

体外转录 mRNA 药物的技术进展和应用前景

侯书婷, 于传飞, 王 兰, 王军志*

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 体外转录 (*in vitro* transcribed, IVT) mRNA 技术发展迅速, COVID-19 大流行中 mRNA 疫苗的广泛应用引起了公众对 mRNA 技术的讨论。相比传统蛋白药物, IVT mRNA 有成本低、模块化生产以及序列易调整等优势, 具有广泛的应用前景; 但由于 mRNA 药物的历史较短, 其缺乏足够的临床数据, 且除 mRNA 疫苗以外的 mRNA 药物没有质量控制标准。本文讨论了 IVT mRNA 药物的序列设计、递送载体、给药方式、应用前景及安全性, 并对其质量控制进行简单探讨。

关键词: 体外转录 mRNA 技术; mRNA 序列设计; mRNA 递送; mRNA 药物; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2047-12

In vitro transcribed (IVT) mRNA drugs: technical progress and application prospect

HOU Shu-ting, YU Chuan-fei, WANG Lan, WANG Jun-zhi*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: The *in vitro* transcribed (IVT) mRNA technology has progressed rapidly and the application of mRNA vaccines in the COVID-19 pandemic made it become the most talked-about topic. Compared with protein drugs, IVT mRNA has a lower cost; it can be modular produced and its sequence can be modified easily, so it has a broad application prospect. However, due to its short history, mRNA drugs face the problem of lacking sufficient clinical data, and there is no quality control standard for mRNA drugs except mRNA vaccines. We overview the sequence design, delivery vectors, administration, application prospect and safety considerations of mRNA drugs. We also discussed the quality control of mRNA drugs briefly.

Key words: *in vitro* transcribed mRNA technology; mRNA sequence design; mRNA delivery; mRNA drug; quality control

1 IVT mRNA 技术

RNA 序列可以通过多种方法获取, 其中体外转录 (*in vitro* transcribed, IVT) 技术在 mRNA 药物中应用最广泛。20 世纪 90 年代起, 人们就开始了对于 IVT mRNA 药物的探索^[1,2]。IVT mRNA 是指以 DNA 为模板, 由 RNA 聚合酶在无细胞体系下催化转录出的 mRNA。IVT

mRNA 药物具有转录时不依赖细胞、序列易调整、理论上无整合风险、低成本、高效且可模块化生产等优点; 目前仍存在组分具有免疫刺激性、研究成果主要来源于啮齿类等小型动物等挑战。本节将简述 IVT mRNA 技术, 包括其序列设计、载体选择及给药方式。

1.1 IVT mRNA 序列设计

IVT mRNA 序列包括 5 个部分: 5'帽子、5'和 3'非编码区 (UTR)、开放阅读框和多聚腺苷酸 (poly(A)) 尾; 自复制型 mRNA 还包含正链 RNA 病毒的复制酶序列。IVT mRNA 以线性化的 DNA 质粒或链式聚合酶反应的 DNA 产物为模板, 由噬菌体 RNA 聚合酶在体外催

收稿日期: 2023-02-20; 修回日期: 2023-05-14.

基金项目: 2022 年度国家药品标准制修订研究课题 (2022S04).

*通讯作者 Tel: 86-10-53851517, Fax: 86-10-53851650,

E-mail: wangjz_nifdc2014@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0201

化转录获取,加帽和加尾可以在转录同时或转录后进行^[3];所得的产物需进行纯化。本小节将依次介绍 IVT mRNA 5'帽子、poly(A)尾、UTR、编码区的设计思路,以及全序列的核苷酸修饰、序列优化和产物纯化思路。

1.1.1 5'帽子及加帽方法 正确的5'帽子结构(m7GpppN)参与阻止IVT mRNA被核酸外切酶降解、降低mRNA免疫原性^[4,5],调节mRNA半衰期^[6]以及调控翻译^[7,8]等过程。5'帽子结构按mRNA 5'末端两个核苷酸甲基化数量分为0型、1型和2型。真核细胞mRNA具有1型或2型帽子,而现有技术可以给IVT mRNA加0型或1型帽子^[3,5,9]。加帽方法分为两种:第一种是酶法加帽,即在转录完成后使用加帽酶进行加帽^[3];第二种是共转录加帽,即在转录体系内加入帽类似物以实现转录同时加帽^[3,10,11]。mRNA体外转录加帽时,存在未加帽或不完全加帽产物^[12],用特定的酶降解错误加帽的mRNA可以提高产物均一性,例如,用脱帽酶DXO/Dom3Z可以脱帽并降解不完全加帽产物^[13]。

1.1.2 poly(A)尾及加尾方法 mRNA的poly(A)尾具备调节mRNA稳定性和调控翻译的作用^[8]。IVT mRNA加尾方法有两种。第一种是在DNA模板中设计poly(A)尾结构,实现转录时加尾。转录时加尾的优势在于尽量保证每条产物的poly(A)尾长度相同;然而,较长的poly(A)结构会影响质粒稳定性^[12],导致质粒复制时易发生缺失,针对这一问题,可以采用在poly(A)尾序列中插入一段10 bp连接子 ([14])。第二种方法是转录后加尾,在转录后由poly(A)聚合酶催化合成poly(A)尾^[3],这种方法的优点是可掺入修饰的核苷酸。

1.1.3 5'和3'UTR设计 5'和3'UTR参与调控翻译、增强mRNA稳定性、辅助蛋白产物定位等^[4,15]。选择高表达基因的UTR可以提高IVT mRNA表达效率^[3],但UTR的效率因细胞而异^[16],需对其进行针对性的优化。UTR的一个优化方向是通过选择含有特定序列的UTR^[17]、减少小干扰RNA结合位点^[18]、减少3'UTR的AU含量^[19]以及设计特殊的UTR结构^[20]等方法增强mRNA稳定性;另一个优化方向是调整UTR序列,改变其招募核糖体或其他调控蛋白的能力^[21],从而调整mRNA在细胞内的翻译效率。考虑到改变3'UTR有可能影响产物定位^[15],实施上述UTR优化后应对产物的定位情况进行检测。

1.1.4 编码区设计 编码区的设计涉及密码子优化的共有需求,以及信号肽选择、设计多顺反子结构、插入复制酶序列等具体需求。

同义密码子的选择影响蛋白质的翻译速率,由于

不同物种细胞对同义密码子有不同的偏好,在利用IVT mRNA表达异种蛋白时,需要对密码子进行优化。加速翻译的密码子选择思路有:使用最优密码子、参考密码子的天然占比或根据tRNA丰度选择密码子等^[22]。然而,适当含量的稀有密码子对延迟翻译速率,确保蛋白质正确折叠是必需的^[22],因此不能一味加速翻译。

密码子优化已应用于IVT mRNA药物^[23,24]。Mauro等^[22]讨论了体内用药的密码子优化的安全性:同义密码子替换时,存在改变mRNA高级结构从而影响其他反式元件的结合、改变翻译速率从而影响翻译后修饰,以及改变内部核糖体进入位点从而导致新肽产生或隐肽丢失等风险。在对IVT mRNA进行密码子优化时,应充分考虑上述问题并进行足量试验。

密码子优化是编码区设计时必须考虑的,此外,不同蛋白产物可能有精确定位、同时翻译多条肽链、长效表达等特殊需求,这些需求都可以通过设计特殊的编码区序列来实现。

蛋白产物常有定位至细胞特定区域或分泌的需求,这种定位需要信号肽引导,然而,同一段信号肽在不同细胞内强度可能不同^[25]。Fattori等^[26]在质粒介导肌肉细胞表达促红细胞生成素的动物模型中,将促红细胞生成素的信号肽替换为组织型纤溶酶原激活剂的信号肽,观察到促红细胞生成素分泌量增加。将编码区内原有的信号肽替换为靶细胞中天然的信号肽类型,可能获得更高的蛋白分泌量。

