

可电离脂质纳米粒用于 siRNA 递送的研究进展

赵雅楠, 何伟, 邵泉林, 刘华宇, 刘铭琦, 莫然*

(中国药科大学, 高端药物制剂与材料研究中心, 江苏南京 210009)

摘要: 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 是 RNA 干扰的引发物, 通过靶向降解特定信使 RNA, 抑制基因表达。siRNA 对基因调控的高效性与特异性, 在疾病治疗方面有重要意义。然而, 裸露或未经修饰的 siRNA 存在稳定性差、易被核酸酶降解、体内半衰期短、入胞效率低等诸多缺陷, 导致其成药性低。可电离脂质纳米粒作为新兴的非病毒类核酸递送系统, 在提升 siRNA 成药性上发挥了重要作用。目前已有一款基于可电离脂质纳米粒的 siRNA 药物获批上市, 用于罕见病的治疗。本文介绍了可电离脂质纳米粒在 siRNA 递送中的研究进展, 重点讨论脂质纳米粒各组分对 siRNA 介导的基因沉默效率的影响, 为可电离脂质纳米粒递送 siRNA 的研究提供参考。

关键词: 药物递送; 小干扰 RNA; 可电离脂质; 脂质纳米粒; 基因沉默

中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2292-08

Research progress of ionizable lipid nanoparticles for siRNA delivery

ZHAO Ya-nan, HE Wei, SHAO Quan-lin, LIU Hua-yu, LIU Ming-qi, MO Ran*

(Center of Advanced Pharmaceuticals and Biomaterials, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Small interfering RNA (siRNA) is the initiator of RNA interference and inhibits gene expression by targeted degradation of specific messenger RNA. siRNA-mediated gene regulation has high efficiency and specificity and exhibits great significance in the treatment of diseases. However, the naked or unmodified siRNA has poor stability, easy to degrade by nuclease, short half-life, and low intracellular delivery. As an emerging non-viral nucleic acid delivery system, ionizable lipid nanoparticles play an important role in improving the druggability of siRNA. At present, one siRNA drug based on ionizable lipid nanoparticles has been approved for the treatment of rare disease. This review introduces the research progress in ionizable lipid nanoparticles for siRNA delivery, focusing on the effect of each component of lipid nanoparticles on the efficiency of siRNA-mediated gene silencing, which provides new references for the studies on ionizable lipid nanocarriers for siRNA delivery.

Key words: drug delivery; small interfering RNA; ionizable lipid; lipid nanoparticle; gene silencing

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)^[1]是近年来生命科学领域最为重大的发现之一, 通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 特异性地降解信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 从而抑制特定基因表达。RNAi 的发现获得了 2006 年诺贝尔生理学/医学

奖, 激发了 siRNA 药物研发的热潮^[2]。针对疾病的致病基因, 设计作用于该基因 mRNA 的 siRNA, 抑制或沉默该致病基因的表达, 从而达到治疗疾病的目的。siRNA 通常是长度为 21~23 个核苷酸的双链 RNA^[3], 在细胞质中与 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合, 结合后 siRNA 解旋, 正义链被降解, 并激活 RISC, 活化的 RISC 选择性地结合 siRNA 反义链碱基互补的 mRNA, 引发靶 mRNA 的降解, 从而阻断 mRNA 的翻译并抑制基因表达。与传统

收稿日期: 2023-04-11; 修回日期: 2023-05-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82273876); 江苏省卓越博士后计划资助 (2022ZB290).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271159, E-mail: rmo@cpi.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0451

化学药物相比, siRNA 具有高效性和特异性等优点。siRNA 药物的研发涉及多个治疗领域^[4-7], 包括遗传性疾病、病毒感染、癌症和自身免疫性疾病等 (表 1)。

尽管 RNAi 疗法展现出巨大的潜力, 但是将 siRNA 有效递送至靶细胞内存在诸多挑战^[4]。例如, 裸露或未经修饰的 siRNA 在血液中易被核酸酶降解, 导致体内半衰期短; siRNA 易被网状内皮系统吞噬或经肾脏随尿液排出体外, 无法到达靶器官或靶组织^[8]; 由于分子量较大以及高亲水性和强负电性, siRNA 难以穿过细胞膜, 造成入胞效率低; siRNA 从内吞囊泡 (如内涵体) 成功“逃逸”转运至细胞质中也极大影响其基因沉默效率等^[9]。因此, 亟需开发高效递送技术将 siRNA 输送到靶器官及靶细胞内。理想的 siRNA 递送载体需满足以下要求^[10]: 提高 siRNA 的稳定性, 保护其不被核酸酶降解, 降低血浆蛋白的非特异性吸附及网状内皮系统的捕获, 促进靶细胞的摄取, 实现内涵体逃逸并在细胞质中释放 siRNA 发挥作用, 同时载体自身有着低毒性和免疫原性^[11]。目前常用的 siRNA 递送载体分为病毒和非病毒载体两类^[12]。病毒载体具有较高的转染效率, 但由于载量低、安全性及免疫原性等问题限制了其在基因治疗中的应用。相比之下, 非病毒载体^[13]具有低成本、高载量、高安全性、低免疫原性以及便于大规模生产等优点得到了广泛研究, 推动了基因治疗的发展^[14]。

