



mRNA 疫苗及其在动物传染病中的研究展望

陈鑫, 秦彤*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 基于信使 RNA(messenger RNA, mRNA)的核酸疫苗是近年来兴起的一种新型疫苗技术。与传统疫苗相比, mRNA 疫苗具有免疫原性强、安全性好、研发周期短、易于大规模生产等特点。过去的几年中, 狂犬病、流感等传染病的多种 mRNA 疫苗进入了临床试验, 并展现出良好的应用前景; 在新冠肺炎疫情期间, mRNA 疫苗的成功应用进一步验证了该平台, 同时也开启了 mRNA 疫苗在传染病预防特别是兽医领域应用的闸门。本文将从 mRNA 疫苗的类型和结构、递送系统、作用机制以及临床应用等几个方面进行详细综述, 以为 mRNA 疫苗在传染病领域的深入研发和应用提供借鉴。

关键词: mRNA 疫苗; 递送系统; 免疫反应; 传染性疾病; 人畜共患病

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2023)07-2732-11

mRNA Vaccine and Its Research Prospect in Zoonotic Diseases

CHEN Xin, QIN Tong*

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Nucleic acid vaccines based on messenger RNA (mRNA) are a new technology that has emerged in recent years. Compared with traditional vaccines, mRNA vaccines are characterized by strong immunogenicity, good safety, fast development cycle and easy large-scale production. In the past few years, kinds of mRNA vaccines for rabies and influenza and other applications, have entered clinical trials and shown good application prospects. The recent successful application of mRNA vaccines against COVID-19 further validates this platform. It also opens the floodgates to the application of mRNA vaccines for infectious disease prevention, particularly in veterinary medicine. In this paper, mRNA vaccine research, functional structures, delivery systems, the mechanism of action, and clinical applications, are reviewed in detail to provide references for research and development of mRNA vaccines in the field of animal disease prevention and control.

Key words: mRNA vaccine; delivery system; immune response; infectious diseases; zoonotic diseases

* **Corresponding author:** QIN Tong, E-mail: qintong@caas.cn

mRNA 疫苗是指通过体外转录(*in vitro* transcription, IVT)技术合成病原的 mRNA, 经递送系统递送至靶细胞, 并在细胞核糖体内被翻译为目的

抗原, 进而启动机体免疫应答反应的新型核酸疫苗。mRNA 疫苗是继第一代减毒/灭活疫苗和第二代亚单位疫苗基础上发展起来的第三代疫苗, 具有针对

收稿日期: 2022-11-18

基金项目: 中国农业科学院创新工程计划(ASTIP-IAS15)

作者简介: 陈鑫(1997-), 男, 山东德州人, 硕士生, 主要从事动物传染病病原学与流行病学研究, E-mail: 1210729369@qq.com

* 通信作者: 秦彤, 主要从事动物传染病病原学与流行病学研究, E-mail: qintong@caas.cn

病原体变异反应速度快、生产工艺简单、易规模化扩大等特点。

mRNA 疫苗的研究最早可追溯到 1990 年, Wolff 等^[1]发现在被注射含有特定基因的质粒 DNA 或 mRNA 的小鼠肌肉组织局部会产生该基因编码的蛋白产物。后续的研究发现,这种被核酸免疫的动物体内会产生针对该核酸编码抗原的特异性免疫反应^[2]。但由于 mRNA 不稳定、在组织内易被降解、细胞吸收率较低等缺陷,其研发进展缓慢。21 世纪后,随着 mRNA 合成、修饰和递送技术的发展,上述缺陷逐渐得到克服,mRNA 疫苗的研发也重新得到重视。2005 年,Weissman 和 Karikó 通过试验证明,使用修饰的核苷(假尿苷)代替尿苷可以降低体外转录 mRNA 的免疫原性^[3],提高 mRNA 在机体内的稳定性,并使 mRNA 具有更高的翻译水平^[4],这为后期研发 mRNA 疫苗奠定了基础。随着全球新冠肺炎疫情的暴发,mRNA 疫苗再次被推上历史舞台。2020 年底,BioNTech/辉瑞和 Moderna 的两款 mRNA 疫苗 BNT162b2、mRNA-1273 相继获批上市,在全球广泛应用,并取得了良好的免疫保护效果^[2]。本文将从 mRNA 疫苗的类型和结构、递送系统、作用机制以及临床应用等方面对 mRNA 疫苗进行全面综述,并对这个新兴疫苗平台在兽医领域的发展方向进行了展望。

1 mRNA 疫苗的类型和结构

mRNA 疫苗可以分为两种类型:非复制 mRNA 疫苗和自扩增 RNA 疫苗。虽然两者具有共同的结构,但自扩增 RNA 疫苗在编码区域包含用于 mRNA 复制的额外序列,从而实现细胞内 mRNA 扩增,可以在同等 mRNA 用量的情况下表达更多抗原^[5]。mRNA 疫苗由 mRNA 和递送系统两个部分组成,其中,mRNA 的功能是为抗原合成提供遗传信息,递送系统是将 mRNA 转入胞内,使 mRNA 免受核酸酶及机体免疫系统的干扰。一个合格的 mRNA 疫苗在 mRNA 和递送系统设计上均格外考究。

1.1 非复制 mRNA 疫苗结构组成

信使 RNA(message RNA),又称为 mRNA,是以线性 DNA 为模板通过转录方式获得的核糖核苷酸,作为模板参与蛋白质的合成过程。用于翻译的 mRNA 由 5' 帽子结构(5' cap)、5' 非翻译区(5' untranslated region, 5' UTR)、翻译区(coding se-

quence, CDS)、3' 非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)以及 poly(A)尾组成。体外转录的 RNA 需要通过加帽、加尾,以模拟天然 mRNA 结构和功能。有些研究人员会对序列进行密码子优化,同时引入 Kozak 序列,以增强 mRNA 翻译水平。

