

一种抵抗带状疱疹的 mRNA 疫苗及其制备方法

相关申请的交叉引用

本发明要求 2023 年 11 月 13 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 202311503470.5，发明名称为“一种抵抗带状疱疹的 mRNA 疫苗及其制备方法”的在先申请的优先权。该在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本申请属于生物医药技术领域，具体的，涉及一种抵抗带状疱疹的 mRNA 疫苗及其制备方法。

背景技术

带状疱疹（Herpes zoster，HZ），是由潜伏在体内的水痘-带状疱疹病毒（Varicella zoster virus，VZV）再激活而引起的一种急性感染性皮肤病。儿童时期初次感染 VZV 引起水痘，感染后病毒进入皮肤的感觉神经末梢，沿着脊髓后根或三叉神经节神经纤维向中心移动，以一种持久潜伏的形式长期存在与脊神经或颅神经感觉神经节中。当人体免疫力低下或受到非特异性刺激后，病毒再次活动，生长繁殖，导致受侵犯的神经节发炎或坏死，产生神经痛，同时再活动的病毒从一个或数个相邻的神经节沿着相应的感觉神经纤维传播到皮肤，造成单侧分布的红斑基础上的簇集性水泡。带状疱疹亚太地区带状疱疹发病率约为 1%，发病率随着年龄增长而升高，40-50 岁之后带状疱疹发病率达 5% 以上。在带状疱疹患者中约 9%~34% 的带状疱疹患者会发生带状疱疹后神经痛，疼痛评级可达 7 级以上，属于重度疼痛，严重影响患者生活质量。带状疱疹和带状疱疹后神经痛尚无特效药，因此接种带状疱疹疫苗是预防带状疱疹的有效手段。

全球已上市的带状疱疹疫苗产品有 Zostavax（默沙东）、Shingrix（GSK）、SkyZoster（SK）、感维（百克生物）。Zostavax 与 SkyZoster 是减毒活疫苗，通过处理实现结构改变、毒性减弱但保留免疫原性，从而建立免疫反应；Shingrix 为重组亚单位疫苗，通过水痘-带状疱疹糖蛋白 E 抗原和 AS01B 佐剂在体内产生和增强免疫反应。临床数据表明，Shingrix 在 50 至 69 岁有效率为 97%，70 岁以上有效率仍然高达 91%；Zostavax 在 50 至 69 岁有效率为 70%，整体有效率为 51%，Shingrix 的有效性要优于 Zostavax。更加安全有效的 VZV 疫苗依然是市场亟需的。

发明内容

为了满足市场关于多技术路线水痘-带状疱疹病毒的疫苗的多样化需求,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水痘-带状疱疹病毒的有效中和抗体应答及细胞免疫的高免疫原性抗原的RNA。本发明基于水痘-带状疱疹病毒(VZV)病毒表面gE糖蛋白制备了VZV mRNA疫苗:利用可编码带状疱疹病毒VZV的抗原性多肽或免疫原性片段或其变体的mRNA,并选择脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)技术包裹mRNA并将其递送至体内免疫细胞。LNP在细胞内释放出mRNA并翻译成水痘-带状疱疹病毒(VZV)的免疫原性片段或其变体,在本申请中称为“VZV抗原肽”或“抗原肽”。免疫细胞表达的VZV抗原肽进一步刺激机体体液免疫,产生针对VZV病毒的中和抗体从而达到保护效果。mRNA疫苗能在刺激体液免疫的同时刺激针对病毒的细胞免疫,被激活的T细胞可以杀伤被病毒感染的细胞,并产生记忆细胞持续保有保护效力。

具体地,本申请提供了以下可选的实施方案:

在第一方面,本申请提供一种核酸分子,其编码水痘-带状疱疹病毒(VZV)糖蛋白或其变体,所述VZV糖蛋白选自:VZV gE、gI、gB、gH、gK、gL、gC、gN以及gM。

在一些实施方案中,所述核酸分子包含具有编码VZV gE蛋白或其变体(属于VZV抗原肽)的开放阅读框的VZV RNA多核苷酸。

在一些实施方案中,所述VZV gE蛋白变体的氨基酸序列相对于SEQ ID NO.8包括选自以下的一种或多种突变,或相对于SEQ ID NO.8的突变为选自以下的一种或多种突变:S593L、S595L、T596L、H362E、T598L、S593I、S595I、T596I、T598I、Del 560-623,其中所述氨基酸的位置以SEQ ID NO.8的氨基酸序列为参比序列进行编号,例如S593L表示相对于参比序列SEQ ID NO: 8的第593位由S突变为L。

在一些实施方案中,所述VZV gE蛋白变体的氨基酸序列相对于SEQ ID NO.8包含或为以下突变中的任一种:

- 1) S593L、S595L、T596L和T598L;
- 2) H362E、S593L、S595L、T596L和T598L;
- 3) H362E、S593I、S595I、T596I和T598I;
- 4) S593I、S595I、T596I和T598I; 以及
- 5) Del 560-623;

并且,其中氨基酸的位置以SEQ ID NO.8的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中,所述VZV gE蛋白变体不包含VZV gE蛋白的信号肽,且其除信号肽以外部分的氨基酸序列相对于SEQ ID NO.8包含或为以下突变中的任一种:

- 1) S593L、S595L、T596L和T598L;

2) H362E、S593L、S595L、T596L 和 T598L;

3) H362E、S593I、S595I、T596I 和 T598I;

4) S593I、S595I、T596I 和 T598I; 以及

5) Del 560-623;

并且, 其中氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中, 所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的信号肽, 且其除信号肽以外部分的氨基酸序列相对于 SEQ ID NO.8 包含或为以下突变中的任一种:

1) S593L、S595L、T596L 和 T598L;

2) H362E、S593L、S595L、T596L 和 T598L;

3) H362E、S593I、S595I、T596I 和 T598I;

4) S593I、S595I、T596I 和 T598I; 以及

5) Del 560-623;

并且, 其中所述氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中, 所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV 糖蛋白 E(可简称为 gE 蛋白或 gE) 的胞外区和跨膜区或由 VZV 糖蛋白 E 的胞外区和跨膜区组成, 不编码所述 gE 蛋白的胞内区。

在一些实施方案中, 所述胞外区包含水痘-带状疱疹病毒 gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸, 所述跨膜区包含水痘-带状疱疹病毒 gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸, 所述氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中, 所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区和跨膜区, 不包含胞内区, 其中所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸, 所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸, 所述 gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。

在一些具体实施方案中, 所述抗原肽进一步包含信号肽序列, 所述信号肽序列位于所述胞外区氨基酸序列的 N 端。

在一些实施方案中, 所述信号肽为 VZV gE 蛋白的信号肽。

在一些实施方案中所述信号肽包含 SEQ ID NO.8 的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸。

在一些实施方案中, 所述信号肽不为 VZV gE 蛋白的天然信号肽。

在一些实施方案中, 所述信号肽为其他可感染哺乳动物细胞的病毒来源的信号肽或其他哺乳动物蛋白来源的信号肽。

在一些实施方案中, 所述信号肽为其他囊膜病毒的囊膜蛋白来源的信号肽。

在一些实施方案中, 所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区和跨膜区, 不包含胞内区, 其中所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸, 所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸, 所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位, 所述 gE 蛋白的

氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示，并且所述 VZV gE 蛋白变体进一步包含信号肽，所述信号肽不是 VZV gE 蛋白的天然信号肽。

在一些实施方案中，所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区和跨膜区，不包含胞内区，其中所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸，所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸，所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位，所述 gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示，并且所述 VZV gE 蛋白变体进一步包含信号肽，所述信号肽不是 VZV gE 蛋白的天然信号肽，而是其他可感染哺乳动物细胞的病毒来源的信号肽或其他哺乳动物蛋白来源的信号肽。

在一些实施方案中，所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区和 VZV gE 蛋白的信号肽，不包含 VZV gE 蛋白的胞内区，所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸，所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸，所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸，所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位，所述胞外区、跨膜区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连，所述氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中，所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区和 VZV gE 蛋白的信号肽，不包含 VZV gE 蛋白的胞内区，所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸，所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸，所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸，所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位，从 N 端至 C 端，所述胞外区、跨膜区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连，所述氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中，所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区和 VZV gE 蛋白的信号肽，不包含 VZV gE 蛋白的胞内区，所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸，所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸，所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸，所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位，所述胞外区、跨膜区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连，所述 VZV gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。

在一些实施方案中，所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区和 VZV gE 蛋白的信号肽，不包含 VZV gE 蛋白的胞内区，所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸，所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸，所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸，所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位，从 N 端至 C 端，所述胞外区、跨膜区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连，所述 VZV gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。

在一些实施方案中，所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、跨膜区、以及胞内区，其中所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸，所述跨膜区包含 VZV gE

蛋白的第 539-559 位氨基酸,所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位,所述 gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示,并且所述 VZV gE 蛋白变体进一步包含信号肽,所述信号肽不是 VZV gE 蛋白的天然信号肽。

在一些实施方案中,所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、跨膜区、以及胞内区,其中所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸,所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸,所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位,所述 gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.14-17 中任一项所示,并且所述 VZV gE 蛋白变体进一步包含信号肽,所述信号肽不是 VZV gE 蛋白的天然信号肽,而是其他可感染哺乳动物细胞的病毒来源的信号肽或其他哺乳动物蛋白来源的信号肽。

在一些实施方案中,所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区、VZV gE 蛋白的胞内区、以及 VZV gE 蛋白的信号肽,所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸,所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸,所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸,所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位,所述胞外区、跨膜区、胞内区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连,所述氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中,所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区、VZV gE 蛋白的胞内区、以及 VZV gE 蛋白的信号肽,所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸,所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸,所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸,所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位,从 N 端至 C 端,所述胞外区、跨膜区、胞内区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连,所述氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

在一些实施方案中,所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区、VZV gE 蛋白的胞内区、以及 VZV gE 蛋白的信号肽,所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸,所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸,所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸,所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位,所述胞外区、跨膜区、胞内区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连,所述 VZV gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.14-17 中任一项所示。

在一些实施方案中,所述 VZV gE 蛋白变体包含 VZV gE 蛋白的胞外区、VZV gE 蛋白的跨膜区、VZV gE 蛋白的胞内区、以及 VZV gE 蛋白的信号肽,所述胞外区包含 VZV gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸,所述跨膜区包含 VZV gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸,所述信号肽包含 VZV gE 蛋白的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸,所述胞内区包含 VZV gE 蛋白第 560-623 位,从 N 端至 C 端,所述胞外区、跨膜区、胞内区以及信号肽各自独立地通过 0 个、1 个或多个氨基酸残基相连,所述 VZV gE 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.14-17 中任一项所示。

在一些实施方案中, 所述 gE 蛋白或其变体包含与 SEQ ID NO.13-17 任一项所示的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的氨基酸, 或所述抗原的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 13-17 任一项所示的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性。

在一些实施方案中, 所述 gE 蛋白或其变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13-17 中任一项所示。

在一些实施方案中, 所述 gE 蛋白或其变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示。

在一些实施方案中, 所述核酸分子中编码前述抗原肽的序列(编码序列)经过密码子优化以提高 GC 含量。

在一些实施方案中, 所述核酸分子中编码前述抗原肽的序列(编码序列)经过密码子优化, 以使其中的密码子为哺乳动物细胞中的高频密码子。

在一些实施方案中, 所述核酸分子中编码前述抗原肽的序列(编码序列)经过密码子优化, 以使其中的密码子为人类细胞中的高频密码子。

在一些实施方案中, 所述核酸分子中编码前述抗原肽的序列(编码序列)经过密码子优化, 以使其中的密码子为人类神经细胞中的高频密码子。

在一些实施方案中, 所述核酸分子中编码前述抗原肽的序列(编码序列)经过密码子优化, 以使其中的密码子为人类免疫细胞中的高频密码子。

在一些实施方案中, 前述的核酸分子是 DNA。

在一些实施方案中, 前述的核酸分子是 RNA。

在一些实施方案中, 所述核酸分子为 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 分子至少包括以下结构:

- (a) 5'-帽结构;
- (b) 5'UTR, 长度为 10-200 个核苷酸, 优选为 15-150 个核苷酸;
- (c) 3'聚腺苷酸序列;
- (d) 3'UTR。

