

一种抵抗狂犬病毒的 mRNA 疫苗及其制备方法

技术领域

本申请属于生物医药技术领域，具体的，涉及一种狂犬病毒 mRNA 疫苗及其制备方法。

背景技术

狂犬病毒（Rabies virus, RABV）属于弹状病毒科狂犬病毒属，是一种单链 RNA 病毒。其外形为子弹状，核衣壳呈螺旋分布，表面具有包膜，内含单股负链 RNA。狂犬病毒的基因组大小约为 12 Kb，主要编码 5 个蛋白。分别为：糖蛋白（G 蛋白）、核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、转录酶蛋白。狂犬病毒依赖其膜表面上的 G 蛋白与神经细胞表面的乙酰胆碱受体结合并入侵细胞，进而造成对人或动物中枢神经系统的严重破坏，最终导致宿主死亡。研究表明：狂犬病病毒可以感染多种哺乳动物，大约 95% 的人类感染是由狗咬伤引起的，但是其他宿主包括土狼、臭鼬和蝙蝠等；基于最新的数据，每年有 60000 人患病死亡，大概每 10min 就有 1 人死亡。

完整的狂犬病毒基因组可以表达糖蛋白（Glycoprotein，G 蛋白）、核蛋白（Nucleocapsidprotein，N 蛋白）、磷蛋白（Phosphoprotein，P 蛋白）、基质蛋白（Matrixprotein，M 蛋白）、转录酶蛋白等多种蛋白质。但是其中仅有 G 蛋白被认为是能诱导机体产生中和抗体的蛋白质，并且由 G 蛋白所引起的免疫作用与全病毒相当。而且，G 蛋白在狂犬病毒的生理周期中具有重要的功能：G 蛋白在狂犬病毒外壳上可以形成同源三聚体的突刺结构，该中空结构可以允许信号分子和遗传物质通过，是病毒脱壳的重要条件。因此，一般选择 G 蛋白作为疫苗的优选抗原蛋白。

具体而言，G 蛋白全长 1575 bp，含有一个开放阅读框（ORF），524 个氨基酸残基，其中成熟 G 蛋白含有 505 个氨基酸残基，其余 19 个氨基酸残基构成 G 蛋白信号肽，在 G 蛋白成熟过程中，被蛋白酶切除。G 蛋白以三聚体的刺突形式呈现在病毒颗粒的表面。并且每个颗粒的表面大约有 1600~1900 个刺突，大小为 10 nm。G 蛋白在结构上可以分为膜外区（第 1~439 位氨基酸残基）、跨膜区（第 440~461 位氨基酸残基）和膜内区（第 462~505 位氨基酸残基），在受体识别、膜融合和 G 蛋白空间构象的稳定上都具有重要的作

用。其中膜外区含有 G I 区、G II 区和 G III 区三个重要抗原决定位点，G I 区上含有空间构象抗原表位和线性抗原表位；G II 区包含两个不连续的空间构象线性表位；G III 区包含一个空间构象表位，含有 B 细胞和 T 细胞识别位点。G 蛋白能够诱导宿主细胞产生特异性免疫应答，也能刺激细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）、辅助 T 细胞的增殖。

由于狂犬病毒对神经组织有极强的亲和力，因此一旦发生感染，病死率几乎为 100%，并且目前没有有效地治疗手段。此外，我国是狂犬病发病率第二高的国家，仅次于印度，并且由于饲养犬类数量的不断提高和防疫意识淡薄，狂犬病始终严重威胁着我国人民的生命健康安全。综上，疫苗接种仍是目前预防狂犬病最为有效地方法，而开发成本更低且更有效地狂犬疫苗仍具有十分重要的社会和经济价值。

目前我国目前批准上市的人用狂犬病疫苗种类包括 Vero 细胞纯化疫苗、人二倍体细胞疫苗和地鼠肾原代细胞纯化疫苗。上述疫苗的主要优点是：技术比较成熟，不良反应发生率低，免疫效果良好，然而其缺点也十分明显，主要包括：

- 1.减毒疫苗存在安全性问题，减毒不完全会存在感染风险。
- 2.传统疫苗制备工艺复杂，生产过程中需要接触活病毒，存在一定的安全隐患。
- 3.传统疫苗生产过程中存在细胞培养环节，质量控制和工艺放大技术要求高，存在引发产品质量事故的风险。
- 4.传统疫苗产生的有效抗原量低，为了保证效果，往往需要提高病毒滴度，从而增加了生产成本。

相比之下，mRNA 疫苗具有独特的优势：

1.mRNA 疫苗是一个非感染性，非整合性平台，并不直接向体内注射完整病毒遗传物质或病毒颗粒，不存在确证的感染或插入突变的潜在风险。其可迅速被正常细胞代谢降解，因此，安全性有保障；

2.mRNA 疫苗能够有效激活 T 细胞免疫和 B 细胞免疫，相对于灭活疫苗，有效性更好；

3.mRNA 疫苗的产品设计和生产工艺相对简单，规模化生产难度和生产成本较低；

目前针对狂犬 mRNA 疫苗,已有部分产品进入临床研究阶段,例如:CureVac AG 公司针对狂犬病毒研发了 mRNA 疫苗 CV7201,但目前该产品的临床实验已经暂停,CureVac AG 公司的另一个产品 CV7202 (NCT03713086) 进展同样不顺利,由于可见,目前针对狂犬病病毒疫苗的 mRNA 疫苗产品很少。

综上所述,现有市面上的狂犬疫苗免疫程序繁琐,针数较多,患者依从性差,对于开发比目前可用的疫苗更负担得起和更快速制备且安全有效的狂犬病疫苗存在未满足的医学需求。另外,现有技术针对狂犬病毒的 mRNA 疫苗产品也极度稀缺,急需更有效、副作用更低的 mRNA 疫苗产品。

为了克服现有技术的缺陷,本专利的发明人经过多年的研究,选择狂犬病毒编码蛋白 G 作为抗原,通过优化设计 mRNA 序列,研制出 mRNA 疫苗,在动物体内可有效阻止狂犬病毒的感染,能够同时引发体液免疫和细胞免疫,在长达 1 年的时间内体内仍存在高浓度的中和抗体,具有针对狂犬病毒的长效免疫保护作用,取得了预料不到的技术效果。

发明内容

第一方面,本申请提供了一种免疫组合物(例如,mRNA 疫苗),其包含编码能够引发针对狂犬病毒抗原(如糖蛋白 G)的有效中和抗体应答的高度免疫原性抗原的 RNA。

在一些实施方案中,所述 mRNA 包含编码区,该编码区编码衍生自狂犬病毒的糖蛋白 G(RAV-G 或 RABV-G)、核蛋白 N(RAV-N)、磷酸化蛋白 P(RAV-P)、基质蛋白 M(RAV-M)或 RNA 聚合酶 L(RAV-L)或其片段、变体的至少一种抗原肽或蛋白。

在一些实施方案中,所述 mRNA 包含编码区,该编码区编码 SEQ ID NO.4 的全长或部分或者与 SEQ ID NO.4 具有 50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

第二方面,本申请提供一种多核苷酸(例如:mRNA),其编码至少一种来源于狂犬病毒病毒或其免疫原性片段或免疫原性变体的抗原肽或蛋白,所述核苷酸包含至少一种异源非翻译区(UTR),其与 SEQ ID NO: 1-3 任一项的核苷酸序

列具有至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%、至少 98%或 100%同一性的核苷酸序列。

在一些实施方案中，该多核苷酸适用于生产疫苗。

在一些实施方案中，所述至少一种抗原肽或蛋白包含或由至少一种来源于结构蛋白、辅助蛋白或复制蛋白或任何上述蛋白的片段或具有免疫原性的变体组成。

在一些实施方案中，所述抗原肽或蛋白选自狂犬病毒的糖蛋白 G(RAV-G 或 RABV-G)、核蛋白 N(RAV-N)、磷酸化蛋白 P(RAV-P)、基质蛋白 M(RAV-M)或 RNA 聚合酶 L(RAV-L)或其片段、变体的至少一种抗原肽或蛋白。

在一些实施方案中，本申请的多核苷酸可包含或由与 SEQ ID NO.1、2、3 中任一个具有至少 75%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列组成。

在一些实施方案中，本申请的多核苷酸的至少一个编码区编码含有一个或数个突变，所述编码区包括经 G/C 含量优化的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述异源非翻译区 (UTR) 包括至少一个异源的 3'UTR 和/或 5' UTR。

在一些实施方案中，所述多核苷酸至少包括以下结构：

- (a) 5'-帽结构；
- (b) 3'聚腺苷酸序列，优选为 50-200 个 A，更优选为 80-200 个 A；
- (c) 5'UTR，长度为 10-200 个核苷酸，优选为 15-150 个核苷酸，优选 alpha-1-globin 5'UTR、KOZAK sequences；
- (d) 3'UTR，优选包括人源 gp130、DH143、hHBB 和 hHBA1 3'UTR 序列；
- (e) 优化后的 mRNA 序列比天然序列（野生型）GC 的碱基含量更高。

在一些实施方案中，所述 3'UTR 也可以选自 PSMB3、ALB7、 α -珠蛋白、CASP1、COX6B1、GNAS、NDUFA1、DH143、gp130、hHBB、hHBA1、CYBA (cytochrome b-245 alpha chain)、兔 β -珠蛋白、乙型肝炎病毒 (HBV)、VEEV (Venezuelan equine encephalitis virus) 病毒、rps9 (Ribosomal Protein S9)、FIG4 (FIG4 Phosphoinositide 5-Phosphatase)、人白蛋白 hHBB (human hemoglobin subunit beta)、HBA1(human Hemoglobin Subunit Alpha 1)的 3' UTR 或来自这些基

因中任一个的同源物、片段或变体。

在一些实施方案中，所述 5' UTR 选自非洲爪蟾或人源性 α -珠蛋白或 β -珠蛋白、人细胞色素 (human cytochrome) b-245a 多肽、羟基类固醇 17b 脱氢酶 (hydroxysteroid (17b) dehydrogenase) 以及烟草蚀刻病毒 (Tobacco etch virus)、 α -1-珠蛋白 (α -1-globin)、HSD17B4、RPL32、ASAH1、ATP5A1、MP68、NDUFA4、NOSIP、RPL31、SLC7A3、TUBB4B 和 UBQLN2 的 5' UTR 或来自这些基因中任一个的同源物、片段或变体。

在一些实施方式中，Kozak 序列如 SEQ ID NO.5 所示。

在一些实施方式中， α -1-globin 5'-UTR 序列如 SEQ ID NO.6 所示的核苷酸序列。

在一些实施方案中，3'UTR 序列包括：SEQ ID NO :8 和/或 9 所示的核苷酸序列。

在一些实施方式中，3'-聚腺苷酸序列优选为 60-120 个 A，更优选为 80-110 个 A，进一步优选为 100 个 A，如 SEQ ID NO.7。

在一些实施方式中，所述 mRNA 进一步包含 5' 鸟苷帽子，其选自：
m7Gppp(2'OMeA)pG、m7GpppApA、m7GpppApC、m7GpppApG、m7GpppApU、
m7GpppCpA、m7GpppCpC、m7GpppCpG、m7GpppCpU、m7GpppGpA、
m7GpppGpC、m7GpppGpG、m7GpppGpU、m7GpppUpA、m7GpppUpC、
m7GpppUpG、m7GpppUpU、m7Gpppm6ApG、m7G3'OmepppApA、
m7G3'OmepppApC、m7G3'OmepppApU、m7G3'OmepppApG、
m7G3'OmepppCpA、m7G3'OmepppCpC、m7G3'OmepppCpG、
m7G3'OmepppCpU、m7G3'OmepppUpA、m7G3'OmepppUpC、
m7G3'OmepppUpG、m7G3'OmepppUpU、m7G3'OmePppA2'OmePpG、
m7G3'OmepppA2'OmePpC、m7G3'OmepppA2'OmePpU、m7G3'OmepppA2'OmePpA、
m7G3'OmepppC2'OmePpA、m7G3'OmepppC2'OmePpU、m7G3'OmepppC2'OmePpG、
m7G3'OmepppC2'OmePpC、m7G3'OmepppG2'OmePpA、m7G3'OmepppG2'OmePpU、
m7G3'OmepppG2'OmePpG、m7G3'OmepppG2'OmePpC、m7G3'OmepppU2'OmePpA、
m7G3'OmepppU2'OmePpU、m7G3'OmepppU2'OmePpG、m7G3'OmepppU2'OmePpC。

