三款 mRNA 疫苗制备工艺技术分析

常洪委[1]，许　龙[2]
（1. 泰州市医药高新技术产业园区公共平台服务中心，江苏泰州 225300；2. 上海百英生物科技股份有限公司，上海 201203）

摘要：与传统的灭活疫苗相比，mRNA 疫苗免疫原性强，可同时激活体液免疫和细胞免疫，另外还具有开发周期短、广谱性、成本低和可大规模快速量产等优势，可有效应对突发性、变异快以及大规模的疫情。作为一种新的疫苗开发路径，mRNA 疫苗在技术工艺上有很多新的特色和挑战。该研究以 Pfizer/BioNTech 公司的 mRNA 疫苗 BNT162b2、Moderna 公司的 mRNA-1273，以及国内多家单位联合开发的 ARCoV 这 3 款新型冠状病毒疫苗为例，从抗原选择、核苷修饰及脂质体纳米颗粒（LNP）制剂制备等方面，对 mRNA 疫苗的开发设计和制备工艺进行了梳理分析，并讨论了当前面临的挑战和未来的发展方向，旨在为 mRNA 疫苗技术的开发和应用提供参考。

关键词：mRNA 疫苗；抗原选择；核苷修饰；递送系统
中图分类号：TQ464　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2023)02-0200-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.02.005

Analysis of Preparation Technology of Three mRNA Vaccines

CHANG Hongwei[1], XU Long[2]
(*1. Taizhou Medical Hi-Tech Zone Public Service Platform, Taizhou 225300; 2. Shanghai Biointron Biological Inc., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Compared with traditional inactivated vaccines, mRNA vaccines have strong immunogenicity and can activate both humoral and cellular immunity. In addition, it has the advantages of a short development cycle, broad neutralization breadth, low cost, and a relatively simple manufacturing process that can be rapidly scaled to respond to sudden and rapidly mutating pandemic outbreaks. As a new vaccine technology, mRNA vaccines have many novel features and challenges. Taking the three coronavirus disease 2019(COVID-19) vaccines, BNT162b2 from Pfizer/BioNTech, mRNA-1273 from Moderna, and ARCoV developed by several Chinese institutions, as examples, this paper summarizes and analyzes the development and manufacturing strategy for mRNA vaccines in terms of antigen selection, nucleoside modification, and lipid nanoparticles(LNP) formulation preparation. The current challenges and future directions are discussed to contribute to a better understanding of mRNA vaccine technology.

Key Words: mRNA vaccine; antigen selection; nucleoside modification; delivery system

全球新型冠状病毒肺炎疫情暴发以来，科学家通过各种途径积极开发有效疫苗，其中基于 mRNA 的疫苗研发受到广泛关注。mRNA 疫苗的研发周期短，平台技术可再利用，且无需细胞和动物培养，生产的成本低、速度快，有利于应对突发性、大规模疫情。新型冠状病毒 mRNA 疫苗通过将含有编码 S 蛋白（spike protein）全长序列或 S 蛋白上的受体结合结构域（receptor-binding domain，RBD）序列的 mRNA 导入人体，在体内翻译得到抗原蛋白，诱导机体产生特异性免疫应答，以达到免疫预防的作用。

2020 年 11 月 18 日，布宜诺斯艾利斯婴幼儿基金会（Fundation INFANT）和纽约州立大学上州医科大学等 14 家单位撰文公布了 Pfizer/BioNTech 公

收稿日期：2022-11-25
作者简介：常洪委(1987—)，男，硕士，从事药物研发和制药工艺研究。
E-mail：chhwzhiyao@163.com

司 BNT162b2（每剂 30 μg）的Ⅲ期临床试验结果[1]，显示该疫苗整体保护率高达 95%，且安全性良好。2020 年 12 月 30 日，新英格兰医学杂志发表了美国 Moderna 公司 mRNA-1273（每剂 100 μg）的Ⅲ期临床试验结果[2]，显示其整体保护率高达 94.1%，与 BNT162b2 的数据非常接近。中国军事医学科学院、艾博生物和沃森生物联合开发的新型冠状病毒疫苗 ARCoV（15 μg/0.5 mL）正在开展国际Ⅲ期临床试验。本研究以上述 3 款 mRNA 疫苗（BNT162b2、mRNA-1273 和 ARCoV）为例，从抗原选择设计、mRNA 假尿苷（Ψ）修饰、脂质体纳米颗粒（LNP）递送系统及制备工艺等方面进行对比分析，旨在为 mRNA 疫苗技术的开发和应用提供参考。

