

mRNA 药物研究进展及市场应用分析

黄可¹ 李山红^{2*}

(1 北京医药健康科技发展中心 北京 100035 2 智凤科技(北京)有限公司 北京 100089)

摘要 信使 RNA(messenger RNA, mRNA) 是一段编码蛋白质的核糖核苷酸序列, 因为其进入细胞经翻译修饰后可以表达目的蛋白, 所以 mRNA 分子可以作为药物治疗相应的疾病。mRNA 药物用于治疗多种疾病, 包括感染性疾病、肿瘤, 以及由于缺少某种蛋白质或者某种蛋白质机能异常所引起的疾病, 甚至作为基因编辑的工具参与基因治疗。mRNA 分子作为疫苗用于预防感染性疾病已经在市场上取得了巨大的成功, 因此其应用潜力得到了广泛的关注。由于 mRNA 药物应用方向广泛, 且 mRNA 药物具有研发生产过程快、生产成本较低等优势, 目前多种 mRNA 药物的相关研究正在进行中。就 mRNA 的基础结构、mRNA 的递送系统、国内外 mRNA 药物的研究及临床进程进行综述, 并对进一步广泛应用 mRNA 药物所面临的问题进行探讨。

关键词 mRNA 药物 mRNA 应用 国内 mRNA 疫苗 mRNA 临床进展

中图分类号 Q522+.2

信使 RNA(messenger RNA, mRNA) 是一段编码蛋白质的核糖核苷酸序列, 在细胞质中能够利用细胞器表达所编码的蛋白质。mRNA 在 1961 年首次被发现, 1987 年 Malone 发现 mRNA 分子和脂滴混合后能够进入细胞表达目的蛋白, 这一发现拉开了 mRNA 作为药物研究的序幕^[1]。随后大量研究探究 mRNA 相关应用的可能性, 但由于 RNA 容易被环境中广泛存在的 RNA 酶(RNase) 降解, 本身并不稳定, 所以对 mRNA 作为药物

的应用大部分人仍持保守态度。Karikó 发现 RNA 在细胞内激活了天然免疫系统导致外源 mRNA 在体内的稳定性较差, 并于 2005 年将修饰碱基应用至 mRNA 合成, 修饰后的 mRNA 可逃避天然免疫系统的识别, 成功减少了天然免疫应答的激活^[2]。mRNA 稳定性大大增加从而增加了 mRNA 成为药物的可能性^[3]。自 2000 年以来, 医药行业加大了对 mRNA 的研究力度, 但是 mRNA 真正进入大众视野展现出巨大潜力还是在 2019 年(图 1)。

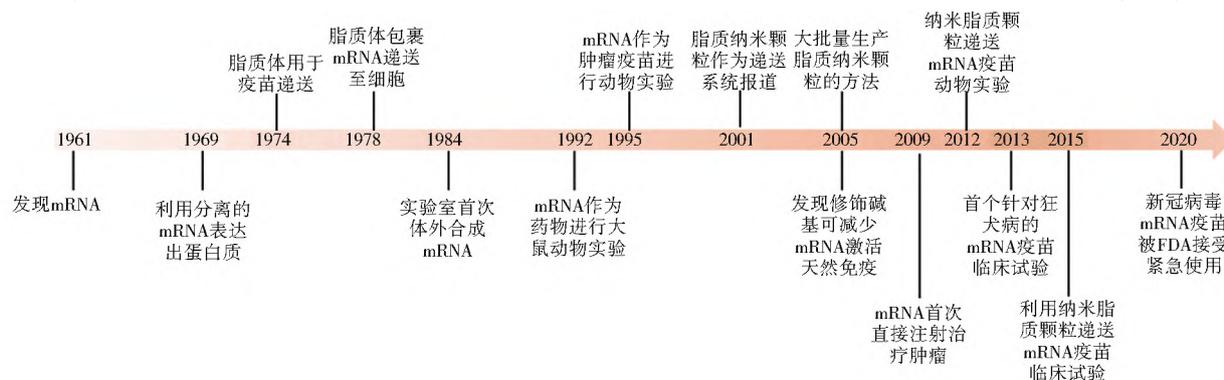


图 1 mRNA 药物研究里程碑

Fig. 1 Milestone of mRNA drug research

收稿日期: 2022-10-26 修回日期: 2023-04-03

* 通讯作者 电子信箱: 13621149254@139.com

2019 年末突如其来的新冠病毒肺炎 (COVID-19) 疫情改变了生物医药行业的布局。面对传染速度快、致病性强的新冠病毒 (SARS-CoV-2), 快速研发出一款有效的疫苗是控制疫情的最佳方案。Pfizer 公司和 Moderna 公司的 mRNA 疫苗获得 FDA 紧急使用的批件迅速上市。相对传统的亚单位疫苗、灭活疫苗, mRNA 疫苗的生产速度具有明显优势, 在突发疫情的情况下快速拿到了产品, 实际临床效果也显示 mRNA 疫苗表现优秀。Moderna 的 mRNA 疫苗 (mRNA-1273) 的保护率高达 94%^[4], Pfizer 和 BioNTech 联合开发的 mRNA

疫苗对 SARS-CoV-2 的保护率高达 95%^[5]。在疫情影响之下, mRNA 疫苗也成为生物药领域的黑马, 2021 年全球药物销售量排行中, Pfizer 和 BioNTech 联合开发的新冠 mRNA 疫苗 Comirnaty[®] 超过 AbbVie 公司的抗炎药 Humira[®], 以销售额 367.81 亿美元排名第一; 而 Moderna 的新冠 mRNA 疫苗 Spikevax[®] 以 176.65 亿美元的销售额在 2021 年的全球药物中排名第三 (图 2)。mRNA 疫苗在其他药物增长幅度较小的情况下实现了绝对领先的收益。

