



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119530252 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 28

(21) 申请号 202311104568.3

A61P 31/14 (2006.01)

(22) 申请日 2023.08.30

(71) 申请人 星锐医药(苏州)有限公司

地址 215000 江苏省苏州市中国(江苏)自
由贸易试验区苏州片区苏州工业园区
星湖街218号生物医药产业园一期项
目A4楼301单元

申请人 星基医药(上海)有限公司

(72) 发明人 李琴 白华荣 胡荣宽 孙涛

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

专利代理师 陆惠中

(51) Int.Cl.

C12N 15/47 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

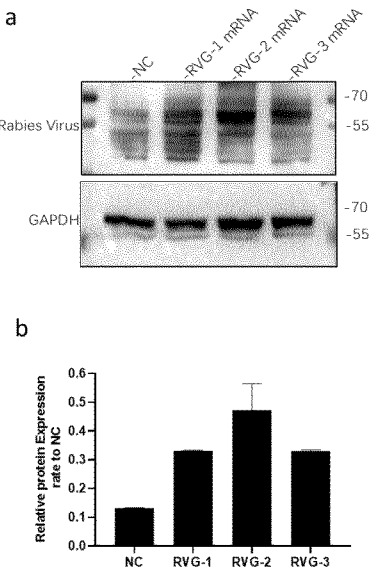
权利要求书1页 说明书12页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种狂犬mRNA疫苗的制备及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种优化RVG mRNA,通过对狂犬病毒CTN-1毒株G蛋白(RVG)编码区进行优化,包括:针对在人体内表达时的密码子偏好性进行调整、常用密码子的使用频率进行调整、提高序列的GC含量等,得到核苷酸序列转录后的mRNA结构更稳定,在哺乳动物和人体内的目标蛋白翻译效率更高。将疫苗载体和优化RVG mRNA混合,得到狂犬病毒核酸疫苗。该方法简单易操作,降低了疫苗生产的工艺难度,可以大规模进行生产,批间差易于控制,极大降低了生产成本。实现使用极小剂量就能达到足够的保护效果,降低生产成本,在有效性方面优于现有的狂犬病疫苗。



1. 一种RVG mRNA,其特征在于,所述RVG mRNA的编码序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 一种优化的RVG mRNA,其特征在于,所述优化的RVG mRNA从5'至3'端依次包含如下元件:5'-帽结构、5'-UTR、权利要求1所述的RVG mRNA的编码序列、3'-UTR和3'-聚腺苷酸序列。
3. 根据权利要求2所述的优化的RVG mRNA,其特征在于,所述5'-UTR长度为10-200个核苷酸,优选为15-100个核苷酸。
4. 根据权利要求3所述的优化的RVG mRNA,其特征在于,所述5'-UTR为ACTBB 5'-UTR序列或KOZAK序列。
5. 根据权利要求2所述的优化的RVG mRNA,其特征在于,所述3'-聚腺苷酸序列优选为60-120个A。
6. 根据权利要求2所述的优化的RVG mRNA,其特征在于,所述3'-UTR包括 β -珠蛋白3'-UTR序列或血红蛋白HBA2 3'-UTR序列。
7. 权利要求1-6任一项所述的RVG mRNA在制备狂犬病毒核酸疫苗中的应用。
8. 一种狂犬病毒核酸疫苗,其特征在于,所述狂犬病毒核酸疫苗包括疫苗载体和权利要求1-6任一项所述的RVG mRNA。
9. 根据权利要求8所述的狂犬病毒核酸疫苗,其特征在于,所述疫苗载体包括阳离子脂质体、阳离子蛋白、阳离子聚合物或阳离子脂质纳米颗粒中的一种或几种。
10. 一种狂犬病毒核酸疫苗的制备方法,其特征在于,将疫苗载体和权利要求1-6任一项所述的RVG mRNA混合,得到狂犬病毒核酸疫苗。
11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - 1) 将可质子化阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂溶于有机溶液,得到有机相;
 - 2) 将权利要求1-6任一项所述的RVG mRNA溶于pH3-4柠檬酸钠或乙酸钠溶液中,得到水相;
 - 3) 将得到的有机相和水相混匀得到混合液,替换混合液中的有机溶液及多余的酸性盐溶液为缓冲液,得到狂犬病毒核酸疫苗。
12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述步骤2)水相中RVG mRNA的浓度为0.1-0.4mg/ml。
13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,所述步骤3)中有机相和水相的体积比为1:2-4。

一种狂犬mRNA疫苗的制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸疫苗领域,具体而言,涉及一种mRNA狂犬病疫苗的制备及其应用。

背景技术

[0002] 狂犬病是由狂犬病病毒(Rabies Virus,RV)感染引起的致命神经系统疾病,病患一旦感染进入发作期,致死率几近100%。该病一直是大规模公共卫生干预措施的主题,至今尚无有效的治疗手段,目前主要通过疫苗接种进行预防。而现有的狂犬病疫苗大多需要通过多次给药才能达到较高中和滴度,且生产成本高昂。因此,开发创新型疫苗是将狂犬病降低到可接受比率的唯一方法。目前,许多临床前和临床研究正在进行中,包括新型疫苗、佐剂和注射方法等方面。mRNA疫苗具有研发和生产周期短,易实现量产,产能高,安全风险较低等优点,相对于传统狂犬病疫苗来说,mRNA疫苗具有显著优势。

[0003] 目前市售的狂犬病疫苗主要为狂犬病毒灭活疫苗,该疫苗生产成本高,最主要的原因是由于生产出来的狂犬病毒滴度低,需要多次注射达到满意的保护效力,而每毫升疫苗中所需的有效抗原量较高,故需生产更高滴度的狂犬病毒。

[0004] 狂犬病的病原体RABV是狂犬病毒属的负链RNA病毒,属于弹状病毒科,编码五种结构蛋白:核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)和RNA导向的RNA聚合酶(L)。其中三聚体G蛋白在其病毒外膜上与基质蛋白相互作用,是唯一暴露在弹状病毒包膜表面的蛋白质,并且是细胞受体的唯一配体,只有G蛋白能刺激机体产生中和抗体。亚单位疫苗只含有所需免疫原性,即从狂犬全病毒中提取糖蛋白,在原核或真核细胞中表达,形成基因产物-蛋白质或多肽免疫体,诱导动物对RABV的免疫,是更安全的狂犬病疫苗,但是如何选择合适的表达系统及表达产物的纯化工艺是研发和生产过程中的技术难点。

