



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117165611 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 05

(21) 申请号 202210594377.9

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.05.27

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 深圳市三源生生物科技有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区西丽街
道松坪山社区松坪山路1号源兴科技
大厦北座0302

(72) 发明人 张丹 邹军 陆杰 张建三

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限

公司 31266

专利代理师 徐迅 崔佳佳

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

一种构建mRNA体外转录模板的骨架

(57) 摘要

本发明提供了一种构建mRNA转录本的骨架。具体地,本发明提供了用于构建mRNA转录本的泛用性骨架在mRNA制备和/或优化中的应用。泛用性骨架能有效增强mRNA的稳定性和翻译活性,从而保证mRNA疫苗的稳定性和优化其表达。同时使用本发明的泛用性骨架可加快对多种传染性疾病的mRNA疫苗研发。

1. 一种泛用性骨架的用途,其特征在于,所述泛用性骨架用于构建mRNA转录本,其中,所述转录本包括待表达的ORF以及位于所述ORF两侧的5'-UTR区和3'-UTR区,其中所述5'-UTR区和3'-UTR区中1个或2个为泛用性UTR。

2. 一种泛用性骨架,其特征在于,所述泛用性骨架具有式I结构:

Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 (I)

式中,

Z1、Z7为无或酶切位点;

Z2为无或启动子元件;

Z3为5'-UTR元件;

Z4为可替换的ORF区;

Z5为3'-UTR元件;

Z6为polyA尾部元件。

3. 一种泛用性UTR元件,其特征在于,所述泛用性UTR元件包括:

(a) 泛用性5'-UTR,其中所述泛用性5'-UTR的序列选自如SEQ ID NO:2或8所示的核苷酸序列或其衍生序列;和/或

(b) 泛用性3'-UTR,其中所述泛用性3'-UTR的序列选自如SEQ ID NO:4、5、6、10、11或12所示的核苷酸序列或其衍生序列。

4. 一种载体,其特征在于,所述载体含有如权利要求2所述的泛用性骨架。

5. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有如权利要求4所述的载体,或其基因组中整合有如权利要求2所述的泛用性骨架。

6. 一种工程化细胞,其特征在于,所述工程化细胞含有:如权利要求4所述的载体,或其基因组中整合有如权利要求2所述的泛用性骨架,并且含有目的基因片段。

7. 一种产生用于制备疫苗的优化mRNA的方法,包括步骤:

(a) 在适合的条件下,培养如权利要求6所述的工程化细胞,从而获得含有转录DNA模板的载体的培养物;

(b) 从所述培养物中分离和/或回收(a)中所述载体,并酶切线性化为DNA模板;

(c) 将(b)中所述DNA模板进行转录,从而获得所述优化mRNA;和

(d) 任选地,对步骤(c)获得的优化mRNA进行纯化和/或修饰。

8. 一种mRNA疫苗的制备方法,其特征在于,所述方法包括步骤:

(i) 通过如权利要求7所述的方法获得优化mRNA;

(ii) 将(i)中获得的优化mRNA与药学上可接受的载体混合,从而获得所述mRNA疫苗。

9. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

(a) 第一质粒,所述第一质粒含有目的基因;和

(b) 第二质粒,所述第二质粒含有如权利要求2所述的泛用性骨架;和

(c) 说明书,所述说明书描述了使用所述第一质粒和第二质粒生产可用于制备疫苗的优化mRNA的方法。

10. 一种mRNA疫苗组合物,其特征在于,所述疫苗组合物含有:

(a) 用于表达免疫原的mRNA,所述mRNA包含如权利要求2所述的泛用性骨架;和

(b) 药学上可接受的载体。

一种构建mRNA体外转录模板的骨架

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,具体涉及一种构建mRNA体外转录模板的骨架及其在mRNA优化设计中的应用。

背景技术

[0002] mRNA疫苗是一种新的疫苗技术,其通过结合分子生物学和免疫学,将mRNA转导进体细胞中表达外源抗原进而激活宿主的适应性免疫。早在1990年代,科学家们通过注射mRNA进入小鼠体细胞,使小鼠体细胞表达了荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶和氯霉素乙酰转移酶。1992年,Jirikowski等人向糖尿病尿崩症小鼠注射编码催产素和加压素的mRNA,结果小鼠在注射后的数小时内未发生尿崩症。此后,mRNA疫苗的发展陷入了低谷期。

[0003] 近数十年中,研究者在实验水平对mRNA疫苗的安全性、表达效率和工业生产等方面进行了研究和优化。这些进步使mRNA疫苗用于肿瘤和病毒感染疾病的预防方面得到优先研发。尤其是近两年新冠病毒的暴发流行使得mRNA疫苗技术的发展和在临床上的应用取得了长足的进步。

[0004] mRNA疫苗的研发主要是为了提高mRNA的稳定性和翻译活性,并减少mRNA自身抗原性。目前,除新冠病毒疫苗由于研发的紧迫性,而能够上市外,其它mRNA疫苗的研发均受到一定阻碍。究其原因,可能是设计mRNA疫苗时过度关注其表达抗原的能力,而忽视了mRNA疫苗自身的抗原性及高表达能力可能带来的毒性风险和引起周围宿主细胞凋亡的风险。

[0005] 本领域迫切需要开发一种副作用更低且能加快研发的mRNA疫苗设计方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于通过采用免疫相关蛋白的UTR增加mRNA疫苗的泛用性,同时可减少潜在的副作用,借助泛用性的骨架可进一步加快对多种传染性疾病的研发。

[0007] 在本发明的第一方面,提供了一种泛用性骨架的用途,所述泛用性骨架用于构建mRNA转录本,其中,所述转录本包括待表达的ORF以及位于所述ORF两侧的5'-UTR区和3'-UTR区,其中所述5'-UTR区和3'-UTR区中1个或2个为泛用性UTR。

[0008] 在另一优选例中,所述的泛用性UTR选自下组:突变的或优化的抗体基因的UTR保守序列、突变的或优化的干扰素基因的UTR保守序列、或其组合。

[0009] 在另一优选例中,所述的mRNA转录本包括mRNA疫苗中的mRNA转录本。

[0010] 在另一优选例中,所述泛用性骨架还包含额外的UTR区(即泛用性UTR之外的其他UTR区)。

[0011] 在另一优选例中,所述抗体基因的UTR保守序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:1或3所示。

[0012] 在另一优选例中,所述抗体基因的UTR保守序列包括5'抗体保守序列和3'抗体保守序列。

[0013] 在另一优选例中,所述5'抗体保守序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

- [0014] 在另一优选例中,所述3'抗体保守序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。
- [0015] 在另一优选例中,如SEQ ID NO:3所示的序列在不同IGL基因中保守。
- [0016] 在另一优选例中,所述干扰素基因的UTR保守序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:7或9所示。
- [0017] 在另一优选例中,所述干扰素基因的UTR保守序列包括5'干扰素保守序列和3'干扰素保守序列。
- [0018] 在另一优选例中,所述5'干扰素保守序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。
- [0019] 在另一优选例中,所述3'干扰素保守序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示。
- [0020] 在另一优选例中,如SEQ ID NO:7或9所示的序列在不同IFNA的亚型间保守。
- [0021] 在另一优选例中,所述泛用性UTR包括泛用性5'-UTR,泛用性3'-UTR。
- [0022] 在另一优选例中,所述泛用性UTR包括:含Kozak序列的5'-UTR。
- [0023] 在另一优选例中,所述抗体基因和干扰素基因的3'-UTR中AT-rich序列被全部或部分剔除。
- [0024] 在另一优选例中,所述泛用性UTR中没有或基本没有AT-rich序列。
- [0025] 在另一优选例中,基本没有AT-rich序列指在一个UTR中,AT-rich序列的数量 ≤ 2 ,更佳地 ≤ 1 。
- [0026] 在另一优选例中,所述AT-rich序列指富含腺嘌呤和胸腺嘧啶碱基的核酸序列。
- [0027] 在另一优选例中,所述泛用性UTR中的GC含量为44%-64%。
- [0028] 在另一优选例中,所述泛用性5'-UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:2或8所示。
- [0029] 在另一优选例中,所述泛用性3'-UTR的核苷酸序列如SEQ ID NO:4、5、6、10、11或12所示。
- [0030] 在另一优选例中,上述核苷酸序列中任意一种核苷酸序列还包括任意地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个)核苷酸并能保留用于优化mRNA能力的衍生序列。
- [0031] 在本发明的第二方面,提供了一种泛用性骨架,所述泛用性骨架具有式I结构:
- [0032] Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 (I)
- [0033] 式中,
- [0034] Z1、Z7为无或酶切位点;
- [0035] Z2为无或启动子元件;
- [0036] Z3为5'-UTR元件;
- [0037] Z4为可替换的ORF区;
- [0038] Z5为3'-UTR元件;
- [0039] Z6为polyA尾部元件。
- [0040] 在另一优选例中,所述Z1、Z7为平末端酶切位点或粘性末端酶切位点。
- [0041] 在另一优选例中,所述泛用性骨架包括酶切位点、启动子、5'-UTR、ORF、3'-UTR和polyA。
- [0042] 在另一优选例中,所述平末端酶选自下组:AleI、AatI、AluI、BavAI、BavBI、EcoRV、MlsI、或其组合。
- [0043] 在另一优选例中,所述平末端酶为AleI。

