

应用于 mRNA 疫苗的非病毒载体递送系统研究进展

苗佳颖, 陆伟*

(复旦大学药学院, 上海 201203)

[摘要] 核酸疫苗相较传统疫苗,能诱导更加全面、持久的免疫应答反应,且易于快速生产。其中,mRNA疫苗抗原设计精确,耐受性良好,免疫应答强烈,表达机制比DNA疫苗更为安全和简单,具有十分广泛的应用前景。然而,mRNA疫苗稳定性较差,且难以穿过细胞膜,设计能够保护mRNA疫苗并将其运送到靶细胞发挥作用的递送系统至关重要。综述目前应用于mRNA疫苗体内递送的脂质、聚合物、肽类及其他非病毒载体和(或)递送系统的特点及研究现状,并对其研究前景进行展望。

[关键词] mRNA疫苗;递送系统;非病毒载体;脂质;聚合物

[中图分类号] R944

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094(2022)02-0084-09

Research Progress of Non-viral Vector Delivery System for mRNA Vaccine

MIAO Jiaying, LU Wei

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Compared with traditional vaccines, nucleic acid vaccines can induce a more comprehensive and durable immune response, and are manufactured more quickly. Among them, mRNA vaccines can be precisely designed, with good tolerance and strong immune response. In comparison with DNA vaccines, the expression mechanism of mRNA vaccines is safer and simpler, showing great potential of broad application. However, since mRNA vaccines are unstable and can't easily penetrate cell membranes, it is critical to design delivery systems that can protect mRNA vaccines and deliver them to target cells. In this review, we highlight the features and research progress of lipids, polymers, peptides and other non-viral vectors and (or) delivery systems used for *in vivo* delivery of mRNA vaccines, and also give an outlook on the research prospect of mRNA vaccines.

[Key words] mRNA vaccine; delivery system; non-viral vector; lipid; polymer

疫苗能为接种后的个体建立较为持久的免疫保护,它彻底消灭了天花和牛瘟,有效控制了非典型性肺炎、禽流感等死亡率高、又无特效治疗药物的传染病,并逐渐成为肿瘤、代谢性疾病等慢性病最具潜力的防治手段。疫苗成本较低,适合大规模接种,为延长人类平均寿命做出了重大贡献^[1]。

传统疫苗包括减毒疫苗、灭活疫苗以及亚单位疫苗,这类疫苗维持了病原体的性状和病原体表面蛋白,能有效地诱导中和抗体产生,但存在毒力恢复或灭活不完全的潜在安全问题。随着疫苗研究的不断深入,通过DNA重组技术制成的基因工程疫苗以其易于取材的便捷性和进一步提升的安全性、

有效性而受到青睐,然而其相对较弱的免疫原性仍是一个有待解决的问题。近年来,合成工艺更为简单,诱导免疫反应更加持久的核酸疫苗逐渐成为研究热点。DNA疫苗、RNA疫苗属于此类疫苗,它们直接将编码某种抗原的外源基因导入体内,经细胞摄取、合成抗原后诱导免疫反应的产生。其中,信使RNA(mRNA)疫苗表达机制更为安全和简单,没有类似DNA疫苗整合到宿主基因组的危险,可以在生物体内自然降解,具有十分广泛的应用前景^[2]。

mRNA疫苗以线性质粒DNA(pDNA)或聚合酶链式反应(PCR)扩增的DNA为模板,通过体外转录合成,能够实现精确的抗原表达,在体内能建立良好的耐受性并引起强效的免疫反应。mRNA疫苗的生产无需动物基质或细胞培养,更加简单、快速、低成本^[3]。mRNA直接在细胞质中进行翻译而不进入细胞核,不会整合进宿主基因组。mRNA本身具有佐剂作用,可增强免疫应答反应。尤其是在新型

接受日期: 2021-09-22

项目资助: 国家自然科学基金(No. 81991493)

***通信作者:** 陆伟,教授,博士生导师;

研究方向: 药物递送载体设计;

Tel: 021-51980185; **E-mail:** wlu@fudan.edu.cn

冠状病毒肺炎 (COVID-19) 大流行的当今, mRNA 疫苗的研制周期比传统疫苗和基因工程疫苗更短, 且序列更易修改, 可以更好地应对随时可能变异的病毒株。目前, 多项关于新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的 mRNA 疫苗正在研发中。然而 mRNA 疫苗稳定性较差, 易被血清中的 RNA 水解酶降解, 或被单核-巨噬细胞系统吞噬而无法到达靶细胞发挥作用。mRNA 相对分子质量较大且带有负电荷, 难以通过磷脂双分子层结构穿过细胞膜。因此, 需要设计合适的递送系统, 以保证 mRNA 疫苗能顺利进入靶细胞, 并有效地释放到细胞质中进行翻译^[4]。

病毒载体递送 mRNA 存在固有的免疫原性风险, 有效荷载包装能力有限且生产较为困难。相比较之下, 非病毒载体能够有效保护负载的 mRNA 不受外部环境或核酸酶的影响, 其通常免疫原性较低, 安全性更高, 设计合成相对便捷且易于生产, 可重复给药, 是用于递送 mRNA 的理想载体。目前, 已有 110 项国内和 248 项国外的 mRNA 疫苗专利技术报道或公开。表 1 列出了目前已进入临床试验阶段的 mRNA 疫苗。本文将针对应用于 mRNA 疫苗的非病毒载体递送系统进行介绍。

