

【综述】

基于脂质载体的 mRNA 疫苗递送系统研究进展

尚红涛, 冯旭晨, 许蓬娟, 王 阳, 付 慧*, 李英鹏*

天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 转录信使RNA (mRNA) 具有安全有效的蛋白质表达谱, 在遗传病新疗法、表达功能性蛋白和抗体、疫苗或基因编辑的开发上具有良好的应用前景。随着病原生物学与免疫学的发展, mRNA 疫苗凭借其高效性与稳定性而愈发被重视。目前, 有效的体内递送手段是 mRNA 疫苗所面临的较大挑战, 脂质载体的 mRNA 疫苗递送系统具有靶向性强、包封率高、细胞亲和性好的特点, 部分脂质载体能够使 mRNA 疫苗在体内以非侵入性的方式进行靶向递送。从 mRNA 疫苗递送的主要难点、脂质载体在 mRNA 疫苗递送中的研究现状以及针对新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的 mRNA 脂质载体疫苗开发进展, 共 3 个方面总结了目前基于脂质载体的 mRNA 疫苗递送系统研究进展, 并对未来的基因疫苗递送系统研究方向进行展望。

关键词: mRNA 疫苗; 脂质载体; 递药系统; 研究开发; 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2)

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2021) 04-0869-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.04.029

Research development of mRNA vaccine delivery system based on lipid carrier

SHANG Hongtao, FENG Xuchen, XU Pengjuan, WANG Yang, FU Hui, LI Yingpeng

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Transcriptional messenger RNA (mRNA) has a safe and effective protein expression profile and a good application prospect in the development of new treatment strategies for genetic diseases, expression of functional proteins and antibodies, vaccines or gene editing. With the development of pathogenic biology and immunology, mRNA vaccine has been paid more and more attention because of its high efficiency and stability. At present, the effective means of *in vivo* delivery is a great challenge for mRNA vaccines. The mRNA vaccine delivery system based on lipid carriers has the characteristics of strong targeting, high entrapment efficiency and good cellular affinity. Some lipid carriers can enable mRNA vaccines to be targeted in a non-invasive manner. This review summarized the research progress of mRNA vaccine delivery system based on lipid vector from three aspects: main challenge of mRNA vaccine delivery, research status of lipid carriers in mRNA vaccine delivery and development progress of mRNA lipid carrier vaccine against SARS-CoV-2, and looks forward to the research direction of gene vaccine delivery system in the future.

Key words: mRNA vaccine; lipid carrier; drug delivery system; research and development; SARS-CoV-2

传染病是造成人类过早死亡的重要原因之一, 在过去几个世纪, 天花、霍乱和流感等传染病的全球大流行威胁着全人类的健康安全。近年来, 新型流行性病毒感染阶段性出现, 包括寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV)、埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV)、严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 (severe acute

respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 等^[1]。疫苗的出现为预防及治疗传染性疾病带来了希望, 已经通过接种天花疫苗彻底消灭了天花病毒, 流感病毒和埃博拉病毒疫苗均已获批上市^[2-3]。目前被广泛研究

收稿日期: 2020-11-30

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (82074030); 天津市科技计划项目 (19JCTPJC57600); 2020 年度天津中医药大学研究生科研创新项目 (YJSKC-20201022)

第一作者: 尚红涛 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物制剂。E-mail: hongtaoshang1995@163.com

*通信作者: 付 慧 (1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中西医结合免疫。E-mail: fuh0050@tjutcm.edu.cn

李英鹏 (1987—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药制剂靶向递药系统。E-mail: liyingpeng@tjutcm.edu.cn