- [0044] 在另一优选例中,所述Z2选自下组:T7启动子、T3启动子、SP6启动子,或其组合。
- [0045] 在另一优选例中,所述Z2为T7启动子。
- [0046] 在另一优选例中,所述Z3和Z5中1个或2个为泛用性UTR。
- [0047] 在另一优选例中,所述Z3选自下组:突变的或优化的5'抗体保守序列、突变的或优化的5'干扰素保守序列、或其组合。
- [0048] 在另一优选例中,所述Z3选自下组:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、人 α 珠蛋白的5'-UTR、或其组合。
- [0049] 在另一优选例中,所述Z4可替换为选自下组的基因:水蛭素、狂犬病毒G蛋白、登革热病毒E蛋白、结核分支杆菌ESAT-6蛋白、Ag85A蛋白、或其组合。
- [0050] 在另一优选例中,所述Z4可替换为选自下组病原的抗原基因:水蛭素、巨细胞病毒(CMV)、寨卡病毒(Zika)、流感病毒(Influenza)、呼吸道合胞病毒(RSV)、基孔肯雅病(Chikungunya)、狂犬病(Rabies)、艾滋病毒(HIV)、埃博拉病毒(Ebola virus)、链球菌(streptococci)、疟疾(malaria)、跳跃病病毒(Louping ill virus)、岗地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、登革热、鼠疫、黄热病、结核病、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、支原体、衣原体、口蹄疫病毒、绿脓杆菌、或其组合
- [0051] 在另一优选例中,所述Z4被替换为水蛭素基因。
- [0052] 在另一优选例中,所述Z4经过密码子优化。
- [0053] 在另一优选例中,所述Z4的替换方法包括同源重组和酶切。
- [0054] 在另一优选例中,所述Z4的终止密码子为多个终止密码子。
- [0055] 在另一优选例中,所述Z4的终止密码子为2个终止密码子。
- [0056] 在另一优选例中,所述Z5选自下组:突变的或优化的3'抗体保守序列、突变的或优化的3'干扰素保守序列、或其组合。
- [0057] 在另一优选例中,所述Z5选自下组:SEQ ID NO:4-6、SEQ ID NO:10-12,或其组合。
- [0058] 在另一优选例中,所述Z6的长度较佳地为100nt-150nt,更佳地为110nt-130nt,更佳地为120nt。
- [0059] 在本发明的第三方面,提供了一种泛用性UTR元件,所述泛用性UTR元件包括:
- [0060] (a) 泛用性5'-UTR,其中所述泛用性5'-UTR的序列选自如SEQ ID NO:2或8所示的核苷酸序列或其衍生序列;和/或
- [0061] (b) 泛用性3'-UTR,其中所述泛用性3'-UTR的序列选自如SEQ ID NO:4、5、6、10、11或12所示的核苷酸序列或其衍生序列。
- [0062] 在另一优选例中,所述衍生序列是指对上述核苷酸序列中任意一种核苷酸序列任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个)核苷酸并能保留用于优化mRNA能力的衍生序列。
- [0063] 在另一优选例中,所述(a)和(b)可来源于同一转录本。
- [0064] 在另一优选例中,所述(a)和(b)可来源于不同转录本。
- [0065] 在本发明的第四方面,提供了一种载体,所述载体含有如本发明第二方面所述的泛用性骨架。
- [0066] 在另一优选例中,所述载体选自下组:DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子、其他基因转移系统,或其组合。优选地,所述载体为质粒。

- [0067] 在另一优选例中,所述载体为pUC57-Amp载体。
- [0068] 在本发明的第五方面,提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞含有如本发明第四方面所述的载体,或其基因组中整合有如本发明第二方面所述的泛用性骨架。
- [0069] 在另一优选例中,所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。
- [0070] 在另一优选例中,所述的宿主细胞选自下组:大肠杆菌、酵母细胞、哺乳动物细胞。
- [0071] 在本发明的第六方面,提供了一种工程化细胞,所述工程化细胞含有:如本发明第四方面所述的载体,或其基因组中整合有如本发明第二方面所述的泛用性骨架,并且含有目的基因片段。
- [0072] 在另一优选例中,所述工程化细胞为stable3大肠杆菌感受态细胞。
- [0073] 在另一优选例中,所述目的基因片段含有同源臂序列。
- [0074] 在另一优选例中,所述载体或泛用性骨架含有同源臂序列。
- [0075] 在另一优选例中,所述目的基因片段与所述载体或泛用性骨架发生同源重组。
- [0076] 在另一优选例中,所述目的基因片段与所述载体或泛用性骨架连接环化。
- [0077] 在另一优选例中,所述目的基因选自下组:水蛭素、巨细胞病毒(CMV)、寨卡病毒(Zika)、流感病毒(Influenza)、呼吸道合胞病毒(RSV)、基孔肯雅病(Chikungunya)、狂犬病(Rabies)、艾滋病毒(HIV)、埃博拉病毒(Ebola virus)、链球菌(streptococci)、疟疾(malaria)、跳跃病病毒(Louping ill virus)、岗地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、登革热、鼠疫、黄热病、结核疫苗病、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、支原体、衣原体、口蹄疫病毒、绿脓杆菌、或其组合。
- [0078] 在本发明的第七方面,提供了一种产生用于制备疫苗的优化mRNA的方法,包括步骤:
- [0079] (a) 在适合条件下,培养如本发明第六方面所述的工程化细胞,从而获得含有转录DNA模板的载体的培养物;
- [0080] (b) 从所述培养物中分离和/或回收(a)中所述载体,并酶切线性化为DNA模板;
- [0081] (c) 将(b)中所述DNA模板进行转录,从而获得所述优化mRNA;和
- [0082] (d) 任选地,对步骤(c)获得的优化mRNA进行纯化和/或修饰。
- [0083] 在本发明的第八方面,提供了一种mRNA疫苗的制备方法,所述方法包括步骤:
- [0084] (i) 通过如本发明第七方面所述的方法获得优化mRNA;
- [0085] (ii) 将(i)中获得的优化mRNA与药学上可接受的载体混合,从而获得所述mRNA疫苗。
- [0086] 在本发明的第九方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0087] (a) 第一质粒,所述第一质粒含有目的基因;和
- [0088] (b) 第二质粒,所述第二质粒含有如本发明第二方面所述的泛用性骨架;和
- [0089] (c) 说明书,所述说明书描述了使用所述第一质粒和第二质粒生产可用于制备疫苗的优化mRNA的方法。
- [0090] 在另一优选例中,所述说明书中还记载了使用第一质粒为模板扩增出带有同源臂序列的第一片段的方法。
- [0091] 在另一优选例中,所述说明书中还记载了使用第二质粒为模板扩增出带有同源臂序列的第二片段的方法。

