

DOI: 10.13376/j.cblls/2023111

文章编号: 1004-0374(2023)08-1012-11

RNA药物递送载体的研究进展

娄 瑞, 林超龙, 黄承浩*

(厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361102)

摘要: 核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 疗法通过将外源 RNA 引入特定细胞来精准调控基因的表达, 从而实现对疾病的干预。近年来, 临床结果表明 RNA 疗法在基因调控和疾病预防上是一种十分有潜力的基因疗法。然而, RNA 药物在递送过程中仍然面临如稳定性差、组织靶向性弱、免疫原性强等诸多问题, 限制了 RNA 药物的进一步临床转化应用。本文总结了不同 RNA 药物的递送方式在临床前和临床实验中取得的最新研究进展, 并讨论不同递送载体的应用前景和局限性, 旨在为 RNA 药物递送方式的优化提供新的设计思路, 促进 RNA 疗法的临床应用。

关键词: 核糖核酸; 递送系统; 非病毒载体; 病毒载体

中图分类号: R943 **文献标志码:** A

Research progress of vector for RNA drugs delivery

LOU Rui, LIN Chao-Long, HUANG Cheng-Hao*

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases,
Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: RNA-based therapies offer a promising approach for treating a variety of diseases by regulating gene expression through introduction of exogenous RNAs into target cells. Clinical data supports the potential of RNA therapeutics in gene regulation and disease prevention. However, RNA-based therapies face several challenges, such as poor stability, weak tissue targeting, and strong immunogenicity during delivery, which have hindered their clinical application. This review highlights recent progress in the development of various RNA drug delivery methods, both in preclinical and clinical trials, then discusses the potential and limitations of different delivery vectors, providing new insights for the optimization of RNA drug delivery methods and the advancement of clinical applications of RNA drugs.

Key words: ribonucleic acid; delivery system; non-viral vector; viral vector

RNA 是一种多功能的生物大分子, 存在于生物细胞以及部分病毒、类病毒中, 广义可分为编码 RNA 和非编码 RNA 两种。编码 RNA 是指能翻译成蛋白质的信使 RNA (messenger RNA, mRNA); 而非编码 RNA 有多种类型, 包括核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)、转运 RNA (transfer RNA, tRNA)、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA)、反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASO) 等多种类型。在药物研究领域, 小分子药物和蛋白药物占据着主导地位, 这些药物通过作用于致病基因的下游靶蛋白发挥功

能。但是, 目前许多致病蛋白没有相应的靶向药物, 因此需要一种更准确、更有效的治疗策略。自 1998 年首款 RNA 药物 Fomivirsen^[1] 获批上市以来, RNA 药物开始跃居药物研究的前沿。2020 年新冠疫情的爆发使得多款 mRNA 疫苗被紧急授权用于治疗新型冠状病毒, mRNA 药物在临床上得到进一步的开发应用^[2]。

收稿日期: 2023-02-10; 修回日期: 2023-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(32100732)

*通信作者: E-mail: huangchenghao@xmu.edu.cn

RNA 药物基于碱基互补配对原则,精准调控目的基因的表达,候选靶点较为丰富,开发过程简单高效,特异性强,生产简便,具有较强的应用潜力。然而, RNA 药物在生物体复杂的环境中仍然面临着诸多的问题,包括稳定性差、易降解、靶向性弱、治疗效果差等,如何提高递送效率成了 RNA 药物应用于临床治疗必须克服的挑战。在 RNA 药物的临床前和临床运用过程中,主要采用载体递送的策略进行 RNA 药物的有效递送和疾病治疗。递送载体在递送过程中,不仅可以提高 RNA 药物在体内的稳定性,还可以提高 RNA 药物的递送效率,同时大部分载体还具有组织靶向性,可以将 RNA 药物递送至特定部位,提高药物疗效同时降低药物毒性。已有研究表明多种递送方式均可以对 RNA 药物进行有效递送,然而目前还未有统一和明确的高效方式。因此,本文将通过综述 RNA 药物在临床中的主要发展,概括总结目前 RNA 药物的多种递送载体并讨论其优缺点,为 RNA 药物的高效递送研究提供坚实的理论参考依据。

1 RNA药物的分类及递送

1.1 RNA药物的分类

mRNA 作为遗传信息载体可以调控蛋白的表达,已经有研究表明 mRNA 疫苗有着巨大的潜能和发展前景。mRNA 疫苗的原理是将 mRNA 递送到细胞内,翻译表达相应的抗原,引导机体产生免疫反应,从而达到预防的作用^[3]。mRNA 疫苗可分为两种,一种是非复制型的传统 RNA 疫苗,另外一种是具有自我复制能力的自扩增 RNA (self-amplifying RNA, saRNA) 疫苗^[4]。传统 RNA 疫苗进入细胞并释放到细胞质后翻译成蛋白,而 saRNA 除了拥有和传统疫苗一样的目的抗原、5'UTR、3'UTR、5'端帽子结构以及 3'端 polyA 尾巴基因外,在抗原基因上游插入了甲病毒的非结构蛋白基因,这些基因进入细胞后可帮助 RNA 实现自我复制^[5]。mRNA 疫苗有望替代传统疫苗,因为它们具有高效能、开发迅速、成本低及安全给药的潜力。从 1990 年 Wolff 等^[6]首次证明在动物体内注射 mRNA 后可以检测到蛋白质的表达开始,研究者们研发了针对多种传染性疾病的 mRNA 疫苗。在过去的二十年里, mRNA 药物研发技术的创新和递送载体的优化使得越来越多的 mRNA 疫苗得到应用。2019 年新冠肺炎疫情的爆发促进了 mRNA 疫苗的研究进展,辉瑞的 BNT162b2 疫苗获得了 FDA 的紧急授权,