表 1 临床试验阶段的 mRNA 疫苗

Table 1 mRNA vaccines under clinical trials

疫苗	递送系统	预防病毒/疾病	临床试验/上市	参考文献/试验号
BNT162b2(BioNTech)	脂质纳米粒	COVID-19	FDA EUA ^a	[5]
mRNA-1273(Moderna)	脂质纳米粒	COVID-19	FDA EUA	[6]
mRNA-1283/mRNA-1273	脂质纳米粒	COVID-19	I 期临床	NCT04813796
CVnCoV	脂质纳米粒	COVID-19	III 期临床	NCT04860258
LNP-nCoVsaRNA	脂质纳米粒	COVID-19	I 期临床	[7]
ARCoV	脂质纳米粒	COVID-19	I 期临床	[8]
ChulaCov19 mRNA	脂质纳米粒	COVID-19	I 期临床	NCT04566276
PTX-COVID19-B	ND ^b	COVID-19	I 期临床	NCT04765436
ChAdV68-S/SAM-LNP-S	脂质纳米粒	SARS-CoV-2	I 期临床	NCT04776317
BI 1361849	鱼精蛋白复合物	非小细胞肺癌	I/II 期临床	NCT03164772
W_ova1	脂质体	卵巢癌	I 期临床	NCT04163094
CV7201	ND	狂犬病	I 期临床	NCT02241135
CV7202	脂质纳米粒	狂犬病	I 期临床	NCT03713086
mRNA-1345	ND	呼吸道合胞病毒	I 期临床	NCT04528719
mRNA-1010	ND	季节性流感	I/II 期临床	NCT04956575
个性化癌症疫苗	ND	黑色素瘤	I/II 期临床	NCT03480152
mRNA-1893	ND	寨卡病毒	I 期临床	NCT04064905
mRNA-1325	ND	寨卡病毒	I 期临床	NCT03014089
mRNA-1647/mRNA-1443	ND	巨细胞病毒	I 期临床	NCT03382405
mRNA-1653	ND	人类偏肺病毒/人类副流感病毒	I 期临床	NCT04144348
H10N8/H7N9 疫苗	ND	H10N8/H7N9 流感病毒	I 期临床	NCT03345043
CV9103	ND	前列腺癌	I/II 期临床	NCT01915524

^aFDA EUA: 美国食品和药品管理局紧急使用授权; ^bND: 未公开

1 脂质载体

磷脂分子的头部亲水、尾部疏水, 其成分与细胞膜类似, 具有良好的生物相容性和可延展性。含有阳离子或可电离类脂材料的脂质混合物在水中或酸性环境中形成带正电荷的封闭囊泡, 可将带负电荷的 mRNA 分子包裹其中, 保护 mRNA 免受核酸酶降解, 且包封率较高。载有 mRNA 的脂质载体

被细胞摄取后, 进入细胞中酸性膜包裹的囊泡结构 (内体)。此时, 带正电荷的脂质与内体膜上带负电荷的磷脂结合, 这种结合扰乱了内体膜结构, 诱导膜融合和内体破坏, 从而导致被包载的 mRNA 逃逸进入细胞质, 进而到核糖体进行翻译^[9]。通过对脂质载体进行修饰, 还能增强其稳定性, 实现靶向递送。

1.1 阳离子脂质体

阳离子脂质体是应用最早的脂质载体。1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷 (DOTAP) 和二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 是脂质体中常含有的成分。由于阳离子脂质体存在一定的毒性且循环半衰期较短, 可能会与带负电荷的胞内或胞外成分非特异性结合, 通常要对其进行一定的修饰, 以提高 mRNA-脂质体复合物的稳定性, 减轻毒性并延长作用时间。

Zhang 等^[10] 利用具有跨膜结构和免疫佐剂功能的胆固醇修饰阳离子肽 DP7, 并对 DOTAP 脂质体进行修饰, 构建了 mRNA 递送系统 DOTAP/DP7-C。该系统能提高向树突状细胞 (DC) 递送编码个体化新抗原的 mRNA 的效率, 并能增强 DC 的活性, 具有载体和免疫佐剂的双重功能。在动物实验中, DOTAP/DP7-C/LL2 新抗原编码 mRNA 复合物经皮下注射能明显抑制小鼠荷 LL2 原位肿瘤和皮下肿瘤生长, 并刺激抗原特异性淋巴细胞反应的产生。Liu 等^[11] 用甘露糖修饰的脂质/磷酸钙 (LCP) 纳米粒将编码肿瘤相关抗原 *MUC1* 的 mRNA 递送至淋巴结 DC, 在三阴性乳腺癌 (TNBC) 原位模型中评估了携带 mRNA 的纳米粒免疫后的治疗效果。LCP 包含磷酸钙核心和由 DOTAP、胆固醇、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000) 与 DSPE-PEG-甘露糖组成的不对称脂质双层, mRNA 分子被浓缩并包裹在磷酸钙核心中。亚细胞分布表明, LCP 可以有效地转染淋巴结 DC, 并将负载的 mRNA 释放到细胞质中, 有利于所递送的编码 *MUC1* 的 mRNA 表达。体内研究表明, 该疫苗递送系统可以诱导出针对 4T1 TNBC 细胞的强烈的抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应。

通过结构设计和优化, 还能改善阳离子脂质体在 DC 中的抗原表达或实现靶向定位。Wang 等^[12] 以不同相对分子质量 PEG (PEG100、PEG1000 和 PEG2000) 为连接物, 合成甘露糖-胆固醇结合物 (MP_n -CHs), 用薄膜分散法制备成 DC 靶向脂质体 (MP_n -LPs), 并通过简单的自组装制备成携带 mRNA 的 MP_n -LPX。摄取研究表明, $MP1000$ -LPX 可以通过过度表达 DC 表面甘露糖受体 (CD206) 来增强 mRNA 的表达, 它具有体积小、近球形、

