



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118620085 B

(45) 授权公告日 2025.02.25

(21) 申请号 202410611267.8

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2024.05.16

C12N 15/85 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 5/10 (2006.01)

申请公布号 CN 118620085 A

A61K 39/12 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.09.10

A61K 47/68 (2017.01)

(73) 专利权人 南京澄实生物医药科技有限公司

A61K 38/53 (2006.01)

地址 210000 江苏省南京市江北新区探秘

A61P 31/12 (2006.01)

路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

(56) 对比文件

(72) 发明人 韩悌云 徐实 李静

CN 114072157 A, 2022.02.18

WO 2023202280 A1, 2023.10.26

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

审查员 李艳丽

公司 11245

专利代理师 陆惠中

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书18页

C12N 9/00 (2006.01)

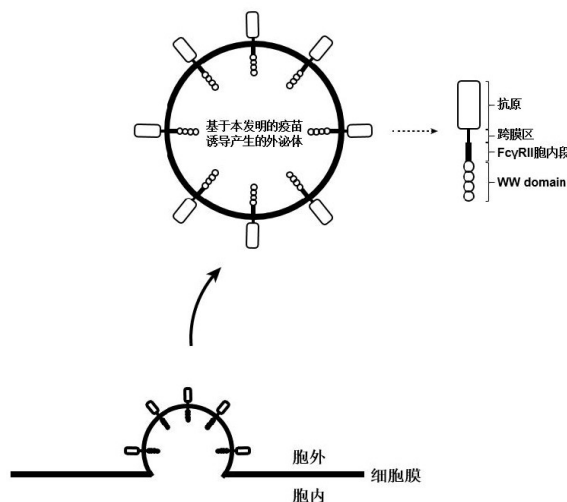
序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

一种可促使细胞膜固定蛋白分泌的融合蛋白、重组疫苗及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种疫苗架构融合蛋白、重组疫苗及其应用等。本发明的融合蛋白包含低亲和力和免疫球蛋白 γ Fc区受体II (Fc γ RII) 的胞内段和E3泛素蛋白连接酶Nedd4家族成员蛋白的WW结构域(WW domain), 和/或一种或多种抗原, 和/或一种或多种跨膜区。本发明提供了一种全新的重组疫苗分子架构, 具备更优的促进免疫抗原表达、分泌的能力, 提高免疫水平的效果, 为重组疫苗的设计方案提供了新思路和新方法, 可广泛的用于疫苗领域。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,从N端到C端依次包含信号肽、靶标抗原、跨膜区、Fc γ RII 胞内段、E3 泛素蛋白连接酶 Nedd4 家族成员蛋白 WW 结构域;其中,跨膜区、Fc γ RII 胞内段、E3 泛素蛋白连接酶 Nedd4家族成员蛋白 WW 结构域之间以 linker 序列相连。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述抗原为病原体的膜蛋白或分泌蛋白的完整序列或部分含有免疫表位的序列。

3. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于,所述病原体的膜蛋白或分泌蛋白为禽流感的HA蛋白或BVDV(牛病毒性腹泻病毒)的E2蛋白的全长序列。

4. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述抗原为禽流感H9N2的HA蛋白,或BVDV(牛病毒性腹泻病毒)的E2蛋白,或禽流感H1N1的HA蛋白。

5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其特征在于,所述禽流感H9N2的HA蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,所述BVDV的E2蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述禽流感H1N1的HA蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

6. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述跨膜区选自抗原序列自有跨膜基序,或截选自其他膜蛋白的跨膜基序。

7. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于,所述截选自其他膜蛋白的跨膜基序来自于任意物种的CD80蛋白。

8. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于,所述自有跨膜基序的氨基酸序列如SEQ ID NO:13。

9. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其特征在于,所述CD80蛋白的跨膜基序的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

10. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述Fc γ RII胞内段选自细胞质区域的全长序列。

11. 根据权利要求10所述的融合蛋白,其特征在于,所述Fc γ RII胞内段来源于小鼠或豚鼠或人。

12. 根据权利要求11所述的融合蛋白,其特征在于,所述来源于小鼠的Fc γ RII胞内段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,或者来源于豚鼠的Fc γ RII胞内段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,或者所述Fc γ RII胞内段来源于人Fc γ RIIa,所述人Fc γ RIIa胞内段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示。

13. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述WW结构域位于细胞质一侧,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

14. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述linker序列如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示。

15. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白从N端至C端依次包含以下元件:

(1) 所述信号肽;所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14所示;

(2) 所述抗原;所述抗原为氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的禽流感H9N2的HA蛋白,或氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示BVDV的E2蛋白,或氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示禽流感H1N1的HA蛋白;

(3) 所述跨膜区;所述跨膜区包含跨膜基序,所述跨膜基序是抗原序列自有跨膜基序,

或是来自于CD80蛋白的跨膜基序;所述CD80蛋白的跨膜基序的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;

(4)所述Fc γ RII胞内段;所述Fc γ RII的胞内段是来源于小鼠的Fc γ RII的胞内段,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,或者是来源于豚鼠的Fc γ RII的胞内段,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示;

(5)所述WW结构域;所述WW结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示;

其中,跨膜区、Fc γ RII 胞内段、WW结构域之间以 linker 序列相连。

16.根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白为:从N端到C端包含如下元件:氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的信号肽,氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示的靶标抗原2,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的跨膜区,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的豚鼠Fc γ RII胞内段,氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示的WW结构域;其中,跨膜区、Fc γ RII 胞内段、WW 结构域之间以 linker 序列相连。

17.一种重组核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-16任一项所述的融合蛋白。

18.一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求17所述的重组核酸分子。

19.根据权利要求18所述的重组基因表达盒,其特征在于,从5' 端到3' 端依次包含以下元件:启动子,5' UTR,编码信号肽核酸,抗原核酸序列,编码所述跨膜区的核酸序列,编码所述Fc γ RII胞内段的核酸序列,编码所述WW结构域的核酸序列,3' UTR,PolyA尾序列;其中,编码跨膜区的核酸序列、编码Fc γ RII 胞内段的核酸序列、编码WW 结构域的核酸序列之间以 linker 序列相连。

20.一种重组载体,其特征在于,包含权利要求17所述重组核酸分子或权利要求18或19所述重组基因表达盒。

21.一种重组宿主细胞,其特征在于,包含权利要求17所述重组核酸分子、或权利要求18或19所述重组基因表达盒、或权利要求20所述重组载体。

22.一种药物组合物,其特征在于,包含一种或多种权利要求1-16任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求17所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求18或19所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求20所述重组载体,和/或一种或多种权利要求21所述重组宿主细胞。

23.根据权利要求22所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

24.一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种权利要求1-16任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求17所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求18或19所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求20所述重组载体,和/或一种或多种权利要求21所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求22或23所述药物组合物。

一种可促使细胞膜固定蛋白分泌的融合蛋白、重组疫苗及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,特别是体液免疫领域,具体涉及一种包含Fc γ RII胞内段以及Nedd4 WW结构域的体液免疫疫苗分子架构及其应用。

背景技术

[0002] 体液免疫(Humoral immunity)是免疫系统的重要组成部分,主要由B细胞介导调控。当机体受到病原体(如细菌、病毒)入侵时,抗原被B细胞表面的受体(BCR)识别、内化,在细胞内降解成肽段呈递给辅助T细胞。活化的辅助T细胞向B细胞提供共刺激信号,促进B细胞增殖分化产生大量针对该抗原的抗体。这些抗体可通过中和、沉淀、激活补体、操纵杀伤细胞等作用清除病原体。同时,少量B细胞分化为记忆B细胞,为机体提供长期免疫保护。

[0003] 体液免疫疫苗是指能够诱导机体产生体液免疫应答的疫苗,是预防性疫苗的主要类型。传统的体液免疫疫苗包括灭活疫苗、减毒活疫苗和重组蛋白疫苗等,通过疫苗中的抗原分子刺激机体产生针对性抗体。近年来,核酸疫苗作为一种新型体液免疫疫苗展现出巨大的发展潜力。

[0004] 核酸疫苗是指携带病毒抗原基因的DNA或mRNA分子疫苗。这些核酸分子在体内表达后,产生的抗原蛋白可诱发体液和细胞免疫应答。与传统疫苗相比,核酸疫苗具有安全性好、易于大规模制备、可快速针对新型病毒设计等优势,在病原体感染类疾病的预防和治疗过程中具有广阔的应用前景。

[0005] 外源膜蛋白和分泌蛋白是重要的体液免疫抗原种类。但常规的体液免疫核酸疫苗往往难以高效表达这些靶标蛋白,且靶标蛋白无法充分呈现到细胞外,被B细胞受体有效识别的概率较低,因此只能诱导机体产生较低水平的抗体,免疫保护作用有限。因此,提高体液免疫抗原的表达水平,并将其有效呈递到B细胞富集的免疫器官或生发中心,是提升此类疫苗免疫原性的关键一步。

[0006] 外泌体(Exosomes)是活细胞产生并分泌到胞外的一种囊泡(Extracellular Vesicles, EVs),其大小为30-160nm,具有和细胞膜一样双层膜结构,参与细胞间的分子传递。几乎所有细胞都可以产生外泌体,目前已有研究利用外泌体的特性进行人工改造,使外泌体能够应用于药物递送领域。例如,现有技术中国专利CN115708871A(公开日2023-02-24)和CN115737796A(2023-03-07),公开了一种将抗原呈现到EVs表面的方法。该方法将抗原融合到CD63蛋白的胞外域中,使含有CD63的EVs出芽时携带抗原,诱导机体产生免疫反应。但由于携带CD63的EVs大部分定位于细胞内,能够分泌到胞外的数量有限,因而诱导的体液免疫并非最佳水平。此外,该方法将抗原融合到CD63的两个跨膜区之间,可能会影响抗原蛋白的构象,阻碍构象表位发挥作用。

[0007] Arrestin Domain Containing 1 (ARRDC1)介导的蛋白质内吞运输能够形成微囊泡,通常与G蛋白偶联受体内化相关,在调控多种膜蛋白如受体、转运体及离子通道等的内化循环中发挥作用。目前已有研究利用该蛋白产生重组外泌体,如美国专利US11730823B2

公开了一种方法,能够将RNA载入由ARRDC1介导的微囊泡(ARMM)中。该方法将RNA结合蛋白融合到ARRDC1蛋白的C端,从而将特定的RNA载入ARMM中,成为RNA药物载体。由于ARRDC1分子量较大,且主要和细胞内吞、内化途径相关,已被许多研究证明不利于抗原在膜表面的呈现,因而无法应用于体液免疫疫苗开发。