成为第一个获准用于人体的 mRNA 药物^[7],随后 Moderna 公司研发出的疗效更好的疫苗 mRNA-1273 被授权在美国使用^[8](表 2)。美国 Moderna 公司一直致力于传染病 mRNA 疫苗的研发,2022 年 1 月开启 HIV 疫苗的 I 期临床试验阶段^[9],同年 2 月呼吸道合胞病毒疫苗 mRNA-1345 启动 III 期临床试验^[10], mRNA 疫苗在临床上的大规模应用对于 RNA 药物具有里程碑意义。

siRNA 又称小干扰 RNA,是由 22~25 个核苷酸对组成的外源性双链 RNA 分子。与同源 mRNA 结合后, siRNA 可介导相关基因的沉默,这个过程称为 RNA 干扰^[11]。siRNA 药物具备特异性强的优势,降低了脱靶的可能性。从 2018 年第一款 siRNA 药物 Patisiran 出现开始, siRNA 药物逐渐进入大众的视野^[12]。2022 年第五款 siRNA 药物 Amvuttra 已经获批上市,用于治疗成人遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性多发性神经病。仅五年时间就有 5 种 siRNA 药物获批上市,表明 siRNA 药物拥有巨大的发展潜力(表 1)。

miRNA 也称微小 RNA,是一类长度约为 21~23 个核苷酸的单链 RNA 分子。miRNA 可以与靶标位点结合,介导基因沉默或者促使靶 mRNA 降解从而抑制蛋白表达,是基因调控的重要工具。和 siRNA 相比, miRNA 药物的特异性较低,毒副作用大,目前未有效果较好的 miRNA 药物获得批准上市^[13]。

ASO 是一种人工合成的单链寡核苷酸分子,长度通常为 15~20 个核苷酸。ASO 的作用原理是进入细胞后靶向 mRNA 形成异质双链体,在核糖核酸酶 H1 的介导下降解 mRNA,从而抑制靶基因的表达^[14]。从 1978 年 ASO 技术出现开始,到 1998 年第一款 ASO 药物 Fomivirsen 获批上市用于治疗巨细胞病毒视网膜炎^[15],至今已有 9 种 ASO 药物获批上市,是应用最为广泛的 RNA 药物(表 1)。

为了对比各种 RNA 药物的作用机制、优缺点及应用范围,本文对 RNA 的分类和性质进行了总结概括(表 2)。

1.2 RNA药物的成药性挑战及递送

近年来, RNA 疗法逐渐受到科学家们的青睐,但当前其临床应用仍须进一步提高自身的稳定性、半衰期和组织靶向性,同时降低自身的免疫原性。目前, RNA 药物的成药性方面仍然面临着几方面的挑战。(1) RNA 药物的稳定性差。与小分子和蛋白质药物不同的是, RNA 分子必须在胞内才能发

表1 FDA和EMA批准的RNA药物

类型	药物名称	获批时间	公司	适应症
ASO	福米韦生	1998, FDA	伊奥尼斯制药	巨细胞病毒性视网膜炎
ASO	米泊美生钠	2013, FDA	伊奥尼斯制药	纯合子家族性高胆固醇血症
ASO	依特立生	2016, FDA	萨雷普塔治疗	杜氏肌营养不良症
ASO	诺西那生钠	2016, FDA	伊奥尼斯制药	脊髓性肌萎缩症
ASO	伊诺特森	2018, EMA	伊奥尼斯制药	遗传性转甲状腺素蛋白介导淀粉样变性的多发性神经病
siRNA	帕蒂西兰	2018, FDA	阿里拉姆制药	遗传性转甲状腺素蛋白介导淀粉样变性的多发性神经病
ASO	戈洛迪森	2019, FDA	萨雷普塔治疗	杜氏肌营养不良症
ASO	伏拉索生	2019, EMA	伊奥尼斯制药	家族性乳糜微粒血症综合征
mRNA	复必泰	2020, FDA	拜恩泰科	COVID-19
mRNA	斯派克瓦克斯	2020, FDA	莫德纳	COVID-19
siRNA	吉佛西兰	2020, FDA	阿里拉姆制药	急性肝卟啉病
siRNA	卢马西兰	2020, EMA	阿里拉姆制药	原发性高草酸尿症 1 型
ASO	维托拉尔森	2020, FDA	日本新药	杜氏肌营养不良症
siRNA	英克西兰	2020, EMA	阿里拉姆制药	原发性高胆固醇血症或混合型血脂异常
ASO	卡西美生	2021, FDA	萨雷普塔治疗	杜氏肌营养不良症
siRNA	夫曲赛仑	2022, FDA	阿里拉姆制药	遗传性甲状腺素转运蛋白介导淀粉样变性的多发性神经病

表2 RNA药物的分类和特性

类型	组成	作用原理	优缺点	应用
mRNA	单链RNA	翻译表达目的蛋白作为抗原	高效能、低成本、安全性高，但稳定性差、递送效率低	主要用于作为各种疾病的疫苗，如新型冠状病毒疫苗
siRNA	双链RNA	靶向并切割mRNA，抑制蛋白质的翻译	特异性高，但具有免疫原性	主要用于治疗各种肝脏疾病和罕见病，如急性肝卟啉症和遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性疾病
miRNA	单链RNA	主要通过靶向mRNA抑制翻译，也可以降解mRNA	一个miRNA可以调节多种mRNA的表达，但是特异性低、毒副作用大	可用于构建基因敲除小鼠
ASO	单链RNA	靶向并降解mRNA	可以不通过载体直接递送至效应部位，但是半衰期较短	用于治疗各种罕见病，如杜氏肌营养不良症

挥作用，但是 RNA 分子对体内广泛存在的核酸酶敏感，裸露的 RNA 容易被降解，使得 RNA 药物难以有效地进入细胞并自行发挥作用^[16]。(2) RNA 药物本身分子量较大且带有负电荷，不能有效通过细胞膜进入细胞^[17]。(3) RNA 药物安全性低。安全性问题也是许多 RNA 药物在临床研究中失败的主要原因。RNA 药物在递送过程中存在着脱靶的可能性，导致药物在非靶组织中累积，影响药物疗效的同时对宿主造成严重的毒副作用^[18]。此外，RNA 药物还存在其他的问题，例如 RNA 药物本身具有免疫原性以及 mRNA 本身尺寸较大等都阻碍着 RNA 药物的临床应用。

目前，解决递送问题主要有两个方法：一是对 RNA 分子进行化学修饰；二是利用载体递送 RNA 药物。其中，药物递送载体的运用不仅突破了 RNA

药物递送的局限性，还大大提升了药物的利用率和安全性。因为载体不仅能将药物包裹在内部，防止被降解，还可以穿过细胞膜，将 RNA 药物递送至细胞内。此外，对载体本身进行优化后，可以发挥特异性靶向的作用，减少药物脱靶，提高 RNA 药物的疗效同时减少毒副作用。因此，研究人员通过对递送载体不断优化，提高 RNA 药物的稳定性和组织靶向性，加速了 RNA 药物的临床应用。然而，递送药物的载体多种多样，每种载体都有着自身的优势和局限性，递送载体的选择也成为提升 RNA 药物疗效的重要一环。

