

· 药咖论坛 ·

## 核酸药物递送的多肽载体研究进展

李楚欣<sup>1</sup>, 宋文婷<sup>1</sup>, 张跃豹<sup>1</sup>, 魏民志<sup>2\*</sup>, 张龙贵<sup>1\*\*</sup>

(1. 深圳厚存纳米药业有限公司, 广东 深圳 518107; 2. 上海兆维科技发展有限公司, 上海 200233)

**[摘要]** 核酸药物可在体内实现基因敲除、基因沉默及诱导蛋白质表达等功能, 在人类疾病预防和治疗中发挥重要作用。常见的核酸药物包括反义寡核苷酸(ASO)、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)和信使RNA(mRNA), 它们在外界及生理条件下不稳定, 因此需要安全高效的递送载体。多肽具有低免疫原性、生物可降解、良好的入胞效率和多功能性等优点, 有利于提高核酸药物的生物利用度并改善体内靶向分布。综述用于核酸药物递送的多肽载体相关研究进展, 探讨多肽-核酸纳米药物在不同剂型和疾病中的适用性, 旨在为提高核酸治疗药物的多样性和有效性研究提供参考。

**[关键词]** 多肽; 载体; RNA 药物; 基因治疗; 纳米药物

**[中图分类号]** R945 **[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094(2024)10-0761-09

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2024.10.005

## Research Progress of Peptide Carriers in Nucleic Acid Delivery

LI Chuxin<sup>1</sup>, SONG Wenting<sup>1</sup>, ZHANG Yuebao<sup>1</sup>, WEI Minzhi<sup>2</sup>, ZHANG Longgui<sup>1</sup>

(1. Longuide Biopharma Corporation, Shenzhen 518107, China; 2. Hongene Biotech Corporation, Shanghai 200233, China)

**[Abstract]** Nucleic acid drugs can achieve gene knockdown or silencing, as well as induction of protein expression *in vivo*, playing a unique significance in disease prevention and intervention. Currently available nucleic acid drugs include antisense oligonucleotides (ASO), small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA), and messenger RNA (mRNA), all of which are unstable under both ambient environments and physiological conditions, thus there is an urgent need for safe and efficient delivery carriers. Peptides have the advantages of low immunogenicity, biodegradability, high internalization efficiency and versatility, which are beneficial to improve the bioavailability of nucleic acid drugs as well as their targeted distribution *in vivo*. This paper reviews the related research progress of peptide carriers for nucleic acid drug delivery, and discusses the applicability of peptide-nucleic acid nanotherapeutics in different formulations and diseases, providing some reference for improving the diversity and effectiveness of nucleic acid-based modern therapies.

**[Key words]** peptide; carrier; RNA drug; gene therapy; nanotherapeutic

基于信使核糖核酸(mRNA)、小干扰核糖核酸(siRNA)等核糖核酸(RNA)的基因治疗制剂, 能在转录、翻译水平调控目标基因和蛋白的表达或沉默, 有望解决一些潜在治疗靶点的不可成药问题, 在流行性疾病预防、重大难治疾病(如癌症、神经性疾病)治疗等方面展现出较大的治疗潜力和开发价值<sup>[1]</sup>。此外, 由严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒感染(corona

virus disease 2019, COVID-19)的流行在全球范围内的影响极大, 人们对流行性疾病的关注日益增加。mRNA疫苗具有高效、安全、可快速制备的特点, 能够针对不同的流行性疾病进行快速、大规模生产, 有效预防和降低流行性病毒的传播与感染。然而, 体内递送核酸药物面临着复杂多样的生理屏障, 包括循环屏障、细胞外基质屏障、细胞膜屏障和体内屏障等<sup>[2-3]</sup>。为克服这些生理屏障并提高核酸药物的生物利用度, 需要设计多功能的递送系统。

脂质纳米粒(lipid nanoparticle, LNP)是当前临床及临床前研究中常用的基因治疗递送载体。目前已有两款使用LNP作为递送载体的mRNA疫苗产品获得美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)的批准用于预防COVID-19, 分别是Pfizer公司和BioNTech公司合作研发的

**接受日期:** 2023-11-29

**\* 通信作者:** 魏民志, 博士;

**研究方向:** 核酸药物相关技术领域开发和服务;

**E-mail:** weiminzhi@hongene.com

**\*\* 通信作者:** 张龙贵, 博士;

**研究方向:** mRNA药物的可降解靶向载体材料、纳米制剂方法及新剂型的设计和工业化研发;

**E-mail:** longuide@longuide.com

Comirnaty<sup>®</sup> 以及 Moderna 公司研发的 Spikevax<sup>®</sup>。然而, 研究发现注射核酸 LNP 可能引起人体的不良反应<sup>[4-5]</sup>。开发低免疫原性、天然、安全和高效的新型核酸递送载体<sup>[6]</sup>, 有望降低核酸制剂的免疫原性, 减少副作用, 提高核酸药物在体内的生物利用度。

