



脂质纳米颗粒递送 mRNA 在疾病防治中的应用*

孙伟伦^{1,2)**} 周悌强^{1,2)**} 杨海银¹⁾ 李路伟³⁾ 翁郁华¹⁾ 张金超³⁾ 黄渊余^{1)***} 梁兴杰^{2)***}

¹⁾ 北京理工大学, 生命学院、前沿交叉科学研究院、分子医学与生物诊疗重点实验室、
医药分子科学与制剂工程重点实验室, 北京 100081;

²⁾ 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190;

³⁾ 河北大学化学与环境科学学院, 药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 新型药物制剂与辅料全国重点实验室,
化学生物学重点实验室, 保定 071002)

摘要 近年来, 信使核糖核酸 (messenger RNA, mRNA) 疗法作为一种革命性的治疗手段, 在遗传性疾病、传染病以及癌症治疗领域展现出巨大潜力。然而, mRNA 分子的不稳定性和体内递送的低效性仍是限制其广泛应用的关键挑战。本综述聚焦于脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 作为高效载体在 mRNA 递送系统中的最新进展与应用, 系统地概述了 mRNA 治疗在疫苗、蛋白质替代疗法和基因编辑治疗中的应用, 并基于 LNP 基础四组分的改造、第五组分的引入、表面改性以及机器学习辅助 LNP 迭代开发等四个方面, 详细介绍了工程化修饰 LNP 的方式以及在治疗中的应用。

关键词 脂质纳米颗粒, mRNA, 工程化, 靶向性

中图分类号 R392, R730.5

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0316

核酸疗法作为一种基于基因水平调控蛋白质的治疗方法, 在蛋白质缺失或突变引起的疾病治疗中有着巨大应用潜力, 同时相比基于蛋白质水平的治疗方法具有更长的治疗半衰期^[1]。基于 DNA 的核酸疗法需要将 DNA 递送至细胞核内, 经过转录翻译才能发挥疗效, 但该疗法伴随着基因整合过程中造成的基因突变风险^[2]。相比之下, mRNA 只需要递送至细胞质中即可启动翻译而发挥功能, 药效产生速度更快, 并能避免基因整合引起的安全隐患^[3]。随着严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) mRNA 疫苗的获批并在预防新型冠状病毒感染 (COVID-19) 大范围传播中取得卓越成效, mRNA 疫苗获得了 2023 年诺贝尔生理学或医学奖, 与此同时 mRNA 治疗也快速发展为生物医学领域重要的研究方向^[4]。

目前, mRNA 治疗主要包括 mRNA 疫苗、蛋白质替代疗法以及基因编辑。mRNA 编码抗原可作为治疗型疫苗或预防性疫苗, 即 mRNA 疫苗。相比于灭活疫苗以及重组蛋白疫苗, mRNA 疫苗无需佐剂即可诱导有效的免疫反应, 同时 mRNA

能够通过翻译在胞质产生抗原蛋白, 并被主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC-I) 呈递诱导 CD8⁺ T 细胞免疫反应, 产生更全面的保护^[5]; 此外, 相对于病毒载体疫苗, mRNA 只是瞬时表达抗原蛋白, 避免了病毒载体感染细胞后可能引发基因整合而导致的安全隐患^[6]。同时 mRNA 也能够编码细胞因子、抗体等治疗型蛋白质或者基因编辑元件, 用于替代蛋白质药物, 能够有效地延长蛋白类治疗药物的半衰期。

然而, mRNA 药物面临的主要难点是如何成功地进入胞内发挥作用。首先, mRNA 是一种带负电荷且亲水性的分子, 难以穿过同样带负电荷且疏水性的细胞膜而进入胞内; 其次, 它需要面临无处不在的 RNA 酶降解, 极其容易因结构被破坏而

* 国家重点研发计划 (2021YFA1201000, 2021YFC2302400), 国家自然科学基金 (32171394, 82302387, 32001008), 河北省创新能力提升计划 (22567632H) 和中国博士后科学基金 (2023M740259) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

梁兴杰 Tel: 010-82545615, E-mail: liangxj@nanoctr.cn

黄渊余 Tel: 010-68911089, E-mail: yyhuang@bit.edu.cn

收稿日期: 2024-07-12, 接受日期: 2024-09-14

失去作用。因此，需要合适的递送载体保护 mRNA 防止其被酶降解并有效递送至胞质^[7]。

mRNA 药物递送载体主要有脂质类材料、聚合物、蛋白质衍生物和外泌体等，其中脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 是常用的先进 mRNA 递送载体，它的出现是推进 mRNA 疫苗获批的重要原因，也为其他 mRNA 治疗领域提供了方向^[8]。LNP 是由可电离脂质、磷脂、胆固醇和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 化脂质这四种组分构成，可增强 mRNA 的稳定性以及提高 mRNA 转染功效^[9]。面对临床疾病治疗的复杂性及多样性，现有 LNP 的结构、性质和功能过于单一，并且缺乏靶向递送能力会造成脱靶的风险。对 LNP 进行多种组分的调整或者通过多种方式对其功能化 (例如对其基本组分的替换与优化、引入第五组分以及对其表面修饰等多种方式)，可以使 LNP 具有更精准的靶向能力或赋予 LNP 额外功能，以协同增强 mRNA 治疗的功效，来应对临床对核酸疗法的需求^[10]。

本文首先综述了 mRNA 疗法不同的应用领域，以及其在不同领域的优势。其次，归纳了 LNP 组分改造与优化、引入第五组分以及表面改性这三种工程化脂质纳米颗粒的方法，并阐述了机器学习在 LNP 迭代开发的应用。最后，探讨了工程化脂质纳米颗粒的应用。因此，本综述可为工程化脂质纳米颗粒递送 mRNA 治疗疾病的合理设计提供参考方法。

1 mRNA 疗法的应用领域

随着 SARS-CoV-2 mRNA 疫苗取得成功，mRNA 疗法引起广泛的关注，其巨大应用潜力也得以挖掘。mRNA 疗法主要包括 mRNA 疫苗、治疗型蛋白质替代疗法以及基因编辑等。相比于传统疫苗，mRNA 疫苗具有自佐剂功能，并且能在安全剂量范围内有效激活细胞免疫^[11]。同时，理论上 mRNA 能够通过序列设计表达任何蛋白质，给因基因突变或缺失引起的疾病治疗带来了希望^[12]。并且基于 mRNA 的基因疗法避免了传统基因疗法因基因整合导致的基因组突变的风险^[13]。相比传统疗法，mRNA 疗法在不同的应用领域均具有特定的优势。

1.1 mRNA 疫苗

mRNA 疫苗的出现是疫苗开发史的一场变革，其作用机制如图 1 所示。传统疫苗的开发周期通常

要达到 10 年以上，而针对 SARS-CoV-2 的 mRNA 疫苗仅用了不到一年时间就完成了开发，并获得了美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的审批并投入使用^[14]。mRNA 疫苗快速发展得益于其优越的技术平台，在完善且成熟的技术条件下，获得目标抗原的基因序列，只需要改变体外转录 (*in vitro* transcription, IVT) 过程中 DNA 模板开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的序列，即可得到编码目标抗原序列的 mRNA，使 mRNA 疫苗的快速开发成为可能，以应对突发的传染性病原体的扩散传播^[15]。

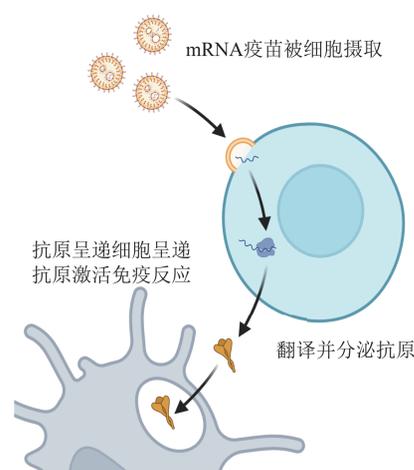


Fig. 1 Mechanism of mRNA vaccine

图1 mRNA疫苗作用机制

mRNA 疫苗相比于传统疫苗，例如灭活疫苗、重组蛋白疫苗和减毒活疫苗等，也具有自身的优势。减毒活疫苗无法在免疫系统疾病患者以及老年患者中使用，而 mRNA 疫苗能够在安全使用的前提下诱导免疫反应^[16]。通常灭活疫苗和重组蛋白疫苗的免疫原性不足，需要与佐剂共同递送才能诱导足够的免疫反应。此外，这两类疫苗经接种后，宿主的免疫细胞通常只能将其识别为外源性抗原，被免疫细胞内吞后通过内涵体内的 MHC-II 呈递，仅能够有效激活 CD4⁺ T 细胞激活体液免疫^[17]。而当 mRNA 疫苗被递送至胞质进行翻译后，表达的抗原被识别为内源性抗原被 MHC-I 识别并呈递，有效地激活抗原特异性的 CD8⁺ T 细胞，诱导机体对病原体更全面的保护，同时也使肿瘤的预防和治疗成为可能^[18]。

1.1.1 预防性 mRNA 疫苗

预防性疫苗主要指在机体接触病原体前，将病

原体的抗原接种至机体内, 使机体的免疫细胞识别抗原并产生针对抗原的适应性免疫反应, 从而在面临病原体感染时能够将其快速清除^[19]。这类疫苗的开发通常是针对于传染性病原体的预防, 也有用于肿瘤高风险人群的预防。目前基于mRNA的传染性病原体预防性疫苗正在被广泛研究并开发, 其中包括SARS-CoV-2、流感病毒、狂犬病毒、寨卡病毒、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 和埃博拉病毒等病原体疫苗。

目前最具代表性的传染性病原体预防性mRNA疫苗就是针对SARS-CoV-2的两款疫苗, mRNA-1273和BNT162b2, 这两款疫苗均能有效地激活抗原特异性的体液免疫和细胞免疫反应, 对遏制COVID-19大范围传播做出巨大的贡献^[20]。虽然这两款疫苗有一定微弱的副作用, 但是暂时并没有产生严重副作用的病例报道。后续研究基于LNP递送编码新冠病毒Spike蛋白的受体结合区 (receptor-binding domain, RBD) 的mRNA (图2a), 精准地针对抗原中和位点刺激机体产生中和抗体, 形成有效保护^[21]。

