

保护性病毒抗原的筛选策略及其在新型疫苗研发中的应用

钟代浪, 王涛, 罗瑞, 仇华吉, 孙元

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069

钟代浪, 王涛, 罗瑞, 仇华吉, 孙元. 保护性病毒抗原的筛选策略及其在新型疫苗研发中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2857-2871.

ZHONG DL, WANG T, LUO R, QIU H-J, SUN Y. Strategies for screening protective viral antigens and their applications in the development of novel vaccines. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2857-2871.

摘 要: 随着疫苗研发技术的发展, 新型疫苗在传染病的预防中得到了广泛应用。由于新型疫苗安全性良好, 因此其在烈性病疫苗的应用中有着得天独厚的优势, 然而研制新型疫苗的前提是筛选出保护性抗原。随着各种组学研究的发展, 针对真核生物的多种生物信息学方法代表着最前沿的技术手段。相对于真核细胞, 病毒具有更为简单的结构, 对应着相对简单的研究方法, 未来的保护性抗原筛选策略, 需要结合生物信息学和传统分子生物学方法的优势。本文分别从宿主和病毒入手, 论述了病毒保护性抗原的筛选策略, 列举了一系列基于真核细胞开发的可能用于保护性抗原筛选的生物信息学方法, 并总结了应用保护性抗原进行新型疫苗设计的案例, 以便加深对病毒保护性抗原筛选策略的认知, 为新型疫苗的研发提供借鉴。

关键词: 保护性抗原; 筛选策略; 新型疫苗

Received: February 28, 2022; **Accepted:** May 31, 2022; **Published online:** June 27, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801403)

Corresponding authors: QIU Hua-Ji. E-mail: qiuhuaaji@caas.cn

SUN Yuan. Tel/Fax: +86-451-51051709; E-mail: sunyuan@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFD1801403)

Strategies for screening protective viral antigens and their applications in the development of novel vaccines

ZHONG Dailang, WANG Tao, LUO Rui, Qiu Hua-Ji, SUN Yuan

State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

Abstract: With the development of vaccine research and development technologies, novel vaccines have been widely used in the prevention of various infectious diseases. Due to the excellent safety, novel vaccines have unique advantages in the application of vaccines against virulent pathogens. The major premise of developing novel vaccines is to screen protective antigens. With the development of various omics research, cutting-edge bioinformatics tools for eukaryotes have been well developed, while the much simpler structure of viruses compared with eukaryotic cells corresponds to relatively simple research methods. Strategies for screening protective antigens need to combine the advantages of both bioinformatics methods and traditional molecular biology methods. In this review, the strategies for screening virus protective antigens were discussed from the perspective of host and virus, and a series of bioinformatics tools developed based on eukaryotic cells that may be used for screening protective antigens were listed. This review also summarized the cases of using protective antigens to design novel vaccines, in order to better understand the strategies for screening virus protective antigens and facilitate the research and development of novel vaccines.

Keywords: protective antigens; screening strategies; novel vaccines

疫苗是人类防控各种传染病最有效的手段, 保护性抗原是疫苗的“有效成分”, 其刺激机体产生的保护性免疫反应可以在易感人群或易感动物暴露在含有病原的环境中时, 使其免受致死性伤害, 甚至不会出现任何临床症状。新型疫苗, 是精细化的疫苗, 即只将保护性抗原或能够在机体内转化为保护性抗原的成分制成的疫苗。此类疫苗的优点是既具有灭活疫苗的安全性, 又具有减毒活疫苗的高效性。要筛选保护性抗原, 首先要保证所采用的筛选方法能够囊括所有保护性抗原。因此, 对某类分子整体进行研究的“组学”被引入保护性抗原筛选策略中, 基因组学、转录组学和蛋白组学相关的方法所筛选的范围, 几乎能够涵盖保护性抗

原的所有信息。但是, 这些方法搜集的信息往往十分庞大, 即便运用免疫学知识对筛选指标进行优化, 缩小筛选范围, 仍然是无法人工处理的, 因此能够分析大量数据的生物信息学方法被应用到筛选策略中。时至今日, 科研人员结合各种组学方法与新型疫苗平台已经研发出多种针对紧急公共卫生事件的疫苗, 在控制烈性传染病的大流行中取得了巨大成就。

1 保护性抗原

保护性抗原是指病原微生物入侵机体后能引起机体免疫系统诱导保护性免疫应答的抗原成分。对于宿主机体而言, 保护性抗原在胞内经过蛋白酶体剪切后由 I 型主要组织相容性复

合体 (major histocompatibility complex, MHC- I) 呈递并诱导相应的细胞免疫反应;或在内环境中被吞噬细胞或树突状细胞 (dendritic cell, DC) 识别捕获,并由 II 型主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex- II, MHC- II) 呈递引起相应的体液免疫反应。对于病原体而言,保护性抗原在病原体入侵、复制以及成熟病原体的装配与释放中发挥着重要作用。因为宿主一旦对病原的保护性抗原产生了相关的免疫反应,便会极大地抑制病原体对宿主的感染。因此,保护性抗原在病原体的感染中,往往发挥着极为重要的功能^[1]。

1.1 病毒视角下的保护性抗原

病毒感染需要经过吸附、入胞、脱壳、表达早期基因、核酸复制、表达晚期基因、装配及释放等步骤^[2]。在这些步骤中,任何一步受到干扰,都会影响病毒的感染能力。因此,对于病毒来说,免疫原性基因一般会与病毒的毒力相关,其编码病毒感染过程中不可或缺的蛋白。也正因如此,即使病毒面临着被宿主免疫系统清除的风险,也要表达出保护性抗原来保障感染周期的正常进行。从另一方面来看,宿主免疫系统能够识别病毒的保护性抗原,这说明在病毒感染过程中,其保护性抗原与宿主免疫系统接触的概率应该要高于非保护性抗原。一些病毒介导吸附与进入细胞的蛋白就是其保护性抗原,例如新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的 S 蛋白,其 S1 亚基拥有能够与人细胞的人类血管紧张素转化酶 2 (human angiotensin converting enzyme 2, hACE2) 受体结合的位点,当 S1 亚基与受体结合后,会引起 S 蛋白构象改变,使 S1 亚基脱落并暴露出承担膜融合功能的 S2 亚基,从而通过膜融合途径介导病毒的入侵^[3]。其他冠状病毒如非典型肺炎冠状病毒

(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 和猪流行性腹泻病毒的 S 蛋白也具有类似的功能^[4],而免疫系统能够识别并阻断这一蛋白的功能,使病毒不仅无法有效入侵宿主靶细胞,且还会直接清除病毒。