[0005] 目前市场上存在的狂犬病毒疫苗通常在其应用时有许多缺点特别是:1)制备工艺复杂需要用细胞培养的方法生产病毒存在一定的安全隐患。2)质量控制和工艺放大要求高,控制不好会引发产品质量事故。3)病毒产生的有效抗原量低,为了保证效果要求提高病毒滴度,从而增加了生产成本。

[0006] 有鉴于此,特提出本发明,该mRNA狂犬疫苗只需要免疫1次,既能产生100%的保护效力。

发明内容

[0007] 本发明的第一目的在于提供一种优化RVG mRNA,以缓解现有技术中用于核酸疫苗的抗原活性低,翻译效率差,稳定性有待提高的技术问题。

[0008] 本发明的第二目的在于提供上述优化RVG mRNA的应用。

[0009] 本发明的第三目的在于提供一种狂犬病毒核酸疫苗,以缓解现有技术中狂犬病疫苗病毒滴度低,有效抗原量少,生产成本高的问题。

[0010] 本发明的第四目的在于提供上述狂犬病毒核酸疫苗的制备方法,提供一种操作简便,产率高的方法。

- [0011] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:
- [0012] 一种优化RVG mRNA,转录所述优化RVG mRNA的编码核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。
- [0013] 进一步地,转录所述优化RVG mRNA的核苷酸序列还包括如下元件:5'-帽结构、5'-UTR、3'-聚腺苷酸序列和3'-UTR中的至少一种;
- [0014] 优选地,所述5'-UTR为10-200个核苷酸,更优选为15-100个核苷酸;
- [0015] 优选地,所述5'-UTR为5'-UTR序列或Kozak序列;
- [0016] 优选地,所述Kozak序列如SEQ ID NO.2所示:
5'-GGCTAGCGCCGCCACC-3'(SEQ ID NO.2);
- [0017] 优选地,所述ACTBB 5'-UTR序列如SEQ ID NO.3所示:
5'-
ACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCC
GATCCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGCCAGCTCACC -3'(SEQ ID NO.3);
- [0019] 优选地,所述3'-聚腺苷酸序列优选为60-120个A,更优选为80-110个A,进一步优选为100个A;
- [0020] 优选地,所述3'-UTR包括 β -珠蛋白3'-UTR序列或血红蛋白的3'-UTR序列;
- [0021] 优选地,所述3'-UTR序列如SEQ ID NO.4所示:
5'-
GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTTTGTTCCCTAA
GTCCAATACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGG
ATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATTGCCATGTGTAT
GTGGGTTCGCCACATACTCTGATGATCCCAATCGTGGCGTGTCTGGC
CTGCTTCGGCAGGCACTGGCGCCGGGATCATTTCATGGCAA -3, (SEQ ID
NO.4)。
- [0023] 优选地,所述RVG mRNA的序列如SEQ ID NO.5所示。
- [0024] 优选地,所述RVG mRNA的序列如SEQ ID NO.6所示。
- [0025] 上述优化RVG mRNA在制备狂犬病毒核酸疫苗中的应用。
- [0026] 一种狂犬病毒核酸疫苗,所述狂犬病毒核酸疫苗包括疫苗载体和本发明提供的优化RVG mRNA,进一步地,所述疫苗载体包括阳离子脂质体、阳离子蛋白、阳离子聚合物或阳离子脂质纳米颗粒中的一种,优选为阳离子脂质体或阳离子脂质纳米颗粒;
- [0027] 优选地,阳离子脂质的可电离氮与mRNA磷酸骨架的磷的摩尔比(即NP比,N/P)为3-7,优选为4-6,更优选为5-6;
- [0028] 进一步地,所述疫苗载体为阳离子脂质纳米颗粒,按摩尔百分比计,包括20-70%阳离子脂质、20-50%结构脂质、5-20%辅助脂质和1-5%表面活性剂,其中,阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂的摩尔含量合计100%;
- [0029] 优选地,所述可质子化阳离子脂质包括SM-102,ALC-0315,DOTPA,Dlin-MC3-DMA,

Dlin-KC2-DMA, DODMA或DIIndMA, 优选为Dlin-MC3-DMA;

[0030] 优选地, 所述结构脂质包括胆固醇、胆固醇酯、固醇类激素、固醇类维生素或胆汁酸, 优选为胆固醇;

[0031] 优选地, 所述辅助脂质包括DSPC, DOPE, DOPC, DSPE或DOPS, 优选为DSPC;

[0032] 优选地, 所述表面活性剂包括PEG-DMG, PEG-DSPE或ALC-0519, 优选为PEG-DMG;

[0033] 优选地, 所述狂犬病毒核酸疫苗的给药方式包括静脉注射、肌肉注射或皮内注射, 优选为肌肉注射。

[0034] 上述狂犬病毒核酸疫苗的制备方法, 将疫苗载体和本发明提供的优化RVG mRNA混合, 得到狂犬病毒核酸疫苗。

[0035] 进一步地, 所述疫苗载体为上述狂犬病毒核酸疫苗中的阳离子脂质纳米颗粒, 制备方法包括:

[0036] (a) 按配方比例将阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂溶于有机溶液, 得到有机相;

[0037] (b) 将优化RVG mRNA溶于pH3-4柠檬酸钠或乙酸钠溶液中, 得到水相;

[0038] (c) 将(a)得到的有机相和(b)得到的水相混匀得到混合液, 替换混合液中多余的有机溶液及多余的酸性盐溶液为缓冲液, 得到狂犬病毒核酸疫苗;

[0039] 优选地, 有机溶液包括无水乙醇、四氢呋喃、丙酮, 异丙醇或DMSO, 优选为无水乙醇;

[0040] 优选地, 有机相中阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂的总浓度为10-35mg/ml;

[0041] 优选地, 水相中优化RVG mRNA的浓度为0.1-0.3mg/ml;

[0042] 优选地, 有机相和水相的体积比为1:2-4;

[0043] 优选地, 替换混合液中的溶媒为缓冲液包括: 用缓冲液将混合液置换30-80倍。

[0044] 与现有技术相比, 本发明的有益效果为:

[0045] 本发明提供一种优化RVG mRNA, 转录其的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。发明人对狂犬病毒CTN-1毒株G蛋白(RVG)编码区进行优化, 序列优化包括: 针对在人体内表达时的密码子偏好性进行调整、常用密码子的使用频率进行调整、提高序列的GC含量等, 得到核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的优化RVG mRNA的序列。该核苷酸序列使得转录后的mRNA结构更稳定, 在哺乳动物和人体内的目标蛋白翻译效率更高。