在一些实施方案中, 前述 mRNA 分子包含 5'-帽结构, 所述 5'-帽结构为 m7G、cap0、cap1、cap2、修饰的 cap0 或修饰的 cap1 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, 其选自以下的任一项: m7Gppp(2'OMeA)pG、m7GpppApA、m7GpppApC、m7GpppApG、m7GpppApU、m7GpppCpA、m7GpppCpC、m7GpppCpG、m7GpppCpU、m7GpppGpA、m7GpppGpC、m7GpppGpG、m7GpppGpU、m7GpppUpA、m7GpppUpC、m7GpppUpG、m7GpppUpU、m7Gpppm6ApG、m7G_{3'}OMepppApA、m7G_{3'}OMepppApC、m7G_{3'}OMepppApU、m7G_{3'}OMepppApG、m7G_{3'}OMepppCpA、m7G_{3'}OMepppCpC、m7G_{3'}OMepppCpG、m7G_{3'}OMepppCpU、m7G_{3'}OMepppUpA、m7G_{3'}OMepppUpC、m7G_{3'}OMepppUpG、m7G_{3'}OMepppUpU、

m7G_{3'}OmePppA_{2'}OmepG、m7G_{3'}OmepppA_{2'}OmepC、m7G_{3'}OmepppA_{2'}OmepU、m7G_{3'}OmepppA_{2'}OmepA、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmepA、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmepU、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmepG、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmepC、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmepA、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmepU、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmepG、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmepC、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmepA、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmepU、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmepG、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmepC；最优选为 m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。

在一些实施方案中，所述 mRNA 分子包含 5' UTR 或 5' UTR 的编码序列，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（alpha-1-globin）、Kozak 序列、HSD17B4、RPL32、ASAHI、ATP5A1、MP68、NDUFA4、NOSIP、RPL31、SLC7A3、TUBB4B 和 UBQLN2 或来自这些基因中任一个的同源物、片段或变体；

优选地，所述 5'UTR 包含或为烟草蚀纹病毒（TEV）5' UTR；进一步优选地，所述 TEV 5'UTR 的核苷酸序列包含如 SEQ ID NO.18 所示或与如 SEQ ID NO:18 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%序列同一性；

或者，

其中所述 5'UTR 的核苷酸序列包含核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示的 Kozak 序列或与如 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%序列同一性；

或者，

其中所述 5'UTR 的核苷酸序列包含的核苷酸序列为如 SEQ ID NO.10 所示的 pVAX.1+TEV 或与如 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%序列同一性。

在一些实施方案中，所述 mRNA 分子包含 3'UTR 或 3'UTR 的编码序列，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；

优选地，所述 3'UTR 包含或为血红蛋白-1 (hHBA1)3'UTR；进一步优选地，其中所述 hHBA1 3'UTR 的核苷酸序列包含如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%序列同一性。

在一些实施方案中，所述 mRNA 分子包含 3'-聚腺苷酸或 3'-聚腺苷酸的编码序列，所述

3'-聚腺苷酸长度为 90-120nt, 且包含非 A 碱基; 优选地, 所述 3'-聚腺苷酸的核苷酸序列包括如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列或与如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%序列同一性。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 分子中的尿苷 (U) 中的部分或全部为碱基经修饰的尿苷或尿苷类似物; 优选地, 该化学修饰的尿苷选自 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) 及假尿苷中的任一种或多种; 更优选地, 所述序列中的每个 U 均为 1-甲基假尿苷。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 分子包含或由与 SEQ ID NO.1-7 中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%、至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列组成。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 分子包含或由与 SEQ ID NO.2-7 中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%、至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列组成。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 分子包含或由与 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、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, 所述 mRNA 分子由与 SEQ ID NO.1-7 中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%、至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列经加帽后形成。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 分子由与 SEQ ID NO.2-7 中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%、至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列经加帽后形成。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 分子由与 SEQ ID NO.3 的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%同一性的核苷酸序列经加帽后形成。

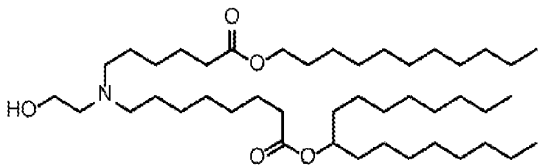
在第二方面, 本申请提供了一种组合物, 优选包含至少一种第一方面的核酸分子的免疫原性组合物。适当地, 所述组合物可包含至少一种核酸分子, 例如至少一种编码 RNA, 所述核酸与一种或多种脂质复合, 包封在一种或多种脂质中或与一种或多种脂质缔合, 从而形成脂质纳米颗粒。

在一些实施方案中, 所述的组合物涉及一种针对水痘-带状疱疹病毒 VZV 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、DODMA、C12-200、DlinDMA,优选SM-102;SM-102结构如下:



在一些实施方案中,所述结构脂质选自胆固醇,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、50mol%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、60mol%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,优选2-15mol%DSPC;例如,脂质纳米颗粒可包含3、4、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,优选30-40mol%胆固醇。例如,脂质纳米颗粒可包含30、31、32、33、34、35、36、37、38、39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,优选1-2mol%DMG-PEG。例如,脂质纳米颗粒可包含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50mol%SM-102,10mol%DSPC,38.5mol%胆固醇和1.5mol%DMG-PEG。

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组合物具有从约 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,所述 mRNA 溶液稀释于注射用水。

在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒与 mRNA 的质量比在 1:1 到 30:1 之间。所述脂质载体优选 LNP 组合物,质量比优选 20:1。

在一些实施方案中,本申请的水痘-带状疱疹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、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、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.1-7 所示的 mRNA、脂质纳米颗粒、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。

在第三方面，本申请提供水痘-带状疱疹病毒抗原肽。

在一些实施方案中，所述抗原肽由所述第一方面的核酸分子编码。

在一些实施方案中，所述抗原肽的氨基酸序列与所述第一方面的核酸分子编码的氨基酸序列相同。

在一些实施方案中，所述抗原肽包含或由与 SEQ ID NO. 13-17 任一项具有至少 75%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99% 或 100% 同一性的氨基酸序列组成。

在第四方面，本申请提供水痘-带状疱疹病毒疫苗，其中所述疫苗包含至少一种第一方面的核酸分子，或至少一种第二方面所述的组合物，或至少一种第三方面所述的抗原性肽。

在一些实施方案中，所述疫苗为水痘带状疱疹病毒 VZV RNA(例如，mRNA)疫苗，所述疫苗含有 VZV gE 抗原肽编码序列，所述抗原肽从 N 至 C 端依次包含 VZV gE 蛋白信号肽序列、VZV gE 蛋白胞外区序列和 VZV gE 蛋白跨膜区序列。

在一些实施方案中，所述 VZV RNA(例如，mRNA)疫苗含有至少一种具有编码 VZV gE 抗原肽的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。

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，本申请提供了一种试剂盒或部件试剂盒，其包含至少一种第一方面所述的核酸分子，和/或至少一种第二方面所述的组合物，和/或至少一种第三方面所述的抗原肽，和/或至少一种第四方面所述的疫苗。

在第六方面，本申请提供了一种组合物，该组合物包含至少两种分离的组分，其中所述至少两种分离的组分选自第一方面所述的两种核酸分子，和/或第二方面所述的两种组合物，和/或第三方面所述的两种抗原肽，和/或第四方面所述的至少两种疫苗。

在第七方面，本申请提供治疗或预防受试者中水痘-带状疱疹病毒感染的方法，包括给予受试者至少一种第一方面所述的核酸分子，和/或至少一种第二方面所述的组合物，和/或至少一种第三方面所述的抗原肽，和/或至少一种第四方面所述的疫苗，可有效诱导受试者体内针对水痘-带状疱疹病毒(VZV)的中和抗体应答。

在第八方面，本申请提供第一方面的核酸分子，或第二方面所述的组合物，或第三方面所述的抗原肽或蛋白，或第四方面所述的疫苗在制备治疗或预防水痘-带状疱疹病毒感染的药物中的应用。

在第九方面，本申请涉及一种水痘-带状疱疹病毒疫苗的制备方法，其特征在于，将疫苗载体和第一方面所述的 mRNA 混合，得到水痘-带状疱疹病毒疫苗。

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) 按配方比例将可电离阳离子脂质、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) 将上述 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，得到水痘-带状疱疹病毒疫苗。

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，所述有机相中可电离阳离子脂质、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 ≥ 12 ml/min。

在第十方面，本申请还涉及第一方面所述的核酸分子或第二方面所述的组合物，或第三方面所述的抗原肽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。

在第十一方面，本申请还设计一种联合用疫苗，包括序贯使用的第一疫苗和第二疫苗，所述第一疫苗选自第一方面所述的核酸分子或第二方面所述的组合物，或第三方面所述的抗原肽，或第四方面所述的疫苗。

在一些实施方案中，所述的联合用疫苗中，所述第二疫苗选自：减毒或灭活疫苗、腺病

毒疫苗、mRNA 疫苗、DNA 疫苗、重组蛋白疫苗。

在一些实施方案中，所述第二疫苗选自：Zostavax、Shingrix 以及 NBP608。

在一些实施方案中，所述第一疫苗和第二疫苗的 mRNA 选自 SEQ ID NO :1-7 中任意两项所示的核苷酸序列组成的组。

在一些实施方案中，本申请所述的疫苗适于选自以下组的一种或多种疫苗进行前后序贯接种，所述疫苗可以基于任何技术路线的疫苗，包括但不限于减毒或灭活疫苗、腺病毒疫苗、mRNA 疫苗、DNA 疫苗、重组蛋白疫苗等。

在一些实施方案中，一次相对完整的接种，完成免疫所需所述一种或多种疫苗的接种次数可以是 1 次、2 次、3 次或 4 次，每次接种可以选择间隔 0 天、7 天、21 天、28 天、35 天、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月。

第十二方面，本申请还涉及一种在受试者中诱发抗原特异性免疫反应的方法，其包括向所述受试者施用有效产生抗原特异性免疫反应的量的第四方面所述的 VZV 疫苗。

在一些实施方案中，其中所述抗原特异性免疫反应包括 T 细胞反应。

在一些实施方案中，其中所述抗原特异性免疫反应包括 B 细胞反应。

在一些实施方案中，其中所述受试者为约 5 岁或 5 岁以下，其中受试者介于约 1 岁与约 5 岁之间，其中受试者介于约 6 个月与约 1 岁之间，其中所述受试者为约 6 个月或 6 个月以下，或其中所述受试者为约 12 个月或 12 个月以下。

在一些实施方案中，其中所述受试者是约 60 岁、约 70 岁或更老(例如，约 60、65、70、75、80、85 或 90 岁)的老年受试者。

在一些实施方案中，其中所述受试者是年龄在约 20 岁与约 50 岁(例如，约 20、25、30、35、40、45 或 50 岁)之间的年轻人。

在一些实施方案中，其中所述受试者为足月出生或早产儿。

在一些实施方案中，其中所述受试者为孕妇。

在一些实施方案中，受试者暴露于 VZV、受 VZV 感染或存在受 VZV 感染的风险。

在一些实施方案中，受试者免疫功能不足(具有受损的免疫系统，例如患有免疫病症或自体免疫病症)。

本发明的有益效果：

本发明基于 VZV 糖蛋白 E 来源的抗原肽，设计了 mRNA 序列，并进行了优化，相比 VZV gE 蛋白原始编码序列，优化后序列的 GC 含量均有提高，克隆到载体 pVAX.1 上，体外合成 mRNA，并且转染 COS7 细胞，所述抗原肽的相对表达量相对于 VZV-WT 显著提高，例如编码 VZV-trunc 的 mRNA (SEQ ID NO.3) 的蛋白表达量是 VZV-WT mRNA (即 VZV gE 蛋白

原始 mRNA) 的蛋白表达量的 6.5 倍。本申请 VZV mRNA 疫苗免疫后的小鼠能够产生高滴度的结合抗体, 其结果高于 GSK 的 Shingrix。本申请 VZV mRNA 疫苗免疫后的小鼠能够产生高滴度的特异性保护抗体, 其结果高于 Shingrix。本申请 VZV mRNA 疫苗免疫后的小鼠能够产生高滴度的中和抗体, 其结果高于 Shingrix。本申请 VZV mRNA 疫苗免疫后的小鼠体内产生很强的特异性 T 细胞免疫。

附图说明

图 1: Bioanalyzer 分析 VZV gE 蛋白 mRNA 的纯度和大小结果。

图 2: LNP 配方优选实验结果图。

图 3: 透射电镜显示 VZV gE 蛋白 mRNA 和脂质纳米颗粒(LNP)复合物形态图。

图 4: VZV gE 蛋白在宿主细胞内的表达情况免疫印迹实验结果图。

图 5: FACS 流式细胞仪检测到目标抗原蛋白在细胞中的表达实验结果图。

图 6: 不同 VZV mRNA 疫苗 (3 μ g) 和不同剂量阳参疫苗 Shingrix 二次免疫后小鼠血清结合抗体检测实验结果图。

图 7: 不同 VZV mRNA 疫苗 (3 μ g) 和不同剂量阳参疫苗 Shingrix 二次免疫后小鼠血清特异性保护抗体检测实验结果 (FAMA 法) 图。