在血清中稳定性好、细胞毒性小等特点, 有望成为 mRNA 疫苗的 DC 靶向递送系统。

1.2 阳离子纳米乳

阳离子纳米乳 (CNE) 将纳米乳液与阳离子脂质结合使用, 具有保护和高效递送核酸的能力。Brito 等^[13] 制成了一种阳离子脂质 DOTAP 和乳剂佐剂 MF59 乳化而成的阳离子纳米乳, 由含有缓冲液和吐温 80 的水相与含有山梨醇酐三油酸酯 (Span 85)、DOTAP 和角鲨烯的油相混合而成。该 CNE 递送的自扩增 mRNA 通过招募免疫细胞增强了局部免疫, 在肌肉中实现与病毒载体相似的蛋白表达位置与表达量, 在多种动物模型中具有良好的耐受性和免疫原性。Bogers 等^[14] 用 CNE 向恒河猴递送编码 C 族包膜糖蛋白的自扩增 RNA 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 疫苗, 首次在非人类灵长类动物中证明了用 CNE 配制的自扩增 RNA HIV 疫苗是安全的, 且具有免疫原性, 可引起体液和细胞免疫反应。Samsa 等^[15] 使用 CNE 递送系统配制了 2 种委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) 自扩增 RNA 疫苗, 分别是携带 *TC-83* 的 RNA 基因组的 Vee SAM 减毒活疫苗 LAV-CNE 和递送缺少衣壳基因的 *TC-83* 基因组的不可逆减毒 Vee SAM 疫苗 IAV-CNE。实验结果证明, 用 LAV-CNE 免疫的小鼠可产生与 *TC-83* 相似的免疫反应, 可以 100% 保护气溶胶 VEEV 攻击。IAV-CNE 也具有免疫原性, 对 VEEV 攻击具有明显的保护作用, 为开发以 CNE 为载体递送 VEEV 等病毒的自扩增 RNA 疫苗提供了概念验证。Luisi 等^[16] 使用 CNE 制备的自放大 mRNA 递送平台开发寨卡病毒 (ZIKV) 候选疫苗, 所制备的疫苗在小鼠和非人类灵长类动物中均能诱导出针对 ZIKV 的中和抗体反应, 其中一种候选疫苗对非人类灵长类动物的 ZIKV 感染提供了完全保护。

1.3 脂质纳米粒

脂质纳米粒 (LNPs) 通常由可电离脂质、PEG 脂质、辅助脂质和胆固醇几个部分组成, 其结构如图 1 所示。带负电荷的 mRNA 与酸性 pH 下带正电荷的可电离脂质结合, 位于整个 LNPs 结构的核心。PEG 脂质位于 LNPs 结构的表面, 能够延长 LNPs 的循环半衰期, 增强粒子的稳定性。辅助脂质能够

支持脂质双层结构并促进粒子与细胞的结合。胆固醇则通常填充于脂质间隙, 起到稳定 LNP 结构的作用。包载 mRNA 的 LNP 进入人体的生理环境后, 可电离脂质变成接近中性。当 LNP 被内吞进入靶细胞体内后, 由于内体环境呈酸性, 可电离脂质重新带有正电荷, 可以与带负电荷的内体膜融合, 促进纳米粒的内体逃逸, 将粒子释放到细胞质中^[17]。最后, 可电离脂质在近中性的胞浆中释放 mRNA, 以利于其进一步到核糖体进行翻译(见图 2)。LNPs 与其他载体相比具有许多优势: 合成可控、组成成分容易调整以提高递送效率和降低毒性, 可以加入佐剂或免疫细胞靶向配体等免疫增强剂以调节免疫反应^[18]。

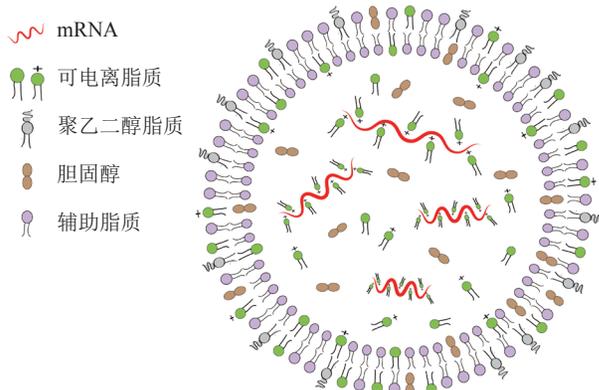


图 1 脂质纳米粒包载 mRNA 结构示意图

Figure 1 Schematic illustration of the structure of mRNA encapsulated LNP

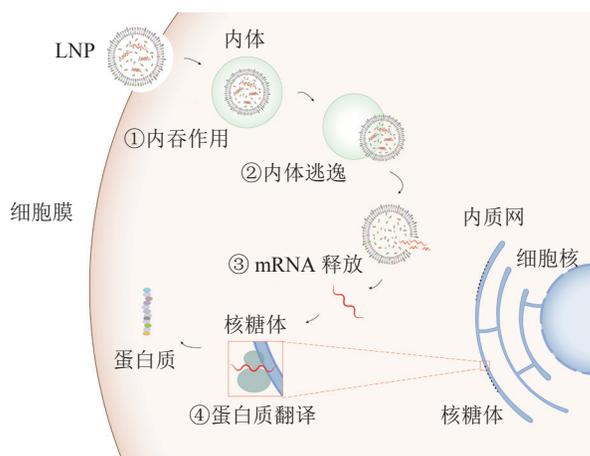


图 2 脂质纳米粒递送 mRNA 入胞及转染过程示意图

Figure 2 Schematic illustration of the endocytic pathway of mRNA delivered by LNP and the transfection process

