

mRNA 药物的结构和临床应用

常东峰, 孙召朋*

石药集团巨石生物有限责任公司, 石家庄 050015

摘要: mRNA 凭借其有效性、安全性和易大规模生产等特点, 在预防急性传染病方面显示出巨大的潜力。mRNA 代表了一个新兴的精准医学领域, 几种针对传染病和癌症等疗法的 mRNA 在体内和体外都显示出良好效果。mRNA 稳定性好、免疫原性高、不受受体主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)型别的限制, 且 mRNA 理论上可实现不同目的蛋白的体内表达, 这使得开发 mRNA 药物更具灵活性, 可用于预防和治疗多种难治性或遗传性疾病。介绍了 mRNA 的一级结构和高级结构, 综述了 mRNA 药物的临床应用进展, 以期帮助理解 mRNA 的药物功能和临床应用, 为 mRNA 药物的发展提供方向。

关键词: mRNA 结构; mRNA 药物; 临床应用

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2023.0139

中图分类号: Q522+.2, R915 文献标志码: A

Structure and Clinical Application of mRNA Drugs

CHANG Dongfeng, SUN Zhaopeng*

CSPC Megalith Biopharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050015, China

Abstract: Because of the characters of effective, safe and easy to be produced on a large scale, mRNA drugs have showed great potential on preventing viral infections. mRNA represents an emerging field of precision medicine, several mRNA drugs targeted therapies for infectious diseases and cancer have shown beneficial results both in vivo and in vitro. mRNA is stable, immunogenic, and not limited by the receptor's major histocompatibility complex (MHC) type. In theory, mRNA can achieve in vivo expression of different target proteins, which makes the development of mRNA drugs more flexible and can be used to prevent and treat many refractory or hereditary diseases. This paper introduced the primary structure and higher structure of mRNA, and summarized the progress of mRNA drugs in clinical application, which was expected to help understand the drug function of mRNA, and the clinical application, and provide the direction for the development of mRNA drugs.

Key words: mRNA structure; mRNA drugs; clinical application

遗传信息存在于细胞核内染色体的 DNA 中, 直接决定了蛋白质的合成与表达。信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 将 DNA 上的遗传信息传递出细胞核, 在细胞质中的核糖体上将 DNA 遗传信息翻译成蛋白质^[1]。

mRNA 药物是一种整合分子生物学和免疫学的新型先进技术, 属于精准医学的应用。mRNA 的药学概念是编码 mRNA 的遗传信息通过非病毒递送途径转入细胞质中, 携带的遗传信息可以满

足所有功能蛋白的编码和表达, 通过蛋白质发挥治疗作用, 其中的功能性活性成分为 mRNA 分子。1990 年 mRNA 首次完成药物的概念验证^[2]。mRNA 在疫苗方面显示出诸多优势, 如自带佐剂特性使得不需额外的佐剂即可刺激机体产生强大而持久的免疫反应^[3]; 体外转录 (in vitro transcription, IVT) 使 mRNA 的生产成本较低, 便于快速大规模生产, 如新型冠状病毒 (以下简称新冠病毒) 大流行期间 mRNA 疫苗的迅速应用^[4-5]; mRNA 不

收稿日期: 2023-10-26; 接受日期: 2023-11-28

基金项目: 河北省生物医药创新专项 (22372405D)。

联系方式: 常东峰 E-mail: changdongfeng@cspc.cn; *通信作者 孙召朋 E-mail: sunzhaopeng@mail.ecspc.com

需进入细胞核内,在细胞基质中即可行使功能,避免了因整合宿主基因组导致的突变^[6];能够避免菌株、毒株难以获取的问题。在作为治疗性药物应用时,缺乏 CpG 岛结构使 mRNA 诱导机体产生排斥反应的可能性也较小^[7];mRNA 较短的分子寿命和内源性物质组成使机体易于将其代谢分解而不会给机体造成较大负担^[1],与传统的蛋白质/肽类药物相比,mRNA 能够连续翻译成编码的蛋白质/肽,从而引发长时间的表达,因此在以蛋白质表达为手段的疾病治疗方面具有广阔的应用前景和较好的疗效^[8]。2020 年,基于脂质体包裹的 mRNA 疫苗(mRNA-1273 和 BNT162b2)在缓解新型冠状病毒症状方面,有效性超过 90%^[9]。2023 年,国家药品监督管理局批准石药集团新型冠状病毒 mRNA 疫苗(SYS6006)纳入紧急使用。

了解 mRNA 的分子结构将有助于解析药物功能,帮助设计药物,解决 mRNA 的不稳定性和不可成药性等问题,临床应用将为药物的发展提供方向和思路。

1 mRNA 一级结构元件

基于 mRNA 的药物通过增加 mRNA 分子核苷修饰和结构元件等来影响免疫反应的强度和特异性。结构元件如帽子结构(Cap)、Poly(A)尾和非翻译区(UTRs)能够直接影响 mRNA 的稳定性和翻译效率^[10],尤其是位于 mRNA 5' 和 3' 末端的 Cap 和 Poly(A)尾对于 mRNA 在细胞质中的稳定性至关重要。mRNA 还需要开放阅读框(open reading frame, ORF)周围的 5' UTRs 和 3' UTRs 来增加半衰期、表达水平和翻译效率^[11]。Poly(A)尾的长度与翻译效率相关^[12]。此外,增加 mRNA 的 G-C 组分可改善 mRNA 的稳定性^[13]。RNA 结构、翻译效率和蛋白质折叠机制最有可能通过稀有密码子替换 mRNA 序列和插入修饰核苷酸来改变^[14]。

1.1 5' Cap 结构

最简单的 5' Cap 结构是掉转方向的 7-甲基鸟苷三磷酸,与 mRNA 5' 端核苷酸通过 5' ppp5' 连接,形成 m⁷GpppN 结构。复杂的 Cap 结构在后面的一个或两个核苷酸还有 2'-O-甲基修饰。Cap 结构的通式可写为 m⁷GpppN(m)pN(m)……。^[15]。5' Cap 结构是真核生物 mRNA 在进化上非常保守的修饰。5' Cap 可募集细胞蛋白并介导加帽相关

的生物学功能,例如前 mRNA 加工、核输出、帽依赖性蛋白质合成和免疫原性等^[16]。

Cap 结构对稳定 mRNA 及其翻译具有重要意义,它不仅可以将 5' 端封闭起来,避免被核酸外切酶水解,还可作为蛋白合成系统的辨认信号,被 Cap 结合蛋白(Cap binding protein)eIF-4E 识别并结合,促使 mRNA 与核糖体小亚基结合,进而启动翻译过程^[16]。另外,在病毒与固有免疫的博弈中,5' Cap 的结构也极为重要。因为固有免疫系统对没有 5' Cap 结构的 RNA 具有较高的敏锐度,因此很多病毒进化出了丰富多样的加帽策略。而对这些病毒 mRNA 的加帽机制研究已拓展出诸如高效体外 RNA 加帽系统和自扩增 mRNA 技术,大大促进了科研型与治疗型 mRNA 的大规模生产^[17]。

1.2 5'非翻译区

5'非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)是 Cap 结构与编码区起始密码子之间的一段较短的序列,其中包括标志翻译起始的序列,如原核生物的 SD 序列。5'UTR 是翻译起始的高度敏感区,其长度、二级结构以及 AUG 的数量都会影响翻译的起始效率^[18]。此外,还影响 mRNA 的半衰期和蛋白表达水平^[19]。5'UTR 的长度一般是 100~200 个核苷酸,少于 20 个碱基时会错过起始密码子 AUG,称为遗漏扫描(leaky scanning)。过长的 5'UTR 容易形成过多二级结构,不利于翻译起始^[20],因此一般引入 Kozak 序列或保持短散的设计来增强翻译效率^[21]。

