

引文格式:

赵浩, 柴德智, 蔡金旋, 等. mRNA 疫苗在药物开发的一些进展 [J]. 集成技术, 2023, 12(5): 62-75.

Zhao H, Chai DZ, Cai JX, et al. Some advances of mRNA vaccines in drug development [J]. Journal of Integration Technology, 2023, 12(5): 62-75.

mRNA 疫苗在药物开发的一些进展

赵 浩^{1,2} 柴德智^{2,3} 蔡金旋^{2,3} 刘兰兰^{4*} 张 键^{2,5,6*}

¹(东北林业大学生命科学学院 哈尔滨 150006)

²(中国科学院深圳先进技术研究院 能量代谢与生殖研究中心 深圳 518055)

³(中国科学院大学 北京 100049)

⁴(中国科学院深圳先进技术研究院 中国科学院健康信息学重点实验室
广东省纳米医药重点实验室 深圳 518055)

⁵(深圳理工大学(筹) 深圳 518055)

⁶(深圳市代谢健康重点实验室 深圳 518055)

摘 要 在制药领域, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型的暴发推动了 mRNA 疫苗的开发, 并使其迅速发展。与其他形式的疫苗相比, mRNA 疫苗生产过程简单, 安全性优于 DNA 疫苗; mRNA 编码的抗原易于在细胞中表达; mRNA 无须在细胞核中转录, 因此没有整合到宿主基因组的风险。然而, mRNA 疫苗也存在局限性, 如可能产生过敏、肾衰竭等严重副作用, 或在注射后可能迅速降解, 或引起细胞因子风暴。因此, 需解决 mRNA 疫苗的免疫原性及递送效率等问题。该文从 mRNA 疫苗的发展开始, 重点讲述 mRNA 疫苗的分子设计、递送系统及临床现状, 为后续 mRNA 疫苗的发展提供一些思考。

关键词 mRNA 疫苗; mRNA 分子设计; 递送系统

中图分类号 Q 789 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20230104001

收稿日期: 2023-01-04 修回日期: 2023-05-04

基金项目: 深圳市科技计划资助项目 (JCYJ20220818101218040); 深圳市代谢健康重点实验室 (ZDSYS20210427152400001)

作者简介: 赵浩, 硕士研究生, 研究方向为生殖与健康; 柴德智, 硕士研究生, 研究方向为代谢生殖; 蔡金旋, 硕士研究生, 研究方向为代谢生殖; 刘兰兰 (通讯作者), 副研究员, 研究方向为微纳仿生药物递送, E-mail: ll.liu@siat.ac.cn; 张键 (通讯作者), 研究员, 研究方向为能量代谢与生殖, E-mail: jian.zhang@siat.ac.cn。

Some Advances of mRNA Vaccines in Drug Development

ZHAO Hao^{1,2} CHAI Dezhi^{2,3} CAI Jinxuan^{2,3} LIU Lanlan^{4*} ZHANG Jian^{2,5,6*}

¹(School of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150006, China)

²(Center for Energy Metabolism and Reproduction, Shenzhen Institute of Advanced Technology,
Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

³(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

⁴(Key Lab of Health Informatics of Chinese Academy of Sciences, Guangdong Key Laboratory of Nanomedicine,
Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

⁵(Shenzhen University of Technology (preparatory), Shenzhen 518055, China)

⁶(Shenzhen Key Laboratory of Metabolic Health, Shenzhen 518055, China)

*Corresponding Authors: ll.liu@siat.ac.cn; jian.zhang@siat.ac.cn

Abstract The emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has led to notable advancements in the pharmaceutical sector regarding the development of mRNA vaccines. These vaccines have gained considerable attention given their straightforward production process, improved safety profile compared to DNA vaccines, and efficient expression of mRNA-encoded antigens within cells. In addition, mRNA vaccines offer the advantage of not requiring transcription within the nucleus, thereby eliminating the risk of integration into the host genome. Nevertheless, mRNA vaccines also have limitations, such as possible allergy, kidney failure, and other serious side effects, or may rapidly degrade after injection or cause a cytokine storm. These factors present substantial challenges concerning the immunogenicity and delivery of mRNA vaccines. The purpose of this article is to primarily focus on the molecular design, delivery systems, and current clinical status of mRNA vaccines, aiming to provide valuable insights for future advancements in this field.

Keywords mRNA vaccine; mRNA molecular design; delivery system

Funding This work is supported by Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20220818101218040) and Shenzhen Key Laboratory of Metabolic Health (ZDSYS20210427152400001)

1 前 言

在人类抗争疾病的历史中, 疫苗扮演着重要角色。1796 年, Edward Jenner 从受感染的挤乳女工手上取得牛痘脓液, 并接种到健康人体内, 发现其对天花有抵抗力^[1]。从此, 世界上第一支疫苗诞生, Edward 被誉为“免疫学之父”。

随着技术的不断突破, 已有多种病毒来源疫苗被应用于常规疫苗接种, 并取得较大进展。

2006 年, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准了人类历史上第一种癌症疫苗: 宫颈癌疫苗 (Gardasil)。该疫苗可预防人乳头瘤病毒 16/18 感染, 较大程度降低宫颈癌发病率^[2-3]。然而, 大多数疫苗从临床前实验到应用的周期较长, 且疫苗本身成为病毒病原体的风险较高, 此外, 人们对疫苗大规模生产和快速开发的需求日益增加, 促使科研人员开始研究新的疫苗系统。

RNA 疫苗是分子生物学和免疫学相结合的新技术产物, 如 mRNA 疫苗、siRNA 疫苗、miRNA 疫苗等。其中, mRNA 疫苗将编码抗原的外源 mRNA 引入体细胞, 通过表达系统合成抗原引起免疫应答^[4-5]。mRNA 疫苗的生产工艺简单、快速、成本低。2019 年末—2022 年, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2) 在全球传播, mRNA 疫苗发展迅速。然而, mRNA 疫苗在注射后易降解, 并可能会引起细胞因子风暴及其他副作用, 因此, 解决 mRNA 疫苗的免疫原性、优化递送系统, 可较大程度地增强疫苗的有效性及其安全性。