图 8: 不同 VZV mRNA 疫苗 (3 μ g) 和阳参疫苗 Shingrix 二次免疫后小鼠血清中和抗体检测实验结果图。

图 9: 不同 VZV mRNA 疫苗 (3 μ g) 和不同剂量阳参疫苗 Shingrix 二次免疫后小鼠体内特异性 T 细胞检测实验结果图。

具体实施方式

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。

如本文所用，术语“参比序列”即用于同源序列比对的标准序列，可用于定义同源蛋白或多肽序列中氨基酸位置的序列。例如目的序列中的氨基酸以参比序列的氨基酸序列“为参比序列进行编号”是指通过向参比序列中引入空位或删除氨基酸等方式使参比序列与目的序列在尽可能多的位置上具有相同氨基酸残基后，参比序列从 5' 端的第 1 位核苷酸开始按序列顺序依次连续编号，目的序列中与所述参比序列通过比对相互对应的氨基酸位置以相同编号进行定义。在本申请中，如非特别说明，所述“参比序列”均为 SEQ ID NO.8。应当理解，“所述胞外区包含所述 gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸”是指所述胞外区包含所述 gE 蛋白以参比序列进行编号的第 31 位、第 538 位及二者之间的全部氨基酸组成的氨基酸序列，该序列的长度可能因为氨基酸的增添或缺失突变导致相对于参比序列的 31-538 位（共 508 mer）更长活更短。“所述 gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸”亦应以同等方式进行解释。

术语“信号肽”是指引导新合成的蛋白质定位或转移的短肽链，自然条件下，其通常位于蛋白前体的 N 端，引导核糖体至内质网从而使不断合成的多肽穿过内质网。信号肽通常包含带正电荷的 N 区、疏水 h 区以及中性极性 c 区，所述 c 区包含轻度保守的酶切位点，在信号肽引导蛋白质完成定位后通常由膜上的信号肽酶识别并切除。在 mRNA 中，信号肽的编码序列通常位于其编码的蛋白质起始密码子后。

在本申请中，“N 端一侧”用以描述同一条氨基酸序列中两段序列、一个氨基酸与一段序列，或两个氨基酸的相对位置关系。其中，“N 端”指所述氨基酸序列中包含游离氨基的一端。例如“所述信号肽序列位于所述胞外区的 N 端一侧”，则指“信号肽序列”相对于“胞外区”，更靠近其共同所在的氨基酸序列的 N 端。同样，“C 端一侧”也用以描述同一条氨基酸序列中两段序列、一个氨基酸与一段序列，或两个氨基酸的相对位置关系。其中，“C 端”指所述氨基酸序列包含游离羧基的一端。位于某序列或某氨基酸 N 端一侧或 C 端一侧的序列或氨基酸可以与所述某序列或某氨基酸直接相连，或间隔一个或更多个氨基酸残基。

如本文所用，“编码序列”可用以指代成熟 mRNA 中可以被翻译为蛋白质的核糖核苷酸序列，亦可以指代作为模板用以转录所述核糖核苷酸（RNA）序列的脱氧核糖核苷酸（DNA）序列的互补序列。此外，本申请的“编码序列”还可以进一步包含编码功能性核酸或元件的序列，例如 DNA 中可转录形成 5' UTR、3' UTR 或多聚腺苷尾等的多核苷酸序列。

术语“5' 帽子”位于 mRNA 的 5' 最末端, 包含甲基化鸟苷酸, 所述甲基化鸟苷酸经焦磷酸连接于 mRNA 的 5' 末端, 与其相邻的核苷酸形成 5',5'-三磷酸连接。5' 帽子结构通常有三种类型(m7G5'ppp5'Np、m7G5'ppp5'NmpNp、m7G5'ppp5'NmpNmpNp), 分别称为 O 型、I 型和 II 型。O 型指末端核苷酸的核糖未甲基化, I 型指末端一个核苷酸的核糖甲基化, II 型指末端两个核苷酸的核糖均甲基化。本文中, “CleanCap AG”则用以指代 m7G(5')ppp(5')(2'-OMeA)pG 帽子。

如本文所用, 术语“Poly(A) 尾”或“PolyA 序列”是指通常位于 RNA 分子 3'-末端的不间断或中断的腺苷酸残基序列。Poly-A 尾或 Poly-A 序列是本领域技术人员已知的, 且可以根据实际需要进行选用。在 mRNA 中, 在有 3'-UTR 存在的情况下, Poly-A 序列与 3'-UTR 的 3' 端相连。不间断的 poly-A 尾的特点是有连续的腺苷酸残基。Poly-A 尾可以是任何长度的。在一些实施方案中, Poly-A 尾包含, 或由至少 20、至少 30、至少 40、至少 80 或至少 100 和至多 500、至多 400、至多 300、至多 200 或至多 150 个腺苷酸(A) 组成, 特别是约 120 个 A。通常, Poly(A) 尾中的绝大多数核苷酸都是腺苷, 所述绝大多数是指至少 75%, 至少 80%, 至少 85%, 至少 90%, 至少 95%, 至少 96%, 至少 97%, 至少 98%。或至少 99% 的核苷酸, 但允许剩余的核苷酸是 A 以外的核苷酸, 例如 U(尿苷酸)、G(鸟苷酸) 或 C(胞苷酸)。如非特别说明, 本申请的“核苷酸”除了是指天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单体以外, 本文中还应当理解为是指其相关的结构变体, 包括衍生物和类似物, 其关于使用该核苷酸的具体上下文在功能上是等效的, 除非上下文明确另外指明。例如, “核苷酸”指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。核苷酸可以是标准核苷酸(即, 腺苷、鸟苷、胞苷、胸苷和尿苷), 核苷酸异构体或核苷酸类似物。核苷酸类似物指具有修饰的嘌呤或嘧啶碱基或者修饰的核糖部分的核苷酸。核苷酸类似物可以是天然存在的核苷酸(例如肌苷、假尿苷等)或非天然存在的核苷酸。核苷酸的糖或碱基部分上的修饰的非限制性实例包括乙酰基、氨基、羧基、羧甲基、羟基、甲基、磷酸基和硫醇基的添加(或去除), 以及碱基的碳和氮原子被其它原子的取代(例如 7-脱氮嘌呤)。核苷酸类似物还包括双脱氧核苷酸、2'-O-甲基核苷酸、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)和吗啉代寡核苷酸(morpholino)。

在本申请中, “肽”有着其最广泛的定义范围。由于蛋白质本身包含多肽, 因此“肽”涵盖了只具有一级结构的多肽的含义, 以及具有二级或三级结构的蛋白。因此在本申请中, 例如术语“抗原肽”涵盖可引起机体免疫反应的只具有一级结构的肽链以及由该肽链剪切、拼接、折叠和/或堆叠形成的具有二级或三级结构的蛋白, 可以表示某个蛋白的片段(例如截短体), 也可以表示完整的蛋白, 并且由于蛋白可包含糖、脂质等成分, 因此本申请的抗原肽还可以涵盖糖蛋白、脂蛋白或其片段; 同样, 由于蛋白本身可以具有化学修饰, 因此本申请的抗原肽也可以具有修饰, 例如磷酸化、糖基化、泛素化、亚硝基化、甲基化、乙酰化等。而术语“VZV 抗原肽”则可以指代 VZV 来源的蛋白(例如 gE 蛋白)的任何具有免疫原性, 可引起机体针对 VZV 的免疫应答的 VZV 来源蛋白的肽片段、VZV 来源蛋白的部分或完整

蛋白, 以及 VZV 来源蛋白的突变体的部分或完整蛋白、所述突变体的肽片段及截短体。应当理解, 本申请的“肽”、“抗原肽”以及“VZV 抗原肽”可以包含氨基酸还包括非天然氨基酸、修饰的氨基酸(例如, 具有修饰的侧链和/或骨架)和氨基酸类似物。为了进一步举例说明, 氨基酸通常为包括取代的或未取代的氨基、取代的或未取代的羧基和一种或多种侧链或基团, 或这些基团的任一种的类似物的有机酸。示例性的侧链包括, 例如巯基、硒基、磺酰基、烷基、芳基、酰基、酮基、叠氮基、羟基、胍、氰基、卤素、酰肼、链烯基、炔基、醚基、硼酸酯(borate)、硼酸盐(boronate)、二氧磷基、磷酰基、磷、杂环、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺或这些基团的任何组合。其他代表性的氨基酸包括, 但不限于, 包含光敏交联剂的氨基酸、金属结合氨基酸、自旋标记的氨基酸、发荧光的氨基酸、包含金属的氨基酸、含新官能团的氨基酸、与其他分子共价或非共价相互作用的氨基酸、对光不稳(photocaged)和/或可光异构化的氨基酸、放射性氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、糖基化的氨基酸、其他碳水化合物修饰的氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、重原子取代的氨基酸、化学可裂解的和/或光可裂解的氨基酸、包含碳连接糖的氨基酸、氧化还原活性氨基酸、包含氨基硫代酸的氨基酸和包含一个或多个毒性部分的氨基酸。本申请所述的氨基酸包括但不限于: 20 种天然氨基酸及 2-氨基己二酸(Aad)、3-氨基己二酸(bAad)、beta-丙氨酸或 beta-氨基丙氨酸(bAla)、2-氨基丁酸(ABu)、4-氨基丁酸或吡啶酸(4ABu)、6-氨基己酸(Acp)、2-氨基庚烷酸(Ahe)、2-氨基异丁酸(Aib)、3-氨基异丁烯酸(bAib)、2-氨基庚二酸(Apm)、2,4-二氨基丁酸(ABu)、脱氧麻黄碱(Des)、2,2'-二氨基庚二酸(Dpm)、2,3-二氨基丙磺酸(Dpr)、乙基甘氨酸(EtGly)、N-乙基天冬氨酸(EtAsn)、羟基赖氨酸(Hyl)、异羟赖氨酸(aHyl)、3-羟脯氨酸(3Hyp)、4-羟脯氨酸(4Hyp)、异锁链素(Ide)、异亮氨酸(alle)、N-甲基甘氨酸或肌氨酸(MeGly)、N-甲基异亮氨酸(Melle)、6-N-甲基赖氨酸(MeLys)、N-甲基缬氨酸(MeVal)、正缬氨酸(Nva)、正亮氨酸(Nle)和鸟氨酸(Orm)。

如本申请所用, 术语“gE 蛋白胞外区”、“gE 蛋白跨膜区”、“gE 蛋白胞内区”、“gE 蛋白信号肽”如非特别说明, 分别指 VZV gE 蛋白或保有其免疫原性的变体的胞外区、跨膜区、胞内区及信号肽。本领域技术人员应当知晓, 由于 VZV gE 蛋白为囊膜蛋白, 因此当其从核酸表达后将会进入分泌通路并定位于宿主细胞的细胞膜或最终连同细胞膜形成病毒囊膜, 根据此时其相对于细胞膜或病毒囊膜的位置可以分为胞外区(膜外部分)、跨膜区(跨膜部分)、胞内区(胞内部分); 其中胞外区为亲水区段(如非特别说明, 不包含信号肽部分), 胞内区为疏水区段, 跨膜区位于胞外区和胞内区之间, 为一段螺旋构象(helical)区段。并且在一些实施方案中, 所述胞外区包含或为相对于参比序列 SEQ ID NO.8 的 31-538 位中的部分区段或全长。在一些实施方案中, 胞内区为疏水区段, 包含或为相对于参比序列 SEQ ID NO.8 的 560-623 位中的部分区段或全长。在一些实施方案中, 所跨膜区包含或为相对于参比序列 SEQ ID NO.8 的 539-559 位中的部分区段或全长。

如本文所用, 应当理解, 在本申请中如非特别说明, 本申请的“尿苷”涵盖天然尿苷及

其衍生物,包括但不限于: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、1-乙基-伪尿苷(1-ethyl-pseudouridine)、及5-甲氧基-尿苷(5-methoxy-uridine)。在其他一些实施方案中,本申请核酸的全部或部分可替换成修饰碱基,例如:1-甲基假尿苷或假尿苷。

本文使用的术语“N:P比”,在本申请中亦称为“N/P”或“N:P”,表示可电离阳离子脂质的可质子化的氮元素与 mRNA 的磷酸基团的摩尔比,N:P比描述了可电离阳离子脂质中氨基基团(N⁺)的阳离子电荷与核酸骨架中磷酸盐基团(PO₄⁻)的阴离子电荷之间的比例,是可电离阳离子脂质与核酸通过静电相互作用复合的基础。N:P比是LNP的关键处方因素,影响LNP的理化性质及药物体内释放。

