

siRNA 非病毒递送载体的研究现状

杨飞飞, 黄 伟, 李云飞, 高钟镐*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年发展起来的一种新技术。RNAi 是指通过外源性或内源性的双链 RNA 在体内诱导靶基因 mRNA 产生特异性降解, 进而引起不同水平的基因沉默。RNAi 已经用于肿瘤、病毒感染、乙型肝炎等多种疾病的治疗。小干扰 RNA (siRNA) 是 RNAi 的效应分子, 可在体内诱导 RNAi 效应。但是裸 siRNA 在体内容易被核酶 (RNase) 降解, 且半衰期短, 转染效率低。因此, siRNA 需要借助递送载体进入细胞发挥治疗作用。病毒载体在基因治疗中有潜在的免疫原性、致突变等副作用。所以, 非病毒载体成为当前的研究热点。本文对 siRNA 非病毒递送载体的研究现状进行了综述。

关键词: RNAi; siRNA; 非病毒载体

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1436-08

Current status of non-viral vectors for siRNA delivery

YANG Fei-fei, HUANG Wei, LI Yun-fei, GAO Zhong-gao*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a newly developed technology. It is the different levels of gene silencing induced by specific degradation of targeted genes *in vivo*, and both exogenous and endogenous double-stranded RNAs could induce the specific degradation. RNAi has been applied in tumor therapy, viral infection, hepatitis B and many other diseases. siRNA is the effector molecule which induces the RNAi *in vivo*. But naked siRNA is easily degraded by RNases *in vivo*, and the half-life is short. Meanwhile, the transfection efficiency of the naked siRNA is comparatively low. So the naked siRNA needs the help of vectors to penetrate the cell membrane and take action. Viral vectors have the potential immunogenicity and mutagenicity in gene therapy. Therefore, non-viral vectors are drawing more and more attention. The latest development of the non-viral vectors is summarized in this review.

Key words: RNAi; siRNA; non-viral vector

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近几年发展起来的一种新技术, 可以阻断特定基因表达, 在基因治疗中有巨大潜力。其过程首先是内源性或者外源性双链 RNA 进入细胞后, 在细胞质中被 Dicer 酶加工成 21~23 个核苷酸的短链 RNA, 即 siRNA^[1, 2]。siRNA 在 RNA 干扰过程中起核心作用, 入胞后与细

胞中的蛋白质形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 接着 siRNA 解旋, 然后以 RISC 复合物上的 siRNA 序列为向导, 寻找并结合特定序列的 mRNA, 对 mRNA 进行酶切。酶切后的 mRNA 片段被胞质中的核酸酶非特异性降解, 结果使特定蛋白无法表达, 实现基因沉默。RISC 复合物可以循环使用, 继续酶切其他的靶向 mRNA 分子, 因此 siRNA 可以将对 mRNA 表达的抑制作用放大 20~30 倍, 在分裂细胞中可以持续几天, 非分裂细胞中可以持续几周, 是目前特异性抑制基因表达

收稿日期: 2011-05-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873168).

*通讯作者 Tel: 86-10-63026505, Fax: 86-10-63028096,

E-mail: zggao@imm.ac.cn

的有效方法。siRNA 在治疗中非常有潜力。RNA 干扰是伴随翻译而不是转录,因此不会干扰染色体 DNA,减小了 DNA 基因治疗中可能产生的基因突变。siRNA 发挥治疗作用是通过与 mRNA 相互作用而不是蛋白,减少了合成前可能生成的有害蛋白;siRNA 作为治疗药物的另一个优点是可以对很多蛋白实现基因沉默而治疗疾病。传统化学药物的靶点局限于特定的受体、离子通道和酶;生物药如单克隆抗体或者细胞因子类主要是递送到细胞表面或者血液中;而 siRNA 药物可以靶向任何感兴趣的 mRNA 上,而不用考虑转录蛋白的细胞定位。另外,只需要很少量的 siRNA 就可以实现基因沉默。

1 RNAi 的作用特点

引发有效 RNAi 的 dsRNA (长链双链 RNA) 长度一般在 21~23 bp,长度 >30 bp 的 dsRNA 会引起细胞非特异性和基因表达受抑制与凋亡^[3];RNAi 作用的发挥是通过降解靶 mRNA 来封闭目的基因表达,发挥效应的时间是在转录后;siRNA 具有高度的序列特异性,任一碱基的错配均会导致 RNAi 效应的丧失,因此其靶向性强;同时在 RNAi 的级联放大效应及 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 的作用下,只需要极少量 dsRNA 便可降解自身浓度几倍甚至几十倍的 mRNA^[4]。并且 siRNA 可在 RdRp 的作用下大量扩增,并转运出细胞,在不同细胞间长距离传递和维持,使 RNAi 扩散到整个机体并可以代传;siRNA 相对较稳定,以 3'-端悬垂 TT 碱基的 siRNA 尤为稳定,在细胞中可稳定存在 3~4 天,半衰期远长于反义寡核苷酸^[5]。

