

## mRNA-LNP 肝外靶向递送的研究进展

李 蕾<sup>1,2</sup>, 赵彩利<sup>2</sup>, 张 宁<sup>2</sup>, 李春雷<sup>1,2\*</sup>

(1. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017; 2. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050035)

**摘要:** 信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 是一种极具潜力的治疗药物, 在免疫学、肿瘤学、疫苗和先天性代谢疾病等研究领域具有广阔前景。但由于其自身不稳定且易被核酸酶降解所以需要高效的递送载体。脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 具有易于配制、稳定性高、细胞摄取高效、内体逃逸等优点, 是被公认的最成熟的递送载体。然而, LNP 在肝脏中的积累严重限制了 mRNA-LNP 技术在肝脏以外的靶向与治疗。为了克服这一障碍, 研究人员一直专注于通过各种手段以实现肝外组织器官的精确递送。本文主要从内源性靶向、主动靶向和给药途径的选择这 3 方面阐述 LNP 器官特异性递送 mRNA 的研究进展, 以为后续新型 mRNA-LNP 递送体系的设计提供思路及方向。

**关键词:** 靶向递送; 信使核糖核酸; 脂质纳米颗粒; 内源性靶向; 配体修饰

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0359-10

## Research progress on extrahepatic targeted delivery of mRNA-LNP

LI Lei<sup>1,2</sup>, ZHAO Cai-li<sup>2</sup>, ZHANG Ning<sup>2</sup>, LI Chun-lei<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., CSPC Pharmaceutical Group, Shijiazhuang 050035, China)

**Abstract:** Messenger ribonucleic acid (mRNA) is a promising therapeutic drug with great potential in the fields of immunology, oncology, vaccines and inborn metabolic diseases. However, due to its instability and susceptibility to nuclease degradation, efficient delivery vectors are required. Lipid nanoparticles (LNPs) are recognized as the most mature delivery vectors due to their advantages of easy formulation, high stability, efficient cell uptake and endosomal escape. However, the accumulation of LNPs in the liver severely limits the targeting and treatment of mRNA-LNP technology beyond the liver. To overcome this obstacle, researchers have been focusing on various means to achieve precise delivery of extrahepatic tissues and organs. This article mainly expounds the research progress of LNP-specific delivery mRNA from three aspects: endogenous targeting, active targeting and selection of administration route, in order to provide ideas and directions for the design of new mRNA-LNP delivery systems in the future.

**Key words:** targeted delivery; messenger ribonucleic acid; lipid nanoparticle; endogenous targeting; ligand modification

信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 疗法是一种将体外合成的 mRNA 递送到人体特定细胞中, 与细胞中的核糖体结合翻译出目标蛋白, 以纠正

或补偿相关基因的表达, 达到预防和治疗疾病的方法<sup>[1]</sup>。相较于传统药物, mRNA 具备很多优势: ① 开发周期短, 可以快速应用于各种疗法; ② 可以编码各种蛋白的遗传信息, 适用于不同种类药物的开发; ③ 具有瞬时活性, 容易通过生理代谢途径降解; ④ 不会整合到宿主的基因组中, 安全性高<sup>[2-6]</sup>。这些优势赋予 mRNA 疗法巨大的开发前景。但由于其自身不稳定且

收稿日期: 2024-09-20; 修回日期: 2024-11-06.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2023YFC3405000).

\*通讯作者 Tel: 18106734070, E-mail: 18332193619@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0916

易被核酸酶降解,所以安全高效的mRNA递送系统是成药的关键<sup>[7]</sup>。

脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 是被公认为最成熟的mRNA递送系统,不仅能保护mRNA不被降解,而且能增加内体逃逸<sup>[8]</sup>。此外,LNP还具有易于配制、自组装、生物相容性好、高生物利用度及有效载容量大等优点<sup>[9,10]</sup>。在mRNA-LNP递送系统中,mRNA分子通过与脂质的静电相互作用被封装于内部,并被携带至相应的组织部位。2020年12月,为应对新型冠状病毒 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 感染,mRNA疫苗BNT162b2 (辉瑞/BioNTech公司) 和mRNA-1273 (Moderna公司) 被紧急纳入使用。两款疫苗在短时间被开发出来并投入使用,大大激发了mRNA-LNP在该领域的发展,目前临床在研的超90%的mRNA药物也同样依赖于LNP递送系统<sup>[11]</sup>。

然而,mRNA-LNP作为热门技术仍存在较多应用难题。其中,LNP在肝脏的积累是开发高效递送系统的重大障碍。在肝细胞富集的主要机制涉及LNP表面“蛋白冠”的形成。LNP在进入血液循环后会吸附各种不同的血浆蛋白从而形成“蛋白冠”,这会改变LNP原有的表面特性,甚至可以屏蔽靶向配体,降低其功效。在“蛋白冠”的组成中影响最大的是载脂蛋白E (apolipoprotein E, ApoE)<sup>[12]</sup>。它是一种参与内源性胆固醇转运的蛋白质,也是最常吸附到LNP表面的蛋白质。ApoE会与肝细胞表面低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 结合,促使LNP通

过受体介导的内吞作用进入肝细胞积累<sup>[13]</sup>。这种途径虽然对肝细胞应用很有价值,但严重限制了mRNA-LNP技术在肝脏以外的靶向递送与治疗应用。因此,将mRNA递送至肝外组织LNP的设计是一个关键挑战,必须突破该挑战才能充分发挥mRNA-LNP技术的潜力,从而设计出更具靶向性的药物。本文主要从内源性靶向、主动靶向和给药途径的选择3方面介绍mRNA-LNP肝外靶向的研究进展 (图1)。

## 1 内源性靶向

内源性靶向,即通过改变LNP的组成、电荷、大小、表面化学性质等手段促进其与不同血浆蛋白相互作用,从而影响LNP在人体内的生物学分布达到组织特异性递送的目的,是设计不同LNP以克服肝脏积累和靶向肝外器官的有效方式<sup>[8]</sup>。

传统四组分LNP是由不同类别的脂质组合而成的纳米结构,主要包括可电离脂质、辅助脂质、胆固醇和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 脂质,这些脂质在微流控混合下与含有mRNA的水相自组装成mRNA-LNP<sup>[14]</sup>。脂质四组分对于体内的递送都起着重要作用<sup>[15]</sup>,其中可电离脂质作为LNP最关键的组成部分,用于结合核酸并帮助内体逃逸<sup>[16]</sup>;辅助脂质主要是磷脂,用于提高LNP的稳定性<sup>[17]</sup>;胆固醇则通过填充脂质之间的空隙来增强体系的流动性,促进与细胞和内体膜融合<sup>[18]</sup>;PEG脂质可防止LNP的聚集,提高稳定性和隐身效应,并延长体循环<sup>[19]</sup>。

