



mRNA疗法的研究进展与挑战

傅佳燕^{1†}, 冯硕^{2†}, 杜彬荷^{2†}, 董海洋¹, 林金钟^{2*}, 金勇丰^{1*}

1. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058;

2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: linjinzhong@fudan.edu.cn; jinyf@zju.edu.cn

收稿日期: 2022-01-22; 接受日期: 2022-02-24; 网络版发表日期: 2022-06-15

国家重点研发计划(批准号: 2021YFE0114900)和浙江大学上海高等研究院繁星科学基金(批准号: SN-ZJU-SIAS-009)资助

摘要 信使RNA(messenger RNA, mRNA)是一种新的药物模式,可利用机体自身的翻译系统表达不同功能的蛋白从而用于多种疾病的治疗,被认为是可代替DNA和重组蛋白介导的疗法.伴随着mRNA体外合成、纯化与修饰技术的不断发展以及递送系统的优化, mRNA的稳定性、翻译效率表现出大幅提升,免疫原性也逐渐可控,这使得mRNA药物在癌症治疗、传染病预防、蛋白质替代疗法以及基因编辑等领域受到越来越多的关注.此外, mRNA药物生产周期较短、成本较低、可实现大规模生产,这些特征赋予了mRNA治疗平台巨大的发展潜力.本文综述了目前mRNA疗法应用于各类疾病临床前和临床研究的现状,并针对现阶段该领域新药开发的挑战与机遇进行讨论与展望.

关键词 mRNA, 癌症治疗, 传染病预防, 蛋白质替代疗法, 基因编辑

信使RNA(messenger RNA, mRNA)是一类携带遗传信息并能够直接指导蛋白质合成的单链核糖核酸.早在1978年,研究者们就证明可将脂质体介导的mRNA转运至小鼠(*Mus musculus*)体内^[1].1990年, Wolff等人^[2]首次报道了小鼠骨骼肌内注射裸mRNA可促使编码蛋白的表达,证明体外合成mRNA作为信息载体指导体细胞蛋白合成的可行性.步入21世纪后, mRNA技术趋于成熟. CureVac, BioNTech, Moderna等制药公司纷纷成立, mRNA技术步入快速发展期.尤其是近几年mRNA技术在癌症领域和新冠肺炎疫情防疫中展现的独特优势,使其一跃成为医疗产业发展的新

兴巨擘.2020年,新冠肺炎mRNA疫苗获世界卫生组织(World Health Organization, WHO)紧急使用授权,这一历史性事件也证明了mRNA疫苗正为流行性疾病大爆发的防治带来曙光.2021年,有着“诺奖风向标”之称的拉斯克医学奖将临床医学研究奖授予了mRNA技术领域的两位先驱: Katalin Karikó与Drew Weissman,再一次肯定了该技术的飞速进步.起初,体外转录信使RNA(*in vitro* transcribed mRNA, IVT mRNA)因其高免疫原性、低稳定性、生产制备局限性等因素,发展应用并不被看好.但随着IVT mRNA纯化与修饰技术的发展以及各类新型递送系统的不断优化,其稳定性、

引用格式: 傅佳燕, 冯硕, 杜彬荷, 等. mRNA疗法的研究进展与挑战. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 30–49

Fu J Y, Feng S, Du B H, et al. Research progress and challenges in mRNA-based therapeutics (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 30–49, doi: 10.1360/SSV-2021-0376

翻译效率大幅提升, 免疫原性也逐渐可控. 作为一种新型的治疗手段, 它正展现出巨大的发展潜力, 可有效代替基于DNA和重组蛋白的传统疗法.

尽管利用病毒(腺病毒、慢病毒等)和非病毒递送方法(物理和化学方法)的DNA疗法已被广泛研究并应用于各类疾病的临床防治, 但插入诱变的潜在风险以及低效的转染过程都在一定程度上限制了其的进一步发展. 病毒载体固有的细胞毒性和免疫原性为DNA的递送带来更多现实障碍. 而对于mRNA来说, 由于其不需要进入核内, 只需到达胞质中被核糖体识别即可表达其编码的蛋白质, 这使得快速高效的转染成为可能, 并且避免了基因意外插入与整合的风险. 另一方面, 在体外进行生产纯化可以避免宿主蛋白和病毒源性污染. mRNA疗法凭借上述优势脱颖而出, 在癌症免疫、传染病治疗、蛋白质替代疗法、基因编辑等多个领域已被广泛研究. 本文综述了目前mRNA疗法发展中的一系列关键问题, 包括免疫原性、稳定性、翻译效率等方面的最新进展, 主要概述了mRNA疗法应用于各类疾病临床前与临床研究的现状, 最后针对阻碍该技术发展的壁垒做了合理的讨论, 并结合制药领域新药开发的机遇进行了展望.

1 mRNA的体外合成、修饰与纯化

1.1 mRNA体外合成与修饰

成熟的哺乳动物mRNA结构主要由5'端非编码区(5' untranslated region, 5' UTR)、3'端非编码区(3' UTR)、可读框(open reading frame, ORF)、帽结构(cap)以及多聚腺苷残基(poly(A))尾组成. 体外合成mRNA技术主要是以质粒DNA, PCR产物或者合成的双链寡核苷酸作为模板, 利用T7或SP6^[3]噬菌体RNA聚合酶在核苷三磷酸(nucleotide triphosphate, NTP)存在下合成单链RNA, 最后进行分离和纯化(图1A). mRNA分子序列以及修饰核苷酸的优化, 对其翻译效率、稳定性与免疫原性至关重要. 例如, 密码子优化可以提高蛋白产量, 已成功应用于抗病毒感染的疫苗研发和表达非病毒蛋白.

mRNA的UTR在转录后调控中发挥了重要作用, 可以调节mRNA的转运、定位、稳定性与翻译效率等. 在UTR中加入合适的调节序列元件可提升mRNA的翻译水平并延长其半衰期, 如被广泛使用的人

Hsp70基因的5' UTR^[4]. 另外有研究表明, 使用两个连续的 β -珠蛋白3' UTR可以有效提升mRNA的稳定性与翻译效率. 真核生物延伸因子eEF1A1的3' UTR和许多正痘病毒存在的5' UTR元件既可以防止脱帽反应的发生, 又可以抑制3'-5'外切酶对mRNA的降解^[5]. 由于UTR序列与目的基因的不同组合对蛋白的表达量有显著影响, 构建一个成熟的UTR元件库对未来mRNA药物的设计与研发具有十分积极的意义.

核苷酸修饰可能会改变mRNA的二级结构并阻碍蛋白质与UTR中调节序列的结合, 从而影响mRNA的翻译和稳定性. 早在2004年, 研究者们就发现外源mRNA是Toll样受体3的内源性配体^[6]. 用假尿苷代替天然的尿苷可有效抑制Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)对mRNA的识别以增强转录本稳定性^[7]. 假尿苷(pseudouridine, ψ)是mRNA疫苗研发中较常用的修饰. 此外, 使用5-甲基胞苷(5-methylcytosine, m5C)、5-甲基尿苷(5-methyluridine, m5U)、2-硫尿苷(2-thiouridine, s2U)或N(1)-甲基假尿苷(N¹-methylpseudouridine, m1 ψ)也有助于降低IVT mRNA的固有免疫原性^[7].

mRNA的5'端帽子结构参与了mRNA稳定性、衰退和翻译起始的调控^[8], 并可帮助IVT mRNA逃脱宿主的抗病毒应答等免疫机制的识别. 帽子结构有Cap-0 (m7GpppN-), Cap-1 (m7GpppNm-) 和 Cap-2 (m7GpppNmNm-) 三种, 其复杂程度与生物进化度密切相关. IVT mRNA的加帽方式分为酶法加帽和共转录加帽. 前者是指在转录完成后, 利用加帽酶对mRNA的5'端进行修饰, 产生帽子结构; 后者是指在转录过程中加入帽子类似物, 通过T7 RNA聚合酶, 直接将帽子结构加到转录出来的mRNA的5'端. 酶法加帽所需的酶量较大, 导致其成本偏高, 对加帽酶表达纯化策略的优化可能是解决这一问题的途径. 共转录加帽中帽子类似物与三磷酸鸟苷在RNA的合成中存在竞争关系, 使得mRNA无法被完全加帽^[9]. 未加帽的mRNA很容易被核糖核酸酶降解, 并且具有更强的固有免疫原性, 可以利用5'磷酸酶消化未加帽的RNA以减少此风险^[10]. 另一问题是人体内源性的mRNA不包含Cap-0, 而是Cap-1或Cap-2, 而帽子类型的差别是人体区分自身和外来mRNA的重要位点^[11], 因此使用Cap-1和Cap-2结构更有利于降低mRNA药物的固有免疫原性.

合适的poly(A)尾巴也可以帮助提升IVT mRNA的稳定性与翻译效率. poly(A)尾巴的长度对mRNA的翻

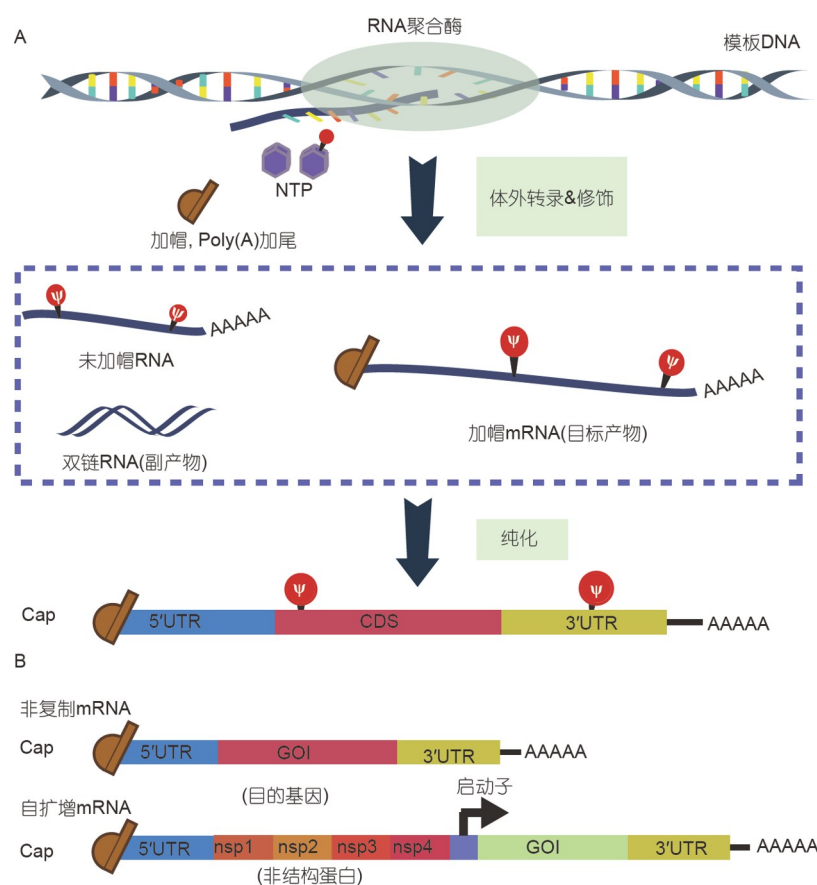


图 1 体外转录mRNA的合成、修饰纯化与分类。A: 体外转录mRNA的合成、修饰与纯化过程; B: 非复制mRNA与自扩增mRNA结构差异(网络版彩图)