多肽是一种天然的非病毒基因转染载体, 具有低免疫原性、较好的生物相容性、特殊的二级结构及靶向性等优点。研发人员可针对不同的生理屏障和递送需求来设计多样化、多功能的多肽载体<sup>[7]</sup>。在研究及生产中, 多肽载体负载核酸药物主要有 2 种策略, 即共价偶联和非共价络合。其中, 非共价络合方式更简便, 无需复杂的化学修饰合成技术, 借助中性条件下带正电荷的碱性氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)与磷酸基团之间的静电相互作用实现高效压缩核酸药物。在多肽中引入特定的氨基酸并合理设计序列, 可以调整多肽载体的两性亲性, 促使多肽与核酸药物的复合体系自组装形成纳米粒。此外, 多肽分子中的疏水侧链基团与细胞膜脂质双分子层具有强亲和力, 研究发现某些多肽可以克服细胞膜屏障, 增强多肽-核酸药物纳米粒与细胞膜的相互作用, 改善核酸药物的细胞内化及转染效果。一些具有 pH 响应性的多肽在进入细胞内酸性亚细胞器(如内体、溶酶体)时可以发生二级构象变化<sup>[8]</sup>, 如翻转形成  $\alpha$ -螺旋结构。这种  $\alpha$ -螺旋结构借助氨基酸疏水侧链基团与脂质的亲和力, 能穿刺插入内体膜结构中, 促使内体膜结构不稳定甚至解体, 进而携带核酸药物逃离酸性内体, 实现向细胞质递送及高效转染。已有研究探讨了多肽载体的作用机制<sup>[9]</sup>, 本文主要介绍用于递送核酸药物的多肽载体材料的新近研究进展, 探索多肽-核酸纳米粒在不同给药剂型和疾病治疗中的适用性, 旨在为新型多肽载体的临床转化提供参考。

## 1 经典载体细胞穿膜肽

细胞穿膜肽 (cell penetrating peptides, CPPs) 是一类与细胞膜具有强亲和力, 能跨越穿透细胞膜屏障实现向细胞内转运递送药物的短肽, 例如寡聚精氨酸、CADY 肽 (GLWRALWRLLRSLWRLLWRAS-NH<sub>2</sub>) 和源自人免疫缺陷病毒的 TAT 肽 (YGRKKRRQRRR)

等<sup>[7]</sup>。CPPs 具有良好的内化入胞效率, 已有研究围绕 CPPs 入胞机制进行了深入探索<sup>[9]</sup>。作为经典的递送载体, CPPs 可用于改善不同药物的分布与递送, 如小分子、质粒、寡核苷酸、蛋白质、纳米颗粒、脂质体等, 且常用于递送寡肽/蛋白质及核酸类药物<sup>[10]</sup>。CPPs 在核酸递送载体设计中具有使用简易、灵活、适用于不同修饰方式等优点, 可通过静电作用和氢键作用与核酸药物直接络合; 也可通过化学偶联的方法直接将 CPPs 与核酸药物结合, 或将 CPPs 修饰在其他递送系统的表面以增强其细胞内化、转染效果。Peng 等<sup>[11]</sup> 研究发现, 多价穿膜肽 (multiple CPP) 可增强核酸纳米粒的细胞内吞水平及 siRNA 转染效率。该研究将富含精氨酸的 ARP 多肽 (KRRKRRRRRK) 通过席夫碱反应以摩尔比 2:1 大量地接枝在聚合物表面制备得到多价穿膜肽聚合物纳米粒; 细胞毒性实验发现, ARP 多肽修饰的聚合物纳米粒对肿瘤细胞的半抑制浓度明显低于未修饰的聚合物纳米粒, 其抑癌作用的提升可能得益于正电 CPPs 与负电细胞膜的亲和力, 显示出 CPPs 靶向肿瘤细胞递送的潜力; 借助正电 CPPs 络合负电性的核酸, 进一步筛选出 ARP 修饰的 P (LAEMA<sub>23</sub>-*St*-FPMA<sub>3</sub>) 聚合物纳米粒 (P3-P), 可载带能够特异性沉默宫颈癌细胞的表皮生长因子受体 (EGFR) 的 siRNA, P3-P 纳米粒的脱靶效率和细胞毒性明显低于市售载体 Lipofectamine<sup>™</sup> 3000, 具有较好的安全性及靶向性优势。

磷酰二胺吗啉代寡核苷酸 (phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMOs) 是一种经 FDA 批准用于迪谢内肌营养不良的反义寡核苷酸治疗制剂。将 CPPs 如寡聚精氨酸 (GR<sub>6</sub>) 修饰在 PMOs 上可制得多肽偶联式磷酰二胺吗啉代寡核苷酸 (peptide-conjugated PMOs, PPMOs) 制剂, 其能有效改善体内组织靶向递送、细胞内化及入核效果<sup>[12]</sup>。Gan 等<sup>[13]</sup> 对给药 30 天后小鼠多个组织器官中外显子跳跃水平和肌营养不良蛋白表达的分析检测发现, 单次注射 PPMOs 即可引起持续、有效的治疗效果, 并通过握力等测试证明了 PPMOs 可显著改善小鼠肌肉性能。研究人员进一步对比相同条件下 PPMOs 与 PMOs 的效果发现, 每月一次的给药频

率下 PPMOs 比单次注射 PPMOs 显示出更持久的治疗效果; 在每月一次的给药频率下, 无 CPPs 修饰的 PMOs 组中, 多只小鼠肌肉性能改善情况不佳且在心脏组织中效果不明显。此外, 已有 II 期临床试验 (NCT04004065) 正在验证 PPMOs 的安全性和药物代谢动力学特征。临床前及临床试验结果揭示了 CPPs 偶联修饰策略具有提高寡核苷酸药物生物利用度、降低给药频率以及拓展应用到其他核酸药物递送体系的潜力。

