

# 纳米粒子在 CRISPR/Cas9 基因治疗中的应用

马跃, 邓莉, 李善刚

昆明理工大学 灵长类转化医学院 省部共建非人灵长类生物学国家重点实验室 云南中科灵长类生物医学实验室, 云南 昆明 650000

马跃, 邓莉, 李善刚. 纳米粒子在 CRISPR/Cas9 基因治疗中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2087-2104.

MA Y, DENG L, LI SG. Application of nanoparticles in CRISPR/Cas9-based gene therapy. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2087-2104.

**摘要:** CRISPR/Cas9 基因编辑技术已成为基因治疗领域最有前景的工具。在临床应用中, 对 CRISPR/Cas9 进行安全有效的递送一直是亟待解决的问题。纳米粒子, 如脂基纳米粒子、聚合物纳米粒子、纳米金颗粒以及生物膜类纳米粒子等, 因其生物相容性、安全性和可设计性等特点有望为基因治疗带来新的突破。文中首先对纳米粒子的特性和基因治疗中 CRISPR/Cas9 的发展进行了概述, 然后详细归纳了纳米粒子在递送不同形式的 CRISPR/Cas9 中的应用, 最后对纳米粒子介导的基因治疗的递送在未来面临的挑战和安全性等方面作出总结论述。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 基因治疗; 非病毒载体; 纳米粒子

## Application of nanoparticles in CRISPR/Cas9-based gene therapy

MA Yue, DENG Li, LI Shangang

Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650000, Yunan, China

**Abstract:** CRISPR/Cas9 is a cutting-edge gene-editing technology that has emerged as a promising tool for gene therapy. Nevertheless, the safe and efficient delivery of CRISPR/Cas9 is still an urgent issue in clinical application. Nanoparticles, such as lipid-based nanoparticles, polymer nanoparticles, gold nanoparticles, and biofilm nanoparticles, are expected to bring new opportunities for CRISPR/Cas9-based

**Received:** September 25, 2021; **Accepted:** December 19, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31960215)

**Corresponding author:** LI Shangang. E-mail: lishg@lpbr.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31960215)

gene therapy because of their biocompatibility, safety and designability. This review briefly introduced the characteristics of nanoparticles and the development of CRISPR/Cas9 in gene therapy. Moreover, the application of nanoparticles in the delivery of different forms of CRISPR/Cas9 were elaborated. Finally, the challenges and safety of nanoparticle-based gene therapy were discussed.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; gene therapy; non-viral vector; nanoparticles

目前, 遗传性疾病是影响人类健康的一大类疾病, 迄今为止我们能够治疗的只是其中很小一部分, 且多数的治疗手段都是“治标不治本”。因此能够“治本”的基因治疗被寄予厚望。基因治疗, 就是利用现代分子生物学的方法修复致病基因, 以实现缓解和治愈疾病的一种治疗手段。而成簇的规则间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9) 系统, 在短短几年后相关发现便荣获诺贝尔奖, 展现出了其基因编辑方面蓬勃的生命力。

在基因治疗中, 安全高效的递送无疑是制约其进一步应用的重要环节。如今应用于 CRISPR/Cas9 的递送系统主要分为两大类: 病毒载体和非病毒载体。病毒载体中以腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 为代表<sup>[1-2]</sup>。例如, 利用 AAV2 介导了编码芳香族 L-氨基酸类脱羧基酶 (aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) 基因的脑部递送, 成功治疗了 ADCC 缺乏症<sup>[3]</sup>。还有研究者更是利用新的腺相关病毒 MyoAAV, 专门针对肌肉干细胞转导, 有效实现了肌肉定向基因递送<sup>[4]</sup>。尽管病毒载体显示出高转染效率, 但其临床应用仍会受到免疫排斥和包装能力的限制。因为 40%–80% 的成人中存在过野生型的 AAV 感染, 而且 AAV 的包装能力 < 4.7 kb<sup>[5-6]</sup>。因此, 现在越来越多的研究者将目光投向了非病毒载体的开发, 以期实现突破。

非病毒载体中的纳米粒子成为递送 CRISPR/Cas9 系统的研究热点。究其原因, 主要有以下几个方面。首先, 它们可以进行设计, 从而被特定类型的细胞或组织所摄取, 提供有效的靶向能力<sup>[7-9]</sup>。第二, 它们可以保护需要递送的货物 (如核酸和蛋白类物质) 不被降解<sup>[10-12]</sup>。第三, 纳米粒子还能够运送大尺寸的“货物”, 如 CRISPR/Cas9 质粒和核蛋白复合体的形式。第四, 纳米粒子的生物安全性高, 与病毒载体相比, 它们本身没有致突变性<sup>[13-14]</sup>。第五, 纳米粒子容易规模化制备, 利于临床的转化应用<sup>[15]</sup>。

## 1 纳米粒子概述

纳米粒子的定义是在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围 (1–100 nm) 或将它们作为基本单元。因为纳米粒子是由相当于分子尺寸甚至是原子尺寸的微小单元组成, 所以其具有了一些特殊的物理或是化学特性。

纳米粒子大致分为有机纳米粒子和无机纳米粒子。在有机纳米粒子中, 用于递送 CRISPR/Cas9 系统的纳米粒子主要有纳米胶束、脂基纳米粒子和聚合物纳米粒子等。而无机纳米粒子应用较广的主要有介孔二氧化硅、磁纳米粒子 (超顺磁氧化铁)、纳米金、量子点 QD (Cd、Se、Te) 和镧系离子 ( $Gd^{3+}$ 、 $Eu^{3+}$ ) 等 (图 1)。利用纳米粒子在光电热磁等方面的特性, 其在基因治疗的包封递送、成像诊断和修饰改造等方面发挥了重要的作用。

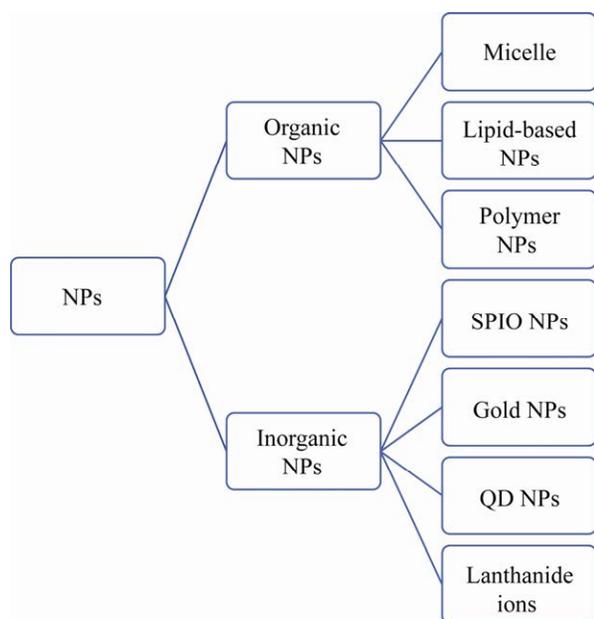


图 1 应用于 CRISPR/Cas9 纳米粒子的分类  
Figure 1 Classification of nanoparticles used in delivering CRISPR/Cas9.

## 2 CRISPR 与基因治疗

根据 CRISPR 的 *cas* 基因座来分类<sup>[16]</sup>, 可将 CRISPR 系统分为 6 种不同的类型 (I–VI), 并且每个系统都使用一组独特的 Cas 蛋白和 CRISPR 相关的 RNA (CRISPR-related RNA, crRNA) 来进行 CRISPR 干扰<sup>[17]</sup>。其中 II 型的 Cas9 系统应用较多, 主要原因是其具有效率高<sup>[18]</sup>、设计应用简单<sup>[19]</sup>等优势。

CRISPR/Cas9 系统的迭代更新也使得基因治疗变得愈加成熟与完善。2016 年, 哈佛大学化学家刘如谦团队开发了单碱基编辑器 (base editors, BEs), 以适用于单个碱基的变化导致的遗传病类型和规避切割双链导致的脱靶效应<sup>[20-21]</sup>。在 2019 年 10 月, 刘如谦实验室又开发了一种新型的引导编辑器 (primer editors, PEs), 在不引入双链断裂和供体 DNA 模板的前提下, 可在人类细胞中成功完成包括目标插

入、缺失和所有 12 种类型点突变在内的编辑<sup>[22]</sup>。在 2020 年 7 月, 其团队开发了线粒体编辑器, 首次实现了对线粒体基因组的精准编辑<sup>[23]</sup>。在 2021 年 5 月 10 日出现的变形式碱基编辑器 (transformer base editors, tBEs), 更是消除了现有碱基编辑技术存在的脱靶问题<sup>[24]</sup>。

基于 CRISPR 的基因治疗正显示出蓬勃的生命力, 从开发更有效的基因编辑工具, 到治疗癌症和遗传疾病, CRISPR 开始从一个基础研究工具逐渐迈入临床应用。

## 3 纳米粒子在递送 CRISPR/Cas9 系统的生物应用

对于 CRISPR/Cas9 系统的递送主要分为 3 种形式。分别是质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) 形式、传递 mRNA 形式和 Cas9 蛋白复合物 (ribonucleoproteins, RNPs) 的形式<sup>[25]</sup>。不同的递送形式各有优劣, 适用不同的目的使用<sup>[26-28]</sup>。