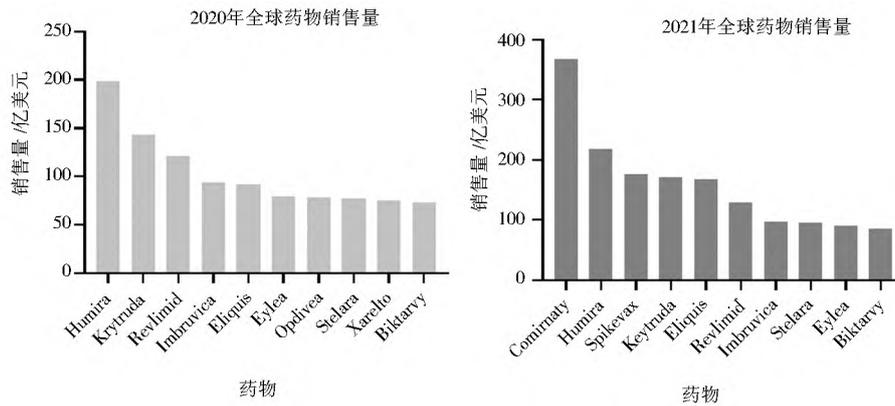


图 2 2020 年和 2021 年全球销售量前十药物

Fig. 2 Top 10 best sale drugs in 2020 & 2021

巨大的经济收益和免疫后产生的优秀保护效果使 mRNA 技术成为生物药领域的关注热点。相对于传统疫苗, mRNA 疫苗生产周期短, 只需要获得编码目的蛋白的核酸序列就可以制备骨架。mRNA 生产高效的特点使其在面对一些突发传染病的疫苗制备中相对于传统的减毒疫苗、灭活疫苗和亚单位疫苗等具有明显优势。mRNA 的生产成本较低, 主要原料是核酸聚合酶、核苷酸、加帽酶、帽子类似物等, 通过体外转录 (*in vitro* transcription, IVT) 反应在短时间内即可产生大量 mRNA。相对于传统技术路线的疫苗, mRNA 的生产过程中无须进行细胞培养、病毒培养等操作, 减少了生产成本也节约了时间。mRNA 疫苗的安全性比较高, 不会出现在减毒疫苗中可能出现的毒力突变的风险; mRNA 疫苗诱导是 Th1 偏向的反应, 减少了由 Th2 免疫反应引起副反应的可能性^[6-8]; 而相对于同是核酸疫苗的 DNA 疫苗, mRNA 疫苗只在细胞质中表达, 并不进入细胞核内, 没有整合宿主基因组的风险, 在安全性上更胜一筹。

mRNA 除了研发生产周期短、成本低、安全性高等

优点外, 其应用方向也十分广泛, 除了针对传染病的预防性疫苗, mRNA 还可以用于开发针对肿瘤的治疗性疫苗; 又因为 mRNA 本身可以在细胞内表达蛋白质, 所以可以作为外源蛋白质补充治疗一些与蛋白质缺失相关的疾病, 或直接编码相应抗体或细胞因子来发挥作用。此外, mRNA 还可以与基因编辑系统 CRISPR/Cas9、TALEN、ZFN 等联合使用进行基因编辑而进行基因治疗。

Pfizer 和 Moderna 的新冠 mRNA 疫苗大获成功使 mRNA 在生物药领域的关注度急剧提升, 将 mRNA 作为药物进行疾病治疗具有良好的应用前景。mRNA 的相关研究和应用正成为当下的热点, 本文就 mRNA 技术的研究和临床应用进展进行综述, 并对国内 mRNA 产业化的现状和面对的挑战进行探讨。

1 mRNA 结构与递送

编码目的蛋白的核酸序列是发挥作用的中心。mRNA 带负电荷, 与细胞膜表面的带电性质产生排斥, 导致进入细胞的效率极低。为了顺利发挥作用, mRNA 需要与相应的递送系统结合, 使其能够进入细

胞发挥作用。所以一个完整 mRNA 药物是由 mRNA 骨架和使 mRNA 顺利进入细胞内发挥作用的递送系统构成的。

1.1 mRNA 结构

mRNA 是一条线性的核苷酸序列,主要由 5 个主要

部分构成:5'端是帽子结构(Cap),与翻译效率相关的 5'非翻译区(untranslated region,UTR),编码蛋白质的开放阅读框(opening reading frame,ORF)区域,与翻译效率相关的 3'UTR,以及与 mRNA 稳定性和翻译效率相关的由多个单磷酸腺苷合成的 polyA 尾(图 3)。

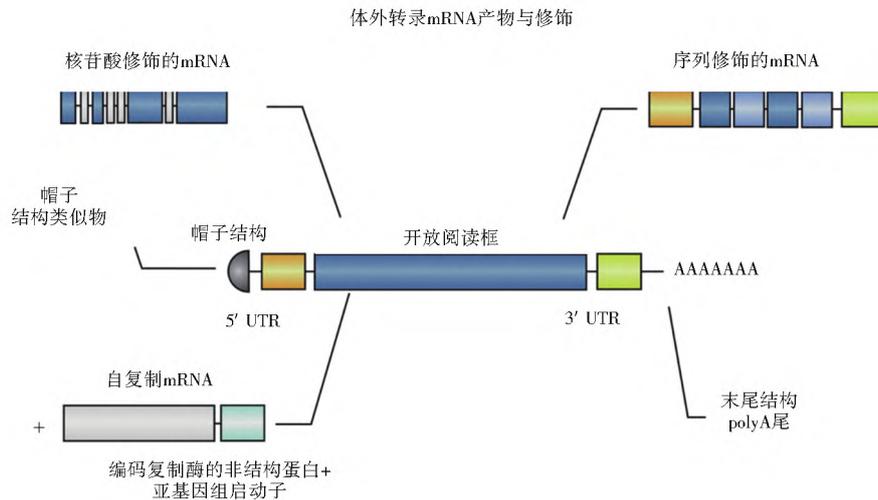


图 3 mRNA 结构^[9]

Fig. 3 Structure scheme of mRNA^[9]

mRNA 的 5' 端的第一个鸟苷有甲基化修饰,此结构被称为帽子(Cap),Cap 能够被翻译起始因子识别,是 mRNA 翻译所必须的元件。此外,mRNA 前端的 Cap 结构能增加 mRNA 的稳定性。Cap 根据修饰的位点不同,可以分为 Cap0、Cap1 和 Cap2 等^[10]。Cap1 和 Cap2 是高等真核生物中自带的、较多的 Cap 结构,带有此类 Cap 结构的 mRNA 不会激活细胞内天然免疫反应。市面上目前主要使用的是带有 Cap1 结构的 mRNA。

目前 mRNA 主要通过两种方法获得 Cap 结构:酶法加帽及共转录加帽。酶法加帽通过体外转录先合成 mRNA,将 mRNA 纯化后再利用牛痘病毒加帽酶(vaccinia capping enzymes)对 mRNA 进行加帽反应,使其获得 Cap0 结构,然后用 2-O-甲基转移酶使 Cap0 结构转变为 Cap1。酶法加帽的效率极高,根据文献报道可达 98%^[11]。共转录加帽是将预先合成好的 Cap 结构类似物作为原料,在 IVT 过程中 Cap 结构类似物将会作为转录起始位置开始合成带有 Cap 结构的 mRNA^[12]。共转录加帽操作简单,但其加帽效率不如酶法加帽,市面上主要的帽子类似物有 ARCA 与 CleanCap。ARCA 提供的是 Cap0 结构,加帽率约为 80%^[13]; CleanCap 提供 Cap1 结构,加帽率可

达 95%^[14]。

mRNA 的 UTR 分为 5'UTR 和 3'UTR,虽然 UTR 不编码蛋白质,但其具有的二级结构对 mRNA 的稳定性及翻译效率有较大影响。通过优化和筛选 UTR 序列,可以提高 mRNA 翻译效率和稳定性^[15]。

