

mRNA 技术应对病毒传染病的研究进展

田颖^{1,2}, 张娜娜^{2,3}, 秦成峰^{1,2}, 李晓峰^{*1,2}

1 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230000

2 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

3 清华大学医学院, 北京 100084

田颖, 张娜娜, 秦成峰, 李晓峰. mRNA 技术应对病毒传染病的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2849-2861

Tian Ying, Zhang Nana, Qin Chengfeng, Li Xiaofeng. Advancements in mRNA technology-based therapies for infectious diseases[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2849-2861

摘要: 信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)疫苗和抗体是近年来兴起的一种新型疫苗和抗体技术。与传统疫苗相比, mRNA 疫苗具有安全性高、均衡免疫性好、研发周期短、生产成本低等优势, mRNA 抗体比其他形式递送的抗体在体内发挥生物学效应的时间更早也更持久。随着 mRNA 修饰与递送技术的快速发展, mRNA 技术迅速走向成熟, 在肿瘤治疗、病毒传染疾病的预防和治疗等方面展现出广阔的应用前景, 特别是新型冠状病毒 mRNA 疫苗以创纪录的速度完成研发并成功应用, 为未来 mRNA 技术的推广铺平了道路。本文综述了 mRNA 技术领域的重要突破, 重点关注 mRNA 疫苗和抗体在应对病毒传染病中的重大进展, 并展望了未来该技术在抗病毒感染领域的研究趋势。

关键词: mRNA 技术; mRNA 修饰; 递送系统; 传染病; 新型冠状病毒

Advancements in mRNA technology-based therapies for infectious diseases

TIAN Ying^{1,2}, ZHANG Nana^{2,3}, QIN Chengfeng^{1,2}, LI Xiaofeng^{*1,2}

1 School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230000, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

3 School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: The messenger RNA (mRNA) platform has emerged as a novel nucleic acid technology for

基金项目: 国家重点研发计划应急项目(2020YFC0841000); 国家自然科学基金面上项目(31770995, 82171820)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2020YFC0841000); National Natural Science Foundation of China (General Program) (31770995, 82171820)

*Corresponding author: E-mail: xiaofeng_li_bj@163.com

Received: 2021-10-20; Accepted: 2021-12-09; Published online: 2022-01-21

the development of vaccines and antibodies in the last decade. mRNA vaccines are superior to conventional vaccines because of safe administration, high potency, short development cycle and low cost of manufacturing. The mRNA-encoded antibodies prevail over other antibody expression platforms because of the high level and long duration of protein expression. Owing to the recent innovations in mRNA modification and delivery, mRNA platform has been developing rapidly and become a promising tool in vaccine development and cancer therapy. It is a miraculous scientific triumph to develop novel mRNA vaccines against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which paves the way to a promising future of this field. Here, we overview the ongoing efforts for the optimization of mRNA approaches, with an emphasis on the research progress of mRNA vaccines and mRNA-encoded antibodies for infectious diseases. Furthermore, we put forward the key issues facing the mRNA platform in combating infectious diseases.

Keywords: mRNA technology; mRNA modification; delivery systems; infectious diseases; SARS-CoV-2

不断暴发的新突发病毒传染病疫情严重威胁人类生命健康,也给全球经济带来巨大冲击和重大损失。疫苗是应对传染病最有效的手段,但传统疫苗研发周期长、成本高,在应对新突发病时更显力不从心。mRNA 疫苗的概念形成于 20 世纪 90 年代^[1],其安全性好、有效性高、设计灵活、研发周期短,一直是疫苗领域中的重点攻关方向。但因为一直未能解决核酸降解和高效递送等难题,所以 mRNA 疫苗的进展缓慢。近 10 年来,基因修饰和体外递送等技术不断迭代更新, mRNA 技术领域持续取得重要突破,在传染病预防、肿瘤治疗方面显现出广阔的应用前景。特别是新型冠状病毒 mRNA 疫苗以破纪录的速度完成研发,更是为 mRNA 疫苗在未来的推广使用铺平了道路。本文主要综述最近 5 年 mRNA 技术及其在应对传染病方面的重要进展,并尝试对该技术未来在应对新突发病病毒传染病领域的发展趋势进行展望。

1 mRNA 技术

1.1 mRNA 技术的原理与优势

mRNA 技术概念的出现并形成是在 20 世纪 90 年代。1990 年 Wolff 等将经由体外转录获得

的 mRNA 直接注入小鼠肌肉后发现,其编码的氯霉素乙酰转移酶能够在肌肉细胞中有效表达^[1]。1992 年 Jirikowski 等进一步揭示,将编码抗利尿激素的 mRNA 注射至大鼠下丘脑后能使大鼠产生特异的生理反应^[2]。科学家据此提出基于 mRNA 技术的新型疫苗策略(图 1),其原理是将编码抗原蛋白的 mRNA 导入细胞质,利用细胞内蛋白合成组件生成抗原,进而激活机体的免疫系统来应对病原体感染^[3-4]。mRNA 疫苗的类型主要包括非复制型和自我扩增型。前者仅包括靶抗原序列,通过体外转录体系获得 mRNA 分子,后者则是将病毒的结构基因替换为目的蛋白基因,进一步将重组病毒载体转入细胞,利用病毒高效的基因组复制能力合成大量目的蛋白的 mRNA^[5]。

与传统疫苗和 DNA 疫苗相比, mRNA 疫苗在安全性、有效性和产能方面具有明显优势(表 1)^[6-8],首先是安全性高,其整合至受体基因组的风险极低;其次是有效性好,能同时激活细胞免疫和体液免疫等均衡的免疫应答;更为重要的是, mRNA 抗原设计灵活、制备工艺简单、产能可迅速放大,在应对新突发病病毒传染病时优势尽显。