1.3 编码区

编码区由起始密码子 AUG 开始,到终止密码子(UAG、UGA、UAA)截止。编码区的二级结构和密码子选择都可能影响翻译效率,过多的二级结构和稀有密码子都会降低翻译速度,通过密码子的优化(规避不常见/不安全组合)、核苷酸替换(使用假尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N⁶-甲基腺苷等修饰核苷酸)等方法可增强 mRNA 的稳定性和翻译效率,同时减少固有免疫反应和 mRNA 的降解^[22]。

编码区中高 GC 含量可能会影响 mRNA 的二级结构,但比例较高的 GC 序列比低 GC 序列的翻译效率高 100 倍^[23]。翻译延伸率受同源 tRNA 可及性和密码子修饰影响,以防止匹配稀有物种的 tRNA 序列并整合与更常见 tRNA 物种匹配的序列^[24]。此外,密码子依赖性翻译延伸率是 mRNA 稳定性的主要参数,密码子修饰对 mRNA 稳定性

至关重要^[25]。用相同的频繁密码子替换稀有密码子会提高产量,而重复使用相同的密码子会加速tRNA翻译,这是由于tRNA在核糖体附近的氨基酰化^[26]。相邻的核苷酸和密码子也会影响翻译速率和效率^[27]。起始密码子应包括Kozak序列^[28],并且可以修改终止密码子的序列^[29]。此外,在正确的起始密码子之前,mRNA中不应存在上游起始密码子。密码子优化的mRNA已被有效地利用在针对病毒感染的疫苗研究中,用于表达非病毒蛋白^[30]。为了进行适当的折叠,一些蛋白质需要由不常见的密码子保证修饰来延迟翻译^[31]。mRNA序列的密码子选择可显著影响蛋白质生成速率和核糖体结合时间。研究发现,N1-甲基-假尿嘧啶核苷(1mΨ)核苷酸替换可增加碱基对的稳定性,形成复杂的二级结构和改善mRNA的翻译效率^[32]。此外,通过修改mRNA二级结构设计,可以提高mRNA对核酸内切酶裂解和化学降解的稳定性^[33]。通常首选5-甲基胞苷(m5C)和假尿嘧啶核苷(ψ)核苷酸修饰来降低免疫原性的同时提高翻译效率^[34]。

1.4 3'非翻译区

3'非翻译区(3'UTR)是位于终止密码子之后的转录序列,是mRNA不稳定因素的集中区,可影响转录后修饰和翻译过程。3'UTR含有加尾信号,包括核心序列AAUAAA,以及下游10~30 bp处的一段富含GU的辅助序列,这些都是导致mRNA不稳定的常见因素^[35-36]。因此,在设计mRNA药物时,应该避免使用这些序列,例如BioNTech在发明专利中使用了人类β-球蛋白3'UTR的两个连续拷贝(2 hBg,也称2βgUTR),以提高转录稳定性和翻译效率(WO 2017/059902 A1;BioNTech RNA制药有限公司)^[37]。研究表明,人α和β球蛋白的3'UTR可以提高mRNA的稳定性和翻译效率,而头尾排列的两种人β球蛋白的3'UTR可以提高mRNA的稳定性^[38]。使用细胞和病毒5'UTR和3'UTR的不同区域可以提高mRNA的稳定性和翻译效率。通过将富含AU的区域插入3'UTRs可以破坏mRNA的稳定性,反而有助于缩短蛋白质合成时间,从而确保mRNA快速分解和短时间内持续性的蛋白质合成^[39]。

1.5 Poly(A)尾结构

多数真核生物mRNA的3'端都有几十到数百个碱基组成的Poly(A)尾^[40]。成熟的mRNA一般

会在它的3'端加上长度为20~200 bp的多聚Poly(A)尾,可以防止外切酶降解,也可以作为核膜孔转运系统的标志,与成熟的mRNA通过核膜孔转运到胞浆有关^[41]。然而,3'Poly(A)尾的长度在细胞核和细胞质中是受到高度调控的,不同长度的3'Poly(A)尾部可调节成熟mRNA的稳定性、转运和翻译。一旦mRNA到达细胞质,Poly(A)尾就会与5'Cap协同,与eIF4F复合体形成稳定的闭环结构,促进翻译起始^[42]。3'Poly(A)尾与5'Cap、内部核糖体进入位点和各种其他决定因素共同作用,调节mRNA的稳定性和翻译效率。

3'Poly(A)尾的长度决定了mRNA翻译的程度。3'Poly(A)尾的缩短和延长可以很好地反映其对基因表达在时间和空间上的调控。哺乳动物细胞mRNA分子在细胞质中含有长约250个核苷酸(nt)的Poly(A)尾,在其一生中从3'逐渐减少。约100 nt的Poly(A)尾是合成mRNA药物的理想选择,因为尾大小可以通过调节3'外切核降解影响mRNA的衰变^[43]。Poly(A)的长度与翻译效率之间存在正相关关系,例如,100 nt的Poly(A)尾比64 nt的Poly(A)尾蛋白质表达水平高约35倍^[44];120 nt的Poly(A)尾比51 nt和42 nt的Poly(A)尾更有利于形成稳定的mRNA,保证有效的翻译^[46];325 nt的Poly(A)尾比172 nt的Poly(A)尾显示出更高的效率^[38]。然而,Poly(A)尾长度与mRNA翻译效率的正相关关系并不总是成立的,在人原代T细胞中,425 nt和525 nt的Poly(A)尾仅比120 nt的Poly(A)尾翻译效率高^[45]。

对mRNA的一级结构表征包括核苷酸序列、核苷酸修饰、帽子结构、Poly(A)尾和核苷酸修饰。目前,三代测序技术可以实现核苷酸碱基序列确定。基于DNA测序技术,RNA需逆转录为与之互补的DNA进行测定,目前所用的逆转录酶的差错率在 10^{-4} ~ 10^{-5} 数量级,这对于药物的质控可以忽略不计^[46]。相对于核酸测序技术,基于酶切的高分辨质谱,包括三酶切方法和固定化RNaseT1单酶部分酶切方法,序列覆盖率在70%左右^[47]。加帽效率、Poly(A)尾长度及分布、核苷酸修饰等特殊结构通常需要其他技术手段进行表征。例如,液相色谱-质谱联用(liquid chromatograph-mass spectrometer,LC-MS)可用于监测体外转录反应的进程和确定关键质量属性(如5'加帽)的状态^[47-48]。在工艺优化和放大过程中,依据不同需

要可以选择不同的分析技术。在工艺表征和工艺验证过程中,mRNA理化性质基本是固定的,其生物活性也是固定的,mRNA的一级结构表征鉴定方法也基本固定。mRNA自身的不稳定性决定了在检测时会优先考虑速度和效率,高效液相色谱的快捷性会成为一级结构表征的趋势。

2 mRNA的高级结构

单链 mRNA 的堆叠、氢键结合以及与水和离子的额外相互作用和自身的折叠形成了各种 mRNA 的高级结构。

2.1 mRNA的二级结构

RNA 二级结构也称为茎环结构(stem-loop structure),包括互补碱基对构成的单链区结构、茎环结构以及双链结构等各种不同组件形成的平面结构,并通过这些结构进行自我折叠。RNA 的二级结构一般由以下几个基本构件组成:单链结构、茎、发卡环、凸环、内环以及多分支环^[50-51]。

单链结构是 RNA 分子折叠成平面结构后两端没有形成配对的单链状结构。

茎是指碱基逆向互补配对时这些碱基对组成的集合^[52]。由空出来不配对的碱基形成的环状结构和“茎”组合成形成似发夹的结构,得名发夹环,茎至少由 4 个未配对碱基组成,其中 5 个碱基对最为稳定^[52-53]。

内环是茎区的两条单链上都存在的未能形成碱基对的碱基,由碱基间作用力而形成向外突出的圆环状结构。通常发生在螺旋内的非典型碱基配对区域,并引起 A 型螺旋骨架的畸变,当两条链上的未配对碱基数相等时,内环是对称的^[51]。

