

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-085

RNA疫苗的设计与递送

杨璐¹, 张镜明², 徐杉¹, 童贻刚¹

(¹ 北京化工大学生命科学与技术学院, 绿色生物制造国家重点实验室, 中国 北京 100029; ² 合肥市综合性国家中心大健康研究院, 先进医药与再生医学研究所, 安徽 合肥 230601)

摘要: RNA疫苗因其快速开发和高效免疫原性成为疫苗领域的革命性技术。本文综述了RNA疫苗的设计优化与递送策略, 聚焦线性mRNA、环状RNA (circular RNA, circRNA) 和自扩增RNA (self-amplifying RNA, saRNA) 三大类型的分子特征与应用潜力。在设计优化方面, 线性mRNA通过5'帽结构、UTR (untranslated region, UTR) 优化、密码子选择和poly(A)尾延长提升稳定性和翻译效率; circRNA凭借共价闭合结构抵抗核酸酶降解, 实现长效表达; saRNA利用病毒复制机制扩增抗原产量, 降低剂量需求。在递送系统中, 脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 仍占据主导地位, 但其可电离脂质设计和靶向配体修饰正不断优化递送效率。此外, 病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 作为新型递送载体, 凭借天然的空心结构和自组装特性, 兼具高生物相容性与高效mRNA装载能力, 同时可模拟天然病毒入侵途径, 增强细胞摄取。最后展望了其在个性化肿瘤疫苗和通用型传染病预防中的应用前景, 通过整合创新递送系统 (如VLP) 与智能化设计, mRNA疫苗技术将迈向更精准、安全的下一代平台。

关键词: RNA疫苗; 环状mRNA (circRNA); 自扩增mRNA (saRNA); 疫苗设计; 递送系统; 脂质纳米颗粒; 病毒样颗粒

中图分类号: R392 文献标志码: A

Design and delivery of RNA vaccines

YANG Lu¹, ZHANG Jingming², XU Shan¹, TONG Yigang¹

(¹State Key Laboratory of Green Biomanufacturing, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; ²Institute of Advanced Medicine and Regenerative Medicine, Institute of Health and Medicine, Hefei Comprehensive National Science Center, Hefei 230601, Anhui, China)

Abstract: RNA vaccines have emerged as a revolutionary technology in vaccinology due to their rapid development and high immunogenicity. This article systematically reviews the latest research progress in molecular design and delivery systems of mRNA vaccines, with a focus on three major types: linear mRNA, circular RNA (circRNA), and self-amplifying RNA (saRNA). It highlights that mRNA vaccines, with their rapid development, high immunogenicity, and favorable safety profiles, have become a significant breakthrough in vaccine technology, demonstrating immense

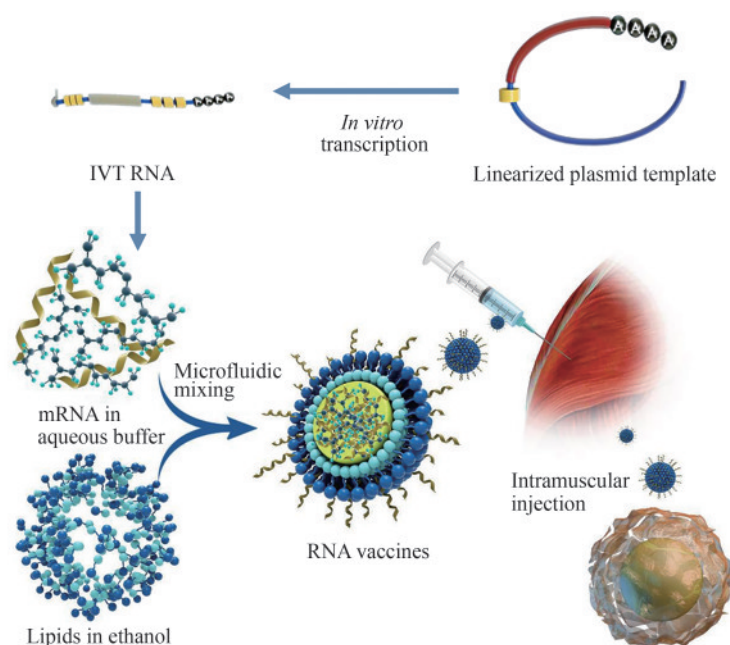
收稿日期: 2025-08-15 修回日期: 2025-09-28

基金项目: 首都卫生发展科研专项 (2024-1G-4421); 国家自然科学基金 (92369201)

引用本文: 杨璐, 张镜明, 徐杉, 童贻刚. RNA疫苗的设计与递送[J]. 合成生物学, 2026, 7(1): 129-151

Citation: YANG Lu, ZHANG Jingming, XU Shan, TONG Yigang. Design and delivery of RNA vaccines[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(1): 129-151

potentials, especially during the COVID-19 pandemic. In terms of design optimization, linear mRNA improves its stability and translation efficiency through strategies such as 5'cap, untranslated region (UTR) optimization, codon selection, and poly(A) tail elongation. Circular RNA, with its covalently closed circular structure, exhibits excellent resistance to nucleases and long-lasting expression properties, providing a new avenue for sustained antigen presentation. Self-amplifying RNA leverages viral replication mechanism to achieve intracellular self-replication, significantly reducing vaccine dosage requirements and enhancing immune responses. The article also notes that while mRNA vaccines inherently possess certain immune-stimulatory effects (acting as a built-in adjuvant), excessive activation of innate immunity may compromise their efficacy. Thus, balancing immunogenicity and expression efficiency requires modifications of nucleotides (*e.g.*, pseudouridine, *N1*-methyl-pseudouridine) and purification processes (*e.g.*, HPLC, FPLC). As for the delivery systems, lipid nanoparticles (LNPs) remain as the mainstream platform. Through the rational composition of ionizable lipids, phospholipids, cholesterol, and PEGylated lipids, LNPs achieve efficient mRNA encapsulation and prevent endosomal escape. Additionally, virus-like particles, as an emerging bioinspired carrier, show great promise with their natural hollow structure, self-assembly properties, and high biocompatibility, enabling enhanced uptake efficiency by antigen-presenting cells and mimicking viral invasion pathways. Other delivery strategies, such as polymer nanoparticles, peptide/protein carriers, and *ex vivo* dendritic cells loading, are also being continuously optimized. This article further explores the tremendous potential of mRNA vaccines in personalized cancer therapy and the prevention of broad-spectrum infectious diseases. It also identifies current challenges, including formulation stability (reliance on cold chains), limited targeting specificity, high production cost, and the regulation of prolonged immune response. Looking ahead, the integration of interdisciplinary innovations—such as artificial intelligence for sequence optimization, development of novel lyophilization techniques, and modular manufacturing—will gradually overcome existing limitations, advancing mRNA vaccine technology toward a more precise, safe, and efficient next-generation platform. This progress will not only play a vital role in human medicine, but also promote the implementation of the “One Health” strategy in veterinary medicine.



Keywords: RNA vaccine; circular RNA (circRNA); self-amplifying RNA (saRNA); vaccine design; delivery system; lipid nanoparticles (LNPs); virus-like particles (VLPs)

在“后疫情时代”，面对随时可能出现的突发性公共卫生事件，开发快速而普适的疫苗高效率生产平台显得尤为重要。目前获批上市的疫苗种类主要包括灭活或减毒活疫苗、重组亚单位疫苗、mRNA疫苗、活载体疫苗等。与其他类型的疫苗相比，mRNA疫苗具有易扩大生产、安全、高免疫应答等优点^[1]，完美符合快速研发的需求。

2020年以来，新冠病毒在全球范围内的肆虐推动了mRNA疫苗的迅速发展。Moderna公司研发的mRNA-1273以及辉瑞/BioNTech研发的mRNA疫苗BNT162b2均对新冠病毒表现出了较高的保护效力^[2]。以已获批的COVID-19疫苗为代表的线性mRNA，需要通过5'端加帽、非翻译区优化、密码子选择和poly(A)尾修饰等策略来最大化蛋白表达，同时避免先天免疫的过度激活^[3-7]。环状RNA凭借共价闭合结构，具有卓越的核酸酶抗性和长效表达特性，为持久抗原呈递提供了新思路^[8-9]。源自甲病毒基因组的saRNA则通过编码病毒复制机制实现RNA的细胞内扩增，在极低剂量下仍能维持高水平抗原表达^[10]。尽管取得这些进展，如何平衡mRNA自身免疫刺激（其本身可作为内置佐剂）与可能影响效力或引发不良反应的过度炎症仍是待解难题。

递送系统同样至关重要，因为裸露的mRNA易被降解且细胞摄取率低^[11]。LNP是目前临床主流载体，但通过对可电离脂质、聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）化修饰和靶向配体的持续优化，其器官靶向性和内涵体逃逸能力正在不断提升^[12-13]。除LNP外，VLP作为受生物启发的载体崭露头角，它兼具病毒载体的高转染效率和非复制系统的安全性^[14]。VLP能将mRNA包裹在其自组装的蛋白质外壳中，通过天然病毒入侵途径促进抗原呈递细胞（antigen-presenting cell, APC）的摄取，同时避免合成材料的细胞毒性^[14-16]。此外，基于聚合物的纳米颗粒和外泌体等新型平台也在探索中，以期进一步提高递送精准度和生物相容性^[17]。

本文系统综述了mRNA疫苗（线性、环状和自扩增型）的设计策略与递送技术（包括LNP、VLP等新兴系统）的最新进展，探讨如何通过mRNA分子结构与递送载体的协同优化提升疫苗

效力、持久性和安全性。尽管mRNA疫苗在规模化生产与冷链稳定性方面已取得显著进展——例如通过脂质纳米颗粒（LNP）工艺优化和冻干技术提升其存储与运输适应性——但其在淋巴器官靶向递送、体内表达调控精度以及长效免疫记忆维持等方面仍面临挑战。本文进一步展望mRNA疫苗在传染病防控与肿瘤治疗领域的未来发展方向，尤其是通过智能递送系统与分子设计优化提升其临床适用性与治疗效果。通过分子生物学前沿技术与创新纳米医学的融合，mRNA疫苗的应用范畴必将远超疫情防控，开创精准医学的新纪元。

1 RNA的结构功能与设计原理

mRNA是由DNA模板转录生成的单链核糖核酸，能够携带遗传信息并指导蛋白质合成。1990年，Wolff等^[18]发现将体外转录（*in vitro* transcribed, IVT）mRNA或质粒DNA直接注射到小鼠骨骼肌中，可在局部诱导编码蛋白的表达，从而提出核酸编码药物的概念。基于IVT mRNA的疗法具有以下优势：①mRNA是非传染性、非整合性的，避免感染或插入突变风险，且可通过生理途径完全降解；②能够精准调控编码蛋白的表达程度和持续时间；③mRNA体外转录产量高，具有快速、廉价、可大规模生产的潜力^[19]。目前主要有三种类型的mRNA用于药物研究：非复制mRNA（non-replicating mRNA）、病毒来源的自扩增RNA（self-amplifying RNA, saRNA）与环状RNA（circular RNA, circRNA）。

1.1 非复制mRNA设计与优化

IVT mRNA是利用一个T7、T3或Sp6噬菌体RNA聚合酶从线性DNA模板体外转录产生^[20]。除了5'帽结构（5' cap），这个线性DNA模板编码功能性mRNA的所有结构。非复制mRNA最佳结构含5' cap、UTR、poly(A)和编码目的抗原的开放阅读框（open reading frame, ORF）[图1(a)]，这种设计使其结构与真核细胞胞质中天然存在的完全成熟的mRNA分子高度相似^[11]。mRNA的稳定性和翻译由RNA/蛋白质相互作用的复杂网络控

