mRNA治疗及其应用前景

杭辰悦¹, 徐山杉¹, 吴其峰¹, 张普昱¹, 张宇², 徐颖洁^{2,3*}

1. 上海交通大学医学院上海-渥太华联合医学院, 上海 200025;

2. 上海交通大学医学院生化与分子细胞生物学系, 上海 200025;

3. 上海市肿瘤微环境与炎症重点实验室, 上海 200025

* 联系人, E-mail: xuyingjie@shsmu.edu.cn

2021-02-27 收稿, 2021-04-14 修回, 2021-04-15 接受, 2021-04-16 网络版发表

上海交通大学科技创新重点前瞻布局基金(2019TPA10)资助

摘要 信使核糖核酸(mRNA)是由DNA的一条链作为模板转录而来的携带遗传信息、指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。随着mRNA体外合成中修饰调控/序列优化系统的日益完善和体内递送系统的逐渐成熟, mRNA缺乏稳定性及无法有效递送等缺点已经逐渐被克服, 基于mRNA的治疗方法已逐步成为研究热点。通过体外转录技术合成的mRNA, 借助脂质纳米颗粒递送系统运送到特定的组织细胞内, 由细胞自身的翻译系统翻译出目标蛋白。这些蛋白或是作为抗原激发免疫反应, 或是补充细胞内缺少的蛋白以行使功能, 最终达到治疗的目的。mRNA治疗具有的制备快速、成本低、安全等优点让它在众多治疗方法中脱颖而出, 被广泛地应用于癌症疫苗、感染性疾病疫苗、蛋白替代治疗和罕见病治疗等领域。为了解全球mRNA治疗的开发和研究现状, 本文重点对mRNA治疗的修饰调控/序列优化系统、递送系统以及临床研究现状进行分析和总结。

关键词 mRNA治疗, 癌症, 疫苗, 罕见病, 递送系统, 修饰调控/序列优化

mRNA治疗是一种通过体外转录技术合成mRNA, 选择合适的递送系统将mRNA运输进入机体, 依靠细胞自身的翻译系统将mRNA翻译成目标蛋白(图1), 从而达到临床治疗目的的先进疗法。1990年, Wolff等人^[1]首次报道了将体外转录的mRNA直接注入小鼠体内后检测到相应蛋白产物的实验, 为mRNA治疗拉开了序幕。但mRNA应用面临两大难点: 第一, 缺少高效的体内递送系统, 难以将mRNA高效地递送至细胞内部; 第二, mRNA自身不稳定, 容易被RNA酶降解, 所以mRNA治疗早期发展缓慢。近年来, 递送系统和修饰调控/序列优化系统相关技术已日益成熟, 基本解决了这两大难点。2017年, Sahin等人^[2]首次报道了将针对多种抗原的个性化mRNA癌症疫苗应用于黑色素瘤患者的临床试验, 13名受试者中有8名得到了有效治疗, 并且1

年内没有复发。2020年12月底, Moderna和BioNTech公司的新型冠状病毒mRNA疫苗由于其优异Ⅲ期临床试验结果, 已通过美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)紧急授权并开始免疫接种。这些临床应用方面的重大进展, 再次在全球激起了mRNA治疗研究的热潮。本文将聚焦体外转录mRNA分子的修饰调控/序列优化系统, 以及mRNA作为极具希望的新一代生物大分子药物的临床应用场景作详细的综述, 总结了mRNA治疗领域的挑战和对未来的展望, 旨在帮助读者了解mRNA治疗及其应用前景, 并为mRNA治疗的研究提供参考依据。

1 mRNA治疗概述

mRNA治疗涉及癌症疫苗、感染性疾病疫苗、蛋

引用格式: 杭辰悦, 徐山杉, 吴其峰, 等. mRNA治疗及其应用前景. 科学通报, 2021, 66: 3649–3666

Hang C Y, Xu S S, Wu Q F, et al. mRNA-based therapies and their clinical prospects (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 3649–3666, doi: 10.1360/TB-2021-0222

图1 mRNA治疗的简短过程介绍(在BioRender.com网站制作)

Figure 1 A brief introduction of mRNA therapy (created with BioRender.com)

白替代治疗、罕见病治疗等领域。在蛋白质替代治疗中, mRNA会在靶细胞内翻译出所需蛋白。在传染病和肿瘤的治疗中, mRNA会翻译出相应抗原, 进而激活或加强特异性免疫, 从而达到预防传染病或加强肿瘤免疫的效果^[3,4]。mRNA治疗具有许多优势。第一, 安全: 相比需要入核的DNA, mRNA在胞质中发挥作用, 没有整合到基因组的风险; 而且mRNA可以通过细胞内正常途径降解, 我们还能通过调整mRNA的修饰和选择不同的递送系统来调节体内mRNA的半衰期^[5~9]; mRNA自身的免疫原性也可以通过修饰调控/序列优化减弱^[5,8,9]。第二, 高效: 适当的修饰调控/序列优化系统可以使得mRNA的稳定性和翻译效率显著提高^[5,8,9]; 高效的递送系统可以使mRNA被迅速摄取并在胞质表达; mRNA作为最小的基因载体, 免疫原性低, 不会因抗载体反应被降解, 可多次翻译, 提高效率。第三, 制备快速: 针对已知序列的任意靶点蛋白, 其mRNA可以在很短时间内合成, 这在针对暴发性感染性疾病的疫苗研发中极具优势。相对传统疫苗而言, mRNA体外转录效率高, 能快速、规模化生产, 适用于流感病毒、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)等高变异性病毒疫苗的研发。另外, 基因工程技术的发展使得mRNA更加适用于个性化医疗。

2 mRNA的修饰调控/序列优化系统

早期的研究表明, mRNA药物的治疗效果受到半衰期短、蛋白表达量低等缺陷的限制, 所以需要通过对mRNA进行化学修饰或序列设计优化以提高其转录稳定性和翻译效率^[10], 正确的设计对治疗效果具有直接的影响。我们围绕针对真核细胞成熟功能性mRNA的5个组件的优化展开介绍(图2), 这5个组件包括: 帽子结构(Cap)、5'端非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)、开放阅读框(open reading frame, ORF)、3'端非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)和多聚腺苷酸(Poly(A))尾。

2.1 帽子结构

真核细胞的mRNA在5'端具有1个保护性的帽子结构(Cap), 帽子结构可以防止未成熟的mRNA被5'核酸外切酶降解, 降低mRNA免疫原性, 同时可以招募pre-mRNA剪切、mRNA运输和翻译时所需要的蛋白^[11]。因此, 帽子结构对于增强mRNA的稳定性和促进翻译起始具有重要的生理意义。常见的帽子结构见图3。

mRNA Cap的典型结构特点是, 7-甲基鸟苷通过焦磷酸键和1个核糖核酸相连形成m⁷GpppN结构。在真核

图2 (网络版彩色)可高效翻译的mRNA结构示意图

Figure 2 (Color online) The structure of the mRNA that can translate effectively

图3 mRNA cap的常见结构^[11]

Figure 3 Common structure of mRNA cap analogues^[11]

细胞和部分病毒中, 它的多样性由首译的前两个核糖核酸的2'-OH基团甲基化状态所决定。2'-OH基团甲基化的Cap(如Cap1和Cap2)可以阻止内源性mRNA与IFIT1(interferon induced proteins with tetratricopeptide repeats)的结合, 防止翻译受阻。已被发现的传统内源性Cap结构有3种, 即Cap0、Cap1、Cap2, 其中后两种在哺乳动物细胞中最为常见。如果脊椎动物mRNA的第一个核苷酸是Am或者A, 那么在其N6位上也可能发生甲基化, 形成m6Am。最近发现, 转录起始位点(transcription start site, TSS)附近m6Am的存在能提高mRNA的稳定性, 并且提高翻译效率^[11]。

因为体外转录使用的DNA模板通常不含有编码5'端帽子结构的序列, 所以体外加帽是设计mRNA药物中关键的一步。在体外转录的体系中加入帽子结构进行共转录是一种可行的加帽方式。这项技术也面临着3个方面的限制。其一, 在添加Cap0帽子时, 可能产生不稳定且无法正确翻译的反向加帽RNA(Gpppm7G-

RNA), 因为聚合酶也可以从m7G的3'-OH开始转录。随着抗反向帽类似物(anti-reverse cap analog, ARCA)的发展, 这个问题得到了解决。ARCA具有额外甲基化修饰的3'-OH或2'-OH结构, 或者在3'-OH或2'-OH结构处被进行了脱氧处理, 可解决反向戴帽的问题^[12,13]。然而, ARCA加帽mRNA和天然mRNA的结构并不一样, 可能在生化功能上出现差异。第二个限制是使用帽子类似物时, 三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)会竞相添加到合成的mRNA中, 导致未加帽mRNA的产生, 降低了加帽效率^[13]。这些未被加帽但含有5'三磷酸的mRNA具有更强的免疫原性, 并会很快被RNA酶降解。目前的解决方案通常是一方面使用磷酸酶处理, 以去除未加帽mRNA的5'末端的三磷酸, 而降低其免疫原性^[14], 另一方面通过减少GTP的用量来提升加帽效率。此外, mRNA也会在细胞质中被脱帽酶去除帽子, 导致mRNA无法被正确地翻译表达。