脂质纳米载体是研究及应用最广的非病毒核酸递送系统。早期研究主要使用阳离子脂质, 如 1,2-双十八烯氧基-3-甲基铵-丙烷 (DOTMA) 和 1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷 (DOTAP)^[15], 与带负电的核酸通过静电作用形成正电性纳米粒, 来提高基因的递送效率。其中, DOTMA 是商用转染试剂 lipofectamine 2000 的关键脂质。然而, 阳离子脂质具有较强的毒性和免疫原性, 并且正电性纳米粒易与血浆蛋白结合, 继而被网

状内皮系统快速清除, 极大地限制了体内应用^[16]。可电离阳离子脂质是一类新型脂质, 具有 pH 敏感性。基于可电离脂质构建的脂质纳米粒 (lipid nanoparticle, LNP) 被广泛用于 siRNA 的递送并已应用于临床疾病的治疗^[17]。2018 年, 美国食品药品监督管理局批准了全球首个基于 LNP 递送技术的 siRNA 药物 Onpattro (Patisiran)^[18], 用于治疗遗传性甲状腺素运载蛋白淀粉样变性引发的多发性神经病变 (表 1)。该药物借助 LNP 将 siRNA 递送至肝脏, 在肝细胞内通过 siRNA 介导的基因沉默, 抑制甲状腺素运载蛋白 (TTR) 的表达^[19]。

可电离 LNP 由可电离脂质、辅助磷脂、胆固醇和 PEG 化脂质组成 (图 1)^[20]。LNP 的内部结构模型主要分为多层囊泡和纳米结构核心等^[21]。多层囊泡模型认为 siRNA 规律排布在可电离脂质和外层脂质双层之间。纳米结构核心模型认为 siRNA 存在于 LNP 内部的“反胶束”中。LNP 的内部结构以及包封的 siRNA 与脂质组分之间的相互作用仍有待深入研究。常用的 LNP 制备方法包括薄膜分化法、乙醇注入法、挤出法和纳米沉淀法等^[22]。目前, 最先进的 LNP 制备技术为微流控混合技术, 其具有条件温和、可重复性高、制备速度快、易于生产放大且制得的颗粒单分散性高等优点^[23]。可电离脂质是 LNP 中最主要的成分, 一般占比约 50 mol% 左右, 分子结构通常含有一个可电离的氨基, 在生理条件 (pH 7.4) 下不带电, 但在酸性条件下带正电。可电离脂质的 pH 敏感性有利于 siRNA 的体内递送, 在血液中呈电中性, 减少与血浆蛋白等生物分子的非特异性吸附, 提高生物相容性^[24], 在胞内内涵体的酸性条件下发生质子化带正电, 与带负电的脂质相互作用, 易形成不稳定的倒六角相^[25], 促进 LNP 与内涵体膜融合, 或通过“质子海绵效应”^[26], 实现 LNP 的内涵体逃逸, 将 siRNA 释放到细胞质中发挥基因沉默作

Table 1 Representative siRNA-based therapeutics. TTR: Transthyretin; ALAS1: δ -Aminolevulinic acid synthase 1; HAO1: Hydroxyacid oxidase 1; PCSK9: Proprotein convertase subtilisin-kexin type 9; AT: Antithrombin; C5: Complement C5; AATD: α -1 Antitrypsin deficiency; AAT: α -1 Antitrypsin; HBV: Hepatitis B virus; AGT: Angiotensinogen; EphA2: Erythropoietin-producing hepatoma receptor A2; AR: Androgen receptor

Name	Disease	Target	Company/Institute	Phase	Clinical trial identifier
Onpattro	TTR-mediated amyloidosis	TTR	Alnylam	Approved	NCT03862807
Givlaari	Acute hepatic porphyrias	ALAS1	Alnylam	Approved	NCT03338816
Lumasiran	Primary hyperoxaluria type 1	HAO1	Alnylam	Approved	NCT03681184
Vutrisiran	Amyloidosis	TTR	Alnylam	Approved	NCT03759379
Inclisiran	Hypercholesterolemia	PCSK9	Alnylam; Novartis	Approved	NCT03060577
Fitusiran	Hemophilia	AT	Alnylam; Genzyme	Phase III	NCT03549871
Cemdisiran	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	C5	Regeneron	Phase III	NCT05133531
ALN-AAT02	AATD	AAT	Alnylam	Phase I/II	NCT03767829
ARO-HBV	Hepatitis B	HBV	Arrowhead	Phase I/II	NCT03365947
ALN-AGT	Hypertension	AGT	Alnylam	Phase I	NCT03934307
siRNA-EphA2-DOPC	Advanced malignant solid neoplasm	EphA2	M.D. Anderson Cancer Center	Phase I	NCT01591356
SXL01	Prostatic cancer	AR	Institute Claudius Regaud	Phase I	NCT02866916

用。本文综述了基于可电离脂质的LNP在siRNA递送中的研究进展,重点探讨LNP各组分对siRNA基因沉默效率的影响,以期对相关研究者提供参考。

1 可电离脂质

可电离脂质的结构一般分为三部分:含可电离氨基的亲水头基、连接键和疏水尾链(图2)。1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)和1,2-二油氧基-*N,N*-二甲基-3-氨基丙烷(DODMA)是最早用于RNA递送的可电离脂质^[27],由二甲氨基头基和两条不饱和烷烃尾链组成。在DODMA基础上,通过合理的结构设计,开发了DLin-DMA和DLin-MC3-DMA。后者是siRNA药物Onpattro中的可电离脂质成分^[28]。围绕可电离脂质的头基、连接键和疏水尾链进行了大量的修饰和优化,进一步探究可电离脂质结构对siRNA递送效率的影响。

