

综述



王红艳, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员, 博士研究生导师, 入选中国科学院百人计划, 获中国科学院优秀指导老师称号。先后获得国家基金委优秀青年、杰出青年、杰出青年延续资助。获国家基金委创新群体项目学术带头人、重点项目及科技部重点研发或中国科学院先导等项目资助。实验室利用基因工程突变小鼠及相应疾病模型, 结合病人样品, 研究巨噬细胞调控炎症反应和CD8⁺T细胞抗感染抗肿瘤的新型分子机制。

脂质纳米颗粒递送mRNA药物

吴思凡, 王红艳*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 核糖核酸功能与应用重点实验室, 上海 200031)

摘要: 在新冠病毒mRNA疫苗获得成功的同时, mRNA在各种疾病的预防和治疗中受到越来越多的关注。脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)是目前最常用的mRNA药物递送方式之一。本文将简要介绍含LNPs在内的mRNA药物递送平台, 总结LNPs的历史发展, 探讨LNPs优化策略以及靶向器官或细胞类型的特异性等问题, 最后聚焦mRNA-LNPs药物的主要应用。

关键词: 脂质纳米颗粒; 优化策略; 靶向性; mRNA药物

Lipid nanoparticles for mRNA drugs delivery

WU Sifan, WANG Hongyan*

(Key Laboratory of RNA Innovation, Science and Engineering, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Due to the success of mRNA vaccines against COVID-19 viruses, mRNA drugs have received great attention in the prevention and treatment of various diseases. Lipid nanoparticles (LNPs) are one of the most used strategies for the delivery of mRNA drugs to date. Here, we briefly overview some kinds of mRNA drugs delivery platforms including LNPs and summarize timeline of some crucial milestones for LNPs development. We discuss the optimization strategies of LNPs, as well as targeting specific tissues and cell types of LNPs delivery. We also highlight the key applications of mRNA-LNPs in clinical studies.

Key Words: lipid nanoparticles; optimization strategies; target selection; mRNA drugs

收稿日期: 2024-07-21

基金项目: 中国科学院战略先导科技专项(XDB0570401)

第一作者: E-mail: wusifan2019@sibcb.ac.cn

*通信作者: E-mail: hongyanwang@sibcb.ac.cn

1 mRNA药物递送平台

随着医学技术的飞速发展, mRNA药物凭借其独特的作用机制, 在疫苗开发、肿瘤治疗和遗传性疾病干预等多个领域展现出了巨大的潜力。mRNA药物发挥作用离不开递送载体。优化递送技术需要考虑如何提升药物在体内的稳定性与效能。mRNA药物的药代动力学涉及四个问题: (1) mRNA作为一种带负电荷的大分子, 难以直接穿过阴离子细胞膜或者通过细胞内吞作用内化; (2) mRNA的细胞内半衰期短, 且对RNA酶敏感, 但在细胞中RNA酶几乎无处不在; (3) mRNA在内化进细胞后, 也可能因无法内体逃逸至细胞质进行翻译; (4) mRNA结构具有免疫原性, 在体内可诱导一定毒性的免疫反应^[1]。

裸mRNA的递送已被用于许多体内研究, 特别是作为编码特定抗原的疫苗。配合着fms样酪氨酸激酶3(fms-like tyrosine kinase 3, FLT3)辅助治疗, 编码肿瘤的mRNA疫苗被节点树突状细胞吸收, 有效诱导抗原特异性CD8⁺ T细胞反应, 显著提高晚期黑色素瘤小鼠的治愈率和存活率^[2]。但是对于其他需要高水平连续表达蛋白质的应用, 裸mRNA是远远不够的。目前常用的mRNA递送载体包括: 蛋白质-mRNA复合物、脂类纳米颗粒、多聚体纳米颗粒(polymeric nanoparticles, PNPs)及脂质和聚合物的杂化载体^[3]。

天然带正电的蛋白质可以与带负电的mRNA通过静电相互作用结合, 形成蛋白质-mRNA复合物。带正电的表面进一步增强细胞摄取, 从而提高转染效率。Fotin-Mleczek等^[4]将鱼精蛋白和编码肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的mRNA结合, 显著激活TLR7受体从而增强小鼠抗肿瘤免疫反应。Segel等^[5]则发现, 将mRNA连接在哺乳动物逆转录病毒样蛋白PEG10非编码区, 这个复合物可以有效地进行不同mRNA的体内递送。

