

· 综 述 ·

传染病 mRNA 疫苗的研究进展及应用

秦凤铭, 任宁, 成温玉, 魏恒*

成都康华生物制品股份有限公司, 四川 成都 611130

秦凤铭, 任宁, 成温玉, 魏恒. 传染病 mRNA 疫苗的研究进展及应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 3966-3984.

QIN Fengming, REN Ning, CHENG Wenyu, WEI Heng. mRNA vaccines for infectious diseases: research progress and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 3966-3984.

摘 要: mRNA 疫苗有望成为预防传染病的新型疫苗。与传统疫苗相比, mRNA 疫苗具有高效、安全、生产周期短和成本低等诸多优势。2020 年, BNT162b2 和 mRNA-1273 这两款 mRNA 疫苗的获批使用, 有效降低了人类感染 COVID-19 的感染风险, 表明 mRNA 技术在针对暴发性传染病疫苗研发上具有一定优势。本文综述了 mRNA 疫苗的分类、免疫机制、修饰方法和在传染病中的应用等, 最后讨论了 mRNA 疫苗目前面临的挑战和未来的发展方向。

关键词: mRNA 疫苗; 传染病; 免疫机制; 修饰方法

mRNA vaccines for infectious diseases: research progress and applications

QIN Fengming, REN Ning, CHENG Wenyu, WEI Heng*

Chengdu Kanghua Biological Products Co., Ltd., Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: Messenger RNA (mRNA) vaccines emerge as promising vaccines to prevent infectious diseases. Compared with traditional vaccines, mRNA vaccines present numerous advantages, such as high potency, safe administration, rapid production potentials, and cost-effective manufacturing. In 2020, two COVID-19 vaccines (BNT162b2 and mRNA-1273) were approved by the Food and Drug Administration (FDA). The two vaccines showed high efficiency in combating COVID-19, which indicates the great advantages of mRNA technology in developing vaccines against emergent infectious diseases. Here, we summarize the type, immune mechanisms, modification methods of mRNA vaccines, and their applications in preventing infectious diseases. Current challenges and future perspectives in developing mRNA vaccines are also discussed.

*Corresponding author. E-mail: weiheng@kangh.com

Received: 2023-04-11; Accepted: 2023-07-10; Published online: 2023-07-25

Keywords: mRNA vaccine; infectious diseases; immune mechanism; modification methods

早在 1990 年, Wolff 等^[1]将体外制备的 mRNA 注射到小鼠骨骼肌细胞后实现了目的蛋白的表达, 由此提出了 mRNA 疫苗的概念。随着 mRNA 稳定性、递送技术研究的不断成熟, mRNA 疫苗作为第三代核酸疫苗被推向临床应用。2020 年 BNT162b2 和 mRNA-1273 mRNA 疫苗获批使用, 两款疫苗均显示出超过 90% 的有效性, 将 mRNA 疫苗的研究推向新的高度^[2]。相比于传统疫苗, mRNA 疫苗展现出诸多的优势: (1) mRNA 疫苗接种后, 模拟病毒感染在位表达相应抗原, 诱导机体产生体液免疫和细胞毒性 T 细胞应答, 展现出对清除细胞内病原体或预防感染的优势。(2) mRNA 疫苗作为外源物质具有病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的特性能被模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别以激活天然免疫应答, 有助于增强适应性免疫反应^[3]。(3) mRNA 在细胞加工过程中被降解, 核酸序列不会整合到宿主基因组中而引起抑癌基因的失活或原癌基因激活的风险, 因此 mRNA

疫苗的安全性高。(4) mRNA 疫苗的研发平台适用于不同 mRNA 疫苗的开发, 节约了成本并缩短了研发周期^[4]。基于上述 mRNA 疫苗的诸多优点, mRNA 疫苗备受研究者的青睐。本文就 mRNA 疫苗的分类、免疫机制、修饰方法和在传染病中的应用进行综述。最后讨论了 mRNA 疫苗技术现阶段存在的挑战和未来的发展方向, 以期对 mRNA 疫苗的开发提供参考。

1 mRNA 疫苗的分类

mRNA 疫苗是以 DNA 为模板合成的单链核苷酸, 通过递送系统运输至体内, 在细胞中表达目标抗原从而诱导宿主的免疫反应。mRNA 根据设计方式的不同分为非复制 mRNA、自我扩增 mRNA (self-amplifying mRNA, saRNA)、反式扩增 RNA (trans-amplifying RNA, taRNA) 和环状 RNA (circular RNA, circRNA) (图 1)。非复制 mRNA 仅编码抗原基因不能实现自我扩增, 而 saRNA 则模仿甲病毒(alphavirus)的复制特点通过在抗原序列之前添加复制酶基因实现自我

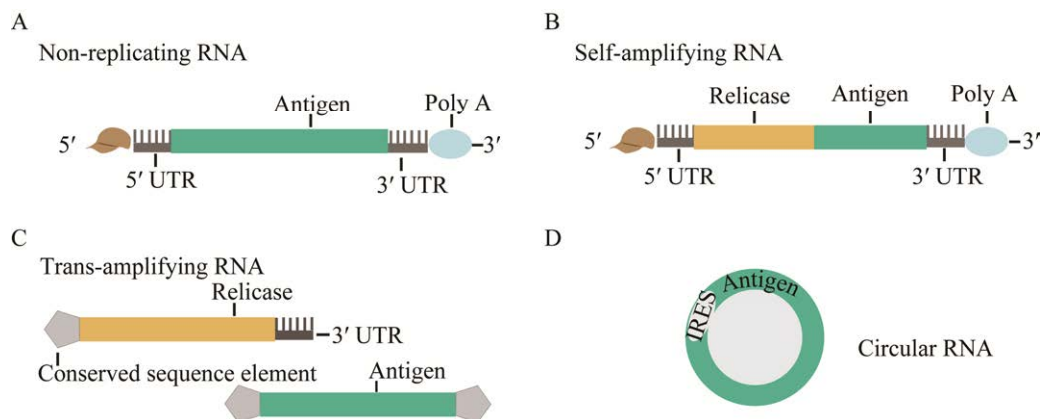


图 1 不同类型的 mRNA 疫苗^[5]

Figure 1 Different types of mRNA vaccines^[5]. UTR: Untranslation regions; IRES: Internal ribosome entry site; Poly(A): Poly-adenylated tail; Cap.

扩增(图 1A 和 1B)。saRNA 被赋予自我扩增能力的同时也使得序列变得复杂。为了规避这一问题, 研究人员开发了 taRNA (图 1C)。taRNA 是利用分裂复制子系统将 saRNA 复制酶基因和抗原序列构建在不同的载体上, 在化繁为简的同时仍然保持 mRNA 自我扩增的特点^[6]。研究结果表明 taRNA 疫苗能高效诱发小鼠产生特异性免疫应答^[7]。此外, 通过共价键闭合环化可制备 circRNA^[8](图 1D)。由于 circRNA 独特的环状结构, 避免了外切酶的影响, 在提高稳定性的同时延长半衰期。与其他 RNA 不同, circRNA 不具有帽子结构, 只需在 5'非翻译区(untranslation regions, UTR)中添加内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)序列或 m⁶A 修饰即可翻译^[9-10]。

2 mRNA 疫苗的免疫原性

1963 年, Isaacs 等^[11]将病毒 RNA 暴露于细胞中诱导产生了干扰素, 证实 mRNA 具有诱导免疫应答的能力。近年来随着 mRNA 技术的进步和免疫学研究的不断深入, 针对 mRNA (纯化和非纯化)的免疫机制取得了一些进展(图 2)。

被递送至胞内的 mRNA 作为一类损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)可被存在于胞膜和胞质中的 PRRs 识别, 从而激活宿主免疫应答反应。纯化的 mRNA 仅包含单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)分子, 通过递送系统包裹并以内吞方式进入核内体, 进入核内体后 mRNA 从递送系统中释放出来并被定位在膜上的 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR) 7 和 TLR-8 识别, 导致下游的髓样分化标记物 88 (myeloid differentiation marker 88, MyD88)被激活, 引起 I 型干扰素(interferon, IFN)激活和炎症因子的分泌^[15-16](图 2B)。I 型 IFN 通路的激活一方面具有佐剂样效应能刺激机体

产生更强的免疫反应;另一方面能激活蛋白激酶受体(protein kinase receptor, PKR)和寡腺苷酸合成酶(oligoadenylate synthetase, OAS)通路从而降低 mRNA 的稳定性和翻译效率, 避免宿主产生过度的免疫应答反应^[17-19]。进入核内体后未从递送系统中释放出来的 mRNA, 通过核内体释放进入细胞质并表达相应的抗原(图 2B)。I 类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)通过识别抗原水解多肽激活 CD8⁺ T 细胞形成细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, CTL), 及时清除被感染的细胞^[20](图 2B)。与此同时, 进入循环系统的抗原被抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)摄取, 随后被蛋白酶水解为多肽, MHC II 识别多肽并呈递给 CD4⁺ T 细胞, 诱导机体产生细胞免疫和体液免疫^[21](图 2B)。

mRNA 体外转录副产物主要包括双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)、副产物 RNA 和 mRNA 降解产物等杂质。此类杂质会引起相应的免疫反应(图 2A)。dsRNA 能激活 PKR、OAS、TLR3 和黑色素瘤分化相关蛋白 5 (melanoma differentiation-associated protein 5, MDA-5) (图 2A)。PKR 的激活会导致真核生物翻译起始因子 2 (eukaryotic translation initiation factor 2, eIF-2) 的磷酸化, 从而阻断 mRNA 的翻译^[16]; OAS 的激活促进 RNA 降解^[22]; TLR3 和 MDA-5 的激活促进 I 型 IFN 的分泌, I 型 IFN 的分泌的增加进一步刺激 PKR 和 OAS 的激活并抑制 mRNA 复制^[22-23](图 2A)。因此, dsRNA 不利于 mRNA 的稳定、复制和翻译。此外, 副产物 mRNA 和 mRNA 降解产物也能激活 TLR7 和 TLR8 通路, 导致 PKR 和 OAS 通路的激活, 从而降低 mRNA 的稳定性和翻译效率^[18-19](图 2A)。因此, 提高 mRNA 的纯度至关重要。

