

· 综 述 ·

mRNA 纳米递送系统在 CAR-T 肿瘤免疫治疗中的应用

曾毅, 魏诗瑶, 孙健红*, 许娜*

武汉科技大学生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430065

曾毅, 魏诗瑶, 孙健红, 许娜. mRNA 纳米递送系统在 CAR-T 肿瘤免疫治疗中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1338-1351.
ZENG Yi, WEI Shiyao, SUN Jianhong, XU Na. Application of mRNA nano-delivery system in CAR-T tumor immunotherapy[J].
Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1338-1351.

摘 要: 嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)免疫疗法能够激活系统特异性免疫来实现抗肿瘤效应, 近年来取得了令人振奋的进展。mRNA 纳米递送系统以纳米颗粒包裹肿瘤免疫治疗相关抗原的 mRNA, 一方面能直接靶向于 T 细胞生成 CAR-T 细胞, 直接作用于相应肿瘤细胞; 另一方面可以通过靶向递送至抗原提呈细胞, 辅助性增强 CAR-T 细胞功能, 进一步诱导对肿瘤细胞产生特异性免疫反应, 因而在 CAR-T 肿瘤免疫治疗中展现出巨大的潜力。本文就 mRNA 纳米递送系统的合成及其在 CAR-T 肿瘤免疫治疗中的研究和应用进行了综述。

关键词: 体外转录 mRNA; 纳米递送系统; 肿瘤免疫治疗; 嵌合抗原受体 T 细胞

Application of mRNA nano-delivery system in CAR-T tumor immunotherapy

ZENG Yi, WEI Shiyao, SUN Jianhong*, XU Na*

College of Life Sciences and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China

Abstract: Chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) immunotherapy, which activates immunity specific to the system in order to achieve antitumor effects, has experienced exciting progress in recent years. mRNA nano-delivery systems, which encapsulate tumor immunotherapy-related antigen mRNA with nanoparticles, have shown great potential in CAR-T tumor immunotherapy. On one hand, these systems can directly target T cells to

资助项目: 湖北省教育厅科学研究计划青年项目(Zy2022e023)

This work was supported by the Young-aged Talents Project of Science Research Program of Hubei Provincial Department of Education (Zy2022e023).

*Corresponding authors. E-mail: SUN Jianhong, sunjianhong0604@sina.com; XU Na, naxu@wust.edu.cn

Received: 2023-08-01; Accepted: 2023-11-29

generate CAR-T cells that directly act upon the corresponding tumor cells. On the other hand, they can be delivered to antigen-presenting cells through targeting, thereby enhancing the function of CAR-T cells and further inducing specific immune responses against tumor cells. This review summarizes the synthesis of mRNA nano-delivery systems and their application in CAR-T tumor immunotherapy.

Keywords: *in vitro*-transcribe mRNA; nano-delivery system; tumor immunotherapy; chimeric antigen receptor T cells (CAR-T)

嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)免疫疗法通过在体外对患者的 T 细胞进行基因改造,使其精准靶向肿瘤细胞,并激活人体免疫系统,从而实现抗肿瘤的效果。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)目前已批准了多款 CAR-T 细胞治疗产品,其适应症涵盖了急性淋巴细胞白血病、复发或难治性大 B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤等多种血液系统恶性肿瘤。CAR-T 免疫疗法取得了极大的成功。

现有的 CAR-T 细胞主要使用病毒载体制备,但是病毒载体制备工艺复杂、成本昂贵,而且存在基因整合的风险和生物安全隐患。近年来 mRNA 的合成、修饰、递送技术都取得了重大进展,新型冠状病毒 mRNA 疫苗研发的巨大成功直接推动了 mRNA 技术的快速研发和成果转化,进一步凸显了 mRNA 纳米递送系统的商业价值,获得了肿瘤免疫治疗领域研究人员的广泛关注。采用纳米递送系统将 CAR mRNA 序列递送到 T 细胞或其他免疫细胞,改造制备成为 CAR-T 细胞,已成为该领域的研究热点。

1 mRNA 纳米递送系统的优势

与病毒载体相比, mRNA 纳米递送系统是一种可以有效进行基因改造的非病毒载体,具备以下几点优势。

(1) 更高的生物安全性。病毒载体通过随机整合到宿主细胞基因组,进而转录和翻译,存

在插入突变风险。而 mRNA 纳米载体无需整合到宿主细胞基因组,即可进行蛋白质翻译,因此具有更高的生物安全性。

(2) 更具有可控性。相对于病毒性基因载体来说 mRNA 纳米载体可以介导基因的瞬时表达,可通过调节给药次数和给药剂量实现更加精准的调控。

(3) 更好的操作性。可以通过在 mRNA 纳米载体表面偶联特异性抗体分子的方式,使 mRNA 纳米递送系统靶向特定的细胞或组织,能更加精准地修饰细胞。

(4) 更高的翻译效率。病毒载体需要进入细胞核,而 mRNA 在细胞质内即可翻译成蛋白质,因此效率更高。而通过优化序列和设计各种修饰,可以进一步提高 mRNA 的稳定性和翻译效率,具备可控可调性。

(5) 更快的制备速度。mRNA 纳米载体可以针对任意已知目标蛋白进行序列设计, mRNA 可以快速合成,研发和制备速度相比于病毒载体都有大幅提升,大大降低了研发成本。

(6) 高效率的规模化生产。病毒载体的生产依赖于宿主细胞,其产量受限于细胞数量和质量,难以实现批量的生产。而 mRNA 纳米载体的两大组成成分——mRNA 序列和递送载体,均可以进行批量生产,使得 mRNA 能够实现规模化生产,大大降低了生产成本。

(7) 自我免疫佐剂功能。mRNA 纳米载体自身可以激活机体的固有免疫,具有免疫佐剂

的功能。固有免疫系统的激活,有望协助适应性免疫,共同发挥抗肿瘤作用。而且,通过优化递送载体修饰,可以调控固有免疫激活的程度。

(8) 更加灵活多样性的设计潜能。双特异性抗体、细胞因子、共刺激配体和受体等可以增强 CAR-T 肿瘤免疫治疗的效果,但是病毒载体在这些拓展性方法中存在着极大的挑战,而 mRNA 纳米载体的灵活性和多样性设计特点,可以帮助克服以上问题,为开发更多样的 CAR-T 细胞治疗产品提供了解决方案。

2 mRNA 纳米递送系统的结构设计及合成

mRNA 纳米递送系统主要由 mRNA 内核和纳米递送载体外壳组成。通过设计 mRNA 的序列和结构,可以有效提高肿瘤相关特异性抗原

在抗原提呈细胞或 T 细胞中的表达,从而实现更好的抗肿瘤效果。通过合成纳米递送载体,保护 mRNA 免受 RNase 的降解,并实现精准靶向作用。因此,内核 mRNA 和递送外壳的设计是决定 mRNA 纳米递送系统效果的两大要素。

2.1 mRNA 的结构与优化

mRNA 通常采用线性 DNA 模板体外转录 (*in vitro*-transcribe, IVT) 的方式获得。mRNA 的结构组成和优化策略如图 1 所示。mRNA 包括 5 个组成部分: 5'-帽结构、5'非翻译区域(5' untranslated region, 5'UTR)、编码阅读框(open reading frame, ORF)、3'非翻译区域(3' untranslated region, 3'UTR)和 3' poly(A)尾巴^[1]。mRNA 的摄取效率、胞内稳定性、翻译效率是影响 mRNA 递送效率的重要因素。为此,研究人员对 mRNA 的结构进行多种修饰,以优化 mRNA 的结构。

