专论 Perspectives

基因治疗递送载体应用现状及安全性研究进展

李嫚琪[1]，魏丽萍[1,2]，陶巧玉[2,3]，何伟伟[1]，常 艳[1*]
（1. 中国医药工业研究总院，上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203；2. 益诺思生物技术南通有限公司，江苏南通 226133；3. 安徽中医药大学药学院，安徽合肥 230012）

摘要：通过载体将基因药物高效递送至靶组织或靶细胞是基因治疗的关键步骤。选择合适、安全、有效的递送系统是基因疗法中亟待解决的任务。目前采用的基因药物递送载体可分为病毒载体和非病毒载体。该综述介绍了基因治疗中常见的病毒载体、合成非病毒载体和生物非病毒载体的应用现状和相关安全性问题，比较了不同载体的优缺点，并总结了基因递送载体非临床安全性评价考虑要点，以期为基因治疗领域的载体的选择、使用及安全性评价提供参考。

关键词：基因递送载体；病毒载体；非病毒载体；合成载体；生物载体；安全性
中图分类号：R945 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)12-1671-12
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.12.001

Application Status and Research Progress on Safety of Gene Therapy Delivery Vectors

LI Manqi[1], WEI Liping[1,2], TAO Qiaoyu[2,3], HE Weiwei[1], CHANG Yan[1*]
(*1. Shanghai InnoStar Biotech Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. InnoStar Biotech Nantong Co., Ltd., Nantong 226133; 3. College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012*)

ABSTRACT: The efficient delivery of genes to target tissues or target cells by vectors is a critical step in gene therapy. Selecting a suitable, safe, and effective gene delivery vector is an urgent task in gene therapy. Gene therapy delivery vectors can be divided into two categories, viral vectors and nonviral vectors. In this review, the current application status and safety of viral vectors, synthetic nonviral vectors, and biological nonviral vectors are summarized, and the advantages and disadvantages of various delivery vectors are compared. Furthermore, the key points for evaluating the nonclinical safety of gene delivery vectors are summarized to provide references for the selection, application, and safety evaluation of vectors in the field of gene therapy.

Key Words: gene delivery vector; viral vector; nonviral vector; synthetic vector; biological vector; safety



【专家介绍】常艳，女，博士，中国毒理学会认证毒理学家(DCST)，荣获“上海市科学技术带头人”“上海领军人才”“上海市三八红旗手”等称号以及“上海市五一劳动奖章”，现任上海益诺思生物技术股份有限公司总经理。中国医药工业研究总院研究员，博士生导师；复旦大学博士生导师；长三角药学高等工程学院硕士生导师；上海工程技术大学硕士生导师。兼任国家食品药品监督管理局药品审评及GLP检查专家、OECD Pig-a指导原则专家组成员、NMPA CDE ICH S5和S12专家组成员、NMPA CDE遗传毒性指导原则专家组成员。长期从事新药安全性评价研究，承担或参与国家级及其他政府科技项目20余项，累计发表文章70余篇，累计申请国内专利14项，其中发明专利3项，已授权专利10项。共培养博士研究生1名(以毕业计)，另有7名在读；共培养硕士研究生15人(以毕业计)，另有在读6人。

基因治疗是将核酸药物或基因编辑装置递送到细胞中持续表达治疗蛋白或纠正细胞错误基因的方法。核酸药物包括质粒 DNA（plasmid DNA，pDNA）、信使 RNA（messenger RNA，mRNA）、微 RNA（microRNA，miRNA）、小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）、反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide，ASO）等。不同基因治疗的机制不同，核酸药物的递送部位和要求也不同。例如，siRNA 药物可以在细胞质中作用于 mRNA，阻止翻译过程发生，因此，需要将 siRNA 有效递送到细胞质中发挥作用。而 DNA 药物一般需要整合到基因组、在细胞核中完成转录以发挥作用，所以 DNA 药物需在细胞核及附近释放。然而，核酸药物稳定性低，进入体内后易被血浆和组织中的核酶降解，或被肝脏和肾脏快速清除，又或被免疫细胞吞噬。此外，不同适应证部位还存在阻碍核酸药物进入的天然生理屏障，例如眼部多重保护性屏障和保护中枢神经系统的血脑屏障等。除胞外屏障外，还有细胞膜、内涵体 - 溶酶体系统和核膜等胞内屏障。因此，用于封装、保护和递送核酸药物的载体对基因治疗的临床应用至关重要。这些递送载体需要克服细胞外和细胞内的屏障、耐受核酶、能增强和协助核酸药物的细胞摄取，且在进入细胞后能促进核酸药物内体逃逸。构建合适的载体需考虑的因素有：载体容量、基因的表达效率、治疗持续时间、免疫应答、生产成本、进入细胞 DNA 的同化作用以及感染病毒的安全性风险等[1]。目前应用于基因治疗的载体主要分为病毒载体和非病毒载体 2 大类。病毒载体包括逆转录病毒、慢病毒、腺病毒和腺相关病毒（adeno-associated viruses，AAV）等；非病毒载体包括以脂质纳米颗粒（lipid nanoparticle，LNP）为代表的合成载体和以细胞外囊泡为代表的生物载体。

收稿日期：2022-08-13

基金项目：江苏省创新能力建设计划科技公共服务平台项目（BM2021002）

作者简介：李嫚琪（1997—），女，硕士，从事药物毒理学研究。

通信联系人：常　艳（1974—），女，研究员，博士生导师，从事药物毒理学研究。

E-mail：ychang@innostar.cn

基因治疗可分为离体基因治疗和在体基因治疗 2 种方式。离体基因治疗是在体外对自体或同种异体的细胞进行基因修饰，再重新输入人体内，即细胞治疗。目前全球已上市的 8 款嵌合抗原受体 T（chimeric antigen receptor T，CAR-T）细胞治疗产品中有 5 款利用慢病毒载体（lentivirus vector，LV），3 款利用逆转录病毒载体（retroviral vector，RV，表 1）。在体基因治疗则利用载体将治疗基因递送到体内的靶细胞或组织。相比于离体基因治疗，在体基因治疗对载体的要求更高。表 2 列举了已上市的在体基因治疗产品，其中 10 款利用病毒载体，仅有 Onpattro 利用非病毒载体。目前 Glybera 和 Zalmoxis 已退市，原因可能与价格昂贵、市场需求受限有关。本研究侧重于在体基因治疗载体，对病毒载体和非病毒载体应用现状进行了总结，着重介绍了各类载体的安全性评价考虑要点，以期为基因治疗领域的载体的选择、使用及安全性评价提供参考。