基于 pDNA 的形式, 其优点有: (1) 操作简单且方便快捷; (2) 环状的 DNA 更稳定。其缺点有: (1) 整体尺寸大 (>10 kb), 递送和表达更加困难<sup>[29]</sup>; (2) 需要进核转录, 降低了编辑效率; (3) 质粒的形式使 Cas9 蛋白的持续时间加长, 可能导致更高的脱靶效应和更强的免疫反应<sup>[30]</sup>。该策略主要应用于体外细胞实验。

基于 mRNA 的形式, 其优点有: (1) 无需入核, 可以更快行使编辑功能; (2) Cas9 mRNA 的瞬时表达, 这可能有助于减少脱靶编辑的发生, 同时避免了插入突变的风险<sup>[31-32]</sup>。其缺点有: (1) 较短的表达时间也可能导致效率低下; (2) mRNA 不稳定, 容易发生降解。所以该策略主要应用于受精卵、早期胚胎和培养细胞的基因组编辑。

基于 RNPs 的形式, 其优点有: (1) RNP 的

形式可以比 pDNA 和 mRNA 更快产生基因编辑效果;(2) 在细胞内可以迅速降解,可以一定程度上减少脱靶效应<sup>[33]</sup>; (3) 蛋白和 sgRNA 的复合物形式,可以保护 sgRNA; (4) RNPs 的传递可以避开整合到基因组的风险<sup>[34]</sup>。其缺点有:

(1) 蛋白形式可能诱发免疫反应;(2) 整体尺寸较大 (Cas9 蛋白约 160 kDa),有效传递较为困难<sup>[35]</sup>; (3) 需大批量获得纯度和活性都有保证的 Cas9 蛋白,投入成本较大。

关于纳米粒子在 CRISPR/Cas9 递送中的应用,最近已经有一些优秀的综述进行了阐述,主要侧重的方面有影响 CRISPR/Cas9 纳米粒子递送的关键因素、在疾病治疗方面的应用、基于刺激的智能纳米粒子以及可时空调控的纳米粒子等<sup>[36-40]</sup>。本文中侧重于纳米粒子在递送不同形式的 CRISPR/Cas9 系统中的应用,主要介绍了目前应用最广的脂基纳米粒子、多聚物纳米粒子、纳米金颗粒以及生物膜类纳米粒子。

### 3.1 脂基纳米粒子 (lipid-based NPs, LNPs)

因为 LNPs 具有组成成分可控、仿细胞膜结构、承载力高和毒性低的特性,在递送 CRISPR/Cas9 的非病毒基因载体中,成为应用最为广泛的载体之一<sup>[41]</sup>。经典的脂质体结构为磷脂双分子层,该磷脂双分子层能够形成将亲脂性成分包裹在双层中的囊泡,或者在将亲水性成分包裹在水核中<sup>[42]</sup>。脂基纳米粒子由于组分的特殊设计,还可以形成单层、双层以及囊泡状的结构。与经典的脂质体不同,这些脂基纳米粒子的表面仍然可以用其他组分修饰,附加额外的功能<sup>[43-44]</sup>。

#### 3.1.1 LNPs 介导的 pDNA 的递送

目前的商用脂质系统,如 Lipofectamine 2000 对于 CRISPR/Cas9 来说,转染效率还是较低。究其原因,主要有两个:尺寸太大和包封不全<sup>[45]</sup>。为了克服这些障碍,有研究者提出了

一种“核-壳”的策略。先以 Cas9-sgPLK-1 质粒/硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS)/鱼精蛋白作为核心 (使整体高度浓缩,小而稳定),然后包裹阳离子脂质 (DOTAP/DOPE/cholesterol) (提高脂层的机械强度) 作为外壳,最后采用 DSPE-PEG 进一步修饰整体 (增加稳定性、溶解度和半衰期),形成了纳米复合物简称为 PLNP/DNA (图 2A),整体的大小约为 156.5 nm, zate 电位为 23.2 mV。在体外转染实验中,在 A375、PC3 和 MCF-7 细胞系中转染效率分别为 47.4%、36.2%和 37.8%,远高于作为对照的 Lipofectamine 2000 转染效率。在对荷瘤小鼠 (注射 A375 细胞系) 进行给药 PLNP/Cas9-sgPLK-1 之后,发现肿瘤的面积明显减小,同时在基因组水平上发现了约 3%的有效编辑<sup>[46]</sup>。pDNA 的形式使用便捷,但在体内递送的进一步研究比较少。

#### 3.1.2 LNPs 介导的 mRNA 的递送

脂质体中可电离型的 LNPs (ionizable LNPs, iLNPs) 近年来被广泛用于 mRNA 递送的研究,主要因为其在生理环境下呈现中性,而在内吞体的酸性环境下可以发生电离,引起整体崩解而释放货物的特性。

在 CRISPR/Cas9 介导的基因治疗中,一次给药而持久有效一直是科学家所追求的目标。在 2018 年 2 月, Finn 等报道了一种名叫 LNP-INT01 的 LNPs,递送了 Cas9 mRNA 和 sgRNA 到小鼠肝脏。在单次给药的情况下,其能够显著编辑 70% 肝脏中的小鼠甲状腺素运载蛋白基因 (transthyretin, *TTR*)。为了使载体成分不会因为生物累积而产生毒副作用,研究者将 LNP-INT01 的主要成分 LP01 的连接区设计成不稳定酯键,方便降解<sup>[47]</sup>。从该研究可以看出 iLNPs 在体内,尤其在介导肝脏的基因编辑方面显示出了卓越的潜力。

同一年,美国食品和药物管理局 (Food

and Drug Administration, FDA) 批准上市一款以 iLNPs 为载体的静脉注射液——Onpattro (Dlin-MC3-DMA/DSPC/Cholesterol/DMG-PEG2K), 主要用来治疗肝脏中因 *TTR* 发生突变所引起的遗传性淀粉样多发性神经性病变。Onpattro 是 FDA 批准的首款 siRNA 药物及首个非病毒给药系统的基因治疗药物<sup>[48]</sup>。

在使用 CRISPR/Cas9 进行癌症治疗的时候, 靶向性一直是我们的重点。有研究者利用了某些癌细胞会过度表达唾液酸 (sialic acid, SA) 受体的特性, 设计了一种具有苯基硼酸 (phenylboronic acid, PBA) 基团的阳离子脂质 PBA-BADP, 其可以通过界面 PBA/SA 相互作用增强摄取 (图 2B)。实验证实了 PBA-BADP 递送 Cas9 mRNA, 使得癌细胞比非癌细胞基因敲除率更高<sup>[49]</sup>。

Rosenblum 等则采取特异性抗体锚定的策略实现了对肿瘤细胞的靶向性。研究者开发了一种新的基于 LNP 的 CRISPR 递送系统 (CRISPR LNP, cLNP), 利用了肿瘤细胞高表达表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的特性, 通过脂锚定融合蛋白结合抗 EGFR 的 Fc 段将其包覆在 cLNP 上 (图 2C)。通过小鼠体内实验发现, 在腹腔注射 EGFR-靶向的 sgPLK1-cLNPs 可被弥散性卵巢肿瘤选择性摄取, 并在体内介导了高达 80% 的基因编辑<sup>[50]</sup>。

在体内实现靶向性的递送, 除了上述文章使用策略之外, 可能还与 LNPs 整体的电荷有关<sup>[51-53]</sup>。Cheng 等的工作证实了 LNPs 整体的电荷可能是影响体内靶向性的原因之一。其团队选择利用前面工作已经证实的肝靶向 5A2-SC8 LNP 的 4 组分脂质配方, 通过额外添加阳离子脂质 DOTAP 和阴离子脂质 18PA 来改变整体的电荷性质。他们惊喜地发现 LNP 的靶向性发生了由肝脏-脾脏-肺部的明显转移。这

一现象并不是特异依赖于 5A2-SC8 LNP 配方, 对于已经用于临床的 Dlin-MC3-DMA LNP 也同样适用。基于此发现, 他们开发了一个选择性器官靶向 (selective organ targeting, SORT) 的递送策略, 来改变 LNP 经静脉给药后的体内靶向性 (图 2D)。针对磷酸酶和紧张素同源物基因 (phosphatase and tensin homolog, *PTEN*), 递送了相应的 Cas9 mRNA 和 sgPTEN。和预期的一样, 该策略可选择性地在肝脏、肺部中实现 13.9% 和 15.1% 的有效编辑。该研究者还发现该策略同样可以递送 Cas9 RNPs<sup>[54]</sup>。这一工作扩展了 LNP 在体内靶向其他器官的能力。

LNPs 不仅仅在小动物体内有着良好的递送能力, 在大动物身上同样表现优秀。在 2021 年 5 月, Musunuru 等报道了一种新颖的 iLNPs, 在单次给药的情况下, 在食蟹猴体内几乎实现了 *PCSK9* 基因的全部敲除, 并且相应地 *PCSK9* 蛋白水平和低密度脂蛋白胆固醇水平分别下降了约 90% 和 60%。对于所用的 iLNP 配方中核心可电离组分文章中未予公布<sup>[55]</sup>。