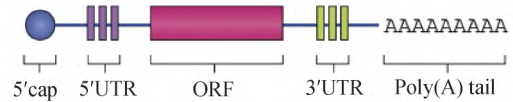


图 1 mRNA 疫苗结构^[6]

Fig.1 The structure of mRNA vaccine^[6]

1.1.1 5' 帽子结构 在真核生物中,成熟 mRNA 分子的 5' 端,有一种特殊结构: $m^7G5'ppp5'Np$,通常被称为甲基鸟苷帽子或 5' 帽子,用于调节前体 mRNA 的剪接,提升 mRNA 核输出,对于 mRNA 的稳定性和蛋白质翻译具有重要作用^[7]。此外,先天免疫系统也会通过 5' 帽子识别自身与非自身 mRNA,因此,5' 帽子可以帮助 IVT mRNA 逃脱免疫系统识别,使其免受外切核酸酶切割^[8]。

5' 帽子有 3 种类型,分别是 cap0、cap1 和 cap2。鸟苷 G 以 5'-5' 焦磷酸键与初级转录本的 5' 端核苷酸相连,当其第 7 位碳原子被甲基化后,形成 $m^7G5'ppp5'Np$,即 cap0。当转录本第一个核苷酸的 2'-O 位也发生甲基化时,形成 m^7GPPPN^1m ,此时形成的为 cap1,这是多数 5' 帽子的存在形式。当转录本第一和第二个核苷酸的 2'-O 位均发生甲基化时,会形成 $m^7GPPPN^1mN^2m$ 结构,即 cap2。哺乳动物细胞内 5' 帽子的主要形式是 cap1 和 cap2,两者在 cap0 的基础上进一步提高了体外转录 mRNA 的翻译效率。

5' 帽子通过 m^7G 的疏水性阳离子的相互作用和翻译起始期间三磷酸桥的负电荷结合真核生物翻译起始因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E),eIF4E 能够与支架蛋白(eIF4G)相互作用形成复合物,eIF4G 还能够与 poly(A) 结合蛋白(poly-adenosine binding protein, PABP)以及 eIF3 相互作用使 mRNA 环化,进而启动 mRNA 翻译^[9-11]。

目前,加帽主要是使用牛痘病毒加帽酶或通过化学共转录法进行^[12]。酶法加帽的过程相对复杂,但产量较高,加帽率近 100%,多用于大规模生产和实验室研究;与酶法加帽相比,化学共转录方法最大程度上减少了反应步骤和酶的用量,过程简单,但产

量和加帽率较低,不能满足大规模生产使用。在使用标准帽类似物进行化学共转录加帽时,会同时产生 $m^7GpppGN$ 和 $Gpppm^7GN$ 两种结构。为此,设计了抗反向帽类似物 (ARCA, $3'-O-Me-m^7G5'ppp5'G$), 其内包含一个 $5'-5'$ 三磷酸桥,可以有效解

决方向错误的问题^[13]。下一代共转录加帽技术 CleanCap 在 ARCA 的基础上进一步提升了产量,加帽率升至 94%^[14]。但目前没有研究证明何种加帽方式更具优势。

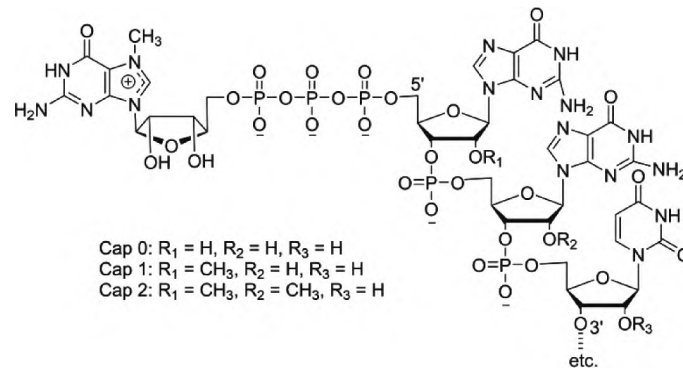


图 2 5'帽子结构^[15]

Fig.2 The structure of 5' cap^[15]

1. 1. 2 非翻译区 在天然 mRNA 分子编码区的 5'端和 3'端,有两个不被翻译成多肽的区域,称为非翻译区(untranslated regions, UTRs)。UTRs 上存在多个调控元件来控制 mRNA 的稳定性和翻译效率,除此之外,UTRs 还与 mRNA 二级结构以及核糖体对 mRNA 的识别有关^[16]。许多促进 mRNA 翻译的 UTRs 序列已经被从天然存在的序列中鉴定出来,如源自 α -珠蛋白和 β -珠蛋白的 UTRs 序列,目前已被广泛用于构建 IVT mRNA^[17]。

5'UTR 主要参与启动翻译过程,作为蛋白质翻译的预起始复合物的起始结合位点,在控制蛋白质翻译效率方面起着重要作用^[10]。eIF4A 与 5'UTR 的结合可以协助在蛋白质翻译发生之前解开 mRNA 的二级结构^[10],这对于 eIF1A 与 mRNA 的结合十分重要^[18]。目前在进行 mRNA 疫苗设计时,通常会在 5'UTR 下游引入 Kozak(GCCACC)序列,提高核糖体识别翻译起始位点的准确性,提升蛋白的表达效率。

3'UTR 中包含 mRNA 降解信号,优化 3'UTR 序列,可以有效提高 mRNA 的稳定性,延长半衰期,进而提升蛋白的表达效率。如 mRNA 的 3'UTR 中富含 A、U 的序列参与了 mRNA 降解过程中 poly(A)尾的去除,因此,改变 3'UTR 中的 A、U 含量可以延长 mRNA 半衰期,提高稳定性^[19]。

