

· 综述 ·

1,2-二亚油酸-3-二甲基氨基丙烷类阳离子脂质 纳米粒的研究进展

胡 玥¹, 陈 周², 罗晓星², 薛小燕^{2*}(中国人民解放军第四军医大学¹学员一旅十四连;²药学系药理学教研室, 西安 710032)

摘要 阳离子脂质纳米粒具有安全、高效和粒径可控的优点, 现已成为核酸药物体内外递送载体的研究热点。该纳米粒的重要组分为阳离子脂质, 其中以1,2-二亚油酸-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)及其衍生物为代表的新型材料, 因递药效能高, 生物相容性好而受到广泛关注。本文介绍了此类阳离子脂质的结构及特点, 并对DLinDMA纳米粒的构造、药物递送机制和临床应用进行了综述。

关键词 DLinDMA; 基因载体; 脂质纳米粒; 进展

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)01-0112-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160117

引用本文 胡玥, 陈周, 罗晓星, 等. 1,2-二亚油酸-3-二甲基氨基丙烷类阳离子脂质纳米粒的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(1): 112–117.

Cite this article as: HU Yue, CHEN Zhou, LUO Xiaoxing, et al. Research progress of 1,2-dilinoleyloxy-3-dimethylaminopropane-based cationic lipid nanoparticle[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(1): 112–117.

Research progress of 1,2-dilinoleyloxy-3-dimethylaminopropane-based cationic lipid nanoparticle

HU Yue¹, CHEN Zhou², LUO Xiaoxing², XUE Xiaoyan^{2*}

¹ 14th Company, 1st Student Brigade; ² Department of Pharmacology, School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract Cationic lipid nanoparticles possessing favorable biocompatibility and controllable particle size have attracted increasing attention in the field of non-viral vectors for delivering nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. 1,2-Dilinoleyloxy-3-dimethylaminopropane(DLinDMA) and its derivatives, one kind of most important cationic lipid materials, have been widely studied as the main composition of cationic lipid nanoparticles. This paper summarizes the structure, characteristics and clinical application of DLinDMA nanoparticles.

Key words DLinDMA; gene vector; lipid nanoparticles; progress

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81402975); and the Basic Research Project of Natural Science in Shaanxi Province(No. 2014JM4105)

随着对基因技术认识的不断深化, 基因疗法成为新的研究热点和重要突破口。利用质粒DNA、siRNA以及反义寡核苷酸等, 对致病基因进行替换、增补、敲除, 已在治疗肿瘤、高胆固醇血症、肾小

管淀粉样变性等顽疾上取得了令人瞩目的成就。然而, 核酸作为一种阴离子聚合体, 与细胞膜、内皮糖蛋白的亲和力较低, 且在血清中易被核酸酶降解, 稳定性差。因此, 必须对裸的核酸分子进行结

构改造和修饰,如硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(PS-ODNs)、2'-甲氧基寡核苷酸(2'-OMes)、2'-甲基氧乙基寡核苷酸(2'-MOE)、锁核酸(LNAs)、吗啉代膦酰二亚胺寡核苷酸(PMOs)、硫代氨基磷酸酯寡核苷酸和肽核酸(PNAs)等,这些修饰策略均不同程度的提高了核酸分子的耐酶性以及与靶点的亲合力。目前认为,真核细胞中PS-ODNs能够刺激RNase H降解mRNA,而对其余所有修饰寡核苷酸结构则显示直接的翻译阻断作用^[1]。

