

基于纳米材料的 CpG 核酸药物载运系统

魏敏[†], 李江[†], 陈楠, 黄庆*, 樊春海*

中国科学院上海应用物理研究所物理生物学实验室, 上海 201800

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: huangqing@sinap.ac.cn; fchh@sinap.ac.cn

2012-08-29 收稿, 2013-03-11 接受, 2013-07-15 网络版发表

国家自然科学基金重大研究计划(90913014)资助

摘要 人工合成的含有胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸的脱氧寡核苷酸(CpG ODN)可以模拟细菌 DNA 的免疫激活作用, 被哺乳动物免疫系统视为“危险”信号而引发机体产生免疫应答. 因此, CpG ODN 可以作为潜在的治疗性 DNA 和免疫佐剂, 在感染性疾病、过敏性疾病和癌症的辅助治疗中发挥作用. 然而, 未经修饰的 CpG ODN 通常易被核酸酶降解, 细胞摄取率低, 需要较高的给药剂量和反复给药, 这些缺陷严重地限制了 CpG 的应用. 近年来, 纳米技术的发展为解决核酸药物的递送问题提供了新的工具. 已有大量研究报道显示, 纳米材料负载的 CpG 核酸药物表现出高活性、低毒性、生物相容性好等特点, 有望作为新型免疫治疗制剂应用于相关疾病的预防和治疗中. 本文对 CpG 核酸药物的发展背景进行了简述, 介绍了 CpG 药物的作用机制、CpG 载运对载体材料提出的要求, 重点对近年来兴起的多种基于新型纳米材料(包括纳米脂质体/共聚物、各种无机纳米材料和 DNA 纳米结构等)的 CpG 载运体系进行了评述, 总结了各种载运系统的原理和特点, 并对纳米材料递送 CpG 药物的发展趋势进行了展望.

关键词

CpG
纳米载体
药物载运
DNA 纳米结构

核酸(包括 DNA 与 RNA)不仅是生命遗传信息的载体, 也能对各种复杂的生命过程起到调控作用. 当前, 尝试将具有调控功能的核酸作为药物而发展出的各种新型治疗策略, 正逐步从基础性研究向临床前实验与临床的实验阶段发展. 其中, 易于人工合成的寡核苷酸(ODN), 包括反义 DNA, 适配体(aptamer)和小干扰 RNA(siRNA)等, 在治疗多种疾病方面已经引起了研究者极大的关注^[1]. 这些人工合成的寡核苷酸通常具有水溶性好、体内毒性低、与靶位点结合的特异性与敏感性高等优点. 然而, 由于细胞膜主要由带负电荷的脂质双分子层组成, 因此同样带负电荷的天然核酸分子难以直接穿过细胞膜进入细胞; 另一方面, 生物在漫长的进化过程中发展出了各种抵御外来核酸入侵的机制, 使得外源核酸很容易在到达靶点发挥作用前就已被阻挡、清除和降解. 这些障

碍使得人工合成核酸在实际的治疗应用中受到很大限制^[1,2].

1 CpG 核酸药物

在众多潜在的核酸药物中, 富含未甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸的 DNA(CpG DNA)是一种可以刺激多种免疫细胞活化或增殖、具有强烈的免疫激活功能的核酸. 早在 1984 年, Tokunaga 等人^[3]在牛分枝结核杆菌卡介苗(BCG)提取液中发现了一种具有刺激作用的短单链 DNA, 可增强 NK 细胞的杀伤活性. 1995 年, Krieger 等人^[4]证实, 这种免疫刺激作用来源于未甲基化的含有 CpG 的二核苷酸, 并将包括特定侧翼序列的以 CpG 二核苷酸为核心的核苷酸六聚体序列命名为“CpG 基序”(CpG motif), 由此开始了对 CpG DNA 的研究.

引用格式: 魏敏, 李江, 陈楠, 等. 基于纳米材料的 CpG 核酸药物载运系统. 科学通报, 2014, 59: 133-145

Wei M, Li J, Chen N, et al. CpG ODN delivery systems based on nanomaterials (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 133-145, doi: 10.1360/972012-1299

1.1 CpG 免疫激活效应的机制

研究者发现,未甲基化的 CpG 基序广泛存在于细菌或病毒的基因组 DNA 中,此类非甲基化的 CpG 二核苷酸在细菌、病毒基因组中的出现频率远远高于脊椎动物,而且脊椎动物中 80% 的胞嘧啶第 5 位碳原子是甲基化的^[4]. 这种显著的差异使来自细菌及病毒的 DNA 可被哺乳动物免疫系统视作“危险信号”而发起免疫应答反应,以清除入侵的病原. Hemmi 等人^[5]于 2000 年发表的研究工作表明, Toll 样受体 9 (Toll like receptor 9, TLR9) 是 CpG DNA 发挥免疫激活性所必需的,可能是 CpG DNA 的细胞内受体. TLR9 属于模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 家族,存在于人类等哺乳动物的 B 淋巴细胞、树突状细胞 (dendritic cells)、单核细胞和自然杀伤细胞 (NKs) 等免疫细胞的内吞小体膜上. 受到 CpG 刺激后, TLR9 可以募集衔接蛋白髓样分化因子 (MyD88), 使 IL-1 相关激酶 4 (IRAK-4) 磷酸化, 与肿瘤坏死因子相关受体 6 (TRAF6) 相互作用, 激活细胞内 MAPK 和核因子- κ B (NF- κ B) 等信号通路^[5,6], 促使细胞分泌各种细胞因子, 包括白介素 6 (IL-6)、白介素 10 (IL-10)、白介素 12 (IL-12)、I 型干扰素 (type I IFNs) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等. 这些细胞因子可引发 B 细胞分化为分泌抗体的浆细胞^[7]、激活自然杀伤细胞 (NK)^[8]、促进 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞应答^[9]等, 从而完成一系列先天的或适应性的免疫应答过程^[10].

研究发现,人工合成的含有 CpG 基序的寡核苷酸序列 (CpG ODN) 完全可以模拟天然细菌 DNA 的刺激作用, 因此可作为有效的免疫治疗工具, 在抗感染免疫、癌症治疗、过敏性疾病以及免疫佐剂等领域具有重要的应用价值^[11,12]. 作为一种核酸药物, CpG ODN 通常经由注射进入血液循环系统和淋巴系统, 被其中的免疫细胞摄取并进入细胞的内吞小体. 与天然病原基因组 DNA 的作用机制相同, CpG ODN 与内吞小体膜上的 TLR9 受体发生特异性结合并引发一系列免疫相关的信号通路, 促使这些细胞分泌各种细胞因子. 其中一些抗肿瘤细胞因子 (如 TNF- α) 可以直接作用于肿瘤细胞, 起到抑制其增殖的作用^[13-15]. 另一方面, 将 CpG ODN 与其他疫苗联用, CpG 可以起到免疫佐剂的作用, 通过引发机体的免疫反应, 增强机体对疫苗的特异性免疫应答, 从而强化疫苗的效用^[16-18]. 目前, CpG ODN 已用于黑色素

瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌及血液系统恶性肿瘤等临床研究的研究中^[19,20]; 其在针对乙型肝炎、炭疽、艾滋病和流感等传染性疾病的临床治疗中也显现出潜在的应用价值^[21-24].

