

综述

非复制型mRNA疫苗的设计策略

贺彩英¹, 竺家扬¹, 刘雨莎², 文金生^{2*}¹宁波大学医学部公共卫生学院, 宁波 315211; ²宁波大学医学部基础医学院, 宁波 315211)

摘要: 随着信使RNA(messenger ribonucleic acid, mRNA)的核苷酸化学修饰和递送技术的不断发展和完善, mRNA疫苗技术在传染病预防和癌症治疗中显示出了超乎预期的效果。2023年, Katalin Karikó及Drew Weissman因为在核苷酸碱基修饰助力mRNA疫苗成功研发方面的突出贡献荣获了诺贝尔生理学或医学奖。本文对近年来非复制型mRNA疫苗研究在降低mRNA诱导免疫反应、提高mRNA稳定性、提升抗原表达效率、递送系统开发等方面的最新进展予以综述, 以期为研究人员提出全新的概述, 并且助力mRNA疫苗在更多传染性疾病乃至肿瘤防治中得到广泛应用。

关键词: mRNA; 非复制; 疫苗; 核苷酸修饰; 递送系统

The design strategy of non-replicating mRNA vaccine

HE Caiying¹, ZHU Jiayang¹, LIU Yusha², WEN Jinsheng^{2*}¹School of Public Health, Ningbo University Health Science Center, Ningbo 315211, China;²School of Basic Medicine, Ningbo University Health Science Center, Ningbo 315211, China)

Abstract: With the continuous development and refinement of nucleotide chemical modification and delivery technologies for messenger ribonucleic acid (mRNA), mRNA vaccine technology has shown great progress in infectious disease prevention and cancer treatment. In 2023, Katalin Karikó and Drew Weissman were awarded Nobel Prize in Physiology or Medicine for their outstanding contributions to the development of mRNA vaccines through nucleotide base modification. In this review, we introduced and discussed the recent progress of non-replicating mRNA vaccines in reducing mRNA autoimmunogenicity, improving mRNA stability, enhancing antigen expression efficiency, and developing delivery systems, aiming to provide researchers a new profile. This paper could also help mRNA vaccines to be widely used in the prevention and treatment of more infectious diseases and even tumors.

Key Words: mRNA; non-replication; vaccine; nucleotide modification; delivery system

1961年, Brenner等^[1]发现, 信使RNA(messenger ribonucleic acid, mRNA)是一种中间遗传物质。mRNA是以脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)为模板转录而成的单链核糖核酸, 其携带5'帽和3' poly(A)尾, 因而可结合核糖体从而指导蛋白质的合成。1990年, Wolff等^[2]将体外构建的编

码氯霉素乙酰基转移酶的mRNA直接注入小鼠骨骼肌后成功表达出了该蛋白质, 证实了动物体内能够翻译外源mRNA。基于mRNA表达的技术也逐步进入传染病、癌症等疫苗研究领域。mRNA疫苗是一种新型疫苗, 其依靠mRNA在宿主体内表达外源性抗原从而诱导特异性免疫应答, 可用于防控感

收稿日期: 2024-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32070162); 浙江省自然科学基金项目(LY22C010004); 宁波市自然科学基金项目(2022J131)

第一作者: E-mail: 2030898685@qq.com

*通信作者: E-mail: wenjinsheng@nbu.edu.cn

染性疾病或肿瘤。由于mRNA具有稳定性差、可能诱导炎症反应、难以递送等方面的不足，一直以来，mRNA疫苗技术的发展相当缓慢。近年来，随着mRNA核苷酸化学修饰和递送技术的不断开发、发展和完善，mRNA疫苗技术在传染病预防和癌症治疗方面重新受到重视。尤其是2020年，新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) mRNA疫苗在临床试验中获得巨大成功并顺利获批上市，促进了mRNA疫苗研究的飞速发展。2023年，两位科学家也因mRNA疫苗技术中最核心的部分——核苷酸修饰而获得诺贝尔医学或生理学奖。与传统疫苗相比，mRNA疫苗具有安全高效、生产简单、研发速度快等优势，因此，基于mRNA的疫苗在感染性疾病和癌症疫苗研发方面显现出巨大潜力，mRNA疫苗也开创了疫苗学的新时代。

1 mRNA疫苗结构及生物学特性

基于是否具有自我复制能力，mRNA疫苗可分为两大类：自扩增mRNA疫苗和非复制型mRNA疫苗^[3]，其中非复制型mRNA疫苗技术平台应用最为广泛。如图1所示，该类型疫苗mRNA基本结构由五部分组成：5'帽(5'cap)、5'非翻译区(untranslated region, UTR)、开放阅读框(open reading frame, ORF)、3'非翻译区和多聚腺苷酸[poly adenine nucleotides, poly(A)]尾结构^[4]。

尽管传统疫苗(灭活疫苗和减毒活疫苗)已在多种传染病(天花、脊髓灰质炎、麻疹等)预防中发挥了重要作用，但也存在诸如免疫原性差、依赖高等级生物安全实验条件等缺陷。此外，对于容易发生突变的病毒如新冠病毒、艾滋病毒、登革病毒、流感病毒等，迫切需要更加快速、高效的疫苗研发平台。与其他类型疫苗相比，mRNA疫苗具有以下显著优势：首先，仅在知晓病毒靶抗原基因序列的基础上即可完成设计mRNA序列，大大简化了研发流程并且降低了生产成本^[5]；其次，mRNA不会整合到宿主细胞基因组中，具有较好的

生物安全性^[6]；第三，mRNA也具有自佐剂效应，它可以辅助其目的蛋白诱导特异性免疫反应^[7]。尽管如此，mRNA疫苗也存在一些不足：一方面，游离的mRNA在血清中极易被mRNA酶降解^[8,9]；另一方面，mRNA易被宿主细胞模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别而诱导免疫反应；最后，由于mRNA和细胞都带负电荷导致的静电排斥反应，因而游离的mRNA不易进入细胞内发挥作用。综上，有必要通过修饰核苷酸、改进mRNA序列等方法降低mRNA诱导免疫反应的能力，改进递送系统等以提高mRNA翻译效率^[10]。

