DOI:10.16016/j.2097-0927.202402048

以新型脂肽为佐剂的 LP-LNP 构建及其对 mRNA 疫苗的增效作用

曹静文[1,2],迟 宇[1],李郭成[2],程 浩[2],邓 炎[2],魏 静[1],朱 吉[2],高英英[1,3],李海波[2] 154007 黑龙江 佳木斯,佳木斯大学临床医学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系微生物与生化药学教研室,国家免疫生物制品工程技术研究中心[2]; 401320 重庆,重庆医科大学附属巴南医院检验科[3]

[**摘要**] **目的** 构建以新型脂肽为佐剂的递送系统脂肽-脂质纳米颗粒(lipopeptide-lipid nanoparticle,LP-LNP),初步探究其对 mRNA 疫苗的增效作用。**方法** 设计并合成 2 种新型脂肽 SS-10 和 SQ18,微流控技术将编码增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,eGFP)、萤火虫荧光素酶(firefly luciferase,F-luc)和卵清白蛋白(ovalbumin,OVA)的 mRNA 包载到 LP-LNP 中,构建以新型脂肽为佐剂的 mRNA 递送系统;利用动态光散射法表征 LP-LNP 的粒径、多分散系数;利用 HEK-Blue™ mTLR2 报告细胞检测其 Toll 样受体 2(Toll-like receptors 2, TLR2)的激活作用,筛选最优脂肽掺入比;将优选的 LP-LNP-eGFP-mRNA 转染至 HEK293T 细胞,荧光显微镜观察 eGFP 的表达;利用活体成像技术考察 LP-LNP-F-luc-mRNA 在小鼠体内的表达水平;流式细胞术评价 LP-LNP-OVA-mRNA 免疫小鼠后诱导引流淋巴结中树突状细胞(dendritic cells,DCs)成熟水平以及交叉递呈抗原的能力。**结果** 脂肽 SQ18 和 SS-10 分别以 0.50%、0.75%的摩尔比掺入后,得到的 LP-LNP 平均粒径分别为 127 和 121 nm,平均多分散系数分别为 0.11 和 0.08,包封率均在 90%以上,且体外安全性好;该配方条件下激活 TLR2 的能力显著强于阳性对照 Pam_2CSK_4($P<0.01$);优选的 LP-LNP 均可以实现有效的体外转染,其中 SQ18 以 0.50%掺入制备的 LP-LNP 体内转染效果显著优于传统 LNP($P<0.01$),且可以显著促进引流淋巴结 DCs 的成熟以及抗原的交叉递呈($P<0.05$)。**结论** 以新型脂肽为佐剂的 LP-LNP 可以增强 mRNA 的递送能力,进一步提高 mRNA 疫苗的免疫效果。

[**关键词**] 脂质纳米颗粒;mRNA 疫苗;佐剂;脂肽
[**中图法分类号**] R342.22; R914.2; R979.5 [**文献标志码**] A

Construction of LP-LNP with novel lipopeptides as adjuvants and its enhancing effects on mRNA vaccines

CAO Jingwen[1,2], CHI Yu[1], LI Guocheng[2], CHENG Hao[2], DENG Yan[2], WEI Jing[1], ZHU Ji[2], GAO Yingying[1,3], LI Haibo[2] [1]Clinical Medical School, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang Province, 154007; [2]Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, National Engineering Technology Research Center for Immune Biological Products, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Department of Clinical Laboratory, Banan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing, 401320, China

[**Abstract**] **Objective** To construct lipid nanoparticles (lipopeptide-lipid nanoparticle, LP-LNP) with novel lipopeptides as adjuvants, and initially explore their synergistic effect on mRNA vaccines. **Methods** Two novel lipopeptides, SS-10 and SQ18, were designed and synthesized. Microfluidic technology was used to encapsulate lipopeptides in different proportions, as well as mRNAs encoding enhanced green fluorescent protein (eGFP), firefly luciferase (F-luc), and ovalbumin (OVA) into lipid nanoparticles to

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(32270988);重庆市自然科学基金重点项目(cstc2020jcyj-zdxmX0027)
[**通信作者**] 李海波,E-mail:lihaibo@tmmu.edu.cn
高英英,E-mail:63543545@qq.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

construct an mRNA delivery system with novel lipopeptides as adjuvants (LP-LNP). The particle size and polydispersity coefficient of LP-LNP were measured using dynamic light scattering. The activation effect on Toll-like receptors 2 (TLR2) was detected using HEK-Blue™ mTLR2 reporter cells to screen the optimal lipopeptide ratio. The preferred LP-LNP-eGFP-mRNA was transfected into HEK293T cells, and the expression of eGFP was observed under a fluorescence microscope. *In vivo* imaging was used to investigate the expression level of LP-LNP-F-luc-mRNA in mice. Flow cytometry was used to evaluate the ability of LP-LNP-OVA-mRNA to induce the maturation of dendritic cells (DCs) in draining lymph nodes and cross-presentation of antigens after immunization. **Results** Lipopeptides SQ18 and SS-10 were incorporated into LNP at 0.50% and 0.75% molar ratios, respectively, to obtain LP-LNP with uniform particle size, high encapsulation efficiency, and good *in vitro* safety. The ability of this formulation to activate TLR2 was significantly stronger than the positive control Pam_2CSK_4 ($P<0.01$). The preferred LP-LNP obtained effective *in vitro* transfection, and LP-LNP prepared with SQ18 at 0.50% molar ratio had significantly better *in vivo* transfection efficiency than traditional LNP ($P<0.01$), and significantly promoted the maturation of DCs in draining lymph nodes and cross-presentation of antigens ($P<0.05$). **Conclusion** LP-LNP with novel lipopeptides as adjuvants can enhance the delivery capacity of mRNA and further improve the immune effect of mRNA vaccines.