1　病毒载体

1.1　逆转录病毒

逆转录病毒是一种 RNA 病毒，典型特征是其 RNA 基因组能逆转录为 cDNA 副本，并稳定整合至宿主细胞基因组中。RV 是经过修饰的逆转录病毒，包括 γ-RV 和 LV 是 2 类，通常具有如下特点：①病毒基因被治疗性转基因替代，该转基因可以转导递送到靶细胞；②缺乏编码蛋白质的完整病毒基因，使这些载体无法复制。有文献对 1995—2020 年接受了造血干细胞和祖细胞相关的体外基因治疗产品（HSPCs-GT）治疗的 406 名患者的情况进行综述和 Meta 分析，结果显示 LV、γ-RV 和自我失活型 γ- 逆转录病毒载体（self-inactivating γ-retroviral vector，SIN-γ-RV）占比分别为 68.7%、29.1%和 2.2%。5 年内遗传毒性事件累积发生率约 9.6%，γ-RV 的遗传毒性事件累积发生率约 17.3%，而在 LV 和 SIN-γ-RV 组中尚未观察到遗传毒性事件[2]。2021 年 6 月，美国蓝鸟生物公司暂停了 LentiGlobin（BB305 LV）治疗镰状细胞病的 2 项临床试验，因为 2 名接受 LentiGlobin 治疗的患者分

表 1 已上市的 CAR-T 细胞治疗产品

Tab.1 Approved CAR-T Cell Therapy Products

药物	靶点	载体	上市时间	适应证	厂家	上市国家和地区
Kymriah	CD19	LV	2017-08	B细胞急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia，ALL)、复发或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma，DLBCL)	诺华	美国、欧盟、加拿大、日本、澳大利亚、以色列、瑞士
Yescarta	CD19	γ-RV	2017-10	复发或难治性DLBCL、非霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤	凯特	欧盟、美国、中国、加拿大
Tecartus	CD19	γ-RV	2020-07	复发或难治性套细胞淋巴瘤	凯特	美国、欧盟
Breyanzi	CD19	LV	2021-02	复发或难治性DLBCL	百时美施贵宝	美国
Abecma	B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen，BCMA)	LV	2021-03	复发或难治性多发性骨髓瘤	百时美施贵宝	美国
奕凯达	CD19	RV	2021-06	二线或以上系统性治疗后复发或难治性DLBCL	复星凯特	中国
倍诺达	CD19	LV	2021-09	二线或以上系统性治疗后成人患者的复发或难治性DLBCL	药明巨诺	中国
Carvykti	BCMA	LV	2022-02	复发和(或)难治性多发性骨髓瘤	传奇生物	美国

表 2 已上市的在体基因治疗产品

Tab.2 Approved *in vivo* Gene Therapy Products

基因治疗药物	载体	上市时间	适应证	状态	上市国家和地区
Gendicine	腺病毒载体	2003-10	头颈部鳞状细胞癌和其他癌症	上市	中国
Rexin-G	RV	2007-12	广泛的顽固性癌症	上市	菲律宾
Glybera	AAV载体	2012-07	脂蛋白脂酶缺乏症	退市	欧盟
Strimvelis	RV	2016-05	腺苷脱氨酶缺乏症-严重联合免疫缺陷症	上市	欧盟
Zalmoxis	RV	2016-08	移植物抗宿主病	退市	欧盟
Luxturna	AAV载体	2017-12	勒伯先天性黑蒙，色素性视网膜炎	上市	美国、欧盟、沙特阿拉伯
Onpattro	LNP	2018-08	成人遗传性转甲状腺素介导的淀粉样变性的多发性神经病	上市	美国、欧盟、加拿大、日本、瑞士、土耳其、巴西
Zolgensma	AAV载体	2019-05	脊髓肌肉营养不良，一种由*SMN1*基因突变引起的严重神经肌肉疾病	上市	美国、欧盟
Zynteglo	LV	2019-05	β地中海贫血	上市	欧盟
Skysona	LV	2021-07	18岁以下携带*ABCD1*基因突变且没有人类白细胞抗原(HLA)匹配的同胞造血干细胞供体可用的早期脑肾上腺脑白质营养不良	上市	欧盟

别被诊断出患有急性髓系白血病和骨髓增生异常综合征。目前 RV 多用于修饰细胞进行离体基因治疗。

1.2 腺病毒

腺病毒是一种非包膜双链 DNA 病毒，它拥有一个二十面体蛋白衣壳，装载容量巨大，可搭载锌指核酸酶（zinc finger nuclease，ZFN）、转录激活物样效应因子核酸酶（transcription activator-like effector nuclease，TALEN）和簇状规则间隔的短回文重复序列及其相关蛋白（clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated systems，CRISPR/Cas）等基因编辑工具[3]。腺病毒作为载体易于获得和操作，在不同类型的非分裂和分裂细胞中都具有较高的转导效率，感染范围广泛，不需要整合到宿主细胞基因组中，且在体内具有较低的遗传毒性[4]。尽管腺病毒载体有许多优点，但高免疫原性、细胞毒性及瞬时转基因表达仍使腺病毒载体研究充满挑战[5]。1999 年，一位 18 岁的患者在使用了旨在纠正鸟氨酸氨基转移酶缺陷的腺病毒载体后死亡，原因是全身注射大剂量腺病毒载体后，对衣壳蛋白的固有免疫反应引发了细胞因子释放综合征（cytokine release syndrome，CRS，又称细胞因子风暴）。此事件使腺病毒载体研究一度停滞。目前，基于腺病毒载体的基因治疗主要应用于基因疫苗和抗肿瘤治疗[6]。

