PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2024, 51(9): 2115~2132
www.pibb.ac.cn

mRNA疫苗和药物：癌症免疫治疗的新宠儿*

未志盟[1,2)**] 党 生[2)**] 李光晨[3)] 高兰柱[3)] 翟景波[1,4,5)***]

([1)] 内蒙古民族大学医学院，通辽 028000；[2)] 内蒙古通辽市科尔沁区第一人民医院检验科，病理科，通辽 028000；
[3)] 通辽市传染病医院感染科，通辽 028000；[4)] 人兽共患病防控自治区高等学校重点实验室，通辽 028000；
[5)] 内蒙古自治区布鲁氏菌病防治工程技术研究中心，通辽 028000）

摘要 新型冠状病毒感染（corona virus disease 2019，COVID-19）mRNA疫苗成功研制，使得mRNA疫苗和药物成为癌症免疫治疗的一个有前途的平台。mRNA癌症疫苗和药物具有高效、安全、开发快速和经济成本低等优势。研究人员对mRNA疫苗的组成成分和递送载体进行了系统性优化，克服了其稳定性差、具有固有免疫原性和体内递送效率低等问题，使COVID-19 mRNA疫苗获批临床应用。尽管还没有mRNA癌症疫苗和药物获批临床应用，但是编码肿瘤抗原、治疗性抗体、细胞因子、肿瘤抑制因子、溶瘤病毒、CRISPR-Cas9、嵌合抗原受体（CAR）、T细胞受体（TCR）mRNA癌症疫苗和药物已经在临床前研究中显示出疗效，并且有一些已经进入临床试验。同时mRNA癌症疫苗和药物与检查点抑制剂联合应用，在临床试验中已取得显著有效的成果。本文对mRNA疫苗和药物的免疫机制、分类、修饰方法、递送系统、多种癌症疫苗和药物的临床应用现状和该领域当前挑战以及未来前景进行了综述，并期待mRNA癌症疫苗和药物尽快的应用于临床，使患者受益。

关键词 mRNA癌症疫苗和药物，免疫机制，分类，修饰方法，递送系统，临床应用
中图分类号 Q71 **DOI**：10.16476/j.pibb.2024.0009

每年约有1 000万人死于癌症，是人类死亡的主要原因之一[1]。寻找有效的癌症治疗方法一直是全球研究人员的主要目标，癌症疫苗和药物研发难度大，具有挑战性。免疫疗法已经成为癌症的主要治疗策略。免疫疗法的作用机制是利用免疫系统识别和破坏癌细胞，而mRNA疫苗和药物治疗癌症属于免疫疗法。由于新型冠状病毒感染（COVID-19）的大流行，使全球关注的焦点集中在mRNA疫苗和药物上。实际上，COVID-19 mRNA疫苗的快速研发和生产，得益于mRNA疫苗和药物多年来在癌症治疗的临床前和临床试验中的相关研究[2]。2020年，辉瑞/生物科技（Pfizer/BioNTech）的BNT162b2和莫德纳（Moderna）的mRNA-1273获批临床应用，这两款疫苗的有效率均达到90%以上，这是mRNA疫苗第一次获批临床应用[3]。mRNA疫苗和药物具有很多优势。a. mRNA的翻译发生在细胞质中，很容易被人体降解，不会在体内积累，并且因其不进入细胞核，所以不存在基因组整合的风险[4]。b. mRNA疫苗和药物利用机体细胞生产蛋白质、无细胞培养、抗原提取与纯化等过程，降低了成本，提高了产能，同时避免病毒源性污染物引起的免疫原性和细胞毒性。c. mRNA疫苗和药物不具有传染性，翻译出的抗原在空间构象和修饰上与癌细胞表达的抗原高度一致，能刺激机体产生强烈的体液免疫和细胞免

* 国家自然科学基金（82160312），内蒙古自治区自然科学基金（2023MS08057）和内蒙古教育厅人兽共患病防控自治区高等学校重点实验室开放课题（MDK2023015，MDK2023017，MDK2023018）资助项目。
** 并列第一作者。
*** 通讯联系人。
Tel：0475-8314234，E-mail：jbzhai@imun.edu.cn
收稿日期：2024-01-05，接受日期：2024-04-26

疫[5]。d. mRNA疫苗和药物的技术平台可以一次性表达多种、任意蛋白质，适用于不同种类mRNA疫苗和药物的开发，减少成本并缩短了研发周期[6]。随着mRNA技术平台的成熟，解决mRNA稳定性、免疫原性及其如何有效地递送入细胞等问题，使得mRNA疫苗和药物成为预防和治疗癌症的一个非常有潜力的平台。为了提高疗效，mRNA疫苗和药物常常与其他免疫疗法一起联合应用。到目前为止，已有多种基于mRNA疫苗和药物的免疫疗法进入临床试验，并在实体肿瘤治疗中取得了一些成果。本文综述mRNA疫苗和药物的免疫机制、分类、修饰方法、递送系统和多种癌症疫苗和药物的临床应用现状，为癌症的mRNA疗法的研发提供参考。

1 mRNA的免疫机制

mRNA通过递送载体进入宿主细胞，利用细胞的蛋白质合成机制产生靶蛋白，从而引起固有性免疫和适应性免疫。mRNA疫苗和药物在肌肉、皮内或皮下进行注射，会转染4种类型的细胞：a. 注射部位的肌肉细胞和表皮细胞等非免疫细胞；b. 注射部位的树突状细胞和巨噬细胞等免疫细胞；c. 注射部位的mRNA疫苗和药物通过淋巴系统转移到临近的淋巴结或脾脏后，转染周围淋巴器官中的免疫细胞；d. 注射部位的mRNA疫苗和药物会通过组织液与血液的交换进入血液循环，到达周围组织器官如肝脏细胞和脾脏细胞等。然而其在肝脏细胞中表达量最高，这是因为可电离脂质纳米颗粒（lipid nanoparticles，LNP）进入血管后，LNP表面会形成蛋白冕，其本质是血清蛋白，含有丰富的载脂蛋白E（apolipoprotein E，APOE），与肝细胞表达的低密度脂蛋白受体（low density lipoprotein receptor，LDL-R）结合，所以LNP-mRNA在肝脏中含量高[7-9]。但是也有研究表明，LNP-mRNA通过肌注接种，其在肌肉细胞中含量最多，但是mRNA却很少，研究者认为出现这种现象是因为只有释放的mRNA可以被染色从而被检测到，而LNP内的mRNA则不能被染色，无法进行检测。说明肌肉组织中虽然有高水平的LNP-mRNA，但是mRNA释放很少，进而导致mRNA表达很少。但在肝脏中的LNP-mRNA含量虽然没有肌肉组织中多，但是mRNA的表达量却在所有组织器官中最多。因此，LNP-mRNA暴露量和mRNA表达不呈线性关系[9-10]。mRNA疫苗和药物引起免疫反应的具体机制如下：细胞内的靶蛋白作为内源性抗原被主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）I类分子提呈给CD8+T细胞，激活细胞免疫[11]。靶蛋白分泌到细胞外形成外源性抗原，其被MHC II类分子提呈给CD4+T细胞，辅助激活体液免疫。同时，外源性抗原被B细胞表面的BCR识别，在CD4+T细胞的辅助下激活体液免疫。mRNA作为病原体相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns，PAMPs）与固有免疫细胞表面的模式识别受体（pattern recognition receptors，PRRs）结合激活固有免疫反应。单链RNA（single-stranded RNA，ssRNA）作为配体激活Toll样受体（Toll-like receptor，TLR）7和TLR 8，双链RNA（double-stranded RNA，dsRNA）作为配体激活TLR3、蛋白激酶受体（protein kinase receptor，PKR）、寡腺苷酸合成酶（oligoadenylate synthetase，OAS）和黑色素瘤分化相关蛋白5（melanoma differentiation-associated protein 5，MDA-5）受体，从而激活固有免疫，产生I型干扰素（interferon，IFN）等细胞因子。I型IFN可以驱动抗原提呈细胞（antigen-presenting cells，APCs）活化和成熟，促进抗原提呈，引起强大的适应性免疫反应，起到佐剂作用，同时其可以激活PKR、OAS，降低mRNA的稳定性和翻译效率[7, 12]。如PKR被激活可以阻断mRNA翻译。OAS的激活，导致外源RNA降解[13]（图1）。因为dsRNA不利于mRNA的稳定和翻译，现在多用高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）去除dsRNA污染物，进行疫苗和药物纯化[14]。以下综述如何对mRNA各个结构组件进行修饰，来克服负向的免疫原性。

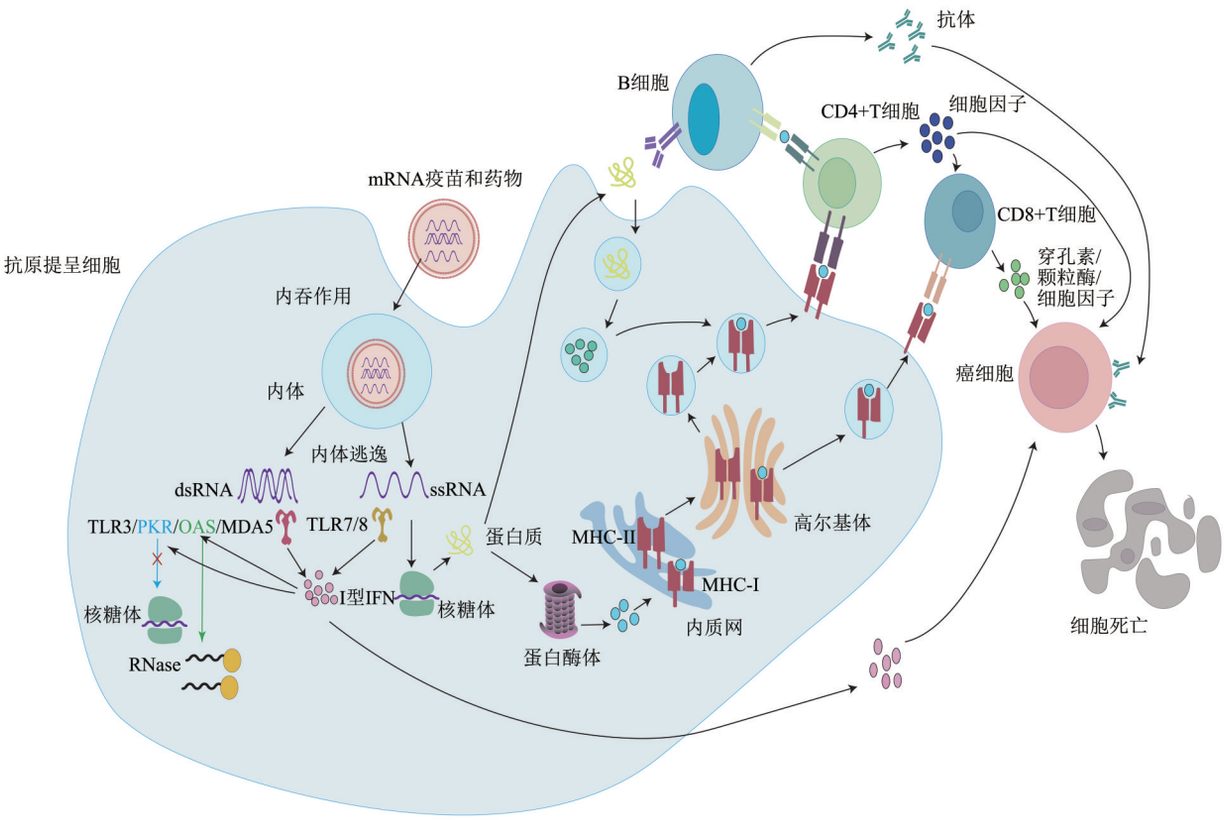


Fig. 1　The function mechanism of the mRNA vaccines and drugs

图1　mRNA疫苗和药物的作用机制

2　mRNA的分类

mRNA疫苗和药物主要分为非复制mRNA（non-replicating mRNA，nrmRNA）疫苗和药物、自扩增RNA（self-amplifying RNA，saRNA）疫苗和药物、反式扩增RNA（trans-amplifying RNA，taRNA）疫苗和药物，以及环状RNA（circular RNA，circRNA）疫苗和药物[15]。mRNA以含有靶抗原的线性DNA为模板，利用T3、T7或SP6噬菌体RNA聚合酶经体外转录（*in vitro* transcription，IVT）生成。

