负载寡核苷酸药物的脂质纳米颗粒物理稳定性考察

范雯榕，苗佳颖，奚　泉*

（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，上海 201203）

摘要：寡核苷酸药物已被用于预防和治疗多种疾病。为提高寡核苷酸药物的稳定性并辅助药物跨膜递送，脂质纳米粒（LNPs）常被用作载体。然而，miRNA-LNPs 稳定性较差，导致制剂贮存条件严苛，限制了其广泛应用。该研究以粒径和包封率为指标，探究了处方与工艺因素对 miRNA-LNPs 物理稳定性的影响。结果表明，不同种类的磷脂均有助于提升 LNPs 的物理稳定性，其中 PEG 化磷脂有助于防止 LNPs 聚集；水的相变过程会直接破坏 LNPs 结构，而冷冻保护剂蔗糖与 PEG 化磷脂联用可以有效抵御水的相变对 LNPs 结构的破坏。该研究揭示了结构材料及水的相变影响 miRNA-LNPs 物理稳定性的机制，并据此引入了冷冻保护剂，为改善负载寡核苷酸药物的 LNPs 物理稳定性提供了新的思路和方法，进而为小核酸疗法的临床应用提供了有力的支持。

关键词：脂质纳米颗粒；寡核苷酸药物；物理稳定性；磷脂；冷冻保护剂

中图分类号：R944.9；TQ464.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)09-1174-09

引用：范雯榕，苗佳颖，奚　泉．负载寡核苷酸药物的脂质纳米颗粒物理稳定性考察［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(9)：1174-1182．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.09.008

Investigation on the Physical Stability of Lipid Nanoparticles Loaded with Oligonucleotide Drugs

FAN Wenrong, MIAO Jiaying, XI Quan*

(*Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Oligonucleotide drugs have been utilized in the prevention and treatment of various diseases. To enhance their stability and facilitate transmembrane delivery, lipid nanoparticles (LNPs) are commonly employed as carriers. However, the poor stability of miRNA-LNPs results in stringent storage requirements, limiting their broad application. Therefore, this study investigated the effects of formulation and process parameters on miRNA-LNPs physical stability, using particle size and encapsulation efficiency as key indicators. The results indicated that various phospholipids contributed to the physical stability of LNPs, among which PEGylated phospholipids effectively preventing LNPs aggregation. The phase transition of water directly destroyed the LNPs structure, and the combination of cryoprotectant sucrose and PEGylated phospholipids could effectively resist the damage caused by water phase transition to the LNPs structure. By elucidating the mechanisms by which structural materials and water phase transitions affect miRNA-LNPs physical stability, this study introduced cryoprotectants as a novel strategy to improve the physical stability of oligonucleotide drug-loaded LNPs. These findings provide valuable insights for optimizing LNP-based formulations, thereby strengthening the clinical applicability of small nucleic acid therapeutics.

Key Words: lipid nanoparticle; oligonucleotide drug; physical stability; phospholipid; cryoprotectant

随着生物技术的快速发展，定制 siRNA、miRNA、小激活 RNA（small activating RNA，saRNA）等寡核苷酸药物（oligonucleotide drug），又称小核酸

收稿日期：2025-03-03

作者简介：范雯榕，硕士研究生，专业方向：吸入制剂和复杂注射剂。

通信作者：奚　泉，研究员，博士生导师，从事口服缓控释制剂、吸入制剂和复杂注射剂的研究。

药物（以下简称“xRNA”），通过调控基因表达，在遗传性疾病、恶性肿瘤、病毒感染等的治疗中初步展示出替代现有疗法、填补空白适应证的潜力，有望成为继小分子药物和抗体药物后的第三大类药物[1]。然而，xRNA 存在稳定性差、细胞摄取效率低等缺陷，限制了其临床应用。

脂质纳米颗粒（lipid nanoparticles，LNPs）具有提高药物稳定性并辅助药物跨膜递送等优势，被广泛用作基因药物、蛋白质和多肽药物等的载体[2]。在实际应用中，LNPs 的物理稳定性较差，表现为贮存时易聚集、融合或泄露。这不仅对运输过程要求较高，增加了运输成本，还可能导致 xRNA 在递送过程中泄露或降解，无法发挥治疗作用。

LNPs 的物理稳定性受组成 LNPs 处方中的磷脂和所载 xRNA 的共同影响。上市或临床阶段的产品通常从改变分子结构的角度出发，通过合成新磷脂或对 RNA 进行修饰来提高稳定性。目前，FDA 批准上市的、以 LNPs 为载体的 xRNA（xRNA-LNPs）只有 1 种，即 patisiran（商品名为 Onpattro®）。为提高稳定性，该产品修饰了 siRNA 并采用专用的阳离子磷脂，使其在 2 ～ 8 ℃可贮存 3 年[3]。然而，修饰 RNA 技术的难度高且通用性较差；目前市售的合成磷脂产品又大多受到专利保护，新磷脂分子难以获得，导致上述 2 种方法均难以广泛应用。因此，目前迫切需要寻求通过其他机制改善 LNPs 物理稳定性的新方法。

有研究[4]表明，负载 xRNA 时，LNPs 最内层磷脂疏水基的朝向不同。因此，很有必要对负载 xRNA 的 LNPs 进行研究。miRNA-LNPs 处方体系中包含分散相 LNPs 及连续相水；而 LNPs 由阳离子磷脂、辅助磷脂、胆固醇、PEG 化磷脂组成。目前尚未见结构材料、水的相变和结构稳定剂对 LNPs 物理稳定性影响的研究。miRNA-486-5p 模拟物（miRNA-486-5p mimics，**1**）可通过靶向作用于肺纤维化的关键通路，转化生长因子 β1（transforming growth factor β1，TGF-β1）/Smad2 通路，消除诱导疾病发生的细胞因子，同时清除细胞外基质，有效治疗肺纤维化[5]，为目前尚无特效药物的肺纤维化疾病提供了新的治疗方案。

