

基于 PLGA 纳米粒的 SARS-CoV-2 DNA 疫苗的制备及初步评价

吴雅琦^{1,2}, 李 蒙², 邢昊楠², 陈大全^{1*}, 郑爱萍^{2*}

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 本研究构建并优化编码新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 刺突 (spike protein, S) 蛋白基因序列的质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) *Opt-S*, 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 纳米粒 (nanoparticles, NPs) 作为 pDNA 的递送载体, 采用纳米沉淀法制备 PLGA-pDNA NPs, 对其体外性质进行初步评价。结果表明所制备的 PLGA-pDNA NPs 形态规整, 边缘清晰, 平均粒径为 (184.2 ± 2.4) nm, 多分散系数 (polydisperse index, PDI) 为 0.093 ± 0.013 , zeta 电位为 (-68.10 ± 0.36) mV, 封装率为 $(98.92 \pm 0.22)\%$, 于 -20 °C 储存 7 个月粒径和 PDI 变化幅度均较小, 稳定性较好, 能保护 pDNA 免受核酸酶降解, 并具有一定的缓释效果, 细胞毒性低, 安全性高, 体外转染实验表明 SARS-CoV-2 S 基因可以进入细胞并表达。以上结果表明 PLGA-pDNA NPs 非病毒基因载体制备工艺简单、性能良好, 有望为 SARS-CoV-2 疫苗研发提供新思路。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 新型冠状病毒 DNA 疫苗; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 纳米沉淀法; 非病毒基因载体
中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1677-08

Preparation and preliminary evaluation of SARS-CoV-2 DNA vaccine based on PLGA nanoparticles

WU Ya-qi^{1,2}, LI Meng², XING Hao-nan², CHEN Da-quan^{1*}, ZHENG Ai-ping^{2*}

(1. Pharmacy School, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: We constructed and optimized the plasmid DNA (pDNA) *Opt-S* encoding the gene of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike (S) protein, using poly (lactic-co-glycolic acid) copolymer (PLGA) as a delivery carrier for pDNA. PLGA-pDNA NPs were loaded by nanoprecipitation and its properties *in vitro* were preliminary evaluated. The results showed that the prepared PLGA-pDNA NPs were regular morphology, clear edges, with an average particle size of (184.2 ± 2.4) nm, polydisperse index (PDI) of 0.093 ± 0.013 , zeta potential of (-68.10 ± 0.36) mV, and encapsulation rate of $(98.92 \pm 0.22)\%$. The PLGA-pDNA NPs were stable at -20 °C for 7 months and could protect pDNA against nuclease degradation. And they also exhibited sustained release of pDNA *in vitro*. The PLGA-pDNA NPs have low cytotoxicity and high safety. In addition, *in vitro* transfection experiments showed that the SARS-CoV-2 S gene could enter cells and be expressed. These results indicate that PLGA-pDNA NPs non-viral gene vector have simple preparation process and good performance, which are expected to provide a new idea for the research and development of SARS-CoV-2 vaccine.

Key words: corona virus disease 2019; SARS-CoV-2 DNA vaccine; poly (lactic-co-glycolic acid) copolymer; nanoprecipitation method; non-viral gene carrier

收稿日期: 2022-12-07; 修回日期: 2023-03-08.

*通讯作者 Tel: 86-535-6706021, E-mail: cdq1981@126.com;

Tel: 86-10-66931694, E-mail: apzheng@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1347

2019年底由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)疫情迅速蔓延全球,接种疫苗是控制疫情和预防死亡的最佳策略^[1-5]。SARS-CoV-2主要由四种结构蛋白组成,刺突(spike protein, S)蛋白负责介导病毒进入宿主细胞,在此过程中跨膜丝氨酸蛋白酶2(transmembrane protease serine 2, TMPRSS2)活化S蛋白,促使S蛋白与细胞表面的血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体结合而进入人体,因此S蛋白是病毒中和抗体的关键靶点^[6-10],针对S蛋白的多个疫苗平台被开发,包括灭活疫苗、病毒减毒疫苗、病毒载体疫苗、亚单位疫苗和核酸疫苗等,其中DNA疫苗研发速度快、生产制备简单、稳定性高,同时可以诱导体液免疫和细胞免疫,持续表达靶抗原,不良反应少,安全性好,有望在新冠领域发挥重要作用^[11-13]。

为提高S蛋白的表达水平,对编码SARS-CoV-2 S蛋白的基因序列进行优化,如:提高GC含量、使用S-2P技术以及将S蛋白原始信号肽更改为组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, tPA)信号肽等,使用优化后的基因序列构建重组质粒*Opt-S*。裸DNA易被降解,使DNA疫苗表达水平有限,导致免疫原性弱^[14,15],故选择具有良好生物相容性和生物可降解性的聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]作为质粒DNA(plasmid DNA, pDNA)载体,PLGA安全性高,已被FDA批准使用,能靶向黏膜表面,提高M细胞的吞噬能力,可以快速实现溶酶体逃逸,并具有药物缓释性,控制抗原缓慢释放,持续产生免疫应答^[16-18]。本研究采用纳米沉淀法制备PLGA-pDNA NPs,对纳米粒进行处方筛选与表征,同时对PLGA-pDNA NPs的抗脱氧核糖核酸酶I(deoxyribonuclease I, DNase I)能力、稳定性、体外释放、体外表达水平及安全性进行初步评价,为SARS-CoV-2 DNA疫苗的研发奠定理论与实践基础。