在一些实施方案中，所述 mRNA 包含化学修饰的碱基或类似物，包括 5-甲

氧基甲基尿苷 (5-methoxymethyl uridine)、5-甲硫基尿苷 (5-methylthio uridine)、1-甲氧基甲基伪尿苷 (1-methoxymethyl pseudouridine)、5-甲基胞苷 (5-methyl cytidine)、5-甲氧基胞苷 (5-methoxy cytidine)、1-甲基假尿苷 (N1-Methyl-Pseudo-UTP)、假尿苷；优选 1-甲基假尿苷进行化学修饰；优选 1-甲基假尿苷 70%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100% 替换尿嘧啶，最优选 1-甲基假尿苷完全替换尿嘧啶，即为不使用天然尿嘧啶，而 100% 使用 1-甲基假尿苷。

在一些实施方案中，前述的多核苷酸是 DNA 或 RNA。

在一些实施方案中，前述的多核苷酸是编码 RNA。

在一些实施方案中，所述编码 RNA 是 mRNA、自我复制 RNA、环状 RNA 或复制子 RNA，优选 mRNA。

在一些实施方案中，所述 mRNA 包含至少一个 3'-聚腺苷酸序列，所述 3'-聚腺苷酸序列包含 30 至 200 个腺苷核苷酸并且所述 3'末端核苷酸是腺苷。

在一些实施方案中，其中所述 mRNA，优选包含 5'-帽结构，所述 5'-帽结构优选为 m⁷G、cap0、cap1、cap2、修饰的 cap0 或修饰的 cap1 结构，优选为 cap1 结构，最优选为 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。

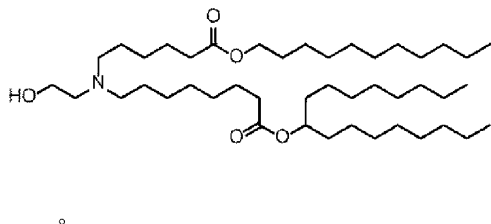
在第三方面，本申请提供了一种组合物，优选包含至少一种第一方面的核苷酸的免疫原性组合物。适当地，所述组合物可包含至少一种核苷酸，例如至少一种编码 RNA，所述核酸与一种或多种脂质复合，包封在一种或多种脂质中或与一种或多种脂质缔合，从而形成脂质纳米颗粒。

在一些实施方案中，本申请涉及一种狂犬病毒核酸疫苗，其特征在于，所述疫苗载体为脂质纳米颗粒 (LNP)，包括可电离的阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂，在一些实施方案中，按摩尔百分比 (mol%) 计，可电离阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂的摩尔含量合计 100%；

在一些实施方案中，所述脂质纳米颗粒包含 20-60mol% 可电离的阳离子脂质、25-55mol% 结构脂质、5-25mol% 辅助脂质和 0.5-15mol% 表面活性剂。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质选自 SM-102、ALC-0315、ALC-0519、Dlin-MC3-DMA (又被称为 MC3)、DODMA、DLin-KC2-DMA、DlinDMA，优选 SM-102；SM-102 (Heptadecan-9-yl 8-((2-hydroxyethyl) (6-oxo-6- (undecyloxy)

hexyl) amino)octanoate) 结构如下:



在一些实施方案中,所述结构脂质包括胆固醇,及胆固醇衍生物,优选胆固醇。

在一些实施方案中,所述辅助脂质选自 DSPC, DOPE, DOPC, DOPG 或 DOPS, 优选为 DSPC。

在一些实施方案中,所述表面活性剂选自 PEG2000-DMG, PEG-DSPE, DTDA-PEG2000, TPGS, 优选为 PEG2000-DMG。

在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒包含 20-50mol%可离子化的阳离子脂质。例如,脂质纳米颗粒可包含 41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 mol% 可电离的阳离子脂质。

在另一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含 50-60mol%可离子化的阳离子脂质。例如,脂质纳米颗粒可包含 51、52、53、54、55、56、57、58、59、60 mol% 可电离的阳离子脂质。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含 5-25mol% DSPC; 例如,脂质纳米颗粒可包含 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15mol%DSPC。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含 25-55mol%胆固醇。例如,脂质纳米颗粒可包含 30、31、32、33、34、35、36、37、38、38.5、39、39.5 或 40mol% 胆固醇。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含 0.5-15mol% DMG-PEG。例如,脂质纳米颗粒可包含 0.5、1、1.5 或 2mol% DMG-PEG。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含 50mol% 可电离阳离子脂质, 10mol%DSPC, 38.5mol%胆固醇和 1.5mol%DMG-PEG。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含 50 mol% SM-102, 10mol% DSPC, 38.5mol% 胆固醇和 1.5mol% PEG2000-DMG。

在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒包括约 2: 1 至约 30: 1 的 N: P 比。

在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒包括约 6: 1 的 N: P 比。

在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒包括约 3: 1 的 N: P 比。

在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒包含约 10: 1 至约 100: 1 的可电离阳离子脂质组分与 RNA 的 wt/wt 比。

在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒包含约 20: 1 的可电离阳离子脂质组分与 RNA 的 wt/wt 比。

在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒包含约 10: 1 的可电离阳离子脂质组分与 RNA 的 wt/wt 比。在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒具有从约 50nm 到约 150nm 的平均直径。

在一些实施方案中，本申请的脂质纳米颗粒具有约 70nm 至约 120nm 的平均直径。优选 100-120nm，最优选 100nm。

在一些实施方案中，本申请的狂犬病毒核酸疫苗还包括：缓冲液成分和冷冻保护剂。

在一些实施方案中，缓冲液可选自：缓冲剂的实例包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、醋酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙、甘油磷酸钙、乳酸钙、乳糖酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、磷酸氢钙、醋酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、氨丁三醇、二元磷酸钾、磷酸钾混合物、醋酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠、氢氧化镁、铝氢氧化物、海藻酸、枸橼酸、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、月桂基镁硫酸盐、十二烷基硫酸钠及其组合。

在一些实施方案中，冷冻保护剂可选自如糖/多元醇类、聚合物类、表面活性剂类、氨基酸类和盐类等物质，其中糖可选自：乳糖、蔗糖、海藻糖、半乳糖等。

在一些实施方案中，所述冷冻保护剂的量为 1 至 50%w/w 如从 2 至 50%w/w，或从 4 至 45%w/w，或从 6 至 12%w/w，或者优选从 6 至 10%w/w，或者最优选从 7 至 9%w/w。

在一些实施方案中，本申请的药物组合物包括前述脂质纳米颗粒组合物和外相缓冲液。

在一些实施方案中，所述水相缓冲液包括：氨丁三醇、醋酸钠、蔗糖，pH=7-8。

在一些实施方案中，所述氨丁三醇的含量选自 10-30 mmol/L，优选 15-25 mmol/L、优选 15 mmol/L、15.5 mmol/L、16 mmol/L、16.5 mmol/L、17 mmol/L、17.5 mmol/L、18 mmol/L、18.5 mmol/L、19 mmol/L、19.5 mmol/L、20 mmol/L、20.5 mmol/L、21 mmol/L、21.5 mmol/L、22 mmol/L、22.5 mmol/L、23 mmol/L、23.5 mmol/L、24 mmol/L、24.5 mmol/L、25mmol/L，最优选 20 mmol/L。

在一些实施方案中，所述醋酸钠的含量选自 0-20 mmol/L，优选 5-11 mmol/L、优选 5 mmol/L、5.5 mmol/L、6 mmol/L、6.5 mmol/L、7 mmol/L、7.5 mmol/L、8 mmol/L、8.5 mmol/L、9 mmol/L、9.5 mmol/L、10 mmol/L、10.5 mmol/L、10.6 mmol/L、10.7 mmol/L、10.8 mmol/L、10.9 mmol/L、11 mmol/L、11.5 mmol/L、12 mmol/L、12.5 mmol/L、13mmol/L，最优选 10.7 mmol/L。

在一些实施方案中，所述蔗糖的含量(w/w)选自：5-15%，优选 7.5-10 %、更优选 7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8.0%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、9%、9.5%、10%，最优选 8.7%。

在一些实施方案中，本申请的药物组合物包括序列如 SEQ ID NO.1 所示的 mRNA、脂质纳米颗粒组合物、20 mmol/L 氨丁三醇，10.7 mmol/L 醋酸钠，8.7% 蔗糖，pH 7.0~8.0，所述脂质纳米颗粒包含 50 mol% SM-102，10mol% DSPC，38.5mol% 胆固醇和 1.5mol% PEG2000-DMG，N:P=6。

在第四方面，本申请提供狂犬病毒核酸疫苗，其包括编码狂犬病毒蛋白或其片段的核酸序列；

在一些实施方案中，所述狂犬病毒蛋白包括但不限于：糖蛋白（Glycoprotein，G 蛋白）、核蛋白（Nucleocapsidprotein，N 蛋白）、磷蛋白（Phosphoprotein，P 蛋白）、基质蛋白（Matrixprotein，M 蛋白）、转录酶蛋白。

在一些实施方案中，所述核酸疫苗包含序列如：SEQ ID NO.1-3 所示或与 SEQ ID NO.1-3 具有至少 75%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述核酸疫苗包含编码 SEQ ID NO.4 或与其具有至少

75%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述核酸包括但不限于 DNA、RNA，优选 mRNA。

在一些实施方案中，所述疫苗的给药方式包括静脉注射、肌肉注射或皮下注射，优选为肌肉注射。

在一些实施方案中，所述疫苗的剂型可以选自冻干粉针剂、液体注射剂型、吸入制剂。

在第五方面，本申请涉及一种核酸疫苗的制备方法，其将疫苗载体和 mRNA 混合，得到核酸疫苗。

在一些实施方案中，所述疫苗载体为阳离子脂质纳米颗粒，所述的制备方法具体步骤包括：

(1) 按配方比例将可质子化阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂溶于有机溶液，得到有机相；

(2) 将优化 mRNA 溶于柠檬酸盐缓冲液或醋酸钠溶液中，得到水相；

(3) 将步骤 (1) 的有机相和步骤 (2) 的水相混匀，生成混合液，得到狂犬病毒疫苗。

在一些实施方案中，所述有机溶液包括无水乙醇。

在一些实施方案中，所述有机相中可质子化阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂的总浓度为 10-15 mg/ml。

在一些实施方案中，所述 mRNA 的浓度为 0.01-1mg/ml,优选 0.1-0.2 mg/ml。

在一些实施方案中，所述有机相和水相的体积比为 1: 2-4。

在一些实施方案中，所述混匀采用微流控设备，流速控制为 $\geq 12\text{ml/min}$ 。

在第六方面，本申请还涉及所述的 mRNA 或所述的组合物在制备疫苗中的用途。

在一些实施方案中，所述疫苗包括多联疫苗和多价疫苗。

在一些实施方案中，所述疫苗为狂犬病毒 mRNA 疫苗。

在第七方面，本发明还涉及一种暴露前或暴露后免疫的方法，包括给予受试者权利要求 7-16 所述组合物，可有效诱导受试者体内针对狂犬病毒抗原的免疫应答。

在第八方面，本发明还涉及所述的 mRNA 对应的核酸分子（编码所述的 mRNA 的 DNA 序列）。

在一些实施方案中，所述核酸分子的核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示。

在一个实施方案中，本发明还涉及所述核酸分子的生物材料。

在一个实施方案中，所述生物材料包括：含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组质粒、转基因细胞系等。