[**Key words**] lipid nanoparticles; mRNA vaccine; adjuvant; lipopeptide

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (32270988) and the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-zdxmX0027). Corresponding author: LI Haibo, E-mail: lihaibo@tmmu.edu.cn; GAO Yingying, E-mail: 63543545@qq.com

自2019年以来,严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-Cov-2)席卷全球,多种新型疫苗技术迅速运用于新冠病毒疫苗的开发[1]。与传统疫苗(如减毒、灭活和重组亚单位疫苗等)相比,mRNA疫苗具有安全性高、研发周期短和免疫原性强的优势,成为这场新冠病毒疫苗竞赛中的明星[2]。随着研究的深入,mRNA技术在传染病预防治疗、肿瘤免疫以及蛋白代替疗法等领域均得到了广泛应用[3]。

mRNA疫苗通常选用脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle,LNP)作为递送载体[4],LNP由可电离脂质、辅助磷脂、胆固醇、聚乙二醇化脂质4部分组成。这些成分可以促进形成单分散纳米颗粒,提高制剂稳定性,实现核酸有效封装,帮助细胞摄取,促进mRNA的内体逃逸[5]。然而,LNP也存在一定局限性,如递送效率欠佳、佐剂活性偏弱、细胞选择性较差、潜在毒性、生产成本高以及储存和运输要求严格。因此,对LNP进行优化改进是当前mRNA疫苗递送的研究重点。

脂肽是一类Toll样受体2(Toll-like receptors 2,TLR2)激动剂,将Pam_2CyS与肽段化学偶联合成得到的脂肽,具有显著的免疫增强作用[6]。目前,已经有10余个以脂肽作为佐剂的疫苗进入了临床研究阶段,显示出良好的佐剂效果。例如针对人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)脂肽疫苗在人体接种后引发了强烈的B细胞和T细胞反应,在受试者体内产生了治疗性免疫反应[7];针对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染的自佐剂脂肽疫苗通过与Pam_2CyS偶联,激发强大的特异性细胞免疫应答和黏膜抗体应答[8]。此外,脂肽分子的两亲性结构使其具有掺入到LNP中的潜力,运用脂肽为佐剂增强mRNA疫苗的免疫效果在理论上是可行的。

本研究将TLR4激活多肽[9]、程序性死亡受体1(programmed Death 1, PD-1)抑制多肽[10]分别与Pam_2CyS偶联,成功合成了SS-10($Pam_2CSKKAPPHALS$)和SQ18($Pam_2CSTGQISTLRVNI-TAPLSQ$)2种新型脂肽。利用脂肽的两亲性[11],将其掺入LNP中,制备新型mRNA递送系统;为优化这一系统,对脂肽掺入比进行筛选,通过检测不同掺入比例下脂肽-脂质纳米颗粒(lipopeptide-lipid nanoparticle, LP-LNP)的均一性、安全性以及TLR2激动剂活性,确定了最优掺入比;SQ18在最优掺入比下显著提高了体内mRNA的表达水平,并促进了小鼠引流淋巴结中树突状细胞(dendritic cells,DCs)的成熟,为提升mRNA疫苗的免疫效果提供了新策略。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

HEK293T细胞、HEK-Blue™ mTLR2细胞系、萤火虫荧光素酶(firefly luciferase,F-luc)-mRNA、卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)-mRNA、RBD-mRNA、Pam_2CSK_4为课题组自备;增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,eGFP)-mRNA(N1-Me-Pseudo UTP)购自近岸蛋白质公司;脂肽SS-10($Pam_2CSKKAPPHALS$)、

SQ18(Pam$_2$CSTGQISTLRVNITAPLSQ)由本课题组设计并交由上海吉尔生化公司合成;RPMI1640、DMEM、opti-MEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;青霉素-链霉素双抗、PBS 干粉、无内毒素水购自 Biosharp 公司;0.25%胰酶、Triton X-100 购自上海碧云天生物公司;DEPC 购自阿拉丁公司;Lipofectamine 3000、集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)、白介素 4(interleukin 4,IL-4)、Quant-iT^{TM} RiboGreen^{TM} RNA Reagent and Kit 试剂盒购自赛默飞世尔科技公司;DLin-MC3-DMA、DMG-PEG2000、DSPC、胆固醇购自上海艾伟拓公司;异氟烷购自深圳瑞沃德公司;D-荧光素钠盐购自百灵威公司;CCK-8 试剂购自 MCE 公司;FITC anti-mouse CD11c、APC anti-mouse CD80、PE anti-mouse CD40、PE/Cyanine7 anti-mouse H2kb bound to SIINFEKL 购自 Biolegend 公司。

1.2 实验动物

32 只 6~8 周龄 SPF 级雌性 Balb/c 小鼠,体质量 16~20 g,购自北京维通利华生物科技有限公司,饲养于陆军军医大学国家免疫生物制品工程技术研究中心 SPF 级动物房。

1.3 LNP、LP-LNP 的制备与表征

利用微流控设备(纳微公司,NWDPS Ⅱ),将含有 mRNA 的水相(0.2 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,pH=4)与含有脂质的乙醇相混合制得 LNP-mRNA;将新型脂肽 SS-10、SQ18 分别按照 0.25%、0.50%、0.75%、1.00%的摩尔比掺入 LNP 中,LP-LNP-mRNA 制备方法同上;具体掺入比例如表 1 所示。制样完成后在 100×10^3 超滤管中用 1×PBS 超滤>20 倍体积的样品。用 Zetasizer pro (Malven PANalutical)测量样品的颗粒大小(Size)、平均分散系数(PDI);包封率(EE)检测用 Quant-iT^{TM} RiboGreen^{TM} RNA Reagent and Kit 试剂盒进行间接验证,在加入 Quant-iT^{TM} RiboGreen^{TM} RNA 试剂后,利用荧光发光对 2%Triton X-100 破乳或未破乳的 mRNA 进行定量(分别为破乳前和破乳后)。包封率计算公式为:EE=(破乳后读值-破乳前读值)/破乳前读值×100%。

