

文章编号 1672-6634(2021)06-0084-08

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2021.06.011

纳米核酸载体和 mRNA 体外合成体系的构建

马亚平, 崔 潇, 杨玉娇, 李 军

(聊城大学 药学院, 山东 聊城 252059)

摘 要 新型冠状病毒肺炎疫情给全球造成了严重的生命健康和经济损失。灭活疫苗和 mRNA 疫苗的上市给终结新型冠状病毒疫情带来了希望。2020 年 11 月, Moderna 公司公布其在研肿瘤 mRNA 疫苗对多种实体肿瘤取得了 90% 的疾病控制率。纳米核酸载体制备、mRNA 体外合成是研发 mRNA 疫苗的两大关键技术。本文构建了简便的纳米核酸载体制备和体外 mRNA 合成体系, 并对所制备纳米核酸载体的粒径, 稳定性, 电镜形态等进行了表征; 以绿色荧光蛋白为测试基因验证了 mRNA 体外合成和纳米核酸载体对 mRNA 和 DNA 的细胞转染效率。该研究为进一步研发具有自主知识产权的病毒和肿瘤核酸疫苗奠定了基础。

关键词 mRNA 疫苗; 病毒; 肿瘤; 纳米核酸载体

中图分类号 R943; R96

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Construction of the Nanoparticle-Mediated Nucleic Acid Delivery System and the *in Vitro* System for the Synthesis of mRNA

MA Yaping, CUI Xiao, YANG Yujiao, LI Jun

(School of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract The New Coronavirus pneumonia has caused serious health and economic losses to the world. The approval of inactivated vaccine and mRNA vaccine has brought hope to the end of the New Coronavirus epidemic. In November 2020, Moderna company announced that their mRNA vaccine got 90% disease control rate for a variety of solid tumors. The preparation of nano nucleic acid carrier and the synthesis of mRNA *in vitro* are two key technologies for the development of mRNA vaccine. In this paper, we constructed a nanoparticle-mediated nucleic acid delivery system and an *in vitro* mRNA synthesis system. The particle size, stability and TEM morphology of the nanoparticle were characterized. Green fluorescent protein (GFP) was used as the test gene to verify the feasibility of *in vitro* synthesis of mRNA and the transfection efficiency of nanoparticle to mRNA and DNA. This study laid a foundation for further research and development of virus and tumor nucleic acid vaccine with independent intellectual property rights.

Key words mRNA vaccine; virus; tumor; nano nucleic acid carrier

收稿日期: 2021-02-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401217, 81402512); 大学生创新创业训练计划(201910447910); 山东省研究生教育创新计划项目(SDY14016); 山东省研究生教育优质课程(SDYKC18097); 山东省高等学校青创科技支持计划(2019KJM012)资助

通讯作者: 李军, 男, 汉族, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物制剂与肿瘤免疫微环境, E-mail: think.a@163.com。

0 引言

2019 年 12 月发现的新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)疫情迅速席卷全球^[1, 2]。我国通过政府强有力的正确领导,医护战线的英勇抗疫和全国人民的众志成城,成功遏制了 COVID-19 疫情在国内的肆虐,并为全球应对 COVID-19 疫情提供了宝贵经验。然而,由于各国国情、社会制度、经济水平和防控策略的差异导致疫情在全世界肆虐,截至目前尚未得到有效控制,SARS-CoV-2 的起源也尚未定论^[3]。根据霍普金斯大学实时统计数据,全球已经确诊超过 1.8 亿人,死亡人数超过 400 万。

检测和诊断、治疗和预防是抗击 COVID-19 疫情的三大策略^[4]。检测和诊断能力在全球,尤其是我国已经获得充分动员,为临床诊断,病毒溯源,控制扩大传染提供了巨大支持^[5]。SARS-CoV-2 之前,在人类传播的 6 种冠状病毒都未有成功的临床药物,研发抑制 SARS-CoV-2 的特效药物也将任重道远^[6]。疫苗被认为是全球抗击新型冠状病毒疫情的最后希望^[7]。COVID-19 疫情爆发以来,以灭活疫苗、重组蛋白亚单位疫苗、病毒载体疫苗、DNA 载体疫苗和 mRNA 疫苗等五大技术路线的过百个疫苗研发项目在全球应急启动。截至 2020 年 12 月底,已经有数款疫苗相继在全球获得应急使用授权。

免疫治疗已经成为手术,放疗,化疗之后肿瘤治疗领域的热点,并被认为是可能治愈肿瘤的最终手段。肿瘤 mRNA 疫苗也成为肿瘤治疗性疫苗研究领域的热点^[8]。2020 年 11 月,美国 Moderna 公司披露了肿瘤疫苗 mRNA-4157 的临床 I 期试验数据,该疫苗对多种恶性实体肿瘤的疾病控制率高达 90%,显示出巨大的抗癌潜力。

mRNA 疫苗的研究可以追溯到 1990 年代^[9],然而 SARS-CoV-2 mRNA 疫苗被紧急授权使用之前尚未有该技术路线的疫苗上市。mRNA 疫苗相比其他技术路线的疫苗,具有安全性高,易于开发针对变异病毒株新疫苗的优势^[10]。另外 mRNA 本身可以作为天然的免疫佐剂提高接种有效性,生产过程不依赖高等级生物安全生产设施,生产速度快,生产成本低,能更好满足全球疫情对疫苗剂量的迫切需求^[11]。mRNA 的体外合成、稳定性和细胞内递送是 mRNA 疫苗研发的关键技术^[12]。目前这些技术主要掌握在 Moderna、BioNTech 和 CureVac 等几个国外公司手中。辉瑞/BioNTech 和 Moderna 研发的 mRNA 疫苗已经在全球上百个国家开始接种,国内复星制药参股 BioNTech 的 mRNA 疫苗 BNT162b2 尚在临床阶段。

