



复制型mRNA技术在传染病疫苗研发中的应用

李晓丹¹, 王鑫¹, 张波^{2*}

1. 湖南师范大学医学院, 长沙 410031;

2. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430207

* 联系人, E-mail: zhangbo@wh.iov.cn

2023-08-28 收稿, 2023-10-09 修回, 2023-10-12 接受, 2023-10-17 网络版发表

国家自然科学基金联合基金(U20A2014)资助

摘要 mRNA疫苗是下一代疫苗的重要平台, 其安全有效和研发周期短的特点在应对新发传染病和其他疾病治疗方面具有巨大优势. 复制型mRNA(self-amplifying, saRNA)是从正链RNA病毒基因组衍生而来的具有自我复制能力的mRNA, 能够以低剂量注射实现高水平的目的蛋白表达. 基于saRNA的疫苗有潜力解决常规非复制型mRNA疫苗使用剂量大和重复接种的问题. 近年来, saRNA合成、载体优化及递送等技术发展迅速, 大大推进了saRNA疫苗的发展, 目前有多种传染病saRNA疫苗正在研发中. 本文介绍了saRNA疫苗的作用机制和递送方式, 对近年来针对病毒性传染病的saRNA疫苗进行综述, 总结了saRNA疫苗设计的一般策略和优化方法, 讨论了saRNA疫苗研发面临的挑战, 并展望了saRNA在传染病防治中的其他研究方向, 以期在saRNA在传染病防治中的应用提供借鉴.

关键词 复制型mRNA, 复制子, 疫苗, mRNA递送

自20世纪90年代Wolff等人^[1]和Boczkowski等人^[2]发现将体外转录获得的mRNA注射至小鼠体内检测到蛋白表达并激活免疫反应后, 基于mRNA的疫苗和治疗方法开始进入人们视野. 理论上, mRNA可以在细胞中表达任意目的蛋白, 适用于所有基于蛋白质的预防 and 治疗方法. 但是, 由于mRNA自身不稳定、高免疫原性和递送难度大等原因, 长时间以来mRNA疗法并未得到充分投入和关注. 近年来, 随着mRNA合成、修饰及递送等重大技术的突破, mRNA的稳定性、递送效率及安全性得到大幅提升, 已成为疫苗、肿瘤治疗、基因治疗等领域的强大工具. 与基于DNA或蛋白质/肽的疗法相比, mRNA疗法具有独特的优势: (1) mRNA被递送至细胞后在细胞质中翻译, 不会进入细胞核中, 避免了引起机体基因突变的风险; (2) mRNA在细胞内翻译的蛋白具有天然构象和生物活性, 能够克服很多蛋

白难以在体外合成和维持活性的难题; (3) mRNA会被细胞核酸酶降解, 毒性风险较低, 其体内半衰期可通过化学修饰进行调整; (4) 生产工艺及质量控制标准化, 步骤和配方对不同mRNA产品有通用性, 研发周期短、生产速度快、成本低, 可快速实现大规模生产.

mRNA技术主要包括常规线性mRNA、环状RNA(circular RNA, circRNA)和自我复制型mRNA(self-amplifying mRNA, saRNA)3种形式(图1). 常规线性mRNA结构与体内mRNA相似, 由5'帽子、3' polyA尾、5'及3'非编码区(untranslated region, UTR)及开放阅读框(open reading frame, ORF)组成. 常规mRNA是mRNA疗法的代表性形式, 基于该技术的新型冠状病毒mRNA疫苗在人群中大规模使用表现出很好的安全性和有效性, 大大推进了常规mRNA疗法的发展, 目前已有多种疫苗和基因治疗产品进入临床试验阶段. circRNA为单

引用格式: 李晓丹, 王鑫, 张波. 复制型mRNA技术在传染病疫苗研发中的应用. 科学通报, 2024, 69: 4889–4904

Li X D, Wang X, Zhang B. Application of self-amplifying mRNA technology in the development of infectious disease vaccines (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 4889–4904, doi: 10.1360/TB-2023-0902

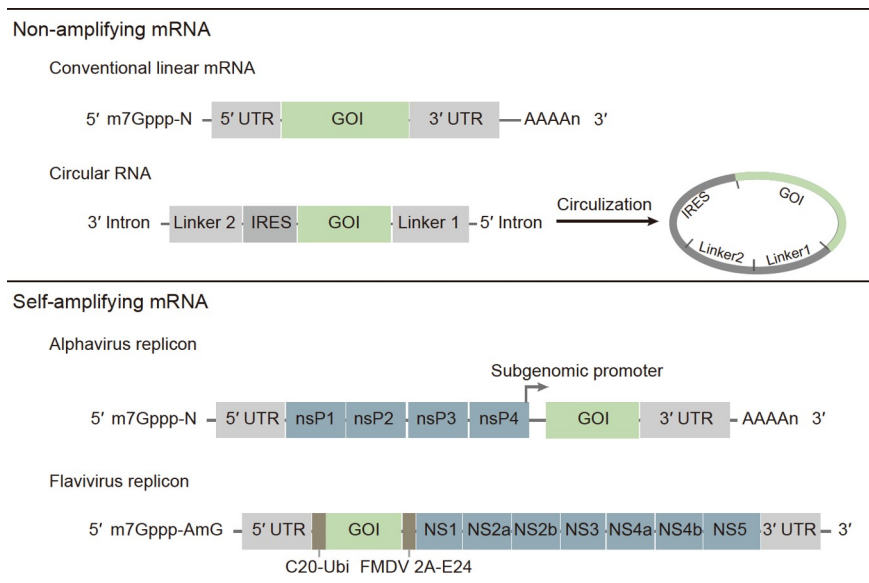


图1 mRNA结构及其表达目的基因策略示意图

Figure 1 Schematic representation of the structure of different mRNAs and their strategies for expression of the GOI

链、共价闭环的RNA, 5'端没有帽子结构, 可以通过在ORF上游引入内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)^[3]或加入m⁶A修饰^[4]起始ORF翻译, 表达目的蛋白。circRNA的闭环结构可保护RNA免受核酸外切酶降解, 半衰期比线性mRNA更长^[5], 但circRNA在体内的代谢和功能尚不明确, 且体外合成产量较低, 产品研发仍在起步阶段。

常规线性mRNA和环状RNA都属于非复制型RNA, 细胞内蛋白表达量取决于递送至细胞内的mRNA含量, 通常需要高剂量的mRNA和重复给药才能达到较好的免疫或治疗效果。saRNA为具有自我复制能力的mRNA, 一般衍生自不分节段的正链RNA病毒, 将病毒基因组中的结构蛋白基因替换为目的蛋白基因, 利用病毒自身的复制酶和元件, saRNA在宿主细胞质中进行复制, 合成更多的saRNA。与常规mRNA相比, saRNA在细胞中表达蛋白水平更高、持续时间更长, 因此低剂量saRNA免疫即可诱导机体产生较强的免疫反应。例如, 仅1.25 μg表达流感病毒血凝素的saRNA在小鼠中可达到与80 μg常规mRNA相同的保护作用^[6]; 表达新型冠状病毒(SARS-CoV-2) S蛋白的saRNA仅需10 ng就可以激活小鼠的免疫反应^[7], 3 μg saRNA可诱导恒河猴产生中和抗体^[8], 5 μg saRNA在I期临床试验中可充分诱导抗体产生^[9], 而辉瑞和莫德纳公司研发的SARS-CoV-2常规mRNA疫苗单剂接种剂量分别

为30和100 μg。saRNA低剂量使用的特点可以减少生产成本, 降低由mRNA递送材料引起的副作用风险, 可以允许与其他疫苗或药物联合使用。基于这些优势, saRNA疫苗或治疗方法具有广阔的应用前景。目前已报道了多种saRNA疫苗和药物的临床前研究, 少数产品已进入临床研究阶段, 本文主要对saRNA及其在病毒性传染病疫苗中的应用进行综述。

1 saRNA概述

saRNA一般来源于甲病毒属(*Alphaviruses*)和黄病毒属(*Flaviviruses*)复制子(replicon)表达系统。甲病毒属中, 塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus, SFV)^[10]、辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SINV)^[11]和委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV)^[12]复制子载体早在1989和1991年被建立, 现已成为saRNA应用研究中最常用的载体平台。黄病毒属中, 昆津病毒(Kunjin virus, KUNV)、黄热病毒(Yellow fever virus, YFV)、登革病毒(Dengue virus, DENV)和蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBEV)复制子被用作saRNA载体。此外, 与黄病毒属同属于黄病毒科的瘟病毒属成员牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)和猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)的复制子也被证明可用作外源基因表达载体^[13]。

1.1 saRNA的作用原理

甲病毒属复制子RNA包含2个ORF, 5'ORF编码病毒非结构蛋白nsP1-nsP4, 3'ORF为目的蛋白基因(gene of interest, GOI)编码序列, 两个ORF中间为病毒的亚基因组启动子(subgenomic promoter). 复制子RNA进入细胞后, 可直接作为mRNA翻译出非结构蛋白, 4个非结构蛋白组装形成病毒复制复合体, 负责负链RNA的合成, 复制复合体识别亚基因组启动子, 以负链RNA为模板合成新的复制子RNA和亚基因组RNA. 甲病毒感染的细胞中, 亚基因组RNA的含量比复制子RNA高10倍, 含量可达 10^6 个拷贝^[14], 而亚基因组RNA作为mRNA翻译目的蛋白, 使目的蛋白在细胞中高效、持久表达(图2). 有研究表明, 将复制子RNA通过不同途径递送至体内后目的蛋白表达时间可持续1~2个月^[15].

