

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：递送 mRNA 的非病毒载体系统及其应用

姓 名：邹晨

学 号：18307110508

院 系：生命科学学院

专 业：生物技术

指导教师：唐翠

职 称：教授

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期：2022 年 5 月 25 日

递送 mRNA 的非病毒载体系统及其 应用

完成人

邹晨

指导小组成员

唐翠 教授

印春华 教授

目 录

摘 要	I
Abstract.....	II
一、前言	1
二、mRNA 的非病毒载体递送系统.....	3
2.1 脂质纳米粒（LNPs）	3
2.2 脂质体.....	8
2.3 胶束	11
2.4 聚合物和脂质聚合物纳米粒.....	12
2.5 阳离子肽.....	15
2.6 新型载体材料	17
三、基于非病毒载体系统的 mRNA 的治疗应用	18
3.1 传染性疾病.....	18
3.1.1 SARS-CoV-2.....	19
3.1.2 其他传染性疾病.....	22
3.2 肿瘤	24
3.3 遗传性疾病	26
3.4 神经性疾病	27
四、总结与展望.....	29
参考文献	31
致谢	39

摘要

2019 新型冠状病毒（COVID-19）肺炎疫情加速推进了 mRNA 技术的全球使用，充分证明 mRNA 疫苗相对于传统生物制药和疫苗技术的独特优势。为实现 mRNA 在体内的治疗应用，使用合适的非病毒载体递送系统是关键因素之一。非病毒载体递送系统主要包括脂质给药系统（脂质纳米颗粒和脂质体）、胶束、聚合物和脂质聚合物复合物、阳离子多肽以及新型载体材料等。除 COVID-19 mRNA 疫苗以外，基于非病毒载体给药系统的 mRNA 疗法还在诸多疾病治疗领域研究使用，如多种传染性疾病、肿瘤、遗传性疾病和神经性疾病等，其中多种候选疫苗或药物已进入临床试验。本文综述了递送 mRNA 的非病毒载体系统以及其在疾病治疗方面的应用，并展望了 mRNA 疗法的发展潜力。

关键词： mRNA，非病毒载体递送系统，材料，治疗应用

Abstract

The COVID-19 pandemic has greatly accelerated the adoption of mRNA technology in the world. In this battle, mRNA vaccines have proved their unique advantages over traditional biopharmaceuticals and vaccine technologies. To overcome the limitation of mRNA in human physiological environment and realize its therapeutic application *in vivo*, the use of appropriate non-viral vector delivery systems is one of the key factors. Non-viral vector delivery systems include lipid drug delivery systems (lipid nanoparticles and liposomes), micelles, polymer and polymer lipid compounds, cationic peptides, and new carrier materials. Apart from COVID-19 mRNA vaccines, mRNA therapeutics based on non-viral delivery systems are being investigated in a wide range of disease fields, including infectious diseases, tumor, genetic diseases and neurological diseases. Many candidate vaccines or drugs are already in clinical trials. In this paper, six kinds of non-viral delivery systems for mRNA therapy and their applications in the treatment of diseases are reviewed, and the development potential of mRNA therapy is evaluated and prospected.

Key words: mRNA, non-viral vector delivery systems, materials, therapeutic application

一、前言

信使 RNA (mRNA) 是基因和蛋白质之间的一种短暂的中介物, 于 1947-1961 年首次被极具开创性地研究发现^[1]。与 rRNA 或 tRNA 相比, mRNA 在细胞总 RNA 中所占比例最小, 寿命最短, 且细胞间差异较大, 是目前为止最后被发现和研究的 RNA。1978 年, 科学家们使用一种叫做脂质体的脂肪膜结构, 将 mRNA 转运到小鼠^[2]和人类^[3]细胞中, 以诱导蛋白质的表达。脂质体对 mRNA 进行包装和保护, 然后与细胞膜融合, 将遗传物质送入细胞。1987 年, Malone 进行了里程碑式的研究^[4]。结果表明 mRNA 和脂肪滴混合后可被人类细胞摄取并产生蛋白质。首次证明了 mRNA 应用于治疗的可能性。

mRNA 可在替代疗法中用于替代蛋白质^[5], 也可用于 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 以降低蛋白质水平^[6], 或者使用碱基编辑在 DNA 水平修复蛋白质突变^[7-8]。许多证据表明, mRNA 能介导更优的转染效率和更长的蛋白质表达时间。与 DNA 相比, 后者需要先入核, 然后转录成 mRNA, 而 mRNA 无需进入细胞核即能发挥功能, 其在细胞质中即启动蛋白质的翻译, 效率高于 DNA。而且 mRNA 不会插入至基因组中, 只瞬时表达编码蛋白质, 不存在基因整合的风险。与蛋白质和病毒相比, mRNA 的生产过程更简单, 成本更低, 更易于工业化生产。此外, 药物递送系统的进展加快了 mRNA 治疗的临床前发展^[9], 为 mRNA 成为一种新型药物提供了重要基础。

mRNA 显示出一定的治疗潜力, 包括病毒疫苗、蛋白质替代疗法、肿瘤免疫疗法、细胞重编程和基因组编辑^[10]。为达到治疗效果, mRNA 分子必须到达特定的靶细胞并产生足够的蛋白质。然而, 靶向传递和内涵体逃逸仍制约 mRNA 的递送, 并且 mRNA 荷负电荷, 体内外易被酶降解, 这些因素均阻碍了 mRNA 的胞内递送, 限制其应用。除修饰 mRNA 以增加其自身的稳定性外, 更重要的是设计构建安全有效的递送载体, 一方面包裹和保护 mRNA, 另一方面以一定的方式突破靶细胞递送屏障, 将 mRNA 传递到细胞质中。

目前已开发了多种用于 mRNA 递送的材料，包括脂质纳米粒、脂质体、聚合物、胶束和蛋白质衍生物^[11]等。值得注意的是，二种已批准上市的新型冠状病毒（COVID-19）疫苗——mRNA-1273^[12]和 BNT162b2^[13]，均使用脂质纳米颗粒递送 mRNA 疫苗。许多其他的脂质纳米颗粒-mRNA 制剂也正在进行临床评估，用于预防和治疗病毒感染、肿瘤和遗传性疾病^[9,14-15]。

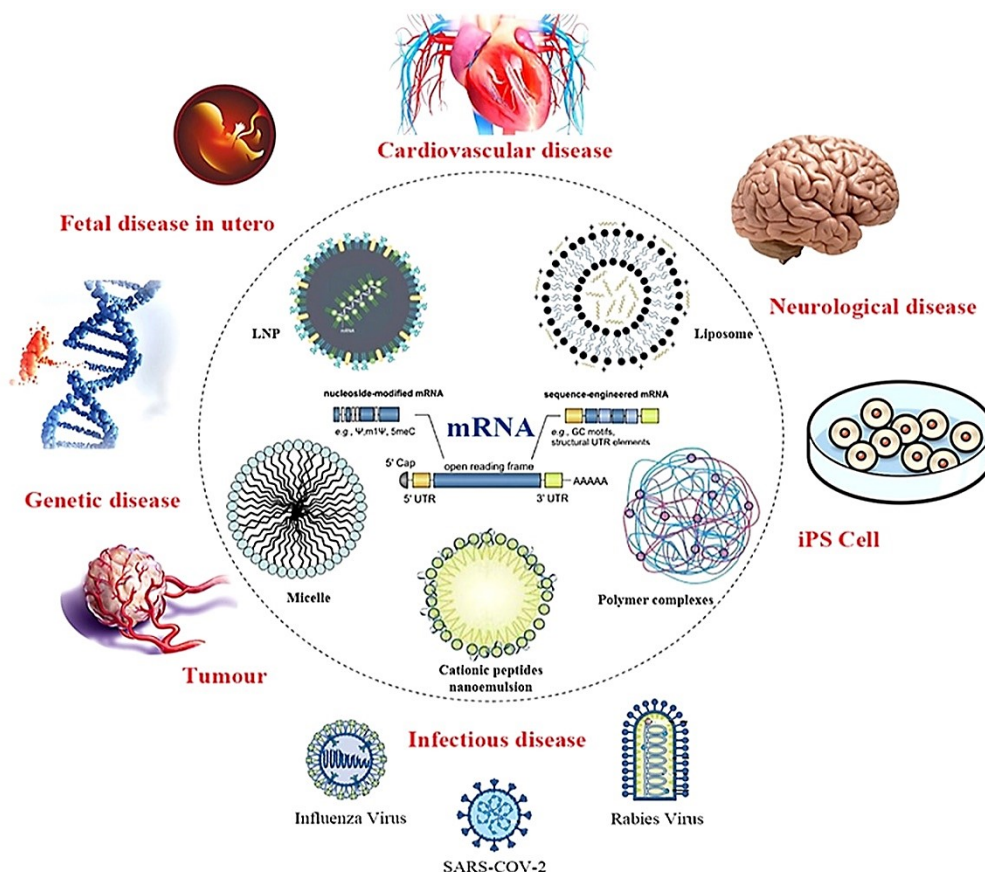


图 1.递送 mRNA 的纳米给药系统及其在疾病治疗方面的应用概述图^[11]

这篇综述概述了用于 mRNA 递送的代表性非病毒载体系统，包括脂质纳米粒、脂质体、胶束、聚合物和脂质聚合物复合体、阳离子肽以及新型载体材料，并介绍了基于纳米递送系统的 mRNA 在疾病治疗方面的应用，展望了 mRNA 疗法的发展潜力。

二、mRNA 的非病毒载体递送系统

mRNA 分子量较大 (10^4 - 10^6 Da) 且荷负电, 难以通过细胞膜的阴离子脂质双分子层, 且其相对比较脆弱的单链结构会被先天免疫系统的细胞吞噬或被核酶降解。虽已广泛报道了通过注射裸 mRNA 以诱导免疫反应, 包括电穿孔、基因枪和体外转染在内的各种技术也已实现培养皿中的细胞内传递 mRNA, 然而应用于体内时, mRNA 的递送仍受到靶组织中存在的细胞外切酶、细胞摄取效率低或内涵体降解等因素的限制, 需使用 mRNA 纳米递送系统转染免疫细胞, 以避免引起毒性或不必要的免疫原性。

幸运的是, 已开发了许多基于创新材料的解决方案。目前常用的纳米给药系统有脂质纳米颗粒 (LNPs)、脂质体、胶束、聚合物和脂质聚合物纳米粒、多肽等^[15], 其中 LNPs 和脂质体是最有前景的 mRNA 递送工具^[16]。

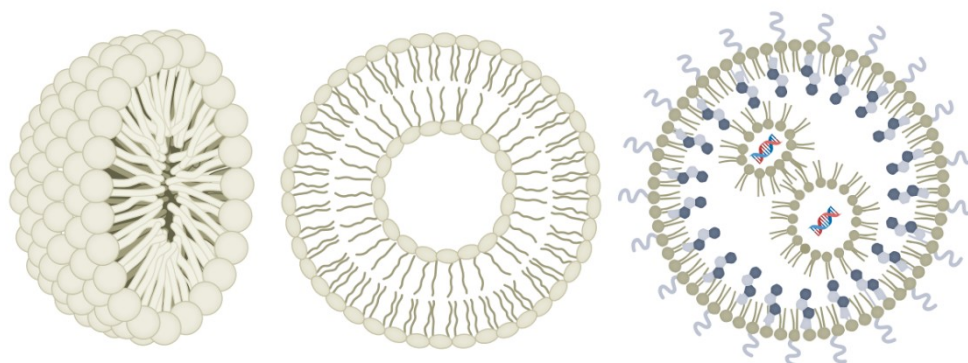


图 2.三种用于递送 mRNA 的脂基结构示意图^[33]

左: 胶束, 由单分子层组成; 中: 脂质体, 由脂质双分子层组成; 右: 脂质纳米颗粒 (LNPs), 由复合脂质层以及包裹核酸的脂质微域组成

2.1 脂质纳米粒 (LNPs)

脂质纳米粒 (LNPs) 是目前发展最为领先的用于基因治疗的非病毒递送载体。随着 LNPs 介导的 siRNA 药物 Onpattro[®] 进入临床试验并成功批准上市, mRNA 递送领域也随之采用了 LNPs 技术。LNPs 是一种复合磷脂结构的生物相容性载体 (如图 3 所示), 可将 mRNA 包裹在脂质核中, 避免降解^[17], 其最佳粒径为 20-200 nm。除荷负电荷的 mRNA 外, LNPs 通常还包括其他四种成分: 结构脂类 (磷脂和固醇脂类)、阳离子或可电离脂类 (CIL)、聚乙二醇偶联脂类 (PEG-脂类) 和辅助脂质。其中结构脂类一般为饱和磷脂, 支持形成双层结构, 其可提高整体相变温度和稳定性, 促进纳米粒结构保持稳定完整^[18]。胆固

醇作为一种稳定剂，具有较强的膜融合能力，可促进 mRNA 的胞内摄入及进入胞质^[19]。聚乙二醇化磷脂位于其表面，提高其亲水性，避免被免疫系统迅速清除，防止颗粒聚集，延长 LNP 的半衰期^[20]。其中最关键的成分为 CIL，其负责经静电结合包载 mRNA 并促进内涵体逃逸，从而决定 mRNA 递送和转染效率^[21]。生理条件（pH=7.4）下，纳米粒需保持非电离状态，而在酸性条件（ ≤ 5 ）下需电离以致叔胺质子化，磷脂形成较小的亲水头部和疏水尾链，形成锥形结构，促进磷脂膜向六方晶相转化，从而实现高效递送和转染。羧酸酯基团有助于磷脂的体内降解，避免了磷脂积累所引起的毒副作用^[22]。

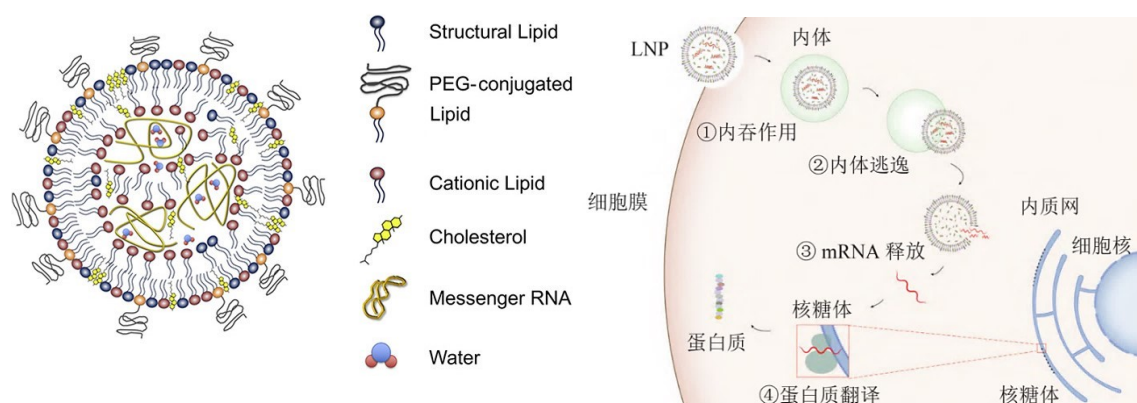


图 3. 脂质纳米粒的结构（左）及其递送 mRNA 入胞和转染过程（右）示意图^[84]