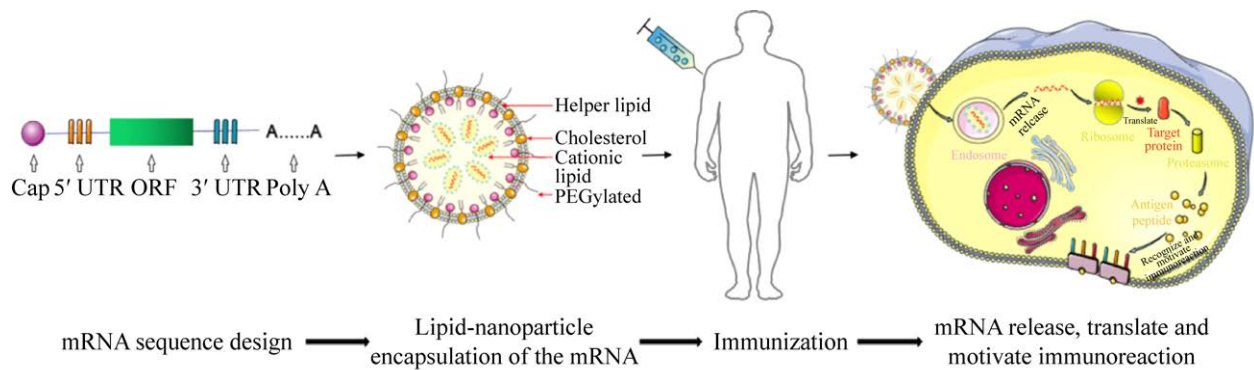


图 1 mRNA 疫苗技术原理

Figure 1 Principle of mRNA vaccine technology.

表 1 mRNA 疫苗与其他类型疫苗的特点比较

Table 1 Comparison of properties of mRNA vaccines and other types of vaccine

Vaccine type	Safety	Validity	Manufacturing
mRNA vaccine	No infection; Very low insertion mutation risk; <i>In vivo</i> activity can be controlled, through the normal cellular pathway can be degraded	Similar or better immune protection than existing vaccines	Encoding any new antigen requires no cell culture and can be rapidly scaled up at low cost
DNA vaccine	There is a risk of integration into the recipient genome and no risk of recovery of pathogenicity	Low immunogenicity	Short production cycle, low cost, can be large-scale production
Inactivated vaccine	Safer	The immune protection effect is generally lower than live attenuated vaccine	Dependent on cell culture production, long cycle and high cost
Live attenuated vaccine	There are risks of virulence recovery, recombination with wild strains and production contamination	It has strong immune protection effect	Dependent on cell culture production, long cycle and high cost
Subunit vaccine	Safer; Less side effects	Poor immunogenicity, the use of adjuvant to enhance the immune effect	Rapid preparation, complex production procedure and high cost

1.2 mRNA 的序列设计

真核生物的 mRNA 分子依次由 5'端帽子、5'非编码区、编码区、3'非编码区和多聚腺苷酸尾组成, 5'端帽子是 N7 甲基化的鸟苷酸, 通过 5'-ppp 与 mRNA 的 5'端核苷酸连接形成 m⁷GpppN, 通过结合翻译起始因子来保护 mRNA 不被核酸外切酶降解, 同时协助 mRNA 起始翻译和避免被天然免疫系统识别^[9-10]; 5'非编

码区含有核糖体识别序列, 与 3'非编码区协同起始 mRNA 的翻译进程, 并完成 mRNA 的亚细胞定位; 3'末端的多聚腺苷酸主要维持 mRNA 的稳定^[11]。

体外转录生成的 mRNA 分子稳定性差、翻译效率低, 一直是 mRNA 疫苗研发过程中需要重点解决的技术难题, 研究者相继开发了一系列 mRNA 分子合成和修饰等技术, 上述问题也

得到极大改观。获得天然的 5'端帽子是 mRNA 行使功能的根本前提,传统加帽过程多采用共转录技术完成,即将抗逆转帽类似物(anti-reverse cap analogues, ARCA)与 GTP 按照一定比例混合后,通过体外转录反应在合成 mRNA 过程中完成加帽^[12],但该方法的加帽效率仅能达到 80%,并且产量仅为 1 mg/mL^[13]。2017 年, TriLink 公司开发了下一代加帽技术 CleanCap 系统,加帽效率可提高至 94%以上,产量提升至 5–10 mg/mL,已成为绝大部分 mRNA 技术公司的首选^[13–14]。5'和 3'非编码区主要影响编码蛋白的表达和 mRNA 的半衰期^[15–16],匹配合理的非编码区组合也是提高 mRNA 翻译效率的关键步骤。Sample 等通过构建 30 000 条能够表达报告基因的随机 5'非编码区序列,建立了能够预测 5'非编码区起始翻译效率的模型,大大便利了高效 5'非编码序列的筛选^[17]。针对 3'非编码区的设计优化也取得多项进展,如通过增加该区的拷贝数可有效提升 mRNA 的表达效率,还可通过消除该区目标细胞特异的 miRNA 靶序列来避免 mRNA 被靶细胞快速降解^[16],或通过引入非目标细胞特异 miRNA 的靶序列,定向降低 mRNA 在非靶细胞中的蛋白表达^[18–19],有力提升了 mRNA 分子表达的特异性。此外,缩短非编码区中阻碍核糖体进入的特定序列长度也能提高 mRNA 的翻译效率^[20]。目前 mRNA 技术公司多选用 β 珠蛋白(β -globin)的非编码区来提高 mRNA 的稳定性和表达效率^[21]。mRNA 的编码序列一般需根据实际情况进行密码子优化,以提高编码蛋白的翻译效率,也可通过增加其 GC 含量来提高 mRNA 的稳定性^[22–23]。近期研究人员还开发了一种通过最大化碱基堆叠策略优化 mRNA 序列的算法,经过该算法获得的 mRNA 序列的稳定性显著提高^[24]。多数 mRNA 末端的多聚腺苷酸数目大于 90,但腺苷酸的数

量对 mRNA 稳定性的影响尚无定论,如 Lima 等的研究显示,翻译效率高的 mRNA 实际上仅含 33–34 个腺苷酸尾^[25],但另一项研究发现人的原代 T 细胞里高效表达的 mRNA 的多聚腺苷酸数量超过 300^[26]。多聚腺苷酸及其数量如何调控体外转录体 mRNA 的表达效率、是否具有细胞特异性是未来重点关注的研究方向。

