

## 上市核酸药物及其脂质纳米递送载体研究进展

崔丽莉\*, 张 勇

(吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130012)

**摘要:** 核酸作为新一代生物技术药物,不但可以从本源上治疗疾病,而且在技术和生产层面均具有显著的平台化特征,因此在医疗领域具有广阔的应用前景。然而,核酸在体内外稳定性差,递送效率低,极大限制了其成药性。近年来,以可离子化脂质为基础的脂质纳米粒展示出良好的临床应用潜力,并在核酸新冠疫苗中得到了验证。脂质纳米粒能够凭借其独特的结构和理化性质特征,在体内展现出较高的递送效率和较好的安全性,为未来核酸药物的临床应用提供了更多可能。本文围绕核酸药物自身特点及其临床应用面临的屏障,结合已获批上市核酸药物,重点阐述其递送载体脂质纳米粒成功的关键要素,并对领域内尚待解决的问题进行展望。

**关键词:** 核酸; 小干扰RNA; 信使RNA; 可离子化脂质; 脂质纳米粒; 体内外递送

中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-0826-08

## Advances in approved nucleic acid drugs and lipid nanoparticle system

CUI Li-li\*, ZHANG Yong

(School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China)

**Abstract:** Nucleic acids, as a next generation of biotechnology drugs, not only can fundamentally treat diseases, but also own significant platform characteristics in view of technology and production. Therefore, nucleic acid-based drugs have broad clinical applications in biomedical fields. However, nucleic acids are degradable and unstable, and have very low intracellular delivery efficiency *in vitro* and *in vivo*, which greatly limits their applications. In recent years, ionizable lipid-based lipid nanoparticles have shown promising application potentials and have been successfully applied to COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) vaccines in clinic. Lipid nanoparticles demonstrate high *in vivo* delivery efficiency and good safety profile due to their unique structural and physicochemical properties, which provides many possibilities for their clinical applications for nucleic acid delivery in the future. This review focused on the characteristics of nucleic acid drugs and their delivery barriers, and discussed the approved nucleic acid drugs to illustrate the key aspects of the success of their delivery carrier system. In addition, problems to be solved in the field were highlighted.

**Key words:** nucleic acid; small interfering RNA; messenger RNA; ionizable lipid; lipid nanoparticles; *in vitro* and *in vivo* delivery

核酸作为重要的遗传物质,处于分子生物学中心法则的上游。即:DNA转录成mRNA,mRNA翻译成蛋白,蛋白维持机体所有的生命活动。蛋白与人类疾

病的发生发展息息相关。蛋白表达的不足、过剩、或者表达的蛋白存在缺陷,均会引起疾病。与蛋白药物相比,核酸药物可以从基因层面依据中心法则进行蛋白表达的调控和纠正,进而实现疾病治疗的目的。理论上,核酸可以靶向所有和疾病相关的蛋白,因此在临床上具有极为广阔的应用前景。现有研究表明,核酸可用于神经性疾病、心血管疾病、癌症等的治疗<sup>[1-3]</sup>,也可

收稿日期: 2022-10-10; 修回日期: 2022-12-26.

\*通讯作者 Tel: 86-431-85167674, E-mail: lilicuinike@gmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1101

用于慢性疾病和传染性疾病的预防<sup>[4]</sup>, 还可以通过基因编辑纠正遗传物质从而治愈罕见性疾病<sup>[5]</sup>。因此, 核酸药物可以拓展疾病治疗的靶点和空间, 对于人类医疗健康具有重大意义。本文基于核酸药物自身特点及其应用面临的屏障, 结合已获批上市核酸药物, 重点阐述其递送载体脂质纳米粒成功的关键要素和领域内尚待解决的问题。

## 1 核酸药物及其作用机制

核酸药物通常由天然或修饰的脱氧核糖核苷或核糖核苷聚合而成, 包括 DNA、RNA、反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 和核酸适配体 (nucleic acid aptamer) 等。其中 RNA 又包括小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、小核糖核酸 (microRNA, miRNA)、短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA)、信使 RNA (messenger RNA, mRNA)、自扩增 RNA (self-amplifying RNA, saRNA) 和环状 RNA (circular RNA, circRNA) 等。

其中, DNA 为双链的多聚脱氧核糖核苷酸。环化的质粒 DNA 能够在细胞核中通过 mRNA 转录来指导靶蛋白的翻译和合成。DNA 分子量通常比较大, 具体取决于所表达的蛋白的大小。DNA 药物递送的靶部位是细胞核, 所以对传递系统和技术的要求比较高, 在核酸药物的开发中最具挑战性。DNA 作为核酸药物的优势是稳定性相对较好, 而且一旦进入细胞核中, 其对靶蛋白的翻译和调控相较于 mRNA 更加持久。

