

mRNA疫苗的研究及应用进展

蔚丹¹, 马云龙¹, 万方^{1*}, 武建强^{2*}

1.内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010010;

2.内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010107

摘要: 与传统疫苗相比, mRNA疫苗具有高效、安全、低成本等优点, 但它的应用一直受到体内传递不稳定、翻译效率较低等技术问题的限制。新型冠状病毒的流行及其疫苗的研发加速了 mRNA疫苗的研发和批准, 特别是在 mRNA结构修饰及脂质纳米颗粒构建等方面有了突破性进展, 如使用优化后核苷、帽子结构的 mRNA疫苗稳定性大大提高, 替换低使用频率的密码子可提高其翻译效率等。目前常用的 mRNA递送系统有脂质纳米颗粒、聚合物载体、类病毒载体等。综述了 mRNA疫苗的发展历程、作用机制、修饰技术突破和递送系统方面的研究及应用进展, 以期促进 mRNA疫苗的深入研究及应用。

关键词: mRNA疫苗; 作用机制; 递送系统

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2023.0015

中图分类号: Q812, R373

文献标志码: A

Advances on Research and Application of mRNA Vaccines

YU Dan¹, MA Yunlong¹, WAN Fang^{1*}, WU Jianqiang^{2*}

1. Faculty of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhehot 010010, China;

2. College of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Huhehot 010107, China

Abstract: Compared with traditional vaccines, mRNA vaccines have the advantages of high efficiency, safety and low cost, but its application has been limited by technical problems such as unstable in vivo delivery and low translation efficiency. The prevalence of SARS-CoV-2 virus and their vaccine development have accelerated the development and approval of mRNA vaccines, especially breakthroughs in mRNA structural modification and construction of lipid nanoparticles, for example, the stability of mRNA vaccines using optimized nucleoside and cap structures is greatly improved, and the replacement of codons with low frequency of use can improve their translation efficiency. The commonly used mRNA delivery systems are lipid nanoparticles, polymer vectors, virus-like vectors, etc. The research and application progress of development history, mechanism of action, technological breakthroughs in modification, and delivery systems of mRNA vaccines were reviewed in order to promote the in-depth research and application of mRNA vaccines.

Key words: mRNA vaccine; mechanism of action; delivery system

mRNA疫苗是一种通过体外转录技术合成后选择合适的递送系统将 mRNA 运输进入机体, 依靠细胞自身的翻译系统将 mRNA 翻译成目标蛋白, 从而达到临床治疗目的的先进疗法^[1]。早在 1961 年就有科学家发现了 mRNA, 但由于自身不稳定且缺少高效的递送载体, mRNA 疫苗的发展

较缓慢。在最近的研究中, Karikó 等^[2]使用假尿苷代替尿苷来合成 mRNA, 不仅可以避免不良的免疫反应, 还可以提高分子稳定性和蛋白质产量。2019 年新型冠状病毒肺炎疫情爆发, Moderna 和 BioNTech 公司的 mRNA 新冠疫苗通过了美国食品药品监督管理局 (US Food and Drug Administra-

收稿日期: 2023-02-13; 接受日期: 2023-03-31

联系方式: 蔚丹 E-mail: 1808367024@qq.com;

*通信作者 万方 E-mail: fwan@imau.edu.cn; 武建强 E-mail: jianqiangwu@immu.edu.cn

tion, FDA)的紧急授权并开始免疫接种,这些临床应用方面的重大进展激起了 mRNA 疫苗的研究热潮。虽然 mRNA 疫苗的生产技术、有效性还需进一步研究,但由于其自身优势,在未来的疾病预防及治疗领域将占据一席之地。

1 mRNA 疫苗的简介

1.1 mRNA 疫苗的概念

mRNA 疫苗是基于 mRNA 指导蛋白合成的特性,在体外设计合成的含有编码特定抗原的 mRNA 序列,经过必要的修饰和纯化等加工,通过不同的方式递送至人体细胞内,直接翻译产生抗原蛋白,模拟病毒感染并引发机体产生特异性免疫反应。与亚单位疫苗、灭活疫苗、减毒活疫苗和 DNA 疫苗相比, mRNA 疫苗有以下优点:①在安全性方面, mRNA 是非感染性、非整合性的,不存在潜在的感染或插入突变风险;②在疗效方面,各种修饰使 mRNA 更加稳定,使用阳离子脂质体(lipid nano-particles, LNPs)将其包裹,可以实现高效的体内递送,使其快速进入抗原递呈细胞并表达;③在生产方面,由于体外转录反应产率较高, mRNA 疫苗具有快速、经济和规模化生产的潜力^[3]。

