

mRNA疫苗纳米递送系统研究进展及监管考量

刘朋, 丁力承, 朱娟* (上海药品审评核查中心, 上海 201203)

摘要 **目的:** 汇总分析国内外信使核糖核酸 (mRNA) 疫苗纳米递送系统的研究进展及关键技术, 为 mRNA 疫苗产品开发、质量控制及上市后监管提供参考。**方法:** 通过文献调研, 对已上市产品/临床试验阶段产品进行分析, 并参考国内外指导原则, 梳理目前研究较多的 mRNA 疫苗纳米递送系统的特点及质量控制要点。**结果与结论:** 对纳米递送平台, 包括聚合物运载技术、脂质运载技术、脂质纳米粒技术、脂质-聚合物复合物技术等方面进行详细论述。各递送系统通过巧妙的设计, 优化提高了细胞转染率及机体免疫应答, 使 mRNA 疫苗在临床预防/治疗方面的作用充分发挥。同时, 纳米递送系统的作用机制、安全性、有效性及质量可控性等方面仍需进一步研究明确, 更好地满足人民群众临床用药需求。

关键词: 信使核糖核酸; 递送系统; 脂质纳米粒子; 监管考量

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)01-0032-09

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.01.005

A Review on Nano-Delivery System for mRNA Vaccine and its Regulatory Consideration

Liu Peng, Ding Licheng, Zhu Juan* (Shanghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Shanghai 201203, China)

Abstract **Objective:** The research process and the critical technique of the nano-delivery system of mRNA vaccine at home and abroad were summarized and analyzed to provide references for development, quality control and post marketing supervision of mRNA vaccine products. **Methods:** Based on the literature research, the products on the market or in the clinical trial stage were analyzed, the characteristics and quality control points of nano-delivery system of mRNA vaccine that is currently studied were summarized by referring to the guiding principles at home and abroad. **Results and Conclusion:** The nano-delivery platforms, including polyplexes (PPs), lipoplexes (PLX), lipid nanoparticles (LNP) and lipopolyplexes (LPP), etc., were discussed in detail. By the means of ingenious design, the delivery system improves the rate of cell transfection and the immune response of the body, which makes mRNA vaccine play a full function in clinical prevention and treatment. Meanwhile, the mechanism of action, the safety, effectiveness and quality control of the nano-delivery system still need to be further studied to better meet the clinical drug needs of the public.

Keywords: mRNA; delivery system; lipid nanoparticles; regulatory consideration

自2019年末以来,严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)即新型冠状病毒迅速传播,并对全球公众健康构成了严重威胁^[1]。疫苗是预防传染病,保护公众健康的重要手段。在多种疫苗技术平台中,例如病毒灭活或减毒疫苗、基因工程重组疫苗、病毒载体类疫苗和核酸类疫苗等,信使核糖核酸(Messenger Ribonucleic Acid, mRNA)疫苗因其独特的优势被美国食品药品监督管理局(US Food and Drug Administration, FDA)及欧盟药品管理局(European Medicines Agency, EMA)紧急批准上市使用。

mRNA疫苗是将外源目的基因序列通过转录、合成等工艺制备的mRNA通过特定的递送系统导入机体细胞并表达目的蛋白,诱导机体免疫应答,以达到疾病预防或治疗的一种核酸制剂^[2]。与其他疫苗技术相比,mRNA疫苗具有安全性高、瞬时表达(mRNA转染细胞1小时内便开始翻译蛋白,翻译蛋白的峰值出现在5~7小时后^[3])、体液免疫和细胞免疫双重机制、生产工艺相对简单、稳定且成本低廉等特点,在应对大规模、新出现的流行病方面具有突出的优势。

考虑到mRNA疫苗这项新技术在新冠疫情中发挥的重要作用,并在未来存在更多应用的可能性,例如通过简单快速的修饰即可应对SARS-CoV-2的变异、预防传染疾病、基因修复(如镰状细胞病、HIV等)、肿瘤免疫治疗、蛋白替代或补给治疗等,《麻省理工科技评论》(MIT Technology Review)于2021年2月将mRNA疫苗技术列为当年“全球十大突破性技术”名单榜首^[4]。

体外合成的mRNA进入细胞内发挥生物学活性这一过程的实现面临许多挑战。细胞外大量的核糖核酸酶会将mRNA快速降解。mRNA分子量大($10^4 \sim 10^6$ Da)且在生理pH条件下带负电荷,难以跨过同为负电荷的细胞膜^[5]。虽然细胞可以通过内吞的方式捕获mRNA,但是细胞摄取率及细胞质转染率非常低(10000个mRNA分子中进入细胞质的分子数量小于1个)^[6],因此,mRNA递送是其向临床应用转化的重要技术壁垒之一。本文重点针对目前研究较多的mRNA疫苗纳米递送系统进行总结,并基于FDA、EMA及我国现有的纳米药物相关技术指南^[7-10],结合mRNA疫苗产品的特点,针对mRNA