[0008] 部分E3泛素蛋白连接酶Nedd4家族成员蛋白的C端含有WW结构域,由WW1、WW2、WW3、WW4四个元件组成。Nedd4是最初在早期小鼠胚胎中枢神经系统中发现高度表达的一种基因。随后,NEDD4类似蛋白家族在人类被确定包括7个成员。NEDD4和NEDD4L蛋白包括多种功能结构域,包括钙依赖的磷脂和膜结合结构域(C2 domain),两种到四种蛋白结合结构域(WW结构域),以及一种E3泛素-蛋白连接酶结构域(HECT结构域)。专利US20190374506A1(公开日2019-12-12)公开了一种治疗癌症的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用有效量的抑制神经前体细胞表达的发育下调蛋白4(NEDD4)的表达或活性的药剂,以及抑制WW结构域蛋白1(WWP1)的表达或活性的试剂。低亲和力免疫球蛋白 γ Fc区受体II(Fc γ RII)是一种在人体细胞表面广泛表达的受体,属于免疫球蛋白G(IgG)Fc区受体家族,主要负责调节免疫细胞的活化和抑制。Fc γ RII是一种跨膜蛋白,由细胞外区域、跨膜区和细胞内区域组成。已有研究将其细胞外区域与靶蛋白融合,如专利WO2022158836A1(公开日2022-07-28)公开了一种重组外泌体,包含与靶蛋白或肽可融合的Fc受体胞外段或其部分,其中Fc受体包括Fc γ RII。专利CN116782932A(公开日2023-09-19)公开了一种胞外囊泡的组合物,包含融合Fc受体胞外段的靶点蛋白,其中Fc受体包括Fc γ RII。但现有技术尚未有研究公开Fc γ RII胞内段和外泌体相关的内容。

[0009] 因此,本领域仍然亟需一种更有利于细胞膜固定蛋白分泌的新的融合抗原架构,以及相应构建的重组疫苗,在不破坏体液免疫抗原构象的前提下,达到更优的促进体液免疫抗原表达、分泌的能力,提高体液免疫水平的效果。

发明内容

[0010] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种体液免疫疫苗架构融合蛋白、重组疫苗等。本发明的融合蛋白包含,低亲和力免疫球蛋白 γ Fc区受体II(Fc γ RII)的胞内段,E3泛素蛋白连接酶Nedd4家族成员蛋白的WW结构域(WW domain),和/或一种或多种抗原,和/或一种或多种跨膜区。本发明提供了一种全新的重组疫苗分子架构,具备更优的促进体液免疫抗原表达、分泌的能力,提高体液免疫水平的效果,为重组疫苗的设计方案提供了新思路和新方法,可广泛的用于体液免疫疫苗领域。本发明还提供相应的重组核酸、基因表达盒、载体、宿主细胞、药物组合物、疫苗、制药用途、应用方法等。

[0011] 本发明的一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,包含以下元件:

[0012] (a) 低亲和力免疫球蛋白 γ Fc区受体II(Fc γ RII)的胞内段;和

[0013] (b) E3泛素蛋白连接酶Nedd4家族成员蛋白的WW结构域(WW domain)。

[0014] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白还包含(c)一种或多种抗原;优选地,所述抗原为体液免疫蛋白的完整序列或部分含有体液免疫表位的序列;更优选地,所述体液免疫蛋白为病原体的膜蛋白或分泌蛋白;最优选地,所述病原体的膜蛋白或分泌蛋白为禽流感的HA蛋白或BVDV(牛病毒性腹泻病毒)的E2蛋白的部分或全长序列。

[0015] 进一步地,其特征在于,所述抗原为禽流感H9N2的HA蛋白,BVDV(牛病毒性腹泻病

毒)的E2蛋白,或禽流感H1N1的HA蛋白;优选地,所述禽流感H9N2的HA蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,所述BVDV的E2蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述禽流感H1N1的HA蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0016] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白还包含(d)一种或多种跨膜区;优选地,所述跨膜区可以是抗原序列自有跨膜基序,或截选自其他膜蛋白的跨膜基序;更优选地,所述截选自其他膜蛋白的跨膜基序来自于任意物种的CD80蛋白;最优选地,所述CD80蛋白的跨膜基序的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,所述自有跨膜基序的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示。

[0017] 进一步地,其特征在于,Fc γ RII的胞内段可以是细胞质区域的全长或部分序列;优选地,所述Fc γ RII的胞内段来源于小鼠或豚鼠或人;更优选地,来源于小鼠的Fc γ RII的胞内段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,或者来源于豚鼠的Fc γ RII的胞内段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,或者所述Fc γ RII的胞内段来源于人Fc γ RIIa,所述人Fc γ RIIa的胞内段氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示。

[0018] 进一步地,其特征在于,所述WW domain位于细胞质一侧,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

[0019] 进一步地,其特征在于,构成元件的各部分可以任选地通过接头(linker)序列间隔开;优选地,所述linker序列如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示。

[0020] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白从N端至C端依次包含以下元件:

[0021] (1)所述抗原;优选地,所述抗原为氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的禽流感H9N2的HA蛋白,氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示BVDV的E2蛋白,或氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示禽流感H1N1的HA蛋白;

[0022] (2)所述跨膜区;优选地,所述跨膜区包含跨膜基序,所述跨膜基序是抗原序列自有跨膜基序,或是来自于任意物种的CD80蛋白;更优选地,所述CD80蛋白的跨膜基序的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;

[0023] (3)所述Fc γ RII的胞内段;优选地,所述Fc γ RII的胞内段是来源于小鼠的Fc γ RII的胞内段,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,或者是来源于豚鼠的Fc γ RII的胞内段,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。

[0024] (4)所述WW domain;优选地,所述WW domain的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

[0025] 其中,构成(1- (4))元件的各部分可以任选地通过接头(linker)序列间隔开,优选地,所述linker序列如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示。

[0026] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白还包含信号肽序列;优选地,所述信号肽序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14所示。

[0027] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白为以下的任一种:

[0028] (A)从N端到C端包含如下元件:氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示的靶标抗原1,氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的小鼠Fc γ RII胞内段,,氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示的WW domain;

[0029] (B)从N端到C端包含如下元件:氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示的靶标抗原1,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的豚鼠Fc γ RII胞内段,氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示的WW domain;

[0030] (C)氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的信号肽,氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示的靶标抗原2,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的跨膜区,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的豚鼠Fc γ RII胞内段,氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示的WW domain;

[0031] 所述元件的各部分可以任选地通过接头(linker)序列间隔开。

[0032] 本发明的另一方面提供一种重组核酸分子,其特征在于,编码本发明所述的融合蛋白。

[0033] 本发明的另一方面提供一种重组基因表达盒,其特征在于,包含本发明所述的重组核酸分子。

[0034] 进一步地,其特征在于,所述重组基因表达盒从5'端到3'端依次包含以下元件:启动子,5' UTR,编码信号肽核酸,抗原核酸序列,所述跨膜区,所述Fc γ RII的胞内段,所述WW domain,3' UTR,PolyA尾序列;其中,所述元件的各部分可以任选地通过接头(linker)序列间隔开。

[0035] 本发明的另一方面提供一种重组载体,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子或所述重组基因表达盒。

[0036] 本发明的另一方面提供一种重组宿主细胞,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或所述重组基因表达盒、或所述重组载体。

[0037] 本发明的另一方面提供一种药物组合物,其特征在于,包含一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞。

[0038] 进一步地,其特征在于,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0039] 本发明的另一方面提供一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞。

[0040] 本发明的另一方面提供一种用于促进融合蛋白以外泌体形式分泌到细胞外的方法,其特征在于,该方法包括向细胞和/或其他生物体施用一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗;优选地,所述方法是非治疗和诊断目的的。

[0041] 本发明的另一方面提供一种用于提高体液免疫抗原免疫原性的方法,其特征在于,该方法包括向细胞和/或其他免疫生物体施用一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗;优选地,所述方法是非治疗和诊断目的的。

[0042] 本发明的另一方面提供一种用于刺激或活化B细胞的方法,其特征在于,该方法包括向细胞和/或其他免疫生物体施用一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发

明所述重组疫苗;优选地,所述方法是非治疗和诊断目的的。

[0043] 本发明的另一方面提供一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗在以下任一项中的用途:

[0044] (a) 制备用于促进抗原以外泌体形式分泌到细胞外的药物;

[0045] (b) 制备用于提高抗原体液免疫原性的药物;

[0046] (c) 制备用于刺激或激活生物体内B细胞的药物;或

[0047] (d) 制备用于治疗、接种疫苗或生物免疫的药物。

[0048] 进一步地,其特征在于,所述药物为用于预防和/或治疗病毒感染疾病的药物;优选地,所述病毒包括流感病毒,腹泻病毒,疱疹病毒,EB病毒,肝炎病毒,或HPV病毒;更优选地,所述流感病毒为禽流感病毒,所述腹泻病毒为病毒性腹泻病毒;最优选地,所述禽流感病毒为禽流感H9N2或H1N1,所述病毒性腹泻病毒为BVDV。

[0049] 本发明的可促使细胞膜固定蛋白分泌的融合蛋白、重组疫苗等具有如下有益技术效果:

[0050] 1. 本发明所述的融合分子架构的设计思路是将体液免疫抗原以外泌体形式表达、分泌到胞外,其关键元件为低亲和力免疫球蛋白 γ Fc区受体II (Fc γ RII) 胞内段和E3泛素蛋白连接酶Nedd4家族成员蛋白的WW结构域(WW domain)。本发明的融合分子架构可以使融合蛋白定位到细胞膜上,并以外泌体的形式出芽(Budding)分泌到胞外,促使抗原递送到免疫器官或是生发中心,有效增加体液免疫系统识别抗原蛋白的概率,从而提高体液免疫响应水平,为制备高效诱导体液免疫的免疫药物领域提供新技术。

[0051] 2. 本发明所述的融合分子架构中,在抗原和WW domain之间加入Fc γ RII蛋白的胞内段,Fc γ RII的胞内段促进形成的囊泡在内质网和高尔基体之间单向运输,有效提高囊泡的出芽率及分泌率。基于本发明的融合分子能够在维持抗原蛋白构象稳定的基础上,大幅增加B细胞识别抗原的几率,从而显著增强抗原靶点的免疫原性,提高体液免疫应答水平。本发明的融合分子架构能够有效改善分泌蛋白和膜蛋白的表达效率,并促使其表达的抗原蛋白呈现在外泌体的表面,分泌到细胞外,从而提高体液免疫响应水平。

[0052] 3. 本发明可作为重组疫苗的通用体液免疫架构,能够在稳定抗原构象的同时,使抗原以外泌体的形式分泌到细胞外,有效提高抗原的体液免疫原性,显著激活体液免疫反应,从而诱导免疫个体产生更高水平的抗原特异性抗体和记忆B细胞。

[0053] 4. 本发明实施例4表明,疫苗A在胞内和上清中的均有表达,证明本发明中的WW domain具备促使抗原分泌的能力,但表达量和分泌效率较低;疫苗B、疫苗C均在上清中检测到显著表达,证明本发明中的Fc γ RII元件和WW domain元件组合,能够显著提高蛋白分泌效果,此外,本发明中的Fc γ RII元件可以来源于不同物种,包括但不限于鼠源、人源等,具有相似的功能。