### 3.1.3 LNPs 介导的 RNP 的递送

CRISPR/Cas9 的飞速发展, 也相应促进商品化的转染试剂的开发。有研究者报道了一种新的转染试剂 Lipofectamine CRISPRMAX, 能够在哺乳动物细胞系中进行有效转染。将供体 donor 与 Cas9 RNPs 共同递送入一个携带被破坏的 EmGFP 表达框的稳定细胞系中, 介导了高达 17% 的有效替换<sup>[56]</sup>。另一研究者利用具有 O、S 和 Se 醚的亲脂尾与各种胺基头部组合文库筛选得到了新的脂质体组合 (76-O17Se 或 76-O17S), 在 Ai14 小鼠的肺部介导了高水平的递送。在 HEK293-GFP 细胞上, 76-O17Se、80-O17Se、81-O17Se 和 400-O17Se 的 LNP 也都实现了约 55% 的有效敲除<sup>[53]</sup>。研究中发现, 类脂的 LNP 与胞内蛋白的传递效率之间存在着

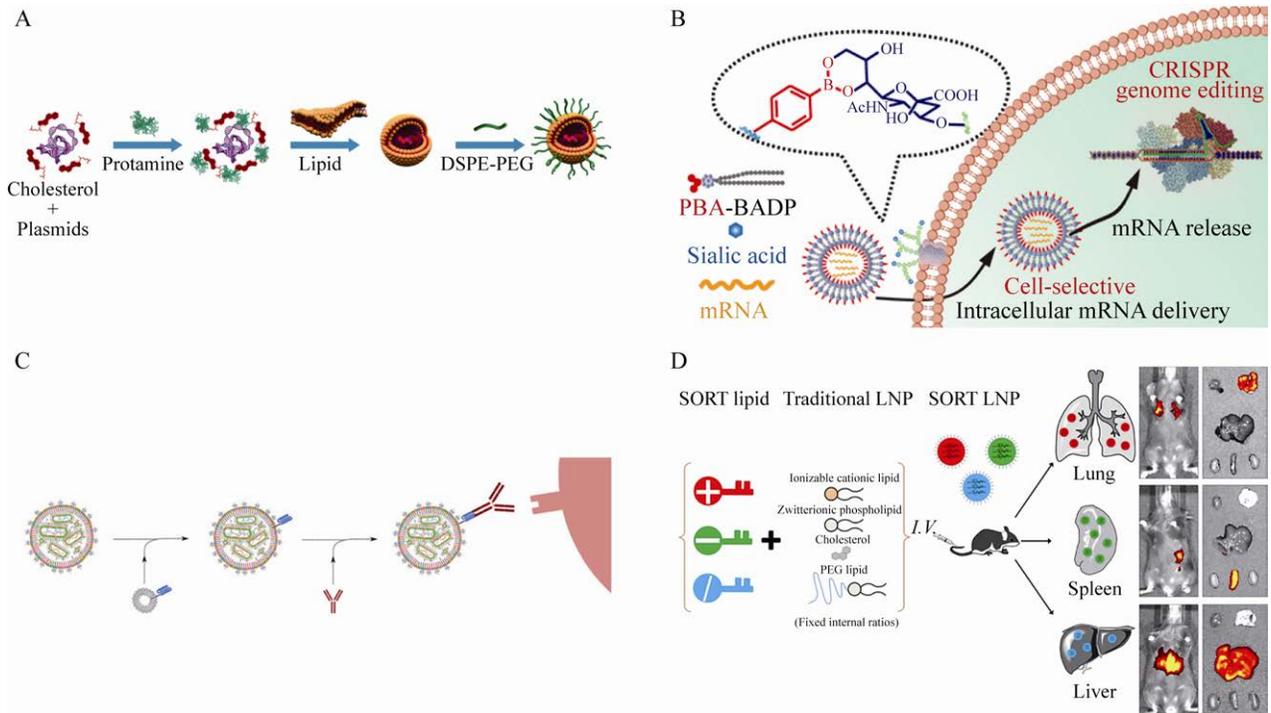


图 2 LNP 介导的 CRISPR/Cas9 系统的递送 A: PLNP/DNA 纳米复合物组装示意图<sup>[46]</sup>; B: 用于 mRNA 传递和基因组编辑的 PBA-BADP/mRNA NPs 组装示意图<sup>[49]</sup>; C: EGFP 抗体修饰在 cLNP 表面示意图<sup>[50]</sup>; D: 选择性器官靶向递送策略示意图<sup>[54]</sup>

Figure 2 LNP mediated delivery of CRISPR/Cas9 system. (A) Assembly diagram of PLNP/DNA nanocomposites<sup>[46]</sup>. (B) Assembly of PBA-BADP/mRNA NPs for mRNA delivery and genome editing<sup>[49]</sup>. (C) Schematic diagram of EGFP antibody modification on the surface of cLNP<sup>[50]</sup>. (D) Schematic diagram of selective organ targeted delivery strategy<sup>[54]</sup>.

明显的构象关系，这或者是 RNP 形式传递需要着重考虑的一个因素。

利用 RNP 的形式对于基因治疗的体内递送来说，可能是一种安全有效的形式。2021 年 7 月 Gillmore 等报告了使用脂质体纳米粒子 NLTA-2001 负载 Cas9 RNPs 形式，针对错误折叠的 TTR 的 I 期临床试验结果。以 0.3 mg/kg 的剂量下单次给药 NLTA-2001 足以将患者的血清学 TTR 水平降低了 96%。且在监测的 28 d 内，没有发现任何严重的不良反应<sup>[57]</sup>。这强有力的证据让我们看到了 LNP 在基因治疗中的光明前景。

### 3.2 聚合物纳米粒子 (polymer nanoparticles)

目前用于基因递送的聚合物纳米粒子主要有聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI)、聚氨基胺 (poly(amido amine), PAMAM) 和壳聚糖等。这些聚合物与核酸相互作用，形成紧凑的纳米尺寸的多聚体<sup>[58-60]</sup>。而这个电荷中和的致密多聚体核心，有利于保持核酸的稳定性<sup>[61-62]</sup>。多聚物/核酸复合物可以通过网格蛋白介导的内吞机制进入细胞，完成递送<sup>[63]</sup>。

#### 3.2.1 聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI)

PEI 是一种阳离子多聚物，其中的-NH-基团使其带有高密度的正电荷，从而可以与带负

电荷的核酸通过静电相互作用而结合,介导有效转染。

分支和线性形式的 PEI 形式,在体内和体外都表现出高转染能力<sup>[64]</sup>。有研究评估了支链的 PEI (分子量在 25 kDa, BPEI-25k) 递送 CRISPR/Cas9 质粒的能力。结果证明,以靶向 *Slc26a4* 基因的 CRISPR 质粒被成功递送到 Neuro2a 细胞中,并介导了约 22.9% 的有效编辑<sup>[65]</sup>。

关于 PEI 进一步应用的限制,主要在于其细胞毒性问题。现有的策略则是通过与生物可降解分子结合来降低 PEI 的毒性 (如肝素、聚己内酯 PCL、葡聚糖、壳聚糖、普鲁兰多糖和叶酸等)<sup>[66]</sup>。

### 3.2.2 聚氨基胺 (poly(amido amine), PAMAM)

PAMAM 是一种树枝状大分子,其大小用代 (generation, G) 来表示。PAMAM 聚合物的外围具有高密度的伯胺基团,能够与核酸发生强络合作用。内部的高密度叔胺,有助于纳米复合物的逃逸。

#### 1) PAMAM 介导的 pDNA 递送

就现有的转染试剂来说,对于较大尺寸的质粒转染都会比较困难,最近有研究者进一步发掘了 PAMAM 的潜力。采取的策略是利用线性共聚物主链固定不同代 (G1–G5) 的树突状分子,最终达到高包装密度、低电荷密度的低细胞毒性的效果。其主要方法是用甲基丙烯酸 2-羟乙基酯和甲基丙烯酸缩水甘油酯,通过原子转移自由基聚合的方式制备线性锚定骨架,然后再固定不同代数的 PAMAM,筛选得到的一种高效转染的组合 fluorinated polymer 12c。该组合能共递送尺寸较大的 EGFP (10.3 kb) 的质粒和 mCherry (5.3 kb),且比 Lipofectamine 2000 转染效率更高<sup>[67]</sup>。PAMAM 聚合物主要的优势在于灵活和可控,文中对于大尺寸质粒的兼容,为细胞实验提供了便利。

有研究者也利用了聚  $\beta$ -氨基 (poly( $\beta$ -amino ester), PBAE) 的良好转染性能,以 PAMAM 为基础,开发了一种 PAMAM-PBAE 的超支化共聚物来递送 CRISPR/Cas9 系统,靶向编辑 HPV 中的 HPV E7 致癌基因 (图 3A)。在带有宫颈癌肿瘤的小鼠身上,实现了 90.3% 的肿瘤抑制率<sup>[68]</sup>。