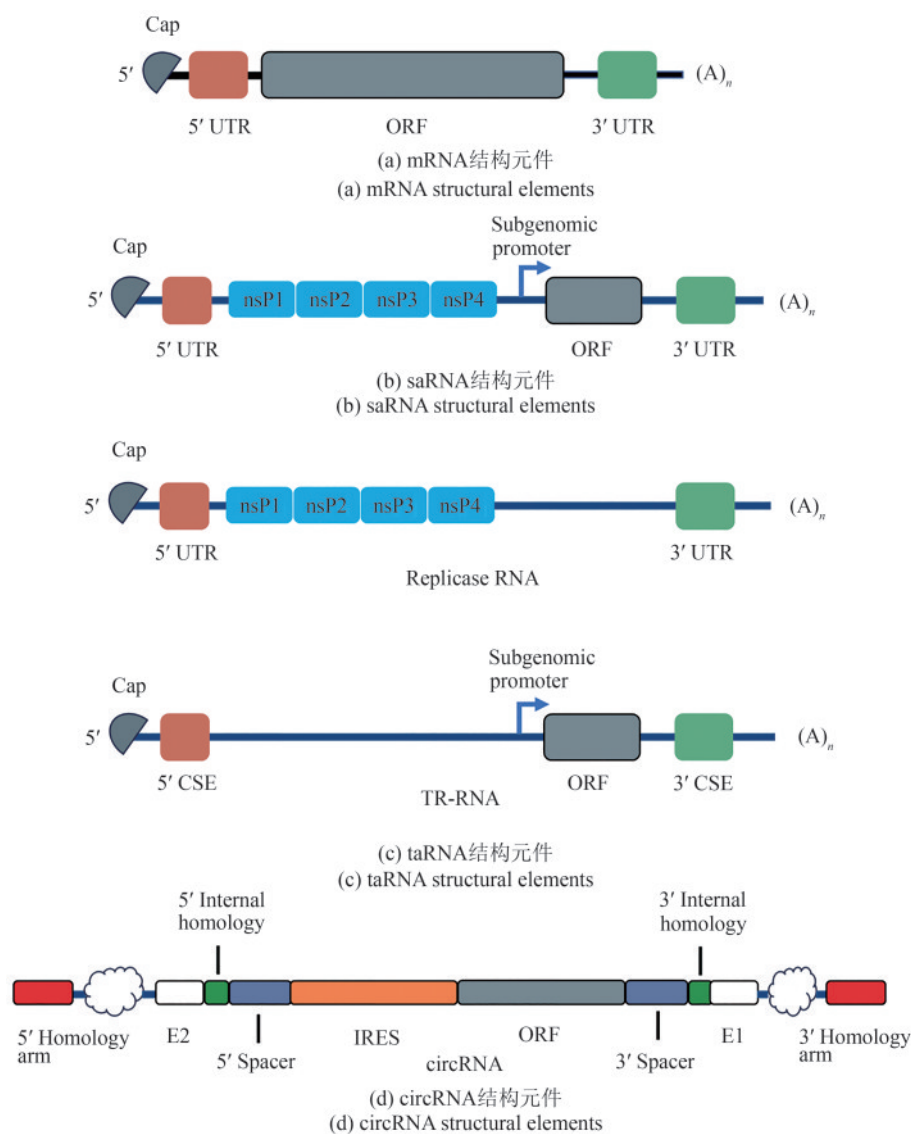


图1 RNA序列结构

Fig. 1 RNA sequence structure

制，并取决于 mRNA 的一级和二级结构、它们的翻译速率以及多种降解机制。已经投入大量的努力来修饰 IVT mRNA 的结构元件，特别是 5' cap、5',3'-UTR、ORF 和 poly(A) tail，以系统地提高其细胞内稳定性和翻译效率。这些改进最终导致在更长的时间范围内，从几分钟到一周以上，产生大量的编码蛋白^[11, 21-22]。

1.1.1.1 5' cap

5' cap 是确保 mRNA 高效翻译的关键元件。天然真核生物 mRNA 在转录过程中，通过 5',5'-三磷酸桥将 7-甲基尿苷帽子连接至 mRNA，形成 m⁷GpppN 结构^[23]。体外转录 (IVT) 制备 mRNA

的过程中，常见的加帽方法包括酶法加帽和共转录加帽。酶法加帽是在线性质粒为模板进行初步合成后，通过重组的痘病毒来源的加帽酶进行第二步操作。酶法加帽的加帽率较高，生成的帽结构与最常见的天然真核生物帽结构完全相同，但其工艺相对复杂，且反应过程相较于共转录加帽引入更多的酶。共转录加帽是在体外转录反应中加入合成帽类似物，实现加帽与体外转录一步完成。然而，共转录加帽所需的帽类似物和体外转录所需的 GTP 核苷酸会发生竞争，导致部分 mRNA 未加帽，丧失翻译活性^[11]。

早期 mRNA 研究通过 m⁷GpppG 帽类似物

(Cap0) 生成的体外转录 (*in vitro* transcribed, IVT) mRNA, 即 m⁷GpppG 的 m⁷G 部分通过 3', 5'-磷酸二酯键连接到 RNA 链的第一个核苷酸残基上。然而, 两个鸟苷分子上游离的 3'-OH 基团会作为转录延伸的起始亲核基团, 导致正向 (m⁷G[5']ppp[5']G [pN]_n) 和反向 (G[5']ppp[5']m⁷G[pN]_n) 两种取向产物的形成, Pasquinelli 等^[24] 发现 1/3~1/2 的帽类似物 m⁷GpppG 反向整合进入 mRNA, 使得翻译机制无法识别 mRNA, 翻译活性下降。为解决此问题, 第一代抗反向帽类似物 (anti-reverse cap analogue, ARCA) 被开发出来。其核心设计是对第二个鸟苷(G)核糖的 3'-OH 进行甲基化修饰 (如 m₂^{7,3'-O}GpppG), 从而仅保留 m⁷G 的 3'-OH 作为唯一的转录起始点, 从结构上确保帽结构以 100% 正向掺入。此外, 研究还发现, 对第一个 m⁷G 核糖的 2'-OH 进行特定修饰 (如 m₂^{7,2'-O}GpppG), 即使第二个 G 保留游离 3'-OH, 也能通过立体位阻效应极高效地引导正向掺入, 发挥 ARCA 作用^[25]。M. Mockey 等^[26] 发现, 在小鼠树突状细胞中, 编码荧光素酶的 mRNA 使用 ARCA 加帽时比 m⁷GpppG 帽类似物的表达量高约 20 倍。

在高等哺乳动物细胞中, Cap0 结构的 IVT mRNA 转录本可以进一步通过转录后修饰转变为 Cap1 结构 (m⁷GpppNm, 其中 Nm 为 2'-O-甲基化核苷), 偶尔还会转变为 Cap2 结构 (m⁷GpppNmNm)^[27]。在病毒复制过程中, 免疫系统区分非自身 RNA 和自身 RNA 至关重要。第一个转录核苷中的 2'-O-甲基基团在先天免疫系统中识别自身 RNA 并区分非自身 RNA 方面发挥重要作用, 从而帮助抑制病毒复制和致病性^[23, 28]。通过使用三核苷酸帽类似物, 已有效解决 Cap0 结构的局限性。与 m⁷GpppNmN 衍生的三核苷酸帽类似物共同转录生成 Cap1 结构, 其中第一个转录核苷具有 2'-O-甲基基团。针对严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的三款已上市的 mRNA 疫苗, 辉瑞-BioNTech 公司的 BNT162b2 mRNA 疫苗通过共转录加帽 Cap1; 在 Moderna 公司的 mRNA 疫苗 mRNA-1273 中, 含 Cap1 结构的 IVT mRNA 转录本是通过涉及痘病毒加帽酶和痘病毒 2'-O-甲基转移酶的酶促 mRNA 加帽获得的; 石药集团的 SYS6006 则是使用共转录加帽。

Cap 是调控 mRNA 降解的关键因素之一。真核细胞中存在两类功能迥异的脱帽酶, 它们在生物学功能、底物特异性及水解区域选择性方面均存在显著差异。第一种 Dcp1/Dcp2 复合体, 是 5'→3' 降解途径的关键起始步骤^[29]。催化脱腺苷化 mRNA 的 α、β 磷酸键断裂, 生成 m⁷GDP 和可被 Xrn1 降解的 5'磷酸化 RNA^[30]。第二种是 DcpS 脱帽酶, 参与 3'→5' mRNA 降解途径^[31]。该酶能够作用于游离的 m⁷GpppN 二核苷酸, 以及经外切体复合物通过 3'端脱腺苷化和降解后释放的短链加帽 mRNA, 但无法切割长链 RNA 上的帽结构^[32]。DcpS 通过区域选择性切割 5', 5'-三磷酸桥的 β 与 γ 磷酸键, 释放出 m⁷GMP 和下游(寡)核苷酸产物。

1.1.2 5'和 3' UTR

在 5'和 3' UTR 中引入特定的调控序列元件可提高 IVT mRNA 在细胞内翻译效率和稳定性。这些非翻译区通过与 RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein, RBP) 的相互作用显著影响蛋白质翻译及 mRNA 稳定性^[33-34]。早期研究表明, 5' UTR 的二级结构 (以高 GC 含量为特征) 会抑制 mRNA 翻译, 因此设计 IVT mRNA 时, 需避免使用富含 GC 的 5' UTR^[35-36]。5' UTR 应保持短小且结构松散, 以便小分子核糖体与起始编码元件结合^[37]。此外, 5' UTR 设计中需规避起始密码子 (AUG), 因其可能干扰 ORF 的正常翻译^[38]。近期研究表明, 虽然富含腺嘌呤核苷酸(A)的 5'UTR 元件能实现不依赖帽子结构的翻译, 但会降低未翻译 mRNA 的稳定性^[39]。

常见的稳定模式是 3' UTR 中富含嘧啶, 它们被普遍存在的 α-复合物识别^[40]。α-复合物识别的最具特征的序列分别是 β 或 α 球蛋白中约 180 bp 或约 80 bp 的 UTR^[41]。在一些临床前研究中, IVT mRNA 的 3' UTR 来自人类或非洲爪蟾 β-珠蛋白基因的 3' UTR^[21]。与不含 UTR 的编码报告基因 RNA 相比, 含有人 β-珠蛋白 3' UTR 的 RNA 的蛋白产量增加^[42]。Holtkamp 等^[43] 根据实验数据得出, 使用两个人 β-珠蛋白 3' UTR 排列以头尾方向, 进一步增强了人-珠蛋白-UTR 序列的稳定作用。在终止密码子后的碱基建议为 G 或 A, 以便有效地终止翻译。此外, 通过在 3'UTR 中加入富含 AU 的元件, 可以实现快速的 mRNA 降解, 从而缩短蛋白质表

达时间^[44]。因此,在设计时,需减少AU元件。

1.1.3 ORF

为了优化 mRNA 编码目的蛋白的表达,起始密码子应位于 Kozak 序列中,其模式为:A/GNNATGG^[45]。核糖体将在此序列上整合 N 端的甲硫氨酸,并向 3' 端移动到下一个密码子。密码子组成会影响翻译效率。将稀有密码子替换为同义高频密码子可提高翻译产量^[46]。由于核糖体附近 tRNA 的氨酰化作用所致使得重复使用相同 tRNA 能加速翻译^[47]。相邻核苷酸和密码子也会影响翻译延伸速率和翻译效率^[48]。经过密码子优化的 IVT mRNA 已成功用于多项疫苗研究^[5, 49-50]。另一种序列优化形式是提高 GC 含量,这已被证明能够在体外增加 mRNA 的稳态水平,并在体内提高蛋白表达,已被 CureVac 应用于 SARS-CoV-2 mRNA 疫苗候选产品 CVnCoV、CV2CoV、CV0501 中^[51-53]。此外,增加二级结构可以延长 mRNA 的半衰期,同时结合优化的密码子能够提高蛋白质表达^[54]。

Zhang 等^[55]基于一种 COVID-19 mRNA 疫苗基准序列 H (中国临床试验注册:CTR20210542),使用核心目标是通过优化 mRNA 二级结构的 LinearDesign 算法设计七条序列(序列 A-G)。7 个由 LinearDesign 生成的 mRNA (序列 A-G) 的蛋白质表达水平相较于基准序列 H 均有显著升高。Everest Medicines (云顶新耀, HKEX 1952.HK) 近日宣布,其自主研发的新型个性化治疗性 mRNA 癌症疫苗 EVM16 已正式进入临床研究阶段。该疫苗基于公司专有的 AI 新抗原预测算法 EVER-NEO-1,通过对每位患者独特的肿瘤突变进行分析,精准筛选具有高免疫原性潜力的新抗原,并设计编码数十种肿瘤新抗原序列。采用脂质纳米颗粒(LNP)递送系统,EVM16 能够高效地在体内递送新抗原编码 mRNA,激活新抗原特异性肿瘤杀伤 T 细胞,从而抑制肿瘤生长。目前,该疫苗已在研究者发起的临床试验(IIT) EVM16CX01 中完成首例患者给药,标志着这一融合人工智能与 mRNA 技术的个体化癌症治疗策略正式进入临床验证阶段。此外,新合生物研发的 XH001 注射液(受理号: CXSL2500215)作为该公司基于 AI 驱动的 mRNA 技术平台开发的首款个性化新抗原疫苗,通过其自主研发的 NeoCura® AI ALPINE 系

统,整合患者个体肿瘤突变谱与 HLA 分型数据,高效筛选具有高免疫原性的新抗原,进而构建针对个体定制的 mRNA 疫苗制剂。该疫苗通过编码特异性新抗原,激活机体肿瘤特异性 T 细胞免疫应答,靶向清除残余肿瘤细胞,从而从源头上降低肿瘤复发风险。目前已开展的研究者发起临床研究(IIT)初步数据显示, XH001 安全性及耐受性良好,并可有效诱导特异性 T 细胞免疫反应,为其后续 I 期临床试验的开展奠定了坚实基础。