本研究选择 **1** 为模型药物，选用初代阳离子磷脂［1,2- 二油酰基 - 三甲基氯化铵（1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane，DOTAP）］、辅助磷脂（DSPC）、植物源胆固醇（cholesterol，Chol）、PEG 化磷脂［1,2- 二肉豆蔻酰甘油 - 聚乙二醇 2000（1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypoly-ethylene glycol-2000，DMG-PEG2000）］，通过微流控法制备 **1**-LNPs，并结合预试验结果，以粒径和包封率为指标，深入探究结构材料和冷冻保护剂、水的相变对 LNPs 物理稳定性的影响。随后，以细胞增殖试验验证贮存一段时间后优化制剂的有效性。本研究旨在为基于药剂学策略改善 LNPs 的物理稳定性提供理论依据。

1 仪器与试药

RSP01-BD 型微流控仪（嘉兴贝塔仪器有限公司）；OS40-S 型数显搅拌器（北京大龙兴创实验仪器股份公司）；JM LNP-B01 型微流控芯片（武汉简米智控科技有限公司）；HT7800 型透射电镜（日本 HITACHI 株式会社）；Nicomp Z3000 型激光粒径电位测试仪（美国 Particle Sizing Systems 公司）；Synergy 型酶标仪（美国 BioTek 公司）；EPS301 型电泳仪（英国 Amersham 公司）；U1000-230V 型紫外投射仪（美国 Analytik 公司）；Forma™ 310 型 CO_2 培养箱、1300 系列 A2 型生物安全柜、Countess Ⅲ型全自动细胞计数仪（美国 Thermo Fisher 公司）。

1（批号 RX096092）、三羟甲基氨基甲烷（Tris）-EDTA 缓冲液（TE 缓冲液）购自上海正大通用药业股份有限公司；DOTAP（批号 20230701）、DSPC（批号 20210601）、DMG-PEG2000（批号 20230301）、Triton X-100（批号 20230701）购自上海朗旭生物科技有限公司；Chol［艾伟拓（上海）医药科技有限公司，批号 20221101］；焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate，DEPC）处理后的灭菌水（以下简称“DEPC 水”，上海碧云天生物技术股份有限公司）；PBS（美国 MedChemExpress 公司）；磷钨酸（上海易恩化学技术有限公司）；RiboGreen 试剂（上海羽哚生物科技有限公司）；核糖核酸酶 A（RNase A，广州美基生物科技有限公司）；琼脂糖（德国 BioFroxx 公司）；GelstainRed 核酸染色试剂（苏州优逸兰迪生物科技有限公司）；2K Plus DNA Ⅱ 标准相对分子质量

Marker(M，北京全式金生物技术有限公司)；10× 上样缓冲液(日本 TaKaRa 公司)；胰蛋白酶、DMEM 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司；胎牛血清[顶沃生物工程(上海)有限责任公司]；CCK-8 试剂(上海史伽生物科技有限公司)；无水乙醇为分析纯，水为超滤纯水。

小鼠胚胎成纤维细胞(NIH/3T3 细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2　方法与结果

2.1　LNPs 的制备和表征

2.1.1　LNPs 的制备

微流控法是常用的 LNPs 制备方法，生产效率高、重复性好，制备的 LNPs 粒径可控、均一性好、单分散性高，可以实现自动化连续生产[6]。本研究采用该法，在微通道内快速混合磷脂乙醇溶液和 **1** 水溶液后，由二者自组装成 LNPs 结构，显著提升了 LNPs 的制备效率。

磷脂溶液配制：参照美国 Moderna 公司的上市产品 Spikevax® 处方配比[7]，按物质的量比为 50 ∶ 10 ∶ 38.5 ∶ 1.5 取 DOTAP、DSPC、Chol、DMG-PEG2000，用乙醇溶解，制得磷脂质量浓度为 7.50 mg/mL 的溶液。

***1* 母液配制**：取适量 **1**，加入用 DEPC 水配制的 0.05 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 4.0)，溶解，制得 0.132 mg/mL 的 **1** 母液。

微流控法制备 **1**-LNPs：将含磷的磷脂溶液和含氮的 **1** 母液(氮磷比为 6)通过微流控芯片的入口注入，使用微型注射泵以 4 mL/min 的流速驱动溶液，调整水脂两相流速比为 3 ∶ 1，在“Y 形”微流控芯片中混合后，在出口处收集产物，然后转入透析袋(截留分子量 8 000)，置 pH 7.4 的 PBS 中，4 ℃透析过夜，即得 **1**-LNPs。

2.1.2　LNPs 的形貌表征

有研究[3]表明，粒径小于 200 nm 且 PDI 小于 0.3 的微粒在体内更易透过血管、黏液等屏障；ζ 电位为 0 ～ 10 mV 的微粒从内涵体中逃逸的效率更高。为了确定上述方法能否成功制备 **1**-LNPs，对“**2.1.1**”项下所得制品的形貌、粒径、PDI 及 ζ 电位进行表征。

负染色透射电镜观察：取 **1**-LNPs 10 μL 置铜网上，沉淀 1 min 后吸去浮液，加磷钨酸染色液 10 μL，沉淀 1 min 后吸去浮液，常温干燥后，进行 TEM 分析。设置电压为 120 kV，检测并拍照记录。

粒径、PDI 及 ζ 电位测定方法：取透析后的 **1**-LNPs 100 μL，用 PBS 稀释 40 倍，使用激光粒径电位测试仪检测粒径、PDI 及 ζ 电位，平行试验 3 次。

