



# mRNA疫苗与脂质纳米颗粒递送载体的研究进展

樊渝川, 殷涵, 李钰, 余溪, 唐晓英, 翁郁华\*, 黄渊余\*

北京理工大学生命学院, 医学技术学院, 前沿交叉科学研究院, 分子医学与生物诊疗重点实验室, 北京 100081

\* 联系人, E-mail: [wengyh@bit.edu.cn](mailto:wengyh@bit.edu.cn); [yyhuang@bit.edu.cn](mailto:yyhuang@bit.edu.cn)

2023-10-25 收稿, 2023-12-29 修回, 2024-01-03 接受, 2024-01-04 网络版发表

国家重点研发计划(2021YFC2302400, 2021YFA1201000)和国家自然科学基金(32001008, 32171394)资助

**摘要** 信使RNA(messenger, mRNA)是一类新兴的核酸药物,用于预防和治疗多种疾病.2020年,新型冠状病毒感染(coronavirus disease 2019, COVID-19)的大流行促进了历史上最快速的mRNA疫苗开发.2023年, Katalin Karikó及 Drew Weissman获得诺贝尔生理学或医学奖,以表彰其发现核苷修饰,从而开发出有效的抗COVID-19 mRNA疫苗.这些无不凸显了mRNA技术在生命科学和医学研究方面的巨大潜力.尽管现在已经清楚mRNA疫苗可以快速、安全地保护患者免受传染病的侵害,但还需要进行更多研究来优化mRNA设计以及胞内递送.除了预防严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染,多款mRNA疫苗也已经进入临床开发阶段,用于预防流感病毒、巨细胞病毒、寨卡病毒、呼吸道合胞病毒等病原体的感染.此外,多款针对肿瘤、罕见病的mRNA疫苗或药物也在加速研发.本文阐述了mRNA药物及疫苗的研发进展,并对部分代表性的mRNA药物或疫苗进行了总结;详细介绍了mRNA疫苗开发中的关键技术,包括mRNA的序列优化以及mRNA的工程化创新,总结了现如今最成熟的脂质纳米颗粒递送系统(lipid nanoparticle, LNP),并对mRNA-LNP疫苗的作用机制进行了详细的阐述.最后,对mRNA疫苗的前景和挑战提出了看法.

**关键词** mRNA疫苗, mRNA修饰, mRNA递送, LNP递送系统

疫苗是一种特定的生物制剂,可以诱导免疫系统对病原体或肿瘤细胞的特定抗原产生免疫反应.减毒活疫苗或灭活全病毒疫苗的使用已经在预防和消除人类多种严重疾病方面取得了巨大成功,如天花、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹等.世界卫生组织(World Health Organization, WHO)预测,目前的疫苗接种计划每年可挽救200万~300万人的生命,显著降低5岁以下儿童的死亡率<sup>[1]</sup>.疫苗在预防传染性疾病传播方面发挥了至关重要的作用,是预防传染性疾病传播的最有用的公共卫生措施.

mRNA疫苗是将含有编码抗原蛋白的mRNA接种至体内,经过翻译后形成相应的抗原蛋白,从而诱导机体产生免疫应答,达到预防免疫的作用.mRNA理论上

可产生几乎所有已知序列的功能蛋白,安全性好,靶点范围广,在精准和个性化医疗领域具有广阔的前景.然而,裸露的mRNA在体内不稳定且容易被核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)降解.此外,带负电荷的mRNA大分子很难穿过同样带负电荷的宿主细胞膜,导致细胞渗透效率低下.mRNA工程技术的快速发展,包括化学修饰,以及使用合理的载体来保护mRNA免受RNase降解并协助细胞内mRNA递送,在一定程度上解决了这些问题.

脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)被认为是最有前途的mRNA递送系统,因为它能够通过可控和简单的化学合成来改变特性,从而增强对mRNA的负载能力以及递送效力.LNP的脂质成分一般包括可

**引用格式:** 樊渝川, 殷涵, 李钰, 等. mRNA疫苗与脂质纳米颗粒递送载体的研究进展. 科学通报, 2024, 69: 4813–4823

Fan Y C, Yin H, Li Y, et al. Progress on mRNA vaccines and lipid nanoparticles (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 4813–4823, doi: [10.1360/TB-2023-1093](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1093)

离子化脂质或阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇以及 PEG 脂质。这些成分促进纳米颗粒的形成,提高纳米颗粒的稳定性,实现高效的核酸包封,有助于细胞摄取。同时,LNP 包裹核酸药物,防止核酸酶降解,直至核酸运输至细胞质,并促进核酸药物的内涵体逃逸。

本文综述了 mRNA 疫苗的技术发展,讨论了提高 mRNA 疫苗稳定性和翻译效率的方法和设计原理,阐述了 mRNA 疫苗的递送系统——LNP 递送系统的设计要求及 mRNA 工程创新策略,并展望了人工智能、高通量筛选技术等 mRNA 药物研究、开发方面的潜能,并对该领域的挑战提出了个人见解。

# 1 mRNA 疫苗的临床进展

2019 年末,新型冠状病毒感染病(coronavirus disease 2019, COVID-19)席卷全球,对全球经济以及全世界人民健康产生了重大影响。为了应对 COVID-19,2020 年 10 月美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)先后批准了辉瑞-BioNTech(Pfizer-BioNTech)和莫德纳(Moderna)mRNA 新冠疫苗的紧急使用授权。这两款 mRNA 疫苗的成功极大地激发了科研人员和投资者对 mRNA 疫苗的热情,导致该领域的大量创新和临床开发的快速进展。表 1 总结了截至目前已上市 mRNA 疫苗。除 COVID-19 疫苗外,近年来许多其他传染病的 mRNA 疫苗的开发也取得了进展。例如,Moderna 的 mRNA-1647 疫苗(编码巨细胞病毒五聚体复合物和针对巨细胞病毒的糖蛋白 B 抗原)以及 mRNA-1345 疫苗(编码针对呼吸道合胞病毒的稳定 F 蛋白融合前构象)都正在进行 III 期临床试验。此外,

