

# mRNA 疫苗的开发及临床研究进展

胡 瞬<sup>1,2,3,4</sup> 易有金<sup>1\*</sup> 胡 涛<sup>3</sup> 李福胜<sup>2\*</sup>

(1 湖南农业大学食品科学技术学院 长沙 410128 2 康众(北京)生物科技有限公司 北京 100176)

(3 中国科学院过程工程研究所 北京 100190 4 湘南学院公共卫生学院 郴州 423000)

**摘要** 随着 mRNA 稳定性和安全高效的递送系统的研究日渐成熟,近年来,mRNA 疫苗在肿瘤个体化疫苗中取得了较大进展,因其生产工艺简单、在细胞内表达抗原、安全性优于 DNA 疫苗等特点,是一种很有前途的新型疫苗。为了解全球 mRNA 疫苗的开发与研究现状,在此重点对 mRNA 疫苗的分子设计、递送系统、临床研究现状进行了分析和综述,为后续 mRNA 疫苗的开发和研究提供参考依据。

**关键词** mRNA 疫苗 递送系统 临床试验

**中图分类号** Q819

早在 1990 年 Wolff 等<sup>[1]</sup>就首次展示了 mRNA 的治疗潜力,但由于 mRNA 不稳定,容易被无处不在的 RNA 酶降解的缺点,被认为应用性较低,多年来 mRNA 疫苗及药物进展缓慢。但在 2017 年 7 月,由 Ugur Sahin 教授率领的美因茨大学团队为每位黑色素瘤患者研发出含有多种肿瘤新抗原的个性化 mRNA 疫苗,13 名受试者中的 8 名患者肿瘤得到有效治疗且 1 年内没有复发,其中包括 2 名患者在接受疫苗后肿瘤缩小,1 名患者在接受 PD-1 抗体药物后得到完全缓解,其他 5 名患者在接受疫苗时肿瘤已经出现扩散,研究结果发表于 *Nature* 杂志<sup>[2]</sup>,这一巨大的临床进展让全球的目光重新聚焦于 mRNA 疫苗。mRNA 作为肿瘤疫苗进入细胞后在细胞质中被翻译成蛋白质,成为胞内抗原并和 MHC I 分子结合,进而提呈于细胞表面被 CD8<sup>+</sup> T 细胞识别后激活 CTL 反应,达到杀伤肿瘤细胞的目的。目前,mRNA 疫苗受到各大研究机构和医药巨头的青睐。近两年来,mRNA 疫苗技术得到了迅速发展。因此,本文对 mRNA 疫苗的分子设计、递送系统和临床研究现状进行了分析和综述,为后续 mRNA 疫苗的开发和研究提供参考依据。

## 1 mRNA 疫苗概述

核酸疫苗是在第一代减毒/灭活疫苗和第二代亚单位疫苗基础上发展起来的第三代疫苗。目前,核酸疫苗主要分为质粒 DNA 疫苗和 mRNA 疫苗。mRNA 疫苗保持了 DNA 疫苗能够表达胞内抗原的优点,同时克服了其免疫原性低、可能产生抗载体的非特异性免疫的缺点,且没有整合到宿主 DNA 的风险。但 mRNA 疫苗的应用需要解决其稳定性较差、容易被降解的问题。mRNA 疫苗的特点如表 1 所示。

目前,大部分 mRNA 疫苗产品处于临床阶段,还没有出现经美国食品及药物管理局(FDA)批准的 mRNA 产品上市,但因其具有作为胞内抗原和生产周期短等特点,mRNA 疫苗在癌症疫苗、流感、HIV 等变异性高的病毒疫苗领域,具有不可替代的优势。mRNA 疫苗的开发难点在于其稳定性和递送系统,mRNA 疫苗的稳定性和其分子设计息息相关。

## 2 mRNA 疫苗的分子设计

mRNA 作为疫苗,通常以线性化的 DNA 为模板通过体外转录获得,可对其 DNA 模板和转录原料进行设计,获得分子水平精准设计的 mRNA 产品。其中,mRNA 的组成含有几个必要的元件,依次包括帽子结构(Cap)、5'UTR 区、编码抗原蛋白的开放阅读框(open