2 mRNA疫苗发挥作用的机制

mRNA疫苗主要通过激活强大的特异性体液免疫和细胞免疫发挥适应性免疫反应。此外，细胞内的mRNA也可以激活其先天免疫系统辅助发挥免疫作用，并且增强适应性免疫反应的免疫效力，共同对抗病原体感染。

mRNA疫苗注射进人体后，被抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APCs)内吞形成内体，mRNA从内体中逸出，然后在细胞质中通过核糖体翻译成内源性抗原蛋白；随后，内源性抗原被蛋白酶体降解为抗原肽，通过经典的主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) I类分子被T细胞受体识别并呈递给CD8⁺ T细胞，并且分泌穿孔素、颗粒酶和细胞因子进行细胞免疫反应。此外，抗原可以分泌到细胞外环境中，作为外源性抗原重新被细胞吸收形成吞噬小体，与溶酶体融合形成吞噬溶酶体并被降解为多肽，并通过MHC II类分子在细胞表面被B细胞受体识别并呈递给CD4⁺ T细胞，活化的CD4⁺ T细胞诱导B细胞活化、增殖分化为浆细胞产生特异性中和抗体，发挥体液免疫反应^[11,12]。此外，mRNA疫苗具有自佐剂特性，可以辅助产生固有免疫反应，诱导产生促炎细胞因子，如图2所示。

3 降低外源性mRNA诱导炎症反应的策略

外源性mRNA及其副产物易被宿主细胞的PRRs识别而引起先天免疫反应，mRNA疫苗诱导产生的先天免疫反应的作用具有两面性。一方面，mRNA具有固有的佐剂特性，可以促进并增强



图1 非复制mRNA疫苗的基本结构

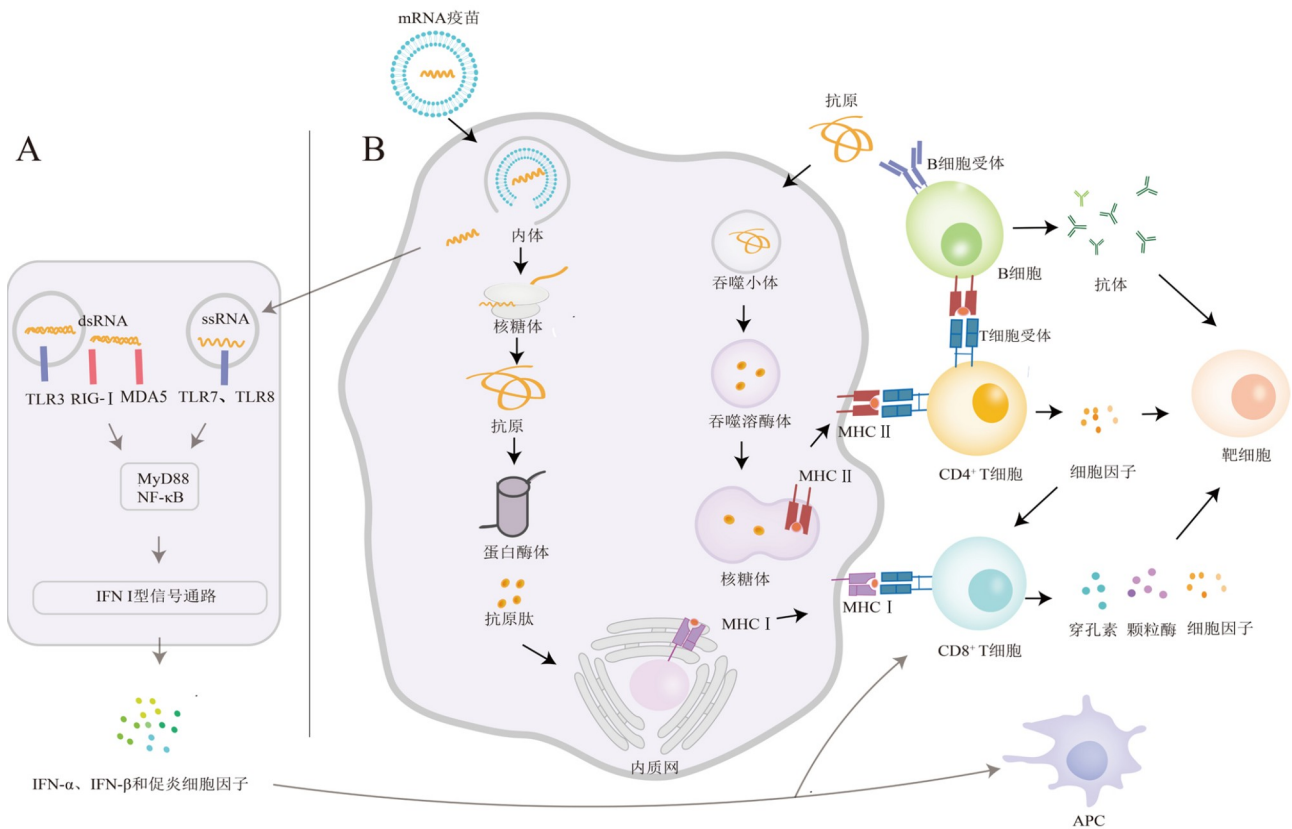


图2 mRNA疫苗发挥作用的机制

适应性免疫应答：当外源性mRNA分子进入细胞后，可以被Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)和RIG- I 样受体(RIG- I-like receptors, RLRs)等PRRs识别，如TLR3、维甲酸诱导基因-1(retinoic acid-inducible gene-1, RIG- I)、黑色素瘤分化相关基因5(melanoma differentiation association protein 5, MDA5)等分子能够识别双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)，激活下游的 I 型干扰素(type I interferon, IFN- I)；TLR7、TLR8可以识别未修饰的单链RNA(single-stranded RNA, ssRNA)及其降解产物，激活下游的髓样分化因子88(myeloid differentiation marker 88, MyD88)，从而进一步激活下游NF-κB核转录因子(nuclear transcription factor-κB, NF-κB)，诱导产生多种促炎细胞因子(如IL-1β、IL-6、IL-12)，并且刺激适应性免疫反应的发生^[13,14]，如图2A所示。另一方面，mRNA体外转录过程中会产生多种RNA副产物，宿主细胞的PRRs能够识别大量外源性mRNA及其副产物，过度刺激IFN- I 分泌，诱导严重的炎

症反应，产生有害的先天免疫反应；同时，dsRNA或其他RNA配体可以激活蛋白激酶R(protein kinase R, PKR)，使其发生自磷酸化反应并且磷酸化真核起始因子2-α(eukaryotic initiation factor 2-α, eIF2α)，从而阻断mRNA翻译，降低蛋白质表达，并且导致不受控制的炎症性疾病或自身免疫性疾病^[15,16]。为了避免宿主细胞识别、攻击外源性mRNA，通常可通过对外源性mRNA进行核苷酸修饰和纯化等方法来降低先天免疫反应的过度激活，使先天免疫应答与蛋白质表达维持在平衡状态。研究发现，对外源性RNA的核苷酸进行全部修饰可显著降低RNA诱导的免疫反应^[17]。

