

引文格式

赵浩, 柴德智, 蔡金旋, 等. mRNA 疫苗的研发历程与药物开发 [J]. 集成技术, 2023, (?:):??

Citing format

Zhao H, Chai DZ, Cai JX, et al. Research and Development Course of mRNA Vaccine and Drug Development[J]. Journal of Integration Technology, 2023, (?:):??

## mRNA 疫苗的研发历程与药物开发

赵浩<sup>1,3</sup> 柴德智<sup>2,3</sup> 蔡金旋<sup>2,3</sup> 刘兰兰<sup>4\*</sup> 张键<sup>3,5,6\*</sup>

(1.东北林业大学, 生命科学学院, 黑龙江, 哈尔滨 150006; 2.中国科学院大学, 北京 100049; 3.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; 4.中国科学院深圳先进技术研究院中国科学院卫生信息学重点实验室, 广东省纳米医学重点实验室, 深圳 518055; 5.中国科学院深圳理工大学, 深圳 518055; 6.深圳市代谢健康重点实验室, 深圳 518055)

**摘要:** 自 SARS-CoV-2 爆发以来, mRNA 疫苗的开发在制药领域受到了巨大的推动并得到迅速发展。相比于其他形式的疫苗, mRNA 疫苗优势明显——生产过程简单, 安全性优于 DNA 疫苗, 并且 mRNA 编码的抗原易于在细胞中表达, 此外 mRNA 不需要在细胞核中转录, 因此没有整合到宿主基因组的危险。然而 mRNA 疫苗也存在着局限性, 如可能产生过敏, 肾衰竭, 等严重副作用, 或者可能在注射后迅速降解或引起细胞因子风暴, 因此解决 mRNA 的免疫原性以及递送效率是一个重大挑战。本文从 mRNA 的发展开始重点讲述了 mRNA 疫苗的分子设计、递送系统以及临床现状, 从而为后续 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

**doi:** 10.12146/j.issn.2095-3135.20230104001

## Research and Development Course of mRNA Vaccine and Drug Development

Zhao Hao<sup>1,3</sup> Chai De-zhi<sup>2,3</sup> Cai Jin-xuan<sup>2,3</sup> Liu  
Lan-lan<sup>4\*</sup> Zhang Jian<sup>3,5,6\*</sup>

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

2.University of Chinese Academy of Sciences,Beijing 100049, China; 3.Center for Energy Metabolism and Reproduction, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China; 4.Key Lab of Health Informatics of Chinese Academy of Sciences, Guangdong Key Laboratory of Nanomedicine, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Science, Shenzhen 518055, PR China; 5.Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China; 6.Shenzhen Key Laboratory of Metabolic Health, Shenzhen 518055, China)

**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

## 引言

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

而随着技术的不断突破，已有多种病毒来源疫苗应用于常规疫苗接种并取得重大进展。在 2006 年，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 (human papillomavirus, HPV) 16/18 感染大大降低宫颈癌发病率[2,3]。然而大多数疫苗正在进行临床前实验以及临床试验并仍存在逃避适应性免疫反应的病毒病原体,此外对于疫苗大规模生产和快速开发的需求日益增加,促使人们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。如 mRNA 疫苗, siRNA 疫苗以及 miRNA 疫苗等,其中 mRNA 疫苗将编码抗原的外源 mRNA 引入体细胞中,通过表达系统合成抗原并引起免疫应答[4,5]。mRNA 疫苗具有生产工艺简单、快速、成本低等优点,随着冠状病毒 SARS-CoV-2 在 2019 年末至 2022 年的全球传播, mRNA 疫苗发展迅速,然而开发 mRNA 疫苗需要注意的是在注射后有可能引起细胞因子风暴以及其他一些副作用,并且在注射后易降解,因此解决 mRNA 疫苗的免疫原性以及优化递送系统可以最大程度的增强疫苗的有效性以及安全性。