综上所述, 本文综述了 mRNA 疫苗在设计上如何降低免疫原性, 以及目前可用的关键递送系统技术, 可为其未来研究和开发提供参考。

2 发展历程

1990 年, Wolff 等^[6]将体外合成的 mRNA 通过肌肉注射到小鼠骨骼肌中, 成功使小鼠骨骼肌内特定蛋白质表达, 这使得人们逐渐开始关注 RNA 治疗。在早期研究中, RNA 治疗主要应用于肿瘤治疗, 2004 年, Carralot 等^[7]首次将 mRNA 注射到小鼠体内, 并成功引起小鼠的免疫反应。这鼓舞了 RNA 治疗的研究。继动物实验后, 2008 年, RNA 治疗被首次应用于癌症患者, 并使一些患者成功出现体液免疫反应^[8]。然而, 在当时, 人们普遍认为, 生

产及处理合成 RNA 载体成本较高, 且较为复杂, 因此, 科研聚焦质粒 DNA 技术及重组病毒载体研发^[9]。最初, mRNA 治疗主要有两种形式: 一种是直接注射 mRNA^[8,10]; 另一种是通过 mRNA 在体外转染树突状细胞, 增强免疫原性进行过继治疗^[11-12]。由此, 制药业开始扩大 mRNA 生产, 为 mRNA 疫苗的问世奠定基础。

mRNA 疫苗是继第一代减毒/灭活疫苗、第二代亚单位疫苗和重组基因疫苗之后的第三代核酸疫苗^[13]。目前, 核酸疫苗主要分为 DNA 疫苗和 RNA 疫苗, 两者均具有较大的开发潜力^[13]。然而, 开发 mRNA 疫苗首先要解决几个难题, 即如何解决 mRNA 的不稳定性、较强的免疫原性, 以及缺乏高效的递送系统^[14-18]。2005 年, Karikó 等^[19]用“假尿苷”替换构成 mRNA 的尿苷, 较大程度地遏制炎症的发生, 解决了免疫原性较高的问题。从 1990 年科研人员开始针对 mRNA 引起免疫反应进行研究至今, 已有多款 mRNA 疫苗问世, mRNA 疫苗技术已趋近成熟, 如图 1 所示。

3 mRNA 疫苗的制备及递送系统

3.1 mRNA 疫苗的分类

mRNA 疫苗可分为两类: 自扩增型 mRNA 和非复制型 mRNA^[14]。与非复制型 mRNA 相比, 自扩增型 mRNA 不仅编码目标抗原, 还编码复制酶复合体, 可使细胞内的疫苗 RNA 扩增

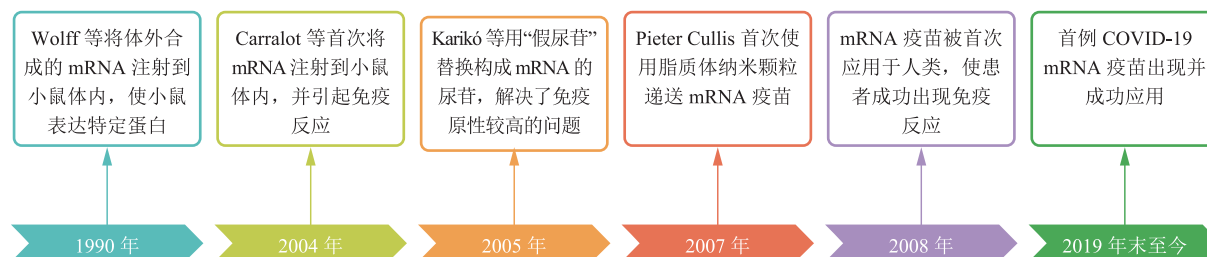


图 1 mRNA 疫苗的发展历程

Fig. 1 The development of mRNA vaccines

和蛋白质表达增强^[13]。非复制型 mRNA 只编码目的抗原蛋白, 结构简单, 但需要成熟的优化工艺才能以较低剂量诱发有效的免疫应答^[20-21]。

mRNA 疫苗的基本元件包括: 5'帽子结构(5'cap structure, 5'Cap m7Gp3N)、5'及 3'非翻译区(untranslated region, UTR)、编码抗原蛋白的开放阅读框(open reading frame, ORF)、3'多聚腺苷酸(polyadenylate, poly A)尾巴结构。此外, 非复制型 mRNA 的开放阅读框前需插入信号肽, 自扩增型 mRNA 在此基础上还在开放阅读框前插入自扩增非结构基因^[22-23]。

3.2 mRNA 疫苗的制备

目前, 较普遍的合成 mRNA 的方式是体外转录(*in vitro* transcription, IVT)合成^[24]。由于 IVT mRNA 使免疫细胞激活, 产生由 Toll 样受体介导的免疫反应^[13], 会诱发机体的炎症反应, 且由于单链的 mRNA 不稳定, 因此, 需修饰 mRNA, 消除其免疫原性, 增强其稳定性。

3.2.1 5'端加帽

mRNA 的稳定性与 5'Cap 相关, 传统的 5'Cap 由 3 部分组成: Cap-0(m7GppXpYp)、Cap-1(m7GpppXmpYp)、Cap-2(m7GpppXmpYmp)。在加帽后, mRNA 的 5'端不存在游离磷酸基, 因此不会被碱性磷酸酶识别降解, 且帽子后面两个核苷酸上的甲基阻断了磷酸二酯键上游离的 2'-羟基基团, 使其不会被 RNA 酶降解^[13], 因此, 5'Cap 可使 mRNA 免受 5'→3'外切酶的攻击。