生物体中天然存在核苷酸修饰的RNA超过100种，而且，哺乳动物细胞比细菌含有更广泛的核苷酸修饰的mRNA。mRNA核苷酸修饰主要包括甲基化修饰，如可将天然腺苷替换为N6-甲基腺苷，天然胞苷替换为5-甲基胞苷，天然尿苷替换为假尿苷、N1-甲基假尿苷或5-甲氧基尿苷等^[18]。这种核苷酸修饰并不影响mRNA的翻译。研究发现，N6-

甲基腺苷能以不依赖真核起始因子4E识别的方式促进mRNA翻译^[19]。Karikó等^[20]研究了尿苷、腺苷和胞苷的不同修饰类型,结果发现,只有尿苷修饰可以避免RNA激活树突状细胞。后续,Karikó等^[21]通过体外转录制备尿苷修饰的mRNA并评估其翻译蛋白的效率,结果表明,携带假尿苷修饰的mRNA翻译蛋白产量是未经修饰的mRNA翻译蛋白产量的10倍;将编码荧光素酶(luciferase, Luc)的mRNA经静脉注射到小鼠体内4 h后,发现携带假尿苷mRNA翻译的Luc的水平比未修饰的mRNA高12倍;免疫小鼠6 h后血清细胞因子检测结果显示,未修饰的mRNA诱导产生的血清IFN- α 水平比携带假尿苷修饰的mRNA诱导产生的血清IFN- α 水平高3倍左右。这些结果表明,假尿苷修饰可以明显降低mRNA诱导的炎症反应,增强其稳定性和翻译效率。Melamed等^[22]研究发现,携带N1-甲基假尿苷修饰的mRNA与未修饰的mRNA相比,其总蛋白表达量升高了15倍。SARS-CoV-2 mRNA疫苗的临床试验数据也支持这一结果:使用N1-甲基假尿苷替换尿苷的辉瑞/BioNTech BNT162b2疫苗和Moderna mRNA-1273疫苗在人群中诱导中和抗体产生的百分率分别为95.0%和94.1%。而未修饰核苷酸的CureVac mRNA疫苗诱导中和抗体产生的百分率只有48%^[23-25]。

Moradian等^[26]在体外转录中分别添加不同的假尿苷(假尿苷或N1-甲基假尿苷或5-甲氧基尿苷)或5-甲基胞苷或假尿苷联合5-甲基胞苷,结果发现,与仅添加假尿苷转录mRNA相比,联合添加假尿苷和5-甲基胞苷转录产生mRNA的过程中dsRNA的含量可以下降了五分之四左右;而添加5-甲氧基尿苷或N1-甲基假尿苷转录产生mRNA的过程中几乎不产生dsRNA;其次,携带5-甲氧基尿苷的mRNA比携带其他不同修饰型核苷的mRNA表达的蛋白质产量至少高一倍以上,并且几乎不刺激巨噬细胞产生炎症细胞因子。

4 提高mRNA疫苗稳定性和翻译效率的策略

非复制性mRNA包含5'cap、UTR、ORF以及poly(A)尾等结构。各个部分结构优化能够增强递送mRNA的稳定性,同时提高mRNA翻译的准确性和效率。这对于mRNA疫苗成功发挥作用至关

重要。

4.1 5'cap结构设计策略

mRNA的5'cap主要有三种类型:cap-0(m7GpppNp)、cap-1(m7GpppN1mp)和cap-2(m7GpppN1mpN2mp)。天然真核细胞mRNA的5'cap为cap-0结构,是N7-甲基鸟苷(m7G)通过5'-5'-三磷酸桥(m7GpppN)与mRNA 5'核苷酸相连,cap-0结构可保护mRNA不被5'-3'核糖核酸外切酶降解,并被真核细胞起始因子4E特异性识别以启动蛋白质翻译过程。cap-1和cap-2结构是基于cap-0结构的第一转录核苷酸或第一及第二转录核苷酸的核糖的2'-O-甲基化修饰而成的^[27]。将天然形成的cap-0结构甲基化修饰为能够逃避先天免疫反应识别的cap-1或cap-2结构,可以减少PRRs对外源mRNA的识别,从而抑制IFN信号通路的激活,提高体内mRNA的翻译效率^[28]。目前,对体外转录产生的RNA加帽方法主要包括两种:一种是转录后加入牛痘病毒加帽酶和2'-O-甲基转移酶进行酶法加帽^[29],另外一种是在体外转录过程中加入修饰帽类似物进行共转录加帽^[30]。

4.2 UTR结构设计策略

真核生物翻译通常依赖UTR区域的序列元件进行调控。5'UTR和3'UTR是mRNA序列两端存在的非编码区,其作用是调节mRNA的稳定性、翻译效率以及在细胞中的准确定位。5'UTR直接影响mRNA翻译的启动过程,因为该序列可以与翻译起始因子结合而介导含有5'cap结构的mRNA翻译起始,另外如果在ORF起始密码子AUG之前添加GCCACC序列可以进一步提高蛋白质翻译效率;同时,5'UTR的上游序列设计要避免AUG的产生,以免出现错误启动影响mRNA翻译效率^[31];mRNA倾向于选择较短的3'UTR序列,因为过长的3'UTR序列中可能存在更多microRNA结合位点导致其被microRNA结合,从而降低mRNA的蛋白质表达^[32]。目前,体外转录的RNA中UTR序列主要选自高表达人源 α 珠蛋白和 β 珠蛋白基因的UTR^[33]。科学家已尝试采用高通量筛选方法或深度学习算法等策略优化UTR序列^[34]。

4.3 ORF序列设计策略

mRNA中ORF负责翻译目标蛋白。其中,密码子、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)含量、RNA二级结构等

都能够影响蛋白质翻译效率。研究发现, 提高mRNA序列中GC含量可以提高mRNA的稳定性^[35]。其次, 密码子优化可以促进翻译效率, 如将外源mRNA序列中的稀有密码子替换为常见同源tRNA较多的同义密码子并且使其更接近脊椎动物密码子, 可以提高该mRNA在脊椎动物细胞中翻译蛋白质的效率^[36]。最后, 利用算法来优化mRNA序列, 使其在体内形成稳定二级结构延长mRNA的半衰期从而提高目标蛋白表达量^[37]。