TEM 结果如图 1 所示，可见制品形态为类球形，粒径约为 140 nm。使用激光粒度仪测得 **1**-LNPs 的粒径为(143.45±3.63)nm，粒径大小与 TEM 观察结果一致；PDI 为 0.242±0.01；ζ 电位为(0.76±0.01)mV。上述结果说明微流控法可以成功制得符合预期的 **1**-LNPs。

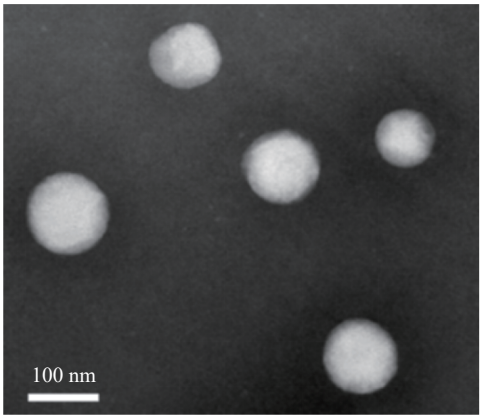


图 1　1-LNPs 的 TEM 照片(×70 000)
Fig.1　TEM Image of **1**-LNPs(×70 000)

2.2　LNPs 负载 1 能力的探究

2.2.1　包封效率

为验证上述方法制备的 **1**-LNPs 是否具备高效负载 **1** 的能力，采用基于 RiboGreen 的荧光法测定其包封率。

样品制备：取 **1**-LNPs 50 μL，共 2 份，分别加至黑色 96 孔板的 2 个孔中，1 份加入 TE 缓冲液 50 μL，另 1 份加入含 2% Triton X-100 的 TE 缓冲液 50 μL，再各加入 RiboGreen 试剂 100 μL；使用酶标仪测定荧光强度，设置激发波长为 485 nm，发射波长为 528 nm。重复试验 3 次。

TE 缓冲液组测得 RNA 总质量浓度($c_{总\,RNA}$)，

含 2% Triton X-100 的 TE 缓冲液组测得游离 RNA 质量浓度（$c_{游离\ RNA}$），按下式计算包封率（entrapped efficiency，EE）。

$$EE=(c_{总\ RNA}-c_{游离\ RNA})/c_{总\ RNA}\times100\%$$

结果显示，**1**-LNPs 的包封率为（99.84±0.11）%，说明该法制备的 LNPs 可以高效负载 **1**。

2.2.2 LNPs 对 **1** 保护作用的探究

LNPs 结构稳定性较差，而 RNA 也极易被广泛存在的 RNase 降解，故而 RNA-LNPs 制剂的稳定性差是 LNPs 与 RNA 共同导致的[3]。在 LNPs 结构中，磷脂包裹在 miRNA 外部，可避免 miRNA 与外界直接接触，因此有必要先了解 LNPs 保护下的 miRNA 的稳定性情况。RNase A 是常见的 RNase 之一，可特异性降解 miRNA 分子中的磷酸二酯键[8]。为了探究 LNPs 对 **1** 的保护作用，本研究将 **1**-LNPs 与 RNase A 共孵育，通过琼脂糖凝胶电泳试验检测未被酶解的 **1**。

取游离 **1**（即用 DEPC 水配制的质量浓度为 0.099 mg/mL 的游离 **1** 溶液）和 **1**-LNPs 各 100 μL，分别与 10 μg/mL 的 RNase A 100 μL 孵育，于 0、10、30、60、120 和 240 min 时取样，加入破乳剂（含 2% Triton X-100 的 TE 缓冲液）50 μL。分别取 20 μL 上样至 1.5%琼脂糖凝胶，在 120 V 电压下电泳 30 min，于紫外光条件下观察并拍照记录。

结果如图 2 所示，游离 **1** 条带的亮度随孵育时间的延长而减弱，30 min 后完全消失，表明此时 **1** 已被完全降解；而 LNPs 组 **1** 条带的亮度几乎不变，说明 LNPs 可有效保护 **1** 不被 RNase A 降解。因此，当 LNPs 结构稳定时，RNA 也能保持稳定，而 RNA 含量下降表明 LNPs 结构可能已发生变化，后续试验将重点关注 LNPs 自身的结构稳定性。

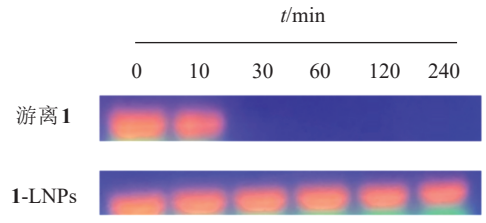


图 2 LNPs 电泳法检测 LNPs 暴露于 RNase A 时的稳定性

Fig.2 Stability of LNPs Exposed to RNase A Conditions by Electrophoresis Method

2.3 处方工艺因素对 LNPs 物理稳定性的影响

2.3.1 处方设计

为了探究结构材料及水的相变对 **1**-LNPs 稳定性的影响，以及冷冻保护剂蔗糖对其结构的加固能力，按“**2.1.1**”项下方法，以处方 F1 ～ F8（表 1）分别制备 **1**-LNPs。

表 1 1-LNPs 处方设计及贮存条件表[1)]

Tab.1 Formulation Design and Storage Conditions of **1**-LNPs

处方编号	DOTAP/%	DSPC/%	Chol/%	DMG-PEG2000/%	蔗糖/%	贮存温度/℃
F1	50	10	38.5	1.5	0	25、4、－20、－80
F2	0	10	38.5	1.5	0	4
F3	50	0	38.5	1.5	0	4
F4	50	10	0	1.5	0	4
F5	50	10	38.5	0	0	4
F6	50	10	38.5	1.5	5	－20、－80
F7	50	10	38.5	1.5	10	－20、－80
F8	50	10	38.5	1.5	15	－20、－80
F9	50	10	38.5	0	15	－80