然而,在某些情况下可能需要避免使用优化密码子。某些蛋白质需要依赖稀有密码子实现的慢速翻译来确保正确折叠^[56]。对于某些体外转录 mRNA 编码的疫苗,维持原始开放阅读框(ORF)也可能更为有利^[11]。当体外转录 mRNA 因核糖体移码以不同阅读框翻译时,或当翻译从内部或 CUG 起始密码子启动时,可能会产生强效隐性 T 细胞表位^[57-59]。而密码子优化应会消除这些抗原肽的重要来源^[11]。

1.1.4 poly(A)尾

poly(A)尾通过与 5' 端帽结构、内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)及其他多种调控元件协同作用,共同调节 mRNA 的稳定性和翻译效率^[60]。Sachs 和 Davis 提出 poly(A)尾通过 PAB 蛋白介导与 60S 核糖体亚基之间的相互作用对调控 80S 翻译起始复合体的形成具有重要作用^[61]。由于它们的双重调节作用,通过添加 5' cap 或 poly(A)尾, mRNA 翻译效率和稳定性都得到了提高。在烟草原生质体中,未加帽的、含 poly(A)尾的 Luc mRNA 比未加帽的、不含 poly(A)尾的 Luc mRNA 的荧光素酶表达量和半衰期分别高 1.5 倍和 1.4 倍。此外, poly(A)尾是加帽功能最优化的必要条件。当 poly(A)尾添加到加帽形式的 mRNA 时,含 poly(A)尾的 mRNA 表达量是不含 poly(A)尾 mRNA 的 21 倍^[60]。在 DC 中的分析表明, poly(A)尾的最佳长度在 120~150 个核苷酸之间^[26, 43]。在 BioNTech 公司公开的专利中,含有 120 nt 的 poly(A)尾的 mRNA 的稳定性和翻译效率高于 poly(A)尾长度为 16 nt、42 nt、51 nt 和 67 nt 的 mRNA。Pfizer 和 BioNTech 联合研发并已上市的 mRNA 疫苗 BNT162b2, poly(A)尾长度为 110 个核苷酸。该 poly(A)尾,包括一段由 30 个腺嘌呤残基

组成的序列，接着是一个10个核苷酸的连接序列，再加上另一段由70个腺嘌呤残基组成的序列^[5]。在Karekar等提出的RNA-LNP疫苗开发的标准化操作流程中，同样使用该方法^[62]。而Moderna公司的mRNA-1273疫苗未说明具体的poly(A)尾使用策略。CureVac公司的mRNA疫苗CVnCoV的poly(A)尾，则是使用由64个腺嘌呤残基组成的序列^[5]。IVT mRNA可通过模板载体编码获得poly(A)尾，也可以在转录后通过重组poly(A)聚合酶单独反应添加poly(A)尾。然而，酶促加poly(A)尾的方法制备的RNA都会包含具有不同长度poly(A)尾，这在临床应用中不被美国FDA认为可接受。

1.2 saRNA的结构与优化

saRNA疫苗的基础源于正链单链RNA[(+)ssRNA]病毒(例如甲病毒、黄病毒、慢病毒、麻疹病毒和弹状病毒)的自我复制特性^[63]。这些单链RNA病毒通过其编码的非结构蛋白(nonstructural proteins, nsP)基因，形成以RNA依赖型RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)复合体为核心的病毒复制机制——该复合体通过与宿主因子的特异性相互作用，驱动病毒基因组的复制与表达。saRNA疫苗理论上能够进行多轮RNA复制，从而在体内产生高产量的疫苗抗原，降低疫苗剂量，从而实现更安全的免疫接种^[64]。

1.2.1 saRNA结构原理

saRNA虽然长度显著大于非复制型mRNA(约9~10 kb)，但仍保留了mRNA的基本结构元件[5' cap、5' UTR、3' UTR以及长度可变的poly(A)尾][图1(b)]^[65]。目前研究最为深入的saRNA分子源自 α 病毒(如委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SINV)和塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus, SFV))的基因组结构^[66]。在构建saRNA疫苗时，研究人员用抗原基因替换 α 病毒结构蛋白编码区^[67]。体外转录生成saRNA的质粒模板包括：①一个指定的噬菌体编码的DNA依赖型RNA聚合酶(DNA-dependent RNA polymerase, DdRP)启动子(如T7、T3或

SP6)；②一个来源于甲病毒的5'-UTR；③编码甲病毒nsP(nsP1、nsP2、nsP3和nsP4)的基因，以产生活性RdRp；④病毒的26S亚基基因启动子序列；⑤编码疫苗抗原的ORF；⑥一个来源于甲病毒的3'-UTR；⑦一个poly(A)尾；⑧一个位于3'-末端的独特限制酶切位点^[68]。

saRNA疫苗相较于传统mRNA疫苗具有多重优势，其核心在于能在宿主细胞内自主复制，这种特性既增强了免疫原性又大幅降低了初始剂量需求。Vogel等^[69]证实，在小鼠流感模型中，传统mRNA疫苗需要80 μ g剂量才能诱导保护性免疫反应，而saRNA疫苗仅需1.25 μ g即可达到同等保护效果。McKay团队^[70]针对SARS-CoV-2的最新研究进一步凸显了saRNA疫苗的剂量优势——编码预融合稳定刺突蛋白的saRNA疫苗在临床前模型中，仅用1 μ g剂量就成功诱导强效中和抗体反应并实现免疫保护。针对SARS-CoV-2研发的saRNA疫苗VLPCOV-01，I期临床试验数据显示：已完成两剂BNT162b2疫苗接种的受试者随机接受0.3 μ g、1.0 μ g或3.0 μ g VLPCOV-01、30 μ g BNT162b2或安慰剂的单次肌肉注射后，0.3 μ g VLPCOV-01组的几何平均滴度是30 μ g BNT162b2组的1.59倍^[71]。

1.2.2 反式自扩增RNA(trans-amplifying(ta)RNA)结构原理

saRNA疫苗进一步发展出taRNA疫苗技术^[72]。该体系采用双RNA组分[图1(c)]：第一种是体外转录的mRNA，编码甲病毒复制酶，可在体内直接翻译；第二种为反式复制子(trans-replicon, TR)RNA，编码相应的抗原，由亚基因组启动子(subgenomic promoter, SGP)调控。由于TR-RNA含有甲病毒5'和3'保守序列元件(conserved sequence element, CSE)，甲病毒复制酶可对其进行反式扩增^[73]。最初Blakney等^[74]基于VEEV骨架，使用荧光报告基因作为抗原，建立了名为“splitzicon”的分割复制子系统，明确了taRNA自扩增所需组分。Beissert与其团队^[72]构建的针对流感病毒的taRNA候选疫苗包含非复制型复制酶mRNA(non-replicative RNA replicon, nrRNA-REPL)和表达流感病毒血凝素的TR-RNA，与saRNA疫苗相比，该疫苗能以更少抗原RNA剂量诱导保护性免疫应答。此外，针对流感等季节性疫苗，可将nrRNA-

REPL作为不变组分提前大规模生产储备, 而仅需针对可变的、高效抗原编码RNA进行按需的新工艺开发和生产。基于基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)的taRNA疫苗候选株, 采用初免-加强免疫策略, 仅需1.5 μg (1.25 μg 复制酶RNA和0.25 μg TR-RNA) RNA剂量即可诱导强效体液与细胞免疫, 成功保护小鼠抵御 10^6 PFU病毒攻击^[75]。Schmidt等^[76]设计一种新型双价taRNA疫苗策略, 通过递送三种RNA(一种编码CHIKV复制酶, 两种分别编码CHIKV和RRV包膜蛋白的TR-RNA)实现多抗原免疫。

1.2.3 局限性和优化策略

基于甲病毒的saRNA疫苗, 存在重组风险隐患, 特别是存在共感染病毒的情况下^[66]。理论上, 细胞内甲病毒复制子来源的saRNA可能与病毒RNA发生重组, 从而产生新型或变异的病毒株。VEEV因其复制效率远高于其他甲病毒, 是目前saRNA设计的常用平台, 但VEEV的高复制率同时会提升突变和重组事件的发生概率, 进而增加嵌合病毒形成的风险^[77]。Hick等^[78]指出saRNA的自扩增特性(特别是采用VEEV等高复制病毒骨架时), 在病毒共感染或潜伏病毒基因组存在的环境中, 可能引发非预期的基因漂变。甲病毒间的自然重组已有历史证据, 且被证实与新发病毒的出现相关。西方马脑炎病毒(Western Equine encephalitis virus, WEEV)就是SINV与VEEV群自然重组产生的^[79]。

针对这一问题, 可采用taRNA系统作为替代方案。虽然这种分离设计本身并不能降低与野生型病毒的重组概率, 但由于复制机制不具备自主增殖能力, 从而减少了重组可能性, 可有效控制风险。Beissert等^[72]的研究证实, 该策略在保持免疫原性的同时减少抗原编码复制子的大小。然而, 该系统需要同时制备两种RNA组分, 且目前尚未开发出高效的体内递送方式。

1.3 circRNA的设计与合成

circRNA是一类具有共价闭环环状结构的单链RNA分子。随着生物技术和分子医学的发展, 人工设计的circRNA已被开发为一类用于疾病治疗和预防的新型疫苗。与线性mRNA疫苗相比,

circRNA具有多种优势: ①由于其具有特殊的环状结构, circRNA无需任何修饰即可表现出高度稳定性和抗RNase降解性, 易于储存; ②相较于线性mRNA需要使用修饰核苷酸降低免疫原性, 未经修饰的circRNA具有更低的免疫原性和更低的细胞毒性; ③circRNA具有延长抗原产生成效和持久免疫应答的能力^[1]。

1.3.1 circRNA的结构

基于重组的I型催化内含子系统已被用于体外环化多种短RNA序列(58~124 nt)中, 其环化效率可达90%^[80-81]。Chen等采用具有自催化剪接功能的噬菌体T4胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, td)基因的I型内含子进行体外circRNA合成^[82]。用于IVT的DNA模板序列包含3'内含子片段、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)的IRES序列, 以及5'内含子片段。体外转录后, 按预期生成1.5 kb的circRNA。Wesselhoeft等^[83]工程化I型催化内含子系统, 能够实现长度达5 kb的序列环化, 并且针对不同序列组成的编码区, 环化效率接近100%。用于环化的前体RNA包含5'同源臂、3'内含子片段、外显子片段2、5'内部同源序列、5'间隔区、EMCV IRES、编码区域、3'间隔区、3'内部同源序列、外显子片段1、5'内含子片段、3'同源臂[图1(d)]。优化后的circRNA不仅能高效表达大量蛋白, 还可通过HPLC有效纯化。2022年, 北京大学魏文胜教授团队^[84]利用工程化I型催化内含子系统, 编码区插入源自人类组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)的信号肽序列、RBD序列以及来源于噬菌体T4纤维蛋白的三聚化结构域, 开发了针对SARS-COV-2的环状RNA疫苗。该研究开展了小鼠及恒河猴的动物实验, 环状RNA疫苗表现出比线性mRNA疫苗更为持久和稳定的抗原表达。Jaffrey团队^[85]采用Tornado circRNA表达系统, 开发了一种在哺乳动物细胞中合成并高效表达环状mRNA的新方法。该团队构建的用于表达编码SARS-CoV-2刺突蛋白的Tornado载体, 包含CMV启动子、5'端Twister核酶(包含环化连接序列)、柯萨奇病毒B3型(Coxsackievirus B3, CVB3) IRES、S蛋白、3'端Twister核酶

(包含环化连接序列)、终止子。将此载体转染 HEK293T 细胞, 可实现全长 4719 个核苷酸的环化。

1.3.2 环状 RNA 的合成

通常通过 IVT 方法, 利用 T7 或 SP6 等噬菌体 RNA 聚合酶, 以 DNA 为模板大量扩增目标序列生成线性前体。前体线性 RNA 通过共价闭合形成环状结构获得 circRNA, 该过程通常由化学、酶促或核酶连接方法介导^[86]。

(1) 化学法

1988 年提出的核酸链化学连接法利用 DNA 链的 5'磷酸基团与 3'羟基, 在 2-(*N*-吗啉代)-乙烷磺酸 (MES) 催化下, 通过 BrCN 生成的氰酸酯中间体形成磷酸二酯键^[87]。该方法同样适用于短链环状 RNA 的合成, 但需借助寡核苷酸“夹板”拉近 5'和 3'端^[88-89]。

1999 年, Micura 等开发了一种从头合成环状 RNA 的方法。该方法通过 2'-*O*-TOM RNA 磷酰胺实现 RNA 链全自动组装, 利用标准磷酸三酯化学在固相支持物上合成环状 RNA, 并通过选择性切割获得高纯度的产物, 环状 RNA 的平均产率为 15%^[90]。

