

综述

mRNA疫苗在人和动物重大疫病防控中的研究进展

高嘉淇¹, 赵献军^{1,2}, 华进联^{1,*}

¹西北农林科技大学动物医学院, 陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100; ²百欧派(天津)生物技术有限公司, 天津 300350

摘要: 已有大量研究证明mRNA疫苗具有安全性高、免疫效果好、开发潜力大等优点, 在免疫治疗中是一种应用前景广阔的治疗策略。近年来, 通过技术创新, mRNA疫苗的稳定性与体内递送效率大幅提高, 目前一些mRNA疫苗已进入临床前试验。本文就mRNA疫苗的研究概况、技术以及在人和动物重大传染病中的应用三个方面对mRNA疫苗进展进行概述, 以期为推进新型mRNA疫苗的研发提供参考。

关键词: mRNA疫苗; 传染病; 递送系统

Progress on mRNA vaccine for the prevention of major infectious diseases in humans and animals

GAO Jia-Qi¹, ZHAO Xian-Jun^{1,2}, HUA Jin-Lian^{1,*}

¹Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center; College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China; ²Baioupai (Tianjin) Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300350, China

Abstract: A large number of studies have demonstrated that mRNA vaccine has been characterized as a technique with good safety, strong immunogenicity and high developmental potential, which makes it have broad prospects in immunotherapy. In recent years, the stability and *in vivo* delivery efficiency of mRNA vaccines have been largely addressed by the progresses in mRNA engineering and delivery innovation. And some mRNA vaccines are now clinical approved or in preclinical trials. Here, we summarize current knowledge on the research advances, technology, and application in major infectious diseases in humans and animals of mRNA vaccines, with the aim to provide a reference for improving the development of novel mRNA vaccines.

Key words: mRNA vaccine; infectious diseases; delivery system

mRNA疫苗是将合成的编码蛋白质抗原的mRNA序列递送至体内, 指导机体表达产生相应的蛋白质, 并诱导机体产生针对该蛋白的免疫应答, 以实现疾病的治疗及预防^[1]。相比于传统疫苗, mRNA疫苗具有诸多优势: 安全性高, 在生产过程中无病原体及抗生素的使用, 同时mRNA疫苗无需整合到宿主基因组中, 避免了插入突变的风险; 免疫原性强, 能够同时激活细胞免疫和体液免疫; 抗

原表达效率高, 因其无需进入细胞核, 在细胞质中即可快速翻译, 翻译效率是DNA的数倍; 开发潜力高, 其制备工艺简单, 易规模化生产^[2]。但是由于mRNA自身稳定性较差且递送效率较低, 早些年mRNA疫苗并没有被重视。近年来, 通过研究与优化mRNA、开发有效的体内递送系统、调整给药途径等方法, mRNA疫苗技术日趋成熟。

人和动物传染病一直严重影响着健康与食品安

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32072806), the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFD1302201), the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2022NY-044) and a Project from Baioupai (Tianjin) Biotechnology Co., Ltd. (No. K4040121281).

*Corresponding author. Tel: +86-29-87091117; E-mail: jinlianhua@nwsuaf.edu.cn

全^[3], 2019年非洲猪瘟病毒(African Swine fever virus, ASFV)导致中国近一半的猪群死亡, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[4]。同年由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-Cov-2)引起的新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)的持续大流行在全球范围内严重威胁着人类健康^[5]。值得关注的是, 超过60%的人类病原体起源于人畜共患病, 目前通过接种疫苗来预防疾病被认为是针对传染病最有效的干预方式^[6]。mRNA疫苗因其研发周期较短、生产过程简单和诱导强烈免疫反应的能力而成为当前的研究热点^[7]。虽然目前临床上针对狂犬病^[8, 9]、流感病毒^[10, 11]、埃博拉病毒^[12, 13]、寨卡病毒^[14, 15]和登革热病毒^[16, 17]等各种人和动物传染病的mRNA疫苗已进入临床前研究或临床试验, 但还未应用于临床治疗。

1 mRNA疫苗的研究概况

mRNA疫苗属于一种核酸疫苗, 在过去的30年中, 对mRNA疫苗的研究已有了一定的进展^[18]。传统疫苗生产过程耗时太长且后续防控效果一般, 有再次感染的风险, 所以核酸疫苗以及mRNA疫苗逐渐兴起, 近年来研究人员不断进行临床试验, mRNA疫苗取得了一些突破性进展(图1)。mRNA疫苗有望克服传统疫苗的缺陷。

1.1 mRNA疫苗的发展

1961年, Brenner等^[19]首次描述了mRNA分子, 由于mRNA分子的高度不稳定性, 直到1969年Lockard等^[20]才第一次在分离的mRNA中合成蛋白质。1978年, Dimitriadis^[21]和Ostro等^[22]尝试使用单分子脂质体包裹外源性mRNA以避免核酸酶降解, 并将其输送到人类上皮癌细胞和小鼠脾脏淋巴细胞中, 发现合成了类似球蛋白的蛋白质。1984年, Krieg和Stump等^[23–25]率先使用SP6 RNA聚合酶在体外成功转录和合成mRNA, 为随后的体外mRNA研究奠定了基础。随后, 1989年Felgner等^[26, 27]将mRNA用阳离子脂质包裹后转染到多种细胞系, 建立了mRNA体外表达的高效系统。1990年, Wolff等^[28]将编码氯霉素乙酰转移酶、荧光素酶和 β -半乳糖苷酶的mRNA注射到小鼠骨骼肌中, 证明了体外转录mRNA可以在机体组织内表达相应的蛋白质, 为mRNA治疗研究拉开序幕。1993年, Martinon等^[29]用编码流感病毒核蛋白(nucleoprotein,

NP)的mRNA-脂质体制剂免疫小鼠后, 在宿主中诱导了抗流感细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)的产生, 从而标志着第一种mRNA疫苗开发成功。然而, mRNA分子本身不稳定, 在体内易被降解, 自身免疫原性高以及体内递送效率低等因素限制了mRNA疫苗的发展。直到2005年, Karikó等^[30, 31]将假尿苷加入到人工合成的mRNA, 通过改变mRNA的密码子从而使mRNA躲过细胞的固有免疫防御, 避免激活Toll样受体所引起的免疫应答, 并且显著增强了mRNA表达蛋白的能力, 开创了mRNA疫苗的新时代。2017年, Sahin等^[32]建立针对人类黑色素瘤的mRNA个性化疫苗的首次临床试验。自从COVID-19爆发, 2020年, 由Moderna和BioNTech分别生产的两种mRNA-LNP疫苗BNT162b2和mRNA-1273获得紧急使用权限^[1, 33], 并获得良好的效果。脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)成为目前主流的递送系统, 2021年, Alameh等^[34]鉴定了COVID-19 mRNA疫苗中LNPs的佐剂活性。目前已经有越来越多针对mRNA疫苗的研究, 期望可以在预防寄生虫感染、抗肿瘤治疗以及预防传染病中发挥更大的作用^[35, 36]。

