

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.11.09

mRNA 技术及其在动物疫病研究中的应用进展

王明伟^{1,2}, 夏应菊¹, 陈紫昱¹, 李佳昕¹, 刘业兵^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所国家猪瘟参考实验室, 北京 100081; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271000)

[收稿日期] 2023-08-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 11-0062-10 [中图分类号] Q78

[摘要] mRNA 技术是一种将人工合成的 mRNA 分子引入细胞内, 并利用细胞自身的翻译机制将其翻译成蛋白质的技术。作为一种新兴的生物技术, mRNA 技术已经在疫苗研究、基因治疗等多个领域取得了重要进展, 并在新冠预防和传染病防治方面进行了临床应用, 展现出了广阔的应用前景。通过对 mRNA 技术的发展历程, mRNA 疫苗的设计、递送及特点, 以及其在动物疫病研究的进展予以综述, 分析其存在的问题, 展望今后的发展方向, 为相关研究提供参考。

[关键词] mRNA 技术; 疫苗研究; 动物疫病

Research Progress on mRNA Technology and Its Application in Animal Disease

WANG Ming-wei^{1,2}, XIA Ying-ju¹, CHEN Zi-yu¹, LI Jia-xin¹, LIU Ye-bing^{1*}

(1. National Reference Laboratory for Classical Swine Fever, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271000, China)

Corresponding author: LIU Ye-bing, E-mail: zjsliuyebing@163.com

Abstract: mRNA technology is a technique that introduces artificially synthesized mRNA molecules into cells and utilizes the cell's own translation mechanism to translate them into proteins. As an emerging biotechnology, it has made important progress in vaccine research, gene therapy and other fields, and has clinical applications in COVID-19 prevention and infectious disease control, showing broad application prospects. This article reviews the history of mRNA technology, the design, delivery, and characteristics of mRNA vaccines, as well as their application status in the field of animal diseases. A discussion of current challenge and future directions are also provided for the reference of related research.

Key words: mRNA technology; vaccine research; animal disease

mRNA 又称信使 RNA (message RNA, mRNA), 由 DNA 为模板转录而来, 负责指导胞内蛋白质的合成^[1]。mRNA 技术是一种将人工合成的 mRNA 分子引入细胞内, 并利用细胞自身的翻译机制将其

基金项目: 国家重点研发计划“非洲猪瘟活载体疫苗评价技术及体系研究”(2021YDF1801405)

作者简介: 王明伟, 硕士研究生, 从事兽医微生物与免疫学研究。

通讯作者: 刘业兵。E-mail: zjsliuyebing@163.com

转录成蛋白质的技术,已有几十年的研究历史。新冠疫情暴发后,Moderna 利用该技术仅用了 42 天即完成了新冠 mRNA 候选疫苗 mRNA-1273 的构建和筛选,并于 2020 年 3 月获得 FDA 批准正式开始评估安全性和免疫原性的 I 期临床试验,试验结果显示该候选株的免疫保护性可达 94.1%^[2]。2020 年 12 月辉瑞和 Moderna 分别研制的 mRNA 疫苗均获得美国食品安全局的紧急使用授权(EUA),成为疫苗史上最快研制上市的疫苗^[3],标志着 mRNA 技术正式应用到 COVID-19 临床预防。随着 mRNA 技术的发展以及在新冠疫情防控中的应用,该技术成为生物学领域的研究热点,得到了极大的关注,并获得了 2023 年诺贝尔生理学或医学奖。同时该技术也在动物疫病中进行了应用研究,现就 mRNA 技术的发展历程,mRNA 疫苗的设计、递送及特点,以及其在动物疫病研究中的进展予以综述。

1 mRNA 技术的发展历程

mRNA 主要分布在细胞质中,由编码区、上游的 5'非编码区和下游的 3'非编码区组成,真核生物 mRNA 分子两端还有 5'帽子和 3'尾部结构,原核细胞的 mRNA 一般没有尾部结构^[4]。1961 年,Brenner 及 Gross 等发现在蛋白质合成过程中,有一种物质与核糖体结合,由此发现了 mRNA^[5]。到了 1975 年,有文献报道发现了 mRNA 的帽子结构(5'端高度甲基化

修饰)^[6]。1978 年,Dimitriadis GJ 将脂质体包裹的 mRNA 递送至小鼠淋巴细胞^[7],有了这些前期的基础,Malone 在 1989 年首次提出 mRNA 疫苗的概念^[8]。然而,受 mRNA 不稳定,易被机体模式识别受体(PRRs)识别并降解等因素的限制,当时的研究更倾向于比较稳定的 DNA 疫苗,而 mRNA 的应用研究更偏向于免疫佐剂方向^[9]。直到 1990 年,Wolff 等人首次报道使用人工合成的裸 mRNA 注射到小鼠骨骼肌可促进编码蛋白的表达^[10],证明体外合成 mRNA 作为信息载体指导体细胞蛋白合成的可行性。2005 年,Weissman 等人发现使用修饰的外源 mRNA 可以降低在体内诱导免疫反应并避免快速降解^[11]。近年来,随着 5'端加帽技术的发展,体外合成 mRNA 的稳定性、翻译效率得到提高,而机体对 RNA 的先天免疫反应,RNA 的降解速度也相对降低。此外,假尿苷修饰技术、种属密码子的选择和优化、最优化的 UTR(非编码区)和多聚 A 等技术的发展进一步增加了 mRNA 稳定性^[12]。2020 年新冠 mRNA 疫苗获得了 EUA 认证^[13],证明 mRNA 疫苗可能成为未来快速应对新发传染病的新手段,也加速了 mRNA 技术的发展。2023 年诺贝尔生理学或医学奖公布,授予匈牙利生物化学家 Katalin Karikó 和美国医学家 Drew Weissman,以表彰他们在核苷碱基修饰方面的发现,从而开发出了有效的 mRNA 疫苗。

