202334080

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202334080 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：111142677 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 11 月 08 日

(51)Int. Cl.： *C07C229/12 (2006.01)* *A61K31/7105 (2006.01)*
A61K47/18 (2006.01) *A61K9/127 (2006.01)*
A61K9/51 (2006.01)

(30)優先權：2021/11/08 美國 63/277,055

(71)申請人：美商歐納醫療公司 (美國) ORNA THERAPEUTICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：霍哈塔 艾倫 T HORHOTA, ALLEN T. (US)；楊 J YANG, JUNGHOON (US)；考夫曼 凱文 KAUFFMAN, KEVIN (US)；巴恩斯 托馬斯 BARNES, THOMAS (AU)；魏索霍夫特 羅伯特 亞歷山大 WESSELHOEFT, ROBERT ALEXANDER (US)；貝克 艾咪 M BECKER, AMY M. (US)；莫茲 格雷戈里 MOTZ, GREGORY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：107 項 圖式數：79 共 528 頁

(54)名稱

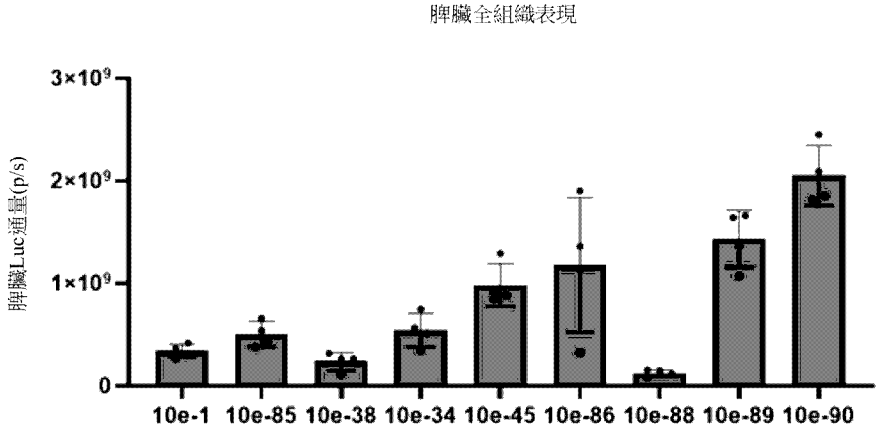
用於遞送環狀聚核苷酸之脂質奈米粒子組合物

(57)摘要

本文揭示一種新穎脂質，其可與其他脂質組分，諸如輔助脂質、結構性脂質及膽固醇組合使用，形成脂質奈米粒子，用於在活體外及活體內遞送治療劑，諸如核酸(例如環狀聚核苷酸)。

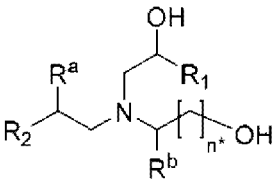
Disclosed herein are novel lipids that can be used in combination with other lipid components, such as helper lipids, structural lipids, and cholesterols, to form lipid nanoparticles for delivery of therapeutic agents, such as nucleic acids (e.g.,circular polynucleotides), both in vitroand in vivo.

指定代表圖：



【圖76】

特徵化學式：



式(13*)

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於遞送環狀聚核苷酸之脂質奈米粒子組合物

【英文發明名稱】

LIPID NANOPARTICLE COMPOSITIONS FOR DELIVERING CIRCULAR POLYNUCLEOTIDES

【中文】

本文揭示一種新穎脂質，其可與其他脂質組分，諸如輔助脂質、結構性脂質及膽固醇組合使用，形成脂質奈米粒子，用於在活體外及活體內遞送治療劑，諸如核酸(例如環狀聚核苷酸)。

【英文】

Disclosed herein are novel lipids that can be used in combination with other lipid components, such as helper lipids, structural lipids, and cholesterols, to form lipid nanoparticles for delivery of therapeutic agents, such as nucleic acids (*e.g.*, circular polynucleotides), both *in vitro* and *in vivo*.

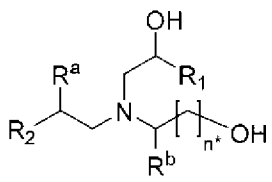
【指定代表圖】

圖76

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



式(13*)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於遞送環狀聚核苷酸之脂質奈米粒子組合物

【英文發明名稱】

LIPID NANOPARTICLE COMPOSITIONS FOR DELIVERING CIRCULAR POLYNUCLEOTIDES

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於新穎脂質，其可與其他脂質組分，諸如輔助脂質、結構性脂質及膽固醇組合使用，形成脂質奈米粒子，用於在活體外及活體內遞送治療劑，諸如核酸(例如環狀聚核苷酸)。

【先前技術】

【0002】 在過去的幾十年中，核酸療法迅速擴展且成為治療廣泛多種疾病之基礎。可用的核酸療法包括但不限於使用DNA或病毒載體將所需遺傳資訊插入宿主細胞及/或構築用於編碼治療性蛋白質之RNA中。DNA及病毒載體遞送有其自身的挫折及挑戰，使其對RNA療法不太有利。舉例而言，在一些情況下，引入之DNA可能無意中插入完整基因中，且導致阻礙或甚至完全消除內源基因之功能的突變，從而導致必需酶之產生消除或有害地減少或中斷調節細胞生長之關鍵基因。基於病毒載體之療法可導致不良免疫反應。相較於DNA或病毒載體，RNA為實質上更安全且更有效的基因治療劑，因為其能夠在細胞核外編碼蛋白質以執行其功能。由此，RNA不會存在穩定整合至經轉染細胞之基因體中的風險。

【0003】 RNA療法習知地由工程改造線性信使RNA (mRNA)組成。雖然比DNA或病毒載體更有效，但線性mRNA在穩定性、免疫原性、轉

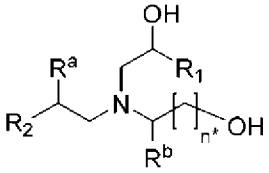
譯效率及遞送方面有其自身的一系列挑戰。由於線性mRNA帽存在的挑戰，此等挑戰中之一些可能導致線性mRNA之尺寸限制及/或破壞。為了克服此等限制，可使用環狀聚核苷酸或環狀RNA。由於為共價閉合的連續環，環狀RNA適用於設計及生產穩定形式之RNA。RNA分子環化為RNA結構及功能研究提供優勢，尤其在易於以非活性構形發生摺疊之分子的情況下(Wang及Ruffner，1998)。環狀RNA亦可尤其引起關注且適用於活體內應用，尤其在基於RNA之基因表現控制及包括蛋白質替代療法及疫苗接種之療法的研究區域中。

【0004】 進一步為了促進有效遞送RNA聚核苷酸，可使用奈米粒子遞送系統。本文揭示之本發明提供一種使用經工程改造之聚核苷酸及脂質奈米粒子組合物之穩固治療劑(therapeutic)，其包含新穎脂質。

【發明內容】

【0005】 本申請案提供可離子化脂質及相關轉移媒劑、組合物及方法。轉移媒劑可包含可離子化脂質(例如本文揭示之可離子化脂質)、經PEG修飾之脂質及/或結構性脂質，由此形成囊封治療劑(例如RNA聚核苷酸，諸如環狀RNA)之脂質奈米粒子。包含此類環狀RNA及轉移媒劑之醫藥組合物尤其適合於活體內在免疫細胞中之有效蛋白質表現。本申請案亦提供前驅體RNA及適用於產生前驅或環狀RNA之物質，該等RNA具有改良的環化效率及/或與有效環狀RNA純化方法相容。

【0006】 在一個態樣中，本文提供一種由式(13*)表示之可離子化脂質：



式(13*)

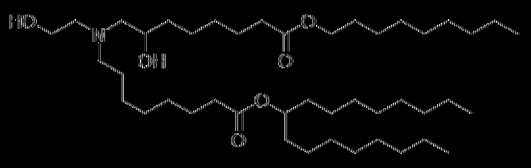
或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

n*為1至7之間的整數；

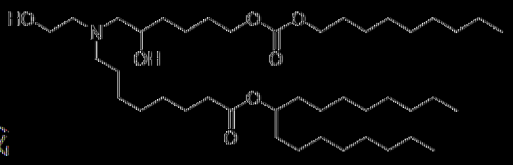
R^a為氫或羥基；

R^b為氫或C_1-C_6烷基；

R_1及R_2各自獨立地為視情況經一或多個選自以下之取代基取代之直鏈或分支鏈C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基或C_1-C_{30}雜烷基：側氧基、鹵基、羥基、氰基、烷基、烯基、醛、雜環基烷基、羥烷基、二羥烷基、羥基烷基胺基烷基、胺基烷基、烷胺基烷基、二烷胺基烷基、(雜環基)(烷基)胺基烷基、雜環基、雜芳基、烷基雜芳基、炔基、烷氧基、胺基、二烷胺基、胺基烷基羰基胺基、胺基羰基烷胺基、(胺基羰基烷基)(烷基)胺基、烯基羰基胺基、羥基羰基、烷基氧基羰基、烷基羰氧基、烷基碳酸酯、烯氧基羰基、烯基羰氧基、烯基碳酸酯、炔氧基羰基、炔基羰氧基、炔基碳酸酯、胺基羰基、胺基烷基胺基羰基、烷基胺基烷基胺基羰基、二烷基胺基烷基胺基羰基、雜環基烷基胺基羰基、(烷胺基烷基)(烷基)胺基羰基、烷基胺基烷基羰基、二烷基胺基烷基羰基、雜環基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基巰基、烷基巰基烷基、烷基磺醯基及烷基磺烷基；



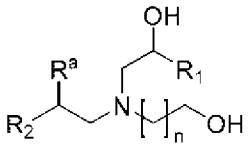
其限制條件為該可離子化脂質不為



或 。

[0007] 在一些實施例中，R^b為C_1-C_6烷基。

[0008] 在一些實施例中，R^b為H，且可離子化脂質由式(13)表示：

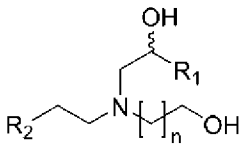


式(13)

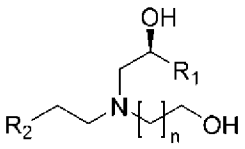
其中n為1至7之間的整數。

【0009】 在一些實施例中，n為1、2、3或4。

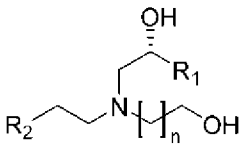
【0010】 在一些實施例中，R_a為氫。在一些實施例中，可離子化脂質由式(13a-1)、式(13a-2)或式(13a-3)表示：



式(13a-1)

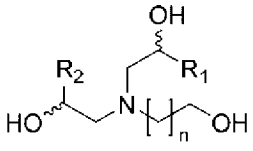


式(13a-2)

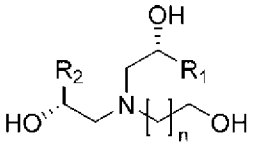


式(13a-3)

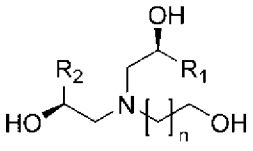
【0011】 在一些實施例中，R_a為羥基。在一些實施例中，可離子化脂質由式(13b-1)、式(13b-2)或式(13b-3)表示：



式(13b-1)

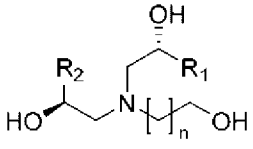


式(13b-2)

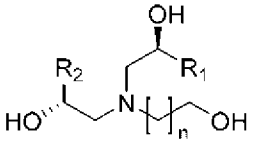


式(13b-3)

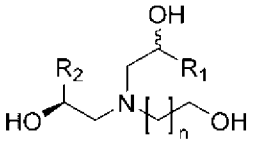
【0012】 在一些實施例中，可離子化脂質由式(13b-4)、式(13b-5)、式(13b-6)、式(13b-7)、式(13b-8)或式(13b-9)表示：



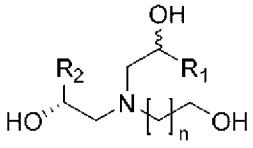
式(13b-4)



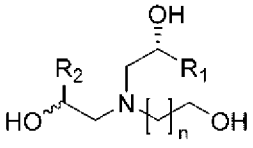
式(13b-5)



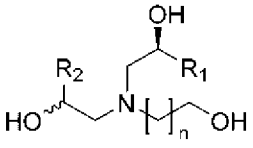
式(13b-6)



式(13b-7)



式(13b-8)



式(13b-9)

【0013】 在一些實施例中，R_1及R_2獨立地為視情況經一或多個選自以下之取代基取代之直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基或C_1-C_{20}雜烷基：C_1-C_{20}烷氧基、C_1-C_{20}烷基氧基羰基、C_1-C_{20}烷基羰氧基、C_1-C_{20}烷基碳酸酯、C_2-C_{20}烯氧基羰基、C_2-C_{20}烯基羰氧基、C_2-C_{20}烯基碳酸酯、C_2-C_{20}炔氧基羰基、C_2-C_{20}炔基羰氧基及C_2-C_{20}炔基碳酸酯。

【0014】 在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者為未經取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_6-C_{30}雜烷基。在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者為經-OC(O)R^6、-C(O)OR^6或-OC(O)OR^6取代之直鏈C_1-C_{12}烷基，其中各R^6獨立地為直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。在一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地為經-OC(O)R^6、-C(O)OR^6或-OC(O)OR^6取代之直鏈C_1-C_{12}烷基，其中各R^6獨立地為直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。

【0015】 在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者選自：

-$(CH_2)_q$C(O)O$(CH_2)_r$CH(R^8)(R^9)、-$(CH_2)_q$OC(O)$(CH_2)_r$CH(R^8)(R^9)及-$(CH_2)_q$OC(O)O$(CH_2)_r$CH(R^8)(R^9)，其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【0016】 在一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地選自：

-$(CH_2)_q$C(O)O$(CH_2)_r$CH(R^8)(R^9)、-$(CH_2)_q$OC(O)$(CH_2)_r$CH(R^8)(R^9)及-$(CH_2)_q$OC(O)O$(CH_2)_r$CH(R^8)(R^9)，

其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【0017】在一些實施例中，R_1為未經取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基。在一些實施例中，R_1為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。在一些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。在一些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。在一些實施例中，其中$R_2$為未經取代之直鏈或分支鏈$C_6$-$C_{30}$烷基。在一些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。在一些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。在一些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。

【0018】在一些實施例中，q為1至6之間的整數。在一些實施例中，q為3、4、5或6。在一些實施例中，r為0。在一些實施例中，r為1至6之間的整數。在一些實施例中，r為1。在一些實施例中，r為2。

【0019】在一些實施例中，R^8為H。在一些實施例中，R^8為R^{10}。

【0020】在一些實施例中，R^9及R^{10}各自獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基。在一些實施例中，R^9及R^{10}各自獨立地為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。在一些實施例中，R^9及R^{10}各自獨立地為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【0021】在一些實施例中，R_1及R_2各自為-$(CH_2)_m$-L-R'，其中：

m為0至10之整數；

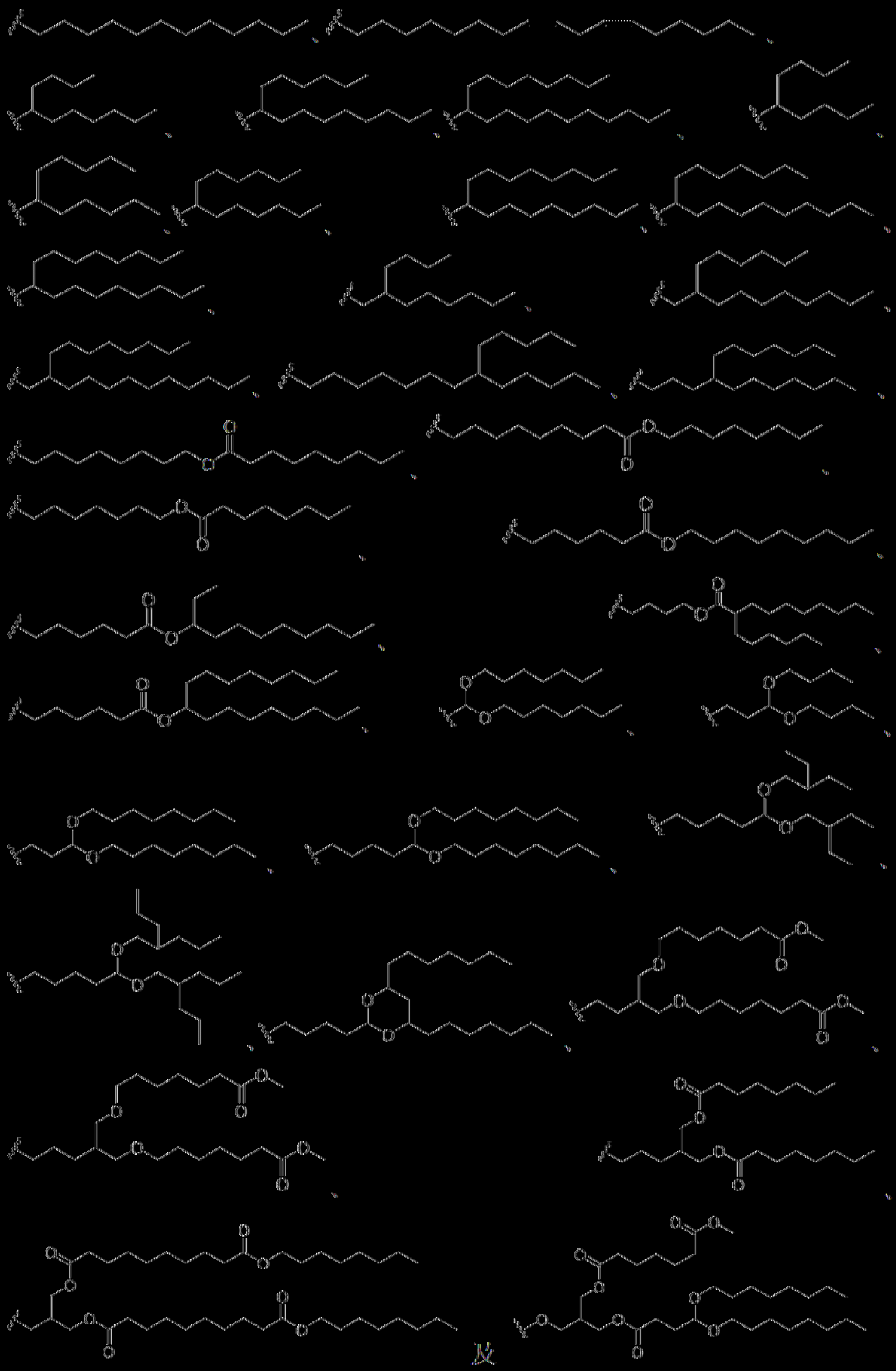
L為不存在、-C(H)(R^L)-*、-OC(O)-*或-C(O)O-*，其中「-*」指示與R'之連接點；

R'選自由以下組成之群：C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基、C_1-C_{30}烷氧基、2-30員伸雜烷基及3-12員雜環基，其中2-30員伸雜烷基視情況經一或多個R''取代，且3-12員雜環基視情況經一或多個C_1-C_{30}烷基取代；

R^L選自由以下組成之群：C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基、C_1-C_{30}烷氧基、2-30員伸雜烷基，其中3-12員伸雜烷基視情況經一或多個R''取代，

R''各自獨立地選自由以下組成之群：側氧基、C_1-C_{30}烷氧基、-C(O)-C_1-C_{30}烷基、-C(O)-C_1-C_{30}烷氧基及-C(O)-C_1-C_{30}伸烷基-C(O)-C_1-C_{30}烷氧基。

【0022】 在一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地選自由以下組成之群：

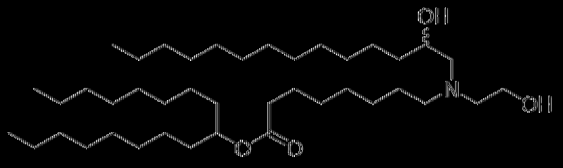
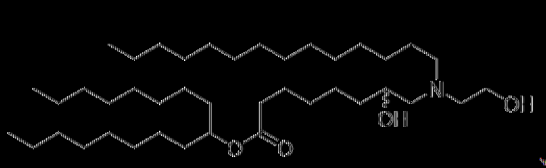
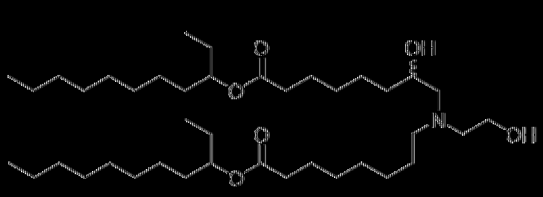
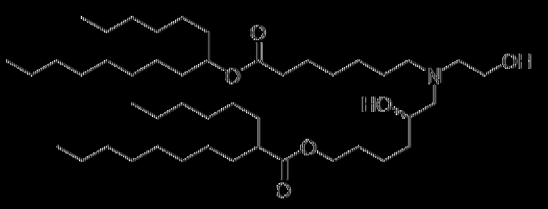
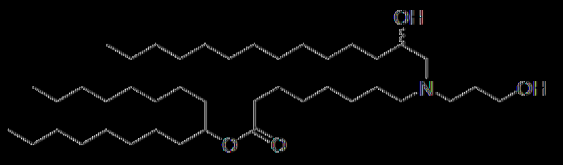
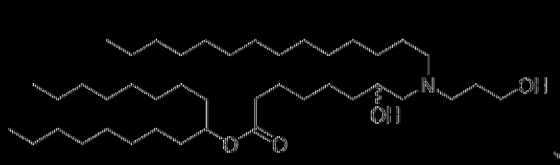
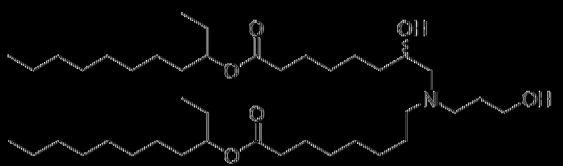
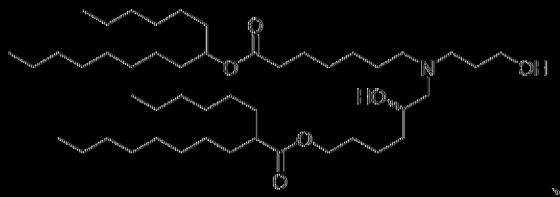
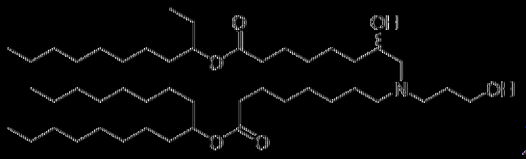
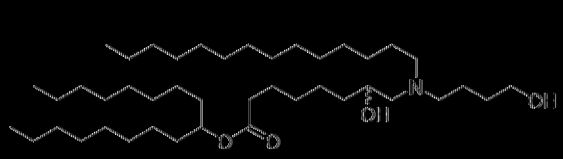


及

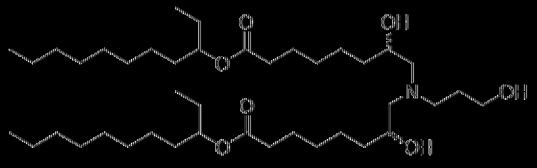
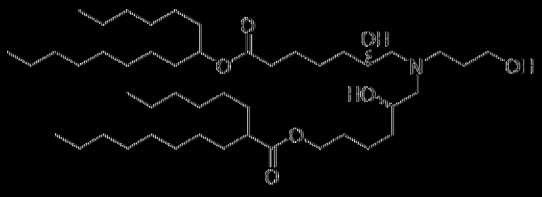
。

[0023] 在一些實施例中，R_1及R_2相同。在一些實施例中，R_1及R_2不同。

[0024] 在一些實施例中，可離子化脂質選自由以下組成之群：


、

、

、

、

、

、

、

、

及

。

[0025] 在一些實施例中，可離子化脂質選自由以下組成之群：


及

。

[0026] 在一些實施例中，可離子化脂質選自表10c。

[0027] 在另一態樣中，本發明提供一種包含轉移媒劑之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含上文描述之可離子化脂質。

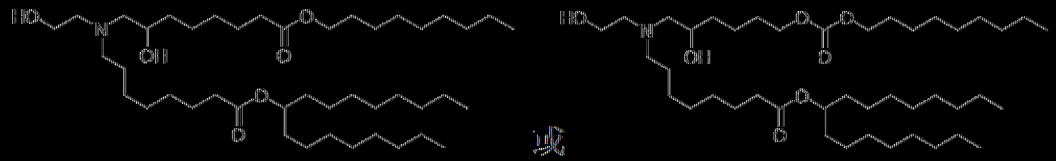
[0028] 在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含RNA聚核苷酸。

在一些實施例中，RNA紫核苷酸為直鏈或環狀RNA紫核苷酸。在一些實施例中，RNA紫核苷酸為環狀RNA紫核苷酸。

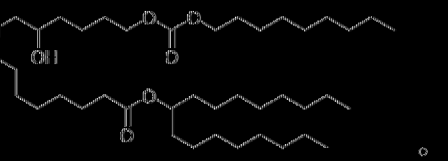
[0029] 在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：

a. RNA紫核苷酸，其中該RNA紫核苷酸為環狀RNA紫核苷酸，及

b. 包含選自以下之可離子化脂質之轉移媒劑：



或



。

[0030] 在一些實施例中，轉移媒劑包含奈米粒子，諸如脂質奈米粒子、核-殼奈米粒子、可生物降解奈米粒子、可生物降解脂質奈米粒子、紫合物奈米粒子或可生物降解紫合物奈米粒子。

[0031] 在一些實施例中，RNA紫核苷酸囊封於轉移媒劑中。在一些實施例中，RNA紫核苷酸囊封於轉移媒劑中，其中囊封效率為至少80%。

[0032] 在一些實施例中，環狀RNA紫核苷酸包含第一表現序列。在一些實施例中，第一表現序列編碼治療性蛋白質。在一些實施例中，第一表現序列編碼細胞介素或其功能片段。在其他實施例中，第一表現序列編碼轉錄因子。在其他實施例中，第一表現序列編碼免疫檢查點抑制劑。在其他實施例中，第一表現序列編碼嵌合抗原受體(CAR)。

[0033] 在一些實施例中，環狀RNA紫核苷酸按以下次序包含：(a) 5'增強型外顯子元件，(b)核心功能元件，及(c) 3'增強型外顯子元件。在一些實施例中，核心功能元件包含轉譯起始元件(translation initiation element；TIE)。在一些實施例中，TIE包含非轉譯區(UTR)或其片段。在一些實施例中，UTR或其片段包含IRES或其核IRES。在一些實施例中，

TIE包含適體複合物，視情況其中適體複合物包含至少兩種適體。

【0034】 在一些實施例中，核心功能元件包含編碼區。在一些實施例中，編碼區編碼治療性蛋白質。在一些實施例中，治療性蛋白質為嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor；CAR)。

【0035】 在一些實施例中，核心功能元件包含非編碼區。

【0036】 在一些實施例中，本文所揭示之醫藥組合物中所包含之RNA聚核苷酸的長度為約100nt至約10,000nt。在一些實施例中，RNA聚核苷酸之長度為約100nt至約15,000nt。

【0037】 在一些實施例中，本文揭示之醫藥組合物中之轉移媒劑進一步包含結構性脂質及經PEG修飾之脂質。

【0038】 在一些實施例中，相較於缺乏結構性脂質之對照轉移媒劑，結構性脂質與C1q結合及/或促進包含該脂質之轉移媒劑與C1q的結合，及/或相較於缺少結構性脂質之對照轉移媒劑，結構性脂質增加免疫細胞中C1q結合轉移媒劑之攝取。在一些實施例中，其中免疫細胞為T細胞、NK細胞、NKT細胞、巨噬細胞或嗜中性球。在一些實施例中，結構性脂質為膽固醇。在一些實施例中，結構性脂質為β-植物固醇。在一些實施例中，結構性脂質不為β-植物固醇。

【0039】 在一些實施例中，經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基胺基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DOMG或PEG-1。在一些實施例中，經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG(2000)。

【0040】 在一些實施例中，轉移媒劑進一步包含輔助脂質。在一些

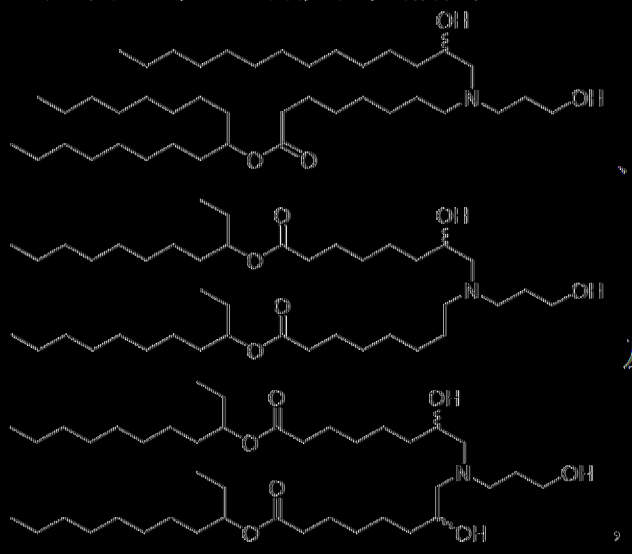
實施例中，輔助脂質為DSPC或DOPE。

[0041] 在一典實施例中，本文揭示之醫藥組合物中所包含之轉移媒劑包含DSPC、膽固醇及DMG-PEG(2000)。

[0042] 在一典實施例中，按莫耳比計，轉移媒劑包含約0.5%至約4%之經PEG修飾之脂質。在一典實施例中，按莫耳比計，轉移媒劑包含約1%至約2%之經PEG修飾之脂質。

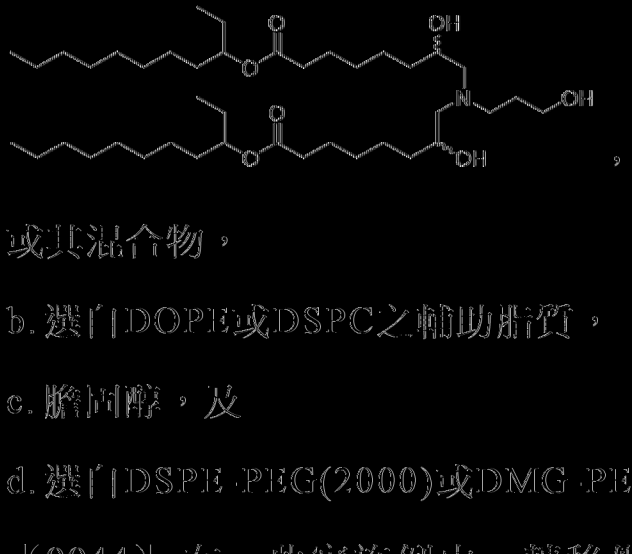
[0043] 在一典實施例中，轉移媒劑包含：

a. 選自以下之可離子化脂質：



、

及



，

或其混合物，

b. 選自DOPE或DSPC之輔助脂質，

c. 膽固醇，及

d. 選自DSPE-PEG(2000)或DMG-PEG(2000)之PEG-脂質。

[0044] 在一典實施例中，轉移媒劑包含可離子化脂質、輔助脂質、膽固醇及PEG-脂質，可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。在一典實施例中，可離子化脂質、輔助脂質、膽固醇及PEG-

脂質中之各者之莫耳比在陳述值之10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%或0.01%內。

【0045】在一些實施例中，轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。在一些實施例中，可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為約62:4:33:1。在一些實施例中，可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為約53:5:41:1。

【0046】在一些實施例中，轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。在一些實施例中，可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約50:10:38.5:1.5。在一些實施例中，可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約41:12:45:2。在一些實施例中，可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2。

【0047】在一些實施例中，轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

【0048】在一些實施例中，轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及C14-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:C14-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

【0049】在一些實施例中，轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

【0050】在一些實施例中，本發明之醫藥組合物之脂質與磷酸酯(IL:P)莫耳比為約3至約9，諸如約3、約4、約4.5、約5、約5.5、約5.7、約6、約6.2、約6.5或約7。

【0051】在一些實施例中，轉移媒劑經調配以用於RNA聚核苷酸之胞內體釋放。在一些實施例中，轉移媒劑能夠與脂蛋白元E (APOE)結合或實質上不含APOE結合位點。在一些實施例中，轉移媒劑能夠依賴低密度脂蛋白受體(low density lipoprotein receptor；LDLR)攝取或不依賴LDLR攝取至細胞中。

【0052】在一些實施例中，轉移媒劑之直徑小於約120 nm，且/或不形成直徑超過300 nm之聚集物。

【0053】在一些實施例中，本發明之醫藥組合物實質上不含線性RNA。

【0054】在一些實施例中，進一步包含以可操作方式連接至轉移媒劑之靶向部分。在一些實施例中，靶向部分特異性或間接結合免疫細胞抗原，其中免疫細胞抗原為選自由以下組成之群的T細胞抗原：CD2、

CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、β7整合素、β2整合素及C1qR。

【0055】 在一些實施例中，靶向部分為小分子。在一些實施例中，小分子為甘露糖、凝集素、阿西維辛(acivicin)、生物素或地高辛(digoxigenin)。在一些實施例中，小分子與免疫細胞上之胞外酶結合，其中胞外酶選自由以下組成之群：CD38、CD73、腺苷2a受體及腺苷2b受體。在一些實施例中，靶向部分為單鏈Fv (scFv)片段、奈米抗體、肽、基於肽之巨環、微型抗體、小分子配體(諸如葉酸、精胺醯甘胺醯天冬胺酸(RGD)或酚可溶性調控蛋白α1肽(PSMA1))、重鏈可變區、輕鏈可變區或其片段。

【0056】 在一些實施例中，本發明之醫藥組合物在組合物中小於1重量%之聚核苷酸為雙股RNA、DNA夾板或三磷酸化RNA。在一些實施例中，醫藥組合物在該醫藥組合物中小於1重量%之聚核苷酸及蛋白質為雙股RNA、DNA夾板、三磷酸化RNA、磷酸酶蛋白質、蛋白質連接酶或加帽酶。

【0057】 在另一態樣中，本文提供一種治療或預防疾病、病症或病狀之方法，其包含投與有效量之上文及本文所描述之醫藥組合物。

【0058】 在另一態樣中，本文提供一種治療有需要之個體之方法，其包含投與治療有效量之上文及本文所描述之醫藥組合物。

【圖式簡單說明】

【0059】 **圖1A至圖1E**描繪在用包含高斯螢光素酶(*Gaussia* luciferase)表現序列及各種IRES序列之環狀RNA轉染24小時後，HEK293、HepG2 (**圖1B**)或1C1C7 (**圖1C**)細胞上清液中之發光。

【0060】 **圖2A至圖2C**描繪在經包含高斯螢光素酶表現序列及具有

不同長度之各種IRES序列之環狀RNA轉染24小時後，HEK293 (**圖2A**)、HepG2 (**圖2B**)或1C1C7 (**圖2C**)細胞上清液中的發光。

【0061】 **圖3A**及**圖3B**描繪藉由發光所量測，選定IRES構築體經3天在HepG2 (**圖3A**)或1C1C7 (**圖3B**)細胞中之穩定性。

【0062】 **圖4A**及**圖4B**描繪以細胞上清液中之分泌的高斯螢光素酶之發光量測，Jurkat細胞中自選定IRES構築體之蛋白質表現。

【0063】 **圖5A**及**圖5B**，藉由發光所量測，選定IRES構築體經3天在Jurkat細胞中之穩定性。

【0064】 **圖6A**及**圖6B**描繪編碼高斯螢光素酶之經修飾線性、未經純化環狀或經純化環狀RNA之24小時發光(**圖6A**)或經3天相對發光(**圖6B**)的比較。

【0065】 **圖7A至圖7F**描繪在用經修飾線性、未經純化環狀或經純化環狀RNA電穿孔Jurkat細胞之後，IFNγ (**圖7A**)、IL-6 (**圖7B**)、IL-2 (**圖7C**)、RIG-I (**圖7D**)、IFN-β1 (**圖7E**)及TNFα (**圖7F**)之轉錄本誘導。

【0066】 **圖8A至圖8C**描繪人類原代單核球(**圖8A**)及巨噬細胞(**圖8B**及**圖8C**)中編碼高斯螢光素酶之環狀RNA及經修飾線性RNA的發光比較。

【0067】 **圖9A**及**圖9B**描繪在用包含高斯螢光素酶表現序列及不同IRES序列之環狀RNA轉導之後，原代T細胞上清液中之經3天相對發光(**圖9A**)或24小時發光(**圖9B**)。

【0068】 **圖10A至圖10C**描繪在用包含高斯螢光素酶表現序列之環狀RNA或經修飾線性RNA轉導之後，原代T細胞上清液中之24小時發光(**圖10A**)或經3天相對發光(**圖10B**)及PBMC中之24小時發光(**圖10C**)。

【0069】 **圖11A**及**圖11B**描繪具有不同排列位點之RNA構築體之

HPLC層析圖(**圖11A**)及環化效率(**圖11B**)。

【0070】 **圖12A**及**圖12B**描繪具有不同內含子及/或排列位點之RNA構築體之HPLC層析圖(**圖12A**)及環化效率(**圖12B**)。

【0071】 **圖13A**及**圖13B**描繪具有或不具有同源臂之3個RNA構築體之HPLC層析圖(**圖13A**)及環化效率(**圖13B**)。

【0072】 **圖14**描繪不具有同源臂或具有同源臂之3個RNA構築體之環化效率，該等同源臂具有各種長度及GC含量。

【0073】 **圖15A**及**圖15B**描繪顯示強同源臂對提高之剪接效率之作用、選定構築體中之環化效率與切口之間的關係及假設展現提高之環化效率之排列位點與同源臂組合的HPLC層析圖。

【0074】 **圖16**顯示模擬電穿孔(左)或經編碼CAR之環狀RNA電穿孔(右)且與表現GFP及螢火蟲螢光素酶之Raji細胞共培養之T細胞的螢光影像。

【0075】 **圖17**顯示模擬電穿孔(頂部)或經編碼CAR之環狀RNA電穿孔(底部)且與表現GFP及螢火蟲螢光素酶之Raji細胞共培養之T細胞的明場(左)、螢光(中央)及重疊(右)影像。

【0076】 **圖18**描繪模擬電穿孔或經編碼不同CAR序列之環狀RNA電穿孔之T細胞對Raji目標細胞之比溶胞率。

【0077】 **圖19A**及**圖19B**描繪在經包含高斯螢光素酶表現序列及不同IRES序列之線性或環狀RNA轉導24小時後，Jurkat細胞(左)或靜息原代人類CD3+ T細胞(右)上清液中的發光(**圖19A**)及經3天相對發光(**圖19B**)。

【0078】 **圖20A至圖20F**描繪在用經修飾線性、未經純化環狀或經純化環狀RNA電穿孔人類CD3+ T細胞之後，IFN-β1 (**圖20A**)、RIG-I (**圖**

20B)、IL-2 (**圖20C**)、IL-6 (**圖20D**)、IFNγ (**圖20E**)及TNFα (**圖20F**)之轉錄本誘導。

【0079】 **圖21A**及**圖21B**描繪藉由螢火蟲發光偵測所測定，經編碼CAR之環狀RNA電穿孔之人類原代CD3+ T細胞對Raji目標細胞之比溶胞率(**圖21A**)及在經不同量之編碼CAR序列之環狀或線性RNA電穿孔24小時後的IFNγ轉錄本誘導(**圖21B**)。

【0080】 **圖22A**及**圖22B**描繪藉由螢火蟲發光偵測所測定，在不同E:T比下，經編碼CAR之環狀或線性RNA電穿孔之人類原代CD3+ T細胞對目標或非目標細胞之比溶胞率。

【0081】 **圖23**描繪在電穿孔1、3、5及7天後，經編碼CAR之RNA電穿孔之人類CD3+ T細胞對目標細胞之比溶胞率。

【0082】 **圖24**描繪經編碼CD19或BCMA靶向CAR之環狀RNA電穿孔的人類CD3+ T細胞對目標細胞之比溶胞率。

【0083】 **圖25**顯示在與含有編碼GFP或CD19 CAR之環狀RNA之測試脂質奈米粒子一起培育之後，人類PBMC中GFP (**圖25A**)及CD19 CAR (**圖25B**)的表現。

【0084】 **圖26**描繪經包含抗鼠類CD19 CAR表現序列及不同IRES序列之環狀RNA脂質體轉染之1C1C7細胞中抗鼠類CD19 CAR的表現。

【0085】 **圖27**顯示抗鼠類CD19 CAR對鼠類T細胞之細胞毒性。CD19 CAR由電穿孔至鼠類T細胞中之環狀RNA編碼且自其表現。

【0086】 **圖28A**及**圖28B**比較自環狀RNA表現之抗人類CD19 CAR與自線性mRNA表現之抗人類CD19 CAR的表現量。

【0087】 **圖29A**及**圖29B**比較自環狀RNA表現之抗人類CD19 CAR

與自線性mRNA表現之抗人類CD19 CAR的細胞毒性作用。

【0088】 **圖30**描繪T細胞中自單一環狀RNA表現之兩種CAR (抗人類CD19 CAR及抗人類BCMA CAR)的細胞毒性。

【0089】 **圖31A**描繪在內含子中具有內置式聚A序列之例示性RNA構築體設計。**圖31B**顯示未經純化環狀RNA之層析跡線。**圖31C**顯示經親和純化環狀RNA之層析跡線。圖31D顯示用不同IVT條件及純化方法製備之環狀RNA的免疫原性。(市售=市售IVT混合物；定製=定製IVT混合物；Aff=親和純化；Enz=酶純化；GMP:GTP比=8、12.5或13.75)。

【0090】 **圖32A**描繪具有專用結合序列之例示性RNA構築體設計，其作為用於雜交純化之聚A的替代方案。**圖32B**顯示未經純化環狀RNA之層析跡線。**圖32C**顯示經親和純化環狀RNA之層析跡線。

【0091】 **圖33A**顯示編碼肌肉萎縮蛋白之未經純化環狀RNA之層析跡線。**圖33B**顯示編碼肌肉萎縮蛋白之經酶純化環狀RNA之層析跡線。

【0092】 **圖34A**及**圖34B**比較Jurkat細胞中，在3'內含子片段/5'內部雙螺旋體區與IRES之間具有不同5'間隔子經純化環狀RNA之表現(**圖34A**)及穩定性(**圖34B**)。(AC=僅A及C用於間隔子序列中；UC=僅U及C用於間隔子序列中。)

【0093】 **圖35**顯示含有指示的原始或經修飾IRES元件之環狀RNA在原代T細胞中之發光表現量及表現穩定性。

【0094】 **圖36**顯示含有指示的原始或經修飾IRES元件之環狀RNA在HepG2細胞中之發光表現量及表現穩定性。

【0095】 **圖37**顯示含有指示的原始或經修飾IRES元件之環狀RNA在1C1C7細胞中之發光表現量及表現穩定性。

【0096】 **圖38**顯示含有插入有非轉譯區(UTR)之IRES元件或雜交IRES元件之環狀RNA在HepG2細胞中之發光表現量及表現穩定性。「Scr」意謂加擾，用作對照。

【0097】 **圖39**顯示含有IRES及可操作地連接至高斯螢光素酶編碼序列之可變終止密碼子卡匣之環狀RNA在1C1C7細胞中的發光表現量及表現穩定性。

【0098】 **圖40**顯示含有IRES及插入在高斯螢光素酶編碼序列之起始密碼子前之可變非轉譯區(UTR)之環狀RNA在1C1C7細胞中的發光表現量及表現穩定性。

【0099】 **圖41**顯示含有位於hEPO編碼序列下游之兩個miR-122目標位點之環狀RNA在Huh7細胞中之人類紅血球生成素(hEPO)之表現量。

【0100】 **圖42A**及**圖42B**顯示當用囊封表現抗CD19 CAR之環狀RNA之LNP處理時周邊血液(**圖42A**)及脾(**圖42B**)中之CAR表現量。抗CD20 (aCD20)及編碼螢光素酶(oLuc)之環狀RNA係用於比較。

【0101】 **圖43A至圖43C**顯示抗CD19 CAR表現總頻率、細胞表面上之抗CD19 CAR表現頻率及T細胞上編碼抗CD19 CAR之IRES特異性環狀RNA對抗腫瘤反應之作用。**圖43A**顯示抗CD19 CAR幾何平均螢光強度，**圖43B**顯示抗CD19 CAR表現百分比，且**圖43C**顯示由抗CD19 CAR所執行之目標細胞溶解百分比。(CK =山羊脊病毒；AP =森鼠(Apodemus)微小RNA病毒；CK* =具有密碼子最佳化之山羊脊病毒；PV =細小病毒(Parabovirus)；SV =薩利病毒(Salivirus)。)

【0102】 **圖44**顯示當用IRES特異性環狀RNA構築體處理時A20 FLuc目標細胞之CAR表現量。

【0103】 **圖45A**及**圖45B**顯示原代人類T細胞中自環狀RNA之胞質蛋白(**圖45A**)及表面蛋白(**圖45B**)的發光表現量。

【0104】 **圖46A至圖46F**顯示當用IRES特異性環狀構築體處理時人類T細胞中之發光表現。將環狀RNA構築體中之表現與線性mRNA進行比較。**圖46A**、**圖46B**及**圖46G**提供多個供體細胞中之高斯螢光素酶表現。**圖46C**、**圖46D**、**圖46E**及**圖46F**提供多個供體細胞中之螢火蟲螢光素酶表現。

【0105】 **圖47A**及**圖47B**顯示在涵蓋編碼針對表現螢火蟲螢光素酶之K562細胞之抗CD19或抗BCMA CAR之環狀RNA的脂質奈米粒子處理後，人類T細胞中抗CD19 CAR及抗BCMA CAR (**圖47B**)表現。

【0106】 **圖48A**及**圖48B**顯示經由以特異性抗原依賴性方式活體外電穿孔編碼抗CD19 CAR之環狀RNA進行遞送而引起的抗CD19 CAR表現量。**圖48A**顯示用抗CD19 CAR進行之Nalm6細胞溶解。**圖48B**顯示用抗CD19 CAR進行之K562細胞溶解。

【0107】 **圖49A至圖49E**顯示藉由在含有LNP及表現綠色螢光蛋白(green fluorescence protein；GFP)之環狀RNA的溶液中使用ApoE3介導之LNP轉染。**圖49A**顯示活-死結果。**圖49B**、**圖49C**、**圖49D**及**圖49E**提供多個供體之表現頻率。

【0108】 **圖50A至圖50C**顯示編碼穩定(雙重脯胺酸突變體) SARS-CoV2棘蛋白之RNA分子之環化效率。**圖50A**顯示~4.5 kb編碼SARS-CoV2棘之環狀RNA之活體外轉錄產物。**圖50B**顯示在將編碼棘之環狀RNA轉染至293細胞中後，經由流式細胞分析技術進行之棘蛋白表面表現直方圖。經轉染293細胞在用CR3022一級抗體及經APC標記之二級抗體

轉染24小時後進行染色。**圖50C**顯示在轉染編碼棘之環狀RNA後，293細胞上之棘蛋白表面表現之流式細胞分析技術圖。經轉染293細胞在用CR3022一級抗體及經APC標記之二級抗體轉染24小時後進行染色。

【0109】 **圖51**提供多種受控佐劑策略。如圖上所指示之環狀RNA需要使用GTP作為活體外指示分子之未經純化有義環狀RNA剪接反應。3p-環狀RNA需要含有三磷酸化5'端之混合的經純化有義環狀RNA以及經純化反義環狀RNA。**圖51**顯示對於使用指示策略產生之經調配環狀RNA的活體內細胞介素反應。

【0110】 **圖52A至圖52C**繪示含有環狀RNA構築體之LNP的肌肉內遞送。**圖52A**提供6小時時段後之活體全身通量，且**圖52B**提供1 μg劑量之LNP-環狀RNA構築體6小時後之全身IVIS。**圖52C**提供經24小時時段之離體表現分佈。

【0111】 **圖53A**及**圖53B**繪示來自單一脂質調配物之多個環狀RNA之表現。**圖53A**提供單一及混合集合之含有環狀RNA構築體之LNP的hEPO效價，而**圖53B**提供單一或混合集合之含有環狀RNA構築體之LNP的生物發光表現總通量。

【0112】 **圖54A至圖54C**繪示編碼棘SARS-CoV2蛋白之環狀RNA之SARS-CoV2棘蛋白表現。**圖54A**顯示棘CoV2表現之頻率；**圖54B**顯示棘CoV2表現之幾何平均螢光強度(geometric mean fluorescence intensity；gMFI)；且**圖54C**比較構築體之gMFI表現與表現頻率。

【0113】 **圖55**描繪線性RNA聚核苷酸前驅體(**10**)之一般序列構築體。如所提供之序列係按5'增強型內含子元件(**20**)、5'增強型外顯子元件(**30**)、核心功能元件(**40**)、3'增強型外顯子元件(**50**)及3'增強型內含子元件

(**60**)之5'至3'次序繪示。

【0114】 **圖56**描繪5'增強型外顯子元件(**20**)之各種例示性迭代。如所繪示，5'增強型外顯子元件(**20**)之一個迭代按5'至3'次序包含：前導非轉譯序列(**21**)、5'親和標籤(**22**)、5'外部雙螺旋體區(**24**)、5'外部間隔子(**26**)及3'內含子片段(**28**)。

【0115】 **圖57**描繪5'增強型外顯子元件(**30**)之各種例示性迭代。如所繪示，5'增強型外顯子元件(**30**)之一個迭代按5'至3'次序包含：3'外顯子片段(**32**)、5'內部雙螺旋體區(**34**)及5'內部間隔子(**36**)。

【0116】 **圖58**描繪核心功能元件(**40**)之各種例示性迭代。如所繪示，核心功能元件(**40**)之一個迭代包含TIE (**42**)、編碼區(**46**)及終止區(例如終止密碼子或終止卡匣) (**48**)。繪示顯示包含非編碼區(**47**)之核心功能元件(**40**)之另一迭代。

【0117】 **圖59**描繪3'增強型外顯子元件(**50**)之各種例示性迭代。如所繪示，3'增強型外顯子元件(**50**)之迭代中之一者按5'至3'次序包含：3'內部間隔子(**52**)、3'內部雙螺旋體區(**54**)及5'外顯子片段(**56**)。

【0118】 **圖60**描繪3'增強型內含子元件(**60**)之各種例示性迭代。如所繪示，3'增強型內含子元件(**60**)之迭代中之一者按以下次序包含：5'內含子片段(**62**)、3'外部間隔子(**64**)、3'外部雙螺旋體區(**66**)、3'親和標籤(**68**)及末端非轉譯序列(**69**)。

【0119】 **圖61**描繪轉譯起始元件(translation initiation element；TIE) (**42**)之各種例示性迭代。如在一個迭代中所繪示之TIE (**42**)序列僅為IRES (**43**)。在另一迭代中，TIE (**42**)為適體(**44**)。在兩個不同迭代中，TIE (**42**)為適體(**44**)及IRES (**43**)組合。在另一迭代中，TIE (**42**)為適體複

合物(**45**)。

【0120】 **圖62**繪示例示性線性RNA聚核苷酸前驅體(10)，其按以下5'至3'次序包含：前導非轉譯序列(**21**)、5'親和標籤(**22**)、5'外部雙螺旋體區(**24**)、5'外部間隔子(**26**)、3'內含子片段(**28**)、3'外顯子片段(**32**)、5'內部雙螺旋體區(**34**)、5'內部間隔子(**36**)、TIE (**42**)、編碼元件(**46**)、終止區(**48**)、3'內部間隔子(**52**)、3'內部雙螺旋體區(**54**)、5'外顯子片段(**56**)、5'內含子片段(**62**)、3'外部間隔子(**64**)、3'外部雙螺旋體區(**66**)、3'親和標籤(**68**)及末端非轉譯序列(**69**)。

【0121】 **圖63**繪示例示性線性RNA聚核苷酸前驅體(**10**)，其按以下5'至3'次序包含：前導非轉譯序列(**21**)、5'親和標籤(**22**)、5'外部雙螺旋體區(**24**)、5'外部間隔子(**26**)、3'內含子片段(**28**)、3'外顯子片段(**32**)、5'內部雙螺旋體區(**34**)、5'內部間隔子(**36**)、編碼元件(**46**)、終止區(**48**)、TIE (**42**)、3'內部間隔子(**52**)、3'內部雙螺旋體區(**54**)、5'外顯子片段(**56**)、5'內含子片段(**62**)、3'外部間隔子(**64**)、3'外部雙螺旋體區(**66**)、3'親和標籤(**68**)及末端非轉譯序列(**69**)。

【0122】 **圖64**繪示例示性線性RNA聚核苷酸前驅體(**10**)，其按以下5'至3'次序包含：前導非轉譯序列(**21**)、5'親和標籤(**22**)、5'外部雙螺旋體區(**24**)、5'外部間隔子(**26**)、3'內含子片段(**28**)、3'外顯子片段(**32**)、5'內部雙螺旋體區(**34**)、5'內部間隔子(**36**)、非編碼元件(**47**)、3'內部間隔子(**52**)、3'內部雙螺旋體區(**54**)、5'外顯子片段(**56**)、5'內含子片段(**62**)、3'外部間隔子(**64**)、3'外部雙螺旋體區(**66**)、3'親和標籤(**68**)及末端非轉譯序列(**69**)。

【0123】 **圖65**繪示在剪接後形成之一般環狀RNA (**8**)結構。如所描

繪之環狀RNA包括5'外顯子元件(**30**)、核心功能元件(**40**)及3'外顯子元件(**50**)。

【0124】 **圖66A至圖66E**繪示輔助元件(**70**) (例如miRNA結合位點)可包括於線性RNA聚核苷酸中之各種方式。**圖66A**顯示在間隔子區處包含輔助元件(**70**)之線性RNA聚核苷酸。**圖66B**顯示包含位於外部雙螺旋體區中之各者與外顯子片段之間的輔助元件(**70**)之線性RNA聚核苷酸。**圖66C**描繪處於間隔子內之輔助元件(**70**)。**圖66D**繪示位於核心功能元件內之輔助元件(**70**)之各種迭代。**圖66E**繪示位於內部核糖體進入位點(internal ribosome entry site；IRES)內之輔助元件(**70**)。

【0125】 **圖67A至圖67C**繪示在不同劑量下，用編碼螢火蟲螢光素酶且具有TIE之環狀RNA調配之LNP在原代人類(**圖67A**)、小鼠(**圖67B**)及石蟹獼猴(**圖67C**)肝細胞中的活體外篩選。

【0126】 **圖68A至圖68C**繪示在不同劑量下，用編碼螢火蟲螢光素酶且具有TIE之環狀RNA調配之LNP在來自三個不同供體之原代人類肝細胞中的活體外篩選。

【0127】 **圖69**繪示在希拉(HeLa)、HEK293及HUH7人類細胞模型中，用編碼GFP且具有TIE之環狀RNA調配之LNP的活體外表現。

【0128】 **圖70**繪示在原代人類肝細胞中，用編碼GFO蛋白且具有TIE之環狀RNA調配之LNP的活體外表現。

【0129】 **圖71A**及**圖71B**繪示在小鼠肌母細胞(**圖71A**)及原代人類肌肉肌母細胞(**圖71B**)中，編碼螢火蟲螢光素酶且具有TIE之環狀RNA的活體外表現。

【0130】 **圖72A**及**圖72B**繪示在肌母細胞及分化原代人類骨骼肌肌

管中，編碼螢火蟲螢光素酶且具有TIE之環狀RNA的活體外表現。**圖72A**提供與自人類供體1接收之細胞相關之資料；**圖72B**提供與自人類供體2接收之細胞相關之資料。

【0131】 **圖73A**及**圖73B**繪示具有可變大小之環狀RNA之無細胞活體外轉譯。在**圖73A**中，測試編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA及編碼螢火蟲螢光素酶之線性mRNA的表現。在**圖73B**中，給予人類細胞及小鼠細胞編碼ATP7B蛋白之環狀RNA。所測試之環狀RNA中之一些經密碼子最佳化。表現螢火蟲螢光素酶之環狀RNA係用於比較。

【0132】 **圖74**繪示以5.7 (5.7A參數調配物)之脂質與磷酸酯比率(IL:P)囊封編碼mOX40L之環狀RNA，包含表10e之脂質1 (10e-1)或表10f之脂質15 (10f-15)之LNP在小鼠脾中的mOX40L表現。

【0133】 **圖75**繪示使用用包含不同數目之β-羥基之可離子化脂質調配之LNP或陰性對照(PBS)遞送之螢火蟲螢光素酶的環狀RNA表現。所使用之可離子化脂質自左向右包含：表10e脂質85 (10e-85)；表10e脂質89 (10e-89)；表10f脂質22 (10f-22)；表10e脂質86 (10e-86)；及表10e脂質90 (10e-90)。

【0134】 **圖76**繪示在靜脈內投與後，使用用來自表10e之可離子化脂質(自左至右：脂質1、85、38、34、45、86、88、89、90)調配之LNP遞送的螢火蟲螢光素酶在脾中之oRNA表現。量測脾中之總螢光素酶通量。

【0135】 **圖77**繪示在靜脈內投與使用包含來自表10e之可離子化脂質(自左至右：脂質1、脂質85、脂質38、脂質34、脂質45、脂質86、脂質88、脂質89、脂質90)之LNP遞送之編碼mOX40L之環狀RNA後的脾T

細胞表現。

【0136】 **圖78**繪示當用囊封於小鼠中之編碼CD-19嵌合抗原受體(CAR)蛋白之環狀RNA處理時，小鼠內的B細胞消耗。環狀RNA係經由包含來自表10e之可離子化脂質(1、16、85、45、86或90)之LNP遞送。在**圖78**中，在血球中觀測到B細胞發育不全。圖上之虛線指示Wasabi對照B細胞發育不全。B細胞%相對於Wasabi對照進行標準化。

【0137】 **圖79**繪示在投與表10e中之LNP-oRNA構築體脂質16、45或86後，Nalm6模型中之腫瘤生長動力學。使用所測試小鼠之總通量來量測表現。

【實施方式】

相關申請案之交互參考

【0138】 本申請案主張2021年11月8日申請之美國臨時申請案第63/277,055號之權益及優先權，其內容出於所有目的特此以全文引用之方式併入。

【0139】 本發明尤其提供可離子化脂質及相關轉移媒劑、組合物及方法。在一些實施例中，轉移媒劑包含可離子化脂質(例如本文揭示之可離子化脂質)、經PEG修飾之脂質及/或結構性脂質，從而形成適合於遞送核酸之脂質奈米粒子。在某些實施例中，核酸可為RNA，諸如siRNA、mRNA或環狀RNA。核酸可編碼治療劑。在一些實施例中，核酸囊封於轉移媒劑中。

【0140】 本文亦揭示RNA療法以及相關組合物及方法。在一些實施例中，RNA療法尤其允許增加之RNA穩定性、表現及延長半衰期。

【0141】 本文亦揭示用於製造環狀RNA之DNA模板(例如載體)。在

一些實施例中，DNA模板包含3'增強型內含子片段、3'增強型外顯子片段、核心功能元件、5'增強型外顯子片段及5'增強型內含子片段。在一些實施例中，此等元件按以上次序位於DNA模板中。

【0142】 額外實施例包括環狀RNA聚核苷酸，包括使用本文提供之DNA模板製造之環狀RNA聚核苷酸(例如包含3'增強型外顯子元件、核心功能元件及5'增強型外顯子元件之環狀RNA)；包含此類環狀RNA之組合物；包含此類環狀RNA之細胞；使用及製造此類DNA模板、環狀RNA、組合物及細胞之方法。

【0143】 在一些實施例中，本文提供包含將本文提供之環狀RNA聚核苷酸投與至細胞中以用於療法或產生適用蛋白質的方法。在一些實施例中，由於環狀RNA對核糖核酸酶之抗性，該方法有利於在真核細胞內產生半衰期比線性RNA更長的所需多肽。

【0144】 環狀RNA聚核苷酸缺乏核酸外切酶介導之降解所必需的自由端，使其對若干RNA降解機制具有抗性，且與等效的線性RNA相比時半衰期延長。環化可允許一般受短半衰期影響之RNA聚核苷酸穩定化且可在各種應用中改善外源性mRNA之總體功效。在一個實施例中，藉由蛋白質合成所評定，本文提供之環狀RNA聚核苷酸在真核細胞(例如哺乳動物細胞，例如人類細胞)中之功能半衰期為至少20小時(例如至少80小時)。

