COVID-19核酸疫苗及其纳米递送系统

杨海银¹, 张萌洁¹, 翁郁华^{1,2}, 曹毅³, 黄渊余^{1*}

1. 北京理工大学生命学院, 前沿交叉科学研究院, 医工融合研究院, 分子医学与生物诊疗重点实验室, 北京 100081;

2. 湖南科技学院, 永州 425199;

3. 南华大学公共卫生学院, 衡阳 421001

* 联系人, E-mail: yyhuang@bit.edu.cn

收稿日期: 2021-03-10; 接受日期: 2021-04-09; 网络版发表日期: 2021-07-13

湖南省自然科学基金(批准号: 2019JJ50196, 2018JJ1019)、湖湘青年英才(批准号: 2018RS3094)、国家自然科学基金(批准号: 32001008, 31871003)、北京市科技新星(批准号: Z201100006820005)、京津冀基础研究合作专项(批准号: 19JCZDJC64100)、北京市科协青年托举人才(批准号: 2020-2022)、国家重点研发项目(批准号: 2021YFE0106900)和北京理工大学生物与医学工程公共实验中心资助

摘要 2019年末, 新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)席卷全球, 对全球经济以及人民健康产生了重大影响. 根据世界卫生组织的数据, 截至2021年3月1日, 全球确诊人数已超1亿, 死亡人数更超2百多万. 幸运的是, 目前已有多种针对COVID-19的疫苗获得紧急使用授权, 其中包括两种mRNA疫苗、多款灭活疫苗及病毒载体疫苗. 核酸疫苗包括mRNA疫苗和DNA疫苗, 相比于传统的疫苗, 它们的开发速度、生产方式、制造成本及应对突变型毒株的灵活性等在本次新型冠状病毒肺炎疫情中显示出了明显优势. 本文将对两种核酸疫苗和重组病毒载体疫苗的作用方式及其纳米递送系统进行综述, 并对现阶段核酸疫苗领域所面临的挑战和未来的研究方向进行展望.

关键词 新型冠状病毒肺炎, mRNA疫苗, DNA疫苗, 重组病毒载体疫苗, 纳米递送系统

新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)是由严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染所引起的新型肺炎. SARS-CoV-2是一类具有囊膜包被的单链RNA冠状病毒, 由表面的刺突(spike, S)蛋白、包膜(envelope, E)蛋白、膜(membrane, M)蛋白、核衣壳(nucleocapsid, N)蛋白以及RNA组成^[1], 其基因序列与SARS-CoV和中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)的相似度分别为79.5%和40%^[2-4]. S-蛋白

是介导病毒入侵宿主细胞的关键蛋白, 当病毒入侵宿主时, 表面的S-蛋白与细胞上的血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE 2)结合, 从而介导其进入细胞, 并在宿主体内大量繁殖(图1), 以S-蛋白为目标设计疫苗是现阶段疫苗研制的主要策略. 针对新型冠状病毒肺炎的疫苗种类繁多, 根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的数据, 目前进入临床研究的新型冠状病毒疫苗已有73个, 处于临床前研究的有180多个, 主要类型包括mRNA疫苗、DNA疫苗、灭活疫苗、减毒疫苗、重组病毒载体疫

引用格式: 杨海银, 张萌洁, 翁郁华, 等. COVID-19核酸疫苗及其纳米递送系统. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 804-818

Yang H Y, Zhang M J, Weng Y H, et al. Nucleic acid-based vaccines of COVID-19 and their delivery systems (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 804-818, doi: [10.1360/SSV-2021-0051](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0051)

图 1 新型冠状病毒的结构及其进入宿主的方式示意图

Figure 1 Schematic illustration of the SARS-CoV-2 structure and its infection pathway

苗、病毒样颗粒等^[5]。核酸疫苗包括mRNA疫苗和DNA疫苗,其具有制备简单、应用安全、效力持久等特点,在新型冠状病毒肺炎暴发后受到辉瑞、Moderna等许多制药企业的青睐。目前获得多个国家紧急使用授权的新型冠状病毒疫苗中就包括两个mRNA疫苗(BioNTech/辉瑞研制的BNT162b2和Moderna研制的mRNA-1273),BNT162b2和mRNA-1273疫苗预防COVID-19的有效性分别为95%和94.1%^[6,7],可见核酸疫苗在应对新型冠状病毒肺炎方面的效果良好。

核酸的胞吞效率低,在体内易被清除,因此需要合适的载体携带其进入细胞内,递送系统的缺乏是目前限制核酸疫苗使用的主要障碍^[8,9]。目前众多候选的新型冠状病毒核酸疫苗中,mRNA疫苗的载体大多为脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP),DNA疫苗则多为裸露的质粒DNA,用于直接注射或用电穿孔辅助递送。合适的递送方式不仅可以增加疫苗的安全性、稳定性以及便利性,更能通过提高入胞效率,促进内涵体逃逸等方式增强疫苗的免疫原性,因此,研究疫苗的递送系统对疫苗研发、生产以及使用都有十分重要的意义。

1 mRNA疫苗

1.1 mRNA疫苗概述

mRNA疫苗是将编码目的抗原的mRNA接种到宿主上,利用宿主细胞的表达系统合成相应的抗原,诱

导并激活宿主对该抗原的免疫应答,当携带该抗原的病原体入侵宿主时,宿主的免疫系统会根据记忆快速做出反应,从而预防该病原体的感染。20世纪90年代,科学家们发现mRNA可以发挥类似于疫苗的作用^[10,11],但受限于当时的技术,mRNA疫苗的稳定性、安全性等都不如传统的疫苗,一直不被人们所重视。直到近十年,mRNA合成、修饰和递送技术的突破^[12],才使mRNA疫苗再次走入大众视野,而此次新型冠状病毒肺炎的暴发更是让mRNA疫苗成为当下研究的热点。在新型冠状病毒肺炎暴发之前,mRNA疫苗的研究主要集中在流感病毒、寨卡病毒、埃博拉病毒、艾滋病毒等传染病病毒的防治方面,例如,Pardi等人^[13,14]开发的一种针对寨卡病毒前膜和包膜(pre-membrane and envelope, prM-E)表面糖蛋白的mRNA-LNP疫苗,在小鼠和恒河猴模型上证明了单次给药后能快速诱导产生强有力的保护性免疫反应,但是随后的I期临床研究表明,该疫苗在人体内无法产生足够的抗体(NCT03014089)。之后Moderna公司对其mRNA序列进行改造而研发的mRNA-1893疫苗,在药效上较之前提高了20倍,并在2019年获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)授予的快速通道资格,目前正处于I期临床研究。相比于其他疫苗,mRNA疫苗的优势有:(i)研发周期短,确定病原体的基因组序列后便可设