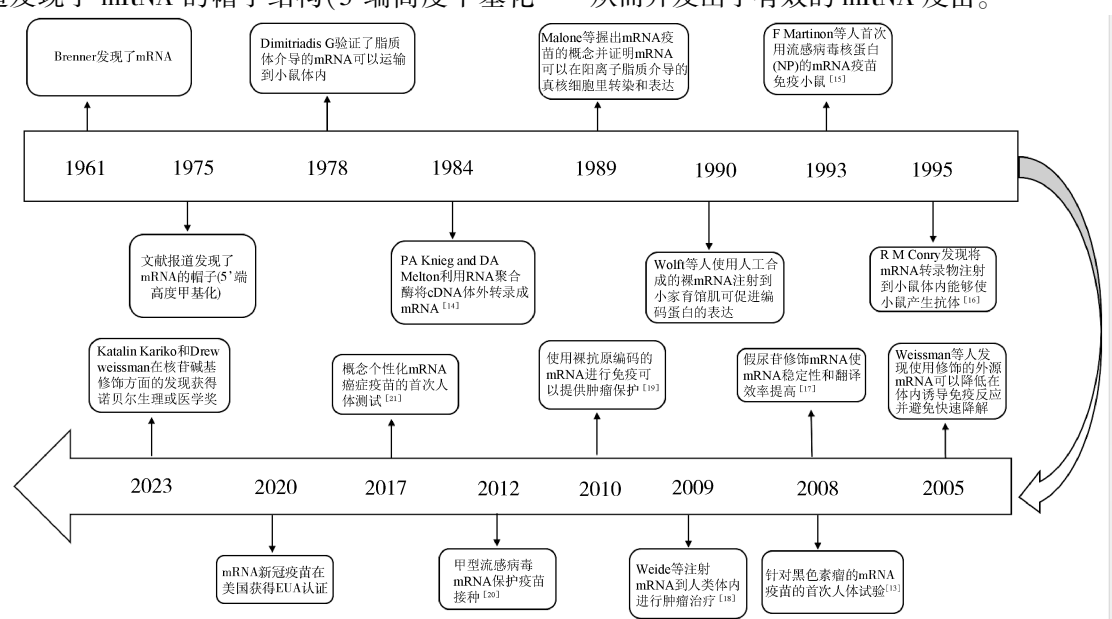


图 1 mRNA 的发展历程图

Fig 1 History of mRNA technology

2 mRNA 疫苗的设计、递送及特点

2.1 mRNA 疫苗的设计 mRNA 技术是一种将人工合成的 mRNA 分子引入细胞内,并利用细胞自身的翻译机制来将其转录成蛋白质的技术。这其中最难的便是人工合成 mRNA 分子,合成过程大概分为三步:第一步根据目的基因序列设计 mRNA 序列,优化其序列并制备重组质粒;第二步对重组质粒进行线性化及加尾;第三步对线性化质粒 DNA 进行体外转录、加帽及纯化,得到 mRNA 分子后,再对其进行体外细胞转染和检测。现阶段 mRNA 技术最成功的应用是 mRNA 疫苗,其结构和 mRNA 一样,包括 5'端帽子结构—5' UTR (非编码区)—ORF 编码区(目的基因序列)—3' UTR (非编码区)—3'端 poly(A)尾巴^[22]。5'末端添加 cap 帽子结构可以增强 mRNA 分子的稳定性。5'端添加 cap 帽子方法很多,可以通过加帽试剂盒添加,也可以在体外转录的同时添加,即 cap 结构, DNA 模板, T7RNA 聚合酶以及核苷酸和修饰的核苷在体外合成 mRNA 分子,然后将其纯化后便得到 mRNA 原液,在众多添加 cap 结构的方法中,这种方法比较快捷方便。位于 5'端和 3'端的 UTR 一般选择高表达基因,如人 β 珠蛋白^[23],因为含有这些 UTR 的 mRNA 通常具有高水平的翻译和稳定性。通过高通量筛选合适的 UTR 序列添加到 mRNA 质粒上,可以提高 mRNA 的表达,合理组合 5'UTR 和 3'UTR 可以使翻译效率最大化。编码抗原的 ORF(开放阅读框)是 mRNA 中最关键的组成部分,因为它包含了翻译成蛋白质的编码序列。尽管开放阅读框的可塑性不及非编码区,但它可以通过将人体内很少使用的密码子替换为经常出现的密码子来进行优化,当然编码蛋白的氨基酸序列不能改变,这样优化可增加蛋白质翻译。目前有多种 poly 尾的添加方法,最简单的方法是在 PCR 扩增目的基因进行质粒线性化的时候在下游引物上增加互补碱基,使得到的目的基因上带有 poly 尾。mRNA 疫苗由这五部分组成的结构不仅增强了 mRNA 的稳定性,同时提高了 mRNA 翻译的准确性和效率。之后再将其体外转录获得的 mRNA 原液直接引入目标细胞中,在细胞内