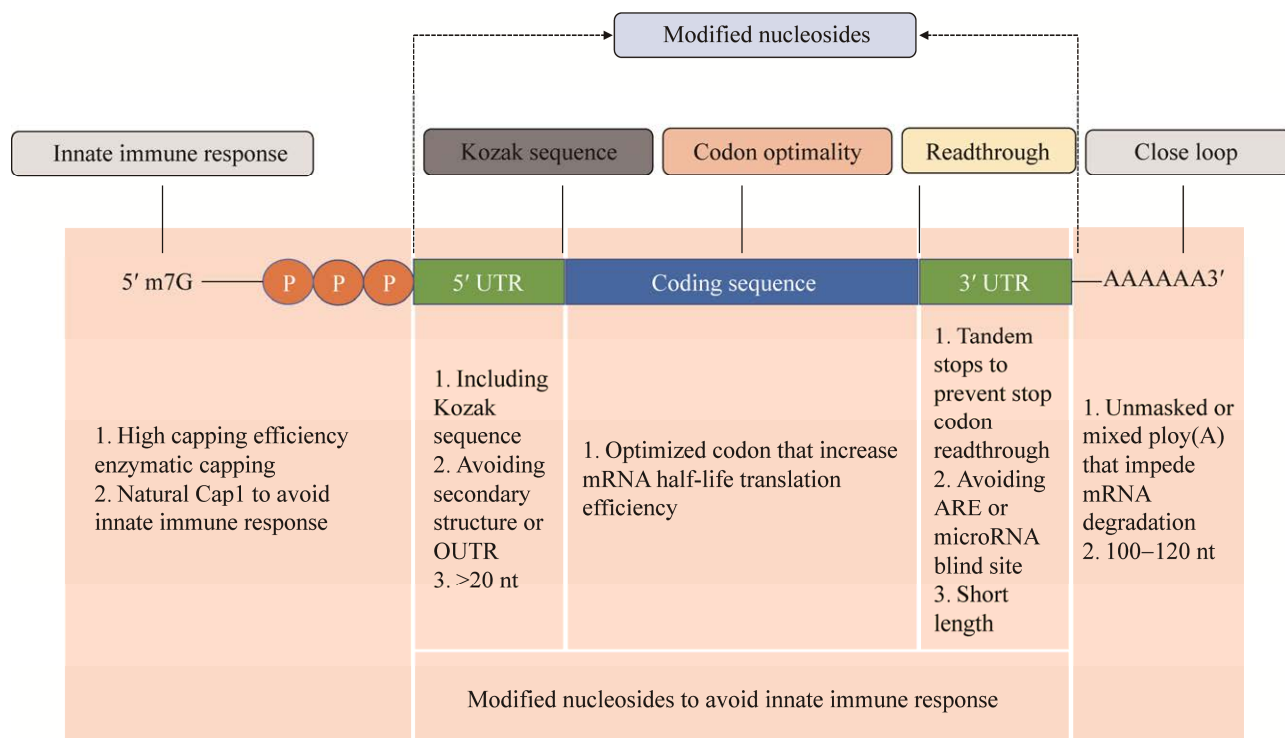


图 1 mRNA 的结构组成及优化策略^[1-3]

Figure 1 The structure and optimization strategies of mRNA^[1-3].

例如：在 5'端修饰抗反向帽类似物，可提高翻译效率；添加人 α -或 β -球蛋白的 5'UTR 和 3'UTR，可调节 mRNA 翻译效率和提高稳定性；用假尿苷代替天然尿苷和胞苷，通过密码子优化提高 ORF 区的 GC 含量，增加 mRNA 的翻译能力；添加 ploy A 尾并优化其长度，提高 mRNA 翻译的稳定性^[2-3]。这些优化策略提高了合成 mRNA 的稳定性和翻译效率，极大地推进了 mRNA 技术的发展。

在 CAR-T 肿瘤免疫治疗中，设计有效靶向肿瘤特异性抗原的 CAR mRNA 序列是其应用的关键。Foster 等^[4]设计了靶向神经母细胞瘤的 GPC2 CAR 结构，该结构使用了 D3 GPC2 抗体的单链抗体部分、CD8 铰链、带有 41BB 共刺激域和 CD3 ζ 信号的跨膜结构域，通过操纵 D3 单链抗体重链和轻链的方向，以及重链和轻链之间的甘氨酸-丝氨酸连接长度(5 vs. 15 个氨基酸)，生成了 GPC2 CAR 的 4 种构型：D3V1、D3V2、D3V3 和 D3V4。该 CAR-mRNA 可以在体外转染到 T 细胞制备成靶向 GPC2 的 CAR-T 细胞，该 CAR-T 细胞能够有效杀伤 GPC2 高表达的神经母细胞瘤 SMS-SAN 和 Nb-EbC1，在小鼠的髓母细胞瘤异种移植模型中，D3V3 和 D3V4 CAR-T 细胞均可在第 25 天使肿瘤消退。Hewitt 等^[5]通过将白细胞介素-12a (interleukin-12a, IL-12a)、白细胞介素-12b (interleukin-12b, IL-12b) 序列与连接子 IL12p70 结合，设计了 IL-12 mRNA，用脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)包裹 IL-12 mRNA 制备出 LNP-mRNA 纳米制剂。该 LNP-mRNA 能够编码 IL-12，可引起 CD8⁺ T 细胞依赖的抗肿瘤免疫，在小鼠耐药结肠癌肿瘤模型中，原发肿瘤部位局部给药后，显著抑制了结肠癌细胞的生长。Rybakova 等^[6]设计了一种在体内传递 HER2 抗体曲妥珠单抗的 IVT-mRNA，该 mRNA 序列的 5'UTR 含有巨细

胞病毒的 *IE1* 基因部分序列，3'UTR 含有人生长激素(human growth hormone, HGH)基因部分序列，poly(A)长约 120 nt，制备成的 IVT-mRNA LNP 在注射小鼠后 14 d 内，血清抗体浓度为 (45 \pm 8.6) mg/mL，而且与注射曲妥珠单抗蛋白相比，该蛋白的药代动力学得到了很好的改善。该 IVT-mRNA LNP 治疗荷瘤小鼠，可选择性地杀死 HER2 阳性乳腺癌细胞，显著提高了动物的生存期。

除了优化核心序列-CAR 的 mRNA 序列之外，碱基修饰也是一种可行的策略。Ye 等^[7]合成 anti-CD19 mRNA 时，利用 N1 甲基假尿苷(N1-methylpseudouridine, N1m ψ)进行修饰，该 mRNA 成功在巨噬细胞和 T 细胞内转染，制备出 CAR-巨噬细胞和 CAR-T 细胞，二者在体外对 B 淋巴瘤都显示了显著的细胞毒性作用。用假尿嘧啶(pseudouridine, ψ)和 5-甲基胞苷(5-methylcytidine, 5-mC)来修饰 mRNA 也是一个常用策略。Oberli 等^[8]设计了能够编码卵白蛋白(ovalbumin, OVA)、肿瘤相关抗原 gp100 和 TPR2 的 mRNA，并加入了 TLR4 激动剂脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)来增强免疫反应。作者发现 ψ 和 5-mC 修饰的 mRNA 能够避免激活 TLR3、TLR7 和 TLR8，显著提高 mRNA 的翻译效率，有效引起 CD8⁺ T 细胞激活，杀伤 B16F10 黑色素瘤细胞。Islam 等^[9]同样采用 ψ 和 5-mC 修饰 mRNA，得到了棕榈酸修饰的 TLR7/8 激动剂 R848，可以特异性激活 TLR7/8。