包括脂质纳米颗粒(lipid-nanoparticles, LNPs)和脂质体在内的脂类纳米颗粒已广泛应用于核酸递送。FDA批准的第一款基于RNA的寡核苷酸药物patisiran[一段短的干扰RNA, 用于治疗前白蛋白介导的遗传性淀粉样沉淀神经病(transthyretin-mediated amyloidosis, TTR)]使用的就是LNPs剂

型^[6]。在癌症免疫治疗方面, BioNTech进行的BNT111(包含四种黑色素瘤相关抗原: NY-ESO-1、酪氨酸酶、MAGE A3、TPTE)采用的就是脂质载体, 目前正在进行临床I-II期试验^[7]。

近年来, 多聚体纳米颗粒凭借多用途结构和易于修饰引起了广泛的关注并迅速发展。基于聚合物的核酸载体通常由单一聚合物构成, 却能同时包含多种官能团。目前广泛用于mRNA递送的聚合物材料有: 聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)^[8]、聚酯(如 α -氨基酯^[9]、丝氨酸酯^[10])、聚 β -氨基酯(polybeta-aminoester, PBAE)^[11]和可电离两亲性Janus树状大分子(ionizable amphiphilic Janus dendrimer, IAJD)^[12]等。类似于LNPs, 聚合物材料也需根据有效载荷进行成分优化, 设计聚合物纳米颗粒以期提高mRNA递送过程中不同步骤的效率^[13]。

含有脂质和聚合物的杂化载体表现出两者的优点, 用脂质修饰的聚合物载体, 可以逃避网状内皮系统的摄取, 延长药物静脉注射后的循环时间, 进一步增强其稳定性和药代动力学^[14]。目前研究的这类载体有金属-有机框架(metal-organic framework, MOF)、金纳米颗粒和氧化石墨烯-PEI杂化载体。

2 LNPs组成成分和发展历史

LNPs由四种成分组成: 可电离的阳离子脂质、磷脂、胆固醇和聚乙二醇脂质(polyethylene glycol, PEG)^[15]。mRNA-LNPs制备, 通常将脂质和mRNA分别溶解在乙醇和酸性水相中, 其乙醇和水相以1:3的体积比与微流控装置混合, 从而自组装形成LNPs。在此期间, 可电离阳离子脂质将被质子化而带正电, 接着通过静电相互作用与带负电的mRNA结合, 从而将mRNA封装在LNPs内。其他辅助脂质, 包括磷脂、胆固醇和聚乙二醇脂质, 在它们上面自我组装, 随后mRNA-LNPs溶液通过缓冲交换调整为中性pH值, 形成稳定的mRNA-LNPs。

1965年, Bangham等制造出首个脂质体。1978年, 首次将脂质体包裹的mRNA递送至细胞。1989年, 将合成mRNA包裹在阳离子脂质中递送到人体细胞、青蛙胚胎。1993年, 测试首个mRNA疫苗,

用于预防小鼠流感。1995年, 首个采用LNPs剂型的药物被FDA批准, 它包裹小分子两性霉素B, 用于治疗严重的真菌感染。接着, 1996年包裹道诺霉素(抗肿瘤化学药物)的LNPs药物, 2000年包裹替波芬(治疗中心浆液性视网膜病变), 2012年包裹长春新碱(抗肿瘤药)陆续获得FDA批准。用于肿瘤免疫治疗的LNPs-mRNA制剂的临床试验(NCT02316457)于2014年开展, 作为流感疫苗的LNPs-mRNA制剂的临床试验(NCT03076385)则于2017年开展, 同年也开展了用于蛋白质替代疗法的LNPs-mRNA制剂的临床试验(NCT03375047), 为遗传疾病提供基因编辑成分的LNPs制剂的临床试验(NCT04601051)则在2020年开展。在此期间, 两款包裹抗肿瘤药物的LNPs(2015年伊立替康, 2017年阿糖胞苷)也均得到FDA批准。2018年首个siRNA药物Onpattro(封装siRNA)得到FDA和EMA的批准。2020年两款COVID-19 mRNA疫苗(mRNA-1273和BNT162b)在疫情期间获得多个国家监管机构的授权, mRNA-LNPs也正式在生命科学领域掀起热潮。