[0054] 5. 基于本发明的体液免疫疫苗,在体外表达实验中,能够提高抗原蛋白表达水平,并且能够在上清中检测到大量含有抗原蛋白的外泌体,达到技术预期效果。本发明实施例5表明,基于本发明的疫苗E转染的细胞,在上清中检测到目的蛋白显著表达,显著高于细胞内的表达水平,证明本发明架构疫苗能够提高分泌类型抗原的表达及分泌效率,优于常

规分泌架构。

[0055] 6. 本发明实施例6表明,本发明的疫苗B所诱导的外泌体形态直径在35-150 nm之间,符合外泌体特征,且靶标蛋白呈簇状分布在外泌体表面。

[0056] 7. 基于本发明的体液免疫疫苗,在体内免疫试验中,能够高效激活体液免疫反应,刺激机体产生高水平的抗原特异性抗体,并产生有效的体液免疫保护,显著优于常规融合分子架构。

[0057] 8. 本发明实施例7表明,用常规膜蛋白架构的mRNA疫苗(疫苗F)仅诱导6只小鼠(66.6%)产生较高水平的中和抗体,无法保证全部个体产生有效的体液免疫。而基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗G)能够诱导全部个体(100%)产生高水平的中和抗体,证明基于本发明的mRNA疫苗能够有效改善mRNA疫苗的体液免疫效果。分析产生上述结果的原因,在于本发明架构能够促使抗原以外泌体形式分泌到细胞外,增加了抗原递送到免疫器官或是生发中心的概率,从而提高了B细胞识别抗原的效率,最终诱导高水平的体液免疫。

[0058] 9. 本发明实施例8表明,用基于本发明的mRNA疫苗(疫苗G)能诱导蛋鸡产生中和抗体,HI效价为 2^8-2^{10} ,优于常规分泌疫苗架构的mRNA疫苗(疫苗H)所诱导的抗体水平(2^3-2^5),证明基于本发明的mRNA疫苗不仅在体外细胞实验中能改善蛋白的分泌效果(如实施例5),并且能够有效提高mRNA疫苗的体液免疫效果。基于本发明的疫苗不受免疫个体的物种限制,在小鼠和蛋鸡中都能够发挥良好的诱导体液免疫的效果。

[0059] 10. 本发明实施例9表明,单次免疫实验,用常规架构的mRNA疫苗(疫苗I)能够诱导小鼠产生中和抗体,HI效价为 2^3-2^4 ,而基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗J)诱导小鼠产生更高水平的中和抗体,HI效价为 2^4-2^5 。证明基于本发明的mRNA疫苗能够在单次免疫后、短期内诱导个体产生更高水平体液免疫反应。

[0060] 11. 基于本发明的体液免疫疫苗适用于多种抗原,且相较于常规融合分子架构,能够在短期内诱导动物个体产生高水平的中和抗体。基于本发明的疫苗,提供了一种全新的重组疫苗分子架构,具备更优的促进体液免疫抗原表达、分泌的能力,提高体液免疫水平的效果,为重组疫苗的设计方案提供了新思路和新方法。

附图说明

[0061] 图1为本发明所涉及的可促使细胞膜固定蛋白分泌的架构以及疫苗的非限制性原理示意图。

[0062] 图2为表达本发明的融合蛋白分子架构的基因表达盒的示意图。

[0063] 图3为表达本发明的融合蛋白分子架构的质粒示意图,其中SP为信号肽(signal peptide)。

[0064] 图4A-图4E为本发明和其他融合分子架构的重组核酸质量控制峰图,其中图4A为基于WW domain的重组核酸质量控制峰图,图4B为基于本发明的重组核酸I质量控制峰图,图4C为基于本发明的重组核酸II质量控制峰图,图4D为基于常规分泌架构的重组核酸质量控制峰图,图4E为基于本发明的重组核酸III质量控制峰图。

[0065] 图5为疫苗A、B、C转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果。

[0066] 图6为疫苗D转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果。

[0067] 图7为疫苗E转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果。

- [0068] 图8为基于本发明的疫苗B所诱导的外泌体电镜图。
- [0069] 图9为疫苗F的架构示意图。
- [0070] 图10为疫苗G的架构示意图。
- [0071] 图11为疫苗F、疫苗G用于小鼠免疫及取样流程示意图。
- [0072] 图12为疫苗F和疫苗G在小鼠中所诱导的H9N2 HA蛋白中和抗体血凝抑制效价检测结果。
- [0073] 图13为疫苗H的架构示意图。
- [0074] 图14为疫苗G、疫苗H用于蛋鸡免疫及取样流程示意图。
- [0075] 图15为疫苗G和疫苗H在蛋鸡中所诱导的H9N2 HA蛋白中和抗体血凝抑制效价检测结果。
- [0076] 图16为疫苗I的架构示意图。
- [0077] 图17为疫苗J的架构示意图。
- [0078] 图18疫苗I、疫苗J用于小鼠免疫及取样流程示意图。
- [0079] 图19为疫苗I和疫苗J在小鼠中所诱导的H1N1 HA蛋白中和抗体血凝抑制效价检测结果。

具体实施方式

[0080] 术语和定义

[0081] 术语“Fc γ RII”是指Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II。具体“Fc γ RII的胞内段”指蛋白Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II的细胞质区域,可以是细胞质区域的全长或部分片段。“Fc γ RII”或“Fc γ RII的胞内段”可以是任意哺乳动物物种来源的,优选是人源或者鼠源。Fc γ RII可来源于小鼠,小鼠Fc γ RII的胞内段氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示。Fc γ RII可来源于豚鼠,豚鼠Fc γ RII的胞内段氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。Fc γ RII可来源于人Fc γ RIIa,人Fc γ RIIa的胞内段氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示。

[0082] 术语“E3泛素蛋白连接酶Nedd4家族成员蛋白的WW domain”指E3 ubiquitin-protein ligase蛋白,Nedd4 family成员蛋白的一段序列,包含WW1、WW2、WW3和WW4。Nedd4的WW结构域来源不限制于物种,针对不同物种可使用对应物种的WW结构域序列。优选的,Nedd4的WW结构域来源于人,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

[0083] 术语“抗原”或“免疫原”可互换使用,其指能够在受试者中诱导免疫响应的物质,通常是蛋白质。该术语还指具有免疫活性的蛋白质,即一旦向受试者给药(直接或通过向受试者给药编码该蛋白质的核苷酸序列或载体)就能够引起针对该蛋白质的体液和/或细胞类型的免疫响应。优选的,抗原是指疫苗抗原,即能够诱导体液免疫反应和/或细胞免疫反应的分子,导致产生对所述抗原特异性的B和/或T淋巴细胞。疫苗抗原可以为病毒抗原,更优选的,抗原可以是病毒的刺突蛋白(S蛋白)、膜蛋白(M蛋白)、包膜蛋白(E蛋白)和核衣壳蛋白(N蛋白),也可以是细菌的外膜蛋白和分泌蛋白。最优选,抗原是指禽流感的HA蛋白或BVDV(牛病毒性腹泻病毒)的E2蛋白。

[0084] 术语“外泌体”指细胞分泌的膜性囊泡,大小约为30-160 nm,可以通过内多泡体与细胞膜融合或通过细胞外膜出芽的方式释放到胞外。

[0085] 术语“给药”或“接种”指,基于本发明核酸疫苗或疫苗组合物优选地经肌内的或皮下的途径给予,尽管其他的给药途径也能被使用,例如,口服、鼻内(例如气雾剂或其他非针剂给药)、淋巴结内、真皮内、腹膜内、直肠或阴道给药,或通过联用的途径。在动物的颈部肌内的给药是优选的。可采用加速方案(boosting regimens)将给药方案调节为提供最佳免疫。

[0086] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0087] 术语“重组核酸分子”指具有在自然界中不连接在一起的序列的多核苷酸。重组多核苷酸可包括在合适的载体中,且该载体可用于转化至合适的宿主细胞。然后多核苷酸在重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”“重组蛋白”“融合蛋白”等。

[0088] 术语“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的DNA结构。重组表达载体可包括,例如包含(1)对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合,例如启动子和增强子;(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列;以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建、可以使用任何载体,包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本公开的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成的DNA序列,例如病毒质粒、细菌质粒、噬菌体DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体DNA的组合中衍生的载体,来自如慢病毒、逆转录病毒、牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40和伪狂犬病等病毒的DNA。包括自复制型载体和非自复制型载体。

[0089] 术语“mRNA”,指信使RNA、Messenger RNA,中文译名“信使核糖核酸”,是由DNA的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。

[0090] 术语“5' -UTR”,指“5' 非翻译区”或“5' UTR”,为转录成初级RNA转录本(前体mRNA)并位于编码序列上游的一部分基因。初级转录本是初始RNA产物,包含内含子和外显子,由DNA转录产生。许多初级转录本必须经过RNA加工以形成具有生理活性的RNA。形成成熟mRNA的加工过程包括修饰末端、切除内含子、加帽和/或从前体RNA上剪切出各rRNA分子。因此,mRNA的5' UTR是不会被翻译成蛋白质并位于编码序列上游的一部分mRNA。在基因组序列中,5' UTR通常被定义为位于转录起始点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5' 非翻译区(5' UTR)长度可以是几十个碱基到几百个碱基。

[0091] 术语“3' -UTR”,指“3' -非翻译区”或“3' UTR”,涉及位于基因的3' 端,在蛋白质编码区的终止密码子下游,并且被转录但不翻译成氨基酸序列的区域,或涉及RNA分子中的对应区域。3' -非翻译区通常从翻译产物的终止密码子延伸至通常在转录过程之后附着的多聚(A)序列。哺乳动物mRNA的3' -非翻译区通常具有已知为AAUAAA六核苷酸序列的同源区。该序列可能是多聚(A)附着信号并且经常位于多聚(A)附着位点上游的10至30个碱基处。3' -非翻译区可以包含一个或更多个反向重复,可以折叠产生茎环结构,所述结构充当核糖核酸外切酶的屏障或与已知提高RNA稳定性的蛋白质(例如,RNA结合蛋白)相互作用。

[0092] 术语“polyA”,指“多聚腺苷酸序列”、“多聚(A)序列”或“多聚(A)尾”,是指通常位于RNA分子的3' 端的腺苷酸残基序列。本发明允许这样的序列通过DNA模板基于在与编码链互补的链中的重复胸苷酸残基来在RNA转录期间附着,然而所述序列在正常情况下不在DNA中编码,而是在细胞核中转录后通过模板独立性RNA聚合酶附着至RNA的游离3' 端。

[0093] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。

宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生基于本发明的重组疫苗的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞。

[0094] 术语“个体”、“患者”或者“受试者”包括动物。动物包括但不限于，家养动物（例如，猪、牛、羊、猫、狗、马、鸡和鸭等），灵长类动物（例如，人和非人灵长类动物如猴），以及啮齿类动物（例如，兔、小鼠和大鼠等）。