然而,化学修饰的核酸相对分子质量大、亲水性强、代谢不稳定、很难穿透细胞膜进入靶组织和靶细胞发挥作用,因此理想的非病毒递药载体已成为核酸药物领域亟待解决的关键问题。目前常见的递药载体有透膜肽、环糊精聚合物、纳米脂质体等。其中,阳离子脂质纳米粒由于生物相容性好、递药效率高而备受瞩目。阳离子脂质纳米粒(cationic lipid nanoparticles)是由两亲阳离子脂质以及其他相关脂质(如磷脂、胆固醇等)组成的包裹核酸分子的纳米粒。2006年Zimmermann等^[2]首次制备并提出了稳定核酸脂质微粒(stable nucleic acid lipid particles, SNALP)的概念,而2010年Semple等^[3]则首次采用1,2-二亚油酸-3-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinoleyloxy-3-dimethylaminopropane, DLinDMA)等材料包裹siRNA制成小囊泡,在小鼠模型上观察到显著的基因转染和治疗效果。此后,DLinDMA作为SNALP中关键的脂质成分被大量研究和报道,由DLinDMA衍生的阳离子脂质也相继被合成,其特征为均具有两条亚油酸基长链与二甲基氨基结构。与此同时,由DlinDMA构成的脂质纳米粒(lipid nanoparticle, LNP)也迅速发展,已有不少品种进入临床研究阶段。如由DLin-MC3-DMA构成的脂质体纳米粒用于治疗甲状腺素运载蛋白淀粉样变性(ClinicalTrials.gov标识符:NCT01617967)以及高脂血症(ClinicalTrials.gov标识符:NCT01437059)。

1 DLinDMA 类阳离子脂质的分子结构和合成

1.1 分子结构

同常规使用的阳离子脂质结构类似, DLinDMA 类脂质结构可分为 3 部分: 疏水性的长烷基链、连接臂以及带正电的首基(图 1)。疏水性长烷基链部分由两条相同的十八碳原子疏水性长

链组成,其在9,12位上含有不饱和双键,疏水性长烷基链是阳离子脂质自聚为薄板囊泡结构的必要条件。在连接臂的选择上,通常采用酯基、醚基、氨基甲酸酯类等。首基的大小、酸解离常数以及可电离基团的数目,均影响纳米粒在体内的递药过程,常见首基有吗啉代、三甲氨基、双二甲氨基等^[3]。部分结构见表1。

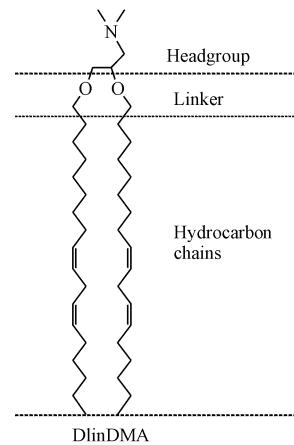
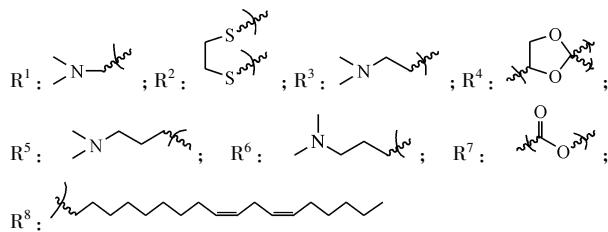


Figure 1 Structure of 1, 2-dilinoleyoxy-3-dimethylaminopropane (DLinDMA)^[3]

Table 1 Modifications to DLinDMA^[3]

Name	Headgroup	Linker	Tail	ED ₅₀ / (mg/kg)
DLin-S-DMA	R ¹	R ²	R ⁸	12-25
DLin-K-DMA	R ¹	R ⁴	R ⁸	~0.4
DLin-KC2-DMA	R ³	R ⁴	R ⁸	~0.1
Dlin-KC3-DMA	R ⁵	R ⁴	R ⁸	~0.6
Dlin-MC3-DMA	R ⁶	R ⁷	R ⁸	~0.005



1.2 合成

Semple 等^[3]提出了对各类 DLinDMA 阳离子脂质的合成方法,存在以下特点:实验操作简便,条件易满足,合成步骤较少,最终产物产率较低等。以 DLin-KC2-DMA 为例,见图 2。