3 LNPs优化策略

LNPs优化的主要策略, 包括设计和筛选新型脂质分子、调整LNPs的内部脂质比例、LNPs的表面修饰。

(1)可电离阳离子脂质是LNPs组分中的关键成分, 在酸性条件下有效包封核酸, 并降低在生理条件下循环过程中的毒性。进入内体和溶酶体(环境pH低于表面pKa), LNPs可以再次带正电, 从而促进内体逃逸, 将mRNA释放到细胞质中。研究人员通常专注于调整脂质尾部结构, 通过改变尾部数量、设计线性或分支结构以及引入不饱和或可生物降解的键来赋予增强的效力或特定功能。目前采用高通量筛选可电离脂质, 已建立起大容量的新脂质库并评估其体内效果^[16,17]。磷脂是辅助脂质, 有助于脂质纳米颗粒的形成和内体的逃逸。Liu等^[18]开发了数百种称为iPhos的可电离磷脂, 克服传统磷脂结构不灵活和难以获得的局限性。聚乙二醇脂质的掺入以减少纳米颗粒的聚集, 延长循环时间, 并逃避单核吞噬细胞的吞噬作用。然而, PEG也能阻碍与靶细胞的相互作用和随后的内

体逃逸, 导致转染效率降低, 调整聚乙二醇脂质中的碳链和相对分子质量可以优化其有利影响。胆固醇有助于提高LNPs的稳定性和膜融合, 优化胆固醇的结构或者掺入一定量的胆固醇衍生物也可以增强LNPs的递送功效^[19], 赋予LNPs特殊的功能^[20]。

(2)选择组分和比率对于LNPs介导的mRNA输送也很关键。传统的LNPs为四组分, 目前的研究有通过引入混合可电离脂质来提高mRNA的传递效率^[21], 也有增加第五种成分实现组织特异的mRNA输送^[22]。有研究发现, 胆固醇和磷脂不是LNPs功能的必需部分, 新设计的具有可生物降解酯核和永久性阳离子脂质, PEG-脂质协同作用的三组分LNPs在功效和肺靶向方面都优于含胆固醇的四组分或五组分LNPs^[23]。除了LNPs的脂质组成外, N/P(N指可电离阳离子脂质的胺基, P指mRNA的磷酸基团)摩尔比也对LNPs的性质有很大影响。N/P比率越小, 其LNPs可以拥有越高的mRNA有效载荷, 但mRNA的包封效率可能会降低。此外, 目前已有研究表明, 低N/P比率的LNPs在内体pH范围内表现出更高的质子化水平, 这将更利于mRNA内体逃逸, 提高mRNA体内表达。

(3)表面修饰也是LNPs优化策略中的一环, 特别是将抗体或其他分子偶联到LNPs上, 可以大大提高其靶向能力。例如将PECAM-1抗体与LNPs偶联制备肺靶向LNPs^[24]; CD3、CD4、和CD5抗体修饰的LNPs则被验证了可在体内向T淋巴细胞传递mRNA^[25]; c-kit(CD117)抗体修饰的LNPs, 则可有效地将RNA输送到体内的造血干细胞和祖细胞^[26]。总的来说, 抗体修饰在优化LNPs递送方面具有巨大潜力。

4 LNPs递送的靶向性

传统LNPs静脉注射主要在肝脏中积累, 原因在于血液中的大量载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)被吸附到LNPs表面, 进而通过ApoE-LDLR(低密度脂蛋白受体)的相互作用促进肝细胞摄入^[15]。目前研究通过设计不同可电离脂质和采用不同给药方式, 实现RNA递送肝脏以外器官和其他细胞。聚合物脂(如7C1)可以有效地将RNA输送到多个器官的内皮细胞, 包括肺部和骨髓^[27]。两

性氨基脂质ZA3-Ep10具有肺部靶向性,而阴离子型则促进脾脏靶向递送^[28]。OF-Deg-Lin LNPs能有效地在脾脏中表达蛋白质(>85%),并在体内实现有效的B淋巴细胞靶向(~7%)^[29]。含有咪唑基团的类脂化合物可以将mRNA传递到T淋巴细胞,铅结构93-O17S在CD4⁺和CD8⁺小鼠脾脏T淋巴细胞中分别实现了8.2%和6.5%的基因重组^[30]。吸入给药或气管内给药适用于肺部疾病,目前正在进行治疗囊性纤维肿的I/II期临床研究,患者就是通过雾化方式接受的两剂MRT5005(包裹编码囊性纤维膜调节蛋白的mRNA)^[31]。此外,LNPs组分中磷脂和胆固醇的替换或修饰也能改变器官靶向性。通过体外磷脂结构的系统筛选,Álvarez-Benedicto等^[32]发现,两性离子型磷脂主要实现肝脏靶向递送,而阴离子型磷脂则促进脾脏靶向递送。研究发现,20 α -羟基胆固醇(20 α -OH)替代胆固醇的LNPs向内皮细胞和Kupffer细胞递送mRNA的能力是肝细胞的5倍^[33]。

