

脂质纳米微粒载体在核酸药物递送中的应用

黄 健, 谢向阳, 梅兴国*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 脂质微粒作为基因药物载体, 用于全身药物递送, 目前已进行了大量深入的研究。其中, 脂质纳米微粒(lipid-based nanoparticles, NP) 药物载体, 在进行基因药物递送时, 为克服体内的各种生理屏障, 粒径需在 100 nm 以下, 本文将重点介绍这类 NP 的配方和组装。NP 作为一种核酸药物的脂质微粒递送载体, 与阳离子脂质体/DNA 复合物区别主要在于粒径大小, NP 的粒径通常在 100 nm 以下。影响 NP 粒径的主要因素包括脂质的构成、脂质与核酸的比例, 以及制备方法等。NP 所递送的核酸主要包括质粒 DNA, siRNA, 反义寡核苷酸。

关键词: DNA; 基因治疗; 脂质微粒

中图分类号: R944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-0440(2008)02-0145-04

1 阳离子脂质基因递送系统的启示

核酸作为治疗性药物被认为是未来疾病的分子治疗学中一个非常重要的方向。有人推荐将非病毒性基因或其他一些核酸药物作为一些重症疾病的替代疗法, 但是这些疗法通常需要对核酸药物进行全身给药, 以便将核酸药物递送到靶细胞, 从而对一些遗传性疾病, 病毒感染或癌症进行治疗。迄今, 安全有效的载体的研发一直是限制基因药物投放临床试验的瓶颈。

裸核酸可通过一些物理方法, 比如电致孔或水压注射等技术进行局部组织或脏器给药, 例如肌肉和肝脏给药。然而, 这些方法无法用于基因药物的全身递送, 或作为商业化基因药物产品。至少对全身性基因药物递送载体而言, 在全身给药比如静脉注射后, 必须具有将药物递送到最远端病灶的能力。

至 20 世纪 80 年代后期, 在基因药物全身性递送的体外研究中, 阳离子脂质体已成为一种递送效率较高的载体。阳离子脂质体与基因混合后, 可以增大基因的密度, 形成阳离子微粒。这种阳离子脂质体/DNA 复合物(lipoplexes)可保护基因药物不受酶的降解, 并通过与带负电的细胞膜之间的静电作用, 将基因药物递送到细胞中去。这种 lipoplexes 并不是一种有序的脂质双分子层包裹 DNA 的结构, 它

更像一种稠密的 DNA 脂质复合体, 具有规则的次级结构与不规则的表面形态。从它最初被引入研究领域开始, 人们合成了大量的阳离子脂质体, 用于非病毒性的基因递送, 并且其中的一些还进行了临床试验。

迄今为止, 大多数阳离子基因递送系统均以失败而告终, 少数进入临床试验的也都因基因递送效率低、炎症性毒性或补体激活效应等不良反应而放弃。

全身给药后, lipoplexes 首先分布到肺部, 然后对肺的上皮细胞进行转染。有研究者认为这与 lipoplexes 经尾静脉注射后, 同肺毛细血管上皮细胞之间所产生的首过关联效应(first pass association)有关。在注射 10 min 后, 血液循环系统中仅剩不到 2% 的 lipoplexes。全身给药后, lipoplexes 在肺上皮细胞中持续分布时间约为 60 min。尽管全身给药后, lipoplexes 首先被肺上皮细胞所摄取, 但其主要代谢部位在肝脏, 因为在注射给药的 60 min 以后, lipoplexes 将由肺部到肝脏进行重新分布。虽然全身给药后, 绝大部分 lipoplexes 最终分布到肝脏, 但它主要被肝脏的 Kupffer 细胞所摄取, 极少进入到其他肝细胞中, 因此对这些肝细胞来说, lipoplexes 的基因递送效率是非常低的。

当 lipoplexes 注射进入血液后, 它的表面能与血浆蛋白产生强烈相互作用, 还能跟含有多糖-蛋白质复合物的组织发生作用。这种相互作用导致了 lipoplexes 在体内循环中的快速清除(半衰期 < 5 min)。这种快速清除具有双重危害: 第一, 容易导

收稿日期: 2007-08-15

作者简介: 黄 健, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 缓控释制剂, E-mail: hysamms@126.com

* 通讯作者: 梅兴国, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型和新技术, Tel: 010-6692644; E-mail: xg_mei@yahoo.com

致机体炎症反应;第二,到达靶组织的药量减少。在对 lipoplexes 的大样本体内分布研究中总结出的一个重要经验是,要克服 lipoplexes 在体内血液循环中的快速清除现象,就必须提高 lipoplexes 自身的药代动力学性质。