1. 1. 3 编码区 编码区序列(coding sequence, CDS)是用以编码目的蛋白的基因序列,在进行

mRNA 疫苗设计时,CDS 序列的设计对 mRNA 的翻译效率和免疫原性具有重要影响^[20]。CDS 的设计需要考虑以下几个因素:首先,不同宿主细胞的密码子偏好性不同,针对 mRNA 疫苗的目标物种进行密码子优化,使用常见密码子替代稀有密码子,可以显著增强 mRNA 在细胞内的翻译水平^[21],但有些蛋白质的部分密码子需要低翻译效率才能保证蛋白的正确折叠,因此需要对靶抗原进行抗原表位预测和蛋白结构预测;其次,研究表明,适当提高序列中鸟嘌呤和胞嘧啶(G 和 C)含量可以增加 mRNA 的稳定性和翻译效率,提高体外稳态 mRNA 含量和体内蛋白质表达水平^[21-22];再次,在设计 mRNA 序列时,增加其二级结构的含量,可以有效减少 mRNA 的降解。最近,一种专门为最大碱基堆叠区域设计最佳 mRNA 序列的算法也被证明可以显著提高 mRNA 稳定性^[23]。

1. 1. 4 poly(A)尾 在真核生物 mRNA 的 3'端,有一个聚腺苷酸化区域,被称为 poly(A)尾,其作用是与 PABP[poly(A)-binding protein]结合,后者随后募集 eIF4G 并增加对 mRNA 5'帽子的亲和力以形成环状 mRNA^[24]。除少数个例(例如组蛋白)外,所有编码 mRNA 的细胞蛋白都具有 poly(A)尾,其对于增强 mRNA 稳定性、提高翻译效率至关重要。在哺乳动物细胞中,天然 mRNA 分子的 poly(A)尾部长度约为 250 nt^[25]。通常,翻译效率与 poly(A)尾中的腺苷数量成正比^[26]。对于 mRNA 药物而言,需要至少

含有 20 nt poly(A)才能有效翻译^[27]。曾有研究表明,120 nt 的 poly(A)尾能够提高 mRNA 的稳定性和翻译效率^[28],但进行 mRNA 疫苗设计时添加 poly(A)尾的具体长度目前尚无定论。

1.1.5 修饰核苷酸 研究表明,IVT RNA 通过刺激 Toll 样受体(TLR),特别是 TLR3、TLR7 和 TLR8 来激活先天免疫系统的免疫细胞。然而,将修饰核苷如假尿苷(Ψ)、5-甲基胞苷(m^5C)、N6-甲基腺苷(m^6A)、5-甲基尿嘧啶(m^5U)或 2-硫代尿苷(S^2U)用于体外转录时,大多数 TLR 不再被激活^[4,29]。Karikó 等^[4]率先开发了用于产生 IVT mRNA 的修饰核苷酸,并声称将 IVT mRNA 中的尿苷替换为假尿苷不仅会降低针对 mRNA 的先天免疫反应,也能增强蛋白质翻译水平。然而,修饰核苷对 TLR 非依赖性免疫反应的影响尚不清楚。

1.2 自扩增 RNA 疫苗

自扩增 RNA (self-assembled RNA, saRNA) 疫苗除包含上述结构外,还引入了来自 RNA 病毒的促进 RNA 复制的其他结构:非结构蛋白基因 nsP1、nsP2、nsP3 和 nsP4。nsP1~4 分别编码负责 mRNA 加帽的蛋白、NTP 酶/解旋酶/蛋白酶、macrodomain 蛋白和 RNA 聚合酶^[30]。自扩增 RNA 进入宿主细胞质后,会通过核糖体中的内源性翻译机制,表达 nsP1~4 前体多聚蛋白,这些非结构蛋白重新组装成 RNA 依赖性 RNA 聚合酶转录酶复合物,以 IVT RNA 为底物分子供翻译为抗原的 mRNA^[31]。因此,一个 saRNA 可以产生多个 mRNA,进而提高抗原表达量。自扩增 RNA 疫苗单剂所需 RNA 的量更低,可以进一步降低疫苗成本^[32]。但自扩增 RNA 疫苗也存在着一定局限性,比如其庞大而复杂的 saRNA 序列,通常 nsP1~4 序列的长度约为 7 000 nt,这使 saRNA 疫苗的全长超过 9 000 nt^[5],过大的体积会限制 RNA 进入细胞的效率。目前,saRNA 疫苗已经表现出了良好的应用前景,Arcturus、CureVac 公司设计的 SARS-CoV-2 saRNA 疫苗已进入临床前研究阶段,Imperial College London 公司设计的 SARS-CoV-2 saRNA 疫苗率先进入 I 期临床试验。

2 递送系统

IVT mRNA 相对分子质量为 $10^4 \sim 10^6$ u,表面带有负电荷,因此难以通过胞吞等方式进入细胞^[33]。外源性 mRNA 进入机体时,易被机体先天

免疫系统捕获,也易被核酸酶降解^[34]。合适的递送系统对 mRNA 进入细胞、抗原表达水平、免疫持续时间以及保护性免疫反应效力具有重要作用。目前,常用的递送系统包括脂质纳米颗粒(LNP)、脂质体、脂质复合物、高分子材料、胶束、多肽、鱼精蛋白、电穿孔等^[33,35-37],其中 LNP 因其表现出的更高的转染效率已成为当下最常用的递送系统之一^[38-40]。