因此, 除了ARCA外, 还有各种化学修饰的帽子类似物被研究出来以解决上述问题, 以下列举部分具有代表性的帽子类似物, 如锁核酸(locked nucleic acid, LNA)帽子类似物(一种化学修饰过的ARCA)。研究表明, LNA是T7 RNA聚合酶的高效底物, 并且转录出的mRNA加尾后可以在体外高效翻译。实验结果显示, 5'-LNA修饰加帽mRNA的稳定性分别是未加帽mRNA、Cap0-mRNA和常规ARCA帽子mRNA的4.23、1.61和1.28倍, 翻译效率大约是Cap0-mRNA的3.2倍^[15]。再如, 新帽子类似物N7-苄基化二核苷四磷酸类似物, 在eIF4E亲和力、帽子依赖的翻译阻碍效应、加帽率、合成方向正确率和体外转录效率等5个参数方面, 与以前经典的帽子类似物相比, 都有令人惊喜的优势。研究表明, 其中b7m2Gp4G、m7Gp3m7G、b7m3'-OGp4G和

m7Gp4m7G加帽的mRNA翻译效率分别是m7Gp3G mRNA的2.5、2.6、2.8和3.1倍^[16]。

目前,随着技术的成熟和探索,研究证实酶学加帽法是另一种可行的加帽方式。基于牛痘病毒加帽酶(vaccinia virus capping enzyme, VCE)的酶学加帽法已经有了完整的系统和应用。VCE由D1和D12两个亚基组成。其中, D1亚基具有3种酶(RNA三磷酸酶、鸟苷转移酶和鸟嘌呤甲基转移酶)的活性,能够将完整的m7Gppp5'(Cap0)结构添加到5'三磷酸RNA上^[17,18]。在体外转录时,只需要提供加帽酶、反应缓冲液、GTP和甲基供体SAM(S-adenosyl methionine)的反应体系,加帽便可在1 h之内完成,并且正向加帽效率接近百分之百,优于添加共转录帽子类似物的方法^[16]。在Cap0的基础上,还可以通过2'OH甲基转移酶(如New England Biolabs的产品M0366)产生Cap1结构,减少对宿主先天免疫系统的刺激,降低mRNA的免疫原性。虽然VCE系统的优点有目共睹,但仍然不能直接让mRNA获得天然Cap1或者Cap2结构,加帽反应仍需在转录完成之后进行,且针对不同长度和二级结构的mRNA体外转录(*in vitro* transcription, IVT)产物的加帽效率还需要优化,因此工艺也相对更为复杂。

最近, Trilink公司研发出的CleanCap技术,使得共转录产生天然Cap1结构成为可能。研究显示,使用CleanCap(Cap1类似物),加帽效率可以稳定在94%,可用于解决ARCA法加帽效率低或酶学加帽法中酶成本高的问题。

2.2 5'UTR

5'UTR(5' untranslated region)是影响翻译效率的主要因素之一。在真核细胞中,翻译开始前mRNA需要招募核糖体亚基结合到其5'm7G cap上,但起始密码子又常常在5'm7G cap下游较远的地方,所以核糖体亚基需要经过5'UTR到达起始密码子AUG(adenine-uridine-guanine)处,从而开始翻译。因此,5'UTR的长度和结构对翻译的起始具有重要影响。有研究报道,5'UTR对癌细胞的基因表达也许有着重要的影响,如*BRCA1*这种常常在乳腺癌中被沉默的抑癌基因^[19]。在乳腺癌细胞中的mRNA的5'UTR具有更长的序列、更多的uAUG序列(upstream AUG, uAUG, 即存在5'UTR区中的三联体AUG序列)和更复杂的二级结构,这可能是导致抑癌基因*BRCA1*不能表达的原因之一^[19]。也有研究指出,紧密的二级结构可以阻止核糖体的结合,所以在设计

mRNA时,5'UTR不能太长或太紧密^[20]。

同时,上游开放阅读框序列(upstream open reading frame, uORFs, 即存在5'UTR的一段包含起始密码子和终止密码子的连续碱基序列)或者uAUGs的存在对蛋白表达具有负面影响。因为uORFs的存在可能会抑制ORF区基因的表达^[21],也可能导致mRNA的降解^[22]。所以,设计mRNA时,应该避免在5'UTR区域引入开放阅读框和起始密码子AUG。

最后,在5'UTR区域,引入强的Kozak序列可以加强起始密码子的识别,让mRNA更容易被翻译(在哺乳动物中Kozak序列是GCCRCCAUGG,其中R代表嘌呤)^[23]。

2.3 3'UTR

3'UTR(3' untranslated region)是mRNA不稳定因素的集中区域。3'UTR内的AU富集序列(AU-rich elements, AREs)是激活mRNA快速衰变的顺式作用序列,AREs上的AUUUA重复序列数量和位置对Poly(A)尾的缩短和RNA降解有关键的影响^[24,25]。而该区域上的另一GU富集序列(GU-rich elements, GREs),在哺乳动物细胞中能与CELF1(CUGBP, Elav-Like Family Member 1)蛋白结合从而加快mRNA的衰变^[26]。因此在设计mRNA时,应尽量避免在3'UTR引入以上富集序列。

另外,在原本不稳定HEK293细胞绿色荧光蛋白基因(*EGFPd2*)的mRNA上引入人类 β -球蛋白的3'UTR序列后,该mRNA的稳定性和翻译效率得到显著增加^[27]。有研究表明,3'UTR上若存有胞嘧啶(C)富集区(C-rich elements, CREs, 比如人 α -球蛋白的3'UTR中),也能提高mRNA的稳定性。其机理是CRE可以与 α CP(alpha-globin Poly(C)-binding protein)蛋白结合,而 α CP又可以与PABP(Poly(A)-binding protein)发生相互作用而保护mRNA不被核糖核酸酶降解^[28]。

此外,终止密码子后的核苷酸也会影响翻译终止的效率,这种核苷酸称作有效核苷酸,而在人类体内,G和A是最常被保留下来的有效核苷酸^[29]。

2.4 开放阅读框架

在mRNA的开放阅读框架(open reading frame, ORF)中,每相邻的3个核苷酸组成密码子,在翻译时代表某一种氨基酸。密码子的组成对mRNA的翻译效率和稳定性都有显著影响^[30,31]。同义密码子是指序列不同但是对应氨基酸相同的密码子,而不同生物常用的

密码子组成都不相同,即使用不同的同义密码子.故将mRNA注射到人体内,原宿主的mRNA包含的密码子虽然对应相同的氨基酸,但是并不常用,导致mRNA进入人体后不稳定并且翻译效率低,故需要将人类不常用的密码子替换掉,即为密码子优化^[30,31].将常用的密码子替换不常用的密码子后发现,mRNA的稳定性显著提高,降解速率变慢了,并且tRNA移位的速率也变快了^[30].研究还发现,密码子优化后mRNA的翻译效率也有所提高的原因在于,翻译过程中可以使用相同的tRNA来翻译相同组成的密码子^[32].Hia等人^[33]则发现,含有更多第3位为G或C密码子的mRNA比含有更多第3位为A或T密码子的mRNA稳定性高并且翻译效率高.密码子环境对mRNA的翻译也有影响,多个稀有密码子聚集在一起更容易造成翻译问题,比如移码、错义^[34-36].Van Gulck等人^[37]使用经密码子优化的mRNA疫苗来诱导HIV病人体内的T细胞免疫应答反应,并取得成功.Karikó等人^[9]在实验中也使用了密码子优化,使mRNA翻译效率增加.虽然密码子优化可以增加稳定性和翻译效率,但是有些蛋白质需要使用比较稀有的密码子使翻译时间变长,来确保蛋白质可以正常折叠^[38].

2.5 多聚腺苷酸尾

Poly(A)尾是影响mRNA翻译效率和稳定性的重要因素.在翻译效率方面,Poly(A)尾和5'帽的协同作用可以增加翻译效率.在稳定性方面,Poly(A)尾的作用在于,Poly(A)尾的去除是大多数真核mRNA降解的第一步和限速步骤,且Poly(A)尾的存在可以抑制mRNA的降解和脱帽.

Poly(A)尾的重要作用决定了实验中对mRNA进行加尾处理的必要性.在体外为mRNA加尾有两种方式:第一种是先进行体外转录,再通过酶促多聚腺苷酸化将Poly(A)尾加到mRNA上;第二种是将Poly(A)尾序列加在模板上,直接通过体外转录合成带Poly(A)尾的mRNA.通过酶促反应进行加尾时,需要注意的是,Poly(A)尾后若有其他碱基可能会影响其功效,因此应避免在体系中混入其他核苷酸.与此同时,最好将Poly(A)尾的长度保持在最佳的100~120个核苷酸^[39,40].Par-di等人^[41]研究出的流感疫苗的Poly(A)尾长度即为101个核苷酸;而在BioNTech公司公开的专利中,长度为120个核苷酸的Poly(A)尾有最高的稳定性和翻译效率^[10].但由于酶促反应进行加尾受到温度、酶质量等

反应条件的影响较大,导致Poly(A)尾长度无法保证完全一致,故在大多临床试验中只能保证加尾长度最少为多少,如果需要保证精准的Poly(A)尾长度则需采用第二种方法.