1.2 宿主视角下的保护性抗原

保护性抗原的“保护”二字,是指其能够诱导宿主产生保护性免疫反应 (图 1)。在宿主的视角下,保护性抗原具有可识别、可呈递、可针对性地产生保护性免疫应答等特性,宿主通过保护性抗原的刺激,能够达到彻底清除病毒感染的效果。宿主对保护性抗原的成功识别,一般会进一步导致保护性抗原的呈递,然后引起体液或细胞免疫反应。大多数病毒在被 DC 细胞捕获后经过细胞内运输、加工并递呈给相应的淋巴细胞,病毒的细胞内运输分为网格蛋白依赖型和网格蛋白非依赖型,无论是通过哪种方式进行细胞内运输,病毒蛋白都有可能被宿主识别,经泛素化修饰后被蛋白酶体降解,并被转运蛋白送入内质网与 MHC- I 类分子结合然后被呈递到细胞膜上,提供给 CD8+T 细胞识别。而吞噬细胞吞噬病毒后,还可以通过 MHC- II 呈递抗原,在 CD4+T 细胞的协助下,诱导免疫反应向细胞免疫或体液免疫方向发展。值得注意的是,外源性抗原可以通过交叉呈递的方式通过内源性途径呈递。宿主清除病毒感染一般是从两个方面进行的,一方面是通过体液免疫来中和释放到内环境中的病毒,另一方面是通过细胞免疫杀灭已经被病毒感染的宿主细胞,若想完全清除病毒感染,需要体液免疫和细胞免疫的共同作用。对于宿主来说,病毒的保护性抗原是能够被宿主免疫系统识别、呈递并同时诱导细胞免疫和体液免疫反应以保护宿主,并使宿主产生对该病毒的免疫记忆的抗原。

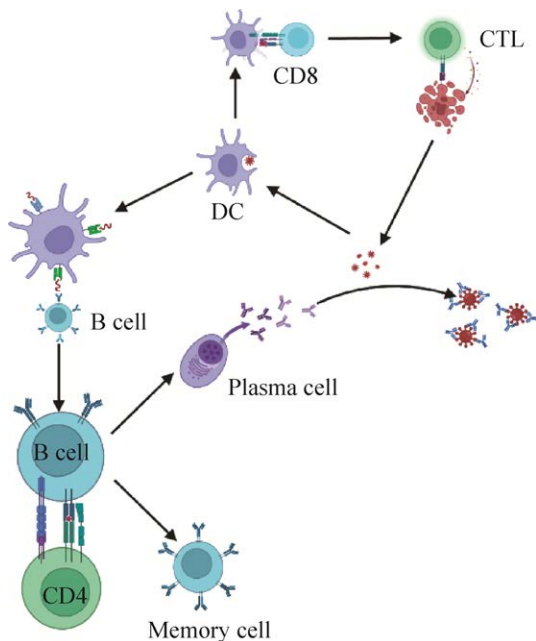


图 1 保护性抗原诱导宿主产生保护性免疫反应
Figure 1 Protective antigen induces protective immune response of the host.

2 保护性抗原的筛选策略

2.1 基于病毒感染机制筛选

这一筛选策略的优势在于，没有细胞结构的病毒，其组成和增殖方式相对于其宿主来说更加简易。通常来说病毒入侵宿主需要经过入侵、复制和释放 3 个步骤。病毒入侵宿主后会引起宿主产生一系列免疫反应，其中很有可能已经出现了保护性抗原相关的免疫反应，不过强毒株往往会引起宿主的急性病症，从而导致宿主迅速死亡。在这种情况下筛选保护性抗原，只能从感染早期高免疫原性和大量表达的非宿主蛋白或表位中进行筛选，不过由于宿主存活时间较短，这种筛选方式往往效率低下。这提示我们，从幸存下来的动物中筛选保护性抗原更为容易，所以利用致弱的病毒感染动物，成为筛选保护性抗原的一个策略。因为病毒在传代过程中可能发生基因突变导致其毒力下降，

这样的毒株虽然失去了毒力基因，但是仍然能够表达病毒的大部分蛋白，直接用这样的传代致弱毒株接种动物，有时可以对毒力较强的亲本毒株攻毒提供保护^[5]。这说明弱毒株表达了针对病毒的保护性抗原，从而使得动物产生了针对强毒株的免疫保护。此时利用间接免疫荧光和 ELISpot 等分子免疫学方法对受保护动物的血清中的抗体进行检测，有可能筛选到潜在的保护性抗原。通过减毒株保护强毒株攻毒而筛选保护性抗原的方法，其关键在于弱毒株的制备。常用的方法是将强毒株连续传代，这需要有合适的模式动物或细胞系，因为某些病毒在常用的细胞系（如 Vero 细胞）中连续传代后，毒力降低的同时也有可能伴随着免疫原性降低^[6]，从而无法筛选出保护性抗原。在病毒感染过程中，某些蛋白只是短暂地表达^[7]，因此在利用这种方法进行筛选保护性抗原时，很有可能因为抗原蛋白本身的表达量低下而无法检测到，从而漏掉了可能的保护性抗原。自 Johnston 等开发出表达文库免疫的方法后^[8]，用病毒的全基因组免疫动物，在对动物没有毒力的情况下模拟病毒感染。如果病毒编码的蛋白数量过多或许多蛋白未知，则也可以根据已有的研究，将病毒部分蛋白的基因组成部分基因文库对动物进行免疫，并在攻毒试验中评估其保护效果，逐渐缩小对病毒保护性抗原的筛选范围^[9]。但是该策略需要进行大量的动物实验，在没有合适的模式动物条件下，成本较高。这种方法效率较低，却应用广泛，难以替代。

2.2 基于感染病毒后的宿主细胞筛选

基于受感染宿主细胞的筛选策略，其优势在于完备的研究工具。病毒在入侵宿主细胞后，完全依靠宿主细胞提供的各种材料进行复制，这表明基于真核细胞（宿主）开发的各种分子标记方法可以用于标记各种病毒分子。经过长

时间的发展,我们对宿主的研究往往比对病毒的研究更加深入,这一优势在新型病毒的研究中显得尤为突出,如果能够将对宿主的研究工具应用到对病毒的研究中,将大大提高病毒保护性抗原筛选效率。

2.2.1 基于基因组学筛选

自美国遗传学家 Thomas H. Roderick 于 1986 年提出基因组学这一概念之后,对各种生物的研究也拓展到了基因组方面的研究,病毒也不例外,由于某些病毒基因组较大,毒株较多,分离与纯化病毒所需时间较长,而由单细胞全基因组学演化而来的单病毒全基因组学^[10]技术则较好地规避了这个问题。但是简化实验室操作必然会带来另一个问题,即产生的庞大数据如何进行分析处理。技术爆炸带来的数据爆炸,使各种基因数据量超出了人力能够处理的范围。因此,基于计算机科学的生物信息学逐渐成为一个研究热点,基因微阵列^[11-13]和用于全基因组测序的二代测序(next-generation sequencing, NGS)^[14-15]等方法被开发出来。目前,NGS 主要应用于细胞生物的测序中,要想应用于病毒基因测序并进一步筛选保护性抗原,还需要一定程度的优化。在分子生物学实验之前,挑选出一些候选的保护性抗原基因,可以极大地减少保护性抗原筛选的工作量^[16],利用新型测序手段进行筛选的一个思路是,对能够诱导保护的弱毒株在传代过程中所有代次的毒株进行全基因组分析,在能和不能诱导保护的临界点,比对其基因序列的差异,锁定潜在的保护性抗原基因。此外,基因缺失活疫苗通常能够诱导较好的同源保护,但是对异源毒株攻毒的保护有限,仅有少数基因缺失活疫苗能够提供异源保护^[17]。基因组学则能够充分利用这些毒株的基因数据,帮助筛选诱导异源保护的抗原基因。此外,泛基因组学在病毒学领