的传统疫苗有4种,灭活疫苗、病毒载体疫苗、重组蛋白疫苗和减毒活疫苗^[4]。但是传统疫苗存在研发周期长,制备困难和易引起二次感染的缺点,所以新型疫苗研发备受关注。最近,核酸疫苗的兴起,特别是针对转录信使RNA(mRNA)疫苗的深入研究让人们看到了未来疫苗的前进方向^[5]。

mRNA具有安全有效的蛋白质表达谱,在遗传病新疗法、表达功能性蛋白和抗体、疫苗或基因编辑的开发上具有良好的应用前景。mRNA疫苗是核酸疫苗中RNA疫苗的重要组成类别,递送过程中使其到达细胞质即可发挥作用,而同属核酸疫苗的DNA疫苗只有到达细胞核才能发挥疗效,所以mRNA疫苗预防及治疗效率更高。并且相较于传统疫苗,mRNA疫苗在安全性、有效性、以及能够快速大规模生产方面更具有优势^[6]。然而,基于mRNA疫苗的临床应用,由于其稳定性和传递效率低下而受到限制。近年来,脂质类材料及其衍生物因其优良的生物相容性以及其对mRNA较好的包封率而被广泛研究应用于mRNA疫苗的体内递送^[7]。

本文以“mRNA疫苗”递送问题为出发点,结合国内外学术界对全球突发新型冠状病毒肺炎的研究,对“脂质载体”递送mRNA疫苗的递药系统构建及研究进展进行了较为系统的综述,旨在使生物医学研究人员和临床工作人员更全面的了解脂质疫苗递送系统,以期在mRNA疫苗方面获得更大的成功。

1 mRNA疫苗递送的难点

mRNA作为新型治疗药物,在疫苗研究方面具有巨大的潜力。mRNA疫苗需要通过细胞外的“胞外屏障”和细胞内的“内体逃逸”及“胞内免疫”多重考验后到达细胞内靶部位,最终发挥功能^[8](图1)。因此,如何特异性地将mRNA递送进入靶细胞是目前面临的难题。

1.1 胞外屏障

首先,mRNA分子非常容易被酶降解,所以在全身给药时需要保护其不受胞外血清中的RNA水解酶(RNase)影响,从而保证mRNA可以顺利到达靶细胞。这就需要在递送mRNA时要将其包裹在密封载体内而避免被酶水解。其次,影响mRNA递送的另一个胞外屏障是单核吞噬系统(mononuclear phagocytic system, MPS),它可以系统地识别并消除外来的纳米颗粒(nanoparticles, NPs)。研究发现,参与吞噬过程的主要有肝和脾中的巨噬细胞,这就导致NPs在这两种组织中聚集,使得mRNA在其他

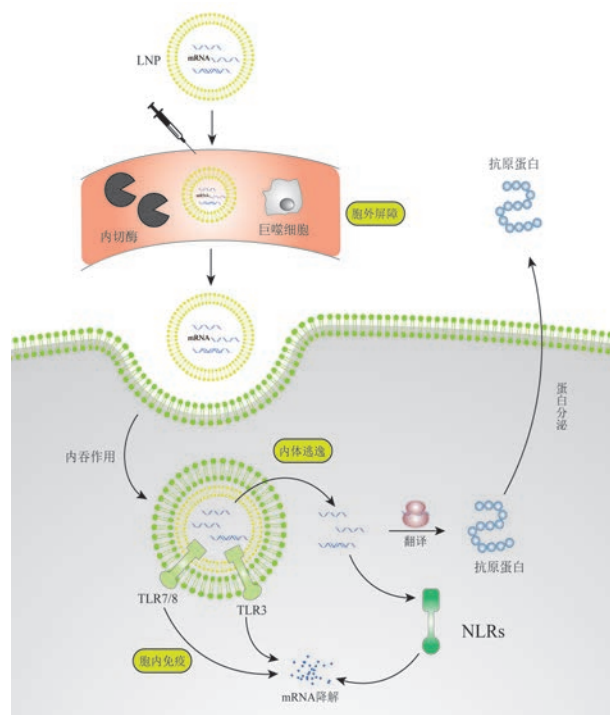


图1 mRNA疫苗递送面临的3个难点—胞外屏障、内体逃逸及胞内免疫

Fig. 1 Three challenges in mRNA vaccine delivery—extracellular barrier, endoplasmic escape and intracellular immunity

组织中的转染变得困难^[9]。

1.2 内体逃逸

当到达靶细胞时,携带mRNA的载体通过内吞的方式进入细胞质,这也是最常见的载体进入细胞内部的方式^[10]。内体逃逸是指mRNA需要从内体小泡中释放出来,进而跟宿主细胞核糖体结合被翻译成抗原蛋白,抗原蛋白经过修饰后被分泌出细胞从而发挥作用。在内体小泡中,mRNA能够被Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)检测到并被送去降解^[11],所以内体逃逸对于mRNA到达核糖体是至关重要的。