将多条肽链组成的蛋白设计成IVT mRNA药物,或是设计多联mRNA疫苗时,需要实现多条肽链的同时翻译。目前有两种方法可以满足上述需求:一是设计多顺反子mRNA来串联多个编码区^[27],但在实际研究中发现此种方法存在核糖体移码以及内部起始的风险^[28];二是同时递送多条mRNA,此时要考虑mRNA之间的摩尔比,例如,Wu等^[29]设计的抗PD-1/PD-L1双特异性抗体的LNP-mRNA,轻链和重链mRNA摩尔比为0.6:1,因为短mRNA翻译更快。

自复制型mRNA的编码区内插入了病毒复制酶的序列,可以实现mRNA的长效表达,用药剂量更低,且表达抗原类蛋白时自身具有佐剂作用。自复制型mRNA的上述优点可以降低总生产成本;其缺点是复制酶序列一般较长且可能包含剪切位点,易导致mRNA稳定性下降,且过度激活的一型干扰素反应会导致炎症、自复制型mRNA表达量下降以及T细胞耗竭^[30,31]。

1.1.5 IVT mRNA的核苷酸修饰或序列优化 天然mRNA含有一定比例的核苷酸修饰^[32]。未修饰的mRNA可被模式识别受体识别,例如mRNA的高G、U

区域可被 TLR7 和 TLR8 识别并诱发一型干扰素反应^[4,12]。因此, IVT mRNA 结构基本设计完成后, 还需要进行核苷酸修饰或是序列优化设计, 结合产物纯化来进一步降低免疫原性, 提升表达效率。

在 mRNA 体外转录时掺入修饰的核苷, 如假尿苷、N1-甲基假尿苷等, 可以降低其免疫原性、增强稳定性并提高产出^[24,33,34]。IVT mRNA 的核苷修饰已有广泛研究, 核苷修饰的新冠 mRNA 疫苗已得到紧急使用授权^[35,36]。核苷修饰的争议在于人工修饰的 mRNA 的核酸修饰比例远高于天然 mRNA^[5], 且修饰有时并不能提高产出^[37,38], 甚至可能存在损害内部核糖体进入位点等风险^[37]; 此外, 核苷酸修饰不适用于自复制型 mRNA, 因为体内合成的新链无法复制母链的修饰形式。Yu 等^[39]总结道, 有些修饰会增加 mRNA 的免疫原性, 因此应选择天然的修饰形式。修饰的核苷酸关系到其他元件与 mRNA 的结合^[40], 从而影响 mRNA 的翻译, 在对 IVT mRNA 进行修饰时应将这一点纳入考虑。

mRNA 序列优化可以代替核苷修饰。减少尿苷是序列优化的一种思路, 例如 Vaidyanathan 等^[9]设计的减少尿苷含量的 Cas9 mRNA 在细胞系和人原代 CD34⁺细胞中活性提高。序列优化与核苷修饰也可结合使用。

使用高效液相色谱等纯化方法去除流产性转录本及双链 RNA 等副产物, 可降低 mRNA 产物免疫原性, 提高产出^[37]。

无论是核苷修饰还是序列优化, 理论上均存在改变 mRNA 高级结构, 改变翻译后修饰, 改变内部起始位点等风险, 应用时需充分考虑风险因素, 进行足量试验。

1.2 IVT mRNA 递送载体与给药方式

IVT mRNA 药物需要递送至生物体内以发挥作用。目前有两种 mRNA 递送思路, 一种是直接将裸露的或载体包装的 mRNA 直接递送到生物体内; 另一种是采用过继细胞疗法, 将 mRNA 递送到离体细胞, 再回输进生物体^[12]。正确的翻译后修饰依赖于精确递送, 因为同一 mRNA 在不同细胞中翻译效率可能不同, 从而导致折叠异常; 后续的糖基化修饰与蛋白剪切也可能不同^[12]。选择适当的递送载体和给药方式, 可以使 mRNA 较精确地递送至靶器官乃至靶细胞, 下文将介绍常用的 mRNA 递送载体及其给药方式。

1.2.1 IVT mRNA 离体递送后细胞回输

mRNA 递送至离体树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的方式多样, 包括电穿孔法、显微注射法及基因枪等^[12,41]。目前已有多项研究将肿瘤抗原或 HIV 抗原 mRNA 递送至患者 DC, 制成治疗性疫苗后回输^[42-47]。过继疗法的优点是 mRNA 精确定位至某种细胞; 缺点是成本高、后续操作复杂且可选细胞种类受限。

1.2.2 IVT mRNA 体内直接递送的载体与给药

直接递送裸的或结合载体的 mRNA 至体内, 相比离体递送操作更简便。选择适当的载体和给药途径, 可使 mRNA 靶向递送至部分器官, 但目前未完全实现细胞层面的 mRNA 靶向递送。RNA 药物的载体可分为非包装载体和包装载体。非包装类载体包括肽类、无机纳米颗粒和聚合物纳米颗粒等; 包装类载体有各类脂质体、外泌体和病毒样颗粒等。

裸 mRNA 分子量大且带负电, 较难通过带负电的细胞膜。直接注射的裸 mRNA 在体内的半衰期约为 8~10 h^[48]。裸 RNA 可以被清道夫受体介导内吞, 经内体逃逸过程进入细胞^[12,49,50], 但效率低下; 未成熟 DC 细胞可以通过巨胞饮机制大量摄取 mRNA^[43,51]。总体而言, 裸 mRNA 有细胞摄取效率低、具有免疫刺激性以及易被降解等问题^[52], 因此 mRNA 的递送一般需要配合载体。

富含带正电或两亲性氨基酸的肽类可做 mRNA 递送载体^[4]。鱼精蛋白富含 L-精氨酸, 是一种带正电的天然蛋白, 可结合 RNA, 增强其稳定性并以内体途径递送 RNA^[42,53]。将鱼精蛋白、阳离子脂质及 mRNA 制成混合颗粒可以提高递送效率^[54]。鱼精蛋白-RNA 可以激活 Toll 样受体 TLR7/8, 因此鱼精蛋白-mRNA 可作为其自身佐剂^[55]。细胞穿透肽是一类可携带大分子进入细胞的短肽, 其主要作用机制包括细胞膜瞬时打孔和内吞, 机制选择依赖于细胞穿透肽和 mRNA 的浓度^[53,56]。细胞穿透肽 PepFect14 成功将卵巢癌治疗性 mRNA 递送至异种移植小鼠模型的卵巢癌细胞^[57]。肽类载体口服利用度低, 需通过注射或鼻吸入给药^[53]。

无机纳米颗粒作为核酸类药物递送载体的优点是尺寸小、易修饰, 且化学性质稳定。常用的无机纳米颗粒载体包括金纳米颗粒和碳纳米颗粒等^[58], 其免疫原性较弱^[59]。细胞可通过 A 类清道夫受体介导的内吞摄取多价核酸金纳米颗粒, 颗粒经内体逃逸途径释放至胞质^[58,59]。

聚合物纳米颗粒是由阳离子或可电离多聚物形成的复合体, 结合 mRNA 后通过内吞途径进入细胞^[4]。聚乙烯酰胺 (PEI) 是最常用的 mRNA 阳离子聚合物递送载体, 但其电荷密度高, 高浓度 PEI 会导致细胞膜损伤与细胞凋亡^[60]; 此外, PEI-mRNA 在储存中易聚集并失活^[61]。pH 响应的聚合物纳米颗粒对细胞损伤较小, 例如, 电荷可变的可释放转运体仅在细胞质 pH 下降解并释放出 mRNA^[62]。