目前, 体外转录 mRNA 较为先进的加帽方法有 2 种: 酶加帽法和化学法。牛痘病毒加帽系统是最具有代表性的酶加帽法, 主要利用牛痘病毒加帽酶, 结合逆终止聚合酶、鸟嘌呤基转移酶和鸟嘌呤-N7 甲基转移酶的酶活性合成 Cap-0 结构。该方法产生的 5'帽结构与天然真核 mRNA 最相似, 加帽效率较高, 不会对 RNA 的长度、序列和底物结构产生影响^[25]。化学法在体外转录过程中添加 Cap 类似物, 较易造成 Cap 类似物定位

到 mRNA 的末端, 并形成反向异构体, 进而影响下游流程。为解决该问题, Hong 等^[26]开发了抗-反转帽子类似物。抗-反转帽子类似物会在 C2 或 C3 位进行修正, 以确保甲基在转录过程中取代正确位置的羟基。

3.2.2 5'UTR/3'UTR 的优化

UTR 包括茎环结构、上下游起始密码子和 ORF、核糖体进入位点, 以及各种可被 RNA 结合蛋白结合的顺式元件, 可调控 mRNA 的半衰期和翻译效率^[13,27]。通常, UTR 是裸露的, 未被核糖体包裹, 因此易于与调控因子相互作用。

5'UTR 序列可以决定核糖体通过哪条起始途径到达起始密码子, 起始效率如何, 选择哪个起始位点。5'UTR 应是短而松散的, 因为稳定的二级结构会阻止小分子核糖体与初始编码元件结合, 从而导致翻译效率降低^[28]。

3'UTR 是 mRNA 不稳定因素的集中区域, 含有丰富的 A、U 元素区域及 G、U 元素区域^[29-30]。富含 U 的 mRNA 序列是激活 Toll 样受体的关键元件^[31], 而缩短 U 富集序列可能是消除免疫原性的一种潜在方法^[32]。此外, 引入稳定元件可提高 mRNA 的稳定性, 延长其半衰期。

ORF 中的密码子会对转录组翻译和 mRNA 稳定性产生影响^[33]。用最优密码子替换非最优密码子可显著提高 mRNA 的稳定性、翻译速度和蛋白质产量; 密码子偏差与 ORF 中的 GC 含量相关, 因此, 调整 ORF 中的 GC 含量, 可改变翻译伸长率^[34]。

3.2.3 核苷酸修饰

由于 DNA 和 RNA 可通过激活 Toll 样受体刺激哺乳动物的免疫系统, 因此通过对核苷酸进行化学修饰可有效降低 mRNA 的免疫原性。含有甲基化 CpG 基因序列的核苷不会引起机体的免疫反应。因此, Weng 等^[35]用含有甲基化序列的核苷取代原有核苷, 有效降低了 mRNA 的免疫原性。

3.2.4 3'poly A 尾的设计

3'poly A 尾是真核生物 mRNA 的 3'端。当 mRNA 进入细胞质后, poly A 结合蛋白可通过真核翻译起始因子与 5'Cap 相连, 形成一种稳定的闭环结构, 促进翻译起始^[15]。就维持 mRNA 的稳定性, 以及是否成功翻译而言, poly A 尾至关重要^[36], 而从 mRNA 中删除 poly A 位点会使 mRNA 不稳定^[37]。

Poly A 尾的添加有两种方法: 一种是重组 poly A 聚合酶介导的聚腺苷酸化; 另一种是根据设计的 DNA 模板进行转录, 将 poly A 尾部添加到 mRNA 的 3'端^[38]。两种方法的区别: 前者长度固定, 后者长度可调。Poly A 尾长度与 mRNA 的翻译和稳定性呈正相关, Urbina 等^[39]以及 Weissman 等^[40]的研究表明, 用多核苷酸磷酸化酶去除 poly A, 可减小肽延伸率和翻译轮数, 添加 poly A 尾巴可减少 U 序列, 降低 mRNA 的免疫原性。

3.2.5 其他修饰

除上述修饰外, 还需对 mRNA 编码的密码子进行改造。由于各类生物在编码氨基酸方面的偏好不同, mRNA 编码抗原的密码子可能在宿主体内很少被使用, 因此, 可针对宿主编码偏好设计密码子, 使抗原蛋白产量提升^[41]。mRNA 的 G:C 比例影响 mRNA 的稳定性, G:C 比例越高, mRNA 的稳定性越高^[42]。然而, GC 碱基易产生二级结构, 阻碍抗原翻译, 因此需考虑 GC 含量过高引起的蛋白质表达效率低下^[5]。其次, 在体外转录过程中, 需对 mRNA 进行纯化, 这对消除免疫原性至关重要^[35,40,43-44]。

此外, mRNA 5'端的帽子结构可通过与真核翻译起始因子 4E 之间的相互作用与 poly A 尾形成闭环, 这种帽尾组合可提高翻译效率, 但在 mRNA 5'末端附近同时存在翻译终止的风险^[45]。

3.3 mRNA 的递送系统

如何使 RNA 有效进入细胞是一项难题。在体

内, 裸 RNA 属于外源核酸, 易被免疫系统识别, 并因此被核酸酶降解; 裸 RNA 分子量较大, 无法通过被动扩散进入细胞^[46], 因此需传递系统来保护 RNA。RNA 在细胞内并不进入细胞核, 仅进入细胞质, 并转化为靶蛋白, 因此, 需考虑如何使 RNA 通过携带负电荷的磷脂双分子层。

RNA 疫苗的传递系统可分为非病毒载体传递系统和病毒载体传递系统, 一些混合系统也被用于传递^[47]。

3.3.1 非病毒载体传递系统

3.3.1.1 脂质体复合物

阳离子脂质体是首个用于 mRNA 疫苗的脂质体传递材料。其结构为单层或多层磷脂组成的球形囊泡。仿照于磷脂双分子层, 阳离子脂质体也具有极性头部基团和非极性尾部基团, 包裹含有目标基因的水核。阳离子脂质体的亲水基团、疏水基团相互作用形成稳定的囊泡结构, 因此, 脂质体的保护可使 mRNA 免受 RNA 酶的降解^[13]。然而, 阳离子脂质体在生理条件下带正电荷, 很可能与生物液体中的其他带负电荷的分子相互作用, 此外, 还易被免疫细胞捕获, 导致传递效果不佳。