2 siRNA 递送的体内障碍^[6]

体内注射后,复合物必须在流经循环系统时避免肾滤过,吞噬细胞摄取,血清蛋白的凝聚和内源性核酸酶的降解才能到达靶细胞。siRNA 在血清中稳定性较差,易被 RNase 降解。吞噬作用是血流和细胞外基质中都存在的免疫障碍。吞噬细胞可以清除外来异物,保护自身免受外来侵害,然而也可以清除体内某些治疗性大分子和纳米复合物。因此,设计药物载体时要尽量想办法避免调理素的作用。从血管流出和跨越血管内皮是将 siRNA 递送至体内许多组织的主要障碍。一般而言,直径 >5 nm 的分子由于不能跨越毛细血管内皮而留在血液循环中。然而,肝、脾和某些肿瘤组织等允许直径约 200 nm 的粒子通过,因此,纳米输送系统足以通过此类组织。

siRNA 复合物进入血管后需要通过由致密网状多糖组成的细胞外基质和纤维蛋白,该过程可能造

成大分子在输送过程中的滞留、减缓甚至中断药物输送。siRNA 到达靶细胞后,还必须经过有效内吞、摄取、同时保持 RNAi 完整性及活性才能发挥作用。复合物从内涵体逃逸至细胞质的过程中如果被低 pH、可降解的内涵体膜阻挡则不能到达细胞质发挥作用。

3 siRNA 的递送

3.1 化学修饰的 siRNA 直接递送

siRNA 双螺旋的修饰方法有很多:核糖修饰、磷酸链修饰、碱基修饰、突触和末端修饰和双螺旋结构修饰等。化学修饰后可以改善 siRNA 血浆稳定性、提高效价、调节免疫活性、降低脱靶效应。Morrissey 等^[7]将 siRNA 和血清一起孵育,分别用 2-F、2-O-Me 和 2-H 取代 2-OH 并结合到磷酸基末端,可以明显延长 siRNA 的半衰期,体内同样表现出较长的半衰期。Song 等^[8]利用抗体 Fab 片段与鱼精蛋白制备了融合蛋白。该融合蛋白与 siRNA 分子复合物注射后,siRNA 能进入靶组织细胞质,沉默靶基因的表达,抑制 HIV 病毒复制或肿瘤细胞增生,证明是一种细胞特异性的给药系统。而裸 siRNA 分子则不能被靶组织细胞摄取。Southcek 等^[9]将 2-O-Me 修饰的抗载脂蛋白 B (apolipoprotein B, apo B) siRNA 分子与胆固醇分子共价连接,可显著降低小鼠体内 apo B mRNA、总胆固醇水平和血浆 apoB 的含量;同时 siRNA 分子的半衰期也显著延长。

3.2 载体递送

裸 siRNA 在生物体内容易被核酶 (RNase) 降解,半衰期短,转染效率低。因此,稳定性对于 siRNAs 发挥阻抑作用至关重要^[10]。病毒载体是最早用于体内递送 siRNA 的载体,由于病毒载体在基因治疗实验中出现一些毒副作用和潜在的免疫原性、致癌性等问题,目前病毒载体已非 siRNA 首选递送方式。良好的递送载体可以提高 siRNAs 的稳定性和靶向性。

3.2.1 适合 siRNA 递送的载体要求

3.2.1.1 载体的稳定性 载体要满足一定的稳定性,才能保护核酸在被细胞摄取前不受酶降解。物理稳定性可以通过调节静电作用或者空间稳定作用减小纳米粒聚集而实现。在生理盐浓度和高聚电解质的条件下,静电稳定性是较难解决的。siRNA 与聚合物的稳定复合是保护其免受核酸降解成功递送的关键^[2]。可以通过调节亲水性/疏水性,聚合物分子量,电荷密度等以优化与 DNA 的复合;N/P 比值、pH 和介质也都影响 DNA 与聚合物的静电结合。同时复合物要对内涵体敏感才能使得聚合物包衣破裂释放核酸。

3.2.1.2 表面电荷^[11] 带正电的纳米粒容易与带负电的细胞膜结合从而被细胞摄取。体内带负电大分子如血清蛋白、白蛋白等在生理盐浓度条件下, 纳米粒间的互相排斥可能会发生聚集。对于非特异性细胞吞噬的摄取方式, 小于 150 nm 是可以接受的粒径范围。此类粒子过度聚集完全不能实现细胞内化。