计编码抗原蛋白的mRNA^[15];同时mRNA由体外转录产生,不需要细胞扩增的过程,也显著提高了疫苗生产的速度。(ii)安全性高,mRNA在细胞质中发挥作用,不需要进入细胞核,避免了其插入到宿主细胞基因组中的风险^[16]。(iii)灵活性高,一旦病毒发生突变,原本的疫苗失效,新的mRNA疫苗可以根据新的病毒序列迅速重新设计和生产。因此,mRNA疫苗是抗击新型冠状病毒疫情最有潜力的疫苗之一。

目前用于制造疫苗的mRNA有三种,分别为传统型(conventional)mRNA、自我扩增型mRNA(self-amplifying mRNA, saRNA)^[16]以及反式扩增型mRNA(trans-amplifying mRNA, taRNA)^[17]。传统型mRNA包括目的抗原的编码序列(coding sequence, CDS)、非翻译区(untranslated region, UTR)以及5'端“帽子”结构和3'端Poly(A)“尾巴”;自我扩增型mRNA除以上结构外,还有编码RNA扩增所需的非结构蛋白序列(nonstructural proteins, nsPs),该序列可使此mRNA在细胞内复制,从而提高蛋白表达量;而在反式扩增型mRNA中,复制酶的编码序列和目的抗原的编码序列分别在不同的mRNA上,提高蛋白产量的同时,也增加了疫苗的安全性,并且此方法对制造多价mRNA疫苗有重要意义(图2)。

1.2 mRNA疫苗纳米递送系统的研究进展

合适的递送系统对于mRNA疫苗的研发必不可少,但目前广泛用于mRNA体内递送的载体并不多,大部分只停留在临床前研究,未来mRNA疫苗领域的重大进展极有可能发生在对递送系统的研究方面。

早期的研究中,人们将鱼精蛋白作为mRNA疫苗的载体。鱼精蛋白中含有多个精氨酸,能通过静电吸引负载mRNA,并且研究表明,鱼精蛋白与mRNA的复合物在提高mRNA稳定性的同时,也能有效改善mRNA的转染效率^[18]。然而,mRNA与鱼精蛋白的结合过于紧密,不利于mRNA的释放,导致其效果不尽如人意^[19,20]。因此现在通常只用鱼精蛋白作为疫苗的佐剂。

阳离子聚合物,如聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚赖氨酸等,近些年被广泛用于核酸的递送,但其分子结构的复杂性和聚合度的不可控性^[21~23]导致其在临床上较少用于mRNA疫苗的递送;此外,不少聚合物在体内表现出较大的毒性^[24],也进一步限制了它的使用。目前用于mRNA递送的聚合物通常用脂肪酸进行修饰以增加其安全性。Zhao等人^[25]早年研究发现,使用硬脂酸修饰的PEI(polyethyleneimine-stearic acid, PSA)比单纯使用PEI有更好的内吞和内涵体逃逸效果,并且毒性更小,以PSA为载体的mRNA疫苗能显著增

图2 mRNA疫苗的示意图及抗原表达的机制

Figure 2 Schematic illustration of mRNA vaccines and antigen expression

强其抗HIV-1 Gag的免疫应答. 而Haabeth等人^[26]最近研发了一种名为电荷反转可释放转运蛋白(charge-altering releasable transporters, CARTs)的含脂聚合物, 以其为载体的mRNA疫苗能在小鼠体内引起有效的T细胞反应来治疗肿瘤, 并且毒性很小. 此外, Chahal等人^[27]将树状分子与脂锚定的PEG(poly(ethylene glycol))结合作为载体递送mRNA, 该系统能在单剂量给药情况下对埃博拉病毒、H1N1流感和鼠弓形虫产生保护性免疫反应. 由此可见, 脂肪酸的修饰对阳离子聚合物的递送起着十分关键的作用.

LNP是通过模拟细胞膜研制的一种纳米载体, 能够将mRNA封装在腔内, 形成具有良好脂质结构的纳米级囊泡, 是目前研究最多也是最透彻的mRNA疫苗递送系统. LNP通常由四部分组成: 可电离脂质、磷脂、PEG-脂质和胆固醇^[28](图3). 可电离脂质是LNP的核心部分, pK_a 通常在6~7之间, 在较低的pH条件下带正电, 能促进载体自组装和mRNA的内涵体逃逸, 常用的可电离脂质有Dlin-MC3-DMA^[29], Lipid 319^[30], C12-200^[31], 5A2-SC8^[32]等; PEG-脂质通常用于延长疫苗的半衰期; 胆固醇主要充当稳定剂; 磷脂为两亲性脂质, 可用于支持脂质双层结构.

研究人员最早利用季胺化阳离子脂质(2,3-二油氧基-丙基)-三甲基氯化铵(N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTAP)结合可电离脂质二油酰磷脂酰乙醇胺(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE)转染mRNA^[33], 虽然体外研究证明了其有效性, 但在体内血液循环中易被清除, 并表现出较大的毒性. 随后开发的稳定质粒-脂质颗粒(stabilized plasmid-lipid particle, SPLP)是LNP的前身, 由季胺化阳离子脂质双十八烷基二甲基氯化铵(dioc-tadecyl dimethyl ammonium chloride, DODAC)结合可离子化脂质DOPE, 并在表面覆盖亲水的PEG涂层, 增强了其在血液循环中的稳定性, 并且DOPE进入细胞后能在内涵体内质子化, 从而介导内涵体逃逸^[34]. SPLP随后进一步发展为稳定的核酸脂质颗粒(stable nucleic acid lipid particle, SNALP), 主要成分包括可离子化脂质、饱和两亲性脂质、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(1,2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC)、胆固醇和PEG-脂质^[35]. 全球首款siRNA药物ONPATRO™的递送系统是后面LNP载体开发的基础, 其主要组成包括4-(N,N-二甲基氨基)丁酸(二亚油基)甲酯(DLin-MC3-DMA)、1,2-二肉豆蔻酰-RAC-甘