材料与方法

试剂 PLGA(端羧基, 50/50, LP1299; 75/25, 0002084262, 德国Evonik公司); PLGA(端羧基, 85/15, P0097310, 广州帝奇医药技术有限公司); 泊洛沙姆407(Pluronic F127, GND32821B, 武汉新大地环保材料股份有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, RH155103, 上海易恩化学技术有限公司); LB液体培养基(PM302126160)、氨苄青霉素(SL32111420)(北京酷来博科技有限公司); 无内毒素质粒大提试剂盒(W0110, 天根生化科技有限公司); 4%多聚甲醛(210315S)、Dil(D8700)、Hochest 33258(B8030)(北京索莱宝科技有限公司);

DNase I(D7073)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA, ST066)、CCK-8试剂盒(C0038)(上海碧云天生物技术有限公司); PicoGreenTM dsDNA定量检测试剂(2383786)、Opti-MEM培养基(31985070)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 10100147C)(美国Thermo公司); 青霉素-链霉素(WH0621K61, 武汉普诺赛生命科技有限公司); DMEM培养基(319-070-CL, 维森特生物技术有限公司); SARS-CoV-2 spike antibody, rabbit PAb(40591-T62, 北京义翘神州生物技术有限公司); Alexa Fluor[®]647偶联试剂盒—Lightning-Link[®](ab269823, 英国Abcam公司); DC2.4细胞(中国典型培养物保藏中心); 重组质粒由北京擎科生物有限公司合成。

仪器 立式压力蒸汽灭菌器(LS-B50L, 江阴滨江医疗设备有限公司); 恒温摇床(HNY-200D, 天津欧诺仪器股份有限公司); 恒温磁力搅拌器(SHJ-4B, 常州高德仪器制造有限公司); 冷冻离心机(5804R, 德国Eppendorf公司); NanoDrop Lite分光光度计(MD-L27E)、多功能酶标仪(Varioskan Lux)、细胞培养箱(Forma series II)(美国Thermo公司); 马尔文粒径仪(Nano-ZS90, 英国Malvern公司); 透射电镜(H-7650, 日本HITACHI公司); 凝胶成像仪(5200Multi, 上海天能生命科学有限公司); 光学显微镜(CKX41, 日本OLYMPUS公司); 激光共聚焦显微镜(LSM880, 德国Carl Zeiss公司); 流式细胞仪(BD FACS ArianaTM II, 美国BD公司)。

重组质粒的构建与鉴定

基因序列的设计 SARS-CoV-2 *Opt-S* 重组质粒设计毒株选择武汉株, 将SARS-CoV-2 S基因序列进行优化, 低频密码子更换为高频密码子, 提高GC含量增强稳定性, 采用S-2P技术添加两个脯氨酸突变稳定S蛋白构象, 将S蛋白原始信号肽更改为tPA信号肽, 提高S蛋白的表达水平, 同时在翻译起始密码子前加入Kozak序列增强S基因翻译效率。

质粒的合成与鉴定 将优化的S基因序列片段插入pcDNA3.1载体, 构建重组质粒*Opt-S*, 酶切位点为*NheI*和*EcoRI*, 同时在*Opt-S*基因序列后添加一段绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因序列, 构建*Opt-S-GFP*质粒, 便于后续实验观察, 设计完成后交由北京擎科生物有限公司合成。将合成后的质粒穿刺菌进行复苏得到含*Opt-S*质粒的大肠杆菌, 接种于经高压灭菌后加入氨苄青霉素的LB液体培养基中, 于37℃、180 r·min⁻¹培养12~16 h, 使用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒。质粒提取后进行酶切鉴定、琼脂糖凝胶电泳评价及全质粒测序, 同时使用NanoDrop

Lite 分光光度计测定质粒浓度及纯度。

纳米粒的制备

空白 PLGA 纳米粒的制备 采用改进的纳米沉淀法^[19]制备空白 PLGA 纳米粒。在磁力搅拌下, 将溶解于 DMSO 的 PLGA 溶液缓慢滴加至 0.5% (w/v) 的 Pluronic F127 水溶液中, 室温搅拌 5 h (800 r·min⁻¹), 然后将整个分散体系于 4 °C、15 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 使用磷酸盐缓冲溶液 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) 重悬离心后沉淀, 过 0.22 μm 滤膜收集纳米粒。