【0145】 本發明之各種態樣在以下章節中加以詳細描述。章節之使用並不意欲限制本發明。各章節可適用於本發明之任何態樣。在本申請案中，除非另外陳述，否則「或」之使用意謂「及/或」。

1. 定義

【0146】 如本文所用，術語「環狀RNA (circRNA)」或「環狀聚核糖核苷酸(circular polyribonucleotide)」或「環狀RNA (circular RNA)」或「oRNA」可互換地使用且係指經由共價鍵形成環狀結構之聚核糖核苷酸。

【0147】 如本文所用，術語「DNA模板(DNA template)」係指能夠轉錄線性RNA聚核苷酸之DNA序列。舉例而言但不意欲為限制的，DNA模板可包括DNA載體、PCR產物或質體。

【0148】 如本文所用，術語「3' I組內含子片段」係指與包括剪接位點二核苷酸之天然I組內含子的3'-近端具有75%或更高相似性之序列。

【0149】 如本文所用，術語「5' I組內含子片段」係指與包括剪接位點二核苷酸之天然I組內含子的5'-近端具有75%或更高相似性之序列。

【0150】 如本文所用，術語「排列位點(permutation site)」係指其中在內含子排列之前進行切割之I組內含子中之位點。此切割產生3'及5' I組內含子片段，該等片段經排列以處於待環化之一連串前驅體RNA之任一側上。

【0151】 如本文所用，術語「剪接位點(splice site)」係指部分或完全包括於I組內含子中且在其間磷酸二酯鍵在RNA環化期間裂解之二核苷酸。(如本文所用，「剪接位點」係指在剪接反應期間發生磷酸二酯鍵裂解的一或多個二核苷酸。「5'剪接位點」係指內含子，例如I組內含子之天然5'二核苷酸，而「3'剪接位點」係指內含子之天然3'二核苷酸)。

【0152】 如本文所用，術語「表現序列(expression sequence)」係指編碼例如肽或多肽之產物或調控核酸或非編碼核酸之核酸序列。編碼肽或多肽之例示性表現序列可包含複數個核苷酸三聯體，其各自可編碼胺基

酸且稱為「密碼子」。

【0153】 如本文所用，「編碼元件」或「編碼區」為位於一或多種蛋白質或多肽(例如治療性蛋白質)之表現序列內且編碼其的區域。

【0154】 如本文所用，「非編碼元件」或「非編碼核酸」為位於表現序列內之區域。但此序列自身不編碼蛋白質或多肽，但可具有其他調控功能，包括但不限於允許總聚核苷酸充當特異性細胞之生物標記或輔助件。

【0155】 如本文所用，術語「治療性蛋白質(therapeutic protein)」係指當以經轉譯核酸形式直接或間接地向個體投與時具有治療性、診斷性及/或預防性作用及/或引發所需生物作用及/或藥理作用之任何蛋白質。

【0156】 如本文所用，術語「免疫原性(immunogenic)」係指誘導針對物質之免疫反應之潛能。當生物體之免疫系統或某一類型免疫細胞暴露於免疫原性物質時可誘導免疫反應。術語「非免疫原性(non-immunogenic)」係指缺乏或不存在高於可偵測臨限值之針對物質之免疫反應。當生物體之免疫系統或某一類型之免疫細胞暴露於非免疫原性物質時，未偵測到免疫反應。在一些實施例中，當藉由免疫原性分析量測時，如本文所提供之非免疫原性環狀聚核糖核苷酸不誘導高於預定臨限值之免疫反應。在一些實施例中，當生物體之免疫系統或某一類型之免疫細胞暴露於如本文提供之非免疫原性環狀聚核糖核苷酸時，未偵測到先天性免疫反應。在一些實施例中，當生物體之免疫系統或某一類型之免疫細胞暴露於如本文所提供之非免疫原性環狀聚核糖核苷酸時，未偵測到後天性免疫反應。

【0157】 如本文所用，術語「環化效率」係指所得環狀聚核糖核苷

酸相較於其線性起始物質之量測值。

【0158】 如本文所用，術語「轉譯效率(translation efficiency)」係指自核糖核苷酸轉錄本產生蛋白質或肽之速率或量。在一些實施例中，轉譯效率可表示為每既定量之編碼蛋白質或肽之轉錄本的所產生蛋白質或肽之量。

【0159】 術語「核苷酸」係指核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、其經修飾形式或其類似物。核苷酸包括包含例如腺嘌呤、次黃嘌呤、鳥嘌呤之嘌呤及其衍生物及類似物，以及例如胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶之嘧啶及其衍生物及類似物的物種。核苷酸類似物包括在鹼基、糖及/或磷酸酯之化學結構中具有修飾的核苷酸，包括但不限於5'-位置嘧啶修飾、8'-位置嘌呤修飾、胞嘧啶外環胺之修飾及5-溴-尿嘧啶之取代；及2'-位置糖修飾，包括但不限於糖修飾之核糖核苷酸，其中2'-OH經諸如H、OR、R、鹵基、SH、SR、NH2、NHR、NR2或CN之基團置換，其中R為如本文所定義之烷基部分。核苷酸類似物亦意欲包括具有以下各者之核苷酸：鹼基，諸如肌苷、Q核苷、黃嘌呤；糖，諸如2'-甲基核糖；非天然磷酸二酯鍵聯，諸如甲基膦酸酯、硫代磷酸酯及肽鍵聯。核苷酸類似物包括5-甲氧基尿苷、1-甲基假尿苷及6-甲基腺苷。

【0160】 術語「核酸(nucleic acid)」及「聚核苷酸(polynucleotide)」在本文中可互換地使用以描述由例如去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸之核苷酸構成的例如大於約2個鹼基、大於約10個鹼基、大於約100個鹼基、大於約500個鹼基、大於1000個鹼基或多達約10,000或更多個鹼基之任何長度的聚合物，且可以酶方式或以合成方式產生(例如如美國專利第5,948,902號及其中引用之參考文獻中所描述)，其可與天然

存在之核酸以與兩種天然存在之核酸之方式類似的序列特異性方式雜交，例如可參與沃森-克里克鹼基配對(Watson-Crick base pairing)相互作用。天然存在之核酸由包括鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶(分別為G、C、A、T及U)之核苷酸構成。

【0161】如本文所用，術語「核糖核酸(ribonucleic acid)」及「RNA」意謂由核糖核苷酸構成之聚合物。

【0162】如本文所用，術語「去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)」及「DNA」意謂由去氧核糖核苷酸構成之聚合物。

【0163】「經分離」或「經純化」通常係指物質(例如在一些實施例中，化合物、聚核苷酸、蛋白質、多肽、聚核苷酸組合物或多肽組合物)之分離，以使得物質佔其所存在之樣品的顯著百分比(例如大於1%、大於2%、大於5%、大於10%、大於20%、大於50%或更多，通常多達約90%-100%)。在某些實施例中，實質上經純化組分佔樣品之至少50%、80%-85%或90%-95%。用於純化所關注之聚核苷酸及多肽之技術為此項技術中熟知的且包括例如離子交換層析法、親和層析法及根據密度之沈降。一般而言，當物質相對於樣品之其他組分以超過其天然存在之量的量存在於樣品中時，該物質經純化。

【0164】如本文所用，術語「雙螺旋」、「雙股」或「雜交」係指由含有互補序列之核酸之兩個單股雜交形成的核酸。在大多數情況下，基因體DNA為雙股的。序列可為完全互補或部分互補的。

【0165】如本文所用，關於RNA之「非結構化」係指並非藉由RNAFold軟體或類似預測工具預測用於形成具有自身序列或相同RNA分子中之其他序列之結構(例如髮夾環)的RNA序列。在一些實施例中，非結

構化RNA可使用核酸酶保護分析進行功能性表徵。

【0166】 如本文所用，關於RNA使用之「結構化(structured)」係指藉由RNAFold軟體或類似預測工具預測用於形成具有自身序列或相同RNA分子中之其他序列之結構(例如髮夾環)的RNA序列。

【0167】 如本文所用，兩個「雙螺旋體序列」、「雙螺旋體區(duplex region)」、「雙螺旋體區(duplex regions)」、「同源臂」或「同源區」可為熱力學上有利於在序列特異性相互作用中交叉配對之任何兩個區。在一些實施例中，兩個雙螺旋體序列、雙螺旋體區、同源臂或同源區與彼此之反向補體共用足夠水準之序列一致性以充當雜交反應之受質。如本文所用，當聚核苷酸序列與反向互補序列或「互補」序列一致或共用序列一致性時，其具有「同源性」。同源區與對應同源區之反向補體之間的序列一致性百分比可為允許雜交發生之任何序列一致性百分比。在一些實施例中，本發明聚核苷酸之內部雙螺旋體區能夠與另一內部雙螺旋體區形成雙螺旋體且不與外部雙螺旋體區形成雙螺旋體。

【0168】 如本文所用，「親和序列」或「親和標籤」為出於輔助聚核苷酸序列純化之目的含有重複集合之核苷酸的在1個核苷酸至數百或數千個核苷酸範圍內之聚核苷酸序列之區域。舉例而言，親和序列可包含但不限於聚A或聚AC序列。

【0169】 如本文所用，「間隔子(spacer)」係指沿聚核苷酸序列分隔兩個其他元件之在1個核苷酸至數百或數千個核苷酸範圍內之聚核苷酸序列之區域。序列可為限定的或可為隨機的。間隔子通常為非編碼的。在一些實施例中，間隔子包括雙螺旋體區。

【0170】 據稱線性核酸分子具有「5'-末端(5'端)」及「3'-末端(3'

端)」，此係因為在取代基單核苷酸之糖部分之5'碳及3'碳處存在核酸磷酸二酯鍵聯。將與5'碳存在新鍵聯之聚核苷酸之末端核苷酸為其5'末端核苷酸。將與3'碳存在新鍵聯之聚核苷酸之末端核苷酸為其3'端核苷酸。如本文所用，末端核苷酸為3'末端或5'末端之末端位置處之核苷酸。

【0171】 如本文所用，「前導非轉譯序列」為位於聚核苷酸序列之最上5'端處之在1個核苷酸至數百個核苷酸範圍內之聚核苷酸序列之區域。序列可為限定的或可為隨機的。前導非轉譯序列為非編碼的。

【0172】 如本文所用，「前導非轉譯序列」為位於聚核苷酸序列之最下3'端處之在1個核苷酸至數百個核苷酸範圍內之聚核苷酸序列之區域。序列可為限定的或可為隨機的。前導非轉譯序列為非編碼的。

【0173】 「轉錄(transcription)」意謂使用DNA分子作為模板，藉由RNA聚合酶形成或合成RNA分子。本發明就用於轉錄之RNA聚合酶而言不受限制。舉例而言，在一些實施例中，可使用T7型RNA聚合酶。

【0174】 「轉譯(translation)」意謂基於RNA模板，藉由核糖體形成多肽分子。

【0175】 應理解，本文所用之術語僅出於描述特定實施例之目的且不意欲為限制性的。除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該(the)」包含複數個參考物。因此，舉例而言，提及「一細胞(a cell)」包括兩個或更多個細胞之組合或細胞總培養物；提及「一聚核苷酸(a polynucleotide)」包括作為實用物質之該聚核苷酸之許多複本。除非明確陳述或自上下文為顯而易見的，否則如本文所用，術語「或」應理解為包括性的。除非本文及本說明書剩餘部分之下文中定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具

有與一般熟習本發明所涉及技術者通常所理解之含義相同的含義。

【0176】 除非明確陳述或為自上下文顯而易見的，否則如本文所用，術語「約」應理解為在此項技術中之一般公差範圍內，例如在平均值之2個標準差內。「約」可理解為在陳述值之10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%或0.01%內。除非上下文另外明確說明，否則本文所提供之所有數值均由術語「約」來修飾。

【0177】 如本文所用，術語「編碼(encode)」廣泛地指藉以使用聚合大分子中之資訊來導引不同於第一分子之第二分子產生的任何方法。第二分子可具有不同於第一分子之化學性質之化學結構。

【0178】 「共投與」意謂將本文提供之治療劑與一或多種額外治療劑在時間上充分接近地投與，使得本文提供之治療劑可增強一或多種額外治療劑之作用，或反之亦然。

【0179】 如本文所用，術語「治療」及「預防」以及自其衍生之字語不一定暗示100%或完全治療或預防。相反，存在不同程度之治療或預防，一般熟習此項技術者認可該等程度之治療或預防具有潛在益處或治療作用。藉由本文所揭示之方法提供之治療或預防可包括治療或預防疾病之一或多種病狀或症狀。此外，出於本文之目的，「預防」可涵蓋延遲疾病或其症狀或病狀之發作。

【0180】 如本文所用，「內部核糖體進入位點(internal ribosome entry site)」或「IRES」係指能夠在不存在典型RNA帽結構之情況下起始多肽轉譯之大小在10 nt至1000 nt或更大範圍內之RNA序列或結構元件。

IRES之長度通常為約500 nt至約700 nt。

【0181】 如本文所用，「適體(aptamer)」一般指單一已確定序列之寡核苷酸或該等核苷酸之混合物，其中混合物保留特異性結合至目標分子(例如真核起始因子、40S核糖體、聚C結合蛋白、聚A結合蛋白、聚嘧啶束結合蛋白、阿耳戈(argonaute)蛋白家族、異質核核糖核蛋白K及La以及相關RNA結合蛋白)的特性。因此，如本文所用，「適體」指示如上文所定義之核苷酸之單個序列及複數個序列。術語「適體」意欲指能夠結合至蛋白質或其他分子之單股或雙股核酸。一般而言，適體較佳包含約10至約100個核苷酸，較佳約15至約40個核苷酸，更佳約20至約40個核苷酸，因為落入此等範圍內之長度之寡核苷酸易於藉由習知技術製備。視情況而言，適體可進一步包含實現特異性結合所必需之最少大致6個核苷酸，較佳10個且更佳14或15個核苷酸。

【0182】 「真核起始因子(eukaryotic initiation factor)」或「eIF」係指用於組裝起始真核轉譯所需之起始tRNA、40S及60S核糖體次單元的蛋白質或蛋白複合物。

【0183】 如本文所用，「內部核糖體進入位點(internal ribosome entry site)」或「IRES」係指能夠在不存在典型RNA帽結構之情況下起始多肽轉譯之大小在10 nt至1000 nt或更大範圍內之RNA序列或結構元件。IRES之長度通常為約500 nt至約700 nt。

【0184】 如本文所用，「miRNA位點(miRNA site)」係指聚核苷酸內能夠形成具有天然miRNA序列之至少8個核苷酸之雙螺旋體的一連串核苷酸。

【0185】 如本文所用，「核酸內切酶位點」係指聚核苷酸內能夠由

核酸內切酶蛋白識別且裂解之一連串核苷酸。

【0186】 如本文所用，「雙順反子RNA (bicistronic RNA)」係指包括編碼兩個不同蛋白質之兩個表現序列的聚核苷酸。此等表現序列可藉由編碼諸如蛋白酶裂解位點之可裂解肽的核苷酸序列間隔開。其亦可藉由核糖體跳躍元件間隔開。

【0187】 如本文所用，術語「核糖體跳躍元件(ribosomal skipping element)」係指能夠使得自一個RNA分子轉譯產生兩個肽鏈之編碼短肽序列之核苷酸序列。儘管不希望受理論束縛，但假設核糖體跳躍元件藉由以下起作用：(1)終止第一肽鏈之轉譯及再起始第二肽鏈之轉譯；或(2)由核糖體跳躍元件編碼之肽序列中之肽鍵藉由經編碼肽之內部蛋白酶活性或藉由環境(例如胞質液)中之另一蛋白酶進行裂解。

【0188】 如本文所用，術語「共同調配(co-formulate)」係指包含兩種或更多種核酸或一核酸及其他活性藥物物質之奈米粒子調配物。通常，比率為等莫耳或以兩種或更多種核酸或核酸及其他活性藥物物質之比例量測量定義。

【0189】 如本文所用，「轉移媒劑(transfer vehicle)」包括一般預期用於結合包括核酸之生物活性劑投與使用之標準醫藥載劑、稀釋劑、賦形劑及其類似者中之任一者。

【0190】 如本文所用，片語「脂質奈米粒子」係指包含一或多種脂質(例如在一些實施例中，陽離子脂質、非陽離子脂質及經PEG修飾之脂質)之轉移媒劑。

【0191】 如本文所用，術語「可離子化脂質」係指在諸如生理pH 4之選定pH下攜帶淨正電荷且在諸如生理pH 7之其他pH下攜帶中性電荷之

多種脂質物種中之任一者。

【0192】在一些實施例中，本文所揭示之例如可離子化脂質之脂質包含一或多個可裂解基團。術語「裂解(cleave)」及「可裂解(cleavable)」在本文中用於意謂處於主題官能基中或與主題官能基相鄰之原子之間的一或多個化學鍵(例如共價鍵、氫鍵、凡得瓦爾力(van der Waals' force)及/或離子相互作用中之一或多者)在暴露於選定條件後(例如在暴露於酶條件後)斷裂(例如水解)或能夠斷裂。在某些實施例中，可裂解基團為二硫鍵官能基，且在特定實施例中為能夠在暴露於所選生物條件(例如細胞內條件)後裂解之二硫鍵基團。在某些實施例中，可裂解基團為能夠在暴露於選定生物條件後裂解之酯官能基。舉例而言，二硫鍵基可酶促裂解或藉由水解、氧化或還原反應裂解。在裂解該二硫鍵官能基之後，可釋放與其結合之一或多個官能部分或官能基(例如頭基及/或尾基中之一或多者)。例示性可裂解基團可包括但不限於二硫鍵基、酯基、醚基及其任何衍生物(例如烷基及芳基酯)。在某些實施例中，可裂解基團不為酯基或醚基。在一些實施例中，可裂解基團與一或多個官能部分或官能基(例如至少一個頭基及至少一個尾基)結合(例如藉由氫鍵、凡得瓦爾力、離子相互作用及共價鍵中之一或多者結合)。在某些實施例中，官能部分或官能基中之至少一者為親水性的(例如包含咪唑、鎓、胺基、亞胺、烯胺、視情況經取代之烷基胺基及吡啶基中之一或多者的親水性頭基)。

【0193】如本文所用，術語「親水性(hydrophilic)」用於在定性術語中指示官能基偏好水且通常此類基團為水溶性的。舉例而言，本文中揭示包含結合至一或多個親水性基團(例如親水性頭基)之可裂解二硫鍵(S-S)官能基的化合物，其中此類親水性基團包含以下或選自由以下組成之群：

咪唑、鋶、胺基、亞胺、烯胺、視情況經取代之烷基胺基(例如烷基胺基，諸如二甲胺基)及吡啶基。

【0194】 在某些實施例中，包含本文所揭示之化合物之部分的官能基中之至少一者本質上為疏水性的(例如，包含天然存在之脂質，諸如膽固醇的疏水性尾基)。如本文所用，術語「疏水性(hydrophobic)」用於在定性術語中指示官能基避開水且通常此類基團不可溶於水。舉例而言，本文揭示化合物，其包含結合至一或多個疏水性基團之可裂解官能基(例如，二硫鍵(S-S)基團)，其中此類疏水性基團包含一或多種天然存在之脂質，諸如膽固醇，及/或視情況經取代、可變飽和或不飽和C6-C20烷基及/或視情況經取代、可變飽和或不飽和C6-C20醯基。

【0195】 本文所描述之化合物亦可包含一或多個同位素取代。舉例而言，H可呈任何同位素形式，包括1H、2H (D或氘)及3H (T或氚)；C可呈任何同位素形式，包括12C、13C及14C；O可呈任何同位素形式，包括16O及18O；F可呈任何同位素形式，包括18F及19F；及其類似者。

【0196】 當描述可包括化合物及其醫藥學上可接受之鹽、含有此類化合物之醫藥組合物及使用此類化合物及組合物之方法的本發明時，除非另外指示，否則以下術語(若存在)具有以下含義。亦應理解，當在本文中描述時，下文定義之任何部分可經多種取代基取代，且各別定義欲將此類經取代之部分包括在其下文闡述之範疇內。除非另外陳述，否則術語「經取代」應如下文所闡述定義。應進一步理解，術語「基團(group)」及「基團(radical)」在本文中使用時視為可互換的。

【0197】 當列舉值之範圍時，其意欲涵蓋該範圍內之各值及子範圍。舉例而言，「C1-6烷基」意欲涵蓋C1、C2、C3、C4、C5、C6、C1-

6、C1-5、C1-4、C1-3、C1-2、C2-6、C2-5、C2-4、C2-3、C3-6、C3-5、C3-4、C4-6、C4-5及C5-6烷基。

【0198】 在某些實施例中，本文所揭示之化合物包含例如至少一個親水性頭基及至少一個疏水性尾基，其各自結合至至少一個可裂解基團，由此使此類化合物具有兩親媒性。如本文中用以描述化合物或組合物，術語「兩親媒性」意謂能夠在極性(例如，水)及非極性(例如，脂質)環境兩者中溶解。舉例而言，在某些實施例中，本文所揭示之化合物包含至少一個親脂性尾基(例如膽固醇或C6-C20烷基)及至少一個親水性頭基(例如咪唑)，其各自結合至可裂解基團(例如二硫鍵)。

【0199】 應注意，如所使用之術語「頭基」及「尾基」描述本發明化合物，且尤其描述包含此類化合物之官能基，用於便於參考以描述一或多個官能基相對於其他官能基之取向。舉例而言，在某些實施例中，親水性頭基(例如鈲)與可裂解官能基(例如二硫鍵)結合(例如藉由氫鍵、凡得瓦爾力、離子相互作用及共價鍵中之一或多者)，該可裂解官能基轉而結合至疏水性尾基(例如膽固醇)。

【0200】 如本文所用，術語「烷基」係指直鏈及分支鏈C1-C40烴(例如C6-C20烴)，且包括飽和烴及不飽和烴。在某些實施例中，烷基可包含一或多個環狀烷基及/或一或多個雜原子，諸如氧、氮或硫，且可視情況經取代基(例如烷基、鹵基、烷氧基、羥基、胺基、芳基、醚、酯或醯胺中之一或多者)取代。在某些實施例中，所考慮之烷基包括(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯。諸如「C6-C20」之名稱之使用意欲指具有所敍述範圍之碳原子之烷基(例如直鏈或分支鏈且包括烯烴及烷基)。在一些實施例中，烷基具有1至10個碳原子(「C1-10烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1

至9個碳原子(「C1-9烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至8個碳原子(「C1-8烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至7個碳原子(「C1-7烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至6個碳原子(「C1-6烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至5個碳原子(「C1-5烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至4個碳原子(「C1-4烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至3個碳原子(「C1-3烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至2個碳原子(「C1-2烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1個碳原子(「C1烷基」)。C1-6烷基之實例包括甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、戊基、己基及其類似者。

【0201】 如本文所用，「烯基(alkenyl)」係指具有2至20個碳原子、一或多個碳-碳雙鍵(例如1、2、3或4個碳-碳雙鍵)及視情況選用之一或多個碳-碳參鍵(例如1、2、3或4個碳-碳參鍵)之直鏈或分支鏈烴基(「C2-20烯基」)。在某些實施例中，烯基不含任何參鍵。在一些實施例中，烯基具有2至10個碳原子(「C2-10烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至9個碳原子(「C2-9烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至8個碳原子(「C2-8烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至7個碳原子(「C2-7烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至6個碳原子(「C2-6烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至5個碳原子(「C2-5烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至4個碳原子(「C2-4烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至3個碳原子(「C2-3烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2個碳原子(「C2烯基」)。一或多個碳-碳雙鍵可在內部(諸如在2-丁烯基中)或末端(諸如在1-丁烯基中)。C2-4之實例包括乙烯基(C2)、1-丙烯基(C3)、2-丙烯基(C3)、1-丁烯基(C4)、2-丁烯基(C4)、丁二烯基(C4)及其類似者。C2-6烯基之實例包

括前述C2-4烯基以及戊烯基(C5)、戊二烯基(C5)、己烯基(C6)及其類似者。烯基之其他實例包括庚烯基(C7)、辛烯基(C8)、辛三烯基(C8)及其類似者。

【0202】 如本文所用，「炔基(alkynyl)」係指具有2至20個碳原子、一或多個碳-碳參鍵(例如1、2、3或4個碳-碳參鍵)及視情況選用之一或多個碳-碳雙鍵(例如1、2、3或4個碳-碳雙鍵)之直鏈或分支鏈烴基(「C2-20炔基」)。在某些實施例中，炔基不含任何雙鍵。在一些實施例中，炔基具有2至10個碳原子(「C2-10炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至9個碳原子(「C2-9炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至8個碳原子(「C2-8炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至7個碳原子(「C2-7炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至6個碳原子(「C2-6炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至5個碳原子(「C2-5炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至4個碳原子(「C2-4炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至3個碳原子(「C2-3炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2個碳原子(「C2炔基」)。一或多個碳-碳參鍵可在內部(諸如在2-丁炔基中)或末端(諸如在1-丁炔基中)。C2-4炔基之實例包括但不限於乙炔基(C2)、1-丙炔基(C3)、2-丙炔基(C3)、1-丁炔基(C4)、2-丁炔基(C4)及其類似者。C2-6炔基之實例包括前述C2-4炔基以及戊炔基(C5)、己炔基(C6)及其類似者。炔基之其他實例包括庚炔基(C7)、辛炔基(C8)及其類似者。

【0203】 如本文所用，「伸烷基(alkylene)」、「伸烯基(alkenylene)」及「伸炔基(alkynylene)」分別指烷基、烯基及炔基之二價基團。當提供用於特定「伸烷基」、「伸烯基」或「伸炔基」之一定範圍或數目之碳時，應理解，該範圍或數目係指直鏈碳二價鏈中之碳的範圍或數目。「伸烷

基」、「伸烯基」及「伸炔基」可經如本文所描述之一或多個取代基取代或未經取代。

【0204】 如本文所用，術語「芳基(aryl)」係指在環部分中含有六至十個碳之芳族基團(例如單環、雙環及三環結構)。芳基可視情況經由可用碳原子取代且在某些實施例中可包括一或多個雜原子，諸如氧、氮或硫。在一些實施例中，芳基具有六個環碳原子(「C6芳基」；例如苯基)。在一些實施例中，芳基具有十個環碳原子(「C10芳基」；例如萘基，諸如1-萘基及2-萘基)。

【0205】 術語「雜烷基」係指包括至少一個碳原子及至少一個選自由O、N、P、Si及S組成之群之雜原子的非環狀穩定直鏈或分支鏈或其組合，且其中氮及硫原子可視情況經氧化，且氮雜原子可視情況經四級銨化。雜原子O、N、P、S及Si可位於雜烷基之任何內部位置處或烷基與分子之其餘部分連接之位置處。例示性雜烷基包括但不限於：$-CH_2-CH_2-O-CH_3$、$-CH_2-CH_2-NH-CH_3$、$-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$、$-CH_2-S-CH_2-CH_3$、$-CH_2-CH_2$、$-S(O)_2$、$-S(O)-CH_3$、$-S(O)_2-CH_2$、$-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$、$-CH=CH-O-CH_3$、$-Si(CH_3)_3$、$-CH_2-CH=N-OCH_3$、$-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$、$-O-CH_3$及$-O-CH_2-CH_3$。至多兩個或三個雜原子可為連續的，諸如$-CH_2-NH-OCH_3$及$-CH_2-O-Si(CH_3)_3$。在敍述「雜烷基」，接著敍述諸如$-CH_2O$、$-NR^BR^C$或其類似者之特定雜烷基之情況下，應理解術語雜烷基及$-CH_2O$或$-NR^BR^C$不為冗餘的或相互排斥的。相反地，敍述特定雜烷基以增加明確性。因此，術語「雜烷基」不應在本文中解釋為排除諸如$-CH_2O$、$-NR^BR^C$或其類似者之特定雜烷基。

【0206】 類似地，除非另外陳述，否則術語「伸雜烷基」本身或作

為另一取代基之一部分意謂衍生自雜烷基之二價基，如例示為但不限於-CH_2O-及-CH_2CH_2O-。伸雜烷基可描述為例如2-7員伸雜烷基，其中術語「員」係指該部分內之非氫原子。對於伸雜烷基而言，雜原子亦可佔據任一或兩個鏈末端(例如伸烷氧基、伸烷二氧基、伸烷基胺基、伸烷基二胺基及其類似者)。又另外，對於伸烷基及伸雜烷基連接基團而言，連接基團化學式書寫方向不暗示連接基團取向。舉例而言，式-$C(O)_2R'$-可表示-$C(O)_2R'$-及-$R'C(O)_2$-兩者。

【0207】 如本文所用，「雜芳基(heteroaryl)」係指在芳族環系統中提供有環碳原子及1-4個環雜原子之5-10員單環或雙環4n+2芳族環系統(例如在環狀陣列中共有6或10個電子)之基團，其中各雜原子獨立地選自氮、氧及硫(「5-10員雜芳基」)。在含有一或多個氮原子之雜芳基中，價數允許時，連接點可為碳或氮原子。雜芳基雙環系統可以在一個或兩個環中包括一或多個雜原子。「雜芳基」包括如上文所定義之雜芳基環與一或多個碳環基或雜環基稠合之環系統，其中連接點在雜芳基環上，且在此等情況下，環成員的數目繼續指示雜芳基環系統中環成員之數目。「雜芳基」亦包括其中如上文所定義之雜芳基環與一或多個芳基稠合之環系統，其中連接點在芳基或雜芳基環上，且在此類情況下，環成員的數目指示稠合(芳基/雜芳基)環系統中之環成員的數目。一個環不含雜原子之雙環雜芳基(例如吲哚基、喹啉基、咔唑基及其類似者)，連接點可在任一環上，亦即，帶有雜原子之環(例如2-吲哚基)或不含雜原子之環(例如5-吲哚基)。

【0208】 術語「環烷基(cycloalkyl)」係指具有3-12、3-8、4-8或4-6個碳之單價飽和環狀、雙環或橋聯環狀(例如金剛烷基)烴基，在本文中例如稱為「C4-8環烷基」，衍生自環烷。例示性環烷基包括但不限於環己

烷、環戊烷、環丁烷及環丙烷。

【0209】 如本文所用，「雜環基」或「雜環」係指具有環碳原子以及1至4個環雜原子之3至10員非芳族環系統的基團，其中各雜原子獨立地選自氮、氧、硫、硼、磷及矽(「3-10員雜環基」)。在含有一或多個氮原子之雜環基中，在價數允許時，連接點可為碳或氮原子。雜環基可為單環(「單環雜環基」)或稠合、橋聯或螺環系統，諸如雙環系統(「雙環雜環基」)，且可為飽和的或可為部分不飽和的。雜環基雙環系統可在一或兩個環中包括一或多個雜原子。「雜環基」亦包括其中如上文所定義之雜環基環與一或多個碳環基稠合的環系統，其中連接點在碳環基或雜環基環上，或其中如上文所定義之雜環基與一或多個芳基或雜芳基稠合的環系統，其中連接點在雜環基環上，且在該等情況下，環成員之數目繼續指示雜環基環系統中之環成員之數目。術語「雜環(heterocycle)」、「雜環基(heterocyclyl)」、「雜環基環(heterocyclyl ring)」、「雜環基(heterocyclic group)」、「雜環部分(heterocyclic moiety)」及「雜環基(heterocyclic radical)」可互換地使用。

【0210】 如本文所用，「氰基(cyano)」係指-CN。

【0211】 如本文所用，術語「鹵基(halo)」及「鹵素(halogen)」係指選自氟(fluorine/fluoro，F)、氯(chlorine/chloro，Cl)、溴(bromine/bromo，Br)及碘(iodine/iodo，I)之原子。在某些實施例中，鹵基為氟基或氯基。

【0212】 如本文所用，術語「烷氧基(alkoxy)」係指經由氧原子連接至另一部分之烷基(-O(烷基))。非限制性實例包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基及丁氧基。

【0213】 如本文所用，「側氧基(oxo)」係指-C=O。

【0214】 一般而言，術語「經取代」，無論前面是否有術語「視情況」，均意謂基團上存在之至少一個氫(例如連接至基團之碳或氮原子之氫)經可容許的取代基置換，例如在取代後產生穩定化合物的取代基，該穩定化合物例如不自發地進行轉型，諸如藉由重排、環化、消除或其他反應的化合物。除非另外指示，否則「經取代」之基團在該基團之一或多個可取代位置具有取代基，且當任何既定結構中之超過一個位置經取代時，取代基在各位置相同或不同。

【0215】 如本文所用，「醫藥學上可接受之鹽」係指如下之彼等鹽：在合理醫學判斷之範疇內，適用於與人類及低等動物之組織接觸而無異常毒性、刺激、過敏反應及其類似者，且與合理的益處/風險比相稱。醫藥學上可接受之鹽為此項技術中所熟知。舉例而言，Berge等人在J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19中詳細描述了醫藥學上可接受之鹽。本發明化合物之醫藥學上可接受之鹽包括衍生自適合無機及有機酸及鹼之彼等鹽。醫藥學上可接受之無毒性酸加成鹽的實例為胺基與無機酸(諸如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硫酸及過氯酸)或有機酸(諸如乙酸、草酸、順丁烯二酸、酒石酸、檸檬酸、丁二酸或丙二酸)形成之鹽，或藉由使用此項技術中所用之其他方法(諸如離子交換)形成之鹽。其他醫藥學上可接受之鹽包括己二酸鹽、褐藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙磺酸鹽、甲酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、葡糖酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫碘化物、2-羥基-乙磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸

鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸酯、軟脂酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、丁二酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、對甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及其類似者。衍生自適當鹼的醫藥學上可接受之鹽包含鹼金屬鹽、鹼土金屬鹽、銨鹽以及N^+(C1-4烷基)$_4$鹽。代表性鹼金屬或鹼土金屬鹽包含鈉鹽、鋰鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽及類似鹽。在適當時，其他醫藥學上可接受之鹽包括無毒銨、四級銨及使用諸如鹵離子、氫氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低級烷基磺酸根及芳基磺酸根之相對離子形成之胺陽離子。

【0216】 在典型實施例中，本發明意欲涵蓋本文所揭示之化合物及此類化合物之醫藥學上可接受之鹽、醫藥學上可接受之酯、互變異構形式、多形體及前藥。在一些實施例中，本發明包括本文所描述之化合物之醫藥學上可接受之加成鹽、醫藥學上可接受之酯、加成鹽之溶劑合物(例如水合物)、互變異構形式、多形體、鏡像異構物、鏡像異構物之混合物、立體異構物或立體異構物之混合物(純的或作為外消旋或非外消旋混合物)。

【0217】 本文所描述之化合物可包含一或多個不對稱中心，且因此可以各種異構形式，例如鏡像異構物及/或非鏡像異構物存在。舉例而言，本文所描述之化合物可呈個別鏡像異構物、非鏡像異構物或幾何異構物形式，或可呈立體異構物之混合物的形式，包括外消旋混合物及富集一或多種立體異構物之混合物。可利用熟習此項技術者已知之方法(包括對掌性高壓液相層析(high pressure liquid chromatography；HPLC)及對掌

性鹽的形成及結晶)而自混合物中分離出異構物；或可藉由不對稱合成來製備較佳異構物。參見例如Jacques等人，Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen等人，Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962)；及Wilen, Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions 第268頁(E.L. Eliel編, Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972)。本發明另外涵蓋作為實質上不含其他異構物之個別異構物且或者作為多種異構物之混合物的本文所描述之化合物。

【0218】 在某些實施例中，化合物及此類化合物為其組分之轉移媒劑(例如脂質奈米粒子)展現增強(例如提高)的轉染一或多種目標細胞之能力。因此，本文亦提供轉染一或多種目標細胞之方法。此類方法一般包含使一或多種目標細胞與本文所揭示之化合物及/或醫藥組合物接觸以使得一或多種目標細胞用囊封於其中之環狀RNA轉染的步驟。如本文所用，術語「轉染(transfect)」或「轉染(transfection)」係指將一或多種經囊封物質(例如核酸及/或聚核苷酸)胞內引入細胞中，或較佳引入目標細胞中。術語「轉染效率(transfection efficiency)」係指藉由引入進行轉染之目標細胞中及/或由進行轉染之目標細胞表現而吸收之此類經囊封物質(例如聚核苷酸)之相對量。在一些實施例中，轉染效率可藉由轉染後目標細胞所產生之報導聚核苷酸產物之量進行估計。在一些實施例中，轉移媒劑具有高轉染效率。在一些實施例中，轉移媒劑具有至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%轉染效率。

【0219】 如本文所用，術語「脂質體(liposome)」一般指由以一或

多個球形雙層排列之脂質(例如兩親媒性脂質)構成的囊泡。在某些實施例中，脂質體為脂質奈米粒子(例如包含本文所揭示之可離子化脂質化合物中之一或多者的脂質奈米粒子)。此類脂質體可為單層或多層囊泡，該等囊泡具有由親脂性物質形成之膜及含有待遞送至一或多個目標細胞、組織及器官之經囊封環狀RNA的水性內部。在某些實施例中，本文所描述之組合物包含一或多種脂質奈米粒子。可用於形成涵蓋之脂質體及脂質奈米粒子之合適的脂質(例如可離子化脂質)之實例包括本文所揭示之化合物中之一或多者(例如HGT4001、HGT4002、HGT4003、HGT4004及/或HGT4005)。此類脂質體及脂質奈米粒子亦可包含諸如以下之額外可離子化脂質：C12-200、DLin-KC2-DMA及/或HGT5001、輔助脂質、結構性脂質、經PEG修飾之脂質、MC3、DLinDMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE、HGT5000、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003及其組合。

【0220】 如本文所用，片語「非陽離子脂質」、「非陽離子輔助脂質」及「輔助脂質」可互換使用，且係指任何中性、兩性離子或陰離子脂質。

【0221】 如本文所用，片語「陰離子脂質」係指在所選pH，諸如生理pH下攜帶淨負電荷之多種脂質物種中之任一者。

【0222】 如本文所用，片語「可生物降解脂質」或「可降解脂質」係指在宿主環境中在數分鐘、數小時或數天之數量級分解，從而理想地使

其毒性較低且不太可能隨時間推移積聚於宿主中之多種脂質物種中的任一者。脂質之常見修飾尤其包括酯鍵及二硫鍵以提高脂質之可生物降解性。

【0223】 如本文所用，片語「可生物降解PEG脂質(biodegradable PEG lipid)」或「可降解PEG脂質(degradable PEG lipid)」係指其中在宿主環境中在數分鐘、數小時或數天之數量級自脂質裂解PEG分子，從而理想地使其具有較低免疫原性之多種脂質物種中的任一者。PEG脂質之常見修飾尤其包括酯鍵及二硫鍵以提高脂質之可生物降解性。

【0224】 在本發明之某些實施例中，轉移媒劑(例如脂質奈米粒子)經製備以囊封一或多種物質或治療劑(例如環狀RNA)。將所需治療劑(例如環狀RNA)併入轉移媒劑中之過程在本文中稱為或「裝載」或「囊封」(Lasic等人, FEBS Lett., 312: 255-258, 1992)。裝載或囊封有轉移媒劑之物質(例如環狀RNA)可完全或部分位於轉移媒劑之內部空間中，轉移媒劑之雙層膜內，或與轉移媒劑之外表面結合。

【0225】 如本文所用，術語「結構性脂質」係指固醇以及含有固醇部分之脂質。

【0226】 如本文所定義，「固醇(sterol)」為由類固醇組成之類固醇子組。

【0227】 如本文所用，術語「PEG」意謂任何聚乙二醇或其他聚伸烷基醚聚合物。

【0228】 如本文中一般定義，「PEG-OH脂質(PEG-OH lipid)」(在本文中亦稱為「羥基-聚乙二醇化脂質」)為脂質上具有一或多個羥基(-OH)之聚乙二醇化脂質。

【0229】 如本文所用，「磷脂」為包括磷酸酯部分及一或多個諸如

不飽和脂肪酸鏈之碳鏈的脂質。

【0230】 本文揭示之所有核苷酸序列可表示RNA序列或對應DNA序列。應理解，DNA中之去氧胸苷(dT或T)經轉錄為RNA中之尿苷(U)。因此，在核苷酸序列中，「T」及「U」在本文中可互換地使用。

【0231】 如本文所用，敍述「序列一致性」或例如包含「50%一致之序列」係指在比較窗上以核苷酸-核苷酸計或以胺基酸-胺基酸計序列一致之程度。因此，「序列一致性百分比」可藉由以下來計算：在比較窗內比較兩個最佳比對序列，確定在兩個序列中出現相同核酸鹼基(例如A、T、C、G、I)或相同胺基酸殘基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys及Met)的位置數以得到匹配位置數，用匹配位置數除以比較窗中之位置總數(亦即窗大小)，且將結果乘以100以得到序列一致性百分比。包括與本文所描述之參考序列中之任一者具有至少約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸及多肽，通常其中多肽變體維持參考多肽之至少一種生物活性。

【0232】 聚核苷酸構築體中之表現序列可藉由使得由表現序列編碼之多肽能夠在轉譯後由細胞分開表現之「裂解位點」序列間隔開。

【0233】 「自裂解肽」係指以下肽：在兩個相鄰胺基酸之間無肽鍵之情況下經轉譯，或起作用以使得當產生包含蛋白質及自裂解肽之多肽時，其緊接著經裂解或分離成不同且離散的第一多肽及第二多肽而不需要任何外部裂解活性。

【0234】 αβ TCR之α及β鏈一般視為各自具有兩個域或區，即可變

域/及恆定域/區。可變域由一連串可變區及接合區組成。因此，在本說明書及申請專利範圍中，術語「TCR α可變域(TCR alpha variable domain)」係指一連串TRAV區及TRAJ區，且術語TCR α恆定域係指胞外TRAC區或C端截短TRAC序列。同樣，術語「TCR β可變域(TCR beta variable domain)」係指一連串TRBV區及TRBD/TRBJ區，且術語TCR β恆定域係指胞外TRBC區或C端截短TRBC序列。

【0235】 如本文所用，術語「雙螺旋」、「雙股」或「雜交」係指由含有互補序列之核酸之兩個單股雜交形成的核酸。在大多數情況下，基因體DNA為雙股的。序列可完全互補或部分互補。

【0236】 如本文所用，「自體免疫」被定義為對非感染性自身抗原之持續及進行性免疫反應，與來自侵入且持續存在於哺乳動物及人體內之細菌、病毒、真菌或寄生蟲生物體的感染性非自身抗原不同。自體免疫病狀包括硬皮病、格雷氏病(Grave's disease)、克隆氏病(Crohn's disease)、斯耶格倫氏病(Sjorgen's disease)、多發性硬化症、橋本氏病(Hashimoto's disease)、牛皮癬、重症肌無力、自體免疫性多內分泌腺病症候群、I型糖尿病(TIDM)、自體免疫性胃炎、自體免疫性葡萄膜視網膜炎、多發性肌炎、大腸炎及甲狀腺炎以及以人類狼瘡為代表之全身性自體免疫疾病。如本文所用，「自體抗原(autoantigen)」或「自身抗原(self-antigen)」係指為哺乳動物原生且在該哺乳動物中具有免疫原性之抗原或抗原決定基。

【0237】 如本文所用，片語「陽離子脂質」係指在所選pH，諸如生理pH下攜帶淨正電荷之多種脂質物種中之任一者。

【0238】 術語「抗體」(Ab)包括但不限於特異性結合至抗原之醣蛋白免疫球蛋白。一般而言，抗體可包含藉由二硫鍵互連之至少兩個重(H)

鏈及兩個輕(L)鏈，或其抗原結合分子。各H鏈可包含重鏈可變區(本文縮寫為VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區可包含三個恆定域CH1、CH2及CH3。各輕鏈可包含輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區可包含一個恆定域CL。VH及VL區可進一步細分成高變區，稱為互補決定區(complementarity determining region；CDR)，穿插有稱為構架區(framework region；FR)之更保守區。各VH及VL可包含三個CDR及四個FR，其自胺基端至羧基端按以下次序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。Ab之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子的結合，包括與免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分。抗體可包括例如單株抗體、以重組方式產生之抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、人類抗體、經工程改造之抗體、人源化抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、胞內抗體、抗體融合物(在本文中有時稱為「抗體結合物」)、異結合抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈可變片段(scFv)、駱駝化抗體、親和抗體、Fab片段、F(ab')2片段、二硫鍵鍵聯的可變片段(sdFv)、抗個體基因型(抗Id)抗體(包括例如抗抗Id抗體)、微型抗體、域抗體、合成抗體(在本文中有時稱為「抗體模擬物」)及以上任一者之抗原結合片段。在一些實施例中，本文所描述之抗體係指多株抗體群體。

【0239】 免疫球蛋白可衍生自包括但不限於IgA、分泌性IgA、IgG及IgM之通常已知之同型中的任一者。IgG子類亦為熟習此項技術者熟

知，且包括但不限於人類IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之Ab類別或子類(例如IgM或IgG1)。術語「抗體」包括例如天然存在與非天然存在之Ab；單株與多株Ab；嵌合與人源化Ab；人類或非人類Ab；完全合成Ab；及單鏈Ab。非人類Ab可藉由重組方法人源化以降低其在人類中之免疫原性。若未明確陳述且除非上下文指示，否則術語「抗體」亦包括前述免疫球蛋白中任一者之抗原結合片段或抗原結合部分，且包括單價及二價片段或部分、及單鏈Ab。

【0240】「抗原結合分子」、「抗原結合部分」或「抗體片段」係指包含自其中衍生分子之抗體之抗原結合部分(例如，CDR)的任何分子。抗原結合分子可包括抗原互補決定區(CDR)。抗體片段之實例包括但不限於Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、dAb、線性抗體、scFv抗體以及由抗原結合分子形成之多特異性抗體。肽體(亦即包含肽結合域之Fc融合分子)為合適的抗原結合分子之另一實例。在一些實施例中，抗原結合分子與腫瘤細胞上之抗原結合。在一些實施例中，抗原結合分子與參與過度增生性疾病之細胞上之抗原或病毒或細菌抗原結合。在一些實施例中，抗原結合分子與BCMA結合。在其他實施例中，抗原結合分子為與抗原特異性結合之抗體片段，包括其互補決定區(CDR)中之一或多者。在其他實施例中，抗原結合分子為單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，抗原結合分子包含高親和性多聚體或由其組成。

【0241】如本文所用，術語「可變區(variable region)」或「可變域(variable domain)」可互換地使用且在此項技術中常見。可變區通常係指抗體之一部分，一般係指輕鏈或重鏈之一部分，通常係指成熟重鏈中胺基端約110至120個胺基酸及成熟輕鏈中約90至115個胺基酸，其序列在抗體

間廣泛不同且用於特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。序列中之可變性集中於稱為互補決定區(CDR)之彼等區中，而可變域中之更高度保守區稱為構架區(FR)。在不希望受任何特定機制或理論束縛之情況下，咸信輕鏈及重鏈之CDR主要負責抗體與抗原之相互作用及特異性。在一些實施例中，可變區為人類可變區。在一些實施例中，可變區包含嚙齒動物或鼠類CDR及人類構架區(FR)。在特定實施例中，可變區為靈長類動物(例如非人類靈長類動物)可變區。在一些實施例中，可變區包含嚙齒動物或鼠類CDR及靈長類動物(例如非人類靈長類動物)構架區(FR)。

【0242】 術語「VL」及「VL域」可互換使用以指代抗體或其抗原結合分子之輕鏈可變區。

【0243】 術語「VH」及「VH域(VH domain)」可互換地使用以指代抗體或其抗原結合分子之重鏈可變區。

【0244】 通常使用多種CDR定義：Kabat編號、Chothia編號、AbM編號或contact編號。AbM定義為由Oxford Molecular之AbM抗體模型化軟體使用之兩者之間的折衷。contact定義係基於可用複合晶體結構之分析。術語「Kabat編號(Kabat numbering)」及類似術語在此項技術中公認且係指編號抗體或其抗原結合分子之重鏈及輕鏈可變區中之胺基酸殘基的系統。在某些態樣中，抗體之CDR可根據Kabat編號系統確定(參見例如Kabat EA及Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391，及Kabat EA等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美國衛生與公眾服務部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH公開案第91-3242號)。使用Kabat編號系統，抗體重鏈分子內之CDR典型地存在於胺基酸位置31至35處，其視情況在35之後可包括一或兩個

其他胺基酸(在Kabat編號方案中稱為35A及35B)(CDR1)；胺基酸位置50至65處(CDR2)；及胺基酸位置95至102處(CDR3)。使用Kabat編號系統，抗體輕鏈分子內之CDR典型地存在於胺基酸位置24至34處(CDR1)、胺基酸位置50至56處(CDR2)及胺基酸位置89至97處(CDR3)。在一具體實施例中，本文所描述之抗體之CDR已根據Kabat編號方案確定。在某些態樣中，抗體之CDR可根據Chothia編號方案確定，Chothia編號方案係指免疫球蛋白結構環之位置(參見例如Chothia C及Lesk AM, (1987), J. Mol. Biol., 196:901-917；Al-Lazikani B等人, (1997), J. Mol. Biol., 273:927-948；Chothia C等人, (1992), J. Mol. Biol., 227:799-817；Tramontano A等人, (1990), J. Mol. Biol. 215(1):175-82；以及美國專利第7,709,226號)。通常，當使用Kabat編號規約時，Chothia CDR-H1環存在於重鏈胺基酸26至32、33或34處，Chothia CDR-H2環存在於重鏈胺基酸52至56處，且Chothia CDR-H3環存在於重鏈胺基酸95至102處，而Chothia CDR-L1環存在於輕鏈胺基酸24至34處，Chothia CDR-L2環存在於輕鏈胺基酸50至56處，且Chothia CDR-L3環存在於輕鏈胺基酸89至97處。在使用Kabat編號規約進行編號時，Chothia CDR-H1環之末端在H32與H34之間變化，此視環之長度而定(此係因為Kabat編號方案將插入置於H35A及H35B；若既不存在35A，亦不存在35B，則環末端位於32；若僅存在35A，則環末端位於33；若35A與35B均存在，則環末端位於34)。在一具體實施例中，本文所描述之抗體之CDR已根據Chothia編號方案確定。

【0245】 如本文所用，術語「恆定區」及「恆定域」可互換且具有此項技術中之常見含義。恆定區為抗體部分，例如不直接參與抗體與抗原之結合但可展現諸如與Fc受體之相互作用之各種效應功能的輕鏈及/或重

鏈之羧基端部分。相對於免疫球蛋白可變域，免疫球蛋白分子之恆定區通常具有更保守的胺基酸序列。

【0246】「結合親和力」一般係指在分子(例如抗體)之單個結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間非共價相互作用的總和強度。除非另外指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間的1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(KD或Kd)表示。親和力可以此項技術中已知之多種方式加以量測及/或表現，包括但不限於平衡解離常數(KD)及平衡結合常數(KA或Ka)。KD由koff/kon之商計算，而KA由kon/koff之商計算。kon係指例如抗體與抗原之結合速率常數，且koff係指例如抗體與抗原之解離。kon及koff可藉由諸如BIACORE®或KinExA之一般熟習此項技術者已知之技術加以測定。

【0247】如本文所用，「保守胺基酸取代」為胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已限定具有類似側鏈之胺基酸殘基家族。此等家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、β-分支鏈側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。在一些實施例中，抗體或其抗原結合分子之CDR內或構架區內之一或多個胺基酸殘基可經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換。

【0248】如本文所用，術語「異源」」意謂來自除天然存在之序列

外之任何來源。

【0249】 如本文所用，「抗原決定基(epitope)」為此項技術中之術語且係指抗原中可與抗體特異性結合之局部化區。抗原決定基可為例如多肽之連續胺基酸(線性或連續抗原決定基)，或抗原決定基可例如由一或多個多肽之兩個或更多個非連續區域聚集在一起得到(構形、非線性、不連續或非連續抗原決定基)。在一些實施例中，與抗體結合之抗原決定基可以例如藉由NMR光譜分析、X射線繞射結晶學研究、ELISA分析、氫/氘交換聯合質譜(例如液相層析電噴霧質譜分析)、基於陣列之寡肽掃描分析及/或誘變定位(例如定點誘變定位)確定。對於X射線結晶學，結晶可使用此項技術中之已知方法中之任一者實現(例如Giege R等人, (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4):339-350；McPherson A (1990) Eur J Biochem 189:1-23；Chayen NE (1997) Structure 5:1269-1274；McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300-6303)。抗體:抗原晶體可使用熟知的X射線繞射技術來加以研究，且可使用電腦軟體來加以優化，該電腦軟體諸如X-PLOR (Yale University, 1992, 由Molecular Simulations, Inc.發行; 參見例如Meth Enzymol (1985)第114及115卷, 編者Wyckoff HW等人; 美國專利公開案第2004/0014194號)，及BUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, 編者Carter CW; Roversi P等人, (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10): 1316-1323)。

【0250】 如本文所用，若抗原與第一結合分子、抗體或其抗原結合分子之間的相互作用阻斷、限制、抑制或以其他方式降低參考結合分子、參考抗體或其抗原結合分子與抗原相互作用之能力，則抗原結合分子、抗

體或其抗原結合分子與參考抗體或其抗原結合分子「交叉競爭」。交叉競爭可為完全的，例如結合分子與抗原之結合完全阻斷參考結合分子結合抗原之能力，或其可為部分的，例如結合分子與抗原之結合降低參考結合分子結合抗原之能力。在一些實施例中，與參考抗原結合分子交叉競爭之抗原結合分子結合與參考抗原結合分子相同或重疊的抗原決定基。在其他實施例中，與參考抗原結合分子交叉競爭之抗原結合分子結合與參考抗原結合分子不同的抗原決定基。可使用許多類型之競爭性結合分析來判定一種抗原結合分子是否與另一抗原結合分子競爭，例如：固相直接或間接放射免疫分析(RIA)、固相直接或間接酶免疫分析(EIA)、夾心競爭分析(Stahli等人, 1983, Methods in Enzymology 9:242-253)；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA (Kirkland等人, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619)；固相直接標記分析、固相直接標記夾心分析(Harlow及Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press)；使用I-125標記之固相直接標記RIA (Morel等人, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15)；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA (Cheung等人, 1990, Virology 176:546-552)；及直接標記的RIA (Moldenhauer等人, 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82)。

【0251】 如本文所用，術語「免疫特異性結合(immunospecifically bind)」、「免疫特異性識別(immunospecifically recognize)」、「特異性結合(specifically bind)」及「特異性識別(specifically recognize)」在抗體之情況下為類似術語，且係指與抗原(例如抗原決定基或免疫複合體)結合之分子，如此類結合由熟習此項技術者所理解。舉例而言，藉由例如免疫分析、BIACORE®、KinExA 3000儀器(Sapidyne Instruments，Boise，ID)或此項技術中已知之其他分析所測定，與抗原特異性結合之分子通常可以

較低親和力與其他肽或多肽結合。在一具體實施例中，與抗原特異性結合之分子與抗原結合的KA為該分子與另一抗原結合時之KA的至少2對數級、2.5對數級、3對數級、4對數級或更大。

【0252】「抗原」係指引起免疫反應或能夠由抗體或抗原結合分子結合之任何分子。免疫反應可涉及抗體產生或特異性免疫勝任細胞之活化或兩者。熟習此項技術者將容易理解，任何大分子，包括實際上所有蛋白質或肽均，可充當抗原。抗原可內源性表現，亦即由基因體DNA表現，或可以重組方式表現。抗原可對諸如癌細胞之某一組織具有特異性，或其可經廣泛表現。另外，較大分子之片段可充當抗原。在一些實施例中，抗原為腫瘤抗原。

【0253】術語「自體性」意謂源自個體之任何物質，該個體與物質隨後重新引入至之個體相同。舉例而言，本文所描述之經工程改造之自體細胞療法(eACT™)方法涉及自患者收集淋巴球，其接著經工程改造以表現例如CAR構築體，且接著投與回至相同患者。

【0254】術語「同種異體」係指源自一個個體之任何物質，接著將其引入至相同物種之另一個體中，例如同種異體T細胞移植。

【0255】「癌症(cancer)」係指特徵在於異常細胞在體內不受控生長之各種疾病廣泛群組。不受調控細胞分裂及生長導致形成侵入鄰近組織且亦可經由淋巴系統或血流轉移至身體之遠端部分的惡性腫瘤。「癌症」或「癌症組織」可包括腫瘤。特定癌症可對化學或放射治療有反應，或癌症可為難治性的。難治性癌症係指不適合於手術干預之癌症，且癌症起初對化學或放射治療無反應或癌症隨時間推移變得無反應。

【0256】如本文所用，「抗腫瘤作用」係指可呈現為腫瘤體積減

小、腫瘤細胞數目減少、腫瘤細胞增殖降低、轉移灶數目減少、總體或無進展存活期延長、預期壽命延長或與腫瘤相關之各種生理學症狀改善之生物效應。抗腫瘤作用亦可指預防腫瘤出現，例如疫苗。

【0257】 如本文所用，「細胞介素」係指回應於與特異性抗原之接觸而藉由一個細胞釋放之非抗體蛋白質，其中細胞介素與第二細胞相互作用以介導第二細胞中之反應。如本文所用，「細胞介素」意指由一種細胞群釋放的作為細胞間介體作用於另一細胞的蛋白質。細胞介素可由細胞內源性表現，或向個體投與。細胞介素可由包括巨噬細胞、B細胞、T細胞、嗜中性球、樹突狀細胞、嗜酸性球及肥大細胞之免疫細胞釋放以傳播免疫反應。細胞介素可在接受者細胞中誘導各種反應。細胞介素可包括體內恆定細胞介素、趨化介素、促炎性細胞介素、效應子及急性期蛋白。舉例而言，包括介白素(IL7及IL-15)之體內恆定細胞介素促進免疫細胞存活及增殖，且促炎性細胞介素可促進發炎反應。體內恆定細胞介素之實例包括但不限於IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-15及干擾素(IFN) γ。促炎性細胞介素之實例包括但不限於：IL-la、IL-lb、IL-6、IL-13、IL-17a、IL-23、IL-27、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor；TNF)-α、TNF-β、纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor；FGF) 2、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(granulocyte macrophage colony-stimulating factor；GM-CSF)、可溶性細胞間黏附分子1 (sICAM-1)、可溶性血管黏附分子1 (sVCAM-1)、血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor；VEGF)、VEGF-C、VEGF-D及胎盤生長因子(PLGF)。效應子之實例包括但不限於顆粒酶A、顆粒酶B、可溶性Fas配體(sFasL)、TGF-β、IL-35及穿孔蛋白。急性期蛋白質之實例包括但不限

於C反應蛋白(C-reactive protein；CRP)及血清澱粉樣蛋白A (serum amyloid A；SAA)。

【0258】 如本文所用，術語「淋巴球」包括自然殺手(NK)細胞、T細胞或B細胞。NK細胞為一種類型之代表先天性免疫系統之主要組分的細胞毒性(cytotoxic/cell toxic)淋巴球。NK細胞抑制腫瘤及感染病毒之細胞。其經由細胞凋亡或計劃性細胞死亡之過程起作用。其稱為「自然殺手」，此係因為其並不需要活化以殺滅細胞。T細胞在細胞介導之免疫中起主要作用(無抗體參與)。T細胞受體(TCR)將T細胞與其他淋巴球類型加以區分。作為免疫系統之特殊器官的胸腺為用於T細胞成熟之主要部位。存在許多類型之T細胞，包括：輔助T細胞(例如CD4+細胞)、細胞毒性T細胞(亦稱為TC、細胞毒性T淋巴球、CTL、T殺手細胞、細胞溶解T細胞、CD8+ T細胞或殺手T細胞)、記憶T細胞((i)如原生細胞之幹記憶細胞(TSCM) 為CD45RO-、 CCR7+ 、 CD45RA+ 、 CD62L+ (L-selectin) 、CD27+、CD28+及IL-7Ra+，但亦表現大量CD95 、IL-2R 、CXCR3及LFA-1，且顯示記憶細胞特有之許多功能屬性)；(ii)中樞記憶細胞(TCM)表現L-selectin及CCR7，其分泌IL-2，但不分泌IFNγ或IL-4，及(iii)然而，效應記憶細胞(TEM)不表現L-selectin或CCR7，但產生如IFNγ及IL-4之效應細胞介素)、調節T細胞(Treg、抑制T細胞或CD4+CD25+或CD4+FoxP3+調節T細胞)、自然殺手T細胞(NKT)及γ δ T細胞。另一方面，B細胞在體液免疫中起主要作用(有抗體參與)。B細胞製造抗體，能夠充當抗原呈現細胞(antigen-presenting cell；APC)且在藉由抗原相互作用進行活化之後變成記憶B細胞及漿細胞，短壽命及長壽命兩者。在哺乳動物中，未成熟B細胞在骨髓中形成。