体外合成的 mRNA 分子相对细胞具有异质性,极易刺激细胞产生 I 型干扰素为主的天然免疫应答,进而会被宿主细胞迅速清除,因此,其也是制约 mRNA 有效发挥功能的关键因素之一。研究显示,通过引入假尿嘧啶、N1-甲基化假尿嘧啶及其他类型的核酸类似物能有效降低宿主的病原模式识别受体对 mRNA 分子的甄别能力,进而显著提高蛋白的表达效率^[11]。Moderna 公司研发的新型冠状病毒 mRNA 疫苗 mRNA-1273、Pfizer 和 BioNTech 公司共同研发的新型冠状病毒 mRNA 疫苗 BNT162b1 及 BNT162b2 序列中均引入了假尿嘧啶、N1-甲基假尿嘧啶等修饰,mRNA 的翻译效率显著提高^[27–28]。CureVac 公司则通过降低尿嘧啶比例、提高 GC 含量的策略确保 mRNA 序列能够逃避免疫系统的识别^[22]。此外,以 m6A 等为代表的转录后表观遗传修饰参与调控免疫系统对 RNA 分子的识别和应答过程,研究显示 RNA 甲基转移酶 *mettl3* 能有效激活树突状细胞,促进基于树突状细胞的 T 细胞免疫应答^[29],提示将该酶的 mRNA 与目标 mRNA 共转染有望改善 mRNA 分子引发的免疫应答。

1.3 mRNA 的递送方式

如何将 mRNA 高效递送至细胞内并避免被降解是 mRNA 疫苗研发面临的另一项关键技术瓶颈。研究人员尝试了包括鱼精蛋白、多糖蛋白、阳离子聚合物、脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)等多种 mRNA 递送系统^[30–31],

但早期的多数材料因本身毒性高、结构复杂、聚合度不可控等缺点未能进入临床研究。LNP 具有细胞相容性好、免疫原性低、核酸包封率高等优势,是目前研究最深入且应用最广泛的 mRNA 递送系统。LNP 由可电离脂质、磷脂、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰脂质和胆固醇四部分组成^[32],可电离脂质通过不同的 pH 环境调节载体自组装和 mRNA 的释放,磷脂是脂质双层结构的核心组分,PEG 修饰脂质用于延长 mRNA 的半衰期,胆固醇则有助于提高颗粒稳定性并协助颗粒与细胞膜发生融合^[33]。研究人员还尝试多种策略赋予了 LNP 新的功能,例如多环金刚烷尾或环状咪唑头可显著提高 LNP 靶向 T 细胞的特异性^[34],而连接有环胺基团的 LNP 可与干扰素刺激蛋白紧密结合,进而促进树突状细胞成熟,发挥潜在的抗肿瘤作用^[35]。

聚合物纳米颗粒是除 LNP 外的另一大类核酸递送载体。聚乙烯亚胺递送核酸的效率极高,进一步通过引入 PEG、连接环糊精等方式显著降低了其毒性^[36-37],也促使聚乙烯亚胺成为聚合物核酸递送载体的典型代表。此外,研究人员还开发了多聚 β -氨基酯等可生物降解的低毒性聚合物^[38-39],并且获得了可对 pH 环境做出响应的乙烯亚胺-多聚天冬酰胺聚合物载体^[40],其在动物体内显示出高效的递送和释放效率^[41-42]。

1.4 mRNA 抗体技术

单抗免疫疗法在自身免疫疾病、神经退行性疾病、抗肿瘤、传染病治疗方面发挥了重要作用,而重组抗体技术、抗体分选与抗体基因测序等领域取得的一系列突破,则有力促进并催生了一批单抗获批上市^[43-45]。然而传统的单抗研发制备周期长、生产成本昂贵,迫切需要开发下一代抗体制备新技术,mRNA 抗体技术随之应运而生。与 mRNA 疫苗的设计原理一致,

mRNA 抗体技术是将编码抗体轻链和重链的 mRNA 递送至细胞内,利用细胞机器合成组装成结构相同并具有功能活性的目标抗体,进而在体内发挥相应的治疗功能。研究发现,mRNA 抗体制剂注入体内 2 h 后即可检测到抗体^[46],而 DNA 或者腺病毒载体递送的抗体制剂在注射后 3-7 d 后才能表达出抗体^[47-48]。mRNA 抗体在体内的表达峰值大约出现在注射后 24-48 h,并可持续高水平表达长达数天^[46,49]。mRNA 抗体在体内表达峰值所需时间更短且持续时间更长,在发挥抗体疗效方面将更具优势。此外,mRNA 技术特有的设计灵活和产能易扩的特点也赋予 mRNA 抗体独特的应用优势,特别是在应对新突发传染病方面将能够迅速完成从抗体设计到制剂制备等一系列工作,为临床救治赢得宝贵时间^[50]。

2 mRNA 技术在应对病毒传染病中的应用

2.1 新型冠状病毒 mRNA 疫苗

冠状病毒的刺突蛋白(spike, S)是病毒最主要的免疫原,其中的受体结合域(receptor binding domain, RBD)是与中和抗体结合的关键区域,因此也是新型冠状病毒疫苗设计的首选靶标^[33]。新型冠状病毒 mRNA 疫苗研发的头部企业是 BioNTech 和 Moderna 公司。BioNTech 研发的两款新型冠状病毒 mRNA 疫苗 BNT162b1 和 BNT162b2 进展最快,前者编码 RBD,并辅以 T4 纤维蛋白结构域而形成具有更强免疫原性的三聚体^[51],后者编码全长 S 蛋白,同时通过引入 2 个脯氨酸突变锁定 S 蛋白的膜融合前构象,便于诱导产生特异性更高的中和抗体^[28],二者均采用 LNP 完成 mRNA 分子的体内递送。一期临床试验数据显示,BNT162b1 和 BNT162b2 均具

