

自复制mRNA 基础知识手册



目录

不同体外转录(IVT) RNA的比较

自复制mRNA的作用机制

自复制mRNA的序列设计

自复制mRNA的制备流程

体外转录

RNA纯化

附录：自复制mRNA的临床研究进展

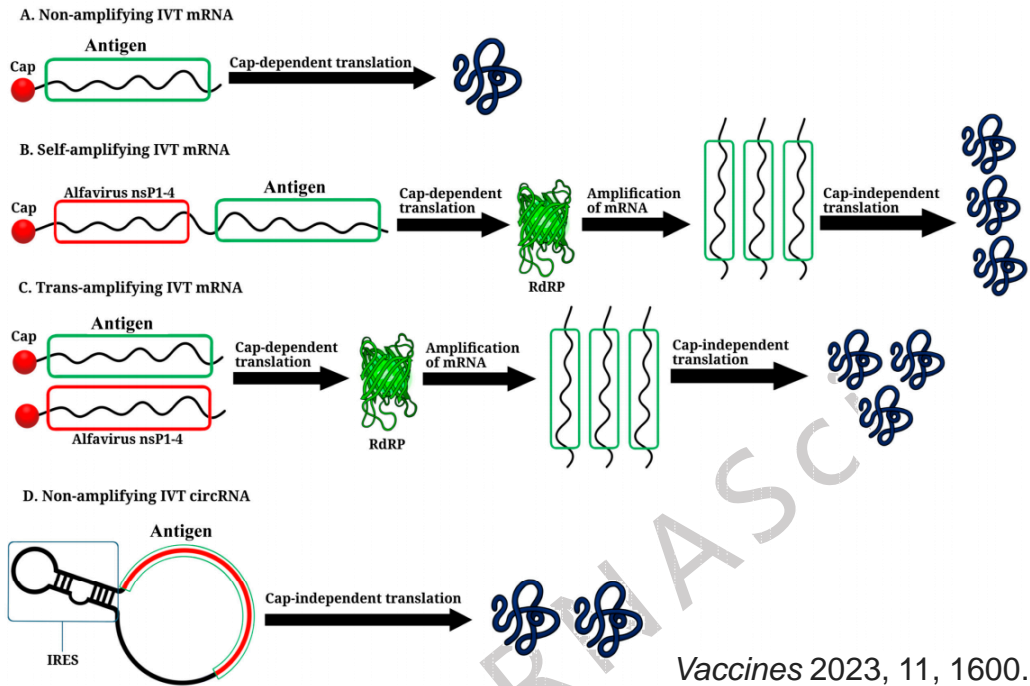
咨询电话：133 8033 2910
耀海生物技术(北京)有限公司

扫码关注



不同体外转录 (IVT) RNA的比较

不同IVT RNA的结构特征

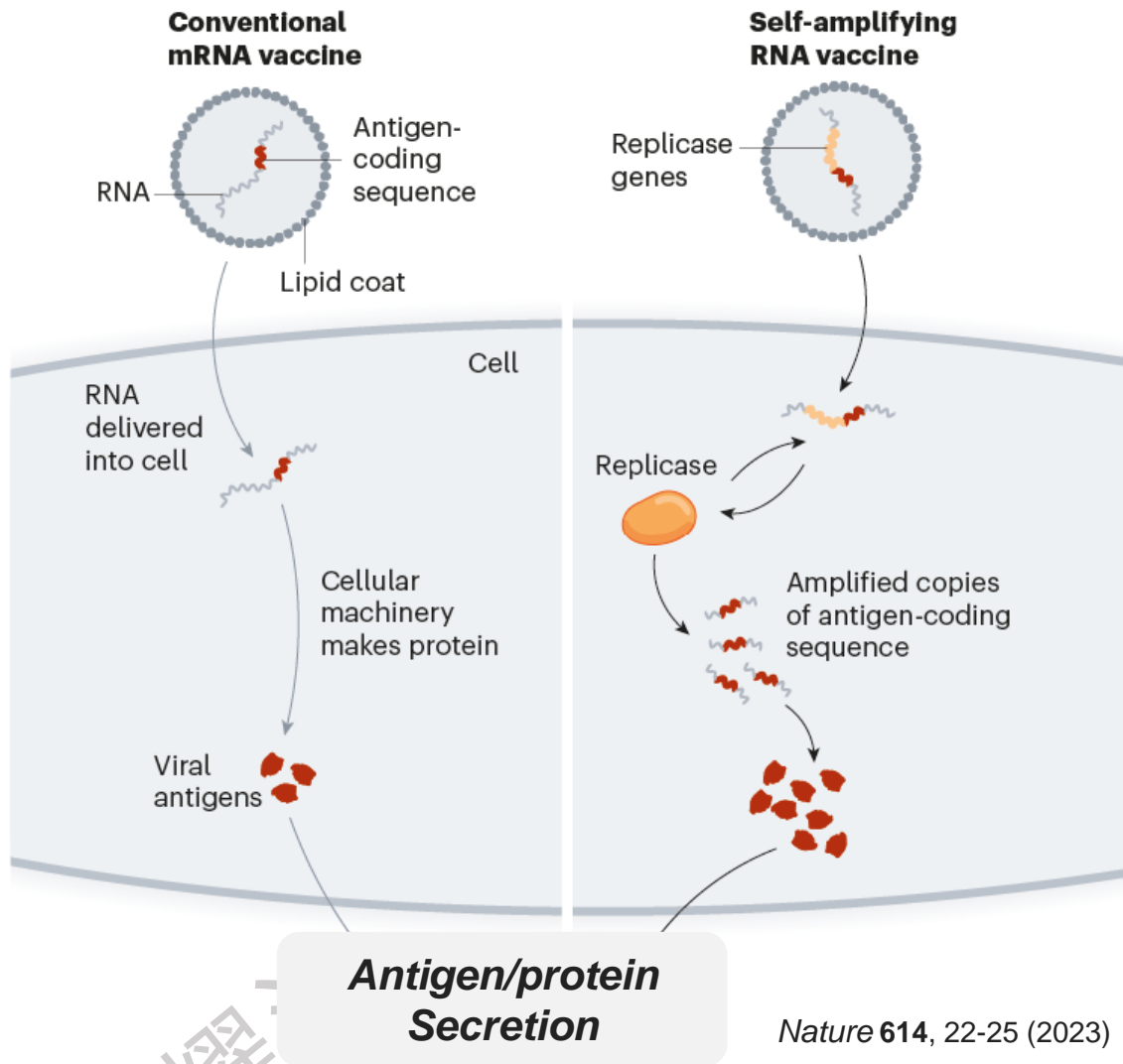


图示: 常规mRNA、自复制mRNA、反向扩增mRNA与环状RNA的比较

不同IVT RNA的表达特征

IVT RNA类型	常规mRNA	自复制mRNA	环状mRNA
结构特征	线性RNA 含5' UTR、目的基因、3' UTR和poly(A)尾	线性RNA 含5' UTR, 复制酶基因、目的基因、3' UTR和poly(A)尾	环状RNA 含IRES, 目的基因
蛋白翻译机制	帽结构与poly A尾巴	帽结构与poly A尾巴	内部核糖体结合位点 (IRES)
帽结构	Cap 1	Cap 1	无
Poly (A)	100 ~ 150 nt	100 ~ 150 nt	无
mRNA长度 (nt)	100 ~ 10,000	9000 ~ 12,000	1000 ~ 5000
RNA半衰期	较短	较长	中等
蛋白表达水平	较低	较高	中等
免疫原性	较低	较高	较低

自复制mRNA的作用机制



自复制mRNA的复制原理

1. 脂质纳米颗粒（LNP）等递送系统将自复制mRNA运送至细胞质；
2. 自复制mRNA在细胞内翻译产生复制酶复合体；
3. 复制酶以RNA正义链为模板合成互补的负义链RNA，然后以负义RNA作为模板，从基因组启动子序列转录完整RNA或从亚基因组启动子转录目标蛋白mRNA；
4. 扩增后的正义链RNA继续翻译复制酶并持续RNA的自扩增过程，亚基因组RNA作为转录本翻译产生目标蛋白质，如抗原等；
5. 基于少量自复制mRNA产生的大量蛋白质被分泌到胞外，发挥预期的生物学功能。