纳米乳是纳米尺寸的液滴分散在另一种不混溶液体介质形成的胶体。阳离子纳米乳由阳离子脂质 DOTAP 或其类似物与其他组分共同构成, mRNA 吸附

在阳离子脂质表面^[63]。MF59是一种水包油纳米乳佐剂, Brito等^[63]以加入DOTAP的MF59作为载体,通过肌肉注射给药成功向多种动物递送了多种病毒抗原的自复制型mRNA。阳离子纳米乳载体在黏膜给药方面有良好的应用前景^[64]。

相比裸递送和非包装载体递送,包装类载体递送是更常用的递送方式。

纳米脂质体(lipid nanoparticles, LNP)是目前应用最广泛的IVT mRNA载体^[65]。在用于mRNA递送之前,已有多种LNP载体的抗生素药物和一种siRNA药物在欧美批准上市,因此LNP是一种研究相对成熟的药物递送载体^[66]。LNP是由可电离脂质(或阳离子脂质)、胆固醇、辅助脂质以及聚乙二醇修饰的脂质组成的双层结构,其中可电离脂质在内层结合mRNA^[4],外层是脂质外壳。传统LNP靶向肝脏^[67,68],但对LNP进行修饰可以改变其靶向性并提高稳定性。向传统LNP添加不同电性的选择性器官靶向脂质可以改变LNP器官靶向性,中性靶向肝、阳离子靶向肺、阴离子靶向脾^[69,70]。向LNP掺入带有不同头部基团或尾部结构的脂质^[71-74]或用模拟细胞表面特异性受体的配体的化合物修饰LNP^[75]可提高LNP的细胞靶向性。尽管LNP是相对成熟的mRNA递送载体,其生产门槛和高昂的储存运输成本仍是产品推广的障碍:全球范围内有能力生产LNP的企业很少^[76];部分基于LNP技术的新冠mRNA疫苗对冷链的要求较高^[35,36]。目前有热稳定性较好的LNP-mRNA新冠疫苗在研^[77],这一成果为提高LNP-mRNA类药物的可及性做出了贡献。

脂质体复合物(lipopolyplex, LPP)是另一类研究较多的IVT mRNA递送载体,其由阳离子多聚物和多种脂质组成,阳离子多聚物在内层结合mRNA,外层是脂质外壳。LPP相对LNP有更好的稳定性: Ewe等^[61]制备的PEI与脂质DPPC组成的LPP在37℃下储存14天仍可保持60%的转染活性; Yang等^[68]设计的新冠病毒全长S蛋白LPP疫苗SW0123在4℃下储存4~6周,对其在小鼠中的免疫原性无影响。LPP的另一特点是靶向性不同于LNP:小鼠肌肉注射的LNP很快迁移至肝脏,而LPP主要停留在注射局部^[68];小鼠静脉注射的LPP主要靶向肝脏及淋巴结,被树突状细胞经大胞饮摄取^[78,79]。

外泌体是内体来源的纳米级细胞外囊泡,广泛存在于生物体,在细胞间运送RNA、蛋白及脂质等,传递信号。由于外泌体是内源囊泡,相对其他载体,具有稳定性高、毒性较低及可穿越多种生物屏障等优势^[80]。Tsai等^[81]从HEK293细胞获取外泌体,搭载新冠抗原后,免疫小鼠,刺激了特异性免疫应答。肌肉注射或眼

部给药的外泌体-mRNA主要在注射局部表达,也有少量扩散至全身^[81]。动脉粥样硬化ApoE^{-/-}小鼠模型接受注射搭载改造的IL-10 mRNA的外泌体,外泌体定位至动脉斑块并表达IL-10^[82]。

病毒样颗粒(VLP)是自组装的均质纳米颗粒,来源于病毒外壳的衣壳蛋白,可用于多种生物分子的递送。噬菌体来源的MS2 VLP适合核酸类的递送^[83]。Prel等^[84]使用MS2嵌合逆转录病毒样颗粒在体内和体外递送了多种mRNA。VLP作为载体的优点是可修饰,缺点是易被吞噬细胞介导清除以及自身不稳定等。

IVT mRNA的体内给药方式多样,包括注射(静脉、皮内、皮下、肌肉、淋巴结等)和吸入等,其选择取决于所选载体和药物类型。RNA疫苗通常以皮内、皮下、淋巴结或肌肉注射方式给药。mRNA用于表达非抗原的蛋白时,静脉注射是较为常见的给药方式。靶向特定器官的mRNA可使用特殊给药方式实现局部递送,例如呼吸道疾病mRNA疫苗或肺部疾病治疗性mRNA可通过雾化吸入方式直接递送至肺部,减少mRNA的全身暴露^[85,86]。

总体而言,目前关于mRNA载体和给药方式的研究较为多样,但主流研究方向仍是LNP载体配合注射给药,其余方向研究有限。此外,mRNA的细胞靶向性递送的问题也尚未完全解决。加强其他载体的研究、优化载体以提升靶向性等都是将来可以拓展研究的方向。

2 IVT mRNA 疗法应用前景

IVT mRNA的应用前景广泛,理论上可应用于疾病预防、癌症疫苗、HIV治疗性疫苗、脱敏疗法、蛋白质替代疗法、基因编辑和再生医学等多个领域。在此对mRNA药物的上述应用领域,以及相比传统药物的优缺点进行简要介绍。

2.1 mRNA 肿瘤疫苗

肿瘤疫苗是IVT mRNA疗法中历史较长、较成熟的应用,目前有大量临床前和临床成果^[87]。mRNA肿瘤疫苗的研发思路包括用编码肿瘤抗原的mRNA转染离体树突状细胞(DC)并回输^[43,88]、直接注射裸露的或有载体包载的肿瘤抗原mRNA^[42,89]以及用编码嵌合抗原受体的mRNA转染离体T细胞并回输^[90,91]等,也可选择免疫调节分子等作为靶点^[87]。mRNA-细胞疗法的成本高、操作复杂,且相比传统细胞疗法优势不明显;体内直接递送肿瘤抗原mRNA更能发挥mRNA药物低成本的优势,有更好的应用前景。

2.2 mRNA HIV 治疗性疫苗

HIV治疗性mRNA疫苗有两种技术路线,一是用载体直接向体内递送编码HIV抗原的mRNA^[44],二是

用编码 HIV 抗原的 mRNA 转染离体 DC 并回输^[45-47]。目前转染 DC 回输的疫苗研发路线进展较快, 已进入临床试验阶段。HIV 治疗性 mRNA 疫苗与鸡尾酒疗法 (HAART) 或抗逆转录病毒疗法 (ART) 联用的 I 期及 II 期临床试验, 成功在患者体内诱导了 HIV 特异性免疫反应^[45-47]。

2.3 mRNA 药物用于感染性疾病主动免疫

相比传统的感染性疾病预防疫苗, IVT mRNA 疫苗具备以无细胞形式生产、生产效率高、成本低、可修改序列以应对病原体变种等优势, 且理论上无整合风险。在 COVID-19 大流行期间, mRNA 预防疫苗发挥了重要作用^[35,36]。mRNA 疫苗的大规模临床试验也推动了 mRNA 疫苗技术发展, 例如, 由艾博生物、沃森生物和军事医学科学院联合开发的 ARCoV 新冠疫苗解决了 mRNA 疫苗热稳定性差的缺点^[77,92]。流感病毒^[93,94]、寨卡病毒^[95,96]、呼吸道合胞病毒^[97]以及狂犬病毒^[98,99]等的预防性 mRNA 疫苗也在研发中。

