



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119709763 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 28

(21) 申请号 202411868852.2

A61P 1/16 (2006.01)

(22) 申请日 2024.12.18

A61P 11/00 (2006.01)

G07K 14/47 (2006.01)

(71) 申请人 中山大学附属第七医院(深圳)

地址 518107 广东省深圳市光明区新湖街
道圳园路628号

申请人 澳门大学

(72) 发明人 肖芷洁 查高峰 毛晓雯 夏恒

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

专利代理师 方琦琦

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 9/1277 (2025.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

一种预防或治疗恶性肿瘤的mRNA疫苗及其
制备方法与应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种预防或治疗恶性肿瘤的mRNA疫苗及其制备方法与应用。所述mRNA疫苗由编码NID1抗原的核酸分子以及包裹核酸分子的阳离子脂质纳米颗粒构成,该核酸分子或其脂质纳米颗粒递具有良好的免疫原性,能在短时间内诱导机体产生强烈的细胞及体液免疫反应,将该核酸分子或其脂质纳米颗粒递送至体内后能够在机体内表达NID1蛋白,触发机体的免疫反应,能够使机体产生对抗肿瘤的免疫反应,同时,该核酸分子或其脂质纳米颗粒只需要低剂量即可有效抑制肿瘤生长,且制备快速简便,可在短期内实现大规模生产,有利于该药物的产业化以及降低抗肿瘤药物的成本。

1. 一种编码NID1抗原的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子的核苷酸序列如(a)或(b)所示:

(a) 核苷酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示;

(b) 在(a)中的核苷酸序列经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸且具有编码NID1抗原功能的由(a)衍生的核苷酸序列。

2. 如权利要求1所述的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子包括DNA、ASO、siRNA、miRNA、mRNA和适配体中的至少一种。

3. 一种核酸-脂质体复合物,其特征在于,所述核酸-脂质体复合物包括权利要求1或2所述的核酸分子,以及包裹核酸分子的阳离子脂质纳米颗粒。

4. 如权利要求3所述的核酸-脂质体复合物,其特征在于,所述阳离子脂质纳米颗粒与核酸分子的摩尔比为(2-10):1。

5. 如权利要求3所述的核酸-脂质体复合物,其特征在于,所述阳离子脂质纳米颗粒包括以下摩尔百分比的组分:15-49%阳离子脂质、40-50%结构脂质、5-20%辅助脂质和1-5%聚乙二醇化脂质。

6. 如权利要求5所述的核酸-脂质体复合物,其特征在于,所述结构脂质包括胆固醇或其衍生物,所述辅助脂质包括DSPC、DOPE、DOPG和DOPS中的任一种,所述聚乙二醇化脂质包括PEG-DMG或PEG-DSPE。

7. 如权利要求5或6所述的核酸-脂质体复合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和聚乙二醇化脂质溶于有机溶剂中,得到有机相;

S2、将核酸分子溶于溶媒缓冲液中,得到水相;

S3、将有机相和水相充分混匀后得到包裹核酸分子的脂质体混合液,再将存储缓冲液替换混合液中的溶媒缓冲液及有机相中的溶剂,即得到所述核酸-脂质体复合物。

8. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述有机相中阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和聚乙二醇化脂质的总浓度1-30mg/mL,所述水相中核酸分子的浓度为0.2-1.5mg/mL,所述有机相和水相的体积比为1:(2-6)。

9. 如权利要求1或2所述的核酸分子,和/或权利要求3-6任一项所述的核酸-脂质体复合物在制备预防或治疗恶性肿瘤的药物中的应用。

10. 如权利要求9所述的应用,其特征在于,所述药物包括疫苗,所述恶性肿瘤包括肝癌和肺癌。

一种预防或治疗恶性肿瘤的mRNA疫苗及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种预防或治疗恶性肿瘤的mRNA疫苗及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 2019冠状病毒病(COVID-19)的全球大流行使得基于mRNA(信使核糖核酸)技术疫苗的发展和应用获得世界瞩目。这项技术的成熟和进展也赋予了mRNA疫苗在其他领域,尤其是在癌症治疗领域的巨大潜力。医界和科学界都希望mRNA疫苗可以成为下一个对抗癌症,挽救病人生命的治疗手段。肿瘤疫苗通过利用肿瘤相关抗原诱导机体的特异性细胞免疫和体液免疫反应,通过增强自身对肿瘤的抵抗力抑制肿瘤生长,从而达到控制肿瘤的目的。目前肿瘤疫苗可分为4大类:基于肿瘤细胞或者抗原提呈细胞的全细胞疫苗、肿瘤多肽疫苗、基于病毒载体的疫苗和基于核酸的疫苗。其中核酸疫苗又包括了DNA疫苗和RNA疫苗。与其他种类的癌症疫苗相比较,基于mRNA的疫苗具有显著的优势,包括研发生产迅速,更安全,且能诱发产生更高效的免疫反应。主要表现在mRNA疫苗仅瞬时表达肿瘤抗原且不与基因组DNA相互作用,因此减少传统,如病毒载体疫苗和DNA疫苗带来的基因组整合风险。更重要的是,mRNA疫苗可以进行更灵活的组合,编码一种或多种抗原,包括抗原蛋白的全长或者部分多肽段,更易实现多价疫苗的功效,方便灵活选择同时使用多种抗原增强疫苗的效果。与传统灭活疫苗或重组蛋白疫苗相比,mRNA疫苗可以更高效地激活细胞反应达到更好的预防疗效。以上优点使得mRNA肿瘤疫苗具有强大的临床应用前景,成为目前的研究热点。