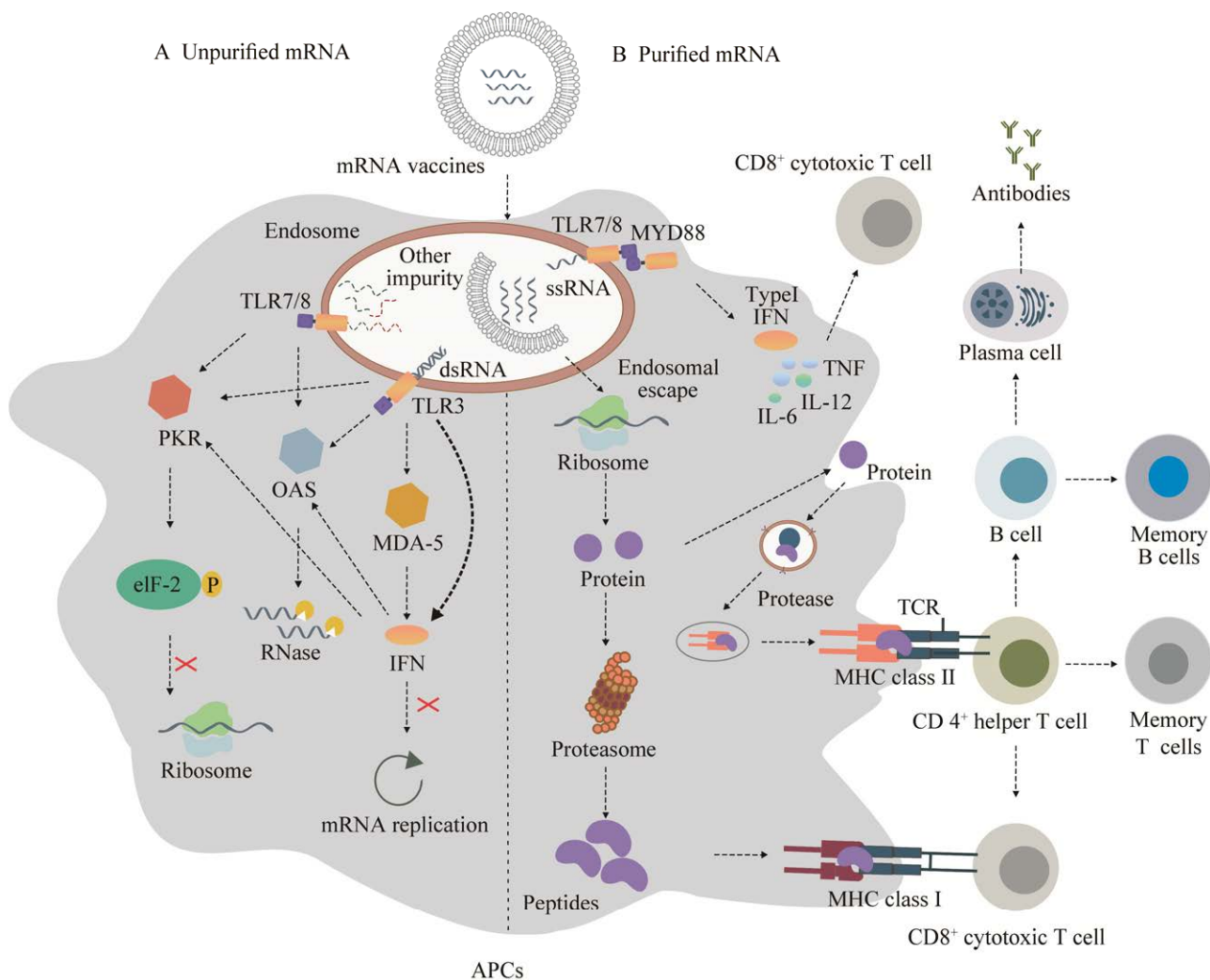


图2 纯化 mRNA 疫苗和未纯化 mRNA 疫苗免疫机制概述^[12-14]

Figure 2 Overview of the immune mechanisms of purified and unpurified mRNA vaccines^[12-14]. MHC: Major histocompatibility complex; APCs: Antigen presenting cells; TLR: Toll-like receptor; IFN: Interferon; MyD88: Myeloid differentiation marker 88; eIF-2: Eukaryotic initiation factor-2; PKR: Protein kinase receptor; OAS: Oligoadenylate synthetase; MDA-5: Melanoma differentiation-associated protein 5; dsRNA: Double-stranded RNA; ssRNA: Single-stranded RNA; IL: Interleukin; TCR: T cell receptor; RNase: Ribonuclease; P: Phosphorylation; TNF: Tumor necrosis factor.

3 mRNA 疫苗的修饰

3.1 5'帽子

5'帽子是真核生物 mRNA 转录后在体内修饰形成的 5'端特殊结构,由一个倒置的 7-甲基鸟苷通过 5'-5'三磷酸桥连接到 RNA 5'末端组成。5'帽子保护 mRNA 免受核酸外切酶的影响,同时

为核糖体识别 mRNA 提供信号,从而提高 mRNA 的稳定性和翻译效率。体外转录 mRNA,常用的加帽方法有酶法加帽和共转录加帽。

酶法加帽主要模拟了真核生物的加帽过程:RNA 三磷酸酶 (triphosphatase, TPase) 水解 mRNA 的 5' γ -磷酸形成 β -磷酸, β -磷酸的 5'末端在鸟苷酸转移酶(guanylyltransferase, GTase)的作

用下与 GMP 结合形成鸟苷三磷酸^[24]。RNA 鸟嘌呤-N7 甲基转移酶(guanine-N7 methyltransferase, G-N7 MTase)利用 S-腺苷-L-蛋氨酸(S-adenosyl-L-methionine, AdoMet)作为底物,在鸟嘌呤的 N7 位置甲基化,形成 Cap 0^[24](图 3A)。痘苗病毒加帽酶(vaccinia capping enzyme, VCE)具有形成 Cap 0 结构所需的 3 种酶活性,通常被用于 mRNA 的加帽^[26]。值得关注的是 mRNA-1273 也采用了 VCE 进行加帽^[27]。虽然 Cap 0 在翻译起始因子的招募中发挥着重要的作用。但仅有 Cap 0 容易被宿主细胞识别为外源 mRNA,从而刺激机体产生免疫反应并引发炎症反应^[28]。为了使外源 mRNA 不易被宿主细胞识别, mRNA 5'端第一个核苷酸的 2'-羟基在 2'-O-甲基转移酶(2'-O-methyltransferase, 2'-O-MTase)的作用下发生甲基化,形成 Cap 1^[29]。mRNA 5'端第二个核苷酸的 2'-羟基继续甲基化,形成 Cap 2^[30](图 3B)。在大大降低 mRNA 免疫原性的同时还对 mRNA 提供额外的保护。

共转录加帽采用帽类似物进行加帽。该方法具有减少反应步骤和酶的使用量的优势,但面临着加帽效率和反应产量低下的问题。为了提高加帽效率和产量,研究者开发了三唑基团、硫代磷酸酯、4-卤-苄等修饰的二核苷帽类似物以及锁定核酸修饰的三核苷帽类似物^[31-33]。其中,三核苷帽类似物在提高加帽效率和翻译水平方面优于二核苷帽类似物^[32]。传统的帽类似物容易在反向进行加帽,导致加帽效率低于 60%。抗反向帽类似物(anti-reverse cap analog, ARCA)的出现解决了这一问题。ARCA 在 7-甲基鸟苷的 3'-羟基上发生甲基化或脱氧,迫使加帽正向进行^[34](图 3C)。然而,鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)与 ARCA 在转录过程中存在竞争,加帽效率约 80%^[35]。此外,

ARCA 等帽类似物与天然帽结构存在差异,容易被 PRRs 识别激活天然免疫系统,从而降低 mRNA 稳定性和翻译水平。2018 年,Trilink 开发了 CleanCap 帽,该技术用 AG 或者 AU 三聚体进行加帽,将加帽效率提高到 90%以上的同时直接形成 Cap 1 结构^[36](图 3D)。CleanCap[®] Reagent AG 用于非复制 RNA,并要求 DNA 模板序列中 T7 启动子后面为 AG 开头;CleanCap[®] Reagent AU 用于 saRNA,并要求 DNA 模板以 AU 开头。BNT162b2 COVID-19 疫苗使用了 Trilink 的 CleanCap 帽^[37]。

3.2 Poly(A)

几乎所有的真核 mRNA 均包含多聚腺苷酸尾[poly-adenylated tail, Poly(A)]。Poly(A)在提高 mRNA 的稳定性和翻译效率方面有着重要的作用。一方面, Poly(A)能抑制脱帽酶与帽的结合,保护 mRNA 不受核酶降解,进而提高 mRNA 的稳定性。另一方面, Poly(A)与 Poly(A)结合蛋白结合后并与翻译起始因子形成“闭环”刺激翻译^[13]。不同物种间 Poly(A)尾的长度差异很大。哺乳动物的 Poly(A)尾平均长度约 200 nt,而酵母中 Poly(A)尾平均长度约 90 nt。Poly(A)尾长度和翻译效率之间并不是简单的线性关系。太短的 Poly(A)无法刺激 mRNA 翻译。通常 Poly(A)尾的长度越长,蛋白翻译效率越高。但若 Poly(A)尾太长(>120 nt),质粒生产时则面临 Poly(A)不稳定易发生丢失缩短的问题。Poly(A)尾长度和 mRNA 半衰期的相关性较差或呈负相关^[38]。因此, Poly(A)尾长度通常设计在 100-150 nt,以求翻译效率和稳定性的同时提高。此外,对 Poly(A)尾进行修饰也能提高 mRNA 的稳定性。Viegas 等^[39]发现通过 N6 甲基腺苷修饰 Poly(A)能增加表达布氏锥虫表面糖蛋白 mRNA 的稳定性。