[0092] 在另一优选例中,所述说明书中还记载了将所述第一片段和所述第二片段通过同源重组连接环化并转入一合适的宿主细胞的方法。

[0093] 在另一优选例中,所述说明书中还记载了从所述宿主细胞获得优化mRNA的方法。

[0094] 在本发明的第十方面,提供了一种mRNA疫苗组合物,所述疫苗组合物含有:

[0095] (a) 用于表达免疫原的mRNA,所述mRNA包含如本发明第二方面所述的泛用性骨架;和

[0096] (b) 药学上可接受的载体。

[0097] 在另一优选例中,所述免疫原选自下组:水蛭素、巨细胞病毒(CMV)、寨卡病毒(Zika)、流感病毒(Influenza)、呼吸道合胞病毒(RSV)、基孔肯雅病(Chikungunya)、狂犬病(Rabies)、艾滋病毒(HIV)、埃博拉病毒(Ebola virus)、链球菌(streptococci)、疟疾(malaria)、跳跃病病毒(Louping ill virus)、岗地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、登革热、鼠疫、黄热病、结核病、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、支原体、衣原体、口蹄疫病毒、绿脓杆菌,或其组合。

[0098] 在另一优选例中,所述疫苗组合物中mRNA本身还可以充当佐剂。

[0099] 在另一优选例中,所述疫苗组合物的剂型选自下组:注射剂、冻干剂。

[0100] 在另一优选例中,所述疫苗组合物包括0.01~99.99%的如本发明第二方面所述的泛用性骨架和0.01~99.99%的药学上可接受的载体,所述百分比为占所述疫苗组合物的质量百分比。

[0101] 在本发明的第十一方面,提供了一种如本发明第十方面所述的mRNA疫苗组合物,或如本发明第六方面所述的工程化细胞的用途,其被用于制备一药物,所述药物用于预防选自下组的病原体:水蛭素、巨细胞病毒(CMV)、寨卡病毒(Zika)、流感病毒(Influenza)、呼吸道合胞病毒(RSV)、基孔肯雅病(Chikungunya)、狂犬病(Rabies)、艾滋病毒(HIV)、埃博拉病毒(Ebola virus)、链球菌(streptococci)、疟疾(malaria)、跳跃病病毒(Louping ill virus)、岗地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、登革热、鼠疫、黄热病、结核病、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、支原体、衣原体、口蹄疫病毒、绿脓杆菌,或其组合。

[0102] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0103] 图1为本发明一个实施例中的载体的结构示意图。

[0104] 图2显示了5'-UTR优化前的序列IGL-5-0、优化后的序列IGL-5'UTR-F及它们对应的GC含量。

[0105] 图3显示了5'-UTR优化前的序列IFN-5-0、优化后的序列IFN-5'UTR-F及它们对应的GC含量。

[0106] 图4显示了3'-UTR优化前的序列IGL-3-0、优化后的序列IGL-3'UTR-F及它们对应的GC含量。

[0107] 图5显示了3'-UTR优化前的序列INF-3-0、优化后的序列IFN-3'UTR-F及它们对应的GC含量。

- [0108] 图6为ORF序列后插入2个终止密码子的示意图。
- [0109] 图7为水蛭素基因合成片段示意图。
- [0110] 图8为骨架扩增片段示意图。
- [0111] 图9显示了插入片段与质粒骨架片段的电泳鉴定结果。
- [0112] 图10显示了Hirudin质粒凝胶电泳结果。
- [0113] 图11显示了Hirudin质粒AleI酶切结果。
- [0114] 图12显示了发酵过程中质粒得率变化。

具体实施方式

[0115] 本发明人经过广泛而深入的研究,并经过大量的筛选,首次开发了一种泛用性UTR和泛用性骨架,用于构建mRNA转录本,从而获得稳定性和翻译活性提高的优化mRNA,从而实现在mRNA疫苗制备和/或优化等方面的应用。使用本发明的泛用性骨架可加快对多种传染性疾病的mRNA疫苗研发。在此基础上完成了本发明。

[0116] 术语

[0117] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。

[0118] 如本文所用,“本发明的泛用性骨架”、“泛用性骨架”、“本发明的骨架”、“骨架”可互换使用,均指包含泛用性UTR元件的ORF区可替换的用于构建mRNA转录本的骨架。

[0119] 如本文所用,“抗体基因的UTR保守序列”、“抗体保守序列”可互换使用,均指抗体基因中UTR区的保守序列,优选地其核苷酸序列如SEQ ID NO:1或3所示。

[0120] 如本文所用,“干扰素基因的UTR保守序列”、“干扰素保守序列”可互换使用,均指干扰素基因中UTR区的保守序列,优选地其核苷酸序列如SEQ ID NO:7或9所示。

[0121] 泛用性骨架及表达载体

[0122] 如本文所用,术语“本发明的泛用性骨架”、“本发明的骨架”可互换使用,指本发明第二方面中所述的泛用性骨架。

[0123] 典型地,本发明的泛用性骨架具有式I结构:

[0124] Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 (I)

[0125] 其中,Z1~Z7如上所述。

[0126] 一种代表性的含有本发明泛用性骨架的载体的结构示意图如图1所示。

[0127] 应理解,适合用本发明的泛用性骨架表达的蛋白或多肽没有特别限制,包括抗原蛋白或抗原肽,或其他有用的蛋白。在本发明中,可将外源蛋白的ORF置于本发明泛用性骨架之中,从而实现高效的表达。通常,ORF带有一个终止密码子。然而,如果需要,也可以引入一个或多个额外的终止密码子,如图6所示。

[0128] mRNA疫苗类型

[0129] mRNA疫苗分为自我扩增RNA(self-amplifying RNA,saRNA)和非扩增RNA(non-replicating mRNA)。经典的非扩增RNA疫苗,包括cap帽子、5'非编码区(5'-untranslated regions,5'-UTR)、开放阅读框(open reading frame,ORF)、3'非编码区(3'-untranslated regions,3'-UTR)和多聚A尾(polyA tail)。ORF区负责编码抗原表达,但以上5个区域共同决定mRNA的稳定性、表达活性和免疫原性。

[0130] 而saRNA的结构来源于 α 病毒基因组。saRNA疫苗利用 α 病毒的基因组能够自我复制的特性使进入体细胞的DNA或RNA先自我扩增,再转录出抗原编码mRNA。saRNA疫苗目前有以DNA质粒为基础的saRNA和病毒样颗粒递送的saRNA两种。基于saRNA,Beissert等人还发展了转基因扩增RNA(trans-amplifying RNA, taRNA),其将编码抗原的基因放在 α 病毒基因组中,增加了疫苗的安全性。与自我扩增RNA相比,非扩增RNA具有更小,表达抗原更特异不引起非特异性免疫的特点。

[0131] mRNA疫苗免疫原性

[0132] mRNA疫苗的一大挑战是减少外源mRNA本身的免疫原性。自然情况下,外源mRNA进入细胞后,能够被维甲酸诱导基因I(retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)识别,激活固有免疫反应,进而被降解。体外转录(in vitro transcription, IVT)mRNA能够激活免疫细胞和Toll样受体(Toll-like receptor)介导的炎症反应。mRNA的U富集(U-rich)序列是激活Toll样受体的关键因素。通过核苷酸化学修饰、添加polyA尾和优化mRNA GC含量等均能够减少mRNA的免疫原性。

[0133] 化学修饰的核苷酸包括5-甲基胞苷(5-methylcytidine, m5C)、5-甲基尿苷(5-methyluridine, m5U)、N1-甲基腺苷(N1-methyladenosine, m1A)、N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)、2-硫尿核苷(2-thiouridine, s2U)、5-氧甲基尿苷(5-methoxyuridine, 5moU)、假尿苷(pseudouridine, ψ)和N1-甲基假尿苷(N1-methylpseudouridine, m1 ψ)。