2.6 化学修饰核苷酸

IVT合成mRNA时,主要产物为单链RNA,但由于转录起始时并不稳定,会导致短的双链RNA生成.而进入生物体后,双链RNA会激活Toll样受体3(Toll-like receptor 3, TLR3),单链RNA会激活TLR7和TLR8,而这些受体的激活会进一步激活先天免疫系统.这一问题随着化学修饰核苷酸的出现,逐渐得到了解决.研究发现,通过使用6-甲基腺苷(m6A)以及2-硫尿苷(s2U)替代原有核苷酸,可以抑制激活TLR3;而使用5-甲基胞苷(m5C)、5-甲基尿苷(m5U)、2-硫尿苷(s2U)、6-甲基腺苷(m6A)以及假尿苷(Ψ)则可阻断对TLR7和TLR8的激活,从而避免先天免疫系统的激活^[42].化学修饰核苷酸的作用得到了众多实验的验证.Karikó等人^[9]证明,将含有假尿苷的mRNA注射给小鼠后,翻译效率提高并且不会引起免疫应答反应.Kormann等人^[43]发现,将mRNA上25%的胞嘧啶替换为5-甲基胞苷、25%的尿苷替换为2-硫尿苷后,该mRNA具有较低的免疫原性和较高的稳定性,且可以在小鼠体内翻译出更多产物.Mays等人^[44]的结果则表明,相比于未修饰的mRNA,含有10% 5-甲基胞苷和10% 2-硫尿苷的mRNA在体外和小鼠体内均有更高的翻译效率.不过由于按比例替代天然核苷酸操作更为复杂,目前对mRNA药物进行的动物和临床试验采用的都是100%使用化学修饰核苷酸来替代天然核苷酸.

3 mRNA治疗的递送系统

对于mRNA治疗来说,递送系统(图4)的选择至关重要.递送系统分为非靶向递送(non-targeted delivery)系统和靶向递送(targeted delivery)系统.非靶向递送是指运输进入机体的mRNA非特异性地进入各类细胞或组织,常常使用脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)来完成.靶向递送则是指通过结合抗体或核酸适配体等方式,将mRNA靶向递送到特定的细胞或组织.

非靶向递送系统包括LNP、多聚体纳米颗粒(polymer-based nanoparticles)和蛋白衍生物-mRNA复合物(protein derivatives mRNA complexes).LNP通常由4个部分组成,分别是阳离子脂质、脂质连接的聚乙二醇

图4 不同种类的递送系统(在BioRender.com网站制作)

Figure 4 Different kinds of delivery system (created with BioRender.com)

(polyethylene glycol, PEG)、胆固醇和天然磷脂。阳离子脂质能够与mRNA一起组装成病毒大小的颗粒,并协助mRNA在细胞质中的释放;PEG可延长制剂的半衰期;胆固醇主要起稳定剂的作用;而天然磷脂则构建起脂质单层结构,将阳离子脂质-mRNA包裹于其中。在过去,大部分LNP商业试剂在体内递送效果不佳,且具有肝损伤毒性和载体免疫原性,因而很难用于人体。但是,随着技术的进步,2018年FDA批准使用的用于递送小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)药物Onpatro的载体LNP^[45]和目前用于递送新型冠状病毒mRNA疫苗BNT162b2的载体LNP^[46]出现并成为了相对安全的载体。多聚体纳米颗粒封装mRNA可保护mRNA并使其免于降解,并且其特定的化学性质可以帮助细胞摄取和内体逃逸。常用的聚合物递送系统材料有聚酰胺(poly-amido-amine, PAA)、聚β氨基酯(poly-beta amino-esters, PBAEs)和聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI),其中PEI应用最广泛。基于PEI偶联物的递送载体主要用于mRNA疫苗,而PAA则被用于蛋白质替代疗法,如递送编码促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的mRNA^[47]。蛋白衍生物-mRNA复合体是指将鱼精蛋白等蛋白直接缀合到RNA,该复合体通过胞吞作用进入细胞,通过涉及Toll样受体(TLR7和TLR8)的MyD88依赖性途径激活免疫系统^[48]。

靶向递送系统主要有利用抗原抗体特异性结合和核酸适配体及其受体特异性结合两种模式。其原理是在运载mRNA的纳米颗粒(nanoparticle, NP)中加入靶向特定细胞表面分子的抗体或者核酸适配体,通过抗原-抗体作用或核酸适配体-受体的高亲和力结合,来实现mRNA向目的细胞的特异性运输^[49-51]。

4 mRNA治疗的应用

4.1 mRNA癌症疫苗

1990年, Wolff等人^[1]发现肌肉注射mRNA后,小鼠体内可以检测到相应的蛋白。1995年, Conry等人^[52]通过肌肉注射癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) mRNA,使小鼠获得了抗肿瘤的免疫反应。至此,利用mRNA诱导抗原特异性免疫反应来治疗癌症的方法,即mRNA癌症疫苗疗法的研发由此展开。

mRNA癌症疫苗常用的临床方法有树突状细胞mRNA癌症疫苗、mRNA癌症疫苗直接注射、外周血细胞mRNA癌症疫苗、编码嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的mRNA等。

树突状细胞mRNA癌症疫苗是指在树突状细胞(dendritic cell, DC)这一抗原递呈细胞中转入抗原mRNA,使其翻译并递呈抗原,从而激发特异性免疫反应。疫苗的制作过程见图5,先在体外培养DC细胞,通过电转等方式将mRNA转入并促进DC细胞的成熟,最后将DC细胞通过各种途径输入人体内。mRNA疫苗自身的免疫原性一方面促进树突状细胞成熟,并由此促进B、T细胞免疫反应;另一方面可能会减少mRNA疫苗自身的翻译,从而减少了树突状细胞抗原的递呈。这两方面之间的平衡,需要在具体疫苗运用中具体考虑。树突状细胞癌症疫苗的效能可以通过添加佐剂(adjuvant)或免疫调节因子mRNA来提升。例如, Trimix (CD70、CD40L和组成型活性TLR4 mRNA)作为一种可以与抗原mRNA组合进行电穿孔的佐剂,可以增加疫苗的免疫原性^[53,54];分别用编码共刺激分子(如CD83)^[55]、肿瘤坏死因子受体超家族成员4(Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, TNFRSF4,也称为OX40)^[56]和4-1BB配体(4-1BBL)^[57,58]的mRNA联合抗原mRNA转染,也能增强树突状细胞的免疫刺激功能。

目前,针对各种癌症类型的树突状细胞疫苗,已经开展了多项临床试验,这些疫苗针对的癌症类型包括转移性肺癌^[59]、黑色素瘤^[60]、急性髓细胞性白血病^[61]、胰腺癌^[62]和其他。

直接注射裸露的(可通过调整序列、添加佐剂来增强稳定性)或者载体(如LNP、脂质体)包裹的mRNA也被观察到具有一定效用。例如,使用裸露的含有β-球蛋白3'UTR序列来增强稳定性的mRNA被观察到能启动一种Th2型反应,并且如果在注射后1 d内使用重组粒

图5 树突状细胞癌症mRNA疫苗的完整制作过程(在BioRender.com网站制作)

Figure 5 The process of making dendritic mRNA cancer vaccine (created with BioRender.com)

细胞/巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 该反应可以增强并转变为Th1型反应^[63]。除了调整序列外, 佐剂如鱼精蛋白也可以保护直接注射的mRNA。鱼精蛋白-mRNA疫苗已经用于转移性黑色素瘤等癌症患者的I、II期临床试验^[64,65]。载体, 如带有正电的脂质体, 不仅能够保护mRNA免于降解, 还能介导mRNA被体内抗原递呈细胞有效摄取和翻译。mRNA癌症疫苗直接注射的效果与它的注射方式息息相关。比较常见的是皮下注射、肌肉注射、皮内注射和鼻喷。不太常见的方式包括淋巴结内注射、静脉注射、脾内注射和肿瘤内注射。

外周血细胞和其中的成分(如淋巴细胞)也可以作为疫苗载体。一项研究表明, 相比作用于野生型小鼠产生的效果, 树突状细胞疫苗对抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC)缺陷型小鼠的效果明显较差^[66]。研究表明, 体外转染的树突状细胞需要将抗原转移到机体原有的树突状细胞, 再由机体原有的树突状细胞负责随后的T细胞活化, 最终发挥作用。与此同时, 树突状细胞mRNA癌症疫苗需要从患者的全血中分离树突状细胞, 单独培养并促成熟, 这使得整个制作周期较长。这启发我们直接使用外周血细胞作为mRNA疫苗的一种载体^[67], 这样节省了原本从外周血中分离并培养树突状细胞的时间, 直接将mRNA载入从人体中分离出来的全血, 再将全血输回人体, 是一种更简单、直