注：1) 各处方中磷脂溶液总质量浓度均为 7.50 mg/mL，处方用量均为物质的量占比。

与处方 F1 制品相比，处方 F2 ～ F5 制品分别未添加 DOTAP、DSPC、Chol 与 DMG-PEG2000，用于探究阳离子磷脂、辅助磷脂、胆固醇及 PEG 化磷脂对 **1**-LNPs 物理稳定性的影响。

将处方 F1 制品分别置 25、4、－20 和－80 ℃贮存 20 d，以探究水的相变对 LNPs 溶液的稳定性影响。参考市售的 mRNA-LNPs 制剂 Comirnaty® 和 Spikevax®，选择蔗糖作为冷冻保护剂。向制备好的处方 F6 ～ F8 中添加不同占比的蔗糖，用于探究介质相变时，蔗糖对 **1**-LNPs 结构的保护作用。处方 F9 在 F8 的基础上去除 DMG-PEG2000，用于探究 PEG 化磷脂与多羟基物质的协同作用。

预试验结果显示，游离 RNA 易被降解，其含量难以被准确测定，故本研究以贮存一段时间后的 LNPs 中所负载的 RNA 量与新鲜制品中总 RNA 量的比值作为包封率，用以描述贮存一段时间后，LNPs 内仍负载的 RNA 占初始总量的比例。根据“**2.2.2**”

项下的结果，LNPs 可有效保护 **1** 不被 RNase A 降解。因此本研究以 LNPs 的粒径和 EE 为指标，评价各处方贮存 20 d 内的稳定性。

2.3.2　结构材料对 LNPs 稳定性的影响

为探究 LNPs 各结构材料对稳定性的影响，按“**2.1.2**”和“**2.2.1**”项下方法，测定 F2 ～ F5 处方制品在 4 ℃贮存 0、5、10、15、20 d 时的粒径和 EE，并与 F1 处方制品对比。

结果如图 3 所示。F2 处方制品（未添加阳离子磷脂 DOTAP）10 d 后无法测得粒径，15 d 后 EE 降至 0，说明 10 ～ 15 d 时 LNPs 丧失结构。F3 处方制品（未添加辅助磷脂 DSPC）初始粒径较大，4 ℃贮存 15 d 时粒径显著增大，EE 降至 0。这表明 20 d 内 F3 处方制品的粒径增大，结构变得松散但并未丧失，无法有效负载 **1**。F4 处方制品（未添加胆固醇）初始粒径大、EE 低，在 4 ℃贮存 20 d，粒径、EE 均发生变化，但幅度较小，说明胆固醇对 LNPs 物理稳定性的影响较小。F5 处方制品（未添加 DMG-PMG2000）初始粒径较大，EE 与 F1 处方制品相近，说明 F5 处方制品透析后发生团聚。在 4 ℃贮存 20 d 后粒径显著增大，EE 基本不变，说明颗粒团聚虽导致粒径变大，但未发生泄露。综上所述，未添加以上任意一种磷脂都会导致 LNPs 稳定性变差。

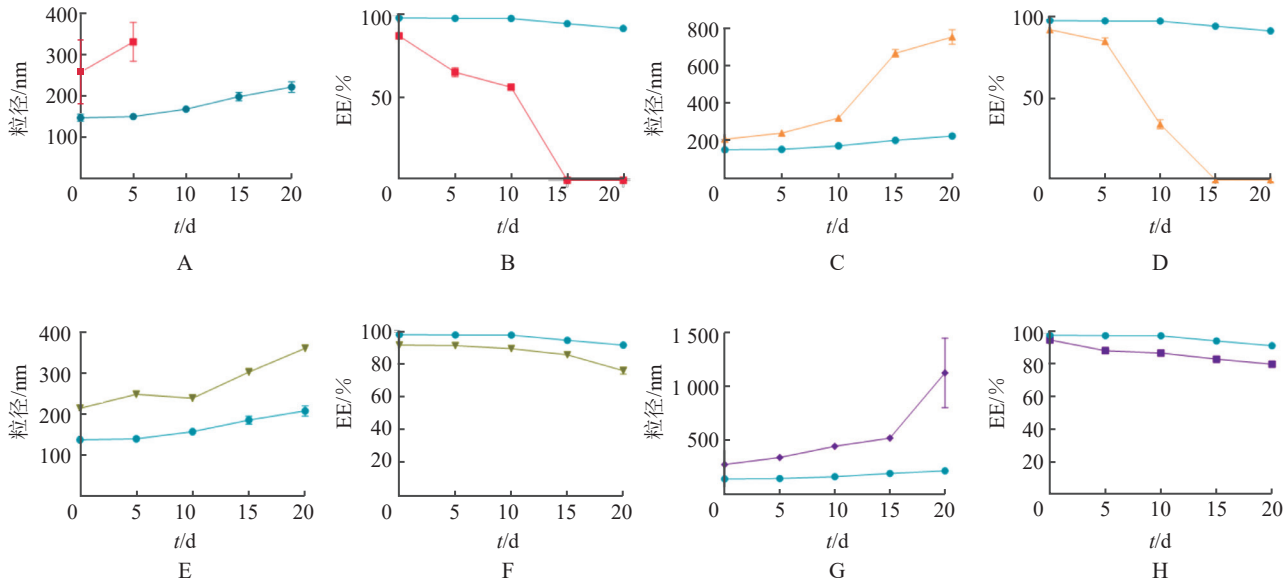
2.3.3　水的相变对 LNPs 稳定性影响

本研究通过冷冻提高 LNPs 稳定性，但水的相变可能会破坏 LNPs 结构，因此有必要探究水的相变对 LNPs 结构的影响。按“**2.1.2**”和“**2.2.1**”项下方法，测定 F1 处方制品在 25、4、－20 和 －80 ℃贮存 0、5、10、15、20 d 时的粒径和 EE。