黄病毒属病毒基因组仅含有一个ORF, 编码的多聚蛋白被进一步切割为3个结构蛋白(Capsid、prM、E)和7个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5). 黄病毒复制子表达载体一般是除了保留衣壳蛋白Capsid的N端20个氨基酸(C20)和包膜蛋白E的C端24个氨基酸(E24)序列之外, 将其余的结构蛋白基因删除, 替换为目的蛋白基因(图1). 其中, C20序列含有基因组复制必需的顺式作用元件^[16], E24是引导NS1进入内质网腔的信号肽^[17]. 通过在C20和目的蛋白基因之间引入泛素基因、目的蛋白基因与E24序列之间插入口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)“自切割”2A肽序列, 能使目的蛋白从多聚蛋白上被切割下来成为单独的蛋白.

一般来说, 多数甲病毒复制子对细胞有毒性^[18,19], 而黄病毒复制子不会引起细胞病变. 有研究比较了VEEV和TBEV复制子转染细胞后外源基因的表达水平和持续时间^[20], 发现VEEV复制子在转染后前3天表达外源基因的水平分别比TBEV复制子高180、20、10倍, 但转染后4~6天多数细胞死亡, 外源基因表达几乎消失; TBEV复制子不会引起细胞病变, 转染的细胞经过4周传代仍能检测到外源基因表达. 外源蛋白的持续表达通常能提高其免疫原性, 而细胞凋亡则可能对疫苗功效是把双刃剑. 研究显示, 当SFV和KUNV复制子按照相同的剂量以裸RNA形式注射至小鼠体内后, 二者激活的CD8⁺ T细胞反应相当, 但SFV复制子诱导产生的抗体水平更高^[21]. 另一研究发现, 与单独表达人乳头瘤病毒E7抗原的SFV复制子相比, 同时表达E7与抗

凋亡分子Bcl-XL的SFV复制子能够延长细胞存活时间, 增强E7的免疫原性, 产生更高的细胞免疫和更好的抗肿瘤效果^[22]. 然而, 当将表达黑色素瘤分化抗原TRP-1的SINV复制子与Bcl-XL表达质粒共同免疫小鼠时, 与单独免疫SINV复制子相比, 尽管小鼠体内TRP-1的表达量更高、产生的特异性抗体更多, 但其抗肿瘤效果却显著降低^[23]. 因此, 非细胞病变和细胞病变型复制子载体可能对抗原的免疫原性和疫苗功效产生不同的影响, 这种影响需要在选择saRNA平台时加以考虑.

1.2 saRNA的生产

saRNA的合成与常规线性mRNA一样, 使用体外转录(*in vitro* transcription, IVT)反应进行. 构建saRNA表达载体质粒时, 需要在saRNA 5'UTR上游引入DNA依赖的RNA聚合酶启动子(如噬菌体T7或SP6启动子). 体外转录反应体系包括线性化的质粒DNA模板、噬菌体RNA聚合酶、三磷酸核糖核苷酸(NTP)、RNA酶抑制剂及含有镁离子的缓冲液. 反应过程中, RNA聚合酶与启动子序列结合启动RNA的转录. 甲病毒属和黄病毒属基因组5'端含有帽子结构, 转录的saRNA需要加帽才具有mRNA功能, 可以在转录后使用专门的加帽酶对saRNA进行加帽, 或在体外转录体系中加入帽类似物进行共转录加帽. 体外转录的saRNA采用高效液相色谱等方法纯化后即可进行配制和递送. 由于含有病毒复制必需序列, saRNA比常规mRNA更长, 现有的IVT方案主要针对常规mRNA开发, saRNA的合成产量远低于常规mRNA. 最近, 一项研究针对saRNA的IVT反应条件进行了优化, 提高了saRNA合成的产量^[24].

1.3 saRNA的递送方式

saRNA可以通过病毒和非病毒等不同方式被递送至体内. 非病毒递送方式包括: (1) 裸saRNA注射. 研究表明, 甲病毒属复制子RNA不经过任何包装, 直接通过肌肉注射至小鼠体内后能够检测到目的蛋白表达, 并激活小鼠体液免疫和细胞免疫^[6,25-27]. (2) saRNA电穿孔. 电穿孔(electroporation, EP)技术是利用高压短脉冲在细胞膜上形成瞬时微孔, 使核酸等大分子物质能够通过微孔进入细胞内. 研究发现, 与裸saRNA注射相比, 通过EP进行小鼠肌肉或皮下saRNA递送后目的蛋白表达量更高, 激活的免疫反应更强^[28,29]; 对猪进行皮内saRNA电穿孔后12天仍能在体内检测到目的蛋白高表达^[30]. (3) 脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)

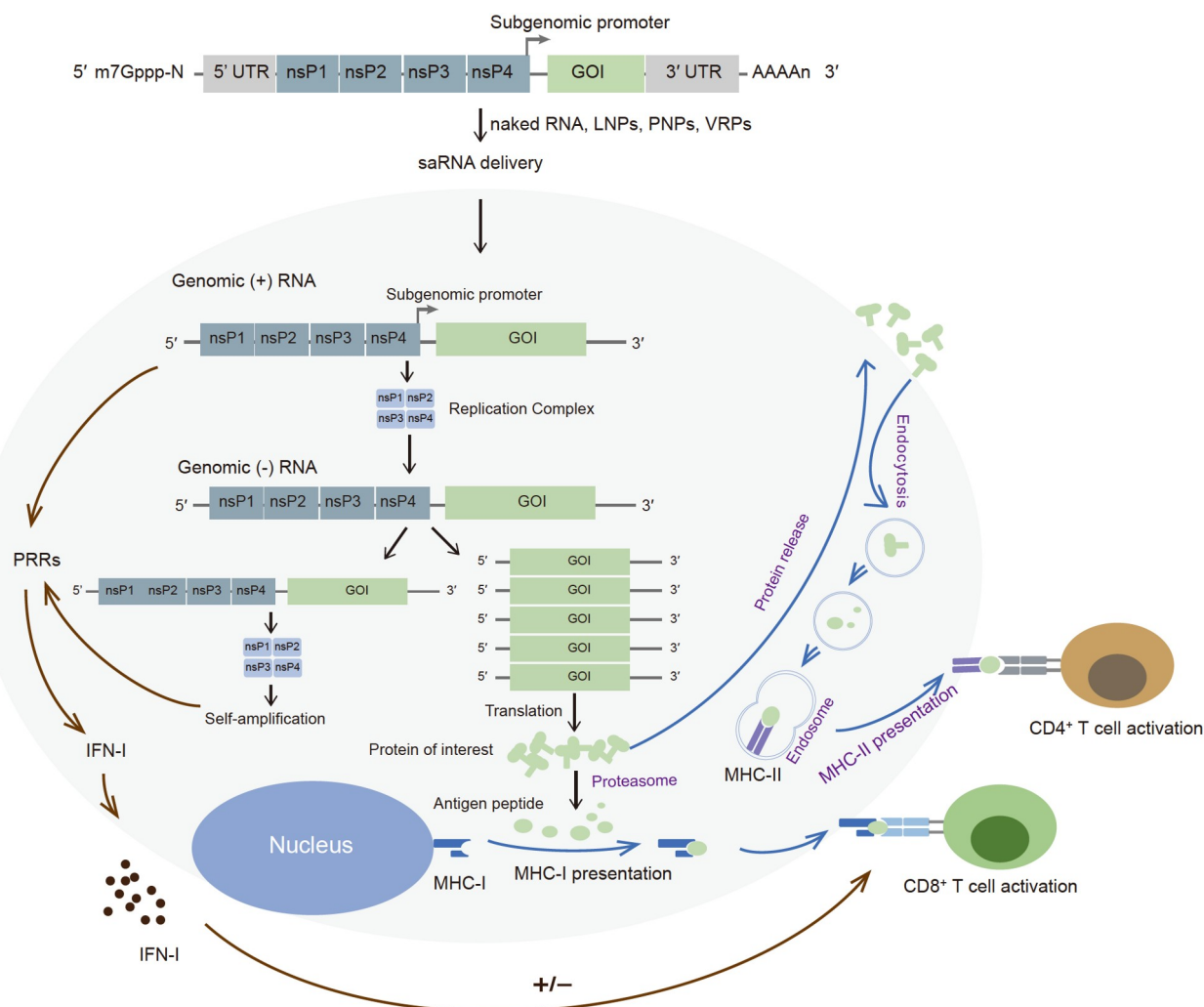


图 2 甲病毒属saRNA疫苗作用机制
Figure 2 The mechanism of action of the alphavirus saRNA based vaccines

包装。LNP是目前最常用的mRNA递送系统,使用LNP包装能够显著提高mRNA的稳定性,降低RNA自身免疫原性,而且没有明显的细胞毒性^[31,32]。目前已有利用LNP包装的siRNA药物patistiran(用于治疗遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的多发性神经疾病)、两种LNP包装的SARS-CoV-2 mRNA疫苗(莫德纳和辉瑞公司)获美国食品和药物管理局批准临床使用。LNP的主要成分为一种可电离的阳离子脂质,如DLin-MC3-DMA、SM-102、ALC-0315等,和磷脂、胆固醇、聚乙二醇这3种中性辅助脂质构成。阳离子脂质通过静电作用与带负电的RNA结合,使其能够被中性脂质封装形成直径约100 nm的脂质纳米颗粒^[15]。最初LNP的优化主要针对siRNA和常规线性mRNA,对分子量更大、结构更复杂的saRNA而言,LNP的封装和递送条件可能

存在很大差异. 2012年, 研究人员首次成功使用LNP包装saRNA进行体内和体外递送^[24]. 此后, 递送saRNA的LNP成分和生产工艺被进一步优化^[31,33,34], 确定了分别具有最小免疫原性、最大免疫原性和最佳关键质量属性的3种最佳配方, 为saRNA不同治疗目的提供选择. 但是, 与常规mRNA相比, LNP封装的saRNA完整性仍然较低^[33], 进一步优化LNP配方以提高saRNA的封装和递送效率将对saRNA的应用有重要促进作用. (4) 阳离子纳米乳剂(cationic nanoemulsion, CNE)递送. CNE由阳离子脂质DOTAP (1, 2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)和MF59乳佐剂组成, 是一种非常有效的saRNA递送系统, 递送效率较裸saRNA强1000倍^[35]. 使用CNE递送基于saRNA的多种疫苗在小鼠和非人类灵长类动物中具有很好的耐受性, 能够有效激活动物的体液和细胞