相对于内环,凸环则是由某段茎区的一条单链上存在着的未能形成碱基对的碱基形成的,这条单链上至少存在一个自由碱基。凸环的存在使得 RNA 二级结构的茎区可以出现弯折现象,且凸环的存在会影响 RNA 的三级结构^[54]。

多分支环也称为多重环,是多个茎区和环的连接组合,二级结构中经常可以看到 1 个多分支环连接 4 个或更多的茎区^[53]。

假结结构是由发夹环上碱基与发夹结构外部非茎区的碱基互补配对形成的氢键所组成,假结属于三级结构的范畴。假结对 RNA 的功能具有重要影响,并在 RNA 参与的生命过程中起重要

作用^[55]。

2.2 mRNA的三级结构

三级结构是一种三维空间形式的高级结构,这种三维结构以二级结构为基础,除了碱基配对产生的相互作用力外,分子内部还存在主链与主链间的相互作用力、主链与碱基间的相互作用力以及孤立氢键间的相互作用力等。这些相互作用力促使平面的二级结构折叠成紧凑的空间结构,通过几个同轴螺旋堆积形成三级结构^[56]。其中,内环中连续腺嘌呤碱基可以形成伪 Watson-Crick 碱基对(沃森克里克模型,双链反向平行),这是形成稳定三级结构的基础,当发夹或内环的互补一级序列和单链区域通过 Watson-Crick 碱基配对相互影响时,形成假结,也可以形成两个交替发夹结构。假结的形成通过发夹双螺旋茎和新形成的环-环相互作用的螺旋堆叠产生延伸的螺旋区域。尽管假结仅比两个发卡略稳定,但桥接环中未配对核苷酸与延伸螺旋内碱基对之间的相互作用(如碱基三倍)提高了三级结构的稳定性^[57]。例如,三级结构中核糖拉链是最常见的形式^[58]。此外,三级结构的稳定性要低于二级结构,其结构极易受到温度、环境等因素的影响。

2.3 mRNA的四级结构

在 RNA 及其他生物大分子三级结构基础上, RNA 和 RNA、RNA 和 DNA、RNA 和蛋白质之间通过相互作用形成的复合物,即为 RNA 的四级结构,这种相互作用大部分依赖 Watson-Crick 碱基对。其中,核糖体就是由 rRNA 和蛋白质组成的最为常见的 RNA 四级结构,如 Sarcin-Ricin (也称 Bulged G-Motif) 结构和 Kink-Turns Motif 结构。Sarcin-Ricin 结构是核糖体的高度保守结构,对于维持核糖体活性、锚定 mRNA 至关重要^[59]。Kink-Turns Motif 结构又称扭结转角,大部分扭结转角与蛋白质结合,可以促进 RNA 之间的结合^[60]。

mRNA 的高级结构中二级结构对于调控来说非常重要,尤其是二级结构的不同模式与编码区域、剪接点和多腺苷酸化点相关,细胞的代谢活动过程受 mRNA 二级结构的影响明显不同,二级结构可以极大地影响三级结构。所以确定和表征 mRNA 的二级结构,对分析和理解基因遗传信息的传递机制至关重要。mRNA 分子的三级结构和四级结构,对遗传信息的影响作用机理尚不完全清楚^[61]。Huang 等^[62]尝试过使用 RNA 二级和三级

结构预测程序最简单的技术,但充满不确定性,将输入的一级序列折叠成潜在的二级结构。这些程序都是通过计算许多碱基配对方案的自由能,找到总自由能最低的二级结构,并将最低能量电位的二级结构返回为最可能的结构。目前,这些高级结构的特性鉴定方法少有报道,mRNA的实际结构表征方法应用仍需进一步探索。

3 mRNA的临床应用进展

迄今为止,大多数 mRNA 的临床应用都集中

在传染病和癌症疫苗领域(表1)。mRNA 在临床上的应用机理基本一致,包裹编码靶蛋白(抗原蛋白)mRNA 的脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)在体内给药时,LNP-mRNA 由于内吞作用被吞噬,mRNA 通过抗原呈递细胞中的内体逃逸机制释放到细胞质中^[63]。在核糖体内部,mRNA 通过翻译形成蛋白质,涉及的蛋白质疗法使用合成的 mRNA 在人体内产生所需的蛋白质,如抗体、细胞因子和酶。对于疫苗,模仿病毒感染过程,细胞内产生的抗原主要引起细胞介导和抗体介导的免疫应答。

表1 临床阶段的 mRNA 药物
Table1 mRNA drugs in clinical phase

应用领域	药物	靶点	作用机制	适应症	全球最高研发阶段	公司/机构
传染病	Daiichirona	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	批准上市	日本第一三共株式会社
	新型冠状病毒 mRNA 疫苗	新冠病毒抗原	新冠病毒抗原抑制剂	新冠病毒感染	批准上市	中国石药集团有限公司
	mRNA 新型冠状病毒肺炎疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	批准上市	中国斯微(上海)生物科技股份有限公司
	冻干脂质纳米颗粒 mRNA 新冠疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	批准上市	中国艾博生物/沃森生物
	Elasomeran 艾拉索米瑞	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒“奥密克戎”变异株感染	批准上市	美国莫德纳公司
	Tozinameran 复必泰	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白调节剂、免疫刺激剂	新冠病毒感染肺炎球菌感染 SARS-CoV-2 急性呼吸道疾病	批准上市	美国辉瑞、德国拜恩泰科、中国上海复星医药(集团)股份有限公司
	mRNA-1345	呼吸道合胞病毒 F 蛋白	呼吸道合胞病毒 F 蛋白调节剂	呼吸道合胞病毒感染	申请上市	美国莫德纳公司
	二价 Delta/Omicron BA.5 疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅲ期	中国艾美疫苗股份有限公司
	CVnCoV 疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅲ期	德国库瑞瓦格有限责任公司、德国拜耳集团
	巨细胞病毒疫苗	未批露	免疫刺激剂	巨细胞病毒感染	临床Ⅲ期	美国莫德纳公司
	mRNA 新冠疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅲ期	中国艾美疫苗股份有限公司、珠海丽凡达生物技术有限公司
	mRNA-1010	未批露	免疫刺激剂	流感病毒	临床Ⅲ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1283	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅲ期	美国莫德纳公司

续表

应用领域	药物	靶点	作用机制	适应症	全球最高研发阶段	公司/机构
传染病	PTX-COVID19-B	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅲ期	中国云顶新耀医药科技有限公司
	SARS-CoV-2 mRNA 二价疫苗	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅲ期	中国艾美疫苗股份有限公司
	mRNA-1273.211	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ/Ⅲ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1273.529	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ/Ⅲ期	美国莫德纳公司
	抗SARS-CoV-2 mRNA 疫苗	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	以色列 Arcturus 医疗 (ARCT)公司
	ChulaCov19 mRNA 疫苗	未披露	免疫刺激剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	泰国朱拉隆功大学
	COVID-19 mRNA 脂质体疫苗	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	中国康希诺生物股份有限公司、加拿大精密纳米系统有限责任公司
	COVID-19 奥密克戎 mRNA 疫苗	未披露	免疫刺激剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	中国中生复诺健生物科技(上海)有限公司
	mRNA-1273.213	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1273.351	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1273.617	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1283.211	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1283.529	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1893	未披露	免疫刺激剂	寨卡病毒感染	临床Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1011	未披露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床Ⅰ/Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1018	未披露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床Ⅰ/Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1020	未披露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床Ⅰ/Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1030	未披露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床Ⅰ/Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1073	新冠病毒S蛋白+血凝素	新冠病毒S蛋白抑制剂、血凝素抑制剂	新冠病毒感染、流感病毒感染	临床Ⅰ/Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1083	未披露	免疫刺激剂	新冠病毒感染、流感病毒感染	临床Ⅰ/Ⅱ期	美国莫德纳公司
	mRNA-1468	未披露	免疫刺激剂	带状疱疹感染、水痘带状疱疹感染	临床Ⅰ/Ⅱ期	美国莫德纳公司

