

mRNA 肿瘤疫苗的研究现状及其研究趋势

朱曼芳, 张越洋, 段醒妹*

电子科技大学医学院 四川省医学科学院·四川省人民医院个体化药物治疗四川省重点实验室 四川成都

【摘要】免疫治疗已经确立为肿瘤治疗的有力手段之一, 其中 mRNA 肿瘤疫苗尤为引人注目, 展现出了巨大的应用潜力。mRNA 肿瘤疫苗利用 mRNA 表达相关抗原激活机体的抗肿瘤免疫应答, 从而实现对肿瘤的有效杀灭。随着体外转录技术和递送系统的发展, 多种 mRNA 肿瘤疫苗在临床试验中已经展现出了良好的安全性和显著的治疗效果。结合现有的治疗方式, mRNA 肿瘤疫苗有望为肿瘤提供更为高效的治疗策略。本综述旨在阐述 mRNA 肿瘤疫苗的作用机制, 聚焦于其递送系统的研究, 并探讨 mRNA 肿瘤疫苗的临床价值。期望为深入理解 mRNA 肿瘤疫苗的研发提供参考。

【关键词】mRNA 肿瘤疫苗; 肿瘤免疫治疗

【收稿日期】2024 年 6 月 2 日 **【出刊日期】**2024 年 7 月 5 日 **【DOI】**10.12208/j.jmbr.20240007

Research status and trends of mRNA tumor vaccines

Manfang Zhu, Yueyang Zhang, Xingmei Duan*

Department of Pharmacy, Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan

【Abstract】Immunotherapy has been established as one of the powerful means of tumor treatment, and mRNA tumor vaccine is particularly eye-catching, showing great application potential. mRNA tumor vaccine uses mRNA expression related antigen to activate the anti-tumor immune response, so as to achieve effective cleaning of tumor cells. With the development of in vitro transcription technology and delivery systems, a variety of mRNA tumor vaccines have shown high safety and significant therapeutic effects in clinical trials. In combination with existing therapies, mRNA tumor vaccines are expected to provide a more effective treatment strateg. The purpose of this review is to elucidate the mechanism of mRNA tumor vaccines, to focus on the studies of delivery system, and to explore the clinical value of mRNA tumor vaccines. It is expected to provide a reference for further understanding of the development of mRNA tumor vaccines.

【Keywords】mRNA tumor vaccine; tumor immunotherapy

1 前言

尽管人类医学在恶性肿瘤方面取得各了类成就, 恶性肿瘤依旧是全球的第二大死因^[1]。目前常规的肿瘤治疗有手术、放疗、化疗和免疫治疗, 肿瘤免疫治疗是打破免疫耐受、激活体内免疫细胞、增强机体抗肿瘤免疫应答, 特异性地清除肿瘤微小病灶、抑制肿瘤生长的治疗新手段。这种治疗方法副作用相对较小、治疗效果明显。与传统治疗方法不同的是, 免疫

治疗从依靠外界药物杀死肿瘤细胞转变为依靠机体自身免疫系统清除肿瘤, 打破了肿瘤治疗在毒副作用方面的限制^[2]。肿瘤疫苗是将多种形式的肿瘤相关抗原注射于肿瘤患者体内, 激活机体免疫系统以杀灭肿瘤细胞, 从而达到控制和治疗肿瘤的目的, 其中 mRNA 肿瘤疫苗是一种极具发展潜力的治疗手段。