nrmRNA只传递编码靶抗原的遗传信息，不进行自我复制，在第**3**节对其进行具体综述[16]。

saRNA模仿甲病毒的复制特点，将编码目的基因（gene of interest，GOI）的序列和RNA聚合酶的序列组装在同一条线性mRNA中，以自身的RNA序列为模板，进行自我复制[17-18]。具体复制流程为：saRNA是对甲病毒进行改造，其基因组RNA中编码非结构蛋白的基因被保留下来，而在亚基因组启动子（subgenomic promoter，SGP）控制下的结构蛋白基因被GOI取代[18]。甲病毒非结构蛋白序列被翻译出非结构蛋白1（nonstructural protein 1，NSP1）、NSP2、NSP3和NSP4四个蛋白质组分，它们组装成RNA复制酶复合物。SGP可以启动GOI的转录。saRNA进入细胞，在RNA复制酶复合物的作用下，以正链RNA为模板合成负链RNA，然后再以负链RNA作为复制中间体合成全长正链RNA（含有GOI和RNA聚合酶的序列）。RNA复制酶复合物识别SGP，还可以合成仅含有编码靶蛋白的亚基因组正链RNA（含有GOI的序列）。因此，一个拷贝的saRNA通过上述机制可以产生多个拷贝的RNA转录物，从而启动细胞中GOI的自我扩增[19]。saRNA疫苗和药物最有利的方面是它可以利用超低剂量的saRNA给药，使生产变得更容易。与mRNA-1273疫苗每剂用量100 μg nrmRNA和BNT162b2疫苗每剂用量30 μg nrmRNA相比，saRNA疫苗每剂用量仅在0.1~10 μg范围内。这种超低注射剂量具有几个优点：a. 更大的生产潜力，因为相同数量的原材料和相同的设备可以生产更多的疫苗和药物；b. 较低剂量导致的副作用减少；c. 较低剂量允许其可以与其他疫

苗和药物组合；d. 内在的自佐剂作用；e. 高水平的抗原表达和长期的免疫持续时间[7]。尽管如此，saRNA 疫苗和药物仍具有某些缺点。a. saRNA 在复制时会形成 dsRNA，可以被 PRRs 识别，激活固有免疫反应，起到自佐剂效应。但是这种固有免疫反应是一把“双刃剑”，其激活过强反而会抑制 saRNA 的表达，并产生过度激活炎症反应，从而影响 saRNA 疫苗和药物的效果，故需要对 saRNA 序列进行优化调整其免疫原性[16]。b. 由甲病毒复制子产生的病毒 NSP，其可能干扰靶宿主细胞中的正常信号转导。c. 考虑到 NSP1~4 序列的长度约为 7 kb，saRNA 序列的全长通常大于 9 kb，这可能会阻碍克隆构建。因此，saRNA 疫苗和药物中采用的递送载体必须允许更高的装载能力和包封效率[7]。d. 核苷修饰可以降低免疫原性，而 saRNA 不耐受核苷修饰[18]。

taRNA 将编码 GOI 的反式复制子（transreplicons，TRs）序列和 RNA 聚合酶的序列分成两个载体，分别在两条线性 mRNA 分子上，避免了由于 saRNA 分子的大而复杂的序列所引起的问题，导致 taRNA 的翻译效率显著高于 saRNA。TRs 是 saRNA 剔除 NSP 复制酶基因，保留 5'保守序列元件（conserved sequence element，CSE）、SGP、GOI 和 3'CSE 改造而来。含有 RNA 聚合酶的序列可以以两种方式提供：a. 以内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site，IRES）为翻译起始点的未加帽的编码复制酶的 nrmRNA 提供，形成 nrmRNA- 复制酶（replicase，REPL），由于 nrmRNA-REPL 中的非编码区（untranslated regions，UTR）缺乏病毒 CSE 功能，因此不会促进复制酶的复制，其只复制 TRs；b. 用 saRNA 提供，但是 saRNA 编码区是无关序列（irrelevant transgene，iTG），形成 saRNA-REPL，其对 REPL 和 TRs 序列都进行复制。研究发现，由 nrmRNA 编码的复制酶比 saRNA 编码的复制酶介导的反式复制表达量高 10~100 倍，这可能归因于其更高的翻译效率和对细胞翻译的不干扰[18]。taRNA 分裂载体系统是从 saRNA 的方法发展而来，具有很多优势。a. 同等剂量 taRNA 平台比 saRNA 平台可以诱导小鼠产生更强的免疫反应来抵御病毒，因此其在保护性免疫方面更有优势。b. 可以提前大规模生产不变的 nrmRNA-REPL 组分，随时与季节性或按需生产的不同的 TRs 结合使用[18]。c. taRNA 分裂载体系统具有安全优势。因为水泡性口炎病毒和狂犬病病毒的糖蛋白能够包装 saRNA，所以如果机体内含有这两种病毒或某些能够形成膜颗粒的物质，它们能够包装 saRNA 分子，就有可能形成假型甲病毒。假型甲病毒具有未知的复制能力和致病性。因此，德国卫生当局将经过 saRNA 构建体处理的细胞归类为生物安全级别。除非能够明确证明所关注的特定糖蛋白无法包装和转移 saRNA，否则都按照该生物安全级别对待。taRNA 利用两个载体来表达抗原，这降低了重组病毒颗粒转移到宿主细胞的可能性[7, 18, 20]。d. 从多功能性和效率的角度来看，TRs 和 REPL 的解偶联是有利的，因为这两种成分可以分别独立优化[18]。例如 saRNA 不耐受核苷修饰，因此不能改造 saRNA-REPL，导致其高免疫原性。然而，nrmRNA-REPL 可以进行核苷修饰，减少了细胞固有免疫反应的产生并保持翻译[18]。e. taRNA 系统具有简单、省时、经济高效的特点。taRNA 的两分载体，导致 taRNA 的长度比 saRNA 短，降低了生产难度，同时利于递送载体的包装和递送。同时，taRNA 简化了生产过程，在不影响免疫原性的情况下，省略了 TRs 体外加帽和缩短了其 poly（A）。目前，taRNA 技术仍处于早期阶段，仅应用于流感疫苗的临床前研究[7]。

circRNA 疫苗和药物分子呈共价闭合环状结构，不含 5'帽子结构（cap）和 3'Poly（A）结构，不受 RNA 外切酶的影响，其稳定性高于线性 RNA[21-22]。circRNA 的半衰期长达 84 h，而线性 mRNA 的平均半衰期<20 h[19]。尽管缺乏帽依赖性翻译的基本元件，circRNA 可以通过在其 5′UTR 区域添加 IRES 元件来进行翻译起始[7]。circRNA 可以激活视黄酸（维甲酸）诱导基因蛋白 I（retinoic acid inducible gene-I，RIG-I），产生 IFN 等促炎细胞因子，通过 N6 甲基腺苷（m6A）核苷酸修饰抑制其固有免疫反应[23]。circRNA 疫苗和药物制造过程，根据预期的抗原进行肽/蛋白质编码序列的设计，并克隆到质粒 DNA 构建体中。质粒 DNA 通过 IVT 技术转录成线性 RNA 前体（pre-circRNA）。pre-circRNA 通过可变剪接，在体外环化为 circRNA。circRNA 通过 HPLC 进行纯化，去除污染物和反应物。纯化的 circRNA 被包封到各种载体之中[23]。circRNA 具有多种优势。a. circRNA 更稳定，易于储存，而线性 mRNA 疫苗和药物在运输、储存、递送等过程中易被 RNase 降解，因此表现出极度的不稳定性。尽管线性 mRNA 骨架和 UTR 区域的核苷酸修饰使其更稳定，但这增加了成本并使

制造过程复杂化，并且由于其热稳定性欠佳，疫苗和药物的储存仍然需要低温冷链。未经任何修饰的circRNA具有高稳定性和RNase抗性，可在室温下或反复冻融条件下储存。b. 未进行任何修饰的circRNA具有较低的免疫原性和细胞毒性。而未修饰的线性mRNA疫苗和药物具有高免疫原性和细胞毒性。c. circRNA具有长时间的抗原产生能力，可以引发持久的适应性免疫反应。d. circRNA具有蛋白质和miRNA海绵功能，可以吸附蛋白质，调节蛋白质活性，也可以吸附大量miRNA，阻断其对mRNA的抑制作用，在肿瘤及其他疾病治疗方面具有重要作用[23-24]。但是circRNA疫苗和药物的开发仍处于起步阶段，其优化、递送和应用需要进一步开发和评估。需要优化的方面具体为：a. 设计具有更低免疫原性和更高抗原产量的circRNA；b. 缩短circRNA长度，如使用较短的IRES类似物，如Kozak序列和富含AU的序列；c. 提高线性RNA前体的环化效率；d. 进一步纯化以避免污染物；e. 建立合适的递送系统[23]。

3　nrmRNA的改造和修饰

3.1　5'帽子（5'cap）

真核细胞mRNA的5′端有帽子结构，5'cap可以使mRNA免遭5'→3'核酸外切酶的降解，降低mRNA免疫原性，同时增强mRNA的翻译效率[25-26]。IVT mRNA模仿真核细胞mRNA，7-甲基鸟苷通过三磷酸键以反向5'-5'方式与mRNA的5'端的第一个核苷酸相连，形成m7G帽子结构也称为CAP 0（m7GpppNp）[27]。5'cap招募真核翻译起始因子4E（eukaryotic initiation factor 4E，eIF4E）以促进核糖体识别和翻译起始[28-29]。在mRNA的IVT过程中，有酶法加帽和共转录加帽法。酶法加帽：mRNA转录后再加帽，常用牛痘病毒加帽酶（vaccinia capping enzyme，VCE）进行加帽。VCE能以正确方向加帽，加帽效率高达100%，但需要VCE的表达和纯化[30]。共转录加帽：mRNA转录过程中进行加帽。利用T7、T3或Sp6噬菌体RNA聚合酶和帽类似物进行加帽。帽类似物有3种：第一代的标准帽结构类似物（m7GpppG，mCap）、第二代的抗反向帽类似物（anti-reverse cap analog，ARCA）和第三代CleanCap™的Cap 1类似物。因为mCap可以反向加入mRNA序列中所以导致大约1/3的mRNA分子没有被正确甲基化，游离磷酸盐悬挂在5'位置，导致下游mRNA翻译效率低下。为了防止反向掺入，研发出ARCA，其可以阻止反向加帽。因为在C3位置被甲基化，导致了IVT时只能在非甲基化鸟苷处添加核苷酸。在IVT过程中，ARCA与GTP竞争结合mRNA序列，竞争关系降低了ARCA加帽效率，ARCA加帽效率为60%~80%。CleanCap™的加帽效率为90%~99%[13]。