4.4 poly(A)尾结构设计策略

poly(A)尾通常是由重复的A组成的序列, poly(A)尾会保护mRNA不被RNA酶降解。poly(A)尾长度对mRNA翻译非常重要, 一般来说, poly(A)尾的长度应该在100 nt以上^[12]; 而且, 设计分段的poly(A)尾可以防止碱基丢失导致poly(A)序列变短以及mRNA衰变的产生^[34]。目前, 对体外转录产生的RNA加poly(A)尾主要有两种策略: 第一种是在体外转录产物中加入poly(A)聚合酶进行加尾反应, 但是其产生的poly(A)序列长度不可控, 而影响后续mRNA的质量控制过程; 另一种是在设计质粒模板序列时加入特定长度的A序列或混合其他核苷酸的A序列, 通过质粒模板体外共转录过程一步合成^[38,39]。

5 mRNA的递送系统

由于mRNA存在易被RNA酶降解、与细胞膜同带负电相互排斥、难以自由扩散入膜等难题, 需要开发mRNA递送技术保护其顺利穿过细胞膜进入细胞质。此外, 由于病毒载体递送系统存在插入诱变等潜在安全问题, 而非病毒载体安全性高并且生产简单, 所以本文仅针对非病毒递送方法进行讨论。到目前为止, 非复制型mRNA疫苗按递送方式不同主要分为基于脂质、聚合物、肽的载体型mRNA疫苗。

5.1 基于脂质的递送系统

阳离子脂质体(liposome, LP)是应用最早的递送mRNA的脂质载体, 如1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)和二油酰磷脂酰乙醇胺(dioleoyl phosphatidyl ethanolamine, DOPE)^[40]。LP是由具有极性头部基团和非极性尾部的磷脂与胆固醇自发

组成的球形囊泡结构。粒径大小为20~200 nm, 具有良好的长期储存稳定性, 能够以靶向方式高效浓缩核酸, 此外, 通过改变阳离子脂质体的理化性质可以提高其在体内的递送效率, 如调整粒径大小、修饰阳离子脂质体表面等^[41]。阳离子脂质因具有带正电荷的胺而有助于将带负电荷的mRNA封装, 但是由于阳离子脂质具有促凋亡和促炎症反应且循环半衰期较短, 且可能会与胞内带负电荷的成分非特异性结合, 因此通常要对其进行修饰, 以提高mRNA-脂质体复合物的稳定性, 减轻毒性并延长其作用时间^[42]。

Huang等^[43]评估了阳离子脂质体递送编码SARS-CoV-2刺突蛋白受体结合域(receptor-binding domain, RBD)的mRNA的效率。研究人员采用薄膜分散法将DOTAP氯化物和胆固醇制备成LP, 然后再与编码RBD的mRNA混合形成mRNA-阳离子脂质体。研究人员比较了五种不同注射途径(静脉、肌肉、皮下、皮内、腹腔)接种小鼠诱导免疫效应情况。结果显示: 除肌肉注射途径外, 通过其他四种注射途径完成三剂接种的小鼠产生的血清抗体可以有效中和SARS-CoV-2假病毒, 其50%噬斑减少中和实验(50% plaque reduction neutralization test, PRNT₅₀)滴度为1:100~1:200。该mRNA-阳离子脂质体不会引起明显的全身毒性反应。因此, 脂质体递送mRNA非常高效, 但容易受到给药途径的影响。

目前, 研究人员也开发了一些新型的基于脂质递送系统的mRNA疫苗, 其中, 脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)递送载体应用最为广泛。LNP主要由可电离的阳离子脂质、中性辅助磷脂、胆固醇和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的脂质组成, 其可封装mRNA, 如图3所示。

递送mRNA的载体开发的关键原则在于递送载体的生物物理特性, 不同递送系统的生物物理特性决定其递送效率, 其中, 载体粒径的大小和均一性是决定其质量控制的初始因素。基于LNP载体递送的mRNA是具有电子致密核心的球体结构^[44]。LNP制剂大小会影响细胞摄取, 进而影响药物的免疫效果。非人灵长类动物研究结果表明: 颗粒粒径大小在60~150 nm之间的mRNA-LNP诱导产生的免疫原性没有显著性差异^[45]。多分散性指数

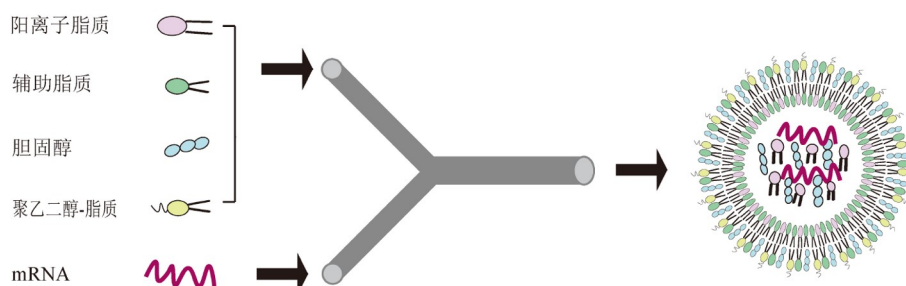


图3 mRNA-脂质纳米颗粒结构

(polydispersity index, PDI)是用来描述聚合物的相对分子质量分布, PDI越大, 相对分子质量分布越宽; PDI越小, 相对分子质量分布越均匀。PDI大小会影响药物与机体的相互作用, PDI较大的颗粒更容易聚集和沉淀, PDI较小的颗粒大小分布更加均匀, LNP制剂的PDI应低于0.2^[46]。此外, LNP制剂的表面电荷也会影响其递送效率, 阴离子LNP会被带负电荷的细胞膜静电排斥, 而阳离子LNP具有细胞毒性, LNP的表面电荷通过Zeta电位来评估, Zeta电位的绝对值一般不超过20 mV表示电荷较弱, 并且可通过调节可电离脂质中的氮(nitrogen, N)含量与核酸中的磷酸(phosphoric acid, P)含量的比值调节表面电荷和包封效率。如Kim等^[47]将四种脂质(可电离的阳离子脂质、中性辅助磷脂、胆固醇和PEG修饰的脂质)按摩尔比为50.0:10.0:38.5:1.5先混合均匀, 再与mRNA水溶液以3:1的N/P比通过高流速微流控方法自组装形成粒径在100~130 nm、PDI小于0.2、Zeta电位绝对值小于6 mV、封装效率大于90%的mRNA-LNP。