1.3 AAV

AAV 是一种非致病性的无包膜细小病毒，具

有单链 DNA。AAV 有 12 个自然血清型和 130 多个变种。不同的血清型有不同的结合受体和组织趋向性，可通过选择合适的血清型将基因输送到特定的组织[7]（表 3）。AAV 不能独立复制，只有在辅助病毒（如腺病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒）存在时，才能进行复制和溶细胞型感染。重组 AAV（rAAV）删除了所有的病毒蛋白基因，只保留了与病毒复制和包装相关的反向末端重复序列（inverted terminal repeat，ITR），最大限度地提高了 AAV 的转基因能力、降低了免疫原性和细胞毒性。因为 rAAV 载体不表达复制（rep）蛋白，它与宿主基因组整合的能力大幅降低，且 rAAV 基因组可在细胞核内形成能长期存在的圆形串联体，从而实现长时间的转基因表达。由于 AAV 具有低免疫原性、低基因毒性、衣壳蛋白多样性、作用时间长和易于生产等特点，已成为较适合在体基因治疗的病毒载体，临床应用广泛，可用于单基因疾病、眼科疾病、代谢性疾病、血液疾病、神经疾病和肌肉骨骼疾病等的治疗[8]。然而，有研究结果显示 AAV 递送的 RNA 干扰（RNAi）疗法可在非人灵长类脑中导致神经毒性[9]。近来，多家公司的 AAV 基因治疗临床试验被叫停（表 4），FDA 也召开了专家委员会会议，对 AAV 基因疗法的安全性进行了讨论[10]。会议总结了 AAV 临床试验中出现的安全性问题，提出了 AAV 载体的整合性和肝脏毒性的风险，以及潜在的致瘤性、血栓性微血管病和神经毒性风险。会议还提出了 AAV 的空衣壳这一安全性盲点问题。此外，有研究认为静脉高剂量注射 AAV 用于基因治疗会产生严重毒性[11]。

4 种常用的病毒载体各有其优缺点（表 5）。除上述 4 种常用的病毒载体外，在临床基因治疗中还有单纯疱疹病毒载体、痘病毒载体、牛痘病毒载体等。总体而言，病毒载体转染效率高、应用广泛，但由于免疫原性、插入突变风险、载体容量有限、成本高、价格昂贵以及生物安全性问题，限制了病毒载体用于在体基因治疗的发展。

表 3　不同血清型 AAV 的特性

Tab.3　Characteristics of Different Serotypes of AAV

血清型	初级受体	共受体	组织趋向性
AAV1	唾液酸	AAV受体	肌肉、中枢神经系统、心脏
AAV2	肝素	整合素、成纤维细胞生长因子受体、肝细胞生长因子受体、层粘连蛋白受体1、AAV受体	肝脏、中枢神经系统、肌肉
AAV3	肝素	成纤维细胞生长因子受体、肝细胞生长因子受体、层粘连蛋白受体1、AAV受体	肌肉、干细胞
AAV4	唾液酸	未知	眼、中枢神经系统
AAV5	唾液酸	血小板衍生生长因子受体、AAV受体	中枢神经系统、肺、眼
AAV6	肝素、唾液酸	表皮生长因子受体、AAV受体	肌肉、中枢神经系统、心脏、肺
AAV7	未知	未知	肌肉、中枢神经系统
AAV8	未知	层粘连蛋白受体1、AAV受体	肝脏、肌肉、胰腺、中枢神经系统
AAV9	半乳糖	层粘连蛋白受体1、AAV受体	所有组织
AAV10	未知	未知	肌肉
AAV11	未知	未知	未知
AAV12	未知	未知	鼻

表 4　近 2 年中止的 AAV 基因治疗临床试验

Tab.4　AAV Gene Therapy Clinical Trials Discontinued in the Past Two Years

叫停时间	公司	产品	载体	适应证	叫停原因	叫停临床试验阶段
2020-12	UniQure	AMT-061	AAV5	B型血友病	1名患者出现肝癌	Ⅲ
2020-12	Voyager、Neurocrine	VY-AADC	AAV2	晚期帕金森病	部分受试者的核磁共振成像（MRI）检查结果异常	Ⅱ
2021-09	BioMarin	BMN307	AAV5	苯丙酮尿症	动物试验出现肝癌	Ⅰ/Ⅱ
2021-09	Astellas	AT132	AAV8	X连锁心肌病（XLMTM）	3名患者肝功能衰竭并死亡	Ⅰ/Ⅱ

2 非病毒载体

相比于病毒载体，非病毒载体具有生物相容性好、可生物降解、装载容量大、成本低、易于生产制造等优势，且由于低毒性和低免疫原性被认为是病毒载体的安全的替代品，具有基因治疗应用潜力。非病毒载体可分为合成载体和生物载体 2 种。

2.1 合成载体

2.1.1 LNP

LNP 由磷脂、胆固醇、聚乙二醇化脂质和阳离子或可电离脂质的混合物组成，是目前研究较广泛的合成非病毒载体。2018 年上市的首款非病毒载体递送 siRNA 产品及上市的 3 款 mRNA 新型冠状病毒肺炎（coronavirus disease 2019，COVID-19）疫苗（包含紧急使用授权）均采用 LNP 递送系统（表 6），表 7 列举了部分在研的 LNP 产品。相比于聚合物和无机纳米颗粒，LNP 具有更好的生物相容性、固有的膜穿透能力、生物降解性、结构灵活性和低免疫原性[12]。然而，阳离子脂质可与多种蛋白质、脂蛋白相互作用，导致 RNA 聚集体的形成或药物突释，从而造成系统毒性。此外，阳离子脂质可抑制蛋白激酶 c 活性并诱发肺部炎症，还可诱导非特异性肝毒性[13]。据报道，由于聚乙二醇特异性抗体的形成，聚乙二醇化脂质可诱导“加速血液清除”现象，并在重复给药后对聚乙二醇产生有效的免疫球蛋白 M（IgM）抗体反应[14]。此外，LNP 超过一定剂量可能会导致免疫激活和细胞毒性[11]。当网状内皮系统（reticuloendothelial system，RES）的吞噬细胞识别 LNP 的脂质成分时，天然免疫系统被激活，Toll 样受体 2（Toll-like receptor 2，TLR2）和 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）可诱导高水平细胞因子的表达，或诱发 CRS[15]。LNP 还可诱导血清补体激活，导致非免疫球蛋白 E（IgE）介导的超敏反应，称为补体激活相关假过敏（complement activation-related pseudo-allergic reactions，CARPA），最终导致过敏性休克[16]。此外，静脉注射后血清蛋白可吸附在 LNP 表面，导致 LNP 在肝脏中自然蓄积[17]。加拿大 Tekmira 公司开发了一种稳定的 LNP 递送的核酸药物 PRO-04020，包载靶向载脂蛋白 B（ApoB）mRNA 的 siRNA，通过静脉注射将 siRNA 递送至目标组织，以减少细胞中胆固醇的摄取[18]。Ⅰ期临床试验（NCT00927459）中共有 17 名患者接受了 TKM-ApoB，其中 2 名接受高剂量药物的患者出现了与 siRNA 诱导的免疫刺激一致的流感样症状，虽并未显示肝毒性，但 Tekmira 公司于 2010 年中止了该研究[19]。由于 LNP 的免疫激活机制和肝靶向特性，LNP 的临床前研究需考虑剂量与细胞因子和趋化因子分泌的相关性、补体激活、重复给药中和抗体的影响、急性肝毒性标志物、潜在的脂质蓄积、靶器官的组织病理学、与正电荷相关的血浆蛋白聚集、免疫刺激和非特异性组织聚集等问题[20]。