2 RNA递送载体

2.1 用于RNA递送的载体分类

为了克服 RNA 递送过程中的障碍，科研人员

运用药物递送载体使 RNA 免受降解, 高效递送至靶向部位。然而, 已有研究表明多种类型的递送载体均可有效递送 RNA 药物, 不同的递送载体之间的成分、结构和递送特性均不相同。根据递送载体成分进行分类, RNA 递送载体主要分为非病毒载体和病毒载体。非病毒载体主要包括脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP)、N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GalNAc)、聚合物纳米粒 (polymer nanoparticle, PNP)、无机纳米粒 (inorganic nanoparticle, INP), 这些载体普遍具有毒性小、安全性高、荷载量大以及设计灵活等特点^[19]。病毒载体主要包括腺病毒载体 (adenovirus vector, AdV)、腺相关病毒载体 (adeno-associated viral vector, AAV)、逆转录病毒载体 (retroviral vector, RV)、慢病毒载体 (lentiviral vector, LV), 广谱性和靶向性强、递送效率高、表达时间长等是病毒载体的应用优势^[20]。此外, 介于病毒载体与非病毒载体之间的类病毒颗粒 (virus-like particle, VLP) 递送载体是我国首个完全自主开发的原创型基因治疗载体, 开辟了递送载体的新形式, 具有巨大的应用潜力。

2.1.1 脂质纳米颗粒

LNP 是一种具有均匀脂质核心的脂质囊泡, 起源于小分子药物的脂质体运输系统, 近期因作为 COVID-19 mRNA 疫苗载体获得成功而备受关注。LNP 的成分通常由阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇、聚乙二醇化脂质 (PEG-脂质) 四部分组成。其中, 胆固醇和 PEG-脂质提高了整体的稳定性; 辅助脂质可加快 LNP 在细胞中的结构转化, 使其从锥形转变为六边形构象, 膜的不稳定性增强从而加速核酸释放^[21]; 阳离子脂质体表面带正电, 可将带负电的 RNA 包裹入内, 随后被表面带负电荷的细胞膜吸附, 再通过膜的融合作用将 RNA 递送至细胞内^[22] (图 1A)。然而, 永久性阳离子脂质组成的囊泡与带负电的细胞膜发生静电作用会引起细胞毒性, 为了防止产生细胞毒性作用, 脂质结构已经发展成能够对体内的酸性环境响应而带正电荷的可电离脂质^[23]。pH 依赖性电离的特性使它们成为核酸递送的最佳材料, 其功效和毒性特征均得到改善。在 RNA 药物递送方面, LNP 相比于其他的递送系统, 在包装均一性、核酸体内外表达效果、安全性等多方面都更具优势。

各种临床前研究充分证明了 LNP 是理想的递送载体。Veiga 等^[24]将 LNP 与 Ly6c 靶向抗体非共价包被, 使抗炎细胞因子 IL-10 mRNA 高效靶向至

白细胞中, 可用于治疗炎症性肠病, 改造后的 LNP 提高了靶向效率, 降低了药物毒性。此外, 在体内利用 LNP 还可以高效递送 PD-L1 siRNA, 进入 Kupffer 细胞后降低 PD-L1 的表达水平, 提高 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞介导的抗病毒免疫反应^[25]。LNP 的 RNA 药物递送类型较为丰富, 还可用于递送 ASO、miRNA 等^[23, 26]。第一款 siRNA 药物以 LNP 作为载体, 用于治疗遗传性转甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性的多发性神经病, 这也是第一款基于 RNAi 技术的药物^[27]。同时 LNP 也是 mRNA 疫苗递送的关键技术^[28], 自新冠疫情爆发以来 FDA 批准的最早的两款 mRNA 新冠疫苗都是以 LNP 作为递送载体。然而, 大多数的 LNP 递送系统的组织靶向性主要局限于肝脏, 如何将 RNA 药物递送到肝外组织或细胞仍然是一个亟待解决的关键问题^[29]。

2.1.2 N-乙酰半乳糖胺

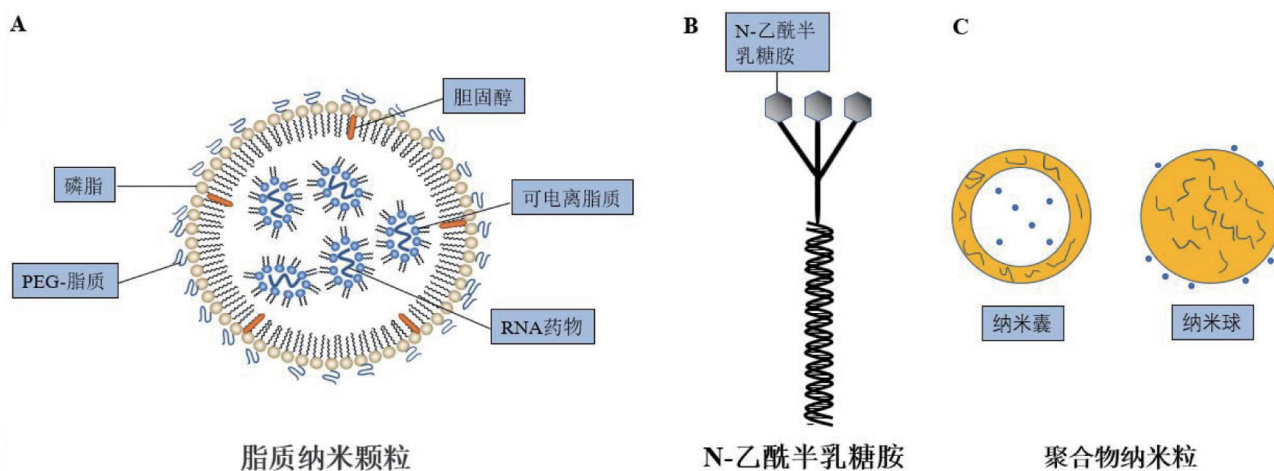
N-乙酰半乳糖胺-核酸是糖类化合物和核酸形成的单缀化合物, 也是常用的 RNA 递送载体之一。GalNAc 以三价态的方式共价缀合到 RNA 的正义链 3' 末端, 形成多糖-RNA 单缀合物, 并通过内吞方式使 RNA 药物进入细胞并发挥功能 (图 1B)。GalNAc 对唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 有很高的亲和力, 而 ASGPR 表达在肝实质细胞表面。对 RNA 进行 GalNAc 修饰后, 通过 ASGPR 介导的细胞内吞作用使 RNA 进入细胞并发挥功能, 整个递送过程特异性地靶向肝脏^[30]。相比于 LNP, GalNAc 偶联 RNA 药物后可皮下给药, 避免了使用 LNP 时由于脂质分子和 PEG 的免疫原性而引起的安全性问题。同时基于 GalNAc 开发的产品更易于放大生产规模, 在给药剂量和频次方面也更具有优势。利用 GalNAc 修饰的药物主要有 GalNAc-ASO 与 GalNAc-siRNA, 其中在治疗上有效的 ASO 是经过大量修饰的, 因此递送载体并不是必需的, 而 siRNA 因为其本身容易降解, 所以多采用载体递送技术。Nair 等^[31]利用 GalNAc-siRNA 共轭物形式进行给药, 成功介导了鼠转甲状腺素蛋白基因的沉默, 降低小鼠体内 mRNA 的水平。此外, Cansby 等^[32]利用 GalNAc 偶联丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的 ASO, 对小鼠进行给药后抑制肝脏中成脂基因表达和降低乙酰辅酶 A 羧化酶蛋白丰度, 在非酒精性脂肪性肝病中具有极高的治疗潜力。目前上市的 siRNA 药物中, 除了 Patisiran 外, 其他四款都是基于 GalNAc 偶联技术进行递送的, 偶联后形成的 GalNAc-siRNA 共轭物形式具有很好的应用潜力^[33]。