将二亚油酸、1,2,4-丁三醇和对甲苯磺酸吡啶盐溶于甲苯中,回流除水,待冷却至室温后,水洗、干燥,并用二氯甲烷做洗脱液,采用柱色谱分离纯化,得到产物(I)。将产物(I)与三乙胺溶于二氯甲烷中,加入甲基磺酸酐,室温下搅拌过夜,稀释

后水洗、干燥，并蒸发溶剂得产物（Ⅱ）。将产物（Ⅱ）溶于四氢呋喃，再加入二甲胺，室温下搅拌

6 d，蒸发溶剂后进行梯度洗脱，最终得 DLin-KC2-DMA^[3]。

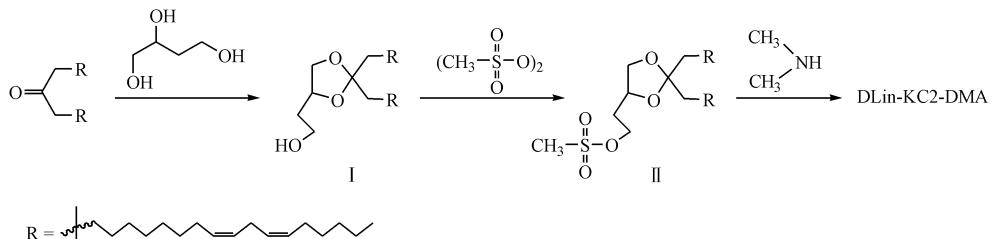


Figure 2 Synthetic route of DLin-KC2-DMA

2 DLinDMA 类阳离子脂质纳米粒的结构与特点

2.1 结构

Miller 等^[4]用 ABCD 结构形象地表示脂质纳米粒(LNP)的组成(图 3)。A 层为相应的核酸药物，B 层由 DLinDMA 类阳离子脂质与中性辅助磷脂结合形成的稳定双层膜结构构成，常用的辅助磷脂有：二硬酯酰磷脂酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酯基磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、磷脂酰胆碱(PC)等。辅助脂质一般用于降低临界温度，提高转染效率和促进核酸释放等。如 DOPE 作为中性磷脂，有很强的细胞膜去稳定化作用，可直接诱导脂质体膜与胞内体膜融合^[5]；加入 17% 胆固醇可使 90% 的包裹药物在 5 min 内释放^[6]。不同 LNP 体系对脂质材料的种类、组成以及比例有不同要求(表 2)。C 层以聚乙二醇(PEG)为多见，引入 PEG，在 AB 两层外形成一个不与蛋白质结合的膜，使其在血清中拥有胶体稳定性和免疫保护性而不易被降解，经证明，连接长短相间的 PEG 比单一长度效果更好。此外引入其他分子，如多糖修饰增加其在生理溶液中的稳定性，提高

转染效率，降低细胞毒性；引入糖酯生物表面活性剂，稳定性也会增强。D 层为一些小分子配体(如抗体等)使 LNP 具有靶向性。例如，研究表明肿瘤细胞中叶酸受体表达过量，将叶酸连于脂质体上，以提高对肿瘤细胞的特异性。配体的连接一般有两种方式，直接连于磷脂上或连于聚乙二醇末端，而后者一般更易与受体结合。

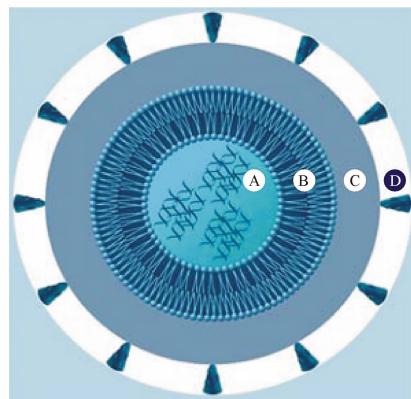


Figure 3 Nanoparticle delivery of RNA interference effectors^[4]
A: Active pharmaceutical ingredient- RNAi effectors; B: Compaction/association agents- typically lipids, amphiphiles, proteins, synthetic polymers, and so on; C: Stealth/biocompatibility polymer layer; D: Biological recognition ligand layer