1.4 LP-LNP 最优脂肽掺入比的筛选

CCK-8 检测体外安全性:取 2 只 Balb/c 小鼠处死消毒后,取其胫骨和股骨无菌分离原代骨髓细胞,用定向分化培养基(含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗、20 ng/mL GM-CSF、10 ng/mL IL-4)将细胞诱导为成熟的骨髓来源的树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cell,BMDCs)。第 3 天和第 5 天分别更换一半的新鲜培养液,第 7 天收集细胞。按 1×10^5 个/孔铺于 96 孔板中,待细胞贴壁后,向各孔中加入 LP-LNP-mRNA 培养 12 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,于培养箱中再孵育 3 h。测定每孔 450 nm 波长处光密度并按下述公式计算制剂对细胞活力的影响。

$$细胞存活率=\frac{OD_{实验}-OD_{空白}}{OD_{对照}-OD_{空白}}\times100\%$$

HEK-Blue^{TM} mTLR2 细胞检测 TLR2 激活作用:HEK-Blue^{TM} mTLR2 细胞复苏,于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养箱中培养至 80%融合,消化计数,调整细胞数至 2×10^4 个/孔,铺于 96 孔板中。将 LP-LNP-mRNA、LNP-mRNA、无内毒素水(阴性对照)和 Pam$_2$CSK$_4$(阳性对照)分别与 HEK-Blue^{TM} mTLR2 细胞在 37 ℃的 HEK-Blue detection 中孵育 16 h,然后在 620 nm 处用分光光度计检测分泌型碱性磷酸酶(secreted alkaline phos-phatase,SEAP)活性。

1.5 优选 LP-LNP 的体外转染能力评价

用 eGFP 的 mRNA 检测优选 LP-LNP 在 HEK293T 细胞的转染能力:HEK293T 细胞复苏,调整细胞数至 2×10^5 个/孔,铺于 12 孔板中,利用微流控将 eGFP-mRNA 分别与 LP-LNP(SQ18 0.50%、SS-10 0.75%)、LNP 混合制备待测样品;Lipofectamine 3000 制剂与 eGFP-mRNA 混合为阳性对照,各孔的 eGFP-mRNA 浓度均为 500 ng/mL,将各组制剂加入细胞中,培养 24 h,用倒置荧光显微镜观察 eGFP 蛋白的表达情况。

1.6 优选 LP-LNP-F-luc-mRNA 的体内递送能力评价

利用活体成像考察优选制剂的体内递送能力:实验小鼠分为 6 组,实验组共 5 组,每组 3 只小鼠,利用微流控将含 3 μg F-luc-mRNA 的分别与 LP-LNP(SQ18 0.50%、SQ18 0.75%、SS-10 0.50%、SS-10 0.75%)、LNP 混合制备待测样品;对照组 3 只小鼠仅注射 1×PBS,免疫方式采用肌肉注射,每只小鼠大腿外侧各注射 50 μL 制剂。6 h 后异氟烷麻醉,腹腔注射 D-荧光素钠盐溶液 100 μL/只。10 min 后将小鼠放入活体成像系统检测化学发光信号。使用 Living Image 软件计算圈选区域的光通量。

表 1 脂质纳米颗粒摩尔比配方(%)

成分	LNP	LP(0.25%)-LNP	LP(0.50%)-LNP	LP(0.75%)-LNP	LP(1.00%)-LNP
DLin-MC3-DMA	50.000	49.950	49.950	49.950	49.950
胆固醇	38.500	38.450	38.450	38.450	38.450
DMG-PEG2000	1.500	1.425	1.300	1.175	1.050
DSPC	10.000	9.925	9.800	9.675	9.550
脂肽 SS-10/脂肽 SQ18	0.000	0.250	0.500	0.750	1.000

1.7　优选 LP-LNP-OVA-mRNA 的免疫增效作用评价

流式细胞术评价优选 LP-LNP 诱导小鼠引流淋巴结中 DCs 成熟以及交叉递呈抗原的能力:实验小鼠分为 4 组,实验组共 3 组,每组 3 只小鼠,利用微流控将含 20 μg OVA-mRNA 的分别与 LP-LNP(SQ18 0.50%、SS-10 0.75%)、LNP 混合制备待测样品;对照组 3 只小鼠注射含有 20 μg RBD-mRNA 的 LNP 制剂;免疫方式采用肌肉注射,每只小鼠大腿外侧各注射 75 μL 制剂;24 h 后脱颈处死小鼠取两侧腹股沟淋巴结,研磨成单细胞悬液,流式抗体染色后分析引流淋巴结中 DCs 成熟以及 DCs 介导的交叉递呈抗原情况。

1.8　统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较使用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　LP-LNP 的制备与表征

将脂肽(SQ18、SS-10)按照不同比例掺入制备 LP-LNP,微流控体系下 LP-LNP-mRNA 脂质纳米颗粒形态如图 1 所示,通过动态光散射粒度分析仪对其进行表征,不同掺入比例下,LP-LNP 的粒径为 110~150 nm(图 2A)、平均分散系数(PDI)为 0.05~0.30(图 2B),其中 SQ18 0.50%、SS-10 0.50%和 SS-10 0.75%的分散度较好。RiboGreen RNA 试剂测定破乳前后 mRNA 的浓度,计算 mRNA 的包封率(EE),SQ18 0.50%、SS-10 0.75%的 EE 均超过 90%,其余掺入比的 EE 约 80%(图 2C)。以上结果表明,脂肽 SQ18、SS-10 分别以 0.50%、0.75%的比例掺入得到 LP-LNP 粒径均一,平均粒径分别为 127 和 121 nm,平均多分散系数分别为 0.11 和 0.08,且包封率较高,具有较优的理化特征。