2.1.3 聚合物纳米粒

聚合物又称高分子化合物,是由一种由单体经聚合形成的产物,具有重复的结构单位,用于制备纳米粒子的聚合物材料包括聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、聚乳酸羟基乙酸(PLAG)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯亚胺(PEI)等。PNP作为递送载体具有多重优势,如可通过调节聚合物生物降解速率和药物从聚合物基质中扩散出来的速率来控制药物释放的速率,具有生物降解性和生物相容性以及特异性靶向等,是理想的药物递送载体^[34]。Yoshinaga等^[35]以PEG作为递送载体,将mRNA进行聚乙二醇化,得到PEG-RNA复合物,PEG以空间位阻和静电方式稳定了mRNA的结构,同时将mRNA的翻译水平提高至原来的20倍。Helmschrodt等^[36]利用构建好的聚乙烯亚胺载体PEI-F25-LMW与帕金森病中的突触前蛋白—— α -突触核蛋白的siRNA进行复合,注入到小鼠的侧脑室中后,显著降低了小鼠的 α -突触核蛋白mRNA水平,有望成为一种治病手段。PNP是一种微小的固体和胶体颗粒,尺寸范围从几纳米到1 000 nm,具有多种结构和形态,可以负载活性化合物包埋在聚合物核心内或表面吸附到聚合物核心上^[37]。PNP根据形态可分为纳米囊和纳米球(图1C),纳米囊可将药物包裹在内部,其外壳可增加药物的稳定性,而纳米球是将药物吸附或偶联在纳米球表面或溶解、包封在实心球中,两者使用的聚合物都具有高度的生物相容性和降解性^[38]。但是,PNP载体仍然存在如毒性、有机溶剂的残留、亲水性药物包封不充分、大规模生产困难以及储存和灭菌问题等缺点^[39]。

2.1.4 无机纳米粒

INP由无机颗粒和可生物降解的聚阳离子合成,典型的INP包括磷酸钙、碳纳米管、二氧化硅、金、氧化铁、磷酸镁等^[40]。INP根据材料成分可分为金属纳米颗粒和非金属纳米颗粒。金属纳米颗粒作为基因载体的结构通常以金属为核,功能材料为壳,具有生物相容性、储存稳定性、易于制备、多功能性、毒副作用小等特点,它还能使某些具有基因递送性能的材料获得靶向性、可控性及可成像等功能。然而,金属纳米颗粒在体内不易降解,临床应用受到限制。非金属纳米颗粒的生物安全性优于金属纳米颗粒,修饰在其上的功能分子在转染效率上通常高于功能分子本身,但是无机非金属纳米颗粒的生物降解性能仍有待改善。与有机材料相比,无机纳米粒具有亲水性、生物相容性和稳定性高的特点,多种无机纳米颗粒已被用作药物递送的载体^[41]。Imani等^[42]利用聚乙二醇和聚乙烯亚胺双功能化的还原氧化石墨烯作为siRNA的载体提高了载体稳定性和细胞内化的效率,将诱导细胞死亡的siRNA转染至MCF-7乳腺癌细胞内,72 h后可诱导细胞死亡。INP在siRNA递送中的治疗潜力已在广泛的疾病模型中得到证实,为未来的治疗应用带来了希望。然而,目前没有使用INP载体进行RNAi治疗的临床试验。同样,关于负载siRNA的纳米颗粒在长效和持续释放平台中的给药、清除途径和潜在免疫反应的安全性的关键信息仍不清楚,仍然需要仔细设计提高安全性的策略以及评估这些策略的方法。最重要的是,缺乏使用临床前动物模型对功能性INP-RNA复合物的中间和最终加合物



