制备出负载 Srxp2 siRNA 的阳离子 LIP, 气管内给药后通过阻断成纤维细胞到肌成纤维细胞的转化来逆转肺纤维化。另有研究团队设计出负载 Sart1 siRNA^[48]和 Mecp2 siRNA^[49]的阳离子 LIP, 通过调节巨噬细胞极化来减轻肺纤维化。

4.2 NLC

Garbuzenko 等^[50]将前列腺素 E (prostaglandin E, PGE2) 与 3 种 siRNA [分别靶向基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase 3, MMP3)、趋化因子 (chemokine (C-C motif) ligand 12, CCL12) 和缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible-factor, HIF1-A)] 联合负载到 NLC 中, 小鼠模型气管内吸入给药后, 体重和肺部羟脯氨酸含量显著降低, 并干扰了 mRNA 表达, 可限制肺组织损伤并提高动物存活率。这种效果不能通过单独使用仅含有 PGE2 或 siRNA 的 NLC 来实现, 且 PGE2 与 3 种 siRNA 联合治疗后小鼠模型肺部纤维化组织的体积与博莱霉素组相比, 降低了约 3/4, 几乎达健康水平。

4.3 聚合物和脂质自组装载体

白细胞介素-11 (interleukin-11, IL-11) 是一种促纤维化细胞因子, 驱动 IPF 发病机制的基础过程, Bai 等^[51]使用可生物降解的 PLGA-PEG 二嵌段共聚物和自制的阳离子脂质样分子 G0-C14 自组装配制成可吸入和黏液穿透纳米颗粒 (PPGC NPs), 用于负载针对 IL-11 的 siRNA 以实现 siIL-11 的高效经黏膜递送。无创气溶胶吸入通过抑制细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和 Smad2 信号转导, 阻碍成纤维细胞分化并减少 ECM 沉积。

5 其他

近 10 年内, 研究学家曾试图利用基因药物共载的 LNP^[52] 等作为纳米药物传输系统, 来研究人类难以根治的血友病 (hemophilia), 也有研究者^[53] 将抗 miRNA 质粒和纳米材料结合, 为常染色体显性遗传性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 的治疗提供了潜在的临床意义。对于纳米药物递送系统治疗罕见病的研究, 除递送生物大分子药物之外, 仍有不少研究团队使用纳米载体递送小分子药物, 如亨廷顿舞蹈症^[54,55]、强直性肌营养不良^[56]、结节性硬化症^[57,58]、枫糖尿症^[59]、肝豆状核变性^[60,61]、淋巴瘤肌病^[62-64]、系统性硬化症^[65,66]、镰刀型细胞贫血症^[67] 等。

文中采用溶剂蒸发、薄膜水合、纳米沉淀、微流控和高压均质等制备方法, 构建了 PLGA NPs、CS NPs、Psi NPs、LIP、G5 PAMAM 聚合物载体、LNP、NM、NLC、有机仿生纳米载体等递送载体, 包载核酸、蛋白等生物大分子药物, 体内外试验评价神经系统、代谢系统、眼部、呼吸系统相关 22 种罕见病的治疗效果。

6 展望

相较于小分子药物, 生物大分子药物药理活性的发挥更加依赖于安全高效的递药系统, 国家高度重视罕见病患者用药问题, 生物大分子纳米递送系统的研发前景广阔。但同时其在罕见病的治疗探索中又受到许多限制: 第一, 大多数罕见病的发病机制尚不明确, 基础研究缺乏不利于罕见病的精准治疗, 而且治疗效果存在很大的基因异质性, 难以普适推广。未来要加深对罕见病发病机制及疾病进程的研究, 不断寻找新的药物靶点, 提高药物递送效率。第二, 罕见病患者人群总体数量较少, I 期临床试验数据的缺乏, 在一定程度上减慢了孤儿药的研发速度, 且纳米药物处于研发早期, 大部分仍停留在动物模型阶段, 很少有成功案例转化为临床试验和应用。第三, 纳米材料蓄积产生的安全性问题不可忽视, 有报道体外无细胞毒性的空白 PLGA, 健康大鼠体内显示轻度毒性信号^[68], 需要再做

