



mRNA 疫苗：战胜新型冠状病毒感染的重要突破*

肖子怡^{1)**} 吴晓敏^{1)**} 关 凡¹⁾ 曾朝阳²⁾ 熊 炜²⁾ 王芙艳^{1)***}⁽¹⁾ 中南大学基础医学院，长沙 410013；⁽²⁾ 中南大学肿瘤研究所，国家卫健委癌变原理重点实验室和教育部癌变与侵袭原理重点实验室，长沙 410078)

摘要 2023年诺贝尔生理学或医学奖授予医学家卡塔琳·卡里科 (Katalin Karikó) 和德鲁·韦斯曼 (Drew Weissman)，以表彰他们在核苷碱基修饰方面的发现，这些修饰的发现对于开发针对严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 的有效 mRNA 疫苗至关重要。疫苗接种是预防感染性疾病最经济最有效的措施。到目前为止，疫苗已经从灭活疫苗、重组蛋白疫苗进入到了第三代核酸疫苗。两位科学家的研究发现，掺入修饰碱基的体外转录 mRNA 可以逃避不良的免疫激活，解决了体外转录的 mRNA 过度引起炎症反应的问题；进一步的研究发现，含假尿苷的 mRNA 能更有效地进行翻译。同时德鲁·韦斯曼对于递送系统的研究与发展也做出了重要贡献。新型冠状病毒感染 (COVID-19) 爆发后，以两位科学家的研究为基础，mRNA 疫苗的研发技术体系被完善，在 COVID-19 疫情期间为人类抗击 SARS-CoV-2 起到非常重要的作用。本文介绍了疫苗发展的过程、mRNA 疫苗中重要的核苷酸修饰和脂质纳米颗粒技术、针对 SARS-CoV-2 的 mRNA 疫苗以及技术发展的总结与展望。

关键词 mRNA疫苗，核苷修饰，脂质纳米颗粒，严重急性呼吸综合征冠状病毒2疫苗

中图分类号 Q812, R186

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0410

疫苗是医学发展史上最杰出的成就之一，是预防传染病最经济最有效的措施。通过激活免疫系统，疫苗使机体建立了对病原体的防御机制。由于疫苗的广泛使用，天花疾病已被消灭，脊髓灰质炎、麻疹和其他儿童疾病的发病率在世界范围内大幅降低^[1]。从中国古代的种痘、英国乡村医生 Edward Jenner 的牛痘疫苗预防天花到如今的严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 疫苗，疫苗由传统的第一代疫苗 (灭活疫苗、减毒活疫苗和类毒素) 发展至第二代 (重组蛋白疫苗、亚单位疫苗) 和第三代疫苗 (基因疫苗)。2023年10月2日，瑞典卡罗琳斯卡医学院宣布将2023年诺贝尔生理学或医学奖授予匈牙利科学家卡塔琳·卡里科 (Katalin Karikó) 和美国科学家德鲁·韦斯曼 (Drew Weissman)，以表彰他们对于核苷碱基修饰技术的发现，以及德鲁·韦斯曼在递送系统方面的贡献，从而为开发有效的抗 SARS-CoV-2 mRNA 疫苗所做出的重要贡献。

1798年，Edward Jenner 提出了疫苗

(vaccination) 的概念，开创了人工主动免疫的先河。随着病原菌的发现，法国微生物学家和化学家巴斯德制备了首个减毒狂犬病疫苗，随后，Calmette 和 Guérin 将牛型结核分枝杆菌经过长达13年传代213代后，将卡介苗 (Bacille Calmette-Guérin, BCG) 应用于预防结核病；针对脊髓灰质炎病毒的 Salk 疫苗^[2] 展现了良好的预防效果，但因生产过程中的失误 (未被完全灭活) 导致了149例小儿麻痹症，却催生了口服减毒疫苗 (Sabin 疫苗)；此外还有麻疹-流行性腮腺炎-风疹三联疫苗、白喉-破伤风类毒素疫苗等。这些第一代传统疫苗通过诱导免疫应答反应，产生针对特定病原体的抗体或效应 T 细胞，是预防传染病的有力武器。但由于这些疫苗成分较为复杂，有一定的副反应发生，如减毒活疫苗有毒力回复的风险等。第二代疫

* 湖南省自然科学基金 (2023JJ30732) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0731-84805346, E-mail: wfy4010@csu.edu.cn

收稿日期: 2023-10-29, 接受日期: 2023-11-17

苗是由病原体的天然成分或其产物制成的亚单位疫苗和通过基因工程技术制备的重组蛋白疫苗。它们通过特定抗原蛋白而不是完整的病原体来诱导免疫反应,减少了潜在的风险,同时提高了疫苗的免疫效果。如通过DNA重组技术制备的乙肝疫苗是疫苗发展新的里程碑,标志着疫苗发展进入了分子时代。虽然传统疫苗,如减毒活疫苗、灭活疫苗以及亚单位疫苗,可以对各种传染病提供持久的保护^[3]。但对于新发传染病或传染病的大流行,需要更快速的开发和大规模部署,亟需开发新一代疫苗。

第三代疫苗为核酸疫苗,代表了当代疫苗研究的最新进展。这一类疫苗的核心特点是使用核酸分子,如RNA或DNA,作为构建疫苗的基本材料。这些核酸分子经过精心设计,携带目标病原体的遗传信息。核酸疫苗导入宿主细胞内,内源性表达抗原,可以模拟病原体感染^[4]。此外,DNA或mRNA疫苗无需专职抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC)摄取也可表达产生相应蛋白质抗原,刺激B细胞或T细胞产生免疫应答反应。核酸疫苗的生产无需在生物安全水平较高的实验室,并且完全无毒性的疫苗成分也利于免疫功能低下人群的疫苗接种^[5]。近年来,mRNA疫苗受到了特别关注,并表现出优于DNA疫苗的一些优势,例如仅靶向递送至细胞质、消除基因组整合的风险以及独立于细胞分裂发挥其功能^[6]。但是RNA疫苗在生产过程中需要额外的步骤,且其具有高免疫原性,容易在离体和体内降解,而DNA疫苗更热稳定,有利于储存。

正如前文所述,传统的mRNA疫苗具有一定的免疫原性,因此在注射入体内后,往往会因为激活过度的炎症反应,降低疫苗的效力,同时剧烈的炎症反应还可以对机体造成伤害。然而,卡塔琳·卡里科和德鲁·韦斯曼通过核苷酸修饰技术和RNA递送系统,使mRNA疫苗的稳定性和表达量都得到了显著提升。这一技术的突破对于全球范围内对抗COVID-19疫情发挥了重要作用。

1 mRNA在体内表达多肽的关键技术突破

1.1 核苷修饰

早在21世纪以前,体外合成mRNA的技术就已经发展起来,但是因为酶法合成,所以体外转录的mRNA不仅仅包括目的产物mRNA,还通常含有dsRNA污染物。目的产物mRNA具有高免疫