1.2 mRNA 疫苗的发展历程

目前,由于 mRNA 疫苗的大规模应用,关于这项技术起源的争论愈演愈烈,事实上这项技术是 30 多年来数百名研究人员的工作成果。1961 年,加州理工学院科学家首次成功提取到 mRNA。1990 年, Wolff 等^[4]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 表达载体分别注射到体内小鼠骨骼肌中,并在肌肉细胞中检测到了它们的表达。1992 年,科学家将来自正常大鼠下丘脑细胞中的 mRNA 注射到患有尿崩症大鼠的下丘脑中,在注射后数小时内观察到尿崩症的暂时逆转^[5]。1995 年,研究人员将癌胚抗原基因注射入小鼠肌肉作为癌症疫苗^[6]。2002 年, Heiser 等^[7]发现编码前列腺特异性抗原的 mRNA 转染的树突细胞(dendritic cell, DC)能够在体外有效地刺激 T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应,并进行了临床试验。2005 年,匈牙利生物化学家 Karikó^[2]发现在 mRNA 中掺入修饰的核苷(m⁵C、m⁶A、m⁵U、s²U 或假尿苷)后抑制了 RNA 激活 DCs 的潜力,即降低了 mRNA 在体内的免疫原性。2009 年, Weide 等^[8]

将鱼精蛋白-mRNA 疫苗成功注射至黑色素瘤患者体内,并证明这是安全可行的。2017 年, Sahin 等^[9]证明了通过 RNA 新表位疫苗靶向个体癌症突变的临床可行性、安全性和抗肿瘤活性。2019 年,新型冠状病毒肺炎疫情爆发,多种 mRNA 疫苗作为新型冠状病毒疫苗获得紧急授权并投入使用^[10],如 Moderna 公司的 mRNA-4157 和 BioNTech 公司的 BNT122,在全球掀起了新一轮 mRNA 研究的热潮。

1.3 mRNA 疫苗的作用机制

在疫苗接种过程中, mRNA 疫苗在抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)中表达抗原,促进 APC 活化并诱导机体产生特异的细胞免疫和体液免疫^[11-12]。抗原递呈细胞包括树突状细胞、单核-巨噬细胞、B 淋巴细胞等。mRNA 疫苗引发免疫反应的过程如图 1 所示。

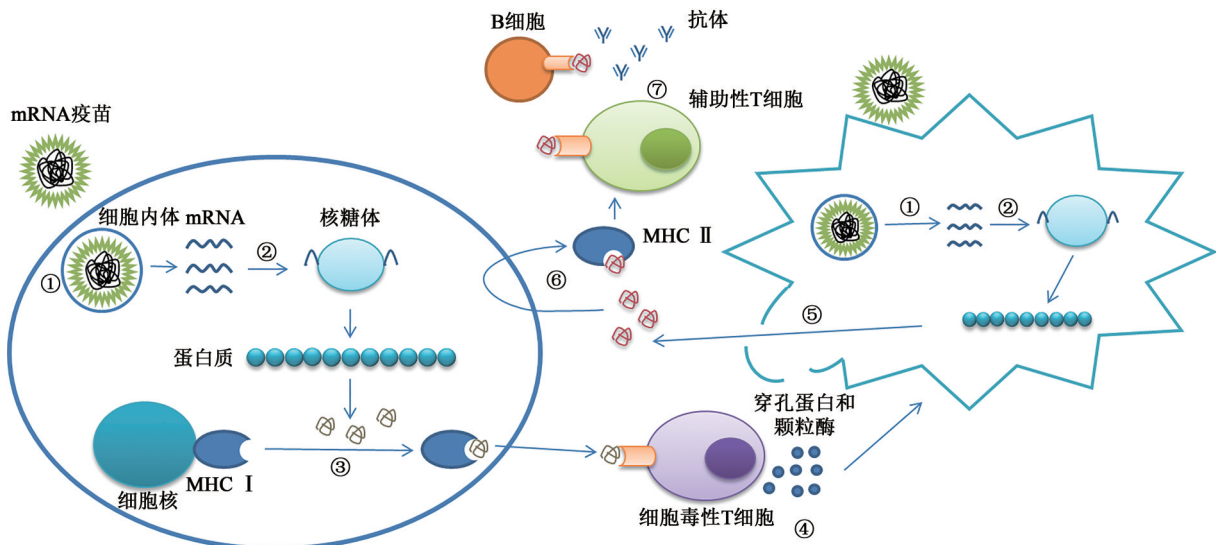
2 mRNA 疫苗的修饰

虽然 mRNA 早在 1961 年被科学家发现,但由于其稳定性和翻译效率较低、免疫原性较高等原因,相关研究进展较缓慢,可通过优化 mRNA 的序列和结构来提高其稳定性和翻译效率,通过修饰核苷酸来降低其免疫原性。

