

· 国外药事 ·

对世界卫生组织预防传染病mRNA疫苗非临床评价技术要点的解析

佟乐[#], 孙巍[#], 杨亚莉, 王佑春, 杨振* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 了解WHO最新发布的《预防传染病mRNA疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑》中关于mRNA疫苗非临床评价的主要内容, 为我国评价此类产品非临床研究提供参考。方法: 分析mRNA疫苗的主要特点, 对照《预防传染病mRNA疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑》, 梳理mRNA疫苗非临床研究特别是药效学和毒理学研究设计、实施和分析的关键要点。**结果与结论:** mRNA技术已成为疫苗研发的前沿技术, 作为新型生物制品, mRNA疫苗具有诸多不同于传统生物制品的特点。WHO认为非临床研究的设计、实施和分析应充分考虑mRNA产品的技术特点, 相关药效学和毒理学研究应着重解决免疫应答的持久性或持久性免疫细胞表型、I型干扰素介导的固有免疫应答、mRNA和LNPs的生物分布和持久性、全身和局部的毒性和炎症反应、非自然修饰核苷的潜在毒性、脂质纳米颗粒中新型脂质的毒性等方面问题, 并提出了在公共卫生突发事件背景下针对优先病原体的mRNA疫苗非临床加速评价的考虑要点, 对我国非临床评价此类产品具有很好的指导作用和应用价值。

关键词: 世界卫生组织; 传染病预防; mRNA疫苗; 非临床评价; 质量控制

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)10-1190-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.10.011

Analysis of Key Technical Points for Nonclinical Evaluation of the World Health Organization's Messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases

Tong Yue[#], Sun Wei[#], Yang Yali, Wang Youchun, Yang Zhen* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To understand the main contents of nonclinical evaluation of mRNA vaccines in the latest WHO guidance on *Regulatory Considerations for Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of Messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases*, and provide references for nonclinical evaluation of such products in China. **Methods:** The main characteristics of mRNA vaccines were analyzed, and key points on design, conduct and analysis of nonclinical studies, especially studies related to the pharmacology and toxicology of mRNA vaccines, were summarized based on the *Regulatory Considerations for Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of Messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases*. **Results and Conclusion:** mRNA technology has become the leading technology in vaccine research and development. As a new biological product, mRNA vaccines have many characteristics different from traditional biological products. According to WHO guidance, the technical characteristics of mRNA products should be fully considered in the

design, implementation and analysis of nonclinical studies. Some issues such as durability of immune responses or persistent immune cell phenotypes, intrinsic immune responses mediated by type I interferon, biodistribution and persistence of mRNA and LNPs, systemic and local toxicity and inflammatory responses, potential toxicity from unnatural nucleoside modifications and novel lipids in LNPs should be addressed in the studies related to pharmacology and toxicology. The key points for accelerating nonclinical evaluation of mRNA vaccines against priority pathogens in the context of public health emergency were proposed. They have good guiding roles and application values for nonclinical evaluation of such products in China.

Keywords: WHO; prevention of infectious diseases; messenger RNA vaccines; nonclinical evaluation; quality control

预防性mRNA疫苗应对新发传染病以及病原体变异展现出显著优势, 由于其结构简单、能够快速构建, 加之“平台技术”的加持, 现已成为疫苗研发的前沿技术, 引发各界的广泛关注。RNA的免疫刺激作用早在20世纪60年代初就已为人所知^[1], 但直到1990年直接注射“裸”核酸后, 即将体外转录的信使RNA (mRNA) 直接注入体内, 短暂性地让基因表达抗原蛋白的可能性才被证实^[2]。随着mRNA的稳定性的改进, 包括RNA生产可行性的增加以及伴随的炎症反应的减少, mRNA疫苗和治疗方法的开发取得了重大进展^[3-6]。目前, 除新冠疫苗外, 利用mRNA技术制备的狂犬、寨卡、人巨细胞病毒等传染病预防性疫苗已经开展临床试验。本文基于两款已上市mRNA疫苗技术特点, 结合WHO最新发布的《预防传染病mRNA疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑》(Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of Messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases: Regulatory Considerations)^[7], 探究mRNA疫苗在非临床研究和评价中的关键要点。

