



基于信使核糖核酸 (mRNA) 治疗 ——过去、现在和未来

余坚

Bayer Health Care

基于信使核糖核酸 (mRNA) 治疗——过去

信使核糖核酸 (mRNA) 是一种单链分子，负责从脱氧核糖核酸 (DNA) 转移遗传信息到核糖体。核糖体再将遗传信息解码并合成蛋白质。而这里将要讨论的 mRNA 疗法是指使用基于 mRNA 研发治疗或预防疾病的药物 (mRNA-based therapy)。

最近几年，体外转录 (*in vitro* transcription, IVT) mRNA 的技术手段逐渐引起了研究机构的科学家和生物医药公司研发部门的兴趣和关注。生物医药公司采用基于 mRNA 的技术平台，研发出具有针对性的药物传递方式，使药物更加精确和个性化。并且在基因工程的协同下，科研人员可以利用合成的 mRNA 来表达特定的蛋白质。由于合成的 mRNA 在结构上类似于天然 mRNA，使患者能够在他们自己的身体中产生治疗性蛋白质，而且减少在重组蛋白的复杂制造过程产生的各种困扰。基于 mRNA 的疗法的多样性，新药研发者使用合成 mRNA 作为疾病治疗工具，在研发癌症治疗的免疫疗法、干细胞治疗以及控制传染病上取得进展，特别是在这次新冠病毒大流行期间，基于 mRNA 技术在疫苗研发上有着明显的优势。

在上个世纪六十年代，细胞分子生物学取得巨

大发展。信使核糖核酸的发现 (1961 年)，与 RNA 相关的复制酶 (replicase) 和逆转录酶 (reverse transcriptase) 的相继发现 (1962 年, 1970 年)，以及 RNA 剪接和催化核酶的发现和运用 (1977 年, 1982 年) 直接或间接地推动基于 mRNA 的新药研发。经过三十多年科学持续进步，基于 RNA 的药物才在动物体上进行试验，首先 Wolff 等人于 1990 年完成了使用 mRNA 分子作为治疗用途的研究工作，这是公认的最早的运用。在这项研究中，IVT mRNA 被直接注射到小鼠的骨骼肌后直接表达了编码蛋白。文章指出由于 RNA 和组织可以重复获取，因此基于 RNA 的治疗可将确定的逆转疾病的遗传信息 (reversible type of gene transfer) 的转移进入患者的细胞，以预防或治疗特定疾病^[1]。随后，一系列里程碑般地实验展露基于 RNA 治疗的潜力，包括注射流感 mRNA 诱导小鼠的免疫反应 (1993 年)，注射 mRNA 疫苗用于小鼠的抗癌研究 (1995 年)，利用改造 RNA 用于抑制小鼠的丙型肝炎病毒 (2002 年) 等一系列突破性研究，这些研究的方法和成果完善了基于 mRNA 治疗在不同领域的发展。

基于脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticles, LNP) 载体技术的提升也极大地促进基于 mRNA 治疗的发展。LNP 是新兴药物载体，它的应用也已扩展到其他领域的创新和发展，如医学影像等领域。最早从理念到临床应用的纳米药物递送平台的 LNP 应该是

DOI: 10.14218/MRP.2023.004S

通讯作者：余坚 Email: jianyu39@gmail.com

脂质体 (Liposome)。因为脂质体可以运输疏水性或亲水性分子, 包括小分子、蛋白质和核酸, 因此成为一种用途极为广泛的载体平台。在抗肿瘤药物的研发中, 脂质体减少了携带药物的副作用并提高了患者的耐受性, 但在很大程度上并未改善患者存活率。在 1990 年代初, 随着纳米科学和纳米技术的发展, LNP 逐渐开始运用。总体上, 脂质纳米颗粒和脂质体有着相似的设计, 两者都是脂质纳米制剂和药物输送载体, 它们都可以保护药物免受人体免疫系统的破坏, 模仿生物膜并让药物有更多时间到达预定靶子。其次, 它们都具有帮助溶解高度亲脂性分子或调节药物的药理特性, 从而最大限度地减少药物导致的副作用, 从而提高药物安全性。LNP 和脂质体在组成和功能上略有不同, 它的运用更加多样化。

