综述

mRNA 疫苗核酸修饰与递送系统的发展历程与挑战

董文彬[1]，张雪梅[1*]，陈一飞[2*]
（1. 复旦大学药学院，上海 201203；2. 上海药品审评核查中心，上海 201203）

摘要：mRNA 疫苗因其开发灵活性、高免疫原性而受到学术界、产业界和监管方等的广泛关注，在 2019 新型冠状病毒病（corona virus disease 2019，COVID-19）的疫情防控中得到了广泛应用。mRNA 疫苗的基因重组风险低、安全性好，但稳定性较差，贮存和运输较困难。可采用核酸修饰和新型递送系统以改善 mRNA 疫苗的稳定性，增强其安全性和有效性。该文从 mRNA 疫苗的分子学基础与制剂开发角度，介绍了 mRNA 疫苗的发展现状及其关键技术，并讨论了 mRNA 疫苗在研发和应用中的难点和可能的解决方向。

关键词：mRNA 疫苗；核酸修饰；递送系统
中图分类号：R945　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)03-0304-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.03.002

Development and Challenges for Nucleic Acid Modifications and Delivery Systems of mRNA Vaccines

DONG Wenbin[1], ZHANG Xuemei[1*], CHEN Yifei[2*]
(*1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 2. Shanghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: mRNA vaccines have attracted extensive attention from academia, industry, and regulatory agencies for their development flexibility and high immunogenicity. They have been widely used to prevent and control the Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). While mRNA vaccines have a low risk of recombination and good safety, their poor stability and strict storage and transportation conditions limit their applications. Nucleic acid modifications and novel delivery systems have been used to improve the stability of mRNA vaccines and enhance their safety and efficacy. From the perspective of the molecular basis and formulation development of mRNA vaccines, the development status and critical technologies of mRNA vaccines are reviewed, and the challenges and possible solutions of mRNA vaccines in the development and application are discussed.

Key Words: mRNA vaccine; nucleic acid modification; delivery system

在 2019 新型冠状病毒病（corona virus disease 2019，COVID-19）疫情防控中，2 款信使 RNA（mRNA）疫苗（美国辉瑞 -BioNTech 公司的 BNT162b2，商品名为 Comirnaty；美国 Moderna 公司的 mRNA-1273，商品名为 Spikevax）的问世开启了核酸类药物发展的新时代[1]，mRNA 疫苗也成为 mRNA 药物的代表性产品。

mRNA 疫苗是根据目的抗原设计基因组序列，将其在体外转录成 mRNA，再经修饰、纯化、包载后递送到人体，利用人体自身的蛋白质合成系统翻

收稿日期：2022-08-10
作者简介：董文彬（1997—），女，硕士研究生，研究方向：新药研究与开发。
通信作者：陈一飞（1983—），女，副研究员，从事GCP/GLP、药品监管科学研究。
E-mail：chenyifei25@smda.sh.cn
张雪梅（1971—），女，教授，从事药学、药理学相关研究。
E-mail：xuemzhang@fudan.edu.cn

译出相应的抗原蛋白，以诱导机体免疫应答，预防或治疗疾病的新型药物[2]。

mRNA分子优化与核酸递送系统是mRNA疫苗开发的两大核心问题。为厘清mRNA疫苗的开发历程，本研究回顾了mRNA疫苗的发展史，简单介绍了目前常见mRNA疫苗的核酸修饰和递送系统，并讨论了该类产品开发面临的挑战及可能的优化策略。

1 mRNA疫苗简介

1.1 mRNA疫苗的作用机制

相较于传统疫苗，mRNA疫苗因开发灵活性、高免疫原性等特点，在预防感染性疾病方面有其独特优势（表1）[3—4]。

mRNA疫苗既能通过表达抗原激活免疫，又可以调节免疫（图1）[5—6]。在免疫激活中，被体细胞或免疫细胞内吞的mRNA可表达目的蛋白，分泌至胞外后由抗原呈递细胞（antigen-presenting cells，APCs）摄取，并激活$CD4^+$ T细胞；体细胞和其他免疫细胞中翻译的蛋白可被加工为抗原表位，与Ⅰ类主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex class Ⅰ，MHC-Ⅰ）结合形成复合物，从而激活$CD8^+$ T细胞；表达的目的蛋白分泌至胞外，由B细胞受体识别而诱导体液免疫。