图3 mRNA-LNP疫苗的示意图

Figure 3 Schematic illustration of mRNA-LNP vaccine

油-3-甲氧基聚乙二醇2000(PEG2000-DMG)、DSPC以及胆固醇。Moderna曾以DLin-MC3-DMA为可电离脂质来递送mRNA, 并进行了多次临床前和临床研究^[14,36], 但后来发现, MC3中二亚油基尾降解缓慢, 反复给药存在潜在的积蓄毒性。因此Moderna在此基础上研发了自己的可离子化脂质——SM-102^[37], 其尾部采用更大的分支来增大其效力, 并引入酯键增加其生物可降解性。BioNTech公司则采用ALC-0315^[38]作为核心可电离脂质, 其设计原理与SM-102类似, 在结构上也具有相似的官能团。Moderna和BioNTech在核心脂质上的改进是其新型冠状病毒肺炎疫苗成功获批的基础, 同时也推进了mRNA疫苗用于其他传染性疾病的研究进展。然而, 目前关于LNP设计的规律尚不完全清楚, 根据以往的研究, 组分比例、生物可降解性、脂质的不饱和度等可能会对载体的递送效果起十分重要的影响^[12]。

1.3 新型冠状病毒mRNA疫苗的纳米递送系统

目前所有的候选新型冠状病毒mRNA疫苗, 都使用LNP作为载体(表1)。根据mRNA的不同, BioNTech/辉瑞公司研发的mRNA疫苗分为4种, 包括两种核苷修饰的mRNA、一种未修饰的mRNA和一种自扩增mRNA。目前获得紧急使用授权的为一种核苷修饰的mRNA(BNT162b2), 其载体由核心脂质(ALC-0315^[38])、DSPC、PEG-脂质(ALC-0159)和胆固醇组成(表2)。BNT162b2以SARS-CoV-2的S-蛋白为目标, 其

临床前研究表明, 单次给药0.2, 1和5 μg 后, 均能在小鼠体内检测到较高的中和抗体滴度, 并激发强烈的抗原特异性免疫反应^[39]。临床研究表明, BNT162b2疫苗预防COVID-19的有效性能高达95%^[6]。

由Moderna研发的mRNA-1273疫苗同样编码SARS-CoV-2的S蛋白, 其LNP载体由4种脂质组成: 可电离脂质(SM-102^[37])、DSPC、PEG-脂质(PEG2000-DMG)和胆固醇(表3)。研究表明, 以“Day1+Day21”的方式对小鼠给药1 μg , 恒河猴给药100 μg 后, 都能检测到高中和抗体滴度和强烈的免疫反应^[40,41]。临床研究表明, mRNA-1273疫苗预防COVID-19的有效率为94.1%^[7], 与BNT162b2相当。

2 DNA疫苗

2.1 DNA疫苗概述

DNA疫苗是继灭活疫苗和减毒疫苗、亚单位疫苗之后的第三代疫苗。1990年Wolff等人^[42]分别将含有氯霉素乙酰转移酶、荧光素酶和 β -半乳糖苷酶基因的RNA和DNA表达载体注射到小鼠骨骼肌中, 检测发现其能够在体内稳定表达编码的蛋白质, DNA疫苗的研究由此开始。相比于前两代疫苗, DNA疫苗的优势有: (i) 工艺简单, 生产成本低; (ii) DNA分子很稳定, 易于运输和保存; (iii) 安全性高, DNA疫苗只是单一的一段病毒基因, 不存在减毒疫苗潜在的毒性逆转风险; (iv) 接种途径多样化, 可以注射, 也能口服或喷雾接

表1 新型冠状病毒的mRNA疫苗

Table 1 mRNA vaccine for COVID-19

药物名称	载体	给药方式	免疫原	研发单位	国家	临床状态
mRNA-1273	LNP	肌肉注射	S-蛋白	Moderna Therapeutics	美国	紧急获批
BNT162b2	LNP	肌肉注射	S-蛋白	BioNTech/Pfizer	德国	紧急获批
BNT162b1	LNP	肌肉注射	S-蛋白	BioNTech/Pfizer	德国	II期/III期
BNT162b3	LNP	肌肉注射	S-蛋白	BioNTech/Pfizer	德国	I期/II期
CVnCoV	LNP	肌肉注射	S-蛋白	CureVac	德国	III期
ARCT-021	LNP	肌肉注射	S-蛋白	Arcturus Therapeutics	美国	I期/II期
LNP-nCoVsaRNA	LNP	肌肉注射	S-蛋白	Imperial College London	英国	I期
ARCoV	LNP	肌肉注射	S-蛋白	苏州艾博生物/沃森生物	中国	II期
ChulaCov19	LNP	肌肉注射	S-蛋白	Chulalongkorn University	泰国	I期
MRT5500	LNP	肌肉注射	S-蛋白	Translate Bio/Sanofi Pasteur	美国/法国	I期/II期
DS-5670	LNP	肌肉注射	S-蛋白	Daiichi Sankyo	日本	I期

表 2 BNT162b2组成及其结构
Table 2 Composition and structure of BNT162B2

组分	化学结构	所占比例(%)
ALC-0315		55.8
ALC-0159		6.5
DSPC		11.7
胆固醇		26.0

表 3 mRNA-1273组成及其结构
Table 3 Composition and structure of mRNA-1273

组分	化学结构	所占比例(%) ^{a)}
SM-102		NS
PEG2000-DMG		NS
DSPC		NS
胆固醇		NS

a) NS: 未标明

种; (v) 能将编码类似抗原的基因组合到一起, 组成多价疫苗. 到目前为止, 共有5个动物DNA疫苗产品陆续上市^[43,44], 但遗憾的是, 目前尚无人用DNA疫苗产品获批.

DNA进入细胞后会在细胞内转录翻译, 产生抗原蛋白, 能同时诱导细胞免疫和体液免疫^[45]. 一方面, DNA疫苗直接转染附近的抗原呈递细胞, 主要是树突状细胞(dendritic cells, DCs), 然后表达编码抗原的基

因,产生抗原肽,抗原肽平行装载到组织相容性 I 类 (major histocompatibility complex I, MHC I) 和 MHC II 分子上,使 DCs 迁移到引流淋巴结,从而产生 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞. 另一方面, DNA 疫苗转染心肌细胞或角质形成细胞,并在其内表达抗原,该抗原由凋亡小体释放,并被 DCs 内化,然后抗原被装载到 MHC II 上,导致辅助性 $CD4^+$ T 细胞的激活,进而促进 B 细胞启动,产生体液免疫反应(图4).