[0095] 术语“转化、转染、转导”具有本领域技术人员普遍理解的意思，即将外源性的DNA、RNA导入宿主的过程。

[0096] 术语“药物组合物”或“药物组合”是指包含在药物生产领域中广泛采用的辅助物料。使用载体的主要目的在于提供一种使用安全、性质稳定和/或具有特定功能性的药物组合物，还在于提供一种方法，以便在为受试者体内得到有效吸收。药学上可接受的载体可以是具有惰性的填充剂，也可以是为药用组合提供某种功能（例如稳定组合物的整体pH值或防止组合物中活性成分的降解）的功效成分。药学上可接受的载体的非限制性实例包括但不限于粘合剂、助悬剂、乳化剂、稀释剂（或填充剂）、成粒剂、粘胶剂、崩解剂、润滑剂、抗粘剂、助流剂、胶凝剂、吸收延迟剂、溶解抑制剂、增强剂、吸附剂、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、着色剂、矫味剂和甜味剂等。

[0097] 除非另外定义或由背景清楚指示，否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所述领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0098] 本发明公开了一种促使靶蛋白以外泌体形式分泌到胞外的融合分子架构、基于该架构的重组疫苗制备方法及应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，他们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0099] 下面结合附图和实施案例对本发明做进一步详细说明。其中，作为一种优选，选用核酸疫苗架构用于制备重组疫苗，但本发明保护范围不局限于所述内容；本发明实施例采用的试剂、仪器、实验动物等均是本领域商业可售或通过常规途径可以获得；实施例中主要采用的实验操作规程、步骤、参数等方法及操作，均是本领域的普通生物技术人员所熟知和能够实现的。

[0100] 实施例1本发明重组核酸疫苗构建

[0101] 图1为本发明所涉及的可促使细胞膜固定蛋白分泌的架构以及疫苗的非限制性原理示意图。为了制备能够产生如图1所示的重组核酸疫苗，示例性的，首先构建一个基因表达盒，其编码氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，该序列全长为814位氨基酸，具体组成是从N端到C端，第1-560位氨基酸为HA抗原全长，HA抗原全长具体包含HA信号肽（第1-18位氨基酸）、HA靶标抗原（第19-524位氨基酸）、HA跨膜区（第525-549位氨基酸）；Linker（Linker 1，第561-566位氨基酸）；豚鼠Fc γ RII胞内段（第567-6116位氨基酸）；Linker（Linker 2，第612-615位氨基酸）；WW结构域（第616-801位氨基酸）；Linker（Linker 3，第802-808位氨基酸）；His tag（第809-814位氨基酸），其可用于WB检测。表达本发明的融合蛋白分子架构的

基因表达盒的示意图如图2所示,表达盒从5'端到3'端依次包含:5' UTR、CDS区、3' UTR、PolyA,其中,CDS区包含的元件为:信号肽、靶标抗原、跨膜区、Fc γ RII胞内段、WW结构域,其中抗原全长可以包含信号肽、靶标抗原、跨膜区,其来源相同作为一个整体抗原。也可以是靶标抗原与信号肽、跨膜区来源不同,进行组合。每个元件之间可以任选地插入linker序列,linker序列可以为GS linker序列。优选的,WW结构域为E3泛素蛋白连接酶Nedd4家族成员蛋白的位于膜内的WW domain,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。Fc γ RII胞内段可来源于小鼠,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,或来源于豚鼠,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。随后,基于密码子简并性对完整的基因表达盒序列做优化,通过基因合成的方式直接获得DNA序列(委托金斯瑞公司合成)。最后,将合成的基因表达盒DNA序列插入至可用于体外RNA转录的表达载体中,得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒(质粒示意图如图3所示)。

[0102] 根据上述方法,制备用于对比实验的(1)-(5)载体。5个载体涉及两组对比实验,其中载体(1)-(3)为一组,载体(4)-(5)为另一组。

[0103] 为了能够更严谨地展示本发明具备促进抗原分泌的效果,并且证明本发明适用于不同类型的抗原,因此本实施例中,同一组对比实验的载体使用相同的抗原,且序列优化方式保持一致。本实施例中,示例性地,靶标抗原1为H9N2的全长HA蛋白(N端包含信号肽,C端包含跨膜区,其氨基酸如SEQ ID NO: 5所示),属于膜蛋白;靶标抗原2为BVDV的E2抗原蛋白(见已公开专利CN116284272B,公告日2023-08-25,其氨基酸如SEQ ID NO: 6所示,不包含自身的信号肽、跨膜区),属于分泌蛋白。

[0104] (1) 基于WW domain的重组核酸疫苗(疫苗A)制备载体

[0105] 步骤a:合成“靶标抗原1(N端包含信号肽,C端包含跨膜区)-WW domain”基因片段。其中,靶标抗原1的氨基酸如SEQ ID NO: 5所示,靶标抗原1中的信号肽的氨基酸如SEQ ID NO: 12所示,靶标抗原1中的跨膜区的氨基酸如SEQ ID NO: 13所示,WW domain的氨基酸如SEQ ID NO: 2所示。

[0106] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0107] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0108] 步骤c:制备重组质粒。

[0109] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于WW domain的重组核酸疫苗制备载体。

[0110] (2) 基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗B)制备载体I

[0111] 步骤a:如上述(1)步骤a,合成“靶标抗原1(N端包含信号肽,C端包含跨膜区)-小鼠Fc γ RII胞内段-WW domain”基因片段。其中,靶标抗原1的氨基酸如SEQ ID NO: 5所示,靶标抗原1中的信号肽的氨基酸如SEQ ID NO: 12所示,靶标抗原1中的跨膜区的氨基酸如SEQ ID NO: 13所示,小鼠Fc γ RII胞内段的氨基酸如SEQ ID NO: 3所示,WW domain的氨基酸如SEQ ID NO: 2所示。

[0112] 步骤b:如上述(1)步骤b,构建核酸疫苗架构载体。

[0113] 步骤c:制备重组质粒。

[0114] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到表达基于本发明的重组核酸疫

苗I的制备载体。

[0115] (3) 基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗C)制备载体II

[0116] 步骤a:如上述(1)步骤a,合成“靶标抗原1(N端包含信号肽,C端包含跨膜区)-豚鼠Fc γ RII胞内段-WW domain”基因片段。其中,靶标抗原1的氨基酸如SEQ ID NO: 5所示,靶标抗原1中的信号肽的氨基酸如SEQ ID NO:12所示,靶标抗原1中的跨膜区的氨基酸如SEQ ID NO:13所示,豚鼠Fc γ RII胞内段的氨基酸如SEQ ID NO:4所示,WW domain的氨基酸如SEQ ID NO: 2所示。

[0117] 步骤b:如上述(1)步骤b,构建核酸疫苗架构载体。

[0118] 步骤c:制备重组质粒。

[0119] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到表达基于本发明的重组核酸疫苗制备载体II。

[0120] (4) 基于常规分泌架构的重组核酸疫苗(疫苗D)制备载体

[0121] 步骤a:如上述(1)步骤a,合成“信号肽-靶标抗原2”基因片段。其中,信号肽来源于牛抗体蛋白的Fc结构域,其氨基酸如SEQ ID NO:14所示;靶标抗原2的氨基酸如SEQ ID NO: 6所示。

[0122] 步骤b:如上述(1)步骤b,构建核酸疫苗架构载体。

[0123] 步骤c:制备重组质粒。

[0124] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到表达基于常规分泌架构的重组核酸疫苗制备载体。

[0125] (5) 基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗E)制备载体III

[0126] 步骤a:如上述(1)步骤a,合成“信号肽-靶标抗原2-跨膜区-豚鼠Fc γ RII胞内段-WW domain”基因片段。其中,信号肽来源于牛抗体蛋白的Fc结构域,其氨基酸如SEQ ID NO: 14所示,靶标抗原2的氨基酸如SEQ ID NO: 6所示,跨膜区来源于牛CD80,其氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,豚鼠Fc γ RII胞内段的氨基酸如SEQ ID NO:4所示,WW domain的氨基酸如SEQ ID NO: 2所示。

[0127] 步骤b:如上述(1)步骤b,构建核酸疫苗架构载体。

[0128] 步骤c:制备重组质粒。

[0129] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到表达基于本发明的重组核酸疫苗制备载体III。

[0130] 表1本发明所涉及架构元件的蛋白氨基酸序列

[0131]

| | |
|--|-------------|
| | 氨基酸序列以及序列编号 |
|--|-------------|

| | |
|--------------------------|--|
| 基因表达盒 编码蛋白 | METISLMTILLIAAASNADKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHTEHN GMLCATSLGQPLILDCTCTIEGLIYGNPACDLLLEGRGWSYIVERSSAVNGTCYPGN VENLEELRTIFSSASSYQRIQIFPDTTWNVSYTGSMSCSDSFYRSMRWLTQKSGF YPVQDAQYTNNRGKNILFVWGIIHHPPTYSAQTTLTYIRNDTTTIVTTEELNRTFKPV IGPRPIVNGQQGRIDYYWSVLKPGQTLRVRTNGNLIAPWYGHVLSGGSHGRILKTD LKSGNCLVQCQTEKGGLNSTLPHNISKYAFGNCPKYVKVNSLKLAVGLRNVPSRS SRGLFGAIAGFIEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRESTQKAIDKITSKVNN IVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKIDDQIQDIWAYNAELLVLENQKTLDE HDANVNNLYNKVKRALGSAVEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRKYQEEES KLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSLVIAMGFAAFLFWAMSNGLSCRCNICI GSGSGSGNPEHREMGETLPEDPGEYSVVFSGSMMSCPGLPDGLEPARTDLSGGGSA PLPPGWEQRVDQHGRVYYVDHVEKRTTWRPEPLPPGWERRVDNMGRIYYVDHFTR TTTWQRPTLESVRNYEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRFIYGNQDLFATSQSKEFDPLG PLPPGWEKRTDSNGRVYFVNHNTRITQWEDPRSQQQLNEKPLPEGWEMRFTVDGIP YFVDHNRRTTTYIDPRTGSGSGSGHHHHH (SEQ ID NO:1) |
| WW domain | APLPPGWEQRVDQHGRVYYVDHVEKRTTWRPEPLPPGWERRVDNMGRIYYVDHFT RTTTWQRPTLESVRNYEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRFIYGNQDLFATSQSKEFDPL GPLPPGWEKRTDSNGRVYFVNHNTRITQWEDPRSQQQLNEKPLPEGWEMRFTVDGI PYFVDHNRRTTTYIDPRT (SEQ ID NO:2) |
| 小鼠Fc γ RII 胞内段 | ALPGNPDHREMGETLPEEVGEYRQPSGGSVPVSPGPPSGLEPTSSSPY (SEQ ID NO:3) |
| 豚鼠Fc γ RII 胞内段 | GNPEHREMGETLPEDPGEYSVVFSGSMMSCPGLPDGLEPARTDLS (SEQ ID NO: 4) |
| H9N2的HA蛋 白 | METISLMTILLIAAASNADKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHTEHN GMLCATSLGQPLILDCTCTIEGLIYGNPACDLLLEGRGWSYIVERSSAVNGTCYPGN VENLEELRTIFSSASSYQRIQIFPDTTWNVSYTGSMSCSDSFYRSMRWLTQKSGF YPVQDAQYTNNRGKNILFVWGIIHHPPTYSAQTTLTYIRNDTTTIVTTEELNRTFKPV IGPRPIVNGQQGRIDYYWSVLKPGQTLRVRTNGNLIAPWYGHVLSGGSHGRILKTD LKSGNCLVQCQTEKGGLNSTLPHNISKYAFGNCPKYVKVNSLKLAVGLRNVPSRS SRGLFGAIAGFIEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRESTQKAIDKITSKVNN IVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKIDDQIQDIWAYNAELLVLENQKTLDE HDANVNNLYNKVKRALGSAVEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRKYQEEES KLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSLVIAMGFAAFLFWAMSNGLSCRCNICI (SEQ ID NO:5) |