LNPs因其生物可接受性和可降解性使其毒性较低,适合用于针对脑疾病靶向治疗。但血脑屏障的存在阻碍了绝大多数治疗药物到达脑部靶点,目前主要通过侵入式和非侵入式给药途径来克服这个难点。侵入式的颅内给药是脑内、皮质内或脑室内注射直接将LNPs输送到大脑。随着打开血脑屏障新兴技术——微泡辅助聚焦超声(瞬间增强血脑屏障的通透性)的发展,研究人员发现以静脉输送mRNA-LNPs不仅可以到大脑表达蛋白,而且无出血和水肿等不良反应^[34]。非侵入式LNPs递送则对LNPs进行靶向配体和抗体修饰,经受体介导的内吞作用或胞吞作用,使得LNPs到达血脑屏障或穿过血脑屏障,增加靶向脑的纳米颗粒的积累^[35]。目前新兴的LNPs改进是在LNPs配方中增加离子液体(在室温或接近室温下呈现液态的、完全由阴阳离子所组成的盐),它能控制LNPs与血液的生物相互作用,即所谓的“红细胞搭便车”技术,克服传统上静脉给药无法进入脑靶向的障碍^[36]。

5 mRNA-LNPs的生物应用和发展前景

LNPs递送mRNA药物的应用聚焦于传染病的预防性mRNA疫苗、癌症的治疗性mRNA疫苗、

mRNA编码的蛋白疗法。

mRNA作为药物具有特异抗原序列的快速优化,可编码多种蛋白和/或蛋白亚基,免疫原性的可调节等优势,联合LNPs递送的细胞特异性和免疫原性的调节,使得这个组合在预防传染病中发挥重要应用^[37]。在新冠大流行期间,辉瑞和BioNTech公司的BNT162b2(商品名Comirnity)及Moderna公司的mRNA-1273(商品名Spikevax)自病毒序列公布到FDA批准紧急授权使用仅用时约11个月,凸显mRNA-LNPs疫苗迅捷的转化潜力。目前还有研究组在探索自我扩增型疫苗,其mRNA可编码RNA依赖的RNA聚合酶,用于RNA扩增,因此一针低剂量的注射,就足以令其在体内增加抗原蛋白的表达;同时由于mRNA疫苗不会产生感染性颗粒,因而不会像减毒疫苗和复制缺陷型病毒疫苗可能转变为致病型加重病情^[38]。但是这类型疫苗需要递送的mRNA相对分子质量较大,这可能会是一个挑战。

近年来,肿瘤免疫治疗的崛起,也促使着人们开始将mRNA-LNPs推向肿瘤治疗方向应用。不同于预防性疫苗通过引起体液免疫实现疗效,治疗性肿瘤疫苗必须令CD8⁺ T细胞对肿瘤发挥杀伤作用。因此如何有效将mRNA-LNPs输送到特定免疫细胞就成为关键。113-O12B的淋巴结靶向LNPs,它可以有效地将OVA mRNA或TRP-2肽(TRP2 180-188)递送到抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)中,在那里产生肿瘤相关抗原,后通过组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)递呈TAA来活化T淋巴细胞,使其杀死肿瘤细胞。这种纳米疫苗在B16F10黑色素瘤小鼠模型中表现出显著的生长抑制作用^[39]。

选择合适的以产生肿瘤高特异性的免疫反应是另一大挑战。肿瘤细胞不仅高表达TAA,而且在癌变过程中,恶性细胞会表达一些正常细胞不存在的蛋白,这些新抗原通常是病人特异的,称为肿瘤特异抗原(tumor specific antigen, TSA)。对于前者,各个公司开展的在研药物中,都采用编码多种抗原,以充分向人体免疫系统提供特定肿瘤的相关抗原,如来自BioNTech公司的BNT111包含四种黑色素瘤相关抗原:NY-ESO-1、酪氨酸酶、MAGEA3、TPTE; Moderna公司研发的mRNA-