2.1 5'Cap 结构的修饰

Cap 结构位于 mRNA 的 5'端,由甲基化的鸟苷酸(m⁷G)经焦磷酸化后与 mRNA 的 5'端核苷酸相连,在体内转录时,传统的 Cap 结构有 Cap0 (m⁷GpppXpYp)、Cap1 (m⁷GpppXmpYp)、Cap2 (m⁷GpppXmpYmp)3 种。它与翻译水平密切相关,当 mRNA 到达细胞质时, Cap 与 Poly A 尾发生协同作用,与翻译起始因子 4F(eIF4F)形成稳定的闭环结构^[13],促进翻译起始,在 mRNA 翻译中发挥重要作用。此外,对 mRNA 进行加帽后,可使 5'端的末端游离磷酸基团缺失,进而不被碱性磷酸酶降解,并且 Cap1 和 Cap2 mRNA 核苷酸上的甲基能够将磷酸酯键上游离的 2'OH 基团封闭,不会被 RNA 酶降解^[14],因此 Cap 结构对 mRNA 有保护作用。

目前有 2 种加帽方法。①转录后加帽(酶法加帽)。使用专门的酶对来自体外转录的 mRNA 进行加帽反应,例如工业上常使用的牛痘病毒加帽酶(vaccinia virus capping enzyme, VCE),它将 m⁷G 封端至 mRNA 的 5'端。此方法加帽效率较高,



注:①注射的 mRNA 疫苗被抗原呈递细胞或肿瘤细胞内吞。②mRNA 脱离内体进入细胞质后,被核糖体翻译成蛋白质,翻译的抗原蛋白可用于刺激免疫系统。③经过翻译的抗原蛋白被蛋白酶体复合物分解成更小的片段,这些片段通过组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) I 类蛋白形成复合物,在细胞表面递呈给细胞毒性 T 细胞。④活化的细胞毒性 T 细胞通过分泌细胞因子,如穿孔素、颗粒酶等,杀死感染细胞。⑤mRNA 也可与肿瘤细胞膜融合后进入细胞,表达为蛋白质,细胞裂解后释放出大量抗原。⑥分泌的抗原可以被 APC 摄取,在内体中降解,并与 MHC II 类蛋白形成复合物 pMHC,在细胞表面呈现给辅助性 T 细胞。⑦辅助性 T 细胞识别 pMHC 并通过刺激 B 细胞产生特异性的中和抗体,通过炎症细胞因子激活吞噬细胞,如巨噬细胞等,促进病原体的清除。

图 1 mRNA 疫苗引发免疫反应的过程图

Fig. 1 Process of mRNA vaccine-induced immune response

但可能会造成 5'端产物的异质性。②共转录加帽。在 T7 聚合酶反应的同时,使用抗逆转帽类似物(anti-reverse cap analogues, ARCA)进行共转录加帽。ARCA 是一种帽状二聚体,此方法操作简单,但在转录反应中,体外转录的原料 GTP 会与 ARCA 产生竞争,因此该方法的加帽效率仅能达到 80%。

2.2 密码子的优化

原始编码区的密码子在体内可合成氨基酸,但一部分密码子的翻译效率不高,因此可以参照密码子使用频率表(表 1)将使用频率较低的密码子替换,提高密码子的翻译效率^[15-16]。

有研究表明,将第 3 位是 A、U 的密码子替换为第 3 位是 G、C 的密码子^[17-18],降低 U 的含量可降低 mRNA 在体内的免疫原性,也可提高所使用密码子的翻译水平,但 GC 含量不是越高越好。此外,应排除编码区序列中含有的酶切位点,防止后续的酶切反应破坏编码序列。

2.3 UTR 的修饰

5'端 UTR 含有与 mRNA 转运和翻译相关的调控序列,可抑制核酸外切酶对 mRNA 的降解,同时能够与内部核糖体的位点相结合^[19]。在 5'UTR 中加入的 Kozak 序列(G/ANNATGG)可与翻译起始因