免疫^[35-38]。(5) 聚合物纳米颗粒(polyplexes nanoparticle, PNP). PNP是天然或合成聚合物形成的纳米颗粒, 带正电的PNP通过静电作用将带负电的saRNA包裹在颗粒内部或吸附在颗粒表面, 保护saRNA不被核酸酶降解。聚合物聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)和pABOL可以有效递送saRNA。中等长度PEI能够结合较长的saRNA, 并将saRNA递送至小鼠体内表达目的蛋白, 小鼠产生的抗体水平显著高于裸saRNA注射^[6,27]。使用甘露糖化的PEI递送saRNA能够特异性增加皮肤上皮细胞中目的蛋白的表达, 有望实现saRNA的靶向递送^[39]。pABOL是一种高分子量线性阳离子聚合物, 与PEI相比, pABOL细胞毒性更小, 递送saRNA的效率更高^[40]; 与LNP相比, 使用pABOL递送saRNA体内目的蛋白表达量更高, 但诱导产生的体液和细胞免疫应答却更低, 可能更适合基于saRNA的蛋白质替代疗法^[41]。

病毒递送系统通过病毒复制子颗粒(viral replicon particle, VRP)感染进行saRNA递送。甲病毒saRNA非结构蛋白序列中含有病毒包装信号, 通过在细胞中反式表达病毒结构蛋白可以包装saRNA形成VRP。VRP表面结构蛋白与真实病毒一致, 因此具有广泛的易感宿主范围, 通过感染可将saRNA递送至细胞中, 进行RNA复制和目的蛋白表达。由于saRNA缺乏结构蛋白基因, 在细胞中无法再包装出病毒颗粒。因此, VRP仅具有单次感染性, 有很好的安全性。目前进入临床试验阶段的saRNA抗肿瘤药物多通过VRP进行递送^[42]。使用最广泛的甲病毒VRP包装系统由saRNA和分别表达病毒衣壳蛋白Capsid和囊膜蛋白E3-E2-E1的2个helper RNA组成, 这种将衣壳蛋白和囊膜蛋白分开表达的策略能够有效避免VRP生产过程中产生重组病毒^[14]。此外, 稳定表达甲病毒结构蛋白细胞系的建立可以简化VRP包装流程, 有利于大规模生产^[43]。目前, 黄病毒复制子RNA都是通过VRP系统进行递送, 尚无使用其他非病毒递送途径的报道。与甲病毒VRP包装方式类似, 黄病毒VRP由反式表达的结构蛋白包装复制子RNA形成, 通过将复制子RNA和结构蛋白表达载体共转染、或将复制子RNA转染至稳定表达结构蛋白的细胞系中可以收获VRP。黄病毒VRP能够在体内体外有效递送复制子RNA, 在小鼠、豚鼠、非人类灵长类动物等模型中均能激活特异性免疫应答, 产生免疫保护作用^[44-46]。

2 saRNA在病毒性传染病疫苗中的应用

saRNA具有固有免疫原性, 细胞中的单链saRNA

以及自我复制过程中产生的双链RNA中间体会刺激模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 激活机体先天免疫, 导致I型干扰素(inteferon-I, IFN-I)和促炎细胞因子的产生(图2)。这种固有免疫原性对蛋白质替换疗法的应用是不利的, 但对其作为疫苗开发可能是有益的^[47]。IFN可以诱导树突状细胞(dendritic cell, DC)的成熟, 及辅助性T细胞和T细胞依赖性B细胞的激活, 从而引发更强大的体液和细胞免疫反应。因此, saRNA具有“自我佐剂”效应。但是, 过度激活的先天免疫会导致mRNA降解和翻译受阻, 使机体无法产生足够的适应性免疫。saRNA中的病毒非结构蛋白具有逃避宿主天然免疫的作用^[48], saRNA引起的先天免疫处于平衡状态有利于saRNA的复制和抗原的表达, 增强机体的适应性免疫应答。目前, saRNA载体被应用于多种传染病包括病毒、细菌和寄生虫疫苗的开发, 其中多数是病毒疫苗, 这些疫苗在临床前研究中表现出很好的免疫保护作用, 部分疫苗已推进至临床研究阶段(表1)。

2.1 呼吸道病毒

呼吸道病毒是引起全球急性感染疾病和死亡的主要原因之一, 新发呼吸道病毒通常引起全球重大公共卫生问题。引起呼吸道急性感染的病毒主要包括流感病毒(influenza virus)、冠状病毒(coronaviruses)和呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)等。

流感病毒中, 血凝素(Hemagglutinin, HA)通过与细胞受体结合介导病毒感染进入细胞, 是诱导产生中和抗体的主要抗原, 神经氨酸酶(neuraminidase, NA)诱导的抗体也有免疫保护作用^[89]。saRNA流感病毒疫苗设计主要以甲病毒属VEEV复制子或改良的VEEV-SINV复制子^[90]为载体表达HA抗原或NA抗原, 制备成单价或多价流感疫苗。此外, 黄病毒CSFV复制子也用作HA或NA表达载体^[56]。不同研究分别针对H1N1、H3N2和H7N9研发了saRNA疫苗, 并建立了包括LNP^[55]、CNE^[36]、pABOL^[40]、PEI^[6]和VRP^[54]等多种递送方法来递送saRNA疫苗。上述方式递送的saRNA经肌肉注射至小鼠、猪或雪貂等动物均能激活体液和细胞免疫应答, 为免疫动物提供攻毒保护作用。另外, 裸saRNA、LNP和PEI经皮内注射也可达到较好免疫效果。

冠状病毒是引起新发传染病的重要来源, 严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)和SARS-CoV-2都是近年出现的对人类有高致病性的新发病毒。刺突蛋白(spike, S)是

表 1 针对病毒性传染病的saRNA疫苗临床前和临床研究示例

Table 1 Examples of preclinical and clinical studies on saRNA vaccines against viral diseases

病原体	抗原	saRNA	递送方法	功效	文献
临床研究					
SARS-CoV-2	S	VEEV	LNP	I/II期临床试验: COVAC1血清转化率80%~87%; ARCT-021血清转化率100%	[9,49,50]
RABV	G		CNE	I期临床试验: 结果尚未公布	
HIV-1	gag	VEEV	VRP	I期临床试验: 高剂量免疫后仅检测到低水平的抗体和 T细胞免疫应答	[51]
HPV	E6-E7	SFV	VRP	I期临床试验: 12名受试者中10人产生特异性T细胞反应	[52]
临床前研究					
流感病毒	HA	SFV	裸RNA	诱导小鼠中和抗体, 提供攻毒保护作用	[25,53]
流感病毒	HA、NA	甲病毒	VRP	HA或HA/NA二价疫苗免疫猪提供强大保护作用	[54]
流感病毒	HA	VEEV-SINV	LNP	低剂量(0.1~1 µg)免疫小鼠诱导的抗体反应与 无佐剂亚单位疫苗相当	[55]
流感病毒	HA	VEEV-SINV	CNE	对小鼠和雪貂具有免疫原性, 诱导小鼠细胞和体液免疫, 提供攻毒保护作用	[36]
流感病毒	HA	VEEV	pABOL	0.1 µg 8 kD pABOL递送saRNA免疫小鼠可诱导产生中和抗体, 提供攻毒保护作用	[40]
流感病毒	HA		PEI	诱导小鼠产生HA特异性抗体, 并提供攻毒保护	[6]
流感病毒	HA、NA	CSFV	NGA	免疫小鼠诱导特异性细胞免疫	[56]
RSV	F	SFV	裸RNA	免疫小鼠提供攻毒保护作用	[53]
RSV	F	VEEV	VRP	免疫小鼠和棉鼠诱导产生全身IgG和呼吸道黏膜IgA抗体反应, 提供攻毒保护作用	[57]
RSV	F	VEEV-SINV	LNP	诱导棉鼠体液和细胞免疫应答, 保护作用与VRP相当	[15]
RSV	F	VEEV-SINV	CNE	对小鼠有免疫原性, 可诱导产生中和抗体	[58]
SARS-CoV	S	VEEV	VRP	免疫小鼠和猕猴能提供长期的攻毒保护作用	[59,60]
MERS-CoV	S	VEEV	VRP	免疫小鼠诱导中和抗体	[61]
SARS-CoV-2	S	VEEV	LNP	单次免疫诱导小鼠体液和细胞免疫, 提供攻毒保护作用	[62]
SARS-CoV-2	S-RBD	VEEV	LNP	免疫食蟹猴和小鼠提供攻毒保护作用	[63]
SARS-CoV-2	S	VEEV	LNP	免疫仓鼠产生中和抗体, 保护仓鼠免受SARS-CoV-2 Wuhan株和 B.1.1.7变体	[64]
SARS-CoV-2	S	VEEV	LION	免疫小鼠和猕猴诱导体液和细胞免疫	[65]
SARS-CoV-2	S	VEEV	VRP	诱导小鼠和仓鼠中和抗体, 提供攻毒保护作用	[66]
TBEV		TBEV	基因枪	1 µg RNA单次免疫小鼠诱导持久的体液和细胞免疫, 提供攻毒保护作用	[67]
ZIKV		ZIKV	VRP	免疫孕鼠后对母体和胎儿提供攻毒保护作用	[68]
ZIKV	prME	VEEV	裸RNA	免疫IFN缺陷小鼠提供攻毒保护, 对免疫完全小鼠诱导产生的 抗体水平较低	[69]
ZIKV	prME	VEEV	NLC	10 ng RNA免疫小鼠提供攻毒保护作用	[70]
ZIKV	prME	VEEV	MDNP	单次免疫小鼠提供攻毒保护作用	[71]
DENV	prME、E85	VEEV	VRP	免疫猕猴提供攻毒保护作用	[72]
DENV	DENV-1/2/3/4 E85	VEEV	VRP	免疫小鼠诱导产生针对每种血清型DENV的中和抗体和 T细胞免疫, 并提供攻毒保护作用	[73]
EEEV	E3-E2-6K-E1	VEEV	VRP	免疫小鼠和猕猴后提供气溶胶攻毒保护	[74]
WEEV	E3-E2-6K-E1	VEEV	VRP	免疫小鼠和猕猴后提供气溶胶攻毒保护	[74]
VEEV	E3-E2-6K-E1	VEEV	VRP	免疫小鼠和猕猴后提供气溶胶攻毒保护	[74]