结果如图 4 所示，在 －20 和 －80 ℃贮存时，水的相变导致 LNPs 粒径增大数倍，EE 均降为 0，说明 LNPs 结构已被完全破坏。在 25 和 4 ℃贮存时，粒径、EE 变化较小，表明其结构相对稳定，但 20 d 后的粒径也超过 200 nm，不满足制剂需要。

2.3.4　蔗糖对 LNPs 保护作用

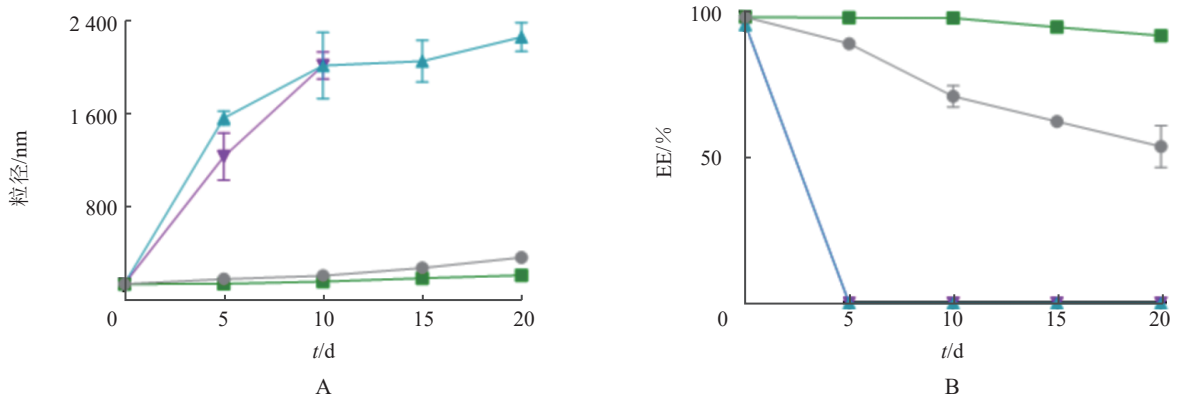
理论上冷冻保存可以提高制剂稳定性。出现“**2.3.3**”项下结果的原因推测是：在相变过程中，水分子重排破坏了 LNPs 结构。因此，LNPs 冻干工序



A—F2 处方制品粒径；B—F2 处方制品 EE；C—F3 处方制品粒径；D—F3 处方制品 EE；
E—F4 处方制品粒径；F—F4 处方制品 EE；G—F5 处方制品粒径；H—F5 处方制品 EE。
●—F1 处方；■—F2 处方；▲—F3 处方；▼—F4 处方；◆—F5 处方。

图 3　F1 ～ F5 处方组 1-LNPs 在 4 ℃贮存 20 d 的粒径与 EE 变化曲线（*n*=3）

Fig.3　Particle Size and EE Change Curves of **1**-LNPs from Formulations F1 – F5 Stored at 4 ℃ for 20 d (*n*=3)



●—25 ℃；■—4 ℃；▲—–20 ℃；▼—–80 ℃。

图 4 F1 处方组 1-LNPs 在不同温度贮存 20 d 的粒径（A）与 EE（B）变化曲线（*n*=3）

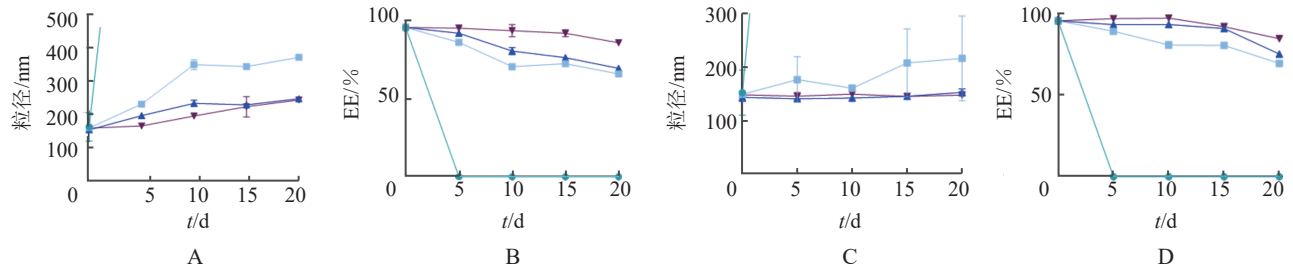
Fig.4 Particle Size (A) and EE (B) Change Curves of **1**-LNPs from Formulation F1 Stored at Different Storage Temperatures for 20 d (*n*=3)

中需要添加冷冻保护剂。

多羟基物质是常见的冷冻保护剂，其中蔗糖的应用最广泛[9]。本研究选择蔗糖为冷冻保护剂，探究其添加量对 LNPs 物理稳定性的影响。按“**2.1.2**”和“**2.2.1**”项下方法，测定 F6 ～ F8 处方制品在发生相变的温度（–20 和 –80 ℃）贮存 0、5、10、15、20 d 时的粒径和 EE，结果如图 5 所示。