2.1.2 聚合物纳米粒（polymeric nanoparticles，PNP）

PNP 可与 mRNA 结合，在生理 pH 条件下形成多聚复合物，促进基因递送。例如，树枝状大分子可将 RNA 递送到中枢神经系统和肝脏内皮细胞中[21—22]。相比于 LNP，PNP 具有较高的转染效率、较好的均质性以及较小的粒径，但存在与结构组成相关的潜在毒性、较差的生物相容性、不可生物降

表 5 4 种不同病毒载体的比较

Tab.5 Comparison of Four Different Viral Vectors

病毒载体	颗粒直径/nm	基因组	载体容量/kb	整合方式	感染性	免疫原性	优点	缺点
RV	90～100	双链RNA	7	随机整合并稳定遗传	感染分裂细胞	中	高效感染宿主细胞，能长期稳定表达	不能感染非分裂期细胞，有插入突变风险
LV	90～100	双链RNA	9	随机整合并稳定遗传	感染分裂和未分裂期细胞	中	能长期稳定表达，感染能力强，免疫原性低	有插入突变风险，致瘤性
腺病毒载体	60～90	双链DNA	37	非整合	感染分裂和未分裂期细胞	高	载体容量大，没有插入突变的风险	高免疫原性，瞬时表达
AVV载体	20～30	单链DNA	4	非整合为主	感染分裂和未分裂期细胞	较低	载体安全性高，外源基因表达时间长，能长期稳定表达	载体容量较小

解性，以及未知可降解片段诱导的体内代谢毒性等缺点[23]。由美国 Calando 公司生产的 CALAA-01 是一种具有靶向性的 PNP-siRNA 系统，可通过简单混合而自组装形成，是第一种用于实体瘤治疗的临床研究的 RNAi 治疗剂，由于剂量限制的不良反应，包括腹泻、发烧和疲劳，中止了Ⅰ期临床试验[24]。可能由于纳米粒子的不稳定性以及在血液中个别成分的分解，毒性由转铁蛋白靶向肽引起[25]。因此需关注由多个成分组成的纳米粒子系统的复杂性和暴露于血液循环中时分解的可能性。

2.1.3 脂质多聚复合物（lipopolyplex，LPP）

LPP 是阳离子脂质体、阳离子聚合物和核酸的三元复合物，由非共价相互作用形成。由于脂质和聚阳离子之间的协同作用，LPP 可有效进入并分布在细胞中。LPP 兼具 LNP 和 PNP 的优点，在所有的研究中都显示出更好的细胞转染性和更低的细胞毒性。相比传统 LNP 具有更好的包载、保护 mRNA 的效果，并能随聚合物的降解逐步释放 mRNA。LPP 优异的树突状细胞靶向性可更好地通过抗原呈递激活 T 细胞的免疫反应，从而达到理想的免疫治疗效果。但由于聚合物的生物相容性和生物降解性较差，LPP 的开发利用主要受限于其细胞毒性。

2.1.4 无机纳米粒子（inorganic nanoparticles，INP）

INP 由无机颗粒和可生物降解的聚阳离子合成，例如介孔二氧化硅纳米粒（MSN）、碳纳米管、量子点、金属磁性纳米粒等。INP 由于可调节的形态和纳米结构、易于功能化、高稳定性及独特的物理化学性质（如光学、电学、声学和磁学性质），相对于传统有机纳米粒子有显著优势。然而，INP 通常大量积聚在 RES 中，导致低靶向性和长期毒性[26]。肾脏清除 INP 可较大限度地减少纳米粒子在体内蓄积和分解所造成的潜在危害[27]，但肾脏清除一直是大多数 INP 临床转化的主要挑战，特别是对于由重金属或有毒金属组成的 INP。近期一项研究表明，在动物模型中，静脉注射二氧化钛、二氧化硅和金纳米粒这几种常规 INP 会显著加快乳腺癌细胞的内渗和外渗，增加现有的恶性肿瘤转移程度并促进新转移位点的出现[28]。该报道引起了纳米医学领域 INP 生物安全问题的广泛关注。

2.1.5 *N*- 乙酰半乳糖胺（*N*-acetylgalactosamine，GalNAc）

GalNAc- 核酸是糖类化合物与核酸形成的单缀合物，将 *N*- 乙酰化的半乳糖胺以三价态共价缀合到不同序列的 RNA 的正义链 3' 末端，形成 GalNAc-RNA 单缀合物。GalNac 可与实质肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）特异性结合，实现快速胞吞。该技术肝靶向性强，制品给药后会高效富集到肝组织；但对其他细胞或组织尚无有效的递送途径。目前，GalNAc 修饰的药物主要

表 6　已上市的 LNP 产品（包含紧急使用授权）

Tab.6　Approved LNP Products（Including Emergency Use Authorization）

药物	类型	活性成分	适应证	上市时间	厂家
Onpattron	siRNA	patisiran	遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性	2018-08	Alnylam
Comirnaty	mRNA疫苗	BNT-162b2	COVID-19	2021-08	Pfizer、BioNTech
Spikevax	mRNA疫苗	mRNA-1273	COVID-19	2022-01	Moderna
AWcorna	mRNA疫苗	ARCoV	COVID-19	2022-09	中国人民解放军军事科学院军事医学研究院、艾博、沃森