1.1 可电离头基 头基的种类会影响LNP的表观酸解离常数(pK_a)、粒径和内涵体逃逸效率等(图2)。

Jayaraman等^[29]通过对亲水性头基进行系统性结构筛选,调节了可离子化脂质的 pK_a ,并研究了 pK_a 值与活性的关系。设计了不同的头基包括伯胺、仲胺、叔胺、季铵和吡啶盐等,半数有效量(ED_{50})随 pK_a 值变化的曲线显示递送效果较好的可电离脂质的 pK_a 范围为6.2~6.5,其中最佳 pK_a 为6.44的DLin-MC3-DMA脂质在小鼠模型上对凝血因子VII具有最高的体内基因沉默效力, ED_{50} 值为 $0.03\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。进一步研究发现,头基结构的变化影响亲水性区域的尺寸,其中可电离脂质DLin-MC3-DMA含有体积较小的二甲氨基类头基,在形成LNP时倾向于采用倒置的非双层结构,有助于破坏内涵体膜,将siRNA释放到细胞质中。

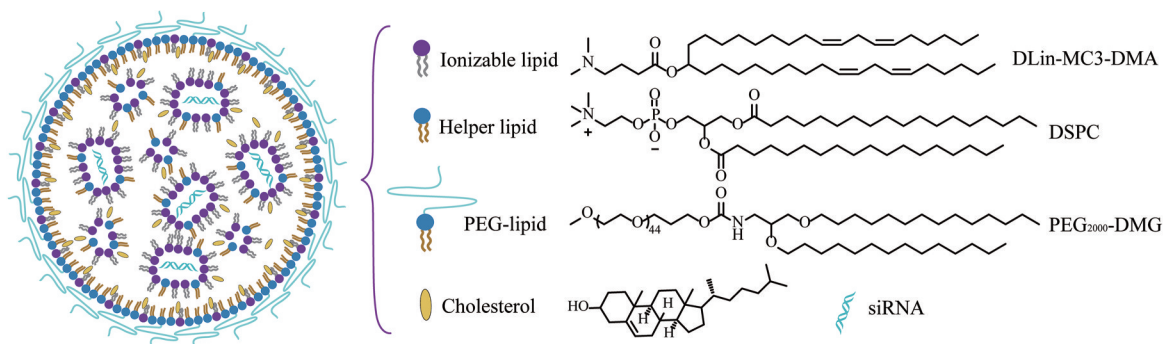


Figure 1 Schematic illustration of LNP and its components

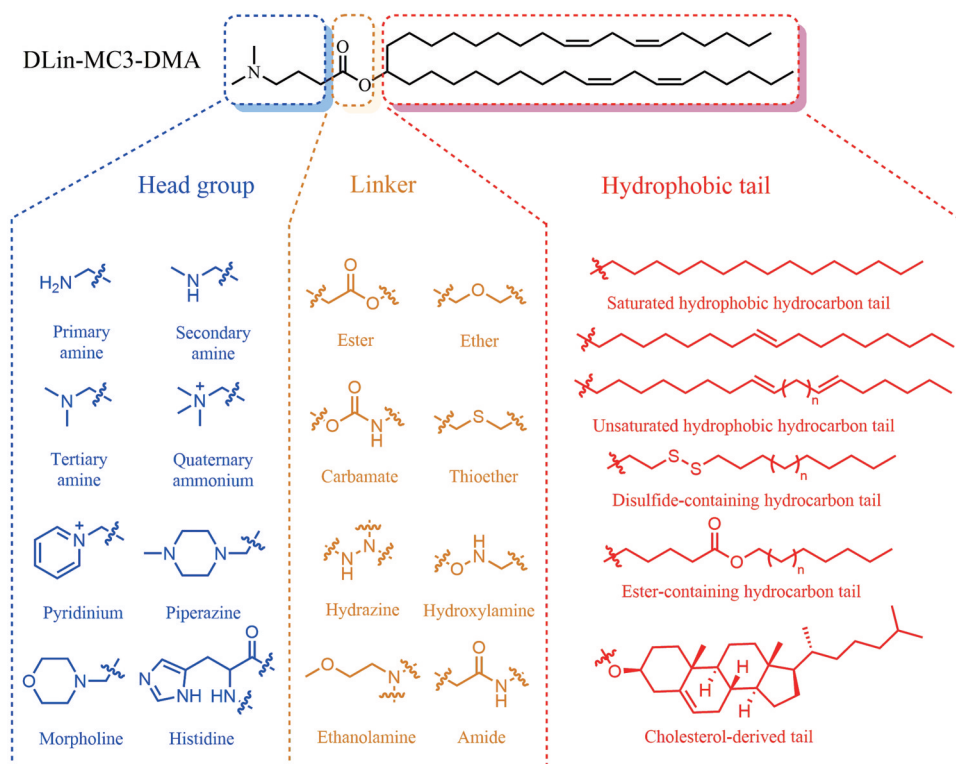


Figure 2 Chemical structures of the DLin-MC3-DMA lipid template and three segments for lipid optimization