[0134] 此外,添加polyA尾也能减少U含量进而减小mRNA的免疫原性。CureVac和Acuita Therapeutics公司尝试通过脂质纳米颗粒运输红细胞生成素编码mRNA进入猪体内,该mRNA具有较高GC含量,结果能够引起红细胞生成素相关反应而没有免疫原性。然而,过高的GC含量会抑制mRNA的翻译活性,这也是疫苗研发过程中需要注意的。

[0135] mRNA的纯化方式在减少mRNA自身的免疫原性中也相当重要。目前常用的纯化方法包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、阴离子交换色谱法、亲和色谱法和粒子大小分离法。纯化的目的主要是去除截短的转录本。一个好的例子是Pardi等人设计的通过HPLC纯化m1 ψ 修饰的编码抗HIV-1抗体的mRNA通过脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)帮助小鼠避免了HIV-1的感染。

[0136] mRNA的序列优化

[0137] mRNA的序列优化是帮助mRNA稳定的方法之一。mRNA的5'-UTR和3'-UTR的序列优化能够增加mRNA的半衰期和翻译活性。Cap结构采用不同的类似物能够增加mRNA的稳定性,利用酶使mRNA的5'端加上Cap结构能够比不同形式的Cap类似物有更好的效能。mRNA的polyA尾的稳定mRNA效果也是非常重要的,有研究去除了mRNA的polyA使得mRNA极度不稳定,同时也降低了mRNA的多聚核糖体数目、延伸速度和翻译轮数。因而polyA对mRNA的稳定和有效翻译至关重要。另外,核苷酸的修饰和密码子的同义替换也能影响mRNA的稳定性和翻译活性。同时序列的优化可能影响mRNA的二级结构和翻译后修饰。此外,增加mRNA的GC含量也能增加mRNA稳定性。综上所述,5'-UTR、3'-UTR、5'Cap、polyA尾、密码子优化和GC含量是增强mRNA稳定性的所有可调节位点。

[0138] mRNA递送

[0139] mRNA目前的递送方法有很多,科学家们建立了脂质体运输、聚合物运输、肽链运

输、病毒样复制子颗粒运输和阳离子纳米乳化剂运输等方法,此外裸mRNA也能够被直接注射进细胞。在研的mRNA疫苗最常用的递送方法是脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)运输。该方法具有毒性小、递送效率高等优势。

[0140] mRNA疫苗激活固有免疫和适应性免疫

[0141] mRNA疫苗通过在体细胞内表达抗原,并通过抗原呈递系统呈递,能够激活固有免疫系统和适应性免疫系统。mRNA直接被体细胞内的模式识别受体如TLR识别会导致mRNA的降解,同时能够增强IFN通路。

[0142] mRNA疫苗通过激发适应性免疫反应发挥主要作用。mRNA翻译出的抗原,通过MHC-I直接呈递激活CD4+T细胞(Helper T细胞)或抗原分泌后,其他细胞吞噬后以MHC-II通路呈递抗原激活CD8+T细胞(细胞毒性T细胞)。抗原表达于细胞表面后也能够被B细胞受体识别激活B细胞的抗体表达和记忆B细胞形成,进而引起感染细胞凋亡和病原体的中和。

[0143] mRNA接种后产生适应性免疫反应的事件

[0144] a) 疫苗的含mRNA颗粒被注射部位局部细胞吸收后,mRNA被模式识别受体识别,同时也开始翻译抗原,导致注射部位的局部炎症,促进免疫细胞的浸润,包括中性粒细胞、单核细胞、髓系树突状细胞(myeloid dendritic cells, MDCs)和浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, PDCs)。中性粒细胞可以有效地吸收LNPs,但单核细胞和MDCs更有效地翻译mRNA。I型干扰素(interferon, IFN)的分泌受到刺激。

[0145] b) mRNA/LNP和蛋白质抗原将传播,细胞将迁移到接种疫苗的淋巴结。

[0146] c) 抗原呈递到T细胞和抗原与B细胞的相互作用发生的导致生发中心的形成,记忆B细胞和生产抗体的浆细胞在此产生,这些细胞驻留在骨髓中。

[0147] mRNA疫苗面对传染性疾病的优势

[0148] 由于mRNA疫苗的机制是通过将编码抗原蛋白的mRNA接种到宿主,然后在体内细胞中利用宿主的遗传物质进行表达合成抗原蛋白,通过抗原蛋白诱导和激活机体的免疫系统产生免疫反应,从而达到预防和治疗疾病的目的。其独特的优势为:1) 所有生产过程的监测和质控可以轻松实现;2) mRNA的研发和生产周期短,容易实现量产,疫苗的产能较高,这对快速应对全球范围的新发传染病至关重要;3) mRNA由于自身的特性,免疫后能很快降解,安全风险较低;4) 免疫效力好,能够同时诱导产生体液免疫和细胞免疫,对目前没有较好疫苗的传染性疾病而言可能存在研发出更有效疫苗的潜力。

[0149] mRNA疫苗优化策略

[0150] mRNA疫苗发挥作用需要面对的挑战包括:1) 延长自身半衰期,增强稳定性;2) 增强翻译活性;3) 减少mRNA的免疫原性,避免被快速清除。

[0151] 达到这些作用的方法就是设计特殊的5'-UTR、3'-UTR、终止密码子和polyA数量等。对于5'-UTR和3'-UTR的设计,有三种有效的手段:1) 采用高表达的人类基因的UTR;2) 使用抗原蛋白自身的UTR;3) 指数富集配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)。前两种方法均较为简单,第三种方法相对复杂,要求通过体外实验不断尝试并优化序列,因此需要很长时间,但第三种方法仍是时间充裕时的最佳选择。

[0152] 目前已经FDA批准上市的辉瑞(Pfizer/BioNTech)的BNT162b2疫苗的5'-UTR采用了人 α 珠蛋白的5'-UTR并优化了Kozak序列和5'端序列,调整了5'-UTR的二级结构,而莫得

那 (Moderna) 的 mRNA-1273 疫苗的 5'-UTR 则采用了其通过计算机设计并优化的序列。对于 3'-UTR, 莫得那的 mRNA-1273 疫苗采用了人 α 珠蛋白 (HBA1) 的 3'-UTR 中的 110nt 碱基, 而辉瑞的 BNT162b2 疫苗采用了基于自然基因进行 SELEX 的方法, 挑选出了人 12S rRNA (mtRNR1) 和 AES/TLE5 基因的 3'-UTR。辉瑞疫苗在此基础上选用了 AES 3'-UTR 的 136nt 序列并进行了两个 C \rightarrow Ψ 的改变, 随后接续 139nt 的 mtRNR1 序列。目前真正有效的 UTR 设计方法还是借鉴自然基因并基于经验进行优化 (PMID: 34358150)。

[0153] 此外, 在抗原蛋白的终止密码子后加入 1-2 个终止密码子的方法也被采用, 以更有效的翻译延伸复合物解聚, 利于 mRNA 的翻译和稳定。辉瑞的 BNT162b2 疫苗采用了终止信号 UGAUGA, 而莫得那的 mRNA-1273 疫苗采用了 UGAUAAUAG。

[0154] polyA 的数量是影响 mRNA 稳定性的重要因素, 80nt-150n 或 100nt-150nt 为宜, 更佳地 120nt。适宜数量的 polyA 数量能够比不适宜数量的 mRNA 具有更高的蛋白表达能力和 mRNA 稳定性。

[0155] 感染性疾病 mRNA 疫苗

[0156] 本发明的构建 mRNA 转录本的骨架可用于构建针对感染性疾病的 mRNA 疫苗。

[0157] 采用本发明 mRNA 转录本的骨架的疫苗可适用于各种不同的病原体, 代表性的病原体包括 (但并不限于): 冠状病毒 (如新冠病毒)、巨细胞病毒 (CMV)、寨卡病毒 (Zika)、流感病毒 (Influenza)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、基孔肯雅病 (Chikungunya)、狂犬病 (Rabies)、艾滋病病毒 (HIV)、埃博拉病毒 (Ebola virus)、链球菌 (streptococci)、疟疾 (malaria)、跳跃病病毒 (Louping ill virus)、岗地弓形虫 (Toxoplasma gondii) 等等。