在一个实施方案中，所述重组载体优选：pVAX.1 载体、pcDNA3.1 载体。

所述第一到第八方面，其中所述狂犬病毒的毒株包括但不限于：巴斯德毒株（PAS）、Flury 株、SAD 株、aG 株、CTN 株、SC16(CSC1016D)、GD1(GDZAQ45)、NM3(CNM1103C)、QH2(CQH1202D)、LY(CNX8601)、YN3(CYN1009D)、XZ17(CXZ1704H)及它们的衍生株；优选 CTN 株，最优选 CTN-1 毒株。

与现有技术相比，本发明抗狂犬病毒 mRNA 疫苗具有以下特点：

1.综合考虑本土狂犬病毒流行的情况，选择 CTN-1 毒株作为研发 mRNA 疫苗的起始毒株；

2.为了使 mRNA 序列在体内达到最佳的表达效果和稳定性，我们对 CTN-1 毒株 G 蛋白的核苷酸编码序列进行了优化，包括：针对在人体内表达时的密码子偏好性进行调整、常用密码子的使用频率进行调整、提高序列的 GC 含量等，并对优化后的核苷酸序列进行筛选，最终确定最优序列，本申请获得的核苷酸序列使得转录后的 mRNA 结构更稳定，在哺乳动物和人体内的目标蛋白翻译效率更高，能够有效产生中和抗体，并引发机体产生体液和细胞免疫，并产生记忆 B 细胞和 T 细胞；使用较小剂量就能诱导动物产生对狂犬病毒多种株系及其突变株的保护效果。

3.本发明采用 LNP 方式进行 mRNA 递送，mRNA 在 LNP 中的稳定性良好，在相对比较高温的 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件储存 12 周后，各项检测项目均维持在一个比较高的水准，类似地，在 -20°C 条件下，各项检测指标也均非常良好，并且储存后疫苗效力没有显著的下降，能够满足大范围使用针对 mRNA 疫苗的储存要求。

定义

除非另有定义,本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的相同含义。关于本领域的定义及术语,专业人员具体可参考 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

尽管本申请的广义范围所示的数字范围和参数近似值,但是具体实施例中所示的数值尽可能准确的进行记载。然而,任何数值本来就必然含有一定的误差,其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外,本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的“1 至 10”的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围;也就是说,所有以最小值 1 或更大起始的子范围,例如 1 至 6.1,以及以最大值 10 或更小终止的子范围,例如 5.5 至 10。另外,任何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。

本领域技术人员可以理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸可以编码相同的多肽。还应当理解,技术人员可以使用常规技术进行核苷酸取代,其不影响由核酸分子编码的多肽序列,以反映在其中表达多肽的任何特定宿主生物体的密码子使用。因此,除非另有说明,“编码本申请蛋白质或免疫原性片段的多核苷酸”包括:彼此简并且编码相同氨基酸序列的所有多核苷酸序列。

抗原

本文所用的抗原是能够诱导免疫应答(例如,引起免疫系统产生针对抗原的抗体)的蛋白质。在本文中,除非另有说明,否则术语“抗原”的使用包括免疫原性蛋白质和免疫原性片段(诱导或能够诱导对至少一种狂犬病毒的免疫反应的免疫原性片段)。应当理解,术语“蛋白质”包括肽并且术语“抗原”包括抗原片段。其他分子也可能是抗原性的,例如细菌多糖或蛋白质和多糖结构的组合,本文所述的病毒疫苗抗原包括病毒蛋白、病毒蛋白片段以及源自狂犬病毒的设计和/或突变的蛋白。

此外,如本文所用的术语“抗原”将被本领域普通技术人员认可和理解,意指可以被免疫系统识别,优选被适应性免疫系统识别,并且能够触发抗原特异性免疫反应的物质,例如:通过形成抗体和/或抗原特异性 T 细胞作为适应性免疫

反应的一部分。抗原可以是或可以包括肽或蛋白质，其可以由 MHC 呈递给 T 细胞。还包括源自例如肽或蛋白质的片段、变体和衍生物。

抗原肽或蛋白质：术语“抗原肽或蛋白质”或“免疫原性肽或蛋白质”将被本领域普通技术人员认可和理解；意指一种肽，蛋白质来源于（抗原性或免疫原性）蛋白质，它刺激身体的适应性免疫系统以提供适应性免疫反应。因此，抗原性/免疫原性肽或蛋白质包含其源自的蛋白质。

正如本领域技术人员所认识到并熟知的：蛋白质片段、功能性蛋白质结构域和同源蛋白质也被认为在感兴趣的狂犬病毒抗原的范围内。例如：狂犬病毒或其突变株的任何蛋白质片段，条件是该片段具有免疫原性并赋予对狂犬病毒的保护性免疫应答；除了与参考蛋白质相同但被截短的变体之外，在一些实施方案中，抗原包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个突变，抗原/抗原多肽的长度范围可以从约 4、6 或 8 个氨基酸到全长蛋白质。

表位

表位：如本文所用的术语“表位”（在本领域中也称为“抗原决定簇”）将被本领域普通技术人员认可和理解。意指 T 细胞表位和 B 细胞表位。T 细胞表位或抗原肽或蛋白质的部分并且可以包含优选具有约 6 至约 20 个或至更多氨基酸的长度的片段，例如。由 MHC I 类分子加工和呈递的片段，优选具有约 8 至约 10 个氨基酸的长度，例如：8、9 或 10 个(或 11 个或 12 个氨基酸)或由 MHC II 类分子加工和呈递的片段，优选具有约 13 至约 20 个或至更多氨基酸的长度。这些片段通常以由肽片段和 MHC 分子组成的复合物形式被 T 细胞识别，即这些片段通常不会以其天然形式被识别。B 细胞表位通常是位于（天然）蛋白质或肽抗原的外表面上的片段，优选具有 5 至 15 个氨基酸，更优选具有 5 至 12 个氨基酸，甚至更优选具有 6 至 9 个氨基酸，其可以是被抗体识别，即以其天然形式识别。蛋白质或肽的此类表位还可选自本文提及的此类蛋白质或肽的任何变体。在本文中，表位可以是构象或不连续的表位，其由本文定义的蛋白质或肽的片段组成，这些片段在本文定义的蛋白质或肽的氨基酸序列中不连续，但在三维结构中聚集在一起或由单一多肽链组成的连续或线性表位。

核酸

术语“核酸”或“核酸分子”将被本领域普通技术人员认可和理解。如本文所

用，术语“核酸”或“核酸分子”优选指 DNA（分子）或 RNA（分子）。它优选与术语多核苷酸同义使用。优选地，核酸或核酸分子是包含核苷酸单体或由其组成的聚合物，所述单体通过糖/磷酸骨架的磷酸二酯键彼此共价连接。术语“核酸分子”还包括修饰的核酸分子，例如本文定义的碱基修饰、糖修饰或骨架修饰的 DNA 或 RNA 分子。

具体而言，本申请公开的组合物包含（至少一种）具有编码狂犬病毒抗原的开放阅读框（ORF）的 RNA。在一些实施方案中，RNA 是信使 RNA (mRNA)。

在一些实施方案中，所述核酸包含至少一个异源非翻译区(UTR)。术语“非翻译区”或“UTR”或“UTR 元件”将被本领域普通技术人员认识和理解意指核酸分子的一部分，通常位于编码序列的 5' 或 3' 端。在 5'端被称为 5' UTR，在 3' 端被称为 3' UTR。一般而言，UTR 不会翻译成蛋白质；UTR 可以是核酸的一部分，例如 DNA 或 RNA。UTR 可以包含用于控制基因表达的元件，也称为调节元件。此类调控元件可以是核糖体结合位点、miRNA 结合位点等；RNA (例如，mRNA) 可以进一步包含 5' UTR、3' UTR、3'-聚腺苷酸和/或 5'帽类似物。

在一些实施方案中，5' UTR 是异源 UTR，即自然界中发现的与不同 ORF 相关的 UTR；在另一个实施方案中，5' UTR 是合成的 UTR；5' UTR 是 mRNA 的区域，位于起始密码子（由核糖体翻译的 mRNA 转录物的第一个密码子）的上游（5'）。5' UTR 不编码蛋白质。天然 5' UTR 具有在翻译起始中发挥作用的特征，其具有像 Kozak 序列这样的特征，Kozak 序列具有共有 CCR(A/G)CCAUGG；示例性的 5' UTR 还包括非洲爪蟾或人源性 α -珠蛋白或 β -珠蛋白、人细胞色素（human cytochrome）b-245a 多肽、羟基类固醇 17b 脱氢酶（hydroxysteroid (17b) dehydrogenase）以及烟草蚀刻病毒（Tobacco etch virus）、 α -1-珠蛋白（alpha-1-globin）5' UTR 等。

在一些实施方案中，3' UTR 可以是异源的或合成的；例如：珠蛋白 UTR，包括非洲爪蟾 β -珠蛋白 UTR 和人 β -珠蛋白 UTR；其他 3' UTR 还可以是 CYBA (cytochrome b-245 alpha chain)、兔 β -珠蛋白、乙型肝炎病毒（HBV）、 α -珠蛋白 3' UTR 和 VEEV (Venezuelan equine encephalitis virus) 病毒 3' UTR 序列。在一些实施方案中，也可以使用 rps9 (Ribosomal Protein S9) 3' UTR、FIG4 (FIG4 Phosphoinositide 5-Phosphatase)、gp130、DH143 和人白蛋白 hHBB (human

hemoglobin subunit beta)、HBA1(human Hemoglobin Subunit Alpha 1)的 3' UTR。

在一些实施方案中, 3'-聚腺苷酸, 又被称多聚 A 尾巴; poly(A) 尾是位于 3' UTR 下游, 例如直接下游 (即 3') 的 mRNA 区域, 其包含多个连续的单磷酸腺苷。多聚 (A) 尾可能包含 10 到 300 个单磷酸腺苷, 可能包含 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、210、220、230、240、250、260、270、280、290 或 300 个单磷酸腺苷。在一些优选实施方案中, 聚(A)尾含有 50 至 250 个单磷酸腺苷, 更有选 50-100 个单磷酸腺苷; 最优选 100 个单磷酸腺苷; 在相关的生物学环境中 (例如, 在细胞中、体内), 3'-聚腺苷酸尾的功能是保护 mRNA 免于酶促降解, 例如在细胞质中, 并有助于转录终止和/或从细胞核中输出 mRNA 和翻译。

在一些实施方案中, RNA (例如: mRNA) 进一步包含 5'鸟苷帽子; 5'鸟苷帽子是真核 mRNA 转录, 5'帽子由倒置的 7-甲基鸟苷组成, 通过 5'-5' 三磷酸桥连接到真核 mRNA 的其余部分, 即所谓的帽子 0 (cap0), 主要起到作为正确 mRNA 加工的质量控制, 并有助于稳定真核 mRNA 的作用; 在帽子 0 的基础上, 在第一个核苷酸进行 2'-OH 甲基化, 称为帽子 1 (cap1); 除了帽子 0 和帽子 1, 还可以针对第二个核苷酸进行进一步的甲基化修饰, 称为帽子 2; 一般而言, 5'-帽子的合成方式可以是: 基于酶促、化学或化学酶促方法的 5' 加帽 mRNA 的不同合成路线;