Semple 等^[25]以 DLin-K-DMA 为基础, 研究了头基变化对 siRNA 递送效率的影响。与含二甲氨基头基的 DLin-K-DMA 相比, 发现含有哌嗪基的 DLin-K-MPZ 和吗啉基的 DLin-K-MA 的 LNP 在小鼠模型中对凝血因子 VII 的沉默效率较低, ED_{50} 分别为 1.5 和 $>15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 而在头基中引入亚甲基获得 DLin-KC2-DMA, ED_{50} 值为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 与 DLin-K-DMA 相比, 体内沉默效率提高了 3 倍。

氨基酸是构成蛋白质的基本结构单位, 作为内源性分子, 具有高生物相容性和低毒性的特点。Patel 等^[30]将组氨酸引入到头基中合成了 8 种可电离脂质, 构建 LNP 用于 siRNA 的递送。结果显示, 在人前列腺癌 (PC3) 细胞中, $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ siRNA 浓度下, 优选脂质 LHHK 可沉默细胞中 70% 的荧光素酶的表达, 与 Lipofectamine 2000 相当。随着头基中组氨酸残基数的增加, LNP 的沉默活性逐渐提高。体外细胞毒性实验结果表明, 可电离脂质的安全性显著高于 Lipofectamine 2000, 8 种脂质制备的 LNP 的细胞存活率约为 80%, 而 Lipofectamine 2000 的存活率仅为 40%。此外, LHHK LNP 在 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下可成功实现胰腺腺癌 (PANC-1) 和 (PANC02) 细胞中的基因沉默。负载 IKBKE siRNA 的 LHHK LNP 在胰腺癌荷瘤小鼠模型上能够有效沉默肿瘤内 IKBKE 的表达, 显著抑制肿瘤生长, 表明氨基酸头基脂质构建的可电离 LNP 在 siRNA 递送和肿瘤治疗方面具有巨大潜力。

1.2 连接键 在脂质结构中, 常见的亲水头基与疏水尾链间的连接键包括酯键、醚键、氨基甲酸酯、硫醚键、肼、羟胺、乙醇胺和酰胺等, 对 siRNA 递送效率也有着重要影响 (图 2)^[31]。

Semple 等^[25]合成了头基尾链相同, 而连接键分别为酯键、醚键、氨基甲酸酯键和硫醚键的 DLin-DAP、DLin-DMA、DLin-C-DAP 和 DLin-S-DMA, 研究连接键对转染效率的影响。以连接键为醚键的 DLin-DMA 制得的 LNP ($\sim 71 \text{ nm}$) 在小鼠模型上沉默凝血因子 VII 的效率最高, ED_{50} 值为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。而以连接键为酯键的 DLin-DAP 制得的 LNP ($\sim 65 \text{ nm}$) 的体内基因沉默效率最差, ED_{50} 值仅为 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

Ramishetti 等^[32]构建了基于可电离脂质 DLin-MC3-DMA 的脂质库, 包含肼、羟胺和乙醇胺等连接键, 制得的 LNP 粒径约为 100 nm , 并将整合素 $\beta 7$ 抗体修饰到负载 CD45 siRNA 的 LNP 表面, 用于靶向体内 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的 T 淋巴细胞。结果显示, 小鼠尾静脉注射剂量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 含肼连接键脂质的 LNP 几乎无沉默效果, 而含羟胺键脂质和含乙醇胺键脂质的 LNP 在 T 淋巴细胞中表现出显著的基因沉默作用, 沉默效率约为

40%。该研究为有效递送 siRNA 至体内特定细胞提供了新方法。

Akinc 等^[33]构建了以酰胺键和酯键为连接键的系列可电离脂质库, 在头基和尾链相同的情况下, 探究连接键改变对 LNP 沉默效果的影响。体外筛选实验结果显示, 在人源宫颈癌 (HeLa) 细胞中, 以酯键为连接键脂质构建的 LNP 的体外沉默效率优于 60% 的可电离脂质有 2 个, 而以酰胺键为连接键脂质制得的 LNP 的体外沉默效率优于 60% 的可电离脂质有 12 个。在小鼠模型中, 连续两天注射 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ siRNA 剂量下, 含有酰胺连接键的脂质 98N12 的 LNP 具有最强的体内基因沉默效率, 对凝血因子 VII 的沉默效率达到 95%。

1.3 尾链 疏水性尾链的长度和不饱和度会影响亲脂性、流动性、融合性和 pK_a 等, 进而影响 LNP 的形成和效力。不同饱和度的 8 到 18 个碳数的烷烃链、胆固醇衍生物或生育酚衍生物均可作为脂质的疏水部分^[31] (图 2)。

Heyes 等^[34]研究了脂质饱和度、流动性与胞内核酸递送效率的关系, 构建了含有叔胺头基尾链饱和度不同的 DSDMA、DODMA、DLinDMA 和 DLenDMA 四种可电离脂质。该系列脂质在体外成功将 Luciferase siRNA 递送至小鼠脑神经瘤 (Neuro2A) 细胞中。研究发现, 随着不饱和度从 0 增加到 6, 脂质从层状相到倒六边形 H (II) 相的相变温度由 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 降低至 $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 流动性增加。在体外转染实验中, 以 DLinDMA 脂质 (每条尾链含有两个双键) 制得的 LNP 在 $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下的基因沉默效率达到 80%, 而以饱和脂质 DSDMA 制备的 LNP 未见基因沉默作用。因此, 通过增加脂质疏水域的不饱和度可提高 LNP 的转染效率。Metwally 等^[35]构建了含有不同饱和度的不对称尾链脂质库, 在体外将 siRNA 递送至 HeLa 细胞中。研究发现, 具有一个和两个不饱和度的 C18 酰基尾链脂质 LinOS 和 DOS 产生高效的基因沉默, 在 $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ siRNA 浓度下, 脂质浓度为每孔 3 和 $6 \text{ } \mu\text{g}$ 时, 显著抑制绿色荧光蛋白的表达, 绿色荧光蛋白的表达率分别为 24% 和 30%。初步安全性实验证明, 筛选出的脂质具有良好的生物安全性, 在 $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ siRNA 浓度下, 脂质浓度分别为每孔 0.3 和 $0.6 \text{ } \mu\text{g}$, LinOS 脂质组的细胞存活率为 88%, DOS 脂质组的存活率为 85%, 显著优于 Lipofectamine 2000。