mRNA-1010 季节性四价流感疫苗也已进入 III 期试验,是 Moderna 第 4 种达到 III 期的 mRNA 疫苗。

mRNA 疫苗技术是一个充满希望的领域。mRNA 疫苗不仅有效遏制了传染病的传播,也为解决癌症等难题提供了可能<sup>[2]</sup>。目前 mRNA 疫苗和药物的总体研发概况如图 1 所示,截至 2023 年 10 月,全球 mRNA 药物和疫苗进入临床的共有 188 个,研发主要集中在疫苗领域。在各种适应证中,感染性疾病占比最大,其次是肿瘤,遗传性疾病排名第 3。除 mRNA 新冠疫苗紧急上市外,其他治疗类 mRNA 药物的研发均处于 I/II 期。国际知名医药企业,如辉瑞、礼来、赛诺菲等,以及国内较为知名的大型制药公司,如恒瑞、石药、君实等都相继开展 mRNA 产品线相关布局。这些药企有的参与当下热门的新冠疫苗研发,有的结合公司自身的特长或与其他公司合作,将 mRNA 药物、疫苗应用于肿瘤、传染病、罕见病等多种不同适应证。表 2 总结了部分适用于不同适应证的 mRNA 疫苗或药物。

# 2 mRNA 疫苗关键技术

## 2.1 mRNA 序列优化

如图 2 所示,体外转录的 mRNA 在结构上与天然存在的成熟 mRNA 相似,具有单链结构,由 5 个主要结构域组成:5'-帽(Cap)、5'-非翻译区(untranslated region, UTR)、编码目的蛋白的开放阅读框(open reading frame, ORF)、3'-UTR 以及多聚腺苷酸(poly(A))尾。目前 mRNA 疗法的主要挑战之一是 mRNA 的半衰期短,这是影响 mRNA 疗法的药代动力学和药效学特性的关键

表 1 目前获批的 mRNA 疫苗

Table 1 Currently approved mRNA vaccines

| 名称            | 公司              | 递送系统  | 病毒种类       | 状态             |
|---------------|-----------------|-------|------------|----------------|
| mRNA-1273     | Moderna         | LNP   | SARS-CoV-2 | 已上市            |
| mRNA-1273.214 | Moderna         | LNP   | SARS-CoV-2 | 已上市            |
| mRNA-1273.222 | Moderna         | LNP   | SARS-CoV-2 | 已上市            |
| BNT162b2      | Pfizer-BioNTech | LNP   | SARS-CoV-2 | 已上市            |
| ARCoV         | 艾博生物            | LNP   | SARS-CoV-2 | 在印度尼西亚获得紧急使用授权 |
| SW-BIC-213    | 斯微生物            | LPP   | SARS-CoV-2 | 在老挝获得紧急使用授权    |
| SYS6006       | 石药集团            | LNP   | SARS-CoV-2 | 在中国获得紧急使用授权    |
| HGC019        | HDT Bio         | LION™ | SARS-CoV-2 | 在印度获得紧急使用授权    |
| DS-5670       | 第一三共株式会社        | LNP   | SARS-CoV-2 | 在日本上市          |
| SYS6006.32    | 石药集团            | LNP   | SARS-CoV-2 | 在中国获得紧急使用授权    |
| RQ3033        | 沃森生物            | LNP   | SARS-CoV-2 | 在中国获得紧急使用授权    |

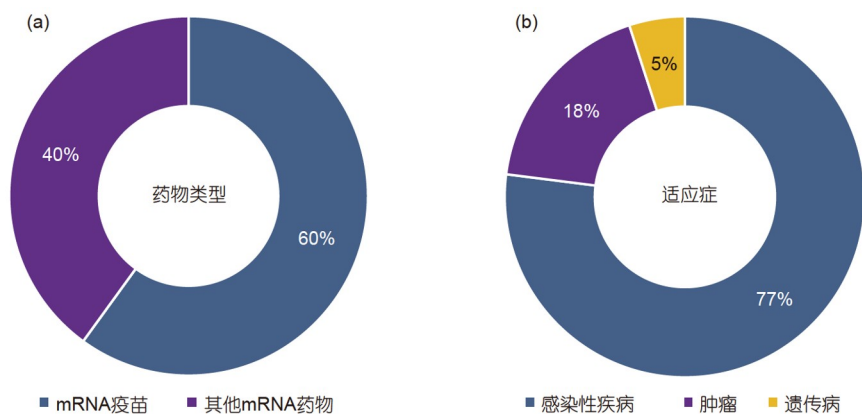


图 1 全球mRNA总体研发概况。(a) 全球mRNA临床管线的类型分布; (b) 全球mRNA临床管线的适应症分布  
Figure 1 Global mRNA research and development overview. (a) Types of the global mRNA clinical pipeline. (b) Distribution of indications in the global mRNA clinical pipeline

表 2 典型mRNA疫苗或药物举例

Table 2 Typical examples of mRNA vaccines or drugs

| 适应症 | 名称        | 公司             | 具体病症                   | 临床开发阶段 | 临床试验编号      |
|-----|-----------|----------------|------------------------|--------|-------------|
| 传染病 | RNA-1345  | Moderna        | 呼吸道合胞病毒感染              | 临床III期 | NCT05127434 |
|     | mRNA-1010 | Moderna        | 季节性流感                  | 临床III期 | NCT04956575 |
|     | mRNA-1647 | Moderna        | 巨细胞病毒感染                | 临床III期 | NCT05085366 |
| 肿瘤  | mRNA-4157 | Moderna-Merck  | 黑色素瘤                   | 临床II期  | NCT03897881 |
|     | BNT113    | BioNTech       | HPV16 <sup>+</sup> 头颈癌 | 临床II期  | NCT04534205 |
|     | BNT111    | BioNTech       | 黑色素瘤                   | 临床II期  | NCT04526899 |
| 罕见病 | mRNA-3927 | Moderna        | 丙酸血症                   | 临床II期  | NCT04159103 |
|     | mRNA-3745 | Moderna        | 糖原贮积病                  | 临床I期   | NCT05095727 |
|     | VX-522    | Moderna-Vertex | 囊性纤维化                  | 临床I期   | NCT05668741 |