[0046] 本发明提供的狂犬病毒核酸疫苗, 包括疫苗载体和优化RVG mRNA该核酸疫苗将体外转录合成的优化RVG mRNA, 递送至体内产生狂犬病毒糖蛋白(即抗原蛋白), 实现使用极小剂量就能达到足够的保护效果, 降低生产成本, 在有效性方面优于现有的狂犬病疫苗技术。

[0047] 本发明提供上述狂犬病毒核酸疫苗的制备方法, 将疫苗载体和优化RVG mRNA混合, 得到狂犬病毒核酸疫苗。该方法简单易操作, 降低了疫苗生产的工艺难度, 可以大规模进行生产, 批间差易于控制, 极大降低了生产成本。

附图说明

[0048] 图1a. 为线性和环形RVG mRNA转染HEK293细胞的表达量western blot胶图;

- [0049] 图1b.为线性和环形RVG mRNA转染HEK293细胞的表达量的数据分析柱状图；
- [0050] 图2.为不同LNP制剂包裹Fluc在小鼠体内的表达强度；
- [0051] 图3a.为动物实验方案示意图；
- [0052] 图3b.为小鼠体重统计图；
- [0053] 图3c.为给药后14天小鼠中和抗体数据统计图；
- [0054] 图3d.为疫苗保护率统计图；
- [0055] 图4a.为不同剂量的线性mRNA疫苗免疫小鼠后的7D中和抗体滴度结果；
- [0056] 图4b.为不同剂量的线性mRNA疫苗免疫小鼠后的14D中和抗体滴度结果；
- [0057] 图4c.为免疫后不同剂量小鼠体重变化统计图；
- [0058] 图4d.为攻毒后小鼠体重变化统计图；
- [0059] 图4e.为不同剂量的线性mRNA疫苗免疫后的保护率；
- [0060] 图5a.为小鼠暴露后接种疫苗的生存期统计图；
- [0061] 图5b.为小鼠接种疫苗后3D/5D的中和抗体；
- [0062] 图5c.为小鼠体重统计图；
- [0063] 图5d.为小鼠接种mRNA疫苗后3D/5D阳性率。

具体实施方式

[0064] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。除非另有说明,本文中所用的专业与科学术语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法或材料也可应用于本发明中。

[0065] 一种优化RVG mRNA转录优化RVG mRNA的编码核酸序列如SEQ ID NO.1。

[0066]

SEQ ID NO.1 RVG mRNA 编码序列

```

ATGATCCCTCAGGCCCTGCTGTTCGTGCCCCCTGCTGGTGTTCCTCTGT
GCTTCGGCAAGTTCCCAATCTACACCATCCCAGATAAGCTGGGACCTT
GGAGCCCTATCGACATTCACCACCTGAGTTGTCCTAACAACCTGGTGG
TCGAGGACGAGGGCTGTACCAATCTGAGCGGCTTCTCCTACATGGAAC
TGAAGGTGGGCTACATCAGCGCCATCAAGGTGAACGGCTTCACTTGCA
CCGGCGTGTTGACCGAGGCCGAGACATACACAAATTTTCGTTGGCTACG
TGACCACCACCTTCAAGAGAAAGCACTTCCGCCCCACCCCTGACGCCT
GTCGGAGCGCTTACAACCTGGAAGATGGCCGGCGATCCTAGATACGAG
GAAAGTCTGCACAACCCCTATCCTGATTACCACTGGCTGAGAACCGTG
AAGACCACAAAGGAAAGCGTGGTGATCATTAGCCCTAGCGTGGCCGA

```

[0067]

TCTGGACCCTTACGACAAGTCTCTCCATAGCAGAGTGTTCCCTAGAGG
 CAAGTGCAGCGGCATAACAGTGAGCTCCGCCTACTGCAGCACCAATCA
 CGACTACACCATCTGGATGCCTGAGAACCCTAGACTGGGTACATCTTG
 TGATATCTTCACAAACAGCAGAGGCAAACGGGCTTCTAAAGGCAGCA
 AGACCTGTGGCTTTGTGGACGAGCGGGGACTGTACAAATCTCTGAAGG
 GCGCCTGCAAGCTGAAACTGTGCGGCGTGCTGGGCCTCCGGCTGATGG
 ACGGCACCTGGGTGCGCCATCCAGACCAGCAACGAGACAAAGTGGTGC
 CCCCCGATCAGCTGGTGAATCTGCACGATTTCCACAGCGACGAAATC
 GAGCATCTGGTGGTGGGAAGAACTGGTTAAAAAGCGGGAAGAGTGCCT
 GGATGCTCTGGAAAGCATCATGACAACCAAATCCGTGAGCTTCCGGAG
 GCTGAGCCACCTGAGAAAGCTGGTTCCCGGCTTCGGCAAGGCCTATAC
 CATCTTTAACAAGACACTGATGGAAGCCGACGCCCCTACAAGAGCGT
 CCGGACCTGGAACGAGATCATCCCTAGCAAGGGCTGCCTGAGAGTGG
 GCGGAAGATGCCACCCCCACGTGAACGGCGTGTTTTTCAACGGCATCA
 TCCTGGGCCCTGACGGCCACGTGCTGATCCCTGAGATGCAGTCCAGCC
 TGCTGCAGCAGCACATGGAAGTCTGGAGAGCTCTGTGATCCCCCTGA
 TGCACCCTCTGGCCGACCCCAGCACAGTGTTTAAGGACGGCGACGAGG
 TGGAGGACTTCGTGGAAGTGCACCTGCCTGACGTGCATAAGCAGGTGA
 GCGGCGTGACCTGGGACTGCCAACTGGGGAAAAGACGTGCTGATG
 GGCGCTGGCGTGCTGACCGCCCTGATGCTGATGATCTTCCTGATGACA
 TGCTGCAGAAGAACCAACCGGGCCGAGAGCATCCAACACAGCCTGGG
 CGAGACCGGCAGAAAGGTGTGCGGTCACCTCTCAGTCTGGAAGAGTGA
 TCAGCTCTTGGGAGAGCTACAAGAGCGGAGGAGAAACCAAACCTGTGA
 TAA

[0068] 实施例1RVG mRNA制备

[0069] 体外转录所用试剂盒为Thermo scientific的Transcript Aid T7 High Yield Transcription Kit(货号:#K0441),反应体系见表1。

[0070] 表1.IVT反应体系

[0071]

DPEC水	Up to 20ul
A/C/GTP,Psedo UTP,clean cap	2ul
5x Reaction Buffer	4ul
Enzyme Mix	2ul
Template	1ug
Total	20ul