Tao 等^[36]在尾链不同位置引入疏水性的胆固醇构建 CLinDMA 系列脂质, 通过静脉给药方式将 Luciferase siRNA 递送到小鼠肝脏。在小鼠模型中, 距连接键 8 个碳长度处引入胆固醇的脂质对凝血因子 VII 具有最佳的基因沉默效率。筛选获得的最优脂质 LNP02L 构建的 LNP 在 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ siRNA 剂量下能够沉默肝脏中

90%的荧光素酶表达,且沉默效果可持续10天,表明该体系在肝脏疾病治疗中有较好的应用潜力。

Wang等^[37]通过迈克尔加成法合成了6种尾链中含有二硫键的脂质,在肿瘤细胞内可实现响应性释放。优选脂质1-O16B制备的LNP粒径约为160 nm,在人源乳腺癌(MDA-MB-231)细胞中,体外基因沉默效率达到72%,而Lipofectamine 2000的基因沉默效率为40%。负载Polo样激酶1(Polo-like kinase 1, PLK1) siRNA的1-O16B LNP在HeLa细胞和鼠源三阴性乳腺癌(4T1)细胞中PLK1的沉默效率显著优于Lipofectamine 2000,表明设计响应性脂质来调控siRNA的胞内递送是一种很有前景的方法。

为了减少脂质蓄积带来的潜在不良反应,可电离LNP需具有良好的生物降解性,降解为无毒的代谢物^[38]。由于DLin-MC3-DMA尾链的降解速度较慢, Maier等^[39]通过将酯键引入到可电离脂质DLin-MC3-DMA的疏水尾链中合成了6种可电离脂质,探究了酯键在烷基链不同位置(C4、C6、C8、C10和C18)对转染效率的影响。制得的LNP的粒径约为60 nm,包封率在90%以上,表明存在疏水烷基尾链中的酯键不会影响包封率。体内实验研究结果显示,最优脂质L319的LNP在0.01 mg·kg⁻¹剂量下,对小鼠凝血因子VII的沉默效率达75%,而在0.1 mg·kg⁻¹剂量下,对大鼠凝血因子VII的沉默效率高达90%。当酯键位置向头部基团靠近会导致转染效率显著降低。脂质L356(酯键在C6)对小鼠凝血因子VII的ED₅₀值为0.12 mg·kg⁻¹,与L319脂质(酯键在C8)相比,提高了10倍以上。含L319的LNP在小鼠中给药4 h后药物浓度下降到0.1%, 8 h后浓度下降到0.8 pmol·mL⁻¹,表明该LNP能够从血浆中快速清除。用¹⁴C标记L319脂质后,大鼠尾静脉注射0.37 mg·kg⁻¹的LNP,给药12 h后在尿液中检测到30%的L319, 12~24 h内在粪便中检测到40%, 72 h内被全部清除。含L319的LNP在大鼠体内的耐受性良好,给药剂量10 mg·kg⁻¹,大鼠无明显的不良临床体征和毒理学参数变化,证明其有着良好的生物相容性。因此,生物可降解类可电离脂质在未来的RNAi治疗中具有巨大的应用前景。

2 辅助磷脂

在递送过程中,LNP穿过细胞膜和内涵体膜是影响转染效率的主要因素。辅助磷脂可以调节LNP双分子层的流动性,通过增强LNP与生物膜的融合来提高递送效率^[40]。研究表明,DOTAP脂质虽然能结合siRNA,但由于其内涵体逃逸能力有限,大多在内涵体中被降解,导致转染效率较低^[41]。因此,合适的辅助磷脂有助于LNP有效地从内涵体中逃逸出来,进而释

放siRNA发挥作用。常用的辅助磷脂有1,2-二硬脂酰基-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)等^[42]。其中,DOPE有一个较小的磷酸乙醇胺头基和两条不饱和的尾链,易形成不稳定的倒六边形H(II)相,这种不稳定结构能够促进LNP的内涵体逃逸以及药物的释放^[43]。

磷脂酰胆碱是生物膜的天然组成成分,在LNP形成过程中起稳定作用^[44]。饱和的磷脂酰胆碱如DSPC具有较高的相变温度,可以形成较稳定的纳米粒^[45]。DSPC具有饱和尾链,其相变温度为54 °C,是SARS-CoV-2疫苗mRNA-1273和BNT162b2的组成成分^[17]。然而,DSPC的高稳定性在一定程度上不利于内涵体逃逸从而影响基因的递送效率。不饱和的磷脂酰胆碱如1,2-二油酰基-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)具有较低的相变温度,为-20 °C,在生理状态下是液体^[20]。Wang等^[46]将6种胆碱类磷脂加入到LNP中,考察不同辅助磷脂对LNP转染效率的影响。在人源肝癌(SK-Hep-1)细胞中,100 nmol·L⁻¹ siRNA的浓度下,相比于以DOPC、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)或DSPC为辅助磷脂的LNP,含有蛋黄磷脂酰胆碱(EPC)和DPPC为辅助磷脂的LNP的基因沉默效率较高,可沉默50%细胞中荧光素酶的表达,与阳性对照Lipofectamine 2000相当,说明胆碱类磷脂成分的选择影响LNP的疗效。