如本文所用,术语“约”是指本技术领域技术人员容易知道的各个值的通常误差范围。提及“约”值或参数在本文中包括针对该值或参数本身的实施方案。如本文所使用的,当术语“约”在数值之前时,通常表示该数值上或下10%的范围内。例如,“约100”涵盖90和110。在一些实施方案中,当约后为一个不大于10的整数时,约包含小数,通过对这些小数的小数点后的数值进行四舍五入后可获得所述整数。例如约9,即包括8.5至9.5范围的端点值及其间的全部数值。当“约”后的数值为一个比值,例如3:1,则可指例如介于2.5:1及3.5:1之间的比值,或例如7:1,可指例如介于6.5:1及7.5:1之间的比值。在本申请中,如非特别指明该值为一个整数或一个准确的小数值,则该数值包含经过四舍五入可以获得该数值的任何数值,以及本领域获得该值或使用该值可允许的常规误差范围。

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水痘-带状疱疹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水痘-带状疱疹病毒的设计和/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。包含至少一个表位的水痘-带状疱疹融合蛋白。

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水痘-带状疱疹病毒抗原的范围内。例如：水痘-带状疱疹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水痘-带状疱疹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为意指 T 细胞抗原表位和 B 细胞抗原表位。T 细胞抗原表位指被 T 细胞受体（T-cell receptor /TCR）识别的抗原表位，表位成分为蛋白质降解后的多肽，多存在于抗原分子内部，需要经过抗原递呈细胞（antigen presenting cells /APC）加工后与 MHC 分子结合成为复合物才能被 TCR 识别。通常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，本申请的组合物包含（至少一种）具有编码水痘-带状疱疹病毒抗原（例如：F 蛋白）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'。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 17 β 脱氢酶(hydroxysteroid (17 β) 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,更优选 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: $m^7Gppp(2'OMeA)pG$ 、 $m^7GpppApA$ 、 $m^7GpppApC$ 、 $m^7GpppApG$ 、 $m^7GpppApU$ 、 $m^7GpppCpA$ 、 $m^7GpppCpC$ 、 $m^7GpppCpG$ 、 $m^7GpppCpU$ 、 $m^7GpppGpA$ 、

$m^7GpppGpC$ 、 $m^7GpppGpG$ 、 $m^7GpppGpU$ 、 $m^7GpppUpA$ 、 $m^7GpppUpC$ 、 $m^7GpppUpG$ 、 $m^7GpppUpU$ 、 m^7Gpppm^6ApG 、 $m^7G_3'OmepppApA$ 、 $m^7G_3'OmepppApC$ 、 $m^7G_3'OmepppApU$ 、 $m^7G_3'OmepppApG$ 、 $m^7G_3'OmepppCpA$ 、 $m^7G_3'OmepppCpC$ 、 $m^7G_3'OmepppCpG$ 、 $m^7G_3'OmepppCpU$ 、 $m^7G_3'OmepppUpA$ 、 $m^7G_3'OmepppUpC$ 、 $m^7G_3'OmepppUpG$ 、 $m^7G_3'OmepppUpU$ 、 $m^7G_3'OmepppA_2'OmePG$ 、 $m^7G_3'OmepppA_2'OmePC$ 、 $m^7G_3'OmepppA_2'OmePU$ 、 $m^7G_3'OmepppA_2'OmePA$ 、 $m^7G_3'OmepppC_2'OmePA$ 、 $m^7G_3'OmepppC_2'OmePU$ 、 $m^7G_3'OmepppC_2'OmePG$ 、 $m^7G_3'OmepppC_2'OmePC$ 、 $m^7G_3'OmepppG_2'OmePA$ 、 $m^7G_3'OmepppG_2'OmePU$ 、 $m^7G_3'OmepppG_2'OmePG$ 、 $m^7G_3'OmepppG_2'OmePC$ 、 $m^7G_3'OmepppU_2'OmePA$ 、 $m^7G_3'OmepppU_2'OmePU$ 、 $m^7G_3'OmepppU_2'OmePG$ 、 $m^7G_3'OmepppU_2'OmePC$ 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，本申请的呼吸道合胞病毒 mRNA 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 互补或具有相同碱基序列的 RNA（例如 mRNA）序列，在此情况下，该核苷酸序列的每个“T”均表示“U”。

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申请的 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. 1-3 中任一项的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述可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，胞嘧啶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，本申请的组合物包含具有编码呼吸道合胞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)和/或伪尿嘧啶(pseudouridine)、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试验。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。固相合成可用于核苷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的范围内。

抗原变体

在一些实施方案中，本申请的组合物包含编码水痘-带状疱疹病毒抗原变体（例如变体三聚体 F 蛋白，例如稳定的融合前 F 蛋白）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% 的同一性。

由本申请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。用于此类试验和计算机确定的方法是本领域已知的。

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苷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苷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。

脂质纳米颗粒(LNP)

本申请的 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。本申请的脂质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呼吸道合胞病毒抗原的 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 或更多呼吸道合胞病毒抗原。

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）。然后可以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水痘-带状疱疹病毒和一种或多种不同生物体的抗原的 RNA。因此，本申请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，例如在水痘-带状疱疹病毒感染危险高的地理区域中发现的其他微生物体或当个体暴露于水痘-带状疱疹病毒时同时可能接触的其他抗原。

序贯接种

序贯接种是指不同技术路线疫苗的间隔接种，包括基础免疫序贯和加强免疫序贯；如果第一针用的是灭活疫苗，第二针用的是腺病毒疫苗或 mRNA 疫苗或其他任何非灭活路线的疫苗，此接种方式被称为基础免疫序贯；如果先前已完成两剂灭活疫苗接种，后续需要打加强针时，改用了其他任何非灭活路线的疫苗，该种接种方式被称为加强免疫序贯。

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水痘-带状疱疹病毒的组合物（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/或治疗水痘-带状疱疹病毒感染的药物中。

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前，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。

mRNA 疫苗的制备方法是本领域已知的。特别的，所述 mRNA 疫苗中的 mRNA 在包含抗原肽编码序列的同时，其还进一步包含多个必要的功能组件的编码序列，以表达、调节、或增强上述 HPV 抗原多肽的表达水平。所述功能组件包括但不限于 5' 帽子、5' UTR、3' UTR、

Poly尾等。所述功能组件是本领域已知的，本领域技术人员可根据实际需要进行选择及组合。

5'UTR和3'UTR两者通常都从基因组DNA转录，并且是成熟前mRNA（或称mRNA前体或pre-mRNA）就具有的元件。成熟mRNA的特征性结构特征(例如5'-帽和3'-多聚(A)尾)通常是在mRNA加工期间添加至经转录的(成熟前)mRNA。因此，在一些实施方案中，所述mRNA是mRNA前体。在一些实施方案中，所述mRNA是成熟mRNA。

本申请涉及的相关序列如下。

应当理解以下序列仅为本申请实施方案的示例性序列，而非对本申请方案的任何限制。以下序列中的核酸序列可表示DNA序列或RNA序列，当其表示RNA序列时，如非特别说明，其中的“T”与“U”可互换使用，代表尿苷。在本申请后文的具体实施例中表示的序列以序列号或名称对应于以下序列，且当其在所述具体实施例中表示mRNA序列时，其中的尿苷均为1-甲基假尿苷。

SEQ ID NO.1

VZV gE 蛋白核苷酸原始序列 VZV-WT

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA
CTAGTCCAGTGTGGTGGGAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACCATGGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTGGGGGTATTGATGGGGTTTCG
GAATTATCACGGGAACGTTGCGTATAACGAATCCGGTCAGAGCATCCGTCTTGCGATA
CGATGATTTTACACCGATGAAGACAACTGGATACAACTCCGTATATGAGCCTTAC
TACCATTTCAGATCATGCGGAGTCTTCATGGGTAAATCGGGGAGAGTCTTCGCGAAAAG
CGTACGATCATAACTCACCTTATATATGGCCACGTAATGATTATGATGGATTTTATAGAG
AACGCACACGAACACCATGGGGTGTATAATCAGGGCCGTGGTATCGATAGCGGGGAA
CGGTTAATGCAACCCACACAAATGTCTGCACAGGAGGATCTTGGGGACGATACGGGCA
TCCACGTTATCCCTACGTTAAACGGCGATGACAGACATAAAATTGTAAATGTGGACCA
ACGTCAATACGGTGACGTGTTTAAAGGAGATCTTAATCCAAAACCCCAAGGCCAAAGA
CTCATTGAGGTGTCAGTGGAAGAAAATCACCCGTTTACTTTACGCGCACCGATTTCAGCG
GATTTATGGAGTCCGGTACACCGAGACTTGGAGCTTTTTGCCGTCATTAACCTGTACGG
GAGACGCAGCGCCCGCCATCCAGCATATATGTTTAAACATACAACATGCTTTCAAGA
CGTGGTGGTGGATGTGGATTGCGCGGAAATACTAAAGAGGATCAGTTGGCCGAAATC
AGTTACCGTTTTCAAGGTAAGAAGGAAGCGGACCAACCGTGGATTGTTGTAAACACGA
GCACACTGTTTGATGAACTCGAATTAGACCCCCCGAGATTGAACCGGGTGTCTTGAA
AGTACTTCGGACAGAAAAACAATACTTGGGTGTGTACATTTGGAACATGCGCGGCTCC
GATGGTACGTCTACCTACGCCACGTTTTTGGTCACCTGGAAAGGGGATGAAAAACAA

GAAACCCTACGCCCCGAGTAACTCCTCAACCAAGAGGGGCTGAGTTTCATATGTGGAA
TTACCACTCGCATGTATTTTCAGTTGGTGATACGTTTAGCTTGGCAATGCATCTTCAGTA
TAAGATACATGAAGCGCCATTTGATTTGCTGTTAGAGTGGTTGTATGTCCCCATCGATC
CTACATGTCAACCAATGCGGTTATATTCTACGTGTTTGTATCATCCCAACGCACCCCCAA
TGCCTCTCTCATATGAATTCCGGTTGTACATTTACCTCGCCACATTTAGCCCAGCGTGTT
GCAAGCACAGTGTATCAAAATTGTGAACATGCAGATAACTACACCGCATATTGTCTGG
GAATATCTCATATGGAGCCTAGCTTTGGTCTAATCTTACACGACGGGGGCACCACGTAA
AAGTTTGTAGATACACCCGAGAGTTTGTCTGGGATTATACGTTTTTGTGGTGTATTTTAA
CGGGCATGTTGAAGCCGTAGCATACTGTTGTATCCACAGTAGATCATTTTGTAAACG
CAATTGAAGAGCGTGGATTTCCGCCAACGGCCGGTCAGCCACCGGCGACTACTAAACC
CAAGGAAATTACCCCCGTAAACCCCGGAACGTCACCACTTCTACGATATGCCGCATGG
ACCGGAGGGCTTGCAGCAGTAGTACTTTTATGTCTCGTAATATTTTAAATCTGTACGGC
TAAACGAATGAGGGTTAAAGCCTATAGGGTAGACAAGTCCCCGTATAACCAAAGCATG
TATTACGCTGGCCTTCCAGTGGACGATTTTCGAGGACTCGGAATCTACGGATACGGAAG
AAGAGTTTGGTAACGCGATTGGAGGGAGTCACGGGGGTTTCGAGTTACACGGTGTATAT
AGATAAGACCCGGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGG
GCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAA
GTCTGAGTGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACT
AA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO.2

VZV gE 蛋白核苷酸序列 VZV-2

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA
CTAGTCCAGTGTGGTGGGAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACCATGGGCACCGTGAACAAGCCCGTGGTGGGCGTGCTGATGGGCTTCG
GCATCATCACCGGCACCCCTGCGGATACCAACCCCGTGCGGGCCAGCGTGCTGCGGTA
CGACGACTTCCACACCGACGAGGACAAGCTGGACACCAACAGCGTGTACGAGCCCTAC
TACCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCTGGGTGAACCGGGGCGAGAGCTCCCGGAAG
GCCTACGACCACAACAGCCCCTACATCTGGCCCCGGAACGACTACGACGGCTTCCTGG
AGAACGCCCACGAGCACCACGGCGTGTACAACCAGGGCCGGGGCATCGACAGCGGCG
AGCGGCTGATGCAGCCCACCCAGATGAGCGCCCAGGAGGACCTGGGCGACGACACCG
GCATCCACGTGATCCCCACCCTGAACGGCGACGACCGGCACAAGATCGTGAACGTGGA
CCAGCGGCAGTACGGCGACGTGTTCAAGGGCGACCTGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA
GCGGCTGATCGAGGTGAGCGTGGAGGAGAACCACCCCTTCACCCTGCGGGCCCCCATC