然而不幸的是,科研工作者仍然没有清楚地解释

### mRNA-LNP extrahepatic targeted delivery

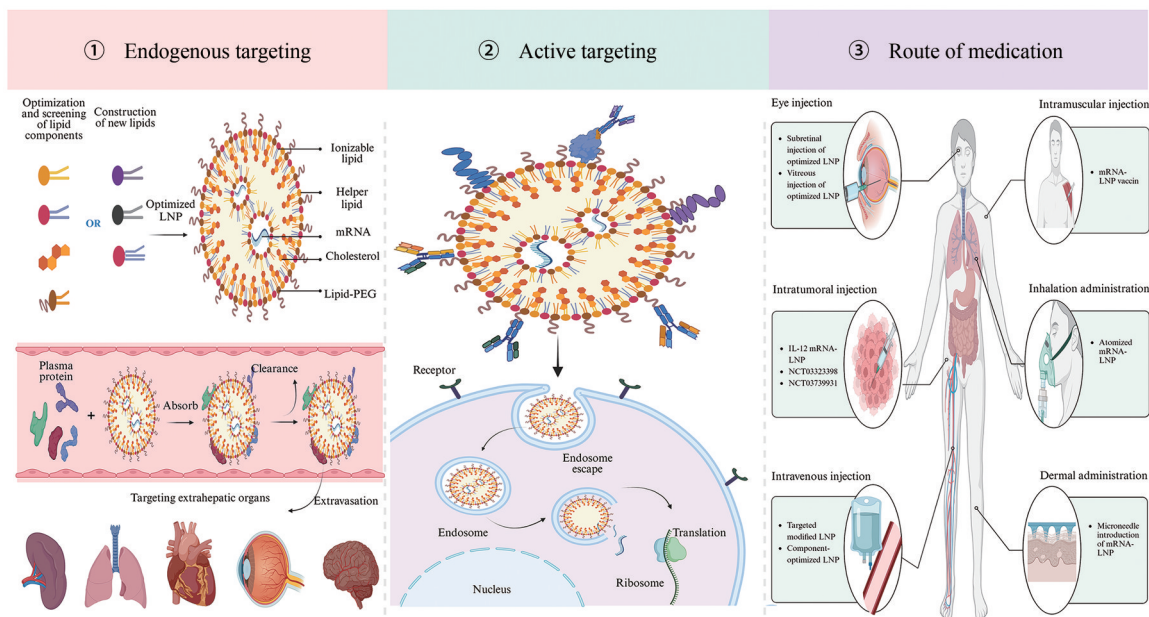


Figure 1 Strategy of mRNA-LNP extrahepatic targeted delivery

LNP的生物分布与其大小、电荷和所用脂质类型与组成之间关系的确切机制<sup>[20]</sup>。但从诸多试验研究中可以发现,LNP组分的优化与筛选及新型脂质结构的构建会影响LNP的内源性靶向,改变组织趋向性(图2)。

### 1.1 LNP组分的优化与筛选

LNP的组分会影响其理化特性和在体内的生物分布,通过优化脂质的组成及比例,可以改变LNP的尺寸、电荷和表面特性。有研究发现,LNP的大小和电荷不同会导致其在血液循环中吸附不同蛋白质形成“蛋白冠”,从而影响LNP在组织器官内的分布<sup>[8]</sup>。根据这一特性可以筛选不同组分的LNP完成对肝外组织的靶向递送。

#### 1.1.1 五组分SORT-LNP的设计

Cheng等<sup>[21]</sup>开发了一种“选择性器官靶向”(selective organ targeting, SORT) LNP的技术,它是通过在传统四组分的基础上添加补充成分SORT分子以调节内部电荷,从而改变组织趋向性,实现mRNA特异递送到肝外组织的策略。通过把季氨基正电荷的脂质1,2-二油酰-3-辅酰胆碱(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)作为SORT分子制备出的五组分LNP,经静脉递送荧光素酶mRNA来评估SORT修饰的效果。结果表明,随着DOTAP摩尔百分比的增加,产生的荧光素酶蛋白表达逐渐从肝脏移动到脾脏,然后移动到肺,显示出了器官特异性递送趋势。该团队为了进一步探索此方法的潜力,以DOTAP类似的方式将带负电荷的1,2-二油酰-*sn*-甘油-3-磷酸(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate, 18PA)作为SORT分子。结果

显示,在10%~40% 18PA加入时, SORT-LNP选择性递送至脾脏。在对SORT-LNP的理化特性和蛋白组学分析后显示, SORT分子化学结构的特异性影响LNP的生物学分布,即表观pKa和血清蛋白相互作用均与传统LNP相比有显著区别。这些特性可能进一步触发了PEG脂质解吸、血浆蛋白吸附并与受体结合及细胞摄取等一系列内源性靶向机制,从而实现了mRNA-LNP在肝外组织的重新分布<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.2 传统四组分的优化

与添加SORT分子制备的五组分LNP相比,对传统LNP的四组分进行优化和筛选也能达到靶向递送的目的,并且会降低制剂的复杂性。Lopresti等<sup>[22]</sup>通过在四组分中替换辅助脂质,制备了靶向肝外的LNP。该课题组用不同带电脂质替换了LNP中的标准辅助脂质二油酰磷脂酰乙醇胺(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE),证明了阴离子脂质和阳离子脂质会介导LNP在不同器官表达mRNA。例如,用DOTAP代替DOPE可使pH=7时的LNP表面正电荷增加5倍,并将肝与肺mRNA表达的比例从36:1改变到1:56。同样,用磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)代替DOPE可将正电荷减少一半,并将肝脏与脾脏mRNA表达的比例从8:1改变为1:3,实现脾脏的LNP靶向递送。

有团队从胆固醇入手来改变LNP的特性以实现肝外器官靶向。Patel等<sup>[23]</sup>通过用不同比例的胆汁酸取代胆固醇,合成了一系列含胆汁酸的C14-4 LNP,并进一步通过体内筛选,鉴定出了一种高度靶向脾脏的