在免疫调节中，Toll样受体（Toll like receptors，TLRs）等模式识别受体（pattern recognition receptors，PRRs）可通过识别外源性RNA，刺激细胞分泌促炎因子和干扰素。但是，近期一项关于BNT162b2的研究[7]显示，其$CD8^+$ T细胞反应不是由已知的TLRs等途径介导，而是依赖于黑色素瘤分化相关基因5（melanoma differentiation associated gene 5，MDA5）信号通路。

1.2 mRNA疫苗的常见类型

mRNA疫苗可分为非复制型mRNA（non-replicating mRNA，nrRNA）疫苗和自扩增型mRNA（self-amplifying mRNA，saRNA）疫苗。

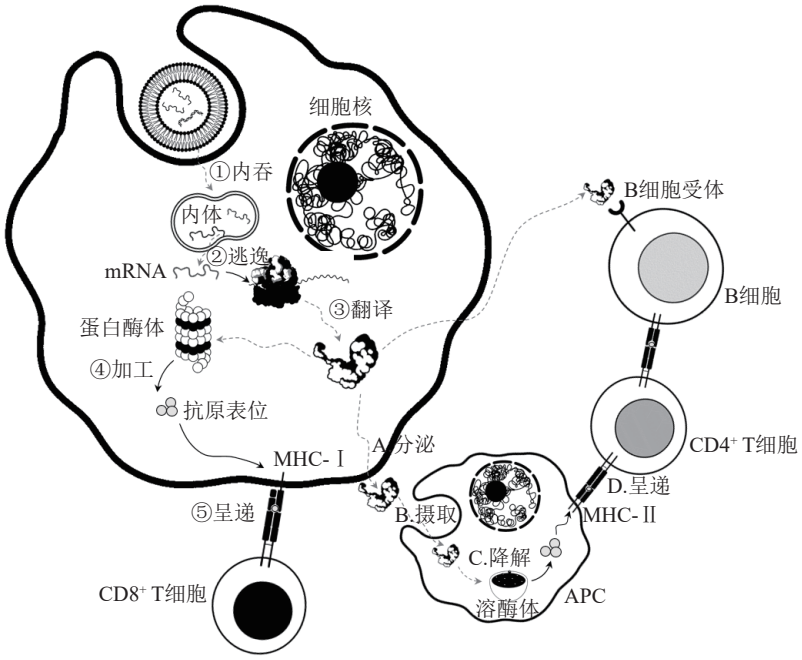
nrRNA是基本的体外转录mRNA（*in vitro* transcription mRNA，IVT mRNA），长度为1 000～5 000个核苷酸（nucleotide，nt），由帽子结构（m7GpppN）、5′-非翻译区（5′-untranslated regions，5′-UTRs）、编码目的抗原的开放阅读框（open reading frame，ORF）、3′-UTRs和多聚腺苷酸（polyadenylate，poly A）尾构成。这些基本结构决定了nrRNA的稳定性、翻译效率和半衰期，进而影响疫苗效果。nrRNA的优点是其ORF区域仅编码抗原，因此受序列长度的限制小；缺点是易降解，体内维持时间短，且蛋白表达量低，nrRNA疫苗保护效力相对较弱，需要更高剂量[6]。

saRNA（9 000～12 000个nt）在ORF区域增加了编码病毒（常用正链RNA病毒，如甲病毒属）复制酶的序列，使saRNA可在体内扩增，持续表达目的抗原，因此低剂量saRNA即可诱导较强的免疫反应[6,8]。但其结构大且复杂，在生产工艺和结构优化上的难点更多，递送效率、胞内复制能力、RNA复制酶的免疫原性都是saRNA疫苗的开发挑战。