ORF 是带有编码目的蛋白的序列区域,在细胞内表达后发挥功能。对 ORF 一般要求选择有功能的区域,对疫苗的设计则要求 ORF 表达的蛋白质要具有免疫原性,刺激免疫系统产生的抗体具有良好的中和活性,能够有效阻止相应病原体的感染。对 ORF 区域除了选择经过实验验证的区域外,也可以通过生物信息学结合 AI 对候选序列进行筛选。除了对表达区域进行筛选,为了增加 mRNA 的稳定性和目的蛋白的表达也可以对序列进行密码子优化^[16-17]。此外,在合成的 mRNA 中使用修饰碱基可以减少天然免疫应答的激活,增加 mRNA 稳定性,同时也能够增加目的蛋白的表达^[2]。目前上市的 Pfizer 和 Moderna 的新冠 mRNA 疫苗均使用修饰碱基 N₁-甲基化假尿嘧啶。另一个 mRNA 巨头公司 CurVac 的 mRNA 疫苗中没有使用修饰碱基,对第一代 CurVac 的新冠 mRNA 疫苗临床试验结果表明保护率仅有 48% 左右,因未达预期而停止上市^[18]。

polyA 尾是位于 mRNA 尾部的一段长的重复单磷酸腺苷序列,对 mRNA 的稳定性和翻译表达效率有直接影响。polyA 长度不同在不同表达系统中的表达效果不同,在真核生物中,120 个单磷酸腺苷可以增加目的蛋白的表达效率,但是对于某个表达系统,最适合的 polyA 可能需要进行筛选^[19]。

传统 mRNA 只需要具有上述的 5 个部分即可在细胞内表达所编码的蛋白质,除了传统结构的 mRNA,还有一种带有复制元件在细胞内能够实现自我复制的 mRNA,被称为自复制 mRNA (self-amplifying mRNA, saRNA)。它除了具有传统 mRNA 所需要的 5 个基础元件,还带有一段通常来自甲病毒科的编码复制酶的序列,该序列可以与 ORF 整合到同一序列进行表达,也可以单独整合到一条 mRNA 序列上,与带有 ORF 的 mRNA 序列同时递送发挥功能。该序列在细胞内表达后产生 RNA 复制所需要的酶,复制子代 mRNA,这使得仅用少量 mRNA 就可以产生大量目的蛋白,在相同 RNA 产能下可提供更多人份的使用量。

1.2 mRNA 递送系统

递送系统可以分为病毒递送系统和非病毒递送系统。病毒递送系统是利用病毒的外壳包裹目的序列形成带有病毒外壳的纳米颗粒达到递送的目的;而非病毒递送种类较多,包括多聚体小分子、脂质体、带电蛋白等。目前上市的核酸药物是基于纳米脂质颗粒递送 mRNA^[20-21]。

纳米脂质颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 主要由可电离阳离子脂质、中性磷脂、胆固醇和聚乙二醇四种成分构成(图 4),将四种成分按照一定比例与 mRNA 混合通过仪器调节流速等参数合成大小在一定范围的纳米颗粒^[22]。LNP 中的可电离阳离子脂质是最关键的成分,在正常生理环境能够与 mRNA 结合,在体内环境中能够顺利释放 mRNA 是发挥作用的关键。中性磷脂起辅助作用,而胆固醇帮助 LNP 与细胞膜融合,聚乙二醇增加了 LNP 在体内的稳定性,同时具有防止颗粒聚集和控制 LNP 大小的作用^[9]。

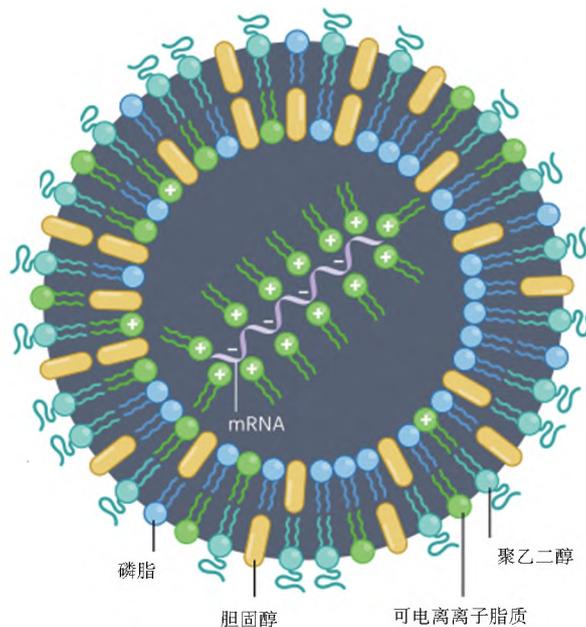


图 4 LNP 结构示意图^[1]

Fig. 4 Structure of LNP^[1]

除 LNP 外,还有一些基于多聚体与 mRNA 结合的思路进行研究的一些递送系统。例如,具有分支状结构的聚乙烯亚胺^[23-24]和生物降解性较好的聚 β 氨基酯^[25]。此外还有一些带正电荷的具有多聚体性质的蛋白质也被选作递送系统,如鱼精蛋白与 mRNA 结合后形

成致密的结构^[26],不仅可以抵抗 RNA 酶还可以增加免疫细胞的刺激。在 CurVac 公司进行的多款 mRNA 疫苗的临床试验中,其使用的递送系统也选择了鱼精蛋白^[3]。国内 mRNA 厂家斯微生物开发的 LPP (lipoplexparticle) 系统应用的 mRNA 疫苗已经进行临床试验。

2 治疗性 mRNA 的临床应用

mRNA 作为编码蛋白质的核酸序列,其实质是在细胞内表达出所编码的蛋白质,通过蛋白质发挥相应的生物学功能,所以用蛋白质可以治疗的疾病理论上也能用 mRNA 进行治疗。目前 mRNA 的应用方向包括针对传染性疾病的预防性疫苗,针对肿瘤的治疗性疫苗^[27],表达某些蛋白质作为蛋白质补充治疗及基因编辑。

mRNA 作为针对传染性疾病的疫苗的应用效果从

表 1 针对感染性疾病的 mRNA 疫苗临床进展示例

Table 1 Examples of clinical progress of mRNA vaccines against infectious diseases

| 疫苗靶标 | 临床试验批号 | 临床进展 | 制造商 |
|-----------------|-------------|--------|---|
| 狂犬病毒 | NCT02241135 | I 期 | CureVac AG |
| 巨细胞病毒 | NCT03382405 | I 期 | ModernaTX, Inc. |
| 人偏肺病毒与副流感病毒 3 型 | NCT03392389 | I 期 | ModernaTX, Inc. |
| 尼帕病毒 | NCT05398796 | 招募中 | National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) & ModernaTX, Inc. |
| 人类免疫缺陷病毒 | NCT05217641 | 招募中 | National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) |
| 基孔肯亚病毒 | NCT03829384 | I 期 | ModernaTX, Inc. |
| EB 病毒 | NCT05164094 | 招募中 | ModernaTX, Inc. |
| 寨卡病毒 | NCT03014089 | I 期 | ModernaTX, Inc. |
| 新型冠状病毒 | NCT05435027 | 招募中 | Gritstone bio, Inc. |
| 呼吸道合胞病毒 | NCT05127434 | III 期中 | ModernaTX, Inc. |
| 流感病毒 | NCT05252338 | 招募中 | GSK& CureVac AG |