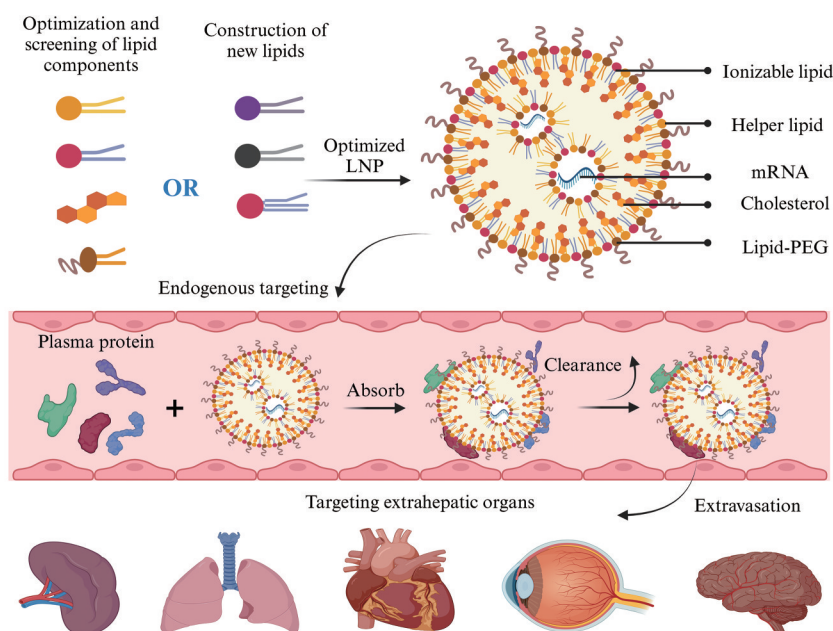


Figure 2 Endogenous targeting mechanism of delivering mRNA-LNP to extrahepatic organs

组合: CA-100 (一种含有胆汁酸且不含胆固醇的四组分LNP)。该团队还发现, 在使用不同可电离脂质 C12-200 的 LNP 制剂中, 用胆汁酸替代胆固醇也将 mRNA 的递送从肝脏转移到脾脏, 表明了这种胆汁酸替代策略是可推广的。

还有团队通过改变 PEG 脂质的摩尔百分比来改变 LNP 的大小。Ryals 等<sup>[24]</sup>试验发现, 含有较少 PEG 脂质 (0.5%) 制备的 150 nm 左右粒径的 LNP 介导了视网膜下和玻璃体内递送 mRNA 最高水平的表达。

### 1.1.3 脂质组分的高通量筛选

测试和比较多种不同脂质组成的 LNP 在体内的组织分布是一项繁重且具挑战性的工作。现如今很多科研工作者相继开发了一系列高通量筛选技术用于 LNP 在人体组织分布的分析。例如, Paunovska 等<sup>[25]</sup>开发了一种名为纳米粒子联合快速 DNA 分析 (joint rapid DNA analysis of nanoparticles, JORDAN) 的高通量筛选技术, 把不同化学性质的 LNP 携带上独特的 DNA 条形码, 并通过流式细胞分选、二代测序技术量化的方法, 筛选出与组织特异性相关的 LNP。随后该课题组进一步将 DNA 条形码和 Cre-Lox 系统相结合开发出纳米粒子递送快速识别 (fast identification of nanoparticle delivery, FIND) 技术<sup>[26]</sup>, 将环化重组酶 (cyclization recombination enzyme, Cre) mRNA (编码 Cre 重组酶, 激活 td-Tomato 荧光蛋白的表达) 和独特 DNA 条形码共同配制的 LNP 给药转基因 td-Tomato 小鼠中, 用流式细胞仪分离 td-Tomato 细胞, 并对细胞进行深度测序以鉴定递送 mRNA 的 LNP。通过采用这种高通量方法可以研究数百种 LNP 在体内靶向细胞的能力并阐明 LNP 结构与体内特异性递送之间的关系, 从而筛选出一类靶向肝外组织的 LNP。例如, Radmand 等<sup>[27]</sup>利用此技术筛选出了一类阳离子胆固醇配制的 LNP, 可以靶向肺干细胞、肝脏和心脏。

总的来说, 调整 LNP 的脂质组成及比例是一种简单有效的方法, 可以操控内源性配体, 使这些配体与 LNP 进一步结合并驱使其在不同组织分布。

## 1.2 新型脂质结构的构建

### 1.2.1 可电离脂质结构的构建

在 LNP 中, 可电离脂质是最关键的组分, 一般占比 50% (摩尔比) 左右, 它在保护 mRNA 和促进胞质转运方面发挥着重要作用。其在酸性 pH 值下带正电荷, 可将 mRNA 包封在 LNP 中; 在生理 pH 值下呈中性, 可以减少与体内生物分子的非特异性吸附, 提高生物相容性将毒性降至最低<sup>[28]</sup>。细胞摄取后, LNP 在酸性内体中质子化, 与带负电的脂质相互作用, 形成不稳定的锥形离子对, 有助于膜融合-破裂、内体逃逸和核酸药

物释放<sup>[29]</sup>。

在结构上可电离脂质包含 3 个部分: 疏水尾部、可电离头基和 1 个连接键<sup>[30]</sup>。疏水尾部决定了脂质的溶解度及其形成圆锥形的能力<sup>[31]</sup>。可电离头基的种类会影响 LNP 的表观 pKa、粒径和内涵体逃逸效率等<sup>[32]</sup>。有研究显示, pKa 值决定了 LNP 的表面电荷, 并进一步影响其与各种类型血浆蛋白相互作用的能力, 从而导致体内分布的差异<sup>[7]</sup>。最后, 连接键将亲水性头部和疏水尾部衔接起来从而产生两性分子。

**1.2.1.1 结构的模块化设计** 围绕可电离脂质结构进行合理的模块化设计, 可以构建新型脂质以改善 LNP 肝外靶向递送。例如, Ni 等<sup>[33]</sup>开发了一种哌嗪核心和 2 个叔胺组成的可电离脂质, 制备的 LNP-A10 可以优先将核酸递送至肝和脾免疫细胞。此外, Eygeris 等<sup>[31]</sup>设计了含有噻吩部分 (硫代脂质) 的可电离脂质, 硫代脂质是通过 Gewald 反应合成, 从而在噻吩环的不同位置使用功能成分进行模块化脂质设计。最后使用 JORDAN 技术, 优化出了两种脂质配方 (20b 和 29d)。根据动物试验结果显示, 20b LNP 能够有效转染肝脏和脾脏, 而 29d LNP 能够在肺和脾脏实现特异性递送。Chen 等<sup>[34]</sup>提出了一个快速创建化学多样性脂质来构建 LNP 的平台, 并成功地识别了一种可电离脂质——iso-A11B5C1, 制备的 LNP 能够在肌肉组织中实现精确的 mRNA 转染。