Figure 1 Synthesis, modification, purification, and classification of *in vitro* transcribed mRNA. A: Synthesis, modification, and purification of *in vitro* transcribed mRNA; B: structural differences between nonreplicating mRNA and self-amplifying mRNA (color online)

译及衰变有重要影响。有报道表明在哺乳动物翻译活跃的细胞中mRNA的poly(A)尾的长度在67~96个碱基之间^[12]。添加poly(A)尾巴的方式有两种:一种是转录后用poly(A)聚合酶在3'端添加尾巴,但很难保证尾巴长度的均一性^[13]。另一种方法是在DNA模板上设计一定长度的poly(A)序列,但质粒模板上的一长串A/T碱基对不稳定,可能在细菌复制的过程中缩短。对于长poly(d(A/T))序列的维护要求很高,且强烈依赖于细菌菌株^[14]。

1.2 IVT mRNA纯化

对于mRNA药物而言,纯化策略是影响产品最终质量的重要因素。在生产IVT mRNA的过程中产生的杂质或副产物会对产品的有效性及固有免疫原性产生影响。一种主要的污染物质是双链RNA(double-

stranded RNA, ds RNA),这种转录副产物可能源于不准确的T7 RNA聚合酶活性^[15]。值得注意的是,该副产物同样也是一种潜在的病原体相关分子,会被TLRs所识别产生免疫应答反应,进而导致mRNA的降解及翻译抑制^[16]。此外,游离核苷酸、寡核苷酸、帽子类似物、RNA聚合酶、盐等也可能对RNA疗法产生负面影响,因此需要通过纯化进行去除(图1A)。

对于大量生产而言,常用的纯化方法主要有高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和寡聚胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸链(oligo(dT))亲和纯化。HPLC的原理是利用不同成分与受体之间的亲和力强度的差异来进行分离。长mRNA含有较多的带电基团,往往导致目标mRNA与固定相基质的相互作用强度过高,在非变性条件下进行洗脱十分困难,因此HPLC更适合纯化较短的mRNA。oligo(dT)亲和纯

化则是利用oligo(dT)与mRNA 3'端的poly(A)尾巴互补配对的原则实现IVT mRNA与其他成分的分离^[17]。这一技术适用于大部分IVT mRNA的纯化,是目前比较理想的mRNA大量纯化工具,但其载量相对较低。

2 mRNA的递送系统

裸露的RNA分子易被生物体降解,且难以穿透细胞膜,因此对RNA药物进行合适的包装与递送是必要的。目前主流的mRNA递送系统是基于纳米颗粒的包装递送方法,包括脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)、多聚体纳米颗粒等。由于纳米颗粒的大小、形状、表面电荷、材料等都会影响细胞对颗粒的摄取^[18],因此不同分子结构的脂质被设计开发,用于制备不同特性的递送工具。蛋白生物-mRNA复合体如鱼精蛋白/RNA复合物也在研究中展现出了良好的临床效果^[19]。但上述递送系统不具备靶向性,这对mRNA在临床上的应用带来了诸多限制,使其多用于局部接种和靶向肝脏的治疗。

近年来,对于mRNA靶向递送系统的研究取得了诸多进展。一些高通量合成和筛选LNP的系统被提出,并实现了靶向特定类型细胞或组织的RNA递送^[20]。在纳米颗粒上结合抗体或核酸适配体则可以更有目的性和方向性地实现RNA药物的靶向运输,达到改善治疗效果、减少不良反应、提高药物利用率的目标。如利用表面载有anti-Ly6c抗体的LNP靶向Ly6c⁺炎性白细胞可精确表达白细胞介素10^[21]。研究还发现,仅通过调控脂质分子的电荷就可实现对肝、肺、脾的不同靶向性^[22],并提出选择性靶向器官的LNP普适性设计原则。

3 mRNA在临床治疗上的应用

mRNA被转运至胞质后经核糖体翻译产生正确折叠、功能完整的多种所需蛋白质,整个过程避免基因意外插入与整合,并且mRNA的自然降解可降低代谢物的毒性,这对于其在疫苗和蛋白质替代疗法上的大规模应用尤其有利。相较于传统的基于全生物的疫苗(如减毒活疫苗、灭活疫苗等)更安全高效(表1)。此外,还可通过各类化学修饰及递送系统的优化以进一步提高安全性,使其在细胞质中被高效摄取。另一方面,

mRNA生产周期较短、成本较低,且具有大规模生产的潜力。这些优势让mRNA技术迅速得到发展,目前已累积大量关于mRNA药物的免疫原性与有效性的临床前与临床数据。

mRNA疫苗主要可以分为两大类:传统非复制型mRNA和自扩增型mRNA(self-amplifying RNA, saRNA)(图1B)。传统非复制型mRNA仅编码目标抗原(gene of interest, GOI),在靶细胞中并不扩增,因此相对较低的瞬时表达量成为不可忽视的局限。而自扩增mRNA不仅含有编码抗原的可读框,还包含编码RNA依赖性RNA聚合酶的可读框,由非结构蛋白(nonstructural protein, NSP)1~4组成,用于扩增抗原蛋白,利用病毒复制子在翻译过程前进行强烈的自我扩增以填补这一缺陷。与非复制型mRNA相比,自扩增型的结构长度更长(通常在10 kb以上),在更低剂量下即可产生相同的免疫保护作用,并且原位表达量更高,峰值持续时间更久^[23]。但其结构复杂性的增加也为生产过程和稳定性带来更大的挑战。目前自扩增mRNA平台已被证明能够成功应用于各种疾病靶点(如艾滋病、呼吸道合胞病毒感染和流感等),在包括小鼠、雪貂(*Mustela putorius furo*)和灵长类动物的多种模型中都有广泛的研究^[24]。近期一种二分载体反式扩增RNA(trans-amplifying RNA, taRNA)系统被开发,使用该系统,动物可在低至50 ng的剂量下免受流感攻击,揭示了taRNA编码的复制酶活性远远优于saRNA。尽管其尚未在传染疾病模型中被广泛研究,但在一定程度上为taRNA系统在安全性、翻译效率、多功能性等方面优于saRNA系统提供线索^[25]。下文主要介绍mRNA疗法在传染病预防、癌症治疗、蛋白质替代、基因编辑等诸多领域取得的进展。其在体内诱导的适应性免疫机制见图2。

3.1 预防传染病治疗

针对传染性疾病的mRNA研究目前已经取得许多可喜的成果。传统的灭活疫苗和减毒疫苗研发生产过程相对较慢,无法及时应对突发的如埃博拉病毒、冠状病毒等引发的传染性疾病。而mRNA疫苗适合简单快速生产,这使得它对于应对流行性传染病爆发具有巨大潜力,有望及时填补对疫苗的迫切需求。

(1) HIV-1疫苗。艾滋病仍是无法治愈的全球性健康难题,其病原体超凡的病毒免疫逃逸机制与遗传多

表 1 常见的疫苗平台优劣势比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of common vaccine platforms

	优势	劣势
减毒活疫苗	1. 免疫原性强, 由病原体直接在宿主中复制产生抗原刺激, 类似于天然感染 2. 一般只需注射一次即可达到目标疗效 3. 作用时间长, 可免疫终生	1. 安全性差, 易在免疫力差或免疫缺陷的个体中引发感染危险 2. 可能因发生逆行突变而在人体内恢复毒力 3. 稳定性差, 不易保存和运输, 易受光、热影响
灭活疫苗	1. 安全性更好 2. 易于保存 3. 无污染风险 4. 研究时间较长, 经验丰富 5. 对母源抗体中和作用不敏感	1. 免疫期短, 需加强免疫 2. 一般需注射多次达到目标效果 3. 免疫途径单一 4. 持续性较差, 不能免疫终生 5. 不产生较好的黏膜免疫
亚单位疫苗	1. 质量可控, 安全性高 2. 利用DNA技术获得大量纯抗原分子 3. 低剂量即可达到疗效 4. 可实现大规模生产	1. 需要添加佐剂 2. 包含亚单位疫苗的抗原非常小 3. 缺少识别抗原所需病原体相关分子模式, 免疫原性潜力低 4. 可能发生抗原变性
重组病毒载体疫苗	1. 可同时构建一个或多个细胞因子基因 2. 诱导更强烈体内免疫应答 3. 携带的传染性颗粒更少, 安全性较强 4. 可利用重组技术实现多价疫苗的生产	1. 病毒结构的复杂性使得分析方法不精确, 不稳定 2. 高通量的开发是重要挑战 3. 下游的纯化技术仍然存在障碍 4. 大多数病毒载体缺乏针对性的高选择性亲和填料
DNA疫苗	1. 在构象上与天然抗原更像, 免疫原性更强 2. 长期表达稳定的抗原蛋白 3. 质粒载体制备、提纯简单 4. 可结合多抗原表位, 诱导更强大的免疫反应 5. 化学性质相对稳定, 耐高温, 便于运输	1. 质粒DNA可能与宿主基因整合, 导致免疫耐受 2. 外源DNA可能通过活性致癌基因的插入完成转换 3. 可能诱发自体抗DNA免疫反应 4. 局限于分裂细胞 5. 高剂量使用时免疫原性较差
mRNA疫苗	非复制mRNA 1. 在细胞质中即可发挥作用, 更高效 2. 不存在插入性突变或感染风险, 安全性高 3. 具备短时间、低成本、大规模的生产潜力 4. 可通过优化密码子、化学修饰、核苷修饰等改善稳定性和固有免疫原性	1. 半衰期短, 稳定性差, 易被核酸酶降解失去疗效 2. 体内递送效率较低, 通常需要非病毒递送载体辅助 3. 分子量和负离子性质为它进入细胞膜屏障带来了巨大阻碍 4. 存在固有免疫原性风险 5. ds RNA会诱导免疫反应
	自扩增mRNA 1. 表达量更高, 达到相同免疫效果仅需要更少的量 2. 原位表达持续时间更长 3. 具有佐剂效果	1. 长度更长 2. 生产过程稳定性低 3. 不适合用核苷修饰, 可能产生不良事件