表1 mRNA疫苗与其他类型疫苗的对比

Tab.1 Comparisons of mRNA Vaccines and Other Vaccines

分类	疫苗类型	优点	缺点
第一代疫苗（传统疫苗）	灭活疫苗	技术成熟；安全性较好；生产工艺简单，成本低；稳定性好	不可灵活设计；免疫原性较弱；接种剂次多
	减毒活疫苗	技术成熟；免疫原性强	不可灵活设计；质量控制条件严格；有毒力恢复的风险；成本较高
第二代疫苗（基因工程疫苗）	重组亚单位疫苗	成分单纯，安全性好	免疫原性较弱，需要佐剂；生产工艺复杂，纯化困难，成本高；贮存和运输条件的要求高；接种剂次多
	重组病毒载体疫苗	免疫原性强；生产工艺简单；接种剂次少	对于既往感染载体病毒的个体，疫苗效果减弱；含有害的病毒组分；有基因重组风险
第三代疫苗（核酸疫苗）	DNA疫苗	可灵活设计；免疫原性强；成本低；稳定性好，便于贮存和运输	基因重组风险高
	mRNA疫苗	可灵活设计；免疫原性强；基因重组风险低，安全性好；成本低	因临床应用时间短，长期安全性未知；稳定性较差，贮存和运输困难



黑色实线—下一步过程；灰色虚线—mRNA 疫苗、mRNA、蛋白质的移动。

图 1　mRNA 疫苗的作用机制示意图

Fig.1　Schematic Diagram of Action Mechanism of mRNA Vaccines

目前还有一种新衍生的反式扩增型 mRNA（trans-amplifying RNA，taRNA）。taRNA 在 saRNA 的基础上进行了优化，用 2 个 mRNA 分别搭载编码目的抗原的序列和编码复制酶的序列。BEISSERT 等 [9] 报道 taRNA 具备更好的安全性、更大的优化潜力和更简单的生产过程，是前景广阔的 mRNA 疫苗类型。

1.3　mRNA 疫苗的制备

mRNA 疫苗制备大致可分为如下 4 步。

①序列设计。用生物信息学方法测得病原体（如流感病毒）或内源性致病细胞（如肿瘤细胞）的基因组序列。

② RNA 体外转录及转录后修饰。将候选基因序列整合到质粒 DNA 中，利用噬菌体（如 T7、T3、Sp6）的 RNA 聚合酶在体外转录 mRNA，对转录后的 mRNA 进行 5′ 端加帽、3′ 端加尾、去磷酸化。

③纯化。通过色谱法去除双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）、mRNA 不完全转录本等杂质。

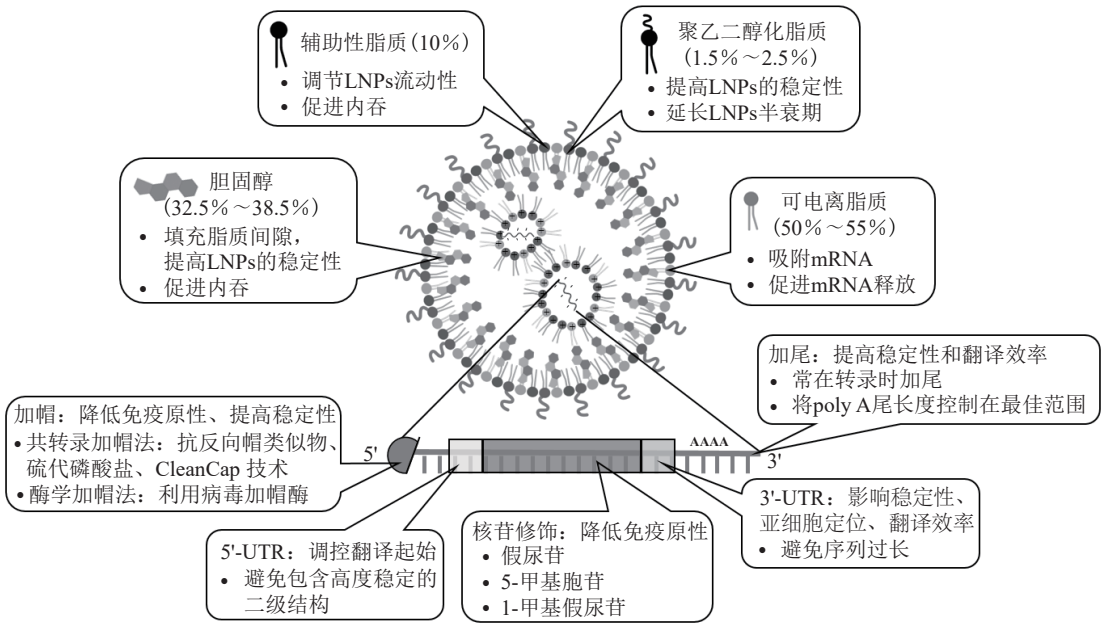
④包载。用脂质纳米粒（lipid nanoparticles，LNPs）或其他递送载体包裹纯化的 mRNA，并通过透析或过滤法进行纯化 [10—12]。