A: 脂质纳米颗粒; B: N-乙酰半乳糖胺; C: 聚合物纳米粒

图1 非病毒载体结构示意图

进行快速且廉价的筛选工具, 这极大地阻碍了临床转化^[43-44]。

2.1.5 腺病毒载体

腺病毒是一种大分子双链无包膜的二十面体 DNA 病毒, 而腺病毒载体是以缺失了病毒活性的腺病毒作为模型进行改造得到的 (图 2A)。经过三次改造后, 第三代腺病毒载体的免疫原性显著降低, 载体量增加, 安全性也更高。腺病毒载体可以感染宿主细胞, 进入细胞后病毒基因组并不会整合到宿主细胞上, 而是游离于细胞染色体外, 仅瞬时表达, 具有较高的安全性。腺病毒载体具有较高的热稳定性和较强的诱导先天免疫的能力, 是有潜力的疫苗载体^[45]。此外, 腺病毒载体还可作为 siRNA 的载体, 将 siRNA 递送至宿主细胞可抑制目的基因表达^[46]。在介导基因沉默上, Pei 等^[47]利用缺失病毒相关 RNA 的腺病毒作为载体, 相比于第一代腺病毒载体, 递送效率显著提高, 在病毒基因组中插入抗 HCV 的 shRNA 后, 有效抑制了感染细胞中 HCV 的复制, 是治疗 HCV 的有效方法。Scholz 等^[48]基于腺病毒载体向细胞内递送 miRNA, 检测发现 A549 细胞中的 tdTomato mRNA 水平和蛋白表达水平降低, 证明了腺病毒载体的体外递送作用。然而, 采用腺病毒作为递送载体的主要缺点在于其免疫原性较强, 高剂量的情况下引发潜在的毒副作用, 同时病毒在细胞内有限复制, 这些都限制了腺病毒载体的临床应用。

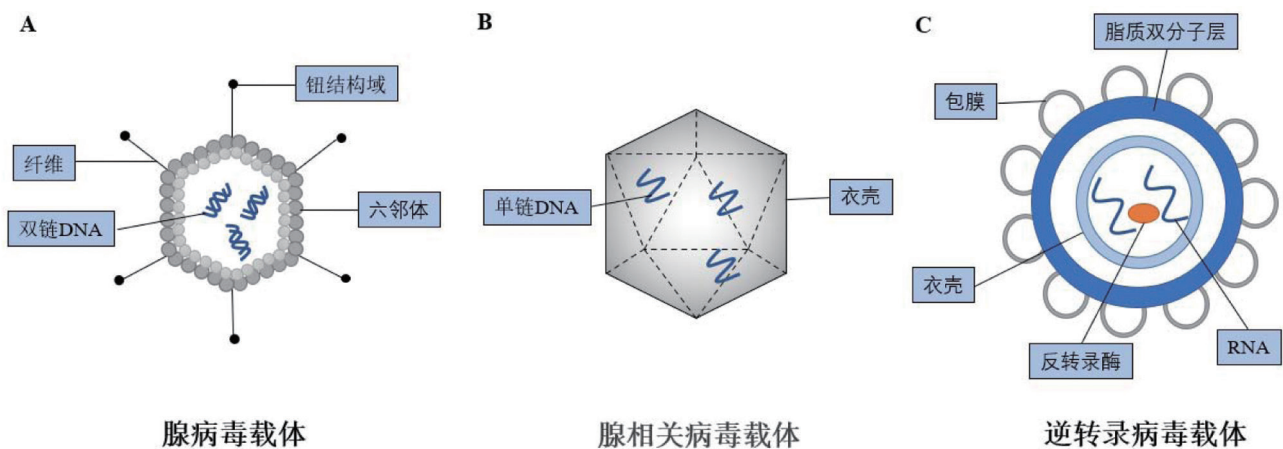
2.1.6 腺相关病毒载体

腺相关病毒是一类无包膜单链线状的 DNA 缺陷型病毒, 形状为二十面体, 可以感染多种细胞 (图

2B)。病毒本身无法独立复制, 只有在辅助病毒存在时才能进行复制和溶细胞性感染。AAV 系统是对腺相关病毒进行改造获得的一种药物递送系统。该系统主要由三部分组成, 包括目的基因、辅助病毒基因以及 AAV 包装和复制所需的基因, 三者构建成质粒后共转染到包装细胞中^[49], 从而实现 AAV 的包装和感染宿主细胞。腺相关病毒载体本身具有安全性高、免疫原性较低、感染谱广、在体内表达外源基因时间长等特点, 被视为最有前途的病毒载体之一, 在基因治疗和疫苗研究中得到广泛应用。Zhang 等^[50]利用 AAV 载体递送针对瞬时受体电位香草亚家族成员 1 (transient receptor potential vanilloid subfamily member 1, TRPV1) 的 siRNA, 转染至稳定表达大鼠 TRPV1 的细胞中, 使用 qPCR 和蛋白质印迹法检测发现 TRPV1 的 mRNA 和蛋白水平降低, 同时鞘内注射 AAV 介导的针对 TRPV1 的 siRNA 可改善骨癌疼痛大鼠的机械异常性疼痛和热痛觉过敏。Kimura 等^[51]利用 AAV2-DJ-shGlx-mVenus 重组病毒对小鼠原代肝细胞和 C2C12 细胞进行感染, Glrx 的敲低效率约为 70%, 在体内给药后的敲除效率也达到了 66%。然而, 采用 AAV 为递送载体也存在一定的局限性, 如插入的目的基因的片段大小有限、感染宿主细胞后不能立即表达等^[50]。

2.1.7 逆转录病毒载体

逆转录病毒是一类有包膜的球形 RNA 病毒, 表面衣壳呈现立体对称 (图 2C)。逆转录病毒可以在逆转录酶存在的情况下将自身 RNA 逆转录成 cDNA, 再经过转录翻译等一系列过程表达蛋白。逆转录病毒在逆转录之后, 将目的基因的 cDNA 整



A: 腺病毒载体; B: 腺相关病毒载体; C: 逆转录病毒载体

图2 病毒载体结构示意图

合到宿主细胞中, 稳定表达目的蛋白^[52]。逆转录病毒作为递送载体可被用于向目的细胞递送 siRNA 或者 shRNA, 随后将 RNA 逆转录得到的 cDNA 整合到宿主细胞基因组上, 实现稳定表达, 以此来精准调控目的基因的表达^[53]。早在 2004 年, Liu 等^[54]利用逆转录病毒载体 pXSN 构建了重组逆转录病毒 pXSNhU6+27sip53, 随后利用该重组病毒感染 HepG2 细胞, 蛋白印迹法检测发现 p53 蛋白的表达水平下降, 成功稳定介导基因的沉默。赖氨酸特异性脱甲基酶 1 (lysine-specific demethylase 1, LSD1) 在肿瘤发生中起重要作用, 是抗肿瘤免疫的潜在靶标。Zhang 等^[55]将 LSD1 shRNA 基因序列以及能促进免疫反应的 miR155 基因序列插入到逆转录病毒载体中, 随后对 CAR-T 细胞进行改造, 上调 miR155 水平的同时下调细胞内的 LSD1 蛋白的表达, 增强 CAR-T 细胞的体内外抗肿瘤活性。逆转录病毒载体具有感染谱广、特异性强、整合效率高以及稳定表达的优点, 但是存在插入突变、激活癌基因的潜在风险以及载体容量较小的问题。