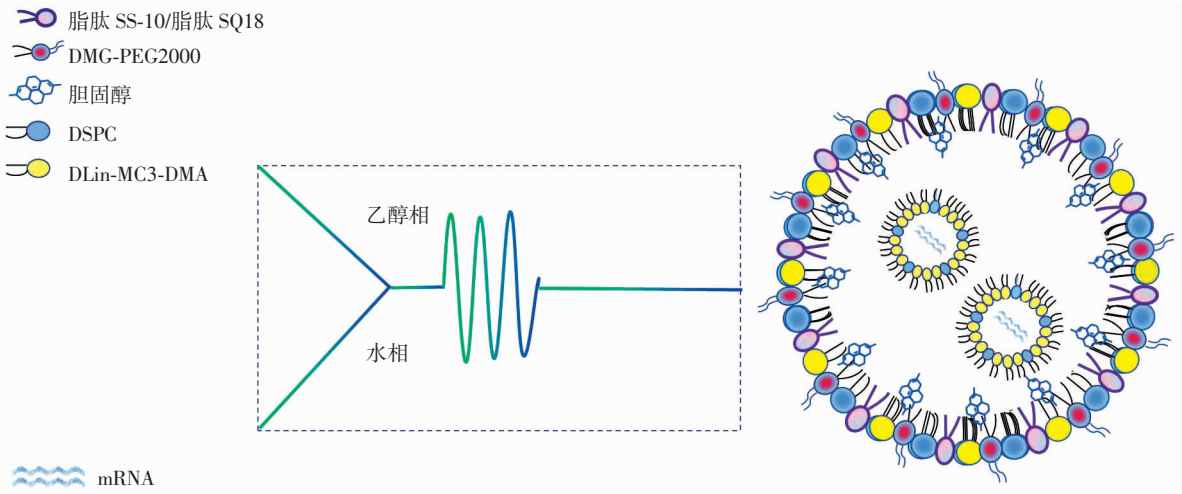
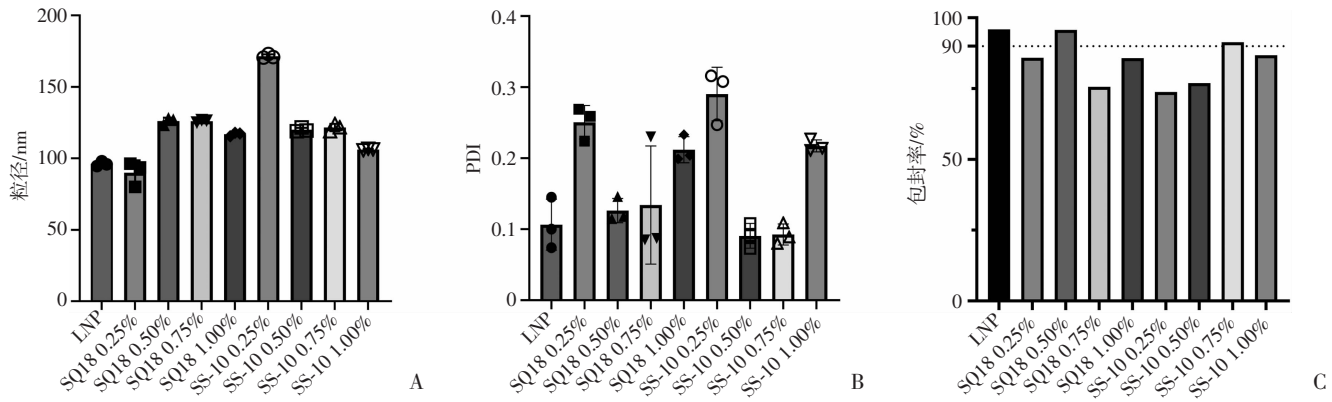


图 1　LP- LNP-mRNA 组装示意图



A:不同 SQ18、SS-10 掺入比例 LP-LNP 的平均粒径;B:不同 SQ18、SS-10 掺入比例 LP-LNP 的 PDI;C:LP-LNP-mRNA 的包封率

图 2　LP-LNP 的表征

2.2　LP-LNP 最优脂肽掺入比的筛选

为了评价 LP-LNP 的体外安全性,CCK-8 实验检测不同比例脂肽掺入后对 BMDCs 细胞存活率的影响。如图 3A、B 显示,脂肽掺入组细胞存活率均超过 90%,与传统 LNP 组相比无统计学差异,表明脂肽掺入对 LP-LNP 制剂的体外安全性无显著影响。

为了验证脂肽的掺入是否可以赋予 LP-LNP 对 TLR2 的激活作用,利用稳定表达 TLR2 的 HEK-Blue™ mTLR2 细胞检测 SQ18、SS-10 以不同比例掺入后 TLR2 的激活能力。如图 3B、C 显示,LNP 组虽然也具有一定的 TLR2 激动作用($P<0.01$),但 SQ18 0.50%、SS-10 0.75%组与 LNP 组相比具有更高的 TLR2 激动活性($P<0.01$)。结合之前对于 LP-LNP 的理化性质表征结果,优选 SQ18 0.50%、SS-10 0.75%配方继续后面的实验。

2.3　优选 LP-LNP 的体外转染能力评价

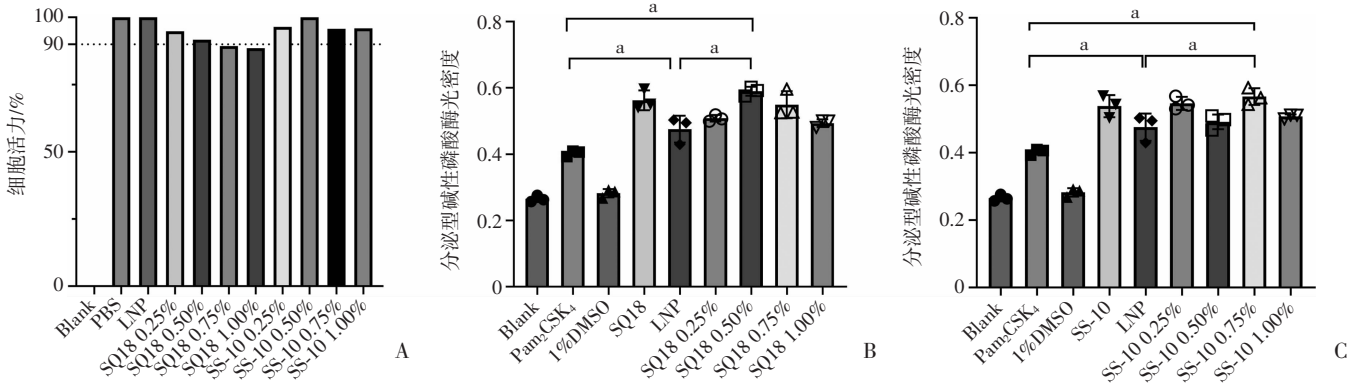
用 SS-10 0.75%、SQ18 0.50%分别包载编码 eGFP 的 mRNA,并转染至 HEK293T 细胞。2 种 LP-LNP 均可将目标 mRNA 转染至细胞,并且成功将 eGFP-mRNA 翻译为显绿色的荧光蛋白(图 4A~C),表达水平与常规转染试剂 Lipofectamine 3000 相当(图 4D)。