续表

应用领域	药物	靶点	作用机制	适应症	全球最高研发阶段	公司/机构
传染病	mRNA-1608	未批露	免疫刺激剂	生殖器疱疹感染、单纯疱疹感染	临床 I / II 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1769	未批露	未批露	猴痘病毒感染	临床 I / II 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1975、mRNA-1982	未批露	未批露	莱姆病感染	临床 I / II 期	美国莫德纳公司
	MRT-5407、MRT-5413	未批露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床 I / II 期	美国赛诺菲巴斯德
	奥密克戎 mRNA 疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床 I / II 期	中国苏州艾博生物科技有限公司
	四价流感 mRNA 疫苗	未批露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床 I / II 期	美国赛诺菲巴斯德
	呼吸道合胞病毒 CL-0059 脂质体 mRNA 疫苗、呼吸道合胞病毒 CL-0137 脂质体 mRNA 疫苗	未批露	免疫刺激剂	呼吸道合胞病毒感染	临床 I / II 期	美国赛诺菲
	SARS-CoV-2 变异株 (BA.4 / 5) mRNA 疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床 I / II 期	中国苏州艾博生物科技有限公司
	SW-0123	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床 I 期	俄罗斯比奥卡德医疗器械公司、中国斯微(上海)生物科技股份有限公司、同济大学、西藏诺迪康药业股份有限公司
	BG505 MD39.3 mRNA 疫苗	未批露	免疫刺激剂	人类免疫缺陷病毒感染	临床 I 期	美国国家过敏和传染病研究所
	CoV2 SAM LNP	未批露	免疫刺激剂	新冠病毒感染	临床 I 期	英国葛兰素史克
	COVID-19 德尔塔/奥密克戎 mRNA 疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床 I 期	中国阿格纳生物制药有限公司、广州市锐博生物科技有限公司
	COVID-19 德尔塔/奥密克戎 mRNA 疫苗	未批露	免疫刺激剂	新冠病毒感染	临床 I 期	中国成都威斯津生物医药科技有限公司
	COVID-2019 疫苗	未批露	免疫刺激剂	新冠病毒感染	临床 I 期	中国深圳深信生物科技有限公司
	DCVC H1 HA mRNA 疫苗	未批露	免疫刺激剂	新冠病毒感染	临床 I 期	美国国家过敏和传染病研究所
	eOD-GT8 60mer + Core-g28v2	未批露	免疫刺激剂	人类免疫缺陷病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司、国际艾滋病疫苗行动组织公司
	FLU SV mRNA、GSK-4184258A	未批露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床 I 期	英国葛兰素史克公司、德国库瑞瓦格有限责任公司
	GLB-003	未批露	免疫刺激剂	新冠病毒感染	临床 I 期	中国绿光生物科技有限责任公司

续表

应用领域	药物	靶点	作用机制	适应症	全球最高研发阶段	公司/机构
传染病	GRT-R910	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床 I 期	美国葛利史东肿瘤科技公司
	H3 脂质体 mRNA 疫苗	未披露	免疫刺激剂	流感病毒感染	临床 I 期	美国赛诺菲巴斯德
	LEM-MR203	未披露	未披露	新冠病毒感染	临床 I 期	中国雷莫内克斯生物制药有限公司
	mRNA 新冠肺炎疫苗	新冠病毒抗原	新冠病毒抗原抑制剂	新冠病毒感染	临床 I 期	中国江苏瑞科生物技术股份有限公司
	mRNA COVID-19 疫苗	新冠病毒S蛋白	新冠病毒S蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床 I 期	英国葛兰素史克
	mRNA MRK-1777	呼吸道合胞病毒F蛋白	呼吸道合胞病毒F蛋白抑制剂	呼吸道合胞病毒感染	临床 I 期	美国默沙东公司
	mRNA-1045	未披露	免疫刺激剂	新冠病毒感染、流感病毒感染、呼吸道合胞病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1172	未披露	免疫刺激剂	呼吸道合胞病毒感染	临床 I 期	美国默沙东公司、莫德纳公司
	mRNA-1189	爱泼斯坦-巴尔病毒感染蛋白	爱泼斯坦-巴尔病毒蛋白抑制剂	爱泼斯坦-巴尔病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1215	未披露	免疫刺激剂	亨尼巴病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1365	未披露	免疫刺激剂	人类偏肺病毒感染、呼吸道合胞病毒感染、呼吸道感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1403、mRNA-1405	未披露	未披露	急性肠胃炎、诺如病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1443	巨细胞病毒蛋白	巨细胞病毒蛋白抑制剂	巨细胞病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1574、mRNA-1644	未披露	免疫刺激剂	人类免疫缺陷病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-1653	未披露	免疫刺激剂	副黏病毒科感染、人偏肺病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司

续表

应用领域	药物	靶点	作用机制	适应症	全球最高研发阶段	公司/机构
	冻干新型冠状病毒 Omicron 株 mRNA 疫苗	新冠病毒 S 蛋白	新冠病毒 S 蛋白抑制剂	新冠病毒感染	临床 I 期	中国深圳市瑞深生物科技有限公司
	mRNA-1851	未披露	免疫刺激剂	甲型流感病毒感染	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-4157	未披露	免疫刺激剂	非小细胞肺癌、黑色素瘤	临床 III 期	美国默沙东公司、莫德纳公司
	mRNA-2416	OX40L	OX40L 抑制剂	淋巴瘤	临床 II 期	美国莫德纳公司
	NCI-4650	未披露	免疫刺激剂	结直肠癌、肝癌、黑色素瘤、泌尿生殖系统肿瘤	临床 II 期	美国莫德纳公司
	树突状细胞疫苗 (umitrelimorgene autodencel)	CMV pp65+ LAMP-1	CMV pp65 抑制剂、LAMP-1 抑制剂	胶质母细胞瘤	临床 II 期	美国免疫治疗有限公司、美国杜克大学医疗中心
	mRNA-4359	IDO1+PDL-1	IDO1 调节剂、PDL-1 调节剂	实体瘤、肿瘤	临床 I / II 期	美国莫德纳公司
	OTX-2002	C-Myc	Myc 抑制剂	肝细胞癌、不可切除肝细胞癌、非小细胞癌	临床 I / II 期	美国 Omega
癌症	SQZ-eAPC HPV	HPV16 蛋白抗原	HPV16 蛋白抗原和免疫刺激蛋白	人乳头状瘤病毒 16+ 实体瘤患者	临床 I / II 期	美国 SQZ 生物技术公司、瑞士罗氏公司
	BNT141	Claudin18.2	Claudin18.2 抑制剂	Claudin18.2 阳性实体瘤	临床 I / II 期	德国生物技术公司
	抗癌治疗性 mRNA 药物	IL-23+IL-36+ OX40L	IL-23 刺激剂、IL-36 刺激剂、OX40L 激动剂	尿路上皮瘤、非霍奇金淋巴瘤、实体瘤、头颈部鳞状细胞瘤、三阴乳腺癌	临床 I 期	美国莫德纳公司
	CARVac Claudin6 mRNA 疫苗	Claudin6	Claudin6 调节剂	实体瘤	临床 I 期	德国拜恩泰科
	EBV mRNA 疫苗	未披露	免疫刺激剂	肿瘤	临床 I 期	中国成都威斯津生物医药科技有限公司
	mRNA 树突状细胞疫苗	未披露	免疫刺激剂	血管肉瘤	临床 I 期	德克萨斯大学 MD 安德森癌症中心
	mRNA-2736	未披露	未披露	浆细胞骨髓瘤难治、复发性多发性骨髓瘤	临床 I 期	美国莫德纳公司