3.2.1.3 低毒性^[6] 病毒载体是最早研究的 siRNA 载体, 但是会通过激活免疫反应而诱发毒性。因此开发了合成的脂质体和聚合物来替代病毒载体进行核酸递药, 并且对其进行了精细的设计以避免激活免疫系统。大分子材料要求其有生物可降解性, 以降低毒性。

3.2.2 阳离子脂质及脂质类似物

脂质体用于核酸递送已经有 20 多年, 最初是由 Felgner 等^[12, 13]用阳离子脂质 DOTMA 递送 DNA 和 RNA 到大鼠、小鼠和人细胞系。现代技术可以通过凝胶电泳及荧光光度法等测定 siRNA 脂质体的含量和包封率, 其研究已经由定性发展到定量阶段^[14]。

Morrissey 等^[15]证明了一种靶向 HBV RNA 的 siRNA—SNALP 复合物可以抑制 HBV 复制, 连续每天注射 3 mg·kg⁻¹ 能够将血清 HBV 水平抑制至原来的 1/10, 并且该抑制效果具有特异性、剂量依赖性, 定量给药后药效至少可以持续 7 天。Zimmermann 等^[16]证实了 SNALPs 可以敲除短尾猴肝脏中的 ApoB, 单次注射 siRNA 48 h 后, ApoB mRNA 的沉默效果具有剂量依赖性, 沉默效果大于 90%。在最大给药剂量 2.5 mg·kg⁻¹ 时效果可以持续 11 天。Sato 等^[17]研究发现, 将维生素 A 偶联的 Lipotrust 脂质体递送抗-gp46 的 siRNA 至纤维化的肝细胞治疗肝硬化。据报道 5 组 siRNA 复合物给药组可以解决大鼠肝纤维化并且能延长有严重肝纤维化大鼠的存活期, 具有剂量和持续时间依赖性。同时证明了治疗效果与脱靶效应无关, 也与固有免疫系统的募集反应无关。

尽管如此, 脂质体给药系统上存在缺乏靶向性、转染率低和全身给药的毒性等问题。其毒性和 siRNA 脱靶效应等问题, 限制了它在体内的应用。

3.2.3 聚合物

聚合物递送系统可以保护 siRNA 免受核酸酶的降解, 并且与配体结合后可以实现 siRNA 靶向递送。然而, 转染效率低是合成纳米载体存在的最大问题。线型或树枝状的阳离子聚合物能有效地结合 siRNA 形成稳定的纳米粒, 可以作为有效的转染材料。

聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 是研究最广泛用于系列核酸的递送载体^[18-22], PEI 分子结构

中带有大量的仲胺基团和叔胺基团。在生理条件下, PEI 中有 1/6~1/5 的氮原子是质子化的, 具有“质子海绵效应”、高的电荷密度和较强的缓冲能力, 能够保护核酸免受核酸酶的降解, 并能辅助核酸从内涵体中释放。但是 PEI 分子表面较高的正电荷密度会导致严重的细胞毒性, 成为限制 PEI 应用的重要影响因素。用其他聚合物包裹低分子量的 PEI, 可以改进其性质, 如: 增加靶向性、延长血液循环时间、增加血清稳定性和生物相容性等^[23, 24]。通过对 PEI 进行结构修饰以降低毒性并保持基因递送效率是近年来的研究热点。PEI 及其衍生物在 siRNA 递送方面已有比较广泛的研究^[25, 26]。实验结果表明, 修饰后的产物 mPEG-PCL-g-PEI 转染效率提高, 细胞毒性降低, 是较理想的递送载体; 给皮下肿瘤模型的小鼠腹腔注射 PEI-siRNA 复合物后, 肿瘤生长速度显著减慢。其机制可能是通过下调 siRNA 介导的 HER2 (human epidermal growth factor 2); 另外, PEG 修饰的 PEI-siRNA 纳米粒已经成功用于体内外实验^[27]。该复合物靶向胃癌细胞的 CD44v6 受体, 经 PEG 修饰后纳米粒的细胞毒性减小, 溶解性和体内稳定性增加; 与血清蛋白的非特异性结合减少, 保持较高的转染效率^[28]; 雄性 C57BL 小鼠静脉注射 3 μg PEI-PEG siRNA 复合物后无死亡现象, 也未见其他急性毒性, 复合物的半衰期大于 30 min, 而 PEI/siRNA 复合物的半衰期仅为 13 min^[29]。向基于 PEI 分子的载体中引入疏水基团也是减小细胞毒性的方法, 然而表面电荷密度要适度减小, 保证 PEI 表面有足够的正电荷发挥“质子海绵效应”。Oskuee 等^[30]向支链 PEI (25 kDa) 中引入不同取代度的羧酸烷基疏水基团, 以增加其疏水性并中和部分正电荷。结果表明低羧酸化度 (<20%) 时, 复合物从内涵体逃逸的效果最好。另有研究显示, 随着烷基取代基链长的增加, 其与 siRNA 形成的复合物稳定性增加^[31]。对于不同分子量的交联 PEI, 低分子量的 PEI 毒性较小, 同时其转染效率也低于高分子量的 PEI。在选择应用交联 PEI 时, 要综合考虑毒性和转染效率的问题^[32-34], 研究发现基因转染效率随着偶联的分支状 PEI 数量的增加而增加, 即转染效率: 线型 PEI (lPEI) < 二硫键耦合的线型 PEI (ssPEI) < 分支状 PEI (bPEI)^[35]。