进一步考察。这要求作者必须对新开发的纳米材料提出要求, 或者对已有载体材料进行合理优化, 降低对机体的毒性。基于生物大分子的自身特点, 其与纳米递药系统的结合更加有利于提高它的成药性, 有研究报道采用有机与无机结合的纳米载体递送拉罗尼酶, 通过长期酶替代疗法来治疗 MPSI^[69]。必须指出的是, 尽管临床前研究中取得了一些成果, 但进入临床试验后效果不尽如人意, 生物大分子纳米药物的上市仍困难重重, 因此在递送过程中生物大分子如何保持活性稳定、成功穿透体内多种生物屏障、实现准确的靶向递送进入细胞发挥作用仍是纳米药物递送系统研究的难点和发展方向。随着人类对罕见病的认识逐渐深入, 新纳米材料的开发, 及与更多技术的联合应用, 将有效助力生物活性大分子在体内的高效递送。

作者贡献: 魏淑洁、何函星负责文献检索和论文撰写及修改; 何朝星、向柏负责论文选题和写作指导; 郝锦涛、吕芊芊负责论文校对; 杨少坤、刘丁阳负责论文的结构调整和优化; 张会丰负责论文的专业性和规范性审阅。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Fu MP, Merrill SM, Sharma M, et al. Rare diseases of epigenetic origin: challenges and opportunities [J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1113086.
- [2] Lv TT, Jia JD. Rare liver diseases are not rare in China [J]. *Liver Int*, 2022, 42: 2023-2028.
- [3] Zhang ZX, Coniot J, Amorim J, et al. Nucleic acid-based therapy for brain cancer: challenges and strategies [J]. *J Control Release*, 2022, 350: 80-92.
- [4] Wong KH, Guo ZP, Law M, et al. Functionalized PAMAM constructed nanosystems for biomacromolecule delivery [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11: 1589-1606.
- [5] He YY, Zhou WB, Tai QW, et al. Application and mechanism of nanomedicine and nanomaterials in antibacterial infection therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学期报)*, 2023, 58: 106-117.
- [6] Xu HT, Wu YH, Shi JF, et al. Research progress of photothermal therapy combined with chemotherapy based on nano co-delivery strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学期报)*, 2020, 55: 1774-1783.
- [7] Saito E, Kuo R, Kramer KR, et al. Design of biodegradable nanoparticles to modulate phenotypes of antigen-presenting cells for antigen-specific treatment of autoimmune disease [J]. *Biomaterials*, 2019, 222: 119432.
- [8] Saito E, Gurczynski SJ, Kramer KR, et al. Modulating lung immune cells by pulmonary delivery of antigen-specific nanoparticles to treat autoimmune disease [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eabc9317.
- [9] Gholamzad M, Baharloo H, Shafiee Ardestani M, et al.

