

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.010

肿瘤治疗性 mRNA 疫苗的研究进展

Advances in therapeutic mRNA vaccines for tumors

曹惠琳¹综述;吴艳峰²审阅(1. 海军军医大学 基础医学院,上海 200433;2. 海军军医大学 基础医学院 免疫学教研室暨免疫与炎症全国重点实验室,上海 200433)

[摘要] 从20世纪90年代早期mRNA被首创性地应用于治疗性疫苗,到2020年COVID-19大流行期间,mRNA疫苗的一鸣惊人,使得mRNA相关技术成为新一代疫苗候选者。mRNA疫苗正以前所未有的速度被应用到多个领域,让人们重燃对mRNA疫苗的热情和兴趣。由于其在灵活性、成本和开发速度方面的优势,该技术也为肿瘤治疗和个体化药物提供了巨大的利好。本文聚焦于mRNA肿瘤疫苗的DC、脂质载体等递送系统,总结了mRNA疫苗的优势及制备、应用等方面的研究进展,将有助于了解mRNA肿瘤疫苗的研发历程,为肿瘤疫苗提供新的思路和策略。

[关键词] mRNA疫苗;肿瘤疫苗;肿瘤治疗;治疗性疫苗

[中图分类号] R735.2;R730.43;730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)09-0810-07

2023年5月,世界卫生组织宣布新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)疫情不再是国际关注的突发公共卫生事件。在抗击该疫情的过程中,疫苗发挥了革命性的作用。信使RNA(message RNA, mRNA)疫苗的异军突起,在制备策略、传递系统、免疫原性等方面,突破了以往mRNA在疫苗研发中的限制,展现了其安全、高效、易生产的优势。肿瘤作为全球第二大死因^[1],对人类生命安全造成了严重威胁。肿瘤疫苗针对肿瘤抗原诱导主动性特异性免疫应答,对恶性肿瘤细胞进行杀伤,较其他免疫疗法具备更强的特异性和持久性。然而目前肿瘤疫苗的研发受到肿瘤微环境、肿瘤异质性、肿瘤抗原多样性等的限制,只有少数可被用于临床使用^[2]。COVID-19的mRNA疫苗的成功应用也催化了其在肿瘤等重大疾病治疗中的研发和应用。

1 mRNA疫苗及其优势

mRNA疫苗通过体外转录获得编码特定抗原的mRNA序列并递送至人体,在体细胞内表达相应抗原蛋白,从而诱导机体产生相应的特异性免疫应答。与传统基于蛋白质、多肽、病毒载体或DNA等的疫苗相比,mRNA具有明显的优势:(1)安全性更高,不会插入基因导致突变,活性短暂,可完全降解;(2)效率更高,转入细胞质即发挥作用,经修饰后表达大幅增强,可表达佐剂蛋白;(3)生产快速、廉价、易扩展,不涉及活细胞培养从而规避污染风险;(4)设计简便,序列易于修改,编码抗原序列的选择较为灵活,全长蛋白、肽表位等均可作为编码抗原。

2 mRNA疫苗的制备的研究进展

mRNA疫苗转录过程相对简单,但如何制作出稳定性较强、递送效率较高、靶向性更强的mRNA一直是该领域亟待突破的难题,随着mRNA新冠疫苗快速发展所带来的技术革新,目前这一难题已得出解决方案,如序列修饰,添加5'和3'非翻译区(untranslated region, UTR)、加帽、加尾、优化密码子序列、分离纯化等。

2.1 5'端加帽可提高mRNA序列稳定性

帽状结构在细胞之中可用于保护mRNA 5'端被核酸外切酶过早消化并参与蛋白质合成的起始^[3]。体外转录(*in vitro* transcription, IVT)过程中不能直接产生加帽的mRNA,可通过转录后加帽或共转录加帽实现。然而,在共转录加帽实验过程中发现,GTP作为启动子会与帽状结构相互竞争,导致部分序列无法被加帽,而有帽/无帽RNA的比例在凝胶上通常不可见,目前这一问题可通过降低GTP浓度或清除无帽mRNA解决^[4];此外,作为引发剂的帽类似物m⁷GpppG可导致帽状结构延伸方向错误,2001年DARZYNKIEWICZ等使用抗反方向帽类似物(anti-reverse cap analogues, ARCA)作为引发剂克服了这一限制,较为可靠地控制了延伸方向^[5]。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(No. 82071796)