1 抗原选择设计

新型冠状病毒 S 蛋白是疫苗研发的重要靶点[3]，包含 2 个功能性亚基，S1 和 S2。S1 亚基包括 N-末端结构域（N-terminal domain，NTD）和 RBD，RBD 可结合宿主细胞受体血管紧张素转化酶 2（angiotensin converting enzyme 2，ACE2，主要在人体心脏、肾脏和睾丸等组织中高水平表达）。S2 亚基包括七肽重复序列（heptad repeat，HR）、中心螺旋（central helix，CH）和连接域（connector domain，CD），可将 S 蛋白锚定在宿主细胞膜上，并介导病毒膜与宿主细胞膜的融合。在 S1 亚基和 S2 亚基交界处有一个弗林蛋白酶酶切位点，正常情况下，病毒膜上的 S 蛋白以封闭形式存在，S1 亚基的 3 个 RBD 盖在 S2 亚基的顶部，S 蛋白三聚体无法与宿主细胞受体 ACE2 结合；当 S 蛋白被弗林蛋白酶酶切后，构象发生变化，RBD 暴露，继而可与 ACE2 结合，实现病毒的侵染[4—6]。

S 蛋白稳定性较差，在与 ACE2 结合的过程中会发生明显的构象变化，介导病毒的入侵过程。在这个过程中，S 蛋白会从活性状态（融合前构象）变为失活状态（融合后构象）。融合后构象的活性较低，不足以刺激人体的免疫反应。采用 S 蛋白稳定化技术，即在 S 蛋白序列中添加 2 个脯氨酸（P）突变（K986P、V987P 突变）[7]，可将 S 蛋白稳定在活性高的“融合前构象”，使其稳定性显著提升，从而诱发更强的免疫应答，科学上把这一设计称为 S-2P。

BNT162b2 和 mRNA-1273 均采用编码全长 S 蛋白的方式，利用 S-2P 设计将蛋白锁定在融合前构象。在研发早期，德国 BioNTech 公司针对新型冠状病毒开发了 2 种不同抗原选择的 mRNA 疫苗，即 BNT162b1 和 BNT162b2[8]。前者编码三聚体 S 蛋白的 RBD，后者采用 S-2P 技术编码全长 S 蛋白。美国罗切斯特大学和辛辛那提儿童医院等 9 家单位报道了这 2 种疫苗的Ⅰ期临床试验结果[9]：BNT162b1 和 BNT162b2 在成年组（18 ～ 55 岁）和老年组（65 ～ 85 岁）中均具备良好的安全性和免疫原性；但在老年组中，BNT162b2 造成全身性严重不良反应的比例相较于 BNT162b1 稍低。因此，选择 BNT162b2 作为Ⅲ期临床试验的对象。BNT162b2 在每剂 30 μg 水平时可在反应原性和免疫原性之间达到良好平衡，被选为Ⅲ期临床试验的接种剂量。

美国弗雷德·哈钦森癌症研究中心的一项研究[10]表明，相比于感染后获得的抗体，接种 mRNA-1273 后获得的抗体活性更加集中在 RBD 区域，90%以上的中和活性都是由 RBD 抗体引起，清除 RBD 抗体后中和滴度直接从 >1 000 下降到 <25。

与 BNT162b2 和 mRNA-1273 不同，ARCoV 编码 S 蛋白的 RBD 序列（氨基酸 319 ～ 541）[11]。虽然 ARCoV 和 BNT162b1 均可编码 S 蛋白的 RBD，但 BNT162b1 中的 mRNA 序列经 Ψ 修饰，编码的是三聚体 RBD 亚基。因此，ARCoV 编码的蛋白与 ACE2 的亲和力低于 BNT162b1[11—12]，其与 ACE2 的解离平衡常数（K_D）为 1.3 nmol/L，是 BNT162b1 的近 260 倍（VOGEL 等[12]报道 BNT162b1 编码的三聚体 RBD 与 ACE2 结合的 K_D 为 5 pmol/L）。