(续表1)

病原体	抗原	saRNA	递送方法	功效	文献
VEEV	E3-E2-6K-E1	VEEV	CNE	免疫小鼠后提供70%气溶胶攻毒保护	[38]
CHIKV	E3-E2-6K-E1	VEEV	VLV	单次免疫小鼠提供攻毒保护作用	[75]
CCHFV	NP、GPC	VEEV	CNC	NP、NP+GPC免疫小鼠提供攻毒保护作用	[76]
RABV	G	SINV	裸RNA	免疫小鼠诱导产生抗体, 提供80%攻毒保护作用	[26]
RABV	G	VEEV-SINV	CNE	单次免疫大鼠耐受性良好	[77]
RABV	G	VEEV-SINV	脂质体、LNP、CNE	低剂量saRNA免疫小鼠诱导强烈的抗体应答	[78]
RABV	G	VEEV	VLV	免疫小鼠后提供的攻毒保护作用比减毒活疫苗LBNAAR更高	[79]
EBOV	GP	KUNV	VRP	免疫豚鼠提供攻毒保护作用	[45]
EBOV	GP-D637L	KUNV	VRP	免疫非洲绿猴提供75%攻毒保护作用	[46]
EBOV	GP	VEEV	VRP	免疫小鼠和豚鼠提供攻毒保护	[80]
EBOV	GP	VEEV	MDNP	免疫小鼠诱导产生体液和细胞免疫, 提供攻毒保护作用	[81]
LASV	GPC、NP	VEEV	VRP	免疫豚鼠提供攻毒保护作用	[82]
HIV-1	Env gp160	SFV	VRP	免疫小鼠产生中和抗体	[83]
HIV-1	Env gp140	VEEV-SINV	LNP	免疫小鼠可诱导较高水平CD8 ⁺ T细胞反应和特异性抗体	[15]
HIV-1	Env gp140	VEEV-SINV	CNE	免疫恒河猴后诱导了较高水平的中和抗体和T细胞反应	[84]
HIV-1	gag、pol	SFV	PEI	免疫小鼠产生CD4 ⁺ 和CD8 ⁺ T细胞反应	[27]
HPV	E6-E7	VEEV	VRP	免疫小鼠产生CTL反应, 有抵抗/消除肿瘤作用	[85]
HPV	E6-E7	SFV	VRP	免疫小鼠产生CTL反应, 有抵抗/消除肿瘤作用	[86-88]

镶嵌在病毒包膜上的结构蛋白, 与细胞受体结合介导病毒进入, 是冠状病毒诱导产生中和抗体的主要抗原。冠状病毒saRNA疫苗的构建策略一般是利用甲病毒复制子RNA表达刺突蛋白。利用表达SARS-CoV S蛋白的VEEV VRP免疫小鼠和猕猴均能提供长期的攻毒保护作用^[59,60]; 同样, 表达MERS-CoV S蛋白的VEEV VRP免疫小鼠也可诱导产生中和抗体^[61]。在SARS和MERS疫苗研究的基础上, 新冠疫情暴发后, 有多项研究利用甲病毒saRNA表达SARS-CoV-2 S蛋白或其中的受体结合结构域(receptor binding domain, RBD), 构建了SARS-CoV-2及其变异株的疫苗, 通过LNP或VRP递送后, 在小鼠、仓鼠或非人类灵长类动物等模型中均能诱导免疫反应, 并提供完全攻毒保护作用^[62-66]。有2种LNP封装的saRNA开展了临床I/II期试验研究: 一种是由英国帝国理工学院(Imperial College London)和帝国临床研究机构研发的LNP-nCoV saRNA(COVAC1), 在伦敦完成了临床I期和IIa期试验, 血清转化率分别为87%^[9]和80%^[49], 受试者对疫苗的耐受性较好, 两次临床试验没有出现与接种相关的严重不良事件; 另一种是杜克-新加坡国立大学医学院(Duke-NUS Medical School)和Arcturus Therapeutics Holdings公司联合开发的ARCT-

021, 受试者单次肌肉接种5 μ g saRNA后血清转化率为100%, 并且能激活T细胞反应^[50]。

呼吸道合胞病毒是引起婴幼儿、老人和免疫功能低下人群下呼吸道感染的常见病原体之一, 目前全球尚无RSV疫苗被批准上市。RSV黏附蛋白(attachment glycoprotein, G)和融合蛋白(fusion protein, F)分别介导病毒与细胞受体结合及病毒包膜与细胞膜的融合, 是刺激机体产生中和抗体和细胞免疫的主要抗原。其中, 不同RSV病毒株的F蛋白序列高度保守, 是疫苗研发的主要抗原靶标。2001年, Fleeton等人^[53]首次使用SFV复制子表达RSV F蛋白, 发现将裸saRNA肌肉注射至小鼠后可为小鼠提供攻毒保护。随后, Mok等人^[57]使用表达RSV F蛋白的VEEV VRP鼻腔免疫小鼠和棉鼠, 能够诱导产生全身IgG和呼吸道黏膜IgA抗体反应, 并在肺部和脾中诱导特异性T细胞反应, 保护动物免受感染。此外, Geall团队使用LNP^[15]和CNE^[58]非病毒方式递送表达F蛋白的VEEV-SINV复制子saRNA, 成功诱导免疫动物体液和细胞免疫应答, 并提供攻毒保护作用。

2.2 虫媒病毒

虫媒病毒是由节肢动物叮咬传播的病毒, 包含多

种对动物和人类致病的病原体,致病性虫媒病毒主要有黄病毒属、甲病毒属和布尼亚病毒科成员。

对黄病毒属病毒来说,其自身复制子或甲病毒属复制子saRNA都可作为疫苗研发平台。Kofler等人^[91]将蜱传脑炎病毒衣壳第28~89位氨基酸序列删除,并在prM信号肽序列中引入突变构建了TBEV-C(Δ 28-89)-S复制子。该复制子RNA进入细胞可包装释放非感染性亚病毒颗粒,使用基因枪将1 μ g RNA单次免疫小鼠能够诱导持久的体液和细胞免疫,保护小鼠免受病毒感染^[67]。使用寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)结构蛋白反式包装复制子RNA形成的ZIKV VRP免疫孕鼠后诱导了较高水平的T细胞免疫,并对母体和胎儿提供有效的攻毒保护作用^[68]。当使用甲病毒复制子表达黄病毒结构蛋白抗原时,使用VRP或LNP包装saRNA免疫动物可有效激活免疫保护反应。White等人^[72]使用表达DENV prM-E或可溶性E蛋白二聚体(E85)的VEEV-VRP免疫猕猴可成功保护猕猴免受DENV感染,使用表达DENV-1/2/3/4四种血清型E85的混合VEEV VRP单次接种免疫成年小鼠和新生小鼠都能诱导针对每种血清型DENV的中和抗体和T细胞免疫,并提供攻毒保护作用^[73]。表达ZIKV prM-E的VEEV复制子以裸RNA^[69]、纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carrier, NLC)^[70]或修饰的树状聚合物纳米颗粒(modified dendrimer nanoparticle, MDNP)^[71]等非病毒递送形式免疫小鼠均能提供免疫保护作用。

甲病毒属中,基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)自2007年在印度洋地区大范围暴发后迅速在全球范围内流行;东方马脑炎病毒(eastern equine encephalitis virus, EEEV)、西方马脑炎病毒(western equine encephalitis virus, WEEV)和VEEV除了经蚊虫叮咬传播外,气溶胶也是其传播途径,被认为是潜在的生物武器。Reed等人^[74]使用VEEV复制子分别表达VEEV、EEEV和WEEV三种病毒的包膜蛋白,并使用VEEV结构蛋白包装形成VRP,组合在一起形成的联合疫苗免疫小鼠和猕猴后可在体内引发针对3种病毒的中和抗体,并能保护动物免受病毒气溶胶感染。Samsa等人^[38]使用CNE递送缺失衣壳蛋白的VEEV复制子RNA免疫小鼠后能诱导产生中和抗体,70%免疫小鼠能够抵抗气溶胶攻毒感染。此外,我们的前期研究发现,使用VEEV复制子表达CHIKV包膜蛋白时能够产生具有感染性的病毒样囊泡(virus-like vesicles, VLVs),该VLV对小鼠不致病,单次、低剂量免疫即可为小鼠提供完全攻毒保

护作用^[75]。

新疆出血热病毒,又称克里米亚刚果出血热病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV),是一种蜱传布尼亚病毒,感染人类发病且死亡率高,我国新疆地区有CCHFV流行,目前尚无预防疫苗可用。Leventhal等人^[76]使用VEEV复制子分别表达CCHFV NP蛋白或GPC蛋白,用阳离子纳米载体(cationic nanocarrier, CNC)进行saRNA递送免疫小鼠,单独表达NP的saRNA能为小鼠提供完全攻毒保护,将表达NP和GPC的saRNA混合能够增强疫苗的保护作用,但单独表达GPC的saRNA未能提供保护效果。

2.3 高致病性病毒

除了上述病毒外,saRNA也被广泛用作狂犬病毒(Rabies virus, RABV)、埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)和拉沙病毒(Lassa virus, LASV)等高致病性病毒的疫苗研发平台。