LNPs 经快速混合进行制备，通常使用微流控装置。微流控混合器能够制备具有低分散性和高包封效率的小型纳米粒。常用的微流体制备方法为乙醇稀释法，即将脂质的乙醇溶液加入过量的水介质中，脂质迅速凝结成纳米液滴，可有效包载 mRNA。

LNPs 可将 mRNA 传递到小鼠、非人类灵长类动物和人类的肝脏。某些情况下，LNPs 使用的材料为用于递送 siRNA 的脂质。例如在小鼠中，由 cKK-E12^[23]、C12-200^[24]和 DLin-MC3-DMA^[25]组成的 LNPs 可将 mRNA 递送至肝脏。一些较新的脂质，如 LP01（Intellia Therapeutics）^[26]、Lipid H（Moderna）^[27]和 FTT5（Ohio State and Beam Therapeutics）^[28]，也可将 mRNA 递送至小鼠肝脏。2021 年，由未经报道的阳离子脂质、PEG-脂质、胆固醇和 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱（DSPC）组成的两种 LNPs 将编码编辑碱基的 CRISPR 相关内切酶 Cas9 mRNA 和靶向 PCSK9 的 sgRNA 成功递送至非人类灵长类动物的肝脏^[29-30]。LNPs 单次给药可维持 PCSK9 基因沉默数月。同年，研究人员报道了 6 例伴有多发性神经病变的遗传性转甲状腺素蛋白（hATTR）淀粉样变患者成功使用了

包载编码化脓性链球菌 Cas9 mRNA 和相关 sgRNA 的 LNPs。hATTR 淀粉样变性是一种由转甲状腺素蛋白 (TTR) 基因突变引起的致命性遗传性疾病, 0.3 mg/kg 剂量单次给药可使 28 天后 TTR 水平较基线值平均降低 87%^[31]。

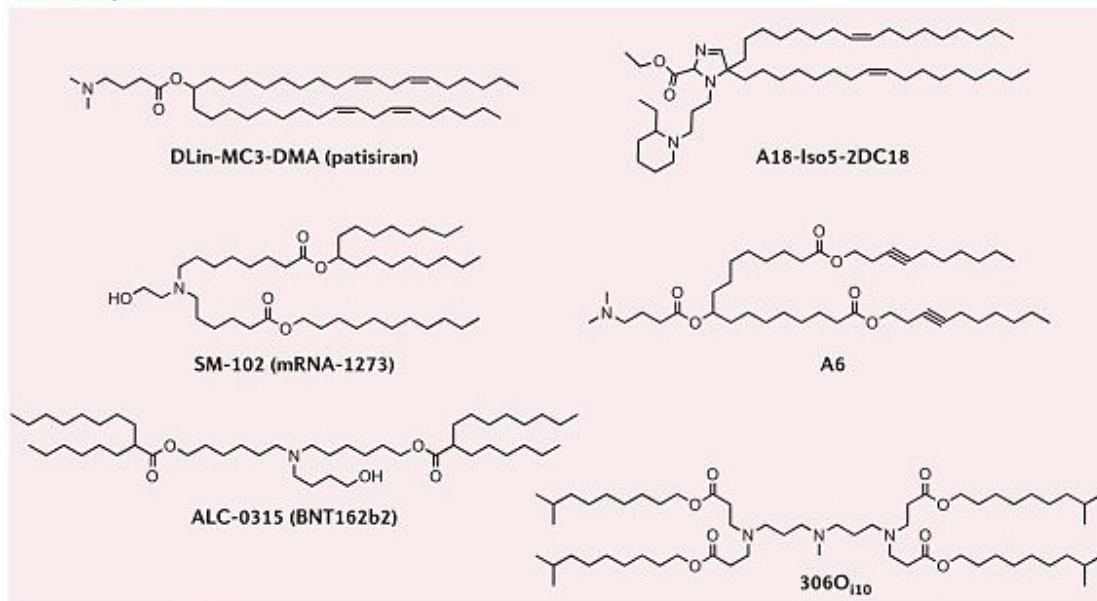
LNPs 的另一项重要的应用是递送 mRNA 疫苗。目前已有二种批准上市的 COVID-19 疫苗正在使用, 分别为 mRNA-1273^[12]和 BNT162b2^[13], 均使用 LNPs 递送抗原 mRNA, 单次注射可诱导较强的 T 细胞反应、长时间的免疫记忆反应以及持续且强大的中和抗体反应。2021 年 10 月, 耶鲁大学的研究团队通过测试疫苗接种者的血液样本, 证实了这二种现有的 mRNA-LNP 疫苗可增强免疫系统对感染的反应, 帮助接种者预防包括德尔塔变种在内的十几种新冠病毒变异株^[32]。其基本组分如表 1 所示。目前, 除 mRNA、胆固醇和辅助脂质 DSPC, Alnylam、Moderna 和辉瑞三家公司的 LNPs 组分均有所差异, 其中阳离子或可电离脂质分别为 DLin-MC3-DMA (Alnylam), SM-102 (Moderna) 和 ALC-0315 (辉瑞), 而 PEG-脂质分别为 PEG-2000-C-DMG (Alnylam), PEG-2000-DMG (Moderna) 和 ALC-0159 (辉瑞)^[33]。脂质组分结构如图 4 所示。

表 1. 目前正在使用的两种 mRNA-LNP 疫苗的基本信息^[11]

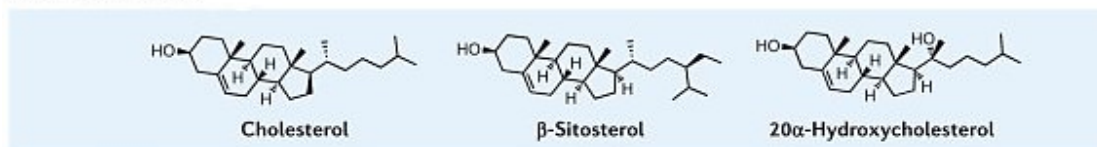
指标	mRNA-1273	BNT162b2
mRNA 剂量; 给药途径	100 µg; 肌肉注射	30 µg; 肌肉注射
组分	SM-102、DSPC、胆固醇、DMG-PEG2000	ALC-0315、DSPC、胆固醇、ALC-0159
可电离阳离子脂类: 中性脂类: 胆固醇: PEG 脂类 (摩尔比, %)	50:10:38.5:1.5	46.3:9.4:42.7:1.6
N/P 摩尔比 ^a	大约为 6	6
其他辅料	氯化钾、氯化钠、蔗糖、注射用水	醋酸钠、蔗糖、注射用水

注: ^aN = 可电离阳离子脂类(氮), P = 核苷酸(磷酸盐)。

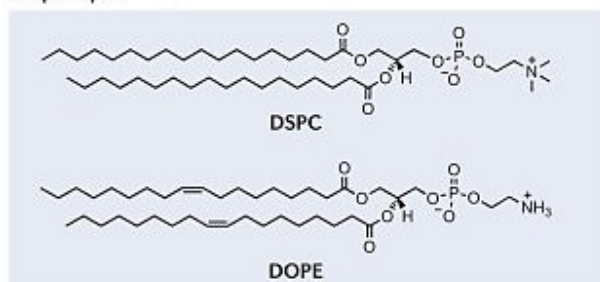
Ionizable lipid



Cholesterol variants



Helper lipid



PEGylated lipid

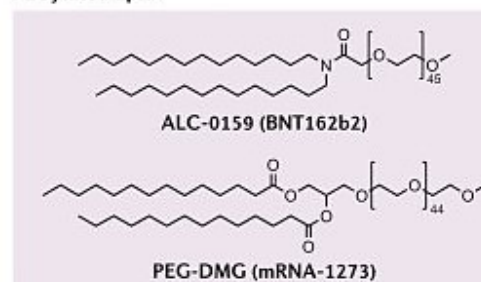


图 4. 构成 LNP 的部分脂质组分结构示意图^[84]

不同的 LNP 具有不同的靶向和功效。LNP 的平均粒径和粒径分布是其质量和各种应用适宜性的重要决定因素，可影响 LNP 的内化、生物分布、降解和清除等过程。另外，LNP 的表面电荷负责与细胞膜和胞内环境发生相互作用，直接影响给药效果及器官摄取倾向。虽大多数临床前研究已评估了阳离子或可电离脂质的结构如何影响递送，但其他三种成分也可影响 LNP 的递送功能^[34]。例如，通过改变胆固醇、PEG-脂质或辅助脂质，将 siRNA 递送至小鼠^[35]和非人类灵长类动物^[36]的肺部和心血管内皮细胞的 LNP 会被重新定位，可在静脉给药后将 siRNA^[37]、sgRNA^[38]或 mRNA^[39]递送至骨髓及肝与脾的内皮细胞，雾化给药后递送至肺上皮细胞^[40]。聚乙二醇-脂质中的聚乙二醇（PEG）和脂质成分均会影响 LNP 和细胞的相互作用：疏水的脂质将聚乙二醇-脂质“锚定”到 LNP

中，而亲水的聚乙二醇与血液相互作用，形成一个类似于其他聚乙二醇化纳米药物周围的水化屏障^[41]。另外，尽管大多数 LNP 均使用未修饰的胆固醇，但已证明细胞和小鼠体内的 LNP 的递送可通过使用氧化胆固醇^[23]、酯化胆固醇^[38]或胆固醇类似物（如植物固醇）来改善。尽管这一改善递送的机制尚不清楚，但可确定的是：修饰过的胆固醇加入 LNP 中可改变其结构^[42]。此外，研究人员已证明使用其他脂质替代 DSPC 可促进 LNP 递送至脾或肺^[43-44]。同样地，通过将永久带电的脂质引入 LNP 中，使其从四组分体系变为五组分体系，可改变器官的优先摄取倾向，这一过程被称为选择性器官靶向（SORT）。Cheng 等^[45]在小鼠中实现了基于脂质电荷的选择性器官靶向：LNP 配方中添加带正电的脂质会优先靶向肺组织，而添加带负电的脂质则优先靶向脾脏组织。Intellia 和 Beam Therapeutics 两大机构共享了有关 LNP 将 mRNA 递送至小鼠的造血干细胞和祖细胞的信息，有望开发体内造血干细胞的靶向治疗。

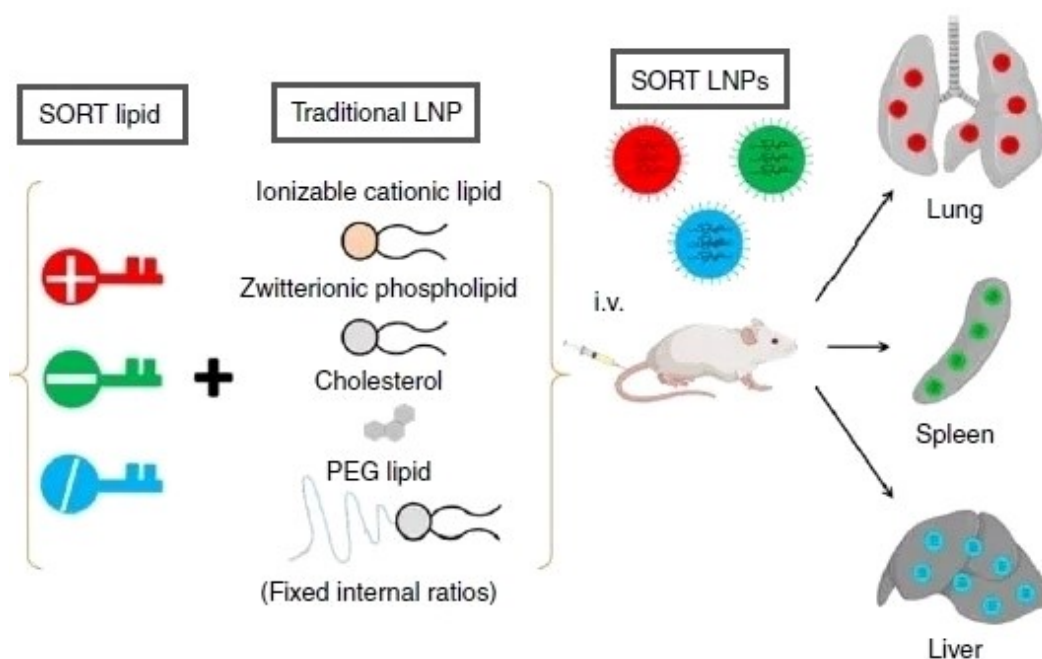


图 5. SORT-LNP 的组成、给药和作用效果示意图^[45]

递送 mRNA 的 LNP 迅速发展。目前，许多公司都在开发针对不同疾病的递送 mRNA 的 LNP 产品。虽然 LNP 是 mRNA 递送最有效的手段之一，但为了获得高效无毒、且对组织、器官或细胞具有选择性的 LNP 配方，尚需改进各种参数。尚待进一步明确关于影响单个 LNP 中的 RNA 数量的因素、内部防止核酸降解的因素、脂质膜的性质如何影响转染效率以及各脂质组分在其中的定位和相互作用。此外，mRNA-LNP 稳定性差，运输和储存费用昂贵，如何实现

其长期储存也是一个重要但尚未开发的工作。

2.2 脂质体

脂质体最早由 A.D. Bangham 于 1965 年发现，并长期用于小分子药物的递送。除包封小分子化疗药物外，脂质体还可包封并递送包括 mRNA 在内的基因药物和蛋白质药物等。脂质体是磷脂双分子层形成的球形封闭囊泡结构（如图 6 所示），其中亲脂双分子层夹在两个亲水层之间，脂质双分子层类似于生物膜，由天然和/或合成磷脂组成，通常与胆固醇结合，粒径从 20 nm 到 1000 nm^[46]。阳离子脂质体荷正电，主要由阳离子脂质组成，能够靶向并高效地包载核酸^[47]。此外，通过调整粒径大小及进行功能基团修饰^[48]等改变阳离子脂质体的理化性质，可获得良好的体内药代动力学性质。

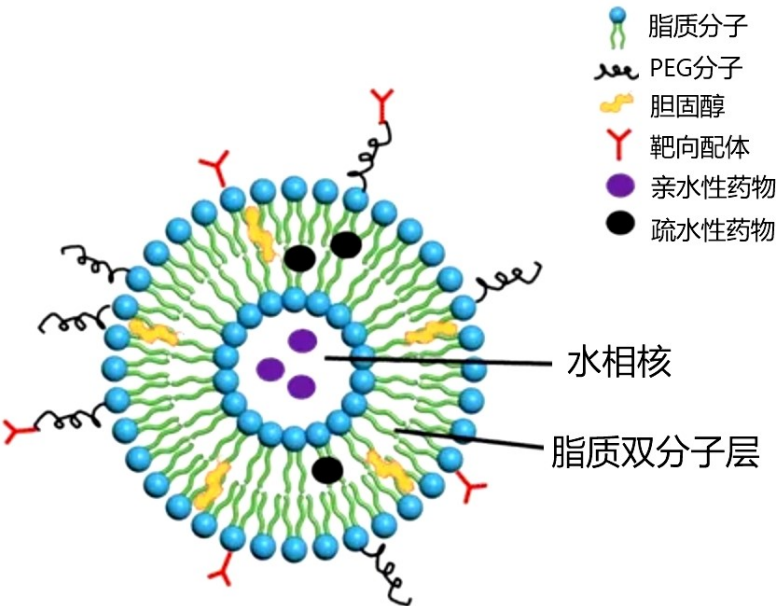


图 6. 脂质体的结构示意图

脂质体在递送 mRNA 方面有许多优点。首先，脂质体是球形的囊泡，可包裹 mRNA 并抵抗核酸酶。其次，脂质体与细胞膜相似，易于与受体细胞融合，转染效率高。第三，脂质体作为一种递送系统，可不受宿主限制。最后，由于磷脂双层膜结构高度模拟细胞膜，脂质体是一种稳定的结构，可在长期储存过程中保持良好的稳定性。递送 mRNA 的脂质体常用的材料见表 2。