在体内环境中,mRNA 半衰期短、稳定性差。裸露的 mRNA 直接进入体内容易被体内广泛存在的 RNA 酶降解。为了保证 mRNA 疫苗在体内的稳定性与安全性,需要合适的载体材料将 mRNA 进行包裹,高效递送到机体细胞内^[13]。研究报告的非病毒 mRNA 递送主要包含阳离子脂质纳米粒、聚合物、肽、类病毒颗粒、阳离子纳米乳和树突状细胞的递送系统^[14]。

我们尝试构建了 mRNA 体外合成制备体系和基于阳离子聚合物聚乙酰胺(Polyetherimide, PEI)的 PEI-脂质纳米核酸递送系统,以期为开发自主知识产权的 mRNA/DNA 核酸疫苗奠定前期工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料

mMESSAGE mMACHINE Kit 转录试剂盒购自 Lifetechnologies,PCR 试剂盒购买于 TaKaRa;质粒提取试剂购自 TIANGEN;MCF-7(HER2 表达阴性细胞系,HER2⁻ cell)、SKOV-3(HER2 表达阳性细胞系,HER2⁺ cell)和 HeLa 细胞购买于中科院典型培养物保藏委员会细胞库,RPMI-1640、DMEM 细胞培养基,胎牛血清购买于美国的 Thermo Fisher Scientific (GIBCO)公司;DSPE-mPEG2000(二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000)、DSPE-PEG2000-NHS(二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-N-羟基丁二酰亚胺)、Cy5-PEG2000-DSPE(近红外染料 Cy5-聚乙二醇-磷脂)购买于西安瑞禧公司;DOTAP [(2,3-二油酰基-丙基)-三甲基氯化铵],聚乙酰胺(PEI)购买于 sigma;抗 HER2 单克隆抗体由上海张江生物科技有限公司赠送;其它常规生化试剂购自国药集团;50、100、200 nm 孔径聚碳酸酯膜购自 Whatman 公司;Zetasizer Nano ZSE 是由英国 Malvern 公司制造,脂质体挤出器 LF-1 由美国 Avestin 公司制造;精密天平为德国梅特勒-托

利多 XP6 百万分之一超微量天平; 荧光倒置显微镜为 Olympus CKX53; 酶标仪为 Biotech Synergy H1。

1.2 实验方法

1.2.1 mRNA 体外合成。体外合成 mRNA 模板质粒制备: 参照图 3 所示技术路线 2, 以绿色荧光蛋白基因 GFP 为测试基因, 验证体外 mRNA 合成体系。首先, 将 T7 启动子序列与 GFP CDS 序列进行设计拼接, 委托基因合成公司进行全序列合成或以含有 GFP 基因的 pEGFP-C1 质粒为模板, 设计含有 T7 启动子的引物, PCR 扩增获得 T 启动子和 GFP CDS 融合序列, 将获得的融合序列定向克隆到设计有 Ploy A 序列的克隆载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态筛选阳性重组子, 提取质粒 Sanger 双脱氧终止法测序以确认序列正确无突变, 获得 GFP-mRNA 体外合成模板质粒。

质粒提取和 mRNA 体外合成模板质粒线性化: 按照 TIANGEN 质粒提取试剂盒说明书提取 GFP 真核表达质粒 pEGFP-C1 和构建的 GFP 模板质粒, 紫外分光光度计检测质粒浓度。在克隆载体 Poly A 3' 端酶切位点处, 用 NEB 限制性内切酶将模板质粒线性化, 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效率, 酚-氯仿抽提纯化获得体外合成 mRNA 的线性化质粒模板。

转录合成 mRNA: 使用 mMESSEGE mMACHINE Kit 转录试剂盒 (Lifetechnologies) 体外合成 mRNA, 在 0.2 mL RNase-free 的 Eppendorf 管中配制 20 μ L 体系: 10 μ L 2 \times NTP/CAP, 2 μ L 10 \times Reaction Buffer, 0.1-1 μ g linear template DNA, 2 μ L Enzyme Mix, Nuclease-free Water up to 20 μ L, 轻柔混匀。PCR 仪中, 37 $^{\circ}$ C 1-2 h, 加 1 μ L TURBO DNase, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 酚氯仿抽提纯化 mRNA。