Pardi 等^[19]将萤火虫荧光素酶 mRNA 结合到组

成为可电离脂质/磷脂酰胆碱/胆固醇/PEG 脂质物质的量比为 50:10:38.5:1.5 (mol/mol) 的 LNPs 中, 其中 mRNA 与总脂质质量比为小于 0.05 (wt/wt), 得到直径为小于 80 nm 的 mRNA-LNPs 复合物。将制备成的 mRNA-LNPs 以 $0.005\sim 0.250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量通过 6 种不同途径注射到小鼠中, 体内成像检测到了高水平的蛋白质翻译, 证明了 mRNA-LNPs 复合物可以在体内不同时间内产生大量蛋白质。Liang 等^[20]用可电离脂质/饱和磷脂/胆固醇/PEG 脂质/6, 9, 12-十八碳三稀酸 (GLA) 物质的量比为 50:9.83:38.5:1.5:0.17 (mol/mol) 的 LNPs 包裹了 2 种修饰的非复制型流感 H10 血凝素 (HA) mRNA 疫苗, 肌肉或皮内注射恒河猴后, 诱导了保护性的 HA 抑制滴度和 H10 特异性的 CD4⁺ T 细胞反应, 证明了 LNPs 递送的 mRNA 疫苗可以产生强有力的特异性免疫应答。

用于肿瘤免疫治疗的 mRNA 疫苗递送研究是肿瘤治疗领域的一个热点。Oberli 等^[21]报道了一种用于递送 mRNA 疫苗的 LNPs 制剂, 以诱导细胞毒性 CD8⁺ T 细胞反应。使用该疫苗对 DC、巨噬细胞和中性粒细胞进行了转染, 并在侵袭性 B16F10 黑色素瘤模型中测试了该疫苗的有效性。含有编码肿瘤相关抗原 *gp100* 和 *trp2* 的 mRNA 的 LNP 单次免疫后, 能够活化 CD8⁺ T 细胞, 诱导获得性免疫杀死黑色素瘤细胞, 延长了荷瘤小鼠的总体生存时间, 并且该疫苗加入佐剂脂多糖 (LPS) 可进一步增强免疫应答。

Miao 等^[22]开发了一个可电离类脂材料的组合库, 用以确定能促进体内 mRNA 传递并提供有效和特异性免疫激活的 mRNA 递送载体。通过三维多组分反应系统检测发现, 表现最好的脂类均具有共同的结构: 不饱和脂尾、二氢咪唑接头和环胺头基。这些制剂并非通过激活 Toll 样受体, 而是通过激活细胞内干扰素基因刺激物 (STING) 途径诱导抗原呈递细胞成熟, 从而导致系统细胞因子的有限表达和增强抗肿瘤效果。其中, 首选的制剂诱导了强大的免疫反应, 并能够抑制黑色素瘤和人乳头状瘤病毒 E7 肿瘤模型中的肿瘤生长和延长荷瘤小鼠生存期。

此外, LNPs 也被广泛应用于递送针对流感病毒、狂犬病病毒、HIV、巨细胞病毒 (CMV) 等的 mRNA 疫苗^[23]。Lutz 等^[18]通过实验证明, 单

次肌肉注射由 LNPs 递送的编码狂犬病病毒或流感病毒抗原的 mRNA 疫苗, 可以诱导保护性抗体滴度, 在长达 1 年的观察期间, 免疫反应可得到增强并保持稳定。Pardi 等^[24]用 LNPs 包裹编码 2013 年 ZIKV 爆发菌株的前膜和包膜糖蛋白的核苷修饰的 mRNA, 进行单次低剂量皮内免疫后, 在小鼠和非人灵长类动物中引发了有效和持久的中和抗体反应。其中, LNPs 的脂质组成为可电离脂质/磷脂酰胆碱/胆固醇/PEG 脂质, 其物质的量比为 50:10:38.5:1.5 (mol/mol), mRNA 与总脂的质量比为 0.05 (wt/wt)。注射剂量为 30 μg 时, 可在免疫后 2 周或 5 个月保护小鼠免受 ZIKV 攻击, 50 μg 的单次免疫则可在 5 周内保护非人类灵长类动物, 表明了核苷修饰的 mRNA-LNPs 能诱导快速持久的保护性免疫反应。

SARS-CoV-2 的出现使应用 mRNA 疫苗预防传染病成为了研究焦点, LNPs-mRNA 在其中得到迅速发展和广泛的应用。2 种获得了美国食品和药品管理局 (FDA) 紧急使用授权的新型冠状病毒肺炎 mRNA 疫苗均采用 LNPs 作为载体。其中, 辉瑞生物技术公司的 BNT162b2, 其 LNPs 载体成分包含胆固醇、2-PEG2000-N, N-二十四烷基乙酰胺、[(4-羟基丁基)氮杂二烷基]双(己烷-6, 1-二基)双(2-己基癸酸酯)、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)。Moderna 公司的 mRNA-1273, 其 LNPs 载体成分包含胆固醇、鞘磷脂-102 (SM-102)、二肉豆蔻酰甘油-PEG2000 和 DSPC。这 2 种疫苗在 III 期临床试验中的有效率分别高达 95% 和 94.5%, 体现了以 LNPs 为载体的 mRNA 疫苗的高效性和在预防感染性疾病中的巨大潜力^[25]。