接的方式。除了全血外, 血中的部分成分如淋巴细胞^[68], 也可以作为载体。

编码CAR的mRNA是一种有前途的策略, 将编码CAR的mRNA导入T细胞, 在T细胞膜表面表达嵌合抗原受体, 从而识别并攻击特定癌细胞。与传统的CAR-T疗法相比, 编码CAR的mRNA介导更瞬时CAR表达, 从而减少副作用的产生。例如, 编码抗人表皮生长因子受体2(EGFR)的CAR mRNA通过电穿孔方式转染的外周血淋巴细胞已经被用于治疗卵巢癌^[69]。因为电穿孔具有一定细胞毒性, 最近更适合的递送平台如脂质纳米颗粒也被研制出来, 用于体外向人体T细胞递送靶向CD19的CAR mRNA, 治疗急性淋巴细胞白血病^[70]。mRNA疫苗也能激活体内原本输入的CAR-T细胞(“CARVac”策略), 如通过在小鼠体内注射CLDN6 mRNA疫苗促进树突状细胞表面CLDN6的表达, 能够激发和促进CLDN6-CAR-T细胞的效能^[4]。

mRNA癌症疫苗和其他癌症治疗方式(如免疫检查点抑制剂、化学疗法、小分子靶点药物、激素、免疫刺激剂和放射)联合的组合疗法如今也被广泛使用。例如, 将使PD-L1沉默的siRNA和次要组织相容性抗原(minor histocompatibility antigen, MiHA)mRNA癌症疫苗联合使用, 治疗血液系统疾病^[71], 可以减少癌症疫苗所受肿瘤微环境和免疫抑制因子的限制。此外, 一种局部辐射搭配mRNA癌症疫苗的治疗策略已经开始了在

晚期非小细胞肺癌患者中的临床试验和评估^[72]。在另一项试验中,晚期黑色素瘤的患者接受了ipilimumab (CTLA4的单克隆抗体)、黑色素瘤相关抗原mRNA树突状细胞疫苗和TriMix的三联治疗。这项干预的结果显示,一部分复发性或难治性黑色素瘤患者的肿瘤发生了持续性缩小^[73]。

4.2 感染性疾病mRNA疫苗

对于传染性疾病,疫苗生产的最大难点是在短时间内获得足量的疫苗,而mRNA疫苗可以解决这一问题。mRNA疫苗作为新一代传染病疫苗,优势明显:首先,mRNA疫苗可以通过体外转录快速制备,无需使用鸡胚或者大规模细胞培养生产,同时具有相当的安全性和高效性;其次,mRNA能迅速应对抗原突变;最后,尽管现在mRNA疫苗并不推荐16岁以下人群使用,但在新生小鼠模型中初见成效。虽然亲代小鼠抗体通常抑制新的抗体反应产生,mRNA疫苗能在亲代小鼠抗体仍然存在的情况下引起较强的免疫反应^[74]。

目前应用的mRNA疫苗主要有两种形式:非复制型mRNA疫苗和自扩增型(self-amplifying, SAM) mRNA疫苗。非复制型的mRNA疫苗仅编码抗原蛋白,具有结构简单的优点,需要成熟的优化工艺才能在较低的剂量诱发有效的免疫应答。SAM mRNA疫苗利用了病毒的非结构蛋白基因,而将病毒的结构基因用外源靶蛋白基因(抗原基因)替换。因此,SAM mRNA可以在转染细胞内扩增,使得其编码的抗原基因大量表达。而且因为结构蛋白基因的缺失,病毒不具有原有的感染性和毒性,具有较好的安全性^[75-77]。SAM mRNA疫苗需要的免疫剂量更低,mRNA成分相应得更加复杂,且起效的时间会延长,体内自扩增的蛋白表达动力学难以预期。mRNA疫苗在动物模型体内取得了良好的效果,表1和2分别总结了非复制型mRNA疫苗和自扩增型mRNA疫苗的前期研究成果,可以看出针对目前传统疫苗难以有效预防的一些疾病,mRNA疫苗也具有相当的潜力。

mRNA疫苗目前的临床试验已取得一定进展。如在流感病毒H10N8 HA mRNA-LNP疫苗 I 期临床试验中,mRNA疫苗成功地在发生轻中度不良反应的志愿者中诱导产生了较强的体液免疫应答。该试验结果表明,疫苗在人体内具有较强的免疫原性、较好的安全性和耐受性^[83]。另有临床试验将编码有HIV-1抗原、人类巨细胞病毒(CMV)pp65抗原的mRNA在体外转染自

体树突状细胞,然后将自体树突状细胞再输注回人体,以激活特异性的细胞免疫。结果同样显示mRNA具有安全性并能引起T细胞的免疫应答^[101,102]。

面对突发的全球性的COVID-19疫情,传统疫苗由于在一般情况下整个研发流程平均需要12~18个月,并且生产时间长,难以应对疫情的快速扩散。而在2020年3月18日,由美国NIAID和Moderna主导研发的mRNA-1273疫苗便进入了 I 期临床试验,是第一个进入临床试验的SARS-COV-2疫苗。mRNA-1273编码了全长棘突蛋白(抗原),为提高稳定性,抗原蛋白986和987号残基被脯氨酸(S-2P)代替,并且使用LNP包载递送。试验中,受试者分别注射了25、100、250 μg 剂量的疫苗两次,间隔4周。除了第二次接受250 μg 剂量的个别患者,其他人均没有出现严重不良反应,显示出mRNA疫苗的安全性;在注射剂量为100 μg 时,疫苗刺激机体产生充分的特异性IgG、中和抗体和T细胞反应,显示出mRNA疫苗的高效性^[103]。在mRNA-1273的 III 期临床试验中,受试者接受了两剂疫苗,每剂100 μg ,相隔28 d。结果显示,在第一次注射42 d后,疫苗的有效率高达94.1%,并具有相当的安全性^[104]。在2020年12月18日,FDA宣布为Moderna COVID-19 mRNA-1273疫苗颁发紧急使用授权,该授权允许美国18岁及以上的个人使用Moderna COVID-19疫苗,并确定剂量为相隔28 d的两次肌肉注射,每次100 μg ,使其成为第二支获得批准的mRNA疫苗。更早地,辉瑞和BioNTech研发的BNT162b2疫苗在 III 期临床试验中,受试者接受两剂疫苗,每剂30 μg ,两剂相隔21 d。结果显示,在首次接种的28 d后,BNT162b2预防SARS-COV-2的有效性高达95%^[46]。这样优秀的结果,使得BNT162b2疫苗在2020年12月11日成为第一支获得FDA批准的SARS-COV-2 mRNA疫苗,并确定用量为相隔21 d的两剂肌肉注射,每剂30 μg 。同时它也是第一支获得FDA紧急使用授权的SARS-COV-2疫苗。

4.3 mRNA蛋白替代治疗

mRNA蛋白替代治疗是指,体内细胞转染mRNA后,用翻译出的蛋白补充体内缺少的蛋白质或替换阻碍正常细胞通路的异常蛋白质,从而达到治疗目的的一种疗法。

布拉特尔伯勒小鼠因基因突变,无法表达出抗利尿激素从而导致尿崩症。Jirikowski等人^[105]为其注射了抗利尿激素mRNA之后,尿崩症有所缓解。然而mRNA

表 1 预防传染性疾病的非复制性mRNA疫苗^[78]Table 1 Non-replicating mRNA vaccine against infectious diseases^[78]

靶点	递送形式	给药方式	激活免疫	动物模型	文献
S蛋白, SARS-CoV-2	mRNA-LNP	i.m.	体液和细胞免疫	非人灵长类动物, 小鼠	[79,80]
HA, 流感病毒A	mRNA分子与鱼精蛋白复合	i.d.	体液和细胞免疫	小鼠	[81]
HA, H1N1流感病毒	mRNA-LNP	i.m.	体液免疫	非人灵长类动物, 小鼠	[82]
HA, H10N8、H7N9流感病毒	mRNA-LNP	i.m.	体液和细胞免疫	小鼠、雪貂和食蟹猴	[83]
prM-E, 寨卡病毒	mRNA-LNP	i.d.	体液免疫	小鼠, 非人灵长动物	[84]
GP, 狂犬病病毒	mRNA分子与鱼精蛋白复合	i.d.	体液和细胞免疫	小鼠, 猪	[85]
GP, 埃博拉病毒	LNP	i.m.	体液免疫	豚鼠	[86]
Gag, HIV	自组装纳米胶束	s.c.	体液免疫	小鼠	[87]
Env, HIV	mRNA-LNP	i.d.	体液和细胞免疫	小鼠	[84]
PrM-E, POWV	mRNA-LNP	i.m.	体液免疫	小鼠	[88]
Env(1086C), HIV	mRNA-LNP	i.d.	体液免疫, ADCC	小鼠, 恒河猴	[89]
sHeVG, 尼帕病毒	mRNA-LNP	i.m.	体液免疫	仓鼠	[90]
Hsp65, 结核杆菌	裸mRNA	i.n.	细胞因子TNF- α , IL-10增加	小鼠	[91]

a) HA, hemagglutinin; prM-E, premembrane and envelope; GP, glycoprotein; Env, envelop; POWV, Powassan virus; sHeVG, soluble Hendra virus-soluble glycoprotein; Hsp65, heat shock protein 65; LNP, lipid nanoparticle; i.m., intramuscular; i.d., intradermal; s.c., subcutaneous; i.n., intranasal; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

表 2 预防传染性疾病的SAM mRNA疫苗^[78]Table 2 SAM mRNA vaccine against infectious diseases^[78]