样性给疫苗设计开发提出挑战。抗逆转录病毒治疗作为一种有效的治疗方法虽在一定程度上降低了艾滋病死亡率, 但高昂的费用、潜在的中长期不良反应以及欠佳的依从性限制了其临床应用^[26]。此外, 常规疫苗很难产生能中和多种HIV-1毒株抗体的广谱中和抗体。随着近几年mRNA修饰技术的快速发展, 研究者开始着眼于这种安全高效的核酸疫苗。利用离体方法靶向HIV-1的方法大多仅导致少量T细胞活化, 如使用转染

编码HIV-1结构蛋白Gag和Nef的mRNA的自体树突状细胞(dendritic cells, DCs)免疫^[27]仅检测到短暂且微弱的免疫应答。体内DCs靶向策略被用于克服这一技术困难。HTI-TriMix是一种基于mRNA的HIV-1候选疫苗, 通过节内注射DCs激活佐剂TriMix和编码HIV-1结构蛋白gag, Pol, Vif和Nef中16个保守片段的裸mRNA在小鼠内引发适度抗原特异性T细胞反应^[28]。尽管它在I期试验中展现出了良好的安全性与耐受性, 但

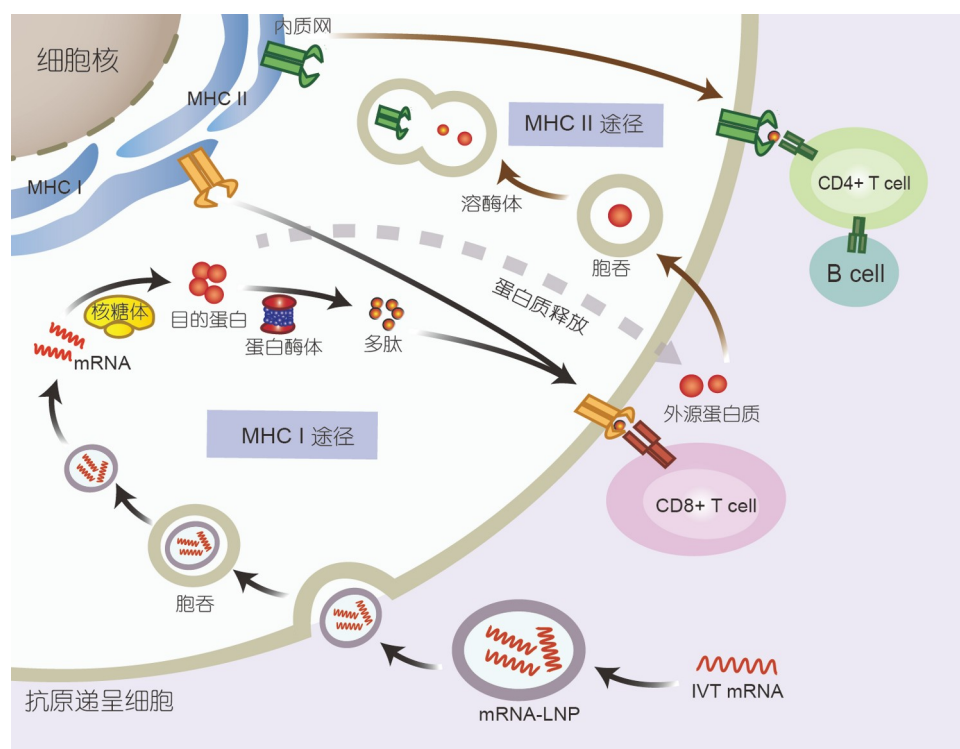


图 2 mRNA疫苗在体内的诱导适应性免疫机制。mRNA由内吞作用逃逸至胞质中由核糖体翻译出抗原蛋白,经蛋白酶降解作用形成小片段多肽,由主要组织相容复合物(major histocompatibility complex, MHC) I 递呈CD8⁺ T细胞表位诱导细胞免疫;部分抗原蛋白还可被释放,由内吞作用进入胞质后通过多种机制进行溶酶体降解,然后由MHC-II递呈CD4⁺ T细胞表位并激活B细胞体液免疫(网络版彩图)

Figure 2 Mechanism of adaptive immunity induced by the mRNA vaccine *in vivo*. The mRNA escapes into the cytoplasm by endocytosis and is translated into antigenic proteins by ribosomes, then degraded by proteasomes to form small peptides, then delivered by MHC I to CD8⁺ T cell epitopes to induce cellular immunity. Some antigenic proteins can also be released, endocytosed into the cytoplasm, and degraded by lysosomes, followed by MHC II delivery to CD4⁺ T cell epitopes and the activation of B-cell humoral immunity (color online)

在II期试验中免疫原性不足。在HTI重组抗原编码序列上游发现的一个意想不到的起始密码子可能会对HTI蛋白表达产生负面影响^[29]。

多项研究评估了直接注射HIV mRNA在临床前模型中的免疫原性。采用皮下递送编码HIV-1 Gag的PEI-mRNA可在小鼠体内引发中度T细胞反应^[30],而采用鼻内接种编码HIV包膜蛋白gp120亚基的mRNA在满足安全性的前提下进一步增强了细胞旁递送^[31],为疫苗接种策略提供了新思路。利用阳离子纳米乳液递送编码HIV-1包膜糖蛋白的自扩增mRNA疫苗^[32]在恒河猴(*Rhesus macaques*)中以相对低的剂量(50 μg)接种展现出了较好的安全性与免疫原性,这为研究非人类灵长类动物中和抗体反应提供重要证据。此外, Moyo等人^[33]通过配制聚合物镶嵌的自扩增mRNA将tHIV-consvX递送到免疫系统,该疫苗通过编码小鼠中gag和

pol蛋白的6个保守区域诱导广泛特异性、多功能的CD8⁺、CD4⁺ T细胞反应,同样显示了自扩增mRNA在抗HIV-1感染中的巨大潜力。尽管自扩增mRNA诱导免疫原性时剂量更低,但其结构往往更复杂。制剂复杂性与免疫原性之间的利弊权衡将是大规模生产中的一大难题。Pardi等人^[34]发现,单次注射编码VRC01(一种针对HIV-1的广谱中和抗体)轻链和重链的mRNA-LNPs可产生高水平的抗HIV-1感染抗体,以完全保护小鼠免受SF162和JR-CSF HIV-1分离株的静脉内攻击。该课题组还发现, m1Ψ核糖修饰的1086C Env mRNA-LNPs单次免疫能够在非人灵长类中诱导强烈的抗原特异性T细胞反应、GC B细胞反应,进而诱导产生有效持久的gp120特异性抗体反应^[35]。尽管临床I/II期试验已证明这种疫苗的安全性与可行性^[36],但较低的免疫应答仍不令人满意,数据显示疫苗并未显著降低病毒载量

或防止病毒反弹。尽管目前对mRNA疫苗递送系统与化学修饰的优化已能引发强烈的抗原特异性T细胞免疫应答,但临床前数据与临床试验结果间的强大落差仍提示着提升mRNA有效免疫应答的关键性。

(2) 流感病毒疫苗。流感病毒在全球范围内导致高发病率和死亡率,每年可致300万~500万重症病例。流感病毒是包膜的RNA病毒,其基因组由8个单链负义RNA片段组成,分别编码包膜糖蛋白血凝素、神经氨酸酶、核蛋白、基质蛋白、离子通道蛋白、聚合酶亚基、非结构蛋白、核输出蛋白等。目前流感病毒疫苗大多数针对血凝素(hemagglutinin, HA)茎中高度保守的构象,不能提供广泛持久的保护性免疫。因此以流感病毒的多保守表位为靶点的疫苗可能是目前最值得期待的候选医疗产品。传统流感疫苗多为在卵胚胎中孵育的灭活病毒,然而禽源病毒很可能导致高致病性。相比之下,mRNA在安全性上更值得信赖。

采用新型水包油型阳离子纳米乳液配制表达HA抗原的自扩增mRNA,在小鼠和雪貂中展现了良好的免疫原性,可有效诱导功能性中和抗体,HA特异性CD4⁺ 1型辅助T细胞以及CD8⁺细胞毒性T细胞的免疫应答,并有助于遏制流感病毒感染动物上呼吸道中的病毒复制^[37]。靶向核蛋白(nuclear protein, NP)的mRNA疫苗也被证明可通过降低免疫细胞浸润,同时增加免疫浸润物中T细胞、单核细胞和主要组织相容性复合体II+(major histocompatibility complex II+, MHC II+)肺泡巨噬细胞的比例来降低肺部病毒滴度,并提高感染恢复率^[38]。基于流感病毒的mRNA疫苗的临床前数据显示,流感疫苗对于同源和异种亚型的流感病毒均能产生广泛的保护性免疫反应^[39]。两种分别基于甲型H9N8和H7N9 HA的LNP-mRNA流感疫苗^[40]在对小鼠、雪貂和食蟹猴(*Macaca fascicularis*)的单次免疫中均产生了快速、强大、有效的中和抗体,展现出良好的安全性与免疫原性。单剂量的H7N9 HA mRNA可保护小鼠免受自体致命攻击,并降低雪貂的肺病毒滴度。近期的一项人类H10N8 HA mRNA剂量递增研究中期结果显示血清转化率非常高,证明了其对人的预防性免疫力很强。Moderna公司针对季节流感开发的四价流感疫苗mRNA-1010,目前已完成I期临床试验的所有患者注册,预计在180名成年人中对其安全性与免疫原性进行评估。

为提高免疫广度,多抗原联合疫苗愈来愈受到研

究者的关注。以皮内递送的方式将组合脂质纳米颗粒mRNA疫苗对小鼠进行给药,同时靶向流感病毒的几个高度保守区域,包括经优化的血凝素、神经氨酸酶和离子通道以及核蛋白的非结构基因衍生抗原^[41]。结果显示,与单一抗原递送相比,多抗原联合递送时的体液免疫强度未有显著差异。尽管这种多抗原联合递送的方式不可避免地增加了临床复杂性与成本,但可能为病毒突变逃逸提供冗余保护层。该试验为单剂量联合疫苗的广泛保护潜力提供强有力的证据。

(3) 新冠肺炎病毒疫苗。2020年,导致新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)的严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)席卷全球,严重威胁全人类健康,这使快速有效的疫苗研发成为医疗行业的中中之重。然而当前的流感疫苗诱导的抗体反应只可预防同源病毒,对抗原变体的效力较低。疫苗研发、生产、物流的时间成为另一个限制因素。研究人员亟需能够针对不同流感株的广谱保护疫苗来应对这种大流行事件。mRNA疫苗在满足这些需求的同时展现出可观的前景。