PLGA-pDNA NPs 的制备 除在溶解于 DMSO 的 PLGA 溶液中加入 pDNA 溶液外, 其余步骤与空白 PLGA 纳米粒的制备相同。

纳米粒的处方筛选 对 PLGA 型号、浓度及 PLGA/pDNA 质量比进行筛选, 考察不同型号 PLGA (50/50、75/25、85/15), 不同浓度 PLGA (10、20、50 mg·mL⁻¹) 以及 PLGA/pDNA 不同质量比 (36:1、48:1、72:1 和 96:1) 对所制备纳米粒理化性质的影响。分别取制备后适量纳米粒分散于去离子水中, 通过动态光散射法 (dynamic light scattering, DLS) 使用马尔文粒径仪测定纳米粒的粒径、多分散系数 (polydisperse index, PDI) 及 zeta 电位, 同时, 采用凝胶阻滞实验^[20]进一步筛选 PLGA/pDNA 质量比 (36:1、48:1、72:1 和 96:1), 进行 0.6% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪下观察结果。

纳米粒的表征

形态观察 取少量纳米粒溶液滴至专用铜网上, 风干后滴加 2% (w/v) 磷钨酸负染 2 min, 用滤纸吸去染色液, 待干后于透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下观察纳米粒形态。

粒径分布及 zeta 电位测定 取适量纳米粒分散于去离子水中, 使用马尔文粒径仪测定纳米粒的粒径及 PDI, 并对其表面 zeta 电位进行检测。

包封率检测 采用 PicoGreenTM dsDNA 定量检测试剂^[21]进行包封率评价, 按照 PicoGreen 染液: 1×TE 缓冲液为 1:200 的比例配制 PicoGreen 工作液。标准品工作液浓度设置为: 2 000、1 500、1 000、500、200、100 和 0 ng·mL⁻¹, 使用 1×TE 缓冲液对标准品工作液及 PLGA-pDNA NPs 离心后上清液进行稀释, 分别加入相同体积的 PicoGreen 工作液, 室温避光孵育 5 min, 从中取 200 μL 溶液转移至微量检测皿 (96 孔板) 中, 平行配置三组 ($n = 3$)。使用多功能酶标仪检测激发波长 480 nm、发射波长 520 nm 处的荧光值, 绘制浓度与对应荧光强度的标准曲线, 以此计算上清液中游离 DNA 含量, 计算包封率 (%) = (总 pDNA 含量 - 游离 pDNA 含量) / 总 pDNA 含量 × 100%。

抗 DNase I 能力考察 为验证 PLGA-pDNA NPs

对 pDNA 的保护作用, 取相应体积 PLGA-pDNA NPs 溶液及裸 *Opt-S* 质粒溶液, 分别加入 5 μL DNase I (1 U·μL⁻¹), 37 °C 水浴孵育 30 min, 向上述反应体系中加入 2 μL EDTA, 65 °C 孵育 10 min 以失活 DNase I, 终止反应。取反应后复合物进行 0.6% 琼脂糖凝胶电泳, 同时设置不添加 DNase I 的裸 *Opt-S* 质粒组, 电泳结束后在凝胶成像仪下观察质粒降解情况。

稳定性考察 将制备的 PLGA-pDNA NPs 于 -20 °C 放置 3 或 7 个月后, 观察纳米粒的变化情况, 肉眼观察纳米粒是否发生聚集沉降, 通过马尔文粒径仪检测 PLGA-pDNA NPs 的粒径、PDI 及 zeta 电位。

体外释放评价 采用恒温振荡摇床法对 PLGA-pDNA NPs 进行体外释放评价^[22]。将制备的 PLGA-pDNA NPs 使用 pH 7.4 的 PBS 重悬, 均分为三份于 EP 管中 ($n = 3$), 于 37 °C 恒温水浴中 120 r·min⁻¹ 振荡释放。在预设时间点 (1、9、12、24 h 和 2、3、4、5、7、9、11、13、15、18 和 20 天) 取样, 同时补充与所取样品相同体积的 PBS 至原 EP 管中, 将所取样品于 4 °C、15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 使用 PicoGreenTM dsDNA 定量检测试剂测定上清液的荧光强度, 计算 pDNA 释放量, 并绘制释放曲线。

体外细胞评价

细胞毒性实验 将 DC2.4 细胞以细胞数 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 培养至贴壁后, 分别加入不同浓度的空白 PLGA NPs 和 PLGA-pDNA NPs, 空白 PLGA NPs 组浓度设置为 2、5、10、20、40 和 80 mg·mL⁻¹, PLGA-pDNA NPs 及 Lipo3000 组 pDNA 浓度设置为 0.1、0.5、1、2、4 和 8 μg·mL⁻¹, 同时设置对照组和空白组, 对照组加入细胞和培养基, 空白组只加入培养基, 每组设置 6 个复孔, 分别孵育 24 和 48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8, 继续孵育 2 h, 在酶标仪下检测波长 450 nm 处各孔的吸光度值 (OD 值), 计算细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%。