2.2 纳米递送载体材料

纳米递送载体是影响 mRNA 递送效率的另一个重要因素。目前在 CAR-T 免疫治疗中研究的递送载体材料主要包括脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)、多聚物、多肽/蛋白质和混合纳米颗粒等(图 2)^[10]。一般来讲，纳米材料表面可以连接特异性抗体分子，如 Rurik 等^[11]研

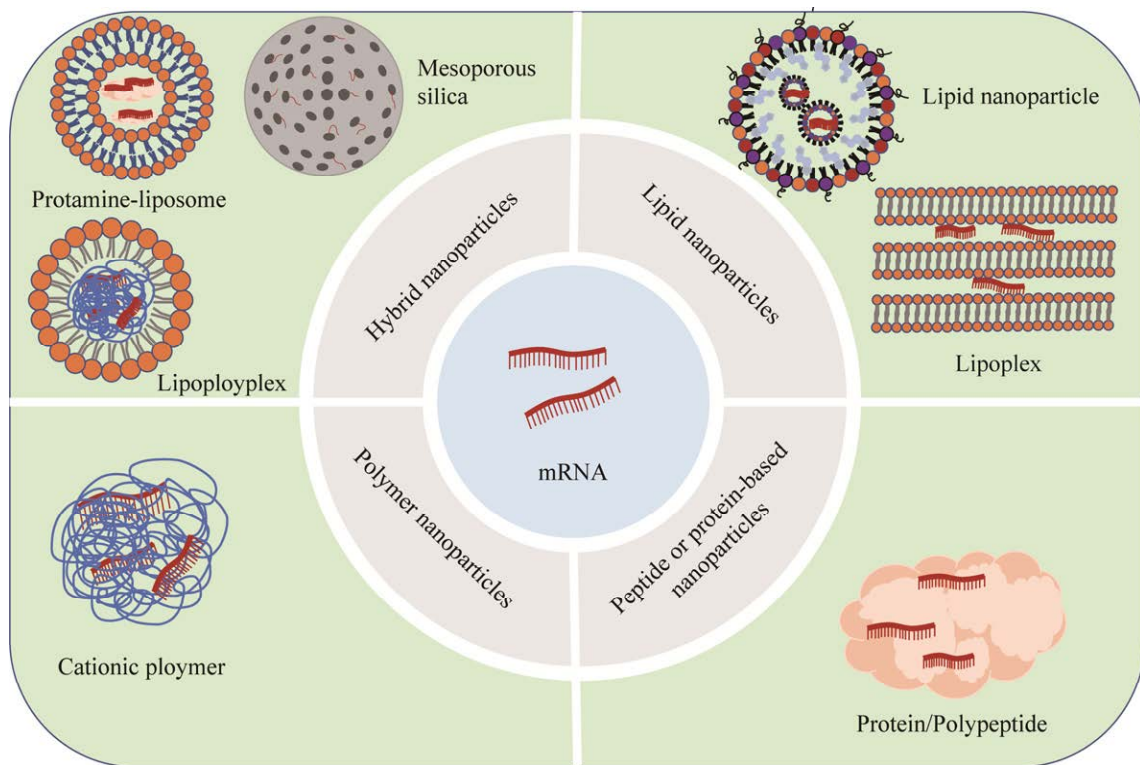


图 2 mRNA 的递送载体类型^[11]

Figure 2 The vector types for mRNA delivery^[11].

究了靶向 T 细胞表面 CD5 靶点的 LNP-FAP CAR mRNA 递送系统。研究者将靶向 CD5 的 mRNA-LNP 注射到小鼠体内后，成功地在体内靶向并重编程了 T 细胞。这表明了通过在纳米递送系统表面上偶联特异性抗体分子这种方式，可以使纳米递送系统靶向特定的细胞或组织。此外也可以通过对于纳米递送系统的组成进行设计和优化，在一定的条件下也可以使纳米递送系统靶向特定的细胞或组织。

2.2.1 脂质纳米系统

关于脂质纳米递送系统，目前使用较多的是脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)和脂质复合物(lipoplex, LPX)。LNPs 通常包含 4 个基础成分：可电离的脂质、胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)。LNPs 的形成机制是在酸性条件下，带正电的可电离

脂类与带负电的核酸通过静电作用结合，在胆固醇和辅助脂质的辅助下，形成稳定的单层磷脂层。胆固醇的主要作用是增强脂质纳米颗粒的稳定性，协助膜融合，促进 mRNA 进入细胞质。辅助磷脂一般为饱和磷脂，可以提高纳米颗粒的整体相变温度和稳定性。PEG 可以改善 LNPs 的稳定性，并阻止巨噬细胞介导的吞噬。可电离脂质是胞质中最关键的赋形剂和决定因子，通过电离释放 mRNA^[12-15]。目前已批准的两种 mRNA 新冠疫苗(BioNTech 公司的 BNT162 与 Moderna 公司的 mRNA-1273)均使用 LNPs 作为载体。BNT162 使用的 LNPs 的组成成分和比例为阳离子脂质体 ALC0315:胆固醇:辅助脂质 1,2-DSPC:PEG=46.3:9.4:42.7:1.6, mRNA-1273 使用的 LNPs 组成成分和比例为：阳离子脂质体 SM-102:胆固醇:1,2-DSPC:PEG=50:10:38.5:1.5^[16-17]。

新冠疫苗的广泛应用极大地推动了 LNPs 在 mRNA 递送领域的发展,也为 CAR-T 细胞治疗提供了新的纳米递送载体。Billingsley 等^[18]设计了具有 24 种不同的可电离脂质库,使用正交实验设计对 LNPs 的原料及配比进行优化,发现原料的修饰和配比会显著影响 mRNA 的递送效率,例如 PEG 上锚定不同长度的烷基链时,C14 烷基链的递送效率最高;作者最终优化出配方 B10,将 B10 LNPs、EP 或慢病毒产生的 CAR-T 细胞杀伤所有急性淋巴细胞、白血病细胞,所有组别都表现出更强大的癌细胞杀伤力。此外,许巧兵教授研究团队^[19]通过文库筛选发现 N 系列的 LNP (尾部含有酰胺键)能够选择性地 mRNA 传递到小鼠肺中。不仅如此,他们对 306-N16B LNP 表面蛋白冠成分进行蛋白质组学分析,研究团队发现了一组独特的血浆蛋白,这些蛋白可能对 LNP 的器官靶向性起到了主要作用。更重要的是他们发现,只要简单调整 N 系列的 LNP 的头部结构,就可以靶向不同的肺细胞类型。这些结果证明 LNP 的优化对 mRNA 递送性能的影响,证明了 LNP-mRNA 递送是在体内实现 CAR-T 改造的有效方案。LPX 是 BioNTech 开发的由阳离子脂质和中性辅助脂质生成的复合物递送载体, mRNA 分子嵌入于双层脂质之间。与 LNP 相比,LPX 的最大优势是实现了全身性靶向,适用于几乎所有类型的肿瘤疫苗。Reinhard 等^[20]使用 LPX 负载 CLDN6-mRNA,在对 OV-90 人类卵巢癌免疫缺陷 NSG (NOD scid gamma)的小鼠静脉给药后,CLDN6-LPX 对脾脏 CD8+DCs、CD8-DCs 和 F4/80+巨噬细胞定向转染,DCs 通过与 CLDN6 靶向的 CAR-T 细胞结合并为其提供生长信号,结果明显抑制了卵巢癌细胞的生长。此外,LPX-mRNA 在多种侵袭性小鼠肿瘤模型中显示了普遍和有效的抗肿瘤能力,包括 B16-OVA 和