表 2. 递送 mRNA 常用的脂质材料^[33]

脂质材料	缩写
(2, 3-dioleoyl-propyl) -trimethylamine	DOTAP

1, 2-dioleoyl-sn-glycerol-3- phosphate ethanolamine	DOPE
cholesterol	chol
1,2-distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine- N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000]	DSPE-PEG2000
anisamide	AA
Histidylated polylysine	HPK
l-histidine- (N, N-di-n- hexadecylamine)ethylamide	HDHE
O,O-dioleoyl-N- [3N-(N- methylimidazoliumiodide)propylene]	KLN25
O,O-dioleoyl-N-histamine phosphoramidate	MM27
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DSPC
Poly-(β -amino ester)polymer	PBAE
1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DOPC
N-[1- (2,3-dioleyloxy)propyl]-N, N,N- trimethylammonium chloride	DOTMA
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-l-serine	DOPS
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000]	C14-PEG2000
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine	EDOPC

脂质体的制备方法一般有薄膜分散法、冷冻干燥法、溶剂注射法和 pH 梯度法等。为解决传统大批量生产方法的局限性，克服脂质体生产工艺的诸多问题，近年来，微流体技术在脂质体制备中的应用已在学术界引起了极大的兴趣。相关研究报道表明微流体技术可持续生产优化、均匀的纳米粒，批量生产重现性好，控制脂质体的特定几何形状和大小，并精确控制各种制造参数，最终实现快速、高通量的生产^[49]。

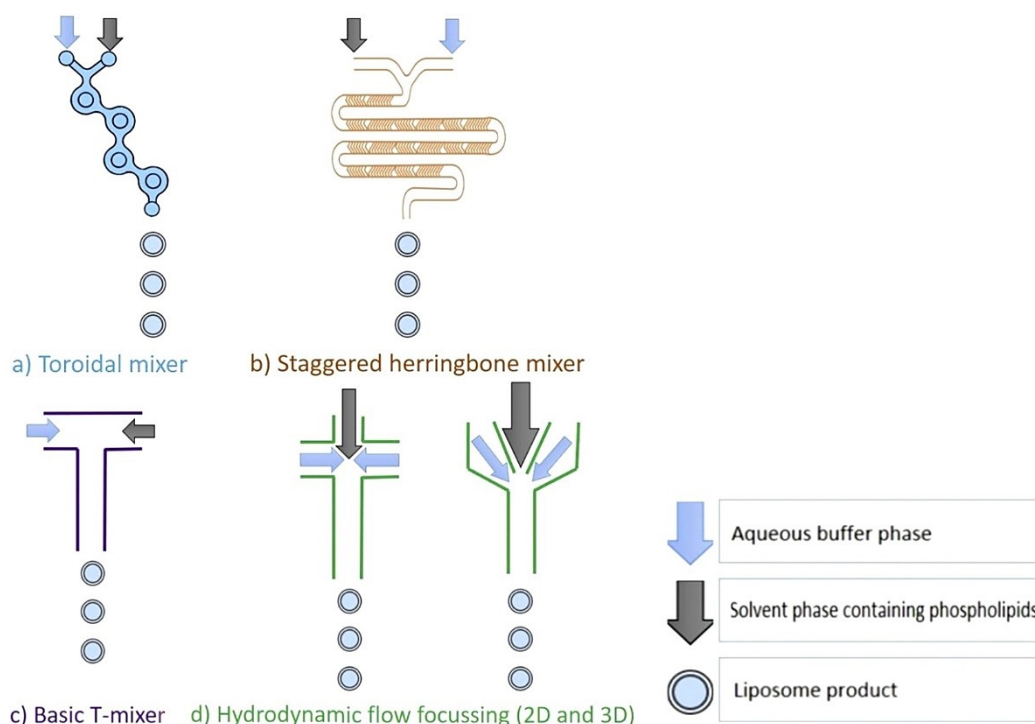


图 7.可使用的微流控混合器装置设计实例的示意图^[49]

注：a)平面几何形状的环形混合器，利用离心力来促进均匀混合；b)带压花 v 形的交错人字形微混合器；c)一个基本的 T 型混合器，有两个入口，液体在外力作用下进入 T 型接头；d)有三个入口的混合器，其中溶剂的中心流由二维（左）或三维（右）的含水流体流汇聚

目前已有不少关于脂质体包载、递送 mRNA 的研究。Michel 等^[50]采用薄膜分散法制备阳离子脂质体，并包载 mRNA。脂质体由 3B[N-(N, N-二甲氨基乙烷)氨甲酰] (DC-胆固醇)/DOPE 组成，室温保存 80 天后仍保持稳定，证明了脂质体良好的结构稳定性。Mai 等^[51]采用薄膜分散法制备了由 DOTAP/CHOL/DSPES-PEG 组成的阳离子脂质体。将脂质体、mRNA 和鱼精蛋白以 10:1:1 混合，形成稳定的脂质体/鱼精蛋白-mRNA 复合物。鼻腔给药后，该脂质体复合物可刺激树突状细胞成熟，并进一步诱导强烈的抗肿瘤免疫效应。通常情况下，阳离子脂质体循环半衰期较短，可能会与荷负电的胞内外成分非特异性结合，且具有一定毒性。其结构组分进行一定的修饰可提高脂质体-mRNA 复合物的稳定性，延长作用时间并减轻毒性。近年的一项研究中，Zhang 等^[52]用具有跨膜结构和免疫佐剂功能的阳离子肽 DP7 修饰 DOTAP 脂质体，结果表明其提高了个体化新抗原 mRNA 的递送效率，并增强了激活树突状细胞的能力。

然而，虽已成功地通过脂质体递送 mRNA，但这一载体也有一些不可忽视

的缺点。除自身毒性和半衰期较短之外，与 LNPs 相比，脂质体制备和 mRNA 包载的生产过程更复杂。目前传统批量生产方法仍具有一定局限性，且用于生产脂质体的工艺存在许多严重的问题。

2.3 胶束

胶束是指表面活性剂在水溶液中浓度达到一定值后开始大量形成的有序分子聚集物。胶束中表面活性剂分子的疏水基团聚集形成胶束的核心，亲水极性基团形成胶束的外层。胶束可作为载体系统将 mRNA 递送至细胞或动物体内。通常 mRNA 与聚合物缩合，形成球形的胶束结构进行细胞转染。部分研究中获得了较高的转染效率，显示出胶束作为递送载体具有良好的发展潜力。

Roloff 等^[53]制备了一种新型 RNA-聚合物两亲性分子组装成的球形胶束（结构如图 8 所示），其直径约为 15-30 nm。结果表明该球形胶束可在不使用转染试剂的情况下高效进入活细胞。另一项研究中，Chan 等^[54]提出使用专门定制的多聚纳米胶束将 mRNA 静脉输送至小鼠大脑。以 42 k 聚乙二醇（PEG）-聚天冬酰胺聚合物的骨架，将多个氨基乙烯重复基团（分别为 2、3 和 4 个单位）共轭到侧链上，以促进与 mRNA 的静电相互作用，这种结构构型会形成粒径在 24 到 34 nm 之间的多聚纳米胶束（如图 9 所示）。以体外转录（IVT）将荧光素酶（Luc2）mRNA 为报告基因，随后将多聚物纳米胶束注入小鼠大脑，绕过血脑屏障。数据显示，具有 4 个氨基重复单位的聚乙二醇多聚纳米胶束表现出最佳的 Luc2 mRNA 递送效率，且未检测到明显的免疫反应，可用于脑疾病的治疗。

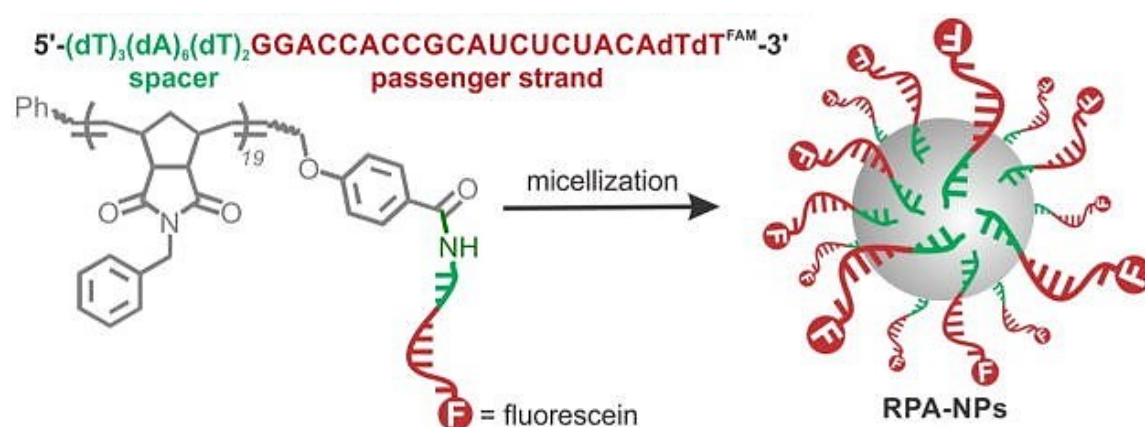


图 8. RNA-聚合物两亲体（RPAs）组装成胶束 RPA-NPs 的核酸序列和聚合物结构^[53]

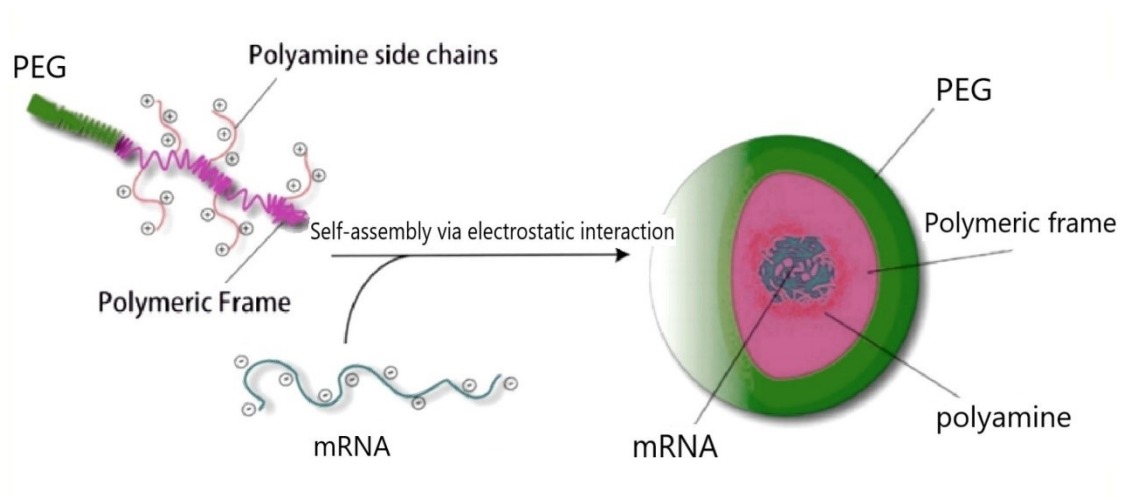


图 9. mRNA 与聚合物在生理环境下缩合成聚乙二醇多聚纳米胶束示意图^[54]

2.4 聚合物和脂质聚合物纳米粒

高分子聚合物材料是分子量通常高达 10^4 - 10^6 Da 的化合物，由简单的结构单元经共价键重复连接，如壳聚糖、聚乙烯亚胺、聚氨酯等。相较于阳离子脂质体，阳离子聚合物的载药工艺较简单，仅需与 mRNA 进行混合，具有更好的稳定性，且可利用可控的结构实现多种功能。大多数用于 mRNA 传递的聚合物材料均需修饰功能基团以提高其转染效率和稳定性^[55]，研究人员可通过改变聚合物的电荷、可降解性和分子量等特征去改善递送效果。Soliman 等^[56]通过静电络合法制备了含有 mRNA 的纳米粒，这些纳米粒具有不同程度的脱乙酰化和磺化度。结果表明，通过调节透明质酸和壳聚糖的聚合物长度和电荷密度改变其和 mRNA 的亲合力，直接影响转染效率。不同 N:P:C 比、海藻糖的混合浓度和核酸剂量也会影响转染效率。

包括聚乙烯亚胺（PEI）和聚 L-赖氨酸（PLL）在内的含有胺基的聚合物是一类重要的递送 RNA 的载体系统，它们的胺基可转变成阳离子，进而经静电相互作用与 RNA 结合并将其递送至细胞中。聚乙烯亚胺（PEI）已成功将 mRNA 递送到细胞^[57]和鼻内^[58]。此外，基于 PEI 的递送系统还改善了小鼠对 sa-mRNA 疫苗的应答^[59]。然而，未经修饰的 PEI 和 PLL 在体内并不具有良好的耐受性，其中 PEI 的转染能力和毒性会随着分子量的增加而增加。因此，用于 mRNA 递送的 PEI 和 PLL 通常经功能基团修饰以提高体内疗效和耐受性。例如，PEG 接枝的 PEI 纳米粒已用于将 mRNA 递送至肺中的免疫细胞^[60]，环糊精-PEI 偶联物已用于体内递送 mRNA 疫苗^[61]。

诸多研究表明经过功能基团修饰的 PEI 载体显示出独特的疗效。Choia 等^[62]以氧化石墨烯 (GO)-聚乙烯亚胺 (PEI) 复合物为 mRNA 递送系统, 可高效生成无基因整合的诱导多能干细胞 (iPSCs)。研究发现 GO-PEI 复合物可包载 mRNA 的重编程转录因子且保护 mRNA 不被核酸酶降解。经 GO-PEI/mRNA 复合物处理的细胞在动态悬浮培养条件下显著提高重编程效率, 并成功地从成人脂肪组织来源的成纤维细胞中产生了大鼠和人类的诱导多能干细胞。Chiper 等^[63]将伯胺修饰为芳香结构, 实现了 1.8 kDa PEI 纳米粒的核酸转染。改进后的化学结构如图 10 所示。这种修饰不影响 PEI 的缓冲能力, 但增强了其由 pH 敏感性引发的聚集效应, 有助于形成稳定的胞外复合物, 同时仍允许核酸入胞后释放。