完成翻译形成蛋白质^[24]。该蛋白质更接近天然构象的蛋白,因为避免了传统蛋白质制备方法中所面临的问题,例如复杂的蛋白质折叠和后续纯化等步骤。

2.2 mRNA 疫苗的递送系统 除了 mRNA 本身外,递送系统也是 mRNA 疫苗中不可或缺的一部分,因为 mRNA 必须穿过细胞膜才能到达细胞质内进行抗原蛋白表达。但由于 mRNA 带有负电荷且分子量较大,容易被核酸酶降解^[25],很难到体内发挥作用,所以需要一种有效的递送方式来解决这个难题。mRNA 递送系统的研发最早可追溯到 1989 年^[8],主要包括物理和化学两种方式,前者通过电穿孔的方式,使靶组织生物膜表面瞬时形成微孔,让 mRNA 通过,这种方式操作简单,但由于电击操作的可变因素较多,电脉冲也会对细胞造成一定损害,该方法的应用受到了限制。化学方式中最常用的是脂质纳米颗粒(LNP)递送技术。LNP 由 4 种成分组成,包括可电离的氨基脂质、惰性亲水性聚乙二醇(PEG)—脂质、稳定剂胆固醇和辅助磷脂。这些成分的精确比例可以增强 LNP 的稳定性,从而促进 mRNA 复合物的吸收,使得 mRNA 在准确递送至细胞内的同时也得到准确高效的翻译,从而将抗原递送给抗原递呈细胞刺激机体的体液免疫和细胞免疫应答^[26]。在使用 LNP 时,可电离的氨基脂质可以在低 pH 下与核酸缩合,促进自组装成病毒大小的颗粒,并将 mRNA 从内体释放到细胞质,惰性亲水性聚乙二醇(PEG)—脂质可以增加制剂的半衰期,并限制蛋白质和细胞的相互作用,同时稳定剂胆固醇可以填补 LNP 分子之间的间隙,提高稳定性,并帮助 LNP 与内体膜融合,辅助磷脂可以支持脂质双层结构。此外, LNP 还可以保护 mRNA 分子不过早被 TLR 识别,避免先天免疫反应过度激活^[12]。由于其简易、模块化和生物兼容性等优势, LNP 成为目前最有前途、研究最广泛、进展最快的 mRNA 递送技术之一。

2.3 mRNA 疫苗的独特优势 mRNA 疫苗相较于亚单位、灭活病毒和减毒活病毒以及 DNA 的疫苗等传统疫苗具有高效性、安全性、适应性、无需单独佐剂等优点。

2.3.1 高效性 mRNA 疫苗研制速度远快于传统疫苗,是因为其生产过程不需要使用活病毒或细菌,也不需要培养细胞,只需要合成 mRNA 序列即可^[25]。此外,mRNA 疫苗可以在短时间内产生特异性免疫反应,是因为它不仅可以激活体液免疫,还可以激活细胞免疫,例如辉瑞和 BioNTech 共同研发的新冠 mRNA 疫苗 BNT162b2,一次注射就足以引发人体高滴度的中和抗体反应以及 CD4 辅助 T 细胞和 CD8 细胞毒性 T 细胞反应^[27]。这也是 mRNA 疫苗的关键优势。

2.3.2 安全性 相比传统的疫苗技术,mRNA 疫苗不包含活病毒或细菌,因此不会引起感染;无需进入细胞核,直接在细胞质翻译,不存在基因组整合风险。此外,mRNA 疫苗在人体内的半衰期较短,仅 10 min 左右^[28],不会在体内长期停留,降低了不良反应的风险。

2.3.3 适应性 mRNA 疫苗可以根据病原体的变异来快速更新,以保持其对新型病毒株的有效性。这种灵活性使得 mRNA 疫苗可以更好地应对新兴病毒和传染病的爆发。

2.3.4 无需单独佐剂 传统疫苗需要添加佐剂以增强免疫反应,但是 mRNA 疫苗的 LNP 组分具有佐剂活性,这种 LNP 驱动的佐剂活性能够激活免疫系统^[29],因此不需要其他单独佐剂。

3 mRNA 技术在动物疫病研究中的应用

mRNA 技术在动物传染病研究中的应用相对滞后,尚无可临床应用的产品被批准。目前国内外动物传染病 mRNA 疫苗的研究主要聚焦人兽共患病及几种少数重要动物疫病的病原微生物,主要动物疫病 mRNA 疫苗的研究进展见表 1。

3.1 在狂犬病研究中的应用 狂犬病(Rabies)是由狂犬病病毒(Rabies virus, RV)引起人和所有温血动物的一种接触性传染病,潜伏期较长,病死率可到达 100%,犬、猫、人、牛、羊、猪等均易感^[30]。RV 的 G 蛋白是中和抗体识别的主要抗原。G 蛋白为糖蛋白全长,其中 G Δ TM 蛋白为 G 糖蛋白的膜外部分;Gtrimer 蛋白为 G 糖蛋白的三聚体(模拟病毒表面 G 蛋白天然构象);除此之外,M 蛋白是 RV

的膜蛋白,M 蛋白可以调控病毒 RNA 复制及病毒的组装,在病毒装配和出芽过程中起关键作用^[31]。目前主要通过疫苗免疫预防和控制该病。现有 Rabies 疫苗包括灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位蛋白疫苗、DNA 疫苗、病毒载体疫苗等。我国现在使用的 VERO 细胞或地鼠肾细胞源的 Rabies 疫苗,均为灭活疫苗,尽管安全、有效,但是需多次接种才能产生足够免疫、生产周期较长且费用高等因素限制了该类疫苗的使用。因此,多个研究团队开展了以 mRNA 技术为载体的新型狂犬疫苗的研发。Saxena S 等研究人员制造了一种表达 RV G 蛋白的 mRNA 疫苗。微小剂量的疫苗能够使小鼠产生类似 DNA 疫苗引发的细胞免疫和体液免疫反应,小鼠产生了较高水平的中和抗体和足够的免疫保护^[32]。张梦玲等分别针对 RV 的 G 蛋白、G Δ TM 蛋白、Gtrimer 蛋白、M 蛋白、Gtrimer 蛋白和 M 蛋白的抗原组合设计了 mRNA 疫苗,发现这五种疫苗候选物均能够诱导小鼠产生高水平的中和抗体,显示出很好的免疫原性^[33]。此外,刘隽等将 RV CTN-1 毒株的 G 蛋白的 mRNA 序列进行优化合成和纯化,之后将纯化后的 mRNA 序列与适宜载体进行组装和包装,形成 mRNA 疫苗颗粒,得到最终的 mRNA 疫苗制剂对小鼠通过静脉注射、皮下注射或肌肉注射等方式进行给药,能够诱导小鼠产生 RV G 蛋白特异性的免疫反应^[34]。Margit Schnee 使用 mRNA 技术开发了一种编码 RV G 蛋白的 mRNA,并将其注射到小鼠和家猪体内。结果显示,这种 mRNA 能够诱导小鼠和家猪产生高水平的中和抗体,保护小鼠和家猪不被 RV 感染^[35]。Stitz L 等根据 RV G 蛋白设计的 mRNA 疫苗可有效保护小鼠感染 RV,进行人体 I 期临床试验结果显示,71% 测试者皮下注射 80 或 160 μ g 疫苗,46% 测试者无针注射装置肌肉注射 200 或 400 μ g 疫苗,可诱导产生有充足保护效力的中和抗体^[36]。这些研究数据显示,基于不同蛋白设计的狂犬 mRNA 候选物均能使实验动物产生高水平的中和抗体,部分免疫攻毒实验数据显示,候选物对免疫动物提供了有效保护,使狂犬有望成为继新冠后的下一个研制成功的 mRNA 疫苗。