壳聚糖 (chitosan, CS) 是另一种研究较多的基因递送载体^[36]。CS 是甲壳胺 (chitin) 脱乙酰基的产物。甲壳胺是从虾皮、蟹壳等提取出来的天然高分子多糖, 由 N-乙酰-氨基葡萄糖以 β-1, 4 苷键结合而成, 分子质量在 100~200 万之间。热的浓碱溶液与甲壳

胺作用,甲壳胺分子上的乙酰基脱去生成 CS,CS 无皮肤刺激性和黏膜刺激性,口服安全无毒。CS 具有生物黏附性,可生物降解,有良好的生物相容性和安全性,并且较容易修饰,因而成为研究较为广泛的基因递送载体。CS 可以递送包括 DNA、siRNA 和寡核苷酸在内的核酸分子。生理条件下,CS 链上质子化的氨基可以与带负电的 siRNA 相互作用,进而穿细胞膜内吞进入细胞。CS 免疫原性低,能压缩 siRNA 保护其免受酶降解。Howard 等^[37]研究发现小鼠腹腔注射 CS/siRNA 复合物后,能沉默全身巨噬细胞中肿瘤坏死因子的表达,进而缓解全身及局部炎症。另有研究将 GFP (green fluorescent protein)-转基因小鼠鼻内给予 CS/siRNA 复合物后,可以沉默小鼠细支气管上皮细胞中 GFP 基因的表达^[38]。Ghosn 等^[39]用 PEG 化的咪唑修饰 CS 后制备了 siRNA 的纳米粒 (chitosan-imidazole-4-acetic acid [IAA]-siRNA)。该纳米粒经静脉或鼻腔给药后均能实现基因沉默。按 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ siRNA 经静脉给药后能有效降低肺和肝脏的三磷酸甘油脱氢酶 (GAPDH) 的活性。其沉默效果与肝脏的载脂蛋白 B 之间存在剂量依赖性。最近有研究者将维生素 E 的琥珀酸盐偶联不同分子量的水溶性寡聚壳聚糖得到两亲性的 α -生育酚-寡聚壳聚糖。该产物能自组装形成类脂质体的单层囊泡,与 siRNA 复合后单分子层明显增厚。比较发现 4 kDa 的寡聚壳聚糖能显著增加 siRNA 的细胞摄取率 (>98%),且抑制靶蛋白表达的效果优于市售的 Lipofectamine 2000。动物实验表明该产物可以有效沉默小鼠体内 Mcl-1 的表达,抑制肿瘤细胞生长^[40]。

环糊精 (cyclodextrins, CD) 也已经开发为 siRNA 递送的载体。环糊精无免疫原性,因而在基因靶向递送系统中受到广泛的关注。在递送质粒 DNA 方面已有较多的研究,而在 siRNA 的递送方面研究并不多^[41-43]。Boe 等^[44]利用一种光化学内化技术 (photochemical internalization, PCI) 制备了环糊精-siRNA 复合物 (CDP-siRNA)。结果表明,优化后的 PCI 处方可以沉默 80%~90% 的 siRNA 表达,产物从核内释放 5 h 后显示最大的基因沉默效应。

另一个成功用于 siRNA 递送的生物相容性材料是端胶原。端胶原/靶向雄激素受体的 siRNA 复合物可以有效抑制人体内前列腺癌细胞生长^[45]。Itaka 等^[46]合成了一种新型聚合胶束材料,是含二氨基侧链的 PEG-阳离子嵌段共聚物,可与 siRNA 通过静电力形成聚合阴离子胶束,简称 PIC 胶束,这种胶束可以通过内涵体的缓冲能力提高 siRNA 细胞内活性,可以

在血清中保持稳定。Kim 等^[47]将 siRNA 和 PEG 通过二硫键形成络合物,再与阳离子 PEI 相互作用制备聚电解质胶束。在类似细胞质的条件下,siRNA 能完好地从络合物中释放。在最佳的条件下,胶束比复合物有更强的基因沉默作用。