收稿日期:2019-03-04 修回日期:2019-04-12

\* 通讯作者,电子信箱:fushengli@sysvax.com; yiyoujin@163.com

表 1 不同类型疫苗的比较  
Table 1 Comparison of different types of vaccines

疫苗种类	免疫原性		安全性	抗体特异性	成分	制备工艺	免疫应答特征	适应范围
第一代疫苗 减毒/灭活疫苗	强	低	低	低	不明确	简单	细胞免疫 体液免疫	预防性疫苗
第二代疫苗 亚单位疫苗	弱	高	高	高	明确	复杂 (需要佐剂)	体液免疫或细胞免疫 (与佐剂有关)	预防性疫苗 治疗性疫苗
第三代疫苗核酸疫苗	DNA	弱	有争议	低	明确	简单	体液免疫 细胞免疫	胞内菌感染预防及治疗性疫苗 肿瘤治疗性疫苗
预防性疫苗	RNA	高	高	高	明确	简单		

reading frame, ORF)、3'UTR 区和 Poly(A) 尾结构。通过对 DNA 模板上的 UTR 区、Poly(A) 尾和体外转录时的 Cap、NTP 等合成 mRNA 的元件进行设计,提高 mRNA 的稳定性和翻译效率。除了不稳定性外, mRNA 的另一个缺点是免疫原性过高,目前的策略是在 mRNA 分子中掺入修饰过的核苷酸,可显著提高其翻译效率,延长其半衰期,同时达到降低其免疫原性的目的<sup>[3]</sup>。

2.1 mRNA 疫苗的 Cap 结构设计

Cap 结构与 mRNA 的稳定性密切相关,且 Cap 可通过与真核翻译起始复合物 eIF4F 结合影响 mRNA 翻译效率。在体内转录时,传统的帽子结构分为 3 种,即 m7GpppXpYp (Cap0)、m7GpppXmpYp (Cap1)、m7GpppXmpYmp(Cap2)。由于加帽后 mRNA 5'端没有游离的末端磷酸基团,所以对碱性磷酸酶很稳定。而且,Cap1 和 Cap2 mRNA 后面两个核苷酸上的甲基分别封闭了磷酸酯键上游离的 2'OH 基团,因而对 RNA 酶 A、T1、T2 都很稳定。

此外还有两种情况:第一,除了核苷酸的甲基化外,磷酸二酯键上的氢键也可能被甲基化,生产 m7G-N1mpN2mpN3p 结构;第二,帽子聚合物可以反方向结合,形成 m7GpppG(pN)<sub>n</sub> 的异构体 Gpppm7G(pN)<sub>n</sub>,这可能会对各种下游过程造成影响。为了解决这些问题,各种帽子类似物被开发出来,称为抗-反转帽子类似物(anti-reverse cap analogue, ARCA)。ARCA 在 C2 或者 C3 位置被修饰(如 m2 7,3-OGpppG),确保在转录时甲基只取代正确位点的 OH。如 3'-O-Me-m7G(5)-pppG(5),其 m7G 除了经典的鸟苷 N7-甲基取代基外,m7G 核糖的 3'-OH 上还包括一个甲基<sup>[4]</sup>。相对传统的帽子结构,ARCA 加帽的 mRNA 将具有更高的翻译效率<sup>[4-7]</sup>。与 ARCA 或传统的 m7GpppG 相比,β-S-ARCA Cap 修饰的 mRNA 转染 DC 细胞后翻译效率更高,半衰

期更长,这可能与其抵抗 DCP2 的脱帽作用有关<sup>[8]</sup>。另有研究表明,5'-LNA-Cap mRNA 分别比具有 M7GpppXpYp 和 ARCA 帽的 RNA 稳定性高 1.61 倍和 1.28 倍,并且比未加帽的 mRNA 高 4.23 倍。在 HeLe 细胞中,1,5'-LNA-Cap mRNA 表达的萤光素酶活性是 M7GpppXpYp Cap mRNA 的 3.2 倍,是 ARCA Cap mRNA 的 1.45 倍<sup>[9]</sup>。所以,在 ARCA 基础上修饰 Cap 结构是一种可行的优化方向。

除了常规的三磷酸 Cap,一系列新型的 N7-苄基二核苷四磷酸帽类似物被合成。通过考察这一系列帽子对 eIF4E 的亲合力、Cap 类似物抑制细胞自由翻译的能力、mRNA 被加帽的效率以及 Cap 类似物加帽方向的正确率,可以揭示不同的 Cap 类似物的差异。结果表明,与 7-甲基三磷酸类似物相比,7-苄基和甲基的四磷酸类似物修饰的 mRNA 翻译效率更高,其中 b7m2GppppG、m7Gpppm7G、b7m3'-O-GppppG 和 m7Gppppm7G 的翻译效率分别是 m7GpppG 的 2.5 倍、2.6 倍、2.8 倍和 3.1 倍<sup>[10]</sup>。

