



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120554528 A

(43) 申请公布日 2025. 08. 29

(21) 申请号 202510656623.2

A61P 37/04 (2006.01)

(22) 申请日 2025.05.21

(71) 申请人 南京澄实生物医药科技有限公司
地址 210000 江苏省南京市江北新区探秘路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

(72) 发明人 韩悌云 徐实 李静

(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.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

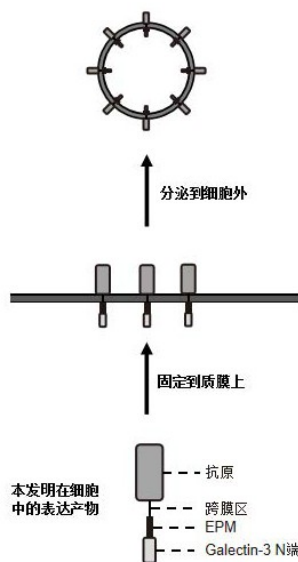
权利要求书4页 说明书21页
序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

可促使膜固定蛋白随外泌体分泌的融合分子及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种可促使膜固定蛋白随外泌体分泌的融合分子及其应用等。本发明具体提供促使抗原以固定在外泌体膜上的方式分泌表达的设计方法及应用,其核心元件为β-半乳糖苷结合凝集素Galectin-3的高度保守N端结构域,能广泛应用于I型、II型、多次跨膜型和分泌型抗原蛋白,与防内吞基序(Endocytosis prevention motif,EPM)组合使用能有效改善抗原的表达效率,并促使抗原蛋白进入外泌体分泌途径,改善免疫响应水平,为制备高效诱导免疫应答的免疫药物领域提供新技术。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,包含: β -半乳糖苷结合凝集素蛋白(Galectin-3)的N端保守结构域;优选地,所述Galectin-3的N端保守结构域包含非凝集素区域,所述非凝集素区域包含7到14个重复的9氨基酸序列(YPG-X₃-P-[G/S]-A),其中X代表任意氨基酸残基,X₃表示连续3个任意氨基酸残基的组合;更优选地,所述Galectin-3的N端保守结构域包含SEQ ID NO.3、4、5、15、17、19或20中的任一氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白还包含防内吞基序(Endocytosis prevention motif,EPM);优选地,所述EPM包含Fc γ R II胞内段;更优选地,所述EPM包含SEQ ID NO.2、6中的任一氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白还包含抗原;优选地,所述抗原为免疫蛋白的完整序列或部分含有免疫表位的片段序列;更优选地,所述免疫蛋白包含膜蛋白或分泌蛋白;最优选地,所述膜蛋白包含I型跨膜蛋白或II型跨膜蛋白或多次跨膜蛋白,当所述抗原为分泌蛋白时,所述融合蛋白需额外引入跨膜区序列;可选地,所述跨膜区位于抗原序列内部,或抗原序列的一端。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的N端还包含信号肽和/或IgG Fc结构域;或者所述融合蛋白的C端还包含人S5a/PSMD4蛋白酶体亚基的C端多肽片段STABILON;或者所述额外引入的跨膜区包含CD80的跨膜结构域;优选地,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示,和/或所述IgG Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示,和/或所述STABILON的氨基酸SEQ ID NO: 12所示,和/或所述CD80的跨膜结构域的氨基酸SEQ ID NO: 13所示。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的不同元件之间可任选地通过linker序列连接;优选地,所述linker包含柔性linker序列和/或刚性linker序列。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的融合蛋白,其特征在于,包含以下4种融合蛋白的任意一种:

融合蛋白A:从N端到C端依次包含:信号肽、分泌型抗原、跨膜区、EPM、Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸;

融合蛋白B:从N端到C端依次包含:I型跨膜抗原、EPM、Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸;

融合蛋白C:从N端到C端依次包含:Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸、EPM、II型跨膜抗原

融合蛋白D:从N端到C端依次包含:多次跨膜抗原、EPM、Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的融合蛋白,其特征在于,包含以下融合蛋白的任意一种:

融合蛋白5:从N端到C端依次包含:I型跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段;优选地,所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示;

融合蛋白12:从N端到C端依次包含:信号肽、牛IgG Fc结构域、分泌蛋白抗原、牛CD80的

跨膜结构域、小鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段；优选地，所述分泌蛋白抗原为BVDV 3E2融合蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示，所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示，所述牛IgG Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示，所述牛CD80的跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示，所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；

融合蛋白1：从N端到C端依次包含：I型跨膜蛋白抗原、豚鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-104位氨基酸片段；优选地，所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列，氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，所述豚鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-104位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示；

融合蛋白2：从N端到C端依次包含：I型跨膜蛋白抗原、豚鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段 (SEQ ID NO: 4)；优选地，所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列，氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，所述豚鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；

融合蛋白3：从N端到C端依次包含：I型跨膜蛋白抗原、豚鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的30-104位氨基酸片段；优选地，所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列，氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，所述豚鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的30-104位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示；

融合蛋白20：从N端到C端依次包含：I型跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、鸡Galectin-3蛋白N端的1-101位氨基酸片段；优选地，所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列，氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，所述鸡Galectin-3蛋白N端的1-101位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示；

融合蛋白21：从N端到C端依次包含：I型跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、人Galectin-3蛋白N端的1-109位氨基酸片段；优选地，所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列，氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，所述人Galectin-3蛋白N端的1-109位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 20所示；

融合蛋白13：从N端到C端依次包含：信号肽、牛IgG Fc结构域、分泌蛋白抗原、牛CD80的跨膜结构域、小鼠EPM、牛Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段；优选地，所述分泌蛋白抗原为BVDV 3E2融合蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示，所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示，所述牛IgG Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示，所述牛CD80的跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示，所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，所述牛Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示；

融合蛋白15：从N端到C端依次包含：仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段、小鼠EPM、II型跨膜蛋白抗原；优选地，所述II型跨膜蛋白抗原为全长H1N1 NA蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示，所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示，所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示；

融合蛋白16：从N端到C端依次包含：猪Galectin-3蛋白N端的1-119位氨基酸片段、小鼠EPM、II型跨膜蛋白抗原；优选地，所述II型跨膜蛋白抗原为全长H1N1 NA蛋白，其氨基酸序

列如SEQ ID NO: 16所示,所述猪Galectin-3蛋白N端的1-119位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示;

融合蛋白18:从N端到C端依次包含:多次跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段;优选地,所述多次跨膜蛋白抗原为全长CXCR2蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。

8.一种重组核酸分子,其特征在于,包含编码权利要求1-7任一项所述融合蛋白的核酸;优选地,所述重组核酸分子为mRNA或DNA。

9.一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求8所述重组核酸分子。

10.一种重组载体,其特征在于,包含权利要求8所述重组核酸分子、或权利要求9所述重组基因表达盒。

11.一种重组宿主细胞,其特征在于,包含权利要求8所述重组核酸分子、或权利要求9所述重组基因表达盒、或权利要求10所述重组载体。

12.一种药物组合物,其特征在于,包含一种或多种权利要求1-7任一项融合蛋白,和/或一种或多种权利要求8所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求9所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求10所述重组载体,和/或一种或多种权利要求11所述重组宿主细胞;优选地,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

13.一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种权利要求1-7任一项融合蛋白,和/或一种或多种权利要求8所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求9所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求10所述重组载体,和/或一种或多种权利要求11所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求12所述药物组合物;优选地,所述重组疫苗为核酸疫苗或亚单位疫苗;更优选地,所述重组疫苗为核酸疫苗。

14.一种用于促进融合蛋白随外泌体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权利要求1-7任一项融合蛋白,和/或一种或多种权利要求8所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求9所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求10所述重组载体,和/或一种或多种权利要求11所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求12所述药物组合物,和/或一种或多种权利要求13所述重组疫苗。

15.一种用于提高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权利要求1-7任一项融合蛋白,和/或一种或多种权利要求8所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求9所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求10所述重组载体,和/或一种或多种权利要求11所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求12所述药物组合物,和/或一种或多种权利要求13所述重组疫苗。

16.一种或多种权利要求1-7任一项融合蛋白,和/或一种或多种权利要求8所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求9所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求10所述重组载体,和/或一种或多种权利要求11所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求12所述药物组合物,和/或一种或多种权利要求13所述重组疫苗在以下任一项中的用途:

- (1) 制备用于促进抗原随外泌体分泌到细胞外的药物;
- (2) 制备用于提高抗原免疫原性的药物;
- (3) 制备用于治疗、接种疫苗或生物免疫的药物。

17. 根据权利要求16所述的用途,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。

18. 根据权利要求16所述的用途,其特征在于,所述药物为用于预防和/或治疗与CXCR2 (C-X-C 趋化因子受体 2) 相关的疾病的药物;优选地,所述与CXCR2相关的疾病包含炎症性疾病、肿瘤相关疾病、心血管疾病、代谢性疾病、神经系统疾病、肾脏疾病的药物;更优选地,所述炎症性疾病包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)、类风湿关节炎(RA)、银屑病,所述肿瘤相关疾病包含癌症进展与转移、急性髓系白血病(AML),所述心血管疾病包含动脉粥样硬化、心肌梗死与心力衰竭,所述代谢性疾病包含肥胖与胰岛素抵抗、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),所述神经系统疾病包含多发性硬化(MS)、中风,所述肾脏疾病包含急性肾损伤(AKI)、慢性肾病(CKD)。

可促使膜固定蛋白随外泌体分泌的融合分子及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,特别是免疫药物技术领域,具体涉及可促使膜固定蛋白随外泌体分泌的融合分子及其应用等。

背景技术

[0002] 免疫系统是人体抵御病原体入侵、维护机体健康的关键防线,由先天免疫和适应性免疫两大部分组成。适应性免疫又分为体液免疫和细胞免疫,二者相互协作,共同抵御病原体。

[0003] 体液免疫主要由 B 细胞介导,其过程为:当病原体入侵机体时,B 细胞表面的受体(BCR)识别并内化抗原,经细胞内降解成肽段后呈递给辅助 T 细胞,活化的辅助 T 细胞为 B 细胞提供共刺激信号,促使 B 细胞增殖分化,产生大量针对该抗原的抗体,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。

[0004] 细胞免疫则主要由 T 细胞介导,发挥着同样重要的作用。其过程为:抗原呈递细胞(如树突状细胞)将抗原呈递给辅助性 T 细胞(Th),激活的 Th 细胞通过分泌细胞因子等来调节免疫反应,细胞毒性 T 细胞(Tc)则识别并结合被感染的宿主细胞或癌细胞,释放穿孔素、颗粒酶等,诱导靶细胞凋亡,从而清除病原体或异常细胞。此外,细胞免疫还涉及 $\gamma\delta$ T 细胞、NKT 细胞等其他细胞类型,它们在免疫监视、抗肿瘤等方面具有独特功能。

[0005] 疫苗接种是预防疾病的重要手段,疫苗可分为预防性疫苗和治疗性疫苗。预防性疫苗主要用于预防传染病,通过产生长期记忆的 B 细胞和 T 细胞来提供持久的免疫保护。而治疗性疫苗用于治疗已经存在的疾病,如癌症、慢性感染性疾病等,通过激活免疫系统来清除癌细胞或病毒。体液免疫疫苗多为预防性疫苗,如灭活疫苗、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,核酸疫苗展现出巨大潜力,其携带病毒抗原基因的 DNA 或 mRNA 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,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。治疗性疫苗则主要侧重于激活细胞免疫,例如 BNT162b2 疫苗可用于治疗恶性脑胶质瘤,目前正在进行的临床试验显示出了良好的治疗效果。此外,还有许多其他治疗性 mRNA 疫苗正在临床试验中,如针对黑色素瘤的 mRNA 疫苗,也展现出了一定的疗效和安全性。