流感病毒是另一大危害人类健康的呼吸道病原体, 每年有数十万人死于流感, 流感病毒mRNA疫苗在加速研发中。流感病毒血凝素 (hemagglutinin, HA) 能够结合宿主细胞唾液酸受体, 并在内涵体酸性环境中介导膜融合释放病毒基因。它是流感病毒感染宿主细胞最关键的抗原, 针对HA的mRNA疫苗已经有了大量研究, 并能够在机体诱导针对HA的抗体, 为病毒感染提供有效防护^[22]。然而, HA突变频率较高是疫苗失效的重要原因。由于mRNA高容量性质, 使得超多价疫苗的开发成为可能, 研究人员使用编码了20种亚型流感病毒HA序列的mRNA构建了20价流感疫苗, 能够使机体产生识别目前出现所有亚型流感病毒的抗体, 起到广泛有效的保护^[23]。McCafferty等^[24]发现, 诱导这种双重抗原靶向细胞介导的免疫反应, 可能对高度突变Spike蛋白变体提供更好的保护, 中和抗体反应, 减轻未来SARS-CoV-2变体的感染突破和疾病严重程度 (图2d)。另外, 为了进一步加强防护作用, 从流感病毒突变频率较低的抗原入手开发疫苗, 例如编码流感病毒神经氨酸酶 (neuraminidase, NA)^[25]、膜外离子通道蛋白 (M2e)^[26]以及核蛋白^[27]等, 这类抗原疫苗能够使机体产生识别多种亚型病毒的抗体。不过这类疫

苗的保护效果略低于针对HA的疫苗, 其更依赖于抗体Fc效应器功能以及细胞免疫的保护。

除了SARS-CoV-2和流感病毒, HIV^[28]、呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)^[29]等病原体的疫苗也在研发中。总体而言, mRNA疫苗相对于传统疫苗类型, 在有效性和安全性等方面都有着巨大的优势, mRNA疫苗的出现也使多种病原体预防成为可能。

1.1.2 治疗性mRNA疫苗

治疗性疫苗是指在机体已经接触病原体或者患有肿瘤的情况下, 机体无法对感染的病原体或者肿瘤细胞抗原产生有效的免疫反应, 此时就需要额外接种编码抗原的疫苗, 使机体产生对病原体或肿瘤细胞的免疫反应, 以达到治疗效果^[30]。

慢性乙型肝炎病毒 (chronic hepatitis B, CHB) 引发的感染对于全世界人类来说是一个重大的公共卫生隐患, 乙型肝炎病毒的感染会大大提高肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌的风险^[31]。目前临床使用的药物无法做到病毒完全清除, 而已有的传统类型治疗性疫苗也尚未做到乙肝病毒的有效清除和抗体的血清转化。mRNA疫苗由于其优越的性能, 在诱导强烈的先天免疫激活、高水平病毒特异性抗体、记忆B细胞和T细胞等方面表现出有效且持续的病毒学抑制 (图2c), 在抗乙型肝炎治疗性疫苗的开发方面展现出美好前景^[32]。

除此之外, 癌症治疗是治疗性疫苗应用最广泛的领域。肿瘤抗原分为肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原。肿瘤相关抗原是指在肿瘤细胞中过量或异常表达的一类蛋白质抗原, 但是在某些正常的细胞中也会有少量的表达; 肿瘤特异性抗原是指从肿瘤细胞基因组在遗传变化的过程中导致突变的蛋白质抗原, 这类抗原只在肿瘤细胞中特异性表达^[33]。Chen等^[34]筛选出了一种基于可电离脂质 (113-O12B) 的淋巴结靶向LNP, 可以将编码全长抗原和抗原肽的mRNA有效地递送到淋巴结中的抗原呈递细胞中, 从而能够有效抑制B16模型小鼠的肿瘤进展, 协同抗PD1疗法能够达到40%的治愈率。Freyn等^[35]利用LNP封装具有多种流感病毒抗原的mRNA疫苗, 在小鼠模型中诱导具有较强的免疫反应 (图2b)。通过mRNA编码肿瘤抗原, 激发机体对肿瘤抗原的适应免疫, 通过机体自身的免疫系统达到杀伤肿瘤的效果。目前已有多项关于肿瘤治疗性mRNA疫苗的临床试验, 例如, mRNA-4157作为一种个性化疫苗 (NCT03313778), 可编

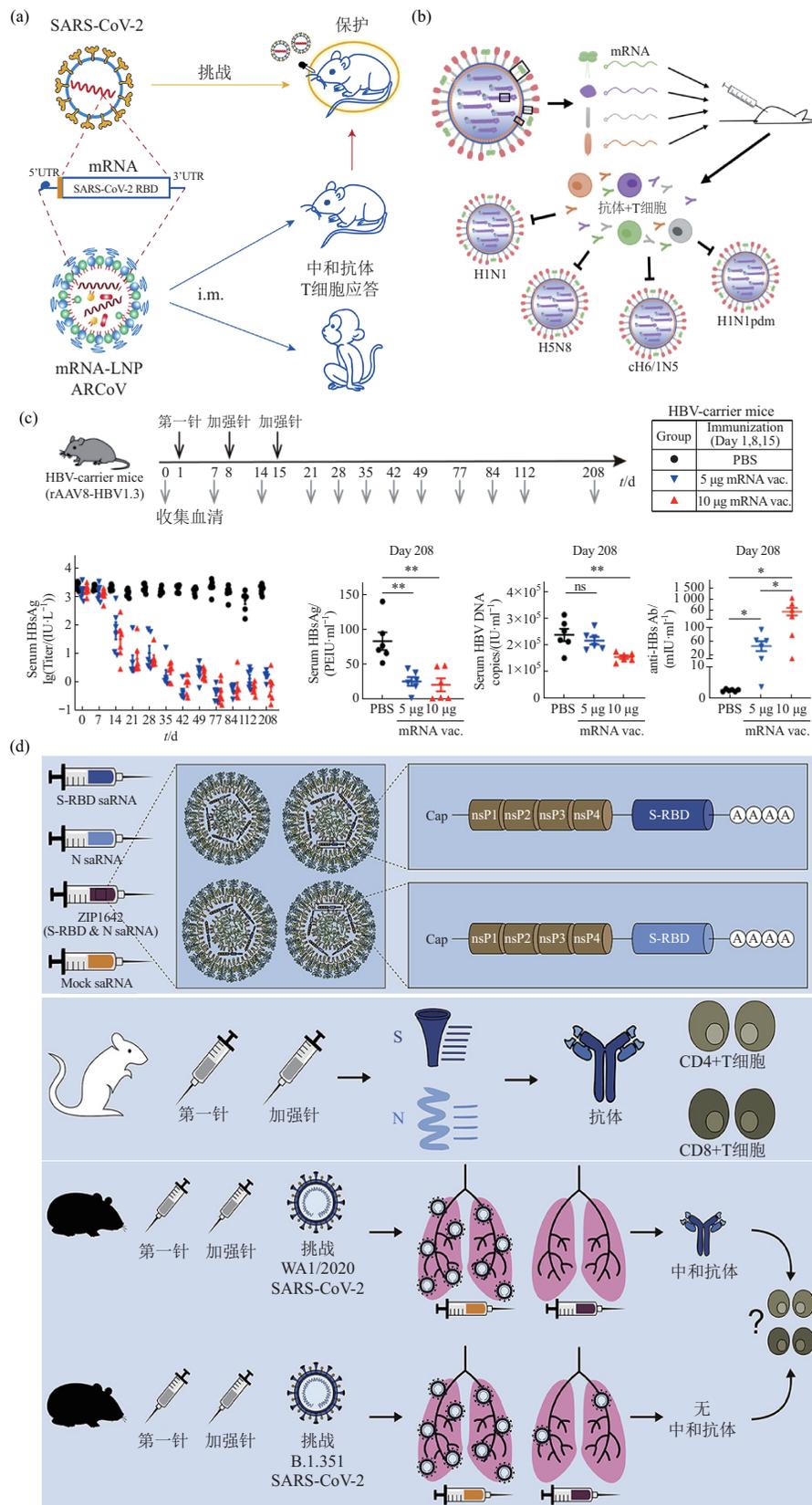


Fig. 2 Application of mRNA vaccine

图2 mRNA疫苗的应用

(a) 以SARS-CoV-2的Spike蛋白的RBD结构域作为抗原,有效激活免疫产生中和抗体,保护机体免受病毒感染^[21]。(b) 四价通用型流感mRNA疫苗诱导机体产生同时识别HA、NA、M2e和NP抗原的广谱免疫反应^[35]。(c) HBV mRNA疫苗诱导了有效且持续的病毒抑制,并实现了有效的血清转化^[32]。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(d) 二价新冠mRNA疫苗靶向细胞介导的免疫反应能够识别多种变体新冠病毒并产生保护^[24]。

码新抗原诱导免疫反应, 用于黑色素瘤、膀胱癌等实体瘤在肿瘤切除后的复发转移抑制, 结果显示, mRNA-4157可诱导新抗原特异性T细胞, 耐受性良好^[36]。

1.2 蛋白质替代疗法

蛋白质替代疗法是指通过使用 mRNA 编码目标蛋白质来翻译和补充无法正常表达或不足量表达的蛋白质, 以及因基因突变导致功能丧失的异常蛋白质, 从而实现疾病的治疗。相比传统的蛋白质疗法, 蛋白质替代疗法有着更长的半衰期以及更低的成本^[37]。

这类疗法可通过使用 mRNA 编码细胞因子, 例如 IL-12、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 等, 调节免疫反应, 用于抗炎或者促炎治疗, 或者编码抑癌基因 PTEN、p53 等恢复肿瘤细胞抑癌功能来达到对肿瘤增殖的抑制^[38]。Xu 等^[39]利用高通量筛选的肺