原性,作为ssRNA,可以被体内的先天免疫受体Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)7、TLR8识别(图1)。污染物dsRNA可以被内体先天免疫受体TLR3、视黄酸诱导蛋白1(retinoic acid-inducible protein 1, RIG-1)、2'-5'-寡腺苷酸合酶(2'-5'-oligoadenylate synthase, OAS)和黑色素瘤分化相关蛋白5(melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5)识别^[7-9]。mRNA若要成为能够诱导强大免疫反应的疫苗,它需要激活先天免疫和适应性免疫。显然,体外合成的mRNA可以直接激活上述模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),触发炎症反应,建立先天免疫和适应性免疫之间的联系。这赋予了mRNA“自我佐剂”的特性,这对于它成为高效力的疫苗来说是非常重要的。但事物都具有两面性,拥有“自我佐剂”特性的同时,也意味着先天免疫系统会对mRNA表现出抗病毒反应^[7]。例如,TLR7和TLR8的激活会产生大量的I型干扰素特别是IFN- α 。IFN- α 可以诱导OAS家族基因的表达,产生以酶原形式存在的寡腺苷酸合成酶,而寡腺苷酸合成酶在dsRNA的激活下,会催化合成2'-5'寡核苷酸。然后由2'-5'寡核苷酸激活核糖核酸酶RNase L,最后由激活的RNase L降解外来mRNA^[10-13]。

dsRNA的污染以及mRNA的高免疫原性使得这些体外合成的mRNA应用十分局限。针对dsRNA的污染,可以在合成完成以后采取纯化的方式解决,但仅仅解决这个方面还不足够。体外合成的mRNA因为高免疫原性,注射进机体就要面临被降解的风险,这显然不符合研究人员预期。面对这样的局面,Karikó等^[14]通过实验发现,体外转录的mRNA之所以会激活TLR3、TLR7和TLR8,是因为这些mRNA缺乏核苷修饰。哺乳动物mRNA几乎不刺激树突状细胞产生干扰素,是因为哺乳动物mRNA具有核苷修饰,包括m5C(5-methylcytidine)、m6A(N6-methyladenosine)、m7G(N7-methylguanosine)和假尿苷(pseudouridine, Ψ)等。当额外加入m5C、m6A、m5U(5-methyluridine)、s2U(2-thiouridine)或者 Ψ 时,mRNA刺激TLR3、TLR7和TLR8的能力会被限制。修饰核苷m6A和s2U可以限制TLR3的激活,修饰核苷m6A、m5C、m5U、s2U和假尿苷则可以限制TLR7和TLR8的激活。TLR3、7、8激活被限制之后,I型干扰素的分泌大大减少,并且它

们可以对 RNase L 的切割表现出抗性^[12]。这些都解释了为什么 1963 年的研究会发现, 向动物体内注射用亚硝酸处理过的同源 RNA, 动物体内均会产生干扰素。这是因为亚硝酸处理后的 RNA, 尿苷的含量会大大增加, 先天免疫的激活也会增强^[15]。

除此之外, 前面还提及了 RIG-1, 而体外合成 mRNA 能和 RIG-1 相互识别的原因是体外合成 mRNA 具有和病毒 RNA 一样的结构, 也就是 5'-三磷酸基团, 这个结构在宿主细胞的 RNA 中是不存在的, 这也是为什么机体能够区分 RNA 是否为外来的原因^[16]。5'-三磷酸基团可以被 RIG-1 有效识别, 如果想要排除这种因素的干扰, 那么在体外酶促合成 mRNA 的过程中, 可以使用酶法去除 5'-三磷酸基团或者使用可以干扰 RIG-1 的病毒蛋白^[17]。Karikó 等^[18]也发现, 当在体外合成 mRNA 的环境中添加修饰核苷 s2U 和 Ψ 时, RIG-1 的激活会被抑制, 这也意味着体外 mRNA 的免疫原性被进一步降低。 Ψ 作为 RNA 中丰富的修饰核苷, 它的存在不仅仅能够让 mRNA 的免疫原性消失, 还可以增强 mRNA 的翻译。 Ψ 可以增强磷酸盐骨架的刚性, Ψ 和腺嘌呤之间的碱基配对强于尿嘧啶和腺嘌呤,

同时 Ψ 可促进碱基的堆积, 进而稳定 mRNA 的二级结构, 此外翻译的增强可以通过保护具有高核糖体占有率的 mRNA 来使 mRNA 稳定性提高^[14, 18-20]。2010 年 Anderson 等^[21]通过实验证明, 含有尿苷的 mRNA 可以激活 RNA 依赖性蛋白激酶 (protein kinase, PKR), 激活后的 PKR 会磷酸化翻译起始因子 2 的 α 亚基, 最后导致翻译的抑制。而当尿苷被假尿苷取代时, mRNA 的翻译水平明显提高。这说明了与尿苷相比, 假尿苷激活 PKR 的程度非常小。此外, Andries 等^[22]在 2015 年的研究中发现, 由 m1 Ψ (N1-methylpseudouridine) 和 m5C 修饰的 mRNA 基因表达的效率高于由 Ψ 和 m5C 修饰的 mRNA, 而这可能与 m1 Ψ 和 m5C 修饰的 mRNA 能够更有效地逃避 TLR 识别有关, 因此, m1 Ψ 在 mRNA 中的应用也越来越广泛。受自身 RNA 在机体内不会被降解和病毒、细菌 RNA 对外源性的启发, 研究人员发现了假尿苷修饰和其他核苷修饰的优势。通过核苷修饰, 同时根据不同治疗目的控制 mRNA 的免疫原性, 让 mRNA 疫苗的免疫原性处在一个相对平衡的位置, 可以恰当地激活先天免疫和适应性免疫, 降低机体对它表现出的抗病毒反应。

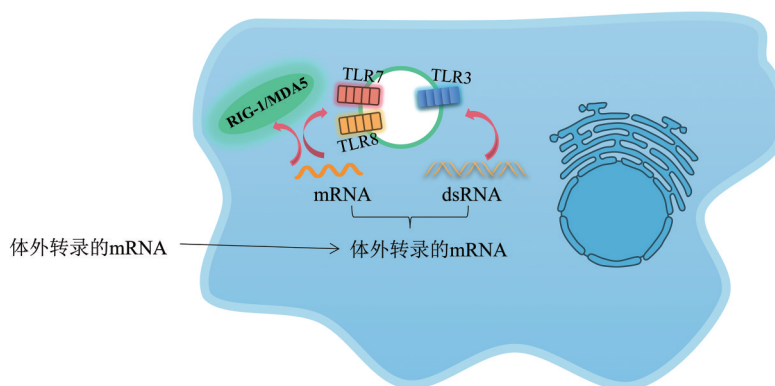


Fig. 1 Recognition of corresponding receptors by *in vitro* transcribed mRNA

图1 体外转录的mRNA对相应受体的识别

1.2 mRNA的体外合成

除了理论的进步, 技术的进步也在为 mRNA 疫苗的诞生奠定基础。特别是前面提到的体外转录 (*in vitro* transcribed, IVT) mRNA 技术的进步, 体外合成的 mRNA 可以通过模拟天然 mRNA 的结构, 在核苷修饰的帮助下, 在机体内瞬时表达蛋白质, 发挥作用^[23]。那么想要了解 IVT mRNA 的大规模