1 mRNA疫苗的主要特点

1.1 mRNA疫苗研发速度快

相比于传统疫苗, mRNA疫苗不依赖细胞培养技术, 能够快速构建。目前, 广泛用于预防新冠病毒的mRNA主要采用一种新型的无细胞的酶工艺方式合成, 通过使用DNA依赖的RNA聚合酶(如T7、T3或Sp6噬菌体RNA聚合酶)和核苷三磷酸或修饰的核苷三磷酸, 在体外由线性DNA模板合成^[7]。在标准化和规定的条件下, 无细胞体外合成技术能够实现mRNA疫苗相对快速的设计和直

接大规模生产。例如Moderna开发的mRNA-1273疫苗, 该疫苗在自2020年1月10日公布SARS-CoV-2病毒基因组序列后仅66天后即进入了I期临床试验^[8], 其中mRNA序列仅2天内就编制完成^[9], 其完整结构包含一个编码蛋白的开放阅读框(Open Reading Frame, ORFs); 两侧有5'和3'非翻译区(Untranslated Region, UTRs); 5'帽子结构(或替代物)和3'序列, 如poly(A)尾。相比于传统疫苗往往需要数年时间才能完成的产品开发^[10], mRNA疫苗在应对突发公共卫生事件的快速响应能力, 使其未来在传染病预防中将发挥重要作用。

1.2 需要特定的递送载体

mRNA在体外合成后, 如何将其递送进入目标细胞是mRNA疫苗研发的重要挑战之一。首先, mRNA极不稳定, 易被免疫细胞吞噬或被核酸酶降解; 其次, mRNA分子量大(104~106 Da)且在生理pH条件下带负电荷, 难以跨过同为负电荷的细胞膜^[11]。此外, 为避免被溶酶体(Lysosome)分解, mRNA被细胞摄取进入体内后必须及时释放到细胞质中。目前, 新冠mRNA疫苗开发中, 进展最快的递送载体是基于脂质的纳米颗粒(Lipid Nanoparticles, LNP)。LNP由多种脂质组成, 通常包括但不限于可电离脂质、辅助脂质、胆固醇和聚乙二醇化(Polyethylene Glycol, PEG)修饰的脂质^[12], 这4种脂质各司其职, 在mRNA递送过程中均发挥了重要的作用, 其中可电离脂质可根据不同的pH环境, 通过电荷相互作用调节LNPs的自组装和mRNA的释放^[13-14]; 胆固醇和辅助脂质能够在细胞摄取时促进脂质体与内体细胞膜的融合^[15-17]; PEG

脂质成分则用于提高LNP的稳定性, 调节纳米颗粒的大小^[18]。

1.3 具有明显的免疫保护力优势

mRNA疫苗的免疫原理是通过特定的递送系统将表达抗原的mRNA导入体内, 在体内表达出蛋白并刺激机体产生获得性免疫应答, 从而使机体获得免疫保护^[19]。当mRNA通过内吞作用进入细胞质后, 一些mRNAs与宿主细胞的核糖体结合并成功翻译。抗原蛋白可被细胞质中的蛋白酶降解为抗原肽, 并通过主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex, MHC) I途径呈递给细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)。或者它们可以从宿主细胞中释放出来并被树突细胞(Dendritic Cells, DCs)吸收。然后, 它们被降解并通过MHC-II途径呈递给辅助T细胞(CD4+)和B细胞。B细胞也可以识别释放的抗原蛋白, 通过上述机制分别激活细胞免疫和体液免疫^[20]。相比于传统灭活疫苗直接将抗原蛋白注射进入人体引起免疫应答的方式, mRNA在进入细胞质内后能够持续表达抗原蛋白, 直至其被降解, 同时细胞免疫和体液免疫的双重机制, 使得mRNA疫苗所介导的获得性免疫应答持续时间更长、免疫记忆更强烈。目前, 已纳入WHO紧急使用名单(Emergency Use Listing, EUL)的两款mRNA产品均显示出了较好的疫苗保护效力, 其中Pfizer和BioNTech联合研发的BNT162b2对新冠病毒感染的保护效力达到94.6%^[21], 而Moderna的mRNA-1273的保护效力也达到94.1%, 而且接种6个月后仍能检测到抗体^[22]。