CAGCGGATCTACGGCGTGCGGTACACCGAGACCTGGAGCTTCCTGCCCAGCCTGACCT
GCACCGGCGACGCCGCCCCCGCCATCCAGCACATCTGCCTGAAGCACACCACCTGCTT
CCAGGACGTGGTGGTGGACGTGGACTGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCTGGC
CGAGATCAGCTACCGGTTCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCTGGATCGTGGTG
AACACCAGCACCTGTTTCGACGAGCTGGAGCTGGACCCCCCGAGATCGAGCCCGGCG
TGCTGAAGGTGCTGCGGACCGAGAAGCAGTACCTGGGCGTGTACATCTGGAACATGCG
GGGCAGCGACGGCACCAGCACCTACGCCACCTTCCTGGTGACCTGGAAGGGCGACGAG
AAGACCCGCAACCCACCCCGCCGTGACCCCGAGCCCGGGGCGCCGAGTTCCACA
TGTGGAACCTACCACAGCCACGTGTTTCAGCGTGGGCGACACCTTCAGCCTGGCCATGCA
CCTGCAGTACAAGATCCACGAGGCCCCCTTCGACCTGCTGCTGGAGTGGCTGTACGTG
CCCATCGACCCACCTGCCAGCCATGCGGCTGTACAGCACCTGCCTGTACCACCCCAA
CGCCCCCAGTGCCTGAGCCACATGAACAGCGGCTGCACCTTCACCAGCCCCACCTG
GCCAGCGGGTGGCCAGCACCGTGTACCAGAACTGCGAGCACGCCGACAACCTACACCG
CCTACTGCCTGGGCATCAGCCACATGGAGCCCAGCTTCGGCCTGATCCTGCACGACGG
CGGCACCACCCTGAAGTTCGTGGACACCCCGAGAGCCTGAGCGGCCTGTACGTGTTC
GTGGTGTACTTCAACGGCCACGTGGAGGCCGTGGCCTACACCGTGGTGAGCACCGTGG
ACCACTTCGTGAACGCCATCGAGGAGCGGGGCTTCCCCCCCACCGCCGGCCAGCCCC
CGCCACCACCAAGCCCAAGGAGATCACCCCGTGAACCCCGGCACCAGCCCCCTGCTG
CGGTACGCCGCCTGGACCGGCGGCCTGGCCGCCGTGGTGCTGCTGTGCCTGGTGATCTT
CCTGATCTGCACCGCCAAGCGGATGCGGGTGAAGGCCTACCGGGTGGACAAGAGCCCC
TACAACCAGAGCATGTACTACGCCGGCCTGCCCCTGGACGACTTCGAGGACAGCGAGA
GCACCGACACCGAGGAGGAGTTCGGCAACGCCATCGGCGGCAGCCACGGCGGCAGCA
GCTACACCGTGTACATCGACAAGACCCGCTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCAT
GCTTCTTGCCCCCTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCG
TGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAGCATATGACTAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO.3

VZV gE 蛋白核苷酸序列 VZV-trunc

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA
CTAGTCCAGTGTGGTGGGAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACCATGGGCACAGTAAATAAACAGTTGTTGGAGTGCTGATGGGGTTTCG
GCATCATCACCGGCACCCTGCGGATACCAACCCCGTGCGGGCCAGCGTGCTGCGGTA
CGACGACTTCCACACCGACGAGGACAAGCTGGACACCAACAGCGTGTACGAGCCCTAC

TACCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCTGGGTGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAG
GCCTACGACCACAACAGCCCCTACATCTGGCCCCGGAACGACTACGACGGCTTCCTGG
AGAACGCCCACGAGCACCACGGCGTGTACAACCAGGGCCGGGGCATCGACTCCGGCG
AGCGGCTGATGCAGCCCACCCAGATGAGCGCCCAGGAGGACCTGGGCGACGACACCG
GCATCCACGTGATCCCCACCCTGAACGGCGACGACCGGCACAAGATCGTGAACGTGGA
CCAGCGGCAGTACGGCGACGTGTTCAAGGGCGACCTGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA
GCGGCTGATCGAGGTGAGCGTGGAGGAGAACCACCCCTTCACCCTGCGGGCCCCCATC
CAGCGGATCTACGGCGTGCGGTACACCGAGACCTGGAGCTTCCTGCCAGCCTGACCT
GCACCGGCGACGCCGCCCCCGCCATCCAGCACATCTGCCTGAAGCACACCACCTGCTT
CCAGGACGTGGTGGTGGACGTGGACTGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCTGGC
CGAGATCAGTACCGGTTCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCTGGATCGTGGTG
AACACCAGCACCTGTTCGACGAGCTGGAGCTGGACCCCCCGAGATCGAGCCCGGCG
TGCTGAAGGTGCTGCGGACCGAGAAGCAGTACCTGGGCGTGTACATCTGGAACATGCG
GGGCAGCGACGGCACCAGCACCTACGCCACCTTCCTGGTGACCTGGAAGGGCGACGAG
AAGACCCGGAACCCACCCCCGCCGTGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAGTTCCACA
TGTGGAATAACACAGCCACGTGTTTCAGCGTGGGCGACACCTTCAGCCTGGCCATGCA
CCTGCAGTACAAGATCCACGAGGCCCCCTTCGACCTGCTGCTGGAGTGGCTGTACGTG
CCCATCGACCCACCTGCCAGCCCATGCGGCTGTACAGCACCTGCCTGTACCACCCCAA
CGCCCCCAGTGCTGAGCCACATGAACAGCGGCTGCACCTTCACCTCCCCCAGCTGG
CCCAGCGGGTGGCCAGCACCGTGTACCAGAACTGCGAGCACGCCGACAATAACACCGC
CTACTGCCTGGGCATCAGCCACATGGAGCCCAGCTTCGGCCTGATCCTGCACGACGGC
GGCACCACCCTGAAGTTCGTGGACACCCCCGAGAGCCTGAGCGGCCTGTACGTGTTTCG
TGGTGTACTTCAACGGCCACGTGGAGGCCGTGGCCTACACCGTGGTGAGACCGTGGA
CCACTTCGTGAACGCCATCGAGGAGCGGGGCTTCCCCCCCCACCGCCGGCCAGCCCCC
GCCACCACCAAGCCCAAGGAGATCACCCCCGTGAACCCCGGCACCAGCCCCCTGCTGC
GGTACGCCGCCTGGACCGGCGGCCTGGCCGCCGTGGTGCTGCTGTGCCTGGTGATCTTC
CTGATCTGCTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTC
CCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTG
AGTGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAA
AAA
AAAAAAAAA

SEQ ID NO.4

VZV gE 蛋白核苷酸序列 VZV-mut-Leu

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA

CTAGTCCAGTGTGGTGGGAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACCATGGGAACAGTAAATAAACACAGTTGTTGGAGTGCTGATGGGCTTCG
GCATCATCACCGGCACCCTGCGGATCACCAACCCCGTGCGCGCCAGCGTGCTGCGGTA
CGACGACTTCCACACCGACGAGGACAAGCTGGACACCAACAGCGTGACGAGCCCTAC
TACCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCTGGGTGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAG
GCCTACGACCACAACAGCCCCTACATCTGGCCCCGGAACGACTACGACGGCTTCCTGG
AGAACGCCCACGAGCACCACGGCGTGTACAACAGGGCCGGGGCATCGACAGCGGCG
AGCGGCTGATGCAGCCCACCCAGATGAGCGCCCAGGAGGACCTGGGCGACGACACCG
GCATCCACGTGATCCCCACCCTGAACGGCGACGACCGGCACAAGATCGTGAACGTGGA
CCAGCGGCAGTACGGCGACGTGTTCAAGGGCGACCTGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA
GCGGCTGATCGAGGTGAGCGTGAGGAGAACCACCCCTTCACCCTGCGGGCCCCCCTC
CAGCGGATCTACGGCGTGCGGTACACCGAGACCTGGAGCTTCCTGCCCAGCCTGACCT
GCACCGGCGACGCCGCCCGCCATCCAGCACATCTGCCTGAAGCACACCACCTGCTT
CCAGGACGTGGTGGTGGACGTGGACTGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCTGGC
CGAGATCAGCTACCGGTTCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCTGGATCGTGGTG
AACACCAGCACCCCTGTTTCGACGAGCTGGAGCTGGACCCCCCGAGATCGAGCCCGGCG
TGCTGAAGGTGCTGCGGACCGAGAAGCAGTACCTGGGCGTGTACATCTGGAACATGCG
GGGCAGCGACGGCACCAGCACCTACGCCACCTTCCTGGTGACCTGGAAGGGCGACGAG
AAGACCCGGAACCCCAACCCCGCCGTGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAGTTCCACA
TGTGGAACCTACCACAGCCACGTGTTTCAGCGTGGGCGACACCTTCAGCCTGGCCATGCA
CCTGCAGTACAAGATCCACGAGGCCCCCTTCGACCTGCTGCTGGAGTGGCTGTACGTG
CCCATCGACCCCACTGCCAGCCCATGCGGCTGTACAGCACCTGCCTGTACCACCCCAA
CGCCCCCAGTGCTGAGCCACATGAACAGCGGCTGCACCTTCACCAGCCCCACCTG
GCCCAGCGGGTGGCCAGCACCGTGTACCAGAACTGCGAGCACGCCGACAACCTACACCG
CCTACTGCCTGGGCATCAGCCACATGGAGCCCAGCTTCGGCCTGATCCTGCACGACGG
CGGCACCACCCTGAAGTTCGTGGACACCCCGAGAGCCTGAGCGGCCTGTACGTGTTT
GTGGTGTACTTCAACGGCCACGTGGAGGCCGTGGCCTACACCGTGGTGAGCACCGTGG
ACCACTTCGTGAACGCCATCGAGGAGCGGGGCTTCCCCCCCACCGCCGGCCAGCCCC
CGCCACCACCAAGCCCAAGGAGATCACCCCGTGAACCCCGGCACCAGCCCCCTGCTG
CGGTACGCCGCTGGACCGGCGGCCTGGCCGCCGTGGTGCTGCTGTGCCTGGTGATCTT
CCTGATCTGCACCGCCAAGCGGATGCGGGTGAAGGCCTACCGGGTGGACAAGAGCCCC
TACAACCAGAGCATGTACTACGCCGGCCTGCCCCTGGACGACTTCGAGGACCTGGAGC
TGCTGGACCTGGAGGAGGAGTTCGGCAACGCCATCGGCGGCAGCCACGGCGGCAGCA
GCTACACCGTGTACATCGACAAGACCCGGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCAT

GCTTCTTGCCCCCTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCG
TGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAGCATATGACTAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO.5

VZV gE 蛋白核苷酸序列 VZV-mut-Ile

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA
CTAGTCCAGTGTGGTGGGAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACCATGGGCACAGTTAATAAACAGTAGTTGGAGTGCTGATGGGCTTCG
GGATCATCACCGGCACCCTGCGGATCACCAACCCCGTGCGGGCCAGCGTGCTGCGGTA
CGACGACTTCCACACCGACGAGGACAAGCTGGACACCAACAGCGTGACGAGCCCTAC
TACCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCTGGGTGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAG
GCCTACGACCACAACAGCCCCTACATCTGGCCCCGGAACGACTACGACGGCTTCCTGG
AGAACGCCCACGAGCACCACGGCGTGTACAACAGGGCCGGGGCATCGACTCCGGCG
AGCGGCTGATGCAGCCACCCAGATGAGCGCCCAGGAGGACCTGGGCGACGACACCG
GCATCCACGTGATCCCCACCCTGAACGGCGACGACCGGCACAAGATCGTGAACGTGGA
CCAGCGGCAGTACGGCGACGTGTTCAAGGGCGACCTGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA
GCGGCTGATCGAGGTGAGCGTGGAGGAGAACCACCCCTTCACCCTGCGGGCCCCC
CAGCGGATCTACGGCGTGCGGTACACCGAGACCTGGAGCTTCCTGCCCAGCCTGACCT
GCACCGGCGACGCCGCCCGCCATCCAGCACATCTGCCTGAAGCACACCACCTGCTT
CCAGGACGTGGTGGTGGACGTGGACTGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCTGGC
CGAGATCAGCTACCGGTTCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCTGGATCGTGGTG
AACACCAGCACCCCTGTTTCGACGAGCTGGAGCTGGACCCCCCGAGATCGAGCCCGGCG
TGCTGAAGGTGCTGCGGACCGAGAAGCAGTACCTGGGCGTGTACATCTGGAACATGCG
GGGCAGCGACGGCACCAGCACCTACGCCACCTTCCTGGTGACCTGGAAGGGCGACGAG
AAGACCCGGAACCCCAACCCCGCCGTGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAGTTCCACA
TGTGGAACCTACCACAGCCACGTGTTACGCGTGGGCGACACCTTCAGCCTGGCCATGCA
CCTGCAGTACAAGATCCACGAGGCCCCCTTCGACCTGCTGCTGGAGTGGCTGTACGTG
CCCATCGACCCCACTGCCAGCCATGCGGCTGTACAGCACCTGCCTGTACCACCCCAA
CGCCCCCAGTGCTGAGCCACATGAACAGCGGCTGCACCTTCACCAGCCCCACCTG
GCCCAGCGGGTGGCCAGCACCGTGTACCAGAACTGCGAGCACGCCGACAACCTACACCG
CCTACTGCCTGGGCATCAGCCACATGGAGCCCAGCTTCGGCCTGATCCTGCACGACGG
CGGCACCACCTGAAGTTCGTGGACACCCCGAGAGCCTGAGCGGCCTGTACGTGTTC
GTGGTGTACTTCAACGGCCACGTGGAGGCCGTGGCCTACACCGTGGTGAGCACCGTGG