产生, 首先需要了解的是天然 mRNA 具有什么样的结构。mRNA 由 5 个关键结构元件构成: 5' cap、5' 非翻译区 (5' untranslated regions, 5' UTR)、编码序列 (coding sequence region, CDS)、3' 非翻译区 (3' untranslated regions, 3' UTR) 和 poly(A) 尾^[24]。m7G 通过 5'-5' 三磷酸桥 (ppp) 连接到 mRNA 的 5', 进而形成 mRNA 5' m7G 帽的结构^[25]。

5' m7G 帽不仅介导真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 的结合, 募集起始复合体启动帽依赖性翻译, 而且可以保护 mRNA, 让 mRNA 免受 5'-3' 核酸外切酶的降解, 使其可以稳定地在细胞质中进行翻译^[18, 24, 26-27]。5' UTR 是核糖体启动翻译的起始位点, 优化它可以提高 mRNA 的稳定性, 提高翻译效率^[24, 28]。3' UTR 可以与 miRNA 结合, 沉默 mRNA 的表达, 若想增强 mRNA 的表达, 可以减短 3' UTR^[24]。同时它还可以稳定 poly(A) 结合蛋白与 poly(A) 尾的结合, 防止 mRNA 的脱多聚腺苷酸化^[26]。开放阅读框 (open reading frame, ORF) 碱基的组成以及密码子的使用也会影响 mRNA 的翻译活性和稳定性^[24, 26-27]。作为 mRNA 的最后一个元件, poly(A) 尾的 3' 端有长的重复腺苷核苷酸。通过与 poly(A) 结合蛋白结合, 它可以保护 mRNA 免受 3'-5' 核酸酶的降解^[24, 26-27]。蛋白质表达的细胞类型, 以及不同的 mRNA 可能都会影响 poly(A) 尾长度的选择^[24, 26]。此外富含 AU 序列的 mRNA 促进二级结构的形成, 会阻碍核糖体和其他调节因子的结合, 控制基因的表达^[24, 29]。若 mRNA 富含 GC, 该 mRNA 的翻译效率会比富含 AU 时高。GC 的增加, 会让尿苷碱基的数量减少, 那么 TLR7/8 的激活也会减少, 这与 mRNA 的免疫原性降低密切相关, 说明除了通过碱基修饰的途径以外, 增加 GC 含量也是降低免疫原性的一个可行策略^[24, 29-31]。

设计和构建 DNA 模板是制备 mRNA 的第一步。该 DNA 模板至少需要 4 个元件: 噬菌体启动子、UTR、ORF 和 poly(T) 序列^[26] (图 2)。为了提高 mRNA 的表达和稳定性, 在构建 DNA 模板时,

就应该对每一个元件进行相应的优化。体外转录反应的原料包括核糖核苷三磷酸、RNA 聚合酶和构建好的 DNA 模板。针对前面提到的 5' m7G 帽, 可以通过使用封端酶进行转录后修饰来封端, 也可以通过在体外转录过程中添加封端类似物来封端^[32]。所以如果采取的是共转录封端, 那么帽类似物也应该作为原料出现在反应溶液中。针对 poly(A) 尾, 同样具有两种策略, 第一种是通过酶促反应将 poly(A) 尾添加到 IVT mRNA, 第二种是通过在体外转录前将 poly(T) 添加到 DNA 模板中, 也就是本文中提到的构建 DNA 模板的 4 种基本原料之一。第二种方式得到的 poly(A) 尾通常比较均匀, 并且它允许批量控制 poly(A) 尾 mRNA 的合成^[26, 33]。在 IVT 过程中添加的核苷酸包括化学修饰核苷和未修饰核苷, 具体的比例是可以调节的^[26], 使用的化学修饰核苷通常是 m1Ψ 和 Ψ。体外转录完成以后, 要进行纯化, 去除残留在反应溶液中的核苷酸、酶、dsRNA 和 DNA 模板等^[26]。特别是 dsRNA, 其可以有效激活 TLR3, 引起免疫应答。针对大规模的纯化, 目前最常用的方法是高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。2011 年, Karikó 等^[34] 经过实验证明, 使用 HPLC 纯化的 mRNA 可以降低其免疫原性, 并且 HPLC 还能改善核苷修饰过的 mRNA 的翻译效率。2019 年针对 dsRNA 的去除, Baierdörfer 等^[35] 又提出了纤维素色谱法, 原理便是在含有乙醇的缓冲液中让 dsRNA 与传统纤维素粉末选择性结合。这种方法与 HPLC 比较起来, 更加简单, 且不需要特殊设备, 成本更低, 对于大规模生产有重要意义。纯化完成以后, IVT mRNA 的合成就完成了, 通过这些

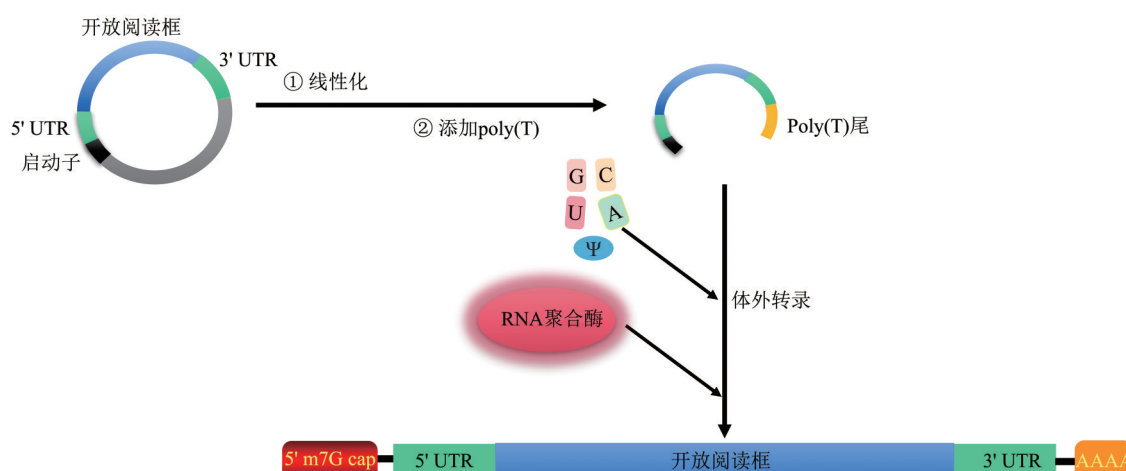


Fig. 2 mRNA synthesis process *in vitro*

图2 体外合成mRNA流程

步骤大规模生产的 mRNA 可以根据开发者的目的去完成下一阶段的使用。

2 mRNA疫苗的递送系统

2.1 脂质体纳米颗粒 (LNPs)