1.4 具有佐剂效应

不同于DNA的双链结构, RNA通常以单链(ssRNA)存在, 但RNA也能形成由短双链片段和中间各种单链环组成的复杂结构, 如双链RNA(dsRNA)。这些RNA作为某些RNA病毒基因组的一种呈现形式, 会被细胞内的模式识别受体(Pattern Recognition Receptor, PRR)感知, 激活对病毒感染的固有免疫应答。例如富含GU的单链RNA可以被TLR-7和TLR-8感知^[23], 而双链RNA可被TLR-3感知^[24]。此外, 如RIG-I、MDA5等胞质传感器也可以识别细胞质中的双链和单链RNA^[24-25]。这些PRR可以增强肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6和IL-12等促炎性细胞因子的基因表达, 刺激

细胞分泌I型干扰素(IFN-I), 进而激活抗原呈递细胞(Antigen-Presenting Cells, APC)^[26-27]。有研究表明固有免疫应答对于激活获得性免疫应答, 特别是细胞免疫应答十分关键, 亚单位疫苗与灭活疫苗激活细胞免疫能力不强, 主要是因为它们无法被PRR识别而激活宿主的固有免疫应答^[20,28]。然而, 过度的免疫应答会导致大量的I型干扰素和其他干扰素的产生, 这些干扰素会抑制mRNA的翻译, 最终导致翻译停滞、RNA降解、CD8+T细胞活化减少, 并最终会导致免疫应答终止^[3-4,29]。此外, LNPs根据其成分也可能具有免疫调节作用^[30-32], 这表明mRNA和LNPs都可能具有佐剂效应, 因此, 两者对mRNA编码的目的抗原的作用模式(如免疫原性)的贡献也应在非临床研究中充分表征, 以确保疫苗的安全性和有效性。

1.5 基于mRNA平台技术

“平台技术”广义上指使用相同的基本成分作为主干, 可通过插入新的基因或蛋白质序列来构建针对不同病原体的系统, 疫苗平台技术是由流行病防范创新联盟(Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, CEPI)于2017年提出, 旨在促使疫苗迅速发展^[33]。mRNA平台技术的应用亦是其能够快速研发和上市的关键, 使用“平台技术”开发新候选疫苗的意义是, 此前获得的经验和信息, 包括生产、质量控制、稳定性和非临床数据等都可以作为支持性数据, 用于更快速地评价和开发新的候选疫苗。此外, 平台技术提供的关于安全起始剂量或可耐受剂量方面的临床和非临床数据也可支持启动新候选疫苗的临床试验。

2 WHO对mRNA疫苗非临床评价的指导意义

鉴于mRNA疫苗的新型无细胞的酶工艺生产方式、需要特定递送载体、具有可持续获得性免疫应答和具有佐剂效应以及平台化的生产方式等诸多不同于传统疫苗的特点, 需要监管机构在评价其安全性和有效性时应有更多的考虑。由于属于完全新的技术线路, 其他WHO疫苗技术指南对该类疫苗帮助有限, 为此, WHO于2021年12月发布了《预防传染病mRNA疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑》^[7], 该指导文件中第7部分对mRNA非临床研究的评价进行了规定, 强调mRNA非临床评价应结合预期临床使用产品特点进行考虑, 非临床研究以及关于药效学(即免疫原性和攻毒试验)和毒理学研