3.2　非编码区（UTR）

UTR包括5'UTR和3'UTR，其不编码蛋白质，主要负责调节mRNA的稳定性、翻译效率，直接影响蛋白质的表达量[31]。5'UTR募集核糖体和参与小亚基扫描起始密码子，调控其下游开放阅读框（open reading frame，ORF）序列的翻译[32]。通常在5'UTR序列后添加Kozak序列，Kozak序列可以提高核糖体对起始密码子识别，从而提高翻译效率[33]。在mRNA疫苗开发中，可以利用高表达的人类和病原体基因的5'UTR，因其是自然选择优化出来的5'UTR，可以充分地在组织细胞内发挥作用[34]。如BNT162b2的5'UTR通过掺入人α珠蛋白血红蛋白A1和A2（HBA1和HBA2）的5'UTR，并对Kozak共有序列进行微小修饰[35]。3'UTR可以通过富AU和GU元件来调节mRNA的稳定性。此外，串联添加两次3'UTR序列可能会提高转录效率[36]。高表达基因的天然3'UTR是合成mRNA的首选，如血红蛋白的α亚基和β亚基、白蛋白（albumin，ALB）、热休克蛋白70（heat shock protein-70，HSP-70）、酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）和I型胶原蛋白α1链（collagen type Iα1chain，COL1A1）的基因来源[7]。

3.3　开放阅读框（ORF）

在ORF区域选择合适的密码子对mRNA的稳定性和翻译效率有直接的影响[37-38]。密码子优化是用宿主细胞中使用频率高的同义密码子去替换外源mRNA序列中的密码子，来提高蛋白质产量[38]。ORF通过调整GC含量来避免mRNA出现二级结构，因为二级结构和发夹环会阻碍核糖体的进入、扫描和延伸，同时因其是PAMPs而被固有免疫系统识别。GC含量的增加会消耗尿苷，富含尿苷的区域可以被RIG-I识别，激活固有免疫系统抑制蛋白质的表达[39]。一些蛋白质的表达需要稀有密码子的存在，延缓核糖体的前进速度，为蛋白质的正确折叠来提供足够的时间[37，40]。

3.4　Poly (A)

Poly (A)尾巴可以保护mRNA不被降解，增加mRNA的稳定性，提高其翻译效率[41]。Poly (A)与多

聚腺苷结合蛋白（poly (A) binding protein，PABP）结合，PABP再结合翻译起始因子，翻译起始因子再与5'cap结合，最终形成mRNA闭环结构[13]。这种闭环结构有效地防止了mRNA末端的“去帽”与“去尾”，增加了mRNA的稳定性，促进翻译起始同时利于核糖体的循环利用[42-43]。Poly (A)尾长度与翻译效率、mRNA稳定性之间并不是简单的线性关系[41]。最佳长度的Poly (A)尾可以提高翻译效率和mRNA稳定性。研究表明，当Poly (A)尾长度增加到120 bp时，相应蛋白质的表达水平也随之增加，而当Poly (A)尾长度大于120 bp时，相应蛋白质的表达量并没有增加[7]。因此最好将Poly (A)尾的长度保持在最佳的100~120 bp[44]。

3.5 核苷酸修饰

IVT合成的ssmRNA不稳定，有部分ssmRNA会形成局部的dsRNA结构[45]。进入机体后，dsRNA作为配体与TLR3受体结合，ssRNA作为配体与TLR7和TLR8受体结合，激活固有免疫系统[46-47]。人体内的mRNA存在天然的核苷酸修饰，免疫系统对其不识别[48]。因IVT的mRNA没有化学修饰，可以被宿主免疫系统识别，随后导致其降解，因此需要对其核苷酸进行化学修饰[49]。Karikó等[50-51]用假尿苷取代尿苷进行mRNA修饰，导致mRNA二级结构的改变，从而阻止了固有免疫系统的识别和RNase的降解，并能增强mRNA翻译能力。常见的核苷酸修饰方法有假尿苷（ψ）、N1-甲基假尿苷（m1ψ）、5-甲氧基尿苷（mo5U）、2-硫尿苷（s2U）、5-甲基胞苷（m5C）和m6A替代天然核苷酸，可以避免免疫系统的识别[7]。mRNA-1273疫苗和BNT162b2疫苗都使用m1ψ替代尿苷进行修饰[52]。Kormann等[53]用m5C替换了25%的mRNA胞嘧啶，用s2U替换了25%的mRNA尿苷，这改善了小鼠的mRNA稳定性并增加了蛋白质翻译效率。因此，修饰的核苷酸以正确的比例取代天然核苷酸更能增强mRNA的稳定性和翻译效率。有研究报道了在体外和体内用N4-乙酰胞苷（N4-acetylcytidine，ac4C）对转录后mRNA进行修饰，都增强了mRNA的翻译[13]。转录后表观基因组RNA修饰也是改善mRNA翻译和逃避固有免疫应答的方法。

4 非病毒载体在mRNA递送中的应用及其靶向性

mRNA分子质量大，具有亲水性，带有负电荷，容易被核酸酶降解，导致其很难进入细胞，所以需要递送载体的协助[54]。对于核酸的递送，目前常用的有病毒载体和非病毒载体。常用的病毒载体有逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和慢病毒。它们具有转染率高等优点，为核酸疫苗和药物的进步做出了巨大贡献。但病毒载体有几个缺点，需要被重视。这些缺点包括致癌作用、免疫原性、核酸负载能力不足以及病毒载体生产的复杂性[55]。而非病毒载体可以弥补病毒载体的这些缺陷，下面对其进行介绍。

4.1 脂质体与脂质纳米颗粒递送系统

脂质体是球形脂质囊泡，主要由磷脂和鞘脂等脂质构成。其内部空腔为亲水性，可以溶解和封装水溶性药物；其脂质双层可以捕获亲脂性药物[56]。随着技术的发展，在脂质体的基础上研发出脂质纳米颗粒。脂质纳米颗粒包括LNP、固体脂质纳米颗粒（solid lipid nanoparticles，SLN）和纳米结构脂质载体（nanostructured lipid carrier，NLC）等。LNP是非病毒载体中最先进的mRNA疫苗和药物递送系统，其是一种纳米脂质囊泡，可以将包裹的核酸和小分子药物递送入细胞内[57]。LNP由4部分组成：可电离脂质、胆固醇、辅助磷脂、脂质连接的聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）[58]。可电离脂质在酸性pH值条件下带正电荷，与带负电荷mRNA结合，再通过与其他脂质组分之间的相互作用形成LNP-mRNA。LNP-mRNA在生理pH值下呈电中性，不能与细胞膜上的阴离子相互作用，从而降低了细胞毒性[57]。LNP-mRNA被细胞摄取后，由于内体里的pH降低，导致可电离脂质质子化，其与内体膜发生作用，导致内体膜破坏，从而使mRNA发生内体逃逸，进入细胞质在其中合成靶蛋白[59-60]。PEG有助于防止颗粒聚集并提高储存稳定性[57]。胆固醇和磷脂是改善脂质双层稳定性，帮助膜融合和内体逃逸[57, 61]。SLN是球形纳米颗粒，其内核是固体脂质用于包封药物，其外层是表面活性剂组成的双层膜。SLN由脂肪酸、甘油三酯、类固醇、偏甘油酯和蜡等脂质、表面活性剂和水配制而成。SLN的优点：较高的生物利用度、可以包封亲脂性和亲水性药物、可调控药物释放速率、可以多途径给药（如口服、静脉内、肺部、眼部和皮内给药等）。SLN的缺点：有限的载药量、药物泄漏（储存期间的结晶会将药物排出）等。NLC是在SLN的基础上发展而来的，具有SLN的优点，同时弥补了它的缺点。NLC是含有固体和

液体脂质的混合物，其是将SLN的部分固体脂质用液体脂质取代，取代后产生更大的空间，增加了载药能力。液体脂质的加入，使得结晶度降低，从而抑制了药物的排出，增强了储存的稳定性[62]。

4.2　聚合物递送系统

聚合物有两种来源。a. 天然聚合物主要有组蛋白、明胶、鱼精蛋白、环糊精和壳聚糖（chitosan，CS）等。它们由生物体合成，具有良好的生物相容性、可降解性，并且产量高。研究表明，鱼精蛋白带有正电荷可以与带负电荷的核酸结合，其不仅促进递送，还可作为佐剂促进APCs提呈并触发抗肿瘤免疫反应[63]。在侵袭性Lewis肺癌模型中，通过含有编码细胞角蛋白19的mRNA的鱼精蛋白复合物对小鼠进行鼻内免疫，引起了强烈的细胞免疫反应并减缓了肿瘤生长[64]。b. 合成聚合物主要有聚乙烯亚胺（polyethylenimine，PEI）、多聚赖氨酸（poly-L-lysine，PLL）和聚甲基丙烯酸二甲胺乙酯（polymethacrylic acid N,N-dimethylaminoethyl ester，PDMAEMA）等[63, 65]。聚合物纳米载体的主要形式有4种，分别是纳米级复合物（polyplexes，PPs）、聚合物囊泡（polymersome）、树枝状聚合物（dendrimers）和水凝胶（hydrogels）。PPs是核酸与阳离子聚合物（如CS、PLL和PEI等）通过静电相互作用，自发缩合而成的纳米颗粒。PPs通过胞吞作用进入细胞，形成内体，随后内体的pH从7降至5.5，pH的下降导致核酸释放到胞质中[55]。聚合物囊泡是由两亲性嵌段共聚物通过自组装而成的双分子层结构，在形态上类似于脂质囊泡[66]。聚合物囊泡的优点有：a. 它的膜比脂质膜厚10倍，减少了封装治疗剂的泄漏，为制剂提供了机械和化学稳定性；b. 聚合物囊泡在设计上是可灵活定制的，如其尺寸、表面官能化、厚度、弹性、渗透性和载药量等可进行调控；c. 聚合物囊泡的种类很多，其原材料（聚合物）来源丰富。有研究表明，通过聚合物囊泡递送环状二核苷酸，其可以激活干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon genes，STING），产生强烈的抗肿瘤固有免疫反应。树枝状聚合物是由一个中心核、重复的分支单元和提供适应性表面功能的三聚体基团组成。树枝状聚合物具有广泛的分枝，由于这些重复的分支单元数量的增加，最终导致其变成大小和形状均匀的三维立体球型结构。树枝状聚合物的内部空腔可以结合药物或核酸，其表面可以富集活性功能团。树枝状聚合物含有高质子海绵容量的叔胺，有助于核酸分子的内体逃逸。最常见的树枝状聚合物有聚酰胺-胺（polyamidoamine，PAMAM）、PLL、PEI、聚丙烯亚胺（polyacrylimide，PPI）等。水凝胶是由聚合物交联成的网络和大量的水（含水量70%~99%）构成。水凝胶具有很强的生物相容性和易于封装亲水性药物的能力。由于水凝胶的物理性质，其包封的药物或核酸可以在局部持续释放[55]。

4.3　生物源性纳米颗粒

生物源性纳米颗粒包括外泌体、细胞膜纳米颗粒、细菌囊泡等，它们是从生物体中提取和纯化获得的。生物源性纳米颗粒有良好的生物相容性、无毒且易降解。因其表面存在细胞受体能够为药物提供仿生伪装从而避免生物体的快速降解和免疫排斥等作用。有研究表明，用外泌体包封siRNA，其可以与P21活化激酶（P21-activated kinase 4，*PAK4*）基因结合，抑制*PAK4*的表达，因为PAK4的过表达可以致癌，所以将此包封的外泌体进行胰腺癌的瘤内注射，导致肿瘤的生长得到抑制并提高了小鼠存活率[67]。