随着对肿瘤研究的逐渐深入,用于肿瘤疫苗设计的免疫原主要分为两类:一类是肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA),一般优先表达在肿瘤细胞中,与肿瘤异常状况相关,此类抗原具有通用性,针对某一类别肿瘤均有效果;另一类是新抗原(neoantigen),是一类表达于肿瘤细胞表面的多肽,能够被 T 细胞识别并激活 T 细胞,neoantigen 一般来自于肿瘤基质细胞的突变。需要将肿瘤组织取出消化后对 neoantigen 进行测序,以确定肿瘤细胞相关突变点。在体外测试其能够被树突状细胞(DC)递送及免疫原性后,根据 neoantigen 表达的多肽合成 mRNA 疫苗,包装至递送系统后进行治疗。由于 neoantigen 的确定需要对患者的肿瘤组织进行分析,所以 mRNA 肿瘤疫苗可以进行针对个体的肿瘤治疗,实现精准治疗(表 2)。

mRNA 可以直接递送到体内激活免疫系统发挥作用,也可以转导至其他细胞使其表达,将表达靶标的细

Pfizer 和 Moderna 的新冠 mRNA 疫苗的成功已经可见一斑。mRNA 疫苗的研发生产周期较短,在面对诸如流感病毒一样容易产生突变的病原体,以及如埃博拉病毒、寨卡病毒等突发病毒时具有明显优势。在新冠疫情之前,已经有一些 mRNA 疫苗进行临床试验,在疫情影响下有更多厂家进入到 mRNA 疫苗研究的竞争中(表 1)。值得一提的是,虽然已经有上市的新冠 mRNA 疫苗,但是针对新冠病毒突变株及与新冠 mRNA 疫苗安全性相关的临床试验仍在大量进行中。

胞用于治疗。将编码免疫调节因子的 mRNA 导入 DC 增加 DC 的活化,从而增强 T 细胞的应答,此类疫苗称为 DC-mRNA 肿瘤疫苗,目前也已经在广泛研究中(表 2)。此外,在细胞治疗方法中,CAR-T(Chimeric antigen receptor T cell immunotherapy)细胞中嵌合抗原的表达也可以通过 mRNA 的导入来实现^[28],由于 mRNA 表达不具有持续性,用 mRNA 表达的 CAR 在体内并不会持久存在,因而可能会减少 CAR-T 细胞对自体细胞识别杀伤造成的脱靶效应,目前用 mRNA 转导的 CAR-T 细胞治疗是 mRNA 相关肿瘤治疗的另一个方向。

编码蛋白质用以补充体内缺少或无功能的蛋白质和表达抑制或活化免疫系统的蛋白质是 mRNA 技术最直接的两个应用方向。将编码 SPB(surfactant protein B)的 mRNA 转导入由缺乏 SPB 引起的致死性肺病的小鼠模型中,结果表明可增加小鼠的生命周期^[29];将编码血管内皮生长因子 A 的 mRNA 注入小鼠心梗模型后

表2 mRNA 肿瘤疫苗临床进程
Table 2 Clinical progress of mRNA vaccine against tumor

| 疫苗名称 | 临床试验批号 | 临床进展 | 靶标 | 厂商 |
|--------------------|-------------|---------|---|--|
| DC-mRNA | NCT00846456 | I/II | Glioblastoma | Oslo University Hospital |
| 个体化 mRNA 疫苗 | NCT03908671 | 未招募 | sophageal cancer Non small cell lung cancer | Stemirna Therapeutics |
| 个体化新抗原 mRNA 疫苗 | NCT05192460 | 招募中 | Gastric cancer , Esophageal cancer , Liver cancer | NeoCura& The Affiliated Hospital of the Chinese Academy of Military Medical Sciences |
| CV9201 | NCT00923312 | III 期 | Non small cell lung cancer | CureVac AG |
| BI 1361849 | NCT03164772 | II 期 | Non small cell lung cancer | Ludwig Institute for Cancer Research; oehringer Ingelheim MedImmune LLC CureVac AG PharmaJet , Inc. |
| BNT111 | NCT04526899 | II 完成 | Melanoma | BioNTech SE |
| TriMix-DC | NCT01066390 | I 期完成 | Melanoma | Universitair Ziekenhuis Brussel Melan-A , Mage-A1 , Mage-A3 |
| Survivin , gp100 , | NCT00204516 | I/II 完成 | Melanoma | University Hospital Tuebingen |
| CV9104 | NCT02140138 | II 期终止 | Prostate cancer | CureVac AG |
| mRNA-4157 | NCT03313778 | 招募中 | Solid tumor | ModernaTX , Inc. |
| DC-006 (DC-mRNA) | NCT01334047 | I/II 终止 | Ovarian Cancer | Oslo University Hospital |
| W_ova1 | NCT04163094 | 招募中 | Ovarian Cancer | University Medical Center Groningen |

增加了小鼠的生存时间^[30];在哮喘模型中使用编码FOXP3的mRNA可以预防过敏原诱导产生的组织炎症^[31]。许多临床前试验已经验证了蛋白质替代疗法的前景。此外,mRNA还可以直接编码表达针对抗原的特异性抗体,转导进入体内后表达产生抗体直接发挥

作用(表3)。虽然mRNA编码蛋白质的应用方向非常广泛,但是此方法也有其局限性。例如,某些蛋白质需要经过特定的修饰才能发挥功能^[32],而某些蛋白质需要经过剪切才能够发挥效果^[33]。在设计编码蛋白质的mRNA时需要考虑这些因素。

表3 基于 mRNA 表达的抗体药物研究进展^[34]