有良好的安全性,除 BNT162b1 的不良反应率稍高外,二者均可诱导人体产生相近的极高水平的中和抗体和强烈的 CD4⁺和 CD8⁺细胞反应^[52-53],三期临床试验的结果显示 BNT162b2 对新型冠状病毒感染的保护效力达到惊人的 94.6%^[28]。该疫苗也于 2020 年 12 月中旬率先获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的紧急使用授权。之后在以色列开展的涵盖 300 多万人群的疫苗保护效力监测数据显示, BNT162b2 在真实世界的有效率维持在 90%以上^[54]。基于其良好的有效性和安全性, BNT162b2 于 2021 年 8 月 23 日正式获美国 FDA 批准用于 16 岁及以上人群预防新型冠状病毒肺炎,成为首个获批正式上市的新型冠状病毒疫苗,但该疫苗要求在不高于 -60 °C 条件下储存和运输,限制了其在经济落后地区的推广使用。Moderna 公司研发的新型冠状病毒 mRNA 疫苗 mRNA-1273 编码全长 S 蛋白,同样采用了双脯氨酸突变方式维持 S 蛋白的膜融合前构象,并通过 LPN 完成 mRNA 的递送。三期临床试验的结果显示其有效性达 94.1%,而且完成接种 6 个月后仍能检测到抗体^[27]。此外, mRNA-1273 无需超低温储存,可以在 -20 °C 保存 6 个月,在 2-8 °C 保存 30 d^[55-56],也继 BNT162b2 后于 2020 年 12 月中旬获美国 FDA 的紧急使用授权。特别指出的是,该疫苗从序列设计开始到启动一期临床试验仅用了 66 d,充分展现了 mRNA 技术在应对突发传染病中所具备的研发迅速这一突出优势^[33]。我国在 2020 年 1 月底启动了新型冠状病毒 mRNA 疫苗研发项目,进展最快的是由军事科学院联合多家企业共同研发的 ARCoV。该疫苗的 mRNA 编码 RBD,使用以具有自主知识产权的阳离子脂质 9001 为组分的 LNP 完成 mRNA 的体内递送, ARCoV 在小鼠和非灵长类动物体内可刺激产

生高水平的中和抗体和 Th1 偏向的 T 细胞免疫反应,发挥均衡的体液和细胞免疫保护作用。更为突出的是, ARCoV 可在室温条件下保持活性至少一周,热稳定性优异^[57]。一期临床试验的结果表明, ARCoV 免疫人群后仅出现一过性发热等症状,安全耐受性好,更为重要的是免疫人群产生高水平的新型冠状病毒中和抗体和强烈的细胞免疫反应^[58]。 ARCoV 已于 2021 年 7 月在中国云南和广西启动临床三期试验,9 月在尼泊尔和墨西哥进入海外临床三期研究阶段。

鉴于新型冠状病毒 mRNA 疫苗率先启动大规模人群接种,并展现出优异的保护效力,研究人员得以对真实世界中人群的免疫应答规律和持久性、疫苗的安全性、序贯免疫的应答特征^[59-60]、疫苗对新型冠状病毒须关切变种(variant of concern, VOC)的中和能力和保护效果^[61-63]等开展全面、深入的研究。在免疫应答机制方面, Amanat 等比较了新型冠状病毒康复者与疫苗接种健康者的体液免疫反应情况,发现 BNT162b2 免疫人体后能产生与康复者相当或更高的针对 RBD 和 N 端域(N-terminal domain, NTD)的抗体,但疫苗免疫组无中和活性的抗体比例更高^[64]。Painter 等监测了疫苗接种健康者体内 T 细胞的动态变化情况,发现首针免疫即可迅速激发 S 蛋白特异的 CD4⁺ T 细胞应答,其中 Th1 和 Tfh 型 T 细胞分别有助于二针免疫后迅速产生 CD8⁺ T 细胞和中和抗体^[65]。此外, Ciabattini 等^[66]和 Woldemeskel 等^[67]发现, BNT162b2 免疫产生的 S 蛋白特异的记忆性 B 细胞能维持 6 个月以上高水平^[66],而 T 细胞整体水平虽在 6 个月有所下降,但对 S 蛋白多肽的刺激仍能保持较高活性^[67],提示完成接种 6 个月后人体仍能对病毒感染迅速做出响应,从而建立有效的免疫保护状态,这为疫苗加强接种的必要性提供了重要依据。新型冠状病毒

mRNA 疫苗在全球接种量已超数十亿剂,其良好的安全性也得到了充分认可。JAMA 发表的一项涵盖 620 万名疫苗接种者的监测数据显示,接种新型冠状病毒 mRNA 疫苗后 1-21 d 内未出现 23 种潜在的严重不良事件^[68]。目前的研究也显示,接种新型冠状病毒 mRNA 疫苗未增加孕妇出现不良妊娠的风险^[69]。但需指出的是,新型冠状病毒 mRNA 疫苗接种可能引发心肌炎,发生率约为 2.13 例/10 万人,特别是在 16-29 岁的男性接种者中比例更高,约为 10.49 例/10 万人^[70-71]。此外, mRNA 疫苗还可能引发极个别的免疫血栓性血小板减少症病例,也需持续关注^[72]。上述研究极大地加深了我们对 mRNA 疫苗免疫保护机制的认识,为未来制定有效的疫苗接种策略、指导下一代 mRNA 疫苗的研发提供了全面、丰富的科学依据。

2.2 寨卡病毒 mRNA 疫苗

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是一种经蚊虫叮咬传播的黄病毒,但 2015 年起暴发于南美洲的寨卡病毒被证实还能经血液、体液传播,并可导致新生儿小头症,彻底颠覆了人们对虫媒病毒的固有认知^[73],研发有效的寨卡病毒疫苗成为当前寨卡相关研究的焦点。虫媒黄病毒的膜蛋白前体 prM 和包膜蛋白 E 是中和抗体的主要结合区,因此也是疫苗研发的关键靶标。2017 年 2 月宾夕法尼亚大学的 Pardi 等发表了首个寨卡病毒 mRNA 疫苗的临床前研究结果,该疫苗选取 2013 年寨卡病毒流行株的 prM 和 E 蛋白基因作为 mRNA 的编码序列,并引入 1-甲基假尿苷(M1Ψ),将经修饰的 mRNA 用 LNP 递送至小鼠和恒河猴的皮内后,均能诱导产生强大和持久的中和抗体^[74]。与此同时,Moderna 公司联合华盛顿大学医学院,通过在 E 蛋白融合环表位中引入突变,设计开发了寨卡病毒 mRNA 疫苗 mRNA-1893,其不仅能诱导