【0259】 術語「經基因工程改造」或「經工程改造」係指修飾細胞基因體之方法，包括但不限於：缺失編碼或非編碼區或其一部分或插入編碼區或其一部分。在一些實施例中，經修飾細胞為可獲自患者或供體之淋巴球，例如T細胞。細胞可經修飾以表現併入細胞基因體中之外源性構築體，諸如嵌合抗原受體(CAR)或T細胞受體(TCR)。

【0260】 「免疫反應」係指免疫系統細胞(例如T淋巴球、B淋巴球、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、嗜酸性球、肥大細胞、樹突狀細胞及嗜中性白血球)及藉由此等細胞中之任一者或肝臟產生之可溶性大分子(包括Ab、細胞介素及補體)之作用，其導致選擇性靶向、結合至、損傷、破壞以下及/或自以下消除：具有侵入病原體、感染病原體之細胞或組織、癌或其他異常細胞，或在自體免疫或病理性發炎之情況下，正常人類細胞或組織之脊椎動物的身體。

【0261】 如本文所用，「協同刺激訊號」係指與諸如TCR/CD3連接之初級訊號組合之引起T細胞反應之訊號，該T細胞反應為諸如但不限於關鍵分子之增殖及/或上調或下調。

【0262】 如本文所用，「共刺激配體」包括抗原呈現細胞上特異性結合T細胞上之同源共刺激分子的分子。協同刺激配體之結合提供介導T細胞反應之訊號，該T細胞反應包括但不限於增殖、活化、分化及其類似者。共刺激配體誘導除初級訊號以外藉由刺激分子，例如藉由T細胞受體(TCR)/CD3複合物與裝載有肽之主要組織相容複合體(major histocompatibility complex；MHC)分子結合提供的訊號。共刺激配體可包括但不限於3/TR6、4-IBB配體、結合鐸(Toll)樣受體之促效劑或抗體、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD30配體、CD40、CD7、CD70、

CD83、疱疹病毒侵入介體(HVEM)、人類白血球抗原G (HLA-G)、ILT4、免疫球蛋白樣轉錄本(ILT) 3、誘導性共刺激配體(ICOS-L)、細胞間黏著分子(ICAM)、特異性結合B7-H3之配體、淋巴毒素β受體、I類MHC鏈相關蛋白A (MICA)、I類MHC鏈相關蛋白B (MICB)、OX40配體、PD-L2或計劃性死亡(programmed death；PD) LI。共刺激配體包括不限於與存在於T細胞上之共刺激分子特異性結合之抗體，諸如但不限於4-1BB、B7-H3、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD7、ICOS、與CD83特異性結合之配體、淋巴球功能相關抗原1 (LFA-1)、自然殺手細胞受體C (NKG2C)、OX40、PD-1或腫瘤壞死因子超家族成員14 (TNFSF14或LIGHT)。

【0263】「共刺激分子」為T細胞上與共刺激配體特異性結合之同源結合搭配物，由此藉由T細胞介導共刺激反應，諸如但不限於增殖。共刺激分子包括但不限於4-1BB/CD137、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD 33、CD 45、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD134、CD137、CD154、CD16、CD160 (BY55)、CD 18、CD19、CD19a、CD2、CD22、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3 (α；β；δ；ε；γ；ζ)、CD30、CD37、CD4、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD5、CD64、CD69、CD7、CD80、CD83配體、CD84、CD86、CD8α、CD8β、CD9、CD96 (Tactile)、CD1- la、CDl-lb、CDl-lc、CDl-ld、CDS、CEACAM1、CRT AM、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fcγ受體、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、ICOS、Igα (CD79a)、IL2R β、IL2Rγ、IL7Rα、整合素、ITGA4、ITGA4、ITGA6、IT GAD、ITGAE、ITGAL、

ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1、LIGHT、LIGHT (腫瘤壞死因子超家族成員14；TNFSF14)、LTBR、Ly9 (CD229)、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1 (CD1 la/CD18)、I類MHC分 子 、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、OX40、PAG/Cbp、PD-1、PSGL1、SELPLG (CD162)、傳訊淋巴球活化分子 、SLAM (SLAMF1；CD150；IPO-3)、SLAMF4 (CD244；2B4)、SLAMF6 (NTB-A；Lyl08)、SLAMF7、SLP-76、TNF、TNFr、TNFR2、鐸配體受體、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6，或其片段、截短體或組合。

【0264】 如本文所用，「疫苗(vaccine)」係指用於為疾病預防及/或治療產生免疫之組合物。因此，疫苗為包含抗原且意欲用於人類或動物中以用於在向人類或動物投與之後產生特定防禦及保護性物質之藥劑。

【0265】 如本文所用，「新抗原(neoantigen)」係指由經表現蛋白質中之腫瘤特異性突變引起之一類腫瘤抗原。

【0266】 如本文所用，「融合蛋白(fusion protein)」為具有至少兩個由已接合以轉錄單一肽之單獨基因編碼之域的蛋白質。

2. DNA模板、前驅體RNA及環狀RNA

【0267】 根據本發明，本文所提供之DNA模板(例如包含3'增強型內含子元件、3'增強型外顯子元件、核心功能元件、5'增強型外顯子元件及5'增強型內含子元件)之轉錄引起能夠環化之前驅體線性RNA聚核苷酸形成。在一些實施例中，此DNA模板包含載體、PCR產物、質體、微型環DNA、黏質體、人工染色體、互補DNA (cDNA)、染色體外DNA (ecDNA)或其中之片段。在某些實施例中，微型環DNA可為線性化或非

線性化的。在某些實施例中，質體可為線性化或非線性化的。在一些實施例中，DNA模板可為單股的。在其他實施例中，DNA模板可為雙股的。在一些實施例中，DNA模板包含完全或部分地來自病毒、細菌或真核載體。

【0268】 如本文所提供，本發明包含共有與在前驅體線性RNA聚核苷酸剪接之前的前驅體線性RNA聚核苷酸相同之序列的DNA模板(例如3'增強型內含子元件、3'增強型外顯子元件、核心功能元件及5'增強型外顯子元件、5'增強型內含子元件)。在一些實施例中，該線性前驅體RNA聚核苷酸經歷剪接，導致在環化過程期間移除3'增強型內含子元件及5'增強型內含子元件。在一些實施例中，所得環狀RNA聚核苷酸缺乏3'增強型內含子片段及5'增強型內含子片段，但維持3'增強型外顯子片段、核心功能元件及5'增強型外顯子元件。

【0269】 在一些實施例中，當在存在一或多種鳥苷核苷酸或核苷(例如GTP)及二價陽離子(例如Mg^{2+})之情況下培育時，前驅體線性RNA聚核苷酸環化。在一些實施例中，3'增強型外顯子元件、5'增強型外顯子元件及/或核心功能元件完全或部分地促進前驅體線性RNA聚核苷酸之環化以形成本文所提供之環狀RNA聚核苷酸。

【0270】 在某些實施例中，本文所提供之環狀RNA係在細胞內部產生。在一些實施例中，在細胞質中藉由噬菌體RNA聚合酶或在細胞核中藉由宿主RNA聚合酶II使用DNA模板(例如在一些實施例中，使用本文所提供之載體)轉錄前驅體RNA，且接著環化。

【0271】 在某些實施例中，將本文所提供之環狀RNA注射至動物(例如人類)中，以使得由環狀RNA分子編碼之多肽在動物內表現。

【0272】 在一些實施例中，本文提供之DNA (例如載體)、線性RNA (例如前驅體RNA)及/或環狀RNA聚核苷酸之長度在以下之間：300至10000、400至9000、500至8000、600至7000、700至6000、800至5000、900至5000、1000至5000、1100至5000、1200至5000、1300至5000、1400至5000及/或1500至5000個核苷酸。在一些實施例中，聚核苷酸之長度為至少300 nt、400 nt、500 nt、600 nt、700 nt、800 nt、900 nt、1000 nt、1100 nt、1200 nt、1300 nt、1400 nt、1500 nt、2000 nt、2500 nt、3000 nt、3500 nt、4000 nt、4500 nt或5000 nt。在一些實施例中，聚核苷酸之長度不超過3000 nt、3500 nt、4000 nt、4500 nt、5000 nt、6000 nt、7000 nt、8000 nt、9000 nt或10000 nt。在一些實施例中，本文提供之DNA、線性RNA及/或環狀RNA聚核苷酸之長度為約300 nt、400 nt、500 nt、600 nt、700 nt、800 nt、900 nt、1000 nt、1100 nt、1200 nt、1300 nt、1400 nt、1500 nt、2000 nt、2500 nt、3000 nt、3500 nt、4000 nt、4500 nt、5000 nt、6000 nt、7000 nt、8000 nt、9000 nt或10000 nt。

【0273】 在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA具有比包含相同表現序列之mRNA高之功能穩定性。在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA具有比包含相同表現序列、5moU修飾、經最佳化UTR、帽及/或聚A尾之mRNA高之功能穩定性。

【0274】 在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA聚核苷酸之功能半衰期為至少5小時、10小時、15小時、20小時、30小時、40小時、50小時、60小時、70小時或80小時。在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA聚核苷酸之功能半衰期為5-80、10-70、15-60及/或20-50小時。在一

些實施例中，本文所提供之環狀RNA聚核苷酸之功能半衰期比編碼相同蛋白質之等效線性RNA聚核苷酸之功能半衰期長(例如長至少1.5倍、長至少2倍)。在一些實施例中，可經由功能蛋白合成偵測來評定功能半衰期。

【0275】 在一些實施例中，本文提供之環狀RNA聚核苷酸之半衰期為至少5小時、10小時、15小時、20小時、30小時、40小時、50小時、60小時、70小時或80小時。在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA聚核苷酸之半衰期為5-80、10-70、15-60及/或20-50小時。在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA聚核苷酸之半衰期比編碼相同蛋白質之等效線性RNA聚核苷酸之半衰期長(例如長至少1.5倍、長至少2倍)。在一些實施例中，環狀RNA聚核苷酸或其醫藥組合物在人類細胞中具有大於或等於預定臨限值之功能半衰期的功能半衰期。在一些實施例中，藉由功能蛋白分析來測定功能半衰期。舉例而言，在一些實施例中，藉由活體外螢光素酶分析來測定功能半衰期，其中經1、2、3、4、5、6、7或14天每1、2、6、12或24小時在表現環狀RNA聚核苷酸之人類細胞(例如HepG2)培養基中量測高斯螢光素酶(GLuc)之活性。在其他實施例中，功能半衰期係藉由活體內分析測定，其中歷經1、2、3、4、5、6、7或14天每1、2、6、12或24小時在患者血清或組織樣品中量測由環狀RNA聚核苷酸之表現序列編碼之蛋白質的水準。在一些實施例中，預定臨限值為包含與環狀RNA聚核苷酸相同的表現序列之參考線性RNA聚核苷酸之功能半衰期。

【0276】 在一些實施例中，與等效線性mRNA相比，本文所提供之環狀RNA可具有更高表現幅度，例如在向細胞投與RNA 24小時之後具有更高表現幅度。在一些實施例中，與包含相同表現序列、5moU修飾、經最佳化UTR、帽及/或聚A尾之mRNA相比，本文所提供之環狀RNA具有

更高表現幅度。

【0277】 在一些實施例中，當暴露於生物體或某一類型之免疫細胞之免疫系統時，本文所提供之環狀RNA可具有比等效mRNA低之免疫原性。在一些實施例中，當暴露於生物體或某一類型之免疫細胞之免疫系統時，本文所提供之環狀RNA與細胞介素之調節型生產相關。舉例而言，在一些實施例中，相較於包含相同表現序列之mRNA，本文提供之環狀RNA在暴露於生物體之免疫系統或某一類型之免疫細胞時與IFN-β1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFNγ及/或TNFα之產生減少相關。在一些實施例中，相較於包含相同表現序列之mRNA，本文所提供之環狀RNA在暴露於生物體或某一類型之免疫細胞之免疫系統時與較少IFN-β1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFNγ及/或TNFα轉錄本誘導相關。在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA具有比包含相同表現序列之mRNA低之免疫原性。在一些實施例中，本文所提供之環狀RNA具有比包含相同表現序列、5moU修飾、經最佳化UTR、帽及/或聚A尾之mRNA低之免疫原性。

【0278】 在某些實施例中，本文所提供之環狀RNA可按原樣轉染至細胞中，或可在細胞中以DNA載體形式轉染及轉錄。可經由添加的聚合酶或由轉染至細胞中之核酸編碼之聚合酶或較佳地經由內源性聚合酶自經轉染DNA載體轉錄環狀RNA。

A. **增強型內含子元件及增強型外顯子元件**

【0279】 如本文之本發明中所存在，增強型內含子元件及增強型外顯子元件可包含間隔子、雙螺旋體區、親和序列、內含子片段、外顯子片段及各種非轉譯元件。增強型內含子元件或增強型外顯子元件內之此等序列經排列以使環化或蛋白質表現最佳化。

【0280】 在某些實施例中，本文提供之DNA模板、前驅體線性RNA聚核苷酸及環狀RNA包含第一(5')及/或第二(3')間隔子。在一些實施例中，DNA模板或前驅體線性RNA聚核苷酸在增強型內含子元件中包含一或多個間隔子。在一些實施例中，DNA模板或前驅體線性RNA聚核苷酸在增強型外顯子元件中包含一或多個間隔子。在某些實施例中，DNA模板或線性RNA聚核苷酸包含3'增強型內含子片段中之間隔子及5'增強型內含子片段中之間隔子。在某些實施例中，DNA模板、前驅體線性RNA聚核苷酸或環狀RNA包含3'增強型外顯子片段中之間隔子及5'增強型外顯子片段中之另一間隔子，以幫助環化或蛋白質表現，此係因為在整個序列中產生之對稱性。

【0281】 在一些實施例中，包括3' I組內含子片段與核心功能元件之間的間隔子可在彼等區域中保存二級結構，此係藉由防止其相互作用來進行，因此提高了剪接效率。在一些實施例中，第一間隔子(在3' I組內含子片段與核心功能元件之間)及第二間隔子(在兩個表現序列與核心功能元件之間)包含額外鹼基配對區，該等鹼基配對區經預測與彼此鹼基配對且不與第一雙螺旋體區及第二雙螺旋體區鹼基配對。在其他實施例中，第一間隔子(在3' I組內含子片段與核心功能元件之間)及第二間隔子(在核心功能元件中之一者與5' I組內含子片段之間)包含額外鹼基配對區，該等鹼基配對區經預測與彼此鹼基配對且不與第一雙螺旋體區及第二雙螺旋體區鹼基配對。在一些實施例中，該間隔子鹼基配對使I組內含子片段彼此極為接近，從而進一步提高剪接效率。另外，在一些實施例中，第一與第二雙螺旋體區之間的鹼基配對及分別地，第一與第二間隔子之間的鹼基配對之組合促進形成含有側接鹼基配對之相鄰區域之I組內含子片段的剪接氣泡。

典型間隔子為具有以下品質中之一或多者之連續序列：1)經預測避免干擾例如IRES、表現序列、適體或內含子之近端結構；2)長度為至少7 nt且不長於100 nt；3)位於3'內含子片段之後且與其相鄰及/或位於5'內含子片段之前且與其相鄰；及4)含有以下中之一或多者：a)長度為至少5 nt之非結構化區、b)長度為至少5 nt之與包括另一間隔子之遠端序列的鹼基配對區及c)長度為至少7 nt之範疇限於間隔子之序列的結構化區。間隔子可具有若干區域，包括非結構化區、鹼基配對區、髮夾/結構化區及其組合。在一實施例中，間隔子具有高GC含量之結構化區。在一實施例中，間隔子內之一區域與同一間隔子內之另一區域鹼基配對。在一實施例中，間隔子內之一區域與另一間隔子內之一區域鹼基配對。在一實施例中，間隔子包含一或多個髮夾結構。在一實施例中，間隔子包含一或多個具有4至12個核苷酸之莖及2至10個核苷酸之環的髮夾結構。在一實施例中，3' I組內含子片段與核心功能元件之間存在額外間隔子。在一實施例中，此額外間隔子防止IRES之結構化區或TIE之適體干擾3' I組內含子片段之摺疊，或降低此情況發生之程度。在一些實施例中，5'間隔子序列之長度為至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或30個核苷酸。在一些實施例中，5'間隔子序列之長度不超過100、90、80、70、60、50、45、40、35或30個核苷酸。在一些實施例中，5'間隔子序列之長度在以下之間：5至50、10至50、20至50、20至40及/或25至35個核苷酸。在某些實施例中，5'間隔子序列之長度為10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50個核苷酸。在一個實施例中，5'間隔子序列為

聚A序列。在另一實施例中，5'間隔子序列為聚AC序列。在一個實施例中，間隔子包含約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%聚AC含量。在一個實施例中，間隔子包含約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%聚嘧啶(C/T或C/U)含量。

【0282】 在一些實施例中，本文提供之DNA模板及前驅體線性RNA聚核苷酸及環狀RNA聚核苷酸包含第一(5')雙螺旋體區及第二(3')雙螺旋體區。在某些實施例中，DNA模板及前驅體線性RNA聚核苷酸包含位於3'增強型內含子片段內之5'外部雙螺旋體區及位於5'增強型內含子片段內之3'外部雙螺旋體區。在一些實施例中，DNA模板、前驅體線性RNA聚核苷酸及環狀RNA聚核苷酸包含位於3'增強型外顯子片段內之5'內部雙螺旋體區及位於5'增強型外顯子片段內之3'內部雙螺旋體區。在一些實施例中，DNA聚核苷酸及前驅體線性RNA聚核苷酸包含5'外部雙螺旋體區、5'內部雙螺旋體區、3'內部雙螺旋體區及3'外部雙螺旋體區。

【0283】 在某些實施例中，第一雙螺旋體區及第二雙螺旋體區可形成完美或不完美的雙螺旋體。因此，在某些實施例中，至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之第一及第二雙螺旋體區可彼此鹼基配對。在一些實施例中，預測雙螺旋體區與RNA中之非預期序列(例如非雙螺旋體區序列)具有小於50%(例如小於45%、小於40%、小於35%、小於30%、小於25%)鹼基配對。在一些實施例中，包括處於前驅體RNA股之末端上且與I組內含子片段相鄰或非常接近之此類雙螺旋體區使I組內含子片段彼此極為接近，從而提高了剪接效率。在一些實施例中，雙螺旋體區之長度為3至100個核苷酸

(例如長度為3-75個核苷酸、長度為3-50個核苷酸、長度為20-50個核苷酸、長度為35-50個核苷酸、長度為5-25個核苷酸、長度為9-19個核苷酸)。在一些實施例中，雙螺旋體區之長度為約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50個核苷酸。在一些實施例中，雙螺旋體區之長度為約9至約50個核苷酸。在一個實施例中，雙螺旋體區之長度為約9至約19個核苷酸。在一些實施例中，雙螺旋體區之長度為約20至約40個核苷酸。在某些實施例中，雙螺旋體區之長度為約30個核苷酸。

【0284】 在其他實施例中，DNA模板、前驅體線性RNA聚核苷酸或環狀RNA聚核苷酸不包含任何雙螺旋體區以使轉譯或環化最佳化。

【0285】 如本文所提供，DNA模板或前驅體線性RNA聚核苷酸可包含親和標籤。在一些實施例中，親和標籤位於3'增強型內含子元件中。在一些實施例中，親和標籤位於5'增強型內含子元件中。在一些實施例中，兩個(3'及5')增強型內含子元件各自包含親和標籤。在一個實施例中，3'增強型內含子元件之親和標籤之長度與5'增強型內含子元件中之長度相同。在一些實施例中，3'增強型內含子元件之親和標籤為與5'增強型內含子元件中之親和標籤相同的序列。在一些實施例中，置放親和序列以使寡聚dT純化最佳化。

【0286】 在一些實施例中，親和標籤包含聚A區。在一些實施例中，聚A區之長度為至少15、30或60個核苷酸。在一些實施例中，一個或兩個聚A區之長度為15-50個核苷酸。在一些實施例中，一個或兩個聚A區

之長度為20-25個核苷酸。聚A序列在環化時被移除。因此，與聚A序列雜交之寡核苷酸，諸如與固體表面(例如樹脂)結合之脫氧胸腺嘧啶寡核苷酸(寡聚(dT))可用於自其前驅體RNA分離環狀RNA。

【0287】 在某些實施例中，3'增強型內含子元件包含前導非轉譯序列。在一些實施例中，前導非轉譯序列為3'增強型內含子片段之5'端。在一些實施例中，前導非轉譯序列包含轉錄起始位點(TSS)之最後一個核苷酸。在一些實施例中，TSS選自病毒、細菌或真核DNA模板。在一個實施例中，前導非轉譯序列包含TSS之最後一個核苷酸以及0至100個額外核苷酸。在一些實施例中，TSS為末端間隔子。在一個實施例中，在RNA T7聚合酶轉譯後，前導非轉譯序列在5'端含有鳥苷。

【0288】 在某些實施例中，5'增強型內含子元件包含尾隨(trailing)非轉譯序列。在一些實施例中，5'尾隨非轉譯序列位於5'增強型內含子元件之3'端。在一些實施例中，尾隨非轉譯序列為部分限制消化序列。在一個實施例中，尾隨非轉譯序列完全或部分為用於使DNA模板線性化之限制消化位點。在一些實施例中，限制消化位點完全或部分來自天然病毒、細菌或真核DNA模板。在一些實施例中，尾隨非轉譯序列為末端限制位點片段。

a. 增強型內含子片段

【0289】 根據本發明，3'增強型內含子元件及5'增強型內含子元件各自包含內含子片段。在某些實施例中，3'內含子片段為與包括3'剪接位點二核苷酸之天然I組內含子之3'近端片段至少75%同源(例如至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源)的連續序列。通常，5'內含子片段為與包括5'剪接位點二核苷

酸之天然I組內含子之5'近端片段至少75%同源(例如至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源)的連續序列。在一些實施例中，3'內含子片段包括3' I組剪接位點二核苷酸之第一核苷酸。在一些實施例中，5'內含子片段包括5' I組剪接位點二核苷酸之第一核苷酸。在其他實施例中，3'內含子片段包括3' I組內含子片段剪接位點二核苷酸之第一核苷酸及第二核苷酸；且5'內含子片段包括3' I組內含子片段二核苷酸之第一核苷酸及第二核苷酸。

b. 增強型外顯子片段

【0290】 在某些實施例中，如本文所提供，DNA模板、線性前驅體RNA聚核苷酸及環狀RNA聚核苷酸各自包含增強型外顯子片段。在一些實施例中，按5'至3'次序，3'增強型外顯子元件位於核心功能元件之上游。在一些實施例中，按5'至3'次序，5'增強型內含子元件位於核心功能元件之下游。

【0291】 根據本發明，3'增強型外顯子元件及5'增強型外顯子元件各自包含外顯子片段。在一些實施例中，3'增強型外顯子元件包含3'外顯子片段。在一些實施例中，5'增強型外顯子元件包含5'外顯子片段。在某些實施例中，如本文所提供，3'外顯子片段及5'外顯子片段各自包含I組內含子片段以及外顯子序列之1至100個核苷酸。在某些實施例中，3'內含子片段為與包括3'剪接位點二核苷酸之天然I組內含子之3'近端片段至少75%同源(例如至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源)的連續序列。通常，5' I組內含子片段為與包括5'剪接位點二核苷酸之天然I組內含子之5'近端片段至少75%同源(例如至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%或100%同源)的連續序列。在一些實施例中，3'外顯子片段包含3' I組內含子剪接位點二核苷酸之第二核苷酸以及外顯子序列之1至100個核苷酸。在一些實施例中，5'外顯子片段包含5' I組內含子剪接位點二核苷酸之第一核苷酸以及外顯子序列之1至100個核苷酸。在一些實施例中，外顯子序列包含部分或完全來自天然存在之外顯子序列，該天然存在之外顯子序列來自病毒、細菌或真核DNA載體。在其他實施例中，外顯子序列進一步包含合成、經基因修飾之(例如含有經修飾之核苷酸)或其他經工程改造之外顯子序列。

【0292】 在一個實施例中，在3'內含子片段包含3' I組剪接位點二核苷酸之兩個核苷酸且5'內含子片段包含5' I組剪接位點二核苷酸之兩個核苷酸的情況下，位於5'增強型外顯子元件及3'增強型外顯子元件內之外顯子片段不包含I組剪接位點二核苷酸。

c. 增強型內含子元件及增強型外顯子元件之例示性排列

【0293】 舉例而言且不意欲為限制性的，在一些實施例中，3'增強型內含子元件按以下5'至3'次序包含：前導非轉譯序列、5'親和標籤、視情況選用之5'外部雙螺旋體區、5'外部間隔子及3'內含子片段。在相同實施例中，3'增強型外顯子元件按以下5'至3'次序包含：3'外顯子片段、視情況選用之5'內部雙螺旋體區、視情況選用之5'內部雙螺旋體區及5'內部間隔子。在相同實施例中，5'增強型外顯子元件按以下5'至3'次序包含：3'內部間隔子、視情況選用之3'內部雙螺旋體區及5'外顯子片段。在再相同實施例中，3'增強型內含子元件按以下5'至3'次序包含：5'內含子片段、3'外部間隔子、視情況選用之3'外部雙螺旋體區、3'親和標籤及尾隨非轉譯序列。

B. **核心功能元件**

【0294】 在一些實施例中，DNA模板、線性前驅體RNA聚核苷酸及環狀RNA聚核苷酸包含核心功能元件。在一些實施例中，核心功能元件包含編碼元件或非編碼元件。在某些實施例中，核心功能元件可含有編碼元件及非編碼元件。在一些實施例中，核心功能元件進一步包含在編碼元件或非編碼元件上游之轉譯起始元件(TIE)。在一些實施例中，核心功能元件包含終止元件。在一些實施例中，終止元件位於TIE及編碼元件下游。在一些實施例中，終止元件位於編碼元件下游，但位於TIE上游。在某些實施例中，在編碼元件包含非編碼區之情況下，核心功能元件缺乏TIE及/或終止元件。

a. 編碼或非編碼元件

【0295】 在一些實施例中，本文所提供之聚核苷酸包含編碼或非編碼元件或兩者之組合。在一些實施例中，編碼元件包含表現序列。在一些實施例中，編碼元件編碼至少一種治療性蛋白質。

【0296】 在一些實施例中，環狀RNA編碼兩種或更多種多肽。在一些實施例中，環狀RNA為雙順反子RNA。編碼兩種或更多種多肽之序列可藉由核糖體跳躍元件或編碼蛋白酶裂解位點之核苷酸序列間隔開。在某些實施例中，核糖體跳躍元件編碼扁刺蛾(thosea-asigna)病毒2A肽(T2A)、豬鐵士古病毒(porcine teschovirus)-1 2A肽(P2A)、口蹄疫病毒2A肽(F2A)、馬鼻炎A病毒2A肽(E2A)、細胞質多角體病毒2A肽(BmCPV 2A)或家蠶軟化病病毒(flacherie vims of B. mori) 2A肽(BmIFV 2A)。

b. 轉譯起始元件(TIE)

【0297】 如本文所提供，在一些實施例中，核心功能元件包含至少

一個轉譯起始元件(TIE)。TIE經設計以允許經編碼蛋白之轉譯效率。因此，僅包含非編碼元件之最佳核心功能元件缺乏任何TIE。在一些實施例中，包含一或多個編碼元件之核心功能元件將進一步包含一或多個TIE。

【0298】 在一些實施例中，TIE包含非轉譯區(UTR)。在某些實施例中，本文所提供之TIE包含內部核糖體進入位點(IRES)。包括IRES准許自環狀RNA轉譯一或多個開讀框(例如形成表現序列之開讀框)。IRES元件吸引真核核糖體轉譯起始複合物且促進轉譯起始。參見例如Kaufman等人, Nuc. Acids Res. (1991) 19:4485-4490；Gurtu等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. (1996) 229:295-298；Rees等人, BioTechniques (1996) 20: 102-110；Kobayashi等人, BioTechniques (1996) 21 :399-402；及Mosser等人, BioTechniques 1997 22 150-161。

i. 天然TIE：病毒及真核/細胞內部核糖體進入位點(IRES)

【0299】 多個IRES序列可用且包括衍生自廣泛多種病毒之序列，諸如：微小RNA病毒，諸如腦心肌炎病毒(EMCV) UTR之前導序列(Jang等人, J. Virol. (1989) 63: 1651-1660)、脊髓灰質炎前導序列、A型肝炎病毒前導序列、C型肝炎病毒IRES、人類鼻病毒2型IRES (Dobrikova等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100(25): 15125- 15130)、來自口蹄疫病毒之IRES元件(Ramesh等人, Nucl. Acid Res. (1996) 24:2697-2700)、賈第蟲病毒IRES (Garlapati等人, J. Biol. Chem. (2004) 279(5):3389-3397)及其類似者。

【0300】 為驅動蛋白質表現，環狀RNA包含可操作地連接於蛋白質編碼序列之IRES。本文揭示用於例如藉由將IRES之5'端及/或3'端截短，向IRES添加間隔子5'，將6個核苷酸5'修飾至轉譯起始位點(Kozak序列)，

修飾替代性轉譯起始位點且產生嵌合/雜交IRES序列來提高或降低IRES活性之對IRES及輔助序列之修飾。在一些實施例中，本文揭示之環狀RNA中之IRES序列包含此等相對於原生IRES之修飾中之一或多者。

【0301】在一些實施例中，IRES為以下各者之IRES序列：桃拉症候群病毒(Taura syndrome virus)、錐蝽病毒(Triatoma virus)、蒂勒氏腦脊髓炎病毒(Theiler's encephalomyelitis virus)、猿猴病毒(Simian Virus) 40、紅火蟻病毒(Solenopsis invicta virus) 1、禾穀縊管蚜病毒(Rhopalosiphum padi virus)、網狀內皮細胞增生病病毒(Reticuloendotheliosis virus)、人類脊髓灰白質炎病毒1、斯氏珀蝽腸病毒(Plautia stali intestine virus)、喀什米爾蜂病毒(Kashmir bee virus)、人類鼻病毒2、玻璃葉蟬(Homalodisca coagulata)病毒-1、1型人類免疫缺乏病毒、虱P病毒、C型肝炎病毒、A型肝炎病毒、GB肝炎病毒、口蹄疫病毒、人類腸病毒71、馬鼻炎病毒、茶尺蠖微小RNA病毒樣病毒、腦心肌炎病毒、果蠅C病毒、人類柯薩奇病毒(Human coxsackievirus) B3、十字花科植物菸草花葉病毒、蟋蟀麻痺病毒、牛病毒性腹瀉病毒1、黑蜂王台病毒(Black Queen Cell Virus)、蚜蟲致死性麻痺病毒、禽類腦脊髓炎病毒、急性蜂麻痺病毒、木槿黃化輪斑病毒、典型豬瘟病毒、人類FGF2、人類SFTPA1、人類AML1/RUNX1、果蠅觸角足、人類AQP4、人類AT1R、人類BAG-1、人類BCL2、人類BiP、人類c-IAPl、人類c-myc、人類eIF4G、小鼠NDST4L、人類LEF1、小鼠HIF1α、人類n.myc、小鼠Gtx、人類p27kipl、人類PDGF2/c-sis、人類p53、人類Pim-1、小鼠Rbm3、果蠅收割者(Drosophila reaper)、犬奔跑者(Canine Scamper)、果蠅Ubx、人類UNR、小鼠UtrA、人類VEGF-A、人類XIAP、無毛果蠅、

釀酒酵母(S. cerevisiae) TFIID、釀酒酵母YAP1、菸草蝕刻病毒、蕪菁皺病毒、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV pEC9、小雙節RNA病毒、HCV QC64、人類科薩病毒(Cosavirus) E/D、人類科薩病毒F、人類科薩病毒JMY、鼻病毒NAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、薩利病毒(Salivirus) A SH1、薩利病毒FHB、薩利病毒NG-J1、人類雙埃可病毒(Parechovirus) 1、克羅希病毒(Crohivirus) B、Yc-3、羅沙病毒(Rosavirus) M-7、香巴病毒(Shanbavirus) A、帕西病毒(Pasivirus) A、帕西病毒A 2、埃可病毒(Echovirus) E14、人類雙埃柯病毒(Parechovirus) 5、愛知病毒(Aichi Virus)、A型肝炎病毒HA16、馮皮病毒(Phopivirus)、CVA10、腸病毒C、腸病毒D、腸病毒J、人類佩吉病毒(Pegivirus) 2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、佩吉病毒A 1220、帕西病毒A3、薩佩洛病毒(Sapelovirus)、羅沙病毒B、巴庫薩病毒(Bakunsa Virus)、震顫病毒(Tremovirus) A、豬帕西病毒1、PLV-CHN、帕西病毒A、西西尼病毒(Sicinivirus)、C型肝炎病毒K、C型肝炎病毒屬A、BVDV1、邊界病病毒(Border Disease Virus)、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573雙順反病毒(Dicistrovirus)、湖北微小RNA病毒樣病毒(Hubei Picorna-like Virus)、CRPV、薩利病毒A BN5、薩利病毒A BN2、薩利病毒A 02394、薩利病毒A GUT、薩利病毒A CH、薩利病毒A SZ1、薩利病毒FHB、CVB3、CVB1、埃可病毒(Echovirus) 7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24或eIF4G之適體。

【0302】在一些實施例中，IRES包含完全或部分地來自真核或細胞IRES。在某些實施例中，IRES來自人類基因，其中人類基因為ABCF1、ABCG1、ACAD10、ACOT7、ACSS3、ACTG2、ADCYAP1、ADK、

AGTR1、AHCYL2、AHI1、AKAP8L、AKR1A1、ALDH3A1、ALDOA、ALG13、AMMECR1L、ANGPTL4、ANK3、AOC3、AP4B1、AP4E1、APAF1、APBB1、APC、APH1A、APOBEC3D、APOM、APP、AQP4、ARHGAP36、ARL13B、ARMC8、ARMCX6、ARPC1A、ARPC2、ARRDC3、ASAP1、ASB3、ASB5、ASCL1、ASMTL、ATF2、ATF3、ATG4A、ATP5B、ATP6V0A1、ATXN3、AURKA、AURKA、AURKA、AURKA、B3GALNT1、B3GNTL1、B4GALT3、BAAT、BAG1、BAIAP2、BAIAP2L2、BAZ2A、BBX、BCAR1、BCL2、BCS1L、BET1、BID、BIRC2、BPGM、BPIFA2、BRINP2、BSG、BTN3A2、C12orf43、C14orf93、C17orf62、C1orf226、C21orf62、C2orf15、C4BPB、C4orf22、C9orf84、CACNA1A、CALCOCO2、CAPN11、CASP12、CASP8AP2、CAV1、CBX5、CCDC120、CCDC17、CCDC186、CCDC51、CCN1、CCND1、CCNT1、CD2BP2、CD9、CDC25C、CDC42、CDC7、CDCA7L、CDIP1、CDK1、CDK11A、CDKN1B、CEACAM7、CEP295NL、CFLAR、CHCHD7、CHIA、CHIC1、CHMP2A、CHRNA2、CLCN3、CLEC12A、CLEC7A、CLECL1、CLRN1、CMSS1、CNIH1、CNR1、CNTN5、COG4、COMMD1、COMMD5、CPEB1、CPS1、CRACR2B、CRBN、CREM、CRYBG1、CSDE1、CSF2RA、CSNK2A1、CSTF3、CTCFL、CTH、CTNNA3、CTNNB1、CTNNB1、CTNND1、CTSL、CUTA、CXCR5、CYB5R3、CYP24A1、CYP3A5、DAG1、DAP3、DAP5、DAXX、DCAF4、DCAF7、DCLRE1A、DCP1A、DCTN1、DCTN2、DDX19B、DDX46、

DEFB123、DGKA、DGKD、DHRS4、DHX15、DIO3、DLG1、DLL4、DMD UTR、DMD ex5、DMKN、DNAH6、DNAL4、DUSP13、DUSP19、DYNC1I2、DYNLRB2、DYRK1A、ECI2、ECT2、EIF1AD、EIF2B4、EIF4G1、EIF4G2、EIF4G3、ELANE、ELOVL6、ELP5、EMCN、ENO1、EPB41、ERMN、ERVV-1、ESRRG、ETFB、ETFBKMT、ETV1、ETV4、EXD1、EXT1、EZH2、FAM111B、FAM157A、FAM213A、FBXO25、FBXO9、FBXW7、FCMR、FGF1、FGF1、FGF1A、FGF2、FGF2、FGF-9、FHL5、FMR1、FN1、FOXP1、FTH1、FUBP1、G3BP1、GABBR1、GALC、GART、GAS7、胃泌素、GATA1、GATA4、GFM2、GHR、GJB2、GLI1、GLRA2、GMNN、GPAT3、GPATCH3、GPR137、GPR34、GPR55、GPR89A、GPRASP1、GRAP2、GSDMB、GSTO2、GTF2B、GTF2H4、GUCY1B2、HAX1、HCST、HIGD1A、HIGD1B、HIPK1、HIST1H1C、HIST1H3H、HK1、HLA-DRB4、HMBS、HMGA1、HNRNPC、HOPX、HOXA2、HOXA3、HPCAL1、HR、HSP90AB1、HSPA1A、HSPA4L、HSPA5、HYPK、IFFO1、IFT74、IFT81、IGF1、IGF1R、IGF1R、IGF2、IL11、IL17RE、IL1RL1、IL1RN、IL32、IL6、ILF2、ILVBL、INSR、INTS13、IP6K1、ITGA4、ITGAE、KCNE4、KERA、KIAA0355、KIAA0895L、KIAA1324、KIAA1522、KIAA1683、KIF2C、KIZ、KLHL31、KLK7、KRR1、KRT14、KRT17、KRT33A、KRT6A、KRTAP10-2、KRTAP13-3、KRTAP13-4、KRTAP5-11、KRTCAP2、LACRT、LAMB1、LAMB3、LANCL1、LBX2、LCAT、LDHA、LDHAL6A、LEF1、LINC-PINT、LMO3、

LRRC4C、LRRC7、LRTOMT、LSM5、LTB4R、LYRM1、LYRM2、MAGEA11、MAGEA8、MAGEB1、MAGEB16、MAGEB3、MAPT、MARS、MC1R、MCCC1、METTL12、METTL7A、MGC16025、MGC16025、MIA2、MIA2、MITF、MKLN1、MNT、MORF4L2、MPD6、MRFAP1、MRPL21、MRPS12、MSI2、MSLN、MSN、MT2A、MTFR1L、MTMR2、MTRR、MTUS1、MYB、MYC、MYCL、MYCN、MYL10、MYL3、MYLK、MYO1A、MYT2、MZB1、NAP1L1、NAV1、NBAS、NCF2、NDRG1、NDST2、NDUFA7、NDUFB11、NDUFC1、NDUFS1、NEDD4L、NFAT5、NFE2L2、NFE2L2、NFIA、NHEJ1、NHP2、NIT1、NKRF、NME1-NME2、NPAT、NR3C1、NRBF2、NRF1、NTRK2、NUDCD1、NXF2、NXT2、ODC1、ODF2、OPTN、OR10R2、OR11L1、OR2M2、OR2M3、OR2M5、OR2T10、OR4C15、OR4F17、OR4F5、OR5H1、OR5K1、OR6C3、OR6C75、OR6N1、OR7G2、p53、P2RY4、PAN2、PAQR6、PARP4、PARP9、PC、PCBP4、PCDHGC3、PCLAF、PDGFB、PDZRN4、PELO、PEMT、PEX2、PFKM、PGBD4、PGLYRP3、PHLDA2、PHTF1、PI4KB、PIGC、PIM1、PKD2L1、PKM、PLCB4、PLD3、PLEKHA1、PLEKHB1、PLS3、PML、PNMA5、PNN、POC1A、POC1B、POLD2、POLD4、POU5F1、PPIG、PQBP1、PRAME、PRPF4、PRR11、PRRT1、PRSS8、PSMA2、PSMA3、PSMA4、PSMD11、PSMD4、PSMD6、PSME3、PSMG3、PTBP3、PTCH1、PTHLH、PTPRD、PUS7L、PVRIG、QPRT、RAB27A、RAB7B、RABGGTB、RAET1E、RALGDS、

RALYL、RARB、RCVRN、REG3G、RFC5、RGL4、RGS19、RGS3、RHD、RINL、RIPOR2、RITA1、RMDN2、RNASE1、RNASE4、RNF4、RPA2、RPL17、RPL21、RPL26L1、RPL28、RPL29、RPL41、RPL9、RPS11、RPS13、RPS14、RRBP1、RSU1、RTP2、RUNX1、RUNX1T1、RUNX1T1、RUNX2、RUSC1、RXRG、S100A13、S100A4、SAT1、SCHIP1、SCMH1、SEC14L1、SEMA4A、SERPINA1、SERPINB4、SERTAD3、SFTPD、SH3D19、SHC1、SHMT1、SHPRH、SIM1、SIRT5、SLC11A2、SLC12A4、SLC16A1、SLC25A3、SLC26A9、SLC5A11、SLC6A12、SLC6A19、SLC7A1、SLFN11、SLIRP、SMAD5、SMARCAD1、SMN1、SNCA、SNRNP200、SNRPB2、SNX12、SOD1、SOX13、SOX5、SP8、SPARCL1、SPATA12、SPATA31C2、SPN、SPOP、SQSTM1、SRBD1、SRC、SREBF1、SRPK2、SSB、SSB、SSBP1、ST3GAL6、STAB1、STAMBP、STAU1、STAU1、STAU1、STAU1、STAU1、STK16、STK24、STK38、STMN1、STX7、SULT2B1、SYK、SYNPR、TAF1C、TAGLN、TANK、TAS2R40、TBC1D15、TBXAS1、TCF4、TDGF1、TDP2、TDRD3、TDRD5、TESK2、THAP6、THBD、THTPA、TIAM2、TKFC、TKTL1、TLR10、TM9SF2、TMC6、TMCO2、TMED10、TMEM116、TMEM126A、TMEM159、TMEM208、TMEM230、TMEM67、TMPRSS13、TMUB2、TNFSF4、TNIP3、TP53、TP53、TP73、TRAF1、TRAK1、TRIM31、TRIM6、TRMT1、TRMT2B、TRPM7、TRPM8、TSPEAR、TTC39B、TTLL11、TUBB6、TXLNB、TXNIP、TXNL1、TXNRD1、TYROBP、

U2AF1、UBA1、UBE2D3、UBE2I、UBE2L3、UBE2V1、UBE2V2、UMPS、UNG、UPP2、USMG5、USP18、UTP14A、UTRN、UTS2、VDR、VEGFA、VEGFA、VEPH1、VIPAS39、VPS29、VSIG10L、WDHD1、WDR12、WDR4、WDR45、WDYHV1、WRAP53、XIAP、XPNPEP3、YAP1、YWHAZ、YY1AP1、ZBTB32、ZNF146、ZNF250、ZNF385A、ZNF408、ZNF410、ZNF423、ZNF43、ZNF502、ZNF512、ZNF513、ZNF580、ZNF609、ZNF707或ZNRD1。

ii. 合成TIE：適體複合物、經修飾核苷酸、IRES變體及其他經工程改造之TIE

【0303】 如本文所涵蓋，在某些實施例中，轉譯起始元件(TIE)包含合成TIE。在一些實施例中，合成TIE包含能夠起始線性RNA或環狀RNA聚核苷酸轉譯之適體複合物、合成IRES或其他經工程改造之TIES。

【0304】 在一些實施例中，一或多個適體序列能夠結合至真核起始因子之組分以增強或起始轉譯。在一些實施例中，適體可用於藉由促進特異性真核起始因子(eukaryotic initiation factor；eIF)來增強活體內及活體外轉譯(例如，WO2019081383A1中之適體能夠結合至真核起始因子4F(eIF4F))。在一些實施例中，適體或適體之複合物可能能夠結合至EIF4G、EIF4E、EIF4A、EIF4B、EIF3、EIF2、EIF5、EIF1、EIF1A、40S核糖體、PCBP1 (聚C結合蛋白)、PCBP2、PCBP3、PCBP4、PABP1(聚A結合蛋白)、PTB、阿耳戈蛋白家族、HNRNPK (異質核核糖核蛋白K)或La蛋白。

c. 終止序列

【0305】 在某些實施例中，核心功能元件包含終止序列。在一些實

施例中，終止序列包含終止密碼子。在一個實施例中，終止序列包含終止卡匣。在一些實施例中，終止卡匣包含至少2個終止密碼子。在一些實施例中，終止卡匣包含至少2個終止密碼子之框架。在相同實施例中，終止卡匣中之終止密碼子之框架各自包含1、2或更多個終止密碼子。在一些實施例中，終止卡匣包含LoxP或RoxStopRox、或frt側接之終止卡匣。在相同實施例中，終止卡匣包含lox-終止-lox終止卡匣。

C. **變體**

【0306】 在某些實施例中，本文提供之環狀RNA聚核苷酸包含經修飾之RNA核苷酸及/或經修飾之核苷。在一些實施例中，經修飾核苷為m^5C (5-甲基胞苷)。在另一實施例中，經修飾核苷為m^5U (5-甲基尿苷)。在另一實施例中，經修飾核苷為m^6A (N^6-甲基腺苷)。在另一實施例中，經修飾核苷為s^2U (2-硫代尿苷)。在另一實施例中，經修飾核苷為Ψ (假尿苷)。在另一實施例中，經修飾核苷為Um (2'-O-甲基尿苷)。在其他實施例中，經修飾之核苷為m^1A (1-甲基腺苷)；m^2A (2-甲基腺苷)；Am (2'-O-甲基腺苷)；ms^2m^6A (2-甲硫基-N^6-甲基腺苷)；i^6A (N^6-異戊烯基腺苷)；ms^2i6A (2-甲硫基-N^6異戊烯基腺苷)；io^6A (N^6-(順式-羥基異戊烯基)腺苷)；ms^2io^6A (2-甲硫基-N^6-(順式-羥基異戊烯基)腺苷)；g^6A (N^6-甘胺醯基胺甲醯基腺苷)；t^6A (N^6-蘇胺醯基胺甲醯基腺苷)；ms^2t^6A (2-甲硫基-N^6-羥丁胺醯基胺甲醯基腺苷)；m^6t^6A (N^6-甲基-N^6-蘇胺醯基胺甲醯基腺苷)；hn^6A (N^6-羥基正纈胺醯基胺甲醯基腺苷)；ms^2hn^6A (2-甲硫基-N^6-羥基正纈胺醯基胺甲醯基腺苷)；Ar(p) (2'-O-核糖苷基腺苷(磷酸鹽))；I (肌苷)；m^1I (1-甲基肌苷)；m^1Im (1,2'-O-二甲基肌苷)；m^3C (3-甲基胞苷)；Cm (2'-O-甲基胞苷)；s^2C (2-硫代胞苷)；ac^4C (N^4-乙醯基胞苷)；f^5C (5-

甲醯基胞苷)；m^5Cm (5,2'-O-二甲基胞苷)；ac^4Cm (N^4-乙醯基-2'-O-甲基胞苷)；k^2C (立西啶(lysidine))；m^1G (1-甲基鳥苷)；m^2G (N^2-甲基鳥苷)；m^7G (7-甲基鳥苷)；Gm (2'-O-甲基鳥苷)；$m^2{}_2G$ (N^2,N^2-二甲基鳥苷)；m^2Gm (N^2,2'-O-二甲基鳥苷)；$m^2{}_2Gm$ (N^2,N^2,2'-O-三甲基鳥苷)；Gr(p) (2'-O-核糖鳥苷(磷酸鹽))；yW (懷俄丁苷)；o_2yW (過氧基懷俄丁苷)；OHyW (羥基懷俄丁苷)；OHyW* (欠修飾之羥基懷俄丁苷)；imG (懷俄苷)；mimG (甲基懷俄苷)；Q (Q核苷)；oQ (環氧Q核苷)；galQ (半乳糖基-Q核苷)；manQ (甘露糖基-Q核苷)；$preQ_0$ (7-氰基-7-去氮鳥苷)；$preQ_1$ (7-胺基甲基-7-去氮鳥苷)；G^+ (古嘌苷)；D (二氫尿苷)；m^5Um (5,2'-O-二甲基尿苷)；s^4U (4-硫代尿苷)；m^5s^2U (5-甲基-2-硫代尿苷)；s^2Um (2-硫基-2'-O-甲基尿苷)；acp^3U (3-(3-胺基-3-羧丙基)尿苷)；ho^5U (5-羥基尿苷)；mo^5U (5-甲氧基尿苷)；cmo^5U (尿苷5-氧基乙酸)；$mcmo^5U$ (尿苷5-氧基乙酸甲酯)；chm^5U (5-(羧基羥甲基)尿苷))；$mchm^5U$ (5-(羧基羥甲基)尿苷甲酯)；mcm^5U (5-甲氧基羧甲基尿苷)；mcm^5Um (5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基尿苷)；mcm^5s^2U (5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷)；nm^5S^2U (5-胺基甲基-2-硫代尿苷)；mnm^5U (5-甲基胺基甲基尿苷)；mnm^5s^2U (5-甲胺基甲基-2-硫代尿苷)；mnm^5se^2U (5-甲胺基甲基-2-硒基尿苷)；ncm^5U (5-胺甲醯基甲基尿苷)；ncm^5Um (5-胺甲醯基甲基-2'-O-甲基尿苷)；$cmnm^5U$ (5-羧甲基胺基甲基尿苷)；$cmnm^5Um$ (5-羧甲基胺基甲基-2'-O-甲基尿苷)；$cmnm^5s^2U$ (5-羧甲基胺基甲基-2-硫代尿苷)；$m^6{}_2A$ (N^6,N^6-二甲基腺苷)；Im (2'-O-甲基肌苷)；m^4C (N^4-甲基胞苷)；m^4Cm (N^4,2'-O-二甲基胞苷)；hm^5C (5-羥甲基胞苷)；m^3U (3-甲基尿苷)；cm^5U (5-羧甲基尿苷)；m^6Am (N^6,2'-O-二甲基腺苷)；$m^6{}_2Am$

(N^6,N^6,O-2'-三甲基腺苷)；$m^{2,7}G$ (N^2,7-二甲基鳥苷);$m^{2,2,7}G$ (N^2,N^2,7-三甲基鳥苷)；m^3Um (3,2'-O-二甲基尿苷)；m^5D (5-甲基二氫尿苷)；f^5Cm (5-甲醯基-2'-O-甲基胞苷)；m^1Gm (1,2'-O-二甲基鳥苷)；m^1Am (1,2'-O-二甲基腺苷)；τm ^5U (5-牛磺酸甲基尿苷)；τm^5s^2U (5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷))；imG -14(4-去甲基懷俄苷)；imG2 (異懷俄苷)；或ac^6A (N^6-乙醯基腺苷)。

【0307】 在一些實施例中，經修飾核苷可包括選自以下之群之化合物：吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮雜-尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羥基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮-假尿苷、二氫尿苷、二氫假尿苷、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、5-氮雜-胞苷、假異胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙醯基胞苷、5-甲醯基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羥甲基胞苷、1-甲基-假異胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假異胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假異胞苷、4-硫代-1-甲基-假異胞苷、4-硫代-1-甲基-1-去氮-假異胞苷、1-甲基-1-去氮-假異胞苷、澤布拉林(zebularine)、5-氮雜-澤布拉林、5-甲基-澤布拉林、5-氮雜-2-硫代-澤布拉林、2-硫代-澤布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假異胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假異胞苷、2-胺基嘌呤、2、6-二胺基嘌呤、7-去氮-腺嘌呤、7-去氮-

8-氮雜-腺嘌呤、7-去氮-2-胺基嘌呤、7-去氮-8-氮雜-2-胺基嘌呤、7-去氮-2,6-二胺基嘌呤、7-去氮-8-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-異戊烯基腺苷、N6-(順式-羥基異戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(順式-羥基異戊烯基)腺苷、N6-甘胺醯基胺甲醯基腺苷、N6-蘇胺醯基胺甲醯基腺苷、2-甲硫基-N6-蘇胺醯基胺甲醯基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、懷俄苷、懷俄丁苷、7-去氮-鳥苷、7-去氮-8-氮雜-鳥苷、6-硫基-鳥苷、6-硫基-7-去氮-鳥苷、6-硫基-7-去氮-8-氮雜-鳥苷、7-甲基-鳥苷、6-硫基-7-甲基-鳥苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鳥苷、1-甲基鳥苷、N2-甲基鳥苷、N2,N2-二甲基鳥苷、8-側氧基-鳥苷、7-甲基-8-側氧基-鳥苷、1-甲基-6-硫基-鳥苷、N2-甲基-6-硫基-鳥苷及N2,N2-二甲基-6-硫基-鳥苷。在另一實施例中，修飾獨立地選自由5-甲基胞嘧啶、假尿苷及1-甲基假尿苷組成之群。

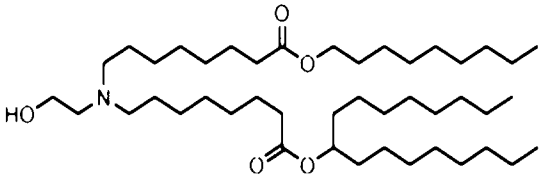
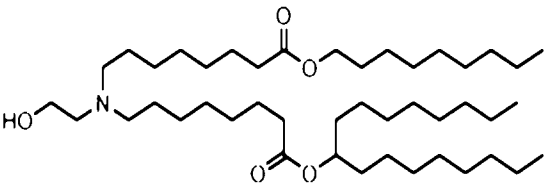
【0308】 在一些實施例中，經修飾核糖核苷包括5-甲基胞苷、5-甲氧基尿苷、1-甲基-假尿苷、N6-甲基腺苷及/或假尿苷。在一些實施例中，此類經修飾核苷提供額外穩定性及對免疫活化之抗性。

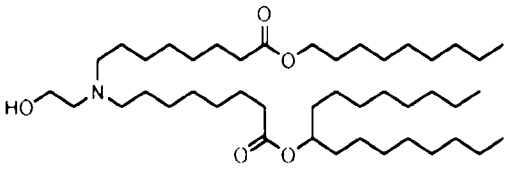
【0309】 在特定實施例中，聚核苷酸可經密碼子最佳化。密碼子最佳化序列可為其中編碼多肽之聚核苷酸中之密碼子已經取代以增加多肽之表現、穩定性及/或活性的序列。影響密碼子最佳化之因素包括但不限於以下中之一或多者：(i)兩種或更多種生物體或基因或以合成方式構築之偏倚台之間的密碼子偏倚變化，(ii)生物體、基因或基因集內之密碼子偏倚程度變化，(iii)包括密碼子之情形之系統變化，(iv)根據密碼子之解碼tRNA的密碼子變化，(v)根據整體或三聯體之一個位置中之GC%的密碼子

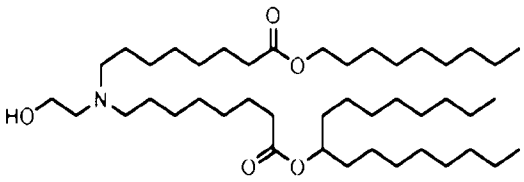
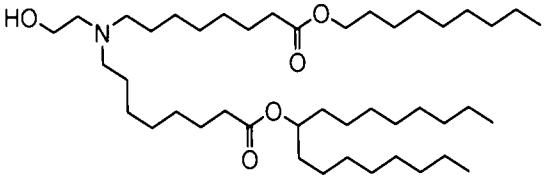
變化，(vi)與例如天然存在之序列之參考序列的類似性程度變化，(vii)密碼子頻率截止值變化，(viii)自DNA序列轉錄之mRNA之結構特性，(ix)關於作為密碼子取代集設計之基礎之DNA序列之功能的先前知識，及/或(x)用於各胺基酸之密碼子集之系統變化。在一些實施例中，經密碼子最佳化聚核苷酸可使核糖核酸酶碰撞減至最少及/或限制表現序列與核心功能元件之間的結構干擾。

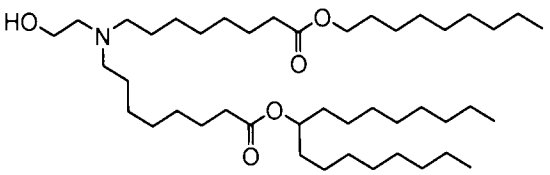
3. 有效裝載

【0310】 在一些實施例中，表現序列編碼治療性蛋白質。在一些實施例中，治療性蛋白質選自下表中所列之蛋白質。

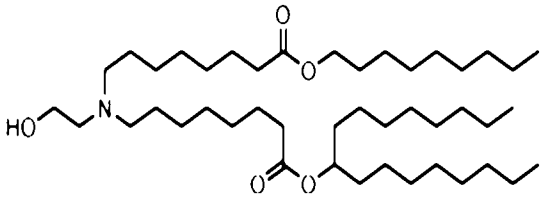
有效裝載	序列	目標細胞/器官	較佳遞送調配物
CD19 CAR	序列309-314中之任一者	T細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%) PEG DMG (1.5 mol%)
BCMA CAR	MALPVTALLLPLALLL HAARPDIVLTQSPASL AVSLGERATINCRASES VSVIGAHLIHWYQQKP GQPPKLLIYLASNLET GVPARFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDAAIYYCL QSRIFPRTFGQGTKLEI KGSTSGSGKPGSGEGS TKGQVQLVQSGSELK KPGASVKVSCKASGY TFTDYSINWVRQAPGQ GLEWMGWINTETREP AYAYDFRGRFVFSLDT SVSTAYLQISSLKAEDT AVYYCARDYSYAMDY WGQGTLVTVSSAAAT	T細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%) PEG DMG (1.5 mol%)

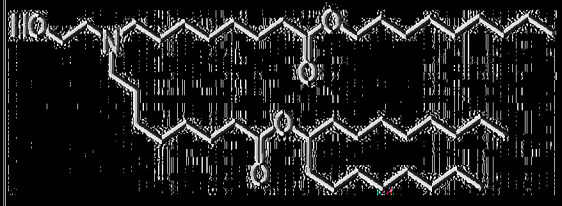
	TTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALP PR		
MAGE-A4 TCR	TCR α鏈： KNQVEQSPQSLIILEGK NCTLQCNYTVSPFSNL RWYKQDTGRGPVSLTI MTFSENTKSNGRYTAT LDADTKQSSLHITASQ LSDSASYICVVNHSGG SYIPTFGRGTSLIVHPYI QKPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPESS TCR β鏈： DVKVTQSSRYLVKRTG EKVFLECVQDMDHEN MFWYRQDPGLGLRLI YFSYDVKMKEKGDIPE GYSVSREKKERFSLILE SASTNQTSMYLCASSF LMTSGDPYEQYFGPGT RLTVTEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQI VSAEAWGRAD	T細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%) PEG DMG (1.5 mol%)

NY-ESO TCR	TCRα胞外序列 MQEVTQIPAALSVPEG ENLVLNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLL LIQSSQREQTSGRLNA SLDKSSGRSTLYIAASQ PGDSATYLCAVRPTSG GSYIPTFGRGTSLIVHP Y TCRβ胞外序列 MGVTQTPKFQVLKTG QSMTLQCAQDMNHEY MSWYRQDPGMGLRLI HYSVGAGITDQGEVPN GYNVSRSTTEDFPLRL LSAAPSQTSVYFCASS YVGNTGELFFGEGSRL TVL	T細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%) PEG DMG (1.5 mol%)
EPO	APPRLICDSRVLERYLL EAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVNFY AWKRMEVGQQAVEV WQGLALLSEAVLRGQ ALLVNSSQPWEPLQLH VDKAVSGLRSLTTLLR ALGAQKEAISPPDAAS AAPLRTITADTFRKLFR VYSNFLRGKLKLYTGE ACRTGDR	腎或骨髓	
PAH	MSTAVLENPGLGRKLS DFGQETSYIEDNCNQN GAISLIFSLKEEVGALA KVLRLFEENDVNLTHI ESRPSRLKKDEYEFFT HLDKRSLPALTNIIKIL RHDIGATVHELSRDKK KDTVPWFPRTIQELDR FANQILSYGAELDADH PGFKDPVYRARRKQF ADIAYNYRHGQPIPRV EYMEEEKKTWGTVFK TLKSLYKTHACYEYN HIFPLLEKYCGFHEDNI PQLEDVSQFLQTCTGF RLRPVAGLLSSRDFLG GLAFRVFHCTQYIRHG SKPMYTPEPDICHELL GHVPLFSDRSFAQFSQ EIGLASLGAPDEYIEKL	肝細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) 膽固醇(38.5% mol%) PEG-DMG (1.5%) 或 MC3 (50 mol%) DSPC (10 mol%) 膽固醇(38.5% mol%) PEG-DMG (1.5%)

