



基于病毒样颗粒的mRNA递送系统研究进展

王珉^{1,2}, 万颖^{1,2}, 张先恩^{3,4}, 徐承晨^{1*}, 李峰^{2*}

1. 武汉科技大学生命科学与健康学院, 武汉 430065;

2. 中国科学院武汉病毒研究所, 生物安全大科学中心, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071;

3. 深圳理工大学(筹)合成生物学院, 深圳 518055;

4. 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

* 联系人, E-mail: xucc@wust.edu.cn; flf@wh.iov.cn

2023-06-28 收稿, 2023-08-12 修回, 2023-08-13 接受, 2023-08-16 网络版发表

湖北省自然科学基金(2023AFD076)、湖北省教育厅科研计划(Q20221103)、湖北省卫生健康委员会面上项目(WJ2021M214)和武汉市知识创新专项(2022020801010146)资助

摘要 近年来, 信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)在疫苗研发、蛋白质替代治疗、基因编辑等领域展现出了独特的研究价值和应用前景. 受限mRNA自身的理化特性, 如何保证mRNA高效进入靶细胞并翻译一直是mRNA治疗领域要解决的主要问题. 开发安全高效的递送系统、提高靶向递送效率仍然是目前研究的热点. 病毒是特异、高效的天然核酸递送系统. 病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)是一种不含病毒基因组的非感染性颗粒, 其形态均匀、具有可修饰的内外表面、良好的生物相容性和生物降解性, 通过可控自组装能够包装外源核酸, 是发展mRNA递送系统的理想候选材料. 本文重点概述了无包膜类和包膜类VLP载体在mRNA包装、递送和应用等方面的研究进展, 探讨了基于VLP的mRNA递送系统所面临的挑战和机遇, 以期开发新型mRNA递送系统提供参考.

关键词 mRNA, 递送系统, 病毒样颗粒, 疫苗, 基因编辑

信使RNA(messenger RNA, mRNA)是一类单链核糖核酸, 由DNA的一条链作为模板转录而来, 携带有遗传信息并能指导蛋白合成. 自mRNA发现^[1]并实现实验室人工合成^[2]以来, mRNA最直接的应用是治疗蛋白质表达失调引起的重大疾病^[3]. 随着mRNA技术的不断发展, 其在疫苗、癌症免疫治疗、基因编辑和细胞重编程的应用潜力不断被挖掘^[4]. mRNA药物具有其独特优势: 首先, mRNA分子在胞质中发挥作用, 不进入细胞核, 不存在潜在的插入突变风险; 其次, mRNA在体内通过自然途径降解, 可实现瞬时表达; 此外, mRNA易于生产、成本低, 可缩短和降低新药开发的周期与成本^[4-6]. 但是, mRNA自身不稳定、容易被核酸酶降解、无法自主入胞、翻译效率低以及免疫刺激活性等

问题限制了mRNA在生物医学研究中的广泛应用^[7].

随着人们对mRNA结构的深入理解以及mRNA合成修饰相关技术的不断进步, 上述难题逐渐得到解决. 天然mRNA由5个不同的部分组成: 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. 在设计体外转录mRNA(*in vitro*-transcribed mRNA, IVT mRNA)时, 每一部分的优化都可以提高蛋白表达水平(表1): (1) 5'端的帽子结构可与帽结合蛋白(cap-binding protein, CBP)结合, 以防止mRNA降解^[12], 并与转录起始因子结合促进翻译起始^[13]. 在mRNA的体外合成过程中, 可能出现无法被CPB识别的反向帽结构, 而抗反

引用格式: 王珉, 万颖, 张先恩, 等. 基于病毒样颗粒的mRNA递送系统研究进展. 科学通报, 2024, 69: 4625–4636

Wang X, Wan Y, Zhang X E, et al. Progress in mRNA delivery systems based on virus-like particles (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 4625–4636, doi: 10.1360/TB-2023-0632

表 1 mRNA优化策略

Table 1 Modification of mRNA

mRNA的组成结构	修饰方法	优化结果	参考文献
5'帽子	抗反向帽类似物	防止mRNA降解, 与转录起始因子结合促进翻译起始	[8]
poly(A)尾	添加100~120个腺苷酸	提高mRNA的翻译效率和半衰期	[9]
5'UTR 3'UTR	整合人 α -球蛋白或人 β -球蛋白基因的UTR序列	负责招募RNA结合蛋白, 提高mRNA的稳定性和翻译活性	[10]
ORF	化学修饰(m^5C 、 m^5U 、 s^2U 、 m^6A 、 Ψ)和密码子优化	降低对TLR的激活, 有助于mRNA在体内的翻译	[11]

向帽类似物(anti-reverse cap analog, ARCA)的出现解决了这一问题^[8]。(2) 在mRNA的另一端, 3'端poly(A)尾的长度间接调节mRNA的翻译和半衰期^[14], 在体外转录合成mRNA时, 通常在其3'端添加一个长度为100~120个腺苷酸的poly(A)尾^[9], 确保能与poly(A)结合蛋白相互作用形成起始翻译所需的复合物。(3) mRNA的3'和5'UTR负责招募RNA结合蛋白, 能显著影响mRNA翻译活性^[15]。体外转录合成mRNA时, 选择整合高表达基因如人 α -球蛋白或人 β -球蛋白基因的UTR序列, 可以提高mRNA的稳定性和翻译效率^[10]。此外, 对mRNA碱基的化学修饰可以调控mRNA的免疫刺激活性^[16], 5-甲基胞苷(m^5C)、5-甲基尿苷(m^5U)、2-硫尿苷(s^2U)、6-甲基腺苷(m^6A)以及假尿苷(Ψ)化学修饰的mRNA能降低对Toll样受体(toll-like receptor, TLR)的激活, 同时提高mRNA在体内的蛋白表达水平^[4,11]。

在化学修饰的基础上, 提高mRNA细胞靶向效率是目前mRNA治疗的主要难点。裸露的mRNA分子量 $(10^4\sim10^6\text{ Da})$, 且携带致密的负电荷, 难以自身穿过细胞膜^[17], 因此需要一种安全高效的包装/递送载体携带mRNA进入细胞、完成内含体/溶酶体逃逸并最终成功翻译。根据组成成分来源不同, mRNA递送载体可主要分为两大类: 非病毒载体和病毒类载体^[18]。非病毒载体主要包括脂质纳米颗粒、聚合物、细胞外囊泡和多肽等。非病毒载体在mRNA递送方面的综述已很详尽^[18~20]。新型冠状病毒mRNA疫苗就是利用脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)作为递送载体, 通过静电相互作用实现编码新型冠状病毒病毒刺突S蛋白mRNA的包装和递送。目前, Pfizer与BioNTech联合研发的BNT162b2^[21]和Moderna的mRNA-1273^[22]已成功上市, 我国自主生产的沃艾可欣(AWcorina)^[23]和克威莎(Convidecia)^[24]等疫苗已完成三期临床研究, 多款针对奥密克戎的mRNA疫苗也已进入临床研究阶段^[25~27]。