1.2 mRNA疫苗的分类与结构

合成mRNA通常是通过体外转录(*in vitro* transcription, IVT)过程产生的, 该过程利用线性DNA模板和RNA聚合酶(T7)等模拟自然细胞转录过程中合成mRNA, 通过纯化去除未反应的成分或双链RNA污染物后即可使用(图2)。mRNA疫苗主要分为非复制mRNA(non-replicating mRNA, NRM)、自我扩增mRNA(self-amplifying mRNA, SAM)以及环状RNA(circular RNA, CircRNA)三类^[1, 37]。

传统的NRM疫苗结构从5'到3'末端依次为5'帽子结构(5' Cap m7Gp3N)、5'非编码区(untranslated region, UTR)、编码疫苗抗原的开放阅读框架(open reading frame, ORF)、3' UTR、poly(A)尾巴^[38]。在ORF处插入目的抗原基因即可完成mRNA疫苗的构建。相对于SAM疫苗, NRM疫苗的显著优势是体积小, 结构简单, 但是它容易被RNA酶降解, 体内活性较低^[39]。

SAM疫苗是一种以甲病毒为基础, 在细胞内能够自行复制表达的疫苗, 除含有5' Cap、5' UTR、3' UTR、poly(A)尾等结构外, 还含有两个ORF和26S亚基因启动子原件。与NRM相比, SAM疫苗

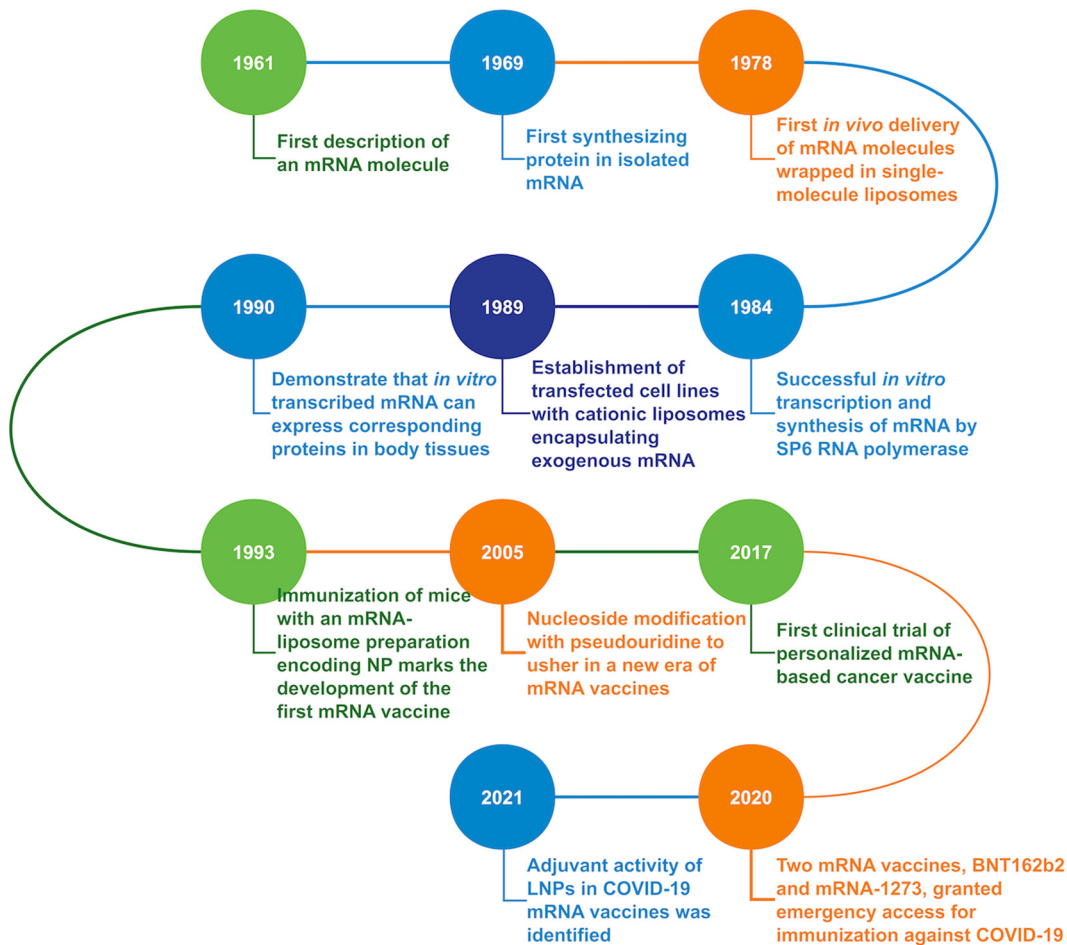


图 1. mRNA疫苗发展时间线

Fig. 1. Timeline of mRNA vaccine development. NP: nucleoprotein; LNPs: lipid nanoparticles; COVID-19: Corona Virus Disease 2019.

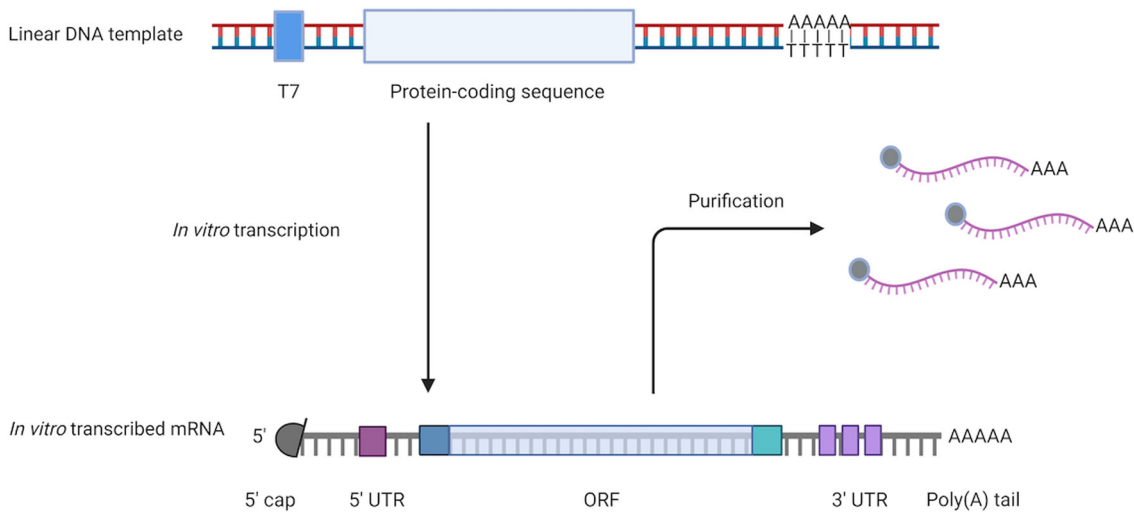


图 2. mRNA体外合成

Fig. 2. mRNA synthesis *in vitro*. The diagram shows the *in vitro* synthesis of mRNA, which uses linear DNA template and RNA polymerase (T7) *etc.* to mimic the synthesis of mRNA during natural cellular transcription, which can be used after removing unreacted components or double-stranded RNA contaminants by purification. UTR: untranslated region; ORF: open reading frame. Created with BioRender.com.