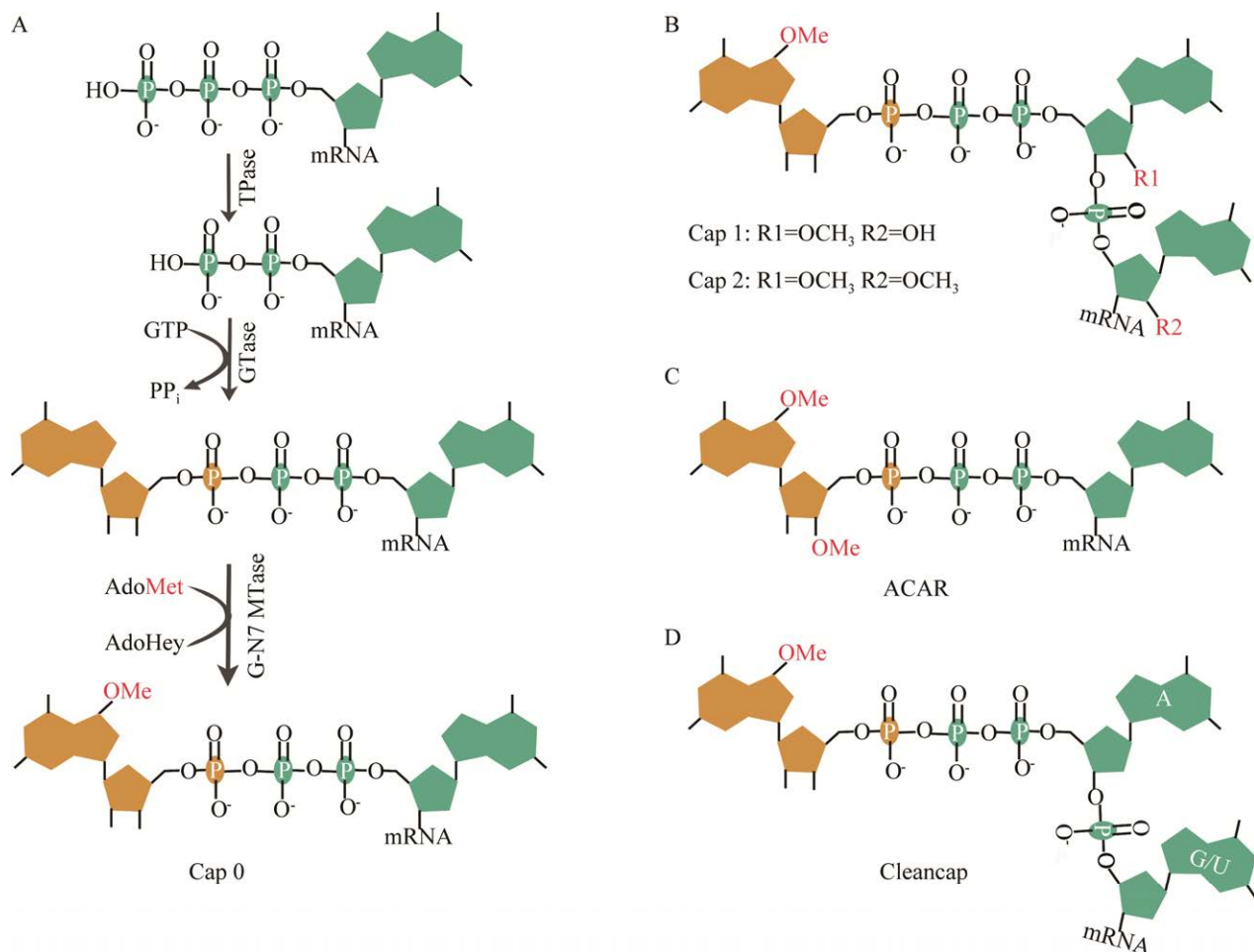


图 3 酶法加帽和帽类似物示意图^[24-25]

Figure 3 Schematic representation of enzymatic capping and cap analogs^[24-25]. A: Enzymatic capping. The RNA triphosphatase (TPase) hydrolyzes the 5' γ -phosphate of mRNA to form β -phosphate. The 5' phosphate terminus of the β -phosphate binds to GMP to form a 5' to 5'-triphosphate linkage with the help of guanylyltransferase (GTase). RNA guanine-N7 methyltransferase (G-N7 MTase) uses S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) as the substrate to methylate guanine at the N7 position, yielding the Cap 0. B: Structures of Cap 1 and Cap 2. With the help of 2'-O-methyltransferase, the R1 is methylated based on Cap 0. When the R2 continues to methylate, Cap 2 is formed. C: Structure of anti-reverse cap analog (ARCA). D: Structure of CleanCap AG/AU Cap 1 trimer.

3.3 UTR

非编码区(untranslated regions, UTRs) (5' UTR 和 3' UTR)不直接编码蛋白但影响 mRNA 的稳定性和翻译效率。5' UTR 位于 5'帽子与编码序列之间,有助于核糖体招募、扫描以及起始密码子选择^[40]。3' UTR 位于编码区下游紧邻 Poly(A),通过 AU 和 GU 富集区域、多腺苷酸化

状态、降解速率等对 mRNA 的翻译、稳定性及亚细胞分布产生影响^[41]。常用的 UTRs 序列主要来源于高表达蛋白的编码序列,例如:珠蛋白、血红蛋白(α 亚基、 β 亚基)、热休克蛋白等。为缩短核糖体亚基从 5'帽子到起始密码子之间的距离,应避免使用较长的 5' UTR。此外,选择结构松散且不含起始密码子的 5' UTR 能促进核

糖体招募和密码子的正确识别,有助于翻译效率的提高。3' UTR 中 AU 和 GU 富集序列能激活快速衰变顺式作用元件,加快 mRNA 的衰变,因此对 AU 和 GU 富集序列进行适当调整有助于维持 mRNA 的稳定^[42-43]。研究发现 3' UTR 的数量对 mRNA 也能产生影响,Linares-Fernandez 等采用两个 3' UTR 串联实现了 mRNA 的稳定性和翻译效率的同时提高^[44]。此外,Hashizume 等^[45]发现 3' UTR 的长度、序列和二级结构对 mRNA 翻译效率和稳定性也有影响。

3.4 开放阅读框

开放阅读框(open reading frame, ORF)作为编码蛋白质的序列,对 mRNA 的稳定性和翻译效率有着直接的影响。不同物种的密码子偏好性不同。为了提高蛋白翻译效率,通常使用频率高的密码子对 ORF 进行优化。然而,某些蛋白质需要在翻译效率低的条件下才能正确折叠。因此为了保证这类蛋白的有效折叠,则选择使用频率低的密码子。不仅密码子影响 mRNA 的翻译效率,ORF 序列中 GC 含量对 mRNA 的翻译效率也有影响。研究发现增加 ORF 的 GC 含量能在增加 mRNA 稳定性的同时提高翻译效率^[46]。例如:CureVac 根据人类密码子的特点,将 CVnCoV 密码子的第 3 个核苷酸中的 A 或 U 替换为 C 或 G,以提高 ORF 中的 GC 含量^[46]。此外,Kozak 序列具有行使翻译起始的功能,影响 mRNA 的翻译效率,因此 Kozak 序列的添加也是必要的。

3.5 核苷酸修饰

2005 年发现假尿嘧啶修饰 mRNA 能降低其免疫原性,自此核苷酸修饰被广泛应用^[47]。Modomics 已报道有 170 多种核苷酸修饰方法^[48]。常见的核苷酸修饰方法有假尿嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、5-甲基胞嘧啶、N4-乙酰胞嘧啶、N1-甲基腺嘌呤和 7-甲基鸟嘌呤。其中,假尿嘧啶修饰应用最为广泛,被称为“第五种核苷”^[49]。除了发现

假尿嘧啶能降低 mRNA 的免疫原性,人们还发现 mRNA 免疫原性的降低与假尿嘧啶的引入数量呈正相关,当假尿嘧啶引入越多,mRNA 的免疫原性降低越多^[50]。当用假尿嘧啶完全替代尿嘧啶后,mRNA 的免疫原性大大降低,且 mRNA 的稳定性和翻译效率也得到提高^[51]。2020 年上市的 BNT162b2 和 mRNA-1273 均采用了假尿嘧啶进行修饰。

4 mRNA 疫苗用于传染病预防

4.1 mRNA 疫苗用于病毒性传染病的预防

4.1.1 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型

尽管 mRNA 疫苗的概念早在 1990 年就被提出,然而受其稳定性、递送系统等因素的限制,一直未得到应用。新冠肺炎的暴发显著推动了 mRNA 疫苗的应用,辉瑞/BioNTech 和 Moderna 分别开发的 BNT162b2 和 mRNA-1273 被正式批准并最快应用于疫情防控。这两款 mRNA 疫苗均以严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型 severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, (SARS-CoV-2)的棘突(spike, S)蛋白为靶点,与传统疫苗相比,BNT162b2 和 mRNA-1273 的保护效力均在 90%以上,而传统疫苗大多低于 90%,可见 mRNA 疫苗保护效力更高(表 1)。BNT162b2 和 mRNA-1273 不仅对 SARS-CoV-2 原始毒株具有有效的预防效果,而且在对其变异株也有良好的保护作用。研究结果显示接种第二剂 14 d 以后,BNT162b2 和 mRNA-1273 对 delta 毒株诱导的重症、危重症或致死性疾病的预防效力分别为 93.4%和 96.1%。此外,BNT162b2 和 mRNA-1273 在卡塔尔人群中可有效预防 delta 毒株感染引起的住院率和死亡率^[54]。针对 omicron 毒株,BNT162b2 接种第二剂后 1 个月内对有症状的 omicron 感染的预防有效率为 61.9%,对重型、危重型或致死性新冠感染预防的有效率在接种

第二剂后仍有 70%，在接种加强针后为 90%^[55]；mRNA-1273 接种第二剂疫苗后的前 3 个月内，对 omicron 感染症状的预防效力最高为 44.8%，对重型、危重型或致死率的预防效力最高分别为 60%和 80%^[55]。总体而言，接种第二剂和加强针后，BNT162b2 和 mRNA-1273 疫苗在预防 SARS-CoV-2 变异株住院和死亡方面的保护作用稳定且持久，但对 omicron 的保护作用低于对 alpha、beta 和 delta 变异株的保护作用^[55]。

BNT162b2 和 mRNA-1273 都需要低温和/或超低温冷链运输和保存，这无疑给经济不发达的地区带来了挑战，而热稳定型 mRNA 疫苗的出现则为这些地区提供了便利。德国 CureVac 公司开发的编码 SARS-CoV-2 S 蛋白非修饰 mRNA 疫苗 CVnCoV 在 5 °C 下可稳定保存 3 个月^[56]。整个人群和 18–60 岁亚群的 2b/3 期临床试验结果显示，CVnCoV 对有症状 COVID-19 的预防效力分别为 48%和 53%^[57]。一项在拉丁美洲成人的研究结果显示，CVnCoV 接种 2 剂或 3 剂后能诱导产生较强的 SARS-CoV-2 特异性 CD4⁺ T 细胞应答^[58]。后来研究人员在 CVnCoV 疫苗的非编码区添加来源于人羟基类固醇(17 β)脱氢酶 4 基因的 5' UTR 和来源于人蛋白酶体 20S 亚基 β 3 基因的 3' UTR 以及组蛋白颈环序列进行优化得到 CV2CoV^[56]。动物试验结果显示，CV2CoV 在大鼠和非人类灵长类动物中表现出更高的效力且对多种