抗原选择对 mRNA 疫苗的稳定性也有影响。mRNA 越长，稳定性越差，在室温下越易降解。BNT162b2 和 mRNA-1273 都是编码全长 S 蛋白，因此这 2 款 mRNA 疫苗的贮存、运输条件要求均较高，须在有蔗糖、冷冻的条件下贮存。BNT162b2 在 －60 ～ －80 ℃条件下贮存，注射前需用生理

盐水解冻和稀释；mRNA-1273 在 －15 ～ －20 ℃条件下贮存，解冻后可直接注射[13]。Moderna 公司开发的二代疫苗 mRNA-1283，选择编码新型冠状病毒刺突蛋白的 RBD 和 NTD[14]，可在冷藏温度（2 ～ 8 ℃）下稳定贮存。值得注意的是，影响 mRNA 疫苗稳定性的因素是多方面的，也有研究认为 mRNA 疫苗与水的接触是影响其稳定性的主要原因，减少与水接触可能是提高 mRNA 疫苗稳定性的有效方法[15]。

2　mRNA Ψ 修饰

免疫原性是 mRNA 疫苗研发面临的挑战之一。外源性 mRNA 可被抗原呈递细胞（APC）识别，随后激活模式识别受体（PRRs），如 Toll 样受体（TLRs，包括 TLR3、TLR7、TLR8 等），从而激活细胞先天免疫系统。2005 年，KARIKÓ 等[16]研究显示，将 Ψ 引入 RNA 中能降低其免疫原性，并且 RNA 的免疫原性随着 Ψ 引入比例的增高而降低。2008 年，KARIKÓ 等[17]的另一项研究结果显示，用 Ψ 完全替代尿苷的 mRNA 不仅能大幅降低 mRNA 的免疫原性，还能提高 mRNA 的稳定性并增强其蛋白表达能力。2015 年，ANDRIES 等[18]研究表明，与 Ψ 完全替代相比，用 N^1- 甲基 - 假尿苷完全替代尿苷的 mRNA 免疫原性更低、增强 mRNA 蛋白表达能力的作用更好。

通过使用核苷类似物，如 Ψ、5- 甲基胞苷（m5c）、N^6- 甲基腺苷（m6A）、5- 甲基尿苷（m5U）和 2- 硫尿苷（s2U），可在很大程度上使合成的转录产物不再激活 TLRs，从而降低免疫原性并增加 mRNA 的蛋白表达能力。BNT162b2 和 mRNA-1273 均在 mRNA 序列中采用 N^1- 甲基 - 假尿苷三磷酸（m1ψTP）取代尿苷三磷酸（UTP）[1—2,12,19—20]，ARCoV 是否使用 Ψ 修饰不详。

3　LNP 递送系统

3.1　LNP 的成分和配方

mRNA 疫苗要进入细胞内发挥作用，有如下几个技术难点需要克服。首先，mRNA 在血液循环运输过程中会被核糖核酸酶（RNase）降解；其次，当 mRNA 及其保护物被内吞进入细胞后会形成核内体，此时 mRNA 可能被 TLRs 识别，从而激活免疫系统，导致 mRNA 被降解；最后，当 mRNA 从核内体进入细胞质后，也有可能经胞内免疫途径降解。要避免上述破坏作用，mRNA 疫苗需要有合适的递送载体。目前，LNP 递送系统和 *N*- 乙酰半乳糖胺（GalNAc）递送系统发展相对成熟，本研究论及的 3 款 mRNA 疫苗都使用了 LNP 递送技术。

LNP 是一种具有均匀脂质核心的脂质囊泡，主要由阳离子脂质、中性辅助磷脂、胆固醇和聚乙二醇修饰的磷脂（PEG- 脂质）组成，脂质的结构和成分是决定 LNP 递送效率的关键。LNP 最早由加拿大 Arbutus 公司发明并申请了专利[21—22]，专利核心内容集中在 2 个方面：阳离子脂质和各成分的配方组成。

阳离子脂质是 RNA 递送效率的决定性物质，带正电的脂质体可促进 mRNA 的包封和释放。mRNA 拥有数量庞大的磷酸根，因而呈负电性；阳离子脂质有一个带铵根的亲水端，在酸性下与氢离子结合而呈正电性。借助二者的静电吸附作用，就能将核酸包载在 LNP 中。在生理 pH 值下，游离脂质保持中性，稳定性高、全身毒性低；当 LNP 被细胞内吞后进入核内体，pH 值降低，阳离子脂质离子化，呈正电性，与核内体膜中带负电荷的脂质相互作用，促进膜融合和失稳，从而实现 mRNA 从核内体中释放。