靶向 LNP 递送编码 IL-12 的环状 RNA (circRNA), 基于单次的注射给药或气管滴注局部给药, 延长 IL-12 的表达时间, 在肺癌的肿瘤微环境中激活了强效的免疫反应, 有效抑制了肿瘤的生长 (图 3a)。此外, 该类疗法也可以编码因遗传疾病导致蛋白质缺失的疾病, 例如肺表面活性蛋白 B (surfactant protein B, SP-B) 缺失引起的急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[40]、囊性纤维化跨膜转导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 缺失引起的肺囊性纤维化^[41]和 α_1 抗胰蛋白酶缺乏症 (alpha-1 antitrypsin deficiency, AATD) 引起的慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等疾病^[42], 能够通过 mRNA 编码遗传原因所致缺失或功能丧失的蛋白质达到治疗效果。

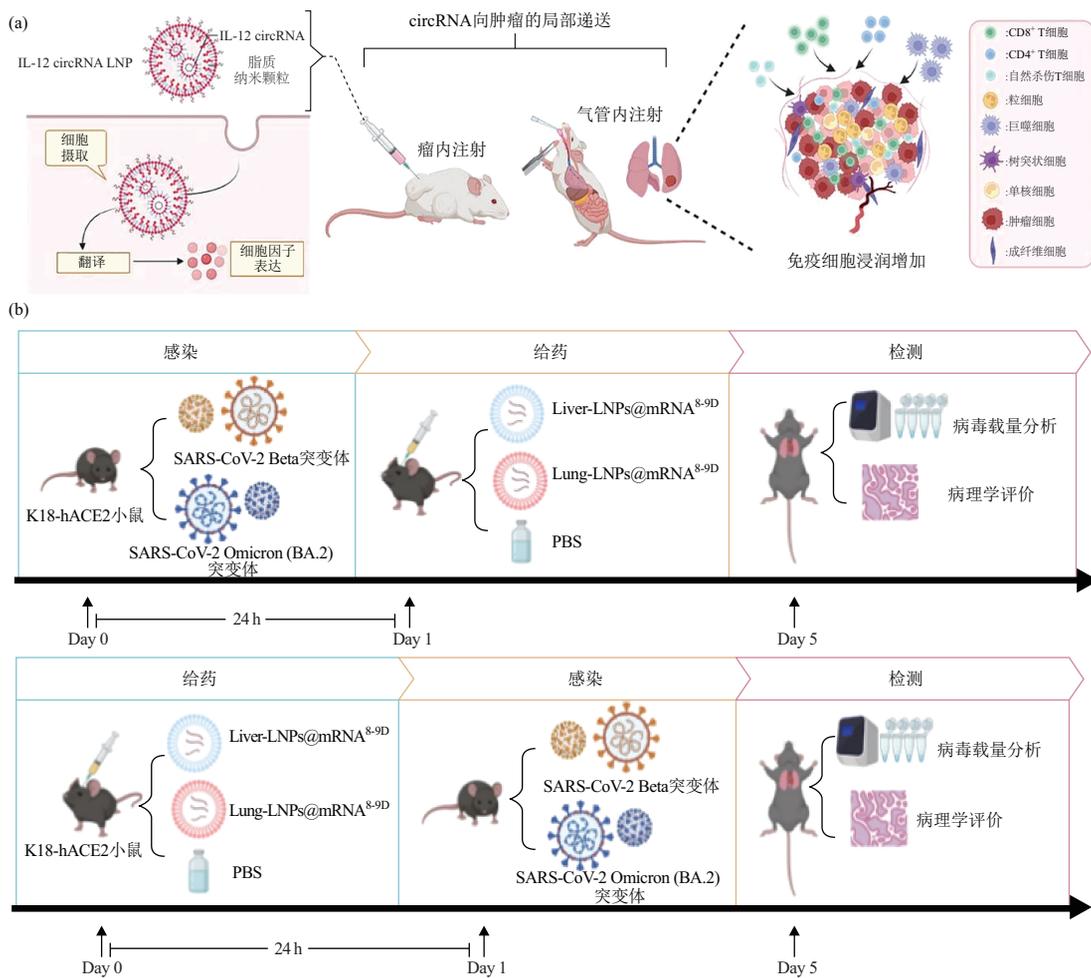


Fig. 3 Application of mRNA in protein replacement therapy

图3 mRNA在蛋白质替代疗法中的应用

(a) 原位接种编码IL-12的mRNA能够激活肿瘤微环境中的T细胞抑制肿瘤生长^[39]。(b) 肺靶向LNP递送广谱新冠抗体8-9D有效预防和治疗新冠病毒感染^[43]。

同时, 该类疗法也可以表达治疗性抗体治疗疾病, Tai等^[43]基于开发了一种肺部靶向的LNP, 并筛选了应对病毒感染后仍能够维持与RBD结构域高亲和力的抗体8-9D, 通过肺靶向LNP递送该抗体序列mRNA, 经静脉注射能够特异性在肺部表达抗体, 预防SARS-CoV-2 Beta和Omicron多种变体的感染(图3b), 并在感染24 h后进行治疗也能实现接近100%的保护效果, 减轻病症。另外, 该类疗法也可以通过mRNA在体内或者体外构建工程化的细胞, 例如CAR-T细胞、CAR-M细胞及TCR-T细胞等, 与常用的通过病毒将工程化DNA插入宿主细胞的方法相比, mRNA由于具有瞬时表达和无插入诱变风险等多重优势, 有效对癌症、纤维化等疾病进行治疗^[44]。

1.3 基因编辑疗法

基因组编辑技术可以将目的基因删除、插入到宿主的基因组中来改变宿主的基因表达。CRISPR以及CRISPR相关蛋白9(Cas9)构建的系统是高度精确且易于设计的第三代基因编辑平台, 于2020年获得诺贝尔化学奖^[45]。CRISPR/Cas9技术由两个组分构成: 一部分是作为DNA剪刀的核酸内切酶Cas9, 另一部分是引导Cas9到目标基因序列的单指导RNA(single guide RNA, sgRNA)^[46](图4)。目前, CRISPR/Cas9系统能够以RNA、DNA以及核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)的形式递送, 而编码Cas9的mRNA与sgRNA共同递送相比其他两种方式有着更高效且安全的优势^[47]。

Miller等^[48]于2017年报道, 首次成功将编码Cas9蛋白的mRNA与相应的sgRNA共递送, 实现了永久性的DNA编辑, 蛋白质表达持续保持在较低水平, 并实现Cas9 mRNA和sgRNA的静脉内共同递送诱导了工程小鼠肝脏、肾脏和肺中tdTomato的表达, 使Cas9 mRNA递送系统用于疾病治疗成为可能。后续Han等^[49]使用mRNA编码并递送Cas9系统有效抑制了抗凝血酶的表达, 将mRNA基因编辑策略持续地用于治疗血友病。目前mRNA编码的Cas9系统在肿瘤治疗中也有着广泛的应用, 例如, Rosenblum等^[50]使用Cas9 mRNA和sgRNA, 在体内胶质母细胞瘤中实现了70%的基因编辑和50%的肿瘤抑制。另外还使用表皮生长因子受体(EGFR)靶向sgRNAs, 在EGFR过表达的卵巢癌细胞中实现了80%的基因编辑, 用于治疗播散性肿瘤, 减少了肿瘤细胞的扩散, 显著延长了荷瘤小鼠的生存期。

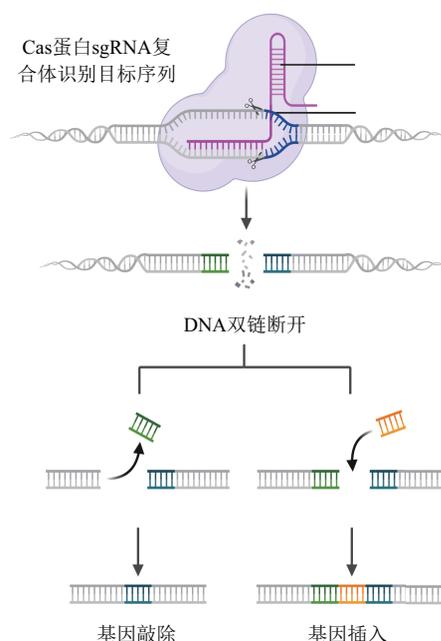


Fig. 4 Gene editing process by CRISPR/Cas9

图4 CRISPR/Cas9基因编辑过程

2 脂质纳米颗粒

基于mRNA的治疗虽然具备以上的诸多优势, 但是mRNA同时存在着稳定性差、难以进入胞质发挥作用等难题^[51], 因此合适的递送载体对于mRNA治疗至关重要。LNP是目前临床上应用最为广泛的核酸药物递送载体, 它能将mRNA递送至胞质表达目标蛋白质(图5), 与其他递送载体相比, LNP具有包封率高、转染效率高、制备简单、结构稳定以及安全性好等诸多优势^[52-53]。2018年用于治疗遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性诱导的多发性神经病的首款siRNA药物(Onpatro), 就是基于LNP作为递送载体^[54]。针对COVID-19的mRNA疫苗(BNT162b2和mRNA-1273)能够紧急授权投入使用, LNP同样起到了关键的作用。LNP在mRNA药物递送方面的优异性能得到了广泛研究和临床应用的认可, 目前已有近80种基于LNP为递送载体的基因药物进入临床开发阶段, 大大加速了基因治疗的发展^[55]。

LNP通常由四种脂质组成: 可电离脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG化脂质。每一种成分都对于LNP的稳定性、转染能力和安全性至关重要^[56]。