2 聚合物

与阳离子脂质体类似, 带有正电荷的阳离子聚合物也可以与 mRNA 疫苗通过电荷相互作用形成复合物。相较于生产过程需要自组装、挤压和络合的阳离子脂质体, 阳离子聚合物仅需要与 mRNA 疫苗进行混合, 生产工艺较为简单, 具有结构可控, 功能多样的优点, 且稳定性更好^[25]。聚乙烯亚胺 (PEI) 是早期广泛用于 mRNA 疫苗递送的聚合

物, 常对其进行结构优化以提高转染效率。聚酰胺胺 (PAMAM)、聚丙烯亚胺 (PPI) 等树枝状大分子也被用于 mRNA 疫苗递送。然而, 聚合物递送系统的生物相容性、细胞毒性和生物降解性问题需要进一步解决, 以提高其安全性、有效性和体内稳定性。通过对这些阳离子聚合物进行修饰并靶向特定细胞, 可以减轻细胞毒性, 改善体内外释放性能。一些研究也采用聚乳酸 (PLA)、聚 β -氨基酯 (PBAE)、聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 等聚酯, 或壳聚糖和葡聚糖等天然聚合物衍生物, 以获得更好的生物降解性^[26-27]。

Karpenko 等^[28]以聚葡萄糖素-亚精胺结合物 (PGS) 作为载体, 递送编码 SARS-CoV-2 刺突蛋白受体结合域的 mRNA (mRNA-RBD), 免疫小鼠后产生了具有中和活性的特异性抗体。Chahal 等^[29]开发了一种树枝状大分子纳米颗粒疫苗载体用于递送含有编码抗原蛋白的 mRNA, 该疫苗可由多个表达抗原的复制子组成, 能够激发 CD8⁺ T 细胞和抗体反应, 对包括 H1N1 流感病毒、弓形虫和埃博拉病毒在内的致命性病原体产生保护性免疫。Li 等^[30]将环糊精 (CD) 与 PEI600 或 PEI2k 偶联, 制备了不同 CD/PEI 比的 CD-PEI 聚合物 (CP)。通过评估淋巴结迁移和免疫应答, 分析了 CP600、CP2k 和 PEI25k 作为鼻腔内 mRNA 疫苗载体的递送效果, 发现 CP2k/mRNA 体外转染效率较高, 向淋巴结迁移和刺激 DC 在体内成熟的能力比 PEI25k/mRNA 更强, 并能产生较强的体液免疫和细胞免疫应答, 且其局部和全身毒性低于 PEI25k/mRNA, 证明了 CD-PEI2k/mRNA 纳米复合物具有向淋巴结高效输送疫苗的潜力。

3 脂质/聚合物杂化纳米粒

脂质/聚合物杂化纳米粒 (LPHNs) 是由脂质壳和聚合物内芯组成的纳米结构, 对 mRNA 的转染效率高达 80%。装载 mRNA 疫苗的 LPHNs 可以通过细胞屏障, 并实现有效的内体释放和高效的蛋白质翻译, 具有稳定、持久、可生物降解等优点^[31]。Ayad 等^[32]用 DSPC/DOTAP 类脂膜 (15 mol/85 mol) 包裹聚乳酸 (PLA) 纳米粒, 用以递送 mRNA 疫苗, 在体外转染 HeLa 和 DC2.4 细胞的实验中获得了比单纯脂质体更高的转染效率, 说明在脂质膜内包裹固体

聚合物颗粒核心可以使载体与 mRNA 的结合更牢固, 使它们在递送过程中不容易丢失 mRNA。

Yasar 等^[33]制备并优化了 PLGA 包覆阳离子脂质 1, 2-双十八烯氧基-3-甲基铵丙烷的纳米粒子 (LPN), 通过实时细胞摄取和报告基因表达的实时细胞成像, 评价了与 mRNA 复合的该脂质-聚合物杂化系统转染 DC 的效率。与一种早期开发的基于聚合物的递送系统壳聚糖-PLGA 纳米粒进行比较, 当 2 种纳米粒的细胞摄取和毒性相当时, LPN 携带的 mRNA 蛋白质表达效率 (约 80%) 显著高于壳聚糖-PLGA 纳米粒 (仅为约 5%)。Siewert 等^[34]将不同比例的阳离子脂质 DOTAP 和鱼精蛋白组装起来, 制备成杂化纳米粒作为 mRNA 的载体。其中, 鱼精蛋白含有大量的阳离子 L-精氨酸, 能结合 mRNA 并保护其免受核酸酶降解, DOTAP 是用于 mRNA 细胞转染的脂质。与单独使用脂质/mRNA 和聚合物/mRNA 颗粒相比, 使用不同的组装路线、采用不同的 DOTAP/鱼精蛋白比例的杂化系统具有更高的转染率。通过荧光素酶活性测定法和小鼠体内生物发光显像法对制剂的结构特征和生物活性进行研究, 表明该制剂具有较高的生物活性。Le Moignic 等^[35]用 α -D-三吡喃甘露糖苷 (triMN) 修饰脂质-聚合物-RNA 复合物 (LPR), 将其在小鼠皮内注射 2 d 后, triMN-LPR 诱导了强烈的局部炎症反应, 随后在注射部位周围的引流淋巴结中募集和激活了 DC。编码 E7 抗原的 mRNA triMN-LPR 免疫小鼠后, 可检测到大量的 E7 特异性 T 细胞, 证明了 triMN-LPR 能引起有效的刺激性免疫反应。