病毒是天然的基因递送载体。病毒类载体目前主要包括慢病毒(lentivirus)、腺病毒(adenovirus)、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)和病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)等。其中, VLP具有形态均一、可自主跨膜、内外表面均可修饰、生物相容、可生物降解、可规模化制备等诸多优势^[28], 是理想的细胞和基因治疗的递送材料^[29], 并已在mRNA递送应用中崭露头角。

本文主要聚焦具有代表性的且已实现mRNA包装和递送的VLP递送载体的特点和设计原理, 总结其在癌症免疫治疗、传染性疾病预防以及基因编辑等领域的运用, 并探讨VLP递送系统当前面临的挑战和未来可能取得突破的方向。

1 病毒样颗粒(VLP)

VLP是由病毒单一或多个结构蛋白自组装而成的与天然病毒衣壳相似的蛋白质颗粒。它们不含完整的病毒基因组, 因此不具有感染性^[30]。利用VLP中空的结构特点, 可将外源货物包装在其内腔, 再通过对VLP表面进行靶向修饰, 实现治疗药物的高效递送(图1)。

根据是否外披包膜, VLP可分为两大类^[31], 即无包膜VLP(nonenveloped VLP)和有包膜VLP(enveloped VLP)。本文主要介绍以豇豆褪绿斑驳病毒(cowpea chlorotic mottle virus, CCMV)、噬菌体MS2为代表的无包膜VLP和以慢病毒、甲病毒为代表的包膜VLP在mRNA递送中的应用(表2)。

2 无包膜VLP

2.1 CCMV VLP

2.1.1 CCMV VLP的结构特点

CCMV是一种植物病毒, 基因组分别由3.2 kb

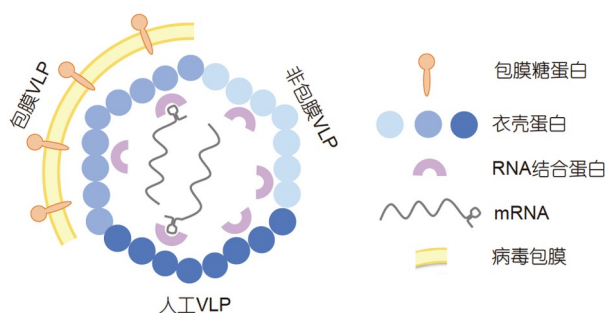


图1 用于mRNA包装与递送的VLP类型

Figure 1 Different types of VLPs for mRNA packaging and delivery

RNA1、2.8 kb RNA2、2.2 kb RNA3以及0.8 kb亚基因组RNA4组成。其衣壳蛋白(capsid protein, CP)由亚基因组RNA4翻译而来, 分子量为20 kD。180个相同的CP单体组装成一个直径28 nm、 $T=3$ 的正二十面体衣壳^[36]。CP的N末端暴露在内腔, 每个CP的N端含有6个Arg和3个Lys, 由此产生了带正电荷的内腔表面^[37]。借助正电荷内腔和负电荷核酸分子之间的静电相互作用, 将核酸分子包裹在CCMV内部, 可实现递送(图2)。

体外适宜条件下, CCMV CP已被证明能通过自组装包装不同长度和序列的单链RNA^[38]。当CCMV CP/RNA质量比足够高时, 长度在140~12000个核苷酸的RNA分子都能被完全包装^[39]。RNA的二级结构在CCMV VLP包装过程中发挥重要作用, 能够影响RNA与CP的静电相互作用。与相同数量单体的线性聚合物相比, CP优先结合更紧凑的RNA, 而且最佳包装长度更长^[40,41]。

2.1.2 CCMV VLP作为载体递送mRNA

为了探索植物来源的球形VLP递送的异源基因在哺乳动物细胞中表达的可能性, Erdemci-Tandogan等人^[42]利用CCMV VLP包装增强黄色荧光蛋白(enhanced yellow fluorescent protein, EYFP)的mRNA, 用于报告在

哺乳动物细胞中RNA的释放和翻译过程。在转染试剂Lipofectamine-2000帮助下, VLP与幼年叙利亚地鼠肾细胞(baby hamster kidney, BHK)孵育, 检测到细胞中EYFP的表达, 说明CCMV VLP能保护RNA不被核酸酶降解, 同时在哺乳动物细胞中成功释放和表达, 为哺乳动物细胞基因递送提供了一个新平台。最新研究表明, 在不依靠佐剂和表面修饰条件下, 包装增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)mRNA的CCMV VLP在体外能直接转染哺乳动物细胞(如HEK293、HeLa和HK2细胞)并成功翻译, 具体的机制仍有待进一步研究^[43]。

靶细胞中无法扩增而导致的低水平表达是mRNA在体内运用的主要限制之一。为了克服这一难题, Gelbart等人^[32]将卵清蛋白的SIINFEKL表位插入到野田村病毒(nodamura virus, NoV)RNA依赖RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)开放阅读框后, 可形成自扩增的卵清蛋白mRNA。以CCMV VLP作为递送载体, 当含有卵清蛋白复制子mRNA的VLP与未成熟的树突状细胞共同孵育时, 卵清蛋白SIINFEKL表位的RNA水平和蛋白产量与裸露的复制子相比有显著增加, 而且树突状细胞表面成熟标志物(如CD86、MHCII和CD80)的激活程度要高1~2个数量级, 说明VLP能有效地保护mRNA并帮助其进入树突状细胞。接种到小鼠体内后, 此VLP产生的抗原特异性T细胞能够诱导IFN和TNF细胞因子的表达。综上, CCMV VLP可作为一种模块化的mRNA递送载体, 利用其体外自组装的特性包装和递送mRNA, 获得目的蛋白表达。

2.2 MS2 VLP

2.2.1 MS2 VLP的结构特点

MS2噬菌体是单链正义RNA病毒, 基因组全长

表2 基于VLP的mRNA递送系统^{a)}

Table 2 VLP-based mRNA delivery systems^{a)}

递送系统	mRNA编码的蛋白	应用	给药方式	参考文献
CCMV VLP	卵清蛋白SIINFEKL表位	模式疫苗	皮下注射	[32]
MS2 VLP	PAP、GM-CSF	前列腺疫苗	静脉注射	[33]
LVLV	SpCas9	老年性黄斑变性	视网膜下腔注射	[34]
VEEV VRP	DENV E蛋白外结构域	DENV疫苗	脚垫注射	[35]

a) DENV: 登革病毒(dengue virus); VEEV: 委内瑞拉马脑炎病毒(venezuelan equine encephalitis virus); CCMV: 豇豆褪绿斑驳病毒(cowpea chlorotic mottle virus); PAP: 前列腺酸性磷酸酶(prostate acid phosphatase); GM-CSF: 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); VRP: 病毒复制子颗粒(viral replicon particle); LVLV: 慢病毒样颗粒(lentivirus-like particles); SpCas9: 化脓性链球菌Cas9(*Streptococcus pyogenes* Cas9)