域的应用也是保护性抗原筛选策略改进的一个方向^[18],尤其是对于基因分型较多的病毒,泛基因组学研究更能够帮助研究者在差异中将病毒基因的多样性与保护性抗原联系起来^[19]。利用生物信息学解决数据爆炸问题的一个主要方向是算法的开发与优化。2016 年,一种名为 Mash 的分析基因组距离进而确定物种亲缘关系的工具被开发出来,并应用到了灵长类动物遗传进化树的绘制中^[20]。2021 年, Yin 等在 Mash 的基础上进一步优化了算法并开发了 RabbitMash,极大地提高了 Mash 的分析速率^[21],这种方法可以尝试应用到病毒不同毒株间基因组距离分析,基因组距离较短的毒株,其保护性抗原相同的概率也更大,这套算法的另一个优势在于其开发目的是用于分析基因组较大的灵长类动物。因此,将其运用于分析基因组较大的病毒时,适配性应该更好。在对细菌进行基因组测序和生物信息学分析中,还发现了新的蛋白编码基因,这可能是潜在的候选保护性抗原蛋白^[22],这种方法经过优化,同样可以用于发现病毒的潜在保护性抗原蛋白。

2.2.2 基于转录组学筛选

基因组学的筛选方法虽然可以对所有的潜在蛋白进行分析与预测,却有一个缺陷,即转录后或翻译后修饰无法从基因序列的分析中得到^[23]。因此,转录组学可以作为基因组学筛选保护性抗原的补充方法。通过转录组学分析全基因组范围内的 RNA 水平,包括定性的(新转录 mRNA 来源)和定量的(每个转录本的表达量)^[24]。近十年来大型转录组学研究表明,虽然只有约 3%的基因组编码蛋白质,但高达 80%的基因组被转录^[25],对于宿主来说,这些 mRNA 参与了许多生理过程,这些针对细胞(病毒的宿主)开发的方法,能够应用于病毒的转录组检测,有助于在 mRNA 水平上阻断病毒感染,

从而找到新的抗病毒靶点。通过 NGS 实现对短 RNA 进行相关分析,还能够识别环状 RNA (近几年发现的一种 RNA^[26])。许多研究表明,动物在处于病理状态时,环状 RNA 会出现失调^[27-28],这提示着环状 RNA 可以作为细胞是否被感染的转录组学指标。此外,相比于线性 RNA,环状 RNA 具有更好的稳定性,它的发现对新型疫苗平台的开发也具有一定启示。例如 2022 年,有学者用内部核糖体进入位点序列 (internal ribosome entry site, IRES) 作为启动环状 RNA 翻译的位点,运用 RNA 体外转录方法 (*in vitro* transcription, IVT) 制备了借助 linker 序列完成首尾相连的环状 RNA 疫苗,并且在新冠疫苗研发中进行了尝试^[29]。另一方面,基于真核细胞的单细胞转录组分析技术也飞速发展,并且某些方法如果应用于病毒的转录组学分析,能够突破其自身的局限。例如,近几年开发出一种能够对 mRNA 转录时间进行统计与分析的方法——scNT-seq^[30],这种方法可以无差别地标记细胞内新转录的所有 mRNA,并以小时为单位检测 RNA 转录的规模,在真核细胞中,由于内含子的影响,无法准确检测新转录 mRNA 的方向性,而病毒基因组不含有内含子,这表明,这种算法不仅能够在感染细胞中检测病毒 mRNA 转录的时间,还能够确定其去向,真正确定病毒 mRNA 的转录轨迹。利用这种方法对受感染细胞进行转录组分析,并结合病毒的感染周期,能够扩大保护性抗原筛选范围。此前, Schofield 等开发的 TimeLapse-seq 测序方法已经能够进行逆转录组分析^[31],为逆转录病毒在转录组学水平上的保护性抗原筛选提供了可能。

2.2.3 基于蛋白组学筛选

蛋白质组学弥补了基因组学和转录组学在筛选保护性抗原方面的不足——翻译后修饰蛋白的检测,因此对病原体的蛋白组学分析作

为对基因组学分析的补充显得十分重要。大部分蛋白质的功能是通过糖基化、磷酸化和泛素化等翻译后修饰实现的^[32-33]。这些修饰在细胞内信号转导、控制酶活性、蛋白质周转和转运以及维持细胞整体结构等方面发挥着关键作用^[34]。有的病毒在病毒粒子的装配过程中,不仅使用自身基因编码的蛋白,还会使用一部分宿主蛋白,如牛痘病毒粒子中就包含一些宿主基因编码的蛋白,以这种方式装配成熟的病毒蛋白,无法通过基因组学和转录组学方法进行检测^[35]。这些蛋白质的翻译后修饰往往需要借助蛋白组学的检测方法才能迅速地被筛选出来。蛋白结晶、磁共振成像、质谱分析和细胞分割技术的发展,使蛋白纯化及鉴定的效率达到了一个较高的水平。专用分析软件的研发,又促进了蛋白筛选的发展^[36],蛋白筛选与保护性抗原蛋白的筛选,只在于筛选的指标不同,其方法应是共通的。为了大量分析蛋白质质谱数据,研究人员开发出了一些算法例如数据库搜索算法 (TopPIC)、肽测序算法 (SWPepNovo) 和混合算法 (ProteomeGenerator)等^[37],极大地提高了蛋白质筛选的效率,结合免疫学相关知识设置好筛选指标,这些算法即可成为保护性抗原筛选的工具。例如,目前常用的指标是抗原-抗体亲和力,利用蛋白质组学高通量的优点,初步预测能够与宿主抗体结合的抗原,并进一步通过分子生物学实验检验其与抗体的结合能力并评估其能否中和病毒^[38],抗原具体表位的确定及抗体结合能力的评估往往需要先构建预测模型,才能够利用计算机的强大算力进行生物信息学评估。目前有学者已经构建并初步验证了一些预测模型,例如运用于人乳头瘤病毒 HPV16 E7 蛋白和人多克隆抗体 TMEM 50A 结合能力预测的线性模型^[39]。由于 B 细胞受体也是抗体,因此,使用这些线性模型可以

很好地通过评估抗原抗体结合能力来预测抗原能否识别 B 细胞表位并诱发相应的体液免疫。有学者通过这种方法评估了 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) 的戊基蛋白的免疫原性,并在动物模型中进行了评估,成功挑选了其作为 FAdV-4 的保护性抗原^[40]。研究者还利用生物信息学成功分析了 α -9 型 HPV 的 E6 蛋白和猪捷申病毒 (PTV) 一段高度保守性多肽 (RNNQIPQDF) 作为保护性抗原的可能性,并在后续研究中得到了验证^[41-42]。对于一些复杂的病毒,还可以大大缩小抗原筛选的范围,例如在 71 型肠道病毒 (EV-A71) 的抗原筛选中,研究者通过生物信息学方法,从预测的 20 个表位中,进行大数据分析最终确定并验证了 9 个免疫原性较强的抗原^[43]。

此外,基于蛋白质组学-转录组学-基因组学的反向遗传技术已应用于已知抗原或具有少量基因的病原体的抗原筛选。不能在体外培养的基因组较大的病原体或没有动物模型的病原体可能无法通过反向疫苗学来筛选保护性抗原,因为有大量的未知功能的潜在靶蛋白。