[0003] 目前大多数mRNA肿瘤疫苗仍处于临床试验阶段,尚未明确疗效。如何设计能诱导特异性肿瘤免疫反应,副作用小且可规模生产的稳定且安全的肿瘤mRNA疫苗,将是决定mRNA疫苗是否能进入临床的关键。目前mRNA疫苗靶向的抗原主要有两类,包括肿瘤相关抗原(Tumor associated antigens,TAAs)和肿瘤特异性抗原(Tumor specific antigens,TSAs)。TAAs主要指在肿瘤中高表达而正常组织低表达的抗原,而TSAs指肿瘤细胞突变产生的新生抗原,仅在肿瘤中表达,具有高度免疫原性。TSAs由于具有高度个体差异,更适合个性化的精准治疗,但由于难以规模化生产导致治疗成本增加,而限制了其普及使用的前景。相反,基于TAA设计的mRNA疫苗制作成本相对较低。然而,由于TAA在正常组织也有表达,所以潜在诱发自身免疫毒性的风险也相应提高。虽然,编码全长抗原序列的mRNA能突破HLA类型的限制,诱导更广泛的T细胞反应,但目前尚未有相关mRNA疫苗获批用于临床。利用mRNA的多抗原结合的优势,同时包含多个TAA序列的mRNA疫苗正在进行临床试验。例如,来自BioNTech的LipoMERIT疫苗联合了包括NY-ESO-1,MAGE-C3,tyrosinase和gp100抗原序列,用于晚期黑色素瘤的治疗。来自CureVac的CV9201疫苗包含了MAGE-C1,MAGE-C2,NY-ESO-1和survivin等多个抗原,用于治疗晚期肺癌。针对不同癌症的预防和治疗,国内外团队正在紧锣密鼓的利用mRNA疫苗技术开展研究,mRNA肿瘤疫苗的应用前景可观。

[0004] 然而,现有抗肿瘤mRNA疫苗存在以下缺点:1)目前获批的或者正处于临床试验阶段的mRNA疫苗所应用的主流LNP系统(DLin-MC3-DMA(MC3),ALC-0315和SM-102)具有稳定性

差,保存条件苛刻等问题。2)以肿瘤特异性抗原为靶点的mRNA疫苗只适合个性化肿瘤疫苗研制,存在成本高,难以规模化生产的缺点。3)以肿瘤相关抗原为靶点的mRNA疫苗生产成本较低,但由于正常组织和细胞也可能含有该相关抗原较低水平的表达,存在诱发自身免疫毒性的风险。4)编码全长抗原序列的mRNA疫苗能更有效的引起T细胞反应,但是目前还没有相关抗肿瘤mRNA疫苗获批上市,安全性还需进一步考证。5)NID1在多种癌症中高表达,并对肿瘤微环境有重要调控作用,前期研究表明是安全且有效的泛癌靶点,但目前仍未有以NID1为抗原靶点的抗肿瘤疫苗上市。

发明内容

[0005] 针对目前抗肿瘤疫苗存在的问题和NID1作为疫苗抗原的前景,本发明以NID1为抗原,提供了一种用于恶性肿瘤预防和治疗mRNA疫苗,该疫苗编码NID1的全长蛋白,只需要低剂量即可有效抑制肿瘤生长或者预防肿瘤生成,安全性好,制备工艺简单。

[0006] 为实现以上目的,本发明所采用的技术方案包括:

[0007] 第一方面,本发明提供一种编码NID1抗原的核酸分子,所述核酸分子的核苷酸序列如(a)或(b)所示:

[0008] (a)核苷酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示;

[0009] (b)在(a)中的核苷酸序列经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸且具有编码NID1抗原功能的由(a)衍生的核苷酸序列。

[0010] 所述核酸分子包含5'-帽结构、5'-UTR、3'-聚核苷酸序列以及3'-UTR中的至少一种。其中,5'-UTR为10-200个核苷酸,优选的50-100个核苷酸;3'-UTR为50-250个核苷酸,优选为100-200个核苷酸;3'-聚核苷酸序列为70-150个A,进一步优选为100-120个A。

[0011] 本发明所述核酸分子能编码全长NID1抗原,具有良好的免疫原性,能在短时间内诱导机体产生强烈的细胞及体液免疫反应,从而达到预防或治疗恶性肿瘤的目的。

[0012] 优选地,所述核酸分子包括DNA、ASO、siRNA、miRNA、mRNA和适配体中的至少一种,更优选地,所述核酸分子为mRNA。

[0013] 第二方面,本发明提供了一种核酸-脂质体复合物,所述核酸-脂质体复合物包括所述的核酸分子,以及包裹核酸分子的阳离子脂质纳米颗粒。

[0014] 优选地,所述阳离子脂质纳米颗粒与核酸分子的摩尔比为(2-10):1。

[0015] 优选地,所述阳离子脂质纳米颗粒包括以下摩尔百分比的组分:15-49%阳离子脂质、40-50%结构脂质、5-20%辅助脂质和1-5%聚乙二醇化脂质。

[0016] 优选地,所述结构脂质包括胆固醇或其衍生物,所述辅助脂质包括DSPC、DOPE、DOPG和DOPS中的任一种,所述聚乙二醇化脂质包括PEG-DMG或PEG-DSPE。