4.4　无机纳米颗粒

无机纳米颗粒有金纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒、磷酸钙纳米颗粒和氧化铁纳米颗粒等。它们可以被设计成特定的尺寸、结构和几何形状，其表面易于化学修饰。磷酸钙纳米颗粒被大量用于基因转染领域。因为磷酸钙是人体骨骼和牙齿的无机矿物质，所以磷酸钙纳米颗粒具有高生物相容性、良好的生物降解性、无毒和无免疫原性。磷酸钙纳米颗粒中的Ca^{2+}易与带负电的核酸分子结合，同时磷酸钙很容易通过脂质双层细胞膜被细胞内吞，并溶解在内体的酸性环境中，导致核酸发生内体逃逸[68]。有研究将mRNA和超顺磁性氧化铁纳米颗粒复配在一起，开发了一款COVID-19 mRNA疫苗。该疫苗在4~25℃条件下能稳定存在长达3个月，临床试验结果良好，有望成为严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型（SARS-CoV-2）病毒疫苗。然而有些无机纳米颗粒，无法被人体降解或清除，所以要对其进行毒理学评估[69]。

4.5　靶向性

以往的LNP-mRNA没有靶向性，可转染多种组织器官，但是其主要在肝脏富集。原因是由于LNP表面的ApoE蛋白冕与肝细胞表面的LDL-R和乳糜微粒（chylomicron，CM）残粒受体结合，导致LNP-mRNA进入肝细胞。同时，还和肝脏的生

物分布和其酸碱电离常数（pKa）接近6.4有关。这就可以解释BNT162b2疫苗在肌肉注射后，主要定位于肝脏和注射部位，而肝脏的富集会导致肝损伤。为了避免脱靶转染导致的不良反应，需要研发靶向LNP-mRNA。而最近一种新型的LNP（iso-A11B5C1）研发成功，其可以靶向性的转染入肌肉细胞，并进行表达，降低肝脏细胞和脾脏细胞脱靶转染，从而为靶向肌肉疾病的安全有效的基因治疗引入了一种新方法。iso-A11B5C1因其不转染APCs，所以相对以往的LNP-mRNA所诱导的体液免疫反应很弱，但是其细胞免疫水平与以往的LNP-mRNA一样强，这一发现预示着mRNA疫苗高水平的转染免疫细胞不是开发mRNA疫苗的唯一标准[66]。RCB-4-8 LNP的合成过程简单，是可降解的可电离脂质，避免了不可生物降解的LNP的不良反应，如肝毒性，并增强了多次给药方案的可行性[66, 70-71]。RCB-4-8 LNP可以将mRNA递送到呼吸道上皮细胞中，并诱导这些细胞中功能蛋白质的有效表达。肺因其特殊的细胞类型、黏液屏障和纤毛清除功能，使普通的LNP载体很难递送到肺内。而RCB-4-8 LNP是目前为止唯一一款已报道的可以递送到肺内进行基因修饰的LNP-Cas9系统。基于DNA的腺病毒相关病毒（adeno-associated virus，AAV）递送系统可以持续表达Cas9蛋白和sgRNA，与其相比LNP-mRNA的寿命相对较短，限制了积累脱靶基因改变的可能性。此外，AAV衣壳的免疫原性触发中和抗体和T细胞应答，限制了基于AAV的治疗的重复给药[70]。113-O12B LNP是一种靶向淋巴结的LNP递送系统，是为mRNA癌症疫苗研发的。113-O12B LNP-mRNA在APCs中的表达增强，表明其具有特异性靶向淋巴结的能力。113-O12B LNP-mRNA可诱导小鼠产生丰富的抗体和CD8+T细胞，而CD8+T细胞增加更为突出。此外，113-O12B LNP-mRNA转染的APCs更多地浸润到肿瘤部位，提高了治疗肿瘤的效果。113-O12B LNP成功递送了编码卵清蛋白（ovalbumin，OVA）的mRNA，还成功递送了编码酪氨酸酶相关蛋白2（tyrosinase-related protein-2，TRP2）的mRNA，TRP2是黑色素瘤中过表达肿瘤相关抗原，表明LNP-mRNA系统可以成为递送多种类型的肿瘤抗原通用平台。接种113-O12B LNP-mTRP2疫苗与抗程序性细胞受体1（programmed death-1，PD-1）疗法联合使用可显著抑制甚至根除已建立的B16F10黑色素瘤。最后，所有在治疗实验中存活的小鼠都没有出现转移性结节的生长，这表明mRNA癌症疫苗具有长期抗肿瘤功效[72]。最近开发了一种选择性器官靶向（selective organ targeting，SORT）的新方法，其中多种类型的LNP被系统改造，通过在传统的四组分（可电离脂质、胆固醇、辅助磷脂、PEG）上添加第五组分SORT分子来专门靶向特定的组织器官。因为研究人员发现，静脉注射LNP后，血液中的特定蛋白质根据其分子组成被募集到LNP的表面，结合在LNP表面的蛋白质与细胞表面受体结合从而将LNP转染到靶器官。具体机制为：a. PEG从LNP表面解吸导致潜在的SORT分子暴露出来；b. 不同的血清蛋白识别SORT分子而吸附在LNP表面；c. 表面吸附蛋白与特定组织细胞上高度表达的同源受体结合，介导LNP-mRNA进入靶细胞。研究表明，LNP在器官的生物分布水平、pKa和血清蛋白吸附是决定其组织靶向性的三要素。实验表明：加入的SORT分子为可电离的阳离子脂质（如1, 2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷（1, 2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane，DODAP））可靶向肝脏，因其吸附ApoE，肝脏细胞表面高表达ApoE的受体LDL-R；加入SORT分子为阴离子脂质（如18PA）可靶向脾脏，因其吸附β2糖蛋白I（β2-glycoprotein I，β2-GPI），β2-GPI可以结合磷脂酰丝氨酸，磷脂酰丝氨酸是一种由衰老红细胞暴露的阴离子脂质，而脾脏的功能为降解衰老的红细胞；加入SORT分子为带有季铵头基的永久阳离子脂质（1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷）可靶向肺脏，因其吸附玻连蛋白（vitronectin，Vtn），Vtn的受体αvβ3整合素在肺内皮细胞上高表达。同时，靶向肝脏的SORT-LNP的*pKa*为6~7，靶向肺部的SORT-LNP的*pKa*>9，靶向脾脏的SORT-LNP的*pKa*为2~6[71, 73-74]。

5 mRNA癌症疫苗和药物

研究发现，癌细胞可通过低表达抗原和MHC分子以及表达免疫检查点分子等多种途径实现免疫逃逸[75]。T细胞是抗肿瘤免疫的重要细胞亚群，但肿瘤组织中的T细胞数量少，且处于免疫抑制甚至耗竭状态，这也是导致肿瘤免疫逃逸和免疫检查点抑制剂等抗肿瘤免疫治疗效果不好的重要原因[76]。1891年，骨科医生William Coley[77]发现，肉瘤患者术后被细菌感染反而更易造成肿瘤消退，从此拉开了肿瘤免疫治疗的序幕。肿瘤免疫疗法旨

在激活宿主抗肿瘤免疫，改变肿瘤微环境免疫抑制状态，并最终导致肿瘤缩小和提高患者的总体生存率。1995年，Conry等[78]通过肌肉注射含有癌胚抗原（carcinoembryonic antigen，*CEA*）基因的mRNA疫苗，使小鼠获得了抗肿瘤的免疫反应。1999年，Gilboa和Vieweg[79]将肾自体肿瘤RNA和前列腺特异性抗原mRNA转染的树突状细胞（dendritic cells，DCs）用于肾和前列腺癌的治疗，在I期临床试验中大多数患者表现出疫苗诱导的T细胞应答。随着mRNA疫苗和递送系统的日益成熟，mRNA已成为癌症免疫治疗有前途的平台。mRNA疫苗和药物治疗癌症的基本原理是将编码一个或多个肿瘤相关抗原（tumor-associated antigen，TAAs）、肿瘤特异性抗原（tumor-specific antigen，TSAs），及细胞因子等蛋白质基因的mRNA导入到宿主细胞质中，表达出靶抗原或靶蛋白，以抑制肿瘤生长或通过MHC分子提呈到细胞表面，激活适应性免疫，特异性地清除肿瘤细胞，并分化出记忆性T、B细胞实现长期治疗的目的。

5.1　编码肿瘤相关抗原的mRNA

TAAs是指在肿瘤细胞中过度表达，且在正常组织中低表达或不表达的非突变蛋白，具有较弱的肿瘤特异性和免疫原性[80-81]。哺乳动物对单一的TAA具有高度的免疫耐受性。因此，使用多种TAA组合越来越受欢迎，以提高癌症疫苗的效力[82]。但是，因为TAAs在正常细胞中也表达，所以增加了疫苗诱导的自身免疫毒性风险。在一项1期剂量递增试验（NCT02410733）中，评估了编码四种黑色素瘤TAAs（NY-ESO-1、MAGE-A3、TPTET和tyrosinase）的阳离子脂质复合物（lipoplex，LPX）递送的mRNA疫苗（BNT111）。结果表明，3名患者产生了针对NY-ESO-1的T细胞应答，其中两名还显示出针对MAGE-A3的应答[13]。另一项II期临床试验评估了BNT111疫苗与抗PD-1抗体西米普利单抗（cemiplimab）联合使用，用于抗PD1难治性/复发性、无法切除的III期或IV期黑色素瘤患者[13，83]。TAAs疫苗存在一些缺陷，限制了其应用。如TAAs可能发生突变并产生疫苗耐药性，TAAs也存在于正常组织中，因此TAAs疫苗可能导致中枢和外周免疫耐受，降低疫苗接种效力[84-85]。

5.2　编码肿瘤特异性抗原的mRNA

TSAs，也称为新抗原，来源于肿瘤细胞中随机的体细胞突变，不存在于正常细胞中，因此不影响中枢和外周免疫耐受[86-87]。TSAs对MHC分子具有高亲和力和免疫原性。TSAs可以被宿主免疫系统识别为“非我”物质，因此是癌症疫苗的最佳靶标。TSAs由肿瘤细胞特异性表达，并引发肿瘤适应性免疫反应，且“脱靶”毒性有限[88]。开发个体化TSAs-mRNA疫苗的第一步是识别和确认肿瘤中的特异性非同义体细胞突变。对肿瘤组织进行活检，进行全外显子组和转录组测序。肿瘤中的非同义体细胞突变，如点突变、插入和缺失，可以通过比较肿瘤和匹配的健康组织的序列来识别。接下来，筛选、分析具有最高免疫原性的突变。利用MHC I类表位预测算法进行鉴定。最后，结合体外实验结果进一步确定候选抗原的排序列表[13]。基于TSAs-mRNA疫苗可以针对多种类型突变。目前已有编码多种TSAs的个体化mRNA疫苗，正在进行临床前和临床中研究。mRNA-4157/V940含有34个TSAs编码基因，它和抗PD-1抗体派姆单抗（Pembrolizumab）联合使用，与单用派姆单抗相比，可以将癌症患者的术后复发率和死亡率下降44%。它已被美国食品药品管理局（Food and Drug Administration，FDA）授予突破性疗法认定，用于完全切除后的高危黑色素瘤患者的辅助治疗[89]。autogene cevumeran（BNT122，RO7198457），含有20种TSAs，与抗程序性死亡受体配体1（programmed death-ligand 1，PD-L1）抗体阿替唑利珠单抗（Atezolizumab）和化疗联用，在治疗接受手术切除的胰腺癌患者的1期临床试验中取得有效成果[90]。