[0158] 此外, 很多感染性疾病缺乏有效的灭活疫苗和重组蛋白疫苗, 因而可能寄希望于 mRNA 疫苗能否激发人体对这些病原体的预防性免疫, 进而研发出有效的疫苗。这些疾病包括登革热 (现有疫苗只能保护一种血清型)、鼠疫、黄热病、结核疫苗、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、支原体、衣原体、口蹄疫病毒等, 还可以用于一些抗肿瘤药物的治疗中。

[0159] 抗体基因 UTR

[0160] 为提高 UTR 的泛用性并减少免疫原性, 发明人采用了抗体基因的 UTR 作为原始 UTR。抗体 (antibody) 分为 5 类 (class), 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链, 与这些重链相配合的轻链有两种, 分别为 kappa (κ) 链和 lambda (λ) 链, 根据 λ 链恒定区个别氨基酸的差异, 又可将 λ 链分为 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 和 $\lambda 4$ 四个亚型。上述这些肽链的基因的重组率均很高, 提示它们的 5'-UTR 和 3'-UTR 序列可能对变化的 ORF 区及变化的肽链表达具有很强的兼容性。因此, 抗体基因的 5'-UTR 和 3'-UTR 可能具有支持不同 ORF 高效翻译的泛用性。

[0161] 在本发明中, 优选的 5'-UTR 和 3'-UTR 是经序列优化的 UTR。图 2 中显示了 5'-UTR 优化前的序列 IGL-5-0 和优化后的序列 IGL-5'UTR-F, 其 GC 含量从 54% 提升至优化后的 64%。图 4 中显示了 3'-UTR 优化前的序列 IGL-3-0 和优化后的序列 IGL-3'UTR-F, 其 GC 含量从 54% 提升至优化后的 56%。

[0162] 在本发明中, 基于抗体基因 UTR 经序列优化的优选 5'-UTR, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示; 基于抗体基因 UTR 经序列优化的优选 3'-UTR, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4、5 或 6 所示。

[0163] 干扰素基因 UTR

[0164] 为提高UTR的泛用性并减少免疫原性,发明人还采用了人体广泛表达的免疫相关蛋白干扰素的基因的UTR作为原始UTR。

[0165] 干扰素是病毒或其它干扰素诱生剂,刺激网内细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等多种细胞所产生的一种可游离到细胞外的、具有广谱抗病毒作用的糖蛋白。其能在多种细胞内稳定表达,使用其5'-UTR和3'-UTR进行优化,可能减少其免疫原性,并进而减少mRNA疫苗的副作用。

[0166] 在本发明中,优选的5'-UTR和3'-UTR是经序列优化的UTR。图3中显示了5'-UTR优化前的序列IFN-5-0和优化后的序列IFN-5'UTR-F,其GC含量从49%提升至优化后的52%。图5中显示了3'-UTR优化前的序列INF-3-0和优化后的序列INF-3'UTR-F,其GC含量从31%提升至优化后的44%。

[0167] 在本发明中,基于干扰素基因UTR经序列优化的优选5'-UTR,其核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示;基于干扰素基因UTR经序列优化的优选3'-UTR,其核苷酸序列如SEQ ID NO:10、11或12所示。

[0168] 本发明的主要优点包括:

[0169] (1) 通过构建带有可替换ORF模板骨架的质粒,能够加快mRNA疫苗的研发速度。

[0170] (2) 通过选择抗体和干扰素基因的UTR作为泛用质粒骨架的UTR部分,即后续产生mRNA的UTR部分,增强了mRNA的稳定性和翻译活性,主要是保证了该质粒骨架的泛用性和mRNA疫苗的稳定性的。

[0171] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0172] 实施例1.UTR序列的筛选与优化方法

[0173] 本发明人设计了一种可替换ORF的质粒,并且使用平末端酶切位点使其可以方便后续体外转录的线性化片段试验。

[0174] 本载体包括载体骨架、A1eI酶切位点、5'-UTR、ORF、3'-UTR、polyA。此外选用了特殊感受态,并进行了ORF密码子优化。

[0175] 本发明人使用了高拷贝质粒载体pUC57-Amp进行扩增片段。利用高效平末端限制性内切酶A1eI作为从质粒上剪切下插入片段的酶,其能够产生的平末端方便以后实验。选用的启动子为T7启动子。

[0176] 基于抗体和干扰素表达的特点,本发明人通过从NCBI数据库中下载了10条不同抗体肽链、不同型干扰素的序列,经过比对后,找出相对保守,且长度合适的UTR序列。并且基于自然UTR序列,通过优化Kozak序列,减少AT-rich序列等步骤,得到了优化后的UTR序列。

[0177] 表1参与对比序列及其编号

	名称	GenBank 编号
[0178]	1 Homo sapiens immunoglobulin lambda locus, mRNA (cDNA clone MGC:104999 IMAGE:3061410), complete cds	GenBank: BC089414.1
	2 Homo sapiens immunoglobulin lambda locus, mRNA (cDNA clone MGC:111580 IMAGE:30325463), complete cds	GenBank: BC093098.1
	3 Homo sapiens immunoglobulin lambda locus, mRNA (cDNA clone MGC:88769 IMAGE:4308881), complete cds	GenBank: BC073762.1
	4 Homo sapiens immunoglobulin kappa locus, mRNA (cDNA clone MGC:71990 IMAGE:30353269), complete cds	GenBank: BC062704.1
	5 Homo sapiens immunoglobulin kappa locus, mRNA (cDNA clone MGC:40426 IMAGE:5178085), complete cds	GenBank: BC032451.1
	6 Homo sapiens immunoglobulin kappa locus, mRNA (cDNA clone MGC:22645 IMAGE:4700961), complete cds	GenBank: BC030813.1
	7 Homo sapiens immunoglobulin heavy locus, mRNA (cDNA clone MGC:88774 IMAGE:4855124), complete cds	GenBank: BC073766.1
	8 Homo sapiens immunoglobulin heavy locus, mRNA (cDNA clone MGC:72071 IMAGE:30349896), complete cds	GenBank: BC065733.1
	9 Homo sapiens interferon alpha 1 (IFNA1), mRNA	NCBI Reference Sequence: NM_024013.3
	10 Homo sapiens interferon alpha 2 (IFNA2), mRNA	NCBI Reference Sequence: NM_000605.4

[0179] 实施例2.5'-UTR及3'-UTR的选择与优化

[0180] 5'-UTR分别选择了抗体保守序列和干扰素保守序列两种,并进行了Kozak序列优化。并且在载体构建之前分别将抗体和干扰素的5'-UTR进行了GC含量的优化。

[0181] 3'-UTR分别选择了抗体保守序列和干扰素保守序列两种,并进行了AT-rich序列的剔除。并且在载体构建之前分别将抗体和干扰素的3'-UTR进行了GC含量的优化。

[0182] 上述序列信息如表2所示:

[0183] 表2野生型序列与优化序列

SEQ ID NO:	序列名称	序列(5'-3')	备注
1	IGL-5'UTR-O	GAGCTTCAGCTGTGGGTAGAGAAGACAGGACTCAGG ACAATCTCCAGC	野生序列
2	IGL-5'UTR-F	GAGCTTCAGCTGTGGGTAGAGAAGACAGGACTCAGG ACAATCGCCACC	最优序列
3	IGL-3'UTR-O	GTTCTCATCCCTCACCCCCACCACGGGAGACTAGAG CTGCAGGATCCCAGGGGAGGGGTCTCTCCTCCACC CCAAGGCATCAAGCCCTTCTCCCTGCACTCAATAAAC CCTCAATAAATATTCTCATTGTCAATT	野生序列
[0184]	4 IGL-3'UTR-F1	GTTCTCCCCTCACCCCCACCACGGGAGACTAGAGCT GCAGGCCAGGGGAGGGGTCTCTCCTCCACCCCAA GGCCAAGCCCTTCTCCCTGCACTCAAAACCCTCAACT CTGTC	最优序列
	5 IGL-3'UTR-F2	GTTCTCATCCCTCACCCCCACCACGGGAGACTAGAG CTGCAGGATCCCAGGGGAGGGGTCTCTCCTCCACC CCAAGGCATCAAGCCCTTCTCCCTGCACTCAAAACCC TCAACTCTGTC	优化序列
	6 IGL-3'UTR-F3	GTTCTCATCCCTCACCCCCACCACGGGAGACTAGAG CTGCAGGATCCCAGGGGAGGGGTCTCTCCTCCACC CCAAGGCATCAAGCCCTTCTCCCTGCACTCAATAAAC	优化序列

		CCTCAACTCTGTC		
	7	IFN-5'UTR-O	AGAGAACCTAGAGCCCAAGGTTTCAGAGTCACCCATC TCAGCAAGCCCAGAAGTATCTGCAATATCTACG	野生序列
	8	IFN-5'UTR-F	AGAGAACCTAGAGCCCAAGGTTTCAGAGTCACCCATC TCAGCAAGCCCAGAAGTATCTGCAATAGCCACC	最优序列
	9	IFN-3'UTR-O	CATCTGGTCCAACATGAAAACAATTCTTATTGACTCA TACACCAGGTCACGCTTTCATGAATTCTGTCATTCA AAGACTCTACCCCTGCTATAACTATGACCATGCTGA TAAACTGATTATCTATTTAAATATTTATTTAACTATT CATAAGATTTAAATTATTTTTGTTTCATATAACGTCAT GTGCACCTTTACTGTTAGTGTAAATAAAACATG TTCCTTATATTTACTC	野生序列
[0185]	10	IFN-3'UTR-F1	CCTGGTCCAACGAAAACCTTTGACTCACACCAGGTC ACGCTTTCGCTGTCTTCAAAGACTCTCACCCCTGCTA ACTGACCCTGAAACTGTTCTTTTTAACTCAAGTTT TTGTTCAACGTCGTGCACCTTTACTGTTAGTG TAAAAACGTTCTTTACTC	最优序列
	11	IFN-3'UTR-F2	CATCTGGTCCAACATGAAAACAATTCTTATTGACTCA CACCAGGTCACGCTTTCGCTGTCTTCAAAGACTCTCA CCCCTGCTAACTGACCCTGAAACTGTTCTTTTTAAC TTCAAGTTTTTGTTCACGTCGTGCACCTTTACTG TGGTTAGTGTAAATAAAACGTTCTTTACTC	优化序列
	12	IFN-3'UTR-F3	CATCTGGTCCAACATGAAAACAATTCTTATTGACTCA CACCAGGTCACGCTTTCGCTGTCTTCAAAGACTCTCA CCCCTGCTAACTGACCCTGAAACTGTTCTTTTTAAC TTCAAGTTTTTGTTCACGTCGTGCACCTTTACTG TGGTTAGTGTAAATAAAACGTTCTTTACTC	优化序列

[0186] 由于翻译延伸复合物在终止密码子处识别多个终止密码子有利于复合物的解聚,进而增强mRNA的翻译活性,因此本发明人增加了2个终止密码子。此外,选用的polyA长度为 120 ± 10 nt。

[0187] 通过同源重组或酶切的方法可以方便的替换质粒骨架中的ORF序列,进而能够用于不同抗原的mRNA疫苗的构建。

[0188] 实施例3.水蛭素mRNA疫苗工程菌株构建

[0189] (1) 使用带有水蛭素基因的质粒为模板,从其上PCR扩增出水蛭素基因(Hirudin)片段,如图7所示,通过引物引入同源臂序列、T7启动子、A1eI酶切位点、GFP和 $6 \times$ His标签。

[0190] 质粒骨架片段以pUC57-Amp载体为模板,如图8所示,通过PCR扩增出带有同源臂的载体骨架的片段。

[0191] 如图9所示,基因合成片段与PCR产物分别在琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定。

[0192] (2) 通过胶回收获得(1)中得到的两个片段,进而采用同源重组的方法连接环化并转入stable3大肠杆菌感受态细胞中构建工程菌,挑取单克隆培养成菌液,进行sanger测序鉴定工程菌。

[0193] 如图10所示,构建成功的工程菌提取的质粒进行琼脂糖凝胶电泳。

[0194] 如图11所示,构建成功的工程菌提取的质粒进行A1eI酶单酶切。

[0195] 实施例4.水蛭素质粒工程菌鉴定

[0196] 将水蛭素质粒工程菌进行长期传代,并对其中部分代数保存菌液,进行菌株鉴定和细菌质粒拷贝数、细菌质粒丢失率检测。检测结果如表1-2所示。

[0197] 3、5、10、15、20代菌液的IMVC生化实验结果显示为典型大肠埃希氏菌;革兰氏染色结果显示为短棒状革兰氏阴性菌,无杂菌污染。

[0198] 表3水蛭素工程菌细菌质粒拷贝数

代数	质粒体积(μL)	质粒浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)	质粒浓度($\text{ng}/\mu\text{l}$)	菌液稀释倍数	菌落数 1	菌落数 2	菌液体积(mL)	质粒拷贝数(copies/cell)
3	50	86.9	119.6	1.00E-06	50	50	5	76.33
5	30	159.4	165.6	1.00E-06	30	30	5	240.28
10	30	244.1	200.1	1.00E-06	30	30	5	180.47
20	50	96	109.7	1.00E-06	74	69	5	53.17

[0200] 如表3所示,细菌质粒拷贝数检测显示工程菌的质粒拷贝数约为53.17-240.28copies/cell。

[0201] 表4水蛭素质粒工程菌细菌质粒丢失率检定结果

代数	LB固体培养基(菌落数)	LB固体培养基+ Amp (菌落数)	质粒丢失率%
3	50	50	0
5	50	50	0
10	50	50	0
20	50	50	0
40	50	50	0
60	50	50	0

[0203] 如表4所示,细菌质粒丢失率检测显示工程菌在传代过程中未出现质粒丢失。

[0204] 实施例5.水蛭素工程菌发酵质粒得率

[0205] 在5L发酵罐中,加入3L LB培养基,在罐压 $0.05 \pm 0.02\text{MPa}$ 、通风2-10L/min、搅拌速度100-250rpm、温度 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、pH 7.0 ± 0.1 条件下进行菌液发酵。发酵10小时过程中每小时取2支5mL菌液,用于提取质粒。质粒浓度结果如表5、图12所示。

[0206] 表5水蛭素工程菌发酵过程质粒得率

时间	质粒浓度1	质粒浓度2	均值
1	15.2	5.5	10.35
2	25.6	14.4	20
3	56	38.8	47.4
4	115	95	105
5	99	93.3	96.15
6	76.9	60.5	68.7
7	63.4	75.4	69.4
8	36.6	48.6	42.6
9	35.2	53.4	44.3
10	31.1	41.2	36.15

[0208] 如图12的实验结果显示种子菌发酵4h,可得到最高的质粒得率。

[0209] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 深圳市三源生生物科技有限公司

<120> 一种构建mRNA体外转录模板的骨架

<130> P2022-0776

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 48

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

gagcttcagc tgtgggtaga gaagacagga ctcaggacaa tctccagc 48

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 优化序列IGL-5'UTR-F

<400> 2

gagcttcagc tgtgggtaga gaagacagga ctcaggacaa tcgccacc 48

<210> 3

<211> 137

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

gttctcatcc ctcaccccc accacgggag actagagctg caggatccca ggggaggggt 60
ctctcctccc accccaagge atcaagcct tctcctgca ctcaataaac cctcaataaa 120
tattctcatt gtcaatt 137