#### 2) PAMAM 介导的 RNP 的递送

对于基于蛋白的治疗,高效的胞质递送是必不可少的一环,而聚合物的易于合成和功能化的特性,使其成为在体内和体外传递胞质蛋白最有希望的候选材料之一。最近,有研究者便利用了 PAMAM 易于功能化的特性,开发了一种富含苯硼酸 (phenylboronic acid, PBA) 的 G5 代树突状分子 (图 3B),能够有效完成不同大小和等电点蛋白的胞质递送。PBA 的结构可以通过氮硼酸盐络合作用与蛋白质的胺和咪唑基团配位,其中的芳香环可以通过阳离子- $\pi$  相互作用与蛋白质上的胍或者胺基结合。最后蛋白质上的阴离子羧酸盐则可以通过离子相互作用与 PAMAM 的伯胺基团结合<sup>[69-71]</sup>。由此富含 PBA 的 G5 代树突状分子可以与不同类型的蛋白高亲和力地结合。PBA-PAMAM 能够有效完成 13 种不同大小和等电点的蛋白的胞质递送,同时保持其生物学活性。其中针对于 Cas9 RNP 的递送,可在稳定表达 EGFP 的 293T 细胞中实现 40% 的有效敲除<sup>[72]</sup>。

另外一研究者则是使用了葡萄糖醛酸基葡萄糖基- $\beta$ -环糊精缀合物 (glucuronylglucosyl- $\beta$ -cyclodextrin, GUG- $\beta$ -CDE) 和 PAMAM (G3 代) 的组合,得到复合物 GUG- $\beta$ -CDE (G3),作为 Cas9 RNP 的有效负载 (图 3C),完成了在脑内大范围的基因编辑。通过脑室给药 GUG- $\beta$ -CDE (G3)/Cas9 RNP 复合物后,研究者发现在注射部位周围 2 mm 冠状片的范围内有效诱导

了 5% 的基因编辑活性和全脑中有效诱导了 1% 的基因组编辑活性<sup>[73]</sup>。除了脑室直接给药之外, 使用载体跨过血脑屏障也是科学家们一直探索的目标。有研究者以血糖控制作为外部诱因, 利用脑毛细血管内皮细胞上表达的葡萄糖转运体-1, 与葡萄糖有低亲和力结合 ( $KD=3 \text{ mmol/L}$ ) 的特性, 用葡萄糖包被聚合物纳米载体, 通过控制葡萄糖数量的方式, 达成了通过静脉给药在脑中得到有效累积的目的<sup>[74]</sup>。这种由葡萄糖介导的跨脑屏障传递策略也为我们提供了一种新颖的思路。

### 3.2.3 壳聚糖 (chitosan, CS)

壳聚糖是一种来源丰富、无毒、可生物降解的天然多糖<sup>[75]</sup>, 它是由几丁质的 N-脱乙酰基得到的, 在酸性和中性的环境下, 由于氨基的存在, 整体携带较高密度的正电荷, 从而能与核酸形成 NPs<sup>[76]</sup>。作为基因载体, 壳聚糖具有免疫原性低、生物相容性好和细胞毒性小等优点<sup>[77]</sup>。除此之外, 壳聚糖能被降解成普通的氨基糖-N-乙酰氨基葡萄糖, 通过糖蛋白的代谢途径排出体外, 生物降解性好<sup>[78]</sup>。

#### 1) 壳聚糖介导的 pDNA 递送

有研究者利用了羧甲基壳聚糖作为外壳, 在此基础上进行功能化的修饰, 实现了对 MCF-7 肿瘤细胞的靶向基因组编辑。该载体系统采用了“核-壳”模式和配体介导的靶向策略来提高编辑效率。主要的方法是使用硫酸鱼精蛋白、 $\text{CaCO}_3$ 、CaP 和质粒形成纳米共沉淀核心 (增加了膜迁移、核定位活性和质粒的装载能力); 使用生物素和 AS1411 配体修饰的羧甲基壳聚糖组成亲水外壳 (来实现靶向性), 形成的 NPs 复合物整体尺寸约 300 nm, zeta 电位约  $-8.0 \text{ mV}$  (图 3D)。上述双靶向给药系统可使 MCF-7 细胞中靶标蛋白 CDK11 显著降低 ( $>90\%$ )<sup>[79]</sup>。该配体修饰的策略在增强肿瘤细胞

的靶向摄取方面也越来越受到关注。

#### 2) 壳聚糖介导的 RNP 的递送

在最初的探索中, 直接用壳聚糖递送 Cas9 RNPs 进入细胞, 没有观察到明显的基因编辑。有研究者利用了一种低分子量 (约 1 kDa) 的壳聚糖 (chitosan, CS) 作为核心, 先包裹带正电荷的红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP), 然后再结合 Cas9 RNP 的方式完成了胞质递送。研究者为了加强载体和 RNP 的结合能力, 在 Cas9 酶的 N 端特异插入了 20 个谷氨酸残基 (图 3E)。使用此系统共递送 Cas9 RNP 和 donor 的情况下, 介导了  $12.5\% \pm 3.0\%$  的同源重组的效率, 与常用的商业试剂 Lipofectamine CRISPRMAX ( $14.5\% \pm 3.5\%$ ) 相当<sup>[80]</sup>。文中比较巧妙的是, 浓缩的核心 RFP 还可以作为荧光探针进行示踪。

有研究者更是将聚乙二醇化壳聚糖用于体外 CRISPR/Cas9 系统的非病毒气雾剂和黏膜递送。纳米复合物以不同的 N/P (胺基对磷酸基) 的比例合成了聚乙二醇化壳聚糖/pSpCas9-2A-GFP 纳米复合物 (图 3F)。该研究证明了壳聚糖的 PEG 偶联提高了所形成纳米复合物的粘液渗透能力和保护核酸不受 DNase I 消化和雾化压力的能力<sup>[81]</sup>。这种以雾化的方式进行吸入式的肺部基因编辑展现出很诱人的前景。

### 3.3 纳米金颗粒

纳米金颗粒的卓越性能, 在基因递送方面一直被视为是很有前景的潜在工具, 其特性包括高的表面积与体积之比、表面化学修饰和多功能化、容易合成以及稳定性等。此外, 纳米金颗粒的高渗透性和滞留效果使得递送的“货物”更易于渗透和积聚。

