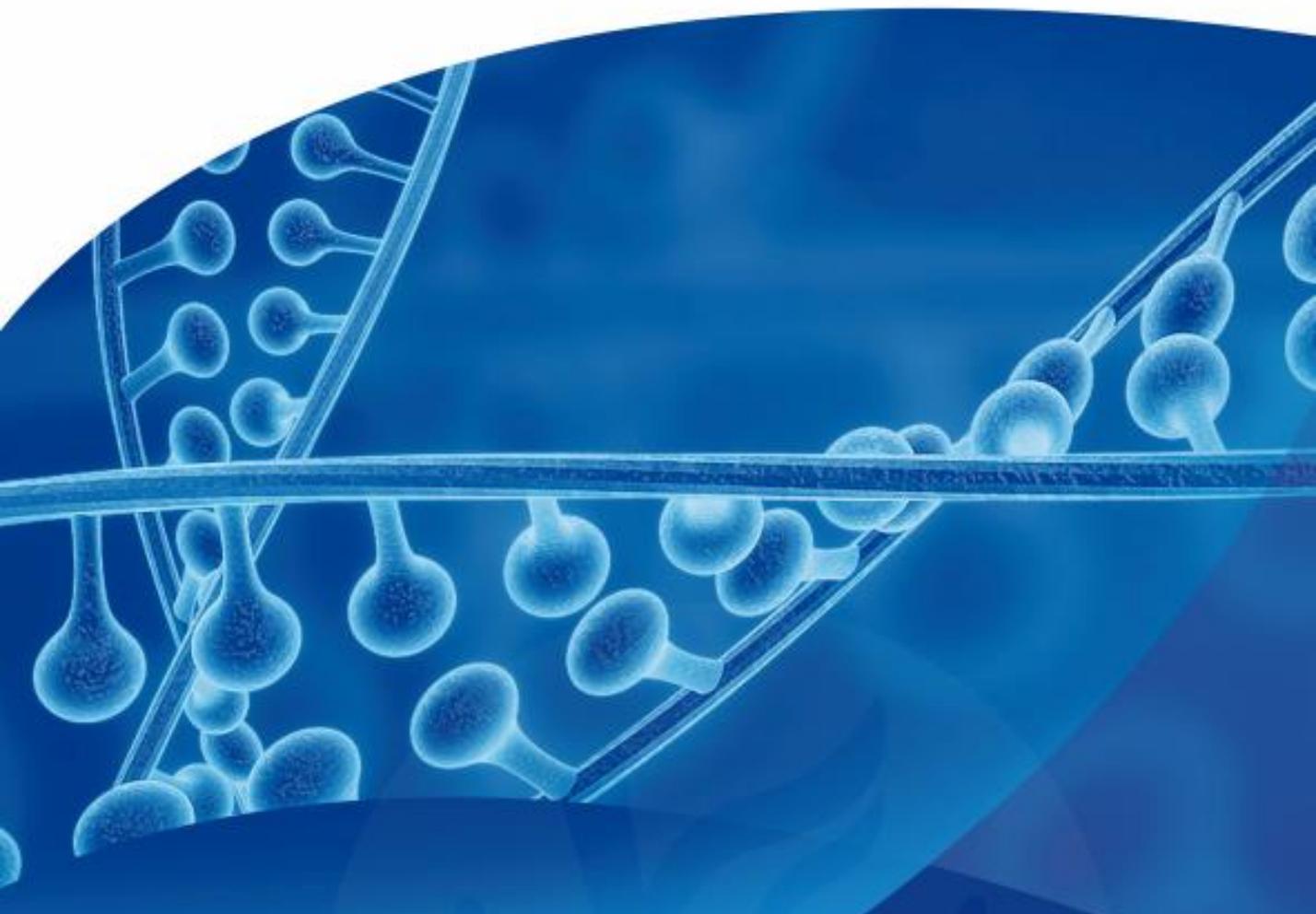


组织特异性LNP递送 基础知识手册



咨询电话：133 8033 2910
耀海生物技术(北京)有限公司

扫码
关注



目录

1. LNP-RNA靶向递送策略

1.1 选择性器官靶向LNP (SORT LNP)

1.2 配体修饰LNP

1.3 新型脂质开发

2. 组织特异性LNP递送研究进展

2.1 肺靶向LNP的开发

2.1.1 雾化稳定性

2.1.2 永久性阳离子脂质SORT LNP

2.1.3 多尾可电离磷脂 (iPhos) -LNP

2.1.4 酰胺系列可电离脂质-LNP

2.2 淋巴器官靶向LNP的开发

2.2.1 脾脏靶向LNP

2.2.2 T细胞靶向LNP

2.2.3 淋巴结靶向LNP

2.3 骨靶向LNP的开发

2.3.1 造血干细胞靶向LNP

2.3.2 骨微环境靶向LNP

2.3.3 骨平衡修复微载体 (BHRC)

2.4 脑靶向LNP的开发

2.4.1 神经递质衍生类脂质 (NT-类脂质)

2.4.2 高通量脑靶向LNP筛选平台

2.5 胰腺靶向LNP的开发

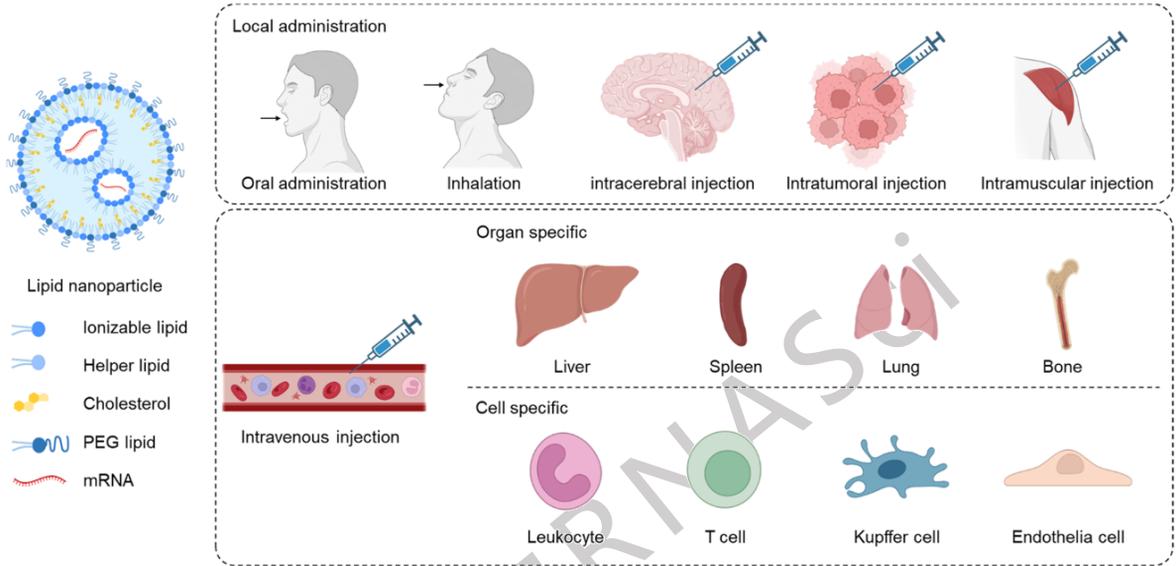
2.5.1 类脂-LNP

2.5.2 生物可降解脂质LNP

1. LNP-RNA靶向递送策略

脂质纳米颗粒（LNP）的成功是RNA药物开发的重大突破，LNP主要组分包括可电离阳离子脂质、PEG脂质、磷脂和胆固醇。当前广泛使用的LNP配方最初是以肝脏为靶器官进行开发的，其肝脏趋向性限制了在肝脏外疾病的应用。