Bang 等<sup>[14]</sup>设计了一种具有肿瘤细胞靶向作用的核酸递送融合肽载体, 通过寡聚甘氨酸短肽, 将正电性聚精氨酸 R<sub>11</sub> 多肽与乳腺癌细胞靶向肽 SP82 结合制备得到 RS 融合多肽 (RRRRRRRRRRGGGGQLEFYTGLAKLI), 以期提高传统 CPPs 多肽载体的靶向特异性。将 RS 融合多肽与抑制肿瘤细胞生长的 siRNA 复合后, 可自组装得到水合粒径为 200~300 nm 的颗粒。在纳米粒稳定性实验中发现, RS 融合多肽相比亲本多肽 R<sub>11</sub> 展现出更好的抗酶解和维持 siRNA 稳定的性能, 在与血清孵育 24、72 h 后仍能有效保留负载的 siRNA, 载荷效率分别达到 90% 和 60% 以上。通过细胞内吞实验对比发现, RS 融合多肽载体相比市售载体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, 具有相近的乳腺癌细胞靶向内化效率, 且展现出对乳腺癌细胞更佳的抑制作用。值得注意的是, 在体外模拟实验中, RS-siRNA 纳米粒被巨噬细胞摄取的水平显著低于 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, 具有降低非特异性摄取清除并提高核酸药物在体内生物利用度的潜力。通过活体观察及切片染色验证发现, RS-siRNA 纳米粒在活体中具有低免疫原性及良好的生物相容性。研究人员进一步对比 RS 融合多肽和另一种能特异性靶向乳腺癌细胞的融合肽 RT (RRRRRRRRRRGGGGAKRGARSTA) 发现, RS 融合多肽络合、压缩、稳定 siRNA 的能力更强, 且对乳腺癌细胞转染、抑制效果更好。该项研究通过融合肽策略, 一方面提高了经典 CPPs 载体的靶向性, 降低非特异性免疫清除; 另一方面通过引入合适的靶向肽, 有利于进一步提高 CPPs 的核酸络合及胞内递送效果, 为多肽载体设计及优化提供重要的理

论参考。

## 2 多肽载体的多功能化设计

除直接利用经典 CPPs 增强核酸递送外, 多项研究基于仿生设计<sup>[15]</sup>和电脑计算优化<sup>[16]</sup>等策略对多肽分子进行了优化和验证, 衍生出丰富多样的多肽序列设计和功能化研究, 为丰富核酸药物递送体系提供重要参考。

### 2.1 支化多肽载体

除了可用于静电络合压缩核酸药物外, 赖氨酸分子支链上的氨基官能团被广泛用于设计合成支化、树枝状多肽分子<sup>[17]</sup>。支化多肽作为基因递送载体, 一方面可提供双臂至多臂可修饰位点, 有利于实现多功能化; 另一方面, 支化多肽可设计成 Y 型、树枝型等非线性结构, 有利于增大多肽载体与核酸药物和细胞膜的作用面积, 从而提高核酸载荷量及入胞效率。Yuan 等<sup>[18]</sup>设计了一系列基于赖氨酸的支链两亲性多肽 (BAPs), 旨在通过实验对比筛选出其中最佳的多肽序列用于递送质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) 和 mRNA。通过比较基于 K<sub>4</sub>、K<sub>6</sub>、K<sub>8</sub> 的短分支 BAPs-pDNA 复合物的尺寸、电势、核酸负载率等, 确定 K<sub>6</sub> 是三者中性能最佳的寡聚赖氨酸。研究人员进一步优化 BAPs 支链上不同氨基酸的含量和排序发现, 通过集中排布正电氨基酸, 合理分割亲水和疏水侧链基团排布以及延长疏水分支长度等设计策略, 可以有效提高 BAPs 的两亲性。其中, BAP-V7 多肽 [序列为 bis(FFLFFHHH)-K-K<sub>6</sub>, 见图 1] 可以与 pDNA 形成更稳定的复合物, 在体外肝素置换实验中显示出相比其他对照多肽更强的核酸负载稳定性。通过体外细胞实验证明, BAP-V7 支化多肽载体的生物相容性及转染效果相比市售基因转染载体支化聚乙烯亚胺更佳, 且可用于递送其他类型的核酸药物如 mRNA, 显示出较好的通用性。

### 2.2 膜亲和性多肽载体

多肽载体与细胞膜的亲和作用主要来源于氢键、静电力、疏水效应等。在多肽序列设计中引入正电性碱性氨基酸或侧链官能团等易形成氢键的氨基酸, 可以有效提高载体与细胞膜的亲和性<sup>[11,14]</sup>。

研究人员发现, 色氨酸与细胞膜的脂质、胆固醇分子具有亲和性, 在 CPPs 的入胞过程中起重要作用<sup>[19]</sup>。此外, 引入色氨酸可增强多肽疏水性, 促进多肽/核酸复合体自组装并提高其稳定性<sup>[20]</sup>。Samec 等<sup>[21]</sup> 基于天冬氨酸-异亮氨酸-缬氨酸 (DIV) 重复序列及寡聚 D 型精氨酸, 设计了一系列两亲性多肽 DIV3(X), 能与 siRNA 自组装成尺寸为 80~100 nm 的颗粒。体外模拟实验发现, 在高浓度胎牛血清及核糖核酸酶 (RNase) 孵育条件下, DIV3W 多肽 [WEADIVADIVWDIVADIVAGGG-(d)

RRRRRRRRR] 载荷的 siRNA 仍保持较高完整性, 证明该递送体系具有良好的稳定性及核酸药物保护功能。进一步对比发现, 含色氨酸的 DIV3W 肽在卵巢癌细胞中的入胞能力及基因沉默效率显著高于 DIV3H 多肽 [WEADIVADIVHDIWADIVAGGG-(d) RRRRRRRRRR]。研究者推测 DIV3W 多肽载体的递送转染效果得益于色氨酸的膜亲和性, 一方面提高入胞递送效率, 另一方面有利于与溶酶体膜结合从而释放核酸药物, 为多肽载体细胞膜亲和性相关研究工作提供一定的参考。