3.3.1.2 脂质体纳米颗粒

脂质体纳米颗粒(liposome nanoparticles, LNPs)是目前最先进的 mRNA 疫苗递送系统。LNPs 最初被用来传递 siRNA, 现已应用于 mRNA 疫苗的传递^[48-51]。LNPs 由可电离的氨基脂质、辅助脂质(磷脂)、胆固醇、聚乙二醇组成, 是一种双层脂分子的稳定粒子, 可将 mRNA 稳定地传递进体内^[52-53]。其中, 可电离的氨基脂质可与包内体膜相互作用, 帮助 mRNA 从包内体逃逸^[53]; 聚乙二醇可延长 LNPs 的循环时间; 胆固醇、磷脂可使 LNPs 的结构保持稳定^[54]。2007 年, de Jong 等^[55]首次使用脂质体纳米颗粒包裹抗原, 成功使免疫效果增强, 并诱导更强的免疫反应, 初步揭示了脂质体纳米颗粒包封在免疫学

方面的优势。

3.3.1.3 聚合物

就脂质体纳米颗粒而言, 聚合物材料的临床研究较少。但自 1987 年 Wu 等^[56]使用阳离子聚合物——聚赖氨酸转染 DNA 质粒以来, 已开发出多种非病毒聚合物载体, 如精胺、聚乙烯亚胺、壳聚糖和聚氨酯等。目前, 常用的聚合物输送系统有聚酰胺、聚 β -氨基酯和聚乙烯亚胺^[13]。然而, 这些聚合物具有多分散性及难以降解等缺点^[57], 因此, 为解决该问题, 提高治疗效果, Dong 等^[58]、Patel 等^[59-60]添加了脂链, 扩展了分支结构, 构建了促进生物降解的结构域。

聚乙烯亚胺作为首例出现的非病毒载体聚合物, 可将 DNA 递送到小鼠大脑, 这表明该聚合物作为载体传递的高效性^[61]。saRNA 对核糖核酸酶敏感, 且易被树突状细胞无效吸收, 而将 mRNA 浓缩到聚乙烯亚胺可解决问题。Démoulin 等^[62]指出, 使用聚乙烯亚胺包裹流感病毒血凝素和核蛋白壳的 mRNA 可引起胞浆复合物促进 mRNA 翻译, 并诱导体液和细胞免疫反应。

Luo 等^[63]以 N-羧基酸酐为开环聚合物, 合成聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)-b-(L-聚亮氨酸)共聚物, 并封装 RNA, 该疫苗通过增加肿瘤引流淋巴结中的成熟树突状细胞(Dendritic cells, DC)和减少免疫抑制细胞, 可有效消除肿瘤微环境中的免疫抑制, 从而引发较大的抗肿瘤免疫应答和显著的肿瘤消退, 延长患者的生存期。

3.3.1.4 肽

肽作为一种携带大量正电荷氨基的大分子, 有较好的递送效果, 可作为 mRNA、siRNA 及 miRNA 的传递系统。由于 RNA 都带有负电, 因此, 可利用阳离子肽的静电作用传递 RNA。

阳离子多肽纳米颗粒是一种多功能的高效传递系统, Liu 等^[64-66]使用基于聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)-b-聚(L-半胱氨酸)杂化多肽自组装纳米颗粒递送 RNA, 可将免疫抑制肿瘤相关巨噬细

胞再极化为抗肿瘤 M1 型巨噬细胞, 并诱导肿瘤消退。其核心部分为半乳糖组分, 带正电荷的聚赖氨酸可通过静电吸附包封 miRNA, 多聚-L-半胱氨酸的巯基可以自交联, 形成氧化还原反应型二硫键, 以增强纳米颗粒的稳定性。

鱼精蛋白是传递 mRNA 的阳离子肽之一, 可防止 mRNA 被血清中的核糖核酸酶降解。Mai 等^[67]指出, 利用鱼精蛋白递送 mRNA 可有效抑制小鼠侵袭性肺癌肿瘤生长。鱼精蛋白的保存性较好, 可在不稳定的温差下使 mRNA 保持活性, Stitz 等^[68]使用 CureVac 公司的 RNActive 平台制备的狂犬病毒 mRNA 疫苗, 在 $-80\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存数月仍保持有效性。但是, 若不使用 RNActive 技术, 仅用鱼精蛋白传递 mRNA, 则会抑制翻译过程, 影响疫苗的效力^[69]。此外, 鱼精蛋白可被当作一种佐剂, Scheel 等^[70]指出, 鱼精蛋白传递的 mRNA 在体内可激活树突状细胞和单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 和干扰素 α , 这两种因子又会通过 Toll 样受体信号通路将信号传递给免疫细胞, 这会导致免疫细胞激活并对进入体内的 mRNA 进行识别从而达到靶向治疗的目的。目前, 鱼精蛋白已进入临床评估^[71-73]。

3.3.2 病毒载体传递系统

类病毒复制子颗粒(virus-like replicon particles, VRPs)可包裹编码抗原的自扩增型 mRNA, 并将其输送到细胞质, 就像病毒感染一样, 在体外合成病毒结构蛋白, 然后封装编码抗原的自扩增型 mRNA^[74]。Bogers 等^[75]的研究表明, 使用 VRPs 包裹编码 C 类胞膜糖蛋白的人类免疫缺陷病毒 mRNA, 可在恒河猴体内引起免疫反应。除此之外, 在结肠癌及黑色素瘤的治疗方面, VRPs 也取得了成效, 利用昆津病毒复制子颗粒包裹编码粒细胞集落刺激因子的 mRNA, 可治愈皮下 CT26 结肠癌和 B16-OVA 黑色素瘤^[76]。VRPs 虽对病毒性疾病、细菌性疾病及癌症有一定治疗作用, 但由于生产效率跟细胞系生产 VRPs