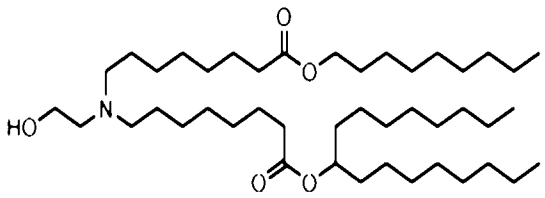
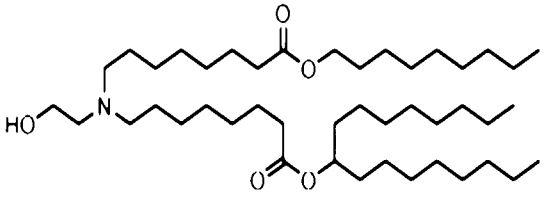
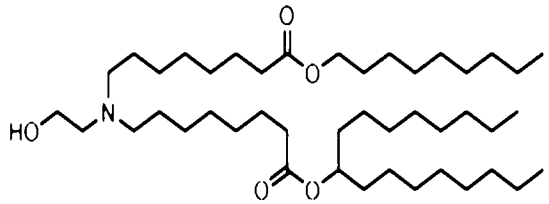
	ATIYWFTVEFGLCKQG DSIKAYGAGLLSSFGE LQYCLSEKPKLLPLEL EKTAIQNYTVTEFQPL YYVAESFNDAKEKVR NFAATIPRPFSVRYDPY TQRIEVLDNTQQLKIL ADSINSEIGILCSALQKI K		
CPS1	LSVKAQTAHIVLEDGT KMKGYSFGHPSSVAG EVVFNTGLGGYPEAIT DPAYKGQILTMANPIIG NGGAPDTTALDELGLS KYLESNGIKVSGLLVL DYSKDYNHWLATKSL GQWLQEEKVPAIYGV DTRMLTKIIRDKGTML GKIEFEGQPVDFVDPN KQNLIAEVSTKDVKV YGKGNPTKVVAVDCGI KNNVIRLLVKRGAEVH LVPWNHDFTKMEYDG ILIAGGPGNPALAEPLI QNVRKILESDRKEPLF GISTGNLITGLAAGAK TYKMSMANRGQNQP VLNITNKQAFITAQNH GYALDNTLPAGWKPLF VNVNDQTNEGIMHES KPFFAVQFHPEVTPGPI DTEYLFDSFFSLIKKGK ATTITSVLPKPALVASR VEVSKVLILGSGGLSIG QAGEFDYSGSQAVKA MKEENVKTVLMNPNI ASVQTNEVGLKQADT VYFLPITPQFVTEVIKA EQPDGLILGMGGQTAL NCGVELFKRGVLKEY GVKVLGTSVESIMATE DRQLFSDKLNEINEKI APSFAVESIEDALKAA DTIGYPVMIRSAYALG GLGSGICPNRETLMDL STKAFAMTNQILVEKS VTGWKEIEYEVVRDA DDNCVTVCNMENVD AMGVHTGDSVVVAPA QTLSNAEFQMLRRTSI NVVRHLGIVGECNIQF	肝細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) 膽固醇(38.5% mol%) PEG-DMG (1.5%) 或 MC3 (50 mol%) DSPC (10 mol%) 膽固醇(38.5% mol%) PEG-DMG (1.5%)

	ALHPTSMEYCIIEVNA RLSRSSALASKATGYP LAFIAAKIALGIPLPEIK NVVSGKTSACFEPSLD YMVTKIPRWDLDRFH GTSSRIGSSMKSVGEV MAIGRTFEESFQKALR MCHPSIEGFTPRLPMN KEWPSNLDLRKELSEP SSTRIYAIAKAIDDNMS LDEIEKLTYIDKWFLY KMRDILNMEKTLKGL NSESMTEETLKRAKEI GFSDKQISKCLGLTEA QTRELRLKKNIHPWV KQIDTLAAEYPSVTNY LYVTYNGQEHDVNFD DHGMMVLGCGPYHIG SSVEFDWCAVSSIRTLR QLGKKTVVVNCNPET VSTDFDECDKLYFEEL SLERILDIYHQEACGG CIISVGGQIPNNLAVPL YKNGVKIMGTSPLQID RAEDRSIFSAVLDELK VAQAPWKAVNTLNEA LEFAKSVDYPCLLRPS YVLSGSAMNVVFSED EMKKFLEEATRVSQEH PVVLTKFVEGAREVE MDAVGKDGRVISHAIS EHVEDAGVHSGDATL MLPTQTISQGAIEKVK DATRKIAKAFAISGPFN VQFLVKGNDVLVIECN LRASRSFPFVSKTLGV DFIDVATKVMIGENVD EKHLPTLDHPIIPADYV AIKAPMFSWPRLRDA DPILRCEMASTGEVAC FGEGIHTAFLKAMLST GFKIPQKGILIGIQQSFR PRFLGVAEQLHNEGFK LFATEATSDWLNANNV PATPVAWPSQEGQNPS LSSIRKLIRDGSIDLVIN LPNNNTKFVHDNYVIR RTAVDSGIPLLTNFQVT KLFAEAVQKSRKVDSK SLFHYRQYSAGKAA		

Cas9	MKRNYILGLDIGITSV GYGIIDYETRDVIDAG VRLFKEANVENNEGR RSKRGARRLKRRRRH RIQRVKKLLFDYNLLT DHSELSGINPYEARVK GLSQKLSEEEFSAALL HLAKRRGVHNVNEVE EDTGNELSTKEQISRN SKALEEKYVAELQLER LKKDGEVRGSINRFKT SDYVKEAKQLLKVQK AYHQLDQSFIDTYIDLL ETRRTYYEGPGEGSPF GWKDIKEWYEMLMG HCTYFPEELRSVKYAY NADLYNALNDLNNLVI TRDENEKLEYYEKFQII ENVFKQKKKPTLKQIA KEILVNEEDIKGYRVTS TGKPEFTNLKVYHDIK DITARKEIIENAELLDQ IAKILTIYQSSEDIQEEL TNLNSELTQEEIEQISN LKGYTGTHNLSLKAIN LILDELWHTNDNQIAIF NRLKLVPKKVDLSQQ KEIPTTLVDDFILSPVV KRSFIQSIKVINAIIKKY GLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQ TNERIEEIIRTTGKENA KYLIEKIKLHDMQEGK CLYSLEAIPLEDLLNNP FNYEVDHIIPRSVSFDN SFNNKVLVKQEENSKK GNRTPFQYLSSSDSKIS YETFKKHILNLAKGKG RISKTKKEYLLEERDIN RFSVQKDFINRNLVDT RYATRGLMNLLRSYFR VNNLDVKVKSINGGFT SFLRRKWKFKKERNK GYKHHAEDALIIANAD FIFKEWKKLDKAKKV MENQMFEEKQAESMP EIETEQEYKEIFITPHQI KHIKDFKDYKYSHRV DKKPNRELINDTLYST RKDDKGNTLIVNNLN GLYDKDNDKLKKLIN	免疫細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%) PEG DMG (1.5 mol%)

	KSPEKLLMYTIHDPQT YQKLKLIMEQYGDEK NPLYKYYEETGNYLTK YSKKDNGPVIKKIKYY GNKLNAHLDITDDYP NSRNKVVKLSLKPYRF DVYLDNGVYKFVTVK NLDVIKKENYYEVNS KCYEEAKKLKKISNQA EFIASFYNNDLIKINGE LYRVIGVNNDLLNRIE VNMIDITYREYLENMN DKRPPRIIKTIASKTQSI KKYSTDILGNLYEVKS KKHPQIIKKG		
ADAMTS13	AAGGLHLELLVAVGP DVFQAHQEDTERYVLT NLNIGAELLRDPSLGA QFRVHLVKMVILTEPE GAPNITANLTSSLLSVC GWSQTINPEDDTDPGH ADLVLYITRFDLELPD GNRQVRGVTQLGGAC SPTWSCLITEDTGFDL GVTIAHEIGHSFGLEH DGAPGSGCGPSGHVM ASDGAAPRAGLAWSP CSRRQLLSLLSAGRAR CVWDPPRPQPGSAGH PPDAQPGLYYSANEQC RVAFGPKAVACTFARE HLDMCQALSCHTDPL DQSSCSRLLVPLLDGT ECGVEKWCSKGRCRS LVELTPLAAVHGRWSS WGPRSPCSRSCGGGV VTRRRQCNNPRPAFGG RACVGADLQAEMCNT QACEKTQLEFMSQQC ARTDGQPLRSSPGGAS FYHWGAAVPHSQGDA LCRHMCRAIGESFIMK RGDSFLDGTRCMPSGP REDGTLSLCVSGSCRT FGCDGRMDSQQVWD RCQVCGGDNSTCSPR KGSFTAGRAREYVTFL TVTPNLTSVYIANHRP LFTHLAVRIGGRYVVA GKMSISPNTTYPSLLE DGRVEYRVALTEDRLP	肝細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) 膽固醇(38.5% mol%) PEG-DMG (1.5%) 或 MC3 (50 mol%) DSPC (10 mol%) 膽固醇(38.5% mol%) PEG-DMG (1.5%)

	RLEEIRIWGPLQEDADI QVYRRYGEEYGNLTRP DITFTYFQPKPRQAWV WAAVRGPCSVSCGAG LRWVNYSCLDQARKE LVETVQCQGSQQPPAW PEACVLEPCPPYWAVG DFGPCSASCGGGLRER PVRCVEAQGSLLKTLP PARCRAGAQQPAVALE TCNPQPCPARWEVSEP SSCTSAGGAGLALENE TCVPGADGLEAPVTEG PGSVDEKLPAPEPCVG MSCPPGWGHLDATSA GEKAPSPWGSIRTGAQ AAHVWTPAAGSCSVS CGRGLMELRFLCMDS ALRVPVQEELCGLASK PGSRREVCQAVPCPAR WQYKLAACSVSCGRG VVRRILYCARAHGEDD GEEILLDTQCQGLPRP EPQEACSLEPCPPRWK VMSLGPCSASCGLGTA RRSVACVQLDQGQDV EVDEAACAALVRPEAS VPCLIADCTYRWHVG TWMECSVSCGDGIQR RRDTCLGPQAQAPVPA DFCQHLPKPVTVRGC WAGPCVGQGTPSLVPH EEAAAPGRTTATPAGA SLEWSQARGLLFSPAP QPRRLLPGPQENSVQS SACGRQHLEPTGTIDM RGPGQADCAVAIGRPL GEVVTLRVLESSLNCS AGDMLLLWGRLTWRK MCRKLLDMTFSSKTN TLVVRQRCGRPGGGV LLRYGSQLAPETFYRE CDMQLFGPWGEIVSPS LSPATSNAGGCRLFINV APHARIAIHALATNMG AGTEGANASYILIRDT HSLRTTAFHGQQVLY WESESSQAEMEFSEGF LKAQASLRGQYWTLQ SWVPEMQDPQSWKG KEGT		

FOXP3	MPNPRPGKPSAPSLAL GPSPGASPSWRAAPKA SDLLGARGPGGTFQGR DLRGGAHASSSSLNPM PPSQLQLPTLPLVMVA PSGARLGPLPHLQALL QDRPHFMHQLSTVDA HARTPVLQVHPLESPA MISLTPPTTATGVFSLK ARPGLPPGINVASLEW VSREPALLCTFPNPSAP RKDSTLSAVPQSSYPL LANGVCKWPGCEKVF EEPEDFLKHCQADHLL DEKGRAQCLLQREMV QSLEQQLVLEKEKLSA MQAHLAGKMALTKAS SVASSDKGSCCIVAAG SQGPVVPAWSGPREAP DSLFAVRRHLWGSHG NSTFPEFLHNMDYFKF HNMRPPFTYATLIRWAI LEAPEKQRTLNEIYHW FTRMFAFFRNHPATWK NAIRHNLSLHKCFVRV ESEKGAVWTVDELEFR KKRSQRPSRCSNPTPG P	免疫細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%) PEG DMG (1.5 mol%)
IL-10	SPGQGTQSENSCTHFP GNLPNMLRDLRDAFS RVKTFFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGC QALSEMIQFYLEEVMP QAENQDPDIKAHVNSL GENLKTLRLRLRRCHR FLPCENKSKAVEQVKN AFNKLQEKGIYKAMS EFDIFINYIEAYMTMKI RN	免疫細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%) PEG DMG (1.5 mol%)
IL-2	APTSSSTKKTQLQLEH LLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELK PLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIIST LT	免疫細胞	 (50 mol%) DSPC (10 mol%) β-植物固醇(28.5% mol%) 膽固醇(10 mol%)

			PEG DMG (1.5 mol%)
BCSP31 (BCSP_BRUME)	MKFGSKIRRLAVAAVAGAIALGASFAVAQAPTFFRIGTGGTAGTYYPIGGLIANAISGAGEKGVPGLVATAVSSNGSVANINAIKSGALESGFTQSDVAYWAYNGTGLYDGKGKVEDLRLLATLYPETIHIVARKDANIKSVADLKGKRVSLDEPGSGTIVDARIVLEAYGLTEDDIKAE HLKPGPAGERLKDGALDAYFFVGGYPTGAISELAISNGISLVPISGPEADKILEKYSFFSKDVVPAGAYKDVAETPTLAVAAQWVTSAKQPDDLIYNITKVLWNEDTRKALDAGHAKGKLIKLDSATSSLGIPLHPGAERFYKEAGVLK	免疫細胞	
MOMP (MOMP6_CHLP6)	MKKLLKSALLFAATGSALSLQALPVGNPAEPSLLIDGTMWEGASGDPCDPCATWCDAISIRAGYYGDYVFDRVLKVDVNKTFSGMAATPTQATGNASNTNQPEANGRPNIAYGRHMQDAEWFSNAAFLALNIWDRFDIFCTLGASNGYFKASSAAFNLVGLIGFSAASSISTDLPMQLPNVGITQGVVEFYTDTSFSWSVGARGALWECGCATLGAEFQYAQSNPKIEMLNVTSSPAQFVIHKPRGYKGASSNFPLPITAGTTEATDTKSATIKYHEWQVGLALSYRLNMLVPYIGVNWSRATFDADTIRIAQPKLKSEILNITTWNPSLIGSTTALPNNSGKDVLSDVLQIASIQINKM KSRKACGVAVGATLIDADKWSITGEARLINERAAHMNAQFRF	免疫細胞	
FomA	MKKLALVLGLLLVVG	免疫細胞	

	SVASAKEVMPAPTPAP EKVVEYVEKPVIVYRD REVAPAWRPNGSVDV QYRWYGEVEKKNPKD DKDENWATGKVNAGR LQTLTKVNFTEKQTLE VRTRNHHTLNDT DANNKKSNGAADEYR LRHFYNFGKLGSSKVN ATSRVEFKQKTNDGEK SLGASVLFDFADYIYS NNFFKVDKLGLRPGY KYVWKGHGNGEEGTP TVHNEYHLAFESDFTL PFNFALNLEYDLSYNR YREKFETTDGLKKAE WYGELTAVLSNYTPLY KAGAFELGFNAEGGY DTYNMHQYKRIGGED GTSVDRRDYELYLEPT LQVSYKPTDFVKLYAA AGADYRNRITGESEVK RWRWQP TASAGMKVTF		
MymA	MNQHFDVLIIGAGLSG IGTACHVTAEFPDKTIA LLERRERLGGTWDLFR YPGVRSDSDMFTFGY KFRPWRDVKVLADGA SIRQYIADTATEFGVDE KIHYGLKVNTAEWSSR QCRWTVAGVHEATGE TRTYTCDYLISCTGYY NYDAGYLPDFPGVHR FGGRCVHPQHWPEDL DYSGKKVVVIGSGATA VTLVPAMAGSNPGSA AHVTMLQRSPSYIFSL PAVDKISEVLGRFLPDR WVYEFGRRRNIAIQRK LYQACRRWPKLMRRL LLWEVRRRLGRSVDM SNFTPNYLPWDERLCA V PNGDLFKTLASGAASV VTDQIETFTEKGILCKS GREIEADIIVTATGLNI QMLGGMRLIVDGAEY QLPEKMTYKGVLLEN APNLAWIIGYTNASWT LKSDIAGAYLCRLLRH	免疫細胞	

	MADNGYTVATPRDAQ DCALDVGMFDQLNSG YVKRGQDIMPRQGSK HPWRVLMHYEKDAKI LLEDPIDDGVLHFAAA AQDHAAA		
ESAT6	MTEQQWNFAGIEAAA SAIQGNVTSIHSLLDEG KQSLTKLAAAWGGSG SEAYQGVQQKWDATA TELNNALQNLARTISE AGQAMASTEGNVTG MFA	免疫細胞	
PorB	MKKSLIALTLAALPVA AMADVTLYGTIKAGV ETYRFVAHNGAQASG VETATEIADLGSKIGFK GQEDLGNGLKAIWQL EQKAYVSGTNTGWGN RQSFIGLKGGFGKVRV GRLNSVLKDTGGFNP WEGKSEYLSLSNIARP EERPISVRYDSPEFAGF SGSVQYVPNDNSGEN KSESYHAGFNYKNSGF FVQYAGSYKRHNYTT EKHQIHRLVGGYDHD ALYASVAVQQQDAKL AWPDDNSHNSQTEVAT TVAYRFGNVTPRVSYA HGFKGSVYEANHDNT YDQVVVGAEYDFSKR TSALVSAGWLQEGKG A	免疫細胞	
PVL (殺白血球素(Panton Valentine leukocidin))	FVGYKPYSQNPRDYF VPDNELPPLVHSGFNP SFIATVSHEKGSGDTSE FEITYGRNMDVTHATR RTTHYGNSYLEGSRIH NAFVNRNYTVKYEVN WKTHEIKVKGHN	免疫細胞	
孔蛋白(Porin)	EVKLSGDARMGVMY NGDDWNFSSRSRVLFT MSGTTDSGLEFGASFK AHESVGAETGEDGTV FLSGAFGKIEMGDALG ASEALFGDLYEVGYTD LDDRGGNDIPYLTGDE RLTAEDNPVLLYTYSA GAFSVAASMSDGKVG	免疫細胞	

	ETSEDDAQEMAVAAA YTFGNYTVGLGYEKID SPDTALMADMEQLEL AAIAKFGATNVKAYYA DGELDRDFARAVFDLT PVAAAATAVDHKAYGL SVDSTFGATTVGGYVQ VLDIDTIDDVTYYGLG ASYDLGGGASIVGGIA DNDLPNSDMVADLGV KFKF		
OmpA	MKKTAIAIAVALAGFA TVAQAAPKDNTWYTG AKLGWSQYHDTGFIN NNGPTHENQLGAGAF GGYQVNPYVGFEMGY DWLGRMPYKGSVENG AYKAQGVQLTAKLGY PITDDLDIYTRLGGMV WRADTKSNVYGKNH DTGVSPVFAGGVEYAI TPEIATRLEYQWTNNI GDAHTIGTRPDNGMLS LGVSYRFGQGEAAPV VAPAPAPAPEVQTKHF TLKSDVLFNFNKATLK PEGQAALDQLYSQLSN LDPKDGSVVVLGYTD RIGSDAYNQGLSERRA QSVVDYLISKGIPADKI SARGM GESNPVTGNTCDNVK QRAALIDCLAPDRRVE IEVKGIKDVVTQPQA	免疫細胞	
MOMP	AGVATATGTKSATINY HEWQVGASLSYRLNS LVPYIGVQWSRATFDA DNIRIAQPKLPTAVLNL TAWNPSLLGNATALST TDSFSDF	免疫細胞	
PepO	MTTYQDDFYQAVNGK WAETAVIPDDKPRTGG FSDLADEIEALMLDTT DAWLAGENIPDDAILK NFVKFHRLVADYAKR DEVGVSPILPLIEEYQS LKSFSEFVANIAKYEL AGLPNEFPFSVAPDFM NAQLNVLWAEAPSILL PDTTYYEEGNEKAEEL	免疫細胞	

	RGIWRQSQEKLLPQFG FSTEEIKDLLDKVIELD KQLAKYVLSREEGSEY AKLYHPYVWADFKKL APELPLDSIFEKILGQV PDKVIVPEERFWTEFA ATYYSEANWDLLKAN LIVDAANAYNAYLTDD IRVESGAYSRALSGTPQ AMDKQKAAFYLAQGP FSQALGLWYAGQKFSP EAKADVESKVARMIE VYKSRLETADWLAPAT REKAITKLNVITPHIGY PEKLPETYAKKVIDESL SLVENAQNLAKITIAH TWSKWNKPVDRSEW HMPAHLVNAYYDPQQ NQIVFPAAILQEPFYSL DQSSSANYGGIGAVIA HEISHAFDTNGASFDE HGSLNDWWTQEDYA AFKERTDKIVAQFDGL ESHGAKVNGKLTVSE NVADLGGVACALEAA QSEEDFSARDFFINFAT IWRMKAREEYMQML ASIDVHAPGELRTNVT LTNFDAFHETFDIKEG DAMWRAPKDRVIIW		
OmpU	MNKTLIALAVSAAAVA TGAYADGINQSGDKA GSTVYSAKGTSLEVGG RAEARLSLKDGKAQD NSRVRLNFLGKAEIND SLYGVGFYEGEFTTND QGKNASNNSLDNRYT YAGIGGTYGEVTYGK NDGALGVITDFTDIMS YHGNTAAEKIAVADRV DNMLAYKGQFGDLGV KASYRFADRNAVDAM GNVVTETNAAKYSDN GEDGYSLSAIYTFGDT GFNVGAGYADQDDQN EYMLAASYRMENLYF AGLFTDGELAKDVDY TGYELAAGYKLGQAA FTATYNNAETAKETSA DNFAIDATYYFKPNFR SYISYQFNLLDSDKVG	免疫細胞	

	KVASEDELAIGLRYDF		
二氧四氫蝶啶合酶	MKGGAGVPDLPSLDA SGVRLAIVASSWHGKI CDALLDGARKVAAGC GLDDPTVVRVLGAIEIP VVAQELARNHDAVVA LGVVIRGQTPHFDYVC DAVTQGLTRVSLDSST PIANGVLTTNTEEQAL DRAGLPTSAEDKGAQ ATVAALATALTLRELR AHS	免疫細胞	
Omp16	MKKLTKVLLVAGSVAV LAACGSSKKDESAGQ MFGGYSVQDLQQRYN TVYFGFDKYNIEGEYV QILDAHAAFLNATPAT KVVVEGNTDERGTPE YNIALGQRRADAVKH YLSAKGVQAGQVSTV SYGEEKPAVLGHDEAA YSKNRRAVLAY	免疫細胞	
Omp19	MGISKASLLSLAAAGI VLAGCQSSRLGNLDN VSPPPPPAPVNAVPAGT VQKGNLDSPTQFPNAP STDMSAQSGTQVASLP PASAPDLTPGAVAGVW NASLGGQSCKIATPQT KYGQGYRAGPLRCPG ELANLASWAVNGKQL VLYDANGGTVASLYSS GQGRFDGQTTGGQAV TLSR	免疫細胞	
CobT	MQILADLLNTIPAIDST AMSRAQRHIDGLLKP VGSLGKLEVLAIQLAG MPGLNGIPHVGKKAV LVMCADHGVWEEGVA ISPKEVTAIQAENMTR GTTGVCVLAEQAGAN VHVIDVGIDTAEPIPGL INMRVARGSGNIASAP AMSRRQAEKLLLDVIC YTQELAKNGVTLFGV GELGMANTTPAAAIVS TITGRDPEEVVGIGAN LPTDKLANKIDVVRRA ITLNQPNPQDGVDVLA KVGGFDLVGIAGVML	免疫細胞	

	GAASCGLPVLLDGFLS YAAALAACQMSPAIKP YLIPSHLSAEKGARIAL SHLGLEPYLNMEMRL GEGSGAALAMPIIEAA CAIYNNMGELAASNIV LPGNTTSDLNS		
RpfE	MKNARTTLIAAAIAGT LVTTSPAGIANADDAG LDPNAAAGPDAVGFD PNLPPAPDAAPVDTPP APEDAGFDPNLPPPLA PDFLSPPAEEAPPVPVA YSVNWDAIAQCESGG NWSINTGNGYYGGLR FTAGTWRANGGSGSA ANASREEQIRVAENVL RSQGIRAWPVCGRRG	免疫細胞	
Rv0652	MAKLSTDELLDAFKE MTLLELSDFVKKFEET FEVTAAAPVAVAAAGA APAGAAVEAAEEQSEF DVILEAAGDKKIGVIK VVREIVSGLGLKEAKD LVDGAPKPLLEKVAKE AADEAKAKLEAAGAT VTVK	免疫細胞	
HBHA	MAENSNIDDIKAPLLA ALGAADLALATVNELI TNLRERAEETRTDTRS RVEESRARLTKLQEDL PEQLTELREKFTAEELR KAAEGYLEAATSRYNE LVERGEAALERLRSQQ SFEEVSARAEGYVDQ AVELTQEALGTVASQT RAVGERAAKLVGIELP KKAAPAKKAAPAKKA APAKKAAAKKAPAKK AAAKKVTQK	免疫細胞	
NhhA	MNKIYRIIWNSALNAW VAVSELTRNHTKRASA TVATAVLATLLFATVQA STTDDDDLYLEPVQRT AVVLSFRSDKEGTGEK EVTEDSNWGVYFDKK GVLTAGTITLKAGDNL KIKQNTNENTNASSFT YSLKKDLTDLTSVGTE KLSFSANSNKVNITSD	免疫細胞	

	TKGLNFAKKTAETNG DTTVHLNGIGSTLTDT LLNTGATTNVTNDNV TDDEKKRAASVKDVL NAGWNIKGVKPGTTA SDNVDFVRTYDTVEFL SADTKTTTVNVESKD NGKRTEVKIGAKTSVI KEKDGKLVTGKDKGE NDSSTDKGEGLVTAKE VIDAVNKAGWRMKTT TANGQTGQADKFETV TSGTNVTFASGKGTTA TVSKDDQGNITVMYD VNVGDALNVNQLQNS GWNLDSKAVAGSSGK VISGNVSPSKGKMDET VNINAGNNIEITRNGK NIDIATSMTPQFSSVSL GAGADAPTLSVDDEG ALNVGSKDANKPVRIT NVAPGVKEGDVTNVA QLKGVAQNLNNHIDN VDGNARAGIAQAIATA GLVQAYLPGKSMMAI GGGTYRGEAGYAIGYS SISDGGNWIIKGTASG NSRGHFGASASVGYQ W		
DnaJ	MAKQDYYEILGVSKT AEEREIRKAYKRLAMK YHPDRNQGDKEAEAK FKEIKEAYEVLTDSQK RAAYDQYGHAAFEQG GMGGGGFGGGADFSD IFGDVFGDIFGGGRGR QRAARGADLRYNMEL TLEEAVRGVTKEIRIPT LEECDVCHGSGAKPG TQPQTCPTCHGSGQVQ MRQGFFAVQQTCPHC QGRGTLIKDPCNKCHG HGRVERSKTLSVKIPA GVDTGDRIRLAGEGEA GEHGAPAGDLYVQVQ VKQHPIFEREGNNLYC EVPINFAMAALGGEIE VPTLDGRVKLKVPGET QTGKLFRMRGKGVKS VRGGAQGDLLCRVVV ETPVGLNERQKQLLQE	免疫細胞	

	LQESFGGPTGEHNSPR SKSFFDGVKKFFDDLT R		
肺炎鏈球菌溶血素	MANKAVNDFILAMNY DKKKLLTHQGESIENR FIKEGNQLPDEFVVIER KKRSLSTNTSDISVTAT NDSRLYPGALLVVDET LLENNPTLLAVDRAPM TYSIDLPGLASSDSFLQ VEDPSNSSVRGAVNDL LAKWHQDYGQVNNV PARMQYEKITAHSMEQ LKVKFGSDFEKTGNSL DIDFNSVHSGEKQIQIV NFKQIYYTVSVDAVKN PGDVFQDTVTVEDLK QRGISAERPLVYISSVA YGRQVYLKLETTSKSD EVEAAFEALIKGVKVA PQTEWKQILDNTEVK AVILGGDPSSGARVVT GKVDMVEDLIQEGSRF TADHPGLPISYTTSFLR DNVVATFQNSTDYVET KVTAYRNGDLLLDHS GAYVAQYYITWDELS YDHQGKEVLTPKAWD RNGQDLTAHFTTSIPLK GNVRNLSVKIRECTGL AWEWWRTVYEKTDLP LVRKRTISIWGTTLYPQ VEDKVEND	免疫細胞	
鞭毛蛋白(FLIC_ECOLI鞭毛蛋白OS =大腸桿菌(菌株K12))	MAQVINTNSLSLITQN NINKNQSALSSSIERLS SGLRINSAKDDAAGQ AIANRFTSNIKGLTQA ARNANDGISVAQTTEG ALSEINNNLQRVRELT VQATTGTNSESDLSSIQ DEIKSRLDEIDRVSGQT QFNGVNVLAKNGSMK IQVGANDNQTITIDLK QIDAKTLGLDGFSVKN NDTVTTSAPVTAFGAT TTNNIKLTGITLSTEAA TDTGGTNPASIEGVYT DNGNDYYAKITGGDN DGKYYAVTVANDGTV TMATGATANATVTDA NTTKATTITSGGTPVQI	免疫細胞	

	DNTAGSATANLGAVSL VKLQDSKGNDTDTYA LKDTNGNLYAADVNE TTGAVSVKTITYTDSS GAASSPTAVKLGGDDG KTEVVDIDGKTYDSA DLNGGNLQTGLTAGG EALTAVANGKTTDPLK ALDDAIASVDKFRSSL GAVQNRLDSAVTNLN NTTTNLSEAQSRIQDA DYATEVSNMSKAQIIQ QAGNSVLAKANQVPQ QVLSLLQG		
IFN-α (IFNA1_人類干擾素α-1/13)	MASPFALLMVLVVLSC KSSCSLGCDLPETHSL DNRRTLMLLAQMSRIS PSSCLMDRHDFGFPQE EFDGNQFQKAPAISVL HELIQQIFNLFTTKDSS AAWDEDLLDKFCTEL YQQLNDLEACVMQEE RVGETPLMNADSILAV KKYFRRITLYLTEKKY SPCAWEVVRAEIMRSL SLSTNLQERLRRKE	免疫細胞	
IFN-γ (IFNG_人類干擾素γ)	MKYTSYILAFQLCIVL GSLGCYCQDPYVKEA ENLKKYFNAGHSDVA DNGTLFLGILKNWKEE SDRKIMQSQIVSFYFK LFKNFKDDQSIQKSVE TIKEDMNVKFFNSNKK KRDDFEKLTNYSVTDL NVQRKAIHELIQVMAE LSPAAKTGKRKRSQM LFRGRRASQ		
IL-2 (IL2_人類介白素-2)	MYRMQLLSCIALSLAL VTNSAPTSSSTKKTQL QLEHLLLDLQMILNGI NNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCL EEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFC QSIISTLT	免疫細胞	
介白素-12 p35次單元	MWPPGSASQPPPSPAA ATGLHPAARPVSLQCR LSMCPAR	免疫細胞	

p40	MGKKQNRKTGNSKTQ SASPPPKERSSSPATEQ SWMENDFDELREEGF RRSNYSELREDIQTKG KEVENFEKNLEECITRI SNTEKCLKELMELKTK TRELREECRSLRSRCD QLEERVSAMEDEMNE MKREGKFREKRIKRNE QTLQEIWDYVKRPNL RLIGVPESDVENGTKL ENTLQDIIQENFPNLAR QANVQIQEIQRTPQRY SSRRATPRHIIVRFTKV EMKEKMLRAAREKGR VTLKGKPIRLTADLLA ETLQARREWGPIFNIL KGKNFQPRISYPAKLSF ISEGEIKYFIDKQMLRD FVTTRPALKELLKEAL NMERNNRYQLLQNHA KM	免疫細胞	
IL-15 (IL15_人類介白素-15)	MRISKPHLRSISIQCYL CLLLNSHFLTEAGIHVF ILGCFSAGLPKTEANW VNVISDLKKIEDLIQSM HIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLLELQVIS LESGDASIHDTVENLII LANNSLSSNGNVTESG CKECEELEEKNIKEFL QSFVHIVQMFINTS	免疫細胞	
IL-18 (IL18_人類介白素-18)	MAAEPVEDNCINFVA MKFIDNTLYFIAEDDE NLESDYFGKLESKLSV IRNLNDQVLFIDQGNR PLFEDMTDSDCRDNAP RTIFIISMYKDSQPRGM AVTISVKCEKISTLSCE NKIISFKEMNPPDNIKD TKSDIIFFQRSVPGHDN KMQFESSSYEGYFLAC EKERDLFKLILKKEDE LGDRSIMFTVQNED		
IL-21	MRSSPGNMERIVICLM VIFLGTLVHKSSSQGQ DRHMIRMRQLIDIVDQ LKNYVNDLVPEFLPAP EDVETNCEWSAFSCFQ KAQLKSANTGNNERII	免疫細胞	

	NVSIKKLKRKPPSTNA GRRQKHRLTCPSCDSY EKKPPKEFLERFKSLL QKMIHQHLSSRTHGSE DS		
GM-CSF	MWLQSLLLLGTVACSI SAPARSPSPSTQPWEH VNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMF DLQEPTCLQTRLELYK QGLRGSLTKLKGPLTM MASHYKQHCPPTPETS CATQIITFESFKENLKD FLLVIPFDCWEPVQE	免疫細胞	
IL-1β	MAEVPELASEMMAYY SGNEDDLFFEADGPKQ MKCSFQDLDLCPLDG GIQLRISDHHYSKGFR QAASVVVAMDKLRK MLVPCPQTFQENDLST FFPFIFEEEPIFFDTWD NEAYVHDAPVRSLNC TLRDSQQKSLVMSGPY ELKALHLQGQDMEQQ VVFSMSFVQGEESND KIPVALGLKEKNLYLS CVLKDDKPTLQLESVD PKNYPKKKMEKRFVF NKIEINNKLEFESAQFP NWYISTSQAENMPVFL GGTKGGQDITDFTMQ FVSS	免疫細胞	
IL-6	MNSFSTSAFGPVAFSL GLLLVLPAAFPAPVPPG EDSKDVAAPHRQPLTS SERIDKQIRYILDGISAL RKETCNKSNMCESSKE ALAENNLNLPKMAEK DGCFQSGFNEETCLVK IITGLLEFEVYLEYLQN RFESSEEQARAVQMST KVLIQFLQKKAKNLD AITTPDPTTNASLLTKL QAQNQWLQDMTTHLI LRSFKEFLQSSLRALR QM	免疫細胞	
TNF-a	MSTESMIRDVELAEEA LPKKTGGPQGSRRCLF LSLFSFLIVAGATTLFC LLHFGVIGPQREEFPR	免疫細胞	

	DLSLISPLAQAVRSSSR TPSDKPVAHVVANPQA EGQLQWLNRRANALL ANGVELRDNQLVVPSE GLYLIYSQVLFKGQGC PSTHVLLTHTISRIAVS YQTKVNLLSAIKSPCQ RETPEGAEAKPWYEPI YLGGVFQLEKGDRLS AEINRPDYLDFAESGQ VYFGIIAL		
IL-7	MFHVSFRYIFGLPPLIL VLLPVASSDCDIEGKD GKQYESVLMVSIDQLL DSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFL FRAARKLRQFLKMNS TGDFDLHLLKVSEGTT ILLNCTGQVKGRKPAA LGEAQPTKSLEENKSL KEQKKLNDLCFLKRLL QEIKTCWNKILMGTKE H	免疫細胞	
IL-17a	MTPGKTSLVSLLLLLS LEAIVKAGITIPRNPGC PNSEDKNFPRTVMVNL NIHNRNTNTNPKRSSD YYNRSTSPWNLHRNE DPERYPSVIWEAKCRH LGCINADGNVDYHMN SVPIQQEILVLRREPPH CPNSFRLEKILVSVGCT CVTPIVHHVA	免疫細胞	
FLt3-配體	MTVLAPAWSPTTYLLL LLLLSSGLSGTQDCSF QHSPISSDFAVKIRELS DYLLQDYPVTVASNL QDEELCGGLWRLVLA QRWMERLKTVAGSKM QGLLERVNTEIHFVTK CAFQPPPSCLRFVQTNI SRLLQETSEQLVALKP WITRQNFSRCLELQCQ PDSSTLPPPWSPRPLEA TAPTAPQPPLLLLLLLP VGLLLLAAAWCLHWQ RTRRRTPRPGEQVPPV PSPQDLLLVEH	免疫細胞	
抗CTLA4 (伊匹魯密單	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSSY	免疫細胞	

抗(ipilumimab))	TMHWVRQAPGKGLE WVTFISYDGNNKYYA DSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAI YYCARTGWLGPFDYW GQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREE QYNST YRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSL SLSPGK		
抗PD1(nivo)	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLDCKASGITFSNS GMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSKRYYA DSVKGRFTISRDNSKN TLFLQMNSLRAEDTAV YYCATNDDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLV	免疫細胞	

	KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK		
抗41BB (烏托米單抗(utomilumab))	EVQLVQSGAEVKKPG ESLRISCKGSGYSFSTY WISWVRQMPGKGLE WMGKIYPGDSYTNYS PSFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAM YYCARGYGIFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKP SNTKVDKTVERKCCV ECPPCPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	免疫細胞	

【0311】在一些實施例中，表現序列編碼治療性蛋白質。在一些實施例中，表現序列編碼細胞介素，例如IL-12p70、IL-15、IL-2、IL-18、IL-21、IFN-α、IFN-β、IL-10、TGF-β、IL-4或IL-35；或其功能片段。在一些實施例中，表現序列編碼免疫檢查點抑制劑。在一些實施例中，表現序列編碼促效劑(例如TNFR家族成員，諸如CD137L、OX40L、ICOSL、LIGHT或CD70)。在一些實施例中，表現序列編碼嵌合抗原受體。在一些實施例中，表現序列編碼抑制性受體促效劑(例如PDL1、PDL2、半乳糖凝集素-9、VISTA、B7H4或MHCII)或抑制性受體(例如

PD1、CTLA4、TIGIT、LAG3或TIM3)。在一些實施例中，表現序列編碼抑制性受體拮抗劑。在一些實施例中，表現序列編碼一或多個TCR鏈(α鏈及β鏈或γ及δ鏈)。在一些實施例中，表現序列編碼分泌T細胞或免疫細胞接合子(例如雙特異性抗體，諸如BiTE，靶向例如CD3、CD137或CD28及腫瘤表現蛋白，例如CD19、CD20或BCMA等)。在一些實施例中，表現序列編碼轉錄因子(例如*FOXP3*、*HELIOS*、*TOX1*或*TOX2*)。在一些實施例中，表現序列編碼免疫抑制性酶(例如IDO或CD39/CD73)。在一些實施例中，表現序列編碼GvHD (例如抗HLA-A2 CAR-Treg)。

【0312】 在一些實施例中，聚核苷酸編碼由經超過一種基因編碼之次單元構成的蛋白質。舉例而言，蛋白質可為異二聚體，其中蛋白質之各鏈或次單元經單獨基因編碼。超過一種環狀RNA分子係在轉移媒劑中遞送且各環狀RNA編碼蛋白質之單獨次單元係可能的。或者，單一環狀RNA可經工程改造以編碼超過一個次單元。在某些實施例中，編碼個別次單元之單獨環狀RNA分子可在單獨轉移媒劑中投與。

A. **抗原識別受體**

a. 嵌合抗原受體(CAR)

【0313】 嵌合抗原受體(CAR或CAR-T)為經基因工程改造之受體。此等經工程改造之受體可經由如本文所描述之環狀RNA插入免疫細胞中且由免疫細胞(包括T細胞)表現。在CAR之情況下，單個受體可經程式化以識別特異性抗原，且當結合至抗原時活化免疫細胞以攻擊及破壞帶有抗原之細胞。當此等抗原存在於腫瘤細胞上時，表現CAR之免疫細胞可靶向且殺滅腫瘤細胞。在一些實施例中，由聚核苷酸編碼之CAR包含：(i)特異性結合至目標抗原之抗原結合分子，(ii)鉸鏈域、跨膜域及胞內域，及

(iii)活化域。

【0314】 在一些實施例中，本發明之CAR之取向包含與共刺激域及活化域串聯之抗原結合域(諸如scFv)。共刺激域可包含胞外部分、跨膜部分及胞內部分中之一或多者。在其他實施例中，多個共刺激域可以串聯方式利用。

i. 抗原結合域

【0315】 CAR可經工程改造以藉由併入與該靶向抗原相互作用之抗原結合分子來結合至抗原(諸如細胞表面抗原)。在一些實施例中，抗原結合分子為其抗體片段，例如一或多個單鏈抗體片段(scFv)。scFv為具有連接在一起之抗體之重鏈及輕鏈之可變區的單鏈抗體片段。參見美國專利第7,741,465號 及 第6,319,494號 以 及Eshhar等 人, Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45: 131-136。scFv保留親本抗體與標靶抗原特異性相互作用之能力。scFv適用於嵌合抗原受體，因為其可經工程改造以連同其他CAR組分一起表現為單鏈之一部分。同上(*Id*)。亦參見Krause等人, J. Exp. Med., 第188卷, 第4期, 1998 (619-626)；Finney等人, Journal of Immunology, 1998, 161: 2791-2797。應瞭解，抗原結合分子通常含於CAR之胞外部分內以使得其能夠識別且結合至所關注之抗原。對超過一個所關注之目標具有特異性之雙特異性CAR及多特異性CAR經考慮在本發明之範疇內。

【0316】 在一些實施例中，抗原結合分子包含單鏈，其中重鏈可變區及輕鏈可變區由連接子連接。在一些實施例中，VH位於連接子之N端處且VL位於連接子之C端處。在其他實施例中，VL位於連接子之N端處且VH位於連接子之C端處。在一些實施例中，連接子包含至少約5個、至

少約8個、至少約10個、至少約13個、至少約15個、至少約18個、至少約20個、至少約25個、至少約30個、至少約35個、至少約40個、至少約45個、至少約50個、至少約60個、至少約70個、至少約80個、至少約90個或至少約100個胺基酸。

【0317】在一些實施例中，抗原結合分子包含奈米抗體。在一些實施例中，抗原結合分子包含DARPin。在一些實施例中，抗原結合分子包含能夠特異性結合至目標蛋白之抗運載蛋白或其他合成蛋白。

【0318】在一些實施例中，CAR包含對選自以下之群組之抗原具有特異性的抗原結合域：CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、C型凝集素樣分子-1、CD33、表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII)、神經節苷脂G2 (GD2)、神經節苷脂GD3、TNF受體家族成員B細胞成熟(BCMA)、Tn抗原((Tn Ag)或(GaINAca-Ser/Thr))、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)、Fms樣酪胺酸激酶3(FLT3)、腫瘤相關醣蛋白72 (TAG72)、CD38、CD44v6、癌胚抗原(CEA)、上皮細胞黏附分子(EPCAM)、B7H3 (CD276)、KIT (CD117)、介白素-13受體次單元α-2、間皮素、介白素11受體α (IL-11Ra)、前列腺幹細胞抗原(PSCA)、蛋白酶絲胺酸21、血管內皮生長因子受體2(VEGFR2)、路易(Lewis) (Y)抗原、CD24、血小板衍生生長因子受體β(PDGFR-β)、階段特異性胚抗原-4 (SSEA-4)、CD20、葉酸受體α、HER2、HER3、細胞表面相關黏蛋白1 (MUC1)、表皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor；EGFR)、神經細胞黏附分子(NCAM)、前列腺酶、前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase；PAP)、突變型延伸因子2 (ELF2M)、艾普瑞林(Ephrin) B2、纖維母細胞

活化蛋白α (FAP)、似胰島素生長因子1受體(IGF-1受體)、碳酸酐酶IX (CAIX)、β型蛋白酶體(前驅體，巨蛋白因子)次單元9 (LMP2)、醣蛋白100 (gp100)、由斷點簇集區(breakpoint cluster region；BCR)及阿貝爾森鼠(Abelson murine)白血病病毒致癌基因同源物1 (Abl)組成之致癌基因融合蛋白(bcr-abl)、酪胺酸酶、艾普瑞林A型受體2 (EphA2)、岩藻糖基GM1、唾液酸基路易黏附分子(sLe)、神經節苷脂GM3、轉麩醯胺酸酶5 (TGS5)、高分子量黑色素瘤相關抗原(HMWMAA)、o-乙醯基-GD2神經節苷脂(OAcGD2)、葉酸受體β、腫瘤內皮標記1 (TEM1/CD248)、相關腫瘤內皮標記7(TEM7R)、密連蛋白6 (CLDN6)、促甲狀腺激素受體(TSHR)、G蛋白偶聯受體C類第5組成員D (GPRC5D)、X染色體開讀框61 (CXORF61)、CD97、CD179a、退行性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase；ALK)、胎盤特異性聚唾液酸1 (PLAC1)、globoH糖基神經醯胺之六醣部分(GloboH)、乳腺分化抗原(NY -BR-1)、尿溶蛋白2 (UPK2)、A型肝炎病毒細胞受體1 (HAVCR1)、腎上腺素受體β3 (ADRB3)、泛連接蛋白3 (PANX3)、G蛋白偶聯受體20 (GPR20)、淋巴球抗原6複合物、基因座K 9 (LY6K)、嗅覺受體51E2 (OR51E2)、TCRγ替代讀框蛋白(TARP)、威爾姆氏腫瘤蛋白(WT1)、癌症/睪丸抗原1 (NY-ESO-1)、癌症/睪丸抗原2 (LAGE-1a)、MAGE家族成員(包括MAGE-A1、MAGE-A3及MAGE-A4)、位於染色體12p上之ETS易位變體基因6 (ETV6-AML)、精子蛋白17 (SPA17)、X抗原家族成員1A (XAGE1)、結合血管生成素之細胞表面受體2 (Tie 2)、黑色素瘤癌症睪丸抗原-1 (MAD-CT-1)、黑色素瘤癌症睪丸抗原-2 (MAD-CT-2)、Fos相關抗原1、腫瘤蛋白p53 (p53)、p53突變體、前列腺蛋白、存活、端粒酶、前列腺癌腫瘤抗原-1、T細胞識別之黑色素瘤

抗原1、大鼠肉瘤(Ras)突變體、人類端粒酶逆轉錄酶(hTERT)、肉瘤易位斷點、細胞凋亡之黑色素瘤抑制劑(ML-IAP)、ERG (跨膜蛋白酶絲胺酸2 (TMPRSS2) ETS融合基因)、N-乙醯基葡糖胺基-轉移酶V (NA17)、配對的框蛋白Pax-3 (PAX3)、雄性激素受體、B1、v-myc禽類髓細胞瘤病病毒致癌基因神經母細胞瘤源性同源物(MYCN)、Ras同源物家族成員C (RhoC)、酪胺酸酶相關蛋白2 (TRP-2)、細胞色素P450 1B1 (CYP1B1)、CCCTC結合因子(鋅指蛋白)樣、T細胞識別的鱗狀細胞癌抗原3 (SART3)、配對的框蛋白Pax-5 (PAX5)、前頂體素結合蛋白sp32 (OY-TES1)、淋巴球特異性蛋白酪胺酸激酶(LCK)、A激酶錨定蛋白4 (AKAP-4)、滑膜肉瘤、X斷點2 (SSX2)、晚期醣化最終產物之受體(RAGE-1)、腎泛蛋白(ubiquitous) 1 (RU1)、腎泛蛋白2 (RU2)、豆莢蛋白、人類乳頭狀瘤病毒E6 (HPV E6)、人類乳頭狀瘤病毒E7 (HPV E7)、腸羧基酯酶、突變型熱休克蛋白70-2 (mut hsp70-2)、CD79a、CD79b、CD72、白血球相關免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)、IgA受體之Fc片段(FCAR或CD89)、白血球免疫球蛋白樣受體子族A成員2 (LILRA2)、CD300分子樣家族成員f (CD300LF)、C型凝集素域家族12成員A (CLEC12A)、骨髓基質細胞抗原2 (BST2)、含EGF樣模組之黏蛋白樣激素受體樣2 (EMR2)、淋巴球抗原75 (LY75)、磷脂肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、Fc受體樣5 (FCRL5)、MUC16、5T4、8H9、αvβθ整合素、αvβ6整合素、α胎蛋白(AFP)、B7-H6、ca-125、CA9、CD44、CD44v7/8、CD52、上皮鈣黏蛋白、EMA (上皮膜抗原)、上皮醣蛋白-2 (EGP-2)、上皮醣蛋白-40 (EGP-40)、ErbB4、上皮腫瘤抗原(epithelial tumor antigen；ETA)、葉酸結合蛋白(folate binding protein；FBP)、激酶插入域受體(KDR)、k-輕鏈、L1細胞

黏附分子、MUC18、NKG2D、癌胚抗原(h5T4)、腫瘤/睪丸-抗原1B、GAGE、GAGE-1、BAGE、 SCP-1、CTZ9、SAGE、CAGE、CT10、MART-1、免疫球蛋白λ樣多肽1 (IGLL1)、B型肝炎表面抗原結合蛋白(HBsAg)、病毒殼體抗原(viral capsid antigen；VCA)、早期抗原(early antigen；EA)、EBV核抗原(EBNA)、HHV-6 p41早期抗原、HHV-6B U94潛伏抗原、HHV-6B p98晚期抗原、巨細胞病毒(CMV)抗原、大T抗原、小T抗原、腺病毒抗原、呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus；RSV)抗原、血球凝集素(HA)、神經胺糖酸酶(NA)、1型副流感抗原、2型副流感抗原、3型副流感抗原、4型副流感抗原、人類間質肺炎病毒(HMPV)抗原、C型肝炎病毒(HCV)核心抗原、HIV p24抗原、人類T細胞嗜淋巴球病毒(HTLV-1)抗原、梅克爾細胞(Merkel cell)多瘤病毒小T抗原、梅克爾細胞多瘤病毒大T抗原、卡堡氏肉瘤(Kaposi sarcoma)相關疱疹病毒(KSHV)溶解性核抗原及KSHV潛伏核抗原。在一些實施例中，抗原結合域包含SEQ ID NO: 321及/或322。

ii. 鉸鏈/間隔子域

【0319】在一些實施例中，本發明之CAR包含鉸鏈域或間隔子域。在一些實施例中，鉸鏈域/間隔子域可包含經截短鉸鏈域/間隔子域(THD)，THD域為完整鉸鏈域/間隔子域(「CHD」)之截短型式。在一些實施例中，胞外域來自或衍生自(例如包含以下所有或其片段)以下各者：ErbB2、血型糖蛋白A (GpA)、CD2、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD4、CD7、CD8a、CD8[T CDl la (IT GAL)、CDl lb (IT GAM)、CDl lc (ITGAX)、CDl ld (IT GAD)、CD18 (ITGB2)、CD19 (B4)、CD27 (TNFRSF7)、CD28、CD28T、CD29 (ITGB1)、CD30 (TNFRSF8)、

CD40 (TNFRSF5)、CD48 (SLAMF2)、CD49a (ITGA1)、CD49d (ITGA4)、CD49f (ITGA6)、CD66a (CEACAM1)、CD66b (CEACAM8)、CD66c (CEACAM6)、CD66d (CEACAM3)、CD66e (CEACAM5)、CD69 (CLEC2)、CD79A (B細胞抗原受體複合物相關α鏈)、CD79B (B細胞抗原受體複合物相關β鏈)、CD84 (SLAMF5)、CD96 (Tactile)、CD100 (SEMA4D)、CD103 (ITGAE)、CD134 (0X40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD158A (KIR2DL1)、CD158B1 (KIR2DL2)、CD158B2 (KIR2DL3)、CD158C (KIR3DP1)、CD158D (KIRDL4)、CD158F1 (KIR2DL5A)、CD158F2 (KIR2DL5B)、CD158K (KIR3DL2)、CD160 (BY55)、CD162 (SELPLG)、CD226 (DNAM1)、CD229 (SLAMF3)、CD244 (SLAMF4)、CD247 (CD3-ζ)、CD258 (LIGHT)、CD268 (BAFFR)、CD270 (TNFSF14)、CD272 (BTLA)、CD276 (B7-H3)、CD279 (PD-1)、CD314 (NKG2D)、CD319 (SLAMF7)、CD335 (NK-p46)、CD336 (NK-p44)、CD337 (NK-p30)、CD352 (SLAMF6)、CD353 (SLAMF8)、CD355 (CRT AM)、CD357 (TNFRSF18)、誘導性T細胞共刺激劑(ICOS)、LFA-1 (CDl la/CD18)、NKG2C、DAP-10、ICAM-1、NKp80 (KLRF1)、IL-2Rβ、IL-2Rγ、IL-7Rα、LFA-1、SLAMF9、LAT、GADS (GrpL)、SLP-76 (LCP2)、PAG1/CBP、CD83配體、Fcγ受體、1類MHC分子、2類MHC分子、TNF受體蛋白、免疫球蛋白蛋白、細胞介素受體、整合素、活化性NK細胞受體、鐸配體受體及其片段或組合。鉸鏈或間隔子域可衍生自天然來源或合成來源。

【0320】 在一些實施例中，鉸鏈或間隔子域位於抗原結合分子(例如

scFv)與跨膜域之間。在此取向中，鉸鏈/間隔子域提供抗原結合分子與CAR表現於其上之細胞膜表面之間的距離。在一些實施例中，鉸鏈或間隔子域來自或衍生自免疫球蛋白。在一些實施例中，鉸鏈或間隔子域選自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、IgM之鉸鏈/間隔子區或其片段。在一些實施例中，鉸鏈或間隔子域包含、來自或衍生自CD8 α之鉸鏈/間隔子區。在一些實施例中，鉸鏈或間隔子域包含、來自或衍生自CD28之鉸鏈/間隔子區。在一些實施例中，鉸鏈或間隔子域包含CD8α之鉸鏈/間隔子區之片段或CD28之鉸鏈/間隔子區之片段，其中該片段為小於全鉸鏈/間隔子區之任何片段。在一些實施例中，CD8α鉸鏈/間隔子區之片段或CD28鉸鏈/間隔子區之片段包含不包括CD8α鉸鏈/間隔子區或CD28鉸鏈/間隔子區之N端或C端或兩者處之至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少11個、至少12個、至少13個、至少14個、至少15個、至少16個、至少17個、至少18個、至少19個或至少20個胺基酸的胺基酸序列。

iii. 跨膜域

【0321】 本發明之CAR可進一步包含跨膜域及/或胞內傳訊域。跨膜域可經設計以與CAR之胞外域融合。其可類似地與CAR之胞內域融合。在一些實施例中，使用與CAR中之域中之一者天然結合之跨膜域。在一些情況下，跨膜域可經選擇或修飾(例如經胺基酸取代)以避免此類域與相同或不同表面膜蛋白之跨膜域結合，以使得與受體複合物之其他成員的相互作用減至最小。跨膜域可來源於天然或合成來源。在來源為天然時，該域可來源於任何膜結合蛋白或跨膜蛋白。

【0322】 跨膜區可衍生自(亦即包含)以下各者：受體酪胺酸激酶(例

如ErbB2)、血型糖蛋白A (GpA)、4-1BB/CD137、活化性NK細胞受體、免疫球蛋白蛋白、B7-H3、BAFFR、BFAME (SEAMF8)、BTEA、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD30、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD7、CD84、CD8α、CD8β、CD96 (Tactile)、CD1 la、CD1 lb、CD1 lc、CD1 Id、CDS、CEACAM1、CRT AM、細胞介素受體、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fcγ 受體、GADS、GITR、HVEM (EIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、Igα (CD79a)、IE-2Rβ、IE-2Rγ、IE-7Rα、誘導性T細胞共刺激因子(ICOS)、整合素、ITGA4、ITGA4、ITGA6、IT GAD、ITGAE、ITGAE、IT GAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、EAT、LFA-1、LFA-1、與CD83特異性結合之配體、LIGHT、LIGHT、LTBR、Ly9 (CD229)、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1；CDl-la/CD18)、1類MHC分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、OX-40、PAG/Cbp、計劃性死亡-1 (PD-1)、PSGL1、SELPLG (CD162)、傳訊淋巴球性活化分子(SLAM蛋白)、SLAM (SLAMF1；CD150；IPO-3)、SLAMF4 (CD244；2B4)、SLAMF6 (NTB-A；Lyl08)、SLAMF7、SLP-76、TNF受體蛋白、TNFR2、TNFSF14、鐸配體受體、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6，或其片段、截短體或組合。

【0323】在一些實施例中，適合的胞內傳訊域包括但不限於活化巨噬細胞/骨髓細胞受體CSFR1、MYD88、CD14、TIE2、TLR4、CR3、CD64、TREM2、DAP10、DAP12、CD169、DECTIN1、CD206、

CD47、CD163、CD36、MARCO、TIM4、MERTK、F4/80、CD91、C1QR、LOX-1、CD68、SRA、BAI-1、ABCA7、CD36、CD31、乳鐵蛋白或其片段、截短體或組合。

【0324】在一些實施例中，受體酪胺酸激酶可衍生自(例如包含)胰島素受體(InsR)、胰島素樣生長因子I受體(IGF1R)、胰島素受體相關受體(IRR)、血小板源生長因子受體α (PDGFRa)、血小板源生長因子受體β (PDGFRfi)。KIT原致癌基因受體酪胺酸激酶(Kit)、群落刺激因子1受體(CSFR)、fms相關酪胺酸激酶3 (FLT3)、fms相關酪胺酸激酶1 (VEGFR-1)、激酶插入域受體(VEGFR-2)、fms相關酪胺酸激酶4 (VEGFR-3)、纖維母細胞生長因子受體1 (FGFR1)、纖維母細胞生長因子受體2 (FGFR2)、纖維母細胞生長因子受體3 (FGFR3)、纖維母細胞生長因子受體4 (FGFR4)、蛋白酪胺酸激酶7 (CCK4)、神經營養受體酪胺酸激酶1 (trkA)、神經營養受體酪胺酸激酶2 (trkB)、神經營養受體酪胺酸激酶3 (trkC)、受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)、受體酪胺酸激酶樣孤兒受體2 (ROR2)、肌肉相關受體酪胺酸激酶(MuSK)、MET原致癌基因受體酪胺酸激酶(MET)、巨噬細胞刺激性1受體(Ron)、AXL受體酪胺酸激酶(Axl)、TYR03蛋白酪胺酸激酶(Tyro3)、MER原致癌基因酪胺酸激酶(Mer)、具有免疫球蛋白樣及EGF樣域之酪胺酸激酶1 (TIE1)、TEK受體酪胺酸激酶(TIE2)、EPH受體A1 (EphAl)、EPH受體A2 (EphA2)、(EPH受體A3) EphA3、EPH受體A4 (EphA4)、EPH受體A5 (EphA5)、EPH受體A6 (EphA6)、EPH受體A7 (EphA7)、EPH受體A8 (EphA8)、EPH受體A10 (EphAlO)、EPH受體B1 (EphBl)、EPH受體B2 (EphB2)、EPH受體B3 (EphB3)、EPH受體B4 (EphB4)、EPH受體B6 (EphB6)、ret原致癌基

因(Ret)、受體樣酪胺酸激酶(RYK)、盤狀域受體酪胺酸激酶1 (DDR1)、盤狀域受體酪胺酸激酶2 (DDR2)、c-ros致癌基因1、受體酪胺酸激酶(ROS)、細胞凋亡相關酪胺酸激酶(Lmrl)、狐猴酪胺酸激酶2 (Lmr2)、狐猴酪胺酸激酶3 (Lmr3)、白血球受體酪胺酸激酶(LTK)、ALK受體酪胺酸激酶(ALK)或絲胺酸/蘇胺酸/酪胺酸激酶1 (STYK1)。

iv. 共刺激域

【0325】 在某些實施例中，CAR包含共刺激域。在一些實施例中，共刺激域包含4-1BB (CD137)、CD28或兩者及/或胞內T細胞傳訊域。在一較佳實施例中，共刺激域為人類CD28、人類4-1BB或兩者，且胞內T細胞傳訊域為人類CD3ζ (zeta)。4-1BB、CD28、CD3ζ可分別包含小於全4-1BB、CD28或CD3ζ。嵌合抗原受體可併有共刺激(傳訊)域以提高其效力。參見美國專利第7,741,465號及第6,319,494號以及Krause等人及Finney等人(見上文)，Song等人, Blood 119:696-706 (2012)；Kalos等人, Sci Transl. Med. 3:95 (2011)；Porter等人, N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011)；及Gross等人, Amur. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56:59-83 (2016)。