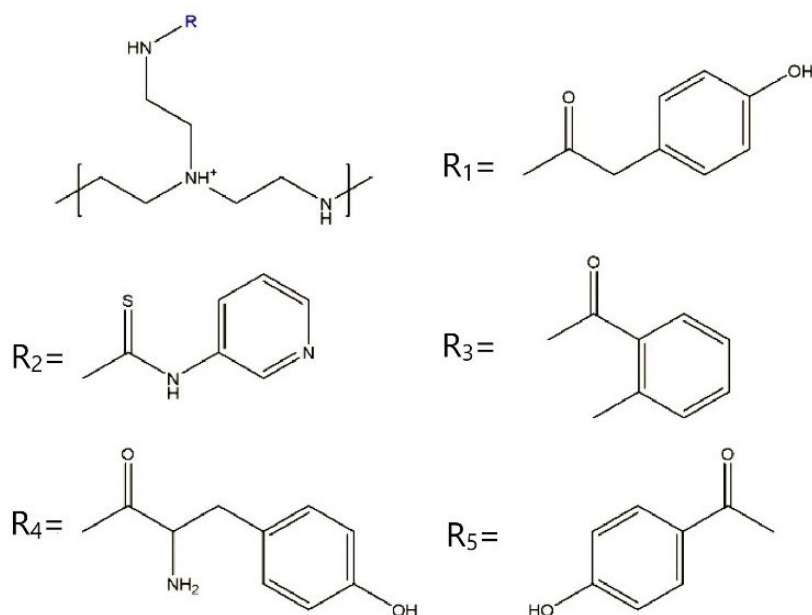


图 10.化学改性后聚乙烯亚胺的化学结构示意图^[63]

另一种研究较多的阳离子聚合物是聚 β -氨基酸 (PBAEs), 其经胺单体结合至二丙烯酸酯而合成。相比于 PEI 和 PLL, PBAEs 除具有阳离子胺之外, 还含有可生物降解的酯键, 改善了生物降解性和细胞毒性。早期研究使用 Michael 加成反应合成了数百种化学性质不同的 PBAEs, 然后评估了这些纳米粒如何将 DNA 和 RNA 递送至细胞中。初期设计表明, 有效的聚合物几乎均为疏水的, 具有单醇或二醇侧基团, 并含有线性双 (二级) 胺^[64]。后续研究表明, 聚合物顶端均由氨基醇形成的, 且化学性质相似, 只相差一个碳^[65]。这些聚合物结构学研究建立了高通量化学合成和高通量给药研究的可行性, 且这种组合文库应

用策略已用于包括 LNP 在内的其他类别的纳米粒的合成。2021 年, Blanchard 等^[66]使用基于 PBAE 的聚合物递送 Cas13a mRNA, 并使用雾化器给药至小鼠和仓鼠的呼吸道, 以治疗 SARS-Cov-2, 结果表明这一靶向治疗有效减轻了呼吸道感染。

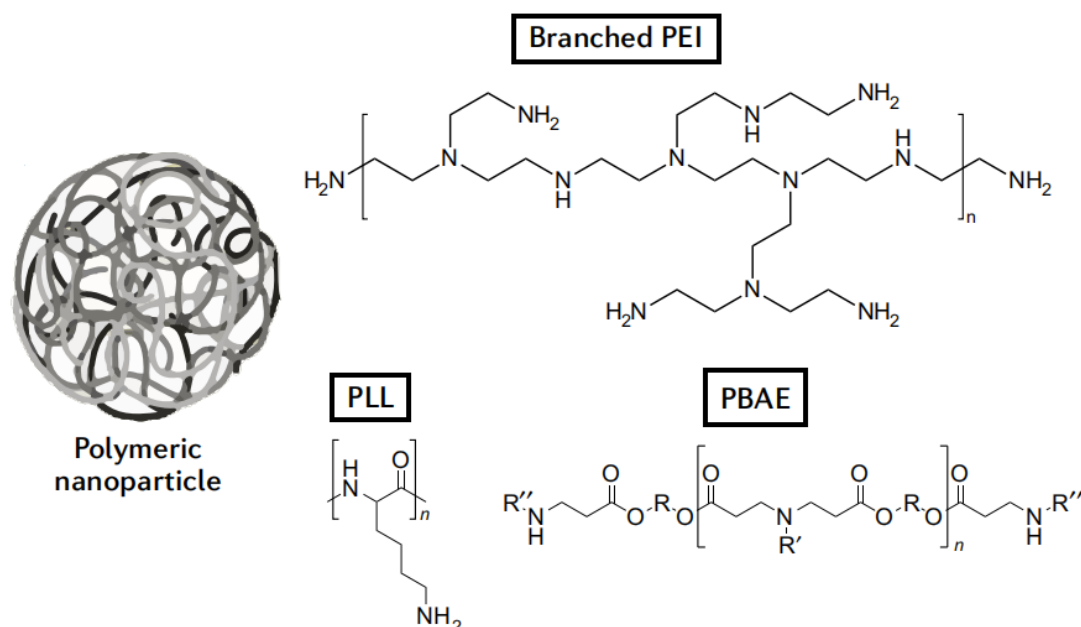


图 11.用于配制递送 mRNA 的纳米粒的聚合物 PEI、PLL 和 PBAE 的结构^[33]

研究人员还合成了脂质聚合物复合物。由脂质壳和聚合物内芯组成的纳米结构可实现 mRNA 的高效转染, 且发现 PBAEs 中添加脂质可提高其血清稳定性和递送剂量^[67-68]。Su 等^[69]开发了可生物降解的核-壳结构的脂质聚合物杂化纳米粒, 其包括具有 pH 响应特性的 PBAE 核心和磷脂壳, 通过静电相互作用包载 mRNA, 实现经非侵入性鼻内递送提高体内转染。Ayad 等^[70]设计了 LipoParticles (LP) 载体, 其由 DSPC/DOTAP (15 mol /85 mol) 脂质膜和聚乳酸 (PLA) 核心组成 (如图 12 所示), 通过添加 LAH4-L1 肽, 使 mRNA 经静电相互作用吸附至 LP 的表面, 进而实现递送和转染。与单纯脂质体相比, 这一脂质聚合物复合物在体外转染 HeLa 和 DC2.4 细胞的实验中获得了更高的转染效率, 表明脂质膜对聚合物核心的包裹可使 mRNA 更牢固地与载体结合, 从而在递送过程中不易出现 mRNA 损失。此外, 这种装配不仅促进了 mRNA 的有效递送, 还有助于质粒 DNA 的传递, 有望作为一种多功能的核酸载体用于各种疫苗应用。

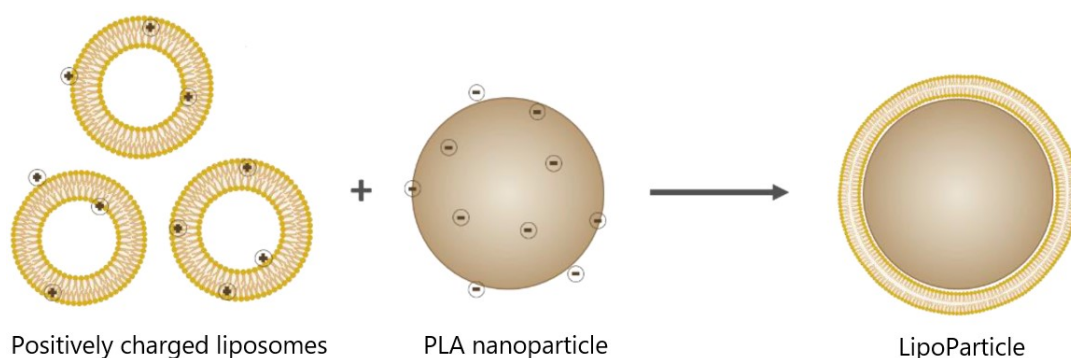


图 12.阳离子脂质体（左）、阴离子聚乳酸（PLA）纳米粒（中）和由两者组成的 LipoParticle（右）示意图^[70]

聚酰胺胺（PAMAM）或聚丙烯亚胺（PPI）等树状大分子也可用于 mRNA 递送，这类聚合物由一个中心核心分子和一定数量的枝干单体组成（如图 13 所示）。由阳离子基团合成的树枝状大分子，如 PAMAM 和 PLL，可形成复合物并将 RNA 送入细胞。研究表明树状大分子成功将 RNA 递送至中枢神经系统^[71]，并作为 mRNA 疫苗的递送平台构建针对广泛的致命病原体（包括 H1N1 流感、弓形虫和埃博拉病毒）产生保护性免疫的系统，可引起 CD8(+)T 细胞和抗体反应^[72]。同样地，树状大分子结构也可经修饰以保护 mRNA 免受核酶降解，并促进内涵体逃逸。

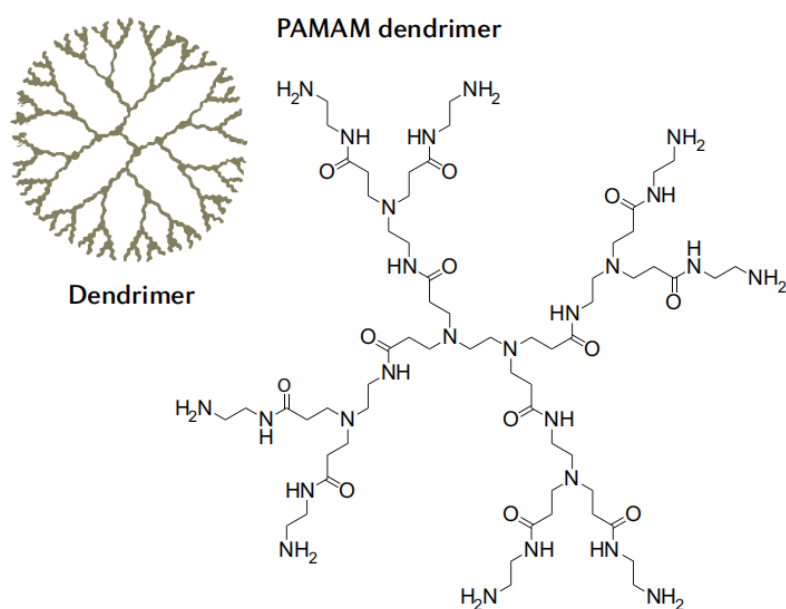


图 13.树状大分子结构示意图（以 PAMAM 为例）^[33]

2.5 阳离子肽

基于肽类物质的给药是一种探索较少的递送系统，仅鱼精蛋白在临床试验中得到了评估^[73]。使用阳离子细胞穿透肽（CPPs）递送 mRNA 是一种常见的新的

型给药方法。CPPs 电荷密度较低，具有出色的穿透细胞膜能力，已被广泛用于递送蛋白质、小分子药物、siRNA 和 pDNA。CPPs 在递送 mRNA 方面也有许多探索性研究。CPPs 因含有赖氨酸和精氨酸残基而荷正电，可与 mRNA 通过静电作用结合形成纳米复合物并被细胞有效摄取，可能的细胞摄取机制为 CPPs 促进细胞表面荷负电的糖胺聚糖的聚集并触发胞吞作用。已证明 CPPs-mRNA 系统体外可调节固有免疫应答，增强树突状细胞和人肿瘤细胞的蛋白表达^[75,76]，体内可改善 T 细胞免疫应答^[74]。除 CPPs 外，少量阴离子多肽也可用于递送 mRNA，与阴离子肽结合的 mRNA 复合物在树突细胞中表现出细胞摄取增加而不诱导细胞毒性的特点^[77]。但目前只有少数多肽可进行有效递送，需开发更多新的肽类物质以扩大肽类递送系统的材料库。

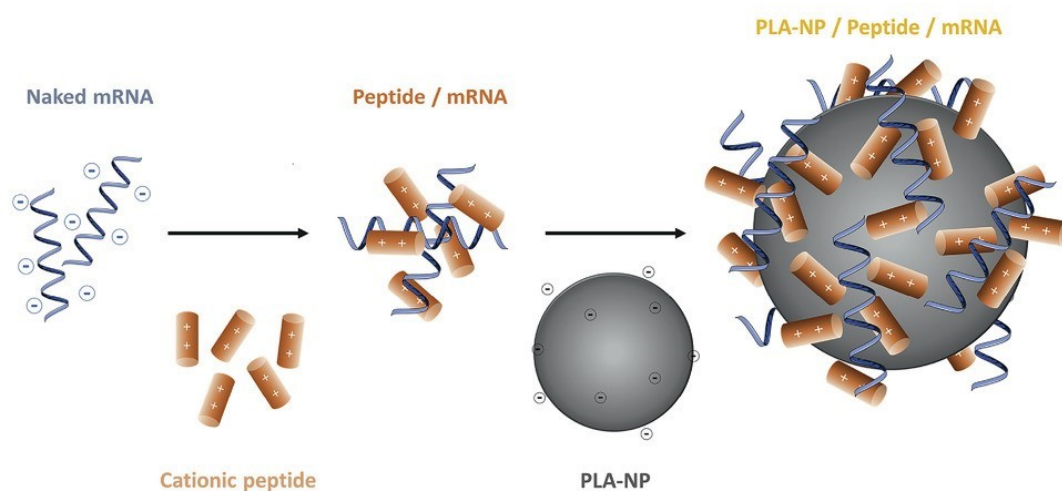


图 14. PLA-NP/阳离子肽/mRNA 纳米复合物的组装和结构示意图^[75]

Coolen 等^[75]利用聚乳酸纳米颗粒（PLA-NPs）和阳离子细胞穿透肽开发了一种以阳离子肽为基础的 mRNA 递送系统。该递送系统分两步进行制备：第一步是将荷负电的 mRNA 与阳离子多肽（RALA, LAH4 或 LAH4-L1）结合形成多肽/mRNA 多聚体，第二步是将该聚乳酸吸附在多肽/mRNA 多聚体表面，形成 PLA-NP/阳离子肽/mRNA 复合物（如图 14 所示）。树突状细胞经吞噬作用和网格蛋白依赖性内吞作用摄取该复合物并通过激活核内体和胞质模式识别受体（PRRs）调节树突状细胞的固有免疫应答，并在体外诱导人类原代树突状细胞中目标蛋白质的高表达。Qiu 等^[78]研究了一种新型的 mRNA 递送载体 PEG12KL4，其将阳离子 KL4 肽（KLLLLKLLLLLLLK - NH₂）与 12 个单分散的线性 PEG 分子以 10:1 的比例（w/w）与 mRNA 形成纳米级复合物，并介导人肺

上皮细胞的有效转染。通过喷雾干燥（SD）和喷雾冷冻干燥（SFD）技术成功制备得到的 PEG12KL4/mRNA 复合物粉体均表现出良好的雾化吸入稳定性和较高的转染效率，表明 PEG12KL4 多肽作为 mRNA 递送载体具有良好的临床应用前景。

2.6 新型载体材料

除上述非病毒载体系统外，还有一些新型材料应用于 mRNA 递送研究，如水凝胶、无机纳米材料等。与传统载体材料相比，这些新型材料在提高转染效率、长效缓释以及体内靶向定位递送等方面具有更大的优势。

2021 年，Yin 等^[79]报道了一种由氧化石墨烯（GO）和聚乙烯亚胺（PEI）组成的可注射水凝胶，其可装载和递送编码模式抗原卵清蛋白的 mRNA（mOVA）和佐剂（R848）。该水凝胶不仅可包载和保护 mRNA 免于降解，还可靶向递送至淋巴结，结果显示抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的数量显著增加，抑制肿瘤细胞生长。同时，该制剂还在血清中产生抗原特异性抗体，预防肿瘤转移。体内注射 30 天后仍可检测到 mOVA，表明该水凝胶是一种长效缓释的 mRNA 递送系统，一次注射即可有效抑制肿瘤生长。