表 7　部分在研的 LNP 产品

Tab.7　Some LNP Products under Clinical Trials

药物	类型	应用	临床试验阶段	厂家
NTLA-2001	CRISPR	转甲状腺素蛋白淀粉样变性	Ⅰ	Intellia，Regeneron
LUNAR®-COV19（ARCT-021）	mRNA疫苗	COVID-19	Ⅰ，Ⅱ	Arcturus
CVnCov	mRNA疫苗	COVID-19	Ⅲ	CureVac
LVRNA009	mRNA疫苗	COVID-19	Ⅲ	丽凡达

有 GalNAc-ASO 和 GalNAc-siRNA。GalNac 具有较好的非临床和临床安全窗。一些模型动物（大鼠和猴）皮下注射 GalNAc-siRNA 后可观察到肝脏病理现象，包括肝细胞空泡化和肝细胞单细胞坏死；此外，GalNAc-siRNA 可在许多组织中蓄积，表现为大鼠近端肾小管细胞和猴肝巨噬细胞中的嗜碱性颗粒，或淋巴结巨噬细胞和注射部位单核细胞的空泡化 [29]。目前尚未观察到 GalNAc-siRNA 存在免疫原性，但 GalNAc-ASO 已观察到免疫原性。

合成载体易于大规模生产，但也存在固有的挑战，如生物利用度低、缺乏靶向性、经靶向修饰则易产生较高的免疫原性和毒性等。此外，合成的非病毒载体在促进细胞摄取、内化和有效荷载释放方面尚未达到预期效果 [19]，因此需要更细致地了解合成载体的安全机制、生物分布和药动学特征。相比于合成载体，生物载体具有更高的生物相容性，在靶向性、安全性和药动学方面也表现出显著优势。

2.2 生物载体

2.2.1 细胞外囊泡

细胞外囊泡是外泌体、微囊泡和凋亡小体的总称，是细胞分泌的磷脂双层囊泡，能包裹各种生物分子，如蛋白质、脂质、DNA 和 RNA 等，并将其从供体细胞转运至受体细胞，从而改变受体细胞的生理机能。细胞外囊泡的生物相容性好，能跨越各种生物屏障，作为潜在的基因递送系统具有独特优势。细胞外囊泡显示出由其脂质组成和蛋白质含量决定的、固有的靶向特性 [30]，其来源和给药途径可显著影响药物的生物分布，且可通过修饰技术提高靶向效率。例如，树突状细胞衍生的细胞外囊泡会优先被脾脏吸收，但黑色素瘤细胞衍生的细胞外囊泡在肝脏中的蓄积更为显著。许多研究表明，与脂质体给药类似，静脉注射细胞外囊泡会导致肝脏、脾脏、胃肠道和肺中的非特异性积累，天然的细胞外囊泡在肿瘤组织中也显示出大量积累。截至 2022 年 7 月，有 4 项细胞外囊泡作为基因载体的临床试验（表 8）。细胞外囊泡作为一种内源性的囊泡，具有较低的免疫原性，大量的研究证实了细胞外囊泡作为基因载体的安全性，未见明显不良反应的报道 [31—32]。但由于细胞外囊泡固有的复杂性、尺寸异质性和批间差异，使其临床转化具有很大挑战性。表 9 列举了细胞外囊泡作为基因载体的研究。

2.2.2 细菌

使用细菌作为载体的基因治疗主要分为 2 种方法：肿瘤特异性细菌复制和细胞内质粒转移（细菌转染）[50]。细菌具有肿瘤靶向、易修饰、基因包装能力强和免疫反应激活等天然特性。细菌载体特有的安全性源于它们对抗菌药的敏感性，使其能够在给药后用抗菌药进行控制。但细菌载体也有一定限制，例如细菌的剂量依赖性不良反应、基因稳定性、潜在的生物安全性以及细菌在定植特定靶组织之前由 RES 清除引起的低治疗效果 [51]。鉴于细菌的强大定植能力，确定合适的给药剂量也将具有挑战性。与化学治疗剂和生物药物制剂不同，基于细菌的递送系统不能用传统方法灭菌，增加了对该类药品生产进行质量管理的难度。此外，细菌幽灵（bacterial ghosts，BG）代表了一种独特的生物药物载体，也为基因药物递送提供了一种有前景的方法。BG 是不含细胞质内容物的细菌空壳，依靠生物黏附性维持其细胞 3D 形态和抗原结构，因此安全性和稳定性优于细菌载体 [52]。

3 基因递送载体安全性评价的考虑要点

安全性是影响基因递送载体临床转化的首要因素，基因治疗产品的研发需关注风险 - 获益比，通过非临床研究可评估安全性风险、验证有效性机制，为临床试验风险 - 获益分析提供充分的信息。

3.1 不同载体的潜在毒性特征

对于载体的非临床安全性研究，除了需要关注其本身的毒性外，还需要考察载体所导致的长期毒性、致癌性、免疫原性和免疫毒性。病毒载体的安全性评估需考虑其在靶组织及非靶组织中的复制水平和持续时间、表达产物的分布、组织易噬性和组织分布选择性。动物模型的选择需考虑病毒是否感染。另外，还需准确检测病毒载体的整合部分，以评估其整合活性带来的非预期的宿主基因组的改变、突变或致癌的风险。非病毒载体则重点关注纳米尺寸带来的毒性、载体与血浆蛋白的结合、血液

表 8　细胞外囊泡作为基因载体的临床试验

Tab.8　Clinical Trials of Extracellular Vesicles as Gene Vectors

临床试验编号	年份	临床试验阶段	装载药物	细胞外囊泡来源	适应证	给药方式	申请人	国家
NCT03384433	2017	Ⅰ/Ⅱ	miRNA	间充质干细胞	缺血性脑卒中	脑立体定向室管膜下注射	塔比亚特莫达雷斯大学	伊朗
NCT03608631	2018	Ⅰ	siRNA	间充质干细胞	胰腺癌	静脉注射	MD安德森癌症中心	美国
NCT04602442	2020	Ⅱ	mRNA	间充质干细胞	COVID-19	吸入给药	Olga Tyumina公司	俄罗斯
NCT05043181	2021	Ⅰ	mRNA	骨髓间充质干细胞	家族性高胆固醇血症	腹腔注射	空军军事医科大学	中国