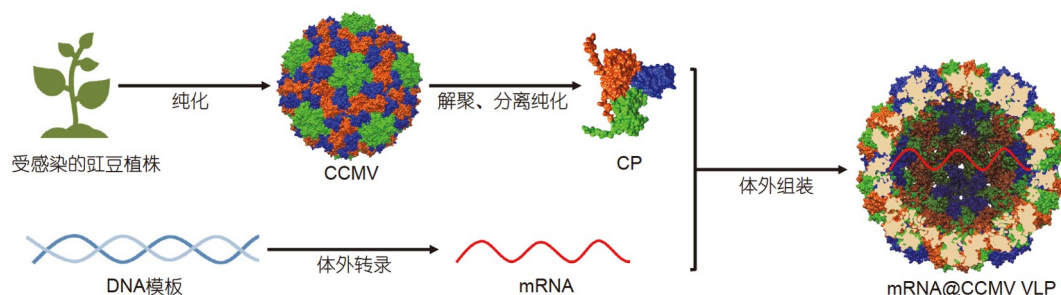


图2 CCMV VLP体外包装mRNA策略示意图

Figure 2 A strategy of using CCMV VLP to package mRNA *in vitro*

3569 nt, 主要编码成熟酶蛋白(或A蛋白)、CP、复制酶蛋白和裂解蛋白。MS2 VLP由180个13.7 kD CP组成, 外径27 nm, 内径15 nm, 呈正二十面体对称性($T=3$)。CP有A、B、C三种不同的构象, 可形成A/B或C/C两种二聚体, 这些不同构象的寡聚物在衣壳中的位置调控着VLP的尺寸和对称性, 并使之能在温度、pH和离子强度显著变化的条件下保持结构的稳定性^[44,45]。MS2 VLP表面存在可修饰的氨基酸位点, 通过化学缀合和基因修饰等方法能在MS2表面实现靶向肽的展示。此外, MS2 VLP具有相对较大的内部空间, 可以使用多种方法装载各种分子和材料, 是药物递送、疾病诊断、疫苗开发等科学研究的理想材料之一^[46,47]。

MS2噬菌体复制酶编码基因的5'端存在一个由19个核苷酸组成的短RNA茎环结构, 又称 pac 位点, 能与MS2 CP二聚体特异性地相互作用, 介导病毒RNA的包装^[48]。利用该位点, MS2 VLP可用来包装非核酸分子, 如修饰有 pac 位点的量子点、化疗药物和蛋白毒素等^[47]。此外, MS2 VLP也能包装其他类型的RNA(如siRNA)^[49], 在作为mRNA递送载体时, 融合有MS2 pac 位点的外源mRNA能特异性地被包装进MS2 VLP内部, 有效保护mRNA免受核酸酶的降解(图3)。

2.2.2 MS2 VLP作为载体递送mRNA

MS2 VLP自身的强免疫原性以及对外源mRNA的特异性包装能力, 使之成为理想的mRNA递送载体之一^[50]。研究发现, 包装有HIV-1 gag mRNA的MS2 VLP疫苗表现出突出的高稳定性, 所递送的mRNA在3种不同的细胞系(HeLa、HEK-293和CHO)中均能高效翻译, 并在肌肉注射后的BALB/c小鼠体内诱发特异性抗原免疫反应^[51]。

在另一项以MS2为递送载体用于治疗前列腺癌的mRNA疫苗研究中, 编码前列腺酸性磷酸酶(prostate acid phosphatase, PAP)mRNA和佐剂粒细胞——巨噬

细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)mRNA可成功在MS2 VLP中实现共包装, 并在此基础上免疫C57BL/6小鼠。ELISA结果表明, 小鼠血清中IL-12和TNF- α 表达水平上调, 在小鼠体内检测到高滴度的PAP特异性IgG抗体和CD4⁺和CD8⁺ T细胞增殖率, 诱发了强烈的体液免疫和细胞免疫反应, 延缓了小鼠肿瘤的生长。此项研究证明了基于MS2 VLP的mRNA疫苗的有效性和安全性, 为mRNA疫苗提供了一种新的递送方法^[33], 并展现了MS2递送载体在前列腺癌治疗中的应用潜力。MS2衣壳二聚体2个亚基的基因融合形成的单链二聚体可以耐受多种肽的插入, 在MS2 VLP表面重复密集排列的肽呈现出较强的免疫原性^[52,53], 这一显著特点与MS2 VLP包装mRNA的能力相结合, 可进一步用于开发mRNA-多肽的组合疫苗。

2.3 其他无包膜VLP

除了CCMV和MS2 VLP, 其他的VLP也可用于递送mRNA分子。嗜热菌*Aquifex aeolicus*的二氧四氢蝶啶合酶(*Aquifex aeolicus* lumazine synthase, AaLS)是由60个相同亚基自组装形成的正二十面体类VLP结构。苏黎世理工学院Hilvert团队^[54]利用阳离子肽和RNA包装信号之间的相互作用, 研发了能够捕获其自身mRNA的AaLS变体, 在CP的N末端融合 λ -噬菌体抗终止蛋白N的RNA结合域(λN^+ 肽), 可以特异性地识别同源mRNA 5'和3'UTR上的人工BoxB茎环结构, 从而实现mRNA的特异性包装。此外, 表面修饰有低分子量鱼精蛋白(low molecular weight protamine, LMWP)的噬菌体PP7 VLP可以特异性包装融合有 pac 位点的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)mRNA, 携带LMWP肽的PP7 VLP能够穿透细胞膜, 并且其包装的mRNA能在哺乳动物细胞中进行高水平的蛋白表达。该系统在开发基于