表 1 几种主要动物疫病 mRNA 疫苗的研究进展一览表

Tab 1 Summary of research progress on mRNA vaccines for several major animal diseases			
病原	靶抗原	主要研究者	对实验动物的效果
狂犬病病毒	G 蛋白	Saxena S 等	微小剂量的疫苗能够使小鼠产生类似 DNA 疫苗引发的细胞免疫和体液免疫反应
	G 蛋白	刘隽等	能够诱导小鼠产生狂犬病病毒 G 蛋白特异性的免疫反应
	G 蛋白	Margit Schnee	诱导小鼠和家猪产生高水平的中和抗体,保护小鼠和家猪不被狂犬病毒感染
	G 蛋白 GΔTM 蛋白 Gtrimer 蛋白 M 蛋白 Gtrimer 蛋白和 M 蛋白的抗原组合	张梦玲等	这五种疫苗候选物均能够诱导小鼠产生高水平的中和抗体,显示出很好的免疫原性
	G 蛋白	Stitz L 等	可以有效保护小鼠感染狂犬病病毒; I 期临床试验结果显示, 71% 测试者皮下注射 80 或 160μg 疫苗, 46% 测试者无针注射装置肌肉注射 200 或 400μg 疫苗, 可诱导产生有充足保护效力的中和抗体
口蹄疫病毒	O 血清型病毒全长	Pulido M R 等	58% 的免疫小鼠都产生了高滴度的 FMDV 中和抗体, 攻毒免疫的小鼠有 38% 的小鼠得到了有效的保护
猪繁殖与呼吸综合征病毒	PRRSV – A PRRSV – B PRRSV – C	贺 笋等	3 种疫苗免疫小鼠后均能够模拟天然感染的过程, 在机体细胞内被翻译、修饰, 可以被 MHC I 类分子和 MHC II 类分子呈递, 激活机体产生特异性的 CD8 ⁺ 和 CD4 ⁺ T 细胞
猪瘟病毒	E2 蛋白	刘业兵等	可使小鼠、猪产生特异性抗体和免疫力, 100% 抵抗猪瘟强毒攻击
	HA 蛋白	Scorza F B 等	可使小鼠产生特异性抗体和部分保护力, 免受致病的同源病毒攻击
流感病毒	HA 蛋白(H1N1)	Chahal J S 等	免疫一次即可使小鼠得到对 H1N1 流感病毒的有效保护
	HA 蛋白(H9N2)	北京农学院	与禽流感全病毒灭活疫苗比较, 对 SPF 雏鸡免疫 25μg mRNA 疫苗的抗体与全病毒灭活疫苗水平相当
	HA 蛋白	Vogel 等	免疫小鼠能够预防 H1N1 流感病毒
	20 种已知 HA 抗原	Arevalo 等	可以同时诱导小鼠和雪貂产生对多种抗原的免疫反应
猴痘病毒	A35R – M1R 蛋白	Yang 等	免疫小鼠可以有效诱导机体的体液免疫和细胞免疫, 并且可以有效中和活病毒感染
弓形虫	GRA6、ROP2A、 ROP18、SAG1、 SAG2A 和 AMA1	Chahal J S 等	该疫苗可以保护小鼠在致命剂量的弓形虫感染中存活超过 6 个月
	NT – Pase – II 蛋白	Luo F 等	该疫苗可诱导小鼠产生中和抗体; 攻毒保护试验显示, 免疫小鼠存活时间延长且脑内弓形虫量减少
细 菌	化脓性链球菌 (GAS) SLOdm 蛋白 无乳链球菌 (GBS) 链 球菌 BP – 2a 蛋白	Maruggi G 等	这两种疫苗都可诱导产生免疫小鼠中和抗体, 并有效的保护小鼠不被细菌感染。

PRRSV – A; GP3 – linker – GP4 – linker – GP5 – linker – M – linker – N
PRRSV – B; GP3 – linker – GP4 – linker – M – linker – GP5 – linker – N
PRRSV – C; GP3 – linker – 4 – linker – 3'GP5 – linker – M – linker – N – linker – 5'GP5

3.2 在口蹄疫研究中的应用 口蹄疫 (Foot – and – mouth – disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot – and – mouth – disease virus, FMDV) 引起的偶蹄兽的一种急性、热性、高度接触性传染病, 猪、