续表

应用领域	药物	靶点	作用机制	适应症	全球最高研发阶段	公司/机构
	mRNA-5671	KRAS	KRAS 基因调节剂	KRAS 突变非小细胞肺癌、胰腺腺瘤、肿瘤	临床 I 期	美国莫德纳公司、默沙东公司
	个性化肿瘤疫苗-PCV	未披露	基因转移、免疫刺激剂 MAGEA3 抑制剂、	实体瘤、食管癌、非小细胞肺癌	临床 I 期	中国斯微(上海)生物科技股份有限公司
	WT1 mRNA-朗格汉斯细胞	MAGEA3+ MAGEC1+ WT1	MAGEC 拮抗剂、WT1 抑制剂	多发性骨髓瘤	临床 I 期	美国斯隆-凯特琳癌症中心
	LUNAR-OTC	未披露	未披露	鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症	临床 II 期	以色列 Arcturus 医疗 (ARCT)公司
	AZD-8601	VEGF-A	VEGF-A 抑制剂	心肌缺血	临床 II 期	美国莫德纳公司
	mRNA-3704	MUT	MUT 基因刺激剂	甲基丙二酸血症	临床 II 期	美国莫德纳公司
其他	mRNA-3705	MUT	MUT 基因刺激剂	甲基丙二酸血症	临床 II 期	美国莫德纳公司、西雅图儿童医院
	mRNA-3927	PCCA+PCCB	PCCA 基因刺激剂、PCCB 基因刺激剂	丙酸血症	临床 I / II 期	美国莫德纳公司
	mRNA-0184	RXFP1	RXFP1 激动剂	慢性心力衰竭、心脏衰竭	临床 I 期	美国莫德纳公司
	mRNA-3745	G6PC1	G6PC1 刺激剂	糖原贮积病、I 型糖原贮积病	临床 I 期	美国莫德纳公司

注:数据来自智慧芽新药情报数据库,截至 2023 年 10 月。

3.1 mRNA 在传染病上的应用

mRNA 的临床应用大都集中在传染病领域(表 1),在新冠病毒的预防上应用最多,季节性流感病毒、Epstein-Barr 病毒、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)、带状疱疹病毒(varicella zoster virus, VZV)也都取得了临床进展。此外,在狂犬病毒、埃博拉病毒、登革热病毒和猴痘病毒等预防方面均取得了积极效果^[64-66]。针对链球菌、铜绿假单胞菌、肺结核杆菌和金黄色葡萄球菌等细菌性传染病也显示出潜在的实验效果^[67-69]。在预防寄生虫,如疟疾、血吸虫和弓形虫等的感染上,mRNA 也提

供了可能^[69-71]。在动物传染病方面,如禽流感预防也显示出一定的效果^[72-73]。mRNA 在传染病的应用上具有许多共同特征,mRNA 进入细胞质后可直接翻译成蛋白质,因此,mRNA 疫苗是非整合的、非传染性的,且耐受性良好。mRNA 在细胞中短暂表达,允许重复接种。mRNA 转录物中编码单位的选择是灵活多样的,允许编码抗原和免疫调节分子来诱导和调节适应性和先天免疫应答,并且含有多个表位的编码全长抗原可以由主要组织相容性复合体 I 类(major histocompatibility complex-I, MHC-I)和 II 类(MHC-II)分子呈现,而不受 MHC 限制^[69]。但是,在传染病的传播方式上,现有的 mRNA 修饰技术和递送系统仍然没有完全解决

mRNA本身的免疫原性^[69]。

3.2 mRNA在癌症疗法上的应用

近年来,mRNA疗法在癌症领域的应用逐渐成为研究热点。相对于传染病,mRNA在癌症等疗法的开发方面面临着更多挑战。在传染病预防上 mRNA只需要产生少量蛋白质,人体免疫系统会通过细胞和抗体介导的免疫反应放大免疫信号,而 mRNA 癌症疗法需要 mRNA 疫苗所表达的 1 000 倍以上的蛋白质水平才能达到治疗阈值。通常情况下,mRNA 疗法需要作用于特定的靶通路、细胞、组织或器官。因此需要重视靶细胞对 mRNA 的吸收,这决定了 mRNA 表达的持续时间和水平。脂质载体递送到组织中的生物利用度、循环半衰期和递送效率都是限速因素。静脉注射可以很容易让 mRNA 药物靶向肝脏,但将其有效递送到其他实体器官仍然具有挑战性。此外,对于慢性疾病的治疗通常需要多次给药,即使优化过的 mRNA 和 LNP 在多次给药后也会激活先天免疫,从而降低治疗性蛋白的表达^[74]。

对于 mRNA 癌症免疫疗法的机制,一种方法是通过编码表达肿瘤抗原蛋白来抑制肿瘤生长,或抑制肿瘤微环境。然而,目前的 mRNA 递送方式不太可能到达患者的每个癌细胞。另外一种方法是通过 mRNA 作为治疗性疫苗来刺激免疫系统杀死癌细胞^[75]。

3.2.1 基于肿瘤抗原的 mRNA 癌症疗法 mRNA 癌症疗法可根据癌细胞表达的肿瘤抗原特异性设计,激发体内抗肿瘤 T 细胞或 B 细胞反应。肿瘤包括肿瘤相关自身抗原(tumor associated autoantigens, TAAs)和肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)。其中,TAA 在肿瘤细胞中过表达,但也存在于正常组织中,具有较弱的肿瘤特异性和免疫原性,而 TSA 是来源于肿瘤细胞突变的抗原,具有高的肿瘤特异性和免疫原性,但机体耐受性较弱。使用多个(如 2~6 个)共享 TAAs 的组合已成为临床开发靶向 mRNA 癌症疫苗的趋势。通常所选择的 TAAs 在相关肿瘤中广泛表达,当与不同的载体或佐剂结合时,可以诱导抗肿瘤免疫反应。

与 TAA 不同,TSA 是由于肿瘤细胞突变而产生的,不会影响中枢免疫耐受。因此,TSA 疫苗或新抗原疫苗是治疗癌症的一种有潜力的形式。一般来说,癌症细胞中的新抗原被蛋白酶降解为小

肽,这些小肽在内质网上加工并呈现给细胞表面的分子。这些新表位 MHC 被 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞识别,以诱导细胞免疫反应。或者,释放到细胞外液中的 TSA 可以被肿瘤微环境中渗透的抗原呈递细胞吸收并呈递。癌症患者肿瘤细胞内的独特突变特征还可用于个性化疫苗设计^[76]。

3.2.2 基于细胞因子的 mRNA 癌症疗法 基于 mRNA 产生的细胞因子来抑制肿瘤微环境,比重组细胞因子更有优势,因为它们理论上可以保持其信号活性。mRNA 技术可以快速且经济高效地生产大量基于细胞因子的治疗分子,使其成为与重组细胞因子相比更广泛使用的选择。此外,无论是系统注射还是肿瘤内给药,将编码细胞因子的 mRNA 封装在纳米颗粒中均可以延长细胞因子的半衰期^[76]。

3.2.3 基于细胞治疗的 mRNA 癌症疗法 基于 mRNA 技术的细胞疗法,如树突状细胞在诱导特异性肿瘤抗原反应中至关重要,在诱导潜在的免疫反应中,树突状细胞(dendritic cell, DCs)发挥着关键的作用,DCs 能够指导细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞形成强大的抗肿瘤武器,从而攻击肿瘤细胞,是 mRNA 癌症疫苗的理想递送目标。mRNA 可以在离体或细胞原位将 DCs 工程化,用于癌症治疗。除了 DCs,基于 mRNA 的 CAR-T 或 TCR-T 细胞疗法也可用于癌症治疗,而且 mRNA 编码 CAR 或 TCR 用于工程化 T 细胞的策略优于逆转录病毒或慢病毒,因为转染率较高且无基因突变的风险^[34]。

3.3 mRNA在其他治疗领域上的应用

在其他治疗领域(表 1),例如,以色列 Arcuturus Therapeutics 公司正在研发一种用于治疗鸟氨酸氨甲酰基转移酶(ornithine transcarbamoylase, OTC)缺乏症的 mRNA 治疗药物 LUNAR-OTC。利用脂质核酸递送系统,评估其在 OTC 缺乏症患者中的安全性和耐受性^[77]。目前正处于 II 期临床试验阶段(NCT05526066)。