正如 Pardi 等^[36] 所描述, 研发 mRNA 疫苗需要克服 4 个障碍, 提高翻译效率、提高 mRNA 稳定性、降低免疫原性、提高体内递送效率。前文已经提到, 前面 3 个障碍可以通过序列优化、掺入修饰核苷、纯化解决。细胞摄取裸核酸的过程非常低效, mRNA 疫苗成功的最后障碍便是提高体内胞质递送效率^[37]。针对基因疫苗存在的递送系统包括质粒 DNA、病毒载体、胞内菌等^[38], 这对于 mRNA 疫苗递送系统的研发提供了借鉴的例子。目前, 针对 mRNA 疫苗的递送系统可分为病毒和非病毒载体递送系统。针对病毒载体, 可以将 mRNA 包装成 RNA 病毒^[39], 但是通过这种方式感染后的 mRNA 表达难以控制, 而且无论是时间成本还是经济成本都比较高^[40], 不适合需要大规模生产的 mRNA 疫苗。非病毒载体递送系统, 包括脂质或脂质材料以及聚合物递送系统等, 其中脂质或脂质材料又包括脂质体复合物和脂质体纳米颗粒 (liposome nanoparticles, LNPs)。脂质体复合物是由带正电荷的阳离子脂质和带负电荷的 mRNA 通过静电相互作用聚集形成的多层囊性复合物。常见的聚合物递送系统包括聚酰胺胺 (poly-amido-amine, PAMAM)、聚 β 氨基酯 (poly-beta amino-esters, PBAEs) 和聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI)^[41]。

递送系统有很多, 但作为目前应用最广泛的 LNPs 递送脱颖而出。LNPs 最初是用于 siRNA 的递送, 但 2015 年 Pardi 等^[36] 通过实验证实了 LNPs 在 mRNA 递送方面的卓越能力。LNPs 的主要成分包括可电离脂质、磷脂酰胆碱 (distearoyl phosphatidylcholine, DSPC)、胆固醇、PEG-脂质^[42-43] (图 3)。可电离脂质在生理 pH 下显中性, 可以消除循环中的阳离子电荷, 在酸性条件下会在内体中被质子化, 促进内体释放。磷脂酰胆碱则有助于在 PEG 表面下形成稳定的双层结构。胆固醇可以填补颗粒间隙, 限制 LNPs 与蛋白质的相互作用, 促进膜融合^[43]。LNP mRNA 的形成以及递送过程如下: 先在 pH 为 4 的缓冲液中快速混合含有疏水性脂质的乙醇相和含有 mRNA 的水相。溶液一旦混合, pH 会接近 5.5, 会让可电离脂质质子化, 可电离脂质会结合 mRNA 的阴离子磷酸骨架, 包绕在 mRNA 周围, 同时两者在水相中会具有疏水性, 可以驱动囊泡形成和 mRNA 封装。囊泡形成以后在溶液的稀释下, 可电离脂质表面会在生理 pH 下恢复为中性, 变得更加疏水, 从而驱动囊泡融合。此时可电离脂质与 mRNA 进一步深入颗粒内部, 两者形成电子致密的核心。亲水的 PEG 会包裹颗粒, 并且决定颗粒最后的尺寸大小。PEG-脂质不会让囊泡过度融合。前面提到的 DSPC 双层也位于 PEG-脂质的下方。注意快速混合才可以将得到的颗粒尺寸限制在 <100 nm, 同时溶液中 LNPs 的组装和形成靠的是疏水力和静电力^[42-45]。当 LNP mRNA 被细胞内吞并在内体内被螯合和酸化时, 可电离的脂质会带正电, 接着与内涵体膜融

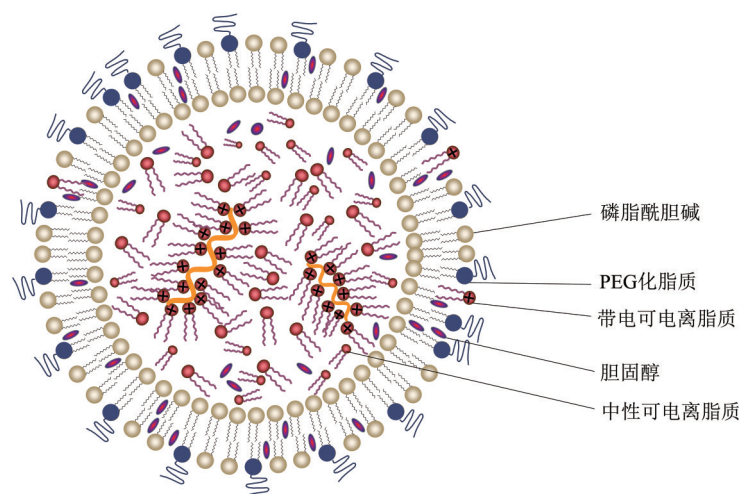


Fig. 3 LNPs structure diagram
图3 LNPs结构图

合, 将 mRNA 释放到细胞质中^[46]。到达细胞质后会在核糖体翻译成蛋白质, 蛋白质作为内源性抗原被蛋白酶体降解成抗原肽。这些抗原肽通过主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子途径呈递给 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞, 激活细胞介导的免疫反应, 从而构成 mRNA 疫苗的关键优势。此外, 翻译出的蛋白质可以分泌到细胞外环境中, 从而进入循环系统, 在循环系统中被 APC 摄取。抗原肽作为外源性抗原通过 MHC-II 类分子被提呈给 CD4⁺ T 细胞, 通过分泌细胞因子诱导细胞免疫应答, 激活 B 细胞产生高亲和力的病毒中和抗体, 发挥体液免疫效应^[47]。针对研制好的 mRNA 疫苗的储存, Muramatsu 等^[45]发现, 冻干可以为 mRNA 疫苗提供长期稳定性, 并且冻干的 mRNA 疫苗在室温下可储存 12 周, 在 4°C 条件下可以储存 24 周。这项发现对于疫苗的全球分发具有重要意义。Han 等^[48]还开发了一种佐剂脂质体, 它不仅可以作为 LNPs 的结构成分, 还可以发挥佐剂的效应, 使得注射了 LNP mRNA 疫苗的机体产生更有效的适应性免疫应答。

2.2 单组分可电离两亲性 Janus 树状大分子可靶向和均匀分布地向器官递送 mRNA

尽管 LNPs 递送已经应用于生产 SARS-CoV-2 疫苗, 德鲁·韦斯曼和他的团队仍然在开发新的递送系统。毕竟 LNPs 递送确实也存在不足, LNP mRNA 的生成需要复杂的微流体技术, 作为四组分的一个载体, 四组分在 LNPs 中的分布未知。与 LNPs 结合的 PEG 会增加 LNPs 在血液的循环时间, 会导致基因表达降级^[49], 所以递送的技术确实还有上升的空间。就在 2021 年, Zhang 等^[49]开发了一种单组分多功能可电离两亲性 Janus 树状大分子 (ionizable amphiphilic Janus dendrimer, IAJD) 的递送系统。这个系统依赖由他们实验室开发的可电离两亲性 Janus 树状大分子 (Janus dendrimers, JDs) 和糖树状大分子 (Janus glycodendrimers, JGD)。两亲性 Janus 树状大分子由功能性亲水性和疏水性树状分子结合而成。IAJDs 与 mRNA 可以共组装成树状大分子纳米颗粒 (dendrimerosome nanoparticles, DNPs), 和 LNPs 相比, DNPs 的合成更加简单, 只需在乙酸盐缓冲液中简单注射即可^[50]。虽然最开始的单组分 IAJD 需要 14 步才能合成, 但是 Zhang 等^[50]通过消除连接在 JD 亲水性片段分支点上的甲氧基三乙二醇片段减少了构建 IAJDs 的步骤, 大大提高了效率。同时和 LNPs 相