B16F10-Luc (荧光素酶)黑色素瘤、CT26 和 CT26-luc 结肠癌、TC-1-Luc 宫颈癌^[21]。

虽然脂质纳米系统是目前认为最理想的递送系统,但多项研究表明其仍存在局限性,阻碍其实际应用^[22-23]。首先,脂质纳米系统的毒理学效应和有效载荷的组织分布仍未研究清楚,其安全性受到质疑。其次,脂质纳米系统的免疫原性较强,脂质纳米系统成分可诱导免疫应答,促进中性粒细胞浸润,促进促炎因子和活性氧的产生^[24]。此外,脂质纳米系统引起的副作用(如疼痛、发红和发烧)也有报道^[25-26]。因此,研究者还在不断优化脂质纳米系统以降低其毒性。

2.2.2 多聚物纳米颗粒

多聚物是一种良好的 mRNA 递送系统,具有良好的递送 mRNA 的能力。由于其精确可控和稳定的纳米化学结构、生物可降解性、易合成、易改性、功能多样性和大规模生产的可能性大,在生物医学工业中占有很大的比重。常用的多聚物有 3 种,包括阳离子聚合物、树枝状聚合物和多糖聚合物。阳离子聚合物具有易于合成和改性的优点,生理 pH 值下的阳离子聚合物作为基因载体,可以通过与带负电荷的 mRNA 相互作用形成纳米级的稳定多聚体。聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)是应用最广泛的阳离子聚合物之一,具有较高的 mRNA 传递效率。然而,PEI 生物降解性差、毒性高的缺点限制了其广泛的临床应用,为了减轻毒性,生物相容性或可降解成分被加入 PEI 配方中^[11,27]。Parayath 等^[28]开发了阳离子聚合物 PBAE 纳米颗粒,利用 PBAE-mRNA 技术在体内编码 CAR-T,在白血病和 LNCAP C42 前列腺瘤的 NSG 小鼠治疗中,PBAE-mRNA 工程的 T 细胞与体外工程 CAR-T 细胞治疗的疗效相当。尽管这些阳离子聚合物在体内显示出有效性,但它

们在 mRNA 传递中的潜力依然受到阳离子聚合物的毒性和复合物的高聚分散度指数的限制。因此还需要进一步地研究。

2.2.3 多肽/蛋白质纳米颗粒

多肽/蛋白质作为 mRNA 纳米递送载体具有稳定性、可设计性、良好的生物安全性、低免疫原性以及低毒性的优点。阳离子多肽含有许多赖氨酸和精氨酸残基,它们带正电并能与带负电的 mRNA 复合。例如,细胞穿透多肽(cell-penetrating peptide, CPPs)是一种阳离子多肽,可以不依赖于受体而通过细胞膜进行转运,具有良好的安全性和高效的转染能力,是一类很有应用前景的非病毒传递载体。然而,由于 CPPs 细胞和组织的低选择性,以及通过不同细胞层接合的货物内化功能受损,限制了其临床应用^[11,27]。鱼精蛋白也是一种阳离子多肽,可以保护包裹的 mRNA 不被细胞外核糖核酸酶降解。鱼精蛋白-mRNA 复合物通过胞吞作用进入细胞,通过 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)的髓系分化标志物 88 (myeloid differentiation marker 88, MyD88)依赖性途径激活免疫系统,该复合物还可以作为佐剂,激活 TLR7/8 以诱导 Th-1 型免疫反应。但是,鱼精蛋白-mRNA 化合物的翻译能力较差,这可能是由于鱼精蛋白与 mRNA 之间相互作用过于紧密。为了解决这一问题, Su 等^[29]开发了 RNAActive 技术,将鱼精蛋白-mRNA 复合体与裸露的抗原编码 mRNA 按照 1:1 比例结合, RNAActive 技术的产品对宫颈癌显示出较好的抗肿瘤效果。

2.2.4 混合纳米颗粒和其他

混合纳米颗粒整合了双材料或多种材料的物理化学特性,成为了一个有前景的 mRNA 递送平台。基于阳离子脂质体和阳离子蛋白多肽结合, Lei 等^[30]构建了鱼精蛋白/脂质体递送系统(protamine/liposome system, CLPP),研究发现

CLPP 递送系统能够通过鱼精蛋白高效地包裹 mRNA,不仅能有效地保护 mRNA,而且转染效率高、稳定性好。

聚合物和无机材料联合用于 mRNA 递送,可高效地包裹和递送 mRNA。Yin 等^[31]将聚乙亚胺和氧化石墨烯制备成可注射水凝胶,用来递送卵清蛋白 mRNA 和免疫佐剂。该纳米颗粒可以保护 mRNA 在 30 d 内不被降解,并定向递送到淋巴结,增加抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的数量,有效地抑制了肿瘤的生长。同时,这种水凝胶可以在血清中产生抗原特异性抗体,可防止转移的发生。

聚合物和脂质也常联合用于 mRNA 递送。脂多聚体(lipopolyplex, LPP)纳米递送系统是一种以聚合物包载 mRNA 为内核、磷脂包裹为外壳的双层结构。作为一种非病毒的基因递送载体, LPP 结合了聚合物和脂质体的优点,表现出卓越的稳定性、降低的细胞毒性、高的基因转染效率以及随着聚合物降解逐步释放 mRNA 分子的能力。例如, Persano 等^[32]开发了一种脂多聚复合物(LPP) mRNA 药物,由包裹在脂质外壳内的聚(β -氨基酸)多聚 mRNA 核组成。腹腔注射携带卵清蛋白抗原和酪氨酸酶相关蛋白 2 (tyrosinase-associated protein 2, TRP2) mRNA 的 LPP 可靶向 DC,激活 T 细胞免疫反应和黑素瘤肺转移,可使肿瘤减少 90%以上。除 LPP 之外, Kong 等^[33]研究并使用了 G0-C14 的阳离子脂质与 mRNA 形成复合物,然后聚乳酸-乙醇酸(poly-lactic acid-glycolic acid, PLGA)/PEG 包被。这种混合纳米制剂黏附在局部黏膜部位,增加了 mRNA 介导的对膀胱癌的抑制。McKinlay 等^[34]开发了被称为改变电荷可释放转运体(changing the charge releases the transporters, CARTs)的新型含脂聚合物。CARTs 为一种低聚物(碳酸-氨基酯),在低 pH 值下呈阳离子,但在 pH 7.4 时

发生重排。由于这些特性, CARTs 可以在低 pH 水平下与 mRNA 形成复合物, 有效地靶向 T 细胞, 从而清除肿瘤。

表 1 总结了以上代表性的 4 种 mRNA 递送纳米载体的优缺点。除此之外, 还有一些正在研发的纳米材料, 如介孔二氧化硅纳米颗粒^[35]、细菌的外膜囊泡(out membrane vesicles, OMVs)^[36]等。