[作者简介] 曹惠琳(2003—),女,本科生,主要从事肿瘤免疫学方面的研究,E-mail:Yunsheng0905@163.com

[通信作者] 吴艳峰,E-mail:wuyf@immunol.org

2.2 核苷修饰可提高 mRNA 翻译效率

KARIKO 等^[6]突破性地发现, 掺入修饰核苷如 m5C、m5U、s2U、m6A 和假尿嘧啶 (pseudouridine, Ψ) 等可降低 RNA 对免疫系统的刺激能力, 并增强 mRNA 的表达水平。研究^[7]表明, 经核苷修饰的 mRNA 可通过抑制对 RNA 依赖蛋白激酶的活化等方式提高翻译效率。ANDRIES 等^[8]通过对比发现, N1-甲基假尿苷 (N1-methylpseudouridine, m1 Ψ) 修饰与 m5U/ Ψ 修饰相比, 增强蛋白质表达和 mRNA 稳定性的效果更好, 细胞毒性更小。不仅如此, m1 Ψ 修饰的 RNA 疫苗可诱导产生更高水平的 T、B 细胞, 引发更强烈的适应性免疫应答^[9]。

2.3 分离纯化可避免污染物的干扰

在 IVT 过程中, 噬菌体聚合酶的使用会产生短 RNA、双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 等污染物, 这些污染物会激活模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), 引发固有免疫应答, 并降低翻译效率。高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 可纯化去除污染物, 是目前为止从长链 IVT mRNA 中去除 dsRNA 最有效的方法^[10]。但该方法成本较高, 且乙腈洗脱液具有毒性。实验证明成本较低的纤维素色谱法也可纯化 IVT mRNA, 并达到与 HPLC 相近的纯化水平^[11]。

3 mRNA 疫苗的递送系统

mRNA 在体内的有效递送对疫苗发挥效应十分关键。mRNA 带有负电荷, 在体内递送需要穿越双层脂膜跨膜负电位的屏障; 在细胞质内, 外源 mRNA 也存在着被核糖核酸酶降解的风险。有效的递送系统可协助 mRNA 顺利穿膜, 并在被降解之前转录成为目的蛋白。mRNA 肿瘤疫苗的传统递送方式包括直接注射、利用病毒载体、体外负载 DC 等, 而最近纳米材料也被证实具备更高的递送效率。

3.1 裸露的 mRNA 递送是最原始、最直接的递送方法

WOLFF 等^[12]开创性地证实, 裸 mRNA 可通过肌肉注入小鼠体内并发挥作用。该方法用缓冲液溶解 mRNA, 无需任何载体, 直接将 RNA 溶液注入体内。常用的缓冲液包括林格液和乳酸钠林格液。裸 mRNA 的注射部位和途径包括肌肉、皮内、淋巴结内、气管、鼻腔内等, 一项针对黑色素瘤的研究结果^[13]显示, 淋巴结内重复注射编码新表位的裸 mRNA 有效抑制了肿瘤生长, 诱导了较强烈的 CD4⁺ T 细胞免疫应答, 并降低了黑色素瘤转移率。

裸 mRNA 递送最为直接, 简便快捷, 易于储存, 但其免疫原性易激活 RNA 传感器, 引发强烈的固有免疫应答, 诱导炎症反应并抑制翻译。另外, 裸 mRNA 也更容易受到膜电位和核酸酶的影响, 优化注射方式可部分改善这一弊端^[14]。

3.2 基于 DC 的 mRNA 递送可有效提呈抗原

DC 作为最强大的抗原提呈细胞, 除诱导 CD4⁺ T 细胞免疫应答以外, 可将外源性抗原经 MHC-I 途径交叉提呈, 诱导 CD8⁺ T 细胞的免疫应答。此外, DC 可装载不同来源的肿瘤抗原, 易于摄取或转染 mRNA, 故 DC 是 mRNA 疫苗的有效载体^[15]。目前 mRNA 转染 DC 的主要方式包括电穿孔、细胞核转染、脂质转染和超声穿孔等, 其中电穿孔的转染效率最高, 应用最为广泛^[16]。