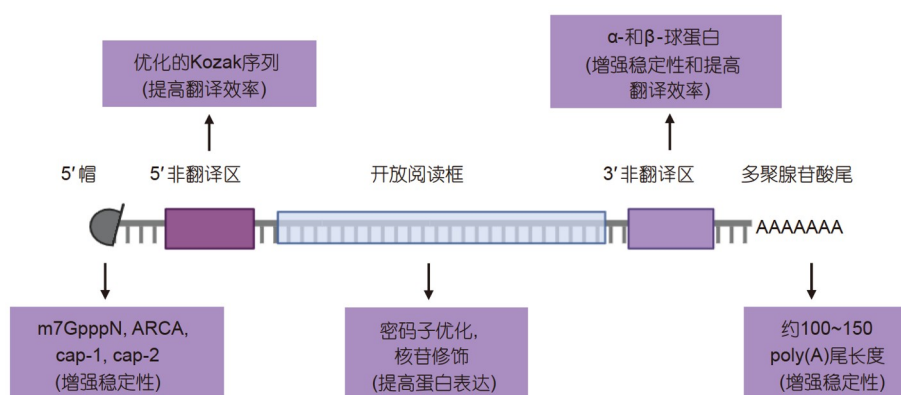


图 2 mRNA的基本结构及各结构域优化策略  
Figure 2 Basic mRNA structure and optimization strategies

因素。为了对mRNA进行有效优化，研究人员探索了mRNA各个结构域的化学修饰方法。

真核生物mRNA的5'-帽(Cap-0)是一个7-甲基鸟苷(7-methylguanosine, m<sup>7</sup>G)，通过5',5'-三磷酸桥

(m<sup>7</sup>GpppN)连接到位于mRNA 5'末端的第一个核苷酸<sup>[3]</sup>。Cap-0通过空间结构抑制核酸酶对mRNA的降解,并通过与真核翻译起始因子4E结合来启动翻译<sup>[3]</sup>。在高等真核生物中,第一个近端核苷酸的核糖2'羟基上带有一个额外的甲基形成Cap-1结构(m<sup>7</sup>GpppmN),其中约有50%的mRNA近端第二个核苷酸的核糖2'羟基上也带有一个额外的甲基形成Cap-2结构(m<sup>7</sup>GpppmNmN),它们相较于Cap-0具有更低的免疫刺激能力<sup>[4]</sup>。此外,抗反向帽类似物(anti-reverse cap analogues, ARCA)修饰的mRNA可防止合成过程中不正确的帽子掺入,因此表现出优秀的翻译效率<sup>[5]</sup>。

mRNA的5'-UTR和3'-UTR区含有特定的调控序列元件,可以调节mRNA的翻译以及影响mRNA的稳定性。通过在UTR中引入稳定元件可以延长mRNA的半衰期,例如, $\alpha$ -和 $\beta$ -球蛋白mRNA的3'-UTR使得该mRNA半衰期超过了1天<sup>[6]</sup>。为了提高稳定性和翻译效率,研究人员设计了许多与 $\alpha$ -和 $\beta$ -球蛋白mRNA 3'-UTR缀合的体外转录的mRNA。此外,两个 $\beta$ -球蛋白mRNA的3'-UTR以头尾相连的方式结合在一起,可以进一步提高稳定效果<sup>[7]</sup>。除了广泛应用的球蛋白UTR外,还有各种UTR,如人热休克蛋白70的5'-UTR、内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry sites, IRES)的5'-UTR和真核延伸因子1 $\alpha$ (eukaryotic elongation factor 1 $\alpha$ , EEF1A1)的3'-UTR等用于治疗性mRNA应用<sup>[8-10]</sup>。虽然许多5'-UTR或3'-UTR可以独立增强mRNA翻译,但5'-UTR和3'-UTR的合理组合可以最大限度地提高翻译效率<sup>[11]</sup>。

对于mRNA的蛋白质编码区,通过密码子的优化使mRNA序列翻译为所需蛋白质可控。由于不同的密码子可能编码相同的氨基酸,单个同义密码子进行替换并不改变氨基酸序列,但却可能对蛋白质表达、蛋白质折叠和细胞功能产生重大影响,因此有多种选择来重编码mRNA序列,以产生氨基酸序列相同的蛋白质。Moderna公司的研究人员发现,mRNA二级结构可以通过改变mRNA翻译的半衰期来调节蛋白质表达,而稳定mRNA空间结构的修饰核苷酸可以实现高蛋白质表达水平<sup>[12,13]</sup>。

在真核生物中,poly(A)尾添加在成熟mRNA的3'端,是通过转录其DNA模板或使用转录后重组聚(A)聚合酶产生的,由于聚合酶可能会合成不同长度的poly(A)尾,该方法不适用于工业大规模生产。利用DNA模板体外转录、得到相同长度poly(A)尾的方法应用更广

泛。长度为100~150个核苷酸的poly(A)尾可以提高mRNA的稳定性,并通过与poly(A)结合蛋白形成复合物来有效启动翻译<sup>[1]</sup>。

机器学习在mRNA序列设计和优化过程中发挥着越来越重要的作用<sup>[14]</sup>。到目前为止,该技术已成功应用于非病毒蛋白的表达和传染病疫苗的开发。先前研究发现,优化mRNA的二级结构可使其结构更稳定,同时也延长了它的半衰期;同时,结构稳定性优化与密码子优化相结合,可提升蛋白质的表达。因此,mRNA设计算法常将优化结构稳定性和密码子优化同时结合,用于提高mRNA疫苗和药物的效力。然而,同义密码子的存在使mRNA设计空间非常大,比如SARS-CoV-2刺突蛋白对应约有约10<sup>632</sup>条mRNA,这是传统mRNA设计方法难以逾越的挑战。百度美国研究院的研究人员开发了一个名为Linear Design的算法,可以联合优化二级结构稳定性和密码子优化,在寻找新冠mRNA疫苗的最稳定mRNA序列时仅用时11 min<sup>[15]</sup>。结果显示,在稳定性、蛋白质表达水平以及免疫原性等多个衡量疫苗的重要指标上,利用该算法设计的新冠疫苗序列优于传统方法设计的基准序列。在疫苗保护力最重要的两个指标——疫苗序列结合抗体滴度和中和抗体滴度上,优化后的mRNA序列分别是传统基准序列的128和20倍。除了利用Linear Design算法对新冠mRNA疫苗进行设计优化外,研究者还将该算法应用于水痘-带状疱疹病毒疫苗,同样获得了满意的结果。