2　mRNA 分子修饰

mRNA 疫苗的发展历史长达 30 年，其应用不仅受到 COVID-19 暴发的影响，更是因为学术界和产业界长期研究、技术优化的积累准备。DOLGIN [13] 在报道中梳理、汇总了 mRNA 疫苗发展的重要事件，显示 mRNA 分子修饰和递送技术是 mRNA 成药能力的两大基石，其中分子修饰对 mRNA 疫苗的安全性起到了决定性作用（图 2）。

2.1　核苷修饰

核苷修饰是降低 IVT mRNA 免疫原性、确保 mRNA 疫苗安全性的根本手段。早在 1984 年，KRIEG 等 [14] 就在实验室合成了具有翻译功能的 IVT mRNA；在基础研究领域应用 8 年后，其成药潜力才显现 [15]。由于与天然 mRNA 分子的结构差异，IVT mRNA 在动物体内诱导了强烈的免疫反应，致使 mRNA 疫苗在临床前研发阶段就已夭折。直到



素材图来源：biorender.com。

图 2 mRNA 疫苗的关键技术

Fig.2 Key Technologies of mRNA Vaccines

2005 年，KARIKÓ 等 [16] 发现假尿苷（pseudouridine，Ψ）修饰的 IVT mRNA 可逃脱机体的固有免疫，解决了 IVT mRNA 免疫原性过强的问题。此后，又衍生出了 5- 甲基胞苷（5-methylcytidine，m^5C）、N^1-甲基假尿苷（N^1-methylpseudouridine，$m^1\Psi$）等多种核苷修饰方法，mRNA 疫苗成药历程逐渐步入正轨。

2.2 结构修饰

帽子结构、polyA 尾、5′-UTRs、3′-UTRs 等结构有助于提高 mRNA 的稳定性、增强翻译能力。IVT mRNA 通常不具备帽子结构，因此需通过人工加帽技术提高其稳定性、降低免疫原性。现有的加帽技术主要包括共转录加帽法和酶学加帽法。共转录加帽法是指在转录时直接加抗反向帽类似物（anti-reverse cap analogs，ARCA）、硫代磷酸盐等帽类似物，其中，ARCA 可避免反向帽导致的 mRNA 降解，确保翻译正常进行。酶学加帽法则是在转录后利用病毒加帽酶（virus capping enzymes，VCE）加帽。这 2 种加帽法各有优势，前者加帽过程更简单、迅速，后者加帽效率更高。近年新兴的共转录加帽技术——CleanCap，因高达 94%的效率成为首选的加帽法 [12,17—18]。此外，鉴于帽类似物复杂的合成过程，WALCZAK 等 [19] 开发了一种含三唑环的二核苷酸帽类似物，既能利用共转录加帽法加帽，又能通过铜（Ⅰ）催化叠氮炔环加成反应［copper（Ⅰ）-catalysed azide alkyne cycloaddition，CuAAC］转录后加帽，可将 mRNA 翻译效率提高 50%。

polyA 尾是决定 mRNA 稳定性和翻译效率的关键因素。IVT mRNA 常采用转录时加尾的方法，即直接设计带有编码 polyA 尾序列的 DNA 模板。早期研究表明，polyA 尾的长度和翻译效率成正比，一般情况下哺乳动物 mRNA 的 polyA 尾平均长约 200 个 nt，要确保 mRNA 的稳定性，polyA 尾长度至少应达 30 个 nt[20]。但后续研究发现，在特定范围内，反而是 polyA 尾较短的 mRNA 获得了更高的翻译效率 [21]，并且不同类型细胞 mRNA 的 polyA 尾最佳长度也有所差异 [12]。因此，应对不同的 IVT mRNA 单独设计试验，以确定 polyA 尾的优化长度范围，而不是越长越好。