目前LNP的研究重点为：如何将mRNA等核酸药物递送至特定器官、特定组织或特定细胞？



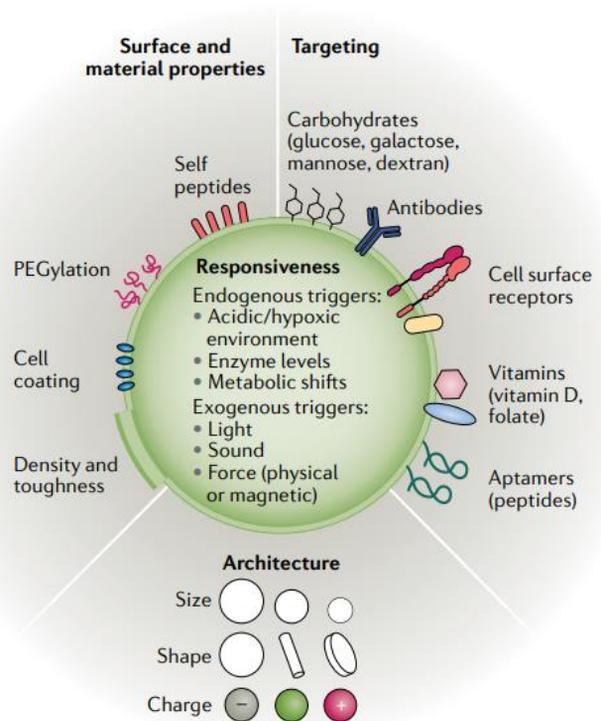
ACS Nanoscience Au 2023 3 (3), 192-203.

给药方式直接影响药物的递送位置。

为了实现LNP-RNA的部位特异性递送，多种给药途径已经被应用，包括口服、吸入和局部注射（肌肉内、肿瘤内和脑内注射）等。

静脉注射是另一种高生物利用度的给药途径。为了将LNP-RNA递送至靶向部位，还需对LNP进行优化，以改善其生物分布和脱靶效应。目前报道的LNP优化策略包括：

- 添加靶向分子（如SORT分子）；
- 配体修饰LNP（如多肽、抗体等）；
- 筛选新型脂质（可电离脂质等）。

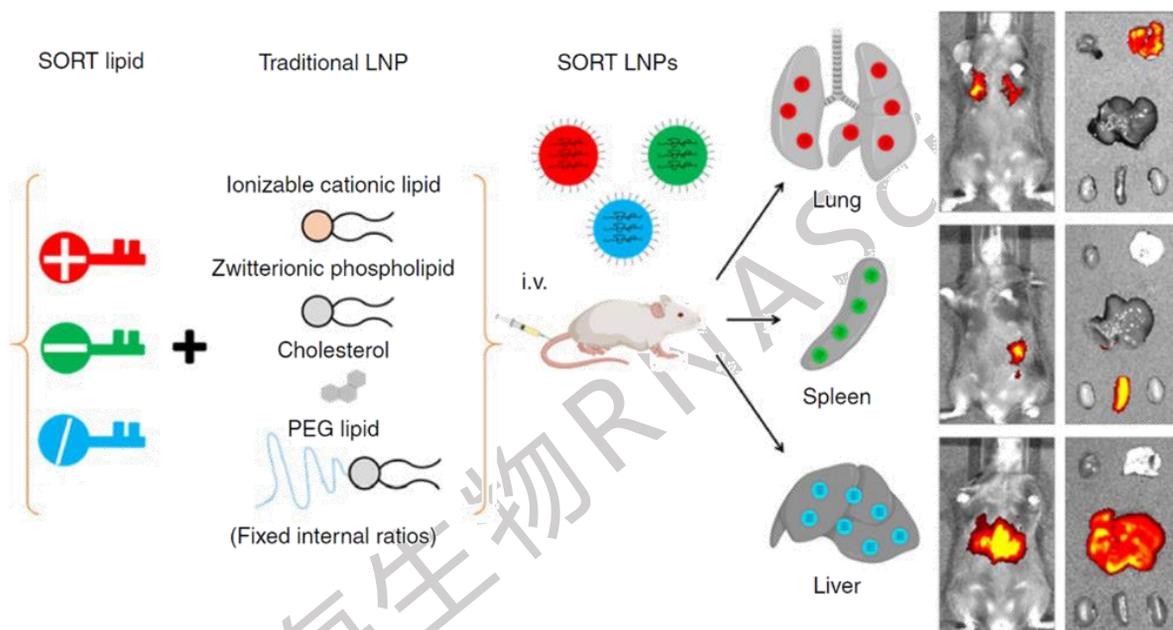


Nat Rev Drug Discov. 2021; 20(2):101-124.

1.1 选择性器官靶向LNP（SORT LNP）

2020年，德克萨斯大学西南医学中心Daniel J Siegwart报道了一种选择性器官靶向LNP（SORT LNP）递送平台。

传统的LNP是一种4组分脂质，包含可电离阳离子脂质、两性亲脂、胆固醇和聚乙二醇（PEG）。而SORT LNP添加了一种补充成分（SORT 分子），精确地改变了RNA的体内分布。其中，肺靶向的SORT分子是一种永久电离阳离子脂质（DOTAP），脾脏靶向SORT分子是阴离子脂质（18PA），肝脏靶向的SORT分子是一种阳离子脂质（DODAP）。



Nat Nanotechnol. 2020;15(4):313-320.

2022年，Siegwart在*Natural Protocols*公开了SORT LNP的制备方法，包括移液枪混合法、涡旋混合法和微流控混合法。其中微流控混合法的LNP各脂质摩尔比例如下表所示；总脂质与mRNA的质量比为40/1（wt/wt）。

Formulations	DOTAP / 18PA	MC3	DSPC	Cholesterol	DMG-PEG
MC3 LNP (liver)	0	50	10	38.5	1.5
50% DOTAP (lung)	50	25	5	19.25	0.75
30% 18PA (spleen)	30	35	7	26.95	1.05

Nat Protoc. 2023;18(1):265-291.

1.2 配体修饰LNP

将特异性配体（如抗体、多肽、蛋白等）掺入到脂质纳米颗粒（LNP）的表面，能够促进LNP直接或间接靶向特定受体，由此借助LNP实现被包封物质（mRNA、circRNA、siRNA等）的靶向递送。

连接配体与LNP的方法包括SATA-马来酰亚胺法、巯基-马来酰亚胺法、点击化学法、ASSET（锚定二抗scFv靶向平台）等。关于配体修饰LNP的研究详见下表：

配体类型	靶器官/细胞	配体-靶点	配体-LNP偶联方式	参考文献
抗体 / 抗体片段	白细胞	Ly6c抗体	ASSET	PMID: 30374059
	T细胞	CD3抗体	巯基-马来酰亚胺法	PMID: 35078042
	T细胞	CD5抗体	SATA-马来酰亚胺法	PMID: 38513098
	T细胞	CD3, CD28抗体	巯基-马来酰亚胺法	PMID: 38419362
	T细胞	CD3, CD5, CD7抗体	巯基-马来酰亚胺法	PMID: 38072809
	T细胞	CD4抗体	SATA-马来酰亚胺法	PMID: 34091054
	干细胞	CD117抗体	巯基-马来酰亚胺法	PMID: 36988645
	干细胞	CD117抗体	SATA-马来酰亚胺法	PMID: 37499029
	干细胞	CD45抗体	巯基-马来酰亚胺法	PMID: 39078677
	肿瘤细胞	EGFR抗体	ASSET	PMID: 33208369
	脑血管	VCAM-1抗体 / CD106 抗体	点击化学法	PMID: 32005712
	胎盘	EGFR抗体	SPAAC点击化学法	PMID: 38789090
	肺	PECAM-1/CD31抗体	SATA-马来酰亚胺法	PMID: 30336167
	肺	PV1抗体片段Fab-C4	Diels-Alder反应	PMID: 32155049
	蛋白/多肽	心脏血管	模块化人工膜结合蛋白AMBp	SpyCatcher-SpyTag反应
病毒特异性T细胞		pMHC+光敏肽	TCEP-马来酰亚胺	PMID: 35196075
白细胞亚群		整合素结合 MAdCAM-1-Fc	巯基-马来酰亚胺法, ASSET	PMID: 34140675
光感细胞		七肽	DSPE-PEG-马来酰亚胺	PMID: 36630502