【0326】 在一些實施例中，共刺激域包含SEQ ID NO: 318或320之胺基酸序列。

v. 胞內傳訊域

【0327】 本文所揭示之經工程改造T細胞之胞內(傳訊)域可向活化域提供傳訊，該活化域隨後活化免疫細胞之正常效應功能中之至少一者。T細胞之效應功能例如可為溶胞活性或輔助活性，包括分泌細胞激素。

【0328】 在一些實施例中，合適的胞內傳訊域包括(例如包含)但不限於：4-1BB/CD137、活化性NK細胞受體、免疫球蛋白蛋白、B7-H3、

BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD 19a、CD2、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD30、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD7、CD84、CD8α、CD8β、CD96 (Tactile)、CD1 la、CD1 lb、CD1 lc、CD1 1d、CDS、CEACAM1、CRT AM、細胞介素受體、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fcγ 受體、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、IA4、ICAM-1、Igα (CD79a)、IL-2Rβ、IL-2Rγ、IL-7Rα、誘導性T細胞共刺激因子(ICOS)、整合素、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、與CD83特異性結合之配體、LIGHT、LTBR、Ly9 (CD229)、Lyl08、淋巴球功能相關抗原-1- 1 (LFA-1；CDl-la/CD18)、1類MHC分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、OX-40、PAG/Cbp、計劃性死亡-1 (PD-1)、PSGL1、SELPLG (CD162)、傳訊淋巴球性活化分子(SLAM蛋白)、SLAM (SLAMF1；CD150；IPO-3)、SLAMF4 (CD244；2B4)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TNF受體蛋白、TNFR2、TNFSF14、鐸配體受體、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6，或其片段、截短體或組合。

【0329】 CD3為天然T細胞上之T細胞受體之元件，且已顯示為CAR中之重要胞內活化元件。在一些實施例中，CD3為CD3ζ。在一些實施例中，活化域包含與SEQ ID NO: 319之多肽序列至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%一

致之胺基酸序列。

b. T細胞受體(TCR)

【0330】使用國際免疫遺傳學(International Immunogenetics；IMGT) TCR命名法對TCR進行描述，且鏈接至TCR序列之IMGT公共資料庫。原生α-β異二聚TCR具有α鏈及β鏈。廣義上，各鏈可包含可變區、接合區及恆定區，且β鏈通常亦含有可變區與接合區之間的短多樣性區，但此多樣性區通常被視為接合區之一部分。各可變區可包含嵌入構架序列中之三個互補決定區(CDR)，一個為命名為CDR3之高變區。存在若干類型之α鏈可變(Vα)區及若干類型之β鏈可變(Vβ)區，其區別在於其構架、CDR1及CDR2序列，以及部分定義之CDR3序列。Vα類型以IMGT命名法藉由獨特TRAV編號提及。因此，「TRAV21」界定具有獨特構架及CDR1及CDR2序列以及由在TCR間保存之胺基酸序列部分界定、但亦包括在TCR間變化之胺基酸序列之CDR3序列的TCR Vα區。以相同方式，「TRBV5-1」界定具有獨特構架及CDR1及CDR2序列、但僅具有部分界定之CDR3序列的TCR Vβ區。

【0331】TCR之接合區類似地由獨特IMGT TRAJ及TRBJ命名法界定，且恆定區由IMGT TRAC及TRBC命名法界定。

【0332】β鏈多樣性區以IMGT命名法藉由縮寫TRBD提及，且如所提到，串連TRBD/TRBJ區常常一起視為接合區。

【0333】由IMGT命名法定義之獨特序列為廣泛已知的，且對於TCR領域之工作人員而言係可獲得的。舉例而言，其可見於IMGT公共資料庫中。「T cell Receptor Factsbook」, (2001) LeFranc及LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8亦揭示由IMGT命名法定義之序列，

但由於其出版日期及隨之而來的時間滯後，其中之資訊有時需要參考IMGT資料庫來確認。

【0334】 原生TCR以異二聚αβ或γδ形式存在。然而，先前已顯示由αα或ββ同二聚體組成之重組TCR結合至肽MHC分子。因此，本發明之TCR可為異二聚αβ TCR或可為αα或ββ同二聚TCR。

【0335】 為了用於授受性療法中，αβ異二聚TCR可例如經轉染為具有細胞質域及跨膜域之全長鏈。在某些實施例中，本發明之TCR可在各別恆定域之殘基之間具有引入之二硫鍵，如例如WO 2006/000830中所描述。

【0336】 本發明之TCR，尤其α-β異二聚TCR可包含α鏈TRAC恆定域序列及/或β鏈TRBC1或TRBC2恆定域序列。α鏈及β鏈恆定域序列可藉由截短或取代加以修飾以使TRAC之外顯子2之Cys4與TRBC1或TRBC2之外顯子2之Cys2之間的原生二硫鍵缺失。α及/或β鏈恆定域序列亦可藉由用半胱胺酸殘基取代TRAC之Thr 48及TRBC1或TRBC2之Ser 57加以修飾，該等半胱胺酸在TCR之α恆定域與β恆定域之間形成二硫鍵。

【0337】 結合親和力(與平衡常數K_D成反比)及結合半衰期(表示為T½)可藉由任何適當方法測定。應瞭解，使TCR之親和力加倍引起K_D減半。T½計算為ln 2除以解離速率(koff)。因此使T½加倍引起koff減半。通常量測TCR之可溶性形式，亦即經截短以移除細胞質域及跨膜域殘基之彼等形式的TCR的K_D及koff值。因此，應理解，若該TCR之可溶性形式具有該等特徵，則既定TCR對親本TCR具有改善之結合親和力及/或結合半衰期。較佳地，使用相同分析方案量測既定TCR之結合親和力或結合半衰期若干次，例如3次或更多次，且取結果平均值。

【0338】 因為本發明之TCR在授受性療法中具有效用，因此本發明包括呈現本發明之TCR之非天然存在之細胞及/或經純化之細胞及/或經工程改造之細胞，尤其T細胞。存在多種適合於使用編碼本發明之TCR之核酸(諸如DNA、cDNA或RNA)轉染T細胞之方法(參見例如Robbins等人, (2008) J Immunol. 180: 6116-6131)。表現本發明之TCR之T細胞將適用於基於授受性療法之癌症治療，該等癌症諸如胰臟癌及肝癌。如熟習此項技術者已知，存在可進行授受性療法之多種適合的方法(參見例如Rosenberg等人, (2008) Nat Rev Cancer 8(4): 299-308)。

【0339】 如在此項技術中所熟知，本發明之TCR在由經轉染細胞表現時可經受轉譯後修飾。醣化為一種該修飾，可包含寡醣部分與TCR鏈中之確定胺基酸之共價連接。舉例而言，天冬醯胺殘基或絲胺酸/蘇胺酸殘基為用於寡醣連接之熟知位置。特定蛋白質之醣化狀態視多種因素而定，該等因素包括蛋白質序列、蛋白質構形及某些酶之可用性。此外，醣化狀態(亦即寡醣類型、共價鍵聯及連接總數)可能會影響蛋白質功能。因此，當產生重組蛋白時，控制醣化常常為合乎需要的。經轉染TCR之醣化可藉由經轉染基因之突變加以控制(Kuball J等人(2009), J Exp Med 206(2):463-475)。此類突變亦涵蓋於本發明中。

【0340】 TCR可對以下之群組中之抗原具有特異性：MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-A13、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、BAGE-1、RAGE-1、LB33/MUM-1、PRAME、NAG、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-

B3)、MAGE-Xp4 (AGE-B4)、酪胺酸酶、腦糖原磷酸化酶、黑色素-A、MAGE-C1、MAGE-C2、NY-ESO-1、LAGE-1、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、α-輔肌動蛋白-4、Bcr-Abl融合蛋白、Casp-8、β-連環蛋白、cdc27、cdk4、cdkn2a、coa-1、dek-can融合蛋白、EF2、ETV6-AML1融合蛋白、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAAO205、Mart2、Mum-2、and 3、neo-PAP、I類肌凝蛋白、OS-9、pml-RARa融合蛋白、PTPRK、K-ras、N-ras、丙糖磷酸異構酶(isomeras)、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、Mage-C2、NA-88、Lage-2、SP17、及TRP2-Int2、(MART-I)、gp100 (Pmel 17)、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、p15(58)、CEA、NY-ESO (LAGE)、SCP-1、Hom/Mel-40、p53、H-Ras、HER-2/neu、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus)抗原、EBNA、人類乳頭瘤病毒(HPV)抗原E6及E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、β-連環蛋白、CDK4、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、PSCA、CT7、端粒酶、43-9F、5T4、791Tgp72、α-胎蛋白、13HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\170K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90 (Mac-2結合蛋白\辛環蛋白)、TAAL6、TAG72、TLP及TPS。

c. B細胞受體(BCR)

【0341】 B細胞受體(BCR)或B細胞抗原受體為在B細胞表面上形成I型跨膜蛋白的免疫球蛋白分子。BCR能夠在識別特異性抗原之後將活化訊號傳輸至B細胞中。在B細胞與抗原結合之前，BCR將保持在未經刺激或「靜息」階段。抗原與BCR之結合引起傳訊，從而引發體液免疫反應。

【0342】 BCR由成熟B細胞表現。此等B細胞與免疫球蛋白(Ig)一起作用以識別病原體且對其加標籤。典型BCR包含膜結合免疫球蛋白(例如mIgA、mIgD、mIgE、mIgG及mIgM)以及相關及Igα/Igβ(CD79a/CD79b)異二聚體(α/β)。此等膜結合免疫球蛋白為由兩條相同重鏈及兩條輕鏈組成之四聚體。在BCR內，膜結合免疫球蛋白能夠藉由跨質膜之訊號傳輸而回應於抗原結合，導致B細胞活化且因此導致無性擴增及特異性抗體產生(Friess M等人(2018), Front. Immunol. 2947(9))。Igα/Igβ異二聚體負責將訊號轉導至細胞內部。

【0343】 Igα/Igβ異二聚體傳訊依賴於位於異二聚體之胞質尾中之各者上基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)之存在。ITAM包含藉由9-12個胺基酸(例如酪胺酸、白胺酸及/或纈胺酸)間隔開之兩個酪胺酸殘基。在抗原結合後，BCR之ITAM之酪胺酸藉由Src-家族酪胺酸激酶Blk、Fyn或Lyn變得磷酸化(Janeway C等人, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (Garland Science, 第5版2001))。

d. 其他嵌合蛋白

【0344】 除上文所提供之嵌合蛋白以外，環狀RNA聚核苷酸可編碼此項技術中可用之各種數目之其他嵌合蛋白。嵌合蛋白可包括重組融合蛋白、嵌合突變蛋白或其他融合蛋白。

B. **免疫調節性配體**

【0345】 在一些實施例中，環狀RNA聚核苷酸編碼免疫調節性配體。在某些實施例中，免疫調節性配體可為免疫刺激性的；而在其他實施例中，免疫調節性配體可為免疫抑制性的。

1. 細胞介素：干擾素、趨化介素、介白素、生長因子及其他

【0346】 在一些實施例中，環狀RNA聚核苷酸編碼細胞介素。在一些實施例中，細胞介素包含趨化介素、干擾素、介白素、淋巴激素及腫瘤壞死因子。趨化介素為在急性發炎及慢性發炎中由各種細胞類型產生之移動且活化白血球之趨化性細胞介素。干擾素包含經由TLR刺激而回應於特異性胞外分子來誘導之一系列分泌α-螺旋細胞介素(Borden, Molecular Basis of Cancer (第四版) 2015)。介白素為由白血球表現之細胞介素。

【0347】 IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-27β、IFNγ及/或TGFβ1之描述及/或胺基酸序列提供於本文中及以登錄號：P60568 (IL-2)、P29459 (IL-12A)、P29460 (IL-12B)、P13232 (IL-7)、P22301 (IL-10)、P40933 (IL-15)、Q14116 (IL-18)、Q14213 (IL-27β)、P01579 (IFNγ)及/或P01137 (TGFβ1)提供於www.uniprot.org資料庫處。

C. **轉錄因子**

【0348】 調控性T細胞(Treg)在維持恆定、控制發炎反應之幅度及持續時間及預防自體免疫反應及過敏反應中至關重要。

【0349】 一般而言，認為Treg主要參與抑制免疫反應，部分充當針對免疫系統之「自檢查」以預防過度反應。特定言之，Treg參與維持對自身抗原、諸如花粉或食物之無害藥劑之耐受性及消除自體免疫疾病。

【0350】 Treg存在於整個身體中，包括但不限於腸道、皮膚、肺及

肝。另外，Treg細胞亦可存在於身體之某些區室中，不直接暴露於諸如脾、淋巴結及甚至脂肪組織之外部環境。此等Treg細胞群體中之各者已知或疑似具有一或多個獨特特點，且額外資訊可發現於Lehtimaki及Lahesmaa, Regulatory T cells control immune responses through their non-redundant tissue specific features, 2013, FRONTIERS IN IMMUNOL., 4(294): 1-10中，該文獻之揭示內容特此全部併入。

【0351】 通常，已知Treg需要TGF-β及IL-2用於適當的活化及發育。表現充足量之IL-2受體(IL-2R)之Treg依賴於由經活化T細胞產生之IL-2。已知Treg產生IL-10及TGF-β，兩者均為強效的免疫抑制性細胞介素。另外，已知Treg抑制抗原呈現細胞(APC)刺激T細胞之能力。一個用於APC抑制之建議機制係經由經Foxp3+ Treg表現之CTLA-4。據認為，CTLA-4可結合至APC上之B7分子且阻斷此等分子或藉由引起內化而將其移除，從而導致B7之可用性降低且無法提供用於免疫反應之充分共刺激。關於Treg之起源、分化及功能之額外論述可發現於Dhamne等人, Peripheral and thymic Foxp3+ regulatory T cells in search of origin, distinction, and function, 2013, Frontiers in Immunol., 4 (253): 1-11中，該文獻之揭示內容特此全部併入。

D. **檢查點抑制劑及促效劑**

【0352】 如本文所提供，在某些實施例中，環狀RNA之編碼元件編碼一或多種檢查點抑制劑或促效劑。

【0353】 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為以下之抑制劑：計劃性死亡-配體1 (PD-L1，亦稱為B7-H1、CD274)、計劃性死亡1 (PD-1)、CTLA-4、PD-L2 (B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、

B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS (誘導性T細胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO (具有成膠結構之巨噬細胞受體)、PS (磷脂醯絲胺酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1或其任何組合。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為IDO1、CTLA4、PD-1、LAG3、PD-L1、TIM3或其組合之抑制劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為PD-L1抑制劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為PD-1抑制劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為CTLA-4抑制劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為LAG3抑制劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為TIM3抑制劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為IDO1抑制劑。

【0354】 如本文中所描述，至少在一個態樣中，本發明涵蓋免疫檢查點拮抗劑之使用。此類免疫檢查點拮抗劑包括免疫檢查點分子之拮抗劑，該等免疫檢查點分子諸如細胞毒性T淋巴球抗原4 (CTLA-4)、計劃性細胞死亡蛋白1 (PD-1)、計劃性死亡-配體1 (PDL-1)、淋巴球活化基因3 (LAG-3)及T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域3 (TIM-3)。CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3或TIM-3之拮抗劑分別干擾CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3或TIM-3功能。CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3及TIM-3之此類拮抗劑可包括分別特異性結合至CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3及TIM-3且抑制及/或阻斷生物活性及功能之抗體。

E. **其他**

【0355】 在一些實施例中，編碼元件中之一或多者內編碼之有效裝

載為激素、FC融合蛋白、抗凝血劑、凝血因子、與缺陷及遺傳病相關之蛋白質、伴隨蛋白、抗微生物蛋白、酶(例如新陳代謝酶)、結構蛋白(例如通道或核孔蛋白)、蛋白質變體、小分子、抗體、奈米抗體、經工程改造之非體抗體或其組合。

4. 額外輔助元件(序列元件)

【0356】 如本發明中所描述，環狀RNA聚核苷酸、線性RNA聚核苷酸及/或DNA模板可進一步包含輔助元件。在某些實施例中，此等輔助元件可包括於環狀RNA、線性RNA聚核苷酸及/或DNA模板之序列內以用於增強環化、轉譯或兩者。在某些實施例中，輔助元件為特異性定位於各別聚核苷酸之增強型內含子元件、增強型外顯子元件或核心功能元件之間或其內的序列。舉例而言但不意欲為限制性的，輔助元件包括IRES異側作用因子區、miRNA結合位點、限制位點、RNA編輯區、結構元件或序列元件、顆粒位點、拉鏈碼(zip code)元件、RNA遷移元件或如此項技術中發現之增強、促進環狀RNA聚核苷酸內經編碼之蛋白質之環化及/或轉譯的另一特殊序列。

A. **IRES異側作用因子**

【0357】 在某些實施例中，輔助元件包含IRES異側作用因子(ITAF)區。在一些實施例中，IRES異側作用因子區經由結合至PCBP1-PCBP4(聚C結合蛋白)、PABP1 (聚A結合蛋白)、PTB (聚嘧啶束結合)、阿爾戈瑙特蛋白家族(Argonaute protein family)、異質核核糖核蛋白K蛋白(HNRNPK)或La蛋白來調節轉譯起始。在一些實施例中，IRES異側作用因子區包含聚A、聚C、聚AC或聚嘧啶束。

【0358】 在一些實施例中，ITAF區位於核心功能元件內。在一些實

施例中，ITAF區位於TIE內。

B. **miRNA結合位點**

【0359】 在某些實施例中，輔助元件包含miRNA結合位點。在一些實施例中，miRNA結合位點位於5'增強型內含子元件、5'增強型外顯子元件、核心功能元件、3'增強型外顯子元件及/或3'增強型內含子元件內。

【0360】 在一些實施例中，其中miRNA結合位點位於增強型內含子元件或增強型外顯子元件內之間隔子內。在某些實施例中，miRNA結合位點包含整個間隔子區。

【0361】 在一些實施例中，5'增強型內含子元件及3'增強型內含子元件各自包含相同的miRNA結合位點。在另一實施例中，5'增強型內含子元件之miRNA結合位點包含與3'增強型內含子元件在長度或核苷酸方面不同之miRNA結合位點。在一個實施例中，5'增強型外顯子元件及3'增強型外顯子元件包含相同的miRNA結合位點。在其他實施例中，5'增強型外顯子元件及3'增強型外顯子元件包含在長度或核苷酸方面不同之miRNA結合位點。

【0362】 在一些實施例中，miRNA結合位點彼此相鄰位在環狀RNA聚核苷酸、線性RNA聚核苷酸前驅體及/或DNA模板內。在某些實施例中，miRNA結合位點中之一者之第一核苷酸在第二miRNA結合位點之第一核苷酸最後一個核苷酸之後。

【0363】 在一些實施例中，miRNA結合位點位於核心功能元件之轉譯起始元件(TIE)內。在一個實施例中，miRNA結合位點位於內部核糖體進入位點(IRES)之前、之後或之內。在另一實施例中，miRNA結合位點位於適體複合物之前、之後或之內。

【0364】 由miRNA命名法定義之獨特序列為廣泛已知的，且可由微小RNA領域之工作人員取得。舉例而言，其可見於miRDB公共資料庫中。

5. 聚核苷酸生產

【0365】 本文所提供之DNA模板可使用分子生物學之標準技術製造。舉例而言，本文所提供之載體之各種元件可使用重組方法，諸如藉由自細胞篩檢cDNA及基因體庫或藉由自已知包括聚核苷酸之DNA模板衍生聚核苷酸來獲得。

【0366】 本文提供之DNA模板之各種元件亦可基於已知序列以合成方式產生而非選殖。完整序列可由重疊寡核苷酸組裝，該等寡核苷酸係藉由標準方法製備且組裝成完整序列。參見例如Edge, Nature (1981) 292:756；Nambair等人, Science (1984) 223 : 1299；及Jay等人, J. Biol. Chem. (1984) 259:631 1。

【0367】 因此，特定核苷酸序列可自具有所需序列之DNA模板獲得，或在適當時完全或部分使用諸如定點誘變及聚合酶鏈反應(PCR)技術之此項技術中已知之各種寡核苷酸合成技術來合成。一種獲得編碼所需DNA模板元件之核苷酸序列之方法係藉由使在習知自動化聚核苷酸合成器中產生之互補集合之重疊合成寡核苷酸黏合，接著與適當的DNA接合酶接合且經由PCR擴增已接合之核苷酸序列。參見例如Jayaraman等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:4084-4088。另外，可使用寡核苷酸定向合成(Jones等人, Nature (1986) 54:75-82)、預先存在之核苷酸區之寡核苷酸定向誘變(Riechmann等人, Nature (1988) 332:323-327及Verhoeyen等人, Science (1988) 239: 1534-1536)及使用T4 DNA聚合酶之間隙式寡核

苷酸之酶填充(Queen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 10029-10033)。

【0368】 本文所提供之前驅體RNA可藉由在准許轉錄由DNA模板編碼之前驅體RNA之條件下培育本文所提供之DNA模板來產生。舉例而言，在一些實施例中，前驅體RNA係藉由在准許活體外轉錄之條件下將本文所提供之DNA模板與可相容RNA聚合酶一起培育來合成，該DNA模板包含在其5'雙螺旋體序列及/或表現序列上游之RNA聚合酶啟動子。在一些實施例中，DNA模板在細胞內部藉由噬菌體RNA聚合酶培育或在細胞之細胞核中藉由宿主RNA聚合酶II培育。

【0369】 在某些實施例中，本文提供藉由使用本文所提供之DNA模板作為模板(例如本文所提供之具有位於5'雙螺旋體區上游之RNA聚合酶啟動子之載體)執行活體外轉錄來產生前驅體RNA的方法。

【0370】 在某些實施例中，所得前驅體RNA可用於藉由在存在鎂離子及鳥苷核苷酸或核苷之情況下在發生RNA環化之溫度下(例如在20℃與60℃之間)對其進行培育來產生環狀RNA (例如本文所提供之環狀RNA聚核苷酸)。

【0371】 因此，在某些實施例中，本文提供製造環狀RNA之方法。在某些實施例中，該方法包含藉由使用本文所提供之載體(例如5'增強型內含子元件、5'增強型外顯子元件、核心功能元件、3'增強型外顯子元件及3'增強型內含子元件)作為模板進行轉錄(例如失控轉錄(run-off transcription))合成前驅體RNA，且在存在二價陽離子(例如鎂離子)及GTP之情況下培育所得前驅體RNA以使得其環化以形成環狀RNA。在一些實施例中，本文所揭示之前驅體RNA能夠在不存在鎂離子及GTP的情

況下及/或在無與鎂離子及GTP一起培育之步驟的情況下環化。已發現，環狀RNA具有相對於對應mRNA降低之免疫原性，此至少部分因為mRNA含有免疫原性5'帽。當自某些啟動子(例如T7啟動子)轉錄DNA載體以產生前驅體RNA時，應理解，前驅體RNA之5'端為G。為了降低含有低含量之污染物線性mRNA之環狀RNA組合物的免疫原性，可在轉錄期間提供相對於GTP過量之GMP以使得大部分轉錄本含有無法加帽之5' GMP。因此，在一些實施例中，轉錄係在存在過量GMP之情況下進行。在一些實施例中，進行轉錄，其中GMP濃度與GTP濃度之比率在約3:1至約15:1，例如約3:1至約10:1、約3:1至約5:1、約3:1、約4:1或約5:1範圍內。

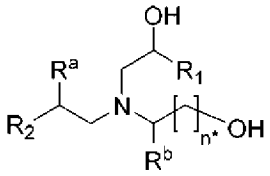
【0372】 在一些實施例中，包含環狀RNA之組合物已經純化。環狀RNA可藉由諸如管柱層析法、凝膠過濾層析法及粒徑排阻層析法之此項技術中常用之任何已知方法來純化。在一些實施例中，純化包含以下步驟中之一或多者：磷酸酶處理、HPLC尺寸排阻純化及RNA酶R消化。在一些實施例中，純化按次序包含以下步驟：核糖核酸酶R消化、磷酸酶處理及HPLC粒徑排阻純化。在一些實施例中，純化包含逆相HPLC。在一些實施例中，經純化組合物含有比未經純化RNA少之雙股RNA、DNA夾板、三磷酸化RNA、磷酸酶蛋白、蛋白質接合酶、加帽酶及/或帶切口RNA。在一些實施例中，經純化組合物之免疫原性低於未經純化組合物之免疫原性。在一些實施例中，暴露於經純化組合物之免疫細胞產生比暴露於未經純化組合物之免疫細胞更少的TNFα、RIG-I、IL-2、IL-6、IFNγ及/或例如IFN-β1之1型干擾素。

6. 轉移媒劑及其他遞送機制之概述

A. **可離子化脂質**

【0373】 在某些實施例中，本文揭示可用作轉移媒劑之組分以便於或增強環狀RNA至一或多個目標細胞之遞送及釋放(例如藉由滲透此類目標細胞之脂質膜或與其融合)的可離子化脂質。在某些實施例中，可離子化脂質包含一或多個可裂解官能基(例如二硫鍵)，該一或多個可裂解官能基允許例如化合物之親水性官能頭基與親脂性官能尾基解離(例如在暴露於氧化、還原或酸性條件後)，藉此便於一或多個目標細胞之脂質雙層中進行相變。

【0374】 在各種實施例中，本發明之可離子化脂質為式(13*)之化合物：



式(13*)

其中：

n*為1至7之間的整數，

R^a為氫或羥基，

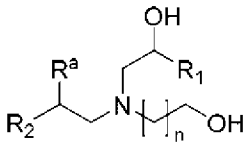
R^b為氫或C_1-C_6烷基，

R_1及R_2各自獨立地為視情況經一或多個選自以下之取代基取代之直鏈或分支鏈C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基或C_1-C_{30}雜烷基：側氧基、鹵基、羥基、氰基、烷基、烯基、醛、雜環基烷基、羥烷基、二羥烷基、羥基烷基胺基烷基、胺基烷基、烷胺基烷基、二烷胺基烷基、(雜環基)(烷基)胺基烷基、雜環基、雜芳基、烷基雜芳基、炔基、烷氧基、胺基、二烷胺基、胺基烷基羰基胺基、胺基羰基烷胺基、(胺基羰基烷基)(烷基)胺基、烯基羰基胺基、羥基羰基、烷基氧基羰基、烷基羰氧基、烷基碳酸酯、烯氧基

羰基、烯基羰氧基、烯基碳酸酯、炔氧基羰基、炔基羰氧基、炔基碳酸酯、胺基羰基、胺基烷基胺基羰基、烷基胺基烷基胺基羰基、二烷基胺基烷基胺基羰基、雜環基烷基胺基羰基、(烷胺基烷基)(烷基)胺基羰基、烷基胺基烷基羰基、二烷基胺基烷基羰基、雜環基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亞碸、烷基亞碸烷基、烷基磺醯基及烷基碸烷基。

【0375】 在式(13*)之一些實施例中，R^b為C_1-C_6烷基。在式(13*)之一些實施例中，R^b為甲基。在式(13*)之一些實施例中，R^b為乙基。

【0376】 在式(13*)之一些實施例中，R^b為H，且可離子化脂質具有式(13)：



式(13)

其中n為1至7之間的整數。在式(13)之一些實施例中，n為1至4之間的整數。

【0377】 在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2相同。在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2不同。

【0378】 在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地為視情況經取代之直鏈或分支鏈烷基、烯基或雜烷基，其中視情況經取代之直鏈或分支鏈基團中存在之碳原子之總數目為30個碳或更少，諸如6-30個碳原子或6-20個碳原子。

【0379】 在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者為未經取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_6-C_{30}雜烷基。

【0380】 在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地為

視情況經一或多個取代基(例如如上文所描述)取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_9-C_{20}雜烷基。在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2獨立地選自經以下取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_9-C_{20}雜烷基：烷基氧基羰基、烷基羰氧基、烷基碳酸酯、烯氧基羰基、烯基羰氧基、烯基碳酸酯。

【0381】 在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地為視情況經一或多個各自獨立地選自以下之取代基取代的直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基或C_1-C_{20}雜烷基：直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷氧基、直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基氧基羰基、直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基羰氧基、直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基碳酸酯、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}烯氧基羰基、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}烯基羰氧基、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}烯基碳酸酯、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}炔氧基羰基、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}炔基羰氧基及直鏈或分支鏈C_2-C_{20}炔基碳酸酯。

【0382】 在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者為經-O(CO)R^6、-C(O)OR^6或-O(CO)OR^6取代之直鏈C_1-C_{12}烷基，其中各R^6獨立地為直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。在式(13*)及式(13)之一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地為經-O(CO)R^6、-C(O)OR^6或-O(CO)OR^6取代之直鏈C_1-C_{12}烷基，其中各R^6獨立地為直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。

【0383】 在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者經烷基氧基羰基取代。在一些實施例中，烷基氧基羰基具有式-C(O)O$R^{6'}$，其中$R^{6'}$為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。

【0384】 在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者經烷基羰氧基取

代。在一些實施例中，烷基羰氧基具有式-OC(O)$R^{6'}$，其中$R^{6'}$為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。

【0385】在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者經烷基碳酸酯取代。在一些實施例中，烷基碳酸酯具有式-O(CO)O$R^{6'}$，其中$R^{6'}$為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。

【0386】在一些實施例中，R_1及R_2各自獨立地為經-O(CO)$R^{6'}$、-C(O)O$R^{6'}$或-O(CO)O$R^{6'}$取代之C_1-C_{12}烷基，其中$R^{6'}$為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。在一些實施例中，R_1及R_2各自為經-O(CO)$R^{6'}$取代之C_1-C_{12}烷基。在一些實施例中，R_1及R_2各自為經-C(O)O$R^{6'}$取代之C_1-C_{12}烷基。在一些實施例中，R_1及R_2各自為經-O(CO)O$R^{6'}$取代之C_1-C_{12}烷基。在一些實施例中，R_1為-C(O)O$R^{6'}$或-O(CO)$R^{6'}$，且R_2為-O(CO)O$R^{6'}$。在一些實施例中，R_1為-O(CO)OR^6，且R_2為-C(O)OR^6或-O(CO)R^6。

【0387】在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者選自下式：

(i) $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

(ii) $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

(iii) $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【0388】 在一些實施例中，R_1及R_2中之各者獨立地選自下式中之一者：

(i) $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

(ii) $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

(iii) $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【0389】 在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為1至6之間的整數。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為0。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為1。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為2。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為3至12之間的整數。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為3至6之間的整數。

【0390】 在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為0。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為1至6之間的整數。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為1。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為2。

【0391】 在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為R^{10}。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^9及R^{10}不同。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^9及R^{10}相同。

【0392】在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_1-C_{12}烯基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_2-C_{12}烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_2-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_5-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【0393】在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_1-C_{12}烯基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_2-C_{12}烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_2-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【0394】在一些實施例中，R_1及R_2中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在一些實施例中，$R_1$及$R_2$中之至少一者為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在一些實施例中，$R_1$及$R_2$中之至少一者為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0395】在某些實施例中，R_1及R_2中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在其他實施例中，$R_1$及$R_2$中之至少一者為-

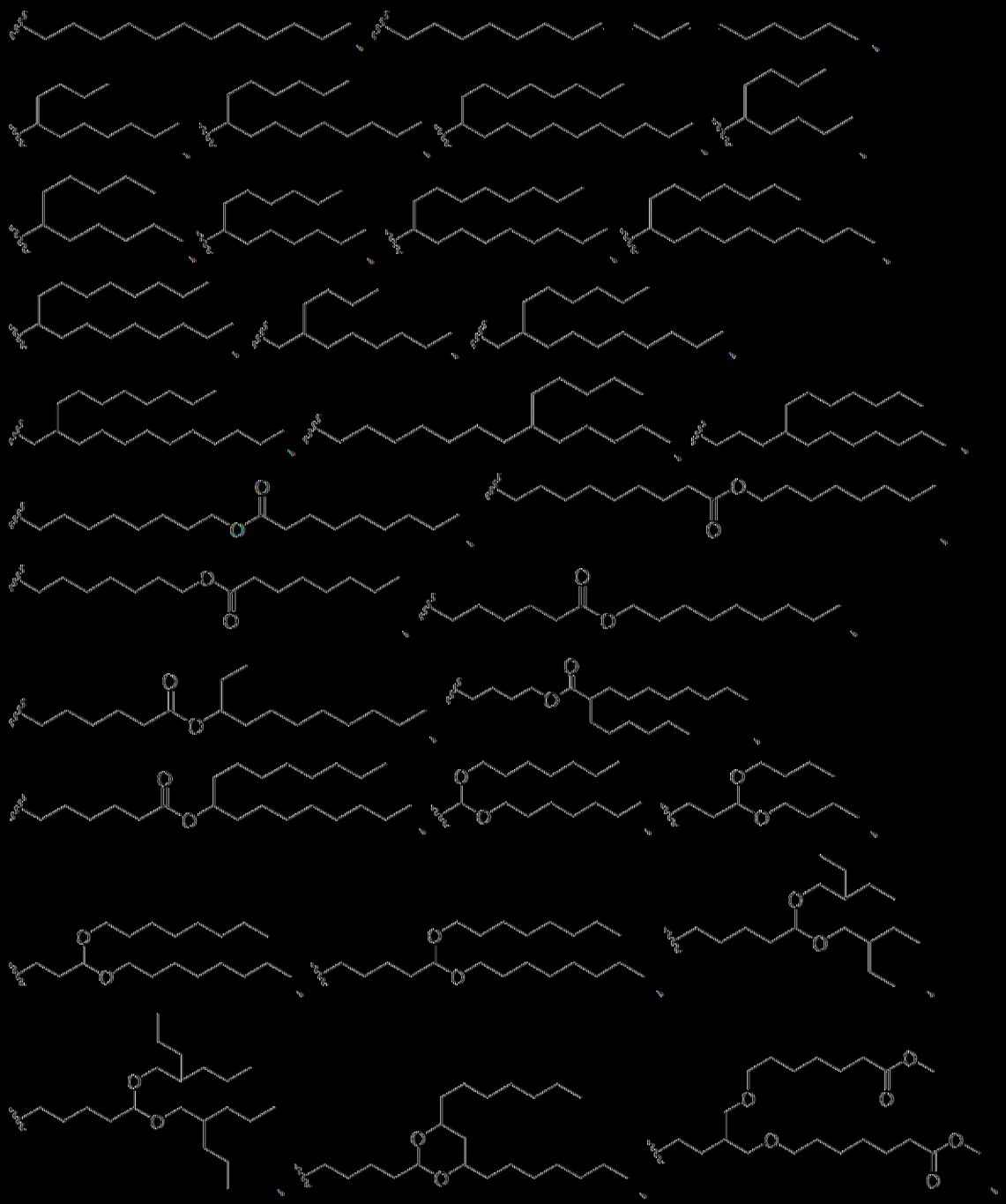
$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在一些實施例中，$R_1$及$R_2$中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

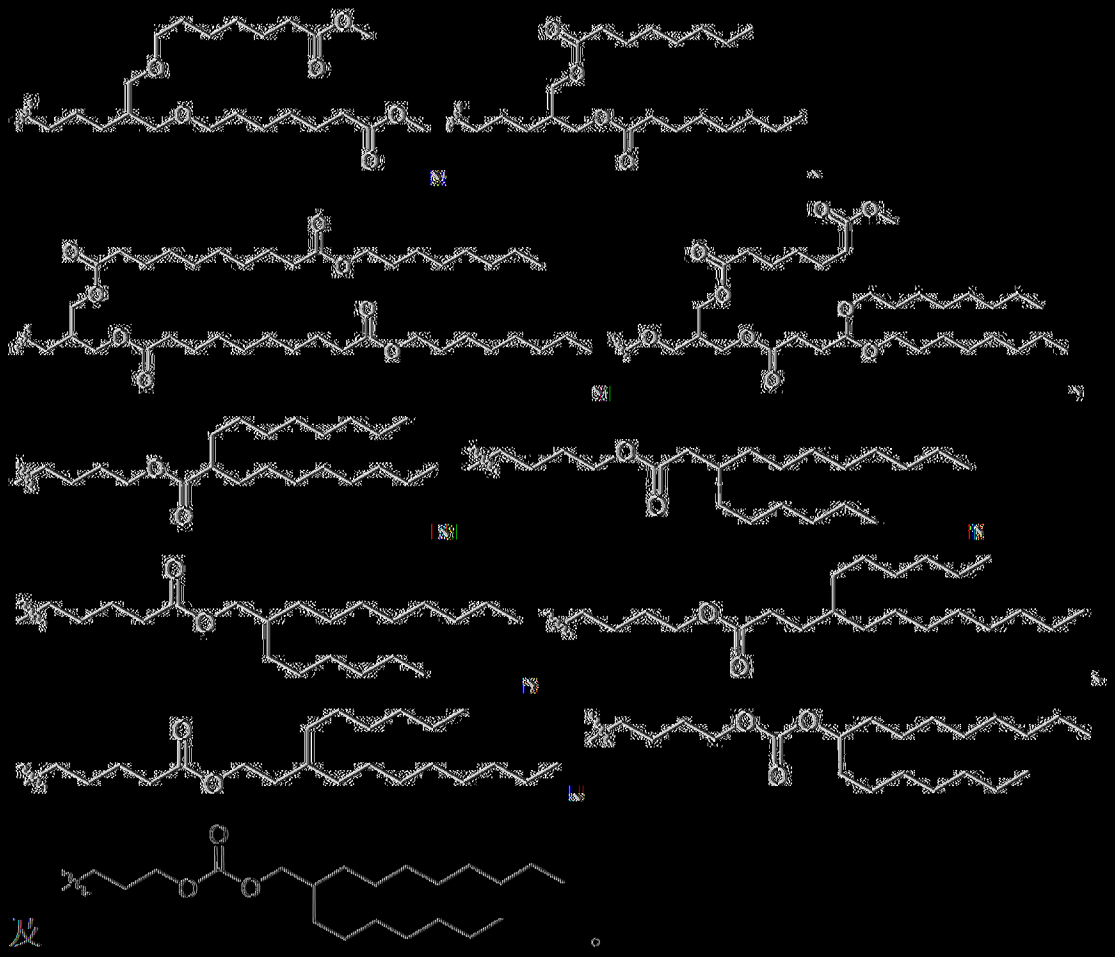
【0396】在某些實施例中，R_1為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0397】在某些實施例中，R_1為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為--$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0398】在某些實施例中，R_1為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_1$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

[0399] 在一典實施例中，R_1及R_2各自獨立地選自由以下組成之群：

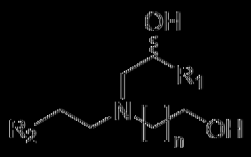




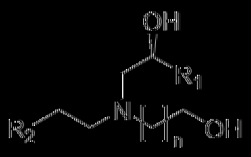
及

。

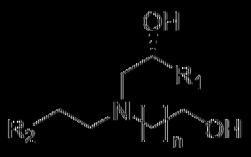
[0400] 在一典實施例中，式(13)之可離子化脂質由式(13a-1)、式(13a-2)或式(13a-3)表示：



式(13a-1)

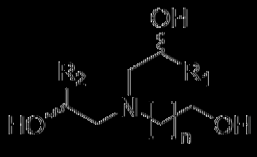


式(13a-2)

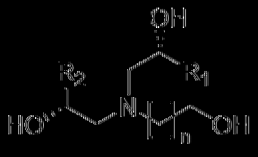


式(13a-3)

[0401] 在一典實施例中，可離子化脂質由式(13b-1)、式(13b-2)或式(13b-3)表示：



式(13b-1)



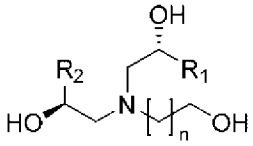
式(13b-2)



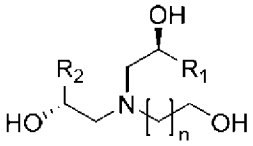
式(13b-3)

[0402] 在一典實施例中，可離子化脂質由式(13b-4)、式(13b-

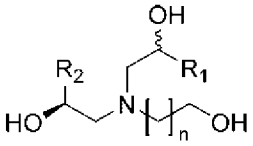
5)、式(13b-6)、式(13b-7)、式(13b-8)或式(13b-9)表示：



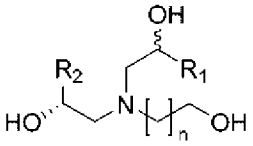
式(13b-4)



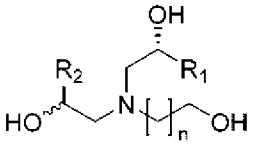
式(13b-5)



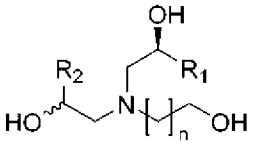
式(13b-6)



式(13b-7)



式(13b-8)



式(13b-9)。

【0403】 在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2獨立地為視情況經-O(CO)R^6、-C(O)OR^6或-O(CO)OR^6取代之C_1-C_{12}烷基，其中R^6為未經取代之直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。在一些實施例中，R^6為未經取代之直鏈C_1-C_{20}烷基。在一些實施例中，R^6為未經取代之分支鏈C_6-C_{20}烷基。在一些實施例中，R^6為未經取代之直鏈C_6-C_{20}烷基。在一些實施例中，R^6為未經取代之分支鏈C_6-C_{20}烷基。

【0404】 在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2獨立地選自直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基、直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烯基、直鏈或分支鏈C_6-C_{30}雜烷基、-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$、-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$及-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q為0至12，r為0至6，$R^8$為H或$R^{10}$，且$R^9$及$R^{10}$獨立地為未經取代之直鏈$C_1$-$C_{20}$烷基或未經取代之直鏈$C_2$-$C_{20}$烯基。在一些實施例中，q為1至8，諸如1至6或2至6。在一些實施例中，r為0。在一些實施例中，r為1至6，諸如1至3。在一些實施例中，r為1。在一些實施例中，r為2。

【0405】 在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2為不同基團。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2相同。在式(13a-1)至

(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之一者為直鏈基團，且R^1及R^2中之另一者包括分支鏈基團。

【0406】在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之至少一者選自下式：

(i) $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

(ii) $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

(iii) $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【0407】在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之各者獨立地選自下式中之一者：

(i) $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

(ii) $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

(iii) $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-

C_{12}烯基。

【0408】 在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為1至6之間的整數。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為1。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為2。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為3至12之間的整數。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為3至6之間的整數。

【0409】 在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為0。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為1至6之間的整數。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為1。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為2。

【0410】 在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為R^{10}。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^9及R^{10}不同。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^9及R^{10}相同。

【0411】 在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_1-C_{12}烯基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_2-C_{12}烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_2-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【0412】 在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_1-C_{12}烯基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_2-C_{12}烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_2-C_8烷基。在式

(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【0413】在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0414】在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或$-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0415】在式(13a-1)至(13b-9)之其他實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，R^1及R^2中之至少一者為$-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0416】在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-

$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

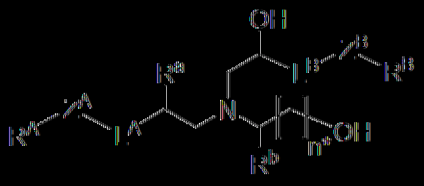
【0417】在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0418】在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R^2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(13a-1)至(13b-9)之某些實施例中，R^1為-$(CH_2)_qOC(O)O$

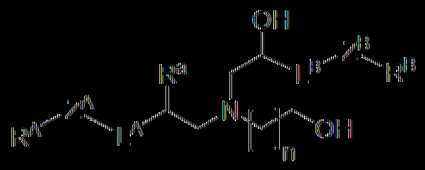
$(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且R^2為$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_r-CH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

[0419] 在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為1。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為2至7之間的整數。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為2。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為3至7之間的整數。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為3。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為4至7之間的整數。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為4。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為5。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為6。在式(13a-1)至(13b-9)之一些實施例中，n為7。

[0420] 在式(13*)之一些實施例中，可離子化脂質具有式(13c-1)或(13c-2)：



式(13c-1)



式(13c-2)

其中：

n^*及n各自為1至7之間的整數；

R^a為氫或甲基，

R^b為氫或C_1-C_6烷基，

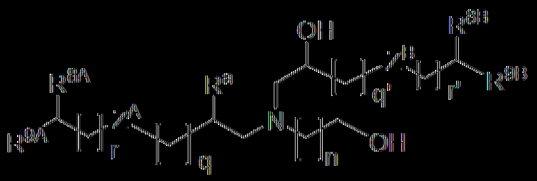
L^A及L^B各自獨立地為直鏈C_1-C_{12}烷基；

Z^A及Z^B各自獨立地為不存在或選自-C(O)O-、-OC(O)-及-OC(O)O-；及

R^A及R^B獨立地為直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。

[0421] 在式(13c-1)及(13c-2)之一些實施例中，Z^A選自-C(O)O-、-OC(O)-及-OC(O)O-，且Z^B不存在。在式(13c-1)及(13c-2)之一些實施例中，Z^B選自-C(O)O-、-OC(O)-及-OC(O)O-，且Z^A不存在。

[0422] 在式(13c-2)之一些實施例中，可離子化脂質具有式(13d-2)：



式(13d-2)

其中：

q及q'各自獨立地為1至12之間的整數，

r及r'各自獨立地為0至6之間的整數，

R^{8A}為H或R^{10A}，

R^{8B}為H或R^{10B}，及

R^{9A}、R^{9B}、R^{10A}及R^{10A}各自獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

[0423] 在式(13d-2)之一些實施例中，R^{9A}、R^{9B}、R^{10A}及R^{10A}各自獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

[0424] 在式(13d-2)之一些實施例中，q為1至6之間的整數。在式(13d-2)之一些實施例中，q為0。在式(13d-2)之一些實施例中，q為1。在式(13d-2)之一些實施例中，q為2。在式(13d-2)之一些實施例中，q為3至12。在式(13d-2)之一些實施例中，q為3至6。

[0425] 在式(13d-2)之一些實施例中，r為0。在式(13d-2)之一些實施例中，r為1至6之間的整數。在式(13d-2)之一些實施例中，r為1。在

式(13d-2)之一典實施例中，r為2。

[0426] 在式(13d-2)之一典實施例中，R^a為氫，Z^A選自 C(O)O、OC(O)及 OC(O)O，且Z^B不存在。在式(13d-2)之一典實施例中，R^a為氫，Z^B為選自 C(O)O、OC(O)及 OC(O)O 之連接基團，且Z^A不存在。

[0427] 在式(13d-2)之一典實施例中，R^a為羥基，Z^A選自 C(O)O、OC(O)及 OC(O)O，且Z^B不存在。在式(13d-2)之一典實施例中，R^a為羥基，Z^B選自 C(O)O、OC(O)及 OC(O)O，且Z^A不存在。

[0428] 在一典實施例中，本發明之可離子化脂質具有如下表1中之化合物中所描述之式(13d-2)，其中任何未定義之變數如上文所描述。表1：式(13d-2)之例示性可離子化脂質。在表1之例示性脂質之一典實施例中，n為1或2。

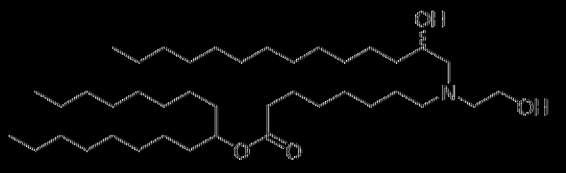
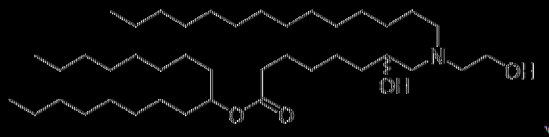
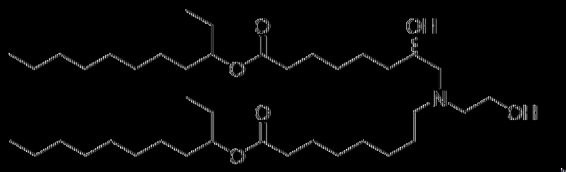
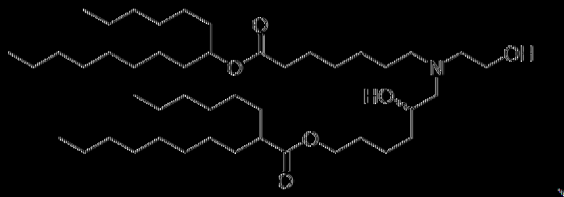
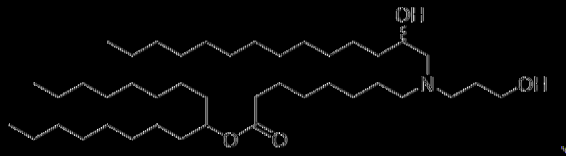
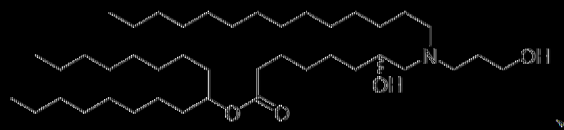
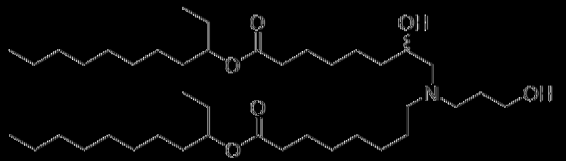
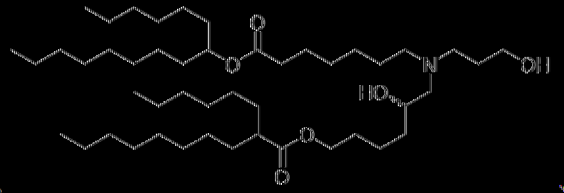
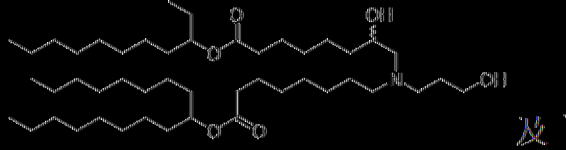
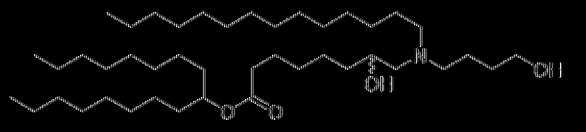


式(13d-2)

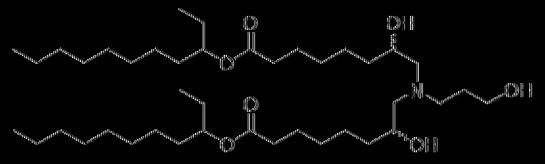
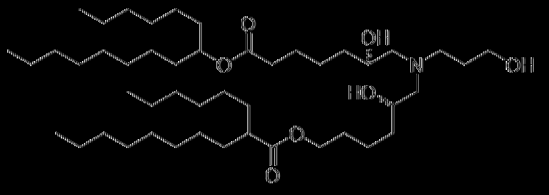
化合物編號	R^{9A}	R^{8A}	r	Z^A	q	R^a	q'	Z^B	r'	R^{8B}	R^{9B}
1	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	C(O)O	3-6	H	3-6	OC(O)	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
2	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	1	C(O)O	3-6	H	3-6	OC(O)	1	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
3	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	2	C(O)O	3-6	H	3-6	OC(O)	2	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
4	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	OC(O)	3-6	H	3-6	C(O)O	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
5	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	1	OC(O)	3-6	H	3-6	C(O)O	1	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
6	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	2	OC(O)	3-6	H	3-6	C(O)O	2	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
7	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	OC(O)O	3-6	H	3-6	OC(O)O	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
8	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	1	OC(O)O	3-6	H	3-6	OC(O)O	1	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基

9	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)-	3-6	H	1-12	不存在	0	H	C_1-C_{12}烷基
10	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	H	C_4-C_{12}烷基
11	C_1-C_{12}烷基	H	0	不存在	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
12	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)-	3-6	OH	1-12	不存在	0	H	C_1-C_{12}烷基
13	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)-	3-6	OH	3-6	-C(O)O-	0	H	C_4-C_{12}烷基
14	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	H	C_4-C_{12}烷基
15	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	H	C_4-C_{12}烷基
16	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	H	C_4-C_{12}烷基
17	C_4-C_8烷基	H	0	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
18	C_4-C_8烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
19	C_4-C_8烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
20	C_4-C_8烷基	H	0	-OC(O)-	3-6	OH	3-6	-OC(O)O-	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
21	C_4-C_8烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	OH	3-6	-C(O)O	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
22	C_4-C_8烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	OH	3-6	-OC(O)O-	0	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基
23	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	C_1-C_4烷基	C_4-C_{12}烷基
24	C_4-C_8烷基	C_4-C_8烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	C_1-C_5烷基	C_6-C_{12}烷基

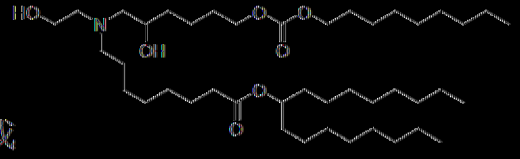
【0429】在一些實施例中，本發明之可離子化脂質選自由以下組成之群：











及

[0430] 在一些實施例中，可離子化脂質選自由以下組成之群：



及

[0431] 在一些實施例中，可離子化脂質不為



或

[0432] 在式(13c-1)及/或(13c-2)之一些實施例中，各R^b為氫。

[0433] 在式(13c-1)及/或(13c-2)之一些實施例中，一個且僅一個R^b為C_1-C_6烷基，且另一R^b基團(若存在)為氫。在式(13c-1)及/或(13c-2)之一些實施例中，一個且僅一個R^b為甲基或乙基。在一些實施例中，為C_1-

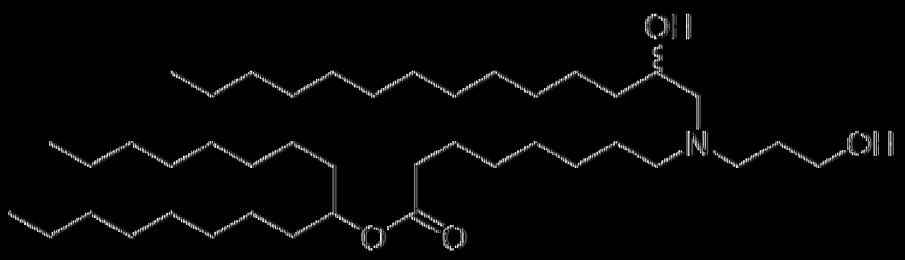
C_6烷基之一個且僅一個R^b連接至與可離子化脂質之氮原子相鄰之碳原子。在式(13c-1)及/或(13c-2)之一些實施例中，n為2至7，且一個且僅一個R^b為C_1-C_6烷基，且另外R^b基團(若存在)為氫。

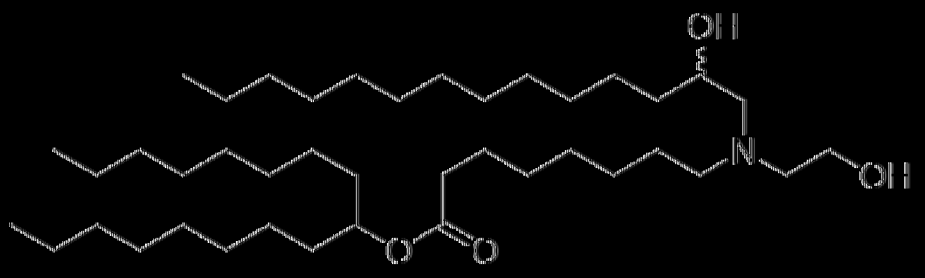
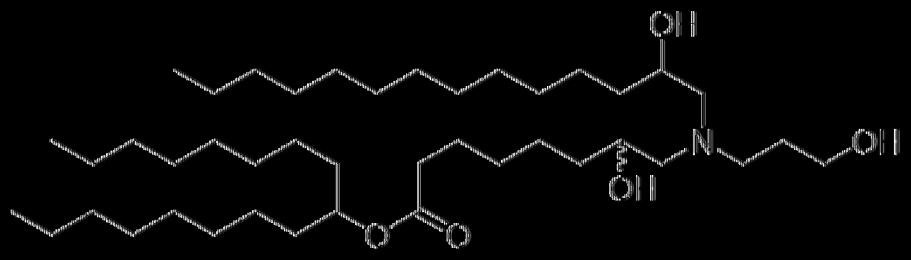
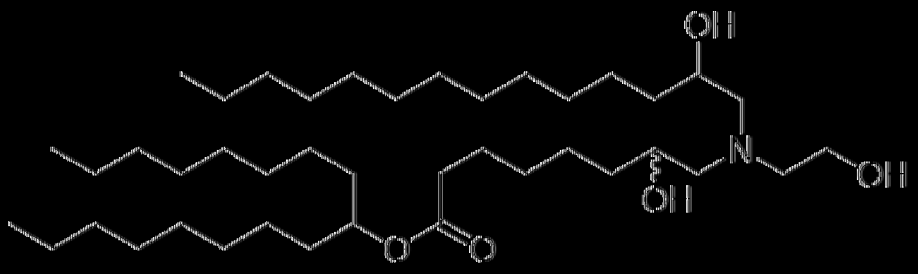
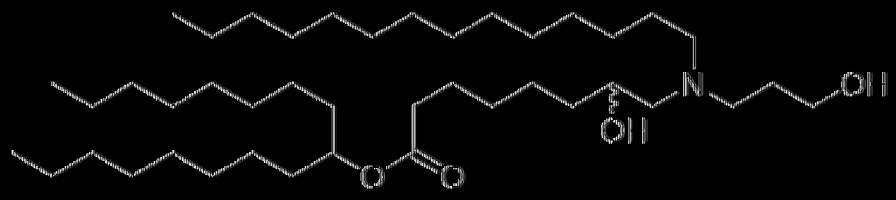
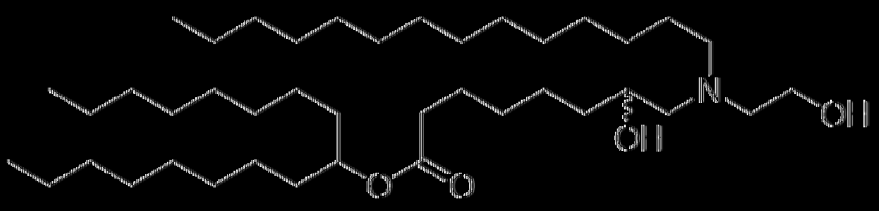
[0434] 在一些實施例中，本發明之可離子化脂質為選自表10c-表10h之脂質。

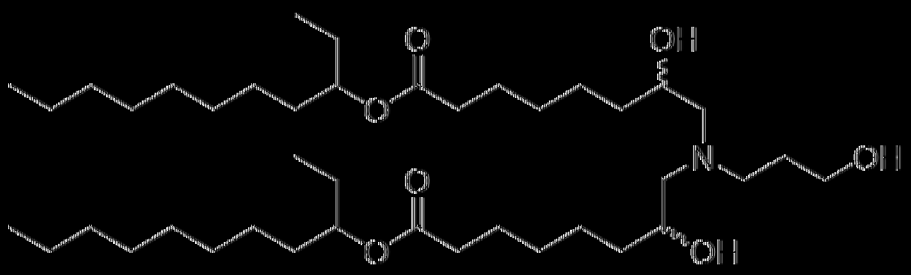
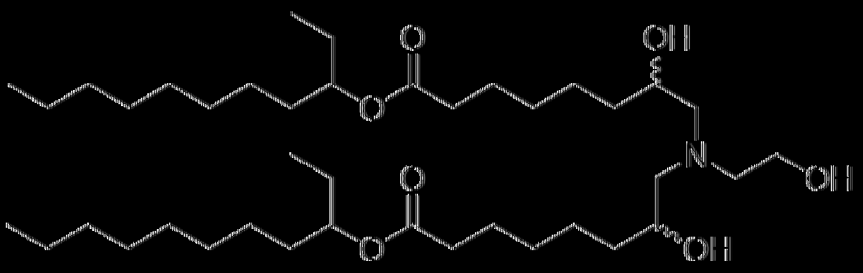
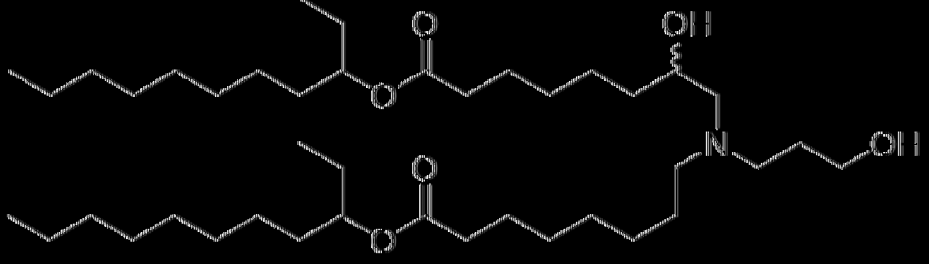
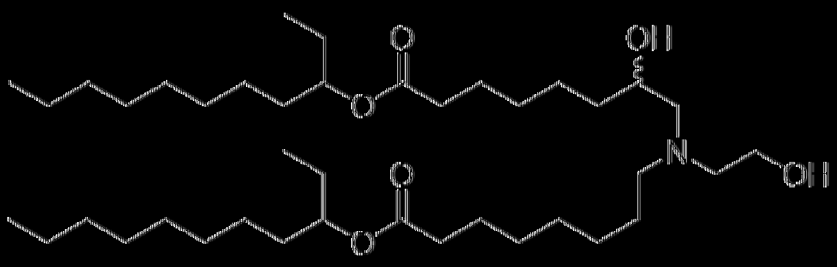
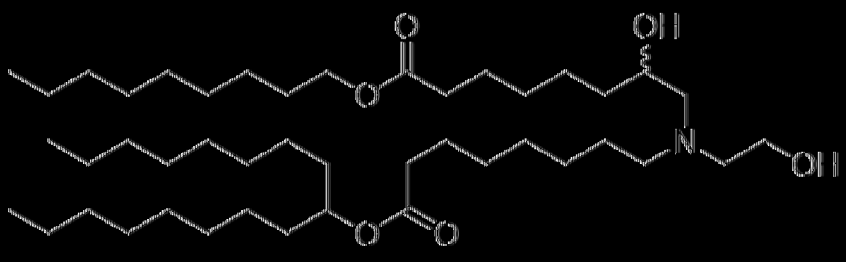
[0435] 在一些實施例中，本發明之可離子化脂質具有β-羥基頭基。在一些實施例中，可離子化脂質具有γ-羥基頭基。