2.3 病毒保护性抗原的验证

应用不同方法筛选出的抗原都需要经过体内外实验进行验证,即需要回归到分子免疫学中进行验证。这时往往能够确定抗原的免疫原性,同时还要在动物中验证,这时才能真正确定抗原的保护效果(图 2)。例如,Linda 等曾采用文库免疫的方法在 47 种非洲猪瘟病毒 (ASFV) 基因中挑选出了能够诱导大量特异性抗体的 15 个抗原蛋白^[9],并在后期的研究中验证了其中 8 种蛋白组成的抗原池可保护猪抵抗致死剂量的 ASFV 攻击^[44]。尤其是基于常规细胞系筛选出的抗原,其筛选过程很大程度上脱离了宿主细胞,有可能出现保护性抗原只针对用于筛选的细胞系有用,而在病毒感染宿主细胞时并不能提供保护的情况。

3 病毒保护性抗原在新型疫苗研发中的应用

保护性抗原的筛选是决定新型疫苗研发速度的关键因素之一。因为在各种疫苗研发平台得到广泛应用的今天,疫苗研发的实验室阶段已经被尽可能地缩短了。利用保护性抗原设计的新型疫苗不同于减毒活疫苗,新型疫苗的安全性有保证,是因为基于现有方法筛选出的抗原,其应用形式包括蛋白或多肽(亚单位疫苗)及核酸(病毒活载体疫苗、DNA 及 mRNA 疫苗),这些分子都只是病毒的一部分,不具有感染能力,细胞中本身就存在大量的蛋白质及核酸,基本不会对细胞的正常生理功能造成影响^[45],而且新型疫苗的接种剂量普遍较小,在引起过敏反应这方面也有一定优势。虽然保护性抗原必须通过一定的方式递送,但是这也增加了递送的抗原本身形式的多样性,这表明了保护性抗原在新型疫苗研发中有着巨大的应用价值(表 1)。

3.1 亚单位疫苗

亚单位疫苗是提取病原体中具有免疫原性的一个或多个多肽、蛋白或多糖制成的疫苗^[46],由于其是针对病毒部分蛋白或表位所设计的疫苗,所以亚基抗原的免疫反应相对较弱,这在局部和全局性不良反应方面是一个优势,但在刺激有效、持久的免疫反应方面则处于劣势。因此,亚单位疫苗通常与强效佐剂联合使用,以激活和调节有效的免疫应答^[47-48]。利用保护性抗原设计亚单位疫苗需要进行 3 个方面的研究:第一是保护性抗原的筛选,一般是在病原不同血清型/基因型中保守的,能够诱导交叉保护的抗原;第二是免疫佐剂的选取,这对于诱导适当的体液、细胞、预防和治疗性免疫反应至关重要^[49];第三是挑选合适的疫苗平台稳定地递送保护性抗原,由于某些病毒的保护性抗

原处于亚稳定状态，因此要针对性地选取递送系统，并采取一定的措施稳定抗原的状态，防止抗原过早地被酶降解^[8]。以人 IgG1 的 Fc 结构域为载体，递呈尼帕病毒 (NiV) 和亨德拉病毒 (HeV) G 蛋白的二价亚单位疫苗，在小鼠模型中诱导了高水平的病毒中和抗体^[50]。此外，

针对 NiV 和呼吸道合胞病毒 (RSV) G 蛋白的二价亚单位疫苗在小鼠中诱导的抗体不仅能够中和亲本病毒，还能够中和具有免疫逃逸特性的突变病毒的假病毒^[51]。以 Fc 作为载体表达猪非典型瘟病毒 (APPV) 的 E2 蛋白能够诱导较高水平的细胞和体液免疫^[52]。

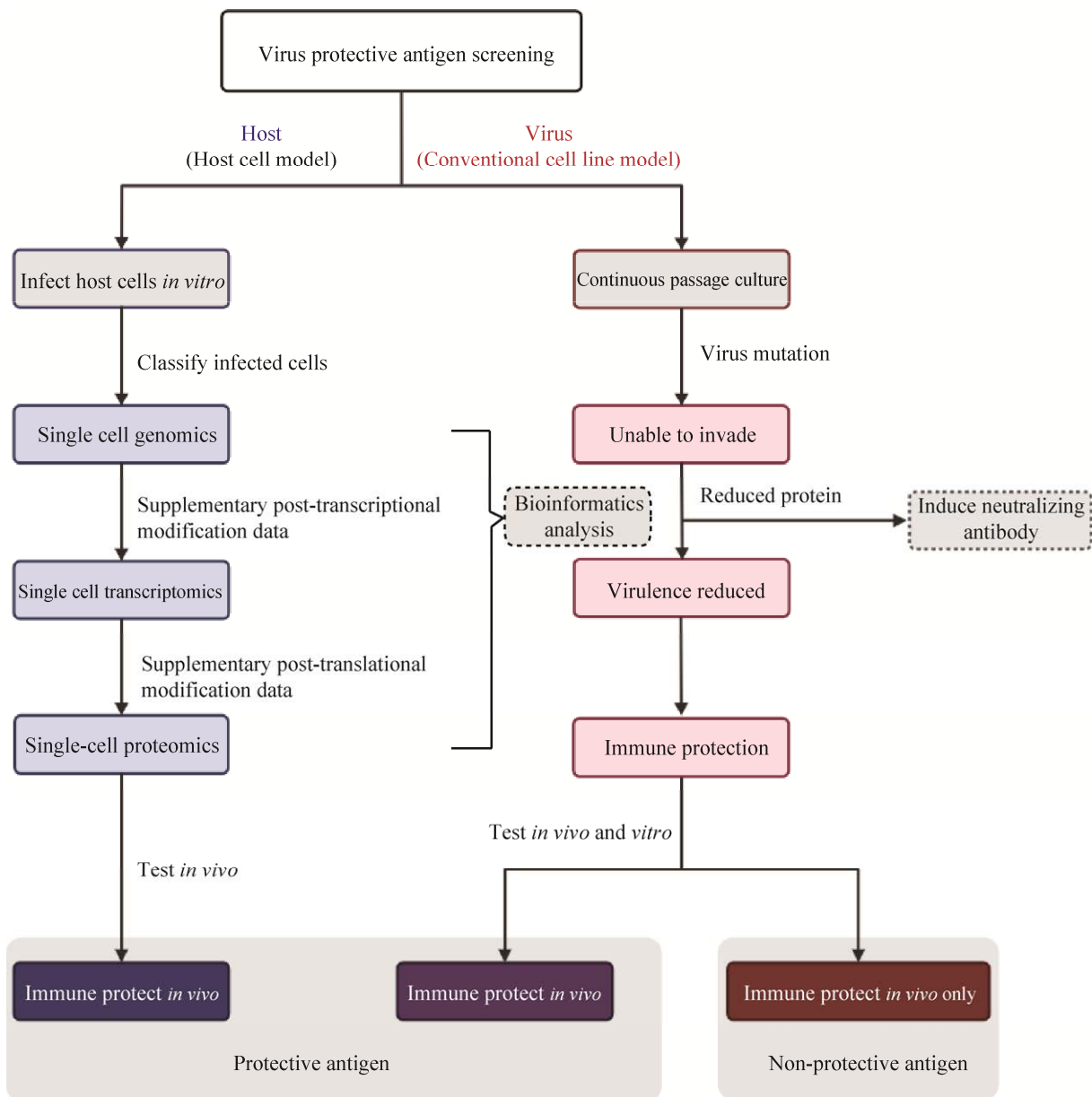


图 2 病毒保护性抗原筛选策略

Figure 2 Strategies for screening virus protective antigens.