4 细胞穿膜肽

用于核酸递送的多肽因包含赖氨酸和精氨酸残基而带正电荷, 称为阳离子细胞穿膜肽 (CPPs), 能与带负电荷的 mRNA 通过静电作用结合形成纳米复合物, 并有效被细胞摄取。该纳米复合物被细胞摄取的可能机制为 CPPs 促进细胞表面带负电荷的糖胺聚糖的聚集, 并触发微吞胞作用。CPPs 具有较低的电荷密度和优异的穿越细胞膜能力, 已被广泛用于递送药物、蛋白质、pDNA 和 siRNA, 在递送 mRNA 方面也有许多探索性研究被报道。但目前只

有少数多肽有效, 需要开发新的有效化合物以扩大肽递送系统的材料库^[36-37]。

Bell 等^[38]报道了截断鱼精蛋白与名为 Xentry 的短 CPP 融合后, 可以将编码报告基因的 mRNAs 转染到人类细胞中。Udhayakumar 等^[37]利用一种含有两性性 RALA 基序的细胞穿透肽将抗原编码 mRNA 递送至免疫细胞。RALA 一端带正电的精氨酸残基, 另一端带中性亮氨酸残基, 可以将 mRNA 浓缩成纳米复合物, 并显示酸性 pH 依赖的膜破坏特性。RALA-mRNA 纳米复合物可使 mRNA 从内体逃逸, 进而在 DC 胞浆内表达, 并可以促进体内抗原特异性 T 细胞增殖。RALA 介导的 mRNA 疫苗免疫原性高且易于生产, 其效力优于由阳离子脂质体 DOTAP 和融合脂质 DOPE 组成的 mRNA 制剂。缺乏 RALA 基序的富含精氨酸的多肽与 mRNA 复合能力减弱, 不具备体外转染 DC 和体内引起 T 细胞免疫的能力。Coolen 等^[39]用两性性阳离子肽 (RALA、LAH4 或 LAH4-L1) 与 mRNA 形成复合物, 并将该复合物吸附到聚乳酸纳米颗粒 (PLA-NPs) 上, 形成的 PLA-NP/阳离子肽/mRNA 纳米复合物可以通过吞噬作用和网格蛋白依赖性内吞作用被 DC 摄取, 并在体外诱导 DC 中目的蛋白的高表达。

5 新型载体材料

除上述载体外, 也有一些新型材料被用于 mRNA 疫苗递送研究, 如无机纳米材料、水凝胶、病毒样颗粒等。与传统材料相比, 这些新型材料在提升 mRNA 疫苗翻译的效率和强度、体内靶向定位、长效缓释等方面具有更大的优势。Zhang 等^[40]开发了一种基于介孔二氧化硅纳米粒的 mRNA (MSN-mRNA) 皮下给药系统。该系统由裸 mRNA 和咪唑-羟吡啶 RNA 激活蛋白激酶 (PKR) 抑制剂 C16 的皮下储库组成, 在体外和体内具有很强的促进 mRNA 翻译的能力。皮下注射 MSN-mRNA 可显著提高裸露 mRNA 在体内的翻译和表达动力学。将编码卵清蛋白和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的裸露 mRNA 和 C16@MSNs 组成的 MSN-mRNA 疫苗配方应用于小鼠 T 淋巴瘤 E.G7-OVA 模型, 可以产生很强的抑瘤作用。Yin 等^[41]报道了一种由氧化石

墨烯 (GO) 和 PEI 组成的可注射水凝胶, 用于包载编码模式抗原卵清蛋白的 mRNA (mOVA) 和佐剂 (R848)。该水凝胶不仅可以包裹和保护 mRNA 不被降解, 还具有淋巴结靶向能力。这种可转化水凝胶能显著增加抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的数量, 从而抑制肿瘤生长。同时, 该制剂可以在血清中产生抗原特异性抗体, 从而预防肿瘤转移的发生。凝胶中的 mOVA 在体内注射 30 d 后仍可检测到, 一次注射即可有效抑制肿瘤生长, 说明该水凝胶是一种长期缓释的 mRNA 疫苗递送系统。Li 等^[42] 用 MS2 噬菌体衣壳包装 mRNA 疫苗, 制备成了重组噬菌体 MS2 病毒样颗粒 (VLP), 用于前列腺癌 (PCA) 的免疫治疗。VLP 中包装的 mRNA 在被巨噬细胞吞噬 12 h 后即可翻译成蛋白质, 能够克服自身耐受性, 激活 DC, 诱导较强的体液和细胞免疫应答, 尤其是 CTL 反应, 可以在不上调 CD4⁺ 调节性 T 细胞的情况下平衡 I 型辅助性 T 细胞/II 型辅助性 T 细胞 (Th1/Th2) 应答, 可完全保护小鼠免受 PCA 的侵袭, 具有强大的肿瘤抑制作用。