1.2 CpG 核酸药物应用面临的问题

从上述 CpG 的作用机制可知, CpG ODN 发挥药效的关键在于其能够有效地被体内免疫细胞摄取并与受体 TLR9 发生相互作用. 然而, 与其他核酸类药物一样, 未经修饰的 CpG DNA 同样面临易被核酸酶降解、细胞摄取率低等问题, 因此需要高剂量重复给药, 这极大地限制了其在医学领域的应用. 最初, 人们通过设计改变 CpG DNA 碱基序列发现, CpG 寡核苷酸 (CpG ODN) 中 CpG 基序的位置及其侧翼核苷酸序列的变化, 对细胞摄取效率和免疫活性均会产生一定的影响^[4,25-27]. 而且, 相同 CpG 序列对不同物种的免疫活性也不尽相同. 尽管选择最优的 CpG 序列可以增强 CpG 的免疫刺激效果, 但由于 CpG ODN 在体内的半衰期较短, 效果仍然不够理想.

为了增强核酸分子的稳定性, 对其进行化学修饰是目前在核酸药物中应用较多的一类方法. 常见的核酸修饰方法包括针对核酸骨架上磷酸二酯键的修饰 (如硫代修饰^[28], 即用硫原子取代磷酸二酯键中的一个非桥联氧原子)、针对核糖的修饰 (如主要针对 RNA 的 2'-氧-甲基化, 2'-氧-烯丙基化和 2'-氟代修饰等)^[29-31]、针对碱基的修饰 (用非天然碱基替换天然碱基)^[32], 以及采用核酸类似物替换核酸骨架 (如肽核酸、锁核酸)^[33,34]等. 这些化学修饰的目标均是增强核酸分子在生理环境下的稳定性^[28], 有的修饰 (如锁核酸) 还能提高其与目标核酸的结合效率^[35]; 但是它们同时也会带来一些毒性和合成成本较高的问题^[28]. 对 CpG 药物而言, 最常用而有效的方法是硫代修饰, 修饰后的寡核苷酸可以抵御核酸酶的降解作用, 稳定性和细胞摄取率可得到显著提高, 在体内的半衰期也得以延长^[1]. 但是有研究表明, 硫代修饰的 CpG 寡核苷酸不能完全模拟天然 CpG 与受体 TLR9 的相互作用, 通过表面等离子体共振 (SPR) 方法检测 CpG 与其受体的相互作用显示, 硫代修饰后的 CpG 序列与天然磷酸骨架的 CpG 相比, 其与受体 TLR9 的亲和力降低^[36]. 更重要的是, 通过硫代方法修饰的 CpG 药物存在明显的毒副作用, 重复注射高剂量硫代 CpG 会引发机体急性毒性, 引起剂量依赖性脾肿大、

导致肾损伤并造成其他与过度激活免疫相关的毒性表现甚至死亡^[37-39]。这种安全隐患很大程度上源自硫代修饰磷酸骨架带来的毒性,而与 DNA 的序列无关。

除了稳定性之外,核酸的细胞摄取效率也是 CpG 核酸药物面临的一个重要问题。带负电荷的寡核苷酸分子被细胞摄取的效率通常较低,这就需要借助那些能够高效进入细胞的材料作为载体来递送这些核酸分子。因此,发展更为安全高效的递送策略成为当前 CpG 核酸药物应用研究的迫切需要。传统的病毒类载体可以为核酸药物提供一种高效率的递送手段。这类载体可利用病毒的侵染特性将外源核酸注入宿主细胞。例如,经过基因工程改造的腺病毒(adenovirus)和腺病毒相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)是两种常见的病毒载体,它们适用的宿主范围较广,可通过基因重组获得靶向性,不受靶细胞是否为分裂细胞所限^[40]。腺病毒基因组为双链 DNA,可插入相对较大的外源基因片段,不会整合到宿主基因组中,可以瞬时表达;而腺病毒相关病毒则是一种单链 DNA 病毒,可将外源 DNA 整合到宿主基因组的特定位点^[40]。目前,这些经过重组的病毒载体已被用于肿瘤疾病的基因治疗当中^[41,42]。但是,病毒自身基因在宿主细胞内的表达依然会带来一些免疫原性与毒性^[43]。基于病毒载体的基因治疗导致的死亡病例使得人们对病毒载体的安全应用更加谨慎^[44]。出于对安全性的考虑,近年来,在递送 CpG ODN 等寡核苷酸药物的应用中,研究者将注意力集中在了非病毒类的载体上^[45]。

1.3 CpG 递送对载体材料的要求

要构建能够胜任 CpG 递送任务的理想载体,候选材料通常需要满足下列 5 点要求:

(i) 理想的细胞摄取效率。携带原本不易进入细胞的 DNA 单链分子进入细胞,是使其发挥生物学效应的前提。一种材料被细胞摄取的效率,除了受到其所带电荷的影响之外,很大程度上与材料的形貌、尺寸等几何属性有关^[46-48]。大量的研究表明,尺度在 20~100 nm 范围内的纳米材料相对更容易被细胞主动摄取^[49-51]。

(ii) 低毒性和良好的生物相容性。一种理想的载体材料应该对宿主低毒或无毒,除了保证所携带药物发挥效力之外,其自身应该避免引发宿主体内不必要的生物反应(如过敏反应)。要实现这一点,材

料通常应该具备下述特点:(1) 材料本身不含有毒或致敏成分,或对其表面进行改性处理后在体内不会释放有毒成分^[52,53];(2) 材料应该具有良好的水溶性,在生理条件下不至于聚集成大尺寸结构而产生毒性^[54,55];(3) 材料应该具有生物可降解性,这同样可以避免材料在体内大量积累无法消化且无法排出而对体内器官组织产生累积毒性^[14,56]。

(iii) 易于装载 CpG 核酸分子。可以通过非共价的吸附作用(如电荷作用力)^[57]或简单的共价连接^[58]装载足够剂量的 CpG 分子,无需过度繁琐的合成与纯化步骤^[59],且有较高的收率。

(iv) 在到达靶点发挥作用之前保护 CpG 核酸分子免受核酸酶降解。未经修饰的 DNA 单链在生理环境下容易被各种核酸酶降解,而载体需要能够在较长时间内保护核酸分子的完整性,延长核酸药物在体内的循环时间,以保证 CpG 到达靶细胞并发挥作用。

(v) 不显著影响 CpG 的免疫刺激效应,甚至能够对其效果有所增强。由于 CpG DNA 需要与细胞内的 TLR9 受体相互作用引发免疫应答途径,因此 CpG 与载体材料的结合不能妨碍 CpG 与 TLR9 受体的作用,以确保其发挥正常的刺激效果。一些研究表明,CpG 的免疫刺激效果除了与 CpG 的侧翼序列相关之外,序列末端的结构对其刺激效果也有较大影响。(1) 让 CpG 序列 5'端保持游离状态可能对刺激效果较为有利,游离的 5'端越多,刺激效果也越明显,暗示 CpG 序列的 5'端可能与受体结合有关^[60-62];(2) CpG 序列 3'端经过修饰或者与其他结构相连通常能获得较好的免疫刺激效果^[63],这可能是由于体内多数核酸酶从 3'端开始消化核酸分子,3'端连接的结构可以保护 DNA 分子免受降解,间接增强其免疫刺激效果。这些影响 CpG 活性的因素都是在构建 CpG 递送体系时值得考虑的问题。

2 基于纳米材料的 CpG 递送策略

物质小到纳米尺度(0.1~100 nm)后会出现特殊性能,这种既不同于原来组成的原子、分子,也不同于宏观物质的材料即为纳米材料。纳米材料可轻易进入到生物体内,为构建药物运输系统提供了巨大的优势^[64]。近年来,随着纳米材料技术的不断发展,为递送外源性 ODN 进入靶细胞提供了更多的选择。各种受到研究者关注的纳米材料,包括脂质体^[65,66]、聚

合物纳米结构^[67,68]、纳米金^[69,70]、硅纳米材料^[71]、量子点^[72]、磁性纳米颗粒^[73,74]、碳纳米管^[75]以及自组装DNA结构^[59,76,77]等,因其各自的独特性质,成为核酸类药物递送系统的候选材料.目前已有大量研究工作报道了基于这些纳米材料的CpG载运系统,目标是发展更为易用、廉价、低毒性且更为高效的CpG递送策略以改善CpG药物的性能,并已经取得了一定的进展.下文将对CpG载运系统(图1)的研究进展进行评述.