事实上, 从上世纪八十年代, 就有研究人员提出体内细胞可以翻译递送到其中的 mRNA, 并且成功

*通讯作者: 段醒妹

用脂质体来运载 mRNA 进入生物体, 证明 mRNA 可以作为一种药物使用^[3]。然而在之后的许多年里, 由于生产技术的限制, mRNA 价格昂贵, 一直未能用作药物或疫苗。直到 2005 年, Katalin Karikó 等人指出重排 mRNA 中尿苷的化学键得到的假尿苷能有效防止机体将外源性的 mRNA 当作抗原清除^[4]。随后在 2012 年, Andrew J. Geall 等人首次利用 LNPs 将 mRNA 稳定递送入生物体, 同时随着 mRNA 的生产技术成熟, 一些大型制药公司开始进入 mRNA 疫苗领域^[5]。而在新冠病毒肆虐后, 研究人员迅速成功研制出可以广泛使用的 mRNA 疫苗用于预防肺炎, 也加快了 mRNA 疫苗的技术瓶颈突破^[6]。

与其他类型肿瘤疫苗相比, 利用 mRNA 疫苗来进行肿瘤预防和治疗是一种更具特异性, 更安全, 并能减少耐药性的手段, 具有一些独特的优势。mRNA 几乎可以编码任何蛋白质, 应用范围广, 还具有高度的特异性和灵活性, 可以根据不同的肿瘤类型和抗原进行定制化设计^[7]。mRNA 疫苗的生产过程相对简单, 可以利用体外转录进行大量制备, 研发和生产周期短。序列合成生产的 mRNA 比其他类型的疫苗更易翻译出抗原蛋白, 同时由于 mRNA 疫苗直接表达抗原蛋白, 不需要进行复杂的表达和纯化, 因此其生产成本相对较低^[8]。mRNA 易于被正常细胞降解和快速清除, 可以最大限度减少免疫治疗带来的副作用例如自身免疫性疾病。与 DNA 不同, 由于 mRNA 不会被整合进入患者基因, 没有外源基因插入细胞基因组的潜在突变风险^[8]。通过各种化学修饰和序列修饰可以调控 mRNA 在体内的半衰期, 增强免疫原性和稳定性并减少副作用^[9]。利用功能性的纳米粒装载 mRNA 还可以实现高效的体内靶向^[10]。

2 mRNA 肿瘤疫苗的免疫机制

mRNA 肿瘤疫苗中的 mRNA 分子被设计成能够编码特定的肿瘤抗原蛋白, 通过 mRNA 递送技术导入人体后, 利用细胞内的蛋白质合成机制, 产生相应的抗原蛋白, 进而被免疫系统中的抗原呈递细胞所识别, 抗原呈递细胞会将这些表达的抗原带到淋巴结等免疫器官, 激活 T 细胞等免疫细胞, 进而特异性攻击表达相同抗原的肿瘤细胞^[11, 12]。通过这种方式, mRNA 肿瘤疫苗能够诱导人体产生针对特定肿瘤细胞的免疫应答, 触发免疫系统对肿瘤细胞的特异性攻击, 从而达到预防和治疗肿瘤的目的。

目标抗原会通过各种途径刺激机体免疫反应。树突状细胞 DCs 和巨噬细胞是两种重要的抗原呈递细胞 APCs, 它们能够摄取、加工并呈递抗原给 T 细胞, 从而启动 T 细胞的免疫应答^[13]。mRNA 翻译的细胞内抗原会被蛋白酶复合体分解成多肽, 并通过主要组织相容性复合体 MHCI 类分子运送到细胞表面呈递给 CD8+T 细胞, 而活化的 CD8+T 细胞具有细胞毒性, 能够特异性地杀伤靶细胞^[13]。分泌性的抗原可被细胞内吞并降解, 通过 MHCII 类蛋白运送至细胞表面呈递给 CD4+T 细胞^[14], CD4+T 细胞一方面通过炎性细胞因子激活吞噬细胞, 增强其杀伤已吞噬靶细胞的能力^[15]; 另一方面, 它可以辅助 B 细胞活化, 产生抗体, 从而发挥体液免疫的作用, 进一步增强免疫反应^[16]。此外, NK 细胞和粒细胞等其他免疫细胞也在 mRNA 肿瘤疫苗刺激的免疫反应中扮演重要角色, 直接攻击被感染的细胞或肿瘤细胞, 从而清除病原体或抑制肿瘤生长^[17]。