1.3 新型脂质开发

商业化的LNP组分包括可电离阳离子脂质、辅助磷脂、PEG脂质和胆固醇，各脂质结构特征如下：

- 可电离阳离子脂质：头部（叔胺）、连接片段（酯键）和尾部（饱和/或不饱和的脂肪链）；
- 辅助磷脂DSPC：磷脂酰胆碱头部和2个饱和的18碳尾部；
- PEG-DMG：甘油的1-3位碳分别连接2个长链饱和脂肪酸（肉豆蔻酸）和PEG2000；
- 胆固醇：亲水性头部（羟基）、四个耦合在一起的环和疏水性尾巴（饱和碳链）。

理性设计新型脂质是一种实现LNP靶向递送的有效策略，如将特殊基团掺入阳离子脂质、辅助磷脂、胆固醇或PEG脂质。

脂质类型	靶器官/细胞	脂质特征	参考文献
阳离子/可电离脂质	骨髓单核细胞	含磷酸盐的可电离脂质	PMID: 35616998
	骨髓间充质干细胞	骨归巢肽靶向脂质	PMID: 30954673
	脾脏B淋巴细胞	可降解脂质OF-Deg-Lin	PMID: 28681930
	脾脏T淋巴细胞	金刚烷基-可电离脂质	PMID: 31465135
	巨噬细胞溶酶体	维生素C-可电离脂质	PMID: 31907443
	脾脏	类脂tB-UC18	PMID: 34278613
	STING通路	环胺头基、不饱和脂质尾部、二氢咪唑接头	PMID: 31570898
	肺	含酰胺键的尾部	PMID: 35173043
	子宫	多胺脂质	PMID: 33523869
	淋巴结	甲基, 短尾, 酯接头	PMID: 35969778
辅助磷脂	次级淋巴器官	磷脂酰丝氨酸脂质	PMID: 36194390
	肝脏免疫细胞	金刚烷基-磷脂	PMID: 33758781
PEG脂质	肝窦内皮细胞	甘露糖-DSPE-PEG	PMID: 33637537
	骨髓内皮细胞	烷基尾 PEG脂质	PMID: 30394729
	树突状细胞 (DC)	甘露糖-PEG脂质	PMID: 29249397
胆固醇	骨髓源性树突状细胞	甘露糖-胆固醇胺结合物	PMID: 31290323
	肝内皮/免疫细胞	氧化胆固醇	PMID: 30748040
	肝内皮细胞	酯化胆固醇	PMID: 30016076

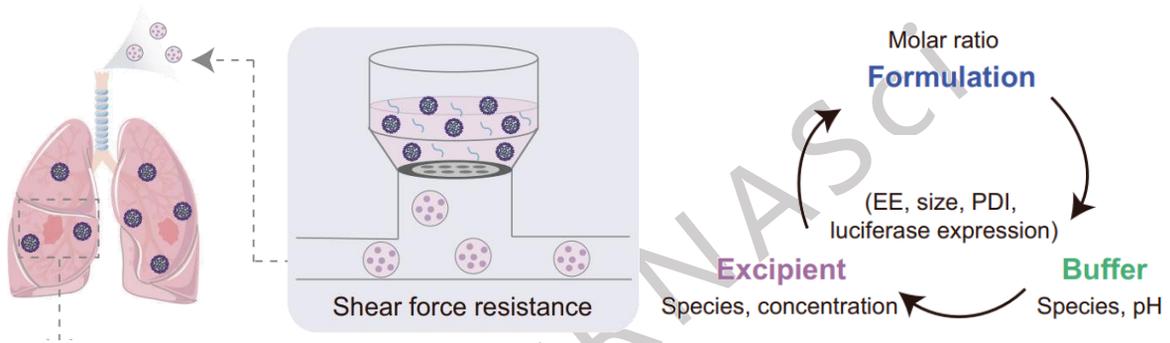
2. 组织特异性LNP递送研究进展

2.1 肺靶向LNP的开发

2.1.1 雾化稳定性

吸入给药是将LNP-RNA直接递送到肺部的有效途径。吸入式LNP-RNA需克服的难题是：优化LNP制剂抵抗雾化器的强大剪切力，维持LNP-RNA的稳定性和递送效率。

具体策略为LNP处方优化。如PEG脂质或辅助脂质的摩尔占比、优化胆固醇结构（如 β -谷甾醇）、添加赋形剂（如亲水性支化聚合物），或者优化LNP透析缓冲液等【PMID: 34616046; PMID: 36038136; PMID: 37985700; PMID: 39122711】。

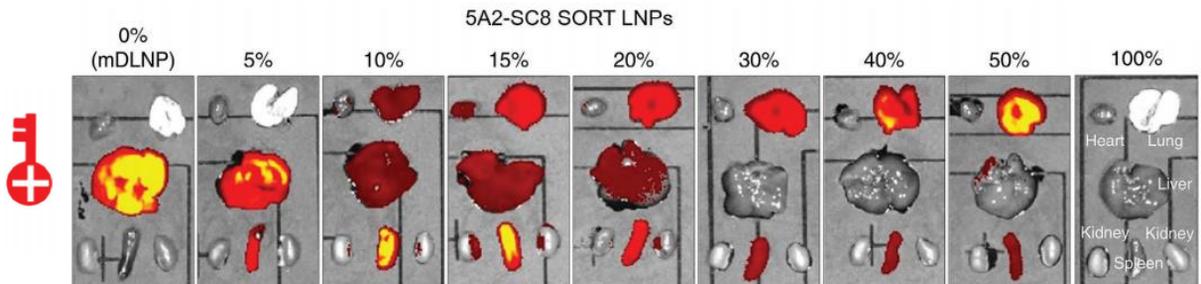


2.1.2 永久性阳离子脂质SORT LNP

在常规四组分LNP中添加一种选择性器官靶向（SORT）分子，可以精准改变RNA的体内分布。

得克萨斯大学Siegwart团队报道了一种永久性阳离子脂质1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷（DOTAP）用于SORT LNP的开发。结果显示，常规四组分LNP（即不含DOTAP的LNP）主要富集在肝脏中；而随着LNP中DOTAP的添加量逐渐增加，mRNA介导的目的蛋白表达位置逐渐从肝脏转移到脾脏、然后到肺部，DOTAP摩尔比为50%时最适合用于肺部递送【PMID: 32251383】。