5.3　编码治疗性抗体的mRNA

通过序列设计，mRNA可以编码治疗性抗体。抗体通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（antibody dependent cellular ctotoxicity，ADCC）、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用（antibody dependent cellular phagocytosis，ADCP）和补体依赖的细胞毒性作用（complement dependent cytotoxicity，CDC）或通过阻断免疫抑制信号来介导肿瘤细胞的杀伤，并在临床试验中得到了成功的应用。抗体由抗原结合位点（fragment of antigen binding，Fab）段和恒定区（fragment crystallizable，Fc）段组成。Fab段与肿瘤抗原结合，Fc段与NK细胞和巨噬细胞等效应细胞表面的Fcγ受体（Fc gamma receptors，FcγRs）结合或与补体结合，发挥杀伤肿瘤细胞的作用。由于mRNA编码抗体的血清半衰期是由抗体本身和

mRNA的半衰期决定，因此导致蛋白质的半衰期延长。截至目前，mRNA已被设计用于表达多种抗体，包括单克隆抗体（monoclonal antibody，mAb）、双特异性抗体（bispecific antibody，BsAb）及其衍生物。利妥昔单抗（Rituximab）是一种针对CD20的单克隆抗体，用于治疗非霍奇金淋巴瘤。含有编码利妥昔单抗LNP-mRNA疫苗，在小鼠体内表达出高滴度的利妥昔单抗，其在淋巴瘤模型中具有显著抑制肿瘤生长的作用[91]。BisCCL2/5i是编码趋化因子CCL2和CCL5的BsAb。LNP包裹BisCCL2/5imRNA，进入细胞内发生瞬时而有效的表达。该BisCCL2/5i LNP-mRNA诱导了肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages，TAMs）向抗肿瘤M1表型的极化，并减少肿瘤微环境中的免疫抑制效应。将BisCCL2/5i mRNA与PD-L1抑制剂相结合给药后，小鼠可在原发性肝癌及结直肠癌和胰腺癌肝转移模型中实现长期存活[92]。

5.4 编码细胞因子的mRNA

肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）是由肿瘤细胞周围的基质细胞和细胞因子构成的[93]。细胞因子是TME的有效调节剂，可以调控肿瘤的生长[94]。1992年，大剂量白介素-2（interleukin 2，IL-2）被批准用于治疗转移性肾细胞癌；1995年IFNα2b被批准用于可切除的黑色素瘤患者。尽管IFNα2b和IL-2已获得临床批准，但它们的使用均存在重大安全问题，且治疗效果较差。重组细胞因子临床应用的主要障碍在于：细胞因子的半衰期短、较窄的治疗窗、每天需要多次给药、高剂量会引起不良免疫反应，以及无法在TME内达到足够高的局部浓度[83]。mRNA技术有望解决以上传统细胞因子疗法的瓶颈问题。现有多种编码细胞因子的mRNA药物，已经进入临床试验阶段。如：IL-12是一种促炎细胞因子，可以激活T细胞和自然杀伤细胞（natural killer cells，NK cells），诱导大量IFN-γ分泌，杀死肿瘤细胞，募集免疫细胞用于癌症治疗[95]。IL-12 mRNA（MEDI1191）目前正处于I期临床评估，在10例接受一种或多种标准全身治疗（其中6例经过免疫治疗）的晚期实体瘤患者中，在肿瘤内（IT）注射给药MEDI1191并联用抗PD-L1抗体度伐利尤单抗（Durvalumab）后，有两例患者出现免疫应答，安全性和耐受性良好，没有≥3级不良反应发生[96]。细胞因子在癌症治疗中由于其毒性作用，限制了全身给药的应用，而局部注射是一个很好的选择[97]。

5.5 编码肿瘤抑制因子的mRNA

肿瘤抑制因子是指由肿瘤抑制基因表达的蛋白质，是一类存在于正常细胞内可抑制细胞生长并具有潜在抑癌作用的蛋白质。肿瘤抑制基因的丢失或失活，会导致恶性肿瘤的发生。在许多类型的肿瘤细胞中，肿瘤抑制因子如张力蛋白同源的磷酸酶（phosphatase and tensin homolog on chromosome ten，PTEN）和p53经常功能失调。编码肿瘤抑制因子的mRNA通过递送系统进入机体表达出肿瘤抑制因子，调节细胞的抗肿瘤过程并诱导肿瘤细胞凋亡。*TP53*基因编码肿瘤抑制因子p53，*TP53*基因突变是癌症中最常见的基因突变，在超过50%的肿瘤中*TP53*丧失部分或全部功能[98]。*TP53*突变使肿瘤细胞避开了细胞周期检查点，避免凋亡和衰老，肿瘤细胞发生大量增殖[99]。*TP53* mRNA纳米颗粒与PD-1单抗联用，恢复了p53表达，在肝癌小鼠模型中，成功抑制了肿瘤生长，并减少了肝腹水和转移灶。与单独使用PD-1单抗或治疗性p53表达相比，这种组合疗法的抗肿瘤效果更好[100]。

5.6 编码合成溶瘤病毒的mRNA

溶瘤病毒（oncolytic viruses，OVs）以癌细胞为目标，而又不影响正常细胞，通过在癌细胞内复制，导致癌细胞裂解[101]。OVs还能靶向肿瘤脉管系统抑制血管生成，激活固有和适应性免疫系统，引发强烈的抗病毒免疫应答[102]。有研究将塞尼卡谷病毒（Seneca Valley virus，SVV）和柯萨奇病毒A21（Coxsackie virus A21，CVA21）的RNA基因组（vRNA）通过LNP递送，LNP-vRNA被内化并释放到肿瘤细胞的细胞质中，vRNA复制并产生一系列传染性病毒体，这些病毒体在局部扩散，杀死肿瘤细胞，并促进免疫细胞向TME募集，还能增强抗PD-1抗体的活性。LNP-vRNA是一种能够重复进行静脉注射，不受中和抗体影响的OVs的技术方法[103]。

5.7 编码CRISPR−Cas9的mRNA

规律成簇的间隔短回文重复（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）和CRISPR相关蛋白质（CRISPR-associated proteins，Cas）组成的系统，CRISPR-Cas9已被广泛用于治疗罕见遗传性疾病，例如β地中海贫血、镰状细胞病、转甲状腺素淀粉样变性、遗传性血管性水肿和血友病等。同时，它也是治疗癌症的有力工具[104]。CRISPR-Cas9由Cas9核酸内切酶和单指导RNA（single guide RNA，sgRNA）

组成[105]。Cas9 mRNA一旦进入靶细胞中，就能在细胞质中产生Cas9核酸酶，然后与特定的sgRNA形成Cas9-sgRNA核糖核蛋白复合物（ribonucleoproteins，RNPs），从而实现高效的基因组编辑作用。CRISPR-Cas9基因组编辑有基因敲入、基因敲除、基因修复和转录调控等作用[106]。Wang等[107]使用CRISPR-Cas 9将人舌鳞状癌细胞（SAS）中人类抗原R（human antigen R，*HuR*）基因敲除，抑制SAS的增殖、转移和耐药性。Cas9可以以RNPs、DNA或mRNA的传递形式进入细胞。RNPs直接递入会引起不良的体液和细胞免疫反应，并在直接进入细胞时面临快速降解，导致基因编辑的维持时间很短[108]。此外，Cas9蛋白相当大（160 ku），这使得以病毒和非病毒载体进行递送都具有挑战性。对于以DNA形式传递Cas9，质粒和腺相关病毒是最流行的载体，因为它们可以产生持续的蛋白质表达，但是DNA载体的递送形式有缺陷。首先，DNA需要进入细胞核，这一过程是十分困难的；其次，DNA需要在细胞核内转录成Cas9 mRNA，需要更多的编辑时间；再次，CRISPR-Cas9系统连续表达不可避免地会产生高脱靶效应。IVT mRNA可用作Cas9的一种瞬时传递形式，降低了潜在的脱靶效应，并且只需进入细胞质即可发挥作用，同时无细胞核中的遗传毒性，从而实现了高效的基因编辑[83]。有研究将脂质纳米颗粒里同时封装Cas9 mRNA和sgRNA，用于卵巢癌和胶质母细胞瘤时，可使体内高达70%~80%的基因编辑，抑制肿瘤生长，提高存活率[109]。通过CRISPR-Cas9技术改造得到的T细胞已经应用于癌症免疫治疗。利用CRISPR-Cas9技术沉默或破坏同种异体T细胞中的T细胞受体（T cell receptor，TCR）和MHC分子，生产通用嵌合抗原受体T细胞（chimeric antigen receptorT-cell，CAR-T）细胞。通用CAR-T细胞技术可以规避很多自体CAR-T细胞技术的缺陷，如生产自体CAR-T细胞过程耗时且昂贵；如果患者患有严重的疾病会导致难以收集到足够数量高质量的自体T细胞。CRISPR-Cas9技术可以通过敲除T细胞抑制性受体或信号分子的基因如细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4（cytotoxic T lymphocyte-asscociated antigen-4，*CTLA-4*）、*PD-1*、淋巴细胞激活基因3（lymphocyte activation gene 3，*LAG-3*）和T细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域3（T cell immunoglobulin domain and mucin domain3，*TIM-3*）来提高CAR-T细胞的功能。CRISPR-Cas9技术可以敲除Fas受体来消除Fas诱导的细胞死亡，生产抗凋亡的CAR-T细胞[110]（图2）。CRISPR-

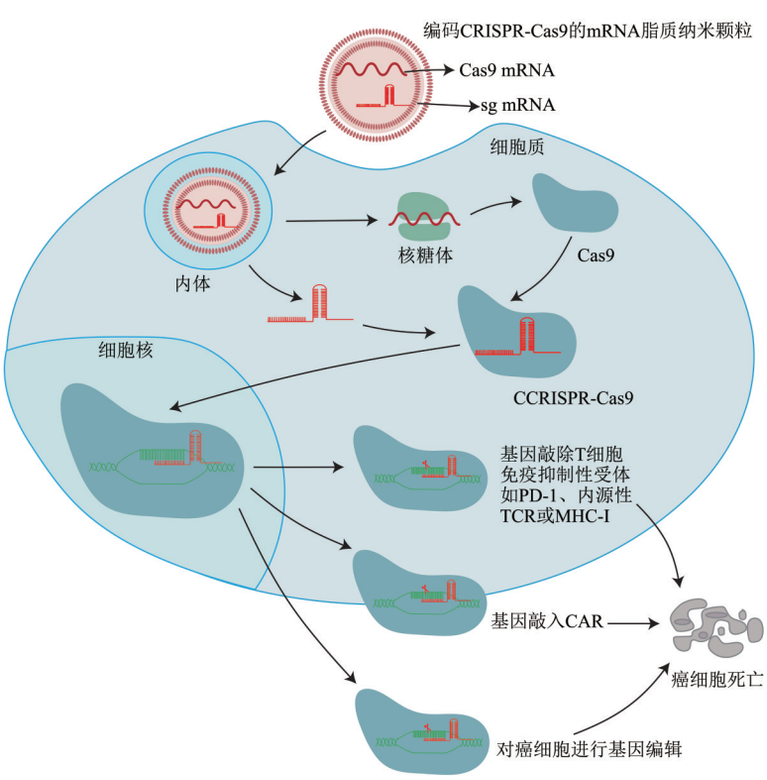


Fig. 2　mRNA lipid nanoparticles encoding CRISPR−Cas9 for cancer immunotherapy

图2　编码CRISPR−Cas9的mRNA脂质纳米颗粒用于癌症免疫治疗

Cas 9可用于生产溶瘤病毒，这种病毒缺乏毒力，但仍然能够裂解癌细胞。通过删除神经毒性基因ICP34.5和核糖核苷酸还原酶基因ICP6，使溶瘤单纯疱疹病毒（oncolytic herpes simplex virus type 1，oHSV-1）只能选择性在肿瘤细胞内复制，而对正常组织细胞影响较小，具有较高的生物安全性[111]。