美国 Alnylam 公司研发的 Onpattro 是美国 FDA 批准的首个 siRNA 药物[23]，其 LNP 递送系统中采用的阳离子脂质是 DLin-MC3-DMA（简称 MC3，化学结构如图 1 所示）。BNT162b2 和 mRNA-1273 采用的阳离子脂质为 ALC-0315 和 SM-102（化学结构如图 1 所示）。三者均由可电离的头部基团、接头区域和尾部烃链组成，ALC-0315 和 SM-102 中进一步引入酯基，提高了脂质的生物降解性，比 MC3 具有更好的体内递送效率和药动学性质[24]。艾博生物在 ARCoV 递送系统中使用了自主研发的阳离子脂质，并已申请了专利[25]，但未知 ARCoV 具体使用何种阳离子脂质[11]。

中性辅助磷脂一般为饱和磷脂，如 1,2- 双硬脂

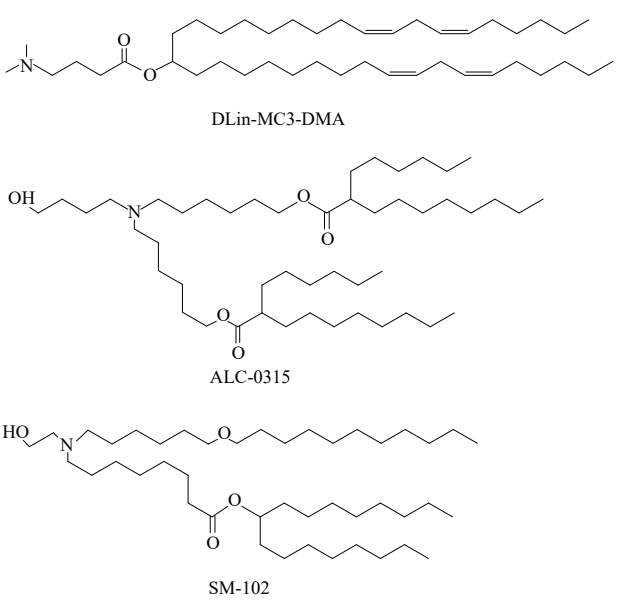


图 1 LNP 中采用的阳离子脂质的化学结构

Fig.1 Chemical Structures of Cationic Lipids Used in LNP

酰基 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱（DSPC），可提高阳离子脂质的相变温度，支持层状脂质双层结构并稳定其结构排列，加快 LNP 在细胞中的结构转化速度，使药物快速释放。胆固醇不仅可以稳定纳米粒结构，还具有较强的膜融合性，可通过低密度脂蛋白（LDL）受体介导途径，促进 RNA 胞内摄取和胞质进入。

PEG- 脂质位于 LNP 表面。阳离子脂质包裹 mRNA 后疏水端向外，因而制品呈疏水性；若加入 PEG- 脂质，其疏水端可与阳离子脂质的疏水段结合（适量的胆固醇可使结合更紧密），亲水端则向外，形成核酸 -LNP 的亲水外壳，从而改善 LNP 的亲水性，同时可避免制品被免疫系统快速清除、防止颗粒聚集以及增加稳定性。然而，PEG- 脂质也会抑制靶细胞的摄取。因此，找到稳定性和转染效率之间的较优平衡，是设计 LNP 递送系统的重要因素。如含有较短链（C_{14}）的 PEG- 脂质，在存在大量脂质的情况（如 LNP 接触细胞膜时）下，会迅速从 LNP 上解离，使 LNP 转变为具有较强转染力的系统[26]。图 2 列出了 BNT162b2 和 mRNA-1273 的 LNP 递送系统中采用的 PEG- 脂质的化学结构。