2.2 mRNA 疫苗的 5'UTR 设计

5'UTR 区的结构特征是影响 mRNA 翻译效率的主要因素。有研究表明,5'端非结构区不应包含上游开放阅读框,这可避免错误的翻译启动和替换阅读框<sup>[11]</sup>。引入优化的 Kozak 序(GCCRCCAUGG,脊椎动物)也可避免错误启动<sup>[12]</sup>。有文献报道,由于稳定的二级结构阻挡小分子核糖体结合起始编码元件,5'UTR 区域必须短而且松散<sup>[13]</sup>。

2.3 mRNA 疫苗的 3'UTR 设计

3'UTR 区是 mRNA 不稳定因素的集中区域,其中 AU(AREs)富集序列、AUUUA 重复序列和 GU 富集序列(GREs)是 3'UTR 引起 mRNA 不稳定的最常见因素<sup>[14-16]</sup>。因此,在合成的 mRNA 中应避免这些序列。

此外,通过引入稳定元件,可以显著提高 mRNA 的稳定性,延长其半衰期。例如,BioNTech 公司专利中使用了 2 个  $\beta$  球蛋白( $\beta$ -globin)串联的 3'UTR,这大大地增强了 mRNA 的稳定性<sup>[17]</sup>。Ferizi 等<sup>[18]</sup>的研究也表明,人类  $\alpha$  和  $\beta$  球蛋白的 3'UTR 可增强 mRNA 的稳定性和翻译效率,头尾排列的人类 2 个  $\beta$ -球蛋白的 3'UTR 可增加 mRNA 的稳定性。这主要是因为  $\alpha$  和  $\beta$  球蛋白的 3'UTR 富含不连续的嘧啶(TC)和相应的 RNP,RNP 与 PABP 直接相互作用,可提高与 Poly(A)尾巴的相互作用,保护 mRNA 不被降解。更重要的是,在  $\beta$ -球蛋白的 mRNA 的 3'UTR 存在稳定的核仁蛋白结合元件<sup>[19]</sup>。此外,在终止密码子后的碱基建议为 G 或 A,以便有效地终止翻译<sup>[20]</sup>。

#### 2.4 mRNA 疫苗中的核苷酸类似物设计

最近的研究表明,mRNA 通过刺激 Toll 样受体 TLRs(TLR3、TLR7、TLR8)能激活细胞先天免疫系统<sup>[21-23]</sup>。但使用核苷类似物合成的转录产物大部分 TLR 不再被激活,如假尿苷( $\Psi$ )、5-甲基胞苷(m5C)、N6-甲基腺苷(m6A)、5-甲基尿苷(m5U)和 2-硫尿苷(s2U)<sup>[24]</sup>。

Pardi 等<sup>[25]</sup>研究表明,(m1 $\Psi$ )-5'-假尿嘧啶-替代 UTP 的 HA mRNA LNP 流感疫苗,在小鼠、兔子和雪貂中引发了持久的针对 HA 柄区的特异性抗体反应;(m1 $\Psi$ )-5'-假尿嘧啶-替代 UTP 的寨卡 prM-E mRNA LNP 疫苗,在一次低剂量免疫接种后保护小鼠和猴免受寨卡病毒的感染<sup>[26]</sup>。Thess 等<sup>[27]</sup>展示了 mRNA 序列加入化学修饰的核苷酸即核苷类似物后,会降低蛋白质表达量。给小鼠注射使用假尿苷( $\Psi$ )合成的 mRNA,mRNA 翻译效率增强,同时免疫原性降低<sup>[28]</sup>。

此外,各种不同的核苷类似物被同时用于 mRNA 疫苗。使用 25% 的 5-甲基胞苷、25% 的 2-硫尿苷合成的 mRNA,能够降低 mRNA 与模式识别受体 TLR3、TLR7、TLR8、RIG-I 的结合概率,提高 mRNA 的稳定性,同时降低其免疫原性<sup>[29]</sup>。10% 的 5-甲基胞苷、10% 的 2-硫尿苷的 Foxp3 的 mRNA,能提高 mRNA 的翻译效率<sup>[30]</sup>。

综上所述,尿嘧啶类似物在核苷酸修饰中较为常见,推测是因为 mRNA 在转录后由无需模板的尿苷化过程形成 3'端的尿苷酸尾,能够被尿苷酸特异性核酸酶 Dis3L2 识别,引发 3'-5'端降解,而尿嘧啶类似物可以避免这种降解。含有核苷类似物的 mRNA 在体内仍可翻译时:第一,可解决 mRNA 作为抗原的免疫原性过

高的问题;第二,以核苷酸类似物为原料的 mRNA,可以抵抗核酸酶对 mRNA 的降解。这种含有核苷酸类似物 mRNA 有望发展成为一种用于基因替换和疫苗接种的新的治疗工具。