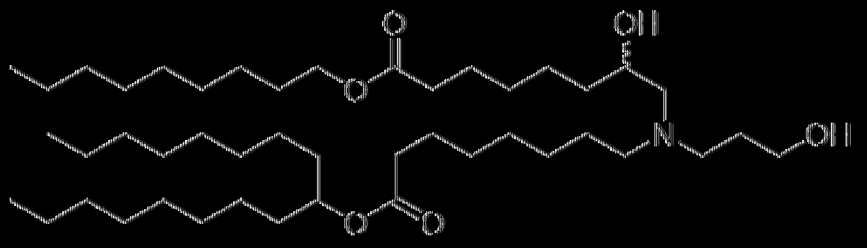
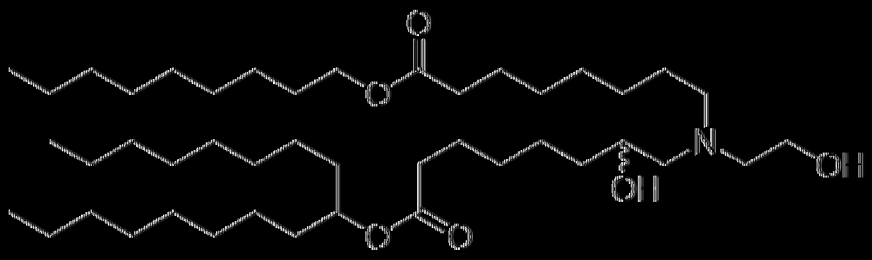
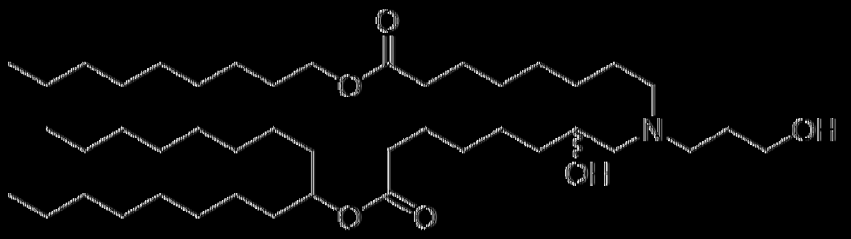
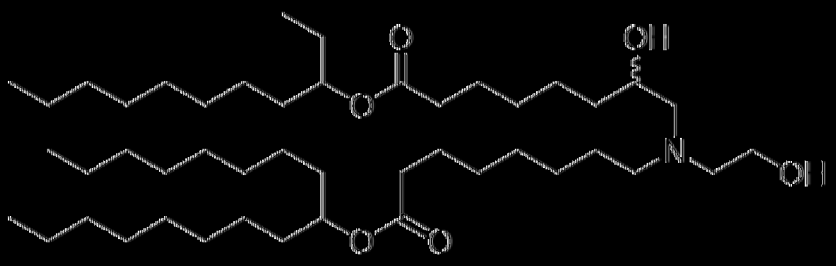
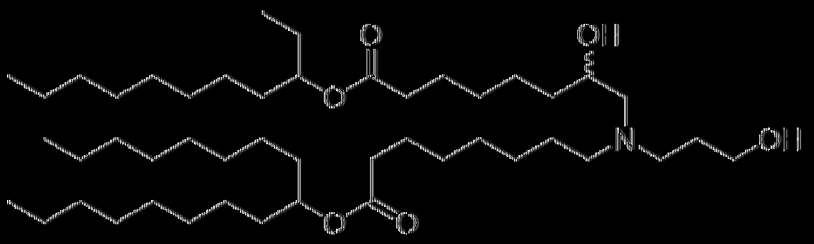
[0436] 在一實施例中，可離子化脂質描述於美國專利公開案第US20170210697A1號中。在一實施例中，可離子化脂質描述於美國專利公開案第US20170119904A1號中。

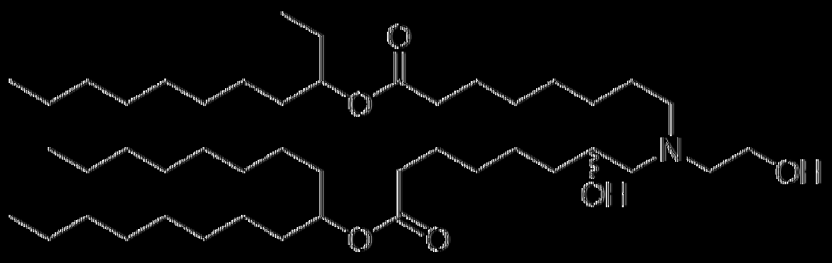
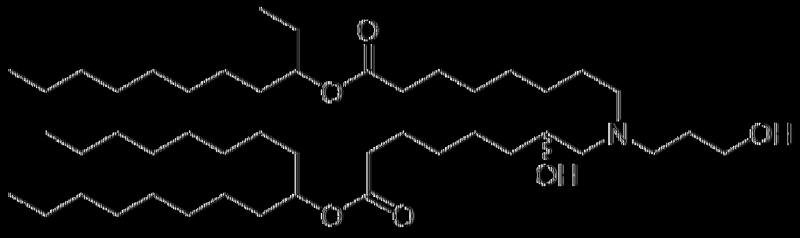
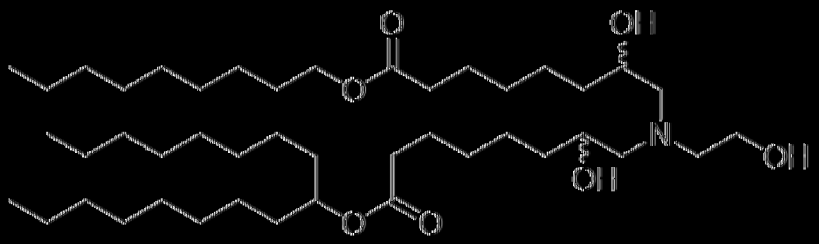
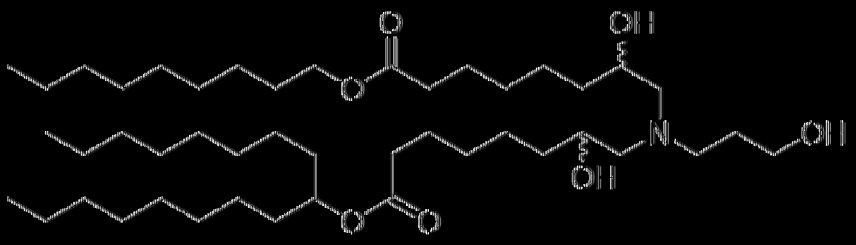
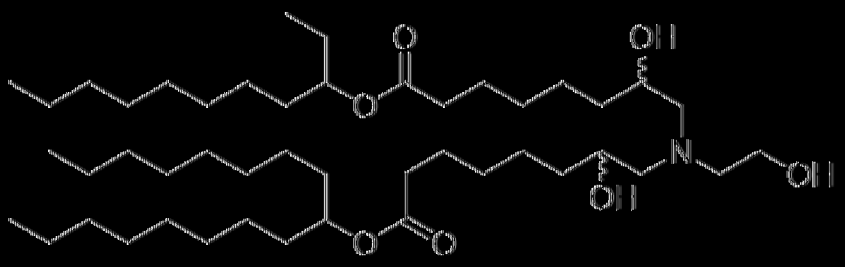
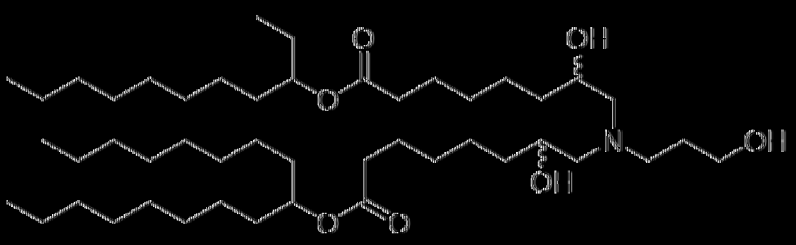
表10c

可離子化脂質編號	結構
1	

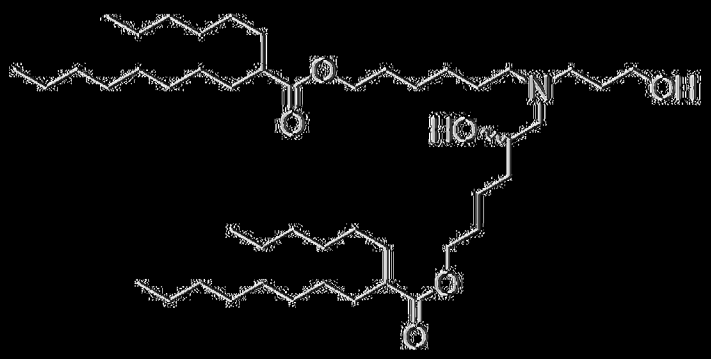
2	
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	
11	

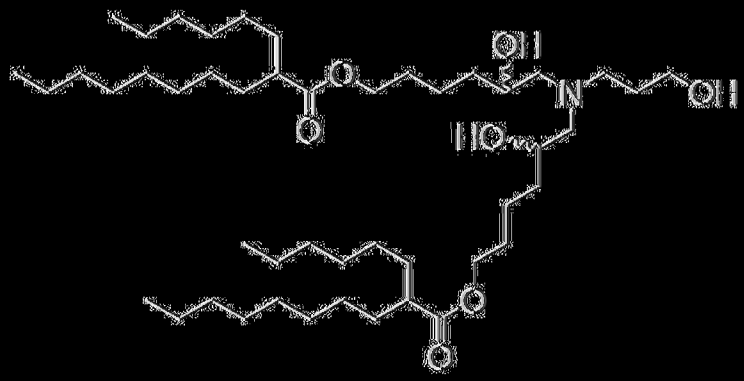
12	
13	
14	
15	
16	

17	
18	
19	
20	
21	
22	

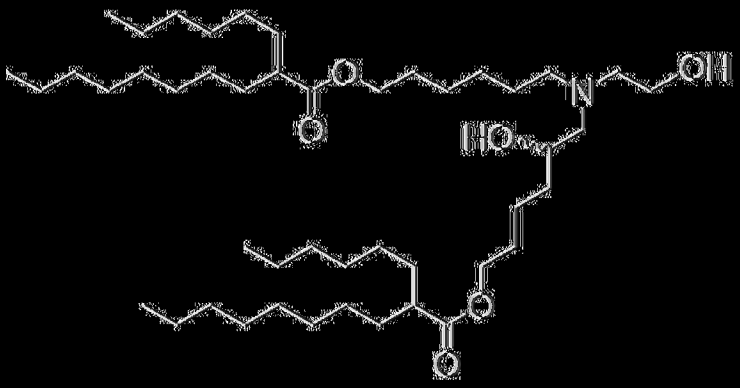
23

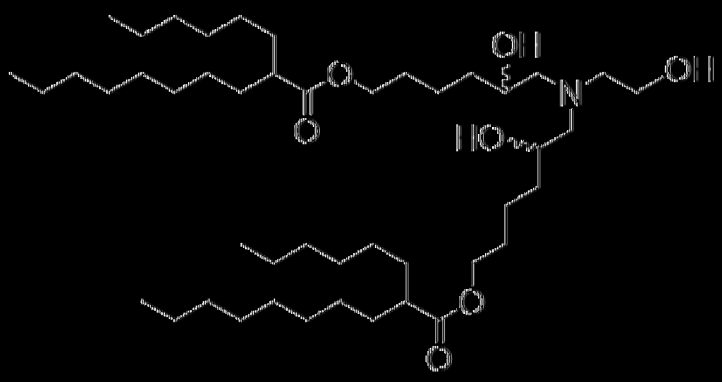
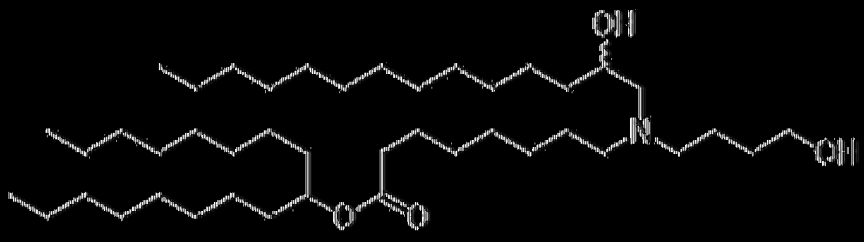
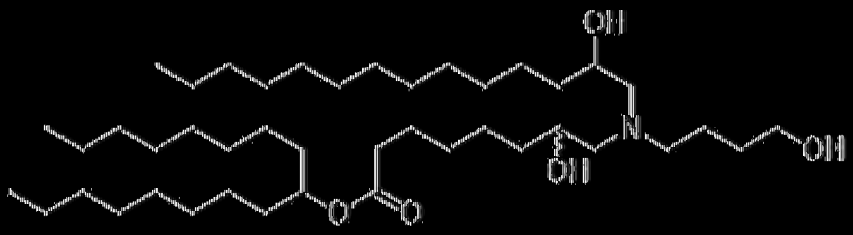
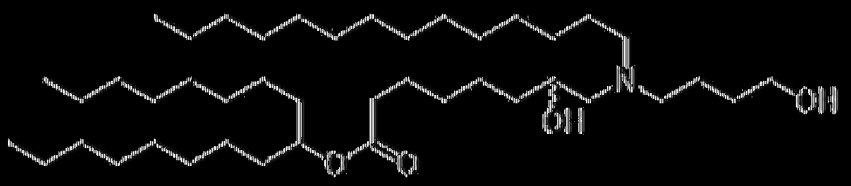
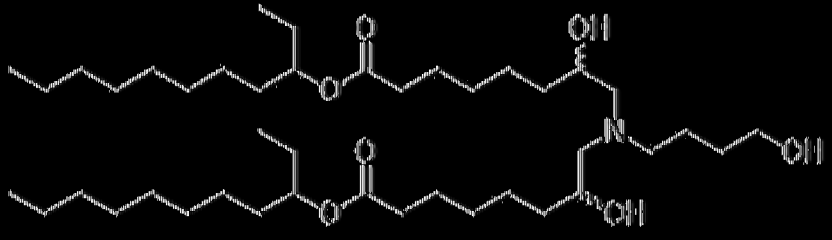


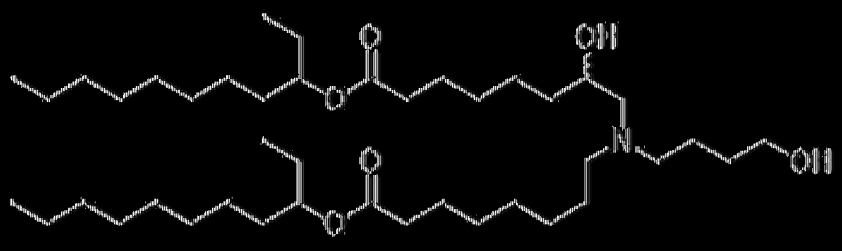
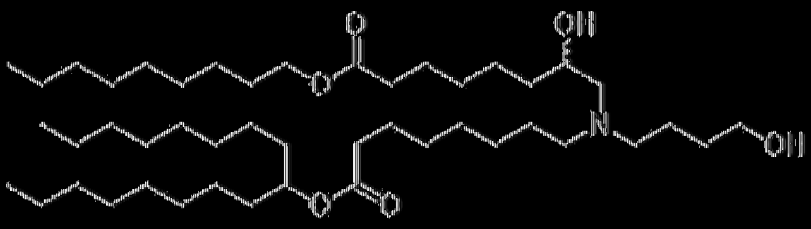
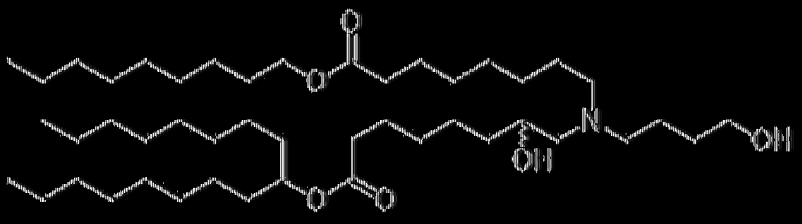
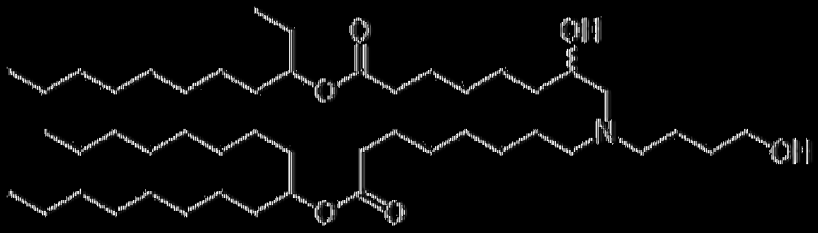
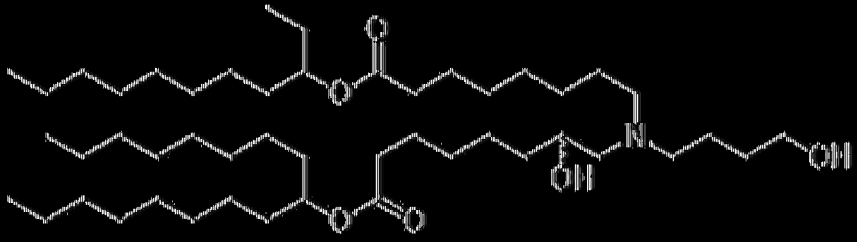
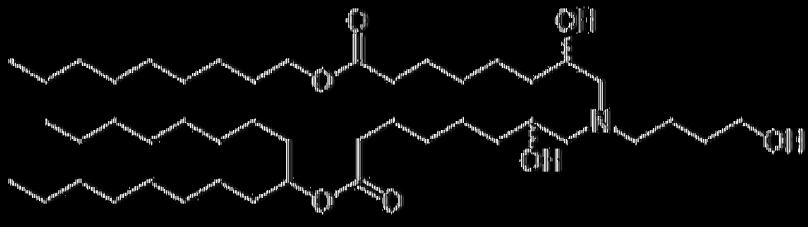
24



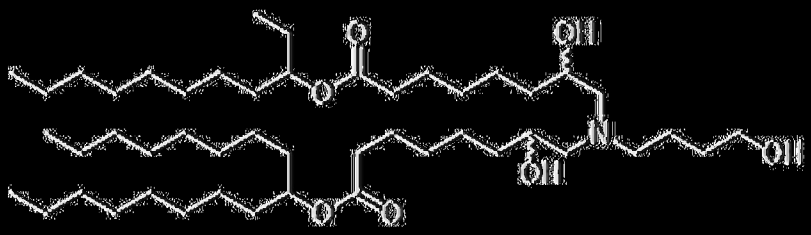
25



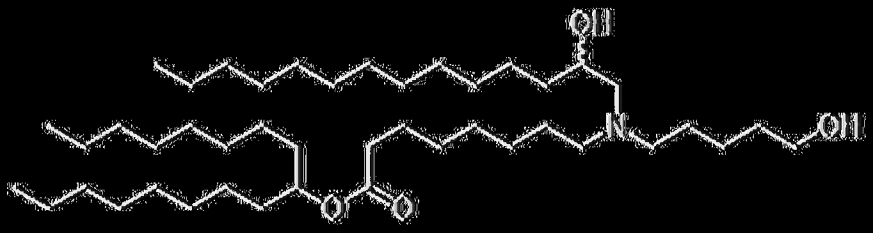
26	
27	
28	
29	
30	

31	
32	
33	
34	
35	
36	

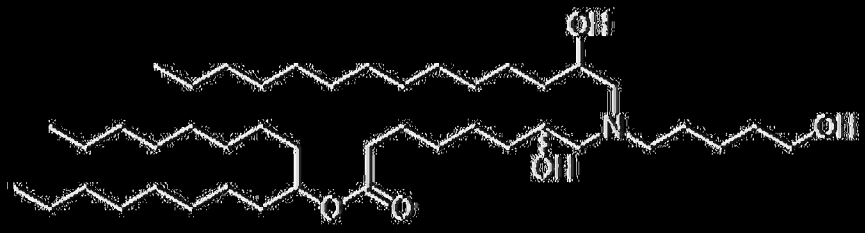
37



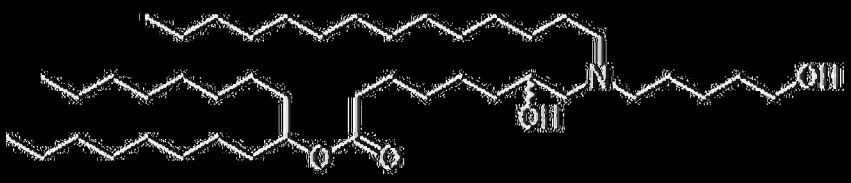
38



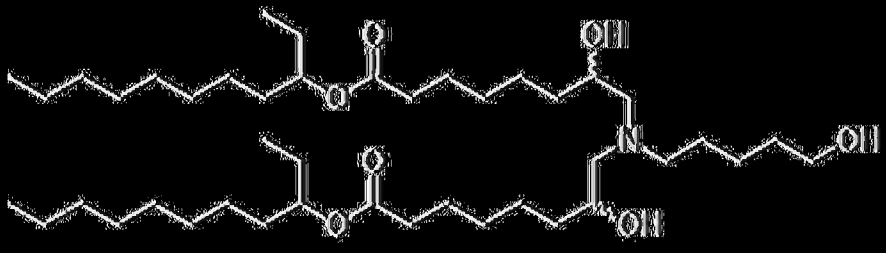
39



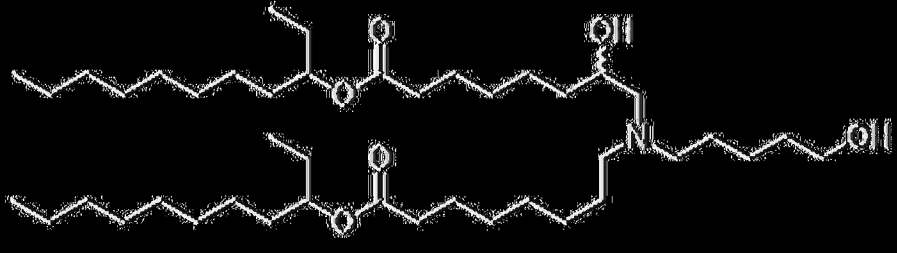
40



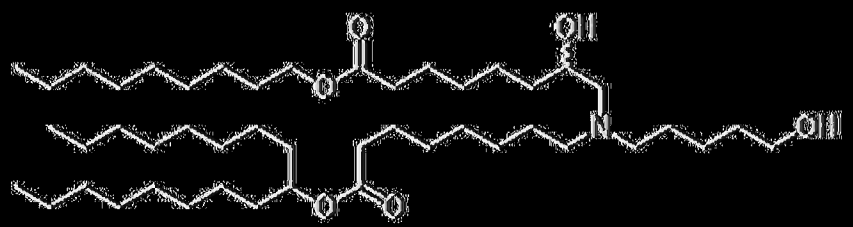
41



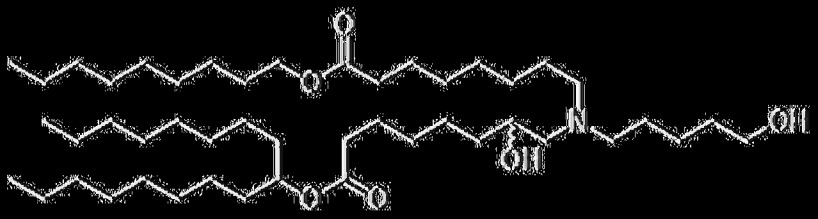
42



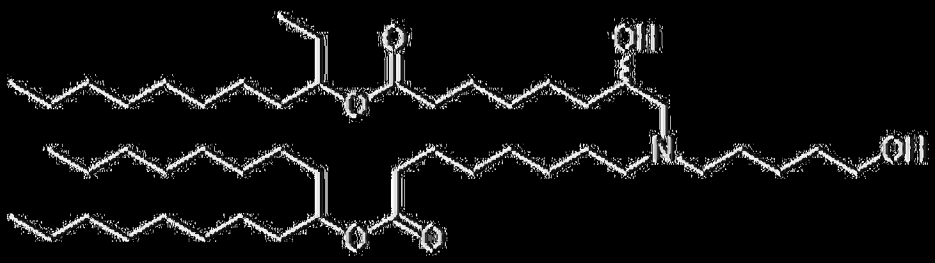
化合物 18



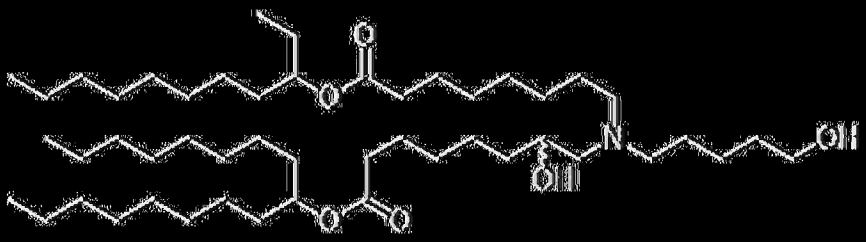
化合物 VII



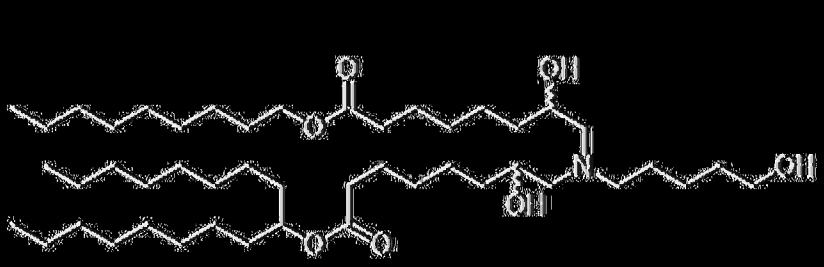
化合物 15



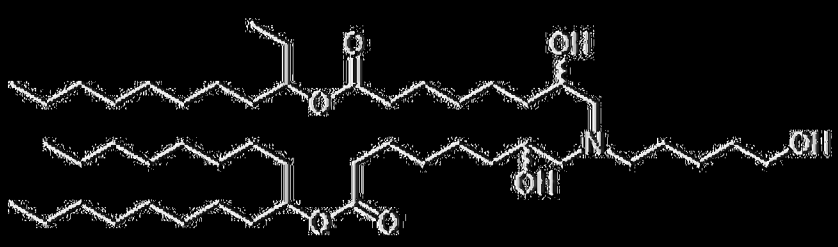
化合物 16



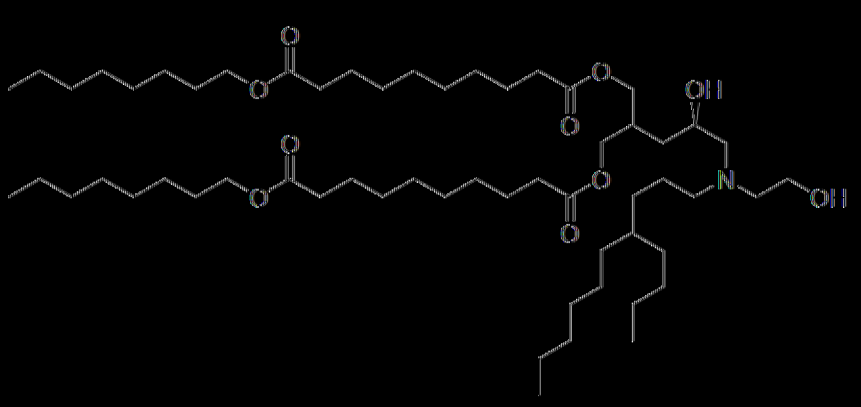
化合物 17



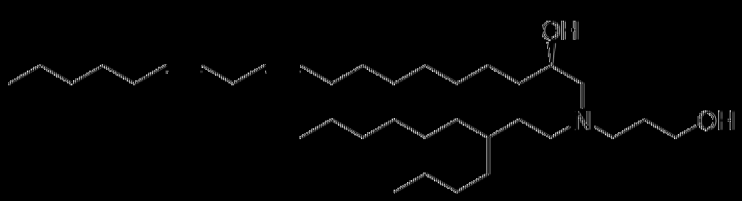
化合物 18



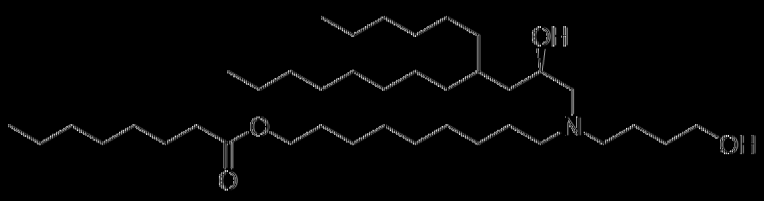
49



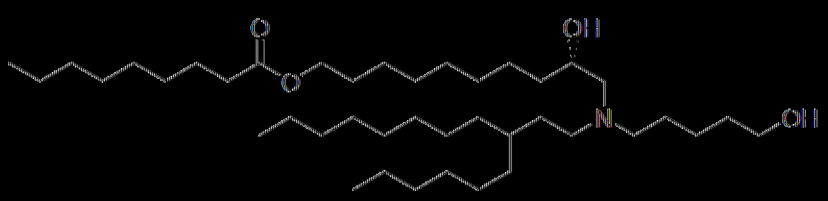
50



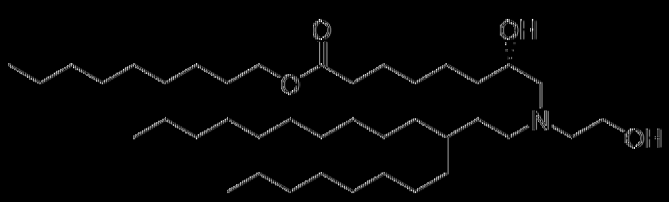
51



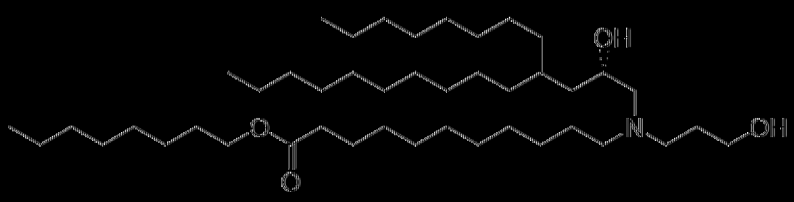
52

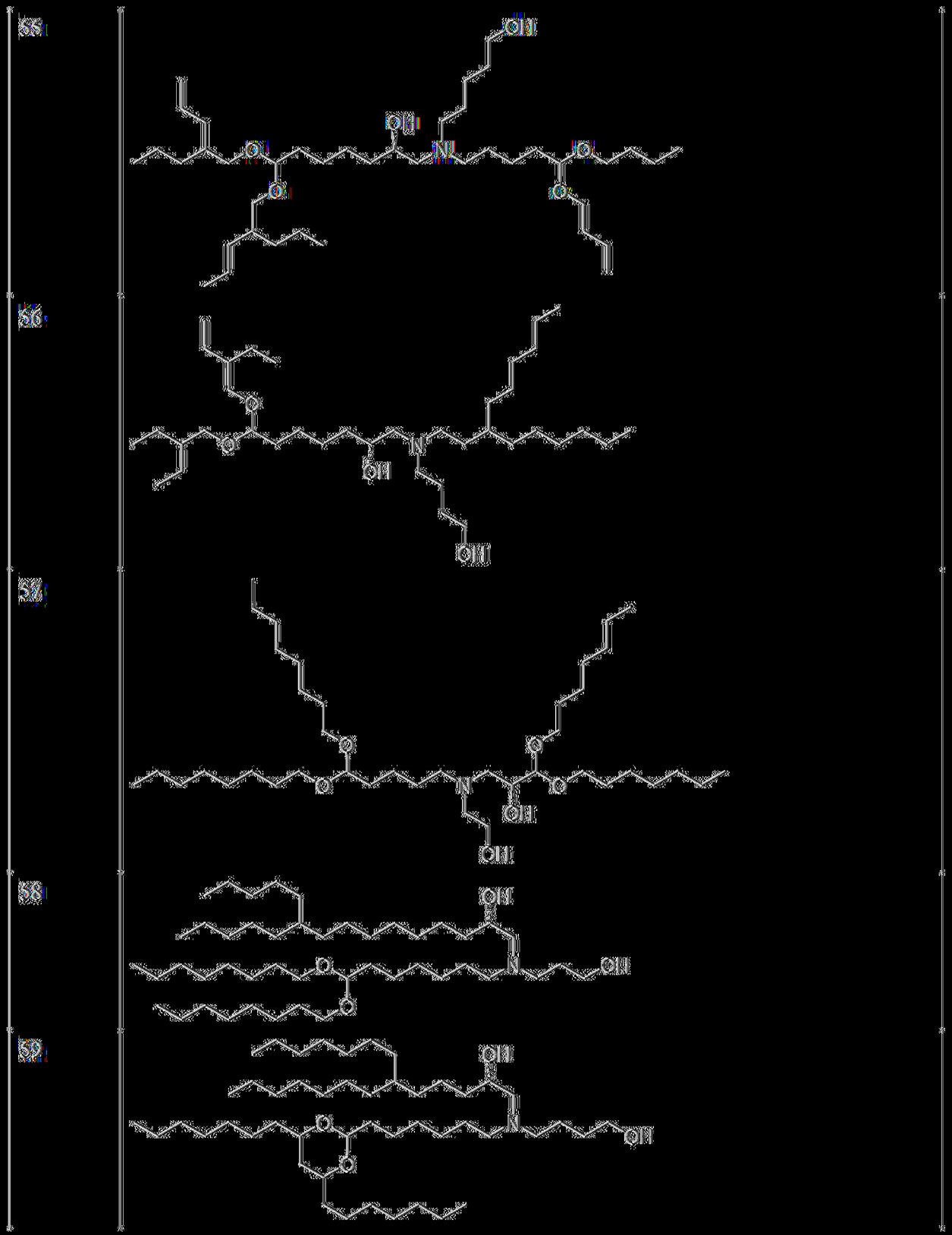


53

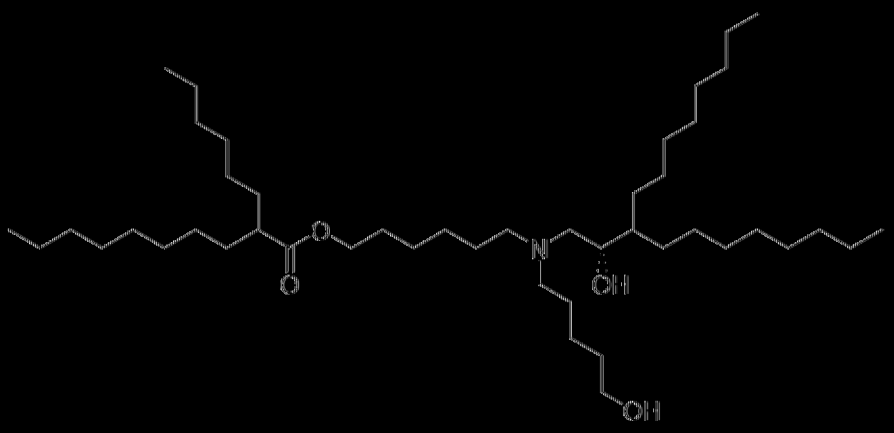


54

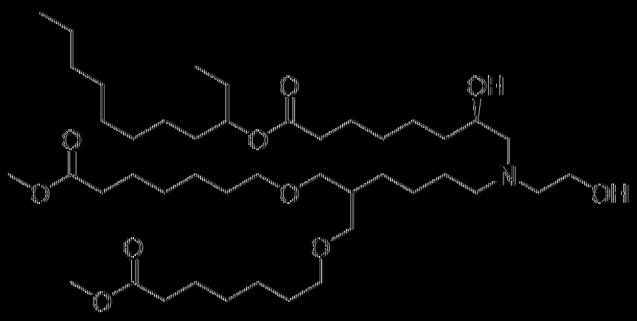




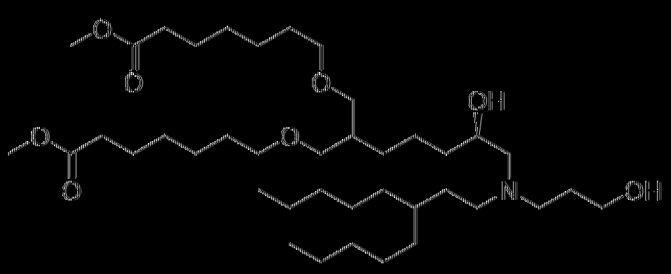
60



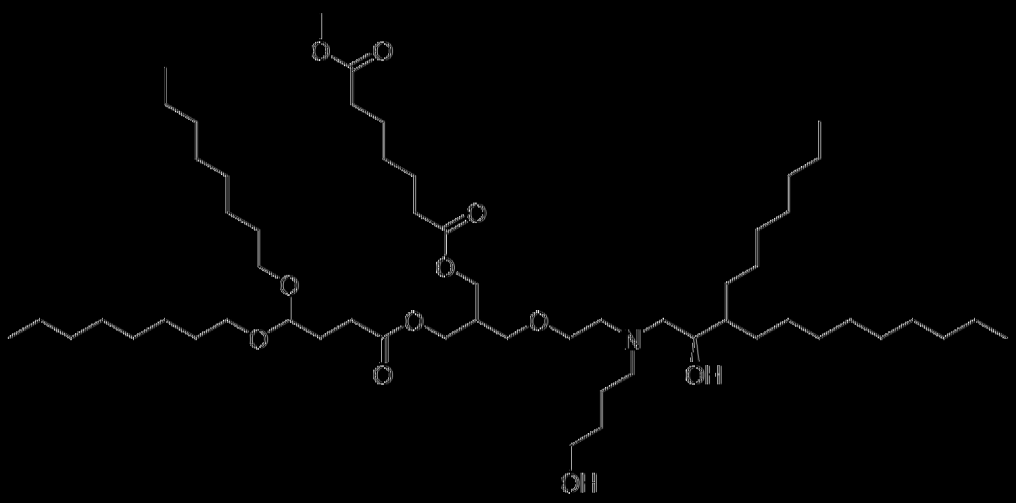
61



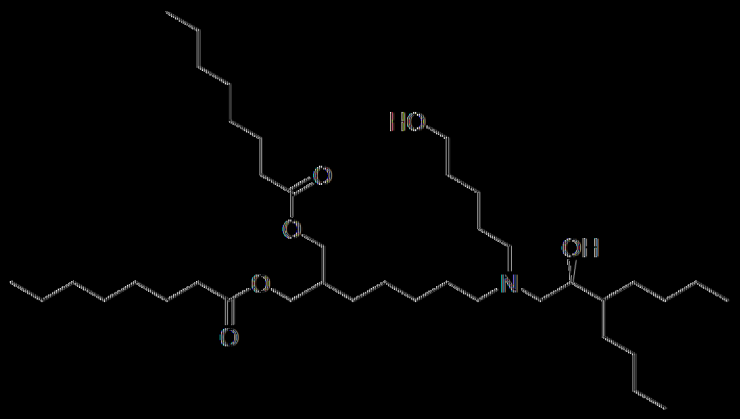
62



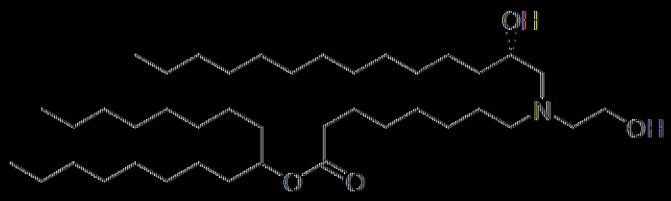
63



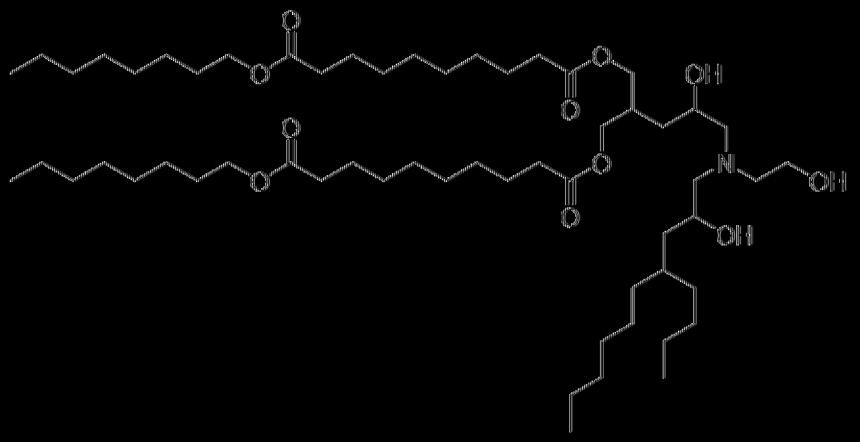
64



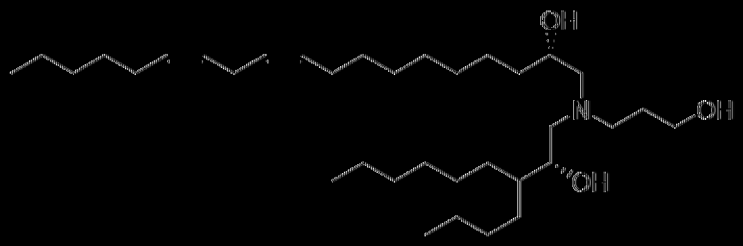
65



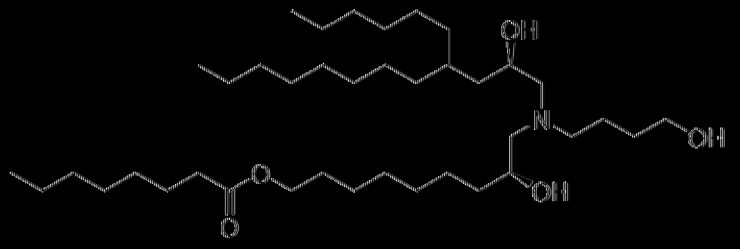
66



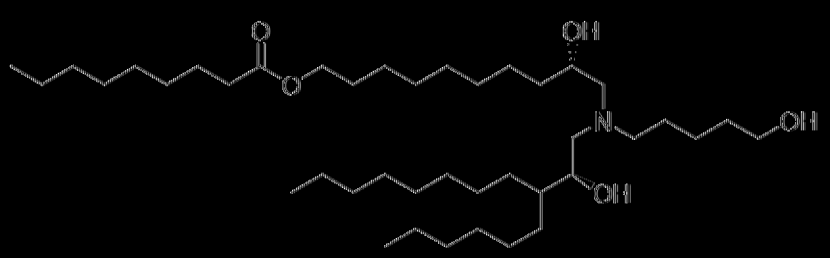
67



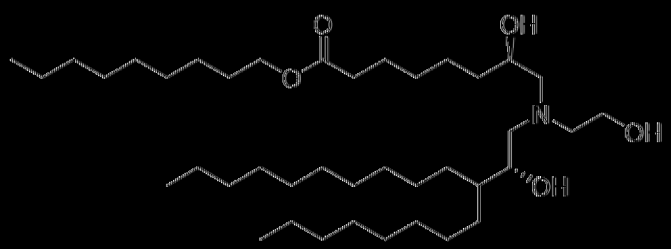
68



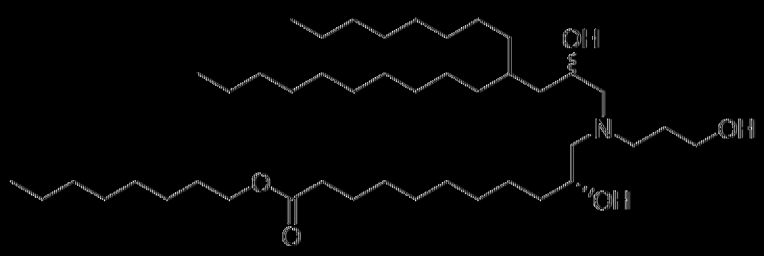
化9



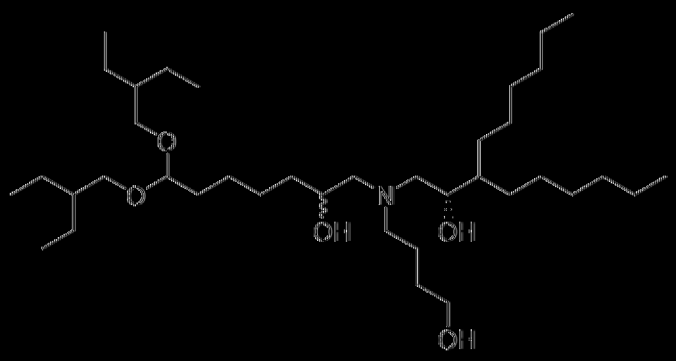
化10



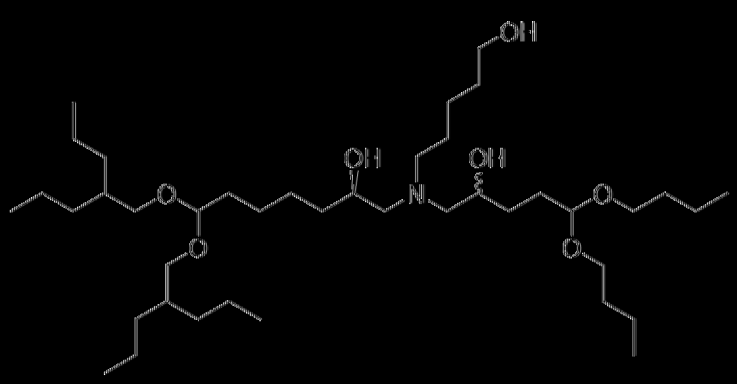
化11

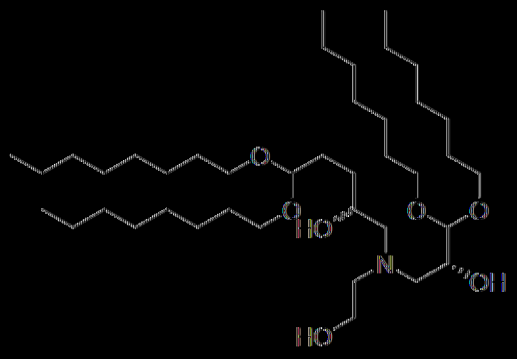
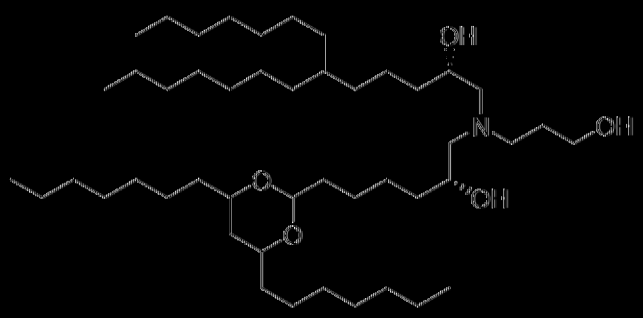
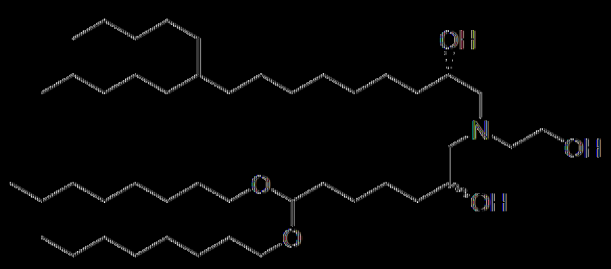
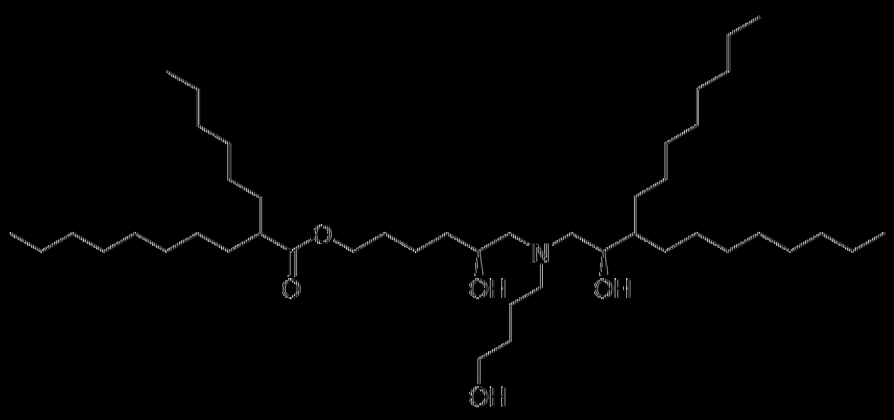
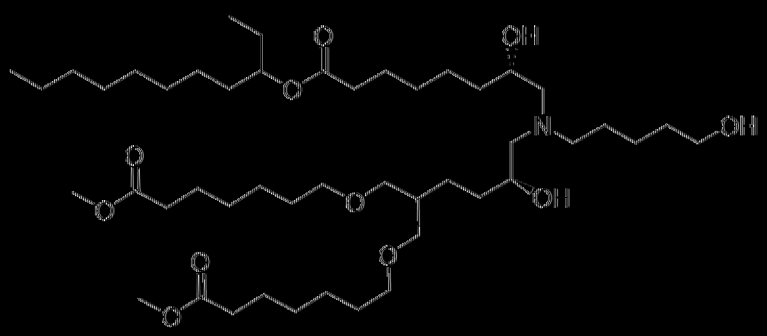


化12

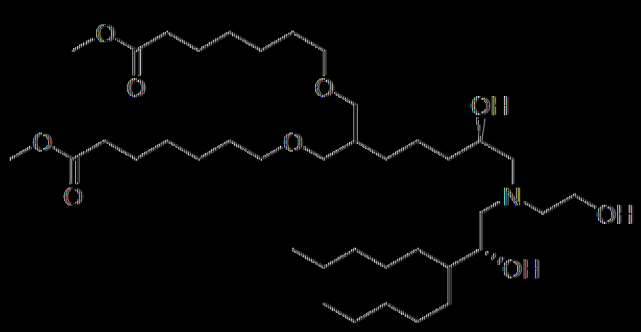


化13

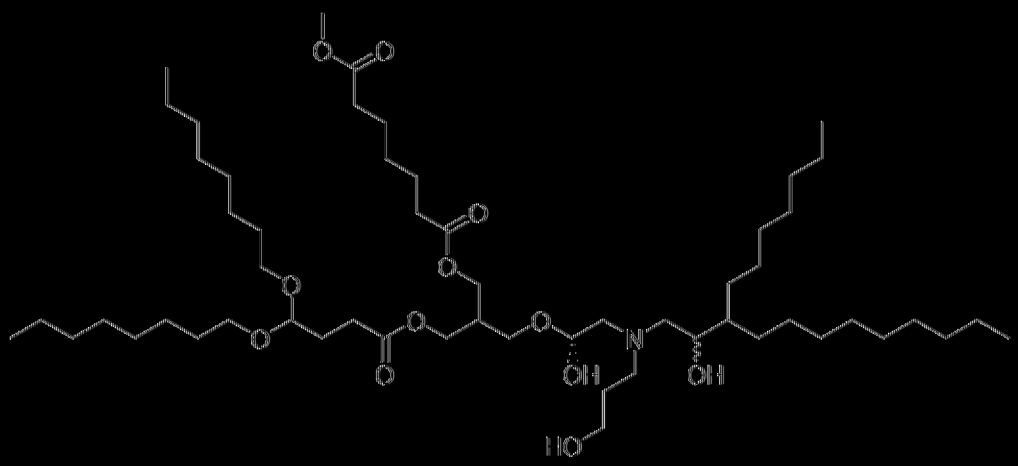


式4	
式5	
式6	
式7	
式8	

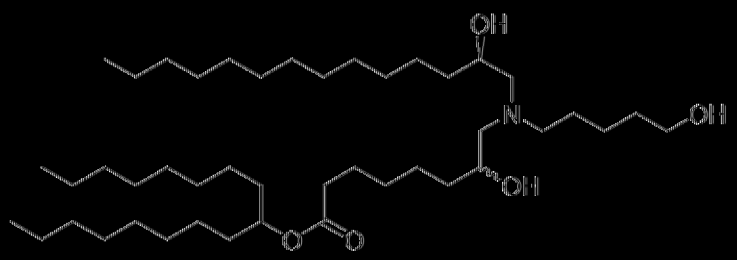
|79



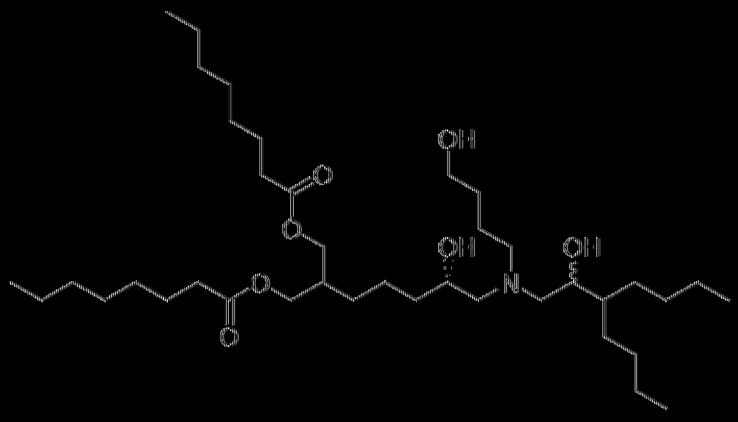
|80

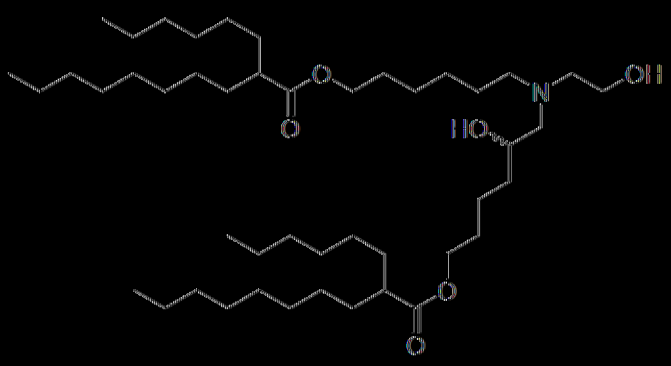
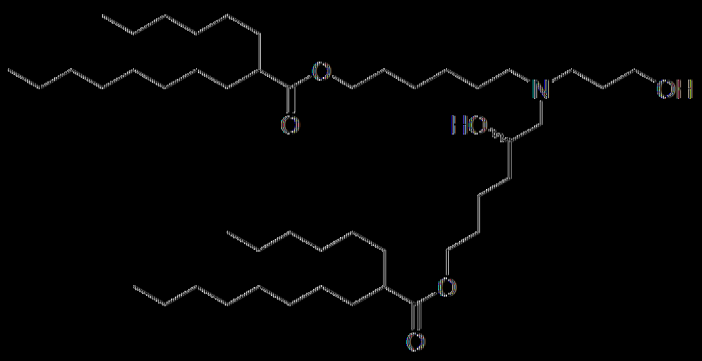
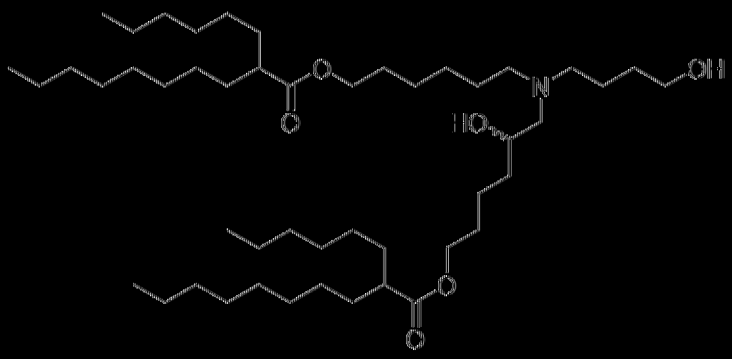
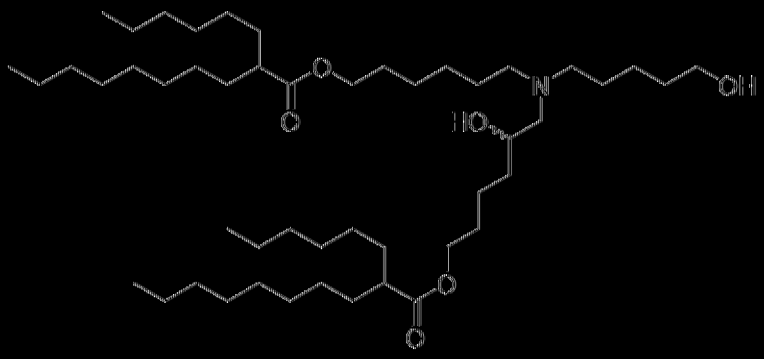


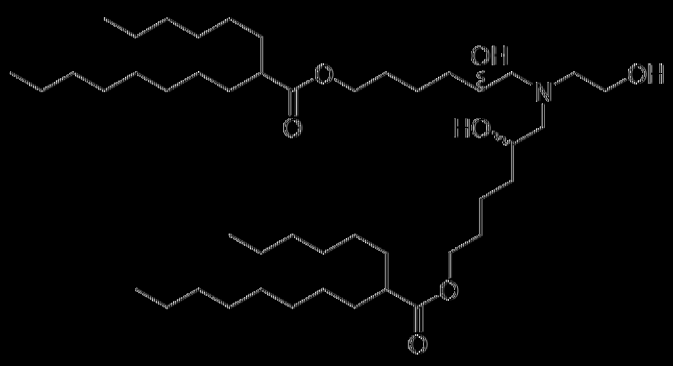
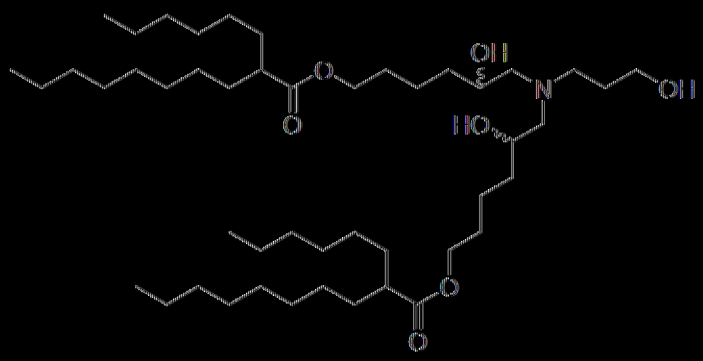
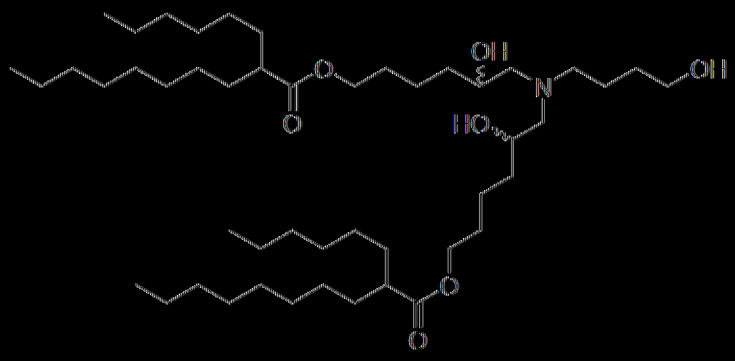
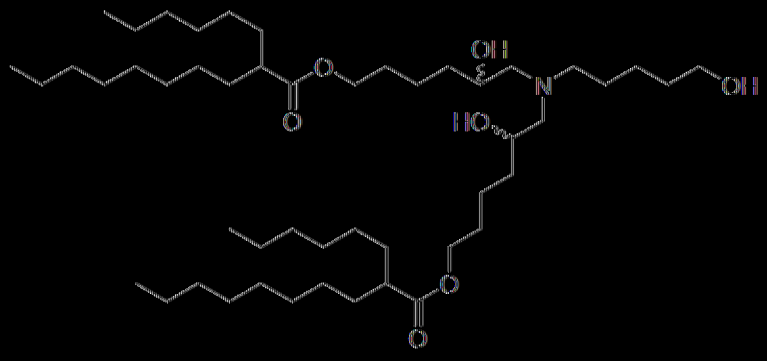
|81

