用于肿瘤血管栓塞治疗的智能型DNA纳米机器人

张银龙¹, 李素萍¹, 蒋乔¹, 狄春志¹, 赵宇亮^{1,2}, 丁宝全^{1,2}, 聂广军^{1,2*}

1. 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米生物效应与安全重点实验室, 北京 100190;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: niegi@nanoctr.cn

2019-03-26 收稿, 2019-05-09 修回, 2019-05-15 接受, 2019-06-21 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2018YFA0208900)和博士后创新人才支持计划(BX20180083)资助

摘要 恶性肿瘤(癌症)是危害人类健康的一大杀手. 肿瘤的快速增殖高度依赖于肿瘤血管的形成及血液供应, 因此堵塞肿瘤血管饿死肿瘤细胞成为继化疗、手术及免疫治疗之后的又一有效治疗策略. 凝血酶(thrombin)可以高效地激活血小板并将纤维蛋白原转化为纤维蛋白, 进而诱导血栓形成. 而游离的凝血酶在血液中的半衰期很短, 并且会引起非特异性的血栓形成, 造成健康组织的损伤, 大大地限制了该分子在肿瘤栓塞治疗中的应用. 寻求可以将凝血酶精准递送到肿瘤组织局部的新方法, 实现特异性肿瘤血管栓塞成为亟待解决的难题. DNA纳米折纸技术的快速发展使这一问题得以解决. 本团队近期构建了智能响应性纳米机器人, 将凝血酶精准高效地递送到肿瘤局部, 诱导血栓形成, 实现高效抑制肿瘤生长和转移的目的. 本文将对该领域近年来的国内外研究进展和本实验室的研究成果进行简单概述, 并对该技术领域的发展方向 and 前景提出一定的展望.

关键词 肿瘤血管, 血管栓塞, 靶向治疗, DNA折纸结构, 凝血酶

早在1971年, 美国医学领域著名的Folkman博士^[1]提出, 肿瘤的生长高度依赖于血液供应, 如果没有血液供给营养和氧气, 肿瘤只能处于休眠期(直径为1~2 mm), 随着时间进而消退. 至此观点提出之后, 日本大阪市立大学医学部的Yamada在1978年提出了经导管肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)术, 可以作为不可手术切除的肝细胞癌的一种有效治疗手段. 后来, TACE作为中晚期肝癌病人的首选疗法, 也写入了肝癌临床治疗指南. 到目前为止, 之所以TACE主要被用来治疗肝癌, 是由于肝脏有两套供血系统, TACE栓塞治疗对正常肝脏组织的损伤比较小^[2]. 由于现有技术所限, TACE实施过程中很难精确选择到特异性为肿瘤供血的血管进行栓塞, 只能尽可能选择下游的供血血管, 这必然会对正常器官或组织造成一定损伤. 当然, 假如随着技术的进步, 可以实现肿

瘤血管的超选择性栓塞, 我们有理由相信, 栓塞治疗策略可以被应用到更多类型的肿瘤治疗当中.

1997年, Thorpe团队^[3]通过靶向MHC II的抗体将组织因子胞外区特异性递送到肿瘤血管部位, 诱导肿瘤血管内血栓形成, 切断肿瘤血液和营养供应, 实现了“饿死”肿瘤的目的. 本项研究表明, 和传统的以肿瘤细胞为靶标的治疗策略相比, 特异性诱导肿瘤血管栓塞, 切断肿瘤血液供给具有以下三大优势: (1) 可以在短时间内高效诱导大量肿瘤细胞死亡; (2) 不需要药物接触肿瘤细胞, 减少了药物组织穿透递送的问题; (3) 不容易引起肿瘤细胞的耐受. 至此之后, 多种肿瘤靶向分子被用来连接组织因子胞外区并将其递送到肿瘤局部, 诱导血栓形成, 如VCAM-1, L19, chTNT-3, RGD, VEGF和NGR等^[4], 在动物模型上取得了很好的治疗效果. 但是到目前为止, tTF-NGR是唯一进入临床试验阶段的

引用格式: 张银龙, 李素萍, 蒋乔, 等. 用于肿瘤血管栓塞治疗的智能型DNA纳米机器人. 科学通报, 2019, 64: 2625–2632

Zhang Y L, Li S P, Jiang Q, et al. An intelligent DNA nanorobot for tumor vascular occlusion (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 2625–2632, doi: 10.1360/N972019-00257