与阳离子脂质相比, 可电离的阳离子脂质无明显的全身毒性, 并且在细胞内体的酸性环境中质子化后带正电荷, 导致内体膜破裂, 使得mRNA释放到细胞质中^[48]。Alameh等^[49]的研究表明, 可电离的阳离子脂质是LNP发挥作用的关键成分。研究人员将重组表达的甲型流感病毒血凝素(hemagglutinin recombinant protein, rHA)与含有或不含可电离阳离子脂质的LNP混合后免疫小鼠4周, 小鼠血清血凝抑制(hemagglutination inhibition, HAI)实验结果表明, 含可电离脂质的LNP与rHA的混合物(rHA-LNP)诱导产生的HAI平均滴度约为1:512, 而不含可电离脂质的rHA-LNP免疫的小鼠血清中检测不到HAI滴度。除可电离阳离子脂质外, 其他三种

成分在稳定LNP结构以及mRNA递送过程中也不可或缺: 胆固醇是一种天然脂质, 它可以填充脂质空隙稳定LNP的结构并且促进LNP与细胞膜融合^[50]; 中性辅助磷脂可以调节LNP的流动性以促进LNP与内体融合^[51]; PEG修饰的脂质影响LNP的大小, 其含量与LNP的颗粒大小成反比, 并且PEG修饰的脂质可以覆盖在LNP的表面形成亲水层, 从而减少LNP被单核吞噬系统细胞的摄取, 延长LNP在血浆的半衰期^[52]。但是, PEG修饰的脂质也具有激活补体、与体内预先存在的抗PEG抗体结合介导超敏反应等不良反应^[53,54]。Ju等^[55]分别检测了接种辉瑞/BioNTech的BNT162b2 mRNA疫苗或Moderna的mRNA-1273疫苗的健康人群的血清PEG特异性抗体水平, 结果显示, 与未免疫人群血清相比, 疫苗接种者血清中抗PEG的免疫球蛋白G (Immunoglobulin G, IgG)水平分别增加了1.78倍和13.1倍; 抗PEG IgM水平分别增加了2.64倍和68.5倍。这表明mRNA-LNP疫苗接种可以增强PEG特异性抗体。

为了降低PEG引起的不良反应, Nogueira等^[56]将一种由内源性氨基酸肌氨酸的重复单元制成的多肽脂质聚肌氨酸(polysarcosine, pSar)代替PEG修饰的脂质合成LNP来递送mRNA, 小动物活体成像实验结果表明, 含有23个肌氨酸链长度和不同摩尔分数(2.5%、5.0%和10.0%)的mRNA-pSar-LNP免疫小鼠的肝脏和脾脏中高表达目标蛋白; 其次, 将mRNA-PEG-LNP和mRNA-pSar₂₃-LNP多次免疫小鼠4周后, 结果显示: mRNA-pSar₂₃-LNP免疫小鼠血清中丙氨酸转氨酶、天门冬氨酸转氨酶、乳酸脱氢酶和炎症细胞因子(IL-1 β 、IL-6和IL-8)的水平比mRNA-PEG-LNP免疫小鼠血清中的水平低一倍左右, 提示含有pSar₂₃的LNP具有较低的细胞毒

性, 且更能高效递送mRNA。Li等^[57]也开发了一种无PEG脂质的双组分mRNA疫苗平台, 其递送系统是由一种类脂化合物tB-UC18和辅助脂质DOPE组成的二元脂质纳米复合物(lipid-like nanoassemblies, LLN)。该类型疫苗mRNA-LLN免疫小鼠4周后, 小鼠血清中的病毒中和抗体滴度(50% neutralization titer, NT₅₀)约为100。尤为重要的是, 高剂量mRNA-LLN免疫小鼠也不会过度激活补体, 表现为小鼠血清中过敏毒素补体(complement, C)成分C3a和C5a没有显著升高。这些结果表明, mRNA-LLN免疫小鼠能诱导高效的免疫反应, 而不会产生强烈的不良反应。

Wang等^[58]开发了非阳离子硫脲脂质纳米颗粒(noncationic thiourea lipid nanoparticle, NC-TNP), 其通过硫脲基团与mRNA的磷酸基团之间的强氢键相互作用来结合mRNA, 取代了传统LNP中依赖阳离子脂质静电相互作用来结合mRNA的技术。与传统LNP的四种成分相比, NC-TNP仅由非阳离子硫脲脂质和胆固醇组成, 因而其制备更加便捷; 将mRNA-NC-TNP和mRNA-LNP分别转染细胞48 h后, 研究人员发现, mRNA-NC-TNP转染组蛋白表达量比mRNA-LNP转染组蛋白表达量高1倍左右; 将不同离子化的LNP(含阳离子脂质或含可电离阳离子脂质)和NC-TNP分别经静脉注射到小鼠体内, 结果显示, 含阳离子脂质的LNP或含可电离阳离子脂质的LNP都能导致小鼠血清中炎症细胞因子(IL-1 β 、IL-6和IL-10)显著升高, 而NC-TNP诱导的炎症反应可以忽略不计, 该结果提示, NC-TNP的生物安全性更高; 此外, 将mRNA-LNP和mRNA-NC-TNP分别经静脉注射小鼠24 h后, 离体肝脏、脾脏荧光成像结果显示: 在肝脏中, mRNA-LNP诱导产生的蛋白质表达量是mRNA-NC-TNP诱导产生的蛋白质表达量的2倍以上; 而在脾脏中, mRNA-NC-TNP诱导产生的蛋白质表达量是mRNA-LNP诱导产生的蛋白质表达量的2倍左右。因此, 与LNP相比, NC-TNP靶向脾脏递送mRNA的能力更强。