表 1 密码子使用频率

Table 1 Codon usage frequency

密码子	频率/10 ³	密码子	频率/10 ³	密码子	频率/10 ³
UUU F	17.6	UCU S	15.2	UAU Y	12.2
UUC F	20.3	UCC S	17.7	UAC Y	15.3
UUA L	7.7	UCA S	12.2	UAA *	0.8
UUG L	12.9	UCG S	4.4	UAG *	0.8
CUU L	13.2	CCU P	17.5	CAU H	10.9
CUC L	19.6	CCC P	19.8	CAC H	15.1
CUA L	7.2	CCA P	16.9	CAA Q	12.3
CUG L	39.6	CCG P	6.9	CAG Q	34.2
AUU I	16.0	ACU T	13.1	AAU N	17.0
AUC I	20.8	ACC T	18.9	AAC N	19.1
AUA I	7.5	ACA T	15.1	AAA K	24.4
AUG M	22.0	ACG T	6.1	AAG K	31.9
GUU V	11.0	GCU A	18.4	GAU D	21.8
GUC V	14.5	GCC A	27.7	GAC D	25.1
GUA V	7.1	GCA A	15.8	GAA E	29.0
GUG V	28.1	GCG A	7.4	GAG E	39.6

子结合避免错误起始,提高 mRNA 的翻译效率^[20]。
3'UTR 除抑制核酸外切酶对 mRNA 的降解外,还可与 Poly A 尾发挥协同作用来提高 mRNA

疫苗的稳定性和翻译效率。也有研究表明,使用人类 α 和 β 球蛋白的3'UTR可增强mRNA的稳定性和翻译效率^[21]。

2.4 Poly A尾的修饰

真核生物中mRNA添加Poly A尾是一个默认的过程,几乎所有真核生物的mRNA通过转录后修饰,都会获得100~150个碱基的Poly A尾,它在发育和细胞周期期间受到动态调节^[22],不同长度的Poly A尾有助于调节mRNA的稳定性、运输和翻译效率^[23]。

在缺少ATP的情况下,可以使用T4多核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase, T4 PNK)对带有3'磷酸的mRNA进行末端修复。当mRNA到达细胞质, Poly A尾与5'Cap发生协同作用,通过形成mRNA闭环模型促进翻译起始^[24]。此外, Poly A尾有助于mRNA从核到细胞质的转运及延长半衰期、增加佐剂效应。

目前有2种加尾方法。①DNA模板含Poly A尾。转录模板中加入100~150 bp碱基A,在细菌培养等过程中可能会发生突变导致Poly A减少,破坏编码序列,可使用A30-linker-A70增加稳定性^[18]。②酶法加尾。体外转录后使用Poly A聚合酶完成,通过调整反应时间和酶用量来控制碱基A的数量,操作简便,但得到的Poly A的数量不稳定。

2.5 核苷酸的修饰

体外转录mRNA的免疫原性较高是一个亟待解决的问题,免疫细胞可被体外转录的mRNA激活并诱导Toll样受体引起炎症反应^[25],从而被免疫系统清除。有研究发现,体外转录的mRNA用假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷($m^1\psi$)或5-甲氧基尿苷(5 moU)代替尿苷可以增强其翻译效率并降低免疫原性。假尿苷是由尿苷通过碱基异构化反应衍生的,其中核碱基围绕N3—C6轴旋转180°,导致核碱基-糖键发生变化(从N1—C1'键变为C5—C1'键),由此产生的C—C键能够使核碱基更自由地旋转,假尿苷也可像尿苷一样与腺苷进行碱基配对,但假尿苷可以通过改善碱基配对、碱基堆叠和主链稳定性来改变mRNA结构(图2)。N1-甲基-假尿苷和假尿苷具有一个关键的共同特征,即C5—C1'键,它有助于改善碱基配对、碱基堆叠和双链稳定性^[26-27]。与尿苷相比,N1-甲基-假尿苷与A配对具有更高的亲和力,从而实现更有效地翻译^[28-29];也有研究者发现,可以用N1-甲基腺苷(m^1A)或N6-

甲基腺苷(m^6A)代替天然腺苷, m^6A 是大多数真核生物中mRNA和长链非编码RNA最丰富的内部修饰元件,它和mRNA的稳定性、剪接加工及翻译有关^[30-31]。此外,还可使用5-甲基胞苷(m^5C)代替天然胞苷, m^5C 已在各种代表性生物的mRNA、rRNA和tRNA中发现。作为可逆的表观遗传修饰, m^5C 修饰可增强mRNA的稳定性,促进剪接和核质运输等^[32-33]。Yamamoto等^[34]发现使用25% 5-甲基胞苷和25% 2-硫尿苷分别代替胞苷和尿苷的效果更好。Andries等^[29]发现 $m^1\psi$ 和 m^5C 联合使用的效果优于只使用假尿苷或5-甲基胞苷。无论是体内试验还是体外实验都表明,替换后的核苷酸在有效降低mRNA免疫原性的同时,显著提高了翻译效率。