为了克服阳离子脂质体所引起的毒性,并延长其在体内的循环时间,很多研究机构利用隐形可变处方方法 (scalable formulation method),将 DNA 或其他一些核酸性药物装入聚乙二醇 (PEG) 掩蔽后的阳离子脂质双分子膜中,以期达到上述目的。PEG 掩蔽的阳离子脂质微粒与普通的 lipoplexes 有所不同,其在核酸外包裹有脂质和 PEG 两层外壳,粒径较 lipoplexes 低 (< 100 nm),在体内具有较好的稳定性。这些特性,使得 PEG 掩蔽的阳离子脂质微粒在体内的循环时间明显延长 (半衰期为 $1 \sim 10$ h),增加了载药微粒经过靶点的数量。

要成功地将核酸包封到纳米微粒中,关键在于工艺处方的选择和控制在。因此,本文将对脂质纳米微粒的组方和制备工艺进行介绍和讨论。

2 基因递送纳米粒的处方因素

对于一个成功的基因递送载体而言,有以下三点要求,这是人们从病毒学中借用过来的。第一, DNA 递送载体的粒径应小于 100 nm,以适应全身性的基因治疗;第二,载体微粒在血液循环中能保持稳定,不被非特异性细胞所摄取,却能在靶细胞吸收后,迅速解体,释放出所携带的 DNA;第三,从商业化的角度而言,载体微粒应成分简单、工艺重现性良好,并适合工业化大生产。

上述这些相互矛盾的要求,使得基因纳米载体的设计和生产具有较大的困难。对于一个由多组分构成的微粒而言,虽然每个组分的作用机制都有相关的文献资料报道,并且理论上满足基因有效递送的各项要求,但这种多组分微粒特性的发挥还在一定程度上依赖于它的组装步骤。各个组分应按恰当的方式组合,以便各项功能在合适的时间和部位发挥作用。为制备出满足这些要求的纳米载体微粒,主要处方影响因素包括:各组分的性质和数量;如果加入阳离子凝缩剂 (cationic condensing agent) 的话,阳离子与核酸上磷酸盐的正负电荷比例;各组分的浓度、加入顺序和混合速度;组装过程中去污剂的浓度,有机溶剂的比例;离子强度,制备和各组分组装时的温度等。

3 纳米粒的组成

脂质纳米粒载体 (NP) 通常由以下部分组成:脂质,PEG 化的脂质,类脂多聚物,pH 或氧化还原敏感成分,以及靶向配体等。

3.1 阳离子脂质

多价阳离子通过与带负电荷的核酸间的静电作用,是对核酸进行浓集压缩,并形成微粒的关键组分。虽然体外实验证明阳离子脂质具有各种优点,但是这些优点在体内却变成了缺点,因为它将引起如前文所提到的诸如免疫反应、血液成分聚集等一系列不良反应。

为了克服这些缺点,一种办法是采用在酸性条件下带正电,但在 pH 7.4 时呈电中性的可滴定阳离子脂质;另一种办法是在微粒形成后通过共价修饰将阳离子基团转化成阴离子或电中性基团;还有一种办法是设计一种通过二硫键连接的能将 DNA 包裹进纳米粒的阳离子脂质,在二硫键交换反应后,微粒表面的电荷可以变成负电或呈电中性。

3.2 中性脂质/辅助脂质

中性脂质最常见的是致融脂质 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE);胆固醇通常作为脂质辅助成分使用,它可提高 DNA 脂质微粒的转染活性。DOPE 通常应用于阳离子脂质基因递送系统,它可以产生膜融合与干扰作用,帮助 DNA 从内含体中释放出来。近年文献报道,一种致融作用较弱的中性脂质,二酰基磷酸胆碱脂质 (diacyl phosphocholine lipid),被用来提高 DNA 脂质纳米粒的稳定性。

3.3 阴离子脂质

由于阳离子脂质复合物的体内毒性和快速清除性,可以选用阴离子脂质微粒,以降低载体微粒与带负电荷的血清蛋白,如白蛋白以及细胞外基质的非特异性结合。在这种方法中, DNA 通常被阳离子聚合物聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine)、鱼精蛋白硫酸盐或聚赖氨酸预先浓集压缩成为纳米级别的阳离子核,然后加入阴离子脂质或脂质体作表面衣膜,最终形成带负电荷或电中性的脂质微粒。

3.4 PEG 化的脂质

PEG 是一种惰性的生物相容性材料,它能极大地减小微粒与细胞表面的相互作用。体外研究表明,PEG 化的脂质微粒载体可以减少与细胞膜的作用,降低基因的细胞转染率,从而减少细胞对 DNA 微粒的摄取。另一方面,PEG 化的脂质能大幅