3 mRNA 纳米递送系统的递送策略

将 mRNA 转导到 T 细胞中是 CAR-T 制备的重要步骤, 目前主要有体外编辑和体内编辑两种方式。

3.1 体外编辑

mRNA 的体外编辑是指将 CAR-T 制备中的病毒载体替换为 mRNA 纳米递送载体, 在体外对患者免疫细胞进行基因改造, 然后将改造后的免疫细胞回输到体内。Stephan 等^[37]在体外对 T 细胞进行了两种不同的编辑, 在第一种情况下, 将 mega TAL 核酸酶的 mRNA 递送到淋巴细胞中, 有效地破坏了 T 细胞表面受体的表达; 在第二种情况下, 将 Foxo1 的 mRNA 递送

到效应 T 细胞中, 将其重编程为功能记忆细胞。以上表明利用 mRNA 递送系统在体外编辑 CAR-T 细胞是可行的。但是, 该方法制备的 CAR-T 细胞不具备长期增殖性, 随着 CAR-T 的扩增, 会导致 CAR 的丢失。

3.2 体内递送

mRNA 的体内递送主要有瘤内注射和静脉注射两种方式。

3.2.1 瘤内注射

在肿瘤内局部注射 mRNA 纳米递送系统可以使其直接到达肿瘤部位, 避开血液免疫系统的清除作用, 提高表达效率。Li 等^[38]设计了仿生磷脂纳米制剂(标记为 PL1), 用于肿瘤内传递编码 OX40 的 mRNA。肿瘤内注射 PL1-OX40 mRNA 可上调肿瘤浸润 T 细胞上 OX-40 的表达, 增加了肿瘤部位 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞的浸润, 并降低了 FOXP3⁺调节性 T 细胞(Treg)/CD4⁺ T 细胞的比例, 显著提高抗 OX40 单抗对黑色素瘤的治疗效果。

3.2.2 静脉注射

静脉注射是临床上的常规药物注射方式, 可以将 mRNA 纳米递送载体通过血液系统递送到靶标部位。Rurik 等^[10]研究了靶向 T 细胞表

表 1 不同 mRNA 纳米递送载体的优缺点

Table 1 The advantages and disadvantages of different mRNA delivery vectors

Delivery method	Advantages	Disadvantages	References
Lipid nanoparticles	High biocompatibility, high encapsulate efficiency, efficient condensation of mRNA, better kinetic stability	Potential cytotoxicity, relatively short cycles, rapid renal clearance, short blood circulation half-life, causing immunogenic reactions	[12-15]
Polymer nanoparticles	Good biocompatibility, simple production process, controllable structure, diverse functions and good stability	Toxic substances contained in the components may have safety hazards, insufficient targeting capacity, limited drug carrying capacity, possible drug leakage	[11,27]
Peptide or protein-based nanoparticles	Lower charge density, better ability to penetrate cell membranes, low immunogenicity, low toxicity	Easy to degrade, short circulating half-life in the body, poor targeting	[11,27,29]
Hybrid nanoparticles	Customizability for easy surface modification and functionalized functions	Complex design and composition, potential immunogenicity and toxicity	[11,30-34]

面 CD5 靶点的 LNP-FAP CAR mRNA 递送系统, 将靶向 CD5 的 mRNA-LNP 注射到小鼠体内后, 成功在体内重编程了 T 细胞, 该 CAR-T 细胞具有抗纤维化作用, 有效地减少了损伤后的心肌纤维化。这展示了体内生成 CAR-T 的可能性。通过这种方式生成的 CAR-T 细胞是短期存在的, 对于心肌纤维化和自身免疫性疾病等非肿瘤性 CAR-T 细胞治疗来说, 有利于其控制剂量和减轻毒副作用, 具有广阔的前景。但是对于肿瘤治疗来说, 肿瘤细胞难清除, mRNA 纳米递送系统在体内瞬时制备 CAR-T 细胞, 不利于记忆性 CAR-T 细胞的形成, 而记忆性 CAR-T 细胞具有免疫监测肿瘤细胞产生和预防肿瘤复发等重要功能, 所以 mRNA 纳米递送系统在肿瘤的长期治疗过程中可能具有一定局限性^[39]。目前临床上暂无使用 mRNA 纳米递送系统体内制备 CAR-T 细胞治疗肿瘤的数据。

4 mRNA 纳米递送系统在 CAR-T 治疗方面的临床应用进展

当前, CAR-T 细胞治疗在血液系统恶性肿瘤中取得了显著疗效, 然而在实体瘤的治疗中仍面临巨大挑战。患者体内 CAR-T 细胞的持久性和扩增已被确定为影响抗肿瘤效果的关键因素。免疫“空间”的缺乏、功能衰竭和缺失都被认为是影响 CAR-T 细胞持久性的原因。这也是实体瘤难治疗的原因: 首先, CAR-T 细胞难以到达实体瘤组织部位, 导致 CAR-T 细胞与肿瘤细胞表面的蛋白相互作用力弱, 从而导致 CAR-T 细胞对肿瘤的杀伤效果弱且在体内获取的增殖信号不足; 其次, 在肿瘤免疫抑制的环境下, 虽然 CAR-T 细胞与肿瘤细胞表面抗原有一定的接触, 但 CAR-T 细胞依旧难以获得足够的增殖信号^[40]。若使用 mRNA 纳米递送载体直

接靶向于 T 细胞可能会导致 T 细胞过度活化和提前耗竭, 造成有害的影响, 如 Kheirloomoom 等^[41] 开发并优化了 mRNA 递送到 T 细胞的 CD3 靶向 mRNA-LNP, 在 aCD3-LNP 注射后 24 h, 全身性 CD25⁺、OX40⁺和 CD69⁺ T 细胞激活, 伴有暂时性 CD3e 配体丢失和脾脏 T 细胞亚群的耗竭。因此, mRNA 纳米递送系统治疗肿瘤最理想的是选择肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigens, TSA)当作 CAR-T 细胞治疗的靶点, 但是由于 TSAs 很少见, 大多数研究选择采用多个高表达的肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAA)当作靶点^[42]。mRNA 纳米递送系统携带 TSA/TAA 的 mRNA 通过静脉注射进入血液循环, 被抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC)摄取后, 促使 APC 细胞膜表面表达相应的 TSA/TAA, 通过 APC 与相应 CAR-T 细胞间的作用可以有效地促进 CAR-T 细胞的生长, 从而使 CAR-T 细胞能识别并杀死对应的肿瘤细胞^[43-44], 所以, mRNA 纳米递送系统在实体瘤的治疗中具有极大的应用潜力, 目前为止已有多项临床试验正在进行中, 适应症包括卵巢癌、黑色素瘤、肺癌等。

BNT211 是一种编码 claudin 6 (CLDN 6) TAAs 的 mRNA 药物, 其递送载体为 LPX (表示为 CLDN6-LPX)。CLDN6 作为一种在肿瘤细胞紧密连接中发挥重要作用的跨膜蛋白, 可以成为实体瘤患者 CAR-T 细胞治疗的新靶点。Reinhard 等^[20]使用 LPX 负载 CLDN6-mRNA, 在对 OV-90 人类卵巢癌免疫缺陷 NSG (NOD scid gamma)的小鼠静脉注射给药后, 发现仅单次注射就可显著诱导 CAR-T 细胞扩增; 重复对小鼠接种后, 可在小鼠体内检测到记忆性 CAR-T 细胞, 表明重复注射可以使 CAR-T 细胞具有更长的持久性; 注射 CLDN6 靶向的 CAR-T 细胞的小鼠肿瘤生长减缓, 而在接种