2.4 mRNA 药物用于脱敏疗法

IVT mRNA 疫苗可用于脱敏疗法。注射过敏原进行脱敏治疗的技术已经较为成熟, 但应用对象主要是过敏患者, 应用人群小, 且由于过敏原的纯化较为粗糙, 在注射过程中可能造成患者对未知组分的过敏反应^[100]。面向健康个体的过敏原的预防性疫苗应用人群更大, 需要更高的安全标准。过敏原 mRNA 疫苗仅表达单一产物且可被快速清除, 可作为面向一般人群的过敏原预防性疫苗的一种选择; 其缺点是仅能表达蛋白类过敏原。Roesler 等^[100]选择 29 种常见过敏原制成 mRNA 疫苗, 成功在小鼠体内诱导 Th1 型免疫应答。

2.5 mRNA 药物用于蛋白替代疗法

mRNA 蛋白质替代疗法是指递送 IVT mRNA, 表达正常蛋白以取代患者缺失的蛋白, 或额外补充功能蛋白, 以预防或治疗疾病^[12]。最早的 mRNA 蛋白替代疗法可追溯至 1992 年, Jirikowski 等^[2]向血管加压素基因缺陷的大鼠下丘脑注射血管加压素 mRNA, 缓解了大鼠尿崩症。用 mRNA 替代蛋白进行给药, 有成本低、可通过序列修饰和改变载体改变药代动力学参数, 以及产物具有人体中翻译后修饰形式等优点。目前 mRNA 蛋白替代疗法主要通过静脉注射 LNP-mRNA 给药。在动物实验中, mRNA 药物被证明可用于治疗多种酶或其他功能蛋白缺陷导致的遗传病^[101-105]。mRNA 也可用于表达生长因子^[106,107]和蛋白类激素^[37], 促进细胞生成和组织再生, 其中 VEGF-A mRNA 已在 2 型糖尿病患者中进行了试验, 患者前臂皮内接种 VEGF-A mRNA 后观察到基础皮肤血流量增加^[107]。肿瘤治疗单抗^[29,108,109]和感染性疾病预防单抗^[85,110,111]是 mRNA 单

抗的主要研究方向, 其中用于预防基肯孔雅热的中和 mRNA 单抗已进入 I 期临床^[67,110]。

2.6 mRNA 药物用于基因编辑

递送编码核酸酶的 IVT mRNA 可实现更安全的基因编辑。相比需递送至核内并长期存在的核酸酶 DNA 序列, 只需递送至胞质的核酸酶 mRNA 对细胞损伤小且脱靶风险低。已有多项研究向多种哺乳动物个体或胚胎中转入锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALENs) 和 Cas9 的 IVT mRNA, 实现靶基因的敲除或插入^[112-114]; 同时递送转座酶 mRNA 和含转座位点的靶 DNA, 可实现靶 DNA 的插入^[115,116]。

2.7 mRNA 药物用于细胞重编程

IVT mRNA 在细胞重编程领域也有应用潜力。2006 年, 研究发现一组特定的转录因子可以将体细胞重编程为诱导的多能干细胞 (iPSCs)。iPSCs 在科研和再生医学和组织工程等领域具有应用潜力, 目前已有基于整合性或非整合性 DNA 载体, 以及非 DNA 载体的诱导 iPSCs 的方法^[117]。相比 DNA 载体和蛋白载体, mRNA 在避免整合风险的同时, 拥有较高的递送效率。Warren 等^[118]通过调整转录因子 mRNA 混合物的配比, 使人成纤维细胞在不依赖于饲养层细胞的条件下体外重编程为 iPSCs。

3 IVT mRNA 疗法的安全性考虑

IVT mRNA 药物的安全性考虑主要有序列人工改造导致的不良反应、载体纳米毒性、mRNA 及产物免疫原性、递送靶向性不足的问题, 以及关于整合风险的争议等。此外, 缺乏大型哺乳动物试验数据和临床数据也是 mRNA 药物面临的一大问题。

mRNA 序列设计时的一些人工改造可能会导致预料之外的不良反应, 例如, 3'UTR 的改变有可能影响蛋白产物的定位^[15]; 同义密码子替换可能导致翻译速率和内部核糖体进入位点的改变, 从而导致错误的翻译后修饰和翻译^[22]; 核苷修饰可能导致 mRNA 与蛋白结合能力改变、损伤内部核糖体进入位点, 完全不修饰的核苷酸又具有较高的免疫原性^[37]等。因此, 人工设计的 mRNA 序列需要经过大量的临床前试验才能投入应用。

递送 IVT mRNA 需要用到各类纳米载体, 一旦缩小至纳米尺寸, 材料更易与生物体发生相互作用, 造成生物体损伤, 即具有“纳米毒性”^[119]。纳米颗粒的形状、大小、电荷、亲疏水性、组成和暴露途径都影响其毒性^[119]。RNA 药物的纳米载体可能存在高密度电荷导致细胞损伤^[60]、难降解的纳米载体在溶酶体中积累导致溶酶体过载^[120]、与生物体蛋白相互作用导致蛋白功能异常^[119,121]、长纤维干扰染色体导致遗传毒性^[122,123]以及不良的免疫反应等风险, 因此需要对载体进行优化

并进行足够的临床前试验以保证载体的安全性。

IVT mRNA、载体以及部分翻译中的副产物具有免疫原性;产物也可能具有免疫原性。不同的 IVT mRNA 药物对 mRNA 及载体免疫原性的要求不同:对于疫苗类产品, mRNA 及载体适当的免疫原性使之充当自身的佐剂,更好地激活特异性免疫反应^[31,63]; IVT mRNA 用于抗体疗法或蛋白替代疗法时,常常需要长期重复性给药,应尽量降低免疫原性。mRNA 自身可能具有免疫原性,多种模式识别受体可识别 RNA,诱导一型干扰素表达、炎症反应以及翻译抑制等^[12,124]。在免疫细胞中, Toll 样受体家族的 TLR3、TLR7 和 TLR8 识别 RNA^[55,125,126];在非免疫细胞中, RNA 由 RIG-I 样受体家族的 RIG-I 和 MDA5 等识别^[127,128]。核苷酸修饰可改变 IVT mRNA 的免疫原性。mRNA 的纳米载体可作为疫苗佐剂;但部分纳米粒子有诱发过敏反应、溶血、补体激活及吞噬作用等反应的风险^[129,130]。由于 mRNA 的翻译在患者自身细胞中进行,其具有宿主细胞的翻译后修饰类型,理论上翻译产物的免疫原性低于异种细胞中表达的蛋白类药物。翻译产物理论上存在诱导抗药抗体产生的风险,但现有的一些研究并未检测到抗药抗体产生^[130,131]。总而言之, IVT mRNA 药物的免疫原性风险需要被重视。

IVT mRNA 正确定位至靶器官和细胞关系到蛋白的正确表达和功能的正常发挥。不同细胞的翻译后修饰能力不同^[132],错误的翻译后修饰可能影响蛋白功能;同一段信号肽在不同细胞内强度不同^[25],未定位至靶细胞的 mRNA 的产物分泌效率低,可能影响剂量敏感性蛋白的功能发挥。目前 mRNA 细胞靶向性递送的问题尚未完全解决,在技术获得突破前,上述风险可能长期存在,其影响程度仍需要观察。在实际应用中,联用的药物是否会影响 mRNA 的靶向递送和正确翻译,需要进一步研究。