体外转染实验 将 DC2.4 细胞以细胞数 1×10^6 /孔接种于共聚焦小皿/6 孔板, 37 °C 培养至细胞贴壁后进行转染实验, 将细胞分为 PLGA-pDNA NPs 组、Lipo3000 组、裸 *Opt-S-GFP* /裸 *Opt-S* 质粒组及空白对照组, 每组分别加入 Opti-MEM 培养基共孵育 8 h 后, 吸弃旧液, 加入 DMEM 完全培养基 (10% FBS、1% 青霉素-链霉素) 继续培养。接种于共聚焦小皿的细胞转染 48 h 后, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, Hoechst 33258 染色细胞核, Dil 染色细胞膜, 进行激光共聚焦观察。接种于 6 孔板的细胞转染 48 h 后, 使用 Alexa Fluor[®] 647 标记的 SARS-CoV-2 S 抗体进行胞内破膜染色 1 h, 通过流式

细胞术检测分析,对纳米粒的转染情况进行评价。

统计学分析 采用SPSS 25软件进行数据分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 重组质粒的构建与鉴定

采用琼脂糖凝胶电泳对质粒进行评价,如图1A所示,所提取质粒显示出目标条带,如图1B所示,经*NheI-EcoRI*首尾酶切后限制性酶谱显示两个大小分别为3 894 bp和5 371 bp的条带,表明插入片段大小与预计结果相符,酶切结果正确,使用NanoDrop Lite分光光度计测定质粒浓度及纯度,浓度 $\geq 500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0内,符合要求,同时全质粒测序成功,表明重组质粒*Opt-S*成功构建。

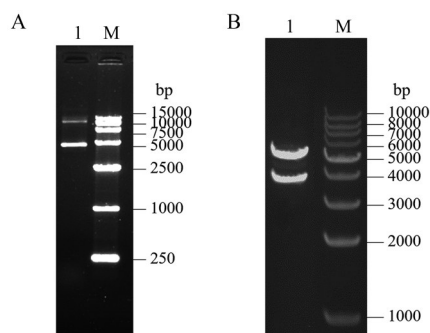


Figure 1 Evaluation results of recombinant plasmid. A: Detection of plasmid integrity. Lane 1: *Opt-S*; Lane M: Marker; B: Enzyme digestion results. Lane 1: *NheI-EcoRI* enzyme digestion; Lane M: Marker

2 纳米粒的制备与处方筛选

2.1 PLGA型号筛选 对不同PLGA型号的PLGA NPs筛选结果见表1,采用PLGA 50/50制备的纳米粒,粒径和PDI均为三者中最小,分散更均匀,zeta电位绝对值更高,更稳定,综合考虑,选择PLGA 50/50型号。

Table 1 PLGA model screening results. PLGA NPs: Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles; PDI: Polydisperse index

Sample name	Size-average /nm	PDI	Zeta potential /mV
PLGA (50/50) NPs	101.3 \pm 1.4	0.045 \pm 0.010	-34.97 \pm 2.65
PLGA (75/25) NPs	124.8 \pm 1.2	0.049 \pm 0.018	-7.47 \pm 0.86
PLGA (85/15) NPs	119.7 \pm 2.6	0.060 \pm 0.020	-12.43 \pm 0.59

2.2 PLGA浓度筛选 对不同PLGA浓度的PLGA NPs筛选结果见表2,PLGA浓度在20 mg·mL⁻¹时,粒径相较更小,PDI < 0.2,分散性良好,zeta电位更稳定,因此,选择PLGA浓度为20 mg·mL⁻¹。

Table 2 PLGA concentration screening results

Sample name	Size-average /nm	PDI	Zeta potential /mV
PLGA 10 mg·mL ⁻¹	160.9 \pm 1.5	0.138 \pm 0.029	-41.60 \pm 1.55
PLGA 20 mg·mL ⁻¹	155.3 \pm 2.0	0.134 \pm 0.005	-46.40 \pm 0.26
PLGA 50 mg·mL ⁻¹	1 089.3 \pm 687.7	0.916 \pm 0.146	-24.20 \pm 2.74

2.3 PLGA/pDNA质量比筛选 不同质量比PLGA-pDNA NPs的粒径、PDI及电位结果见表3,可以看出粒径和zeta电位绝对值有随PLGA/pDNA质量比增大而增加的趋势,PDI < 0.2,粒径分布均匀,综合来看,质量比为72:1时粒径更小,zeta电位相对较高,采用凝胶阻滞实验进行进一步验证。

Table 3 Screening results of PLGA/pDNA mass ratio. pDNA: Plasmid DNA

PLGA/pDNA mass ratio	Size-average /nm	PDI	Zeta potential /mV
36:1	165.1 \pm 2.3	0.146 \pm 0.009	-5.70 \pm 1.91
48:1	197.5 \pm 0.4	0.172 \pm 0.034	-34.97 \pm 8.54
72:1	193.4 \pm 3.4	0.121 \pm 0.034	-44.20 \pm 2.19
96:1	259.5 \pm 1.44	0.048 \pm 0.028	-44.27 \pm 7.71