靶点	复制子	激活免疫	动物模型	文献
HA, H1N、H7N9流感病毒	N/A	体液免疫	小鼠	[92]
NP、M1或NP+M1, 流感病毒	N/A	体液和细胞免疫	BALB/c小鼠	[93]
GP, 埃博拉病毒	KUNV	体液和细胞免疫	非人灵长动物	[94]
Capsid protein C, TBEV	TBEV	体液和细胞免疫	小鼠	[95]
Gag, HIV	N/A	体液和细胞免疫	非人灵长动物	[76]
Epitope SP70, EV71	JEV	体液和细胞免疫	小鼠	[96]
Pentamer, CMV	VEEV	体液和细胞免疫	小鼠	[97]
HA, 流感病毒; GP, 埃博拉病毒	VEEV, SFV	体液和细胞免疫	小鼠	[98]
SLOdm and BP-2a Streptococci	N/A	体液免疫	小鼠	[99]
Conserved region, HIV	SFV	细胞免疫	小鼠	[100]

a) HA, hemagglutinin; NP, nucleoprotein; M1, matrix protein 1; GP, glycoprotein; EV71, enterovirus-71; CMV, cytomegalovirus; SLOdm, GAS streptolysin-O; BP-2a, GBS pilus 2a backbone protein; N/A, not known; KUNV, Kunjinvirus; TBEV, tick-borne encephalitis virus; JEV, Japanese encephalitis virus; VEEV, Venezuelan equine encephalitis virus; SFV, Semliki Forest virus

的高免疫原性限制了后续研究, 直至修饰调控/序列优化系统的出现可以降低免疫原性后, 才有了新的研究进展. Kormann等人^[43]给因缺乏表面活化蛋白B(SP-B)而患有先天性肺发育不良的小鼠使用了2-硫尿苷和5-甲基胞苷修饰的SP-B mRNA之后, 小鼠体内的SP-B含量显著提高并且生存时间延长. Karikó等人^[106]将假尿苷修饰的EPO的mRNA注射到小鼠体内, 小鼠血液中

的EPO显著提高, 红细胞数也明显上升. Mays等人^[44]用2-硫尿苷和5-甲基胞苷修饰Foxp3 mRNA后, 注射到小鼠体内, 平衡了辅助T细胞的应答, 并且避免了过敏原引起的超敏反应. Huang等人^[107]用PEI为载体, 向小鼠体内递送胰岛素生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)的mRNA, IGF-1在细胞内高表达, 提高了心肌梗死后心肌的存活率. Levy等人^[108]发现, 将编码IL-

10、PSGL-1和SLeX的mRNA体外转染到小鼠的间充质干细胞中后,可以促进伤口恢复。

VEGF-A mRNA在心肌梗、糖尿病等疾病中也已经有了一些临床试验。Zangi等人^[109]将修饰过的VEGF-A mRNA注入到小鼠的心脏,发现心脏的梗死面积缩小了,并且心肌预后得到改善,生存率也比注入DNA要高。引入mRNA可以产生脉冲型的VEGF-A过表达,使得梗死周边的血管生成得更好。Lui等人^[110]研究发现,修饰的VEGF-A mRNA可以促进移植的人类Isl1+细胞增殖和提高移植成活率。Carlsson等人^[111]将修饰的VEGF-A mRNA注入到心肌梗死后的猪体内,发现了高效的心内表蛋白质表达,并且射血分数、肌力功能和顺应性、边缘区毛细血管和小动脉密度都有所提高,心肌纤维化也有所减少。Gan等人^[112]首次对mRNA的蛋白替代治疗进行了临床I期试验。他们将修饰过的VEGF-A mRNA皮下注射到2型糖尿病患者的手臂中,发现局部VEGF-A含量显著提高,而整体含量未变,并且局部基底皮肤血流量也显著提高,他们认为,VEGF-A mRNA可以成为潜在的血管再生药物。AstraZeneca正在对VEGF-A mRNA进行临床II期试验,将其应用于冠状动脉搭桥术后的患者,预计将在2021年7月结束^[113]。

在抑癌基因缺失的癌症中,也可以使用mRNA进行蛋白替代治疗。Islam等人^[114]研究了人第10号染色体缺失的磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)缺失的前列腺癌,发现引入PTEN mRNA可以增加PTEN的表达量并且恢复细胞内PTEN的活性。体外试验和小鼠实验均表明,PTEN mRNA转染前列腺癌细胞(PC3)后,癌细胞内PTEN表达量增加,癌细胞增殖受到抑制,细胞凋亡有所增加。Kong等人^[115]研究了另一抑癌基因p53。他们发现,给肝细胞性肝癌和非小细胞性肺癌转染p53 mRNA,可以通过诱导细胞周期停止和细胞凋亡延缓癌细胞生长;在小鼠试验中他们发现, p53 mRNA不仅可以延缓癌细胞生长,还与mTOR抑制剂依维莫司有协同作用。

尽管mRNA蛋白替代治疗已经取得众多成果,但这一治疗方案仍面临很多困难,例如针对不同的疾病,最合适的给药剂量和给药频次都是不确定的,需要大量实验来进行摸索。

4.4 mRNA罕见病治疗

罕见病指一组由特异性基因突变所引起,具有发

病率低、病情严重、诊断治疗复杂等特点的疾病,是现代医学亟须攻破的难题之一。由于目标患者较少,所以治疗罕见病的药物又被称为孤儿药。目前较为成功的药物大多是一些针对单基因突变疾病的治疗性蛋白。而最近的研究显示,定向递送mRNA的治疗方案,在罕见病治疗领域同样有着巨大的潜力。表3展示了现在处于临床试验或临床前实验中的单基因罕见病mRNA治疗项目的实验进展。

其中,针对甲基丙二酸血症(methylmalonic acidemia, MMA)、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症(OTC deficiency)、法布里病(Fabry disease)三种代谢性罕见病,mRNA已经在临床前实验被证实具有良好的疗效,而且最近的研究还发现了其在急性间歇性卟啉病(acute intermittent porphyria, AIP)上的治疗潜力(4种罕见病mRNA治疗原理见图6)。

MMA是一种由甲基丙二酰辅酶A变位酶(methylmalonyl Coenzyme A mutase, MUT)缺乏所引起的,具有高病死率和严重并发症的单基因代谢性疾病,血浆中的甲基丙二酸升高是MMA的标志性特征。以前,肝脏移植是唯一治疗方法,而如今mRNA治疗为其提供了新思路。mRNA治疗的体外实验中,MUT mRNA翻译出的MUT酶展现出了正常的酶活性和对线粒体的定位能力^[117]。应用于MUT酶缺陷的小鼠模型后,在单次静脉注射LNPs包被MUT mRNA(0.5 mg/kg)的2 h内,小鼠体内的MUT酶可上升到治疗所需浓度;16 h后,MUT酶浓度达到峰值;且MUT酶浓度可以在体内保持7 d^[116]。而在每周注射MUT mRNA的小鼠实验中发现,小鼠血浆中MMA浓度的减少情况与在肝移植病人中的观察结果相似^[118]。同时,药物安全性测试实验中,小鼠在重复静脉注射3~5周0.2 mg/kg的MUT mRNA后,未发现肝功能的明显改变,在血浆中也未发现炎症标志物的升高和抗MUT抗体的产生,显示出mRNA药物良好的耐受性^[116]。

AIP是一种常染色体显性代谢性罕见病,由肝脏的胆色素原脱氨酶(porphobilinogen deaminase, PBGD)缺陷所引起。AIP的主要临床特征是血浆和尿液中ALA(δ -aminolaevulinic acid)和PBG(porphobilinogen)的浓度升高,继而引起急性神经内脏症状,如腹部绞痛、顽固性便秘和精神症状等,具有致死性。在小鼠实验中,静脉注射的PBGD mRNA在2 h内起效,表现为小鼠肝脏的PBGD表达量增多和酶活性增强。PBGD mRNA也展示出了较好的组织滞留治疗能力,表现为单次注射后,

表 3 单基因罕见病的临床前和临床阶段mRNA治疗^[116]Table 3 The preclinical and clinical experimental progress of mRNA therapy for single-gene rare diseases^[116]

公司	罕见病	mRNA靶点	使用方式	阶段
Arcturus	血友病B	IV因子(分泌)	i.v.	临床前期
Arcturus	鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症	OTC(细胞内)	i.v.	临床前期
Genevant	鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症	OTC(细胞内)	i.v.	临床前期
Moderna	甲基丙二酸血症	MUT(细胞内)	i.v.	临床 I 期/II 期
Moderna	丙酸血症	PCCA、PCCB(细胞内)	i.v.	临床前期
Moderna	糖原贮积病Ia型	G6PC(细胞内)	i.v.	临床前期
Moderna	苯丙酮尿症	PAH(细胞内)	i.v.	临床前期
Moderna	法布里病	α -Gal A(分泌)	i.v.	临床前期
Translate Bio	鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症	OTC(细胞内)	i.v.	IND申报阶段
Translate Bio	囊性纤维化	CFTR(跨膜)	吸入	临床 I 期/II 期
Ultragenyx/Arcturus	糖原贮积病 III 型	GDE(细胞内)	i.v.	临床前期

a) OTC, ornithine transcarbamylase; MUT, methylmalonyl-coenzyme A mutase; PCCA, propionyl coenzyme A carboxylase alpha subunit; PCCB, propionyl coenzyme A carboxylase beta subunit; G6PC, glucose-6-phosphatase; PAH, phenylalanine hydroxylase; α -Gal A, alpha-galactosidase A; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; GDE, glycogen debranching enzyme; i.v., intravenous; IND, investigational new drug application

图 6 4种罕见代谢性疾病的mRNA治疗原理(在BioRender.com网站制作)