酚氯仿抽提、纯化线性化模板 DNA 和 mRNA: 用 Tris 饱和酚抽提 DNA, 水饱和酚抽提 RNA, 步骤如下: DNA 或者 RNA 溶液中加入等体积饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 振荡 15 s 混匀, 静置 3 min 分层, 12,000 g 离心 10 min; 将上层水相移入新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1) 重复抽提 1 次; 将上层水相移入新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 0.1 体积 3 M 的醋酸钠 (pH 5.2) 和 2 倍体积无水乙醇, 充分混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min; 4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min; 弃上清, 保留沉淀, 500 μ L 预冷 70% 乙醇, 轻柔颠倒洗沉淀 3-5 次, 4 $^{\circ}$ C 7500 g 离心 2 min; 弃上清, 敞开管口室温直至乙醇挥发完全; 用适合下步实验的溶剂溶解 DNA 或者 RNA 沉淀; 紫外分光光度计检测 DNA/RNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 PEI 脂质纳米核酸载体的制备。DOTAP、DOTAP-mPEG2000 脂质纳米粒 (DOTAP-m2000) 制备: 将 DOTAP: DSPE-mPEG2000 按摩尔比 96: 4 溶于氯仿中, 加入玻璃烧瓶中, 用旋转蒸发仪 60 $^{\circ}$ C 旋转蒸发, 直至氯仿完全挥发, 得到均匀的脂质薄膜, 45 $^{\circ}$ C, 用络合缓冲液 (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH = 7.4) 薄膜水化, 得到 DOTAP-m2000 脂质纳米粒 (LNP)。将 DOTAP 溶于氯仿中, 制备方法同上, 制得 DOTAP 脂质纳米粒。

免疫脂质纳米粒和荧光脂质纳米粒制备: 根据上述方法, 将 DOTAP: DSPE-mPEG2000: DSPE-PEG2000-NHS 按摩尔比 96: 3.3: 0.7 溶于氯仿中, 旋转蒸发薄膜水化法制备 DOTAP-PEG2000-NHS 脂质纳米粒。根据本课题组前期构建的免疫脂质体制备方法^[15], 用抗 HER2 抗体修饰, 获得 Anti HER2 免疫脂质纳米粒 (HLNP)。精确称取 0.1 mg 的 Cy5-PEG2000-DSPE (645 nm 激发红光荧光染料) 溶于 50 μ L PBS 溶液, 每 100 μ L DOTAP-m2000 脂质纳米粒 (LNP) 或免疫脂质纳米粒 (HLNP) 中加入 10 μ L Cy5-PEG2000-DSPE 溶液 (2 mg/mL), 混合均匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 透析去除未连接的抗体和游离的荧光染料, 获得 LNP-Cy5 (DOTAP-m2000 荧光脂质纳米粒) 和 HLNP-Cy5 (Anti HER2 荧光免疫脂质纳米粒)。

PEI-pEGFP、PEI-mRNA 聚合物制备: PEI (1mg/mL) 与 GFP 真核表达质粒 pEGFP-C1 或 GFP-mRNA 溶于 150 mM NaCl 溶液, 以 PEI: pEGFP-C1/GFP-mRNA 质量比 2: 1 (N: P = 6.6: 1) 的比例混合, 涡旋 10 s 静置 20 min, 制备 PEI-GFP、PEI-GFP-mRNA 复合物。

PEI、PEI-pEGFP-C1、PEI-GFP-mRNA 脂质纳米粒制备: PEI 与 DOTAP 或 DOTAP-m2000 脂质纳米粒, 以质量比 5: 1 的比例混合, 涡旋 10 s, 室温静置 1 h, 获得 PEI-DOTAP 和 PEI-DOTAP-m2000 脂质纳米粒, 用微型挤出器挤过脂质纳米粒悬液数次 ($n = 0, 1, 5, 9, 13$), 以使脂质纳米粒粒径均一化。PEI-pEGFP-C1、PEI-GFP-mRNA 复合物分别与 DOTAP 或 DOTAP-m2000 脂质纳米粒以质量比 5: 1 的比例混合, 涡旋 10 s, 室温静置 1 h, 制备 PEI-GFP-DOTAP, PEI-GFP-DOTAP-m2000, PEI-GFP-mRNA-DOTAP-m2000 脂

质纳米粒。

1.2.3 细胞培养。SKOV-3 细胞(HER2⁺)用 RPMI-1640 培养基,含 10% 胎牛血清(FBS),37 °C,5% CO₂ 培养;MCF-7 细胞(HER2⁻)用 DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清(FBS),37 °C,5% CO₂ 培养;HeLa 细胞用 DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清(FBS),37 °C,5% CO₂ 培养;显微镜下观察细胞,选择生长状态良好的细胞,密度达到 80-90% 即可传代,传代时用 0.25% 胰酶消化细胞,制备单细胞悬液进行细胞计数。根据细胞计数的结果,将适当数量的细胞悬液按照实验需要接入含有新鲜培养液的培养瓶、培养皿或细胞培养板中,补足培养基,放入 37 °C,5% CO₂ 培养,以备实验所需。

1.2.4 纳米粒粒径分析。使用英国 Malvern 公司的 Zetasizer Nano ZSE 纳米激光粒度仪测定样品的粒径,每份样品重复 3 次。

1.2.5 细胞毒性分析。使用细胞计数试剂盒 CCK8 方法测量不同脂质体的体外细胞毒性。将 SKOV-3 细胞与 MCF-7 细胞分别接种于 96 孔板中,8000 个细胞/孔,37 °C,5% CO₂ 培养过夜。将 PEI、PEI-DOTAP、PEI-DOTAP-m2000 分别按指定浓度(0.05、0.25、1.25 μg/mL)加入,培养 24 h。每孔加入 100 μL CCK8 溶液(1 mg/mL),孵育 4 h。多功能酶标仪 490 nm 处测定吸光度,按照公式 RCV(%) = 测试组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%,测定细胞存活率,实验重复三次。