(2) 酶法合成

酶促合成法主要利用 T4 RNA 连接酶 I 和 II, 在 ATP 依赖的条件下催化线性 RNA 前体的 5'-磷酸基与 3'-羟基形成 3',5'-磷酸二酯键。

T4 RNA 连接酶 I 在 1972 年被用于线性前体的环化^[91]。然而, 该方法可能产生分子间连接的聚体, 但通过优化反应条件, 环化产物可成为主产物^[92]。最短 6~8 nt 的 RNA 链即可环化^[93-94]。T4 RNA 连接酶 I 的对连接位点的供体和受体核苷酸的偏好不同: 3'端核苷酸受体的偏好性为 A > G > C > U, 5'端核苷酸受体为 pC > pU > pA > pG^[95-96]。其环化效率受线性 RNA 前体的二级结构影响, 使用辅助脱氧寡核苷酸可以防止线性 RNA 折叠成不利结构, 从而提高环化效率。在线性辅助寡核苷酸的存在下, 环状 RNA 的产率为 40%, 发夹辅助环状 RNA 的产率接近 100%^[97]。除了通过辅助连接寡核苷酸外, 还可以使用夹板使活性端靠近在一起, 使供体和受体 RNA 的末端保持 2~3 个核苷酸单链^[98]。此外, 通过设计线性 RNA 前体的 5'和

3'末端为单链区域, 利用内部二级结构拉近两端也可促进环化^[99]。

2002 年, Ho 等^[100]描述了 T4 RNA 连接酶 II 的分子间和分子内连接活性。与 T4 RNA 连接酶 I 相比, T4 RNA 连接酶 II 能够更有效地连接 dsRNA 底物上的缺口, 而不是连接 ssRNA 的末端^[101]。根据 T4 RNA 连接酶 II 的这一特性, 在设计线性 RNA 前体序列时, 5'供体和 3'受体端需要通过内部二级结构保持较近的空间距离^[102]。在噬菌体 KVP40 中存在一种与 T4 RNA 连接酶 II 同源的蛋白。它以 ATP 依赖的方式催化单链小 RNA 的环化^[103]。此外, T4 RNA 连接酶 II 存在截短版本 (249 个氨基酸), 可在无 ATP 条件下催化预腺苷化的 RNA 或 DNA 与 RNA 的连接, 用于 RNA 环化。这些特性使 T4 RNA 连接酶在 RNA 环化中具有广泛应用潜力。

(3) 核酶催化合成

与只能在体外应用的化学和酶连接方法不同, 一种基于 I 型内含子自剪接原理开发的环化方法, 被称为 PIE 策略, 可以在体外和体内产生环状 RNA。利用 I 型内含子的自剪接特性的方法应用较为广泛, 更适用于长链 RNA。且相比于化学法和酶法合成环状 RNA 需要在体系中引入额外的化学和生物催化剂, 核酶法只需要在体系中添加 GTP 和 Mg²⁺作为辅助因子^[80]。该方法的原理为 I 型内含子作为核酶催化的 RNA 自剪接, 该过程包括两步转酯反应。首先, 一个外源的鸟苷(G)结合到内含子催化中心的 G 结合位点, 其 3'-OH 攻击 5'剪接位点的磷酸二酯键, 与内含子的 5'端第一个核苷酸形成 3',5'-磷酸二酯键, 并释放出 5'-外显子。随后, 游离 5'-外显子的 3'-OH 攻击 3'剪接位点的磷酸二酯键, 使 5'-外显子与 3'-外显子发生连接并释放内含子。基于该机制, M. Puttaraju 等^[80]于 1992 年发明了 I 型内含子-外显子置换系统 (permuted intron-exon, PIE), 利用核酶的自剪接特性形成一个外显子-外显子共价连接的环状 RNA。当本体的 5'端剪接位点位于本体剪接位点的 3'端处时, RNA 剪接反应可产生环状外显子序列。在这种情况下, 外源核苷酸序列插入外显子和内含子位点之间, 产生包含外源 RNA 片段的环状 RNA。在此 PIE 系统基础上, Wesselhoeft 等^[83]做出了一系列优化,

增加同源臂和间隔序列产生更大的环状RNA, 增加IRES增加蛋白翻译效率。PIE策略在其被提出之后的三十余年中得到了广泛的应用^[84, 104-108]。

此外, 除了I型内含子外, II组内含子也可以用同样的重排方法用于体外合成环状RNA, 其机制与I型内含子相似。Mikheeva等^[109]证明, 可以将酵母线粒体基因组中II型内含子重排, 构建PIE结构。与I型内含子PIE系统不同, II型内含子的使用导致剪接机制不需要原生外显子, 从而避免引入外源序列。Sun等^[110]构建基于II C型自剪接内含子针对RSV的新型环状RNA疫苗, 在体内可有效激发以Th1型偏向为主的细胞和体液免疫应答。

1.3.3 环状RNA纯化

PIE策略合成的环状RNA中主要存在的杂质包括未成功环化的线性RNA前体、剪接出的RNA内含子片段、核苷三磷酸以及开环RNA。由于线性RNA前体和开环RNA的分子量与对应circRNA相近, 去除线性RNA杂质成为circRNA疫苗生产中的难点^[111]。可采用HPLC或RNase R酶切法去除线性RNA前体等杂质。

环状RNA由于其共价闭合的环状结构, 可以在一定程度上抵抗核酸外切酶的降解, 因此可以利用该特点对环状RNA进行纯化。RNase R能消化线性RNA, 但不能消化环状RNA、套索RNA、3'突出末端少于7个核苷酸的双链RNA以及具有复杂二级结构的tRNA、5S RNA等^[112]。RNase R酶切线性RNA前体的主要问题在于其复杂的二级结构会降低对RNase R的敏感性。尽管高温加热和化学试剂可以破坏二级结构, 但这些方法可能增加后续纯化步骤的难度。由于线性RNA在3'端为单链状态时更易被RNase R降解, 可通过引入无二级结构的元件[如poly(A)尾]来提高降解效率^[113]。然而, 低剂量RNase R可能无法充分降解线性RNA, 而高剂量又可能导致circRNA断裂, 因此需要优化反应条件^[114]。此外, RNase R价格昂贵, 限制了其工业应用。

HPLC是一种灵敏度高、精密度高、适用范围广的色谱技术, 目前广泛应用于环状RNA的纯化, 其中体积排除色谱(SEC-HPLC)是最常用的填料^[115]。通过结合RNase R酶切, SEC-HPLC能够

分离环状RNA、开环环状RNA和线性RNA前体, 并显著提高环状RNA纯度, 降低其免疫原性^[116]。然而, 由于这些RNA分子具有相近的分子量和二级结构, 色谱图中仍可能出现重叠峰, 同时环状RNA在纯化过程中容易自发开环。现有方法尚需优化, 可尝试离子交换色谱或反相色谱与SEC联用, 同时改进流动相条件(如调节pH值、加入柠檬酸钠)以进一步提高纯化效率并减少环状RNA的开环风险^[116]。

1.4 免疫原性调节

外源性mRNA本质上具有免疫刺激性, 因为它会被多种细胞表面、内体和细胞质中的先天免疫受体识别^[117]。酶促合成的mRNA制备中含有双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)污染物, 这是IVT反应的异常产物^[118]。作为病毒基因组和复制中间体的模拟物, dsRNA是一种强效的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 能够被多个细胞区室中的模式识别受体感知。含有dsRNA污染物的IVT mRNA被识别后, 会导致强效的I型干扰素产生, 从而上调蛋白激酶R(protein kinase R, PKR, 也称为EIF2AK2)和2',5'-寡腺苷酸合成酶(2',5'-oligoadenylate synthetase, OAS)的表达和激活, 分别引发翻译的抑制以及细胞mRNA和核糖体RNA的降解^[119-120]。Karikó团队^[118]研究证实, 通过反相快速蛋白液相色谱(reversed-phase FPLC, RP-FPLC)或高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)等色谱方法可有效去除体外转录mRNA中的dsRNA杂质, 其中FPLC纯化能使mRNA在人类原代树突细胞中的蛋白表达量提升高达1000倍。此外, 单链mRNA分子本身在外源性传递至细胞时也是一种PAMP。单链寡核糖核苷酸及其降解产物会被内体传感器TLR7和TLR8检测到^[121-122], 从而引发I型干扰素的产生^[123]。

通过整合修饰的核苷酸[假尿苷(Ψ)、1-甲基假尿苷(m 1Ψ)等], 不仅可以防止TLR7、TLR8以及其他先天免疫传感器的激活, 还能够部分抑制对dsRNA类型的识别, 增强翻译能力^[124-128]。

Karikó 等^[124]将多组编码海肾荧光素酶的 mRNA 与 lipofectin 复合后转染 293 细胞，结果表明含 Ψ 修饰的 mRNA 翻译效率约为未修饰 mRNA 的 10 倍，而含 m5C 修饰的 mRNA 则产生 4 倍增强效果。

三大 mRNA 疫苗巨头公司 Moderna、BioNTech 和 Curevac 研发的 mRNA-1273、BNT162b2 和 CVnCoV 疫苗，其保护率分别为 94.1%^[4]、95%^[129] 和 48%^[130]。CVnCoV 的有效性未能达到世界卫生组织（WHO）的基准要求，已终止研发。分析三款 mRNA 疫苗的设计，不含 5' UTR 和修饰核苷酸可能是导致 CVnCoV 疫苗保护率较低的原因。

2 mRNA 疫苗递送策略

高效的体内 mRNA 递送是实现治疗的关键。外源 mRNA 必须穿透脂质膜屏障才能进入细胞质，进而翻译为功能性蛋白（图 2）。多种细胞类型可自发摄取裸露 mRNA。通过清道夫受体介导的内吞作用进入细胞的裸露 mRNA 会积聚在溶酶体中，仅少量 mRNA 能泄漏至细胞质^[131]。mRNA 释放至细胞质的机制尚未明确表征，且可能因细胞类型而异。此外，mRNA 还能通过外泌体在细胞间进行交流^[132]。对大多数细胞而言，mRNA 的主动摄

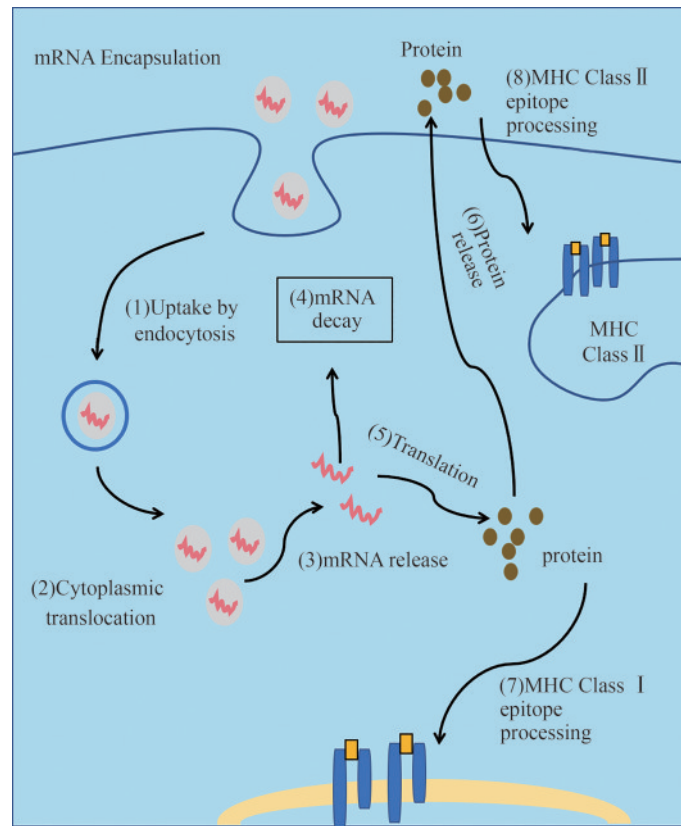


图2 mRNA 递送原理

[(1) 包封后的 mRNA 被细胞摄取内吞，进入内体途径；(2) 包封后的 mRNA 释放至细胞质；(3) mRNA 从递送载体中释放；(4) 翻译终止伴随 mRNA 降解，由核酸外切酶催化；(5) mRNA 翻译成蛋白质；(6) 蛋白质通过自分泌、旁分泌或内分泌机制分泌至胞外行使功能；(7) 蛋白质产物需被降解为抗原肽表位，这些表位被装载至主要组织相容性复合体（MHC）分子上，呈递至细胞表面供免疫效应细胞识别；(8) 在抗原呈递细胞中，为获得 T 细胞辅助以增强免疫应答持续性，需将蛋白质产物导向 MHC II 类分子装载区。]

Fig. 2 Principle of mRNA Delivery

[(1) Encapsulated mRNA is taken up by cells *via* endocytosis and enters the endosomal pathway. (2) Encapsulated mRNA is released into the cytoplasm. (3) The mRNA is released from the delivery vehicle. (4) Translation termination is accompanied by mRNA degradation, catalyzed by exonucleases. (5) The mRNA is translated into protein. (6) The protein is secreted extracellularly *via* autocrine, paracrine, or endocrine mechanisms to exert its function. (7) The protein product needs to be degraded into antigenic peptide epitopes. These epitopes are loaded onto major histocompatibility complex (MHC) molecules and presented on the cell surface for recognition by immune effector cells. (8) In antigen-presenting cells (APCs), to obtain T cell help for enhanced persistence of the immune response, the protein product needs to be directed to the MHC class II loading compartment.]