疫苗递送系统还决定着疫苗的效果和不良反应^[48]。对于抵抗病毒感染的免疫反应,细胞免疫占据了很重要的地位,细胞免疫途径需要抗原通过内源性途径由 MHC-I 类分子呈递,而亚单位疫苗往往是以诱导体液免疫为主。因此,要想亚单位疫苗诱导相当强的细胞免疫,除了筛选出免疫原性较强的抗原外,还要通过一定手段让抗原以交叉呈递的方式诱导细胞免疫^[53]。近年来,纳米颗粒作为一类优秀的抗原递呈系统,能够在保证抗原免疫原性的基础上同时诱导细胞和体液免疫,并且能够在同一颗粒上同时呈递多种抗原。因此,被应用于许多病毒尤其是血清型较多的病毒候选疫苗的研发^[54-55],例如将全球 3 种主要血清型的轮状病毒的 VP8* 抗原同时表达在 P24 纳米颗粒上,可以在小鼠模型中同时诱导针对各自亲本毒株的中和抗体^[56]。此

外,利用 SpyCatcher/SpyTag 偶联系统可以将纳米颗粒与抗原蛋白分开表达,然后由此系统连接在一起,降低了载体-抗原纯化的难度,目前已经应用于新冠疫苗^[57-58]和 HPV 疫苗的研发当中^[59](图 3)。而病毒样颗粒 (virus-like particles, VLP) 递送系统,可以借助宿主自身免疫系统的识别和摄取机制,确保抗原和佐剂同步被递送到抗原递呈细胞^[60-61],还能够保护抗原不受降解、延长抗原的体内存续时间^[62](表 1)。例如,使用重组杆状病毒载体表达兔戊型肝炎病毒 (HEV) ORF2 所形成的 VLP 免疫家兔后,能够诱导高水平的针对亲本病毒的中和抗体,且该抗体能够体外中和人 HEV,既对于兔 HEV 来说是一种较好的候选疫苗,也可以制成人 HEV 的抗体制剂^[63]。除此之外,脂质体包裹抗原也是非常优良的递送方式^[64]。

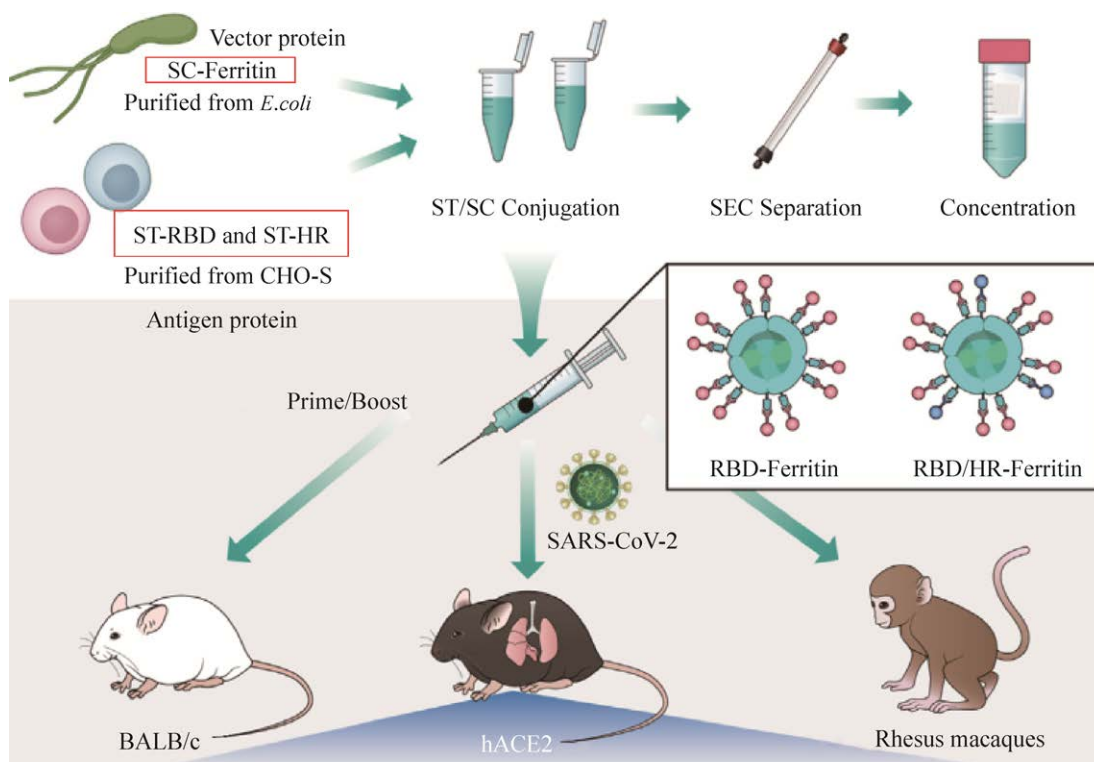


图 3 SARS-CoV-2 的纳米颗粒疫苗平台 (改编自 Ma 等^[57])

Figure 3 Nanoparticle vaccine platform for SARS-CoV-2 (adapted from Ma et al^[57]).

3.2 病毒活载体疫苗

病毒活载体疫苗是利用减毒的活病毒作为载体来表达保护性抗原制成的疫苗。目前,哺乳动物中常用的病毒载体有腺病毒载体 (Ad)、腺联病毒 (AAV) 载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体^[65]和黄热病病毒载体^[66]等 (表 1)。在腺病毒载体中,常用来构建载体的是人腺病毒 C 亚属的 2 型 (Ad2) 和 5 型 (Ad5), 因为其具有良好的安全性,能够携带大量外源基因并且高效地表达,所以在各种动物和人类的疫苗研发中得到了广泛的应用 (表 1)。研究表明,腺病毒既能诱导体液免疫,又能诱导细胞免疫^[67],是多种动物活载体疫苗的候选载体。在保护性抗原筛选成功后,利用腺病毒载体平台能够迅速研制出候选载体疫苗,应对突发的流行传染病。有研究表明,利用分别表达多个非洲猪瘟病毒候选保护性抗原蛋白的腺病毒载体混合免疫猪后,能够对 ASFV 强毒株的攻击提供一定的保护^[44],这为腺病毒载体疫苗的应用提供了一个思路,即在保护性抗原没有明确筛选出来之前,基于病原已有的基础研究,将多种可能的保护性抗原一起利用腺病毒载体表达,在进行载体疫苗保护效果的评估的同时,进行保护性抗原的筛选。针对埃博拉病毒囊膜糖蛋白 (GP) 和核蛋白 (NP) 设计的腺病毒载体疫苗能够对小鼠和非人灵长类提供 100% 保护,该疫

苗目前已经通过了 I 期临床试验^[68]。

3.3 核酸疫苗

DNA 疫苗技术通常来说以质粒为载体来表达候选抗原,编码的抗原在一个强的真核启动子下表达,以达到高水平表达候选抗原的目的^[69] (图 4)。DNA 疫苗的一个主要优势是能够同时诱导体液免疫和细胞免疫^[70],因此可以用于抗病毒感染,目前主要用于兽医领域^[71]。然而在早期的临床研究中,DNA 疫苗表现出了较低的免疫原性,让人对其有效性产生质疑,不过随着疫苗研发技术的发展,科学家们开发了各种提高 DNA 疫苗有效性的方法,尤其是基因工程细胞因子载体的出现,使得 DNA 疫苗的有效性得以显著提高。DNA 疫苗的设计与研发最重要的一点仍然是保护性抗原基因的筛选,其次就是载体,以及接种方式的选择。需要克服的一个问题就是如何将 DNA 质粒导入宿主细胞。目前,常用的方法是用脂质体包裹带有保护性抗原基因免疫动物,因为脂质体不仅能够与细胞膜融合提高转染的效率,还具有佐剂作用,基本上能够解决 DNA 疫苗无法进入细胞而导致的免疫原性低下问题,是一种比较好的递送方式^[64] (表 1)。2021 年,一款名为 VGX-3100 的表达 HPV 的 E6 和 E7 抗原的 DNA 疫苗在美国完成了 III 期临床试验^[72],这表明 DNA 疫苗无论是在安全性还是在有效性方面都有较为优秀的表现。