#### 3.3.1 纳米金颗粒介导的 pDNA 递送

在基因递送载体道路的探索上, 可控释放一直是科学家努力想达成的目标。2017 年,

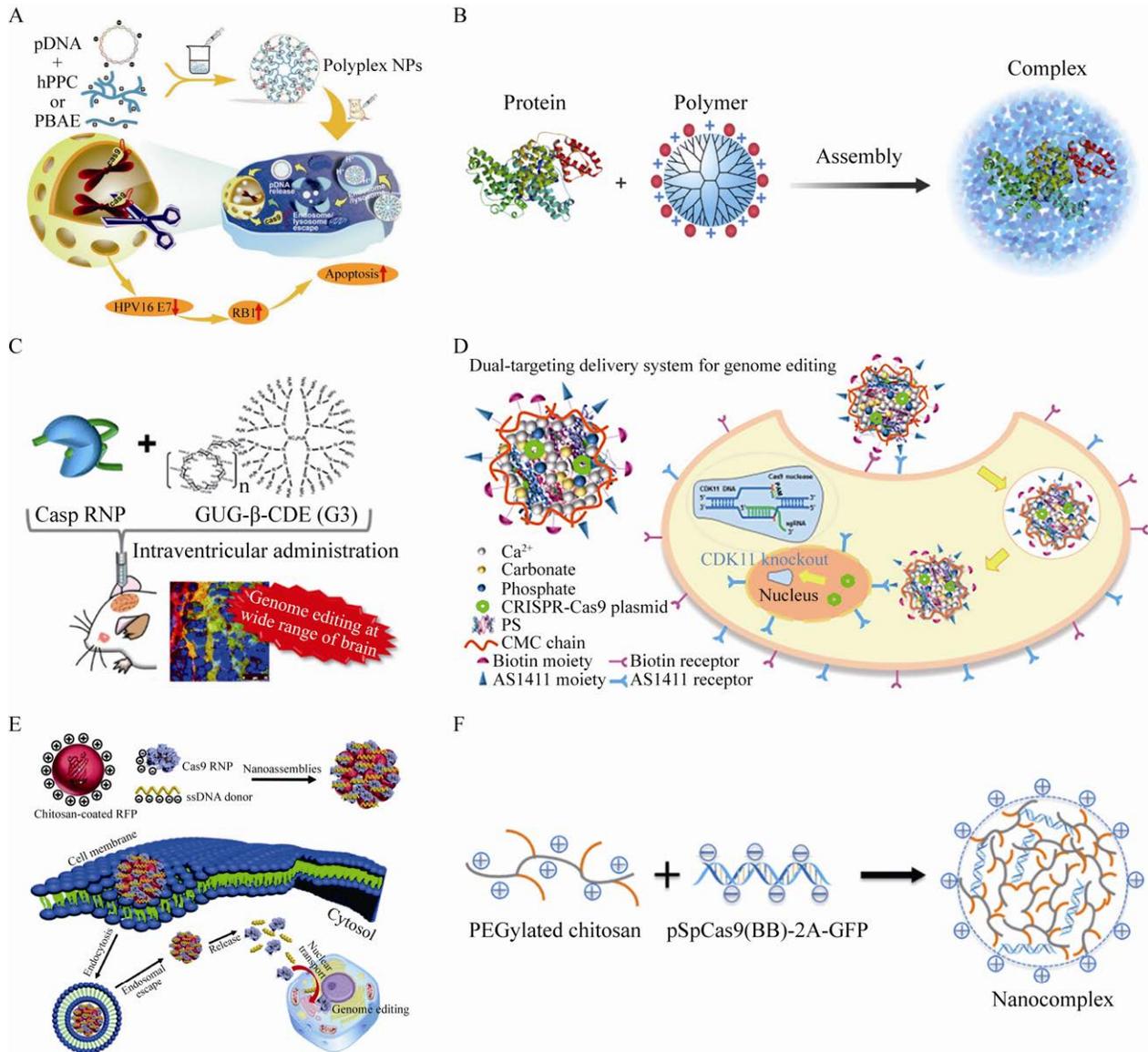


图3 多聚物介导的 CRISPR/Cas9 系统的递送 A: 多聚 NPs 的制备及 HPV 感染相关宫颈癌治疗机制示意图<sup>[68]</sup>; B: 富硼酸盐树枝状大分子与蛋白质复合物形成过程示意图<sup>[72]</sup>; C: GUG- $\beta$ -CDE (G3) 递送 Cas9 RNP 介导大脑神经元编辑示意图<sup>[73]</sup>; D: CRISPR-Cas9 质粒双靶向递送系统的构建及肿瘤靶向递送 CRISPR-Cas9 质粒以实现有效基因组编辑过程示意图<sup>[79]</sup>; E: 壳聚糖包被的 RFP-NPs 介导 HDR 的基因组编辑示意图<sup>[80]</sup>; F: PEG 修饰的壳聚糖/pSpCas9-2A-GFP 纳米复合物形成示意图<sup>[81]</sup>

Figure 3 Polymer mediated delivery of CRISPR/Cas9 system. (A) Preparation of poly NPs and treatment mechanism of HPV infection related cervical cancer<sup>[68]</sup>. (B) The formation process of borate rich dendrimer protein complex<sup>[72]</sup>. (C) The schematic diagram of delivering Cas9 RNP mediated brain neuron editing<sup>[73]</sup>. (D) Construction of CRISPR-Cas9 plasmid double targeted delivery system and tumor targeted delivery of CRISPR-Cas9 plasmid to achieve effective genome editing<sup>[79]</sup>. (E) Genome editing of HDR mediated by chitosan coated RFP-NPs<sup>[80]</sup>. (F) The formation of PEG modified chitosan/pSpCas9-2A-GFP nanocomposites<sup>[81]</sup>.

蒋兴宇团队便构建了一种以纳米金为核心自组装粒子 LACP (脂质/金纳米颗粒/Cas9-sgPlk-1 质粒, lipid/AuNPs/Cas9-sgPlk-1 plasmids, LACP), 达成了可控释放的目的。其构建同样采用“核-壳”的策略, 其中的壳成分为脂质体外壳 (DOTAP、DOPE、cholesterol 和 PEG2000-DSPE) (图 4A)。因为内部的金纳米颗粒可以收集近红外光并将其转化为热能, 这样在特定波长和功率的光照射后, 可以通过损伤脂质体层, 达到可控释放的目的。将 LACP 用于在 A375 肿瘤细胞中敲除 *Plk-1* 基因, 发现在  $24 \text{ mW/cm}^2$  的功率密度下照射 20 min, 有 25.9% 的细胞发生了细胞凋亡, 相应地 *Plk-1* 蛋白的表达水平下调 65%<sup>[82]</sup>。这种基于纳米金颗粒光热特性的 CRISPR/Cas9 系统可控释放的尝试, 为以后的基因编辑提供一种新颖的思路。无独有偶, 国家纳米中心梁兴杰团队最近的研究也证实了可控的基因治疗的广阔前景。其团队综合考虑了纳米药物颗粒在体内的多种生物学行为特性, 打破常规, 设计构建了以纳米金为基础的, 可变形的多级次纳米药物递送系统 (因为其结构十分像一朵盛开的太阳花, 所以叫作纳米太阳花)。然后结合体外近红外光的调控, 同时实现了大尺寸颗粒 (约 200 nm) 被动靶向到肿瘤部位、中等尺寸颗粒 (约 50 nm) 渗透进肿瘤内部和小尺寸颗粒 (<10 nm) 被肿瘤细胞高效摄取, 最终达到了良好的基因调控效果<sup>[83]</sup>。

### 3.3.2 纳米金颗粒介导的 RNP 递送

纳米金在递送 Cas9 RNPs 的能力上也显示了卓越的效力, 有研究者使用精氨酸修饰的纳米金颗粒与 Cas9 蛋白进行自组装的形式, 直接进行胞质递送。这里研究者同样对 Cas9 进行工程化改造 (N 端添加谷胱甘肽的标签,

E-tag) 的策略 (图 4B)。研究发现, 添加的 E-tag 的数量为 20 的时候, 可以通过膜融合的方式在 HeLa 细胞上达到 90% 有效摄取。通过该系统递送 Cas9E15-RNP, 在多种细胞系上均介导了约 30% 的有效编辑<sup>[84]</sup>。

在造血干细胞和祖细胞 (haematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) 中, shahbazi 等发现与电转相比, AuNP/CRISPR 载体可显著提高 HDR 效率并改善细胞存活情况 (图 4C)。并且在克隆形成试验和小鼠骨髓移植实验中发现, AuNP/CRISPR 载体的处理对 HSPCs 的适应性并无明显副作用, 且增强了 HSPCs 在小鼠骨髓中的重建潜能<sup>[85]</sup>。基于纳米金强大的比表面积, 该载体最终的大小约为 64 nm, 这或许是优于传统电转的原因。

最近的研究中都不约而同地选择将 AuNP 作为核心进行浓缩 RNP。有研究者便以 AuNPs 为核心, 构建了三重靶向肝脏的载体, 成功介导了对肝脏中 *PCSK9* 基因的功能性缺失的编辑。研究中主要采取以下的方式, 在体内实现三重靶向性。其一, 使用 HIV-1-转录激活因子 (TAT) 修饰 AuNP (增强核靶向)。然后将 Cas9 (带有 NLS) 和 sgPCSK9 的阴离子复合物结合上去。其二, 进一步封装在脂质体外壳中 (DOTAP/DOPE)。其三, 用 Gal-PEG-DSPE (半乳糖靶向肝脏的唾液糖蛋白受体) 进行最后的修饰, 得到 Gal-LGCP (Gal-PEG-lipid/TAT-GNCs/Cas9 RNP/sgPcsk9) (图 4D)。研究者首先在 Hepa 1-6 细胞上, 通过 Gal-LGCP 递送, 实现了约 57% 的编辑效率。然后通过追踪 Gal-LGCP 在体内的生物分布, 发现 Gal-LGCP 主要在肝脏聚集。在小鼠的体内实验中, 也发现 Gal-LGCP 成功介导了 *PCSK9* 的基因编辑, 并且与之相关联的低密度脂蛋白胆固醇水平下降约 30%<sup>[86]</sup>。

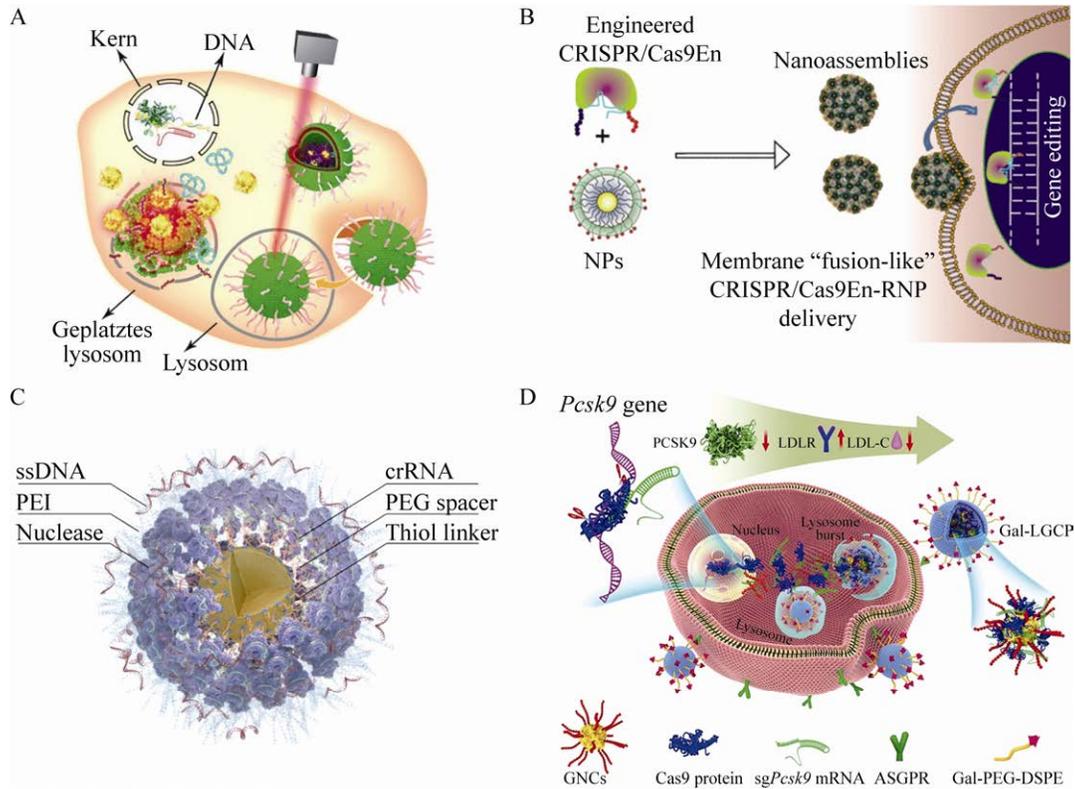


图 4 纳米金颗粒介导的 CRISPR/Cas9 系统的递送 A: 激光增强 LACP 敲除 A375 细胞靶基因的示意图<sup>[82]</sup>; B: 精氨酸纳米粒子通过膜融合递送工程化 Cas9 RNPs 示意图<sup>[84]</sup>; C: AUNPs/Cas RNPs 组装结构示意图<sup>[85]</sup>; D: Gal-LGCP 合成工艺示意图<sup>[86]</sup>