取效率低下,且在低剂量时即达饱和。未成熟树突状细胞(DC)是个例外——这些细胞在环境采样过程中特化于持续吞噬细胞外液,能通过巨胞饮作用以线性非饱和方式高效摄取mRNA,其浓度适应范围可达数个数量级^[133]。因此,要向大多数细胞类型递送mRNA,需要合适的制剂保护体外转录(IVT)mRNA免受细胞外RNase介导的降解,并促进其进入细胞。目前mRNA疫苗递送主要有两种基本策略:第一种是体外将mRNA导入树突状细胞(dendritic cell, DC)后将转染的细胞重新输注^[134];第二种是直接通过注射途径递送携带或不携带载体的mRNA。体外DC转染能精确控制靶细胞类型、转染效率等参数,但作为细胞疗法,这种疫苗接种方式成本高昂且操作复杂。相比之下,mRNA直接注射更为快速经济。

2.1 体外负载DC法

DC作为连接先天免疫与适应性免疫的关键桥梁,是调控T细胞应答的主要抗原呈递细胞^[135]。其通过内吞和蛋白水解加工抗原,并分别通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I类和II类将抗原呈递给CD8⁺和CD4⁺T细胞,从而启动适应性免疫应答。此外,DC还可将完整抗原呈递给B细胞以激发抗体反应^[136]。DC对mRNA转染也具有高度适应性,这些特性使其成为mRNA疫苗极具吸引力的靶点。

尽管研究表明DC能通过多种内吞途径摄取裸露mRNA^[131, 133, 137],但体外转染通常采用电穿孔技术以提高效率——该方法通过高压脉冲形成细胞膜孔隙,使mRNA分子直接进入细胞质。这种递送方式因无需载体分子即可实现高效转染而备受青睐。经体外负载mRNA的DC随后被重新输注到自体疫苗接种者体内以启动免疫反应。大多数体外加载的DC疫苗主要诱导细胞介导的免疫反应,因此主要用于癌症治疗^[138]。

2.2 基于脂质递送系统

在非病毒核酸载体中,基于脂质递送系统(如LNP、脂质体、脂质复合物)已成为最常用的递送平台^[139](图3)。DOTMA(*N*-[1-(2,3-二油

酰氧基)丙基]-*N,N,N*-三甲基氯化铵)是首个用于体外递送编码荧光素酶IVT-mRNA的合成阳离子脂质,已成功实现了多种(如人、大鼠、小鼠、非洲爪蟾和果蝇)细胞的体外转染^[139-140]。研究发现DOTMA衍生物DOTAP(1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷)具有较低的制备成本和更高的递送效率^[21, 141-142]。为提升DOTAP介导的IVT-mRNA转染效率,Zohra等^[143]在DOTAP脂质载体中引入碳酸盐磷灰石(一种对核酸具有强亲和力的无机晶体),使转染效率较单纯DOTAP对照组提高5~15倍。后续研究发现,在DOTAP-磷灰石颗粒中整合纤维连接蛋白(靶向 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的识别基序),使HeLa细胞中IVT-mRNA的转基因表达(定性和定量)均优于非靶向颗粒^[144]。后续研究发现两性离子脂质DOPE(1,2-二油酰-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺)与DOTAP联用可显著增强基因表达^[145]。阳离子脂质还能用于制备阳离子纳米乳(CNE),通过均质化含辅料的水相/油相后与mRNA复合而成^[146]。Bogers等^[147]研究发现使用CNE递送编码HIV C亚型包膜糖蛋白的saRNA疫苗,在恒河猴中诱导了强效免疫应答。Luisi等^[148]利用sa mRNA技术平台结合阳离子纳米乳(cationic nanoemulsion, CNE)递送系统开发了针对寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)现用现配的候选疫苗。其中,VRC5283 SAM(CNE)疫苗在小鼠和非人灵长类攻毒模型中均能持续诱导针对ZIKV的完全免疫保护。

随着微流控技术的发展,现可采用阳离子/可电离脂质、电中性磷脂、胆固醇和PEG化脂质高效制备LNP,大幅提升mRNA的包封率和转染效率^[149]。美国FDA批准的Patisiran、BNT162b2和mRNA-1273三款药物均基于LNP技术。其各组分功能明确:阳离子/可电离脂质通过正电荷结合mRNA并协助内体逃逸;磷脂(如DOPE、DSPC)和胆固醇维持结构稳定;PEG化脂质(如DMG-PEG2000)可减少血浆蛋白非特异性结合,延长体内半衰期^[150]。在临床应用中,LNP技术具有技术成熟、递送效率高和模块化设计等优势,已有多款产品获批且生产工艺易于放大;然而仍面临靶向性局限、潜在毒性和长期安全性未明等挑战,且多数制剂依赖低温储存,对物流要求较高。

当前LNP研发聚焦三大方向:新型脂质发现、

组分优化和功能化修饰。传统设计策略通过调控氨基头基、疏水尾链和连接桥来改变脂质特性^[151]。功能化脂质方面，Oyama等^[152]研究开发的维生素E支架脂质(ssPalmE)能激活I型干扰素信号通路增强抗肿瘤免疫；Tang等^[153]报道的苯硼酸修饰阳离子脂质PBA-BADP可与癌细胞表面过表达的唾液酸特异性结合，提升纳米颗粒内化效率。针对安全性问题，Bang团队设计的海藻糖糖脂TDO通过氢键稳定颗粒结构，在保持递送效能的同时降低可电离脂质毒性，体现了LNP技术向高效化与安全化并重的发展趋势^[154]。值得注意的是，冻干疫苗技术的突破为LNP制剂提供了全新的稳定性解决方案——通过冷冻干燥工艺可实现mRNA-LNP疫苗在25℃条件下长期储存，且不影响其生物活性与免疫原性，这标志着LNP技术正朝着高效化、安全化与制剂稳定化并重的方向发展^[155]。

2.3 基于聚合物递送系统

带负电的IVT-mRNA可通过静电作用自发与

阳离子聚合物形成复合物^[156]。PEI是目前研究最广泛的核酸递送聚合物，其丰富的氨基可提供高密度正电荷以实现mRNA封装，并通过“质子海绵”效应实现出色的内体逃逸^[157]。然而PEI介导的mRNA递送存在效率-毒性失衡问题：高分子量PEI虽递送效率优异但细胞毒性显著，低分子量PEI毒性较低却效率不足^[158]。Guo等^[159]基于低分子量PEI(1.8 k)构建了14种聚合物候选库，最终筛选出性能最优的含有八碳烷基链的POctS。POctS不仅在mRNA递送中展现出显著的部位特异性，还可直接与STING蛋白相互作用，诱导关键信号分子TBK1和IRF3的磷酸化，并促进I型干扰素的分泌。POctS递送OVA mRNA显著抑制肿瘤生长并诱导免疫记忆，效果优于Alum/OVA疫苗；递送MLKL mRNA可诱导免疫原性细胞死亡，重塑免疫微环境，与PD-L1抑制剂协同抗肿瘤，疗效超越吉西他滨。POctS系统毒性低，炎症因子水平稳定，具有部位特异性累积优势，可精准激活局部免疫而不影响健康组织。

不可降解的PEI存在潜在毒性问题，而可生物降解的聚β-氨基酸(PBAE)凭借易合成、单体易

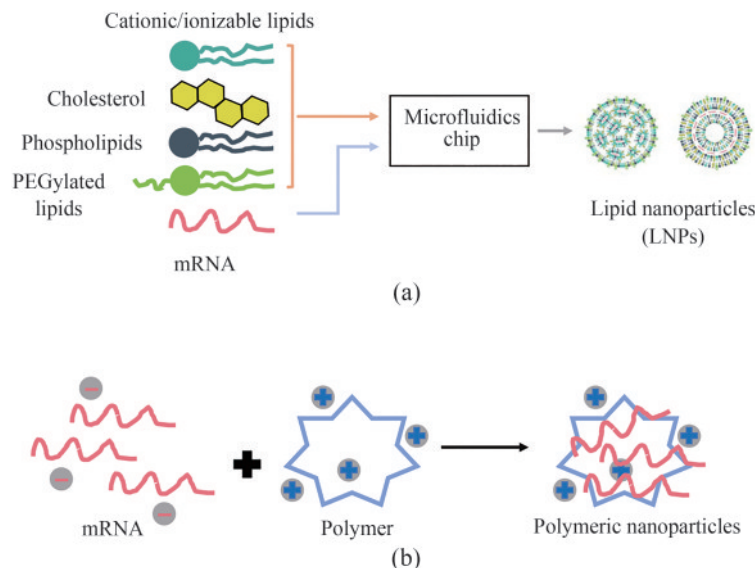


图3 递送系统的常见结构

[(a) 脂质纳米颗粒：通常通过微流控技术制备，成分包括传统（阳离子或可离子化）脂质、功能化脂质、胆固醇及辅助脂质。(b) 聚合物载体：包括聚乙烯亚胺(PEI)、可离子化两亲性Janus树枝状大分子(IAJD)和壳聚糖等，可通过简单混合包裹mRNA形成稳定的纳米颗粒。]

Fig. 3 Common structures of the LNP delivery system

[(a) Lipid nanoparticles (LNPs): Typically prepared via microfluidic technology, their components include conventional (cationic or ionizable) lipids, functionalized lipids, cholesterol, and helper lipids. (b) Polymer-based carriers: These include polyethylenimine (PEI), ionizable amphiphilic Janus dendrimers (IAJD), chitosan, etc. They can form stable nanoparticles encapsulating mRNA through simple mixing.]

获取等优势成为更优替代选择。Chen等^[160]合成了108种结构多样的聚 β -氨基酸，通过调控背骨亲疏水性、侧链碳链长度和端基氨基官能团，将其与辅助脂质等结合形成聚合物-脂质纳米颗粒(PLNP)，以开发高效靶向递送碱基编辑工具的非病毒载体。该团队筛选出新型聚合物7C8C8，其mRNA递送效率超越FDA批准的脂质载体(如ALC-0315等)，且安全性优异($LD_{50}=403.8\text{ mg/kg}$)。该载体冻存后稳定性长达2个月，体内碱基编辑效率达70%，并能通过协同敲除PCSK9和ANGPTL3基因，实现LDL-C持续降低60%以上。树状大分子作为具有球形分支结构的聚合物，其中聚酰胺胺(PAMAM)是研究最广泛的类型^[150]。Tang等^[161]设计了一种新型双靶向mRNA纳米颗粒(HDPMNP)，其核心由阳离子PAMAMG0-C14包裹mRNA构成，通过表面修饰透明质酸(HA)靶向肺癌细胞表面的CD44受体，同时采用DSPE-PEG-甘露糖(Man)进一步功能化纳米颗粒表面，使其兼具靶向炎症巨噬细胞表面葡萄糖转运蛋白的能力。除合成载体外，壳聚糖等天然聚合物因其良好生物相容性也成为核酸载体候选，常与PLGA、透明质酸等材料联用以提升mRNA稳定性和递送效率。需要指出的是，聚合物材料的批次间差异可能影响药物一致性——分子量的微小变化会显著改变体内mRNA转染效率，这导致尽管聚合物材料种类丰富，其在mRNA治疗领域的临床转化进度仍滞后于脂质系统^[139]。

2.4 基于多肽或蛋白质的递送系统

带正电荷的肽和蛋白质可以通过静电相互作用与带负电荷的mRNA结合，从而实现良好的生物相容性和可降解性^[150]。两亲性肽因其含有精氨酸等阳离子或两亲性氨基，可通过静电作用与mRNA结合，并借助质子海绵效应促进溶酶体逃逸，从而协助mRNA递送入细胞^[162]。Qiu等报道了一种新型RNA递送载体PEG12KL4，该载体通过将合成的KL4阳离子肽与12聚体单分散线性PEG共价连接而成^[163]。当PEG12KL4与mRNA以10:1(质量比)比例复合时，可形成纳米级复合物，并在人肺上皮细胞中实现高效转染。

在蛋白质类递送系统中，鱼精蛋白作为一种富含精氨酸的小分子带正电荷蛋白，能够有效负载mRNA，并已应用于mRNA治疗领域^[164]。CureVac公司开发的RNAactive®平台即采用了游离mRNA与鱼精蛋白复合mRNA的组合，可同时诱导平衡的适应性免疫应答和T细胞介导的免疫反应^[165]。基于该技术，CureVac已启动多个临床研究项目^[166-168]。