2.1 基于阳离子脂质体/多聚物纳米结构的CpG载运系统

由于细胞膜表面带负电荷,使得带正电荷的脂质体或聚合物容易通过静电作用与细胞结合进而被细胞摄取,从而将原本不易穿透细胞膜的核酸分子递送至细胞质内.并且,经过简单的混合之后,这些带正电荷的材料即可吸附或包裹带负电荷的核酸分子.基于这一原理的纳米尺度的阳离子脂质体和聚合物目前已被广泛应用于商业化的细胞转染试剂中(如Lipofectamine™和JetPEI™),且有多种基于这类材料的药物已在美国通过认证或进入后期临床研究^[78,79].因此,阳离子脂质体和多聚物纳米结构也较早地被用于CpG药物递送的研究.Wilson等人^[57]总结了基于脂质纳米颗粒的CpG载体(如双相脂质体^[80])对于CpG的递送特性:除可以很方便地装载核酸分子外,还可以保护其负载的CpG抵御核酸酶降解,提高靶细胞的摄取效率,增强CpG ODN的免疫刺激活性等.阳离子多聚物材料,如聚(丙交酯-乙交酯)共聚物(PLG)纳米微球^[81~83]、聚氨基酸(PAA)纳米颗

粒^[84]等,也被报道用于CpG ODN的递送,同样可以提高CpG的摄取效率,减少CpG的使用剂量.此外,Zwiorek等人^[85]还利用阳离子凝胶颗粒作为载体递送CpG ODN,并进行了动物体内的效应研究.结果显示,在小鼠体系中,这种凝胶颗粒作为一种生物可降解且耐受性好的载运体系,可将CpG ODN递送至靶细胞,激活免疫系统,并可以提高CpG的细胞摄取率和免疫刺激活性.然而,尽管带来了理想的细胞摄取效率,这类载体自身的细胞毒性仍然是不容忽视的问题^[86].阳离子脂质体的细胞毒性往往由其结构中的亲水基团决定,而阳离子聚合物的毒性与其分子量大小有较大关联,这些载体的残留毒性则与其成分的可降解性有关^[86].另外,这类材料靠静电作用装载核酸药物,对其组装结构的均一性、有序性等缺乏精确控制,较难实现复杂的多功能复合结构^[77],未被除去的空载体也容易产生较大的毒性^[86].并且,血清中的复杂组分对这类材料的转染效率影响很大,限制了其在活体中的实际应用.

2.2 基于无机纳米材料的CpG载运系统

无机纳米材料(如碳纳米管、纳米金和量子点等)经过多年的发展,在生物学诊断和治疗领域已有大量研究和实际应用^[49,87,88].在安全性方面,这些纳米材料的尺寸大小、化学组成、表面结构、溶解性、形状以及聚集状态等均可以影响其生物学效应.它们进入体内后的归宿和作用等问题也尚待解决.迄今为止,许多研究者对多种纳米材料的安全性进行了研究,但得到的结论不尽相同^[64].下面介绍3种已经用于CpG ODN载运的无机纳米材料载体.

(i) 碳纳米管-CpG载运系统.碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)作为一种经典的碳纳米材料,在药物递送领域的应用研究受到广泛的关注^[75].最初,碳纳米管在制备过程中常常引入金属催化剂,并且在水溶液中容易发生聚集,使得碳纳米管的毒性成为限制其生物学应用的一大问题^[89].但是,得益于碳材料的化学特性,碳纳米管表面可以很容易地被修饰各种化学基团(如羧基、氨基等)乃至多聚物分子(如PEG, PEI等),这些基团可以增加其在水溶液中的分散性^[90],对于改善材料的生物相容性至关重要,也使得在碳纳米管上偶联药物分子更为便捷.此外,碳纳米管在动物活体组织中的残留毒性仍然是值得关注的问题.大量研究表明,除了水溶性之外,碳纳

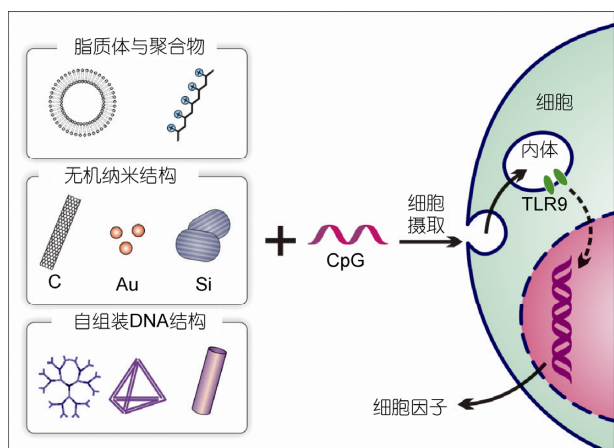


图1 基于各种纳米材料的CpG药物载运策略及作用原理

米管的毒性还取决于催化剂、表面修饰、长度和形貌等多方面因素^[91]。例如,长度达到微米级的碳纳米管不易被巨噬细胞和吞噬细胞清除,可在体内循环数周时间并引发炎症反应^[92]。另有研究表明,碳纳米管在肝和肺中的剂量累积容易导致这些脏器的氧化压力上升^[93]。近年来,经表面修饰的碳纳米管已被成功用作核酸递送的载体,实现了在细胞中的实验应用^[94-97]。在利用碳纳米管进行 CpG 递送方面,2005 年, Bianco 等人^[98]利用氨基修饰的单壁碳纳米管构建 CpG ODN 的载体。由于质子化的氨基使得碳纳米管带正电荷,可与带负电荷的 CpG ODN 以非共价吸附的方式偶联,得到的碳纳米管-CpG 复合结构可以有效进入靶细胞,且没有明显的细胞毒性。通过检测相关细胞因子(IL-6, IFN- γ)的分泌,结果表明,这种阳离子化的碳纳米管可以显著提高 CpG ODN 的免疫刺激活性。

(ii) 介孔硅-CpG 载运系统。介孔硅(mesoporous silica)纳米结构也具有有利于生物医学应用的特色:(1)多孔的表面带来的巨大比表面积,使其可以装载更多的药物分子;(2)研究者可以引入其他尺寸更小的材料对介孔硅上装载药物分子的孔洞加盖或去盖,从而实现药物的可控释放^[71];(3)硅材料的生物相容性较为理想。但是,也有报道表明,未经修饰的硅纳米颗粒可造成血液中红细胞的细胞膜破裂,导致溶血现象,但这种毒性可以通过在其表面修饰聚合物分子(如 PEG)来消除^[99]。此外,对于动物活体的组织毒性研究表明,介孔硅纳米颗粒主要在肝与脾中积聚,聚合物修饰的介孔硅颗粒更容易从这些脏器中逃脱,在血液中循环时间更长,不易被降解和排出体外。但是其在活体内的组织毒性并不明显^[100]。近年来,研究者利用介孔硅材料发展了一系列基因转染和核酸递送策略^[71,101,102]。2011 年, Zhu 等人^[103]报道了将介孔硅纳米颗粒用于 CpG 递送的研究工作。在该系统中,带负电荷的 CpG ODN 通过非共价吸附与带正电荷的氨基化介孔硅纳米颗粒共组装,然后加入阳离子聚丙烯氯化铵(PAH)对其进行包被,形成一种多组分复合的纳米结构。在对稳定表达 TLR9 的人胚肾细胞(293XL-hTLR9)进行处理后,该结构显示出良好的细胞摄取效率和较低的细胞毒性;对靶细胞中 NF- κ B 活性的检测表明,该体系能够有效刺激宿主细胞的免疫反应。值得一提的是,引入阳离子聚合物 PAH 作为包被材料后,该结构的免疫激活效果