5.8 编码CARs或TCRs的mRNA

过继性T细胞治疗（adoptive cell transfer therapy，ACT）是指从患者或健康的捐赠者体内获取T细胞，在体外培养改造后，使其靶向杀伤功能增强，然后重新回输到患者体内，从而消灭肿瘤细胞[112]。ACT可分为CAR-T、T细胞受体工程化T细胞治疗（T-cell receptor engineered T cell therapy，TCR-T）和肿瘤浸润淋巴细胞（tumor-infiltrating lymphocyte，TIL）治疗[113]。CAR-T技术是利用基因工程技术将肿瘤识别与活化信号分子（胞外抗原识别域识别肿瘤抗原与胞内信号域刺激T细胞活化增殖）直接表达于T细胞表面，使CAR-T能以抗原依赖、MHC非依赖形式识别肿瘤抗原，其活化效率远远高于经由DCs递呈途径[114-115]。TCR-T技术是通过筛选和鉴定能够特异性结合靶抗原的TCR序列，采用基因工程手段将TCR转入到患者外周血来源的T细胞中（或异源T细胞中），再将改造后的T细胞回输至患者体内，使其特异性识别和杀伤表达抗原的肿瘤细胞，从而达到治疗肿瘤的目的。TCRs和CARs的基因工程改造对治疗方案的成功至关重要[116]。CAR-T或TCR-T细胞疗法的体外改造过程，往往需要以逆转录病毒或慢病毒为载体，然后进行体外扩增，但转染存在诱发基因突变的风险。然而，mRNA脂质纳米技术可有效降低风险并提高转染率。在NCT01897415研究中，6名晚期胰腺癌患者静脉注射了含有编码嵌合抗间皮素免疫受体SS1的mRNA T细胞，其中2名患者在治疗后病情稳定，无明显不良反应生存率明显提高。虽然基于mRNA的体外工程化CAR-T或TCR-T技术具有在T细胞表面产生高水平编码CAR或TCR的优势，但由此产生的工程T细胞是个性化的细胞治疗产品，需要从患者身上提取T细胞，并且制造过程昂贵且耗时。为了克服这些挑战，可以静脉给药T细胞靶向编码CAR或TCR的mRNA纳米颗粒，从而在体内产生CAR或TCR工程T细胞。有研究将靶向T细胞的编码CAR或TCR的mRNA纳米载体注射到小鼠体内，对循环T细胞进行基因重编程，使其瞬时表达CAR或TCR，以治疗小鼠模型中的淋巴瘤、前列腺癌和乙型肝炎病毒诱导的肝细胞癌[83]。

6 总结与展望

mRNA疫苗和药物具有开发周期短、双重免疫机制、安全、高效和可大规模生产等优势。双重免疫机制是指mRNA编码的抗原能够激活适应性免疫，同时mRNA本身也可以激活固有免疫。但是需要合理调节mRNA的免疫原性，使其充当佐剂，提高疫苗和药物的免疫效力。虽然COVID-19的LNP-mRNA疫苗获得成功，但是由于癌症本身的复杂性，导致mRNA癌症疫苗和药物还有很长的一段路要走。开发mRNA癌症疫苗和药物的挑战在于以下几点。a. 肿瘤疫苗理想靶标是TSAs，因此选择合适有效的TSAs是mRNA癌症疫苗设计和开发的关键。由于筛选TSAs非常困难，需要解决两个关键技术点：识别体细胞突变位点和预测TSAs与MHC分子之间的亲和力。这将需要进一步开发高通量深度基因测序技术，并结合先进的数据分析算法模型，以便系统地筛选出最有潜力的候选TSAs[117]。b. 深度开发saRNA、taRNA和circRNA，因其在小剂量下能够产生大量的靶蛋白，所以可以避免为了达到疗效而重复使用mRNA纳米颗粒。c. 加强对生物降解脂质的研发，因为有啮齿动物研究表明，含有不可生物降解的可电离脂质的LNP可导致肝损伤，因此强调了生物降解脂质设计的必要性[66]。d. 靶向纳米递送载体的研发，以提高mRNA向所需器官和组织递送效率，避免捕获颗粒部位产生的低效递送，阻止全身暴露的副作用，使其精准发挥作用。e. 扩大mRNA的给药途径，如口服给药、雾化吸入等。根据疾病自身特点选择合适的给药途径，使疫苗和药物发挥最大效力。因为给药途径会影响抗原摄取、表达以及抗原递呈效率，从而影响免疫反应的强度。例如，在小鼠体内，甲型流感病毒H1N1的LNP-mRNA疫苗通过雾化给药比全身给药更有效[118]。因此针对肺癌的mRNA疫苗和药物可以选择以雾化吸入的方式接种。f. 由于mRNA稳定性差，极易被环境中普遍存在的RNase降解，因此采用超低温条件储存和运输mRNA疫苗和药物，从而抑制RNase活性[7]。因为mRNA疫苗和药物的储存和运输需要严苛的温度条件，限制了中低收入国家的应用，所以需要研制出能够在室温或更高温度条件下储存的mRNA

疫苗和药物。研发人员可以通过三方面对mRNA疫苗和药物的稳定性进行改善：一是对mRNA序列进行优化或修饰，以提高mRNA的稳定性；二是将LNP-mRNA疫苗和药物制成冻干制剂，有研究发现，冻干的LNP-mRNA疫苗在4℃、22℃和37℃下，其转染特性至少可以保持12周[119]；三是研发circRNA，其半衰期长，更稳定。mRNA疫苗和药物除了可以用于癌症治疗，还可以用于传染病、遗传性疾病、再生医学和抗衰老等领域的治疗。我们已经看到COVID-19 mRNA疫苗的有效性和安全性，其克服了传统疫苗研制方法的多种缺陷，成为传染病疫苗研发的主要技术手段。目前有多种病原体的mRNA疫苗正处于研发阶段，如流感病毒、狂犬病毒、寨卡病毒、人类免疫缺陷病毒、结核分枝杆菌和鼠疫耶尔森菌等。mRNA药物通过翻译合成目的基因编码的蛋白质来治疗遗传性疾病，如囊性纤维化、甲基丙二酸血症、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症、法布里病、糖原贮积病1a和急性间歇性卟啉病等，临床前实验证实mRNA药物对这些疾病具有良好的疗效[120]。在再生医学和抗衰老领域，mRNA可以翻译出所需蛋白质，如生长因子、细胞因子和转录因子等，诱导细胞的多能性分化或重编程，以进行相应的细胞、组织修复或器官移植[121-122]。

综上所述，mRNA疫苗和药物在多种疾病防治方面是一个非常有潜力的平台，虽然还有很多技术难点没有解决，但是随着科学技术的发展这些困难会被逐一攻破。有报道称mRNA癌症疫苗和药物有望在2030年左右上市，使广大肿瘤患者受益。

参　考　文　献

[1] Sobhani N, Scaggiante B, Morris R, *et al*. Therapeutic cancer vaccines: from biological mechanisms and engineering to ongoing clinical trials. Cancer Treat Rev, 2022, **109**: 102429

[2] Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines. Nature, 2021, **597**(7876): 318-324

[3] Kanizsai A, Molnar T, Varnai R, *et al*. Fever after vaccination against SARS-CoV-2 with mRNA-based vaccine associated with higher antibody levels during 6 months follow-up. Vaccines, 2022, **10**(3): 447

[4] Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, *et al*. Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. Pharmaceutics, 2020, **12**(2): 102

[5] Kairuz D, Samudh N, Ely A, *et al*. Production, characterization, and assessment of permanently cationic and ionizable lipid nanoparticles for use in the delivery of self-amplifying RNA vaccines. Pharmaceutics, 2023, **15**(4): 1173

[6] Rauch S, Jasny E, Schmidt K E, *et al*. New vaccine technologies to combat outbreak situations. Front Immunol, 2018, **9**: 1963

[7] Fang E, Liu X, Li M, *et al*. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. Signal Transduct Target Ther, 2022, **7**(1): 94

[8] Francia V, Schiffelers R M, Cullis P R, *et al*. The biomolecular corona of lipid nanoparticles for gene therapy. Bioconjug Chem, 2020, **31**(9): 2046-2059

[9] Di J, Du Z, Wu K, *et al*. Biodistribution and non-linear gene expression of mRNA LNPs affected by delivery route and particle size. Pharm Res, 2022, **39**(1): 105-114

[10] Hassett K J, Rajlic I L, Bahl K, *et al*. mRNA vaccine trafficking and resulting protein expression after intramuscular administration. Mol Ther Nucleic Acids, 2023, **35**(1): 102083

[11] Villadangos J A, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. Nat Rev Immunol, 2007, **7**(7): 543-555

[12] Zhang P, Wang J, Wang D, *et al*. Dendritic cell vaccine modified by *Ag85A* gene enhances anti-tumor immunity against bladder cancer. Int Immunopharmacol, 2012, **14**(3): 252-260

[13] Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. Mol Cancer, 2021, **20**(1): 41

[14] Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, *et al*. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. Nucleic Acids Res, 2011, **39**(21): e142

[15] Szabó G T, Mahiny A J, Vlatkovic I. COVID-19 mRNA vaccines: platforms and current developments. Mol Ther, 2022, **30**(5): 1850-1868

[16] Pardi N, Hogan M J, Porter F W, *et al*. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. Nat Rev Drug Discov, 2018, **17**(4): 261-279

[17] Blakney A K, Ip S, Geall A J. An update on self-amplifying mRNA vaccine development. Vaccines, 2021, **9**(2): 97

[18] Beissert T, Perkovic M, Vogel A, *et al*. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. Mol Ther, 2020, **28**(1): 119-128

[19] Perenkov A D, Sergeeva A D, Vedunova M V, *et al*. *In vitro* transcribed RNA-based platform vaccines: past, present, and future. Vaccines, 2023, **11**(10): 1600

[20] Jia F, Miao H, Zhu X, *et al*. Pseudo-typed Semliki Forest virus delivers EGFP into neurons. J Neurovirol, 2017, **23**(2): 205-215

[21] Kuang Z, Yang H, Cheng S, *et al*. Silencing of circ_002136 sensitizes gastric cancer to paclitaxel by targeting the miR-16-5p/HMGA1 axis. Open Med, 2023, **18**(1): 20220625

[22] Chen J, Shi P, Zhang J, *et al*. CircRNA_0044556 diminishes the sensitivity of triple-negative breast cancer cells to adriamycin by sponging miR-145 and regulating NRAS. Mol Med Rep, 2022, **25**(2): 51

[23] Niu D, Wu Y, Lian J. Circular RNA vaccine in disease prevention and treatment. Signal Transduct Target Ther, 2023, **8**(1): 341

[24] Liu X, Zhang Y, Zhou S, *et al*. Circular RNA: an emerging frontier in RNA therapeutic targets, RNA therapeutics, and mRNA

vaccines. J Control Release, 2022, **348**: 84-94

[25] Kwon H, Kim M, Seo Y, *et al*. Emergence of synthetic mRNA: *in vitro* synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. Biomaterials, 2018, **156**: 172-193

[26] Hyde J L, Diamond M S. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. Virology, 2015, **479/480**: 66-74

[27] Wojcik R, Baranowski M R, Markiewicz L, *et al*. Novel N7-arylmethyl substituted dinucleotide mRNA 5' cap analogs: synthesis and evaluation as modulators of translation. Pharmaceutics, 2021, **13**(11): 1941

[28] Yan L, Huang Y, Ge J, *et al*. A mechanism for SARS-CoV-2 RNA capping and its inhibition by nucleotide analog inhibitors. Cell, 2022, **185**(23): 4347-4360.e17

[29] Muttach F, Muthmann N, Rentmeister A. Synthetic mRNA capping. Beilstein J Org Chem, 2017, **13**: 2819-2832