在过去的二十年里, 基于 mRNA 的技术开发针对癌症的治疗逐渐被重视并得以充分地发展。经过不断优化, 基于 mRNA 技术在癌症、罕见病、遗传病和传染病的研究中取得令人瞩目的进展。2018 年 8 月, 首款基于小核酸 (siRNA, small interfering RNA-based) 药物 Patisiran 获得美国 FDA 的批准, 用于治疗遗传性转甲状腺素淀粉样变性 (hATTR) 导致多发性神经疾患 (poly neuropathy due to hereditary transthyretin amyloidosis)。这是基于 RNA 治疗具有里程碑意义的上市批准。siRNA 是指小段双链 RNA, 它们可以分成单链并与其预定目标的 mRNA 结合, 使预定目标的 mRNA 断裂和降解, 因此也被称为 RNA 干扰 (RNAi) 治疗。Patisiran 就是一种 siRNA, 配制成 LNP, 然后和载脂蛋白 E(APOE) 受体结合, 并被肝细胞吸收, 通过干扰 RNA 进一步切割和分解控制转甲状腺素蛋白的 mRNA, 从而减少循环中转甲状腺素蛋白的产生及其在组织和器官中的沉积。在 ATTR 淀粉样变性患者中, 错乱重叠的转甲状腺素蛋白在体内的多种组织堆积, 如外周神经和心脏, 造成器官和组织的损伤, 导致神经病变和心肌病。至今, 除了 Patisiran, 还有其他三种 RNAi 药物在美国批准上市用于治疗某种罕见疾病, 如急性肝卟啉症 (AHP), 原发性 1 型高草酸尿症 (PH1)

和家族性高胆固醇血症 (HeFH) 或临床动脉粥样硬化性心血管疾病 (ASCVD)。

在过去几年中, 基于 mRNA 的治疗在传染病领域里取得靓丽的成绩, 包括利用核苷修饰的 mRNA 用于针对人类免疫缺陷病毒 (HIV)、巨细胞病毒 (CMV)、人乳头瘤病毒 (HPV) 等感染的免疫治疗。

在此期间, 基于 mRNA 治疗的体外转录 mRNA 方法也逐渐成熟。目前常用且稳定的方法有两种。一种是将 mRNA 离体转移到患者的细胞中, 然后将这些细胞回输给患者, 这种方法普遍用于基因组工程、基因重编程、或基于细胞 (T 细胞和树突细胞) 的免疫细胞抗癌的研究中。另一种方法是直接递送体外转录 mRNA, 用于在治疗肿瘤和传染病、过敏耐受和其他蛋白质替代疗法的研究中。除了上述的在治疗罕见病所表现的成就, 在减少新冠 COVID-9 感染和预防其重症上, mRNA 疫苗也展示其高效和安全的优势。相对传统疫苗, 基于合成 mRNA 疫苗更加有效, 同时没有整合到人体 DNA 的风险和具备研发周期短、生产工艺简单和制造成本低优点, 使 mRNA 疫苗成为在刺激免疫应答, 降低感染率或重症方面更有吸引力。

基于信使核糖核酸 (mRNA) 治疗——现在

自新冠 COVID-19 大流行开始, mRNA 疫苗成功地替代传统疫苗, 发展成为一种革命性的新药。在整体增加医疗健保和研发支出的驱动下, 基于 mRNA 为基础的疫苗研发激增。第一个获得紧急使用授权 (EUA) 的 mRNA 疫苗是辉瑞 /BioNTech 研发的 Comirnaty (2020 年 12 月) 和 Moderna 研发的 Spikevax (2020 年 12 月)。随后, 获得地方紧急使用授权的 mRNA 疫苗不断涌现, 印度 Gennova 生物制药的 GEMCOVAC-19 在印度 (2022 年 6 月), 中国沃森生物的沃艾可欣 (AWcornia) 在印度尼西亚 (2022 年 10 月) 和斯微生物的新冠 mRNA 疫苗在老挝 (2022 年 12 月) 分别获当地药物监督部门的紧急使用授权。不仅仅是在对抗新冠病毒感染,