2.4　优选 LP-LNP 的体内递送能力评价

SS-10 0.75%、SQ18 0.50% 分别包载编码 F-luc-mRNA 后,小鼠肌肉注射给药,6 h 后小动物成像仪观察化学发光强度。如图 5 所示,SQ18 0.50%组小鼠在注射部位较传统 LNP 组的化学发光信号强度更高($P<0.01$),提示 SQ18 0.50%组相比传统 LNP 组具有更高的体内递送效率;SS-10 0.75%组发光信号强度虽然也高于 LNP 组,但无统计学差异。

2.5　优选 LP-LNP 对 OVA-mRNA 的免疫增效作用评价

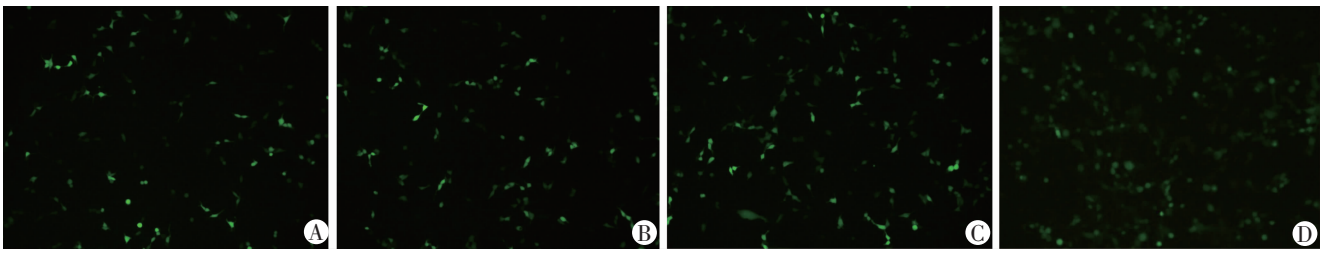
SS-10 0.75%、SQ18 0.50%分别包载编码 OVA 的 mRNA 后,小鼠肌注给药 24 h 后取腹股沟淋巴结,通过流式细胞术评价 DCs 成熟以及交叉递呈抗原的情况。首先使用 FSC-A 和 SSC-A 参数选择淋巴细胞;然后使用 FSC-A 和 FSC-H 参数选择单重态细胞,根据活/死 Flour 700-A 和 FSC-A 参数识别和选择活细胞;最后分别选择 CD11c+和 CD40+细胞群、CD11c+和 CD80+细胞群、CD11c+和 H2kb-SIINFEKL+细胞群,对发光信号进行分析后,得到圈门策略,如图 6 所示。图 7A 为流式细胞术分析代表图,具体分析如下。与传统 LNP 组相比,SQ18 0.50%组刺激 DCs 表达 CD40、CD80



a:$P<0.01$

A:不同 SQ18、SS-10 掺入比例 LP-LNP 对 BMDCs 存活率的影响;B、C:不同 SQ18、SS-10 掺入比例 LP-LNP 的 TLR2 激活作用　Blank 为无内毒素水,Pam_2CSK_4 为阳性对照

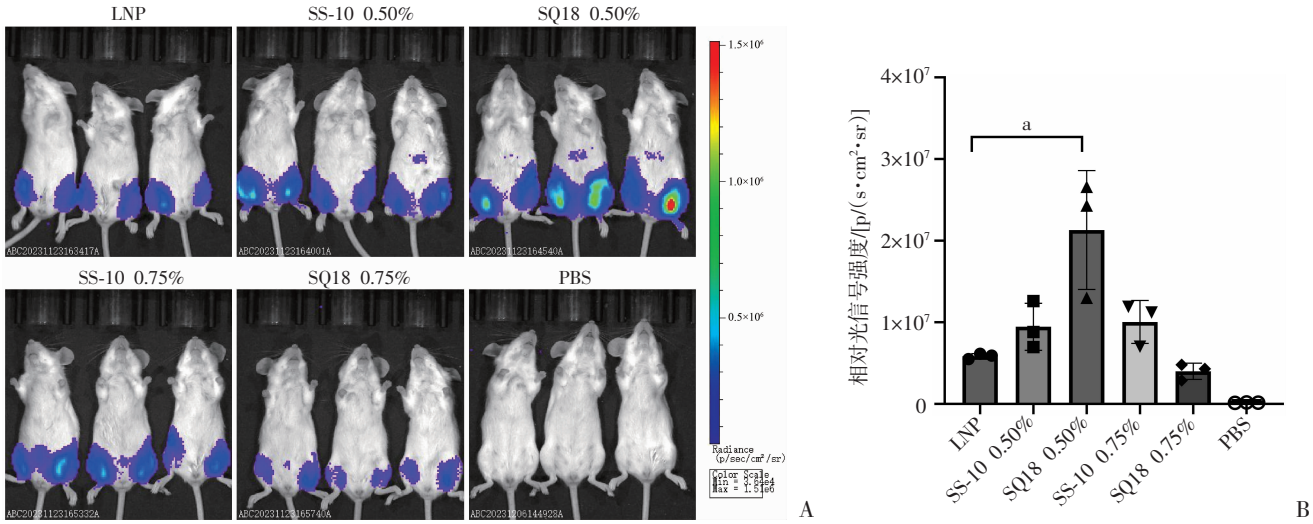
图 3　LP-LNP 的最优脂肽掺入比筛选



A:SQ18 0.50%-LNP-eGFP;B:SS-10 0.75%-LNP-eGFP;C:LNP-eGFP;D:Lipofectamine 3000-eGFP

图 4　优选 LP-LNP 对 eGFP-mRNA 的体外转染作用(×200)

的水平显著提升(P<0.05,图 7B、C),提示 SQ18 0.50%组能够有效刺激 DCs 的成熟。SS-10 0.75%组与 LNP 组相比均无统计学差异,提示其刺激 DCs 成熟能力与传统 LNP 相当。以 LNP 包载 RBD-mRNA 作为对照,分析优选 LP-LNP 提升 DCs 交叉递呈抗原的能力,SQ18 0.50%组细胞表面表达 H2kb-SIINFEKL 的水平显著高于 LNP 组(P<0.05,图 7D),表明脂肽 SQ18 0.50%掺入 LNP 后增强了 DCs 交叉递呈抗原的能力。