较不带 PAH 的介孔硅-CpG 结构显著增强,这是因为 PAH 保护 DNA 分子在血清中不被降解,并且增加了纳米结构的细胞摄取效率。

(iii) 金纳米颗粒-CpG 载运系统。金纳米颗粒(AuNPs)作为一种易于合成且易于与其他生物大分子偶联的贵金属纳米材料,近年来被广泛应用于生物医学研究中^[104-111]。在过去的十几年中,研究者设计、合成并研究了各种多价 DNA 修饰的金纳米颗粒(DNA-AuNPs)^[112],并充分利用这些多价 DNA-AuNPs 的独特性质(包括与金纳米颗粒聚集程度相关的光学特性^[113]、对 DNA 稳定性的增强^[114]、易于被哺乳动物细胞摄取^[115]等),发展了一系列生物医学诊断和治疗策略^[116,117]。此外,纳米金的生物相容性较好。对于静脉注射的纳米金的活体内分布研究表明,除了肝与脾之外,粒径较小(10 nm)的纳米金在多个脏器中均有分布^[118]。但是,在一定剂量范围内,纳米金引起的体重、脾脏指数、红细胞指标等毒性指标的变化并不明显^[119]。由于纳米金的众多优越特性,本课题组^[58]在前期工作中尝试用纳米金颗粒作为载体,与巯基修饰的 CpG ODN 通过 Au-S 键自组装构建多价 CpG-纳米金复合物(CpG-AuNPs)用于 CpG 递送。实验表明,纳米金颗粒载带的 CpG ODN 在细胞内大量分布,同时,显著提高了 CpG ODN 的免疫激活效果(分泌细胞因子浓度提高两个数量级),且显著优于商品化的阳离子脂质体。并且这种免疫激活效果的提高来源于 CpG 序列,而非纳米金颗粒自身。此外,本课题组发现,CpG-纳米金复合物对细胞活力几乎没有影响。在以上实验的基础上认为,以纳米金为载体的 CpG 载运系统具有以下优势:(1)纳米金尺寸相对均一,经生物大分子包被后在水溶液中有良好的分散性,免疫原性和细胞毒性很低;(2)CpG-纳米金复合物极易进入细胞,并且能够保护其表面的 CpG DNA 免受核酸酶的降解,同样有助于最大限度地发挥 CpG DNA 的生物学活性;(3)DNA 分子在纳米金颗粒表面的组装具有较好的有序性和可控性,使多个 CpG ODN 分子能够同时在纳米颗粒表面保持向外伸展状态,提供大量游离的 5'端,从而保证了 CpG 的免疫刺激活性,这也可能是纳米金递送体系刺激效果优于阳离子脂质体的原因。

2.3 基于自组装 DNA 结构的 CpG 载运系统

DNA 碱基准确的互补配对原则为人们设计合成

纳米尺度的几何结构提供了一种优越的原材料. 通过对 DNA 序列的设计, 线性的 DNA 分子可以通过自发的杂交、扭转、拼接和折叠形成各种二维或三维的几何结构^[120-122], 并且具有高度的有序性、可控性与可寻址性. 自 DNA 纳米技术的开创者 Seeman 教授^[123,124]于 1980 年开始相关工作以来, 研究者已经利用 DNA 纳米技术构建了各种高度复杂的纳米结构并将其应用于分子检测^[125-127]、DNA 计算^[128,129]和纳米机器^[130-132]等方向的研究. 在发展核酸递送载体方面, DNA 纳米结构的潜力也逐渐受到研究者的重视. DNA 纳米结构用于核酸递送的特色在于: (1) DNA 在这一体系中既是载体材料又是效应分子, 使得整个结构具有同质性, 容易通过序列设计实现对结构和功能的一体化设计和控制, 获得很高的有序性(如核酸药物装载的数量、位置、方向、密度等); (2) 由于 DNA 是天然存在于生物体自身内部的物质, 因此基本不必担忧生物相容性和毒性的问题; (3) 即使未加任何其他化学基团修饰, 带负电荷的 DNA 结构, 只要具有合适的尺寸, 也可以有效地被多种哺乳动物细胞摄取^[62,133], 从而打开了 DNA 纳米结构在生物医学领域应用的局面. 下面将对近年来已报道的一些基于自组装 DNA 结构的 CpG 递送策略进行评述.

(i) 基于 Y 形/枝状 DNA 结构的 CpG 载运系统. Nishikawa 等人^[14,62,134,135]研究发现, 将含有 CpG 基序的 3 条寡核苷酸链通过两两互补杂交方法, 可以构建成含有 CpG 基序的自组装 Y 形 DNA 结构^[134], 这一结构的 3 个分支末端可以携带 3 段 CpG 序列. 体外细胞实验证实, 与线性的单链/双链 CpG ODN 相比, Y 形 CpG DNA 可显著地提高对小鼠巨噬样细胞的免疫刺激效应. 随后, 其课题组又进一步以这种 Y 形 DNA 为结构单元, 通过 1~3 轮(代)彼此杂交拼接成不同大小的含 CpG 基序的树枝状结构(dendrimer-like CpG, DL-CpG)^[62]. 实验结果表明, 生长了 3 轮后的树枝状结构尺寸较单个 Y 形 DNA 或生长了 1~2 轮的树枝结构尺寸更大, 更多的分支结构意味着更多的 CpG 基序, 因而也具有更好的免疫刺激活性, 从而佐证了游离的 CpG 5'端数量对免疫刺激效果的影响. 此后, Nishikawa 等人^[14]以类似的 X 形 CpG DNA 为结构单元通过彼此交联杂交的方法制成了尺度更大的 DNA 水凝胶, 由于抗肿瘤药物阿霉素分子易于嵌入 DNA 双链, 这样的结构不仅发挥了 CpG 基序的免疫刺激作用, 还可以向靶细胞高效地递送阿霉素. 这

种双管齐下的处理方式强化了肿瘤抑制的效果, 为癌症的免疫治疗开辟了新的思路. 在最近的报道中, Nishikawa 等人^[135]又利用与合成 Y 形 DNA 相同的方法, 通过增加杂交 DNA 链的种类合成了一系列比 Y 形 DNA 分支数(3 个分支)更多的“多足状”DNA 结构(polypod-like structures), 并用于 CpG 载运. 与此前的树枝状 DNA 结构(DL-CpG)不同的是, 这类多足状结构不需要单元结构的周期性拼装, 有很好的均一性, 可以携带可控数量的含有 CpG 序列的分支(包括 3, 4, 5, 6, 8 个分支), 对这些结构的免疫刺激效果进行比较的结果表明, 分支数量的增加可以带来刺激效果的增强^[135].