自复制mRNA的序列设计

自复制RNA骨架来源

甲病毒 (Alphavirus)

委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV, Venezuelan equine encephalitis virus)

辛德比斯病毒 (SINV, Sindbis virus)

塞姆利基森林病毒 (SFV, Semliki Forest virus)

基孔肯雅病毒 (CHIKV, Chikungunya virus)

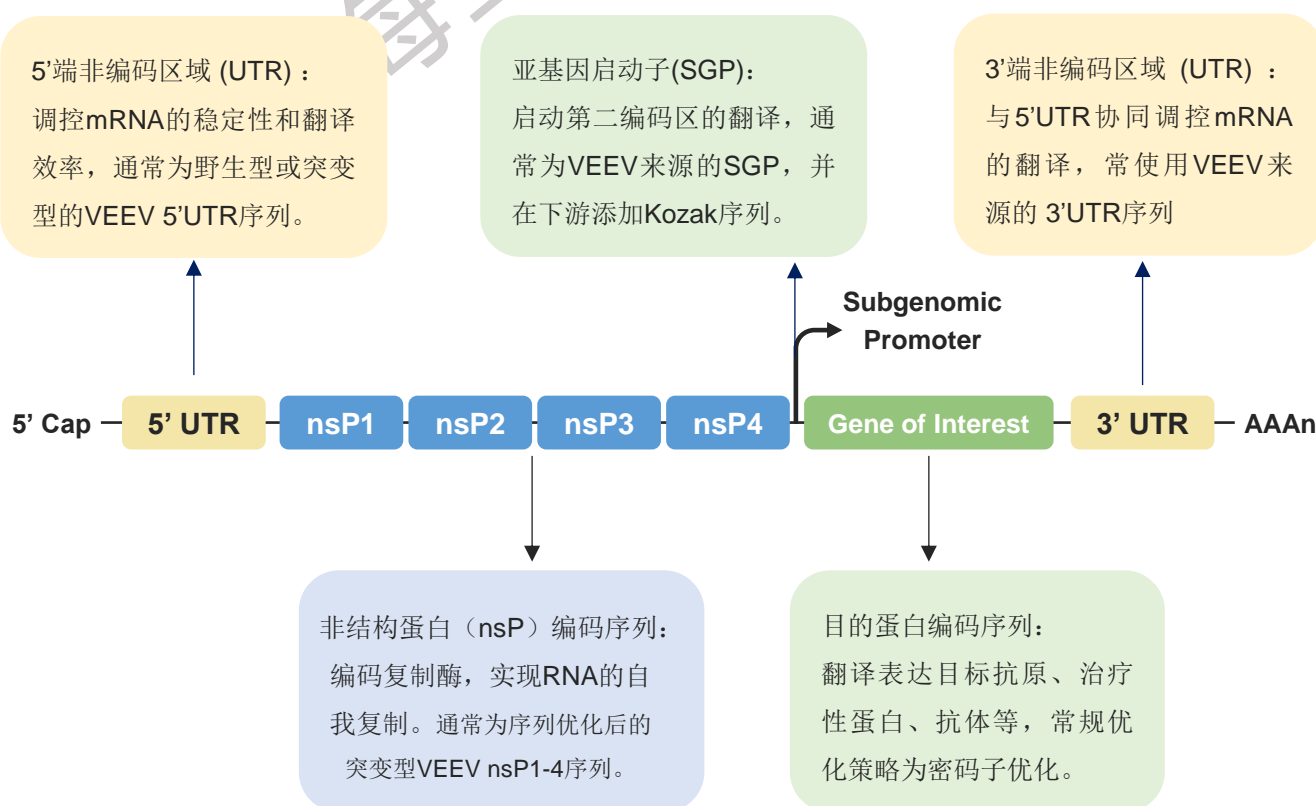
VEEV-SINV嵌合序列

黄病毒 (Flavivirus)

经典猪瘟病毒 (CSFV, Classical swine fever virus)