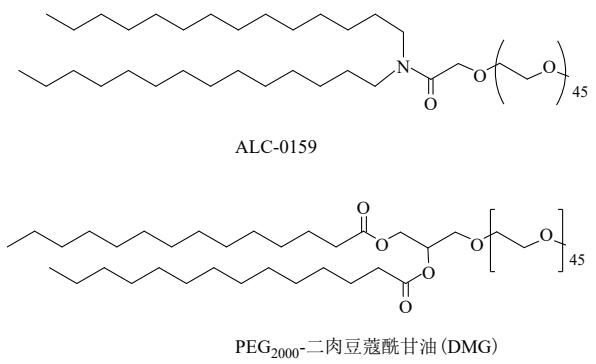


图 2 用于 BNT162b2 和 mRNA-1273 递送系统的 PEG- 脂质化学结构

Fig.2 Chemical Structures of PEG-lipids Used in Delivery Systems of BNT162b2 and mRNA-1273

LNP 配方的专利布局复杂，其中 Arbutus 公司在专利中定义了 LNP 各成分的比例，限定了非常宽泛的配比范围。阳离子脂质、中性辅助磷脂、胆固醇或其衍生物、PEG- 脂质占总磷脂的物质的量分数分别为 50%～65%、4%～10%、30%～40%、0.5%～2%[22]。在上述 3 款疫苗中，LNP 的配方组成是非常相似的，如表 1 所示。

3.2 mRNA 的包封

mRNA 的包封主要依靠疏水力和静电力驱动，目前主要采用微流控混合技术来实现，该技术简便快速、条件温和，易实现放大生产。

表 1 3 款 mRNA 疫苗的 LNP 组成

Tab.1 Composition of LNP for Three mRNA Vaccines

疫苗名称	LNP组成				各组分物质的量比例	参考文献
	阳离子脂质	中性辅助磷脂	胆固醇或其衍生物	PEG-脂质		
BNT162b2	ALC-0315	DSPC	胆固醇	ALC-0159	46.3∶9.4∶42.7∶1.6	[27—28]
mRNA1273	SM-102	DSPC	胆固醇	PEG_{2000}-DMG	50∶10∶38.5∶1.5	[27—28]
ARCoV	未知	DSPC	胆固醇	未知	50∶10∶38.5∶1.5	[11]

T形或Y形微流体器件是典型的生产装置结构。首先将4种脂质溶于乙醇等溶剂中，由于不存在任何反离子，阳离子脂质在乙醇溶液中呈电中性；将mRNA溶于酸性缓冲液中。然后将两相溶液分别注入制备系统的两条入口通道，每股液流中成分的浓度对所得LNP的粒径和有效的mRNA包封都很重要。两股进样液流在外力驱动下在混合通道中接触、混合，脂质在水、乙醇溶剂中的溶解度低，阳离子脂质离子化后与带负电荷的mRNA结合，形成mRNA-LNP，并以单股液流流出设备。通过改变流体注入速度和比率可以控制LNP的粒径。随后通过稀释、透析或切向流过滤去除未封装的核酸、多余的脂质和乙醇等物质；通过缓冲液置换并添加冻干保护剂；将pH值提高至7.4，中和多余的阳离子脂质，使LNP不带电荷。最后进行除菌过滤，完成mRNA疫苗的制备[29]。

有媒体报道Pfizer/BioNTech的新型冠状病毒疫苗中，LNP的生产使用德国Knauer公司研发生产的碰撞喷射混合器（IJM）设备，采用冲击式射流混合法，利用高压泵使mRNA溶液和脂质体溶液形成两股射流，在一个腔体中进行对冲，利用流体动力学让脂质各个组分充分混合，形成包载mRNA的LNP。Moderna公司的规模化生产采用的是定制设备，混合器结构和相关参数未见报道。国内艾博生物采用自主开发的动态精准混合技术进行LNP的工业化生产。据报道，该工艺可一步反应生成均一分布的LNP并完成mRNA包裹。

4　结语

BNT162b2和mRNA1273在许多国家已大规模接种，其安全性和有效性进一步得到了真实世界数据验证，客观上发挥了重要作用；ARCoV目前在印度尼西亚上市，其安全性和有效性仍有待数据支撑。BNT162b2和mRNA1273疫苗在抗原选择、核苷修饰及LNP药物递送等技术应用上相对更成熟，这3款mRNA疫苗的相关工艺等信息汇总于表2。