[0072] 混匀后37℃反应30min。反应结束的转录产物加入2ul DNase I 37℃消化20min；加入等体积LiCl Precipitation Solution 22uL充分混合，-20℃冷却1h，终止和沉淀RNA。4℃最高速离心15min沉淀RNA，去上清。用70%的1mL乙醇(DEPC水配置)洗涤沉淀，再次离心，去除上清，干燥沉淀，并根据需要加入合适的溶液溶解RNA，在-70℃保存mRNA。

[0073] 实施例2RVG mRNA的序列优化

[0074] 本实施例中的RVG mRNA的序列优化方案如表2所示，具体如下：

[0075] 表2.RVG mRNA的序列信息

mRNA 编号	元件 名称	具体序列
[0076] RVG -1 mRNA (CN 105 517 569 A))	5'UTR	GGCGCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTTCTCGGCATC
	CD	SEQ ID NO.1 序列
	3'UTR	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCCTTGTCCCTAAGTCCAACACTACT AAACTGGGGGATATTACCTGGTCTTTGAATAAAAGTCTGAGTGGGCAG
	polyA	AA AAAAAAA
	RVG -2 mRNA	基于 SEQ ID NO.1 序列的环状 RNA
[0076] RVG -3	5'UTR	ACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGC CCGTCCACACCCGCCGCCAGCTACCGGCTAGCGCCGCCACC
[0077]	+Kozak	
	CD	SEQ ID NO.1 序列
	3'UTR	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCCTTGTCCCTAAGTCCAACACTACT AAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATT TATTTTCATTGCAATTGCCATGTGTATGTGGGTTGCCCCACATACTCTGATGATCCCCAAT CGTGGCGTGTGCGCCTGCTTCGGCAGGCACTGGCGCCGGGATCATTCATGGCAA
	polyA	AA AAA

[0078] 最终获得RVG-1mRNA编码序列为：

GGCGCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTTCTCGGCATCATGATC
CCTCAGGCCCTGCTGTTTCGTGCCCCCTGCTGGTGTTCCTCTGTGCTTCG
GCAAGTTCCCAATCTACACCATCCCAGATAAGCTGGGACCTTGGAGCC
CTATCGACATTACCCACCTGAGTTGTCCTAACAACCTGGTGGTCGAGG
ACGAGGGCTGTACCAATCTGAGCGGCTTCTCCTACATGGAAGTGAAGG
TGGGCTACATCAGCGCCATCAAGGTGAACGGCTTCACTTGCACCGGCG
TGGTGACCGAGGCCGAGACATACACAAATTTTCGTTGGCTACGTGACCA
CCACCTTCAAGAGAAAGCACTTCCGCCCCACCCCTGACGCCTGTCGGA
GCGCTTACAAGTGAAGATGGCCGGCGATCCTAGATACGAGGAAAGT
[0079] CTGCACAACCCCTATCCTGATTACCACTGGCTGAGAACCGTGAAGACC
ACAAAGGAAAGCGTGGTGATCATTAGCCCTAGCGTGGCCGATCTGGA
CCCTTACGACAAGTCTCTCCATAGCAGAGTGTTCCCTAGAGGCAAGTG
CAGCGGCATAACAGTGAGCTCCGCCTACTGCAGCACCAATCACGACTA
CACCATCTGGATGCCTGAGAACCCTAGACTGGGTACATCTTGTGATAT
CTTCACAAACAGCAGAGGCAAACGGGCTTCTAAAGGCAGCAAGACCT
GTGGCTTTGTGGACGAGCGGGGACTGTACAAATCTCTGAAGGGCGCCT
GCAAGCTGAAACTGTGCGGCGTGCTGGGCCTCCGGCTGATGGACGGC
ACCTGGGTCGCCATCCAGACCAGCAACGAGACAAAGTGGTGCCCCC
CGATCAGCTGGTGAATCTGCACGATTTCCACAGCGACGAAATCGAGCA

TCTGGTGGTGAAGAAGTGGTTAAAAAGCGGGAAGAGTGCCTGGATG
CTCTGGAAAGCATCATGACAACCAAATCCGTGAGCTTCCGGAGGCTGA
GCCACCTGAGAAAGCTGGTTCCCGGCTTCGGCAAGGCCTATACCATCT
TTAACAAGACACTGATGGAAGCCGACGCCCACTACAAGAGCGTCCGG
ACCTGGAACGAGATCATCCCTAGCAAGGGCTGCCTGAGAGTGGGCGG
AAGATGCCACCCCCACGTGAACGGCGTGTTTTTCAACGGCATCATCCT
GGGCCCTGACGGCCACGTGCTGATCCCTGAGATGCAGTCCAGCCTGCT
GCAGCAGCACATGGAAGTCTGGAGAGCTCTGTGATCCCCCTGATGCA
CCCTCTGGCCGACCCCAGCACAGTGTTTAAGGACGGCGACGAGGTGG
[0080] AGGACTTCGTGGAAGTGCACCTGCCTGACGTGCATAAGCAGGTGAGC
GGCGTGGACCTGGGACTGCCAACTGGGGAAAAGACGTGCTGATGGG
CGCTGGCGTGCTGACCGCCCTGATGCTGATGATCTTCCTGATGACATG
CTGCAGAAGAACCAACCGGGCCGAGAGCATCCAACACAGCCTGGGCG
AGACCGGCAGAAAGGTGTCGGTCACCTCTCAGTCTGGAAGAGTGATC
AGCTCTTGGGAGAGCTACAAGAGCGGAGGAGAAACCAAACCTGTGATA
AGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTTTGTTCCCTA
AGTCCAACCTACTAACTGGGGGATATTACCTGGTCTTTGAATAAAGTC
TGAGTGGGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA。(SEQ ID NO.5)

[0081] 最终获得RVG-3mRNA编码序列为：

ACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCC
GATCCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGCGCAGCTCACCGGCTAGCGCCGC
CACCATGATCCCTCAGGCCCTGCTGTTTCGTGCCCTGCTGGTGTTCCT
[0082] CTGTGCTTCGGCAAGTTCCCAATCTACACCATCCCAGATAAGCTGGGA
CCTTGGAGCCCTATCGACATTCACCACCTGAGTTGTCCTAACAACCTG
GTGGTCGAGGACGAGGGCTGTACCAATCTGAGCGGCTTCTCCTACATG
GAACTGAAGGTGGGCTACATCAGCGCCATCAAGGTGAACGGCTTCACT
TGCACCGGCGTGGTGACCGAGGCCGAGACATACACAAATTCGTTGGC