在适宜的电特性条件下, 相较于质粒电穿孔、脂质转染和无源脉冲, 电穿孔转染 mRNA 的 DC 具备更高的递送效率, 且实现了最佳水平的抗原提呈^[17]。DC 也可与编码 CD70、CD40 配体 (CD40L) 和构成型活性 TLR4 的 mRNA (TriMix) 共同电穿孔转染, 并结合伊匹单抗 (TriMixDC-MEL IPI), 该策略可在 III 期或 IV 期黑色素瘤患者, 尤其是有临床反应的患者体内产生强烈的 CD8⁺ T 细胞反应^[18]。

负载 mRNA 的 DC 是经典的主动免疫细胞治疗方法, 采用人外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 获取前体 DC, 经体外诱导分化、负载 mRNA、功能验证后回输患者^[16]。负载 mRNA 的 DC 疫苗具备强大的抗原提呈功能和较高的生物相容性, 相关研究已进入临床试验阶段, 其局限性在于制备过程相对较为复杂, 成本较高, 且易受到肿瘤异质性和肿瘤抗原靶标选择的影响^[14]。

3.3 载体介导的递送可显著 mRNA 的传递效率

载体对 mRNA 疫苗的递送效率至关重要。早期核酸疫苗的递送多以具有高转染效率的病毒为载体, 然而该递送方式存在产生自我复制性逆转录病毒的风险^[19]。故临床治疗一般更倾向于采用更为安全的非病毒载体进行递送。

3.3.1 脂质是目前使用最广泛的载体

mRNA 疫苗的脂质载体包括脂质、类脂类化合物以及脂质衍生物。脂质衍生纳米颗粒 (lipid-derived nanoparticle, LNP) 转染效率较高, 安全性好, 是目前使用最为广泛的 mRNA 疫苗载体。LNP 包括四种成分: 阳离子脂质, 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)-脂质偶联物, 胆固醇, 以及天然磷脂。其中阳离子脂质是保证 LNP 递送效率最关键的成分, 可与带负电荷的 mRNA 相互作用, 暴露在水环境

中后,即包裹 mRNA 入水核,自组装为纳米脂质体,同时阳离子脂质可破坏内体结构,从而将 mRNA 释放^[15]。常用的阳离子脂质包括 1,2-二油酰氧基丙基三甲基氯化铵,二油酰磷脂酰乙醇胺,1,2-二聚氧-3-(三甲基氨基)丙烷,1,2-二烯基羟丙基-3-二甲基羟乙基溴化铵等^[20]。

研究者们发现,相较于阳离子脂质,对 pH 敏感的可电离脂质和类脂可在生理 pH 下保持中性或轻度正电荷,细胞毒性更小,且具备更高的传递效率^[21]。一项研究使用以可电离脂质为主要成分的 LNP 作为载体,将荧光素酶 mRNA 注入位于妊娠期母鼠子宫的胎儿体内,测得强荧光素酶信号,且不转移至母体及子宫内其他胎儿。结果表明该 LNP 载体较递送系统 MC3、jetPEI 具备更高的 mRNA 传递效率,且完全饱和的可电离脂质可诱导最大程度的 mRNA 传递^[22]。在最近的一项研究^[23]中,研究者使用三种可电离脂质制备 LNP 载体,将 mRNA 递送至胰腺细胞内,并与阳离子脂质成分载体 DOTAP 进行比较,结果表明可电离脂质成分的载体较 DOTAP 递送效率更高,特异性更强。

脂质的优化可通过修饰胺基头部^[24]、增加疏水成分如 PEG^[25]等方式实现。注射方式对递送效率也有影响。LNP 常见的注射方式包括肌肉、皮下、皮内注射,其中肌肉注射较为简便,易于操作,可直接到达淋巴结,是目前最常用的给药途径^[21]。肿瘤内给药也被证实效果良好^[25]。

3.3.2 聚合物也是较为新颖、有效的递送载体

与脂质载体类似,聚合物也可保护 mRNA 免受核酸酶的降解并促进递送。天然聚合物及其衍生物如几丁质、壳聚糖,在自然界生物体中广泛存在,具备良好的生物相容性和降解性,但难溶性使其应用受到限制^[26]。合成聚合物中主要使用阳离子聚合物,如聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI)、聚酰胺胺 (polyamidoamine, PAMAM) 树枝状大分子及多糖。其中 PEI 使用较为广泛。