A:F-luc-mRNA 在小鼠注射部位表达情况;B:F-luc-mRNA 发光量化图(n=3,$\bar{x}\pm s$)　a:P<0.01

图 5　优选 LP-LNP 对 F-luc-mRNA 的体内递送作用

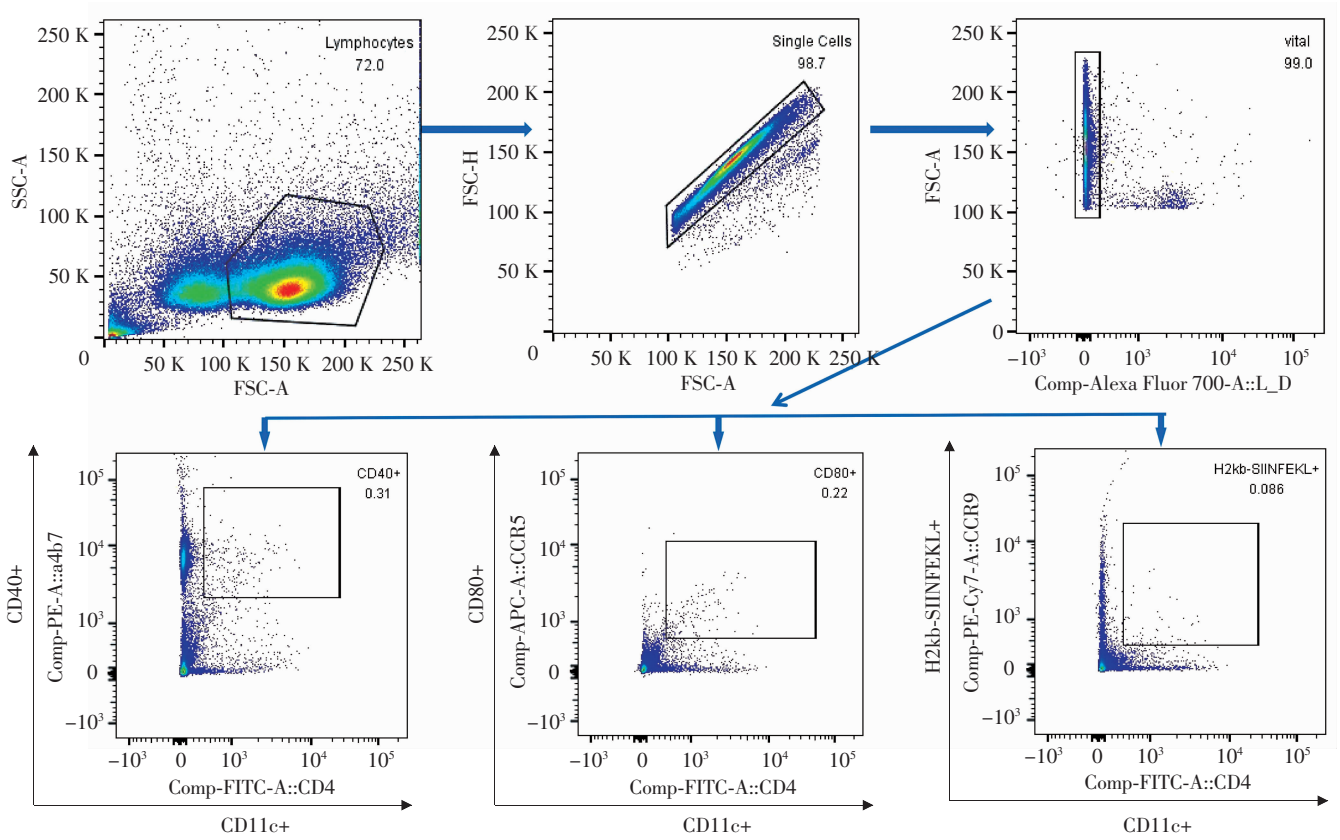
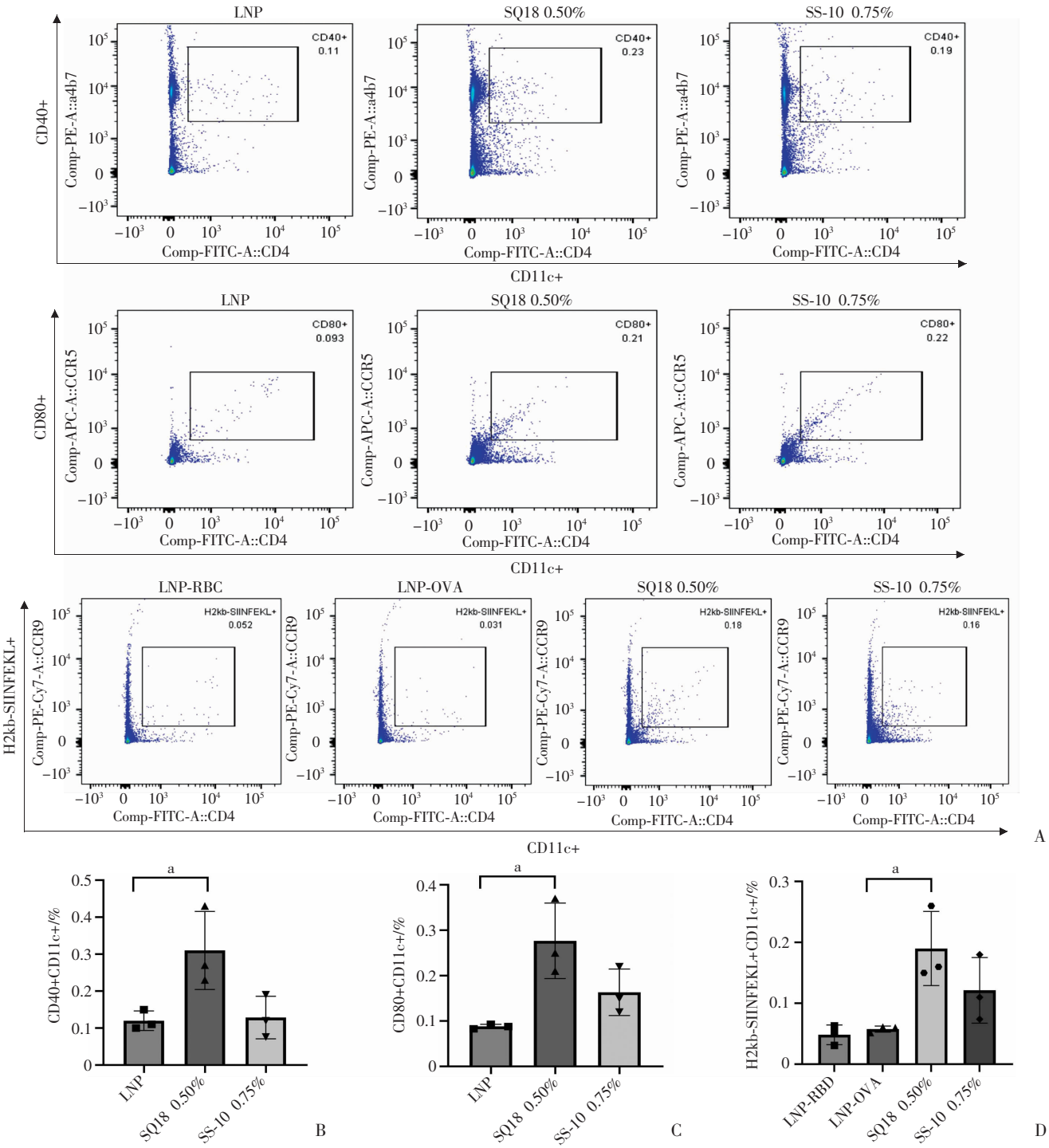