递送系统,即mRNA纳米制剂部分的风险点及监管考虑进行阐述。

1 mRNA疫苗纳米递送系统

mRNA疫苗纳米递送系统是将体外转录合成的裸mRNA(Naked mRNA)转运至靶细胞内的具有纳米尺寸的载体($1 \sim 100$ nm或 $<1 \mu\text{m}$)。理想的核酸递送系统应具有高转染率、低细胞毒性和目标细胞特异性等^[11]。通过对递送系统巧妙的设计,mRNA可以克服细胞内外多重屏障进入细胞质,达到提高细胞转染率、目标蛋白表达及机体免疫应答的目的。纳米递送系统可以将mRNA包裹于载体内部,避免其与外部环境接触而被降解;通过对载体的表面修饰,可降低载体与血浆蛋白的非特异性结合、降低巨噬细胞的清除、增强与靶细胞的相互作用并使mRNA跨越细胞膜屏障;及时使mRNA从内涵体或溶酶体中逃逸至细胞质,避免mRNA被溶酶体降解等。目前,研究较多的mRNA疫苗纳米递送系统包括聚合物运载技术、脂质运载技术、脂质纳米粒技术、脂质-聚合物复合载体技术及其他递送系统。

1.1 聚合物运载技术

聚合物运载技术(Polyplexes, PPs)是以阳离子聚合物为载体,与核酸[例如DNA质粒、mRNA、自扩增型mRNA(self-amplifying RNA, saRNA)、小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)、向导RNA(guide RNA, gRNA)等]通过静电作用自组装形成的聚电解质络合物。阳离子聚合物可以高密度压缩大分子核酸成为小粒子,并将其包裹于内部形成聚合物胶束或纳米粒子,以提高核酸稳定性及细胞递送效率。

常见的高分子聚合物载体包括:聚赖氨酸[poly(lysine), PLL]或其他聚氨基酸^[12-13]、聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)^[14]、聚酰胺-胺(Polyamidoamine, PAMAM)树状物^[15]、壳聚糖^[16]和寡聚肽^[17]等。PPs的优点在于无免疫原性,可与核酸自组装形成络合物,通过对聚合物结构的修饰(如增加亲水或疏水基团)降低分子本身毒性或增强与细胞膜的作用等^[18]。相比常用的PLL来说,PEI具有更高的转染率^[19]。早在1995年,Boussif等^[20]使用PEI作为细胞转染试剂将DNA转至新生小鼠的脑部。由于PEI分子结构中含有伯胺基、仲胺基和叔胺基,在内涵体的酸性环境中,

PEI的质子海绵效应(Proton Sponge Effect)导致内涵体溶胀破裂进而释放核酸^[19]。PEI的转染效率、细胞毒性与其结构和分子量相关,线型PEI相比于树枝状结构来说具有更高的转染率和更低的毒性,高分子量的PEI具有高转染率,但是细胞毒性也较强^[21-22]。另外,非生物降解的PEI会在人体组织,如肺、肝脏和脾脏等滞留无法排除,对人体产生毒副作用^[23]。

1.2 脂质运载技术

脂质运载技术(Lipoplexes, LPX)是由阳离子脂质材料与核酸通过静电作用形成的复合物^[24]。1989年,LPX被用于动物基因转染试验^[25];1993年,LPX被用于基因治疗黑色素瘤的临床试验^[26]。LPX的形成需要两步:第一步,脂质体与核酸通过静电作用结合,脂质体结构不变,此步骤反应快速、放热且可逆;第二步,脂质体融合,重排,此步骤反应慢、吸热且不可逆^[27]。LPX与PPs非常类似,均对人体无免疫原性,可以有效地保护核酸不被外界环境降解,但是其运载核酸进入细胞质的机制不同。带正电荷的LPX与细胞表面带负电荷的蛋白多糖非特异性结合并被细胞内吞形成内涵体,LPX中的阳离子脂质与内涵体膜中的阴离子脂质(如磷脂酰乙醇胺/PE、磷脂酰丝氨酸/PS)相互作用并融合。LPX中阳离子脂质的正电荷被中和后,与核酸的结合被削弱,核酸被释放至细胞质中发挥生物学活性^[23,28]。

LPX通常至少由2种脂质组成:阳离子脂质和中性脂质(又称辅助脂质)^[24]。阳离子脂质是由带正电的极性头部、疏水的烷基双链和连接子3个部分构成的两亲性分子,极性头部一般由不同取代程度的氨基或其他阳性基团(如脒基、胍基或吡啶)提供正电荷。常见的阳离子脂质包括:(2,3-二油酰基-丙基)三甲基氯化铵(DOTAP)、1,2-双十八烯氧基-3-甲基铵丙烷(DOTMA)、DC-胆固醇(阳离子修饰的胆固醇)等;其中,DOTAP化学不稳定但可生物降解,DOTMA化学稳定但非生物降解。常见的中性脂质包括:二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)和胆固醇。DOPE在LPX中以反六角相结构(HII)存在,这种结构利于LPX与内涵体的融合,从而使内涵体去稳定化,为核酸逃逸创造条件^[29]。