然而，新型冠状病毒还在不断进化和变异，产生了多种变异株，其中奥密克戎变异株携带的突变较多，其S蛋白上有15个RBD发生突变，导致目前所用的大多数疫苗的防护效力显著降低。奥密克戎变异株尤其对靶向S蛋白头部ACE2受体结合区（receptor-binding motif，RBM）的抗体展现出较大程度的免疫逃逸。一项随机对照研究[30]评估了2剂BNT162b2和mRNA-1273疫苗以及加强针对于奥密克戎变异株的有效性，结果显示接种2剂BNT162b2疫苗对由奥密克戎变异株引起的感染效果有限；在接种2剂BNT162b2疫苗后，再接种BNT162b2或mRNA-1273疫苗加强针，可以有效增加对奥密克戎变异株的有效性，但随着时间推移，有效性减弱。mRNA疫苗开发相对较快，各个公司也在积极开发针对二代、三代变异株的mRNA疫苗，连续接种和序贯接种能从一定程度上加强免疫接种效果。

疫苗研发应更关注抗原保守表位，聚焦强效的广谱性中和抗体。WANG等[31]已从接种3针新冠灭活疫苗的志愿者血清中分离出广谱性的强效抗体，经基因测序和体外重组表达，获得了可以中和新型冠状病毒已知的所有关切变异株（variant of concern，VOC）的抗体。LI等[32]报道在S蛋白三聚体内部存在1个保守表位，不仅在奥密克戎变异株上保守，在已知的其他常见变异株上也保持不变。这一高度保守的表位对研发广谱抗新型冠状病毒的疫苗和药物有重要意义。

表2　3款mRNA疫苗相关工艺的信息汇总

Tab.2　Summary of Relevant Process Information on Three mRNA Vaccines

研发者	疫苗名称	抗原选择	核苷修饰	递送系统	阳离子脂质	规格	运输温度/℃	稳定性
Pfizer/BioNTech	BNT162b2	S-2P	m1ψTP取代UTP	LNP	ALC-0315	西林瓶，多人份，接种前稀释	－70	－70 ℃下6个月；2～8 ℃下24 h；室温下(25 ℃)<2 h
Moderna	mRNA1273	S-2P	m1ψTP取代UTP	LNP	SM-102	西林瓶，多人份，接种前稀释	－20	－20 ℃下6个月；2～8 ℃下7 d
军事医学科学院/艾博/沃森	ARCoV	RBD	未知	LNP	未知	预灌充，单人份，每瓶(剂)0.5 mL	2～8	2～8 ℃下6个月；室温下(25 ℃)>2 h

在 mRNA 技术领域，国外已有 10 多年的时间积累，摸索出很多工艺细节和质控标准。国内的 mRNA 产业链和基础供应链还在完善中，RNA 修饰和 LNP 递送技术的专利和技术壁垒较高，短时间内较难打破；LNP 辅料及核心的 LNP 制备设备等需要依赖进口，这也在一定程度上限制了国内企业相关工艺的成熟和项目的推进，要形成一套完整、成熟的 mRNA 成药体系，还面临较多的困难和挑战。当前，国内许多企业纷纷加入 mRNA 疫苗开发领域，希望借助新型冠状病毒疫苗的绿色通道打通 mRNA 产业线路，随着对 mRNA 行业关注度的提高、资本投入和政府支持力度的不断加大，相信国内 mRNA 行业会迎来突破性进展。

参考文献：

[1] POLACK F P, THOMAS S J, KITCHIN N, *et al*. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2020, **383**(27): 2603-2615.

[2] BADEN L R, EL SAHLY H M, ESSINK B, *et al*. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2021, **384**(5): 403-416.

[3] AMANAT F, KRAMMER F. SARS-CoV-2 vaccines: status report [J]. *Immunity*, 2020, **52**(4): 583-589.

[4] BENTON D J, WROBEL A G , XU P Q, *et al*. Receptor binding and priming of the spike protein of SAR-CoV-2 for membrane fusion [J]. *Nature*, 2020, **588**(7837): 327-330.

[5] WRAPP D, WANG N S, CORBETT K S, *et al*. Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, **367**(6483): 1260-1263.

[6] WALLS A C, PARK Y J, TORTORICI M A , *et al*. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. *Cell*, 2020, **181**(2): 281-292.

[7] PALLESEN J, WANG N S, CORBETT K S , *et al*. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(35): E7348-E7357.