产生针对寨卡病毒的特异性保护抗体,同时能够减少增强登革病毒感染的交叉反应抗体的产生^[75]。该疫苗也率先进入一期临床试验,其中的数据显示,10 μg 和 30 μg 的 mRNA-1893 可诱导 94%-100%的血清阳转率,并具有良好的耐受性^[76]。mRNA-1893 的相关研究发现再次展现了 mRNA 疫苗设计简便、快速、有效的优势,同时为设计能降低抗体依赖的感染增强作用的登革病毒 mRNA 疫苗提供了重要借鉴。寨卡病毒 mRNA 疫苗诱发产生的中和抗体水平显著高于传统疫苗,并能有效激活保护性的 T 细胞免疫应答,有望在未来发展为应对寨卡病毒感染的高效手段。

2.3 流感病毒 mRNA 疫苗

现有流感疫苗的主要保护性抗原组分是病毒的血凝素蛋白,但该蛋白极易发生抗原漂移,每年必须针对可能的新流行株调整和更新流感疫苗,此外病毒在鸡胚生产过程中积累的适应性突变也可能影响疫苗的免疫原性,上述诸多因素导致流感疫苗的生产效率和有效性大打折扣。mRNA 技术有望从根本上克服上述缺陷,为研发下一代流感疫苗提供新手段。自 2012 年首次证实流感病毒 mRNA 疫苗可在动物体内诱导产生保护性免疫应答以来^[77],研究者评价了多种递送系统和核酸修饰手段对此类疫苗免疫保护效果的影响。在流感病毒 mRNA 疫苗研究领域,Moderna 公司研发的甲型 H7N9 (mRNA-1440)和甲型 H10N8 (mRNA-1851)流感病毒 mRNA 疫苗编码全长的血凝素蛋白,于 2016 年率先进入一期临床试验,并显示出良好的免疫原性和耐受性^[78]。此外, mRNA 技术在通用型流感疫苗的研发中也进行了尝试, Pardi 等设计了编码甲型 H1N1 流感病毒 Cal09 株血凝素蛋白茎部保守区的 mRNA 疫苗,经 LNP 递送至小鼠、雪貂和家兔体内后均能诱导针对

该保守区的特异抗体,特别是能同时保护小鼠免受甲型 H1N1 PR8 株和禽流感病毒 H5N1 的致死性感染^[79],展现出了良好的应用前景。研究者将进一步结合传统流感疫苗的研究发现,充分利用 mRNA 疫苗设计简便快速的优点,不断调整优化配伍抗原序列,进而研发获得具有更好免疫保护效果的流感疫苗。

2.4 其他病毒 mRNA 疫苗

mRNA 技术在其他病毒传染病疫苗研发中也取得了重要进展,巨细胞病毒、呼吸道合胞病毒、狂犬病毒、基孔肯雅病毒等 mRNA 疫苗均进入临床试验阶段^[33]。埃博拉病毒和 HIV 的 mRNA 疫苗的临床前研究也取得了令人振奋的结果,如将埃博拉病毒保护性抗原糖蛋白基因插入到委内瑞拉马脑炎病毒复制子,进一步包裹进树状多聚物纳米颗粒后免疫小鼠,小鼠能产生明显的糖蛋白特异的 IgG 抗体、IFN- γ 和 IL-2,并能有效对抗致死剂量埃博拉病毒的感染^[80]。另一种编码糖蛋白并由 LNP 递送的修饰型埃博拉病毒 mRNA 疫苗也能保护豚鼠免受致死剂量病毒的攻击^[81]。研究者也尝试采用阳离子纳米乳液、聚合物纳米颗粒以及 LNP 递送 HIV 的 mRNA 疫苗,积累了丰富的免疫应答数据,为后续抗原序列和递送方式的优化及临床研究奠定了重要基础^[82-84]。

2.5 mRNA 抗体

mRNA 抗体技术的概念验证于 2017 年由 mRNA 技术先驱 Weissman 的研究团队最先完成,研究人员将经过 m1 ψ 修饰的编码 HIV 广谱中和抗体 VRC01 的轻链和重链基因的 mRNA 以 1:1 混合,包裹于 LNP 后经静脉注射至小鼠体内,24 h 后血清中的抗体滴度即达峰值,并能稳定表达 5 d,同时能为小鼠提供有效的免疫保护^[85]。Kose 等开发了基孔肯雅病毒中和单抗 CHKV-24 的 mRNA 抗体,以 0.5 mg/kg 剂量静

脉给药可为小鼠提供完全的保护,也能有效缓解猴体感染病毒后出现的多发性关节炎^[49]。该抗体也是第一个进入一期临床试验阶段的 mRNA 抗体(临床试验名称为 mRNA-1944),期中数据显示出良好的耐受性,在静脉给药后 24 h 血清中的抗体水平即可达峰值,半衰期为 2 个月,为下一步开展更大规模的临床研究奠定了良好基础^[86]。新型冠状病毒 mRNA 抗体也有重要进展,Li 等利用甲病毒复制子颗粒系统成功构建获得了自我复制型的 mRNA 抗体 VEEV-VRP-CB6,并通过滴鼻途径递送至小鼠肺部,有效降低了小鼠肺部和气管中的病毒载量^[87]。该策略表明,甲病毒复制子系统也可成为一种新的 mRNA 疫苗递送方式,有望解决 LNP 滴鼻免疫效果不佳的瓶颈,为滴鼻型 mRNA 疫苗的设计和应用提供了新的思路。

3 展望

新型冠状病毒全球大流行是 21 世纪人类遭遇的第一次也是最严重的全球性瘟疫,而新型冠状病毒 mRNA 疫苗以明显优势从众多疫苗中脱颖而出,标志着 mRNA 技术理念在经历三十多年不懈的科学探索后正式落地。与此同时,以 BioNTech、CureVac 和 Moderna 为代表的国际 mRNA 技术企业已布局了艾滋病、流感、埃博拉、寨卡病毒等重要新老传染病的 mRNA 疫苗研发管线,多个疫苗已进入临床一期或二期试验。特别是在公认最难攻克 HIV 疫苗领域,Moderna 公司研发的 mRNA 疫苗已于 2021 年 8 月启动临床一期试验,其能否成功将成为验证 mRNA 疫苗有效性的又一项重要尝试。我国的 mRNA 技术企业在抗击新型冠状病毒疫情中迎难而上,多款新型冠状病毒 mRNA 疫苗先后进入临床研究,上述企业也在积极布局疫苗和肿瘤治疗等产品管线,以期在未来 mRNA