UTRs 对翻译过程起到重要的调控作用。5′-UTR 至少可通过以下途径调控翻译：调控核糖体在 mRNA 上的移位；形成假结等高级结构；以茎环

结构结合真核生物起始因子3（eukaryotic initiation factor，eIF3）介导翻译起始[22]。3′-UTR可以通过结合微RNA（microRNAs，miRNA）调控翻译并影响mRNA的稳定性和亚细胞定位[23]。若5′-UTR包含高度稳定的二级结构，或3′-UTR序列过长，都会影响翻译效率[17]，因此在设计mRNA分子时需避免此类结构。

3　mRNA疫苗递送系统

由于mRNA是带负电荷的大分子，无法透过细胞膜，同时裸mRNA进入细胞后会刺激机体固有免疫，进而被核酸酶降解[10]。因此，递送系统是mRNA疫苗开发中的另一项关键性技术。

21世纪初，在阳离子脂质体技术的基础上，可规模化生产LNPs的技术开始发展[24]。有研究[25]显示其可递送mRNA疫苗至小鼠中，其临床研究逐渐受到关注。上述两款mRNA疫苗产品均使用LNPs技术递送。LNPs的组成部分包括：可电离脂质、聚乙二醇化脂质（polyethylene glycol-functionalized lipids，PEG-lipids）、胆固醇和辅助性脂质（一般是磷脂）4个组成部分。可电离脂质是LNPs的核心结构，目前递送mRNA的可电离脂质种类繁多，部分可与DNA、siRNA的递送载体交叉应用[26]。

潜在的mRNA疫苗递送系统还包括基于多肽的递送系统和基于聚合物的递送系统。鱼精蛋白富含精氨酸，属于细胞穿膜肽（cell-penetrating peptides，CPPs），是研发进程较快的多肽类载体[27]。虽然鱼精蛋白可作为免疫佐剂进一步刺激机体免疫，但已有的临床数据显示，鱼精蛋白搭载的mRNA疫苗保护效力较低[28]，推测原因与内体逃逸困难有关。

基于聚合物的递送系统载体可分为阳离子聚合物和阴离子聚合物两类。聚乙烯亚胺（polyethyleneimine，PEI）是常见的阳离子聚合物类载体，但其大分子结构会带来一定的毒性，一些研究显示，用脂肪链或酯类修饰PEI可降低其毒性，并提高递送效率[29—30]。

由于LNPs在递送效率和生物相容性上的优势（表2）[31—34]，以及其在mRNA疫苗中的成功应用，未来一段时间的研发可能仍将集中于LNPs。

4　mRNA疫苗的其他挑战

除核酸分子、递送系统外，尽管已有多年的技术积累并已成功推出了商业化产品，mRNA疫苗在研发和应用中仍面临诸多挑战，如纯化工艺效率低、贮存和运输困难、毒性风险评价有限等。

4.1　mRNA疫苗的纯化

除了mRNA分子本身，mRNA疫苗制备过程中产生的dsRNA等副产物同样具备免疫原性，进入人体后会促进干扰素及其他促炎因子的分泌，降低翻译效率，影响疫苗防护效果[35]。

纯化是避免IVT mRNA副产物所致不利免疫原性的有效方法。然而，醇沉法、分子筛色谱法、离子交换色谱法等传统纯化手段均无法彻底去除副产物；离子对反相高效液相色谱法虽然纯化效果好，但价格高昂，而且会产生大量有害废物。近期的一些研究[36—38]可为mRNA疫苗的纯化技术开发提供新的思路，例如，纤维素可选择性地结合dsRNA，有研究[36—37]利用该特点开发了基于纤维素的纯化技术，大幅减少了dsRNA副产物。WU等[38]则将常规RNA合成酶替换成耐高温的T7 RNA合成酶，无需额外的纯化步骤即可在高温下合成纯度更高的mRNA。