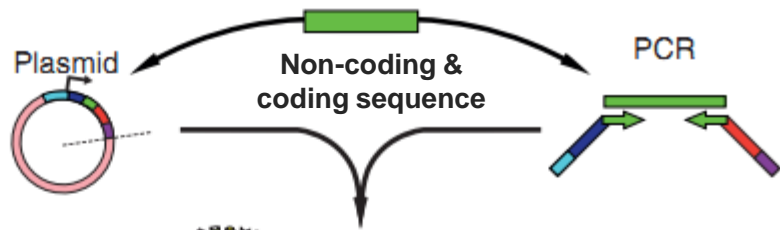
VEEV自复制骨架

委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) 是最常用的自复制mRNA骨架。首款在法规市场上市的自复制mRNA疫苗ARCT-154是由VEEV骨架设计而来，已于2023年获日本药监局PMDA批准上市。

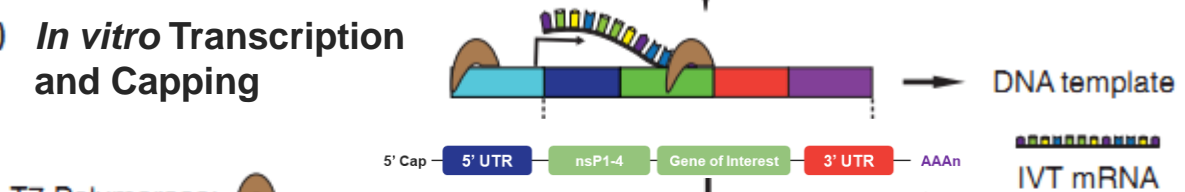


自复制mRNA的制备流程

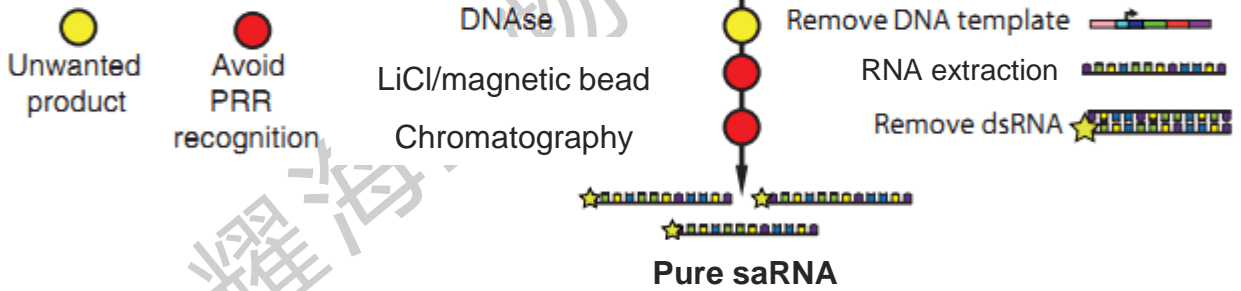
(A) Sequence Design



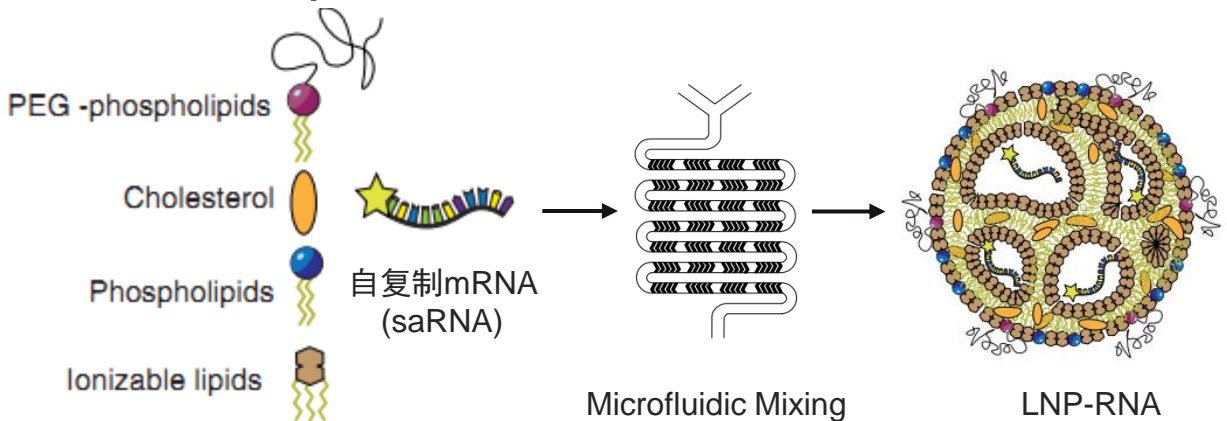
(B) *In vitro* Transcription and Capping