| | |
|----------------------|---|
| BVDV的E2蛋白 | HLDCCKPEFSYAIKASDRIGPLGAEGLT TTWKDYSEMKLED TMVIAWCKD GKFVYL QRCTRETRYLA I LHSRALPTS VVFKKLF DGRREQEDTVEMDDNF EFLGPCDAKPIV RGKFNTLLNGPAFQMVCPIGWTGTVSCMLANRDTLDTAVVRTYRRSKPFPYRQGC GGSGGGSGGLPDCKPDFSYAIKND EIGPLGATGLTTQWYEYSDGMRLQDTEVVV WCKDGEFKYL I RCEREARYLA I L HTRALPTS VVFEKILNGKEQEDVEMDDNF EFG LCPCDAKPLVRGKFNTLLNGPAFQMVCPIGWTGTV SCTLANKDTLATTVVRTYKR HRPFPYRQCGSGGGSGGFPECKEGFYAISKDKMGLLGPESLTTWHLPTKK IVDSMVQVWCEGKDLKILRTCTKEERYLVAVHERALSTSAEFLQISDGTTGPEVID MPDDFEFGLCPCDSKPVIKGFNTSLLNGPAFQMVCPQGTGTIECILANQDTLDT TVIRTYRRTPPFQRRKWC (SEQ ID NO:6) |
| H1N1的HA蛋白 | MKANLLVLLCALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL EDSHNG KLCRLKGIAPLQLGKCN IAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDF IDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLT EKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLVLWG IHHPPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNR RFTPEIAERP KVRDQAGRMNYWTL LKPGDTI IFEANGNL IAPMYAFALSRGFGSG IITSNASMHECNTKCTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRN IPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGIT NKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENE RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKE I GNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPK YSEESKLNREKVDGVKLES MG IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQ CRICI (SEQ ID NO:7) |
| Linker序列1 | GSGSGS (SEQ ID NO:8) |
| Linker序列2 | GGGS (SEQ ID NO:9) |
| Linker序列3 | GSGSGSG (SEQ ID NO:10) |
| 人Fc γ RIIa胞内段 | CRKKRISANSTDPVKA AQFEPGRQMI AIRKRQLEETNNDYETADGGYMTLNPRAP TDDDKNIYLTLPNDHVNSNN (SEQ ID NO:11) |
| H9N2 HA蛋白的信号肽 | METISLMTILLIAAASNA (SEQ ID NO:12) |
| H9N2 HA蛋白的跨膜区 | LTIIYSTVASSLVIAMGFAAFLWAM (SEQ ID NO:13) |
| 牛抗体蛋白Fc结构域的信号肽 | MNPLWTL L FVLSAPRGVLS (SEQ ID NO:14) |
| 牛CD80蛋白的跨膜区 | LTWTIIIPVSAFGISVIIAVILTCLTC (SEQ ID NO:15) |

[0132] 实施例2本发明重组核酸疫苗制备

[0133] (1) 加帽mRNA疫苗制备

[0134] 步骤a:将实施例1中用于生产加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0135] 步骤b:将线性化的质粒进行体外共转录加帽反应,将7-甲基化鸟苷酸帽结构加至转录的mRNA的5'端,并对模板DNA进行降解。

[0136] (2) 非加帽mRNA疫苗制备

[0137] 步骤a:将实施例1中用于生产非加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0138] 步骤b:将线性化的质粒进行体外非加帽的转录反应,并对模板DNA进行降解。

[0139] (3) DNA疫苗制备

[0140] 步骤a:将实施例1中用于生产DNA疫苗的载体质粒进行扩增,获得大量用于纯化的目的质粒。

[0141] 步骤b:用去内毒素质粒提取及纯化试剂盒对目的质粒进行提取纯化。

[0142] 实施例3本发明重组核酸体外转录质量控制及疫苗制备

[0143] 以实施例2中的加帽mRNA疫苗制备的方法制备获得疫苗A(基于WW domain的重组核酸)、疫苗B(基于本发明的重组核酸I)、疫苗C(基于本发明的重组核酸II)、疫苗D(基于常规分泌架构的重组核酸)、疫苗E(基于本发明的重组核酸III)。对生产的重组核酸进行纯度检测,用于对比实验的5组重组核酸纯度均大于80%,基于本发明和其他融合分子架构的重组核酸质量控制峰图如图4A、图4B、图4C、图4D、图4E所示。具体描述为:(1)基于WW domain的重组核酸(疫苗A),纯度为80.9%;(2)基于本发明的重组核酸I(疫苗B),纯度为80.1%;(3)基于本发明的重组核酸II(疫苗C),纯度为80.3%;(4)基于常规分泌架构的重组核酸(疫苗D),纯度为92.5%;(5)基于本发明的重组核酸III(疫苗E),纯度为83.1%。上述纯度均符合细胞转染实验和生产疫苗的质量要求。

[0144] 实施例4基于本发明的重组核酸促进膜蛋白类型的抗原分泌表达

[0145] 通过细胞转染试剂,将实施例3中的疫苗A、B、C转染至HEK293T细胞中,体外培养48小时后收集上清浓缩,获得细胞外组分,并裂解细胞获得细胞膜和胞内组分,二者均进行Western blot检测。

[0146] 图5为疫苗A、B、C转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果,如图5所示,所有疫苗转染后,都在上清中检测到靶标蛋白,疫苗A、B、C的蛋白分子量如表2所示。其中,疫苗A在胞内和上清中的均有表达,证明本发明中的WW domain具备促使抗原分泌的能力,但表达量和分泌效率较低;疫苗B、疫苗C均在上清中检测到显著表达,证明本发明中的Fc γ RII元件和WW domain元件组合,能够显著提高蛋白分泌效果,此外,本发明中的Fc γ RII元件可以来源于不同物种,包括但不限于鼠源、人源等,具有相似的功能。实验结果符合理论及预期。

[0147] 由于本实施例所使用的靶标抗原1为H9N2的HA蛋白,属于膜蛋白,所以在常规表达时,并不会分泌到胞外上清中。因此,本实施例中的样品,如果在上清中检测到靶蛋白,足以证明其融合的外泌体相关元件已发挥作用。

[0148] 表2 疫苗A、B、C的蛋白分子量

[0149]

| 名称 | 描述 | 蛋白分子量 (kDa) |
|-----|------------------|-------------|
| 疫苗A | 基于WW domain的重组核酸 | 88.6 |
| 疫苗B | 基于本发明的重组核酸I | 91.8 |
| 疫苗C | 基于本发明的重组核酸II | 91.7 |

[0150] 实施例5基于本发明的重组核酸促进分泌类型的抗原分泌表达

[0151] 通过细胞转染试剂,将实施例3中的疫苗D、E转染至HEK293T细胞中,体外培养48小时后收集上清浓缩,获得细胞外组分,并裂解细胞获得细胞膜和胞内组分,二者均进行Western blot检测。疫苗D、E的蛋白分子量如表3所示。

[0152] 表3 疫苗D、E的蛋白分子量

| 名称 | 描述 | 蛋白分子量 (kDa) |
|-----|---------------|-------------|
| 疫苗D | 基于常规分泌架构的重组核酸 | 90.2 |
| 疫苗E | 基于本发明的重组核酸Ⅲ | 124.3 |

[0154] 图6为疫苗D转染HEK293细胞的体外表达WB (Western blot) 检测结果,如图6所示,疫苗D转染的细胞,在胞内和上清中均检测到目的蛋白表达,胞内表达量显著高于上清,说明常规分泌架构可以使分泌蛋白(靶标抗原2)分泌到细胞外,但效率较低。图7为疫苗E转染HEK293细胞的体外表达WB (Western blot) 检测结果,如图7所示,基于本发明的疫苗E转染的细胞,在上清中检测到目的蛋白显著表达,显著高于细胞内的表达水平,证明本发明能够提高分泌类型抗原的表达及分泌效率,优于常规分泌架构。

[0155] 实施例6基于本发明的疫苗促使抗原以外泌体的形式分泌

[0156] 通过细胞转染试剂,将实施例3中的疫苗B转染至HEK293T细胞中,体外培养48小时后收集上清,通过超滤管低温离心浓缩,获得外泌体组分。

[0157] 通过冷冻电镜对收集的外泌体样品成像,基于本发明的疫苗B所诱导的外泌体形态如图8所示,直径在35-150 nm之间,符合外泌体特征,且靶标蛋白呈簇状分布在外泌体表面,与图1所示的非限制性原理示意图一致,证明基于本发明的疫苗能够发挥所述功能,与预期相符。

[0158] 因此,图5和图7中所展示的浓缩上清中的蛋白表达量,均为以外泌体形式分泌到细胞外的抗原蛋白,符合技术原理及效果预期。

[0159] 实施例7基于本发明的H9N2重组核酸疫苗改善小鼠的体液免疫效果

[0160] 为了展示本发明在动物体内的有效性,本实施例基于常规膜蛋白疫苗架构和本发明疫苗架构,分别构建了含有H9N2体液免疫抗原的疫苗F和疫苗G,抗原H9N2 HA全长序列如SEQ ID NO: 5所示,用于本实施例的小鼠免疫实验。两个疫苗的抗原序列相同,仅在架构上存在差别。

[0161] 疫苗F的架构示意图如图9所示,从5' 到3' 端,依次包含T7启动子,5' UTR,H9N2 HA全长序列,H9N2 HA全长序列(氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,其包含自身信号肽和跨膜区)中信号肽如SEQ ID NO:12所示,跨膜区如SEQ ID NO:13所示,3' UTR,各元件具体序列见表1。

[0162] 疫苗G的架构示意图如图10所示,从5' 到3' 端,依次包含T7启动子,5' UTR,H9N2 HA全长序列,H9N2 HA全长序列(氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,其包含自身信号肽和跨膜区)中信号肽如SEQ ID NO:12所示,跨膜区如SEQ ID NO:13所示,Linker序列(其为Linker序列1,氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示),Fc γ RII胞内段(氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示),Linker序列(其为Linker序列2,氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示),WW domain(氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示),3' UTR,各元件具体序列见表1。