- Prophylactic and therapeutic effects of MOG-conjugated PLGA nanoparticles in C57Bl/6 mouse model of multiple sclerosis [J]. *Adv Pharm Bull*, 2021, 11: 505-513.
- [10] Pei WY, Wan X, Shahzad KA, et al. Direct modulation of myelin-autoreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in EAE mice by a tolerogenic nanoparticle co-carrying myelin peptide-loaded major histocompatibility complexes, CD47 and multiple regulatory molecules [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 3731-3750.
- [11] Youssef AEH, Dief AE, El Azhary NM, et al. LINGO-1 siRNA nanoparticles promote central remyelination in ethidium bromide-induced demyelination in rats [J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75: 89-99.
- [12] González LF, Acuña E, Arellano G, et al. Intranasal delivery of interferon- β -loaded nanoparticles induces control of neuroinflammation in a preclinical model of multiple sclerosis: a promising simple, effective, non-invasive, and low-cost therapy [J]. *J Control Release*, 2021, 331: 443-459.
- [13] Krienke C, Kolb L, Diken E, et al. A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Science*, 2021, 371: 145-153.
- [14] Carnasciali A, Amoriello R, Bonechi E, et al. T cell delivery of nanoparticles-bound anti-CD20 monoclonal antibody: successful B cell depletion in the spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 16: 376-389.
- [15] Rezaei S, Dabirmanesh B, Zare L, et al. Enhancing myelin repair in experimental model of multiple sclerosis using immobilized chondroitinase ABC I on porous silicon nanoparticles [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 146: 162-170.
- [16] Hersh J, Condor Capcha JM, Iansen Irion C, et al. Peptide-functionalized dendrimer nanocarriers for targeted microdystrophin gene delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 2159.
- [17] Kim H, Jang BR, Lee D, et al. Artificial primary-miRNAs as a platform for simultaneous delivery of siRNA and antisense oligonucleotide for multimodal gene regulation [J]. *J Control Release*, 2022, 349: 983-991.
- [18] Boutary S, Caillaud M, El Madani M, et al. Squalenoyl siRNA PMP22 nanoparticles are effective in treating mouse models of charcot-marie-tooth disease type 1 A [J]. *Commun Biol*, 2021, 4: 317.
- [19] Muraki Y, Nishimoto Y, Yamasaki M, et al. The evaluation of lymph node cell proliferation response by liposomes loaded with major histocompatibility complex class II binding aquaporin 4 antigen peptide [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85: 537-544.
- [20] Salvalaio M, Rigon L, Belletti D, et al. Targeted polymeric nanoparticles for brain delivery of high molecular weight molecules in lysosomal storage disorders [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0156452.
- [21] Vera LNP, Schuh RS, Fachel FNS, et al. Brain and visceral gene editing of mucopolysaccharidosis I mice by nasal delivery of the CRISPR/Cas9 system [J]. *J Gene Med*, 2022, 24: e3410.
- [22] Fraga M, Bruxel F, Diel D, et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model [J]. *J Control Release*, 2015, 209: 37-46.
- [23] Schuh RS, Bidone J, Poletto E, et al. Nasal administration of cationic nanoemulsions as nucleic acids delivery systems aiming at mucopolysaccharidosis type I gene therapy [J]. *Pharm Res*, 2018, 35: 221.
- [24] Schuh RS, de Carvalho TG, Giugliani R, et al. Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 122: 158-166.
- [25] Álvarez JV, Herrero Filgueira C, González AF, et al. Enzyme-loaded gel core nanostructured lipid carriers to improve treatment of lysosomal storage diseases: formulation and *in vitro* cellular studies of elosulfase alfa-loaded systems [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11: 522.
- [26] Garnacho C, Dhami R, Solomon M, et al. Enhanced delivery and effects of acid sphingomyelinase by ICAM-1-targeted nanocarriers in type B niemann-pick disease mice [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 1686-1696.
- [27] Aldosari MH, de Vries RP, Rodríguez LR, et al. Liposome-targeted recombinant human acid sphingomyelinase: production, formulation, and *in vitro* evaluation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 137: 185-195.
- [28] Jiang DH, Lee H, Partridge WM. Plasmid DNA gene therapy of the niemann-pick C1 mouse with transferrin receptor-targeted trojan horse liposomes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 13334.
- [29] Rodríguez-Castejón J, Gómez-Aguado I, Beraza-Millor M, et al. Galactomannan-decorated lipidic nanocarrier for gene supplementation therapy in fabry disease [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2022, 12: 2339.
- [30] Lee HJ, Park HH, Sohn Y, et al. α -Galactosidase delivery using 30Kc19-human serum albumin nanoparticles for effective treatment of fabry disease [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 10395-10402.
- [31] Perez-Garcia CG, Diaz-Trelles R, Vega JB, et al. Development of an mRNA replacement therapy for phenylketonuria [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 28: 87-98.
- [32] Diaz-Trelles R, Lee S, Kuakini K, et al. Lipid nanoparticle delivers phenylalanine ammonia lyase mRNA to the liver leading to catabolism and clearance of phenylalanine in a phenylketonuria mouse model [J]. *Mol Genet Metab Rep*, 2022, 32: 100882.
- [33] Truong B, Allegri G, Liu XB, et al. Lipid nanoparticle-targeted mRNA therapy as a treatment for the inherited metabolic liver disorder arginase deficiency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