ACCACTTCGTGAACGCCATCGAGGAGCGGGGCTTCCCCCCCACCGCCGGCCAGCCCC
CGCCACCACCAAGCCCAAGGAGATCACCCCCGTGAACCCCGGCACCAGCCCCCTGCTG
CGGTACGCCGCCTGGACCGGCGGCCTGGCCGCCGTGGTGCTGCTGTGCCTGGTGATCTT
CCTGATCTGCACCGCCAAGCGGATGCGGGTGAAGGCCTACCGGGTGGACAAGAGCCCC
TACAACCAGAGCATGTACTACGCCGGCCTGCCCCGTGGACGACTTCGAGGACATCGAGA
TCATCGACATCGAGGAGGAGTTTCGGCAACGCCATCGGCGGCAGCCACGGCGGCTCCAG
CTACACCGTGTACATCGACAAGACCCGGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATG
CTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGT
GGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGCATATGACTAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO.6

VZV gE 蛋白核苷酸序列 VZV-mut-H362E-Leu

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA
CTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACCATGGGAACAGTAAATAAACAGTTGTTGGAGTGCTGATGGGCTTCG
GCATCATCACCGGCACCCTGCGGATCACCAACCCCGTGCGCGCCAGCGTGCTGCGGTA
CGACGACTTCCACACCGACGAGGACAAGCTGGACACCAACAGCGTGTACGAGCCCTAC
TACCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCTGGGTGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAG
GCCTACGACCACAACAGCCCCTACATCTGGCCCCGGAACGACTACGACGGCTTCCTGG
AGAACGCCCACGAGCACCACGGCGTGTACAACCAGGGCCGGGGCATCGACAGCGGCG
AGCGGCTGATGCAGCCACCCAGATGAGCGCCCAGGAGGACCTGGGCGACGACACCG
GCATCCACGTGATCCCCACCCTGAACGGCGACGACCGGCACAAGATCGTGAACGTGGA
CCAGCGGCAGTACGGCGACGTGTTCAAGGGCGACCTGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA
GCGGCTGATCGAGGTGAGCGTGGAGGAGAACCACCCCTTCACCCTGCGGGCCCCCATC
CAGCGGATCTACGGCGTGCGGTACACCGAGACCTGGAGCTTCCTGCCAGCCTGACCT
GCACCGGCGACGCCGCCCGCCATCCAGCACATCTGCCTGAAGCACACCACCTGCTT
CCAGGACGTGGTGGTGGACGTGGACTGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCTGGC
CGAGATCAGCTACCGGTTCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCTGGATCGTGGTG
AACACCAGCACCCCTGTTTCGACGAGCTGGAGCTGGACCCCCCGAGATCGAGCCCGGCG
TGCTGAAGGTGCTGCGGACCGAGAAGCAGTACCTGGGCGTGTACATCTGGAACATGCG
GGGCAGCGACGGCACCAGCACCTACGCCACCTTCCTGGTGACCTGGAAGGGCGACGAG
AAGACCCGGAACCCCAACCCCGCCGTGACCCCGAGCCCGGGGCGCCGAGTTCCACA
TGTGGAACCTACCACAGCCACGTGTTTCAGCGTGGGCGACACCTTCAGCCTGGCCATGGA

GCTGCAGTACAAGATCCACGAGGCCCCCTTCGACCTGCTGCTGGAGTGGCTGTACGTG
CCCATCGACCCACCTGCCAGCCCATGCGGCTGTACAGCACCTGCCTGTACCACCCCAA
CGCCCCCAGTGCCTGAGCCACATGAACAGCGGCTGCACCTTCACCAGCCCCACCTG
GCCCAGCGGGTGGCCAGCACCGTGTACCAGAACTGCGAGCACGCCGACAACCTACACCG
CCTACTGCCTGGGCATCAGCCACATGGAGCCCAGCTTCGGCCTGATCCTGCACGACGG
CGGCACCACCCTGAAGTTCGTGGACACCCCCGAGAGCCTGAGCGGCCTGTACGTGTTC
GTGGTGTACTTCAACGGCCACGTGGAGGCCGTGGCCTACACCGTGGTGAGCACCGTGG
ACCACTTCGTGAACGCCATCGAGGAGCGGGGCTTCCCCCCCCACCGCCGGCCAGCCCC
CGCCACCACCAAGCCCAAGGAGATCACCCCCGTGAACCCCGGCACCAGCCCCCTGCTG
CGGTACGCCGCCTGGACCGGCGGCCTGGCCGCCGTGGTGCTGCTGTGCCTGGTGATCTT
CCTGATCTGCACCGCCAAGCGGATGCGGGTGAAGGCCTACCGGGTGGACAAGAGCCCC
TACAACCAGAGCATGTACTACGCCGGCCTGCCCCGTGGACGACTTCGAGGACCTGGAGC
TGCTGGACCTGGAGGAGGAGTTCGGCAACGCCATCGGCGGCAGCCACGGCGGCAGCA
GCTACACCGTGTACATCGACAAGACCCGGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCAT
GCTTCTTGCCCCCTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCG
TGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAGCATATGACTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO.7

VZV gE 蛋白核苷酸序列 VZV-mut-H362E-Ile

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA
CTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACCATGGGCACAGTTAATAAACCAGTAGTTGGAGTGCTGATGGGCTTCG
GGATCATCACCGGCACCCTGCGGATCACCAACCCCGTGCGGGCCAGCGTGCTGCGGTA
CGACGACTTCCACACCGACGAGGACAAGCTGGACACCAACAGCGTGTACGAGCCCTAC
TACCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCTGGGTGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAG
GCCTACGACCACAACAGCCCCTACATCTGGCCCCGGAACGACTACGACGGCTTCCTGG
AGAACGCCCACGAGCACCACGGCGTGTACAACCAGGGCCGGGGCATCGACTCCGGCG
AGCGGCTGATGCAGCCACCCAGATGAGCGCCCAGGAGGACCTGGGCGACGACACCG
GCATCCACGTGATCCCCACCCTGAACGGCGACGACCGGCACAAGATCGTGAACGTGGA
CCAGCGGCAGTACGGCGACGTGTTCAAGGGCGACCTGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA
GCGGCTGATCGAGGTGAGCGTGGAGGAGAACCACCCCTTCACCCTGCGGGCCCCCATC
CAGCGGATCTACGGCGTGCGGTACACCGAGACCTGGAGCTTCCTGCCAGCCTGACCT
GCACCGGCGACGCCGCCCCCGCCATCCAGCACATCTGCCTGAAGCACACCACCTGCTT

CCAGGACGTGGTGGTGGACGTGGACTGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCTGGC
CGAGATCAGCTACCGGTTCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCTGGATCGTGGTG
AACACCAGCACCTGTTCGACGAGCTGGAGCTGGACCCCCCGAGATCGAGCCCGGCG
TGCTGAAGGTGCTGCGGACCGAGAAGCAGTACCTGGGCGTGACATCTGGAACATGCG
GGGCAGCGACGGCACCAGCACCTACGCCACCTTCCTGGTGACCTGGAAGGGCGACGAG
AAGACCCGGAACCCACCCCGCCGTGACCCCGAGCCCGGGGCGCCGAGTTCCACA
TGTGGAACCTACCACAGCCACGTGTTACGCGTGGGCGACACCTTCAGCCTGGCCATGGA
GCTGCAGTACAAGATCCACGAGGCCCCCTTCGACCTGCTGCTGGAGTGGCTGTACGTG
CCCATCGACCCACCTGCCAGCCATGCGGCTGTACAGCACCTGCCTGTACCACCCCAA
CGCCCCCAGTGCCTGAGCCACATGAACAGCGGCTGCACCTTCACCAGCCCCACCTG
GCCAGCGGGTGGCCAGCACCGTGTACCAGAACTGCGAGCACGCCGACAACCTACACCG
CCTACTGCCTGGGCATCAGCCACATGGAGCCCAGCTTCGGCCTGATCCTGCACGACGG
CGGCACCACCCTGAAGTTCGTGGACACCCCGAGAGCCTGAGCGGCCTGTACGTGTTC
GTGGTGTACTTCAACGGCCACGTGGAGGCCGTGGCCTACACCGTGGTGAGCACCGTGG
ACCACTTCGTGAACGCCATCGAGGAGCGGGGCTTCCCCCACCAGCCGCCAGCCCC
CGCCACCACCAAGCCCAAGGAGATCACCCCGTGAACCCCGCACCAGCCCCCTGCTG
CGGTACGCCGCTGGACCGGCGGCCTGGCCGCCGTGGTGCTGCTGTGCCTGGTGATCTT
CCTGATCTGCACCGCCAAGCGGATGCGGGTGAAGGCCTACCGGGTGGACAAGAGCCCC
TACAACCAGAGCATGTACTACGCCGGCCTGCCCCTGGACGACTTCGAGGACATCGAGA
TCATCGACATCGAGGAGGAGTTCGGCAACGCCATCGGCGGCAGCCACGGCGGCTCCAG
CTACACCGTGTACATCGACAAGACCCGGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATG
CTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCGT
GGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGCATATGACTAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

注：上述序列中的 U 可以全部(100%)或部分替换成修饰碱基，例如：1-甲基假尿苷或假尿苷。

SEQ ID NO.8

VZV gE 蛋白抗原原始氨基酸序列

MGTVNKPVVGVLMGFGIITGLRITNPVRASVRLRYDDFHTDEDKLDNTNSVYEPYYHSD
HAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLNAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQP
TQMSAQEDLGDDTGIHVITLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVE
ENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDAEN
TKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVNTSTLFDLELDPPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIYW

NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA
MHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLA
QRVASTVYQNCHEADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFFVYF
NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYYAAWTG
GLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDSESTDTEEEFG
NAIGGSHGGSSYTVYIDKTR

SEQ ID NO.9

KOZAK 序列

GCCACCATG

SEQ ID NO.10

pVAX.1+TEV 5'UTR 序列

GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA
CTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT
ATAAGAGCCACC

SEQ ID NO.11

3'-聚腺苷酸序列

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAA
AA
AA

SEQ ID NO.12

3'-UTR 血红蛋白-1 (hHBA1)序列

GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTC
CCCTTCCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC

SEQ ID NO.13

VZV-trunc

MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYYDDFHTDEDKLDTNSVYEPYYHSD
HAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLNAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQP
TQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVE
ENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAEN
TKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTKQYLGVIYW
NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA
MHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLA

QRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVYF
NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYYAAWTG
GLAAVVLLCLVIFLIC

SEQ ID NO.14

VZV-mut-Ile

MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYYDDFHTDEDKLDTNSVYEPYYHSD
HAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLNAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQP
TQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVE
ENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCEN
TKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTKQYLGVIYW
NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA
MHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLA
QRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVYF
NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYYAAWTG
GLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDIEIIDIEEEFGNA
IGGSHGGSSYTVYIDKTR

SEQ ID NO.15

VZV-mut-Ile-H362E

MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYYDDFHTDEDKLDTNSVYEPYYHSD
HAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLNAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQP
TQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVE
ENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCEN
TKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTKQYLGVIYW
NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA
MELQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLA
QRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVYF
NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYYAAWTG
GLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDIEIIDIEEEFGNA
IGGSHGGSSYTVYIDKTR

SEQ ID NO.16

VZV-mut-Leu

MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYYDDFHTDEDKLDTNSVYEPYYHSD
HAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLNAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQP

TQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVE
ENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDC
TKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTKQYLGVIW
NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA
MHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLA
QRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVYF
NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYYAAWTG
GLAAVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDLELLDLEEEFG
NAIGGSHGGSSYTVYIDKTR

SEQ ID NO.17

VZV-mut-Leu -H362E

MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYYDDFHTDEDKLDNTSVYEPYHSD
HAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQP
TQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVE
ENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDC
TKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTKQYLGVIW
NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA
MELQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLA
QRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVYF
NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYYAAWTG
GLAAVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDLELLDLEEEFG
NAIGGSHGGSSYTVYIDKTR

SEQ ID NO.18

TEV 5'UTR

GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC

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：编码 VZV gE 蛋白或其抗原性片段或免疫原性变体蛋白抗原的密码子优化

根据水痘带状疱疹病毒 gE 蛋白的天然编码区序列、其抗原性片段或免疫原性变体蛋白抗原，设计了 mRNA 序列。除了编码区外，mRNA 序列特征还包括 pVAX.1+TEV 5'UTR、hHBA1

3'UTR 和 100 个 polyA。VZV-2、VZV-trunc、VZV-mut-Leu、VZV-mut-Ile、VZV-mut-H362E-Leu 和 VZV-mut-H362E-Ile mRNA 序列都在 VZV gE 蛋白编码区做了优化，相比 VZV gE 蛋白原始编码序列，优化后序列的 GC 含量均有提高，而在 UTR 区域保持一致。序列设计优化方案以及相对表达量实验结果如表 1 所示。

表 1：不同密码子优化 mRNA 相对表达量数据

mRNA	5'UTR	ORF	3'UTR	polyA 序列 以及后续元 件	相对表达量
VZV-2 (SEQ ID NO.2)	pVAX.1+T EV 5'UTR	gE 蛋白核苷酸序 列 (优化方案 1)	hHBA1 3'UTR	100A	400%
VZV-trunc(S EQ ID NO.3)	pVAX.1+T EV 5'UTR	gE 蛋白截短体核 苷酸序列 (优化方 案 2)	hHBA1 3'UTR	100A	654%
VZV-mut-Leu (SEQ ID NO.4)	pVAX.1+T EV 5'UTR	gE 蛋白变体核苷 酸序列 (优化方案 3)	hHBA1 3'UTR	100A	402%
VZV-mut-Ile(SEQ ID NO.5)	pVAX.1+T EV 5'UTR	gE 蛋白变体核苷 酸序列 (优化方案 4)	hHBA1 3'UTR	100A	462%
VZV-mut-H3 62E-Leu (SEQ ID NO.6)	pVAX.1+T EV 5'UTR	F 蛋白变体核苷酸 序列 (优化方案 5)	hHBA1 3'UTR	100A	444%
VZV-mut-H3 62E-Ile (SEQ ID NO.7)	pVAX.1+T EV 5'UTR	F 蛋白变体核苷酸 序列 (优化方案 6)	hHBA1 3'UTR	100A	431%
VZV-WT (SEQ ID No.1)	pVAX.1+T EV 5'UTR	gE 蛋白核苷酸原 始序列	hHBA1 3'UTR	100A	100%

本研究设计多条优化序列，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 ELISA 检测细胞中 VZV gE 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。表达水平结果参见表 1，结果表明：通过密码子优化能够显著提高 mRNA 的表达水平，根据上述实验结果，VZV-trunc 抗原肽 mRNA（SEQ ID NO.3）相对表达量较高，作为后续研究开发疫苗的优选 mRNA 序列。

VZV gE 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 10xTranscription 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.3 对应的 DNA 序列）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）：VZV-trunc 抗原的 mRNA 体外合成后，经过分离纯化，得到高纯度的 mRNA。

实施例 2：配方筛选实验

综合考虑对制剂配方的脂质配比进行了优化，具体配方选择如表 2 所示。采用 3 μg mRNA（使用 1-11 不同配方的 LNP 包裹）单次免疫正常小鼠，之后于 14 天检测小鼠血清中的结合抗体。根据结合抗体水平和制剂稳定等方面的考虑，最终确定配方 9 为优选配方。其中，图 2 显示了包封如表 1 所示的 VZV-trunc mRNA 的 LNP 的结果。

表 2. LNP 配方成分列表

序号	脂质配比	给药前处理
配方 1	HUO：38.2%，胆固醇：43.5%，DSPC：15.6%，PEG-DMG：2.6%	-20℃取出， 放置室温解 冻，轻轻摇晃 即可。
配方 2	HUO：43.8%，胆固醇：42%，DSPC：12.4%，PEG-DMG：1.8%	
配方 3	HUO：49%，胆固醇：39%，DSPC：8.7%，PEG-DMG：3%	
配方 4	HUO：49%，胆固醇：31%，DSPC：17%，PEG-DMG：3%	
配方 5	HUO：43%，胆固醇：45%，DSPC：8.6%，PEG-DMG：3%	
配方 6	HUO：42.3%，胆固醇：41%，DSPC：14%，PEG-DMG：2.5%	
配方 7	HUO：40.5%，胆固醇：50%，DSPC：8%，PEG-DMG：1.6%	
配方 8	HUO：45%，胆固醇：44%，DSPC：9.6%，PEG-DMG：1.4%	
配方 9	HUO：50%，胆固醇：38.5%，DSPC：10%，PEG-DMG：1.5%	

配方 10	HUO: 49%, 胆固醇: 39%, DSPC: 11.5%, PEG-DMG: 1.5%	
配方 11	HUO: 49%, 胆固醇: 31%, DSPC: 18.5%, PEG-DMG: 1.5%	

注：HUO 的化学名为：十七烷-9-基-8-（（2-羟乙基）（6-氧代-6-（（十一烷氧基）己基）氨基）辛酸酯），亦称为 SM-102。

实施例 3：抗原肽 mRNA-LNP 制剂的制备和确认

依据实施例 2 中选定的配方（即配方 9）制备 VZV gE 蛋白或其抗原性片段或免疫原性变体蛋白抗原 mRNA-LNP 制剂，具体制备步骤如下：

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 7.4），含 60%蔗糖的 Tris-NaOAc 缓冲溶液（20 mM，10.7 mM，pH 7.4）
3. 取适量 mRNA 原液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 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 g/mL 同时外水相体系中蔗糖含量（w/v，即浓度）为 8.7%即可。

结果显示，VZV gE 蛋白或其抗原性片段或免疫原性变体蛋白抗原 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，形态一致，大都为 100 nm 左右，满足进行下一步实验的基本要求。示例性地，VZV-trunc mRNA-LNP 的结构如图 3 所示。

实施例 4：VZV gE 蛋白抗原肽在宿主细胞表达的免疫印迹实验

将表达 VZV gE 蛋白抗原的 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 VZV gE 抗原 mRNA 的细胞作为阴性对照(Blank)，GAPDH 作为内参。如图 4 所示，是其中的代表性结果，为 VZV-trunc 的蛋白表达量。可见，本申请获得的编码 VZV gE 抗原肽的 mRNA 能够有效在 COS-7 细胞中稳定大量表达目标抗原。

免疫印迹具体步骤如下：

- 1.取出转染好的细胞弃去上清, PBS 洗一遍, 每孔加入 100 μ L 1xSDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 震荡裂解 3 min 后, 收样备用。
- 2.将收集的样品于 95 $^{\circ}$ C 加热 7 min 后上样, 电压 80V 条件下进行电泳, 每个样品上样量为 10 μ L。
- 3.电泳结束后将甲醇活化后的 PVDF 膜按照“三明治夹心法”组装转膜装置, 而后在冰浴条件下, 100V 电压转膜 1.5 h。
- 4.在含 5%脱脂奶粉的 PBST 缓冲液室温封闭 PVDF 膜 1h, 使用 PBST 清洗三次, 继而将 PVDF 膜与 VZV gE Antibody 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 5.第二天, 将 PBST 清洗三次后的 PVDF 膜与 GAPDH 抗体(小鼠单抗)室温孵育 1 h。
- 6.PBST 洗去未结合二抗后, 加入 ECL 显影液利用 Proteinsimple/FluorChem E 采集化学发光图像。

实施例 5: 流式检测抗原蛋白在细胞中的表达

将表达 VZV gE 抗原肽 mRNA 转染 COS-7 细胞后, 使用流式细胞仪检测目标抗原蛋白在细胞中表达情况。未转染 VZV gE 抗原肽 mRNA 的细胞作为阴性对照(Blank)。具体方法如下所述:

1. 为检测 VZV gE 抗原肽 mRNA 在细胞中的表达, 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 300000 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 $^{\circ}$ C 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-FastTM 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-FastTM Perm Wash solution, 350g, 离心 5min。弃上清后用 1 ml 1 $\times$ Cyto-FastTM Perm Wash solution 重悬, 再漂洗一次, 离心弃上清。
7. 利用 100 μ l 1 $\times$ Cyto-FastTM 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 $\times$ Cyto-FastTM Perm Wash solution, 350g, 离心 5min, 弃上清后用 1 ml 1 $\times$ Cyto-FastTM Perm Wash solution 重悬, 再漂洗一次, 离心弃上清。

9. 利用 250 μ l 1 $\times$ 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 $\times$ 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。

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 μ l 1%多聚甲醛固定液重悬细胞, 流式上机检测细胞中 VZV gE 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。每个样本读取 10000 个信号。

实验结果表明: 本申请获得的编码 VZV gE 抗原的 mRNA 能够有效在 COS-7 细胞中高效稳定表达目标蛋白。例如图 5 显示了 VZV-trunc mRNA 的抗原肽的蛋白表达量。

实施例 6: 小鼠血清结合抗体和检测实验

6-8 周龄 BALB/c 小鼠随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半, 在第 0 天和第 28 天分别通过肌肉注射溶媒, 受试物 VZV mRNA-LNP 制剂 (3 μ g/只) 以及上市疫苗 Shingrix (3 μ g/只或 5 μ g/只) 进行免疫接种。在免疫后第 14、35 天收集血清样品, 检测第 14 天血清结合抗体滴度, 结果如图 6 所示: 通过本申请 VZV mRNA 疫苗免疫后的小鼠能够产生高滴度的结合抗体, VZV mRNA 疫苗 (VZV-2、VZV-trunc、VZV-mut-Leu、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile) 免疫后小鼠血清中结合抗体几何平均滴度 (GMT) 均高于已上市疫苗 Shingrix。其中, VZV-2、VZV-trunc、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile 相较于 VZV-mut-Leu 和 VZV-mut-H362E-Leu, 血清结合抗体 GMT 均显著更高, 且 Bar 值更小, 在不同个体中差异更小, 免疫效果更稳定。

小鼠血清结合抗体检测方法如下:

提前一天准备好包被 VZV gE 蛋白的高结合力 96 孔板, 第二天将稀释成不同的梯度的血清加入到包被的 96 孔板中共孵育 2 小时, 然后采用通用的 ELISA 方法对血清中的结合抗体进行检测。

实施例 7: 小鼠血清特异性保护抗体检测实验 (FAMA 法)

6-8 周龄 BALB/c 小鼠随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半, 在第 0 天和第 28 天分别通过肌肉注射溶媒, 受试物 VZV gE mRNA 制剂 (3 μ g/只) 以及上市疫苗 Shingrix (3 μ g/只或 5 μ g/只) 进行免疫接种。在免疫后第 14、35、63 天收集血清样品, 检测第 63 天血清特异性保护抗体滴度, 结果如图 7 所示: 通过本申请 VZV 疫苗免疫后的小鼠能够产生高滴度的特异性保护抗体, VZV mRNA 疫苗 (VZV-2、VZV-trunc、VZV-mut-Leu、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile) 免疫后小鼠血清中特异性保护抗体几何平均滴度 (GMT) 均高于同剂量 (3 μ g/只) 已上市疫苗 Shingrix。并且, 其中 VZV-trunc 和 VZV-mut-Leu

相较于 VZV-2、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile, 特异性保护抗体 GMT 则显著更高。此外, VZV-trunc 的组的 Bar 值也更小, 显示出其在不同个体中的差异更小, 免疫效果更稳定。

小鼠血清特异性保护抗体检测方法如下:

FAMA 法以水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 感染细胞作为抗原制备成固定抗原玻片, 以异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)作为二抗, 检测小鼠血清中抗 VZV 特异性 IgG 抗体, 所形成的抗原抗体复合物主要位于感染细胞表面, 荧光显微镜下观察可见独特的膜性环状荧光。感染细胞表面出现黄绿色荧光环者判为阳性, 未见完整荧光环或无荧光环者判为阴性。将样品系列稀释, 记录待测组细胞出现荧光环的最大稀释倍数, FAMA 抗体滴度为待测样品出现荧光环的最大稀释倍数。