2.4 凝胶阻滞实验 不同质量比PLGA-pDNA NPs的凝胶阻滞结果如图2所示,与裸*Opt-S*质粒组相比,经PLGA包裹的纳米粒组未在泳道上显示条带,表明PLGA-pDNA NPs成功包载*Opt-S*。其中PLGA/pDNA质量比为72:1和96:1时制备的PLGA-pDNA NPs可以明显看出能将质粒滞留在加样孔,且72:1时亮度显著,说明此质量比下PLGA-pDNA NPs能与DNA有效结合。综上所述,确定PLGA/pDNA质量比为72:1。

3 纳米粒的表征

3.1 TEM及DLS表征 空白PLGA NPs与PLGA-

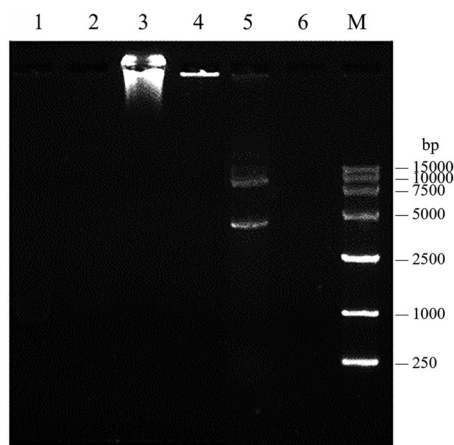


Figure 2 Visualization of the PLGA-pDNA NPs. Lane 1: PLGA/pDNA 36:1; Lane 2: PLGA/pDNA 48:1; Lane 3: PLGA/pDNA 72:1; Lane 4: PLGA/pDNA 96:1; Lane 5: *Opt-S*; Lane 6: PBS; Lane M: Marker

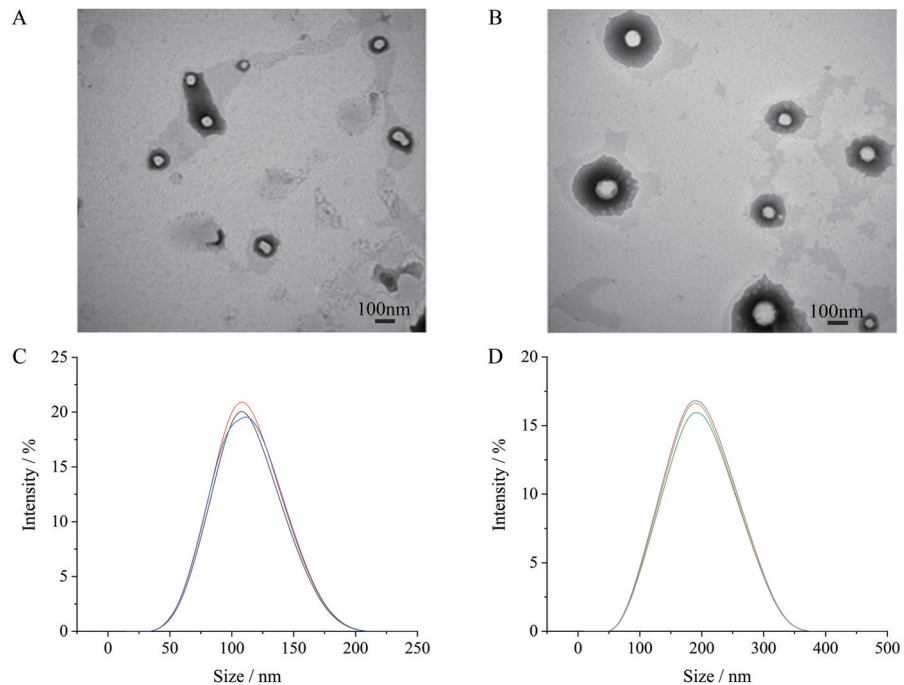


Figure 3 Surface morphology and particle size distribution of PLGA NPs. A, C: Blank PLGA NPs; B, D: PLGA-pDNA NPs

pDNA NPs 的 TEM 及 DLS 表征见图 3, 通过 TEM 观察可见纳米粒形态规则, 表面光滑, 大小均匀, 边缘清晰。通过 DLS 检测可见粒径分布均匀, 空白 PLGA NPs 平均粒径为 (107.6 ± 0.15) nm, PDI 为 0.042 ± 0.012 , zeta 电位为 (-35.9 ± 1.25) mV, 处方优化工艺制备的 PLGA-pDNA NPs 平均粒径为 (184.2 ± 2.4) nm, PDI 为 0.093 ± 0.013 , zeta 电位为 (-68.10 ± 0.36) mV。

3.2 包封率检测 采用 PicoGreen™ dsDNA 定量检测试剂进行 pDNA 浓度-荧光强度标准曲线的绘制和包封率的测定, 由标准曲线得到 DNA 线性回归方程 $y = 0.0302x - 0.3151$ ($r = 0.9996$), $r > 0.999$ 符合要求, 根据该回归方程计算 PLGA-pDNA NPs 中游离 DNA 的含量, 进而得出包封率为 $(98.92 \pm 0.22)\%$ 。