Table 3 Research progress of antibody drugs based on mRNA^[34]

| 治疗方向 | 抗体形式 | 靶标或适应证 | 研究进程 | 研究团队 |
|-------|----------------|----------|--------|--|
| 肿瘤 | 双特异性 | 实体瘤 | 研究阶段 | BioNTech AG |
| | 未披露 | 实体瘤 | 临床前 | BioNTech AG |
| | IgG | CD20 | 研究阶段 | CurVac AG |
| | 未披露 | 表面肿瘤 | 临床前 | CurVac AG |
| 感染性疾病 | IgG | 人类免疫缺陷病毒 | 研究阶段 | University of Pennsylvania |
| | IgG | 狂犬病毒 | 研究阶段 | CurVac AG |
| | IgG | 乙型流感病毒 | 研究阶段 | CurVac AG |
| | IgG | 甲型流感病毒 | 研究阶段 | Moderna Therapeutics |
| | 多种形式抗体 | 呼吸道合胞病毒 | 研究阶段 | Georgia Institution of Technology and Emory University |
| | 未披露(mRNA-1944) | 基孔肯亚病毒 | 临床 I 期 | Moderna Therapeutics/DARPA |
| 毒素 | 中和抗体 | 肉毒菌毒素 | 研究阶段 | CurVac AG |
| | 中和抗体 | 志贺毒素 | 研究阶段 | CurVac AG |

mRNA 还能结合基因编辑技术进行基因治疗。常见的基因编辑技术有 Zinc finger nuclease 系统、TALE nuclease 系统、CRISPR/Cas9 系统及转座子系统。这些基因编辑系统在体内发挥作用的前提是需要有相应的核酸酶(nuclease)对原来的 DNA 分子进行切割,产生断裂的核酸分子从而进行修复与编辑^[35]。而对于 Zinc finger nuclease 系统,其核心就是 Zinc finger nuclease,将编码 Zinc finger nuclease 的 mRNA 递送到体内,Zinc finger 表达后即可对靶标序列进行编辑。对于 TALE

nuclease 系统,其递送 mRNA 编码的 TALE nuclease。对于 CRISPR/Cas9 系统,其将编码 Cas9 的 mRNA 和与靶标序列结合的 sgRNA 共同递送至细胞内发挥作用。目前基于 mRNA 技术的基因编辑技术已经在动物实验中证明能靶向删除目的序列或插入目的基因^[36-38],同时一些临床试验也在进行中(表 4)。目前基于 mRNA 的基因编辑技术被期望用于治疗遗传性疾病,或由病毒感染后造成的基因变化引起的疾病。

表 4 基于 mRNA 的基因编辑临床试验

Table 4 Clinical experiments of gene edit based on mRNA

| 靶标 | 临床试验批号 | 临床试验进展 | 技术路线 | 厂商 |
|-----------------------|-------------|--------|-------------|----------------------------|
| 病毒性角膜炎 | NCT04560790 | I/II 期 | CRISPR/Cas9 | Shanghai BDgene Co., Ltd. |
| 遗传性血管水肿 | NCT05120830 | I/II 期 | CRISPR/Cas9 | Intellia Therapeutics |
| ZFN 修饰的 T 细胞治疗 HIV 感染 | NCT02388594 | I 期 | ZFN | University of Pennsylvania |
| 镰刀状红细胞 | NCT03653247 | I/II 期 | ZFN | Sangamo Therapeutics |

3 mRNA 药物市场发展与挑战

3.1 国内外公司 mRNA 药物研发进展

mRNA 自 20 世纪 80 年代展现出具有作为药物的潜力,因为应用广泛、安全性高,其作为药物用于治疗疾病被广泛研究。国外 mRNA 的应用研究和大公司的入局时间较早(详见 <https://www.fiercebiotech.com/r-d/industry-voices-mrna-based-therapies-blueprints-for-therapeutics>)。CurVac 在 2000 年成立,诺华在 2008 年建立了 mRNA 研发中心,同年 BioNTech 建立,2010 年 Moderna 公司成立^[1]。这些对 mRNA 药物研究较早的公司已经在相应领域进行布局。BioNTech 的建立者 Sahin 认为 mRNA 可以基于肿瘤的 neoantigen 的发现制备针对单独个体的个性化疫苗,实现针对性的肿瘤治疗,其布局在基于 mRNA 技术的肿瘤治疗方向;而 Moderna 最早期的方向是将 mRNA 用于蛋白质补充疗法,期望治疗一些有体内蛋白质缺失导致的疾病,但此方向进展并不顺利,现将研究方向更改为 mRNA 疫苗。到 2020 年,Moderna 已经有 9 个 mRNA 候选疫苗进行了临床试验。在新冠疫情到来时,Moderna 将其他管线的研究工作暂停全力研发新冠 mRNA 疫苗,在新冠病毒基因组公布后数日之后就设计了 mRNA 疫苗的原型;BioNTech 也采用相同的策略,与 Pfizer 联合开发 mRNA 疫苗快速推进临床试验。BioNTech 和 Moderna 在 mRNA 技术平台上的布局较早,且都针对疫苗方向,

在早期的积累下,mRNA 疫苗研发策略相对较为成熟,在突发疫情下迅速取得了成果。国外 mRNA 治疗技术布局起步较早,目前产线已较为成熟,供应系统较为完备,能够支持临床试验和大量生产^[39],但是产能仍然有待提升^[40]。目前与 mRNA 相关的临床试验中国外 mRNA 三巨头 BioNTech、Moderna、CurVac 的申请占大多数。目前 BioNTech 在进行的临床试验有 47 个注册,其中不乏大量对新冠 mRNA 疫苗使用后续的安全性评价。其中与肿瘤治疗相关的临床试验注册有 28 项。Moderna 在进行的临床试验有 60 项,其中关于传染性疫苗开发的 33 项,关于肿瘤的临床试验 6 项。CurVac 进行的临床试验申请 22 项,其中关于新冠 mRNA 疫苗的申请 8 项,关于其他传染性疾病 5 项,其余则是关于肿瘤治疗的临床试验。

国内 mRNA 研发起步较晚,但是国内优秀的 mRNA 研发企业不断涌现,它们的策略多是在短期内集中开发新冠 mRNA(表 5)以期能够实现国内 mRNA 疫苗自主开发甚至与国外 mRNA 疫苗相竞争,借此开发建立成熟的 mRNA 疫苗研发平台,逐渐扩展 mRNA 治疗相关应用研发。

3.2 mRNA 国内产线发展

国内 mRNA 研发企业如斯微生物、艾博生物、瑞吉瑞科等均有自主研发平台,技术独立于国外。研发管线顺利推进的同时,国内的原料厂商也为 mRNA 生产提供了条件。mRNA 生产主要分为三个部分:mRNA 生产、递送系统构成、质检后灌装为成品^[41](图 5)。

表5 国内 mRNA 疫苗研发产线进展

Table 5 Progress of domestic mRNA vaccine research development

| 名称 | 研发企业 | 临床进程 | 靶标 |
|------------------|----------|--------|------------------|
| ARCoV | 艾博/沃森 | III 期 | 新冠原始毒株 |
| 奥密克戎 mRNA 疫苗 | 艾博 | 获得临床批件 | 新冠奥密克戎变异株 |
| - | 斯微生物 | II 期 | 新冠原始毒株 |
| LVRNA009 | 丽凡达/艾美 | III 期 | 新冠原始毒株 |
| SYS6006 | 石药 | II 期 | 新冠奥密克戎变异株和德尔塔突变株 |
| - | 康希诺 | I/II 期 | 新冠原始毒株 |
| R520A | 瑞科/瑞吉 | I 期 | 新冠原始毒株 |
| - | 锐博/阿格纳 | I 期 | 新冠原始毒株 |
| - | 威斯津 | IND 申请 | 新冠奥密克戎变异株和德尔塔突变株 |
| RQ3011/3012/3013 | 蓝鹊/沃森/复旦 | 临床前 | 新冠原始毒株 |
| 新冠突变株 mRNA 疫苗 | 蓝鹊/沃森 | 临床前 | 新冠原始毒株 |
| - | 中生复诺健 | 临床前 | 新冠奥密克戎变异株和德尔塔突变株 |