ASOs 通常由 15~25 个核苷酸组成。单链的 ASO 需要通过化学修饰来提高稳定性, 降低免疫原性和改善体内行为<sup>[6]</sup>。修饰的位点通常在糖环和磷酸骨架上。ASO 通过 Watson-Crick 碱基互补配对原则与靶 mRNA 相互作用, 这一相互作用可以发生在细胞浆或细胞核内。ASO 实现靶蛋白下调的机制分为以下两种: ① 通过 RNA-DNA 杂合设计, 使其与靶 mRNA 相结合, 并对 RNase H (ribonuclease H) 核酸酶进行征集, 从而实现靶 mRNA 的特异性降解; ② 通过特异性阻断剪接蛋白和 pre-mRNA 的结合来实现从 pre-mRNA 到成熟 mRNA 的阻碍, 从而实现靶蛋白的调控<sup>[1]</sup>。

核酸适配体为长度 50~120 个碱基的单链核酸。核酸适配体包括 DNA 适配体和 RNA 适配体。尽管与其他核酸同样由 DNA 或 RNA 组成, 但是适配体的作用靶点既不在 pre-mRNA 上, 也不在 mRNA 上, 而是直接作用于靶蛋白, 并通过空间位阻阻断蛋白行使相应功能<sup>[7]</sup>。

siRNA 是 RNA 干扰机制的典型代表, 可以实现靶蛋白的高效沉默。siRNA 为双链 RNA, 由正义和反义链组成。siRNA 的作用位点为细胞浆。细胞浆中的

siRNA 可以与 RNA 介导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 复合。复合后 siRNA 发生双链解聚, 其中正义链离开 RISC 复合体, 反义链继续与 RISC 复合。反义链含有与靶标 mRNA 互补配对的碱基序列, 因此能够引导 RISC 复合物与靶标 mRNA 结合。RISC 复合物中含有核酸降解酶 argonaute, 当 siRNA 反义链结合 mRNA 后, RISC 中的 argonaute 酶就会降解 mRNA, 从而减少 mRNA 对相应蛋白的翻译。

mRNA 可以上调体内靶蛋白的表达。mRNA 在细胞浆中发挥作用, 作用机制为与核糖体结合进行靶蛋白翻译。mRNA 翻译的靶蛋白可以是细胞内蛋白, 也可以被细胞分泌出去, 从而被其他细胞摄取 (如抗原递呈细胞), 或与细胞表面的靶点发生特异性相互作用。mRNA 体内外稳定性较差, 其在细胞内发挥作用的持久性通常也短于 DNA。

目前研究进展较快且已在临床中应用的核酸药物主要有 ASOs、核酸适配体、siRNA 和 mRNA。ASOs 和核酸适配体分子量相对较小, 并可通过化学修饰或共聚确保其体内外稳定性和跨膜转运效率。因此, 目前已上市的 ASOs 和核酸适配体均未涉及纳米递送载体技术。本文将聚焦于依赖于纳米递送载体技术, 并成功上市的 siRNA 和 mRNA 药物。

## 2 RNA 核酸药物的性质和递送屏障

核酸药物与传统小分子药物的物理化学性质差别主要在于分子量和亲疏水性。核酸通常由多个核苷通过磷酸二酯键连接而成, 核苷单元从 20 到 10 000 不等。其中, siRNA 由大约 20~30 个核苷组成, 属于小核酸范畴, 但其分子质量也高达 13 kD 左右。小核酸一般可以通过化学合成的方式获得。mRNA 的核苷数量与其编码的蛋白大小相关, 从 500 到 5 000 不等, 分子量可达 1 000 kD。在编码蛋白完全相同条件下, saRNA (self-amplifying RNA) 通常比 mRNA 大, 可达 9 500 个碱基, 主要是因为 saRNA 中包含了一些自扩增元件<sup>[8]</sup>。这些自扩增原件可显著降低核酸的使用剂量。mRNA 和 saRNA 递送的靶部位均为细胞浆, 均可通过体外转录的方法进行合成。由于合成过程不需要细胞, 因此合成制备工艺相对简单; 而且与抗体和蛋白药物相比, 可避免细胞源性杂质, 纯化工艺也相对简单。核酸药物由于分子量较大, 分子可被攻击破坏的位点较多, 因此稳定性差, 体内易降解, 而且不易进入细胞和亚细胞器发挥作用。另外, 核酸药物的磷酸二酯键骨架使核酸的负电性和亲水性极强, 因此不易跨过细胞膜, 体内递送效率极低。此外, RNA 本身可被机体病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 识别, 激活机体固有免疫系统, 从而