mRNA 肿瘤疫苗在刺激免疫细胞的过程中, 其效果并不仅仅局限于初次免疫应答, 还能激活和增强记忆免疫, 这对于长期抗肿瘤免疫至关重要。记忆 T 细胞和记忆 B 细胞可以在初次接触抗原后长期存在^[18, 19], 一旦再次遇到相同的抗原, 它们就能够迅速响应, 清除肿瘤细胞。此外, 通过优化疫苗的递送方式、mRNA 的稳定性以及选择更高效的抗原靶标等, mRNA 肿瘤疫苗对免疫系统的激活效果还可以进一步增强。

3 mRNA 肿瘤疫苗的设计开发

mRNA 肿瘤疫苗设计是一项综合性的任务, 需要综合考虑抗原选择、序列设计、修饰与优化、安全性与免疫原性以及递送系统等多个方面。mRNA 疫苗产生系统性副作用的主要原因是 I 型 IFNs 引起的炎症反应^[20, 21], 在开发 mRNA 肿瘤疫苗时要注意避免过多的免疫反应。同时给药途径也会影响 mRNA 疫苗的免疫反应, 例如与肌肉注射相比, 皮内注射激活局部树突状细胞可引起更强的免疫反应, 静脉注射可以直接将疫苗暴露于血液循环的免疫细胞从而增强效果, 但细胞因子风暴以及细胞毒性 T 细胞募集可能会引起全身副作用, 例如脾脏损伤和淋巴细胞耗竭^[22]。所以 mRNA 肿瘤疫苗的设计是一项复杂的任务, 其目标是创建能够有效表达肿瘤抗原的序列, 使用理想的递送载体选择合适的给药途径将其

递送入体内, 从而刺激机体产生针对肿瘤细胞的免疫应答, 同时还要尽可能减少其带来的副作用, 在开发 mRNA 肿瘤疫苗时需要综合考虑这些问题。

首先选择靶标时需要确定好目标肿瘤抗原, 这些抗原可以是肿瘤特异性抗原 (TSA), 也可以是肿瘤相关抗原 (TAA)。选择抗原时需要考虑其免疫原性、表达水平以及在肿瘤细胞中的特异性。第二步是基于选定的抗原, 设计能够编码这些抗原的 mRNA 序列。这包括确定 mRNA 的长度、编码区的序列以及非编码区的结构。编码区的序列应该尽可能优化以提高蛋白表达效率, 非编码区则对 mRNA 的翻译和稳定性起到关键作用。通常还需要对 mRNA 进行修饰和优化, 在 5'端添加帽结构, 在 3'端添加多聚腺苷酸尾, 对序列进行密码子优化可以提高翻译效率, 减少 tRNA 耗竭风险, 从而减少错误翻译^[23]。在设计序列时, 需要特别注意其安全性和免疫原性, 避免使用可能引发免疫反应的序列, 避免引发不必要的副作用。截至目前, 普遍认为使用来自 hHBB 的 5'和 3'UTR 能最大限度促进 mRNA 的有效表达^[24]。PaulJSample 等人构建了一个将人类 5'UTR 序列与翻译相关联的预测模型, 使用该模型可以设计新的 5'UTR, 调整序列以实现最佳蛋白质表达的能力^[25]。经修饰的 mRNA 在体内引起的免疫应答明显减弱, 有利于避免一些不良免疫反应。在设计好 mRNA 后, 就需要选择有效的递送策略来将 mRNA 导入机体。