[0017] 更优选地,所述结构脂质为胆固醇,所述辅助脂质为DSPC,所述聚乙二醇化脂质为PEG-DMG。

[0018] 本发明所述包覆核酸分子的阳离子脂质纳米颗粒能确保将编码肿瘤相关抗原的mRNA有效递送至靶细胞,防止其在体内被降解,并且实现瞬时表达肿瘤相关抗原,激活机体的免疫反应,且在一定程度上能促进免疫系统的启动和调节,增强肿瘤免疫治疗的效果。

[0019] 第三方面,本发明提供了所述的核酸-脂质体复合物的制备方法,包括以下步骤:

[0020] S1、将阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和聚乙二醇化脂质溶于有机溶剂中,得到

有机相;

[0021] S2、将核酸分子溶于溶媒缓冲液中,得到水相;

[0022] S3、将有机相和水相充分混匀后得到包裹核酸分子的脂质体混合液,再将存储缓冲液替换混合液中的溶媒缓冲液及有机相中的溶剂,即得到所述核酸-脂质体复合物。

[0023] 优选地,所述有机相中阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和聚乙二醇化脂质的总浓度1-30mg/mL,所述水相中核酸分子的浓度为0.2-1.5mg/mL,所述有机相和水相的体积比为1:(2-6)。

[0024] 更优选地,所述有机相中阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和聚乙二醇化脂质的总浓度15-20mg/mL,有机相和水相的体积比为1:3。

[0025] 优选地,所述有机溶剂包括但不限于乙醇,所述溶媒缓冲液包括但不限于柠檬酸盐缓冲液、醋酸钠溶液,所述存储缓冲液包括但不限于PBS溶液。

[0026] 优选地,替换混合液中的溶媒缓冲液及有机相中的溶剂的方法为:采用稳定的存储缓冲液将包裹核酸的脂质体混合液稀释10-200倍(优选50-100倍)再浓缩,或将包裹核酸的脂质体混合液放置在1000倍体积的稳定存储缓冲液中透析后浓缩,或采用切向流等缓冲液置换技术来将溶媒缓冲液及有机相中的溶剂替换成稳定的存储缓冲液。

[0027] 第四方面,本发明提供了所述的核酸分子,和/或所述的核酸-脂质体复合物在制备预防或治疗恶性肿瘤的药物中的应用。

[0028] 优选地,所述药物包括疫苗,所述恶性肿瘤包括肝癌。

[0029] 本发明利用公开的编码NID1抗原的mRNA核酸分子开发了一种疫苗,以mRNA作为疫苗的主要成分具有研发快速、安全性高、易产业化等优点;以mRNA作为疫苗的主要成分采用体外酶法合成,制备工艺成熟,无需借助细胞来增殖病毒或生产重组蛋白;使用极小剂量即能达到足够的保护效果,在安全性、有效性方面优于现有的其他肿瘤疫苗技术。此外,NID1在多种恶性肿瘤中显著高表达,和现有抗肿瘤mRNA疫苗相比,以NID1为抗原的mRNA疫苗是对肺癌和肝癌都有明显治疗预防效果的疫苗。

[0030] 优选地,所述疫苗的给药方式包括雾化给药、静脉注射、皮下注射、肌肉注射、眼部给药。

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0032] 本发明公开了一种能够有效预防和治疗肿瘤的核酸分子,该核酸分子至少包括一个编码NID1蛋白的核苷酸,或者上述核苷酸的脂质纳米颗粒。该核酸分子或其脂质纳米颗粒递具有良好的免疫原性,能在短时间内诱导机体产生强烈的细胞及体液免疫反应,将该核酸分子或其脂质纳米颗粒递送至体内后能够在机体内表达NID1蛋白,触发机体的免疫反应,能够使机体产生对抗肿瘤的免疫反应。同时,该核酸分子或其脂质纳米颗粒只需要低剂量即可有效抑制肿瘤生长。此外,该核酸分子或其脂质纳米颗粒制备快速简便,可在短期内实现大规模生产,有利于该药物的产业化以及降低抗肿瘤药物的成本。

附图说明

[0033] 图1为mNID1(鼠源)的mRNA序列优化前后序列比对结果图;

[0034] 图2为hNID1(人源)的mRNA序列优化前后序列比对结果图;

[0035] 图3为mRNA疫苗IVT模板质粒图谱;

- [0036] 图4为非修饰与修饰的NID1 mRNA完整结构示意图；
[0037] 图5为NID1 mRNA的琼脂糖凝胶电泳成像结果图；
[0038] 图6为WB检测人工制备的NID1 mRNA在HEK293T细胞中的翻译效率结果图；
[0039] 图7为制备的LNP-mRNA的粒径与分布检测结果图；
[0040] 图8为NID1-mRNA疫苗对治疗肝癌效果的实验流程图；
[0041] 图9为NID1-mRNA疫苗对治疗肝癌的效果图。

具体实施方式

[0042] 为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下参照实施例对本发明作进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0043] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为可通过常规的商业途径购买得到。

[0044] 实施例1. 编码NID1抗原的mRNA的制备

[0045] (1) NID1 mRNA序列优化:

[0046] 当前主流的密码子优化算法主要以优化CAI作为指标,针对异源mRNA序列中密码子和宿主细胞最佳密码子使用频率的相符程度。但密码子并不是影响蛋白表达的唯一因素,特别是通过T7 RNA聚合酶在试管中大量合成mRNA时,除了CAI作为指标外,还要考虑GC含量,二级结构(自由能),T7 RNA聚合酶敏感的转录终止子,mRNA序列内部的类T7 RNA聚合酶启动子和UTR的选择等都会严重影响人工合成mRNA在细胞和体内的表达。