导致核酸在体内的快速清除,降低核酸药物体内利用率<sup>[9]</sup>。

核酸药物的体内递送面临诸多屏障,主要包括细胞外屏障和细胞内屏障(图1)。细胞外屏障,如血液、器官、组织间质中的血浆蛋白复合;单核吞噬细胞系统;血浆核酸酶降解;肝部代谢和肾排泄等<sup>[10]</sup>。细胞内屏障是指核酸跨膜转运,进入细胞后被内涵体包裹,随着内涵体的成熟,内环境pH逐渐下降,呈酸性。同时内涵体-溶酶体内的各种酶在酸性条件下开始活化,并最终导致核酸的降解和破坏。马克斯·普朗克研究所(Max Planck Institute, MPI)和Alnylam公司关于siRNA-LNP的研究<sup>[11]</sup>发现,绝大多数的siRNA都滞留在内涵体-溶酶体系统中,只有约1%~2%的siRNA能从溶酶体逃逸出来,进入细胞浆发挥作用。这一量化研究明确了溶酶体逃逸效率在核酸成药性上的重要性。增加核酸溶酶体逃逸效力的策略有很多,如多肽、阳离子脂质、阳离子聚合物、聚乙烯亚胺、聚酰胺-胺聚合物、阳离子纳米乳等<sup>[12]</sup>。但溶酶体逃逸策略的选择必须兼顾临床应用中的安全性,并避免递送载体、载体材料及其代谢产物可能导致的相关不良反应。因此,如何平衡递送效率和安全性一直是核酸递送领域的重点和难点。

### 3 RNA 核酸药物递送载体

临床上在研的RNA核酸药物递送载体主要可以分为三大类:脂质纳米粒(lipid nanoparticle, LNP)、聚合物纳米粒(polymer-based nanoparticle)和脂质聚合物纳米粒(lipid-polymer hybrid nanoparticle)<sup>[2]</sup>。但目前在真实世界中验证可行的递送载体主要是基于可离子化脂质的脂质纳米粒LNP。该载体与传统阳离子脂质纳米粒最大的区别在于,LNP采用了可离子化脂质分子作为其核心脂质,这使LNP在生理条件下呈电中性,但在pH较低的环境下(如酸性缓冲溶液和包涵体-溶酶体系统)可通过质子化呈现正电荷。可离子化

脂质的上述特点可在体外帮助LNP实现核酸分子的包封,在体内可以帮助LNP实现有效的溶酶体逃逸。传统的阳离子脂质纳米粒、聚合物纳米粒和脂质聚合物纳米粒通常采用的是阳离子脂质或阳离子聚合物,因此具有永久性正电荷。虽然上述材料分子也可实现核酸包封和递送,但其所含的阳离子基团在体内递送过程中会与机体内部多种负电性蛋白、脂质、细胞等发生静电相互作用,从而诱发组织和细胞毒性,并激活网状内皮吞噬系统。因此,可离子化脂质优于传统阳离子材料分子的关键在于,前者很大程度上解决了体内递送效率和安全性如何平衡的难题。

**3.1 基于可离子化脂质的LNP** 基于可离子化脂质的LNP是由天然和化学合成脂质组成的球形实心纳米粒子,大小通常介于50~200 nm之间。制备LNP常用的四种脂质包括可离子化脂质、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(distearoyl phosphatidylcholine, DSPC)、胆固醇和PEG化脂<sup>[13]</sup>。表1为目前已上市的三款脂质纳米粒的处方组成。这四种脂质具有各自功能。可离子化脂质的表观 $pK_a$ 通常小于7,因此可以在酸性条件下发生质子化而带正电荷,并与带负电荷的核酸相互作用,实现亲水性核酸的成功包封。装载核酸药物的LNP在生理条件下为电中性,可避免电荷所带来的毒性和机体网状内皮吞噬系统的识别。DSPC和胆固醇为结构脂质,使形成的LNP具有特定的实心结构,并可影响LNP的稳定性。PEG化脂质含量的高低影响LNP粒径,并可通过空间位阻效应维持LNP的制剂稳定性。

LNP的形成是上述脂质分子在疏水溶剂环境向亲水溶剂环境过渡过程中发生的自组装过程<sup>[14]</sup>。以装载siRNA的脂质纳米粒为例,脂质溶解在乙醇有机相中,核酸溶解在酸性pH水相中(如pH 4)。当两相溶液在酸性条件下快速混合时,由于可离子化脂质相关基团的质子化,首先形成带正电荷的小单室脂质体,而核酸被夹在两个脂质单分子层中。然后在对方进行中性