究的设计、实施和分析,应结合现行WHO关于疫苗非临床评价^[34]、疫苗佐剂和含佐剂疫苗非临床评价^[35]等指导原则共同考虑,研究设计中需要特别关注免疫应答的持久性或持久性免疫细胞表型、I型干扰素介导的固有免疫应答情况、mRNA和LNPs的生物分布和持久性、全身和局部的毒性和炎症反应、非自然修饰核苷的潜在毒性、脂质纳米递送系统中新型脂质的毒性等方面问题。这些考虑要点虽然并非与所有mRNA疫苗都存在必然联系,但WHO认为疫苗开发者或生产商有必要对其加以验证,以便更好地了解候选疫苗的安全性和有效性。同时,WHO建议,如mRNA疫苗针对疾病还有其他疫苗和相应WHO指导原则,还应参考这些疫苗指导原则中关于评价该疾病疫苗具体问题的指导意见^[7]。

3 mRNA疫苗非临床评价中的特别考虑要点

3.1 对药效学研究设计的考虑

3.1.1 关注免疫应答的持久性或具有持久性的免疫细胞表型

在非临床研究中,免疫原性试验考察疫苗在动物体内引起的与人体相关的免疫应答^[36]。如前所述,mRNA翻译的抗原片段分别递呈给CD4+T、CD8+T细胞或者通过释放被B细胞识别,最终激活细胞免疫和体液免疫,产生免疫抗体。随着时间的推移,疫苗激发的免疫应答水平会逐渐下降,因此,了解免疫应答的持久性,对于评估后续剂量的需求(或时间)至关重要。为此,WHO认为应关注免疫应答的持久性或具有持久性的免疫细胞表型,特别是被认为与候选疫苗诱导保护作用相关的免疫应答持久性^[7],例如通过对抗原特异性CD4+T、CD8+T细胞的表征研究,有助于研究mRNA介导的细胞免疫的持久性和记忆反应,体液免疫持久性需要通过动物血清结合抗体和中和抗体效价确定,因此,需要关注体液免疫产生的靶点特异性IgG抗体水平。

3.1.2 关注I型干扰素介导的固有免疫应答

如“1.4”项中所述,I型干扰素介导适度的固有免疫应答会加强获得性免疫应答,但过多I型干扰素也会导致免疫应答终止。因此,为确保疫苗接种的有效性,应关注I型干扰素介导的固有免疫应答并对其合理调控,目前所采取的方法主要通过使用自然修饰的核苷如假尿苷或N1-甲基假尿苷来代替尿苷,可以有效降低宿主的病原

模式识别受体对mRNA分子的甄别能力^[3]。例如Moderna采取了将假尿苷修饰的核苷掺入mRNA-1273并在mRNA生产过程中去除dsRNA片段的方式,通过减少TLR信号传导和胞质传感器的激活来有效降低对mRNA的固有免疫应答信号传导^[37],以此提高蛋白的表达效率。

3.2 对动物模型中安全性/毒性研究设计的考虑

在评价动物模型中安全性/毒性时,除遵循WHO疫苗非临床评价指南中的要求外,应考虑是否需要设计研究来解决以下问题。

3.2.1 mRNA和LNPs的生物分布和持久性

传统的在动物模型中的毒性试验往往具有局限性,不能准确推断一些不良事件的关联因素。为此,WHO建议可通过确定mRNA和LNPs(或脂质成分)是否会从接种疫苗的组织中分散出去、分布到哪些组织、所持续时间等,来展开对疫苗安全性的评价^[7]。

3.2.2 全身和局部的毒性和炎症反应

RNA通过多种途径引发炎症反应,特别是通过固有免疫系统及其众多的RNA传感器引发。如前所述,在mRNA疫苗中,mRNA和LNPs都具有可以影响和触发固有免疫系统的特性。尽管其中一些活性可能有利于疫苗的免疫应答,但重要的是要监测全身和局部的毒性和炎症反应,以了解所有免疫应答、反应原性或毒性,这些将是预测人类严重不良事件或特别关注的不良事件(Adverse Event of Special Interest, AESI)的免疫指标^[38-39]。此外,为帮助递送而添加的其他成分,如聚乙二醇(PEG),虽然相对无害,但也会影响理化特性,进而影响安全性^[40-42]。因此,重要的是需要了解产品的整体情况,包括了解制剂过程及各成分的理化性质是如何影响炎症反应和安全性的。