比, DNP 还可以更好地实现靶向递送的功能。Zhang 等^[51]通过使用不同的烷基长度设计 IAJDs 疏水区, 发现 mRNA 靶向递送的效率大大提高。筛选文库产生的一级结构分析还证明 IAJDs 的亲水部分可以通过其电离胺的结构和序列决定靶器官, 羟乙基哌嗪有利于靶向脾脏, 甲基哌嗪有助于靶向肝脏, 哌啶和二甲胺则有利于输送到肺部^[52]。这些意味着 IAJDs 疏水区的一级结构具有重要的作用, 所以选择合适的烷基长度、电离胺的结构和序列对于不同靶器官疫苗的研发有着重要的启示。

3 SARS-CoV-2 mRNA 疫苗

SARS-CoV-2 是一种正链 RNA 病毒^[53]。SARS-CoV-2 基因组的长度约为 30 kb, 它至少编码 29 个蛋白质, 包括 16 个非结构蛋白 (NSP)、4 个结构蛋白和 9 个辅助蛋白^[54]。4 种结构蛋白包括刺突蛋白 (S)、包膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N)^[47]。mRNA 疫苗将基于 LNPs 疫苗载体的 mRNA 传递给 APC^[55]。在内体内的酸性环境中, 可电离脂质的头基被质子化到阳离子状态。在吸引并结合内膜磷脂的阴离子头基后, 阳离子脂和磷脂的疏水尾部膨胀, 稳定的磷脂双层结构被破坏, 这反过来允许 mRNA 逃逸内体, 到达细胞质室并被核糖体翻译成蛋白质, 作为内源性抗原被蛋白酶体降解成抗原肽。LNP-mRNA 疫苗中可电离的脂质组分和 IL-6 细胞因子能诱导佐剂活性, 这种由 LNPs 驱动的佐剂活性可诱导强大的 Tfh 细胞反应和体液免疫, 从而增强基于 mRNA 疫苗的效力^[55]。

SARS-CoV-2 表面的三聚体 S 蛋白在介导宿主细胞侵袭中起关键作用。因此, S 蛋白被认为是疫苗设计的主要抗原^[47]。目前, 设计针对 SARS-CoV-2 S 蛋白的疫苗通常采用两种策略: 2P 突变和 S1/S2 裂解位点。BioNTech 生产的 BNT162b2 疫苗和 Moderna 生产的 mRNA-1273 均是使用 2P 突变策略。采用该策略, 将 S2 亚单位中心螺旋位置顶部的两个氨基酸替换为脯氨酸 (K986P 和 V987P), 有效地提高了 S 蛋白在融合前构象中的稳定性。由 Moderna 研发的 mRNA1273 编码 SARS-CoV-2 的全长预融合刺突蛋白, 是基于南非首次发现的 SARS-CoV-2 Beta 变种开发的。疫苗有效率为 94.1%, 在青少年和成人中普遍具有良好的有效性、耐受性和安全性。mRNA-1273 对 Alpha 和 Beta 变体的有效性分别为 100% 和 96.4%, 而对 Delta 的有效性略低

(73.1%)。有数据显示, 接种三剂 mRNA-1273 可提供对 Delta 感染的高而持久的保护 (95.2%), 但对 Omicron 的保护较低 (62.5%)。BioNTech 研发的疫苗是基于核苷修饰的基因 BNT162b2 编码一个全长的峰糖蛋白, BNT162b1 编码三聚体峰蛋白 RBD 的分泌形式。跨膜预融合峰 (BNT162b2)、分泌型峰 RBD (BNT162b1) 疫苗提供的保护率为 95.6%, 带有 BNT162b2 的疫苗增强剂可以增强 Omicron 变体的中和作用^[47]。根据一项以色列的研究数据, BNT162b2 作为两剂计划的疫苗有效性为 94%。然而, 有证据表明, 该疫苗与心肌炎风险的增加有关^[56], 其聚乙二醇添加剂也可能诱发过敏反应^[57]。

4 展 望

mRNA 疫苗具有高效、快速开发、低成本生产和安全使用的潜力。目前 mRNA 的测序和合成技术已经十分成熟, 可以根据变异毒株快速对其 mRNA 进行测序并合成相应的 mRNA, 经过核苷酸修饰和 LNPs 的递送迅速发挥强大的免疫作用。但同时也存在许多问题, 如疫苗接种会有不良反应, 包括罕见的过敏反应和急性心包炎等^[58]。且 mRNA 对核酸外切酶具有较高的敏感性, 对生产要求较高, 需要在超低温条件下运输和储存 mRNA 疫苗, mRNA 疫苗的稳定性和递送体系有待进一步探索和优化^[47]。本文认为对 mRNA 序列再进行更加细致的优化也许可以进一步提高其稳定性。也可以考虑修改其他辅助脂质成分或 mRNA-LNPs 的结构或使用 HPLC、快速蛋白质液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC)、寡聚 (DT) 纯化、切向流动过滤 (tangential flow filtration, TFF) 等方式进一步改善 mRNA 的质量^[55]。

无论是什么类型的疫苗, 注射进入机体后, 机体都会针对疫苗所包含的或者编码的抗原做出免疫应答。既然 mRNA 疫苗可以用于预防传染病的感染, 那么同理, 针对肿瘤, 也可以研发相应的 mRNA 疫苗, mRNA 疫苗可以通过编码肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen, TAA) 或者个性化新抗原 (personalized neoantigens) 来激活机体内的抗肿瘤免疫反应, 诱导强大的细胞毒性 CD8⁺T 细胞来杀死癌细胞^[59-60]。在肿瘤生长的过程中, 肿瘤细胞会产生血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 诱导新生血管