2020年3月,Moderna公司生产研发由脂质纳米颗粒包裹的编码带有2P突变的全长棘突糖蛋白(spike glycoprotein, S糖蛋白)抗原的LNP-mRNA-1273,该疫苗设计在体内诱导出针对刺突糖蛋白的抗体,从而阻止S糖蛋白与血管紧张素转化酶2的结合来中和病毒入侵靶细胞的能力^[42]。与传统灭活或减毒活疫苗相比,该疫苗仅靶向S蛋白而非整个病毒颗粒,S2P抗原由跨膜锚S糖蛋白与完整S1~S2切割位点所组成,其中S2亚基中心螺旋顶部两个连续的脯氨酸置换使其稳定在融合前构象中。该疫苗的I期临床试验结果^[43]中出现包括疲劳、发冷、头痛和肌痛等在内的轻度与中度不良反应病例,这也是mRNA疫苗普遍诱导的副反应。同年12月发表的III期临床结果证明了mRNA-1273在老年人群中具有94.1%的有效性^[44]。目前美国食品药品监督管理局(US Food and Drug Administration, FDA)已为LNP-mRNA-1273颁发紧急使用授权紧急使用授权(emergency use authorization, EUA)。

另一有效的候选mRNA疫苗是来自Pfizer/BioNTech的BNT162b1(NCT04368728)和BNT162b2(NCT04368728)。LNP-BNT162b1 mRNA表达的受体结合域(receptor binding domain, RBD)抗原通过添加T4

纤维蛋白结构域衍生的折叠三聚化结构进行修饰^[45], 增强其免疫原性. I/II 期临床试验对其安全性、有效性、免疫原性等进行了评估^[46]. 而BNT162b2 mRNA同样采用LNP包裹形式编码具有两个关键脯氨酸取代的融合前稳定S蛋白, 降低膜融合能力, 导致中和抗体的免疫应答能力增强^[47]. I/II 期临床试验结果评估了它的安全性. 尽管具有短暂的副作用, 但加强剂量后可产生与恢复期血浆相当或更好的抗体水平(NCT04368728). 针对mRNA-BNT162b2的II/III期临床数据表明其在青少年中展现出良好的免疫原性与安全性, 第二剂接种7天后仍具有超95%的有效性^[48]. 来自Pfizer/BioNTech的这两种疫苗均在I期研究中展现出良好耐受性, 但BNT162b2在II/III期试验中更温和的全身反应原性使其成为更有希望的候选疫苗. 作为拥有抗击Delta突变株临床数据的mRNA疫苗, BNT162b2率先得到FDA的上市批准.

与Moderna公司的LNP-mRNA-1273疫苗相比, mRNA-BNT162b2的不良反应发生率更低, 尤其是在心肌炎中展现出更优越的安全性. 然而其对温度具有更高的敏感性, mRNA-BNT162b2需在 $-60\sim-80^{\circ}\text{C}$ 环境下超低温储存, 这对于疫苗的运输与储存将带来很大挑战. 此外, 这两类疫苗在接种剂量、配方特征、给药间隔、注射方式等方面存在显著差异. 但在稳定性、翻译效率等优化策略上这两类疫苗展现出一定的相同点: 如两者共同使用1-甲基-3'-假尿苷替代尿苷的手段产生具有更高翻译能力和生物稳定性的非免疫原性载体^[49]. 在翻译延伸效率、准确度、起始信号、终止信号等方面作出的密码子优化差异通常导致有效性、稳定性与免疫原性之间的彼此冲突与妥协. 总的来看, 优化后的Pfizer/BioNTech COVID-19和Moderna COVID-19两种mRNA疫苗平台均显示出良好的耐受性, 并诱导抗原特异性T与B细胞免疫反应, 预防感染人群保护力达95%, 成为新冠肺炎疫情期间全球范围内最高效的两款疫苗.

mRNA-1073作为同样由Moderna公司研发的新组合候选疫苗, 编码SARS-CoV-2 S蛋白和流感病毒血凝素糖蛋白, 有望同时预防COVID-19和流感, 目前仍在研发阶段. ARCT-021是由Arcturus Therapeutics Inc.公司开发的疫苗, 通过Arcturus专有的LUNAR脂质系统介导mRNA递送^[50], 可在极低剂量($2\text{ }\mu\text{g}$)给药60天后增加中和抗体, 诱导强大的 CD8^{+} T细胞和I型辅助T细胞

免疫反应, 其I期临床试验数据(NCT04480957)已于2021年1月发布. 开发更多满足长期存贮要求以及保持生物制剂中刺突蛋白固有稳定性的新型mRNA疫苗是抗击新冠肺炎病毒后续发展的重点.

相较国外对mRNA疫苗的开发与临床应用, 为有效应对疫情发生, 国内目前主要以成熟的疫苗技术为主, 包括灭活疫苗、腺病毒载体疫苗等. 当前这些疫苗已被广泛接种, 极大减轻了国内疫情的恶化与反弹. 然而中国研究团队也逐渐开展针对新冠肺炎mRNA疫苗的研发, 为其做出不可忽视的贡献. 林金钟团队^[51]联合徐颖洁团队首先取得重要突破, 其mRNA药物研发平台经过大量序列摸索与优化, 获得了高效表达新冠肺炎病毒四个结构基因的修饰mRNA分子, 首次成功表达出SARS-CoV-2病毒样颗粒并在小鼠体内完成概念疫苗的验证. 此外, 基于免疫信息学方法预测来自SARS-CoV-2蛋白质组的多种免疫原性蛋白质并设计多表位疫苗^[52], 通过Java密码子适应性工具及RNA二级结构计算机模拟可进一步增强mRNA疫苗有效性. 在临床疫苗开发中, 艾博生物联合军事医学科学院、沃森生物开发的新冠肺炎mRNA疫苗(ARCoV)是国内首款获批临床试验的mRNA疫苗. 该耐热候选疫苗已被证明可在 25°C 下稳定存放一周, 可在食蟹猴中诱发高SARS-CoV-2特异性IgG抗体和强病毒中和滴度^[53], 目前已在海外开展III期临床试验, 有望实现中国mRNA疫苗从零到一的突破.

(4) 呼吸道合胞病毒疫苗. 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)与急性下呼吸道感染息息相关, 是幼儿致病甚至死亡的重要原因. RSV表面融合糖蛋白结构生物学的进步迅速扩大了呼吸道合胞病毒疫苗的开发. 高度保守的F蛋白(病毒融合蛋白)通过不可逆的蛋白质重折叠, 从不稳定的融合前构象转变为稳定的融合后构象, 以促进病毒与宿主细胞融合, 因此目前的临床研究主要将其作为RSV的抗原靶点^[54]. 一项研究发现, 高度稳定的融合前RSV F糖蛋白可在小鼠体内引发中和抗体, 并完全保护其免受病毒攻击^[55]. 利用阳离子纳米乳液递送编码RSV F糖蛋白或稳定融合前构象的自扩增mRNA^[56], 在小鼠模型中展现出良好的免疫原性, 且未观察到疫苗相关性疾病. 针对临床研究, Moderna公司正在评估三种编码融合前F蛋白的单剂量候选疫苗(mRNA-1172, mRNA-1777, mRNA-1345). mRNA-1777的I期临床试验在健

康年轻人与老年人中对其免疫原性与安全性进行了评估^[57], 数据显示mRNA-1777的所有剂量水平都具有良好的耐受性, 并且没有报告与疫苗相关的严重不良事件. mRNA-1345将目标人群进一步扩大, 包括1~5岁的未成年人. 尽管RSV mRNA疫苗目前积累的临床数据并不如病毒载体疫苗, 但其理论上更为安全有效, 未来将拥有更广阔的应用前景.

(5) 其他传染病病毒疫苗. 除上述提到的几种主要传染性疾病, mRNA疫苗还在狂犬病毒(rabies virus, RV)、寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)、埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)等诸多疾病预防中起到关键作用.

狂犬病毒是一种嗜神经性病毒, 潜伏期后出现流感症状, 最终导致严重的嗜神经症状. 基于狂犬病毒快速致命的特性, mRNA疫苗提供了一种周转时间短、灵活、适用性广、成本效益高的生产流程. 首个基于狂犬病毒的mRNA候选疫苗是编码狂犬病病毒糖蛋白(rabies virus-glycoprotein, RABV-G)的冻干、热稳定mRNA, 以阳离子鱼精蛋白作为其稳定剂和佐剂, 在小鼠和猪(*Sus scrofa domestica*)模型中验证了其可行性与有效性^[58], 结果显示以微克剂量注射两次后可诱导病毒中和抗体、抗原特异性CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的反应. 值得注意的是, 初次免疫后诱导的病毒中和抗体应答在成年猪和新生猪中均远高于WHO阈值(0.5 IU/mL), 而后逐渐保持稳定, 表明猪的“初始-加强”策略诱导强大的体液免疫反应. 由CureVac公司开发的第一代狂犬病预防性疫苗CV7201临床I期数据显示了在健康成人中被以各种不同剂量/时间通过皮内或肌肉注射产生的安全性和免疫原性^[59]. 数据显示, 大多数受试者报告了与剂量无关的轻中度局部反应, 但mRNA疫苗整体仍显示出较好的安全性与耐受性. 然而初次接种一年后, 14名受试者内仅有2名仍具有可检测抗体, 免疫应答的强度对此类致命感染而言是亟待解决的难题(NCT02241135). 此外, 仅有皮内注射表现出短暂的体液免疫反应, 这种弱给药效果表明仍需进一步优化给药途径. 2019年的后续临床前研究报告指出, 与鱼精蛋白表达的候选mRNA疫苗相比, 使用LNP包装的RABV-G mRNA在小鼠和非人灵长类动物中改善了体液和细胞免疫反应, 相应的人体临床试验正在进一步跟进. CureVac开发的另一狂犬病疫苗CV-7202的I期临床试验表明两个1 μg剂量可产生高滴度中和抗体及强适应性免疫反应(NCT03713086). 冻

干法结合注射前缓冲液重建的方法进一步验证了该候选mRNA疫苗的耐热性^[60], 可在70℃温度下保存数月后仍保留较好的免疫原性和保护作用, 这为其在极端气候供应地区的应用迈出一大步.