mRNA 生产的原料比较简单,主要包括 T7 聚合酶、牛痘病毒加帽系统、2-O-甲基转移酶、DNase I,以及合成的原料 NTP、修饰碱基;如果使用共转录加帽体系,则还需要 Cap 结构类似物,在转录中将加帽过程同时完成。在生产中所用的原料酶最早都是在 20 世纪 90 年代研究并进行商业化的^[11],其制作工艺成熟,目前国内的厂商如近岸蛋白、诺唯赞、翊圣等均能提供 GMP 级别 mRNA 合成原料,mRNA 原料供应的国产化程度较高。Cap1 的加帽系统 CleanCap 具有专利保护,但是国内也有企业研发自主的 Cap1 加帽系统以期建立不受专利限制的、更简便的生产方式。mRNA 模板一般采用稳定性较高的质粒,目前国内金斯瑞、博腾等上市企业已经具有稳定大量生产质粒的成熟产线。

国内开发中的 mRNA 疫苗采用的递送系统大多是 LNP,但是目前 LNP 是国内 mRNA 疫苗研发的主要壁垒。LNP 的专利主要是由 Arbutus 和 Genevant 共同拥有,主要包括纳米脂质颗粒的制备专利和阳离子脂质。其中阳离子脂质是 LNP 的核心,也是目前 Moderna 和 Pfizer 选择的递送系统的主要差异。mRNA 和脂质组装成 LNP 需要将 mRNA 和各种脂质组分按照一定比例、以一定流速利用微流控技术进行混合,形成大小均一的 LNP。由于 LNP 的核心阳离子脂质受到专利保护^[43],国内只有代理,而其他成分如中性磷脂、胆固醇

等国内厂家可以提供 GMP 级别原料。目前 LNP 制备仪器依赖进口,国产厂商仍需要加大研发力度。

在 LNP 组装结束后,需要对 mRNA-LNP 进行质检。目前对 mRNA-LNP 的质检方案较为明确,需要检测 LNP 的粒径与均一度,检测 mRNA-LNP 的封装效率,用 LC-MS 分析 mRNA 的加帽效率、polyA 尾长度的分布情况,用 UPLC 分析 LNP 中各个组分的比例,以及疫苗使用常规的无菌检测和内毒素检测。LC-MS、UPLC 一般以 Thermofisher Scientific 或 Agilent 为主流,这两个厂商也针对 mRNA 质检出具了完整的解决方案;而关于 LNP 粒径分析则是采用 Malvern Panalytical 的仪器。如果采用其他递送系统,则质检方案根据其特性进行修改,根据国家发布的《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)》,质检的主要内容应该仍然包括 mRNA 浓度、纯度和完整性、加帽率、polyA 尾长度、翻译活性、递送系统封装率、粒径、各个组分的比例以及稳定性等。

根据分析,目前 mRNA 疫苗市场的 81% (约 322 亿元)集中在 mRNA 原液制备中,而 LNP 与 mRNA 的组装有 20 亿元左右的市场。对于占大比例的制备原料,国产厂家可持续发力进行国有替代,对于相应的仪器替代,国内厂家替代的空间仍然很大。

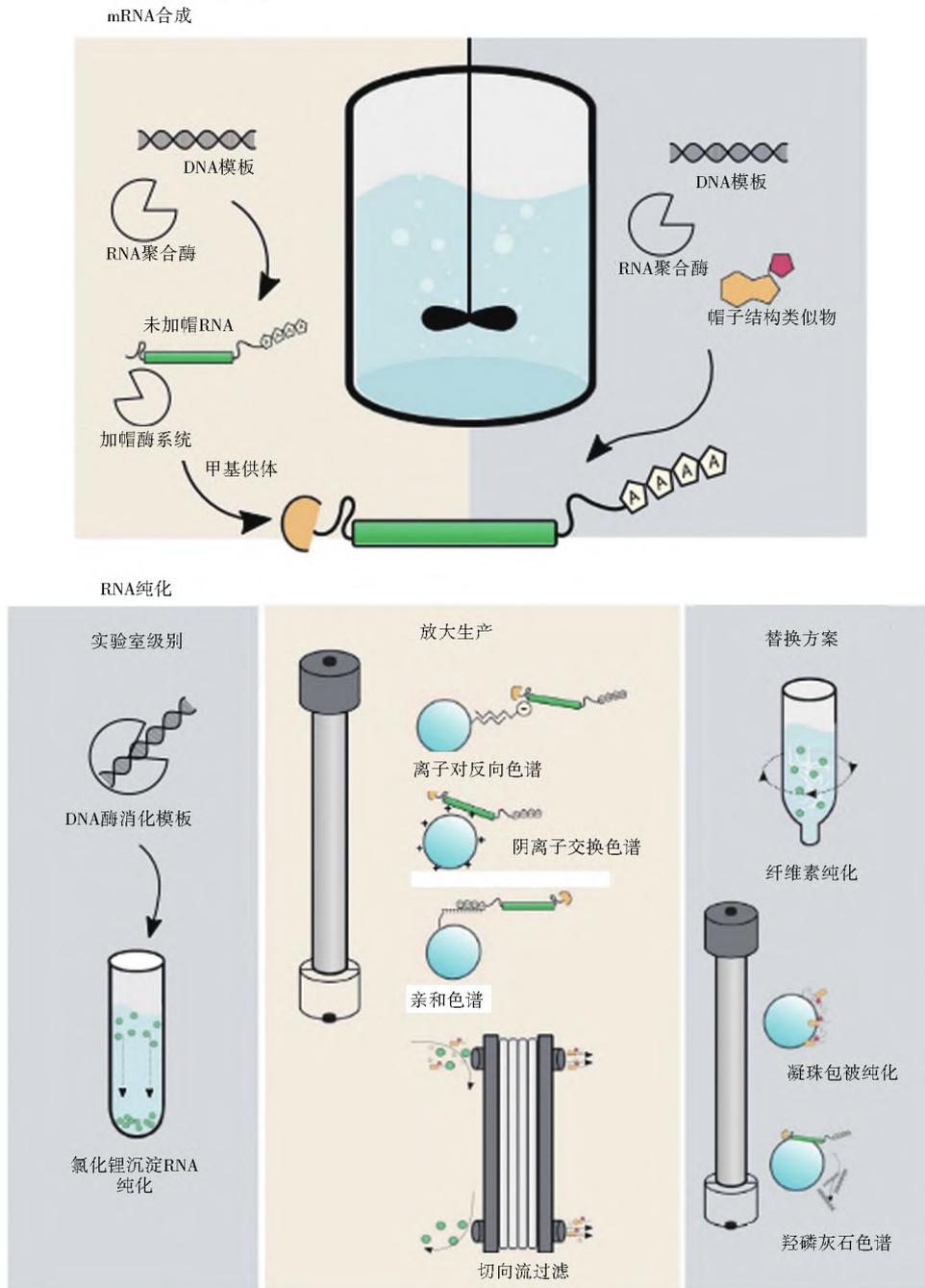


图5 mRNA 药物生产过程^[42]