(C) Purification



(D) LNP-RNA Encapsulation



自复制mRNA的体外转录

体外转录反应组分

当前的体外转录（IVT）通常适用于常规mRNA（1000~4000 nt）的制备，未必适用于自复制mRNA（>9000 nt）。用于合成自复制mRNA的IVT反应体系需进行定制化开发和优化。

反应体系	各组分介绍
DNA模板	通常为带有相应启动子序列的线性化质粒或PCR产物，溶解在RNase-free H ₂ O中。
二硫苏糖醇（DTT）	DTT是一种还原剂，在转录过程中维持酶的活性。
RNase抑制剂	抑制RNase的活性，维持mRNA的稳定性。
T7 RNA聚合酶	与启动子序列对应的RNA聚合酶（T7, SP6等），催化DNA转录形成RNA。
醋酸钠（NaOAc）	Mg ²⁺ 是RNA聚合酶的辅因子，浓度过低会降低转录效率，浓度过高导致RNA降解。
NTP	NTP作为底物，是组成RNA的基本单元。
亚精胺	亚精胺能够稳定DNA-酶复合物，刺激转录反应；但过高浓度时存在抑制作用。
无机焦磷酸酶（PPase）	IVT反应中加入PPase能够避免无机焦磷酸离子（PPI）的累积，避免其与Mg ²⁺ 螯合形成沉淀，从而保证一定的游离Mg ²⁺ 。

体外转录反应体系

反应体系	推荐浓度 ^a	推荐浓度 ^b	推荐浓度 ^c	推荐浓度 ^d	推荐浓度 ^e
DNA模板	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
HEPES	40 mM	-	-	-	-
TRIS-HCl	-	40 mM pH 7.0	40 mM pH 7.0	40 mM pH 7.41	40 mM pH 7.0
二硫苏糖醇（DTT）	40 mM	10 mM	40 mM	40 mM	10 mM
RNase抑制剂	4 U	1 U/ µL	1 U/ µL	1 U/ µL	1 U/ µL
无机焦磷酸酶（PPase）	-	0.002 U/µL	0.002 U/µL	0.002 U/µL	0.002 U/µL
T7 RNA聚合酶	100 U	4 U/µL	4 U/µL	4 U/µL	4 U/µL
醋酸钠（NaOAc）	10 mM	-	-	-	-
Mg ²⁺	75 mM	46.8 mM	10 mM	10 mM	50.97 mM
NTP	10 mM	7.78 mM	7.78 mM	7.78 mM	7.78 mM
DMSO	-	10%	0	10%	10%
亚精胺	0.2 mM	2 mM	4 mM	2.27 mM	2 mM