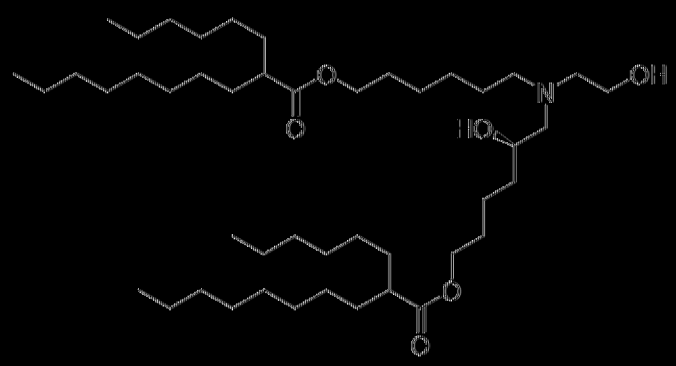
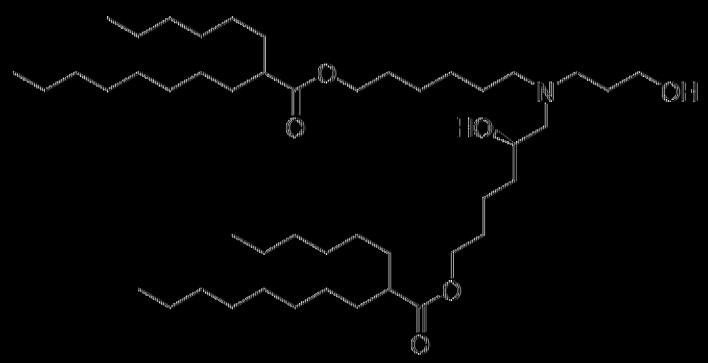
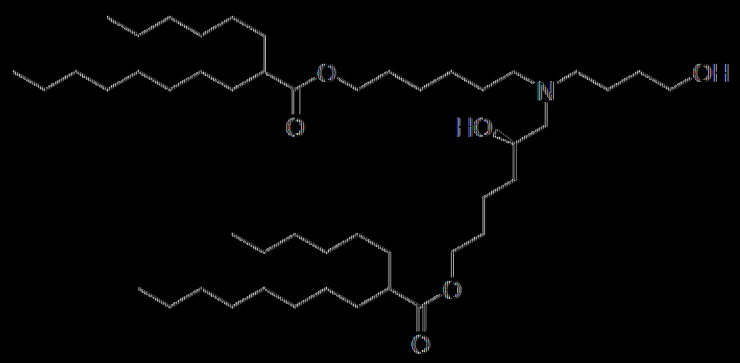
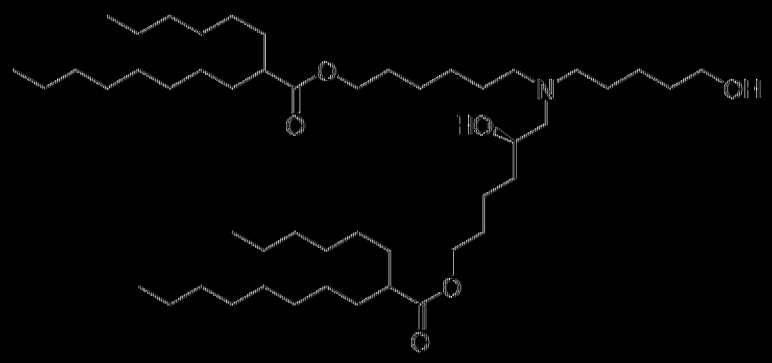


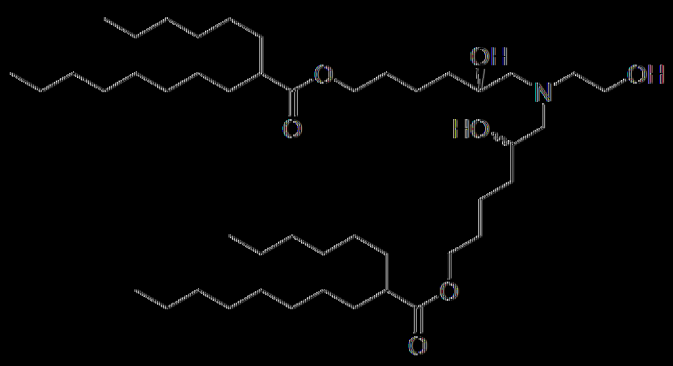
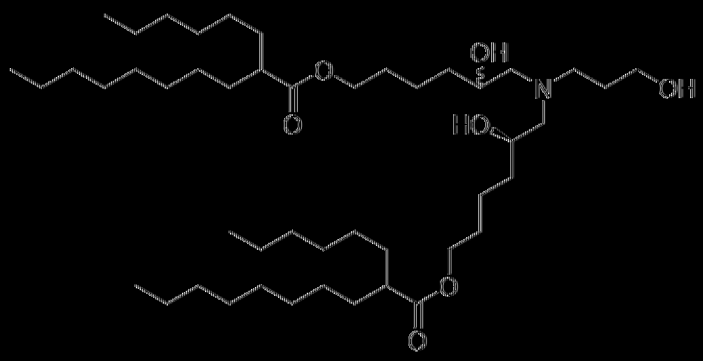
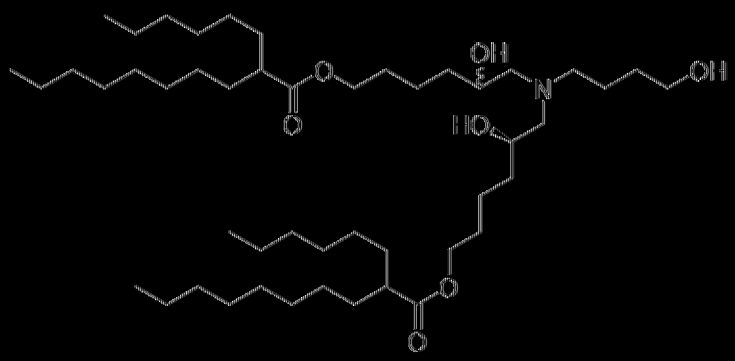
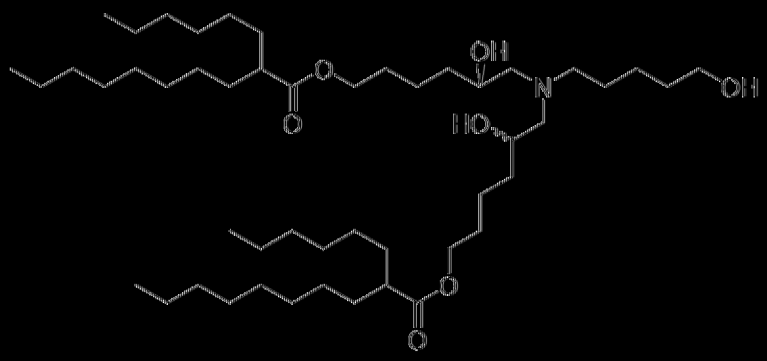
|82

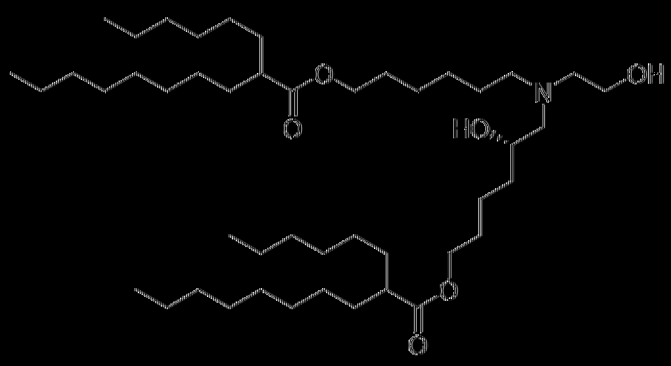
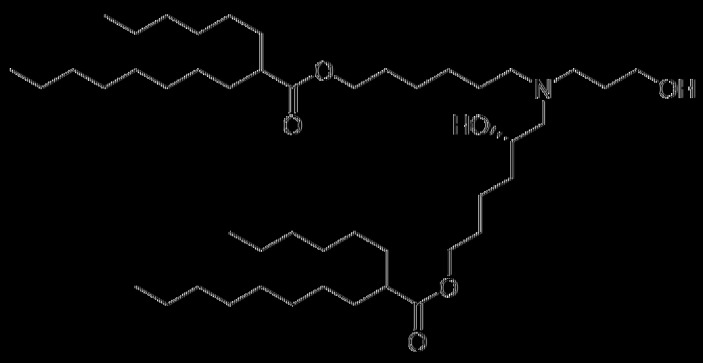
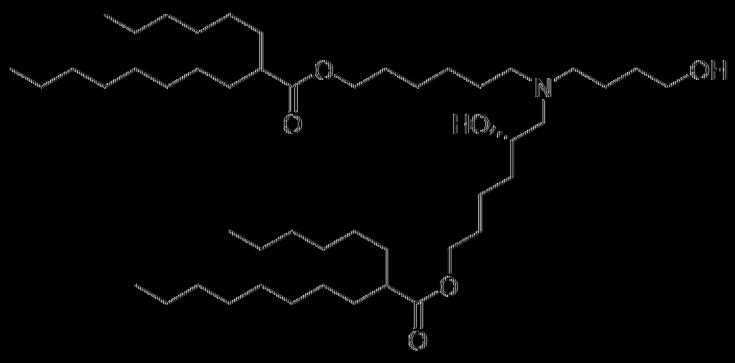
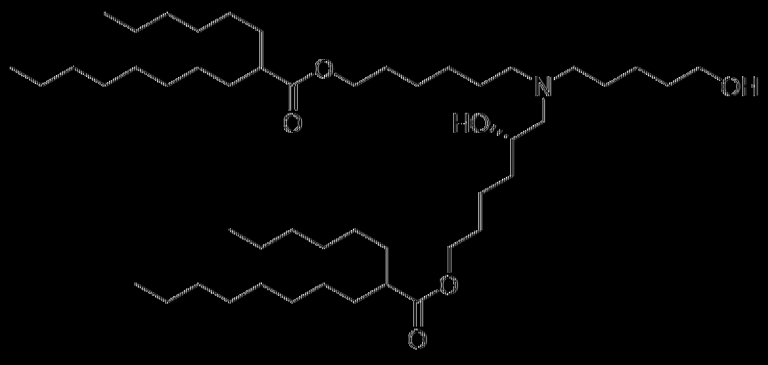


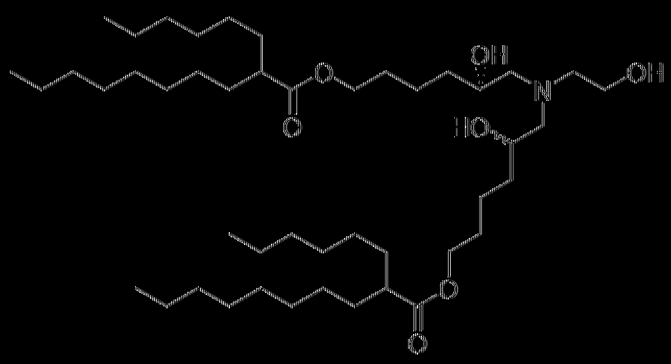
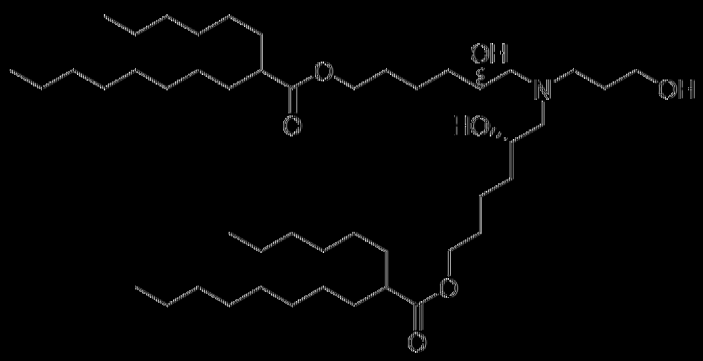
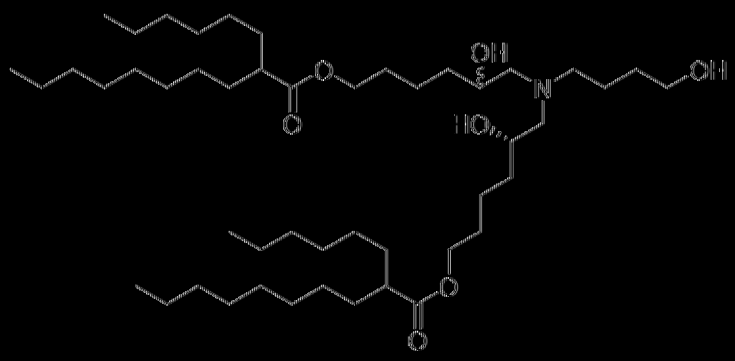
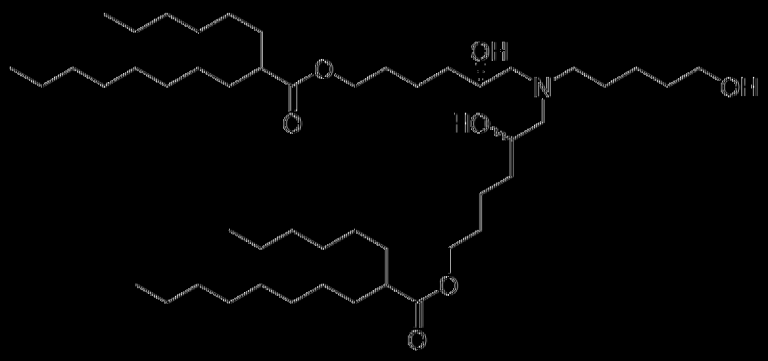
83	
84	
85	
86	

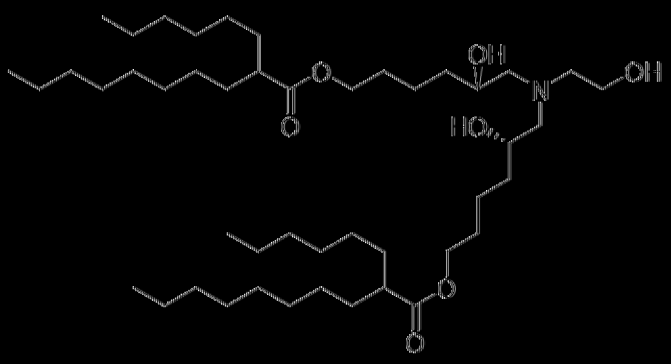
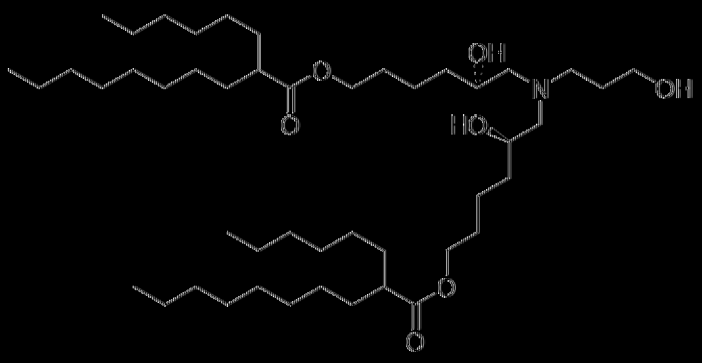
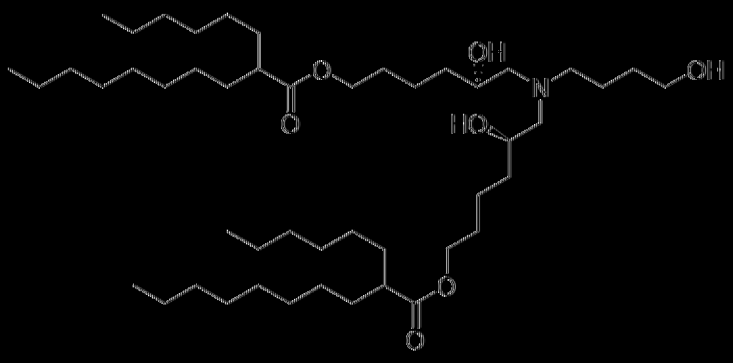
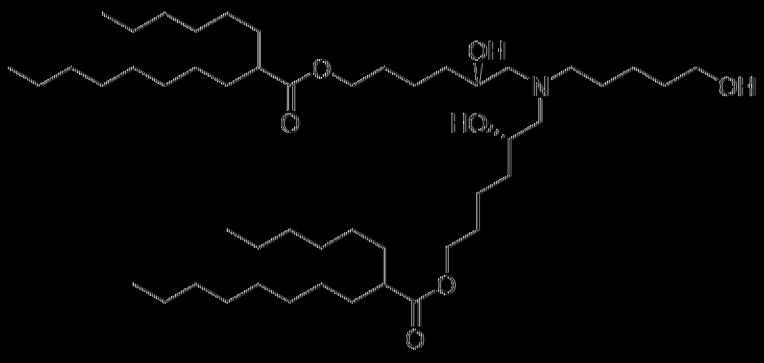
87	
88	
89	
90	

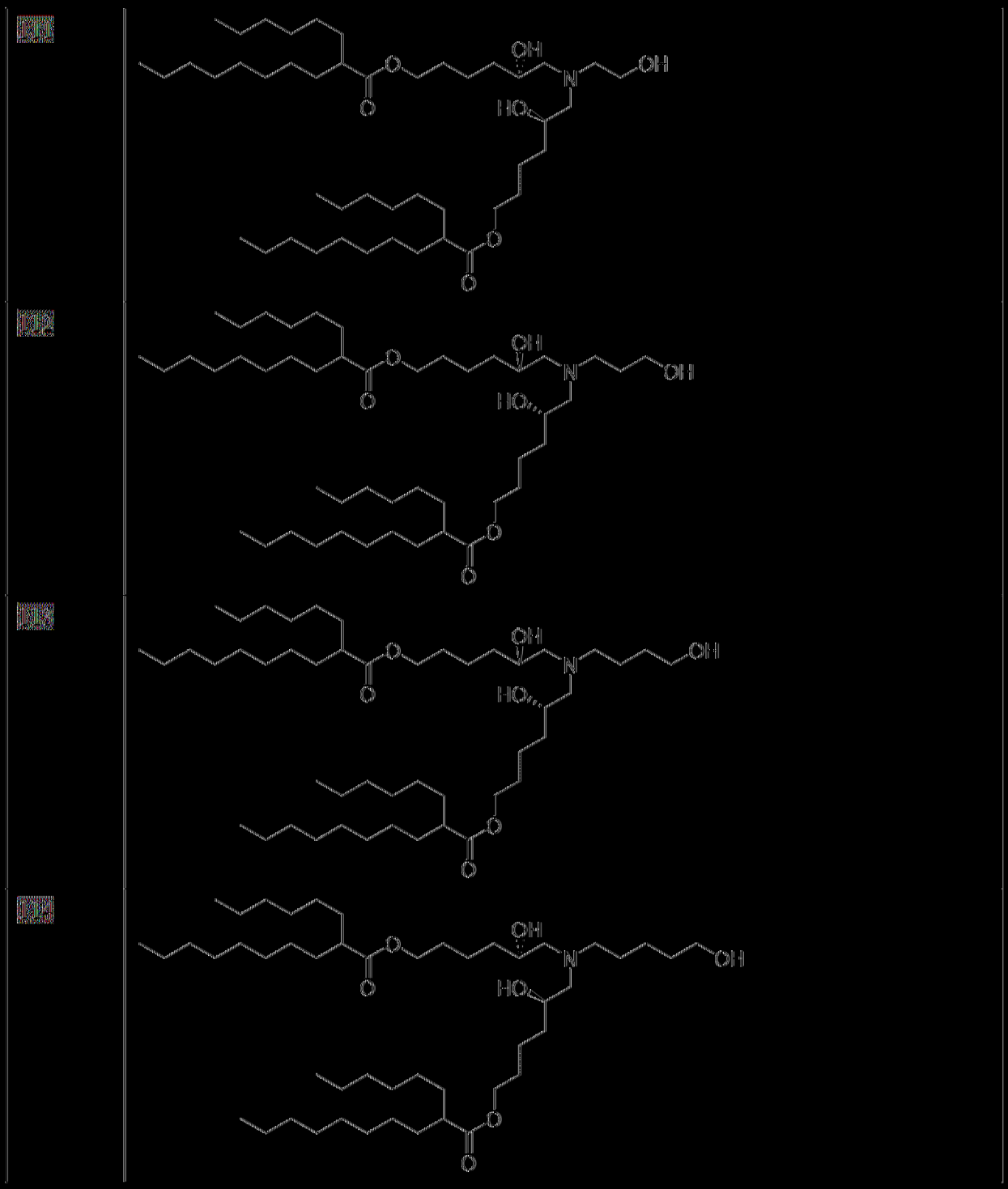
β1	
β2	
β3	
β4	

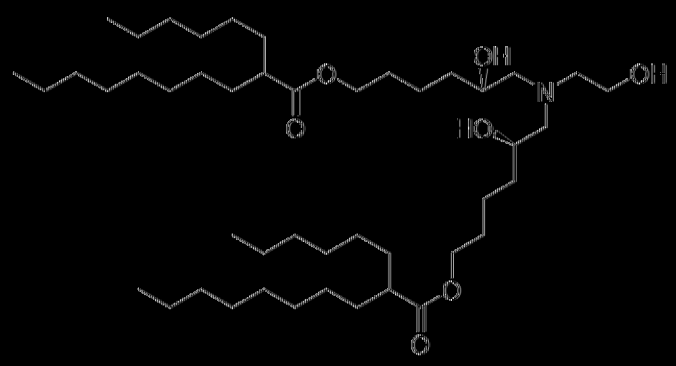
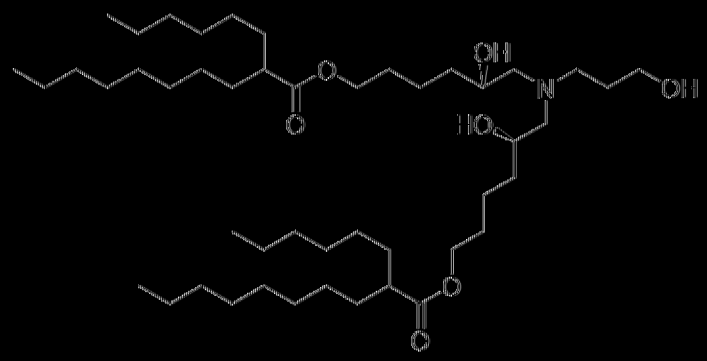
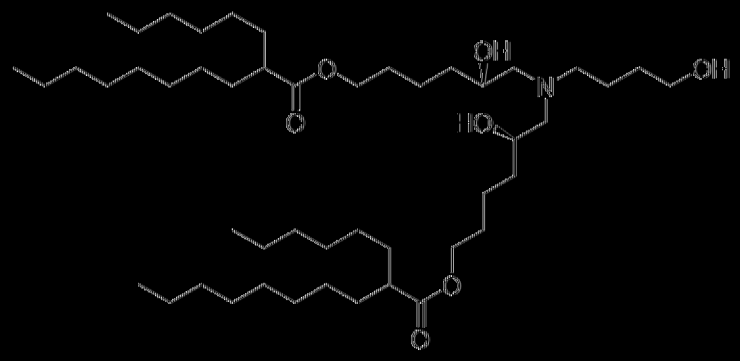
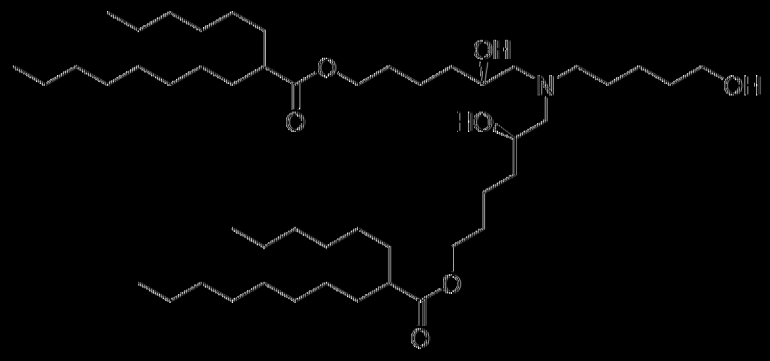
95	
96	
97	
98	

結構	
結構	
結構	
結構	

103	
104	
105	
106	

107	
108	
109	
110	



115	
116	
117	
118	

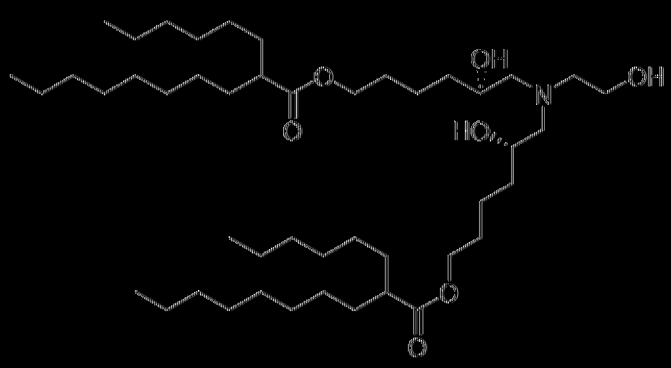
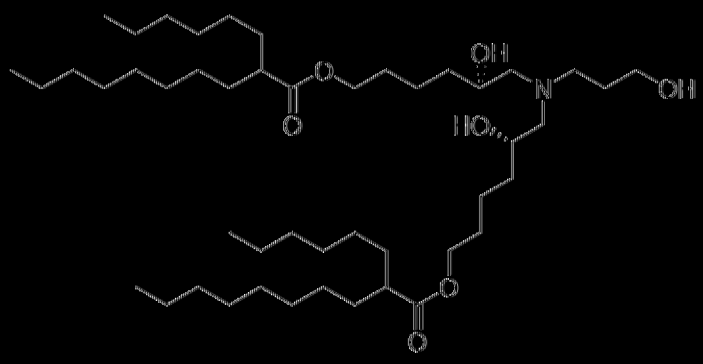
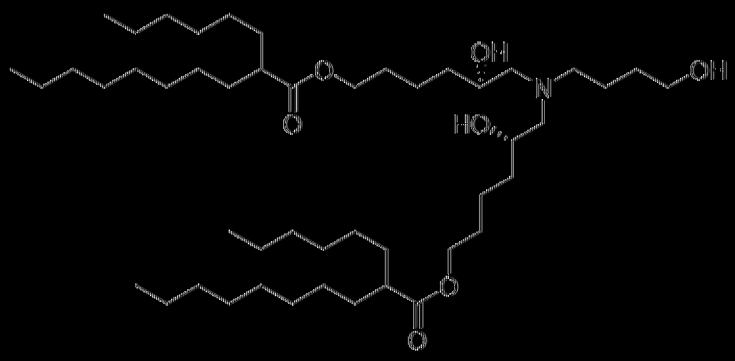
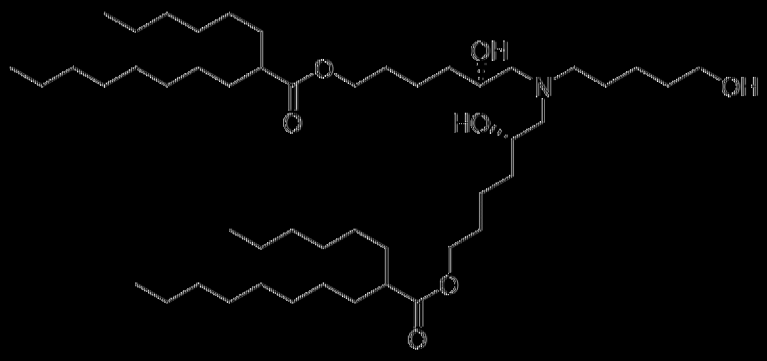
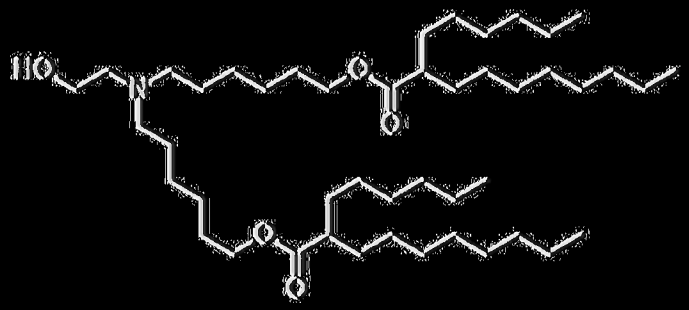
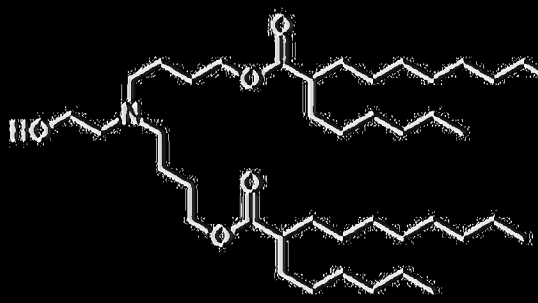
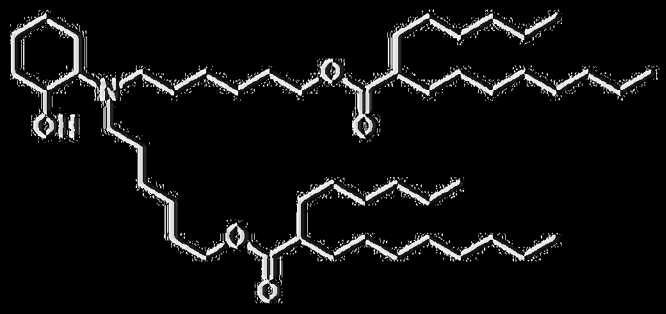
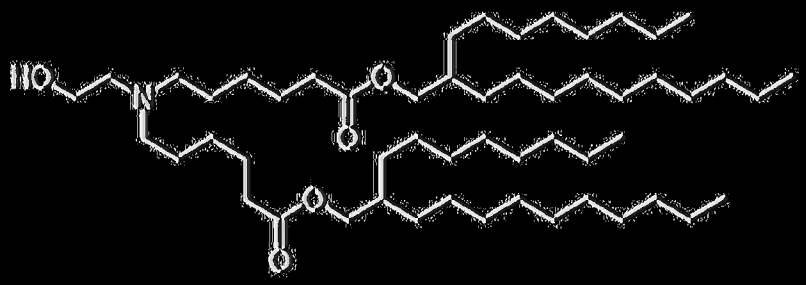
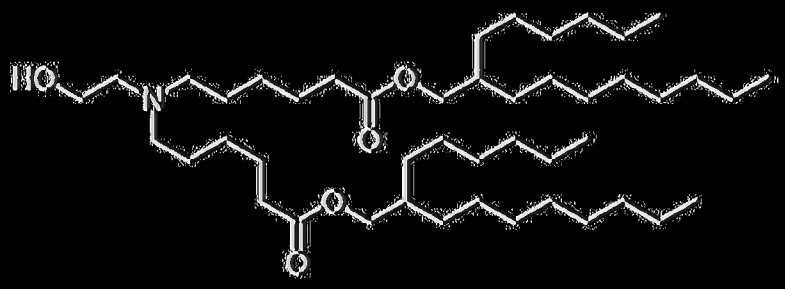
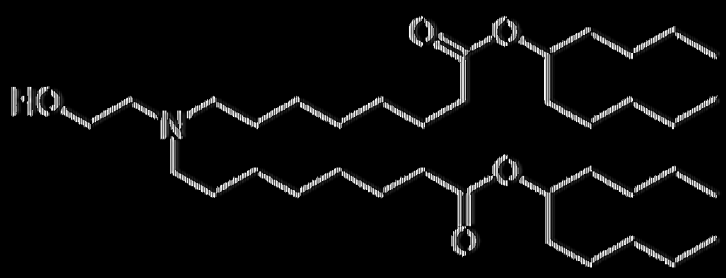
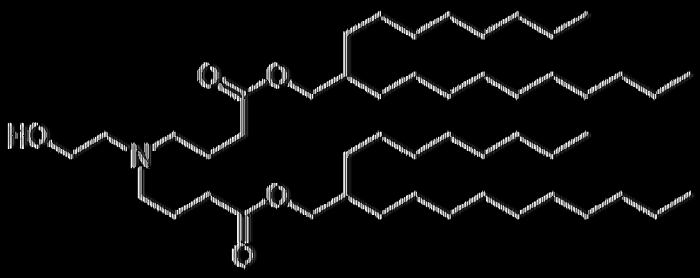
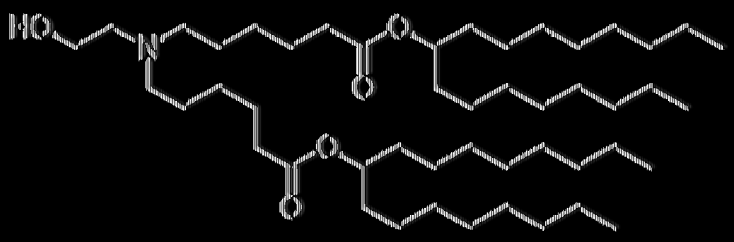
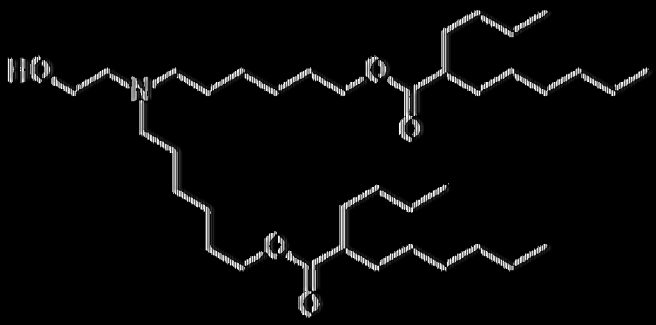
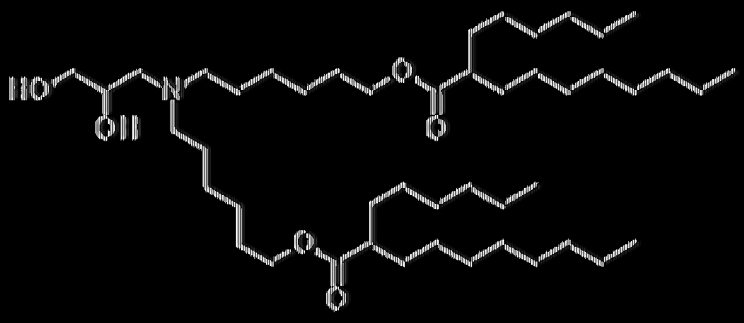
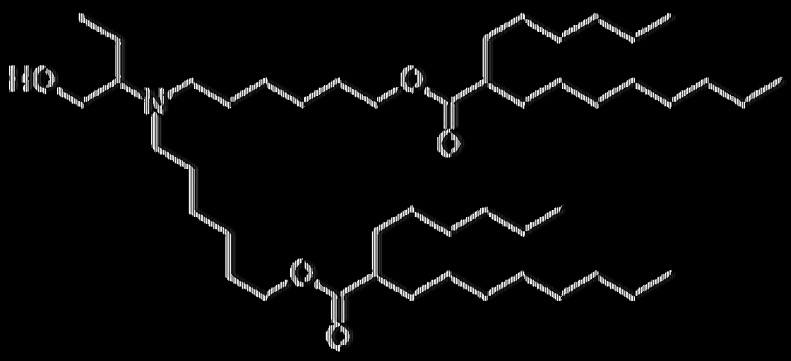
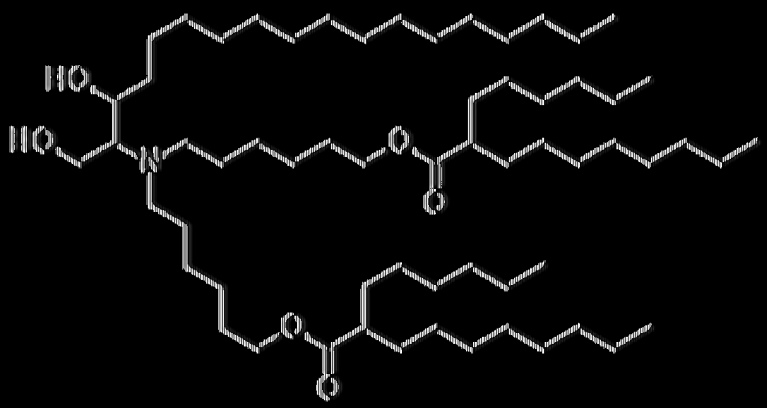
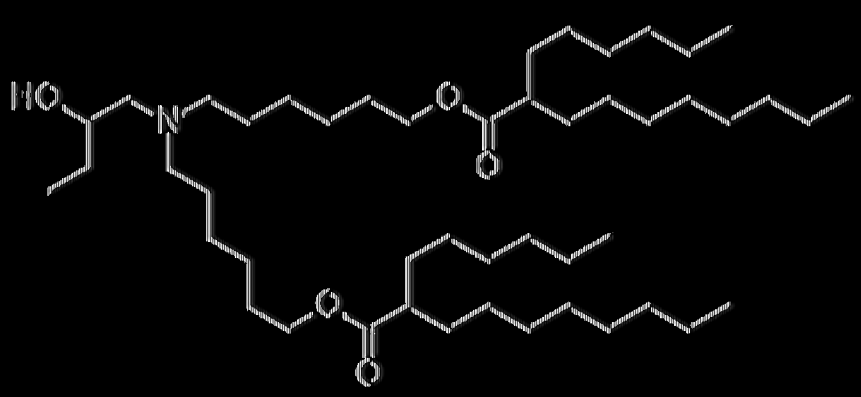
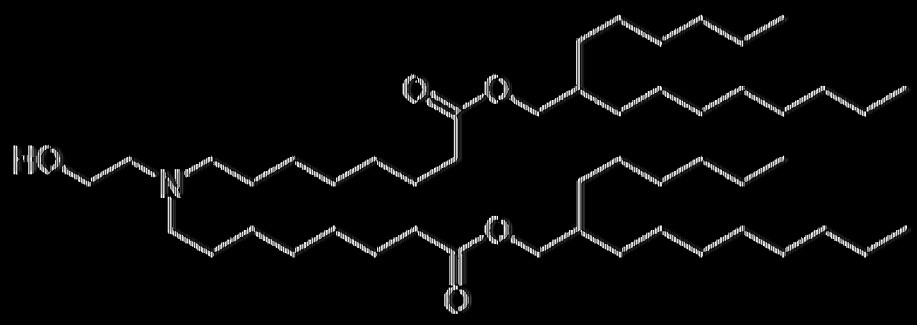
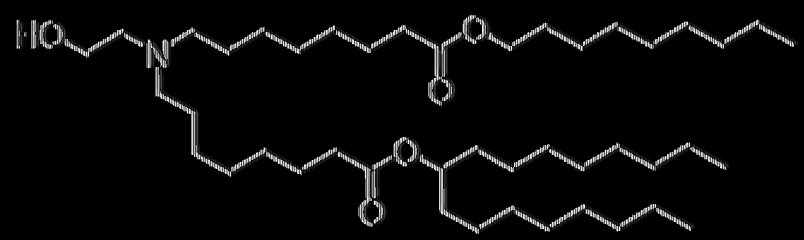
[0239]	
[0240]	
[0241]	
[0242]	

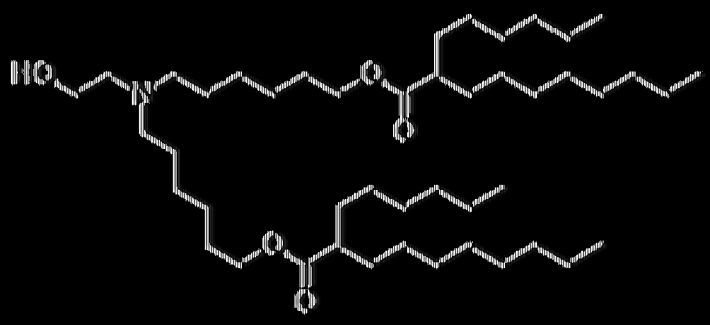
表10-1

化合物編號	結構式
1	
2	
3	
4	
5	

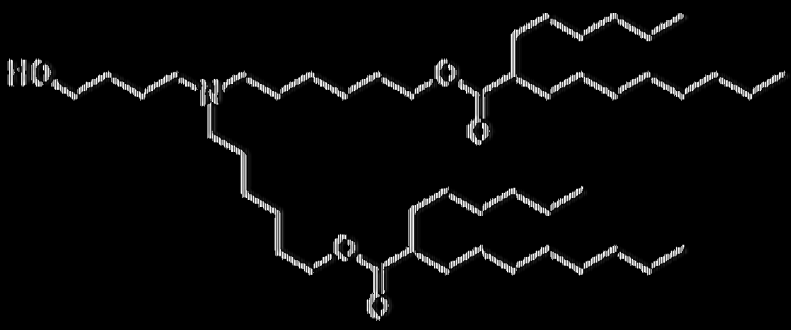
6	
7	
8	
9	
10	

11	
12	
13	
14	
15	

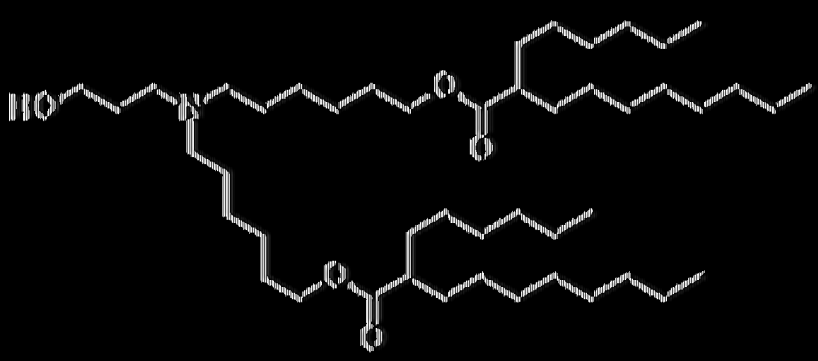
16



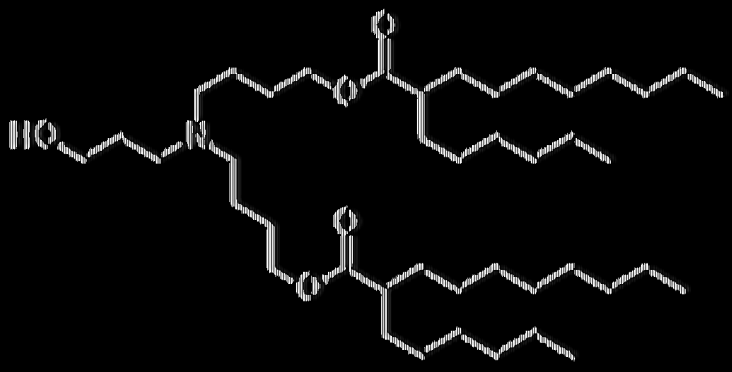
17



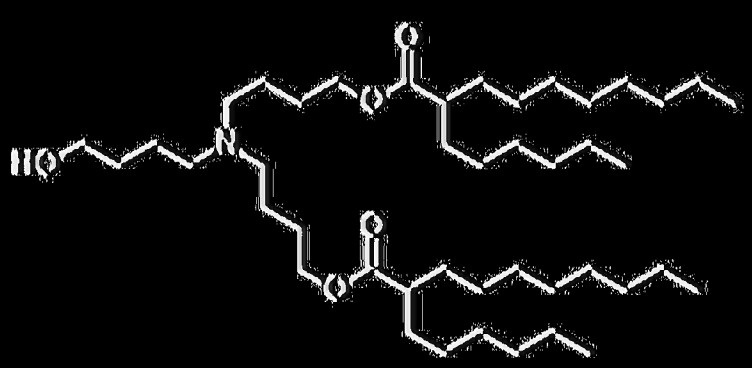
18



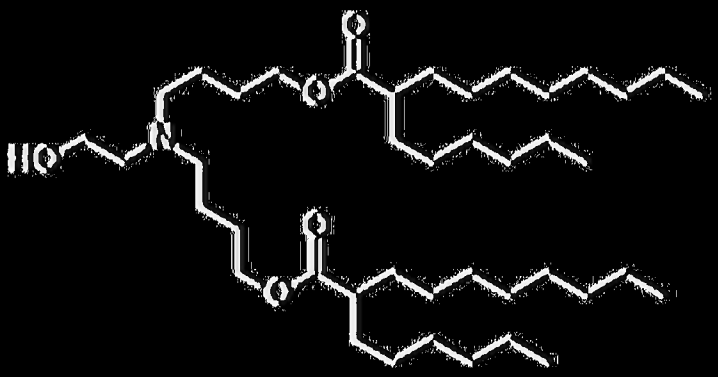
19



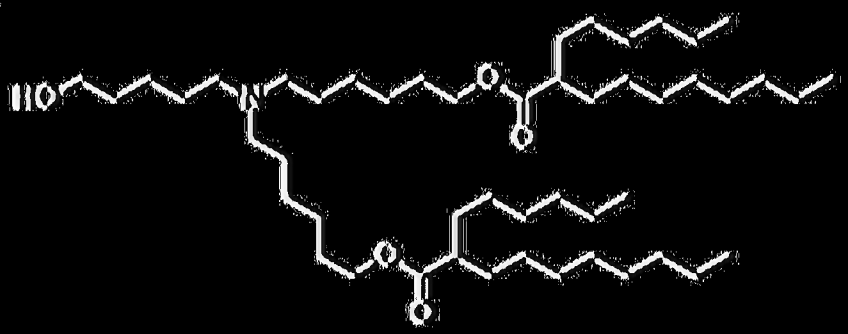
20



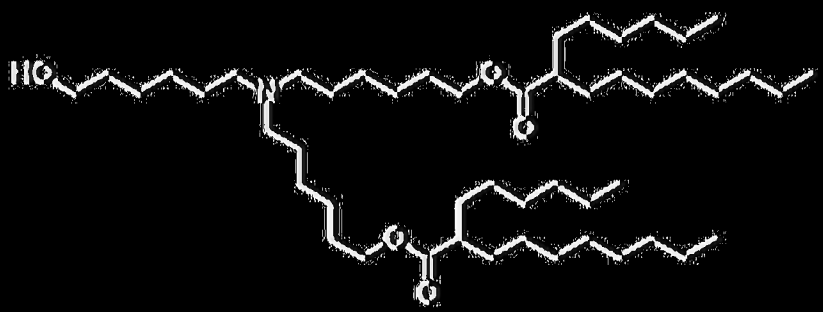
21



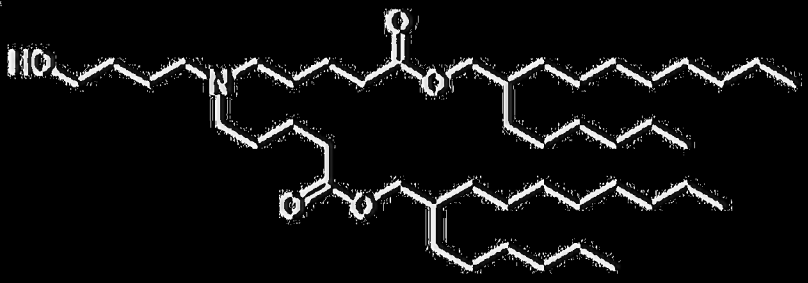
22



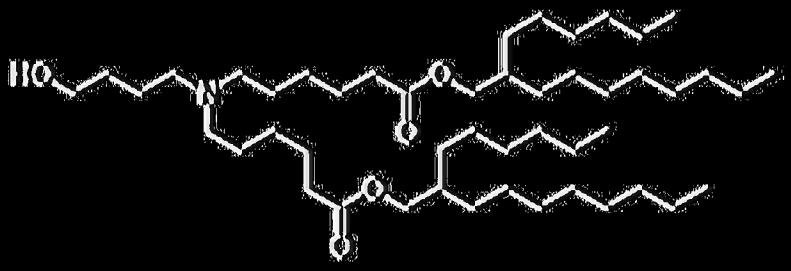
23



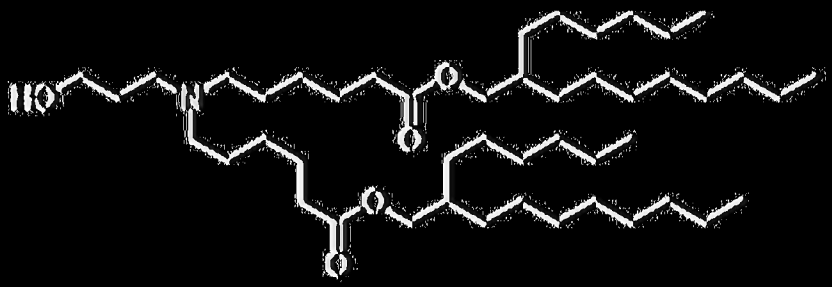
24



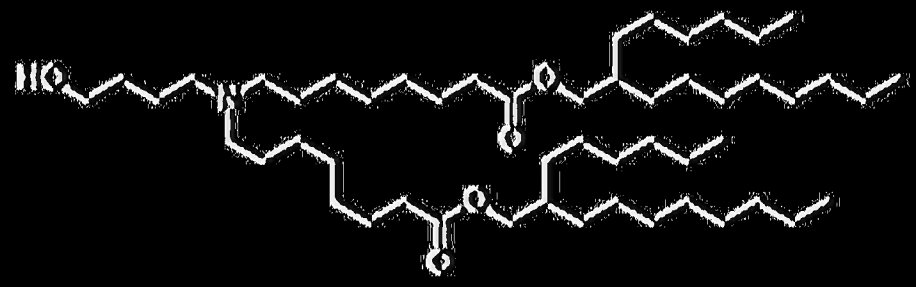
25



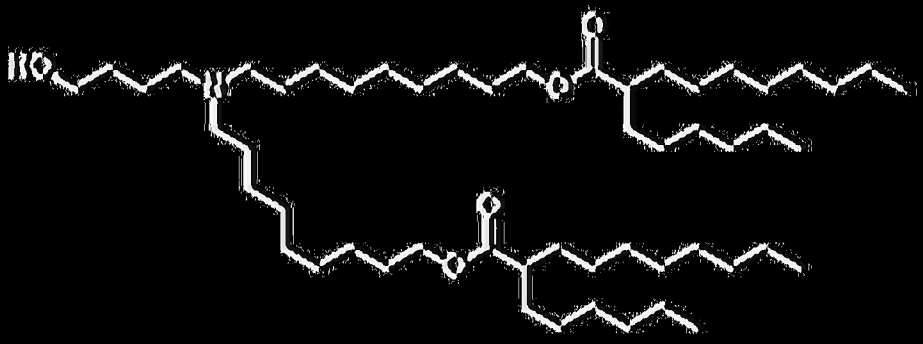
26



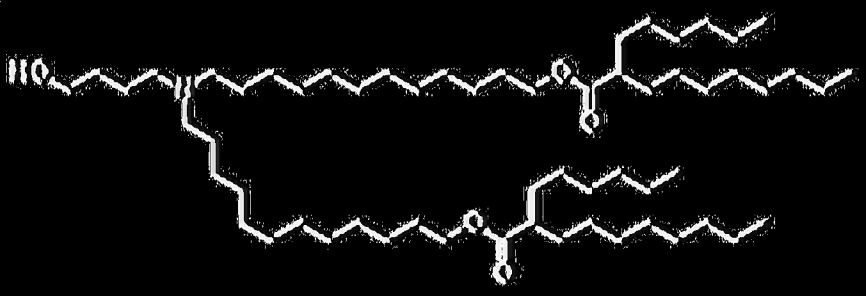
27



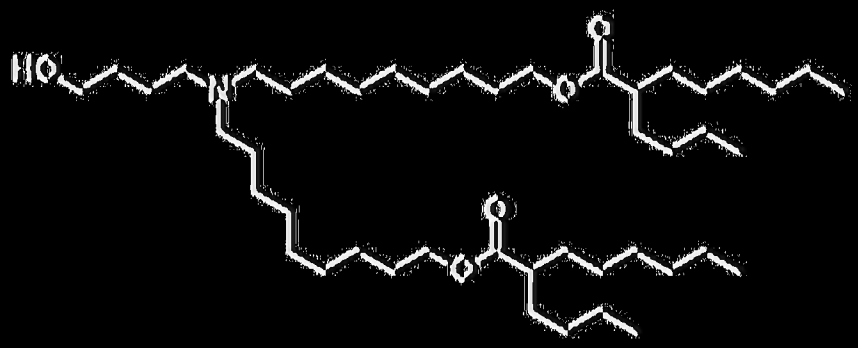
28



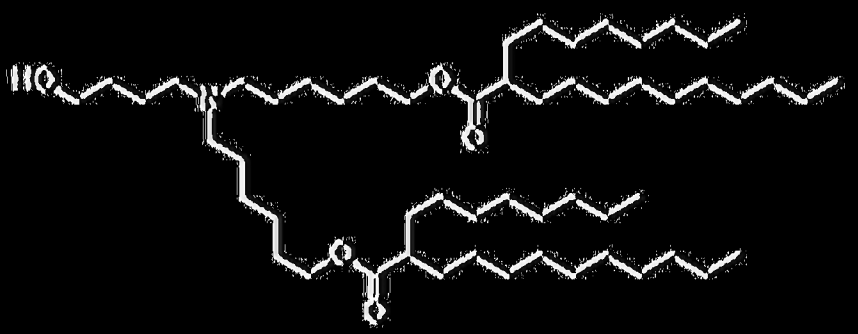
29



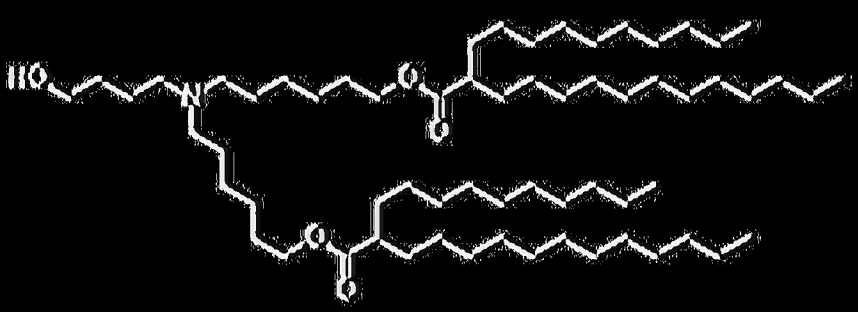
30



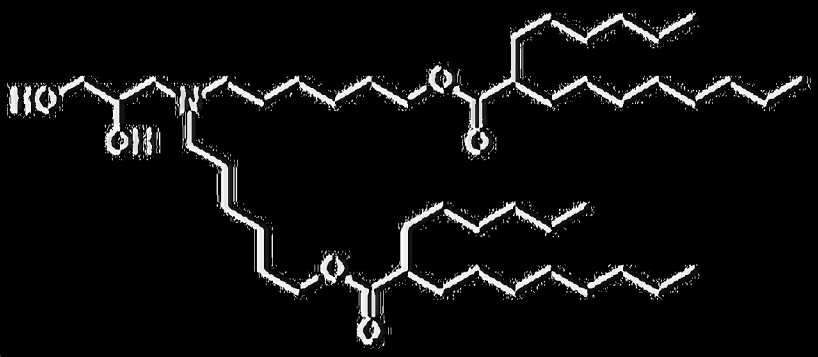
31



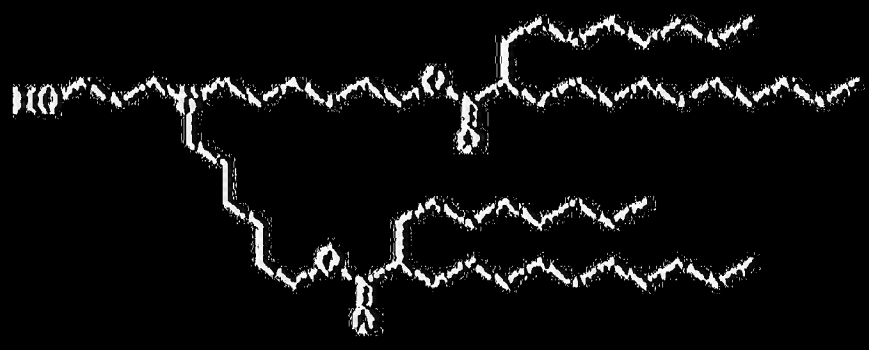
32

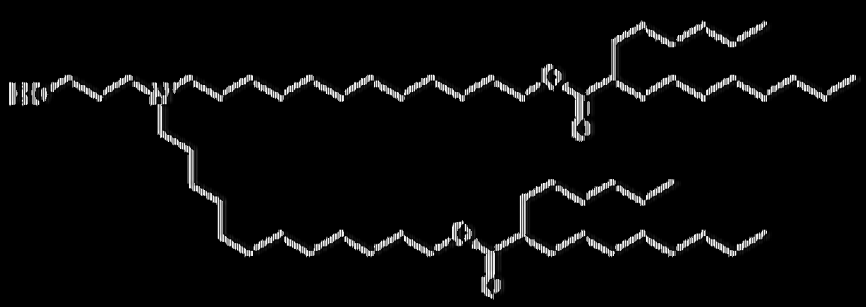
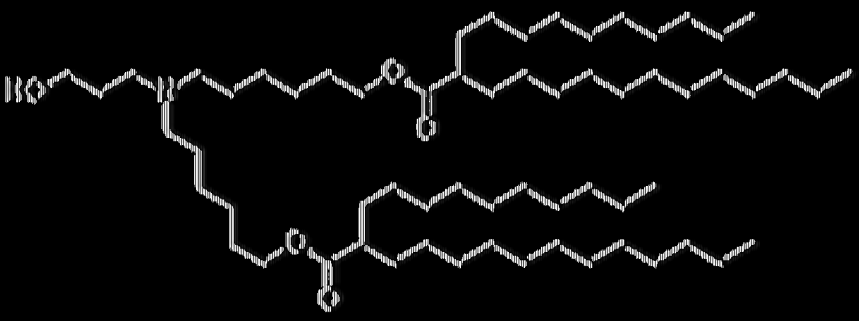
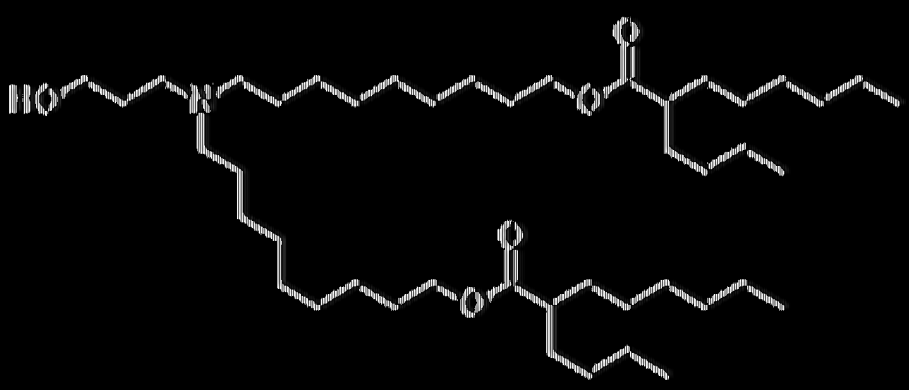
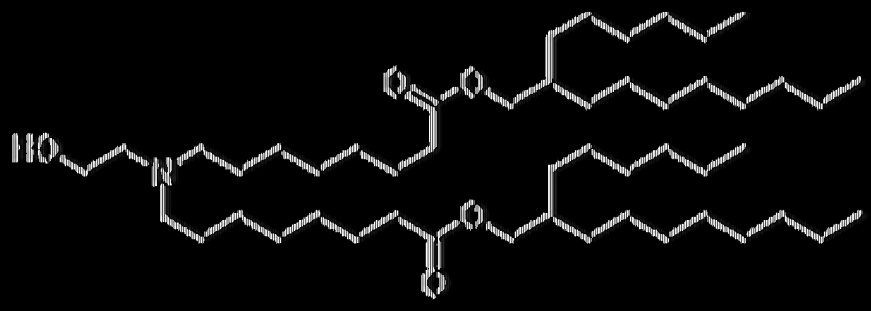