[0006] 外泌体,作为一种由活细胞产生并分泌到胞外的囊泡,其具有和细胞膜一样双层膜结构,在细胞间的分子传递过程中扮演着重要角色。外泌体在免疫治疗中的应用受到广泛关注,可作为天然的抗原递呈载体,将抗原递呈给免疫细胞,激发免疫应答。例如,树突状细胞(DC)衍生的外泌体(DEX)有望成为具有抗原呈递和免疫细胞激活分子的无细胞疫苗,其受肿瘤免疫抑制微环境的影响较小,早期研究已证明其在肿瘤治疗中的可行性,并发现 DEX 参与 NK 细胞介导的先天免疫。然而,现有方法在抗原递呈和外泌体应用方面仍存在诸多问题。如中国专利 CN115708871A 和 CN115737796A 公开的将抗原融合到 CD63 蛋白的胞外域中的方法,存在分泌到胞外的 EVs 数量有限、可能影响抗原蛋白构象等缺陷。

[0007] Galectin-3 是一种 β -半乳糖苷结合凝集素,在免疫调节、炎症反应等多种生理

和病理过程中发挥重要作用。Galectin-3在细胞核、细胞质、细胞表面都有分布,还能分泌到细胞外基质,其在不同亚细胞位置执行不同功能。Galectin-3的N端结构域具有高度保守性和非凝集素依赖性活性,该结构域由富含脯氨酸、甘氨酸和酪氨酸的序列组成,参与配体结合时的寡聚化。

[0008] 目前,在免疫治疗领域,尽管有一些关于提高抗原表达和递呈效率的专利和研究报告,但现有技术存在诸多不足。一方面,常规的体液免疫核酸疫苗难以高效表达外源膜蛋白和分泌蛋白等靶标蛋白,且靶标蛋白无法充分呈现到细胞外,导致诱导机体产生的抗体水平较低,免疫保护作用有限。另一方面,在治疗性疫苗领域,现有技术同样存在明显缺陷。例如,治疗性疫苗的递送系统效率不高,且缺乏调节剂,难以靶向递送抗原,从而影响免疫激活效果。同时,部分治疗性疫苗如DNA疫苗存在免疫原性较差、有DNA整合至染色体的风险,且其诱导的细胞免疫应答强度和持久性不足。

[0009] 综上所述,当前亟需一种能够改善抗原表达水平、提高免疫响应水平的技术方案。

发明内容

[0010] 针对现有技术的不足,本发明将 β -半乳糖苷结合凝集素 Galectin-3 的高度保守 N 端结构域融合到抗原的胞内端,与防内吞基序 (Endocytosis prevention motif, EPM) 组合使用,促进抗原进入外泌体分泌途径,可克服现有技术的不足,为免疫治疗提供一种更高效、更优质的解决方案。

[0011] 本发明涉及一种免疫疫苗架构设计方法及应用,核心元件为 β -半乳糖苷结合凝集素 Galectin-3 的高度保守 N 端结构域。本发明具体提供一种融合分子架构,能广泛应用于 I 型、II 型、多次跨膜型和分泌型抗原蛋白,与防内吞基序 (Endocytosis prevention motif, EPM) 组合使用能有效改善抗原的表达效率,并促使抗原蛋白进入外泌体分泌途径,改善免疫响应水平。该融合分子架构的关键组成元件包含:抗原、跨膜区(如抗原本身即包含跨膜区,则不需要该元件)、EPM、Galectin-3 的高度保守 N 端结构域。该架构可以促使融合蛋白固定到外泌体膜上,随外泌体分泌到细胞外,促使抗原递送到免疫器官或是生发中心,有效增加免疫系统识别抗原蛋白的概率,从而提高免疫响应水平,为制备高效诱导免疫应答的免疫药物领域提供新技术。

[0012] 本发明的一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,包含: β -半乳糖苷结合凝集素蛋白 (Galectin-3) 的 N 端保守结构域;优选地,所述 Galectin-3 的 N 端保守结构域包含非凝集素区域,所述非凝集素区域包含 7 到 14 个重复的 9 氨基酸序列 (YPG- X_3 -P-[G/S]-A),其中 X 代表任意氨基酸残基, X_3 表示连续 3 个任意氨基酸残基的组合;更优选地,所述 Galectin-3 的 N 端保守结构域包含 SEQ ID NO.3、4、5、15、17、19 或 20 中的任一氨基酸序列。

[0013] 进一步地,所述融合蛋白还包含防内吞基序 (Endocytosis prevention motif, EPM);优选地,所述 EPM 包含 Fc γ RII 胞内段;更优选地,所述 EPM 包含 SEQ ID NO.2、6 中的任一氨基酸序列。

[0014] 进一步地,所述融合蛋白还包含抗原;优选地,所述抗原为免疫蛋白的完整序列或部分含有免疫表位的片段序列;更优选地,所述免疫蛋白包含膜蛋白或分泌蛋白;最优选地,所述膜蛋白包含 I 型跨膜蛋白或 II 型跨膜蛋白或多次跨膜蛋白,当所述抗原为分泌蛋白时,所述融合蛋白需额外引入跨膜区序列;可选地,所述跨膜区位于抗原序列内部,或抗原

序列的一端。

[0015] 进一步地,所述融合蛋白的N端还包含信号肽和/或IgG Fc结构域;或者所述融合蛋白的C端还包含人S5a/PSMD4蛋白酶体亚基的C端多肽片段STABILON;或者所述额外引入的跨膜区包含CD80的跨膜结构域;优选地,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示,和/或所述IgG Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示,和/或所述STABILON的氨基酸SEQ ID NO: 12所示,和/或所述CD80的跨膜结构域的氨基酸SEQ ID NO: 13所示。

[0016] 进一步地,所述融合蛋白的不同元件之间可任选地通过linker序列连接;优选地,所述linker包含柔性linker序列和/或刚性linker序列。

[0017] 进一步地,所述的融合蛋白包含以下4种融合蛋白的任意一种:

(1) 融合蛋白A:从N端到C端依次包含:信号肽、分泌型抗原、跨膜区、EPM、Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸;

(2) 融合蛋白B:从N端到C端依次包含:I型跨膜抗原、EPM、Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸;

(3) 融合蛋白C:从N端到C端依次包含:Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸、EPM、II型跨膜抗原

(4) 融合蛋白D:从N端到C端依次包含:多次跨膜抗原、EPM、Galectin-3的N端保守结构域的第1-120位氨基酸。

[0018] 进一步地,所述的融合蛋白包含以下的任意一种:

(1) 融合蛋白5:从N端到C端依次包含:I型跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段;优选地,所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示;

(2) 融合蛋白12:从N端到C端依次包含:信号肽、牛IgG Fc结构域、分泌蛋白抗原、牛CD80的跨膜结构域、小鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段;优选地,所述分泌蛋白抗原为BVDV 3E2融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示,所述牛IgG Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示,所述牛CD80的跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示;

(3) 融合蛋白1:从N端到C端依次包含:I型跨膜蛋白抗原、豚鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-104位氨基酸片段;优选地,所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列,氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述豚鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-104位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示;

(4) 融合蛋白2:从N端到C端依次包含:I型跨膜蛋白抗原、豚鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段(SEQ ID NO: 4);优选地,所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列,氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述豚鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示;

(5) 融合蛋白3:从N端到C端依次包含:I型跨膜蛋白抗原、豚鼠EPM、仓鼠Galectin-

3蛋白N端的30-104位氨基酸片段;优选地,所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列,氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述豚鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的30-104位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示;

(6)融合蛋白20:从N端到C端依次包含:I型跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、鸡Galectin-3蛋白N端的1-101位氨基酸片段;优选地,所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列,氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述鸡Galectin-3蛋白N端的1-101位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示;

(7)融合蛋白21:从N端到C端依次包含:I型跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、人Galectin-3蛋白N端的1-109位氨基酸片段;优选地,所述I型跨膜蛋白抗原为H9N2 HA全长序列,氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述人Galectin-3蛋白N端的1-109位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 20所示;

(8)融合蛋白13:从N端到C端依次包含:信号肽、牛IgG Fc结构域、分泌蛋白抗原、牛CD80的跨膜结构域、小鼠EPM、牛Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段;优选地,所述分泌蛋白抗原为BVDV 3E2融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示,所述牛IgG Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示,所述牛CD80的跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述牛Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示;

(9)融合蛋白15:从N端到C端依次包含:仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段、小鼠EPM、II型跨膜蛋白抗原;优选地,所述II型跨膜蛋白抗原为全长H1N1 NA蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示;

(10)融合蛋白16:从N端到C端依次包含:猪Galectin-3蛋白N端的1-119位氨基酸片段、小鼠EPM、II型跨膜蛋白抗原;优选地,所述II型跨膜蛋白抗原为全长H1N1 NA蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示,所述猪Galectin-3蛋白N端的1-119位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示;

(11)融合蛋白18:从N端到C端依次包含:多次跨膜蛋白抗原、小鼠EPM、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段;优选地,所述多次跨膜蛋白抗原为全长CXCR2蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示,所述小鼠EPM的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。

[0019] 本发明的另一方面提供一种重组核酸分子,其特征在于,包含编码本发明任一项所述融合蛋白的核酸;优选地,所述重组核酸分子为mRNA或DNA。

[0020] 本发明的另一方面提供一种重组基因表达盒,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子。

[0021] 进一步地,所述重组基因表达盒还包括启动子、终止子、调控序列中的一种或多种。

[0022] 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、或本发明所述重组基因表达盒。

[0023] 进一步地,所述重组载体包含原核载体或真核载体。

[0024] 进一步地,所述原核载体包含但不限于大肠杆菌载体。

[0025] 进一步地,所述大肠杆菌载体包含但不限于pET载体、pGEX载体、pMAL载体、pBAD载体、pUC载体、pBR载体。

[0026] 进一步地,所述真核载体包含但不限于酵母表达载体、昆虫表达载体、哺乳动物细胞表达载体。

[0027] 进一步地,所述酵母表达载体包含但不限于pPICZ载体、pGAPZ载体、pYES载体、pGAP载体、pA0815载体、pPIC9载体。

[0028] 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、或本发明所述重组基因表达盒、或本发明所述重组载体。

[0029] 进一步地,所述重组宿主细胞包含真核细胞或原核细胞。

[0030] 进一步地,所述真核细胞包含哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞。

[0031] 进一步地,所述酵母细胞包含但不限于酿酒酵母、毕赤酵母、汉逊酵母。

[0032] 进一步地,所述原核细胞包含但不限于大肠杆菌细胞、枯草芽孢杆菌细胞、假单胞菌细胞。

[0033] 进一步地,所述大肠杆菌细胞包含但不限于BL21 (DE3)、DH5 α 、TOP10、Rosetta。

[0034] 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任一项融合蛋白,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;优选地,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0035] 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任一项融合蛋白,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药物组合物;优选地,所述重组疫苗为核酸疫苗或亚单位疫苗;更优选地,所述重组疫苗为核酸疫苗。

[0036] 本发明的另一方面提供一种用于促进融合蛋白随外泌体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任一项融合蛋白,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药物组合物,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗。

[0037] 本发明的另一方面提供一种用于提高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任一项融合蛋白,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药物组合物,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗。

[0038] 本发明的另一方面提供一种或多种本发明任一项融合蛋白,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药物组合物,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:

(1) 制备用于促进抗原随外泌体分泌到细胞外的药物;