## 2.2 调节mRNA免疫原性

当mRNA作为疫苗使用时,需要适当的免疫原性激活人体免疫系统;当mRNA作为药物使用时,则希望避免免疫原性,这是mRNA疫苗或药物开发中需要重点考虑的因素。由于体外转录的mRNA是外源RNA,因此会被细胞识别为病毒感染的信号。非免疫细胞通过视黄酸诱导基因I(retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)受体识别外源RNA,然后触发先天免疫反应<sup>[16]</sup>。免疫细胞可以被外源RNA激活并通过Toll样受体诱导炎症<sup>[17]</sup>。

减少体外转录的mRNA免疫刺激的最有效策略之一是核苷修饰。2023年,Katalin Karikó和Drew Weissman因核苷修饰方面的发现获得诺贝尔生理学或医学奖。核苷修饰方面的发现使得开发针对COVID-19的有效mRNA疫苗成为可能。迄今为止,可以选择几种核苷酸化学修饰策略来降低免疫原性而不影响mRNA的翻译特性。例如,用N<sup>1</sup>-甲基腺苷(N<sup>1</sup>-methyadenosine,



$m^1A$ )或 $N^6$ -甲基腺苷( $N^6$ -methyladenosine,  $m^6A$ )替代天然腺苷<sup>[18]</sup>; 用5-甲基胞苷(5-methylcytidine,  $m^5C$ )替代天然胞苷; 用5-甲基尿苷(5-methyluridine,  $m^5U$ )、2-硫代尿苷(2-thiouridine, s2U)、5-甲氧基尿苷(5-methoxyuridine, 5moU)、假尿苷(pseudouridine,  $\psi$ )或 $N^1$ -甲基假尿苷( $N^1$ -methyl-pseudouridine,  $m^1\psi$ )替换天然尿苷<sup>[19-21]</sup>。图3中总结了体外转录mRNA代表性核苷修饰策略。最早上市的两款mRNA疫苗均采用 $m^1\psi$ 修饰, 而未经修饰的CureVac新冠疫苗(CVnCOV)的新冠保护率仅为47%, 实验结果不尽人意。可能的原因之一是未修饰的mRNA免疫反应性更强, 因此降低了使用剂量, 导致不足以产生有效的中和抗体反应。

### 2.3 mRNA工程化创新

自复制mRNA(self-amplifying mRNA, saRNA)被认为是线性RNA的升级版之一, 其包含甲病毒的复制子, 可以促进编码蛋白的表达, 因此在大多数应用中比传统mRNA需要的剂量要低得多。额外复制子基因的掺入使得自复制mRNA的大小比传统mRNA更大。因此, 常规mRNA技术应用于较大尺寸的自复制mRNA时需要进一步优化<sup>[23]</sup>。虽然核苷修饰广泛用于mRNA疗法, 但目前认为核苷修饰会干扰saRNA自我扩增的过程。基于mRNA的自复制SARS-CoV-2疫苗已证明其能够在动物中诱导高中和抗体滴度<sup>[24]</sup>。此外, saRNA疫苗在人乳头瘤病毒相关的小鼠原位癌症模型中表现出

了良好的治疗效果, 接种单剂疫苗后实现了有效的肿瘤控制<sup>[25]</sup>。

环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类具有潜在广泛生物学功能的非编码RNA。一些circRNA的蛋白质编码功能为蛋白替代疗法带来了巨大的希望。与线性mRNA相比, 独特的闭环结构使circRNA具有更高的稳定性, 因为缺乏核酸外切酶介导的降解所需的末端基序。一项开创性的研究表明, 使用自剪接内含子构建的circRNA在真核细胞中表现出强大且稳定的蛋白质表达<sup>[26]</sup>。线性RNA前体的自环化最终产生含有内部核糖体进入位点的circRNA, 以驱动蛋白质的表达<sup>[27]</sup>。除了稳定性增强之外, circRNA比未修饰的线性mRNA诱导的不良免疫反应要少得多, 因为它们不会激活Toll样受体和视黄酸诱导基因I受体等RNA传感器。与线性mRNA疫苗相比, circRNA疫苗引发了更高水平的中和抗体, 在小鼠和恒河猴中表现出对SARS-CoV-2及其新变种的巨大保护功效<sup>[28]</sup>。

### 2.4 mRNA疫苗的LNP递送系统

高效、安全的mRNA递送是mRNA疗法开发中最大的挑战之一, 比寡核苷酸的递送更具挑战性<sup>[29,30]</sup>。很多类型的细胞可以自发摄取裸露的mRNA, 通过内吞作用在溶酶体中累积, 但其中只有一小部分mRNA能够进入细胞质中<sup>[31]</sup>。对绝大部分细胞类型而言, mRNA的主动摄取不仅效率低, 而且容易在低浓度下达到饱