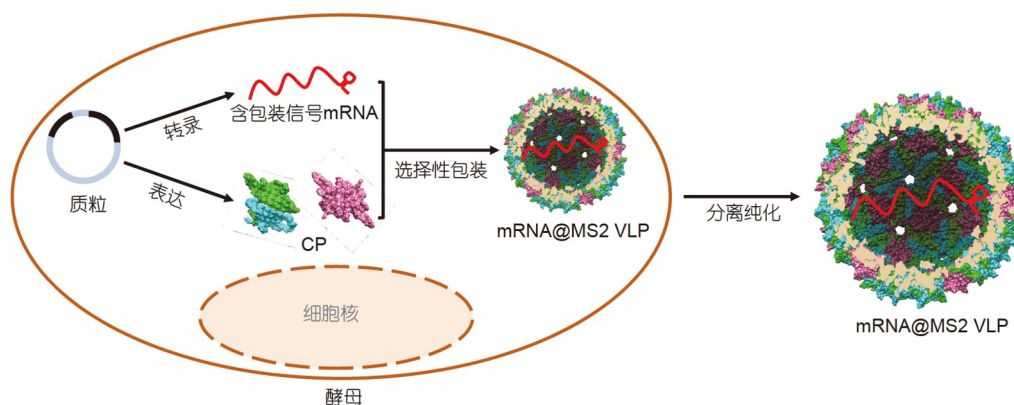


图3 MS2 VLP体内包装mRNA原理示意图

Figure 3 A strategy of using MS2 VLP to package mRNA *in vivo*

mRNA和多肽的重大疾病靶向疗法的预防和治疗方面展现出了较大潜力^[55]。

3 包膜VLP

3.1 慢病毒载体

3.1.1 慢病毒载体结构特点

慢病毒是逆转录病毒科的一个属，为含有两拷贝正链RNA的包膜病毒，能同时感染非分裂细胞和分裂细胞。其正链RNA在5'和3'末端各有一个长末端重复序列(long terminal repeats, LTRs)。LTR具有启动子活性，可以调控3个结构蛋白基因(*gag*、*pol*、*env*)的表达。*gag*基因编码CP、基质蛋白和核衣壳蛋白；*pol*基因编码逆转录酶(p66/p51)、蛋白水解酶和整合酶；*env*基因编码gp120和gp41两种包膜糖蛋白^[56]。此外，LTR序列还含有启动逆转录和介导病毒基因组整合到宿主基因组的信号，在逆转录酶和整合酶的帮助下，慢病毒以病毒RNA为模板合成cDNA，以cDNA为模板合成双链DNA，最终将双链DNA整合到宿主基因组中，实现持久性表达^[57]。目前，慢病毒载体，特别是来自HIV-1的载体已被设计成为有效的基因递送工具，与显微注射、电穿孔或化学转染相比，慢病毒载体的基因转移是一个主动的、受体依赖的过程，其转染效率高、细胞毒性小^[58]。

慢病毒载体已被广泛用于基因编辑器的递送，但慢病毒载体介导核酸酶的长期表达会提高基因编辑的脱靶效应^[59]。因此，为了实现基因编辑蛋白的瞬时表达，研究者开发了通过慢病毒包膜包装递送蛋白或mRNA的LVLP。LVLP包装mRNA策略主要有2种：(1) LVLP利

用慢病毒RNA LTR附近的 Ψ 包装信号与核衣壳蛋白之间的相互作用将mRNA包装在逆转录酶或整合酶失活的LVLP内部，mRNA不能逆转录，只能作为翻译的模板^[58]；(2) 利用RNA适配体及其适配体结合蛋白之间的相互作用来包装和递送mRNA，该mRNA不包含LTR，可以避免逆转录和整合，并最终在靶细胞中成功翻译发挥其功能^[60]。上述两种策略递送的mRNA都具有瞬时表达的特征，能够降低不良的免疫反应和整合到宿主基因组的风险，同时又保留了慢病毒载体的转导效率。

3.1.2 慢病毒载体递送mRNA研究现状

mRNA治疗在基因编辑领域应用前景广阔。通过递送编码锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)、TAL效应核酸酶(TAL effector nucleases, TALENs)和CRISPR/Cas的mRNA分子，实现对特定DNA片段的插入、删除，或特定DNA碱基的缺失、替换等，以改变目的基因或调控元件的序列、表达量或功能，从而在基因层面实现对疾病的干预和治疗。慢病毒颗粒很容易包装编码TALENs的mRNA，但进入靶细胞后TALEN基因的多个重复序列会在逆转录过程中发生重组，阻止其成功递送。因此，Mock等人^[58]开发了一种逆转录酶突变的新型慢病毒载体用于解决重组问题，结果表明逆转录酶失活的慢病毒载体递送的TALENs-mRNA能够在靶细胞中瞬时高效地表达并进行基因编辑。其中递送的CCR5特异性TALEN mRNA在CCR5⁺/293T报告细胞中实现了高达12% CCR5敲除。此外，mRNA引入poly(A)信号后CCR5敲除效率增加至2.5倍，这种新型慢病毒载体同样也适用于长期表达时具有毒性的效应蛋白。上述载体不仅解决了重组问题，还解决了载体

整合、核酸酶表达延长和插入突变相关的潜在问题, 如果与额外的修饰相结合以防止整合, 可以进一步降低慢病毒基因组插入的概率。

Lu等人^[59]在金黄色葡萄球菌Cas9(*Staphylococcus aureus* Cas9, SaCas9)mRNA终止密码子后加入人β血红蛋白(human beta hemoglobin, HBB)基因的3'UTR序列和MS2适配体, 利用MS2衣壳蛋白(MS2 coat protein, MCP)及其识别茎环之间的特异性相互作用将SaCas9 mRNA包装在LVLP内, 随后与表达HBB-sgRNA1的整合缺陷慢病毒载体(integration-defective lentiviral vectors, IDLVs)共同转导至GFP报告细胞中。结果表明, Sa-Cas9能够实现瞬时和高效表达, 转导48 h后, 13%的报告细胞呈GFP阳性, 86.5%的等位基因发生插入和缺失。为使递送系统更加方便和高效, 该团队正在探究Sa-Cas9 mRNA与sgRNA共同包装的可能性。

上海交通大学蔡宇伽团队^[34]利用慢病毒载体开发了一种递送mRNA的新技术。该技术结合了MCP对RNA茎环结构的特异识别和慢病毒对几乎所有细胞的

高效感染的优势, 利用源自HIV-1的工程化慢病毒协同递送SpCas9 mRNA和靶向血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, Vegfa)的sgRNA(图4), 用来治疗由Vegfa诱导引起的湿性老年性黄斑变性。在HEK293T细胞中包装同时含有SpCas9 mRNA和sgRNA的一体化CRISPR慢病毒VLP(mLP-CRISPR)。在单次视网膜下腔注射后, mLP-CRISPR敲除44%视网膜色素上皮细胞中的Vegfa基因, 减少了63%的新生血管面积, 实现了高效的基因编辑, 同时递送的Cas9 mRNA存在时间只有72 h, 可以显著降低脱靶风险和减少免疫反应。该研究搭建了基于慢病毒VLP的CRISPR递送治疗系统, 展现了VLP递送载体在开发安全有效基因编辑技术方面的重要潜力。