<210> 4

<211> 115

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 优化序列IGL-3'UTR-F1

<400> 4

gttctcccct cccccccac cacgggagac tagagctgca ggcccagggg aggggtctct 60
cctcccaccc caaggccaag cccttctccc tgcactcaaa accctcaact ctgtc 115

<210> 5

<211> 121
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 优化序列IGL-3'UTR-F2
<400> 5
gttctcatcc ctcaccccc accacgggag actagagctg caggatccca ggggaggggt 60
ctctcctccc accccaagge atcaagcct tctcctgca ctcaaaacc tcaactctgt 120
c 121
<210> 6
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 优化序列IGL-3'UTR-F3
<400> 6
gttctcatcc ctcaccccc accacgggag actagagctg caggatccca ggggaggggt 60
ctctcctccc accccaagge atcaagcct tctcctgca ctcaataaac cctcaactct 120
gtc 123
<210> 7
<211> 69
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 7
agagaaccta gagcccaagg ttcagagtca ccatctcag caagcccaga agtatctgca 60
atatctacg 69
<210> 8
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 优化序列IFN-5'UTR-F
<400> 8
agagaaccta gagcccaagg ttcagagtca ccatctcag caagcccaga agtatctgca 60
atagccacc 69
<210> 9
<211> 239
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

catctggtcc aacatgaaaa caattcttat tgactcatac accaggtcac gctttcatga 60
attctgtcat ttcaaagact ctcaccctg ctataactat gaccatgctg ataaactgat 120
ttatctatatt aatatattat ttaactattc ataagattta aattatattt gttcatataa 180
cgtcatgtgc acctttacac tgtggtagt gtaataaac atgttcctta tatttactc 239

<210> 10

<211> 167

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 优化序列IFN-3'UTR-F1

<400> 10

cctggtccaa cgaaaacctt tgactcacac caggtcacgc tttcgctgct ttcaaagact 60
ctcaccctg ctaactgacc gctgaaactg ttctttttaa cttcaagttt ttgttcaacg 120
tcgtgcacct ttacactgtg gttagtgtaa aaacgttct tttactc 167

<210> 11

<211> 178

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 优化序列IFN-3'UTR-F2

<400> 11

atctggtcca acatgaaaac aattcttatt gactcacacc aggtcacgct ttcgctgtct 60
tcaaagactc tcaccctgc taactgaccg ctgaaactgt tctttttaac ttcaagtttt 120
tgttcaacgt cgtgcacctt tacactgtgg ttagtgtaat aaaacgttcc tttactc 178

<210> 12

<211> 177

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 优化序列IFN-3'UTR-F3

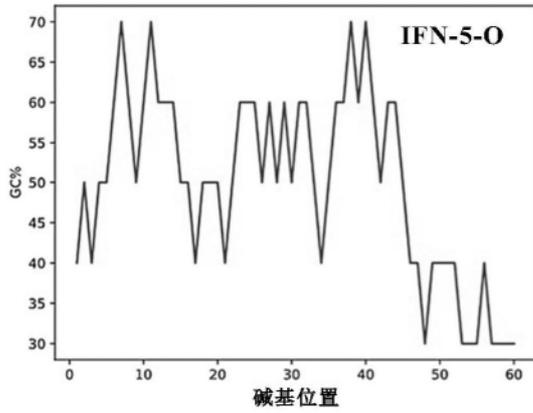
<400> 12

catctggtcc aacatgaaaa caattcttat tgactcacac caggtcacgc tttcgctgct 60
ttcaaagact ctcaccctg ctaactgacc gctgaaactg ttctttttaa cttcaagttt 120
ttgttcaacg tcgtgcacct ttacactgtg gttagtgtaa aaacgttct tttactc 177

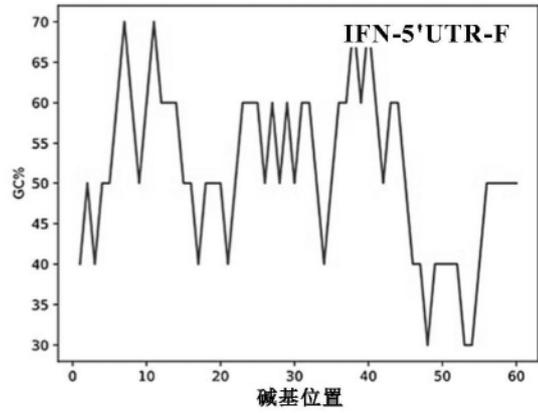

```

▶ IFN-5-O      1  AGAGAACCTAGAGCCCAAGGTTGAGAGTCACCCATCTCAGCAAGCCAGAAGTATCTGCAATATCTAC 68
   |||||
▶ IFN-5'UTR-F 1  AGAGAACCTAGAGCCCAAGGTTGAGAGTCACCCATCTCAGCAAGCCAGAAGTATCTGCAATAGCCAC 68

```



总结: 全长(69bp) | A(33.33% 23) | C(28.99% 20) | G(20.29% 14) | T(17.39% 12)



总结: 全长(69bp) | A(33.33% 23) | C(31.88% 22) | G(20.29% 14) | T(14.49% 10)

图3

```

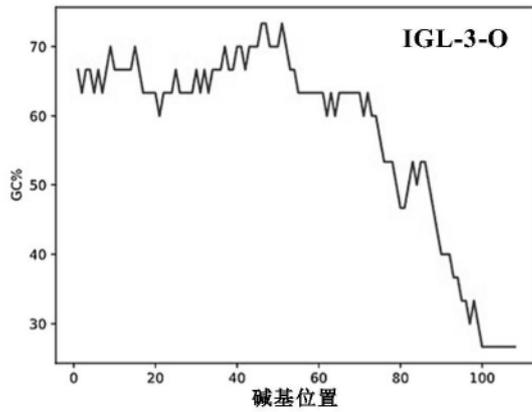
▶ IGL-3-O      1  GTTCTCATCCCTCACCCCCACCACGGGAGACTAGAGCTGCAAGATCCCAAGGGAGGGGCTCTCTCTCCACCCCAAGGGATCAAGCCCTTCTCCCTGCACCTCAATAAAC 110
   |||||
▶ IGL-3'UTR-F1 1  GTTCTC--CCCTCACCCCCACCACGGGAGACTAGAGCTGCAAG--CCCAAGGGAGGGGCTCTCTCTCCACCCCAAGGG--CAAGCCCTTCTCCCTGCACCTCA--AAAC 102

```

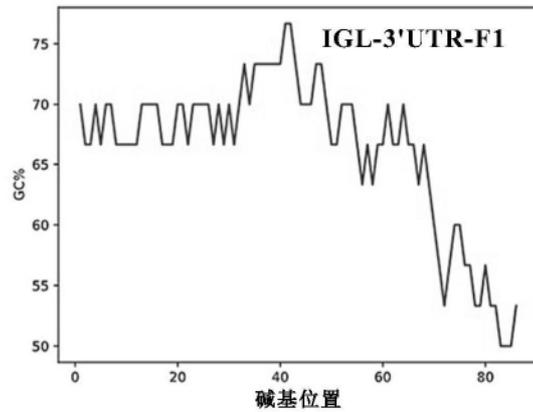
```

▶ IGL-3-O      111 CCTCAATAAATATTCTCATTGTC 133
   |||||
▶ IGL-3'UTR-F1 103 CCTCAA-----CTC--TGTC 115

```



总结: 全长(137bp) | A(24.09% 33) | C(37.23% 51) | G(16.79% 23) | T(21.9% 30)



总结: 全长(115bp) | A(19.13% 22) | C(44.35% 51) | G(20.0% 23) | T(16.52% 19)