【热点荟萃】

mRNA 技术在对抗 HIV 感染的研究开始启动 (NIH News 2022 年 3 月 14 日)。在预防呼吸道合胞病毒 (RSV) 导致的呼吸道疾病的三期临床试验也显示通过 mRNA 技术研发出来的疫苗有着良好的安全性和临床疗效 (Moderna News 2023 年 1 月 17 日)。

在各种利益相关者日益增长的兴趣和鼓励临床的推动下, 在基于 RNA 分子生物在科学进步和突破性候选药物的治疗前景下, 基于 RNA 疗法和疫苗市场在 2035 年以前有望持续增长。目前, 超过 35 家公司参与了超过 195 种基于 mRNA 的疗法或疫苗正在不同阶段的临床研发中, 而且是针对不同疾病。可以预期在接下来的十年里, 一些基于 RNA 的治疗将不断在临床上崭露头角被商业化。由于投资者看到 RNA 的疗法不断成功, 对那些从事 mRNA 技术的生物技术公司表现出越来越大的投资兴趣; 同时, 生物技术公司将资金投入在提高 mRNA 技术平台、精简运作以及提供更加广泛的服务范围等领域, 促进其良性发展。跨国制药公司的积极参与 mRNA 技术和药物的开发也至关重要, 研发管线 (Pipelines) 将持续增长。全球在该领域的主要领生物生物技术公司包括 (地区, 成立时间, 雇员。按公司雇员规模排序): BioNTec (德国, 2008 年, 1,200), Moderna (美国, 2005 年, 760), CureVac (德国, 2007 年, 700), 斯微生物 (中国, 2016 年, 500), ImmoRNA (美国, 2019 年, 200), Omega 医疗 (美国, 2017 年, 200), eTheRNA (比利时, 2013 年, 50), 蓝鹊生物 (中国, 2019 年, 50), Chimeron 生物 (美国, 2015 年, 10+)。

如前所述, 基于 mRNA 技术研发新兴治疗方法具有一些优势, 比如可以对候选药物进行工程改造用以递送 mRNA 分子, 该分子编码对于功能性蛋白质, 从而能够替换有缺陷的蛋白质等, 其主要优点如下:

- mRNA 疗法有能力在不进入细胞核的情况下潜在地恢复基因表达或改变基因组;
- mRNA 疗法不需要细胞内转录 (transcription), 这使得它不容易出错, 因此, 实现更快

的基因翻译 (translation);

- 通过 mRNA 的表达是短暂的, 并且可以控制, 这归因于 mRNA 原则上不能复制, 从而减少过度表达或任何相关的机会副作用;
- mRNA 疗法与其他基于核酸 (如 DNA) 疗法相比, 具有更好的转染能力, 从而提供更好的表达机会和更高的成功率;
- mRNA 疗法有可能治愈目前无法治愈的疾病, 主要是 mRNA 疗法使用细胞自身的机制来产生自然和充分的功能性蛋白质;
- mRNA 疗法具有类似药物的特性, 可以简化剂量变化和重复的调整;
- mRNA 疗法是从目标基因选择到候选产品, 于是其研发会相对更快。

尽管 mRNA 疗法提供了许多好处, 但是目前的研发仍遇到很多问题。除了候选药物的稳定性有待提高和靶向递送相关的技术困难有待解决, 其他主要问题包括有限的专业知识和人才、缺乏专业基础设施的需求、过高的资本投资要求和限制、以及不是非常清楚和统一的生产规范 (GMP)。另外, 目前的基于 mRNA 疗法的市场推动设计主要是通过肌注给药, 似乎这种趋势不太可能有巨大的改变, 至少预见在近期没有上台阶那样提升。而且基于 mRNA 的疗法在全球市场上最大份额的是在传染病领域, 而在肿瘤或罕见病方面还缺少绝对优势。但是无论如何, 越来越多基于 RNA 的疗法在不同疾病领域的研发预示该技术有着非常广泛的用途, 是目前一个高度活跃的研究领域。生物科技的进步和产生的分子优势极大地驱动基于 RNA 治疗的研究和开发工作。与其他治疗方式相比, 基于 RNA 治疗除了多功能递送平台, 同时它展示了高疗效、高免疫原性和低毒性的特点。正如上面所述, 基于 RNA 治疗在传染病上造成意外感染的不良风险低, 插入诱变的可能性小。其次, mRNA 的体内半衰期可以通过生物工程调节, 进行不同的修改或改善药物传递方法从而使药物更稳定。第三, 它具有高度可转录性, 通常又会被典型的细胞活动降解, 从而降低长期存在体内