提高基因载体系统的安全性,这是由于它能提高载体系统在体内的稳定性,延长其体循环时间,从而降低释药系统的毒副作用。

3.5 靶向配体

大多数经 PEG 修饰后的 NP,虽然在体内的稳定性有所增强,但靶细胞的摄取量却下降。虽然粒径在 100 nm 以下的 NP 能够被动靶向到肿瘤区域,但可能无法与肿瘤细胞结合而进入细胞,因此在 PEG 化的 NP 表面连接上某种配体,这一配体能与肿瘤表面的内源性受体发生特异性结合,从而提高靶细胞对治疗基因的摄取。人们在靶向配体方面进行了大量研究,但未与结合靶向配体的脂质纳米微粒相比,带有靶向配体的 NP 并未能显著提高核酸药物的体内递送效率。

3.6 脂质共聚物

某些阳离子聚合物,如 PEI,是有效的体外转染试剂。将脂质分子如胆固醇用 PEI 修饰后,再结合到聚合物主链上,这就生成了水溶性的脂质共聚物,它被认为整合了阳离子脂质和多聚阳离子的双重特性。DNA 能够迅速地被这种共聚物所包裹,并且可以从内含体中脱离到细胞质中或跨越胞膜进入到细胞质中。

4 制备工艺

NP 在溶液中形成,其制备关键在于先保持各个组分之间分离,然后再让它们按照某种可调控的方式进行自组装。这种方法依赖于动力学上的控制,以将阳离子脂质、中性脂质、PEG 化的脂质和核酸等组分最终组合成微粒载体。以较为简单的直接混合法为例,它是通过调整浓度、电荷比、离子强度及阳离子脂质与核酸的混合速度来实现动力学控制的。

对另一些更为复杂的制备方法而言,是通过添加去污剂或溶媒-水混合物来破坏双层结构,以保持各个组分之间的分离。这样就降低或消除了阳离子脂质与核酸间的多价相互作用。去污剂和有机溶剂通过透析或过滤加以除去,载有 DNA 的 NP 在去污剂和有机溶剂减少的过程中形成。

4.1 直接混合

直接混合法常用于传统的 lipoplexes 的制备,其操作方法主要是在水溶液中将预先制备好的阳离子脂质体与质粒 DNA 快速搅拌混合。Pardridge 研究组的研究人员将该方法加以改进,分为三步:第一步

与传统的 lipoplexes 制备方法一样;第二步是将脂质/DNA 分散体冷冻再解冻 10 min,然后通过 400, 200, 100, 50 nm 的聚碳酸酯滤膜各 10 次;第三步是将铁传递蛋白受体的单克隆抗体连接到脂质体微粒上。

4.2 去污剂透析

去污剂透析法最初是用于制备相对稳定的阳离子脂质-DNA 微粒,制备过程是先将 DNA 与阳离子脂质溶于含有去污剂的溶液中,然后通过透析的方法将去污剂除去。由这种方法制备的微粒载体与由直接混合法制备的微粒载体相比,在基因转染效率方面基本相同,但由前者制备的微粒载体稳定时间长,在含有介质的血清中活性较强。令人遗憾的是,本方法不能提高微粒在体内的基因递送效率。从这些试验中,可以得到如下结论:(1)由于 DNA 和脂质都是可溶的,所以去污剂溶液可用来作为它们的捕获介质;(2)正辛基葡萄糖苷作为去污剂是一种不错的选择,因为它的临界胶束浓度(CMC)很高,并且由于它属于非离子型去污剂,因而不会干扰 DNA 与脂质间相互的电荷作用。

4.3 乙醇透析

乙醇透析法是将 DNA 与脂质溶于乙醇中混合均匀,然后将混合液注入水中,再通过透析法除去乙醇。由该法制备的脂质体为单层结构,直径大约在 60 nm 左右。由乙醇注入法制备的阳离子脂质体在基因转染效率方面与标准的蒸发/超声法所制备的微粒载体相似。另外,在一定浓度的多价阳离子存在的条件下,乙醇还能将 DNA 浓集压缩成环状、棒状或纤维状结构。

4.4 其他有机溶剂

除乙醇外,其他有机溶剂也被用来包封 DNA。Murphy 等将表面活性剂(胆酸盐)和有机溶剂(*N,N*-二甲基甲酰胺)同时用于 DNA 脂质微粒的制备过程。将质粒 DNA/阳离子多肽-脂质共轭物的 *N,N*-二甲基甲酰胺溶液与阴离子胆酸盐胶束以一定的比例混合,制备出的 DNA 胶束复合物性质稳定,结构紧密,直径为 30 ~ 60 nm。