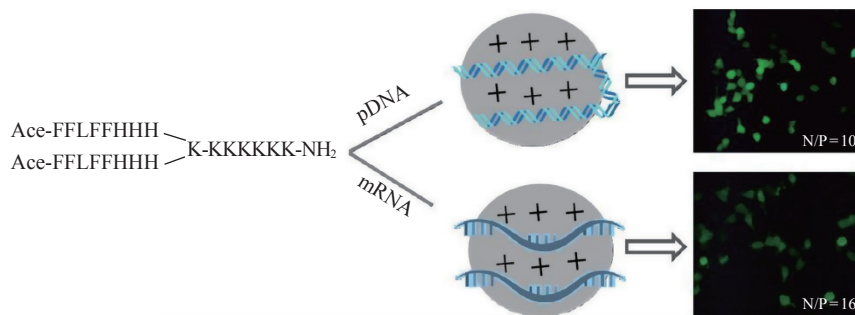


图 1 用于递送 pDNA 与 mRNA 的支化两亲性多肽载体<sup>[18]</sup>

Figure 1 Branched amphiphilic peptides for pDNA and mRNA delivery

### 2.3 自交联多肽载体

在序列设计中引入半胱氨酸可赋予多肽载体一些特别的功能。一方面, 半胱氨酸的侧链基团可以形成二硫键。含半胱氨酸的多肽载体, 可以在分子内交联形成环肽结构, 也可以在多肽载体分子间交联形成网络结构从而更好地包封药物减少泄露, 还可以与其他成分 (如核酸药物) 交联形成分子间二硫键从而制备更稳定的纳米复合物。此外, 二硫键具有可逆性, 有利于实现细胞内多肽-核酸纳米粒的药物释放, 促进核酸药物与作用位点结合并发挥生物效应<sup>[22]</sup>。Mandal 等<sup>[23]</sup> 通过在以色氨酸和精氨酸为主的不同多肽序列中引入半胱氨酸, 制备了一系列自交联多肽。其中, 环状多肽 C4 [序列为 Cyclo(CR<sub>5</sub>W<sub>5</sub>C)] 和杂化肽 H4 [W<sub>4</sub>-Cyclo(CR<sub>5</sub>C)-W<sub>4</sub>] 显示出优异的稳定性、核酸保护能力, 良好的生物相容性及较高的入胞效率<sup>[22]</sup>。利用环肽二硫键在细胞内的还原环境下可以裂解的性质, 促进载荷 siRNA 进入细胞质并释放, 沉默靶标基因及抑制蛋白表达效率高达 70%~75%; 展现了多肽载体递送

核酸药物的高效、安全的特点。

基于半胱氨酸的自交联多肽载体在工业核酸治疗制剂生产中也具有重要应用。例如, 德国的生物科技公司 CureVac 就在其公开的专利 (如 CN108026537B、CN102573919B、CN107648604A 和 CN103025876A) 中涉及了多种含半胱氨酸的多肽载体并用于制备交联多肽纳米粒, 旨在提高核酸药物颗粒的稳定性和体内递送、释放、转染的效果。

### 2.4 内体逃逸多肽载体

在内体酸性环境下, 质子化的组氨酸可引发内体膨胀甚至破裂, 因此, 在多肽序列中引入组氨酸有利于促进核酸药物的内体逃逸<sup>[24-26]</sup>。Mixson 课题组设计了基于通式 X<sub>2</sub>-K-K(X)-K(X)-CONH<sub>2</sub> 且支链 X 富含组氨酸的树枝状多肽, 并发现其侧链序列稍作改变即可获得不同性能的多肽用以递送核酸药物<sup>[27-28]</sup>。研究发现, H2K4b 多肽 (序列为 X<sub>2</sub>-K-K(X)-K(X)-CONH<sub>2</sub>, 其中 X = KHKHHKHHKHHKHHKHHK) 适用于递送相对分子质量较大的质粒<sup>[27]</sup>, 而 H3K4b 多肽 [序列为

X<sub>2</sub>-K-K(X)-K(X)-CONH<sub>2</sub>, 其中 X=KHHHKHHHKH-HHKHHHK] 则是 siRNA 的良好载体。在此基础上, He 等<sup>[28]</sup> 在树枝状多肽 H3K4b 侧链上引入单个组氨酸, 得到 H3K(+H)4b 多肽 [序列为 X<sub>2</sub>-K-K(X)-K(X)-CONH<sub>2</sub>, 其中 X=KHHHKHHHKHHHKHHHK] 并用于递送 mRNA。与 H3K4b 相比, H3K(+H)4b 具有更强的 mRNA 压缩能力和更高的稳定性。另外, 细胞实验显示, H3K(+H)4b 多肽载体递送 mRNA 的转染效率是 H3K4b 载体的 10 倍, 且无明显的细胞毒性作用。将 H3K(+H)4b 中的 L 型赖氨酸替换成稳定性更高、对蛋白酶降解具有抗性的 D 型赖氨酸制备得到 H3k(+H)4b 多肽。以 H3k(+H)4b 多肽作为载体, 可进一步提高 mRNA 的体外转染效果, 揭示了载体的抗酶解稳定性对核酸递送转染的重要影响。

### 2.5 抵抗酶降解的多肽载体

多肽-核酸药物递送系统需要克服体内复杂多样的活性酶带来的降解问题以提高递送效率<sup>[29-31]</sup>。逆反肽 (retro-inverso peptide) 与亲本多肽具有完全相反的氨基酸序列; 在性能上, 逆反肽比其亲本肽具有更强的蛋白酶耐受性, 不易被水解, 因此具有更好的稳定性<sup>[32]</sup>。Vaissière 等<sup>[33]</sup> 基于细胞穿膜肽 CADY 设计了新的多肽载体 CADY-K (GLWRALWRLRLSLWRLWK), 并在此基础上采用逆反转策略 (retro-inverso) 制备了逆反肽 RICK (kwlrlwslrlrlwrlwlg)。此外, 不同于由 L 型氨基酸组成的亲本对照肽 CADY-K, RICK 多肽由不易被蛋白酶降解的 D 型氨基酸组成。实验发现, RICK 多肽与亲本 CADY-K 多肽拥有相近的 siRNA 络合能力, 逆反转设计并不影响多肽负载核酸的能力。然而在蛋白酶孵育实验中, CADY-K/siRNA 纳米粒被酶迅速降解导致 siRNA 泄露失活, 而 RICK/siRNA 纳米粒展现出显著增强的稳定性, 可保护负载的 siRNA 并实现高效细胞递送及转染。目前逆反转设计及引入 D 型氨基酸在多肽载体的理论研究和实际生产应用中均较少报道, 但可为新型多肽载体设计提供了另一种研究思路。