5671包含四种最常见的KRAS替代物: G12D、G12V、G13D、G12C。后者临床上则采用将手术切除后的肿瘤通过二代测序鉴定出病人特异的新抗原, 接着制备编码这些新抗原的mRNA-LNPs, 后将注射回该病人体内, 诱导免疫反应攻击病人肿瘤。目前这类疫苗大多是多肽疫苗, 但是介于mRNA不仅可以同时表达多种抗原, 用多条mRNA链或集中在同一条链上, 而且可以编码整个抗原蛋白, 递呈多种表位, 且无需受限于多肽疫苗中特定的HLA表位等优势^[40], mRNA药物从诱发更广泛免疫反应的角度来看是相当富有前景的。

癌症疫苗的应用中, 最后的挑战来自肿瘤微环境的免疫抑制作用, 它将阻止T细胞浸润肿瘤并导致T细胞耗竭。目前研究希望激活杀伤性T淋巴细胞的同时, 也能靶向肿瘤微环境的免疫抑制作用。主要采用两种方式, 一种为LNPs递送编码肿瘤抗原的mRNA, 或者利用mRNA产生细胞因子、免疫检查点抑制剂或其他功能蛋白, 以重塑肿瘤微环境或者提高免疫监视功能。mRNA-2416就是此类产品, 其mRNA编码免疫检查点调节子OX40L, 活化T细胞的增殖和并提供存活的共刺激信号^[41]。另一种则和克服肿瘤微环境的疗法联用, 如Moderna和Merck Sharp & Dohme公司开发的RNA-4157(包含34种新抗原)联用pembrolizumab, 与pembrolizumab单抗药物治疗相比, 在手术切除的高风险黑色素瘤患者中延长了无复发生存期, 并具有可控的安全性^[42]。此外, 嵌合抗原受体T细胞疗法(chimeric antigen receptor T-cell therapy, CAR-T)临床上目前用于治疗血液癌症, mRNA-LNPs体系的发展将实现CAR-T的在体生成, 比起传统病毒递送制备CAR-T方式, LNPs体现更优的装载能力, 反复给药的安全性, 特定细胞递送的有效性等^[43]。

最近, mRNA-LNPs的应用研究激发了对蛋白或免疫调节蛋白(如抗体或细胞因子)疗法的兴趣。与传染病和癌症疫苗相比, 这类应用场景要求的蛋白表达量更高, 甚至需要终生治疗, 因此需要实现更低的免疫原性。而LNPs所拥有的生物可接受性和生物可降解性使其引发的免疫原性较低, 并且它可以根据生物应用场景的不同, 调整免疫原性。吸入式mRNA疗法MRT5005(FDA授予治疗

囊性纤维化)采用LNPs制剂, 连续五周给药, 安全性并未随着注射次数增加而变严重^[31]。此外, 某些蛋白需要额外的翻译后修饰以获得完整功能, 但这可能无法由mRNA序列本身直接实现, 因此如何将mRNA送至靶器官或特定细胞类型以达到最佳治疗效果是其另一挑战。LNPs制剂可以通过外壳组分的搭配、不同比例的调整 and 给药方式的选择来达到对不同脏器和免疫细胞类型的靶向。如Neurimmune和Ethris的合作的吸入式mRNA编码新冠单抗, 不仅体现mRNA药物合成的高性价比, 同时LNPs吸入式的给药方式也让药效得到最好的发挥。

总体来说, mRNA-LNPs作为药物拥有以下几个优势: (1)灵活和高性价比, 不管是包封的mRNA还是外壳LNPs, 均可以在体外通过化学方式快速制备和扩大生产; (2)药物在体时间上的可控, 目前研究通过对外壳或者mRNA结构上的调整, 使其可以根据不同生物场景调整在体生物降解时间; (3)免疫原性的可调整, 这一点在传染病疫苗中最为突出, 我们发现不仅是mRNA所表达的蛋白具有引起免疫反应的作用, 就单纯的mRNA本身结构和LNPs不同配方组合也能产生不同程度的固有免疫反应; (4)特定脏器和组织的靶向, LNPs可以通过不同的优化策略和给药方式来提升对不同脏器和组织的选择递送。