SARS-COV-2 突变株 (B.1.351、B.1.1.7、B.1.617.2 和 C.37)产生更强的中和抗体^[57,59]。另一热稳定 mRNA 疫苗 ARCoV，编码 SARS-COV-2 S 蛋白三聚体受体结合域(receptor binding domain, RBD)，可在 2–8 °C 下储存至少 6 个月，而不影响其免疫原性^[60]。1 期临床试验结果显示，ARCoV 安全性高、耐受性良好，抗 RBD IgG 抗体在接种第二剂后 7 d 显著增加，14–28 d 达到峰值；特异性 T 细胞应答在全程接种疫苗后 7–14 d 达到峰值，中和抗体最高时为 COVID-19 恢复期患者的 2 倍^[61]。

除上述常规 mRNA 疫苗外，自我扩增 mRNA 疫苗也引起了 COVID-19 mRNA 疫苗研究人员的关注。与传统 mRNA 疫苗相比，接种更少剂量自我扩增 mRNA 疫苗就能产生与非复制 mRNA 疫苗相当的效果^[62]。LNP-nCoVsaRNA，编码复制酶和 SARS-CoV-2 S 蛋白，在 192 名 18–45 岁健康人的研究结果显示疫苗安全性高，未发生与接种疫苗相关的严重不良事件^[63]。另一自我扩增 mRNA 疫苗 ARCT-021 又称 LUNAR-CoV19，编码甲病毒复制子和 SARS-CoV-2 S 蛋白^[64]。在 K-18 人源化 ACE2 转基因小鼠中，单次免疫即诱导出强大的以 Th1 为主的细胞免疫和体液免疫^[64]。1/2 期临床试验表明，ARCT-021 的耐受性良好，抗 S 蛋白的 IgG 血清转换率高达 100%，并产生 S 蛋白中和抗体和 T 细胞应答^[65]。

表 1 不同类型新冠疫苗的有效性(数据来源于 Yan 等^[52]和 Kwok^[53]综述)

Table 1 Efficacies of different Covid-19 vaccines (data from the reviews of Yan et al.^[52] and Kwok^[53])

| Vaccines | Vaccine type | Age | Usage (doses) | Efficacy (%) |
|--------------------|-------------------|-------|---------------|--------------|
| mRNA-1273 | mRNA-based | 18–65 | 2 | 95.6 |
| BNT162b2 | mRNA-based | 18–55 | 2 | 94.6 |
| CoronaVac | Inactivated | 18–59 | 2 | 50.4 |
| NVX-CoV2373 | Pro-subunit | 18–65 | 2 | 89.3 |
| ChAdOx1 nCoV-19 | Adenoviral vector | 18–55 | 2 | 70.4 |
| rAd26-S and rAd5-S | Adenoviral vector | 18–60 | 2 | 91.6 |

最近, Liang 等^[66]开发的未修饰的编码 SARS-CoV-2 RBD 的 circRNA 疫苗, 免疫小鼠和恒河猴后, 诱导产生了强效中和抗体和 T 细胞应答, 并且 circRNA 疫苗产生的抗原比假尿嘧啶修饰的 mRNA 疫苗更高且更持久。综上所述, circRNA 在无需核苷酸修饰的情况下对传染病具有更强的保护作用, 有望成为疫苗和药物开发的新平台。

4.1.2 猴痘病毒

猴痘病毒(mpox virus, MPXV)是与天花病毒同属正痘病毒属的人畜共患病原体, 于1958年首次在用于研究的猴子中发现, 长期在非洲中西部地区呈现地方性流行。2022年5月以来, MPXV 感染在全球范围内暴发, 已造成非疫源地区超过50 000例的猴痘确诊病例(93例死亡病例), 成为国际关注的公共卫生事件^[67]。自疫情暴发后, 葡萄牙里斯本国立卫生研究院的 João Paulo Gomes 博士团队公布了首个猴痘病毒基因组序列以来, 针对猴痘病毒的 mRNA 疫苗研究也在如火如荼地进行^[68]。Sang 等^[69]针对细胞内成熟病毒的 A29L 和 MIR 基因以及细胞外包膜病毒的 A35R 和 B6R 基因开发了两款猴痘病毒四组分 mRNA 疫苗, 通过肌肉注射诱导小鼠产生 MXPV 特异性 IgG 抗体和高水平的痘苗病毒(vaccinia virus, VACV)特异性中和抗体。此外, 该款 mRNA 疫苗在小鼠中还诱导产生持久的 MXPV 特异性杀伤记忆 T 细胞免疫和记忆 B 细胞免疫^[69]。Fang 等^[70]以 MPXV 的 A35R、E8L、MIR、B6R 和 A29 等 5 个基因为靶点, 开发了 MPXVac-097, 采用 3 剂次(初免-二免-加强)免疫小鼠后, 抗体检测发现其对 A35R 和 E8L 抗原产生强抗体应答, 对 MIR 产生中等应答, 对 B6R 或 A29 没有反应, 表现出免疫原性的差异。此外, Freyn 等^[71]开发了一款编码 4 种高度保守的 MXPV 表面蛋白的 mRNA-LNP 疫苗可以诱导 MXPV 特异性免

疫和对致死性的 VACV 攻击的异源保护。

4.1.3 流感病毒

流感病毒是威胁人类健康的重要病原, 以甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)引起的季节性最为严重。据统计, 全世界每年约有 29 万至 65 万人死于流感病毒^[72]。流感病毒亚型众多、抗原变异较快且因其流行趋势难以预测等因素给疫苗的更新带来难度。与传统疫苗相比, mRNA 疫苗因其研发周期短而受到流感病毒疫苗研发人员的青睐。IAV 基因组由 8 个单股负链 RNA (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS)组成, 共编码 10 种必需蛋白(PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2)和 7 种非必需蛋白(PB1-F2、N40、PA-X、PA-N155、PA-N182、M42 和 NS3)^[73]。早在 2012 年, 编码流感病毒 A/PuertoRico/8/1934 (PR8HA)的全长血凝素(hemagglutinin, HA)的 mRNA 疫苗在免疫幼鼠和老年鼠后诱导产生了针对甲型流感病毒的长期保护性免疫, 并呈现 B 细胞和 T 细胞依赖, 因其靶向流感病毒多个抗原, 具有交叉保护^[74]。Brazzoli 等^[75]研发了一种编码流感病毒 HA 抗原的 saRNA 疫苗, 在雪貂和小鼠中具有广泛的保护性免疫反应。随后该团队又以 IAV 的 NP 和 MI 基因为靶点设计了 3 款自我复制型 mRNA 疫苗(saRNA-NP、saRNA-M1 和 saRNA-M1-NP), 三者均可诱导产生强大的 CD4⁺ Th1 细胞, 并延长了感染同源或异源流感病毒小鼠的生存时间^[76]。最近, 一种核苷修饰的编码来自 20 种已知的甲型流感病毒亚型和乙型流感病毒分支的血凝素抗原 mRNA 疫苗被开发出来, 能诱导针对多个抗原的抗体^[77]。尽管目前尚无针对流感病毒的 mRNA 疫苗获批应用于流感病毒的免疫防控, 然而 Moderna 开发的流感病毒 mRNA 疫苗(NCT05566639)已开展 3 期临床试验, 并表现出良好的保护效果, 有

望尽快推向临床^[78]。

4.1.4 寨卡病毒

寨卡病毒(zika virus, ZIKV)是一种蚊虫传播的黄病毒,与新生儿的小头畸形、脑钙化、眼睛缺陷、听力损失以及成人的 Guillain-Barré 综合征有关,于 1947 年首次分离^[79]。近年来,预防 ZIKV 的 mRNA 疫苗也引起了研究者的关注。2017 年,编码野生型或变异型 ZIKV 结构基因的修饰 mRNA 疫苗,采用脂质纳米粒封装,两剂免疫小鼠后诱导产生了高滴度中和抗体(约 1/100 000)^[80]。同年,编码 ZIKV 前膜和胞膜(membrane and envelope, prM-E)糖蛋白的核苷酸修饰 mRNA 疫苗通过皮内单次低剂量免疫小鼠和非人类灵长类动物诱导产生有效且持久的中和抗体反应^[81]。2019 年,Zhong 等^[82]通过皮内电穿孔法将编码 prM 糖蛋白的 saRNA 疫苗在未有载体递送的情况下免疫 *IFNAR1*^{-/-} C57BL/6 小鼠,可诱导针对 ZIKV 病毒的强烈体液和细胞免疫应答,使其对 ZIKV 病毒感染具有完全的保护作用。Luisi 等^[79]采用阳离子纳米乳剂(cationic nanoemulsion, CNE)递送编码 prM 糖蛋白的 saRNA 疫苗,并在小鼠和非人类灵长类动物体内诱导出针对 ZIKV 的有效中和抗体。值得注意的是,CNE 可以与 mRNA 床旁混合,并且可以在 2-4 °C 下稳定多年^[79]。另有研究人员发现编码巴西 SPH2015 毒株的 prM-E 糖蛋白 mRNA-LNP 疫苗诱导的抗体反应在 IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 受体缺陷的 AG129 小鼠中得到保护^[83]。目前,Moderna 生产的 ZIKV mRNA 疫苗 mRNA-1893 已完成临床 1 期实验,且 mRNA-1893 的有效性是 mRNA-1325 的 20 倍,mRNA-1893 相关 2 期临床正在开展,不久有望推向临床^[84]。

4.1.5 狂犬病病毒

狂犬病是一种引起神经系统症状的人畜共患病,病死率接近 100%。目前已有狂犬病疫苗上市,但由于产量有限、储存要求严格和成本高,

每年仍造成近 5 万多人死亡^[85],因此需寻求新的狂犬病疫苗。mRNA 疫苗因安全性高、易于大规模生产和能诱导强免疫反应,也同样受到狂犬病疫苗开发的青睐。2016 年,CureVac 公司开发的未经任何修饰的编码狂犬病病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RABV-G)的非复制型 mRNA 疫苗 CV7201 免疫小鼠和猪,观察到中和抗体的产生和特异性 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞应^[86]。在 1 期临床试验中,无针注射器皮内和肌肉注射 CV7201 均诱导产生了中和抗体^[87]。CV7202 mRNA 疫苗也同样编码 RABV-G,但不同于 CV7201 采用基于鱼精蛋白的递送系统,CV7202 采用脂质纳米粒作为递送系统,1 期临床显示,肌肉注射两剂 CV7202 后,抗体滴度 ≥ 0.5 IU/mL,符合世界卫生组织(World Health Organization, WHO)标准^[88]。2022 年,Li 等^[89]将编码 RABV-G 的 mRNA 疫苗的 ORF 区进行优化开发出新的狂犬病疫苗 LVRNA001,动物试验结果显示该疫苗对狂犬病病毒的攻击具有较高的保护作用。除此之外,研究人员对编码 RABV-G 的 mRNA-LNP 疫苗进行密码子优化和核苷酸修饰发现,单独接种中等或高剂量的 mRNA 疫苗比 3 次接种灭活疫苗能诱导更有效的体液和 T 细胞免疫应答,重要的是,单一低剂量免疫小鼠也能对致命的狂犬病病毒攻击显示出完全的保护作用^[90]。Saxena 等^[91]开发的编码 RABV-G 的 saRNA 疫苗免疫小鼠,能有效诱导免疫应答和保护作用,产生了类似于狂犬病 DNA 疫苗的细胞和体液 IgG 反应。狂犬病病毒耐温 mRNA 疫苗的开发有助于减少运输和贮藏成本。Stitz 等^[85]开发的非复制 mRNA 的狂犬病病毒疫苗,在 -80 °C 到 +70 °C 条件下长时间储存数月不会影响 mRNA 疫苗的保护能力。