同年，Zhang 等^[80]开发了一种介孔二氧化硅纳米粒-mRNA（MSN-mRNA）皮下给药系统，由裸 mRNA 和皮下储存的咪唑-羟吡啶 RNA 激活蛋白激酶（PKR）抑制剂 C16 组成，该系统体内外均具有较强地促进 mRNA 翻译的能力。实验结果表明皮下注射 MSN-mRNA 可显著增强 mRNA 的体内翻译和表达，将编码卵清蛋白和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的裸 mRNA 和 C16@MSNs 组成的 MSN-mRNA 疫苗配方用于 E.G7-OVA 小鼠 T 淋巴瘤模型，产生了非常有效的肿瘤抑制作用。

鉴于 mRNA 巨大的应用潜力，mRNA 纳米递送系统方面已有越来越多的研究，相信在不久的将来会开发出转染效率更高、毒性更低、稳定性更好的新型递送载体并投入临床使用。

三、基于非病毒载体系统的 mRNA 的治疗应用

目前有二种 mRNA 递送的方法：利用病毒或非病毒载体。病毒递送系统，包括慢病毒、腺相关病毒和仙台病毒，可全身性递送核酸（包括 mRNA）。然而，由于机体会产生不必要的免疫反应，病毒递送系统的使用受到限制。作为病毒递送系统的替代品，非病毒载体系统已经在临床前动物模型和早期临床研究中初见成效。随着 mRNA 修饰技术和递送技术的发展，其应用前景越来越广泛。下面介绍有关基于纳米给药系统的 mRNA 递送在治疗疾病方面的应用。

3.1 传染性疾病

基于非病毒载体系统的 mRNA 疫苗的研究主要集中在传染性强、危害性高的 RNA 病毒感染，如严重急性呼吸系统综合征（SARS-CoV-2）、甲型流感病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒（RSV）、寨卡病毒（Zika）、人类免疫缺陷病毒（HIV-1）、埃博拉病毒（EBOV）等。mRNA 疫苗可同时激活细胞免疫和体液免疫，具有较高的保护率，其通过转染抗原递呈细胞引起免疫的具体过程如图 15 所示。

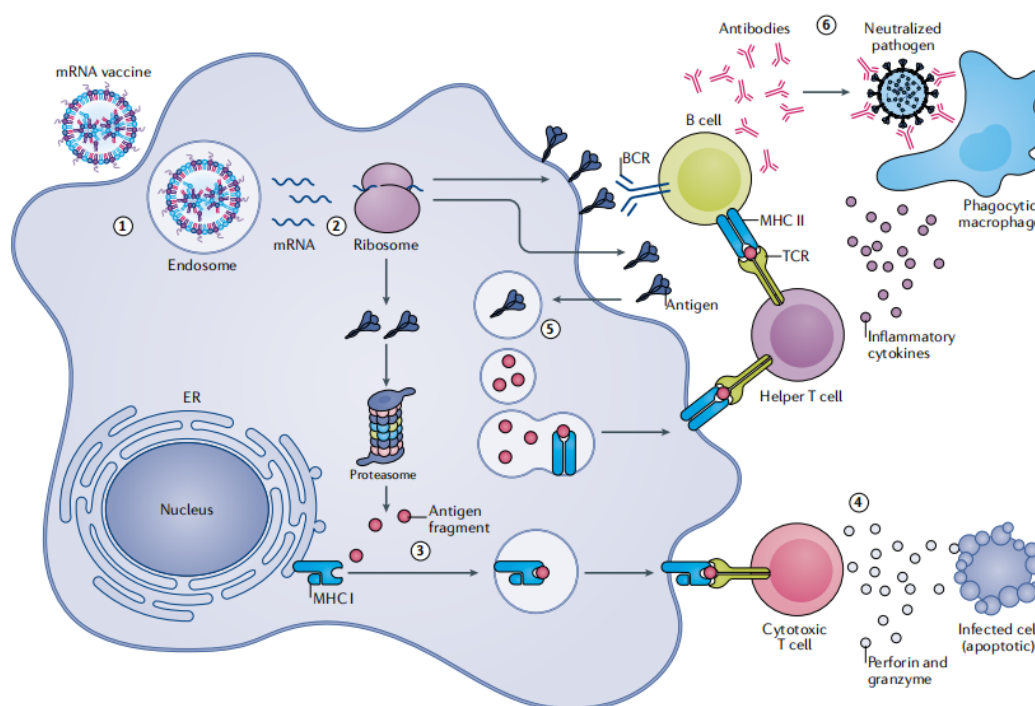


图 15. mRNA 疫苗在接种者体内引发免疫的具体过程示意图^[84]

注：(1)注射的 mRNA 疫苗被抗原递呈细胞内吞；(2) mRNA 逃离核内体进入细胞

质后，被核糖体翻译成蛋白质，翻译后的抗原蛋白可以以多种方式刺激免疫系统；(3)胞内抗原被蛋白酶体复合体分解成更小的片段，并通过主要组织相容性复合体(MHC) I 类蛋白在细胞表面递呈给细胞毒性 T 细胞；(4)活化的细胞毒性 T 细胞通过分泌穿孔素、颗粒酶等溶细胞分子杀死感染细胞；(5)此外，分泌的抗原可被细胞吸收，在核内体内降解，并通过 MHC II 类蛋白在细胞表面递呈给辅助 T 细胞；(6)辅助 T 细胞通过刺激 B 细胞产生中和抗体，通过炎症细胞因子激活巨噬细胞等吞噬细胞，促进循环病原体的清除。BCR：B 细胞受体；ER，内质网；TCR，T 细胞受体

3.1.1 SARS-CoV-2

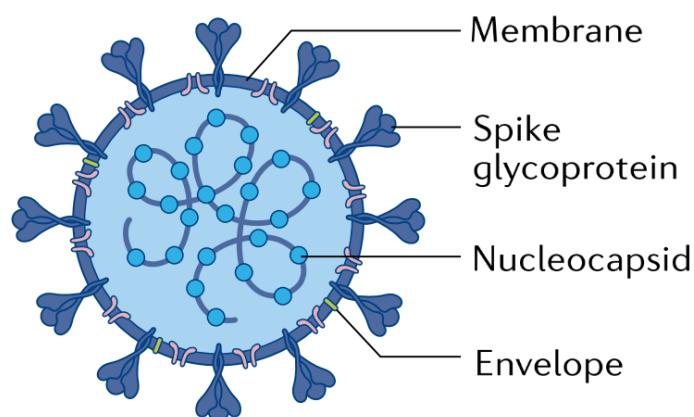


图 16. SARS-CoV-2 病毒结构组成示意图^[84]

近两年来，人工合成的 COVID-19 mRNA 首次用于临床。相对于病毒载体疫苗和重组蛋白疫苗，mRNA 疫苗对公众的影响最大。近几十年来 mRNA 疫苗的开发和技术突破为其在 SARS-CoV-2 疫情期间的快速崛起奠定了基础。SARS-CoV-2 是有包膜的正义单链 RNA 病毒，其结构如图 16 所示：病毒体有两个组成部分：与 RNA 基因组结合的核衣壳（N）蛋白形成的螺旋衣壳和由膜（M）和包膜（E）蛋白组成的包膜。包膜上有类似 "皇冠 "的三聚体尖头（S）蛋白（Spike protein），其为中和抗体的主要部位，易发生变异^[81]。高度突变的病毒对现有疫苗的有效性构成了巨大的威胁，而 mRNA 疫苗可以根据突变株的突变基因更新其序列，从而实现快速应用。mRNA 疫苗主要靶向 S 蛋白或 S 蛋白受体结合域，其作用机制如图 17 所示，S-mRNA 进入宿主细胞质后可被翻译成 S 蛋白，可诱导免疫应答。同时，mRNA 疫苗还利用人体自身的分子机制缩短了反应时间。

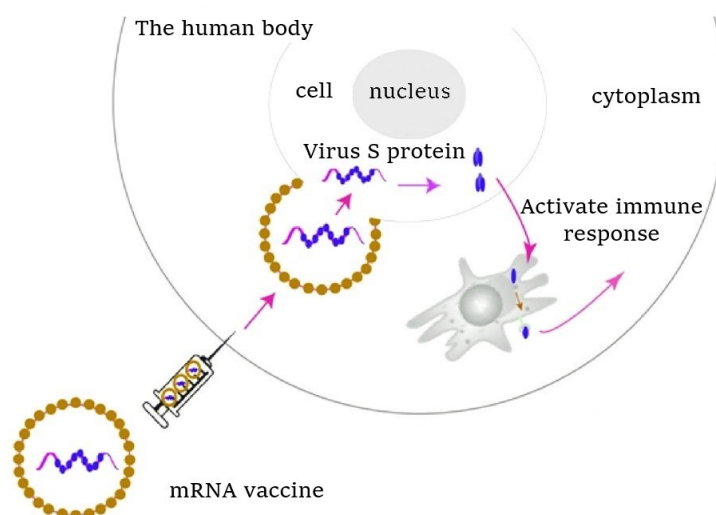


图 17. SARS-CoV-2 mRNA 疫苗的作用机制示意图^[81]

COVID-19 已在全球范围内引发一场具有挑战性和威胁性的疫情，造成巨大的健康威胁和经济损失。美国食品药品监督管理局（FDA）已批准紧急使用 BNT162b2（辉瑞）和 mRNA-1273（Moderna）两种制剂用于预防 COVID-19 感染和重症。BNT162b2 和 mRNA-1273 均为由 LNPs 包载并递送的 mRNA 疫苗，其中 mRNA 编码 S 蛋白。最初推荐 BNT162b2 用于 16 岁及以上人群，而经过研究证明它对 12-15 周岁的接种者也是安全有效的，它也因此成为了目前唯一被授权用于 16 岁以下人群的 mRNA 疫苗。第一次接种后，BNT162b2 能提供至少 119 天的免疫原性，预防 SARS-CoV-2 感染的有效率为 95%。mRNA-1273 被推荐用于 18 岁以上人群接种，首次接种后也可提供至少 119 天的免疫原性，预防 SARS-CoV-2 感染的有效率为 94.5%。二种疫苗均报告了一些相关的过敏症状，包括疼痛、发红、发热、疲劳、头痛和注射部位肌肉疼痛等^[82]。据报道，与 mRNA-1273 相比，BNT162b2 的不良发生率更低，但 mRNA-1273 在运输和储存方面更稳定。对于不同年龄段的接种人群，疫苗的有效性也不尽相同。调查显示，对于美国的养老院居民，二剂 mRNA 疫苗预防感染的有效率为 74.7%（2021 年 3 月至 5 月）。在 2021 年 6-7 月，B.1.617.2（Delta）变异株占主导地位时，该有效性数据显著下降至 53.1%^[83]，可见新的变异病毒株出现会降低疫苗的有效性。mRNA 疫苗为研发和应用周期最短的新兴疫苗，具有广阔的提升空间和应用前景，有望针对新毒株进行快速更新升级，以适应日新月异的治疗需求。

除此之外，许多针对 SARS-CoV-2 的优化的 mRNA 疫苗正处于临床或临床

前阶段（如表 3 所示），它们主要由脂质载体系统包载和递送。例如 Qin 等^[81]开发了一种脂质纳米粒包载的编码 SARS-CoV-2 受体结合域（RBD）的 mRNA（mRNA-LNP）候选疫苗（称为 ARCoV），目前正处于临床试验阶段。在小鼠和非人类灵长类动物中，肌肉注射 ARCoV mRNA-LNP 激发了针对 SARS-CoV-2 的强大的中和抗体反应及 Th1 偏向的细胞反应。此外，ARCoV 以液体制剂形式生产，室温下储存至少 1 周，2-8℃时稳定性更好。

表 3. SARS-CoV-2 mRNA 疫苗的临床试验信息^[84]

疫苗名称	疫苗类型	临 床 试 验 阶段	临床试验编号	资金来源
TAK-919	Nucleoside-modified	I/II	NCT04677660	Takeda, Moderna
CVnCoV (Zorecimeran)	unmodified	I II III	NCT04449276 ISRCTN73765130NCT 04515147, PER-054-20 NCT04652102, EUCTR2020-003998- 22, EUCTR2020- 004066-19, NCT04674189 NCT04860258 NCT04848467	CureVac
ARCoV	unmodified	I Ib II III	ChiCTR2000034112 ChiCTR2000039212 ChiCTR2100041855 NCT04847102	Walvax Biotechnology, PLA
BNT162b1 (Abdavomeran)	Nucleoside-modified	I I/II II/III	ChiCTR2000034825, NCT04523571 EudraCT 2020-001038- 36, NCT04380701 NCT04368728	BioNTech, Pfzer
mRNA-1273.211 ARCT-021	Nucleoside-modified Self-amplifying mRNA	II I/II II	NCT03305076 NCT04480957 NCT04728347 NCT0466839	Moderna Arcturus
BNT162a1	unmodified	I/II	EudraCT 2020-001038- 36, NCT04380701	BioNTech, Pfzer
BNT162b3	Nucleoside-modified	I/II	NCT04537949, EUCTR2020-003267- 26-DE	BioNTech, Pfzer

BNT162c2	Self-amplifying mRNA	I/II	EudraCT 2020-001038-36, NCT04380701	BioNTech, Pfizer
MRT5500	unmodified	I/II	NCT04798027	Sanof, Translate Bio
LNP-nCoVsaRNA	Self-amplifying mRNA	I	ISRCTN17072692	Imperial College London, Acuitas Therapeutics
ChulaCov19	Nucleoside-modified	I/II	NCT04566276	Chulalongkorn University
PTX-COVID19-B	Nucleoside-modified	I	NCT04765436	Providence Therapeutics
SAM-LNP-S	Self-amplifying mRNA	I	NCT04776317	Gristone Oncology, NIAID
mRNA-1273.351	Nucleoside-modified	I	NCT04785144	Moderna
mRNA-1283	Nucleoside-modified	I	NCT04813796	Moderna
CoV2 SAM [LNP]	Self-amplifying mRNA	I	NCT04758962	GSK

注：表中疫苗为除 BNT162b2 和 mRNA-1273 之外的其他 SARS-CoV-2 mRNA 疫苗。

3.1.2 其他传染性疾病

除 SARS-CoV-2 外，由非病毒载体递送的 mRNA 疫苗也可用于其他传染性疾病。下面主要以流行性感冒、狂犬病和寨卡病毒病为例进行介绍。

流感疫苗是第一个尝试用 mRNA 来预防疾病的疫苗，目前已有较多相关的探索性研究。mRNA 流感疫苗所用的载体多为脂质制剂。Martinon 等^[85]证实皮下注射 mRNA 脂质体疫苗可诱导体内抗流感的细胞毒性 T 淋巴细胞免疫。Petsch 等^[86]将多价 mRNA 疫苗（血凝素、神经氨酸酶和核蛋白）注射于小鼠、雪貂和猪体内，评估了其对抗甲型流感 H1N1、H3N2 和 H5N1 毒株的作用。结果显示皮内注射的 mRNA 疫苗可诱导抗原特异性中和抗体，有助于动物对抗甲型流感病毒。Moderna 进行的临床试验也获得了类似的结果，已证明针对 A 型禽流感病毒 H10N8 和 H7N9 的肌肉注射疫苗是安全且具有免疫性的^[87]。