技术领域的国际竞争中占据主动。

mRNA 技术彻底更新了人们对疫苗的认识, 但该领域仍有诸多亟须解决的问题。首先是如何使外源 mRNA 更有效逃避人体天然免疫系统的识别, 进而降低或消除由此引起的发热和炎症等不良反应, 同时也需降低递送载体组分免疫原性引发的负面效应, 进一步提高疫苗的安全性; 其次是如何使 mRNA 刺激产生更真实、全面的保护性免疫应答, 提高有效性的同时降低接种剂量, 进而间接提升 mRNA 产能; 最后是解决 mRNA 制剂需超低温保藏和冷链运输等难题, 降低 mRNA 制剂对保藏和运输条件的超高要求, 为疫苗和抗体在经济欠发达地区的使用铺平道路。解决上述问题一方面依赖于技术方法和材料的革新, 需要生物学、化学、材料学、物理学等多学科的新技术理念的充分交叉融合, 研发可逃避天然免疫系统识别的 mRNA 序列设计与修饰新技术, 开发靶向可控的智能核酸递送和释放新方法, 研制人体更耐受以及耐高温的 mRNA 递送和储存运输新材料; 另一方面也取决于我们理解免疫保护机制的广度和深度, 这需要包括微生物学、免疫学、计算生物学等领域的科学工作者通力合作, 将各领域对生命本质的不同理解有机融合, 全面认识保护性免疫应答如何发生发展这一根本问题, 从而为 mRNA 疫苗和抗体的设计开发提供全景式的科学理论支撑。新型冠状病毒 mRNA 疫苗的成功研发不仅为人类未来战胜新老传染病带来光明愿景, 整个生物医学领域也将迎来革命性突破, 值得我们持续关注。

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] Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, Bloom FE. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA[J]. *Science*, 1992, 255(5047): 996-998
- [3] Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective[J]. *Npj Vaccines*, 2020, 5: 11
- [4] Blakney AK, Ip S, Geall AJ. An update on self-amplifying mRNA vaccine development[J]. *Vaccines*, 2021, 9(2): 97
- [5] Kim J, Eygeris Y, Gupta M, Sahay G. Self-assembled mRNA vaccines[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 170: 83-112
- [6] Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, Baumhof P, Scheel B, Koch SD, Fotin-Mleczek M. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive® vaccines[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2013, 9(10): 2263-2276
- [7] Sullenger BA, Nair S. From the RNA world to the clinic[J]. *Science*, 2016, 352(6292): 1417-1420
- [8] Ulmer JB, Geall AJ. Recent innovations in mRNA vaccines[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2016, 41: 18-22
- [9] 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*, 2013, 42(5): 3228-3245
- [10] Jang SK, Paek KY. Cap-dependent translation is mediated by 'RNA looping' rather than 'ribosome scanning'[J]. *RNA Biology*, 2016, 13(1): 1-5
- [11] 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
- [12] Jemielity J, Fowler T, Zuberek J, Stepinski J, Lewdorowicz M, Niedzwiecka A, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties[J]. *RNA*, 2003, 9(9): 1108-1122
- [13] Pascolo S. Synthetic messenger RNA-based vaccines: from scorn to hype[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 270
- [14] Henderson JM, Ujita A, Hill E, Yousif-Rosales S, Smith C, Ko N, McReynolds T, Cabral CR, Escamilla-Powers JR, Houston ME. Correction: cap 1 messenger RNA synthesis with co-transcriptional CleanCap® analog by *in vitro* transcription[J]. *Current*

- Protocols, 2021, 1(12): e336
- [15] Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, Miller RL, Cheng CJ, Subramanian RR, Brown JM. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(6): 756-762
- [16] Orlandini Von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, Diken M, Löwer M, Vallazza B, Beissert T, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(4): 824-836
- [17] Sample PJ, Wang B, Reid DW, Presnyak V, McFadyen IJ, Morris DR, Seelig G. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(7): 803-809
- [18] Jain R, Frederick JP, Huang EY, Burke KE, Mauger DM, Andrianova EA, Farlow SJ, Siddiqui S, Pimentel J, Cheung-Ong K, et al. microRNAs enable mRNA therapeutics to selectively program cancer cells to self-destruct[J]. *Nucleic Acid Therapeutics*, 2018, 28(5): 285-296
- [19] Hewitt SL, Bai AL, Bailey D, Ichikawa K, Zielinski J, Karp R, Apte A, Arnold K, Zacharek SJ, Iliou MS, et al. Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36 γ , and OX40L mRNAs[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(477): eaat9143
- [20] Leppik K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(3): 158-174
- [21] Schlake T, Thess A, Thran M, Jordan I. mRNA as novel technology for passive immunotherapy[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2019, 76(2): 301-328
- [22] 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
- [23] Kudla G, Lipinski L, Caffin F, Helwak A, Zylicz M. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(6): e180
- [24] Wayment-Steele HK, Kim DS, Choe CA, Nicol JJ, Wellington-Oguri R, Watkins AM, Parra Sperberg RA, Huang PS, Participants E, Das R. Theoretical basis for stabilizing messenger RNA through secondary structure design[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(18): 10604-10617
- [25] Lima SA, Chipman LB, Nicholson AL, Chen YH, Yee BA, Yeo GW, Collier J, Pasquinelli AE. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(12): 1057-1063
- [26] Grier AE, Burleigh S, Sahni J, Clough CA, Cardot V, Choe DC, Krutein MC, Rawlings DJ, Jensen MC, Scharenberg AM, et al. pEVL: a linear plasmid for generating mRNA IVT templates with extended encoded poly(A) sequences[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2016, 5: e306
- [27] Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Rouphael N, Creech CB, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(5): 403-416
- [28] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Pérez Marc G, Moreira ED, Zerbini C, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2020, 383(27): 2603-2615
- [29] Wang HM, Hu X, Huang MY, Liu J, Gu Y, Ma LJ, Zhou Q, Cao XT. Mettl3-mediated mRNA m6A methylation promotes dendritic cell activation[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1898
- [30] Chen RY, Zhang H, Yan JX, Bryers JD. Scaffold-mediated delivery for non-viral mRNA vaccines[J]. *Gene Therapy*, 2018, 25(8): 556-567
- [31] Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G. *In vivo* application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies[J]. *European Journal of Immunology*, 2000, 30(1): 1-7
- [32] Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, Himansu S, Schäfer A, Ziwawo CT, DiPiazza AT, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 567-571
- [33] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(11): 817-838
- [34] La Manna P, De Rosa M, Talotta C, Rescifina A, Floresta G, Soriente A, Gaeta C, Neri P. Synergic interplay between halogen bonding and hydrogen