3.2.3 非自然修饰核苷的非预期和严重毒性

一些抗病毒药物和抗癌药物中,含有特定的非自然核苷类似物,它们的构象发生了改变,产生了线粒体毒性,从而导致了肌病、多发性神经病变、乳酸酸中毒、肝脂肪变性、胰腺炎、脂肪代谢障碍,甚至死亡。然而,这些临床观察到的毒性并没有在非临床动物模型中发现。虽然当前两款新冠mRNA疫苗中使用的修饰核苷是天然存在的,但未来的候选疫苗可能包含非自然修饰的核苷。因此,特别是对于含有非自然修饰核苷mRNA疫苗,

这些修饰在其他已开发的核酸产品中并没有被完全定性,在安全性评价中,应仔细考虑如何在合适的动物模型和非临床研究中观察到这些潜在的毒性^[43-45]。

3.3 对脂质纳米递送系统中新型脂质毒性的考虑

两款mRNA COVID-19疫苗中的LNP由4个主要成分组成:中性磷脂、胆固醇、聚乙二醇-脂质和可电离的阳离子脂质。目前针对LNP的研发焦点主要针对可电离的阳离子脂质的优化,如Moderna开发了一类新型可电离脂质SM-102,而BNT162b2则使用了Acuitas的新型阳离子脂质ALC-0315^[46]。不同脂质辅料的选择会导致LNP的理化属性,如颗粒大小、形态、封装效率和表面电荷的差异,进而导致不同的安全性,与此同时,当各种脂质的比例发生变化时,LNP的理化属性也会改变,因此当LNP由新型脂质制成或其自身被修饰(例如改变比率或更改工艺),且此前未进行过非临床和临床测试,则需要对包含的新型脂质的材料单独开展毒性研究,并关注其遗传毒性、生殖毒性等,这与《WHO关于疫苗佐剂和佐剂疫苗的非临床评价指南》(WHO Guidelines on the Nonclinical Evaluation of Vaccine Adjuvants and Adjuvanted Vaccines)^[35]中关于新型佐剂的要求和/或《ICH人用药品的遗传毒性试验和数据分析指导原则》[ICH Guideline S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use]^[47]中关于新化学实体的要求类似。

3.4 对mRNA疫苗的遗传风险的考虑

对质粒DNA疫苗开发中疫苗核酸可能整合到宿主基因组的担忧,此前普遍观点(包括WHO)认为该担忧并不适用于mRNA疫苗,无需开展非临床研究解决,原因主要有以下几点:首先,唯一已知的关于RNA整合到宿主基因组的机制需要包含逆转录酶和整合酶的复合物;其次,mRNA候选疫苗的设计应考虑到不应包含逆转录酶启动转录所需引物的特定RNA结合位点;再次,RNA经逆转录并组成新产物后才可能被转移到细胞核中;最后,疫苗中mRNA一旦被人体细胞摄取,就会在相对较短的时间内降解,细胞自身的mRNA亦是如此^[7]。但近期针对Pfizer和BioNTech联合研发的BNT162b2的研究表明,其可在人肝细胞系中实现逆转录,研究发现BNT162b2激活并增加了人体细胞内的自主逆

录转座子LINE-1基因的表达,而LINE-1作为细胞内源性逆转录酶,能够介导RNA在肝细胞系Huh 7中被逆转录为DNA。这一发现可能导致需要重新审视mRNA疫苗的整合或遗传风险,对于这些逆转录产生的DNA是否会整合到细胞基因组中,未来可能还需要设计相应研究,如对疫苗接种的人体组织/细胞进行全基因组测序,明确其对基因组完整性的影响^[48]。