1.2.6 荧光共聚焦显微镜分析。SKOV-3 和 MCF-7 细胞分别接种于 24 孔板培养过夜,将免疫荧光脂质纳米粒 HLNP-Cy5 和荧光脂质纳米粒 LNP-Cy5 分别与 SKOV-3 和 MCF-7 细胞孵育,37 °C,2 h,用 PBS 清洗 2 遍,每孔加入 500 μL 4% 多聚甲醛,固定 5 min,吸走多聚甲醛再用 PBS 清洗 2 遍,每孔加入 1 mL DAPI (5 μg/mL)染色 15 min,用 PBS 洗两遍,加入 1 mL PBS,共聚焦显微镜拍照检测纳米粒靶向特异性;用 PEI-GFP、PEI-GFP-DOTAP、PEI-GFP-DOTAP-m2000、PEI-GFP-mRNA-DOTAP-m2000 分别与 HeLa 细胞孵育,培养过夜,按上述方法 DAPI 染色,共聚焦显微镜拍照检测 GFP 转染效率。

1.2.7 流式分析。制备 SKOV-3 和 MCF-7 细胞悬液,分别加入纳米粒 LNP-Cy5 和 HLNP-Cy5,4 °C 孵育 30 min,PBS 清洗两遍,过 100 目尼龙网,使用密理博 guava easy Cyte 8HT 流式细胞分析仪检测靶向效率。将 PEI-GFP、PEI-GFP-DOTAP、PEI-GFP-DOTAP-m2000 分别加入 HeLa 细胞中,培养过夜,制备单细胞悬液,使用密理博 guava easy Cyte 8HT 流式细胞分析仪检测转染效率。

1.2.8 统计学分析。细胞毒性实验所得数据以平均值(Mean ± SD)表示,以 2-tailed Student's t-test 或 1-way ANOVA with a Tukey's post hoc test 分析各组数据差异显著性, $p > 0.05$ 表示差异性不显著; $0.01 < * p < 0.05$ 表示差异性显著;** $p < 0.01$ 表示差异性极显著;*** $p < 0.001$ 表示差异极其显著性。

2 结果与讨论

2.1 PEI-脂质纳米粒表征分析

应用激光纳米粒度电位仪分别检测挤出次数分别为 0、1、5、9、13 次的 PEI-DOTAP 脂质纳米粒(PEI-DOTAP)(图 1(a)) 和 PEI-DOTAP-PEGm2000 脂质纳米粒(PEI-DOTAP-m2000)的粒径(图 1(b))。结果显示挤出次数达到 9 次及以上,平均粒径达到 100 nm 左右,且实现了较好的均一化。将制备的 PEI-DOTAP-m2000 脂质纳米粒常温放置 7、28、60 天,检测样品粒径,数据显示经过放置,所制备的脂质纳米粒粒径没有明显变大,并且保持了较好的均一性(图 1(c))。另外,检测制备的 DOTAP-m2000 脂质纳米粒(LNP) 和 Anti HER2 免疫脂质纳米粒(HLNP)粒径,抗体免疫化修饰的脂质纳米粒粒径没有明显增大(HLNP)(图 1(d))。

2.2 细胞毒性分析

CCK-8 法测定不同浓度的 PEI、PEI-DOTAP、PEI-DOTAP-m2000 对 MCF-7 和 SKOV-3 细胞的细胞毒性。结果显示,相比 PBS 对照,不同浓度的脂质纳米粒对 MCF-7 细胞(图 2(a))、SKOV-3 细胞(图 2(b)) 细胞活力的影响无显著差异,表明所制备的 PEI-脂质纳米粒具有较低的细胞毒性。

2.3 mRNA 体外制备与纯化

以绿色荧光蛋白为测试基因,按照图 3 所示技术路线 2 构建了测试基因 GFP 的 mRNA 体外合成体系,

通过琼脂糖凝胶电泳检测 GFP-mRNA 合成效率,纯化效率和 PEI-脂质纳米载体对 mRNA 的包封效率(图 4(a))。并对所制备的 PEI-GFP-mRNA-DOTAP-m2000 纳米制剂进行了粒径和透射电镜表征分析,结果显示所制备 GFP-mRNA 脂质纳米粒具有较均一的粒径分布(平均粒径 124 nm)(图 4(b),4(c))。