表 9　细胞外囊泡作为基因载体的研究

Tab.9　Researches of Extracellular Vesicles as Gene Vectors

细胞外囊泡种类	包载基因	细胞外囊泡来源	治疗应用	装载方式	参考文献
细胞外囊泡	siRNA	人胚肾细胞、人乳腺癌细胞	降低乳腺癌致癌受体2(HER2)的表达	电穿孔	[33]
外泌体	siRNA	人胚肾细胞	肺癌	电穿孔	[34]
外泌体	siRNA	人胚肾细胞	HER2阳性乳腺癌	电穿孔	[35]
外泌体	siRNA	自体乳腺癌细胞	抑制术后乳腺癌转移	孵育、挤压	[36]
细胞外囊泡	DNA	人脐静脉内皮细胞、人骨髓间充质干细胞	实现基因传递，可用于基因治疗	电穿孔	[37]
外泌体	siRNA，pDNA	牛初乳	实现基因传递，可用于基因治疗	孵育	[38]
外泌体	siRNA	人间充质干细胞	脊髓损伤	孵育	[39]
外泌体	mRNA	人胚肾细胞	诱导白色脂肪褐变	电穿孔	[40]
外泌体及外泌体样囊泡	miRNA	淋巴结和脾脏细胞	T细胞耐受的过敏性接触性皮炎	孵育	[41]
外泌体	miRNA	人胚肾细胞	抑制肝癌细胞(HepG2细胞)增殖	电穿孔	[42]
外泌体	mRNA	人胚肾细胞	诱导新型冠状病毒免疫	简单混合	[43]
外泌体	mRNA	人胚肾细胞	动脉粥样硬化	化学转染亲本细胞	[44]
外泌体	miRNA	人胚肾细胞	结肠癌	电穿孔	[45]
外泌体	miRNA	人膝关节软骨细胞	骨关节炎	电穿孔	[46]
外泌体	siRNA、miRNA	人胚肾细胞	前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌	孵育	[47]
细胞外囊泡	siRNA、miRNA	小鼠4T1乳腺肿瘤模型的骨髓中的原代树突状细胞	乳腺癌	电穿孔	[48]
外泌体	CRISPR/Cas9	人胚肾细胞	胰腺癌	化学转染亲本细胞	[49]

相容性等问题以及纳米颗粒内各组分的影响所引起的构效或毒性关系。若非病毒载体表面设计了靶向功能的工程改造，则需关注靶组织和非靶组织分布特点。合成的非病毒载体需关注炎症和组织损伤等问题。对于细胞外囊泡生物载体，在进行安全性评价时应关注细胞外囊泡的来源（自体、同种异体、异体、异种），若应用同种异体细胞外囊泡，需考虑组织相容性的潜在影响。由于细胞外囊泡组分复杂，应尽量解析所有组分在体内的相互关系。另外，细胞外囊泡可能携带较为复杂的亲本细胞的遗传信息，可能具有潜在的致瘤风险，除需关注亲本细胞本身的成瘤或致瘤性风险外，还需在细胞外囊泡安全性评价中重点关注体内试验中异常或异位增生性病变（如增生、肿瘤）发生情况，初步评估其致瘤性风险。此外，需关注包载的核酸能否在体内有效逃逸并可控释放，从而评估脱靶效应和免疫刺激等非特异性免疫反应所引起的浓度依赖性不良反应，以及与包载核酸剂量、序列、大小有关的 CRS 和 RNA 的折叠[53]。

3.2 药学研究

须基于不同载体类型制定风险控制策略，根据不同研发阶段不断优化风险控制策略，鼓励运用先进的分析方法，多角度、多层面地开展质量研究。载体的生产同样须在 GMP 条件下进行，当载体结构发生重大变更时，需要评估开展桥接研究或新的非临床研究的必要性，非病毒类载体须关注工艺相关的杂质，处方中若含有在人体内首次使用或在拟定给药途径中首次使用的新型辅料，应根据辅料生产相关的风险因素系统评价辅料的安全性并制定相应的质量标准。在缺乏人体安全性研究数据支持的情况下，须参照《新药用辅料非临床安全性评价指导原则》进行研究。病毒类载体设计须以有效递送和表达目的基因、降低载体的致病性，以及降低载体的重组和突变风险等为目的。应重点关注整合特征、复制特征、靶向特性、载体纯度和杂质检测、载体鉴别和结构研究。

3.3 药动学研究

生物分布研究的检测方法应经过方法学验证。生物分布研究应采用足够的剂量，以临床拟用的给药途径，在相关动物种属或动物模型中开展。研究对象包括导入基因、基因表达产物，以及载体；须考察基因治疗产品中载体和导入基因在体内的转录、翻译、分布、存续情况，为毒性试验的结果解释提供支持性数据（必要时设置卫星组）。具有体内复制特征的基因治疗产品，采样点至少包括第一和第二两个峰值和清除阶段。须根据基因治疗产品的特点评估开展脱落分析的必要性。除相关的核酸检测外，脱落分析还应根据具体产品的特点考虑排出体外成分的感染能力。

在某些情况下，给予基因治疗产品后也可能发生细胞介导的、针对载体的免疫反应，导致无法提供有用的生物分布特征。如果预计有这种情况，可以考虑收集和存档适当的样本，以便进行可能的免疫原性分析，以支持对生物分布数据的解释。不建议仅为评估生物分布特征而对动物进行免疫抑制。但如产品或种属特定的情况下需要免疫抑制，应提供科学依据。在某些情况下，也可考虑采用种属特异的导入基因替代物规避免疫反应的影响。已评价过的基因治疗产品（具有相同的载体结构和其他决定其组织或细胞特异性的特征，但转录或翻译的产物不同）的生物分布数据也可能支持免除进一步的非临床生物分布研究，但应该进行科学论证。

在某些情况下，不存在可提供临床人群生物分布特征信息的生物学相关动物种属，如当载体与人类细胞上的靶标分子结合但动物细胞上不存在该靶标时，应对该问题进行全面讨论和科学论证，以支持采用替代方法进行非临床生物分布评价。

3.4 毒理学研究

应根据基因治疗产品的具体特点，评估分析因基因突变和内源性病毒片段重组产生复制型病毒的可能性。如果基因治疗产品有可能产生复制型病毒，应采用动物或细胞模型对复制型病毒风险进行评估。在评估复制型病毒风险时，应考虑到该病毒在不同物种之间的流行性和传播性。针对动物或细胞试验的结果是否能够反映在人类中传播的流行病学原理需要进行慎重评估。病毒载体类基因治疗产