LNP 具有磷脂单分子层结构,带正电荷的 LNP 与带负电荷的 mRNA 通过静电作用,将 mRNA 包裹在 LNP 内^[33,41]。LNP 含有多种成分,以 Moderna 公司 Spikevax 疫苗为例,该疫苗中 LNP 的组成成分包括阳离子脂质(SM-102)、辅助脂质磷脂二甲酰磷脂胆碱(DSPC)、胆固醇(cholesterol)和聚乙二醇化脂质(PEG2000-DMG)^[42],这四种成分按 50:38.5:1.5:10 的比例混合,形成 LNP 复合物。这四种成分的功能各不相同,阳离子脂质可以根据不同内环境的 pH,通过电荷相互作用调节 LNP 的自组装和 mRNA 的释放^[43];辅助脂质通常是饱和磷脂,可以提高整体相变温度和稳定性^[44];胆固醇具有很强的膜融合能力,可以促进细胞对 mRNA 的摄入^[45];聚乙二醇化磷脂位于 LNP 表面,可以提高 LNP 亲水性,避免其被免疫系统快速清除,防止颗粒聚集,调节颗粒大小,并提高稳定性^[46]。

目前脂质纳米颗粒的制备方法主要有薄膜水化法、挤出法、均质法和反相蒸发等传统方法^[47]。与这些方法相比,采用微流控混合技术来制备 LNP,相对简便快速,条件温和,粒径均匀,转染效率高,容易实现生产放大^[48]。

在过去几年里,大量研究表明,使用 LNP 技术可以极大地促进 mRNA 的递送并增强抗原表达^[49]。这些研究阐述了 LNP 对 mRNA 疫苗诱导有效的免疫反应起到重要作用,但其机制尚不明晰^[50-51],未来需要作出更多努力,来阐明 LNP 递送 mRNA 的作用机制^[52]。

3 mRNA 疫苗诱导免疫应答的机制

非复制 mRNA 疫苗若要引发针对抗原的适应性免疫,必须通过宿主细胞的翻译机制将 mRNA 翻译成内源性抗原,内源性抗原在细胞内被蛋白酶体和溶酶体降解为小分子抗原片段后,分别激活 MHC I 类和 II 类途径,引起机体产生有效的细胞免疫和体液免疫。

mRNA 疫苗的免疫效果与接种途径有关,人们通常选择用皮内、肌肉和皮下注射,注射后 mRNA 可以转染至注射部位附近的非免疫细胞和组织驻留免疫细胞中^[53]。在非免疫细胞中,经翻译得到的抗原最初位于宿主细胞的胞质中,由于合成的抗原蛋白不用于细胞,因此它们在泛素化后作为内源性抗原被蛋白酶体降解^[2]。降解后的抗原片段与 MHC I 类分子形成复合物,随后抗原片段被呈递于细胞表面,供细胞毒性 T 淋巴细胞($CD8^+$ T 细胞)识别,进而激活 $CD8^+$ T 细胞介导的免疫应答反应^[54]。对于组织驻留免疫细胞,主要是针对抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC),如树突细胞(dendritic cells, DC)和巨噬细胞(macrophages)^[55]。与非免疫细胞不同的是,mRNA 转染至组织驻留免疫细胞后,除可以激活 MHC I 类途径,还能通过 MHC II 类途径处理抗原,进而激活 $CD4^+$ T 细胞介导的体液免疫应答^[54]。通常,MHC II 类途径由外源性抗原激活,但也存在交叉递呈途径,部分内源性

抗原可以通过自噬作用激活 MHC II 类途径^[56],还有一部分内源性抗原会分泌出胞外,重新作为外源性抗原被内吞入胞内,进而激活 MHC II 类途径^[5]。该过程是内源性抗原被分泌至胞外后,重新进入细胞,并被溶酶体降解为小分子抗原片段,随后进入内质网中,与 MHC II 类分子形成复合物,再经高尔基体转运至细胞表面,供 $CD4^+$ T 细胞识别^[57]。 $CD4^+$ T 细胞受抗原刺激后,通过分泌细胞因子等方式使 B 细胞成熟并分化为浆细胞,进而激活体液免疫应答^[58-59]。

由此可见,若想使 mRNA 引起有效的细胞和体液免疫反应,需要依靠内源性抗原同时激活 MHC I 类和 MHC II 类途径,其中能够激活 MHC II 类途径是成功激活体液免疫的关键。通常,MHC II 类途径由外源性抗原激活,如果引入分泌型信号肽,通过基因工程改造将抗原引导至胞外^[60],便可以将内源性抗原转换为外源性抗原,进而更有效激活 MHC II 类途径^[61]。