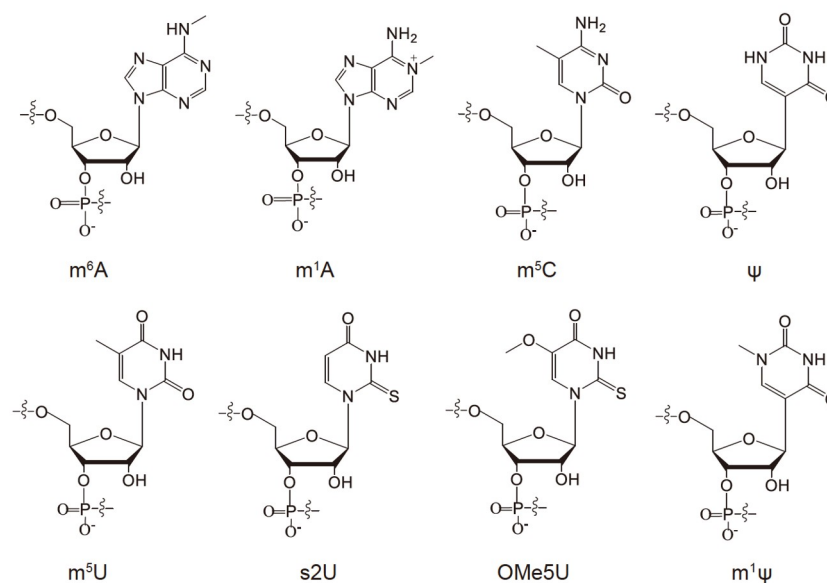


图3 体外转录mRNA代表性核苷修饰策略<sup>[22]</sup>

Figure 3 mRNA partial nucleoside modification strategies<sup>[22]</sup>

和。此外,裸露的mRNA也很容易被胞外的RNase降解,因此必须寻找合适的策略来帮助mRNA向胞内转运。

LNP是研究最深入、临床最先进的mRNA递送载体<sup>[32]</sup>。最广泛使用的是阳离子或可电离脂质的LNP<sup>[33,34]</sup>,其通常含有阳离子或可电离的脂质、胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇化脂质。如图4所示,mRNA-LNP疫苗通过转染抗原呈递细胞来引发免疫响应。mRNA疫苗首先被抗原呈递细胞内吞,逃离内涵体并进入细胞质后,mRNA被核糖体翻译成蛋白质,翻译的抗原蛋白可以通过多种方式刺激免疫系统。细胞内抗原被蛋白酶体分解成更小的片段,这些片段通过主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)I类分子展示在细胞表面,以呈现给细胞毒性T细胞。激活的细胞毒性T细胞通过分泌穿孔素和颗粒酶等来杀死受感染的细胞。此外,抗原片段可以通过MHC II类分子呈递给辅助T细胞,辅助T细胞通过刺激B细胞产生中和抗体,促进循环病原体的清除。

带有季铵基团的阳离子脂质,如DOTMA或DOTAP,以pH非依赖的方式保持带正电荷,其能与带负电荷的mRNA通过静电作用相互吸附,使阳离子脂质递送系统成为早期临床研究中使用的最广泛的mRNA递送系统<sup>[35]</sup>。尽管编码肿瘤抗原或疾病相关自身抗原的阳离子脂质纳米颗粒在癌症免疫治疗中显示出前景,但它们潜在的细胞毒性和相对较短的血液循环时间阻碍了其临床转化<sup>[36]</sup>。

为了解决这些问题,研究人员开发了多种新型可

电离脂质,如图5所示<sup>[22,37,38]</sup>。与具有永久正电荷的阳离子脂质不同,可电离脂质在生理pH下保持中性,但在酸性pH下可质子化<sup>[39]</sup>。生理液中可电离脂质中性降低了毒性,并在一定程度上增加了可电离LNP的循环半衰期。此外,可电离脂质在酸性pH下的质子化不仅可以方便地在酸性缓冲液中浓缩和封装mRNA,而且还有助于mRNA从酸性内体中逃逸。对新一代可电离脂质的深入探索最终导致了脂质SM-102<sup>[40]</sup>和脂质ALC-0315<sup>[41]</sup>的产生,进而使得两种有效的COVID-19 mRNA疫苗快速发展。这些疫苗的良好安全性可能归因于脂质的生物降解性。

尽管可电离脂质是LNP最重要的成分,但其他3种脂质成分——胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇化脂质,也能促进纳米颗粒的形成和功能。胆固醇是一种天然存在的脂质,通过填充脂质之间的间隙来增强纳米颗粒的稳定性,有助于在细胞摄取过程中与内体膜融合<sup>[42]</sup>。辅助脂质通过促进脂质相变来调节纳米颗粒的流动性并增强功效,从而有助于膜与内体的融合<sup>[43,44]</sup>。最佳辅助脂质的选择取决于可电离脂质材料和RNA药物。PEG脂质可以稳定LNP,通过限制脂质融合来调节纳米颗粒尺寸<sup>[45]</sup>,并通过减少与巨噬细胞的非特异性相互作用来延长纳米颗粒半衰期<sup>[46]</sup>。

mRNA必须在靶细胞内产生足够的编码蛋白才能达到预防或治疗效果。因此,mRNA的疗效与具体的给药途径和靶器官/细胞密切相关。大多数LNP在静脉注射后优先积聚在肝脏<sup>[47]</sup>。因此,将mRNA靶向递送至非