诱导的抗原产量显著提升，持续时间以及免疫应答时间大幅延长^[40]。

CircRNA 是一种高度稳定的具有封闭环状结构的非编码 RNA 分子。与线性 mRNA 相比，CircRNA 不具有 5' Cap 和 3' poly(A) 结构，同时不受 RNA 外切酶影响，不易降解且表达更稳定，据研究显示，CircRNA 的半衰期至少比线性 mRNA 长 2.5 倍^[41–44]。虽然 CircRNA 缺乏帽依赖性翻译的必须元件，但它可以通过内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 或结合 ORF 上游的 N6- 甲基腺苷 (m6A) 修饰来实现蛋白质翻译。COVID-19 爆发后，Qu 等^[45] 开发了针对 SARS-CoV-2 及其新兴变种的 CircRNA 疫苗，通过 CircRNA 表达棘突蛋白的受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 作为抗原，成功诱导了小鼠和恒河猴对 SARS-CoV-2 的强效中和 T 细胞反应。

2 mRNA疫苗技术

mRNA 疫苗的特征见表 1。因稳定性差，体内递送效率低^[46] 以及较高的先天免疫原性而在早期不被看好，经过近年不断的技术创新与研究，mRNA

疫苗已成为疫苗开发领域非常有前景的治疗工具。

2.1 mRNA合成修饰

目前主要通过以下三种方式来增强 mRNA 的稳定性及翻译效率，合成修饰效果见表 2。

(1) 5' Cap 修改：5' Cap 结构可防止 mRNA 被外切酶降解，从而保持 mRNA 稳定性并实现翻译启动。根据甲基化程度，三种主要帽结构为 Cap 0、Cap 1、Cap 2^[47]。然而 Cap 0 的 mRNA 可能会被宿主识别为外源 RNA，导致宿主的先天性免疫反应启动，触发炎症反应。Cap 1 可以减少模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 的激活，从而提高 mRNA 在体内的翻译效率。Cap 2 可以提高 mRNA 的翻译效率^[48, 49]。目前 Cap 1 结构最常用于 mRNA 加帽^[50]，通过转录过程中加入过量的 Cap 类似物或转录后使用牛痘病毒加帽酶进行加帽^[51, 52]，使 mRNA 产生 Cap 1，从而将 mRNA 标记为“自身 RNA”，使其免受免疫系统攻击并且增强翻译。

(2) 修饰 3' poly(A) 尾：poly(A) 尾是大多数成熟哺乳动物 mRNA 的 3' 末端的一段腺苷酸残基，它可以与多聚 (A) 结合蛋白 (poly A binding proteins, PABPs) 形成细胞质核糖核蛋白 (ribonucleoprotein,

表1. mRNA疫苗的特征
Table 1. Characteristics of mRNA vaccines

Vaccine type	Advantages	Disadvantages
mRNA vaccine	1. High safety, no pathogens and antibiotics are used in the production process, while mRNA vaccines do not need to be integrated into the host genome, avoiding the risk of insertional mutations.	1. mRNA is unstable on its own and is susceptible to enzymatic degradation <i>in vivo</i> .
	2. High immunogenicity, capable of activating both cellular and humoral immunity.	2. Low delivery efficiency <i>in vivo</i> , influenced by its own size and molecular weight.
	3. High efficiency of antigen expression, as it can be rapidly translated in the cytoplasm without entering the nucleus, and the translation efficiency is several times higher than that of DNA.	3. Low translation efficiency, double-stranded RNA (dsRNA) is produced during transcription <i>in vitro</i> , which affects the translation process.
	4. High development potential, and its preparation process is simple and easy to produce on a large scale.	4. Inconvenient transportation, due to its instability, it needs to be stored and transported under low temperature conditions.

The table shows the advantages and disadvantages of mRNA vaccines.

表2. mRNA合成修饰及效果
Table 2. mRNA synthetic modifications and effects

Structural element	Modification	Effect
5' Capping	Cap structure	Increase protein synthesis and stability ^[50]
Poly(A) tail	Tail elongation	Increase stability and translational efficiency ^[54]
Nucleoside	Modify mRNA transcripts with alternative nucleotides	Reduce innate immune activation and increase translational capacity ^[58]

The table shows the modifications to the three sites of mRNA and the corresponding effects.

RNP) 复合物^[53]。这种相互作用对于高效翻译和控制 mRNA 稳定性是非常必要的。当 mRNA 到达细胞质, poly(A) 尾 RNP 复合物与 5' Cap 协同作用, 可以和真核翻译起始因子 4F (eukaryotic initiation factor 4F, eIF4F) 复合物形成稳定的闭环结构, 从而促进翻译起始^[54]。因此, poly(A) 尾的存在对于有效的蛋白质表达是必不可少的。此外, poly(A) 还可以通过防止外切酶降解来稳定 mRNA 分子。目前主要是通过 DNA 模版上设计固定长度的 poly(A) 序列并转录由此生成长度可控的 poly(A) 尾。

(3) 替代核苷酸修饰: 自然界中很多 RNA 都发生了转录后修饰, 目前已确定的 RNA 合成后修饰多达 150 多种^[55], 宿主免疫系统可以很容易地识别未经修饰的 mRNA, 并将其作为外源 RNA, 从而诱导炎症反应并中断 mRNA 翻译^[56, 57]。在 mRNA 中常用的核苷酸修饰策略是在体外合成 mRNA 时, 利用假尿苷 (Ψ)、1- 甲基假尿苷 (m 1Ψ) 和 5- 甲基胞苷 (m $5C$) 替代天然尿苷和胞苷来进行转录反应^[58]。

2.2 mRNA疫苗递送系统

mRNA 的分子量大并带有负电荷, 很难通过细胞膜的磷脂双分子层, 在体内易被核酸酶降解, 因此开发了各种用于包裹 mRNA 的运载工具。目前脂质体载体被广泛应用于 mRNA 的递送, 但是这类载体具有一系列潜在缺点, 例如具有体内毒性、对抗原呈递细胞缺乏靶向性等^[59, 60], 因此目前更多的研究集中在优化与设计更理想的载体。

2.2.1 LNPs

LNPs 是研究最多的 mRNA 递送系统。LNPs 是一种纳米囊泡, 类似细胞膜的脂质结构, 由四个组分组成: 胆固醇、中性磷脂、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)- 脂质和可电离脂质^[61]。其核心空腔可以实现对 mRNA 的包裹。最早在 1989 年, Malone 等^[26, 27] 就将 mRNA 用阳离子脂质包裹后转染到多种细胞系。目前 Pfizer-BioNTech 和 Moderna 公司开发的两款广泛使用的 mRNA 新型冠状病毒疫苗即以 LNPs 为载体^[62]。

2.2.2 生物膜基载体

呼吸道疾病是全球发病和死亡的主要原因之一, 尽管 LNPs 作为新型冠状病毒疫苗的递送系统已取得了很好的效果, 但是由于肺的自我保护屏障, 其在肺实质和支气管中的分布存在很大限制。已有一些研究证明了外泌体可以作为吸入治疗和 RNA 输送载体^[63, 64], 2022 年, Popowski 等^[65] 用肺源性