2.2 DNA疫苗递送方式的研究

DNA 疫苗由 2~10 kb 的质粒分子组成,油水分配系数低^[46],所以很难透过细胞膜进入细胞. 此外, DNA 疫苗对人类的免疫原性较差^[47,48],这是目前尚无 DNA 疫苗获批上市的主要原因. 为了克服这一问题,近年来,涌现了一些提高 DNA 疫苗免疫原性的策略,其中就包括递送方式的改进,目前 DNA 疫苗的递送方式主要包括电穿孔(electroporation, EP)、微针(microneedle, MN)、纳米颗粒(nanoparticles, NPs)、基因枪、脂质体等.

电穿孔是近年来研究较多的给药技术,其基本原理是通过高强度的电场作用,瞬时提高细胞膜的通透性,从而使 DNA 或其他生物大分子能透过细胞膜进入细胞. Kulkarni 等人^[49]利用电穿孔的方式对恒河猴递送 SIV DNA 疫苗,结果表明,这种方式更能在灵长类动物体内诱导稳定持久的免疫反应;同时,已有多个基于电穿孔的 DNA 疫苗进入临床研究^[50,51]. 然而,不同的

细胞所需的电转条件不一样,并且多数电转方案尚处于探索期,以至电穿孔技术目前还较少用于人类 DNA 疫苗的递送. 进一步完善电穿孔策略,以期开发一种共同的 DNA 电穿孔方案是电穿孔治疗发展的重要方向.

微针介导的递送系统为 DNA 疗法的应用提供了一个独特的平台. 20 世纪 70 年代就已经提出了微针的概念,但直到近 30 年纳米技术的高速发展,微针技术才受到广泛的关注,在临床应用上显示出巨大的前景^[52]. 经过近几十年的发展,微针发展出了固体微针、中空聚合物微针和多孔微针^[53]等几种类型,其所用的材料多为多孔硅、聚合物^[54]、陶瓷^[55]以及不锈钢^[56]等. 微针能将 DNA 递送至表皮层或真皮层,多项研究表明,用微针注射流感疫苗可以激发强有效的体液免疫反应,并保护小鼠免受流感病毒的入侵^[57,58]. 此外,微针是一种无痛微创的疫苗接种方式,并且不需要注射技巧,方便无医护人员时自我给药,因此更加适用于儿童的疫苗接种.

纳米颗粒的直径在 1~1000 nm 之间,易于被细胞吸收. NPs 作为 DNA 疫苗的载体能防止 DNA 的过早降解,并通过内吞作用改善细胞摄取以增强疫苗的免疫原性. 目前用于 DNA 疫苗递送载体的纳米颗粒主要有聚合物纳米颗粒、脂质纳米颗粒、无机纳米颗粒、病毒样纳米颗粒几类^[59]. Jones 等人^[60]用聚乳酸-乙醇酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)包裹质粒 DNA,通过灌胃给药,携带 DNA 疫苗的 PLGA 颗粒能在小鼠体内引起血清 IgG, IgA 和 IgM 抗体反应以及黏

图 4 DNA 疫苗的作用机制示意图

Figure 4 Schematic illustration of the working mechanism of DNA vaccines

膜反应。同样, Yu等人^[61]用pH敏感的固体脂质纳米颗粒(solid lipid nanoparticles, SLNs)同时包裹紫杉醇和质粒DNA, 证明SLNs能有效介导胞吞和药物释放, 并且为化疗药物和基因药物的联合使用提供了新思路。由此可见, 几类NPs在递送DNA疫苗方面同样具有广阔的应用前景。

2.3 新型冠状病毒DNA疫苗的递送方式

新型冠状病毒肺炎暴发至今, 已有多个DNA疫苗进入临床研究(表4), 其中INO-4800和CORVax等疫苗都使用了电穿孔的方式来增加DNA的入胞效率。INO-4800是由Inovio公司、艾棣维欣(苏州)生物制药有限公司共同研发的新型新型冠状病毒DNA疫苗, 目前已进入II期临床阶段, 其I期临床的数据表明, INO-4800具有良好的安全性和耐受性, 且通过引发细胞或(和)体液免疫应答, 在100%(38/38)的受试者中都具有免疫原性^[62]。并且十分重要的是, 根据Inovio公司发布的最新声明, INO-4800可以在室温下保存1年以上, 在37℃条件下可以保存一个月以上, 而在标准冷藏温度(2~8℃)下的预计保质期为5年, 并且无需冷冻运输和储藏。这是其相较于灭活疫苗和mRNA疫苗最大的优势所在, 一旦投入使用, 将为疫苗运输与普及带来巨大的便利。INO-4800使用的是CELLECTRA[®]电转仪, CELLECTRA[®]电转仪是Inovio公司研发的一种毫秒级电脉冲, 其作用原理是利用瞬间电流使细胞膜出现一些小的孔洞, 让DNA质粒通过孔洞进入细胞内, 由于

细胞膜具有流动性, 在瞬间电流结束后, 细胞膜上的孔洞逐渐愈合, 此方式大幅度提高了DNA的递送效率。此外, Inovio公司的另一个疫苗VGX-3100使用的同样是CELLECTRA[®]电转仪, VGX-3100是靶向HPV-16的E6/E7蛋白和HPV-18的E6/E7蛋白的治疗性DNA疫苗, 在其II期临床试验中观察到良好的安全性和耐受性^[63]。CORVax使用的是CLINIPORATOR[®]电转仪, 其原理与CELLECTRA[®]电转仪类似, CLINIPORATOR[®]电转仪已广泛用于电化学疗法, 研究证明, 其在治疗皮肤及皮下黑色素瘤的转移方面具有很好的效果^[64,65]。

利用电穿孔的方式递送DNA疫苗, 不需要引入外源物质, 避免了潜在的安全风险, 比灭活疫苗、减毒疫苗等更安全, 目前, 各种电转仪已经广泛地应用到临床试验中, 不仅大幅提高了DNA疫苗的免疫原性, 同时对人体的影响也很小, 是一种具有广阔应用前景的递送方式。

3 重组病毒载体疫苗

3.1 重组病毒载体疫苗概述

重组病毒载体疫苗是将致病病毒的抗原基因插入到另一种病毒基因组内获得重组病毒, 免疫机体后表达出相应的抗原蛋白, 从而诱导机体产生免疫应答的一类疫苗(图5)。严格意义上来说, 根据其作用原理, 重组病毒载体疫苗也属于核酸疫苗的范畴。1982年,