肿瘤血管栓塞蛋白药物^[5]。分析其原因,可能是由于组织因子融合蛋白进入机体后与血液直接接触导致的非特异性栓塞,容易造成严重的毒副作用。因此,寻求新的可以将凝血酶安全递送到肿瘤局部,智能识别肿瘤血管、进行特异性栓塞的治疗策略成为该领域发展的必然趋势,是解决当前栓塞疗法局限性的有效手段。纳米机器人的概念属于分子仿生学的范畴,模拟细胞生命过程中各个环节,参照分子生物学原理,设计制造纳米尺度上各种各样可在纳米空间进行操作的“功能分子器件”,其主要由主体、效应分子和驱动力组成。我们近期的研究工作表明,利用智能化DNA纳米机器人技术,可以为解决以上的临床困境提供有效的创新型方案。本文将首先概述常用凝血分子和DNA折纸技术两个方面背景知识,其次介绍本研究团队近期发表在*Nature Biotechnology*的研究成果,最后简要分析该领域的发展前景。

1 凝血蛋白分子概述

常见的用于肿瘤栓塞治疗的蛋白凝血分子主要是指组织因子(tissue factor, TF)。TF是外源性凝血途径的主要启动者。TF由胞外区和跨膜区组成,发挥凝血功能的主要是胞外区,但是胞外区必须被固定在细胞膜上才具有凝血功能,游离的胞外区凝血活力很低。当外源性因素诱导组织或细胞损伤时,暴露内皮下组织因子,启动凝血反应,产生局部血栓,从而发挥止血的功能。组织因子胞外区的这一特点,直接决定了它是很好的用于肿瘤栓塞治疗的促凝分子^[6]。1997年,Thorpe团队^[3]实现了这一设想,至此之后很多种类肿瘤靶向分子被连接到组织因子胞外区用于肿瘤栓塞治疗。1998年,Thorpe团队^[7]将肿瘤血管标志物VCAM-1的抗体与TF胞外区进行融合表达,实现了50%的肿瘤生长抑制效果。2001年,Nilsson等人^[8]将靶向纤连蛋白ED-B区的抗体L19和TF胞外区进行融合表达,当给药剂量达到35 $\mu\text{g}/\text{只}$ 时,30%的肿瘤完全消退,但副作用也很明显。2003年,Hu等人^[9]合成了3种不同的tTF融合蛋白(chTNT-3-tTF, chTV-1-tTF, RGD-tTF),其抗肿瘤的效果差异很大,前两者具有一定的治疗效果,但是RGD-tTF没有明显的抗肿瘤效果。2008年,Berdel团队^[5]构建了靶向CD13的TF融合蛋白NGR-tTF,在3种小鼠肿瘤模型中都具有显著的治疗效果,并且他们在人体进行了初步的安全性和药效学研究,实验结果显示NGR-tTF可以有效降低肿瘤血液供应,具有显著的治疗效果。

以上所述融合蛋白当中,只有NGR-tTF进入了临床实验阶段,分析其原因,可能主要是融合蛋白的脱靶效应导致非特异性血栓形成。为了进一步改善该治疗策略,2015年本课题组^[10]将酸响应穿膜肽pHLIP和TF融合表达。pHLIP在正常血液pH>7.0条件下呈无规则状态,而在pH<7.0的肿瘤微环境中,构象发生改变,形成 α 螺旋结构,插入细胞膜中,促使TF诱导血栓形成。pHLIP-TF在乳腺癌和黑色素瘤小鼠模型中都取得了很好的治疗效果,个别老鼠肿瘤完全消退(图1)。该研究成果正在进行临床前实验研究。此外,本课题组^[11]在2018年构建了血栓靶向肽CREKA和TF融合蛋白,在多种肿瘤模型中都取得了不错的治疗效果。综上所述,以TF为效应蛋白的栓塞治疗策略遇到了一定的困难,但也取得了一定的成果。与组织因子相比,凝血酶是凝血瀑布更下游的分子,可以通过直接高效激活血小板并将纤维蛋白原转化为纤维蛋白诱发比较强的凝血反应,因此理论上肿瘤栓塞效果会更强,但游离凝血酶是不可以直接进行静脉注射的。临床上凝血酶主要是用来手术过程中局部止血^[12]。而尚无将凝血酶直接静脉注射用于恶性肿瘤的栓塞治疗的相关报道。因此,构建可以将凝血酶有效包载,并高效递送到肿瘤局部,然后通过刺激响应释放凝血酶的载体,是将凝血酶应用到肿瘤栓塞治疗中的有效手段。