针对这些问题,本文综述了在 mRNA 设计上如何降低免疫原性以及目前可用于 mRNA 疫苗的关键递送系统技术,从而为 mRNA 疫苗的未来研究和开发提供参考。

## 一.发展历程

1990 年, wolff 等人将体外合成的 mRNA 通过肌肉注射到小鼠骨骼肌当中成功使小鼠骨骼肌内特定蛋白质表达[6],这使得人们开始逐渐关注于 RNA 治疗。在早期的研究中, RNA 治疗主要应用于肿瘤治疗方面,2004 年德国科学家 J-P Carralot 等人首次将 mRNA 注射到小鼠体内并成功引起了小鼠的免疫反应[7]。这对于 RNA 治疗的研究产生了巨大的鼓舞。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,人们普遍认为生产以及处理合成 RNA 载体成本较高,并且较为复杂,因此人们的目光更集中在质粒 DNA 技术以及重组病毒载体研发上[9]。最初 mRNA 治疗主要有两种形式,一种是直接注射 mRNA[8,10],一种是使用 mRNA 在体外转染树突状细胞来增强免疫原性进行的过继治疗[11,12],制药业也逐渐将目光放在了 RNA 治疗的研究开发中,扩大了 RNA 生产,从而为 mRNA 疫苗的问世铺平了道路。

mRNA 疫苗是继第一代减毒/灭活疫苗以及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]，核酸疫苗目前主要分为 DNA 疫苗和 RNA 疫苗，两者都有很高的开发潜力[13]。然而在当时对于 mRNA 疫苗的开发还存在着巨大的挑战，主要在于 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]。打破这一僵局的是女科学家 Katalin Karikó，她在 2005 年发表的论文中指出将构成 mRNA 的尿苷替换为与之类似的“假尿苷”可以极大程度的遏制炎症的发生从而解决了免疫原性较高的问题[19]。第一款上市的 mRNA 疫苗到现在新型冠状病毒(SARS-CoV-2)大流行期间，已有多款针对 mRNA 疫苗问世，并且均已取得成效。

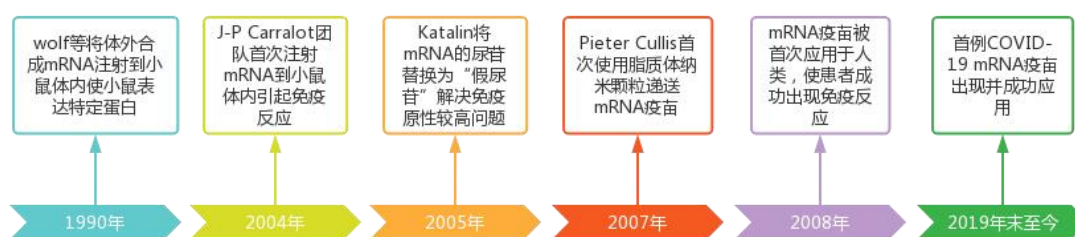


图 1.mRNA 疫苗发展历程

## 二. mRNA 疫苗制备以及递送系统

### 2.1 mRNA 疫苗分类

mRNA 疫苗可以分为两类，分别为自扩增型 mRNA(Self-amplifying mRNA, SAM mRNA)和非复制型 mRNA(nonreplicating mRNA, NRM mRNA)[14]。与 NRM mRNA 相比，SAM mRNA 不仅编码目标抗原，还编码复制酶复合体，使细胞内的疫苗 RNA 扩增和蛋白质表达增强[13]。而 NRM mRNA 只编码目的抗原蛋白，优点为结构简单，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 疫苗主要的基本元件包括 5'帽子结构(5'cap structure, 5'Cap m7Gp3N), 5'以及 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'多聚腺苷酸尾巴(poly A)结构, 此外在 ORF 前还会插入信号肽(signal peptide, SP), SAM mRNA 在此之上还插入了自扩增非结构基因(NSP1-4) [22,23]。

## 2.2 mRNA 疫苗的制备

目前合成 mRNA 最普遍的方式是通过体外转录 (IVT) 合成[24]。然而 IVT mRNA 使免疫细胞激活并产生由 toll 样受体介导的免疫反应[13]，从而诱发机体的炎症反应，并且单链的 mRNA 并不稳定，因此需要对 mRNA 进行修饰以消除其免疫原性以及增强其稳定性。