Figure 4 Gold nanoparticles mediated delivery of CRISPR/Cas9 system. (A) The schematic diagram of laser enhanced LACP knockout of target genes in A375 cells<sup>[82]</sup>. (B) Schematic diagram of arginine nanoparticles delivering engineered Cas9 RNPs through membrane fusion<sup>[84]</sup>. (C) Assembly structure of AuNPs/Cas RNPs<sup>[85]</sup>. (D) The synthesis process diagram of Gal-LGCP<sup>[86]</sup>.

纳米金在体内较差的生物降解性是临床应用面临的一个重要问题。在小鼠的体内实验发现, 40 nm 的纳米金粒子在 6 个月里, 只有 9% 从肝脏中被排出<sup>[87]</sup>。临床前研究发现, 即使注射后超过一年, 150 nm 纳米金粒子体内量也没有明显减少<sup>[88]</sup>。基于此, 美国宾夕法尼亚大学 Higbee-Dempsey 等合成了一种可生物降解的硫醇化葡聚糖修饰的纳米金粒子, 其表面修饰上了疏水性缩醛基团。这种疏水的外表使纳米金粒子被两亲性嵌段共聚物 PEG-PCL 密集地包裹成大约 150 nm 的聚合胶束。当暴露在酸性环境

中缩醛基团被裂解, 纳米金颗粒就变得高度溶于水而退化降解。研究发现该载体在 3 个月的时间里, 小鼠肝脏中有 >85% 的纳米金颗粒被清除<sup>[89]</sup>。这一研究解决了纳米金临床转化中的一个关键问题, 对于以纳米金为基础的载体来说十分值得关注。

### 3.4 生物膜类纳米粒子

生物膜是由磷脂双分子层构成的半透膜结构, 主要成分为脂质、蛋白质和少量的糖类, 担负着物质交换和信息传递等重要功能。生物膜类纳米粒子则是利用生物膜结构的一类复合

型载体,其也因为具有免疫原性低、安全可降解和长循环时间的特性在基因递送方面而备受关注。根据细胞种类不同,现已经开发的生物膜种类有红细胞外膜、白细胞外膜、血小板外膜、间充质干细胞外膜、癌细胞外膜和细菌外膜等等<sup>[90-91]</sup>,以此为基础的生物膜类纳米粒子在载药、肿瘤靶向、疫苗等方面均有很好的应用。在生物膜类纳米粒子的发展过程中,发现了一种由细胞分泌的天然细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),同样具有生物膜的特性,越来越多的研究显示了其在CRISPR/Cas9递送中惊人的潜力。

#### 3.4.1 EVs 介导的 pDNA 的递送

有研究者发现肿瘤的EVs作为天然载体可将CRISPR/Cas9质粒有效地传递到肿瘤细胞。实验表明,肿瘤来源的EVs可在SKOV3异种移植小鼠的卵巢癌肿瘤中选择性积累,并且诱导了卵巢癌细胞的凋亡(图5A)。此外,在其所介导的基因编辑实验中还发现增强了铂的化学敏感性与协同的细胞毒性<sup>[92]</sup>。对于治疗癌症来说寻求特定肿瘤来源的EVs或许是一个靶向递送的全新思路。

#### 3.4.2 EVs 介导的 mRNA 递送

利用EVs进行RNA的递送时,包装效率低一直是大家思考的问题。第四军医大学杨国栋和袁丽君团队则通过CD9-HuR功能化EVs有效包装了CRISPR系统。功能化的主要方式是将EVs膜CD9与RNA结合蛋白融合,CD9与miR-155相互作用蛋白HuR融合。体外实验发现,该种CD9-HuR功能化EVs可以更高效地负载miR-155,更好地作用于受体细胞。对于CRISPR的包装,作者研究发现该系统可以特异募集含AU片段的RNA,于是在CRISPR系统终止密码子的下游加上了3xAREs,从而显著降低了成脂干细胞C/ebp $\alpha$ 的内源性表达

(图5B)<sup>[93]</sup>。也许更多关注RNA与蛋白结构的特性,能在其包装富集方面实现进一步突破。

#### 3.4.3 EVs 介导的 RNP 的递送

对于RNP的递送有研究者利用了EVs富含CD63蛋白的特性,采取了一种基于RNA配体Com和配体结合蛋白Com的富集系统,成功在细胞水平上将sgRNA和多种RNP富集到EVs中,效率提高了10倍以上。具体方法是,作者将Com序列插入到sgRNA中,同时在CD63蛋白的N端和C端融合Com。由于EVs富含CD63蛋白,因此Com-CD63-Com在EVs中高表达,同时Com-CD63-Com和sgRNA-Com结合便达到富集的目的。当Cas9质粒共转的时候,EVs便完成了对于sgRNA和RNP的整体包装(图5C)<sup>[94]</sup>。另一研究者开发了基于EVs的RNP递送系统NanoMEDIC,采取主动掺入的方式将RNP包装进了EVs。前者利用化学配体诱导FRB-SpCas9与FKBP12-Gag HIV二聚化,从而主动掺入SpCas9;后者利用HIV $\Psi$ 包装信号与Gag之间的相互作用及两种自切割核酶引导sgRNA进入NanoMEDIC。将NanoMEDIC应用于不同类型细胞,如人诱导多能干细胞、神经元和成肌细胞等,均介导了高效的基因编辑。其中在iPSCs来源的骨骼肌细胞中诱导了90%以上的外显子跳跃活性的结果尤其引人注目<sup>[95]</sup>。该研究中的NanoMEDIC能够对难以转染的细胞达到如此编辑效果,表明进一步开发利用的潜力巨大。

EVs的潜在细胞特异性主要是由表面受体决定的。有研究者同样利用了EVs富含CD63的特性,将肌肉生长抑制素前肽的抑制域融合到CD63的第二个细胞外环中,以此形成的功能化EVs在mdx小鼠中产生了明显的功能恢复效果<sup>[96]</sup>。另一研究者采用了DNA适配体偶联的方式,功能化修饰了EVs,实现了特定细胞

的靶向性。选择 DNA 适配体主要基于其不具有免疫原性和能够向 EVs 添加负电荷减少非特异性结合的特性。研究发现一个适配体和 3 个胆固醇锚定的修饰, 在 HepG2 细胞中特异性地累积并成功介导了 RNP 的基因编辑 (图 5D)<sup>[97]</sup>。对于 EVs 和靶细胞特性的研究, 将有利于更有针对性地递送与治疗。

### 4 总结与展望

CRISPR/Cas9 系统在治疗单基因疾病、多基因疾病和传染病方面, 已经显示出巨大潜力。对于临床的进一步应用仍然存在一些亟待解决的问题, 适合的载体便是其中之一。理想的载体需要达到的要求是有效、安全和可控。