**1.2.1.2 尾部连接子结构的改变** 尾部连接子的结构亦会影响 LNP 的递送倾向。Qiu 等<sup>[35]</sup>通过胺头和丙烯酰胺尾部之间的迈克尔加成反应合成了一个含酰胺键的脂质 (N 系列 LNP) 库。通过体内筛选, 发现 N 系列 LNP 几乎在全身给药后将 mRNA 递送至肺部。试验进一步发现改变 N 系列 LNP 的胺头结构, 可以靶向不同的肺亚细胞群。并且, 他们之前的研究表明, 尾部含有酯键的 O 系列脂质倾向于将 mRNA 递送至肝脏。LNP 在体内器官的选择性可以通过简单地改变尾部连接子结构来精确调节, 通过把接头从酯键 (称为 O 系列) 转变为酰胺键 (称为 N 系列), LNP 的 mRNA 递送特异性从肝脏切换到肺部。该团队还受到神经递质 (如色胺衍生物) 在血脑屏障渗透机制的启发, 设计出了一种仿生脂质, 成功地将小分子药物、核酸和蛋白质透过血脑屏障传递到神经元细胞中, 实现了有效的脑部递送<sup>[36]</sup>。

**1.2.1.3 多尾可电离脂质的合成** 尾部支链也会影响可电离脂质的性能。多尾可电离脂质相较于普通脂质, 尾部区域的横截面增加, 具有更强的内体逃逸能力。Liu 等<sup>[37]</sup>开发了一类膜不稳定多尾可电离脂质 (iPhos), 优化后的 iPhos 脂质含有 1 个叔胺、1 个磷酸基

团和3个烷基尾部,这种独特结构不仅更容易引起内体膜融合,促进核酸药物释放,还具有组织特异性。构效关系表明,烷基链长度极大地影响了药效和组织选择性:胺侧的8~10个碳长度介导了体内mRNA的高表达,磷酸基团旁的烷基长度则影响了器官选择性,较短的链(9~12个碳)在肝脏中显示mRNA的表达,而较长的链(13~16个碳)会将蛋白质表达转移到脾脏。该团队进一步研究了iPhos是否可以用于SORT技术。结果显示,具有两性离子、可电离阳离子和永久阳离子辅助脂质的9A1P9 iP LNP分别在脾脏、肝脏和肺中实现了mRNA的选择性递送。

### 1.2.2 杂化脂质的合成

杂化脂质的合成可以整合其他成分的优点,以提高mRNA在肝外组织器官的递送效力。例如Xue等<sup>[38]</sup>合成了含有不同硅氧烷胺核心成分和烷基链结构的杂化脂质库。由于硅氧烷这种化学材料具有高稳定性、低化学活性和良好的生物相容性等特点,所以这些脂质被用于制备含硅氧烷的LNP(Si-LNP),并用来评价其递送mRNA的效力。结果表明,Si-LNP不仅可以增强mRNA-LNP的内吞作用,还能提高其从内体中逃逸的能力。更重要的是,含硅氧烷的杂化脂质结构发生轻微的改变就能够显著改变其组织亲和性。例如,Si5-N14靶向肺,Si12-C10则靶向脾脏,这显示出了Si-LNP器官特异性递送mRNA的潜力。

Xue等<sup>[39]</sup>构建了一系列对骨矿物质具有高亲和力的双磷酸盐(bisphosphonate, BP)脂质样材料,用来将mRNA治疗药物有效地递送到体内骨骼微环境中。研究人员对配制成的BP-LNP进行体外筛选后,确定了一种候选制剂490BP-C14。经小鼠体内研究表明,静脉给药后,BP-LNP增强了治疗性骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2) mRNA的靶向递送和分泌。

## 2 主动靶向

与内源性靶向相比,主动靶向的设计度和可控性相对较高,已然成为了靶向递送研究的焦点。LNP的化学结构具有高度可设计性,利用配体-受体的特异性识别,可以对LNP进行配体的功能化修饰,从而达到主动靶向的目的。

基于配体不同的理化性质,主要有两种制备方法<sup>[40]</sup>:一步法和后插入法。其中一步法,即直接将连有靶向配体或者活性官能团的磷脂和其他磷脂辅料共同混合,一步合成LNP。通常小分子配体一般采用一步法合成靶向LNP。该方法可以通过控制靶向配体的进料比来合理调节配体的密度,并且有结果表明,该法制备的脂质体表面配体分布较为均匀<sup>[41]</sup>。后插入法,分为两步,先制备表面带有特殊官能团的预制LNP,再将预制的LNP与靶向配体反应来进行表面偶联或修饰,最终合成靶向LNP。通常抗体(antibodies, Abs)和多肽这样的大分子配体,分子结构复杂且价格昂贵,在一步法制备中,可能因制备条件的影响丧失活性,而且很可能被封装于LNP内部,使得它们无法被识别。鉴于这些问题,可以采用后插入法制备,这种情况下靶向配体仅分布在LNP的外表面,并且密度和功能受表面偶联效率的调节。

采用配体修饰的主动靶向策略分为有机化学反应的非特异性偶联和生物活性结构的特异性位点偶联(表1)。

### 2.1 非特异性偶联

利用靶向配体所具备的高效反应位点(例如胺、巯基和羧基),可以通过有机反应将配体偶联到LNP表面。基于这些官能团的化学活性和反应机制,这类配体的修饰方法被认为是非特异性的。

有机化学反应的非特异性偶联被广泛用于肝外mRNA-LNP的递送。例如,利用巯基-马来酰亚胺反应,可以先将DSPE-PEG-马来酰亚胺脂质和其他脂质组分混合得到预制LNP,再借助有机反应使配体与预制LNP偶联合成靶向LNP。例如,Tombácz等<sup>[42]</sup>修饰CD4抗体合成的靶向Cre-mRNA-LNP能够在体内介导CD4 T细胞的基因重组。而Breda等<sup>[43]</sup>使用CD117抗体修饰LNP表面,使其特异性靶向造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)。经CD117-LNP递送促凋亡蛋白p53上调凋亡调控因子(p53 upregulated modulator of apoptosis, PUMA)的mRNA,能够通过静脉注射直接在体内靶向并诱导HSC的凋亡,实现对HSC移植前的无遗传毒性调控。Rurik等<sup>[44]</sup>利用同样的化学偶联法将编码特定嵌合抗原受体(chimeric

**Table 1** Advantages and disadvantages of different targeting strategies. SPAAC: Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition; FcBP: Fc-binding-protein; ASSET: Anchored secondary scFv enabling targeting