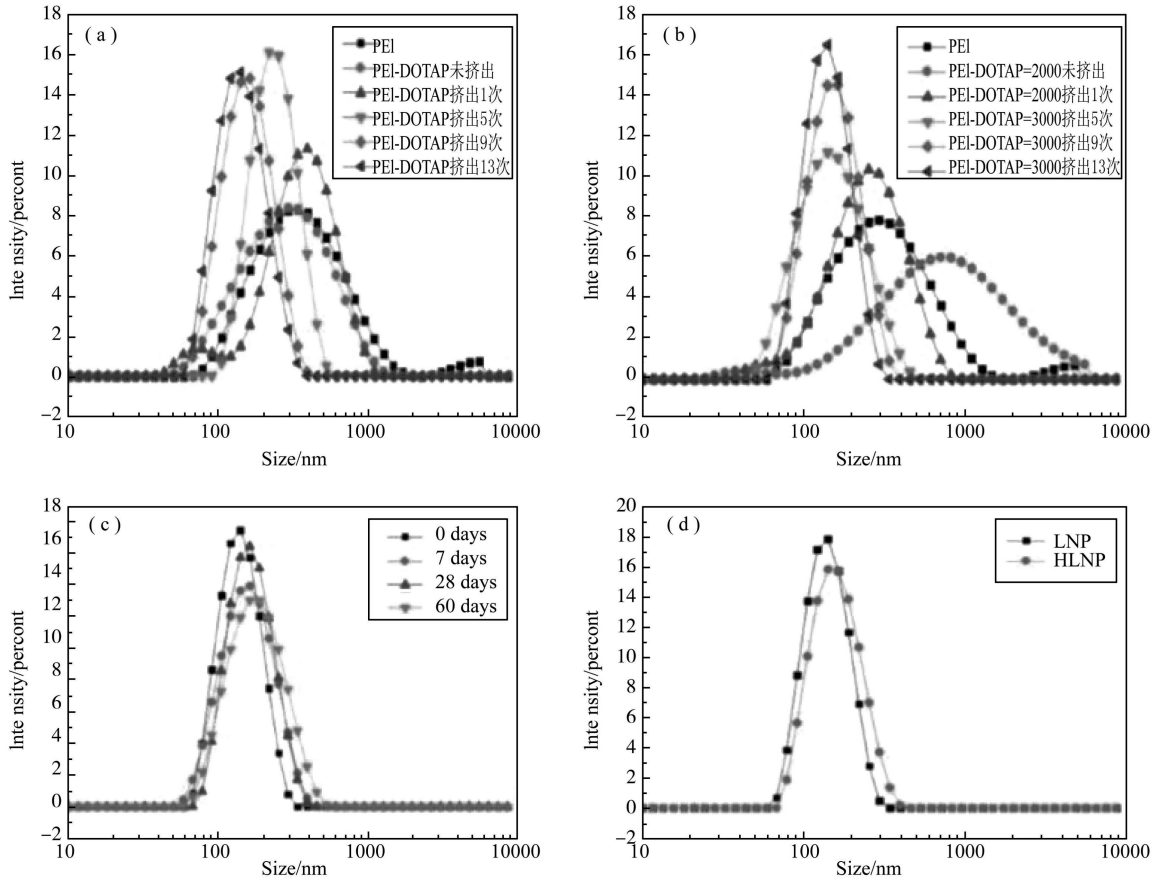


图 1 PEI 脂质纳米核酸载体的制备和表征 (a) 挤出次数对 PEI-DOTAP 脂质纳米粒粒径分布影响;(b)挤出次数对 PEI-DOTAP-m2000 脂质纳米粒粒径影响;(c)PEI-DOTAP-m2000 脂质纳米粒室温放置稳定性; (d)抗体免疫修饰对脂质纳米粒(HLNP)粒径分布的影响

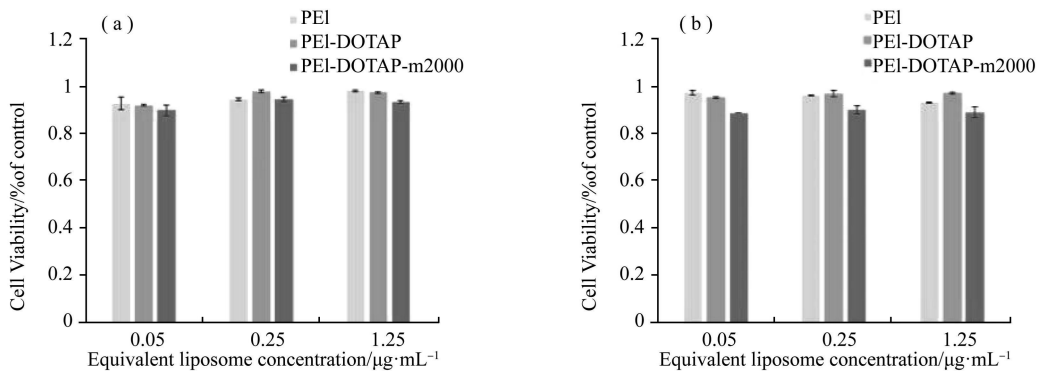


图 2 脂质纳米粒体外细胞毒性分析 (a)脂质纳米粒处理 MCF-7 细胞 24 h 后的细胞活力; (b)脂质纳米粒处理 SKOV-3 细胞 24 h 后的细胞活力

2.4 PEI-脂质纳米粒对 GFP-mRNA 的细胞转染效率分析

以制备 PEI-GFP-mRNA-DOTAP-m2000 脂质纳米粒转染 HeLa 细胞,荧光显微镜检测分析表明,所制备的 mRNA 脂质纳米粒能高效转染 mRNA 到 HeLa 细胞,介导 GFP 蛋白的细胞内表达(图 4 (d))。

2.5 脂质纳米粒对 pEGFP-C1 质粒的转染效率分析

分别用 PEI、PEI-DOTAP、PEI-DOTAP-m2000 将 pEGFP-C1 质粒转染 HeLa 细胞,倒置荧光显微镜检测。结果表明,所制备的 PEI-DOTAP 脂质纳米粒对 pEGFP-C1 质粒具有更高的转染效率,而 PEI、PEI-

DOTAP-m2000 对 pEGFP-C1 质粒的转染效率相对较低(图 5 (a))。流式分析取得了一致结果(图 5 (b))。结果预示所制备的 PEI 脂质纳米粒也具有 DNA 载体应用前景,而且 mPEG2000 修饰可以通过提高脂质纳米粒的隐形作用而降低非被动靶向,后期可通过抗体等靶向修饰提高载体主动靶向效率。