TACGTGACCACCACCTTCAAGAGAAAGCACTTCCGCCCCACCCCTGAC
GCCTGTCGGAGCGCTTACAACTGGAAGATGGCCGGCGATCCTAGATAC
GAGGAAAGTCTGCACAACCCCTATCCTGATTACCACTGGCTGAGAACC
GTGAAGACCACAAAGGAAAGCGTGGTGATCATTAGCCCTAGCGTGGC
CGATCTGGACCCTTACGACAAGTCTCTCCATAGCAGAGTGTTCCCTAG
AGGCAAGTGCAGCGGCATAACAGTGAGCTCCGCCTACTGCAGCACCA
ATCACGACTACACCATCTGGATGCCTGAGAACCCTAGACTGGGTACAT
CTTGTGATATCTTCACAAACAGCAGAGGCAAACGGGCTTCTAAAGGCA
GCAAGACCTGTGGCTTTGTGGACGAGCGGGGACTGTACAAATCTCTGA
AGGGCGCCTGCAAGCTGAAACTGTGCGGCGTGCTGGGCCTCCGGCTGA
TGGACGGCACCTGGGTCGCCATCCAGACCAGCAACGAGACAAAGTGG
TGCCCCCCCCGATCAGCTGGTGAATCTGCACGATTTCCACAGCGACGAA
ATCGAGCATCTGGTGGTGGAAGAACTGGTTAAAAAGCGGGAAGAGTG
CCTGGATGCTCTGGAAAGCATCATGACAACCAAATCCGTGAGCTTCCG
[0083] GAGGCTGAGCCACCTGAGAAAGCTGGTTCCCGGCTTCGGCAAGGCCTA
TACCATCTTTAACAAGACACTGATGGAAGCCGACGCCCACTACAAGAG
CGTCCGGACCTGGAACGAGATCATCCCTAGCAAGGGCTGCCTGAGAGT
GGGCGGAAGATGCCACCCCCACGTGAACGGCGTGTTTTTCAACGGCAT
CATCCTGGGCCCTGACGGCCACGTGCTGATCCCTGAGATGCAGTCCAG
CCTGCTGCAGCAGCACATGGAAGTGTGGAGAGCTCTGTGATCCCCCT
GATGCACCCTCTGGCCGACCCCAGCACAGTGTTTAAGGACGGCGACGA
GGTGGAGGACTTCGTGGAAGTGACCTGCCTGACGTGCATAAGCAGGT
GAGCGGCGTGGAACCTGGGACTGCCAAACTGGGGAAAAGACGTGCTGA
TGGGCGCTGGCGTGCTGACCGCCCTGATGCTGATGATCTTCCTGATGA
CATGCTGCAGAAGAACCAACCGGGCCGAGAGCATCCAACACAGCCTG
GGCGAGACCGGCAGAAAGGTGTCGGTCACCTCTCAGTCTGGAAGAGT
GATCAGCTCTTGGGAGAGCTACAAGAGCGGAGGAGAAACCAAAGTGT
GATAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCCTTTGTT
CCCTAAGTCCAACCTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGC

ATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATTGCCAT
GTGTATGTGGGTTTCGCCACATACTCTGATGATCCCCAATCGTGGCGT
GTCGGCCTGCTTCGGCAGGCACTGGCGCCGGGATCATTTCATGGCAA
[0084] AA
AA
AAAAAAAA. (SEQ ID NO.6)

[0085] RVG-1mRNA序列关键元件是采用不同的5'UTR、CTN-1毒株的编码G蛋白的开放阅读框核苷酸(SEQ ID NO.1所示为优化后序列)、3'UTR和polyA序列(参考CureVac狂犬病毒mRNA疫苗专利(CN105517569A))。RVG-3mRNA与RVG-1mRNA的编码区域(CDS)部分一致在5'UTR,3'UTR,polyA部分改用了优化后的序列,RVG-2mRNA编码区与RVG-1mRNA保持一致,采用了环形RNA的方式,这3个ORF最终翻译出来的蛋白序列一致,为CTN-1毒株的G蛋白。

[0086] 实施例3RVG mRNA体外抗原表达检测

[0087] 上述体外转录工艺制备获得的RVG-1mRNA、RVG-2mRNA和RVG-3mRNA分别转染HEK293细胞。取对数生长期的HEK293细胞,调整细胞悬液浓度至 5×10^5 细胞/ml,按每孔1ml接种于6孔板,置于37℃,含5%CO₂的培养箱中使细胞贴壁,培养过夜。转染时,4μg mRNA和转染试剂Lipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)8μl分别稀释于250μl无血清培养液(Opti-MEM)中混匀,室温孵育5分钟,然后将上述mRNA溶液与lipofectamine 2000溶液混匀,于室温静置20分钟,将500μl的寡聚核酸-脂质体复合物加到细胞培养板中,另外补充500μl无血清培养液(Opti-MEM)至6孔板中,使转染终体系为1ml。转染24小时后,M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo)裂解HEK293细胞,进行蛋白提取,所得蛋白用于Western Blot检测。具体为BRADFORD法测定总蛋白浓度;1X PBS调整各组总蛋白浓度;天能VE-180垂直电泳槽跑胶。电泳结束后,使用天能VE-186型转移电泳槽进行转膜。转膜完毕后,用Blocking Buffer封闭转印膜2h。加入稀释好的一抗,4℃孵育过夜。1X PBST洗涤3次。加入稀释好的二抗,室温孵育1h。用1X PBST洗涤3次。ECL底物进行化学发光检测,经Tanon 4200全自动化学发光图像分析系统曝光后并使用Gel-Pro analyzer软件进行灰度分析定量。

[0088] 结果如图1所示,从图1中结果可以看出,RVG-2mRNA及RVG-3mRNA转染细胞组中的G蛋白表达量高于RVG-1mRNA转染组,可见不同的5UTR、以及做成完美的CleanCap GAG promoter可以提高G蛋白表达量,RVG-2mRNA转染细胞的G蛋白含量高于RVG-3mRNA转染组,可见环形RNA能够提高G蛋白表达量。

[0089] 实施例4狂犬病毒核酸疫苗的制备方法

[0090] 将体外转录制备的mRNA溶解于pH4的柠檬酸钠缓冲液,调整浓度为0.2mg/ml,得到水相。

[0091] 按配方SM-102或Stama 1-4(星锐医药(苏州)有限公司)将SM-102、胆固醇、DSPC/DOPE和PEG-DMG按比例溶于无水乙醇,并将总脂质浓度调整为10-35mg/ml,得到有机相。利用微流控设备混合流速12.0ml/min将有机相与水相以1:3的体积比混合。得到的混合液立刻用PBS溶液稀释,并使用切向流过滤(TFF)除去溶液中乙醇及多余的柠檬酸盐缓冲液成分,溶液浓缩至mRNA浓度约0.1mg/ml,得到包裹mRNA的脂质纳米颗粒。将不同处方的包裹