3 mRNA疫苗的递送系统

mRNA进入细胞并成功表达后,易被RNA酶降解,因此需使用能够抵御降解的载体来递送mRNA。目前,已经开发了多种递送载体,如脂质纳米颗粒(LNP)、聚合物载体、病毒载体类病毒载体等。

3.1 LNP

LNPs递送系统主要由阳离子脂质体和其他辅助脂质体组成,阳离子脂质体与带负电的mRNA结合,可实现较高的包载效果,形成直径小于200 nm的复合物,在体内由低密度脂蛋白介导的胞吞机制可使纳米粒子成功被细胞摄取,进而实现良好的细胞摄取效果。LNP可以在内核中携带mRNA并避免RNA酶的降解,LNP的亲脂性可使它和细胞膜融合,完成mRNA的递送。

3.2 鱼精蛋白

鱼精蛋白是一种碱性蛋白质,主要在鱼类成熟精子的细胞核中作为和DNA结合的核精蛋白存在。鱼精蛋白也是一种天然的阳离子蛋白,与带负电的mRNA络合成纳米级别的核酸颗粒,保护其不被降解^[35]。但由于鱼精蛋白与mRNA结合的较紧密,使它在体内的表达效率降低,因此鱼精蛋白使用率较低。

3.3 聚合物载体

常用的聚合物递送载体有聚酰胺、聚 β 氨基酯和聚乙烯亚胺等,其中聚乙烯亚胺的应用较广泛。由于聚合物载体的不良反应较强,且和mRNA结合比较紧密,因此使用率也较低。此外,Prieve等^[36]发

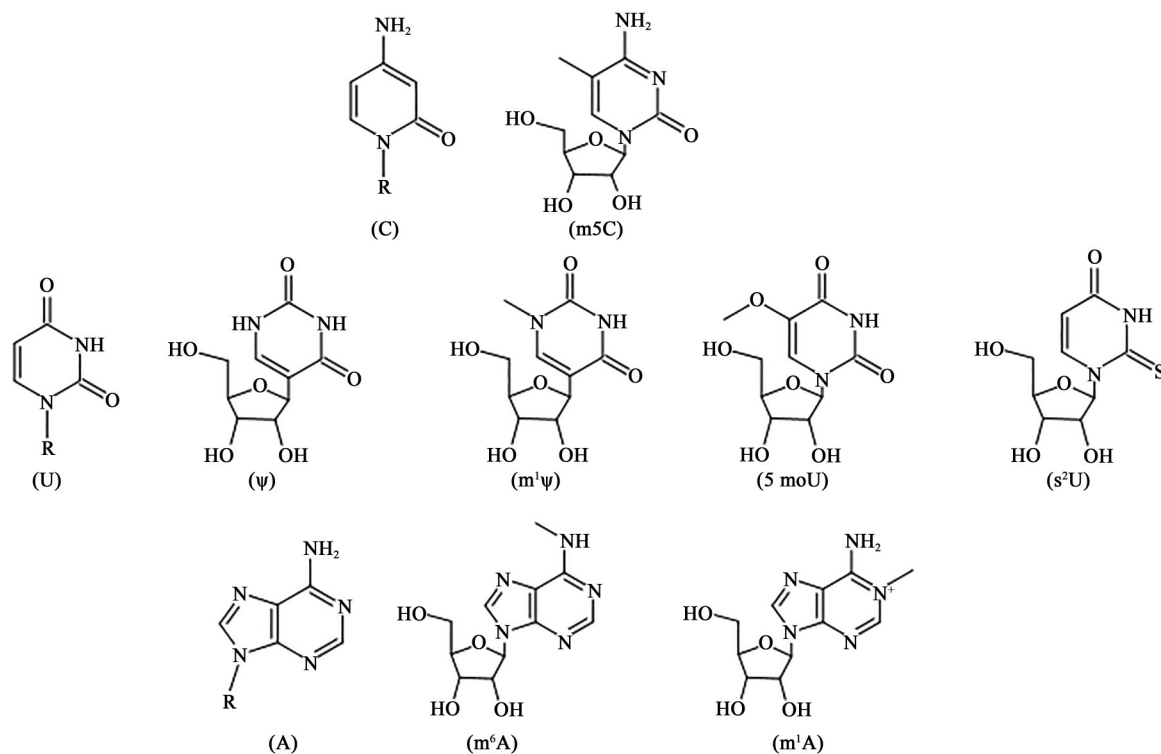


图2 核苷酸的基本结构与化学修饰

Fig. 2 Basic structure and chemical modification of nucleotides

明了一种新的递送技术——结合脂质和聚合物颗粒来递送 mRNA,这种递送载体包含聚合物胶束和 LNP 2 种纳米粒子,其中聚合物胶束以肝细胞为靶点,促进 mRNA 在内体中的释放并产生特异性蛋白质。