Grabbe等与BioNTech公司共同发表了利用LPX

技术制备RNA疫苗治疗黑色素瘤的药学研究及临床试验I期数据^[30],其产品包装形式为组合A(4种编码不同肿瘤抗原的RNA各1瓶)+组合B(脂质体+稀释液),病人使用时将脂质体溶液加入至稀释后的RNA溶液中混合,4种RNA药品间隔一定周期依次静脉给药。药学研究数据表明,脂质体中阳离子脂质与RNA的电荷比(N/P)是决定LPX粒径大小、表面电位及组织分布等的关键参数。N/P在1/1至3/1时,粒径近1 μm 或1 μm 以上,其他过量RNA(N/P<1/1)或过量阳离子脂质(N/P>3/1)产生的粒子粒径均为400 nm以下且LPX粒子显示非常稳定。正电荷的LPX优先靶向肺部,而带负电荷的LPX主要在脾脏表达。较之于小粒径LPX(200 nm),大粒径的LPX(400 nm)RNA表达率更高。动物试验数据^[30]显示,LPX-RNA疫苗有效地抑制了小鼠黑色素瘤的生长;临床数据^[30]显示,LPX-RNA疫苗在人体内产生了显著的抗原特异性免疫反应且未对人体造成严重的不良反应。

1.3 脂质纳米粒技术

PPs、LPX分别由1种或2种不同的聚合物或脂质材料构成,形成的纳米粒子比较“柔软”,所以粒子稳定性及生产批次间的重现性较差。脂质纳米粒技术(Lipid Nanoparticles, LNP)是由2种或2种以上(通常为4种)脂质以不同比例制备的纳米级(即<1 μm)脂质系统^[31],其结构不同于脂质体(内部空腔为水相),而更趋向于是一个实心的纳米粒子(Solid Nanoparticles)^[32]。依据不同的脂质组分,LNP可能形成不同的结构,如多个双分子层洋葱状结构、内部包含纳米核的结构、均匀的核壳结构或其他自组装形态等^[33-34],目前对LNP内部结构尚不完全清楚。

1.3.1 LNP技术及相关产品

LNP技术是目前已上市或处于临床试验阶段mRNA疫苗应用最广泛的递送技术平台(见表1)^[35-36],其中Spikevax[®](Moderna公司)和Comirnaty[®](BioNTech/Pfizer公司)已获批上市。其作用机理为肌肉注射LNP后产生短暂的局部炎症,中性粒细胞和抗原递呈细胞(Antigen Presenting Cells, APCs)被招募到达炎症部位,APCs内吞LNP后mRNA在宿主细胞胞浆中表达蛋白,随后APCs迁移到淋巴启动T细胞反应^[32]。

赛诺菲的产品MRT5500 mRNA是利用MRTTM

技术平台制备得到的LNP, 该技术平台包含两部分内容: 使用未修饰的碱基及进一步序列优化合成表达目标蛋白的mRNA; 通过设计优化mRNA递送载体的大小、表面电位及脂质组成, 将合成的mRNA装配入递送系统^[37]。Arcturus的产品LUNAR-COV19是利用STARRTM技术平台将saRNA与LUNAR[®]脂质介导的核酸传递技术平台

相结合制备得到的LNP, LUNAR[®]含有250多种专利脂质材料^[38]。除此之外, FDA于2018年8月批准的首款siRNA药物Onpattro也是利用LNP技术, 递送siRNA阻止有缺陷的转甲状腺素产生, 从而减少组织内淀粉样蛋白的形成和沉积, 缓解遗传性转甲状腺素蛋白 (Hereditary Transthyretin, hATTR) 淀粉样变性的症状。

表 1 利用 LNP 技术已上市或处于临床试验阶段的 RNA 药品或新冠疫苗

产品代号 / 商品名	持有人	核酸类型	申报进度	适应症
ALN-TTR02/Onpattro	Alnylam	siRNA	获批上市	hATTR 淀粉样变性
mRNA-1273/Spikevax	Moderna	mRNA	获批上市	SARS-CoV-2 预防
BNT162b2/Comirnaty	BioNTech/Pfizer	mRNA	获批上市	SARS-CoV-2 预防
ARCoV	艾博生物	mRNA	III 期	SARS-CoV-2 预防
CVnCoV	CureVac	mRNA	I 期	SARS-CoV-2 预防
ARCT-021/ LUNAR-COV19	Arcturus	saRNA	II 期	SARS-CoV-2 预防
LNP-nCoVsaRNA	伦敦帝国理工学院	saRNA	I 期	SARS-CoV-2 预防
DS-5670	第一三共 (Daiichi Sankyo) / 东京大学	mRNA	I / II 期	SARS-CoV-2 预防
MRT5500 mRNA	赛诺菲 / Translate Bio	mRNA	临床前	SARS-CoV-2 预防

1.3.2 LNP脂质材料

LNP载体通常包含4种组分, 分别为阳离子或可离子化的脂质、聚乙二醇 (Polyethylene Glycol, PEG) 修饰的脂质 (PEG-脂质)、中性脂质和胆固醇。