在一些实施方案中, 在体外转录中, 直接添加帽类似物到体外转录(IVT)体系中, 所述 5'加帽类似物 (5' cap analog) 包括但不限于: m7Gppp(2'OMeA)pG、m7GpppApA、m7GpppApC、m7GpppApG、m7GpppApU、m7GpppCpA、m7GpppCpC、m7GpppCpG、m7GpppCpU、m7GpppGpA、m7GpppGpC、m7GpppGpG、m7GpppGpU、m7GpppUpA、m7GpppUpC、m7GpppUpG、m7GpppUpU、m7Gpppm6ApG、m7G3'OmepppApA、m7G3'OmepppApC、m7G3'OmepppApU、m7G3'OmepppApG、m7G3'OmepppCpA、m7G3'OmepppCpC、m7G3'OmepppCpG、m7G3'OmepppCpU、m7G3'OmepppUpA、m7G3'OmepppUpC、m7G3'OmepppUpG、m7G3'OmepppUpU、m7G3'OmePppA2'OmepG、m7G3'OmepppA2'OmepC、m7G3'OmepppA2'OmepU、m7G3'OmepppA2'OmepA、m7G3'OmepppC2'OmepA、

m7G3'OmepppC2'OmeU、m7G3'OmepppC2'OmeG、m7G3'OmepppC2'OmeC、m7G3'OmepppG2'OmeA、m7G3'OmepppG2'OmeU、m7G3'OmepppG2'OmeG、m7G3'OmepppG2'OmeC、m7G3'OmepppU2'OmeA、m7G3'OmepppU2'OmeU、m7G3'OmepppU2'OmeG、m7G3'OmepppU2'OmeC 等。

在一些实施方案中，所述加帽类似物还可以是其他结构，例如：四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体等。其具体的序列可以根据模板的情况确定。

还应当理解，本申请公开的狂犬病疫苗可以包括任何 5'非翻译区(UTR)和/或任何 3' 非翻译区(UTR)。核酸包含核苷酸的聚合物（核苷酸单体）。因此，核酸也称为多核苷酸。核酸可以是或可以包括，例如，脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA)、苏糖核酸 (TNA)、乙二醇核酸 (GNA)、肽核酸 (PNA)、锁核酸 (LNAs)、乙烯核酸 (ENA)、环己烯基核酸 (CeNA) 和/或嵌合体和/或其组合。

信使 RNA (mRNA) 是编码（至少一种）蛋白质（一种天然存在的、非天然存在的或经修饰的氨基酸聚合物）并且可以在体外、体内翻译以产生编码蛋白质的任何 RNA、原位或离体。技术人员将理解，除非另有说明，否则本申请中列出的核酸序列可以在代表性 DNA 序列中引用“T”，但是当序列代表 RNA（例如，mRNA）时，“T”将替换为“U”。因此，本文通过特定序列识别号公开和识别的任何 DNA 还公开了与 DNA 互补的相应 RNA（例如 mRNA）序列，其中 DNA 序列的每个“T”被“U”取代。

开放阅读框

开放阅读框 (ORF) 是一段连续的 DNA 或 RNA，以起始密码子（例如甲硫氨酸 (ATG 或 AUG)）开始并以终止密码子（例如 TAA、TAG 或 TGA，或 UAA、UAG 或 UGA），一般而言，ORF 通常编码蛋白质。应当理解，本文公开的序列还可以包含额外的元件，例如 5'和 3' UTR，但与 ORF 不同的是，这些元件不一定存在于本专利公开的 RNA 多核苷酸中。

在一些实施方案中，组合物包含 RNA(例如，mRNA)，其包含具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或 100%同一性的核苷酸序列 SEQ ID NO.1-6 中任一项的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述开放阅读框优选至少部分被密码子优化。密码子优

化基于这样的发现：翻译效率可以由细胞中转移 RNA(tRNA)出现的不同频率决定。因此，如果在本文定义的本申请的核酸的编码区中存在增加程度的所谓的“稀有密码子”，相应修饰的核酸序列的翻译比存在编码相对“常见的”tRNA 的密码子的情况下效率低。本领域技术人员可以能够其体外表达系统的特点针对待翻译序列进行密码子优化。

化学修饰或未修饰的核苷酸

在一些实施方案中，RNA（例如 mRNA）不是化学修饰的，而是包含由腺苷，鸟苷，胞苷和尿苷组成的标准核糖核苷酸。在一些实施方案中，本申请公开的核苷酸和核苷包含标准的核苷残基，例如存在于转录的 RNA（例如 A，G，C 或 U）中的那些。在一些实施方案中，本申请公开的核苷酸和核苷包括标准的脱氧核糖核苷，例如 DNA 中存在的脱氧核糖核苷（例如 dA，dG，dC 或 dT）；

在一些实施方案中，本申请公开的组合物包含具有编码狂犬病毒抗原的开放阅读框的 RNA，其中核酸包含本领域已知的可以是标准的（未修饰的）或修饰的核苷酸和/或核苷。在一些实施方案中，本申请公开的核苷酸和核苷包括修饰的核苷酸或核苷。这种修饰的核苷酸和核苷可以是天然存在的修饰的核苷酸和核苷或非天然存在的修饰的核苷酸和核苷。这样的修饰可以包括本领域公知的核苷酸和/或核苷的糖，主链或核碱基部分的修饰。

在一些实施方案中，核酸中的修饰的核酸碱基（例如 RNA 核酸，例如 mRNA 核酸）包括 1-甲基假尿苷(1-methyl-pseudouridine)，1-乙基-伪尿嘧啶(1-ethyl-pseudouridine)、5-甲氧基-尿苷(5-methoxy-uridine)、5-甲基-胞苷(5-methyl-cytidine)、假尿苷。

体外转录系统（IVT）

体外转录是将含有 RNA 聚合酶、NTP 等组分，在体外无细胞系统中，用 DNA 作为模板，模仿体内转录过程生成 mRNA。一般而言，体外转录反应中所合成的加帽 RNA 可以用于显微注射、体外翻译以及转染等后续实验。体外转录系统通常包括转录缓冲液，三磷酸核苷酸(NTP)，RNA 酶抑制剂和聚合酶。NTP 可以在自行合成或从供应商处选择。NTP 可以是天然的或非天然的 NTP。可选的聚合酶包括但不限于噬菌体 RNA 聚合酶，例如 T7RNA 聚合酶，T3RNA 聚合酶，SP6 RNA 聚合酶和/或其聚合酶突变体，例如：但不限于能够掺入修饰核酸

和/或修饰核苷酸，包括化学修饰核酸和/或核苷酸的聚合酶。一些实施方案排除了 DNA 酶的使用。在一些实施方案中，RNA 包含 5'鸟苷帽子。

除了体外转录系统合成外，还可以采用化学合成法，其中包括固相化学合成和液相化学合成；关于固相化学合成，本申请公开的核酸可以全部或部分使用固相技术制备；核酸的固相化学合成是一种自动化方法，其中分子固定在固体载体上，并在反应物溶液中逐步合成。固相合成可用于核酸序列中化学修饰的位点特异性引入；关于液相化学合成，可以通过顺序加入单体构建体合成本申请公开的核酸可以在液相中进行。此外，还可以将上述合成方法组合使用，因为以上讨论的合成方法各自具有其自身的优点和局限性，可以尝试将这些方法组合在一起，克服了上述限制。这些方法的组合在本申请公开的范围之内。

抗原变体

在一些实施方案中，本申请公开的组合物包含编码狂犬病毒抗原变体的 RNA。抗原变体或其他多肽变体是指其氨基酸序列与野生型、天然或参考序列不同的分子。与天然或参考序列相比，抗原/多肽变体可在氨基酸序列内的某些位置具有取代、缺失和/或插入。通常，变体与野生型、天然或参考序列具有至少 50% 的同一性。在一些实施方案中，变体与野生型、天然或参考序列具有至少 80% 或至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性。

由本申请公开内容的核酸编码的变体抗原/多肽可以包含赋予多种期望特性中的任一种的氨基酸变化，例如，增强它们的免疫原性、增强它们的表达和/或改善它们的稳定性或 PK/PD 特性。通常可以使用常规诱变技术制备变体抗原/多肽，并酌情进行分析以确定它们是否具有所需的特性。确定表达水平和免疫原性的测定是本领域众所周知的，并且示例性的此类测定在实施例部分中阐述。类似地，可以使用本领域公认的技术来测量蛋白质变体的 PK/PD 特性，例如，通过确定接种对象中抗原随时间的表达和/或通过观察诱导的免疫反应的持久性。由变体核酸编码的蛋白质的稳定性可以通过测定尿素变性时的热稳定性或稳定性来测量，或者可以使用计算机预测来测量。用于此类实验和计算机确定的方法是本领域已知的。

同一性

术语“同一性”是指通过比较序列确定的两个或多个多肽（例如抗原）或多核苷酸（核酸）的序列之间的关系。同一性还指由两个或多个氨基酸残基或核酸残基的串之间的匹配数确定的序列之间或之中的序列相关性程度。同一性测量两个或多个序列中较小的序列之间相同匹配的百分比，其中间隙比对（如果有）由特定数学模型或计算机程序（例如，“算法”）解决。可以通过已知方法容易地计算相关抗原或核酸的身份。用于多肽或多核苷酸序列的“百分比（%）同一性”定义为候选氨基酸或核酸序列中与氨基酸中的残基相同的残基（氨基酸残基或核酸残基）的百分比序列或第二个序列的核酸序列在比对序列并引入缺口之后，如果需要，以获得最大百分比同一性。用于比对的方法和计算机程序是本领域公知的。可以理解，同一性取决于同一性百分比的计算，但由于计算中引入的差距和惩罚，其值可能会有所不同。通常，特定多核苷酸或多肽（例如抗原）的变体具有 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性，如通过本文所述的序列比对程序和参数确定的特定参考多核苷酸或多肽并且是本领域技术人员已知的。

脂质纳米粒(LNP)

本申请公开的 RNA（例如，mRNA）被配制在脂质纳米颗粒(LNP)中。脂质纳米颗粒通常包括可电离的阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇和 PEG 脂质组分以及感兴趣的核酸。脂质本申请公开的纳米颗粒可以使用本领域中通常已知的组分，组合物和方法来生成。

多价疫苗

本文所提供的组合物可包括编码相同或不同种类的两种或多种抗原的 RNA 或多个 RNA。在一些实施方案中，组合物包括编码两种或多种狂犬病毒抗原的 RNA 或多个 RNA。在一些实施方案中，RNA 可以编码 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 或更多狂犬病毒抗原。

编码抗原的两种或多种不同 RNA（例如，mRNA）可以配制在同一脂质纳米粒中。在其它实施方案中，可以将编码抗原的两种或多种不同 RNA 配制在单独的脂质纳米颗粒中（每个 RNA 配制在单个脂质纳米颗粒中）。然后将脂质纳米颗粒组合作为单一疫苗组合物（例如，包含编码多种抗原的多种 RNA）

给药，或者可以单独给药。

多联疫苗

本文提供的组合物可包括编码相同或不同病毒株的两种或多种抗原的 RNA 或多个 RNA。本文还提供了组合疫苗，其包括编码一种或多种狂犬病毒和一种或多种不同生物体的抗原的 RNA。因此，本申请公开的疫苗可以是靶向同一株/物种的一种或多种抗原的联合疫苗，或不同菌株/物种的一种或多种抗原，例如诱导对在狂犬病毒感染危险高的相同地理区域中发现的生物体或个体暴露于狂犬病毒时可能暴露于其的生物体的免疫力的抗原。

药物制剂

本文提供了用于预防或治疗例如人和其它哺乳动物的狂犬病毒的组合物(例如药物组合物)，方法，试剂盒和试剂。本文提供的组合物可用作治疗剂或预防剂。它们可用于预防和/或治疗狂犬病毒感染的药物中。

药物组合物

术语“药物组合物”是指活性剂与惰性或活性载体的组合，使得该组合物特别适合于体内或体外诊断或治疗用途。“药学上可接受的载体”在施用于受试者之后或施用于受试者之后，不会引起不希望的生理作用。药物组合物中的载体必须是“可接受的”，其意义还在于它与活性成分相容并且能够稳定它。一种或多种增溶剂可用作递送活性剂的药物载体。药学上可接受的载体的例子包括但不限于生物相容性载体，佐剂，添加剂和稀释剂，以获得可用作剂型的组合物。其它载体的例子包括胶体氧化硅，硬脂酸镁，纤维素和十二烷基硫酸钠。在 Remington's Pharmaceutical Sciences 中描述了其它合适的药物载体和稀释剂，以及用于它们的药物必需品。