的危险性。第四，由于体外转录反应的产量高，通过 mRNA 技术的候选药物的生产制造具有较好的成本效益、快速和可扩展性。

疫苗接种是现代医学的主要成功之一。比如，麻疹等传染病的流行率随着疫苗接种计划而降低，天花在接种疫苗后基本消除。尽管传统疫苗取得了巨大成功，但这些方法仍然对快速变异的病原微生物不是很有效，例如流感病毒，埃博拉病毒或寨卡病毒等，这对于世界的公共卫生仍然是巨大的隐患，这些病毒一旦流行，就会给世界带来巨大灾难。然而传统疫苗有以下缺点：如（1）需要一个漫长、复杂和昂贵的过程。培养目标病原体 / 抗原在专门的细胞培养和 / 或基于发酵的生产过程中，然后提取、灭活、分离和纯化。（2）虽然显示出实证效力，可是确切的机制在大多数情况下，对人体的保护是不清楚的。（3）需要特定严格的生产流程、复杂的生产设施和严格培训后的操作人员。然而这些传统疫苗的缺点基本上可以被基于 mRNA 疫苗克服，基于 mRNA 技术疫苗却可以在更短的时间里制造，生产成本更低并有着更好的抗传染病疗效。基于 mRNA 的疫苗具有多种优势，包括：

- 能够模拟自然病毒感染的许多方面；当一个 mRNA 序列进入细胞后，它可以合成病毒抗原蛋白，这些蛋白甚至能够模仿病毒感染的微小细节。这样可以极大地增强机体免疫反应，包括 B 和 T 细胞反应；
- 能够研发并生产多价 mRNA 同时用于针对复杂病毒的疫苗：利用 mRNA 技术制作出针对不同病毒蛋白的多个 mRNA 片段是可行的，这样可以生产出同时针对复杂多聚体抗原病毒感染；
- 能够快速推进从病原的发现到临床实验研发进展：由于最近在生物信息学，现在可以记录几种病毒抗原蛋白的序列。它也变得更加容易识别目标基因。

因此，普遍认为 mRNA 疫苗为治疗危及生命的疾病或预防感染提供新型替代治疗方法。

与肿瘤细胞增长有关的特异性抗原或因子，有时又被称为新抗原。新抗原可用作人类 mRNA 疫苗的靶标，使癌症疫苗就是针对在癌细胞中表达的这些特异性抗原，进一步达到治疗效果。大多数可用的癌症疫苗是治疗性的，因为它们有助于刺激免疫细胞反应，从而消除或减少肿瘤细胞。Dolgin 在一篇回顾性文章中指出，最初使用基于 RNA 的疫苗治疗肿瘤的概念以及其可行性的研究发表于二十年前^[2]。从那时起，多项临床前和临床研究 mRNA 疫苗用于治疗肿瘤^[3]。