3.5 对mRNA平台技术的考虑

对于基于同一平台技术类似候选疫苗的临床数据或非临床安全数据,应就其是否在科学上足以免除进一步非临床安全性研究,与监管部门达成共识^[7]。例如同一平台中,当使用具有相同摩尔数和mRNA-脂质比的LNP时,且多价疫苗中所含mRNA总量不超过单价制剂非临床安全性研究中的最高安全剂量时,单价疫苗的非临床安全性数据(临床数据)可以支持多价疫苗或联合疫苗的临床开发。目前,由于各生产商mRNA疫苗生产和控制方法尚未标准化,各生产商的“平台技术”信息尚无法共享,除非能够提供令人信服的证据,证明两个“平台技术”产品种类相似。此外,即便是对于“平台技术”的运用,目前也尚无统一标准,因此,WHO认为对mRNA疫苗进行科学灵活的监管是合理的,应采取个案具体分析的方式,通过与监管部门讨论并达成共识。

4 在公共卫生突发事件期间针对优先病原体疫苗快速开发的非临床加速评价

在公共卫生突发事件期间优先病原体疫苗快速开发的情况下,WHO认为当新的候选疫苗是基于特定生产商的平台技术,可考虑对非临床方案进行简化^[7]。在该过程中,应始终考虑已知相关产品和已评价产品情况,特别是在基于同一平台技术的情况下,如有相关产品的临床数据,在评价候选疫苗在人体中的安全性时,可能比任何指定动物模型或体外人体模型中获得的数据更有意义。

4.1 仅改变目的抗原序列的mRNA候选疫苗

对于已经过临床研究的mRNA疫苗,如仅改变目的抗原序列,例如当已检测出季节性或其他潜在的大流行性毒株抗原,或出现了变异的SARS-CoV-2刺突蛋白或大流行性流感毒株时,在使用相同的递送载体和已批准的生产工艺的前提下,则非临床方案可只在相关动物模型中进行免疫原性研究

或攻毒保护研究,但须不断收集安全信息,因为这些非临床概念验证研究通常不能完全符合GLP规范^[7]。此外,对于表达相关抗原的兽用疫苗的安全性信息,如相关,也应予以提供。此外,关于平台技术的其他安全性信息也应上报供监管部门考虑,例如毒理学和生物分布研究数据。

4.2 使用全新目的抗原的mRNA候选疫苗

对于使用全新目的抗原构建的mRNA疫苗进行临床研究时,非临床研究方法只局限于免疫原性或攻毒保护研究可能是不够的,这需要基于对自然疾病的了解和认知程度,并结合其病理学进行考虑^[7]。如果自然疾病与免疫病理的关联是由于交叉反应、分子模拟、自身免疫、过敏原性或免疫相关疾病增强所导致,则可能需要进行毒理学研究,确保新的目的抗原与这些效应无关。应注意的是,在非临床研究中可能无法研究自身性免疫^[34]。当自然疾病与免疫病理无关联或对自然疾病知之甚少的情况下,应与监管机构具体讨论如何缩短非临床计划。

4.3 递送载体和目的抗原均发生变化的mRNA候选疫苗

当递送载体和目的抗原均是全新的,非临床评价将更为复杂,需要更深入的研究,可能导致无法大幅简化非临床评价方案,这需要与监管部门进行具体讨论。

5 结语

鉴于当前新冠大流行以及新冠mRNA疫苗的研发速度,WHO发布的《预防传染病mRNA疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑》为监管机构评价mRNA疫苗安全性及有效性提供了指导,具有重要意义,但也应该认识到,mRNA疫苗介导免疫原性的类型和数量仍未研究透彻,其安全性也需要更长的时间观察,要想成功、广泛适用和持久有效地预防目标疾病,每种疫苗都要从其收益和风险角度进行评估。本文主要梳理了WHO法规中对mRNA疫苗非临床评价中需要特别考虑的问题,以期为研发企业和监管机构非临床评价提供参考。