Fluc-mRNA的脂质纳米颗粒通过肌肉注射到小鼠中,具体处方信息见表3,通过活体成像观察小鼠的荧光值(图2),挑选较好的Stama-3处方用于包裹对应的RVG-mRNA,即为RVG-mRNA狂犬病毒核酸疫苗。

[0092] 表3.LNP处方表(表格中的含量为摩尔百分比)

[0093]	Fomulation	Ionizable lipid (SM-102)	Helper Lipid	Chol	PEG-DMG
	SM102	50	10 (DSPC)	38.5	1.5
	Starna-1	65.5	7 (DOPE)	26	1.5
	Starna-2	67.5	11.5 (DOPE)	19.5	1.5
	Starna-3	62.5	9 (DOPE)	27	1.5
	Starna-4	64.5	9 (DOPE)	25	1.5

[0094] 实施例5小鼠中和抗体滴度测定

[0095] mRNA选用实施例3中的RVG-2mRNA,RVG-3mRNA进行Balb/C小鼠免疫实验,疫苗载体选取阳离子脂质纳米颗粒应用实施例4中Stama-3配方制备。商品化疫苗为灭活全病毒疫苗(英特威)作为阳性对照PC($\geq 10^{6.3}$ FAID₅₀/ml,给药体积为100u1/只),每只小鼠按照5ug的给药量注射,注射体积为100u1/只。阴性对照为等体积生理盐水注射液。以上各种疫苗制剂一次给药后14天检测小鼠血清狂犬病毒中和抗体滴度,并于给药后14天进行小鼠脑内注射攻毒(100倍LD50 RABV CVS-24),监测攻毒后21天小鼠体重和小鼠的存活率,如图3所示,从图3中结果可以看出,单次免疫RVG-mRNA疫苗诱导产生的中和抗体滴度远高于市售狂犬病疫苗,说明本发明技术优于现有技术。

[0096] 实施例6剂量依赖性的体液免疫应答

[0097] 利用实施例5中Stama-3配方包裹RVG-3mRNA进行Balb/C小鼠免疫实验,剂量梯度设为:0.5ug,5ug,50ug,注射体积为100u1/只。商品化疫苗为灭活全病毒疫苗(英特威)作为阳性对照PC($\geq 10^{6.3}$ FAID₅₀/ml,给药体积为100u1/只)。阴性对照为等体积生理盐水注射液。以上各种疫苗制剂一次给药后14天检测小鼠血清狂犬病毒中和抗体滴度,并于给药后17天进行小鼠脑内注射攻毒(100倍LD50 RABV CVS-24),监测攻毒后39天小鼠体重和存活率,结果如图4所示:同时参考药典(2020)通则1141检查法,监测制剂异常毒性,结果如图4所示:

[0098] 从图4中结果可以看出,单次给药0.5ug剂量的RVG-mRNA疫苗诱导产生的中和抗体滴度相当于市售狂犬病疫苗,对攻毒后小鼠的保护率与市售狂犬疫苗相当。单次给药5ug及50ug剂量的RVG-mRNA疫苗诱导产生的中和抗体滴度远远高于市售狂犬病疫苗,且接种疫苗的所有小鼠都被保护抵抗致死性的狂犬病毒攻击感染,且体重没有减轻。异常毒性显示小鼠免疫后的体重无显著差异。

[0099] 实施例7暴露后免疫保护

[0100] 利用实施例5中Stama-3配方及SM102包裹RVG-3mRNA进行Balb/C小鼠免疫实验。小鼠左后肢肌肉注射50倍LD50 CVS-24狂犬病毒,在病毒注射后6小时,小鼠右后肢肌肉注射

以上疫苗制剂给药。阴性对照为等体积生理盐水注射液。给药后3天和5天检测小鼠血清狂犬病毒中和抗体滴度。然后监测给药后小鼠体重和小鼠的存活率,结果如图5所示:

[0101] 从图5中结果可以看出,单次给药Stama-3配方及SM102商业化配方包裹RVG-3mRNA疫苗后5天即可诱导产生较高中和抗体,并充分高于0.5IU/mL的WHO标准,表明以上疫苗可以快速诱导小鼠产生中和抗体。接种Starna-3配方疫苗的小鼠狂犬病毒暴露后保护率为60%,接种SM102配方疫苗的小鼠暴露后保护率为40%,然而阴性对照组的小鼠在14天内全部死于狂犬病。以上数据表明,Stama-3配方疫苗优于SM102商业化配方疫苗,且对暴露后小鼠有较好的保护效果。

[0102] 本发明通过上述实施例来说明本发明的工艺方法,但本发明并不局限于上述工艺步骤,即不意味着本发明必须依赖上述工艺步骤才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