- bonding in the activation of a neutral substrate in a nanoconfined space[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2020, 59(2): 811-818
- [35] Miao L, Li LX, Huang YX, Delcassian D, Chahal J, Han JS, Shi YH, Sadtler K, Gao WT, Lin JQ, et al. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(10): 1174-1185
- [36] Ke XY, Shelton L, Hu YZ, Zhu YN, Chow E, Tang HY, Santos JL, Mao HQ. Surface-functionalized PEGylated nanoparticles deliver messenger RNA to pulmonary immune cells[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(32): 35835-35844
- [37] Tan L, Zheng T, Li M, Zhong XF, Tang Y, Qin M, Sun X. Optimization of an mRNA vaccine assisted with cyclodextrin-polyethyleneimine conjugates[J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2020, 10(3): 678-689
- [38] Kaczmarek JC, Kauffman KJ, Fenton OS, Sadtler K, Patel AK, Heartlein MW, DeRosa F, Anderson DG. Optimization of a degradable polymer-lipid nanoparticle for potent systemic delivery of mRNA to the lung endothelium and immune cells[J]. *Nano Letters*, 2018, 18(10): 6449-6454
- [39] Kaczmarek JC, Patel AK, Kauffman KJ, Fenton OS, Webber MJ, Heartlein MW, DeRosa F, Anderson DG. Polymer-lipid nanoparticles for systemic delivery of mRNA to the lungs[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2016, 55(44): 13808-13812
- [40] Kim HJ, Ogura S, Otabe T, Kamegawa R, Sato M, Kataoka K, Miyata K. Fine-tuning of hydrophobicity in amphiphilic polyaspartamide derivatives for rapid and transient expression of messenger RNA directed toward genome engineering in brain[J]. *ACS Central Science*, 2019, 5(11): 1866-1875
- [41] McKinlay CJ, Vargas JR, Blake TR, Hardy JW, Kanada M, Contag CH, Wender PA, Waymouth RM. Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals[J]. *PNAS*, 2017, 114(4): E448-E456
- [42] Haabeth OAW, Blake TR, McKinlay CJ, Waymouth RM, Wender PA, Levy R. mRNA vaccination with charge-altering releasable transporters elicits human T cell responses and cures established tumors in mice[J]. *PNAS*, 2018, 115(39): E9153-E9161
- [43] Nissim A, Chernajovsky Y. Historical development of monoclonal antibody therapeutics[J]. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008(181): 3-18
- [44] Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market[J]. *mAbs*, 2015, 7(1): 9-14
- [45] Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020[J]. *mAbs*, 2020, 12(1): 1703531
- [46] Sabnis S, Kumarasinghe ES, Salerno T, Mihai C, Ketova T, Senn JJ, Lynn A, Bulychev A, McFadyen I, Chan J, et al. A novel amino lipid series for mRNA delivery: improved endosomal escape and sustained pharmacology and safety in non-human primates[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2018, 26(6): 1509-1519
- [47] Khoshnejad M, Patel A, Wojtak K, Kudchodkar SB, Humeau L, Lyssenko NN, Rader DJ, Muthumani K, Weiner DB. Development of novel DNA-encoded PCSK₉ monoclonal antibodies as lipid-lowering therapeutics[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(1): 188-199
- [48] Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang LL, Baltimore D. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis[J]. *Nature*, 2012, 481(7379): 81-84
- [49] Kose N, Fox JM, Sapparapu G, Bombardi R, Tennekoon RN, De Silva AD, Elbashir SM, Theisen MA, Humphris-Narayanan E, Ciaramella G, et al. A lipid-encapsulated mRNA encoding a potently neutralizing human monoclonal antibody protects against chikungunya infection[J]. *Science Immunology*, 2019, 4(35): eaaw6647
- [50] Deal CE, Carfi A, Plante OJ. Advancements in mRNA encoded antibodies for passive immunotherapy[J]. *Vaccines*, 2021, 9(2): 108
- [51] Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Neuzil K, Raabe V, Bailey R, Swanson KA, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 589-593
- [52] Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Neuzil K, Mulligan MJ, Bailey R, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based covid-19 vaccine candidates[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(25): 2439-2450
- [53] Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, Baum A, Pascal K, Quandt J, Maurus D, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses[J]. *Nature*, 2020,