5.2 基于聚合物的递送系统

聚合物是一组连接重复的化学单元构建而成的大分子化合物, 聚合物种类多样, 生产过程仅需要与mRNA混合即可, 制备简单, 并且聚合物具有

良好的亲水性和生物相容性等优点。聚合物包括阳离子聚合物和阴离子聚合物, 其中, 阳离子聚合物因带正电荷更易通过静电作用结合带负电荷的mRNA形成复合物, 代表性的阳离子聚合物有乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)、聚酯、聚氨基酸、葡聚糖或树枝状聚合物等^[59]。将一种或多种过量阳离子聚合物与mRNA通过静电作用混合, 能够形成具有不同组成和结构的球形纳米颗粒。聚合物的结构决定了其性质和mRNA递送效率, 研究人员发现, 粒径小于200 nm的聚合物纳米颗粒容易逃脱网状内皮系统的识别, 从而延长血液系统中聚合物纳米颗粒的半衰期^[60]。与LNP载体相比, 高密度的阳离子聚合物容易导致高细胞毒性, 降低mRNA的递送效率。研究发现, 体积较小、电荷密度偏低的聚合物具有较低的细胞毒性, 更适用于递送mRNA^[61]。调节聚合物的化学结构可以改变聚合物载体转染mRNA的效率^[59]。适当提高聚合物的疏水性可以促进聚合物组装, 在生理条件下通过疏水间相互作用提高聚合物纳米颗粒的稳定性^[62], 从而提高mRNA转染效率。而且, 用于递送mRNA的拓扑结构包括线性、支链结构等, 控制拓扑结构是调整聚合物特性和优化mRNA递送效率的重要策略, 如代表性支链聚合物之一是具有球形结构和高度规则支链的树枝状聚合物, 已被证明可有效递送mRNA^[63]。此外, 还可以通过调节聚合物纳米颗粒的组成、比例和组装结构来增强mRNA递送效率, 聚(D,L-丙交酯-co-乙交酯)[poly(D,L-lactide-co-glycolide), PLGA]是一种可生物降解的阳离子聚合物, 具有生物降解性、生物相容性和易于改性的优势。研究人员将PLGA和PEI共组装成聚合物纳米颗粒递送mRNA进入细胞, 结果表明, PLGA/PEI mRNA-NP的包膜对未成熟的单核细胞来源的树突状细胞没有毒性作用, 并且能够将体外转录的mRNA递送至人单核细胞衍生的树突状细胞中^[64]。

此外, 为了避免聚合物高细胞毒性, 一些研究利用带正电荷的葡聚糖和聚(β -氨基酯)[poly(β -aminoester), PBAE]等作为核酸递送载体, 葡聚糖和PBAE都具有生物降解性和低毒性等优点^[65,66]。Karpenko等^[67]评估了葡聚糖-亚精胺复合物(polyglucin-spermidine, PGS)和脂质体3000(一种市

售的脂质体,作为对照)两种载体分别递送SARS-CoV-2 RBD mRNA的细胞毒性,结果显示,mRNA-RBD-PGS复合物和mRNA-RBD-脂质体3000的细胞半数中毒浓度(concentration of cytotoxicity 50%, CC50)分别为625 $\mu\text{g/mL}$ 和20.4 $\mu\text{g/mL}$,提示PGS作为核酸递送载体具有较低的细胞毒性。动物实验结果表明:与mRNA-RBD免疫小鼠产生的抗体相比,mRNA-RBD-PGS复合物免疫小鼠产生的血清SARS-CoV-2 RBD特异性IgG抗体平均滴度增加了100倍左右,上述结果证明了PGS载体具有较高的安全性和递送效率。Cao等^[68]将PBAE、DOTAP、DOPE、胆固醇和PEG修饰的脂质混合组成了五元纳米颗粒(five-element nanoparticle, FNP)。传统LNP的热稳定性较差,需要在低温环境中运输和储存,增加了疫苗的经济成本,相比之下,在该FNP中,聚合物PBAE可以通过其侧链与其他脂质成分的脂肪族链相互作用,从而增强颗粒内的疏水力,提高FNP的稳定性。研究人员发现,冻干的FNP制剂在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下能稳定储存至少6个月。此外, Rotolo等^[69]也证实,含氨基硫醇的PBAE聚合物载体能通过雾化器将mRNA高效递送到不同动物(小鼠、仓鼠、雪貂、奶牛和恒河猴)的肺部。

5.3 基于肽的递送系统

除了脂质和聚合物以外,肽也能用于递送mRNA,其中,肽因依赖带阳离子的氨基酸残基(如精氨酸或赖氨酸)可以与带负电荷的mRNA以静电作用方式结合,形成粒径小于200 nm的球形复合物。肽具有单分散性,表明其复合物的粒径分布均一。鱼精蛋白是由30~50个氨基酸组成的天然阳离子肽,其因富含精氨酸而带正电荷,鱼精蛋白本身具有佐剂样作用,以及良好的生物相容性和高递送效率。研究人员将鱼精蛋白与mRNA按照3:1浓度比进行等体积混合,动态光散射表征结果发现,mRNA-鱼精蛋白复合物的粒径大小接近100 nm,并且mRNA-鱼精蛋白复合物可以自发地进入内体并刺激TLR,从而允许免疫细胞产生I型干扰素,诱导先天免疫反应的发生^[70-72]。Schnee等^[73]评估了鱼精蛋白递送编码狂犬病病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RABV-G) mRNA的能力。研究人员用RABV-G mRNA-鱼精蛋白混合物

和Rabipur疫苗(一种获批的灭活狂犬病疫苗,作为对照)分别免疫小鼠,荧光抗体病毒中和实验(fluorescent antibody virus neutralization test, FAVN)结果发现,两组免疫的小鼠血清中病毒中和滴度均大于10 IU/mL;将RABV-G mRNA-鱼精蛋白混合物和乳酸钠林格缓冲液(一种复方氯化钠注射液,作为对照)分别免疫成年猪8周后,血清中RABV-G特异性中和抗体平均滴度为2.9 IU/mL,而对照组的平均滴度低于0.1 IU/mL。这些结果表明,鱼精蛋白能够高效地将mRNA递送到小鼠和猪体内,诱导抗体反应。

此外, Sugimoto等^[74]发现,一种新型细胞穿透性肽(cell-penetrating peptide, CPP)与LNP结合可以更高效地递送mRNA。研究人员首先将带负电荷的谷氨酸(E)和带正电荷的赖氨酸(K)构建出重复序列KK-(EK)₄多肽,然后将其与一种炔烃标记的脂质组成KK-(EK)₄-脂质衍生物,将KK-(EK)₄-脂质衍生物与可电离的阳离子脂质、中性辅助磷脂、胆固醇、PEG修饰的脂质和mRNA自组装成mRNA-LNP。CPP具有高分散性和易溶解的优点,其与细胞膜结合时,多肽序列能够增强膜转位,进而使CPP内化进入细胞,从而更有利于将mRNA释放到细胞质。该细胞实验结果表明, KK-(EK)₄-脂质修饰的mRNA-LNP组细胞中蛋白质表达量比未修饰的mRNA-LNP组细胞中蛋白质表达量高10倍以上。