1.3 胞内免疫

当外来mRNA被递送到细胞质中时,能够被TLR3和TLR7/8识别,或者通过激活细胞质中的维甲酸诱导基因I样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)从而激活天然免疫系统^[12-13]。同时,外来的mRNA还可以通过激活TLRs诱导干扰素(IFN)- α 和IFN- β 等I型干扰素等促炎细胞因子的表达^[14-15]。所以,合成的mRNA疫苗可以通过激活不同的细胞因子来促进mRNA免疫后的细胞或者体液反应,从而作为良好的自佐剂。但是胞内免疫也会限制mRNA发挥作用,TLR家族中的模式识别受体(pattern

recognition receptors, PRRs)、RLRs 和 NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)能够特异性检测双链 mRNA(ssRNA)或者单链 mRNA(dsRNA),并且能够在它们转化为有治疗作用的蛋白质之前使其降解。

2 脂质载体在 mRNA 疫苗递送中的研究现状

传统的递送 mRNA 疫苗的手段有物理方法和病毒载体方法,电穿孔^[16]和基因枪^[17]是物理手段递送 mRNA 的经典方法,但是临床实验证明物理方法通常对细胞有害,不适合在体内应用^[18]。基于病毒载体递送 mRNA 的方式尽管已经应用于临床治疗,但是仍然存在安全性、稳定性以及有效性等诸多方面的问题,所以更加有效的传递系统亟待开发。脂质及其衍生物凭借其低免疫原性、生物相容性及对 mRNA 较高的包封率成为近年来备受关注的 mRNA 疫苗的新型递送系统。基于脂质载体的递送系统能够包裹 mRNA 分子,包封率较高,保护 mRNA 免受酶降解。另外脂质载体通常会含有对 mRNA 细胞内转运有利的重要的功能性脂质成分^[19]。这些脂质成分在生理环境下带有正电荷,通过静电作用将带有负电荷的 mRNA 分子包裹起来,并帮助整个载体系统与靶细胞的细胞膜相结合,从而起到递送 mRNA 的作用。不仅如此,在内体逃逸过程中,可电离的阳离子脂类与内体膜上的阴离子脂类相互作用,形成破坏性的非双层膜结构,最终将包裹的 mRNA 释放到细胞质中^[20]。目前用于递送 mRNA 疫苗的脂质载体分为 3 大类:脂质体、脂质纳米粒和脂质-聚合物纳米粒^[21-28],见表 1。组成脂质的材料包括 2-二油酰基羟丙基-3-*N,N,N*-三甲胺氯(DOTAP)、胆固醇(Chol)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG)、二油酰磷脂酰乙

醇胺(DOPE)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、聚-(β -氨基酯)聚合物(PBAE)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EDOPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-*N*-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](C14-PEG2000)。

2.1 脂质体

脂质体是当两亲性的磷脂分散于水相时,分子的疏水尾部倾向于聚集在一起,避开水相,而亲水性的头部暴露在水相,从而形成具有双分子层的封闭囊泡。近年来,关于利用脂质体递送 mRNA 疫苗的技术越来越成熟。DOTAP 是一种含有单不饱和脂肪酸的阳离子磷脂,制备成本相对较低,并且具有较高的 mRNA 递送效率,因此成为该领域被广泛研究的阳离子脂质载体^[29-30]。为了增强载体对 mRNA 的运载能力以及提高 mRNA 的稳定性,研究人员多数情况下会对脂质体进行一些修饰。Zohra 等^[31]用对核酸具有强亲和力的无机晶体-碳酸盐磷酸石修饰了基于 DOTAP 的脂质体载体,发现其转染率比对照组高 5~15 倍。Zhang 等^[32]研究制备了胆固醇修饰的阳离子肽 DP7,并且用它来修饰 DOTAP 脂质体进而制备出了具有双重功能的递送系统,该系统既可以作为 mRNA 的载体将 mRNA 有效地递送到不同的树突状细胞(dendritic cell, DC)中去,又可以作为免疫佐剂刺激 DC 成熟,证明该系统是一种非常有前景的 mRNA 疫苗的递送系统。