寨卡病毒主要通过吸血蚊子进行传播, 孕妇感染ZIKV可导致新生儿不同程度的先天畸形及其他先天缺陷疾病. 膜和包膜蛋白(prM-E)是寨卡病毒疫苗最常见的抗原, 因为针对prM-E的中和抗体可有效防止病毒融合. 编码2013 ZIKV爆发株prM-E的mRNA-LNPs疫苗^[61]采用单剂量(50 μg)足以保护非人类灵长类动物在接种后5周免受攻击. 登革热病毒与寨卡病毒非常相似, 它们都主要由蚊子传播, 并且遗传物质具有高度的序列相似性. 在此类疫苗开发过程中, 寨卡病毒和登革热病毒之间的相似性导致的交叉反应性或成为最大问题. 针对这一问题, Richner等人^[62]利用LNP递送编码prM-E RNA的突变体以消除E-DII-FL中具有免疫优势的保守交叉反应性表位, 并最小化交叉反应性抗体的产生. 类似地, 将prM和E蛋白编码到RNA复制子载体中作为可读框, 可在小鼠中引发ZIKV E蛋白特异性IgG反应, 并鉴定其独特的H-2Db限制性表位^[63]. 尽管相同的编码蛋白被用作抗原, 它们在封装结构上存在显著区别. 此外, Moderna与华盛顿医学院合作开发了靶向E蛋白突变融合环形表位的优化prM-E mRNA, I期临床试验显示出良好的有效性(NCT03014089). 中期结果表明mRNA-1893可在10天内诱导94%~100%的血清转阳, 这一良好的耐受性鼓舞了后期临床试验.

2018年, 针对西非2014~2016年史无前例的埃博拉病毒开发了两种新型的基于EBOV包膜糖蛋白抗原的mRNA疫苗, 接种后豚鼠可诱发EBOV特异性IgG, 感染存活率达100%, 证明了该类疫苗可能是目前EBOV疫苗潜在的候补选手^[64]. 人类κ免疫球蛋白(Igκ)信号肽或GP的野生型信号肽序列也被整合到该疫苗转录物中, 表明其进入临床试验的潜力.

3.2 癌症免疫治疗

目前针对癌症治疗的mRNA疫苗主要有两种方式: 使用体外负载或电穿孔的DC, 直接注射带有或不带有载体的mRNA. 近年来, 联合疗法已成为研究的新热点, 将mRNA疗法与免疫检查点抑制剂、嵌合抗原受体、放射疗法、化学疗法等结合已被证明可显著提升抗癌效果.

(1) 树突状细胞mRNA疫苗. 癌症免疫疗法是mRNA技术在临床前和临床研究中为期最长的探索领域. DCs作为免疫系统专职抗原递呈细胞, 具有吸收和处理外周血和组织中抗原的独特能力, 常被用作mRNA疫苗的靶向细胞. 1995年就证实了肌肉内注射编码癌胚抗原的裸mRNA可以引起抗原特异性抗体反应^[65]. 1996年再次证实皮下种植肿瘤小鼠的DCs在暴露于编码特定抗原的mRNA或肿瘤细胞提取的总mRNA时, 产生T细胞免疫反应, 可以抑制移植肿瘤的生长^[66]. 这些发现加快了mRNA转染树突状细胞方法的开发和临床的转化. 此后, 在癌症患者中进行了许多基于IVT mRNA转染树突状细胞的疫苗临床试验, 从而确定了该方法的可行性和安全性. 这种疗法基于DCs细胞吸收 mRNA翻译成蛋白质后加工成肽并呈递给CD8⁺ T细胞的能力^[66]. 该过程仅有部分mRNA能到达胞质进行翻译, 需通过电穿孔^[67]、核转染^[68]、超声等方法辅助mRNA递送至DCs细胞. 此外, mRNA本身即可激活模式识别受体如Toll样受体并诱导DCs激活, 具有免疫佐剂的功能. 目前已使用多种来源的mRNA为DCs细胞呈递抗原, 如IVT mRNA和肿瘤来源的mRNA. 肿瘤来源的mRNA可完整呈递肿瘤的抗原表位库, 用于扩大免疫反应, 避免由抗原表达丢失或下调导致的肿瘤免疫逃逸, 如胰腺癌和转移性前列腺癌^[69]端粒酶hTERT. IVT mRNA转染DCs的步骤还可以进一步优化, 例如可优化DCs的体外成熟, 或是在递送mRNA的同时加入免疫应答调节剂(如细胞因子和共刺激剂等^[70])以增强患者的抗肿瘤活性.

(2) 直接注射癌症疫苗. 考虑到细胞疗法昂贵且复杂, 很多研究者也考虑直接体内递送编码癌症抗原的IVT mRNA. 不同递送策略包括阳离子脂质体和基因枪的轰击, 均取得了不错的进展. 皮下递送经过序列优化的裸露或者是鱼精蛋白复合物形式的IVT mRNA的临床试验表明, 皮肤细胞能够表达编码的抗原, 并且诱导T细胞和抗体免疫反应的发生^[71]. 此外, 皮内单独注射裸mRNA可以诱导T辅助2(T helper 2, Th2)型抗原特异性免疫反应. 相比之下, 通过共同提供佐剂如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)^[72]或将IVT mRNA与鱼精蛋白复合^[73]可以实现向T辅助1(T helper 1, Th1)型应答的强烈转变. 鱼精蛋白复合IVT mRNA以及与GM-CSF组合的mRNA的早期临床试验表明, 用这些

化合物进行皮内接种是可行的、安全的, 并可诱导抗原特异性抗体和T细胞免疫应答^[74]. 通过该方法进一步优化, 得到了一种包含两种组分的药物级疫苗, 这种疫苗将编码抗原的裸mRNA与鱼精蛋白复合的mRNA佐剂(由CureVac开发)结合在一起. 该疫苗在临床前研究中显示出有效的活性^[75].

在另一种策略中, 优化的IVT mRNA被用于体内原位转染. 该策略的目的是改善IVT mRNA的翻译效率和稳定性, 并增强编码的抗原在鼠和人的树突状细胞的MHC I和MHC II分子上的呈递^[76]. 将裸露的IVT mRNA直接注射到淋巴结中被认为是诱导强力T细胞应答最有效的途径. IVT mRNA通过胞吞作用被淋巴结有选择地高效吸收, 并通过TLR7信号传导介导其成熟. 通过用树突状细胞激活FMS样酪氨酸激酶3配体作为有效的佐剂来优化mRNA疫苗^[77], 或利用免疫调节剂CD40L, CD70和截短的组成型活性TLR4共转染来增强树突状细胞的免疫反应.

(3) 联合免疫检查点抑制剂. 肿瘤的免疫反应是肿瘤发生发展中的重要过程, 脱离机体免疫监控能够促进肿瘤的增殖、侵袭和转移, 因此了解肿瘤的免疫逃逸机制对于肿瘤治疗具有重要作用. 免疫检查点是指免疫系统存在的一些抑制性信号通路, 机体在正常抗肿瘤免疫应答情况下, 共刺激信号和共抑制信号保持平衡, 通过调节自身免疫反应的强度来维持免疫耐受. 肿瘤侵袭机体时, 通常会阻断免疫检查点信号通路从而抑制自身免疫, 给肿瘤细胞的生长和逃逸提供机会. 免疫检查点抑制剂通常作用于以下3个靶点: (i) T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4); (ii) 程序性细胞死亡蛋白受体1(programmed cell death protein-1, PD-1); (iii) 程序性细胞死亡蛋白配体1(programmed cell death-Ligand 1, PD-L1). 以CTLA-4, PD-1, PD-L1为作用靶点的药物可调节机体自身的免疫反应以发挥抗肿瘤作用, 近年来已经成研究热点.

将mRNA疗法和与免疫检查点抑制剂进行组合有望增强癌症免疫应答. 早在2012年就有报道在EG7-OVA肿瘤模型中交替使用编码卵白蛋白的mRNA疫苗和抗CTLA-4抗体进行治疗可显著减缓肿瘤生长^[78]. 在前列腺癌和非小细胞肺癌患者中进行的两项独立的I/IIa期临床试验数据表明, 这种双组分mRNA疫苗在人体中具有良好的安全性、耐受性与免疫原性.

联合免疫检查点阻断治疗的优越性已在临床前动物模型与人类临床试验中得到证实^[79]。另外,在原三阴性乳腺癌模型中,甘露糖修饰的脂质/钙质/磷质纳米颗粒被用来将编码肿瘤抗原黏蛋白状糖蛋白(Mucin1, MUC1)的mRNA疫苗递送至淋巴结DCs^[80],以激活和扩增肿瘤特异性T细胞。通过对MUC1疫苗组和抗CTLA-4抗体组的抗肿瘤活性评估,发现使用抗体阻断CTLA可增强MUC1疫苗疗效。

更多维的抗癌策略似乎显示出更大的抗癌潜力。如使用三维联合疗法——基于mRNA疫苗诱导抗原特异性T细胞反应,免疫检查点抑制剂(程序性细胞死亡蛋白-1、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3、淋巴细胞活化基因-3)以及白介素-6、转化生长因子- β 抗体以增强皮下肺上皮细胞抗肿瘤效果,显著延长了小鼠的生存期^[81]。在另一项试验中,III/IV期黑色素瘤患者接受ipi-limumab(CTLA4单克隆抗体)、编码黑色素瘤相关抗原的mRNA疫苗以及TriMix(佐剂)的三联治疗。类似地,这种联合干预促进复发性黑色素瘤的持续性缩小^[82]。这些试验结果都证明了多维联合疗法的巨大临床潜力。

(4) 联合嵌合抗原受体。嵌合抗原受体T细胞疗法(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)是一种非常个性化的新型肿瘤免疫疗法。它使用患者衍生的T细胞进行体外培养与改造,经基因转导使T淋巴细胞特异性识别靶抗原^[83]。一旦这些细胞被注入病人体内,就可以攻击病人体内特定位置的肿瘤,达到抗癌效果。目前CAR-T细胞疗法仍处于实验治疗阶段,患者仍需遭受严重的副反应,如细胞因子风暴和裂解肿瘤细胞综合征等。另外,大多数肿瘤相关抗原不限于肿瘤细胞表达,导致CAR-T的脱靶效应。优化的IVT mRNA可在T细胞内诱导包含CD3- ζ 和4-1BB共刺激域的CAR短效表达以改善这些问题(图3)。

目前mRNA电穿孔技术在工程T细胞瞬时表达CAR中已得到深入研究,被证明在血液系统恶性肿瘤、实体瘤等多种疾病治疗中存在巨大潜力。宾夕法尼亚大学的June课题组^[84]应用这种方法在临床前肿瘤模型中诱导强效的抗体,通过多次注射转染抗间皮素CAR mRNA的自体T细胞来治疗在体内生长超过50天的腹膜内源性肿瘤,发现该法可显著降低肿瘤的发生率。利用电穿孔技术转染CD19-BB-z mRNA得到CAR-自然杀伤细胞(CAR-natural killer, CAR-NK),引