英国阿斯利康公司和美国莫德纳公司合作开发了一种编码血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)的 mRNA 治疗药物 AZD8601。II 期临床试验(NCT03370887)研究了在接受冠状动脉搭桥手术的中度收缩功能受损患者的心肌内注射 AZD8601 药物后的安全性和耐受性,并探索了其相关疗效。结果显示,

AZD8601 药物无严重不良反应,且疗效呈上升趋势^[78]。

美国SQZ生物技术公司与瑞士罗氏公司合作开发了一种基于 mRNA 的细胞疗法,名为 SQZeAPC HPV。SQZeAPC-HPV 向 4 种不同类型的工程免疫细胞(单核细胞、T 细胞、B 细胞和 NK 细胞)输送 5 种针对 HPV16 蛋白抗原和免疫刺激蛋白的 mRNA 分子。目前正在招募一项 I/II 期临床试验(NCT05357898),以评估 SQZeAPC HPV 作为单一疗法和联合派姆单抗治疗复发、局部晚期或转移性 HPV16⁺实体瘤患者的安全性、耐受性、抗肿瘤活性、免疫原性和药效学效应等。

德国 BioNTech 公司开发了一种可在体内编码分泌 IgG 抗体的 mRNA 药物 BNT141。该药物目前正处于 I/II 期临床试验(NCT04683939)阶段,主要研究其在 Claudin18.2 阳性实体瘤患者中的安全性和药代动力学^[79]。

4 挑战与展望

mRNA 新冠疫苗的成功研制促进了 mRNA 药物的高速发展,但是 mRNA 技术仍然存在许多挑战有待解决。

首先,优化 mRNA 从而提高体内蛋白质生产的时间和数量,利用基于核苷的化学修饰(如尿苷修饰)来增加蛋白质的表达^[74,80]。除蛋白质的表达量外,缩短蛋白质翻译的时间、解决重复给药障碍也是 mRNA 用于治疗慢性病的关键,如自我复制的 mRNAs(saRNAs)在使用自身 RNA 序列作为模板进行扩增后,在细胞质中可提高 RNA 转录本的含量^[81-82]。环状 mRNAs(circRNAs)能够提供另外一种延长蛋白质翻译时间的方法,即环状结构可使 circRNAs 免受核酸外切酶的攻击,通过延长 RNA 的寿命提高蛋白质的总产量^[83]。

其次,各种智能的递送系统可以改善在血液中的循环时间、生物分布、装载和释放等关键功能。改进包装和递送系统,包括可电离的脂质纳米颗粒(LNP)、基于肽的纳米颗粒、细胞生物膜、基于细胞的胞外囊泡等,能够提高 mRNA 药物靶向精准度,增强药效。阳离子和可电离的 LNP 是目前研究最深入、应用最广泛、临床上最先进的 mRNA 递送载体^[84-86],但其可能的细胞毒性和相对较短的循环时间将阻碍其在临床上的应

用^[87-88]。目前已经合成并测试了各种新型脂质-聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)共轭物和可电离脂质。可电离脂质在生理 pH 条件下保持中性,降低毒性的同时,还能在一定程度上增加循环半衰期^[89]。在酸性 pH 下可电离脂质的质子化现象不仅能够封装 mRNA,还能够使 mRNA 从酸性核内体中逃逸^[22]。由 PEG 脂质化形成的 PEG 外壳能够显著延长 LNPs 的循环半衰期、减少聚集,从而减少与血清蛋白不利的相互作用^[90]。另外一种有效的方法是使用细胞外囊泡(外泌体)。外泌体具有生物相容性、低免疫原性、无毒性、重复给药后耐受性良好等优点,在需要重复给药的情况下,被认为是未来最有前景的 mRNA 递送系统^[91]。细胞穿透肽(cell penetrating peptide, CPPs)可以穿透细胞膜进入细胞质中,根据 CPPs 和 RNA 的性质,通过形成各种纳米复合物用于 RNA 递送系统^[92]。基于细胞的递送系统,其可以利用细胞的分泌能力直接将 mRNA 合成的蛋白质递送至离体细胞中。该递送系统具有生物相容性、无毒性、延长循环半衰期等优点,可将 mRNA 导入免疫细胞等细胞中进行修饰^[92]。研究人员还开发了一种细菌介导的口服 mRNA 疫苗载体,该多靶点疫苗成功探索了基于沙门氏菌的工程化载体,以提供针对新冠病毒德尔塔和奥密克戎变异株的 mRNA 疫苗^[93]。

另外,要实现 mRNA 疗法的全部潜力,还需要解决 mRNA 的靶向性问题,特别是对于心脏、肾脏、大脑和肺等实体器官的特异性递送。目前,肝脏是大多数分子疗法的首选器官,其丰富的血管系统有利于有效的均匀递送和大颗粒通过。简单的静脉注射就可以将 mRNA 高效递送到肝脏细胞并表达出治疗性蛋白质。此外, GalNAc 与寡核苷酸的结合代表了一种可安全用于肝脏靶向递送的核酸治疗剂方法^[94]。基于 GalNAc 的递送主要依赖于肝细胞表达去唾液酸糖蛋白受体的能力,通过受体介导的内吞作用结合糖蛋白^[95]。然而,将 mRNA 治疗药物选择性递送到肝脏以外的器官需要专门开发具有适当亲和力的包装和递送系统。如近年开发的工程脂质纳米颗粒能够选择性地 mRNA 传递到肝外器官^[96];内源性淋巴结导向脂质纳米颗粒系统^[97];腹腔内给药将含有阳离子辅助性脂质纳米颗粒传递到胰腺,进而产生胰岛素细胞^[98];基于 LNP 的 mRNA 治疗方法可增加 PEG