鱼精蛋白是一种存在于鱼类成熟精子细胞核中的碱性蛋白质,能够应用于将 mRNA 凝聚成纳米复合物,以提高 mRNA 稳定性和载体包封率。Mai 等^[21]利用鱼精蛋白修饰阳离子脂质体,制备了阳离子脂质体/鱼精蛋白复合物(LPC),体外摄取实验证明,LPC 在摄取 mRNA 疫苗方面显示出更高的效

表 1 mRNA 疫苗的基于脂质递送系统示例
Table 1 Example of lipid-based delivery system for mRNA vaccine

脂质组成	类型	疾病	mRNA 编码蛋白	给药途径
DOTAP ^[21]	脂质体	结肠癌	Survivin-T34A	腹腔注射
DOTAP/Chol/DSPE-PEG ^[22]	脂质体	肺癌	细胞角蛋白	鼻腔给药
DOTAP/DOPE ^[23]	脂质纳米粒	艾滋病	HIV-1 Gag 蛋白	皮下注射
DSPC ^[24]	脂质纳米粒	呼吸道合胞病毒	融合糖蛋白	肌肉注射
DOPE ^[25]	脂质纳米粒	血友病	人促红细胞生成素 凝血因子	静脉注射
C12-200 ^[26]	脂质纳米粒	—	荧光素酶	静脉注射
PBAE:EDOPC,DOPE DSPE-PEG ^[27]	脂质-聚合物纳米粒	—	卵清蛋白	静脉注射
PBAE:C14-PEG2000 ^[28]	脂质-聚合物纳米粒	—	荧光素酶	静脉注射

率,并且具有更强的刺激树突状细胞使之成熟的作用,从而诱导了有效的抗肿瘤免疫应答。在Lewis肺癌模型中,LPC携带编码细胞角蛋白19(cytokeratin 19)的mRNA通过鼻腔给药的方式,引起了强烈的细胞免疫反应并延缓了肿瘤的生长。Zhang等^[22]用鱼精蛋白对脂质体进行修饰,制备了鱼精蛋白脂质体(CLPP),用来携带编码Survivin-T34A基因的mRNA,形成了一种新型的核壳结构纳米粒制剂(CLPP/mSur-T34A),结果表明该制剂在体内外对各种C26结肠癌模型均有明显的治疗作用。

甘露糖也能作为脂质体的修饰材料对mRNA的递送起到一定的效果。Wang等^[33]以不同PEG单元为连接物,合成了甘露糖-胆固醇结合物(MPN-CHS),并将其制备树突状细胞靶向脂质体(MPN-LP),最终制备了携带mRNA的MPN-LPX(MPN-LPX)。体外转染DC实验表明,甘露糖衍生物的PEG长度对GFP编码mRNA的表达有显著影响,含有MP1000-CH的MP1000-LPX的转染效率最高(52.09±4.85)%。此外,MP1000-LPX对血清中mRNA的降解有保护作用,效果显著。

2.2 脂质纳米粒

越来越多的研究表明了各种脂质纳米粒(Lipid nanoparticles, LNP)在mRNA疫苗治疗中的潜力^[34-35]。LNPs由胆固醇(有助于稳定)、天然磷脂(支持脂质双层结构)、PEG衍生物(减少聚集和非特异性摄取)和可电离脂质(复合带负电mRNA、增强内体逃逸)组成。Oberli等^[36]报道了一种脂质纳米颗粒制剂,该制剂用于运送mRNA疫苗,以诱导细胞毒性CD8⁺T细胞反应。用含有编码肿瘤相关抗原gp100和trp2的mRNA的脂质纳米粒治疗B16F10黑色素瘤,导致肿瘤缩小,并延长了治疗小鼠的总生存期。显示出该脂质纳米粒是一种有希望的mRNA疫苗载体,能够诱导强烈的细胞毒性T细胞反应。Kauffman等^[37]采用脂质纳米颗粒来载送mRNA并通过处方优化,改变了可电离脂质与mRNA的配比,使得促红细胞生成素mRNA的负载效力提高了7倍。Richner等^[38]设计并测试了一种改良的基于mRNA的ZIKV疫苗。采用源自递送小干扰RNA(siRNA)的改进技术将该疫苗组装成了脂质纳米粒(LNP),并评估该疫苗在免疫低下的AG129小鼠和免疫活性C57BL/6小鼠中的效果。结果显示,经肌肉注射10 μg LNP的动物第21天加强免疫后血清中和抗体水平较高,并且接种ZIKV