4 mRNA 肿瘤疫苗的递送系统研究

裸 mRNA 疫苗可以通过皮内或淋巴结内注射给药, 淋巴结内给予非配方的 mRNA 可以将抗原递送给 APCs, 原位激活 T 细胞, 从而绕开了抗原提呈细胞迁移的需求^[7, 26, 27]。但在实际应用中还需要克服一些挑战, 例如如何确保 mRNA 在体内的稳定性和有效性、避免潜在免疫反应和副作用等问题都需要进一步研究和解决。为了使 mRNA 肿瘤疫苗有更确切的临床价值, 需从两个层面入手: 确保能通过最具特异性的途径去诱导免疫反应; 确保疫苗能够到达肿瘤部位并在没有任何限制的情况下发挥功能, 这就要求 mRNA 递送系统能有效提高 mRNA 稳定性及具有肿瘤靶向性, 同时还需要满足不会引起毒性或不必要免疫反应的条件。

尽管 mRNA 疫苗从 2015 年就开始向临床转化, 递送系统方面却一直没有能有效地兼顾安全性和实

用性的问题。基于 DCs 的 mRNA 递送可有效提呈抗原, 带有 mRNA 的自体树突状细胞体外工程曾是肿瘤抗原递送的首选方法。然而临床试验中最常用的 DC 来源于 PBMC 或白细胞, 目前尚不清楚具体哪些 DCs 才最理想, 而且制备过程涉及细胞分离、纯化、转染和成熟, 耗时且成本高昂, 难以满足部分患者的紧急治疗需求。随着技术的进步, 目前大多数的 mRNA 疫苗采用脂质纳米颗粒为载体进行直接注射给药。

LNPs 凭借其优越的生物相容性以及保护 mRNA 的能力已成为 mRNA 疫苗最广泛使用的载体之一, 其构成涉及四种主要成分, 即阳离子脂质、聚乙二醇-脂质偶联物、胆固醇和天然磷脂。阳离子脂质作为 LNP 递送效率的决定性元素, 能够结合 mRNA, 脂质会包裹 mRNA 自组装成纳米脂质体。同时阳离子脂质还具备破坏内体结构的能力, 以实现 mRNA 的胞内释放。常见的阳离子脂质有 1,2-二油酰氧基丙基三甲基氯化铵、二油酰磷脂酰乙醇胺、1,2-二聚氧-3-(三甲基氨基)丙烷以及 1,2-二烯基羟丙基-3-二甲基羟乙基溴化铵等。脂质纳米颗粒中, 研究人员还发现可电离脂质较普通的阳离子脂质体递送效率更高, 进一步, 通过修饰胺基头部脂质、增加疏水成分如 PEG 等方式实现载体的进一步优化。

2020 年, NIH 和 Moderna 合作开发出第一个针对新型冠状病毒进入人体试验的实验性 mRNA 疫苗, mRNA-1273 采用 LNP 的递送方法得到了临床验证^[28]。BNT-112 是一款基于 mRNA 的肿瘤疫苗, 使用 LNP 递送 5 个表达 TAA (RBL038、RBL039、RBL-040、RBL-041 和 RBL-045) 的 mRNA, 通过静脉给药治疗转移性去势抵抗性前列腺癌^[29]。LNPs 在递送 mRNA 之外, 还可以诱导引流淋巴结产生 IL-6, 促进滤泡辅助 T 细胞增值分化从而诱导机体免疫反应。然而, 这种效应也可能会导致中性粒细胞浸润, 激活各种炎症途径以及产生各种炎性细胞因子和趋化因子从而引起过敏反应^[30]。例如目前在全球广泛使用的 mRNA 新冠疫苗就被报道了与炎症相关的副作用, 例如头痛肌痛、肿胀、发烧和嗜睡^[31]。且 LNP 易氧化降解、制备重现率差等问题都仍待解决。

除了脂质载体外, 早期有些研究者还会采用聚合物材料来进行核酸递送, 如聚乙烯亚胺 PEI、聚氨基酯 PBAE、壳聚糖等。目前已经有多项研究致力于

借助高通量筛选等手段对聚合物的化学特征与功能的联系进行量化,并用于筛选开发新的 mRNA 载体材料^[32-34]。而脂质聚合物杂化纳米颗粒 LPHNPs 兼具 LNP 和聚合物纳米材料的优势, Randall A Meyer 使用阳离子脂质体作为 PLGA 聚合物核心的涂层开发了壳核结构的 LPH, 并证明其可以通过吸附或包封的方式作为 mRNA 的载体, 促进 mRNA 给药后在脾和肺中的快速表达^[35]。LPHNPs 的脂质层可以进行修饰以调整表面特性, 促进细胞摄取或者延长血液循环时长; 也充当分子屏障, 阻止水分扩散入内核保护聚合物核心免受降解, 减少药物损失。