#### 2.5 mRNA 疫苗的 Poly(A)尾设计

在大部分真核细胞内,3'端 Poly(A)尾结构是除了 5'端 Cap 结构以外对 mRNA 稳定性最重要的结构。虽然 mRNA 的降解既可从外部结构 Poly(A)尾、帽子被除去开始,也可以由内切酶从内部攻击 mRNA 开始,但是大多数的 mRNA 降解是从 Poly(A)尾开始的。首先,mRNA 的 Poly(A)尾结构经脱腺苷化作用被缩短为寡 A 尾巴(oligo A)结构,这是 mRNA 降解过程中重要的一步。接着 Lsm1-7 复合物结合在 oligo A 上,可以招募脱帽酶 DCP1-2(decapping mRNA2)或 Nudt16(X)到达 5'帽子结构,随后帽子结构被除去,mRNA 被核糖核酸外切酶 XRN1 从 5'→3'方向降解。假若 Lsm1-7 不能有效结合 oligo A,脱腺苷化的 mRNA 就会被外切复合体复合物结合,从 3'→5'方向降解。

在树突状细胞中,Poly(A)尾最佳长度为 120 ~ 150nt<sup>[31]</sup>。Pardi 等<sup>[25]</sup>研究的 mRNA 流感疫苗使用长度为 101nt 的 Poly(A)尾。在 BioNTech 公司公开的专利中,含有 120nt 的 Poly(A)尾的 mRNA 的稳定性和翻译效率高于 Poly(A)尾长度为 16nt、42nt、51nt 和 67nt 的 mRNA<sup>[17]</sup>。

### 3 mRNA 疫苗的递送系统

mRNA 疫苗需要进入细胞质,随后在细胞内被翻译成目的蛋白。因此,涉及如何把 mRNA 递送进入细胞的问题。在体外试验中,mRNA 疫苗的递送通常采用电穿孔的方法,将抗原 mRNA 电转进入患者自体的 DC 细胞,这已经被用于癌症免疫治疗<sup>[32]</sup>。

mRNA 疫苗在人体内顺利地被递送进入细胞是其发挥作用的基本保障,这一过程存在一定挑战。首先,血液和组织中无处不在的 RNA 酶是 mRNA 进入细胞的重要障碍,mRNA 极有可能在进入细胞之前被快速降解;其次,mRNA 需要穿过带负电荷的磷脂双分子层结构的细胞膜才可进入细胞内部。只有小于 1 000Da 的分子可以在细胞膜上被动扩散,而裸 mRNA 作为一种分子量较大且带负电荷的分子,没有载体几乎不可能进入细胞。因此,mRNA 通常被制备成纳米粒子,纳米粒子进入细胞的机制取决于其大小,小于 200nm 的颗粒被网格蛋白介导的胞吞作用所吸收,而粒径较大

的颗粒主要依靠膜穴样凹陷途径进细胞<sup>[33]</sup>。目前 mRNA 的递送系统可大致分为两类,即脂类或类脂材料和聚合物递送系统。

### 3.1 脂质体纳米粒子递送系统

脂质体纳米粒子的递送机制主要是通过阳离子脂质体与带负电荷的 mRNA 结合,形成粒径小于 200nm 的复合物,能够被细胞内吞。在体外实验中,多种商业的转染试剂表现出良好的转染效果。但大多数商业试剂在体内递送效果不佳,且具有肝损伤等毒性,以及载体免疫原性等缺点而不能用于人体<sup>[34-35]</sup>。商业试剂体内活性丧失的一个根本原因在于阳离子脂质体 mRNA 复合物带有正电荷的特性,这种带正电荷的复合物在全身循环时,能被带负电荷的血清蛋白包裹,使其被单核巨噬细胞清除<sup>[36]</sup>。

脂质纳米颗粒(LNPs)是最先进的传递系统,最初在 siRNA 的递送中被证明是安全有效的<sup>[36-38]</sup>。LNPs 是以脂质为基础的递送系统,由阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇和聚乙二醇(PEG)组成稳定的颗粒,在其内核中携带 mRNA 并保护 mRNA 不被降解,同时 LNP 的亲脂性可以使颗粒和受试机体细胞膜融合,递送 mRNA 进入机体细胞内。Pardi 等<sup>[39]</sup>对 LNPs 进行了 mRNA 递送的综合研究,研究给药途径对脂质 mRNA-LNP 复合物分布的影响。结果表明,给药剂量为 0.005 ~ 0.25mg/kg 由 LNP 加载 mRNA 时,皮下、肌肉和皮内注射方式能够介导局部范围内的 mRNA 编码的蛋白质表达。静脉注射、腹腔注射、肌肉注射和气管吸入能够介导全身 mRNA 转运和表达,其中静脉注射效果最佳,能够使 mRNA 基因翻译的蛋白质在肝脏中表达长达 4 天<sup>[40]</sup>。