Figure 6 The mechanisms of mRNA therapies treating 4 rare metabolic diseases (created with BioRender.com)

PBGD浓度升高可维持10 d^[119]。同时,在药物起效浓度(0.5 mg/kg)下注射治疗,小鼠尿液中的ALA和PBG浓度

在24 h后能减少约90%。在为期6周的每2周给药1次的测试当中, PBGD mRNA的耐受性良好,对卟啉前体的

减少表现出稳定和可重复的效果。更值得注意的是, mRNA治疗对AIP小鼠的剧烈疼痛、运动功能不全和高血压等症状均具有一定缓解作用。同时, PBGD mRNA的治疗效果在另外两种大型动物(AIP兔和野生型的非人类灵长类动物)的实验中也得到了验证。在mRNA治疗后, 两种动物尿液中的ALA和PBG浓度均显著下降到正常范围, 血浆中抗PBGD抗体阴性、肝功能正常等结果, 显示了该疗法的安全性^[116]。

OTC deficiency是一种由肝脏线粒体中的鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏引起的疾病。因为在尿素循环过程中, 肝脏线粒体中的OTC酶可以催化鸟氨酸与氨基甲酰磷酸酯的结合, 从而消除体内过量的氮元素, 所以OTC缺乏会导致尿素循环障碍, 引起血液中氨浓度升高(高血氨症)。长期患病可能会导致神经系统的损伤、昏迷甚至死亡。OTC缺乏的患者必须终身限制蛋白质的摄入。而目前, 肝移植是对重症病人的唯一治疗方法, 而最近一些实验则证明了mRNA在治疗OTC缺乏症中良好的效果和耐受性。在Otcspf-ash小鼠(OTC基因突变导致mRNA剪切不全, 但残基仍保留部分OTC酶的活性, 临床表现并不明显的小鼠)中单次注射包裹了人类OTC mRNA(hOTC)的杂合纳米颗粒后^[120], 线粒体OTC酶表达明显增加, 且酶活性增强长达10 d。在Otcspf-ash小鼠上用腺病毒相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的shRNA(short hairpin RNA)来敲低小鼠体内残留的OTC mRNA后, 获得了临床表现更明显的OTC模型小鼠。在这种临床症状更严重的小鼠中, 1周两次注射hOTC mRNA可使血浆中的氨浓度和尿液中的乳清酸(orotic acid)水平恢复正常。实验发现, 所有对照组(即未给予mRNA治疗)的小鼠在被shRNA感染后都在3周内死亡; 然而, 接受过mRNA治疗的小鼠不仅存活了35 d的给药时间, 并且在停止给药后至少存活3周。更重要的是, 实验中未发现由mRNA引发的炎症反应和肝脏毒性, 说明了整个治疗过程的安全性^[121]。

法布里病(Fabry disease)是一种罕见的X连锁隐性遗传病, 是因为GLA基因突变导致溶酶体中的 α -Gal酶缺陷, 引起代谢中间产物Gb3和lyso-Gb3在多个脏器中的累积, 包括肾脏、心脏和皮肤。疾病晚期, 常会引发肾脏、心脑血管等器官或系统的严重疾病。Zhu等人^[122]给出了患法布里病的老鼠和野生型非人灵长类(nonhuman primates, NHPs)的临床前实验数据, 证明了mRNA编码的 α -Gal A酶治疗方案的有效性。不同于前3种疾病, 法布里病不仅局限于肝脏, 还覆盖更多的脏器,

这无疑表明法布里病具有更高的治疗难度。但令人惊喜的是, 在使用LNPs包被的 α -Gal A酶mRNA单次静脉注射给药(0.05~0.5 mg/kg)的3 d后, 所有关键脏器的 α -Gal A酶都明显增加, 同时血浆和关键疾病组织中的Gb3和lyso-Gb3浓度也相应减少。药效动力学研究发现了mRNA的持续治疗能力, 在单次给药(0.5 mg/kg)后, 血浆中的低浓度Gb3和lyso-Gb3维持了5~6周, 而在停药12周后, 浓度才回弹。虽然在3个月的小鼠重复给药实验中, 从小鼠体内检测到了抗 α -Gal A酶的抗体, 说明当mRNA编码的 α -Gal A酶进入循环后, 可能在Fabry GLA-敲除的小鼠体内诱发免疫反应^[116]。但是, 在为期6周的NHPs重复给药实验中, 动物体内并没有检测到抗 α -Gal A酶的抗体^[122]。这些数据都证明, 与传统的法布里病治疗方式如 α -Gal酶替代疗法(ERT enzyme replacement therapy)相比, mRNA治疗可能有更好的效果和发展前景。

5 总结与展望

mRNA生产工艺简单、合成快速、成本较低; 且在细胞质中翻译而不进入细胞核, 没有整合宿主基因组的风险; 能够作为内源性抗原, 被MHC(major histocompatibility complex)分子提呈, 激活细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应, 杀伤肿瘤细胞和病原体, 是疫苗的最佳选择; 能够翻译出目标蛋白, 可作为缺陷蛋白的蛋白替代疗法。这些优点都让mRNA治疗成为十分有前景的治疗方式。

目前mRNA疫苗的挑战主要在于稳定性和递送特异性的提升。稳定性方面, 我们需要加强质量控制并减少免疫原性的负面影响。质量控制是指, 提高检测出残留的模板DNA、体外转录反应副产物和不完整mRNA的能力。减少免疫原性的负面影响, 则是因为对于非免疫相关的应用, 免疫激活对治疗效果产生负面影响, 尤其是在需要重复施用IVT mRNA的情况下。在这方面, 同时使用免疫抑制剂可以改善非免疫治疗相关的IVT mRNA应用的结果。特异性方面, 需要实现使mRNA有效靶向所需细胞, 以避免全身性暴露。在这方面, 利用抗原-抗体反应或核酸适配体-受体反应的靶向递送系统有望改善将mRNA递送至位点特异性区域的有效性。此外, 在比较独立的给药途径时, mRNA剂量与蛋白质效应之间的关系是否在个体之间甚至个体内部变化, 还没有进行彻底的研究。

近年来, 由于mRNA不整合入基因组、翻译效率

高、免疫原性小等特性,通过LNP运输编码Cas9等核酶酶的mRNA,也逐渐成为了基因编辑领域的一条新思路^[123]。相关研究也逐渐展开,如使用LNP递送化学修饰的sgRNA(small guide RNA)和Cas9 mRNA后,血

清TTR(transthyretin)降低了97%且持续1年以上,显示进行了有效的基因编辑^[124]。尽管仍存在不少挑战,mRNA治疗仍然是一种十分有前景的治疗方式,我们期待它在癌症治疗等领域有着更加巨大的发展。

参考文献

- Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247: 1465–1468
- Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*, 2017, 547: 222–226
- Richner J M, Himansu S, Dowd K A, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell*, 2017, 168: 1114–1125.e10
- Reinhard K, Rengstl B, Oehm P, et al. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors. *Science*, 2020, 367: 446–453
- Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, et al. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e142
- Kauffman K J, Webber M J, Anderson D G. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J Control Release*, 2016, 240: 227–234
- Guan S, Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Ther*, 2017, 24: 133–143
- Thess A, Grund S, Mui B L, et al. Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals. *Mol Ther*, 2015, 23: 1456–1464
- Karikó K, Muramatsu H, Welsh F A, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 2008, 16: 1833–1840
- Sahin U, Holtkamp S, Türeci Ö, et al. Modification of RNA, producing an increased transcript stability and translation efficiency. Google Patents, US9476055B2, 2016
- Sikorski P J, Warminski M, Kubacka D, et al. The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 1607–1626
- Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, et al. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG. *RNA*, 2001, 7: 1486–1495
- Grudzien-Nogalska E, Kowalska J, Su W, et al. Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties. *Methods Mol Biol*, 2013, 969: 55–72
- Pardi N, Muramatsu H, Weissman D, et al. *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides. *Methods Mol Biol*, 2013, 969: 29–42
- Kore A R, Shanmugasundaram M, Charles I, et al. Locked nucleic acid (LNA)-modified dinucleotide mRNA cap analogue: Synthesis, enzymatic incorporation, and utilization. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 6364–6365
- Grudzien E, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, et al. Novel cap analogs for *in vitro* synthesis of mRNAs with high translational efficiency. *RNA*, 2004, 10: 1479–1487
- Guo P X, Moss B. Interaction and mutual stabilization of the two subunits of vaccinia virus mRNA capping enzyme coexpressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 4023–4027
- Mao X, Shuman S. Intrinsic RNA (guanine-7) methyltransferase activity of the vaccinia virus capping enzyme D1 subunit is stimulated by the D12 subunit. Identification of amino acid residues in the D1 protein required for subunit association and methyl group transfer. *J Biol Chem*, 1994, 269: 24472–24479
- Sobczak K, Krzyzosiak W J. Structural determinants of BRCA1 translational regulation. *J Biol Chem*, 2002, 277: 17349–17358
- Pelletier J, Sonenberg N. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell*, 1985, 40: 515–526
- Lohse I, Reilly P, Zaugg K. The CPT1C 5'UTR contains a repressing upstream open reading frame that is regulated by cellular energy availability and AMPK. *PLoS One*, 2011, 6: e21486
- Oliveira C C, McCarthy J E G. The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. *J Biol Chem*, 1995, 270: 8936–8943
- Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*, 1987, 196: 947–950
- Barreau C, Paillard L, Osborne H B. AU-rich elements and associated factors: Are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 7138–