使用肽类进行 mRNA 递送一般会选阳离子肽, 例如鱼精蛋白作为一类天然阳离子肽, 可以包裹 mRNA, 其膜转运活性较强, 还具备佐剂样效应, 诱导抗肿瘤细胞免疫应答^[36, 37]。采用包含有两亲性序列精氨酸-丙氨酸-亮氨酸-丙氨酸的细胞穿膜肽也可以将 mRNA 高效递送到胞内, 诱导 T 细胞应答^[38]。

5 mRNA 肿瘤疫苗的临床试验研究

mRNA 肿瘤疫苗作为一种新的肿瘤免疫治疗手段, 其有效性和安全性在许多研究中都得到了证实, 取得了预期治疗效果。尽管目前还没有临床上市的 mRNA 肿瘤疫苗, 仍多个候选疫苗已经进入不同阶段的临床试验, 已经成功应用于多种类型的肿瘤治疗中, 如黑色素瘤、乳腺癌、肺癌等。

5.1 基于 DCs 递送的 mRNA 肿瘤疫苗

一项联合使用 mRNA-DC 疫苗、纳武利尤单抗和聚肌苷酸-聚胞苷酸免疫疗法的研究表明, 采用自体 DCs 装载表达 TAA (MTFR2 和 ADAMTSL1) 的 mRNA, 可以使患者产生抗肿瘤特异性 T 细胞反应。这种联合疗法可以长期进行, 其安全性和有效性都得到了验证^[39]。一款治疗脑胶质母细胞瘤的 mRNA-DC 疫苗 Survivin DC 细胞注射液的临床试验在我国已获批准, 将负载 mRNA 的 DC 通过皮内注射和静脉输注于患者, 助力原发性脑胶质母细胞瘤患者在术后清除残余的肿瘤细胞。而 LK101 注射液的独特之处在于它负载了患者特有的肿瘤新生抗原 mRNA, 将针对患者个体肿瘤突变信息所设计的、包含数十个个性化肿瘤抗原靶点的 mRNA 转导至 DC 中, 实现个性化治疗。

5.2 利用载体直接递送的 mRNA 肿瘤疫苗

目前, 进入临床试验的 mRNA 肿瘤疫苗常用的

递送载体仍以 LNP 为主, 也有部分使用了 VLP、LPX 等。这些疫苗的目标编码抗原非常多样, 包括 KRAS 突变体、酪氨酸激酶、HPV16 E6 和 E7 等致癌性蛋白、LAMP pp65、NY-ESO-1、MAGE-A3、TPTE、PSA、PAP、CLDN6 等。个性化肿瘤疫苗是目前研究的热点, 能够编码多达数十种患者特异性新抗原。从布局来看, Moderna、BioNTech 和 CureVax 等公司依旧处于领先。