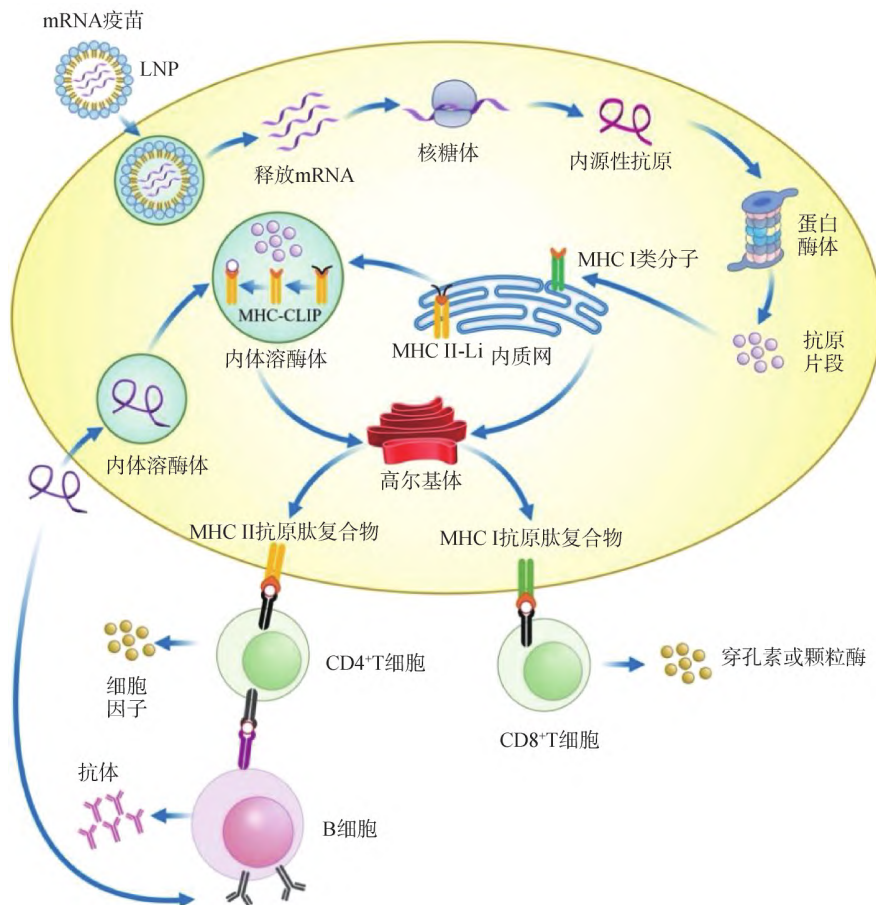


图3 mRNA 疫苗作用机制

Fig.3 Mechanism of action of mRNA vaccine

4 mRNA 疫苗的应用

mRNA 疫苗因其相较于传统疫苗更快的研发速度和良好的保护效力在新冠肺炎疫情防控中脱颖而出。2021 年 8 月 23 日,由 BioNTech 设计的 mRNA 疫苗(商品名为 Comirnaty)正式获批上市,用于预防 16 岁及以上人群的新冠病毒感染,临床试验结果显示,该疫苗预防新冠的有效率为 91%^[62]。当前,Moderna、NIAID、Canadian Immunization Research Network、BioNTech 和 CureVac 等多家公司研发的针对新冠的 mRNA 疫苗已进入临床阶段。此外,还有多种针对不同病原的 mRNA 疫苗(如人副流感病毒、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒、艾滋病毒等)也已经进入临床研究阶段,但目前没有更多数据得到披露^[63-64]。

表 1 进入临床试验的人畜共患病 mRNA 疫苗(截至 2022 年 12 月)

Table 1 List of mRNA vaccines against zoonoses in clinical trials(till December 2022)

疫苗名称 Vaccine name	研发单位 Research unit	病原 Pathogeny	靶抗原 Target antigen	临床阶段 Phase	临床登记号 Clinical registration number
mRNA-1893	Moderna	寨卡病毒	prM 和 E 蛋白	I 期	NCT04064905
mRNA-1893	Moderna	寨卡病毒	prM 和 E 蛋白	II 期	NCT04917861
VAL-506440	Moderna	H10N8 流感病毒	HA 蛋白	I 期	NCT03076385
VAL-339851	Moderna	H7N9 流感病毒	HA 蛋白	I 期	NCT03345043
mRNA-1010	Moderna	四价季节性流感	HA 蛋白	I 期	NCT04956575
CV7201	CureVac	狂犬病病毒	G 蛋白	I 期	NCT02241135
CV7202	CureVac	狂犬病病毒	G 蛋白	I 期	NCT03713086
GSK3903133A	GlaxoSmithKline	狂犬病病毒	G 蛋白	I 期	NCT04062669
mRNA-1944	Moderna	基孔肯雅病毒	CHKV-24 蛋白	I 期	NCT03829384
mRNA-1388	Moderna	基孔肯雅病毒	CHKV-24 蛋白	I 期	NCT03325075
mRNA-1215	Moderna	尼帕病毒	未知	I 期	NCT05398796

表中数据出自 <https://clinicaltrials.gov/>

The data in the table comes from <https://clinicaltrials.gov/>

5 mRNA 疫苗在兽医领域的挑战和展望

与减毒活疫苗和灭活疫苗相比,mRNA 疫苗以 IVT mRNA 为主要成分,排除了在传统疫苗中常见的内毒素和其他等感染风险。此外,mRNA 疫苗进入细胞质即可表达,无需进入细胞核,不会产生 DNA 疫苗存在的基因组突变的风险,其安全性优于 DNA 疫苗和病毒活载体疫苗。且不同于传统疫苗

针对人畜共患病的 mRNA 疫苗也已有多种进入临床试验。2015 年 12 月—2017 年 8 月,德国和美国开展了 H10N8 和 H7N9 流感病毒 mRNA 疫苗的 I 期临床试验,评估了流感病毒 mRNA 疫苗的安全性和免疫原性。结果表明,疫苗没有导致严重的不良反应,并能引起强烈的体液免疫反应^[65]。2021 年 11 月 23 日,CureVac 公司完成了对狂犬病病毒 mRNA 疫苗 CV7202 的 I 期临床试验,用以评估在成人中的安全性、反应原性和免疫原性,受试者分别接种了 1、2 和 5 μg mRNA,结果表明 1 和 2 μg 剂量的耐受性更好,二者均诱导产生了中和抗体,提高了 IgG 水平,没有引起相关的安全问题,与商品化狂犬病疫苗相当^[66]。表 1 中汇总了进入临床试验的人畜共患病 mRNA 疫苗。

动辄数年甚至数十年的研发周期,mRNA 疫苗的研发速度也远超于其他疫苗,这种极短的研发周期对攻克具有高突变率特点的病毒来说,具有重要意义。但是,mRNA 疫苗的研发也存在一些问题。由于知识产权分散,mRNA 疫苗通常是由不同部门的许多参与者共同完成的,这种多头合作会增加沟通成本,降低 mRNA 疫苗研发效率^[67]。此外,虽然使用 LNP 可以提高 mRNA 递送效率,但 LNP 的不稳定

性要求 mRNA 疫苗的储存和运输需满足苛刻的条件。有研究显示,基于 LNP 的 mRNA 疫苗冻干化处理后可以在室温下长期储存,这为 mRNA 疫苗的储存和运输提供了一个潜在的解决方案^[68]。随着全球合作的进一步深化,mRNA 疫苗的专利限制和技术瓶颈等问题或许有望得到解决。