Fig.5 mRNA drug production process^[42]

3.3 mRNA 国内产线面临的挑战

国内的 mRNA 疫苗已经推进至临床试验阶段,出现了比较希望的候选疫苗,但是对于 mRNA 治疗性成熟平台的搭建仍然有一些问题有待解决。

mRNA 编码的蛋白质是 mRNA 骨架的中心,对发挥功能区域的选择至关重要。除了传统的通过实验验证的方法,对大量序列筛选时应该建立相应的平台。

目前领先药企在大量实验验证的基础上,引入了人工智能对大量的 mRNA 序列进行分析筛选。与此对应的是生产 mRNA 的产线应该保持灵活,其反应器可以采用一次性反应袋,便于生产不同的候选疫苗。

mRNA 治疗药物的另一方面的研发壁垒是专利保护,主要涉及 mRNA 合成过程中的修饰碱基、加帽所用的帽子类似物,以及 LNP 用到的阳离子脂质。修饰碱

基和帽子类似物在国内替代已经有了相应的研究,但是对 LNP 的核心可电离阳离子脂质的替代国内厂家还没有给出良好的答案。

mRNA 疫苗储存条件较高,由于环境中 RNase 广泛存在,所以对 mRNA 合成、运输和储存都有较高要求。目前上市的 Moderna 和 Pfizer 的疫苗均需要在低温下保存(表 6),超低温运输增加了运输成本和保存难度,而且保存不当 mRNA 容易降解失去活性。目前对 mRNA 的储存稳定性也是产业化面临的一个主要问题。目前艾博生物的疫苗临床前研究显示其 mRNA 疫苗的热稳定性较好,相对于 Pfizer 和 Moderna 的 mRNA

疫苗在室温仅能储存数小时,艾博的 mRNA 疫苗在室温可以储存 1 周^[44]。而正在进行临床试验的瑞吉瑞科的 mRNA 疫苗宣称以冻干粉的形式生产,在 4℃ 可以长期稳定储存。关于 mRNA 的储存条件已经在探索中逐渐有了一些进展,而实际储存条件是否能够被改善则需要大量实际试验进行验证。

mRNA 技术作为药物应用市场前景广阔,国内 mRNA 疫苗的研发已经有了较大进步,研发思路明确且已经有一些产品进入了临床试验,但对于 mRNA 药品的专利壁垒、递送系统开发、稳定性提高等方面仍是需要攻克的难点。

表 6 国外 mRNA 疫苗储存条件与稳定性

Table 6 Storage conditions and stability of foreign mRNA vaccines

| 厂商 | 冷冻条件下储存稳定性 | 2-8℃ 储存稳定性 | 室温储存稳定性 |
|-----------------|------------------------------|------------|---------|
| Moderna | -20℃ 约 6 个月 | 30 天 | 约 24 h |
| Pfizer-BioNTech | -80 ~ -60℃、约 6 个月,或 -20℃、2 周 | 约 1 个月 | 约 2 h |

Note: Data deadline 2023. 1.

Data source <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/moderna-covid-19-vaccines>;
<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/pfizer-biontech-covid-19-vaccines>

4 展望

mRNA 作为一种生物药在预防传染病上的应用获得认可以后,在其他生物药的热门领域也开始有明确的发展和布局。2022 年 10 月,Moderna 和制药巨头默沙东宣布联合开发基于 mRNA 的癌症疫苗;而 BioNTech 的多种癌症疫苗也处于研发和临床阶段,有希望在 2030 年之前面世;在比较前沿的基因治疗领域中,mRNA 也结合 CRISPR/Cas9 系统进行基因水平上的治疗。随着癌症、心血管疾病、艾滋病等重大慢性病和传染病的逐渐流行,mRNA 以其研发生产快速、安全性高、针对个体进行个性化治疗等优点,必定会在这些领域发挥重要作用。

参考文献

- [1] Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*, 2021, 597(7876): 318-324.
- [2] 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. *Molecular Therapy*, 2008, 16(11): 1833-1840.
- [3] Xu S Q, Yang K P, Li R, et al. mRNA vaccine era-mechanisms, drug platform and clinical prospection. *International Journal of*

Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6582.

- [4] Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(5): 403-416.
- [5] Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [6] Corbett K S, Flynn B, Foulds K E, et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman Primates. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(16): 1544-1555.
- [7] Vogel A B, Kanevsky I, Che Y, et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature*, 2021, 592(7853): 283-289.
- [8] Zhao H, Wang T C, Li X F, et al. Long-term stability and protection efficacy of the RBD-targeting COVID-19 mRNA vaccine in nonhuman Primates. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 438.
- [9] Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni J A, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 601: 120586.
- [10] Ramanathan A, Robb G B, Chan S H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(16): 7511-7526.
- [11] Fuchs A L, Neu A, Sprangers R. A general method for rapid and