- 586(7830): 594-599
- [54] Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, Hernán MA, Lipsitch M, Reis B, Balicer RD. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in a nationwide mass vaccination setting[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(15): 1412-1423
- [55] Martin C, Lowery D. mRNA vaccines: intellectual property landscape[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(9): 578
- [56] Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, Flach B, O'Connell S, Bock KW, Minai M, et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(16): 1544-1555
- [57] Zhang NN, Li XF, Deng YQ, Zhao H, Huang YJ, Yang G, Huang WJ, Gao P, Zhou C, Zhang RR, et al. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19[J]. *Cell*, 2020, 182(5): 1271-1283.e16
- [58] Chen GL, Li XF, Dai XH, Li N, Cheng ML, Huang Z, Shen J, Ge YH, Shen ZW, Deng YQ, et al. Safety and immunogenicity of the SARS-CoV-2 ARCoV mRNA vaccine in Chinese adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial[J]. *The Lancet Microbe*, 2022, 3(3): e193-e202
- [59] Pozzetto B, Legros V, Djebali S, Barateau V, Guibert N, Villard M, Peyrot L, Allatif O, Fassier JB, Massardier-Pilonchéry A, et al. Immunogenicity and efficacy of heterologous ChAdOx1-BNT162b2 vaccination[J]. *Nature*, 2021, 600(7890): 701-706
- [60] Normark J, Vikström L, Gwon YD, Persson IL, Edin A, Björnell T, Dernstedt A, Christ W, Tevell S, Evander M, et al. Heterologous ChAdOx1 nCoV-19 and mRNA-1273 vaccination[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(11): 1049-1051
- [61] Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, Stowe J, Tessier E, Groves N, Dabrera G, et al. Effectiveness of covid-19 vaccines against the B.1.617.2 (delta) variant[J]. *Missouri Medicine*, 2021, 385(7): 585-594
- [62] Lucas C, Vogels CBF, Yildirim I, Rothman JE, Lu PW, Monteiro V, Gehlhausen JR, Campbell M, Silva J, Tabachnikova A, et al. Impact of circulating SARS-CoV-2 variants on mRNA vaccine-induced immunity[J]. *Nature*, 2021, 600(7889): 523-529
- [63] Neidelman J, Luo XY, McGregor M, Xie GR, Murray V, Greene WC, Lee SA, Roan NR. mRNA vaccine-induced T cells respond identically to SARS-CoV-2 variants of concern but differ in longevity and homing properties depending on prior infection status[J]. *eLife*, 2021, 10: e72619
- [64] Amanat F, Thapa M, Lei T, Ahmed SMS, Adelsberg DC, Carreño JM, Strohmeier S, Schmitz AJ, Zafar S, Zhou JQ, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccination induces functionally diverse antibodies to NTD, RBD, and S2[J]. *Cell*, 2021, 184(15): 3936-3948.e10
- [65] Painter MM, Mathew D, Goel RR, Apostolidis SA, Pattekar A, Kuthuru O, Baxter AE, Herati RS, Oldridge DA, Gouma S, et al. Rapid induction of antigen-specific CD4⁺ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination[J]. *Immunity*, 2021, 54(9): 2133-2142.e3
- [66] Ciabattini A, Pastore G, Fiorino F, Polvere J, Lucchesi S, Pettini E, Auddino S, Rancan I, Durante M, Miscia M, et al. Evidence of SARS-CoV-2-specific memory B cells six months after vaccination with the BNT162b2 mRNA vaccine[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 740708
- [67] Woldemeskel BA, Garliss CC, Blankson JN. mRNA vaccine-elicited SARS-CoV-2-specific T cells persist at 6 months and recognize the delta variant[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2021
- [68] Klein NP, Lewis N, Goddard K, Fireman B, Zerbo O, Hanson KE, Donahue JG, Kharbanda EO, Naleway A, Nelson JC, et al. Surveillance for adverse events after COVID-19 mRNA vaccination[J]. *JAMA*, 2021, 326(14): 1390-1399
- [69] Sun H. On preliminary findings of mRNA covid-19 vaccine safety in pregnant persons[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(16): 1535-1536
- [70] Mevorach D, Anis E, Cedar N, Bromberg M, Haas EJ, Nadir E, Olsha-Castell S, Arad D, Hasin T, Levi N, et al. Myocarditis after BNT162b2 mRNA vaccine against COVID-19 in Israel[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(23): 2140-2149
- [71] Witberg G, Barda N, Hoss S, Richter I, Wiessman M, Aviv Y, Grinberg T, Auster O, Dagan N, Balicer RD, et al. Myocarditis after COVID-19 vaccination in a large health care organization[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(23): 2132-2139
- [72] Rodríguez C, Pérez-Nieva A, Máiz L, Meijón M, Llamas P, Monreal M, Bikdeli B, Jiménez D. Vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia after the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: a case

- study[J]. *Thrombosis Research*, 2021, 208: 1-3
- [73] Liu ZY, Shi WF, Qin CF. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 131-139
- [74] Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, DeMaso CR, Dowd KA, Sutherland LL, Scarce RM, Parks R, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination[J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 248-251
- [75] Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, Julander JG, Tang WW, Shresta S, Pierson TC, et al. Modified mRNA vaccines protect against zika virus infection[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1114-1125.e10
- [76] Faria NR, Da Silva Azevedo RDS, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Thézé J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings[J]. *Science*, 2016, 352(6283): 345-349
- [77] Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, Schlake T, Thess A, Kallen KJ, Stitz L, et al. Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(12): 1210-1216
- [78] Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychiev A, Brito LA, Hassett KJ, Laska ME, Smith M, Almarsson Ö, Thompson J, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25(6): 1316-1327
- [79] Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, McMahon M, Zost SJ, Mui BL, Tam YK, Karikó K, Barbosa CJ, Madden TD, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3361
- [80] Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, McPartlan JS, Tsosie JK, Tilley LD, Sidik SM, Lourido S, Langer R, Bavari S, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose[J]. *PNAS*, 2016, 113(29): E4133-E4142
- [81] Meyer M, Huang E, Yuzhakov O, Ramanathan P, Ciaramella G, Bukreyev A. Modified mRNA-based vaccines elicit robust immune responses and protect Guinea pigs from Ebola virus disease[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018, 217(3): 451-455
- [82] Brito LA, Chan M, Shaw CA, Hekele A, Carsillo T, Schaefer M, Archer J, Seubert A, Otten GR, Beard CW, et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(12): 2118-2129
- [83] Zhao MN, Li M, Zhang ZR, Gong T, Sun X. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA[J]. *Drug Delivery*, 2016, 23(7): 2596-2607
- [84] Pardi N, LaBranche CC, Ferrari G, Cain DW, Tombácz I, Parks RJ, Muramatsu H, Mui BL, Tam YK, Karikó K, et al. Characterization of HIV-1 nucleoside-modified mRNA vaccines in rabbits and rhesus macaques[J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2019, 15: 36-47
- [85] Pardi N, Secreto AJ, Shan XC, Debonera F, Glover J, Yi YJ, Muramatsu H, Ni HP, Mui BL, Tam YK, et al. Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14630
- [86] Fulton BO, Sachs D, Schwarz MC, Palese P, Evans MJ. Transposon mutagenesis of the Zika virus genome highlights regions essential for RNA replication and restricted for immune evasion[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(15): e00698-e00617
- [87] Li JQ, Zhang ZR, Zhang HQ, Zhang YN, Zeng XY, Zhang QY, Deng CL, Li XD, Zhang B, Ye HQ. Intranasal delivery of replicating mRNA encoding neutralizing antibody against SARS-CoV-2 infection in mice[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 369