图 6　流式细胞术圈门策略



A:流式细胞术分析代表图;B~D:CD40+CD11c+细胞、CD80+CD11c+细胞、H2kb-SIINFEKL+CD11c+细胞占存活淋巴细胞的百分比 a:$P<0.05$

图 7 流式细胞术检测 DCs 共刺激分子的表达水平以及交叉递呈抗原的能力

3 讨论

近年来,新冠病毒 mRNA 疫苗的研究取得了巨大成功,推动了 mRNA 疫苗技术的飞速发展。合适的佐剂是增强 mRNA 疫苗保护效果的关键[12]。mRNA 疫苗佐剂通常有以下几种添加方式:①设计合成带有佐剂效应的新型递送脂质,如类脂质 C12-TLRa(由环氧 C12 和含胺的 TLR7/8 激动剂组成)可促进 mRNA 疫苗递送和 TLR 应答,诱导高水平的中和抗体[13];②设计可整合至 mRNA 链上的佐剂,如短双链 RNA

(dsRNA)通过靶向视黄酸诱导基因 I(RIG-I),可以杂交拴在 mRNA 链上,通过触发先天免疫信号传导而具有内在佐剂活性[14];③添加外源性免疫刺激剂,如胆固醇修饰的阳离子肽 DP7(VQWRIRVIRK),可以激活 TLR2-MyD88-IKK-NF-κB 途径并改善由新抗原疫苗诱发的免疫应答,从而作为个体化癌症疫苗的有效佐剂[15]。本研究利用脂肽的两亲性结构特点,经 SQ18 和 SS-10 2 种脂肽直接掺入 LNP 中,获得了粒径均一、递送效率高的 mRNA 递送系统。

在 LNP 的构成比例方面,PEG-脂质和磷脂在调节 LNP 的大小、防止聚集及提高稳定性方面具有重要作用[16];KULKARNI 等[17]制备了不同 PEG-脂质含量的 7 种 LNP,其结果表明增加 PEG-脂质摩尔比有助于形成更小的 LNP,随着摩尔比增高,LNP 的作用也发生改变,因此在对 LNP 进行设计的时候要选择合适的比例;磷脂的掺入有助于增加 LNP 的膜流动性,DSPC 等磷脂改善了 LNP 制剂在体外的内吞作用[18]。本研究针对 LNP 的构成比进行调整,增加脂肽所占摩尔比,相应减小 PEG-脂质和 DSPC 的摩尔比,评价新型制剂理化性质的改变;LNP 的粒径和多分散系数是评估纳米制剂效果的 2 个重要指标,研究表明脂质纳米颗粒的粒径为 100~200 nm、PDI 在 0.2 以下的制剂在体内外递送时可以发挥最优效果[19]。随着脂肽占比增加(0.25%~1.00%),LNP 的粒径和 PDI 发生改变;当脂肽在 0.25%摩尔比例下,脂质纳米颗粒的粒径和 PDI 呈现增加的趋势。脂肽在 1.00%的摩尔比例下,虽然粒径较小,但纳米颗粒分散性差;随着脂肽占比增加,LP-LNP 在体内的递送效率发生改变,小动物成像结果显示脂肽的掺入量与递送效率未呈现等比上升趋势。这可能与 PEG-脂质和 DSPC 比例减少有关,说明脂肽 SQ18、SS-10 分别以 0.50%、0.75%的比例替换一定比例的 DMG-PEG2000、DSPC 可以发挥最大递送优势。

新型脂肽 SQ18(Pam_2CSTGQISTLRVNITAPLSQ)除了具有 TLR2 激动剂活性[20],其多肽部分可以作为 PD1 受体阻断剂拮抗 PD1 受体,增强幼稚效应 CD8+T 细胞转化和分化[10, 21]。本研究将 SQ18 与 LNP 联用,筛选出优势配比,结果表明,SQ18(0.50%)-LNP 增强了 mRNA 疫苗在体内的表达,进一步刺激 DCs 成熟,提高 DCs 对抗原的交叉递呈能力。这可能与 SQ18 中的多肽单元可以阻断 PD1 受体,发挥佐剂效应有关[22]。新型脂肽 SS-10(Pam_2CSKKAPPHALS)是将 Pam_2CyS 与 TLR4 激活多肽偶联[23]。LI 等[9]研究表明该多肽作为 TLR4 激动剂在重组 5 型腺病毒(rAd 5)疫苗中发挥了显著作用,多肽佐剂通过活化由 MyD88 介导的 TLR4/NF-κB 信号通路,进一步增强了抗原特异性细胞毒性 T 细胞应答。新型脂肽 SS-10 与 LNP 联用后,通过 TLR 增强了小鼠体内 F-luc 基因表达,但刺激 DCs 成熟的能力弱于脂肽 SQ18,后续实验将进一步验证该脂肽的免疫激活机制。

综上所述,脂肽 SQ18 0.50%、SS-10 0.75%掺入 LNP 包载 mRNA 后的脂质纳米颗粒大小均一,与传统的 LNP 相比可增强 mRNA 疫苗效果。脂肽 SQ18 0.50%-LNP 可以促进 DCs 成熟,增强抗原交叉递呈能力;后续可进一步分析 SQ18 0.50%-LNP 在体内引起的免疫环境改变,进而深入挖掘脂肽佐剂对 mRNA 疫苗的增效机制,为后续佐剂与 mRNA 疫苗联用提供新思路。

参考文献:

[1] XIE C Y, YAO R H, XIA X J. The advances of adjuvants in mRNA vaccines[J]. NPJ Vaccines, 2023, 8: 162. DOI: 10.1038/s41541-023-00760-5.