安全性方面,Sedic 等<sup>[40]</sup>通过使用 LNPs 包装人红细胞生成素 mRNA,进行 LNPs 的安全性评估。在大鼠和猴子体内,每周使用 0.3mg/kg 两次静脉注射 mRNA-LNP,除了证明其药理活性外,还发现 mRNA 治疗可诱导大鼠产生干扰素  $\gamma$  和肝损伤,猴子脾脏坏死和淋巴细胞耗竭。通过降低剂量或降低剂量频率,这些轻微到中度的促炎反应可能会减少。LNPs 递送的 siRNA 产品 Patisiran 的批准,为免疫原性的可控性和安全性提供了参考证据<sup>[41]</sup>。

### 3.2 聚合物递送系统

常用的聚合物递送系统材料有聚酰胺(poly-amido-amine, PAA)、聚  $\beta$  氨基酯(poly-beta amino-esters, PBAEs)和聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI),其中 PEI

应用最广泛。基于 PEI 偶联物的递送载体主要用于 mRNA 疫苗<sup>[42-43]</sup>,而 PAA 被研究用于蛋白质替代方法,如传递促红细胞生成素编码的 mRNA<sup>[44]</sup>。

此外,最新的技术结合脂质和聚合物颗粒来传递 mRNA,这种传递系统包括一个 LNP 来保护 mRNA 和一个聚合物胶束,聚合物胶束以肝细胞为靶点并触发 mRNA 的内体释放。编码鸟氨酸转氨酶甲酰化酶(OTC)的 mRNA 的小鼠体内实验表明,能够在肝脏中产生特异性有效的蛋白质<sup>[45]</sup>。

## 4 mRNA 疫苗临床研究进展

目前,全球 mRNA 疫苗的开发主要集中在 BioNTech、CureVac AG 和 Moderna 三家公司,它们与各大药企合作。礼来联合 CureVac 开发横跨多种类型癌症的 mRNA 疫苗产品。另外,辉瑞与 BioNTech 公司合作,宣布开发流感 mRNA 疫苗。三家公司主要研发管线及进展如表 2 所示。

### 4.1 已经完成的临床试验

在 clinicaltrials.gov 数据库中,大多数的 mRNA 疫苗处于临床 I/II 期。已经完成的 mRNA 疫苗临床研究包括 8 项 mRNA 转染患者自体 DC 后的研究和 2 项直接注射 mRNA 的研究。mRNA 通常采用电转进入 DC 细胞,随后 DC 细胞接种人体,接种方式包括皮内注射、淋巴结注射和静脉注射。2 项直接注射 mRNA 的研究均采用皮内注射。mRNA 临床试验涉及的癌症包括恶性黑色素瘤、前列腺癌、急性髓性白血病、HIV-1 等。

Gandhi 等<sup>[46]</sup>用编码 HIV-1 Gag 和 Nef 的 mRNA 转染的自体树突细胞后,在第 0 周、第 2 周、第 6 周和第 10 周皮内注射 DC 细胞免疫 HIV-1 感染者。免疫接种未引起显著的干扰素 ELISPOT 反应,但是能够引起短暂的抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖。因此,此 HIV-1 的 DC 细胞治疗性疫苗,需要被进一步优化以引起更强和更持久的免疫应答。

恶性黑色素瘤患者 mRNA 转染的 DC 细胞通过皮内注射,或者淋巴结内注射接种 4 次,同时在淋巴结注射 IL-2 提高 DC 疫苗的功效。结果表明,疫苗未见明显不良反应,19 例患者中,9 例可以增强 T 细胞的增殖和 IFN- $\gamma$  的表达,8 例患者显示迟发型超敏反应,证明 DC 疫苗进行免疫基因治疗安全可行,并且在体内引起 T 细胞对转染的肿瘤 mRNA 编码的抗原反应,通过比较皮内和淋巴结两种接种方式发现,淋巴结注射并不优于皮内注射<sup>[47]</sup>。

进一步研究黑色素瘤患者接种肿瘤 mRNA 转染树突状细胞后的 T 细胞反应,CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖和细胞因子 ELISPOT 结果表明,mRNA 能激活 T 细胞的持续反应,且 10 个 T 细胞克隆具有不同的 TCR,这证明肿瘤 mRNA 表达的抗原对 T 细胞具有广谱反应。且观察到 Th1/Th2 细胞因子的混合分布,甚至在来自单个细胞的 T 细胞克隆中也是如此。这一发现表明,癌症疫苗接种后的细胞因子模式可能比经典的 Th1/Th2