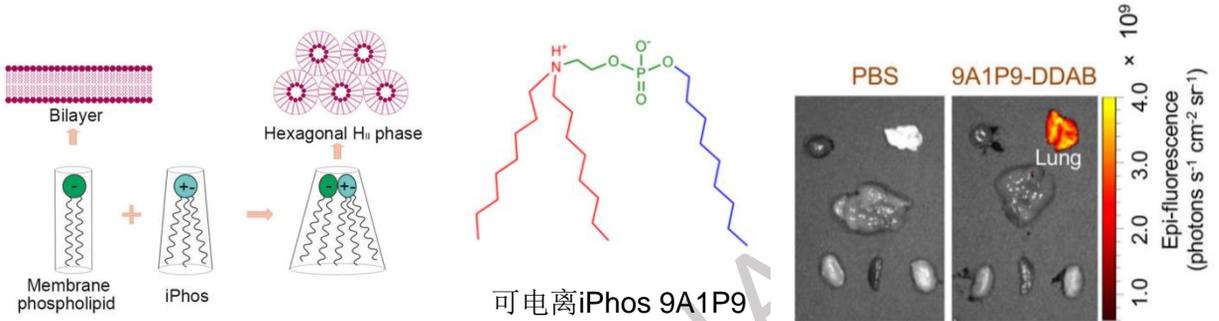
永久性阳离子脂质定义为带正电荷、且不解离或 $pK_a > 8$ 的阳离子脂质。



2.1.3 多尾可电离磷脂 (iPhos) -LNP

基于SORT LNP的五组分LNP增加了配方复杂性。为维持四组分LNP，Siegwart团队针对SORT LNP进行了优化。

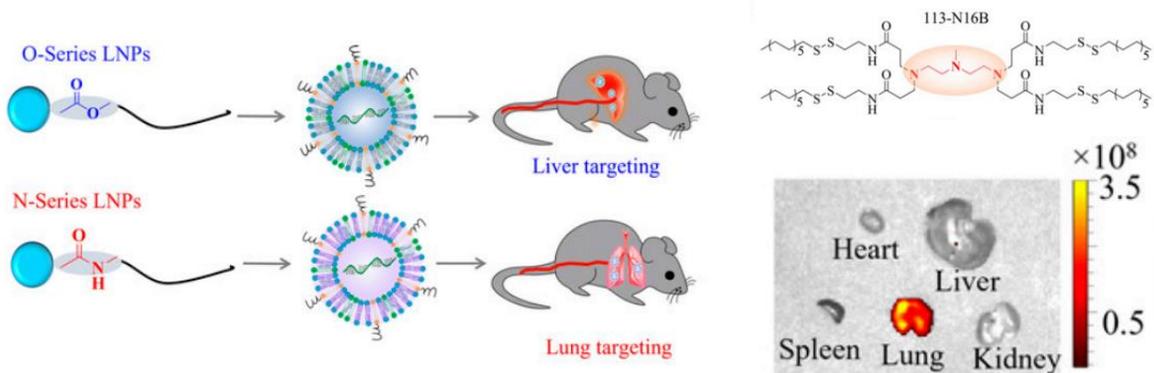
他们发现一种可电离磷脂9A1P9，包含一个可电离胺、一个磷酸基团和三个疏水尾部，称为可电离多尾磷脂 (iPhos)。由可电离iPhos、永久性阳离子脂质DDAB、PEG脂质和胆固醇组成的LNP能够将RNA靶向递送至肺部【PMID: 33542471; PMID: 34035211】。



2.1.4 酰胺系列可电离脂质-LNP

目前商业化的可电离阳离子脂质，如DLin-MC3-DMA、SM-102、ALC-0315，其结构特征是由头部（叔胺）和尾部（饱和/或不饱和的脂肪链）由酯键连接。

塔夫茨大学Xu等发现，将可电离阳离子脂质尾部的酯键替换为酰胺键（类脂分子113-N16B），能够将mRNA的递送位置从肝脏转移至肺部。研究在淋巴管平滑肌瘤病（LAM）小鼠模型中验证了这一肺靶向性LNP的递送效率【PMID: 35173043】。



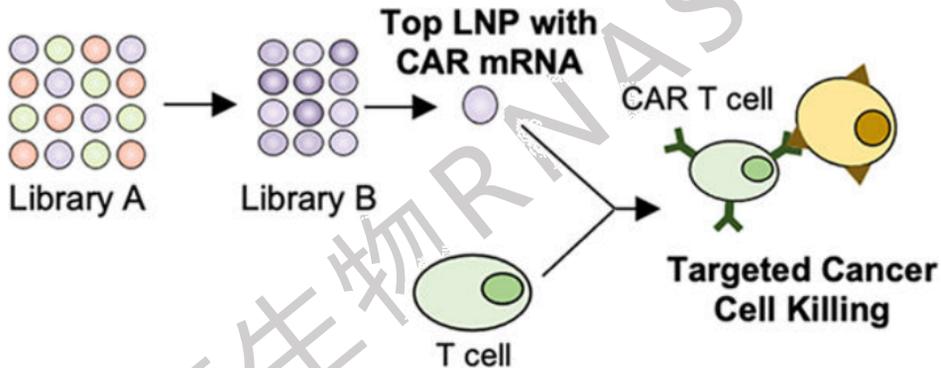
2.2.2 T细胞靶向LNP

T细胞是脾脏的重要细胞群，是免疫疗法的关键靶点。嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）疗法在血液肿瘤治疗领域具有重大突破，而CAR-T疗法的限制在于体外培养、改造细胞的工艺复杂性。

随着mRNA与LNP体内递送技术的成熟，使用LNP将CAR mRNA递送至体内实现原位CAR-T治疗成为一种可能。这一研究领域中，T细胞靶向的LNP开发是热点研究方向之一，多项研究发表了基于mRNA-LNP的原位CAR T疗法的概念验证试验。

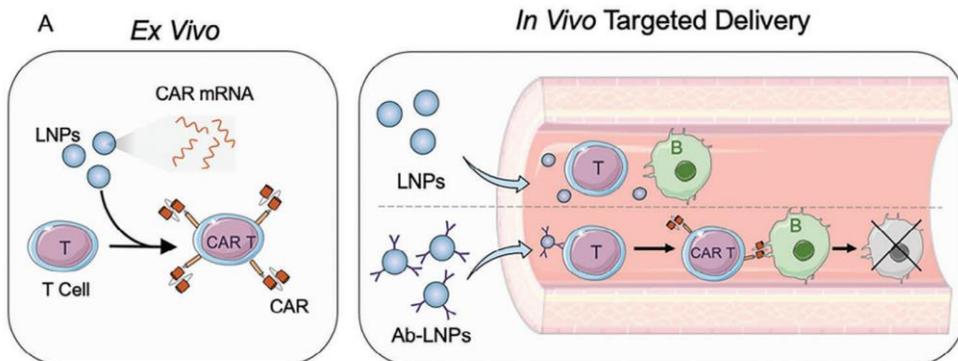
第一种策略为**筛选新型LNP脂质配方**。宾大Michael J Mitchell团队利用实验设计（DoE）筛选得到一种最佳的B10 LNP制剂，能够在T细胞中诱导CAR表达，且具有较低的细胞毒性和有效的癌细胞杀伤能力【PMID: 34669421】。

有研究筛选到一种含咪唑的LNP递送载体，成功递送mRNA至小鼠T淋巴细胞【PMID: 32662132】。



第二种策略为**抗体偶联LNP（Ab-LNP）**，这也是诺奖得主Weissman与宾大Mitchell团队的主攻方向之一。通过将针对T细胞标志物（CD4、CD3、CD5和CD7等）的抗体偶联至LNP表面，能够将mRNA特异性递送至T细胞【PMID: 35078042; 38513098; 38419362; 38072809; 34091054】。