实施例 8: 小鼠血清真病毒中和抗体检测实验

6-8 周龄 BALB/c 小鼠随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半, 在第 0 天和第 28 天分别通过肌肉注射溶媒, 受试物 VZV mRNA-LNP 制剂 (3 μ g/只) 以及上市疫苗 Shingrix (3 μ g/只或 5 μ g/只) 进行免疫接种。在免疫后第 14、35、63 天收集血清样品, 检测第 63 天血清中和抗体滴度, 结果如图 8 所示: 通过本申请 VZV 疫苗 (VZV-trunc 和 VZV-2) 免疫后的小鼠能够产生高滴度的中和抗体, VZV mRNA 疫苗免疫后小鼠血清中和抗体几何平均滴度 (GMT) 均高于已上市疫苗 Shingrix。并且其中, VZV-trunc 的中和抗体 GMT 显著高于 VZV-2。

小鼠血清中和抗体检测方法如下:

1. 细胞准备: 将 MRC-5 细胞密度调整, 接种至 96 孔板, 置于细胞培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 培养过夜, 保证第二天的细胞汇合度为 90% 左右即可开始实验。
2. 血清灭活: 水浴 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 分钟。
3. 梯度稀释: 样本起始稀释 30 倍, 进行 3 倍比梯度稀释, 共设置 8 个稀释度 (含首孔), 2 复孔。
4. 病毒稀释: 根据病毒的 PFU 值, 输入合适的病毒量。
5. 中和反应: 样本孔和病毒对照孔分别加入稀释好的病毒 (VR-1832™, Oka 株, ATCC 购买), 回滴孔依次按照 2 倍梯度向下稀释, 共 3 个稀释度, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中中和约 1 小时。
6. 病毒吸附: 将上述病毒与血清中和产物和阳性及回滴孔病毒加入提前准备好的细胞中, 每孔 50ul, 2 个复孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养约 2 小时后换液, 每孔加入 100ul 培养基继续培养约 48h。
7. 测板: 弃上清, 将细胞固定后加入荧光标记的检测抗体, 使用 CTL 仪器读板。

实施例 9: 小鼠体内特异性 T 细胞应答检测实验

6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分组, 每组 3 只, 在第 0 天和第 28 天分别通过肌肉注射溶媒, 受试物 VZV mRNA-LNP 制剂 (3 μ g/只) 以及上市疫苗 Shingrix (3 μ g/只或 5 μ g/只) 进行免疫接种。在免疫后第 42 天收集脾脏样品, 检测小鼠体内特异性 T 细胞的应答, 结果如图 9 所示: 通过本申请 VZV 疫苗免疫后的小鼠体内产生很强的特异性 T 细胞免疫。VZV mRNA 疫苗 (VZV-2、VZV-trunc、VZV-mut-Leu、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile) 组小鼠体内的特异性 T 细胞比例显著高于同剂量 (3 μ g) 甚至更高剂量 (5 μ g) 的 Shingrix 组 ($P < 0.05$)。而其中, VZV-trunc、VZV-mut-Leu、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile 的特异性 T 细胞比例高于 VZV-2; 并且进一步的, 在同等剂量下, VZV-trunc 还高于 VZV-mut-Leu、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile。

小鼠体内特异性 T 细胞应答检测方法如下:

1. 小鼠脾细胞的分离

将小鼠脾脏置于 70 μ m 细胞筛网上进行研磨。加入含 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的杜氏磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) 冲洗筛网上的细胞, 离心后加入红细胞裂解液进行裂红处理。裂解完全后, 加入含 5% FBS 的 DPBS 终止裂解。离心后用 RPMI-1640 培养基, 该培养基含有 10% FBS、1% GlutaMaxTM 和 1% 青链霉素 (Penicillin-Streptomycin, PS), 重悬细胞, 用细胞计数仪对细胞进行细胞计数, 用于后续 ICS 检测。

2. 小鼠脾细胞 ICS (基于流式检测为基础的胞内因子染色) 检测

将小鼠脾细胞以 1,000,000 cells/孔接种至 96 孔细胞培养板, 分别加入刺激物 (对照组: 培养基 (medium); 测试组: VZV 肽库 (PepMixTM VZV (gE), JPT, 覆盖 gE 氨基酸序列全长的短肽库), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育培养 16 小时。然后加入蛋白转运抑制剂, 再孵育 4 小时。孵育结束后在 96 孔 V 孔板中对细胞进行染色。Fixable Viability Stain 700 和纯化大鼠抗小鼠 CD16/CD32 鼠 Fc 阻断剂一起室温孵育 10 min, 然后加入 CD3 与 CD8 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, Staining buffer 洗细胞 2 次, 4 $^{\circ}$ C 固定破膜 30 min。Wash buffer 洗细胞 2 次后进行胞内细胞因子染色, 胞内抗体 CD4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 混合 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。Wash buffer 洗细胞后重悬细胞转移至流式管中, 通过流式细胞仪进行分析。

综上所述, 本申请获得的 mRNA 疫苗能够充分地激活免疫系统, 诱导高滴度的中和抗体以及细胞免疫, 取得了预料不到的技术效果。此外, VZV-trunc、VZV-mut-Leu、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile 引起的多种免疫应答均显著强于 VZV-2。而表现最为突出的 VZV-trunc 相较于 VZV-mut-Leu、VZV-mut-H362E-Leu、VZV-mut-Ile 以及 VZV-mut-H362E-Ile, 个体化差异更小, 引起的细胞免疫更强, 且总能引起相对更强的体液免疫反应。

权 利 要 求

1. 一种核酸分子, 其包含水痘-带状疱疹病毒(VZV)抗原肽编码序列, 所述抗原肽包含 VZV 糖蛋白 E(gE 蛋白)的胞外区和跨膜区; 所述胞外区包含所述 gE 蛋白的第 31-538 位的氨基酸, 所述跨膜区包含所述 gE 蛋白的第 539-559 位氨基酸, 所述氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号; 并且所述抗原肽相对于 SEQ ID NO.8 的氨基酸突变为或包含选自以下的一种或多种: S593L、S595L、T596L、H362E、T598L、S593I、S595I、T596I、T598I 以及 Del 560-623。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸分子, 所述 VZV gE 蛋白变体的氨基酸序列相对于 SEQ ID NO.8 包含或为以下突变中的任一种:

- 1) S593L、S595L、T596L 和 T598L;
- 2) H362E、S593L、S595L、T596L 和 T598L;
- 3) H362E、S593I、S595I、T596I 和 T598I;
- 4) S593I、S595I、T596I 和 T598I; 以及
- 5) Del 560-623;

并且, 其中氨基酸的位置以 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列为参比序列进行编号。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的核酸分子, 所述抗原肽进一步包含信号肽序列, 所述信号肽序列位于所述胞外区的 N 端一侧。

4. 根据权利要求 3 的核酸分子, 其中所述信号肽为 VZV gE 蛋白的信号肽, 优选地, 所述信号肽序列包含或为 SEQ ID NO.8 的第 1-30 位或 2-30 位氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的核酸分子, 其中所述抗原肽序列如 SEQ ID NO.13-17 中任一项所示, 或包含与如 SEQ ID NO.13-17 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的核酸分子, 其中包含 3'-聚腺苷酸序列或加尾信号序列。

7. 根据权利要求 6 所述的核酸分子, 所述 3'-聚腺苷酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示或包含与如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% 或 80% 序列同一性的核苷酸序列。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的核酸分子, 其包含 5' UTR 或 5' UTR 的编码序列, 所述 5'UTR 包含或为烟草蚀纹病毒 (TEV) 5' UTR。

9. 根据权利要求 8 所述的核酸分子, 其中所述 5'UTR 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.18

或 SEQ ID NO.10 所示或包含与如 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%序列同一性的核苷酸序列。

10.根据权利要求 1-9 任一项所述的核酸分子,其包含 3'UTR 或 3'UTR 的编码序列,所述 3'UTR 包含或为血红蛋白-1 (hHBA1)的 3'UTR。

11.根据权利要求 10 所述的核酸分子,其中所述 hHBA1 3'UTR 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示或与包含与如 SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列具有至少 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或 80%序列同一性的核苷酸序列。

12.根据权利要求 1-11 任一项所述的核酸分子,其核苷酸序列如 SEQ ID NO.2-7 中任一项所示,或包含与如 SEQ ID NO.2-7 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或 100%序列同一性的核苷酸序列。

13.根据权利要求 1-12 任一项所述的核酸分子,其为 mRNA 分子。

14.根据权利要求 1-13 任一项所述的核酸分子,所述 mRNA 进一步包含 5' 鸟苷帽子,其选自以下的任一项: m7Gppp(2'OMeA)pG、m7GpppApA、m7GpppApC、m7GpppApG、m7GpppApU、m7GpppCpA、m7GpppCpC、m7GpppCpG、m7GpppCpU、m7GpppGpA、m7GpppGpC、m7GpppGpG、m7GpppGpU、m7GpppUpA、m7GpppUpC、m7GpppUpG、m7GpppUpU、m7Gpppm6ApG、m7G_{3'}OmepppApA、m7G_{3'}OmepppApC、m7G_{3'}OmepppApU、m7G_{3'}OmepppApG、m7G_{3'}OmepppCpA、m7G_{3'}OmepppCpC、m7G_{3'}OmepppCpG、m7G_{3'}OmepppCpU、m7G_{3'}OmepppUpA、m7G_{3'}OmepppUpC、m7G_{3'}OmepppUpG、m7G_{3'}OmepppUpU、m7G_{3'}OmePppA_{2'}OmePpG、m7G_{3'}OmepppA_{2'}OmePpC、m7G_{3'}OmepppA_{2'}OmePpU、m7G_{3'}OmepppA_{2'}OmePpA、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmePpA、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmePpU、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmePpG、m7G_{3'}OmepppC_{2'}OmePpC、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmePpA、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmePpU、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmePpG、m7G_{3'}OmepppG_{2'}OmePpC、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmePpA、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmePpU、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmePpG、m7G_{3'}OmepppU_{2'}OmePpC, 优选为 m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。

15.根据权利要求 13 或 14 所述的核酸分子,其中所述核酸分子中的尿苷(U)中的一个或多个为经碱基修饰的尿苷;优选地,所述经碱基修饰的尿苷选自 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)及假尿苷中的任一种或多种;更优选地,所述核酸分子中的每个 U 均为 1-甲基假尿苷。

16.一种组合物,其包含脂质体以及权利要求 1-15 任一项所述的核酸分子。

17.根据权利要求 16 所述的组合物,其中所述脂质体为脂质纳米颗粒(LNP),按摩尔百分比计(mol%),所述 LNP 由 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% 表面活性剂组成。

18.根据权利要求 16 或 17 的组合物,所述脂质纳米颗粒由 50mol% SM-102, 10mol% DSPC, 38.5mol% 胆固醇和 1.5mol% DMG-PEG 组成。

19. 根据权利要求 16-18 任一项所述的组合物,所述脂质纳米颗粒中的阳离子叔胺与来自权利要求 1-15 中任一项所述的核酸分子的阴离子磷酸基团的摩尔比为约 3:1 至 7:1,例如为 6:1。

20.根据权利要求 16-19 任一项所述的组合物,其 pH 值与正常人体生理 pH 值相当,优选为约 7.3 至 7.5,例如为 7.4。

21.根据权利要求 16-20 任一项所述的组合物,其进一步包含 Tris-NaOAc 缓冲液和 8.7% 蔗糖。

22. 根据权利要求 16-21 任一项所述的组合物,所述核酸分子为序列如 SEQ ID NO.1-7 中任一项所示的 mRNA,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,所述 LNP 中的阳离子叔胺与来自所述核酸分子的阴离子磷酸基团的摩尔比为 6:1,并且所述组合物的 pH 值为 7.4。

23.根据权利要求 1-15 中任一项所述的抗原肽。

24.工程化细胞,其包含权利要求 1-15 中任一项所述的核酸分子,或权利要求 23 所述的抗原肽。

25.权利要求 1-15 任一项所述的核酸分子,权利要求 16-22 任一项所述的组合物,权利要求 23 所述的抗原肽,或权利要求 24 所述的工程化细胞在制备疫苗中的用途。

26.预防 VZV 感染或由 VZV 引起的症状的方法,包括给予受试者有效量的权利要求 1-15 任一项所述的核酸分子,权利要求 16-22 任一项所述的组合物,权利要求 23 所述的抗原肽,或权利要求 24 所述的工程化细胞,以诱导受试者体内针对水痘-带状疱疹病毒的免疫应答。