Hashimoto等^[47]构建了以DOP-DEDA为可电离脂质的LNP,分别考察了以DPPC和二氢鞘磷脂(DHSM)为辅助磷脂对LNP转染的影响。体外实验表明在siRNA浓度为10 nmol·L⁻¹,在人纤维肉瘤(HT1080)细胞中,以DPPC为辅助磷脂的LNP的基因沉默效率为40%,而以DHSM为辅助磷脂的LNP为60%。进一步测定了LNP的p*K_a*,发现含有DPPC的LNP的p*K_a*为5.42,而含有DHSM的LNP的表观p*K_a*为6.43,结果表明,辅助磷脂可影响LNP的p*K_a*,进而影响LNP的递送效率。Wagner等^[48]研发的含DOPC的LNP(EPHARNA)已进入I期临床试验。该siRNA靶向EphA2(编码一种酪氨酸激酶)并在晚期癌症患者中进行评估。

3 胆固醇

胆固醇通过填充磷脂间的空隙来调节膜的流动性,当与相变温度低的磷脂结合时,降低膜流动性,增加双层膜的厚度;当与相变温度高的脂质结合时,能够提高膜流动性并使双层膜变窄^[49]。此外,胆固醇的加入可以调节膜的完整性和硬度,减少LNP中药物的渗漏^[50]。胆固醇结构变化也显著影响LNP的转染效率。Hattori等^[51]开发了6种胆固醇类似物与DOPE制

备脂质体, 结果表明在人源乳腺癌 (MCF-7) 细胞中, 50 nmol·L⁻¹ siRNA 浓度下, LP-OH、LP-OH-C、LP-HAPC 组转染效率较高, 可抑制 80% 的荧光素酶的表达, LP-DMAPC 和 LP-MHAPC 组可以抑制 50%~70% 的蛋白的表达, LP-DMHAPC 组基本上无抑制效果。Hattori 等^[52]用 DOPE 和氨基甲酸酯胆固醇类似物制备纳米粒, 体外结果显示 LP-NC 脂质体可显著抑制 MCF-7 细胞中荧光素酶的活性, 在 5 nmol·L⁻¹ 浓度下, 可实现 60% 的基因沉默。

4 PEG 化脂质

PEG 化脂质占 LNP 中构成脂质成分的最小摩尔比 (通常为 1.5 mol%), 但其影响 LNP 的性质, 如粒径、分散性以及制备和储存期间的粒子稳定性等^[53]。此外, PEG 化脂质还影响 LNP 的体内半衰期、生物分布和免疫反应等。PEG 化脂质的含量影响 LNP 的粒径, 在 LNP 形成时, 亲水性 PEG 层通过限制脂质融合调节 LNP 的大小, 防止聚集, 提高稳定性。Bao 等^[54]制备了不同 PEG-C-DMA 含量的 7 种 LNP, PEG-C-DMA 的含量由 0.1 mol% 增加到 10 mol%, 所得 LNP 的粒径由 2 067.3 nm 减小至 65 nm, 表明增加 PEG-C-DMA 摩尔比有助于形成更小的 LNP。含 0.1 mol% PEG-C-DMA 的 LNP 不稳定, 存在聚集性和分层性, 粒径约为 2 000 nm。PEG-C-DMA 的含量为 (0.5~10) mol% 的 LNP 在 4 °C 下放置一年后仍有着较好的稳定性。在小鼠模型中, 静脉注射剂量为 3 mg·kg⁻¹ siRNA 时, PEG-C-DMA 含量为 0.5 mol% 的 LNP 对凝血因子 VII 的沉默效率最高, 达 90%, 而 PEG-C-DMA 含量为 10 mol% 的 LNP 的体内沉默效率最低, 仅为 20%。

PEG 化脂质的脂链长度影响 LNP 的循环时间和递送效率。通常来说, 脂质的碳链长度为 10 到 18 个碳。PEG₂₀₀₀-DMG 和 PEG₂₀₀₀-DSG 均为中性的 PEG 化脂质^[55], 其饱和烷基链的碳数分别为 14 和 18。PEG₂₀₀₀-DSG 修饰的 LNP 的体内半衰期约为 27 h, 而 PEG₂₀₀₀-DMG 的 LNP 的半衰期为约 1 h。虽然 PEG₂₀₀₀-DMG LNP 的循环时间更短, 但具有更高的体外基因沉默效率。在 HeLa 细胞中, 1 nmol·L⁻¹ siRNA 浓度下, PEG₂₀₀₀-DSG LNP 的基因沉默效率为 40%, PEG₂₀₀₀-DMG LNP 为 60%, 可能原因是 PEG₂₀₀₀-DMG 从 LNP 表面快速解离, 增加了靶细胞的摄取。综上所述, PEG 化脂质在调节 LNP 的理化性质及生理学特性方面起着重要作用。但 PEG 化脂质也存在一些局限, 如产生快速血液清除 (accelerated blood clearance, ABC) 现象^[56], 即首次注射的 PEG 化纳米粒产生了抗 PEG IgM, 二次注射 PEG 化纳米粒后, 抗 PEG IgM 快速识别并结合纳米粒, 激活补体系统, 加快单核吞噬系统对 PEG 化纳米粒的捕