在 –20 和 –80 ℃，添加不同用量蔗糖（F6 ～ F8 处方）的 LNPs 稳定性较 F1 处方制品显著提升，说明蔗糖能有效保护 LNPs，避免其结构受到破坏。然而，添加 5%蔗糖不能控制 LNPs 的粒径和 EE 保持不变。添加 10%蔗糖时，制品在 – 80 ℃可保持粒径稳定，但保存 20 d 后 EE 降低；于 – 20 ℃贮存时，粒径和 EE 仍会发生变化，说明添加 10%蔗糖整体上对 LNPs 的保护作用强于添加 5%蔗糖，但 20 d 内的稳定性仍较差。添加 15%蔗糖的 LNPs 在 – 80 ℃贮存 20 d 时粒径基本不变，EE 略降低，整体物理稳定性较好。

以 F8 处方制品为例，比较 –20 和 –80 ℃制品的物理稳定性。结果如图 6 所示，在 –80 ℃贮存 20 d 的 LNPs 粒径无明显变化，而在 –20 ℃贮存时明显增大；2 种温度条件下，LNPs 的 EE 相近且变化缓慢。上述结果表明，在蔗糖添加量为 15%时，–20 和 –80 ℃贮存均能有效控制 EE，且 –80 ℃条件下粒径控制效果更佳。



A—–20 ℃贮存的制品粒径；B—–20 ℃贮存的制品 EE；C—–80 ℃贮存的制品粒径；D—–80 ℃贮存的制品 EE。

●—F1 处方；■—F6 处方；▲—F7 处方；▼—F8 处方。

图 5 F1、F6 ～ F8 处方组 1-LNPs 在 –20 或 –80 ℃贮存 20 d 的粒径与 EE 变化曲线（*n*=3）

Fig.5 Particle Size and EE Change Curves of **1**-LNPs from Formulation F1, and F6 – F8 Stored at –20 or –80 ℃ for 20 d (*n*=3)

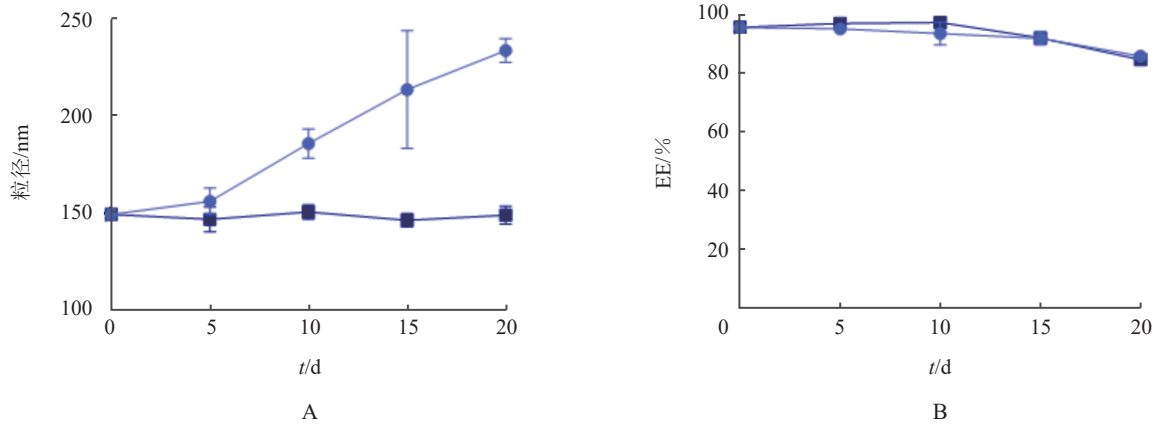


图 6　F8 处方组 1-LNPs 在 – 20 或 – 80 ℃贮存 20 d 的粒径（A）与 EE（B）变化曲线（*n*=3）

Fig.6　Particle Size（A）and EE（B）Change Curves of **1**-LNPs from Formulation F8 Stored at – 20 or – 80 ℃ for 20 d（*n*=3）

2.3.5　多羟基物质起保护作用的机制

蔗糖含有多个羟基，易形成氢键；PEG 基团也可形成氢键，且位于 LNPs 结构的最外层。因此，二者接触后形成氢键可能是蔗糖起到保护作用的原因。为了进一步探究多羟基物质的保护作用与 PEG 化磷脂的关联，按“**2.1.2**”和“**2.2.1**”项下方法，测定 F9 处方制品在发生相变的 – 80 ℃贮存 0、5、10、15、20 d 时的粒径和 EE，结果如图 7 所示。与 F8 处方制品相比，贮存 20 d 内，F9 处方制品的粒径与 EE 均有大幅变化，说明在没有 PEG 化磷脂的情况下，蔗糖对 LNPs 的保护作用显著减弱。

2.4　**1**-LNPs 的药效评价

上述研究表明，F8 处方制品在 – 80 ℃贮存 20 d 后结构保持稳定。为了充分证明其功能也未发生变化，需要测定该制品贮存 20 d 前后的药效。本研究选择 CCK-8 试验考察 **1**-LNPs 在体外对细胞增殖能力的影响。

以 NIH/3T3 细胞作为试验细胞，设置空白组（不接种细胞）、阴性对照（不给药）、阳性对照（1 μg/mL 的 **1**- 转染试剂 Lipo2000）、试验组（贮存 0 d 的 1、10、50 μg/mL **1**-LNPs，于 – 80 ℃贮存 20 d 的 50 μg/mL **1**-LNPs，质量浓度均以 **1** 计；各试验组