可电离脂质是LNP中占比最高的组分,这一脂质组分在中性环境中不携带电荷,而在酸性环境中携带正电荷。LNP在酸性环境中自组装制备过程中,正电荷的可电离脂质通过静电相互作用与负电荷的mRNA相结合,将mRNA有效地负载到LNP中^[57];除此之外,可电离脂质通过改变LNP表面电荷而控制其内化过程,在血清的中性环境中,LNP不携带电荷,减少了与血清蛋白相互作用导致的聚集,进而减少了被单核巨噬细胞吞噬清除的命运,延长了药物的半衰期,同时降低了传统永久性阳离子脂质带来的毒副作用。当LNP被细胞内吞至内涵体中后,由于内涵体的酸性环境使LNP携带正电荷,促进了LNP与内涵体膜的相互作用,使mRNA释放到胞质,提高转染效率^[58]。

辅助脂质主要是磷脂,这一组分对于LNP结构的形成以及稳定性至关重要,并且能够促进LNP与内涵体膜的融合促进mRNA的释放。目前应用最为广泛的两种磷脂是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)和1,2-二油酰基-sn-磷酸胆碱(DOPE)。DSPC相变温度高,稳定性更好,而DOPE具有锥形结构,能够促进六方相的形成并提高mRNA的转染效率^[59]。

胆固醇是细胞膜的天然组分,也是构建LNP的关键组分之一,其在LNP中的占比仅次于可电离脂质。胆固醇主要存在于LNP的外壳中,它能够调节LNP的稳定性,增加LNP在体循环过程中的循环时间,并能够增加膜的流动性和渗透性,促进mRNA的释放过程^[60]。PEG化脂质在LNP的自组装过程中,PEG链从载体表面延伸,形成亲水

性空间屏障,防止聚集有效控制LNP的粒径。同时在体循环过程中有效地减少血清蛋白的吸附,增加LNP的稳定性并提高LNP的循环时间^[61]。

PEG化脂质是LNP中占比最小的成分,然而其作用却也同样重要,并且其用量以及PEG的分子质量需要精准的控制,因为高用量或高分子质量的LNP虽然能够减少血清蛋白吸附,稳定性更好,同时也会减少与细胞膜的相互作用减少细胞的内吞,并且在内吞后也会减少LNP与内涵体膜的相互作用,影响LNP将mRNA释放到胞质的过程^[62]。

3 工程化脂质纳米颗粒的构建

LNP作为递送载体在mRNA治疗中的作用已经毋庸置疑,但在实际应用中仍存在许多问题。例如,LNP在经过体循环后通常在肝部富集,对于肝以外的器官靶向是一个难题^[63];另外,LNP作为一种多组分构成的纳米载体,除了载体之外的功能过于单一,无法有效地协同mRNA治疗。这一部分内容将总结工程脂质纳米颗粒的策略,包括基于LNP经典四组分的改造、第五组分脂质的引入以及对LNP进行表面改性修饰。

3.1 LNP经典四组分的改造

作为LNP最核心组分,可电离脂质是LNP工程化的首要目标。目前并没有明确标准作为可电离脂质改造的规律,因此通常需要庞大的可电离脂质库。可电离脂质通常以氨基头基、内接头和疏水尾组成,以这三部分基团为模块,进行排列组合,将不同模块组装形成一系列可电离脂质,而后通过体内外高通量筛选找出具有高转染性能且具有功能化的可电离脂质^[64]。Miao等^[65]从基于不饱和脂质尾部、二氢咪唑接头和环胺头基合成的可电离脂质库中筛选出了具有杂环胺头基的可电离脂质,杂环胺头基能够通过刺激干扰素基因的细胞内刺激因子(stimulator of IFN genes, STING)通路促进抗原呈递细胞的成熟,用于mRNA疫苗的制备。Xue等^[66]利用双膦酸盐(bisphosphonate)对骨亲和力强的特点,将双膦酸盐引入到脂质体中,合成了一系列含双膦官能团的可电离阳离子脂质库,并以双膦酸盐与骨的高亲和力为基础,通过尾静脉注射将mRNA有效地递送到骨微环境中(图6a),用于骨折愈合的治疗。Han等^[67]通过可降解的连接物,以两条分支尾方式附加到一种氨基酸类脂质上,构建了可降解支链类可电离脂质库,该类脂质含有两

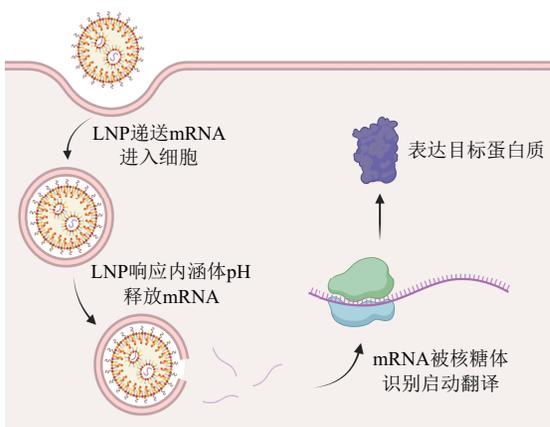


Fig. 5 LNP delivers mRNA to cytoplasmic for expression of target protein

图5 LNP递送mRNA至胞质表达目标蛋白质

条短体尾, 在显著提高 mRNA 的传递效率的同时, 能够在机体内快速降解, 从而提高了安全性。

以磷脂为组分的辅助脂质通常也存在着功能单一的问题, 在磷脂结构的基础上进行功能化改造也是工程化 LNP 改造方式之一。Liu 等^[68] 开发了数百种称为 iPhos 的可电离磷脂, 优化的 iPhos 脂质由一个 pH 可切换的两性离子和三个疏水尾组成, 在内体酸性环境中呈锥形, 促进膜六方转化和随后的内体货物释放, 经该可电离磷脂构建的 LNP 递送 mRNA 的转染效率相比于经典的 DSPC 提高了 40 倍, 而相比于 DOPE 提高了 965 倍, 并且通过优化 iPhos 的化学结构可以控制 LNP 在体内的功效和器官选择性。磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 是衰老细胞释放给单核巨噬细胞的“吃我”信号, Luozhong 等^[69] 将含有 PS 结构的磷脂二油酰基磷脂酰丝氨酸 (DOPS) 作为辅助脂质构建 LNP, PS 释放的“吃我”信号来增强单核细胞对 LNP 的内吞, 来实现次级淋巴结的靶向递送 (图 6d)。

胆固醇主要功能是维持 LNP 的稳定性以及促进膜融合, 在此基础上可以进行一些改造。Paunovska 等^[70] 发现, 胆固醇在体内被自然酯化和氧化形成胆固醇变体, 这些胆固醇变体参与构建的 LNP 能够通过其表面结合的脂蛋白 (包括低密度脂蛋白 (LDL) 和极低密度脂蛋白 (VLDL)) 在体内进行差异性运输 (图 6c), 结果发现, 与小鼠中所有测试的细胞类型进行比较时, 用酯化胆固醇配制的 LNP 比用常规胆固醇或氧化胆固醇配制的 LNP 能够更有效地将核酸递送至胞质进行转染, 并且含有胆固醇油酸酯的 LNP, 能够更有效地将核酸递送至肝内皮细胞中。而 Patel 等^[71] 通过胆固醇类似物的构效分析发现, 将 C-24 烷基植物甾醇掺入 LNPs 中可增强核酸的递送效率, 并且烷基尾部长度、甾醇环的柔韧性和 -OH 基团引起的极性是维持高转染所必需的。

最后, PEG 化脂质的改造也能够用于工程化 LNP。在 LNP 递送 mRNA 的过程中, PEG 化脂质是一把双刃剑。虽然 PEG 能够延长 LNP 体循环的时间, 同样 PEG 也会减少 LNP 与细胞的接触, 导致转染效率降低。对 PEG 化脂质的改造已经展开了大量的研究, 比如对 PEG 分子质量和 LNP 组分占比进行优化。目前认为 LNP 中含有摩尔比为 1.5% 的分子质量为 2 000 u 的 PEG 化脂质能够最小化 PEG 对 LNP 递送 mRNA 效率的影响, 并能够显

著提高 LNP 的稳定性以及体内循环时间^[72]。此外, 在 PEG 化脂质在应用中也存在着一定的弊端。例如 PEG 化 LNP 诱导免疫系统产生 anti-PEG 的 IgM, 其选择性地与再次接种的 PEG 化脂质体中的 PEG 分子相互作用, 导致补体激活。补体反应通常由细胞表面蛋白质控制, 以防止对正常组织的自身伤害, 如果补体水平过高, 它会像自身免疫性疾病一样, 对多种器官造成严重损害。另外, 多次重复给药也会导致高水平的抗 PEG 抗体, 增加 LNP 的免疫原性反而导致 LNP 快速清除^[73]。为了应对此类问题, PEG 替换的优化策略应运而生。Nogueira 等^[74] 用聚肌氨酸脂质取代了传统的聚乙二醇化脂质 (图 6b), 以形成多肌氨酸功能化的 LNP, 这类 LNP 显示出比传统 PEG 化 LNP 更低的免疫原性。由此可见, 基于 PEG 的替换改造 LNP 能够提高 LNP 的安全性和有效性。

3.2 第五组分脂质的引入

除了对经典四组分的改造, 在原有组分的基础上引入第五组分脂质也是工程化 LNP 的一种策略, 可以实现器官靶向和细胞靶向递送 (图 7)。

Cheng 等^[75] 在 LNP 原有四组分的基础上引入了第五组分, 报道了一种器官选择性靶向途径实现肝外靶向递送的方法, 他们将永久阳离子脂质 DOTAP 引入到 LNP 中, 通过静脉注射发现 LNP 富集在肺部, 而将永久阴离子脂质 18PA 引入到 LNP 中通过静脉注射实现了 LNP 在脾的富集。这项技术解决了 LNP 肝外递送的问题, 有助于开发靶向肺或脾组织中的蛋白质替代疗法和基因校正疗法, 能够有效提高治疗的靶向性, 减少治疗脱靶带来的安全隐患。此外, Lian 等^[76] 将一类共价脂质以第五组分加入 LNP 中, 实现骨髓靶向。