表4 新型冠状病毒的DNA疫苗

Table 4 DNA vaccine for COVID-19

药物名称	递送方式 ^{a)}	给药方式	免疫原	研发单位	国家	临床状态
INO-4800	EP	皮内注射	S-蛋白	Inovio/艾棣维欣生物	美国/中国	II期/III期
AG0301-COVID19	N/A	肌肉注射	S-蛋白	Osaka/AnGes/Takara	日本	II期/III期
ZyCoV-D	N/A	皮内注射	S-蛋白	Zydus Cadila	印度	III期
GX-19	EP	肌肉注射	S-蛋白	Genexine Consortium	韩国	I期/II期
Covigenix VAX-001	PLV	肌肉注射	S-蛋白	Entos Pharmaceuticals	加拿大	I期
CORVax	EP	皮内注射	S-蛋白	Providence Health & Services	美国	I期
bacTRL	N/A	口服	S-蛋白	Symvivo Corporation	加拿大	I期
GLS-5310	N/A	皮内注射	S-蛋白	GeneOne Life Science	韩国	I期/II期
COVIGEN	N/A	肌肉注射	S-蛋白	University of Sydney/Bionet	澳大利亚	I期
COVID-eVax	N/A	肌肉注射	S-蛋白	Takis/Rottapharm Biotech	意大利	I期/II期

a) N/A: 不适用, 即无载体; PLV: proteo-lipid vehicle, 蛋白脂质载体

图5 重组病毒载体疫苗的作用机制示意图

Figure 5 Schematic illustration of the working mechanism of recombinant virus vector-based vaccine

Mackett等人^[66]成功以牛痘病毒为载体表达外源基因后,人们开始了对重组病毒载体疫苗的深入探索.与灭活疫苗和减毒疫苗相比,重组病毒载体疫苗产生免疫的时间更持久,不存在毒性逆转的风险,安全性更高.此外,重组病毒载体疫苗能插入较长的外源基因片段,且能同时诱导体液免疫和细胞免疫,因此近年来受到人们的广泛关注.新型冠状病毒肺炎暴发后,我国军事科学院军事医学研究院生物工程研究所陈薇院士团队和康希诺公司一直致力于新型冠状病毒重组病毒载体疫苗的研究,近日,该团队以人Ad5型腺病毒为载体的疫苗Ad5-nCoV获得多个国家的紧急使用授权.此外,值得一提的是,同样由陈薇院士团队和康希诺联合研发的Ad5载体埃博拉疫苗Ad5-EBOV已在2017年10月通过了我国国家食品药品监督管理总局的新药注册申请.

目前用于生产疫苗的病毒载体有两种,分别为复制型病毒载体和非复制型病毒载体^[67](图5).复制型病毒载体基因组中携带了该病毒复制相关的基因,在进入宿主细胞后首先会利用宿主的复制系统进行大量繁殖,因此其特点是免疫原性强,并且持续时间久,但同时宿主对该载体本身的免疫能力可能会削弱疫苗的活性.非复制型病毒载体则是通过基因修饰等方式将病毒载体改造为复制缺陷型,对于此类疫苗,每个病毒颗粒只能感染单个细胞,免疫原性较弱,并且持续时间短,但安全性则显著提高,并且去除病毒复制相关的基因能显著增加载体对外源基因的负载量,如常见的腺病毒载体.

3.2 重组病毒载体疫苗纳米递送系统的研究

病毒载体的直径一般为100 nm左右,属于纳米递送系统的范畴.以病毒颗粒为载体的优势有:(i) 转染效率高,进入细胞依赖于病毒天然的感染性;(ii) 宿主范围广,不受靶细胞是否为分裂细胞的限制;(iii) 基因组结构简单、分子背景较清楚,易于改造和制备.与上述的LNP等载体相比,病毒载体的包装技术已趋于成熟,更适用于工业化大规模生产,但其感染通常缺乏靶向性,在感染靶细胞的同时可能导致其他正常组织感染而产生不良反应.此外,病毒本身携带的抗原可能会刺激机体产生免疫反应从而影响免疫结果.因此,对各种病毒载体进行优化是其应用的关键.目前用于重组病毒载体疫苗的递送载体主要有腺病毒、痘病毒、疱疹病毒(herpesviruses, HSV)、水泡型口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)等.其中以腺病毒载体使用最为广泛.

腺病毒是无包膜的线性双链DNA病毒,能通过受体介导的内吞作用进入细胞内,但没有内源性整合机制,不会整合到宿主细胞基因组中.腺病毒的基因组大小约为36 kb,两端各有一个反向末端重复区(inverted terminal repeat, ITR),ITR内侧为病毒包装信号.基因组上分布着承担调节功能的4个早期转录元(E1, E2, E3, E4),以及一个编码结构蛋白的晚期转录元^[68].E1区负责调节病毒的复制,其缺失通常导致病毒复制的流产;E3为复制非必需区,其缺失则可以扩大外源基因的插入容量.目前应用最多的是E1/E3缺陷的腺

病毒^[69]。人腺病毒中目前已经发现50多个血清型,其中以5型(Ad5)应用最为广泛。然而,许多人群体内都存在天然Ad5抗体,因此可能会存在针对载体的预存免疫,影响疫苗的免疫原性^[70]。

痘病毒直径在30~400 nm左右,呈砖形或椭圆形,具有脂质蛋白外壳,其结构复杂,种类繁多,遗传物质为一个约20 kb的线性双链DNA。痘病毒作为疫苗载体的优势在于其非必需区基因多,可以插入较大片段的外源基因,并能高效表达所插入的外源基因。1982年,研究人员将外源基因插入痘苗病毒的TK基因中,成功构建了表达外源基因的重组痘苗病毒^[66]。此外,禽痘病毒在选择宿主方面具有良好的专一性,并且能携带大片段的外源基因,因此近年来也越来越受到人们的重视。