LPX-mRNA 的小鼠中, 60%的小鼠表现出对卵巢癌完全排斥, 这在动物实验水平证明了 mRNA 纳米递送系统对 CAR-T 细胞治疗实体瘤功效有增强作用。临床数据(NCT04503278)显示, 在接受 CLDN6 CAR-T 细胞治疗以及与 CARVac 联合治疗的 7 名可评估患者中, 有 4 名患者(57%)病情得到部分缓解, 1 名患者(14%) 在 6 周评估时病情稳定, 在为期 12 周的评估中报告了缓解反应^[45-46]。

BNT111 是一款治疗黑色素瘤的 mRNA 药物, 其编码酪氨酸酶(tyrosinase, Tyr)、MAGE-A3、NYESO-1 和 TPTE 4 种 TAA, 递送载体为 LPX, 通过静脉注射给药。I 期剂量递增试验(NCT02410733)中, 50 例患者中有超过 39 例患者(75%)被检测到对一种或多种肿瘤相关抗原产生免疫应答, 且在此过程中, BNT111 能够刺激产生 CAR-T 细胞识别并杀死肿瘤细胞。有 17 例患者接受了 BNT111 与抗 PD-1 联合治疗, 其中有 6 例患者(35%)产生了部分反应, 2 例患者(12%)病情稳定。25 例患者单独给予 BNT111 治疗, 其中 3 例患者(12%)病情得到部分缓解, 7 例患者(28%)病情稳定。该结果表明 BNT111 能诱导特异性抗肿瘤免疫应答, 且具有安全性和有效性^[47]。目前有一项随机 II 期临床试验(NCT04526899)正在对 BNT111 进行评估, 该试验单独使用 BNT111 或与抗 PD-1 抗体西米普利(cemiplimab)联用, 用以治疗难以通过抗 PD-1 抗体治愈的或复发性不可切除的 III 期和 IV 期黑色素瘤患者。与单独使用抗 PD-1 抗体西米普利(cemiplimab)相比, 使用 BNT111 和 cemiplimab 联合治疗后, 黑色素瘤患者的客观缓解率达到 24 个月, 展现出更佳临床效果。此外, Moderna 公司开发的 mRNA-4157 是黑色素瘤个性化癌症药物, 可编码 34 种 Neo-Ag, 其递送载体为 LNP。I 期剂量临床试验结果(NCT03313778)显

示, 在所有测试剂量下, 患者均具有良好耐受性, 并引发了 Neo-Ag 特异性 T 细胞反应^[48]。目前 mRNA-4157 已进入 II 期临床试验阶段(NCT03897881), 与单独使用 mRNA-4157 或帕博利珠单抗(pembrolizumab)相比, 二者联合使用后, 黑色素瘤患者的无复发生存期长达 3 年。

CV9201 是一种运用 RNActive 免疫技术并编码了 5 种非小细胞肺癌肿瘤相关抗原的鱼精蛋白封装的 mRNA 药物。在患者一线治疗病情稳定后进行了 I/II 期剂量递增试验临床研究(NCT00923312), 7 名 III b 期非小细胞肺癌患者和 39 名 IV 期非小细胞肺癌患者接受了 5 次 CV9201 皮内注射, 结果显示疫苗的耐受性良好。在 30 名可评估的患者中, 有 19 名患者(63%)检测到对至少一种肿瘤相关抗原的 T 细胞反应, 但与历史对照组相比, 该疗法并未提高总体存活率。在 I b 期临床试验(NCT01915524)评估了 RNActive 药物与局部放射相结合治疗 IV 期非小细胞肺癌患者的效果。在这项试验中, 编码 6 种肿瘤相关抗原的 RNActive (CV9202: CV9201 中使用的 5 种肿瘤相关抗原加上 MUC-1 中使用的肿瘤相关抗原)通过皮下注射方式给药。根据非小细胞肺癌的病理类型, 将患者分为 3 组。3 组患者中有 2 组继续接受化疗或酪氨酸激酶抑制剂治疗, 疫苗治疗耐受性良好。在 25 名可评估的患者中, 有 21 名患者(84%)检测到 CV9202 抗原特异性免疫, 1 名患者(3.8%)部分缓解, 26 名可评估患者中有 12 名患者(46.2%)达到疾病稳定状态^[49-50]。

5 前景与展望

mRNA-LNP 在 COVID-19 流行时的快速反应展示了 mRNA 疗法的巨大应用潜力, 推动了 mRNA 疗法在肿瘤等各种疾病中的探索和研究。但是, mRNA 纳米递送系统在 CAR-T 细胞

治疗应用过程中亦存在一些不足: (1) mRNA 纳米递送系统是一种蛋白的瞬时表达系统, 不能持久地表达蛋白, 无法使免疫细胞建立长期免疫监视。(2) 由于 mRNA 纳米递送系统介导蛋白表达的瞬时性, 因此需要多次给药才能达到治疗目标, 治疗流程相对复杂。(3) mRNA 纳米递送系统研发存在较多技术难题, 如: mRNA-LNP 需要低温保存, 储存和运输的条件苛刻; mRNA 纳米递送系统的不良反应较多, 递送载体的生物相容性及纯度有待提高。随着 mRNA 技术和递送载体开发技术的不断提高, 相信 mRNA 纳米递送系统能更好地用于临床肿瘤治疗。

REFERENCES

- [1] SOUNDARA RAJAN T, GUGLIANDOLO A, BRAMANTI P, MAZZON E. *In vitro*-transcribed mRNA chimeric antigen receptor T cell (IVT mRNA CAR T) therapy in hematologic and solid tumor management: a preclinical update[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6514.
- [2] 潘燕平, 张昊, 向虹, 阳小胡, 胡勇. mRNA 疗法在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(3): 154-158.
PAN YP, ZHANG H, XIANG H, YANG XH, HU Y. Application of mRNA in tumor immunotherapy[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2019, 46(3): 154-158 (in Chinese).
- [3] JIA LF, QIAN SB. Therapeutic mRNA engineering from head to tail[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(23): 4272-4282.
- [4] FOSTER JB, GRIFFIN C, ROKITA JL, STERN A, BRIMLEY C, RATHI K, LANE MV, BUONGERVINO SN, SMITH T, MADSEN PJ, MARTINEZ D, DELAIDELLI A, SORENSEN PH, WECHSLER-REYA RJ, KARIKÓ K, STORM PB, BARRETT DM, RESNICK AC, MARIS JM, BOSSE KR. Development of GPC2-directed chimeric antigen receptors using mRNA for pediatric brain tumors[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2022, 10(9): e004450.
- [5] HEWITT SL, BAILEY D, ZIELINSKI J, APTE A, MUSENGE F, KARP R, BURKE S, GARCON F, MISHRA A, GURUMURTHY S, WATKINS A, ARNOLD K, MOYNIHAN J, CLANCY-THOMPSON E, MULGREW K, ADJEI G, DESCHLER K, POTZ D, MOODY G, LEINSTER DA, et al. Intratumoral IL12 mRNA therapy promotes TH1 transformation of the tumor microenvironment[J]. *Clinical Cancer Research*, 2020, 26(23): 6284-6298.
- [6] RYBAKOVA Y, KOWALSKI PS, HUANG YX, GONZALEZ JT, HEARTLEIN MW, DeROSA F, DELCASSIAN D, ANDERSON DG. mRNA delivery for therapeutic anti-HER2 antibody expression *in vivo*[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(8): 1415-1423.
- [7] YE ZF, CHEN JJ, ZHAO XW, LI YM, HARMON J, HUANG CF, CHEN JZ, XU QB. *In vitro* engineering chimeric antigen receptor macrophages and T cells by lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2022, 8(2): 722-733.
- [8] OBERLI MA, REICHMUTH AM, DORKIN JR, MITCHELL MJ, FENTON OS, JAKLENEC A, ANDERSON DG, LANGER R, BLANKSCHTEIN D. Lipid nanoparticle assisted mRNA delivery for potent cancer immunotherapy[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(3): 1326-1335.
- [9] ISLAM MA, RICE J, REESOR E, ZOPE H, TAO W, LIM M, DING JX, CHEN YH, ADULUSO D, ZETTER BR, FAROKHZAD OC, SHI JJ. Adjuvant-pulsed mRNA vaccine nanoparticle for immunoprophylactic and therapeutic tumor suppression in mice[J]. *Biomaterials*, 2021, 266: 120431.
- [10] 顾盼盼, 高彤, 刘永军, 张娜. 纳米递送系统在 mRNA 肿瘤疫苗中的研究进展[J]. *药学报*, 2022, 57(8): 2327-2333.
GU PP, GAO T, LIU YJ, ZHANG N. Research progress of nano-delivery system in mRNA tumor vaccine[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(8): 2327-2333 (in Chinese).
- [11] RURIK JG, TOMBÁČZ I, YADEGARI A, MÉNDEZ FERNÁNDEZ PO, SHEWALE SV, LI L, KIMURA T, SOLIMAN OY, PAPP TE, TAM YK, MUI BL, ALBELDA SM, PURÉ E, JUNE CH, AGHAJANIAN H, WEISSMAN D, PARHIZ H, EPSTEIN JA. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury[J]. *Science*, 2022, 375(6576): 91-96.
- [12] HOU XC, ZAKS T, LANGER R, DONG YZ. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. *Nature Reviews Materials*, 2021, 6(12): 1078-1094.
- [13] 曹学智, 彭华, 傅阳心. 基于 mRNA-LNP 的肿瘤免