3.2.4 阳离子肽段

各种细胞穿膜肽包括源自 HIV-1 的 TAT、MPG 穿膜肽和聚精氨酸已经用于装载核酸和蛋白递送至靶细胞。细胞穿膜肽 (cell-penetrating peptides, CPP) 也被称为蛋白转导域 (PTD),是几十年前从 HIV-1 Tat 蛋白中发现的,在逆转录 HIV-1 时发现能够自行穿越细胞质膜。其肽片段为 49~59 个氨基酸,含有高密度的基本氨基酸 (精氨酸或赖氨酸),能与质膜表面的负电荷相互作用提高肽段的内化。

3.2.4.1 共价结合的 CPP-siRNA “Tat 肽”是一种结构明确的细胞穿膜肽。Chiu 等^[48]将 Tat-肽 N-末端半胱氨酸与 siRNA 反义链用 3'-氨基连接构建了 Tat-siRNA 共聚物。加入细胞培养介质中,可以诱导 RNA; 实现外源基因 EGFP 和内源基因 CDK9 的沉默,亚细胞在核周围呈点状分布。这说明大部分 Tat-siRNA 定位于内涵体中。2007 年有报道用 HPLC 法纯化 CPP-siRNA 共聚物后测定其 RNA 干扰效果^[8, 49, 50]。浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 p38 的表达的抑制 (20%~60%) 效果提高了 2 倍。RGD 肽段是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp) 的小分子多肽,与整合素 $\alpha v \beta_3$ 受体有高度的选择性和亲和力。将含有不同数目单体的 RGD (cRGD) 与荧光素酶 (luciferase) 修饰的 siRNA (Luc-siRNA) 偶联得到聚合物 cRGD-siRNA。人黑色素瘤细胞 (M21⁺) 对其细胞摄取、亚细胞分布及药理效果进行检测。结果显示 M21⁺ 的摄取受受体介导,而未连接 cRGD 的 siRNA 则观察不到明显的受体介导^[51]。胆固醇连接 9-聚精氨酸肽段 (9R) 后可以将 siRNA 递送至小鼠体内移植瘤,该模型中将能与特异性细胞表面连接的肽段或抗体片段连接到 9R 肽段上,与肽段聚合后产物有细胞特异性;与抗体聚合可以在配体与细胞受体结合后实现 siRNA 内化^[52]。Wang 等^[53]将八聚精氨酸 (R8) 与 PEG 化磷脂脂质体偶联,修饰后的脂质体在 10% 血清存在的培养基中其转染效率和抑制肿瘤细胞的能力强于 Lipofectamine 2000,毒性低于 Lipo 2000,实现了对靶基因的沉默。

3.2.4.2 非共价结合的 CPP-RNA 复合物 将 siRNA 通过静电作用与 CPP 结合是简单有效的方法,但是需要过量的 CPP 才能形成 CPP/siRNA 复合物大分子,

在寡聚精氨酸/siRNA 复合物中, 精氨酸肽段和 siRNA 的混合比例为电荷 12 : 1, 摩尔比为 56 : 1^[54]; MPG 肽段中, 电荷比为 10 : 1, 摩尔比是 84 : 1^[55]。大量的阳离子 CPP 可能与细胞中负电分子发生非特异性的相互作用或者将胞外的负电分子带入胞内而引起副作用。

3.2.5 适体及抗体

许多有治疗作用的抗体, 也能用作靶向药物输送。Aptamer 可以将 siRNA 携带进入细胞。例如, 小鼠异种移植模型中, 将前列腺特异膜受体抗原 (PSMA, 一种在前列腺癌细胞和血管内皮中过表达的细胞表面抗原) 结合 aptamer 后与 siRNA 共价连接进行瘤内注射, 该 Aptamer-siRNA 共聚物靶向促存活基因 *Plk1* 和 *Bcl-2*, 注射后可以将 siRNA 递送至肿瘤细胞并且内化, 诱发细胞凋亡, 抑制肿瘤生长^[50], siRNA 5'-末端用 20 kDa PEG 修饰后, 该嵌合体的体内循环时间延长, 生物利用度大幅提高, 靶基因沉默时间延长, 抑制肿瘤细胞生长的效果也更加明显^[56]。Guo^[57]实验室利用具备自组装功能的噬菌体 *phi29* RNA (pRNA) 构建了装载 siRNA 和荧光标记物的纳米装置。pRNA 含有具备聚合作用的 loop, 通过 loop 间的相互作用, 实现对于 CD4 特异性 aptamer、siRNA 或者荧光染料的装载。当把二聚体应用于 CD4 过表达的 T 细胞系时, 可被特异性细胞摄入并实现靶基因沉默。天然的阳离子鱼精蛋白能与带负电的核酸结合并且压缩核酸。Song 等^[8]把鱼精蛋白抗体融合蛋白用于将 siRNA 递送至体内特定细胞。该重组蛋白通过静电相互作用结合 siRNA, 选择性将 siRNA 递送到感染 HIV 的细胞, 观察到靶向表达 *ErbB2* 鱼精蛋白单链抗体融合蛋白的乳腺癌细胞特异性和基因沉默效果。系统给予与该载体结合的靶向 *c-myc*、*MDM2* 和 *VEGF* 的 siRNA, 能有效抑制小鼠移植瘤的生长。