Table 2 Composition of cationic lipid nanoparticles (LNPs)^[7]

LNP	Composition	Ratio	Lipid: siRNA/(m:m)
SNALP	DLinDMA/DSPC/Chol/PEG2000-C-DMA:siRNA	30:20:48:2	~12:1
	DLinDMA/DSPC/Chol/PEG2000-C-DMA:siRNA	40:10:48:2	~10:1
ALN-VSP02	DLinDMA/DPPC/Chol/PEG2000-C-DMA:siRNA	57.1:7.1:34.3:1.4	~6:1
SNALP	DLin-KC2-DMA/DPPC/Chol/PEG2000-C-DMA:siRNA	57.1:7.1:34.3:1.4	~6:1
LNP201	DLinDMA/Chol/PEG2000-DMG:siRNA	50:44:6	~7:1

SNALP: stable nucleic acid lipid particles; DSPC: distearoyl phosphatidyl choline; Chol: cholesterol; DPPC: dipalmitoyl phosphatidylcholine

2.2 LNP 递送机制及其影响因素

目前认为，影响 LNP 成功递送的关键因素包括形状(Shape)、粒径(Size)、表面性质(Surface)和脂质分子结构(Structure)，简称“4S”因素。

形状：一般情况下，球形的单分散体系比非球形的多分散体系更有利递送，因此较 LNP 的生物利用度而言，其性质与分散度更应被优先考虑。

粒径:在粒径方面,100 nm 的 LNP 一般多被递送至肝脏或肿瘤部位,而大于 100 nm 的则多集中于肺部。

表面性质:表面的亲水性程度与残基电荷是影响 LNP 作用的重要参数,例如加入不同摩尔比的 PEG-脂质(PEG 修饰的脂质),可影响 LNP 的亲水程度,含有摩尔分数 5% PEG-脂质的 LNP 主要递送至肝细胞^[8],而含有摩尔分数 7% ~ 20% PEG-脂质的 LNP 更趋于肿瘤部位^[9]。同时,随着靶向药物的发展,采用特异性的配体对 LNP 进行主动靶向修饰,已逐渐代替由粒径、电势所介导的被动靶向。

脂质分子结构:LNP 的结构转化依赖于脂质(即 B 层),其自聚形成的中间体的结构是由不同结构和形状的脂质分子决定的,因此通过调整各脂质分子的比例可控制和改善 LNP 的功能。脂质分子常见的结构有三种:圆柱形、圆锥形和反圆锥形(见图 4)。DOPC 与胆固醇为圆柱形,DODAG 为圆锥形,DOPE 为反圆锥形。生理状态下,单分子脂质需自聚形成类生物膜双分子层的薄板状结构(L_{α}),保证 LNP 在递药过程中的稳定性。而在跨膜转运时,LNP 需实现由 L_{α} 向反六棱柱结构(H_{II})的转变,然后才能释放 A 层的核酸。

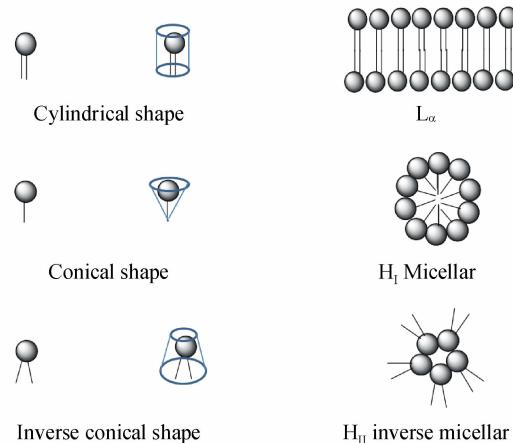


Figure 4 Molecular structure shapes of lipids^[4]