3.2 甲病毒载体

3.2.1 甲病毒结构特点

甲病毒(alphavirus)是单股正链RNA包膜病毒, 能够在许多脊椎动物和无脊椎动物中复制。基因组全长

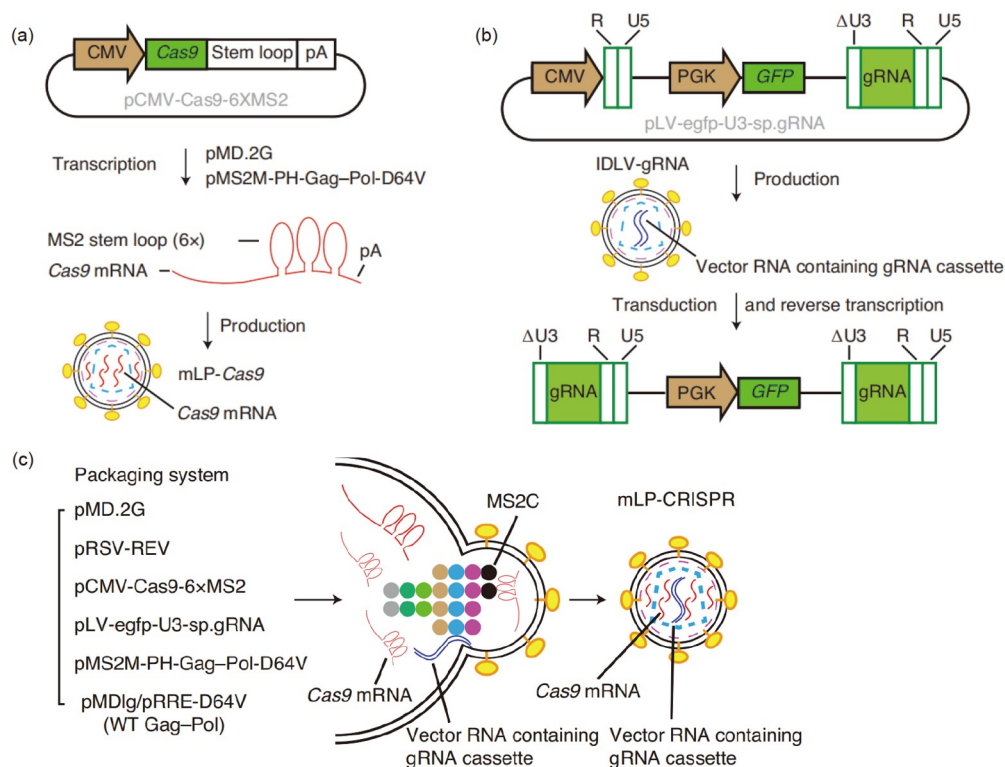


图4 用于协同递送Cas9 mRNA和sgRNA的LVLP载体的包装过程示意图^[34]。(a) 慢病毒颗粒包装Cas9 mRNA原理; (b) IDLV-gRNA产生和转导过程; (c) 一体化mLP-CRISPR的包装过程

Figure 4 The packaging process of LVLP for co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA^[34]. (a) The principle of packaging Cas9 mRNA into lentiviral particles; (b) production and transduction of gRNA-expressing IDLV; (c) the process for producing the all-in-one mLP-CRISPR

12 kb, 含有2个ORF. 第一个ORF位于基因组5'末端的前2/3部分, 编码非结构蛋白(non-structural protein, nsP) nsP1、nsP2、nsP3和nsP4, 并负责病毒RNA负链和新正链的转录. 第二个ORF位于基因组3'末端的后1/3部分, 编码结构蛋白, 包括CP、膜糖蛋白E1、E2、E3和6K蛋白, 负责包装病毒RNA和最终组装成包膜颗粒. 其中甲病毒的结构蛋白由亚基因组mRNA(也称26S mRNA)翻译得到, 该mRNA是病毒的非结构蛋白形成的复制复合体利用负链RNA ORF间的亚基因启动子转录得到的(图5(a))^[61]. 当甲病毒作为基因转移的载体时, 甲病毒复制子包含病毒基因组5'和3'末端的顺式作用序列和全部的非结构蛋白基因, 结构蛋白ORF被外源基因取代, 被取代的结构蛋白通过辅助RNA提供, 最终将复制子RNA包装入VLP^[62]. 这些复制子进入易感宿主细胞后, 通过复制子中编码的病毒RNA聚合酶复合物进行自我复制.

3.2.2 甲病毒复制子的应用

中国科学院武汉病毒研究所张波课题组以甲病毒为载体建立了一种快速高效的新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)小鼠感染模型. 在编码VEEV衣壳和包膜蛋白的辅助RNA帮助下, 带有S标签的人血管紧张素转换酶2(human angiotensin converting enzyme 2, hACE2)的复制子被包装到VEEV-VRPs中(图5(b)), 通过外源性递送hACE2构建对SARS-CoV-2敏感的小鼠模型, VEEV-VRP-hACE2转导的小鼠在SARS-CoV-2感染后出现与COVID-19患者类似的肺部病变, 可利用该模型测试潜在的抗病毒药物和疫苗^[63].

非扩增mRNA疫苗在体内受到细胞对mRNA表达持续时间的限制, 只能实现短暂的低水平表达, 因此需要多次重复接种疫苗, 而自扩增mRNA疫苗的效力原理上要更高, 利用甲病毒RNA在宿主细胞内的自我复制能力, 增加蛋白表达总量和延长表达持续时间, 从而降低给药量和给药频率^[64]. 同时RNA复制中间体——双链RNA触发细胞的免疫反应可被用来进一步提高疫苗的效力^[62]. 这些VRPs已成功地用于许多不同抗原的递送并作为候选疫苗进行了验证^[35,65-67], 能产生有效和广泛的体液和细胞免疫反应. Daeman等人^[65]尝试开发基于重组塞姆利基森林病毒(recombinant semliki forest virus, rSFV)载体的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)治疗性疫苗. 编码HCV NS3/4A或HCV全部保守nsPs的rSFV复制子在免疫小鼠后能够有效诱导产生

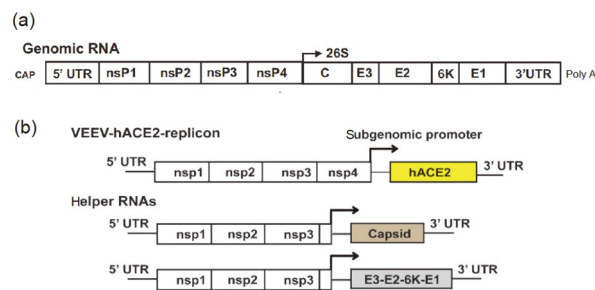


图5 甲病毒载体及mRNA递送应用. (a) 甲病毒基因组结构^[61]; (b) 包装hACE2复制子的VLP组装元件^[63]

Figure 5 Application of alphavirus vectors in mRNA delivery. (a) Genomic structure of alphavirus^[61]; (b) assembly elements of VLP packaging hACE2 replicon^[63]

NS3特异性CD8⁺ T细胞反应. 在EL4肿瘤小鼠模型中, 该HCV疫苗降低了肿瘤细胞中HCV nsPs的表达和频率, 显著延缓肿瘤的生长. 下一步的研究聚焦在HCV特异性疫苗与免疫干预或直接作用的抗病毒药物结合, 以期提升不同阶段的HCV感染患者的预后水平.