序列信息

本申请涉及的相关序列如下：

SEQ ID NO.1

GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAAGCUUGGUACCGAGCUCGGAUCC
ACUAGUCCAGUGUGGUGGAAUUCAGAAUAAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAG
ACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAUCCUCAGGCCUCGUGUUCGUGCCCCUGCU
GGUGUUUCCUCUGUGCUUCGGCAAGUUCCAAUCUACACCAUCCCAGAUAAAGCUGG
GACCUUGGAGCCCUAUCGACAUUCACCACCUGAGUUGUCCUAACAACCUGGUGGUC

GAGGACGAGGGCUGUACCAAUCUGAGCGGCUUCUCCUACAUGGAACUGAAGGUGG
GCUACAUCAGCGCCAUCAAGGUGAACGGCUUCACUUGCACCGGCGUGGUGACCGAG
GCCGAGACAUACACAAAUUUCGUUGGCUACGUGACCACCACCUUCAAGAGAAAGCA
CUUCCGCCCCACCCUGACGCCUGUCGGAGCGCUUACAACUGGAAGAUGGCCGGCG
AUCCUAGAUACGAGGAAAGUCUGCACAAACCCCUAUCCUGAUUACCACUGGCUGAGA
ACCGUGAAGACCACAAAGGAAAAGCGUGGUGAUCAUUAGCCCUAGCGUGGCCGAUC
UGGACCCUUAACGACAAGUCUCUCCAUAAGCAGAGUGUUCUUAGAGGCAAGUGCAGC
GGCAUAAACAGUGAGCUCCGCCUACUGCAGCACCAAUCACGACUACACCAUCUGGAU
GCCUGAGAACCCUAGACUGGGUACAUCUUGUGAUACUUCACAAACAGCAGAGGC
AAACGGGCUUCUAAAGGCAGCAAGACCUGUGGCUUUGUGGACGAGCGGGGACUGU
ACAAAUCUCUGAAGGGCGCCUGCAAGCUGAAAACUGUGCGGCGUGCUGGGCCUCCGG
CUGAUGGACGGCACCUGGGUCGCAUCCAGACCAGCAACGAGACAAAGUGGUGCCC
CCCCGAUCAGCUGGUGAAUCUGCACGAUUUCCACAGCGACGAAAUCGAGCAUCUGG
UGGUGGAAGAACUGGUUAAAAAGCGGGAAGAGUGCCUGGAUGCUCUGGAAAGCAU
CAUGACAACCAAUCCGUGAGCUUCCGGAGGCUGAGCCACCUGAGAAAGCUGGUUC
CCGGCUUCGGCAAGGCCUAUACCAUCUUUAACAAGACACUGAUGGAAGCCGACGCC
CACUACAAGAGCGUCCGGACCUGGAACGAGAUAUCCCUAGCAAGGGCUGCCUGAG
AGUGGGCGGAAGAUGCCACCCCCACGUGAACGGCGUGUUUUUAACGGCAUCAUCC
UGGGCCUGACGGCCACGUGCUGAUCCCUAGAGUCCAGCCUGCUGCAGCAG
CACAUGGAACUGCUGGAGAGCUCUGUGAUCCCCCUGAUGCACCCUCUGGCCGACCC
CAGCACAGUGUUUAAGGACGGCGACGAGGUGGAGGACUUCGUGGAAGUGCACCUG
CCUGACGUGCAUAAGCAGGUGAGCGGCGUGGACCUGGGACUGCCAAACUGGGGAA
AAGACGUGCUGAUGGGCGCUGGCGUGCUGACCGCCCUGAUGCUGAUGAUCUCCU
GAUGACAUGCUGCAGAAGAACCAACCGGGCCGAGAGCAUCCAACACAGCCUGGGCG
AGACCGGCAGAAAGGUGUCGGUCACCUCUCAGUCUGGAAGAGUGAUCAGCUCUUG
GGAGAGCUACAAGAGCGGAGGAGAAACCAAACUGUGAUAAACUCGAGCUGGUACUG
CAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUCUCCGUGCCUGGGUACCCGAGUCUCCCCCG
ACCUCGGGUCCCAGGUAGCUCUCCACCUCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUA
GUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCA
CACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACU
AAGCUAUACUAAACCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCCUGGAGCUAG
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAAA
AA
A

SEQ ID NO.2

GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAAGCUUGGUACCGAGCUCGGAUCC
ACUAGUCCAGUGUGGUGGAAUUCAGAAUAAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAG
ACUCAGAGAGAAACCGCCACCAUGAUUCCCCAGGCACUGCUGUUCGUGCCGUUGCU
GGUUUUUCCACUGUGUUUUGGUAAGUUUCCCAUAUAUACCAUCCCGAUAAACUG
GGCCCUUGGUCCCCCAUCGACAUCCACCACUUGAGCUGUCCCAACAAUCUGGUUGU
UGAGGACGAGGGCUGUACCAACCUCAGCGGCUUCAGUUUAUUGGAACUGAAGGUU
GGCUAUUUAGCGCCAUCAAGUGAAUGGCUUUACCUGCACCGGAGUGGUGACCG
AAGCCGAGACCUACACGAACUUUGUUGGUUACGUCACCACAACGUUUAAACGUAA

GCACUCCGACCGACUCCAGAUGCCUGUAGGUCGGCCUACAAUUGGAAGAUGGCCG
GAGAUCCACGUUAUGAGGAAUCCCUCCAUAACCCAUACCCGGACUACCAUUGGCUG
AGGACGGUGAAGACAACGAAGGAGUCCGUGGUCAUAAUCUCGCCAUCCGUGGCCG
ACCUUGGAUCCCUACGAUAAGAGCCUGCACUCCCGAGUGUUCCACGAGGCAAGUGU
AGCGGUAAUACGGUCAGCAGCGCAUACUGUUCACAAAUCACGAUUAUACUAUUAU
GGAUGCCCCGAGAACCCACGGCUGGGAACAAGUUGCGACAUUUUUACCAAUUCCAG
GGGAAAGCGGGCAUCGAAGGGAUCCAAGACAUGUGGCUUCGUCGAUGAACGGGGA
CUGUACAAGAGUCUUAAGGCGCUUGUAAGCUGAAACUCUGUGGUGUUCUGGGAU
UGCGACUGAUGGAUGGAACCUUGGUGGCCAUUCAGACGAGCAAUGAGACCAAUG
GUGCCCCGCCGAUCAAUUGGUGAAUCUGCAUGACUUUCACAGCGACGAGAUCGAGC
AUUUGGUGGUGGAGGAACUGGUGAAGAAGCGCGAAGAGUGCUUGGACGCCUGGA
AUCGAUCAUGACCACUAAAUCGGUUUCGUUCCGCCGGCUUUCGCACCUCAGGAAGU
UGGUGCCGGGCUUCGGCAAGGCUUACACCAUUAUUAAGACCCUGAUGGAGGC
UGACGCACACUACAAGUCCGUUAGGACUUGGAAUGAGAUCAUCCAAGUAAGGGC
UGCUUGAGGGUAGGAGGUCGGUGCCAUCCGCAUGUGAAUGGUGUCUUCUCAAUG
GCAUCAUUUUGGACCGGAUGGCCAUGUGCUCAUCCCAGAGAUGCAGUCCUCCUC
CUCCAACAGCACAUUGAACUGCUGGAGAGUUCGGUAAUCCACUGAUGCAUCCCCU
GGCCGAUCCGAGCACAGUUUUUAAGGACGGUGAUGAGGUAGAAGACUUCGUCGAG
GUACAUUUGCCCGAUGUACACAAACAGGUUUCGGGAGUGGACCUUGGAUUGCCCA
ACUGGGGCAAGGAUGUUUGAUGGGGAGCCGGAGUGCUCACCGCACUUAUGCUGAU
GAUUUUCUGAUGACUUGCUGCCGCAGGACCAACAGGGCAGAGUCGAUUCAGCAU
AGCUUGGGCGAGACGGGUCGGAAAGUCUCCGUCACCAGUCAGUCCGGACGUGUGA
UCAGCUCCUGGGAGAGUUACAAAAGCGGCGUGAAACCAAGCUGUGAUAAUCGA
GCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUCGCGUCCUGGGUACCCCGA
GUCUCCCCCGACCUCCGGUCCAGGUAUGCUCCCAACCUCACCUGCCCCACUACCA
CCUCUGCUAGUUCAGACACCUCCTCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUA
GCCUAGCCACACCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUAGCAAUAAACGAAA
GUUUAACUAAGCUAUACUAACCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCCU
GGAGCUAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAA
AAA
AAAAAAAAA

SEQ ID NO.3

GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAAGCUUGGUACCGAGCUCGGAUCC
ACUAGUCCAGUGUGGUGGAAUUCAGAAUAAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAG
ACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAUCCCCAAGCUUUGCUGUUCGUGCCUCUCCU
GGUCUUUCCACUGUGCUUUGGAAAUUCCTCAUUUACACCAUCCAGAUAAAGCUCG
GCCUUGGUCUCCCAUCGACAUUCAUACCUUGUCUUGUCCUAAUUAUUGGUGGUG
GAGGACGAAGGAUGCACAAAUCUUAAGCGGCUUCAGCUAUUUGGAAUUGAAAGUCG
GGUACAUAAAGCGCCAUUAAGGUCAACGGUUUACCUUGCACGGGCGUGGUGACUGA
GGCGGAAACUUAACACAAACUUGUCGGCUAUGUGACCACGACAUUCAAGAGGAAA
CACUUCAGACCUACGCCAGAUGCUUGCAGGUCUGCUUAUAAACUGGAAGAUGGCAG
GCGAUCCUAGGUUAGAGGAAUCUCUGCAUAAACCUUUAUCCUGAUUAUCAUUGGCU
UCGCACGGUGAAAACCAAAAGAGAGCGUGGUCAUUAUUCACCAUCUGUGGCG

[illegible]

注：在 SEQ ID NO.1-3 中，U 可以 100% 替换成 1-甲基假尿嘧啶。

SEQ ID NO.4

MI PQALLFVPLLVPPLCFGKFPIY TIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYM
ELKVGYISAIKVNGFTCTGVVTEAETYTNFVG YVTTTFKRKHFRPTPDACRSAYNWKMA
GDPRYEESLHNPYPDYHWLRTVKTTKESVVIISPSVADLDPYDKSLHSRVFPRGKCSGITVS
SAYCSTNHDIYTIWMPENPRLGTSCDIFTNSRGKRASKGSKTCGFVDERGLYKSLKGACKL
KLCGVGLRLMDGTWVAIQTSNETKWCPDQLVNLHDFHSDEIEHLVVEELVKKREECLD
ALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIIPSKGCLR
VGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGHVLIPEMQSSLLQQHMELLESSIPLMHPLADPSTVFK
DGDEVEDFVEVHLPDVHKQVSGVDLGLPNWGKDVLMGAGVLTALMLMIFLMTCCRRTN
RAESIQHSLGETGRKVS VTSQSGRVISSWESYKSGGETKL

SEQ ID NO.5 (KOZAK 序列)

GCCACCATG

SEQ ID NO.6 (alpha-1-globin 5'-UTR)

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACT
AGTCCAGTGTGGTGGAATTCAGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGA
GAGAACCCGCCACC

SEQ ID NO.7 (3'-聚腺苷酸序列)

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
A

SEQ ID NO.8 (gp130 3'-UTR)

CTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCC
GAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACC
ACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC

SEQ ID NO.9 (DH143 3'-UTR)

CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAAC
AGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGG
TTGGTCAATTCGTGCCAGCCAC

SEQ ID NO.10 (序列 1 对应的 DNA 序列)