致谢:感谢中国食品药品检定研究院的王军志院士、李玉华主任对本研究的贡献。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Karikó K, Muramatsu H, Welsh F A, et al. Incorporation of Pseudouridine into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector with Increased Translational Capacity and Biological Stability[J]. *Molecular Therapy*, 2008, 16 (11): 1833–1840.
- [5] Thess A, Grund S, Mui B L, et al. Sequence-engineered mRNA without Chemical Nucleoside Modifications Enables An Effective Protein Therapy in Large Animals[J]. *Molecular Therapy*, 2015, 23 (9): 1456–1464.
- [6] Rauch S, Lutz J, Kowalczyk A, et al. RNActive® Technology: Generation and Testing of Stable and Immunogenic mRNA Vaccines[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1499: 89–107.
- [7] WHO. Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of Messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases: Regulatory Considerations; TRS 1039, Annex 3 [EB/OL]. (2022-04-12) [2022-09-06]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240046870>.
- [8] Jackson L A, Anderson E J, Roupael N G, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2—Preliminary Report[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 383 (20): 1920–1931.
- [9] Granados-Riveron J T, Aquino-Jarquín G. Engineering of the Current Nucleoside-modified mRNA-LNP Vaccines against SARS-CoV-2[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 142: 111953.
- [10] Pronker ES, Weenen TC, Commandeur H, et al. Risk in Vaccine Research and Development Quantified[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e57755.
- [11] Li M, Li Y, Li S, et al. The Nano Delivery Systems and Applications of mRNA[J]. *Eur J Med Chem*, 2022 (227): 113910–113923.

- [12] Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, et al. SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Design Enabled by Prototype Pathogen Preparedness[J]. *Nature*, 2020, 586 (7830) : 567-571.
- [13] Cui S, Wang Y, Gong Y, et al. Correlation of the Cytotoxic Effects of Cationic Lipids with Their Headgroups[J]. *Toxicology Research*, 2018, 7 (3) : 473-479.
- [14] Loney C, Vandenbranden M, Ruyschaert J M. Cationic Lipids Activate Intracellular Signaling Pathways[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64 (15) : 1749-1758.
- [15] Yang S T, Kreuzberger A J B, Lee J, et al. The Role of Cholesterol in Membrane Fusion[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2016, 199: 136-143.
- [16] Cheng X, Lee R J. The Role of Helper Lipids in Lipid Nanoparticles (LNPs) Designed for Oligonucleotide Delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 99: 129-137.
- [17] Koltover I, Salditt T, Rädler J O, et al. An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery[J]. *Science*, 1998, 281 (5373) : 78-81.
- [18] Kulkarni J A, Darjuan M M, Mercer J E, et al. On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA[J]. *ACS Nano*, 2018, 12 (5) : 4787-4795.
- [19] 孟子延, 马丹婧, 高雪, 等. mRNA疫苗及其作用机制的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (6) : 740-744.
- [20] 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.
- [21] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2020, 383 (27) : 2603-2615.
- [22] Baden LR, El Sahly HM, 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) : 403-416.
- [23] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific Recognition of Single-stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8[J]. *Science*, 2004, 303 (5663) : 1526-1529.
- [24] De Beuckelaer A, Grooten J, De Koker S. Type I Interferons Modulate CD8+ T cell Immunity to mRNA Vaccines[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2017, 23 (3) : 216-226.
- [25] Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, et al. Length-dependent Recognition of Double-stranded Ribonucleic Acids by Retinoic Acid-inducible Gene-I and Melanoma Differentiation-associated Gene 5[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205 (7) : 1601-1610.
- [26] Moon C. Fighting COVID-19 Exhausts T Cells[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20 (5) : 277-277.
- [27] Devoldere J, Dewitte H, De Smedt S C, et al. Evading Innate Immunity in Nonviral mRNA Delivery: Don't Shoot the Messenger[J]. *Drug Discovery Today*, 2016, 21 (1) : 11-25.
- [28] 尼博, 李月华, 刘拂晓, 等. mRNA疫苗研究进展及其在传染病防控中的应用[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (3) : 600-606.
- [29] De Beuckelaer A, Pollard C, Van Lint S, et al. Type I Interferons Interfere with the Capacity of mRNA Lipoplex Vaccines to Elicit Cytolytic T Cell Responses[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24 (11) : 2012-2020.
- [30] Buschmann M D, Carrasco M J, Alishetty S, et al. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines[J]. *Vaccines*, 2021, 9 (1) : 65.
- [31] Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The Systemic Toxicity of Positively Charged Lipid Nanoparticles and the Role of Toll-like Receptor 4 in Immune Activation[J]. *Biomaterials*, 2010, 31 (26) : 6867-6875.
- [32] Pizzuto M, Bigey P, Lachgè s A M, et al. Cationic Lipids as One-component Vaccine Adjuvants: A Promising Alternative to Alum[J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 287: 67-77.
- [33] 吴爽, 王寅, 尹华静, 等. 基于平台技术的mRNA疫苗非临床评价的考虑[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33 (10) : 1214-1216.
- [34] WHO. Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines; TRS 927, Annex 1[EB/OL]. (2005-01-01) [2022-09-06]. <https://www.who.int/publications/i/item/9241209275>.
- [35] WHO. Guidelines on the Nonclinical Evaluation of Vaccine Adjuvants and Adjuvanted Vaccines; TRS 987, Annex 2[EB/OL]. (2014-01-18) [2022-09-06]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241500000>.