3.3 其他包膜递送载体

美国麻省理工学院张锋课题组^[68]发现, 人体内存在逆转录病毒gag同源物——LTR逆转录转座子衍生蛋白PEG10可以形成在细胞外囊泡中分泌的VLP, 并结合自身mRNA, 在细胞间进行功能性转移. 该团队利用PEG10非翻译区与目的基因的可重编程特性, 开发了一种用于细胞递送的选择性内源性衣壳化系统(selective endogenous encapsidation for cellular delivery, SEND), 能够实现包装、分泌和递送特定mRNA(图6). 将携带 $SpCas9$ mRNA的PEG10 VLP转移至表达靶向小鼠Kras sgRNA的小鼠脑神经瘤细胞(N2a)系中, Kras基因座产生约60%的插入和缺失. 为进一步构建一体化载体并确定这种基因组编辑方法的可重复性, 利用SEND系统将 $SpCas9$ mRNA和sgRNA共包装, 在HEK293FT细胞HsVEGFA基因座产生约40%的插入缺失, 表明SEND系统能精确有效将mRNA递送至靶细胞中并行使其功能. SEND系统利用内源性人类蛋白自组装为VLP, 与其他递送载体相比, 所引起的免疫反应更少, 更具安全性, 因此可作为一种新型的基因治疗工具, 对核酸治疗的应用具有重要意义.

无包膜VLP和包膜VLP在递送mRNA研究中都得到了初步应用. 其中无包膜VLP更容易设计和改造, 其制备过程也更为简便和经济, 不需要复杂的包膜工程步骤, 能在适当的生产宿主(体内组装)中或无细胞条件

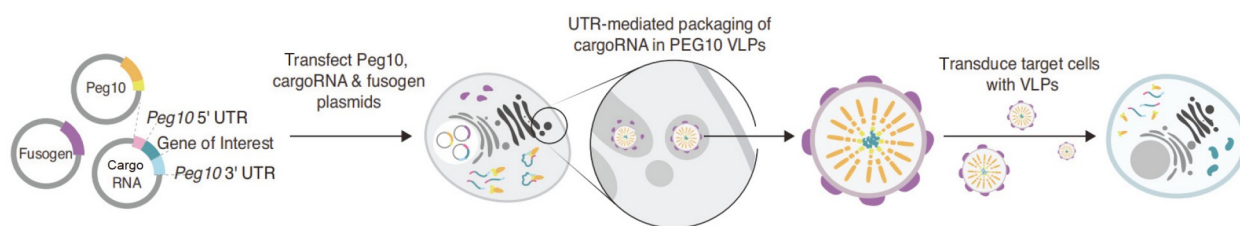


图 6 PEG10 VLP对RNA功能性递送示意图^[68]

Figure 6 Schematic diagram of PEG10 VLP for functional delivery of a cargo RNA^[68]

下(体外组装)组装成含有mRNA的VLP; 但无包膜VLP缺乏脂质双层膜, 因此不能利用膜融合的方式进入细胞, 内涵体逃逸效率低, 不利于mRNA的高效翻译。相比之下, 包膜VLP能通过膜融合方式进入细胞, 有利于mRNA的胞质释放和高效翻译, 但其组成更为复杂, 对不同的病毒, 包膜的来源和组成各不相同; 同时颗粒的稳定性和完整性易受外部环境的影响^[69]。如何生产兼具高效递送和高稳定的包膜VLP并实现mRNA体内递送, 仍然是亟待解决的问题。

4 人工VLP递送载体

病毒作为天然生物大分子递送系统, 也启发人们从头设计全新的VLP并探索其在生物递送中的潜力, 以期打破天然VLP的技术瓶颈。外表面可以被设计成特定的抗原或表位, 从而针对特定的细胞类型进行药物输送^[70], 自组装形成的内腔可以用来包装不同载荷, 如功能性蛋白、核酸(DNA, siRNA、microRNA)和纳米材料等^[71]。人工VLP在mRNA递送方面也蕴藏着重要机遇。美国华盛顿大学David Baker团队^[72]设计了一种原子级精度的二十面体蛋白衣壳, 由12个五聚体和20个三聚体组成, 能够自组装, 内腔足够大, 可以包装生物大分子。通过诱变和选择过程, 在衣壳内腔引入带正电荷的氨基酸, 能够有效包装和保护mRNA^[73]。合成的核衣壳可以允许更进一步地工程化和改造, 从而改善基因组包装、核酸酶耐受和体内循环时间。人工VLP在治疗性核酸递送的应用代表了下一代VLP技术的一个方向, 将大大扩展现有mRNA递送技术平台。

作为人工VLP的另一类代表, 基于DNA折纸技术的纳米递送载体也已引起人们关注。DNA折纸纳米载体的优势在于可编程设计和良好的生物相容性^[74]。受病毒衣壳正二十面体结构的启发, 上海交通大学杨洋课题组^[75]设计了模拟病毒衣壳的DNA框架。该框架不仅可模拟噬菌体感染大肠杆菌, 还可以在框架外载适

配体以模拟病毒刺突, 内载小干扰RNA(siRNA), 由此实现可编程的RNA治疗药物的递送^[76]。DNA折纸框架与VLP有类似的特点, 可通过低阶结构的修饰与改造来调控高阶结构的构象与功能。DNA纳米载体的理性设计与应用可为探索高性能递送载体, 尤其是类VLP递送系统, 提供新的思路。

5 结论与展望

mRNA治疗是一种十分有应用前景的治疗方式。mRNA在细胞质中翻译并发挥作用, 没有基因整合的风险; 同时体外合成过程耗时短, 在应对突发传染病、个体化治疗等方面具有很大优势。通过化学修饰可以改善mRNA的不稳定性、翻译效率以及自身的免疫原性等问题, 但mRNA的高效递送仍是限制mRNA治疗应用的主要障碍, 因此开发安全有效的递送系统对mRNA治疗至关重要。LNP已经在mRNA疫苗递送方面取得巨大成功, 但LNP倾向于在肝脏中富集, 限制了该递送系统更广泛的应用。本文主要介绍了VLP(包膜VLP、非包膜VLP和人工VLP)递送mRNA的原理以及在疫苗和基因编辑领域的应用, 展示了VLP作为mRNA递送载体的独特潜力。应该看到, 尽管人们已开展了一些成功的尝试, 基于VLP的mRNA递送系统还处于发展当中, 无包膜VLP的递送调控和mRNA翻译效率亟待突破, 包膜VLP的高效、稳定、规模化制备有待提升, 对更多种类VLP用于mRNA递送的尝试也应尽快展开。同时, 在VLP递送mRNA真正用于临床前, VLP在体内的毒性和生物分布应该得到准确的评估。不同类型VLP的大小、组成和表面化学性质等影响自身免疫原性以及生物分布, 这些特征对mRNA治疗至关重要。作为非疫苗应用时, VLP自身的免疫原性可能会引起炎症反应, 影响mRNA药物到达目标组织发挥功能。聚乙二醇修饰可以调节其免疫原性, 提高在宿主体内的半衰期, 同时减少肝脏和脾脏对VLP的摄取。利用VLP递送

mRNA尚面临诸多挑战, 但不可否认该领域积极的研究前景. 随着人们生物设计能力的提升, VLP递送系统

有望在mRNA药物领域取得突破, 在癌症、遗传疾病和传染病疫苗方面发挥重要作用.