[0163] 实验选用6-8周龄的Ba1b/c品系雌性小鼠共18只,适应性饲养3~7天后,按体重随

机分成2组。其中,每组实验9只小鼠,共2组。具体如表4所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0164] 表4 实施例7免疫实验动物分组及处理方式

| 疫苗组别 | 免疫日程 | |
|------|------------------------|------------------------|
| | Day0 | Day21 |
| F | 剂量 5 μ g/只, 左腿肌肉注射 | 剂量 5 μ g/只, 左腿肌肉注射 |
| G | 剂量 5 μ g/只, 左腿肌肉注射 | 剂量 5 μ g/只, 左腿肌肉注射 |

[0166] 将上述各组小鼠按照表4的免疫流程进行一免和二免,第0天(一免前)、第28天(Day28)采血,测定血凝抑制效价(HI titers)。每组中的3只小鼠提取的血清混合为1份生物样品,因此每组采样后可获得3份血清混合生物样品用于检测。免疫及取样流程如图11所示。

[0167] 疫苗F和疫苗G在小鼠中所诱导的H9N2 HA蛋白中和抗体血凝抑制效价检测结果如图12所示,由实验结果可知,用常规膜蛋白架构的mRNA疫苗(疫苗F)仅诱导6只小鼠(66.6%)产生较高水平的中和抗体,无法保证全部个体产生有效的体液免疫。而基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗G)能够诱导全部个体(100%)产生高水平的中和抗体,证明基于本发明的mRNA疫苗能够有效改善mRNA疫苗的体液免疫效果。

[0168] 分析产生上述结果的原因,在于本发明能够促使抗原以外泌体形式分泌到细胞外,增加了抗原递送到免疫器官或是生发中心的概率,从而提高了B细胞识别抗原的效率,最终诱导高水平的体液免疫。

[0169] 实施例8基于本发明的H9N2重组核酸疫苗改善蛋鸡的体液免疫效果

[0170] 为了展示基于本发明的疫苗在不同动物体内的有效性,并且比较本发明与常规分泌架构的差异,本实施例沿用实施例7中的体液免疫抗原,采用常规分泌疫苗架构,新构建了疫苗H,和实施例7中基于本发明的疫苗G进行对比实验。本实施例在蛋鸡体内进行免疫实验,两个疫苗的抗原序列相同,均为促进蛋白分泌的疫苗架构,疫苗H为常规分泌架构元件,疫苗G为基于本发明的架构元件。

[0171] 疫苗H的架构示意图如图13所示,从5'到3'端,依次包含T7启动子,5' UTR,H9N2 HA胞外域(其包含自身信号肽,不包含自身跨膜区),H9N2 HA胞外域中信号肽如SEQ ID NO:12所示,3' UTR,各元件具体序列见表1。

[0172] 实验选用SPF蛋鸡共8只,分成2组,每组4只。具体如表5所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0173] 表5 实施例8免疫实验动物分组及处理方式

| 疫苗组别 | 免疫日程 | |
|------|-----------------------|-----------------------|
| | Day0 | Day21 |
| G | 剂量 5 μ g/只, 左大腿肌注 | 剂量 5 μ g/只, 左大腿肌注 |
| H | 剂量 5 μ g/只, 左大腿肌注 | 剂量 5 μ g/只, 左大腿肌注 |

[0175] 将上述各组蛋鸡按照表5的免疫流程进行一免和二免,第0天(一免前)、第28天(Day28)、第35天(Day35)采血,测定血凝抑制效价(HI titers)。每只蛋鸡的血清单独检测。免疫及取样流程如图14所示。

[0176] 疫苗G和疫苗H在蛋鸡中所诱导的H9N2 HA蛋白中和抗体血凝抑制效价检测结果如图15所示,由实验结果可知,用基于本发明的mRNA疫苗(疫苗G)能诱导蛋鸡产生中和抗体,HI效价为 2^8-2^{10} ,优于常规分泌疫苗架构的mRNA疫苗(疫苗H)所诱导的抗体水平(2^3-2^5)。证明基于本发明的mRNA疫苗不仅在体外细胞实验中能改善蛋白的分泌效果(如实施例5),并且能够有效提高mRNA疫苗的体液免疫效果。

[0177] 此外,基于本发明的疫苗不受免疫个体的物种限制,在小鼠和蛋鸡中都能够发挥良好的诱导体液免疫的效果。

[0178] 实施例9基于本发明的H1N1重组核酸疫苗短期内诱导小鼠产生高水平抗体

[0179] 为了展示本发明不受靶点限制,并且能在单次免疫后、短期内诱导个体产生高水平体液免疫反应,本实施例基于常规疫苗架构和本发明所述疫苗架构,分别构建了含有H1N1体液免疫抗原的疫苗I和疫苗J,抗原序列如SEQ ID NO:7所示,用于本实施例的小鼠免疫实验。两个疫苗的抗原序列相同,仅在架构上存在差别。

[0180] 疫苗I的架构示意图如图16所示,从5'到3'端,依次包含T7启动子,5' UTR,H1N1 HA全长序列(其包含信号肽、跨膜区),3' UTR,各元件具体序列见表1。

[0181] 疫苗J的架构示意图如图17所示,从5'到3'端,依次包含T7启动子,5' UTR,H1N1 HA全长序列(其包含信号肽、跨膜区),Linker序列,Fc γ RII胞内段,Linker序列,WW domain,3' UTR,各元件具体序列见表1。

[0182] 实验选用6-8周龄的Balb/c品系雌性小鼠共10只,适应性饲养3~7天后,按体重随机分成2组。其中,每组实验5只小鼠,共2组。具体如表6所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0183] 表6 实施例9免疫实验动物分组及处理方式

| 疫苗组别 | 免疫日程 |
|------|-----------------------|
| I | 剂量10 μ g/只,左腿肌肉注射 |
| J | 剂量10 μ g/只,左腿肌肉注射 |

[0185] 将上述各组小鼠按照表6的免疫流程进行单次免疫,第14天(Day14)采血,测定血凝抑制效价(HI titers)。每只小鼠提取的血清单独检测。免疫及取样流程如图18所示。

[0186] 疫苗I和疫苗J在小鼠中所诱导的H1N1 HA蛋白中和抗体血凝抑制效价检测结果如图19所示,由实验结果可知,用常规架构的mRNA疫苗(疫苗I)能够诱导小鼠产生中和抗体,HI效价为 2^3-2^4 ,而基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗J)诱导小鼠产生更高水平的中和抗体,HI效价为 2^4-2^5 。证明基于本发明的mRNA疫苗能够在单次免疫后、短期内诱导个体产生更高水平体液免疫反应,符合预期。

[0187] 综上所述,本发明提供一种融合分子架构,促使蛋白以外泌体的形式分泌到胞外,不仅能够有效提高蛋白表达水平和分泌效率,还能够应用于动物免疫药物的生产和研发,显著提高体液免疫抗原的免疫原性,诱导接种个体产生高水平的体液免疫应答,且效果优于当前已有技术,具有极高的商业价值及广阔的应用前景。

[0188] 本公开的上述实施例仅是为清楚地说明本公开所作的举例,而并非是对本公开的

实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本公开的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本公开权利要求的保护范围之内。。