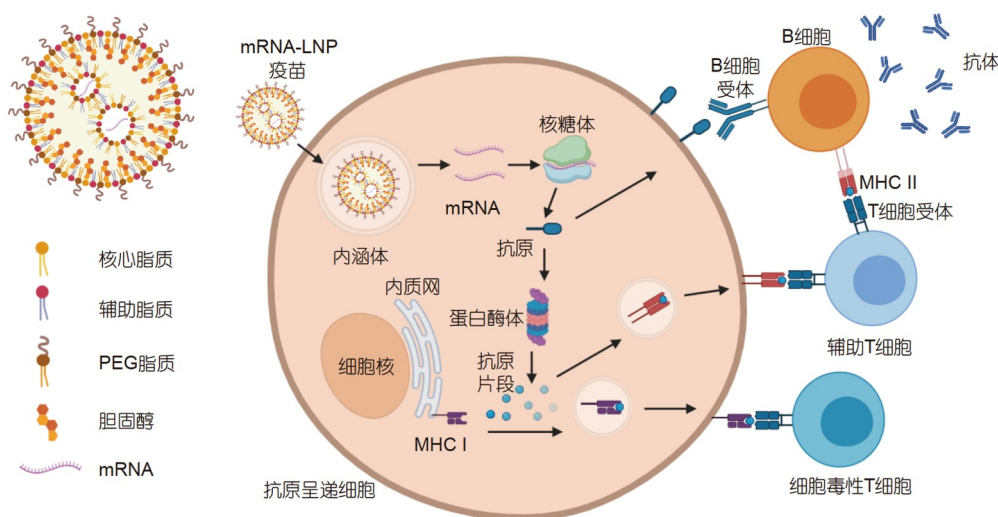


图4 mRNA-LNP疫苗组成及其作用机制示意图

Figure 4 Composition and mechanism of mRNA-LNP vaccine

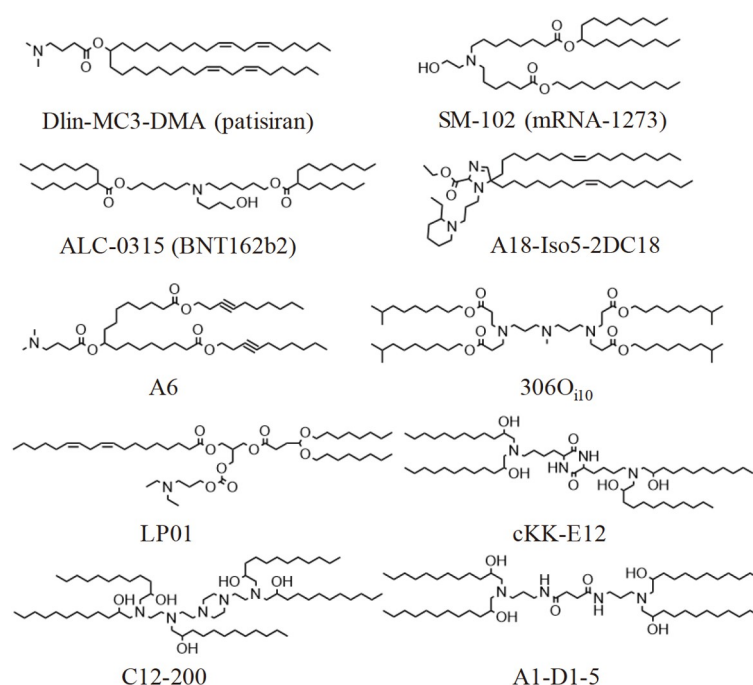


图5 代表性可电离脂质的化学结构<sup>[22,37,38]</sup>

Figure 5 Chemical structure of typical ionizable lipids<sup>[22,37,38]</sup>

肝脏组织将大大拓宽mRNA疗法的应用。为此, Cheng等人<sup>[48]</sup>开发了选择性器官靶向(selective organ targeting, SORT)纳米颗粒平台, 用于组织特异性mRNA递送。通过在广泛使用的四组分LNP系统中添加阳离子、阴离子或可电离脂质的补充SORT分子, 已经分别实现了mRNA选择性递送至小鼠肺、脾或肝, 从而实现了有效的药物递送。Liu等人<sup>[49]</sup>进一步开发出新版本的SORT纳米颗粒平台, 其含有膜不稳定的可电离磷脂, 进一步提高了mRNA递送效率。

除器官靶向外, 选择性地将mRNA递送至特定类型的细胞中可以实现更精确、更有效的治疗。细胞类型特异性mRNA递送的一种策略是开发新型LNP, 其配方针对特定靶细胞类型进行了优化, 如基于咪唑的LNP已被用于将mRNA靶向递送至T细胞以进行癌症免疫治疗<sup>[50]</sup>; 通过开发新型可电离氨基脂质还实现了将mRNA选择性递送至白细胞<sup>[51]</sup>。另一种策略是使用细胞特异性配体。为了能够将治疗性mRNA靶向递送至患有炎症性肠病的小鼠的Ly6c<sup>+</sup>炎症白细胞, 使用锚定的二级单链可变片段实现靶向(anchored secondary scFv enabling targeting, ASSET)模块化靶向平台将抗Ly6c靶向配体与LNP缀合<sup>[52]</sup>。该平台的优点之一是可以根据不同的应用方便地更换靶向单克隆抗体。在另

一项研究中, 使用相同的ASSET平台将靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的配体偶联到LNP上<sup>[53]</sup>。这些EGFR-LNP选择性地将Cas9 mRNA和单向导RNA(single guide RNA, sgRNA)递送至小鼠体内表达EGFR的播散性卵巢肿瘤, 通过有效的CRISPR-Cas9基因编辑抑制肿瘤生长并提高存活率。通过将抗原或CD4抗体分别与LNP结合, 可以将mRNA选择性递送至抗原特异性CD8<sup>+</sup> T细胞<sup>[54]</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞<sup>[55]</sup>。随着更多的研究, 这些器官或细胞特异性mRNA递送平台将扩大mRNA疗法可治疗的疾病类型。

### 3 总结与展望

随着COVID-19疫苗的推出, mRNA疫苗及脂质纳米颗粒递送系统均取得了重大进展, mRNA药物在多种疾病的预防和治疗中发挥着至关重要的作用。mRNA的序列优化以及化学修饰极大地提高了mRNA的稳定性及翻译效率, 并显著降低其免疫原性。LNP递送系统可以保护mRNA不被核酸酶降解, 改善mRNA的药代动力学以及延长半衰期, 有助于mRNA入胞及内体逃逸, 极大地提高了mRNA药物的有效性, 在一定程度上解决了mRNA临床应用面临的挑战。然而, 在充分发挥mRNA纳米药物的潜力之前, 依然有些问题亟



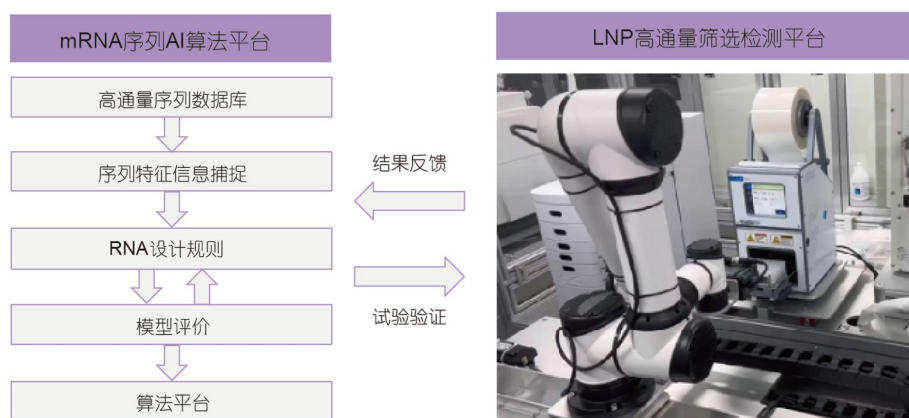


图6 人工智能结合高通量试验平台助力mRNA-LNP药物开发

Figure 6 Combining AI with High-Throughput Experimental Platforms to facilitate the development of mRNA-LNP drugs