(ii) 基于 DNA 四面体三维纳米结构的 CpG 载运系统. 随着 DNA 纳米技术的不断发展, 结构精巧的新型 DNA 纳米结构不断涌现. 典型的例子是牛津大学 Turberfield 及其合作者^[136,137]开发的“笼子状”三维 DNA 纳米结构. 这种 DNA“纳米笼”由 4 条人工合成的 DNA 短链构成, 可自行组装成一个约 5 nm 高的四面体, 这种三维的 DNA 纳米结构具有很好的结构刚性和稳定性^[138,139]. 有趣的是, Walsh 等人^[133]将荧光标记的 DNA 四面体与实验室培养的人类胚胎肾脏细胞共同孵育后进行研究, 结果发现, 即使在没有转染试剂辅助的情况下, DNA 四面体也能够进入哺乳动物细胞, 而且进入细胞的大部分“纳米笼”仍然保持完整性, 能抵抗细胞内酶的降解作用达 48 h 之久.

本课题组首先将这种有趣的三维 DNA 纳米结构应用到 CpG 的载运^[59]. 将刚性的 DNA 四面体结构与不同数目的 CpG 寡核苷酸结合, 形成不同价态的 CpG-四面体, 评估细胞摄取率和这些多价修饰 DNA 纳米结构的稳定性, 并研究它们的免疫刺激效果. 实验中的 DNA 四面体纳米结构利用 4 条单链 DNA 经过简单的退火反应组装而成. 四面体的 4 个顶点延伸出 1~4 条 CpG ODN 单链. 结构表征发现, 附加的 CpG 链没有妨碍四面体结构的形成. 通过荧光成像及流式细胞仪检测 CpG-四面体的细胞摄取情况可以看出, 虽然单链的 CpG DNA 很难被细胞摄取, 但 CpG-四面体则可以被细胞大量摄取, 证明四面体结构在细胞摄取中起到重要的促进作用, 在没有转染试剂辅助的情况下可以有效地携带 CpG 基序进入小鼠巨噬样细胞(Raw264.7). 此外, 一系列实验也证明, 这种四面体纳米结构可以增强 CpG DNA 在细胞内外的稳定性. 经 CpG-四面体处理后, 检测宿主细胞释

放细胞因子 TNF- α , IL-6 和 IL-12 的水平, 结果表明这一结构有良好的免疫刺激效果, 明显优于阳离子脂质体转染的等量 CpG ODN^[59]. 并且, 这种刺激效应主要来源于四面体上携带的 CpG 基序, 而非四面体结构本身. 同时本课题组还比较了不同价态 CpG-四面体的免疫刺激活性, 在 DNA 四面体浓度相同的情况下, 随着四面体上负载的 CpG 序列数量增加, 免疫刺激性也随之增强. 值得一提的是, 虽然四价 CpG-四面体(连接 4 段 CpG 基序的四面体)的免疫刺激性较高, 但是 CpG 基序绝对剂量的增多并不是免疫刺激性高的唯一原因, 当调节一价 CpG-四面体与四价 CpG-四面体的 CpG 基序浓度一致时, 四价 CpG-四面体刺激细胞产生的 TNF- α 的浓度仍高出一价 CpG-四面体 50% 以上, 这一结果可能与 CpG 结构的分布有关, 说明在一个四面体颗粒上有更多的 CpG DNA 5'端可能会增加 CpG 序列与受体结合的亲和力.

这一系列研究工作证明, 即便不使用阳离子化的载体, 由天然的带负电荷的 DNA 分子构建的三维纳米结构也可以被哺乳动物的吞噬细胞主动摄取. 因此, 只要通过序列设计和 DNA 杂交构建适当的结构, 就可以在不加任何其他化学修饰的情况下, 制备具有理想活性的 CpG 药物载运系统.

最近, 颜颖及其合作者^[17]将携带 CpG 序列的 DNA 四面体结构与作为模式抗原的链酶亲和素(streptavidin, STV)偶联, 形成一种复合疫苗. 通过体外实验和小鼠体内实验证明, 在这样一个复合结构中, 由于 CpG 可以起到高效刺激免疫应答的作用, 作为抗原的 STV 在其辅助下可以大大增强刺激小鼠体内产生对应抗体的水平和提高免疫效应的持续时间, 效果显著高于注射非结合态的 CpG 序列与 STV.

(iii) 基于 DNA 折纸结构的 CpG 载运系统. 最近, Schuller 等人^[76]报道了利用基于 DNA 折纸术(DNA origami)的 DNA 纳米管结构实现 CpG 递送的应用. DNA 折纸术^[120,140,141]是近年新发展起来的一种使 DNA 序列自发折叠形成纳米尺度几何结构的新技术. 该技术通常以多条人工设计的寡核苷酸序列作为“订书钉链”, 与一条较长的病毒 DNA 单链(“脚手架链”)退火杂交, 通过对订书钉序列的设计可以对脚手架链的折叠方式进行精确控制, 从而构建相当复杂的二维^[120,126,127,142]和三维^[121,143-145]几何结构.

在 Schuller 等人^[76]的工作中, 一条长 8634 bp 的

M13mp18 噬菌体载体单链 DNA 被用作“脚手架链”, 与另外两百多条“订书钉链”退火, 形成了一个三维的管状纳米结构. 随后, CpG ODN 再通过杂交被锚定在纳米管上的特定位置, 实现对 CpG 的装载. 实验结果表明, 这一结构可以被小鼠脾淋巴细胞主动摄取, 是一种高效的 CpG 递送工具. 与亚细胞结构的共定位成像实验表明, 进入细胞的 DNA 纳米结构主要分布于内体(endosome)中, 保证了 CpG 能够与内体膜上的 TLR9 受体相互作用. 此结构同样对宿主细胞有高效的免疫刺激作用, 引起细胞因子 IL-6 的分泌和 CD69(作为早期免疫激活的标志)表达水平的升高. 有趣的是, CpG 序列无论连接在管状结构的内表面还是外表面, 得到的刺激结果都是相似的. 他们认为, 这是由于管状结构在细胞内体中被部分消化展开, 或者 CpG 链从结构上脱离所致. 此外, DNA 折纸结构自身在 TLR9 阴性的细胞中也能引起非 TLR9 通路专一的免疫反应, 提示特定的 DNA 纳米结构自身也可能存在潜在的安全风险. 但是, 对于 DNA 纳米管免疫原性的来源尚未进行研究.

3 前景展望

基于上述的研究进展, 有理由相信, 基于新型纳米材料载运系统的 CpG 核酸药物具有广阔的应用前景. 在药物递送系统发展日新月异的今天, 纳米材料 CpG 载运系统可能朝着下述 3 个方向进一步发展.

(i) 靶向给药. 靶向给药是药物递送研究发展的一个重要方向. 靶向给药使得药物分子能够主动在靶点富集, 更为高效地发挥作用, 从而降低药物使用剂量和由此带来的毒副作用. 目前, 重点关注的靶向分子包括特异性地针对某些细胞或细胞中某些组分的配体分子(如叶酸^[146]、短肽^[147]、人工筛选的核酸适配体(aptamer)^[148]和抗体^[149]等. 这些分子不仅可以发挥靶向作用, 还能增加药物进入靶细胞的效率. 例如, 最近 Anderson 及其合作者^[150]报道了一种用于递送小干扰 RNA(siRNA)的 DNA 四面体结构, 连接叶酸分子作为带有肿瘤靶向性的配体, 实验结果表明, 这种结构在没有转染试剂辅助的情况下可以对大量表达叶酸受体的肿瘤细胞中的靶基因起到显著抑制作用. 这些最新的研究进展可能会对 CpG 药物递送策略的发展方向提供借鉴.