狂犬病毒糖蛋白(glycoprotein, G)通过与宿主细胞受体结合并与细胞膜融合促进病毒进入细胞,能够诱导机体产生中和抗体,是狂犬疫苗研发的主要抗原。RABV saRNA疫苗研发策略主要是以甲病毒复制子载体表达RABV G蛋白,并建立不同的saRNA递送方式。研究发现,10 μ g表达RABV-G的SINV复制子裸RNA免疫小鼠可诱导产生RABV-G特异性抗体,提供80%攻毒保护作用^[26]。使用脂质体、LNP、CNE、PNP等非病毒递送方式可使低剂量saRNA($\leq$ 1.5 μ g)免疫小鼠即诱导产生强烈的抗体应答。其中,葛兰素史克(GSK)公司专有的、CNE56递送的saRNA诱导的抗体水平与商用灭活疫苗Rabipur相当^[78]。GSK对使用CNE56配制的狂犬saRNA (RG-SAM)疫苗开展了I期临床试验(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04062669),目前尚未公布结果。此外,我们的前期研究发现,表达RABV-G的VEEV复制子可在BHK-21细胞中形成感染性VLV,该VLV对小鼠不致病,免疫小鼠后提供的攻毒保护作用比商用减毒活疫苗LBNAR更高^[79]。

埃博拉病毒糖蛋白(glycoprotein, GP)是位于病毒包膜表面的唯一蛋白,是EBOV疫苗研发的主要抗原。KUNV和甲病毒复制子saRNA被用以开发EBOV疫苗。表达EBOV-GP或突变型GP-D637L的KUNV VRP免疫可保护豚鼠免受致死剂量的EBOV感染^[45],将表达GP-D637L的KUN VRP经皮下免疫4只非洲绿猴,其中3只能完全抵抗EBOV的病毒感染^[46]。同样,表达EBOV-GP

蛋白的VEEV VRP免疫也可小鼠和豚鼠提供攻毒保护^[80]。此外,使用树状聚合物纳米颗粒MDNP递送表达EBOV-GP的VEEV复制子免疫小鼠能够诱导高水平抗体和CD8⁺ T细胞免疫应答,保护小鼠免受致死剂量病毒感染^[81]。

拉沙病毒的囊膜糖蛋白(glycoprotein complex, GPC)和核衣壳蛋白(nucleoprotein, NP)是LASV疫苗研发的靶抗原。Pushko等人^[82]使用VEEV VRP表达LASV GPC或NP,将2种VRP单独或组合免疫豚鼠后均能提供攻毒保护作用,但将免疫豚鼠的血清转移至未免疫豚鼠却不能提供被动免疫保护作用;通过构建双顺反子VEEV复制子载体,他们构建了同时表达LASV-GPC和EBOV-GP的VRP,将该VRP免疫豚鼠可提供LASV和EBOV两种病毒的攻毒保护作用。利用同样的双顺反子VEEV复制子载体,Wang等人^[92]构建了同时表达2种不同谱系LASV (LASV-I和LASV-IV)GPC和ΔGPfib的VRP,将VRP皮下免疫小鼠后能诱导针对LASV-I和LASV-IV的交叉T细胞反应,但该研究未开展攻毒试验来评价疫苗保护效果。

2.4 其他病毒

艾滋病仍然是全球发病率最高的性传播疾病之一。HIV-1的高度变异性及免疫逃逸为其疫苗研发带来巨大挑战,大量亚单位疫苗、病毒载体疫苗和核酸疫苗的临床试验收效甚微,拓展疫苗研究平台是扩大候选疫苗范围的有效手段。使用saRNA作为HIV疫苗研发平台在临床前研究中表现出较好的应用前景。saRNA的固有免疫原性可能有利于增强机体对免疫原性较低的HIV抗原的免疫应答。使用KUNV或甲病毒复制子saRNA表达HIV抗原蛋白均在动物模型中表现出较好的免疫原性。使用表达HIV gag蛋白的KUNV复制子裸RNA或VRP免疫小鼠后诱导了gag特异性的持久CD8⁺ T细胞反应,可保护小鼠免受实验性病毒攻击^[44]。甲病毒属VEEV、SINV或SFV VRP系统被广泛用作猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)和HIV Env gp160、gp140或gp120及gag等抗原的表达和递送载体,在小鼠和非人类灵长类动物中有效激活抗体和T细胞免疫应答^[83,93-95]。然而,在Wecker等人^[51]对表达HIV-1 C亚型gag的VEEV VRP疫苗开展的I期临床试验中,该疫苗免疫人类后诱导的免疫反应水平很低,高剂量VRP免疫后仅检测到低水平的抗体和T细胞免疫应答。近年来,使用非病毒递送方式的HIV-1 saRNA疫苗在临

床前研究中表现出较好的安全性和免疫原性。Geall等人^[15]首次证明,使用LNP封装表达HIV-1 Env gp140的saRNA经肌肉注射免疫小鼠可诱导较高水平CD8⁺ T细胞反应和特异性抗体。Bogers等人^[84]使用CNE递送编码gp140的saRNA免疫恒河猴后诱导了较高水平的中和抗体和T细胞反应。此外,基于PEI递送表达HIV-1 gag和pol蛋白保守区域的saRNA疫苗免疫小鼠后诱导了持续22周的CD4⁺和CD8⁺ T细胞反应^[27];使用聚合物PLX递送表达HIV-1 Env三聚体的saRNA疫苗在小鼠、豚鼠、兔子和猕猴中均诱导了高水平抗体反应^[96]。目前尚无非病毒递送方式的HIV saRNA疫苗进入临床试验阶段。

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是导致宫颈癌的主要原因。高危型HPV致癌机制主要是病毒感染后将其基因组DNA整合到宿主基因组中,导致病毒E6和E7蛋白持续表达,促进正常上皮细胞转化为癌细胞。甲病毒saRNA载体被用于开发针对HPV诱发宫颈癌的治疗性疫苗。表达HPV-16型E6-E7融合蛋白的VEEV VRP免疫正常小鼠后可激活HPV特异性细胞毒性T细胞(CTL)反应,所有免疫小鼠均能有效抵抗C3或TC-1肿瘤细胞的侵袭,对已使用C3肿瘤细胞荷瘤的小鼠进行免疫可使90%的小鼠消除肿瘤^[85]。同样,表达HPV-16 E6-E7蛋白的SFV VRP免疫小鼠也能诱导强烈并持久的CTL应答,且观察到明显的肿瘤抑制和消除效果^[86-88]。Komdeur等人^[52]对SFV-E6-E7 VRP疫苗(Vvax001)开展了I期临床试验,经过3次疫苗免疫,在12名有宫颈上皮内瘤病史的受试者中有10人出现HPV E6/E7特异性T细胞反应,疫苗耐受性较好,受试者没有出现与接种相关的严重不良反应。

3 增强疫苗功效的saRNA改造方法

在saRNA疫苗设计中,除了上述抗原选择和递送途径会直接影响疫苗功效外,也有研究对saRNA载体进行了优化和改造,以期进一步提高saRNA疫苗的保护作用。

3.1 taRNA

Beissert等人^[97]基于甲病毒saRNA建立了一种反式扩增RNA (trans-amplifying RNA, taRNA)系统,即将表达目的蛋白的saRNA中病毒复制酶基因删除形成taRNA,同时使用另一mRNA表达病毒复制酶,从而驱动taRNA的表达。他们发现,使用taRNA系统表达外源基

因效率比saRNA更高,使用裸RNA进行皮内注射时,50 ng编码H1N1 HA蛋白的taRNA与1.25 μ g saRNA诱导的免疫保护反应水平相当.这种taRNA系统的另一优点是可以提前大规模生产表达病毒复制酶的mRNA,taRNA生产无需加帽反应,由于分子量较小,其合成产量也更大,从而简化RNA疫苗的生产过程. Schmidt等人^[98]利用taRNA系统也成功构建了基孔肯雅病毒和罗斯河病毒(Ross River virus, RRV)疫苗,说明该系统有潜力成为疫苗研发通用平台.

3.2 saRNA突变体

为了提高saRNA表达外源蛋白的效率, Frolov团队对甲病毒saRNA进行了系列改造:通过筛选稳定表达SINV复制子的细胞系发现,位于nsP2的适应性突变P726L或N779K能够使SINV复制子在哺乳动物细胞BHK-21、CHO和Vero细胞中复制,但不引起细胞病变^[99],有利于目的基因在细胞中的持久表达;在VEEV复制子sg promoter下游引入5' UTR和位于nsP1的51-nt CSE序列,改造后的VEEV复制子编码目的蛋白的效率提高了10~50倍,基于该复制子包装的表达WNV prM/E的VRP以低剂量免疫即可为小鼠提供攻毒保护作用^[100].为了克服saRNA由于激活宿主先天免疫而被降解的问题, Li等人^[101]将VEEV复制子在免疫完全的细胞中进行连续传代,成功筛选出能够在免疫完全细胞中持续高效表达外源蛋白的复制子,这种变化可能是由于VEEV nsP2和nsP3出现的适应性突变使复制子适应了宿主先天免疫所致;与野生型VEEV复制子相比,该复制子对IFN的敏感性更低,在细胞中表达外源蛋白的水平更高、持续时间更长, LNP封装的复制子肌肉注射至体内能够增强外源蛋白的表达水平和持续时间,使用该复制子表达IL-12能够刺激产生更强的抗肿瘤免疫,显著抑制小鼠B16F10黑色素瘤的生长,说明该复制子可用于改进saRNA的疫苗和肿瘤免疫治疗功效.

3.3 共表达免疫调节蛋白

除了上述通过构建甲病毒非结构蛋白突变体降低saRNA固有免疫原性外,也有研究通过共表达具有IFN调节功能的蛋白来促进saRNA逃避宿主先天免疫.一些病毒蛋白,如痘病毒B18R、E3和K3蛋白、甲型流感病毒NS1、MERS-CoV ORF4a蛋白等,具有减少PRR刺激、抑制IFN免疫通路的作用,被认为是潜在的先天免疫抑制剂,能够改善mRNA在细胞中的表达^[47].