在狂犬病预防和治疗方面，研究证明 mRNA 疫苗比病原体疫苗具有更好的保护作用。例如，Schnee 等^[88]证实了 mRNA 疫苗对啮齿动物和猪的狂犬病的有效性。编码病毒糖蛋白（RABV-G）的非复制性 mRNA 疫苗在体内可诱导抗原特异性免疫反应。值得注意的是，与特许灭活疫苗（Rabipur）诱导的细胞免疫相比，mRNA 疫苗诱导了更多的特异性 CD4⁺T 细胞，且在长达 1 年的观察期间，小鼠的中和抗体滴度保持稳定。该抗狂犬病疫苗（CV7202）的安全性、有效性

和免疫效应目前正在 Cure Vac 的资助下进行 I 期试验评估。Lou 等^[89]利用 LNPs 递送自编码狂犬病毒糖蛋白 (RVG) 的扩增 mRNA 疫苗, 经比较几种常用的阳离子脂质后选择了诱导最高抗原表达效率的 DOTAP 或 DDA, 并对其形成的 LNPs 进行动物体内评估。结果显示狂犬病毒攻击时该 mRNA-LNP 疫苗具有良好的保护作用。

为对抗寨卡病毒, Pardi 等^[90]提出了一种二价修饰的 mRNA 疫苗, 该疫苗编码 2013 年寨卡病毒株的前膜和包膜糖蛋白。用 LNPs 包载并皮内注射单剂量疫苗就足以保护小鼠在接种后两周至五个月内免受病毒攻击, 并可在接种五周后保护非人类灵长类动物。Moderna 使用相同的抗原开发了一种由 LNPs 包载的核苷修饰的抗寨卡病毒疫苗 mRNA-1893, 该疫苗迅速获得了 FDA 的批准, 并正在进行 I 期试验, 以评估其安全性、耐受性和免疫原性^[91]。目前重要的研究成果证明 mRNA-1893 在先天性感染的小鼠模型中阻止了病毒的先天性传播。针对除 COVID-19 外的 mRNA 疫苗临床试验信息如表 4 所示。

表 4. 针对除 COVID-19 外的 mRNA 疫苗临床试验信息^[84]

疫苗名称	目标病毒	疫苗类型	临床试验阶段	临床试验编号	资金来源
mRNA-1647	CMV	Nucleoside-modified mRNA-LNP	II	NCT04232280 NCT03382405	Moderna
mRNA-1443		Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT03382405	Moderna
mRNA-1893	Zika	Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT04064905	Moderna
mRNA-1325		Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT03014089	Moderna
mRNA-1653	hMPV/PIV3	Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT04144348 NCT03392389	Moderna
mRNA-1345	RSV	Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT04528719	Moderna
mRNA-1777(V171)		Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	Unregistered	Moderna /Merck
mRNA-1172(V172)		Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	Unregistered	Moderna /Merck
mRNA-1851 (VAL-339851)	Infuenza A (H7N9)	Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT03345043	Moderna
mRNA-1440 (VAL506440)	Infuenza A (H10N8)	Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT03076385	Moderna
mRNA-1010	Infuenza A (H1N1,H3N2), Infuenza B (Yamagata)	Unknown	I/II	NCT04956575	Moderna

	lineage,Victoria lineage)				
MRT5400	Infuenza A (H3N2)	Unknown	I	Unregistered	Translate Bio,Sano f
MRT5401	Infuenza A (H3N2)	Unknown	I	Unregistered	Translate Bio,Sano f
mRNA-1944	Chikungunya	Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT03829384	Moderna
mRNA-1388 (VAL-181388)		Nucleoside-modified mRNA-LNP	I	NCT03325075	Moderna
CV7201	Rabies	Unmodified mRNA complexed in RNAActive	I	NCT02241135	CureVac
CV7202		Unmodified mRNA-LNP	I	NCT03713086	CureVac
GSK3903133		Self-amplifying mRNA in cationic nanoemulsion	I	NCT04062669	GSK

3.2 肿瘤

近几年，基于 mRNA 的肿瘤疫苗得到了广泛的研究。大多数肿瘤疫苗是治疗性的，而非预防性的。通过精确的序列设计，mRNA 肿瘤疫苗可编码一种或多种肿瘤特异性抗原（TSA），并在细胞内完成翻译和抗原加工，与抗原呈递细胞中主要组织相容性抗原复合物 I（MHC I）结合，最终呈递给 T 细胞，从而诱导强大的肿瘤特异性 T 细胞反应，在不损伤正常细胞的情况下清除或减少肿瘤细胞。除肿瘤特异性 T 细胞外，细胞因子和 T 细胞招募因子的表达还会引发巨噬细胞和树突状细胞（如 NK 细胞）的免疫反应，表明其不仅可在体内表达抗原，还能激活信号通路，显著提高肿瘤抗原的免疫反应。这也意味着 mRNA 疫苗可与其他肿瘤治疗药物如检查点抑制剂和免疫激动剂联合使用，达到更全面的肿瘤治疗效果。同时也意味着经电穿孔使 mRNA 进入树突状细胞也可引起对肿瘤抗原的有效免疫反应，这一研究发现使得 DC mRNA 疫苗成为重点开发的一类肿瘤疫苗。多项研究表明，电穿孔树突状细胞与编码共刺激分子的 mRNA 可显著增加树突状细胞的免疫应答活性，其中共刺激因子包括 CD83，肿瘤坏死因子受体超家族成员 4（TNFRSF4；也被称为 OX40）和 4-1BB 配体（4-1BBL）等^[92-94]。树突状细胞的功能也可通过使用 mRNA 编码的促炎细胞因子（如 IL-12）来调节^[95]。目前已有多种 mRNA 肿瘤疫苗正在临床试验中，如表 5 所示。

表 5. 部分抗原 mRNA 疫苗与 DC mRNA 疫苗的临床试验信息^[96]

疫苗类型（给药途径）	作用目标	试验编号
------------	------	------

DC EP with TAA mRNA (i.d. or NA)	急性髓白血病	NCT00834002
		NCT01686334
	急性髓白血病	NCT00965224
	慢性粒细胞白血病	
	多发性骨髓瘤	
	多重固体肿瘤	NCT01291420
DC EP with autologous tumour mRNA with or without CD40L mRNA (i.d. or NA)	间皮瘤	NCT02649829
	恶性胶质瘤	NCT02649582
	肾细胞癌	NCT01482949
		NCT00678119
		NCT00272649
		NCT01582672
		NCT00087984
	胰腺癌	NCT00664482
	急性髓白血病	NCT00510133
	黑色素瘤	NCT01684241
DC loaded with TAA mRNA (NA)		NCT02035956
		NCT02410733
Naked TAA or neo-Ag mRNA (i.nod.)	黑色素瘤	NCT02316457
Liposome-complexed TAA mRNA (i.v.)	乳腺癌	NCT00923312
Liposome-formulated TAA and neo-Ag mRNA (i.v.)		NCT01915524
RNAActive TAA mRNA (i.d.)	非小细胞肺癌	NCT02140138
	前列腺癌	NCT00831467
		NCT01817738
		NCT01734304
DC loaded with TAA and CMV Ag mRNA (i.d.)	急性髓白血病	
DC (Langerhans) EP with TAA mRNA (i.d.)	黑色素瘤	NCT01456104
DC loaded with TAA mRNA (i.d.)	前列腺癌	NCT01197625
		NCT01278914
	胶质母细胞瘤	NCT00846456
DC, matured, loaded with TAA mRNA (NA)	卵巢癌	NCT01334047
DC EP with TAA mRNA (i.d. and i.v. or i.nod)	结肠直肠癌	NCT00228189
DC EP with TAA and TriMix mRNA (i.d.和 i.v.)	黑色素瘤	NCT01066390
DC, matured, loaded with autologous tumor RNA (i.v.)		NCT01302496
Autologous tumour mRNA with GM-CSF protein (i.d. and s.c.)		NCT01676779
Protamine-complexed TAA mRNA with GM-CSF protein (i.d. and s.c.)	黑色素瘤	NCT01983748
DC loaded with TAA mRNA (NA)	黑色素瘤	NCT00204516
		NCT00204607
RNAActive TAA mRNA (i.d.)	急性髓性白血病	NCT03083054
	骨髓增生异常综合症	
	前列腺癌	NCT00906243

注：该表格总结了近几年在 ClinicalTrials.gov 上注册的部分临床试验。Ag：抗原；CD40L：CD40 配体；CMV：巨细胞病毒；DC：树突状细胞；EP：电穿孔的；GM-CSF：粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子；i.d.：皮内注射；ing.：腹股沟注射；i.nod.：结内注射；i.v.：静脉注射；NA：无法使用；neo-Ag：特异性肿瘤抗原（新抗原）；s.c.：皮下注射；TAA：肿瘤相关抗原。

目前，临床上用于体内递送的 mRNA 载体主要是 LNPs 和阳离子脂质体，部分采用注射裸 mRNA 或者鱼精蛋白复合物的策略给药。然而由于肿瘤抗原的异质性和复杂性，这种耗时的包载过程并不适合个性化肿瘤疫苗的定制生产，且 mRNA 肿瘤疫苗通常需要同时施用免疫佐剂，这无疑增添了制备的难度，使得制备过程更加复杂。基于此，市面上迫切需要一种能快速呈递 mRNA 抗原并具有先天免疫刺激功能的新型纳米载体，以进一步开发基于 mRNA 的个性化肿瘤疫苗。2022 年，Li 等^[97]报道了一项新研究，基于细菌源性外膜囊泡（OMVs）因被树突状细胞有效识别和摄取且具有丰富的病原体相关分子模式（PAMPs）可强烈刺激先天免疫系统的特点，基因工程修饰 RNA 结合蛋白 L7Ae 和溶酶体逃逸蛋白李斯特溶血素 O，使用 OMVs 作为 mRNA 递送平台，获得 OMV-LL。OMV-LL 可通过 L7Ae 结合 mRNA 抗原形成 OMV-LL-mRNA，并将其递送至树突状细胞，然后经李斯特菌溶素 O 介导的内涵体逃逸实现交叉呈递，如图 18 所示。结果显示 OMV-LL-mRNA 显著抑制黑色素瘤的生长，使得 37.5% 的结直肠癌小鼠模型的肿瘤完全消退，且可诱导长期免疫记忆，60 天后仍能保护小鼠免受肿瘤攻击，证明了这一新型 mRNA 肿瘤疫苗递送平台良好的发展潜力。

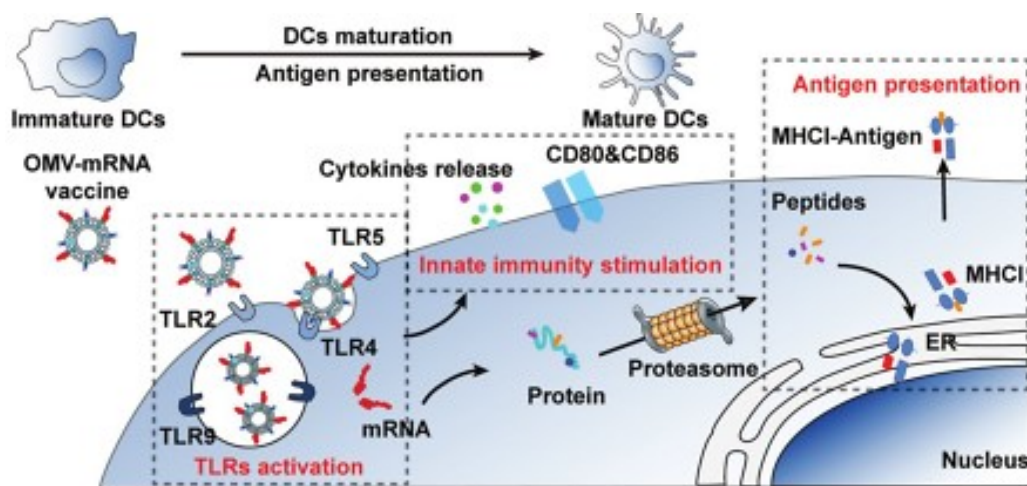


图 18. 基于 OMVs 的 mRNA 疫苗触发 TLR 激活、刺激固有免疫和抗原呈递的示意图^[97]

3.3 遗传性疾病

近年来，mRNA 在治疗遗传性疾病方面的应用也成为了研究热点之一。体外转录（IVT）mRNA 的出现大大提升了实现基因高表达的能力。这些 IVT mRNA 经化学修饰可避免激活免疫反应，提高自身稳定性并延长半衰期。基于 mRNA 的基因递送消除了发生非预期的基因组整合的可能性，解决了相关的安全问题。同时，细胞质中存在的翻译机制消除递送 DNA 时面临的入核障碍，从

而可实现更高的转染效率以及蛋白质的快速合成。LNPs 在临床中的成功使用使其成为 mRNA 递送的首选纳米颗粒系统。

在 mRNA 药物治疗遗传性疾病的一项研究中，Patel 等^[98]使用微流控制器制备了 11 种脂质纳米粒，并测试了它们将 mRNA 递送至眼球后部的能力（如图 19 所示）。研究表明，含有不饱和脂质链的低酸度系数的脂质纳米粒在视网膜中报告基因转染的数量最多，基因表达动力学表现为快速启动（4 小时内）和持续时间长（96 小时）的特点。另外，基因递送是细胞类型特异性的，该纳米粒在视网膜色素上皮（RPE）中表达最多，在 Muller 胶质细胞中表达有限，表明该 LNPs 药物递送系统可能有望用于治疗 RPE 单基因视网膜退行性疾病，预防失明。

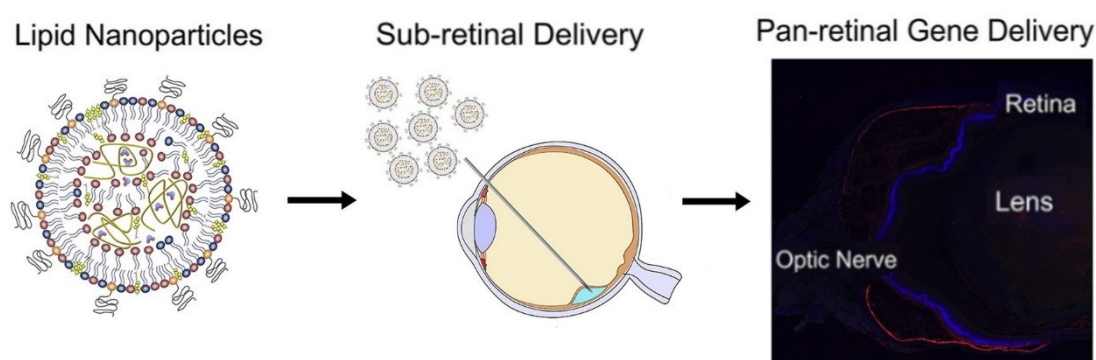


图 19. 基于脂质纳米粒的针对视网膜下的 mRNA 递送和泛视网膜递送结果^[98]