(ii) 受控释放. 受控药物释放指药物载运系统对药物分子的释放可以受到外界刺激或时间的控制,

也是药物递送领域很有意义的研究方向。一方面,希望药物分子在循环系统的输送过程中受到载体尽可能完全的保护以免受降解并穿过细胞各种屏障;另一方面,在到达药物作用靶点后,这种保护又可能阻碍药物分子与受体相互作用并发挥效果。为了解决这一矛盾,对于药物受控释放的研究近年来也逐渐成为热点。受控释放常常与靶向给药策略相结合,实现智能化的药物递送^[151],进一步提高药物的利用效率并降低毒副作用。例如,最近 Church 课题组^[152]报道的一种逻辑门运算纳米机器人就是结合了靶向给药与可控释放的范例。在其工作中,由 DNA 折纸术构建的纳米容器可以由其上两段核酸适配体与靶分子结合的逻辑关系决定,当两段核酸适配体均与细胞表面各自的靶分子结合时(逻辑“与”),容器就可以打开,释放其载带的药物分子,从而实现靶向性和可控释放特性的结合。虽然到目前为止尚未见到有关 CpG 受控释放的报道,但相信这也应该是 CpG 药物将来的一个发展趋势。

(iii) 协同递送。很多情况下,在实际治疗某种疾病时需要多种药物协同作用进行复合治疗,这就对纳米材料递送系统同时运载多种药物分子并保持各自的活性提出了要求。由于 CpG 常被用作疫苗佐

剂与疫苗一同被注射到体内以强化免疫系统对疫苗的应答^[16],近年来,研究者在利用纳米材料协同递送 CpG 与其他药物分子方面也取得了一些进展。例如, Diwan 等人^[83]利用聚合物聚乳酸-乙醇酸(PLGA)将 CpG 与破伤风类毒素协同递送至小鼠体内, CpG 作为免疫佐剂使破伤风疫苗获得了更好的免疫应答效果,并且利用多聚物载体共载带 CpG 与疫苗的效果明显优于两者在溶液中简单混合的效果。Nishikawa 等人^[14]利用 DNA 水凝胶将 CpG 与阿霉素分子协同递送至细胞内,与单独使用阿霉素相比, CpG-阿霉素协同载运系统对小鼠皮下肿瘤细胞的抑制作用更加显著。Liu 等人^[17]则利用 DNA 纳米四面体结构协同递送 CpG 序列与作为模式抗原的链霉亲和素至小鼠体内,获得了比单独用药更为理想的抗体产生效率和免疫效应持续性。因此,协同递送策略对于减少药物的使用剂量、提高治疗效果等方面均有重要的意义,值得研究者进行更深入的探索。

综上所述,随着人们在纳米尺度下对各种物质的精确设计和控制的技术日臻成熟,各种新颖的具备优越性能的纳米材料不断涌现,多功能、智能化、高效并且安全的纳米治疗系统也将得以发展,在未来的临床应用中发挥更大的作用。

参考文献

- 1 Agrawal S, Zhao Q. Antisense therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2: 519–528
- 2 Mutwiri G K, Nichani A K, Babiuk S, et al. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J Control Release*, 2004, 97: 1–17
- 3 Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*, 1984, 72: 955–962
- 4 Krieg A M, Yi A K, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995, 374: 546–549
- 5 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408: 740–745
- 6 Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 795–804
- 7 Jung J, Yi A K, Zhang X, et al. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J Immunol*, 2002, 169: 2368–2373
- 8 Ballas Z K, Rasmussen W L, Krieg A M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol*, 1996, 157: 1840–1845
- 9 Schwarz K, Storni T, Manolova V, et al. Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol*, 2003, 33: 1465–1470
- 10 Krieg A M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 471–484
- 11 Vollmer J, Krieg A M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 195–204
- 12 Fonseca D E, Kline J N. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 256–262
- 13 Carpentier A F, Chen L, Maltonti F, et al. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res*, 1999, 59: 5429–5432
- 14 Nishikawa M, Mizuno Y, Mohri K, et al. Biodegradable CpG DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice. *Biomaterials*, 2011, 32: 488–494

- 15 van Horssen R, Ten Hagen T L, Eggermont A M. TNF-alpha in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*, 2006, 11: 397–408
- 16 Pashine A, Valiante N M, Ulmer J B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*, 2005, 11: 63–68
- 17 Liu XW, Xu Y, Yu T, et al. A DNA nanostructure platform for directed assembly of synthetic vaccines. *Nano Lett*, 2012, 12: 4254–4259
- 18 Klinman D M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 249–258
- 19 Krieg A M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest*, 2007, 117: 1184–1194
- 20 Krieg A M. Antitumor applications of stimulating Toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr Oncol Rep*, 2004, 6: 88–95
- 21 Krieg A M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 709–760
- 22 Cooper C L, Davis H L, Morris M L, et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: A double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol*, 2004, 24: 693–701
- 23 Angel J B, Cooper C L, Clinch J, et al. CpG increases vaccine antigen-specific cell-mediated immunity when administered with hepatitis B vaccine in HIV infection. *J Immune Based Ther Vaccines*, 2008, 6: 4
- 24 Cooper C L, Davis H L, Morris M L, et al. Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine. *Vaccine*, 2004, 22: 3136–3143
- 25 Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 2181–2195
- 26 Kandimalla E R, Bhagat L, Cong Y P, et al. Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306: 948–953
- 27 Shimosato T, Kimura T, Tohno M, et al. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C···G-3' stem structure. *Cell Microbiol*, 2006, 8: 485–495
- 28 Chen X L, Dudgeon N, Shen L, et al. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 587–593
- 29 Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, et al. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 589–595
- 30 Lima W F, Prakash T P, Murray H M, et al. Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell*, 2012, 150: 883–894
- 31 Sundaram P, Kurniawan H, Byrne M E, et al. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48: 259–271
- 32 Sasaki S, Nagatsugi F. Application of unnatural oligonucleotides to chemical modification of gene expression. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10: 615–621
- 33 Egholm M, Buchardt O, Nielsen P E, et al. Peptide nucleic-acids (PNA)–Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc*, 1992, 114: 1895–1897
- 34 Wahlestedt C, Salmi P, Good L, et al. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 5633–5638
- 35 Braasch D A, Corey D R. Locked nucleic acid (LNA): Fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol*, 2001, 8: 1–7
- 36 Kindrachuk J, Potter J E, Brownlie R, et al. Nucleic acids exert a sequence-independent cooperative effect on sequence-dependent activation of Toll-like receptor 9. *J Biol Chem*, 2007, 282: 13944–13953
- 37 Chavany C, Connell Y, Neckers L. Contribution of sequence and phosphorothioate content to inhibition of cell growth and adhesion caused by c-myc antisense oligomers. *Mol Pharmacol*, 1995, 48: 738–746
- 38 Croke R M. *In vitro* toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Des*, 1991, 6: 609–646
- 39 Levin A A. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1489: 69–84
- 40 Lai C M, Lai Y K, Rakoczy P E. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol*, 2002, 21: 895–913
- 41 Roth J A, Cristiano R J. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89: 21–39
- 42 Choi J W, Lee J S, Kim S W, et al. Evolution of oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64: 720–729
- 43 Hartman Z C, Appledorn D M, Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res*, 2008, 132: 1–14
- 44 Marshall E. Clinical trials–Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 1999, 286: 2244–2245
- 45 Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: Delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther*, 2001, 12: 861–870
- 46 Qiu Y, Liu Y, Wang L M, et al. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 2010, 31: 7606–7619
- 47 Arnida, Janat-Amsbury M M, Ray A, et al. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 77: 417–423
- 48 Albanese A, Tang P S, Chan W C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng*, 2012, 14: 1–16