待解决。

越来越多的证据表明, 特定的生物途径可能会干扰mRNA的递送或翻译<sup>[56,57]</sup>。因此, 了解生物途径如何影响体内mRNA的递送和翻译可以进一步提高mRNA药物的疗效。同时也应仔细考虑mRNA及其载体引起的潜在毒性和免疫反应。mRNA的进一步化学修饰或开发更好的递送平台以提高其稳定性仍是未来的研究重点。此外, 虽然已经开发了多种组织特异性靶向递送技术, 但是肝脏仍然是LNP的主要聚集器官, 这限制了mRNA疗法在其他器官疾病中的应用。开发特定组织或细胞类型的mRNA靶向递送仍是重要的研究方向。

与此同时, 已上市的mRNA疫苗也暴露出mRNA药物技术目前的局限性, 即对冷链储存和运输的依赖, 如何将mRNA疫苗运输至全球各地仍是具有挑战性的事情。BNT162b2新冠疫苗可以在-70℃下储存6个月, 2~8℃下只能储存5d, 保存和运输条件极为苛刻, 冷链运输对于mRNA疫苗极为重要。以冻干粉的形式储存和运输是mRNA疫苗开发的一个方向。添加合适的冻

干保护剂, 采用优化的冻干工艺, 使疫苗可在常规条件下储存和运输, 将显著提高疫苗的可及性。

mRNA在免疫、炎症等多个关键生理过程中发挥的作用仍有许多不够清楚。为了实现有效的临床转化, 仍需继续发展提高mRNA稳定性和提高蛋白表达的技术, 以及开发更先进的纳米递送策略。基于微流控的自动化高通量LNP配方筛选技术可以显著加速LNP配方筛选的过程, 而将人工智能技术应用于mRNA疫苗开发领域则有利于加快疫苗研发速度(图6)。利用人工智能(artificial intelligence, AI)算法对目标mRNA序列及空间结构进行优化, 建立mRNA序列-蛋白质表达关系模型, 利用该模型来优化mRNA序列, 同时通过高通量机器人自动筛选平台进行实验验证, 试验结果反馈mRNA序列与功能之间的关系, 最终指导并优化设计活性和稳定性更高的mRNA序列以及递送效率更高的LNP配方。高通量筛选检测平台、大数据以及人工智能等先进技术, 不仅对mRNA疫苗的研究具有积极作用, 对推动核酸疗法的临床转化具有更深远的意义。

## 参考文献

- 1 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
- 2 Liu Y, Li S, Lin S, et al. A tetrahedral framework nucleic acid based multifunctional nanocapsule for tumor prophylactic mRNA vaccination. *Chin Chem Lett*, 2023, 34: 107987
- 3 Ramanathan A, Robb G B, Chan S H. mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 7511–7526
- 4 Schlake T, Thess A, Thran M, et al. mRNA as novel technology for passive immunotherapy. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 301–328
- 5 Ziemniak M, Strenkowska M, Kowalska J, et al. Potential therapeutic applications of RNA cap analogs. *Future Med Chem*, 2013, 5: 1141–1172
- 6 Holcik M, Liehaber S A. Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3' untranslated region RNA-protein complexes sharing *cis* and *trans* components. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2410–2414



- 7 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
- 8 Bergman N, Moraes K C M, Anderson J R, et al. Lsm proteins bind and stabilize RNAs containing 5' poly(A) tracts. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 824–831
- 9 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
- 10 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
- 11 Zeng C, Hou X, Yan J, et al. Leveraging mRNA sequences and nanoparticles to deliver SARS-CoV-2 antigens *in vivo*. *Adv Mater*, 2020, 32: e2004452
- 12 Pardi N, Hogan M J, Porter F W, et al. mRNA vaccines—A new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 261–279
- 13 Buschmann M D, Carrasco M J, Alishetty S, et al. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines. *Vaccines*, 2021, 9: 65
- 14 Kai J, Yaya H, Fei W, et al. Structurally reconfigurable designer RNA structures for nanomachines. *Biophys Rep*, 2021, 7: 21–34
- 15 Zhang H, Zhang L, Lin A, et al. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity. *Nature*, 2023, 621: 396–403
- 16 Chow K T, Gale Jr. M, Loo Y M. RIG-I and other RNA sensors in antiviral immunity. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36: 667–694
- 17 Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 2004, 303: 1529–1531
- 18 Hajj K A, Whitehead K A. Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat Rev Mater*, 2017, 2: 17056
- 19 Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt S C, et al. N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Control Release*, 2015, 217: 337–344
- 20 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
- 21 Anderson B R, Muramatsu H, Nallagatla S R, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 5884–5892
- 22 Weng Y, Li C, Yang T, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnol Adv*, 2020, 40: 107534
- 23 Schmidt C, Schnierle B S. Self-amplifying rna vaccine candidates: Alternative platforms for mRNA vaccine development. *Pathogens*, 2023, 12: 138
- 24 McKay P F, Hu K, Blakney A K, et al. Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice. *Nat Commun*, 2020, 11: 3523
- 25 Ramos da Silva J, Bitencourt Rodrigues K, Formoso Pelegrin G, et al. Single immunizations of self-amplifying or non-replicating mRNA-LNP vaccines control HPV-associated tumors in mice. *Sci Transl Med*, 2023, 15: eabn3464
- 26 Wesselhoeft R A, Kowalski P S, Anderson D G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. *Nat Commun*, 2018, 9: 2629
- 27 Kameda S, Ohno H, Saito H. Synthetic circular RNA switches and circuits that control protein expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51: e24
- 28 Qu L, Yi Z, Shen Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell*, 2022, 185: 1728–1744.e16
- 29 Kowalski P S, Rudra A, Miao L, et al. Delivering the messenger: Advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Mol Ther*, 2019, 27: 710–728
- 30 Kubiawicz L J, Mohapatra A, Krishnan N, et al. mRNA nanomedicine: Design and recent applications. *Exploration*, 2022, 2: 20210217
- 31 Lorenz C, Fotin-Mleczek M, Roth G, et al. Protein expression from exogenous mRNA: Uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway. *RNA Biol*, 2011, 8: 627–636
- 32 Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater*, 2021, 6: 1078–1094
- 33 Zhang Y, Sun C, Wang C, et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery. *Chem Rev*, 2021, 121: 12181–12277
- 34 Guo S, Li K, Hu B, et al. Membrane-destabilizing ionizable lipid empowered imaging-guided siRNA delivery and cancer treatment. *Exploration*, 2021, 1: 35–49
- 35 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
- 36 Cui S, Wang Y, Gong Y, et al. Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. *Toxicol Res*, 2018, 7: 473–479
- 37 Yuan M, Han Z, Liang Y, et al. mRNA nanodelivery systems: Targeting strategies and administration routes. *Biomater Res*, 2023, 27: 90
- 38 Hu B, Li B, Li K, et al. Thermostable ionizable lipid-like nanoparticle (iLAND) for RNAi treatment of hyperlipidemia. *Sci Adv*, 2022, 8: eabm1418