疫苗42 d后,在没有体质量减轻的情况下小鼠100%存活。

2.3 脂质-聚合物杂化纳米粒

脂质-聚合物杂化纳米粒(lipid-polymer hybrid nanoparticles, LPNs)是包含聚合物内芯和脂质壳的纳米粒子结构,在物理稳定性和生物相容性方面具有聚合物纳米粒子和脂质纳米粒的互补特性。值得注意的是,与脂质纳米粒和脂质体相比,LPNs最近已被证明具有优越的体内细胞传递功效。研究证明,无论在体内还是体外,脂质-聚合物杂化纳米粒都能有效的递送siRNA^[39]。Jansen等^[40]设计了一种脂质-聚合物杂化纳米粒,由脂质和聚乳酸-羟基乙酸组成,成功负载了针对肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)的治疗性siRNA。最近的研究表明,脂质-聚合物纳米粒也能有效地递送mRNA。Su等^[41]用磷脂双分子层包裹聚β氨基脂(PBAE),然后通过静电作用将mRNA加载到该纳米颗粒表面,通过鼻腔黏膜给药方式传递mRNA疫苗。因为PBAE固有的pH响应性能够促进内溶酶体的破坏,所以被选为聚合物核心。脂质的作用是赋予PBAE核心的生物相容性,并介导mRNA的吸附。体外实验结果表明,LPN/mRNA复合物很容易被树突状细胞所摄取,并能够将mRNA传递到树突状细胞的细胞质中,以使毒性最小化。另外Ball等^[42]考察了mRNA和siRNA的共传递,他们将mRNA和siRNA共同融合在1个由可电离脂类、胆固醇和聚乙二醇等修饰的脂质组成的聚合物中,结果显示,同1个LPN中的siRNA和mRNA无论在体内还是体外都增强了药物的疗效。

3 针对新型冠状病毒的mRNA脂质载体疫苗开发

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎疫情席卷全球。据世界卫生组织统计,截止到2020年11月27日,全世界累计确诊病例已超6 000万人^[43],但是由于流行范围广、潜伏周期长和缺乏有效的治疗药物,确诊人数以及死亡人数仍在不断上涨。SARS-CoV-2的基因序列公布之后,用于预防和治疗的相关疫苗就开始投入研发。mRNA疫苗作为第三代疫苗,由于其良好的应用前景引起了疫苗研发人员的广泛关注,2020年3月,Moderna公司的mRNA-1273疫苗从研究到进入I期临床试验只用了42 d,目前也有更多的关于SARS-CoV-2的mRNA疫苗正在研发当中,这就充分证明了mRNA疫苗在传染性病毒方面的潜力^[44-45]。而脂质及其衍生物作为mRNA疫苗的效果较好的载体,自然也得

到了研究人员的青睐。

目前,大多数新型冠状病毒 mRNA 疫苗依然处于临床前阶段。Laczkó 等^[45]在小鼠身上评估 2 种基于脂质载体的核苷修饰的 mRNA 疫苗候选疫苗,一种编码缺失 Furi 裂解位点的全长 S 蛋白,另一种编码 S 蛋白受体结合域。在肌肉注射单次给药后,这两种基因疫苗都能在脾和肺中诱导出强大的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞反应,证明基于脂质载体的 mRNA 疫苗的确能够发挥作用。Zhang 等^[46]开发了一种脂质纳米粒包裹的热稳定的 mRNA 疫苗(ARCoV),并已经进入了 I 期临床试验评估。该纳米粒平均直径为 88 nm,对 mRNA 的包封率超过 95%,后期实验证明,两种不同剂量的 ARCoV 疫苗免疫小鼠都能诱导出高水平的抗体,并具有广泛的中和能力,并且成功诱导了 Th1 偏向的 SARS 冠状病毒特异性细胞免疫应答。