除了 4S 因素之外,生物学屏障也是影响 LNP 成功递送效应分子的重要因素。除需在体液中稳定存在外,LNP 需要克服不同组织的屏障作用才可到达靶器官。如采用吸入给药,则肺部黏液产生阻碍;如采用静脉注射,则血清各成分产生阻碍^[10]。

目前认为,肝或肿瘤周围的血管壁细胞空隙较大,允许 100 nm 及其以下粒径的 LNP 通过。同时,靶细胞所处微环境中的胞外基质(Extracellular matrix, ECM),由于其结构和与细胞黏附作用等因素受疾病或损伤的影响,在传递过程中也有至关重要的作用^[4]。

由 DLinDMA 制备的 LNP 是如何进入细胞的,其机制尚不明确。通常认为有两种可能:若微粒直径小于 300 nm,则由网格蛋白介导运输入胞内;若微粒直径大于 500 nm,则由细胞质膜微囊介导运输入胞内^[3]。LNP 进入胞内后形成的早期胞内体,由于其表面存在 H^+ -ATP 质子泵,所以 4 ~ 6 h 后 pH 降到 5 ~ 6,之后便与溶酶体融合,此时 LNP 必须具备从胞内体逃逸,避免被溶酶体降解的能力。研究认为,入胞后组成 LNP 的阳离子脂质与负电性的胞内体膜形成电子对,由先前的薄板状变为反向的六棱柱结构,进而破坏胞内体膜(图 5)。促使结构发生转变的最低温度称为临界温度,称为 T_{BH} ^[3]。

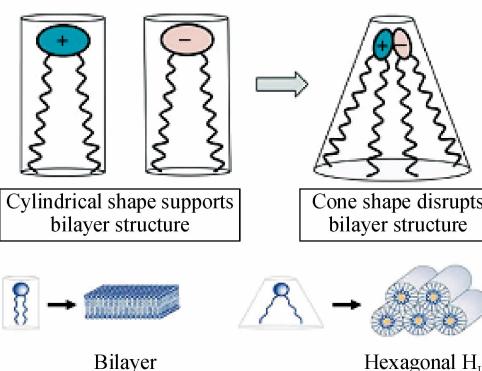


Figure 5 Lipid mesophases and molecular shapes^[3]

2.3 LNP 特点

2.3.1 体内活性与 pK_a 、 T_{BH}

体内活性与 pK_a 的关系 载体材料在不同 pH 条件下的表面电荷性质,是影响 LNP 血浆蛋白结合率、血浆清除率及组织分布的重要因素。尤其是当 LNP 进入胞内体酸性环境后,其带的表面电荷直接影响其与胞内体膜的相互作用。因此要求 LNP 的 pK_a 在 5.4 ~ 7.6 之间,以保证其在血液循环中呈电中性,而在早晚期与内颗粒融合时质子化。以 DLin-KC2-DMA 为例,其首基为活性最好的二甲氨基,并在首基与连接臂之间引入了一个亚甲基,不仅改变了基团间距离与链的

柔性,还影响了氨基的 pK_a (6.7 ± 0.08),有效提高了递药能力。

体内活性与 T_{BH} 的关系 T_{BH} 受首基极性与长烃基链的饱和程度影响。一般情况下,首基极性越小,烃基链不饱和键越多, T_{BH} 越小,结构转变越易发生。在 pH 为 4.8 的条件下测定, DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-KC3-DMA 的 T_{BH} 分别为 19 ℃、20 ℃、18 ℃。说明在体内较易发生结构的转变从而有效释放药物。

2.3.2 生物相容性 DLin-KC2-DMA 若作为载体,可使 ED_{50} 在啮齿动物中低至 0.01 mg/kg,在灵长类低至 0.1 mg/kg。以 Dlin-KC2-DMA 为例,在大鼠模型中对其进行毒性分析。经研究,取有效剂量的 50 倍为起始剂量,并采取不会引起毒性和相关药理作用的针对荧光素酶的 siRNA,对大鼠体重和相关血液学参数进行监测,发现大鼠对高浓度耐受且没有剂量依赖性。在非人类的灵长类动物中得出一致的结论。因此 DLin-KC2-DMA 具有良好的生物相容性^[3]。