牛、羊最易感,人也偶尔感染发病,是世界上现有家畜传染病中最复杂、最受重视的疾病之一,传播速度极快,往往会造成大范围流行,传染性极强。

Pulido MR 等将 O 血清型 FMDV 的基因组转录产生的 mRNA 注入小鼠体内。小鼠分为四组,其中一组为对照组注射生理盐水,另外三组分别注入 10 μg 、50 μg 以及 100 μg 体外转录的 mRNA,其中接种 mRNA 的小鼠中,58% 的小鼠都产生了高滴度的 FMDV 中和抗体,随后对这些小鼠进行攻毒实验,发现免疫的小鼠中,有 38% 的小鼠得到了有效的保护。该结果表明,使用 FMDV 基因组转录产生的 mRNA 可以在小鼠体内产生高水平的抗体^[37],但如何产生足够有效的免疫保护还需进一步探讨。

3.3 在猪繁殖与呼吸综合征研究中的应用 猪繁殖与呼吸综合征病(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖和呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起猪的一种接触性传染病,主要导致仔猪呼吸道疾病和母猪繁殖障碍,给养猪业造成巨大的经济损失^[38]。贺笋等利用 PRRSV 含有中和抗原表位的结构蛋白 GP3、GP4、GP5、M 和 N 蛋白,通过不同组合方式,将挑选的含有抗原表位的基因通过 linker 连接起来,进行后期融合表达。这 5 种蛋白根据不同的排列组合构建了三种 mRNA 疫苗,将这三种疫苗免疫小鼠,发现这些疫苗均能够模拟天然感染的过程,在机体细胞内被翻译、修饰,可以被 MHC I 类分子和 MHC II 类分子呈递,激活机体产生特异性的 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞,从而产生高水平的细胞免疫和体液免疫应答^[39]。

3.4 在流感研究中的应用 流感(Influenza)是由流感病毒(Influenza virus)引起的人兽共患传染病,通常只感染禽类,但个别亚型也会感染猪或人。本病广泛分布于世界各地,甲型和乙型流感病毒呈季节性流行,每年有近 300 万~500 万例病例,造成全世界 29 万~65 万人死亡^[40]。禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)属于甲型流感病毒,根据病毒表面蛋白囊膜的血凝素(HA,)及神经氨酸酶(NA)的抗原性不同分为 18 种血凝素亚型和 11 种神经

氨酸酶亚型^[41]。目前针对不同亚型的 AIV 疫苗具有良好的免疫保护效果,但由于 AIV 频繁的基因突变和重组,需要及时更新疫苗以应对疫苗与流行株之间存在的抗原差异。目前,广泛使用的 AIV 灭活疫苗和减毒活疫苗等传统疫苗生产周期长,无法及时研发出候选疫苗应对 AIV 的频繁变异,而 mRNA 疫苗由于生产周期较短,工艺与传统疫苗相比也更简单,有望成为未来代替传统疫苗的新型 AIV 候选疫苗。一项早期研究表明,用编码 HA 抗原的自扩增性 mRNA (self-amplifying mRNA, SAM) 疫苗进行免疫,可使小鼠产生特异性抗体和部分保护力,免受致病的同源病毒攻击^[42]。另一项研究针对 H9N2 亚型 AIV 设计出 mRNA 疫苗候选物,并对其安全性和免疫效力进行了评估,发现候选物对鸡安全,并可使 SPF 鸡产生高水平的体液免疫以及细胞免疫。与 AIV 全病毒灭活疫苗比较,对 SPF 雏鸡免疫 25 μg mRNA 疫苗的抗体与全病毒灭活疫苗水平相当,之后对两种疫苗免疫的 SPF 雏鸡进行攻毒实验,荧光定量 PCR 检测咽拭子以及肺脏、气管、十二指肠和腺胃发现,25 μg 免疫剂量免疫的 mRNA 疫苗组与全病毒灭活疫苗组,除气管之外各个组织的病毒载量极显著低于未免疫的对照组($P < 0.01$),气管中全病毒灭活疫苗组显著低于对照组($P < 0.05$),25 μg 免疫的 mRNA 疫苗组极显著低于对照组($P < 0.01$)^[43]。这项结果表明 mRNA 疫苗在免疫保护上与灭活疫苗水平相当,但是 mRNA 疫苗生产周期比灭活疫苗的生产周期要短很多,这也大大彰显了 mRNA 疫苗的独特优势。Chahal J S 等构建了包括 H1N1 HA 抗原、刚地弓形虫抗原和埃博拉病毒多种抗原表达的 mRNA 疫苗,可以对 H1N1 AIV、刚地弓形虫和埃博拉病毒等多种致病性病原体免疫保护,产生特异性 CD8⁺ T 细胞和抗体反应,攻毒试验结果表明,免疫一次即可使小鼠得到对 H1N1 AIV 的有效保护^[44]。Vogel 等用表达几种不同血清型的 HA 抗原的 SAM 疫苗对小鼠进行免疫,能够有效预防 H1N1 流感病毒^[45]。Arevalo 等开发了一种编码了所有已知的 20 种甲型和乙型流感病毒亚型的 HA 抗原的 mRNA (20 -

HAmRNA - LNP) 疫苗, 研究证明该疫苗可以同时诱导小鼠和雪貂产生对多种抗原的免疫反应^[46]。

3.5 在猴痘研究中的应用 猴痘 (Monkeypox, Mpox) 是一种由猴痘病毒 (Monkeypox virus, MPXV) 感染所致的病毒性人畜共患病, 人类中出现的症状与过去在天花患者身上所看到的症状相似, 但是自 1980 年世界上消灭天花以后, MPX 成为现存最为严重的且由正痘病毒引起的疾病^[47]。Yang 等构建了 3 种表达 MPX A35R 蛋白和 M1R 蛋白的 mRNA 疫苗, 其中 VGPox1 和 VGPox2 是编码由 A35R 的胞外结构域和全长的 M1R 组成的融合蛋白, 两者的区别在于 VGPox2 去除了 A35R 的茎区。而 VGPox3 含有两个单独的 mRNA - LNP 的混合物, 分别编码 A35R 和 M1R。免疫小鼠结果显示 VGPox1 和 VGPox2 比 VGPox3 具有更好的抗病毒能力^[48]。