[2] WANG Y, ZHANG Z Q, LUO J W, *et al*. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 33. DOI: 10.1186/s12943-021-01311-z.

[3] PARDI N, HOGAN M J, PORTER F W, *et al*. mRNA vaccines —a new era in vaccinology[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(4): 261-279. DOI: 10.1038/nrd.2017.243.

[4] WANG Z, MA W T, FU X X, *et al*. Development and applications of mRNA treatment based on lipid nanoparticles[J]. Biotechnol Adv, 2023, 65: 108130. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2023.108130.

[5] PATTIPEILUHU R, ARIAS-ALPIZAR G, BASHA G, *et al*. Anionic lipid nanoparticles preferentially deliver mRNA to the hepatic reticuloendothelial system[J]. Adv Mater, 2022, 34(16): e2201095. DOI: 10.1002/adma.202201095.

[6] LU B L, WILLIAMS G M, VERDON D J, *et al*. Synthesis and evaluation of novel TLR2 agonists as potential adjuvants for cancer vaccines[J]. J Med Chem, 2020, 63(5): 2282-2291. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01044.

[7] GAHÉRY-SÉGARD H, PIALOUX G, CHARMETEAU B, *et al*. Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine[J]. J Virol, 2000, 74(4): 1694-1703. DOI: 10.1128/jvi.74.4.1694-1703.2000.

[8] XUE R Y, LIU C, WANG J Q, *et al*. Synthetic self-adjuvanted lipopeptide vaccines conferred protection against *Helicobacter pylori* infection[J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12(23): e2300085. DOI: 10.1002/adhm.202300085.

[9] LI M, JIANG Y H, GONG T, *et al*. Intranasal vaccination against HIV-1 with adenoviral vector-based nano complex

using synthetic TLR-4 agonist peptide as adjuvant[J]. Mol Pharm, 2016, 13(3): 885-894. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00802.

[10] PHARES T W, KOTRAIAH V, KARUNARATHNE D S, *et al*. A peptide-based PD1 antagonist enhances T-cell priming and efficacy of a prophylactic malaria vaccine and promotes survival in a lethal malaria model[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1377. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01377.

[11] GU Y Z, YANG J Y, HE C, *et al*. Incorporation of a Toll-like receptor 2/6 agonist potentiates mRNA vaccines against cancer and infectious diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8: 273. DOI: 10.1038/s41392-023-01479-4.

[12] KAYESH M E H, KOHARA M, TSUKIYAMA-KOHARA K. An overview of recent insights into the response of TLR to SARS-CoV-2 infection and the potential of TLR agonists as SARS-CoV-2 vaccine adjuvants[J]. Viruses, 2021, 13(11): 2302. DOI: 10.3390/v13112302.

[13] ZHANG G, TANG T Y, CHEN Y F, *et al*. mRNA vaccines in disease prevention and treatment[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8: 365. DOI: 10.1038/s41392-023-01579-1.

[14] TOCKARY T A, ABBASI S, MATSUI-MASAI M, *et al*. Comb-structured mRNA vaccine tethered with short double-stranded RNA adjuvants maximizes cellular immunity for cancer treatment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(29): e2214320120. DOI: 10.1073/pnas.2214320120.

[15] ZHANG R, TANG L, TIAN Y M, *et al*. Cholesterol-modified DP7 enhances the effect of individualized cancer immunotherapy based on neoantigens[J]. Biomaterials, 2020, 241: 119852. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119852.

[16] ALBERTSEN C H, KULKARNI J A, WITZIGMANN D, *et al*. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 188: 114416. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114416.

[17] KULKARNI J A, WITZIGMANN D, LEUNG J, *et al*. On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA[J]. Nanoscale, 2019, 11(45): 21733-21739. DOI: 10.1039/C9NR09347H.

[18] KULKARNI J A, MYHRE J L, CHEN S, *et al*. Design of lipid nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* delivery of plasmid DNA[J]. Nanomed Nanotechnol Biol Med, 2017, 13(4): 1377-1387. DOI: 10.1016/j.nano.2016.12.014.

[19] SHI D, TOYONAGA S, ANDERSON D G. *In vivo* RNA delivery to hematopoietic stem and progenitor cells *via* targeted lipid nanoparticles[J]. Nano Lett, 2023, 23(7): 2938-2944. DOI: 10.1021/acs.nanolett.3c00304.

[20] KAUR A, PIPLANI S, KAUSHIK D, *et al*. Stereoisomeric Pam_2CS based TLR2 agonists: synthesis, structural modelling and activity as vaccine adjuvants[J]. RSC Med Chem, 2022, 13(5): 622-637. DOI: 10.1039/d1md00372k.

[21] LIU H, ZHAO Z, ZHANG L, *et al*. Discovery of low-molecular weight anti-PD-L1 peptides for cancer Immunother[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 270. DOI: 10.1186/s40425-019-0705-y.

[22] CHEN T K, LI Q, LIU Z L, *et al*. Peptide-based and small synthetic molecule inhibitors on PD-1/PD-L1 pathway: a new choice for immunotherapy?[J]. Eur J Med Chem, 2019, 161: 378-398. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.10.044.

[23] SHANMUGAM A, RAJORIA S, GEORGE A L, *et al*. Synthetic Toll like receptor-4 (TLR-4) agonist peptides as a novel class of adjuvants[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30839. DOI: 10.1371/journal.pone.0030839.

(**收稿**:2024-02-19;**修回**:2024-04-16)

(编辑 张 维)