4 抗 DNase I 能力考察

考察 PLGA-pDNA NPs 对 pDNA 的核酸酶保护作用, 如图 4 所示, 不添加 DNase I 的裸 *Opt-S* 质粒组出现条带, PLGA-pDNA NPs 包裹的 *Opt-S* 质粒经 DNase I 作用后滞留在加样孔, 可看到加样孔中有明亮条带, 而经 DNase I 作用后未被包裹的裸 *Opt-S* 质粒组加样孔及泳道中均无条带, 说明裸 *Opt-S* 质粒被 DNase I 降解, PLGA-pDNA NPs 可以保护 *Opt-S* 质粒不被 DNase I 降解。

5 稳定性考察

PLGA-pDNA NPs 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 3 或 7 个月后, 肉眼观察未见溶液发生聚集和沉降现象, 粒径和 PDI 变化如图 5 所示, 3 个月 PLGA-pDNA NPs 平均粒径为 (207.1 ± 1.5) nm, PDI 为 0.117 ± 0.010 , zeta 电位为

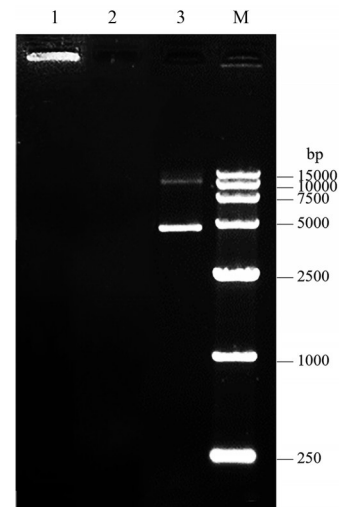


Figure 4 Protective effect of PLGA-pDNA NPs on DNase I. Lane 1: PLGA-pDNA NPs with DNase I; Lane 2: *Opt-S* pDNA with DNase I; Lane 3: *Opt-S* pDNA without DNase I; Lane M: Marker

(-57.67 ± 2.55) mV; 7 个月 PLGA-pDNA NPs 平均粒径为 (228.5 ± 3.3) nm, PDI 为 0.132 ± 0.056 , zeta 电位为 (-44.20 ± 4.42) mV, 可见纳米粒的粒径和 PDI 变化幅度均较小, 稳定性较好。

6 体外释放评价

PLGA-pDNA NPs 的释放结果如图 6 所示, PLGA-pDNA NPs 中 pDNA 在 0~48 h 快速释放, 释放量达到 $(49.42 \pm 0.50)\%$, 此为突释阶段, 随着时间的延长释放

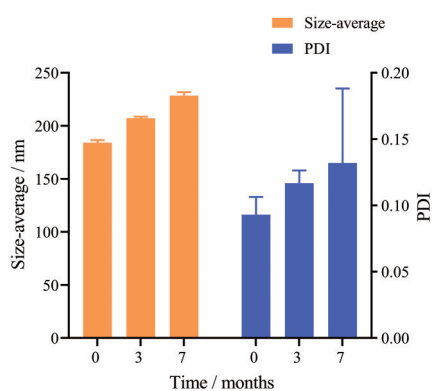


Figure 5 Stability of PLGA-pDNA NPs at 3 and 7 months ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

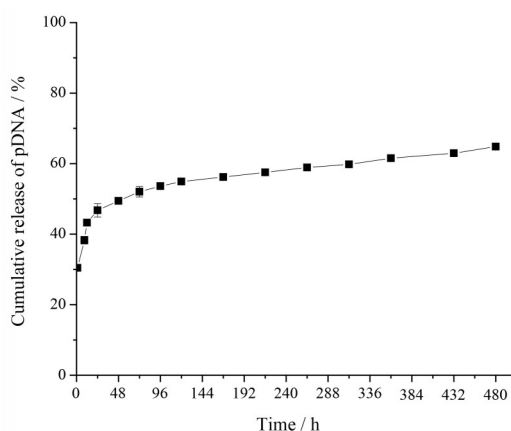


Figure 6 Cumulative release of pDNA from PLGA-pDNA NPs ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

缓慢增加,到20天释放达 (64.83 ± 0.85)%,具有一定的缓释效能。

7 体外细胞评价

7.1 细胞毒性实验 采用CCK-8法测定不同浓度的空白PLGA NPs及PLGA-pDNA NPs对DC2.4细胞作用24、48 h的细胞毒性,并以Lipo3000作用24 h的细胞毒性作为对照。如图7所示,空白PLGA NPs和PLGA-pDNA NPs在不同浓度下的细胞存活率均大于80%,pDNA浓度 $\geq 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,PLGA-pDNA NPs细胞毒性显著低于Lipo3000,表明优化工艺制备的PLGA-pDNA NPs对DC2.4细胞无抑制作用,无明显毒性,构建的SARS-CoV-2 DNA疫苗纳米粒递送系统具有较高的安全性。