Beissert等人^[102]将编码痘病毒E3、K3或B18R的mRNA与SFV复制子RNA共转染至免疫完全的细胞,发现E3蛋白的表达能使SFV复制子表达外源蛋白量提高35倍;将3种mRNA与SFV复制子RNA共同肌肉注射至BALV/c小鼠后SFV表达外源蛋白量也显著提高. Blakney等人^[103]利用VEEV复制子RNA共表达萤火虫萤光素酶(Fluc)和多种具有IFN通路抑制作用的病毒蛋白,发现在免疫完全的细胞中,共表达MERS-CoV ORF4a的VEEV复制子表达Fluc的水平比VEEV野生型复制子高数百倍,且在C57BL/6小鼠中带有MERS-CoV ORF4a的复制子表达Fluc的水平也更高;为了验证MERS-CoV ORF4a的表达对saRNA表达外源基因抗原性的影响,他们使用带有MERS-CoV ORF4a的VEEV复制子编码RABV-G蛋白,将RNA免疫兔子后诱导产生的RABV-G特异性抗体和中和抗体滴度均比编码RABV-G的VEEV野生型复制子高10倍,但免疫小鼠和大鼠时则无增强作用.

像其他疫苗一样,saRNA疫苗也可通过加入佐剂来增强机体T细胞免疫应答. Manara等人^[37]建立了一种saRNA佐剂策略,即使用saRNA表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). GM-CSF具有诱导抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)募集、成熟和激活的活性,已被证明是有效的疫苗佐剂.当表达流感病毒NP蛋白的saRNA与编码GM-CSF的甲病毒saRNA混合肌肉注射免疫小鼠时,注射部位APC被瞬时募集,诱导小鼠产生了更高的CD8⁺ T细胞反应,并提供更强的攻毒保护作用.

4 总结与展望

mRNA疫苗具有安全有效、生产成本低、研发周期短等特点,在应对新发突发传染病及高度变异的病原体方面具有独特优势, SARS-CoV-2 mRNA疫苗的成功应用大大加速了mRNA疫苗的发展,目前已有多个基于常规mRNA的传染病和抗肿瘤疫苗启动临床试验^[104],但针对saRNA的研究相对缓慢. saRNA自我复制的特性使其使用剂量较常规mRNA更低,有潜力解决常规mRNA疫苗免疫剂量大和重复接种的问题,具有广阔的应用前景.本文介绍了saRNA及其在近年病毒性传染病疫苗研发中的应用.

影响saRNA疫苗功效的关键因素包括载体选择、抗原设计、合成和递送方式.目前最常用的saRNA载

体是甲病毒属和黄病毒属病毒复制子, 外源蛋白基因插入不同saRNA载体的策略具有通用性, 一般是替换病毒结构蛋白基因。不同研究对甲病毒saRNA载体进行改造以增强其表达外源蛋白的水平, 包括taRNA、不引起细胞病变的突变体saRNA和表达干扰素抑制蛋白的双顺反子saRNA等, 但目前对这些改造saRNA的疫苗评价研究还十分有限, 它们是否对不同抗原具有普遍的疫苗功效增强效应还需进一步研究。saRNA的固有免疫性对表达抗原的免疫原性有利有弊: 一方面, 先天免疫的激活有利于增强抗原特异性的适应性T细胞免疫反应; 另一方面, 过度的先天免疫促进细胞凋亡, 抑制saRNA的扩增和抗原表达, 不利于适应性免疫的激活。深入研究saRNA与宿主先天免疫的作用机制及其对适应性免疫反应的调节将对进一步优化saRNA载体、提高saRNA疫苗功效有重要意义。病毒病原体抗原一般是可诱导中和抗体的病毒包膜表面糖蛋白, 另外也可将包膜糖蛋白与其他有保护作用的抗原共同表达来提高疫苗保护作用。也有研究针对少数细菌和寄生虫的蛋白质抗原开发了saRNA疫苗^[105], 说明saRNA有潜力成为以蛋白质为保护性抗原的传染病的疫苗通用载体。尽管有研究对saRNA的合成条件进行了优化, 但目前尚无saRNA大规模生产和纯化工艺的报道, 提高saRNA大规模生产的产量和纯度仍是有待解决的技术问题。saRNA疫苗的递送是限制其应用的关键问题。2012年之前的研究中, saRNA主要以病毒VRP的方式进行递送。VRP递送saRNA效率高, 能有效诱导机体适应性免疫, 但针对VRP的预存免疫可能会削弱

疫苗的保护作用。近年的研究开发了多种非病毒递送方式, 包括LNP、CNE、PEI、LION、pABOL等, 其中LNP递送的SARS-CoV-2 saRNA疫苗在I/II期临床试验中没有出现与接种有关的严重不良反应, CNE递送的RABV saRNA疫苗临床试验结果尚未公布, 其他材料和配方都处于临床前研究阶段。目前的研究缺乏不同材料递送saRNA效率的比较数据, 同一配方是否能用于不同saRNA的递送也尚未可知, 未来还需大量研究探索不同材料递送saRNA的安全性和有效性。

在传染病防治中, 除了saRNA疫苗的主动免疫之外, 利用saRNA表达有保护作用的单克隆抗体进行被动免疫预防或治疗也是saRNA研究的重要方向。有研究使用甲病毒saRNA表达寨卡病毒单克隆抗体, 发现saRNA肌肉注射在病毒暴露前预防或暴露后治疗中都显示出有效的保护作用^[106]; 表达SARS-CoV-2单克隆抗体的甲病毒VRP鼻腔注射小鼠也能有效预防SARS-CoV-2感染^[107], 证明saRNA表达单克隆抗体进行被动免疫具有可行性。此外, 有研究在SFV nsP3和nsP4之间引入了6个神经元特异性的miR124序列, 限制了SFV在小鼠中枢神经系统中的扩散^[108], 增强了SFV作为溶瘤病毒的抗肿瘤活性^[109], 提示甲病毒saRNA也有潜力成为RNAi疗法的有效递送载体。

综上所述, saRNA疫苗在临床前研究中均诱导产生了有效的抗感染免疫保护, 随着SARS-CoV-2和狂犬病毒saRNA疫苗临床试验的开展, 我们相信不久的将来会有更多有效的saRNA疫苗实现临床转化, 成为传染病防治的强大工具。

参考文献

- 1 Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247: 1465–1468
- 2 Boczkowski D, Nair S K, Snyder D, et al. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med*, 1996, 184: 465–472
- 3 Wesselhoeft R A, Kowalski P S, Anderson D G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. *Nat Commun*, 2018, 9: 2629
- 4 Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine. *Cell Res*, 2017, 27: 626–641
- 5 Euka Y, Lauriola M, Feldman M E, et al. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 1370–1383
- 6 Vogel A B, Lambert L, Kinnear E, et al. Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses. *Mol Ther*, 2018, 26: 446–455
- 7 Maruggi G, Mallett C P, Westerbeck J W, et al. A self-amplifying mRNA SARS-CoV-2 vaccine candidate induces safe and robust protective immunity in preclinical models. *Mol Ther*, 2022, 30: 1897–1912
- 8 Rappaport A R, Hong S J, Scallan C D, et al. Low-dose self-amplifying mRNA COVID-19 vaccine drives strong protective immunity in non-human primates against SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, 2022, 13: 3289

- 9 Pollock K M, Cheeseman H M, Szubert A J, et al. Safety and immunogenicity of a self-amplifying RNA vaccine against COVID-19: COVAC1, a phase I, dose-ranging trial. *eClinicalMedicine*, 2022, 44: 101262
- 10 Liljeström P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the semliki forest virus replicon. *Bio/Technology*, 1991, 9: 1356–1361
- 11 Xiong C, Levis R, Shen P, et al. Sindbis virus: An efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science*, 1989, 243: 1188–1191
- 12 Davis N L, Willis L V, Smith J F, et al. *In vitro* synthesis of infectious venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: Analysis of a viable deletion mutant. *Virology*, 1989, 171: 189–204
- 13 Lundstrom K. Self-replicating RNA viruses for vaccine development against infectious diseases and cancer. *Vaccines*, 2021, 9: 1187
- 14 Frolov I, Hoffman T A, Pragai B M, et al. Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11371–11377
- 15 Geall A J, Verma A, Otten G R, et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 14604–14609
- 16 Corver J, Lenches E, Smith K, et al. Fine mapping of a *cis*-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J Virol*, 2003, 77: 2265–2270
- 17 Khromykh A A, Westaway E G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: Construction and applications. *J Virol*, 1997, 71: 1497–1505
- 18 Akhrymuk I, Lukash T, Frolov I, et al. Novel mutations in nsP2 abolish Chikungunya virus-induced transcriptional shutoff and make the virus less cytopathic without affecting its replication rates. *J Virol*, 2019, 93: e02062-18
- 19 Casales E, Rodriguez-Madoz J R, Ruiz-Guillen M, et al. Development of a new noncytopathic Semliki Forest virus vector providing high expression levels and stability. *Virology*, 2008, 376: 242–251
- 20 Gehrke R, Heinz F X, Davis N L, et al. Heterologous gene expression by infectious and replicon vectors derived from tick-borne encephalitis virus and direct comparison of this flavivirus system with an alphavirus replicon. *J Gen Virol*, 2005, 86: 1045–1053
- 21 Tannis L, Gauthier A, Eveleigh C, et al. Semliki Forest virus and Kunjin virus RNA replicons elicit comparable cellular immunity but distinct humoral immunity. *Vaccine*, 2005, 23: 4189–4194
- 22 Kim T W, Hung C F, Juang J, et al. Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by delaying suicidal DNA-induced cell death. *Gene Ther*, 2004, 11: 336–342
- 23 Leitner W W, Hwang L N, Bergmann-Leitner E S, et al. Apoptosis is essential for the increased efficacy of alphaviral replicase-based DNA vaccines. *Vaccine*, 2004, 22: 1537–1544
- 24 Samnuan K, Blakney A K, McKay P F, et al. Design-of-experiments *in vitro* transcription yield optimization of self-amplifying RNA. *F1000Res*, 2022, 11: 333
- 25 Zhou X, Berglund P, Rhodes G, et al. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine*, 1994, 12: 1510–1514
- 26 Saxena S, Sonwane A A, Dahiya S S, et al. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. *Vet Microbiol*, 2009, 136: 36–44
- 27 Moyo N, Vogel A B, Buus S, et al. Efficient induction of T cells against conserved HIV-1 regions by mosaic vaccines delivered as self-amplifying mRNA. *Mol Ther-Methods Clin Dev*, 2019, 12: 32–46
- 28 Johansson D X, Ljungberg K, Kakoulidou M, et al. Intradermal electroporation of naked replicon RNA elicits strong immune responses. *PLoS One*, 2012, 7: e29732
- 29 Cu Y, Broderick K, Banerjee K, et al. Enhanced delivery and potency of self-amplifying mRNA vaccines by electroporation *in situ*. *Vaccines*, 2013, 1: 367–383
- 30 Leyman B, Huysmans H, Mc Cafferty S, et al. Comparison of the expression kinetics and immunostimulatory activity of replicating mRNA, nonreplicating mRNA, and pDNA after intradermal electroporation in pigs. *Mol Pharm*, 2018, 15: 377–384
- 31 Blakney A K, McKay P F, Yus B I, et al. Inside out: Optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and *in vivo* delivery of saRNA. *Gene Ther*, 2019, 26: 363–372
- 32 Cullis P R, Hope M J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol Ther*, 2017, 25: 1467–1475
- 33 Ly H H, Daniel S, Soriano S K V, et al. Optimization of lipid nanoparticles for saRNA expression and cellular activation using a design-of-experiment approach. *Mol Pharm*, 2022, 19: 1892–1905
- 34 Kairuz D, Samudh N, Ely A, et al. Production, characterization, and assessment of permanently cationic and ionizable lipid nanoparticles for use in the delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Pharmaceutics*, 2023, 15: 1173
- 35 Ballesteros-Briones M C, Silva-Pilipich N, Herrador-Cañete G, et al. A new generation of vaccines based on alphavirus self-amplifying RNA. *Curr Opin Virol*, 2020, 44: 145–153
- 36 Brazzoli M, Magini D, Bonci A, et al. Induction of broad-based immunity and protective efficacy by self-amplifying mRNA vaccines encoding influenza virus hemagglutinin. *J Virol*, 2016, 90: 332–344