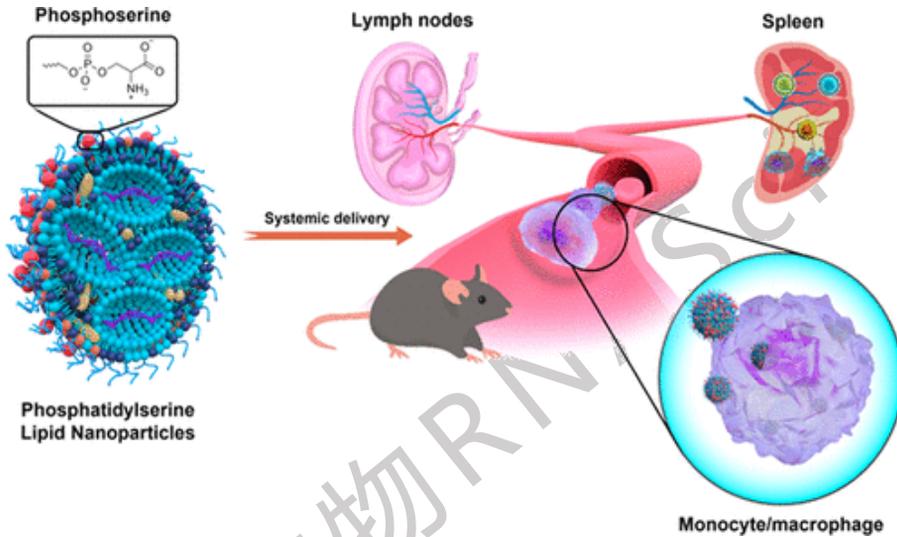
通过定制化的CAR mRNA，如肿瘤杀伤分子CD19、心衰标志物成纤维细胞活化蛋白（FAP）等，原位CAR-T平台有望应用于各种疾病的治疗。



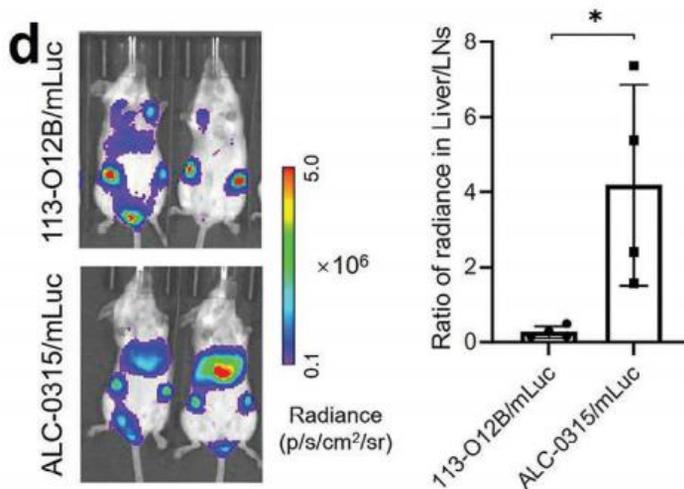
2.2.3 淋巴结靶向LNP

淋巴结是肿瘤免疫治疗中的重要组织。将免疫功能分子（如mRNA）递送到淋巴结能够促进抗原呈递、激活白细胞或抗肿瘤蛋白，是一种有效的增强肿瘤免疫治疗的策略。

使用阴离子替代辅助脂质改变mRNA的趋向性，是一种淋巴器官靶向的LNP开发策略。康乃尔大学Shaoyi Jiang教授团队设计了一种阴离子脂质（磷脂酰丝氨酸(PS)）-LNP，即将PS添加到含MC3的标准四组分LNP中，全身给药后将mRNA递送至淋巴结和脾脏【PMID: 36194390】。



塔夫茨大学与中山大学孙逸仙纪念医院合作发表了一种淋巴结靶向的LNP（113-O12B），其结构特征为甲基、短尾、酯接头。与ALC-0315的肝脏趋向性不同，113-O12B LNP递送增加了mRNA在淋巴结中的表达。通过113-O12B LNP递送肿瘤抗原mRNA（皮下给药），在B16F10肿瘤模型中观察到显著的肿瘤抑制作用。



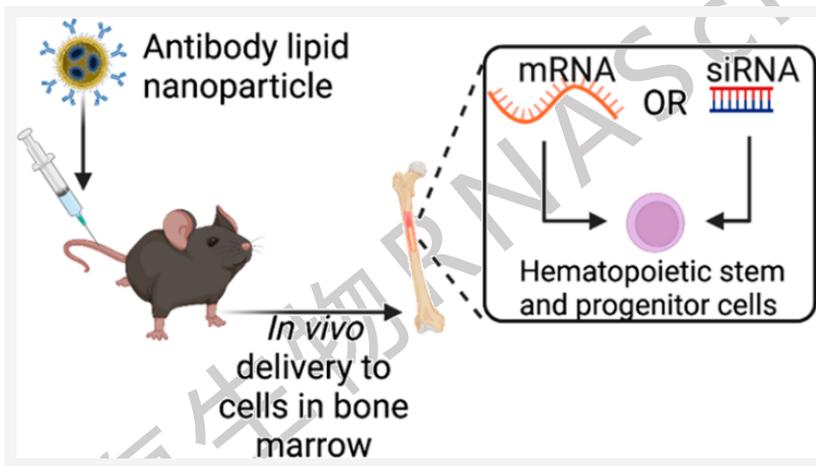
2.3 骨靶向LNP的开发

2.3.1 造血干细胞靶向LNP

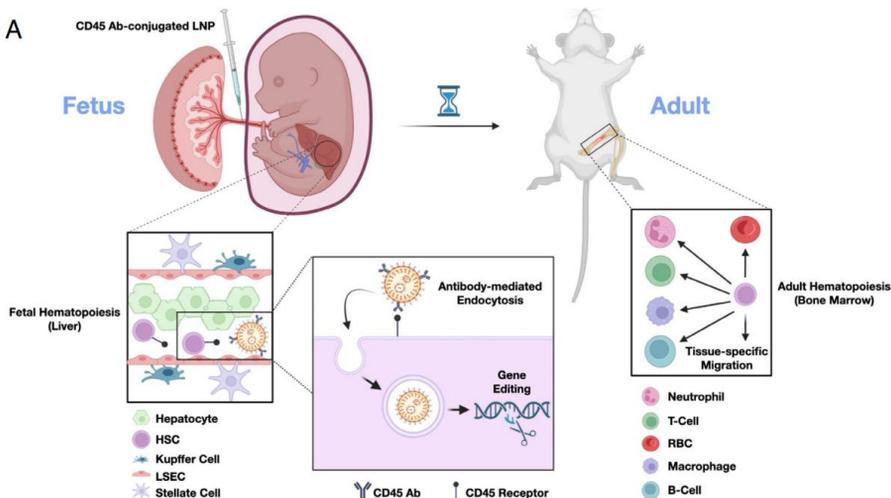
造血干细胞（HSC）基因编辑疗法在单基因遗传病的治疗方面具有巨大的前景。

2023年，*Nano Letters* 和 *Science* 杂志先后发表了抗体偶联LNP（Ab-LNP）策略将mRNA靶向递送至造血干细胞的研究成果，作者分别为麻省理工学院Daniel G. Anderson团队、费城儿童医院Stefano Rivella合作宾夕法尼亚大学Hamideh Parhiz团队【PMID: 36988645; 37499029】。

两项研究都使用了CD117抗体偶联LNP。Anderson团队使用Ab-LNP递送Cre重组酶mRNA，验证了递送系统的造血干细胞和祖细胞（HSPC）靶向性。而Rivella团队进一步尝试了CD117 Ab-LNP递送治疗性mRNA的潜力，包括促凋亡蛋白mRNA（PUMA mRNA）和基因编辑mRNA/gRNA。