除上述病毒性传染病外,针对人类免疫缺

陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、和埃博拉病毒(ebolavirus)的 mRNA 疫苗也有相
呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV) 关研究, 有的已经进入临床研究阶段(表 2)。

表 2 除 SARS-CoV-2 以外的病毒性传染病 mRNA 疫苗的临床试验(数据来源于 ClinicalTrials.gov, 截至 2023 年 4 月 7 日)

Table 2 Clinical trials of mRNA vaccines for viral infectious diseases other than SARS-CoV-2 (data from ClinicalTrials.gov as of 7 April, 2023)

| Target | NCT No. (phase) | Name | Sponsor | Reference | |
|-----------------------------|-------------------|---|---------------------------------------|------------|------|
| Influenza | NCT03076385(I) | mRNA-1440 | ModernaTX, Inc. | [92] | |
| | NCT05426174(I) | mRNA NA vaccine | Sanofi Pasteur, a Sanofi Company | | |
| | NCT05624606(I/II) | MRT5410 | Sanofi Pasteur, a Sanofi Company | | |
| | NCT05553301(I/II) | MRT5407 | Sanofi Pasteur, a Sanofi Company | | |
| | NCT05650554(I/II) | MRT5413 | Sanofi Pasteur, a Sanofi Company | | |
| | NCT05052697(I/II) | mIRV/bIRV AB/qIRV/QIV/bIRV AA/bIRV BB | Pfizer | | |
| | NCT05252338(I) | CVSQIV | CureVac | | |
| | NCT05566639(III) | mRNA-1010 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05415462(III) | mRNA-1010 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT04956575(I/II) | mRNA-1010 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05333289(I/II) | mRNA-1030/ mRNA-1020 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05606965(II) | mRNA-1010 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT03345043(I) | mRNA-1851 | ModernaTX, Inc. | [92] | |
| | Rabies | NCT03713086(I) | CV7202 | CureVac AG | [88] |
| | | NCT02241135(I) | CV7201 | CureVac AG | [87] |
| HIV | NCT05217641(I) | mRNA-1574 | NIAID | | |
| | NCT02413645(I) | iHIVARNA | Judit Pich Martínez | [93] | |
| | NCT02888756(II) | iHIVARNA | Rob Gruters | [94] | |
| | NCT05217641(I) | BG505 MD39.3 mRNA/BG505 MD39.3 gp151 mRNA/BG505 MD39.3 gp151 CD4KO mRNA | NIAID | | |
| Cytomegalo virus | NCT05001373(I) | mRNA-1644 | International AIDS Vaccine Initiative | | |
| | NCT05085366(III) | mRNA-1647 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05105048(I) | mRNA-1647 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT04232280(II) | mRNA-1647 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05575492(I/II) | mRNA-1647 | ModernaTX, Inc. | | |
| Zika virus | NCT03382405(I) | mRNA-1647/ mRNA-1443 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT03014089(I) | mRNA-1325 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT04917861(II) | mRNA-1893 | ModernaTX, Inc. | | |
| Respiratory syncytial virus | NCT04064905(I) | mRNA-1893 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT04528719(I) | mRNA-1345 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05330975(III) | mRNA-1345 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05127434(III) | mRNA-1345 | ModernaTX, Inc. | | |
| | NCT05639894(I/II) | mRNA LNP CL-0059/mRNA LNP CL-0137 | Sanofi | | |
| Chikungunya virus | NCT03829384(I) | mRNA-1944 | ModernaTX, Inc. | [95] | |
| | NCT03325075(I) | mRNA-1388 | ModernaTX, Inc. | | |
| Nipah virus | NCT05398796(I) | mRNA-1215 | NIAID | | |

4.2 mRNA 疫苗用于非病毒性传染病的预防

4.2.1 鼠疫

鼠疫是由鼠疫耶尔森菌感染引起, 俗称黑死病。1346–1353 年, 鼠疫造成约 2 亿人死亡。抗生素的发现可有效治疗鼠疫。然而, 多重耐药菌的出现使得感染患者病情复杂, 治愈困难, 因此亟需找到新的治疗策略。近期, Kon 等^[96]研发出编码鼠疫耶尔森菌部分荚膜蛋白的 mRNA-LNP 疫苗。为了增加疫苗的有效性和稳定性, 研发人员对鼠疫 mRNA 疫苗进行优化: 将分泌信号替换为真核分泌信号、提高序列中 GC 含量、引入人类抗体片段和核苷酸修饰等。动物试验结果显示, 鼠疫 mRNA-LNP 疫苗单次免疫 C57BL/6 小鼠后, 能在小鼠体内引起体液免疫应答和细胞免疫应答, 且接种一剂鼠疫 mRNA-LNP 疫苗两周后, 小鼠仍全部存活, 表明鼠疫 mRNA 疫苗能提供完全的保护^[96]。鼠疫 mRNA-LNP 疫苗在动物试验上的成功, 为抗菌疫苗的研发开辟了道路。

4.2.2 肺结核

2019 年 WHO 公布的位列传染病死亡原因之首的肺结核, 是由结核分枝杆菌感染所引起的一类胞内寄生性细菌。目前唯一获批用于预防肺结核的疫苗为卡介苗, 但卡介苗对成年人的保护效力有限, 当成人大量吸入结核分枝杆菌或者机体抵抗力低下时, 仍有被感染的风险。同时多重耐药菌和广泛耐药菌的出现, 大大降低了现有治疗药物的有效性。早在 2004 年, Xue 等^[97]使用体外合成的编码结核分枝杆菌 MPT83 抗原的 RNA 免疫小鼠, 诱导产生了体液免疫反应和 T 细胞免疫反应。2022 年, Larsen 等^[98]设计编码 ID91 自扩增 mRNA 疫苗能诱导小鼠产生 CD4⁺ Th1 细胞并对降低肺部的细菌载量有显著效果。此外, BioNTech 也开展了肺结核 mRNA 疫苗的研发管线, 相关研究已经进入临

床 1 期(NCT05537038, NCT05547464)试验, 但尚无数据公布其保护效率。

4.2.3 疟疾

疟疾是由疟原虫引起的虫媒传染病, 临床表现为全身发冷、发热、多汗, 甚至引发贫血、脾肿大。目前疟疾的治疗手段有药物治疗和支持治疗, 以及接种疟疾疫苗(RTS, S/AS01), 但流行病学研究发现, 目前全球仍有近 1 亿疟疾病例, 且每年引起超过 200 万人死亡, 因此, 研发更为高效的疟疾疫苗迫在眉睫。mRNA 疫苗技术的快速发展, 为疟疾 mRNA 疫苗的研发提供了方向。2021 年, Mallory 等^[99]将编码恶性疟原虫的环孢子蛋白的 mRNA 利用 LNP 包裹后免疫小鼠, 发现能预防小鼠感染疟疾。近期, MacMillen 等^[100]利用 LNP 将编码环孢子蛋白的自我扩增 mRNA 疫苗免疫小鼠, 同样能有效预防小鼠感染疟疾, 这为疟疾 mRNA 疫苗尽快推向临床奠定了基础。

5 结论与展望

随着人们对 mRNA 免疫机制的深入研究以及加帽、加尾、UTR 选择、ORF 优化和核苷酸修饰等手段的发展, 促进了 mRNA 疫苗在传染病中的应用。特别是 BNT162b2 和 mRNA-1273 的成功获批, 进一步促进了 mRNA 疫苗的发展。尽管目前已有众多传染病 mRNA 疫苗进入临床试验, 但 mRNA 疫苗技术仍有值得改进的地方。

在运输方面, mRNA 疫苗需要冷冻保存和冷链运输且保存有效期短。如 BNT162b2, 在 -70 °C 超低温冰箱可保存 6 个月, 在 2–8 °C 医院冰箱仅保存 5 d。mRNA-1273 在 -20 °C 保存 7 个月, 2–8 °C 医院冰箱保存 1 个月。即使是后来开发的热稳定较好的 CVnCoV 和 ARCoV, 在 2–8 °C 医用冰箱保存也不超过半年。毫无疑问, mRNA 疫苗严苛的保存和运输条件增加了

经济不发达地区的负担,降低了人群接种率,因此有必要开发能够在室温甚至高温天气下保存而不影响免疫效力的 mRNA 疫苗。此外, mRNA 疫苗大多采用肌肉注射的方式给药。一方面肌肉注射对接种者的操作技能要求更高,增加了医疗机构的培训成本;另一方面,肌肉注射容易给被接种者造成心理压力,易发生疫苗接种心因性反应。mRNA 疫苗新剂型以及新的给药方式的开发有望降低肌肉注射方式带来的困扰。另一值得关注的是 mRNA 中杂质的存在会影响其稳定性、翻译效率和免疫效果。目前 mRNA 的纯化方式多采用层析纯化,层析纯化存在载量低、流速慢和剪切力高,不适用于 mRNA 的工业化放大,有必要开发新的纯化方法。除此之外, mRNA 疫苗在工艺开发的过程中,为了让产品能最终安全、有效地应用于人体,需要对每一步的工艺进行严格的质量控制,如质粒模板中宿主 DNA、RNA 和蛋白质残留, mRNA 中 dsRNA、模板 DNA 残留以及制剂的粒径、zeta 电位等。随着 COVID-19 的暴发, mRNA 疫苗被美国食品药品监督管理局正式批准推向临床。mRNA 疫苗作为一个新兴的疫苗类型,其生产过程中涉及质粒 DNA 模板的制备、mRNA 原液的制备、mRNA 的包封与灌装等多个模块,均需要对应的质量控制标准。目前,国内可供参考的文件为国家药品审评中心发布的《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)》,国外参考文件有世界卫生组织发布的“评估基于 RNA 的传染病预防性疫苗的质量、安全性和有效性:监管考虑因素”和美国药典委员会发布的“mRNA 疫苗质量分析方法”^[101-103]。这些指导性文件是基于目前公开发布的 mRNA 疫苗的信息,尚缺乏许多新的候选 mRNA 疫苗的检测项目、分析方法和质量控制标准,这使得制定统一的 mRNA 生产