3.6 在弓形虫病研究中的应用 弓形虫是一种单细胞寄生虫, 其学名为 *Toxoplasma gondii*, 是一种广泛分布于世界各地的寄生虫。弓形虫能够感染人类和其他哺乳动物。弓形虫感染每年会导致超过 100 万人死亡。Chahal J S 等人在他们的研究中利用树突状纳米粒子封装 mRNA 复制体, 开发了一种六价 mRNA 疫苗。该疫苗的抗原是弓形虫的多个生命周期阶段中高度保守的蛋白质, 包括 GRA6、ROP2A、ROP18、SAG1、SAG2A 和 AMA1。他们对小鼠进行了接种, 每个小鼠接种单剂 40 μg 的疫苗 (每个复制子 6.67 μg), 结果发现该疫苗可以保护小鼠在致命剂量的弓形虫感染中存活超过 6 个月^[44]。这项研究表明, 利用树突状纳米粒子封装 mRNA 复制体制备的六价 mRNA 疫苗具有很高的保护效力, 可以为弓形虫感染提供新的预防和控制手段。Luo F 等构建了表达弓形虫核昔三磷酸水解酶 - II (NT-Pase - II) 蛋白的 LNPs-saRNA 疫苗, 该疫苗可诱导小鼠产生中和抗体; 攻毒保护试验显示, 免疫小鼠存活时间延长且脑内弓形虫量减少至对照组的 46.4%^[49]。

3.7 在细菌性疾病研究中的应用 mRNA 技术在病毒上有较多的研究, 只有极少数细菌抗原被尝试用于 mRNA 疫苗的构建。2017 年, Maruggi G 等人

设计了两种预防性 SAM 疫苗, 分别与编码 A 组链球菌溶血素 - O (SLOdm) 和 B 组链球菌 (GBS) 链球菌的毛发 2a 骨架蛋白 (BP - 2a) 混合, 接种小鼠进行动物试验, 结果小鼠成功产生大量全功能抗体^[50]。

在单一病原菌致病种中, 细菌病原菌结核分枝杆菌致死率长期居全球首位。尽管如此, 只有一种疫苗获准针对人类结核: 卡介苗 (BCG), 这是一种减毒全细胞疫苗, 但临床上存在局限性, 一是卡介苗免疫效力在不同个体中差异较大, 免疫力较弱的人群即使免疫了卡介苗依然可能感染结核; 二是 BCG 由许多遗传上不同的亚菌株组成。这些遗传差异是否以及如何影响 BCG 的效力仍然未知^[51]。MVA85A 是一种表达单抗原 Ag85A 的结核亚单位疫苗, 在 IIb 期试验中没有显著改善保护作用^[52]。失败案例说明与病毒感染相比, 细菌感染往往具有更复杂的阶段, 具有多种分子表达特征, 仅表达单个抗原无法满足免疫保护要求。未来 mRNA 疫苗想进一步应用于细菌感染的预防和治疗领域, 应考虑更多的优化, 包括各种抗原或表位的选择和重组, 不同靶抗原的周期性给药, 甚至直接添加佐剂等被动免疫组合物^[53]。

4 存在问题及展望

在过去的十年里, mRNA 技术已经从实验室走向临床应用, 取得了良好效果。这种生物技术领域的突破性进展在冠状病毒病 (COVID - 19) 全球大流行期间表现得尤为明显, 也标志着 mRNA 技术正在逐步走向成熟。到目前为止, 许多实验证明了 mRNA 疫苗无论从 mRNA 本身的特性, 还有引发的免疫反应情况等方面来看, 都优于亚单位疫苗、灭活疫苗等传统疫苗^[54]。

虽然 mRNA 技术发展迅速, 但是它也存在一些问题和挑战, 主要表现在以下几个方面。一是 mRNA 技术用于设计疫苗, 首先需找到对该疫病可产生免疫保护力的关键蛋白以及最适 UTR 和质粒载体, 而不像灭活病毒疫苗那样直接全病毒灭活, 如何寻找最适蛋白及 UTR 和载体是至关重要的问题。此外, 在设计 mRNA 序列时需要考虑对细胞

的毒性和免疫反应等因素^[55],这也增加了技术的复杂性。二是 mRNA 分子的稳定性较差,容易被降解,导致注射进体内没有效果,所以如何保存 mRNA 疫苗不被降解也是一个难题。三是目前 mRNA 制备所涉及的几项关键原材料,由于受专利保护、技术壁垒、制备流程等因素限制,成本较高,若构建动物疫病 mRNA 疫苗,如何降低成本,也是需要解决的难点问题。

针对这些问题,要在病原端及基于 LNP 的 mRNA 疫苗冻干工艺端加快步伐。首先需要充分了解某种病原,收集病原 UTR 等序列库以供筛选,并建立自有的质粒载体,满足线性化酶切这一特殊需求;同时,也应该建立平台性的 mRNA 设计和筛选流程、以及平台性的工艺路线,即可适用于几乎所有的 mRNA 序列。研究表明基于 LNP 的 mRNA 疫苗冻干化处理后可以在室温下长期储存^[56],这为 mRNA 疫苗的储存和运输提供了一个潜在的解决方案。同时,对于目前尚存在的专利保护及技术壁垒等问题,希望能够随着全球合作的进一步深化以及 mRNA 技术的进一步成熟来解决。

总体来说,mRNA 技术是一项具有广阔前景的生物技术,它可以为许多疾病的治疗提供新的思路和方法,比如肿瘤疾病,遗传学疾病及各种自身免疫疾病,相信 mRNA 技术会成为这些疫苗开发的新突破;同时也会推动更多的动物 mRNA 疫苗的研发和应用,比如一些重要的动物传染病,如非洲猪瘟、猪圆环病毒病、犬猫细小病毒病等,可以根据这些病毒的靶抗原或者多种组合抗原的形式设计 mRNA 候选疫苗,随着 mRNA 技术的进一步发展以及对这些疾病的进一步探索,开发这些疾病的 mRNA 候选疫苗是非常有前途的策略。

参考文献:

[1] 邹思湘. 动物生物化学第五版[M]. 北京:中国农业出版社: 2012: 63-64.