2024年，宾夕法尼亚大学Mitchell Lab和费城儿童医院Peranteau合作在 *PNAS* 发表了Ab-LNP的研究成果。与上述两项研究不同的是，他们使用了CD45抗体作为LNP偶联配体，在小鼠模型中验证了CD45 Ab-LNP靶向递送CRISPR mRNA/sgRNA的能力【PMID: 39078677】。



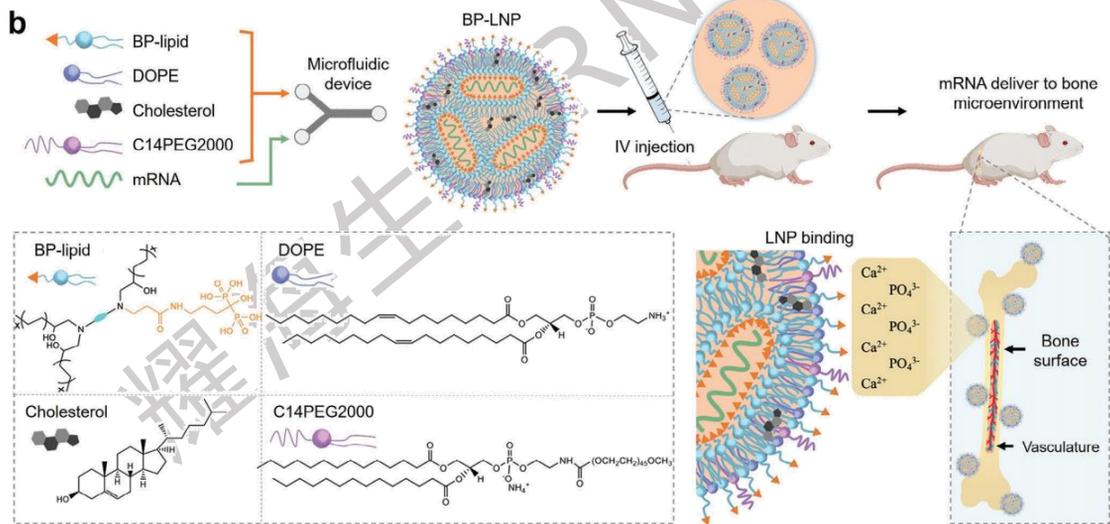
2.3.2 骨微环境靶向LNP

由于多种生物障碍，例如骨骼血流量低、血-骨髓屏障以及药物与骨矿物质之间的低亲和力，药物的骨骼微环境递送是一个重大挑战。

2022年，宾大Mitchell和Weissman（诺奖得主）合作构建了一系列对骨矿物质具有高亲和力的双膦酸盐（BP）脂质样材料，用来将mRNA治疗药物有效地递送到体内骨骼微环境【PMID: 35616998】。

研究人员对配制成LNP的BP脂质样材料进行体外筛选后，确定了一种候选制剂490BP-C14。经小鼠体内研究表明，与不含BP的490-C14 LNP相比，490BP-C14在小鼠骨微环境中的mRNA表达和定位增强。经静脉给药后，BP-LNP增强了治疗性骨形态发生蛋白2（BMP-2）mRNA的靶向递送和蛋白分泌。

这些结果证明了BP-LNP递送到骨微环境的潜力，可能用于一系列mRNA治疗应用，包括再生医学、蛋白质替代和基因编辑疗法。

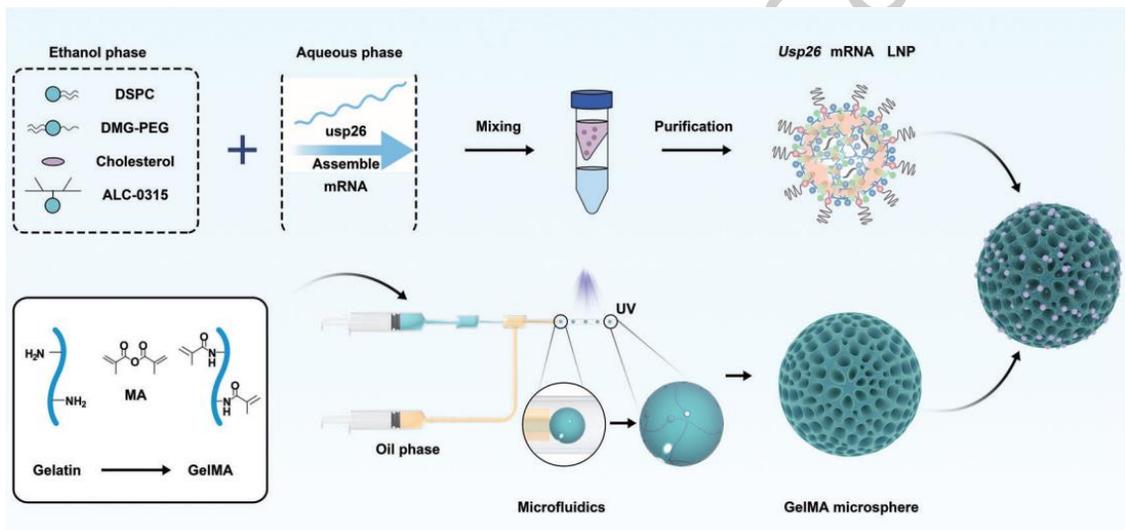


2.3.3 骨平衡修复微载体（BHRC）

成骨细胞-破骨细胞（OB-OC）的平衡对于骨修复至关重要。泛素特异性蛋白酶 26（USP26）能够独立调节 β -catenin 和 I κ B- α 进而协调 OB-OC间的相互影响，是骨质疏松治疗的重要靶点。

2024年8月，瑞金医院/上海市伤骨科研究所邓廉夫教授团队开发了一种微球-LNP递送系统，评估了其对USP26 mRNA的递送效率。他们构建了骨平衡修复微载体（BHRC），在 MMPs 响应型 GelMA 水凝胶微球中包封了 Usp26 mRNA -LNP【PMID: 39155412】。

结果表明，mRNA-LNP表现出均匀的粒径和高转染效率，而GelMA水凝胶微球具有出色的生物相容性和MMP响应性，提供了良好的细胞存活空间和可控的mRNA-LNP释放。释放的LNP有效上调 USP26蛋白表达，有效促进成骨，同时抑制破骨细胞形成。体内实验表明，将 BHRC 注射到骨质疏松大鼠椎间盘缺损部位，通过响应微环境和调节细胞间相关作用，显著促进尾椎融合。