但是根据mRNA-LNPs药物的临床研究以及各个研发公司公布的数据来看, mRNA-LNPs目前也出现了一些挑战。Moderna公司的mRNA-1944(编码基孔肯雅病毒特异性单克隆中和抗体)的I期临床试验结果显示, 在最高剂量时, 4位受试者中的3位出现注射处反应, 其中一位患者出现三级心动过速和白细胞升高, 二级恶心、呕吐、发热和动态心电图T波倒置^[44]。后来, 他们采用预先使用类固醇类的方式, 降低了不良反应事件, 但是抗体的表达也降低了1.7倍^[37]。低蛋白表达量带来不良反应减少的现象是否暗示一定水平的炎症反应是理想蛋白表达量的前提。如果这是对的, 那么临床上mRNA-LNPs的使用就需要在目标蛋白产量和个体承受能力之间选择一个合适的支点。此外, 由于LNPs由脂质构成, 在一些需要长期多频次使用的生物场景中, 脂质聚积也将会是一个问题。

我们不知道来不及清除的脂质，在目标组织内部或其他组织中聚积会对机体产生什么风险，是否在这些特定生物场景中我们需要对LNPs做一些特殊优化来减少此类现象，这些问题未来都亟待解决。

参考文献

- [1] Kim J, Eygeris Y, Gupta M, et al. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv Drug Deliver Rev*, 2021, 170: 83-112
- [2] Kreiter S, Diken M, Selmi A, et al. FLT3 ligand enhances the cancer therapeutic potency of naked RNA vaccines. *Cancer Res*, 2011, 71(19): 6132-6142
- [3] Xiao Y, Tang Z, Huang X, et al. Emerging mRNA technologies: delivery strategies and biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 2022, 51(10): 3828-3845
- [4] Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother*, 2011, 34(1): 1-15
- [5] Segel M, Lash B, Song J, et al. Mammalian retrovirus-like protein PEG10 packages its own mRNA and can be pseudotyped for mRNA delivery. *Science*, 2021, 373(6557): 882-889
- [6] Zhang X, Goel V, Robbie GJ. Pharmacokinetics of patisiran, the first approved RNA interference therapy in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *J Clin Pharma*, 2020, 60(5): 573-585
- [7] Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*, 2020, 585(7823): 107-112
- [8] Li M, Zhao M, Fu Y, et al. Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. *J Control Release*, 2016, 228: 9-19
- [9] McKinlay CJ, Vargas JR, Blake TR, et al. Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(4): E448
- [10] Benner NL, McClellan RL, Turlington CR, et al. Oligo (serine ester) charge-altering releasable transporters: organocatalytic ring-opening polymerization and their use for *in vitro* and *in vivo* mRNA delivery. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(21): 8416-8421
- [11] Capasso Palmiero U, Kaczmarek JC, Fenton OS, et al. Poly(β -amino ester)-*co*-poly(caprolactone) terpolymers as nonviral vectors for mRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. *Adv Healthcare Mater*, 2018, 7(14): e1800249
- [12] Zhang D, Atochina-Vasserman EN, Maurya DS, et al. One-component multifunctional sequence-defined ionizable amphiphilic Janus dendrimer delivery systems for mRNA. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(31): 12315-12327
- [13] Huang P, Deng H, Zhou Y, et al. The roles of polymers in mRNA delivery. *Matter*, 2022, 5(6): 1670-1699
- [14] Kong N, Zhang R, Wu G, et al. Intravesical delivery of *KDM6A*-mRNA via mucoadhesive nanoparticles inhibits the metastasis of bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(7): e2112696119
- [15] Kon E, Ad-El N, Hazan-Halevy I, et al. Targeting cancer with mRNA-lipid nanoparticles: key considerations and future prospects. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(11): 739-754
- [16] Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(5): 561-569
- [17] Whitehead KA, Dorkin JR, Vegas AJ, et al. Degradable lipid nanoparticles with predictable *in vivo* siRNA delivery activity. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 4277
- [18] Liu S, Cheng Q, Wei T, et al. Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Mater*, 2021, 20(5): 701-710
- [19] Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, et al. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 983
- [20] Paunovska K, Da Silva Sanchez AJ, Sago CD, et al. Nanoparticles containing oxidized cholesterol deliver mRNA to the liver microenvironment at clinically relevant doses. *Adv Mater*, 2019, 31(14): e1807748
- [21] Miao L, Lin J, Huang Y, et al. Synergistic lipid compositions for albumin receptor mediated delivery of mRNA to the liver. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2424
- [22] 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
- [23] Su K, Shi L, Sheng T, et al. Reformulating lipid nanoparticles for organ-targeted mRNA accumulation and translation. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 5659
- [24] Parhiz H, Shuvaev VV, Pardi N, et al. PECAM-1 directed re-targeting of exogenous mRNA providing two orders of magnitude enhancement of vascular delivery and expression in lungs independent of apolipoprotein E-mediated uptake. *J Control Release*, 2018, 291: 106-115
- [25] Tombácz I, Laczkó D, Shahnawaz H, et al. Highly efficient CD4⁺ T cell targeting and genetic recombination using engineered CD4⁺ cell-homing mRNA-LNPs. *Mol*