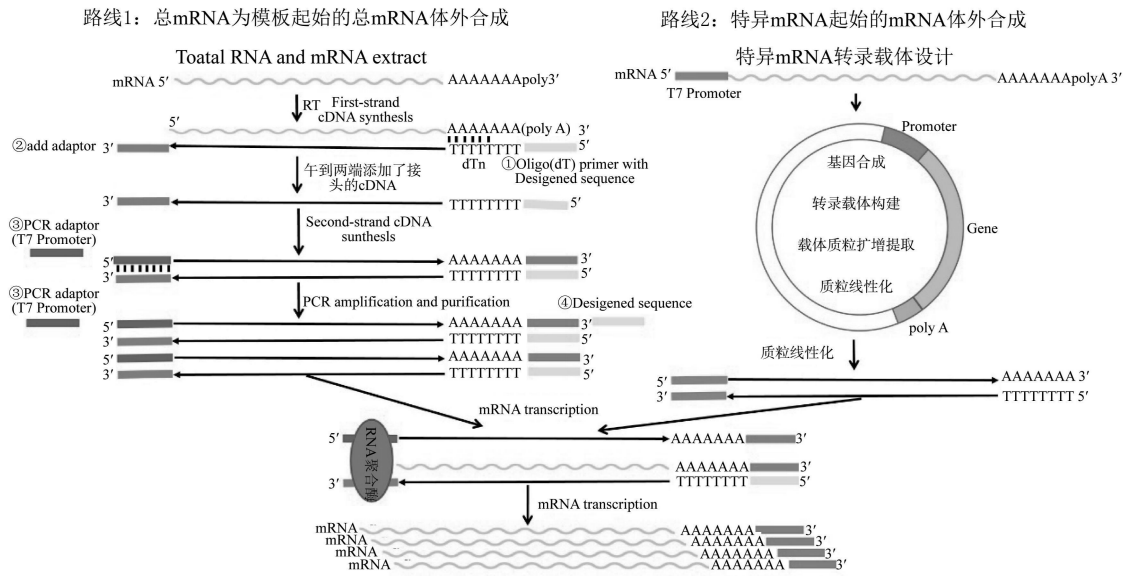


图 3 mRNA 体外制备技术路线示意图

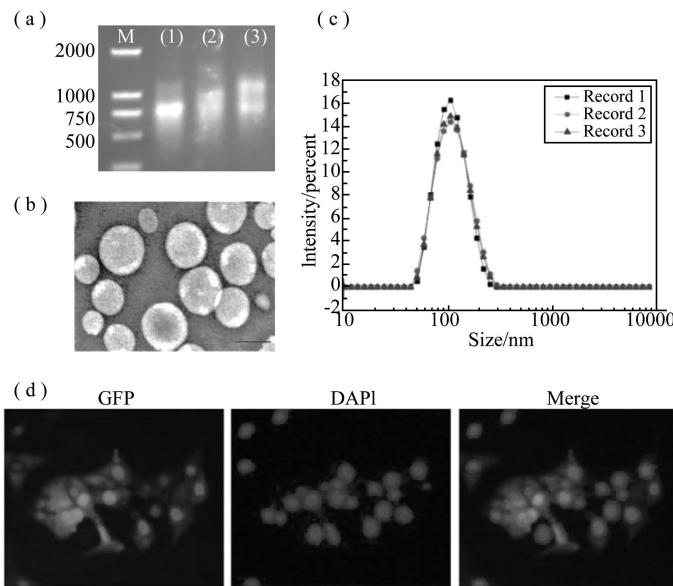


图 4 PEI-脂质纳米粒对 GFP-mRNA 的转染效率验证(a)GFP-mRNA 的合成(1)纯化效率和(2)PEI-脂质纳米载体对 mRNA 的包封效率(3)检测;(b)PEI-GFP-mRNA-DOTAP-m2000 脂质纳米粒粒径分析;(c)PEI-GFP-mRNA-DOTAP-m2000 脂质纳米粒透射电镜表征分析;(d)倒置荧光显微镜拍摄 PEI-GFP-mRNA-DOTAP-m2000 脂质纳米粒转染效率

2.6 荧光显微镜检测免疫脂质载体的靶向特异性和靶向效率

将荧光脂质纳米粒 LNP-Cy5 和免疫荧光脂质纳米粒 HLNP-Cy5 分别与 SKOV-3 和 MCF-7 细胞孵育 2 h,荧光显微镜拍照检测。结果显示,HER2 低表达的 MCF-7 细胞对 HLNP-Cy5 与 LNP-Cy5 的内吞效率没有显著差异(图 6(a)),而 HER2⁺ SKOV-3 细胞对 HLNP-Cy5 具有更高的内吞效率(图 6 (c)),流式分析取得了与荧光显微镜一致的结果(图 6 (b,d))。预示着通过抗体修饰可以提高脂质纳米载体的主动靶向效率和靶向特异性。