BioNTech 和 Genentech 正在进行临床研究的项目 BNT111 是一种静脉注射脂质体 mRNA 疫苗, 针对黑色素瘤的四种非突变的 TAA^[40]。BioNTech 公司的另一款疫苗 BNT122, 正在针对黑色素瘤患者进行临床试验, 通过表达多种 TSA 的 mRNA 来刺激患者的免疫反应, 初步研究表明它能够有效提高患者的抗肿瘤免疫应答, 为黑色素瘤的治疗提供了新的选择^[41]。借助 LNP 以及 TriMix®免疫增强技术, ARC01 这款疫苗成功将编码 HPV-16 型病毒中 E6 和 E7 抗原的 mRNA 转染至自体细胞中, 诱导机体产生针对性针对 HPV-16 阳性、晚期不可切除或复发/转移性实体瘤的免疫应答, 当前也已步入临床试验阶段。一项编号为 NCT01915524 的 Ib 期临床试验探讨了 CV-9202 (使用阳离子鱼精蛋白的 mRNA 疫苗, 它编码了 NY-ESO-1、MAGE-C2、MAGE-C1、Survivin、5T4、MUC1 等六种在肺癌细胞中显著过表达的抗原) 在 26 例晚期 (IV 期) 非小细胞肺癌患者中的安全性与疗效。未观察到紧急治疗相关的不良事件, 且 80% 的受试者体内特异性免疫应答得到了显著增强^[42]。

V940/mRNA-4157 是由 Moderna 与默沙东共同研发的个性化肿瘤疫苗, 专门针对高风险 (III/IV 期) 黑色素瘤进行治疗, 目前已经进入到 III 期临床试验。此疫苗是依据患者个性化需求设计的 mRNA 疫苗, 对患者的肿瘤样本进行 DNA 测序, 再利用特定算法, 针对患者肿瘤的特异性 DNA 突变设计 mRNA 疫苗, 能编码最多 34 种不同新抗原。在 II 期临床试验中, 采用与 Keytruda 联合治疗的方案后, 患者在术后三年的癌症复发或死亡风险降低了 49%, 远处转移或死亡风险更是降低了 62%^[43]。

TG4050 是一款由 Transgene 与 NEC 公司研发的针对头颈鳞状细胞癌的新抗原癌症疫苗, 基于非致病性痘病毒平台, 借助 AI 技术, 精确预测高度特

异性的新抗原, 能够提供 30 种个性化的新抗原, 引领治疗性肿瘤疫苗走向数字化时代。I 期临床试验

数据显示, 所有接受 TG4050 治疗的患者均成功激活了特异性免疫, 在观察期内均无复发。

表 1 部分进入临床试验的 mRNA 肿瘤疫苗

药物	NCT 编号	针对肿瘤类型	抗原	载体
BNT111	NCT04526899	黑色素瘤	MAGE-A3、NY-ESO-1、TYR、TPTE	LNP
BNT112	NCT04382898	HPV16 阳性癌	HPV16 E6、E7	LPX
BNT113		HPV16 阳性癌	HPV16 E6、和 E7	LNP
BNT122	NCT04486378	胰腺导管腺癌、黑色素瘤	20 种不同的 TSA	LNP
ARC01		HPV-16 阳性癌	HPV1 6E6、E7	LNP
CV-9202	NCT01915524	非小细胞肺癌	NY-ESO-1、5T4、MAGE-C2、MAGE-C1、Survivin、MUC1	PRM
mRNA-4157	NCT03897881	高风险黑色素瘤	针对特异性突变进行个性化设计	LNP
VAC85135	NCT05444530	骨髓增生性瘤	TSA	VLP
TG4050	NCT04183166	头颈鳞状细胞癌、卵巢癌	借助 AI 预测个体化新抗原	VLP
WGc-043		晚期 EB 病毒阳性瘤	TAA	VLP
AVX-701	NCT01890213	III期结肠癌	CEA	VLP
mRNA-0523-L001	NCT06141369	晚期内分泌肿瘤	个体化新抗原	
CVGBM	NCT05938387	胶质母细胞瘤	8 个 TAA 的表位	
ABOR2014	NCT05981066	肝癌	20 种肝癌高频 TAA	LNP

此外, 还有多款 mRNA 肿瘤治疗性疫苗也进入了临床试验阶段。目前面临的挑战主要是如何选择合适的抗原靶点、优化序列和递送系统以提高疫苗的免疫原性和疗效; 如何克服肿瘤微环境的免疫抑制状态, 增强疫苗的免疫激活能力; 需要考虑患者的个体差异、免疫状态以及治疗方案的优化等因素, 以确保疫苗的安全性和有效性。