Ligand coupling strategy	Modification method	Advantage	Disadvantage
Non-specific conjugation	Thiol-maleimide reaction	High conjugation efficiency	Products are diverse and uncontrollable
	SPAAC	Applicable to various ligands	Misalignment of targeting ligands
Site-specific conjugation	Bacterial-derived FcBP	High purity	Limited to specific ligand species
	ASSET	Structural specificity	Requirement to pre-code targeting ligands with specific tags or terminus

antigen receptor, CAR) 的 mRNA 包封于 CD5 靶向的 LNP 中。发现 CD5/CAR-mRNA-LNP 能被高效递送至 T 淋巴细胞, 从而在体内产生瞬时有效的 CAR-T 细胞。这种基于 mRNA 的原位 CAR-T 疗法可以避免目前治疗肿瘤时采用的体内回输 CAR-T 细胞而诱发的严重不良反应<sup>[45]</sup>。除了修饰抗体外, Herrera-Barrera 等<sup>[46]</sup>使用基于 M13 噬菌体的七聚体肽库来筛选出能够在体内结合到神经视网膜的肽序列, 并将筛选的肽链有机结合到 LNP 表面, 使 mRNA 成功递送到神经视网膜。

利用应变促进叠氮炔环加成反应 (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) 修饰靶向配体, 也是一种常用的非特异性偶联方法。例如, 将抗体 scFv-N3 共价偶联到二苯并环辛炔 (dibenzocyclooctyne, DBCO) 标记的预制 LNP 上, 所制得的 Ab-LNP 能透过血脑屏障在脑部特异性积累, 以治疗中枢神经系统疾病<sup>[47]</sup>。Geisler 等<sup>[48]</sup>利用 SPAAC 反应合成了一种表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 为靶点的 Ab-LNP, 实现了 mRNA 的胎盘靶向递送。Kim 等<sup>[49]</sup>通过该反应, 将 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-DBCO 与 N 端叠氮乙酰基修饰的细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 结合肽偶联, 修饰后的 LNP 靶向递送磷酸酶和紧张素同系物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) mRNA 可产生有效的抗肿瘤免疫反应, 促进肿瘤细胞自噬和免疫原性细胞死亡, 在原位肿瘤模型中显著抑制三阴性乳腺癌发展。

## 2.2 特异性位点偶联

考虑到抗体的取向会影响它的识别能力, 然而基于有机化学反应的共价修饰策略通常无法控制偶联抗体的取向, 这会导致异质结合和功能障碍。在自然界中, 细菌使用非共价和高亲和力结合模型来偶联免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 的可结晶段 (fragment crystallizable, Fc), 这使得抗原结合片段 (fragment of antigen binding, Fab) 向外部突出, 也避免了宿主巨噬细胞对 Fc 受体介导的吞噬作用<sup>[50]</sup>。受这种现象的启发, Shim 等<sup>[51]</sup>筛选了细菌衍生的 Fc 结合肽 (Fc-binding-protein, FcBP), 通过用 FcBP 标记预制 LNP, 可以在外表面偶联一系列抗体。与基于有机反应的共价偶联相比, 这种 FcBP 的位点特异性偶联可以显著增加偶联抗体的结合密度和控制偶联抗体的取向。

Kedmi 等<sup>[52]</sup>开发了一种利用工程化的重组单链抗体可变区域 (single-chain variable fragment, scFv) 将抗体与 LNP 连接的锚定二抗 scFv 靶向 (anchored secondary scFv enabling targeting, ASSET) 技术。使用这种技术转换 scFv 连接不同抗体即可针对不同的细胞亚群进

行特异性靶向, 是一个实用性强的多功能平台。将 Ly6c 单抗连接至 LNP 表面, 成功将白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) mRNA 递送至 Ly6c 阳性的白细胞中, 在炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 小鼠模型中验证了其治疗潜力<sup>[53]</sup>。后续该课题组使用构象敏感的靶向策略, 用  $\alpha 4\beta 7$  整合素的天然配体 MAdCAM-1 的整合素结合域 D1 和 D2 融合到免疫球蛋白 Fc 上, 并有效地将这种融合蛋白结合到 LNP 的表面, 实现了白细胞的特异性递送, 从而改善了 IBD 的治疗结果<sup>[54]</sup>, 并且这种方法为构象敏感靶向提供了新思路。

## 3 给药途径选择

除了对 LNP 本身优化和修饰外, 选择合适的给药途径也极大影响 mRNA-LNP 制剂的器官分布和治疗效果 (图 3)。

### 3.1 注射给药

#### 3.1.1 静脉注射

静脉注射是 mRNA-LNP 最常用的给药方式, 具有 100% 的生物利用度。但由于血液中 ApoE 的吸附作用, 给药后主要在肝脏积累, 降低了肝外疾病的治疗效果。可以从肝脏富集的机制<sup>[12,13]</sup>入手, 通过改变 LNP 的尺寸、电荷和表面特性来改变 LNP 的蛋白吸附效应, 从而达到将 mRNA 递送到肝外器官的目的<sup>[21-23,27,31,33-35,37]</sup>。不幸的是, 目前对 LNP 特性与体内生物分子的相互作用了解有限, 所以难以预测优化后的 LNP 在体内的靶向行为。相比之下, 在 LNP 表面修饰配体的主动靶向策略设计度和可控性更高, 并能实现高精度靶细胞的特异性递送与 mRNA 表达<sup>[42,44,45,53]</sup>。

#### 3.1.2 肌肉注射

mRNA 疫苗通常使用肌内注射。注射后, mRNA-LNP 主要分布于注射部位的结缔组织和引流淋巴结, 由 mRNA 编码的抗原被抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells, APC) 处理, 并呈递到 T 淋巴细胞进行随后的免疫反应<sup>[55]</sup>。代表性新冠疫苗 mRNA-1273 和 BNT162b2, 及首款上市的 saRNA 疫苗 ARCT-154 均是通过肌肉注射给药。Alameh 等<sup>[56]</sup>开发了一种同时靶向艰难梭菌毒素和毒力因子的多价 mRNA 疫苗。肌肉注射后, 在动物模型中诱导了强大且长期的全身和黏膜抗原特异性体液及细胞免疫反应, 且不会显著破坏肠道微生物群。

#### 3.1.3 瘤内注射

mRNA-LNP 的瘤内注射是靶向癌细胞最简单的给药方法。大多数肿瘤组织具有脉管系统异常、高密度细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和缺少淋巴引流的特点, 这会限制 LNP 从其他注射部位扩散到肿瘤甚至更深层的肿瘤内部<sup>[57]</sup>。因此, 瘤内注射是一种