外泌体作为 mRNA 的递送系统在小鼠和非人类灵长类动物中进行试验。研究表明相对于 LNPs 而言, 肺源性外泌体有效地避免了黏液黏附, 并且在肺部保持了更高浓度的 mRNA 和蛋白质沉积、保留和分布。同时 Popowski 等还配制了 S-Exo (SARS-CoV-2 spike protein encoding mRNA-loaded Lung-Exos) 冻干粉并验证了其在室温条件下储存一个月仍然有效。肺源性外泌体作为一种在室温稳定的纳米颗粒药物递送系统, 可用于许多肺部疾病的治疗。

2.2.3 复合佐剂纳米胶囊

Liu 等^[59] 发明了一种复合佐剂以及基于复合佐剂的 mRNA 纳米疫苗, 该佐剂由连接有胞嘧啶 - 磷酸 - 鸟嘌呤 (CpG) 的 DNA 四面体 (CpG-tFNA) 和小鼠 β - 防御素 2 (murine β defensin 2, mDF2 β) 复合而成。tFNA 是一种新兴的三维载体, 具有出色的细胞渗透性和生物安全性, mDF2 β 是一种宿主防御肽 (host defense peptide, HDP), 与树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 表达的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 相互作用。基于静电作用, 带负电荷的 CpG-tFNA 和带正电荷的 mDF2 β 结合在一起, 形成双佐剂纳米胶囊 CpG-tFNA-mDF2 β , 同时带负电荷的 mRNA 被自组装到带正电荷的纳米胶囊上, 最终形成双佐剂 mRNA 纳米疫苗。研究表明该 mRNA 纳米疫苗可被 DCs 内化并促进其成熟, 成熟的 DCs 分泌细胞因子并在细胞膜上表达共刺激分子, 随后迁移至 T 细胞中呈递抗原, 活化的抗原特异性 CD8⁺ T 细胞迁移至外周并渗透早期肿瘤组织, 识别、攻击肿瘤细胞, 最终抑制肿瘤的发生和生长。同时该研究的 mRNA 是位于整个疫苗结构之外的, 不同于传统的递送系统, 例如 LNPs 是将 mRNA 包裹在其中, 这在一定程度上保护了 mRNA 的稳定性, 但是也有可能抑制 mRNA 的转录^[59]。相信通过更多的研究可以进一步优化 mRNA 与递送系统之间的相互作用。

3 mRNA疫苗在人和动物传染病防控中的应用

目前, 大多数 mRNA 疫苗主要应用于重要的新发人畜共患病, 如狂犬病、流感、寨卡病、猴痘、艾滋病以及巨细胞病毒感染症等, 针对兽医领域开发的 mRNA 疫苗较少。

3.1 狂犬病

狂犬病是一种由狂犬病病毒 (rabies virus, RABV) 引起的人类和动物的急性神经感染, 通常通过动物

叮咬传播。每年狂犬病导致全球约 6 万人死亡^[66]。狂犬病疫苗最初是由路易斯·巴斯德从动物神经组织中制备的。现在细胞培养疫苗占了现有疫苗的绝大部分, 根据生产方法分为四种: 人类二倍体细胞疫苗 (human diploid cell rabies vaccine, HDCV)、纯化鸡胚细胞疫苗 (purified chick embryo cell vaccine, PCECV)、原代仓鼠肾细胞疫苗 (purified hamster kidney cell vaccine, PHKCV) 以及纯化 Vero 细胞狂犬病疫苗 (purified Vero cell rabies vaccine, PVRV)^[67]。虽然目前的狂犬病疫苗是有效的, 但是需要多次接种才能在所有受种者中达到高中和滴度, 而且费用昂贵, 因此有必要开发安全有效、成本较低、接种较少剂量能诱导持续免疫的新疫苗。

Li 等^[68]构建了编码 RABV-G 的 NRM 疫苗 LVRNA001, 用 LNPs 进行包裹后对小鼠和犬进行免疫接种, 在第 14 天和第 35 天收集血液样本进行抗体检测, 并以 50 倍的半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 注射病毒。接种 LVRNA001 疫苗的小鼠和狗呈现出 100% 的存活率, 体内没有检测出 RABV 并且存在高水平抗体, 证明了该疫苗对小鼠和狗的保护作用。

3.2 流感

流感是一种由流感病毒引起的高度传染性的呼吸道疾病, 在鸟类、猪和狗等多种动物物种中传播。除了季节性流行病外, 四次重要大爆发是由流感变种引起的, 包括 1918 年的 H1N1、1957 年的 H2N2、1968 年的 H3N2 和 2009 年的 H1N1^[69, 70]。预防流感病毒的最佳方法是接种疫苗, 但由于流感病毒的高突变性和基因重组能力, 开发更有效以及能诱导普遍免疫的多价疫苗刻不容缓^[71]。

Vogel 等^[72]用表达几种不同血清型的血凝素 (hemagglutinin, HA) 抗原的 SAM 疫苗对小鼠进行免疫, 成功预防了 H1N1 流感病毒。并且与三价灭活流感疫苗相比, 编码 HA 抗原的两剂 mRNA 脂质纳米颗粒诱导的 T 细胞和 B 细胞免疫反应更强。Arevalo 等^[73]开发了一种编码了所有已知的 20 种甲型和乙型流感病毒亚型的 HA 抗原的 mRNA 脂质纳米颗粒 (20-HA mRNA-LNP) 疫苗, 研究证明该疫苗可以同时诱导小鼠和雪貂产生对多种抗原的免疫反应。但还需要进一步研究以充分阐明 20-HA mRNA-LNP 疫苗诱导免疫反应的机制。

3.3 口蹄疫

口蹄疫仍然是中低收入国家由口蹄疫病毒

(foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的最具传染性的偶蹄动物疾病之一。根据抗原特性, FMDV 分为七个血清型 (A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3)^[74]。目前大多数针对口蹄疫的商业疫苗都是化学灭活病毒产生的, 疫苗稳定性差, 免疫原性差且免疫持续时间有限^[75]。

Pulido 等^[76]在小鼠 FMDV 模型中, 使用 FMDV 基因组转录产生的 mRNA 接种小鼠, 发现多只小鼠产生了高滴度的 FMDV 中和抗体, 证明了 FMDV mRNA 疫苗可以诱导对 FMDV 的强烈免疫反应。

3.4 寨卡病

寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 是一种由节肢动物传播的黄病毒, 最初在 1952 年发现了首例人类 ZIKV 感染病例^[77], 在后续半个世纪内一直是零星散发病例, 直到 2007~2017 年间雅浦岛^[78]、法属波利尼西亚^[79]和美洲^[80, 81]出现大规模爆发病例, 针对 ZIKV 的疫苗开始研发, 但到目前为止还没有针对该疾病的许可疫苗。

Medina-Magües 等^[15]构建了 mRNA 疫苗 (ZIKV prM-E mRNA-LNP), 并评估其在 AG129 小鼠模型中的疗效。试验表明接种 ZIKV prM-E mRNA-LNP 诱导了特异性 IgG1 和 IgG2a 同型抗体和 T 细胞反应, 接种致命剂量 ZIKV 的 AG129 小鼠显示出 100% 的生存率, 同时体内病毒量显著下降。接着对小鼠进行预防接种以观察 ZIKV prM-E mRNA-LNP 引起的抗体强度, 结果显示其诱导了高水平的中和抗体, 保护小鼠免受 ZIKV 感染。