7.2 体外转染实验 将DC2.4细胞转染48 h后分别进行激光共聚焦观察和流式细胞术分析,由图8A可以看出,空白PLGA NPs未能检测到绿色荧光,裸 *Opt-S-GFP* 质粒组荧光较弱,PLGA-pDNA NPs组可以检测到强于裸质粒组、偏弱于Lipo3000组的绿色荧光。由图8B可以看出,与空白组荧光强度相比,裸 *Opt-S* 质粒组

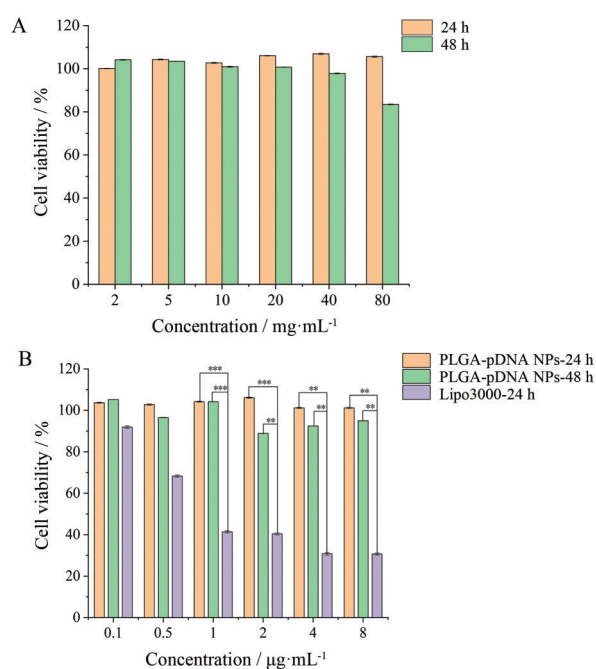


Figure 7 Blank PLGA NPs (A), PLGA-pDNA NPs and Lipo3000 (B) act on DC2.4 cell viability results. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

变化不大,而PLGA-pDNA NPs组与Lipo3000组荧光强度均明显增加,PLGA-pDNA NPs组阳性率为55.8%,Lipo3000组阳性率为64.7%,结果表明PLGA-pDNA NPs可以使SARS-CoV-2 *Opt-S*基因进入细胞并表达。

讨论

COVID-19疫情给全球带来不同程度的影响,对经济增长、社会公共健康造成了巨大冲击,进而引发社会危机和心理危机,随着各种更强传播性变异株的出现,继续开发新的疫苗平台、使用不同的疫苗开发策略进一步提高疫苗的稳定性和安全性迫在眉睫。

本文基于PLGA纳米粒构建SARS-CoV-2 DNA疫苗,选择SARS-CoV-2 S蛋白为疫苗靶点,设计合成SARS-CoV-2重组质粒 *Opt-S*,使用具有生物相容性及生物可降解性等诸多优势的PLGA制备PLGA-pDNA NPs,改善DNA易降解问题,通过处方筛选,控制PLGA-pDNA NPs的粒径、PDI及zeta电位于适宜的范围内,确定了PLGA-pDNA NPs的最佳制备工艺。使用优化工艺制备的PLGA-pDNA NPs形态规整,平均粒径为 (184.2 ± 2.4) nm,分散性较好,具有较高的包封率和稳定性,能抵抗DNase I降解,有一定的缓释效果,体外细胞转染效率高,略低于Lipo3000,但其转染效果不受血清和抗生素的影响,细胞毒性低于Lipo3000,安全性高,表明PLGA-pDNA NPs可以更安