表 1 保护性抗原的应用

Table 1 Applications of protective antigens

Vaccines	Subunit vaccines	Live vector vaccines	Nucleic acid vaccines
Form of antigens	Proteins/peptides	DNA	DNA/mRNA
Delivery system	Nanoparticles, VLPs	Virus, bacteria, parasite vectors	Liposomes
Direction of optimization	Cross-presentation; novel adjuvants	Vector modification	Antigen stability
Diseases	NiV, HeV, RSV, APPV, RV, HPV, HEV, SARS-CoV-2	ASFV, Ebola virus, SARS-CoV-2	HIV, HPV, NDV, CIAV, SARS-CoV-2
References	[50-52, 54-59, 63]	[44, 65-66, 68, 82]	[9, 72-73, 79-80]

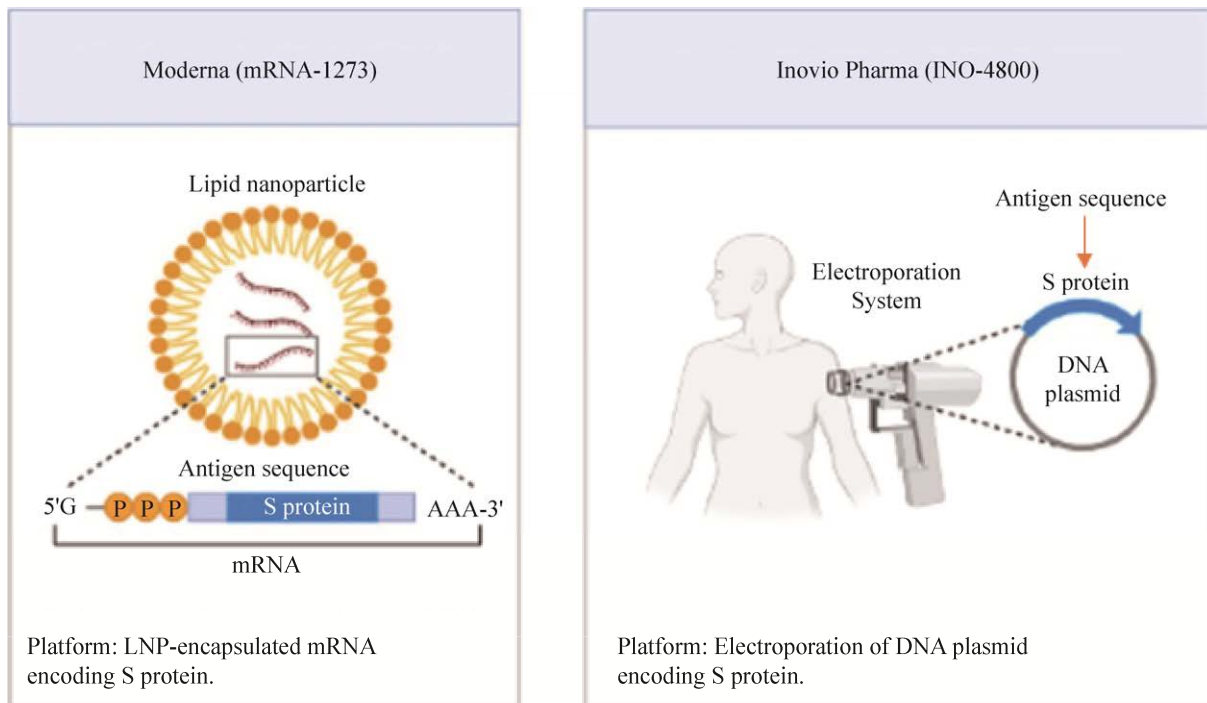


图4 SARS-CoV-2的DNA疫苗和mRNA疫苗平台(改编自Savina等^[84])

Figure 4 DNA vaccine and mRNA vaccine platform for SARS-CoV-2 (adapted from Savina et al^[84]).

一直以来困扰 mRNA 疫苗应用的问题比 DNA 疫苗更为严重,因为 mRNA 在体内比 DNA 更不稳定,传递效率也比较低下,在新的疫苗平台尤其是脂质体递送平台广泛应用之后^[73], mRNA 疫苗的安全性、稳定性、可表达性进一步提高,并且具有快速、廉价和大规模生产的潜力^[74](图4)。mRNA 疫苗与 DNA 疫苗也有类似的地方,比如载体的选择方面(表1)。目前, RNA 载体的研究表明,有的载体已经能够在一定的情况下延长抗原在体内的表达,进而延长疫苗的保护期限^[75-76]。而且, mRNA 疫苗不仅可以通过 RNA 修饰来提高蛋白的表达量^[77],还可以通过密码子替换,将低频率密码子同义替换成高频率密码子来提高抗原蛋白的表达量^[78]。外源 RNA 本身对于宿主细胞有一定免疫刺激作用,因为细胞表面、胞浆都有能够识别外源 RNA 的先天性免疫受体^[79]。这种免疫刺激作用

具有两面性,一方面, mRNA 疫苗发挥类似自佐剂效应的功能诱导 DC 成熟,从而诱导强烈的细胞免疫和体液免疫;另一方面,这种针对 mRNA 的先天性免疫反应可能会抑制抗原蛋白的表达,从而抑制了针对保护性抗原的免疫反应。针对 HIV-1 囊膜糖蛋白 Env 设计的 mRNA 疫苗,能够在小鼠和恒河猴中诱导广泛且持久的中和抗体,并显著降低其受感染的几率^[80]。而用新城疫病毒(NDV)作为载体表达鸡传染性贫血病毒(CIAV)的 VP2 和 VP1 基因,能够同时在鸡体内诱导强烈的针对 NDV 和 CIAV 的体液和细胞免疫,是一款优良的二联候选疫苗^[81]。

最近研究发现,美国辉瑞公司研发的新型冠状病毒 mRNA 疫苗能够在人的肝脏中反转录为 DNA,可能存在将新冠病毒基因整合到人基因组中的风险^[82]。而此前已有研究学者发现反转录为 DNA 的 SARS-CoV-2 抗原基因,有整合

到人 12 号和 15 号染色体上的能力^[83]。这使得人们开始担忧 mRNA 疫苗的安全性,不过就目前新冠全球如此大的感染情况下,仅有零星报道,说明 mRNA 疫苗安全性尚可。