尽管多肽作为核酸递送载体显示出多功能及良好生物相容性等优点, 其体内应用仍面临稳定性差、易降解等问题, 还需更多研究和新策略以增强多肽

抗酶解能力, 从而提高多肽递送系统在体内的稳定性及核酸药物的生物利用度。

## 3 多肽载体的给药途径

近年来, 多肽载体不同给药途径的开发受到广泛关注。研究人员通过实验设计, 筛选、优化了多肽-核酸制剂处方, 结合不同的制备技术, 成功地将多肽-核酸纳米粒制备成灵活适用于不同给药途径的制剂, 显示出多肽载体广泛的应用潜力。

### 3.1 经皮递送

经皮给药在用药依从性、维持稳定血药浓度等方面具有诸多优势。目前促进经皮递送基因治疗制剂的方法包括电穿孔、超声、离子电渗、微针递送以及添加化学增强剂等<sup>[34]</sup>。相较于其他方法, 化学增强剂具有创伤小、操作简易、普及性广的特点。多肽材料有望被开发成为温和高效的化学增强剂以促进核酸药物的经皮递送, 在皮肤疾病和美容医疗领域具有一定的应用前景<sup>[35]</sup>。Chen 等<sup>[36]</sup> 将细胞穿膜肽 SPACE (AC-TGSTQH-QG, 又称 Disulfide Bridge 2-10) 添加入 siRNA-脂质体制剂处方, 可促进 siRNA 渗透皮肤及递送转染。该制剂处方中, 研究人员同时以 3 种方式掺入 SPACE 多肽, 对比其他以单一形式引入 SPACE 多肽的处方, 能够更好地促进 siRNA 多肽脂质体颗粒渗透皮肤和表皮。该研究一方面展现了多肽载体用于经皮递送的优势, 另一方面为构建多肽-脂质-核酸复合纳米粒提供参考。

### 3.2 肺部递送

肺部吸入给药方式可以避开肝脏部位的首过效应 (first-pass effect), 药物直接进入血液循环, 具有起效迅速、生物利用度高等特点。将核酸药物制成吸入制剂有利于实现简便、快速、有效的肺部核酸递送, 对于防治呼吸系统疾病如流行性病毒感染等具有重大意义。目前研究已开发出一些适用于肺部给药的多肽核酸递送及吸入式处方<sup>[37-39]</sup>。Munir 等<sup>[37]</sup> 通过喷雾干燥技术 (spray drying) 将 RALA 阳离子两亲性多肽 (WEARLARALARALARHLARALARALRACEA) 与质粒 pDNA 复合制成稳定、高效、可吸入的基因治疗剂, 并通过正交实验设计, 研究对比不同配

方和工艺参数对多肽-核酸纳米粒尺寸、电势、包封率、稳定性、工艺产量等多方面质量指标的影响。该项研究通过喷雾干燥技术成功制备理化性能及生物功能稳定的 RALA-pDNA 粉剂, 并报道了其中的配方和工艺参数优化筛选方案, 展现了多肽载体的剂型多样性, 为制备多肽纳米粒干粉提供实验参考和设计思路。

肺部组织的生理屏障包括负电荷黏蛋白的静电吸附作用、黏液构成的网状结构等, 这需要递送系统拥有中性或电负性以降低与黏液的相互作用, 或短暂性地破坏黏液网状结构以实现有效的药物渗透递送同时保证生物安全性。Kumari 等<sup>[38]</sup>以阳离子

细胞穿膜肽 CRHC-2 (CRRRRRHHHHHHRRRRC) 及两亲性多肽 M9 (CRRLRHLRHHYRRRWHRFRC) 作为载体, 分别与质粒 DNA、siRNA 复合得到纳米核, 并进一步在纳米核表面包裹甘露醇修饰的硫酸软骨素 A, 旨在促进纳米粒穿透网状黏液层屏障 (见图 2)。通过体外模拟黏液层穿透实验证实修饰包封后的多肽-核酸纳米粒在 4 h 内可快速穿透黏液层实现核酸转运, 而简单混合核酸药物和甘露醇修饰的硫酸软骨素 A 并不能穿透黏液层。该项研究提供了一种增强多肽载体向肺部递送核酸药物的修饰策略, 以期拓展多肽载体在肺部疾病中的应用。