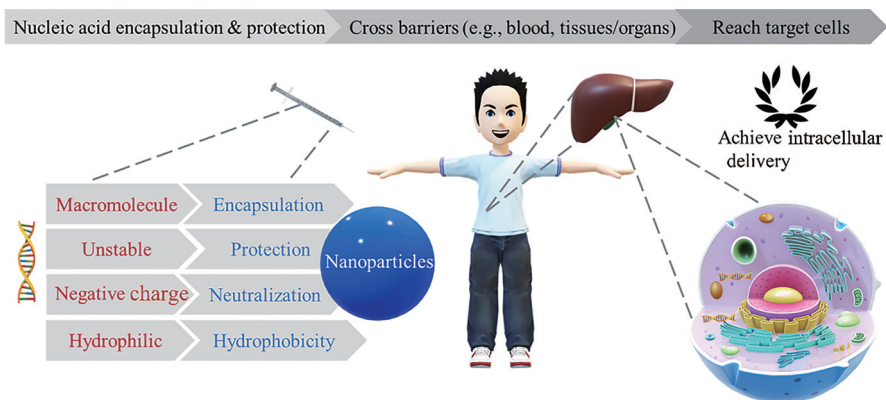


Figure 1 Nucleic acid-customized nanomedicine and its delivery barriers

缓冲液透析和置换的过程中,随着pH的不断升高,可离子化脂质的正电荷逐渐下降,使小单室脂质体间的电荷排斥作用减弱,从而发生聚集和融合。随着融合的进行,粒子逐渐长大,PEG化脂质、DSPC和胆固醇会逐渐转移至外层脂质单层膜中,而中性的可离子化脂质则沉积在粒子的内部,和核酸形成双层膜结构,在核心形成无定形油相<sup>[14]</sup>。LNP形成的另一种机制与上述过程类似,不同之处在于所形成的内部微观结构为反胶束,即可离子化脂质在胆固醇和DSPC的辅助下在siRNA表面堆积成反胶束结构<sup>[15]</sup>。Yanez Arteta等<sup>[16]</sup>也提出了mRNA LNP内部为无序反六角相的假设。值得注意的是,以上结构和自主装过程尚未完全得到验证,需要进一步结构鉴定和机制研究。除了内部结构,LNP外观形态也具有多样性,如球形和六面体等<sup>[17]</sup>。LNP内部结构和外观形态可能受处方组成和制备技术影响,而且其微观精细结构的解析有赖于相关检测技术的不断进步和可靠数据分析模型及方法的合理应用。

**3.2 LNP组织亲和性** LNP特有的脂质组成成分和性质特征,使其具有良好的组织亲和性。装载mRNA的LNP可分布于肝脏、肾脏和脾脏等组织<sup>[18]</sup>。LNP上述的分布和表达特征受粒子表面PEG影响较大。当siRNA LNP通过静脉注射进入血液循环后,PEG化脂质组分会迅速从LNP表面解离脱落。PEG化脂质在体内的解离动力学研究表明初始解离速率高达每分钟2%,使得LNP的血浆半衰期只有0.6~0.9 h<sup>[19]</sup>。另外,PEG的解离脱落使LNP失去水化层而暴露出疏水表面,这一疏水表面会吸附血浆中的脂蛋白形成蛋白冠。蛋白冠是影响脂质纳米粒组织分布的另一重要因素。血浆中富含载脂蛋白E (apolipoprotein E, ApoE)的脂蛋白可以作为内源性配体附着在LNP表面,将其伪装成内源性脂蛋白复合物,随血流进入肝脏,因此具有很强的肝脏组织靶向性和亲和性。LNP不仅可经静脉注射途径进入肝脏,而且还可经肌肉注射途径实现肝脏的聚集和靶向。Pardi等<sup>[20]</sup>研究发现,肌肉注射的mRNA LNP不仅在注射部位有表达,而且也在肝部表达,持续表达时间可达1~4天。Szebeni等<sup>[21]</sup>研究证实mRNA LNP经肌肉注射后,在淋巴组织也有表达。LNP的组织亲和性与LNP处方组成、结构特征和理化性质有关。LNP非肝组织靶向性是日前领域内研究的热点和难点,而且需要和发病机制和临床特征相结合。

**3.3 LNP细胞亲和性** LNP特有的脂质组成成分和性质特征,赋予了LNP良好的细胞兼容性。小鼠静脉注射LNP后,进入肝脏的LNP可被多种肝细胞吞噬,例如Kupffer细胞、肝实质细胞等<sup>[11]</sup>。Gilleron等<sup>[11]</sup>系统研究了ApoE在siRNA-LNP细胞吞噬和体内外活性

中的重要作用。研究通过敲除野生型小鼠中的ApoE或LDL (low-density lipoprotein)受体来检测其基因沉默效率。作者发现,敲除ApoE或LDL受体均会导致siRNA失去体内基因沉默活性。由此证明,siRNA-LNP体内活性依赖于ApoE和LDL受体,LNP可借助吸附于其表面的ApoE蛋白冠经LDL受体等进入肝实质细胞。Liang等<sup>[22]</sup>研究证实,mRNA-LNP流感疫苗经肌肉注射后,能够引起一系列局部炎症反应,这些炎症反应与招募的抗原呈递细胞等一系列免疫细胞有关。有趣的是,这些免疫细胞的招募由LNP决定,并不依赖于编码蛋白抗原的mRNA。这一特点是LNP具备佐剂效力的具体体现。深入的研究表明,在LNP招募的一系列免疫细胞中,能够摄取LNP并将其所装载的mRNA表达为蛋白的主要细胞类型为单核细胞和树枝状细胞。树枝状细胞是连接机体固有免疫和获得性免疫的桥梁,在调控后续免疫类型和免疫响应方面至关重要。