3.4 病毒载体

一些正链 RNA 病毒,如甲病毒属(辛德华斯病毒、福斯特病毒)、小核糖核酸病毒、黄病毒、仙台病毒等可携带目的基因进入人体细胞核,可用于 mRNA 的递送。

3.5 类病毒载体

已有研究人员开发了工程化无 DNA 类病毒颗粒(virus-like particles, eVLP),这种类病毒颗粒在逆转录病毒的基础上做了大量改造和优化,以解决包装、递送和释放中存在的问题。它能够在人类细胞、多种小鼠器官和组织(如肝脏、大脑、眼睛)中进行有效的基因编辑^[37]。eVLP 是由病毒蛋白组装而成的小颗粒,可模拟病毒进入细胞并运送分子货物,在颗粒表面使用不同的分子,就可递送到不同的目的地。由于 eVLP 内没有病毒的遗传物质,不会在细胞中插入外来的 DNA,因此被认为比用真正病毒作载体的递送方法更安全。

4 mRNA 疫苗应用进展

2020 年,有研究人员开发了黑色素瘤疫苗 Fix-Vac,它是一种通过静脉注射的纳米颗粒脂质体 mRNA 疫苗,其能靶向作用于淋巴组织中未成熟的树突状细胞,并驱动肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAAs)在 MHC I 类和 II 类分子上呈现^[38]。研究人员通过利用 TLR 配体刺激后细胞内葡萄糖的消耗来判断 FixVac 是否靶向,在 RNA-LPX 注射后进行 [¹⁸F]-氟-2-脱氧-2-d-葡萄糖-正电子发射断层扫描/计算机断层扫描,发现脾脏中葡萄糖代谢活性显著增加,表明免疫细胞进行了快速靶向和瞬时激活^[39]。研究者又通过测量血浆中细胞因子含量来评估佐剂性,IFN-α、IFN-γ、IL-6、IFN-IP-10 和 IL-12 p70 含量随着 Fix-Vac 剂量的增加而增加,并伴有体温的短暂升高,细胞因子含量在治疗后 2~6 h 达到高峰,并在 24 h 内恢复正常^[40]。这种疫苗包含了 4 种 TAAs,分别是 NY-ESO-1、MAGE-A3、酪氨酸酶和 TPTE,通过诱导机体的效应 T 细胞对 TAAs 产生反应,并介导免疫检查点阻滞剂(immune checkpoint blockades, ICB)对晚期黑色素瘤患者产生持久的反应^[41]。

ELISPOT分析表明,患者在接种疫苗后至少对一种TAA产生特异性T细胞反应,其中大多数仅表现为CD4⁺T细胞反应,少数患者表现出CD8⁺和CD4⁺T细胞反应。在每月接受FixVac增强剂的患者体内,TAA特异性效应T细胞的频率继续增加或保持稳定,但在没有连续接种疫苗的患者体内记忆T细胞也持续存在。某些患者在PD-1抑制剂治疗失败后接种FixVac疫苗,会出现肿瘤消退的现象,而在接受过ICB的患者中,接受FixVac和抗PD-1联合治疗的患者肿瘤消退率超过35%,因此FixVac疫苗既可作为单一药物使用,也可与抗PD-1抑制剂协同作用达到抗肿瘤效果。

2022年美国癌症研究所(Cancer Research Institute)进行了一项临床试验旨在评估NSCLC检查点抑制剂与mRNA疫苗联合治疗的安全性和初步疗效。该mRNA疫苗包含6种抗原,分别是MUC1、survivin、NY-ESO-1、5T4、MAGE C2及MAGE C1。临床试验中病人分为2组,A组接受mRNA疫苗和PD-1抑制剂治疗,B组接受mRNA疫苗和PD-1抑制剂、CTLA-4抑制剂治疗,结果显示,B组患者的治疗效果较好,且接受治疗后出现的不良反应症状较轻,死亡人数较少(临床试验编号NCT03164772)。