7150

- 25 Murray E L, Schoenberg D R. A+U-rich instability elements differentially activate 5'-3' and 3'-5' mRNA decay. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 2791–2799
- 26 Vlasova-St Louis I, Bohjanen P R. Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. *Curr Opin Genet Dev*, 2011, 21: 444–451
- 27 Adibzadeh S, Fardaei M, Takshid M A, et al. Enhancing stability of destabilized green fluorescent protein using chimeric mrna containing human beta-globin 5' and 3' untranslated regions. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2019, 11: 112–117
- 28 Wang Z, Kiledjian M. The Poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 6334–6341
- 29 van der Velden A W, Voorma H O, Thomas A A M. Vector design for optimal protein expression. *Biotechniques*, 2001, 31: 572–582
- 30 Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 2004, 22: 346–353
- 31 Presnyak V, Alhusaini N, Chen Y H, et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, 2015, 160: 1111–1124
- 32 Cannarozzi G, Cannarozzi G, Schraudolph N N, et al. A role for codon order in translation dynamics. *Cell*, 2010, 141: 355–367
- 33 Hia F, Yang S F, Shichino Y, et al. Codon bias confers stability to human mRNAs. *EMBO Rep*, 2019, 20: e48220
- 34 Kane J F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6: 494–500
- 35 Gurvich O L, Baranov P V, Gesteland R F, et al. Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arginine codons AGG_ AGG and AGA_ AGA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005, 187: 4023–4032
- 36 Kramer E B, Farabaugh P J. The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA*, 2007, 13: 87–96
- 37 Van Gulck E R A, Ponsaerts P, Heyndrickx L, et al. Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins. *Blood*, 2006, 107: 1818–1827
- 38 Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, et al. A “silent” polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science*, 2007, 315: 525–528
- 39 Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 2006, 108: 4009–4017
- 40 Mockey M, Gonçalves C, Dupuy F P, et al. mRNA transfection of dendritic cells: Synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340: 1062–1068
- 41 Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat Commun*, 2018, 9: 3361
- 42 Karikó K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 2005, 23: 165–175
- 43 Kormann M S D, Hasenpusch G, Aneja M K, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 154–157
- 44 Mays L E, Ammon-Treiber S, Mothes B, et al. Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *J Clin Invest*, 2013, 123: 1216–1228
- 45 Saw P E, Song E W. siRNA therapeutics: A clinical reality. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 485–500
- 46 Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2603–2615
- 47 Dong Y, Dorkin J R, Wang W, et al. Poly(glycoamidoamine) brushes formulated nanomaterials for systemic siRNA and mRNA delivery *in vivo*. *Nano Lett*, 2016, 16: 842–848
- 48 Kallen K J, Heidenreich R, Schnee M, et al. A novel, disruptive vaccination technology. *Human Vaccines Immunother*, 2013, 9: 2263–2276
- 49 Varshosaz J, Farzan M. Nanoparticles for targeted delivery of therapeutics and small interfering RNAs in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 12022–12041
- 50 Veiga N, Goldsmith M, Granot Y, et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. *Nat Commun*, 2018, 9: 4493
- 51 Wu D, Wang W, He X, et al. Biofabrication of nano copper oxide and its aptamer bioconjugate for delivery of mRNA 29b to lung cancer cells. *Mater Sci Eng-C*, 2019, 97: 827–832
- 52 Conry R M, LoBuglio A F, Wright M, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*, 1995, 55: 1397–1400
- 53 Bonehill A, Van Nuffel A M T, Corthals J, et al. Single-step antigen loading and activation of dendritic cells by mRNA electroporation for the purpose of therapeutic vaccination in melanoma patients. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 3366–3375
- 54 Dewitte H, Van Lint S, Heirman C, et al. The potential of antigen and TriMix sonoporation using mRNA-loaded microbubbles for ultrasound-

- triggered cancer immunotherapy. *J Control Release*, 2014, 194: 28–36
- 55 Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaeerts S, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 686–695
 - 56 Dannull J, Nair S, Su Z, et al. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand. *Blood*, 2005, 105: 3206–3213
 - 57 De Keersmaecker B, Heirman C, Corthals J, et al. The combination of 4-1BBL and CD40L strongly enhances the capacity of dendritic cells to stimulate HIV-specific T cell responses. *J Leukoc Biol*, 2011, 89: 989–999
 - 58 Grünebach F, Kayser K, Weck M M, et al. Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12: 749–756
 - 59 Nair S K, Morse M, Boczkowski D, et al. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg*, 2002, 235: 540–549
 - 60 Aarntzen E H J G, Schreibelt G, Bol K, et al. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 5460–5470
 - 61 Van Tendeloo V F, Van de Velde A, Van Driessche A, et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 13824–13829
 - 62 Suso E M I, Dueland S, Rasmussen A M, et al. hTERT mRNA dendritic cell vaccination: Complete response in a pancreatic cancer patient associated with response against several hTERT epitopes. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60: 809–818
 - 63 Carralot J P, Probst J, Hoerr I, et al. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 2418–2424
 - 64 Weide B, Pascolo S, Scheel B, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: Results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother*, 2009, 32: 498–507
 - 65 Weide B, Carralot J P, Reese A, et al. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J Immunother*, 2008, 31: 180–188
 - 66 Yewdall A W, Drutman S B, Jinwala F, et al. CD8⁺ T cell priming by dendritic cell vaccines requires antigen transfer to endogenous antigen presenting cells. *PLoS One*, 2010, 5: e11144
 - 67 Phua K K L, Boczkowski D, Dannull J, et al. Whole blood cells loaded with messenger RNA as an anti-tumor vaccine. *Adv Healthcare Mater*, 2014, 3: 837–842
 - 68 Lee J, Dollins C M, Boczkowski D, et al. Activated B cells modified by electroporation of multiple mRNAs encoding immune stimulatory molecules are comparable to mature dendritic cells in inducing *in vitro* antigen-specific T-cell responses. *Immunology*, 2008, 125: 229–240
 - 69 Hung C F, Xu X, Li L, et al. Development of anti-human mesothelin-targeted chimeric antigen receptor messenger RNA-transfected peripheral blood lymphocytes for ovarian cancer therapy. *Human Gene Ther*, 2018, 29: 614–625
 - 70 Billingsley M M, Singh N, Ravikumar P, et al. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering. *Nano Lett*, 2020, 20: 1578–1589
 - 71 Hobo W, Novobrantseva T I, Fredrix H, et al. Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-1 ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62: 285–297
 - 72 Sebastian M, Papachristofilou A, Weiss C, et al. Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2014, 14: 748
 - 73 Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, et al. Phase II study of autologous monocyte-derived mRNA electroporated dendritic cells (TriMixDC-MEL) plus ipilimumab in patients with pretreated advanced melanoma. *J Clin Oncol*, 2016, 34: 1330–1338
 - 74 Willis E, Pardi N, Parkhouse K, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccination partially overcomes maternal antibody inhibition of *de novo* immune responses in mice. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaav5701
 - 75 Perri S, Greer C E, Thudium K, et al. An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. *J Virol*, 2003, 77: 10394–10403
 - 76 Bogers W M, Oostermeijer H, Mooij P, et al. Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion. *J Infect Dis*, 2015, 211: 947–955
 - 77 Geall A J, Mandl C W, Ulmer J B. RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin Immunol*, 2013, 25: 152–159
 - 78 Zhang C, Maruggi G, Shan H, et al. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front Immunol*, 2019, 10: 594
 - 79 Corbett K S, Edwards D K, Leist S R, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 2020, 586: 567–571
 - 80 Corbett K S, Flynn B, Foulds K E, et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1544–1555