LNP的细胞内吞途径具有多样性。研究<sup>[11]</sup>表明,装载siRNA的LNP可同时经由网格蛋白介导的细胞内吞途径和巨吞饮途径进入细胞。有趣的是,巨吞饮途径可由网格蛋白介导的细胞内吞引发,而且为LNP细胞摄取的主要途径。对于装载mRNA的LNP,Cui等<sup>[18]</sup>研究也表明,网格蛋白介导的内吞和巨吞饮同时存在。然而,LNP的粒径对细胞摄取途径影响较大,大粒子的LNP主要以巨吞饮途径为主,并有利于后续mRNA的蛋白表达效率的提高。

**3.4 LNP溶酶体逃逸机制** 核酸药物对递送的需求为亚细胞器传递,只有实现有效的细胞浆或细胞核递送,才能进行靶蛋白的沉默或表达。而亚细胞器递送需要绕开内涵体-溶酶体系统对核酸的降解和破坏作用,即实现有效的溶酶体逃逸。

LNP诱导的内涵体-溶酶体逃逸和其脂质组成和物理化学性质密不可分。通过不同途径进入细胞的LNP会以各种内涵体的形式存在于胞浆中。随着内涵体的逐渐成熟,其内部环境逐渐由中性变为酸性,如pH从6.5降低到4.5。这一过程中,LNP会随着环境pH的降低而发生质子化,所带电荷由电中性变为荷正电的状态。如Onpattro递送载体LNP所使用的可离子化脂质为Dlin-DMA-MC3 (MC3)。MC3 LNP的表观pK<sub>a</sub>为6.44,低于中性pH,这使MC3 LNP可在酸性环境中(例如内涵体pH 6.5~4.5)实现质子化,从而带上正电荷<sup>[23]</sup>。成熟的内涵体进化为溶酶体,并与细胞膜一样具有脂质双分子层结构,呈现出内外脂质双层的不对称性。溶酶体内膜通常含有很多带负电荷的磷脂酰丝氨酸,使其内膜略带负电荷。溶酶体内膜与质子化而

带正电荷的LNP可通过正负电荷相互作用实现两者的融合。这种静电相互作用通常并不足以破坏溶酶体的脂质双层膜结构,但如果LNP所含可离子化脂质具有特定分子几何特征结构时,可通过反六角相结构破坏溶酶体双层脂膜的稳定结构。这一假说由Cullis等<sup>[24]</sup>提出,即溶酶体膜脂略带负电,正常条件下采取的为圆柱形几何结构,并排列成稳定的双层膜结构。然而,当带正电荷的可离子化脂质与略带负电的溶酶体膜脂发生正负电荷相互作用后,相互吸引的脂质头部离子对的横切面要小于相互吸引前各自横切面之和,因此形成具有圆锥体结构特征的脂质分子对结构特征。这种圆锥体结构堆积,能够促进形成不稳定的非双层膜结构,例如反六角相,从而打破内涵体溶酶体膜原有的稳定性,实现核酸从不稳定溶酶体膜中逃逸。Spadea等<sup>[25]</sup>通过人工单层膜模拟了内涵体-溶酶体膜与包含MC3可离子化脂质的LNP相互作用的过程。作者提出LNP从接触人工膜到实现核酸逃逸可分为三个过程。首先,LNP借助水性环境中的布朗运动与人工膜发生接触碰撞,在这个过程中导致一部分脂质成分从LNP中解离出来,并转移至人工膜中。同时,LNP中的可离子化脂质在酸性水溶液环境中发生质子化,并通过电荷相互作用吸附到人工单层膜上。最后,LNP中的可离子化脂质与核酸以复合物的形式从LNP中转移至人工单层膜,从而实现跨膜转运和有效传递。在这个碰撞接触-结合-传递的过程中,人工膜环境中的pH至关重要,只有在pH小于6.5的条件下才会发生。上述研究进一步证明了可离子化脂质在膜融合和逃逸过程中的重要性。

#### 4 已上市RNA核酸药物

目前已有多款核酸药物获得美国FDA和欧洲药监局EMA批准并上市。这些核酸药物除了靶向肝脏,还可以应用于眼睛、大脑、肌肉和淋巴系统等。核酸药物目前可介入的疾病治疗范围很广,如抗病毒性视网膜炎、家族性高血脂、脊髓型肌萎缩症、杜氏肌肉营养不良、淀粉样变性引起的多发性神经系统疾病、高乳糜微粒血症、急性肝卟啉病、高草酸盐尿症、新冠疫苗等<sup>[13,26,27]</sup>。本部分重点解读与递送技术密切相关且已上市的siRNA和mRNA核酸药物产品,其具体的处方