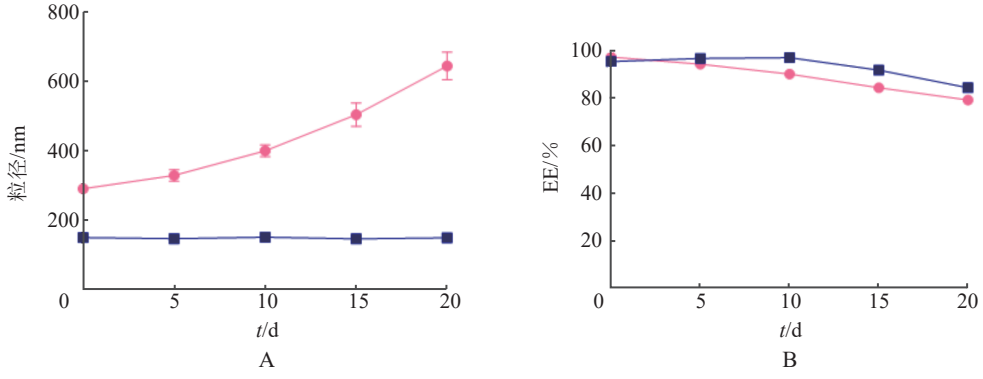


图 7　F9 和 F8 处方组 1-LNPs 在 – 80 ℃贮存 20 d 的粒径（A）与 EE（B）变化曲线（*n*=3）

Fig.7　Particle Size（A）and EE（B）Change Curves of **1**-LNPs from Formulations F9 and F8 Stored at – 80 ℃ for 20 d（*n*=3）

分别记作 A、B、C、D），各组均设置 4 个复孔。将 NIH/3T3 细胞以每孔 5 000 个的密度接种至 96 孔板，每孔加 DMEM 培养基 100 μL，按上述各组处理后，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h，然后换为含 2 ng/mL TGF-β1 溶液 10 μL 的 DMEM 培养基 100 μL，继续孵育 24 h，再更换培养基为 CCK-8 试剂 10 μL，继续孵育 1 h，用酶标仪测定样品在 450 nm 处的吸光度（A），按下式计算细胞活力（V）。

$$V=(A_{加药}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})\times100\%$$

结果（图 8）表明，当 **1** 质量浓度为 50 μg/mL 时，细胞活力显著下降。F8 处方制品贮存 20 d 后给药，细胞活力与新鲜制品相比没有显著变化，也进一步证明选择粒径与 EE 为关键指标进行处方优化具有科学性。

3 总结与讨论

3.1 结构材料对 LNPs 稳定性的影响

LNPs 结构的形成依赖于阳离子磷脂与 RNA 的电荷相互吸引及磷脂自组装。未添加阳离子磷脂使这一关键的结合力被削弱，LNPs 结构松散，粒径增大，

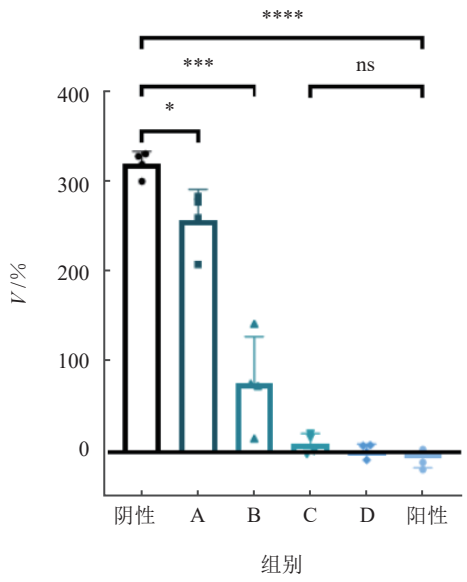


图 8 在 －80 ℃贮存 20 d 的 F8 处方组 1-LNPs 对细胞增殖能力的影响（n=4；* 表示 P<0.05，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1，ns 表示 P>0.05）

Fig.8 The Effect of **1**-LNPs from Formulation F8 after Storage at －80 ℃ for 20 d on Cell Proliferation Capacity (n=4; * Represents P<0.05; *** Represents P<0.001; **** Represents P<0.000 1; ns Represents P>0.05)

负载的 **1** 从松散的磷脂层中逸出，EE 下降。这表明阳离子磷脂对 LNPs 物理稳定性的影响至关重要。

未添加辅助磷脂 DSPC 的 LNPs，粒径、EE 变化速度快，稳定性较差。说明缺少 DSPC 会导致磷脂层排列不紧密、体系不稳定。贮存期间，体系熵值升高，磷脂分子热运动加剧，结构松散，粒径迅速增大，负载的 **1** 会透过磷脂层空隙扩散至溶液中，导致 EE 下降。因此，缺少 DSPC 的 LNPs 磷脂层结构有缺陷，影响了 LNPs 的物理稳定性。

胆固醇在磷脂分子层中有以下主要作用：限制磷脂分子运动、调控层流动性，以及增强层柔韧性。这些有助于维持磷脂层的稳定性[10]。未添加胆固醇的处方稳定性略有下降，但变化不大，说明胆固醇对 LNPs 物理稳定性的影响较小。

PEG 化磷脂是指 PEG 修饰的天然或合成磷脂，是脂质体、LNPs 等脂质微粒的常见膜材之一。在 LNPs 自组装时，由于 PEG 化磷脂亲水性较高、空间位阻较大，常在 LNPs 的最外层形成外部聚合层，从而防止 LNPs 聚集[11]。试验结果表明，未添加 PEG 化磷脂的 LNPs 易发生聚合，激光粒径仪测得的粒径是多个 LNPs 聚集后的结果，而结构重排将导致 **1** 泄露、EE 下降。因此，PEG 化磷脂通过影响 LNPs 的聚集情况，进而影响贮存过程中粒径的稳定性。