Zou Sixiang. Animal Biochemistry Fifth Edition[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House: 2012: 63-64.

[2] Patel R, Kaki M, Potluri VS, *et al.* A comprehensive review of

SARS-CoV-2 vaccines; Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson [J]. Hum Vaccin Immunother, 2022, 18(1): 2002083.

[3] Teo S P. Review of COVID-19 mRNA vaccines; BNT162b2 and mRNA-1273[J]. Pharm Pract, 2022, 35(6): 947-951.

[4] 唐超智, 黄召怡, 张玉玲. RNA 的结构、功能及应用[J]. 生物学教学, 2022, 47(01): 88-91.

Tang C Z, Huang Z Y, Zhang Y L. The structure, function, and application of RNA [J]. Biology Teaching, 2022, 47 (01): 88-91.

[5] Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis [J]. Nature, 1961, 190: 576-581.

[6] Furuichi Y, Miura K. A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus [J]. Nature, 1975, 253(5490): 374-375.

[7] Dimitriadis G J. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes [J]. Nature, 1978, 274 (5674): 923-924.

[8] Malone R W, Felgner P L, Verma I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989, 86(16): 6077-6081.

[9] 秦立得, 赵思俊, 刘华雷, 等. 动物传染病 mRNA 疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2022, 43(07): 64-68.

Qin L D, Zhao S J, Liu H L, *et al* Research progress on mRNA vaccines for animal infectious diseases [J]. Progress in Animal Medicine, 2022, 43 (07): 64-68.

[10] Wolff J A, Malone R W, Williams P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247 (4949): 1465-1468.

[11] 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.

[12] 胡佳欣, 章晓联. mRNA 疫苗的原理、研究现状和展望 [J/OL]. 武汉大学学报(医学版), 2023: 1-13.

Hu J X, Zhang X L. The principle, research status, and prospects of mRNA vaccines [J/OL]. Journal of Wuhan University (Medical Edition), 2023: 1-13.

[13] Sasso J M, Ambrose B J B, Tenchov R, *et al.* The Progress and promise of RNA medicine—An arsenal of targeted treatments [J]. Journal of Medical Chemistry, 2022, 65(10): 6975-7015.

[14] Krieg P A, Melton D A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs [J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(18): 7057-7070.

- [15] Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, *et al.* Induction of virus – specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome – entrapped mRNA[J]. *European Journal of Immunology*, 1993, 23(7): 1719 – 1922.
- [16] Conry R M, LoBuglio A F, Wright M, *et al.* Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector[J]. *Cancer Research*, 1995, 55(7): 1397 – 1400.
- [17] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, *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.
- [18] Weide B, Pascolo S, Scheel B, *et al.* Direct injection of protamine – protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients [J]. *Journal of Immunotherapy*, 2009, 32(5): 498 – 507.
- [19] Kreiter S, Selmi A, Diken M, *et al.* Intranodal vaccination with naked antigen – encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(22): 9031 – 9040.
- [20] Petsch B, Schnee M, Vogel AB, *et al.* Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(12): 1210 – 1216.
- [21] Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly – specific therapeutic immunity against cancer[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 222 – 226.
- [22] 王佳敏, 时小双, 杜寿文, 等. mRNA 疫苗——一种新的疫苗策略[J/OL]. *中国兽医学报*, 2023, 43(05): 1099 – 1106.
Wang J M, Shi X S, Du S W, *et al.* mRNA vaccine—A new vaccine strategy [J/OL]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 43(05): 1099 – 1106.
- [23] 陈鑫, 秦彤. mRNA 疫苗及其在动物传染病中的研究展望[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(07): 2732 – 2742.
Chen X, Qin T. mRNA vaccines and their research prospects in animal infectious diseases[J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023, 54(07): 2732 – 2742.
- [24] 全纹萱, 周仔欣, 关山, 等. mRNA 疫苗制备方法的优化及验证[J]. *免疫学杂志*, 2023, 39(01): 78 – 85.
Quan W X, Zhou Y X, Guan S, *et al.* Optimization and validation of mRNA vaccine preparation methods[J]. *Journal of Immunology*, 2023, 39(01): 78 – 85.
- [25] 张傲, 刘可欣, 刘佳丽, 等. mRNA 疫苗的应用及研究进展[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(03): 366 – 372.
Zhang A, Liu K X, Liu J L, *et al.* The application and research progress of mRNA vaccines[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(03): 366 – 372.
- [26] Yanez Arteta M, Kjellman T, Bartesaghi S, *et al.* Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(15): E3351 – E3360.
- [27] Szabó G T, Mahiny A J, Vlatkovic I. COVID – 19 mRNA vaccines: Platforms and current developments[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(5): 1850 – 1868.
- [28] Baudrimont A, Voegeli S, Vioria E C, *et al.* Multiplexed gene control reveals rapid mRNA turnover[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700006.
- [29] 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*, 2022, 55(6): 1136 – 1138.
- [30] 龙晋蓉. 狂犬病 mRNA 疫苗的研究[D]. 南华大学, 2023.
Long J R. Research on Rabies mRNA Vaccine[D]. South China University, 2023.
- [31] Finke S, Conzelmann K K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(22): 12074 – 12082.
- [32] Saxena S, Sonwane A A, Dahiya S S, *et al.* Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self – replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein[J]. *Veterinary Microbiology*, 136(1/2): 36 – 44.
- [33] 张梦玲, 胡洋洋, 金侠, 等. 一种狂犬病病毒修饰性 mRNA 疫苗及其制备方法[P]. 中国, 1149921481A. 2022 – 08 – 19.
Zhang M L, Hu Y Y, Jin X, *et al.* A rabies virus modified mRNA vaccine and its preparation method [P]. China, 1149921481A. 2022 – 08 – 19.
- [34] 刘隽, 彭育才, 向晨楠, 等. 一种 mRNA 狂犬病疫苗[P]. 中国, 110714015A. 2020 – 01 – 21.
Liu J, Peng Y C, Xiang S N, *et al.* A mRNA rabies vaccine [P]. China, 110714015A. 2020 – 01 – 21.
- [35] Schnee M, Vogel A B, Voss D. *et al.* An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs[J]. *PLoS neglected Tropical Diseases*, 2016, 10(6): e0004746.
- [36] Stitz L, Vogel A, Schnee M, *et al.* A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies[J]. *PLoS neglected Tropical Diseases*, 2017, 11(12): e0006108.