在细胞靶向上, LNP 第五组分的开发研究较少, 其靶向性主要体现在肝窦内皮细胞和树突状细胞 (dendritic cells, DC) 上。Han 等^[77] 基于 Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 7/8 激动剂化学合成了一种 LNP 成分, 并将其引入 LNP 作为第五组分, 该组分的引入赋予了 LNP 的 TLR7/8 激动剂活性, 能够增强 mRNA 疫苗的佐剂性, 通过 TLR7/8 诱导激活的先天免疫, 促进抗原呈递细胞的成熟, 有效地激发了强效的中和抗体、强大的 Th1 偏向性细胞免疫以及显著的 B 细胞和长寿命浆细胞反应, 在小鼠中有着良好的耐受性, 并且引入了该组分的 LNP 能够在内涵体中与内涵体膜上的 TLR7/8 受体相互作用, 增强了 LNP 与内涵体膜的相互作用,

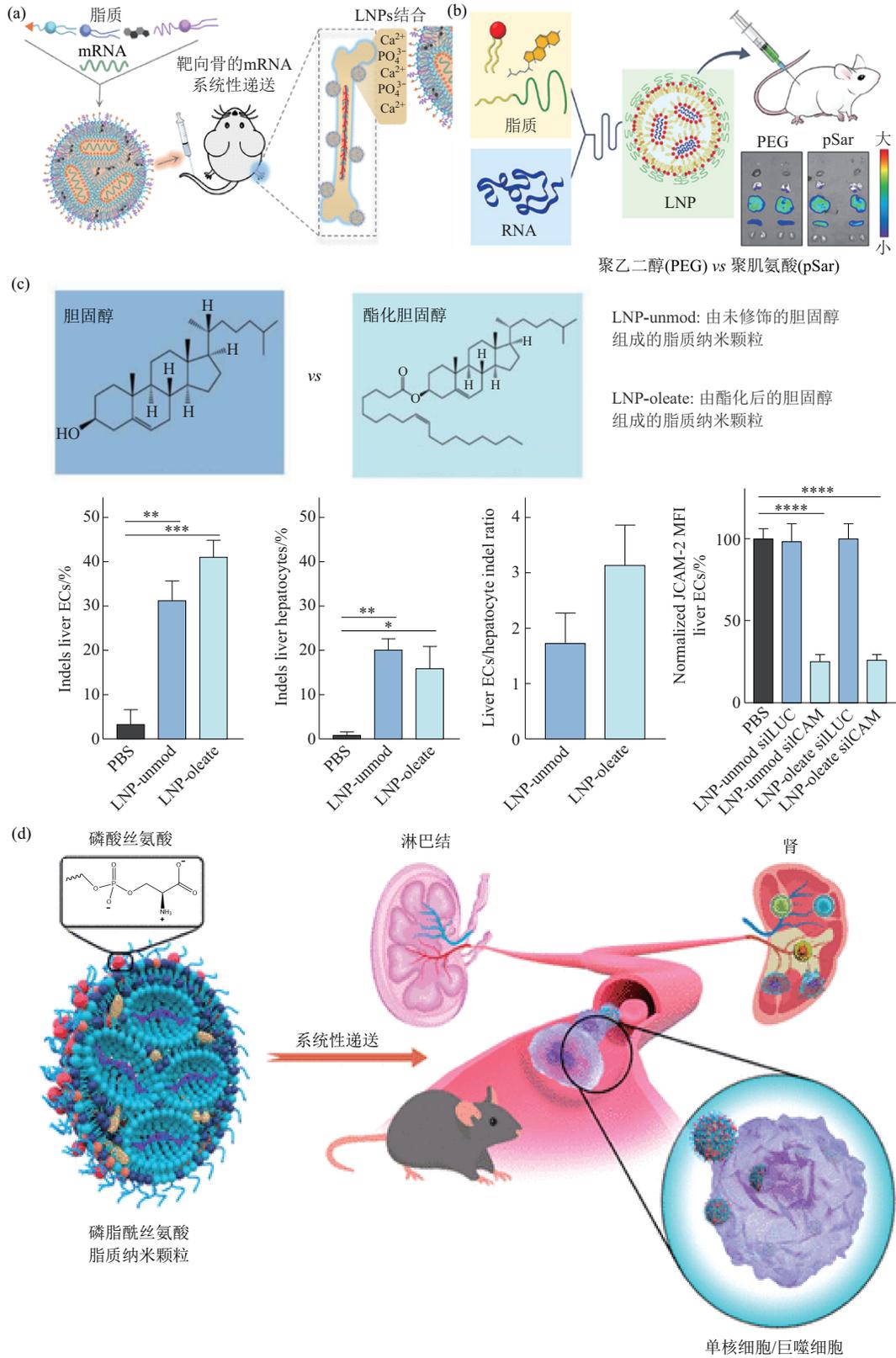


Fig. 6 LNP transformation based on classical four components

图6 基于经典四组分对LNP进行改造

(a) 双磷酸盐修饰的LNP提高对骨细胞的转染能力^[66]。(b) 聚肌氨酸修饰LNP降低PEG引起的免疫原性^[74]。(c) 酯化胆固醇提高LNP对肝内皮细胞的转染能力^[70]。(d) DOPS作为辅助磷脂提高单核细胞的摄取并增加LNP在刺激淋巴结的蓄积^[69]。

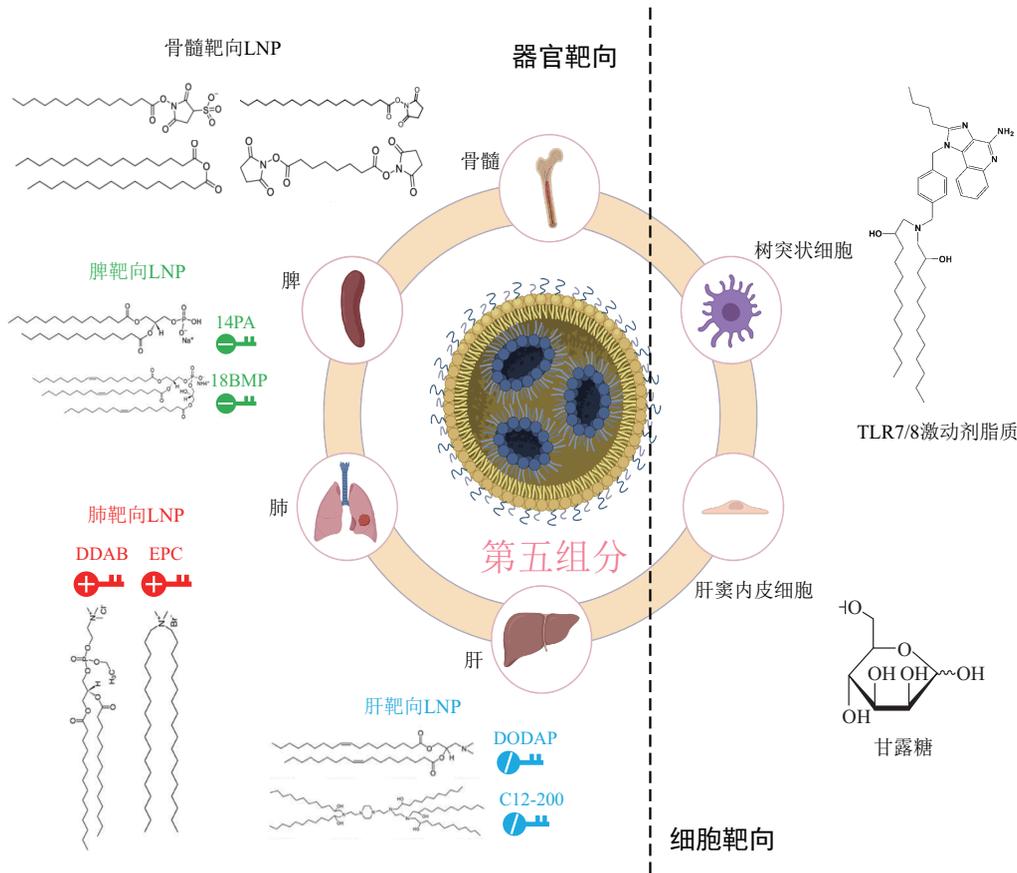


Fig. 7 LNP transformation based on the introduction of the fifth lipid component
图7 基于第五种脂质组分的引入对LNP改造

有效地促进了负载在LNP中mRNA释放到胞质，提高了转染效率。Kim等^[78]发现，在LNP中增加PEG含量，可增强肝细胞靶向递送，而加入甘露糖则增加肝窦内皮细胞（liver sinusoidal endothelial cell, LSEC）递送。

总之，第五组分的引入能够在经典四组分维持LNP基本功能的基础上赋予LNP功能性，提高了LNP递送系统的器官和细胞靶向性，实现了精准定位递送的目标。

3.3 LNP表面改性

LNP表面改性是在其经典四组分维持基本功能的基础上，在制备过程中引入马来酰胺化或叠氮化的PEG化脂质，将制备后的LNP与活化的蛋白质、抗体或配体相连接，使LNP表面改性，实现靶向组织、器官或细胞（图8）。