获, 导致其快速从血液中清除。Abu Lila 等^[57]采用聚甘油 (PG) 代替 PEG, 减少加速血液清除现象的发生。在大鼠模型上, 分别二次注射 PG 化脂质体和 PEG 化脂质体。五天后检测血清中 IgM 的水平发现, 不同剂量 (0.001、0.1、5 μmol·kg⁻¹) 的 PG 化脂质体组的血清中几乎未检测到 IgM, 而 PEG 化脂质体组诱导大量 IgM 的产生。因此, 开发 PEG 有效替代物来减少 PEG 介导的免疫原性相关不良反应也是 LNP 递送技术的一个重要研究方向。

5 展望

自 RNAi 现象发现以来, siRNA 具有高效性和特异性等优点, 在疾病治疗方面有着重要的意义, 但裸露或未经修饰的 siRNA 存在稳定性差、易被核酸酶降解、体内半衰期短、入胞效率低等诸多缺陷阻碍了药物的开发。2018 年全球首个基于 LNP 递送技术的 siRNA 药物 Onpatro 获批, 标志着 RNAi 疗法从概念走向实际应用。虽然可电离化 LNP 递送 siRNA 的研究已经取得了一些进展^[58], 但是仍存在诸多挑战。首先, LNP 的体内安全性和药代动力学等特征仍需进一步的探究; 其次, LNP 在体内易被网状内皮系统捕获, 因此其靶向递送效率需进一步提高; 此外, 通过对载体结构的设计修饰实现 LNP 对靶器官和靶细胞特异性递送是当前研发新型递送系统的迫切需要^[59]。目前, 研究人员已开发设计智能响应性材料包括 pH 敏感性脂质等用于增强 siRNA 的靶向功能^[60]、研究多组分反应快速合成脂质库以及将一些生物相容性配体等引入头部基团改善 siRNA 的递送。此外, 研究 LNP 的理化性质、形态等为未来 LNP 的设计提供参考^[61]。随着研究的不断深入, LNP 介导的 siRNA 高效递送技术将会为疾病的靶向治疗提供新方法。

作者贡献: 赵雅楠、刘华宇、刘铭琦负责文献检索及文稿撰写; 邵泉林负责图片绘制; 莫然和何伟负责文稿修改和检查。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2006, 441: 111-114.
- [2] Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence [J]. *Nature*, 2009, 457: 413-420.
- [3] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 129-138.
- [4] Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*,

- 2019, 18: 421-446.
- [5] Zhang Y, Cui LL. Advances in approved nucleic acid drugs and lipid nanoparticle system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 826-833.
- [6] Gao J, Xia Z, Vohidova D, et al. Progress in non-viral localized delivery of siRNA therapeutics for pulmonary diseases [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 1400-1428.
- [7] Butowska K, Han X, Gong N, et al. Doxorubicin-conjugated siRNA lipid nanoparticles for combination cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 1429-1437.
- [8] Crooke ST, Baker BF, Crooke RM, et al. Antisense technology: an overview and prospectus [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 427-453.
- [9] Hattab D, Gazzali AM, Bakhtiar A. Clinical advances of siRNA-based nanotherapeutics for cancer treatment [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 1009.
- [10] Han X, Mitchell MJ, Nie G. Nanomaterials for therapeutic RNA delivery [J]. *Matter*, 2020, 3: 1948-1975.
- [11] Dominska M, Dykxhoorn DM. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123: 1183-1189.
- [12] Subhan MA, Torchilin VP. siRNA based drug design, quality, delivery and clinical translation [J]. *Nanomedicine*, 2020, 29: 102239.
- [13] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 541-555.
- [14] Zhang X, Hai L, Gao Y, et al. Lipid nanomaterials-based RNA therapy and cancer treatment [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 903-915.
- [15] Yuan X, Naguib S, Wu Z. Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8: 521-536.
- [16] Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: current perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 154-155: 37-63.
- [17] Akinc A, Maier MA, Manoharan M, et al. The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs [J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14: 1084-1087.
- [18] Kulkarni JA, Witzigmann D, Chen S, et al. Lipid nanoparticle technology for clinical translation of siRNA therapeutics [J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52: 2435-2444.
- [19] Kulkarni JA, Witzigmann D, Thomson SB, et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 630-643.
- [20] Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114416.
- [21] Viger-Gravel J, Schantz A, Pinon AC, et al. Structure of lipid nanoparticles containing siRNA or mRNA by dynamic nuclear polarization-enhanced NMR spectroscopy [J]. *J Phys Chem B*, 2018, 122: 2073-2081.
- [22] Xu L, Wang X, Liu Y, et al. Lipid nanoparticles for drug delivery [J]. *Adv Nanobiomed Res*, 2021, 2: 2100109.
- [23] Zhang H, Yang J, Sun R, et al. Microfluidics for nano-drug delivery systems: from fundamentals to industrialization [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023. DOI: 10.1016/j.apsb.2023.01.018.
- [24] Kalita T, Dezfouli SA, Pandey LM, et al. siRNA functionalized lipid nanoparticles (LNPs) in management of diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 2520.
- [25] Semple SC, Akinc A, Chen J, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 172-176.
- [26] Hu B, Zhong L, Weng Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 101.
- [27] Ren T, Song YK, Zhang G, et al. Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse [J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 764-768.
- [28] Dong Y, Siegwart DJ, Anderson DG. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 144: 133-147.
- [29] 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.
- [30] Patel P, Fetse J, Lin CY, et al. Development of amino acid-modified biodegradable lipid nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Acta Biomater*, 2022, 154: 374-384.
- [31] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, et al. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2022, 55: 2-12.
- [32] Ramishetti S, Hazan-Halevy I, Palakuri R, et al. A combinatorial library of lipid nanoparticles for RNA delivery to leukocytes [J]. *Adv Mater*, 2020, 32: e1906128.
- [33] Akinc A, Zumbuhl A, Goldberg M, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 561-569.
- [34] Heyes J, Palmer L, Bremner K, et al. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids [J]. *J Control Release*, 2005, 107: 276-287.
- [35] Metwally AA, Reelfs O, Pourzand C, et al. Efficient silencing of EGFP reporter gene with siRNA delivered by asymmetrical N^4, N^9 -diacyl spermines [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9: 1862-1876.
- [36] Tao W, Davide JP, Cai M, et al. Noninvasive imaging of lipid nanoparticle-mediated systemic delivery of small-interfering RNA to the liver [J]. *Mol Ther*, 2010, 18: 1657-1666.
- [37] Wang M, Alberti K, Varone A, et al. Enhanced intracellular siRNA delivery using bioreducible lipid-like nanoparticles [J]. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3: 1398-1403.
- [38] Alabi CA, Love KT, Sahay G, et al. Multiparametric approach for the evaluation of lipid nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 12881-12886.
- [39] Maier MA, Jayaraman M, Matsuda S, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics [J]. *Mol Ther*, 2013, 21: 1570-