- [37] Pulido MR, Sobrino F, Borrego B, *et al.* RNA immunization can protect mice against foot – and – mouth disease virus [J]. Antiviral Research, 2010, 85(3): 556 – 558.
- [38] 陈溥言. 动物传染病学第六版[M]. 北京:中国农业出版社, 2015: 223 – 224.
Chen P Y. Animal Infectious Diseases Sixth Edition[M] Beijing: China Agricultural Publishing House, 2015: 223 – 224.
- [39] 贺 笋, 张 伟, 李俊辉, 等. 用于预防猪繁殖与呼吸综合征的 mRNA 疫苗及制备方法[P]. 中国, 115025212A. 2022 – 09 – 09.
He S, Zhang W, Li J H, *et al.* mRNA vaccine and preparation method for preventing porcine reproductive and respiratory syndrome[P]. China, 115025212A. 2022 – 09 – 09.
- [40] 庄忻雨. 流感病毒 mRNA 疫苗的构建、制备与实验免疫研究 [D]. 军事科学院, 2020.
Zhuang X Y. Construction, preparation, and experimental immune research of influenza virus mRNA vaccine[D]. Academy of Military Sciences, 2020.
- [41] 陈溥言. 动物传染病学第六版[M]. 北京:中国农业出版社, 2015: 73 – 74.
Chen P Y. Animal Infectious Diseases Sixth Edition[M] Beijing: China Agricultural Publishing House. 2015: 73 – 74.
- [42] Scorza FB, Pardi N. New kids on the block: RNA – Based influenza virus vaccines[J]. Vaccines (Basel), 2018, 6(2): 20.
- [43] 阮文科, 张博文, 徐胜奎, 等. H9 N2 亚型禽流感病毒 mRNA 疫苗及制备方法与应用[P]. 中国, 115252770A. 2022 – 11 – 01.
Ruan W K, Zhang B W, Xu S K, *et al.* H9 N2 subtype avian influenza virus mRNA vaccine and its preparation method and application[P]. China, 115252770A. 2022 – 11 – 01.
- [44] Chahal J S, Khan O F, Cooper C L, *et al.* Dendrimer – RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1 N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(29): E4133 – E4142.
- [45] 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.
- [46] Arevalo C P, Bolton M J, Le Sage V, *et al.* A multivalent nucleoside – modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes[J]. Science, 2022, 378(6622): 899 – 904.
- [47] 刘雪荣, 王学娟, 杨 齐. 猴痘的传播、流行及防治对策[J]. 医学动物防制, 2006(02): 98 – 100.
- Liu X R, Wang X J, Yang Q. The spread, prevalence, and prevention and control strategies of monkeypox [J]. Medical Animal Control, 2006 (02): 98 – 100.
- [48] Hou F, Zhang Y, Liu X, *et al.* Novel mRNA vaccines encoding Monkeypox virus M1R and A35R protect mice from a lethal virus challenge[J]. BioRxiv, 2022: 2022.2011.2019.517190.
- [49] Luo F, Zheng L, Hu Y, *et al.* Induction of protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice by nucleoside triphosphate hydrolase – II (NTPase – II) self – amplifying RNA vaccine encapsulated in lipid nanoparticle (LNP) [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 605.
- [50] 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.
- [51] Zhang L, Ru H W, Chen F Z, *et al.* Variable virulence and efficacy of BCG vaccine strains in mice and correlation with genome polymorphisms[J]. Molecular Therapy, 2016, 24(2): 398 – 405.
- [52] Tameris M D, Hatherill M, Landry B S, *et al.* Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo – controlled phase 2b trial[J]. Lancet, 2013, 381(9871): 1021 – 1028.
- [53] Xu S, Yang K, Li R, *et al.* mRNA vaccine era—Mechanisms, drug platform and clinical prospection[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6582.
- [54] 蔚 丹, 马云龙, 万 方, 等. mRNA 疫苗的研究及应用进展 [J]. 生物技术进展, 2023, 13(04): 492 – 498.
Wei D, Ma Y L, Wan F. *et al.* Research and application progress of mRNA vaccines [J]. Progress in Biotechnology, 2023, 13 (04): 492 – 498.
- [55] 傅佳燕, 冯硕, 杜彬荷, 等. mRNA 疗法的研究进展与挑战 [J]. 中国科学: 生命科学, 2023, 53(01): 30 – 49.
Fu J Y, Feng S, Du B H, *et al.* Research progress and challenges in mRNA therapy [J]. Chinese Science: Life Sciences, 2023, 53 (01): 30 – 49.
- [56] Muramatsu H, Lam K, Bajusz C, *et al.* Lyophilization provides long – term stability for a lipid nanoparticle – formulated, nucleoside – modified mRNA vaccine[J]. Molecular Therapy, 2022, 30(5): 1941 – 1951.

(编 辑:李文平)