4 其他递送方式

超声及微气泡超声对比剂可以递送 siRNA 分子^[58], 采用微气泡超声对比剂结合 siRNA 分子, 经静脉注射进入血液循环, 当达到靶区域时, 运用超声破坏微泡, 使其在局部释放, 可提高局部组织的 siRNA 分子浓度, 提高转染率。对比剂被击碎的过程中所产生的“空化效应”、“声孔效应”使局部毛细血管破裂、内皮细胞间隙增宽、通透性增加, 使 siRNA 分子易于穿过血管屏障进入组织内。

5 临床试验中的 siRNA 载体及制剂

临床试验中的 siRNA 大部分是局部给药, 如玻璃体或者鼻内给药。第 1 例 siRNA 临床试验是利用

siRNA 靶向血管内皮生长因子 (VEGF) 治疗老年性黄斑变性 (AMD) 的药物 bevasiranib 注射剂。II 期临床试验证明玻璃体内注射后能减缓患者眼睛中血管的生长并改善视力, 除注射部位红肿外无其他不良反应^[59]。III 期临床试验效果不佳, 2009 年终止 III 期临床试验。siRNA 疗法另外一个治疗 AMD 的 siRNA 的候选药 RTP-801i, 阻断 *REDD-1* 基因表达, 2007 年已经进入 I 期临床试验。Sirna-027 (termed AGN211745) 是一种化学修饰的靶向 VEGF 受体 1 的 siRNA 注射剂, II 期临床试验已经结束^[60], 结果显示患者视敏度有显著提高。在相关亚类患者中没有严重的副反应和剂量毒性事件。

第 1 个治疗呼吸道病毒感染的 siRNA 是 Alnylam Pharmaceuticals 公司的 ALN-RSV01 鼻腔喷雾制剂, 靶向呼吸道合胞病毒。目前正在自然感染的成年患者中进行 II 期临床的第二阶段试验^[61]。Nucleonics 已经开始了 NUC B1000 治疗慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染 I 期临床的人体安全性研究。NUC B1000 是基于 siRNA 用于减小恶性肝炎设计的阳离子脂质组分的系统给药制剂^[62]。Calando 公司的 CALAA-01 是基于环糊精的靶向核糖核苷酸还原酶 M2 亚基的 siRNA 多聚纳米粒^[63], 成为第 1 个治疗人类实体瘤 (转移性淋巴瘤) 的 siRNA 靶向纳米制剂。该纳米粒由线型环糊精、靶向转铁蛋白受体的人转铁蛋白配体、亲水性 PEG 聚合物和抗核糖核苷酸还原酶 (anti-ribonucleotide reductase, *RRM2*) siRNA 组成。CALAA-01 临床 I 期结果显示 *RRM2* mRNA 及蛋白表达水平降低, 通过实验验证了 *RRM2* mRNA 水平的降低是通过 RNAi 实现的^[64]。

6 问题及展望

RNAi 技术的发展有目共睹: 对裸 siRNA 进行结构稳定性和靶向性修饰后, 理化性质和生物体内行为得到改善; 脂质递送载体能够避免酶降解, 容易实现摄取, 但对靶细胞特异性不强; 连接了 aptamer、抗体及肽片段的纳米递送系统靶向性强、转染效率高、毒性低, 是很有潜力的递送载体, 有待进一步开发。RNAi 已在抗病毒、抗肿瘤研究中展示了广阔的应用前景, 在心血管、神经系统、内分泌系统疾病的研究中也发挥着重要作用。但是将 siRNA 应用于临床治疗, 仍有较多问题需要解决和改善: 给药途径、时效关系及量效关系、减少非特异反应、基于 siRNA 药物的治疗机制也需要进一步研究。siRNA 的脱靶免疫副作用为其临床应用带来了新的挑战, 通过高效特异性的 siRNA 序列的设计和化学修饰, 达到增强

靶基因的沉默效果,又避免 siRNA 诱导的免疫刺激和脱靶副作用,为其临床应用打下基础^[65]。

最近,牛津大学科学家开发出一种由 DNA 制造的分子“笼子”,能进入哺乳动物活细胞内部并在其中生存,可能带来一种有效的药物递送新方法。DNA “分子笼”由 4 条人工合成的 DNA 短链构成,能围绕蛋白质分子组装起来,从而形成一个“分子笼”将该蛋白质包在内部,而且能够通过设计程序,让“分子笼”在遇到细胞内特定的“触发”分子时再度打开。特波菲尔德认为,这种四面体“分子笼”只有 7 nm,不但容易进入细胞,还留出了相当大的空间以容纳药物,可以根据所装载的药物设计“分子笼”的结构,以达到理想的释放^[66]。该研究为 siRNA 的递送提供了新的思路和方法,“分子笼”在递送 siRNA 方面的应用有待研究开发。