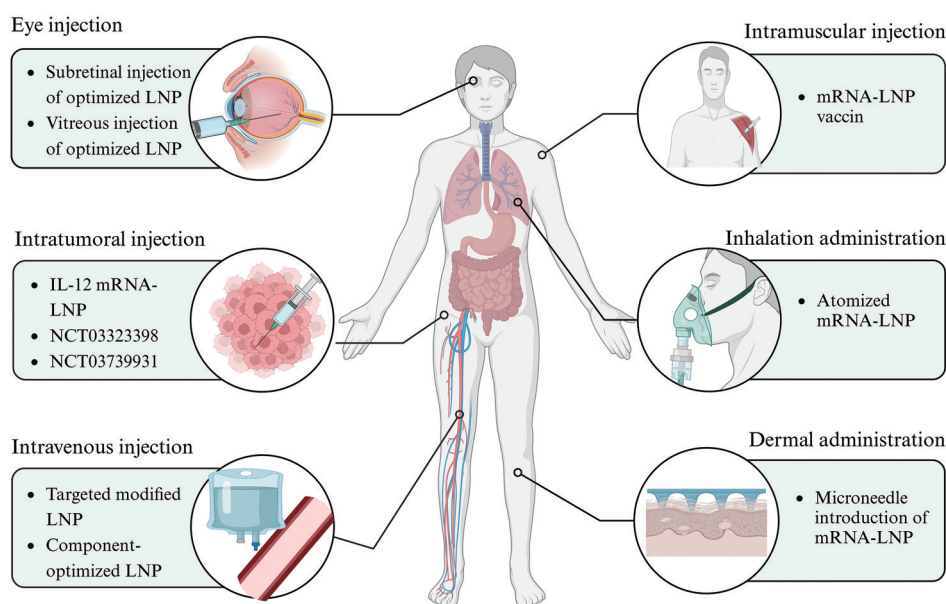


Figure 3 Selection of different routes of mRNA-LNP administration

有效的癌细胞靶向治疗方式。Hewitt 等<sup>[58]</sup>开发了一种编码白细胞介素 12 (interleukin-12, IL-12) 的 mRNA-LNP 瘤内注射制剂, 用于治疗实体瘤。在细胞、多种小鼠模型和肿瘤患者立体培养物中证实了 IL-12 mRNA-LNP 具有强效的抗肿瘤活性。目前, 已有多项基于 mRNA-LNP 瘤内注射的研究进入临床试验<sup>[59]</sup>。例如, mRNA-2416 的 LNP 制剂瘤内注射后可表达 OX40L 蛋白, 用于治疗实体瘤患者 (NCT03323398)。而 mRNA-2752 则是共同编码 OX40L、IL-23 和 IL-36 $\gamma$  的 mRNA-LNP, 旨在诱导促炎性肿瘤微环境, 同时加强 T 细胞扩增和免疫记忆 (NCT03739931)。

### 3.1.4 眼部注射

眼睛的解剖和生理学屏障严重阻碍了药物的渗透与递送, 静脉注射 mRNA-LNP 难以到达靶部位。Patel 等<sup>[60]</sup>发现含有低 pKa 和不饱和碳氢链可电离脂质的 LNP 在视网膜下注射后, 大部分 mRNA 在视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 中表达。还有研究发现含有较少 PEG 脂质的 LNP, 通过玻璃体内注射, 可以将 mRNA 递送到 Müller 细胞、视神经头和小梁网中<sup>[24]</sup>。Herrera-Barrera 等<sup>[46]</sup>将肽配体 LNP 注射到小鼠的玻璃体内后, 该递送系统成功定位并且能够将治疗性 mRNA 靶向递送至小鼠的光感受器 (photoreceptor, PR)、RPE 和 Müller 神经胶质细胞, 扩大了 mRNA-LNP 疗法在遗传性失明中的应用。

## 3.2 吸入给药

肺部给药是治疗呼吸系统疾病的理想方式。对于肺部的 mRNA 递送, LNP 吸入给药具有许多优势: ① 对呼吸道的低毒性、能重复给药和减少全身暴露<sup>[61]</sup>;

② 它的纳米级尺寸使其能封装在雾化液滴中并在肺部富集, 起效快<sup>[62]</sup>。然而, 理想的吸入型 LNP 应具备抗剪切力、黏液渗透、细胞转染率高等特性<sup>[63]</sup>, 这也是开发吸入型 LNP 的主要挑战。

Kim 等<sup>[64]</sup>对一个小型 LNP 制剂库进行了筛选, 确定了一种符合雾化处理的 LNP 制剂, 并命名为可雾化 LNP (nLNP)。nLNP 含有  $\beta$ -谷甾醇和高 PEG 脂质含量, 对雾化过程中的剪切应力具有弹性。此外, 试验结果还表明, nLNP 单纳米颗粒分辨率下在黏蛋白悬浮液中表现出优异的扩散率, 为分泌过多和痰液清除受损的肺部疾病提供治疗策略。Zhang 等<sup>[65]</sup>针对雾化吸入采用实验设计来优化 LNP, 筛选出 4 种先导 LNP (F2、F8、F11 和 F17), 并通过 Aerogen Solo 雾化器雾化。结果显示, 雾化吸入的 LNP 制剂能够在小鼠肺部介导有效的荧光素酶 mRNA 转染, 而没有任何在心脏、肝脏和肾脏中转染的表现。目前, 已有公司开展 LNP 雾化给药的临床试验。专注于 mRNA 疗法的 Translate Bio 公司开发了携带囊性纤维化跨膜传导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) mRNA 的 LNP (MRT5005), 并且完成了在囊性纤维化患者使用时安全性和耐受性的评价<sup>[66]</sup>。

## 3.3 皮肤给药

皮肤是人体最大的器官, 通过皮肤进行局部给药能够将药物富集在疾病部位, 同时最大限度地减少全身性不良反应。LNP 具有高效药物传递性和皮肤亲和性, 可以作为皮肤局部给药的优秀载体, 然而 LNP 在皮肤上的应用多见于化妆品行业。但 mRNA-LNP 系统针对皮肤疾病治疗仍具有广阔的应用前景。Bolsoni

等<sup>[67]</sup>将包载 Cas9 mRNA 的 LNP 通过微针导入皮肤,旨在将基因编辑工具导入到人类皮肤的表皮层从而进行致病基因的原位矫正,以治疗遗传性皮肤病。

#### 4 展望与挑战

近年来, mRNA 药物由原来的“不可成药”靶点转化为“可成药”的靶点在疾病的预防和治疗方面显示出了独特的潜力。为了克服自身稳定性差和对核酸酶敏感的缺点,广泛采用 LNP 作为递送载体。然而, mRNA-LNP 系统的应用有很大局限性: 缺乏肝外靶向能力, 这导致 mRNA 药物的生物利用度较低, 并可能产生脱靶效应, 以及体内毒性。因此, 提高 LNP 靶向肝外器官的能力具有重要的临床意义。