综上所述,目前应用最成熟的mRNA递送技术仍是以LNP为代表的递送载体,同时,基于脂质、聚合物、肽的更安全高效的新型mRNA非病毒递送平台正在成为当前的研究热点^[75]。除上述有机合成纳米载体外,目前也有一些仍处于早期阶段的无机纳米材料如二氧化硅纳米颗粒等被用于mRNA疫苗的递送研究^[76]。

6 总结与展望

本文综述了近年来非复制型mRNA的结构设计、核苷酸修饰和递送载体等方面的研究。其中,以LNP为代表的各种设计策略正在不断改进和创新。这些策略已经在动物实验中表现出明显的优势,使其在新型mRNA疫苗的制备中受到青睐。不可否认,近年来mRNA疫苗已成为疾病防治的热

点, 在基础研究和临床试验中占据了主导地位。然而, 目前除SARS-CoV-2以外的其他疾病的mRNA疫苗的临床试验还处于早期阶段, 并且还需要进一步消除mRNA疫苗在基础疾病人群中可能引起的不良反应。未来mRNA疫苗技术需要进一步优化才能更加成熟, 总之, mRNA疫苗有望成为对抗未来更多传染性疾病乃至肿瘤防治中的关键武器。

参考文献

- [1] Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 1961, 190(4776): 576-581
- [2] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247 (4949): 1465-1468
- [3] Kim J, Eygeris Y, Gupta M, et al. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv Drug Deliver Rev*, 2021, 170: 83-112
- [4] Tai W, Zhang X, Drelich A, et al. A novel receptor-binding domain (RBD)-based mRNA vaccine against SARS-CoV-2. *Cell Res*, 2020, 30(10): 932-935
- [5] Ishack S, Lipner SR. Bioinformatics and immunoinformatics to support COVID-19 vaccine development. *J Med Virol*, 2021, 93(9): 5209-5211
- [6] Probst J, Weide B, Scheel B, et al. Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA *in vivo* is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther*, 2007, 14(15): 1175-1180
- [7] Wang Q, Song Z, Yang J, et al. Transcriptomic analysis of the innate immune signatures of a SARS-CoV-2 protein subunit vaccine ZF2001 and an mRNA vaccine RRV. *Emerging Microbes Infects*, 2022, 11(1): 1145-1153
- [8] Gebre MS, Rauch S, Roth N, et al. Optimization of non-coding regions for a non-modified mRNA COVID-19 vaccine. *Nature*, 2022, 601(7893): 410-414
- [9] Tsui NB, Ng EK, Lo YD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*, 2002, 48(10): 1647-1653
- [10] Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 2017, 543(7644): 248-251
- [11] Li C, Lee A, Grigoryan L, et al. Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. *Nat Immunol*, 2022, 23(4): 543-555
- [12] Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, et al. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response. *Trends Mol Med*, 2020, 26(3): 311-323
- [13] Chen N, Xia P, Li S, et al. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *IUBMB Life*, 2017, 69(5): 297-304
- [14] Wei L, Dong C, Zhu W, et al. mRNA vaccine nanoplat-forms and innate immunity. *Viruses*, 2024, 16(1): 120
- [15] Verbeke R, Hogan MJ, Loré K, et al. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity*, 2022, 55(11): 1993-2005
- [16] Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(17): 5884-5892
- [17] Harcourt EM, Kietrys AM, Kool ET. Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature*, 2017, 541(7637): 339-346
- [18] Fisher AJ, Beal PA. Structural basis for eukaryotic mRNA modification. *Curr Opin Struct Biol*, 2018, 53: 59-68
- [19] Akichika S, Hirano S, Shichino Y, et al. Cap-specific terminal N⁶-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*, 2019, 363 (6423): eaav0080
- [20] Karikó K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA Recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 2005, 23(2): 165-175
- [21] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 2008, 16(11): 1833-1840
- [22] Melamed JR, Hajj KA, Chaudhary N, et al. Lipid nanoparticle chemistry determines how nucleoside base modifications alter mRNA delivery. *J Control Release*, 2022, 341: 206-214
- [23] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383(27): 2603-2615
- [24] Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 384(5): 403-416
- [25] Kremsner PG, Ahuad Guerrero RA, Arana-Arri E, et al. Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(3): 329-340
- [26] Moradian H, Roch T, Anthofer L, et al. Chemical modification of uridine modulates mRNA-mediated proinflammatory and antiviral response in primary human macrophages. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 27: 854-869
- [27] Senthilvelan A, Vonderfecht T, Shanmugasundaram M, et