- 49 Petros R A, DeSimone J M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 615–627
- 50 Choi H S, Liu W, Liu F, et al. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nat Nano*, 2010, 5: 42–47
- 51 Davis M E, Chen Z, Shin D M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 771–782
- 52 Derfus A M, Chan W C W, Bhatia S N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett*, 2004, 4: 11–18
- 53 Hoshino A, Fujioka K, Oku T, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett*, 2004, 4: 2163–2169
- 54 Wick P, Manser P, Limbach L K, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 2007, 168: 121–131
- 55 Studer A M, Limbach L K, van Duc L, et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol Lett*, 2010, 197: 169–174
- 56 Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 329–347
- 57 Wilson K D, de Jong S D, Tam Y K. Lipid-based delivery of CpG oligonucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 233–242
- 58 Wei M, Chen N, Li J, et al. Polyvalent immunostimulatory nanoagents with self-assembled CpG oligonucleotide-conjugated gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 1202–1206
- 59 Li J, Pei H, Zhu B, et al. Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *ACS Nano*, 2011, 5: 8783–8789
- 60 Kandimalla E R, Bhagat L, Yu D, et al. Conjugation of ligands at the 5'-end of CpG DNA affects immunostimulatory activity. *Bioconjug Chem*, 2002, 13: 966–974
- 61 Yu D, Zhao Q, Kandimalla E R, et al. Accessible 5'-end of CpG-containing phosphorothioate oligodeoxynucleotides is essential for immunostimulatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10: 2585–2588
- 62 Rattanakit S, Nishikawa M, Funabashi H, et al. The assembly of a short linear natural cytosine-phosphate-guanine DNA into dendritic structures and its effect on immunostimulatory activity. *Biomaterials*, 2009, 30: 5701–5706
- 63 Meng W J, Yamazaki T, Nishida Y, et al. Nuclease-resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human Toll-like receptor 9 agonists. *Bmc Biotechnol*, 2011, 11: 88
- 64 刘颖, 陈春英. 纳米材料的安全性研究及其评价. *科学通报*, 2011, 56: 119–125
- 65 Li W J, Szoka F C. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res*, 2007, 24: 438–449
- 66 Yoshizawa T, Hattori Y, Hakoshima M, et al. Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70: 718–725
- 67 Gary D J, Puri N, Won Y Y. Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release*, 2007, 121: 64–73
- 68 Pridgen E M, Langer R, Farokhzad O C. Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy. *Nanomed*, 2007, 2: 669–680
- 69 Patel P C, Giljohann D A, Seferos D S, et al. Peptide antisense nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 17222–17226
- 70 Giljohann D A, Seferos D S, Prigodich A E, et al. Gene regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2072–2073
- 71 Slowing I I, Vivero-Escoto J L, Wu C W, et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 1278–1288
- 72 Li Y L, Duan X, Jing L H, et al. Quantum dot-antisense oligonucleotide conjugates for multifunctional gene transfection, mRNA regulation, and tracking of biological processes. *Biomaterials*, 2011, 32: 1923–1931
- 73 Medarova Z, Pham W, Farrar C, et al. *In vivo* imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nat Med*, 2007, 13: 372–377
- 74 Dobson J. Gene therapy progress and prospects: Magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Ther*, 2006, 13: 283–287
- 75 Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9: 674–679
- 76 Schuller V J, Heidegger S, Sandholzer N, et al. Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA origami structures. *ACS Nano*, 2011, 5: 9696–9702
- 77 Lee H, Lytton-Jean A K R, Chen Y, et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 389–393
- 78 Allen T M, Cullis P R. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science*, 2004, 303: 1818–1822
- 79 Wagner V, Dullaart A, Bock A K, et al. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1211–1217

- 80 Babiuk S, Baca-Estrada M E, Middleton D M, et al. Biphasic lipid vesicles (Biphax) enhance the adjuvanticity of CpG oligonucleotides following systemic and mucosal administration. *Curr Drug Deliv*, 2004, 1: 9–15
- 81 Singh M, Ott G, Kazzaz J, et al. Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory CpG DNA. *Pharm Res*, 2001, 18: 1476–1479
- 82 Diwan M, Elamanchili P, Cao M, et al. Dose sparing of CpG oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery. *Curr Drug Deliv*, 2004, 1: 405–412
- 83 Diwan M, Tafaghodi M, Samuel J. Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. *J Control Release*, 2002, 85: 247–262
- 84 Kim H, Akagi T, Akashi M. Preparation of CpG ODN-encapsulated anionic poly(amino acid) nanoparticles for gene delivery. *Chem Lett*, 2010, 39: 278–279
- 85 Zwioerek K, Bourquin C, Battiany J, et al. Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm Res*, 2008, 25: 551–562
- 86 Lv H T, Zhang S B, Wang B, et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 2006, 114: 100–109
- 87 Farokhzad O C, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 2009, 3: 16–20
- 88 许利耕, 陈春英. 纳米材料作为重大疾病疫苗载体或佐剂的研究进展. *科学通报*, 2012, 57: 2341–2353
- 89 Lam C W, James J T, McCluskey R, et al. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol*, 2006, 36: 189–217
- 90 Dyke C A, Tour J M. Overcoming the insolubility of carbon nanotubes through high degrees of sidewall functionalization. *Chem-Eur J*, 2004, 10: 813–817
- 91 Firme C P, Bandaru P R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomed-Nanotechnol*, 2010, 6: 245–256
- 92 Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, et al. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and subcutaneous tissue of rats *in vivo*. *Mol Biosyst*, 2005, 1: 176–182
- 93 Lacerda L, Soundararajan A, Singh R, et al. Dynamic Imaging of functionalized multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion. *Adv Mater*, 2008, 20: 225–230
- 94 Lu Q, Moore J M, Huang G, et al. RNA polymer translocation with single-walled carbon nanotubes. *Nano Lett*, 2004, 4: 2473–2477
- 95 Liu Y, Wu D C, Zhang W D, et al. Polyethylenimine-grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4782–4785
- 96 Jia N Q, Lian Q, Shen H B, et al. Intracellular delivery of quantum dots tagged antisense oligodeoxynucleotides by functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Nano Lett*, 2007, 7: 2976–2980
- 97 Podesta J E, Al-Jamal K T, Herrero M A, et al. Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic siRNA silencing in a human lung xenograft model. *Small*, 2009, 5: 1176–1185
- 98 Bianco A, Hoebcke J, Godefroy S, et al. Cationic carbon nanotubes bind to CpG oligodeoxynucleotides and enhance their immunostimulatory properties. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 58–59
- 99 Lin Y S, Haynes C L. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 4834–4842
- 100 He Q J, Zhang Z W, Gao F, et al. *In vivo* biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: Effects of particle size and PEGylation. *Small*, 2011, 7: 271–280
- 101 Radu D R, Lai C Y, Jeftinija K, et al. A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 13216–13217
- 102 Torney F, Trewyn B G, Lin V S Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 295–300
- 103 Zhu Y F, Meng W J, Li X L, et al. Design of mesoporous silica/cytosine-phosphodiester-guanine oligodeoxynucleotide complexes to enhance delivery efficiency. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 447–452
- 104 Wang B, Chen N, Wei Y, et al. Akt signaling-associated metabolic effects of dietary gold nanoparticles in *Drosophila*. *Sci Rep*, 2012, 2: 563
- 105 Chen P, Pan D, Fan C H, et al. Gold nanoparticles for high-throughput genotyping of long-range haplotypes. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 639–644
- 106 Zheng X X, Liu Q, Jing C, et al. Catalytic gold nanoparticles for nanoplasmonic detection of DNA hybridization. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 11994–11998