### 2.2.1 5'端加帽

mRNA 的稳定性与 5'Cap 息息相关,传统的 5'Cap 总共由三部分组成: Cap-0 (m7GppXpYp); Cap-1(m7GpppXmpYp); Cap-2(m7GpppXmpYmp)。在加帽之后,在 mRNA5'端不存在游离磷酸基,因此并不会被碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)识别降解,并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'-OH 基团,使其不会被 RNA 酶降解[13], 5'cap 可以保护 mRNA 免受 5'→3' 外切酶的攻击。

目前 IVT mRNA 较为先进的加帽方法有两种,酶加帽法和化学法。酶加帽法最具有代表性的为牛痘病毒加帽系统,主要利用牛痘病毒加帽酶(VCE),结合 RTP 酶、GTase 和 G-N7 MTase 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,加帽效率非常高,且不会对 RNA 的长度、序列和底物结构产生影响[25]。另外一种方法为在体外转录过程中添加 cap 类似物,然而这很容易造成 cap 类似物会定位到 mRNA 的末端并形成反向异构体进而影响下游流程,为了解决这种问题,研究人员开发了抗-反转帽子类似物(anti-reverse cap analogs, ARCAs) [26]。ARCAs 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。

### 2.2.2 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(internal ribosome entry site, IRES)以及各种可以被 RNA 结合蛋白结合的顺式元件,可以调控 mRNA 的半衰期和翻译效率[13,27]。UTR 通常是裸露的,未被核糖体包裹,这使得他们更易于调控因子相互作用。

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 必须是短而松散的,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,从而会导致翻译效率降低[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(AREs)以及 G、U 元素区域(GREs) [29,30]。富含 U 的 mRNA 序列是激活 Toll 样受体的关键元件[31], 而通过缩短 U 富集序列可能是消除免疫原性的一种潜在方法[32]。而除此之外, 引入稳定元件可以提高 mRNA 的稳定性, 延长其半衰期。

ORF 中的密码子对转录组翻译和稳定性也会产生影响[33]。用最优密码子替换非最优密码子可显著提高 mRNA 稳定性、翻译速度和蛋白质产量, 其次, 密码子偏差与 ORF 中 GC 含量的百分比密切相关, 因此调整 OFR 中的 GC 含量也会改变翻译伸长率[34]。

### 2.2.3 核苷酸修饰

由于 DNA 和 RNA 可以通过激活 Toll 样受体(Toll like receptor, TLRs)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 基因序列的核苷并不会引起机体的免疫反应。因此许多科学家用还有甲基化序列的核苷取代原有核苷可有效降低 mRNA 的免疫原性[35]。

### 2.2.4 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, polyA 结合蛋白能够与 5'Cap 通过 eIF 相连, 形成一种稳定的闭环结构, 促进翻译起始[15]。Poly (A) 尾对于维持 mRNA 的稳定性以及是否成功翻译至关重要[36], 而从 mRNA 中删除 poly (A) 位点会使 mRNA 不稳定[37]。

对于 poly(A) 尾的添加一种是通过重组 poly(A)聚合酶介导的聚腺苷酸化, 另外一种是根据设计的 DNA 模板进行转录, 将 poly (A) 尾部添加到 mRNA 的 3'端[38]。这两种方法的区别在于前者长度固定, 后者长度可调节。而 poly(A) 尾长度与 mRNA 翻译和稳定性呈正相关, 已有研究表明用多核苷酸磷酸化酶去除 poly (A) 分别减小了肽延伸率和翻译轮数[39], 添加 poly (A) 尾巴可以减少 U 序列, 从而降低 mRNA 的免疫原性[40]。

### 2.2.5 其他修饰

除上述修饰以外, 还需对 mRNA 所编码的密码子进行改造, 由于各类生物在编码氨基酸方面都有着不同的编码偏好性, 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性设计密码子, 使得抗原蛋白产

量提升[41], mRNA G:C 的比例也影响 mRNA 的稳定性, G:C 的比例越高 mRNA 的稳定性就越高[42], 然而 GC 碱基容易产生二级结构阻碍抗原翻译, 因此也要考虑到 GC 含量过高引起的蛋白质表达效率低下[43]。其次在 IVT 过程中, 需要对 mRNA 进行纯化, 这对于消除免疫原性至关重要[35,40,44,45]。

此外 mRNA 5'端的帽子结构可以通过与 eIF4E、eIF4E 和 PABPC 分子之间的相互作用与 poly (A) 尾形成闭环并直接行使功能, 这种帽尾组合可以显著提高翻译效率, 但同时存在在 mRNA 5'末端附近发生翻译终止的风险[46]。