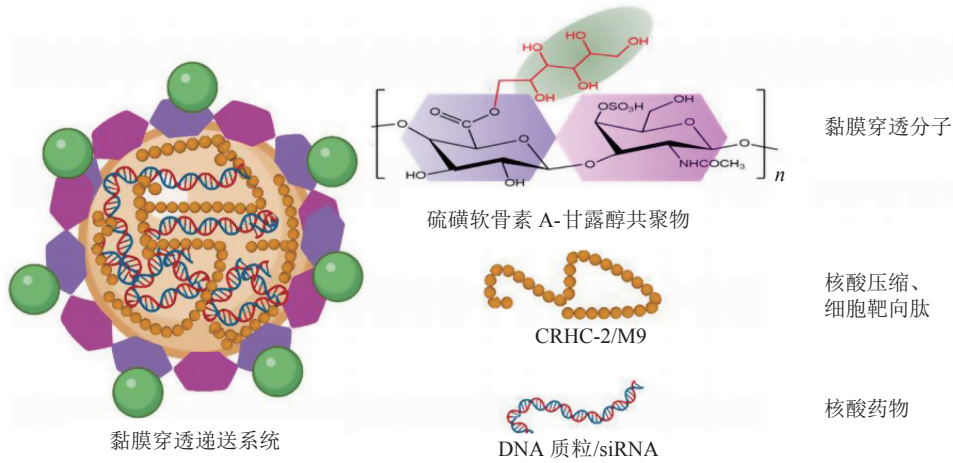


图 2 用于递送 siRNA 和质粒 DNA 的多肽-核酸纳米复合物<sup>[38]</sup>

Figure 2 Peptide-nucleic acid nanocomplexes for the delivery of siRNA and plasmid DNA

### 3.3 口服递送

口服递送核酸药物要面对复杂的胃肠道环境, 需要递送载体携带核酸药物能克服强酸性、多种活性酶降解等难题。Ibaraki 等<sup>[40]</sup>将多功能肽  $\text{CH}_2\text{R}_4\text{H}_2\text{C}$  (序列为 CHHRRRRHHC) 修饰的甲氧基聚乙二醇-聚己内酯聚合物 (mPEG-PCL- $\text{CH}_2\text{R}_4\text{H}_2\text{C}$ ) 与 siRNA 复合得到多肽聚合物胶束用于口服治疗结肠炎。在体外模拟的胃酸环境 (pH=1.2) 中, 该多肽聚合物颗粒载荷的 siRNA 约有 90% 仍保持较好完整性, 证明其良好的核酸压缩保护能力。在体内分布实验中, mPEG-PCL- $\text{CH}_2\text{R}_4\text{H}_2\text{C}$  纳米粒在口服后 3 h 内即可快速富集停留于肠道, 而在小鼠胃部无明显富集; 无载体的自由药物在肠道富集效果相对较差, 证明该多肽聚合物载体具有靶向肠道递送药物的潜力。此外, 在小鼠结肠炎模型中, mPEG-

PCL- $\text{CH}_2\text{R}_4\text{H}_2\text{C}$ -siRNA 纳米制剂显示出与阳性对照药物 5-氨基水杨酸相近的治疗效果, 证明其治疗结肠炎的潜力, 同时展现了多肽载体口服递送的可能性, 也为口服核酸药物研究提供一定的参考。

### 3.4 鼻腔给药

研究发现, CPPs 可作为化学增强剂提高经鼻腔向大脑运输药物的效率。Samaridou 等<sup>[41]</sup>设计了一种基于多肽和聚合物的核酸递送纳米载体, 旨在通过鼻腔给药手段促进 RNA 药物向大脑递送, 并检验其在神经系统疾病治疗中的潜在用途。研究人员将修饰了十二烷酸的正电荷 CPPs 寡聚精氨酸 ( $\text{R}_8\text{-C12}$ ) 与 RNA 复合得到正电性的纳米核 NCPs, 并进一步在纳米核表面分别修饰负电性的聚乙二醇聚谷氨酸嵌段聚合物 (PEG-PGA)、透明质酸 (HA) 制备得到大小约为 100 nm 的均一复合物 ENCPs,

室温条件下可保存长达4周。通过添加冻干保护剂可制成复溶稳定的干粉剂, ENCPs 显示出较好的储存稳定性及剂型多样性。同时, 研究人员发现, 聚合物表面修饰策略可以增强 ENCPs 的制剂稳定性和转染效率。通过鼻内给药的方式给小鼠注入载荷治疗药物 miR-132 的纳米粒, 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应检测证实 PEG-PGA 修饰的 ENCPs 能有效增加小鼠大脑海马体内的 mRNA 表达水平, 展现出 ENCPs 鼻腔给药的适用性及脑部靶向递送潜力。此外, Samaridou 等<sup>[41]</sup> 还进一步通过微流控技术优化聚合物多肽-核酸纳米粒的配比、制备方法以及理化性质, 为放大生产多肽-核酸纳米制剂提供一定的参考。

#### 4 结语与展望

随着人们对疾病防治中核酸药物关注度和重视度的提升, 对安全高效的核酸药物递送载体需求也日益增长。多肽载体因其天然、安全、多功能化等特点, 在核酸药物递送领域展现出巨大的应用潜力。上文介绍了近年来用于递送核酸的多肽载体相关研究报道。一方面为多肽载体研发提供多方面的参考, 包括序列功能化设计、表面修饰策略、工艺配方参数优化等; 另一方面展现了多肽载体在序列设计、功能优化方面的多样性和可行性, 在不同疾病和给药方式中的灵活应用潜力。然而, 目前多肽载体在实际临床生产应用中仍处于起步阶段, 未来开发设计及临床转化将面临诸多挑战。目前已报道的研究也揭示了未来多肽载体研发存在的问题及攻坚方向: 1) 目前多肽载体相比市售载体(如 Lipofectamine™ 2000) 展现出一定的竞争优势, 然