PEI 具备很高的核酸传递效率,且含 PEI 的 RNA 疫苗可诱导产生更高的抗体滴度^[27],但其细胞毒性较高^[28]。使用低分子量 PEI 可降低细胞毒性,然而其传递效率也随之降低。经研究发现,将低分子量 PEI 与酸不稳定性酯类结合,或与分支 PEI 连接,可在降低细胞毒性的同时提高传递效率^[28-29]。糖类对 PEI 也具备良好的优化效果,实验证明,环糊精-PEI 载体较 PEI 载体细胞毒性更低,亲和力增强^[30];甘露糖基化的 PEI 载体可促进 RNA 的表达,提高蛋白质的表达水平^[31]。

PAMAM 树枝状大分子和多糖聚合物载体也得

到广泛研究。CHAHAL 等^[32]研究发现,树枝状大分子作为载体的 RNA 疫苗可引发强烈的 CD8⁺ T 细胞免疫应答,具备对 H1N1 抗原、埃博拉病毒、刚地弓形虫的免疫效应。另有研究^[33]发现甘露聚糖载体具备较高的转染效率,可提高 mRNA 的表达水平,产生抗肿瘤作用。

3.3.3 肽类具备佐剂效应

肽类物质作为 RNA 载体使用时,一般使用阳离子肽。鱼精蛋白是一类天然阳离子肽,通过自发浓缩并包裹 RNA 以保护其体内的传递^[34],其膜转运活性较强,可提高转染效率^[35]。值得注意的是,鱼精蛋白具备佐剂样效应。鱼精蛋白浓缩的 mRNA 比裸 mRNA 可诱导更强烈的抗肿瘤 T 细胞免疫应答,使肿瘤生长出现明显延迟甚至消退^[36]。疫苗 RNActive[®] (CV9202) 将游离 mRNA 与佐剂鱼精蛋白-mRNA 复合物结合,在临床研究中展示了良好的免疫原性和耐受性^[37],且该疫苗可解决因肽类与 mRNA 结合过于紧密引起的蛋白质表达受限的问题^[34]。

4 mRNA 肿瘤疫苗的应用进展

第一个进入临床试验的基于 mRNA 的肿瘤疫苗是将 mRNA 转染至 DC,输入体内实现抗肿瘤效应^[38]。目前基于 IVT 的 mRNA 肿瘤疫苗已开展相关临床前研究和临床试验,根据编码产物可分为 mRNA 编码免疫刺激剂、TAA、新抗原三种。

4.1 mRNA 编码免疫刺激剂可作为佐剂进行联用

免疫刺激剂主要通过受体介导发送的信号调节免疫反应的质量,可作为 mRNA 疫苗的编码抗原增强机体的抗肿瘤免疫,常作为佐剂与其他免疫治疗药物共同使用。

IL-2 是参与 T 细胞分化、增殖、发挥效应的关键细胞因子,已被批准用于黑色素瘤和肾细胞癌的治疗^[39],其限制在于半衰期短、优先刺激调节性 T 细胞 (Treg 细胞)。研究者将编码 IL-2 的 mRNA 疫苗与编码 IL-7 的 mRNA 疫苗结合,观察到该疗法中 IL-2 半衰期延长,动物实验小鼠体内 CD8⁺ T 细胞数量相对增高^[40]。其他可编码细胞因子还包括 IL-23、IL-12、IL-15 等^[34, 40]。

mRNA 疫苗还可编码共刺激分子。TriMix 佐剂疫苗包含三个裸 mRNA 分子,分别编码共刺激分子 CD70、激动剂 CD40 配体 (CD40L)、构成性活性 TLR4 (constitutively active TLR4, caTLR4),可与编码肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen, TAA) 抗原的 mRNA 疫苗联用,或联合检查点抑制剂伊匹单抗,与 DC 细胞共同电穿孔,实验表明这两种疗法可发挥强有力的抗肿瘤效应,且

具备良好的耐受性^[18,41]。另一种共刺激分子OX40L是OX40的配体,可活化CD8⁺T细胞和Treg细胞。mRNA-2456为编码OX40L的疫苗,针对淋巴瘤及卵巢癌的临床试验已进入I/II期(NCT03323398),该产品可与PD-L1免疫检查点敲除联用,研究结果表明其发挥了显著的肿瘤抑制效应^[42]。