阳离子脂质分子形成的正电荷纳米粒子对细胞具有一定的毒性, 且在体内循环时易被单核吞噬细胞系统清除。可离子化氨基脂质分子 ($pK_a < 7$) 很好地解决了阳离子脂质细胞毒性这一缺点, 已上市的3个核酸产品 (Comirnaty[®]、Spikevax[®]、Onpattro[®]) 使用的可离子化脂质辅料见图1 (a、c、e)。可离子化氨基脂质分子在酸性条件下制备LNP装载核酸, 在人体pH中性条件下 (pH 7.4) 呈现中性或微弱的正电荷, 在内涵体 (pH 5.5) 中显示正电荷, 破坏内涵体膜的完整性, 使核酸从内涵体逃逸至细胞质进行翻译。这一设计在保证核酸包封率的前提下, 使得LNP体内循环时间延长、细胞毒性降低、转染率提高^[39]。Jayaraman等^[40]通过设计不同结构的极性头部获得不

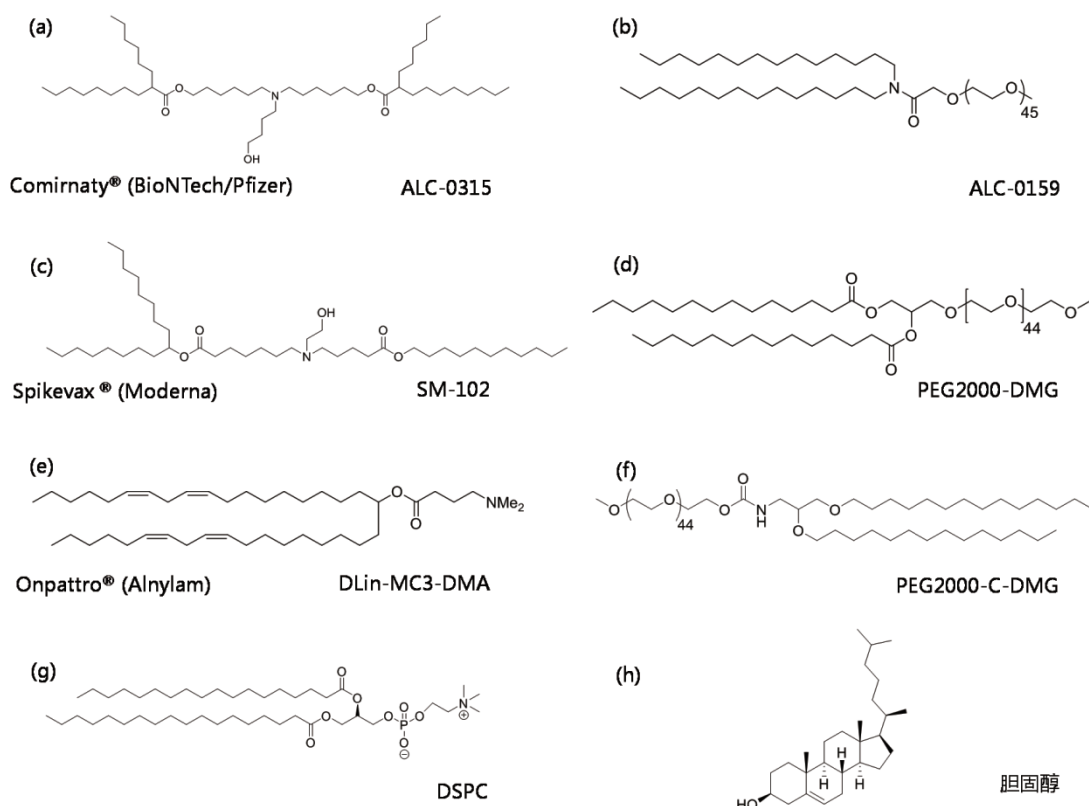
同电离常数 (pK_a) 的可离子化的脂质, 考察 pK_a 与siRNAs在体内诱导肝细胞基因沉默活性的相互关系; 试验结果发现, 在设计56个分子中 (pK_a 范围4.17~8.12), DLin-MC3-DMA (见图1 e) ($pK_a=6.44$) 的siRNAs基因沉默活性最高。另外, ALC-0315与SM-102的 pK_a 分别为6.09和6.68。

PEG-脂质, 如ALC-0159、PEG2000-DMG和PEG2000-C-DMG (见图1b、d、f) 是一种功能性脂质, 其亲水的PEG链 (已上市3个产品中的PEG链分子量均为2000) 在LNP表面形成水化层, PEG链的空间位阻作用降低了LNP粒子间的相互作用, 使产品在制备和储存过程中保持粒径均一的状态。另外, PEG层可以降低LNP与血浆蛋白的相互作用, 使静脉注射的LNP不被单核吞噬系统识别, 在体内长循环^[41]。然而, PEG的保护作用会影响LNP的细胞内吞及核酸在细胞质的释放, 进而降低siRNA的基因沉默活性或mRNA的蛋白翻译等^[42]。已上市的3个产品均使用含有较短烷基疏水链 (如14碳) 的PEG-脂质, 它可以快速地从LNP表面解

离,降低PEG对细胞内吞及细胞质释放的影响。Mui等^[43]使用含有不同长度脂肪酸(C14、C16和C18)的PEG-脂质制备siRNA LNP,PEG-脂质从LNP的解离速率分别为>45%/小时、1.3%/小时和0.2%/小时,PEG-脂质的解离速率随着碳链长度增加呈现指数下降趋势。另外,在确保LNP物理稳定的前提下降低PEG-脂质的使用量也可以提高核酸传递的成功率^[43]。