## 2.3 mRNA 的递送系统

如何使 RNA 能够有效进入细胞内是一项重点难题。由于在体内裸 RNA 属于外源核酸, 因此易被免疫系统识别, 在进入体内后被核酸酶降解, 裸 RNA 分子量较大, 无法通过被动扩散进入细胞[47], 因此就需要传递系统来保护 RNA。RNA 在细胞内并不进入细胞核而仅仅进入细胞质并转化为靶蛋白, 因此首要考虑是如何使 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[48]。

### 2.3.1 非病毒载体传递系统

#### 2.3.1.1 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, 其中包裹有含有目标基因的水核。这些亲水基团以及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以使 mRNA 免受 RNA 酶的降解[13]。然而, 由于阳离子脂质在生理条件下也带正电荷, 它们很可能与生物液体中的其他带负电荷的分子相互作用, 此外也易被免疫细胞捕获, 导致传递效果不佳。

#### 2.3.1.2 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[49-52]。LNPs 由可电离的氨基脂质、辅助脂质 (磷脂)、胆固醇以及聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 组成, 是一种双层脂分子的稳定粒子, 可以稳

定的传递 mRNA 进入体内[53,54]。其中可电离的氨基脂质可以与包内体膜相互作用帮助 mRNA 从包内体逃逸[54]。PEG 是另一种重要的组分，可以延长 LNPs 的循环时间。胆固醇以及磷脂则可以使 LNPs 结构保持稳定[55]。Pieter Cullis 博士作为该领域的先驱者在 2007 年首次使用脂质体纳米颗粒包裹抗原并发现可以增强免疫效果并诱导更强的免疫反应[56]，初步揭示了脂质体纳米粒包封在免疫学方面的优势。

### 2.3.1.3 聚合物

相对于 LNPs 来说，对于聚合物材料的临床研究较少。但自从 1987 年 Wu 等人成功使用阳离子聚合物聚赖氨酸 (polylysine, PLL) 转染 DNA 质粒以来[57]，目前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 (PAA)、聚 $\beta$ -氨基酯 (PBAE) 和聚乙烯亚胺 (PEI) [13]。然而其缺点是多分散性以及身为大分子难以降解等[58]，因此为了解决这些问题提高治疗效果，科学家们添加了脂链，扩展了分支结构，并构建了促进生物降解的结构域[59-61]。

PEI 作为首例出现的非病毒载体聚合物早在 1995 年就已有研究，可将 DNA 递送到小鼠大脑，表明了这种聚合物作为载体传递的高效性[62]。saRNA 对 RNase 敏感并且易被树突状细胞无效的吸收，而将 mRNA 浓缩到 PEI 即可解决问题。已有研究表明使用 PEI 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[63]。

在我们先前的研究中以 N-羧基酐(N-carboxyanhydride, NCA) 为开环聚合物，合成了 PEG-PLL-PLL<sub>Leu</sub> 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 DC 和减少免疫抑制细胞，有效地消除了肿瘤微环境中的免疫抑制，从而导致了强大的抗肿瘤免疫应答和显著的肿瘤消退，延长了生存期[64]。

### 2.3.1.4 肽

肽作为一种携带大量正电荷氨基的大分子也有着较好的递送效果，可作为 mRNA、siRNA 以及 miRNA 的传递系统，RNA 都带有负电，因此可以使用阳离子肽通过静电作用传递 RNA。

阳离子多肽纳米颗粒是一种多功能高效的传递系统，如我们使用基于聚(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 有效地将免疫抑制 TAMs 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(Gal-PLL-PLC, GLC)，带正电荷的 PLL 可以通过静电吸附包封 miR, PLC 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[65,66,67]。