质量管理标准变得困难,从而使 mRNA 疫苗生产过程控制充满挑战,亟需完善相关质量控制和管理标准。

综上所述, mRNA 疫苗技术用于病毒性传染病疫苗的开发取得了不错的进步,但 mRNA 疫苗技术在室温甚至高温条件下长期保存、给药形式多样化、纯化方法优化、质量控制和管理标准等方面还有待提高。

REFERENCES

- [1] WOLFF JA, MALONE RW, WILLIAMS P, CHONG W, ACSADI G, JANI A, FELGNER PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247(4949 Pt 1): 1465-1468.
- [2] SAHIN U, MUIK A, DERHOVANESSIAN E, VOGLER I, KRANZ LM, VORMEHR M, BAUM A, PASCAL K, QUANDT J, MAURUS D, BRACHTENDORF S, LÖRKS V, SIKORSKI J, HILKER R, BECKER D, ELLER AK, GRÜTZNER J, BOESLER C, ROSENBAUM C, KÜHNLE MC, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and T_H1 T cell responses[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 594-599.
- [3] PARDI N, WEISSMAN D. Measuring the adjuvant activity of RNA vaccines[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 2017, 1499: 143-153.
- [4] RAUCH S, JASNY E, SCHMIDT KE, PETSCH B. New vaccine technologies to combat outbreak situations[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1963.
- [5] FANG EY, LIU XH, LI M, ZHANG ZL, SONG LF, ZHU BY, WU XH, LIU JJ, ZHAO DH, LI YH. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7: 94.
- [6] BLAKNEY AK, MCKAY PF, SHATTOCK RJ. Structural components for amplification of positive and negative strand VEEV splitzicons[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2018, 5: 71.
- [7] PERKOVIC M, GAWLETTA S, HEMPEL T, BRILL S, NETT E, SAHIN U, BEISSERT T. A trans-amplifying RNA simplified to essential elements is highly replicative and robustly immunogenic in mice[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2023, 31(6): 1636-1646.

- [8] KRISTENSEN LS, ANDERSEN MS, STAGSTED LVW, EBBESEN KK, HANSEN TB, KJEMS J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20(11): 675-691.
- [9] ALEXANDER WESSELHOEFT R, KOWALSKI PS, ANDERSON DG. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2629.
- [10] YANG Y, FAN XJ, MAO MW, SONG XW, WU P, ZHANG Y, JIN YF, YANG Y, CHEN LL, WANG Y, WONG CC, XIAO XS, WANG ZF. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine[J]. *Cell Research*, 2017, 27(5): 626-641.
- [11] ISAACS A, COX RA, ROTEM Z. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon[J]. *The Lancet*, 1963, 282(7299): 113-116.
- [12] PARDI N, HOGAN MJ, PORTER FW, WEISSMAN D. mRNA vaccines—a new era in vaccinology[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(4): 261-279.
- [13] SZABÓ GT, MAHINY AJ, VLATKOVIC I. COVID-19 mRNA vaccines: platforms and current developments[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(5): 1850-1868.
- [14] MACHADO BAS, HODEL KVS, FONSECA LMDS, MASCARENHAS LAB, ANDRADE LPCDS, ROCHA VPC, SOARES MBP, BERGLUND P, DUTHIE MS, REED SG, BADARÓ R. The importance of RNA-based vaccines in the fight against COVID-19: an overview[J]. *Vaccines*, 2021, 9(11): 1345.
- [15] KRANZ LM, DIKEN M, HAAS H, KREITER S, LOQUAI C, REUTER KC, MENG M, FRITZ D, VASCOTTO F, HEFESHA H, GRUNWITZ C, VORMEHR M, HÜSEMANN Y, SELMI A, KUHN AN, BUCK J, DERHOVANESSIAN E, RAE R, ATTIG S, DIEKMANN J, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy[J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 396-401.
- [16] LINARES-FERNÁNDEZ S, LACROIX C, EXPOSITO JY, VERRIER B. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2020, 26(3): 311-323.
- [17] MINNAERT AK, VANLUCHEHNE H, VERBEKE R, LENTACKER I, de SMEDT SC, RAEMDONCK K, SANDERS NN, REMAUT K. Strategies for controlling the innate immune activity of conventional and self-amplifying mRNA therapeutics: getting the message across[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 176: 113900.
- [18] ZHANG ZK, OHTO U, SHIBATA T, KRAYUKHINA E, TAOKA M, YAMAUCHI Y, TANJI H, ISOBE T, UCHIYAMA S, MIYAKE K, SHIMIZU T. Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA[J]. *Immunity*, 2016, 45(4): 737-748.
- [19] TANJI H, OHTO U, SHIBATA T, TAOKA M, YAMAUCHI Y, ISOBE T, MIYAKE K, SHIMIZU T. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(2): 109-115.
- [20] VILLADANGOS JA, SCHNORRER P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(7): 543-555.
- [21] CAGIGI A, LORÉ K. Immune responses induced by mRNA vaccination in mice, monkeys and humans[J]. *Vaccines*, 2021, 9(1): 61.
- [22] PULIT-PENALOZA JA, SCHERBIK SV, BRINTON MA. Activation of *Oas1a* gene expression by type I IFN requires both STAT1 and STAT2 while only STAT2 is required for *Oas1b* activation[J]. *Virology*, 2012, 425(2): 71-81.
- [23] KUMAR P, SWEENEY TR, SKABKIN MA, SKABKINA OV, HELLEN CUT, PESTOVA TV. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp-mRNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(5): 3228-3245.
- [24] MUTTACH F, MUTHMANN N, RENTMEISTER A. Synthetic mRNA capping[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2017, 13: 2819-2832.
- [25] VAIDYANATHAN S, AZIZIAN KT, HAQUE AKMA, HENDERSON JM, HENDEL A, SHORE S, ANTONY JS, HOGREFE RI, KORMANN MSD, PORTEUS MH, MCCAFFREY AP. Uridine depletion and chemical modification increase Cas9 mRNA activity and reduce immunogenicity without HPLC purification[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2018, 12: 530-542.
- [26] SHUMAN S. Catalytic activity of vaccinia mRNA capping enzyme subunits coexpressed in *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(20): 11960-11966.
- [27] CORBETT KS, EDWARDS DK, LEIST SR, ABIONA OM, BOYOGLU-BARNUM S, GILLESPIE RA, HIMANSU S, SCHÄFER A, ZIWAWO CT, DIPIAZZA AT, DINNON KH, ELBASHIR SM, SHAW CA,

- WOODS A, FRITCH EJ, MARTINEZ DR, BOCK KW, MINAI M, NAGATA BM, HUTCHINSON GB, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 567-571.
- [28] TO KKW, CHO WCS. An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2021, 16(11): 1307-1317.
- [29] FURUICHI Y, SHATKIN AJ. Viral and cellular mRNA capping: past and prospects[J]. *Advances in Virus Research*, 2000, 55: 135-184.
- [30] DESPIC V, JAFFREY SR. mRNA ageing shapes the Cap2 methylome in mammalian mRNA[J]. *Nature*, 2023, 614(7947): 358-366.
- [31] WOJCIK R, BARANOWSKI MR, MARKIEWICZ L, KUBACKA D, BEDNARCZYK M, BARAN N, WOJTCZAK A, SIKORSKI PJ, ZUBEREK J, KOWALSKA J, JEMIELITY J. Novel N7-arylmethyl substituted dinucleotide mRNA 5' cap analogs: synthesis and evaluation as modulators of translation[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1941.
- [32] SHANMUGASUNDARAM M, SENTHILVELAN A, KORE AR. Recent advances in modified cap analogs: synthesis, biochemical properties, and mRNA based vaccines[J]. *The Chemical Record*, 2022, 22(8): e202200005.
- [33] SENTHILVELAN A, VONDERFECHT T, SHANMUGASUNDARAM M, PAL I, POTTER J, KORE AR. Trinucleotide cap analogue bearing a locked nucleic acid moiety: synthesis, mRNA modification, and translation for therapeutic applications[J]. *Organic Letters*, 2021, 23(11): 4133-4136.
- [34] STEPINSKI J, WADDELL C, STOLARSKI R, DARZYNKIEWICZ E, RHOADS RE. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG[J]. *Rna*, 2001, 7(10): 1486-1495.
- [35] MIAO L, ZHANG Y, HUANG L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 41.
- [36] HENDERSON JM, UJITA A, HILL E, YOUSIF-ROSALES S, SMITH C, KO N, MCREYNOLDS T, CABRAL CR, ESCAMILLA-POWERS JR, HOUSTON ME. Cap 1 messenger RNA synthesis with co-transcriptional CleanCap® analog by *in vitro* transcription[J]. *Current Protocols*, 2021, 1(2): e39.
- [37] VOGEL AB, KANEVSKY I, CHE Y, SWANSON KA, MUIK A, VORMEHR M, KRANZ LM, WALZER KC, HEIN S, GÜLER A, LOSCHKO J, MADDUR MS, TOMPKINS K, COLE J, LUI BG, ZIEGENHALS T, PLASCHKE A, EISEL D, DANY SC, FESSER S, et al. A prefusion SARS-CoV-2 spike RNA vaccine is highly immunogenic and prevents lung infection in non-human primates[J]. *BioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.09.08.280818.
- [38] PASSMORE LA, COLLIER J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(2): 93-106.
- [39] VIEGAS IJ, de MACEDO JP, SERRA L, de NIZ M, TEMPORÃO A, SILVA PEREIRA S, MIRZA AH, BERGSTROM E, RODRIGUES JA, ARESTA-BRANCO F, JAFFREY SR, FIGUEIREDO LM. N6-methyladenosine in poly(A) tails stabilize VSG transcripts[J]. *Nature*, 2022, 604(7905): 362-370.
- [40] JIA LF, MAO YH, JI QQ, DERSH D, YEWDELL JW, QIAN SB. Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27(9): 814-821.
- [41] WANG Z, DAY N, TRIFILLIS P, KILEDJIAN M. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA *in vitro*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(7): 4552-4560.
- [42] LUI KH, GEISBERG JV, MOQTADERI Z, STRUHL K. 3' untranslated regions are modular entities that determine polyadenylation profiles[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2022, 42(9): e00244-00222.
- [43] ABDULLA SZ, KIM K, AZAM MS, GOLUBEVA YA, CAKAR F, SLAUCH JM, VANDERPOOL CK. Small RNAs activate *Salmonella* pathogenicity island 1 by modulating mRNA stability through the *hilD* mRNA 3' untranslated region[J]. *Journal of Bacteriology*, 2023, 205(1): e00333-00322.
- [44] LINARES-FERNÁNDEZ S, MORENO J, LAMBERT E, MERCIER-GOUY P, VACHEZ L, VERRIER B, EXPOSITO JY. Combining an optimized mRNA template with a double purification process allows strong expression of *in vitro* transcribed mRNA[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2021, 26: 945-956.
- [45] HASHIZUME M, TAKASHIMA A, IWASAKI M. A small stem-loop-forming region within the 3'-UTR of a nonpolyadenylated LCMV mRNA promotes translation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(2): 101576.