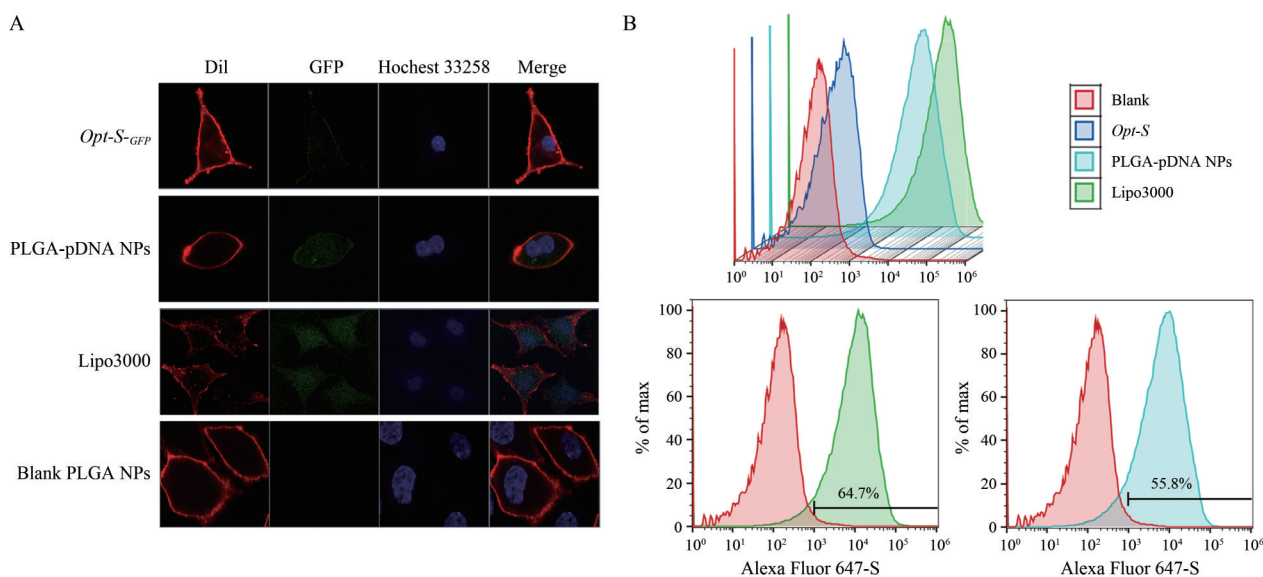


Figure 8 Evaluation of cell transfection *in vitro*. A: Results of immunofluorescence identification *in vitro*; B: Results of flow cytometry *in vitro* transfection; GFP: Green fluorescent protein

全稳定地递送 SARS-CoV-2 S 基因进入细胞并表达, 为 COVID-19 疫苗的开发提供参考, 有望在应对 COVID-19 等传染病中发挥作用。

作者贡献: 吴雅琦是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 完成数据分析、论文初稿的撰写; 李蒙、邢昊楠指导并参与实验设计和结果分析; 陈大全、郑爱萍是项目构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Chavda VP, Kapadia C, Soni S, et al. A global picture: therapeutic perspectives for COVID-19 [J]. *Immunotherapy*, 2022, 14: 351-371.
- [2] Stone BM. The explanatory ability of COVID-19 life changes on quality of life: a comparison of those who have had and not had COVID-19 [J]. *Curr Psychol*, 2022. DOI: 10.1007/s12144-022-03504-1.
- [3] Ochani R, Asad A, Yasmin F, et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management [J]. *Infez Med*, 2021, 29: 20-36.
- [4] An X, Martinez MP, Rezvan A, et al. Single-dose intranasal vaccination elicits systemic and mucosal immunity against SARS-CoV-2 [J]. *iScience*, 2021, 24: 103037.
- [5] Hadj HI. COVID-19 vaccines and variants of concern: a review [J]. *Rev Med Virol*, 2022, 32: e2313.
- [6] Kang S, Yang M, Hong Z, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1228-1238.
- [7] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181: 271-280.
- [8] Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5: 562-569.
- [9] Wu C, Liu Y, Yang Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 766-788.
- [10] Wang L, Xiang Y. Spike glycoprotein-mediated entry of SARS coronaviruses [J]. *Viruses*, 2020, 12: 1289.
- [11] Acosta-Coley I, Cervantes-Ceballos L, Tejeda-Benítez L, et al. Vaccines platforms and COVID-19: what you need to know [J]. *Trop Dis Travel Med Vaccines*, 2022, 8: 20.
- [12] Li M, Wang H, Tian L, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 146.
- [13] Silveira MM, Moreira MSG, Mendonça M. DNA vaccines against COVID-19: perspectives and challenges [J]. *Life Sci*, 2021, 267: 118919.
- [14] Jin X, Yu QL, Wang B, et al. Research progress on DNA vaccines against SARS-CoV-2 [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2020, 29: 2425-2433.
- [15] Smith TRF, Patel A, Ramos S, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 2601.
- [16] Cappellano G, Abreu H, Casale C, et al. Nano-microparticle platforms in developing next-generation vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9: 606.

- [17] Park K, Skidmore S, Hadar J, et al. Injectable, long-acting PLGA formulations: analyzing PLGA and understanding microparticle formation [J]. *J Control Release*, 2019, 304: 125-134.
- [18] Harada A, Tsutsuki H, Zhang T, et al. Preparation of biodegradable PLGA-nanoparticles used for pH-sensitive intracellular delivery of an anti-inflammatory bacterial toxin to macrophages [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2020, 68: 363-368.
- [19] Niu X, Zou W, Liu C, et al. Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2009, 35: 1375-1383.
- [20] Leya T, Ahmad I, Sharma R, et al. Bicistronic DNA vaccine macromolecule complexed with poly lactic-co-glycolic acid-chitosan nanoparticles enhanced the mucosal immunity of *Labeo rohita* against *Edwardsiella tarda* infection [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 156: 928-937.
- [21] Duguay BA, Huang KW, Kulka M. Lipofection of plasmid DNA into human mast cell lines using lipid nanoparticles generated by microfluidic mixing [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 104: 587-596.
- [22] Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, et al. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery [J]. *Int J Pharm*, 2008, 354: 210-216.