- (2) 制备用于提高抗原免疫原性的药物;
- (3) 制备用于治疗、接种疫苗或生物免疫的药物。

[0039] 进一步地,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。

[0040] 进一步地,所述药物为用于预防和/或治疗与CXCR2 (C-X-C 趋化因子受体 2) 相关的疾病的药物;优选地,所述与CXCR2相关的疾病包含炎症性疾病、肿瘤相关疾病、心血管疾病、代谢性疾病、神经系统疾病、肾脏疾病的药物;更优选地,所述炎症性疾病包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)、类风湿关节炎(RA)、银屑病,所述肿瘤相关疾病包含癌症进展与转移、急性髓系白血病(AML),所述心血管疾病包含动脉粥样硬化、心肌梗死与心力衰竭,所述代谢性疾病包含肥胖与胰岛素抵抗、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),所述神经系统疾病包含多发性硬化(MS)、中风,所述肾脏疾病包含急性肾损伤(AKI)、慢性肾病(CKD)。

[0041] 本发明的融合蛋白分子架构及编码其的核酸架构、药物组合物、重组疫苗等具有如下有益技术效果:

1. 本发明提供一种包含Galectin-3的高度保守N端结构域的融合分子架构,能广泛应用于I型、II型、多次跨膜型和分泌型抗原蛋白,与防内吞基序组合使用能有效改善抗原的表达效率,并促使抗原蛋白进入外泌体分泌途径,改善免疫响应水平。

[0042] 2. 本发明的融合分子架构的关键组成元件包含:抗原、跨膜区(如抗原本身即包含跨膜区,则不需要该元件)、EPM、Galectin-3的高度保守N端结构域。该架构可以促使融合蛋白固定到外泌体膜上,随外泌体分泌到细胞外,促使抗原递送到免疫器官或是生发中心,有效增加免疫系统识别抗原蛋白的概率,从而提高免疫响应水平,为制备高效诱导免疫应答的免疫药物领域提供新技术。

[0043] 3. 实施例1证明:①本发明可以融合在I型跨膜蛋白的胞内端,能够发挥促进蛋白分泌表达的作用;②本发明与EPM元件组合使用,能够进一步改善促进抗原分泌表达的效率,效果明显优于现有技术;③本发明与小鼠EPM元件组合使用,效果最佳,不仅能够促进抗原分泌表达,并且能够促使抗原在细胞内高丰度表达、积累;④本发明所涉及的核心元件在不同物种中的功能保守,不同物种的Galectin-3N端肽段都具备相似的效果。

[0044] 4. 实施例2证明本发明能够应用于分泌型抗原表达,显著提高抗原的表达及分泌效率,并且效果优于现有技术。

[0045] 5. 实施例3证明本发明能够应用于II型跨膜蛋白的表达、显著改善表达水平,并且效果优于常规技术手段。

[0046] 6. 实施例2、3均再次证明本发明的元件序列在不同物种中的功能较为保守,不同物种来源的元件序列,均能发挥相似的促表达、促分泌作用。

[0047] 7. 实施例4证明本发明能够应用于多次跨膜蛋白的表达、显著改善表达水平,并且效果优于常规技术手段。

[0048] 8. 实施例5表明融合本发明元件的mRNA疫苗5诱导豚鼠产生的中和抗体水平显著高于mRNA疫苗19 ($p < 0.05$)。证明基于本发明的mRNA疫苗能够通过改善抗原呈递水平诱导更高水平的免疫效价。分析产生上述结果的原因,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,最终诱导高水平的免疫反应。

[0049] 9. 实施例6表明基于本发明的mRNA疫苗12在豚鼠模型中诱导了更高水平的免疫反应,显著优于常规分泌设计的mRNA疫苗9 ($p < 0.01$),再次证明基于本发明的mRNA疫苗不仅在体外细胞实验中能提高蛋白的表达及分泌效果(实施例2),并且能够有效改善mRNA疫苗的免疫效果。

附图说明

- [0050] 图1为本发明所涉及的融合分子非限制性原理示意图。
[0051] 图2为表达本发明的融合蛋白的非限制性分子盒示意图。
[0052] 图3为实施例1所使用疫苗的分子设计架构示意图。
[0053] 图4为图3中的疫苗所对应的质控图。
[0054] 图5 为疫苗1-5的Western blot结果图。
[0055] 图6为疫苗2、5、7的Western blot结果图。
[0056] 图7为疫苗5、20、21的Western blot结果图。
[0057] 图8为实施例2所使用疫苗的分子设计架构示意图。
[0058] 图9为图8中的疫苗所对应的质控图。
[0059] 图10为疫苗8-13的Western blot结果图。
[0060] 图11为实施例3所使用疫苗的分子设计架构示意图。
[0061] 图12为图11中的疫苗所对应的质控图。
[0062] 图13为疫苗14-16的Western blot结果图。
[0063] 图14为实施例4所使用疫苗的分子设计架构示意图。
[0064] 图15为图14中的疫苗所对应的质控图。
[0065] 图16为疫苗17-18的Western blot结果图。
[0066] 图17为疫苗19的分子设计架构示意图。
[0067] 图18A-18B为疫苗5、疫苗19在豚鼠模型中的免疫效果对比。
[0068] 图19A-19B为疫苗9、疫苗12在豚鼠模型中的免疫效果对比。

具体实施方式

[0069] 术语和定义

术语“Galectin-3”指 β -半乳糖苷结合凝集素蛋白,由LGALS3基因编码,广泛表达于多种细胞类型中。Galectin-3具有三个结构域:高度保守的N端结构域、长的N端结构域和C端的碳水化合物识别结构域(CRD)。Galectin-3的N端保守结构域为非凝集素区域,包含7到14个重复的9氨基酸序列(YPG- X_3 -P-[G/S]-A),其中X代表任意氨基酸残基, X_3 表示连续3个任意氨基酸残基的组合。Galectin-3可来源于任意物种,优选来源于哺乳动物或禽类,更优选来源于仓鼠、鸡、人。优选地,所述Galectin-3的N端结构域的截短序列包含任意的SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列。

[0070] 术语“外泌体(exosome)”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。

[0071] 术语“防内吞基序(Endocytosis prevention motif, EPM)”指能够阻止内吞的内吞作用阻止基序。EPM可将靶蛋白束缚在细胞骨架上,从而阻止定位到包被小窝并阻止内吞作用。EPM可来源于任意物种,优选来源于哺乳动物,更优选来源于豚鼠、小鼠、人。优选地,所述EPM包含任意的SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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)。

[0082] 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。

[0083] 术语“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、抗粘合剂、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。

[0084] 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。

[0085] 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(包括融合分子核酸架构和蛋白架构)、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。

[0086] 本发明提供的融合蛋白和编码核酸及其元件,制备方法及应用中,所用原料及试剂均可由市售获得。根据本领域常规的分子克隆、表达构建、疫苗制备、免疫等基础知识,本领域技术人员均可以实施实现本发明的实施例方法。

[0087] 下面结合实施例,进一步阐明本发明。其中,作为一种优选,选用核酸疫苗架构用于制备重组疫苗。

[0088] 实施例1本发明的融合分子在I型跨膜蛋白中的应用及最佳组合方式筛选

图1为本发明所涉及的融合分子非限制性原理示意图,解释了本发明的融合分子作用机理。图2为表达本发明的融合蛋白的非限制性分子盒示意图。图2给出了A-D四种示例性的融合蛋白,其中融合蛋白A从N端到C端依次包含信号肽、跨膜段、EPM、Galectin3的N端

1-120个氨基酸,融合蛋白B从N端到C端依次包含I型跨膜抗原、EPM、Galectin3的N端1-120个氨基酸,融合蛋白C从N端到C端依次包含Galectin3的N端1-120个氨基酸、EPM、II型跨膜抗原,融合蛋白D从N端到C端依次包含多次跨膜抗原、EPM、Galectin3的N端1-120个氨基酸。本实施例主要阐述本发明的融合分子在I型跨膜蛋白中的应用及最佳组合方式筛选。

[0089] 本发明所采用的核心功能元件为Galectin-3蛋白的N端结构域,为了验证本发明能够应用于I型跨膜蛋白,并且对比筛选出本发明的最佳组合方式,需要制备能够产生如图3所示的重组核酸疫苗。首先,图3为实施例1所使用疫苗的分子设计架构示意图,包含疫苗1-5、7、疫苗20-21的结构示意图。按照图3的分子示意图构建所需的基因表达盒,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。示例性的,生产加帽mRNA疫苗用于后续的实验。加帽mRNA生产流程如下:

步骤a:将用于生产加帽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。

[0090] 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。

[0091] 为了能够更严谨地展示本发明具备的效果,本实施例1中的mRNA疫苗抗原均为H9N2的HA蛋白(SEQ ID NO: 1),且序列优化方式保持一致。

[0092] 根据上述方法,制备用于本实施例对比实验的mRNA疫苗1-5、7、mRNA疫苗20-21(结构示意图如图3):

mRNA疫苗1,从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、豚鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 2)、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-104位氨基酸片段(SEQ ID NO: 3);

mRNA疫苗2,从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、豚鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 2)、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段(SEQ ID NO: 4);

mRNA疫苗3,从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、豚鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 2)、仓鼠Galectin-3蛋白N端的30-104位氨基酸片段(SEQ ID NO: 5);

mRNA疫苗4,从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段(SEQ ID NO: 4);

mRNA疫苗5,从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段(SEQ ID NO: 4);

mRNA疫苗7,现有技术(CN118620085B),从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、豚鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 2)、鸡ITCH的WW结构域氨基酸片段(SEQ ID NO: 8)。

[0093] mRNA疫苗20,从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、鸡Galectin-3蛋白N端的1-101位氨基酸片段(SEQ

ID NO: 19);

mRNA疫苗21,从N端到C端的表达核心元件依次包含:H9N2 HA全长序列(SEQ ID NO: 1)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、人Galectin-3蛋白N端的1-109位氨基酸片段(SEQ ID NO: 20);

上述疫苗的质控结果如图4所示。

[0094] 对比实验分为三组,具体分组情况如下:

组A:包含mRNA疫苗1、mRNA疫苗2、mRNA疫苗3、mRNA疫苗4、mRNA疫苗5,平行检测,目的是对比不同筛选方式的Galectin-3 N端片段,是否都能够促进蛋白分泌表达,以及搭配不同来源的防内吞基序EPM(endocytosis prevention motif),是否能进一步改善分泌表达的效果。

[0095] 组B:包含mRNA疫苗2、mRNA疫苗5、mRNA疫苗7,平行检测,目的是对比本发明的最佳组合方式产生的效果是否优于现有技术。

[0096] 组C:包含mRNA疫苗5、mRNA疫苗20、mRNA疫苗21,平行检测,目的是证明本发明所涉及的核心元件在不同物种中的功能保守,不同物种的Galectin-3 N端肽段都具备相似的效果。

[0097] 上述组A、组B和组C的平行检测,均采用体外转染的方式,将等量的mRNA疫苗转染至HEK293细胞,转染后48h收集细胞和培养基上清,进行蛋白浓缩提取。提取后的蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,每个样品取40微克,等量上样,进行SDS-PAGE电泳以及Western blot检测。mRNA疫苗1-5、7、20-21的预估分子量如表1所示。

[0098] 表1 mRNA疫苗1-5、7、20-21的预估分子量

名称	预估分子量 (kDa)
mRNA 疫苗 1	82.3
mRNA 疫苗 2	80.7
mRNA 疫苗 3	77.8
mRNA 疫苗 4	77.3
mRNA 疫苗 5	82.5
mRNA 疫苗 7	93.3
mRNA 疫苗 20	80.9
mRNA 疫苗 21	81.5