3.5 猴痘

猴痘是由猴痘病毒 (Monkeypox virus, MPXV) 引起的人畜共患病, 随着天花的消灭, 猴痘成为现存最为严重的、由正痘病毒引起的疾病。截至 2022 年 6 月 10 日, 包括欧洲和北美在内的 43 个国家报告了 1 500 多例病例^[82]。2022 年 7 月 23 日, 由于世界范围内猴痘感染病例的增加, 世界卫生组织宣布猴痘爆发为全球健康紧急事件。MPXV 主要通过细胞外包膜病毒 (extracellular enveloped virus, EEV) 和细胞内成熟病毒 (intracellular mature virus, IMV) 感染机体, 以前针对 MPXV 的疫苗大多为减毒活病毒疫苗, 而后发现使用来自 EEV 和 IMV 的重组病毒蛋白的亚单位疫苗具有更好的安全性^[83, 84]。

自从 mRNA 疫苗在 SARS-Cov-2 上取得了良好的效果, Yang 等^[85]构建了 3 种表达 MPXV EEV 蛋白 A35R 和 IMV 蛋白 M1R 的 mRNA 疫苗, 其中

VG-Pox 1 和 VG-Pox 2 是单一的 mRNA 分子, 编码由 A35R 的胞外结构域和全长的 M1R 组成的融合蛋白, 两者的区别在于 VG-Pox 2 去除了 A35R 的茎区。而 VG-Pox 3 含有两个单独的 mRNA-LNP 的混合物, 分别编码 A35R 和 M1R。结果显示只有 VG-Pox 1 和 2 可以有效诱导机体的体液免疫和细胞免疫, 并且可以有效中和活病毒感染。研究表明 VG-Pox 1 和 2 可以成为针对猴痘的 mRNA 疫苗。

3.6 艾滋病

艾滋病, 又称为获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS), 是由于机体感染人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 而引发的全身性疾病。它分为两种: HIV-1 和 HIV-2。HIV 属于逆转录病毒科的慢病毒属, 主要通过性接触、体液交换和围产期感染传播^[86], 进入体内后它主要攻击 CD4⁺T 细胞, 从而导致机体对疾病的易感性增加。目前针对艾滋病的治疗方法主要是终身服用抗逆转录病毒药物, 虽然可以有效控制疾病进展, 然而这些药物有许多缺点, 包括副作用、成本以及需要严格遵守服药时间等^[87], 所以需要一种安全有效的治疗或预防性疫苗。

由于 mRNA 技术的最新进步, 其交付方法的改进及其相对于传统疫苗平台的优势, 近年来, 许多关于 HIV-mRNA 疫苗的临床前研究以及临床试验已经发表^[86, 88]。Zhang 等^[89]研发的 HIV-mRNA 疫苗已在小鼠和非人灵长类动物中显示出安全性和有效性, 其能够对靶向细胞进行指令编码, 从而组装形成两种关键 HIV 蛋白: Env 和 Gag 蛋白, 接种这种疫苗的动物肌肉细胞将这两种蛋白质组装起来, 产生病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP)。由于缺少完整的 HIV 基因组, 这些 VLP 无法在接种疫苗的动物体内引发感染或疾病, 然而这些 VLP 会引发强烈的免疫反应。试验表明与未接种疫苗的恒河猴相比, 在接种初始疫苗 (priming vaccine) 以及此后多次接种加强疫苗的恒河猴, 每次接触猿-人类免疫缺陷病毒 (simian-human immunodeficiency virus, SHIV) 后的感染风险下降了 79%。目前仍需要大量研究来评估和进一步改进该 HIV-mRNA 疫苗, 以尽快可以在健康成人志愿者的体内开展该疫苗的一期临床试验。

3.7 巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染症

人类 CMV 属于疱疹病毒, 在高危人群中引起以生殖泌尿系统、中枢神经系统和肝脏疾患为主的

各系统感染。CMV 多表现为隐性感染, 在免疫功能低下的个体中会引起严重的并发症。

John 等^[90]研发了编码 CMV 糖蛋白 gB 和五聚体复合物 (PC) 的 mRNA-LNP 疫苗, 在小鼠和非人类灵长类动物 (non-human primates, NHPs) 中显示出有效而持久的中和抗体滴度。同时 Moderna 公司为育龄妇女的 CMV 感染开发的 mRNA-1647 疫苗在第一阶段和第二阶段的临床试验的中期结果中分析是有效的, 目前已经开始第三期临床试验 (NCT05085366)。该试验的主要目标是评估 mRNA-1647 疫苗在 CMV 血清阴性女性参与者中的疗效, 并评估 mRNA-1647 疫苗在所有参与者中的安全性和免疫原性^[91]。

4 结论与展望

自从 30 年前在临床前试验中首次成功应用 mRNA 疫苗以来^[26], 通过不断的技术创新, 例如对 mRNA 进行合成修饰、建立高效的递送系统以及研究 CircRNA 等, 解决了 mRNA 稳定性差和体内递送效率低等缺点, 使 mRNA 疫苗治疗技术不断成熟。与传统疫苗相比, mRNA 疫苗具有安全性高、免疫原性强、抗原表达效率高、可以快速设计以及开发潜力大等优势。2019 年, COVID-19 的爆发促进 mRNA 疫苗迅速发展^[39], 目前针对狂犬病、流感等人畜共患病的 mRNA 疫苗已经进入临床前试验, 并显示出良好的免疫效果^[68-72, 75, 92], 但是目前尚缺乏有效控制针对家禽和牲畜等动物传染病的疫苗, 如猪繁殖和呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV)、犬瘟热、猫传染性腹膜炎等, 研发 mRNA 疫苗对于预防以上疾病或许有巨大潜力。因此需要加强筛选更有效的靶点和靶标 mRNA 及递送方式的研究。

由于疫苗的不稳定性、成本较高以及递送特异性较低等阻碍了 mRNA 疫苗在兽医领域的应用。目前, 肌肉注射或皮下注射是 mRNA 疫苗的主要输送途径, 为了减轻疫苗接种的压力、疼痛与成本, 经口、经鼻或气溶胶给药逐渐成为动物疫苗的首选途径, 因此, 需要设计新的递送系统以适应非侵入式给药方式。此外, 虽然 mRNA 疫苗的生产相对简单且周期较短, 但是生产过程中的质量控制仍是一个挑战, 如生产过程中质粒纯度、菌株质量、脂质辅料的类型及纯度、杂质以及封盖效率等都会影

响 mRNA 的质量, 所以需要制定质量控制程序并优化生产步骤等措施提高 mRNA 疫苗质量。同时, 还需要在动物试验中进一步评估 mRNA 疫苗的安全性及过敏反应。最后由于需要大面积应用于经济动物, 所以还需进一步降低 mRNA 疫苗生产成本。