2022年6月,中国军事医学科学院、沃森生物公司和艾博生物公司合作完成了一项在300名中国成年人中进行的临床试验,结果显示接种两剂灭活新冠疫苗后,使用mRNA疫苗ARCoV(也叫作AWcora)作为第三针加强针,与继续使用灭活疫苗作为加强针相比,能够引发更强的针对新冠野生毒株、Delta突变株和Omicron突变株的免疫反应。这项临床试验证实了ARCoV作为第三针疫苗接种的安全性和有效性,也标志着我国第一个mRNA疫苗有望获批。

5 展望

随着研究的不断深入,mRNA疫苗技术已经日渐成熟,Karikó等^[2,26]的研究使其翻译效率和稳定性提高,各种递送系统使其成功进入人体细胞并激发高效的免疫应答。从mRNA本身的特性、引发的免疫反应情况等方面来看,mRNA疫苗优于亚单位疫苗、灭活疫苗等。但mRNA疫苗大规模用于人体的时间尚短,需进行长期不良反应监测,以验证其安全性及有效性^[42]。到目前为止,在

癌症的免疫治疗中通过将mRNA转入树突状细胞方面存在瓶颈,使mRNA疫苗在治疗方面的应用受到限制,将其应用于不同类型疾病的治疗研究还需不断的拓展。总之,mRNA疫苗的研究在疾病预防、治疗等方面具有重大意义。

参 考 文 献

- [1] 古丽米热·依米提,斯坎德尔·白克力,王延蛟.大鼠肝癌模型中*Piwi4*、*Mael*和*Ddx4*基因mRNA和蛋白表达水平及其与肿瘤检测的关系[J].生物技术进展,2020,10(1):74-79.
- [2] KARIKÓ K, BUCKSTEIN M, NI H, *et al.* Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA[J]. *Immunity*, 2005, 23(2): 165-175.
- [3] RUIZ R, HUNIS B, RAEZ L E. Immunotherapeutic agents in non-small-cell lung cancer finally coming to the front lines[J]. *Curr. Oncol. Rep.*, 2014, 16(9): 1-10.
- [4] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247(4949): 1465-1468.
- [5] JIRIKOWSKI G F, SANNA P P, MACIEJEWSKI-LENOIR D, *et al.* Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA[J]. *Science*, 1992, 255(5047): 996-998.
- [6] CONRY R M, LOBUGLIO A F, WRIGHT M, *et al.* Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector[J]. *Gland Surg.*, 1995, 55(7): 1397-1400.
- [7] HEISER A, COLEMAN D, DANNUL J, *et al.* Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors[J]. *J. Clin. Investig.*, 2002, 109(3): 409-417.
- [8] WEIDE B, PASCOLO S, SCHEEL B, *et al.* Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients[J]. *J. Immunother.*, 2009, 32(5): 498-507.
- [9] SAHIN U, DERHOVANESEAN E, MILLER M, *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 222-226.
- [10] CHAUDHARY N, WEISSMAN D, WHITEHEAD K A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2021, 20(11): 817-838.
- [11] SAKURAI T, ITOH K, HIGASHITSUJI H, *et al.* A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells[J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(15): 15505-15514.
- [12] GEALL A J, VERMA A, OTTEN G R, *et al.* Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, 109(36): 14604-14609.
- [13] SHANMUGASUNDARAM M, SENTHILVELAN A, KORE A R. Recent advances in modified cap analogs: synthesis, biochemical properties, and mRNA based vaccines[J/OL]. *Chem. Rec.*, 2022, 22(8): e202200005[2022-04-14]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tcr.202200005>.