和胆固醇类似物 β -谷固醇^[99];允许重复给药治疗慢性疾病的策略。

尽管存在这些挑战,mRNA疫苗在预防新冠病毒感染应用中的巨大成功,以及在致命癌症治疗中的多种尝试,验证了未来该技术的巨大应用前景。

参 考 文 献

- [1] SAHIN U, KARIKÓ K, TÜRECI Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs[J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2014, 13: 759-780.
- [2] PARDI N, HOGAN M J, PORTER F W, *et al.* mRNA vaccines-a new era in vaccinology[J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2018, 17: 261-279.
- [3] VAN LINT S, RENMANS D, BROOS K, *et al.* The ReNAisanCe of mRNA-based cancer therapy[J]. *Expert Rev. Vaccines*, 2015, 14(2): 235-251.
- [4] PARDI N, MURAMATSU H, WEISSMAN D, *et al.* *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides[J]. *Meth. Mol. Biol.*, 2013, 969: 29-42.
- [5] VOGEL A B, KANEVSKY I, CHE Y E, *et al.* A prefusion SARS-CoV-2 spike RNA vaccine is highly immunogenic and prevents lung infection in non-human primates[J/OL]. *BioRxiv. Preprint Server.*, 2020: 280818v1[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1101/2020.09.08.280818>.
- [6] JACKSON N A C, KESTER K E, CASIMIRO D, *et al.* The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective[J/OL]. *NPJ Vaccines*, 2020, 5: 11[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8>.
- [7] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247(1): 1465-1468.
- [8] DEAL C E, CARFI A, PLANTE O J. Advancements in mRNA encoded antibodies for passive immunotherapy[J/OL]. *Vaccines Basel*, 2021, 9(2): 108[2023-10-20]. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020108>.
- [9] SHYH P T. Review of COVID-19 mRNA Vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273[J]. *J. Pharm. Pract.*, 2022, 35(6): 947-951.
- [10] KIM S C, SEKHON S S, SHIN W R, *et al.* Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency[J]. *Mol. Cell. Toxicol.*, 2022, 18(1): 1-8.
- [11] CONRY R M, LOBUGLIO A F, WRIGHT M, *et al.* Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector[J]. *Cancer Res.*, 1995, 55(7): 1397-1400.
- [12] WHITELAW E, COATES A, PROUDFOOT N J. Globin gene transcripts can utilize histone gene 3' end processing signals[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14(17): 7059-7070.
- [13] ZHONG C, WEI P, ZHANG Y P. Enhancing functional expression of codon-optimized heterologous enzymes in *Escherichia coli* BL21(DE3) by selective introduction of synonymous rare codons[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2017, 114(5): 1054-1064.
- [14] WANG Y, ZHANG Z, LUO J, *et al.* mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy[J/OL]. *Mol. Cancer*, 2021, 20(1): 33 [2023-10-20]. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01311-z>.
- [15] RAMANATHAN A, ROBB G B, CHAN S H. mRNA capping: biological functions and applications[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(16): 7511-7526.
- [16] VAN DIJK E, COUGOT N, MEYER S, *et al.* Human Dep2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures[J]. *EMBO J.*, 2002, 21(24): 6915-6924.
- [17] BRENGUES M, TEIXEIRA D, PARKER R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies[J]. *Science*, 2005, 310(5747): 486-489.
- [18] LEPPEK K, DAS R, BARNA M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, 19: 158-174.
- [19] WADHWA A, ALJABBARI A, LOKRAS A, *et al.* Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines[J/OL]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(2): E102[2023-10-20]. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020102>.
- [20] TREPOTEC Z, ANEJA M K, GEIGER J, *et al.* Maximizing the translational yield of mRNA therapeutics by minimizing 5'-UTRs[J]. *Tissue Eng. Part A*, 2019, 25(1-2): 69-79.
- [21] ZARGHAMPOOR F, AZARPIRA N, KHATAMI S R, *et al.* Improved translation efficiency of therapeutic mRNA[J]. *Gene*, 2019, 707: 231-238.
- [22] CHAUDHARY N, WEISSMAN D, WHITEHEAD K A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2021, 20: 817-838.
- [23] KUDLA G, LIPINSKI L, CAFFIN F, *et al.* High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells[J/OL]. *PLoS Biol.*, 4(6): e180[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040180>.
- [24] HANSON G, COLLIER J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, 19: 20-30.
- [25] PRESNYAK V, ALHUSAINI N, CHEN Y H, *et al.* Codon optimality is a major determinant of mRNA stability[J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1111-1124.
- [26] CANNAROZZI G, SCHRAUDOLPH N N, FATY M, *et al.* A role for codon order in translation dynamics[J]. *Cell*, 2010, 141(2): 355-367.
- [27] BOSSI L, ROTH J R. The influence of codon context on genetic code translation[J]. *Nature*, 1980, 286: 123-127.
- [28] KOZAK M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes[J]. *Cell*, 1986, 44(2): 283-292.
- [29] LIU Q. Comparative analysis of base biases around the stop codons in six eukaryotes[J]. *Biosystems*, 2005, 81(3): 281-289.
- [30] KARIKÓ K, MURAMATSU H, KELLER J M, *et al.* Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoie-

- tin[J]. *Mol. Ther.*, 2012, 20(5): 948-953.
- [31] KIMCHI-SARFATY C, OH J M, KIM I W, *et al.* A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity[J]. *Science*, 2007, 315(5811): 525-528.
- [32] MAUGER D M, CABRAL B J, PRESNYAK V, *et al.* mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, 116(48): 24075-24083.
- [33] WAYMENT-STEELE H K, KIM D S, CHOE C A, *et al.* Theoretical basis for stabilizing messenger RNA through secondary structure design[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2021, 49(18): 10604-10617.
- [34] WENG Y, LI C, YANG T, *et al.* The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape[J/OL]. *Biotechnol. Adv.*, 2020, 40: 107534[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040180>.
- [35] LIN H H, HUANG L F, SU H C, *et al.* Effects of the multiple polyadenylation signal AAUAAA on mRNA 3'-end formation and gene expression[J]. *Planta*, 2009, 230(4): 699-712.
- [36] SHULMAN E D, ELKON R. Systematic identification of functional SNPs interrupting 3'UTR polyadenylation signals[J/OL]. *PLoS Genet.*, 2020, 16(8): e1008977[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008977>.
- [37] ORLANDINI VON NIESSEN A G, POLEGANOV M A, RECHNER C, *et al.* Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening[J]. *Mol. Ther.*, 2019, 27(4): 824-836.
- [38] 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[J]. *Blood*, 2006, 108(13): 4009-4017.
- [39] CHEN C Y, SHYU A B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation[J]. *Trends Biochem. Sci.*, 1995, 20(11): 465-470.
- [40] NICHOLSON A L, PASQUINELLI A E. Tales of detailed poly(A) tails[J]. *Trends Cell Biol.*, 2019, 29(3): 191-200.
- [41] JALKANEN A L, COLEMAN S J, WILUSZ J. Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size: does this protein make my tail look big? [J]. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2014, 34: 24-32.
- [42] PELLETIER J, SONENBERG N. The organizing principles of eukaryotic ribosome recruitment[J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 2019, 88: 307-335.
- [43] SCHLAKE T, THESS A, FOTIN-MLECZEK M, *et al.* Developing mRNA-vaccine technologies[J]. *RNA Biol.*, 2012, 9(11): 1319-1330.
- [44] 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[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 340(4): 1062-1068.
- [45] GRIER A E, BURLEIGH S, SAHNI J, *et al.* pEVL: a linear plasmid for generating mRNA IVT templates with extended encoded poly(A) sequences[J/OL]. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2016, 5: e306[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.21>.
- [46] POTAPOV V, FU X, DAI N, *et al.* Base modifications affecting RNA polymerase and reverse transcriptase fidelity[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46(11): 5753-5763.
- [47] JIANG T, YU N, KIM J, *et al.* Oligonucleotide sequence mapping of large therapeutic mRNAs via parallel ribonuclease digestions and LC-MS/MS[J]. *Anal. Chem.*, 2019, 91(13): 8500-8506.
- [48] BEVERLY M, HAGEN C, SLACK O. Poly A tail length analysis of *in vitro* transcribed mRNA by LC-MS[J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, 410(6): 1667-1677.
- [49] CHALLENGER C. Analysis of mRNA therapeutics and vaccines[J]. *BioPharm. International.*, 2022, 35 (2):10-15.
- [50] RICH A. The double helix: a tale of two puckers[J]. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2003, 10: 247-249.
- [51] HENDRIX D K, BRENNER S E, HOLBROOK S R. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule[J]. *Q. Rev. Biophys.*, 2005, 38(3): 221-243.
- [52] BUTCHER S E, PYLE A M. The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks[J]. *Acc. Chem. Res.*, 2011, 44(12): 1302-1311.
- [53] D'ASCENZO L, LEONARSKI F, VICENS Q, *et al.* Revisiting GNRA and UNCG folds: U-turns versus Z-turns in RNA hairpin loops[J]. *RNA*, 2017, 23(3): 259-269.
- [54] SCHROEDER K T, MCPHEE S A, OUELLET J, *et al.* A structural database for k-turn motifs in RNA[J]. *RNA*, 2010, 16(8): 1463-1468.
- [55] EGLI M, MINASOV G, SU L, *et al.* Metal ions and flexibility in a viral RNA pseudoknot at atomic resolution[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(7): 4302-4307.
- [56] BATEY R T, RAMBO R P, DOUDNA J A. Tertiary motifs in RNA structure and folding[J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1999, 38(16): 2326-2343.
- [57] YU C, GABRIELE V. RNA Structure[M]. Wiley Online Library, 2020.
- [58] TAMURA M, HOLBROOK S R. Sequence and structural conservation in RNA ribose zippers[J]. *J. Mol. Biol.*, 2002, 320(3): 455-474.
- [59] SHI X, KHADE P K, SANBONMATSU K Y, *et al.* Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis[J]. *J. Mol. Biol.*, 2012, 419(3-4): 125-138.
- [60] HUANG L, LIAO X, LI M, *et al.* Structure and folding of four putative kink turns identified in structured RNA species in a test of structural prediction rules[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2021, 49(10): 5916-5924.
- [61] LI B, CAO Y, WESTHOF E, *et al.* Advances in RNA 3D structure modeling using experimental data[J/OL]. *Genetics*, 2020, 11: 574485[2023-10-20]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.574485>.
- [62] SEETIN M G, MATHEWS D H. RNA structure prediction: an overview of methods[J]. *Meth. Mol. Biol.*, 2012, 905: 99-122.
- [63] MAUGERI M, NAWAZ M, PAPADIMITRIOU A, *et al.* Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading in-