截止到 2020 年 11 月,已经有基于脂质的 mRNA 新冠病毒疫苗进入临床试验。Sahin 等^[47]报道了一种脂质纳米颗粒配方的核苷修饰的 mRNA 疫苗 BNT162B1 的安全性、耐受性和抗体反应的相关数据。60 名年纪在 20~56 岁的受试者接受了 2 次接种,结果证明没有发生任何的严重不良反应,并且参与者表现出强烈的、剂量相关的疫苗诱导的抗体反应。在 42 名接受强化免疫的受试者中,有 40 人获得了特异性的 CD4⁺T 细胞应答。相似的数据也被 Mulligan 等^[48]的报道所证实。这些实验数据证明脂质材料能够成为新冠肺炎有效疫苗的良好载体。

4 结语

本文主要介绍了脂质类材料在递送 mRNA 疫苗方面的应用。首先,从 mRNA 疫苗在人体内递送所面临的难点入手,系统性阐述了 mRNA 疫苗在进入人体后如何透过细胞膜进入细胞质,最终发挥作用的过程;其次,分别介绍了脂质体、脂质纳米粒和脂质-聚合物杂化纳米粒在递送 mRNA 疫苗方面的研究进展;最后,结合 2020 年突发新型冠状病毒肺炎,针对该病毒进行的以脂质材料为载体的 mRNA 疫苗的研究进展做了简单总结。

mRNA 疫苗较传统疫苗安全性高,并且具有合成任意一种蛋白的可能性,所以 mRNA 疫苗针对现在新型的病毒性传染病以及癌症都可能具有良好的治疗效果。但是 mRNA 自身稳定性较差,在体内递送时会被人体内酶所降解,导致其研究进展缓慢。随着载体技术的研究不断成熟,新型载体被用

来递送 mRNA 以提高疫苗稳定性。脂质类材料作为一种优良的 mRNA 疫苗载体,能够与 mRNA 通过静电作用结合,并且能够保护 mRNA 在体内不被降解,并且最终将 mRNA 递送到细胞质中使之发挥作用。但是迄今为止依然没有一种完全成熟的 mRNA 疫苗被大众所接受。虽然大部分临床前研究证实 mRNA 疫苗确实能够引起免疫应答,但是 mRNA 疫苗的安全性一直是研究人员所关注的重点。一方面体外引入的 mRNA 疫苗有可能引起 I 型干扰素反应,从而引起炎症,甚至会影响自身的免疫系统^[49];另一方面,对于 mRNA 疫苗载体潜在的毒性,也会导致疫苗安全性问题^[50]。所以,在 mRNA 疫苗开展大规模的临床研究之前,一定要进行严格的安全性评价。目前 mRNA 疫苗主要面临的问题是:(1)如何合理构建 mRNA,使其在体内能够稳定发挥疗效,并且不会影响正常的生理环境;(2)如何构建安全无毒的疫苗递送载体,以提高疫苗的安全性。

总之,脂质类材料作为体内可降解、生物相容性好的仿生材料,在递送药物方面有着巨大潜力,有望成为 mRNA 疫苗的优选递送载体。展望未来,期待尽早开发出不同冠状病毒的通用疫苗,以便应对可能会出现的其他病毒引起的公共卫生事件,也期望新型脂质载体的研发可以提高疫苗的安全性及疗效,从而更好地保障人类健康。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siddharta A, Pfaender S, Vielle N J, et al. Virucidal activity of World Health Organization-recommended formulations against enveloped viruses, including Zika, Ebola, and emerging coronaviruses [J]. J Infect Dis, 2017, 215(6): 902-906.
- [2] 姚伟, 苏波, 沈吉友, 等. 四价流感病毒裂解疫苗安全性及免疫原性研究 [J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(4): 1-6.
Yao W, Su B, Shen J Y, et al. Safety and Immunogenicity of quadrivalent influenza vaccine [J]. Prog Microbiol Immunol, 2018, 46(4): 1-6.
- [3] Regules J A, Beigel J H, Paolino K M, et al. A recombinant vesicular stomatitis virus Ebola vaccine [J]. N Engl J Med, 2017, 376(4): 330-341.
- [4] 康庄, 唐梅. 新型冠状病毒疫苗的研发进展及分析 [J]. 生物医学工程学杂志, 2020, 37(3): 373-379.
Kang Z, Tang M. Progress and analysis on the development of 2019-nCoV vaccine [J]. J Biomed Eng,