此外，灵敏高效的鉴别检测方法也是排除污染风险的必备手段。美国药典（USP）在“mRNA疫苗质量分析方法（草案）”中提出了针对dsRNA、

表2　mRNA疫苗的递送载体

Tab.2　Delivery Vectors for mRNA Vaccines

递送载体	优点	缺点
LNPs	递送效率高；有免疫佐剂作用；半衰期长；生物相容性好；生物可降解性好	所得mRNA疫苗的贮存和运输条件高；存在加强原有炎症反应的风险
鱼精蛋白	发挥免疫佐剂作用；细胞毒性低；所得mRNA疫苗的贮存和运输条件低	内体逃逸困难，递送效率较低
PEI	分子多样性程度高，可灵活设计	递送效率低；制品具有多分散性；生物可降解性差

mRNA 完整性、残余 DNA 模板等的一系列鉴别检测方法，如免疫印迹法、凝胶电泳法、实时荧光聚合酶链式反应（real-time polymerase chain reaction，RT-PCR）等。

4.2 mRNA 疫苗的贮存和运输

BNT162b2 和 mRNA-1273 采用 LNPs 搭载，制品对贮存和运输条件的要求高，都需要在低温条件（分别为 －25 ～ －15 和 －80 ～ －60 ℃）才可长时间储存，室温下的贮存时间只有 2 h[1]，严苛的贮存和运输条件限制了其普及性。

mRNA 的序列设计、递送载体、制备工艺均能影响产品的稳定性。文献[39—40]报道，更短的受体结合结构域序列设计可将 mRNA 疫苗在 2 ～ 8 ℃下的贮存时间延长至 6 个月，采用鱼精蛋白搭载的在研 mRNA 疫苗可在 2 ～ 8 ℃下贮存 3 个月，提示特定的序列长度以及鱼精蛋白在维持 mRNA 疫苗的热稳定性上具有优势。此外，MURAMATSU 等[41]研究表明，采用冻干法制备的 mRNA 疫苗可在室温下稳定保存 12 周，可能是短期内解决上市产品贮存和运输困难的方式。

4.3 mRNA 疫苗的安全性

由于 mRNA 疫苗的开发在近几年才迅速推进，其人群安全性信息有限且尚无长期临床监测数据。mRNA 疫苗报道的常见不良反应为注射部位疼痛和肿胀、全身发热等。在罕见不良反应中，过敏反应的发生率较高。近期有研究[42]提示 LNPs 的结构如 PEG 化脂质、辅助性脂质等会引发不同程度的过敏反应，上述两款 mRNA 疫苗都有相关报道，但具体机制尚不明确。

炎症反应加重是 mRNA 疫苗潜在的安全性问题。有研究[43]表明，LNPs 可激活小鼠体内多条炎症通路，诱导细胞因子和趋化因子的产生。对于病理状态下的小鼠，尤其是体内已存在炎症的小鼠，LNPs 可进一步提高炎症因子水平，导致炎症恶化[32]。因此，临床应用时应着重关注患者的过敏史和炎症性疾病病史；需要开展更多的研究，以了解不同个体对 LNPs 炎症特性的耐受度差异是否会造成炎症恶化。

此外，有细胞试验[44—45]研究结果提示 mRNA 疫苗可能存在基因重组风险。尽管如此，由于体外试验条件受人为控制，例如药物剂量、给药时间、细胞系类型、基因表达水平等，该类试验并未还原 mRNA 疫苗在人体内的真实情况，mRNA 疫苗的基因毒性仍有待确证。

5 讨论

应用于疾病预防，mRNA 疫苗免疫原性强、开发灵活度高，且可避免 DNA 疫苗较高的基因重组风险；应用于疾病治疗时，mRNA 疫苗比蛋白质药物设计灵活性强、更易于成药，因而应用范围更广，是应对传染病、难治性疾病、罕见病的前景更广阔的药物。