二分法所显示的更为复杂<sup>[48]</sup>。  
Weide 等<sup>[49]</sup> 进行转移性黑色素瘤患者 1/2 期 mRNA 疫苗试验,通过皮内注射编码黑素瘤抗原 (Melan-A、Mage-A1、Mage-A3、Survivin、GP100 和酪氨酸酶)的 mRNA 来诱导抗原的特异性免疫应答,疫苗采用 GM-CSF 用作佐剂。结果在治疗过程中,抗原特异性 T 细胞在部分患者中增加,证明了直接注射 mRNA 的可行性和安全性。

表 2 三家主要公司的 mRNA 疫苗研发管线及进展							
Table 2 The mRNA vaccine research and development pipeline and progress of three major companies							
公司名称	项目名称	平台	项目内容	前期研发	临床前研究	临床 I 期	临床 II 期
Moderna	mRNA-1777	预防性疫苗	呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗	完成	完成	完成	
	mRNA-1647		巨细胞病毒(CMV)疫苗	完成	完成	进行	
	mRNA-1653		人偏肺病毒(hMPV) + 副流感病毒 3 型 PIV3 疫苗	完成	完成		
	mRNA-1278		带状疱疹疫苗(VZV)疫苗	完成	进行		
	mRNA-1440		流感 H10N8 疫苗	完成	完成	完成	
	mRNA-1850		流感 H7N9 疫苗	完成	完成	完成	
	mRNA-1893		寨卡病毒(ZIKV)疫苗	完成	进行		
	mRNA-1388		奇昆古尼亚热病(Chikungunya)疫苗	完成	完成	完成	
	mRNA-4157	肿瘤疫苗	个体化肿瘤疫苗	完成	完成	进行	
	mRNA-5671		KRAS 疫苗(针对结直肠癌,非小细胞肺癌,胰腺癌)	完成	完成		
BioTech	个体化新表位特异性免疫治疗	肿瘤疫苗	转移性黑色素瘤	完成	完成	进行	
			多样实体瘤	完成	进行		
			保密	完成	完成	完成	进行
			晚期黑素瘤	完成	完成		
			HPV + 头部或者颈部肿瘤	完成	进行		
			三阴性乳腺癌	完成	进行		
			前列腺癌、卵巢癌、神经内分泌肿瘤	进行			
			季节性流感	进行			
			多达 10 种传染病的适应证	进行			
	罕见疾病	蛋白质替代治疗	5 种疾病	进行			
CureVAC AG	预防性疫苗		狂犬病病毒	完成	完成	进行	
			流感病毒	完成	进行		
			多样性项目(疟疾,流感)	进行			
			呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗	进行			
			艾滋病	进行			
			爆发的紧急的目标	完成	进行		
		肿瘤治疗	非小细胞肺癌	完成	完成	进行	
			浅表肿瘤	完成	进行		

Wilgenhof 等<sup>[50]</sup>采用单核来源树突状细胞 DCs 电转编码 CD40、TLR4 和 CD40 的 mRNA,同时给予人患者编码白细胞抗原 HLA-II 类靶信号的 DC-LAMP 和黑色素瘤抗原(MAGE-A3、MAGE-C2、酪氨酸酶或 gp100 TriMixDC-MEL)的融合 mRNA,均具有较好的免疫原性。临床 I/b 实验中,将 DC 细胞( $2.4 \times 10^7$  个)通过静脉和皮下(腋窝或腹股沟)给药相结合的方式给药,每两周 1 次,重复 4 次,在第 16 周进行第 5 次给药。其中静脉给药的 DC 细胞数量在这 4 次给药时依次增加,通过分析血源 T 细胞和皮肤浸润淋巴细胞(SKILs)的抗原特异性来评估免疫应答。预处理的 15 例晚期黑色素瘤患者,给予 TriMixDC-MEL 后耐受良好,2 例患者完全缓解,2 例患者部分缓解。治疗的 12 例患者中 6 例出现抗原特异性 SKILs,5 例患者中 4 例血液中检测到抗原特异性 CD80<sup>+</sup> T 细胞。本研究证明静脉注射 TriMixDC-MEL 安全可行且在临床上具有良好免疫原性。

#### 4.2 正在进行和招募的临床试验

目前正在进行的 mRNA 临床试验包括:治疗性前列腺 DC 疫苗和多发性骨髓瘤患者 CT7\MAGE-A3\WT1mRNA 电穿孔的 DC 细胞作为自体干细胞移植的巩固。正在招募的临床试验包括:免疫治疗联合 mRNA 疫苗的 1/2 期临床研究(非小细胞肺癌);高级消化系统肿瘤(晚期食管鳞状细胞癌、胃腺癌、胰腺癌、结直肠癌)患者新型抗原个体化 mRNA 疫苗的临床研究;黑色素瘤、结肠癌、胃肠道癌症的个性化新抗原 mRNA 疫苗的临床研究。