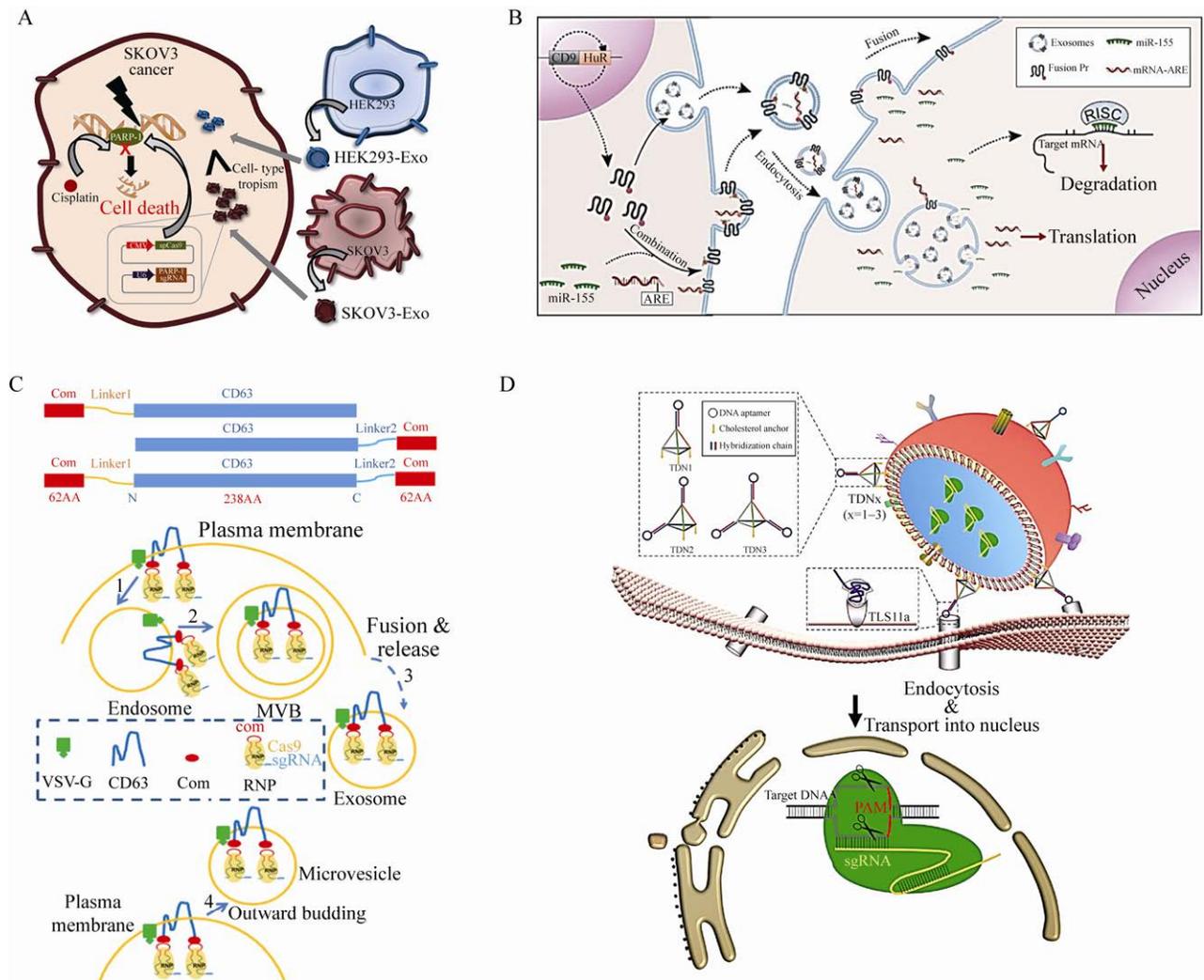


图 5 生物膜类纳米粒子介导的 CRISPR/Cas9 的递送 A: 卵巢癌细胞的联合治疗方案示意图<sup>[92]</sup>; B: CD9-HuR 功能化 EVs 组装示意图<sup>[93]</sup>; C: 在 EVs 中富集 RNPs 的策略示意图<sup>[94]</sup>; D: EVs 的靶向递送设计示意图<sup>[97]</sup>

Figure 5 Biofilm nanoparticles mediated delivery of CRISPR/Cas9. (A) Scheme of a combinatory therapy in treating ovarian cancer cells<sup>[92]</sup>. (B) Scheme of CD9 HuR functional EVs assembly<sup>[93]</sup>. (C) Strategy for enriching RNPs in EVs<sup>[94]</sup>. (D) Design and the targeted delivery of EVs<sup>[97]</sup>.

## 4.1 有效性

CRISPR/Cas9 系统要想达到理想的编辑效率,前提是能够被有效摄取。对于体外递送来说,进行载体系统设计的时候需要注意的是细胞外基质、主要的摄取机制、细胞表面特异性表达的受体、逃逸机制和入核要求等方面。对于体内递送来说,还需要特别注意的是,在生理环境下 NPs 复合物的稳定性和网状内皮系统识别和清除。

## 4.2 安全性

对于体外递送来说,安全性主要体现为细胞毒性。对于材料设计来说,可降解性、整体电荷密度、拓扑结构、尺寸大小方面需要尤其注意。对于体内递送来说,主要体现在屏蔽免疫原性,因为 CRISPR/Cas9 系统的组成部分可以触发宿主免疫应答。所以采用 mRNA 和 Cas9 RNP 的递送形式,使得在宿主细胞内有较短的滞留,或者值得着重考虑。

## 4.3 可控性

对于 CRISPR/Cas9 系统来说,如果能够做到可控的基因编辑,无疑是最理想的一种状态。可控性第一方面体现在靶向特异地摄取,不会被额外地消耗。其次,编辑工具的可控释放与关闭有助于减少脱靶效应的产生。最后,递送系统的组分能够被有效降解,减少因累积而产生的不良反应。CRISPR/Cas9 系统想要在临床应用中更进一步,必然伴随着安全有效可控的载体工具的突破。我们相信,未来纳米粒子在 CRISPR/Cas9 的基因治疗中,定会以主流之姿登上历史舞台。

## REFERENCES

- [1] Keener AB. Delivering the goods: scientists seek a way to make CRISPR-Cas gene editing more targeted. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1239-1241.
- [2] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80-84.
- [3] Pearson TS, Gupta N, San Sebastian W, et al. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency by MR-guided direct delivery of AAV2-AADC to midbrain dopaminergic neurons. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4251.
- [4] Tabebordbar M, Lagerborg KA, Stanton A, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell*, 2021, 184(19): 4919-4938.e22.
- [5] Chen X, Gonçalves MA. Engineered viruses as genome editing devices. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 447-457.
- [6] Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV. Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annu Rev Biomed Eng*, 2015, 17: 63-89.
- [7] Hattori Y, Nakagawa Y, Onishi H. Gene delivery into hepatic cells with ternary complexes of plasmid DNA, cationic liposomes and apolipoprotein E-derived peptide. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4): 2628-2638.
- [8] Akinc A, Qureshi W, De S, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther*, 2010, 18(7): 1357-1364.
- [9] Aldayel AM, Naguib YW, O'Mary HL, et al. Acid-sensitive sheddable PEGylated PLGA nanoparticles increase the delivery of TNF- $\alpha$  siRNA in chronic inflammation sites. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5(7): e340.
- [10] Morris AS, Sebag SC, Paschke JD, et al. Cationic CaMKII inhibiting nanoparticles prevent allergic asthma. *Mol Pharm*, 2017, 14(6): 2166-2175.
- [11] Ebeid K, Meng X, Thiel KW, et al. Synthetically lethal nanoparticles for treatment of endometrial cancer. *Nat Nanotechnol*, 2018, 13(1): 72-81.
- [12] Wongrakpanich A, Morris AS, Geary SM, et al. Surface-modified particles loaded with CaMKII inhibitor protect cardiac cells against mitochondrial injury. *Int J Pharm*, 2017, 520(1/2): 275-283.
- [13] Wang HX, Li M, Lee CM, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem Rev*, 2017, 117(15): 9874-9906.
- [14] Wang HX, Song Z, Lao YH, et al. Nonviral gene editing via CRISPR/Cas9 delivery by membrane-disruptive and endosomolytic helical polypeptide. *PNAS*, 2018, 115(19): 4903-4908.

- [15] Paliwal R, Babu RJ, Palakurthi S. Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges. *AAPS PharmSciTech*, 2014, 15(6): 1527-1534.
- [16] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-736.
- [17] Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 2016, 164(1/2): 29-44.
- [18] Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(6): 387-399.
- [19] Charpentier E, Marraffini LA. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 19: 114-119.
- [20] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [21] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [22] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [23] Mok BY, De Moraes MH, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, 2020, 583(7817): 631-637.
- [24] Wang L, Xue W, Zhang H, et al. Eliminating base-editor-induced genome-wide and transcriptome-wide off-target mutations. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(5): 552-563.
- [25] Wan T, Niu D, Wu CB, et al. Material solutions for delivery of CRISPR/Cas-based genome editing tools: current status and future outlook. *Mater Today*, 2019, 26: 40-66.
- [26] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [27] Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299-311.
- [28] Glass Z, Lee M, Li Y, et al. Engineering the delivery system for CRISPR-based genome editing. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(2): 173-185.
- [29] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191.
- [30] Hughes TS, Langer SJ, Virtanen SI, et al. Immunogenicity of intrathecal plasmid gene delivery: cytokine release and effects on transgene expression. *J Gene Med*, 2009, 11(9): 782-790.
- [31] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-472.
- [32] Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Bloor J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1020-1027.
- [33] Liang X, Potter J, Kumar S, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*, 2015, 208: 44-53.
- [34] Kim S, Kim D, Cho SW, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1012-1019.
- [35] Sun WJ, Hu QY, Ji WY, et al. Leveraging physiology for precision drug delivery. *Physiol Rev*, 2017, 97(1): 189-225.
- [36] Chen F, Alphonse M, Liu Q. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2020, 12(3): e1609.
- [37] Duan L, Ouyang K, Xu X, et al. Nanoparticle delivery of CRISPR/Cas9 for genome editing. *Front Genet*, 2021, 12: 673286.
- [38] Naeem M, Hoque MZ, Ovais M, et al. Stimulus-responsive smart nanoparticles-based CRISPR-cas delivery for therapeutic genome editing. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 11300.
- [39] Xie R, Wang Y, Gong S. External stimuli-responsive nanoparticles for spatially and temporally controlled delivery of CRISPR-Cas genome editors. *Biomater Sci*, 2021, 9(18): 6012-6022.
- [40] Xu YX, Liu RF, Dai ZF. Key considerations in designing CRISPR/Cas9-carrying nanoparticles for therapeutic genome editing. *Nanoscale*, 2020, 12(41): 21001-21014.
- [41] Buschmann MD, Carrasco MJ, Alishetty S, et al. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines.