[0099] 组A检测结果如图5所示。mRNA疫苗4的上清蛋白检测出目的蛋白信号,意味着单独使用本发明元件(Galectin-3的N端结构域氨基酸肽段),就能够促使抗原分泌表达,但效果一般。mRNA疫苗2和mRNA疫苗4的对比结果证明,添加EPM元件,能进一步促进抗原分泌表达。mRNA疫苗1、mRNA疫苗2、mRNA疫苗3的对比结果证明,不同筛选长度的本发明元件,和EPM元件组合使用,均能够促使抗原分泌表达,其中,含有1-120位氨基酸筛选肽段(mRNA疫苗2)的促分泌、促表达效果最好。mRNA疫苗2、mRNA疫苗4和mRNA疫苗5的对比结果证明,小鼠来源与豚鼠来源的EPM元件均能与本发明组合使用,进一步促进抗原分泌表达,其中,小鼠EPM元件

与本发明组合,效果最好。

[0100] 组B检测结果如图6所示,含有本发明的mRNA疫苗2和mRNA疫苗5上清中检测到的目的蛋白信号明显高于现有技术(mRNA疫苗7),此外,小鼠EPM元件与本发明组合(mRNA疫苗5)不仅能够促进分泌表达,并且能够促使目的蛋白在细胞内高丰度表达、积累。

[0101] 组C检测结果如图7所示,三个疫苗上清中均能检测到目的蛋白,证明不同物种来源的Galectin-3 N端结构域均具备促进蛋白分泌表达的功能。

[0102] 综合上述A、B、C三组平行测试结果,可以得出以下结论:①本发明可以融合在I型跨膜蛋白的胞内端,能够发挥促进蛋白分泌表达的作用;②本发明与EPM元件组合使用,能够进一步改善促进抗原分泌表达的效率,效果明显优于现有技术;③本发明与小鼠EPM元件组合使用,效果最佳,不仅能够促进抗原分泌表达,并且能够促使抗原在细胞内高丰度表达、积累;④本发明所涉及的核心元件在不同物种中的功能保守,不同物种的Galectin-3 N端肽段都具备相似的效果。

[0103] 实施例2本发明的融合分子在分泌蛋白中的应用及最佳组合方式筛选

为了验证本发明能够应用于分泌蛋白,并且效果优于现有技术,需要制备能够产生如图8所示的重组核酸疫苗,包含疫苗8-13。首先,按照图8的分子示意图构建所需的基因表达盒,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。示例性的,生产加帽mRNA疫苗用于后续的验证实验。加帽mRNA生产流程如下:

步骤a:将用于生产加帽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。

[0104] 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。

[0105] 为了能够更严谨地展示本发明具备的效果,本实施例中的mRNA疫苗抗原均为BVDV的3个E2蛋白融合(SEQ ID NO: 9),均采用专利CN116284272B公开的3E2融合蛋白设计,且序列优化方式保持一致。

[0106] 根据上述方法,制备用于本实施例对比实验的mRNA疫苗8-13(图8):

mRNA疫苗8,从N端到C端的表达核心元件依次包含:信号肽(SEQ ID NO: 10)、牛IgG Fc结构域(SEQ ID NO: 11)、BVDV 3E2融合蛋白(SEQ ID NO: 9);

mRNA疫苗9,从N端到C端的表达核心元件依次包含:信号肽(SEQ ID NO: 10)、牛IgG Fc结构域(SEQ ID NO: 11)、BVDV 3E2融合蛋白(SEQ ID NO: 9)、STABILON肽段(SEQ ID NO: 12);

mRNA疫苗10,从N端到C端的表达核心元件依次包含:信号肽(SEQ ID NO: 10)、牛IgG Fc结构域(SEQ ID NO: 11)、BVDV 3E2融合蛋白(SEQ ID NO: 9)、牛CD80的跨膜结构域(SEQ ID NO: 13)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、EABR氨基酸片段(SEQ ID NO: 7);

mRNA疫苗11,从N端到C端的表达核心元件依次包含:信号肽(SEQ ID NO: 10)、牛IgG Fc结构域(SEQ ID NO: 11)、BVDV 3E2融合蛋白(SEQ ID NO: 9)、牛CD80的跨膜结构域(SEQ ID NO: 13)、豚鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 2)、牛ITCH的WW结构域氨基酸片段(SEQ ID NO: 14);

mRNA疫苗12,从N端到C端的表达核心元件依次包含:信号肽(SEQ ID NO: 10)、牛IgG Fc结构域(SEQ ID NO: 11)、BVDV 3E2融合蛋白(SEQ ID NO: 9)、牛CD80的跨膜结构域(SEQ ID NO: 13)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段(SEQ ID NO: 4);

mRNA疫苗13,从N端到C端的表达核心元件依次包含:信号肽(SEQ ID NO: 10)、牛IgG Fc结构域(SEQ ID NO: 11)、BVDV 3E2融合蛋白(SEQ ID NO: 9)、牛CD80的跨膜结构域(SEQ ID NO: 13)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、牛Galectin-3蛋白N端的1-124位氨基酸片段(SEQ ID NO: 15)。

[0107] 上述疫苗的质控结果如图9所示。

[0108] mRNA疫苗8-12进行平行检测,用来对比验证本发明是否能够改善分泌蛋白的表达及分泌效率;mRNA疫苗13单独检测,用来证明本发明所涉及的核心元件在不同物种中的功能保守,不同物种的Galectin-3 N端肽段都具备相似的效果。

[0109] 采用体外转染的方式,将等量的mRNA疫苗转染至HEK293细胞,转染后48h收集细胞和培养基上清,进行蛋白浓缩提取。提取后的蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,每个样品取40微克,等量上样,进行SDS-PAGE电泳以及Western blot检测。mRNA疫苗8-13的预估分子量如表2所示。

[0110] 表2 mRNA疫苗8-13的预估分子量

名称	预估分子量 (kDa)
mRNA疫苗8	88.6
mRNA疫苗9	90.2
mRNA疫苗10	108.6
mRNA疫苗11	124.3
mRNA疫苗12	111.5
mRNA疫苗13	113.5

检测结果如图10所示。mRNA疫苗8、mRNA疫苗9的上清中未检测到目的蛋白信号,意味着仅使用信号肽或是搭配使用STABILON促表达原件,都不能使3E2蛋白显著表达、分泌,无法满足应用需求。mRNA疫苗10、mRNA疫苗11,和融合了本发明元件mRNA疫苗12均能在上清中检测到高丰度的目的蛋白,且mRNA疫苗12的目的蛋白信号最强,证明本发明能够应用于分泌型抗原表达,显著提高抗原的表达及分泌效率,并且效果优于现有技术。mRNA疫苗13同样在上清中检测到目的蛋白大量表达,再次证明本发明的元件序列在不同物种中的功能较为保守,不同物种来源的元件序列,均能发挥相似的促表达、促分泌作用。

[0111] 实施例3本发明的融合分子在II型跨膜蛋白中的应用及最佳组合方式筛选

为了验证本发明能够应用于II型跨膜蛋白,并且效果优于常规技术,需要制备能够产生如图11所示的重组核酸疫苗,包含疫苗14-16。首先,按照图11的分子示意图构建所需的基因表达盒,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。示例性的,生产加帽mRNA疫苗用于后续的验证实验。加帽mRNA生产流程如下:

步骤a:将用于生产加帽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。

[0112] 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。

[0113] 为了能够更严谨地展示本发明具备的效果,本实施例中的mRNA疫苗抗原均为H1N1的NA蛋白(SEQ ID NO: 16),且序列优化方式保持一致。

[0114] 根据上述方法,制备用于本实施例对比实验的mRNA疫苗14-16(图11):

mRNA疫苗14,表达核心元件包含表达全长H1N1 NA蛋白(SEQ ID NO: 16);

mRNA疫苗15,从N端到C端的表达核心元件依次包含:仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段(SEQ ID NO: 4)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、全长H1N1 NA蛋白(SEQ ID NO: 16);

mRNA疫苗16,从N端到C端的表达核心元件依次包含:猪Galectin-3蛋白N端的1-119位氨基酸片段(SEQ ID NO: 17)、小鼠来源的EPM(SEQ ID NO: 6)、全长H1N1 NA蛋白(SEQ ID NO: 16);

上述疫苗的质控结果如图12所示。

[0115] mRNA疫苗14、15进行平行检测,用来对比验证本发明是否能够改善II型跨膜蛋白的表达;mRNA疫苗15、16进行平行检测,用来证明本发明所涉及的核心元件在不同物种中的功能保守,不同物种的Galectin-3 N端肽段都具备相似的效果。

[0116] 采用体外转染的方式,将等量的mRNA疫苗转染至HEK293细胞,转染后48h收集细胞和培养基上清,进行蛋白浓缩提取。提取后的蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,每个样品取40微克,等量上样,进行SDS-PAGE电泳以及Western blot检测。mRNA疫苗14-16的预估分子量如表3所示。

[0117] 表3 mRNA疫苗14-16的预估分子量

名称	预估分子量 (kDa)
mRNA疫苗14	54.8
mRNA疫苗15	70.2
mRNA疫苗16	71.7

检测结果如图13所示。由于NA蛋白为二类跨膜蛋白,常规表达时不分泌,因此mRNA疫苗14仅检测裂解蛋白中的表达量。对比mRNA疫苗14和mRNA疫苗15的目的蛋白信号,发现融合了本发明元件的mRNA疫苗15上清中能够检测到目的蛋白显著表达,而常规单独表达NA全长的mRNA疫苗14未能检测到蛋白表达,证明本发明能够应用于II型跨膜蛋白的表达、显著改善表达水平,并且效果优于常规技术手段。

[0118] 对比mRNA疫苗15和mRNA疫苗16的目的蛋白信号,上清中均能检测到目的蛋白显著表达,再次证明本发明的元件序列在不同物种中的功能较为保守,不同物种来源的元件序列,均能发挥相似的促表达、促分泌作用。

[0119] 实施例4本发明的融合分子在多次跨膜蛋白中的应用及最佳组合方式筛选

为了验证本发明能够应用于多次跨膜蛋白,并且效果优于常规技术,需要制备能够产生如图14所示的重组核酸疫苗,包含疫苗17-18。首先,按照图14的分子示意图构建所需的基因表达盒,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。示例性的,生产加帽mRNA疫苗用于后续的验证实验。加帽mRNA生产流程如下:

步骤a:将用于生产加帽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。

[0120] 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。

[0121] 为了能够更严谨地展示本发明具备的效果,本实施例中的mRNA疫苗抗原均为7次跨膜蛋白CXCR2 (SEQ ID NO: 18),且序列优化方式保持一致。

[0122] 根据上述方法,制备用于本实施例对比实验的mRNA疫苗17、18(图14):

mRNA疫苗17,表达核心元件包含表达全长CXCR2 (SEQ ID NO: 18);

mRNA疫苗18,从N端到C端的表达核心元件依次包含:全长CXCR2 (SEQ ID NO: 17)、小鼠来源的EPM (SEQ ID NO: 6)、仓鼠Galectin-3蛋白N端的1-120位氨基酸片段 (SEQ ID NO: 4);

上述疫苗的质控结果如图15所示。

[0123] mRNA疫苗17、18进行平行检测,用来对比验证本发明是否能够改善多次跨膜蛋白的表达。

[0124] 采用体外转染的方式,将等量的mRNA疫苗转染至HEK293细胞,转染后48h收集细胞和培养基上清,进行蛋白浓缩提取。提取后的蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,每个样品取40微克,等量上样,进行SDS-PAGE电泳以及Western blot检测。mRNA疫苗17-18的预估分子量如表4所示。