2.1.8 慢病毒载体

慢病毒属于逆转录病毒科, 是单链 RNA 病毒, 相比于其他的逆转录病毒, 除了同样包含 gag、pol、env 三个基因编码病毒的基本结构外, 还拥有额外的调节基因和辅助基因。慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 为来源的一种病毒载体, 包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息, 这些是慢病毒载体的主要组成成分^[56]。在相应的基础研究中, Kim 等^[57]利用慢病毒作为载体将 shRNA 递送至细胞内, 基于蛋白免疫印迹和免疫荧光检测方法, 发现重组慢病毒成功降低了 C2C12 细胞中的 Tnfsf14 蛋白的表达水平。慢病毒载体和逆转录病毒载体的递送方式相同, 不同的地方在于慢病毒载体可以将目的基因整合到分裂和非分裂细胞的基因组中, 拥有较为广泛的感染谱。慢病毒载体系统经过一系列的优化改造, 最终将三质粒系统改造成了四质粒系统, 极大地提高了安全性。

非病毒载体和病毒载体都有着十分显著的优缺点。非病毒载体具有易于制备、毒性低、免疫反应减少、可多剂量使用、荷载量大、安全性高以及设计灵活等特点。非病毒载体在表达质粒、反义寡核苷酸或反义表达质粒向真核细胞进行药物递送的过程中发挥着病毒载体不可替代的作用。但是, 非病毒载体的转导效率低, 目的基因只能实现瞬间表达、广谱性差、运送的颗粒较大容易引发免疫反应, 这

些都成为了限制非病毒载体发展的重要原因。相反地, 病毒载体可以成为出色的传递系统, 主要在于病毒具有感染细胞的能力, 递送效率更高。病毒作为载体通常是缺陷或者减毒的病毒, 外源基因取代了部分毒力基因, 病毒载体的毒性减弱, 靶向特定的组织并将 DNA 或 RNA 递送到细胞中, 精准调控基因的表达。虽然病毒载体是核酸的高效递送系统, 但是存在着生产成本较高、免疫原性强以及病毒基因组整合到宿主细胞基因组上等问题, 仍然有改进的空间^[58]。

2.1.9 类病毒颗粒

VLP 为病毒单一或多个结构蛋白自我组装形成的高度结构化蛋白颗粒, 其在形态结构上与相应的天然病毒相似, 因此具有较强的免疫原性、特异性及生物活性。但是, 颗粒本身不具备病毒核酸, 因此没有增殖能力, 安全性较高。VLP 递送系统利用 mRNA 茎环结构与噬菌体衣壳蛋白特异识别的原理, 通过病毒工程技术, 将病毒和 mRNA 两者的优点完美地结合起来, 创造了新型递送技术 VLP-mRNA, 成为了 RNA 递送载体的下一个热门研究方向^[59]。Ling 等^[60]利用 VLP 递送 Cas9 mRNA 使血管内皮生长因子 A 基因敲除效率高达 44%, 且不会诱导脱靶编辑, 是一种有潜力的递送载体。

为了更为直观地比较各种载体之间的组成结构差异以及优缺点, 本文对各种载体的性质进行了总结归纳(表 3)。

2.2 递送载体的开发与应用

在过去的 25 年里, RNA 药物逐步走向临床应用。目前 RNA 的体内递送主要有两个方法: 一个是改造核酸分子, 使 RNA 结构稳定并躲避免疫系统的识别; 另外一个就是利用药物传输系统, 比如说脂质纳米颗粒 (LNP) 和 GalNAc (N-乙酰半乳糖胺) 偶联技术。其中, 药物传输系统的研发成为 RNA 药物发展的重要方向, 随着对递送系统的深入研究, 不同递送系统的创新与发展也促进了 RNA 药物的逐步发展。

在 RNA 药物开发方面, 目前已有 9 款 ASO 药物、5 款 siRNA 药物和 2 款 mRNA 药物上市。其中主要采用的非病毒载体包括脂质纳米粒 (LNP) 和 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc), 基于 LNP 的 RNA 药物包括 Patisiran (ONPATTRO™)、BNT162b2 和 mRNA-1273, 其中 Patisiran 作为首个获批上市的 siRNA 药物, 既是 LNP 的首次临床应用, 也是首个非病毒载体用于 RNA 药物递送; 基于 GalNAc 偶联技术

表3 RNA 药物载体的分类和特性

类型	名称	组成结构	优点	缺点
非病毒载体	脂质纳米颗粒	具有均匀脂质核心的脂质囊泡	包装均一性、核酸体内外表达效果好、安全性高	组织靶向性较为局限
	N-乙酰半乳糖胺	三价态形式的糖类化合物	可皮下给药, 更易于放大生产规模, 安全性高	仅能靶向肝脏细胞
	聚合物纳米粒	由一种单体经聚合形成的产物	控制药物释放的速率, 具有生物降解性和生物相容性以及靶向特异性	毒性高、有机溶剂的残留、亲水性药物包封不充分、大规模生产困难以及储存和灭菌问题
病毒载体	无机纳米粒	由无机颗粒和可生物降解的聚阳离子合成	亲水性、生物相容性和稳定性高	缺乏临床试验数据, 临床转化困难
	腺病毒载体	大分子双链无包膜的二十面体 DNA 病毒	具有较高的热稳定性和较强的诱导先天免疫的能力, 仅瞬时表达	免疫原性较强, 载体容量小, 细胞内复制有限
	腺相关病毒载体	无包膜单链线状的二十面体 DNA 缺陷型病毒	安全性高、免疫原性较低、感染谱广、在体内表达外源基因时间长	目的基因的片段大小有限, 感染宿主细胞后不能立即表达
	逆转录病毒载体	有包膜的球形 RNA 病毒	感染谱广、特异性强、整合效率高, 可以稳定表达目的基因	存在插入突变、激活癌基因的潜在风险, 载体容量较小
	慢病毒载体	有包膜的球形 RNA 病毒	感染谱更广、特异性强、整合效率高, 可以稳定表达目的基因, 载体容量有所提升	存在插入突变、激活癌基因的潜在风险
其他载体	类病毒颗粒	高度结构化蛋白颗粒	较强的特异性及生物活性、安全性高、递送效率高	免疫原性较强