IVT mRNA 药物的整合风险是公众关注的焦点之一。Jaenisch 课题组^[133,134]使用体外细胞系得到了 SARS-COVID-2 RNA 整合进宿主细胞基因组的结果,这一结果引起了广泛讨论。然而,体外实验的结果并不能完全反映药物在体内的情况,因为体外实验更高的 mRNA 剂量、永生细胞系分裂活跃导致 mRNA 可入核、细胞系人为导入了未受抑制的逆转录转座子 LINE-1^[134](人体多数细胞 LINE-1 被抑制)以及体外实验缺乏 mRNA 清除机制等因素,导致体外实验具有更适于 RNA 整合的环境。目前仍缺少体内用药导致 mRNA 整合的证据;此外,在 mRNA 设计时,避免整合位点及逆转录酶结合位点的出现,可进一步降低 mRNA 的体内整合风险。因此,对 mRNA 药物的整合

风险可以予以适当关注,但 mRNA 药物理论上基本无整合风险。

mRNA 需要在体内翻译后发挥效应,同一段 mRNA 在不同的靶细胞内可能有不同的翻译效率和翻译后修饰,导致产物的表达量、结构和功能可能发生变化,因此,人体和动物的试验结果相比传统的蛋白药物可能有更大的差异。目前 mRNA 药物的研究成果多数仍停留在小型哺乳动物的阶段,研究数据不充分。

总而言之,由于 IVT mRNA 技术历史较短,其安全性研究尚不充分,再考虑到动物与人体的差异,此类药物在进行临床试验前需要补充更多的人体细胞、大型动物和灵长类的研究数据,且在人体试验时应以较低剂量起始,以保障受试者的安全。

4 IVT mRNA 的质量控制

IVT-mRNA 药物历史较短,目前上市或批准紧急使用的相关药物以新冠 mRNA 疫苗为主,因此,目前各类 mRNA 药物中,只有 LNP-mRNA 疫苗类产品有比较完整的技术指南^[48,135,136]。随着 mRNA 药物的研发,出台其他类型 mRNA 药物的技术指南很有必要。按照生物制品的定义, IVT-mRNA 药物属于生物制品范畴。Yu 等^[65]指出,按现有定义, mRNA 类药物在我国属于基因治疗制品,但除用于基因编辑的 mRNA 药物以外,其余 mRNA 药物不会导致宿主细胞基因组的改变,因此基因治疗制品质量标准中有部分质量控制项目并不适用于 mRNA 药物。相关机构需要结合 mRNA 药物的特点出台新的技术指南。

药品质量控制的目的是确保药品质量能满足质量要求,药品质量控制贯穿其研发、上市和在市场上存在的全过程。从药物研发生产流程来看, mRNA 药物的质量控制可分为生产工艺研究、质量控制的方法学研究、药品稳定性研究、药品质量标准的建立、药品包材的研究与质量标准、工艺变更等部分。

其他品种 mRNA 药物生产过程中的质量管理规范可参考《药品生产质量管理规范》的原则,结合现有 mRNA 疫苗以及基因治疗制品的相关指南来进行制定。mRNA 药物的生产工艺研究包括目的蛋白的选择、DNA 模板设计、质粒构建和菌种库构建,以及后续生产过程涉及的转录模板制备、mRNA 原液生产(mRNA 转录与纯化)、制剂处方工艺研究(递送系统与佐剂的研究、mRNA 与载体的结合、产物纯化)、结构确证以及除菌过滤以及灌装等^[48,136]。mRNA 药物生产工艺的研究为质量控制的方法学研究、稳定性研究以及质量标准的最终制定提供数据支持。成品制剂的包材,以及和产品接触的耗材,需要进行包材相容性的研究^[136]。

随着 IVT mRNA 药物的研发和生产, 其质量特性的数据逐步积累, 可以进行药物质量控制的方法学研究及验证, 以供制订质量标准和指导完善生产工艺。其他 mRNA 药物的方法学研究可参考 mRNA 疫苗^[136]和对应传统药物的相关指南进行。应针对 mRNA 的结构和理化特性、递送载体的结构和理化特性、mRNA 与递送载体的结合, 以及药物的生物学活性等方面选择关键质量属性并开发相应的检测方法。相比其他项目, 不同药物活性检测方法会有较大差异。

IVT mRNA 药物的稳定性是实际应用时必须考虑的。在无 RNA 酶存在的条件下, mRNA 本身的稳定性较好^[65]。建议用方法学研究过程中形成的药物质量分析方法, 重点分析 mRNA 药物在温度、pH 值、光照及湿度变化以及复溶和反复冻融的条件下, 关键理化特性和 mRNA 的表达效率是否有变化; 此外, 企业应进行长期留样试验。考虑到已有 LNP-mRNA 疫苗保存条件的差异^[35,36,77], 以及未来 mRNA 药物递送载体进一步多样化的趋势, 不同产品稳定性研究的数据可能会有很大差异。稳定性研究为确定药物的储存和运输条件提供依据, 为质量标准的最终制订提供数据支持。

随着 mRNA 药物生产、方法学研究和稳定性研究的推进, 在申报临床时可初步形成质量标准, 在上市阶段确定完整的质量标准^[136]。mRNA 药物的质量标准应覆盖 DNA 模板、mRNA 原液和成品 (有时还需考虑制剂中间产物) 等阶段。其他 IVT mRNA 药物的关键质量属性, 可参考 mRNA 疫苗^[48,135,136]以及 mRNA 药物对应的传统药物的相关指南, 结合药物研发的实际情况进行确定, 并视情况做出必要修订。以下列出 mRNA 药物建议的检定项目。

DNA 模板来源于工程菌, 其质量控制主要针对所构建的质量和/或菌种的种子库进行。质粒和菌种库的质量控制包括遗传稳定性、菌种的相关特性鉴定、微生物限度控制、基因序列分析、质粒的纯度、质粒的保有率及产率, 以及质粒的超螺旋结构等。在进行线性化后, 需对 DNA 模板进行鉴定, 并检测其含量、纯度、微生物限度和内毒素等进行检测, 并对宿主 RNA、DNA 和蛋白残留等杂质进行控制。由于 mRNA 的测序准确度低于 DNA, 菌种库、质粒及 DNA 模板的测序应予以重视。

mRNA 原液的质量控制项目包括含量、mRNA 结构分析 (鉴别、序列准确性、序列完整性、加帽率、poly(A) 尾长度和修饰比例等)、纯度、产品相关杂质 (双链 RNA 及不完整 RNA)、工艺相关杂质 (DNA 模板残留、酶残留及其他)、无菌和内毒素等。mRNA 结构分析涉及参数影响 mRNA 的稳定性、翻译效率和免疫原

性, 应予以重视。

根据递送载体的不同, 生产中可能存在制剂中间产物。例如, LNP-mRNA 由脂质外壳包裹结合了阳离子或可电离材料的 mRNA, 则结合可电离材料但未封装的 mRNA 可视为制剂中间产物。当某检项对制剂中间产物最敏感, 或是后续生产步骤需要提供制剂中间产物的质量数据时, 需要对制剂中间产物进行质量控制^[136], 检项与成品类似。

mRNA 药物成品的质量控制项目包括鉴别、含量 (mRNA 含量、完整性、纯度; 递送系统含量; 佐剂与辅料含量)、理化特性 (包括常规属性如外观、装量、可见异物、不溶性颗粒和渗透压等; 关键属性如纳米颗粒粒径、分散系数、zeta 电位和 pH 等)、复合率和/或包封率、杂质、安全性 (无菌、内毒素和异常毒性)、生物学活性。