References

- [1] Shi ML, Zhao ZH, Wang Y, et al. *In vivo* delivery of siRNA [J]. *Herditas* (遗传), 2009, 31: 683–688.
- [2] Dana J, Gary NP, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery [J]. *J Control Release*, 2007, 121: 64–73.
- [3] Davenport RJ. Gene silencing: a faster way to shut down gene [J]. *Science*, 2001, 292: 1469–1471.
- [4] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806–811.
- [5] Min M, Gao GL. Progress of RNA interfering and its application in the tumor therapy [J]. *Pract J Cancer*, 2008, 23: 537–539.
- [6] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 129–139.
- [7] Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, et al. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication [J]. *Hepatology*, 2005, 41: 1349–1356.
- [8] Song E, Zhu P, Lee SK, et al. Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 709–717.
- [9] Southcek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs [J]. *Nature*, 2004, 432: 173–178.
- [10] Jonathan KW, Glen F, Masad JD, et al. Chemically modified siRNA: tools and applications [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13: 842–855.
- [11] Chen CB, Qing C, Lu SL. Advances in research and applications of gene-silencing technologies induced by siRNAs [J]. *Acta Univ Med Second Shanghai* (上海第二医科大学学报), 2005: 1184–1187.
- [12] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 7413–7417.
- [13] Malone RW, Felgner PL, Verma LM. Cationic liposome-mediated RNA transfection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6077–6081.
- [14] Shen Y, TU JS, Pang H, et al. Electrophoresis and fluorospectrophotometry methods to determine the content and entrapment efficiency of siRNA in cationic liposomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2009, 44: 430–435.
- [15] Morrissey DV, Lockrige JA, Shaw L, et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1002–1007.
- [16] Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2006, 441: 111–114.
- [17] Sato Y, Murase K, Kato J, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 431–442.
- [18] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7297–7301.
- [19] Putnam D. Polymers for gene delivery across length scales [J]. *Nat Mater*, 2006, 5: 439–451.
- [20] Grayson AC, Doody AM, Putnam D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery *in vitro* [J]. *Pharm Res*, 2006, 23: 1868–1876.
- [21] Thomas M, Lu JJ, Ge Q, et al. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 5679–5684.
- [22] Werth S, Urban KB, Dai L, et al. A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes [J]. *J Control Release*, 2006, 112: 257–270.
- [23] Namgung R, Kim J, Singha K, et al. Synergistic effect of low cytotoxic linear polyethylenimine and multiarm polyethylene glycol: study of physicochemical properties and *in vitro* gene transfection [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6: 1826–1835.
- [24] Park IK, Singha K, Arote RB, et al. pH-responsive polymers