[0125] 表4 mRNA疫苗17-18的预估分子量

名称	预估分子量 (kDa)
mRNA疫苗17	45.6
mRNA疫苗18	62.4

检测结果如图16所示。由于CXCR2蛋白为多次跨膜蛋白,常规全长表达时不分泌,因此mRNA疫苗17仅检测裂解蛋白中的表达量。对比mRNA疫苗17和mRNA疫苗18的目的蛋白信号,发现融合了本发明元件的mRNA疫苗18上清中能够检测到目的蛋白显著表达,而常规单独表达CXCR2全长的mRNA疫苗17未能检测到蛋白表达,证明本发明能够应用于多次跨膜蛋白的表达、显著改善表达水平,并且效果优于常规技术手段。

[0126] 实施例5基于本发明的H9N2重组核酸疫苗改善豚鼠的免疫效果

为了展示本发明在动物体内的有效性,本实施例构建了表达H9N2 HA全长蛋白 (SEQ ID NO: 1)的mRNA疫苗19,图17给出了疫苗19的分子设计架构示意图。与实施例1中的mRNA疫苗5做为平行对比测试疫苗,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。

[0127] 实验选用SPF级豚鼠共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5所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0128] 表5免疫实验动物分组及处理方式

疫苗	免疫日程	
	Day0	Day21
疫苗 19	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射
疫苗 5	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射

[0129] 将上述各组豚鼠按照表1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)。免疫及取样流程如图18A所示。

[0130] 血凝抑制效价检测结果如表6和图18B所示,由实验结果可知,融合本发明元件的mRNA疫苗5诱导豚鼠产生的中和抗体水平显著高于mRNA疫苗19($p < 0.05$)。证明基于本发明的mRNA疫苗能够通过改善抗原呈递水平诱导更高水平的免疫效价。

[0131] 表6 免疫豚鼠血清样品H9亚型禽流感HI抗体检测结果

样品编号	HI 效价	样品编号	HI 效价 (2 ²)
	白陶土处理		白陶土处理
L1/001/D0/S	<1:4	L1/001/D28/S	11
L1/002/D0/S	<1:4	L1/002/D28/S	12
L1/003/D0/S	<1:4	L1/003/D28/S	12
L1/004/D0/S	<1:4	L1/004/D28/S	11
L1/005/D0/S	<1:4	L1/005/D28/S	11
L2/006/D0/S	<1:4	L2/006/D28/S	12
L2/007/D0/S	<1:4	L2/007/D28/S	12
L2/008/D0/S	<1:4	L2/008/D28/S	12
L2/009/D0/S	<1:4	L2/009/D28/S	13
L2/010/D0/S	<1:4	L2/010/D28/S	13

[0132] 注:白陶土处理将血清作了4倍稀释。

[0133] 分析产生上述结果的原因,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,最终诱导高水平的免疫反应。

[0134] 实施例6基于本发明的BVDV重组核酸疫苗改善豚鼠的免疫效果

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蛋白设计的差异,本实施例沿用实施例2中的免疫抗原,采用mRNA疫苗9和mRNA疫苗12进行对比试验。本实施例在豚鼠体内进行免疫实验,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9为常规分泌蛋白设计,疫苗12为基于本发明的设计。

[0135] 实验选用SPF级豚鼠共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7所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0136] 表7免疫实验动物分组及处理方式

疫苗	免疫日程	
	Day0	Day21
疫苗 9	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射
疫苗 12	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射	剂量 10 μ g/只, 右腿肌肉注射

[0137] 将上述各组豚鼠按照表3的免疫流程进行一免和二免,第0天(一免前)、第28天(Day28)采血,分离血清。待检样品56 $^{\circ}$ C灭活30min,检测针对BVDV-1a,NADL株(GenBank:M31182.1)的中和抗体效价(固定病毒-稀释样品法),评价不同设计疫苗对豚鼠的免疫效果。免疫及取样流程如图19A所示。

[0138] 检测结果如表8和图19B所示,由实验结果可知,基于本发明的mRNA疫苗12在豚鼠模型中诱导了更高水平的免疫反应,显著优于常规分泌设计的mRNA疫苗9($p < 0.01$),再次证明基于本发明的mRNA疫苗不仅在体外细胞实验中能提高蛋白的表达及分泌效果(实施例2),并且能够有效改善mRNA疫苗的免疫效果。

[0139] 表8血清抗体检测结果(BVDV-1a)

样品编号	不同稀释度(Log ₂)细胞孔阳性统计 (每个稀释度 4个重复)												结果 Log ₂
	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	
L5/021/D0	4	4	4	4	4	4	4	4	/	/	/	/	<-2
L6/026/D0	4	4	4	4	4	4	4	4	/	/	/	/	<-2
L5/021/D28	/	/	/	/	0	0	0	0	2	3	4	4	-10.26
L5/022/D28	/	/	/	/	0	0	0	0	0	4	4	4	-10.5
L5/023/D28	/	/	/	/	0	0	0	2	3	4	4	4	-9.26
L5/024/D28	/	/	/	/	0	0	2	4	4	4	4	4	-8
L5/025/D28	/	/	/	/	0	0	1	2	3	4	4	4	-9
L6/026/D28	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	3	4	-11.67
L6/027/D28	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	1	4	-12.33
L6/028/D28	/	/	/	/	0	0	0	0	0	4	4	4	-10.5
L6/029/D28	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	3	4	-11.67
L6/030/D28	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	3	4	-11.67
阳性血清	0/4	0/4	/										成立
阴性血清	4/4	4/4	/										成立
病毒对照	4/4												成立
空白对照	0/4												成立

[0140] 综上所述,本发明提供一种融合分子架构,具有极高的商业价值及广阔的应用前景,具备以下优良特征:①本发明可以融合在多种类型蛋白的胞内端,能够发挥促进蛋白表

达、分泌的作用；②本发明与EPM元件组合使用，能够进一步改善促进抗原分泌表达的效率，效果明显优于现有技术；③本发明与小鼠EPM元件组合使用，效果最佳，不仅能够促进抗原分泌表达，并且能够促使抗原在细胞内高丰度表达、积累；④本发明所涉及的核心元件在不同物种中的功能保守，不同物种的Galectin-3 N端肽段都具备相似的效果；⑤本发明能够应用于动物免疫药物的生产和研发，显著提高抗原的免疫原性，诱导接种个体产生高水平的免疫应答，且效果优于当前已有技术。

[0141] 上述所有实施例所涉及的蛋白氨基酸序列如表9所示。

[0142] 表9本发明所涉及的蛋白氨基酸序列

序列编号	序列
SEQ ID NO:1	METVSLITILLVATVSNADKICIGYQSTNSTETV DTLTENNVPTVTHVKELLHTEHNGMLCATSLGHPL ILDCTIEGLIYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPS AVNGLCYPGNVENLEELRSLFSSARSYQRIQIFP DTIWNVSYSGTSKACSDSFYRSMRWLTQKNNAYP IQDAQYTNNQKNILFMWG INHPPTDTTQTNLTYT RTDTTTSVATEE INRIFKPLIGRPLVNGLMGRI DYYWSVLKPGQTLRIRSDGNLIAPWYGHILSGES HGRILKTDLKRGSCTVQCQTEKGGNTTLPFQNV SKYAFGNCSKYIGITSLKLAVGLRNVPSRSSRGL FGAIAGFIEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAA DRDSTQKAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEI IDHEF SEVETRLNMINKIDDQIQDIWAYNAELLVLEN QKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAVEDGKGCF ELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRKYQEESKLERQK IEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSLVIAMGFAAF LFWAMSNGSCRCNICI
SEQ ID NO:2	GNPEHREMGETLPEDPGEYSVVFGGSMMSCPGLP DGLPARTDLS
SEQ ID NO:3	MADGFSLNDALAGSGNPNPQGWPWAWGNQPGAGG YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGPTAP GAYPGPAPGAYPGQPGASGAYPSAPGAYPAAGPY GA
SEQ ID NO:4	MADGFSLNDALAGSGNPNPQGWPWAWGNQPGAGG YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGPTAP GAYPGPAPGAYPGQPGASGAYPSAPGAYPAAGPY GAPTGAL TVPYKLPLAGG
SEQ ID NO:5	PGAGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYP GPTAPGAYPGPAPGAYPGQPGASGAYPSAPGAYP AAGPYGA

SEQ ID NO:6	ALPGNPDHREMGETLPEEVGEYRQPSGGSVVPVSP GPPSGLEPTSSSPY
SEQ ID NO:7	FNSSINNIHEMEIQLKDALEKNQQWLVDQQRREV YVKGLLAKIFELEKKTETAHSLP
SEQ ID NO:8	GPLPPGWEQRVDQHGRVYYVDHVEKRTTWDRPEP LPPSWERRVDNMGRYYYYVDFTRTTTWQRPTLES VRNYEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRFIYGNQDFSS TQNKEFDPLGPLPPGWEKRTDSNGRVYFVNHNTR ITQWEDPRSQQQLNEKPLPEGWEMRFTVDGIPYF VDHNRRTTTYIDPRT
SEQ ID NO:9	HLDCPEFSYAIKSDRIGPLGAEGLTWTKDYS HEMKLEDTMVIAWCKDGKVFYLRCTRETRYLAI LHSRALPTSVVFKKLDGRRQEDTVEMDDNFEFG LCPCDAKPIVRGKFNTLLNGPAFQMVCPIGWTG TVSCMLANRDLDTAVVRTYRRSKPFPYRQCGG SGGGGSGGLPDCCKPDFSYAIAKNDEIGPLGATGL TTQWYEYSDGMRLQDTEVVVWCKDGEFKYLIRCE REARYLAILHTRALPTSVVFEKILNGKEQEDVVE MDDNFEFGLCPCDAKPLVRGKFNTLLNGPAFQM VCPIGWTGTVSCTLANKDTLATTVVRTYKRHRPF PYRQCGGSGGGGSGGFPECKEGFYAISKDKKM GLLGPESLTTWHLPTKKIVDSMVQVWCEGKDLK ILRTCTKEERYLVAVHERALSTSAEFLQISDGT GPEVIDMPDDFEFGLCPCDSKPVIKGKFNTSLLN GPAFQMVCPQGTGTIECILANQDLDTTVIRTY RRTTPFQRRKWC
SEQ ID NO:10	MNPLWTLLFVLSAPRGVLS
SEQ ID NO:11	DPRCKTTCDCPPPELPGGPSVFIKPKPKDTLT ISGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEVNT ATTKPREEQFNSTYRVVSALRIHQDWTGGKEFK CKVHNEGLPAPIVRTISRKGPAREPQVYVLAPP QEELSKSTVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQPE SEDKYGTPPQLDADGSYFLYSRLRVDNRNSWQEG DTYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK
SEQ ID NO:12	KDGKKDKKEEDKK
SEQ ID NO:13	LTWTIIIPVSAFGISVIIAVILTCLTCRNAAIRR QRRENEVEMQSCSQSP