基于信使核糖核酸(mRNA)治疗——未来和挑战

毫无疑问，mRNA 技术在未来的不断进步会使其在更多领域得到广泛应用，特别是癌症免疫治疗和传染病疫苗。例如，基于 mRNA 的多能干细胞诱导、通过 mRNA 核酸酶辅助设计、以及蛋白递送等技术都开始在药物研发中得以运用。未来几年间，基于 mRNA 技术衍生的新兴治疗手段会得到突飞猛进地发展，比如（1）过敏耐受疗法，通过编辑质粒 DNA 和 mRNA，调节由辅助 T 细胞 (T helper) 和调节 T 细胞 (Treg) 引起的过敏反应；（2）癌症免疫疗法：增强或改变自主免疫系统，使其更好地发现并攻击癌细胞，或利用微 RNA 和 mRNA 调节免疫相关基因，从而激活免疫反应以对抗癌细胞；（3）基因组工程治疗或基因疗法，包括移植正常的基因或高效和精确地编辑核酸基因组序列，以替换缺失或有缺陷的基因，从而纠正遗传疾病或促进不活跃的有益机制或途径，使它们具有治疗遗传疾病的潜力；（4）蛋白质替代疗法：mRNA 药物被认为提供基因疗法的有效替代品，特别是蛋白质替代品，因为它们避免了基因组整合的风险并提供强大的瞬时表达。

值得一提的是，最近在这个领域内新兴的基因编辑系统——CRISPR/Cas 基因组编辑的应用。CRISPR/Cas 基因编辑被广泛用于系统发育和进化的研究。然而，近些年科学家根据 CRISPR 最初

【热点荟萃】

在原核生物中的表现的遗传性 (heritable) 和后天性 (adaptive) 免疫特点, 用来自于原核生物的 Cas 蛋白来治疗传染病。这些蛋白质是有害的, 但是当它们进入人体时, 会引起免疫反应, 产生特异性抗体^[4]。另外, CRISPR/Cas 技术也融入肿瘤细胞分子生物学研究, 用来快速地准确编辑基因组, 构建基因突变研究肿瘤相关基因, 或敲除基因用于肿瘤治疗的研究^[5]。另外, 基于 mRNA 的联合疗法也渐渐成为治疗恶性肿瘤的方法^[6]。

如上所述, 传统疫苗对预防反复快速变异的病毒感染似乎不很理想, 使用 mRNA 疫苗开发预防性或治疗性疫苗是遏制新冠 COVID-19 流行的最有效方法。使用 mRNA 技术开发的疫苗体现其优势在生产上, 以及其安全性和预防或治疗效果在临床上都得以充分地证实。在今后十年的时间里, 采用自扩增或复制子 RNA 疫苗和非复制 mRNA 疫苗会得到更加广泛地运用。除了 mRNA 疫苗预防传染病的积极探索, 使用 mRNA 在治疗肿瘤新兴治疗方法上也会在未来十年内取得里程碑地发展。

值得强调的是基于体外转录 mRNA 疗法的开发仍处于早期阶段, 如何获得大量合成可用于临床治疗的 mRNA 仍然是一个挑战。与此类分子的靶向递送相关问题也需要解决, 有效递送方式需要不断健全, 疫苗免受 RNA 各种酶的破坏或避免药物的活性成分跨细胞屏障时被降解也需要突破。为了克服上述挑战, 包括采用体外 mRNA 技术重新编辑并移植患者自体 T 细胞或树突细胞, 同时不断改善递送 mRNA 疫苗的方法。目前, 生物制药和技术行业投入资源试图解决以下问题:

稳定性相关问题

如前所述, mRNA 分子平均包含 1,000-6,000 碱基对, 分子量大 ($4-5 \times 10^5$ 道尔顿), 这是因为 mRNA 是使用酶进行合成, 与较小的 sRNA 相比, mRNA 相对较大, 使它们本质上不稳定, 难以制造, 而用于修饰寡核苷酸 (Oligonucleotide) 的方法, 如

锁定核酸 (Locked Nucleic acid, LNA) 和不锁定核酸 (Un-locked Nucleic acid, UNA) 化学在基于 mRNA 的产品上使用有限。因此, 急需一种技术可以把这些药物分子注射到人体后, 保持药物分子的稳定并促进细胞摄取。