6 传统载体材料的局限性

虽然已有许多研究报道用于 mRNA 疫苗递送的脂质、聚合物、肽类等载体, 但这些材料仍然存在一些问题和挑战。如一些阳离子脂质体或聚合物与 mRNA 的结合过于紧密, 导致 mRNA 释放困难。LNPs 中脂质的不饱和度、各组分的比例等需要更加精确的设计以提升递送效率。PEI 等聚合物大分子的结构复杂, 聚合度较难控制, 组成高分子链单元的相对分子质量和排列变异性大, 不同合成批次之间差异较大。一些聚合物在体内具有较大毒性。递送载体的稳定性和包封率也需要进一步提升。另一方面, 人和动物模型的免疫系统存在差异, 尽管有些材料在动物研究中能引起有效的免疫反应, 但这些材料能否在人体内获得与动物体内相同的免疫效果, 是否会出现新的毒副作用仍有待考察。

mRNA 疫苗递送要求以更全面的研究思路设计和开发新型递送载体材料和递送系统。要对载体介导的递送过程进行详细研究, 掌握规律, 设计和优化以增强内体逃逸, 提高转染效率为目的的新载体, 促进保护性免疫反应。掌握疫苗靶向递送机制和规律, 设计和优化载体表面修饰方法, 提高 mRNA 的靶向递送效率, 增强免疫效力, 减轻毒副作用。根据有效荷载的不同对 mRNA 和递送材料的组装进行优化, 以高度可控且可重复性的方式对组分进行装载。对比不同的递送技术平台, 为设计满足不同 mRNA 疫苗免疫需求的最佳递送载体以及预测体内免疫应答提供有价值的指导。最后, 需要在人体试验中综合评价给药途径、载药剂量、给药频率等以确定免疫反应的最佳参数, 并在保证疫苗效力的同时优化载体的安全性^[36]。

7 结语与展望

mRNA 疫苗是一种治疗和预防传染病、防治癌症的新型疫苗。mRNA 疫苗需要在载体的帮助下有效地发挥作用。mRNA 疫苗递送系统需要达到以下几个要求: 包埋效率高且能保护 mRNA 不被水解酶降解; 能将疫苗递送至靶细胞, 并高效地释放 mRNA 至细胞质进行翻译; 毒性小, 不使机体产生严重炎症反应或毒副作用。以脂质纳米粒为代表的非病毒载体递送系统, 可以有效负载 mRNA 并转染细胞, 表达特异性抗体, 激活机体免疫反应, 在应对 COVID-19 感染中显示出良好的临床效果。同时, 通过紧急授权使用后的临床结果也证实了以脂质纳米粒作为载体递送 mRNA 疫苗具有较高的安全性。但 mRNA 疫苗极其不稳定, 在室温下很快降解失效, 需要超低温保存, 储存条件苛刻。因此, mRNA 疫苗的长期储存和长距离运输的问题仍有待解决。总之, 研制能够靶向定位、稳定性强、毒性小、易于储存的新型非病毒载体, 是未来 mRNA 疫苗递送研究的目标, 同时也具有很好的临床转化的应用价值。

[参考文献]

- [1] Guo C, Manjili M H, Subject J R, *et al.* Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 119: 421-475. DOI: 10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1.
- [2] Tejeda-Mansir A, Garcia-Rendón A, Guerrero-Germán P. Plasmid-

- DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2019, 35(1): 46–68.
- [3] Alfagih I M, Aldosari B, AlQuadeib B, *et al.* Nanoparticles as adjuvants and nanodelivery systems for mRNA-based vaccines[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 13(1): 45. DOI: 10.3390/pharmaceutics13010045.
- [4] Maruggi G, Zhang C L, Li J W, *et al.* mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 757–772.
- [5] Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(27): 2603–2615.
- [6] Wang F, Kream R M, Stefano G B. An evidence based perspective on mRNA-SARS-CoV-2 vaccine development[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e924700. DOI: 10.12659/MSM.924700.
- [7] McKay P F, Hu K, Blakney A K, *et al.* Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3523. DOI: 10.1038/s41467-020-17409-9.
- [8] Zhang N N, Li X F, Deng Y Q, *et al.* A thermostable mRNA vaccine against COVID-19[J]. *Cell*, 2020, 182(5): 1271–1283.e16.
- [9] Schlich M, Palomba R, Costabile G, *et al.* Cytosolic delivery of nucleic acids: the case of ionizable lipid nanoparticles[J]. *Bioeng Transl Med*, 2021, 6(2): e10213. DOI: 10.1002/btm2.10213.
- [10] Zhang R, Tang L, Tian Y M, *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. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.08.023.
- [11] Liu L N, Wang Y H, Miao L, *et al.* Combination immunotherapy of MUC1 mRNA nano-vaccine and CTLA-4 blockade effectively inhibits growth of triple negative breast cancer[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(1): 45–55.
- [12] Wang F, Xiao W, Elbahnasawy M A, *et al.* Optimization of the linker length of mannose-cholesterol conjugates for enhanced mRNA delivery to dendritic cells by liposomes[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 980. DOI: 10.3389/fphar.2018.00980.
- [13] Brito L A, Chan M, Shaw C A, *et al.* A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(12): 2118–2129.
- [14] Bogers W M, Oostermeijer H, Mooij P, *et al.* Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(6): 947–955.
- [15] Samsa M M, Dupuy L C, Beard C W, *et al.* Self-amplifying RNA vaccines for venezuelan equine encephalitis virus induce robust protective immunogenicity in mice[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 850–865.
- [16] Luisi K, Morabito K M, Burgomaster K E, *et al.* Development of a potent Zika virus vaccine using self-amplifying messenger RNA[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(32): eaba5068. DOI: 10.1126/sciadv.aba5068.
- [17] Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: current perspectives[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 154/155: 37–63. DOI: 10.1016/j.addr.2020.06.002.
- [18] Lutz J, Lazzaro S, Habbedine M, *et al.* Unmodified mRNA in LNPs constitutes a competitive technology for prophylactic vaccines[J]. *NPJ Vaccines*, 2017, 2: 29. DOI: 10.1038/s41541-017-0032-6.
- [19] Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, *et al.* Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes[J]. *J Control Release*, 2015, 217: 345–351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.08.007.
- [20] Liang F, Lindgren G, Lin A, *et al.* Efficient targeting and activation of antigen presenting cells *in vivo* after modified mRNA vaccine administration in rhesus macaques[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(12): 2635–2647.
- [21] Oberli M A, Reichmuth A M, Dorkin J R, *et al.* Lipid nanoparticle assisted mRNA delivery for potent cancer immunotherapy[J]. *Nano Lett*, 2017, 17(3): 1326–1335.
- [22] Miao L, Li L X, Huang Y X, *et al.* Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(10): 1174–1185.
- [23] 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.
- [24] Pardi N, Hogan M J, Pelc R S, *et al.* Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination[J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 248–251.
- [25] Khurana A, Allawadhi P, Khurana I, *et al.* Role of nanotechnology behind the success of mRNA vaccines for COVID-19[J]. *Nano Today*, 2021, 38: 101142. DOI: 10.1016/j.nantod.2021.101142.
- [26] Kim J, Eygeris Y, Gupta M, *et al.* Self-assembled mRNA