### 5 展 望

mRNA 疫苗生产工艺简单、合成快速、成本较低,本身具有激活免疫反应的佐剂作用;且在细胞质中翻译不进入细胞核,没有整合宿主基因组的风险;能够作为内源性抗原,被 MHC I 分子提呈激活 CTL 反应杀伤肿瘤细胞;同时作为核酸本身具有激活免疫反应的佐剂作用。在癌症基因测序和抗原新表位发现技术发展的基础上,mRNA 疫苗成为肿瘤个性化疫苗的最佳选择。

通过基因测序、生物信息学等多项技术获得一系列抗原表位后,如何使 mRNA 疫苗成功激活 T 细胞反应杀伤肿瘤细胞,技术上还有待完善。目前稳定性依然是 mRNA 疫苗最大的挑战,在分子设计理论上有很多考量。另外,相比体外细胞实验,动物和人体内环境

复杂,mRNA 递送系统也极为关键。在质量控制方面,如何检测残留的模板 DNA 和合成的不完全 mRNA 也是一大挑战,中国还没有专门针对核酸药物质量的标准,国外是暂行参照基因治疗标准。此外,2019 年最新发表在 *Nature Communications* 杂志的临床研究表明,经化学修饰的 mRNA 编码和传递的 VEGF-A 蛋白在 2 型糖尿病患者皮肤中表达,并增强了皮肤血流<sup>[51]</sup>。因此,在解决 mRNA 的稳定性和递送问题后,除了用作疫苗,mRNA 也可作为蛋白质补充或替代疗法治疗其他多种疾病,这有望能成为一种非常理想的药物形式。期待随着生物信息学的应用,对更多 mRNA 稳定序列的分析和预测,以及法律法规的不断完善,可以加快促进 mRNA 疫苗和药物的发展。

#### 参考文献

- [1] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247 (4949): 1465-1468.
- [2] Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*, 2017, 547(7662): 222-226.
- [3] Kormann M S D, Hasenpusch G, Aneja M K, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(2): 154-157.
- [4] Peng Z H, Sharma V, Singleton S F, et al. Synthesis and application of a chain-terminating dinucleotide mRNA cap analog. *Organic Letters*, 2002, 4(2): 161-164.
- [5] Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, et al. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogues 7-methyl(3-*O*-methyl) GpppG and 7-methyl(3-deoxy) GpppG. *RNA*, 2001, 7(10): 1486-1495.
- [6] Jemielity J, Fowler T, Zuberek J, et al. Novel "Anti-Reverse" cap analogues with superior translational properties. *RNA*, 2003, 9(9): 1108-1122.
- [7] Grudzien-Nogalska E, Stepinski J, Jemielity J, et al. Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCA) and their applications in mRNA translation and stability. *Methods in Enzymology*, 2007, 431: 203-227.
- [8] Kuhn A N, Diken M, Kreiter S, et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses *in vivo*. *Gene Therapy*, 2010, 17(8): 961-971.
- [9] Kore A R, Shanmugasundaram M, Charles I, et al. Locked nucleic acid (LNA)-modified dinucleotide mRNA cap analogue: synthesis, enzymatic incorporation, and utilization. *Journal of the*