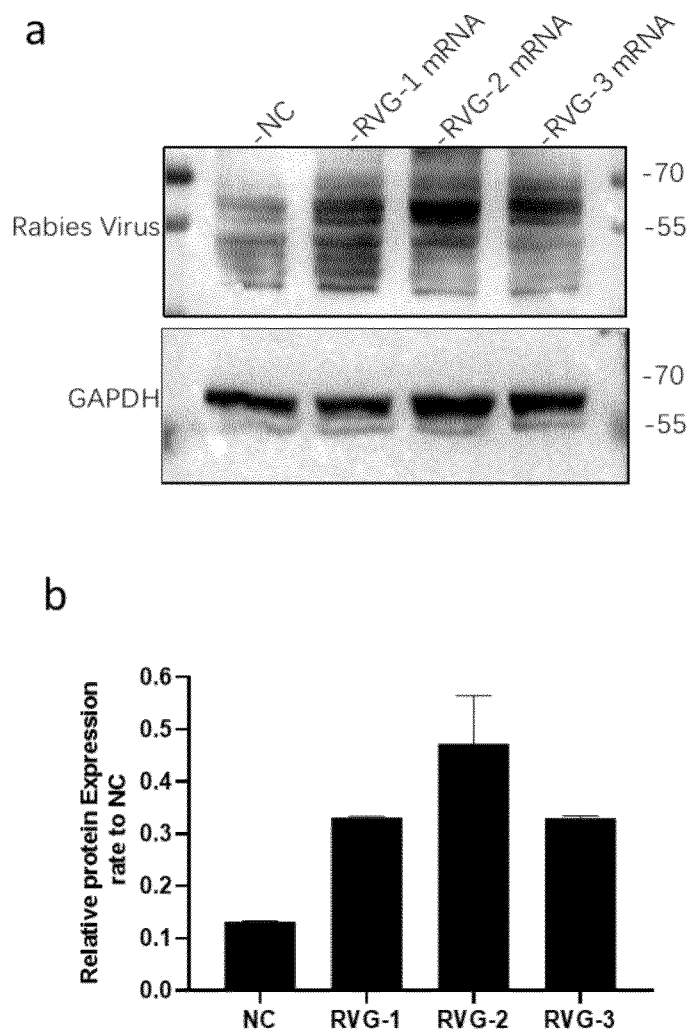


图1

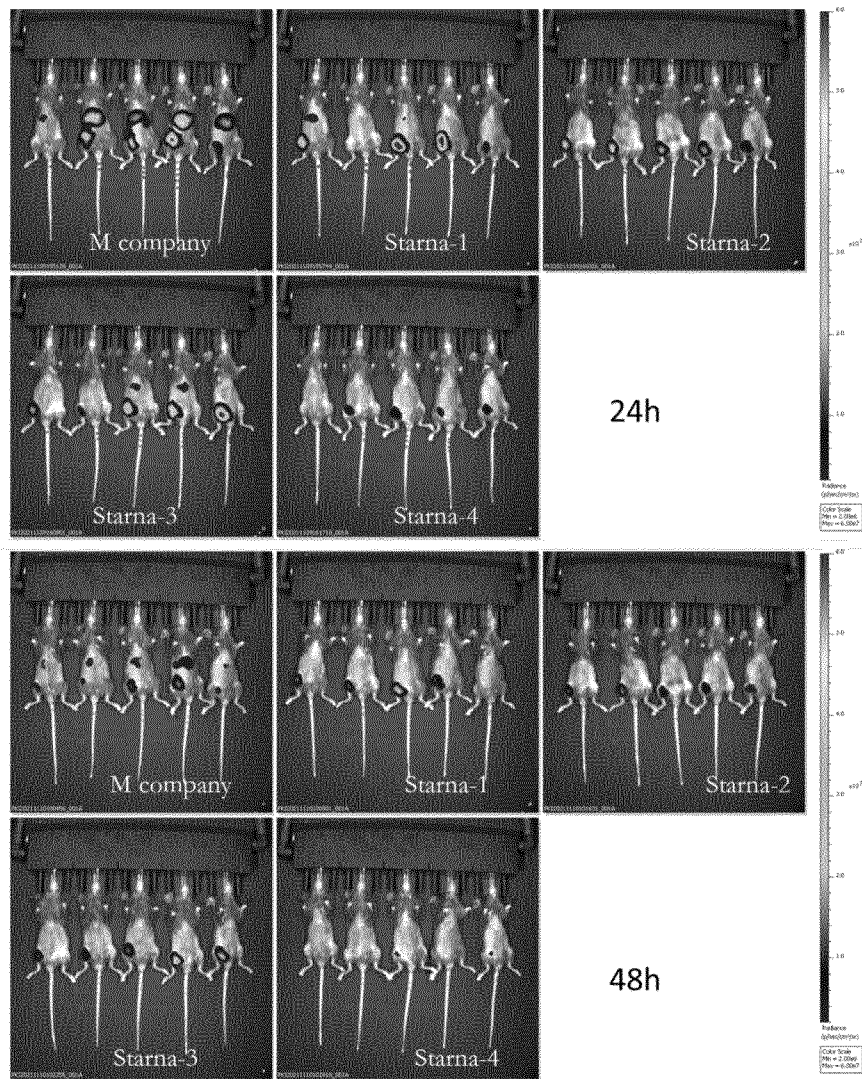


图2

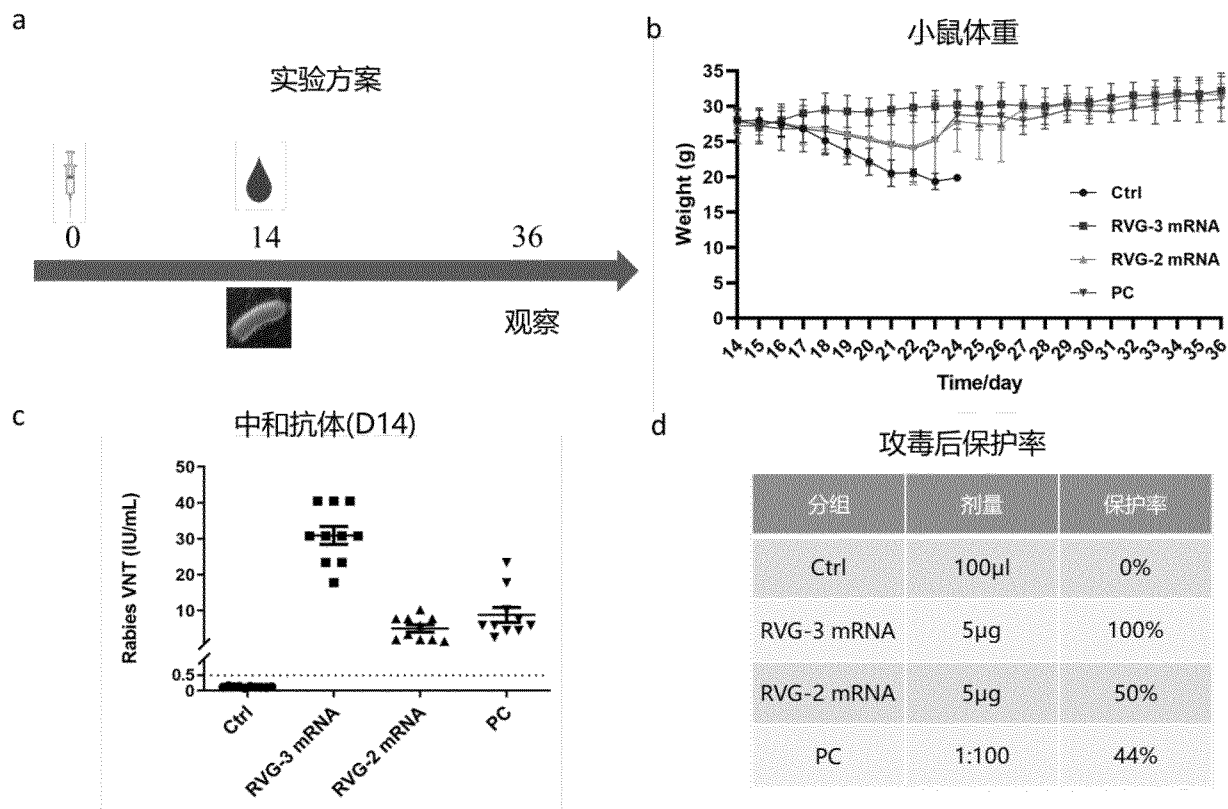