本研究组建立了永生化犬脂肪间充质干细胞 (adipose mesenchymal stem cells, ADMSCs) 和多种细胞系, 并且已经展示出它们在免疫介导、2 型糖尿病、肝损伤以及皮肤损伤等相关领域的作用^[93–101]。那么将 ADMSCs 作为 mRNA 递送系统是否可以提高体内输送效率以及抗原表达效率? 本研究组后续将冠状病毒抗原编码的 mRNA 转染 ADMSCs 后输送进宠物犬和猫体内, 观察其是否能使犬和猫产生针对冠状病毒的中和抗体并有效预防冠状病毒疾病。相信在不久的将来, mRNA 疫苗会愈加成熟, 在人和动物重大疫病防控中发挥重要作用。

参考文献

- Fang E, Liu X, Li M, Zhang Z, Song L, Zhu B, Wu X, Liu J, Zhao D, Li Y. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7(1): 94.
- Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov* 2021; 20(11): 817–838.
- Tomley FM, Shirley MW. Livestock infectious diseases and zoonoses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; 364(1530): 2637–2642.
- Liu J, Liu B, Shan B, Wei S, An T, Shen G, Chen Z. Prevalence of African swine fever in China, 2018–2019. *J Med Virol* 2020; 92(8): 1023–1034.
- Majumder J, Minko T. Recent developments on therapeutic and diagnostic approaches for COVID-19. *AAPS J* 2021; 23(1): 14.
- Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, Levy S, Hossain MJ, El Zowalaty ME, Rahman AT, Ashour HM. Zoonotic diseases: etiology, impact, and control. *Microorganisms* 2020; 8(9): 1405.
- Pilkington EH, Suys EJA, Trevaskis NL, Wheatley AK, Zukancic D, Algarni A, Al-Wassiti H, Davis TP, Pouton CW, Kent SJ, Truong NP. From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. *Acta Biomater* 2021; 131: 16–40.
- Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, Stitz L. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(6): e0004746.
- Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, Gottardo R, Bica MA, Garofano A, Koch SD, Fotin-Mleczek M, Hoerr I, Clemens R, von Sonnenburg F. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet* 2017; 390(10101): 1511–1520.
- Wong SS, Webby RJ. An mRNA vaccine for influenza. *Nat Biotechnol* 2012; 30(12): 1202–1204.
- Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, Schlake T, Thess A, Kallen KJ, Stitz L, Kramps T. Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol* 2012; 30(12): 1210–1216.
- Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, McPartlan JS, Tsosie JK, Tilley LD, Sidik SM, Lourido S, Langer R, Bavari S, Ploegh HL, Anderson DG. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(29): E4133–E4142.
- 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 Infect Dis* 2018; 217(3): 451–455.
- Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, Julander JG, Tang WW, Shrestha S, Pierson TC, Ciaramella G, Diamond MS. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell* 2017; 168(6): 1114–1125.e10.
- Medina-Magües LG, Gergen J, Jasny E, Petsch B, Lopera-Madrid J, Medina-Magües ES, Salas-Quinchucua C, Osorio JE. mRNA vaccine protects against Zika virus. *Vaccines (Basel)* 2021; 9(12): 1464.
- Roth C, Cantaert T, Colas C, Prot M, Casadémont I, Levilayer L, Thalmensi J, Langlade-Demoyen P, Gerke C, Bahl K, Ciaramella G, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A. A modified mRNA vaccine targeting immunodominant NS epitopes protects against dengue virus infection in HLA class I transgenic mice. *Front Immunol* 2019; 10: 1424.
- Zhang M, Sun J, Li M, Jin X. Modified mRNA-LNP vaccines confer protection against experimental DENV-2 infection in mice. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020; 18: 702–712.
- Wang KL (汪楷丽), Wang X, Jiang D, Pei Y, Wang Z, Zhou X, Wu J, Mo X, Wang H. Delivery of mRNA vaccines through non-invasive transcutaneous route effectively inhibits tumor growth. *Compos Part B-Eng (复合材料B:工*

- 程) 2022; 233: 109648 (in Chinese).
- 19 Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 1961; 190: 576–581.
 - 20 Lockard RE, Lingrel JB. The synthesis of mouse hemoglobin beta-chains in a rabbit reticulocyte cell-free system programmed with mouse reticulocyte 9S RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 37(2): 204–212.
 - 21 Dimitriadis GJ. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. *Nature* 1978; 274(5674): 923–924.
 - 22 Ostro MJ, Giacomoni D, Lavelle D, Paxton W, Dray S. Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome-mediated insertion into a human cell line. *Nature* 1978; 274(5674): 921–923.
 - 23 Krieg PA, Melton DA. Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* 1984; 12(18): 7057–7070.
 - 24 Krieg PA, Melton DA. *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol* 1987; 155: 397–415.
 - 25 Stump WT, Hall KB. SP6 RNA polymerase efficiently synthesizes RNA from short double-stranded DNA templates. *Nucleic Acids Res* 1993; 21(23): 5480–5484.
 - 26 Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(16): 6077–6081.
 - 27 Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(21): 7413–7417.
 - 28 Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247(4949 Pt 1): 1465–1468.
 - 29 Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magné R, Gomard E, Guillet JG, Lévy JP, Meulien P. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 1993; 23(7): 1719–1722.
 - 30 Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 12542–12550.
 - 31 Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. 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.
 - 32 Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, Bukur V, Tadmor AD, Luxemburger U, Schrörs B, Omokoko T, Vormehr M, Albrecht C, Paruzynski A, Kuhn AN, Buck J, Heesch S, Schreeb KH, Müller F, Ortseifer I, Vogler I, Godehardt E, Attig S, Rae R, Breitkreuz A, Tolliver C, Suchan M, Martic G, Hohberger A, Sorn P, Diekmann J, Ciesla J, Waksman O, Brück AK, Witt M, Zillgen M, Rothermel A, Kasemann B, Langer D, Bolte S, Diken M, Kreiter S, Nemecek R, Gebhardt C, Grabbe S, Höller C, Utikal J, Huber C, Loquai C, Türeci Ö. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017; 547(7662): 222–226.
 - 33 Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: first approval. *Drugs* 2021; 81(4): 495–501.
 - 34 Alameh MG, Tombácz I, Bettini E, Lederer K, Sittplangkoon C, Wilmore JR, Gaudette BT, Soliman OY, Pine M, Hicks P, Manzoni TB, Knox JJ, Johnson JL, Laczkó D, Muramatsu H, Davis B, Meng W, Rosenfeld AM, Strohmeier S, Lin PJC, Mui BL, Tam YK, Karikó K, Jacquet A, Krammer F, Bates P, Cancro MP, Weissman D, Luning Prak ET, Allman D, Locci M, Pardi N. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity* 2021; 54(12): 2877–2892.e7.
 - 35 You H, Jones MK, Gordon CA, Arganda AE, Cai P, Al-Wassiti H, Pouton CW, McManus DP. The mRNA vaccine technology era and the future control of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 2023; 36(1): e0024121.
 - 36 Yuan Y, Gao F, Chang Y, Zhao Q, He X. Advances of mRNA vaccine in tumor: a maze of opportunities and challenges. *Biomark Res* 2023; 11(1): 6.
 - 37 Wang Y, Zhang Z, Luo J, Han X, Wei Y, Wei X. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Mol Cancer* 2021; 20(1): 33.
 - 38 Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *NPJ Vaccines* 2020; 5: 11.
 - 39 Chakraborty C, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee SS. From COVID-19 to cancer mRNA vaccines: moving from bench to clinic in the vaccine landscape. *Front Immunol* 2021; 12: 679344.
 - 40 Ni B (尼博), Li YH, Liu FX, Wei R. Progress in mRNA vaccine and its application in controlling infectious diseases. *Chin J Vet Sci (中国兽医学报)* 2022; 42(3): 600–606 (in Chinese).
 - 41 Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 2013; 495(7441): 333–338.
 - 42 Enuka Y, Lauriola M, Feldman ME, Sas-Chen A, Ulitsky I,