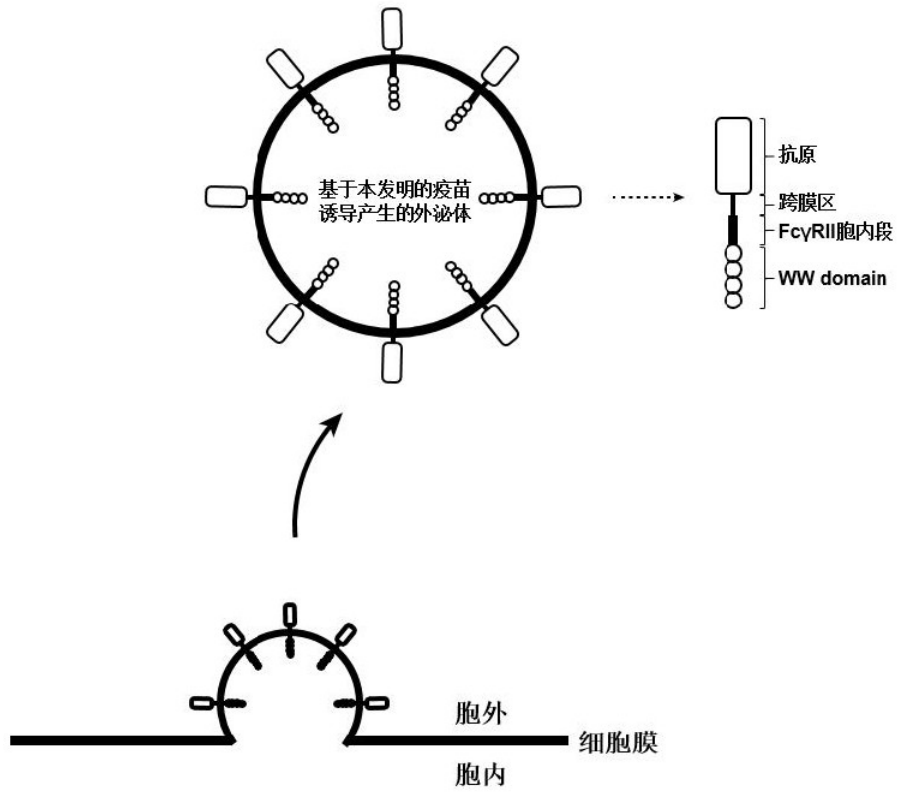


图1

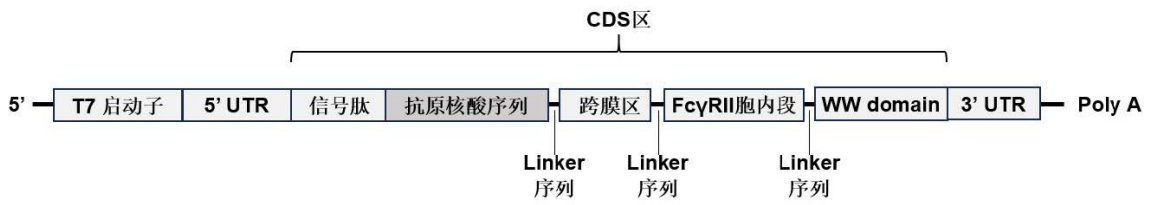


图2

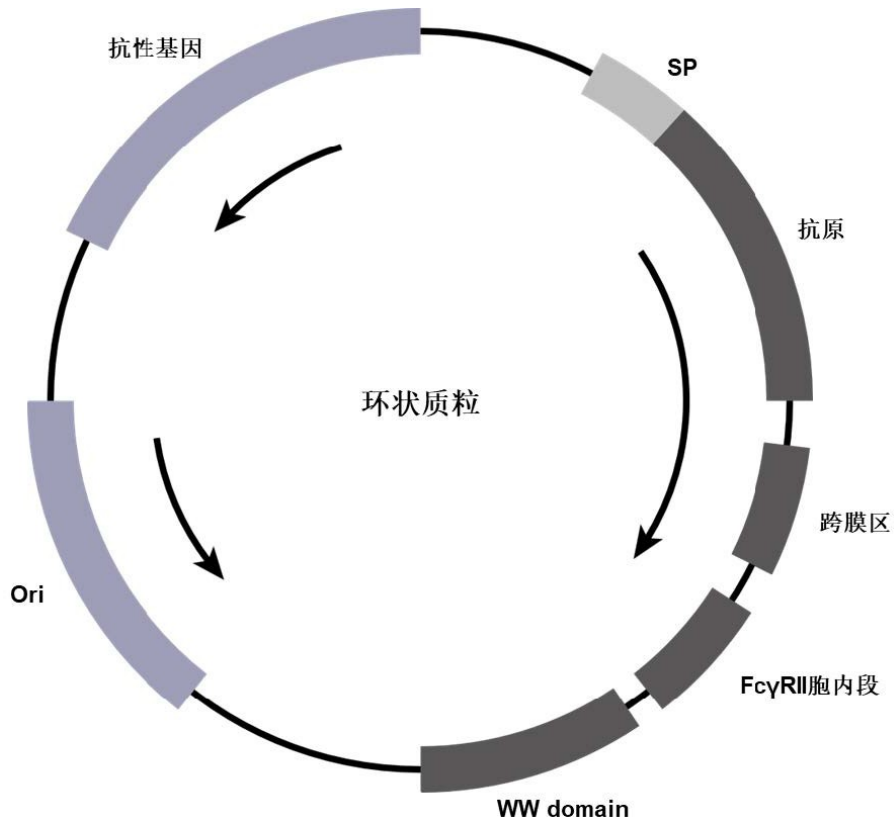


图3

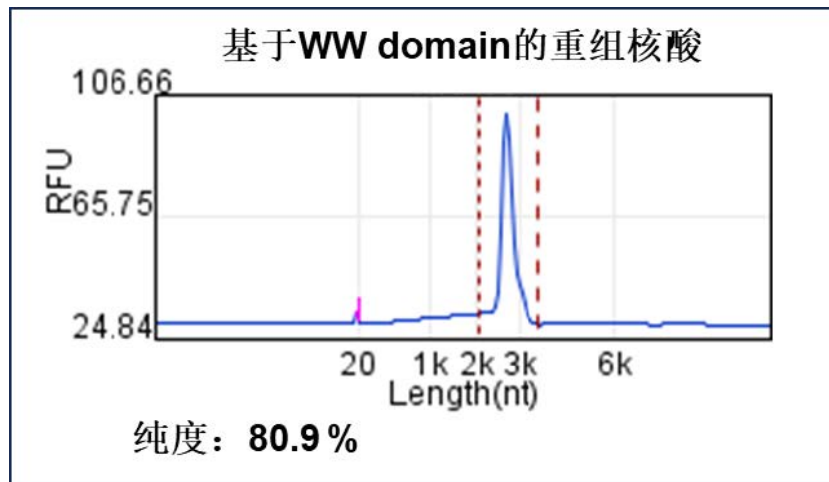


图4A

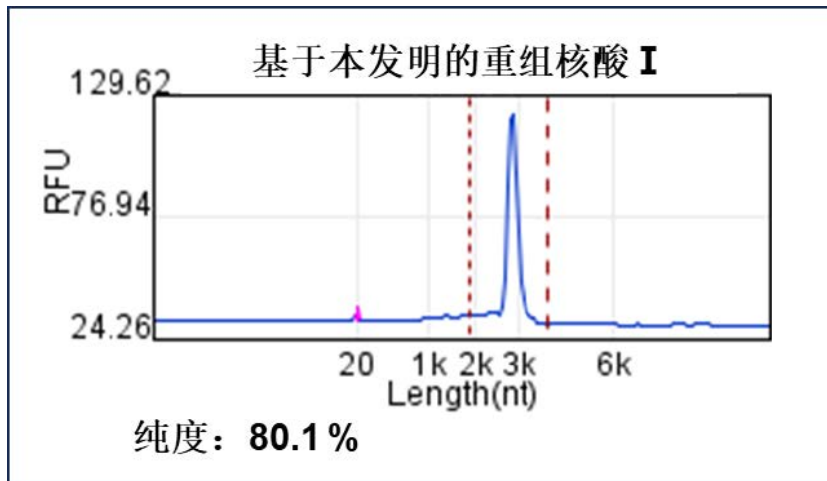


图4B

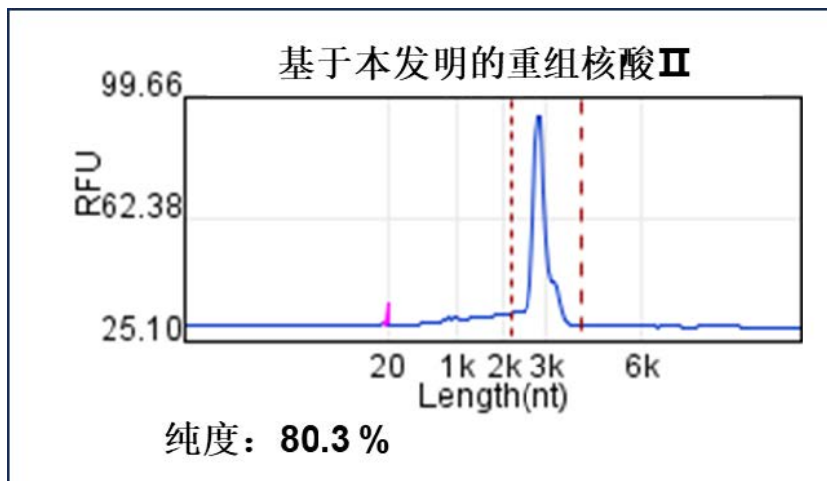


图4C

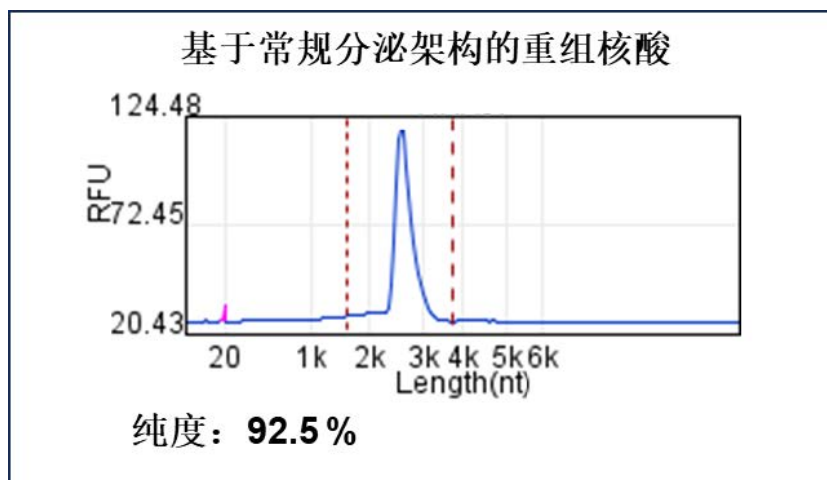


图4D

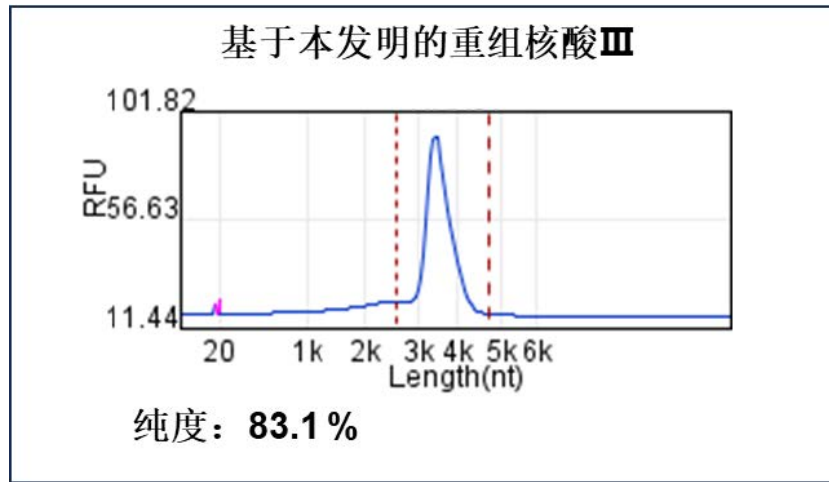


图4E

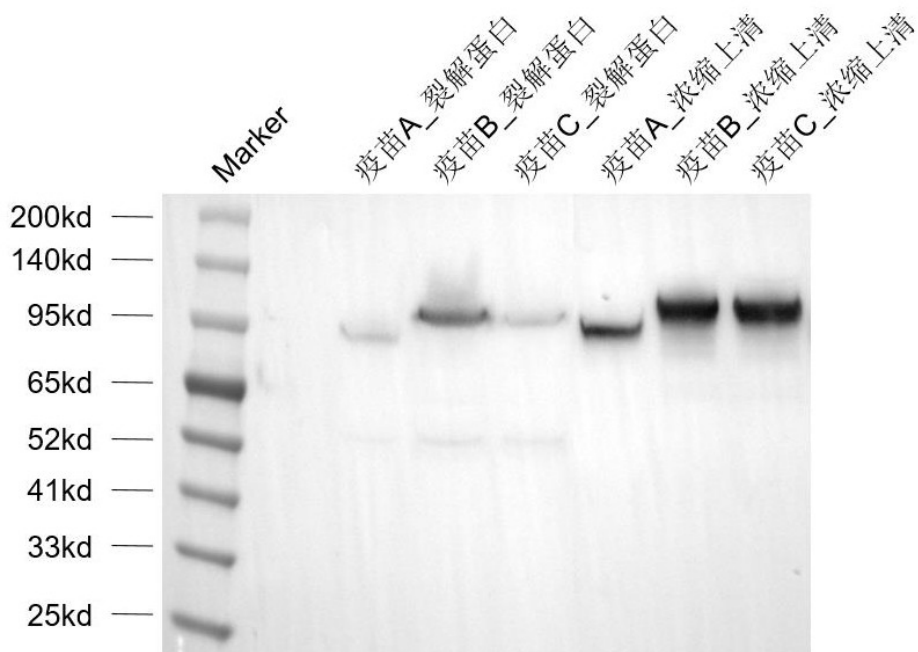