的 siRNA 药物也很多, 包括 Givosiran^[61]、Lumasiran^[62] 和 Inclisiran^[63], GalNAc-siRNA 也是常用的递送技术。

自新冠疫情爆发以来, 以腺病毒为载体的疫苗层出不穷, 目前以腺病毒为载体的新冠疫苗有阿斯利康的 ChAdOx1 nCoV-19、强生的 Ad26.COV2.S^[64]、康希诺的 Ad5-nCoV-S^[65] 以及俄罗斯加马列亚中心的 Gam-COVID-Vac^[66] 四种。此外, 我国推出了以 rAAV 作为递送系统的 RNA 药物 STSG-0002, 用于治疗乙型肝炎病毒感染相关疾病, 也是病毒载体研究上一个新的突破。除此之外, 在构建不同的小鼠基因敲除模型方面, 通过采用慢病毒载体递送 siRNA 调控目的基因表达也在被广泛地运用^[67]。由于病毒载体有着自身的递送优势, 随着研究发展的不断进步, 基于病毒载体进行药物递送有着广阔的运用前景。

VLP 是自组装的生物分子, 与天然病毒非常相似, 但是区别于病毒载体和非病毒载体, 是递送载体的新形式。目前还未有 VLP 作为载体获批的药物,

但是作为一种新型的疫苗递送载体, 多项研究表明 VLP 递送 mRNA 的潜力巨大, 是载体未来发展的一个重要方向。

3 总结与展望

RNA 药物的成药性得到提高, 有望开启继小分子、抗体药物之后的第三次新药创制浪潮, 但是无法穿过细胞膜、体内稳定性差、递送效率低和脱靶效率高等问题阻碍着 RNA 药物的发展, 药物递送仍然是 RNA 药物发展的瓶颈。而递送载体不仅提高了 RNA 药物的稳定性和靶向特异性, 还促进了 RNA 药物的临床应用。RNA 药物的递送载体可以分为病毒载体和非病毒载体两类, 非病毒载体的普遍优点是毒性小、安全性高、荷载量大以及设计灵活等。其中 LNP 的应用更为广泛, 是作为 mRNA 疫苗的最佳载体, 但是载体多靶向至肝脏组织, 靶向肝外组织的能力有待提高。病毒载体的优点包括广谱性和靶向性强、递送效率高、表达时间长等。

在病毒载体中, AAV 载体拥有较高的递送效率, 目前已经被应用于临床上的体内外基因治疗, 是一种相对成熟的递送技术。但是, AAV 载体本身插入的目的基因的片段大小有限, 感染宿主细胞后也不能立即表达, 仍需继续优化。目前, 科学界在病毒载体和非病毒载体两个大方向上都有诸多尝试, 而介于病毒载体与非病毒载体之间的类病毒颗粒 VLP 递送策略无疑为目前的递送载体选择上增添了新鲜的血液, VLP-mRNA 递送形式可将 mRNA 高效递送至细胞内, 具有广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Keam SJ. Vutrisiran: first approval. *Drugs*, 2022, 82: 1419-25
- [2] 刘晶晶, 李玉华. 预防性 mRNA 疫苗的研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34: 487-92+98
- [3] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 261-79
- [4] Brito LA, Kommareddy S, Maione D, et al. Self-amplifying mRNA vaccines. *Adv Genet*, 2015, 89: 179-233
- [5] Bloom K, Van Den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther*, 2021, 28: 117-29
- [6] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247: 1465-8
- [7] Pawlowski C, Lenehan P, Puranik A, et al. FDA-authorized COVID-19 vaccines are effective per real-world evidence synthesized across a multi-state health system. *Med*, 2021, 2: 979-92
- [8] Dickerman BA, Gerlovin H, Madenci AL, et al. Comparative effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 vaccines in US veterans. *N Engl J Med*, 2022, 386: 105-15
- [9] Sahoo JP, Mishra P, Samal KC. A new HIV vaccine heads to clinical trials by Moderna's mRNA Technology. *Biotica Res Today*, 2021, 3: 853-6
- [10] Qiu X, Xu S, Lu Y, et al. Development of mRNA vaccines against respiratory syncytial virus (RSV). *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 68: 37-53
- [11] Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, et al. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*, 2017, 13: 48-57
- [12] Hoy SM. Patisiran: first global approval. *Drugs*, 2018, 78: 1625-31
- [13] Xu JZ, Zhang JL, Zhang WG. Antisense RNA: the new favorite in genetic research. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19: 739-49
- [14] Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, et al. Antisense oligonucleotides: an emerging area in drug discovery and development. *J Clin Med*, 2020, 9: 2004
- [15] Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, et al. Noncoding RNA therapeutics—challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 629-51
- [16] Kim YK. RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. *Exp Mol Med*, 2022, 54: 455-65
- [17] Roberts TC, Langer R, Wood MJ. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 673-94
- [18] Yu AM, Choi YH, Tu MJ. RNA drugs and RNA targets for small molecules: principles, progress, and challenges. *Pharmacol Rev*, 2020, 72: 862-98
- [19] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 541-55
- [20] Van Der Loo JC, Wright JF. Progress and challenges in viral vector manufacturing. *Hum Mol Genet*, 2016, 25: R42-52
- [21] Álvarez-Benedicto E, Farbiak L, Ramírez MM, et al. Optimization of phospholipid chemistry for improved lipid nanoparticle (LNP) delivery of messenger RNA (mRNA). *Biomater Sci*, 2022, 10: 549-59
- [22] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, et al. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *ACC Chem Res*, 2021, 55: 2-12
- [23] Hsu S-H, Yu B, Wang X, et al. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. *Nanomedicine*, 2013, 9: 1169-80
- [24] Veiga N, Goldsmith M, Granot Y, et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. *Nat Commun*, 2018, 9: 4493
- [25] Dolina JS, Sung SS, Novobrantseva TI, et al. Lipidoid nanoparticles containing PD-L1 siRNA delivered *in vivo* enter Kupffer cells and enhance NK and CD8⁺ T cell-mediated hepatic antiviral immunity. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e72
- [26] Cheng X, Liu Q, Li H, et al. Lipid nanoparticles loaded with an antisense oligonucleotide gapmer against Bcl-2 for treatment of lung cancer. *Pharm Res*, 2016, 34: 310-20
- [27] Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'riordan WD, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 2018, 379: 11-21
- [28] Kowalski PS, Rudra A, Miao L, et al. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Mol Ther*, 2019, 27: 710-28
- [29] Qiu M, Tang Y, Chen J, et al. Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e21116271119
- [30] D'souza AA, Devarajan PV. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting — strategies and applications. *J Controlled Release*, 2015, 203: 126-39
- [31] Nair JK, Willoughby JL, Chan A, et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 16958-61
- [32] Cansby E, Nuñez-Durán E, Magnusson E, et al. Targeted delivery of Stk25 antisense oligonucleotides to hepatocytes