近年来，VLP技术备受关注——这类颗粒仅包含病毒组装衣壳所需的主要结构蛋白，而不携带病毒基因组物质。VLP既保留了病毒载体的高效递送和靶向能力，又避免了病毒基因组整合风险，被用作mRNA疫苗的递送载体^[14]。VLP凭借与天然病毒相似的结构，能高效被APC识别和摄取^[16]，并模拟病毒感染有效递送mRNA，且无基因组整合风险；其优势包括高生物相容性、固有佐剂效应和优异靶向性，但也面临生产工艺复杂、预存免疫干扰、载量有限及免疫原性难以控制等挑战。

MS2衣壳与特定的19个核苷酸茎环(pac位点)相互作用，将目标RNA包裹进VLP中^[169-170]。Li等^[171]利用此方法构建了针对前列腺癌基于MS2 VLP的hPAP-GM-CSF mRNA疫苗。此mRNA疫苗引发了强烈的体液和细胞免疫反应，特别是抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和平衡的Th1/Th2反应，并完全保护C57BL/6小鼠免受前列腺癌的危害。随后，该团队利用此方法将MicroRNA-122包裹进展示HIV TAT肽的MS2 VLP中用于治疗肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[172]。结果表明，展示TAT的MS2 VLP能够有效穿透细胞膜并递送miR-122。此外，其在Hep3B、HepG2和Huh7细胞及Hep3B相关动物模型中的对HCC的抑制效果显著。Unti等^[85]利用MS2衣壳蛋白将含MS2茎环结构的CVB3 IRES-circRNA包装至VLP，相较于线性mRNA显著增强蛋白表达持久性，但需哺乳细胞体外转录的特性限制了低成本大规模生产。Su等^[15]利用双启动子系统同步驱动MS2衣壳蛋白表达与OVA mRNA转录，并通过pac序列介导的特异性识别，实现mRNA在VLP组装过程中的高效包装，获得MS2-OVA mRNA疫苗。基于VLP系

统可有效保护 mRNA 免受核酸酶降解，同时确保稳定性和向宿主细胞的高效递送。

豇豆褪绿斑驳病毒 (cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) 衣壳可包裹 2500~4200 nt 的异源单链 RNA，研究者利用该平台递送连接诺达姆拉昆虫病毒 (Nodamura virus, NoV) RdRP 的卵清蛋白表位 SIINFEKL。未成熟树突细胞与这类 VLP 共孵育后，成熟标志物激活增强，RNA 摄取/复制水平提升，并显著增加抗原特异性 T 细胞^[173]。针对 COVID-19 的 VLPCOV-02 疫苗在 VLPCOV-01 (含甲病毒非结构蛋白 1-4 和膜锚定 RBD 的 LNP-saRNA 平台) 基础上进行了改进：引入 HLA DR 通用结合表位序列 (可结合常见人类白细胞抗原 DR 亚型) 和 5-甲基胞苷。这些修饰在 I 期临床试验中降低了反应原性和不良事件发生率，同时诱导了强效抗体应答^[174]。

在多项研究中，HIV 的 env 和 gag 蛋白被用于构建基于 gag 的 VLP 以递送 mRNA。Zhang 等^[175]将 SARS-CoV-2 刺突蛋白的天然胞质尾 (cytoplasmic tail, CT) 与 HIV-1 或猴-人免疫缺陷病毒 (SIV) 的 gp41 跨膜 env 蛋白 CT 融合，形成杂交刺突蛋白，其中截短至 745 个氨基酸的反转录病毒 CT 能诱导刺突蛋白在细胞表面表达。通过以 1:2 比例共转染表达杂交刺突蛋白的 mRNA 与 SIV gag mRNA 可形成 VLP，而共表达截短刺突蛋白与 SIV Gag 的 mRNA 疫苗能激发更高效的免疫应答，其机制可能与多重抗原呈递、膜锚定蛋白天然构象保留或多抗原协同作用有关。另一项研究表明，乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV) 核心蛋白 (hepatitis B virus core protein, HBc) C 端截短是决定 RNA 降解的关键因素，其自组装域 (aa 1~140) 和鱼精蛋白样聚精氨酸域 (PA, aa 150~183) 中，去除 PA 域可减少 RNA 降解，但保留全部四个精氨酸模块 (block1-162、block2-163、block3-171、block4-175) 能轻微提升包装效率，而包装能力缺失会促使 Th2 免疫应答转为 Th1 型并降低 IFN- γ 水平，这可能与 CTL 表位丢失有关，这些发现提示蛋白 C 端截短是开发高效疫苗的有力工具^[176]。类似策略在抗猴-人免疫缺陷病毒 mRNA 疫苗中同样有效，研究表明在 HEK 293T 细胞中共表达 HIV-1 env 与 SIV Gag 蛋白的 mRNA 可形成

VLP，诱导广谱中和抗体并降低恒河猴感染风险，表明 Gag 基 VLP-mRNA 疫苗设计灵活且对多种传染病有效^[177]。此外，人类基因组编码的类逆转录病毒 gag 蛋白 (如 PNMA 家族成员 PNMA2) 可自组装为二十面体衣壳，经改造后能携带核酸，展示了其在哺乳动物细胞中作为递送工具的潜力^[178]。

3 总结与展望

mRNA 技术的崛起无疑是生物医学领域的一场革命。其在 COVID-19 疫苗中的成功应用，不仅证明了该技术在应对突发公共卫生事件中具有无与伦比的开发速度与防护效力，更展现出作为平台型技术在肿瘤治疗、遗传性疾病防治、蛋白替代疗法等诸多领域的广阔前景。当前，mRNA 技术的核心发展方向聚焦于三大维度：分子结构的创新设计 (如环状 RNA、自扩增 RNA 等新型核酸平台)、递送系统的持续优化 (包括 LNP 组分工程化改造与新型载体开发) 以及生产工艺的协同升级，旨在系统性平衡并提升疫苗的免疫原性、表达效力、生物安全性及制剂稳定性。

值得注意的是，mRNA 疫苗技术在兽医学领域同样展现出显著的应用潜力。与传统兽用疫苗相比，mRNA 疫苗具备研发周期短、易于针对病原变异进行快速序列更新、可灵活实现多价配伍、通常无需额外佐剂即可激发强免疫应答等突出优势，特别适用于高效应对禽流感、非洲猪瘟、犬瘟热等重要动物传染病的暴发。研究显示，基于 LNP 或病毒样颗粒 (VLP) 递送系统的 mRNA 疫苗在猪、鸡、牛等经济动物中均可诱导强大的体液与细胞免疫，且安全性表现良好。目前已有包括 RPS1903 在内的多个兽用 mRNA 疫苗产品获批进入临床研究阶段。随着制剂稳定性技术的突破 (如冻干工艺的应用) 和大规模生产成本的下探，mRNA 技术有望逐步取代传统疫苗平台，成为动物疫病防控的主流技术手段，从而有力推动“人—动物—环境”健康共同体的构建与实践“同一个健康” (one health) 战略理念。

然而，mRNA 技术迈向更广泛的应用仍面临多项根本性挑战。其一在于制剂的长期稳定性问

题,多数现有 mRNA 疫苗(尤其是 LNP 制剂)仍严重依赖低温冷链运输与储存,这在资源有限地区可及性较差;其二,递送系统的靶向精度仍有待提高,脱靶效应可能引起安全性顾虑并降低治疗指数;其三,个性化疫苗(如肿瘤新抗原疫苗)的生产成本居高不下,限制了其临床推广与可及性;其四,我们对复杂疾病环境中 mRNA 表达调控、免疫应答持久性及与宿主互作的深层机制理解尚不全面,制约了理性设计能力的提升。

展望未来, mRNA 技术的进一步突破必将依赖于多学科前沿科技的交叉融合。在序列与载体设计层面,可借助人工智能与机器学习方法对 mRNA 二级结构、密码子使用、调控元件[如 UTR、poly(A)尾]进行理性设计,以最大化翻译效率并最小化免疫原性;在制剂开发方面,通过新型冻干工艺、糖基化稳定策略及常温储存型纳米颗粒的开发,有望彻底解决冷链依赖问题;在生产制造领域,模块化、封闭自动化的一体化生产平台将大幅提高产线柔性、降低生产成本,从而推动个体化医疗产品的商业化与应用普及。

最终,随着这些技术瓶颈的逐步攻克, mRNA 平台将不再仅限于传染性疾病的预防,而是演进为一个真正可编程的医学工具,能够实现个性化癌症疫苗、蛋白替代疗法、基因编辑工具递送、细胞重编程等多元应用,全面推动人类与动物医学迈向精准、高效、安全的“同一个健康”新纪元。

参 考 文 献

- [1] NIU D, WU Y R, LIAN J Q. Circular RNA vaccine in disease prevention and treatment[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 341.
- [2] POH T. Review of COVID-19 mRNA vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273[J]. *Journal of Pharmacy Practice*, 2022, 35(6): 947-951.
- [3] VIZCARRA P, HAEMMERLE J, VELASCO H, et al. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine reactogenicity: the key role of immunity[J]. *Vaccine*, 2021, 39(51): 7367-7374.
- [4] BADEN L R, EL SAHLY H M, ESSINK B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(5): NEJMoa2035389.
- [5] KON E, ELIA U, PEER D. Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 73: 329-336.
- [6] RICHNER J M, HIMANSU S, DOWD K A, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1114-1125.
- [7] PARDI N, KRAMMER F. mRNA vaccines for infectious diseases: advances, challenges and opportunities[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2024, 23(11): 838-861.
- [8] CAI Z Y, WURI Q, SONG Y, et al. CircRNA-loaded DC vaccine in combination with low-dose gemcitabine induced potent anti-tumor immunity in pancreatic cancer model[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2025, 74(2): 68.
- [9] WEI H Y, FAN X J, MAO M W. A review on circular RNA translation and its implications in disease[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2025, 2883: 109-137.
- [10] WAYNE C J, BLAKNEY A K. Self-amplifying RNA COVID-19 vaccine[J]. *Cell*, 2024, 187(8): 1822-1822.e1.
- [11] SAHIN U, KARIKÓ K, TÜRECI Ö. mRNA-based therapeutics: developing a new class of drugs[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 13(10): 759-780.
- [12] ESTAPÉ SENTI M, GARCÍA DEL VALLE L, SCHIFFELERS R M. mRNA delivery systems for cancer immunotherapy: lipid nanoparticles and beyond[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2024, 206: 115190.
- [13] VERMA A, AWASTHI A. Innovative strategies to enhance mRNA vaccine delivery and effectiveness: mechanisms and future outlook[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2024, 30(14): 1049-1059.
- [14] GUPTA R, ARORA K, MEHROTRA ARORA N, et al. Significance of VLPs in Vlp-circRNA vaccines: a vaccine candidate or delivery vehicle?[J]. *RNA Biology*, 2024, 21(1): 917-928.
- [15] SU J Y, ZHANG J S, FENG X N, et al. A universal viral capsid protein based one step RNA synthesis and packaging system for rapid and efficient mRNA vaccine development[J]. *Molecular Therapy*, 2025, 33(4): 1720-1734.
- [16] BACHMANN M F, JENNINGS G T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(11): 787-796.
- [17] MOCHIDA Y, UCHIDA S. mRNA vaccine designs for optimal adjuvanticity and delivery[J]. *RNA Biology*, 2024, 21(1): 422-448.
- [18] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247(4949 Pt 1): 1465-1468.
- [19] PARDI N, HOGAN M J, PORTER F W, et al. mRNA vaccines: a new era in vaccinology[J]. *Nature Reviews Drug*