2 DNA折纸技术

在遗传学研究当中,DNA是遗传信息的主要载体,决定了生物体千姿百态的表型。DNA双链主要是由腺嘌呤脱氧核苷酸(A)、胸腺嘧啶脱氧核苷酸(T)、胞嘧啶脱氧核苷酸(C)、鸟嘌呤脱氧核苷酸(G)4种脱氧核苷酸通过碱基互补配对的形式构成。近几十年来,以此为发展起来的结构DNA纳米技术,因其高度可控的合成及功能化修饰,受到了广泛的关注。从1980年,Seeman^[13]首次提出工程化DNA自组装纳米结构的概念以来,各种形貌及各种功能化的DNA纳米载体被成功构建。图2总结了2017年之前DNA纳米载体的发展历程^[14]。2006年,Rothemund^[15]首次提出DNA折纸术(DNA Origami)的概念。DNA折纸术是指长链的DNA可以被短链DNA固定,像折纸术里的纸被订书针固定一样,进而得到不同形状的DNA自组装纳米结构。Rothemund^[15]利用M13mp18环状单链作为模板链,将其与预先设计的200多条互补短链进行碱基互补配对,成功地构建出了三角形、长方形、五角星、笑脸等图

图 1 (网络版彩色)pHLIP-TF融合蛋白的抗肿瘤活性研究^[10]
Figure 1 (Color online) Anti-tumor activity of fusion protein pHLIP-TF^[10]

案的DNA纳米结构。2009年, Andersen^[16]构建了三维DNA纳米盒子结构,其主要特点是盒子的顶盖可以在特定条件下打开,该体系的构建进一步推进了DNA折纸术在生物医药领域应用的可能,但该体系没有在细胞或活体实验中得到验证。2012年, Douglas等人^[17]构建了DNA篮结构纳米机器,并在其篮中间偶联功能蛋白分子。该体系可以在细胞表面特异受体存在条件下打开DNA篮,暴露内部纳米颗粒或蛋白分子,为DNA纳米载体用于蛋白输运提供了可行的方案。但迄今为

止,没有一个DNA折纸纳米机器被成功地应用于哺乳动物相关疾病的活体治疗。DNA折纸技术的快速发展,为纳米医药领域提供了一种全新的药物运输平台,正如Rothemund所说:“DNA折纸是一类艺术品,但我相信如果我们有能力用DNA做出各种所需要的形状,就可以利用它制造更有用的物品,并且在制作过程中,人们可以对DNA本身性质了解更多”。利用DNA折纸技术合成纳米载体,具有形貌高度可控,功能精巧设计的特点,因此,该技术的快速发展为智能型纳米机器人的构

图2 (网络版彩色)过去几十年DNA纳米技术的发展演化过程^[14]

Figure 2 (Color online) Evolution of DNA nanotechnology for the past several decades^[14]

奠定了基础。

3 装载凝血酶的智能型DNA纳米机器人

到目前为止,没有研究将凝血酶作为活性分子应用

到活体肿瘤栓塞治疗当中。针对凝血酶的不可成药性及其运输方面的困境,本课题组^[18]从2012年开始着手构建可以将凝血酶高效递送到肿瘤局部,并可以响应肿瘤微环境分子信号,释放凝血酶诱导血栓形成的DNA