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACT
AGTCCAGTGTGGTGGAATTCAGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGA
GAGAACCCGCCACCATGATCCCTCAGGCCCTGCTGTTCTGTGCCCTGCTGGTGTTTCCT
CTGTGCTTCGGCAAGTTCCCAATCTACACCATCCCAGATAAGCTGGGACCTTGGAGCC
CTATCGACATTCACCACCTGAGTTGTCTAACAACCTGGTGGTCGAGGACGAGGGCTG
TACCAATCTGAGCGGCTTCTCTACATGGAAGTGAAGGTGGGTACATCAGCGCCATCA
AGGTGAACGGCTTCACTTGCACCGGCGTGGTGACCGAGGCCGAGACATACACAAATTT
CGTTGGCTACGTGACCACCACCTTCAAGAGAAAGCACTTCCGCCCCACCCCTGACGCC
TGTCGGAGCGCTTACAACCTGGAAGATGGCCGGCGATCCTAGATACGAGGAAAGTCTGC
ACAACCCCTATCCTGATTACCACTGGCTGAGAACCGTGAAGACCACAAAGGAAAGCG
TGGTGATCATTAGCCCTAGCGTGGCCGATCTGGACCCCTTACGACAAGTCTCTCCATAGC
AGAGTGTTCCCTAGAGGCAAGTGCAGCGGCATAACAGTGAGCTCCGCCTACTGCAGCA
CCAATCACGACTACACCATCTGGATGCCTGAGAACCCTAGACTGGGTACATCTTGTGAT
ATCTTCACAAACAGCAGAGGCAAACGGGCTTCTAAAGGCAGCAAGACCTGTGGCTTT
GTGGACGAGCGGGGACTGTACAAATCTCTGAAGGGCGCCTGCAAGCTGAAACTGTGC
GGCGTGCTGGGCCTCCGGCTGATGGACGGCACCTGGGTGCGCATCCAGACCAGCAAC
GAGACAAAGTGGTGCCCCCGATCAGCTGGTGAATCTGCACGATTTCCACAGCGACG
AAATCGAGCATCTGGTGGTGGAAGAACTGGTTAAAAAGCGGGAAGAGTGCCTGGATG
CTCTGGAAGCATCATGACAACCAAATCCGTGAGCTTCCGGAGGCTGAGCCACCTGAG
AAAGCTGGTTCCCGGCTTCGGCAAGGCCTATACCATCTTTAACAAGACACTGATGGAA
GCCGACGCCCACTACAAGAGCGTCCGGACCTGGAACGAGATCATCCCTAGCAAGGGC
TGCCTGAGAGTGGGCGGAAGATGCCACCCCCACGTGAACGGCGTGTTTTTCAACGGCA
TCATCCTGGGCCCTGACGGCCACGTGCTGATCCCTGAGATGCAGTCCAGCCTGCTGCA

GCAGCACATGGAAGCTGCTGGAGAGCTCTGTGATCCCCCTGATGCACCCTCTGGCCGAC
CCCAGCACAGTGTTTAAGGACGGCGACGAGGTGGAGGACTTCGTGGAAGTGACCTG
CCTGACGTGCATAAGCAGGTGAGCGGCGTGGACCTGGGACTGCCAACTGGGGAAAA
GACGTGCTGATGGGCGCTGGCGTGCTGACCGCCCTGATGCTGATGATCTTCCTGATGAC
ATGCTGCAGAAGAACCAACCGGGCCGAGAGCATCCAACACAGCCTGGGCGAGACCGG
CAGAAAGGTGTCGGTCACCTCTCAGTCTGGAAGAGTGATCAGCTCTTGGGAGAGCTAC
AAGAGCGGAGGAGAAACCAAACTGTGATAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAAT
GCTAGCTGCCCCCTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAG
GTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCA
AGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAG
CAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAAGTTAACTAAGCTATACTAACCCACAGGGTT
GGTCAATTTCTGCCAGCCACACCCTGGAGCTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

附图说明

- 图 1: Bioanalyzer 分析编码 G 蛋白的 mRNA 纯度。
- 图 2: LNP 配方优选实验结果。
- 图 3: 透射电镜显示 G 蛋白 mRNA 和脂质纳米颗粒(LNP)复合物形态。
- 图 4: 免疫印迹实验验证 G 蛋白在宿主细胞内的表达情况。
- 图 5: FACS 流式细胞仪检测到目标抗原蛋白在细胞中的表达情况。
- 图 6: 单次免疫后小鼠中和抗体检测实验。
- 图 7: 不同免疫程序免疫后小鼠中和抗体检测实验。
- 图 8: 食蟹猴中和抗体实验结果。
- 图 9: 狂犬 mRNA 疫苗肝脏毒性结果。
- 图 10: 狂犬 mRNA 疫苗长效性中和抗体浓度结果。
- 图 11: 狂犬 mRNA 疫苗针对中国主流毒株的中和活性实验结果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本申请的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本申请,而不应视为限定本申请的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1: 抗原蛋白序列优化与体外转录 (IVT)

1.1 抗原蛋白序列优化

根据狂犬病毒G蛋白的天然编码区序列，本申请设计了SY mRNA序列。除了编码区外，SY mRNA序列特征还包括 alpha-1-globin 5'UTR、gp130和DH143 3'UTR和100个polyA。SY-1、SY-2和SY-3 mRNA序列都在G蛋白编码区做了优化，相比狂犬病毒G蛋白原始序列，优化后序列的GC含量均有提高，而在UTR区域保持一致。

具体实验步骤如下：本发明设计多条优化序列，并且克隆到载体pVAX.1上(金斯瑞生物科技有限公司)。以线性化载体（委托金斯瑞生物科技有限公司定制）为模板，体外合成mRNA，并且转染COS7细胞。在设定时间，通过流式细胞仪检测细胞中G蛋白表达水平，评估密码子优化对mRNA表达水平和稳定性的影响。表达水平结果如下：

表1 不同密码子优化策略的G蛋白表达量数据

mRNA	5'UTR	ORF	3'UTR	polyA 序列以及后续元件	相对表达量
SY-01 SEQ ID NO.1	pVAX.1+alpha-1-globin 5'UTR	G 蛋白核苷酸序列优化方案 1	gp130 和 DH143 3'UTR	100A	30.39
SY-02 SEQ ID NO.2	pVAX.1+alpha-1-globin 5'UTR	G 蛋白核苷酸序列优化方案 2	gp130 和 DH143 3'UTR	100A	26.74
SY-03 SEQ ID NO.3	pVAX.1+alpha-1-globin 5'UTR	G 蛋白核苷酸序列优化方案 3	gp130 和 DH143 3'UTR	100A	28.06

注：相对表达量含义是：以转染了SY-01、SY-02、SY-03 mRNA的COS7细胞为实验组，以未转染mRNA的细胞记为对照组，根据实施例3中的方法在体外对G蛋白的表达水平进行检测，分别记录实验组和对照组细胞的平均荧光密度(MFI)。并按照如下公式计算相对表达量：

$$\text{相对表达量} = \frac{\text{实验组 MFI}}{\text{对照组 MFI}}$$

根据上述实验结果，选择相对表达量最高的SY-01（SEQ ID NO.1）作为后续研究开发疫苗的优选mRNA序列和下述实施例采用的序列。

1.2 G 蛋白抗原的体外转录(IVT)

步骤如下：

- 1.按照 IVT 试剂盒（诺唯赞试剂盒 货号：DD4201-P-01）的配套说明，配置 IVT 反应体系，即分别混合 10×Transcription Buffer、ATP、GTP、CTP、PseudoUTP（1- 甲基假尿嘧啶，兆维科技， 货号为 R5-064）、5’帽子类似物（m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG，兆维科技， 货号为 ON-134)、注射用水、质粒模板（带有 T7 启动子的线性化质粒，其模板为 SEQ ID NO.1 对应的 DNA 序列，即为 SEQ ID NO:10）和 Enzyme Mix。
2. 混合的反应体系置于 37℃ 条件下反应 40 min。
3. 加入相应比例 DNase I 终止反应。
4. 加入等体积的一定浓度的（7.5 M）LiCl 溶液沉降 2 次，之后使用 75%的乙醇溶液洗涤两次，超净台中室温晾干，使用适量 RNase-free H₂O 溶解。
- 使用 Bioanalyzer 分析所得 mRNA 的纯度，实验结果表明（参见图 1）：G 蛋白的 mRNA 体外合成后，经过分离纯化，得到高纯度的 mRNA。

实施例 2：mRNA-LNP 制剂配方优选与制备方法

2.1 配方筛选实验

综合考虑以下四个方面进行对制剂配方进行优化：脂质配比、缓冲体系、N/P（氮磷比）以及是否冻干。具体配方选择如表 2.1、表 2.2 所示。

采用 5 μg mRNA（使用 1-9 不同配方的 LNP 包裹）单次免疫正常小鼠，之后分别于 7 天和 14 天检测小鼠血清中的中和抗体。根据中和抗体的滴度表现，最终确定配方 9 为优选配方（参见图 2）。

表 2.1 LNP 配方成分列表

序号	配比	缓冲体系	N/P	类别	给药前处理
配方1	C2	PBS	6	冻干后	加入400ul注射用水进行复溶，轻轻摇晃即可。 20℃取出放置室温，自然解冻后，轻轻摇晃即可。
配方2	C2	PBS	6	冻干前	
配方3	A2	PBS	6	冻干前	
配方4	C1	PBS	6.5	冻干前	
配方5	A2	TRIS	6.5	冻干前	
配方6	B4	TRIS	6.5	冻干前	
配方7	B4	TRIS	6	冻干前	
配方8	B6	TRIS	6.5	冻干前	
配方9	A3	TRIS	6	冻干前	

表 2.2 脂质配比列表

	配比	MC3	SM-102	Cholesterol	PEG-DMG2000	DSPC
摩尔比	C2	0.5	0	0.4	0.03	0.07
	A2	0	0.463	0.427	0.016	0.094
	B4	0	0.463	0.413	0.03	0.094
	B6	0	0.477	0.413	0.016	0.094
	A3	0	0.5	0.385	0.015	0.1

2.2 mRNA-LNP 制剂的制备方法

以上述配方 9 为例，G 蛋白抗原 mRNA-LNP 制剂的制备步骤如下：

- 1.分别精密称量一定量的摩尔质量比为 50%的 SM-102、10%的 DSPC、38.5%的胆固醇以及 1.5%的 DMG-PEG2000 脂质并加入适量无水乙醇溶解，配置成脂质工作液备用（脂质工作液终浓度 12 mg/mL）；
- 2.分别配置含 130 mM 氯化钠的柠檬酸缓冲溶液（10 mM，pH 4.0），Tris-NaOAc 缓冲溶液（20 mM，10.7 mM，pH 7.5），含 60%蔗糖的 Tris-NaOAc 缓冲溶液（20 mM，10.7 mM，pH 7.5）；
- 3.取适量 mRNA 原液（序列如 SEQ ID NO.1 所示）使用前述配置的氯化钠-柠檬酸缓冲溶液稀释，将 mRNA 工作液终浓度调整至 0.18 mg/mL；
- 4.使用微流控仪器及配套芯片按照 1:3 的体积比将脂质工作液与 mRNA 工作液混合制备得到载 mRNA 的 LNP 溶液；
- 5.依据制备的 LNP 溶液体积加入 9 倍体积量 Tris-NaOAc 缓冲溶液稀释，并用 TFF（切向流超滤）浓缩纯化，去除体系中乙醇溶液；
- 6.使用紫外分光法检测 LNP 溶液中 mRNA 含量并加入适量含 60%蔗糖的 Tris-NaOAc 缓冲溶液（20 mM，10.7 mM，pH 7.5），将成品 LNP 溶液中 mRNA 终浓度调整为 100 μg/mL 同时外水相体系中蔗糖含量为 8.7%即可。

实验结果表明（参见图 3）：G 蛋白 mRNA 和脂质工作液经微流控混合，形成 LNP 复合物，粒径大小均一，大都为 100 nm 左右，满足进行下一步实验的基本要求。

实施例 3: G 蛋白体外表达实验

3.1 免疫印迹实验:

将 G 蛋白 mRNA 转染 COS-7 细胞(注:非洲绿猴肾成纤维细胞,购自南京科佰生物科技有限公司),转染 24 h 后,收集细胞,进行免疫印迹检测。未转染 G 蛋白 mRNA 的细胞作为阴性对照(Blank)。实验结果表明(参见图 4):本申请获得的编码 G 蛋白的 mRNA 能够有效在 COS-7 细胞中稳定大量表达。