4.2 mRNA编码TAA是目前最常用的靶向抗原

抗原选择是mRNA肿瘤疫苗有效性的关键一环。mRNA可将TAA作为抗原进行编码,从而达到对肿瘤细胞的靶向识别与杀伤效果。例如,mRNA疫苗CV9202编码了六种非小细胞性肺癌(NSCLC)相关抗原(NY-ESO-1、MAGE-C1、MAGE-C2、存活素、5T4和MUC-1),在26例接受治疗的患者中进行评估,46.2%(12/26)病情稳定,1例患者出现部分缓解,1例患者未达到部分缓解程度的病灶减小,6例患者超过15%的未照射病灶缩小^[37]。mRNA疫苗BNT111以四种黑色素瘤相关抗原(NT-ESO-1、MAGE-A3、酪氨酸酶和TPTE)作为编码抗原,可与PD-1免疫检查点抑制剂联用,I期试验(NCT02410733)结果^[43]表明该疫苗可诱导强烈的免疫应答效应。最近,有研究者^[44]以黑色素瘤相关抗原gp100(25-33)作为靶向抗原,编码mRNA并免疫黑色素瘤荷瘤小鼠,免疫后第12日发现,实验组肿瘤体积明显缩小,肿瘤和脾脏组织皆可检测到CD4⁺、CD8⁺T细胞的浸润。

但采用TAA作为编码抗原有一定的限制性:(1)TAA在正常组织细胞中也有表达,以TAA为靶向抗原可能会引发免疫耐受或脱靶效应;(2)目前已鉴定的TAA十分有限,无法广泛应用;(3)TAA具有变异性,易发生免疫逃逸和耐药。因此,对新抗原的研究应运而生。

4.3 mRNA编码新抗原作为新兴疗法促进个性化治疗

新抗原(neoantigen)广义上是指由肿瘤细胞的突变基因所编码产生的,能被机体免疫细胞所识别,并激活免疫应答的一类异常表达的蛋白质。新抗原疫苗不仅具有高度的个体化特性,还可以避免损伤机体非恶性细胞、防止因中枢耐受导致肿瘤细胞逃逸等。SAHIN等^[13]通过对患者全基因组和RNA测序,突破性地确定了13名患者的体细胞非同义突变。而后下一代测序(next-generation sequencing, NGS)技术的发展应用实现了在个体患者中识别特异性突变,协助预测MHC-I类分子结合表位,从而准确、及时、有效地提供治疗药物^[45]。

多个编码新抗原的mRNA肿瘤疫苗的研究正在进行中。CAFRI等^[46]利用肿瘤浸润淋巴细胞鉴定肿瘤中表达的特异免疫原性突变,将编码新抗原的mRNA疫苗与免疫检查点抑制剂结合,结果表明该疫苗较为安全,在患者体内引发了针对预测新表位的特异性T细胞免疫应答,目前该疫苗(NCT03480152)已完成I/II期临床试验。成功研发新冠mRNA疫苗的Moderna公司研发的mRNA-4157,由编码34种新抗原的合成mRNA组成,是一种针对肿瘤患者而量身定制的个体化肿瘤疫苗,用于治疗非小细胞性肺癌、黑色素瘤等实体瘤,IIb期临床试验最新数据(NCT03897881)显示,在接受治疗的157名中晚期黑色素瘤患者中,与单独使用PD-1抗体相比,接受mRNA-4157/V940联合PD-1作为辅助治疗,mRNA疫苗组的18个月无复发生存率为78.6%,而PD-1组为62.2%,预示mRNA肿瘤疫苗可显著降低复发或死亡风险。最近,ROJAS等^[47]采用mRNA疫苗BNT122,在胰腺导管腺癌患者中展开研究,该研究将编码新抗原的mRNA疫苗与阿替利珠单抗、叶酸等化疗药物结合,测试携带佐剂的个体化疫苗对新抗原特异性T细胞的诱导效果。研究结果显示,16例接受治疗的患者中8例(50%)产生明显的特异性T细胞免疫应答,230种新抗原中有25种(11%)诱导了足够高强度的T细胞反应。