纳米机器人。该纳米机器人以M13噬菌体DNA单链作为模板,多条互补短链组装成长方形片层纳米结构,并将凝血酶通过表面DNA修饰,再通过与片层结构表面伸出的互补DNA序列杂交,将凝血酶固定到片层结构的上表面。然后在片层结构两侧设计了多对“锁扣”结构,将片层结构卷曲成管状结构,并最终将凝血酶包裹在管腔内部。为了实现精确的肿瘤血管定位,分子机器两端装载有肿瘤靶向核酸适配体AS1411,可特异性识别肿瘤血管内皮细胞标志物核仁素蛋白,提供靶向识别和定位功能。同时,它也是分子机器的激活剂,当DNA纳米机器人到达肿瘤血管时,“锁扣”序列双链部分可响应性识别核仁素,发生变构,双链打开,从而使DNA纳米机器人从管状恢复成片层结构,暴露其中的凝血酶,引发凝血级联反应,进而实现诱导血栓形成的功能(图3)。蛋白水平和细胞水平实验结果显示,当纳米机器人遇到核仁素时,可以发生形变从而暴露凝血酶在试管内引发血栓产生。体内外稳定性研究结果表明,在实验条件下DNA纳米机器人可以很好的保持结构稳定和凝血酶活力。将纳米机器人注射到荷瘤老鼠的体内,可以将凝血酶高效靶向递送至肿瘤组织,并原位诱导血栓的形成。利用DNA纳米机器人完成活体递送凝血酶,在乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌及原发肺癌等多种肿瘤中都表现出显著的治疗效果(图4)。并且,在小鼠和Bama小

型猪体内,这种纳米机器人具有良好的生物安全性和免疫惰性。该体系成功的将不能成药的凝血酶应用于活体肿瘤栓塞治疗,具有很重要的开创性意义。

4 结论与展望

本研究成功的构建了肿瘤微环境智能响应的DNA纳米机器人,其主体是DNA纳米载体,效应分子是凝血酶,驱动力是核仁素特异性识别的核酸适配体,将本来不能成药的凝血酶安全高效的递送到肿瘤局部,诱发血栓形成,达到切断肿瘤营养供应的目的。该DNA纳米机器人在多种肿瘤模型中都表现出不错的肿瘤抑制效果,并且没有检测到明显的生物毒性。近年来,随着精准医疗概念的引入,利用纳米医学机器人实现对人类重大疾病的精准诊断和治疗是我们追逐的一个伟大的目标。因此,纳米机器人的成功构建,预示着一一种未来人类精准药物设计的全新模式,为恶性肿瘤等疾病的治疗提供了全新的治疗策略。虽然该体系在动物水平取得了很好的治疗效果,但是该研究依旧属于基础研究领域,距离临床应用还有很长的路要走,在未来研究中还有很多的问题亟待解决。比如DNA纳米材料的免疫原性问题,纳米机器人体内代谢的机制研究以及是否会引起机体代谢通路的变化,规模化生产等。作为智能化药物运输平台,该体系能否用于其他效应分子

图3 (网络版彩色)DNA纳米机器人设计和表征^[18]

Figure 3 (Color online) Design and characterization of DNA nanorobot^[18]

图4 (网络版彩色)DNA纳米机器人的体外响应性及体内靶向、肿瘤栓塞和抗肿瘤研究^[18]

Figure 4 (Color online) The *in vitro* responsiveness, *in vivo* tumor targeting, infarction and anti-tumor activity of DNA nanorobot^[18]

(如毒素蛋白)的高效递送, 能否用于其他疾病模型的精准诊断和治疗, 这些问题都需要后续进一步研究来解

答。未来的纳米机器人也必然是向着更加精准的结构和响应性设计发展。

参考文献

- 1 Sherwood L M, Parris E E, Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, 285: 1182–1186
- 2 Yamada R, Kishi K, Sato M, et al. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in the treatment of unresectable liver cancer. *World J Surg*, 1995, 19: 795–800
- 3 Huang X. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, 1997, 275: 547–550
- 4 Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Zarghami N. Tumor vascular infarction: Prospects and challenges. *Int J Hematol*, 2017, 105: 244–256
- 5 Bieker R, Kessler T, Schwöppe C, et al. Infarction of tumor vessels by NGR-peptide-directed targeting of tissue factor: Experimental results and first-in-man experience. *Blood*, 2009, 113: 5019–5027