目前,虽然没有兽用 mRNA 疫苗进入临床试验阶段,但新冠 mRNA 疫苗的成功上市依旧点燃了人们对研发兽用 mRNA 疫苗的热情。我国是畜牧业大国,动物传染病是制约我国畜牧业发展的重要原因,其中人畜共患病也会对人类的健康和生命财产安全产生重大影响,而接种有效的疫苗是预防和控制传染病最有效的公共卫生干预措施之一^[69]。当前影响畜牧业生产和发展的主要动物传染病如非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)等,其疫苗保护效力均不理想,mRNA 疫苗已在以上动物传染病疫苗研发中展现出了巨大的潜力。在此,作者将以动物冠状病毒和非洲猪瘟病毒为例展望 mRNA 疫苗在兽医领域的应用。

5.1 基于动物冠状病毒 RBD 区的 mRNA 疫苗

冠状病毒的宿主谱广泛,除了人类之外,还能够感染猪、牛等家畜以及宠物犬、猫等多种动物^[70]。感染不同物种的冠状病毒具有遗传结构相似性,刺突蛋白(S 蛋白)是冠状病毒主要的结构蛋白,也是诱发细胞免疫和体液免疫的重要组成成分。S 蛋白由 S1 和 S2 两个亚基组成,S1 亚基包含一个受体结合域,即 RBD 区,负责与特定的受体结合,而 S2 亚基则介导病毒和宿主细胞膜的融合。各种证据表明,RBD 区是诱导机体产生中和抗体的主要靶点,因此,这一区域也成为疫苗研发的重点目标^[31]。新冠肺炎大流行期间,多个公司基于新冠病毒 RBD 区域设计开发了多款 mRNA 疫苗,数据显示,基于 RBD 区的候选疫苗,如 BNT162b1、mRNA-1273 等均具有良好的免疫原性^[71]。

人类 mRNA 疫苗的成功为 mRNA 疫苗在兽医学中的应用展示了希望。猪流行性腹泻、猪传染性胃肠炎及新发的猪急性腹泻综合征均是由冠状病

毒引发的严重危害养猪业的重要胃肠道传染病^[70],常用的灭活疫苗、减毒活疫苗和基因工程疫苗虽然对于防控冠状病毒感染起到了一定的效果,但由于冠状病毒易发生重组或突变,常规疫苗在防控方面往往不尽如人意,研发基于猪冠状病毒 RBD 区的 mRNA 疫苗或许将为疾病防控提供新思路。在宠物疫病方面,猫传染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV)是目前发生最普遍的一种由冠状病毒变异株引起的高度致死性传染病,目前没有商品化的疫苗上市^[72]。随着对动物冠状病毒 RBD 和细胞表面受体认识的进一步深入,基于 RBD 的 mRNA 疫苗将成为一种对抗新发和再发动物冠状病毒非常有前途的策略。

5.2 T 细胞靶向的非洲猪瘟 mRNA 疫苗

非洲猪瘟(ASF)是由非洲猪瘟病毒(ASFV)引起的猪的一种急性、热性、高度接触性传染病,所有品种和年龄的猪均可感染,发病率和死亡率最高可达 100%。由于缺乏有效的疫苗,非洲猪瘟已经蔓延到许多国家并造成了严重的经济损失。我国 2019 年至今非洲猪瘟已造成近 700 万头猪死亡^[73]。国内外科研人员虽然已经开发出多种删除了毒力基因的 ASFV 减毒活疫苗候选疫苗株,但这些减毒疫苗的大规模生产严重依赖于原代猪肺泡巨噬细胞或骨髓细胞,既耗时又费钱^[74-76];基于结构蛋白设计的重组蛋白疫苗,虽会诱导出相应中和抗体,并延迟临床症状,但中和抗体无法提供充分的保护。研究证明 T 细胞在 ASFV 的抗病毒免疫和保护中发挥重要作用。近期,科研人员利用 iVAX 计算疫苗设计平台,在 ASFV 编码的蛋白质中鉴定出高度保守的细胞毒性 T 细胞表位^[77-78],开发了一种含有预测的猪 MHC I 类和 II 类表位的 T 细胞靶向 ASF DNA 疫苗,并正在评估这种新型疫苗的免疫原性^[79-81]。考虑到 DNA 疫苗存在整合到宿主基因组的潜在风险,基于 mRNA 的疫苗方法有可能促进安全有效 ASF 疫苗的改进。ASFV 为大型双链 DNA 病毒,基因组大小为 170~194 kb,含有 150~167 个开放阅读框,编码 150~200 种蛋白质,目前仍有一半以上的 ASFV 编码蛋白功能尚不清楚。随着研究的逐渐深入,更多潜在的 T 细胞表位将被挖掘,为开发具有更大表位范围的 T 细胞靶向 mRNA 疫苗提供了广阔前景。

参考文献(References):

[1] WOLFF J, MALONE R, WILLIAMS P, et al.

- Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. *Science*, 1990, 247(4949):1465-1468.
- [2] KWON S, KWON M, IM S, et al. mRNA vaccines: the most recent clinical applications of synthetic mRNA[J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45(4):245-262.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] KIM J, EYGERIS Y, GUPTA M, et al. Self-assembled mRNA vaccines[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2021, 170:83-112.
- [6] 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.
- [7] RAMANATHAN A, ROBB G B, CHAN S H. mRNA capping: biological functions and applications [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(16):7511-7526.
- [8] DAFFIS S, SZRETTER K J, SCHRIEWER J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members [J]. *Nature*, 2010, 468(7322):452-456.
- [9] QIN S G, TANG X S, CHEN Y T, et al. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):166.
- [10] HINNEBUSCH A G, IVANOV I P, SONENBERG N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs[J]. *Science*, 2016, 352(6292): 1413-1416.
- [11] ZOHRA F T, CHOWDHURY E H, TADA S, et al. Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mRNA-based transfection [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(1): 373-378.
- [12] LADAK R J, HE A J, HUANG Y H, et al. The current landscape of mRNA vaccines against viruses and cancer—A mini review[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:885371.
- [13] MUTTACH F, MUTHMANN N, RENTMEISTER A. Synthetic mRNA capping [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2017, 13:2819-2832.
- [14] HENDERSON J M, UJITA A, HILL E, et al. Cap 1 messenger RNA synthesis with Co-transcriptional CleanCap[®] analog by *in vitro* transcription[J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(2):e39.
- [15] SHANMUGASUNDARAM M, SENTHILVELAN A, KORE A R. Recent advances in modified cap analogs: synthesis, biochemical properties, and mRNA based vaccines [J]. *Chem Rec*, 2022, 22 (8):e202200005.
- [16] CHATTERJEE S, PAL J K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases [J]. *Biol Cell*, 2009, 101(5):251-262.
- [17] SCHROM E, HUBER M, ANEJA M, et al. Translation of angiotensin-converting enzyme 2 upon liver - and lung-targeted delivery of optimized chemically modified mRNA [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7:350-365.
- [18] SVITKIN Y V, PAUSE A, HAGHIGHAT A, et al. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure[J]. *RNA*, 2001, 7(3):382-394.
- [19] BARREAU C, PAILLARD L, OSBORNE H B. AU-rich elements and associated factors; are there unifying principles? [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(22):7138-7150.
- [20] DE JONGH R P H, VAN DIJK A D J, JULSING M K, et al. Designing eukaryotic gene expression regulation using machine learning [J]. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(2):191-201.
- [21] THESS A, GRUND S, MUI B L, et al. Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals [J]. *Mol Ther*, 2015, 23 (9): 1456-1464.
- [22] KUDLA G, LIPINSKI L, CAFFIN F, et al. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4 (6):e180.
- [23] WAYMENT-STEELE H K, KIM D S, CHOE C A, et al. Theoretical basis for stabilizing messenger RNA through secondary structure design [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(18):10604-10617.
- [24] YU S, KIM V N. A tale of non-canonical tails: gene regulation by post-transcriptional RNA tailing [J].

- Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(9):542-556.
- [25] TANG T T L, PASSMORE L A. Recognition of poly (A) RNA through its intrinsic helical structure[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2019, 84: 21-30.
- [26] OH S, KESSLER J A. Design, assembly, production, and transfection of synthetic modified mRNA[J]. *Methods*, 2018, 133:29-43.
- [27] ELANGO N, ELANGO S, SHIVSHANKAR P, et al. Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)₁₀₀ tail-containing vector [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(3):958-966.
- [28] ECKMANN C R, RAMMELT C, WAHLE E. Control of poly(A) tail length[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, 2(3):348-361.
- [29] LACZKÓ D, HOGAN M J, TOULMIN S A, et al. A single immunization with nucleoside-modified mRNA vaccines elicits strong cellular and humoral immune responses against SARS-CoV-2 in mice[J]. *Immunity*, 2020, 53(4):724-732.
- [30] ABU BAKAR F, NG L F P. Nonstructural proteins of alphavirus-potential targets for drug development [J]. *Viruses*, 2018, 10(2):71.
- [31] HAAKE C, COOK S, PUSTERLA N, et al. Coronavirus infections in companion animals: virology, epidemiology, clinical and pathologic features[J]. *Viruses*, 2020, 12(9):1023.
- [32] COHEN J. First self-copying mRNA vaccine proves itself in pandemic trial [J]. *Science*, 2022, 376(6592):446.
- [33] LI M Y, LI Y, LI S Q, et al. The nano delivery systems and applications of mRNA[J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 227:113910.
- [34] KNUDSON C J, ALVES-PEIXOTO P, MURAMATSU H, et al. Lipid-nanoparticle-encapsulated mRNA vaccines induce protective memory CD8 T cells against a lethal viral infection [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(9):2769-2781.
- [35] JARZEBSKA N T, LAUCHLI S, ISELIN C, et al. Functional differences between protamine preparations for the transfection of mRNA[J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1):1231-1235.
- [36] COPPIN L, LECLERC J, VINCENT A, et al. Messenger RNA life-cycle in cancer cells; emerging role of conventional and non-conventional RNA-binding proteins? [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3):650.
- [37] LI B, ZHANG X F, DONG Y Z. Nanoscale platforms for messenger RNA delivery [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2019, 11(2):e1530.
- [38] EYGERIS Y, PATEL S, JOZIC A, et al. Deconvoluting lipid nanoparticle structure for messenger RNA delivery[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(6):4543-4549.
- [39] ALAMEH M G, TOMBÁCZ I, BETTINI E, et al. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses [J]. *Immunity*, 2021, 54(12):2877-2892. e7.
- [40] KOWALSKI P S, RUDRA A, MIAO L, et al. Delivering the messenger; advances in technologies for therapeutic mRNA delivery[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4):710-728.
- [41] HOU X C, ZAKS T, LANGER R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery [J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(12):1078-1094.
- [42] BADEN L R, EL SAHLY H M, ESSINK B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(5):403-416.
- [43] CUI S H, WANG Y Y, GONG Y, et al. Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2018, 7(3): 473-479.
- [44] GUIMARAES P P G, ZHANG R, SPEKTOR R, et al. Ionizable lipid nanoparticles encapsulating barcoded mRNA for accelerated *in vivo* delivery screening[J]. *J Control Release*, 2019, 316:404-417.
- [45] HORIUCHI Y, LAI S J, YAMAZAKI A, et al. Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(2):BSR20180144.
- [46] BASKARARAJ S, PANNEERSELVAM T, GOVINDARAJ S, et al. Formulation and characterization of folate receptor-targeted PEGylated liposome encapsulating bioactive compounds from *Kappaphycus alvarezii* for cancer therapy [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(3):136.
- [47] 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[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(10): 2507-2522.