- 疫疗法[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(7): 605-612.
- CAO XZ, PENG H, FU YX. mRNA-LNP-based cancer immunotherapy[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2022, 29(7): 605-612 (in Chinese).
- [14] 叶柏新, 胡永仙, 张明明, 黄河. 脂质纳米粒-mRNA 递送系统及其在嵌合抗原受体 T 细胞治疗中的应用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(2): 185-191
- YE BX, HU YX, ZHANG MM, HUANG H. Research advance in lipid nanoparticle-mRNA delivery system and its application in CAR-T cell therapy[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2022, 51(2): 185-191 (in Chinese).
- [15] ZONG Y, LIN Y, WEI T, CHENG Q. Lipid nanoparticle (LNP) enables mRNA delivery for cancer therapy[J]. Advanced Materials, 2023: e2303261.
- [16] POLACK FP, THOMAS SJ, KITCHIN N, ABSALON J, GURTMAN A, LOCKHART S, PEREZ JL, PEREZ MARC G, MOREIRA ED, ZERBINI C, BAILEY R, SWANSON KA, ROYCHOUDHURY S, KOURY K, LI P, KALINA WV, COOPER D, FRENCK RW, JR., HAMMITT LL, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [17] BADEN LR, EL SAHLY HM, ESSINK B, KOTLOFF K, FREY S, NOVAK R, DIEMERT D, SPECTOR SA, ROUPHAEL N, McGETTIGAN J, KHETAN S, SEGALL N, SOLIS J, BROSZ A, FIERRO C, SCHWARTZ H, NEUZIL K, COREY L, GILBERT P, JANES H, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. The New England Journal of Medicine, 2021, 384(5): 403-416.
- [18] BILLINGSLEY MM, SINGH N, RAVIKUMAR P, ZHANG R, JUNE CH, MITCHELL MJ. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering[J]. Nano Letters, 2020, 20(3): 1578-1589.
- [19] QIU M, TANG Y, CHEN JJ, MURIPH R, YE ZF, HUANG CF, EVANS J, HENSKE EP, XU QB. Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioliomyomatosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(8): e2116271119.
- [20] REINHARD K, RENGSTL B, OEHM P, MICHEL K, BILLMEIER A, HAYDUK N, KLEIN O, KUNA K, OUCHAN Y, WÖLL S, CHRIST E, WEBER D, SUCHAN M, BUKUR T, BIRTEL M, JAHNDEL V, MROZ K, HOBHOM K, KRANZ L, DIKEN M, KULHCKE K, TURECI O, SAHIN U. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors[J]. Science, 2020, 367(6476): 446-453.
- [21] KRANZ LM, DIKEN M, HAAS H, KREITER S, LOQUAI C, REUTER KC, MENG M, FRITZ D, VASCOTTO F, HEFESHA H, GRUNWITZ C, VORMEHR M, HÜSEMANN Y, SELMI A, KUHN AN, BUCK J, DERHOVANESSIAN E, RAE R, ATTIG S, DIEKMANN J, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy[J]. Nature, 2016, 534(7607): 396-401.
- [22] KOZMA GT, SHIMIZU T, ISHIDA T, SZEBENI J. Anti-PEG antibodies: properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nano-biopharmaceuticals[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2020, 154/155: 163-175.
- [23] MCSWEENEY MD, MOHAN M, COMMINS SP, LAI SK. Anaphylaxis to pfizer/BioNTech mRNA COVID-19 vaccine in a patient with clinically confirmed PEG allergy[J]. Frontiers in Allergy, 2021, 2: 715844.
- [24] KEDMI R, BEN-ARIE N, PEER D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation[J]. Biomaterials, 2010, 31(26): 6867-6875.
- [25] NDEUPEN S, QIN Z, JACOBSEN S, ESTANBOULI H, BOUTEAU A, IGYÁRTÓ BZ. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory[J]. BioRxiv: the Preprint Server for Biology, 2021: 2021.03.04.430128.
- [26] WADMAN M. Public needs to prep for vaccine side effects[J]. Science, 2020, 370(6520): 1022.
- [27] LI DF, LIU QS, YANG MF, XU HM, ZHU MZ, ZHANG Y, XU J, TIAN CM, YAO J, WANG LS, LIANG YJ. Nanomaterials for mRNA-based therapeutics: challenges and opportunities[J]. Bioengineering & Translational Medicine, 2023, 8(3): e10492.
- [28] PARAYATH NN, STEPHAN SB, KOEHNE AL, NELSON PS, STEPHAN MT. *In vitro*-transcribed antigen receptor mRNA nanocarriers for transient expression in circulating T cells *in vivo*[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 6080.
- [29] SU L, ZHANG YW, ZHANG X, LIU T, LIU SJ, LI YY, JIANG MJ, TANG T, SHEN HQ, WANG C.