- 107 Li D, Song S P, Fan C H. Target-responsive structural switching for nucleic acid-based sensors. *Accounts Chem Res*, 2010, 43: 631–641
- 108 Song S P, Qin Y, He Y, et al. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 4234–4243
- 109 Song S P, Liang Z Q, Zhang J, et al. Gold-nanoparticle-based multicolor nanobeacons for sequence-specific DNA analysis. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 8670–8674
- 110 Zhang J, Wang L H, Pan D, et al. Visual cocaine detection with gold nanoparticles and rationally engineered aptamer structures. *Small*, 2008, 4: 1196–1200
- 111 Li J, Song S P, Liu X F, et al. Enzyme-based multi-component optical nanoprobe for sequence-specific detection of DNA hybridization. *Adv Mater*, 2008, 20: 497–500
- 112 Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 1997, 277: 1078–1081
- 113 Storhoff J J, Lazarides A A, Mucic R C, et al. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 4640–4650
- 114 Seferos D S, Prigodich A E, Giljohann D A, et al. Polyvalent DNA nanoparticle conjugates stabilize nucleic acids. *Nano Lett*, 2009, 9: 308–311
- 115 Giljohann D A, Seferos D S, Daniel W L, et al. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3280–3294
- 116 Ghosh P, Han G, De M, et al. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 1307–1315
- 117 Rosi N L, Giljohann D A, Thaxton C S, et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*, 2006, 312: 1027–1030
- 118 de Jong W H, Hagens W I, Krystek P, et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 2008, 29: 1912–1919
- 119 Zhang X D, Wu H Y, Wu D, et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles *in vivo* by different administration routes. *Int J Nanomed*, 2010, 5: 771–781
- 120 Rothmund P W K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, 440: 297–302
- 121 Han D, Pal S, Nangreave J, et al. DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space. *Science*, 2011, 332: 342–346
- 122 Lin C, Liu Y, Rinker S, et al. DNA tile based self-assembly: Building complex nanoarchitectures. *Chem Phys Chem*, 2006, 7: 1641–1647
- 123 Seeman N C. Nucleic-acid junctions and lattices. *J Theor Biol*, 1982, 99: 237–247
- 124 Seeman N C. An overview of structural DNA nanotechnology. *Mol Biotechnol*, 2007, 37: 246–257
- 125 Lin C X, Katilius E, Liu Y, et al. Self-assembled signaling aptamer DNA arrays for protein detection. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 5296–5301
- 126 Zhang Z, Wang Y, Fan C H, et al. Asymmetric DNA origami for spatially addressable and index-free solution-phase DNA chips. *Adv Mater*, 2010, 22: 2672–2675
- 127 Zhang Z, Zeng D D, Ma H W, et al. A DNA-origami chip platform for label-free SNP genotyping using toehold-mediated strand displacement. *Small*, 2010, 6: 1854–1858
- 128 Qian L L, Winfree E. Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades. *Science*, 2011, 332: 1196–1201
- 129 Mao C D, LaBean T H, Reif J H, et al. Logical computation using algorithmic self-assembly of DNA triple-crossover molecules. *Nature*, 2000, 407: 493–496
- 130 Omabegho T, Sha R, Seeman N C. A bipedal DNA brownian motor with coordinated legs. *Science*, 2009, 324: 67–71
- 131 Lund K, Manzo A J, Dabby N, et al. Molecular robots guided by prescriptive landscapes. *Nature*, 2010, 465: 206–210
- 132 Gu H Z, Chao J, Xiao S J, et al. A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line. *Nature*, 2010, 465: 202–205
- 133 Walsh A S, Yin H, Erben C M, et al. DNA cage delivery to mammalian cells. *ACS Nano*, 2011, 5: 5427–5432
- 134 Nishikawa M, Matono M, Rattanakit S, et al. Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation. *Immunology*, 2008, 124: 247–255
- 135 Mohri K, Nishikawa M, Takahashi N, et al. Design and development of nanosized DNA assemblies in polypod-like structures as efficient vehicles for immunostimulatory CpG motifs to immune cells. *ACS Nano*, 2012, 6: 5931–5940
- 136 Goodman R P, Berry R M, Turberfield A J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron. *Chem Commun*, 2004: 1372–1373
- 137 Goodman R P, Schaap I A, Tardin C F, et al. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science*, 2005, 310: 1661–1665
- 138 Keum J W, Bermudez H. Enhanced resistance of DNA nanostructures to enzymatic digestion. *Chem Commun*, 2009: 7036–7038
- 139 Pei H, Lu N, Wen Y L, et al. A DNA nanostructure-based biomolecular probe carrier platform for electrochemical biosensing. *Adv Mater*, 2010, 22: 4754–4758
- 140 Seeman N C. Nanomaterials based on DNA. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 65–87

- 141 Nangreave J, Han D, Liu Y, et al. DNA origami: A history and current perspective. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14: 608–615
- 142 Qian L L, Wang Y, Zhang Z, et al. Analogic China map constructed by DNA. *Chin Sci Bull*, 2006, 51: 2973–2976
- 143 Douglas S M, Dietz H, Liedl T, et al. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, 2009, 459: 414–418
- 144 Andersen E S, Dong M, Nielsen M M, et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 2009, 459: 73–76
- 145 Ke Y, Sharma J, Liu M, et al. Scaffolded DNA origami of a DNA tetrahedron molecular container. *Nano Lett*, 2009, 9: 2445–2447
- 146 Sudimack J, Lee R J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 41: 147–162
- 147 Chen X Y, Plasencia C, Hou Y P, et al. Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J Med Chem*, 2005, 48: 5874
- 148 Bagalkot V, Farokhzad O C, Langer R, et al. An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 8149–8152
- 149 Alley S C, Okeley N M, Senter P D. Antibody-drug conjugates: Targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14: 529–537
- 150 Lee H, Lytton-Jean A K R, Chen Y, et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery. *Nat Nano*, 2012, 7: 389–393
- 151 Fu J L, Yan H. Controlled drug release by a nanorobot. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 407–408
- 152 Douglas S M, Bachelet I, Church G M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, 2012, 335: 831–834

CpG ODN delivery systems based on nanomaterials

WEI Min, LI Jiang, CHEN Nan, HUANG Qing & FAN ChunHai

Laboratory of Physical Biology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Artificially synthesized CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs) can imitate bacterial DNA and effectively stimulate the mammalian immune system in response to signals resulting from hazardous invasion. For this reason, CpG ODNs represent promising materials with a range of applications in the treatment of different infections, allergies and cancers. Unfortunately, however, unmodified CpG ODNs alone can be readily degraded by enzymes, resulting in a reduced level of uptake into cells. Repeated high-dose drug administration is therefore required in these treatments, which largely limits their application. In recent years, significant progress in nanomaterial technology has provided a range of new opportunities for the development of effective delivery systems for nucleotide drugs. Based on reports from the literature, a variety of different nanomaterial-based CpG delivery systems have been developed that show a range of advantages, such as high levels of activity, low toxicity and good biocompatibility, making them excellent candidates for use in therapeutic reagents in immune-related diseases. Herein, we provide an introduction to the background and development history of CpG ODN drugs, including their mechanisms of action and the requirements for successful delivery. Particular emphasis has been given to newly developed CpG delivery systems based on different nanomaterials, with a summary of their respective principles and features. Furthermore, we have provided a sketch of the prospects and future trends expected of these materials.

CpG, nanocarrier, drug delivery, DNA nanostructure

doi: 10.1360/972012-1299