[0047] 本研究采用深圳虹信生物(magicRNA)公司专门针对mRNA序列优化开发的软件平台,其算法注重考虑多因素(GC含量、密码子使用频率和二级结构,转录终止子,类T7 RNA聚合酶启动子规避)平衡,通过magicRNA平台技术对mNID1(鼠源)和hNID1(人源)的序列进行优化后(同时,优化后的序列规避了BsaI酶切位点,以便采用BsaI酶在polyA后的人工设计的BsaI酶切位点处切开质粒获得线性化的IVT模板),其中mNID1的GC含量从55.6%提高到63.4%,CAI从0.91提高到0.98,得到mNID1 mRNA的优化序列NID1_a(SEQ ID NO:1);hNID1的GC含量从57.4%提高到62.95%,CAI从0.80提高到0.98,得到hNID1 mRNA的优化序列NID1_b(SEQ ID NO:2);图1-2分别为mNID1(鼠源)和hNID1(人源)的mRNA序列优化前后序列比对结果图。

[0048] (2) IVT(体外转录)模板质粒的构建:

[0049] 本研究mRNA的UTR序列来自于Morderna新冠COVID-19疫苗(mRNA-1273)的5' UTR(Mod)和3' UTR(Mod),本研究选择先将T7promoter-UTR(Mod)-120A-BsaI串联序列交由金斯瑞公司合成后插入到pUC57载体的HindIII与EcoRI酶切位点之间,得到IVT框架空载体,命名为:pIVT-T7-UTR(Mod)-120A-BsaI,其中各元件的序列如下:

[0050] T7 promoter(启动子序列):5'-TAATACGACTCACTATA-3'(SEQ ID NO:3);

[0051] 5'-UTR(Morderna)序列:

[0052] 5'-GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCC GGCGCCGCCACC-3'(SEQ ID NO:4);

[0053] 3'-UTR(Morderna)序列:

[0054] 5' -CTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCA GCCCCTCCTCCCCTTCCT
GCACCCGTACCCCGTGTCTTTGAATAAAGTCT GAGTGGGCGGTAGC (SEQ ID NO:5);

[0055] polyA(120A) 序列:

[0056] 5'-AAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGAGACC(SEQ ID NO:6)
(其中“TGAGACC”为BsaI酶切位点)。

[0057] 在此基础上,根据无缝克隆原理,本发明设计引物(见表1)将优化后的NID1_a和NID1_b分别插入到IVT框架空载体,获得pIVT-T7-+NID1a-120A-BsaI和pIVT-T7-+NID1b-120A-BsaI质粒(图3),并通过感受态转化和单克隆测序筛选polyA尾长度>110A的菌落并保种,菌种用于放大培养提取IVT模板质粒。

[0058] 表1NID1 mRNA模板质粒构建所需引物

引物名称	引物序列(5'-3')	序列名称
pIVT-Fp	TGATGAGCTGGAGCCTCGGTGGCCTAG	SEQ ID NO: 7
pIVT-Rp	CATGGTGGCGGCGCCGGGGTCTTATATTTC	SEQ ID NO: 8
NID1_a-Fg	GGCGCCGCCACCATGCTGGACGCCAGCGGCT GTTCTTG	SEQ ID NO: 9
NID1_a-Rg	GGCTCCAGCTCATCACTTTCTCTCGATGCAGT CCACGC	SEQ ID NO: 10
NID1_b-Fg	GGCGCCGCCACCATGCTGGCCAGCAGCAGCA GAATCAG	SEQ ID NO: 11
NID1_b-Rg	GGCTCCAGCTCATCACTTCTGCTCGATGCAGT CCACGC	SEQ ID NO: 12

[0060] (3) NID1 mRNA (m1ψ修饰和无修饰Mrna) 的制备:

[0061] 1) 将上一步构建好的pIVT-UTR+NID1 a-120A-BsaI和

[0062] pIVT-UTR+NID1_b-120A-BsaI质粒的菌种放大培养至100mL LB培养基中,然后用Axygen的质粒中抽试剂盒(MD-P-25)进行质粒提取,将质粒通过BsaI限制性内切酶酶切后使用DNA纯化磁珠(诺唯赞)进行线性化质粒的纯化,并溶解于无酶水置于-20℃。

[0063] 2) 体外转录合成RNA(表2):

[0064] 表2体外转录体系(100μL)组分表

[0065]	组分名称	浓度
	10×转录缓冲液	10μL
	NTP (A、G、C、U/ml 中各25mM)	各7.5μL
	DNA模板 (线性化的模板质粒)	终浓度:50ng/μL
	无机焦磷酸酶 (10μM)	5.0μL
	RNA酶抑制剂 (U/μL)	3.0μL
	T7 RNA聚合酶 (50U/μL)	10.0μL
	补充无酶H ₂ O	至总体积100μL

[0066] 轻弹混匀后置于37℃反应1小时,加入75μL的Dnase I在37℃消除DNA半小时,中间取出混匀一次,然后加入等体积的无酶水混匀后,再加入1.8倍体积的RNA纯化磁珠(诺唯赞)对合成好的RNA进行纯化。

[0067] 3) RNA加帽反应(10mL加帽反应体系):