- al. Trinucleotide cap analogue bearing a locked nucleic acid moiety: synthesis, mRNA modification, and translation for therapeutic applications. *Org Lett*, 2021, 23(11): 4133-4136
- [28] Drazkowska K, Tomecki R, Warminski M, et al. 2'-O-methylation of the second transcribed nucleotide within the mRNA 5' cap impacts the protein production level in a cell-specific manner and contributes to RNA immune evasion. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(16): 9051-9071
- [29] Viswanathan T, Arya S, Chan SH, et al. Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3718
- [30] Starostina EV, Sharabrin SV, Antropov DN, et al. Construction and immunogenicity of modified mRNA-vaccine variants encoding influenza virus antigens. *Vaccines*, 2021, 9(5): 452
- [31] Xia X. Detailed dissection and critical evaluation of the pfizer/bioNTech and moderna mRNA vaccines. *Vaccines*, 2021, 9(7): 734
- [32] Kirshina A, Vasileva O, Kunyk D, et al. Effects of combinations of untranslated-region sequences on translation of mRNA. *Biomolecules*, 2023, 13(11): 1677
- [33] Weissman D. mRNA transcript therapy. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(2): 265-281
- [34] Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 824-836
- [35] Kudla G, Lipinski L, Caffin F, et al. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells. *PLoS Biol*, 2006, 4(6): e180
- [36] Wu X, Shan K, Zan F, et al. Optimization and deoptimization of codons in SARS-COV-2 and related implications for vaccine development. *Adv Sci*, 2023, 10(23): e2205445
- [37] Zhang H, Zhang L, Lin A, et al. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity. *Nature*, 2023, 621(7978): 396-403
- [38] Xiong Q, Lee GY, Ding J, et al. Biomedical applications of mRNA nanomedicine. *Nano Res*, 2018, 11(10): 5281-5309
- [39] Li CY, Liang Z, Hu Y, et al. Cytidine-containing tails robustly enhance and prolong protein production of synthetic mRNA in cell and *in vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 30: 300-310
- [40] Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(16): 6077-6081
- [41] Gkionis L, Aojula H, Harris LK, et al. Microfluidic-assisted fabrication of phosphatidylcholine-based liposomes for controlled drug delivery of chemotherapeutics. *Int J Pharm*, 2021, 604: 120711
- [42] Cui S, Wang Y, Gong Y, et al. Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. *Toxicol Res*, 2018, 7(3): 473-479
- [43] Huang H, Zhang C, Yang S, et al. The investigation of mRNA vaccines formulated in liposomes administrated in multiple routes against SARS-CoV-2. *J Control Release*, 2021, 335: 449-456
- [44] Trollmann MFW, Böckmann RA. mRNA lipid nanoparticle phase transition. *Biophys J*, 2022, 121(20): 3927-3939
- [45] Hassett KJ, Higgins J, Woods A, et al. Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity. *J Control Release*, 2021, 335: 237-246
- [46] Schober GB, Story S, Arya DP. A careful look at lipid nanoparticle characterization: analysis of benchmark formulations for encapsulation of RNA cargo size gradient. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 2403
- [47] Kim J, Jozic A, Sahay G. Naturally derived membrane lipids impact nanoparticle-based messenger RNA delivery. *Cell Mol Bioeng*, 2020, 13(5): 463-474
- [48] Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(12): 1078-1094
- [49] Alameh MG, Tombácz I, Bettini E, et al. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity*, 2021, 54(12): 2877-2892.e7
- [50] Pattnaik GP, Chakraborty H, et al. Cholesterol: a key player in membrane fusion that modulates the efficacy of fusion inhibitor peptides. *Vitam Horm*, 2021, 117: 133-155
- [51] Cheng X, Lee RJ. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, 99: 129-137
- [52] Zalba S, ten Hagen TLM, Burgui C, et al. Stealth nanoparticles in oncology: facing the PEG dilemma. *J Control Release*, 2022, 351: 22-36
- [53] Mouri M, Imamura M, Suzuki S, et al. Serum polyethylene glycol-specific IgE and IgG in patients with hypersensitivity to COVID-19 mRNA vaccines. *Allergol Int*, 2022, 71(4): 512-519
- [54] Chen WA, Chang DY, Chen BM, et al. Antibodies against poly(ethylene glycol) activate innate immune cells and induce hypersensitivity reactions to pegylated nanomedicines. *ACS Nano*, 2023, 17(6): 5757-5772
- [55] Ju Y, Lee WS, Pilkington EH, et al. Anti-peg antibodies boosted in humans by SARS-COV-2 lipid nanoparticle mRNA vaccine. *ACS Nano*, 2022, 16(8): 11769-11780

- [56] Nogueira SS, Schlegel A, Maxeiner K, et al. Polysarcosine-functionalized lipid nanoparticles for therapeutic mRNA delivery. *ACS Appl Nano Mater*, 2020, 3(11): 10634-10645
- [57] Li M, Huang Y, Wu J, et al. A PEG-lipid-free COVID-19 mRNA vaccine triggers robust immune responses in mice. *Mater Horiz*, 2023, 10(2): 466-472
- [58] Wang C, Zhao C, Wang W, et al. Biomimetic noncationic lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(51): e2311276120
- [59] Jiang Y, Gaudin A, Zhang J, et al. A “top-down” approach to actuate poly(amine-co-ester) terpolymers for potent and safe mRNA delivery. *Biomaterials*, 2018, 176: 122-130
- [60] Kulkarni SA, Feng SS. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharm Res*, 2013, 30(10): 2512-2522
- [61] Huang P, Deng H, Zhou Y, et al. The roles of polymers in mRNA delivery. *Matter*, 2022, 5(6): 1670-1699
- [62] Solomun JI, Cinar G, Mapfumo P, et al. Solely aqueous formulation of hydrophobic cationic polymers for efficient gene delivery. *Int J Pharm*, 2021, 593: 120080
- [63] Cheng Q, Wei T, Jia Y, et al. Dendrimer-based lipid nanoparticles deliver therapeutic FAH mRNA to normalize liver function and extend survival in a mouse model of hepatorenal tyrosinemia type I. *Adv Mater*, 2018, 30(52): e1805308
- [64] Sharifnia Z, Bandehpour M, Hamishehkar H, et al. *In-vitro* transcribed mRNA delivery using plga/pei nanoparticles into human monocyte-derived dendritic cells. *Iran J Pharm Res*, 2019, 18(4): 1659-1675
- [65] Patel AK, Kaczmarek JC, Bose S, et al. Inhaled nanoformulated mRNA polyplexes for protein production in lung epithelium. *Adv Mater*, 2019, 31(8): e1805116
- [66] Chen F, Huang G, Huang H. Preparation and application of dextran and its derivatives as carriers. *Int J Biol Macromolecules*, 2020, 145: 827-834
- [67] Karpenko LI, Rudometov AP, Sharabrin SV, et al. Delivery of mRNA vaccine against SARS-COV-2 using a polyglucin: spermidine conjugate. *Vaccines*, 2021, 9(2): 76
- [68] Cao Y, He Z, Chen Q, et al. Helper-polymer based five-element nanoparticles (FNPs) for lung-specific mRNA delivery with long-term stability after lyophilization. *Nano Lett*, 2022, 22(16): 6580-6589
- [69] Rotolo L, Vanover D, Bruno NC, et al. Species-agnostic polymeric formulations for inhalable messenger RNA delivery to the lung. *Nat Mater*, 2023, 22(3): 369-379
- [70] Tusup M, Pascolo S. Generation of immunostimulating 130nm protamine-RNA nanoparticles. *Methods Mol Biol*, 2017, 1499: 155-163
- [71] Jarzebska NT, Lauchli S, Iselin C, et al. Functional differences between protamine preparations for the transfection of mRNA. *Drug Deliver*, 2020, 27(1): 1231-1235
- [72] Petsch B, Schnee M, Vogel AB, et al. Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(12): 1210-1216
- [73] Schnee M, Vogel AB, Voss D, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(6): e0004746
- [74] Sugimoto Y, Suga T, Umino M, et al. Investigation of enhanced intracellular delivery of nanomaterials modified with novel cell-penetrating zwitterionic peptide-lipid derivatives. *Drug Deliver*, 2023, 30(1): 2191891
- [75] Wang C, Pan C, Yong H, et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21(1): 272
- [76] Dong S, Feng Z, Ma R, et al. Engineered design of a mesoporous silica nanoparticle-based nanocarrier for efficient mRNA delivery *in vivo*. *Nano Lett*, 2023, 23(6): 2137-2147