<p>SEQ ID NO:14</p>	<p>APLPPGWEQRVDQHGRVYYVDHIEKRRTTWRPEP LPPGWERRVDNMGRIYYVDHFTRTTTWRPTLES VRNYEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRFIYGNQDLFA TSQNKEFDPLGPLPPGWEKRTDSNGRVYFVNHT RITQWEDPRNQGQLNEKPLPEGWEMRFTVDGIPY FVDHNRRTTTYIDPRT</p>
<p>SEQ ID NO:15</p>	<p>MADGFSLNDALSGSGKPNPQGWPQSWGNQPAGAG GYPGAAYPGAYPGQAPPGPYPGQGPPGAYPGQGP PGAYPGQPPGAYPGPTAPAYPGPTAPSAYPGPG AYPPPAQPSAPGAYPAAGPYGI</p>
<p>SEQ ID NO:16</p>	<p>MSPNQKIITIGSICMTIGIASLILQIGNIISIWI SHSIQTENQSQSEICNQNVIYENNTWVNQTYVN VSNTNFVAEQTVASVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK DNSVRIGSKGDVFIREFIISCSHLECRFFLTQ GALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPY NSRFESVAWSASACHDGTSWLTIGISGPDNGAVA VLKYNGIITDTIKSWRKNILRTQESECACVNGSC FTVMTDGPSNGQASYKIFKIEKGKIVKSVELNAP NYHYEECSCYPESSEIICVCRDNWHGSNRPWVSF NQNLEYQIGYICSGIFGDNRPNDKTGSCGPVFL NGANGVKGFSEFKYNGVWIGRTKSTNSRMGFEMI WDPDGWTRTDDKFSVKQDIIGITDWSGYSGSFVQ HPELTGLDCMRPCFWVELIRGRP KENTIWTS GSS ISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK</p>
<p>SEQ ID NO:17</p>	<p>MADGFSLNDALSGSGKPNPQGWPQAWGNQPAGPG GYPGASYPGTYPGQPPGAYPGQAPPGAYPGQAP PGAYPGPTAPGYPGAAPGAYPGQPPGPGAYPPP AQPSAPGAYPATGPYGA</p>
<p>SEQ ID NO:18</p>	<p>MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLL DAAPCEPESLEINKYFVVIYALVFLLSLLGNL VMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLP IWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILL LACISVDRYLAIVHATR TLTKRYLVKFI CLSIW GLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNT ANWRMLLRILPQSFGFIVPLLIMLFCYGFTRLTL FKAHMGQKHRAMRVIFAVLIFLLCWLPYNLVLL ADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILH SCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSL PKDSRPSFVGSSSGHTSTTL</p>

SEQ ID NO:19	MSDGFSLSDALPAHNPGAPPPQGWRPPGPGAFP AYPGYPGAYPGAPGPYPGAPGPHHGPPGPYPGGP PGPYPGGPPGPYPGGPPGPYPGGPTAPYSEAPA
SEQ ID NO:20	MADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPGAWGNQPAGAG GYPGASYPGAYPGQAPPAYPGQAPPAYPGAPG AYPGAPAPGVYPPSPGAYPSSGQPSATGAYP ATGPYGA