入异种移植性白血病的免疫缺陷小鼠中,可观察到T细胞迅速迁移至病灶,并保留了靶标特异性裂解活性,在侵袭性白血病异种移植模型中延长小鼠生存期^[85]。值得注意的是,T细胞的瞬时CAR表达随时间衰减,这可能减弱甚至消除了靶向肿瘤细胞的能力。为克服这一障碍,研究者尝试采用多种加权给药策略来避免癌症复发。鉴于上述潜力,基于mRNA的CAR-T细胞疗法正在多项癌症临床试验中进行评估,包括结直肠癌和B细胞淋巴瘤等^[86]。另外电穿孔的方法可能具有细胞毒性,电离脂质纳米颗粒离体递送mRNA至T细胞^[87]可解决这一问题。对于该类策略的细胞剂量、输注频率、给药途径的评估和优化是研究重点。整体来看,将mRNA免疫疗法与CAR-T联合治疗无疑是过继性T细胞转移的一种新方法,作为逆转录病毒和慢病毒工程改造T细胞之外的一种灵活补充,在肿瘤免疫治疗上具有可观前景。更多新颖的癌症免疫疗法与之结合的策略被用于增强抗肿瘤能力,如化学疗法、肿瘤消融等。

3.3 蛋白质替代疗法

mRNA最常见的应用之一是引入治疗性抗体和功能蛋白,即注射mRNA转染至体细胞后翻译出蛋白质,以替换异常蛋白质或作为缺乏蛋白质的补充。1992年,加压素mRNA首次被用于蛋白质替代疗法,在患尿崩症的大鼠中暂时逆转了这一症状^[88]。近年来随着mRNA修饰、递送等技术的发展,这种代替功能蛋白的疗法在多种疾病模型中被广泛研究。在缺乏表面活性蛋白B(surfactant protein-B, SP-B)引起的致死性先天性肺病的小鼠模型中,将2-硫尿苷和5-甲基胞苷双重修饰的SP-B mRNA气雾剂递送到肺部恢复了71%的野生型SP-B表达,同时延长了小鼠的生存时间^[89]。宾夕法尼亚大学和费城儿童医院的研究团队利用LNP系统将编码促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的mRNA递送到鼠胎肝细胞中,使其在肝脏、肺部和肠道中蓄积,结果显示鼠胎血液循环中的EPO蛋白水平升高^[90]。此外,利用mRNA在小鼠肺部以时间和位点特异性方式表达调节性T细胞转录因子叉头框蛋白P3(forkhead box P3, FOXP3),以防止体内过敏性哮喘。结果表明,在两个哮喘模型中修饰的FOXP3 mRNA重新平衡了肺T辅助细胞反应并保护免受过敏原诱导的组织炎症、气道高反应性和杯状细胞化生^[91]。

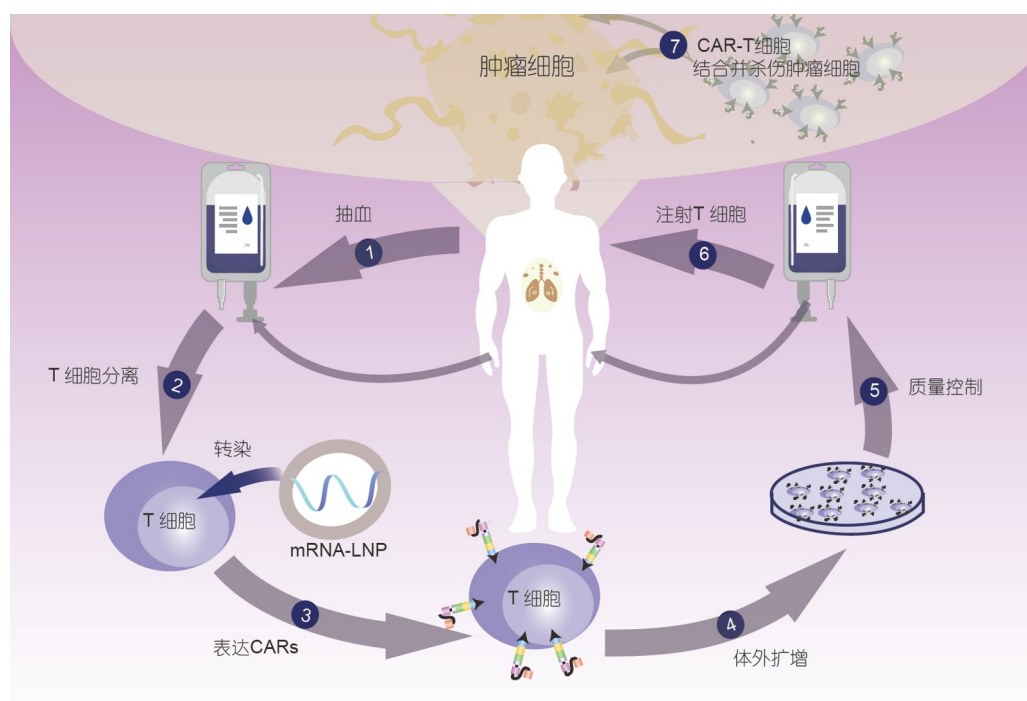


图 3 联合嵌合抗原受体的mRNA疗法肿瘤免疫机制. 采集患者血液后对T细胞进行收集、分离, 利用mRNA电穿孔技术在工程T细胞内瞬时表达嵌合抗原受体CAR, 经体外增殖培养得到大量T细胞后重新输注回到患者体内, 改造后T细胞即可靶向识别抗原以攻击病灶肿瘤细胞(网络版彩图)

Figure 3 Mechanism of mRNA encoding the chimeric antigen receptor for tumor immunity. First, T cells of the blood of patients are collected and separated. Then, mRNA electroporation is used to transiently express chimeric antigen receptors in the engineered T cells. The engineered T cells were re-injected into patients after *in vitro* proliferation and culture. The modified T cells can target and recognize antigens to attack focal tumor cells (color online)

囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)是一种单基因常染色体隐性遗传疾病, 全球范围内约有7万人受其影响. mRNA介导的蛋白代替疗法可用于产生囊性纤维化跨膜电导调节蛋白(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)的功能拷贝, 为这种单基因疾病痊愈带来希望. 一项双盲安慰剂对照试验显示, 脂质体包裹的mRNA经鼻内给药至囊性纤维化患者后四周未检测到免疫反应或功效降低, 表现出良好的持续性. 由壳聚糖包裹的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米颗粒在小鼠模型中能穿透CF黏液并成功递送hCFTR mRNA, 显著改善小鼠肺功能, 使更深的肺部递送成为可能^[89]. Translate Bio研发的CF mRNA MRT5005 I/II期临床数据表明(NCT03375047)总体安全性和耐受性良好, 但没有观察到每秒用力呼吸量百分比的增加趋势, 表明受试者肺功能并未显著改善. 下一代CF mRNA药物正在进一步研发中.

蛋白替代疗法在心血管疾病领域也展现出巨大潜力. 目前利用裸DNA质粒或病毒载体递送目的基因以

及施用重组蛋白的方法结果好坏参半. 在心肌内注射编码人血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)的修饰RNA(modRNA)^[92]的方法可有效驱动心外膜祖细胞分化至心血管系, 在减少梗死面积、增强心肌灌注和提高存活率方面显著优于质粒DNA. 利用modRNA瞬时、高水平 and 局部转移到心脏和骨骼肌的优势弥补了DNA注射持续递送对血管功能产生的不利影响. 这种modRNA还可被应用于驱动胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor 1, IGF1)在小鼠体内的递送^[93], 诱导下游Akt和Erk磷酸化水平的增加, 证明modRNA-IGF1在促进急性心肌梗死后心肌细胞早期存活方面的潜能. 利用VEGF-A modRNA还可介导胰岛因子1(Islet1⁺, ISL1⁺)祖细胞对自分泌因子的高效表达, 促进移植后心脏祖血管形成、增殖和存活, 这一研究拓宽了VEGF促进心血管再生的新功能^[94]. 继续对UTR序列、加帽效率、纯化过程进行持续优化, 在单次给药后观察到猪心脏模型中射血分数、心肌力、心室顺应性等得到改善, 表明

VEGF-A mRNA在大小动物模型中降低心脏损伤、改善心脏功能的潜在可行性。Moderna与AstraZeneca合作开发的mRNA AZD-8601由于能局部瞬时表达VEGF-A而受到关注。利用化学修饰的VEGF-A mRNA在2型糖尿病患者中的I期临床研究被首次报道,结果表明皮内VEGF-A mRNA具有良好的耐受性,并导致2型糖尿病男性局部功能性VEGF-A蛋白表达和瞬时皮肤血流增强^[95]。这些发现进一步支持VEGF-A mRNA作为血管生成疗法,不仅适用于2型糖尿病相关的外周缺血患者,也同样适用于缺血性心血管疾病患者。

3.4 基因编辑

基因编辑技术通过使用靶序列特异型工程核酸酶来操纵真核基因组,其在促进基因组序列正确校正方面所具有的特殊优势,使基于基因编辑的疗法被积极应用于多种疾病。目前基因编辑系统主要包括锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇规则间隔的短回文重复序列相关核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas9)。核酸酶可以DNA, mRNA, 蛋白质等多种形式的递送。使用经典DNA载体翻译编辑酶的策略会因持续表达产生脱靶效应,而使用IVT mRNA瞬时递送可绕过DNA进入细胞核的需求,另一方面其短而强的表达能力会导致高活性和脱靶效应最小化。有效传递编码基因组的mRNA及其伴侣,如用于CRISPR的小向导RNA(small guide RNA, sgRNA)和用于靶向插入的供体模板DNA,是成功进行基因组编辑的关键和限速步骤。

针对递送系统中的潜在缺陷,研究者们开发了多种物理方法、非病毒合成材料递送法以高效安全地完成体内递送过程,如微注射法、电穿孔法、微流体膜变形法、纳米颗粒介导法等。利用微注射或电穿孔法将编码ZFN, TALEN和CRISPR的mRNA和gRNA(guide RNA, gRNA)引入单细胞阶段的胚胎或合子目前已成功应用在多种动物模型中,包括斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、猪等^[96,97]。2014年,通过在单细胞胚胎内共注射Cas9 mRNA和sgRNA,成功在食蟹猴中实现精确的基因靶向,使建立研究人类疾病的高等动物模型成为可能^[98]。然而显