3.3 新型冠状病毒重组病毒载体疫苗的纳米递送系统

目前进入临床试验的十几种重组病毒载体疫苗

中,所用的病毒载体包括腺病毒、慢病毒、流感病毒、痘苗病毒、水泡型口炎病毒等,其中以腺病毒载体占大多数(表5)。

由陈薇院士团队和康希诺研发的Ad5-nCoV疫苗是以复制缺陷型人5型腺病毒(Ad5)为载体的疫苗,该腺病毒载体系统由三部分组成:穿梭质粒pCA13、腺病毒基因组质粒pBHG11和Hek293细胞。首先利用基因工程手段将编码SARS-CoV-2病毒S-蛋白的基因导入穿梭质粒,之后再重组的穿梭质粒与pBHG11共转染Hek293细胞(整合Ad5 E1基因的人胚胎肾细胞系),质粒在细胞内发生同源重组,从而形成重组腺病毒颗粒。Ad5-nCoV是单剂量接种的新型冠状病毒疫苗,可以快速实现免疫保护,缩短接种周期。此外,Ad5-nCoV在2~8℃下能稳定保存,相比于mRNA-1273疫苗的-20℃保存和BNT162b2疫苗的-70℃保存,其更便于运输及存储,疫苗可及性更高。III期临床研究数据表明,单针接种Ad5-nCoV疫苗14天后,保护效力为68.83%,28天后保护效力为65.28%,对新型冠状病毒

表 5 新型冠状病毒的重组病毒载体疫苗

Table 5 Recombinant virus vector-based vaccine for COVID-19

药物名称	病毒载体 ^{a)}	给药方式	免疫原	研发单位	国家	临床状态
AZD1222	腺病毒	肌肉注射	S-蛋白	AstraZeneca/University of Oxford	英国	紧急获批
Ad5-nCoV	腺病毒	肌肉注射	S-蛋白	康希诺	中国	紧急获批
Gam-COVID-Vac(卫星-V)	腺病毒	肌肉注射	S-蛋白	Gamaleya	俄罗斯	紧急获批
Ad26.COVS.2.S	腺病毒	肌肉注射	S-蛋白	Janssen Pharmaceutical	美国	紧急获批
GRAd-COV2	腺病毒	肌肉注射	S-蛋白	ReiThera / Leukocare	意大利/德国	I 期
VXA-CoV2-1	腺病毒	口服	S-蛋白	Vaxart	美国	I 期
MVA-SARS-2-S	MVA	肌肉注射	S-蛋白	University of Munich	德国	I 期
hAd5-S-Fusion+N-ETSD	腺病毒	皮下注射或口服	S-蛋白	ImmunityBio/ NantKwest	美国	I 期
COH04S1	MVA	肌肉注射	S-蛋白	City of Hope Medical Center/NCI	美国	I 期
AdCOVID	NS	鼻腔给药	S-蛋白	Altimmune	美国	I 期
BBV154	腺病毒	鼻腔给药	S-蛋白	Bharat Biotech International Limited	印度	I 期
DelNS1-2019-nCoV-RBD-OPT1	流感病毒	鼻腔给药	S-蛋白	香港大学/厦门大学/万泰生物	中国	II 期
IIBR-100	水泡型口炎病毒	肌肉注射	S-蛋白	Israel Institute for Biological Research	以色列	I 期/II 期
AdCLD-CoV19	腺病毒	肌肉注射	S-蛋白	Cellid	韩国	I 期/II 期
Pathogen-specific aAPC	慢病毒/aAPC	皮下注射	S-蛋白	深圳市免疫基因治疗研究院	中国	I 期
LV-SMENP-DC	慢病毒/DC	皮下注射或静脉注射	S-蛋白	深圳市免疫基因治疗研究院	中国	I 期/II 期
AV-COVID-19	DC	肌肉注射	S-蛋白	Aivita Biomedical	美国	I 期/II 期

a) MVA: modified vaccinia virus Ankara, 改良的安卡拉痘苗病毒; NS: not specified, 未标明; aAPC: artificial antigen presenting cells, 人工抗原呈递细胞

毒肺炎有良好的预防效果。该疫苗目前已获得紧急使用授权。

获得紧急使用授权的新型冠状病毒重组病毒载体疫苗还有阿斯利康和牛津大学研发的AZD1222(ChAdOx1)、强生公司研发的Ad26.COV2.S以及Gamaleya公司研发的Gam-COVID-Vac(卫星-V)。AZD1222(ChAdOx1)以黑猩猩腺病毒为载体,黑猩猩腺病毒与人Ad5非常相似,但其在人类中的血清流行性远小于Ad5,因此可有效避免Ad5载体疫苗中存在的预存免疫问题^[71],其临床研究表明,该疫苗预防新型冠状病毒肺炎的效力为70.4%^[72]。Ad26.COV2.S疫苗则以人腺病毒血清型26(Ad26)作为载体,Ad26相对Ad5较为罕见,其血清流行性也同样小于Ad5^[73],研究表明,Ad26.COV2.S疫苗在世界范围内的总有效率为66%。Gam-COVID-Vac(卫星-V)疫苗分为两剂,分别以Ad26和Ad5为载体,首先注射Ad26载体,然后注射Ad5载体加强,两者都携带SARS-CoV-2病毒S-蛋白的基因,据报道,Gam-COVID-Vac疫苗的有效率为91.6%^[74]。

4 总结与展望

本文总结了近几十年来核酸疫苗领域中常用的纳米递送系统,并分析了其在新型冠状病毒疫苗中的应用。尽管核酸技术是近几十年来才兴起的新技术,但发展十分迅速,这主要归因于纳米载体系统研究的不断深入。核酸疫苗从设计序列到临床试验所需的时间短,在应对病毒突变方面具有明显的优势,这使其成为新型冠状病毒疫情下开发疫苗的首要选择。两款mRNA疫苗获得多个国家的紧急使用授权,标志着核酸疫苗第一次走向世界的舞台,如果随着时间的推移,核酸疫苗最终被证明是成功的,那么它不仅能对预防新型冠状病毒肺炎产生巨大影响,也将对人类疾病的