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。

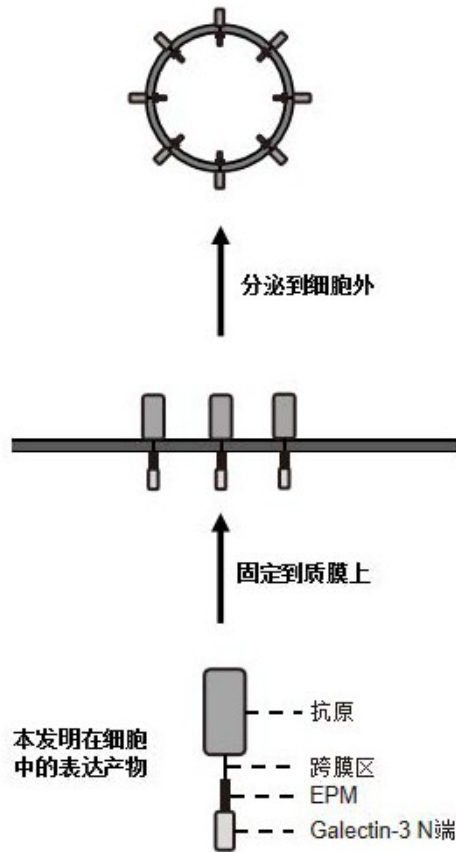


图1

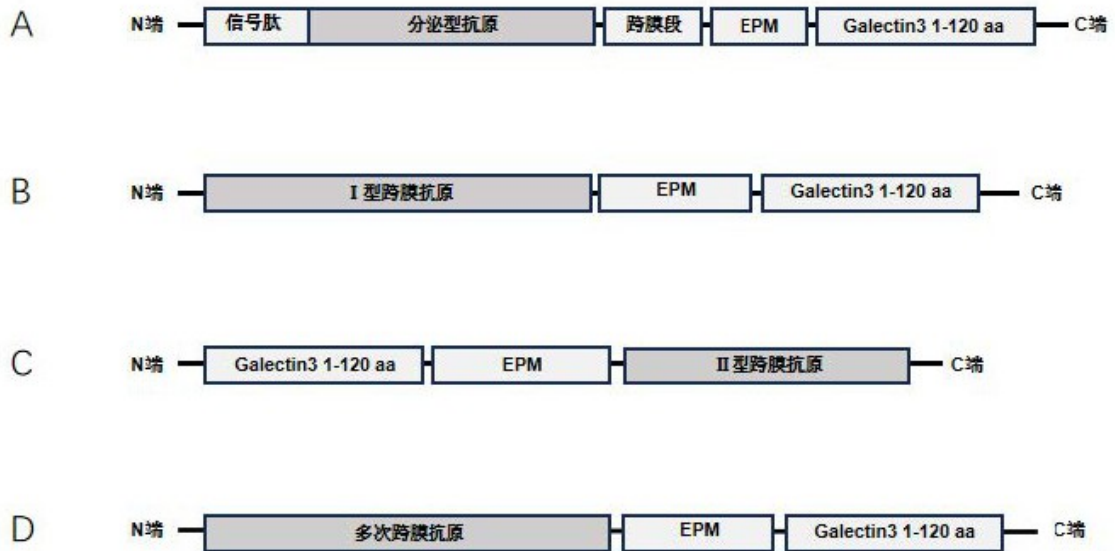


图2

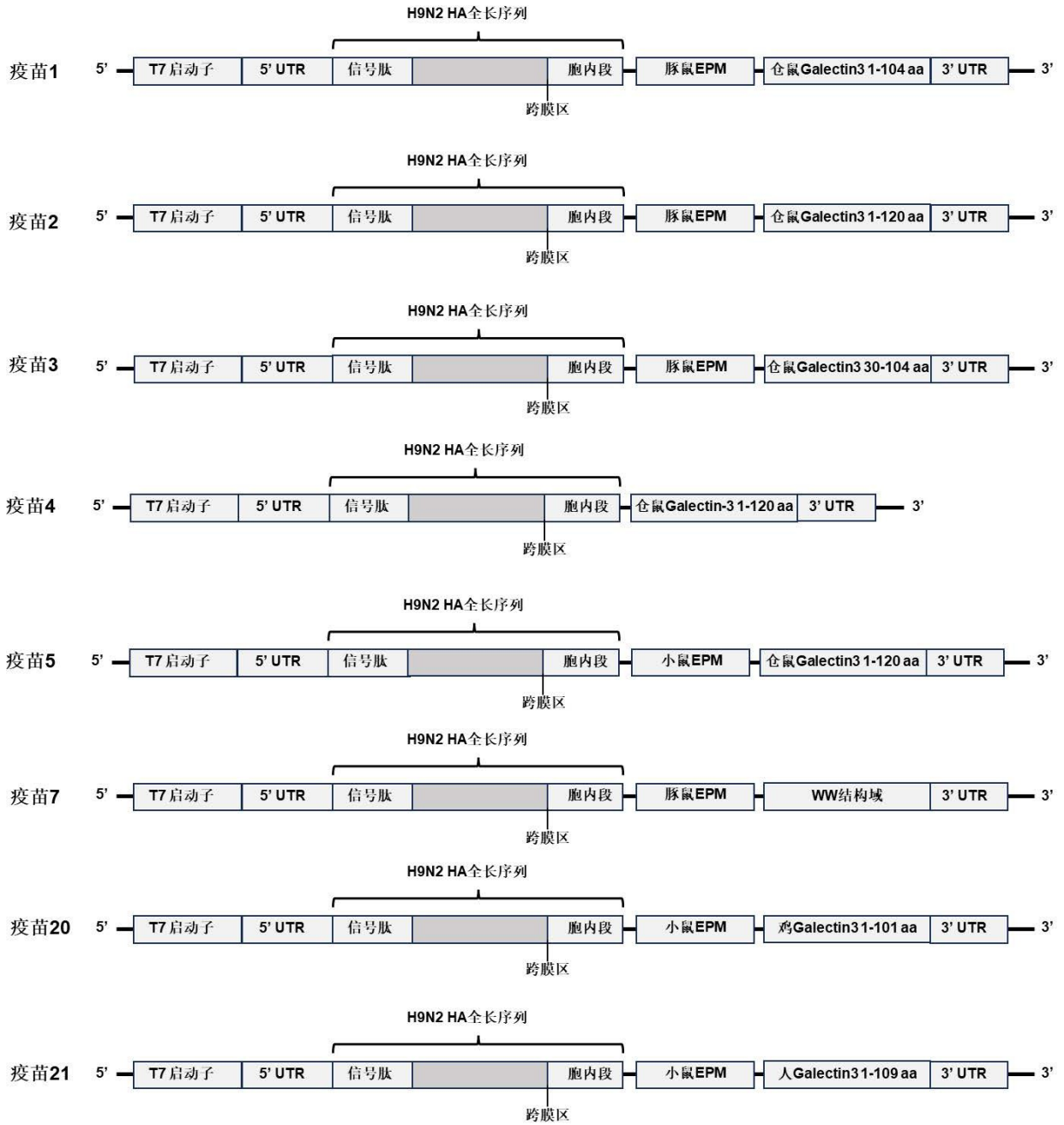


图3

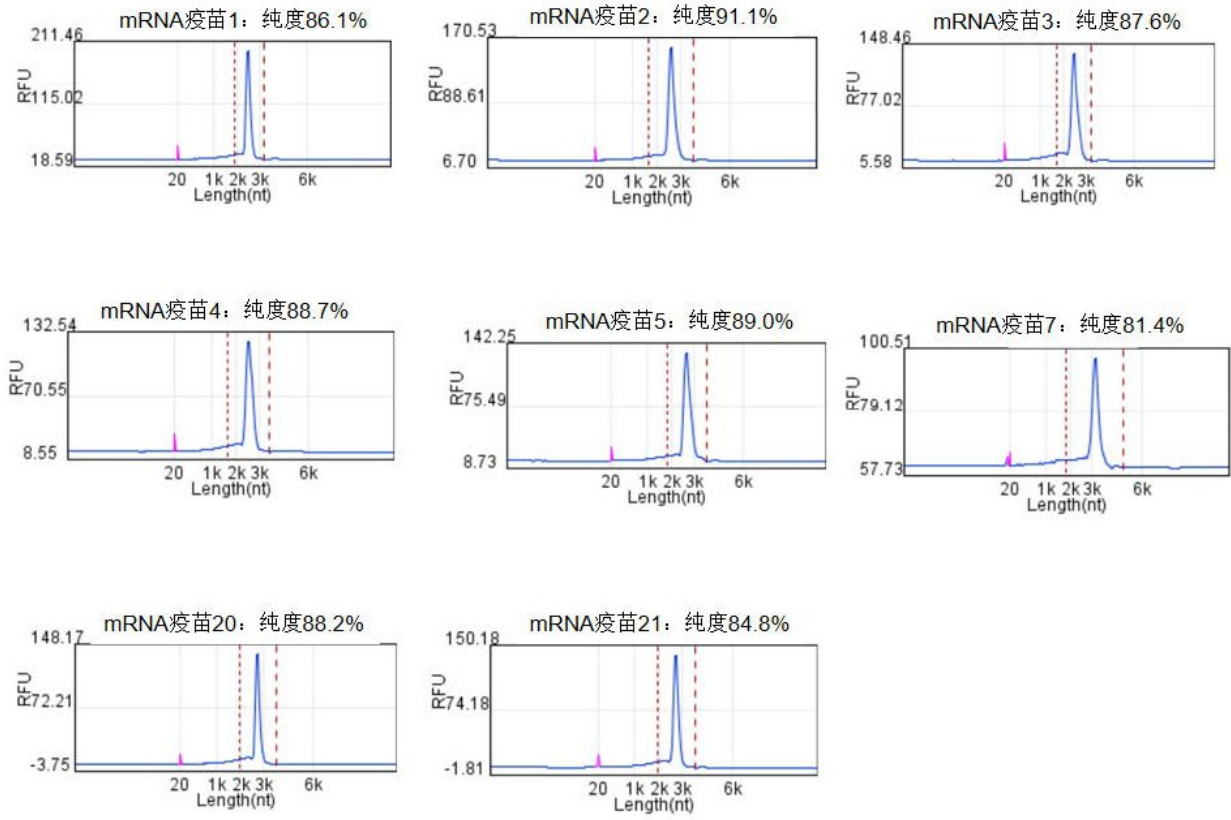


图4



图5

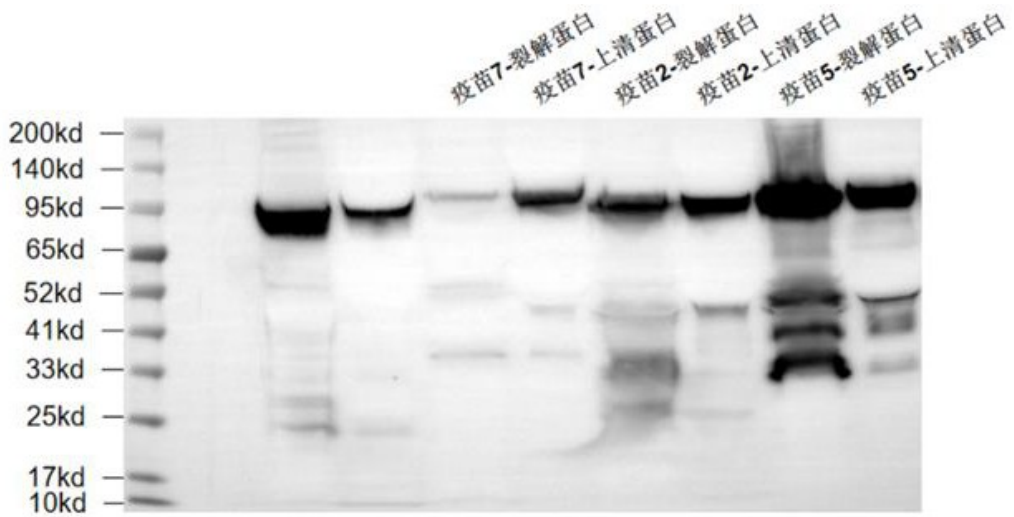


图6

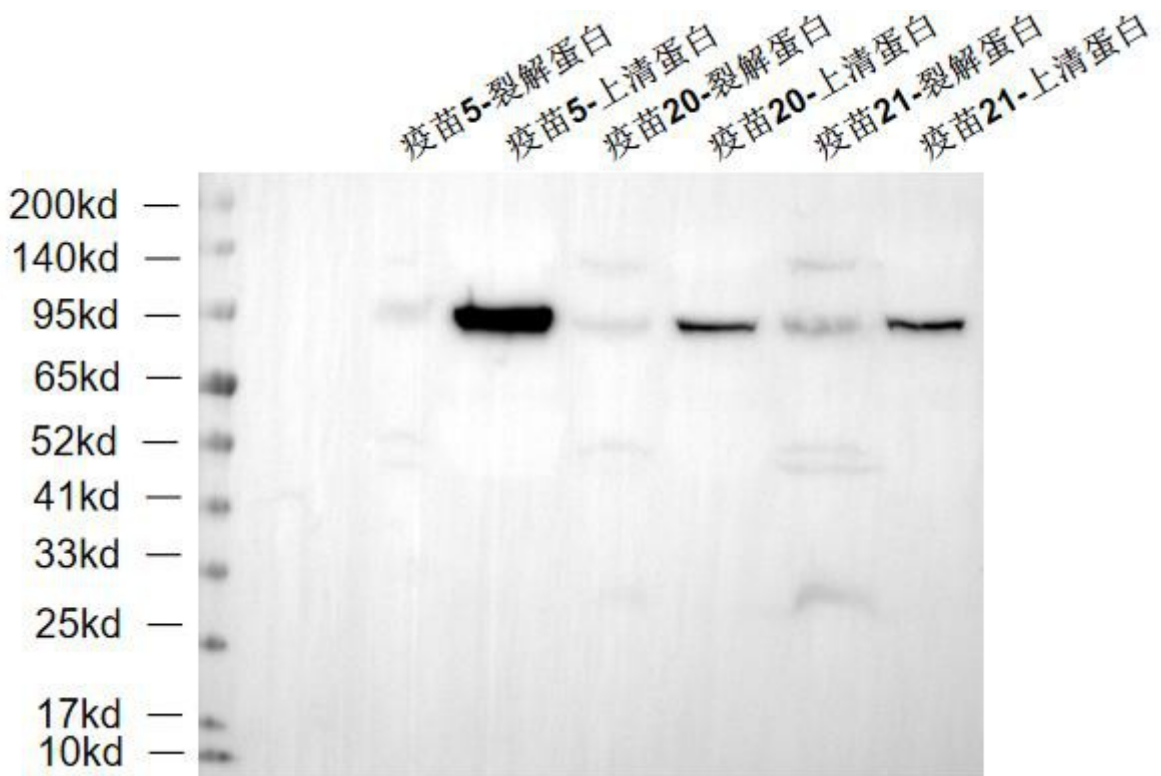


图7

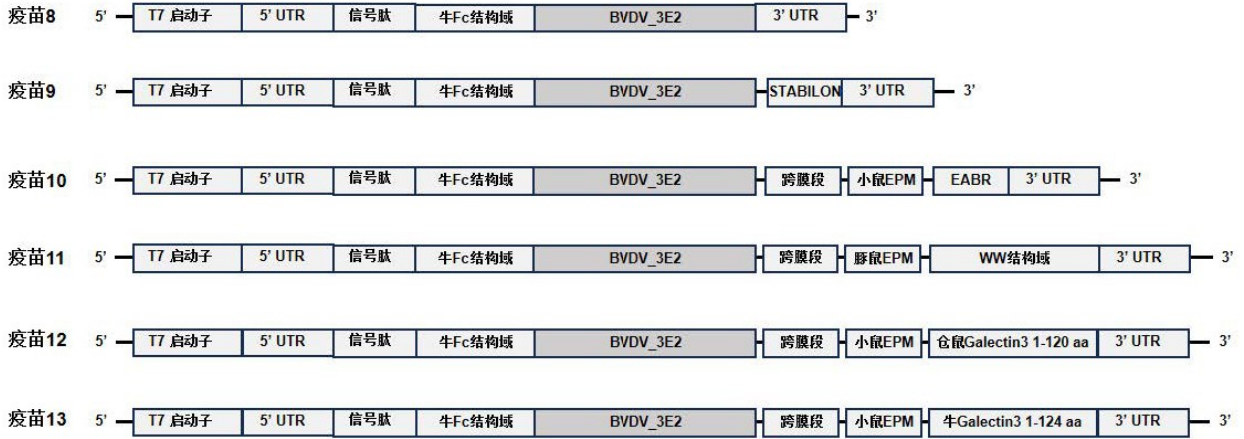


图8

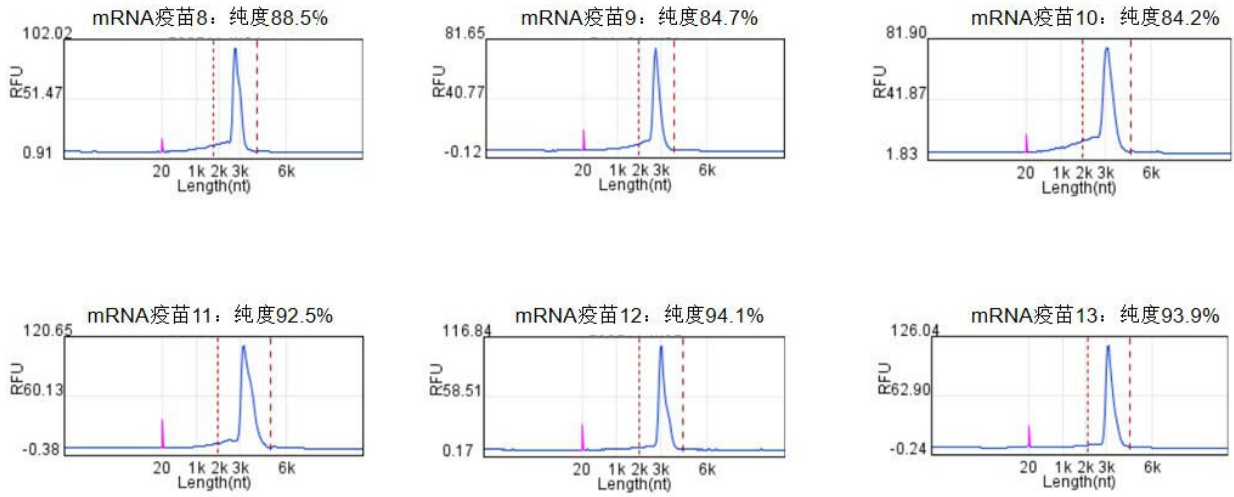


图9