- 2019, 116: 21150-21159.
- [34] Khoja S, Liu XB, Truong B, et al. Intermittent lipid nanoparticle mRNA administration prevents cortical dysmyelination associated with arginase deficiency [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 28: 859-874.
- [35] Cheng Q, Wei T, Jia YM, et al. Dendrimer-based lipid nanoparticles deliver therapeutic FAH mRNA to normalize liver function and extend survival in a mouse model of hepatorenal tyrosinemia type I [J]. *Adv Mater*, 2018, 30: e1805308.
- [36] Knox SL, Wissner R, Piszkiwicz S, et al. Cytosolic delivery of argininosuccinate synthetase using a cell-permeant miniature protein [J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7: 641-649.
- [37] Prieve MG, Harvie P, Monahan SD, et al. Targeted mRNA therapy for ornithine transcarbamylase deficiency [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 801-813.
- [38] Jiang L, Park J, Yin L, et al. Dual mRNA therapy restores metabolic function in long-term studies in mice with propionic acidemia [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5339.
- [39] An D, Schneller JL, Frassetto A, et al. Systemic messenger RNA therapy as a treatment for methylmalonic acidemia [J]. *Cell Rep*, 2017, 21: 3548-3558.
- [40] Chan A, Liebow A, Yasuda M, et al. Preclinical development of a subcutaneous ALAS1 RNAi therapeutic for treatment of hepatic porphyrias using circulating RNA quantification [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, 4: e263.
- [41] Delnoy B, Haskovic M, Vanoevelen J, et al. Novel mRNA therapy restores GALT protein and enzyme activity in a zebrafish model of classic galactosemia [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2022, 45: 748-758.
- [42] Tabatabaei SN, Derbali RM, Yang C, et al. Co-delivery of miR-181a and melphalan by lipid nanoparticles for treatment of seeded retinoblastoma [J]. *J Control Release*, 2019, 298: 177-185.
- [43] Passos Gibson V, Derbali RM, Phan HT, et al. Survivin silencing improved the cytotoxicity of carboplatin and melphalan in Y79 and primary retinoblastoma cells [J]. *Int J Pharm*, 2020, 589: 119824.
- [44] Wu MX, Xiong H, Zou HM, et al. A laser-activated multifunctional targeted nanoagent for imaging and gene therapy in a mouse xenograft model with retinoblastoma Y79 cells [J]. *Acta Biomater*, 2018, 70: 211-226.
- [45] Yang JY, Lu B, Feng Q, et al. Retinal protection by sustained nanoparticle delivery of oncostatin M and ciliary neurotrophic factor into rodent models of retinal degeneration [J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2021, 10: 6.
- [46] Valdés-Sánchez L, Borrego-González S, Montero-Sánchez A, et al. Mesoporous silica-based nanoparticles as non-viral gene delivery platform for treating retinitis pigmentosa [J]. *J Clin Med*, 2022, 11: 2170.
- [47] Wang Q, Liu J, Hu YN, et al. Local administration of liposomal-based Srpx2 gene therapy reverses pulmonary fibrosis by blocking fibroblast-to-myofibroblast transition [J]. *Theranostics*, 2021, 11: 7110-7125.
- [48] Pan T, Zhou Q, Miao K, et al. Suppressing Sart1 to modulate macrophage polarization by siRNA-loaded liposomes: a promising therapeutic strategy for pulmonary fibrosis [J]. *Theranostics*, 2021, 11: 1192-1206.
- [49] Mou Y, Wu GR, Wang Q, et al. Macrophage-targeted delivery of siRNA to silence *Mecp2* gene expression attenuates pulmonary fibrosis [J]. *Bioeng Transl Med*, 2022, 7: e10280.
- [50] Garbuzenko OB, Ivanova V, Kholodovych V, et al. Combinatorial treatment of idiopathic pulmonary fibrosis using nanoparticles with prostaglandin E and siRNA(s) [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13: 1983-1992.
- [51] Bai X, Zhao GL, Chen QJ, et al. Inhaled siRNA nanoparticles targeting IL11 inhibit lung fibrosis and improve pulmonary function post-bleomycin challenge [J]. *Sci Adv*, 2022, 8: eabn7162.
- [52] Han JP, Kim M, Choi BS, et al. *In vivo* delivery of CRISPR-Cas9 using lipid nanoparticles enables antithrombin gene editing for sustainable hemophilia A and B therapy [J]. *Sci Adv*, 2022, 8: eabj6901.
- [53] Tsai YC, Teng IL, Jiang ST, et al. Safe nanocomposite-mediated efficient delivery of microRNA plasmids for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8: e1801358.
- [54] Bhatt R, Singh D, Prakash A, et al. Development, characterization and nasal delivery of rosmarinic acid-loaded solid lipid nanoparticles for the effective management of huntington's disease [J]. *Drug Deliv*, 2015, 22: 931-939.
- [55] Li M, Yasumura D, Ma AA, et al. Intravitreal administration of HA-1077, a ROCK inhibitor, improves retinal function in a mouse model of Huntington disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e56026.
- [56] Koebis M, Kiyatake T, Yamaura H, et al. Ultrasound-enhanced delivery of morpholino with bubble liposomes ameliorates the myotonia of myotonic dystrophy model mice [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 2242.
- [57] Le Guyader G, Do B, Rietveld IB, et al. Mixed polymeric micelles for rapamycin skin delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 569.
- [58] Quartier J, Lapteva M, Boulaguiem Y, et al. Polymeric micelle formulations for the cutaneous delivery of sirolimus: a new approach for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex [J]. *Int J Pharm*, 2021, 604: 120736.
- [59] Mescka CP, de Moura Coelho D, Sitta A, et al. Preliminary results of PBA-loaded nanoparticles development and the effect on oxidative stress and neuroinflammation in rats submitted to a chemically induced chronic model of MSUD [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36: 1015-1027.