3.2 流式细胞仪检测:

将 G 蛋白 mRNA 转染 293T 细胞或 COS-7 细胞后,使用 FACS 流式细胞仪检测到目标抗原蛋白在细胞中的表达情况。未转染 G 蛋白 mRNA 的细胞作为阴性对照(Blank)。具体方法如下所述(以 COS-7 细胞为例):

1. 为检测狂犬病毒 G 蛋白 mRNA 在人类细胞中的表达,我们将培养 24 小时以上的 COS-7 细胞消化并传入 6 孔板中,将细胞密度控制在 250000 个每孔。

2. 将六孔板于 37 度孵育 24 小时后利用显微镜观察细胞状态。细胞汇合度达到 80%以上即可进行 mRNA 转染。

3. 利用 Lipofectamine 2000 试剂盒转染相应 mRNA 到 COS-7 细胞中(每孔转染 4 μ g 的 mRNA),具体操作参考试剂盒说明。并于 37 摄氏度继续培养 24 小时。

4. 待 mRNA 持续表达 24 小时后表达量接近峰值,此时将细胞上清液除去,利用 PBS 清洗一次,采用 0.05%胰酶消化 1 分钟后,用完全培养基中和,收集细胞。将收集的细胞 350g,离心 5min,弃上清。再使用 2ml PBS 重悬细胞后收集细胞,350g,离心 5min,弃上清,最后用 100 μ l PBS 重悬细胞,并控制细胞数量在 200000 到 1000000 之间。

5. 采用 150 μ l Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer 固定收集的细胞,冰上孵育 20 分钟。

6. 向固定后的细胞中加入提前配制好的 1 ml 1 $\times$ Cyto-Fast™ Perm Wash solution,350g,离心 5min。弃上清后用 1 ml 1 $\times$ Cyto-Fast™ Perm Wash solution 重悬,再漂洗一次,离心弃上清。

7. 利用 100 μ l 1 $\times$ Cyto-Fast™ Perm Wash solution 将一抗稀释至 1:100,将其加入到细胞中,震荡混匀,冰上孵育 30 分钟。

8. 向与一抗孵育后细胞中加入 1 ml 1× Cyto-Fast™ Perm Wash solution, 350g, 离心 5min, 弃上清后用 1 ml 1× Cyto-Fast™ Perm Wash solution 重悬, 再漂洗一次, 离心弃上清。

9. 利用 250μl 1× Cyto-Fast™ Perm Wash solution 将二抗稀释至 1:1000, 将其加入到细胞中, 震荡混匀, 冰上孵育 30 分钟。

10. 向与二抗孵育后细胞中加入 1 ml 的 1× Cyto-Fast™ Perm Wash solution, 350g, 离心 5min, 弃上清后用 1 ml 1× Cyto-Fast™ Perm Wash solution 重悬, 再漂洗一次, 离心弃上清。

11. 使用 PBS 将 4%多聚甲醛固定液稀释为 1%多聚甲醛固定液。最后用 200 ul 1%多聚甲醛固定液重悬细胞, 流式上机检测细胞中狂犬糖蛋白的表达。

12. 流式细胞检测: 将没有转染 mRNA 的细胞设为阴性对照组, 依次检测各样本, 利用直方图读取 FITC 荧光强度信号。记录细胞平均荧光强度 (MFI), 每个样本读取 10000 个信号。

实验结果表明 (参见图 5): 本发明获得的编码 G 蛋白的 mRNA 能够有效在 COS-7 细胞和 293T 细胞中稳定表达。

实施例 4: 小鼠中和抗体检测实验

挑选健康, 生长状态良好 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠 (购自上海南方模式生物科技有限公司), 体重测量后随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半。使用肌肉注射方式给药 (实施例 2.2 制备的通过 LNP 递送的 mRNA)。给药时间为第 0 天, 给药剂量分别为 2.5 μg、5 μg、10 μg。

使用不同剂量的 G 蛋白 mRNA (2.5 μg、5 μg、10 μg) 免疫小鼠, 14 天后检测小鼠血清中的中和抗体。实验结果表明 (参见图 6): 即使是低剂量组小鼠血清中也检测到了高浓度的中和抗体。且都远高于 WHO 指定的 0.5 IU/mL 的标准。

实施例 5: 不同免疫程序免疫后小鼠中和抗体检测实验

挑选健康, 生长良好 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠 (购自上海南方模式生物科技有限公司), 体重测量后随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半。使用肌肉注射方式给药 (实施例 2.2 制备的通过 LNP 递送的 mRNA)。给药时间为第 0 天、第 0 天和

第3天、第0天和第7天；给药剂量分别为0.125 µg、0.5 µg、1 µg、2 µg（第0天注射）、0.0625 µg、0.25 µg、1 µg（第0天和第3天注射）、1 µg（第0天和第7天注射）。分别以不同剂量（0.125 µg、0.5 µg、1 µg、2 µg以及0.0625 µg、0.25 µg、1 µg）和不同免疫方式（0D注射、0/3D注射、0/7D注射）免疫正常小鼠，再于5天和14天后检测小鼠血清中的中和抗体。

实验结果表明（参见图7）：在单次注射1 µg mRNA的条件下，5天后即可在小鼠体内检测到高于WHO标准（0.5 IU/mL）的中和抗体。在0/3天两次注射0.0625 µg mRNA的条件下，14天时也能在小鼠体内检测到高于WHO标准（0.5 IU/mL）的中和抗体。由此可见，在极低的注射剂量下（0.0625 µg），本申请的mRNA疫苗也可以产生高水平的中和抗体。

实施例6：NIH效价检测实验

按照WHO指定的标准NIH效价检测流程分别测定基于实施例2.2制备的mRNA疫苗成品制剂（待检疫苗）、阳参mRNA疫苗（参考专利CN110714015A实施例1-狂犬病毒核酸疫苗的制备方法制得）和参考疫苗标准品（中检院标准品疫苗，为灭活疫苗，标定效价为11.4 IU/ml）的NIH效价，具体操作过程如下：

1、取用一支冻干的参考疫苗，加入灭菌注射用水1.0 ml，待完全溶解混匀后使用；复溶后的标示效价为11.4 IU/ml；用PBS（pH7.4）将复溶的参考疫苗进行5倍系列稀释，取1:25、1:125、1:625和1:3125等4个稀释度的样品，冰浴保存备用；

2、取待检疫苗和阳参疫苗，将样品进行5倍系列稀释，取疫苗成品、1:5、1:25、1:125和1:625等5个稀释度的样品，冰浴保存备用；

3、首次免疫时，取稀释好的各稀释度参考疫苗和待检疫苗，分别从最高稀释度到最低稀释度进行接种，每个稀释度各腹腔注射3-4周龄、体重11-16g的雌性小鼠16只，0.5ml/只。首次免疫后间隔一周，取各稀释度参考疫苗和待检疫苗，按照前述方法和剂量对首次免疫后的小鼠进行第二次免疫。

4、首次免疫后14天，所有免疫小鼠经脑内接种50 LD₅₀/0.03ml狂犬病病毒CVS-24株病毒液，0.03ml/只。攻毒后所有小鼠连续观察14日，前4日内（含第4日）死亡的小鼠记为非特异性死亡，从第5日记录各组每日死于狂犬病的小鼠数量，第14日出现麻痹或痉挛等典型狂犬病症状的小鼠也按死亡计算。对5-14

日内死亡和存活的小鼠进行统计。

5、采用 Reed-Muench 法计算待检疫苗和参考疫苗的 ED50，并按下列公式计算待检疫苗的相对效价（RP，即为 NIH 效价）。

$$RP = \frac{\text{待检疫苗 ED50 的倒数}}{\text{参考疫苗 ED50 的倒数}} \times \text{参考疫苗效价 (IU/ml)}$$

具体结果如下：

表 3 NIH 效价检测结果

待检mRNA疫苗	1: 25	14/15	93.33%	6.67%	25.49 IU/mL
	1: 125	12/16	75%	25%	
	1: 625	10/16	62.5%	37.5%	
	1: 3125	3/16	18.75%	81.25%	
	1: 15625	0/16	0%	100%	
阳参mRNA疫苗	1: 25	15/16	93.75%	6.25%	9.71 IU/mL
	1: 125	10/16	62.5%	37.5%	
	1: 625	6/16	37.5%	62.5%	
	1: 3125	1/15	6.67%	93.33%	
	1: 15625	0/16	0%	100%	
参考疫苗 (标准品)	1: 25	15/16	93.75%	6.25%	11.4 IU/ml
	1: 125	10/16	62.5%	37.5%	
	1: 625	6/16	37.5%	62.5%	
	1: 3125	3/16	5%	95%	

上述结果表明：本申请获得的狂犬 mRNA 疫苗效价经测为 25.49 IU/mL，远高于阳参 mRNA 疫苗（9.71 IU/mL）和参考疫苗（11.4 IU/mL）。此外，同等剂量下，本申请的狂犬 mRNA 疫苗免疫小鼠死亡率远低于阳参疫苗。

实施例 7：LNP 制剂配方稳定性实验

在-20℃和 5℃条件下保存狂犬 mRNA 疫苗成品制剂(实施例 2.2 方法制备)，以不同理化指标考察疫苗稳定性。两种条件下保存六个月，mRNA 疫苗成品制

剂的理化性质未发生明显变化，RNA 浓度未发生明显改变，且包封率保持在 75% 以上，以上结果表明：疫苗制剂具有长期稳定性。具体参见表 4：

表 4 LNP 疫苗稳定性实验结果

稳定性考察类型	全检	长期实验 (-20℃)	加速实验 (5℃)	长期实验	加速实验	长期实验	加速实验
外观	乳白色澄清 液体	乳白色澄清 液体	乳白色澄清 液体	乳白色澄清 液体	乳白色澄清 液体	乳白色澄清 液体	乳白色澄清 液体
渗透压	365	345	343	345	351	349	350
PH	7.5	7.5	7.5	7.3	7.4	7.3	7.3
不溶性微粒	≥10um: 110 ≥25um: 4	≥10um: 133 ≥25um: 5	≥10um: 312 ≥25um: 3	≥10um: 239 ≥25um: 4	≥10um: 367 ≥25um: 13	≥10um: 394 ≥25um: 7	≥10um: 19 ≥25um: 407
mRNA浓度 (ug/ml)	69	68	67	68	66	71.9	72.8
包封率(%)	89	80	79	84	84	82	81
粒径(nm)	110.9	126.5	129.5	133	126	132	124
电位(mv)	-7.27	-2.87	-7.85	-3.8	0	-2.5	-2.4
纯度(%)	96	92	93	92	86	91	81.1

实施例 8：食蟹猴中和抗体实验

在正常食蟹猴中（每个剂量组 3 只猴子）分别使用 0/7 天两次免疫不同剂量（10 μg、30 μg）的 mRNA 疫苗的 LNP 制剂（实施例 2.2 方法制备），于 14 天检测食蟹猴血清中的中和抗体。使用结果表明（参见图 8）：与已上市的 Rabipur 相比，本发明狂犬 mRNA 疫苗使用更少的免疫次数产生了更高滴度的中和抗体。

实施例 9：暴露后免疫实验

在小鼠攻毒后的 0、3 天分别两次免疫 3 μg 的 mRNA 疫苗的 LNP 制剂（实施例 2.2 方法制备），分别考察每组小鼠的 7、14、21 天存活率。本申请 mRNA 疫苗的保护效力明显高于标准品阳参 mRNA 疫苗（参考专利 CN110714015A 实施例 1-狂犬病毒核酸疫苗的制备方法获得），具体结果参见表 5.1：

表 5.1 暴露后免疫实验结果

暴露后免疫策略	疫苗	剂量	存活数/总数	中和率	血清转阳率
攻毒后第0、7天接种2剂溶媒	溶媒组		10/10	1/10	0/10
攻毒后第0、3、7、14天接种4剂	Inactivated Vaccine 中检院狂犬标 准品	0.57 IU	10/10	4/10	4/10
攻毒后第0、3天接种2剂	待检mRNA疫苗	3 µg	10/10	7/10	7/10
攻毒后第0、3天接种2剂	阳参mRNA疫苗	3 µg	10/10	3/10	2/10