- 37 Manara C, Brazzoli M, Piccioli D, et al. Co-administration of GM-CSF expressing RNA is a powerful tool to enhance potency of SAM-based vaccines. *Vaccine*, 2019, 37: 4204–4213
- 38 Samsa M M, Dupuy L C, Beard C W, et al. Self-amplifying RNA vaccines for venezuelan equine encephalitis virus induce robust protective immunogenicity in mice. *Mol Ther*, 2019, 27: 850–865
- 39 Blakney A K, Abdouni Y, Yilmaz G, et al. Mannosylated poly(ethylene imine) copolymers enhance saRNA uptake and expression in human skin explants. *Biomacromolecules*, 2020, 21: 2482–2492
- 40 Blakney A K, Zhu Y, McKay P F, et al. Big is beautiful: Enhanced saRNA delivery and immunogenicity by a higher molecular weight, bioreducible, cationic polymer. *ACS Nano*, 2020, 14: 5711–5727
- 41 Blakney A K, McKay P F, Hu K, et al. Polymeric and lipid nanoparticles for delivery of self-amplifying RNA vaccines. *J Control Release*, 2021, 338: 201–210
- 42 Morse M A, Crosby E J, Force J, et al. Clinical trials of self-replicating RNA-based cancer vaccines. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30: 803–811
- 43 Polo J M, Belli B A, Driver D A, et al. Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus- and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4598–4603
- 44 Harvey T J, Anraku I, Linedale R, et al. Kunjin virus replicon vectors for human immunodeficiency virus vaccine development. *J Virol*, 2003, 77: 7796–7803
- 45 Reynard O, Mokhonov V, Mokhonova E, et al. Kunjin virus replicon-based vaccines expressing Ebola virus glycoprotein GP protect the guinea pig against lethal Ebola virus infection. *J Infect Dis*, 2011, 204: S1060–S1065
- 46 Pyankov O V, Bodnev S A, Pyankova O G, et al. A kunjin replicon virus-like particle vaccine provides protection against Ebola virus infection in nonhuman primates. *J Infect Dis*, 2015, 212: S368–S371
- 47 Minnaert A K, Vanluchene H, Verbeke R, et al. Strategies for controlling the innate immune activity of conventional and self-amplifying mRNA therapeutics: Getting the message across. *Adv Drug Deliver Rev*, 2021, 176: 113900
- 48 Liu Y, Yuan Y, Zhang L. Innate immune evasion by alphaviruses. *Front Immunol*, 2022, 13: 1005586
- 49 Szubert A J, Pollock K M, Cheeseman H M, et al. COVAC1 phase 2a expanded safety and immunogenicity study of a self-amplifying RNA vaccine against SARS-CoV-2. *eClinicalMedicine*, 2023, 56: 101823
- 50 Low J G, de Alwis R, Chen S, et al. A phase I/II randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of a self-amplifying Covid-19 mRNA vaccine. *npj Vaccines*, 2022, 7: 161
- 51 Wecker M, Gilbert P, Russell N, et al. Phase I Safety and immunogenicity evaluations of an alphavirus replicon HIV-1 subtype C gag vaccine in healthy HIV-1-uninfected adults. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19: 1651–1660
- 52 Komdeur F L, Singh A, van de Wall S, et al. First-in-human phase I clinical trial of an SFV-based RNA replicon cancer vaccine against HPV-induced cancers. *Mol Ther*, 2021, 29: 611–625
- 53 Fleeton M N, Chen M, Berglund P, et al. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. *J Infect Dis*, 2001, 183: 1395–1398
- 54 Wymore Brand M, Anderson T K, Kitikoon P, et al. Bivalent hemagglutinin and neuraminidase influenza replicon particle vaccines protect pigs against influenza a virus without causing vaccine associated enhanced respiratory disease. *Vaccine*, 2022, 40: 5569–5578
- 55 Hekele A, Bertholet S, Archer J, et al. Rapidly produced SAM[®] vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. *Emerging Microbes Infects*, 2013, 2: 1–7
- 56 McCullough K C, Bassi I, Milona P, et al. Self-replicating replicon-RNA delivery to dendritic cells by chitosan-nanoparticles for translation *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e173
- 57 Mok H, Lee S, Utley T J, et al. Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles encoding respiratory syncytial virus surface glycoproteins induce protective mucosal responses in mice and cotton rats. *J Virol*, 2007, 81: 13710–13722
- 58 Brito L A, Chan M, Shaw C A, et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Mol Ther*, 2014, 22: 2118–2129
- 59 Deming D, Sheahan T, Heise M, et al. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS Med*, 2006, 3: e525
- 60 Reap E A, Watson A D, Norberg P K, et al. Evaluation of the immunogenicity of an alphavirus replicon particle vaccine expressing the SARS-CoV spike (S) glycoprotein in non-human primates (B191). *J Immunol*, 2007, 178: LB40
- 61 Agnihothram S, Gopal R, Yount Jr B L, et al. Evaluation of serologic and antigenic relationships between middle eastern respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses to develop vaccine platforms for the rapid response to emerging coronaviruses. *J Infect Dis*, 2014, 209: 995–1006
- 62 de Alwis R, Gan E S, Chen S, et al. A single dose of self-transcribing and replicating RNA-based SARS-CoV-2 vaccine produces protective adaptive immunity in mice. *Mol Ther*, 2021, 29: 1970–1983
- 63 Komori M, Nogimori T, Morey A L, et al. saRNA vaccine expressing membrane-anchored RBD elicits broad and durable immunity against