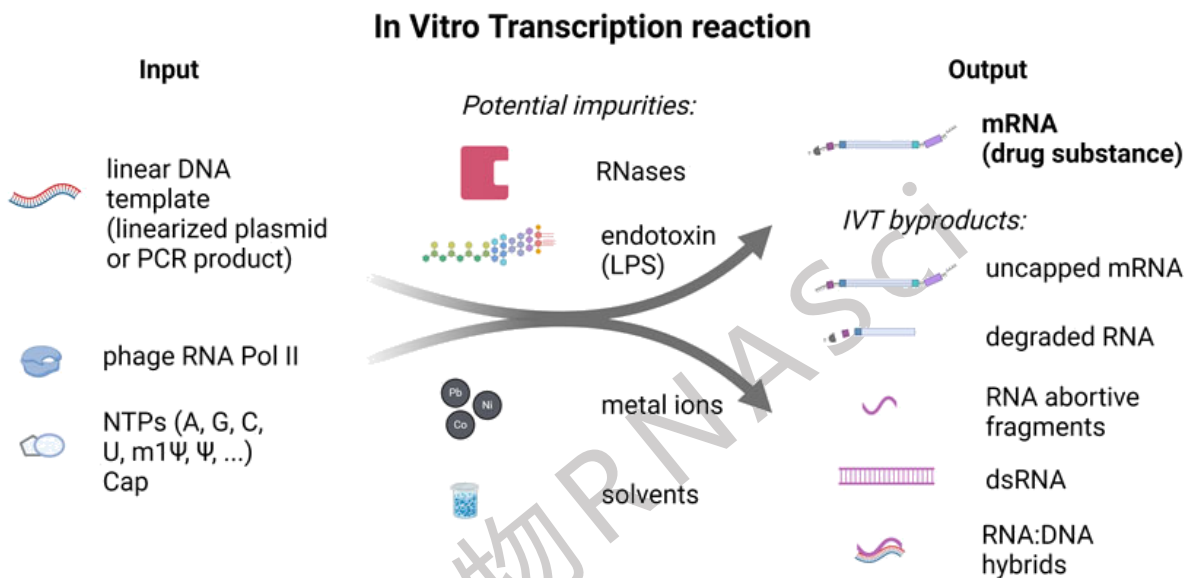
a: Robin J Shattock等优化了IVT体系，适用于高产量和高质量saRNA的合成；b-e: A.K. Blakney等开发的IVT体系，适用于高产量(b), 高质量(c), 低dsRNA(d), 兼具产量和质量(e)的saRNA合成。

自复制mRNA的纯化方法

IVT mRNA杂质

体外转录（IVT）是合成mRNA和自复制mRNA的优选方法。IVT反应体系中除含有所需的mRNA外，还包含模板DNA、NTP、酶、金属离子等未完全消耗的底物、以及IVT反应过程形成的副产物，如双链RNA（dsRNA）和截断的RNA片段等杂质。

选择合适的纯化方法制备高纯度的mRNA是保证样品质量和安全性的关键。



IVT mRNA纯化方法

氯化锂（LiCl）沉淀法

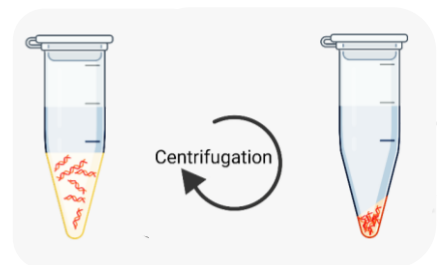
纯化原理：

在一定的pH条件下，锂离子能降低RNA分子间的同电相斥，实现RNA的聚集沉淀。沉淀后的RNA可以通过离心的方式分离，随后溶解得到纯的RNA。

氯化锂沉淀法能够去除蛋白、盐、NTP等杂质，纯化后的RNA样品可用于加帽/加尾反应、细胞转染等实验。

操作步骤：

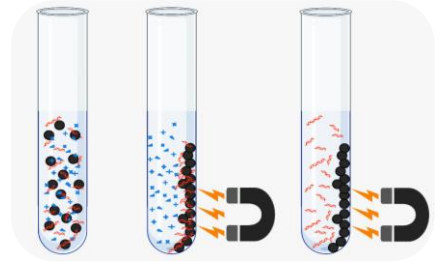
- 1) 取IVT产物加入LiCl溶液，使得 mRNA溶液中LiCl最终浓度达到2.5M；
- 2) 将反应在-20°C下冷却30min；
- 3) 在离心机中以最高速度离心 15min，弃去上清液；
- 4) 用预冷的70%乙醇洗涤沉淀，以除去残留的盐；离心去除乙醇，开盖静置使乙醇完全挥发；
- 5) 将mRNA沉淀重悬于RNase-free溶剂中，注意不要让沉淀完全干燥，否则会变得难以重悬。



磁珠纯化法

纯化原理:

将羧基、oligo dT等功能性基团连接至磁珠，能够利用mRNA与羧基、oligo dT的结合特性富集mRNA。其中羧基基团能够与mRNA通过静电作用结合，oligo dT通过亲和特性与mRNA结合。磁珠法能够去除蛋白、盐、NTP等杂质，纯化后的RNA样品可用于加帽/加尾反应、细胞转染实验。



色谱纯化法

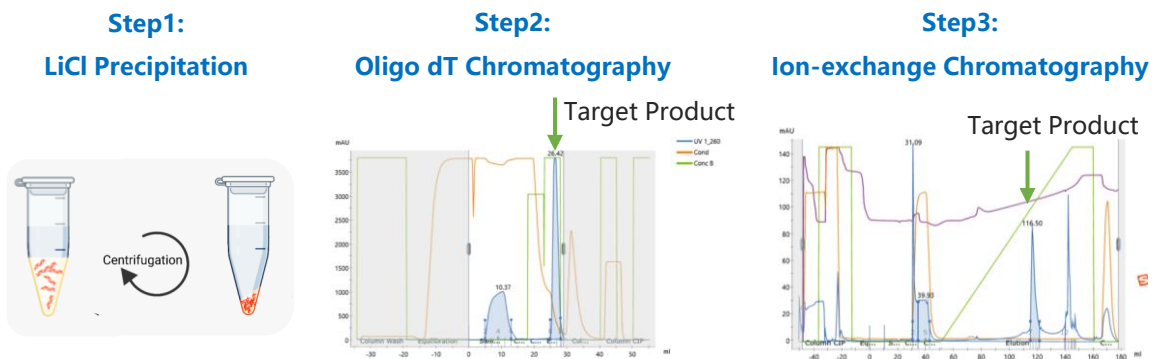
纯化原理:

色谱法包括亲和层析、离子交换层析、体积排阻层析、疏水层析等，通过mRNA体积大小、或功能基团与mRNA或杂质间的亲和、电荷、疏水作用差异纯化mRNA。色谱纯化被认为是高纯度mRNA制备的金标准。

色谱法能够去除dsRNA、截断的RNA片段等影响mRNA免疫原性的杂质。色谱法是GMP级、高纯度mRNA样品纯化的首选方案。色谱纯化的mRNA样品可用于动物研究。

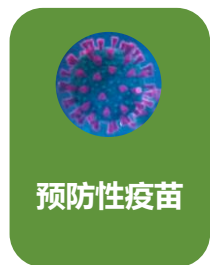
操作步骤:

- 1) 氯化锂沉淀法富集体外转录的mRNA产物，并将粗纯的mRNA样品以1: 9比例加入高盐上样缓冲液（10 mM TE, 0.5 M NaCl）中；
- 2) 亲和层析二次纯化mRNA：将mRNA样品上样至Oligo dT层析柱，采用0.5 M NaCl、0.1 M NaCl逐级梯度洗脱，最后经10 mM TE缓冲液洗脱mRNA，获得含mRNA的样品；
- 3) 离子交换层析三次纯化mRNA：将亲和层析收集的mRNA样品上样至DEAE阴离子柱，通过淋洗液（50 mM Tris, 3 M NaCl, 20 mM EDTA）洗去未结合的杂质，然后经洗脱液（20 mM Tris, 20 mM BTP, 50 mM NaCl, 20 mM甘氨酸）进行pH梯度洗脱，所述pH梯度为pH 7.2-pH 11，进一步去除mRNA中的dsRNA杂质，收集高度纯化的mRNA样品。