的速度有关, 因此无法实现大规模生产^[77]。此外, VRPs 复合物会促进抗载体抗体的产生^[78], 因此, 该载体系统的使用存在局限性。

3.3.3 其他递送 mRNA 的方法及材料

一般情况下, mRNA 疫苗需递送系统辅助给药, 但是, 直接使用裸 mRNA 也可进行给药。将林氏溶液或乳酸林氏溶液作为 mRNA 溶剂^[79], 由于不使用递送系统辅助, 因此, 裸 mRNA 需利用电穿孔^[80]、光穿孔、物理性膜破坏及生物化学膜破坏等方法递送。然而, 若无递送系统保护, 则需考虑 mRNA 的不稳定性, 因此, 一般情况下, 通过改变给药方式来弥补该缺点, 具体包括皮内注射^[81]、皮下注射^[82]、肌肉注射^[83]等。

4 mRNA 疫苗的应用

4.1 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型暴发前的 mRNA 疫苗研究

在 SARS-CoV-2 大流行之前, mRNA 疫苗的临床研究聚焦于癌症及病毒性传染病, 包括非小细胞肺癌、卵巢癌, 以及 HIV 和黄病毒属等, 其中, 大多处于临床 I/II 期。早期 mRNA 癌症疫苗的递送多使用树突状细胞(DC)。DC 是一种理想的疫苗靶标, 作为抗原呈递细胞, 可将抗原内化、加工, 并呈递给免疫细胞, 从而产生适应性免疫反应^[84]。Boczkowski 等^[11]发现, 利用针对卵清蛋白的 RNA 设计的 DC 疫苗可使小鼠肺癌转移显著减少。此后, 通过对递送系统的改进, mRNA 癌症疫苗已趋于成熟, 且其他病毒性传染病的研究也大多进入临床试验阶段。表 1 和表 2 分别展示了目前临床试验中的 mRNA 癌症疫苗和 mRNA 病毒疫苗。

4.2 新型冠状病毒感染 mRNA 疫苗

2019 年年底, SARS-CoV-2 在全球范围传播, 全球开始大范围暴发不明肺炎。世界主要

的大型制药公司以及各大科研机构开始致力于研究新冠疫苗。根据世界卫生组织统计, 截至 2022 年 8 月, 已有 170 种新冠疫苗处于临床研发阶段, 198 种处于预临床研究, 其中, RNA 疫苗 41 种。目前, 新冠疫苗的开发主要集中在 3 家公司: BioNTech、CureVac 和 Moderna。2020 年底, Pfizer 与 BioNTech 合作开发的 mRNA 新冠疫苗 BNT162b2 以及 Moderna 的 mRNA-1273 被 FDA 授权可紧急使用。2021 年 5 月 10 日, FDA 批准, 在 12~18 岁的青少年中, 紧急使用 Moderna 的 mRNA-1273 疫苗。此外, 2021 年 8 月 23 日, 经 FDA 批准, BNT162b2 成为首个获得批准的 COVID-19 疫苗。

4.2.1 疫苗效力

在疫苗有效率方面, Moderna 的 mRNA-1273 疫苗在注射第二剂后预防有效率为 94.1%; Pfizer/BioNTech 的 BNT162b2 在注射第二剂后预防有效率为 95%, 并于 2021 年 3 月 31 日, Pfizer 在经过 I/II/III 期实验后宣布, 该疫苗在青少年 COVID-19 上的预防有效率高达 100%。

Xie 等^[85]的研究表明, 与原始病毒株相比, BNT162b2 疫苗对病毒突变株 N501Y 的疗效未降低。Moderna 的 mRNA-1273 疫苗对病毒突变株也有一定作用, 该疫苗对 B.1.1.7 变体保持其中和活性, 对 B.1.351 变体的中和抗体滴度降低^[86]。

4.2.2 疫苗安全性

BNT162b2 III 期试验的安全性测试(在疫苗第二剂接种后 14 周内)显示: 较常见的局部反应为注射部位轻度至中度疼痛; 常见的全身反应包括疲劳、头痛; 小部分人群伴随着发热($\geq 38^\circ\text{C}$); 部分人群会有过敏反应。Garvey 等^[87]指出, 过敏反应可能与聚乙二醇有关。

Moderna 安全性评估显示: 局部不良反应为疼痛、红斑、肿胀和淋巴结肿大; 全身不良反应为发热、头痛、疲劳、肌痛、关节痛、恶心/呕吐和寒颤^[88]。

表 1 临床试验中的癌症 mRNA 疫苗^[14]Table 1 Cancer mRNA vaccines in clinical trials^[14]