参考文献

- Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 1961, 190: 576–581
- 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
- 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
- Haji K A, Whitehead K A. Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat Rev Mater*, 2017, 2: 17056
- Yao H M. Research progress of mRNA vaccines development (in Chinese). *Compet Intellig*, 2021, 17: 10 [姚恒美. mRNA疫苗发展态势研究. 竞争情报, 2021, 17: 10]
- Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — Developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 759–780
- Islam M A, Reesor E K G, Xu Y, et al. Biomaterials for mRNA delivery. *BioMater Sci*, 2015, 3: 1519–1533
- 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
- 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
- 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
- Kariko K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: Implication for therapeutic RNA development. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2007, 10: 523
- Evdokimova V. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J*, 2001, 20: 5491–5502
- Haghighat A, Sonenberg N. eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-Cap structure. *J Biol Chem*, 1997, 272: 21677–21680
- Chang H, Lim J, Ha M, et al. TAIL-seq: Genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell*, 2014, 53: 1044–1052
- 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
- Li B, Luo X, Dong Y. Effects of chemically modified messenger RNA on protein expression. *Bioconjugate Chem*, 2016, 27: 849–853
- Chaudhary N, Weissman D, Whitehead K A. mRNA vaccines for infectious diseases: Principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 817–838
- Yin H, Kanasty R L, Eltoukhy A A, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 541–555
- Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater*, 2021, 6: 1078–1094
- Ibba M L, Ciccone G, Esposito C L, et al. Advances in mRNA non-viral delivery approaches. *Adv Drug Deliver Rev*, 2021, 177: 113930
- 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
- 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*, 2020, 384: 403–416
- Liu X, Li Y, Wang Z, et al. Safety and superior immunogenicity of heterologous boosting with an RBD-based SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Chinese adults. *Cell Res*, 2022, 32: 777–780
- Li J X, Wu S P, Guo X L, et al. Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: A randomised, open-label, single-centre trial. *Lancet Respiratory Med*, 2022, 10: 739–748
- Hui A M, Li J, Zhu L, et al. Immunogenicity and safety of BNT162b2 mRNA vaccine in Chinese adults: A phase 2 randomised clinical trial. *Lancet Regional Health-Western Pac*, 2022, 29: 100586
- Zhang N N, Zhang R R, Zhang Y F, et al. Rapid development of an updated mRNA vaccine against the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell Res*, 2022, 32: 401–403
- Wang H, Chen Z, Wang Z, et al. mRNA based vaccines provide broad protection against different SARS-CoV-2 variants of concern. *Emerging Microbes Infects*, 2022, 11: 1550–1553

- 28 Ma Y, Nolte R J M, Cornelissen J J L M. Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2012, 64: 811–825
- 29 Douglas T, Young M. Viruses: Making friends with old foes. *Science*, 2006, 312: 873–875
- 30 Slivac I, Guay D, Mangion M, et al. Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, 17: 105–118
- 31 Nooraei S, Bahrololom H, Hoseini Z S, et al. Virus-like particles: Preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19: 59
- 32 Biddlecome A, Habte H H, McGrath K M, et al. Delivery of self-amplifying RNA vaccines in *in vitro* reconstituted virus-like particles. *PLoS ONE*, 2019, 14: e0215031
- 33 Li J, Sun Y, Jia T, et al. Messenger RNA vaccine based on recombinant MS2 virus-like particles against prostate cancer. *Int J Cancer*, 2014, 134: 1683–1694
- 34 Ling S, Yang S, Hu X, et al. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a VEGFA-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 144–156
- 35 Khalil S M, Tonkin D R, Mattocks M D, et al. A tetravalent alphavirus-vector based dengue vaccine provides effective immunity in an early life mouse model. *Vaccine*, 2014, 32: 4068–4074
- 36 Zinkhan S, Ogrina A, Balke I, et al. The impact of size on particle drainage dynamics and antibody response. *J Control Release*, 2021, 331: 296–308
- 37 Douglas T, Young M. Virus particles as templates for materials synthesis. *Adv Mater*, 1999, 11: 679–681
- 38 Hu Y, Zandi R, Anavitarte A, et al. Packaging of a polymer by a viral capsid: The interplay between polymer length and capsid size. *Biophys J*, 2008, 94: 1428–1436
- 39 Cadena-Nava R D, Comas-Garcia M, Garmann R F, et al. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: Requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J Virol*, 2012, 86: 3318–3326
- 40 Erdemci-Tandogan G, Wagner J, van der Schoot P, et al. Effects of RNA branching on the electrostatic stabilization of viruses. *Phys Rev E*, 2016, 94: 022408
- 41 Singaram S W, Garmann R F, Knobler C M, et al. Role of RNA branchedness in the competition for viral capsid proteins. *J Phys Chem B*, 2015, 119: 13991–14002
- 42 Azizgolshani O, Garmann R F, Cadena-Nava R, et al. Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *Virology*, 2013, 441: 12–17
- 43 Villagrana-Escareno M V, Reynaga-Hernandez E, Galicia-Cruz O G, et al. VLPs derived from the CCMV plant virus can directly transfect and deliver heterologous genes for translation into mammalian cells. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 4630891
- 44 Toropova K, Basnak G, Twarock R, et al. The three-dimensional structure of genomic RNA in bacteriophage MS2: Implications for assembly. *J Mol Biol*, 2008, 375: 824–836
- 45 Brauer D D, Hartman E C, Bader D L V, et al. Systematic engineering of a protein nanocage for high-yield, site-specific modification. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 3875–3884
- 46 Kovacs E W, Hooker J M, Romanini D W, et al. Dual-surface-modified bacteriophage MS2 as an ideal scaffold for a viral capsid-based drug delivery system. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 1140–1147
- 47 Ashley C E, Carnes E C, Phillips G K, et al. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*, 2011, 5: 5729–5745
- 48 Rolfsson Ó, Middleton S, Manfield I W, et al. Direct evidence for packaging signal-mediated assembly of bacteriophage MS2. *J Mol Biol*, 2016, 428: 431–448
- 49 Galaway F A, Stockley P G. MS2 viruslike particles: A robust, semisynthetic targeted drug delivery platform. *Mol Pharm*, 2013, 10: 59–68
- 50 Sun S, Li W, Sun Y, et al. A new RNA vaccine platform based on MS2 virus-like particles produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407: 124–128
- 51 Legendre D, Fastrez J. Production in *Saccharomyces cerevisiae* of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs. *J Biotechnol*, 2005, 117: 183–194
- 52 Peabody D S, Manifold-Wheeler B, Medford A, et al. Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2. *J Mol Biol*, 2008, 380: 252–263
- 53 Peabody D S. Subunit fusion confers tolerance to peptide insertions in a virus coat protein. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 347: 85–92
- 54 Terasaka N, Azuma Y, Hilvert D. Laboratory evolution of virus-like nucleocapsids from nonviral protein cages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 5432–5437
- 55 Sun Y, Sun Y, Zhao R, et al. Intracellular delivery of messenger RNA by recombinant PP7 virus-like particles carrying low molecular weight protamine. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 46
- 56 Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, et al. Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 2013, 36: 1–22