诱发肿瘤的病毒可为治疗性mRNA肿瘤疫苗提供靶向抗原。例如,EB病毒可诱发鼻咽癌,目前尚无相关治疗性疫苗。一项研究^[48]通过体外转录EBV潜伏膜蛋白2(latent membrane protein 2, LMP2)编码mRNA,免疫小鼠后测得小鼠体内CD8⁺T细胞增多,肿瘤生长明显受到抑制。在最近的另一项研究^[49]中,研究者根据人乳头瘤病毒(HPV)16早期蛋白E6、E7编码mRNA疫苗并肌肉注射小鼠,观察到小鼠体内出现由CTL介导的抗肿瘤免疫应答,截至免疫后59d,实验组小鼠存活率为100%,完全缓解症状率达到60%。

5 挑战

在人类与新型冠状病毒的斗争中,mRNA疫苗在安全性、生产快速方面,对于应对突发、新发传染病展现出了极大的优势。然而与传染病疫苗的预防性质不同,抗肿瘤疫苗在研发与应用过程中面临更多挑战。

在安全性方面,mRNA疫苗的制备过程中对原始序列的修饰可能会产生不利结果,有研究^[50]表明,即使同义突变也可导致疾病的发生。此外,

mRNA 疫苗免疫原性强度的控制仍是一大难题, 如何在避免炎症等不良反应的同时发挥充分的免疫效应, 需要对免疫原性和免疫反应的种类进行优化。

在有效性方面, 尽管已应用多种分子修饰与载体系统, mRNA 在体内传递的稳定性仍有待提高, 并且缺乏直接比较各种递送工具在安全性和运载效率方面的研究。目前, 治疗性抗肿瘤疫苗大多能够诱导体液免疫应答, 而对 MHC- I 限制性的 CD8⁺ T 细胞反应的激活并不充分, 这对抗肿瘤的效果产生了很大影响。由于患者个体的异质性, mRNA 肿瘤疫苗在患者体内难以充分发挥作用, 而目前 TAA 和新抗原的筛选鉴定十分有限, 个性化 mRNA 肿瘤疫苗的临床试验仍然很少, 不同患者的治疗效果差异很大。虽然 mRNA 肿瘤疫苗的临床试验正在积极开展, 但总体仍处于开发初期。

mRNA 疫苗领域仍远未成熟, 但其作为优选疫苗的潜力已被充分证明。需要更多深入的研究, 继续探索最合适的编码抗原、递送途径、治疗人群、给药途径和剂量、联合治疗策略, 才能在肿瘤免疫治疗方面取得又一次突破, 造福广大肿瘤患者。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] GRIMMETT E, AL-SHARE B, ALKASSAB M B, *et al.* Cancer vaccines: past, present and future; a review article[J/OL]. *Discov Oncol*, 2022, 13(1): 31[2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35576080/>. DOI: 10.1007/s12672-022-00491-4.
- [3] PARK J W, LAGNITON P N P, LIU Y, *et al.* mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(6): 1446-1460. DOI: 10.7150/ijbs.59233.
- [4] MUTTACH F, MUTHMANN N, RENTMEISTER A. Synthetic mRNA capping[J]. *Beilstein J Org Chem*, 2017, 13: 2819-2832. DOI: 10.3762/bjoc.13.274.
- [5] JANOWSKI M, ANDRZEJEWSKA A. The legacy of mRNA engineering: a lineup of pioneers for the Nobel Prize[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 29: 272-284. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.07.003.
- [6] KARIKO K, BUCKSTEIN M, NI H, *et al.* Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA[J]. *Immunity*, 2005, 23(2): 165-175. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
- [7] ANDERSON B R, MURAMATSU H, NALLAGATLA S R, *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(17): 5884-5892. DOI: 10.1093/nar/gkq347.
- [8] ANDRIES O, MC C S, DE SMEDT S C, *et al.* N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice[J]. *J Control Release*, 2015, 217: 337-344. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051.
- [9] PARDI N, HOGAN M J, NARADIKIAN M S, *et al.* Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(6): 1571-1588. DOI: 10.1084/jem.20171450.[PubMed]
- [10] 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/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): e142 [2023-07-30]. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr695>. DOI: 10.1093/nar/gkr695.
- [11] BAIERSDÖRFER M, BOROS G, MURAMATSU H, *et al.* A facile method for the removal of dsRNA contaminant from in vitro-transcribed mRNA[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 15: 26-35. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.02.018.
- [12] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. *Science*, 1990, 247(4949 Pt 1): 1465-1468. DOI: 10.1126/science.1690918.
- [13] SAHIN U, DERHOVANESSIAN E, MILLER M, *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 222-226. DOI: 10.1038/nature23003.
- [14] ZENG C X, ZHANG C X, WALKER P G, *et al.* Formulation and delivery technologies for mRNA vaccines[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2022, 440: 71-110. DOI: 10.1007/82_2020_217.
- [15] PARDI N, HOGAN M J, PORTER F W, *et al.* mRNA vaccines - a new era in vaccinology[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4): 261-279. DOI: 10.1038/nrd.2017.243.[PubMed]
- [16] BENTEYN D, HEIRMAN C, BONEHILL A, *et al.* mRNA-based dendritic cell vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(2): 161-176. DOI: 10.1586/14760584.2014.957684.
- [17] VAN TENDELOO V F, PONSARTS P, LARDON F, *et al.* Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells[J]. *Blood*, 2001, 98(1): 49-56. DOI: 10.1182/blood.V98.1.49.
- [18] DE KEERSMAECKER B, CLAERHOUT S, CARRASCO J, *et al.* TriMix and tumor antigen mRNA electroporated dendritic cell vaccination plus ipilimumab: link between T-cell activation and clinical responses in advanced melanoma[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000329[2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32114500/>. DOI: 10.1136/jitc-2019-000329.
- [19] KAMIMURA K, SUDA T, ZHANG G S, *et al.* Advances in gene delivery systems[J]. *Pharmaceut Med*, 2011, 25(5): 293-306. DOI: 10.2165/11594020-000000000-00000.
- [20] HIRKO A, TANG F X, HUGHES J A. Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(14): 1185-1193. DOI: 10.2174/0929867033457412.
- [21] REICHMUTH A M, OBERLI M A, JAKLENEC A, *et al.* mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles[J]. *Ther Deliv*, 2016, 7(5): 319-334. DOI: 10.4155/tde-2016-0006.