过去几十年里，核酸分子修饰和非病毒类递送载体技术上的突破大幅推动了 mRNA 疫苗的发展，mRNA 疫苗的临床应用也验证了其药效和易规模化生产的优势。从临床应用角度来看，还需长期监测 mRNA 疫苗的不良反应以及时应对潜在风险。从药物研发角度来看，当前 mRNA 疫苗亟待攻克的难题包括探索更优效的生产工艺以确保其安全性、有效性和质量可控性，以及寻找更合理的贮存和运输方式以提高可及性。以转录为例，仅一个碱基的变化都可能导致严重后果，因此 DNA 模板、转录过程、mRNA 质量控制等每个步骤对产品的有效性和安全性均具有重要的意义。另外，对于预防性 mRNA 疫苗来说，由于传统的注射给药受操作专业度、多剂次接种、针刺意外事件等的影响，且注射给药易造成局部疼痛、红肿等不良反应，儿童、老人等免疫功能较弱的群体顺应性较差，提高了感染风险。因此，推进 mRNA 疫苗新剂型（例如鼻腔给药、肺内给药、微针透皮给药等）的应用，可提高 mRNA 疫苗的可及性、顺应性[46]。同时，mRNA 疫苗生产全过程的质量管理是推进产品开发的重要支撑。只有技术研发、生产工艺、质量标准、质量控制、安全性评价和临床监测等环节的协同优化进步，才能高效促进 mRNA 疫苗的开发与应用。

参考文献：

[1] CREECH C B, WALKER S C, SAMUELS R J. SARS-CoV-2 Vaccines [J]. *JAMA*, 2021, **325**(13): 1318-1320.

[2] 杭辰悦, 徐山杉, 吴其峰, 等. mRNA 治疗及其应用前景[J]. 科学通报, 2021, **66**(Z2): 3649-3666.

[3] GHATTAS M, DWIVEDI G, LAVERTU M, *et al*. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: current progress, challenges, and opportunities[J]. *Vaccines*(Basel), 2021, **9**(12): 1490.

[4] 叶瑞贤, 张锡宝. 疫苗的发展历史[J]. 皮肤科学通报, 2020, **37**(4): 329-335.

[5] KIM J, EYGERIS Y, GUPTA M, SAHAY G, *et al*. Self-assembled mRNA vaccines[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, **170**: 83-112.

[6] MINNAERT A K, VANLUCHENE H, VERBEKE R, *et al*. Strategies for controlling the innate immune activity of conventional and self-amplifying mRNA therapeutics: getting the message across[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, **176**: 113900.

[7] LI C, LEE A, GRIGORYAN L, *et al*. Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine[J]. *Nat Immunol*, 2022, **23**(4): 543-555.

[8] 井汇源, 段二珍, 董　望. 体外转录的自我复制型mRNA疫苗研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2020, **40**(12): 25-30.

[9] BEISSERT T, PERKOVIC M, VOGEL A, *et al*. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity[J]. *Mol Ther*, 2020, **28**(1): 119-128.

[10] CHAUDHARY N, WEISSMAN D, WHITEHEAD K A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**(11): 817-838.

[11] WANG Y, ZHANG Z Q, LUO J W, *et al*. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy[J]. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 33.

[12] LINARES-FERNÁNDEZ S, LACROIX C, EXPOSITO J Y, *et al*. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response[J]. *Trends Mol Med*, 2020, **26**(3): 311-323.

[13] DOLGIN E. The tangled history of mRNA vaccines[J]. *Nature*, 2021, **597**(7876): 318-324.

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

[15] JIRIKOWSKI G F, SANNA P P, MACIEJEWSKI-LENOIR D, *et al*. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA[J]. *Science*, 1992, **255**(5047): 996-998.

[16] 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.

[17] JIA L F, QIAN S B. Therapeutic mRNA engineering from head to tail[J]. *Acc Chem Res*, 2021, **54**(23): 4272-4282.

[18] 田　颖, 张娜娜, 秦成峰, 等. mRNA技术应对病毒传染病的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, **49**(7): 2849-2861.

[19] WALCZAK S, NOWICKA A, KUBACKA D, *et al*. A novel route for preparing 5' cap mimics and capped RNAs: phosphate-modified cap analogues obtained via click chemistry[J]. *Chem Sci*, 2017, **8**(1): 260-267.