组成如表1所示。

**4.1 siRNA药物 Onpattro** 目前,已有多款siRNA药物上市,但是采用递送载体技术的只有一款,商品名为Onpattro。该药物用于遗传性转甲状腺淀粉样蛋白介导的淀粉样变性引起的多发神经性病变治疗,于2018年由美国FDA批准上市。Onpattro给药方式为静脉输注,每三周一次,用药剂量为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。Onpattro的成功离不开siRNA化学修饰和脂质纳米粒传递技术。siRNA化学修饰可以提高分子稳定性,也就是在3'端引入了两个DNA核苷,并对其他核苷进行了部分2-氧甲基修饰。采用LNP封装技术可以进一步提高siRNA的稳定性,并实现其在体内的肝部靶向和细胞浆递送效率。Onpattro是第一款以LNP为递送载体的上市药物,也是首款上市的非病毒载体核酸纳米药物,在核酸药物领域具有重要的里程碑意义。LNP递送技术在Onpattro上的成功也直接加速了新冠mRNA疫苗的开发和上市。值得说明的是,由于Onpattro采用静脉输注,而且LNP递送载体所含的可离子化脂质MC3在体内降解清除较慢,通常需要在给药前使用皮质类固醇药物(如地塞米松)、H1和H2阻断剂来降低和避免输液引起的相关不良反应。为了降低LNP相关的不良反应,可离子化脂质的更新换代一直是核酸递送领域研究的热点。例如,Moderna公司开发的新一代生物可降解可离子化脂质,其体内的半衰期相较于MC3有所缩短,而且体内安全性良好,这为mRNA新冠疫苗的成功开发奠定了重要基础<sup>[28]</sup>。此外,科研人员也在寻求更适合的siRNA递送形式。例如最近获批上市的siRNA药物Ampvutra,其靶点与Onpattro相同,但却摒弃了LNP递送载体,而是采用了增强稳定化学型GalNAc共价偶联递送平台技术<sup>[29]</sup>。其给药途径也由静脉输注变更为患者顺应性更好的皮下注射,并将给药频率降低到每三个月一次。

**4.2 mRNA新冠疫苗** mRNA-LNP新冠疫苗目前有两款上市产品,分别是Moderna公司的Spikevax和Pfizer-BioNTech公司的Comiranty,上述两款疫苗的二价加强版目前也已获得美国FDA批准并上市。上述疫苗所含的mRNA均编码新冠病毒表面刺突蛋白,而且通过S-2P技术对所表达的抗原蛋白进行了融合前

**Table 1** FDA approved nucleic acid nanomedicine. DSPC: 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; Chol: Cholesterol; DMG-PEG2K: 1,2-Dimyristoyl-*rac*-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000

Formulation	Onpattro	Pfizer/BioNTech COVID-19 vaccine	Moderna COVID-19 vaccine
Nucleic acid	siRNA	mRNA	mRNA
Dose	10 mg in 5 mL	30 $\mu\text{g}$ in 0.3 mL	100 $\mu\text{g}$ in 0.5 mL
Composition	MC3/DSPC/Chol/DMG-PEG2k	ALC-0315/DSPC/Chol/ALC-0159	SM102/DSPC/Chol/DMG-PEG2k
Molar ratio	50/10/38.5/1.5	46.3/9.4/42.7/1.5	50/10/38.5/1.5
N/P ratio	5	6	5

构象限定, 以便于呈现病毒表面刺突蛋白的原生态抗原表位。临床试验数据表明, 上述两款新冠疫苗对预防原始毒株感染的有效性在 III 期临床试验中分别展示出高达 94.5% 和 95% 的保护效率<sup>[30]</sup>。

上述两款 mRNA-LNP 新冠疫苗的首次获批, 揭开了 mRNA 技术药物在现实世界中应用的序幕, 具有里程碑意义。两款 mRNA 新冠疫苗成功的关键在于: 其不但可以诱发机体产生针对新冠病毒刺突蛋白的中和抗体, 还能产生强大的抗原特异性细胞免疫<sup>[31]</sup>。细胞免疫尤其是 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫响应的产生依赖于 LNP 介导的核酸溶酶体逃逸。mRNA 在 LNP 的辅助下, 经溶酶体逃逸进入免疫细胞胞浆后, 可以利用胞浆内核糖体表达刺突蛋白。表达的刺突蛋白随后被胞浆内的蛋白酶降解成片段。在胞浆中, 上述抗原片段可被 MHC I 分子识别, 并递呈给 T 细胞, 从而促进细胞免疫偏向型 T 辅助细胞的分化, 并最终诱导 CD8<sup>+</sup> T 细胞的成熟。另一方面, mRNA 所表达的刺突蛋白可以被分泌到细胞外, 并被周边其他免疫细胞摄取, 并经由包涵体-溶酶体路径实现 MHC II 分子抗原递呈, 从而诱发产生后续以 B 细胞为主的体液免疫。体液免疫和细胞免疫在预防病毒感染致病方面同等重要。体液免疫中 B 细胞产生的中和抗体可与进入机体的游离病毒刺突蛋白发生特异性结合, 通过病毒颗粒包裹和免疫细胞吞噬将其清除。而细胞免疫中的 CD8<sup>+</sup> T 细胞可以识别已经被新冠病毒感染的机体细胞, 通过释放颗粒酶和穿孔素等策略杀伤清除被感染的机体细胞。上述两种机制, 尤其是 mRNA-LNP 新冠疫苗通过包涵体-溶酶体逃逸诱发的较强细胞免疫, 使其在抵御新冠病毒感染方面展现出明显优于其他疫苗的优势。