- [Ther](#), 2021, 29(11): 3293-3304
- [26] Shi D, Toyonaga S, Anderson DG. *In vivo* RNA delivery to hematopoietic stem and progenitor cells *via* targeted lipid nanoparticles. [Nano Lett](#), 2023, 23(7): 2938-2944
- [27] Sago CD, Lokugamage MP, Islam FZ, et al. Nanoparticles that deliver RNA to bone marrow identified by *in vivo* directed Evolution. [J Am Chem Soc](#), 2018, 140(49): 17095-17105
- [28] 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](#), 2017, 56(4): 1059-1063
- [29] Fenton OS, Kauffman KJ, Kaczmarek JC, et al. Synthesis and biological evaluation of ionizable lipid materials for the *in vivo* delivery of messenger RNA to B lymphocytes. [Adv Mater](#), 2017, 29(33): 1606944
- [30] Zhao X, Chen J, Qiu M, et al. Imidazole-based synthetic lipidoids for *in vivo* mRNA delivery into primary T lymphocytes. [Angew Chem Int Ed](#), 2020, 59(45): 20083-20089
- [31] Rowe SM, Zuckerman JB, Dorgan D, et al. Inhaled mRNA therapy for treatment of cystic fibrosis: interim results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1/2 clinical study. [J Cystic Fibrosis](#), 2023, 22(4): 656-664
- [32] Álvarez-Benedicto E, Farbiak L, Márquez Ramírez M, et al. Optimization of phospholipid chemistry for improved lipid nanoparticle (LNP) delivery of messenger RNA (mRNA). [BioMater Sci](#), 2022, 10(2): 549-559
- [33] Patel SK, Billingsley MM, Frazee C, et al. Hydroxycholesterol substitution in ionizable lipid nanoparticles for mRNA delivery to T cells. [J Control Release](#), 2022, 347: 521-532
- [34] Ogawa K, Kato N, Yoshida M, et al. Focused ultrasound/microbubbles-assisted BBB opening enhances LNP-mediated mRNA delivery to brain. [J Control Release](#), 2022, 348: 34-41
- [35] Ma F, Yang L, Sun Z, et al. Neurotransmitter-derived lipidoids (NT-lipidoids) for enhanced brain delivery through intravenous injection. [Sci Adv](#), 2020, 6(30): eabb4429
- [36] Khare P, Edgecomb SX, Hamadani CM, et al. Lipid nanoparticle-mediated drug delivery to the brain. [Adv Drug Deliver Rev](#), 2023, 197: 114861
- [37] Barbier AJ, Jiang AY, Zhang P, et al. The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. [Nat Biotechnol](#), 2022, 40(6): 840-854
- [38] Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2016, 113(29): E4133
- [39] Chen J, Ye Z, Huang C, et al. Lipid nanoparticle-mediated lymph node-targeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust CD8⁺ T cell response. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2022, 119(34): e2207841119
- [40] Diken M, Kranz LM, Kreiter S, et al. mRNA: a versatile molecule for cancer vaccines. [Curr Issues Mol Biol](#), 2017, 22: 113-128
- [41] Deng Z, Yang H, Tian Y, et al. An OX40L mRNA vaccine inhibits the growth of hepatocellular carcinoma. [Front Oncol](#), 2022, 12: 975408
- [42] Weber JS, Carlino MS, Khattak A, et al. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): A randomised, phase 2b study. [Lancet](#), 2024, 403(10427): 632-644
- [43] Rurik JG, Tombácz I, Yadegari A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury. [Science](#), 2022, 375(6576): 91-96
- [44] August A, Attarwala HZ, Himansu S, et al. A phase 1 trial of lipid-encapsulated mRNA encoding a monoclonal antibody with neutralizing activity against Chikungunya virus. [Nat Med](#), 2021, 27(12): 2224-2233