- to EVs for transport to other cells[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2019, 10: 4333[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12275-6>.
- [64] WANG Y S, KUMARI M, CHEN G H, *et al.* mRNA-based vaccines and therapeutics: an in-depth survey of current and upcoming clinical applications[J/OL]. *J. Biomed. Sci.*, 2023, 30(1): 84[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00977-5>.
- [65] WHITAKER J A, SAHLY H M E, HEALY C M. mRNA vaccines against respiratory viruses[J]. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2023, 36(5): 385-393.
- [66] HOU F, ZHANG Y, LIU X, *et al.* mRNA vaccines encoding fusion proteins of monkeypox virus antigens protect mice from vaccinia virus challenge[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2023, 14: 5925 [2023-10-20]. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41628-5>.
- [67] NAVEED M, WASEEM M, AZIZ T, *et al.* Identification of bacterial strains and development of anmRNA-based vaccine to combat antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* via *in vitro* and *in silico* approaches[J/OL]. *Biomedicines*, 2023, 11(4): 1039[2023-10-20]. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041039>.
- [68] WANG X, LIU C, RCHEULISHVILI N, *et al.* Strong immune responses and protection of PcrV and OprF-I mRNA vaccine candidates against *Pseudomonas aeruginosa*[J/OL]. *NPJ Vaccines*, 2023, 8: 76[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00672-4>.
- [69] HE Q, GAO H, TAN D, *et al.* mRNA cancer vaccines: advances, trends and challenges[J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2022, 12(7): 2969-2989.
- [70] YOU H, JONES M K, GORDON C A, *et al.* The mRNA vaccine technology era and the future control of parasitic infections[J/OL]. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2023, 36(1): e0024121 [2023-10-20]. <https://doi.org/10.1128/cmr.00241-21>.
- [71] BORKENS Y. Malaria & mRNA vaccines: a possible salvation from one of the most relevant infectious diseases of the global south[J]. *Acta Parasitol.*, 2023, 68(4): 916-928.
- [72] LE T, SUN C, CHANG J, *et al.* mRNA vaccine development for emerging animal and zoonotic diseases[J/OL]. *Viruses*, 2022, 14(2): 401[2023-10-20]. <https://doi.org/10.3390/v14020401>.
- [73] HERRERA-ONG L R. Strategic construction of mRNA vaccine derived from conserved and experimentally validated epitopes of avian influenza type A virus: a reverse vaccinology approach[J]. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2023, 12(2): 156-171.
- [74] ROHNER E, YANG R, FOO K S, *et al.* Unlocking the promise of mRNA therapeutics[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2022, 40: 1586-1600.
- [75] BARBIER A J, JIANG A Y, ZHANG P, *et al.* The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2022, 40: 840-854.
- [76] LIU C, SHI Q, HUANG X, *et al.* mRNA-based cancer therapeutics[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2023, 23: 526-543.
- [77] Pipeline of arcturus-owned mRNA therapeutic candidates[EB/OL]. (2023-10-25) [2023-11-28]. <https://arcturusrx.com/mrna-medicines-pipeline/#lunarOTC>.
- [78] AZD8601 EPICURE Phase II trial demonstrated safety and tolerability in patients with heart failure[EB/OL]. (2021-11-15) [2023-11-28]. <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2021/azd8601-epicure-phase-ii-trial-demonstrated-safety-and-tolerability-in-patients-with-heart-failure.html#>.
- [79] Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and preliminary efficacy trial of BNT141 in patients with unresectable or metastatic CLDN18.2-positive gastric, pancreatic, ovarian and biliary tract tumors[EB/OL]. (2023-10-02)[2023-11-28]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04683939?titles=BNT141&rank=1>.
- [80] SCHAEFER M, KAPOOR U, JANTSCH M F. Understanding RNA modifications: the promises and technological bottlenecks of the 'epitranscriptome'[J/OL]. *Open Biol.*, 2017, 7(5): 170077[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1098/rsob.170077>.
- [81] KIM D Y, ATASHEVA S, MCAULEY A J, *et al.* Enhancement of protein expression by alphavirus replicons by designing self-replicating subgenomic RNAs[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111(29): 10708-10713.
- [82] 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[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2020, 11: 3523[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17409-9>.
- [83] WESSELHOEFT R A, KOWALSKI P S, ANDERSON D G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2018, 9: 2629[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05096-6>.
- [84] SASSO J M, AMBROSE B J B, TENCHOV R, *et al.* The progress and promise of RNA medicine-an arsenal of targeted treatments[J]. *J. Med. Chem.*, 2022, 65(10): 6975-7015.
- [85] PAUNOVSKA K, LOUGHREY D, DAHLMAN J E. Drug delivery systems for RNA therapeutics[J]. *Nat. Rev. Genet.*, 2022, 23: 265-280.
- [86] ZHANG Y, SUN C, WANG C, *et al.* Lipids and lipid derivatives for RNA delivery[J]. *Chem. Rev.*, 2021, 121(20): 12181-12277.
- [87] CUI S, WANG Y, GONG Y, *et al.* Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups[J]. *Toxicol. Res.*, 2018, 7(3): 473-479.
- [88] XIA Y, TIAN J, CHEN X. Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery[J]. *Biomaterials*, 2016, 79: 56-68.
- [89] CULLIS P R, HOPE M J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies[J]. *Mol. Ther.*, 2017, 25(7): 1467-1475.
- [90] GREF R, MINAMITAKE Y, PERACCHIA M T, *et al.* Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres[J]. *Science*, 1994, 263(5153): 1600-1603.
- [91] SU S A, XIE Y, FU Z, *et al.* Emerging role of exosome-mediated intercellular communication in vascular remodeling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 25700-25712.
- [92] MA Y, LI X, ZHAO R, *et al.* Creating *de novo* peptide-based bioactivities: from assembly to origami[J]. *RSC Adv.*, 2022, 12(40): 25955-25961.

- [93] LLOREN K K S, JAWALAGATTI V, HEWAWADUGE C, *et al.*. *Salmonella*-mediated oral delivery of multiple-target vaccine constructs with conserved and variable regions of SARS-CoV-2 protect against the Delta and *Omicron* variants in hamster[J/OL]. *Microbes Infect.*, 2023, 25(5): 105101[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105101>.
- [94] CUI H, ZHU X, LI S, *et al.*. Liver-targeted delivery of oligonucleotides with N-acetylgalactosamine conjugation[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(25): 16259-16265.
- [95] DEBACKER A J, VOUTILA J, CATLEY M, *et al.*. Delivery of oligonucleotides to the liver with GalNAc: from research to registered therapeutic drug[J]. *Mol. Ther.*, 2020, 28(8): 1759-1771.
- [96] CHENG Q, WEI T, FARBIAK L, *et al.*. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing[J]. *Nat. Nanotechnol.*, 2020, 15: 313-320.
- [97] CHEN J, YE Z, HUANG C, *et al.*. Lipid nanoparticle-mediated lymph nodetargeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust CD8⁺ T cell response[J/OL]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2022, 119(34): e2207841119[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207841119>.
- [98] MELAMED J R, YERNENI S S, ARRAL M L, *et al.*. Ionizable lipid nanoparticles deliver mRNA to pancreatic β cells via macrophage-mediated gene transfer[J/OL]. *Sci. Adv.*, 2023, 9(4): eade1444[2023-10-20]. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade1444>.
- [99] KIM J, JOZIC A, LIN Y, *et al.*. Engineering lipid nanoparticles for enhanced intracellular delivery of mRNA through inhalation[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(9): 14792-14806.