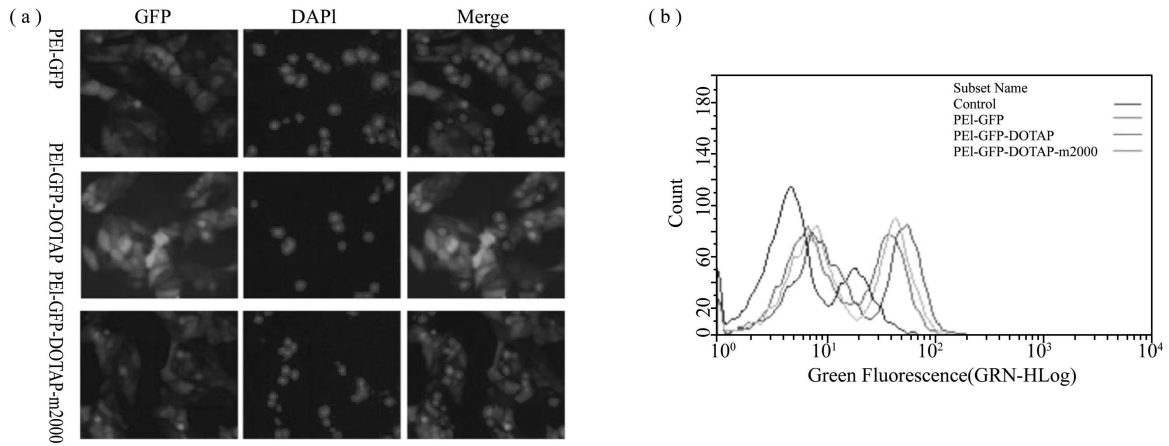


图5 脂质纳米粒对 pEGFP-C1 质粒的转染效率分析 (a) 荧光显微镜分析纳米粒对 pEGFP-C1 质粒转染效率; (b) 流式分析纳米粒对 pEGFP-C1 质粒转染效率

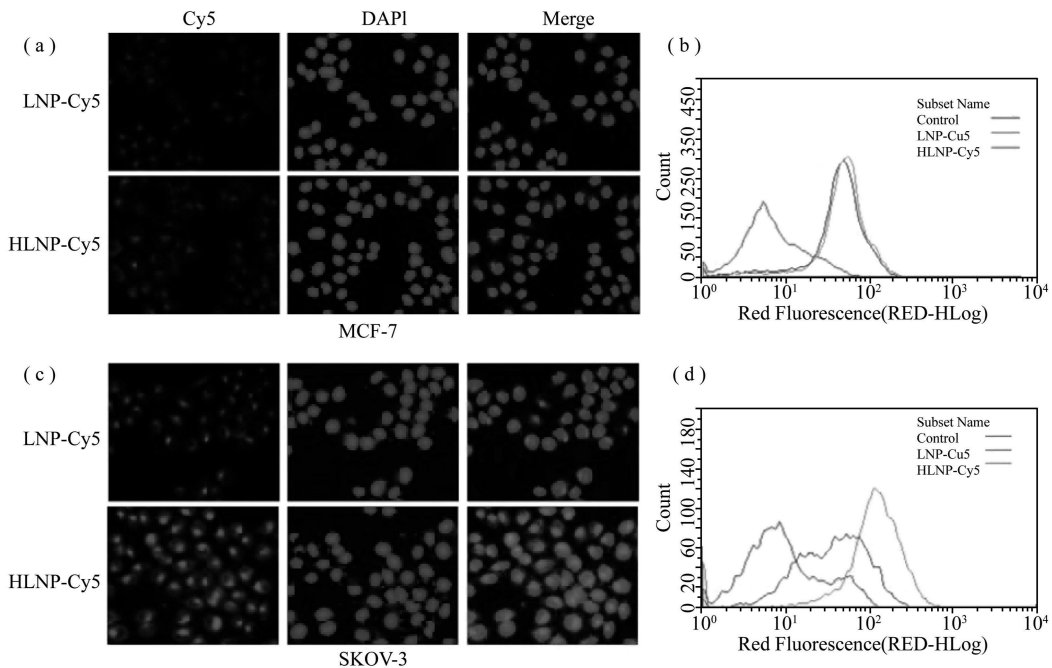


图6 免疫化修饰对脂质纳米粒靶向效率和靶向特异性的影响 (a) 荧光显微镜分析 MCF-7 细胞对纳米粒的内化效率; (b) 流式分析 MCF-7 细胞对纳米粒的内化效率; (c) 荧光显微镜分析 SKOV-3 细胞对纳米粒的内化效率; (d) 流式分析 SKOV-3 细胞对纳米粒的内化效率

3 结论

mRNA 疫苗作为一种新型的疫苗研发技术,以其安全、高效、易开发生产的优势,在抗击 COVID-19 战役中获得疫苗行业瞩目^[16]。目前已经在 SARS-CoV-2 预防中取得了突破性应用,并在多种实体瘤免疫治疗的临床实验获得了良好的效果。mRNA 的体外高效合成和体内递送是开发 mRNA 疫苗的两大关键核心技术,我们基于阳离子聚合物 PEI 开发了一种适用于 DNA 和 mRNA 的脂质纳米核酸递送载体,并通过载体表征,优化了该载体的制备方法。针对总 mRNA 合成和特定基因 mRNA 合成两种不同应用场景设计了两种技术路线,以绿色荧光蛋白 GFP 为测试基因,验证了特定基因 mRNA 体外合成的技术路线。另外我们验证了所制备的 PEI 脂质纳米载体介导绿色荧光白 GFP 的真核表达质粒 pEGFP-C1 和 GFP-mRNA 转染细胞的效率,通过 PEG 隐形化修饰可以降低所制备核酸载体的被动靶向。我们还尝试对制备的纳米载体进行靶向修饰,以抗 HER2 抗体为例初步验证了抗体免疫化修饰可以提高载体的靶向特异性和靶向效率,预示着该载体具有体内靶向递送的潜在应用价值。未来,我们还需要进行更深入的体内外实验验证该载体系统在核酸(DNA/mRNA)疫苗研发方面的应用前景。