治疗与预防做出巨大的贡献,人类将彻底摆脱目前许多重大疾病无有效疫苗预防的困境。

然而,尽管近几十年核酸领域取得了前所未有的发展,但现阶段的核酸疫苗仍面临一些问题和挑战。mRNA疫苗方面,其稳定性较低,必须低温保藏和运输是目前该领域最突出的问题,导致mRNA不稳定的主要因素是细胞内核酸酶的降解,因此对mRNA序列的特定位置进行修饰是解决此问题的有效方式,例如,利用帽类似物代替mRNA的帽子结构能降低其对脱帽复合物DCP1/DCP2的敏感性,从而调节mRNA的降解;控制Poly(A)尾的长短能有效调节mRNA的半衰期等。尽管近年来核酸修饰方面取得突出进展,但有效且普遍适用于工业化的方案少之又少,因此新型有效的修饰方案是未来该领域研究的重点。此外,安全性也是mRNA疫苗不可忽视的问题,外源RNA通常会被机体视为病毒感染的信号,非免疫细胞能通过视黄酸诱导基因I(retinoic acid-inducible gene-I, RIG-I)受体识别外源RNA,然后触发先天免疫反应,并激活Toll样受体引起炎症,而富含U的RNA序列是已知的Toll样受体的有效激活剂。因此,可以通过降低mRNA序列中U的含量来增强其安全性。DNA疫苗方面,免疫原性较差是限制其应用的主要因素,目前解决此问题最常用的方法是递送方式的改进,如上述的电穿孔、基因枪等都取得不俗的效果;使用强启动子以及使用明矾等疫苗佐剂,也在很大程度上增加了DNA疫苗的免疫原性;此外,外源DNA注入体内后,存在整合到宿主基因组上的风险,以及质粒DNA长期高水平地表达外源抗原,可能导致机体对该抗原产生免疫耐受,也是DNA疫苗领域长期存在并限制其应用的问题。研发普适性的递送方式、质粒DNA密码子的优化以及疫苗佐剂的搭配将是未来DNA疫苗研发的重要方向。

参考文献

- 1 Naqvi A A T, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta*, 2020, 1866: 165878
- 2 Chan J F W, Yuan S, Kok K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, 2020, 395: 514–523
- 3 Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579: 270–273
- 4 Luo D, Wang T, Tan Z Y, et al. A novel coronavirus—from basic research to clinic (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2021, 51 [罗丹, 王霆, 谭忠元, 等].

新型冠状病毒——从基础研究到临床. 中国科学: 生命科学, 2021, 51]

- 5 Dai L, Gao G F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 73–82
- 6 Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2603–2615
- 7 Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 384: 403–416
- 8 Porter K R, Raviprakash K. DNA vaccine delivery and improved immunogenicity. *Curr Issues Mol Biol*, 2017, 22: 129–138
- 9 Pardi N, Hogan M J, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol*, 2020, 65: 14–20
- 10 Conry R M, LoBuglio A F, Wright F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*, 1995, 55: 1397–1400
- 11 Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol*, 1993, 23: 1719–1722
- 12 Weng Y, Li C, Yang T, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotech Adv*, 2020, 40: 107534
- 13 Pardi N, Hogan M J, Naradikian M S, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med*, 2018, 215: 1571–1588
- 14 Pardi N, Hogan M J, Pelc R S, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 2017, 543: 248–251
- 15 Hekele A, Bertholet S, Archer J, et al. Rapidly produced SAM[®] vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2: 1–7
- 16 Maruggi G, Zhang C, Li J, et al. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. *Mol Ther*, 2019, 27: 757–772
- 17 Fuller D H, Berglund P. Amplifying RNA vaccine development. *N Engl J Med*, 2020, 382: 2469–2471
- 18 Hoerr I, Obst R, Rammensee H G, et al. *In vivo* application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 1–7
- 19 Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, et al. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol*, 2012, 9: 1319–1330
- 20 Fotin-Mleczek M, Duchardt K M, Lorenz C, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother*, 2011, 34: 1–15
- 21 Akinc A, Maier M A, Manoharan M, et al. The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14: 1084–1087
- 22 Crommelin D J A, van Hoogevest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *J Control Release*, 2020, 318: 256–263
- 23 Leroux J C. Editorial: drug delivery: too much complexity, not enough reproducibility? *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 15170–15171
- 24 Lv H, Zhang S, Wang B, et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 2006, 114: 100–109
- 25 Zhao M, Li M, Zhang Z, et al. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Deliv*, 2016, 23: 2596–2607
- 26 Haabeth O A W, Blake T R, McKinlay C J, et al. mRNA vaccination with charge-altering releasable transporters elicits human T cell responses and cures established tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E9153–E9161
- 27 Chahal J S, Khan O F, Cooper C L, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E4133–E4142
- 28 Yang T, Li C, Wang X, et al. Efficient hepatic delivery and protein expression enabled by optimized mRNA and ionizable lipid nanoparticle. *Bioact Mater*, 2020, 5: 1053–1061
- 29 Semple S C, Akinc A, Chen J, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 172–176
- 30 Maier M A, Jayaraman M, Matsuda S, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther*, 2013, 21: 1570–1578
- 31 Kauffman K J, Dorkin J R, Yang J H, et al. Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery *in vivo* with fractional factorial and definitive screening designs. *Nano Lett*, 2015, 15: 7300–7306
- 32 Cheng Q, Wei T, Jia Y, et al. Dendrimer-based lipid nanoparticles deliver therapeutic FAH mRNA to normalize liver function and extend survival in a mouse model of hepatorenal tyrosinemia type I. *Adv Mater*, 2018, 30: 1805308