[0068] 取5.0mg上一步合成的RNA,补充无酶H₂O至总体积7.0mL,混匀后置于70℃热变性5分钟后立刻置于冰上5分钟;然后加入1.0mL的10×加帽缓冲液;0.5mL的GTP(10mM),0.5mL SAM(4mM)0.5mL的牛痘病毒加帽酶(Cap0);0.5mL的2'-O-甲基转移酶(Cap1);混匀后37℃反应30分钟,每隔10分钟取出轻轻颠倒混匀一次。加帽反应结束后,最后加入0.5倍体积的RNA纯化磁珠(诺唯赞)进行RNA纯化。

[0069] 4) Oligo(dT)25亲和填料(Thermo)纯化去除转录中断和降解的RNA产物,提高mRNA产物的纯度和均一性。

[0070] 5) RNA质量检测:

[0071] 首先,通过Nano-drop紫外分光光度计对4个NID1 mRNA(m1ψ修饰或天然无修饰的NID1_a和NID1_b mRNA)的浓度进行测定,并通过OD280/260和OD260/230的数值来判断mRNA的纯度;其次,通过琼脂糖凝胶电泳检测mRNA的完整性以及大小是否正确,具体步骤为:将1.0μg mRNA样品用5μL无酶水稀释后加入等体积的2×RNA loading buffer混匀后,85℃加热变性2分钟后立刻置于冰上2分钟,然后在浓度为1.5%的琼脂糖凝胶中通过100V电泳30min,使用RNA marker(Thermo, SM1821)来指示样品RNA大小,紫外凝胶成像结果见图5。

[0072] 6) mRNA候选疫苗在细胞水平的翻译效率筛选:

[0073] mRNA转染细胞前24小时,将293T细胞铺于24孔板中,然后按照每孔0.5μg mRNA+1.5μL lip3000转染试剂的比例进行细胞转染操作,24小时后收集;细胞样品通过细胞裂解液裂解后,离心收集裂解液上清,加入5×SDS loading buffer,然后在98℃变性5分钟后进行Western-blot实验,一抗为NID1单克隆抗体(Abcam),通过ECL化学发光检测来判断4个mRNA分别在293T细胞中的表达水平(图6)。本发明从人源和鼠源NID1 mRNA中各筛选出一条翻译表达更好的mRNA来进行LNP纳米颗粒包裹和动物实验。

[0074] 实施例2. LNP-mRNA脂质体纳米颗粒的包裹与鉴定

[0075] (1) 脂质体纳米颗粒的制备:

[0076] 先将可离子化脂质(专利号:CN202111017566.1)与结构脂质(胆固醇)、辅助脂质(DSPC)、聚乙二醇化脂质(PEG2000-DMG)按摩尔比:44.2:9.9:44.2:1.7溶解在无水乙醇中(有机相),然后使用微流控制备系统(迈安纳, INano E)将溶解有脂质体的有机相和溶解有mRNA的25mM柠檬酸钠溶液(水相)以1:3的体积比在微流控芯片中混合,混合流速为12mL/h,制得脂质纳米颗粒的粗溶液。再将所得溶液用PBS进行稀释,并用15mL或50mL超滤离心管(Millipore, 100K)在4℃下以1500rcf的转速超滤20min,共超滤3次,最终使可离子化脂质与mRNA的摩尔比约为5:1。

[0077] (2) 脂质纳米颗粒的表征:

[0078] 粒径、PDI及电位的表征:所制备的脂质纳米颗粒的粒径和PDI通过Nano-ZSZEN3600(Malvern)测定。取制备的LNP-mRNA脂质体纳米颗粒用PBS溶液稀释100倍进行粒径或电位测量,稳定时间120s,循环3次,每次循环10次。测试结果表明所制备的LNP-NID1_a mRNA和LNP-NID1_b mRNA纳米颗粒的粒径分别为82.83nm和84.27nm, PDI小于0.1(图7),测

得电位在0.5mV左右。

[0079] 包封率测定:参照Quant-iT RiboGreen RNA试剂盒标准规程进行测定,分别检测x-100破乳前后的mRNA浓度,计算可得LNP包封率,大致过程为:分别往2 μ L超滤后的LNP-mRNA样品加入498 μ L 1 $\times$ TE和498 μ L 2%浓度Triton-100溶液,加入发光液后用酶标仪分析吸光度,并根据标准曲线计算mRNA浓度。结果显示所制备的LNP-NID1_a mRNA和LNP-NID1_b mRNA样品的包封率分别为93.6%和94.6%, $R^2>0.99$ 。

[0080] 实施例3.验证mRNA疫苗作用效果的动物实验

[0081] 选取检疫合格与体重达标的SPF级C57BL/6小鼠(6-8w,体重为16-20g),建立肝癌原位瘤模型。肝癌原位接种具体如下:小鼠麻醉后,取仰卧位,固定于实验板上,剃毛碘伏消毒皮肤,剑突下沿腹中线纵行切口,逐层剪开皮肤和腹膜,充分暴露肝左叶。用50 μ L微量注射器抽取50 μ L含 1×10^5 1753p53-/-cMyc细胞悬液,20°角刺入肝脏实质约0.5cm缓慢注入细胞悬液,停留片刻,注射完毕拔出针头,立即用棉棒轻压针孔至肝脏表面不再渗血,逐层关腹。术后继续饲养,自由进食、进水。分组:雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组(PBS)和NID1-mRNA疫苗治疗组,每组数量5只。当原位瘤模型经生物荧光确认模型建立成功后(第7天),第7和14天分别给予PBS或疫苗处理,即通过肌注(IM)向每只小鼠注射50 μ L(LNP-mRNA)疫苗,各疫苗分别含1 μ g、5 μ g或10 μ gNID1-mRNA疫苗。定期观察C57BL/6小鼠的精神、饮食、排便、体重和活动等情况,每周测量原位瘤生物信号,并检查小鼠生存期。于第21天,实验结束(见图8)。