中性脂质和胆固醇是构成LNP的基本组成部

分,目前已上市及部分处于临床试验阶段的mRNA LNP产品均使用二硬酯酰磷脂酰胆碱(DSPC)作为辅助脂质,它也是脂质体产品中常见的辅料之一。因其硬脂酸为饱和脂肪酸,DSPC具有较高的相变温度(55℃),在室温及人体温度条件下可以保持LNP脂膜的刚性和稳定性,提高与细胞的融合性。胆固醇位于脂膜中,可以促进LNP的形成、增加脂膜的刚性和稳定性^[44]。



a、b. 产品 Comirnaty® (BioNTech/Pfizer) 所使用的可离子化脂质 ALC-0315、PEG-脂质 ALC-0159;
c、d. Spikevax® (Moderna) 所使用的可离子化脂质 SM-102、PEG-脂质 PEG-DMG;
e、f. Onpattro® (Alnylam) 所使用的可离子化脂质 DLin-MC3-DMA、PEG-脂质 PEG-C-DMG;
以上 3 个品种所用的中性脂质均为 DSPC (g) 和胆固醇 (h)。

图 1 利用 LNP 技术获批上市的 RNA 产品脂质辅料结构图

1.3.3 LNP生产工艺

LNP生产工艺一般包括核酸物质解冻/稀释、LNP形成、缓冲液交换、浓缩和过滤、浓度调整、添加冷冻保护剂、无菌过滤、无菌灌装、目视检查、标签、冷冻和储存等工序^[32]。LNP的形成主要采用微流控技术,即两相溶液,包括核酸水溶液(一般情况下为低pH的醋酸缓冲液)、脂质有机

溶剂溶液(一般为乙醇或其他有机溶剂)分别在微通道相遇后,经过微型混合器自组装成粒径100 nm左右且粒径分布均一、包封率近100%、重现性高的纳米粒子^[31]。

1.4 脂质-聚合物复合载体技术

脂质-聚合物复合载体技术(Lipopolyplexes, LPP)是一种以聚合物包载核酸为内核、脂质为外

壳的双层结构纳米粒子^[45]。阳离子聚合物用于结合核酸并在细胞质内释放核酸，外部的脂质外壳使LPP具有更好的稳定性、增强细胞吞噬、降低细胞毒性等作用。LPP通过抗原呈递激活T细胞以达到理想的免疫治疗效果。我国斯微科技有限公司注册申报处于I期临床的SARS-CoV-2疫苗就是采用LPP技术^[46]。

LPP的制备步骤一般包括：1) 制备核酸-阳离子聚合物的复合物(PPs)，文献报道用来制备LPP的阳离子聚合物有鱼精蛋白^[47]、PEI^[48]及聚(β-氨基酯)^[49]等；2) 制备纳米脂质体；3) 将纳米脂质体与PPs溶液混合，或者在脂质膜水化步骤时加入PPs溶液自组装形成LPP。Perche等^[50]首先将RNA或saRNA与树枝状PEI(MW=25K)形成复合物，然后将形成的RNA-PEI复合物(+20 mV)与带负电的脂质体[二油酰磷脂酸(DOPA)、DOPE、甘露糖化的磷脂(PA-PEG3-Man)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)]混合制备形成中性LPP纳米粒子[160~190 nm, 多分散系数(Polydispersity Index, PDI) 0.13~0.15, 表面电位0.5~2.5 mV]。该LPP有效地避免了核糖核酸酶对RNA的降解，在血浆中保持稳定不聚集且细胞毒性低于RNA-PEI复合物。对小鼠静脉注射LPP-RNA 48 h后，脾脏的树突状细胞转染率为7%；对小鼠肌肉注射编码流感抗原的LPP-saRNA后，基因可持续表达并激活T细胞产生抗原特异性免疫应答^[50]。Persano等^[49]用合成的聚(β-氨基酯)(分子量约4KDa)结合表达卵清蛋白抗原(肺转移肿瘤细胞表达的抗原)的mRNA，然后将其包裹于二油酰乙基磷脂酰胆碱(EDOPC)/DOPE/DSPE-PEG脂质壳中，接种肺转移瘤小鼠，实验结果显示肿瘤减小了90%，说明LPP增强了mRNA疫苗抗原呈递能力，激活自身抗肿瘤免疫，介导免疫系统对肿瘤细胞的杀伤和清除。

1.5 其他递送系统

纳米乳剂(Nanoemulsions, NEs)被广泛研究用作小分子药物^[51]和核酸类药物(如siRNA、mRNA、DNA)的递送^[52-54]。NEs主要由3部分构成，包括分散相(疏水的核)、连续相(亲水分散介质)和表面活性剂/稳定剂^[55]；其中，缓冲盐或溶剂等亲水性物质分布在外水相，疏水性物质被包封