一方面, 可以利用 LNP 在全身给药后的内源性靶向机制, 通过 LNP 组分的优化与筛选和新型脂质结构的构建来改变 LNP 的性质, 进一步影响 LNP 表面与不同蛋白质的相互作用从而达到 LNP 在不同组织器官的趋向性。但目前人们对 LNP 性质与其表面形成的蛋白冠类型之间的关系有待进一步了解, 导致难以预测优化后的 LNP 在体内的靶向行为。mRNA-LNP 递送需要在组织器官、细胞和亚细胞器水平进行全面而深入的体内命运研究, 这对未来药物研发和临床应用至关重要, 同时也是目前缺失和亟待解决的难题<sup>[68]</sup>。究其原因, 一是受检测技术的限制, 二是 mRNA-LNP 在生物体内分布、代谢和排泄的复杂性受多种因素影响。

另一方面, 用配体 (小分子、肽、抗体等) 修饰的主动靶向 LNP 在器官、细胞到细胞器特异性受体的多维和多类型精确靶向方面表现出优势, 被广泛用作肝外递送 mRNA 的策略。然而, 精确可控地调节脂质纳米颗粒表面配体的呈现 (即局部配体密度、配体分布、配体取向和配体构象) 仍然是一个主要挑战。除了对 LNP 本身的优化和修饰外, 选择合适的给药途径也能达到 mRNA-LNP 肝外靶向治疗的目的。但是, 局部注射给药一般适用于已知和可触及病理部位的疾病, 而吸入制剂会涉及到复杂的处方组成与制备。此外, mRNA-LNP 还面临着其他长期存在的问题, 包括体内逃逸不良、潜在的免疫原性和毒性及严格的储存条件等, 限制了其在临床上的广泛应用。

mRNA 疗法作为极具潜力的平台, 可以用于多种不同的领域, 例如癌症疫苗、传染病疫苗、遗传疾病治疗、蛋白质替代疗法等。相信随着体内外稳定性、体内命运和安全性、组织靶向性等一系列问题的深入研究, 还有新兴人工智能和大数据技术的支撑, 假以时日更加安全、高效的递送系统将在创新药领域展现出强大的生命力。

作者贡献: 李蕾负责文献收集、综述撰写和修改; 赵彩利和张宁负责提供撰写思路及修改意见; 李春雷负责全程指导。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

#### References

- [1] Zhu HL, Zhu DD, Chen W, et al. Research advances in lipid- and polymer-based mRNA delivery systems [J]. *Prog Pharm Sci (药科学进展)*, 2022, 46: 347-358.
- [2] Xu SQ, Yang KP, Li RS, et al. mRNA vaccine era-mechanisms, drug platform and clinical prospectation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6582.
- [3] Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20: 41.
- [4] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 759-780.
- [5] Shi LW, Zhang N, Zhu LY, et al. New progress in the research of nanocarriers for mRNA-based therapeutics [J]. *Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术)*, 2024, 19: 45-51.
- [6] Dilliard SA, Siegwart DJ. Passive, active and endogenous organ-targeted lipid and polymer nanoparticles for delivery of genetic drugs [J]. *Nat Rev Mater*, 2023, 8: 282-300.
- [7] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, et al. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2022, 55: 2-12.
- [8] Dilliard SA, Cheng Q, Siegwart DJ. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2109256118.
- [9] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 817-838.
- [10] Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid nanoparticles enabling gene therapies: from concepts to clinical utility [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28: 146-157.
- [11] Wei L, Xue YC. Breakthroughs in mRNA vaccines and innovations in drug development [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2023, 68: 4948-4953.
- [12] Akinc A, Querbes W, De SM, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms [J]. *Mol Ther*, 2010, 18: 1357-1364.
- [13] Pattipeiluhu R, Arias-Alpizar G, Basha G, et al. Anionic lipid nanoparticles preferentially deliver mRNA to the hepatic reticuloendothelial system [J]. *Adv Mater*, 2022, 34: e2201095.
- [14] Schober GB, Story S, Arya DP. A careful look at lipid nanoparticle characterization: analysis of benchmark formulations for encapsulation of RNA cargo size gradient [J]. *Sci Rep*, 2024, 14: 2403.
- [15] Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, et al. Nanomedicines to deliver mRNA: state of the art and future perspectives [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10: 364.