- [48] TO K K W, CHO W C S. An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, 16 (11): 1307-1317.
- [49] ZHANG C L, MARUGGI G, SHAN H, et al. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:594.
- [50] SCHOENMAKER L, WITZIGMANN D, KULKARNI J A, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines;structure and stability[J]. *Int J Pharm*, 2021, 601:120586.
- [51] VERBEKE R, HOGAN M J, LORÉ K, et al. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines [J]. *Immunity*, 2022, 55(11):1993-2005.
- [52] COOLEN A L, LACROIX C, MERCIER-GOUY P, et al. Poly (lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering their activation [J]. *Biomaterials*, 2019, 195:23-37.
- [53] PROBST J, WEIDE B, SCHEEL B, et al. Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA *in vivo* is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent [J]. *Gene Ther*, 2007, 14 (15): 1175-1180.
- [54] PARDI N, HOGAN M J, PORTER F W, et al. mRNA vaccines-a new era in vaccinology[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4):261-279.
- [55] LINDSAY K E, BHOSLE S M, ZURLA C, et al. Visualization of early events in mRNA vaccine delivery in non-human primates via PET-CT and near-infrared imaging[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3 (5):371-380.
- [56] MÜNZ C. Antigen processing for MHC class ii presentation via autophagy [J]. *Front Immunol*, 2012, 3:9.
- [57] BELL G D, YANG Y, LEUNG E, et al. mRNA transfection by a Xentry-protamine cell-penetrating peptide is enhanced by TLR antagonist E6446 [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e0201464.
- [58] BAEZA GARCIA A, SIU E, SUN T, et al. Neutralization of the *Plasmodium*-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2714.
- [59] PARDI N, HOGAN M J, NARADIKIAN M S, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(6):1571-1588.
- [60] MARUGGI G, CHIAROT E, GIOVANI C, et al. Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens[J]. *Vaccine*, 2017, 35(2):361-368.
- [61] CORBETT K S, EDWARDS D K, LEIST S R, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness[J]. *Nature*, 2020, 586(7830):567-571.
- [62] THOMAS S J, MOREIRA E D Jr, KITCHIN N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine through 6 months[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(19):1761-1773.
- [63] KADAMBARI S, EVANS C, LYALL H. Congenital infections; priorities and possibilities for resource-limited settings[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2023, 42 (2):e45-e47.
- [64] ABBASI J. Moderna's mRNA vaccine for seasonal flu enters clinical trials [J]. *JAMA*, 2021, 326 (14):1365.
- [65] FELDMAN R A, FUHR R, SMOLENOV I, et al. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials[J]. *Vaccine*, 2019, 37(25):3326-3334.
- [66] ALDRICH C, LEROUX-ROELS I, HUANG K B, et al. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers;a phase 1 trial[J]. *Vaccine*, 2021, 39(8):1310-1318.
- [67] KUMAR A, BLUM J, THANH LE T, et al. The mRNA vaccine development landscape for infectious diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21 (5): 333-334.
- [68] MURAMATSU H, LAM K, BAJUSZ C, et al. Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(5):1941-1951.
- [69] RAHMAN T, SOBUR A, ISLAM S, et al. Zoonotic diseases; etiology, impact, and control [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9):1405.
- [70] WOO P C Y, LAU S K P, HUANG Y, et al. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234 (10):1117-1127.
- [71] GREANEY A J, LOES A N, GENTLES L E, et al. Antibodies elicited by mRNA-1273 vaccination bind more broadly to the receptor binding domain than do

- those from SARS-CoV-2 infection[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(600):eabi9915.
- [72] IZES A M, YU J, NORRIS J M, et al. Current status on treatment options for feline infectious peritonitis and SARS-CoV-2 positive cats[J]. *Vet Quart*, 2020, 40(1):322-330.
- [73] ZHAO D M, LIU R Q, ZHANG X F, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1):438-447.
- [74] CHEN W Y, ZHAO D M, HE X J, et al. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(5):623-634.
- [75] BORCA M V, RAMIREZ-MEDINA E, SILVA E, et al. ASFV-G- Δ I177L as an effective oral nasal vaccine against the Eurasia strain of Africa swine fever[J]. *Viruses*, 2021, 13(5):765.
- [76] BORCA M V, RAMIREZ-MEDINA E, SILVA E, et al. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain[J]. *J Virol*, 2020, 94(7):e02017-19.
- [77] ROS-LUCAS A, CORREA-FIZ F, BOSCH-CAMÓS L, et al. Computational analysis of African swine fever virus protein space for the design of an epitope-based vaccine ensemble[J]. *Pathogens*, 2020, 9(12):1078.
- [78] BOSCH-CAMÓS L, LÓPEZ E, NAVAS M J, et al. Identification of promiscuous African swine fever virus T-cell determinants using a multiple technical approach[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(1):29.
- [79] BURMAKINA G, MALOGOLOVKIN A, TULMAN E R, et al. Identification of T-cell epitopes in African swine fever virus CD2v and C-type lectin proteins[J]. *J Gen Virol*, 2019, 100(2):259-265.
- [80] MOISE L, GUTIÉRREZ A H, KHAN S, et al. New immunoinformatics tools for swine: designing epitope-driven vaccines, predicting vaccine efficacy, and making vaccines on demand[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:563362.
- [81] PÉREZ-NÚÑEZ D, SUNWOO S Y, SÁNCHEZ E G, et al. Evaluation of a viral DNA-protein immunization strategy against African swine fever in domestic pigs[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2019, 208:34-43.

(编辑 白永平)