- Yarden Y. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(3): 1370–1383.
- 43 Holdt LM, Kohlmaier A, Teupser D. Circular RNAs as therapeutic agents and targets. *Front Physiol* 2018; 9: 1262.
 - 44 Chen X, Lu Y. Circular RNA: Biosynthesis *in vitro*. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9: 787881.
 - 45 Qu L, Yi Z, Shen Y, Lin L, Chen F, Xu Y, Wu Z, Tang H, Zhang X, Tian F, Wang C, Xiao X, Dong X, Guo L, Lu S, Yang C, Tang C, Yang Y, Yu W, Wang J, Zhou Y, Huang Q, Yisimayi A, Liu S, Huang W, Cao Y, Wang Y, Zhou Z, Peng X, Wang J, Xie XS, Wei W. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell* 2022; 185(10): 1728–1744.e16.
 - 46 Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Mol Cancer* 2021; 20(1): 41.
 - 47 Schlake T, Thess A, Thran M, Jordan I. mRNA as novel technology for passive immunotherapy. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(2): 301–328.
 - 48 Pelletier J, Schmeing TM, Sonenberg N. The multifaceted eukaryotic cap structure. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2021; 12(2): e1636.
 - 49 Akichika S, Hirano S, Shichino Y, Suzuki T, Nishimasu H, Ishitani R, Sugita A, Hirose Y, Iwasaki S, Nureki O, Suzuki T. Cap-specific terminal N⁶-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science* 2019; 363(6423): eaav0080.
 - 50 Kwon H, Kim M, Seo Y, Moon YS, Lee HJ, Lee K, Lee H. Emergence of synthetic mRNA: *In vitro* synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials* 2018; 156: 172–193.
 - 51 Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(16): 7511–7526.
 - 52 Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol* 2020; 65: 14–20.
 - 53 Yu S, Kim VN. A tale of non-canonical tails: gene regulation by post-transcriptional RNA tailing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(9): 542–556.
 - 54 Goss DJ, Kleiman FE. Poly(A) binding proteins: are they all created equal? *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013; 4(2): 167–179.
 - 55 Fisher AJ, Beal PA. Structural basis for eukaryotic mRNA modification. *Curr Opin Struct Biol* 2018; 53: 59–68.
 - 56 Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque A, Henderson JM, Hendel A, Shore S, Antony JS, Hogrefe RI, Kormann MSD, Porteus MH, McCaffrey AP. Uridine depletion and chemical modification increase Cas9 mRNA activity and reduce immunogenicity without HPLC purification. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 12: 530–542.
 - 57 Isaacs A, Cox RA, Rotem Z. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon. *Lancet* 1963; 2(7299): 113–116.
 - 58 Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T. N¹-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.
 - 59 Liu Y, Li S, Lin S, Shi S, Tian T, Zhang B, Zhang T, Lin Y. A tetrahedral framework nucleic acid based multifunctional nanocapsule for tumor prophylactic mRNA vaccination. *Chin Chem Lett* 2022: 107987.
 - 60 Chen J, Ye Z, Huang C, Qiu M, Song D, Li Y, Xu Q. Lipid nanoparticle-mediated lymph node-targeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust CD8⁺ T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(34): e2207841119.
 - 61 Feng C, Li Y, Ferdows BE, Patel DN, Ouyang J, Tang Z, Kong N, Chen E, Tao W. Emerging vaccine nanotechnology: From defense against infection to sniping cancer. *Acta Pharm Sin B* 2022; 12(5): 2206–2223.
 - 62 Gu PP (顾盼盼), Gao T, Liu YJ, Zhang N. Research progress of nano delivery system in mRNA tumor vaccines. *Acta Pharm Sin (药学报)* 2022; 57(8): 2327–2333 (in Chinese).
 - 63 Dinh PC, Paudel D, Brochu H, Popowski KD, Gracieux MC, Cores J, Huang K, Hensley MT, Harrell E, Vandergriff AC, George AK, Barrio RT, Hu S, Allen TA, Blackburn K, Caranasos TG, Peng X, Schnabel LV, Adler KB, Lobo LJ, Goshe MB, Cheng K. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nat Commun* 2020; 11(1): 1064.
 - 64 Zhang D, Lee H, Wang X, Rai A, Groot M, Jin Y. Exosome-mediated small RNA delivery: a novel therapeutic approach for inflammatory lung responses. *Mol Ther* 2018; 26(9): 2119–2130.
 - 65 Popowski KD, Moatti A, Scull G, Silkstone D, Lutz H, López de Juan Abad B, George A, Belcher E, Zhu D, Mei X, Cheng X, Cislo M, Ghodsi A, Cai Y, Huang K, Li J, Brown AC, Greenbaum A, Dinh PC, Cheng K. Inhalable dry powder mRNA vaccines based on extracellular vesicles. *Matter* 2022; 5(9): 2960–2974.
 - 66 Jackson AC. Rabies: a medical perspective. *Rev Sci Tech* 2018; 37(2): 569–580.
 - 67 Fisher CR, Schnell MJ. New developments in rabies vaccination. *Rev Sci Tech* 2018; 37(2): 657–672.
 - 68 Li J, Liu Q, Liu J, Wu X, Lei Y, Li S, Zhao D, Li Z, Luo L, Peng S, Ou Y, Yang H, Jin J, Li Y, Peng Y. An mRNA-based