微注射的应用场景仍较为局限,其他基于基因编辑的递送系统被广泛研究。通过对脂质体介导质粒、Cas9 mRNA/gRNA、Cas9 RNP的CRISPR递送进行分别评估^[99],发现Cas9 mRNA/gRNA在所有测试细胞系中的编辑效率均优于质粒递送,其快速周转的特性减少了脱靶结合与清除的可能性。将脂质纳米颗粒介导的Cas9 mRNA与编码sgRNA以及修复模板的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)相结合,有效治疗了Fah突变小鼠^[100]。这种病毒与非病毒的组合递送系统使Cas9核酸酶短期表达,高效靶向基因组编辑。类似地,利用壳聚糖纳米颗粒包裹编码ZFNs的mRNA与AAV-DNA供体模板共转染,这种递送方式更频繁地诱导双链断裂和同源定向修复,使SP-B缺陷小鼠中编码SP-B的基因得到纠正,并延长了它们的生存期^[101]。Intellia Therapeutics公司同样通过包裹脂质纳米颗粒化学修饰的sgRNA和Cas9 mRNA在小鼠肝脏中进行基因组编辑,通过单次给药编辑小鼠肝脏中的甲状腺素运载蛋白基因,血清蛋白水平下降了97%以上超过持续12个月^[102]。一种集成二硫键的脂质纳米颗粒可同时递送Cas9 mRNA和sgRNA,以高效敲除人胚肾细胞的绿色荧光蛋白,并将小鼠血清中的9型枯草芽孢杆菌素水平下降到未治疗时的20%^[103]。这些研究结果都表明,LNP递送系统与具有化学修饰的sgRNA相结合对于mRNA的体内高活性至关重要。除了这些主流的基因编辑方法,IVT-mRNA还可代替传统转座子载体系统中的辅助质粒,作为转座酶的有效来源介导基因插入与表达,与携带目的基因的质粒一起组成Tol2转座子系统,实现简单高效转基因技术^[104]。由于mRNA半衰期较短,且缺乏与基因组的整合,这种不稳定的特性在一定程度上消除了长期副作用的风险,降低了转基因再活化的可能性,使转座子载体生物安全性得以提高。

近几年不仅动物模型,针对人类疾病的临床试验也逐渐成为研究的热点。趋化因子受体5(C-C chemokine receptor 5, CCR5)是人类细胞R5嗜性HIV-1感染所需的共受体,它的缺失会使细胞对R5嗜性HIV-1感染产生抗性。Sangamo Therapeutics公司目前正引领基于mRNA的ZFN递送临床研究,用于T细胞和造血干细胞中的基因编辑,以治疗 β -地中海贫血和HIV。他们在CCR5基因组位点上开发治疗性基因组编辑的非病毒平台,以电穿孔介导编码CCR5特异性ZFN序列的

mRNA(SB-728mR)体内递送^[105]. 在体内外维持造血潜能的前提下, 供体造血干/祖细胞中高达72.9%的修饰克隆的双等位CCR5基因被有效破坏, 这种临床前开发证明了其可作为HIV-1感染终身抗病毒药物治疗的潜在替代方法. 此外, Editas Medicine和Intellia Therapeutics等CRISPR技术公司重点关注肝、肺、造血功能相关疾病, 预计很快就会进入临床试验. 这些可喜的动物模型数据与临床研究成果表明mRNA技术与基因编辑技术强强联手的巨大潜能.

4 mRNA疗法的局限

虽然mRNA在多种疾病模型的预防与治疗中都展示出了巨大的应用潜力, 但是它的发展仍受到许多因素束缚. 针对递送载体的优化仍然任重道远. 大自然的“防火墙”使mRNA进入体内的精准靶向过程困难重重. 尽管它不需要进入细胞核, 在细胞质中即可发挥作用, 但是它的分子量和负离子性质为它进入细胞膜屏障带来了巨大阻碍. 细胞膜主要由两性离子和带负电荷的磷脂双分子层构成, 各种离子泵和离子通道用于维持细胞膜上的负电平衡. 为屏蔽其负电荷, 确保顺利通过细胞膜, 各类递送系统的优化应运而生, 如脂质纳米颗粒. 然而纳米脂质过大不易降解且易产生细胞毒性, 过小则不易穿过细胞膜, 因此寻求纳米脂质的大小平衡成为关键点. 另外, 脂质载体易在非肝脏器官导致输液相关的超敏反应和肝毒性, 这限制了它们在其他器官中的应用, 导致靶点局限在肝脏. 尽管目前纳米载体有了很大发展, 如聚合物涂层和潜在黏液溶解剂的联合应用可提升mRNA纳米载体复合物的稳定性及靶细胞吸收能力, 但这一载体促进细胞摄取mRNA的具体机制仍不明确.

另一问题是mRNA穿过细胞膜后能否在细胞质中有效扩散并到达核糖体表达足量蛋白质. 这可能与mRNA在体内的内吞逃逸机制有关. 目前已发现许多纳米粒子内吞逃逸的例子, 膜融合、孔形成、质子海绵效应等多种策略被用于克服这种逃逸瓶颈, 以实现更高效率的体内摄取. 靶向残基用于识别特定细胞类型或抗原的递送载体有望提高靶点特异性, 此外, 还可拓宽靶点至难以转染的细胞(如角质形成细胞). 更好地理解细胞摄取、内体逃逸、翻译抑制等药理机制

及递送靶点将有助于设计更有效的递送系统. 另一方面, 载体优化后的mRNA相较于同条件优化下的DNA仍有很大差距. 此外, 由于目前并不确定如何将mRNA精确递送至靶细胞, 以及如何达到正确的治疗剂量水平, mRNA剂量与效应的关系是否在个体间甚至个体内发生变化仍是未知的^[16]. 因此如何在个性化治疗中确定一致的mRNA剂量, 成为另一个阻碍临床开发的重要障碍.

在免疫应答方面, 对IVT mRNA的启动子区域修饰、编码序列优化、核苷酸修饰等可在一定程度上保护它们免受核酸酶的降解, 但IVT mRNA仍可以通过模式识别受体识别诱导I型干扰素依赖性免疫反应. 对于疫苗接种, mRNA本身具有的强大免疫激活作用及内在佐剂活性可能是有利的, 但对于非免疫疗法相关的应用(如蛋白质替代疗法), 这种免疫激活会导致细胞过度死亡^[16]. 在这种情况下, 联合使用免疫抑制剂(如B18R蛋白)可以改善非免疫治疗相关的IVT mRNA的不良结果. 在细胞重编程和谱系转换实验中, 必须在几天内表达特定的重编程因子, mRNA的瞬时蛋白表达和快速降解成为一大缺陷. 需要每天使用IVT mRNA进行重复转染, 这在很大程度上增加了时间成本.

在大规模生产过程中, 尽管针对mRNA的修饰层出不穷, 它的热稳定性与传统疫苗相比仍不令人满意. 由于RNA寡核苷酸内磷酸二酯键的反应性在低温下强烈依赖于底物的碱基序列, 这种本质性的不稳定性与易水解的特性使其需要通过冷冻保存来保证稳定性. 冷冻干燥曾被探索作为改善mRNA疫苗热稳定性的一种方法. 但目前临床开发的mRNA疫苗仍需要严格的冷冻运输条件. Moderna和Pfizer的mRNA疫苗使用-20℃或-70℃冰箱进行冷链传递, 低温存放的条件过于严苛, 且若没有严格执行可能导致疫苗毒副作用. 此外, 对于有效的转染和连续的蛋白质生物合成, 由于不同来源的细胞转染能力与效率存在差异, 转染试剂的选择也很重要. 需要针对不同的细胞类型对转染条件进行个性化优化, 同时需要考虑转染试剂的毒性, 以实现安全高效的蛋白质合成. 尽管mRNA的优势赋予其巨大的临床应用潜力, 它的发展仍需克服重重难关, 未来这些技术壁垒的突破性进展必将对mRNA疫苗的大规模开发产生巨大影响.

5 总结与展望

自mRNA疗法得到迅速发展以来, 针对其稳定性、免疫原性、翻译效率、递送系统的研究层出不穷. 与传统的蛋白质药物相比, mRNA的生产周期更短、成本更低、污染更易控制, 这些优势赋予了其巨大的临床应用潜力. 但目前靶向递送、免疫原性、热稳定性方面存在的问题仍待解决. 本文重点着眼于mRNA技术在传染性疾病、癌症等一系列疾病的临床应用. 近年来, 许多令人欣喜的研究成果促使人们继续深入研究这种新型的治疗手段, 包括与其他治疗方法的联合使用. 尤其是在个性化的癌症治疗中, 联合疗法已成为研究的新热点, 将mRNA疗法与化学疗法、放射疗法、免疫检查点抑制剂以及嵌合抗原受体相结

合, 其治疗效果得到显著提升. 此外, mRNA疫苗研发周期较短的特性, 使其可以在新冠肺炎疫情等突发性传染病事件中大放异彩. 这种低成本、高效率的大规模工程化治疗平台有望成为应对全球性感染疾病的有力工具. 蛋白质替代疗法、基因编辑疗法等其他治疗手段中mRNA起到的独特作用, 可以满足精确医疗时代患者个性化治疗的需求. 虽然目前mRNA平台开发仍存在各种亟待解决的障碍. mRNA相关技术的发展, 如编码区密码子优化算法的引入及生物信息学对mRNA序列稳定性的进一步分析和预测, 必将大幅促进mRNA疗法在临床防治上的应用与发展. 它在生产成本以及多靶点设计上的优势, 将使之成为21世纪极具潜力的新型治疗手段.

致谢 衷心感谢杭州师范大学孟一君研究员、中国科学院上海营养与健康研究所杨赞博士、浙江大学徐兵兵博士对本文撰写提出宝贵建议.

参考文献

- 1 Dimitriadis G J. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. *Nature*, 1978, 274: 923–924
- 2 Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247: 1465–1468
- 3 Melton D A, Krieg P A, Rebagliati M R, et al. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl Acids Res*, 1984, 12: 7035–7056
- 4 Vivinus S, Baulande S, van Zanten M, et al. An element within the 5' untranslated region of human *Hsp70* mRNA which acts as a general enhancer of mRNA translation. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 1908–1917
- 5 Zinckgraf J W, Silbart L K. Modulating gene expression using DNA vaccines with different 3'-UTRs influences antibody titer, seroconversion and cytokine profiles. *Vaccine*, 2003, 21: 1640–1649
- 6 Karikó K, Ni H, Capodici J, et al. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, 2004, 279: 12542–12550
- 7 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
- 8 Wang Z, Jiao X, Carr-Schmid A, et al. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 12663–12668
- 9 Grudzien-Nogalska E, Kowalska J, Su W, et al. Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties. In: Rabinovich P, ed. *Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Totowa: Humana Press, 2013. 55–72
- 10 Pardi N, Muramatsu H, Weissman D, et al. *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides. In: Rabinovich P, ed. *Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Totowa: Humana Press, 2013. 29–42
- 11 Züst R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, et al. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol*, 2011, 12: 137–143
- 12 Subtelny A O, Eichhorn S W, Chen G R, et al. Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*, 2014, 508:

66–71

- 13 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
- 14 Elango N, Elango S, Shivshankar P, et al. Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)100 tail-containing vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330: 958–966
- 15 Cazenave C, Uhlenbeck O C. RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 6972–6976
- 16 Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 759–780
- 17 Astell C, Smith M. Thermal elution of complementary sequences of nucleic acids from cellulose columns with covalently attached oligonucleotides of known length and sequence. *J Biol Chem*, 1971, 246: 1944–1946
- 18 Sahay G, Alakhova D Y, Kabanov A V. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release*, 2010, 145: 182–195
- 19 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
- 20 Fenton O S, Kauffman K J, Kaczmarek J C, et al. Synthesis and biological evaluation of ionizable lipid materials for the *in vivo* delivery of messenger RNA to B lymphocytes. *Adv Mater*, 2017, 29: 1606944
- 21 Veiga N, Goldsmith M, Granot Y, et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. *Nat Commun*, 2018, 9: 4493
- 22 Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15: 313–320
- 23 Vogel A B, Lambert L, Kinnear E, et al. Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses. *Mol Ther*, 2018, 26: 446–455
- 24 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
- 25 Beissert T, Perkovic M, Vogel A, et al. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. *Mol Ther*, 2020, 28: 119–128
- 26 Beyrer C, Pozniak A. HIV drug resistance—an emerging threat to epidemic control. *N Engl J Med*, 2017, 377: 1605–1607
- 27 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
- 28 Guardo A C, Joe P T, Miralles L, et al. Preclinical evaluation of an mRNA HIV vaccine combining rationally selected antigenic sequences and adjuvant signals (HTI-TriMix). *AIDS*, 2017, 31: 321–332
- 29 Jong W, Leal L, Buyze J, et al. Therapeutic vaccine in chronically HIV-1-infected patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIa trial with HTI-TriMix. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7
- 30 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 Deliv*, 2016, 23: 2596–2607
- 31 Li M, Zhao M, Fu Y, et al. Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. *J Control Release*, 2016, 228: 9–19
- 32 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
- 33 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
- 34 Pardi N, Secreto A J, Shan X, et al. Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun*, 2017, 8: 14630
- 35 Pardi N, Hogan M J, Naradikian M S, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med*, 2018, 215: 1571–1588
- 36 Allard S D, De Keersmaecker B, de Goede A L, et al. A phase I/IIa immunotherapy trial of HIV-1-infected patients with Tat, Rev and Nef expressing dendritic cells followed by treatment interruption. *Clin Immunol*, 2012, 142: 252–268
- 37 Brazzoli M, Magini D, Bonci A, et al. Induction of broad-based immunity and protective efficacy by self-amplifying mRNA vaccines encoding

- influenza virus hemagglutinin. *J Virol*, 2016, 90: 332–344
- 38 Joe P T, Christopoulou I, van Hoecke L, et al. Intranasal administration of mRNA encoding nucleoprotein provides cross-strain immunity against influenza in mice. *J Transl Med*, 2019, 17: 242
- 39 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
- 40 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
- 41 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: 1569–1584
- 42 Ipage{1584}, Wang F, Kream R M, Stefano G B. An evidence based perspective on mRNA-SARS-CoV-2 vaccine development. *Med Sci Monit*, 2020, 26: 1569
- 43 Jackson L A, Anderson E J, Roupheal N G, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2—preliminary report. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1920–1931
- 44 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
- 45 Güthe S, Kapinos L, Möglich A, et al. Very fast folding and association of a trimerization domain from bacteriophage T4 fibrillin. *J Mol Biol*, 2004, 337: 905–915
- 46 Mulligan M J, Lyke K E, Kitchin N, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*, 2020, 586: 589–593
- 47 Walsh E E, Frenck Jr. R W, Falsey A R, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2439–2450
- 48 Chagla Z. The BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) vaccine had 95% efficacy against COVID-19 ≥ 7 days after the 2nd dose. *Ann Intern Med*, 2021, 174: JC15
- 49 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
- 50 de Alwis R, Gan E S, Chen S, et al. A single dose of self-transcribing and replicating RNA-based SARS-CoV-2 vaccine produces protective adaptive immunity in mice. *Mol Ther*, 2021, 29: 1970–1983
- 51 Lu J, Lu G, Tan S, et al. A COVID-19 mRNA vaccine encoding SARS-CoV-2 virus-like particles induces a strong antiviral-like immune response in mice. *Cell Res*, 2020, 30: 936–939
- 52 Dong R, Chu Z G, Yu F X, et al. Contriving Multi-Epitope Subunit of Vaccine for COVID-19: Immunoinformatics Approaches. *Front Immunol*, 2020, 11, doi : 10.3389/fimmu.2020.01784
- 53 Zhang N N, Li X F, Deng Y Q, et al. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19. *Cell*, 2020, 182: 1271–1283.e16
- 54 Crank M C, Ruckwardt T J, Chen M, et al. A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans. *Science*, 2019, 365: 505–509
- 55 Krarup A, Truan D, Furmanova-Hollenstein P, et al. A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. *Nat Commun*, 2015, 6: 8143
- 56 Brito L A, Chan M, Shaw C A, et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Mol Ther*, 2014, 22: 2118–2129
- 57 Aliprantis A O, Shaw C A, Griffin P, et al. A phase 1, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and immunogenicity of an mRNA-based RSV prefusion F protein vaccine in healthy younger and older adults. *Hum Vaccines Immunother*, 2021, 17: 1248–1261
- 58 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
- 59 Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong H S, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet*, 2017, 390: 1511–1520
- 60 Stitz L, Vogel A, Schnee M, et al. A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11: e0006108
- 61 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

- 62 Richner J M, Himansu S, Dowd K A, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell*, 2017, 168: 1114–1125.e10
- 63 Chahal J S, Fang T, Woodham A W, et al. An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8⁺ T cell responses in a mouse model. *Sci Rep*, 2017, 7: 252
- 64 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
- 65 Conry R M, LoBuglio A F, Wright M, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*, 1995, 55: 1397–1400
- 66 Boczkowski D, Nair S K, Snyder D, et al. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med*, 1996, 184: 465–472
- 67 Van Tendeloo V F I, Ponsaerts P, Lardon F, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*, 2001, 98: 49–56
- 68 Melhem N M, Gleason S M, Liu X D, et al. High-level antigen expression and sustained antigen presentation in dendritic cells nucleofected with wild-type viral mRNA but not DNA. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15: 1337–1344
- 69 Su Z, Dannull J, Yang B K, et al. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol*, 2005, 174: 3798–3807
- 70 Wilgenhof S, Van Nuffel A M T, Benteyn D, et al. A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. *Ann Oncol*, 2013, 24: 2686–2693
- 71 Hoerr I, Obst R, Rammensee H, et al. *In vivo* application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 1–7
- 72 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
- 73 Scheel B, Teufel R, Probst J, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol*, 2005, 35: 1557–1566
- 74 Rittig S M, Haentschel M, Weimer K J, et al. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8⁺ and CD4⁺ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. *Mol Ther*, 2011, 19: 990–999
- 75 Fotin-Mleczek M, Duchardt K M, Lorenz C, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother*, 2011, 34: 1–15
- 76 Kuhn A N, Diken M, Kreiter S, et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses *in vivo*. *Gene Ther*, 2010, 17: 961–971
- 77 Kreiter S, Diken M, Selmi A, et al. FLT3 Ligand as a molecular adjuvant for naked RNA vaccines. In: Rhoads R, ed/ Synthetic mRNA. Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2016. 163–175
- 78 Koch S D, Scheel B, Sebastian M, et al. RNActive—a novel mRNA-based vaccination technology induces strong T- and B-cell responses in phase I/IIa trials in non-small-cell lung cancer and prostate carcinoma. *Immunology*, 2012, 137: 55
- 79 Fotin-Mleczek M, Zanzinger K, Heidenreich R, et al. Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect. *J Gene Med*, 2012, 14: 428–439
- 80 Liu L, Wang Y, Miao L, et al. Combination immunotherapy of MUC1 mRNA nano-vaccine and CTLA-4 blockade effectively inhibits growth of triple negative breast cancer. *Mol Ther*, 2018, 26: 45–55
- 81 Bialkowski L, Van der Jeught K, Bevers S, et al. Immune checkpoint blockade combined with IL-6 and TGF- β inhibition improves the therapeutic outcome of mRNA-based Immunotherapy. *Int J Cancer*, 2018, 143: 686–698
- 82 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
- 83 Jensen M C, Riddell S R. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *Curr Opin Immunol*, 2015, 33: 9–15
- 84 Zhao Y, Moon E, Carpenito C, et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res*, 2010, 70: 9053–9061
- 85 Barrett D M, Zhao Y, Liu X, et al. Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells. *Hum Gene Ther*, 2011, 22: 1575–

- 1586
- 86 Foster J B, Barrett D M, Karikó K. The emerging role of *in vitro*-transcribed mRNA in adoptive T cell immunotherapy. *Mol Ther*, 2019, 27: 747–756
- 87 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
- 88 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
- 89 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
- 90 Riley R S, Kashyap M V, Billingsley M M, et al. Ionizable lipid nanoparticles for in utero mRNA delivery. *Sci Adv*, 2021, 7: eaba1028
- 91 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
- 92 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
- 93 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
- 94 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
- 95 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
- 96 Doyon Y, McCammon J M, Miller J C, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 702–708
- 97 Yang D, Xu J, Zhu T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6: 97–99
- 98 Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836–843
- 99 Liang X, Potter J, Kumar S, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*, 2015, 208: 44–53
- 100 Yin H, Song C Q, Dorkin J R, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 328–333
- 101 Mahiny A J, Dewerth A, Mays L E, et al. *In vivo* genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 584–586
- 102 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
- 103 Liu J, Chang J, Jiang Y, et al. Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bioreducible lipid and messenger RNA nanoparticles. *Adv Mater*, 2019, 31: 1902575
- 104 Sumiyama K, Kawakami K, Yagita K. A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. *Genomics*, 2010, 95: 306–311
- 105 DiGiusto D L, Cannon P M, Holmes M C, et al. Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 3: 16067

Research progress and challenges in mRNA-based therapeutics

FU JiaYan¹, FENG Shuo², DU BinHe², DONG HaiYang¹, LIN JinZhong² & JIN YongFeng¹

¹ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

² School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

mRNA-based therapeutics are widely used for treating various diseases and represent an emerging preventive and therapeutic approach that can be an effective alternative to DNA- and recombinant protein-based therapeutics. Accompanied by the continuous development of *in vitro* synthesis, purification, modification, and delivery system optimization, mRNA-based therapeutics have been substantially improved in terms of stability, translation efficiency, and controllable immunogenicity. At present, mRNA-based drugs are receiving increasing attention in cancer therapy, infectious disease prevention, protein replacement, and gene editing. Moreover, low costs and fast turnover rates in large-scale production confer great potential for the development of mRNA therapeutic platforms. This paper reviews the current status of mRNA-based therapeutics used for various diseases in both preclinical and clinical stages. It also provides a reasonable discussion on key barriers in this field and an outlook towards its future.

mRNA, cancer therapy, infectious disease prevention, protein replacement therapy, gene editing

doi: [10.1360/SSV-2021-0376](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0376)