6 mRNA 肿瘤疫苗面临的挑战及前景

要实现 mRNA 肿瘤疫苗的广泛应用, 目前还有一系列挑战需要克服, 主要有: 第一、抗原的特异性不够, 不能完全调动免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用; 第二、每位患者的肿瘤都有其独特的特征, 在设计需要结合 TSA、TAA, 进行个体化设计; 第三、mRNA 在发挥作用前需要突破胞外屏障、内体逃逸等层层障碍, 这对递送系统的要求很高。

在递送系统的优化方面, 各研究人员正在探索各种策略使用各种 LNPs、聚合物、病毒样颗粒或 DNA 质粒等作为载体, 以提高 mRNA 稳定性和递送效率。其次, 开发能够针对患者个体化肿瘤抗原的疫苗, 将有助于提高 mRNA 肿瘤疫苗治疗的精准性。个性化疫苗的研发需要结合高通量测序、生物信息

学分析等技术, 对肿瘤组织进行深入研究, 了解每个患者的肿瘤特性和免疫状态, 从而设计符合个体需求的疫苗, 提高治疗效果。此外, mRNA 肿瘤疫苗与其他治疗手段的联用以形成多模态的治疗策略, 例如与免疫检查点抑制剂、化疗、放疗等联合使用, 可以充分利用不同治疗手段的优势, 弥补单一疗法的不足, 提供更全面的治疗选择。与细胞疗法、基因编辑等前沿技术相结合还开发出更加先进高效的治疗方案。随着科技不断进步和研究的深入, mRNA 肿瘤疫苗新抗原和递送系统得以在 AI 辅助下进行预测和设计, 在未来会有更多 mRNA 肿瘤疫苗进入临床应用阶段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] JASSIM A, RAHRMANN E P, SIMONS B D, et al. Cancers make their own luck: theories of cancer origins [J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(10): 710-24.

[2] WALDMAN A D, FRITZ J M, LENARDO M J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical

- practice [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(11): 651-68.
- [3] MALONE R W, FELGNER P L, VERMA I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(16): 6077-81.
- [4] KARIKO K, BUCKSTEIN M, NI H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA [J]. *Immunity*, 2005, 23(2): 165-75.
- [5] WEBB C, IP S, BATHULA N V, et al. Current Status and Future Perspectives on mRNA Drug Manufacturing [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(4): 1047-58.
- [6] HODGSON J. The pandemic pipeline [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 523-32.
- [7] SAHIN U, DERHOVANESEAN E, MILLER M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer [J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 222-6.
- [8] JAHANAFROOZ Z, BARADARAN B, MOSAFER J, et al. Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(3): 552-60.
- [9] VAIDYANATHAN S, AZIZIAN K T, HAQUE A, et al. Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 530-42.
- [10] WANG Y, ZHANG L, XU Z, et al. mRNA Vaccine with Antigen-Specific Checkpoint Blockade Induces an Enhanced Immune Response against Established Melanoma [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 420-34.
- [11] CORR M, TIGHE H. Plasmid DNA vaccination: mechanism of antigen presentation [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 1997, 19(2): 139-45.
- [12] MAASS G, SCHMIDT W, BERGER M, et al. Priming of tumor-specific T cells in the draining lymph nodes after immunization with interleukin 2-secreting tumor cells: three consecutive stages may be required for successful tumor vaccination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12): 5540-4.
- [13] NAIR S, BUITING A M, ROUSE R J, et al. Role of macrophages and dendritic cells in primary cytotoxic T lymphocyte responses [J]. *Int Immunol*, 1995, 7(4): 679-88.
- [14] HERKEL J, JAGEMANN B, WIEGARD C, et al. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5): 1079-85.
- [15] TUBO N J, JENKINS M K. CD4+ T Cells: guardians of the phagosome [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27(2): 200-13.
- [16] STUBER E, STROBER W. The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 979-89.
- [17] GRAYDON E K, CONNER T L, DUNHAM K, et al. Natural killer cells and BNT162b2 mRNA vaccine reactogenicity and durability [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1225025.
- [18] KNUDSON C J, ALVES-PEIXOTO P, MURAMATSU H, et al. Lipid-nanoparticle-encapsulated mRNA vaccines induce protective memory CD8 T cells against a lethal viral infection [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(9): 2769-81.
- [19] GOEL R R, PAINTER M M, APOSTOLIDIS S A, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern [J]. *Science*, 2021, 374(6572): abm0829.
- [20] 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): 251-9.
- [21] NITIKA, WEI J, HUI A M. The Development of mRNA Vaccines for Infectious Diseases: Recent Updates [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 5271-85.
- [22] ZENG C, ZHANG C, WALKER P G, et al. Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2022, 440: 71-110.
- [23] FUGLSANG A. Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 31(2): 247-9.
- [24] LEPPEK K, BYEON G W, KLDWANG W, et al. Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1536.
- [25] SAMPLE P J, WANG B, REID D W, et al. Human 5' UTR