- [22] RILEY R S, KASHYAP M V, BILLINGSLEY M M, *et al.* Ionizable lipid nanoparticles for in utero mRNA delivery[J/OL]. *Sci Adv*, 2021, 7(3): eaba1028 [2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33523869/>. DOI: 10.1126/sciadv.aba1028.
- [23] MELAMED J R, YERNENI S S, ARRAL M L, *et al.* Ionizable lipid nanoparticles deliver mRNA to pancreatic β cells via macrophage-mediated gene transfer[J/OL]. *Sci Adv*, 2023, 9(4): eade1444[2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9882987/>. DOI: 10.1126/sciadv.ade1444.
- [24] SEMPLE S C, AKINC A, CHEN J X, *et al.* Rational design of cationic lipids for siRNA delivery[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(2): 172-176. DOI: 10.1038/nbt.1602.
- [25] SATO Y, HATAKEYAMA H, SAKURAI Y, *et al.* A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo[J]. *J Control Release*, 2012, 163(3): 267-276. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.09.009.
- [26] USMAN A, ZIA K M, ZUBER M, *et al.* Chitin and chitosan based polyurethanes: a review of recent advances and prospective biomedical applications[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 630-645. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.004.
- [27] VOGEL A B, LAMBERT L, KINNEAR E, *et al.* Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 446-455. DOI: 10.1016/j.jymthe.2017.11.017.
- [28] ZHAO C, ZHOU B Q. Polyethyleneimine-based drug delivery systems for cancer theranostics[J/OL]. *J Funct Biomater*, 2022, 14(1): 12[2023-07-30]. <https://doi.org/10.3390/jfb14010012>. DOI: 10.3390/jfb14010012.
- [29] ZHANG L, YU M, WANG J, *et al.* Low molecular weight PEI-based vectors via acid-labile ortho ester linkage for improved gene delivery[J]. *Macromol Biosci*, 2016, 16(8): 1175-1187. DOI: 10.1002/mabi.201600071.
- [30] ABDELLATIF A A, AHMED F, MOHAMMED A M, *et al.* Recent advances in the pharmaceutical and biomedical applications of cyclodextrin-capped gold nanoparticles[J]. *Int J Nanomed*, 2023, 18: 3247-3281. DOI: 10.2147/ijn.s405964.
- [31] BLAKNEY A K, ABDOUNI Y, YILMAZ G, *et al.* Mannosylated poly (ethylene imine) copolymers enhance saRNA uptake and expression in human skin explants[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(6): 2482-2492. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00445.
- [32] CHAHAL J S, KHAN O F, COOPER C L, *et al.* Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(29): E4133-E4142 [2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27382155/>. DOI: 10.1073/pnas.1600299113.
- [33] SON S, NAM J, ZENKOV I, *et al.* Sugar-nanocapsules imprinted with microbial molecular patterns for mRNA vaccination[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(3): 1499-1509. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b03483.
- [34] MIAO L, ZHANG Y, HUANG L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy[J/OL]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 41 [2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33632261/>. DOI: 10.1186/s12943-021-01335-5.
- [35] JARZEBSKA N T, MELLETT M, FREI J, *et al.* Protamine-based strategies for RNA transfection[J/OL]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(6): 877 [2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34198550/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060877.
- [36] SCHEEL B, AULWURM S, PROBST J, *et al.* Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(10): 2807-2816. DOI: 10.1002/eji.200635910.