## 5 核酸递送尚待解决的问题

mRNA 新冠疫苗在抗击全球新冠大流行中发挥了至关重要的作用, 验证了核酸疫苗在传染性疾病预防中的潜力。然而, 核酸疫苗的不良反应问题不容忽视。现有研究表明, mRNA 新冠疫苗常见不良反应有注射部位热、红、肿、痛。系统性不良反应包括疲劳、发烧、头痛、肌肉痛、关节痛等<sup>[32,33]</sup>。这些不良反应虽然也常见于其他类型疫苗, 但其发生率的高低将会对核酸疫苗和药物的社会可接受性产生重要影响。此外, 核酸疫苗在真实世界应用过程中发生的严重不良反应包括急性过敏反应和心肌炎等。急性过敏反应是严重的多系统反应, 发生率在二十万分之一, 特点为发病快, 患者可因窒息、心血管衰竭和其他并发症而死亡<sup>[32,33]</sup>。这些严重不良反应的发生一方面受个人机体状况影响; 另一方面可能与疫苗中的一种或多种成分有关, 如 LNP 中的 PEG 化脂质。mRNA 新冠疫苗不良反应发

生机制是未来核酸药物安全性提升的重要依据。而具体机制研究离不开新冠疫苗和载体材料的体内命运解析, 如体内吸收、分布、代谢和排泄。这一研究方向与传统纳米递送载体的体内命运研究存在诸多类似。因此, 相关技术方法可作为 LNP 体内命运研究的重要基础, 如液质联用分析 PEG 化材料体内命运等<sup>[34]</sup>。

除了不良反应, 核酸药物的保存条件和长期稳定性是另一亟待解决的问题。目前上市的两款 mRNA 新冠疫苗 Spikevax 和 Comiranty 都需超低温保存, 最初的有效期均为 6 个月, 融化后在冷藏条件下, 也只有 1~2 个月的有效期<sup>[35]</sup>。虽然现在两者的有效期已分别延长至 9 个月和 12 个月, 但这仍为疫苗的运输、发放和使用带来了巨大成本和不便。上述情况使 mRNA 疫苗在热带发展中国家和第三世界国家的推广应用极具挑战性。核酸疫苗长期稳定性和递送载体及 mRNA 息息相关。mRNA 为生物大分子, 在 pH 大于 6 的环境中易发生水解。脂质纳米粒通过包封虽然为 mRNA 提供了保护, 但脂质纳米粒内部水分子的存在以及脂质分子的副产物等会加速 mRNA 的降解。其中的一个解决方案就是对包封 mRNA 的脂质纳米粒进行冻干而去除水分。Ball 等<sup>[36]</sup>对 siRNA LNP 的冻干行为进行了详细考察, 发现蔗糖和海藻糖可作为 LNP 的冻干保护剂而维持其生物活性。核酸药物长期储存稳定性相关机制研究, 以及由此产生的改进策略将决定核酸药物未来临床应用的广度和深度。

## 6 总结与展望

从目前上市的核酸药物产品来看, 以可离子化脂质为基础的 LNP 在平衡载体递送效率和安全性方面明显优于其他递送载体, 这为未来核酸药物的进一步临床应用开发提供了重要依据。LNP 在肝脏、肌肉和淋巴靶向方面的研究越来越深入。值得期待的是开发出能够特异性分布于其他组织器官的新型 LNP。肺部靶向为目前研究焦点, LNP 在肺部吸入给药方面的研究将对呼吸系统相关疫苗开发和呼吸系统疾病治疗起到重大推动作用。此外, 新型 LNP 或其他核酸递送载体的开发需要重点兼顾临床应用中不同群体、不同年龄和不同疾病患者的用药安全性。长期频繁用药情况下, 更需要全面评估其收益和风险比。不管是递送效率还是临床应用安全性, 都需要更加深入的药代动力学和药效学数据作为核酸药物研究和开发依据。核酸 LNP 递送需要在组织器官、细胞和亚细胞器水平进行全面而深入的体内命运研究。这对未来核酸临床应用至关重要, 也是目前缺失和亟待解决的。究其原因, 首先是核酸、LNP、载体材料多维度多层次体内命运追踪受检测技术的限制; 其次, 核酸 LNP 在生物体内分布、

代谢和排泄的复杂性受多种因素影响。核酸为新一代生物技术药物,将其平台化并应用于疾病的防治需要各个领域科学家的共同努力。相信,随着体内外稳定性、体内命运和安全性、组织靶向等一系列问题的深入研究,核酸药物将在重大突发传染性疾病预防、解决临床尚未被满足的重大疾病需求、基因编辑和基因治疗方面展现出强大的生命力。