有效的递送方法。尽管目前有下列几种递送方法

- 基于脂质的递送: 利用脂质或其衍生物 / 类似化合物形成颗粒 (LNP), 可用于 mRNA 治疗剂和疫苗的体内递送。LNPs 是由合成或生理脂质材料组成的纳米颗粒, 好处是封装在 LNP 中的 RNA 不太容易被酶促降解, 而且封装的效率比较高, 易于生产。此外, 细胞通过吞噬 LNP 有效地将 mRNA 分子递送到细胞胞质溶胶中;
- 基于肽的递送: 各种肽, 特别是含有阳离子氨基酸 (如赖氨酸和精氨酸) 可以作为交付载体, 通过静电相互作用在载体和 mRNA 之间形成更好的复合物。复合物的产生降低了酶促降解的可能;
- 基于聚合物的输送: 聚合物材料 (如多胺、枝状聚合物和共聚物) 可用于有效递送 mRNA 候选物。该载体同样具有防止酶降解和支持细胞内递送的优点。问题是它们通常不是很稳定。为此, 聚合物材料的结构需要修饰, 提高候选药物的稳定性和安全性。例如掺入脂链、超支化基团和可生物降解的亚基, 如此操作必将增加工艺流程;
- 类病毒复制子颗粒 (VRP): 将小激活 RNA (saRNA) 和病毒复制子颗粒封装, 将编码递送到细胞质中。一旦进入细胞, saRNA 就会自我复制并表达出指定抗原。基于 VRP 递送的优点是高效。然而它存在两个重大挑战。首先, 需要特殊的制造工艺进行大规模的 VRPs 生产。其次, 人体可能会产生针对病毒载体的抗体;
- 阳离子纳米乳液: 利用阳离子脂质组成的纳

米乳液也被用于 RNA 递送。这些化合物利用其疏水性和亲水性的特性稳定药物或疫苗的脂质特性，因为分子表面上的化学特性的相互作用可以保护 mRNA 免于酶降解，从而实现分子的稳定递送。而且生成纳米乳液通过一些简单的技术就能实现，例如剧烈搅拌，超声波或微流体；

在未来的时间里，下一代 LNP 的复杂内部结构需要强化，其物理稳定性需要进一步增强，如固体脂质纳米颗粒、纳米结构脂质载体和阳离子脂质核酸复合物等。通过化学手段，控制药物在体内输送释放的地点和时间的能力可以进一步提高，为多种疾病提供更有效或 / 和更安全的治疗。

安全问题

mRNA 疫苗可能会诱导干扰素反应的问题似乎还不清楚，这会是导致与炎症和自身免疫有关的副作用的根本原因？另一个潜在的安全问题可能来自细胞外的反应。

目前欧美药品管理局没有发布具体的 mRNA 药物相关规定

可能是基于 mRNA 疗法属于广泛的遗传免疫原或疫苗范畴，所以有关 mRNA 的药物研发在欧洲药品管理局 (EMA) 归类为高级治疗药物产品 (ATMP)

或基因治疗药物产品 (GTMP)。然而，随着 mRNA 产品在医疗领域不断出现，为了使其研发更加顺利，建立更加具体的监管规定是非常必要的，至少在该类药物研发的安全性和疗效的相关临床实验需要明确的规定，或者根据 mRNA 独特的功能，修改 DNA 疫苗和基因治疗载体制定的规范应用于基于 mRNA 的新药或疫苗的研发？

可以肯定，基于 RNA 疗法已经在不同领域取得了重大进展，并且很多疗法处于临床（前）开发的不同阶段。伴随着分子生物学的进步和大量人力物力的投入，基于 mRNA 疗法已经成为现实。随着更多的投入在该领域，基于 mRNA 疗法必将被推到新的高度，成为治疗癌症，感染和遗传疾病的备受瞩目的治疗全新手段。

参考文献

- [1] Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247(4949 Pt 1):1465–1468.
- [2] Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines. *Nature* 2021;597(7876):318–324.
- [3] Dammes N, Peer D. Paving the Road for RNA Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2020;41(10):755–775.
- [4] Lou J, Wang B, Li J, Ni P, Jin Y, Chen S, *et al.* The CRISPR-Cas system as a tool for diagnosing and treating infectious diseases. *Mol Biol Rep* 2022;49(12):11301–11311.
- [5] Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, Sanjana NE, Dow LE. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2022;22(5):259–279.
- [6] Qin S, Tang X, Chen Y, Chen K, Fan N, Xiao W, *et al.* mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7(1):166.