图5

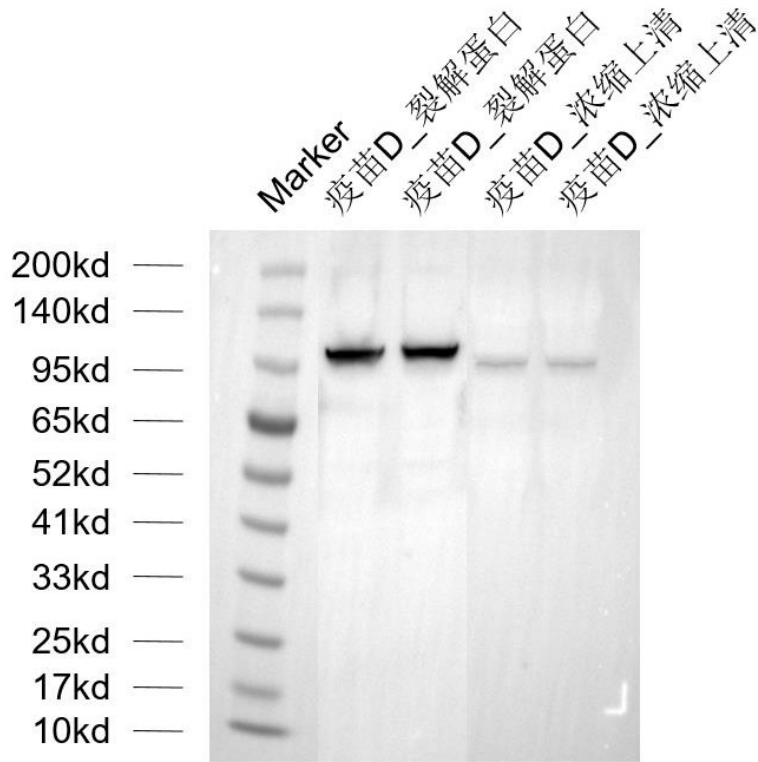


图6

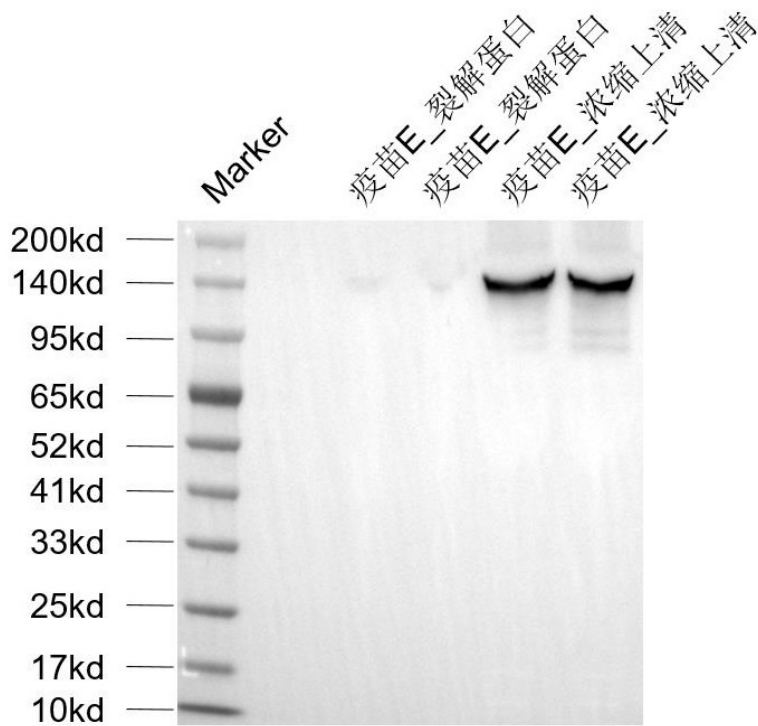


图7

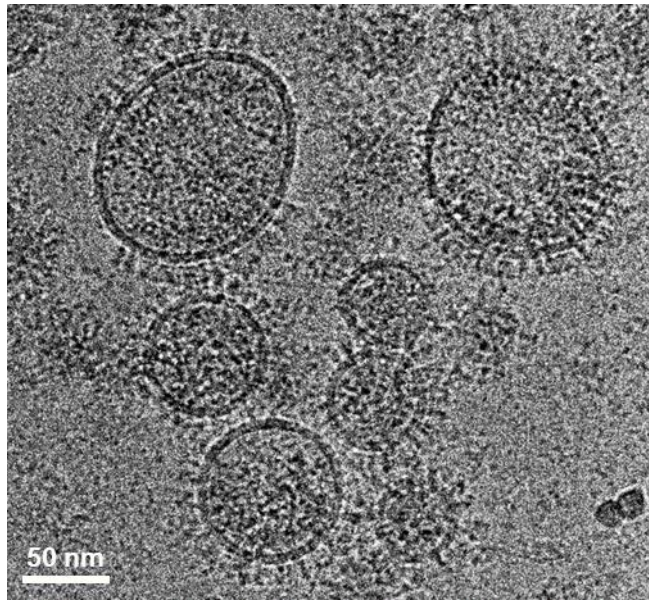


图8

疫苗F



图9

疫苗G

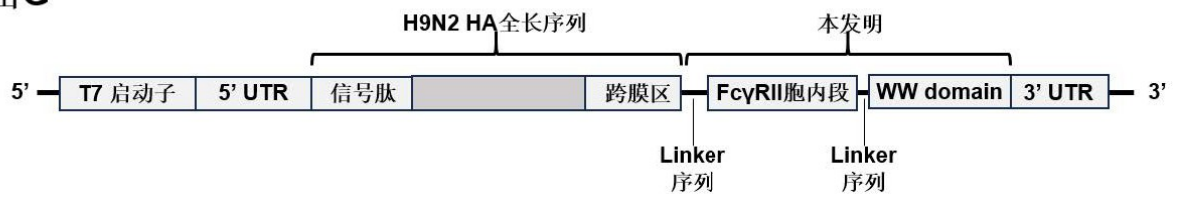


图10

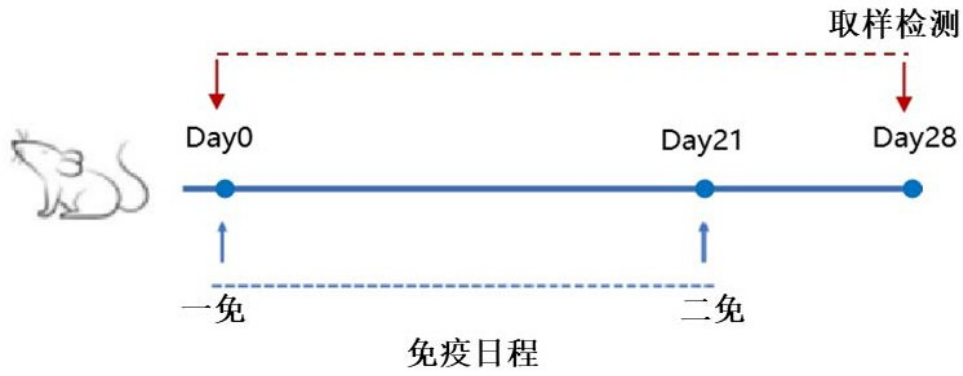


图11

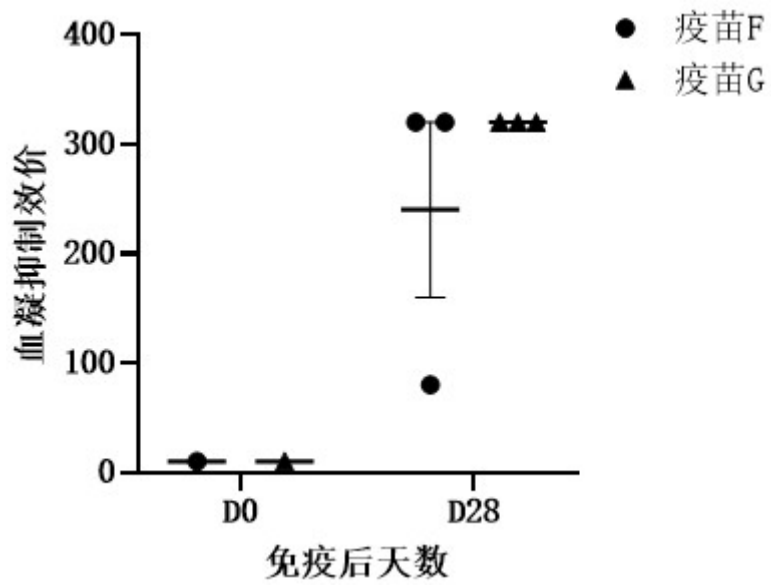


图12

疫苗H



图13

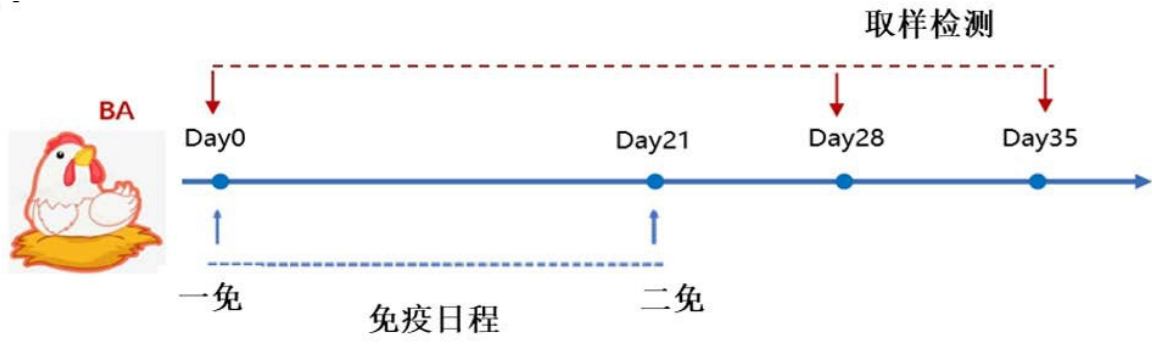


图14

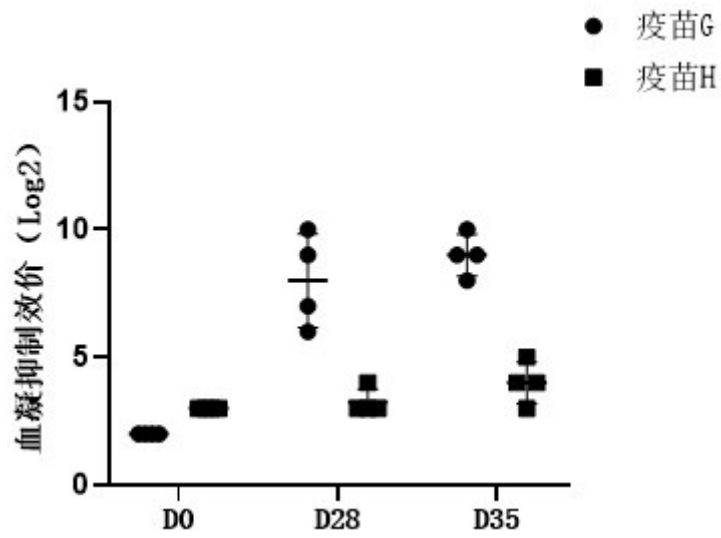


图15

疫苗I



图16