2.4 脑靶向LNP的开发

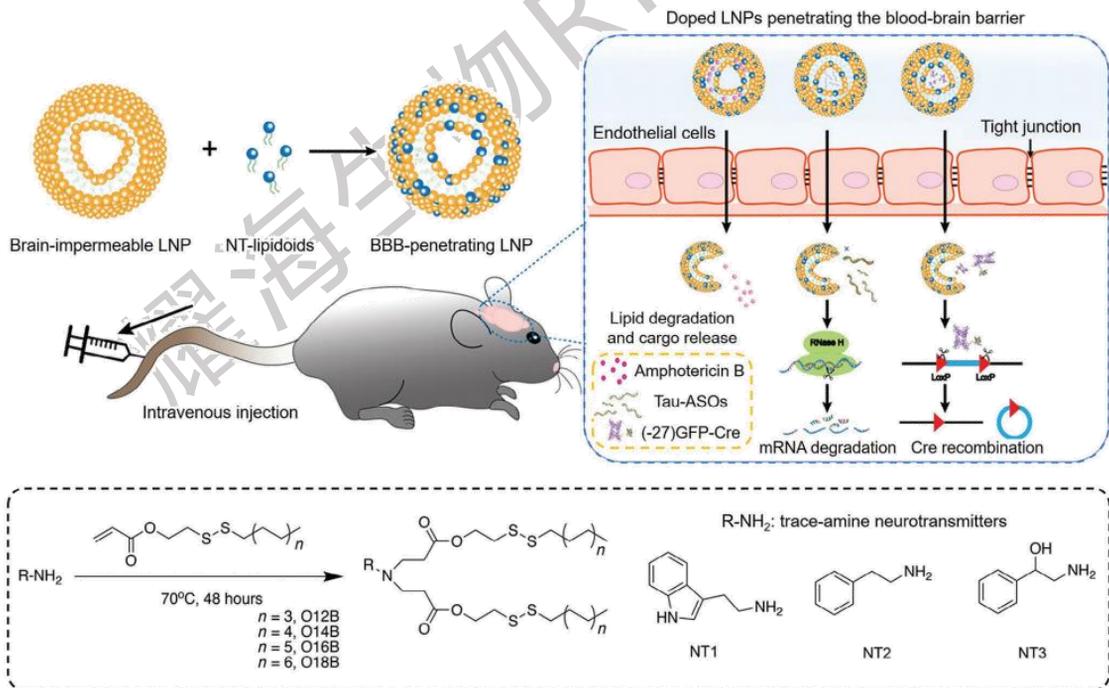
中枢神经系统（CNS）疾病包括阿尔兹海默症（AD）、帕金森综合征（PD）、多发性硬化症（MS）、卒中、癫痫、偏头痛、脑胶质瘤等。全身给药方式下，血脑屏障（BBB）是向中枢神经系统（CNS）递送亲水性大分子的重要阻碍。

脂质纳米颗粒（LNP）是当前唯一获批的非病毒递送载体，在临床阶段药物中也广泛使用。基于LNP开发特异性器官靶向递送系统是一大趋势。

2.4.1 神经递质衍生类脂质（NT-类脂质）

靶向血脑屏障相关受体可能是将药物输送到大脑的有效策略。2020年，塔夫茨大学许巧兵团队发现了一种基于神经递质衍生类脂质（NT-类脂质）的LNP递送系统，它能够用于增强几种血脑屏障不可渗透型药物的大脑内递送【PMID: 32832671】。

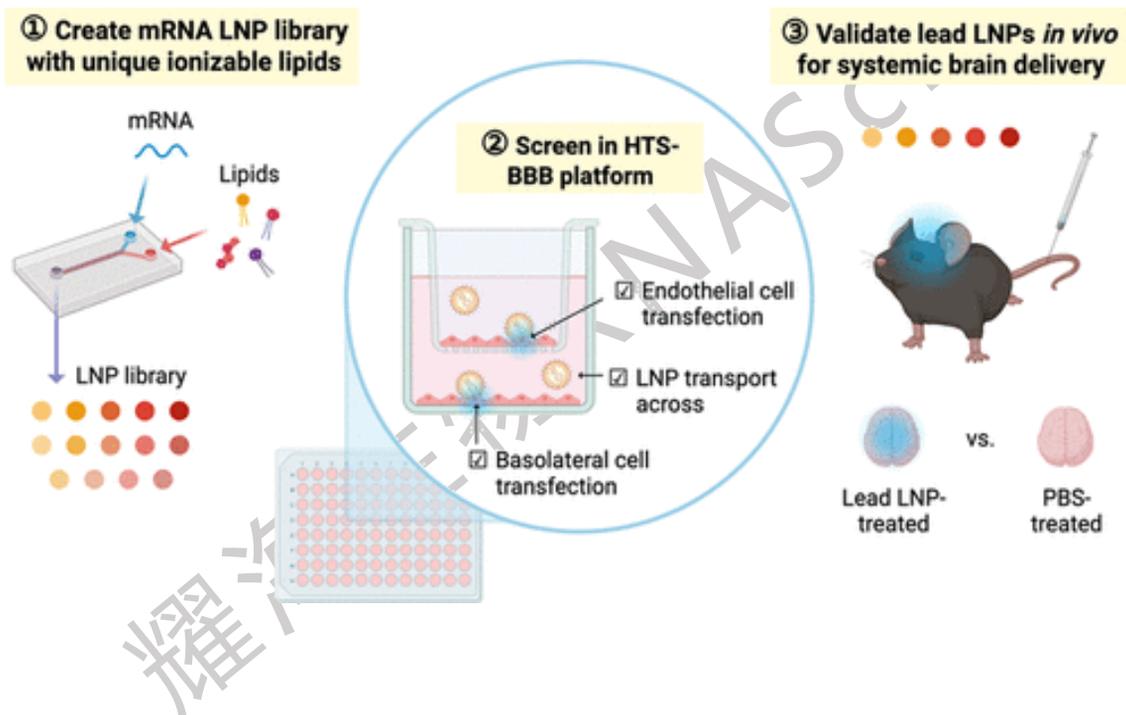
研究人员通过将 NT 脂质掺入到 LNP 中，使 LNP 能够穿过血脑屏障，通过全身静脉给药成功将小分子化合物、反义寡核苷酸（ASO）和基因组编辑融合蛋白 GFP-Cre 重组酶递送到小鼠大脑中。



2.4.2 高通量脑靶向LNP筛选平台

2024年，宾夕法尼亚大学 Mitchell 实验室发表关于血脑屏障靶向性mRNA LNP的研究成果。他们设计了一种高通量筛选转运孔板平台（HTS-BBB），专门为筛选血脑屏障特异性mRNA LNP进行了优化。与大多数仅评估跨内皮单层运输的转运孔板试验不同，HTS-BBB 可同时测量 LNP 转运和内皮细胞本身的 mRNA 转染【PMID: 38259198】。

他们借助 HTS-BBB 平台筛选了由14种不同结构的可电离脂质组成的LNP库，并验证了候选脂质在静脉注射后向小鼠大脑递送 mRNA 的能力，证明了这一筛选平台的性能。该平台可应用于一系列脑靶向的mRNA蛋白替代疗法和基因编辑疗法。



2.5 胰腺靶向LNP的开发

脂质纳米颗粒（LNP）是临床上最先进的RNA递送系统，但其应用主要受限于全身给药的肝细胞靶向和肌肉注射疫苗给药。为释放mRNA疗法在各种疾病中的全部潜力，真正的需求是实现LNP的器官靶向递送。