4 总结与展望

在新型疫苗研发中,决定研发速度的往往是保护性抗原筛选这一步骤。筛选策略会随着技术的发展而进步,在信息时代,每一次的技术更迭,往往也伴随着数据爆炸,因此以算法开发与优化为核心的,能够深度挖掘与分析新型数据的生物信息学必将成为未来免疫学研究的一大热点。基于多组学和计算机技术的保护性抗原筛选方法也将被开发,而这些方法往往是针对前沿的人类或动物等真核生物所开发的,所以未来筛选保护性抗原的一个重要策略就是,在病毒感染的宿主细胞中,优化并运用这些方法。不过值得注意的是,保护性抗原的筛选与应用,最核心的是“保护性”,即一切疫苗研发最终都要回到动物身上,要对疫苗在动物攻毒实验中的保护效果进行评估。而在各种组学结合的保护性抗原的筛选中,我们往往是以免疫原性作为保护性抗原的筛选标准,这可能会把我们带进一个误区,即保护性抗原的筛选就是高免疫原性抗原的筛选,我们不应该局限于这种单一标准。在未来的保护性抗原筛选时,我们还应该着眼于动物模型的构建,针对病原找到经济适用的模型动物,评估疫苗对动物模型的保护效果。

在利用病毒保护性抗原进行疫苗研发的过程中,多种疫苗平台的应用既扩大了保护性抗原设计的疫苗类型,又丰富了保护性抗原的应用方式。各种疫苗各有优缺点,目前来看,新型疫苗如亚单位疫苗的应用前景较传统疫苗更为广阔,不过还需要结合疫苗在实际中应用的

情况进行综合判断,在动物疫苗的研发与应用中,如果需要用到特别精细的免疫方式,那么这种疫苗的应用前景会受到一定程度的限制。因此,在未来的疫苗研发中,我们既要在疫苗的分子设计中进行优化,以提高疫苗的保护效果,也要针对疫苗应用场景对各个步骤进行优化,在确保疫苗的保护效果基础上,进一步提高疫苗接种的成功率,让疫苗走出实验室,走向现地。

REFERENCES

- [1] Van Montfoort N, Van der Aa E, Woltman AM. Understanding MHC class I presentation of viral antigens by human dendritic cells as a basis for rational design of therapeutic vaccines. *Front Immunol*, 2014, 5: 182.
- [2] Sempere Borau M, Stertz S. Entry of influenza A virus into host cells—recent progress and remaining challenges. *Curr Opin Virol*, 2021, 48: 23-29.
- [3] Wrapp D, Wang NS, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [4] Zhang JL, Chen JF, da Shi, et al. Porcine *Deltacoronavirus* enters cells via two pathways: a protease-mediated one at the cell surface and another facilitated by cathepsins in the endosome. *J Biol Chem*, 2019, 294(25): 9830-9843.
- [5] Teklue T, Wang T, Luo YZ, et al. Generation and evaluation of an African swine fever virus mutant with deletion of the CD2v and UK genes. *Vaccines*, 2020, 8(4): 763.
- [6] Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, et al. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J Virol*, 2015, 89(4): 2324-2332.
- [7] Rappuoli R, Bottomley MJ, D'Oro U, et al. Reverse vaccinology 2.0: human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med*, 2016, 213(4): 469-481.
- [8] Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, et al. Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(4):

- 190-200.
- [9] Jancovich JK, Chapman D, Hansen DT, et al. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank African swine fever virus immunogenic and protective proteins. *J Virol*, 2018, 92(8): e02219-e02217.
- [10] Garcia-Heredia I, Bhattacharjee AS, Fornas O, et al. Benchmarking of single-virus genomics: a new tool for uncovering the virosphere. *Environ Microbiol*, 2021, 23(3): 1584-1593.
- [11] Voight BF, Kang HM, Ding J, et al. The metabochip, a custom genotyping array for genetic studies of metabolic, cardiovascular, and anthropometric traits. *PLoS Genet*, 2012, 8(8): e1002793.
- [12] Ragoussis J. Genotyping technologies for genetic research. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2009, 10: 117-133.
- [13] Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(2): 95-108.
- [14] Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(6): 415-425.
- [15] Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*, 2013, 155(1): 27-38.
- [16] Schussek S, Trieu A, Doolan DL. Genome- and proteome-wide screening strategies for antigen discovery and immunogen design. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(2): 403-414.
- [17] Gallardo C, Sánchez EG, Pérez-Núñez D, et al. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine*, 2018, 36(19): 2694-2704.
- [18] Tettelin H, Riley D, Cattuto C, et al. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(5): 472-477.
- [19] Sherman RM, Salzberg SL. Pan-genomics in the human genome era. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(4): 243-254.
- [20] Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 132.
- [21] Yin ZK, Xu XM, Zhang JX, et al. RabbitMash: accelerating hash-based genome analysis on modern multi-core architectures. *Bioinformatics*, 2021, 37(6): 873-875.
- [22] Falisse-Poirrier N, Ruelle V, ElMoualij B, et al. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. *J Microbiol Methods*, 2006, 67(3): 593-596.
- [23] Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, et al. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *J Biomed Inform*, 2015, 53: 405-414.
- [24] Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 83.
- [25] Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012, 489(7414): 57-74.
- [26] Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development*, 2016, 143(11): 1838-1847.
- [27] Chen YH, Li C, Tan CL, et al. Circular RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *J Med Genet*, 2016, 53(6): 359-365.
- [28] Feinberg MW, Moore KJ. microRNA regulation of atherosclerosis. *Circ Res*, 2016, 118(4): 703-720.
- [29] Qu L, Yi Z, Shen Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell*. 2022 May 12;185(10):1728-1744.
- [30] Qiu Q, Hu P, Qiu XJ, et al. Massively parallel and time-resolved RNA sequencing in single cells with scNT-seq. *Nat Methods*, 2020, 17(10): 991-1001.
- [31] Schofield JA, Duffy EE, Kiefer L, et al. TimeLapse-seq: adding a temporal dimension to RNA sequencing through nucleoside recoding. *Nat Methods*, 2018, 15(3): 221-225.
- [32] Beck HC, Nielsen EC, Matthiesen R, et al. Quantitative proteomic analysis of post-translational modifications of human histones. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(7): 1314-1325.
- [33] Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 255-261.
- [34] Wu RH, Haas W, Dephoure N, et al. A large-scale method to measure absolute protein phosphorylation stoichiometries. *Nat Methods*, 2011, 8(8): 677-683.
- [35] Jensen ON, Houthaev T, Shevchenko A, et al. Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis. *J Virol*, 1996, 70(11): 7485-7497.
- [36] Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against *Mycoplasma* infection using expression-library immunization. *Nature*, 1995, 377(6550): 632-635.
- [37] Chen C, Hou J, Tanner JJ, et al. Bioinformatics

- methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2873.
- [38] Guest JD, Vreven T, Zhou J, et al. An expanded benchmark for antibody-antigen docking and affinity prediction reveals insights into antibody recognition determinants. *Structure*, 2021, 29(6): 606-621.
- [39] Srivastava U, Singh S, Gautam B, et al. Linear epitope prediction in HPV type 16 E7 antigen and their docked interaction with human TMEM 50A structural model. *Bioinformatics*, 2017, 13(5): 122-130.
- [40] Aziz F, Tufail S, Shah MA, et al. In silico epitope prediction and immunogenic analysis for penton base epitope-focused vaccine against hydropericardium syndrome in chicken. *Virus Res*, 2019, 273: 197750.
- [41] He JY, Li QF, Ma SY, et al. The polymorphism analysis and epitope predicted of *Alphapapillomavirus* 9 E6 in Sichuan, China. *Virology*, 2022, 19(1): 14.
- [42] Tsai TH, Chang CY, Wang fun-in. A highly conserved epitope (RNNQIPQDF) of porcine *Teschovirus* induced a group-specific antiserum: a bioinformatics-predicted model with pan-PTV potential. *Viruses*, 2020, 12(11): 1225.
- [43] Zhang JH, Huang HQ, Xu L, et al. Screening and identification of linear B cell epitopes within the nonstructural proteins of *Enterovirus* 71. *Viral Immunol*, 2019, 32(2): 84-88.
- [44] Goatley LC, Reis AL, Portugal R, et al. A pool of eight virally vectored African swine fever antigens protect pigs against fatal disease. *Vaccines*, 2020, 8(2): 234.
- [45] Butkovich N, Li EY, Ramirez A, et al. Advancements in protein nanoparticle vaccine platforms to combat infectious disease. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13(3): e1681.
- [46] Dudek NL, Perlmutter P, Aguilar MI, et al. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(28): 3149-3157.
- [47] Tandrup Schmidt S, Foged C, Korsholm KS, et al. Liposome-based adjuvants for subunit vaccines: formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. *Pharmaceutics*, 2016, 8(1): 7.
- [48] Reed SG, Tomai M, Gale MJ Jr. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Curr Opin Immunol*, 2020, 65: 97-101.
- [49] Bobbala S, Hook S. Is there an optimal formulation and delivery strategy for subunit vaccines? *Pharm Res*, 2016, 33(9): 2078-2097.
- [50] Li YH, Li RH, Wang MR, et al. Fc-based recombinant *Henipavirus* vaccines elicit broad neutralizing antibody responses in mice. *Viruses*, 2020, 12(4): 480.
- [51] Isaacs A, Cheung STM, Thakur N, et al. Combinatorial F-G immunogens as nipah and respiratory syncytial virus vaccine candidates. *Viruses*, 2021, 13(10): 1942.
- [52] Ren XJ, Qian P, Liu SD, et al. Fc-mediated E2-dimer subunit vaccines of atypical porcine *Pestivirus* induce efficient humoral and cellular immune responses in piglets. *Viruses*, 2021, 13(12): 2443.
- [53] Joffre OP, Segura E, Savina A, et al. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(8): 557-569.
- [54] Kang YF, Sun C, Zhuang Z, et al. Rapid development of SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates. *ACS Nano*, 2021, 15(2): 2738-2752.
- [55] Slieden K, Ozorowski G, Burger JA, et al. Presenting native-like HIV-1 envelope trimers on ferritin nanoparticles improves their immunogenicity. *Retrovirology*, 2015, 12: 82.
- [56] Xia M, Huang PW, Jiang X, et al. A nanoparticle-based trivalent vaccine targeting the glycan binding VP8* domains of rotaviruses. *Viruses*, 2021, 13(1): 72.
- [57] Ma XC, Zou F, Yu F, et al. Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain (RBD) and heptad repeat (HR) of SARS-CoV-2 elicit robust protective immune responses. *Immunity*, 2020, 53(6): 1315-1330.
- [58] Tan TK, Rijal P, Rahikainen R, et al. A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 542.
- [59] Wang WJ, Liu ZD, Zhou XX, et al. Ferritin nanoparticle-based SpyTag/SpyCatcher-enabled click vaccine for tumor immunotherapy. *Nanomedicine*, 2019, 16: 69-78.
- [60] Neumann S, Young K, Compton B, et al. Synthetic TRP2 long-peptide and α -galactosylceramide formulated into cationic liposomes elicit CD8⁺ T-cell responses and prevent tumour progression. *Vaccine*, 2015, 33(43): 5838-5844.
- [61] Kamath AT, Mastelic B, Christensen D, et al. Synchronization of dendritic cell activation and antigen exposure is required for the induction of Th1/Th17 responses. *J Immunol*, 2012, 188(10): 4828-4837.
- [62] Jones SW, Roberts RA, Robbins GR, et al. Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2

- immunity and strain background. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3061-3073.
- [63] Bai HM, Kataoka M, Ami Y, et al. Immunogenicity and antigenicity of rabbit hepatitis E virus-like particles produced by recombinant baculoviruses. *Viruses*, 2021, 13(8): 1573.
- [64] Karkada M, Weir GM, Quinton T, et al. A liposome-based platform, VacciMax, and its modified water-free platform DepoVax enhance efficacy of *in vivo* nucleic acid delivery. *Vaccine*, 2010, 28(38): 6176-6182.
- [65] Haagmans BL, van den Brand JMA, Raj VS, et al. An *Orthopoxvirus*-based vaccine reduces virus excretion after MERS-CoV infection in dromedary camels. *Science*, 2016, 351(6268): 77-81.
- [66] Sanchez-Felipe L, Verduyck T, Sharma S, et al. A single-dose live-attenuated YF17D-vectored SARS-CoV-2 vaccine candidate. *Nature*, 2021, 590(7845): 320-325.
- [67] Zhu JG, Huang XP, Yang YP. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and-independent pathways. *J Virol*, 2007, 81(7): 3170-3180.
- [68] Marzi A, Mire CE. Current Ebola virus vaccine progress. *BioDrugs*, 2019, 33(1): 9-14.
- [69] Galvin TA, Muller J, Khan AS. Effect of different promoters on immune responses elicited by HIV-1 gag/env multigenic DNA vaccine in *Macaca mulatta* and *Macaca nemestrina*. *Vaccine*, 2000, 18(23): 2566-2583.
- [70] Giri M, Ugen KE, Weiner DB. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(2): 370-389.
- [71] Suschak JJ, Williams JA, Schmaljohn CS. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(12): 2837-2848.
- [72] Tang JM, Li MZ, Zhao C, et al. Therapeutic DNA vaccines against HPV-related malignancies: promising leads from clinical trials. *Viruses*, 2022, 14(2): 239.
- [73] Elia U, Ramishetti S, Rosenfeld R, et al. Design of SARS-CoV-2 hFc-conjugated receptor-binding domain mRNA vaccine delivered via lipid nanoparticles. *ACS Nano*, 2021, 15(6): 9627-9637.
- [74] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4): 261-279.
- [75] Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*, 2015, 217: 345-351.
- [76] Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol Ther*, 2017, 25(6): 1316-1327.
- [77] Gallie DR. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev*, 1991, 5(11): 2108-2116.
- [78] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(7): 346-353.
- [79] Chen NH, Xia PP, Li SJ, et al. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *IUBMB Life*, 2017, 69(5): 297-304.
- [80] Zhang P, Narayanan E, Liu QB, et al. A multiclade env-gag VLP mRNA vaccine elicits tier-2 HIV-1-neutralizing antibodies and reduces the risk of heterologous SHIV infection in macaques. *Nat Med*, 2021, 27(12): 2234-2245.
- [81] Chellappa MM, Dey S, Pathak DC, et al. Newcastle disease virus vectored chicken infectious anaemia vaccine induces robust immune response in chickens. *Viruses*, 2021, 13(10): 1985.
- [82] Aldén M, Olofsson Falla F, Yang DW, et al. Intracellular reverse transcription of pfizer BioNTech COVID-19 mRNA vaccine BNT162b2 *in vitro* in human liver cell line. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(3): 1115-1126.
- [83] Zhang LG, Richards A, Barrasa MI, et al. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *PNAS*, 2021, 118(21): e2105968118.
- [84] Savina K, Sreekumar R, Soonu VK, et al. Various vaccine platforms in the field of COVID-19. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*, 2022, 11(1): 35.

(本文责编 郝丽芳)