在 mRNA 药物的质量控制中, 应建立相应的标准物质, 用于仪器校准、作为工作标准品以及评价质量控制方法等。标准物质的质量特性已经准确定值, 在质量控制中, 单独检测标准物质或将其与待测样品平行检测, 可以评价检测过程的可靠性以及待测样品检测结果的准确性。mRNA 药物具有广阔的发展前景, 将来会有更多实验室承担药品各阶段的检验检测工作, 标准物质为检测方法的标准化和结果的可比性提供重要的标尺。

疫苗类制品、血液制品、用于血源筛查的体外诊断试剂等的上市需要批签发。IVT-mRNA 类药物是否需要批签发, 应根据使用人群 (如疫苗的使用人群为健康人, 使用范围广)、生产过程的污染风险、产品安全风险以及可能造成的社会影响等方面具体考虑。例如, mRNA 疫苗类产品应进行批签发, mRNA 治疗性单抗可以考虑不进行批签发。

随着技术发展和研发的进行, 研发中产品和已上市产品可能发生生产工艺的变更。需要对变更前后产品的关键质量属性进行可比性分析, 证实变更未对产品的质量属性造成不利影响。考虑到对 mRNA 药物认知的有限和药物的复杂性, 工艺变更应谨慎进行, 且变更后应充分评估产品质量变化。

5 总结与讨论

IVT-mRNA 药物的应用前景广泛。随着 IVT-mRNA 技术的发展, mRNA 药物的序列设计、递送系统和给药途径都在不断优化。然而, IVT-mRNA 药物作为一项新兴技术, 还面临诸多挑战。在药物设计与应用方面, 如何提高 mRNA 药物的靶向性, 降低纳米毒性和免疫原性是需要考虑的问题。此外, 现有 mRNA 疫苗的超低温冷链运输条件影响了产品的可及性, 因此, 如何优化药物设计, 降低产品储存运输成本, 也是制药者需要努

力的方面。在药物评价方面, mRNA 药物临床试验数据不足, 其安全性和人体中的有效性尚有一定争议, 考虑到体外实验和体内实验的差异, 以及动物和人体的差异, 需要补充更多的人类细胞系和临床试验数据。在药物质量控制方面, IVT-mRNA 药物的历史较短, 目前仅 LNP-mRNA 疫苗的技术指南较完善; 随着 mRNA 药物研究的深入, 将来需要完善其他品种 mRNA 药物的质量控制乃至质量管理体系, 从研发、生产、检验和销售等全方位保障 mRNA 药物的安全性和有效性。

作者贡献: 王军志负责选题、确定文章框架、提供修改意见和总体协调; 侯书婷负责资料收集、图片绘制和文章撰写, 以及文章修改; 王兰和于传飞负责基金募集、指导写作、提供修改意见。

利益冲突: 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, et al. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA [J]. *Science*, 1992, 255: 996-998.
- [2] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. *Science*, 1990, 247: 1465-1468.
- [3] Pardi N, Muramatsu H, Weissman D, et al. *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 969: 29-42.
- [4] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 817-838.
- [5] Schlake T, Thran M, Fiedler K, et al. mRNA: a novel avenue to antibody therapy? [J]. *Mol Ther*, 2019, 27: 773-784.
- [6] Li Y, Kiledjian M. Regulation of mRNA decapping [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010, 1: 253-265.
- [7] Mockey M, Gonçalves C, Dupuy FP, et al. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340: 1062-1068.
- [8] Gallie DR. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency [J]. *Genes Dev*, 1991, 5: 2108-2116.
- [9] Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque AKMA, et al. Uridine depletion and chemical modification increase Cas9 mRNA activity and reduce immunogenicity without HPLC purification [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 530-542.
- [10] Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, et al. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG [J]. *RNA*, 2001, 7: 1486-1495.
- [11] Jemielity J, Fowler T, Zuberek J, et al. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties [J]. *RNA*, 2003, 9: 1108-1122.
- [12] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 759-780.
- [13] Jiao X, Chang JH, Kilic T, et al. A mammalian pre-mRNA 5' end capping quality control mechanism and an unexpected link of capping to pre-mRNA processing [J]. *Mol Cell*, 2013, 50: 104-115.
- [14] Stadler CR, Bähr-Mahmud H, Celik L, et al. Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies [J]. *Nat Med*, 2017, 23: 815-817.
- [15] Berkovits BD, Mayr C. Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization [J]. *Nature*, 2015, 522: 363-367.
- [16] Sample PJ, Wang B, Reid DW, et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 803-809.
- [17] Bergman N, Moraes KC, Anderson JR, et al. Lsm proteins bind and stabilize RNAs containing 5' poly(A) tracts [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 824-831.
- [18] Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, et al. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26: 311-323.
- [19] Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation [J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20: 465-470.
- [20] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells [J]. *Blood*, 2006, 108: 4009-4017.
- [21] Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 158-174.
- [22] Mauro VP, Chappell SA. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics [J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20: 604-613.
- [23] van Gulck ER, Ponsaerts P, Heyndrickx L, et al. Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins [J]. *Blood*, 2006, 107: 1818-1827.
- [24] Karikó K, Muramatsu H, Keller JM, et al. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin [J]. *Mol Ther*, 2012, 20: 948-953.
- [25] Barash S, Wang W, Shi Y. Human secretory signal peptide description by hidden Markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294: 835-842.
- [26] Fattori E, Cappelletti M, Zampaglione I, et al. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-