此外，本发明还针对本申请 mRNA 疫苗与灭活疫苗 Rabipur®进行了相关试验：选用雌性 BALB/c 小鼠，每组 10 只，暴露后免疫小鼠，攻毒后当天（D0）分别接种 mRNA 疫苗和 Rabipur®后，观察动物存活情况至 D28，具体结果参见表 5.2。

表 5.2 暴露后免疫生存率结果

疫苗	免疫剂量	免疫策略	生存率%
Rabipur®	1/10 剂	0、3、7、14	60
	1/30 剂		0
mRNA 疫苗	1/10 剂	0、7	100
	1/30 剂		80

注：1、人用 Rabipur 灭活疫苗规格为 300 ul，小鼠注射剂量为人用剂量的 1/10 和 1/30 剂量；

2、本申请的人用 mRNA 疫苗暂定规格为 30 ug，小鼠注射剂量为人用剂量的 1/10 与 1/30 剂量。

由此可见，注射本申请的 mRNA 疫苗的小鼠存活率显著高于 Rabipur 组，证明本申请疫苗的免疫效果显著优于 Rabipur。

实施例 10：狂犬 mRNA 疫苗肝脏毒性实验

分别以低剂量（30 µg）和高剂量（90µg）mRNA 疫苗的 LNP 制剂（实施例 2.2 方法制备）在食蟹猴中于 0、7、14 天共进行 3 次免疫。于 17 天时，考察各组食蟹猴的肝脏丙氨酸氨基转移酶活性和天门冬氨酸氨基转换酶活性。结果表明（参见图 9）：不论是低剂量组还是高剂量组，本发明制备的狂犬 mRNA 疫苗均未表现出明显的肝脏毒性，安全性非常好。

实施例 11：狂犬 mRNA 疫苗长效性实验

选择 6-8 周龄 Balb/C 雌雄小鼠各 5 只，10 只/组，肌肉注射给药。0 天和 21 天分别注射 10 μg 。之后分别于 0、14、28、35、90、180、270、360 天取小鼠血清，检测小鼠血清中的中和抗体浓度。结果表明（参见图 10，横坐标为天）：0、21 天注射 10 μg 的 mRNA 疫苗 LNP 制剂（实施例 2.2 方法制备）后，在小鼠体内可以长期（至少一年）产生高浓度的中和抗体，且都远高于 WHO 指定的 0.5 IU/mL 的标准，起到对狂犬病毒的长效保护效应。

实施例 12：狂犬 mRNA 疫苗针对中国主流毒株的中和活性实验

mRNA 疫苗 LNP 制剂肌肉注射给予食蟹猴，动物首次免疫记为 D0，间隔 7 天免疫 2 次（D0、D7），收集 2 针免疫后 14 天（D21）猴血清，检测血清对 SC16，GD1，NM3，QH2，LY，YN3，XZ17 等 7 个 China 种群代表毒株的体外中和活性（图 11）。分子流行病学研究结果表明，中国流行的狂犬病病毒可分为上述七个种群（SC16、GD1、NM3、QH2、LY、YN3、XZ17）。实验结果显示：所有动物各毒株中和抗体阳转率（GMT>0.5 IU/mL）均为 100%，提示本申请 mRNA 疫苗对狂犬病毒具有广谱中和活性。

综合上述实验结果表明：本发明获得的 mRNA 疫苗能够产生高水平的中和抗体，并有效诱导 B 细胞免疫和 T 细胞免疫，其综合免疫效果远优于阳参对照品，并且疫苗储存条件适中，可以在 -20°C 条件下长期稳定储存，运输相对便捷对设备要求不高，更适合经济不发达或欠发达等最急需疫苗接种的地区。此外，本发明获得的狂犬 mRNA 疫苗对中国流行的狂犬病病毒七个种群的代表毒株具有广谱的中和活性，并在暴露前和暴露后免疫实验中为攻毒小鼠提供较好的保护作用。

权 利 要 求 书

1.一种 mRNA，其编码的狂犬病毒抗原包含与 SEQ ID NO.4 的氨基酸序列具有至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，至少 98%或 100%同一性的氨基酸。

2.权利要求 1 任一项所述的 mRNA，其中所述 mRNA 包含 5' UTR、3' UTR 以及 3'-聚腺苷酸。

3.权利要求 2 所述的 mRNA，所述 3'-聚腺苷酸包括 SEQ ID NO.7 的核苷酸序列。

4.如权利要求 2-3 任一项所述的 mRNA，所述 5'UTR 包括 SEQ ID NO. 6 的核苷酸序列和/或所述 3'UTR 包括 SEQ ID NO.8 和/或 SEQ ID NO.9 的核苷酸序列。

5.如权利要求 2-4 任一项所述的 mRNA，其包含与 SEQ ID NO.1-3 任一项的核苷酸序列具有至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，至少 98%或 100%同一性的核苷酸序列。

6.如权利要求 1-5 任一项所述的 mRNA，所述 mRNA 进一步包含 5'鸟苷帽子，其选自：m7Gppp(2'OMeA)pG、m7GpppApA、m7GpppApC、m7GpppApG、m7GpppApU、m7GpppCpA、m7GpppCpC、m7GpppCpG、m7GpppCpU、m7GpppGpA、m7GpppGpC、m7GpppGpG、m7GpppGpU、m7GpppUpA、m7GpppUpC、m7GpppUpG、m7GpppUpU、m7Gpppm6ApG、m7G3'OmepppApA、m7G3'OmepppApC、m7G3'OmepppApU、m7G3'OmepppApG、m7G3'OmepppCpA、m7G3'OmepppCpC、m7G3'OmepppCpG、m7G3'OmepppCpU、m7G3'OmepppUpA、m7G3'OmepppUpC、m7G3'OmepppUpG、m7G3'OmepppUpU、m7G3'OmePppA2'OmeG、m7G3'OmepppA2'OmeC、m7G3'OmepppA2'OmeU、m7G3'OmepppA2'OmeA、m7G3'OmepppC2'OmeA、m7G3'OmepppC2'OmeU、m7G3'OmepppC2'OmeG、m7G3'OmepppC2'OmeC、m7G3'OmepppG2'OmeA、m7G3'OmepppG2'OmeU、m7G3'OmepppG2'OmeG、m7G3'OmepppG2'OmeC、m7G3'OmepppU2'OmeA、m7G3'OmepppU2'OmeU、m7G3'OmepppU2'OmeG、m7G3'OmepppU2'OmeC。

7.如权利要求 1-6 任一项所述的 mRNA，其编码的狂犬病毒抗原为：G 蛋白。

8.一种包含脂质纳米颗粒和 mRNA 的组合物，所述 mRNA 为权利要求 1-7

任一项权利要求所述的 mRNA。

9.权利要求 8 任一项所述的组合物，包括可电离阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂。

10.如权利要求 8-9 任一项所述的组合物，按摩尔百分比计 (mol%)，所述脂质纳米颗粒包含 20-60mol% 可电离阳离子脂质、25-55mol% 结构脂质、5-25mol% 辅助脂质和 0.5-15mol% 表面活性剂。

11.权利要求 8-10 任一项所述的组合物，所述结构脂质选自胆固醇，及胆固醇衍生物，优选胆固醇。

12.如权利要求 8-11 任一项所述的组合物，所述阳离子脂质选自：SM-102、ALC-0315、ALC-0519、Dlin-MC3-DMA、DODMA、DLin-KC2-DMA、DlinDMA，优选 SM-102。

13.如权利要求 8-12 任一项所述的组合物，所述辅助脂质选自 DSPC、DOPE，DOPC、DOPG 或 DOPS，优选为 DSPC。

14.如权利要求 8-13 任一项所述的组合物，所述表面活性剂选自 PEG2000-DMG、PEG-DSPE、DTDA-PEG2000、TPGS，优选为 PEG2000-DMG。

15.如权利要求 8-14 任一项所述的组合物，按摩尔百分比计 (mol%)，所述脂质纳米颗粒包含 50mol% SM-102、10mol% DSPC、38.5mol% 胆固醇和 1.5mol% PEG2000-DMG。

16.权利要求 1-7 所述的 mRNA 或权利要求 8-15 所述的组合物，其中所述 mRNA 包含化学修饰的碱基或类似物，所述化学修饰的碱基或类似物选自 5-甲氧基甲基尿苷 (5-methoxymethyl uridine)、5-甲硫基尿苷 (5-methylthio uridine)、1-甲氧基甲基伪尿苷 (1-methoxymethyl pseudouridine)、5-甲基胞苷 (5-methyl cytidine)、5-甲氧基胞苷 (5-methoxy cytidine)、1-甲基假尿苷 (N1-Methyl-Pseudo-UTP)、假尿苷；优选 1-甲基假尿苷。

17.权利要求 1-7 任一项所述的 mRNA 或权利要求 8-16 任一项所述的组合物在制备狂犬病毒核酸疫苗中的用途。

18.权利要求 17 所述的用途，所述疫苗包括多联疫苗和多价疫苗。

19.权利要求 17-18 任一项所述的用途，所述疫苗为抗狂犬病毒 mRNA 疫苗。

20 一种暴露前或暴露后免疫的方法，包括给予受试者权利要求 7-16 所述组

合物，可有效诱导受试者体内针对狂犬病毒抗原的免疫应答。

21. 一种药物组合物，包括序列如 SEQ ID NO.1 所示的 mRNA、脂质纳米颗粒组合物、20 mmol/L 氨丁三醇，10.7 mmol/L 醋酸钠，8.7%蔗糖，pH 7.0~8.0，所述脂质纳米颗粒包含 50 mol% SM-102，10mol% DSPC，38.5mol% 胆固醇和 1.5mol% PEG2000-DMG，N:P=6。

22. 一种核酸疫苗的制备方法，其步骤包括：

(1) 按一定比例将可质子化阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂溶于有机溶液，得到有机相；

(2) 将序列如 SEQ ID NO.1 所示的 mRNA 溶于柠檬酸盐缓冲液或醋酸钠溶液中，得到水相；

(3) 将步骤 (1) 的有机相和步骤 (2) 的水相混匀，生成混合液，得到狂犬病毒疫苗。

23. 权利要求 22 所述的制备方法，所述有机溶液包括无水乙醇。

24. 权利要求 22-23 任一项所述的制备方法，所述有机相中可质子化阳离子脂质、结构脂质、辅助脂质和表面活性剂的总浓度为 10-15 mg/ml。

25. 权利要求 22-24 任一项所述的制备方法，所述 mRNA 的浓度为 0.01-1mg/ml, 优选 0.1-0.2 mg/ml。

26. 权利要求 22-25 任一项所述的制备方法，所述有机相和水相的体积比为 1: 2-4。

27. 权利要求 22-26 任一项所述的制备方法，所述混匀采用微流控设备，流速控制为 $\geq 12\text{ml/min}$ 。

28. 如 SEQ ID NO.10 所示的核酸分子。

29. 表达权利要求 28 所述核酸分子的生物材料；优选地，所述生物材料包括：含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组质粒或转基因细胞系；所述重组载体优选：pVAX.1 载体、pcDNA3.1 载体。

30. 如权利要求 1-7 任一项所述的 mRNA，如权利要求 8-16 任一项所述组合物，如权利要求 17-19 所述用途，如权利要求 20 所述方法，其中所述狂犬病毒的毒株包括但不限于：巴斯德毒株 (PAS)、Flury 株、SAD 株、aG 株、CTN 株、SC16(CSC1016D)、GD1(GDZAQ45)、NM3(CNM1103C)、QH2(CQH1202D)、

LY(CNX8601)、YN3(CYN1009D)、XZ17(CXZ1704H)及它们的衍生株；优选 CTN 株，最优选 CTN-1 毒株。