- 1578.
- [40] Ickenstein LM, Garidel P. Lipid-based nanoparticle formulations for small molecules and RNA drugs [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2019, 16: 1205-1226.
- [41] Terp MC, Bauer F, Sugimoto Y, et al. Differential efficacy of DOTAP enantiomers for siRNA delivery *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2012, 430: 328-334.
- [42] Evers MJW, Kulkarni JA, Meel R, et al. State-of-the-art design and rapid-mixing production techniques of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery [J]. *Small Methods*, 2018, 2: 1700375.
- [43] Sakurai F, Nishioka T, Yamashita F, et al. Effects of erythrocytes and serum proteins on lung accumulation of lipoplexes containing cholesterol or DOPE as a helper lipid in the single-pass rat lung perfusion system [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001, 52: 165-172.
- [44] Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821: 754-761.
- [45] Cheng X, Lee RJ. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99: 129-137.
- [46] Wang X, Yu B, Ren W, et al. Enhanced hepatic delivery of siRNA and microRNA using oleic acid based lipid nanoparticle formulations [J]. *J Control Release*, 2013, 172: 690-698.
- [47] Hashimoto M, Yonezawa S, Furan S, et al. Increasing the siRNA knockdown efficiency of lipid nanoparticles by morphological transformation with the use of dihydrosphingomyelin as a helper lipid [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11: 3269-3277.
- [48] Wagner MJ, Mitra R, McArthur MJ, et al. Preclinical mammalian safety studies of EPHARNA (DOPC nanoliposomal EphA2-targeted siRNA) [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16: 1114-1123.
- [49] Krause MR, Regen SL. The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 3512-3521.
- [50] Seo H, Jeon L, Kwon J, et al. High-precision synthesis of RNA-loaded lipid nanoparticles for biomedical applications [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12: e2203033.
- [51] Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, et al. Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic lipoplex [J]. *J Drug Target*, 2019, 27: 217-227.
- [52] Hattori Y, Hara E, Shingu Y, et al. siRNA delivery into tumor cells by cationic cholesterol derivative-based nanoparticles and liposomes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38: 30-38.
- [53] Dos Santos N, Allen C, Doppen AM, et al. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768: 1367-1377.
- [54] Bao Y, Jin Y, Chivukula P, et al. Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of siRNA/lipid nanoparticle complexes [J]. *Pharm Res*, 2013, 30: 342-351.
- [55] Zhu X, Tao W, Liu D, et al. Surface de-PEGylation controls nanoparticle-mediated siRNA delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. *Theranostics*, 2017, 7: 1990-2002.
- [56] Besin G, Milton J, Sabnis S, et al. Accelerated blood clearance of lipid nanoparticles entails a biphasic humoral response of B-1 followed by B-2 lymphocytes to distinct antigenic moieties [J]. *Immunohorizons*, 2019, 3: 282-293.
- [57] Abu Lila AS, Nawata K, Shimizu T, et al. Use of polyglycerol (PG), instead of polyethylene glycol (PEG), prevents induction of the accelerated blood clearance phenomenon against long-circulating liposomes upon repeated administration [J]. *Int J Pharm*, 2013, 456: 235-242.
- [58] Zhang M, Huang Y. siRNA modification and delivery for drug development [J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28: 892-893.
- [59] Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15: 313-320.
- [60] Nakamura T, Nakade T, Yamada K, et al. The hydrophobic tail of a pH-sensitive cationic lipid influences siRNA transfection activity and toxicity in human NK cell lines [J]. *Int J Pharm*, 2021, 609: 121140.
- [61] Zhang Y, Sun C, Wang C, et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery [J]. *Chem Rev*, 2021, 121: 12181-12277.