- human primates [J]. *J Gene Med*, 2005, 7: 228-236.
- [27] Erasmus JH, Archer J, Fuerte-Stone J, et al. Intramuscular delivery of replicon RNA encoding ZIKV-117 human monoclonal antibody protects against Zika virus infection [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 18: 402-414.
- [28] Saulquin X, Scotet E, Trautmann L, et al. +1 Frameshifting as a novel mechanism to generate a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope derived from human interleukin 10 [J]. *J Exp Med*, 2002, 195: 353-358.
- [29] Wu L, Wang W, Tian J, et al. Engineered mRNA-expressed bispecific antibody prevent intestinal cancer *via* lipid nanoparticle delivery [J]. *Bioengineered*, 2021, 12: 12383-12393.
- [30] Maruggi G, Zhang C, Li J, et al. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases [J]. *Mol Ther*, 2019, 27: 757-772.
- [31] Bloom K, van den Berg F, Arbutnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases [J]. *Gene Ther*, 2021, 28: 117-129.
- [32] Li X, Zhu P, Ma S, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 592-597.
- [33] Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 5884-5892.
- [34] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability [J]. *Mol Ther*, 2008, 16: 1833-1840.
- [35] FDA. Fact sheet for healthcare providers administering vaccine (vaccination providers): emergency use authorization (EUA) of the Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine to prevent coronavirus disease 2019 (COVID-19) [EB/OL]. (2022-11-22) [2022-11-22]. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/pfizer-biontech-covid-19-vaccines#additional>.
- [36] FDA. Fact sheet for healthcare providers administering vaccine (vaccination providers): emergency use authorization (EUA) of the moderna COVID-19 vaccine to prevent coronavirus disease 2019 (COVID-19) [EB/OL]. (2022-8-31) [2022-10-13]. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/moderna-covid-19-vaccines>.
- [37] Thess A, Grund S, Mui BL, et al. Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals [J]. *Mol Ther*, 2015, 23: 1456-1464.
- [38] 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 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e142.
- [39] Yu AM, Choi YH, Tu MJ. RNA drugs and RNA targets for small molecules: principles, progress, and challenges [J]. *Pharmacol Rev*, 2020, 72: 862-898.
- [40] Gilbert WV, Bell TA, Schaening C. Messenger RNA modifications: form, distribution, and function [J]. *Science*, 2016, 352: 1408-1412.
- [41] Parlea L, Puri A, Kasprzak W, et al. Cellular delivery of RNA nanoparticles [J]. *ACS Comb Sci*, 2016, 18: 527-547.
- [42] Papachristofilou A, Hipp MM, Klinkhardt U, et al. Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 38.
- [43] Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 409-417.
- [44] Zhao M, Li M, Zhang Z, et al. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23: 2596-2607.
- [45] van Gulck E, Vlieghe E, Vekemans M, et al. mRNA-based dendritic cell vaccination induces potent antiviral T-cell responses in HIV-1-infected patients [J]. *AIDS*, 2012, 26: F1-F12.
- [46] Allard SD, de Keersmaecker B, de Goede AL, et al. A phase I/IIa immunotherapy trial of HIV-1-infected patients with Tat, Rev and Nef expressing dendritic cells followed by treatment interruption [J]. *Clin Immunol*, 2012, 142: 252-268.
- [47] de Jong W, Aerts J, Allard S, et al. iHIVARNA phase IIa, a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial to evaluate the safety and immunogenicity of iHIVARNA-01 in chronically HIV-infected patients under stable combined antiretroviral therapy [J]. *Trials*, 2019, 20: 361.
- [48] USP. Analytical procedures for mRNA vaccine quality (draft guidelines) [EB/OL]. (2022-02-10) [2022-10-13]. <https://www.uspnf.com/notices/analytical-procedures-mrna-vaccines-20220210>.
- [49] Zelphati O, Szoka FC Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 11493-11498.
- [50] Wan Y, Moyle PM, Toth I. Endosome escape strategies for improving the efficacy of oligonucleotide delivery systems [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22: 3326-3346.
- [51] Diken M, Kreiter S, Selmi A, et al. Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation [J]. *Gene Ther*, 2011, 18: 702-708.
- [52] Rinoldi C, Zargarian SS, Nakielski P, et al. Nanotechnology-assisted RNA delivery: from nucleic acid therapeutics to COVID-19 vaccines [J]. *Small Methods*, 2021, 5: e2100402.
- [53] Jarzebska NT, Mellett M, Frei J, et al. Protamine-based strategies for RNA transfection [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 877.
- [54] Siewert CD, Haas H, Cornet V, et al. Hybrid biopolymer and lipid nanoparticles with improved transfection efficacy for mRNA

- [J]. Cells, 2020, 9: 2034.
- [55] Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA [J]. Science, 2004, 303: 1529-1531.
- [56] Tusup M, Pascolo S. Generation of immunostimulating 130 nm protamine-RNA nanoparticles [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1499: 155-163.
- [57] van den Brand D, Gorris MAJ, van Asbeck AH, et al. Peptide-mediated delivery of therapeutic mRNA in ovarian cancer [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2019, 141: 180-190.
- [58] Ding Y, Jiang Z, Saha K, et al. Gold nanoparticles for nucleic acid delivery [J]. Mol Ther, 2014, 22: 1075-1083.
- [59] Choi CH, Hao L, Narayan SP, et al. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110: 7625-7630.
- [60] Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, et al. A two-stage poly (ethylenimine) -mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy [J]. Mol Ther, 2005, 11: 990-995.
- [61] Ewe A, Schaper A, Barnert S, et al. Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery [J]. Acta Biomater, 2014, 10: 2663-2673.
- [62] McKinlay CJ, Vargas JR, Blake TR, et al. Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114: E448-E456.
- [63] Brito LA, Chan M, Shaw CA, et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines [J]. Mol Ther, 2014, 22: 2118-2129.
- [64] Dai W, Liu XY, Li JH, et al. Development of the novel cationic nanoemulsion drug delivery system [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2013, 48: 1980-1984.
- [65] Yu LL, Li XY, Chen GL, et al. Development and challenges of mRNA-based therapeutics [J]. Chin J New Drug (中国新药杂志), 2021, 30: 2029-2033.
- [66] Akinc A, Maier MA, Manoharan M, et al. The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs [J]. Nat Nanotechnol, 2019, 14: 1084-1087.
- [67] Kose N, Fox JM, Sapparapu G, et al. A lipid-encapsulated mRNA encoding a potentially neutralizing human monoclonal antibody protects against Chikungunya infection [J]. Sci Immunol, 2019, 4: eaaw6647.
- [68] Yang R, Deng Y, Huang B, et al. A core-shell structured COVID-19 mRNA vaccine with favorable biodistribution pattern and promising immunity [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6: 213.
- [69] Liu S, Cheng Q, Wei T, et al. Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing [J]. Nat Mater, 2021, 20: 701-710.
- [70] Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing [J]. Nat Nanotechnol, 2020, 15: 313-320.
- [71] Lokugamage MP, Sago CD, Gan Z, et al. Constrained nanoparticles deliver siRNA and sgRNA to T cells *in vivo* without targeting ligands [J]. Adv Mater, 2019, 31: e1902251.
- [72] Zhao X, Chen J, Qiu M, et al. Imidazole-based synthetic lipidoids for *in vivo* mRNA delivery into primary T lymphocytes [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2020, 59: 20083-20089.
- [73] Miao L, Li L, Huang Y, et al. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation [J]. Nat Biotechnol, 2019, 37: 1174-1185.
- [74] Hou X, Zhang X, Zhao W, et al. Vitamin lipid nanoparticles enable adoptive macrophage transfer for the treatment of multi-drug-resistant bacterial sepsis [J]. Nat Nanotechnol, 2020, 15: 41-46.
- [75] Ho W, Gao M, Li F, et al. Next-generation vaccines: nanoparticle-mediated DNA and mRNA delivery [J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10: e2001812.
- [76] Webb C, Ip S, Bathula NV, et al. Current status and future perspectives on mRNA drug manufacturing [J]. Mol Pharm, 2022, 19: 1047-1058.
- [77] Zhang NN, Li XF, Deng YQ, et al. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19 [J]. Cell, 2020, 182: 1271-1283.
- [78] Persano S, Guevara ML, Li Z, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination [J]. Biomaterials, 2017, 125: 81-89.
- [79] Guevara ML, Jilesen Z, Stojdl D, et al. Codelivery of mRNA with α -galactosylceramide using a new lipopolyplex formulation induces a strong antitumor response upon intravenous administration [J]. ACS Omega, 2019, 4: 13015-13026.
- [80] Lu M, Xing H, Xun Z, et al. Exosome-based small RNA delivery: progress and prospects [J]. Asian J Pharm Sci, 2018, 13: 1-11.
- [81] Tsai SJ, Atai NA, Cacciottolo M, et al. Exosome-mediated mRNA delivery *in vivo* is safe and can be used to induce SARS-CoV-2 immunity [J]. J Biol Chem, 2021, 297: 101266.
- [82] Bu T, Li Z, Hou Y, et al. Exosome-mediated delivery of inflammation-responsive IL-10 mRNA for controlled atherosclerosis treatment [J]. Theranostics, 2021, 11: 9988-10000.
- [83] Rohovie MJ, Nagasawa M, Swartz JR. Virus-like particles: next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery [J]. Bioeng Transl Med, 2017, 2: 43-57.
- [84] Prel A, Caval V, Gayon R, et al. Highly efficient *in vitro* and *in vivo* delivery of functional RNAs using new versatile MS2-chimeric retrovirus-like particles [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2015, 2: 15039.
- [85] Tiwari PM, Vanover D, Lindsay KE, et al. Engineered mRNA-expressed antibodies prevent respiratory syncytial virus infection [J]. Nat Commun, 2018, 9: 3999.