[30] Fuchs A L, Neu A, Sprangers R. A general method for rapid and cost-efficient large-scale production of 5' capped RNA. RNA, 2016, **22**(9): 1454-1466

[31] Nachtigall P G, Kashiwabara A Y, Durham A M. CodAn: predictive models for precise identification of coding regions in eukaryotic transcripts. Brief Bioinform, 2021, **22**(3): bbaa045

[32] Wisse L E, Penning R, Zaal E A, *et al*. Proteomic and metabolomic analyses of vanishing white matter mouse astrocytes reveal deregulation of ER functions. Front Cell Neurosci, 2017, **11**: 411

[33] Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol, 1987, **196**(4): 947-950

[34] Xia X. Detailed dissection and critical evaluation of the pfizer/BioNTech and moderna mRNA vaccines. Vaccines, 2021, **9**(7): 734

[35] Weissman D. mRNA transcript therapy. Expert Rev Vaccines, 2015, **14**(2): 265-281

[36] 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. Mol Ther, 2019, **27**(4): 824-836

[37] Presnyak V, Alhusaini N, Chen Y H, *et al*. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. Cell, 2015, **160**(6): 1111-1124

[38] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. Trends Biotechnol, 2004, **22**(7): 346-353

[39] Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito J Y, *et al*. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response. Trends Mol Med, 2020, **26**(3): 311-323

[40] Parvathy S T, Udayasuriyan V, Bhadana V. Codon usage bias. Mol Biol Rep, 2022, **49**(1): 539-565

[41] Nicholson A L, Pasquinelli A E. Tales of detailed poly(A) tails. Trends Cell Biol, 2019, **29**(3): 191-200

[42] Tudisca V, Simpson C, Castelli L, *et al*. PKA isoforms coordinate mRNA fate during nutrient starvation. J Cell Sci, 2012, **125**(Pt 21): 5221-5232

[43] Lima S A, Chipman L B, Nicholson A L, *et al*. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. Nat Struct Mol Biol, 2017, **24**(12): 1057-1063

[44] 杭辰悦, 徐山杉, 吴其峰, 等 . mRNA 治疗及其应用前景 . 科学通报, 2021, **66**(S2): 3649-3666
Hang C Y, Xu S S, Wu Q F, *et al*. Chin Sci Bull, 2021, **66**(S2): 3649-3666

[45] Wu M Z, Asahara H, Tzertzinis G, *et al*. Synthesis of low immunogenicity RNA with high-temperature *in vitro* transcription. RNA, 2020, **26**(3): 345-360

[46] Feng Y, Chen H, Cai J, *et al*. Cardiac RNA induces inflammatory responses in cardiomyocytes and immune cells *via* Toll-like receptor 7 signaling. J Biol Chem, 2015, **290**(44): 26688-26698

[47] Roschewski M, Lionakis M S, Sharman J P, *et al*. Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19. Sci Immunol, 2020, **5**(48): eabd0110

[48] Fisher A J, Beal P A. Structural basis for eukaryotic mRNA modification. Curr Opin Struct Biol, 2018, **53**: 59-68

[49] Damiati L A, El-Messeiry S. An overview of RNA-based scaffolds for osteogenesis. Front Mol Biosci, 2021, **8**: 682581

[50] Sultana N, Magadum A, Hadas Y, *et al*. Optimizing cardiac delivery of modified mRNA. Mol Ther, 2017, **25**(6): 1306-1315

[51] Karikó K, Muramatsu H, Welsh F A, *et al*. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. Mol Ther, 2008, **16**(11): 1833-1840

[52] Rezaei M, Nazari M. New generation vaccines for COVID-19 based on peptide, viral vector, artificial antigen presenting cell, DNA or mRNA. Avicenna J Med Biotechnol, 2022, **14**(1): 30-36

[53] 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**(2): 154-157

[54] Karim M E, Haque S T, Al-Busaidi H, *et al*. Scope and challenges of nanoparticle-based mRNA delivery in cancer treatment. Arch Pharm Res, 2022, **45**(12): 865-893

[55] Yadav K, Sahu K K, Sucheta, *et al*. Biomedical applications of nanomaterials in the advancement of nucleic acid therapy: mechanistic challenges, delivery strategies, and therapeutic applications. Int J Biol Macromol, 2023, **241**: 124582

[56] Subramanian P. Lipid-based nanocarrier system for the effective delivery of nutraceuticals. Molecules, 2021, **26**(18): 5510

[57] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, *et al*. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. Acc Chem Res, 2022, **55**(1): 2-12

[58] Ayad C, Yavuz A, Salvi J P, *et al*. Comparison of physicochemical properties of LipoParticles as mRNA carrier prepared by automated microfluidic system and bulk method. Pharmaceutics, 2022, **14**(6): 1297

[59] Shen Z, Liu C, Wang Z, *et al*. Development of a library of disulfide bond-containing cationic lipids for mRNA delivery. Pharmaceutics, 2023, **15**(2): 477

[60] Sakurai Y, Watanabe H, Nishio K, *et al*. pH-responsive lipid

nanoparticles achieve efficient mRNA transfection in brain capillary endothelial cells. Pharmaceutics, 2022, **14**(8): 1560

[61] Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: current perspectives. Adv Drug Deliv Rev, 2020, **154/155**: 37-63

[62] Shirodkar R K, Kumar L, Mutalik S, *et al*. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: emerging lipid based drug delivery systems. Pharm Chem J, 2019, **53**(5): 440-453

[63] Cai X, Dou R, Guo C, *et al*. Cationic polymers as transfection reagents for nucleic acid delivery. Pharmaceutics, 2023, **15**(5): 1502

[64] Mai Y, Guo J, Zhao Y, *et al*. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity. Cell Immunol, 2020, **354**: 104143

[65] Palau J, Climent F, Avilés F J, *et al*. Interactions of histones and histone peptides with DNA thermal denaturation and solubility studies. Biochim Biophys Acta Nucleic Acids Protein Synth, 1977, **476**(2): 108-121

[66] Chen J, Xu Y, Zhou M, *et al*. Combinatorial design of ionizable lipid nanoparticles for muscle-selective mRNA delivery with minimized off-target effects. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, **120**(50): e2309472120

[67] Xu L, Faruqu F N, Lim Y M, *et al*. Exosome-mediated RNAi of PAK4 prolongs survival of pancreatic cancer mouse model after loco-regional treatment. Biomaterials, 2021, **264**: 120369

[68] Levingstone T J, Herbaj S, Redmond J, *et al*. Calcium phosphate nanoparticles-based systems for RNAi delivery: applications in bone tissue regeneration. Nanomaterials (Basel), 2020, **10**(1): 146

[69] 石立旺, 张楠, 祝纶宇, 等 . mRNA 治疗用纳米载体研究新进展 . 中国医药生物技术, 2024, **19**(1): 45-51, 56
Shi L W, Zhang N, Zhu L Y, *et al*. Chin Med Biotechnol, 2024, **19**(1): 45-51, 56

[70] Li B, Manan R S, Liang S Q, *et al*. Combinatorial design of nanoparticles for pulmonary mRNA delivery and genome editing. Nat Biotechnol, 2023, **41**(10): 1410-1415

[71] Dilliard S A, Cheng Q, Siegwart D J. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, **118**(52): e2109256118

[72] Chen J, Ye Z, Huang C, *et al*. Lipid nanoparticle-mediated lymph node-targeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust $CD8^+$ T cell response. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, **119**(34): e2207841119

[73] Wang X, Liu S, Sun Y, *et al*. Preparation of selective organ-targeting (SORT) lipid nanoparticles (LNPs) using multiple technical methods for tissue-specific mRNA delivery. Nat Protoc, 2023, **18**(1): 265-291

[74] 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**(4): 313-320

[75] Grosser R, Cherkassky L, Chintala N, *et al*. Combination immunotherapy with CAR T cells and checkpoint blockade for the treatment of solid tumors. Cancer Cell, 2019, **36**(5): 471-482

[76] Pauken K E, Wherry E J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. Trends Immunol, 2015, **36**(4): 265-276

[77] Coley W B. II. Contribution to the knowledeg of sarcoma. Ann Surg, 1891, **14**(3): 199-220

[78] Conry R M, LoBuglio A F, Wright M, *et al*. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. Cancer Res, 1995, **55**(7): 1397-1400

[79] Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. Immunol Rev, 2004, **199**: 251-263

[80] Bridle B W, Boudreau J E, Lichty B D, *et al*. Vesicular stomatitis virus as a novel cancer vaccine vector to prime antitumor immunity amenable to rapid boosting with adenovirus. Mol Ther, 2009, **17**(10): 1814-1821

[81] Haen S P, Löffler M W, Rammensee H G, *et al*. Towards new horizons: characterization, classification and implications of the tumour antigenic repertoire. Nat Rev Clin Oncol, 2020, **17**(10): 595-610

[82] He Q, Gao H, Tan D, *et al*. mRNA cancer vaccines: advances, trends and challenges. Acta Pharm Sin B, 2022, **12**(7): 2969-2989

[83] Liu C, Shi Q, Huang X, *et al*. mRNA-based cancer therapeutics. Nat Rev Cancer, 2023, **23**(8): 526-543

[84] Benteyn D, Heirman C, Bonehill A, *et al*. mRNA-based dendritic cell vaccines. Expert Rev Vaccines, 2015, **14**(2): 161-176

[85] Guo Y, Lei K, Tang L. Neoantigen vaccine delivery for personalized anticancer immunotherapy. Front Immunol, 2018, **9**: 1499

[86] Ruangapirom L, Sutivijit N, Teerapakpinyo C, *et al*. Identification of shared neoantigens in *BRCA1*-related breast cancer. Vaccines, 2022, **10**(10): 1597

[87] Minati R, Perreault C, Thibault P. A roadmap toward the definition of actionable tumor-specific antigens. Front Immunol, 2020, **11**: 583287

[88] Vishweshwaraiah Y L, Dokholyan N V. mRNA vaccines for cancer immunotherapy. Front Immunol, 2022, **13**: 1029069

[89] Burris H A, Patel M R, Cho D C, *et al*. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. J Clin Oncol, 2019, **37**(15_suppl): 2523

[90] Rojas L A, Sethna Z, Soares K C, *et al*. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. Nature, 2023, **618**(7963): 144-150

[91] Thran M, Mukherjee J, Pönisch M, *et al*. mRNA mediates passive vaccination against infectious agents, toxins, and tumors. EMBO Mol Med, 2017, **9**(10): 1434-1447

[92] Wang Y, Tiruthani K, Li S, *et al*. mRNA delivery of a bispecific single-domain antibody to polarize tumor-associated macrophages and synergize immunotherapy against liver malignancies. Adv Mater, 2021, **33**(23): e2007603

[93] Chen X, Wang Y, Li Y, *et al*. Identification of immune-related cells and genes in the breast invasive carcinoma microenvironment.