鱼精蛋白是传递 mRNA 的阳离子肽之一，可以保护 mRNA 避免被血清中的 RNase 降解。已有研究表明使用鱼精蛋白递送 mRNA 可有效抑制小鼠侵袭性肺癌肿瘤生长[68]。鱼精蛋白具有优秀的保存性，可在变化极其不稳定的温差下使 mRNA 保持活性，Stitz 等人使用 CureVac 公司的 RNActive 平台制备狂犬病毒 mRNA 疫苗可在-80°至 70°的温差中储存数月而依然保持疫苗的有效性[69]。但是鱼精蛋白也有局限性，如果不使用 RNActive 技术单独用鱼精蛋白传递 mRNA 的会抑制翻译过程，从而影响疫苗的效力[70]。此外，鱼精蛋白可以被看成一种佐剂，一项研究表明用鱼精蛋白传递的 mRNA 可以激活树突状细胞和单核细胞分泌 TNF- $\alpha$ 和 IFN- $\alpha$ ，并且可以通过 TLR-7/TLR-8 轴激活免疫细胞对 mRNA 进行识别[71]。目前在所有肽载体中，鱼精蛋白已进入临床评估[72-74]。

### 2.3.2 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 sa-RNA 将其输送到细胞质中，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 saRNA[75]。已有研究表明使用 VRPs 包裹编码 C 类胞膜糖蛋白的 HIV 来源 mRNA 可在恒河猴体内引起免疫反应[76]。除此之外，使用 VRPs 针对结肠癌以及黑色素瘤的治疗也取得了成效，如将编码粒细胞集落刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF）的昆津复制子病毒样颗粒能够治愈皮下 CT26 结肠癌和 B16-OVA 黑色素瘤[77]。虽然 VRP 对于病毒性疾病、细菌性疾病以及癌症有一定的治疗作用，但由于生产效率跟细胞系生产 VRP 的速度有关，无法实现大规模生产[78]。并且 VRP 复合物会促进抗载体抗体的产生[79]，因此该载体系统的使用还存在着局限性。

### 2.3.3 其他递送 mRNA 的方法及材料

虽然在一般情况下，mRNA 疫苗需要递送系统辅助给药，但直接使用裸 mRNA 也可进行给药。使用林氏溶液或者乳酸林氏溶液作为 mRNA 溶剂[80]，

由于不使用递送系统辅助，因此裸 mRNA 需要通过电穿孔[81]，光穿孔，物理性膜破坏以及生物化学膜破坏等方法递送。然而没有递送系统的保护就意味着需要考虑到 mRNA 的不稳定性，因此一般需要改变给药方式来弥补这种缺点，具体包括 ID[82]、SC[83]、IM[84]等。

### 三. mRNA 疫苗的应用

#### 3.1 SARS-CoV-2 爆发前 mRNA 疫苗的研究

在 2019 年末 SARS-CoV-2 大流行爆发以前，对于 mRNA 疫苗的临床研究多集中于癌症以及病毒性传染病的研究，包括非小细胞肺癌、卵巢癌以及 HIV 和黄病毒属等等，其中大多数处于临床 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 APC，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[85]。Boczkowski, D. 等人最早发现利用针对卵清蛋白(OVA)的 RNA 设计的 DC 疫苗可以使小鼠肺癌转移显著减少[86]。在此后通过对递送系统的改进，mRNA 癌症疫苗已经趋于成熟，并且对于其他病毒性传染病的研究也大多进入临床试验阶段，table1 中显示了目前临床试验中的 mRNA 癌症疫苗，table2 中展示了临床试验中的 mRNA 病毒疫苗。

**Table1 临床实验中的癌症 mRNA 疫苗[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

癌症类型	NCT 号	药物	阶段	状态
	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
前列腺癌	NCT02649582	自体 WT1 mRNA 负载 DC+替莫唑胺	I/II	招募
	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
消化系统癌症	NCT02528682	MiHA mRNA 负载的 PD-L 增强 DC	I/II	已完成
	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

### 3.2 COVID-19 mRNA 疫苗

2019 年年底，由于严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型（SARS-CoV-2）在全球范围传播，全球开始大范围爆发新冠肺炎。因此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，截止到 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。目前对于新冠疫苗的开发主要集中在三家公司：BioNTech，

CureVac 和 Moderna。2020 年底，Pfizer 与 BioNTech 合作开的 mRNA 新冠疫苗 BNT162b2 以及 Moderna 的 mRNA1273 已被 FDA 授权可紧急使用。2021 年 5 月 10 日，FDA 批准在 12 至 18 岁的青少年中紧急使用 Moderna 的 mRNA1273 疫苗，此外在 2021 年 8 月 23 日经 FDA 批准，BNT162b2 成为首个获得批准的 COVID-19 疫苗。