- [46] THESS A, GRUND S, MUI BL, HOPE MJ, BAUMHOF P, FOTIN-MLECZEK M, SCHLAKE T. Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2015, 23(9): 1456-1464.
- [47] WILLIS E, PARDI N, PARKHOUSE K, MUI BL, TAM YK, WEISSMAN D, HENSLEY SE. Nucleoside-modified mRNA vaccination partially overcomes maternal antibody inhibition of *de novo* immune responses in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(525): eaav5701.
- [48] BOCCALETTO P, STEFANIAK F, RAY A, CAPPANNINI A, MUKHERJEE S, PURTA E, KURKOWSKA M, SHIRVANIZADEH N, DESTEFANIS E, GROZA P, AVŞAR G, ROMITELLI A, PIR P, DASSI E, CONTICELLO SG, AGUILO F, BUJNICKI JM. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2021 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D231-D235.
- [49] SONG BW, TANG YJ, WEI Z, LIU G, SU JL, MENG J, CHEN KQ. PIANO: a web server for pseudouridine-site (Ψ) identification and functional annotation[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 88.
- [50] KARIKO K, BUCKSTEIN M, NI HP, WEISSMAN D. 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.
- [51] KARIKÓ K, MURAMATSU H, WELSH FA, LUDWIG J, KATO H, AKIRA S, WEISSMAN D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability[J]. *Molecular Therapy*, 2008, 16(11):1833-1840.
- [52] YAN ZP, YANG M, LAI CL. COVID-19 vaccines: a review of the safety and efficacy of current clinical trials[J]. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 2021, 14(5): 406.
- [53] KWOK HF. Review of Covid-19 vaccine clinical trials-a puzzle with missing pieces[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(6): 1461-1468.
- [54] TANG P, HASAN MR, CHEMAITELLY H, YASSINE HM, BENSLIMANE FM, AL KHATIB HA, AIMUKDAD S, COYLE P, AYOUB HH, AL KANAANI Z, AL KUWARI E, JEREMIENKO A, KALEECKAL AH, LATIF AN, SHAIK RM, ABDUL RAHIM HF, NASRALLAH GK, AL KUWARI MG, AL ROMAIHI HE, BUTT AA, et al. BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the SARS-CoV-2 delta variant in Qatar[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(12): 2136-2143.
- [55] CHEMAITELLY H, AYOUB HH, ALMUKDAD S, TANG P, ABU-RADDAD LJ. Duration of protection of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccines against symptomatic SARS-CoV-2 omicron infection in Qatar[J]. *MedRxiv*, 2022. DOI: 10.1101/2022.02.07.22270568.
- [56] GEBRE MS, RAUCH S, ROTH N, YU JY, CHANDRASHEKAR A, MERCADO NB, HE X, LIU JY, MCMAHAN K, MARTINOT A, MARTINEZ DR, GIFFIN V, HOPE D, PATEL S, SELLERS D, SANBORN O, BARRETT J, LIU XW, COLE AC, PESSAIN L, et al. Optimization of non-coding regions for a non-modified mRNA COVID-19 vaccine[J]. *Nature*, 2022, 601(7893): 410-414.
- [57] GEBREMS, RAUCH S, ROTH N, YU JY, BAROUCH DH. Optimization of non-coding regions improves protective efficacy of an mRNA SARS-CoV-2 vaccine in nonhuman primates[J]. *BioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.08.13.456316.
- [58] SÁEZ-LLORENS X, LANATA C, ARANGUREN E, CELIS CR, CORNEJO R, DEANTONIO R, ECKER L, GARRIDO D, GIL AI, GONZALES M, HESS-HOLTZ M, LEROUX-ROELS G, JUNKER H, KAYS SK, KOCH SD, LAZZARO S, MANN P, QUINTINI G, SRIVASTAVA B, VAHRENHORST D, et al. Safety and immunogenicity of mRNA-LNP COVID-19 vaccine CVnCoV in Latin American adults: a phase 2 randomized study[J]. *Vaccine: X*, 2022, 11: 100189.
- [59] ROTH N, SCHÖN J, HOFFMANN D, THRAN M, THESS A, MUELLER SO, PETSCH B, RAUCH S. CV2CoV, an enhanced mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate, supports higher protein expression and improved immunogenicity in rats[J]. *BioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.05.13.443734.
- [60] ZHAO H, WANG TC, LI XF, ZHANG NN, LI L, ZHOU C, DENG YQ, CAO TS, YANG G, LI RT, HUANG YJ, LI YG, ZHANG YM, LI FX, ZHOU YR, JIANG YH, LU XS, SUN SH, CHENG ML, GU KP, et al. Long-term stability and protection efficacy of the RBD-targeting COVID-19 mRNA vaccine in nonhuman primates[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 438.
- [61] CHEN GL, LI XF, DAI XH, LI N, CHENG ML, HUANG Z, SHEN J, GE YH, SHEN ZW, DENG YQ, YANG SY, ZHAO H, ZHANG NN, ZHANG YF, WEI

- L, WU KQ, ZHU MF, PENG CG, JIANG Q, CAO SC, et al. Safety and immunogenicity of the SARS-CoV-2 ARCoV mRNA vaccine in Chinese adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial[J]. *The Lancet Microbe*, 2022, 3(3): e193-e202.
- [62] SCHMIDT C, SCHNIERLE BS. Self-amplifying RNA vaccine candidates: alternative platforms for mRNA vaccine development[J]. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 2023, 12(1): 138.
- [63] POLLOCK KM, CHEESEMAN HM, SZUBERT AJ, LIBRI V, BOFFITO M, OWEN D, BERN H, O'HARA J, MCFARLANE LR, LEMM NM, MCKAY PF, RAMPLING T, YIM YTN, MILINKOVIC A, KINGSLEY C, COLE T, FAGERBRINK S, ABAN M, TANAKA M, MEHDIPOUR S, et al. Safety and immunogenicity of a self-amplifying RNA vaccine against COVID-19: COVAC1, a phase I, dose-ranging trial[J]. *Eclinicalmedicine*, 2022, 44: 101262.
- [64] de ALWIS R, GAN ES, CHEN SW, LEONG YS, TAN HC, ZHANG SL, YAU C, LOW JGH, KALIMUDDIN S, MATSUDA D, ALLEN EC, HARTMAN P, PARK KJ J, ALAYYOUBI M, BHASKARAN H, DUKANOVIC A, BAO YJ, CLEMENTE B, VEGA J, ROBERTS S, et al. A single dose of self-transcribing and replicating RNA-based SARS-CoV-2 vaccine produces protective adaptive immunity in mice[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2021, 29(6): 1970-1983.
- [65] LOW JG, de ALWIS R, CHEN S, KALIMUDDIN S, LEONG YS, MAH TKL, YUEN N, TAN HC, ZHANG SL, SIM JX. A phase 1/2 randomized, double-blinded, placebo controlled ascending dose trial to assess the safety, tolerability and immunogenicity of ARCT-021 in healthy adults[J]. *MedRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.07.01.21259831.
- [66] LIANG QU, YI ZY, SHEN Y, LIN LR, CHEN F, XU YY, WU ZG, TANG HX, ZHANG XX, TIAN F, WANG CH, XIAO X, DONG XJ, GUO L, LU SY, YANG CY, TANG C, YANG Y, YU WH, WANG JB, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1728-1744.e16.
- [67] MAHASE E. Monkeypox: what do we know about the outbreaks in Europe and north America?[J]. *British Medical Journal Publishing Group*, 2022: o1274.
- [68] First draft genome sequence of monkeypox virus associated with the suspected multi-country outbreak, May 2022 (confirmed case in Portugal)[EB/OL]. [2023-03-13]. <https://virological.org/t/first-draft-genome-sequence-of-monkeypox-virus-associated-with-the-suspected-multi-country-outbreak-may-2022-confirmed-case-in-portugal/799>.
- [69] SANG Y, ZHANG Z, LIU F, LUHT, YU CX, SUN HS, LONG JR, CAO YM, MAI JR, WANG X, FANG JX, WANG YC, HUANG WJ, YANG J, WANG SQ. Monkeypox virus quadrivalent mRNA vaccine induces antibody responses and cellular immunity and protects mice against Vaccinia virus[J]. *BioRxiv*, 2022, DOI: 10.1101/2022.11.22.517500.
- [70] FANG ZH, MONTEIRO VS, RENAUER PA, SHANG XB, SUZUKI K, LING XY, BAI MZ, XIANG Y, LEVCHENKO A, BOOTH CJ, LUCAS C, CHEN SD. Polyvalent mRNA vaccination elicited potent immune response to monkeypox virus surface antigens[J]. *Cell Research*, 2023, 33(5): 407-410.
- [71] FREYN AW, ATYEO C, EARL PL, AMERICO JL, CHUANGGY, NATARAJAN H, FREY T, GALL J, MOLIVA JI, HUNEGNAW R, ARUNKUMAR GA, OGEA C, NASIR A, BENNETT H, JOHNSON J, DURNEY MA, STEWART-JONES G, HOOPER JW, COLPITTS T, ALTER G, et al. A monkeypox mRNA-lipid nanoparticle vaccine targeting virus binding, entry, and transmission drives protection against lethal orthopoxviral challenge[J]. *BioRxiv*, 2022. DOI: 10.1101/2022.12.17.520886.
- [72] KRAMMER F, PALESE P. Advances in the development of influenza virus vaccines[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(3): 167-182.
- [73] CHUA SCJH, CUI JZ, ENGELBERG D, LIM LHK. A review and meta-analysis of influenza interactome studies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 869406.
- [74] PETSCH B, SCHNEE M, VOGEL AB, LANGE E, HOFFMANN B, VOSS D, SCHLAKE T, THESS A, KALLEN KJ, STITZ L, KRAMPS T. Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(12): 1210-1216.
- [75] BRAZZOLI M, MAGINI D, BONCI A, BUCCATO S, GIOVANI C, KRATZER R, ZURLI V, MANGIAVACCHI S, CASINI D, BRITO LM, de GREGORIO E, MASON PW, ULMER JB, GEALL AJ, BERTHOLET S. Induction of broad-based immunity and protective efficacy by self-amplifying mRNA vaccines encoding influenza virus hemagglutinin[J]. *Journal of Virology*, 2015, 90(1): 332-344.
- [76] MAGINI D, GIOVANI C, MANGIAVACCHI S, MACCARI S, CECCHI R, ULMER JB, de GREGORIO E, GEALL AJ, BRAZZOLI M,