**作者贡献:** 崔丽莉负责文献收集整理、阅读、文章构思、撰写和审阅;张勇参与文章构思,并负责内容讨论,审阅和校对。

**利益冲突:** 所有作者声明本研究内容无任何利益冲突。

## References

- [1] Rinaldi C, Wood MJA. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14: 9-21.
- [2] Herrera VL, Colby AH, Ruiz-Opazo N, et al. Nucleic acid nanomedicines in phase II/III clinical trials: translation of nucleic acid therapies for reprogramming cells [J]. *Nanomedicine*, 2018, 13: 2083-2098.
- [3] Tabrizi SJ, Ghosh R, Leavitt BR. Huntingtin lowering strategies for disease modification in huntington's disease [J]. *Neuron*, 2019, 102: 899.
- [4] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 817-838.
- [5] Kowalski PS, Rudra A, Miao L, et al. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery [J]. *Mol Ther*, 2019, 27: 710-728.
- [6] Levin AA. Treating disease at the RNA level with oligonucleotides [J]. *New Engl J Med*, 2019, 380: 57-70.
- [7] Thiel KW, Giangrande PH. Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers [J]. *Oligonucleotides*, 2009, 19: 209-222.
- [8] Blakney AK, McKay PF, Yus BI, et al. Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and *in vivo* delivery of saRNA [J]. *Gene Ther*, 2019, 26: 363-372.
- [9] Chen N, Xia P, Li S, et al. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens [J]. *IUBMB life*, 2017, 69: 297-304.
- [10] Desai AS, Hunter MR, Kapustin AN. Using macropinocytosis for intracellular delivery of therapeutic nucleic acids to tumour cells [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374: 20180156.
- [11] Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 638-646.
- [12] Dominska M, Dykxhoorn DM. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123: 1183-1189.
- [13] Hu B, Zhong L, Weng Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art [J]. *Signal Transduc Target Ther*, 2020, 5: 101.
- [14] Kulkarni JA, Darjuan MM, Mercer JE, et al. On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA [J]. *ACS Nano*, 2018, 12: 4787-4795.
- [15] Leung AK, Tam YY, Chen S, et al. Microfluidic mixing: a general method for encapsulating macromolecules in lipid nanoparticle systems [J]. *J Phys Chem B*, 2015, 119: 8698-8706.
- [16] Yanez Arteta M, Kjellman T, Bartesaghi S, et al. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E3351-E3360.
- [17] Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, et al. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 983.
- [18] Cui L, Hunter MR, Sonzini S, et al. Mechanistic studies of an automated lipid nanoparticle reveal critical pharmaceutical properties associated with enhanced mRNA functional delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. *Small*, 2022; 18: e2105832.
- [19] Mui BL, Tam YK, Jayaraman M, et al. Influence of polyethylene glycol lipid desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e139.
- [20] Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes [J]. *J Control Release*, 2015, 217: 345-351.
- [21] Szebeni J, Storm G, Ljubimova JY, et al. Applying lessons learned from nanomedicines to understand rare hypersensitivity reactions to mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines [J]. *Nat Nanotechnol*, 2022, 17: 337-346.
- [22] Liang F, Lindgren G, Lin A, et al. Efficient targeting and activation of antigen-presenting cells *in vivo* after modified mRNA vaccine administration in rhesus macaques [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 2635-2647.
- [23] Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing *in vivo* [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51: 8529-8533.
- [24] Cullis PR, Hope MJ. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 1467-1475.
- [25] Spadea A, Jackman M, Cui L, et al. Nucleic acid-loaded lipid nanoparticle interactions with model endosomal membranes [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14: 30371-30384.
- [26] Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses [J]. *Nature*, 2021, 596: 109-113.
- [27] Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide

- drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 673-694.
- [28] Sabnis S, Kumarasinghe ES, Salerno T, et al. A novel amino lipid series for mRNA delivery: improved endosomal escape and sustained pharmacology and safety in non-human primates [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 1509-1519.
- [29] Huang Y. Preclinical and clinical advances of GalNAc-decorated nucleic acid therapeutics [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 6: 116-132.
- [30] Friedrichs S, Bowman DM. COVID-19 may become nanomedicine's finest hour yet [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 362-364.
- [31] Bettini E, Locci M. SARS-CoV-2 mRNA vaccines: immunological mechanism and beyond [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9: 147.
- [32] Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine [J]. *New Engl J Med*, 2021, 384: 403-416.
- [33] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine [J]. *New Engl J Med*, 2020, 383: 2603-2615.
- [34] Yin L, Pang Y, Shan L, et al. The *in vivo* pharmacokinetics of block copolymers containing polyethylene glycol used in nano-carrier drug delivery systems [J]. *Drug Metab Dispos*, 2022, 50: 827-836.
- [35] Uddin MN, Roni MA. Challenges of storage and stability of mRNA-Based COVID-19 vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9: 1033.
- [36] Ball RL, Bajaj P, Whitehead KA. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 305-315.