- 39 Cullis P R, Hope M J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol Ther*, 2017, 25: 1467–1475
- 40 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
- 41 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
- 42 Yang S T, Kreutzberger A J B, Lee J, et al. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem Phys Lipids*, 2016, 199: 136–143
- 43 Cheng X, Lee R J. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99: 129–137
- 44 Koltover I, Salditt T, Radler J O, et al. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, 1998, 281: 78–81
- 45 Kulkarni J A, Darjuan M M, Mercer J E, et al. On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA. *ACS Nano*, 2018, 12: 4787–4795
- 46 Kanasty R, Dorkin J R, Vegas A, et al. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat Mater*, 2013, 12: 967–977
- 47 Miao L, Lin J, Huang Y, et al. Synergistic lipid compositions for albumin receptor mediated delivery of mRNA to the liver. *Nat Commun*, 2020, 11: 2424
- 48 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
- 49 Liu S, Cheng Q, Wei T, et al. Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Mater*, 2021, 20: 701–710
- 50 Zhao X, Chen J, Qiu M, et al. Imidazole-based synthetic lipidoids for *in vivo* mRNA delivery into primary t lymphocytes. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 20083–20089
- 51 Ramishetti S, Hazan-Halevy I, Palakuri R, et al. A combinatorial library of lipid nanoparticles for RNA delivery to leukocytes. *Adv Mater*, 2020, 32: e1906128
- 52 Kedmi R, Veiga N, Ramishetti S, et al. A modular platform for targeted RNAi therapeutics. *Nat Nanotech*, 2018, 13: 214–219
- 53 Rosenblum D, Gutkin A, Kedmi R, et al. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. *Sci Adv*, 2020, 6: eabc9450
- 54 Su F Y, Zhao Q H, Dahotre S N, et al. *In vivo* mRNA delivery to virus-specific T cells by light-induced ligand exchange of MHC class I antigen-presenting nanoparticles. *Sci Adv*, 2022, 8: eabm7950
- 55 Tombácz I, Laczkó D, Shahnawaz H, et al. Highly efficient CD4<sup>+</sup> T cell targeting and genetic recombination using engineered CD4<sup>+</sup> cell-homing mRNA-LNPs. *Mol Ther*, 2021, 29: 3293–3304
- 56 Paunovska K, Da Silva Sanchez A, Foster M T, et al. Increased PIP3 activity blocks nanoparticle mRNA delivery. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba5672
- 57 Lokugamage M P, Gan Z, Zurla C, et al. Mild innate immune activation overrides efficient nanoparticle-mediated RNA delivery. *Adv Mater*, 2020, 32: e1904905

Summary for “mRNA疫苗与脂质纳米颗粒递送载体的研究进展”

## Progress on mRNA vaccines and lipid nanoparticles

Yuchuan Fan, Han Yin, Yu Li, Xi Yu, Xiaoying Tang, Yuhua Weng<sup>\*</sup> & Yuanyu Huang<sup>\*</sup>

*School of Life Science, School of Medical Technology, Advanced Research Institute of Multidisciplinary Science, Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotheranotics, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China*

<sup>\*</sup> Corresponding authors, E-mail: [wengyh@bit.edu.cn](mailto:wengyh@bit.edu.cn); [yyhuang@bit.edu.cn](mailto:yyhuang@bit.edu.cn)

Vaccines are one of the most remarkable achievements in the history of medicine and the most cost-effective and efficient way to prevent infectious diseases. By stimulating the immune system, vaccines enable the body to develop a defense mechanism against pathogens. The widespread adoption of vaccines has led to the eradication of the smallpox virus and a significant reduction in the global incidence of polio, measles, and other childhood diseases. Messenger RNA (mRNA) represents an emerging class of nucleic acid therapeutics employed for the prevention and treatment of diverse diseases. mRNA vaccines involve injecting mRNA carrying the encoded antigen protein into the human body, where it functions by translating the antigen protein within cells. This process triggers the production of specific immune responses, effectively achieving the goal of immunization and prevention.

During the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, mRNA vaccines played a pivotal role, leading to an unprecedented rapid advancement in this technology. In 2023, Katalin Karikó and Drew Weissman were awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine for their groundbreaking discovery in nucleoside modifications. These achievements underscore the immense potential of mRNA technology in the fields of life science and medical research. Although mRNA vaccines have proven to be both effective and safe in preventing infectious diseases, further research is needed to optimize mRNA design and intracellular delivery. Beyond combating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), numerous mRNA vaccines are in the development pipeline for various pathogens, including influenza virus, cytomegalovirus, Zika virus, and respiratory syncytial virus infections. Furthermore, there is a burgeoning momentum in the development of mRNA vaccines and drugs for tumors and rare diseases.

This review provides an overview of the characteristics of mRNA drugs and vaccines, highlighting some representative mRNA drugs or vaccines. It delves into key technologies in mRNA vaccine development, such as sequence optimization and engineering innovations. Additionally, this review also discusses advanced lipid nanoparticle delivery systems and the mechanism of action of mRNA-LNP vaccines. Finally, the authors thoroughly examine the prospects and challenges associated with mRNA vaccines.

**mRNA vaccine, mRNA modification, mRNA delivery, LNP delivery system**

doi: [10.1360/TB-2023-1093](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1093)