Shi等^[79]将c-kit（CD117）抗体修饰在LNP表

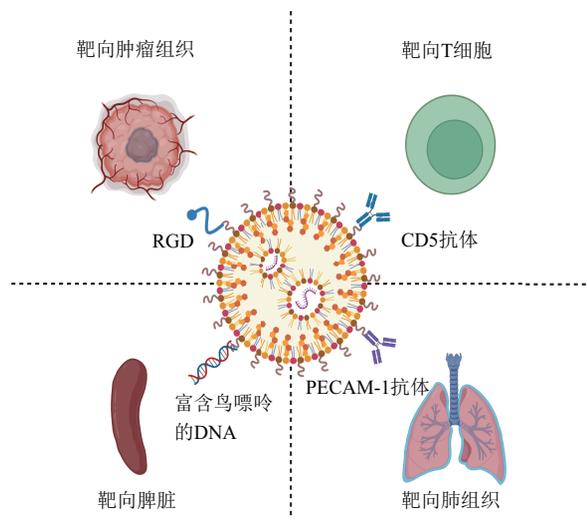


Fig. 8 LNP surface modification regulates its targeting
图8 LNP表面修饰调控其靶向性

RGD是一种多肽，氨基酸序列为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸。

面, 经过静脉注射后实现了对高表达 c-kit 的造血干细胞靶向, 并实现了对体内 90% 的造血干细胞核酸递送。Zhao 等^[80] 将巨噬细胞特异性的 F4/80 的抗体修饰在 LNP 表面, 通过鼻腔接种使 LNP 高效靶向到肺部的巨噬细胞, 并实现了炎症反应通路的有效抑制, 显著改善了感染引起的肺损伤。此外, 有研究将 CD3、CD5 的抗体连接在 LNP 表面, 用于在体内靶向 T 细胞, 通过 T 细胞靶向性 LNP 将编码 CAR 的 mRNA 递送至 T 细胞, 实现嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T-Cell, CAR-T) 的体内原位构建, 相比体外构建的过继性细胞疗法具有明显优势^[81]。另外, 也有通过将小分子配体连接在 LNP 表面进行改性, 实现对器官或细胞的靶向, 例如甘露糖修饰的 LNP 靶向肝窦内皮细胞、巨噬细胞和 DC 等^[82], 在 LNP 表面修饰透明质酸可以实现对肿瘤细胞的靶向^[83]。Sinegra 等^[84] 将 DNA 修饰在 LNP 的表面, 发现经富含 G 基序的 DNA 修饰后的 LNP 能以尾静脉注射形式特异性地将 mRNA 递送至脾组织, 而经富含 T 序列的 DNA 修饰后的 LNP 则未显示出肝外器官特异性靶向。由此可见, LNP 表面改性是一种简单有效的工程化 LNP 方式, 能够明显改善 LNP 的肝外靶向性问题。

3.4 机器学习辅助LNP迭代开发

LNP 是目前 mRNA 最先进和应用最广泛的递送载体, 其性能的优化和应用的拓展对 mRNA 疗法至关重要。通过对递送效率和靶向性不断地改进, 大大促进了基于 LNP 的 mRNA 疗法临床转化, 如 SARS-CoV-2 mRNA 疫苗^[85]。尽管如此, 要充分释放 mRNA 在肝脏疾病或肝外疾病的治疗潜力, 就需要具有极好安全性的强效 LNP 递送系统。然而, 由于脂质庞大结构改造空间和筛选的限制, 延缓了 LNP 的发展。近年来, 机器学习技术与 LNP 开发交叉结合, 为 LNP 在 mRNA 应用中的发展提供了强大的助力。

机器学习在多个方面辅助 LNP 迭代开发, 通过机器学习算法优化载体设计, 增强递送效率和靶向性, 利用进化算法和编程探索新的递送策略, 克服生物屏障。

在 LNP 配方的优化中, 基于已有的大量实验数据, 通过机器学习算法 (如回归分析和聚类分析), 构建 LNP 中脂质与其物理性能和生物性能之间相关性的复杂模型, 优化 LNP 中脂质成分的比例和组合, 从而提高 LNP 对 mRNA 的包封效率和稳定性。基于这些模型, 能够预测新的脂质配方的性能, 从而减少实验的盲目性, 提高研发效率。

在 LNP 脂质分子结构优化中, 机器学习可以辅助筛选合适结构的脂质。目前, 已有的脂质分子结构种类繁多, 不同结构的组合搭配, 可形成无穷无尽的脂质, 要从中筛选出结构最优脂质来构建 LNP 并非易事。机器学习可以整合已有的脂质结构与性能数据, 通过特征提取和模式识别, 可以预测哪些脂质分子具有更好的成膜能力、与 mRNA 的亲合力以及体内生物相容性等性能, 与传统的人工筛选相比, 它具有明显的优势 (图 9a)。Li 等^[86] 报道了一种结合了机器学习和先进的组合化学来加速发现用于 mRNA 递送的有效可离子化脂质的方法, 基于化学多样性的 584 种可离子化脂质的 mRNA 转染效率数据, 训练机器学习模型, 并将该模型预测扩展虚拟的 40 000 种脂质性能, 筛选出表现优异的脂质, 最终通过实验得到验证 (图 9b)。Wang 等^[87] 利用一种机器学习算法 lightGBM, 分析了 325 个具有 IgG 滴度的 mRNA 疫苗 LNP 制剂的数据样本, 构建了性能良好的预测模型, 加速 mRNA 疫苗的 LNP 开发。

此外, 机器学习还可以助力 LNP 在 mRNA 体内递送过程的优化。由于机体内环境复杂, LNP 与机体内各种因素相互作用, 影响其递送效果。通过机器学习分析稳定性、组织器官分布、血液循环时间和免疫反应等体内数据, 预测 LNP 在机体内的行为规律, 为设计更具稳定性、靶向性和安全性的 LNP 提供依据。

总之, 机器学习作为一种强大的工具, 在 LNP 迭代开发中发挥重要的作用, 同时也为 LNP 在 mRNA 应用中的创新发展提供了新的思路和方法。通过数据驱动的策略, 能够更高效地优化 LNP 的配方、设计和应用, 加速 mRNA 疗法的研发进程, 为疾病的预防与治疗带来更多的可能性。

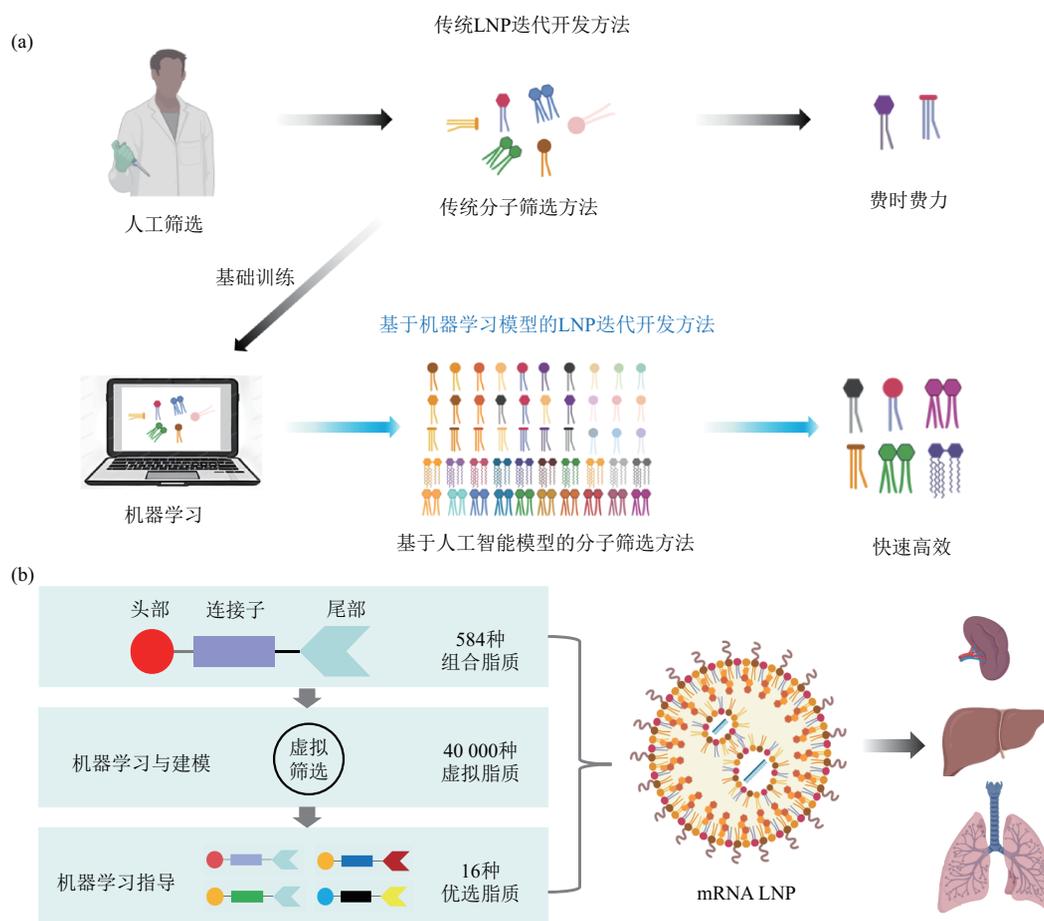


Fig. 9 Iterative development application of LNP assisted by machine learning in mRNA delivery

图9 机器学习辅助LNP迭代开发在mRNA递送中的应用

(a) 与传统分子筛选对比，基于人工智能模型的分子筛选方法优势。(b) 在机器学习引导下递送mRNA的脂质开发示意图。

4 总 结

脂质纳米颗粒的出现虽然快速推进了mRNA治疗领域的发展，但在进一步提高mRNA治疗效果方面仍十分受限，其单一化的功能无法满足临床需求。因此，需要对LNP进行有目的的优化改造，包括通过对LNP基本四组分的改造与优化改善mRNA递送效率并提高安全性，或通过引入第五组分来改善肝外的靶向递送以及药物的功能化协同mRNA治疗，或通过LNP表面改性实现精准靶向。目前基于脂质纳米颗粒递送mRNA的技术还处于起步阶段，仍然有很多问题难以解决，例如理想可电离脂质设计、生物可降解性及安全性等。随着生物技术不断的提升，相信脂质纳米颗粒递送mRNA的技术也会得到不断的改进，这将进一步促

进mRNA的安全有效递送，推动mRNA疗法的发展。

参 考 文 献

- [1] Kulkarni J A, Witzigmann D, Thomson S B, *et al.* The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat Nanotechnol*, 2021, **16**(6): 630-643
- [2] Ryskov A P, Church R B, Bajszar G, *et al.* Inverted repetitions in mammalian DNA transcribed into nucleus-restricted hairpin-like structures of pre-mRNA. *Mol Biol Rep*, 1973, **1**(2): 119-122
- [3] Chen J, Chen J, Xu Q. Current developments and challenges of mRNA vaccines. *Annu Rev Biomed Eng*, 2022, **24**: 85-109
- [4] Herzog R W, Giangrande P H. The Nobel Prize awarded to pioneers of mRNA vaccines. *Mol Ther*, 2023, **31**(11): 3105-3106
- [5] Islam M A, Rice J, Reesor E, *et al.* Adjuvant-pulsed mRNA vaccine nanoparticle for immunoprophylactic and therapeutic tumor suppression in mice. *Biomaterials*, 2021, **266**: 120431