而相关实验对比和数据报道仍较少, 亟需深入、全面对比验证新型多肽载体与经典载体在理化性质、生物学功能等方面的区别和优势, 以期加快推进多肽载体生产转化及临床应用。2) 目前对多肽载体递送核酸药物的效果评估实验方案有多样化、全面深入化的趋势和需求。Feng 等<sup>[26]</sup> 报道的多肽载体在3种不同细胞中均有不低于80%的转染效率, 显示出广泛普适性的同时也会引起人们对多肽载体特异性及脱靶问题的疑虑。基于单一细胞株的评估实验不能满足全面评估多肽-核酸纳米药物生化性质的需求, 需要未来的研究工作进一步在多细胞实验、小动物活体实验水平进行深入的验证和分析。3) 在临床转化前, 需要对多肽-核酸纳米粒稳定性和安全性进行全面深入的研究。目前研究报道通过血清/核酸酶/蛋白酶孵育、肝素置换实验等手段模拟生理条件, 验证多肽载体的尺寸稳定性及核酸分子的完整性。在安全性方面, 许多研究报道了多肽载体在细胞实验水平具有低毒性和良好的安全性, 显著优于市售载体。少数研究工作评估了多肽载体在小鼠活体内的免疫刺激反应, 显示出无明显的促炎作用和体内应用潜力。然而, 体外实验可能与体内真实情况有较大差距, 未来相关研究应着力于进一步评估核酸药物与多肽载体复合物在体内的代谢分布、作用机制和效果。4) 现有报道揭示了多肽载体的放大生产和剂型多样性, 制剂配方、制备工艺参数等相关报道仍较少。本文综述近期用于核酸递送的多肽载体相关研究进展, 以期引起更多医药工作者、研发生产者对多肽载体的关注研究和生产投入, 开发出更多样、高效的核酸治疗制剂, 为相关重大疾病的预防和治疗提供参考。

#### [ 参考文献 ]

- [1] Gupta A, Andresen J L, Manan R S, *et al.* Nucleic acid delivery for therapeutic applications[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2021, 178: 113834. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113834.
- [2] Rinoldi C, Zargarian S S, Nakielski P, *et al.* Nanotechnology-assisted RNA delivery: from nucleic acid therapeutics to COVID-19 vaccines[J]. *Small Methods*, 2021, 5(9): 2100402. DOI: 10.1002/smt.202100402.
- [3] Mallick A M, Tripathi A, Mishra S, *et al.* Emerging approaches for enabling RNAi therapeutics[J]. *Chem Asian J*, 2022, 17(16): e202200451. DOI: 10.1002/asia.202200451.
- [4] Moghimi S M. Allergic reactions and anaphylaxis to LNP-based COVID-19 vaccines[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(3): 898-900.
- [5] Hui A M, Li J, Zhu L, *et al.* Immunogenicity and safety of BNT162b2 mRNA vaccine in Chinese adults: a phase 2 randomised clinical

- trial[J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2022, 29: 100586. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2022.100586.
- [6] 丁晓然, 王升启. 多肽介导的核酸药物递送系统研究进展 [J]. *药* 学进展, 2015, 39(2): 105-112.
- [7] Hadianmrei R, Zhao X. Current state of the art in peptide-based gene delivery[J]. *J Control Release*, 2022, 343: 600-619. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.02.010.
- [8] 赵欢乐, 梁菊, 吴文澜, 等. 酸敏感多肽在药物递送方面的作用机制及其应用 [J]. *药* 学学报, 2019, 54(3): 440-447.
- [9] 任锦, 钦传光, 徐春兰, 等. 细胞穿膜肽作为药物载体的研究进展 [J]. *药* 学学报, 2010, 45(1): 17-25.
- [10] Heitz F, Morris M C, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(2): 195-206.
- [11] Peng Y Y, Hu H, Diaz-Dussan D, et al. Glycopolymer-cell-penetrating peptide (CPP) conjugates for efficient epidermal growth factor receptor (EGFR) silencing[J]. *ACS Macro Lett*, 2022, 11(4): 580-587.
- [12] Erdos M R, Cabral W A, Tavarez U L, et al. A targeted antisense therapeutic approach for Hutchinson-Gilford progeria syndrome[J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 536-545.
- [13] Gan L, Wu L C L, Wood J A, et al. A cell-penetrating peptide enhances delivery and efficacy of phosphorodiamidate morpholino oligomers in *mdx* mice[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 30: 17-27. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.08.019.
- [14] Bang J H, Ryu Y C, Kim K A, et al. Targeted delivery of self-assembled nanocomplex between fusion peptides and siRNAs for breast cancer treatment[J]. *Biochem Eng J*, 2022, 186: 108564. DOI: 10.1016/j.bej.2022.108564.
- [15] Decker S, Taschauer A, Geppel E, et al. Structure-based peptide ligand design for improved epidermal growth factor receptor targeted gene delivery[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 176: 211-221. DOI: 10.1016/j.ejpb.2022.05.004.
- [16] Wolfe J M, Fadzen C M, Choo Z N, et al. Machine learning to predict cell-penetrating peptides for antisense delivery[J]. *ACS Cent Sci*, 2018, 4(4): 512-520.
- [17] Rodríguez-Hernández J, Gatti M, Klok H A. Highly branched poly(L-lysine)[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(2): 249-258.
- [18] Yuan X, Luo S Z, Chen L. Novel branched amphiphilic peptides for nucleic acids delivery[J]. *Int J Pharm*, 2022, 624: 121983. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121983.
- [19] Crombez L, Aldrian-Herrada G, Konate K, et al. A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 95-103.
- [20] Morris M C, Gros E, Aldrian-Herrada G, et al. A non-covalent peptide-based carrier for *in vivo* delivery of DNA mimics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(7): e49. DOI: 10.1093/nar/gkm053.
- [21] Samec T, Alatise K L, Boulos J, et al. Fusogenic peptide delivery of bioactive siRNAs targeting CSNK2A1 for treatment of ovarian cancer[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 30: 95-111. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.09.012.
- [22] Panigrahi B, Singh R K, Suryakant U, et al. Cyclic peptides nanospheres: a '2-in-1' self-assembled delivery system for targeting nucleus and cytoplasm[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 171: 106125. DOI: 10.1016/j.ejps.2022.106125.
- [23] Mandal D, Mohammed E H M, Lohan S, et al. Redox-responsive disulfide cyclic peptides: a new strategy for siRNA delivery[J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(5): 1338-1355.
- [24] Toriyabe N, Hayashi Y, Harashima H. The transfection activity of R8-modified nanoparticles and siRNA condensation using pH sensitive stearylated-octahistidine[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1337-1343.
- [25] He J, Xu S, Mixson A J. The multifaceted histidine-based carriers for nucleic acid delivery: advances and challenges[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(8): 774. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080774.
- [26] Feng R, Chang A C Y, Ni R, et al. mRNA delivery and storage by co-assembling nanostructures with designer oligopeptides[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, 5(7): 3476-3486.
- [27] Leng Q, Mixson A J. Modified branched peptides with a histidine-rich tail enhance *in vitro* gene transfection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): e40. DOI: 10.1093/nar/gni040.
- [28] He J, Xu S, Leng Q, et al. Location of a single histidine within peptide carriers increases mRNA delivery[J]. *J Gene Med*, 2021, 23(2): e3295. DOI: 10.1002/jgm.3295.
- [29] Wolfe J M, Fadzen C M, Holden R L, et al. Perfluoroaryl bicyclic cell-penetrating peptides for delivery of antisense oligonucleotides[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(17): 4756-4759.
- [30] Qiu J, Fan Q, Xu S, et al. A fluorinated peptide with high serum-and lipid-tolerance for the delivery of siRNA drugs to treat obesity and