胰腺靶向LNP的突破有望为糖尿病和胰腺癌等胰腺疾病提供治愈机会。当前胰腺靶向LNP的开发策略包括LNP组分优化（可电离脂质和磷脂）和给药方式优化（腹膜注射）。

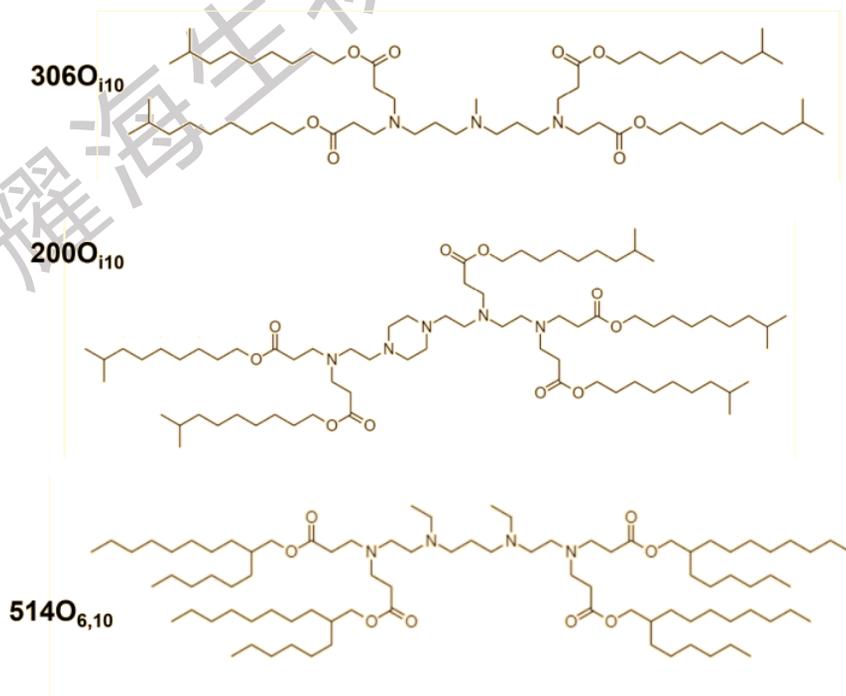
2.5.1 类脂-LNP

2023年，卡内基梅隆大学Kathryn A. Whitehead教授团队发表了胰腺靶向LNP-mRNA的研究成果。他们测试了3种可电离类脂质（类脂化合物：306O_{i10}，200O_{i10}，或514O_{6,10}）和3种辅助磷脂（两性离子辅助脂质DOPE、阴离子辅助脂质PS或阳离子辅助脂质DOTAP）【PMID: 36706177】。

结果显示，类脂质306O_{i10}对胰腺特异性的改善最显著；三种辅助磷脂在胰腺中产生的信号一致，其中阳离子辅助脂质DOTAP最大程度地降低了肝脏和脾脏中的脱靶表达。

研究还发现，相比静脉给药，LNP-mRNA的腹膜给药更有效地促进mRNA的胰腺递送和蛋白表达。

目前，胰腺的基因递送主要需要通过胰管输注病毒载体，而腹膜内注射LNP能降低患者的给药风险。

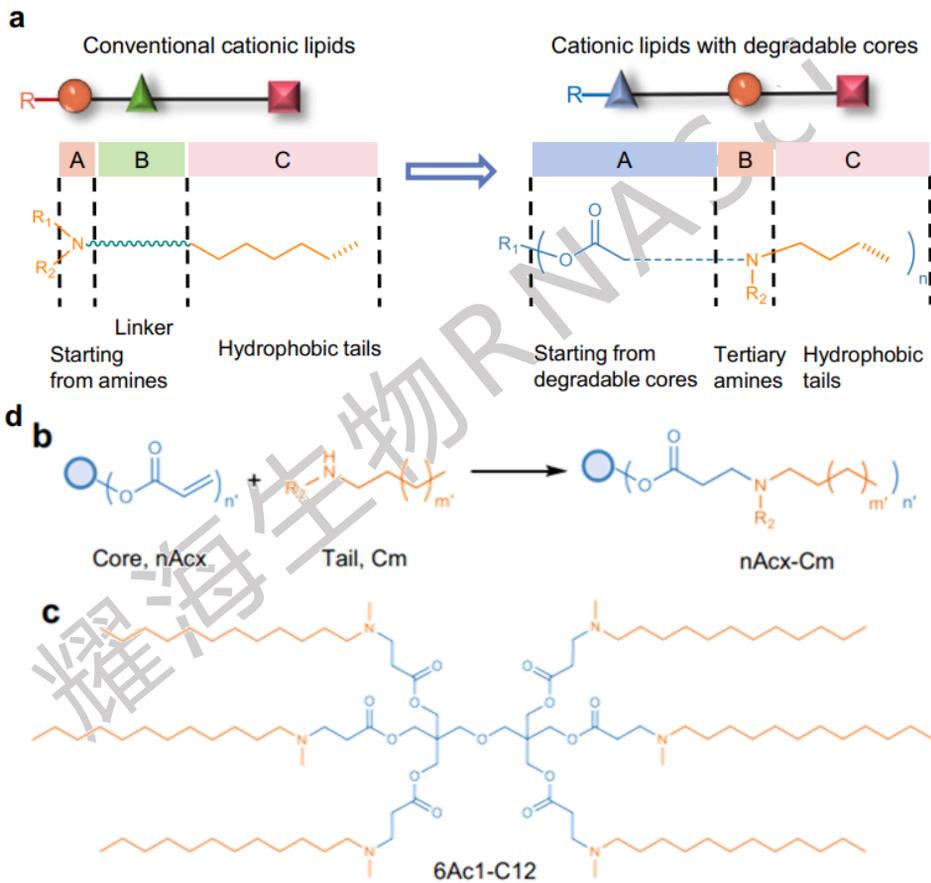


2.5.2 生物可降解脂质LNP

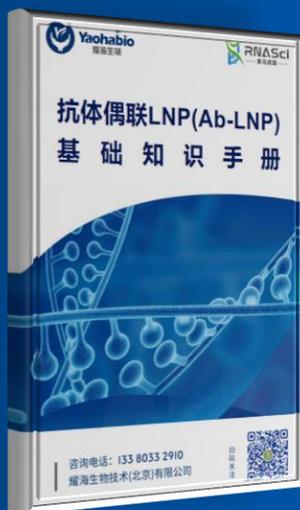
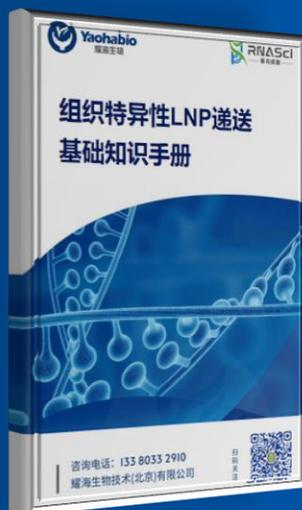
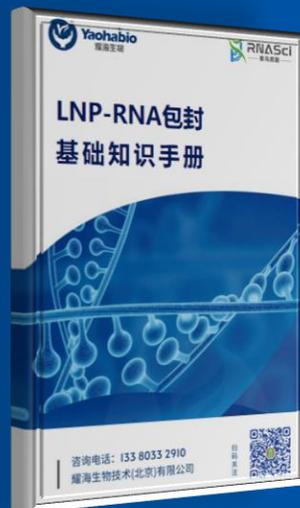
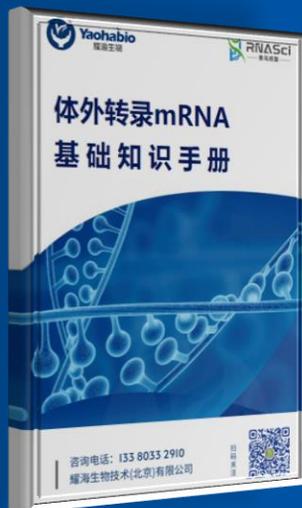
2024年7月，浙江大学药学院刘帅教授课题组在*Nature Communications*发表了靶向LNP的开发策略，他们证明了通过调整脂质结构或注射途径来实现器官选择性的可行性。

抛开常规的源自胺核的阳离子脂质，研究人员设计了具有可生物降解酯核（nAcx-Cm）的可电离子脂质库【PMID: 38969646】。

研究发现，在不同给药方式下6Ac1-C12 LNP与辅助脂质DOTAP的器官靶向性是不一致的，腹膜注射后其促进了mRNA在胰腺中的表达，而静脉注射后促进了mRNA在肺部的表达。



IVT RNA & LNP 系列手册



联系方式

电话：133 8033 2910

邮箱：CRO@yaohaibio.cn

网站：www.yaohaibio-pharma.com

地址：北京市大兴区生物医药基地好景象科技园C座4楼