的生成^[61]。因此, 也可以通过合成能够编码抗 VEGF 抗体的 mRNA, 注射到患者体内, 抑制肿瘤血管生成, 最终达到抑制肿瘤生长的目的。针对 VEGF, 德鲁·韦斯曼团队^[62-63]已经发现, VEGFA mRNA 可以促进胆管上皮向肝细胞转化, 逆转脂肪变性和纤维化, 核苷修饰的 VEGFC mRNA 可以诱导器官特异性淋巴生长并且逆转实验性淋巴水肿。

mRNA 在再生医学中也具有巨大的应用潜力。再生医学的目的是为了创造、补充丢失的细胞、组织或者器官。再生医学的实现离不开功能蛋白质, 包括生长因子、细胞因子和转录因子。可以将编码功能蛋白质的 mRNA 递送到体内, 翻译后产生功能蛋白质发挥相应的功能。直接注射功能蛋白质, 会引起结构变形影响活性, 但使用 mRNA 就可以克服这一缺点, 提高治疗效率^[26]。当前的基因治疗多是通过递送正常的基因来替换有缺陷的基因, 但无论是病毒介导的还是质粒 DNA 的基因递送都各有缺陷。在这样一个阶段, mRNA 也为基因治疗带来了新的希望, mRNA 可以避免不必要的插入, 具有更高的转染效率和稳定性^[64]。

mRNA 对核酸外切酶具有较高的敏感性, 且需要核苷酸修饰来提高其稳定性和降低免疫原性, 对生产要求较高^[65]。而环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类没有 5' 或 3' 端的天然 (生物) 或合成的闭合 RNA, 由于其独特的环状结构不会被核酸外切酶降解而具有高度的稳定性, 它们相对于目前的线性 mRNA 具有更高的药物稳定性和生物稳定性^[66]。并且 circRNAs 能够通过滚环翻译产生不同大小的蛋白质, 也可以利用有限的核苷酸序列来翻译更大的蛋白质^[67]。有研究表明, 对于 SARS-CoV-2, circRNA 疫苗通过表达 S 蛋白的三聚体 RBD 诱导了强大的中和抗体和 T 细胞反应, 比 m1 ψ 修饰的 mRNA 疫苗能够产生更高和更持久的抗原, 并引发更高比例的中和抗体和明显的 Th1 扭曲免疫反应^[68]。2022 年清华大学的一项研究表明, circRNA 具有相对线性 RNA 较弱的免疫原性, 能够同时作为免疫原和佐剂^[69]诱导抗原特异性 T 细胞活化、抗体产生和抗肿瘤免疫。m6A RNA 对 circRNA 的修饰能够抑制先天性免疫, 使其免疫基因激活和佐剂活性丧失^[66]。在 B16 原位黑色素瘤小鼠实验中发现, circRNA-LNPs 疫苗使 SIINFEKL-MHC-I 四聚体阳性细胞毒性 T 细胞的频率显著增加, 表明其引发了强大的抗原特异性 T 细

胞反应；进一步的研究发现，circRNA-LNPs极大地抑制了免疫排斥肿瘤的进展，诱导免疫沙漠肿瘤的完全消退，并防止癌细胞转移，这表明癌症RNA疫苗的有效性^[70]。虽然目前技术还不成熟，可能会导致抗原或蛋白质积累失控^[67]等后果，但circRNAs作为一种工具来编程抗原特异性T细胞反应，结合了编程简单、持久的抗原表达和安全给药的特点^[69]，其良好的特性很有可能推动传染病和癌症免疫治疗疫苗的突破性发展。

卡塔琳·卡里科和德鲁·韦斯曼开辟的mRNA核苷酸修饰技术奠定了mRNA疫苗体系建立的基础，在COVID-19疫情的严峻挑战中mRNA疫苗被迅速制造并取得了完整的胜利，他们的突破性发现从根本上改变了人们对mRNA如何与免疫系统相互作用的理 解，为疫苗的变革性发展做出了巨大贡献。

参 考 文 献

- [1] Younger D S, Younger A P, Guttmacher S. Childhood vaccination: implications for global and domestic public health. *Neurol Clin*, 2016, **34**(4): 1035-1047
- [2] Vashishtha V M, Kamath S. A brief history of vaccines against polio. *Indian Pediatr*, 2016, **53** Suppl 1: S20-S27
- [3] Plotkin S A. Vaccines: the fourth century. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, **16**(12): 1709-1719
- [4] Liu M A. A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines (Basel)*, 2019, **7**(2): 37
- [5] Melo A, De Macêdo L S, Invenção M, *et al.* Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes (Basel)*, 2022, **13**(12): 2287
- [6] Tombácz I, Weissman D, Pardi N. Vaccination with messenger RNA: a promising alternative to DNA vaccination. *Methods Mol Biol*, 2021, **2197**: 13-31
- [7] Iavarone C, O'hagan D T, Yu D, *et al.* Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2017, **16**(9): 871-881
- [8] Xu S, Yang K, Li R, *et al.* mRNA vaccine era-mechanisms, drug platform and clinical prospection. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(18): 6582
- [9] Kowalski P S, Rudra A, Miao L, *et al.* Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Mol Ther*, 2019, **27**(4): 710-728
- [10] Nallagatla S R, Toroney R, Bevilacqua P C. A brilliant disguise for self RNA: 5'-end and internal modifications of primary transcripts suppress elements of innate immunity. *RNA Biol*, 2008, **5**(3): 140-144
- [11] Chakrabarti A, Jha B K, Silverman R H. New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, **31**(1): 49-57
- [12] Anderson B R, Muramatsu H, Jha B K, *et al.* Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(21): 9329-9338
- [13] 关凡, 吴晓敏, 黄河, 等. 远古的馈赠: 近现代人类基因溯源突破性进展——写在2022年诺贝尔生理学或医学奖颁布之际. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(12): 2253-2265
Guan F, Wu X M, Huang H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(12): 2253-2265
- [14] Karikó K, Buckstein M, Ni H, *et al.* Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 2005, **23**(2): 165-175
- [15] Isaacs A, Cox R A, Rotem Z. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon. *Lancet*, 1963, **2**(7299): 113-116
- [16] Hornung V, Ellegast J, Kim S, *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 2006, **314**(5801): 994-997
- [17] Kuhn A N, Beißert T, Simon P, *et al.* mRNA as a versatile tool for exogenous protein expression. *Curr Gene Ther*, 2012, **12**(5): 347-361
- [18] Karikó K, Muramatsu H, Welsh F A, *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 2008, **16**(11): 1833-1840
- [19] Boo S H, Kim Y K. The emerging role of RNA modifications in the regulation of mRNA stability. *Exp Mol Med*, 2020, **52**(3): 400-408
- [20] Yang X, Gokulnath P, Lehmann H I, *et al.* RNA modifications in aging-associated cardiovascular diseases. *Aging (Albany NY)*, 2022, **14**(19): 8110-8136
- [21] Anderson B R, Muramatsu H, Nallagatla S R, *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(17): 5884-5892
- [22] Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt S C, *et al.* N(1) -methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Control Release*, 2015, **217**: 337-344
- [23] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(10): 759-780
- [24] Kang D D, Li H, Dong Y. Advancements of *in vitro* transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, **199**: 114961
- [25] Ramanathan A, Robb G B, Chan S H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(16): 7511-7526
- [26] Kwon H, Kim M, Seo Y, *et al.* Emergence of synthetic mRNA: *in vitro* synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*, 2018, **156**: 172-193
- [27] Hınçer A, Ahan R E, Aras E, *et al.* Making the next generation of therapeutics: mRNA meets synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 2023, **12**(9): 2505-2515
- [28] Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures

- in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, **19**(3): 158-174
- [29] Araujo P R, Yoon K, Ko D, *et al.* Before it gets started: regulating translation at the 5' UTR. *Comp Funct Genomics*, 2012, **2012**: 475731
- [30] Weissman D, Karikó K. mRNA: Fulfilling the promise of gene therapy. *Mol Ther*, 2015, **23**(9): 1416-1417
- [31] Kudla G, Lipinski L, Caffin F, *et al.* High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells. *PLoS Biol*, 2006, **4**(6): e180
- [32] Yisraeli J K, Melton D A. Synthesis of long, capped transcripts *in vitro* by SP6 and T7 RNA polymerases. *Methods Enzymol*, 1989, **180**: 42-50
- [33] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 2006, **108**(13): 4009-4017
- [34] Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, *et al.* Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(21): e142
- [35] Baierdörfer M, Boros G, Muramatsu H, *et al.* A facile method for the removal of dsRNA contaminant from *in vitro*-transcribed mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, **15**: 26-35
- [36] 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
- [37] Pardi N, Hogan M J, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol*, 2020, **65**: 14-20
- [38] Dubensky T W, Jr., Liu M A, Ulmer J B. Delivery systems for gene-based vaccines. *Mol Med*, 2000, **6**(9): 723-732
- [39] Agapov E V, Frolov I, Lindenbach B D, *et al.* Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(22): 12989-12994
- [40] Tavernier G, Andries O, Demeester J, *et al.* mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release*, 2011, **150**(3): 238-247
- [41] Liu T, Liang Y, Huang L. Development and delivery systems of mRNA vaccines. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, **9**: 718753
- [42] Hogan M J, Pardi N. mRNA Vaccines in the COVID-19 pandemic and beyond. *Annu Rev Med*, 2022, **73**: 17-39
- [43] Buschmann M D, Carrasco M J, Alishetty S, *et al.* Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2021, **9**(1): 65
- [44] Shepherd S J, Han X, Mukalel A J, *et al.* Throughput-scalable manufacturing of SARS-CoV-2 mRNA lipid nanoparticle vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(33): e2303567120
- [45] Muramatsu H, Lam K, Bajusz C, *et al.* Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine. *Mol Ther*, 2022, **30**(5): 1941-1951
- [46] Lee J, Woodruff M C, Kim E H, *et al.* Knife's edge: balancing immunogenicity and reactogenicity in mRNA vaccines. *Exp Mol Med*, 2023, **55**(7): 1305-1313
- [47] Fang E, Liu X, Li M, *et al.* Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 94
- [48] Han X, Alameh M G, Butowska K, *et al.* Adjuvant lipidoid-substituted lipid nanoparticles augment the immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA vaccines. *Nat Nanotechnol*, 2023, **18**(9): 1105-1114
- [49] Zhang D, Atochina-Vasserman E N, Maurya D S, *et al.* One-component multifunctional sequence-defined ionizable amphiphilic Janus dendrimer delivery systems for mRNA. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(31): 12315-12327
- [50] Zhang D, Atochina-Vasserman E N, Maurya D S, *et al.* Targeted delivery of mRNA with one-component ionizable amphiphilic Janus dendrimers. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(43): 17975-17982
- [51] Zhang D, Atochina-Vasserman E N, Lu J, *et al.* The unexpected importance of the primary structure of the hydrophobic part of one-component ionizable amphiphilic Janus dendrimers in targeted mRNA delivery activity. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(11): 4746-4753
- [52] Lu J, Atochina-Vasserman E N, Maurya D S, *et al.* Screening libraries to discover molecular design principles for the targeted delivery of mRNA with one-component ionizable amphiphilic Janus dendrimers derived from plant phenolic acids. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(6): 1572
- [53] Noori M, Nejadghaderi S A, Arshi S, *et al.* Potency of BNT162b2 and mRNA-1273 vaccine-induced neutralizing antibodies against severe acute respiratory syndrome-CoV-2 variants of concern: a systematic review of *in vitro* studies. *Rev Med Virol*, 2022, **32**(2): e2277
- [54] Zhu G, Zhu C, Zhu Y, *et al.* Minireview of progress in the structural study of SARS-CoV-2 proteins. *Curr Res Microb Sci*, 2020, **1**: 53-61
- [55] Szabó G T, Mahiny A J, Vlatkovic I. COVID-19 mRNA vaccines: platforms and current developments. *Mol Ther*, 2022, **30**(5): 1850-1868
- [56] Mevorach D, Anis E, Cedar N, *et al.* Myocarditis after BNT162b2 mRNA vaccine against COVID-19 in Israel. *N Engl J Med*, 2021, **385**(23): 2140-2149
- [57] Hashimoto T, Ozaki A, Bhandari D, *et al.* High anaphylaxis rates following vaccination with the Pfizer BNT162b2 mRNA vaccine against COVID-19 in Japanese healthcare workers: a secondary analysis of initial post-approval safety data. *J Travel Med*, 2021, **28**(7): taab090
- [58] Verbeke R, Hogan M J, Loré K, *et al.* Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity*, 2022, **55**(11): 1993-2005
- [59] Zhang G, Tang T, Chen Y, *et al.* mRNA vaccines in disease prevention and treatment. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, **8**(1): 365
- [60] Barbier A J, Jiang A Y, Zhang P, *et al.* The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. *Nat Biotechnol*, 2022, **40**(6): 840-854
- [61] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000,

- 100(1):57-70**
- [62] Szőke D, Kovács G, Kemecsei É, *et al.* Nucleoside-modified VEGFC mRNA induces organ-specific lymphatic growth and reverses experimental lymphedema. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3460
- [63] Rizvi F, Lee Y R, Diaz-Aragon R, *et al.* VEGFA mRNA-LNP promotes biliary epithelial cell-to-hepatocyte conversion in acute and chronic liver diseases and reverses steatosis and fibrosis. *bioRxiv*, 2023. doi:10.1101/2023.04.17.537186
- [64] Youn H, Chung J K. Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, **15**(9): 1337-1348
- [65] Qu L, Yi Z, Shen Y, *et al.* Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell*, 2022, **185**(10): 1728-1744.e1716
- [66] Chen Y G, Chen R, Ahmad S, *et al.* N6-Methyladenosine modification controls circular RNA immunity. *Mol Cell*, 2019, **76**(1): 96-109.e109
- [67] Zhao X, Zhong Y, Wang X, *et al.* Advances in circular RNA and its applications. *Int J Med Sci*, 2022, **19**(6): 975-985
- [68] Liu X, Zhang Y, Zhou S, *et al.* Circular RNA: an emerging frontier in RNA therapeutic targets, RNA therapeutics, and mRNA vaccines. *J Control Release*, 2022, **348**: 84-94
- [69] Amaya L, Grigoryan L, Li Z, *et al.* Circular RNA vaccine induces potent T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(20): e2302191120
- [70] Li H, Peng K, Yang K, *et al.* Circular RNA cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies. *Theranostics*, 2022, **12**(14): 6422-6436