3.2 水的相变对 LNPs 稳定性的影响

根据稳定性试验结果，LNPs 在 25 和 4 ℃贮存时，粒径会增大且 EE 降低，且 25 ℃时这一变化的发展更为迅速。推测此现象是高温环境下分子热运动加剧，导致构成 LNPs 结构的磷脂分子运动增强，进而使其结合变得松散，造成 LNPs 粒径增大。同时，LNPs 中负载的 **1** 可能通过松散的磷脂层间隙透出，从而导致 EE 下降。

理论上，LNPs 冷冻后保存应展现出更好的稳定性。然而，试验结果表明，直接在 －20 和 －80 ℃进行冷冻贮存，LNPs 的结构会直接被破坏，且在 －80 ℃的稳定性比在 －20 ℃更差。由于 LNPs 处于水溶液中，内部非核心部分的水和外部紧邻的水过冷时会形成多个小冰核，冰核的破裂与生长都会导致水分子运动，使亲水性的磷脂头基随之发生摆动，且生长速度快的冰晶比冰核更坚硬、体积更大，内外冰晶生长速度的

不均衡还会挤压 LNPs 的磷脂层，导致 LNPs 结构不再紧密[12]。因此，为确保 LNPs 在冷冻保存过程中的稳定性，有必要向其中添加冷冻保护剂。

3.3 蔗糖对 LNPs 的保护作用

试验数据表明，蔗糖用量介于 0 至 15%，其对 LNPs 的保护能力展现出随用量递增而增强的趋势，有效降低了 LNPs 粒径及 EE 的变化速度与幅度，从而提升稳定性。与 F8 处方制品相比，F9 处方制品的稳定性较差，证明 PEG 化磷脂参与了蔗糖保护 LNPs 结构的过程。尽管具体机制尚不明确，但主流理论认为这与玻璃态假说、水替代假说有关，二者均在一定程度上解释了多羟基物质在冷冻过程中对 LNPs 的保护作用。

以蔗糖为例，因其含有多个羟基，能替代水分子与 PEG 化磷脂形成氢键，进而在 LNPs 表面富集[13]。随着水发生相变的过程，蔗糖溶解度降低、黏度增加，富集在 LNPs 表面的蔗糖紧密环绕在磷脂分子层外，构筑起一层玻璃态防护层。此层限制了磷脂分子的热运动，能有效防止 LNPs 结构趋于松散，进而减缓粒径增大的速度，增强了 LNPs 结构的稳定性。同时，该保护层还减少了 **1** 从磷脂间隙的逸出，延缓了 EE 的下降。此外，由于 LNPs 周围水分含量降低，形成的冰晶无法接近 LNPs，从而减轻了冰晶对 LNPs 结构的破坏程度。在适当范围内，增加蔗糖用量可显著增强保护层的厚度与稳定性，进而提升 LNPs 抵抗结构松散的能力，实现对 LNPs 更有效的保护效果。

3.4 总结

为优化 xRNA-LNPs 制剂，本研究主要探讨了不同因素对 **1**-LNPs 物理稳定性的影响，并提出了改善稳定性的新方法。本研究结果显示，阳离子磷脂和辅助磷脂是影响 LNPs 物理稳定性的关键因素，PEG 化磷脂影响颗粒间聚集情况；工艺方面，水的相变过程会破坏 LNPs 结构；冷冻保护剂蔗糖与 PEG 化磷脂联用可以提高 LNPs 在贮存过程中的物理稳定性。此外，不同的多羟基物质均可能对 LNPs 产生不同程度的保护作用，这有待进一步考察。为避免水的相变过程对 LNPs 的影响，采用冻干工艺可能有助于进一步提高制品的稳定性。

参考文献：

[1] MIAO Y X, FU C, YU Z J, *et al*. Current status and trends in small nucleic acid drug development: leading the future [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, **14**(9): 3802-3817.

[2] 周　勇, 赵　笛, 杨　磊, 等. siRNA 吸入给药系统的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2020, **51**(12): 1497-1508.

[3] SCHOENMAKER L, WITZIGMANN D, KULKARNI J A, *et al*. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability [J]. *Int J Pharm*, 2021, **601**: 120586.

[4] KON E, ELIA U, PEER D. Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, **73**: 329-336.

[5] JI X M, WU B Q, FAN J J, *et al*. The anti-fibrotic effects and mechanisms of microRNA-486-5p in pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 14131.

[6] EYGERIS Y L, GUPTA M, KIM J, *et al*. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2022, **55**(1): 2-12.

[7] 常洪委, 许　龙. 三款 mRNA 疫苗制备工艺技术分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(2): 200-206.

[8] SARAMAGO M, BÁRRIA C, DOS SANTOS R F, *et al*. The role of RNases in the regulation of small RNAs [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014, **18**: 105-115.

[9] MURAMATSU H, LAM K, BAJUSZ C, *et al*. Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine [J]. *Mol Ther*, 2022, **30**(5): 1941-1951.

[10] OKAYAMA A, HOSHINO T, WADA K, *et al*. Comparison of structural effects of cholesterol, lanosterol, and oxysterol on phospholipid (POPC) bilayers [J]. *Chem Phys Lipids*, 2024, **259**(3): 105376.

[11] TENCHOV R, SASSO J M, ZHOU Q A. PEGylated lipid nanoparticle formulations: immunological safety and efficiency perspective [J]. *Bioconjug Chem*, 2023, **34**(6): 941-960.

[12] KALITA A, MROZEK-MCCOURT M, KALDAWI T F, *et al*. Microstructure and crystal order during freezing of supercooled water drops [J]. *Nature*, 2023, **620**: 557-561.

[13] FRIIS K P, GRACIN S, OAG S, *et al*. Spray dried lipid nanoparticle formulations enable intratracheal delivery of mRNA [J]. *J Control Release*, 2023, **363**: 389-401.