于分散相，核酸、佐剂及表面活性剂分布在油相/水相界面处。诺华公司利用阳离子NEs递送saRNA疫苗(9 kb)和自主研发的佐剂MF59，制备得到的saRNA NEs平均粒径129 nm, PDI为0.117^[56]。实验数据证明，低剂量(75 μg)的saRNA NEs可在小鼠等多种动物体内产生免疫反应，且免疫应答与病毒载体相当。(N-乙酰半乳糖胺)-核酸偶联技术(GalNAc)在病毒预防、抗病毒治疗和核苷酸干预治疗等领域也是一项突破性的技术^[57-58]。

2 mRNA疫苗纳米递送系统监管考量

无论是PPs、PLX、纳米乳剂，还是LNP和LPP，载体材料与mRNA自组装形成的纳米粒子结构相对复杂。在产品开发时，制药企业应对纳米粒结构的复杂性、质量属性(如粒径、粒径分布、表面电位、mRNA包封率、各脂质材料的含量等)与体内代谢、转染效率、表达效率及免疫效果的相关性进行充分研究。研究^[59]表明，人体细胞对不同粒径疫苗纳米粒子的摄取具有选择性，树突状细胞容易摄取10~200 nm的粒子，而巨噬细胞倾向于摄取>200 nm的大粒子。

制药企业应充分了解生产过程中对产品质量(如工艺稳定性、批次均一性)、安全性和有效性产生影响的潜在风险，积累生产经验、理解潜在风险，对生产过程建立有效的控制策略至关重要。在研发阶段越早确认产品的关键质量属性，对生产操作及生产过程控制越有利，并应在药品的整个生命周期内不断研究并积累相关数据，持续降低制剂过程中存在的不确定性。分析检验时，样品取样、前处理及分析方法应能准确表征产品的特性，例如：LNP表面带正电荷，若稀释溶液选用不当，LNP样品的表面电位可能被中和导致测定结果不准确；粒径测试结果包括多种报告形式，如强度分布、体积分布和数量分布等，不同报告形式显示的粒径结果不同，所以应明确粒径的报告形式。FDA在关于脂质体产品的技术指南中推荐以体积分布的形式报告粒径^[8]。

辅料是递送系统本身的组成部分，有些辅料如阳离子聚合物或脂质、PEG-脂质均为功能性辅料，它们直接关系到mRNA的包封率、纳米粒子的稳定性及在体内的分布等。对于脂质材料，其脂肪酸的不饱和度、酰基侧链的位置特异性、来源(如天然、合成)、合成及纯化工艺、有关物质等均需

要得到有效的控制,以减小对产品质量及安全性的影响。为避开阳离子或可离子化脂质的专利保护,设计合成的新型辅料应根据其在体内的暴露水平、暴露时间及给药途径,全面评估其安全性。

3 小结与展望

席卷全球的新冠疫情提醒我们,人类在探索疾病预防和疾病治疗的道路上应加快脚步。在过去的30年里,纳米技术(包括脂质体、纳米粒子、聚合物胶束等)在小分子药物疾病治疗领域取得了一定的成果,但从已上市品种的数量来看,纳米技术的优势并没有得到充分的展现。令人可喜的是,纳米技术在免疫治疗、免疫调节等领域发展迅速^[60]。随着mRNA修饰手段及递送系统的不断发展,mRNA疫苗的临床价值将进一步凸显,临床应用领域将进一步扩大。然而,递送系统的作用机理及安全性等方面仍需进一步研究,制药企业应主动积累产品知识和工艺知识,加强上市后药物监测,持续提升产品的安全性、有效性及质量可控性,更好地满足人民群众临床用药安全和需求。

参考文献:

- [1] Madden EA, Diamond MS. Host Cell-Intrinsic Innate Immune Recognition of SARS-CoV-2[J]. *Curr Opin Virol*, 2021 (52) : 30-38.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 新型冠状病毒预防用mRNA疫苗药学研究技术指导原则(试行)[S]. 2021.
- [3] Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, et al. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10 (2) : 364-406.
- [4] MIT Technology Review. Presents 10 Breakthrough Technologies of 2021[EB/OL]. (2021-02-24) [2021-10-15]. <https://www.technologyreview.com/press-releases/mit-technology-review-presents-10-breakthrough-technologies-of-2021/>.
- [5] Li M, Li Y, Li S, et al. The Nano Delivery Systems and Applications of mRNA[J]. *Eur J Med Chem*, 2022 (227) : 113910-113923.
- [6] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based Therapeutics-Developing a New Class of Drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13 (10) : 759-780.
- [7] FDA. Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials - Guidance for Industry[S]. 2017.
- [8] FDA. Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation[S]. 2018.
- [9] EMA. Reflection Paper on the Data Requirements for Intravenous Liposomal Products Developed with Reference to an Innovator Liposomal Product[S]. 2013.
- [10] 国家药品监督管理局药品审评中心. 纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行)[S]. 2021.
- [11] Carvalho M, Sepodes B, Martins AP. Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2017 (4) : 182-199.
- [12] Abbasi S, Uchida S, Toh K, et al. Co-encapsulation of Cas9 mRNA and Guide RNA in Polyplex Micelles Enables Genome Editing in Mouse Brain[J]. *J Control Release*, 2021 (332) : 260-268.
- [13] Chang YH, Lin MW, Chien MC, et al. PolyplexNanomicelle Delivery of Self-amplifying RNA Vaccine[J]. *J Control Release*, 2021 (338) : 694-704.
- [14] Démoulin T, Milona P, Englezou PC, et al. Polyethylenimine-based Polyplex Delivery of Self-replicating RNA Vaccines[J]. *Nanomedicine*, 2016, 12 (3) : 711-722.
- [15] Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, et al. Dendrimer-RNA Nanoparticles Generate Protective Immunity Against Lethal Ebola, H1N1 Influenza, and Toxoplasma Gondii Challenges with a Single Dose[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (29) : E4133-E4142.
- [16] Kumari M, Liu CH, Wu W. Oligochitosan Modified Albumin as Plasmid DNA Delivery Vector: Endocytic Trafficking, Polyplex Fate, in Vivo Compatibility[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020 (142) : 492-502.
- [17] Zheng N, Song Z, Yang J, et al. Manipulating the Membrane Penetration Mechanism of Helical Polypeptides via Aromatic Modification for Efficient Gene Delivery[J]. *Acta Biomater*, 2017 (58) : 146-157.
- [18] Kevin I. Polyplexes for Gene and Nucleic Acid Delivery: Progress and Bottlenecks[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020 (150) : 105358-105369.