- vaccines[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 170: 83–112. DOI: 10.1016/j.addr.2020.12.014.
- [27] Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 41. DOI: 10.1186/s12943-021-01335-5.
- [28] Karpenko L I, Rudometov A P, Sharabrin S V, *et al.* Delivery of mRNA vaccine against SARS-CoV-2 using a polyglucin: spermidine conjugate[J]. *Vaccines*, 2021, 9(2): 76. DOI: 10.3390/vaccines9020076.
- [29] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(29): e4133–e4142.
- [30] Li M, Li Y, Peng K, *et al.* Engineering intranasal mRNA vaccines to enhance lymph node trafficking and immune responses[J]. *Acta Biomater*, 2017, 64: 237–248. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.10.019.
- [31] Rahman M, Alharbi K S, Alruwaili N K, *et al.* Nucleic acid-loaded lipid-polymer nanohybrids as novel nanotherapeutics in anticancer therapy[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17(6): 805–816.
- [32] Ayad C, Libeau P, Lacroix-Gimon C, *et al.* LipoParticles: lipid-coated PLA nanoparticles enhanced *in vitro* mRNA transfection compared to liposomes[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3): 377. DOI: 10.3390/pharmaceutics13030377.
- [33] Yasar H, Biehl A, de Rossi C, *et al.* Kinetics of mRNA delivery and protein translation in dendritic cells using lipid-coated PLGA nanoparticles[J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 72. DOI: 10.1186/s12951-018-0401-y.
- [34] Siewert C D, Haas H, Cornet V, *et al.* Hybrid biopolymer and lipid nanoparticles with improved transfection efficacy for mRNA[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2034. DOI: 10.3390/cells9092034.
- [35] Le Moignic A, Malard V, Benvegna T, *et al.* Preclinical evaluation of mRNA trimannosylated lipopolyplexes as therapeutic cancer vaccines targeting dendritic cells[J]. *J Control Release*, 2018, 278: 110–121. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.03.035.
- [36] Ho W, Gao M, Li F, *et al.* Next-generation vaccines: nanoparticle-mediated DNA and mRNA delivery[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(8): e2001812. DOI: 10.1002/adhm.202001812.
- [37] Udhayakumar V K, de Beuckelaer A, McCaffrey J, *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. DOI: 10.1002/adhm.201601412.
- [38] Bell G D, Yang Y, Leung E, *et al.* mRNA transfection by a Xentry-protamine cell-penetrating peptide is enhanced by TLR antagonist E6446[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0201464. DOI: 10.1371/journal.pone.0201464.
- [39] Coolen A L, Lacroix C, Mercier-Gouy P, *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. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.12.019.
- [40] Zhang W, Liu Y, Min Chin J, *et al.* 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. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.03.011.
- [41] Yin Y, Li X, Ma H, *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.
- [42] Li J M, Sun Y L, Jia T T, *et al.* Messenger RNA vaccine based on recombinant MS2 virus-like particles against prostate cancer[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(7): 1683–1694.



【专家介绍】陆伟: 博士, 复旦大学药学院教授、博士生导师、国家海外高层次青年人才、“东方学者”特聘教授、上海市优秀青年学术带头人、全国优秀博士学位论文获得者。现任智能化递药教育部重点实验室副主任。担任《药学报》、*Acta Pharm Sin B*、*Asian J Pharm Sci* 等中英文杂志青年编委。

2005年毕业于复旦大学并获药剂学博士学位。2006—2009年, 在美国德克萨斯大学 M.D. 安德森癌症中心进行分子影像学博士后深造。2010—2015年担任美国罗德岛大学药学院助理教授, 2015年被破格晋升为副教授并获终身教职。自2010年独立开展研究以来, 从事药物递送载体设计研究, 主要研究方向包括: 1) 基于癌症诊疗一体化药物递送载体的设计; 2) 针对肿瘤和感染性疾病新型疫苗递送载体的设计及其递送机制研究; 3) 药物递送载体的体内药动学性质及其调控研究。

先后主持美国国立卫生院 (NIH) R01 研究项目、中国国家自然科学基金重大项目课题、国家重大研究计划培育项目、面上项目等; 参编中英文专著与教材 5 部。在 *Nat Commun*、*ACS Nano*、*Adv Funct Mater*、*Nano Lett*、*Biomaterials*、*J Control Release* 等国际知名刊物上发表 SCI 论文 60 余篇; 论文总被引 5 600 余次。授权中国专利 6 项。