- American Chemical Society, 2009, 131(18): 6364-6365.
- [10] Grudzien E, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, et al. Novel cap analogs for *in vitro* synthesis of mRNAs with high translational efficiency. *RNA*, 2004, 10(9): 1479-1487.
- [11] Gray N K, Wickens M. Control of translation initiation in animals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1998, 14(1): 399-458.
- [12] Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, 1987, 196(4): 947-950.
- [13] Pelletier J, Sonenberg N. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell*, 1985, 40(3): 515-526.
- [14] Chen C Y, Shyu A B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20(11): 465-470.
- [15] Murray E L, Schoenberg D R. A + U-rich instability elements differentially activate 5'-3' and 3'-5' mRNA decay. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(8): 2791-2799.
- [16] Vlasova-St L I, Bohjanen P R. Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21(4): 444-451.
- [17] Sahin U, Holtkamp S, Türeci Ö, et al. Modification of RNA, producing an increased transcript stability and translation efficiency; US, US2019/0062762 A1. 2019-2-28[2019-03-01]. <http://www.freepatentsonline.com/20190062762.pdf>.
- [18] Ferizi M, Leonhardt C, Meggle C, et al. Stability analysis of chemically modified mRNA using micropattern-based single-cell arrays. *Lab on a Chip*, 2015, 15(17): 3561-3571.
- [19] Wang Z, Kiledjian M. The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(17): 6334-6341.
- [20] Van der Velden A W, Voorma H O, Thomas A A. Vector design for optimal protein expression. *Biotechniques*, 2001, 31(3): 572, 574, 576-580.
- [21] Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.
- [22] Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 2004, 303(5663): 1529-1531.
- [23] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004, 303(5663): 1526-1529.
- [24] Karikó K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors; the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 2005, 23(2): 165-175.
- [25] Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3361.
- [26] Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 2017, 543(7644): 248-251.
- [27] Thess A, Grund S, Mui B L, et al. Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals. *Molecular Therapy*, 2015, 23(9): 1456-1464.
- [28] 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.
- [29] Kormann M S, Hasenpusch G, Aneja M K, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(2): 154-157.
- [30] Mays L E, Ammon Treiber S, Mothes B, et al. Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(3): 1216-1228.
- [31] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 13(10): 759-780.
- [32] Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109(3): 409-417.
- [33] Rejman J, Oberle V, Zuhorn I S, et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 2004, 377(1): 159-169.
- [34] Ma Z, Li J, He F, et al. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 755-759.
- [35] Landesman-Milo D, Peer D. Toxicity profiling of several common RNAi-based nanomedicines; a comparative study. *Drug Delivery and Translational Research*, 2014, 4(1): 96-103.
- [36] Islam M A, Reesor E K G, Xu Y, et al. Biomaterials for mRNA delivery. *Biomaterials Science*, 2015, 3(12): 1519-1533.
- [37] Maier M A, Jayaraman M, Matsuda S, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Molecular Therapy*, 2013, 21

- (8): 1570-1578.
- [38] Jayaraman M, Ansell S M, Mui B L, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing *in vivo*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 124(34): 8529-8533.
- [39] Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of Controlled Release*, 2015, 217: 345-351.
- [40] Sedic M, Senn J J, Lynn A, et al. Safety evaluation of lipid nanoparticle-formulated modified mRNA in the Sprague-Dawley rat and cynomolgus monkey. *Veterinary Pathology*, 2017, 55(2): 341-354.
- [41] Rizk M, Tüzmen S X. Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 2017, 2017(10): 267-278.
- [42] Zhao M, Li M, Zhang Z, et al. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Delivery*, 2016, 23(7): 2596-2607.
- [43] Li M, Zhao M, Fu Y, et al. Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. *Journal of Controlled Release*, 2016, 228: 9-19.
- [44] Dong Y, Dorkin J R, Wang W, et al. Poly ( glycoamidoamine ) brushes formulated nanomaterials for systemic siRNA and mRNA delivery *in vivo*. *Nano Letters*, 2016, 16(2): 842-848.
- [45] Prieve M G, Harvie P, Monahan S D, et al. Targeted mRNA therapy for ornithine transcarbamylase deficiency. *Molecular Therapy*, 2018, 26(3): 801-813.
- [46] Gandhi R T, Kwon D S, Macklin E A, et al. Immunization of HIV-1-infected persons with autologous dendritic cells transfected with mRNA encoding HIV-1 gag and Nef. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2016, 71(3): 246-253.
- [47] Kyte J A, Kvalheim G, Lislérud K, et al. T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2006, 56(5): 659-675.
- [48] Kyte J A, Mu L, Aamdal S, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Therapy*, 2006, 13(10): 905-918.
- [49] 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. *Journal of Immunotherapy*, 2009, 32(5): 498-507.
- [50] Wilgenhof S, Van Nuffel A M T, Benteyn D, et al. A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. *Annals of Oncology*, 2013, 24(10): 2686-2693.
- [51] Gan L M, Lagerström Fernér M, Carlsson L G, et al. Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 871.

## Development and Clinical Progress of mRNA Vaccine

HU Shun<sup>1,2,3,4</sup> YI You-jin<sup>1</sup> HU Tao<sup>3</sup> LI Fu-sheng<sup>2</sup>

(1 College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2 Kangzhong (Beijing) Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100176, China)

(3 Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

(4 School of Public Health, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China)

**Abstract** As the increasingly development of mRNA stability and delivery systems, the mRNA vaccine has made rapid progress in the individualized tumor vaccine in recent years. Due to its simple production process, expression the antigens in cells, and security features is superior to DNA vaccine, mRNA is a new form of vaccine promising alternative to attenuated and inactivated vaccine and protein vaccine. In order to understand the development and research status of global mRNA vaccine, the molecular design, delivery system and clinical research status of mRNA vaccine were analyzed and summarized, providing reference for the subsequent development and research of mRNA vaccine.

**Key words** mRNA vaccine Delivery systems Clinical trial