- SARS-CoV-2 variants of concern. *Nat Commun*, 2023, 14: 2810
- 64 Frise R, Baillon L, Zhou J, et al. A self-amplifying RNA vaccine protects against SARS-CoV-2 (D614G) and alpha variant of concern (B.1.1.7) in a transmission-challenge hamster model. *Vaccine*, 2022, 40: 2848–2855
- 65 Erasmus J H, Khandhar A P, O'Connor M A, et al. An *Alphavirus*-derived replicon RNA vaccine induces SARS-CoV-2 neutralizing antibody and T cell responses in mice and nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eabc9396
- 66 Zhang H Q, Zhang Y N, Zhang Z R, et al. An alphavirus replicon particle delivering prefusion-stabilized spike protein provides potent immunoprotection against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7: 390
- 67 Aberle J H, Aberle S W, Kofler R M, et al. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J Virol*, 2005, 79: 15107–15113
- 68 Garcia G Jr, Chakravarty N, Abu A E, et al. Replication-deficient Zika vector-based vaccine provides maternal and fetal protection in mouse model. *Microbiol Spectr*, 2022, 10: e0113722
- 69 Zhong Z, Portela Catani J P, Mc Cafferty S, et al. Immunogenicity and protection efficacy of a naked self-replicating mRNA-based Zika virus vaccine. *Vaccines*, 2019, 7: 96
- 70 Erasmus J H, Khandhar A P, Guderian J, et al. A nanostructured lipid carrier for delivery of a replicating viral RNA provides single, low-dose protection against Zika. *Mol Ther*, 2018, 26: 2507–2522
- 71 Chahal J S, Fang T, Woodham A W, et al. An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model. *Sci Rep*, 2017, 7: 252
- 72 White L J, Sariol C A, Mattocks M D, et al. An alphavirus vector-based tetravalent dengue vaccine induces a rapid and protective immune response in macaques that differs qualitatively from immunity induced by live virus infection. *J Virol*, 2013, 87: 3409–3424
- 73 Khalil S M, Tonkin D R, Mattocks M D, et al. A tetravalent alphavirus-vector based dengue vaccine provides effective immunity in an early life mouse model. *Vaccine*, 2014, 32: 4068–4074
- 74 Reed D S, Glass P J, Bakken R R, et al. Combined alphavirus replicon particle vaccine induces durable and cross-protective immune responses against equine encephalitis viruses. *J Virol*, 2014, 88: 12077–12086
- 75 Zhang Y N, Zhang Z R, Li N, et al. High-titer self-propagating capsidless Chikungunya virus generated in vero cells as a strategy for alphavirus vaccine development. *J Virol*, 2022, 96: e0148021
- 76 Leventhal S S, Meade-White K, Rao D, et al. Replicating RNA vaccination elicits an unexpected immune response that efficiently protects mice against lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus challenge. *eBioMedicine*, 2022, 82: 104188
- 77 Stokes A, Pion J, Binazon O, et al. Nonclinical safety assessment of repeated administration and biodistribution of a novel rabies self-amplifying mRNA vaccine in rats. *Regulatory Toxicol Pharmacol*, 2020, 113: 104648
- 78 Anderluzzi G, Lou G, Gallorini S, et al. Investigating the impact of delivery system design on the efficacy of self-amplifying RNA vaccines. *Vaccines*, 2020, 8: 212
- 79 Zhang Y N, Chen C, Deng C L, et al. A novel rabies vaccine based on infectious propagating particles derived from hybrid VEEV-Rabies replicon. *EBioMedicine*, 2020, 56: 102819
- 80 Pushko P, Bray M, Ludwig G V, et al. Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 2000, 19: 142–153
- 81 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: E4133–4142
- 82 Pushko P, Geisbert J, Parker M, et al. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with lassa and Ebola viruses. *J Virol*, 2001, 75: 11677–11685
- 83 Brand D, Lemiale F, Turbica I, et al. Comparative analysis of humoral immune responses to HIV type 1 envelope glycoproteins in mice immunized with a DNA vaccine, recombinant semliki forest virus RNA, or recombinant semliki forest virus particles. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998, 14: 1369–1377
- 84 Bogers W M, Oostermeijer H, Mooij P, et al. Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion. *J Infect Dis*, 2015, 211: 947–955
- 85 Cassetti M C, McElhiney S P, Shahabi V, et al. Antitumor efficacy of Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles encoding mutated HPV16 E6 and E7 genes. *Vaccine*, 2004, 22: 520–527
- 86 Daemen T, Pries F, Bungener L, et al. Genetic immunization against cervical carcinoma: Induction of cytotoxic T lymphocyte activity with a recombinant alphavirus vector expressing human papillomavirus type 16 E6 and E7. *Gene Ther*, 2000, 7: 1859–1866
- 87 Daemen T, Riezebos-Brilman A, Bungener L, et al. Eradication of established HPV16-transformed tumours after immunisation with recombinant Semliki Forest virus expressing a fusion protein of E6 and E7. *Vaccine*, 2003, 21: 1082–1088
- 88 Daemen T, Riezebos-Brilman A, Regts J, et al. Superior therapeutic efficacy of alphavirus-mediated immunization against human papilloma virus

- type 16 antigens in a murine tumour model: Effects of the route of immunization. [Antiviral Ther](#), 2004, 9: 733–742
- 89 Creyten S, Pascha M N, Ballegeer M, et al. Influenza neuraminidase characteristics and potential as a vaccine target. [Front Immunol](#), 2021, 12: 786617
- 90 Perri S, Greer C E, Thudium K, et al. An alphavirus replicon particle chimera derived from Venezuelan Equine Encephalitis and Sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. [J Virol](#), 2003, 77: 10394–10403
- 91 Kofler R M, Aberle J H, Aberle S W, et al. Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2004, 101: 1951–1956
- 92 Wang M, Jokinen J, Tretyakova I, et al. Alphavirus vector-based replicon particles expressing multivalent cross-protective Lassa virus glycoproteins. [Vaccine](#), 2018, 36: 683–690
- 93 Vajdy M, Gardner J, Neidleman J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 gag-specific vaginal immunity and protection after local immunizations with Sindbis virus-based replicon particles. [J Infect Dis](#), 2001, 184: 1613–1616
- 94 Mossman S P, Bex F, Berglund P, et al. Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine. [J Virol](#), 1996, 70: 1953–1960
- 95 Davis N L, Caley I J, Brown K W, et al. Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. [J Virol](#), 2000, 74: 371–378
- 96 Aldon Y, McKay P F, Moreno Herrero J, et al. Immunogenicity of stabilized HIV-1 Env trimers delivered by self-amplifying mRNA. [Mol Ther Nucleic Acids](#), 2021, 25: 483–493
- 97 Beissert T, Perkovic M, Vogel A, et al. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. [Mol Ther](#), 2020, 28: 119–128
- 98 Schmidt C, Hastert F D, Gerbeth J, et al. A bivalent trans-amplifying RNA vaccine candidate induces potent Chikungunya and Ross River virus specific immune responses. [Vaccines](#), 2022, 10: 1374
- 99 Frolov I, Agapov E, Hoffman Jr. T A, et al. Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. [J Virol](#), 1999, 73: 3854–3865
- 100 Kim D Y, Atasheva S, McAuley A J, et al. Enhancement of protein expression by alphavirus replicons by designing self-replicating subgenomic RNAs. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 10708–10713
- 101 Li Y, Teague B, Zhang Y, et al. *In vitro* evolution of enhanced RNA replicons for immunotherapy. [Sci Rep](#), 2019, 9: 6932
- 102 Beissert T, Koste L, Perkovic M, et al. Improvement of *in vivo* expression of genes delivered by self-amplifying RNA using vaccinia virus immune evasion proteins. [Hum Gene Ther](#), 2017, 28: 1138–1146
- 103 Blakney A K, McKay P F, Bouton C R, et al. Innate inhibiting proteins enhance expression and immunogenicity of self-amplifying RNA. [Mol Ther](#), 2021, 29: 1174–1185
- 104 Gote V, Bolla P K, Kommineni N, et al. A comprehensive review of mRNA vaccines. [Int J Mol Sci](#), 2023, 24: 2700
- 105 Blakney A K, Ip S, Geall A J. An update on self-amplifying mRNA vaccine development. [Vaccines](#), 2021, 9: 97
- 106 Erasmus J H, Archer J, Fuerte-Stone J, et al. Intramuscular delivery of replicon RNA encoding ZIKV-117 human monoclonal antibody protects against Zika virus infection. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2020, 18: 402–414
- 107 Li J Q, Zhang Z R, Zhang H Q, et al. Intranasal delivery of replicating mRNA encoding neutralizing antibody against SARS-CoV-2 infection in mice. [Sig Transduct Target Ther](#), 2021, 6: 369
- 108 Ylösmäki E, Martikainen M, Hinkkanen A, et al. Attenuation of Semliki Forest virus neurovirulence by microRNA-mediated detargeting. [J Virol](#), 2013, 87: 335–344
- 109 Martikainen M, Niittykoski M, von und zu Fraunberg M, et al. MicroRNA-attenuated clone of virulent Semliki Forest virus overcomes antiviral type I interferon in resistant mouse CT-2A Glioma. [J Virol](#), 2015, 89: 10637–10647

Summary for “复制型mRNA技术在传染病疫苗研发中的应用”

Application of self-amplifying mRNA technology in the development of infectious disease vaccines

Xiaodan Li¹, Xin Wang¹ & Bo Zhang^{2*}

¹ School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410031, China;

² Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430207, China

* Corresponding author, E-mail: zhangbo@wh.iov.cn

The mRNA vaccine has become a promising platform for prevention and treatment of infectious diseases due to its advantages of high efficacy, low risk of genetic integration and rapid development cycle. The current mRNA technologies include three types of synthetic RNAs which are conventional linear mRNA, circular RNA and self-amplifying mRNA (saRNA). Both conventional linear mRNA and circular RNA are non-amplifying, and the protein expression levels depend on the amount of RNAs delivered into cells. Therefore, high mRNA doses and repetitive vaccination of the conventional mRNA vaccines are often required to induce adequate immune responses. saRNAs are derived from the genomes of positive-strand RNA viruses in which the coding sequences of viral structural proteins are replaced by a heterologous gene of interest (GOI). saRNAs carry the viral replicase genes and therefore maintain self-replicative activity in the host cells, leading to enhanced and lasting expression of the GOI. It has been reported that compared to the conventional mRNA vaccines, lower doses of saRNAs can provide similar expression levels of the antigens and stimulate equivalent or even more potent immune responses *in vivo*. Therefore, compared to conventional mRNA vaccines, the saRNA-based vaccines have potential to decrease the initial RNA dosage and immunization frequency, thereby minimizing the potential side effects associated with the delivery materials and also making the vaccination less costly. However, the development of saRNA vaccines faces greater challenges than conventional mRNA vaccines. Due to the large size of the genome, the synthesis and delivery of saRNA is more difficult than that of conventional mRNA. In addition, the self-replicating property of saRNAs also increases their innate immunogenicity, which may lead to degradation of saRNAs and interfere with the therapeutic outcome of GOI. In recent years, tremendous efforts have been put into the optimization of saRNA synthesis, vector design and delivery systems to overcome these issues, and the relevant advances have facilitated the development of saRNA vaccines. Several saRNA vaccine candidates against a variety of infectious diseases have been reported to show protective effects in preclinical studies, and the vaccines against rabies virus and SARS-CoV-2 have been subjected to clinical trials, demonstrating the superior potential of saRNA vaccines in combating infectious diseases. In this review, we described the technologies that support the development of saRNA vaccines, including their mechanism of action, the *in vitro* RNA synthesis, the progress in the delivery systems, and the strategies of vector optimization in the effort to increase the efficiency of saRNA vaccines. We provided a detailed overview of the developing saRNA vaccine candidates against various virus infections, and summarized the general design strategies for saRNA vaccines against viral diseases. In addition to the application in vaccines, we have also proposed other directions for saRNA in the prevention and treatment of infectious diseases.

self-amplifying mRNA, replicon, vaccine, mRNA delivery

doi: [10.1360/TB-2023-0902](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0902)