### 3.2.1 疫苗效力

在疫苗有效率方面，Moderna mRNA-1273 疫苗在第二剂后预防有效率为 94.1%；Pfizer/BioNTech BNT162b2 在第二剂后预防效率为 95%，并且在 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 的预防效率高达 100%。

而对于突变株的效力研究表明，相对于原始菌株，BNT162b2 疫苗对突变菌株 N501Y 的疗效没有降低[87]。Moderna mRNA-1273 疫苗针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。然而针对 B.1.351 变体的中和抗体滴度降低[88]。

### 3.2.2 疫苗安全性

BNT162b2 III 期试验的安全性测试（在疫苗第二针接种后 14 周内）显示最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，Lene H. Garvey 和 Shuaib Nasser 在研究种表明过敏反应可能与聚乙二醇（PEG）有关[89]。

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[90]。

**Table2 临床实验中抗病毒性疾病的 mRNA 疫苗[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	I/II	已完成

		DC+/- 无 mRNA 转染的 自体 DC		
	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

## 四. 展望

mRNA 疫苗技术日益成熟。其优点显著不：mRNA 不需要在细胞核中转录，因此没有整合到宿主基因组的风险；它们可用作内源性抗应激物质，MHCI 分子促进编码肽的呈递，从而激活细胞毒性 T 淋巴细胞反应以杀死肿瘤细胞。

在病毒性疾病预防方面，包括新冠肺炎、狂犬病、呼吸道合胞病毒感染、寨卡病毒感染、艾滋病毒感染等方面都取得了进展。尤其是在新冠肺炎流行期间，新冠肺炎 mRNA 疫苗取得重大突破。

许多候选疫苗仍处于临床前和早期临床 I-II 阶段，但这并没有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、复星制药和 BioNTech 的创始人兼首席执行官 Ugur Sahin 称，他已授权由中国独家开发和商业化基于 BioNTech 专有 mRNA 技术平台的新型冠状病毒疫苗。

mRNA 疫苗技术最近取得了快速进展，但如何更有效地激活免疫应答，仍然是具有挑战性的问题。此外，开发最佳递送系统以保护 mRNA 不在体内被降解以及 mRNA 疫苗本身的安全性问题仍然不容小觑。在开发 mRNA 疫苗时应考

虑抗体依赖增强（Antibody-Dependent Enhancement, ADE）风险。

## 五. 参考文献

1. Moore ZS, Seward JF, Lane JM. Smallpox [J]. *Lancet*, 2006 Feb 4, 367(9508): 425-35.
2. Malagón T, Drolet M, Boily MC, et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012 Oct, 12(10):781-9.
3. Kirby T. FDA approves new upgraded Gardasil 9 [J]. *Lancet Oncol*, 2015 Feb, 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 Mol Med*. 2013 Dec, 19(12): 705-13.
5. Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, et al. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response [J]. *Trends Mol Med*, 2020 Mar, 26(3): 311-323.
6. Wolff J A , Malone R W , Williams P , et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo [J]. *Science*, 1990 Mar 23, 247(4949 Pt 1): 1465-8.
7. Carralot J P , Probst J , Hoerr I , et al. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 2004, 61(18): 2418-24.
8. Weide B , Carralot J P , Reese A , et al. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA [J]. *Journal of Immunotherapy*, 2008, 1(2): 180-188.
9. Leitner W W , Ying H , Restifo N P . DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects [J]. *Vaccine*, 1999, 18( 9–10): 765-777.
10. Granstein R D , Ding W , 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): 632-6.
11. Boczowski 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. Boczowski D, Nair S . RNA as performance-enhancers for dendritic cells [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2010, 10(4): 563.
13. Liu T, Liang Y, Huang L. Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9:718753.
14. Wang Y, Zhang Z, Luo J, et al. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy [J]. *Mol Cancer*, 2021 Feb 16, 20(1): 33.
15. Pardi N, Hogan M J, 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]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2022, 440: 187-205.

17. Rice A M , Morales A C , Ho A T , et al. Evidence for strong mutation bias towards, and selection against, U content in SARS-CoV-2: implications for vaccine design [J]. *Mol Biol Evol*, 2021 Jan 4, 38(1): 67-83.