[0082] 结果显示,只需1 μ g NID1-mRNA疫苗即可延长肝癌小鼠生存期,与1 μ gNID1-mRNA疫苗相比,5 μ g疫苗更显著抑制肝癌肿瘤生长,在安全性方面,高达10 μ g的NID1-mRNA疫苗对小鼠体重也没有明显影响(见图9)。以上实验证明低剂量的NID1-mRNA疫苗即能显著延长荷瘤小鼠生存率,有效抑制肿瘤生长,而高剂量的疫苗仍具有较好的安全性。

[0083] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

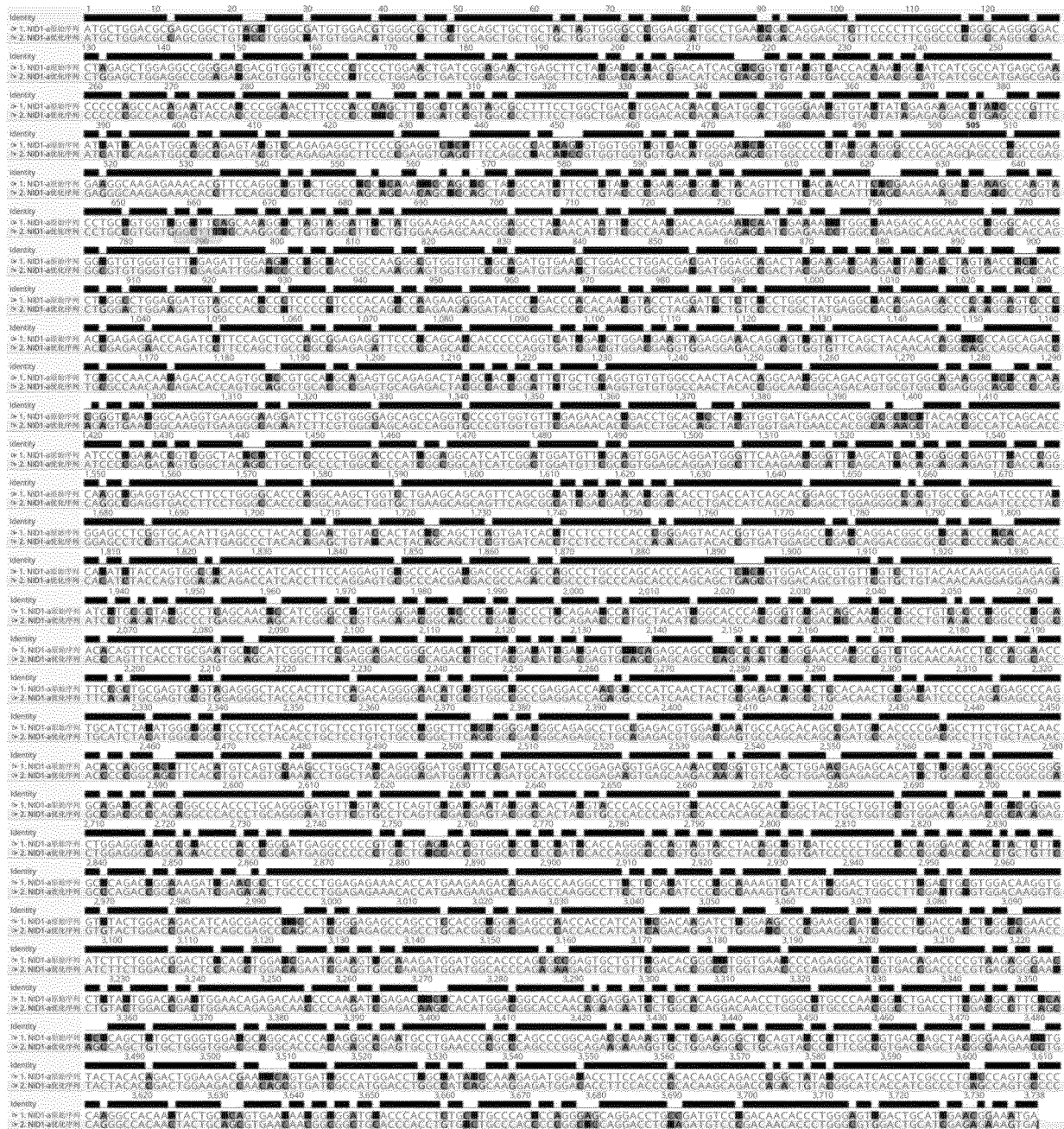


图1



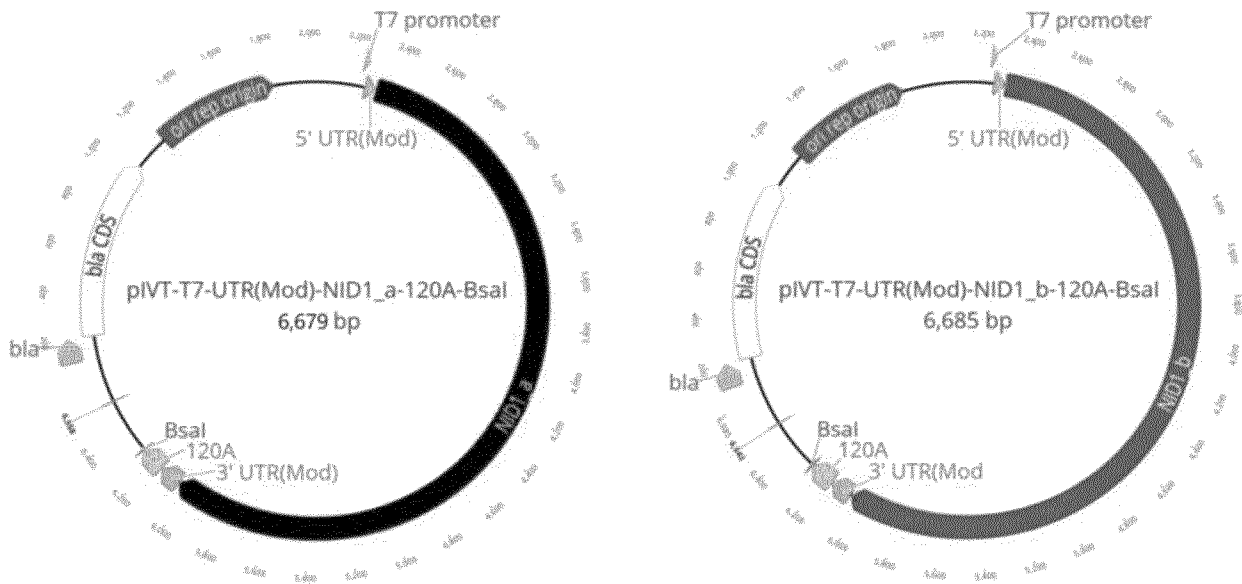


图3

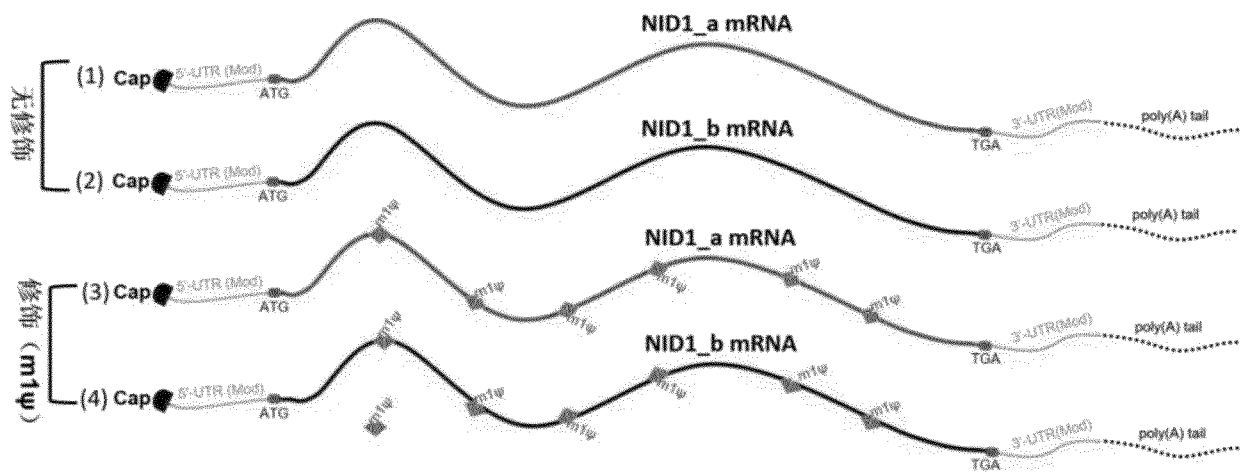


图4