- [37] PAPACHRISTOFILOU A, HIPPE M M, KLINKHARDT U, *et al.* Phase I b 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/OL]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 38 [2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30736848/>. DOI: 10.1186/s40425-019-0520-5.
- [38] VORMEHR M, SCHRÖRS B, BOEGEL S, *et al.* Mutanome engineered RNA immunotherapy: towards patient-centered tumor vaccination[J/OL]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 595363 [2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26844233/>. DOI: 10.1155/2015/595363.
- [39] JIANG T, ZHOU C C, REN S X. Role of IL-2 in cancer immunotherapy[J/OL]. *OncoImmunology*, 2016, 5(6): e1163462 [2023-07-30]. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2016.1163462>. DOI: 10.1080/2162402x.2016.1163462.
- [40] BECK J D, REIDENBACH D, SALOMON N, *et al.* mRNA therapeutics in cancer immunotherapy[J/OL]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 69 [2023-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33858437/>. DOI: 10.1186/s12943-021-01348-0.
- [41] JANSEN Y, KRUSE V, CORTHALS J, *et al.* A randomized controlled phase II clinical trial on mRNA electroporated autologous monocyte-derived dendritic cells (TriMixDC-MEL) as adjuvant treatment for stage III/IV melanoma patients who are disease-free following the resection of macrometastases[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(12): 2589-2598. DOI: 10.1007/s00262-020-02618-4.
- [42] WALTERS A A, SANTACANA-FONT G, LI J, *et al.* Nanoparticle-mediated in situ molecular reprogramming of immune checkpoint interactions for cancer immunotherapy[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(11): 17549-17564. DOI: 10.1021/acsnano.1c04456.
- [43] SAHIN U, OEHM P, DERHOVANESSIAN E, *et al.* An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma [J]. *Nature*, 2020, 585(7823): 107-112. DOI: 10.1038/s41586-020-2537-9.
- [44] HUSSEINI R A, ABE N, HARA T, *et al.* Use of iontophoresis technology for transdermal delivery of a minimal mRNA vaccine as a potential melanoma therapeutic[J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46(2): 301-308. DOI: 10.1248/bpb.b22-00746.
- [45] BLASS E, OTT P A. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(4): 215-229. DOI: 10.1038/s41571-020-00460-2.
- [46] CAFRI G, GARTNER J J, ZAKS T, *et al.* mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11): 5976-5988. DOI: 10.1172/JCI134915.
- [47] ROJAS L A, SETHNA Z, SOARES K C, *et al.* Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2023, 618(7963): 144-150. DOI: 10.1038/s41586-023-

- 06063-y.
- [48] GUO M R, DUAN X, PENG X C, *et al.* A lipid-based LMP2-mRNA vaccine to treat nasopharyngeal carcinoma[J]. *Nano Res*, 2023, 16(4): 5357-5367. DOI: 10.1007/s12274-022-5254-x.
- [49] ZHOU K, YUZHAKOV O, BEHLOUL N, *et al.* HPV16 E6/E7-based mRNA vaccine is therapeutic in mice bearing aggressive HPV-positive lesions[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1213285 [2023-07-30]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1213285>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1213285.
- [50] HUNT R C, SIMHADRI V L, IANDOLI M, *et al.* Exposing synonymous mutations[J]. *Trends Genet*, 2014, 30(7): 308-321. DOI: 10.1016/j.tig.2014.04.006.
- [收稿日期] 2023-08-01 [修回日期] 2023-09-03
[本文编辑] 黄静怡