- [6] Sa S, Lee C W, Shim S R, *et al.* The safety of mRNA-1273, BNT162b2 and JNJ-78436735 COVID-19 vaccines: safety monitoring for adverse events using real-world data. *Vaccines*, 2022, **10**(2): 320
- [7] Dutta K, Das R, Medeiros J, *et al.* Charge-conversion strategies for nucleic acid delivery. *Adv Funct Mater*, 2021, **31**(24): 2011103
- [8] Kimura N, Maeki M, Sato Y, *et al.* Development of a microfluidic-based post-treatment process for size-controlled lipid nanoparticles and application to siRNA delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(30): 34011-34020
- [9] Sun D, Lu Z R. Structure and function of cationic and ionizable lipids for nucleic acid delivery. *Pharm Res*, 2023, **40**(1): 27-46
- [10] Zong Y, Lin Y, Wei T, *et al.* Lipid nanoparticle (LNP) enables mRNA delivery for cancer therapy. *Adv Mater*, 2023, **35**(51): e2303261
- [11] Verbeke R, Hogan M J, Loré K, *et al.* Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity*, 2022, **55**(11): 1993-2005
- [12] Zhang H, Zhang L, Lin A, *et al.* Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity. *Nature*, 2023, **621**(7978): 396-403
- [13] Zhang H X, Zhang Y, Yin H. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther*, 2019, **27**(4): 735-746
- [14] Jia Y, Wang X, Li L, *et al.* Lipid nanoparticles optimized for targeting and release of nucleic acid. *Adv Mater*, 2024, **36**(4): e2305300
- [15] Hajiaghapour Asr M, Dayani F, Saedi Segherloo F, *et al.* Lipid nanoparticles as promising carriers for mRNA vaccines for viral lung infections. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(4): 1127
- [16] Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, *et al.* Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol*, 2012, **9**(11): 1319-1330
- [17] Fraiman J, Erviti J, Jones M, *et al.* Serious adverse events of special interest following mRNA COVID-19 vaccination in randomized trials in adults. *Vaccine*, 2022, **40**(40): 5798-5805
- [18] Cafri G, Gartner J J, Zaks T, *et al.* mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J Clin Invest*, 2020, **130**(11): 5976-5988
- [19] Garbuglia A R, Lapa D, Sias C, *et al.* The use of both therapeutic and prophylactic vaccines in the therapy of papillomavirus disease. *Front Immunol*, 2020, **11**: 188
- [20] Haq H N, Khan H, Chaudhry H, *et al.* Pfizer-BioNTech (BNT162b2), Moderna (mRNA-1273) COVID-19 mRNA vaccines and hypersensitivity reactions. *J Natl Med Assoc*, 2022, **114**(6): 601-612
- [21] Zhang N N, Li X F, Deng Y Q, *et al.* A thermostable mRNA vaccine against COVID-19. *Cell*, 2020, **182**(5): 1271-1283.e16
- [22] Yamayoshi S, Kawaoka Y. Current and future influenza vaccines. *Nat Med*, 2019, **25**(2): 212-220
- [23] Arevalo C P, Bolton M J, Le Sage V, *et al.* A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes. *Science*, 2022, **378**(6622): 899-904
- [24] McCafferty S, Haque A K M A, Vandierendonck A, *et al.* A dual-antigen self-amplifying RNA SARS-CoV-2 vaccine induces potent humoral and cellular immune responses and protects against SARS-CoV-2 variants through T cell-mediated immunity. *Mol Ther*, 2022, **30**(9): 2968-2983
- [25] Jagadesh A, Salam A A A, Mudgal P P, *et al.* Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Arch Virol*, 2016, **161**(8): 2087-2094
- [26] Neirynek S, Deroo T, Saelens X, *et al.* A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med*, 1999, **5**(10): 1157-1163
- [27] van de Ven K, Lanfermeijer J, van Dijken H, *et al.* A universal influenza mRNA vaccine candidate boosts T cell responses and reduces zoonotic influenza virus disease in ferrets. *Sci Adv*, 2022, **8**(50): eadc9937
- [28] Fortner A, Bucur O. mRNA-based vaccine technology for HIV. *Discoveries (Craiova)*, 2022, **10**(2): e150
- [29] Wilson E, Goswami J, Baqui A H, *et al.* Efficacy and safety of an mRNA-based RSV PreF vaccine in older adults. *N Engl J Med*, 2023, **389**(24): 2233-2244
- [30] Choudhuri S, Rios L, Vázquez-Chagoyán J C, *et al.* Oxidative stress implications for therapeutic vaccine development against Chagas disease. *Expert Rev Vaccines*, 2021, **20**(11): 1395-1406
- [31] Guvenir M, Arikan A. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pol J Microbiol*, 2020, **69**(4): 391-399
- [32] Zhao H, Shao X, Yu Y, *et al.* A therapeutic hepatitis B mRNA vaccine with strong immunogenicity and persistent virological suppression. *NPJ Vaccines*, 2024, **9**(1): 22
- [33] Pardi N, Hogan M J, Porter F W, *et al.* mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, **17**: 261-279
- [34] 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
- [35] Freyn A W, Ramos da Silva J, Rosado V C, *et al.* A multi-targeting, nucleoside-modified mRNA influenza virus vaccine provides broad protection in mice. *Mol Ther*, 2020, **28**(7): 1569-1584
- [36] Weber J S, Carlino M S, 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
- [37] You Y, Tian Y, Yang Z, *et al.* Intradermally delivered mRNA-encapsulating extracellular vesicles for collagen-replacement therapy. *Nat Biomed Eng*, 2023, **7**(7): 887-900
- [38] Qiao J, Fu Y X. Cytokines that target immune killer cells against tumors. *Cell Mol Immunol*, 2020, **17**(7): 722-727
- [39] Xu S, Xu Y, Solek N C, *et al.* Tumor-tailored ionizable lipid nanoparticles facilitate IL-12 circular RNA delivery for enhanced lung cancer immunotherapy. *Adv Mater*, 2024, **36**(29): e2400307
- [40] Sun H, Zhang Y, Wang J, *et al.* Application of lung-targeted lipid nanoparticle-delivered mRNA of soluble PD-L1 via SORT Technology in acute respiratory distress syndrome. *Theranostics*, 2023, **13**(14): 4974-4992

- [41] Rowe S M, Zuckerman J B, 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 Cyst Fibros*, 2023, **22**(4): 656-664
- [42] Martinez F J, Criner G J, Gessner C, *et al.* Icenticaftor, a CFTR potentiator, in COPD: a multicenter, parallel-group, double-blind clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, **208**(4): 417-427
- [43] Tai W, Yang K, Liu Y, *et al.* A lung-selective delivery of mRNA encoding broadly neutralizing antibody against SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 8042
- [44] Shen S, Sanchez M E, Blomenkamp K, *et al.* Amelioration of alpha-1 antitrypsin deficiency diseases with genome editing in transgenic mice. *Hum Gene Ther*, 2018, **29**(8): 861-873
- [45] Zhang H, Qin C, An C, *et al.* Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 126
- [46] Xu Z, Wang Q, Zhong H, *et al.* Carrier strategies boost the application of CRISPR/Cas system in gene therapy. *Exploration*, 2022, **2**(2): 20210081
- [47] Lin Y, Wagner E, Lächelt U. Non-viral delivery of the CRISPR/Cas system: DNA *versus* RNA *versus* RNP. *Biomater Sci*, 2022, **10**(5): 1166-1192
- [48] Miller J B, 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
- [49] Han J P, Kim M, Choi B S, *et al.* *In vivo* delivery of CRISPR-Cas9 using lipid nanoparticles enables antithrombin gene editing for sustainable hemophilia A and B therapy. *Sci Adv*, 2022, **8**(3): eabj6901
- [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] Kubiawicz L J, Mohapatra A, Krishnan N, *et al.* mRNA nanomedicine: design and recent applications. *Exploration*, 2022, **2**(6): 20210217
- [52] Cullis PR, Hope M J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol Ther*, 2017, **25**(7): 1467-1475
- [53] Ma Y, Li S, Lin X, *et al.* A perspective of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Exploration*, 2024. DOI: 10.1002/EXP.20230147
- [54] Akinc A, Maier M A, Manoharan M, *et al.* The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol*, 2019, **14**(12): 1084-1087
- [55] Verma M, Ozer I, Xie W, *et al.* The landscape for lipid-nanoparticle-based genomic medicines. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, **22**(5): 349-350
- [56] Wang C, Zhang Y, Dong Y. Lipid nanoparticle-mRNA formulations for therapeutic applications. *Acc Chem Res*, 2021, **54**(23): 4283-4293
- [57] Patel P, Ibrahim N M, Cheng K. The importance of apparent pKa in the development of nanoparticles encapsulating siRNA and mRNA. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, **42**(6): 448-460
- [58] Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: current perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154/155**: 37-63
- [59] Ahmed K S, Hussein S A, Ali A H, *et al.* Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *J Drug Target*, 2019, **27**(7): 742-761
- [60] Sebastiani F, Arteta M Y, Lerche M, *et al.* Apolipoprotein E binding drives structural and compositional rearrangement of mRNA-containing lipid nanoparticles. *ACS Nano*, 2021, **15**(4): 6709-6722
- [61] Tenchov R, Sasso J M, Zhou Q A. PEGylated lipid nanoparticle formulations: immunological safety and efficiency perspective. *Bioconjug Chem*, 2023, **34**(6): 941-960
- [62] Fang Y, Xue J, Gao S, *et al.* Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. *Drug Deliv*, 2017, **24**(sup1): 22-32
- [63] Witzigmann D, Kulkarni J A, Leung J, *et al.* Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **159**: 344-363
- [64] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, *et al.* Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc Chem Res*, 2022, **55**(1): 2-12
- [65] Miao L, Li L, Huang Y, *et al.* Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(10): 1174-1185
- [66] Xue L, Gong N, Shepherd S J, *et al.* Rational design of bisphosphonate lipid-like materials for mRNA delivery to the bone microenvironment. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(22): 9926-9937
- [67] Han X, Xu J, Xu Y, *et al.* *In situ* combinatorial synthesis of degradable branched lipidoids for systemic delivery of mRNA therapeutics and gene editors. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 1762
- [68] 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
- [69] Luozhong S, Yuan Z, Sarmiento T, *et al.* Phosphatidylserine lipid nanoparticles promote systemic RNA delivery to secondary lymphoid organs. *Nano Lett*, 2022, **22**(20): 8304-8311
- [70] Paunovska K, Gil C J, Lokugamage M P, *et al.* Analyzing 2000 *in vivo* drug delivery data points reveals cholesterol structure impacts nanoparticle delivery. *ACS Nano*, 2018, **12**(8): 8341-8349
- [71] Patel S K, Billingsley M M, Frazee C, *et al.* Hydroxycholesterol substitution in ionizable lipid nanoparticles for mRNA delivery to T cells. *J Control Release*, 2022, **347**: 521-532
- [72] Mui B L, Tam Y K, Jayaraman M, *et al.* Influence of polyethylene glycol lipid desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, **2**(12): e139
- [73] Shi D, Beasock D, Fessler A, *et al.* To PEGylate or not to PEGylate: immunological properties of nanomedicine’s most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, **180**: 114079
- [74] Nogueira S S, Schlegel A, Maxeiner K, *et al.* Polysarcosine-functionalized lipid nanoparticles for therapeutic mRNA delivery.