- Discovery, 2018, 17(4): 261-279.
- [20] PARDI N, MURAMATSU H, WEISSMAN D, et al. *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 969: 29-42.
- [21] KARIKÓ K, KUO A, BARNATHAN E S. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the *in vitro* transcribed encoding mRNA[J]. *Gene Therapy*, 1999, 6(6): 1092-1100.
- [22] KALLEN K J, THEß A. A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs[J]. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 2014, 2(1): 10-31.
- [23] SHANMUGASUNDARAM M, SENTHILVELAN A, KORE A R. Recent advances in modified cap analogs: synthesis, biochemical properties, and mRNA based vaccines[J]. *The Chemical Record*, 2022, 22(8): e202200005.
- [24] PASQUINELLI A E, DAHLBERG J E, LUND E. Reverse 5' caps in RNAs made *in vitro* by phage RNA polymerases[J]. *RNA*, 1995, 1(9): 957-967.
- [25] JEMIELITY J, FOWLER T, ZUBEREK J, et al. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties[J]. *RNA*, 2003, 9(9): 1108-1122.
- [26] MOCKEY M, GONÇALVES C, DUPUY F P, et al. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of *ARCA* mRNA capping with poly(A) chains *in cis* and *in trans* for a high protein expression level[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340(4): 1062-1068.
- [27] RAMANATHAN A, ROBB G B, CHAN S H. mRNA capping: biological functions and applications[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(16): 7511-7526.
- [28] 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.
- [29] MUHLRAD D, DECKER C J, PARKER R. Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(4): 2145-2156.
- [30] HSU C L, STEVENS A. Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(8): 4826-4835.
- [31] MUKHERJEE D, GAO M, O'CONNOR J P, et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(1-2): 165-174.
- [32] LIU H D, RODGERS N D, JIAO X F, et al. The scavenger mRNA decapping enzyme DepS is a member of the HIT family of pyrophosphatases[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(17): 4699-4708.
- [33] MIGNONE F, GISSI C, LIUNI S, et al. Untranslated regions of mRNAs[J]. *Genome biology*, 2002, 3(3): Reviews0004.1.
- [34] GEBAUER F, HENTZE M W. Molecular mechanisms of translational control[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(10): 827-835.
- [35] LEPPEK K, DAS R, BARNAM M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(3): 158-174.
- [36] PELLETIER J, SONENBERG N. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency[J]. *Cell*, 1985, 40(3): 515-526.
- [37] LIU T C, LIANG Y J, HUANG L P. Development and delivery systems of mRNA vaccines[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 718753.
- [38] KIM S C, SEKHON S S, SHIN W R, et al. Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 2022, 18(1): 1-8.
- [39] JIA L F, MAO Y H, JI Q Q, et al. Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27(9): 814-821.
- [40] HOLCIK M, LIEBHABER S A. Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3' untranslated region RNA-protein complexes sharing *cis* and *trans* components[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(6): 2410-2414.
- [41] PASCOLO S. Vaccination with messenger RNA (mRNA)[M]// *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer, 2008: 221-235.
- [42] ROSS J, SULLIVAN T. Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes[J]. *Blood*, 1985, 66(5): 1149-1154.
- [43] 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.
- [44] CHEN C A, SHYU A B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20(11): 465-470.
- [45] KOZAK M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?[J]. *Cell*, 1978, 15(4): 1109-1123.
- [46] GUSTAFSSON C, GOVINDARAJAN S, MINSHULL J. Codon bias and heterologous protein expression[J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(7): 346-353.

- [47] CANNAROZZI G, SCHRAUDOLPH N N, FATY M, et al. A role for Codon order in translation dynamics[J]. *Cell*, 2010, 141(2): 355-367.
- [48] BOSSI L, ROTH J R. The influence of Codon context on genetic code translation[J]. *Nature*, 1980, 286(5769): 123-127.
- [49] ZHAO Y X, FAN B C, SONG X, et al. PEDV-spike-protein-expressing mRNA vaccine protects piglets against PEDV challenge[J]. *mBio*, 2024, 15(2): e02958-23.
- [50] WANG Z Y, TIAN C Y, ZHU J H, et al. Avian influenza mRNA vaccine encoding hemagglutinin provides complete protection against divergent H5N1 viruses in specific-pathogen-free chickens[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 55.
- [51] RAUCH S, ROTH N, SCHWENDT K, et al. mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus-neutralising antibodies and mediates protection in rodents[J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6: 57.
- [52] ROTH N, SCHÖN J, HOFFMANN D, et al. Optimised non-coding regions of mRNA SARS-CoV-2 vaccine CV2CoV improves homologous and heterologous neutralising antibody responses[J]. *Vaccines*, 2022, 10(8): 1251.
- [53] ROTH N, GERGEN J, KOVACIKOVA K, et al. Assessment of immunogenicity and efficacy of CV0501 mRNA-based Omicron COVID-19 vaccination in small animal models[J]. *Vaccines*, 2023, 11(2): 318.
- [54] MAUGER D M, CABRAL B J, PRESNYAK V, et al. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(48): 24075-24083.
- [55] ZHANG H, ZHANG L, LIN A, et al. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity[J]. *Nature*, 2023, 621(7978): 396-403.
- [56] KIMCHI-SARFATY C, OH J M, KIM I W, et al. A “silent” polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity [J]. *Science*, 2007, 315(5811): 525-528.
- [57] MALARKANNAN S, HORNG T, SHIH P P, et al. Presentation of out-of-frame peptide/MHC Class I complexes by a novel translation initiation mechanism[J]. *Immunity*, 1999, 10(6): 681-690.
- [58] SAULQUIN X, SCOTET E, TRAUTMANN L, et al. +1 Frameshifting as a novel mechanism to generate a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope derived from human interleukin 10[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2002, 195(3): 353-358.
- [59] SCHWAB S R, LI K C, KANG C, et al. Constitutive display of cryptic translation products by MHC Class I molecules[J]. *Science*, 2003, 301(5638): 1367-1371.
- [60] GALLIE D R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency[J]. *Genes & Development*, 1991, 5(11): 2108-2116.
- [61] SACHS A B, DAVIS R W. The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation[J]. *Cell*, 1989, 58(5): 857-867.
- [62] KAREKAR N, REID CAHN A, MORLA-FOLCH J, et al. Protocol for the development of mRNA lipid nanoparticle vaccines and analysis of immunization efficiency in mice[J]. *STAR Protocols*, 2024, 5(2): 103087.
- [63] POURSEIF M M, MASOUDI-SOBHANZADEH Y, AZARI E, et al. Self-amplifying mRNA vaccines: mode of action, design, development and optimization[J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(11): 103341.
- [64] 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[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(5): 1897-1912.
- [65] BRITO L A, KOMMAREDDY S, MAIONE D, et al. Self-amplifying mRNA vaccines[M]//Nonviral vectors for gene therapy: physical methods and medical translation. Amsterdam: Elsevier, 2015: 179-233.
- [66] VALLET T, VIGNUZZI M. Self-amplifying RNA: advantages and challenges of a versatile platform for vaccine development [J]. *Viruses*, 2025, 17(4): 566.
- [67] SILVA-PILIPICH N, BELOKI U, SALABERRY L, et al. Self-amplifying RNA: a second revolution of mRNA vaccines against COVID-19[J]. *Vaccines*, 2024, 12(3): 318.
- [68] BLAKNEY A K, IP S, GEALL A J. An update on self-amplifying mRNA vaccine development[J]. *Vaccines*, 2021, 9(2): 97.
- [69] 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[J]. *Molecular Therapy*, 2018, 26(2): 446-455.
- [70] MCKAY P F, HU K, BLAKNEY A K, et al. Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3523.
- [71] AKAHATA W, SEKIDA T, NOGIMORI T, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 self-amplifying RNA vaccine expressing an anchored RBD: a randomized, observer-blind phase 1 study[J]. *Cell Reports Medicine*, 2023, 4(8): 101134.
- [72] BEISSERT T, PERKOVIC M, VOGEL A, et al. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity[J]. *Molecular Therapy*, 2020, 28(1):

- 119-128.
- [73] SPUUL P, BALISTRERI G, HELLSTRÖM K, et al. Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(10): 4739-4751.
- [74] BLAKNEY A K, MCKAY P F, SHATTOCK R J. Structural components for amplification of positive and negative strand VEEV splitzicons[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2018, 5: 71.
- [75] SCHMIDT C, HAEFNER E, GERBETH J, et al. A taRNA vaccine candidate induces a specific immune response that protects mice against Chikungunya virus infections[J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2022, 28: 743-754.
- [76] 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 [J]. *Vaccines*, 2022, 10(9): 1374.
- [77] ALDON Y, MCKAY P F, MORENO HERRERO J, et al. Immunogenicity of stabilized HIV-1 env trimers delivered by self-amplifying mRNA[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2021, 25: 483-493.
- [78] HICK T A H, GEERTSEMA C, NGUYEN W, et al. Safety concern of recombination between self-amplifying mRNA vaccines and viruses is mitigated *in vivo*[J]. *Molecular Therapy*, 2024, 32(8): 2519-2534.
- [79] ALLISON A B, STALLKNECHT D E, HOLMES E C. Evolutionary genetics and vector adaptation of recombinant viruses of the western equine encephalitis antigenic complex provides new insights into alphavirus diversity and host switching[J]. *Virology*, 2015, 474: 154-162.
- [80] PUTTARAJU M, BEEN M D. Group I permuted intron-exon (PIE) sequences self-splice to produce circular exons[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(20): 5357-5364.
- [81] FORD E, ARES M. Synthesis of circular RNA in bacteria and yeast using RNA cyclase ribozymes derived from a group I intron of phage T4[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(8): 3117-3121.
- [82] CHEN Y G, KIM M V, CHEN X Q, et al. Sensing self and foreign circular RNAs by intron identity[J]. *Molecular Cell*, 2017, 67(2): 228-238.e5.
- [83] WESSELHOEFT R A, KOWALSKI P S, ANDERSON D G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2629.
- [84] QU L, YI Z Y, SHEN Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1728-1744.e16.
- [85] UNTI M J, JAFFREY S R. Highly efficient cellular expression of circular mRNA enables prolonged protein expression[J]. *Cell Chemical Biology*, 2024, 31(1): 163-176.e5.
- [86] GONG Z H, HU W T, ZHOU C W, et al. Recent advances and perspectives on the development of circular RNA cancer vaccines[J]. *NPJ Vaccines*, 2025, 10: 41.
- [87] SOKOLOVA N I, ASHIRBEKOVA D T, DOLINNAYA N G, et al. Chemical reactions within DNA duplexes Cyanogen bromide as an effective oligodeoxyribonucleotide coupling agent[J]. *FEBS Letters*, 1988, 232(1): 153-155.
- [88] DOLINNAYA N G, BLUMENFELD M, MERENKOVA I N, et al. Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(23): 5403-5407.
- [89] WANG S, KOOL E T. Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(12): 2326-2333.
- [90] MICURA R. Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solid-phase synthesis[J]. *Chemistry - A European Journal*, 1999, 5 (7): 2077-2082.
- [91] SILBER R, MALATHI V G, HURWITZ J. Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1972, 69(10): 3009-3013.
- [92] PETKOVIC S, MÜLLER S. RNA circularization strategies *in vivo* and *in vitro*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(4): 2454-2465.
- [93] KAUFMANN G, KLEIN T, LITTAUER U Z. T4 RNA ligase: substrate chain length requirements[J]. *FEBS Letters*, 1974, 46 (1-2): 271-275.
- [94] SUGINO A, SNOOPER T J, COZZARELLI N R. Bacteriophage T4 RNA ligase. Reaction intermediates and interaction of substrates[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252 (5): 1732-1738.
- [95] ENGLAND T E, UHLENBECK O C. Enzymic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA ligase[J]. *Biochemistry*, 1978, 17(11): 2069-2076.
- [96] MCLAUGHLIN L W, ROMANIUK E, ROMANIUK P J, et al. The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1982, 125(3): 639-643.
- [97] WANG L, RUFFNER D E. Oligoribonucleotide circularization by 'template-mediated' ligation with T4 RNA ligase: synthesis of circular hammerhead ribozymes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(10): 2502-2504.
- [98] FROMMER J, HIERONYMUS R, SELVI ARUNACHALAM