自复制mRNA的临床研究进展

自复制mRNA的应用场景



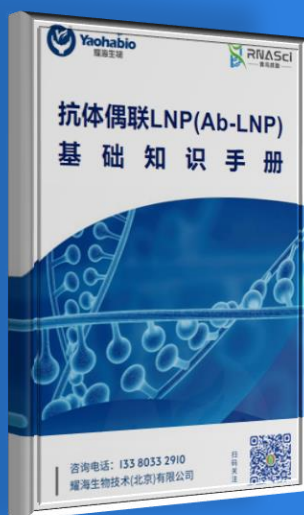
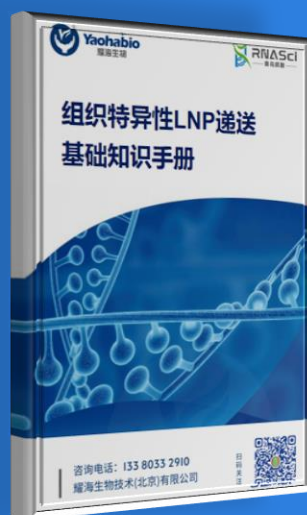
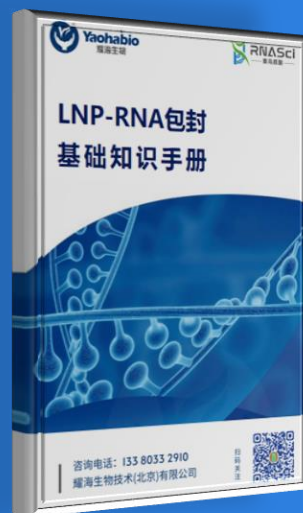
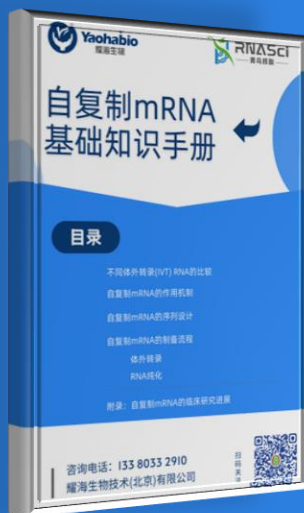
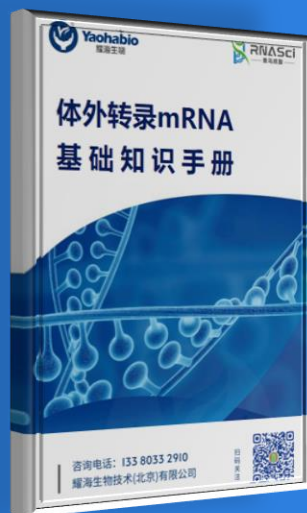
自复制mRNA临床管线

2023年11月，日本厚生劳动省批准了由CSL和Arcturus Therapeutics联合开发的自扩增RNA (saRNA) COVID-19疫苗ARCT-154，标志着法规市场首款自复制mRNA疫苗的上市。

目前，已有多款saRNA疫苗/治疗性药物发展至临床阶段：

应用领域	自复制RNA管线	适应症	阶段	企业
传染病疫苗 -新冠	ARCT-154	新冠 (Covid-19)	获批上市	Arcturus
	ARCT-2301	新冠 (Covid-19 Ancestral/Omicron BA.4/5)	phase 3	Arcturus
	ARCT-2303	新冠 (Covid-19 XBB.1.5)	phase 3	Arcturus
	LNP-nCoVsaRNA	新冠 (Covid-19)	phase 2	Imperial College London
	CORAL	新冠 (Covid-19)	phase 1	Gritstone
	BNT162c2	新冠 (Covid-19)	phase 2, 终止	BioNTech
	CoV2 SAM	新冠 (Covid-19)	phase 1	GSK
	ARCT-2138	流感 (Influenza)	phase 1	Arcturus
传染病疫苗 -其他	ARCT-2304	流感 (Influenza)	phase 1	Arcturus
	PF-07852352	流感 (Influenza)	phase 1	Pfizer
	JCXH-105	带状疱疹 (Shingles)	Phase 1	嘉晨西海
	GSK4108771A	单纯疱疹 (HSV-2)	Phase 1	GSK
	RG SAM	狂犬病 (Rabies)	Phase 1	GSK
癌症治疗	GRT-R902	癌症 (Cancer)	phase 2/3	Gritstone
	GRT-R904	癌症 (Cancer)	Phase 1/2	Gritstone
	JCXH-211	癌症 (Cancer)	Phase 1	嘉晨西海

IVT RNA & LNP 系列手册



联系方式

电话：133 8033 2910

邮箱：CRO@yaohaibio.cn

网站：www.yaohaibio-pharma.com

地址：北京市大兴区生物医药基地好景象科技园C座4楼