品相对更易产生免疫原性，应考虑实验动物预存免疫对试验的影响，选择的动物应经适当方法检测预存免疫（理想情况下是呈阴性，但可能不易实现），可考虑采用无偏差方法将动物随机入组。需要分析基因组改变（载体或遗传物质整合进基因组、对基因组编辑等）的特征，并评估相关潜在风险。

通常不需要进行标准的遗传毒性组合试验。应根据产品特点、适应证、载体的已有信息、导入基因序列结构等，评估产品整合进基因组的可能性，以判断是否需要开展另外的遗传毒性研究，如研究基因组修饰的发生情况，并检测随后可能发生的异常细胞行为；评估插入突变（插入位点、插入拷贝数等）引起的遗传毒性风险。当基因治疗产品采用基因编辑或转座子技术时，需要关注脱靶编辑、转座子转座印迹引起的遗传毒性问题；鉴定或表征基因组的整合位点。一般认为基因修饰细菌相关的产品通常不会直接与宿主细胞基因组发生相互作用，可以不进行遗传毒性研究。必要时还应考虑基因治疗产品的生殖毒性风险。

4　总结

理想的基因递送载体应具备靶向性、稳定性、易制备、可浓缩和纯化、无毒或低毒性、有利于基因的高效转移和长期表达、容量大且缺乏自动复制载体自身的能力。目前各类载体都有其优缺点，尚无完美的载体。尚需要更多的技术研究来避免现有载体的问题，例如大规模生产工艺、长期贮存稳定性配方研制、免疫原性和免疫反应、靶向特异性、插入突变风险和病毒复制等。就目前看来，非病毒载体具有更加广阔的应用前景，但对于非病毒载体，特别是生物载体的研究，还处于起步阶段，需要进一步了解其作用机制并深入研究，不断优化，以减少毒性、提高递送效率。最近，有研究利用外泌体包裹 AAV，结合病毒载体和非病毒载体的优势，开发了一种基因递送新策略[54]。未来，通过载体构建技术的革新有望实现递药方式的“减毒增效”、加速基因治疗产品的临床转化、推动基因治疗领域的发展。

参考文献：

[1] ALHAKAMY N A, CURIEL D T, BERKLAND C J. The era of gene therapy: from preclinical development to clinical application [J]. *Drug Discov Today*, 2021, **26**(7): 1602-1619.

[2] TUCCI F, GALIMBERTI S, NALDINI L, *et al*. A systematic review and meta-analysis of gene therapy with hematopoietic stem and progenitor cells for monogenic disorders [J]. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1315.

[3] BULCHA J T, WANG Y, MA H, *et al*. Viral vector platforms within the gene therapy landscape [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, **6**(1): 53.

[4] CRENSHAW B J, JONES L B, BELL C R, *et al*. Perspective on adenoviruses: epidemiology, pathogenicity, and gene therapy [J]. *Biomedicines*, 2019, **7**(3): 61.

[5] SINGH S, KUMAR R, AGRAWAL B. Adenoviral vector-based vaccines and gene therapies: current status and future prospects [M]// DESHEVA Y. Adenoviruses. London: IntechOpen, 2019: 53-91.

[6] MENNECHET F J D, PARIS O, OUOBA A R, *et al*. A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2019, **18**(6): 597-613.

[7] LI C W, SAMULSKI R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, **21**(4): 255-272.

[8] DUAN L, XU L M, XU X, *et al*. Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy [J]. *Nanoscale*, 2021, **13**(3): 1387-1397.

[9] KEISER M S, RANUM P T, YRIGOLLEN C M, *et al*. Toxicity after AAV delivery of RNAi expression constructs into nonhuman primate brain [J]. *Nat Med*, 2021, **27**(11): 1982-1989.

[10] FDA. Cellular, tissue, and gene therapies advisory committee september 2, 2021 meeting presentation- toxicity risks of adeno-associated virus(AAV) vectors for gene therapy(GT) [EB/OL]. [2022-03-04]. https://www.fda.gov/media/151969/download.

[11] HINDERER C, KATZ N, BUZA E L, *et al*. Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, **29**(3): 285-298.

[12] YONEZAWA S, KOIDE H, ASAI T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154-155**: 64-78.

[13] CHARBE N B, AMNERKAR N D, RAMESH B, *et al*. Small interfering RNA for cancer treatment: overcoming hurdles in delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, **10**(11): 2075-2109.

[14] VERBEKE R, LENTACKER I, DE SMEDT S C, *et al*. The dawn of mRNA vaccines: the COVID-19 case [J]. *J Control Release*, 2021, **333**: 511-520.

[15] HALAMODA-KENZAOUI B, BREMER-HOFFMANN S. Main trends of immune effects triggered by nanomedicines in preclinical studies [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, **13**: 5419-5431.

[16] SEDIC M, SENN J J, LYNN A, *et al*. Safety evaluation of lipid nanoparticle-formulated modified mRNA in the sprague-dawley rat and cynomolgus monkey [J]. *Vet Pathol*, 2018, **55**(2): 341-354.

[17] AKINC A, QUERBES W, DE S, *et al*. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms [J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(7): 1357-1364.

[18] BURNETT J C, ROSSI J J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects [J]. *Chem Biol*, 2012, **19**(1): 60-71.

[19] THI T T H, SUYS E J A, LEE J S, *et al*. Lipid-based nanoparticles in the clinic and clinical trials: from cancer nanomedicine to COVID-19 vaccines [J]. *Vaccines* (Basel), 2021, **9**(4): 359.

[20] VLATKOVIC I. Non-immunotherapy application of LNP-mRNA: maximizing efficacy and safety [J]. *Biomedicines*, 2021, **9**(5): 530.

[21] XU L, ZHANG H, WU Y. Dendrimer advances for the central nervous system delivery of therapeutics [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014, **5**(1): 2-13.

[22] KHAN O F, ZAIA E W, YIN H, *et al*. Ionizable amphiphilic dendrimer-based nanomaterials with alkyl-chain-substituted amines for tunable siRNA delivery to the liver endothelium *in vivo* [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(52): 14397-14401.

[23] YAN Y, LIU X Y, LU A, *et al*. Non-viral vectors for RNA delivery [J]. *J Control Release*, 2022, **342**: 241-279.