癌症类型	NCT 号	药物	阶段	状态
非小细胞肺癌	NCT03164772	BI 1361849 (CV9202)+德瓦鲁单抗+/-曲美木单抗	I/II	招募
	NCT03908671	编码新抗原的个性化 mRNA 疫苗	—	未招募
	NCT02688686	细胞因子信号传导抑制因子(SOCS)1	I/II	未知
卵巢癌	NCT04163094	W_ova1+卡铂/紫杉醇	I	招募
	NCT01334047	DC-006	I/II	终止
	NCT01456065	负载 TERT mRNA 和 Survivin 肽的 DC	I	未知
黑色素瘤	NCT00204607	mRNA+GM-CSF	I/II	已完成
	NCT00978913	hTERT、survivin 和 p53 转染的 DC	I	已完成
	NCT01278940	mRNA 转染的 DCs+IL-2	I/II	已完成
	NCT01530698	mRNA 电穿孔自体树突状细胞疫苗	I/II	已完成
	NCT03480152	(NCI)-4650, 一种基于 mRNA 的个性化癌症疫苗	I	终止
	NCT00929019	用 mRNA 电穿孔的自体树突状细胞	I/II	终止
脑癌(主要是胶质母细胞瘤)	NCT00846456	肿瘤干细胞来源的 mRNA 转染的树突状细胞	I/II	已完成
	NCT00626483	负载 CMV pp65 LAMP mRNA 的 DC+GM-CSF	I	已完成
	NCT03548571	用编码 survivin 和 hTERT+替莫唑胺的 mRNA 转染的 DC	II/III	已完成
	NCT02649582	自体 WT1 mRNA 负载 DC+替莫唑胺	I/II	招募
前列腺癌	NCT01278914	mRNA 转染的树突状细胞	I/II	已完成
	NCT01446731	用 PSA、PAP、survivin 和 hTERT mRNA+多西紫杉醇转染的 DC	II	已完成
	NCT02452307	肽疫苗+蒙太尼 ISA-51+/-GM-CSF 公司+/-咪喹莫德+/-mRNA/鱼精蛋白	I/II	未知
血液系统癌症(主要为白血病)	NCT00834002	DC 装载 Wilms 肿瘤基因(WT1)mRNA	I	已完成
	NCT01734304	用编码 WT1、PRAME 和 CMVpp65 的 mRNA 电穿孔的 DC	I/II	已完成
	NCT00510133	GRNVAC1(编码人端粒酶逆转录酶(hTERT)和一部分溶酶体相关膜蛋白 LAMP-1(LAMP)的 mRNA)	II	已完成
	NCT02528682	MiHA mRNA 负载的 PD-L 增强 DC	I/II	已完成
消化系统癌症	NCT00228189	DC 装载 CEA mRNA	I/II	已完成
	NCT03468244	编码新抗原的个性化 mRNA 疫苗	—	招募
	NCT02693236	腺病毒转染的自体 DCs+CIK 细胞	I/II	未知

5 展 望

mRNA 疫苗技术日益成熟, 其优点显著: mRNA 无须在细胞核中转录, 无整合到宿主基因组的危险; 可作为内源性抗应激物质, 组织相容性复合体 I 分子促进编码肽的呈递, 从而激活细胞毒性 T 淋巴细胞, 以杀死肿瘤细胞。

在病毒性疾病预防方面, 包括严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型感染、狂犬病、呼吸道合胞病毒感染、寨卡病毒感染、人类免疫缺陷病毒感

染等, 取得了进展。尤其是在新冠肺炎流行期间, 新冠肺炎 mRNA 疫苗取得较大突破。

虽然许多候选疫苗仍处于临床前和早期临床 I/II 阶段, 但这并未降低该领域研发的热情, 越来越多的公司和机构进入该领域。目前, 许多完全批准的商业 mRNA 疫苗正在迅速进入市场, 据 BioNTech 和复星制药的创始人兼首席执行官 Ugur Sahin 称, 他已授权中国独家开发和商业化基于 BioNTech 专有 mRNA 技术平台的严重急性呼吸综合征疫苗。

表 2 临床试验中抗病毒性疾病的 mRNA 疫苗^[14]Table 2 mRNA vaccines against viral diseases in clinical trials^[14]

疾病类型/病毒类型	NCT 号	药物	阶段	状态
SARS-CoV-2	NCT04523571	BNT162b1+安慰剂	I	招募
	NCT04449276	CVnCoV 疫苗+安慰剂	I	招募
	NCT04470427	mRNA-1273+安慰剂	III	招募
	NCT04368728	BNT162b1+BNT162b2	I/II/III	招募
	NCT04515147	CVnCoV	IIA	尚未招募
	NCT04283461	mRNA-1273	I	进行中, 未招募
	NCT04405076	mRNA-1273+安慰剂	IIA	进行中, 未招募
狂犬病	NCT02241135	编码狂犬病病毒糖蛋白的 CV7201 mRNA	I	已完成
	NCT03713086	Rabipur®	I	进行中, 未招募
HIV-1	NCT00833781	mRNA 转染的自体 DC+/-无 mRNA 转染的自体 DC	I/II	已完成
	NCT02413645	TriMix mRNA +/-HIV mRNA	I	已完成
	NCT02888756	iHIVARNA-01+TriMix +/-安慰剂	IIA	终止
寨卡病毒	NCT03014089	mRNA-1325+安慰剂	I	已完成
	NCT04064905	mRNA-1893+安慰剂	I	进行中, 未招募
肺结核	NCT01669096	GSK 692342	II	已完成
人副流感病毒以及人偏肺病毒	NCT03392389	mRNA-1653+安慰剂	I	已完成
	NCT04144348	mRNA-1653+安慰剂	I B	招募
埃博拉病毒	NCT02485912	分别编码两种扎伊尔毒株埃博拉糖蛋白的两种单独的 mRNA	I	已完成
流感	NCT03076385	VAL-506440+安慰剂	I	已完成
呼吸道合胞病毒	NCT04528719	mRNA-1345+安慰剂	I	尚未招募
巨细胞病毒感染	NCT03382405	mRNA-1647, mRNA-1443	I	进行中, 未招募
	NCT04232280	mRNA-1647+安慰剂	II	进行中, 未招募

近年来, mRNA 疫苗技术取得了快速发展, 但如何更有效地激活免疫应答, 仍是挑战性问题。此外, 开发最佳递送系统, 保护 mRNA 在体内不被降解, 以及 mRNA 疫苗的安全性问题仍不容小觑。在开发 mRNA 疫苗时, 应考虑抗体依赖增强风险。

参 考 文 献

- [1] Moore ZS, Seward JF, Lane JM. Smallpox [J]. The Lancet, 2006, 367(9508): 425-435.
- [2] Malagón T, Drolet M, Boily MC, et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2012, 12(10): 781-789.
- [3] Kirby T. FDA approves new upgraded Gardasil 9 [J]. The Lancet Oncology, 2015, 16(2): e56.
- [4] Pollard C, De Koker S, Saelens X, et al. Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines [J]. Trends in Molecular Medicine, 2013, 19(12): 705-713.
- [5] Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, et al. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response [J]. Trends in Molecular Medicine, 2020, 26(3): 311-323.
- [6] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247(4949): 1465-1468.
- [7] Carralot JP, Probst J, Hoerr I, et al. Polarization of immunity induced by direct injection of naked