- 6 Zillmann A, Luther T, Müller I, et al. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281: 603–609
- 7 Ran S, Gao B, Duffy S, et al. Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Cancer Res*, 1998, 58: 4646–4653
- 8 Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, et al. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res*, 2001, 61: 711–716
- 9 Hu P, Yan J, Sharifi J, et al. Comparison of three different targeted tissue factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis. *Cancer Res*, 2003, 63: 5046–5053
- 10 Li S, Tian Y, Zhao Y, et al. pHLP-mediated targeting of truncated tissue factor to tumor vessels causes vascular occlusion and impairs tumor growth. *Oncotarget*, 2015, 6: 23523–23532
- 11 Shi Q, Zhang Y, Liu S, et al. Specific tissue factor delivery using a tumor-homing peptide for inducing tumor infarction. *Biochem Pharmacol*, 2018, 156: 501–510
- 12 Lew W K, Weaver F A. Clinical use of topical thrombin as a surgical hemostat. *Biol Targets Therapy*, 2008, 2: 593–599
- 13 Seeman N C. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol*, 1982, 99: 237–247
- 14 Zhang Y, Tu J, Wang D, et al. Programmable and multifunctional DNA-based materials for biomedical applications. *Adv Mater*, 2018, 30: 1703658
- 15 Rothmund P W K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, 440: 297–302
- 16 Andersen E S, Dong M, Nielsen M M, et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 2009, 459: 73–76
- 17 Douglas S M, Bachelet I, Church G M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, 2012, 335: 831–834
- 18 Li S, Jiang Q, Liu S, et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 258–264

Summary for “用于肿瘤血管栓塞治疗的智能型DNA纳米机器人”

An intelligent DNA nanorobot for tumor vascular occlusion

Yinlong Zhang¹, Suping Li¹, Qiao Jiang¹, Chunzhi Di¹, Yuliang Zhao^{1,2}, Baoquan Ding^{1,2} & Guangjun Nie^{1,2*}

¹ Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials & Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology of China, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Corresponding author, E-mail: niegj@nanoctr.cn

Malignant cancer is one of the major threats for human health. In the clinical practice, surgery, radiotherapy and chemotherapy are the major approaches for cancer treatment. However, once diagnosed, most patients are already in advanced stage with less possibility of surgery. Besides, radiotherapy and chemotherapy usually bring patients with severe systemic side effects, especially myelosuppression. Therefore, new strategies with high efficiency and low side effects are urgently needed to be explored.

Rapid tumor growth is highly dependent on the angiogenesis and blood supply, blocking tumor blood vessels to starve tumor cells to death is therefore an effective tumor therapeutic strategy. From 1978, Prof. Yamada suggested the usage of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma, various truncated tissue factor based tumor embolization therapeutics were developed and realized highly effective anti-tumor activity, such as pHLP-Ttf, CREKA-Ttf, chTNT-3-tTF, chTV-1-tTF and RGD-tTF. The coagulation protease thrombin is able to efficiently induce the formation of thrombus through inducing platelet activation and converting fibrinogen to fibrin network. However, the short half-life and nonspecific thrombus induction in the circulation limit thrombin application for tumor embolization therapy. Therefore, developing new techniques for tumor-specially delivering thrombin to tumor vessels are urgently needed to introduce it into tumor therapy. The rapid development of DNA origami technology, with highly controlled synthesis and functionalization, offers a great possibility to achieve this purpose. In previous works, several intelligent DNA nanostructures were used to load chemotherapeutics or functional proteins and achieved controlled drug release. However, none of them was successfully applied for *in vivo* treatment of mammal diseases. In current work, we developed an intelligent tumor-targeting nanorobot which carried thrombin molecules inside and recognized tumor endothelium specific marker nucleolin to unfold thrombin. When intravenously injected into tumor-bearing mice, the DNA nanorobot was able to efficiently target to tumor tissue and induce local thrombus formation. Subsequently, this nanorobot lead to tumor necrosis in a large scale and significantly inhibited tumor growth in B16 melanoma, MDA-MB-231 breast cancer, SK-OV3 ovarian cancer and Kras mutation lung cancer models. Safety evaluation in mice and bama miniature pigs indicated the nanorobot has a good *in vivo* tolerance. This kind of DNA nanorobotic systems with targeting and triggered release properties inspires the design of novel cancer therapeutics and may benefit the precision medicine in the future research.

Based on our work, we herein summarized recent progress of this field at home and abroad and particularly made a brief perspective about the development of DNA nanorobots. We hope this progress report can provide a reference for the future design of DNA nanorobots in the field of tumor embolism therapy.

tumor vessels, vascular occlusion, targeting therapy, DNA origami, thrombin

doi: [10.1360/N972019-00257](https://doi.org/10.1360/N972019-00257)