[24] LIANG X, LIU L, WEI Y Q, *et al*. Clinical evaluations of toxicity and efficacy of nanoparticle-mediated gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, **29**(11): 1227-1234.

[25] KOKKINOS J, IGNACIO R M C, SHARBEEN G, *et al*. Targeting the undruggable in pancreatic cancer using nano-based gene silencing drugs [J]. *Biomaterials*, 2020, **240**: 119742.

[26] ELSAESSER A, HOWARD C V. Toxicology of nanoparticles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, **64**(2): 129-137.

[27] HUANG H, FENG W, CHEN Y, *et al*. Inorganic nanoparticles in clinical trials and translations [J]. *Nano Today*, 2020, **35**: 100972.

[28] PENG F, SETYAWATI M I, TEE J K, *et al*. Nanoparticles promote *in vivo* breast cancer cell intravasation and extravasation by inducing endothelial leakiness [J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, **14**(3): 279-286.

[29] DEBACKER A J, VOUTILA J, CATLEY M, *et al*. Delivery of oligonucleotides to the liver with GalNAc: from research to registered therapeutic drug [J]. *Mol Ther*, 2020, **28**(8): 1759-1771.

[30] MURPHY D E, DE JONG O G, BROUWER M, *et al*. Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking [J]. *Exp Mol Med*, 2019, **51**(3): 1-12.

[31] HERRMANN I K, WOOD M J A, FUHRMANN G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, **16**(7): 748-759.

[32] ELSHARKASY O M, NORDIN J Z, HAGEY D W, *et al*. Extracellular vesicles as drug delivery systems: why and how? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **159**: 332-343.

[33] LAMICHHANE T N, JEYARAM A, PATEL D B, *et al*. Oncogene knockdown via active loading of small RNAs into extracellular vesicles by sonication [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2016, **9**(3): 315-324.

[34] BAI J, DUAN J L, LIU R, *et al*. Engineered targeting tLyp-1 exosomes as gene therapy vectors for efficient delivery of siRNA into lung cancer cells [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2020, **15**(4): 461-471.

[35] LIMONI S K, MOGHADAM M F, MOAZZENI S M, *et al*. Engineered exosomes for targeted transfer of siRNA to HER2 positive breast cancer cells [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, **187**(1): 352-364.

[36] ZHAO L W, GU C Y, GAN Y, *et al*. Exosome-mediated

siRNA delivery to suppress postoperative breast cancer metastasis [J]. *J Control Release*, 2020, **318**: 1-15.

[37] LAMICHHANE T N, RAIKER R S, JAY S M. Exogenous DNA loading into extracellular vesicles via electroporation is size-dependent and enables limited gene delivery [J]. *Mol Pharm*, 2015, **12**(10): 3650-3657.

[38] MUNAGALA R, AQIL F, JEYABALAN J, *et al*. Exosome-mediated delivery of RNA and DNA for gene therapy [J]. *Cancer Lett*, 2021, **505**: 58-72.

[39] GUO S W, PERETS N, BETZER O, *et al*. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell derived exosomes loaded with phosphatase and tensin homolog siRNA repairs complete spinal cord injury [J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(9): 10015-10028.

[40] GUO Y T, WAN Z, ZHAO P, *et al*. Ultrasound triggered topical delivery of Bmp7 mRNA for white fat browning induction via engineered smart exosomes [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, **19**(1): 1-13.

[41] BRYNIARSKI K, PTAK W, JAYAKUMAR A, *et al*. Antigen-specific, antibody-coated, exosome-like nanovesicles deliver suppressor T-cell microRNA-150 to effector T cells to inhibit contact sensitivity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, **132**(1): 170-181.

[42] LIANG G F, KAN S, ZHU Y L, *et al*. Engineered exosome-mediated delivery of functionally active miR-26a and its enhanced suppression effect in HepG2 cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, **13**: 585-599.

[43] TSAI S J, ATAI N A, CACCIOTTOLO M, *et al*. Exosome-mediated mRNA delivery *in vivo* is safe and can be used to induce SARS-CoV-2 immunity [J]. *J Biol Chem*, 2021, **297**(5): 101266.

[44] BU T, LI Z L, HOU Y, *et al*. Exosome-mediated delivery of inflammation-responsive Il-10 mRNA for controlled atherosclerosis treatment [J]. *Theranostics*, 2021, **11**(20): 9988-10000.

[45] LIANG G F, ZHU Y L, ALI D J, *et al*. Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, **18**(1): 1-15.

[46] LIANG Y J, XU X, LI X F, *et al*. Chondrocyte-targeted microRNA delivery by engineered exosomes toward a cell-free osteoarthritis therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(33): 36938-36947.

[47] PI F M, BINZEL D W, LEE T J, *et al*. Nanoparticle orientation to control RNA loading and ligand display on extracellular vesicles for cancer regression [J]. *Nat Nanotechnol*, 2018, **13**(1): 82-89.

[48] WANG Y Y, CHEN X J, TIAN B Q, *et al*. Nucleolin-targeted extracellular vesicles as a versatile platform for biologics delivery to breast cancer [J]. *Theranostics*, 2017, **7**(5): 1360-1372.

[49] MCANDREWS K M, XIAO F, CHRONOPOULOS A, *et al*. Exosome-mediated delivery of CRISPR/Cas9 for targeting of oncogenic KrasG12D in pancreatic cancer [J]. *Life Sci Alliance*, 2021, **4**(9): e202000875.

[50] BABAN C K, CRONIN M, O'HANLON D, *et al*. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer [J]. *Bioeng Bugs*, 2010, **1**(6): 385-394.

[51] CHEN W F, WANG Y, QIN M, *et al*. Bacteria-driven hypoxia targeting for combined biotherapy and photothermal therapy [J]. *ACS Nano*, 2018, **12**(6): 5995-6005.

[52] SALEM-BEKHIT M M, YOUSSOF A M E, ALANAZI F K, *et al*. Bacteria from infectious particles to cell based anticancer targeted drug delivery systems [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(12): 1984.

[53] YU A M, BATRA N, TU M J, *et al*. Novel approaches for efficient *in vivo* fermentation production of noncoding RNAs [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, **104**(5): 1927-1937.

[54] OREFICE N S, SOUCHET B, BRAUDEAU J, *et al*. Real-time monitoring of exosome enveloped-AAV spreading by endomicroscopy approach: a new tool for gene delivery in the brain [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, **14**: 237-251.