- [86] Sahu I, Haque AKMA, Weidensee B, et al. Recent developments in mRNA-based protein supplementation therapy to target lung diseases [J]. *Mol Ther*, 2019, 27: 803-823.
- [87] He Q, Gao H, Tan D, et al. mRNA cancer vaccines: advances, trends and challenges [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 2969-2989.
- [88] Weide B, Pascolo S, Scheel B, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients [J]. *J Immunother*, 2009, 32: 498-507.
- [89] Rittig SM, Haentschel M, Weimer KJ, et al. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8⁺ and CD4⁺ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients [J]. *Mol Ther*, 2011, 19: 990-999.
- [90] Zhao Y, Moon E, Carpenito C, et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 9053-9061.
- [91] Barrett DM, Zhao Y, Liu X, et al. Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22: 1575-1586.
- [92] Liu X, Li Y, Wang Z, et al. Safety and superior immunogenicity of heterologous boosting with an RBD-based SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Chinese adults [J]. *Cell Res*, 2022, 32: 777-780.
- [93] Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses [J]. *Mol Ther*, 2022, 30: 2874.
- [94] Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 3361.
- [95] Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination [J]. *Nature*, 2017, 543: 248-251.
- [96] Richner JM, Himansu S, Dowd KA, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection [J]. *Cell*, 2017, 169: 176.
- [97] Aliprantis AO, Shaw CA, Griffin P, et al. A phase 1, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and immunogenicity of an mRNA-based RSV prefusion F protein vaccine in healthy younger and older adults [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17: 1248-1261.
- [98] Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial [J]. *Lancet*, 2017, 390: 1511-1520.
- [99] Aldrich C, Leroux-Roels I, Huang KB, et al. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: a phase 1 trial [J]. *Vaccine*, 2021, 39: 1310-1318.
- [100] Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, et al. Immunize and disappear-safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124: 1070-1077.
- [101] An D, Schneller JL, Frassetto A, et al. Systemic messenger RNA therapy as a treatment for methylmalonic acidemia [J]. *Cell Rep*, 2018, 24: 2520.
- [102] Roseman DS, Khan T, Rajas F, et al. G6PC mRNA therapy positively regulates fasting blood glucose and decreases liver abnormalities in a mouse model of glycogen storage disease 1a [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 814-821.
- [103] Robinson E, MacDonald KD, Slaughter K, et al. Lipid nanoparticle-delivered chemically modified mRNA restores chloride secretion in cystic fibrosis [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 2034-2046.
- [104] Prieve MG, Harvie P, Monahan SD, et al. Targeted mRNA therapy for ornithine transcarbamylase deficiency [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 801-813.
- [105] Martini PGV, Guey LT. A new era for rare genetic diseases: messenger RNA therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30: 1180-1189.
- [106] Rizvi F, Everton E, Smith AR, et al. Murine liver repair *via* transient activation of regenerative pathways in hepatocytes using lipid nanoparticle-complexed nucleoside-modified mRNA [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 613.
- [107] Gan LM, Lagerström-Fermér M, Carlsson LG, et al. Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 871.
- [108] Wu L, Wang W, Tian J, et al. Intravenous delivery of RNA encoding anti-PD-1 human monoclonal antibody for treating intestinal cancer [J]. *J Cancer*, 2022, 13: 579-588.
- [109] Rybakova Y, Kowalski PS, Huang Y, et al. mRNA delivery for therapeutic anti-HER2 antibody expression *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2019, 27: 1415-1423.
- [110] August A, Attarwala HZ, Himansu S, et al. A phase 1 trial of lipid-encapsulated mRNA encoding a monoclonal antibody with neutralizing activity against Chikungunya virus [J]. *Nat Med*, 2021, 27: 2224-2233.
- [111] Deng YQ, Zhang NN, Zhang YF, et al. Lipid nanoparticle-encapsulated mRNA antibody provides long-term protection against SARS-CoV-2 in mice and hamsters [J]. *Cell Res*, 2022, 32: 375-382.
- [112] 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 [J]. *Mol Ther*, 2019, 27: 866-877.
- [113] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats *via* embryo microinjection of zinc-finger nucleases [J]. *Science*, 2009, 325: 433.
- [114] Xu C, Lu Z, Luo Y, et al. Targeting of NLRP3 inflammasome with gene editing for the amelioration of inflammatory diseases

- [J]. Nat Commun, 2018, 9: 4092.
- [115] Sumiyama K, Kawakami K, Yagita K. A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection [J]. Genomics, 2010, 95: 306-311.
- [116] Wilber A, Frandsen JL, Geurts JL, et al. RNA as a source of transposase for Sleeping Beauty-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues [J]. Mol Ther, 2006, 13: 625-630.
- [117] Bernal JA. RNA-based tools for nuclear reprogramming and lineage-conversion: towards clinical applications [J]. J Cardio-vasc Transl Res, 2013, 6: 956-968.
- [118] Warren L, Ni Y, Wang J, et al. Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA [J]. Sci Rep, 2012, 2: 657.
- [119] Xue HY, Liu S, Wong HL. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine [J]. Nano-medicine (Lond), 2014, 9: 295-312.
- [120] Zabinryk O, Yezhelyev M, Seleverstov O. Nanoparticles as a novel class of autophagy activators [J]. Autophagy, 2007, 3: 278-281.
- [121] Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61: 428-437.
- [122] Tsukahara T, Haniu H. Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 352: 57-63.
- [123] Freedland SJ, Malone RW, Borchers HM, et al. Toxicity of cationic lipid-ribozyme complexes in human prostate tumor cells can mimic ribozyme activity [J]. Biochem Mol Med, 1996, 59: 144-153.
- [124] Vlatkovic I. Non-immunotherapy application of LNP-mRNA: maximizing efficacy and safety [J]. Biomedicines, 2021, 9: 530.
- [125] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 [J]. Nature, 2001, 413: 732-738.
- [126] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA *via* toll-like receptor 7 and 8 [J]. Science, 2004, 303: 1526-1529.
- [127] Schlee M, Roth A, Hornung V, et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus [J]. Immunity, 2009, 31: 25-34.
- [128] Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, et al. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection [J]. J Virol, 2009, 83: 10761-10769.
- [129] Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, et al. Nanoparticles and the immune system [J]. Endocrinology, 2010, 151: 458-465.
- [130] Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution [J]. Mol Pharm, 2008, 5: 487-495.
- [131] Jiang L, Berraondo P, Jericó D, et al. Systemic messenger RNA as an etiological treatment for acute intermittent porphyria [J]. Nat Med, 2018, 24: 1899-1909.
- [132] Kolarich D, Weber A, Turecek PL, et al. Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms [J]. Proteomics, 2006, 6: 3369-3380.
- [133] Zhang L, Richards A, Khalil A, et al. SARS-CoV-2 RNA reverse-transcribed and integrated into the human genome [J]. bioRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.12.12.422516.
- [134] Zhang L, Richards A, Barrasa MI, et al. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118: e2105968118.
- [135] WHO. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations [EB/OL]. (2021-12-07) [2022-1013]. <https://www.who.int/publications/m/item/evaluation-of-the-quality-safety-and-efficacy-of-messenger-rna-vaccines-for-the-prevention-of-infectious-diseases-regulatory-considerations>.
- [136] Center for Drug Evaluation of National Medical Products Administration. Guideline on the chemistry, manufacture and control (CMC) of prophylactic COVID-19 mRNA vaccines [EB/OL]. (2020-08-14) [2022-10-13]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-08/15/content_5535069.htm.