- sequence-stabilized mRNA vaccines [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004, 61(18): 2418-2424.
- [8] Weide B, Carralot JP, Reese A, et al. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA [J]. Journal of Immunotherapy, 2008, 31(2): 180-188.
- [9] Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects [J]. Vaccine, 1999, 18(9-10): 765-777.
- [10] Granstein RD, Ding WH, Ozawa H. Induction of anti-tumor immunity with epidermal cells pulsed with tumor-derived RNA or intradermal administration of RNA [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2000, 114(4): 632-636.
- [11] Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, et al. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of Experimental Medicine, 1996, 184(2): 465-472.
- [12] Boczkowski D, Nair S. RNA as performance-enhancers for dendritic cells [J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2010, 10(4): 563-574.
- [13] Liang YJ, Huang LP, Liu TC. Development and delivery systems of mRNA vaccines [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 718753.
- [14] Wang Y, Zhang ZQ, Luo JW, et al. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy [J]. Molecular Cancer, 2021, 20(1): 1-23.
- [15] Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology [J]. Current Opinion in Immunology, 2020, 65: 14-20.
- [16] Naik R, Peden K. Regulatory considerations on the development of mRNA vaccines [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2022, 440: 187-205.
- [17] Rice AM, Morales AC, Ho AT, et al. Evidence for strong mutation bias toward, and selection against, U content in SARS-CoV-2: implications for vaccine design [J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(1): 67-83.
- [18] Brito LA, Kommareddy S, Maione D, et al. Self-amplifying mRNA vaccines [J]. Advances in Genetics, 2015, 89: 179-233.
- [19] Karikó 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): 165-175.
- [20] Tews BA, Meyers G. Self-replicating RNA [J]. Methods in Molecular Biology, 2016, 1499: 15-35.
- [21] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2018, 17(4): 261-279.
- [22] Versteeg L, Almutairi MM, Hotez PJ, et al. Enlisting the mRNA vaccine platform to combat parasitic infections [J]. Vaccines (Basel), 2019, 7(4): 122.
- [23] Lundstrom K. Replicon RNA viral vectors as vaccines [J]. Vaccines (Basel), 2016, 4(4): 39.
- [24] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2014, 13(10): 759-780.
- [25] Yuan Y, Gao F, Chang Y, et al. Advances of mRNA vaccine in tumor: a maze of opportunities and challenges [J]. Biomarker Research, 2023, 11(1): 6.
- [26] Hong SP, McIntosh MC. An approach to the synthesis of the eupomatilones [J]. Organic Letters, 2002, 4(1): 19-21.
- [27] Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, et al. Developing mRNA-vaccine technologies [J]. RNA Biology, 2012, 9(11): 1319-1330.
- [28] Pelletier J, Sonenberg N. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5'noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency [J]. Cell, 1985, 40(3): 515-526.

- [29] Murray EL, Schoenberg DR. A+U-rich instability elements differentially activate 5'-3' and 3'-5' mRNA decay [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(8): 2791-2799.
- [30] Louis IV, Bohjanen PR. Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1 [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21(4): 444-451.
- [31] Hornung V, Barchet W, Schlee M, et al. RNA recognition via TLR7 and TLR8 [J]. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008, (183): 71-86.
- [32] Thess A, Grund S, Mui BL, et al. Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals [J]. *Molecular Therapy*, 2015, 23(9): 1456-1464.
- [33] Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability [J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1111-1124.
- [34] Hanson G, Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 19(1): 20-30.
- [35] Weng YH, Li CH, Yang TR, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107534.
- [36] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells [J]. *Blood*, 2006, 108(13): 4009-4017.
- [37] Whitelaw E, Coates A, Proudfoot NJ, et al. Globin gene transcripts can utilize histone gene 3' end processing signals [J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(17): 7059-7070.
- [38] Passmore LA, Collier J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 23(2): 93-106.
- [39] Urbina F, Morales-Pison S, Maldonado E. Enzymatic protein biopolymers as a tool to synthesize eukaryotic messenger ribonucleic acid (mRNA) with uses in vaccination, immunotherapy and nanotechnology [J]. *Polymers (Basel)*, 2020, 12(8): 1633.
- [40] Weissman D, Karikó K. mRNA: fulfilling the promise of gene therapy [J]. *Molecular Therapy*, 2015, 23(9): 1416-1417.
- [41] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression [J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(7): 346-353.
- [42] Kudla G, Lipinski L, Caffin F, et al. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells [J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(6): e180.
- [43] Batey RT, Kieft JS. Improved native affinity purification of RNA [J]. *RNA*, 2007, 13(8): 1384-1389.
- [44] Weissman D, Pardi N, Muramatsu H, et al. HPLC purification of *in vitro* transcribed long RNA [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 969: 43-54.
- [45] Shirokikh NE, Preiss T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: recent insights and open questions [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2018, 9(4): e1473.
- [46] Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis [J]. *The Biochemical Journal*, 2004, 377(Pt 1): 159-169.
- [47] Zhang RX, Ahmed T, Li LY, et al. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(4): 1334-1355.
- [48] Islam MA, Reesor EKG, Xu YJ, et al. Biomaterials for mRNA delivery [J]. *Biomaterials Science*, 2015, 3(12): 1519-1533.