18. Brito L A , Kommareddy S , Domenico Maione §, et al. Self-Amplifying mRNA Vaccines [J]. *Advances in Genetics*, 2015, 89: 179-233.

19. Katalin Karikó , Michael Buckstein, Houping Ni, 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.

20. Tews BA, Meyers G. Self-Replicating RNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1499: 15-35.

21. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4): 261-279.

22. Leroy Versteeg, Mashal M Almutairi, Peter J Hotez, et al. Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections [J]. *Vaccines (Basel)*, 2019 Sep 20, 7(4): 122.

23. Lundstrom, K. Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2016 Nov 7, 4(4): 39.

24. Sahin U , Katalin Karikó, zlem Türeci. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 13(10): 759-80.

25. Yuan Y, Gao F, Chang Y, et al. Advances of mRNA vaccine in tumor: a maze of opportunities and challenges [J]. *Biomark Res*, 2023 Jan 18, 11(1): 6.

26. Sang-phyo, Hong, Matthias, et al. An Approach to the Synthesis of the Eupomatilones [J]. *Organic Letters*, 2002 Jan 10, 4(1): 19-21.

27. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, et al. Developing mRNA-vaccine technologies [J]. *RNA Biology*, 2014, 9(11): 1319-1330.

28. J Pelletier, N Sonenberg. Insertion Mutagenesis to Increase Secondary Structure within the 5' Noncoding Region of a Eukaryotic mRNA Reduces Translational Efficiency [J]. *Cell*, 1985 Mar, 40(3): 515-26.

29. Murray EL, Schoenberg DR. A+U-rich instability elements differentially activate 5'-3' and 3'-5' mRNA decay [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(8): 2791-9.

30. Vlasova-St Louis I, Bohjanen PR. Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1 [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2011, 21(4): 444-51.

31. Hornung V, Barchet W, Schlee M, et al. RNA Recognition via TLR7 and TLR8 [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 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]. *Mol Ther*, 2015, 23(9) : 1456-64.

33. Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability [J]. *Cell*, 2015 Mar 12, 160(6): 1111-24.

34. Hanson G, Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018 Jan, 19(1): 20-30.

35. Weng Y, Li C, Yang T, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape [J]. *Biotechnol Adv*, 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): 4009-17.
37. Whitelaw, Coates, N J, et al. Globin gene transcripts can utilize histone gene 3' end processing signals [J]. *Nucleic acids research*, 1986 Sep 11, 14(17): 7059-70.
38. Passmore LA, Collier J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022 Feb, 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 Jul 23, 12(8): 1633.
40. Weissman D, Karikó K. mRNA: Fulfilling the Promise of Gene Therapy [J]. *Mol Ther*, 2015 Sep, 23(9): 1416-7.
41. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J, Gustafsson, C. Codon bias and heterologous protein expression [J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(7): 346-53.
42. Kudla G, Lipinski L, Caffin F, et al. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(6): e180.
43. Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, et al. Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(3): 311-323.
44. Batey RT, Kieft JS. Improved native affinity purification of RNA [J]. *RNA*, 2007, 13(8): 1384-9.
45. Weissman D, Pardi N, Muramatsu H, et al. HPLC purification of in vitro transcribed long RNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 969: 43-54.
46. Shirokikh NE, Preiss T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018 Jul, 9(4): e1473.
47. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis [J]. *Biochemical Journal*, 2004 Jan 1, 377(Pt 1): 159-69.
48. 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.
49. Islam MA, Reesor EK, Xu Y, et al. Biomaterials for mRNA delivery [J]. *Biomater Sci*, 2015, 3(12): 1519-33.
50. Shin MD, Shukla S, Chung YH, et al. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(8): 646-655.
51. 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]. *Adv Mater*, 2019, 31(33): e1902575.
52. Lokugamage MP, Gan Z, Zurla C, et al. Mild Innate Immune Activation Overrides Efficient Nanoparticle-Mediated RNA Delivery [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(1): e1904905.
53. Kuntsche J, Horst JC, Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 2011, 417(1-2): 120-37.
54. Ramishetti S, Hazan-Halevy I, Palakuri R, et al. A Combinatorial Library of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery to Leukocytes [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(12): e1906128.



55. Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 154-155: 37-63.
56. 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 Immunol Immunother*, 2007, 56(8): 1251-64.
57. 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.
58. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, et al. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 710-728.
59. Dong Y, Dorkin JR, Wang W, et al. Poly(glycoamidoamine) Brushes Formulated Nanomaterials for Systemic siRNA and mRNA Delivery in Vivo [J]. *Nano Lett*, 2016, 16(2): 842-8.
60. Patel AK, Kaczmarek JC, Bose S, et al. Inhaled Nanoformulated mRNA Polyplexes for Protein Production in Lung Epithelium [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(8): e1805116.
61. Kaczmarek JC, Patel AK, Kauffman KJ, et al. Polymer-Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of mRNA to the Lungs [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(44): 13808-13812.
62. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995 Aug 1, 92(16): 7297-301.
63. Démoulines T, Milona P, Englezou PC, et al. Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines [J]. *Nanomedicine*, 2016, 12(3): 711-722.
64. Luo Z, Wang C, Yi H, 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.
65. Liu L, Yi H, He H, et al. Tumor associated macrophage-targeted microRNA delivery with dual-responsive polypeptide nanovectors for anti-cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2017 Jul, 134:166-179.
66. Yi H, Liu L, 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): 1737-47.
67. Liu L, Yi H, Wang C, et al. Integrated Nanovaccine with MicroRNA-148a Inhibition Reprograms Tumor-Associated Dendritic Cells by Modulating miR-148a/DNMT1/SOCS1 Axis [J]. *J Immunol*, 2016 Aug 15, 197(4): 1231-41.
68. 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.
69. Stitz L, Vogel A, Schnee M, et al. A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(12): e0006108.
70. Scheel B, Braedel S, Probst J, et al. Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2): 537-47.
71. Scheel B, Teufel R, Probst J, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(5): 1557-66.
72. 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]. *Prostate*, 2009, 69(9): 917-27.

73. 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 Jun, 32(5): 498-507.
74. Westdorp H , Creemers J H A , Oort I M V , et al. Blood-derived dendritic cell vaccinations induce immune responses that correlate with clinical outcome in patients with chemo-naïve castration-resistant prostate cancer[J]. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2019 Nov 14, 7(1): 302.
75. 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]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3286.
76. Bogers W M, Herman O, Petra M, 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]. *Journal of Infectious Diseases*, 2015(6): 947-55.
77. 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*, 2009 Feb, 16(2): 190-9.
78. 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 Nov 10, 217: 345-51.
79. Fuchs J D, Frank I, Elizaga M L, 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 Infect Dis*, 2015 Jun 5, 2(3): ofv082.
80. Ringer, Sydney. Concerning the Action of Salts of Potash, Soda, and Ammonia on the Frog's Heart [J]. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1882, MCT-65(1): 191-223.
81. Gallie, D R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency.[J]. *Genes Dev*, 1991, 5(11): 2108-2116.
82. 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]. *J Transl Med*, 2017 Jan 3, 15(1): 1.
83. Joe P T , Christopoulou I , Hoecke L V , 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.
84. Fleeton M N, Chen M, Peter B, et al. Self-Replicative RNA Vaccines Elicit Protection against Influenza A Virus, Respiratory Syncytial Virus, and a Tickborne Encephalitis Virus [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2001 May 1, 183(9):1395-8.
85. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function [J]. *Nat Rev Immunol*. 2019 Feb, 19(2), 89-103.
86. Boczowski, D. 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.
87. Shi PY, Xie X, Zou J, et al. Neutralization of N501Y mutant SARS-CoV-2 by BNT162b2 vaccine-elicited sera [J]. *Res Sq [Preprint]*, 2021 Jan 13 : rs.3.rs-143532.
88. Wu KK, Werner AP, Koch M, et al. Serum Neutralizing Activity Elicited by mRNA-1273 Vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2021 Apr 15, 384(15): 1468-1470..
89. Garvey LH, Nasser S. Anaphylaxis to the first COVID-19 vaccine: is polyethylene glycol (PEG) the culprit? [J] *Br J Anaesth*, 2021, 126(3): 106–108..

90. Baden LS, Essink HMB. efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine [J].  
New Eng J Med, 2021, 384(5): 13.