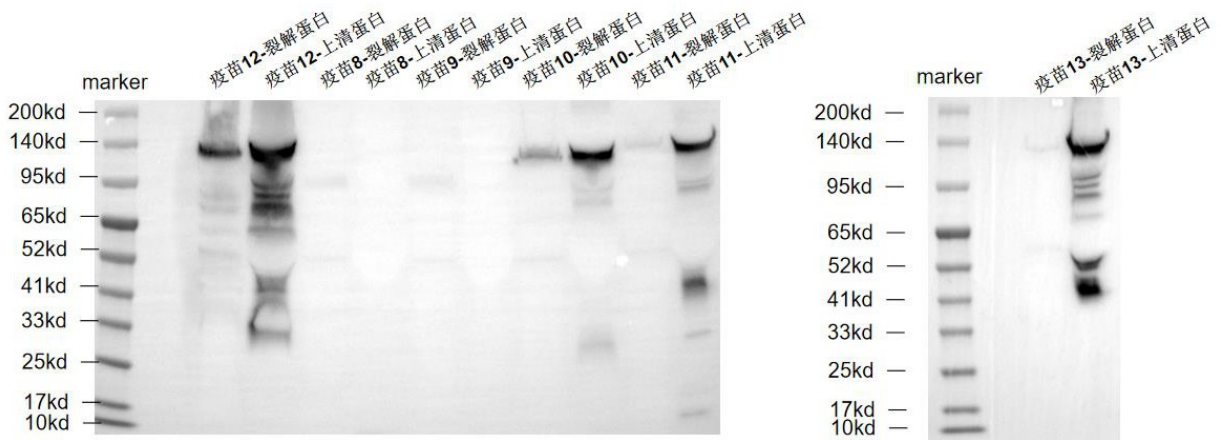


图10

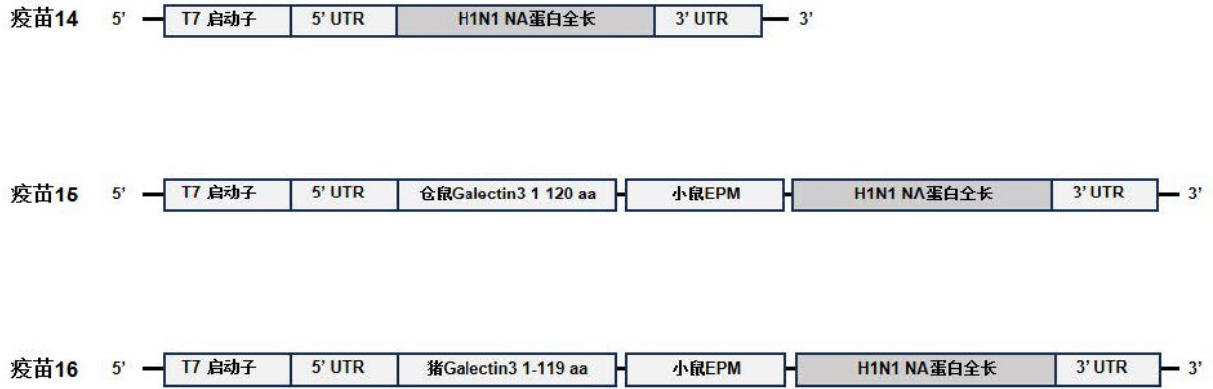


图11

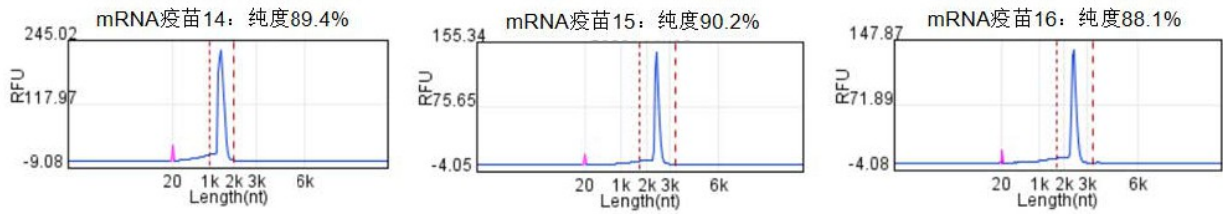


图12

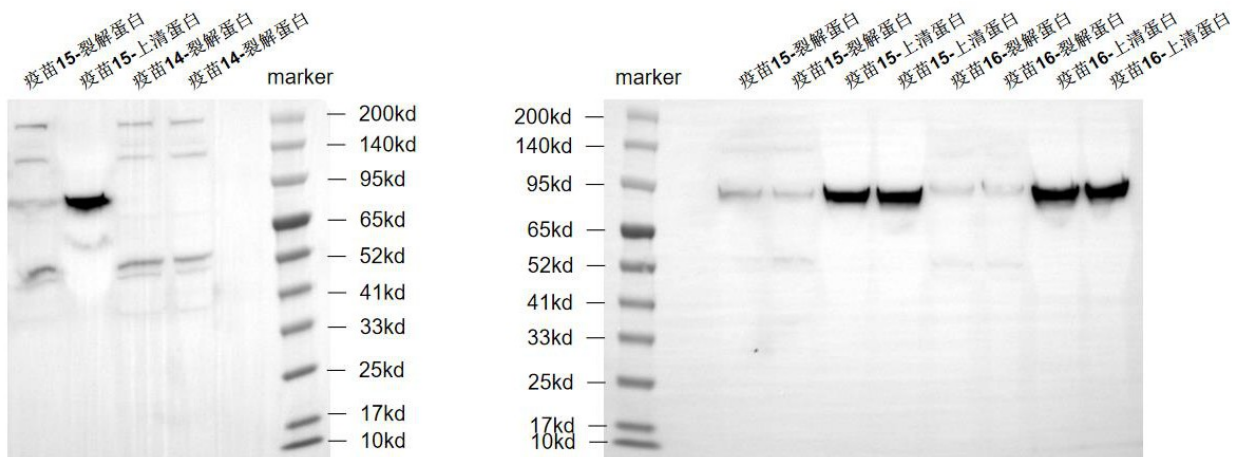


图13



图14

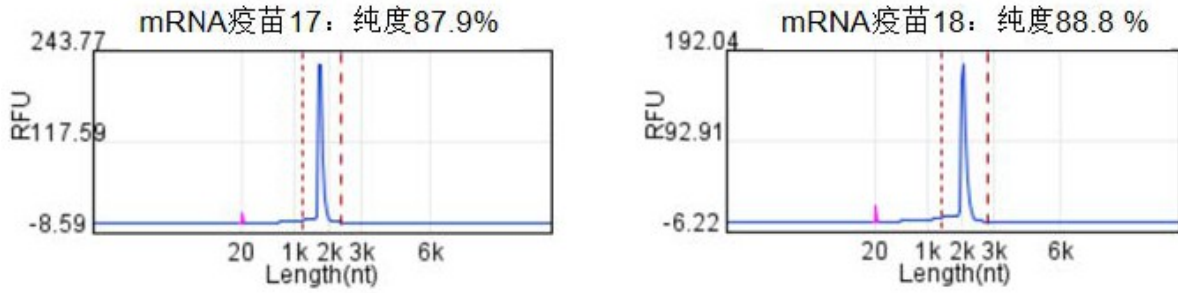


图15

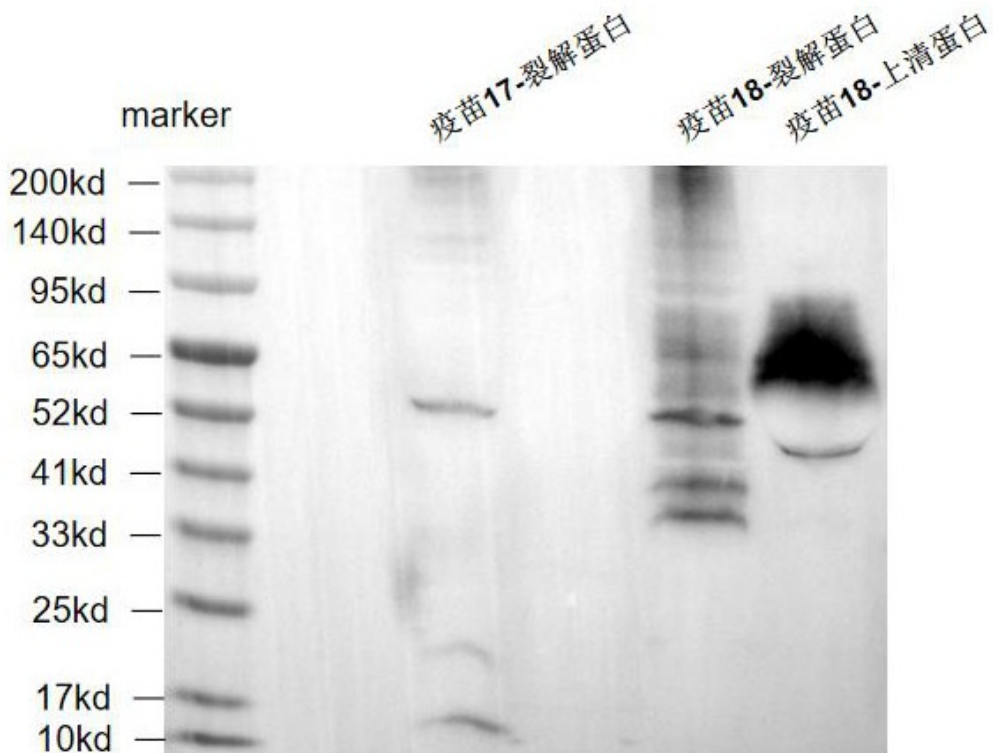


图16



图17



图18A

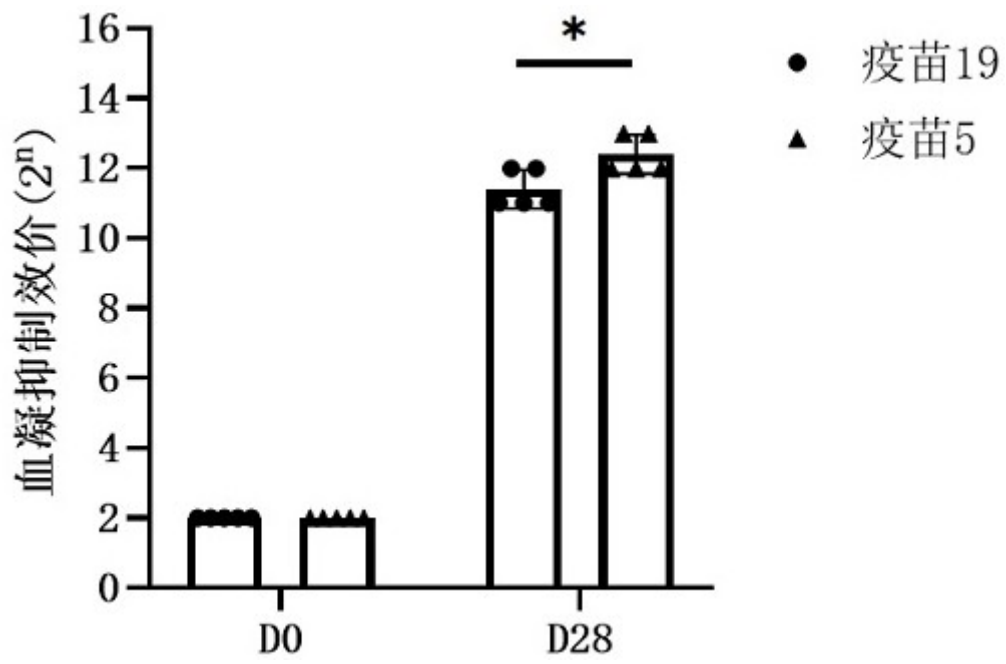


图18B

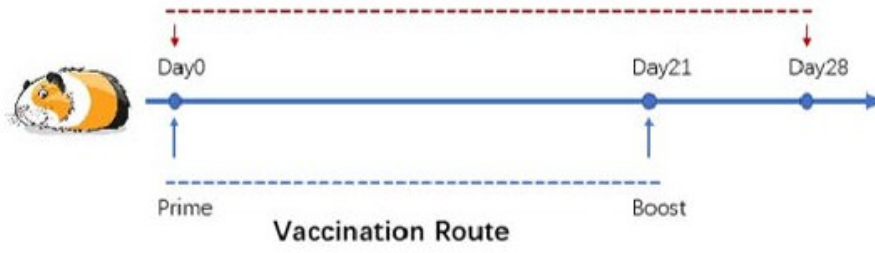


图19A

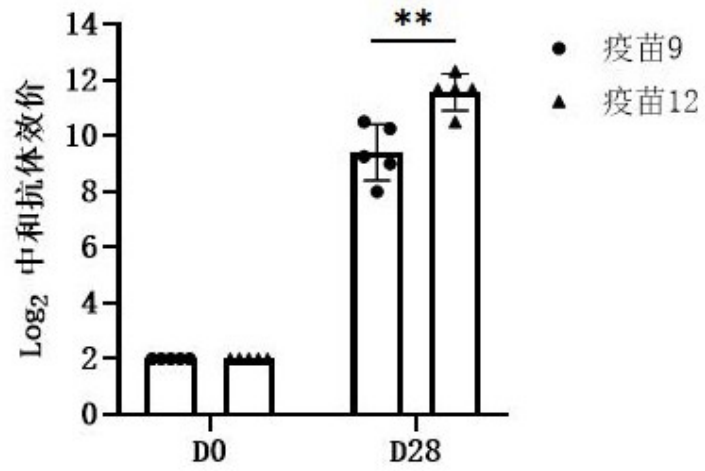


图19B