3 DLinDMA 类阳离子脂质纳米粒的应用

3.1 肿瘤治疗

在正位膀胱癌治疗中,dsp21-322 双链 RNA 通过促进肿瘤抑制基因 p21 的表达而抑制肿瘤细胞的生长。Kang 等^[11] 将化学修饰的 dsp21-322-2'F 包裹于 DLin-KC2-DMA 制备的 LNP 中,发现药物能在体内保持高活性。在新鲜人尿中,等量的裸 dsp21-322 和裸 dsp21-322-2'F 分别在 3 h 和 24 h 内被降解,而被脂质纳米粒包裹的 dsp21-322-2'F 存在时间高达 6 d。在治疗白血病方面,以驱动蛋白家族第 11 个成员 (KIF11) mRNA 为靶点设计 siRNA,并用 Dlin-KC2-DMA 等包裹,以 4 mg/kg 的剂量注入无胸腺小鼠中,可达到 80% 的基因沉默率,使脾等白血病好发器官中的 KIF11 表达量有效降低^[12]。

3.2 慢性病治疗

在现代生活中,肥胖已成为危害人体健康的重要诱因。经报道,D(KLAKLAK)2 作为一种诱导脂肪细胞凋亡的毒性蛋白,可以促进肥胖小鼠的体重减轻。研究人员确定了其受体的氨基酸序列,并已通过了临床 I 期实验,但其肾毒性仍不可忽视。因此,利用 DLin-MC3-DMA 制成 LNP 包裹,并在表面

连接有保护作用的 PEG₅₀₀₀ 和针对脂肪组织微脉管细胞的靶向配体——KGRAKD 肽,显著提高了其靶向性,降低了细胞毒性^[13]。

此外,PCSK9(前蛋白转换酶枯草溶菌素 9)调控着 LDL 受体的表达,降低其含量可增加肝中 LDL 的受体水平,同时降低血清中 LDL 受体水平。DLin-MC3-DMA 制备的 LNP 包裹 PCSK9 的抑制基因,发现其可以进入体内抑制 PCSK9 的合成,可减少血清中 50% 的 LDL,有效治疗高脂血症^[14]。

3.3 疫苗制备

近十几年里,树突状细胞作为强力抗原呈递细胞,成为提高体内抗原特异性 T 细胞免疫应答的最佳选择。尽管基于其制成的疫苗体现了一定的生物活性,但是在提高免疫应答强度、提升 T 细胞功能以及 T 细胞永久记忆方面仍有待提高。经研究发现,树突细胞在成熟过程中可激活一些共抑制分子,如细胞凋亡配体 1 (PD-L1) 及 PD-L2 等,而 T 细胞的活性是由这些共刺激与共抑制分子之间的平衡所决定的。因此,通过 siRNA 沉默 PD-L1 及 PD-L2 的表达,使树突细胞的刺激潜能提升。5'-AGAccuuGAuAcuuucAAAdTsdT-3' 和 5'-UUU-GAAAGuAUcAAGGUCUdTsdT-3' 是抑制 PD-L1 最有效的双链 siRNA。研究发现,用 DLin-KC2-DMA 或 DLin-MC3-DMA 与 DSPC、胆固醇和 PEG 制成 LNP,以约 10:1 的质量比包裹 siRNA,结果发现 PD-L1 沉默的树突细胞可使肿瘤转移患者体内的记忆 T 细胞显著扩增^[15]。