- design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 803-9.
- [26] EDWARDS D K, JASNY E, YOON H, et al. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 1.
- [27] CARRALOT J P, PROBST J, HOERR I, et al. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(18): 2418-24.
- [28] BADEN L R, EL SAHLY H M, ESSINK B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(5): 403-16.
- [29] ROJAS L A, SETHNA Z, SOARES K C, et al. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2023, 618(7963): 144-50.
- [30] NDEUPEN S, QIN Z, JACOBSEN S, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory [J]. *bioRxiv*, 2021.
- [31] JACKSON L A, ANDERSON E J, ROUPHAEL N G, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(20): 1920-31.
- [32] RUI Y, WILSON D R, TZENG S Y, et al. High-throughput and high-content bioassay enables tuning of polyester nanoparticles for cellular uptake, endosomal escape, and systemic in vivo delivery of mRNA [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(1): eabk2855.
- [33] TU Z, YU Q, WU R, et al. High-Throughput Screening of Polymer Library for mRNA Tumor Vaccine Carriers with Innate Adjuvant Properties [J]. *Chemistry of Materials*, 2024.
- [34] RODRIGUES A F, REBELO C, SIMOES S, et al. A Polymeric Nanoparticle Formulation for Targeted mRNA Delivery to Fibroblasts [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(5): e2205475.
- [35] MEYER R A, HUSSMANN G P, PETERSON N C, et al. A scalable and robust cationic lipid/polymer hybrid nanoparticle platform for mRNA delivery [J]. *Int J Pharm*, 2022, 611: 121314.
- [36] JARZEBSKAN T, MELLETT M, FREI J, et al. Protamine-Based Strategies for RNA Transfection [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(6).
- [37] SCHEEL B, AULWURM S, PROBST J, et al. Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(10): 2807-16.
- [38] 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).
- [39] ZHU P, LI S Y, DING J, et al. Combination immunotherapy of glioblastoma with dendritic cell cancer vaccines, anti-PD-1 and poly I:C [J]. *J Pharm Anal*, 2023, 13(6): 616-24.
- [40] SAHIN U, OEHM P, DERHOVANESEAN E, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma [J]. *Nature*, 2020, 585(7823): 107-12.
- [41] JONES R P, LEE L Y W, CORRIE P G, et al. Individualized cancer vaccines versus surveillance after adjuvant chemotherapy for surgically resected high-risk stage 2 and stage 3 colorectal cancer: protocol for a randomized trial [J]. *Br J Surg*, 2023, 110(12): 1883-4.
- [42] PAPACHRISTOFILOU A, HIPPE M M, KLINKHARDT U, et al. Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 38.
- [43] WEBER J S, CARLINO M S, KHATTAK A, et al. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study [J]. *Lancet*, 2024, 403(10427): 632-44.