- cost-efficient large-scale production of 5' capped RNA. RNA (New York , N Y) ,2016 ,22(9) : 1454-1466.
- [12] Grudzien-Nogalska E , Jemielity J , Kowalska J , et al. Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. RNA , 2007 , 13 (10) : 1745-1755.
- [13] Beverly M , Dell A , Parmar P , et al. Label-free analysis of mRNA capping efficiency using RNase H probes and LC-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry , 2016 , 408 (18) : 5021-5030.
- [14] Henderson J M , Ujita A , Hill E , et al. Correction: cap 1 messenger RNA synthesis with Co-transcriptional CleanCap[®] analog by *in vitro* transcription. Current Protocols ,2021 ,1(12) : e336.
- [15] Jia L F , Mao Y H , Ji Q Q , et al. Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR. Nature Structural & Molecular Biology ,2020 ,27(9) : 814-821.
- [16] Xia X H. Detailed dissection and critical evaluation of the pfizer/ BioNTech and moderna mRNA vaccines. Vaccines ,2021 ,9(7) : 734.
- [17] Presnyak V , Alhusaini N , Chen Y H , et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. Cell , 2015 , 160 (6) : 1111-1124.
- [18] Morais P , Adachi H , Yu Y T. The critical contribution of pseudouridine to mRNA COVID-19 vaccines. Frontiers in Cell and Developmental Biology ,2021 ,9: 789427.
- [19] Elango N , Elango S , Shivshankar P , et al. Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T) 100 tail-containing vector. Biochemical and Biophysical Research Communications , 2005 , 330(3) : 958-966.
- [20] Adams D , Gonzalez-Duarte A , O' Riordan W D , et al. Patisiran , an RNAi therapeutic , for hereditary transthyretin amyloidosis. N Engl J Med ,2018 ,379(1) : 11-21.
- [21] Dobrowolski C , Paunovska K , Hatit M Z C , et al. Therapeutic RNA delivery for COVID and other diseases. Advanced Healthcare Materials ,2021 ,10(15) : 2002022.
- [22] Leung A K K , Tam Y Y C , Chen S , et al. Microfluidic mixing: a general method for encapsulating macromolecules in lipid nanoparticle systems. The Journal of Physical Chemistry B , 2015 ,119(28) : 8698-8706.
- [23] Ewe A , Höbel S , Heine C , et al. Optimized polyethylenimine (PEI) -based nanoparticles for siRNA delivery , analyzed *in vitro* and in an *ex vivo* tumor tissue slice culture model. Drug Delivery and Translational Research ,2017 ,7(2) : 206-216.
- [24] Ke X Y , Shelton L , Hu Y Z , et al. Surface-functionalized PEGylated nanoparticles deliver messenger RNA to pulmonary immune cells. ACS Applied Materials & Interfaces , 2020 , 12 (32) : 35835-35844.
- [25] Vandenbroucke R E , De Geest B G , Bonn  S , et al. Prolonged gene silencing in hepatoma cells and primary hepatocytes after small interfering RNA delivery with biodegradable poly(β -amino esters) . The Journal of Gene Medicine ,2008 ,10(7) : 783-794.
- [26] Jarzebska N T , Mellett M , Frei J , et al. Protamine-based strategies for RNA transfection. Pharmaceutics , 2021 , 13 (6) : 877.
- [27] 王 彧 , 白 岳 丘 , 田 易 晓 , 等. mRNA 疫苗在疾病预防与治疗中的研究进展与展望. 中国生物工程杂志 ,2022 ,42(10) : 51-59.
- Wang Y , Bai Y Q , Tian Y X , et al. Advances and prospects of mRNA vaccines used in the prevention and therapies of diseases. China Biotechnology ,2022 ,42(10) : 51-59.
- [28] Martinez M , Moon E K. CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding , infiltrating , and surviving in the tumor microenvironment. Frontiers in Immunology ,2019 ,10: 128.
- [29] Yin X J , Li L H , Fan H X , et al. Correlation between surfactant protein B mRNA expression and neonatal respiratory distress syndrome. Experimental and Therapeutic Medicine , 2012 , 4 (5) : 815-819.
- [30] Zangi L , Lui K O , von Gise A , et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. Nature Biotechnology , 2013 , 31 (10) : 898-907.
- [31] Mays L E , Ammon-Treiber S , Mothes B , et al. Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. The Journal of Clinical Investigation , 2013 , 123 (3) : 1216-1228.
- [32] Leutert M , Entwisle S W , Vill n J. Decoding post-translational modification crosstalk with proteomics. Molecular & Cellular Proteomics ,2021 ,20: 100129.
- [33] Seidah N G , Chr tien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides I. Brain Research ,1999 ,848(1-2) : 45-62.
- [34] Schlake T , Thran M , Fiedler K , et al. mRNA: a novel avenue to antibody therapy? Molecular Therapy ,2019 ,27(4) : 773-784.
- [35] Zhang H X , Zhang Y , Yin H. Genome editing with mRNA encoding ZFN , TALEN , and Cas9. Molecular Therapy ,2019 , 27(4) : 735-746.
- [36] Conway A , Mendel M , Kim K , et al. Non-viral delivery of zinc finger nuclease mRNA enables highly efficient *in vivo* genome editing of multiple therapeutic gene targets. Molecular Therapy , 2019 ,27(4) : 866-877.
- [37] Qiu M , Glass Z , Chen J J , et al. Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific *in vivo* genome editing of *Angptl3*. Proceedings of the

- National Academy of Sciences of the United States of America , 2021 , 118(10) . DOI: 10. 1073 /pnas. 2020401118.
- [38] Miller J B , Zhang S Y , Kos P , et al. Non-viral CRISPR/cas gene editing *in vitro* and *in vivo* enabled by synthetic nanoparticle Co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angewandte Chemie International Edition* , 2017 , 56(4) : 1059-1063.
- [39] Whitley J , Zwolinski C , Denis C , et al. Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials. *Translational Research* , 2022 , 242: 38-55.
- [40] Kis Z , Kontoravdi C , Shattock R , et al. Resources , production scales and time required for producing RNA vaccines for the global pandemic demand. *Vaccines* , 2020 , 9(1) : 3.
- [41] Webb C , Ip S , Bathula N V , et al. Current status and future perspectives on mRNA drug manufacturing. *Molecular Pharmaceutics* , 2022 , 19(4) : 1047-1058.
- [42] Rosa S S , Prazeres D M F , Azevedo A M , et al. mRNA vaccines manufacturing: challenges and bottlenecks. *Vaccine* , 2021 , 39(16) : 2190-2200.
- [43] 润顺琪 , 熊壮壮 , 魏应亮 , 等. 新冠病毒 mRNA 疫苗递送系统的中国专利风险. *中国发明与专利* , 2022 , 19(8) : 35-41.
- Run S Q , Xiong Z Z , Wei Y L , et al. Risk analysis of patent of COVID-19 mRNA vaccine delivery system in China. *China Invention & Patent* , 2022 , 19(8) : 35-41.
- [44] Zhang N N , Li X F , Deng Y Q , et al. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19. *Cell* , 2020 , 182 (5) : 1271-1283. e16.

Analysis of mRNA Drug Development and Market Application

HUANG Ke¹ LI Shan-hong²

(1 Beijing Pharma & Biotech Center(BPBC) , Beijing 100352 , China)

(2 Zhifeng Technology (Beijing) Co. , Ltd. , Beijing 100089 , China)

Abstract Messenger RNA (mRNA) is a kind of nucleic acid sequence which can express any protein of interest after its translation and modification in cells. Because of its inherent feature of protein of interest production , mRNA has potential to be used as drugs to treat various diseases , including viral infections , tumors , diseases caused by deficiency or abnormality of a certain protein *in vivo* , as well as genetic diseases by encoding Cas9 protein which is involved in gene editing. With the great success of mRNA vaccines , mRNA drugs have drawn increasing attention for their application potential. In addition , due to their advantages such as rapid research and development cycle , the ease and rapid large-scale production at low cost , and elimination of insertional mutagenesis and integration risk for the host , mRNA drugs have become the third generation of drugs after small molecule and antibody drugs. In this review , the structural properties and the delivery system of mRNA are introduced , the clinical progress of mRNA therapeutics and domestic mRNA vaccine development are summarized , and the remaining problems to be solved in the market application including research , manufacture and logistics of mRNA therapeutics are discussed , hoping to provide a reference for mRNA drug discovery and manufacturing.

Key words mRNA drugs mRNA biologicals Domestic mRNA vaccine mRNA clinical progress