- as gene carriers [J]. *Macromol Rapid Commun*, 2010, 31: 1122–1133.
- [25] Lü M, Hang W, Gao ZG, et al. Development of siRNA delivery mediated by polyethylenimine and its derivatives [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2011, 46: 81–84.
- [26] Yang H, Che O, Chen S, et al. Silence of VEGFR2 expression mediated by PEI/siRNA complexes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 576–581.
- [27] Unwalla H, Rossi JJ. Tat-regulated expression of RNA interference: triggers for the treatment of HIV infection [J]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2008, 5: 40–43.
- [28] Wu Y, Wang WW, Chen YT, et al. The investigation of polymer-siRNA nanoparticle for gene therapy of gastric cancer *in vitro* [J]. *Int J Nanomed*, 2010, 5: 129–136.
- [29] Malek A, Merkel O, Fink L, et al. *In vivo* pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various (PEI-PEG)/siRNA complexes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 236: 97–108.
- [30] Oskuee RK, Philipp A, Dehshahri A, et al. The impact of carboxyalkylation of branched polyethylenimine on effectiveness in small interfering RNA delivery [J]. *J Gene Med*, 2010, 12: 729–738.
- [31] Philipp A, Zhao X, Tarcha P, et al. Hydrophobically modified oligoethylenimines as highly efficient transfection agents for siRNA delivery [J]. *Bioconjug Chem*, 2009, 20: 2055–2061.
- [32] Kim TI, Lee M, Kim SW. A guanidynylated bioreducible polymer with high nuclear localization ability for gene delivery systems [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 1798–1804.
- [33] Son S, Hwang DW, Singha K, et al. RVG peptidetethered bioreducible polyethylenimine for gene delivery to brain [J]. *J Control Release*, 2011, 155: 18–25.
- [34] Son S, Singha K, Kim WJ. Bioreducible BPEI-SS-PEG-eNGR polymer as a tumor targeted nonviral gene carrier [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 6344–6354.
- [35] Breunig M, Hozsa C, Lungwitz U, et al. Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: disulfide bonds boost intracellular release of the cargo [J]. *J Control Release*, 2008, 130: 57–63.
- [36] Li C, Guo T, Zhou D, et al. A novel glutathione modified chitosan conjugate for efficient gene delivery [J]. *J Control Release*, 2011, 154: 177–188.
- [37] Howard KA, Paludan SR, Behlke MA, et al. Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF- α knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model [J]. *Mol Ther*, 2009, 17: 162–168.
- [38] Howard KA, Rahbek UL, Liu X, et al. RNA interference *in vitro* and *in vivo* using a chitosan/siRNA nanoparticle system [J]. *Mol Ther*, 2006, 14: 476–484.
- [39] Ghosn B, Singh A, Li M, et al. Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA [J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20: 163–172.
- [40] Noh SM, Han S E, Shim G, et al. Tocopheryl oligochitosan-based self assembling oligomersomes for siRNA delivery [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 849–857.
- [41] Heidel JD, Yu Z, Liu JY, et al. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 5715–5721.
- [42] Bartlett DW, Su H, Hildebrandt IJ, et al. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality *in vivo* imaging [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15549–15554.
- [43] Bartlett DW, Davis ME. Impact of tumor-specific targeting and dosing schedule on tumor growth inhibition after intravenous administration of siRNA containing nanoparticles [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99: 975–985.
- [44] Boe SL, Longva AS, Hovig E. Cyclodextrin containing polymer delivery system for light-directed siRNA gene silencing [J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20: 175–182.
- [45] Azuma K, Nakashiro KI, Sasaki T, et al. Anti-tumor effect of small interfering RNA targeting the androgen receptor in human androgen-independent prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391: 1075–1079.
- [46] Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, et al. Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationic polymer carrying diamine chain with distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 13612–13613.
- [47] Kim SH, Jeong JH, Kim T, et al. VEGF siRNA delivery system using arginine-grafted bioreducible poly(disulfide-amine) [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6: 718–726.
- [48] Chiu YL, Ali A, Chun CY, et al. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells [J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 1165–1175.
- [49] McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, et al. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1005–1015.
- [50] Turner JJ, Jones S, Fabani MM, et al. RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 38: 1–7.
- [51] Md RA, Xin M, Michael F, et al. Multivalent cyclic RGDconjugates for targeted delivery of small interfering RNA

- [J]. *Bioconjug Chem*, 2011, 22: 1673–1681.
- [52] Kim WJ, Christensen LV, Jo S, et al. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma [J]. *Mol Ther*, 2006, 14: 343–350.
- [53] Wang W, Tang N, Zhang CL, et al. Cell penetrating peptides enhance intracellular translocation and function of siRNA encapsulated in PEGylated liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 142–148.
- [54] Wang YH, Hou YW, Lee HJ. An intracellular delivery method for siRNA by an arginine-rich peptide [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70: 579–586.
- [55] Simeoni F, Morris MC, Heitz F, et al. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 2717–2724.
- [56] Dassie JP, Liu XY, Thomaset GS, et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 839–849.
- [57] Shu Y, Cinier M, Guo PX, et al. Assembly of multifunctional phi29 pRNA nanoparticles for specific delivery of siRNA and other therapeutics to targeted cells [J]. *Methods*, 2011, 54: 204–214.
- [58] Zheng XZ, Du LF, Chang J. Advance in administration routes of siRNA [J]. *Biomed Eng Clinic Med (生物医学工程与临床)*, 2009, 13: 461–464.
- [59] Wang QX, Wang JJ, Xu GX. Progress of RNAi drugs in clinical research [J]. *Pharm Clin Res (药学与临床研究)*, 2010, 18: 127–130.
- [60] Behlke MA. Progress towards *in vivo* use of siRNAs [J]. *Mol Ther*, 2006, 13: 644–670.
- [61] DeVincenzo J, Cehelsky JE, Alvarez R, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV) [J]. *Antiviral Res*, 2008, 77: 225–231.
- [62] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 850–862.
- [63] Castanotto D, Rossi JJ. The promise and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics [J]. *Nature*, 2009, 457: 426–433.
- [64] Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA *via* targeted nanoparticles [J]. *Nature*, 2010, 464: 1067–1070.
- [65] Guo JJ, Wang JJ, Xu GX, et al. Pharmacokinetic perspective and the delivery of siRNA *in vivo* [J]. *Pharm Clin Res (药学与临床研究)*, 2010, 18: 363–369.
- [66] Walsh AS, Yin HF, Erben CM, et al. DNA cage delivery to mammalian cells [J]. *ACS Nano*, 2011, 5: 5427–5432.