[8] BioNTech. BNT162 COVID-19 vaccine update call [EB/OL]. [2022-11-25]. https: //investors. biontech. de/static-files/c4feb567-e564-40e5-a9cf-538892af1c04.

[9] WALSH E E, FRENCK R W Jr, FALSEY A R, *et al*. Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates [J]. *N Engl J Med*, 2020, **383**(25): 2439-2450.

[10] GREANEY A J, LOES A N, GENTLES L E, *et al*. Antibodies elicited by mRNA-1273 vaccination bind more broadly to the receptor binding domain than do those from SARS-CoV-2 infection [J]. *Sci Transl Med*, 2021, **13**(600): eabi9915.

[11] ZHANG N N, LI X F, DENG Y Q, *et al*. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19 [J]. *Cell*, 2020, **182**(5): 1271-1283.

[12] VOGEL A B, KANEVSKY I, CHE Y, *et al*. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2021, **592**(7853): 283-289.

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

[14] Moderna. First participants dosed in phase 1 study evaluating mRNA-1283, Moderna's next generation COVID-19 vaccine [EB/OL]. [2022-11-25]. https://investors. modernatx. com/news-releases/news-release-details/first-participants-dosed-phase-1-study-evaluating-mrna-1283.

[15] SCHOENMAKER L, WITZIGMANN D, KULKARNI J A, *et al*. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability [J]. *Int J Pharm*, 2021, **601**: 120586.

[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] KARIKÓ K, MURAMATSU H, WELSH F A, *et al*. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability [J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(11): 1833-1840.

[18] ANDRIES O, CAFFERTY S M, DE SMEDT S C, *et al*. N^1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice [J]. *J Control Release*, 2015, **217**: 337-344.

[19] CORBETT K S, FLYNN B, FOULDS K E, *et al*. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates [J]. *N Engl J Med*, 2020, **383**(16): 1544-1555.

[20] HASSETT K J , BENENATO K E, JACQUINET E, *et*

al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, **15**: 1-11.

[21] EDWARD Y, KIEU L, LLOYD J, *et al*. Lipid formulations for nucleic acid delivery: US, 9364435B2 [P]. 2016-06-14.

[22] EDWARD Y, KIEU L, LLOYD J, *et al*. Lipid formulations for nucleic acid delivery: US, 8058069B2 [P]. 2011-11-15.

[23] AKINC A, MAIER M A , MANOHARAN M, *et al*. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs [J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, **14**(12): 1084-1087.

[24] HOU X C, ZAKS T, LANGER R, *et al*. Lipid nanoparticles for mRNA delivery [J]. *Nat Rev Mater*, 2021, **6**(12): 1078-1094.

[25] 英　博, 王秀莲. 一种阳离子脂质化合物、包含其的组合物及应用: 中国, 112979483A [P]. 2021-06-18.

[26] JUDGE A, MCCLINTOCK K, PHELPS J R, *et al*. Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes [J]. *Mol Ther*, 2006, **13**(2): 328-337.

[27] SEMPLE S C, LEONE R, BARBOSA C J, *et al*. Lipid nanoparticle delivery systems to enable mRNA-based therapeutics [J]. *Pharmaceutics*, 2022, **14**(2): 398.

[28] NICULESCU A, BÎRCĂ A C, GRUMEZESCU A M . New applications of lipid and polymer-based nanoparticles for nucleic acids delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(12): 2053.

[29] LBARTA I, HOFFMAN S, SIMPKINS A. Manufacturing strategy for the production of 200 million sterile doses of an mRNA vaccine for COVID-19 [EB/OL]. [2022-11-25]. https://repository. upenn. edu/cgi/viewcontent. cgi?article=1132&context=cbe_sdr.

[30] ANDREWS N, STOWE J, KIRSEBOM F, *et al*. Covid-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant [J]. *N Engl J Med*, 2022, **386**(16): 1532-1546.

[31] WANG K, JIA Z J, BAO L L, *et al*. Memory B cell repertoire from triple vaccinees against diverse SARS-CoV-2 variants [J]. *Nature,* 2022, **603**: 919-925.

[32] LI C, ZHAN W Q, YANG Z L, *et al*. Broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by an inhalable bispecific single-domain antibody [J]. *Cell*, 2022, **185**(8): 1389-1401.