- [60] Gauthier L, Charbonnier P, Chevallet M, et al. Development, formulation, and cellular mechanism of a lipophilic copper chelator for the treatment of Wilson's disease [J]. *Int J Pharm*, 2021, 609: 121193.
- [61] Ho W, Hu Y, Cheng CW, et al. Liposome-encapsulated curcumin attenuates HMGB1-mediated hepatic inflammation and fibrosis in a murine model of Wilson's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152: 113197.
- [62] Landh E, Moir LM, Gomes Dos Reis L, et al. Inhaled rapamycin solid lipid nano particles for the treatment of lymphangioliomyomatosis [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 142: 105098.
- [63] Landh E, M Moir L, Bradbury P, et al. Properties of rapamycin solid lipid nanoparticles for lymphatic access through the lungs & part i: the effect of size [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2020, 15: 1927-1945.
- [64] Shi YH, Jiao CQ, Lu X, et al. Rapamycin nanoparticles improves drug bioavailability in PLAM treatment by interstitial injection [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2022, 17: 349.
- [65] Xu D, Bhattacharyya S, Wang WX, et al. PLG nanoparticles target fibroblasts and MARCO⁺ monocytes to reverse multiorgan fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2022, 7: e151037.
- [66] González-Sánchez E, Muñoz-Callejas A, Gómez-Román J, et al. Targeted nanotherapy with everolimus reduces inflammation and fibrosis in scleroderma-related interstitial lung disease developed by PSGL-1 deficient mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179: 4534-4548.
- [67] Alp G, Oztas Y. Facile l-glutamine delivery to erythrocytes via DOPC-DPPG mixed liposomes [J]. *J Liposome Res*, 2021, 31: 409-419.
- [68] Fodor-Kardos A, Kiss ÁF, Monostory K, et al. Sustained *in vitro* interferon-beta release and *in vivo* toxicity of PLGA and PEG-PLGA nanoparticles [J]. *RSC Adv*, 2020, 10: 15893-15900.
- [69] Mayer FQ, Adome MD, Bender EA, et al. Laronidase-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: promising formulation for a more effective treatment of mucopolysaccharidosis type I [J]. *Pharm Res*, 2014, 32: 941-954.