- 2020, 37(03): 373-379.
- [5] 刘昌孝, 伊秀林, 崔涛, 等. 新型冠状病毒疫苗研发与评价 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1421-1432.
Liu C X, Yi X L, Cui T, et al. Research development and evaluation of SARS-CoV-2 vaccines [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(7): 1421-1432.
- [6] 宋全伟, 王华庆. 不同技术路线研发新型冠状病毒疫苗的特性和研究进展 [J]. 中华医学杂志, 2020, 100(38): 3030-3040.
Song Q W, Wang H Q. Characteristics and research progress of novel coronavirus vaccine developed by different technical routes [J]. Natl Med J China, 2020, 100(38): 3030-3040.
- [7] Landesman-Milo D, Peer D. Toxicity profiling of several common RNAi-based nanomedicines: a comparative study [J]. Drug Deliv Transl Res, 2014, 4(1): 96-103.
- [8] Nakamura T, Ono K, Suzuki Y, et al. Octaarginine-modified liposomes enhance cross-presentation by promoting the C-terminal trimming of antigen peptide [J]. Mol Pharm, 2014, 11(8): 2787-2795.
- [9] Yong S B, Song Y, Kim H J, et al. Mononuclear phagocytes as a target, not a barrier, for drug delivery [J]. J Control Release, 2017, 259: 53-61.
- [10] Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale [J]. Chem Soc Rev, 2012, 41(7): 2718-2739.
- [11] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs [J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(10): 759-780.
- [12] Agier J, Żelechowska P, Kozłowska E, et al. Expression of surface and intracellular Toll-like receptors by mature mast cells [J]. Cent Eur J Immunol, 2016, 41(4): 333-338.
- [13] Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells [J]. J Immunol, 2003, 171(6): 3154-3162.
- [14] Anderson B R, Muramatsu H, Nallagatla S R, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(17): 5884-5892.
- [15] Kormann M S D, Hasenpusch G, Aneja M K, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 154-157.
- [16] Gerer K F, Hoyer S, Dörrie J, et al. Electroporation of mRNA as universal technology platform to transfect a variety of primary cells with antigens and functional proteins [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1499: 165-178.
- [17] Frelin L, Ahlén G, Alheim M, et al. Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene [J]. Gene Ther, 2004, 11(6): 522-533.
- [18] Derdelinckx J, Mansilla M J, De Laere M, et al. Clinical and immunological control of experimental autoimmune encephalomyelitis by tolerogenic dendritic cells loaded with MOG-encoding mRNA [J]. J Neuroinflamm, 2019, 16(1): 167.
- [19] Midoux P, Pichon C. Lipid-based mRNA vaccine delivery systems [J]. Expert Rev Vaccines, 2015, 14(2): 221-234.
- [20] Selby L I, Cortez-Jugo C M, Such G K, et al. Nanoscopy: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2017, 9(5): e1452.
- [21] Mai Y, Guo J, Zhao Y, et al. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity [J]. Cell Immunol, 2020, 354: 104143.
- [22] Zhang X, Men K, Zhang Y, et al. Local and systemic delivery of mRNA encoding survivin-T34A by lipoplex for efficient colon cancer gene therapy [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 2733-2751.
- [23] Pollard C, Rejman J, De Haes W, et al. Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines [J]. Mol Ther, 2013, 21(1): 251-259.
- [24] Geall A J, Verma A, Otten G R, et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(36): 14604-14609.
- [25] DeRosa F, Guild B, Karve S, et al. Therapeutic efficacy in a hemophilia B model using a biosynthetic mRNA liver depot system [J]. Gene Ther, 2016, 23(10): 699-707.
- [26] Kauffman K J, Mir F F, Jhunjhunwala S, et al. Efficacy and immunogenicity of unmodified and pseudouridine-modified mRNA delivered systemically with lipid nanoparticles *in vivo* [J]. Biomaterials, 2016, 109: 78-87.
- [27] Persano S, Guevara M L, Li Z, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination [J]. Biomaterials, 2017, 125: 81-89.
- [28] Kaczmarek J C, Patel A K, Kauffman K J, et al. Polymer-lipid nanoparticles for systemic delivery of mRNA to the lungs [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2016, 55(44): 13808-13812.
- [29] Zohra F T, Chowdhury E H, Akaike T. High performance mRNA transfection through carbonate apatite-cationic liposome conjugates [J]. Biomaterials, 2009, 30(23/24): 4006-4013.
- [30] 喻刚, 郝鹏亮, 韩锡鑫, 等. 阳离子脂质体DOTAP作为乙肝疫苗佐剂的免疫增强效果 [J]. 中国生物制品学杂志