- metabolic dysfunction[J]. *Biomaterials*, 2022, 285: 121541. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121541.
- [31] Danielsen M, Hempel C, Andresen T L, *et al.* Biopharmaceutical nanoclusters: towards the self-delivery of protein and peptide therapeutics[J]. *J Control Release*, 2022, 347: 282–307. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.04.050.
- [32] Doti N, Mardirossian M, Sandomenico A, *et al.* Recent applications of retro-inverso peptides[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8677. DOI: 10.3390/ijms22168677.
- [33] Vaissière A, Aldrian G, Konate K, *et al.* A retro-inverso cell-penetrating peptide for siRNA delivery[J]. *J Nanobiotechnol*, 2017, 15(1): 34. DOI: 10.1186/s12951-017-0269-2.
- [34] Singh P, Muhammad I, Nelson N E, *et al.* Transdermal delivery for gene therapy[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(11): 2613–2633.
- [35] Nasrollahi S A, Taghibiglou C, Azizi E, *et al.* Cell-penetrating peptides as a novel transdermal drug delivery system[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 80(5): 639–646.
- [36] Chen M, Zakrewsky M, Gupta V, *et al.* Topical delivery of siRNA into skin using space-peptide carriers[J]. *J Control Release*, 2014, 179: 33–41. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.01.006.
- [37] Munir M, Kett V L, Dunne N J, *et al.* Development of a spray-dried formulation of peptide-DNA nanoparticles into a dry powder for pulmonary delivery using factorial design[J]. *Pharm Res*, 2022, 39(6): 1215–1232.
- [38] Kumari A, Pal S, Betsy Reshma G, *et al.* Surface-engineered mucus penetrating nucleic acid delivery systems with cell penetrating peptides for the lungs[J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(5): 1309–1324.
- [39] Qiu Y, Man R C H, Liao Q, *et al.* Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide[J]. *J Control Release*, 2019, 314: 102–115. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.10.026.
- [40] Ibaraki H, Hatakeyama N, Takeda A, *et al.* Multifunctional peptide carrier-modified polymer micelle accelerates oral siRNA-delivery to the colon and improves gene silencing-mediated therapeutic effects in ulcerative colitis[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 73: 103481. DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103481.
- [41] Samaridou E, Walgrave H, Salta E, *et al.* Nose-to-brain delivery of enveloped RNA-cell permeating peptide nanocomplexes for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Biomaterials*, 2020, 230: 119657. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119657.



**【专家介绍】**张龙贵：四川大学与德国慕尼黑大学联合培养药剂学博士，深圳厚存纳米药业有限公司创始人，德国华人华侨科技工商协会生物医药专业委员会副主任，光明留学生联谊会理事，四川大学生物医学工程学院生物医学工程专业学位研究生产业导师，深圳理工大学曙光书院荣誉辅导员。

从事纳米药物递送技术研究 14 年，擅长靶向纳米粒载体的设计和开发，发表 SCI 论文 8 篇，专注于 RNA 药物开发的可降解靶向递送材料、纳米制剂方法及新剂型的设计和转化。于 2018 年创建深圳厚存纳米药业有限公司，带领公司研发团队研究 mRNA 药物纳米递送技术，主导研发的肝靶向 LLLRNA<sup>®</sup>、Genefrei<sup>®</sup> 系列试剂盒、肺靶向 Lunguide<sup>®</sup>、淋巴结靶向 DCguide<sup>®</sup>、脾靶向 SPguide<sup>®</sup>、Tguide<sup>®</sup>、多肽 BMPNP<sup>®</sup> 等纳米递送技术已获得 26 项专利授权。公司专利技术可用于预防型疫苗、治疗型疫苗、CART 疗法、siRNA 疗法、蛋白替代疗法及基因编辑等药物开发。所带领的公司团队先后荣获光创赛行业赛二等奖、总决赛三等奖、最具投资价值奖，深创赛行业总决赛优秀奖、国赛总决赛优秀奖，2021 年申请深圳市创新创业计划-创业资助项目，并获得 100 万项目资助。公司分别在 2021 年和 2022 年被收录于《中国疫苗白皮书》和《RNA 疗法行业白皮书》中，2022 年入选“科创中国”生物医药领域“先导技术”榜单，深圳光明区首批授牌认定的合成生物企业，2023 年入选国家级科技型中小企业、深圳市创新型中小企业。