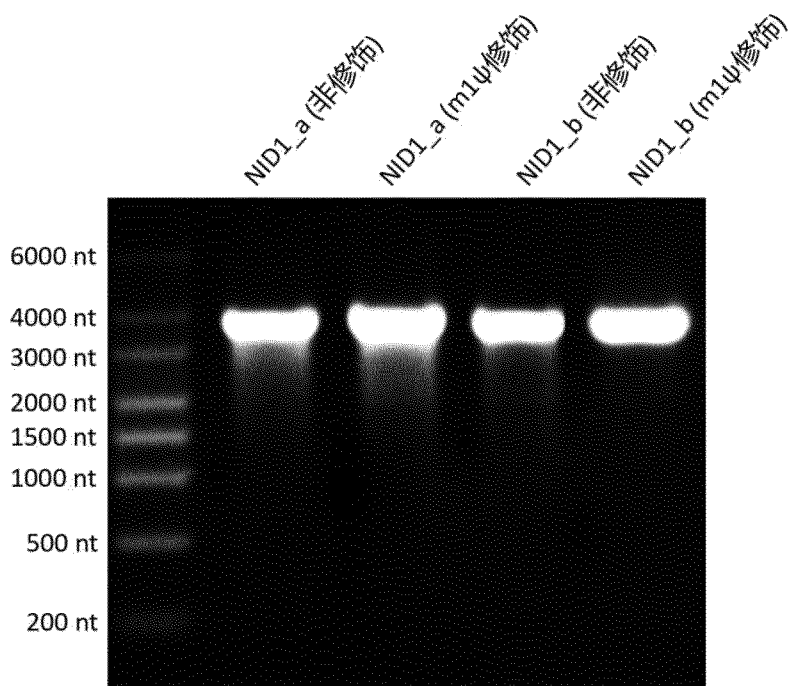


图5

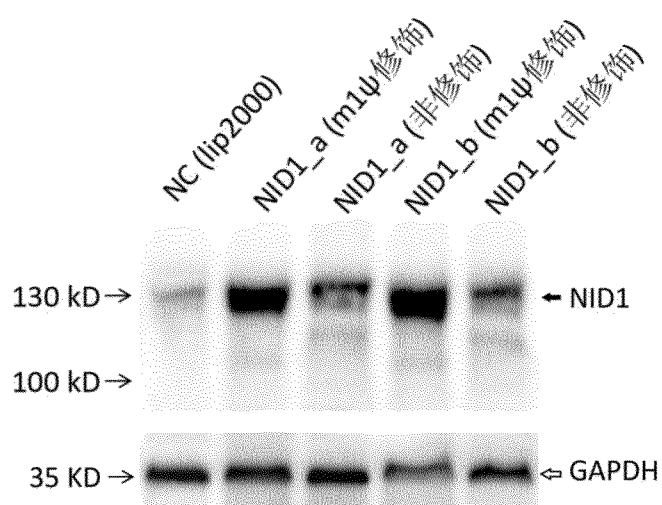
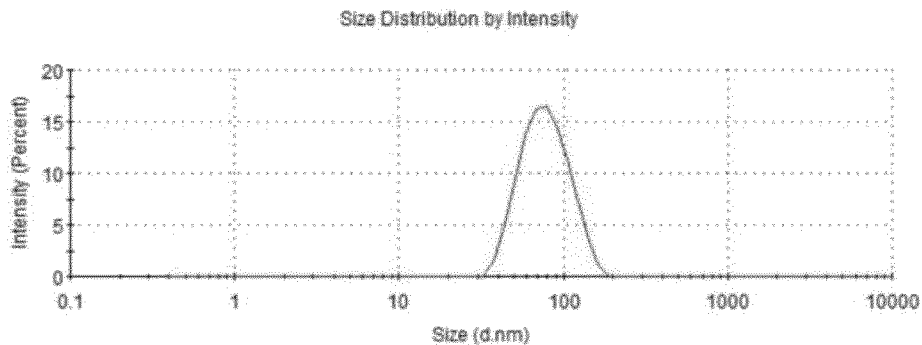


图6

(A)

LNP-NID1_a mRNA

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 82.83	Peak 1: 80.46	100.0	26.17
Pdl: 0.090	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.961	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



(B)

LNP-NID1_b mRNA