- [19] Vuorimaa-Laukkanen E, Lisitsyna ES, Ketola TM, et al. Difference in the Core-Shell Dynamics of Polyethyleneimine and Poly(l-lysine) DNA Polyplexes[J]. Eur J Pharm Sci, 2017 (103) : 122-127.
- [20] Pandey AP, Sawant K. Polyethylenimine: A versatile, Multifunctional Non-Viral Vector for Nucleic Acid Delivery[J]. MaterSciEng C Mater BiolAppl, 2016 (68) : 904-918.
- [21] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size Matters: Molecular Weight Affects the Efficiency of Poly(ethylenimine) as a Gene Delivery Vehicle[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45 (3) : 268-275.
- [22] Wiseman JW, Goddard CA, McLelland D, et al. A Comparison of Linear and Branched Polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE Liposomes for Gene Delivery to Epithelial Cells in Vitro and in Vivo[J]. Gene Ther, 2003, 10 (19) : 1654-1662.
- [23] Shende P, Ture N, Gaud RS, et al. Lipid-and Polymer-based Plexes as Therapeutic Carriers for Bioactive Molecules[J]. IntJ Pharm, 2019 (558) : 250-260.
- [24] Ilarduya CTD, Sun Y, D ü z g ü n e N. Gene Delivery by Lipoplexes and Polyplexes[J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 40 (3) : 159-170.
- [25] Brigham KL, Meyrick B, Christman B, et al. Rapid Communication: in Vivo Transfection of Murine Lungs with a Functioning Prokaryotic Gene Using a Liposome Vehicle[J]. Am J MedSci, 1989, 298 (4) : 278-281.
- [26] Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, et al. Direct Gene Transfer with DNA-Liposome Complexes in Melanoma: Expression, Biologic Activity, and Lack of Toxicity in Humans[J]. ProcNatAcadSci UAS, 1993, 90 (23) : 11307-11311.
- [27] Pector V, Backmann J, Maes D, et al. Biophysical and Structural Properties of DNA Center. DiC(14)-Amidine Complexes—Influence of the DNA/Lipid Ratio[J]. J BiolChem, 2000, 275 (38) : 29533-29538.
- [28] 丁会芹, 崔韶辉, 王冰. 阳离子脂质体运载基因的跨膜机制[J]. 生命科学, 2011, 23 (5) : 497-501.
- [29] ElouahabiA, Ruyschaert JM. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes[J]. MolTher, 2005, 11 (3) : 336-347.
- [30] Grabbe S, Haas H, Diken M, et al. Translating Nanoparticulate-personalized Cancer Vaccines into Clinical Applications: Case Study with RNA-Lipoplexes for the Treatment of Melanoma[J]. Nanomedicine(Lond), 2016, 11 (20) : 2723-2734.
- [31] Pilkington EH, Suys EJA, Trevaskis NL, et al. From Influenza to COVID-19: Lipid Nanoparticle mRNA Vaccines at the Frontiers of Infectious Diseases[J]. ActaBiomater, 2021 (131) : 16-40.
- [32] EMA.Comirnaty[EB/OL]. (2021-05-19) [2021-10-15]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>.
- [33] Eygeris Y, Patel S, Jozic A, et al. Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery[J]. Nano Lett, 2020, 20 (6) : 4543-4549.
- [34] 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 PhysChem B, 2018, 122 (7) : 2073-2081.
- [35] EMA. COVID-19 Vaccines: Research and Development [EB/OL]. (2021-10-25) [2021-12-13]. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-research-development>.
- [36] Suzuki Y, Ishihara H. Difference in the Lipid Nanoparticle Technology Employed in Three Approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 Vaccine) Drugs[J]. Drug Metabolism Pharmacokinetics, 2021 (41) : 100424-100431.
- [37] Translate Bio. Restoring Protein Function[EB/OL] (2021-01-01) [2021-10-15]. <https://translate.bio/scientific-platform/>.
- [38] Arcturus. RNA & mRNA Proprietary Technologies[EB/OL]. (2021) [2021-10-15]. <https://arcturusrx.com/rna-mrna-proprietary-technologies/>.
- [39] Semple SC, Akin A, Chen J, et al. Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28 (2) : 172-176.
- [40] JayaramanM, Ansell SM, Mui BL, et al. Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo[J]. AngewChemInt Ed Engl, 2012, 51