图3

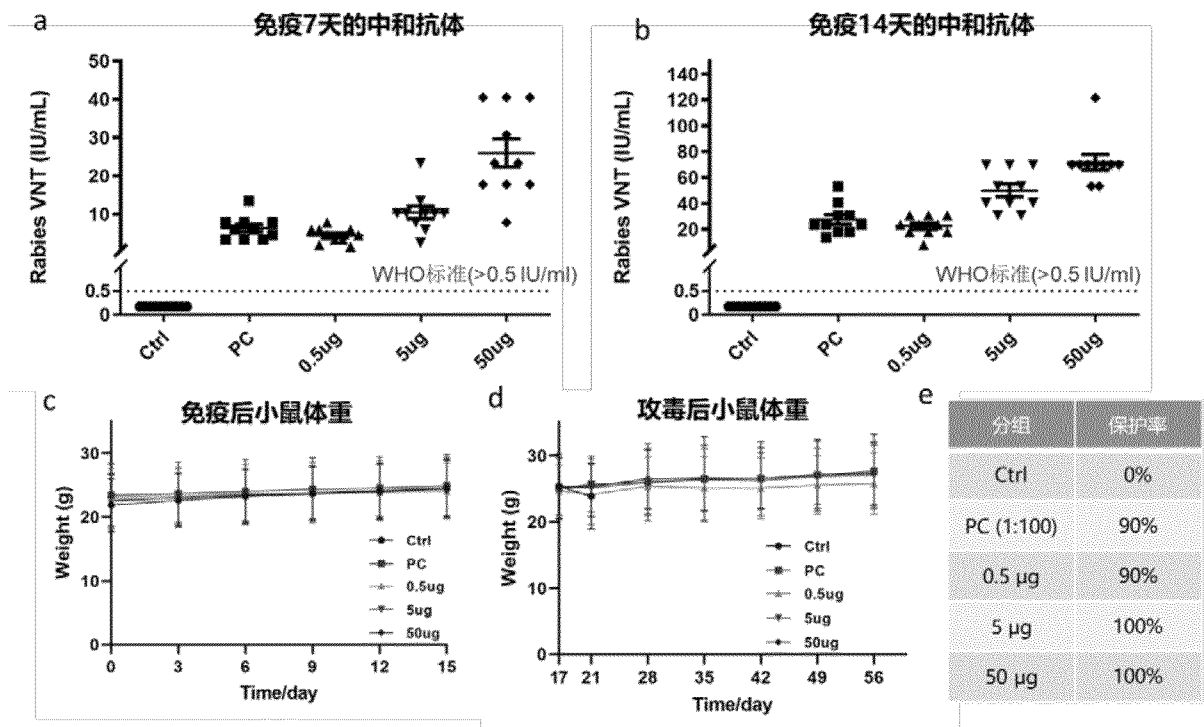


图4

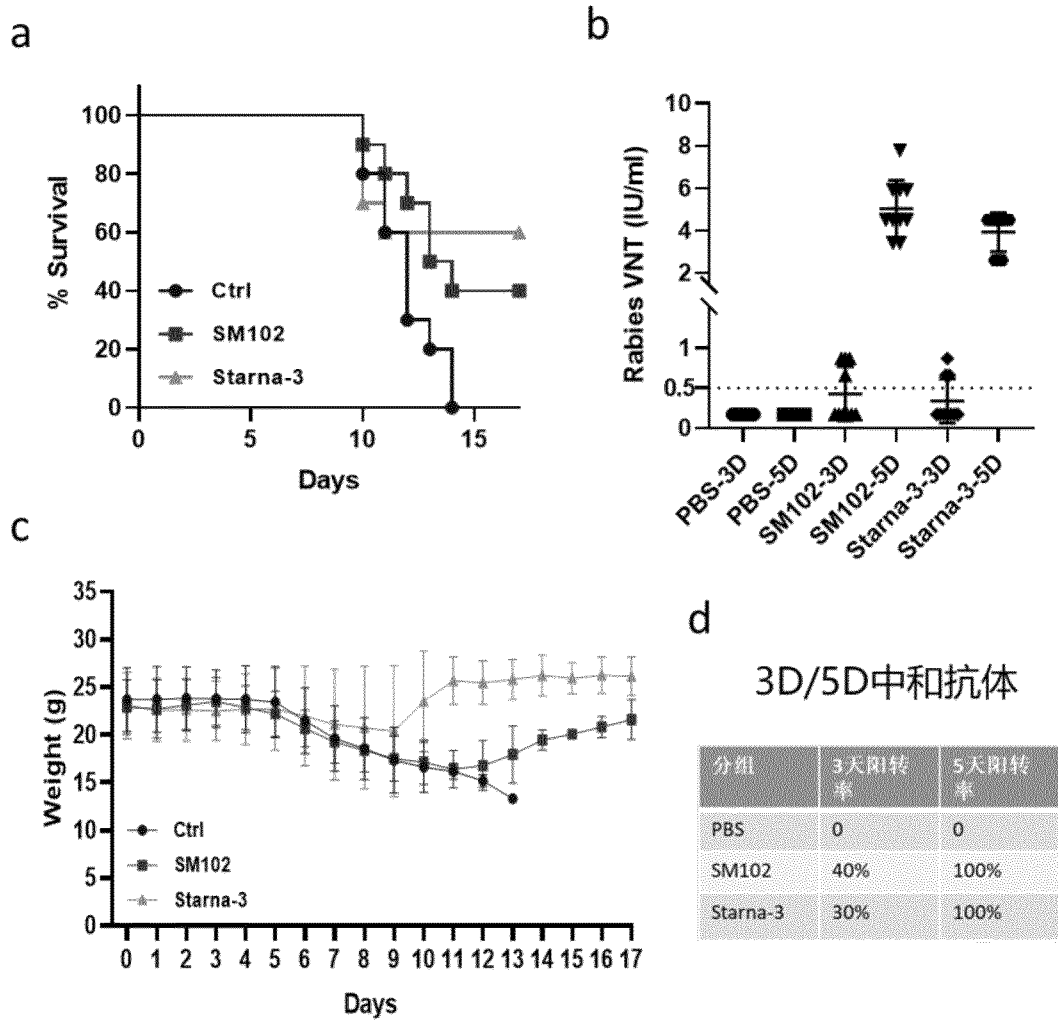


图5