图4

```

> IFN-3-O      4 CTGGTCCAACATGAAAACAATTCTTATTGACTCATACACCAAGGTCACGCTTTCATGAATTCTGTCAATTTCAAAGACTCTCACCCCTGCTATAACTATGACCATGCTGATA 113
IFN-3'UTR-F1 2 CTGGTCCAAC--GAAAAC---CT--TTGACTC--ACACCAAGGTCACGCTTTC-----GCTGTC--TTCAAAGACTCTCACCCCTGC--TAAC--TGACC--GCTG--A 85

> IFN-3-O      114 AACTGATTTATCTATTTAAATATT-TATTTAACTATTTCATAAGATTTAAATATTTTTGTTTCATATAACGTCATGTGACACCTTTACACTGTGGTTAGTGAATAAAAAACAT 222
IFN-3-F       86 AACTG-----TTCTTTTAAAC--TTC--AAG-----TTTTTGTTTC--AACGTC--GTGACACCTTTACACTGTGGTTAGTGA--AAAAC-- 154

> IFN-3-O      223 GTTCCTTATATTTACTC 239
IFN-3'UTR-F1 155 GTTCCT----TTTACTC 167
    
```

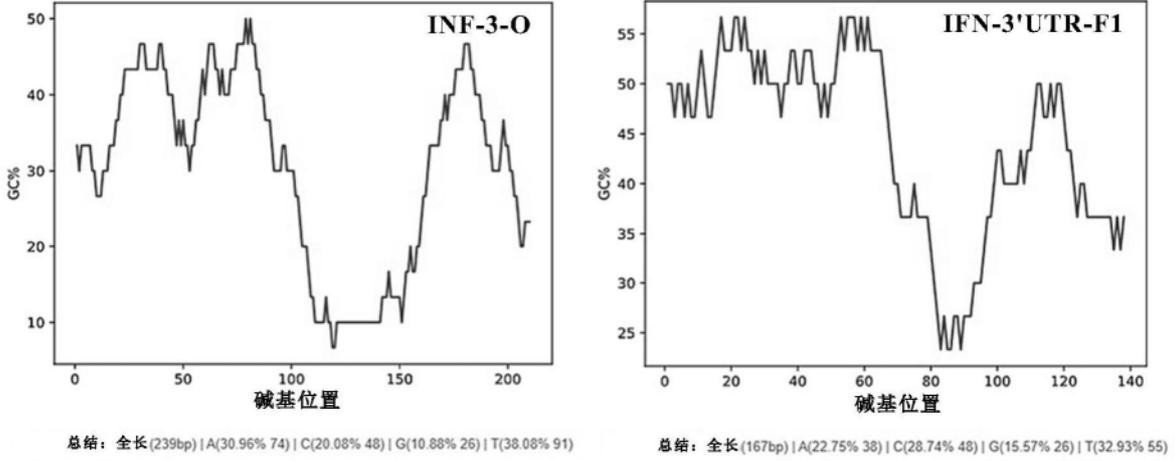


图5

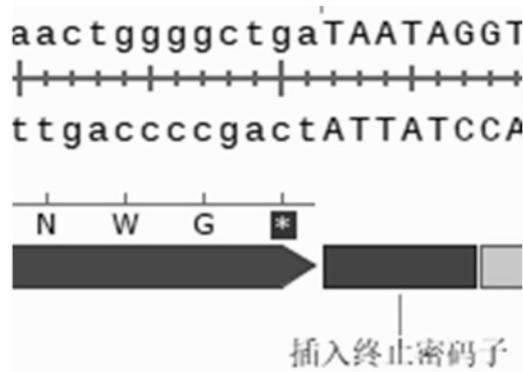


图6



图7



图8

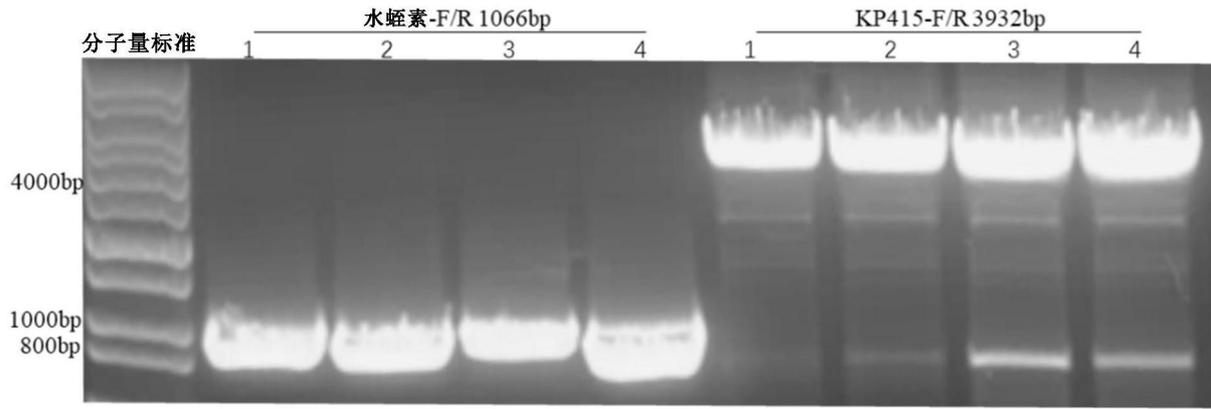


图9

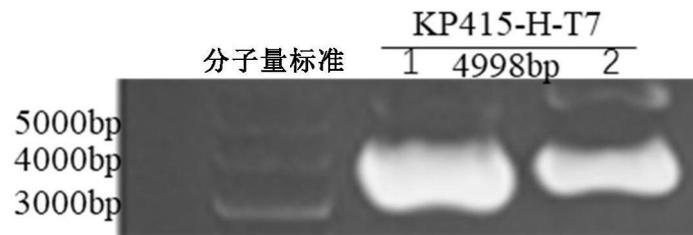


图10

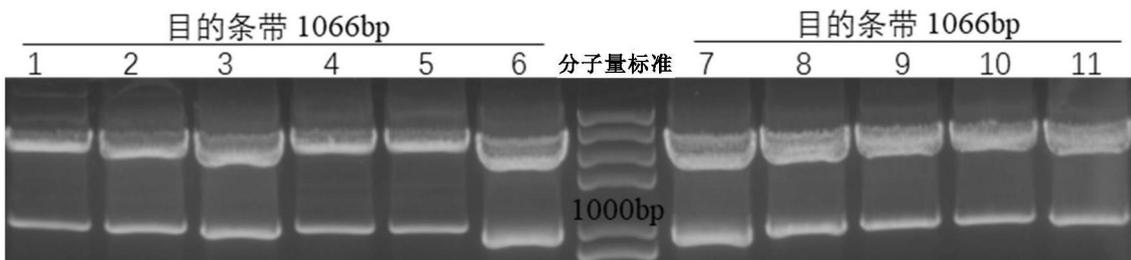


图11

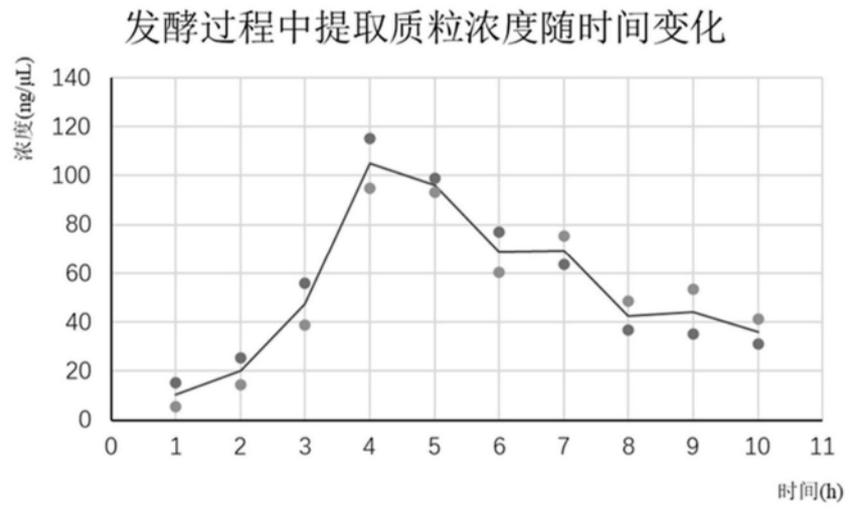


图12