- Combination immunotherapy with two attenuated *Listeria* strains carrying shuffled HPV-16 E6E7 protein causes tumor regression in a mouse tumor model[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 13404.
- [30] LEI S, ZHANG X, MEN K, GAO Y, YANG X, WU S, DUAN X, WEI Y, TONG R. Efficient colorectal cancer gene therapy with IL-15 mRNA nanoformulation[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2020, 17(9): 3378-3391.
- [31] YIN Y, LI XY, MA HX, ZHANG J, YU D, ZHAO RF, YU SJ, NIE GJ, WANG H. *In situ* transforming RNA nanovaccines from polyethylenimine functionalized graphene oxide hydrogel for durable cancer immunotherapy[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(5): 2224-2231.
- [32] PERSANO S, GUEVARA ML, LI ZQ, MAI JH, FERRARI M, POMPA PP, SHEN HF. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination[J]. *Biomaterials*, 2017, 125: 81-89.
- [33] KONG N, ZHANG RN, WU GW, SUI XB, WANG JQ, KIM NY, BLAKE S, DE DB, XIE T, CAO YH, TAO W. Intravesical delivery of *KDM6A*-mRNA via mucoadhesive nanoparticles inhibits the metastasis of bladder cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(7): e2112696119.
- [34] MCKINLAY C, VARGAS JR, BLAKE TR, HARDY J, KANADA M, CONTAG C, WENDER P, WAYMOUTH R. Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114: E448-E456.
- [35] ZHANG W, LIU Y, MIN CHIN J, PHUA KKL. Sustained release of PKR inhibitor C16 from mesoporous silica nanoparticles significantly enhances mRNA translation and anti-tumor vaccination[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e V*, 2021, 163: 179-187.
- [36] LI Y, MA XT, YUE YL, ZHANG KY, CHENG KM, FENG QQ, MA NN, LIANG J, ZHANG TJ, ZHANG LZ, CHEN ZQ, WANG XW, REN L, ZHAO X, NIE GJ. Rapid surface display of mRNA antigens by bacteria-derived outer membrane vesicles for a personalized tumor vaccine[J]. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla)*, 2022, 34(20): e2109984.
- [37] MOFFETT HF, COON ME, RADTKE S, STEPHAN SB, McKNIGHT L, LAMBERT A, STODDARD BL, KIEM HP, STEPHAN MT. Hit-and-run programming of therapeutic cytoreagents using mRNA nanocarriers[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 389.
- [38] LI WQ, ZHANG XF, ZHANG CX, YAN JY, HOU XC, DU S, ZENG CX, ZHAO WY, DENG BB, McCOMB DW, ZHANG YB, KANG DD, LI JN, CARSON WE 3rd, DONG YZ. Biomimetic nanoparticles deliver mRNAs encoding costimulatory receptors and enhance T cell mediated cancer immunotherapy[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 7264.
- [39] BIASCO L, IZOTOVA N, RIVAT C, GHORASHIAN S, RICHARDSON R, GUVENEL A, HOUGH R, WYNN R, POPOVA B, LOPES A, PULE M, THRASHER AJ, AMROLIA PJ. Clonal expansion of T memory stem cells determines early anti-leukemic responses and long-term CAR T cell persistence in patients[J]. *Nature Cancer*, 2021, 2(6): 629-642.
- [40] GARGETT T, YU WB, DOTTI G, YVON ES, CHRISTO SN, HAYBALL JD, LEWIS ID, BRENNER MK, BROWN MP. GD2-specific CAR T cells undergo potent activation and deletion following antigen encounter but can be protected from activation-induced cell death by PD-1 blockade[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(6): 1135-1149.
- [41] KHEIROLOMOOM A, KARE AJ, INGHAM ES, PAULMURUGAN R, ROBINSON ER, BAIKOGHLI M, INAYATHULLAH M, SEO JW, WANG J, FITE BZ, WU B, TUMBALE SK, RAIE MN, NICHOLS L, BOROWSKY AD, FERRARA KW. *In situ* T-cell transfection by anti-CD3-conjugated lipid nanoparticles leads to T-cell activation, migration, and phenotypic shift[J]. *Biomaterials*, 2022, 281: 121339.
- [42] KON E, AD-EL N, HAZAN-HALEVY I, STOTSKY-OTERIN L, PEER D. Targeting cancer with mRNA-lipid nanoparticles: key considerations and future prospects[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2023, 20(11): 739-754.
- [43] PORTER DL, HWANG WT, FREY NV, LACEY SF, SHAW PA, LOREN AW, BAGG A, MARCUCCI KT, SHEN A, GONZALEZ V, AMBROSE D, GRUPP SA, CHEW A, ZHENG ZH, MILONE MC, LEVINE BL, MELENHORST JJ, JUNE CH. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(303): eaac5415.
- [44] ZHANG YB, HOU XC, DU S, XUE YE, YAN JY,

- KANG DD, ZHONG YC, WANG C, DENG BB, MCCOMB DW, DONG YZ. Close the cancer-immunity cycle by integrating lipid nanoparticle-mRNA formulations and dendritic cell therapy[J]. *Nature Nanotechnology* 2023, 18(11): 1364-1374.
- [45] MACKENSEN A, KOENECKE C, HAANEN J, ALSDORF W, DESUKI A, WAGNER-DROUET E, HEUDOBLER D, BORCHMANN P, WIEGERT E, SCHULZ C, RENGSTL B, PREUSSNER L, TUERECI O, SAHIN U. 958 BNT211: a phase I/II trial to evaluate safety and efficacy of CLDN₆ CAR-T cells and vaccine-mediated *in vivo* expansion in patients with CLDN6-positive advanced solid tumors[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(suppl 2): A1008.
- [46] HAANENJB, MACKENSEN A, KOENECKE C, ALSDORF W, WAGNER-DROUET E, HEUDOBLER D, BORCHMANN P, BOKEMEYER C, KLOBUCH S, DESUKI A, LÜKE F, WIEGERT E, SCHULZ C, RENGSTL B, PREUSSNER L, TÜRECI Ö, SAHIN U. Abstract CT002: BNT211: a phase I trial to evaluate safety and efficacy of CLDN₆ CAR-T cells and CARVac-mediated *in vivo* expansion in patients with CLDN6-positive advanced solid tumors[J]. *Cancer Research*, 2022, 82(12_supplement): CT002.
- [47] SAHIN U, OEHM P, DERHOVANESEAN E, JABULOWSKY RA, VORMEHR M, GOLD M, MAURUS D, SCHWARCK-KOKARAKIS D, KUHN AN, OMOKOKO T, KRANZ LM, DIKEN M, KREITER S, HAAS H, ATTIG S, RAE R, CUK K, KEMMER-BRÜCK A, BREITKREUZ A, TOLLIVER C, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma[J]. *Nature*, 2020, 585(7823): 107-112.
- [48] KHUSHALANI N, BROHL A, MARKOWITZ J, BAZHENOVA L, DANIELS G, YECKES-RODIN H, FU S, MCCORMICK L, KURMAN M, GILLINGS M, LEE G, EROGLU Z. 797 significant anti-tumor activity of HBI-8000, a class I histone deacetylase inhibitor (HDACi) in combination with nivolumab (NIVO) in anti-PD1 therapy-naïve advanced melanoma (TN-Mel)[Z]. *Late-breaking Abstracts*. 2020: A476.472-A477.10.1136/jitc-2020-SITC2020.0797.
- [49] SEBASTIAN M, SCHRÖDER A, SCHEEL B, HONG HS, MUTH A, BOEHMER L, ZIPPELIUS A, MAYER F, RECK M, ATANACKOVIC D, THOMAS M, SCHNELLER F, STÖHLMACHER J, BERNHARD H, GRÖSCHEL A, LANDER T, PROBST J, STRACK T, WIEGAND V, GNAD-VOGT U, et al. A phase I/IIa study of the mRNA-based cancer immunotherapy CV9201 in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2019, 68(5): 799-812.
- [50] PAPACHRISTOFILOU A, HIPPE MM, KLINKHARDT U, FRÜH M, SEBASTIAN M, WEISS C, PLESS M, CATHOMAS R, HILBE W, PALL G, WEHLER T, ALT J, BISCHOFF H, GEIBLER M, GRIESINGER F, KALLEN KJ, FOTIN-MLECZEK M, SCHRÖDER A, SCHEEL B, MUTH A, et al. Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2019, 7(1): 38.

(本文责编 陈宏宇)