- 33 Malone R W, Felgner P L, Verma I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1989, 86: 6077–6081
- 34 Wheeler J J, Palmer L, Ossanlou M, et al. Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. [Gene Ther](#), 1999, 6: 271–281
- 35 Heyes J, Palmer L, Bremner K, et al. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. [J Control Release](#), 2005, 107: 276–287
- 36 Richner J M, Himansu S, Dowd K A, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. [Cell](#), 2017, 168: 1114–1125.e10
- 37 Hassett K J, Benenato K E, Jacquinet E, et al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines. [Mol Ther Nucleic Acids](#), 2019, 15: 1–11
- 38 Buschmann M D, Carrasco M J, Alishetty S, et al. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines. [Vaccines](#), 2021, 9: 65
- 39 Vogel A B, Kanevsky I, Che Y, et al. A prefusion SARS-CoV-2 spike RNA vaccine is highly immunogenic and prevents lung infection in non-human primates. [bioRxiv](#), 2020.09.08.280818
- 40 Corbett K S, Edwards D, Leist S R, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine development enabled by prototype pathogen preparedness. [bioRxiv](#), 2020.06.11.145920
- 41 Corbett K S, Flynn B, Foulds K E, et al. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. [N Engl J Med](#), 2020, 383: 1544–1555
- 42 Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. [Science](#), 1990, 247: 1465–1468
- 43 Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. [Vaccine](#), 2007, 25: 5563–5576
- 44 Atherton M J, Morris J S, McDermott M R, et al. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. [Vet Immunol Immunopathol](#), 2016, 169: 15–26
- 45 Hobernik D, Bros M. DNA vaccines—How far from clinical use? [Int J Mol Sci](#), 2018, 19: 3605
- 46 Zhao K, Shi X, Zhao Y, et al. Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. [Vaccine](#), 2011, 29: 8549–8556
- 47 Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, et al. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. [J Control Release](#), 2012, 160: 495–501
- 48 Ferraro B, Morrow M P, Hutnick N A, et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. [Clin Infect Dis](#), 2011, 53: 296–302
- 49 Kulkarni V, Rosati M, Bear J, et al. Comparison of intradermal and intramuscular delivery followed by *in vivo* electroporation of SIV Env DNA in macaques. [Hum Vaccin Immunother](#), 2013, 9: 2081–2094
- 50 Hooper J W, Moon J E, Paolino K M, et al. A phase I clinical trial of Hantaan virus and Puumala virus M-segment DNA vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome delivered by intramuscular electroporation. [Clin Microbiol Infect](#), 2014, 20: 110–117
- 51 Nilsson C, Hejdeman B, Godoy-Ramirez K, et al. HIV-DNA given with or without intradermal electroporation is safe and highly immunogenic in healthy Swedish HIV-1 DNA/MVA vaccinees: a phase I randomized trial. [PLoS ONE](#), 2015, 10: e0131748
- 52 Prausnitz M R. Engineering microneedle patches for vaccination and drug delivery to skin. [Annu Rev Chem Biomol Eng](#), 2017, 8: 177–200
- 53 Kim Y C, Park J H, Prausnitz M R. Microneedles for drug and vaccine delivery. [Adv Drug Deliv Rev](#), 2012, 64: 1547–1568
- 54 Meng F, Hasan A, Mahdi Nejadi Babadaei M, et al. Polymeric-based microneedle arrays as potential platforms in the development of drugs delivery systems. [J Adv Res](#), 2020, 26: 137–147
- 55 de Groot A M, Platteel A C M, Kuijt N, et al. Nanoporous microneedle arrays effectively induce antibody responses against diphtheria and tetanus toxoid. [Front Immunol](#), 2017, 8: 1789
- 56 Rajabi M, Roxhed N, Shafagh R Z, et al. Flexible and stretchable microneedle patches with integrated rigid stainless steel microneedles for transdermal biointerfacing. [PLoS ONE](#), 2016, 11: e0166330
- 57 Alarcon J B, Hartley A W, Harvey N G, et al. Preclinical evaluation of microneedle technology for intradermal delivery of influenza vaccines. [Clin Vaccine Immunol](#), 2007, 14: 375–381
- 58 Zhu Q, Zarnitsyn V G, Ye L, et al. Immunization by vaccine-coated microneedle arrays protects against lethal influenza virus challenge. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2009, 106: 7968–7973
- 59 Shah M A A, He N, Li Z, et al. Nanoparticles for DNA vaccine delivery. [J Biomed Nanotechnol](#), 2014, 10: 2332–2349
- 60 Jones D H, Corris S, McDonald S, et al. Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. [Vaccine](#), 1997, 15: 814–817
- 61 Yu D M, Li W, Zhang Y, et al. Anti-tumor efficiency of paclitaxel and DNA when co-delivered by pH responsive ligand modified nanocarriers

- for breast cancer treatment. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 1428–1435
- 62 Tebas P, Yang S P, Boyer J D, et al. Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of an open-label, Phase 1 clinical trial. *Eclinicalmedicine*, 2021, 31: 100689
- 63 Trimble C L, Morrow M P, Kraynyak K A, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*, 2015, 386: 2078–2088
- 64 Colombo G L, Matteo S D, Mir L M. Cost-effectiveness analysis of electrochemotherapy with the CliniporatorTM vs other methods for the control and treatment of cutaneous and subcutaneous tumors. *Ther Clin Risk Manag*, 2008, 4: 541–548
- 65 Ricotti F, Giuliadori K, Cataldi I, et al. Electrochemotherapy: an effective local treatment of cutaneous and subcutaneous melanoma metastases. *Dermatol Ther*, 2014, 27: 148–152
- 66 Mackett M, Smith G L, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 7415–7419
- 67 Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr Opin Biotech*, 2007, 18: 546–556
- 68 Crystal R G. Adenovirus: the first effective *in vivo* gene delivery vector. *Hum Gene Ther*, 2014, 25: 3–11
- 69 Renaut L, Colin M, Leite J P G, et al. Abolition of hCAR-dependent cell tropism using fiber knobs of *Atadenovirus* serotypes. *Virology*, 2004, 321: 189–204
- 70 Zhang S, Huang W, Zhou X, et al. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenoviruses type-5 and type-26 and chimpanzee adenovirus type-68 in healthy Chinese adults. *J Med Virol*, 2013, 85: 1077–1084
- 71 Santra S, Sun Y, Koriath-Schmitz B, et al. Heterologous prime/boost immunizations of rhesus monkeys using chimpanzee adenovirus vectors. *Vaccine*, 2009, 27: 5837–5845
- 72 Voysey M, Clemens S A C, Madhi S A, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*, 2021, 397: 99–111
- 73 Abbink P, Lemckert A A C, Ewald B A, et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol*, 2007, 81: 4654–4663
- 74 Logunov D Y, Dolzhikova I V, Shcheblyakov D V, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, 397: 671–681

Nucleic acid-based vaccines of COVID-19 and their delivery systems

YANG HaiYin¹, ZHANG MengJie¹, WENG YuHua^{1,2}, CAO Yi³ & HUANG YuanYu¹

¹*School of Life Science, Advanced Research Institute of Multidisciplinary Science, Institute of Engineering Medicine, Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotherapy, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;*

²*Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China;*

³*School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China*

At the end of 2019, COVID-19 rapidly spread around the world and had a major impact on the global economy and people's health. According to the World Health Organization (WHO), as of 1 March 2021, more than 100 million people have been diagnosed and 2 million are died because of this pandemic. Fortunately, several vaccines against COVID-19 have been authored for emergency use, including two mRNA vaccines. Nucleic acid-based vaccines, which include mRNA vaccines and DNA vaccines, have shown great advantages in preventing the current COVID-19 than traditional vaccines, such as inactive vaccines, regarding their development rate, manufacture, cost, flexibility for adapting to mutant strains. In this review, the working mechanisms and delivery systems of the nucleic acid-based vaccines and recombinant virus vector-based vaccines are elaborately reviewed and discussed. Moreover, the challenges and future research directions in the field of nucleic acid-based vaccines are also prospected.

COVID-19, mRNA vaccine, DNA vaccine, recombinant virus vector-based vaccine, delivery systems

doi: [10.1360/SSV-2021-0051](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0051)