- protects mice against nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7: 597-618
- [33] Wang W, Sun Q. Novel targeted drugs approved by the NMPA and FDA in 2019. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 65
- [34] Crucho CI, Barros MT. Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C*, 2017, 80: 771-84
- [35] Yoshinaga N, Naito M, Tachihara Y, et al. PEGylation of mRNA by hybridization of complementary PEG-RNA oligonucleotides stabilizes mRNA without using cationic materials. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 800
- [36] Helmschrodt C, Höbel S, Schöniger S, et al. Polyethylenimine nanoparticle-mediated siRNA delivery to reduce α -Synuclein expression in a model of Parkinson's disease. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9: 57-68
- [37] Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 2020, 25: 3731
- [38] Begines B, Ortiz T, Pérez-Aranda M, et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery: recent developments and future prospects. *Nanomaterials*, 2020, 10: 1403
- [39] Rochín-Wong S, Vélaz-Rivas I. Lipid and polymeric nanocapsules[M]// *Drug Carriers*. IntechOpen, 2022
- [40] Pugazhendhi A, Edison TNJI, Karuppusamy I, et al. Inorganic nanoparticles: a potential cancer therapy for human welfare. *Int J Pharm*, 2018, 539: 104-11
- [41] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 101-24
- [42] Imani R, Shao W, Taherkhani S, et al. Dual-functionalized graphene oxide for enhanced siRNA delivery to breast cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 147: 315-25
- [43] Jiang Y, Huo S, Hardie J, et al. Progress and perspective of inorganic nanoparticle-based siRNA delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13: 547-59
- [44] Barui AK, Kotcherlakota R, Bolli VS, et al. Biomedical and drug delivery applications of functionalized inorganic nanomaterials[M]// *Biopolymer-Based Composites: Drug Delivery and Biomedical Applications*. Amsterdam: Elsevier Ltd, 2017: 325-79
- [45] Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2022, 42: 100432
- [46] Guo J, Gao J, Li Z, et al. Adenovirus vector-mediated Gli1 siRNA induces growth inhibition and apoptosis in human pancreatic cancer with Smo-dependent or Smo-independent Hh pathway activation *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett*, 2013, 339: 185-94
- [47] Pei Z, Shi G, Kondo S, et al. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Sci Rep*, 2013, 3: 3575
- [48] Scholz J, Weil PP, Pembaur D, et al. An adenoviral vector as a versatile tool for delivery and expression of miRNAs. *Viruses*, 2022, 14: 1952
- [49] Wang D, Tai PW, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 358-78
- [50] Zhang S, Zhao J, Meng Q. AAV-mediated siRNA against TRPV1 reduces nociception in a rat model of bone cancer pain. *Neurol Res*, 2019, 41: 972-9
- [51] Kimura T, Ferran B, Tsukahara Y, et al. Production of adeno-associated virus vectors for *in vitro* and *in vivo* applications. *Sci Rep*, 2019, 9: 1-13
- [52] Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, et al. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *J Transl Med*, 2016, 14: 1-15
- [53] O'keefe EP. siRNAs and shRNAs: tools for protein knockdown by gene silencing. *Materi Methods*, 2013, 3: 197
- [54] Liu CM, Liu DP, Dong WJ, et al. Retrovirus vector-mediated stable gene silencing in human cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313: 716-20
- [55] Zhang J, Zhu J, Zheng G, et al. Co-expression of miR155 or LSD1 shRNA increases the anti-tumor functions of CD19 CAR-T cells. *Front Immunol*, 2022, 12: 5629
- [56] Sertkaya H, Ficarelli M, Sweeney NP, et al. HIV-1 sequences in lentiviral vector genomes can be substantially reduced without compromising transduction efficiency. *Sci Rep*, 2021, 11: 12067
- [57] Kim D, Reyes-Ordoñez A, Chen J. Lentivirus-mediated RNAi in skeletal myogenesis. *Methods Mol Biol*, 2019, 1889: 95-110
- [58] Li L, Hu S, Chen X. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: challenges and opportunities. *Biomaterials*, 2018, 171: 207-18
- [59] Zhitnyuk Y, Gee P, Lung MS, et al. Efficient mRNA delivery system utilizing chimeric VSVG-L7Ae virus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505: 1097-102
- [60] Ling S, Yang S, Hu X, et al. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 144-56
- [61] Scott LJ. Givosiran: first approval. *Drugs*, 2020, 80: 335-9
- [62] Garrelfs SF, Frishberg Y, Hulton SA, et al. Lumasiran, an RNAi therapeutic for primary hyperoxaluria type 1. *N Engl J Med*, 2021, 384: 1216-26
- [63] Lamb YN. Inclisiran: first approval. *Drugs*, 2021, 81: 389-95
- [64] Michalik S, Siegerist F, Palankar R, et al. Comparative analysis of ChAdOx1 nCoV-19 and Ad26.COV2.S SARS-CoV-2 vector vaccines. *Haematologica*, 2021, 107: 947-57
- [65] Annexes to the recommendations for use of the CanSinoBIO Ad5-nCoV-S [recombinant] vaccine (Convidecia™) against COVID-19: grading of evidence: evidence to recommendation tables, first issuance: 19 May 2022 [EB/OL]. World Health Organization. World Health Organization, 2022[DB/OL]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/354410>
- [66] Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheplyakov DV, et al.

Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, 397: 671-81

[67] Li YX, He XG, Yao YG, et al. Construction and identification of lentiviral vector mediated GATA-3 gene RNA interference in mouse. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2017, 31: 627-32