- who.int/publications/i/item/9789241209878.
- [36] 国家药品监督管理局.《新型冠状病毒预防用疫苗临床评价指导原则(试行)》及起草说明[EB/OL]. (2020-08-14) [2022-03-29]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-08/15/content_5535069.htm.
- [37] Verbeke R, Lentacker I, De Smedt S C, et al. The dawn of mRNA Vaccines: The COVID-19 case[J]. Journal of Controlled Release, 2021, 333: 511-520.
- [38] Obeid M A, Tate R J, Mullen A B, et al. Lipid-based Nanoparticles for Cancer Treatment[M]//Grumezescu A M. Lipid Nanocarriers for Drug Targeting. Norwich (NY): William Andrew Publishing, 2018: 313-359.
- [39] Marlowe J L, Akopian V, Karmali P, et al. Recommendations of the Oligonucleotide Safety Working Group's Formulated Oligonucleotide Subcommittee for the Safety Assessment of Formulated Oligonucleotide-based Therapeutics[J]. Nucleic Acid Therapeutics, 2017, 27 (4): 183-196.
- [40] European Medicines Agency. CHMP Safety Working Party's Response to the Paediatric Committee Regarding the Use of PEGylated Drug Products in the Paediatric Population[EB/OL]. (2012-11-23) [2022-03-29]. <https://www.ema.europa.eu/en/chmp-safety-working-partys-response-paediatric-committee-regarding-use-pegylated-drug-products>.
- [41] Turecek P L, Bossard M J, Schoetens F, et al. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 105 (2): 460-475.
- [42] Liu G, Li Y, Yang L, et al. Cytotoxicity Study of Polyethylene Glycol Derivatives[J]. RSC Advances, 2017, 7 (30): 18252-18259.
- [43] Turecek P L, Siekmann J. PEG-protein Conjugates: Nonclinical and Clinical Toxicity Considerations[M]//Pasut G, Zalipsky S. Polymer-Protein Conjugates. Amsterdam: Elsevier, 2020: 61-101.
- [44] Johnson A A, Ray A S, Hanes J, et al. Toxicity of Antiviral Nucleoside Analogs and the Human Mitochondrial DNA Polymerase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (44): 40847-40857.
- [45] Moyle G. Toxicity of Antiretroviral Nucleoside and Nucleotide Analogues[J]. Drug Safety, 2000, 23 (6): 467-481.
- [46] Buschmann M D, Carrasco M J, Alishetty S, et al. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines[J]. Vaccines, 2021, 9 (1): 65.
- [47] EMA. ICH Guideline S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Step 5[EB/OL]. (2012-06) [2022-09-06]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use-step_en.pdf.
- [48] Aldén M, Olofsson Falla F, Yang D, et al. Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 *in vitro* in Human Liver Cell Line[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2022, 44 (3): 1115-1126.

(收稿日期 2022年4月7日 编辑 王雅雯)