- (34) : 8529–8533.
- [41] Semple SC, Klimuk SK, Harasym TO. Efficient Encapsulation of Antisense Oligonucleotides in Lipid Vesicles Using Ionizable amino Lipids: Formation of Novel Small Multilamellar Vesicle Structures[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1510 (1–2) : 152–166.
- [42] Song LY, Ahkong QF, Rong Q, et al. Characterization of the Inhibitory Effect of PEG–Lipid Conjugates on the Intracellular Delivery of Plasmid and Antisense DNA Mediated by Cationic Lipid Liposomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1558 (1) : 1–13.
- [43] Mui BL, Tam YK, Jayaraman M, et al. Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2 (12) : e139–146.
- [44] Yeagle PL. Modulation of Membrane Function by Cholesterol[J]. *Biochimie*, 1991, 73 (10) : 1303–1310.
- [45] Rezaee M, Oskuee RK, Nassirli H, et al. Progress in the Development of Lipopolyplexes as Efficient Non-viral Gene Delivery Systems[J]. *J Control Release*, 2016 (236) : 1–14.
- [46] 斯微生物. LPP纳米递送平台[EB/OL]. (2021–06–01) [2021–10–15]. <https://www.stemirna.com/about/index.aspx>.
- [47] Koh CG, Zhang X, Liu S, et al. Delivery of Antisense Oligodeoxyribonucleotide Lipopolyplex Nanoparticles Assembled by Microfluidic Hydrodynamic Focusing[J]. *J Control Release*, 2010, 141 (1) : 62–69.
- [48] Pinnapireddy SR, Duse L, Strehlow B, et al. Composite Liposome–PEI/Nucleic Acid Lipopolyplexes for Safe and Efficient Gene Delivery and Gene Knockdown[J]. *Colloids Surf BBiointerfaces*, 2017 (158) : 93–101.
- [49] Persano S, Guevara ML, Li Z, et al. Lipopolyplex Potentiates Anti-tumor Immunity of mRNA-based Vaccination[J]. *Biomaterials*, 2017 (125) : 81–89.
- [50] Perche F, Clemençon R, Schulze K, et al. Neutral Lipopolyplexes for in Vivo Delivery of Conventional and Replicative RNA Vaccine[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019 (17) : 767–775.
- [51] Henostroza MAB, Melo KJC, Yukuyama MN, et al. Cationic Rifampicin Nanoemulsion for the Treatment of Ocular Tuberculosis[J]. *Colloid Surface A*, 2020 (597) : 124755–124765.
- [52] Yadav S, Gandham SK, Panicucci R, et al. Intranasal Brain Delivery of Cationic Nanoemulsion–Encapsulated TNF α siRNA in Prevention of Experimental Neuroinflammation[J]. *Nanomedicine*, 2016, 12 (4) : 987–1002.
- [53] Khachane PV, Jain AS, Dhawan VV, et al. Cationic Nanoemulsions as Potential Carriers for Intracellular Delivery[J]. *Saudi Pharm J*, 2015, 23 (2) : 188–194.
- [54] Franklyne JS, Gopinath PM, Mukherjee A, et al. Nanoemulsions: The Rising Star of Antiviral Therapeutics and Nanodelivery System—Current Status and Prospects[J]. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2021 (54) : 101458–101472.
- [55] Tayeb HH, Felimban R, Almaghrabi S, et al. Nanoemulsions: Formulation, Characterization, Biological Fate, and Potential Role Against COVID-19 and Other Viral Outbreaks[J]. *Colloids Interface Sci Commun*, 2021 (45) : 100533–100551.
- [56] Brito LA, Chan M, Shaw CA, et al. A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-Generation RNA Vaccines[J]. *Mol Ther*, 2014, 22 (12) : 2118–2129.
- [57] Debacker AJ, Voutilainen J, Catley M, et al. Delivery of Oligonucleotides to the Liver with GalNAc: From Research to Registered Therapeutic Drug[J]. *Mol Ther*, 2020, 28 (8) : 1759–1771.
- [58] Thangamani L, Balasubramanian B, Easwaran M, et al. GalNAc–siRNA Conjugates: Prospective Tools on the Frontier of Anti-viral Therapeutics[J]. *Pharmacol Res*, 2021 (173) : 105864–105872.
- [59] Singh P, Bodycomb J, Travers B, et al. Particle Size Analyses of Polydisperse Liposome Formulations with a Novel Multispectral Advanced Nanoparticle Tracking Technology[J]. *Int J Pharm*, 2019 (566) : 680–686.
- [60] Sofias AM, Combes F, Koschmieder S, et al. A Paradigm Shift in Cancer Nanomedicine: From Traditional Tumor Targeting to Leveraging the Immune System[J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26 (6) : 1482–1489.

(收稿日期 2021年10月28日 编辑 郑丽娥)