- ACS Appl Nano Mater, 2020, **3**(11): 10634-10645
- [75] 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
- [76] Lian X, Chatterjee S, Sun Y, *et al.* Bone-marrow-homing lipid nanoparticles for genome editing in diseased and malignant haematopoietic stem cells. *Nat Nanotechnol*, 2024, **19**(9): 1409-1417
- [77] Han X, Alameh M G, Butowska K, *et al.* Adjuvant lipidoid-substituted lipid nanoparticles augment the immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA vaccines. *Nat Nanotechnol*, 2023, **18**(9): 1105-1114
- [78] Kim M, Jeong M, Hur S, *et al.* Engineered ionizable lipid nanoparticles for targeted delivery of RNA therapeutics into different types of cells in the liver. *Sci Adv*, 2021, **7**(9): eabf4398
- [79] Shi D, Toyonaga S, Anderson D G. *In vivo* RNA delivery to hematopoietic stem and progenitor cells *via* targeted lipid nanoparticles. *Nano Lett*, 2023, **23**(7): 2938-2944
- [80] Zhao G, Xue L, Geisler H C, *et al.* Precision treatment of viral pneumonia through macrophage-targeted lipid nanoparticle delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, **121**(7): e2314747121
- [81] Rurik J G, Tombácz I, Yadegari A, *et al.* CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury. *Science*, 2022, **375**(6576): 91-96
- [82] Uehara K, Harumoto T, Makino A, *et al.* Targeted delivery to macrophages and dendritic cells by chemically modified mannose ligand-conjugated siRNA. *Nucleic Acids Res*, 2022, **50**(9): 4840-4859
- [83] Choi J, Rustique E, Henry M, *et al.* Targeting tumors with cyclic RGD-conjugated lipid nanoparticles loaded with an IR780 NIR dye: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm*, 2017, **532**(2): 677-685
- [84] Sinegra A J, Evangelopoulos M, Park J, *et al.* Lipid nanoparticle spherical nucleic acids for intracellular DNA and RNA delivery. *Nano Lett*, 2021, **21**(15): 6584-6591
- [85] Ziqi W, Kai C, Costabel U, *et al.* Nanotechnology-facilitated vaccine development during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Exploration (Beijing)*, 2022, **2**(5): 20210082
- [86] Li B, Raji I O, Gordon A G R, *et al.* Accelerating ionizable lipid discovery for mRNA delivery using machine learning and combinatorial chemistry. *Nat Mater*, 2024, **23**(7): 1002-1008
- [87] Wang W, Feng S, Ye Z, *et al.* Prediction of lipid nanoparticles for mRNA vaccines by the machine learning algorithm. *Acta Pharm Sin B*, 2022, **12**(6): 2950-2962

The Application of Lipid Nanoparticle-delivered mRNA in Disease Prevention and Treatment*

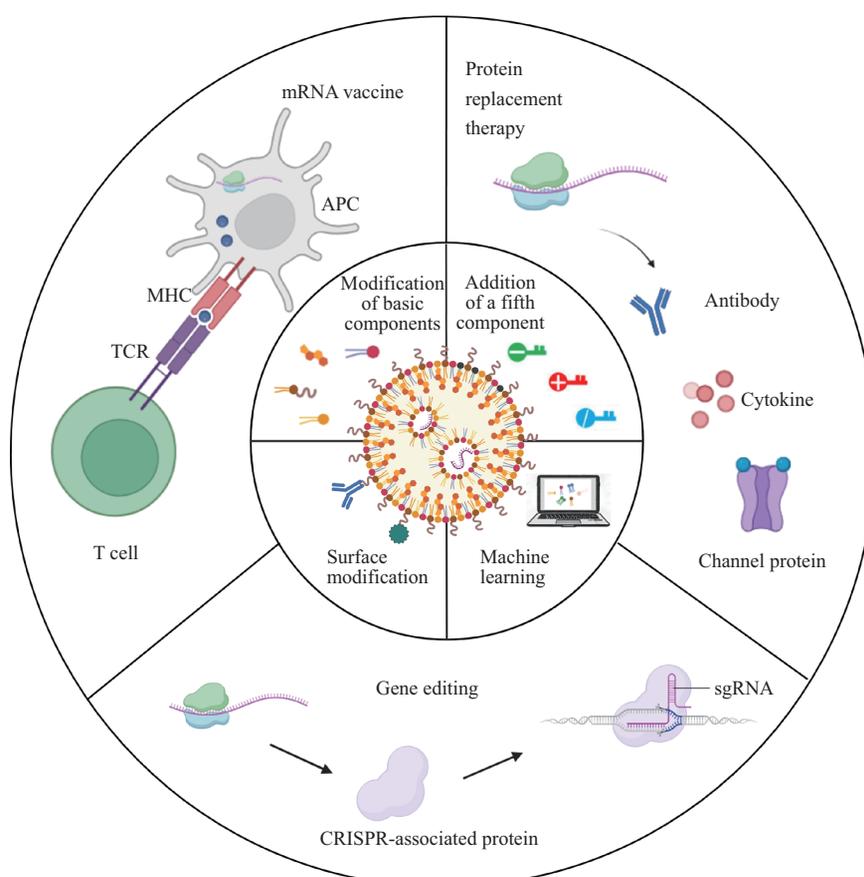
SUN Wei-Lun^{1,2)**}, ZHOU Ti-Qiang^{1,2)**}, YANG Hai-Yin¹⁾, LI Lu-Wei³⁾, WENG Yu-Hua¹⁾,
ZHANG Jin-Chao³⁾, HUANG Yuan-Yu^{1)***}, LIANG Xing-Jie^{2)***}

¹⁾School of Life Science, Advanced Research Institute of Multidisciplinary Science, Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotherapy, Key Laboratory of Medical Molecule Science and Pharmaceutics Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

²⁾Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, Chinese Academy of Sciences, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;

³⁾College of Chemistry & Materials Science, Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of Ministry of Education, State Key Laboratory of New Pharmaceutical Preparations and Excipients, Chemical Biology Key Laboratory of Hebei Province, Hebei University, Baoding 071002, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from the National Key Research & Development Program of China (2021YFA1201000, 2021YFC2302400), The National Natural Science Foundation of China (32171394, 82302387, 32001008), Hebei Province Innovation Capability Enhancement Plan Project (22567632H), and China Postdoctoral Science Foundation (2023M740259).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

LIANG Xing-Jie. Tel: 86-10-82545615, E-mail: liangxj@nanoctr.cn

HUANG Yuan-Yu. Tel: 86-10-68911089, E-mail: yyhuang@bit.edu.cn

Received: July 12, 2024 Accepted: September 14, 2024

Abstract In recent years, nucleic acid therapy, as a revolutionary therapeutic tool, has shown great potential in the treatment of genetic diseases, infectious diseases and cancer. Lipid nanoparticles (LNPs) are currently the most advanced mRNA delivery carriers, and their emergence is an important reason for the rapid approval and use of COVID-19 mRNA vaccines and the development of mRNA therapy. Currently, mRNA therapeutics using LNP as a carrier have been widely used in protein replacement therapy, vaccines and gene editing. Conventional LNP is composed of four components: ionizable lipids, phospholipids, cholesterol, and polyethylene glycol (PEG) lipids, which can effectively load mRNA to improve the stability of mRNA and promote the delivery of mRNA to the cytoplasm. However, in the face of the complexity and diversity of clinical diseases, the structure, properties and functions of existing LNPs are too homogeneous, and the lack of targeted delivery capability may result in the risk of off-targeting. LNPs are flexibly designed and structurally stable vectors, and the adjustment of the types or proportions of their components can give them additional functions without affecting the ability of LNPs to deliver mRNAs. For example, by replacing and optimizing the basic components of LNP, introducing a fifth component, and modifying its surface, LNP can be made to have more precise targeting ability to reduce the side effects caused by treatment, or be given additional functions to synergistically enhance the efficacy of mRNA therapy to respond to the clinical demand for nucleic acid therapy. It is also possible to further improve the efficiency of LNP delivery of mRNA through machine learning-assisted LNP iteration. This review can provide a reference method for the rational design of engineered lipid nanoparticles delivering mRNA to treat diseases.

Key words lipid nanoparticles, mRNA, engineering, targeting

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0316