- 81 Petsch B, Schnee M, Vogel A B, et al. Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 1210–1216
- 82 Lutz J, Lazzaro S, Habbeldine M, et al. Unmodified mRNA in LNPs constitutes a competitive technology for prophylactic vaccines. *npj Vaccines*, 2017, 2: 29
- 83 Bahl K, Senn J J, Yuzhakov O, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol Ther*, 2017, 25: 1316–1327
- 84 Pardi N, Hogan M J, Pelc R S, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 2017, 543: 248–251
- 85 Schnee M, Vogel A B, Voss D, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10: e0004746
- 86 Meyer M, Huang E, Yuzhakov O, et al. Modified mRNA-based vaccines elicit robust immune responses and protect guinea pigs from Ebola virus disease. *J Infect Dis*, 2018, 217: 451–455
- 87 Zhao M, Li M, Zhang Z, et al. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Deliver*, 2016, 23: 2596–2607
- 88 VanBlargan L A, Himansu S, Foreman B M, et al. An mRNA vaccine protects mice against multiple tick-transmitted flavivirus infections. *Cell Rep*, 2018, 25: 3382–3392.e3
- 89 Pardi N, LaBranche C C, Ferrari G, et al. Characterization of HIV-1 nucleoside-modified mRNA vaccines in rabbits and rhesus macaques. *Mol Ther-Nucleic Acids*, 2019, 15: 36–47
- 90 Lo M K, Spengler J R, Welch S R, et al. Evaluation of a single-dose nucleoside-modified messenger RNA vaccine encoding Hendra virus-soluble glycoprotein against lethal Nipah virus challenge in Syrian hamsters. *J Infect Dis*, 2020, 221: S493–S498
- 91 Lorenzi J C C, Trombone A P F, Rocha C D, et al. Intranasal vaccination with messenger RNA as a new approach in gene therapy: Use against tuberculosis. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 77
- 92 Hekele A, Bertholet S, Archer J, et al. Rapidly produced SAM[®] vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2: e52
- 93 Magini D, Giovani C, Mangiavacchi S, et al. Self-amplifying mRNA vaccines expressing multiple conserved influenza antigens confer protection against homologous and heterosubtypic viral challenge. *PLoS One*, 2016, 11: e0161193
- 94 Pyankov O V, Bodnev S A, Pyankova O G, et al. A Kunjin replicon virus-like particle vaccine provides protection against Ebola virus infection in nonhuman primates. *J Infect Dis*, 2015, 212: S368–S371
- 95 Aberle J H, Aberle S W, Kofler R M, et al. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J Virol*, 2005, 79: 15107–15113
- 96 Huang Y T, Liao J T, Yen L C, et al. Japanese encephalitis virus replicon-based vaccine expressing enterovirus-71 epitope confers dual protection from lethal challenges. *J Biomed Sci*, 2015, 22: 74
- 97 Hofmann I, Wen Y, Ciferri C, et al. Expression of the human cytomegalovirus pentamer complex for vaccine use in a CHO system. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112: 2505–2515
- 98 Chahal J S, Khan O F, Cooper C L, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E4133–E4142
- 99 Maruggi G, Chiarot E, Giovani C, et al. Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens. *Vaccine*, 2017, 35: 361–368
- 100 Moyo N, Vogel A B, Buus S, et al. Efficient induction of T cells against conserved HIV-1 regions by mosaic vaccines delivered as self-amplifying mRNA. *Mol Ther-Methods Clin Dev*, 2019, 12: 32–46
- 101 Gandhi R T, Kwon D S, Macklin E A, et al. Immunization of HIV-1-infected persons with autologous dendritic cells transfected with mRNA encoding HIV-1 Gag and Nef. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2016, 71: 246–253
- 102 Van Craenenbroeck A H, Smits E L J, Anguille S, et al. Induction of cytomegalovirus-specific T cell responses in healthy volunteers and allogeneic stem cell recipients using vaccination with messenger RNA-transfected dendritic cells. *Transplantation*, 2015, 99: 120–127
- 103 Anderson E J, Roupheal N G, Widge A T, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2427–2438
- 104 Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 384: 403–416
- 105 Jirikowski G F, Sanna P P, Maciejewski-Lenoir D, et al. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: Intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science*, 1992, 255: 996–998
- 106 Karikó K, Muramatsu H, Keller J M, et al. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol Ther*, 2012, 20: 948–953

- 107 Huang C L, Leblond A L, Turner E C, et al. Synthetic chemically modified mRNA-based delivery of cytoprotective factor promotes early cardiomyocyte survival post-acute myocardial infarction. *Mol Pharm*, 2015, 12: 991–996
- 108 Levy O, Zhao W, Mortensen L J, et al. mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation. *Blood*, 2013, 122: e23–e32
- 109 Zangi L, Lui K O, von Gise A, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 898–907
- 110 Lui K O, Zangi L, Silva E A, et al. Driving vascular endothelial cell fate of human multipotent Isl1⁺ heart progenitors with VEGF modified mRNA. *Cell Res*, 2013, 23: 1172–1186
- 111 Carlsson L, Clarke J C, Yen C, et al. Biocompatible, purified VEGF-A mRNA improves cardiac function after intracardiac injection 1 week post-myocardial infarction in swine. *Mol Ther-Methods Clin Dev*, 2018, 9: 330–346
- 112 Gan L M, Lagerström-Fermér M, Carlsson L G, et al. Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes. *Nat Commun*, 2019, 10: 871
- 113 Anttila V, Saraste A, Knuuti J, et al. Synthetic mRNA encoding VEGF-A in patients undergoing coronary artery bypass grafting: Design of a phase 2a clinical trial. *Mol Ther-Methods Clin Dev*, 2020, 18: 464–472
- 114 Islam M A, Xu Y, Tao W, et al. Restoration of tumour-growth suppression *in vivo* via systemic nanoparticle-mediated delivery of PTEN mRNA. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 850–864
- 115 Kong N, Tao W, Ling X, et al. Synthetic mRNA nanoparticle-mediated restoration of p53 tumor suppressor sensitizes *p53*-deficient cancers to mTOR inhibition. *Sci Transl Med*, 2019, 11: eaaw1565
- 116 Martini P G V, Guey L T. A new era for rare genetic diseases: Messenger RNA therapy. *Human Gene Ther*, 2019, 30: 1180–1189
- 117 An D, Schneller J L, Frassetto A, et al. Systemic messenger RNA therapy as a treatment for methylmalonic acidemia. *Cell Rep*, 2017, 21: 3548–3558
- 118 Niemi A K, Kim I K, Krueger C E, et al. Treatment of methylmalonic acidemia by liver or combined liver-kidney transplantation. *J Pediatr*, 2015, 166: 1455–1461.e1
- 119 Jiang L, Berraondo P, Jericó D, et al. Systemic messenger RNA as an etiological treatment for acute intermittent porphyria. *Nat Med*, 2018, 24: 1899–1909
- 120 Prieve M G, Harvie P, Monahan S D, et al. Targeted mRNA therapy for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Ther*, 2018, 26: 801–813
- 121 Berraondo P, Martini P G V, Avila M A, et al. Messenger RNA therapy for rare genetic metabolic diseases. *Gut*, 2019, 68: 1323–1330
- 122 Zhu X, Yin L, Theisen M, et al. Systemic mRNA therapy for the treatment of Fabry disease: Preclinical studies in wild-type mice, Fabry mouse model, and wild-type non-human primates. *Am J Human Genet*, 2019, 104: 625–637
- 123 Zhang H X, Zhang Y, Yin H. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther*, 2019, 27: 735–746
- 124 Finn J D, Smith A R, Patel M C, et al. A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing. *Cell Rep*, 2018, 22: 2227–2235

Summary for “mRNA治疗及其应用前景”

mRNA-based therapies and their clinical prospects

Chenyue Hang¹, Shanshan Xu¹, Qifeng Wu¹, Puyu Zhang¹, Yu Zhang² & Yingjie Xu^{2,3*}¹ Ottawa-Shanghai Joint School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;² Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;³ Shanghai Key Laboratory for Tumor Microenvironment and Inflammation, Shanghai 200025, China* Corresponding author, E-mail: xuyingjie@shsmu.edu.cn

The striking effectiveness of messenger ribonucleic acid (mRNA) vaccines against coronavirus disease 2019 (COVID-19) not only offers hope to end the current pandemic, but also presents mRNA-based therapeutics as a potential new treatment class that may help in the fight against other diseases. *In vitro*-transcribed (IVT) mRNA is engineered to structurally resemble naturally occurring mature and processed eukaryotic mRNA. Such synthetic mRNAs deliver genetic information that allows the translational machinery of the host cells to produce many copies of the encoded proteins, which can function as antigens to boost immune responses or as supplementary beneficial proteins, resulting in a therapeutic effect. With recent developments in mRNA *in vivo* delivery platforms and the improvement of modified regulatory systems, the stability and transfection efficiency of mRNA have been greatly improved. Modified regulatory systems utilize caps, 5' and 3' untranslated regions, open reading frames, Poly(A) tails, and chemically modified nucleotides. Notably, *in vivo* delivery platforms can either be a non-targeted or targeted delivery system.

Currently, mRNA-based therapeutics, including vaccines and protein replacement therapy, are being clinically developed for cancers, infectious diseases, and rare diseases. Common mRNA cancer vaccines include dendritic cell mRNA cancer vaccine, naked mRNA injection, mRNA encoding CAR, and other combination therapies. There are two main types of mRNA vaccines against infectious diseases: Non-replicating and self-amplifying. In addition, mRNA protein replacement therapies are available; these are therapies in which body cells are transfected with mRNA, and the translated proteins are used to supplement the lack of proteins in the body or replace abnormal proteins that hinder normal cellular pathways. mRNA therapies are also used in treatment of rare genetic diseases, such as Fabry disease, methylmalonic acidemia, ornithine carbamoyltransferase deficiency, and acute intermittent porphyria. Furthermore, IVT mRNA encoding genome-editing nucleases has been used as a novel method to perform gene editing.

mRNA therapies have the advantages of fast preparation, low production costs, and safety. However, there are still challenges to be overcome for the successful clinical application of mRNA-based therapies. For example, mRNA stability and target specificity still require improvement. In terms of stability, quality control needs to be improved and the negative impact of immunogenicity should be reduced. Quality control refers to improving the ability to detect residual template deoxyribonucleic acid, IVT reaction by-products, and incomplete mRNA. In addition, when comparing independent routes of administration, the variation between- and within individuals, particularly due to the mRNA dosage and protein effects has not been thoroughly studied.

To understand the up-to-date development and research status of mRNA therapies, this review focuses on molecular design, delivery system, and clinical research status of mRNA therapies.

mRNA therapy, cancer, vaccine, rare diseases, delivery system, modifications/codon optimizationdoi: [10.1360/TB-2021-0222](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0222)