3.4 神经性疾病

mRNA 的治疗可控制特定疾病相关蛋白质的表达，无病毒启动子和细菌序列，无插入突变的风险，且不需要进入细胞核，不整合到宿主基因组，可实现瞬时基因表达，这增加了在不分裂或缓慢分裂的细胞（如神经细胞）中转染的机会。基于此，mRNA 也是一种有希望治疗神经性疾病的手段。

尽管研究仍处于初级阶段，但 mRNA 疗法在治疗蛋白质功能发生改变的脑相关疾病（如阿尔茨海默病、额颞叶变性（FTLD）和其他疾病）方面已呈现出巨大的潜力。Lin 等^[99]使用 PEG 化阳离子聚合物形成多簇纳米胶束，并通过脑室内给药将 mRNA 递送入小鼠大脑，结果显示 β -淀粉样蛋白的清除率增加，首次证明引入外源性 mRNA 治疗脑疾病的潜力。

特别是，以阳离子脂质体为基础的脑给药系统可与阴离子 mRNA 的高度结合，脂质体包载 mRNA 可保护 mRNA 免受易感核酸酶降解，有助于细胞摄取，

促进内涵体逃逸。脂质经修饰可增强上述作用。此外，脂质具有生物相容性，可携带核酸分子穿过血脑屏障（BBB）进入神经细胞，或者通过第二种途径，即不受血脑屏障干扰的鼻内途径，脂质体可沿着鼻内通过嗅觉神经和三叉神经到达大脑。Zheng 等^[100]使用脂质体包裹 β 片层阻断肽 H102，经鼻内途径递送后大脑中显示出有效的药物浓度和有限的毒性。另一项研究表明，编码荧光蛋白的 GFP-mRNA 经聚乙二醇化和脂质包载后，体外可以 30% 的效率转染 DC2.4 细胞，并成功通过鼻内途径在体内表达^[69]。总的来说，鼻内给药是首选的脑给药途径，其采用非病毒载体非侵入性途径给药。与静脉给药相比，鼻内给药有助于减少治疗剂量，降低外周组织的非特异性吸收。

2021 年的一项研究中，Dhaliwal 等^[101]开发了一种用于慢性疾病治疗的 mRNA 阳离子脂质体，该脂质体由 DOTAP、DPPC 和胆固醇组成，已在小鼠模型中评估了从鼻内输送至大脑的潜力，结果显示与对照组相比，实验组皮质、纹状体和中脑区域的荧光素酶活性显著升高，证明了脑特异性 mRNA 非病毒递送载体用于治疗各种神经系统疾病的可行性。

除上述应用外，基于非病毒载体给药系统的 mRNA 药物在治疗心血管疾病、克服胎儿免疫系统不成熟的问题以及推进 iPSC 技术等方面都已开展了相关研究，并取得了一定的成果^[62,102-104]。相信在不远的将来会有更多 mRNA 制剂上市，可攻克更多目前难以治愈的疾病。

四、总结与展望

合成的 mRNA 递送至细胞质后会进行短暂的蛋白质表达，并可通过生理代谢途径完全降解，避免基因组整合的风险。这种瞬时性的特点满足了许多只需在有限时间内表达蛋白质的应用需求，如基因编辑、细胞重编程和一些免疫疗法。目前已开发出多种递送 mRNA 的非病毒载体系统，如 LNPs、脂质体、胶束、聚合物和阳离子肽等，也逐步开发了一些新型载体材料用于 mRNA 递送。不同的 mRNA 递送系统有不同的递送机制，以脂质纳米递送系统为例，LNPs 通过微流控制备方法将 mRNA 包裹在核心中，主要经内吞作用、溶酶体逃逸途径将 mRNA 递送至细胞质；而 mRNA 在脂质体内借助静电附着，主要通过膜融合将 mRNA 递送至细胞质。除脂质纳米递送系统，其他纳米递送系统也有各自的 mRNA 包载策略和递送特点。

然而，基于 mRNA 的治疗方法也存在一些缺点，如递送效率低且不稳定。目前，受限于纳米递送系统的内涵体定位，只有少量的 mRNA（0.01%）可成功进入细胞质并表达蛋白质。另外，聚合物大分子结构复杂，较难精确控制其聚合度，不同合成批次之间差异较大，增加了生产的难度，并且部分聚合物在体内具有较大毒性。递送载体的稳定性较差，载药量较低，因此，大剂量给药仍是必需的，这会导致副作用。另一个无法避免的问题在于人与动物模型存在差异，在动物模型中取得理想效果的材料，其在人体内的有效性和安全性仍有待考察。

针对上述问题，一方面要进行更细致的探索，包括详细研究载体系统介导的递送过程、递送材料的有效组分比例及有效载荷、高效可控的装载方式以及不同疾病治疗适用的不同递送平台等，掌握规律，设计出最优方案。另一方面，要致力于开发转染效率更高、毒性更低、稳定性更好的新型递送载体材料和递送系统。最后，还需在人体内考察材料的生物相容性和毒性，综合评价给药途径、用药剂量和给药频率等参数，保证制剂的有效性和安全性。

在临床应用上，无论是 mRNA 本身的特性还是基于非病毒载体的纳米给药系统都有着引人注目的优势。基于纳米递送系统的 mRNA 已经在治疗诸多疾病中使用，比如多种传染性疾病、肿瘤、遗传性疾病、神经性疾病等，特别是在

近年新冠疫情盛行之时，基于 LNPs 递送系统的 mRNA 疫苗大放异彩。可以说，COVID-19 疫情真正将 mRNA 技术推向了全球使用，在关键时刻展现了其独特的优势。这些技术是由学术界和工业界的科学家经过多年的艰苦努力而开发出来的，虽然还存在不足，但不可否认的是，基于非病毒载体系统的 mRNA 疗法已经积累了不可忽视的发展潜力，并有望在更多领域造福更广的人群。

参考文献

1. Josephson K, Ricardo A, Szostak JW. mRNA display: from basic principles to macrocycle drug discovery[J]. Drug Discov. Today, 2014,19(4):388e399.
2. Dimitriadis GJ. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes[J]. Nature, 1978,274:923e924
3. Ostro MJ, Giacomoni D, Lavelle D, Paxton W, Dray S. Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome-mediated insertion into a human cell line[J]. Nature, 1978,274: 921e923.
4. Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines[J]. Nature, 2021,597(16): 318e324.
5. Da Silva Sanchez A, Paunovska K, Cristian A, Dahlman JE. Treating cystic fibrosis with mRNA and CRISPR[J]. Hum. Gene Ther, 2020, 31:940–955.
6. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis[J]. N. Engl. J. Med, 2021, 385: 493–502.
7. Chadwick AC, Wang X, Musunuru K. In Vivo Base Editing of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9) as a Therapeutic Alternative to Genome Editing[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(9):1741-1747.
8. Wang X, Raghavan A, Chen T, Qiao L, Zhang Y, Ding Q, et al. CRISPR-Cas9 Targeting of PCSK9 in Human Hepatocytes In Vivo-Brief Report[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(5):783-786.
9. Li B, Zhang X, Dong Y. Nanoscale platforms for messenger RNA delivery[J]. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol, 2019, 11: e1530 .
10. Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. Nature Reviews Materials, 2021, 6(12): 1078-1094.
11. Li M, Li Y, Li S, Jia L, Wang H, Li M, et al. The nano delivery systems and applications of mRNA[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 5(227): 113910.
12. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. N. Engl. J. Med, 2021, 384: 403–416.
13. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine[J]. N. Engl. J. Med, 2020, 383: 2603–2615.
14. Xiong Q, Lee GY, Ding J, Li W, Shi J. Biomedical applications of mRNA nanomedicine[J]. Nano Res, 2018, 11(10): 5281–5309.
15. Meng C, Chen Z, Li G, Welte T, Shen H. Nanoplatforams for mRNA therapeutics[J]. Adv. Ther, 2021, 4(21):2000099.
16. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery[J]. Mol. Ther, 2019, 27:710-728.

17. Koitabashi K, Nagumo H, Nakao M, Machida T, Yoshida K, Sakai-Kato K. Acidic pH-induced changes in lipid nanoparticle membrane packing[J]. *BBA-Biomembranes*, 2021,1863: 183627.
18. Guimaraes PPG, Zhang R, Spektor R, Tan M, Chung A, Billingsley MM, et al. Ionizable lipid nanoparticles encapsulating barcoded mRNA for accelerated in vivo delivery screening[J]. *J. Contr. Release*, 2019, 316:404-417.
19. Horiuchi Y, Lai SJ, Yamazaki A, Nakamura A, Ohkawa R, Yano K, et al. Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells[J]. *Atherosclerosis Suppl*, 2018, 32:59.
20. Baskararaj S, Panneerselvam T, Govindaraj S, Arunachalam S, Parasuraman P, Pandian SRK, et al. Formulation and characterization of folate receptor-targeted PEGylated liposome encapsulating bioactive compounds from *Kappaphycus alvarezii* for cancer therapy[J]. *Biotech*, 2020, 10: 136.
21. Drescher S, van Hoogevest P. The phospholipid research center: current research in phospholipids and their use in drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12:1235.
22. Rak M, Ochalek A, Gawarecka K, Masnyk M, Chmielewski M, Chojnacki T, et al. Boost of serum resistance and storage stability in cationic polyprenyl-based lipofection by helper lipids compositions[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 2020, 155: 199-209.
23. Paunovska K, Da Silva Sanchez AJ, Sago CD, Gan Z, Lokugamage MP, Islam FZ, et al. Nanoparticles Containing Oxidized Cholesterol Deliver mRNA to the Liver Microenvironment at Clinically Relevant Doses[J]. *Adv Mater*, 2019,31(14):e1807748.
24. Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, Heartlein MW, DeRosa F, Mir FF, et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs[J]. *Nano Lett*, 2015, 15(11):7300-6.
25. Sedic M, Senn JJ, Lynn A, Laska M, Smith M, Platz SJ, et al. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey[J]. *Vet Pathol*, 2018,55(2):341-354.
26. Finn JD, Smith AR, Patel MC, Shaw L, Youniss MR, van Heteren J, et al. A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(9):2227-2235.
27. ModernaTx. Compounds and compositions for intracellular delivery of therapeutic agents[P]. US: US20170210697A1, 2021.
28. Zhang X, Zhao W, Nguyen GN, Zhang C, Zeng C, Yan J, et al. Functionalized lipid-like nanoparticles for in vivo mRNA delivery and base editing[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(34):eabc2315.
29. Musunuru K, Chadwick AC, Mizoguchi T, Garcia SP, DeNizio JE, Reiss CW, et al. In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates[J]. *Nature*, 2021,593(7859):429-434.
30. Rothgangel T, Dennis MK, Lin PJC, Oka R, Witzigmann D, Villiger L, et al. In vivo adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels[J]. *Nat Biotechnol*. 2021,39(8):949-957.

31. Rim JH, Gopalappa R, Gee HY. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(18):1722.
32. Lucas C, Vogels CBF, Yildirim I, Rothman JE, Lu P, Monteiro V, et al. Impact of circulating SARS-CoV-2 variants on mRNA vaccine-induced immunity[J]. *Nature*, 2021, 600(7889):523-529.
33. Paunovska K, Loughrey D, Dahlman JE. Drug delivery systems for RNA therapeutics[J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(5):265-280.
34. Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018,28(3):146-157.
35. Dahlman JE, Barnes C, Khan O, Thiriot A, Jhunjunwala S, Shaw TE, et al. In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight[J]. *Nat Nanotechnol*. 2014, 9(8):648-655.
36. Khan OF, Kowalski PS, Doloff JC, Tsosie JK, Bakthavatchalu V, Winn CB, et al. Endothelial siRNA delivery in nonhuman primates using ionizable low-molecular weight polymeric nanoparticles[J]. *Sci Adv*, 2018,4(6):eaar8409.
37. Sago CD, Lokugamage MP, Islam FZ, Krupczak BR, Sato M, Dahlman JE. Nanoparticles That Deliver RNA to Bone Marrow Identified by in Vivo Directed Evolution[J]. *J Am Chem Soc*, 2018,140(49):17095-17105.
38. Paunovska K, Gil CJ, Lokugamage MP, Sago CD, Sato M, Lando GN, et al. Analyzing 2000 in Vivo Drug Delivery Data Points Reveals Cholesterol Structure Impacts Nanoparticle Delivery[J]. *ACS Nano*, 2018,12(8):8341-8349.
39. Sago CD, Lokugamage MP, Paunovska K, Vanover DA, Monaco CM, Shah NN, et al. High-throughput in vivo screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018,115(42):E9944-E9952.
40. Lokugamage MP, Vanover D, Beyersdorf J, Hatit MZC, Rotolo L, Echeverri ES, et al. Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs[J].*Nat Biomed Eng*,2021,5(9):1059-1068.
41. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016,99(Pt A):28-51.
42. Eygeris Y, Patel S, Jozic A, Sahay G. Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(6):4543-4549.
43. Kauffman KJ, Oberli MA, Dorkin JR, Hurtado JE, Kaczmarek JC, Bhadani S, et al. Rapid, Single-Cell Analysis and Discovery of Vectored mRNA Transfection In Vivo with a loxP-Flanked tdTomato Reporter Mouse[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018,10:55-63.
44. Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy[J]. *Nature*, 2016,534(7607):396-401.
45. Cheng Q, Wei T, Farbiak L, Johnson LT, Dilliard SA, Siegwart DJ. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing[J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(4):313-320.

46. Gkionis L, Aojula H, Harris LK, Tirella A. Microfluidic-assisted fabrication of phosphatidylcholine-based liposomes for controlled drug delivery of chemotherapeutics[J]. *Int J Pharm*, 2021, 604:120711.
47. Li J, Zhou S, Yu J, Cai W, Yang Y, Kuang X, et al. Low dose shikonin and anthracyclines coloaded liposomes induce robust immunogenetic cell death for synergistic chemo-immunotherapy[J]. *J Control Release*, 2021, 335:306-319.
48. Takata H, Shimizu T, Kawaguchi Y, Ueda H, Elsadek NE, Ando H, et al. Nucleic acids delivered by PEGylated cationic liposomes in systemic lupus erythematosus-prone mice: A possible exacerbation of lupus nephritis in the presence of pre-existing anti-nucleic acid antibodies[J]. *Int J Pharm*, 2021, 601:120529.
49. Gkionis L, Aojula H, Harris LK, Tirella A. Microfluidic-assisted fabrication of phosphatidylcholine-based liposomes for controlled drug delivery of chemotherapeutics[J]. *Int J Pharm*, 2021, 604:120711.
50. Michel T, Luft D, Abraham MK, Reinhardt S, Salinas Medina ML, Kurz J, et al. Cationic Nanoliposomes Meet mRNA: Efficient Delivery of Modified mRNA Using Hemocompatible and Stable Vectors for Therapeutic Applications[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 8:459-468.
51. Mai Y, Guo J, Zhao Y, Ma S, Hou Y, Yang J. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity[J]. *Cell Immunol*, 2020, 354:104143.
52. Zhang R, Tang L, Tian Y, Ji X, Hu Q, Zhou B, et al. DP7-C-modified liposomes enhance immune responses and the antitumor effect of a neoantigen-based mRNA vaccine[J]. *J Control Release*, 2020, 328:210-221.
53. Roloff A, Nelles DA, Thompson MP, Yeo GW, Gianneschi NC. Self-Transfecting Micellar RNA: Modulating Nanoparticle Cell Interactions via High Density Display of Small Molecule Ligands on Micelle Coronas[J]. *Bioconjug Chem*, 2018, 29(1):126-135.
54. Chan LY, Khung YL, Lin CY. Preparation of Messenger RNA Nanomicelles via Non-Cytotoxic PEG-Polyamine Nanocomplex for Intracerebroventricular Delivery: A Proof-of-Concept Study in Mouse Models[J]. *Nanomaterials(Basel)*, 2019, 9(1): 67.
55. Solomun JJ, Cinar G, Mapfumo P, Richter F, Moek E, Hausig F, et al. Solely aqueous formulation of hydrophobic cationic polymers for efficient gene delivery[J]. *Int J Pharm*, 2021, 593:120080.
56. Soliman OY, Alameh MG, De Crescenzo G, Buschmann MD, Lavertu M. Efficiency of Chitosan/Hyaluronan-Based mRNA Delivery Systems In Vitro: Influence of Composition and Structure[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109(4):1581-1593.
57. Zhao M, Li M, Zhang Z, Gong T, Sun X. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag Mrna[J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(7):2596-2607.
58. Li M, Zhao MN, Fu Y, Li Y, Gong T, Zhang ZR, et al. Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways[J]. *J Control Release*, 2016, 228:9-19.

59. Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, Busse D, Erbar S, Reuter KC, 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.
60. Ke XY, Shelton L, Hu YZ, Zhu YN, Chow E, Tang HY, et al. Surface-Functionalized PEGylated Nanoparticles Deliver Messenger RNA to Pulmonary Immune Cells[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(32): 35835-35844.
61. Tan L, Zheng T, Li M, Zhong XF, Tang Y, Qin M, et al. Optimization of an mRNA vaccine assisted with cyclodextrin-polyethyleneimine conjugates[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2020, 10(3):678-689.
62. Choi HY, Lee TJ, Yang GM, Oh J, Won J, Han J, et al. Efficient mRNA delivery with graphene oxide-polyethylenimine for generation of footprint-free human induced pluripotent stem cells[J]. *J Control Release*, 2016, 235:222-235.
63. Chipper M, Tounsi N, Kole R, Kichler A, Zuber G. Self-aggregating 1.8kDa polyethylenimines with dissolution switch at endosomal acidic pH are delivery carriers for plasmid DNA, mRNA, siRNA and exon-skipping oligonucleotides[J]. *J Control Release*, 2017, 246:60-70.
64. Anderson DG, Lynn DM, Langer R. Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, 42(27):3153-8.
65. Anderson DG, Akinc A, Hossain N, Langer R. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters)[J]. *Mol Ther*, 2005, 11(3):426-34.
66. Blanchard EL, Vanover D, Bawage SS, Tiwari PM, Rotolo L, Beyersdorf J, et al. Treatment of influenza and SARS-CoV-2 infections via mRNA-encoded Cas13a in rodents[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(6):717-726.
67. Rahman M, Alharbi KS, Alruwaili NK, Anfinan N, Almalki WH, Padhy I, et al. Nucleic acid-loaded lipid-polymer nanohybrids as novel nanotherapeutics in anticancer therapy[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17(6): 805-816.
68. Kaczmarek JC, Patel AK, Kauffman KJ, Fenton OS, Webber MJ, Heartlein MW, et al. Polymer-Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of mRNA to the Lungs[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(44):13808-13812.
69. Su X, Fricke J, Kavanagh DG, Irvine DJ. In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(3):774-87.
70. Ayad C, Libeau P, Lacroix-Gimon C, Ladavière C, Verrier B. LipoParticles: Lipid-Coated PLA Nanoparticles Enhanced In Vitro mRNA Transfection Compared to Liposomes[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3):377.
71. Xu L, Zhang H, Wu Y. Dendrimer advances for the central nervous system delivery of therapeutics[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014, 5(1):2-13.
72. Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, McPartlan JS, Tsosie JK, Tilley LD, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(29):E4133-42.

73. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, 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(5):498-507.
74. Udhayakumar VK, De Beuckelaer A, McCaffrey J, McCrudden CM, Kirschman JL, Vanover D, et al. Arginine-Rich Peptide-Based mRNA Nanocomplexes Efficiently Instigate Cytotoxic T Cell Immunity Dependent on the Amphipathic Organization of the Peptide[J]. *Adv Healthc Mater*. 2017, 6(13): 1601412.
75. Coolen AL, Lacroix C, Mercier-Gouy P, Delaune E, Monge C, Exposito JY, et al. Poly(lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering their activation[J]. *Biomaterials*. 2019, 195:23-37.
76. Bell GD, Yang Y, Leung E, Krissansen GW. mRNA transfection by a Xentry-protamine cell-penetrating peptide is enhanced by TLR antagonist E6446[J]. *PLoS One*. 2018, 13(7):e0201464.
77. Lou B, De Koker S, Lau CYJ, Hennink WE, Mastrobattista E. mRNA Polyplexes with Post-Conjugated GALA Peptides Efficiently Target, Transfect, and Activate Antigen Presenting Cells[J]. *Bioconjug Chem*. 2019, 30(2):461-475.
78. Qiu Y, Man RCH, Liao Q, Kung KKK, Chow MYT, Lam JKW. Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide[J]. *J Control Release*. 2019, 314:102-115.
79. Yin Y, Li XY, Ma HX, Zhang J, Yu D, Zhao RF, et al. In situ transforming RNA nanovaccines from polyethylenimine functionalized graphene oxide hydrogel for durable cancer immunotherapy[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(5): 2224-2231.
80. Zhang W, Liu Y, Chin JM, Phua KKL. Sustained release of PKR inhibitor C16 from mesoporous silica nanoparticles significantly enhances mRNA translation and anti-tumor vaccination[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 163: 179-187.
81. Zhang NN, Li XF, Deng YQ, Zhao H, Huang YJ, Yang G, et al. A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19[J]. *Cell*, 2020, 182(5):1271-1283.
82. Meo SA, Bukhari IA, Akram J, Meo AS, Klonoff DC. COVID-19 vaccines: comparison of biological, pharmacological characteristics and adverse effects of Pfizer/BioNTech and Moderna Vaccines[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3):1663-1669.
83. Nanduri S, Pilishvili T, Derado G, Soe MM, Dollard P, Wu H, et al. Effectiveness of Pfizer-BioNTech and Moderna Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Nursing Home Residents Before and During Widespread Circulation of the SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant - National Healthcare Safety Network[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2021, 70(34):1163-1166.
84. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(11):817-838.
85. Rosenbaum P, Tchitchek N, Joly C, Pozo AR, Stimmer L, Langlois S, et al. Vaccine Inoculation Route Modulates Early Immunity and Consequently Antigen-Specific Immune Response[J]. *Front Immunol*. 2021, 12:645210.

86. Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection[J]. *Nat Biotechnol.* 2012, 30(12):1210-6.
87. Armbruster N, Jasny E, Petsch B. Advances in RNA Vaccines for Preventive Indications: A Case Study of A Vaccine Against Rabies[J]. *Vaccines (Basel).* 2019,7(4):132.
88. Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive® vaccines[J]. *Hum Vaccin Immunother.* 2013, 9(10):2263-76.
89. Lou G, Anderluzzi G, Schmidt ST, Woods S, Gallorini S, Brazzoli M, et al. Delivery of self-amplifying mRNA vaccines by cationic lipid nanoparticles: The impact of cationic lipid selection[J]. *J Control Release.* 2020, 325:370-379.
90. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines – a new era in vaccinology[J]. *Nat Rev Drug Discov.* 2018,17(4):261-279.
91. Diamond DJ, La Rosa C, Chiuppesi F, Contreras H, Dadwal S, Wussow F, et al. A fifty-year odyssey: prospects for a cytomegalovirus vaccine in transplant and congenital infection[J]. *Expert Rev Vaccines.* 2018,17(10):889-911.
92. DeKeersmaecker B, Heirman C, Corthals J, Empsen C, van Grunsven LA, Allard SD, et al. The combination of 4-1BBL and CD40L strongly enhances the capacity of dendritic cells to stimulate HIV-specific T cell responses[J]. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, 89(6): 989–999.
93. Dannull J, Nair S, Su Z, Boczkowski D, DeBeck C, Yang BJ, et al. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand[J]. *Blood*, 2005, 105(8): 3206–3213.
94. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses[J]. *Eur. J. Immunol.*, 2007, 37(3): 686–695.
95. Bontkes HJ, Kramer D, Ruizendaal JJ, Meijer CJ, Hooijberg E. Tumor associated antigen and interleukin-12 mRNA transfected dendritic cells enhance effector function of natural killer cells and antigen specific T-cells[J]. *Clin. Immunol.*, 2008, 127(3): 375–384.
96. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines – a new era in vaccinology[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(4): 261-279.
97. Li Y, Ma XT, Yue YL, Zhang KY, Cheng KM, Feng QQ, et al. Rapid Surface Display of mRNA Antigens by Bacteria-Derived Outer Membrane Vesicles for a Personalized Tumor Vaccine[J]. *Adv Mater.* 2022, e2109984.
98. Patel S, Ryals RC, Weller KK, Pennesi ME, Sahay G. Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye[J]. *J Control Release.* 2019, 303:91-100.
99. Lin CY, Perche F, Ikegami M, Uchida S, Kataoka K, Itaka K. Messenger RNA-based therapeutics for brain diseases: An animal study for augmenting clearance of beta-amyloid by intracerebral administration of neprilysin mRNA loaded in polyplex nanomicelles[J]. *J Control Release.* 2016, 235:268-275.

100. Zheng XY, Shao XY, Zhang C, Tan YZ, Liu QF, Wan X, et al. Intranasal H102 Peptide-Loaded Liposomes for Brain Delivery to Treat Alzheimer's Disease[J]. *Pharm Res.* 2015, 32(12):3837-49.
101. Dhaliwal HK, Fan Y, Kim J, Amiji MM. Intranasal Delivery and Transfection of mRNA Therapeutics in the Brain Using Cationic Liposomes[J]. *Mol Pharm.* 2021,17(6):1996-2005.
102. Gan LM, Lagerstrom-Fermer M, Carlsson LG, Arfvidsson C, Egnell AC, Rudvik A, et al. Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes[J]. *Nat Commun.* 2019,10(1):871.
103. Riley RS, Kashyap MV, Billingsley MM, White B, Alameh MG, Bose SK, et al. Ionizable lipid nanoparticles for in utero mRNA delivery[J]. *Sci Adv.* 2021, 7(3): eaba1028.
104. Choi HY, Lee TJ, Yang GM, Oh J, Won J, Han J, et al. Efficient mRNA delivery with graphene oxide-polyethylenimine for generation of footprint-free human induced pluripotent stem cells[J]. *J Control Release.* 2016, 235:222-235.

致谢

至此，我的毕业论文完成了，我要毕业了。四年前，我肯定想不到大学最后的日子是这样在疫情中收尾的，也想不到自己会成长为一名怎样的毕业生。相比于四年前作为大一新生的我，我相信我是长大了，而我的成长离不开以下我要感谢的老师、朋友和家人们。

衷心感谢唐翠教授和印春华教授给予我的指导和帮助。在他们的课堂上，我接触并学习到了感兴趣的方向和知识；在他们的实验室里，我有机会自己动手操作，完成课题；在论文的完成过程中，老师也细致地进行指导和修正；在未来的选择上，他们给了我很多有用的建议，帮助我顺利确定了发展方向和道路。在此，谨向我的师长们表达最真挚的谢意和祝福，祝他们工作顺利，家庭幸福，桃李满园！

衷心感谢实验室的师兄师姐对我的帮助。感谢柳恒青师姐在我不方便前往江湾实验室的时候热心地帮我换水、收样，还经常为我答疑解惑，她的温暖和善良深深感染到了我。还要感谢张佳琪师姐和钱进师兄对我负责的科创项目细致的指导和帮助，没有两位师兄师姐的帮助，我的项目无法顺利开展和结项。感谢屈宏飞师兄和石兮亮师兄，初来实验室时，是两位师兄热心地带着我学习基本设备和操作，并给了我很多关于保研和读研的建议。感谢林子云师兄对我的毕设项目的指导，帮助我顺利完成了前期的实验工作。感谢姜婷师姐、刘畅师姐、吕秋萍师姐、沈瑜师姐、胥露师姐、王珂师兄和李胜琦师兄的帮助。祝各位师兄师姐科研顺利，学业有成！

衷心感谢我的辅导员戴佳倩老师，她总是能在我迷茫或者遇到困难的时候给我及时的帮助和切实的建议。工作细致而负责的她，经常会让我感到安心，让我在遇到困境时能够得到帮助，让我在犹豫不决时获得鼓励，祝她一切顺利，平安健康！衷心感谢我的实验搭档和专业课友邓艳虹和徐雅菲同学。二位的陪伴为艰难课业学习增添了乐趣，让我在疲惫之余还能感受到科研实验的快乐和动力，虽然毕业之后我们三人走向了不同的方向，但我一直铭记那些携手并进的日子，带着这些鼓励和欢乐踏上新的征程，祝我们都不负韶华，前程似锦！

衷心感谢我的舍友邓艳虹、林太玥、展玉媛和黄可欣。四年来，你们的陪

伴和照顾，让我始终能感受到友谊的美好和温暖，让宿舍成为了家一般的存在，让我收获了真挚的友情，给我留下了最珍贵的回忆。不管是平日里的欢声笑语，还是数个一起挑灯备考的静谧的夜晚，抑或是共同解决彼此遇到的难题，分享难过的心事，持续到深夜的夜聊，都给我带来了无尽的温情和力量，让我能够快快乐乐地度过了大学四年的时光。祝她们今后还能收获美好的新友谊，在各自选择的人生方向上勇敢前进，拥有属于自己的璀璨人生！

衷心感谢我的家人们，他们一直无条件地支持我的每一个选择，是我永远的靠山。他们是我努力学习的动力，为了未来的幸福，我不会放弃前进和奋斗。他们也是我感到疲惫时的港湾，每当度过了一个辛苦的学期后，回到家总是能卸掉疲惫，安心地享受家庭的舒适和温暖，每当觉得难过或是劳累的时候，家总会是航程里的一座灯塔，告诉我前方有光，他们一直会在那里守着我。祝我的家人们都平安喜乐，万事顺遂！

衷心感谢我最贴心的朋友、最好的搭档、最合适的伴侣朱潇同学。因为他的陪伴、支持和照顾，我拥有了更健全的自我、更美好的生活、更坚定的目标和更强大的动力。他是创造我的快乐的人，也是与我分享快乐的人，他是我遇到困难时的坚强后盾，也是与我相互学习共同成长的伙伴。那些一起学习，一起运动，一起吃饭，一起出游的日子，构成了我本科四年里的黄金时光，是我一生的财富和力量。在此，祝他健康快乐，拥有光明的未来和圆满的人生！

最后，谨此向上述的各位致以最深切的谢意！也许我的谢意表达出来只是几段文字，但他们对我的帮助和影响，会一直伴随我走向更远更好的未来。

邹晨

2022 年 5 月 24 日

写于复旦大学南区公寓