- [14] 孟子延, 马丹婧, 高雪, 等. mRNA疫苗及其作用机制的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2021(6): 740-744.
- [15] VLATKOVIC I. Non-immunotherapy application of LNP-mRNA: maximizing efficacy and safety[J/OL]. Biomedicines, 2021, 9(5): 530[2021-05-10]. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050530>.
- [16] MARUGGI G, ZHANG C, LI J, *et al.* mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases[J]. Mol. Ther., 2019, 27(4): 757-772.
- [17] LUNDSTROM K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines[J/OL]. Future Sci. OA, 2018, 4(5): FSO300[2018-05-04]. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0151>.
- [18] VON DER MÜLBE F, HOERR I, PASCOLO S. Pharmaceutical composition containing a stabilised mRNA optimised for translation in its coding regions: US10188748[P]. 2019-01-29.
- [19] 庄忻雨. 流感病毒mRNA疫苗的构建、制备与实验免疫研究[D]. 北京:军事科学院, 2020.
- [20] HERNÁNDEZ G, OSNAYA V G, PÉREZ-MARTÍNEZ X. Conservation and variability of the AUG initiation *Codon* context in eukaryotes[J]. Trends Biochem. Sci., 2019, 44(12): 1009-1021.
- [21] REISER A, WOSCHÉE D, MEHROTRA N, *et al.* Correlation of mRNA delivery timing and protein expression in lipid-based transfection[J]. Integr. Biol., 2019, 11(9): 362-371.
- [22] ZHAO T, HUAN Q, SUN J, *et al.* Impact of poly(A)-tail G-content on *Arabidopsis* PAB binding and their role in enhancing translational efficiency[J/OL]. Genome Biol., 2019, 20(1): 189 [2019-00-03]. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1799-8>.
- [23] CHANG H, YEO J, KIM J G, *et al.* Terminal uridylyltransferases execute programmed clearance of maternal transcriptome in vertebrate embryos[J]. Mol. Cell, 2018, 70(1): 72-82.
- [24] HOLTkamp S, KREITER S, SELMI A, *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells[J]. Blood, 2006, 108(13): 4009-4017.
- [25] MELSSEN M M, PETRONI G R, CHIANESE-BULLOCK K A, *et al.* A multi-peptide vaccine plus toll-like receptor agonists LPS or polyICLC in combination with incomplete Freund's adjuvant in melanoma patients[J/OL]. J. Immunother. Cancer, 2019, 7(1): 163[2019-06-27]. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0625-x>.
- [26] KARIKÓ K, MURAMATSU H, WELSH F A, *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability[J]. Mol. Ther., 2008, 16(11): 1833-1840.
- [27] LI B, LI B, LUO X, *et al.* Effects of chemically modified messenger RNA on protein expression[J]. Bioconjugate Chem., 2016, 27(3): 849-853.
- [28] JIANG H. Granulation of m1A-modified mRNAs protects their functionality through cellular stress[J]. J. Mol. Cell Biol., 2021, 12(11): 821-822.
- [29] ANDRIES O, CAFFERTY S M C, DE SMEDT S C, *et al.* N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice[J]. J. Control. Release, 2015, 217: 337-344.
- [30] WANG S, LV W, LI T, *et al.* Dynamic regulation and functions of mRNA m6A modification[J/OL]. Cancer Cell Int., 2022, 22(1): 48[2022-01-29]. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02452-x>.
- [31] HU Y, CHEN C, TONG X, *et al.* NSUN₂ modified by SUMO-2/3 promotes gastric cancer progression and regulates mRNA m5C methylation[J/OL]. Cell Death Dis., 2021, 12(9): 842[2021-09-09]. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04127-3>.
- [32] LIU Y, ZHAO Y, WU R, *et al.* mRNA m5C controls adipogenesis by promoting CDKN1A mRNA export and translation[J]. RNA Biol., 2021, 18(S2): 711-721.
- [33] PARDI N, MURAMATSU H, WEISSMAN D, *et al.* *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides[J]. Meth. Mol. Biol. Clifton. N. J., 2013, 969: 29-42.
- [34] YAMAMOTO A, KORMANN M, ROSENECKER J, *et al.* Current prospects for mRNA gene delivery[J]. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009, 71(3): 484-489.
- [35] 史迈, 江芮, 崔新霞, 等. 鱼精蛋白-siRNA不同形貌复合体的制备、结构及药效学分析[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(6): 1164-1171.
- [36] PRIEVE M G, HARVIE P, MONAHAN S D, *et al.* Targeted mRNA therapy for ornithine transcarbamylase deficiency[J]. Mol. Ther., 2018, 26(3): 801-813.
- [37] LIU X, LI Y, WANG Z, *et al.* Safety and superior immunogenicity of heterologous boosting with an RBD-based SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Chinese adults[J]. Cell Res., 2022, 32(8): 777-780.
- [38] 郭子豪, 裴铁民, 梁德森, 等. 胰岛素生长因子2 mRNA结合蛋白3与肿瘤的相关性研究进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(6): 711-717.
- [39] 于敏, 王敏, 魏延焕, 等. SARS-CoV-2病毒感染潜在关键分子生物标志物及免疫浸润特征分析[J]. 生物技术进展, 2022, 12(5): 760-768.
- [40] SAHIN U, OEHRM P, DERHOVANESEAN E, *et al.* An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma[J]. Nature, 2020, 585(7823): 107-112.
- [41] BORDON Y. An RNA vaccine for advanced melanoma[J/OL]. Nat. Rev. Immunol., 2020, 20(9): 517[2020-08-04]. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00417-7>.
- [42] 张月明, 罗雅琴, 郑伟, 等. 急性髓系白血病mRNA与非编码RNA差异表达谱及CeRNA调控网络分析[J]. 生物技术进展, 2023, 13(1): 146-153.