- Vaccines, 2021, 9(1): 65.
- [42] Givens BE, Naguib YW, Geary SM, et al. Nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 genome-editing therapeutics. *Aaps J*, 2018, 20(6): 108.
- [43] Del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, et al. Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: *in vivo* protein expression after intravenous administration. *Int J Pharm*, 2010, 385(1/2): 157-162.
- [44] Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, El Yousfi Y, et al. Cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles as carriers for efficient gene-silencing therapy. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 3223-3233.
- [45] Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440-455.
- [46] Zhang LM, Wang P, Feng Q, et al. Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy. *NPG Asia Mater*, 2017, 9(10): e441.
- [47] Finn JD, Smith AR, Patel MC, et al. A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing. *Cell Rep*, 2018, 22(9): 2227-2235.
- [48] Wood H. FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(10): 570.
- [49] Tang Q, Liu J, Jiang Y, et al. Cell-selective messenger RNA delivery and CRISPR/Cas9 genome editing by modulating the interface of phenylboronic acid-derived lipid nanoparticles and cellular surface sialic acid. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(50): 46585-46590.
- [50] Rosenblum D, Gutkin A, Kedmi R, et al. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. *Sci Adv*, 2020, 6(47): eabc9450.
- [51] Zhou K, Nguyen LH, Miller JB, et al. Modular degradable dendrimers enable small RNAs to extend survival in an aggressive liver cancer model. *PNAS*, 2016, 113(3): 520-525.
- [52] Miller JB, Zhang S, Kos P, et al. Non-viral CRISPR/Cas gene editing *in vitro* and *in vivo* enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(4): 1059-1063.
- [53] Li Y, Yang T, Yu Y, et al. Combinatorial library of chalcogen-containing lipidoids for intracellular delivery of genome-editing proteins. *Biomaterials*, 2018, 178: 652-662.
- [54] Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(4): 313-320.
- [55] Musunuru K, Chadwick AC, Mizoguchi T, et al. *In vivo* CRISPR base editing of *PCSK9* durably lowers cholesterol in primates. *Nature*, 2021, 593(7859): 429-434.
- [56] Yu X, Liang X, Xie H, et al. Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(6): 919-929.
- [57] Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 2021, 385(6): 493-502.
- [58] Zhang XQ, Intra J, Salem AK. Conjugation of polyamidoamine dendrimers on biodegradable microparticles for nonviral gene delivery. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(6): 2068-2076.
- [59] Intra J, Salem AK. Rational design, fabrication, characterization and *in vitro* testing of biodegradable microparticles that generate targeted and sustained transgene expression in HepG2 liver cells. *J Drug Target*, 2011, 19(6): 393-408.
- [60] Li Y, Maciel D, Rodrigues J, et al. Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. *Chem Rev*, 2015, 115(16): 8564-8608.
- [61] Vijayanathan V, Agostinelli E, Thomas T, et al. Innovative approaches to the use of polyamines for DNA nanoparticle preparation for gene therapy. *Amino Acids*, 2014, 46(3): 499-509.
- [62] Zhou T, Llizo A, Wang C, et al. Nanostructure-induced DNA condensation. *Nanoscale*, 2013, 5(18): 8288-8306.
- [63] Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(14): 4218-4244.
- [64] Nouri F, Sadeghpour H, Heidari R, et al. Preparation, characterization, and transfection efficiency of low molecular weight polyethylenimine-based nanoparticles for delivery of the plasmid encoding *CD200* gene. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 5557-5569.
- [65] Ryu N, Kim MA, Park D, et al. Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy. *Nanomedicine*, 2018, 14(7): 2095-2102.
- [66] Thomas TJ, Tajmir-Riahi HA, Pillai CKS. Biodegradable polymers for gene delivery. *Molecules*,

- 2019, 24(20): 3744.
- [67] Kretzmann JA, Ho D, Evans CW, et al. Synthetically controlling dendrimer flexibility improves delivery of large plasmid DNA. *Chem Sci*, 2017, 8(4): 2923-2930.
- [68] Gao XQ, Jin Z, Tan XY, et al. Hyperbranched poly( $\beta$ -amino ester) based polyplex nanoparticles for delivery of CRISPR/Cas9 system and treatment of HPV infection associated cervical cancer. *J Control Release*, 2020, 321: 654-668.
- [69] Lv S, Wu Y, Cai K, et al. High drug loading and sub-quantitative loading efficiency of polymeric micelles driven by donor-receptor coordination interactions. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(4): 1235-1238.
- [70] Wang J, Wu W, Zhang Y, et al. The combined effects of size and surface chemistry on the accumulation of boronic acid-rich protein nanoparticles in tumors. *Biomaterials*, 2014, 35(2): 866-878.
- [71] Wang X, Zhen X, Wang J, et al. Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 2013, 34(19): 4667-4679.
- [72] Liu C, Wan T, Wang H, et al. A boronic acid-rich dendrimer with robust and unprecedented efficiency for cytosolic protein delivery and CRISPR-Cas9 gene editing. *Sci Adv*, 2019, 5(6): eaaw8922.
- [73] Taharabaru T, Yokoyama R, Higashi T, et al. Genome editing in a wide area of the brain using dendrimer-based ternary polyplexes of Cas9 ribonucleoprotein. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(19): 21386-21397.
- [74] Min HS, Kim HJ, Naito M, et al. Systemic brain delivery of antisense oligonucleotides across the blood-brain barrier with a glucose-coated polymeric nanocarrier. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(21): 8173-8180.
- [75] Worthington KS, Green BJ, Rethwisch M, et al. Neuronal differentiation of induced pluripotent stem cells on surfactant templated chitosan hydrogels. *Biomacromolecules*, 2016, 17(5): 1684-1695.
- [76] Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*, 2004, 104(12): 6017-6084.
- [77] Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(1): 83-99.
- [78] Putnam D. Polymers for gene delivery across length scales. *Nat Mater*, 2006, 5(6): 439-451.
- [79] Liu BY, He XY, Xu C, et al. A dual-targeting delivery system for effective genome editing and *in situ* detecting related protein expression in edited cells. *Biomacromolecules*, 2018, 19(7): 2957-2968.
- [80] Qiao J, Sun W, Lin S, et al. Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(32): 4707-4710.
- [81] Zhang H, Bahamondez-Canas TF, Zhang Y, et al. PEGylated chitosan for nonviral aerosol and mucosal delivery of the CRISPR/Cas9 system *in vitro*. *Mol Pharm*, 2018, 15(11): 4814-4826.
- [82] Wang P, Zhang L, Zheng W, et al. Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(6): 1491-1496.
- [83] Huo S, Gong N, Jiang Y, et al. Gold-DNA nanosunflowers for efficient gene silencing with controllable transformation. *Sci Adv*, 2019, 5(10): eaaw6264.
- [84] Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, et al. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for efficient gene editing. *ACS Nano*, 2017, 11(3): 2452-2458.
- [85] Shahbazi R, Sghia-Hughes G, Reid JL, et al. Targeted homology-directed repair in blood stem and progenitor cells with CRISPR nanoformulations. *Nat Mater*, 2019, 18(10): 1124-1132.
- [86] Zhang L, Wang L, Xie Y, et al. Triple-targeting delivery of CRISPR/Cas9 to reduce the risk of cardiovascular diseases. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(36): 12404-12408.
- [87] Sadauskas E, Danscher G, Stoltenberg M, et al. Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*, 2009, 5(2): 162-169.
- [88] Gad SC, Sharp KL, Montgomery C, et al. Evaluation of the toxicity of intravenous delivery of auroshell particles (gold-silica nanoshells). *Int J Toxicol*, 2012, 31(6): 584-594.
- [89] Higbee-Dempsey EM, Amirshaghghi A, Case MJ, et al. Biodegradable gold nanoclusters with improved excretion due to pH-triggered hydrophobic-to-hydrophilic transition. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(17): 7783-7794.
- [90] Dehaini D, Wei XL, Fang RH, et al. Erythrocyte-platelet hybrid membrane coating for

enhanced nanoparticle functionalization. *Adv Mater*, 2017, 29(16): 10.1002/adma.201606209.

- [91] Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*, 2013, 19(1): 35-42.
- [92] Kim SM, Yang Y, Oh SJ, et al. Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *J Control Release*, 2017, 266: 8-16.
- [93] Li Z, Zhou X, Wei M, et al. *In vitro* and *in vivo* RNA inhibition by CD9-HuR functionalized exosomes encapsulated with miRNA or CRISPR/dCas9. *Nano Lett*, 2019, 19(1): 19-28.
- [94] Yao X, Lyu P, Yoo K, et al. Engineered extracellular vesicles as versatile ribonucleoprotein delivery vehicles for efficient and safe CRISPR genome editing. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(5): e12076.
- [95] Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y, et al. Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1334.
- [96] Ran N, Gao X, Dong X, et al. Effects of exosome-mediated delivery of myostatin propeptide on functional recovery of mdx mice. *Biomaterials*, 2020, 236: 119826.
- [97] Zhuang J, Tan J, Wu C, et al. Extracellular vesicles engineered with valency-controlled DNA nanostructures deliver CRISPR/Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(16): 8870-8882.

(本文责编 陈宏宇)