- [16] Han XX, Zhang HW, Butowska K, et al. An ionizable lipid toolbox for RNA delivery [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 7233.
- [17] Kulkarni JA, Witzigmann D, Leung J, et al. On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA [J]. *Nanoscale*, 2019, 11: 21733-21739.
- [18] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 101-124.
- [19] Nunes SS, Fernandes RS, Cavalcante CH, et al. Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2019, 9: 123-130.
- [20] Godbout K, Tremblay JP. Delivery of RNAs to specific organs by lipid nanoparticles for gene therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 2129.
- [21] Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15: 313-320.
- [22] Lopresti ST, Arral ML, Chaudhary N, et al. The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs [J]. *J Control Release*, 2022, 345: 819-831.
- [23] Patel SK, Billingsley MM, Mukalel AJ, et al. Bile acid-containing lipid nanoparticles enhance extrahepatic mRNA delivery [J]. *Theranostics*, 2024, 14: 1-16.
- [24] Ryals RC, Patel S, Acosta C, et al. The effects of PEGylation on LNP based mRNA delivery to the eye [J]. *PLoS One*, 2020, 15: e0241006.
- [25] Paunovska K, Sago CD, Monaco CM, et al. A direct comparison of *in vitro* and *in vivo* nucleic acid delivery mediated by hundreds of nanoparticles reveals a weak correlation [J]. *Nano Lett*, 2018, 18: 2148-2157.
- [26] Sago CD, Lokugamage MP, Paunovska K, et al. High-throughput *in vivo* screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E9944-E9952.
- [27] Radmand A, Kim H, Beyersdorf J, et al. Cationic cholesterol-dependent LNP delivery to lung stem cells, the liver, and heart [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121: e1987166176.
- [28] Zhao YN, He W, Shao QL, et al. Research progress of ionizable lipid nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2292-2299.
- [29] Semple SC, Akinc A, Chen JX, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 172-176.
- [30] Zhang YB, Sun CZ, Wang C, et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery [J]. *Chem Rev*, 2021, 121: 12181-12277.
- [31] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, et al. Thiophene-based lipids for mRNA delivery to pulmonary and retinal tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121: e1987154176.
- [32] Kalita T, Dezfouli SA, Pandey LM, et al. siRNA functionalized lipid nanoparticles (LNPs) in management of diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 2520.
- [33] Ni HZ, Hatit MZC, Zhao K, et al. Piperazine-derived lipid nanoparticles deliver mRNA to immune cells *in vivo* [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 4766.
- [34] Chen JG, Xu Y, Zhou MY, et al. Combinatorial design of ionizable lipid nanoparticles for muscle-selective mRNA delivery with minimized off-target effects [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120: e2309472120.
- [35] Qiu M, Tang Y, Chen JJ, et al. Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioliomyomatosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2116271119.
- [36] Ma FH, Yang L, Sun ZR, et al. Neurotransmitter-derived lipidoids (NT-lipidoids) for enhanced brain delivery through intravenous injection [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eabb4429.
- [37] Liu S, Cheng Q, Wei T, et al. Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing [J]. *Nat Mater*, 2021, 20: 701-710.
- [38] Xue LL, Zhao G, Gong NQ, et al. Combinatorial design of siloxane-incorporated lipid nanoparticles augments intracellular processing for tissue-specific mRNA therapeutic delivery [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024. DOI: 10.1038/s41565-024-01747-6.
- [39] Xue LL, Gong NQ, Shepherd SJ, et al. Rational design of bisphosphonate lipid-like materials for mRNA delivery to the bone microenvironment [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 9926-9937.
- [40] Menon I, Zaroudi M, Zhang Y, et al. Fabrication of active targeting lipid nanoparticles: challenges and perspectives [J]. *Mater Today Adv*, 2022, 16: 100299.
- [41] Wang S, Wang H, Drabek A, et al. Unleashing the potential: designing antibody-targeted lipid nanoparticles for industrial applications with CMC considerations and clinical outlook [J]. *Mol Pharm*, 2024, 21: 4-17.
- [42] Tombácz I, Laczkó D, Shahnawaz H, et al. Highly efficient CD4+ T cell targeting and genetic recombination using engineered CD4+ cell-homing mRNA-LNPs [J]. *Mol Ther*, 2021, 29: 3293-3304.
- [43] Breda L, Papp TE, Triebwasser MP, et al. *In vivo* hematopoietic stem cell modification by mRNA delivery [J]. *Science*, 2023, 381: 436-443.
- [44] Rurik JG, Tombácz I, Yadegari A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury [J]. *Science*, 2022, 375: 91-96.
- [45] Billingsley MM, Gong NQ, Mukalel AJ, et al. *In vivo* mRNA CAR T cell engineering *via* targeted ionizable lipid nanoparticles with extrahepatic tropism [J]. *Small*, 2024, 20: e2304378.
- [46] Herrera-Barrera M, Ryals RC, Gautam M, et al. Peptide-guided lipid nanoparticles deliver mRNA to the neural retina of rodents and nonhuman primates [J]. *Sci Adv*, 2023, 9: eadd4623.

- [47] Ye Z, Gastfriend BD, Umlauf BJ, et al. Antibody-targeted liposomes for enhanced targeting of the blood-brain barrier [J]. *Pharm Res*, 2022, 39: 1523-1534.
- [48] Geisler HC, Ghalsasi AA, Safford HC, et al. EGFR-targeted ionizable lipid nanoparticles enhance *in vivo* mRNA delivery to the placenta [J]. *J Control Release*, 2024, 371: 455-469.
- [49] Kim Y, Choi J, Kim EH, et al. Design of PD-L1-targeted lipid nanoparticles to turn on PTEN for efficient cancer therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11: e2309917.
- [50] Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, et al. Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* [J]. *mBio*, 2013, 4: e00513-e00575.
- [51] Shim G, Kim D, Lee S, et al. *Staphylococcus aureus*-mimetic control of antibody orientation on nanoparticles [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2019, 16: 267-277.
- [52] Kedmi R, Veiga N, Ramishetti S, et al. A modular platform for targeted RNAi therapeutics [J]. *Nat Nanotechnol*, 2018, 13: 214-219.
- [53] Veiga N, Goldsmith M, Granot Y, et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 4493.
- [54] Dammes N, Goldsmith M, Ramishetti S, et al. Conformation-sensitive targeting of lipid nanoparticles for RNA therapeutics [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 1030-1038.
- [55] Zong Y, Lin Y, Wei T, et al. Lipid nanoparticle (LNP) enables mRNA delivery for cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2023, 35: e2303261.
- [56] Alameh MG, Semon A, Bayard NU, et al. A multivalent mRNA-LNP vaccine protects against clostridioides difficile infection [J]. *Science*, 2024, 386: 69-75.
- [57] Kon E, Ad-El N, Hazan-Halevy I, et al. Targeting cancer with mRNA-lipid nanoparticles: key considerations and future prospects [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20: 739-754.
- [58] Hewitt SL, Bailey D, Zielinski J, et al. Intratumoral IL12 mRNA therapy promotes TH1 transformation of the tumor microenvironment [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 6284-6298.
- [59] Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery [J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6: 1078-1094.
- [60] Patel S, Ryals RC, Weller KK, et al. Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye [J]. *J Control Release*, 2019, 303: 91-100.
- [61] Lu L, Li JR, Moussaoui M, et al. Immune modulation by human secreted RNases at the extracellular space [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1012.
- [62] Kim J, Jozic A, Sahay G. Naturally derived membrane lipids impact nanoparticle-based messenger RNA delivery [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2020, 13: 463-474.
- [63] Bai X, Chen QJ, Li FQ, et al. Optimized inhaled LNP formulation for enhanced treatment of idiopathic pulmonary fibrosis via mRNA-mediated antibody therapy [J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 6844.
- [64] Kim J, Jozic A, Lin YX, et al. Engineering lipid nanoparticles for enhanced intracellular delivery of mRNA through inhalation [J]. *ACS Nano*, 2022, 16: 14792-14806.
- [65] Zhang HR, Leal J, Soto MR, et al. Aerosolizable lipid nanoparticles for pulmonary delivery of mRNA through design of experiments [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12: 1042.
- [66] 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]. *J Cyst Fibros*, 2023, 22: 656-664.
- [67] Bolsoni J, Liu D, Mohabatpour F, et al. Lipid nanoparticle-mediated Hit-and-Run approaches yield efficient and safe *in situ* gene editing in human skin [J]. *ACS Nano*, 2023, 17: 22046-22059.
- [68] Cui LL, Zhang Y. Advances in approved nucleic acid drugs and lipid nanoparticle system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 826-833.