4.5 模板指导的装配

已有几个研究组开发了一种模板指导装配法,该法利用能形成二聚体的阳离子去污剂,以二硫键作为脂质与 DNA 连接的中介,在 DNA 模板上直接进行载体微粒的装配。

(下转第 150 页)

底上皮细胞,此时病毒基因组仍处于附加型状态。在此阶段,HPV 基因表达水平很低。上皮细胞分化和伴随的迁移均促使 HPV 递送至上皮基底上层,此外适合病毒复制。然而,只有在接近基底层上皮区域内,上皮细胞分化早期和迁移中,才能观察到 HPV 无衣壳基因的低水平表达。随着上皮细胞分化和迁移进展,方能检测到衣壳和非衣壳 HPV 基因的表达,此上皮区域已远离基底层。最终,上皮表面的脱屑细胞释放出 HPV。典型 HPV 感染,以上皮异形、乳头瘤状、核周边空穴细胞和角化不全细胞为标志。HPV 引起的良性损害,包括非生殖器皮肤疣、肛门生殖器上皮疣、肛门生殖器粘膜尖锐湿疣、口咽乳头瘤等。某些人血清型 HPV 长期感染能引起肛门生殖器恶性肿瘤的发生,例如子宫颈、外阴、阴道、阴茎和肛门处的癌。

子宫颈癌是最常见的 HPV 引起的肿瘤,是世界范围内引起妇女死亡仅次于乳腺癌的第二大原因。实际上所有子宫颈癌病例都源于性交传染的 HPV。然而,引起子宫颈癌的 HPV 主要是 HPV-16 和 HPV-18,将近 50% 子宫颈癌由 HPV-16 引起,另外 20% 属于 HPV-18。

从病毒感染到子宫颈癌发病的平均无癌间隔时间大约为 12 ~ 15 年。近来已有两家制药公司开发出有效的 HPV 预防性疫苗:葛兰素史克公司的 Cer-

varix 和默克公司的 Gardasil。这两种疫苗中含有 HPV 主结构衣壳蛋白,名为 L1 蛋白,装配有携带通过宿主体液免疫反应中和病毒所需要的表型免疫域的病毒样颗粒(VLP)。Cerrarix 的病毒颗粒中还携带重组杆状病毒系统和昆虫细胞,佐剂是基于铝佐剂和单磷酸酯 A(一种修饰过的脂多糖合剂),而 Gardasil 来源于酵母,只使用铝佐剂。这两种疫苗均能引起宿主有效的免疫反应,但需要在 6 个月内肌肉注射强化接种 3 次;均设计为宿主对抗 HPV-16 和 HPV-18 感染,二者是引起 70% 子宫颈癌的病原体病毒。此外,默克公司的疫苗还靶向 HPV-6 和 HPV-11,虽然它们不涉及子宫颈癌的发生,但这两种血清型 HPV 能引起外生殖器疣,也可能感染子宫颈组织。

4 结语

针对肿瘤病毒的预防性疫苗有可能降低癌症的发病率和死亡率。因此疫苗目前用于预防 HBV 和 HPV 感染,而几项进行中的项目旨在开发 HCV 和幽门螺杆菌感染的预防性疫苗。另一个繁重任务是在低收入国家中推行针对 HBV 和 HPV 感染的大规模疫苗接种。

[编译自:Romano G. Viral oncology and development of preventive vaccines[J]. *Drugs Fut*, 2007, 32(4):367-373]

(上接第 147 页)

为了调节去污剂胶束的稳定性,人们合成了一种双半胱氨酸(biscysteine)去污剂,它能与 DNA 形成胶束复合物,然后其他包裹在 DNA 表面的去污剂单体与脂质间发生化学反应,生成二硫键连接的多阳离子、多酰基脂质复合物。这种去污剂-脂质的形成能提高 DNA 复合物的稳定性,并且能够避免某些条件下复合物的大量聚集。当等摩尔的 DNA 磷酸盐基团和去污剂阳离子基团混合时,由这种方法所制备的微粒粒径在 30nm 左右,呈电中性。从理论上讲,该方法制备的微粒,一个微粒只包裹一个 DNA 分子。

5 讨论

到目前为止,NP 作为 DNA 的递送载体其效率还尚待提高。此为,所面临的另一大问题是,还不知其如何让载体微粒中各个组分协同工作。这些组分在它们各自单独的系统模型中可能可以很好地发挥作用,可一旦组合在一起则不能发挥各自的功能。对研究机构而言,合成更好的组分,寻求更好的制备方法还有大量的工作需要进行。同时还需要制药企业的大力参与,这样才能研制和生产出安全、有效、可靠的基因药物递送系统和产品。

[编译自:Li WJ, Szoka FC Jr. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery[J]. *Pharm Res*, 2007, 24(3):438-447]