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 84.27	Peak 1: 80.74	100.0	23.96
Pdl: 0.074	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.965	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			

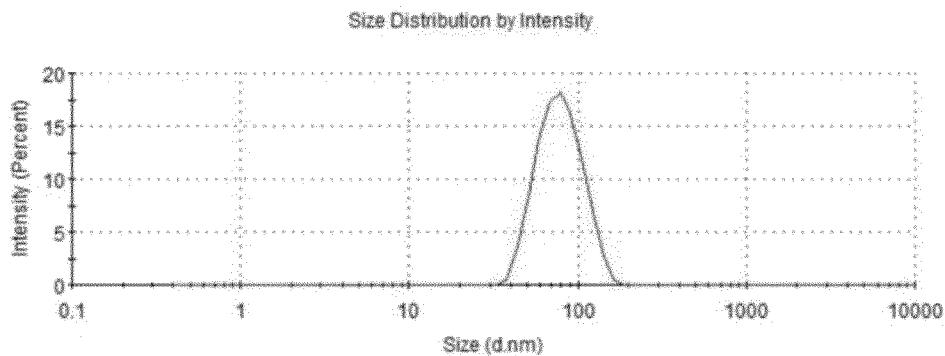


图7

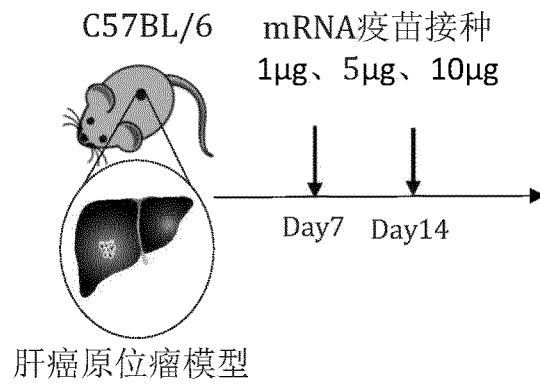


图8

疫苗接种后第一周活体成像

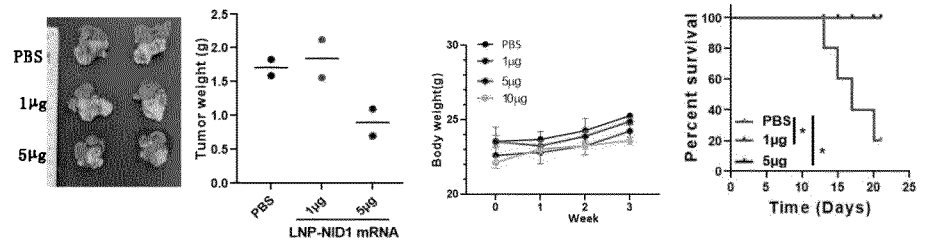
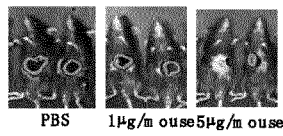


图9