[20] PASSMORE L A, COLLER J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, **23**(2): 93-106.

[21] LIMA S A, CHIPMAN L B, NICHOLSON A L, *et al*. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(12): 1057-1063.

[22] LEPPEK K, DAS R, BARNA M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, **19**(3): 158-174.

[23] MAYR C. Regulation by 3'-untranslated regions[J]. *Annu Rev Genet*, 2017, **51**: 171-194.

[24] JEFFS L B, PALMER L R, AMBEGIA E G, *et al*. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA[J]. *Pharm Res*, 2005, **22**(3): 362-372.

[25] GEALL A J, VERMA A, OTTEN G R, *et al*. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(36): 14604-14609.

[26] CULLIS P R, HOPE M J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies[J]. *Mol Ther*, 2017, **25**(7): 1467-1475.

[27] JARZEBSKA N T, MELLETT M, FREI J, *et al*. Protamine-based strategies for RNA transfection[J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(6): 877.

[28] 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]. *Lancet*

Infect Dis, 2022, **22**(3): 329-340.

[29] 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.

[30] REN J, CAO Y M, LI L, *et al*. Self-assembled polymeric micelle as a novel mRNA delivery carrier [J]. *J Control Release*, 2021, **338**: 537-547.

[31] SAMARIDOU E, HEYES J, LUTWYCHE P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: current perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154-155**: 37-63.

[32] RUSESKA I, FRESACHER K, PETSCHACHER C, *et al*. Use of protamine in nanopharmaceuticals-a review [J]. *Nanomaterials* (Basel), 2021, **11**(6): 1508.

[33] PUTNAM D. Polymers for gene delivery across length scales [J]. *Nat Mater*, 2006, **5**(6): 439-451.

[34] PARHIZ H, BRENNER J S, PATEL P N, *et al*. Added to pre-existing inflammation, mRNA-lipid nanoparticles induce inflammation exacerbation (IE) [J]. *J Control Release*, 2022, **344**: 50-61.

[35] MU X, HUR S. Immunogenicity of *in vitro*-transcribed RNA [J]. *Acc Chem Res*, 2021, **54**(21): 4012-4023.

[36] ZHONG Z F, MCCAFFERTY S, OPSOMER L, *et al*. Corticosteroids and cellulose purification improve, respectively, the *in vivo* translation and vaccination efficacy of sa-mRNAs [J]. *Mol Ther*, 2021, **29**(4): 1370-1381.

[37] BAIERSDÖRFER M, BOROS G, MURAMATSU H, *et al*. A facile method for the removal of dsRNA contaminant from *in vitro*-transcribed mRNA [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, **15**: 26-35.

[38] WU M Z, ASAHARA H, TZERTZINIS G, *et al*. Synthesis of low immunogenicity RNA with high-temperature *in vitro* transcription [J]. *RNA*, 2020, **26**(3): 345-360.

[39] ZHAO H, WANG T C, LI X F, *et al*. Long-term stability and protection efficacy of the RBD-targeting COVID-19 mRNA vaccine in nonhuman primates [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, **6**(1): 438.

[40] STITZ L, VOGEL A, SCHNEE M, *et al*. A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, **11**(12): e0006108.

[41] 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.

[42] KLIMEK L, NOVAK N, CABANILLAS B, *et al*. Allergenic components of the mRNA-1273 vaccine for COVID-19: possible involvement of polyethylene glycol and IgG-mediated complement activation [J]. *Allergy*, 2021, **76**(11): 3307-3313.

[43] NDEUPEN S, QIN Z, JACOBSEN S, *et al*. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory [J]. *iScience*, 2021, **24**(12): 103479.

[44] ZHANG L G, RICHARDS A, BARRASA M I, *et al*. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, **118**(21): e2105968118.

[45] ALDÉN M, FALLA F O, YANG D W, *et al*. Intracellular reverse transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA vaccine BNT162b2 *in vitro* in human liver cell line [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, **44**(3): 1115-1126.

[46] QIN M, DU G S, SUN X. Recent advances in the noninvasive delivery of mRNA [J]. *Acc Chem Res*, 2021, **54**(23): 4262-4271.