Aging, 2022, **14**(3): 1374-1388

[94] Merline R, Moreth K, Beckmann J, *et al*. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and microRNA-21. Sci Signal, 2011, **4**(199): ra75

[95] Sánchez-Arribas N, Martínez-Negro M, Aicart-Ramos C, *et al*. Gemini cationic lipid-type nanovectors suitable for the transfection of therapeutic plasmid DNA encoding for pro-inflammatory cytokine interleukin-12. Pharmaceutics, 2021, **13**(5): 729

[96] Hamid O, Hellman M, Carneiro B, *et al*. 19O Preliminary safety, antitumor activity and pharmacodynamics results of HIT-IT MEDI1191 (mRNA IL-12) in patients with advanced solid tumours and superficial lesions. Ann Oncol, 2021, **32**: S9

[97] Da-Costa R C, Vieira I L, Hunger A, *et al*. p19Arf sensitizes B16 melanoma cells to interferon-β delivered *via* mesenchymal stem cells *in vitro*. Rev Bras De Pesquisas Med E Biol, 2020, **53**(3): e8876

[98] Perri F, Pisconti S, Della Vittoria Scarpati G. P53 mutations and cancer: a tight linkage. Ann Transl Med, 2016, **4**(24): 522

[99] Chen X, Lü C, Zhu X, *et al*. MicroRNA-504 modulates osteosarcoma cell chemoresistance to cisplatin by targeting p53. Oncol Lett, 2019, **17**(2): 1664-1674

[100] Xiao Y, Chen J, Zhou H, *et al*. Combining p53 mRNA nanotherapy with immune checkpoint blockade reprograms the immune microenvironment for effective cancer therapy. Nat Commun, 2022, **13**(1): 758

[101] Su Y, Su C, Qin L. Current landscape and perspective of oncolytic viruses and their combination therapies. Transl Oncol, 2022, **25**: 101530

[102] Rincón E, Cejalvo T, Kanojia D, *et al*. Mesenchymal stem cell carriers enhance antitumor efficacy of oncolytic adenoviruses in an immunocompetent mouse model. Oncotarget, 2017, **8**(28): 45415-45431

[103] Kennedy E M, Denslow A, Hewett J, *et al*. Development of intravenously administered synthetic RNA virus immunotherapy for the treatment of cancer. Nat Commun, 2022, **13**(1): 5907

[104] Rasul M F, Hussen B M, Salihi A, *et al*. Strategies to overcome the main challenges of the use of CRISPR/Cas9 as a replacement for cancer therapy. Mol Cancer, 2022, **21**(1): 64

[105] Li C, Psatha N, Gil S, *et al*. HDAd5/35++ adenovirus vector expressing anti-CRISPR peptides decreases CRISPR/Cas9 toxicity in human hematopoietic stem cells. Mol Ther Meth Clin Dev, 2018, **9**: 390-401

[106] Chen S, Yao Y, Zhang Y, *et al*. CRISPR system: discovery, development and off-target detection. Cell Signal, 2020, **70**: 109577

[107] Wang C S, Chang C H, Tzeng T Y, *et al*. Gene-editing by CRISPR-Cas9 in combination with anthracycline therapy *via* tumor microenvironment-switchable, EGFR-targeted, and nucleus-directed nanoparticles for head and neck cancer suppression. Nanoscale Horiz, 2021, **6**(9): 729-743

[108] Li T, Yang Y, Qi H, *et al*. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. Signal Transduct Target Ther, 2023, **8**(1): 36

[109] Rosenblum D, Gutkin A, Kedmi R, *et al*. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. Sci Adv, 2020, **6**(47): eabc9450

[110] Mollanoori H, Shahraki H, Rahmati Y, *et al*. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. Hum Immunol, 2018, **79**(12): 876-882

[111] Selvakumar S C, Preethi K A, Ross K, *et al*. CRISPR/Cas9 and next generation sequencing in the personalized treatment of Cancer. Mol Cancer, 2022, **21**(1): 83

[112] Rataj F, Jacobi S J, Stoiber S, *et al*. High-affinity CD16-polymorphism and Fc-engineered antibodies enable activity of CD16-chimeric antigen receptor-modified T cells for cancer therapy. Br J Cancer, 2019, **120**(1): 79-87

[113] Yee C. Adoptive T cell therapy: points to consider. Curr Opin Immunol, 2018, **51**: 197-203

[114] Schepisi G, Cursano M C, Casadei C, *et al*. CAR-T cell therapy: a potential new strategy against prostate cancer. J Immunother Cancer, 2019, **7**(1): 258

[115] Heiblig M, Elhamri M, Michallet M, *et al*. Adoptive immunotherapy for acute leukemia: new insights in chimeric antigen receptors. World J Stem Cells, 2015, **7**(7): 1022-1038

[116] Lahiri A, Maji A, Potdar P D, *et al*. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. Mol Cancer, 2023, **22**(1): 40

[117] Lang F, Schrörs B, Löwer M, *et al*. Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines. Nat Rev Drug Discov, 2022, **21**(4): 261-282

[118] Lokugamage M P, Vanover D, Beyersdorf J, *et al*. Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. Nat Biomed Eng, 2021, **5**(9): 1059-1068

[119] Meulewaeter S, Nuytten G, Cheng M H Y, *et al*. Continuous freeze-drying of messenger RNA lipid nanoparticles enables storage at higher temperatures. J Control Release, 2023, **357**: 149-160

[120] Luo T, Huo C, Zhou T, *et al*. Progress on RNA-based therapeutics for genetic diseases. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2023, **52**(4): 406-416

[121] 肖子怡, 吴晓敏, 关凡, 等 . mRNA疫苗:战胜新型冠状病毒感染的重要突破 . 生物化学与生物物理进展, 2023, **50**(12): 2779-2790
Xiao Z Y, Wu X M, Guan F, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2023, **50**(12): 2779-2790

[122] Sarkar T J, Quarta M, Mukherjee S, *et al*. Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. Nat Commun, 2020, **11**(1): 1545

mRNA Vaccines and Drugs: a New Favorite for Cancer Immunotherapy*

WEI Zhi-Meng[1,2)**], DANG Sheng[2)**], LI Guang-Chen[3)], GAO Lan-Zhu[3)], ZHAI Jing-Bo[1,4,5)***]

([1)]*Medical College, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao* 028000, China;

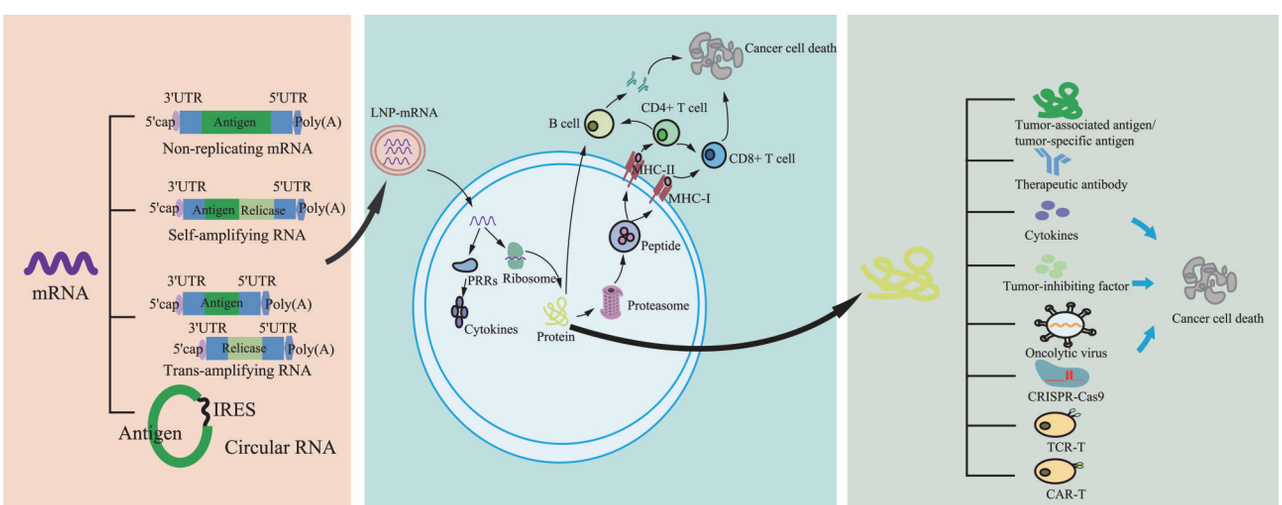
[2)]*Department of Laboratory, Department of Pathology, Keerqin District First People's Hospital, Tongliao* 028000, China;

[3)]*Infectious Diseases Department, Tongliao Infectious Disease Hospital, Tongliao* 028000, China;

[4)]*Key Laboratory of Zoonose Prevention and Control at Universities of Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao* 028000, China;

[5)]*Brucellosis Prevention and Treatment Engineering Research Center of Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao* 028000, China)

Graphical abstract



Abstract　mRNA vaccines and drugs enter host cells through delivery vectors and produce target proteins using the protein synthesis mechanism of cells. mRNA and target proteins can induce the body to produce innate immunity and adaptive immunity, and the target protein itself can also play a corresponding role. Tumor cells are inhibited and cleared under the above immune effects and target proteins. This article reviews the immunogenicity of mRNA, that is, the specific mechanism of stimulating the body to produce an immune response. At the same time, the main types of cells transfected by mRNA vaccine were briefly introduced. (1) Muscle cells, epidermal cells, dendritic cells and macrophages at the injection site; (2) immune cells in peripheral lymphoid organs; (3) liver cells and spleen cells, *etc*. Although transfected with a variety of cells, it is mainly enriched in immune cells and liver cells because immune cells express toll-like receptors and liver cells express low-density lipoprotein receptors. mRNA vaccines and drugs are mainly divided into non-replicating mRNA (nrmRNA),

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82160312), Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2023MS08057), and Key Laboratory of Zoonose Prevention and Control at Universities of Inner Mongolia Autonomous Region open issue (MDK2023015, MDK2023017, MDK2023018).

** The authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel：86-475-8314234，E-mail：jbzhai@imun.edu.cn

Received：January 5，2024　Accepted：April 26，2024

self-amplifying RNA (saRNA), trans-amplifying RNA (taRNA) and circular RNA (circRNA).This article reviews how these 4 types of vaccines and drugs work, and compares their advantages and disadvantages. Due to its inherent immunogenicity, instability, and low delivery efficiency *in vivo*, mRNA vaccines and drugs have been unable to enter the clinic. This article describes in detail how to reformation and modify the 5'cap, 5'UTR, 3'UTR, ORF, 3'Poly(A) and some nucleotides of mRNA to eliminate its immunogenicity and instability. Due to the low efficiency of the delivery carrier, the researchers optimized it. This article briefly introduces the application of non-viral vectors and their targeting, specifically involving the mechanism of action of various types of delivery vectors and their advantages and disadvantages, and summarizes some of the current targeting vectors. Targeted carriers can improve the delivery efficiency of mRNA to specific tissues and prevent side effects of systemic exposure, such as liver injury. The specific methods of using mRNA vaccines and drugs to treat cancer are as follows: mRNA can be used to encode and transcribe tumor-associated antigens, tumor-specific antigens (TSAs), therapeutic antibodies, cytokines, tumor suppressors, oncolytic viruses, CRISPR-Cas9, CARs and TCRs, so as to play an anti-tumor role. In this paper, the specific mechanism of the above methods and the current research and development of corresponding mRNA vaccines and drugs are briefly reviewed. The successful development of the COVID-19 mRNA vaccine has brought mRNA technology to the attention of the world and brought new and effective means for the prevention and treatment of cancer. mRNA vaccines and drugs have the advantages of short development cycle, dual immune mechanism, safety, high efficiency and large-scale production. At the same time, there are also many areas that need further improvement, such as the development of ideal target TSAs, the in-depth development of saRNA, taRNA and circRNA, the development of targeted nano-delivery for different tissues and organs, the expansion of mRNA administration routes, and the development of mRNA that can be stably stored at room temperature or even high temperature. These problems need to be further studied and solved. In addition to cancer therapy, mRNA vaccines and drugs can also be used in the treatment of infectious diseases, genetic diseases, regenerative medicine and anti-aging. mRNA vaccines and drugs are a very promising platform, and we believe that they will benefit cancer patients in the near future.

Key words mRNA cancer vaccines and drugs, immune mechanism, classification, modification methods, delivery systems, clinical application

DOI：10.16476/j.pibb.2024.0009