- 志, 2016, 29(10): 1017-1020, 1026.
- Yu G, Hao P L, Han X J, et al. Immunopotential of cationic liposome DOTAP as an adjuvant of hepatitis B vaccine [J]. Chin J Biologicals, 2016, 29(10): 1017-1020, 1026.
- [31] Zohra F T, Chowdhury E H, Nagaoka M, et al. Drastic effect of nanoapatite particles on liposome-mediated mRNA delivery to mammalian cells [J]. Anal Biochem, 2005, 345(1): 164-166.
- [32] Zhang R, Tang L, Tian Y, et al. DP7-C-modified liposomes enhance immune responses and the antitumor effect of a neoantigen-based mRNA vaccine [J]. J Control Rel, 2020, 328: 210-221.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Richner J M, Himansu S, Dowd K A, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection [J]. Cell, 2017, 169(1): 176.
- [36] 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.
- [37] Kauffman K J, Dorkin J R, Yang J H, 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): 7300-7306.
- [38] Richner J M, Himansu S, Dowd K A, et al. Modified mRNA Vaccines protect against Zika virus infection [J]. Cell, 2017, 169(1): 176.
- [39] Thanki K, Zeng X, Foged C. Preparation, characterization, and *in vitro* evaluation of lipidoid-polymer hybrid nanoparticles for siRNA delivery to the cytosol [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1943: 141-152.
- [40] Jansen M A A, Klausen L H, Thanki K, et al. Lipidoid-polymer hybrid nanoparticles loaded with TNF siRNA suppress inflammation after intra-articular administration in a murine experimental arthritis model [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2019, 142: 38-48.
- [41] Su X, Fricke J, Kavanagh D G, et al. *In vitro* and *in vivo* mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles [J]. Mol Pharm, 2011, 8(3): 774-787.
- [42] Ball R L, Hajj K A, Vizelman J, et al. Lipid Nanoparticle formulations for enhanced co-delivery of siRNA and mRNA [J]. Nano Lett, 2018, 18(6): 3814-3822.
- [43] World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [EB/OL]. 2020-11-27. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [44] Ahammad I, Lira S S. Designing a novel mRNA vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 162: 820-837.
- [45] Laczkó D, Hogan M J, Toulmin S A, et al. A Single immunization with nucleoside-modified mRNA vaccines elicits strong cellular and humoral immune responses against SARS-CoV-2 in mice [J]. Immunity, 2020, 53(4): 724-732.
- [46] 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.
- [47] Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses [J]. Nature, 2020, 586(7830): 594-599.
- [48] Mulligan M J, Lyke K E, Kitchin N, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults [J]. Nature, 2020, 586(7830): 589-593.
- [49] Weiss R, Scheiblhofer S, Thalhamer J. Allergens are not pathogens: why immunization against allergy differs from vaccination against infectious diseases [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(3): 703-707.
- [50] 吴爽, 王寅, 尹华静, 等. 基于平台技术的mRNA疫苗非临床评价的考虑[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(10): 1214-1216.
- Wu S, Wang Y, Yin H J, et al. Consideration of non-clinical evaluation of mRNA vaccine based on platform technology [J]. Chin J Biol, 2020, 33(10): 1214-1216.

[责任编辑 李红珠]