- T, et al. Preparation of modified long-mer RNAs and analysis of FMN binding to the *ypaA* aptamer from *B. subtilis*[J]. RNA Biology, 2014, 11(5): 609-623.
- [99] BEAUDRY D, PERREAULT J P. An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(15): 3064-3066.
- [100] HO C K, SHUMAN S. Bacteriophage T4 RNA ligase 2 (gp24.1) exemplifies a family of RNA ligases found in all phylogenetic domains[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(20): 12709-12714.
- [101] BULLARD D R, BOWATER R P. Direct comparison of nick-joining activity of the nucleic acid ligases from bacteriophage T4[J]. The Biochemical Journal, 2006, 398(1): 135-144.
- [102] PETKOVIC S, MÜLLER S. RNA self-processing: formation of cyclic species and concatemers from a small engineered RNA[J]. FEBS Letters, 2013, 587(15): 2435-2440.
- [103] YIN S M, KIONG HO C, MILLER E S, et al. Characterization of bacteriophage KVP40 and T4 RNA ligase 2[J]. Virology, 2004, 319(1): 141-151.
- [104] LIAO K C, ESHAGHI M, HONG Z B, et al. Characterization of group I introns in generating circular RNAs as vaccines[J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53(4): gkaf089.
- [105] FENG Z Y, ZHANG X B, ZHOU J, et al. An *in vitro*-transcribed circular RNA targets the mitochondrial inner membrane cardiolipin to ablate EIF4G2⁺/PTBP1⁺ pan-adenocarcinoma[J]. Nature Cancer, 2024, 5(1): 30-46.
- [106] LIU Y C, CUI H Z, WANG W J, et al. Construction of circular miRNA sponges targeting miR-21 or miR-221 and demonstration of their excellent anticancer effects on malignant melanoma cells[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2013, 45(11): 2643-2650.
- [107] LIU X L, LI Z F, LI X X, et al. A single-dose circular RNA vaccine prevents Zika virus infection without enhancing dengue severity in mice[J]. Nature Communications, 2024, 15: 8932.
- [108] YUE X Y, ZHONG C L, CAO R, et al. CircRNA based multivalent neuraminidase vaccine induces broad protection against influenza viruses in mice[J]. NPJ Vaccines, 2024, 9: 170.
- [109] MIKHEEVA S, HAKIM-ZARGAR M, CARLSON D, et al. Use of an engineered ribozyme to produce a circular human exon[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 5085-5094.
- [110] SUN Z Y, LU L R, LIU L J, et al. Group IIC self-splicing intron-derived novel circular RNA vaccine elicits superior immune response against RSV[J]. Frontiers in Immunology, 2025, 16: 1574568.
- [111] ZHANG Z Y, FU Y L, JU X L, et al. Advances in engineering circular RNA vaccines[J]. Pathogens, 2024, 13(8): 692.
- [112] VINCENT H A, DEUTSCHER M P. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(40): 29769-29775.
- [113] XIAO M S, WILUSZ J E. An improved method for circular RNA purification using RNase R that efficiently removes linear RNAs containing G-quadruplexes or structured 3' ends [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(16): 8755-8769.
- [114] ZHANG Y, YANG L, CHEN L L. Characterization of circular RNAs[J]. Methods in Molecular Biology, 2016, 1402: 215-227.
- [115] YANG Y L, LI H, LI Z J, et al. Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens [J]. Vaccine, 2015, 33(9): 1143-1150.
- [116] WESSELHOEFT R A, KOWALSKI P S, PARKER-HALE F C, et al. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*[J]. Molecular Cell, 2019, 74(3): 508-520.e4.
- [117] CHEN N H, XIA P P, LI S J, et al. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens[J]. IUBMB Life, 2017, 69(5): 297-304.
- [118] KARIKÓ K, MURAMATSU H, LUDWIG J, et al. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(21): e142.
- [119] DE HARO C, MÉNDEZ R, SANTOYO J. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis[J]. FASEB Journal, 1996, 10(12): 1378-1387.
- [120] LIANG S L, QUIRK D, ZHOU A M. RNase L: its biological roles and regulation[J]. IUBMB Life, 2006, 58(9): 508-514.
- [121] ZHANG Z K, OHTO U, SHIBATA T, et al. Structural analysis reveals that toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA[J]. Immunity, 2016, 45(4): 737-748.
- [122] TANJI H, OHTO U, SHIBATA T, et al. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2015, 22(2): 109-115.
- [123] ISAACS A, COX R A, ROTEM Z. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon[J]. The Lancet, 1963, 282(7299): 113-116.
- [124] 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]. Molecular Therapy, 2008, 16(11): 1833-1840.
- [125] ANDRIES O, MC CAFFERTY S, DE SMEDT S C, et al. *M1-*

- methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice[J]. *Journal of Controlled Release*, 2015, 217: 337-344.
- [126] ANDERSON B R, MURAMATSU H, NALLAGATLA S R, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(17): 5884-5892.
- [127] ANDERSON B R, MURAMATSU H, JHA B K, et al. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5' -oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21): 9329-9338.
- [128] KARIKÓ K, BUCKSTEIN M, NI H P, 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.
- [129] POLACK F P, THOMAS S J, KITCHIN N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [130] KREMSNER P G, AHUAD GUERRERO R A, ARANA-ARRI E, et al. Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022, 22(3): 329-340.
- [131] LORENZ C, FOTIN-MLECZEK M, ROTH G, et al. Protein expression from exogenous mRNA: uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking *via* the lysosomal pathway[J]. *RNA Biology*, 2011, 8(4): 627-636.
- [132] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(6): 654-659.
- [133] DIKEN M, KREITER S, SELMI A, et al. Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation[J]. *Gene Therapy*, 2011, 18(7): 702-708.
- [134] BENTEYN D, HEIRMAN C, BONEHILL A, et al. mRNA-based dendritic cell vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2015, 14(2): 161-176.
- [135] DAS R, GE X Y, FEI F, et al. Lipid nanoparticle-mRNA engineered dendritic cell based adoptive cell therapy enhances cancer immune response[J]. *Small Methods*, 2025, 9(1): 2400633.
- [136] WYKES M, POMBO A, JENKINS C, et al. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response [J]. *Journal of Immunology*, 1998, 161(3): 1313-1319.
- [137] SELMI A, VASCOTTO F, KAUTZ-NEU K, et al. Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells *via* macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2016, 65(9): 1075-1083.
- [138] BERNEMAN Z N, DE LAERE M, GERMONPRÉ P, et al. WT1-mRNA dendritic cell vaccination of patients with glioblastoma multiforme, malignant pleural mesothelioma, metastatic breast cancer, and other solid tumors: type 1 T-lymphocyte responses are associated with clinical outcome [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2025, 18(1): 9.
- [139] GÓMEZ-AGUADO I, RODRÍGUEZ-CASTEJÓN J, VICENTE-PASCUAL M, et al. Nanomedicines to deliver mRNA: state of the art and future perspectives[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(2): 364.
- [140] MALONE R W, FELGNER P L, VERMA I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(16): 6077-6081.
- [141] ZOHRA F T, CHOWDHURY E H, TADA S, et al. Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mRNA-based transfection[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 358(1): 373-378.
- [142] LU D, BENJAMIN R, KIM M, et al. Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells *in vitro* and *in vivo* employing cationic liposome vectors[J]. *Cancer Gene Therapy*, 1994, 1(4): 245-252.
- [143] ZOHRA F T, CHOWDHURY E H, NAGAOKA M, et al. Drastic effect of nanoapatite particles on liposome-mediated mRNA delivery to mammalian cells[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 345(1): 164-166.
- [144] ZOHRA F T, MAITANI Y, AKAIKE T. mRNA delivery through fibronectin associated liposome-apatite particles: a new approach for enhanced mRNA transfection to mammalian cell[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(1): 111-115.
- [145] KAUFFMAN K J, DORKIN J R, YANG J H, et al. Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery *in vivo* with fractional factorial and definitive screening designs[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(11): 7300-7306.
- [146] DEL POZO-RODRÍGUEZ A, SOLINÍS M Á, RODRÍGUEZ-GASCÓN A. Applications of lipid nanoparticles in gene therapy[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 109: 184-193.

- [147] 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]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2015, 211(6): 947-955.
- [148] LUISI K, MORABITO K M, BURGOMASTER K E, et al. Development of a potent Zika virus vaccine using self-amplifying messenger RNA[J]. *Science Advances*, 2020, 6(32): eaba5068.
- [149] KAUFFMAN K J, WEBBER M J, ANDERSON D G. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 240: 227-234.
- [150] HE X, LI G H, HUANG L T, et al. Nonviral targeted mRNA delivery: principles, progresses, and challenges[J]. *MedComm*, 2025, 6(1): e70035.
- [151] TILSTRA G, COUTURE-SENÉCAL J, LAU Y M A, et al. Iterative design of ionizable lipids for intramuscular mRNA delivery[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(4): 2294-2304.
- [152] OYAMA R, ISHIGAME H, TANAKA H, et al. An ionizable lipid material with a vitamin E scaffold as an mRNA vaccine platform for efficient cytotoxic T cell responses[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(19): 18758-18774.
- [153] TANG Q, LIU J, JIANG Y, et al. Cell-selective messenger RNA delivery and CRISPR/Cas9 genome editing by modulating the interface of phenylboronic acid-derived lipid nanoparticles and cellular surface sialic acid[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(50): 46585-46590.
- [154] BAE S H, YOO S, LEE J S, et al. A lipid nanoparticle platform incorporating trehalose glycolipid for exceptional mRNA vaccine safety[J]. *Bioactive Materials*, 2024, 38: 486-498.
- [155] AI L X, LI Y F, ZHOU L, et al. Lyophilized mRNA-lipid nanoparticle vaccines with long-term stability and high antigenicity against SARS-CoV-2[J]. *Cell Discovery*, 2023, 9: 9.
- [156] GUAN S, ROSENECKER J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems[J]. *Gene Therapy*, 2017, 24(3): 133-143.
- [157] AKINC A, THOMAS M, KLIBANOV A M, et al. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2005, 7(5): 657-663.
- [158] KUNATH K, VON HARPE A, FISCHER D, et al. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine[J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 89(1): 113-125.
- [159] GUO X Y, YANG Z Y, GUO Z P, et al. A polymeric mRNA vaccine featuring enhanced site-specific mRNA delivery and inherent STING-stimulating performance for tumor immunotherapy[J]. *Advanced Materials*, 2025, 37(17): 2410998.
- [160] CHEN Q, CHANG Y, HE X Y, et al. Targeted delivery of mRNA with polymer-lipid nanoparticles for *in vivo* base editing [J]. *ACS Nano*, 2025, 19(8): 7835-7850.
- [161] TANG Z M, YOU X R, XIAO Y F, et al. Inhaled mRNA nanoparticles dual-targeting cancer cells and macrophages in the lung for effective transfection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(44): e2304966120.
- [162] MCCARTHY H O, MCCAFFREY J, MCCRUDDEN C M, et al. Development and characterization of self-assembling nanoparticles using a bio-inspired amphipathic peptide for gene delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 189: 141-149.
- [163] QIU Y S, MAN R C H, LIAO Q Y, et al. Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 314: 102-115.
- [164] JARZEBSKA N T, MELLETT M, FREI J, et al. Protamine-based strategies for RNA transfection[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(6): 877.
- [165] KALLEN K J, HEIDENREICH R, SCHNEE M, et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive (®) vaccines [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2013, 9(10): 2263-2276.
- [166] PAPACHRISTOFILOU A, HIPPE M M, KLINKHARDT U, et al. Phase I b evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2019, 7(1): 38.
- [167] ALBERER M, GNAD-VOGT U, HONG H S, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase I clinical trial[J]. *Lancet*, 2017, 390(10101): 1511-1520.
- [168] SEBASTIAN M, SCHRÖDER A, SCHEEL B, et al. A phase I/II a study of the mRNA-based cancer immunotherapy CV9201 in patients with stage III B/IV non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2019, 68(5): 799-812.
- [169] ZHAN S E, LI J M, XU R H, et al. Armored long RNA

- controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type 1[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(8): 2571-2576.
- [170] CALDEIRA J C, PEABODY D S. Thermal stability of RNA phage virus-like particles displaying foreign peptides[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, 9(1): 22.
- [171] LI J M, SUN Y L, JIA T T, et al. Messenger RNA vaccine based on recombinant MS2 virus-like particles against prostate cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 134(7): 1683-1694.
- [172] WANG G J, JIA T T, XU X X, et al. Novel miR-122 delivery system based on MS2 virus like particle surface displaying cell-penetrating peptide TAT for hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 59402-59416.
- [173] BIDDLECOME A, HABTE H H, MCGRATH K M, et al. Delivery of self-amplifying RNA vaccines in *in vitro* reconstituted virus-like particles[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0215031.
- [174] ABOSHI M, MATSUDA K, KAWAKAMI D, et al. Safety and immunogenicity of VLP-COV-02, a SARS-CoV-2 self-amplifying RNA vaccine with a modified base, 5-methylcytosine[J]. *iScience*, 2024, 27(2): 108964.
- [175] ZHANG P, FALCONE S, TSYBOVSKY Y, et al. Increased neutralization potency and breadth elicited by a SARS-CoV-2 mRNA vaccine forming virus-like particles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(29): e2305896120.
- [176] SOMINSKAYA I, SKRASTINA D, PETROVSKIS I, et al. A VLP library of C-terminally truncated Hepatitis B core proteins: correlation of RNA encapsidation with a Th1/Th2 switch in the immune responses of mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75938.
- [177] ZHANG P, NARAYANAN E, LIU Q B, et al. A multiclade env-gag VLP mRNA vaccine elicits tier-2 HIV-1-neutralizing

antibodies and reduces the risk of heterologous SHIV infection in macaques[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(12): 2234-2245.

- [178] MADIGAN V, ZHANG Y G, RAGHAVAN R, et al. Human paraneoplastic antigen Ma2 (PNMA2) forms icosahedral capsids that can be engineered for mRNA delivery[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(11): e2307812120.



通讯作者: 童贻刚(1966—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为病毒学、抗病毒药物、疫苗、噬菌体学、生物信息学,从事新发病原体、生物安全、生物信息学、高通量测序、噬菌体学等领域研究。

E-mail: tongyigang@mail.buct.edu.cn



共同通讯作者: 徐杉(1992—),女,博士,副教授,硕士生导师。研究方向为流感病毒等复制机制及利用高通量测序技术发现未知病原体。

E-mail: shanxu@buct.edu.cn



第一作者: 杨璐(1997—),女,博士研究生。研究方向为 mRNA 疫苗、噬菌体载体疫苗。

E-mail: 1359526291@qq.com