- rabies vaccine induces strong protective immune responses in mice and dogs. *Virol J* 2022; 19(1): 184.
- 69 Jester BJ, Uyeki TM, Jernigan DB. Fifty years of influenza A(H3N2) following the pandemic of 1968. *Am J Public Health* 2020; 110(5): 669–676.
 - 70 Shrestha SS, Swerdlow DL, Borse RH, Prabhu VS, Finelli L, Atkins CY, Owusu-Edusei K, Bell B, Mead PS, Biggerstaff M, Brammer L, Davidson H, Jernigan D, Jhung MA, Kamimoto LA, Merlin TL, Nowell M, Redd SC, Reed C, Schuchat A, Meltzer MI. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009–April 2010). *Clin Infect Dis* 2011; 52 Suppl 1: S75–S82.
 - 71 Rcheulishvili N, Papukashvili D, Liu C, Ji Y, He Y, Wang PG. Promising strategy for developing mRNA-based universal influenza virus vaccine for human population, poultry, and pigs- focus on the bigger picture. *Front Immunol* 2022; 13: 1025884.
 - 72 Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, Busse D, Erbar S, Reuter KC, Wicke L, Perkovic M, Beissert T, Haas H, Reece ST, Sahin U, Tregoning JS. Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mrna vaccines but at much lower doses. *Mol Ther* 2018; 26(2): 446–455.
 - 73 Arevalo CP, Bolton MJ, Le Sage V, Ye N, Furey C, Muramatsu H, Alameh MG, Pardi N, Drapeau EM, Parkhouse K, Garretson T, Morris JS, Moncla LH, Tam YK, Fan SHY, Lakdawala SS, Weissman D, Hensley SE. A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes. *Science* 2022; 378(6622): 899–904.
 - 74 Jamal SM, Belsham GJ. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res* 2013; 44(1): 116.
 - 75 Belsham GJ. Towards improvements in foot-and-mouth disease vaccine performance. *Acta Vet Scand* 2020; 62(1): 20.
 - 76 Pulido MR, Sobrino F, Borrego B, Sáiz M. RNA immunization can protect mice against foot-and-mouth disease virus. *Antiviral Res* 2010; 85(3): 556–558.
 - 77 Smithburn KC. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *J Immunol* 1952; 69(2): 223–234.
 - 78 Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009; 360(24): 2536–2543.
 - 79 Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(6): 1085–1086.
 - 80 Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika virus spreads to new areas - region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65(3): 55–58.
 - 81 Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2015; 21(10): 1885–1886.
 - 82 Kumar N, Acharya A, Gendelman HE, Byrareddy SN. The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus. *J Autoimmun* 2022; 131: 102855.
 - 83 Hooper JW, Thompson E, Wilhelmsen C, Zimmerman M, Ichou MA, Steffen SE, Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Jahrling PB. Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *J Virol* 2004; 78(9): 4433–4443.
 - 84 Kaufman DR, Goudsmit J, Holterman L, Ewald BA, Denholtz M, Devoy C, Giri A, Grandpre LE, Heraud JM, Franchini G, Seaman MS, Havenga MJ, Barouch DH. Differential antigen requirements for protection against systemic and intranasal vaccinia virus challenges in mice. *J Virol* 2008; 82(14): 6829–6837.
 - 85 Hou F, Zhang Y, Liu X, Murad Y, Xu J, Yu Z, Hua X, Song Y, Ding J, Huang H, Zhao R, Jia W, Yang X. Novel mRNA vaccines encoding Monkeypox virus M1R and A35R protect mice from a lethal virus challenge. *bioRxiv* 2022: 2022.2011.2019.517190.
 - 86 Fortner A, Bucur O. mRNA-based vaccine technology for HIV. *Discoveries (Craiova)* 2022; 10(2): e150.
 - 87 Gulick RM, Flexner C. Long-acting HIV drugs for treatment and prevention. *Annu Rev Med* 2019; 70: 137–150.
 - 88 Khalid K, Padda J, Khedr A, Ismail D, Zubair U, Al-Ewaidat OA, Padda S, Cooper AC, Jean-Charles G. HIV and messenger RNA (mRNA) vaccine. *Cureus* 2021; 13(7): e16197.
 - 89 Zhang P, Narayanan E, Liu Q, Tsybovsky Y, Boswell K, Ding S, Hu Z, Follmann D, Lin Y, Miao H, Schmeisser H, Rogers D, Falcone S, Elbashir SM, Presnyak V, Bahl K, Prabhakaran M, Chen X, Sarfo EK, Ambrozak DR, Gautam R, Martin MA, Swerczek J, Herbert R, Weiss D, Misamore J, Ciaramella G, Himansu S, Stewart-Jones G, McDermott A, Koup RA, Mascola JR, Finzi A, Carfi A, Fauci AS, Lusso P. A multiclade env-gag VLP mRNA vaccine elicits tier-2 HIV-1-neutralizing antibodies and reduces the risk of heterologous SHIV infection in macaques. *Nat Med* 2021; 27(12): 2234–2245.
 - 90 John S, Yuzhakov O, Woods A, Deterling J, Hassett K, Shaw CA, Ciaramella G. Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine* 2018; 36(12): 1689–1699.

- 91 Gote V, Bolla PK, Kommineni N, Butreddy A, Nukala PK, Palakurthi SS, Khan W. A comprehensive review of mRNA vaccines. *Int J Mol Sci* 2023; 24(3): 2700.
- 92 Qin LD (秦立得), Zhao SJ, Liu HL, Song CP, Tian WX. Progress on mRNA vaccine for animal infectious diseases. *Progr Veter Med (动物医学进展)* 2022; 43(7): 64–68 (in Chinese).
- 93 Aierken A, Li B, Liu P, Cheng X, Kou Z, Tan N, Zhang M, Yu S, Shen Q, Du X, Enkhbaatar BB, Zhang J, Zhang R, Wu X, Wang R, He X, Li N, Peng S, Jia W, Wang C, Hua J. Melatonin treatment improves human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy in a mouse model of type II diabetes mellitus via the PI3K/AKT signaling pathway. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13(1): 164.
- 94 Ren Y, Aierken A, Zhao L, Lin Z, Jiang J, Li B, Wang J, Hua J, Tu Q. hUC-MSCs lyophilized powder loaded polysaccharide ulvan driven functional hydrogel for chronic diabetic wound healing. *Carbohydr Polym* 2022; 288: 119404.
- 95 Yan Y, Fang J, Wen X, Teng X, Li B, Zhou Z, Peng S, Arisha AH, Liu W, Hua J. Therapeutic applications of adipose-derived mesenchymal stem cells on acute liver injury in canines. *Res Vet Sci* 2019; 126: 233–239.
- 96 Zhang J, Zhou Y, Yue W, Zhu Z, Wu X, Yu S, Shen Q, Pan Q, Xu W, Zhang R, Wu X, Li X, Li Y, Li Y, Wang Y, Peng S, Zhang S, Lei A, Ding X, Yang F, Chen X, Li N, Liao M, Wang W, Hua J. Super-enhancers conserved within placental mammals maintain stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(40): e2204716119.
- 97 Yang XC, Wu XL, Li WH, Wu XJ, Shen QY, Li YX, Peng S, Hua JL. OCT6 inhibits differentiation of porcine-induced pluripotent stem cells through MAPK and PI3K signaling regulation. *Zool Res* 2022; 43(6): 911–922.
- 98 Fang J, Wei Y, Teng X, Zhao S, Hua J. Immortalization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells and their seminiferous tubule transplantation. *J Cell Biochem* 2018; 119(4): 3663–3670.
- 99 Fang J, Wei Y, Lv C, Peng S, Zhao S, Hua J. CD61 promotes the differentiation of canine ADMSCs into PGC-like cells through modulation of TGF- β signaling. *Sci Rep* 2017; 7: 43851.
- 100 Fang J, Yan Y, Teng X, Wen X, Li N, Peng S, Liu W, Donadeu FX, Zhao S, Hua J. Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating NRF2 and inhibiting ER stress. *Aging (Albany NY)* 2018; 10(10): 2954–2972.
- 101 Wei Y, Fang J, Cai S, Lv C, Zhang S, Hua J. Primordial germ cell-like cells derived from canine adipose mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2016; 49(4): 503–511.