- BERTHOLET S. Self-amplifying mRNA vaccines expressing multiple conserved influenza antigens confer protection against homologous and heterosubtypic viral challenge[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161193.
- [77] AREVALO CP, BOLTON MJ, LE SAGE V, YE NQ, FUREY C, MURAMATSU H, ALAMEH MG, PARDI N, DRAPEAU EM, PARKHOUSE K, GARRETSON T, MORRIS JS, MONCLA LH, TAM YK, FAN SHY, LAKDAWALA SS, WEISSMAN D, HENSLEY SE. A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 899-904.
- [78] FOCOSI D. From co-administration to co-formulation: The race for new vaccines against COVID-19 and other respiratory viruses[J]. *Vaccines*, 2023, 11(1): 109.
- [79] LUISI K, MORABITO KM, BURGOMASTER KE, SHARMA M, KONG WP, FOREMAN BM, PATEL S, FISHER B, ALESHNICK MA, LALIBERTE J, WALLACE M, RUCKWARDT TJ, GORDON DN, LINTON C, RUGGIERO N, COHEN JL, JOHNSON R, AGGARWAL K, KO SY, YANG ES, et al. Development of a potent zika virus vaccine using self-amplifying messenger RNA[J]. *Science Advances*, 2020, 6(32): eaba5068.
- [80] RICHNER JM, HIMANSU S, DOWD KA, BUTLER SL, SALAZAR V, FOX JM, JULANDER JG, TANG WW, SHRESTA S, PIERSON TC, CIARAMELLA G, DIAMOND MS. Modified mRNA vaccines protect against zika virus infection[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1114-1125.e10.
- [81] KOWALSKI PS, CAPASSO PALMIERO U, HUANG YX, RUDRA A, LANGER R, ANDERSON DG. Ionizable amino-polyesters synthesized *via* ring opening polymerization of tertiary amino-alcohols for tissue selective mRNA delivery[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(34): 1801151.
- [82] ZHONG ZF, PORTELA CATANI JP, MC CAFFERTY S, COUCK L, van den BROECK W, GORLÉ N, VANDENBROUCKE RE, DEVRIENDT B, ULBERT S, CNOPS L, MICHELS J, ARIËN KK, SANDERS NN. Immunogenicity and protection efficacy of a naked self-replicating mRNA-based zika virus vaccine[J]. *Vaccines*, 2019, 7(3): 96.
- [83] MEDINA-MAGÜES LG, GERGEN J, JASNY E, PETSCH B, LOPERA-MADRID J, MEDINA-MAGÜES ES, SALAS-QUINCHUCA C, OSORIO JE. mRNA vaccine protects against zika virus[J]. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1464.
- [84] ESSINK B, CHU L, SEGER W, BARRANCO E, LE CAM N, BENNETT H, FAUGHNAN V, PAJON R, PAILA YD, BOLLMAN B, WANG S, DOOLEY J, KALIDINDI S, LEAV B. The safety and immunogenicity of two zika virus mRNA vaccine candidates in healthy flavivirus baseline seropositive and seronegative adults: the results of two randomised, placebo-controlled, dose-ranging, phase 1 clinical trials[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2023, 23(5): 621-633.
- [85] STITZ L, VOGEL A, SCHNEE M, VOSS D, RAUCH S, MUTZKE T, KETTERER T, KRAMPS T, PETSCH B. A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11(12): e0006108.
- [86] SCHNEE M, VOGEL AB, VOSS D, PETSCH B, BAUMHOF P, KRAMPS T, STITZ L. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016, 10(6): e0004746.
- [87] ALBERER M, GNAD-VOGT U, HONG HS, MEHR KT, BACKERT L, FINAK G, GOTTARDO R, BICA MA, GAROFANO A, KOCH SD, FOTIN-MLECZEK M, HOERR I, CLEMENS R, von SONNENBURG F. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial[J]. *Lancet (London, England)*, 2017, 390(10101): 1511-1520.
- [88] ALDRICH C, LEROUX-ROELS I, HUANG KB, BICA MA, LOELIGER E, SCHOENBORN-KELLENBERGER O, WALZ L, LEROUX-ROELS G, von SONNENBURG F, OOSTVOGELS L. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: a phase 1 trial[J]. *Vaccine*, 2021, 39(8): 1310-1318.
- [89] LI JL, LIU Q, LIU J, WU XH, LEI YX, LI S, ZHAO DH, LI Z, LUO LP, PENG S, OU YR, YANG H, JIN J, LI YH, PENG YC. An mRNA-based rabies vaccine induces strong protective immune responses in mice and dogs[J]. *Virology Journal*, 2022, 19(1): 184.
- [90] BAI SM, YANG TH, ZHU CS, FENG MQ, ZHANG L, ZHANG ZL, WANG X, YU R, PAN XH, ZHAO C, XU JQ, ZHANG XY. A single vaccination of nucleoside-modified rabies mRNA vaccine induces prolonged highly protective immune responses in

- mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 13: 1099991.
- [91] SAXENA S, SONWANE AA, DAHIYA SS, PATEL CL, SAINI M, RAI A, GUPTA PK. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 136(1-2): 36-44.
- [92] BAHL K, SENN JJ, YUZHAKOV O, BULYCHEV A, BRITO LA, HASSETT KJ, LASKA ME, SMITH M, ALMARSSON Ö, THOMPSON J, RIBEIRO AM, WATSON M, ZAKS T, CIARAMELLA G. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2017, 25(6): 1316-1327.
- [93] LEAL L, GUARDO AC, MORÓN-LÓPEZ S, SALGADO M, MOTHE B, HEIRMAN C, PANNUS P, VANHAM G, van den HAM HJ, GRUTERS R, ANDEWEG A, van MEIRVENNE S, PICH J, ARNAIZ JA, GATELL JM, BRANDER C, THIELEMANS K, MARTÍNEZ-PICADO J, PLANA M, GARCÍA F, et al. Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA-based therapeutic vaccine against HIV-1 infection[J]. *AIDS (London, England)*, 2018, 32(17): 2533-2545.
- [94] JONG W, AERTS J, ALLARD S, BRANDER C, BUYZE J, FLORENCE E, GORP E, VANHAM G, LEAL L, MOTHE B, THIELEMANS K, PLANA M, GARCIA F, GRUTERS R. On behalf of the iHIVARNA consortium. iHIVARNA phase IIa, a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial to evaluate the safety and immunogenicity of iHIVARNA-01 in chronically HIV-infected patients under stable combined antiretroviral therapy[J]. *Trials*, 2019, 20(1): 1-10.
- [95] AUGUST A, ATTARWALA HZ, HIMANSU S, KALIDINDI S, LU S, PAJON R, HAN S, LECERF JM, TOMASSINI JE, HARD M, PTASZEK LM, CROWE JE, ZAKS T. A phase 1 trial of lipid-encapsulated mRNA encoding a monoclonal antibody with neutralizing activity against Chikungunya virus[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(12): 2224-2233.
- [96] KON E, LEVY Y, ELIA U, COHEN H, HAZAN-HALEVY I, AFTALION M, EZRA A, BAR-HAIM E, NAIDU GS, DIESENDRUCK Y, ROTEM S, AD-EL N, GOLDSMITH M, MAMROUD E, PEER D, COHEN O. A single-dose F1-based mRNA-LNP vaccine provides protection against the lethal plague bacterium[J]. *Science Advances*, 2023, 9(10): eadg1036.
- [97] XUE T, STAVROPOULOS E, YANG M, RAGNO S, VORDERMEIER M, CHAMBERS M, HEWINSON G, LOWRIE DB, COLSTON MJ, TASCONE RE. RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6324-6329.
- [98] LARSEN SE, ERASMUS JH, REESE VA, PECOR T, ARCHER J, KANDAHAR A, HSU FC, NICHOLEK K, REED SG, BALDWIN SL, COLER RN. An RNA-based vaccine platform for use against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Vaccines*, 2023, 11(1): 130.
- [99] MALLORY KL, TAYLOR JA, ZOUXY, WAGHELA IN, SCHNEIDER CG, SIBILO MQ, PUNDE NM, PERAZZO LC, SAVRANSKY T, SEDEGAH M, DUTTA S, JANSE CJ, PARDI N, LIN PJC, TAM YK, WEISSMAN D, ANGOV E. Messenger RNA expressing PfCSP induces functional, protective immune responses against malaria in mice[J]. *Npj Vaccines*, 2021, 6: 84.
- [100] MACMILLEN Z, HATZAKIS K, SIMPSON A, SHEARS MJ, WATSON F, ERASMUS JH, KHANDHAR AP, WILDER B, MURPHY SC, REED SG, DAVIE JW, AVRIL M. Accelerated prime-and-trap vaccine regimen in mice using repRNA-based CSP malaria vaccine[J]. *BioRxiv: the Preprint Server for Biology*, 2023. DOI: 10.1101/2023.05.23.541932.
- [101] 国家药监局药审中心关于发布《新型冠状病毒预防用疫苗研发技术指导原则(试行)》等5个指导原则的通告(2020年第21号)[EB/OL]. [2023-10-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20200814230916157.html>.
- [102] Evaluation of the quality, safety and efficacy of RNA-based prophylactic vaccines for infectious diseases: regulatory considerations[EB/OL]. [2023-10-12]. https://www.who.int/docs/default-source/biologicals/ecbs/reg-considerations-on-rna-vaccines_1st-draft_pc_tz_22122020.pdf?sfvrsn=c13e1e20_3.
- [103] Analytical Procedures for mRNA Vaccines Quality - 2nd Edition[EB/OL]. [2023-10-12]. <https://go.usp.org/mRNAVaccineQuality>.

(本文责编 陈宏宇)