- 57 Cockrell A S, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. [Mol Biotechnol](#), 2007, 36: 184–204
- 58 Mock U, Riecken K, Berdien B, et al. Novel lentiviral vectors with mutated reverse transcriptase for mRNA delivery of TALE nucleases. [Sci Rep](#), 2014, 4: 6409
- 59 Lu B, Javidi-Parsijani P, Makani V, et al. Delivering SaCas9 mRNA by lentivirus-like bionanoparticles for transient expression and efficient genome editing. [Nucleic Acids Res](#), 2019, 47: e44
- 60 Prel A, Caval V, Gayon R, et al. Highly efficient *in vitro* and *in vivo* delivery of functional RNAs using new versatile MS2-chimeric retrovirus-like particles. [Mol Ther Methods Clin Dev](#), 2015, 2: 15039
- 61 Rayner J O, Dryga S A, Kamrud K I. Alphavirus vectors and vaccination. [Rev Med Virol](#), 2002, 12: 279–296
- 62 Geall A J, Mandl C W, Ulmer J B. RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. [Semin Immunol](#), 2013, 25: 152–159
- 63 Zhang Y N, Li X D, Zhang Z R, et al. A mouse model for SARS-CoV-2 infection by exogenous delivery of hACE2 using alphavirus replicon particles. [Cell Res](#), 2020, 30: 1046–1048
- 64 Rohner E, Yang R, Foo K S, et al. Unlocking the promise of mRNA therapeutics. [Nat Biotechnol](#), 2022, 40: 1586–1600
- 65 Ip P P, Boerma A, Regts J, et al. Alphavirus-based vaccines encoding nonstructural proteins of hepatitis C virus induce robust and protective T-cell responses. [Mol Ther](#), 2014, 22: 881–890
- 66 Oreshkova N, Cornelissen L A H M, de Haan C A M, et al. Evaluation of nonspreading Rift Valley fever virus as a vaccine vector using influenza virus hemagglutinin as a model antigen. [Vaccine](#), 2014, 32: 5323–5329
- 67 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
- 68 Segel M, Lash B, Song J, et al. Mammalian retrovirus-like protein PEG10 packages its own mRNA and can be pseudotyped for mRNA delivery. [Science](#), 2021, 373: 882–889
- 69 Deng F. Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. [J Immunol Sci](#), 2018, 2: 36–41
- 70 Heddle J G, Chakraborti S, Iwasaki K. Natural and artificial protein cages: Design, structure and therapeutic applications. [Curr Opin Struct Biol](#), 2017, 43: 148–155
- 71 Sahandi Zangabad P, Karimi M, Mehdizadeh F, et al. Nanocaged platforms: Modification, drug delivery and nanotoxicity. Opening synthetic cages to release the tiger. [Nanoscale](#), 2017, 9: 1356–1392
- 72 Bale J B, Gonen S, Liu Y, et al. Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. [Science](#), 2016, 353: 389–394
- 73 Butterfield G L, Lajoie M J, Gustafson H H, et al. Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. [Nature](#), 2017, 552: 415–420
- 74 Lacroix A, Sleiman H F. DNA nanostructures: Current challenges and opportunities for cellular delivery. [ACS Nano](#), 2021, 15: 3631–3645
- 75 Xu Y, Yang Y R, Shi Q, et al. An infectious virus-like particle built on a programmable icosahedral DNA framework. [Angew Chem Int Ed](#), 2023, 62: e202214731
- 76 Shi Q, Wu Y, Xu Y, et al. Virus mimetic framework DNA as a non-LNP gene carrier for modulated cell endocytosis and apoptosis. [ACS Nano](#), 2023, 17: 2460–2471

Summary for “基于病毒样颗粒的mRNA递送系统研究进展”

Progress in mRNA delivery systems based on virus-like particles

Xuan Wang^{1,2}, Ying Wan^{1,2}, Xian-En Zhang^{3,4}, Chengchen Xu^{1*} & Feng Li^{2*}¹ College of Life Sciences and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China;² State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Center for Biosafety Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;³ Faculty of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;⁴ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China* Corresponding authors, E-mail: xucc@wust.edu.cn; li@wh.iov.cn

In the past few years, the global COVID-19 pandemic has led to widespread attention to mRNA therapy, with the emergence of the mRNA COVID-19 vaccine driving the rapid development of mRNA therapeutics. mRNA has shown great and unique potential in vaccine development, protein replacement therapy, and gene editing, which, however, has been limited by issues such as poor stability, inability to enter cells autonomously, low translation efficiency, and immune stimulation activity. With a deepening understanding of mRNA structure and continuous progress in mRNA synthesis and modification-related technologies, optimization of the cap structure, 5'- and 3'-untranslated regions, open reading frame, and poly(A) tail have been implemented to enhance mRNA stability, increase its expression levels *in vivo*, and reduce immune stimulation.

Efficient mRNA delivery into target cells to enable high-level translation has always been a major problem in mRNA therapy. Developing safe and efficient delivery vectors has been a central pursuit to solve the problem. Based on the source of their composition, mRNA delivery vectors can be divided into two categories: Non-viral and viral. Non-viral vectors include lipid nanoparticles, polymers, extracellular vesicles, and peptides. The most commonly used is the lipid nanoparticles. However, problems with this non-viral vector remain, such as cell toxicity and the inability to target specific tissues.

Viruses are natural vehicles for nucleic acid delivery. Viral mRNA vectors include lentivirus vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus (AAV) vectors, and virus-like particles (VLPs). VLPs have many beneficial features as mRNA vectors, such as uniform morphology, the activity of entering target cells, having three interfaces for modification, biocompatibility, biodegradability, and scalable production. According to whether they have a lipid membrane, VLPs are classified as enveloped or non-enveloped.

In this review, the recent progress of mRNA delivery by VLPs is summarized. Specifically, cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) VLP and bacteriophage MS2 VLP, which represent the non-enveloped VLP group, are first introduced. Lentivirus and alphavirus representing enveloped VLPs are described in the following sections. In each section, structural features closely related to the immunogenicity and biodistribution of VLPs such as structural composition, icosahedral arrangement, genome components, and surface chemistry, are discussed. Based on the structural features, the mechanisms for packaging and delivering mRNA drugs by VLPs are explained respectively. The fundamental studies and applications of VLP-based mRNA delivery systems in cancer immunotherapy, antiviral vaccines, and gene editing are also mentioned. Moreover, an emerging group of *de novo*-designed artificial VLPs is introduced in the last section. The application of artificial VLPs has opened up new possibilities for efficient mRNA delivery. They will benefit the platforms for mRNA therapy in the near future.

Contributions of VLP-based mRNA delivery systems are expanding the frontier of gene therapy by nanocarriers. It should be noted that the regulation of mRNA delivery and translation efficiency still needs to be improved. Considering continuous multidisciplinary efforts in this field, we anticipate a promising future of mRNA therapy in VLP-based nanomedicine.

mRNA, delivery systems, virus-like particles, vaccines, gene editingdoi: [10.1360/TB-2023-0632](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0632)