4 结语

目前,DLinDMA 类阳离子 LNP 在基因治疗领域发展迅速,经其包裹的核酸类分子 (siRNA、miRNA 等) 在抗肿瘤、抗感染 (致病菌、病毒等)、遗传相关疾病等方面,具有非常广阔的应用前景。然而,DLinDMA 类阳离子 LNP 的研究仍存在诸多问题,未来的研究应集中于以下几个方面:一是对 Dlin DMA 等结构的进一步优化和改善,以降低其毒性提高转染效率;二是如何控制 DLinDMA 类阳离子 LNP 的粒径,阐述影响制备和稳定性的各种因素,实现对其的质量控制;三是深入探索 DLinDMA 类阳离子 LNP 的透膜机制以及对不同细胞的选择性,为基因靶向治疗提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Bai H. Design, synthesis and antibacterial activity of antisense peptide nucleic acid targeting bacterial RNA polymerase primary σ70 [D]. Xi'an; the Fourth Military Medical University, 2011.
- [2] Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2006, **441**(7089):111–114.
- [3] Semple SC, Akinc A, Chen J, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(2):172–176.
- [4] Miller AD. Delivery of RNAi therapeutics: work in progress[J]. *Expert Rev Med Devices*, 2013, **10**(6):781–811.
- [5] Zhou YD, Li J. Cationic liposome used as gene vector: materials and preparation techniques[J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2009, **33**(7):297–304.
- [6] Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, et al. Delivery materials for siRNA therapeutics[J]. *Nat Mater*, 2013, **12**(11):967–977.
- [7] Miller AD. Delivering the promise of small ncRNA therapeutics [J]. *Ther Deliv*, 2014, **5**(5):569–589.
- [8] Kolli S, Wong SP, Harbottle R, et al. pH-triggered nanoparticle mediated delivery of siRNA to liver cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioconjug Chem*, 2013, **24**(3):314–332.
- [9] Kenny GD, Kamaly N, Kalber TL, et al. Novel multifunctional nanoparticle mediates siRNA tumour delivery, visualisation and therapeutic tumour reduction *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2011, **149**(2):111–116.
- [10] Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez S. Intracellular trafficking of nonviral vectors[J]. *Gene Ther*, 2005, **12**(24):1734–1751.
- [11] Kang MR, Yang G, Place RF, et al. Intravesical delivery of small activating RNA formulated into lipid nanoparticles inhibits orthotopic bladder tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2012, **72**(19):5069–5079.
- [12] Guo J, Cahill MR, McKenna SL, et al. Biomimetic nanoparticles for siRNA delivery in the treatment of leukaemia[J]. *Biotechnol Adv*, 2014, **32**(8):1396–1409.
- [13] Kajimoto K, Sato Y, Nakamura T, et al. Multifunctional envelope-type nano device for controlled intracellular trafficking and selective targeting *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2014, **190**:593–606.
- [14] Haynes M, Huang L. Hepatic RNA interference: delivery by synthetic vectors[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2014, **4**(1):61–73.
- [15] Hobo W, Novobrantseva TI, Fredrix H, et al. Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-1 ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, **62**(2):285–297.

· 本刊讯 ·

本刊两篇论文入选“2014年中国药学会药学期刊优秀论文奖”

近期,中国药学会和同方知网联合发布了“2014年中国药学会药学期刊优秀论文奖”评选结果。此次评选是中国药学会联合同方知网根据综合指标评定,从2011-2013年发表的药学论文中筛选出100篇优秀论文。《中国药科大学学报》有两篇入选“2014年中国药学会药学期刊优秀论文奖”。

两篇入选论文如下:

1. 田泓,金宇灏,陈阳建,高向东,姚文兵.聚乙二醇氨基酸衍生物的合成及其对紫杉醇的修饰. *中国药科大学学报*, 2011, **42**(1):78–82.
2. 储妍,丁黎,刘荷英,于勇,朱贺,孙鲁宁.奥替拉西钾血药和尿药浓度的测定及其药代动力学和药物蓄积性评价. *中国药科大学学报*, 2011, **42**(5):436–442.

(本刊编辑部)