参 考 文 献

- [1] LAUXMANN M A, SANTUCCI N E, AUTRAN-GOMEZ A M. The SARS-CoV-2 coronavirus and the COVID-19 outbreak[J]. International Braz J Urol, 2020, 46(1):6-18.
- [2] SHI Y, WANG G, CAI X P, et al. An overview of COVID-19[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2020, 21(5):343-360.
- [3] WANG M, LIAO Z. SARS-CoV-2 and COVID-19: How much do we know? [J]. Acta Virologica, 2020, 64(3):288-296.
- [4] BRISCHETTO A, ROBSON J. Testing for COVID-19[J]. Aust Prescr, 2020, 43(6):204-208.
- [5] WANG H, LI G, ZHAO J, et al. An overview of nucleic acid testing for the novel coronavirus SARS-CoV-2 [J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7:571709.
- [6] STASI C, FALLANI S, VOLLER F, et al. Treatment for COVID-19: An overview[J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 889: 173644.
- [7] NG W H, LIU X, MAHALINGAM S. Development of vaccines for SARS-CoV-2[J]. F1000Res, 2020(9):1-10.
- [8] ESPRIT A, DE MEY W, BAHADUR SHAHI R, et al. Neo-Antigen mRNA Vaccines[J]. Vaccines (Basel), 2020, 8(4):1-6.
- [9] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. Science, 1990, 247(4949 Pt 1): 1465-1468.
- [10] DEERING R P, KOMMAREDDY S, ULMER J, et al. Nucleic acid vaccines: prospects for non-viral delivery of mRNA vaccines[J]. Expert Opinion on Drug Delivery, 2014, 11(6):885-899.
- [11] BOUZZAOUI A, ABDELLATIF A A H, AL-ALLAF F A, et al. Strategies for vaccination: conventional vaccine approaches versus new-generation strategies in combination with adjuvants[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(2):1-11.
- [12] JACKSON N A C, KESTER K E, CASIMIRO D, et al. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective [J]. NPJ Vaccines, 2020, 5(1):11-14.
- [13] BELLIVEAU N M, HUFT J, LIN P J, et al. Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2012, 1:e37.
- [14] WANG Y, ZHANG Z, LUO J, et al. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy[J]. Molecular Cancer, 2021, 20(1):33-36.
- [15] 崔潇, 马亚平, 张亚柯, 等. Anti-HER2 免疫脂质体的制备及其靶向特异性的检测[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2021, 34(2):96-102.
- [16] POLAND G A, OVSYANNIKOVA I G, CROOKE S N, et al. SARS-CoV-2 vaccine development: Current status [J]. Mayo Clinic Proceedings, 2020, 95(10):2172-2188.

(上接第 83 页)

- [36] 杨强, 冯娇, 刘煜莹, 等. TPGS 修饰载精氨酸脱亚胺酶环糊精脂质纳米粒的酶活性和药动学研究[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(3): 362-366.
- [37] FARUK T. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors[J]. Journal of Oncology, 2012, 2012: 647684.
- [38] LIU Q, DAS M, LIU Y, et al. Targeted drug delivery to melanoma[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2018, 127: 208-221.
- [39] ATLAS N. Genomic classification of cutaneous melanoma[J]. Cell, 2015, 161(7): 1681-1696.
- [40] NAPOLITANO S, BRANCACCIO G, ARGENZIANO G, et al. It is finally time for adjuvant therapy in melanoma[J]. Cancer Treatment Reviews, 2018, 69: 101-111.
- [41] ZORATTI M J, DEVJI T, LEVINE O, et al. Network meta-analysis of therapies for previously untreated advanced BRAF-mutated melanoma[J]. Cancer Treatment Reviews, 2019, 74: 43-48.
- [42] FONTANA F, RAIMONDI M, DOMIZIO A D, et al. Unraveling the molecular mechanisms and the potential chemopreventive/therapeutic properties of natural compounds in melanoma[J]. Seminars in Cancer Biology, 2019, 59: 266-282.
- [43] FERRAZ C, JUNIOR R G D O, OLIVEIR A, et al. Complexation with β -cyclodextrin enhances apoptosis-mediated cytotoxic effect of harman in chemoresistant BRAF-mutated melanoma cells[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 150: 105353.
- [44] JOSHI M., RIZVI S M, BELANI C P, et al. Afatinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer[J]. Cancer Manag Research, 2015, 7: 75-82.
- [45] PETERS S, ZIMMERMANN S, ADJEI A A. Oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer: Comparative pharmacokinetics and drug-drug interactions[J]. Cancer Treatment Reviews, 2014, 40(8): 917-926.
- [46] PARVATHANENI V, ELBATANONY R S, SHUKLA S K, et al. Bypassing P-glycoprotein mediated efflux of afatinib by cyclodextrin complexation-Evaluation of intestinal absorption and anti-cancer activity[J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 327: 114866.