- [49] Shin MD, Shukla S, Chung YH, et al. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward [J]. *Nature Nanotechnology*, 2020, 15(8): 646-655.
- [50] Liu J, Chang J, Jiang Y, et al. Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bioreducible lipid and messenger RNA nanoparticles [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(33): e1902575.
- [51] Lokugamage MP, Gan ZB, Zurla C, et al. Mild innate immune activation overrides efficient nanoparticle-mediated RNA delivery [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(1): e1904905.
- [52] Kuntsche J, Horst JC, Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 417(1-2): 120-137.
- [53] Ramishetti S, Hazan-Halevy I, Palakuri R, et al. A combinatorial library of lipid nanoparticles for RNA delivery to leukocytes [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(12): e1906128.
- [54] Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: current perspectives [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020, 154-155: 37-63.
- [55] de Jong S, Chikh G, Sekirov L, et al. Encapsulation in liposomal nanoparticles enhances the immunostimulatory, adjuvant and anti-tumor activity of subcutaneously administered CpG ODN [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2007, 56(8): 1251-1264.
- [56] Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(10): 4429-4432.
- [57] Kowalski PS, Rudra A, Miao L, et al. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery [J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(4): 710-728.
- [58] Dong YZ, Dorkin JR, Wang WH, et al. Poly(glycoamidoamine) brushes formulated nanomaterials for systemic siRNA and mRNA delivery *in vivo* [J]. *Nano Letters*, 2016, 16(2): 842-848.
- [59] Patel AK, Kaczmarek JC, Bose S, et al. Inhaled nanoformulated mRNA polyplexes for protein production in lung epithelium [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(8): e1805116.
- [60] Kaczmarek JC, Patel AK, Kauffman KJ, et al. Polymer-lipid nanoparticles for systemic delivery of mRNA to the lungs [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(44): 13808-13812.
- [61] Bousif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine [C] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995: 7297-7301.
- [62] Démoulin T, Milona P, Englezou PC, et al. Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines [J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016, 12(3): 711-722.
- [63] Luo ZC, Wang C, Yi HQ, et al. Nanovaccine loaded with poly I:C and STAT3 siRNA robustly elicits anti-tumor immune responses through modulating tumor-associated dendritic cells *in vivo* [J]. *Biomaterials*, 2015, 38: 50-60.
- [64] Liu LL, Yi HQ, He HM, et al. Tumor associated macrophage-targeted microRNA delivery with dual-responsive polypeptide nanovectors for anti-cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2017, 134: 166-179.
- [65] Yi HQ, Liu LL, Sheng N, et al. Synergistic therapy of doxorubicin and miR-129-5p with self-cross-linked bioreducible polypeptide nanoparticles reverses multidrug resistance in cancer cells [J].

- Biomacromolecules, 2016, 17(5): 1737-1747.
- [66] Liu LL, Yi HQ, Wang C, et al. Integrated nanovaccine with microRNA-148a inhibition reprograms tumor-associated dendritic cells by modulating miR-148a/DNMT1/SOCS1 axis [J]. *Journal of Immunology*, 2016, 197(4): 1231-1241.
- [67] Mai YP, Guo JS, Zhao Y, et al. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity [J]. *Cellular Immunology*, 2020, 354: 104143.
- [68] Stitz L, Vogel A, Schnee M, et al. A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11(12): e0006108.
- [69] Scheel B, Braedel S, Probst J, et al. Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules [J]. *European Journal of Immunology*, 2004, 34(2): 537-547.
- [70] Scheel B, Teufel R, Probst J, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA [J]. *European Journal of Immunology*, 2005, 35(5): 1557-1566.
- [71] Feyerabend S, Stevanovic S, Gouttefangeas C, et al. Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer [J]. *The Prostate*, 2009, 69(9): 917-927.
- [72] Weide B, Pascolo S, Scheel B, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients [J]. *Journal of Immunotherapy*, 2009, 32(5): 498-507.
- [73] Westdorp H, Creemers JHA, Oort IMV, et al. Blood-derived dendritic cell vaccinations induce immune responses that correlate with clinical outcome in patients with chemo-naive castration-resistant prostate cancer [J]. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2019, 7(1): 302.
- [74] Li W, Ma L, Guo LP, et al. West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 3286.
- [75] Bogers WM, 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]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2015, 211(6): 947-955.
- [76] Hoang-Le D, Smeenk L, Anraku I, et al. A Kunjin replicon vector encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor for intra-tumoral gene therapy [J]. *Gene Therapy*, 2008, 16(2): 190-199.
- [77] Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes [J]. *Journal of Controlled Release*, 2015, 217: 345-351.
- [78] Fuchs JD, Frank I, Elizaga ML, et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant vesicular stomatitis virus human immunodeficiency virus-1 gag vaccine (HVTN 090) [J]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2015, 2(3): ofv082.
- [79] Ringer S, Sainsbury H. Concerning the action of salts of potash, soda, and ammonia on the frog's heart [J]. *Medico-chirurgical Transactions*, 1882, 65(1): 191-224.5.
- [80] Gallie DR. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency [J]. *Genes & Deleopment*, 1991, 5(11): 2108-2116.
- [81] Edwards DK, Jasny E, Yoon H, et al. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response [J]. *Journal of*

- Translational Medicine, 2017, 15(1): 1-18.
- [82] Joe PT, Christopoulou I, Hoecke LV, et al. Intranodal administration of mRNA encoding nucleoprotein provides cross-strain immunity against influenza in mice [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 242.
- [83] Fleeton MN, Chen M, Berglund P, et al. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183(9): 1395-1398.
- [84] Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, 19(2): 89-103.
- [85] Xie XP, Zou J, Fontes-Garfias CR, et al. Neutralization of N501Y mutant SARS-CoV-2 by BNT162b2 vaccine-elicited sera [Z/OL]. *bioRxiv Preprint*, bioRxiv: rs.3.rs-143532, 2021.
- [86] Wu K, Werner AP, Koch M, et al. Serum neutralizing activity elicited by mRNA-1273 vaccine [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(15): 1468-1470.
- [87] Garvey LH, Nasser S. Anaphylaxis to the first COVID-19 vaccine: is polyethylene glycol (PEG) the culprit? [J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2021, 126(3): e106-e108.
- [88] Baden LR, El Sahly HM, Essink B. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(5): 403-416.