mRNA Vaccine: an Important Breakthrough in Defeating COVID-19*

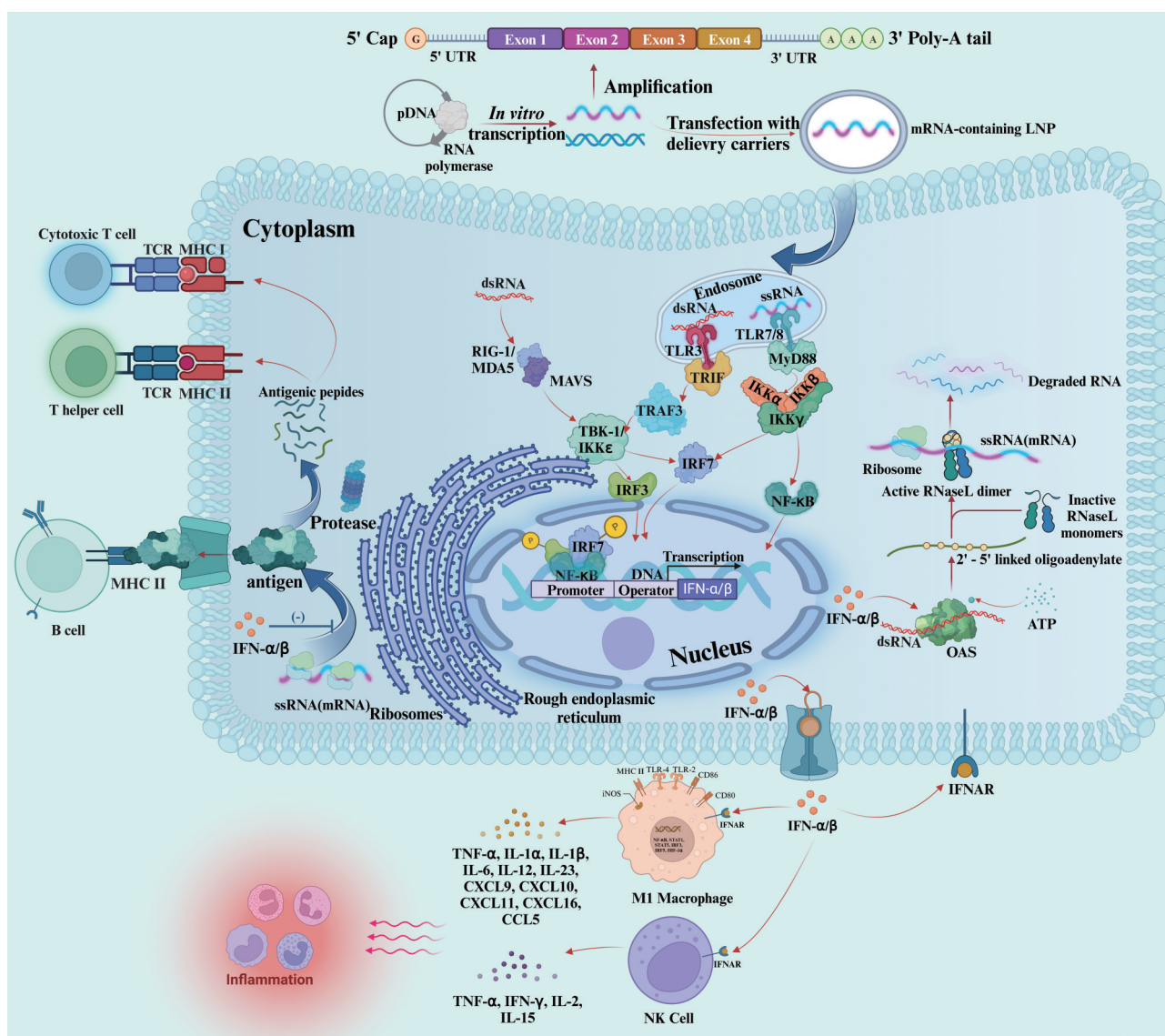
XIAO Zi-Yi^{1)**}, WU Xiao-Min^{1)**}, GUAN Fan¹⁾, ZENG Zhao-Yang²⁾,

XIONG Wei²⁾, WANG Fu-Yan^{1)***}

(¹⁾School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410013, China;

(²⁾NHC Key Laboratory of Carcinogenesis and Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion of the Chinese Ministry of Education, Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Graphical abstract



* This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Hunan Province (2023JJ30732).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-731-84805346, E-mail: wfy4010@csu.edu.cn

Received: October 29, 2023 Accepted: November 17, 2023

Abstract The 2023 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to medical scientists Katalin Karikó and Drew Weissman for their discovery of nucleoside base modification. The two researchers found that mRNA produced from modified nucleoside bases can evade innate immune recognition and improve protein expression. The discovery of these modifications is essential for the development of an effective mRNA vaccine against novel coronavirus SARS-CoV-2. Vaccination is the most economical and effective measure to prevent infectious diseases. So far, the vaccine has entered the third generation of nucleic acid vaccine from inactivated vaccine, subunit vaccine and recombinant protein vaccine. mRNA vaccine has the potential of high efficiency, rapid development, low-cost production and safe use. It is not a replication vector, and it does not have the characteristics of antibiotic resistance, genome integration and strong immunogenicity. Furthermore, corresponding mRNA vaccine can be quickly produced for different strains in large-scale, which speeds up the production process. However, mRNA synthesized *in vitro* is the ligand of Toll-like receptors. Once mRNA synthesized *in vitro* activates these receptors, the innate immune responses in the body will be turned on and a large amount of type I interferon will be produced, and mRNA will face the risk of degradation. The study of Katalin Karikó and Drew Weissman found that *in vitro* transcribed mRNA with modified bases can escape poor immune activation and solve the problem of inflammatory response stimulated by *in vitro* transcribed mRNA. Further studies have found that mRNA containing pseudouridine can be translated more effectively. At the same time, Drew Weissman has made an important contribution to the research and development of delivery system. After the outbreak of COVID-19, based on the research of two scientists, together with the development of efficient delivery systems such as lipid nanoparticles (LNPs) delivery system and one-component ionizable amphiphilic Janus dendrimer delivery system, the stability of SARS-CoV-2 prickle antigen and unparalleled investment by industry and government, the research and development technology system of mRNA vaccine was improved. Two very successful mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines were approved at the end of 2020, which played a very important role in fighting COVID-19 during COVID-19 epidemic and paved the way for future mRNA applications. mRNA vaccine also has great potential in inhibiting tumor growth and regenerative medicine. Therefore, the circular RNA vaccine can also be studied. This paper introduces the process of vaccine development, the important nucleotide modification and lipid nanoparticles technology in mRNA vaccine, the *in vivo* effect of mRNA vaccine and the summary and prospect of technical development.

Key words mRNA vaccine, nucleoside modification, lipid nanoparticles, SARS-CoV-2 vaccine

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0410