33



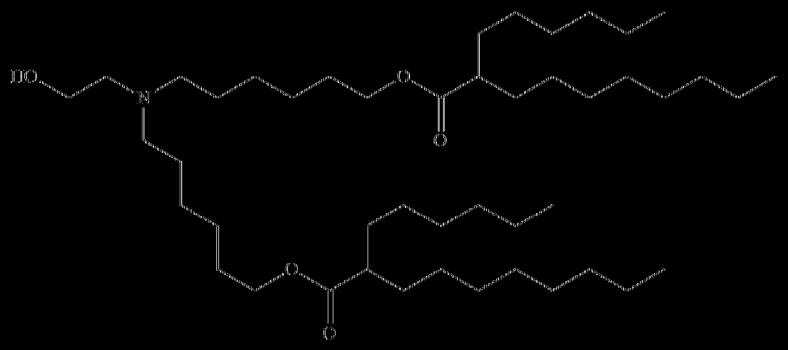
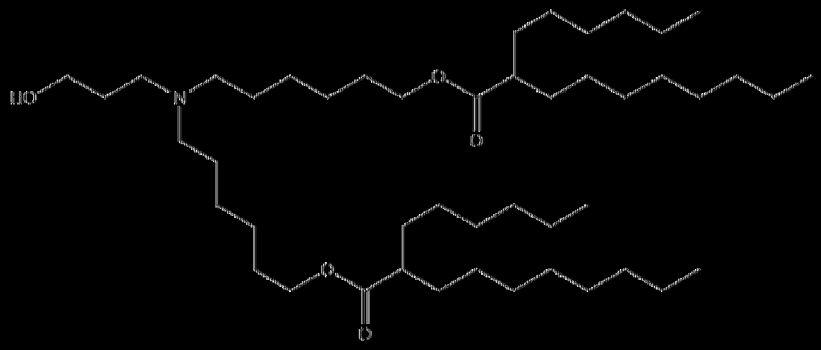
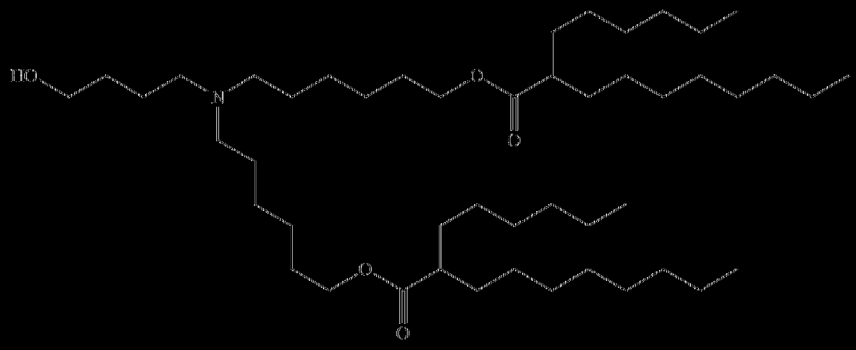
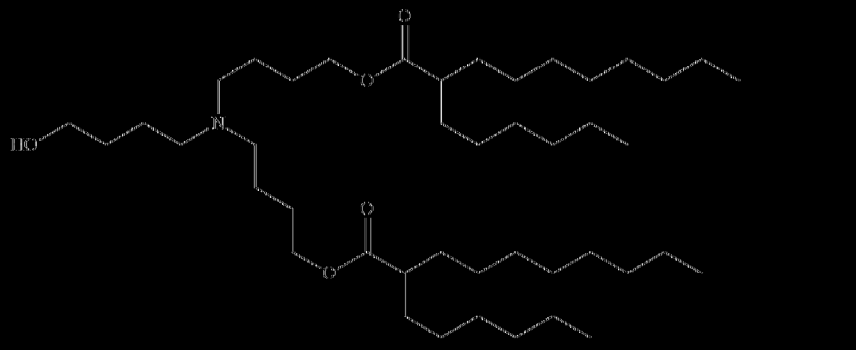
34



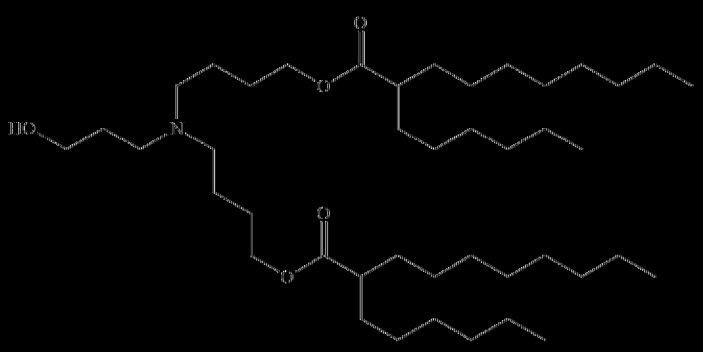
35	
36	
37	
38	

[0437] 在一些實施例中，可離子化脂質具有下表10中所闡述之結構中之一者。

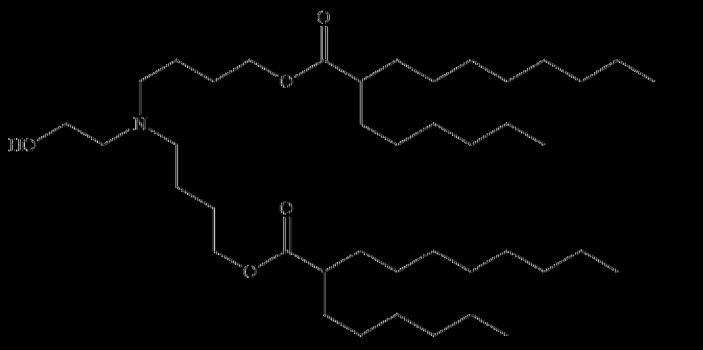
表10g

編號	結構
1	
2	
3	
4	

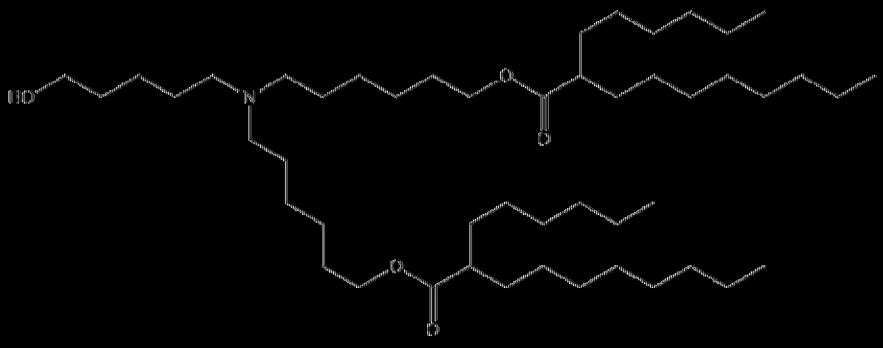
5



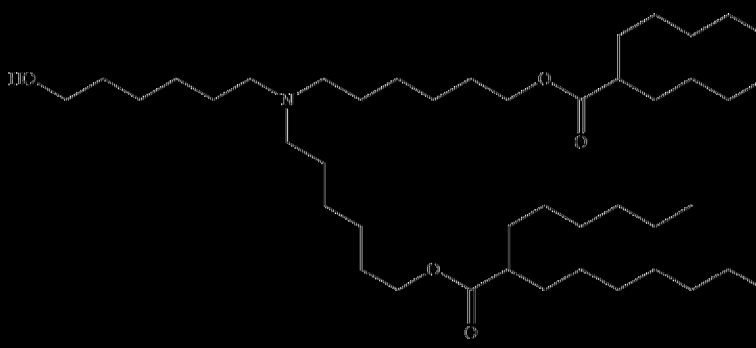
6



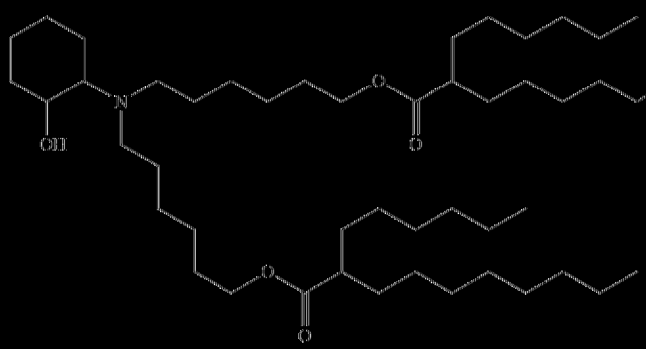
7



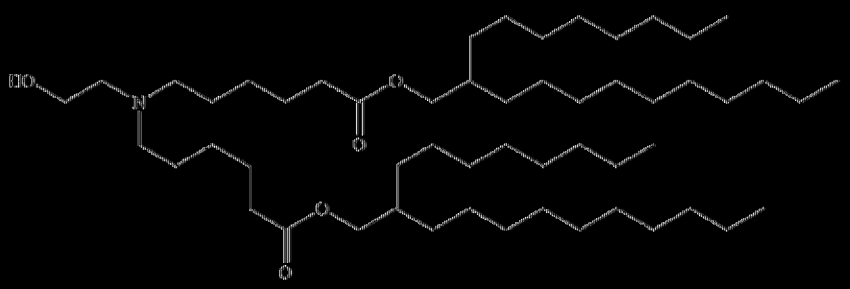
8



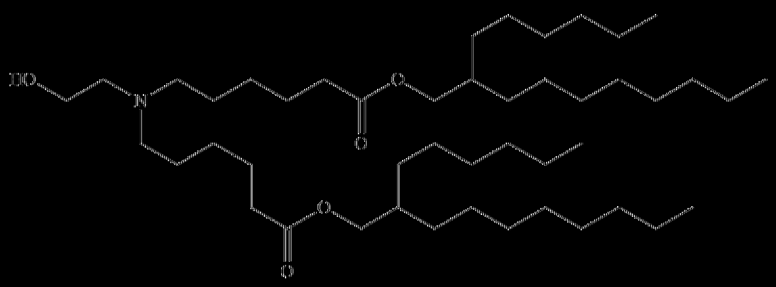
9



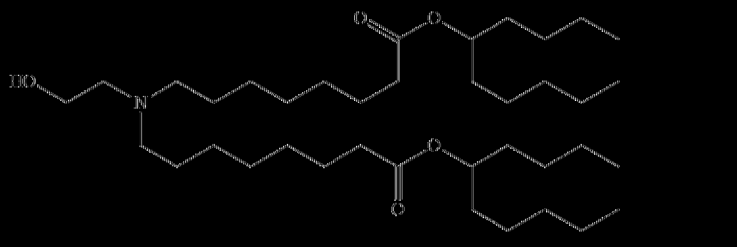
10



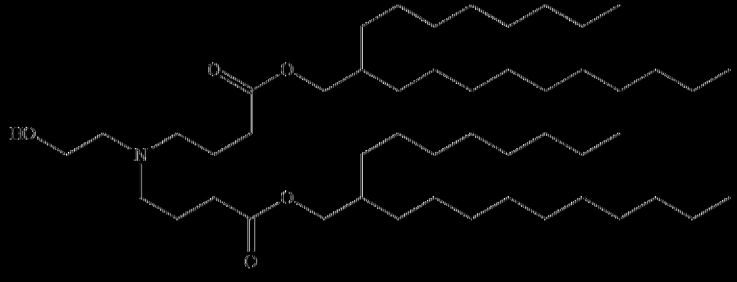
11



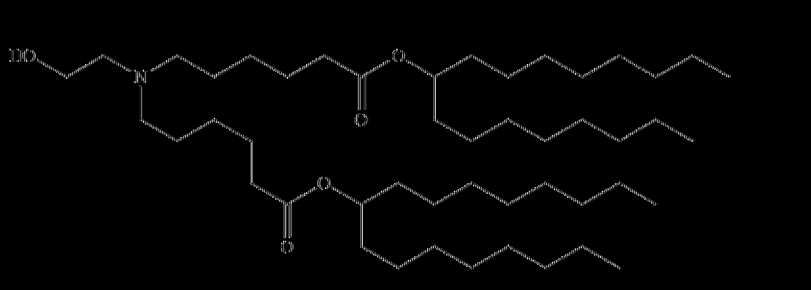
12



13

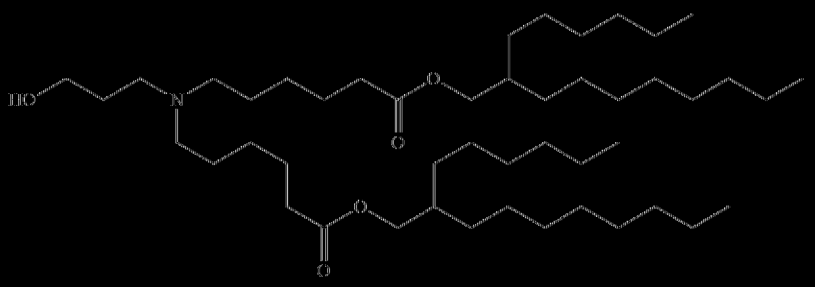


14

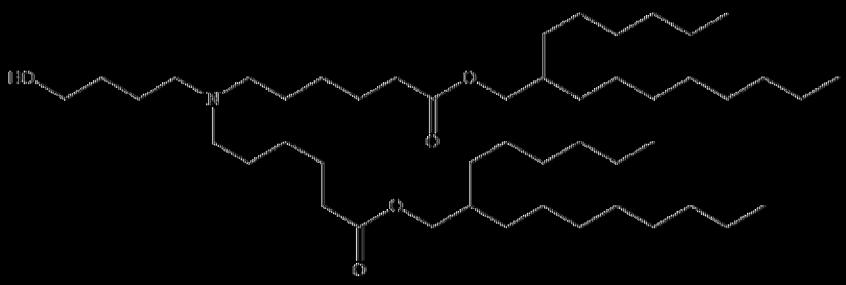


15

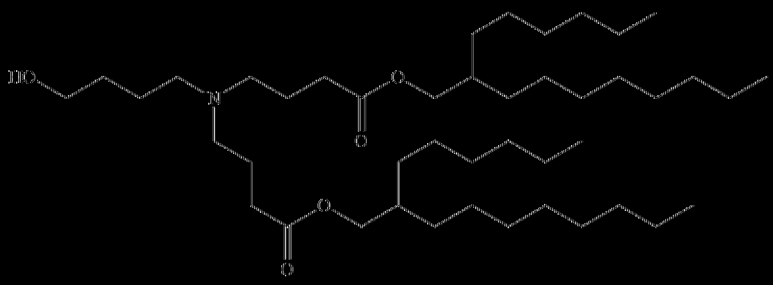
16



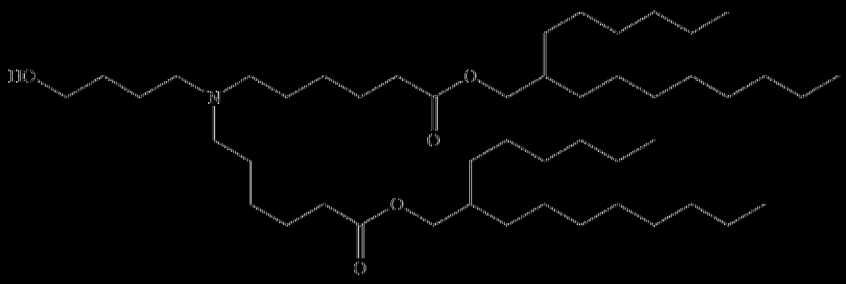
17



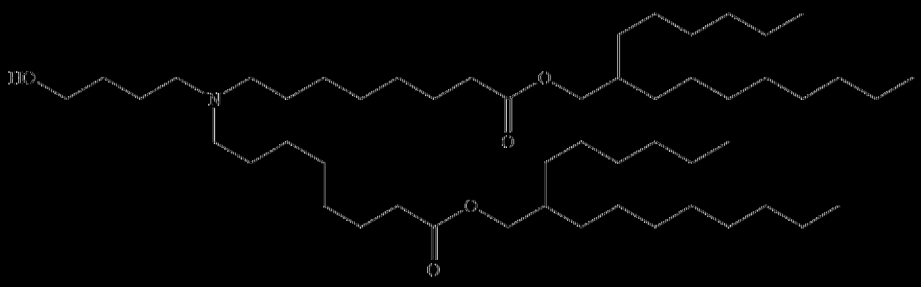
18



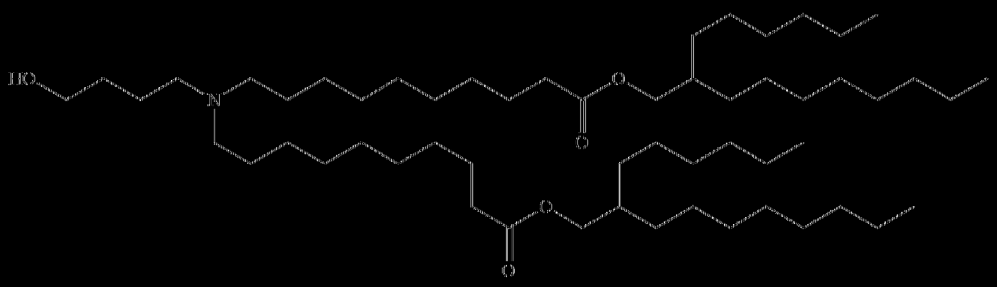
19



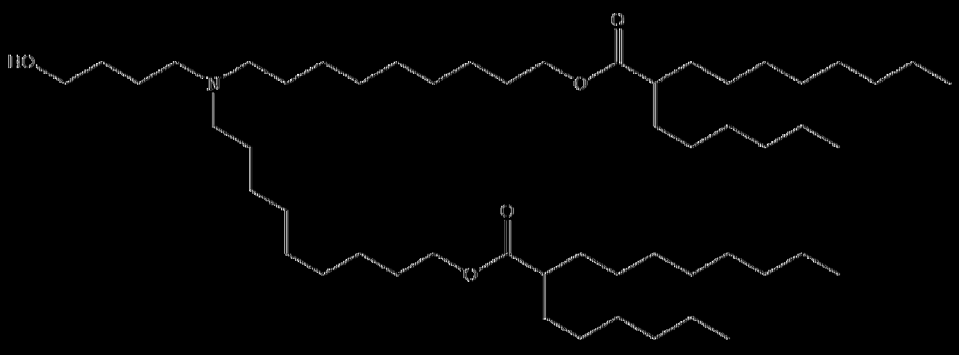
20



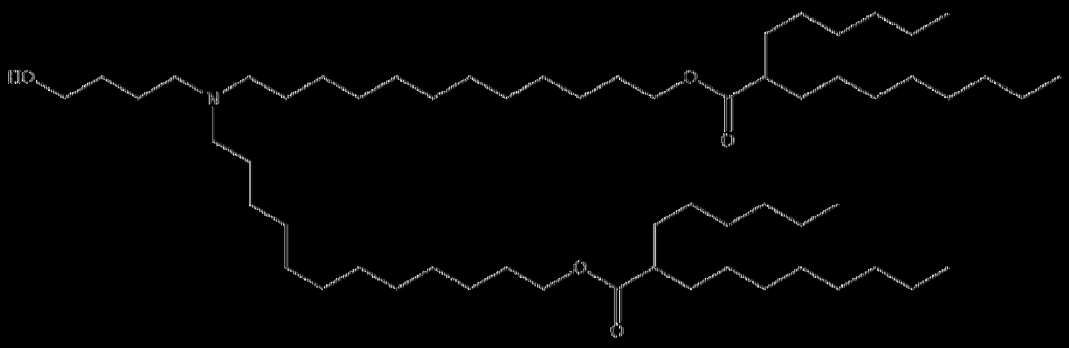
21



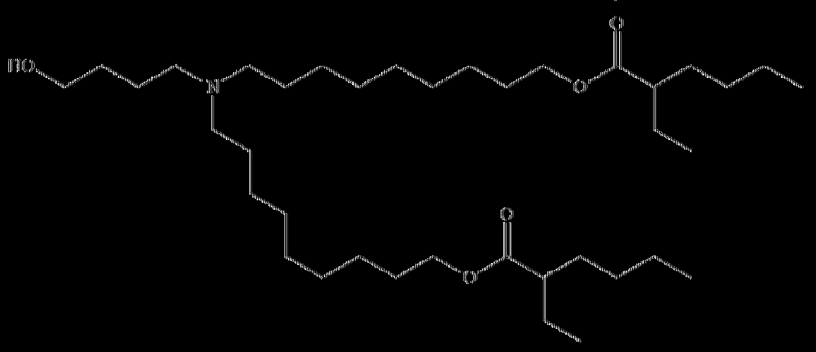
22



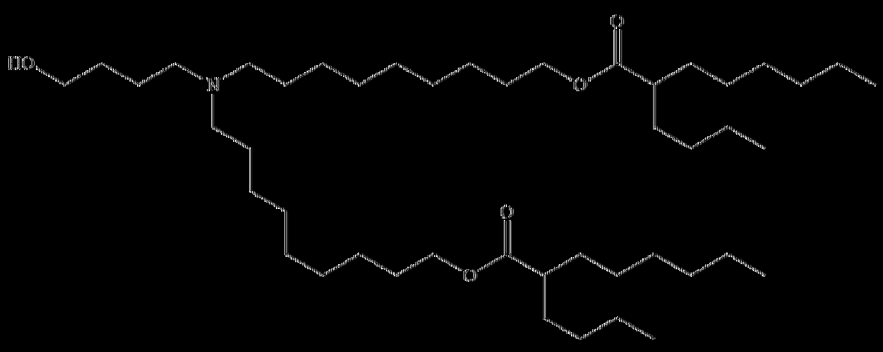
23



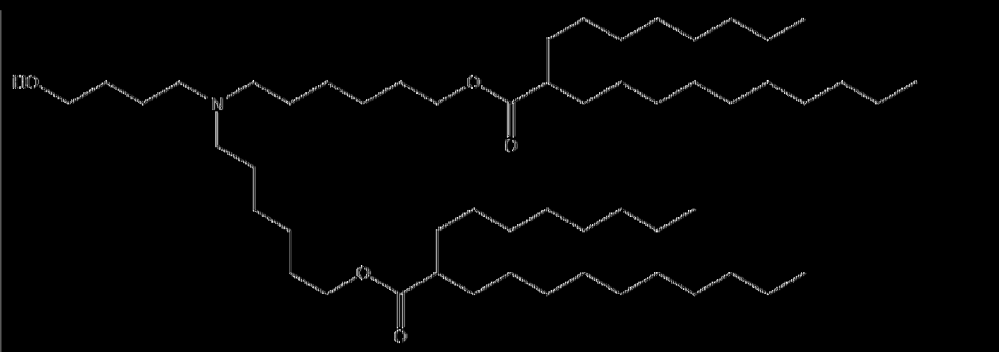
24



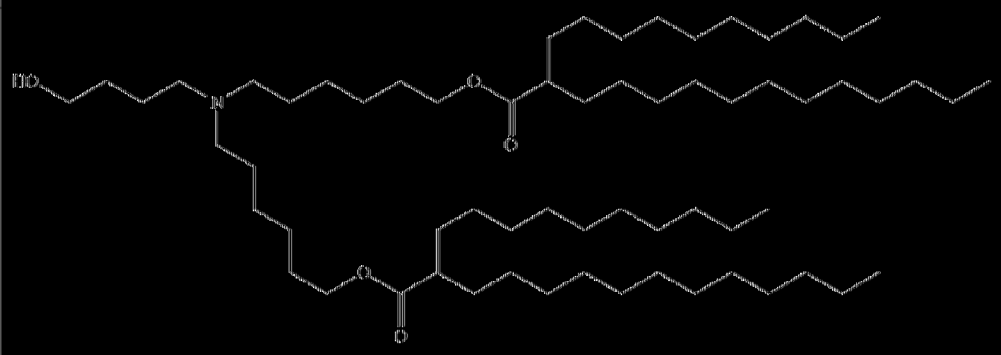
25



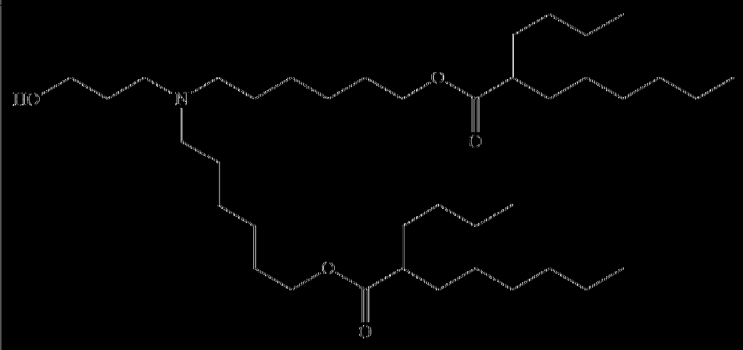
26



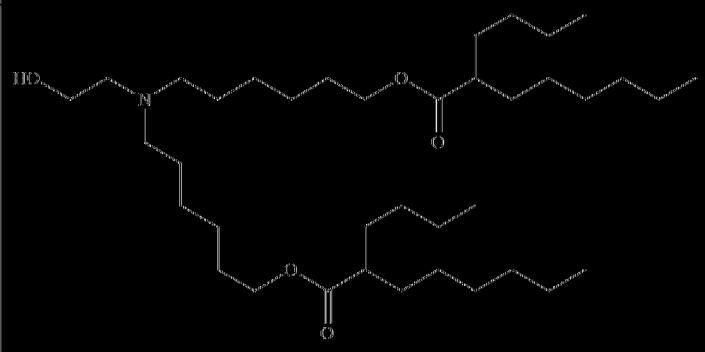
27



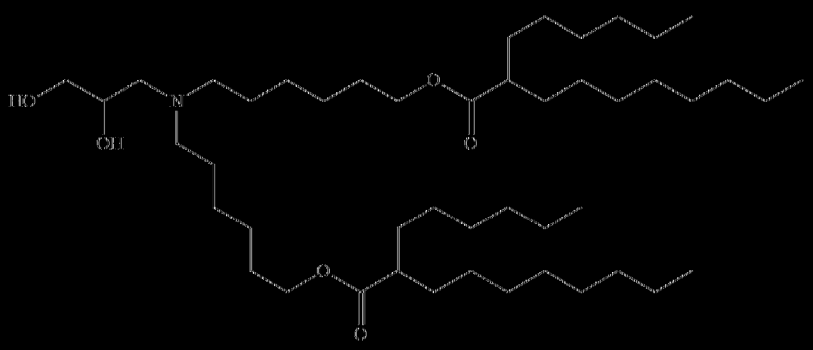
28



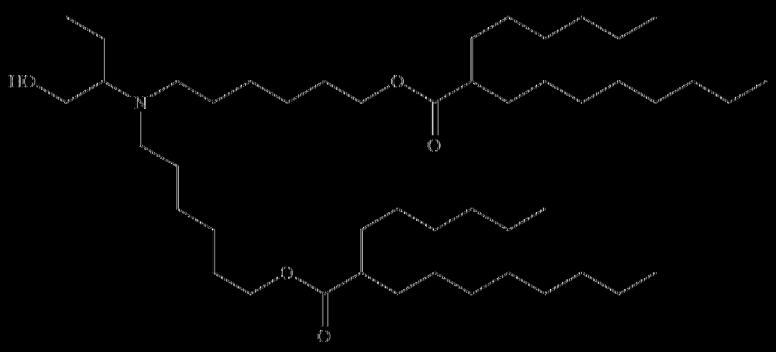
29



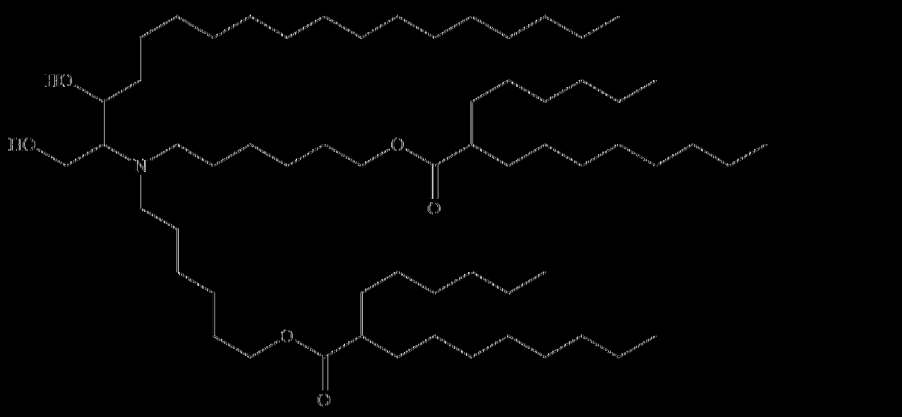
30



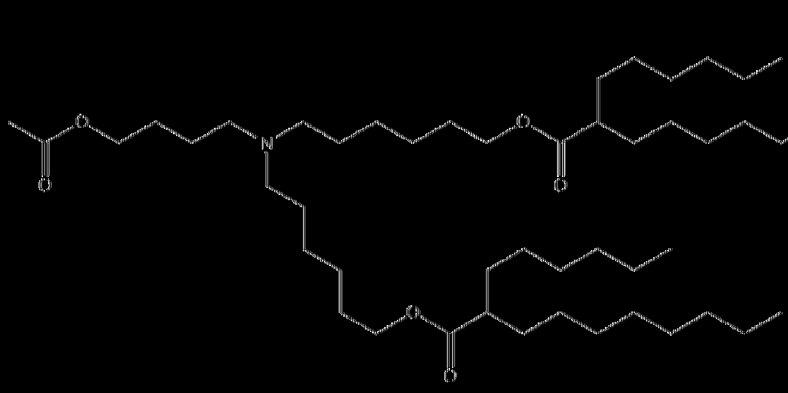
31



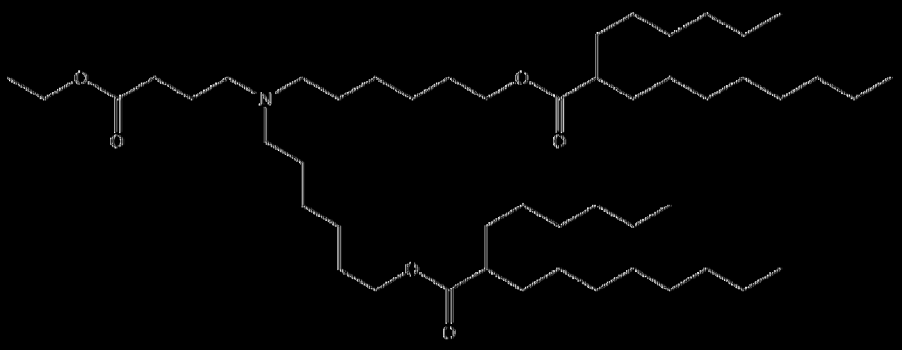
32



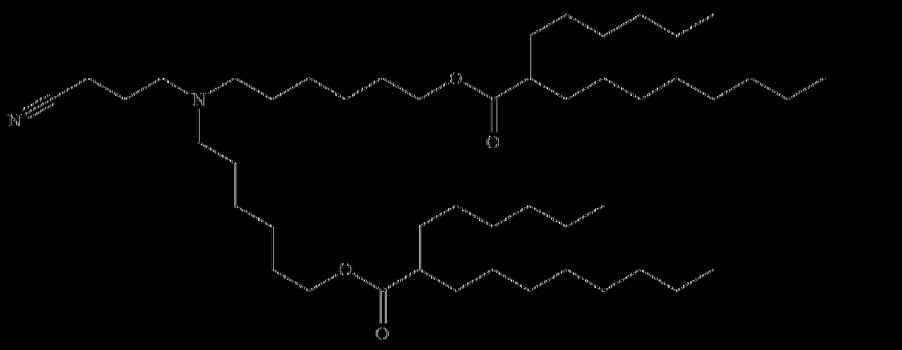
33



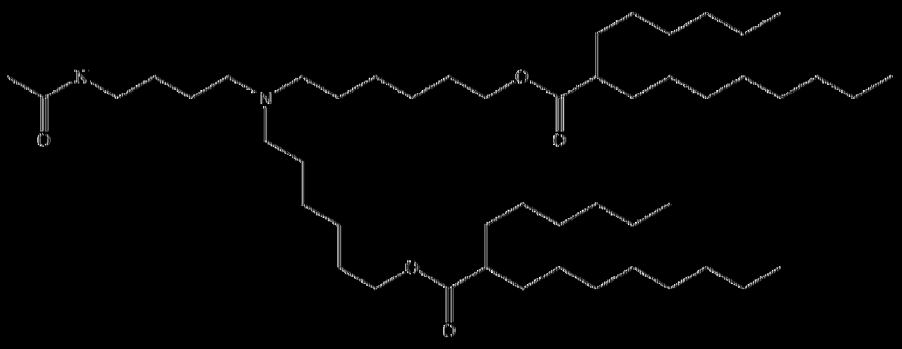
34



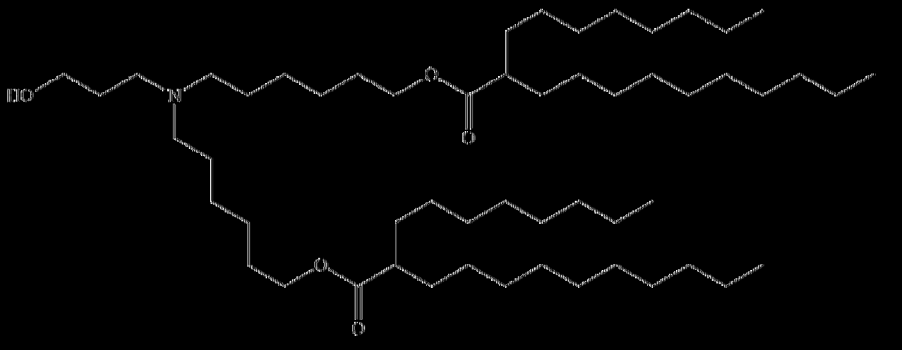
35



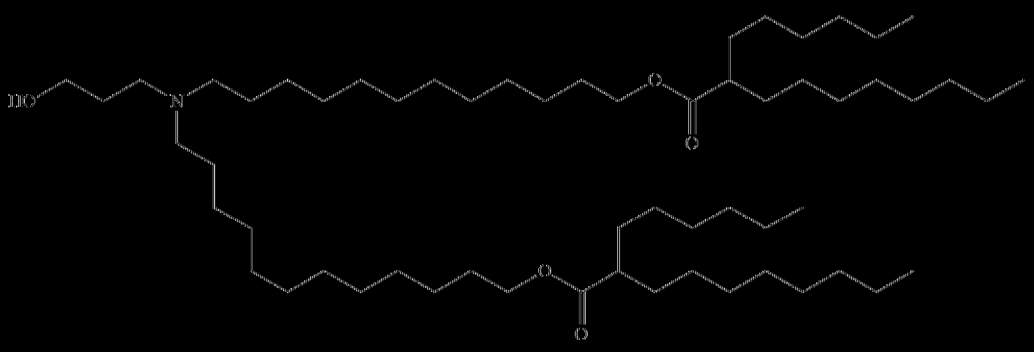
36



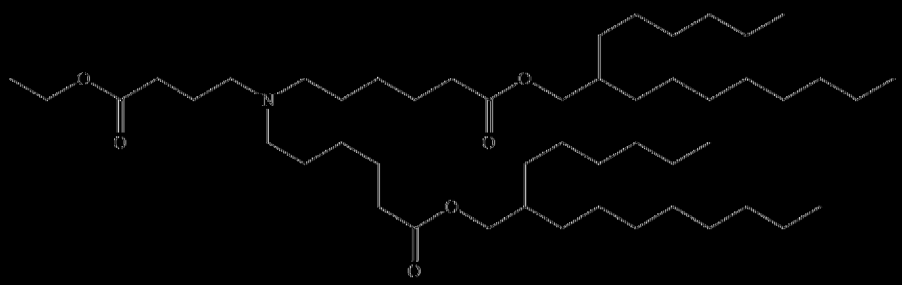
37



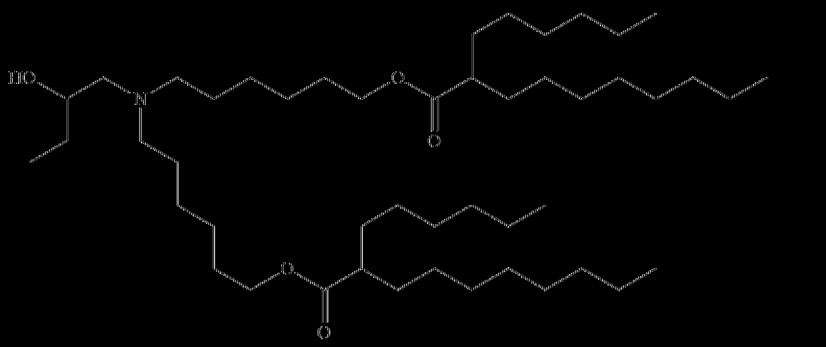
38



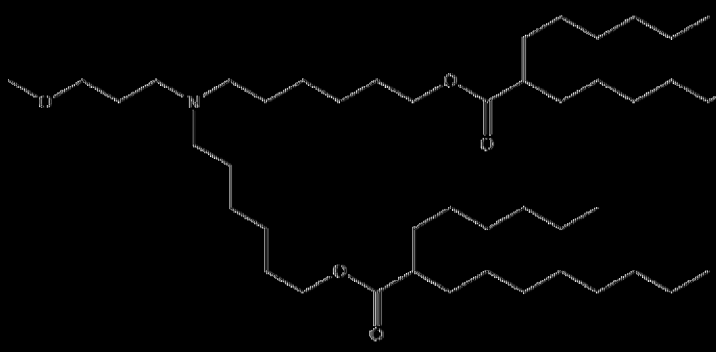
39



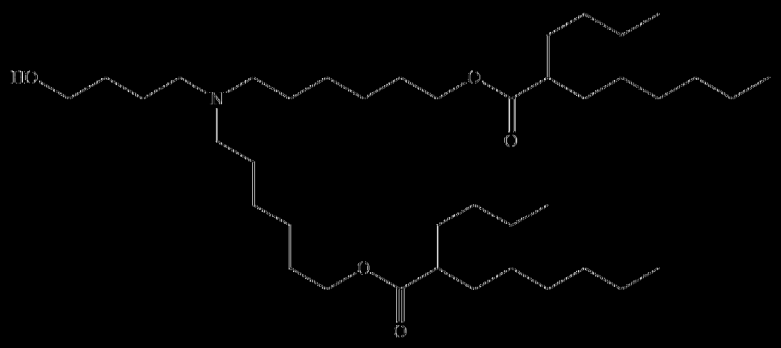
40



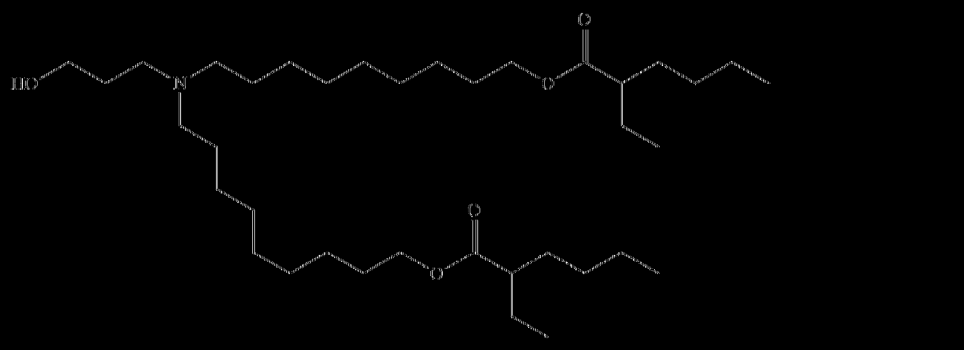
41



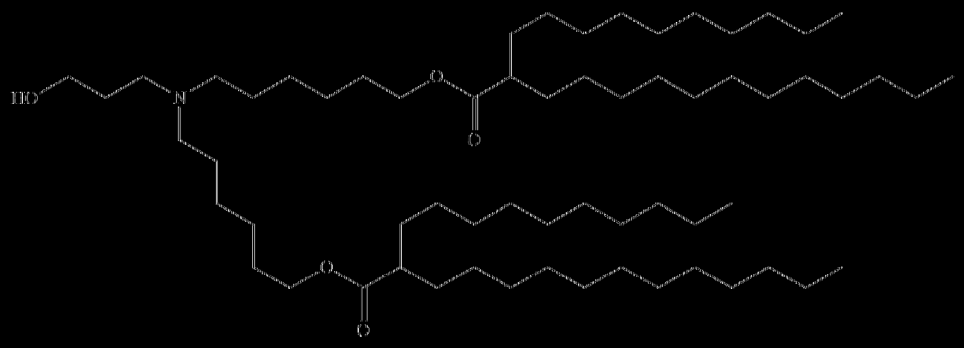
42



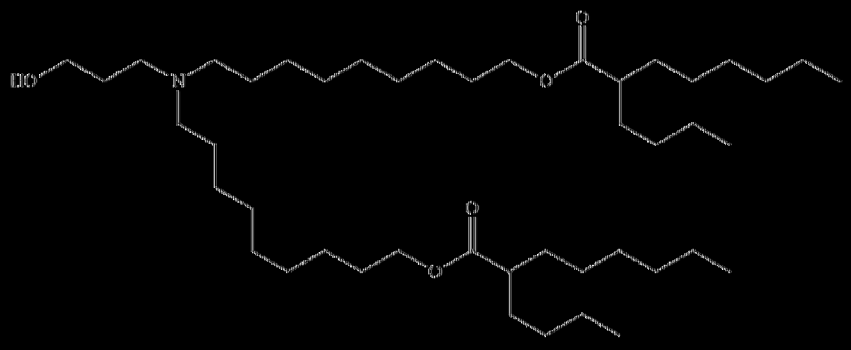
43



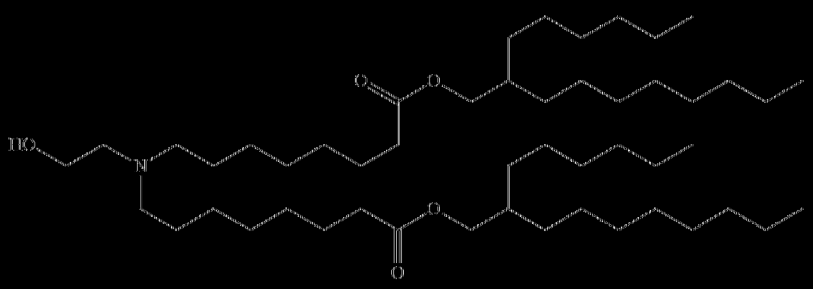
44



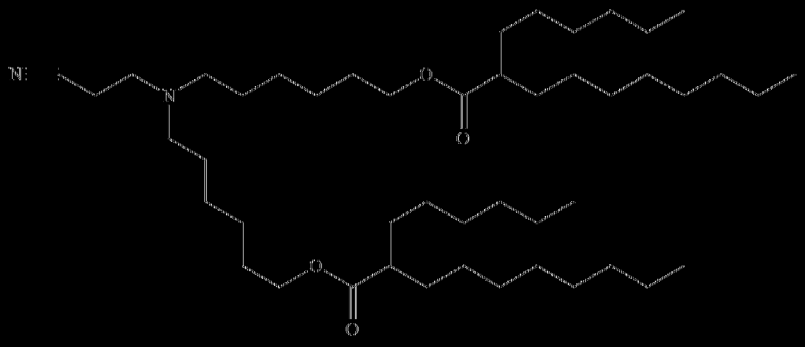
45



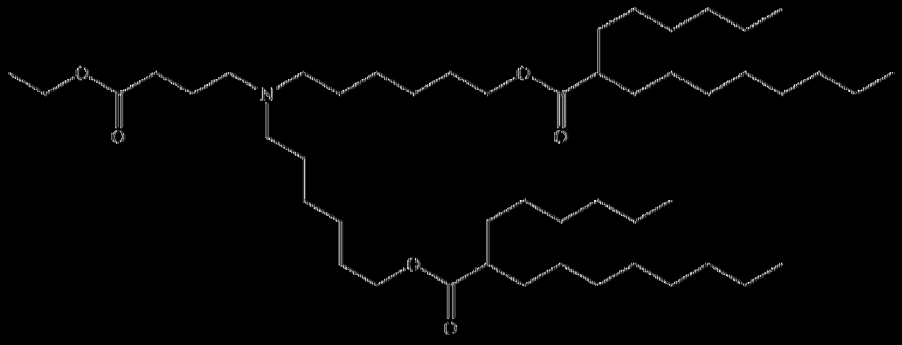
46



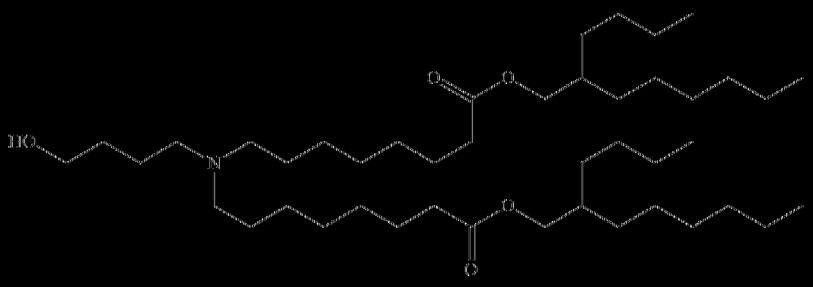
47



48

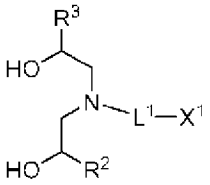


49



[0438] 在一些實施例中，可離子化脂質如國際專利申請案PCT/US2020/038678中所描述。

[0439] 在一些實施例中，可離子化脂質由式(14*)表示：



式(14*)

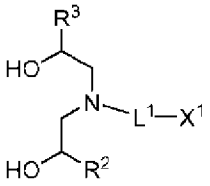
或其醫藥學上可接受之鹽，其中

L^1為C_2-C_{11}伸烷基、C_4-C_{10}伸烯基或C_4-C_{10}伸炔基；

X^1為OR^1、SR^1或$N(R^1)_2$，其中R^1獨立地為H或未經取代之C_1-C_6烷基；及

R_2及R_3各自獨立地為視情況經一或多個選自以下之取代基取代之直鏈或分支鏈C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基或C_1-C_{30}雜烷基：側氧基、鹵基、羥基、氰基、烷基、烯基、醛、雜環基烷基、羥烷基、二羥烷基、羥基烷基胺基烷基、胺基烷基、烷胺基烷基、二烷胺基烷基、(雜環基)(烷基)胺基烷基、雜環基、雜芳基、烷基雜芳基、炔基、烷氧基、胺基、二烷胺基、胺基烷基羰基胺基、胺基羰基烷胺基、(胺基羰基烷基)(烷基)胺基、烯基羰基胺基、羥基羰基、烷基氧基羰基、烷基羰氧基、烷基碳酸酯、烯氧基羰基、烯基羰氧基、烯基碳酸酯、炔氧基羰基、炔基羰氧基、炔基碳酸酯、胺基羰基、胺基烷基胺基羰基、烷基胺基烷基胺基羰基、二烷基胺基烷基胺基羰基、雜環基烷基胺基羰基、(烷胺基烷基)(烷基)胺基羰基、烷基胺基烷基羰基、二烷基胺基烷基羰基、雜環基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亞碸、烷基亞碸烷基、烷基磺醯基及烷基碸烷基。

【0440】 在一些實施例中，可離子化脂質由式(14)表示：



式(14)

或其醫藥學上可接受之鹽，其中

L^1為C_2-C_{11}伸烷基、C_4-C_{10}伸烯基或C_4-C_{10}伸炔基；

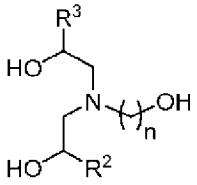
X^1為OR^1、SR^1或$N(R^1)_2$，其中R^1獨立地為H或未經取代之C_1-C_6烷基；及

R^2及R^3各自獨立地為C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_6-C_{30}炔基。

【0441】在一些實施例中，X^1為OR^1。在一些實施例中，X^1為OH。在一些實施例中，X^1為SR^1。在一些實施例中，X^1為SH。在一些實施例中，X^1為$N(R^1)_2$。在一些實施例中，X^1為NH_2。

【0442】在一些實施例中，L^1為C_2-C_{10}伸烷基。在一些實施例中，L^1為未經取代之C_2-C_{10}伸烷基。在一些實施例中，L^1為C_4-C_{10}伸烯基。在一些實施例中，L^1為未經取代之C_4-C_{10}伸烯基。在一些實施例中，L^1為C_4-C_{10}伸炔基。在一些實施例中，L^1為未經取代之C_4-C_{10}伸炔基。

【0443】在式(14)之一些實施例中，脂質具有根據式(14-2)之結構，



式(14-2)

或其醫藥學上可接受之鹽，其中n為2-10之整數。

【0444】在一些實施例中，n為2、3、4或5。在一些實施例中，n為2。在一些實施例中，n為3。在一些實施例中，n為4。在一些實施例中，n為5。在一些實施例中，n為6。在一些實施例中，n為7。在一些實施例中，n為8。在一些實施例中，n為9。在一些實施例中，n為10。

【0445】在式(14*)及式(14-2)之一些實施例中，R_2及R_3獨立地為視

情況經一或多個各自獨立地選自以下之取代基取代的直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基或C_1-C_{20}雜烷基：直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷氧基、直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基氧基羰基、直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基羰氧基、直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基碳酸酯、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}烯氧基羰基、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}烯基羰氧基、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}烯基碳酸酯、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}炔氧基羰基、直鏈或分支鏈C_2-C_{20}炔基羰氧基及直鏈或分支鏈C_2-C_{20}炔基碳酸酯。

【0446】 在式(14*)或式(14-2)之某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為未經取代之C_6-C_{30}烷基、未經取代之C_6-C_{30}烯基或未經取代之C_6-C_{30}炔基。在某些實施例中，R^2及R^3中之各者為未經取代之C_6-C_{30}烷基。在某些實施例中，R^2及R^3中之各者為未經取代之C_6-C_{30}烯基。在某些實施例中，R^2及R^3中之各者為未經取代之C_6-C_{30}炔基。

【0447】 在式(14*)之一些實施例中，烷基氧基羰基取代基具有式-C(O)OR^6，其中R^6為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。在式(14*)或式(14-2)之一些實施例中，R_2及R_3中之至少一者經烷基羰氧基取代。在一些實施例中，烷基羰氧基具有式-OC(O)R^6，其中R^6為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。在一些實施例中，R_2及R_3中之至少一者經烷基碳酸酯取代。在一些實施例中，烷基碳酸酯具有式-O(CO)OR^6，其中R^6為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。在一些實施例中，R_2及R_3獨立地為經-O(CO)R^6、-C(O)OR^6或-O(CO)OR^6取代之C_1-C_{12}烷基，其中R^6為未經取代之C_6-C_{30}烷基或C_6-C_{30}烯基。在一些實施例中，R_2及R_3各自為經-O(CO)R^6取代之C_1-C_{12}烷基。在一些實施例中，R_2及R_3各自為經-C(O)OR^6取代之C_1-C_{12}烷基。在一些實施例中，R_2及R_3各自為經-

O(CO)OR^{6}取代之C_1-C_{12}烷基。在一些實施例中，R_2為-C(O)OR^{6}或-O(CO)R^6，且R_3為-O(CO)OR^6。在一些實施例中，R_2為-O(CO)OR^6，且R_3為-C(O)OR^{6}或-O(CO)R^6。

【0448】在式(14*)或式(14-2)之一些實施例中，R_2及R_3中之至少一者選自下式：

(i) -$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

(ii) -$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

(iii) -$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12，

r為0至6，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【0449】在式(14*)或式(14-2)之一些實施例中，R_2及R_3中之各者獨立地選自下式中之一者：

(i) -$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

(ii) -$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

(iii) -$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12，

r為0至6，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【0450】在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為1至6。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為0。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為1。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為2。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為3至12。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，q為3至6。

【0451】在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為0。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為1至6。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為1。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為2。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為3。在式(i)-(iii)中之任一者之一些實施例中，r為4。

【0452】在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為R^{10}。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^9及R^{10}不同。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^9及R^{10}相同。

【0453】在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_1-C_{12}烯基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_2-C_{12}烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_2-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_5-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8為H，且R^9為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【0454】在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取

代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_1-C_{12}烯基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_2-C_{12}烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_2-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。在式(i)-(iii)之一些實施例中，R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【0455】在式(14*)或式(14-2)之一些實施例中，R_2及R_3中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在一些實施例中，$R_2$及$R_3$中之至少一者為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在一些實施例中，$R_2$及$R_3$中之至少一者為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在式(14*)或式(14-2)之一些實施例中，R_2及R_3中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q為3至12(例如6至12)，r為1至6 (例如1、2或3)，且R^8及R^9各自獨立地為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。

【0456】在式(14*)或式(14-2)之某些實施例中，R_2及R_3中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在其他實施例中，$R_2$及$R_3$中之至少一者為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在一些實施例中，$R_2$及$R_3$中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0457】在式(14*)或式(14-2)之其他實施例中，R_2及R_3中之至少一

者為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在一些實施例中，$R_2$及$R_3$中之至少一者為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$或-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0458】在式(14*)或式(14-2)之某些實施例中，R_2為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)$ (R^9)，其中q、r、R^8及R^9如上文所定義。

【0459】在式(14*)或式(14-2)之某些實施例中，R_2為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)$ (R^9)，其中q、r、R^8及R^9如上文所定義。

【0460】在式(14*)或式(14-2)之某些實施例中，R_2為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_2$為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，且$R_3$為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。在某些實施例中，$R_2$為-

$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$， 且$R_3$為$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，其中q、r、$R^8$及$R^9$如上文所定義。

【0461】 在式(14*)或式(14-2)之某些實施例中，R_2及R_3中之一者或各者為未經取代之C_6-C_{22}烷基，或R^2及R^3中之一者或各者為未經取代之C_6-C_{22}烯基。在某些實施例中，R^2及R^3中之各者為未經取代之C_6-C_{22}烷基。在某些實施例中，R_2及R_3中之各者為未經取代之C_6-C_{22}烯基。

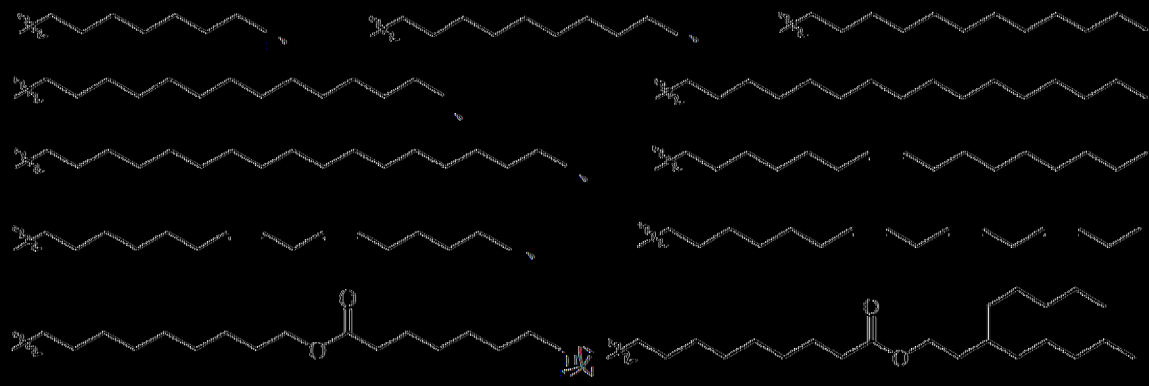
【0462】 在某些實施例中，R_2及R_3中之一者或各者為$-C_6H_{13}$、$-C_7H_{15}$、$-C_8H_{17}$、$-C_9H_{19}$、$-C_{10}H_{21}$、$-C_{11}H_{23}$、$-C_{12}H_{25}$、$-C_{13}H_{27}$、$-C_{14}H_{29}$、$-C_{15}H_{31}$、$-C_{16}H_{33}$、$-C_{17}H_{35}$、$-C_{18}H_{37}$、$-C_{19}H_{39}$、$-C_{20}H_{41}$、$-C_{21}H_{43}$、$-C_{22}H_{45}$、$-C_{23}H_{47}$、$-C_{24}H_{49}$、$-C_{25}H_{51}$。

【0463】 在某些實施例中，R_2及R_3中之一者或各者為$-(CH_2)_4CH=CH_2$、$-(CH_2)_5CH=CH_2$、$-(CH_2)_6CH=CH_2$、$-(CH_2)_7CH=CH_2$、$-(CH_2)_8SCH=CH_2$、$-(CH_2)_9CH=CH_2$、$-(CH_2)_{10}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{11}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{12}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{13}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{14}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{15}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{16}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{17}CH=CH_2$、$-(CH_2)_{18}CH=CH_2$、$-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_3CH_3$、$-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_5CH_3$、$-(CH_2)_4CH=CH(CH_2)_8CH_3$、$-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$、$-(CH_2)_6CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_4CH_3$、$-(CH_2)_7CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_4CH_3$、$-(CH_2)_7CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH_3$、$-(CH_2)_3CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_4CH_3$、$-(CH_2)_3CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH_3$、$-(CH_2)IICH=CH(CH_2)_7CH_3$或$-(CH_2)_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=$

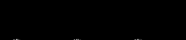
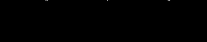
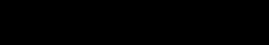
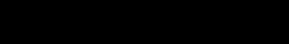
$CHCH_2CH$、$CHCH_2CH$、$CHCH_2CH$、$CHCH_2CH_3$。

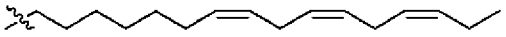
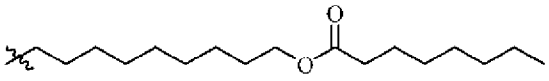
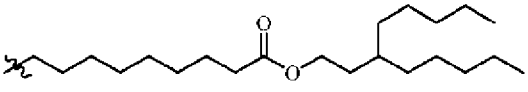
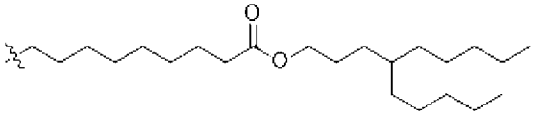
[0464] 在某些實施例中，R_2及R_3中之一者或各者為經$O(CO)R^6$或$C(O)OR^6$取代之C_6-C_{12}烷基，其中R^6為未經取代之C_6-C_{14}烷基。在某些實施例中，R^6為未經取代之直鏈C_6-C_{14}烷基。在某些實施例中，R^6為未經取代之分支鏈C_6-C_{14}烷基。

[0465] 在某些實施例中，R_2及R_3中之一者或各者為$(CH_2)_7C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$或$(CH_2)_8C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$。在某些實施例中，$R^2$及$R^3$中之一者或各者為



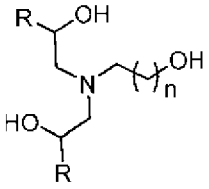
。

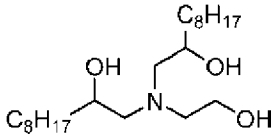
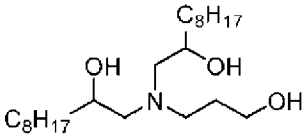
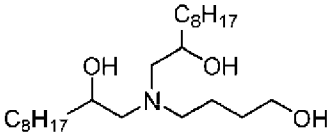
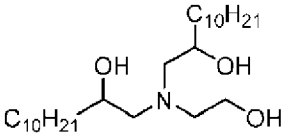
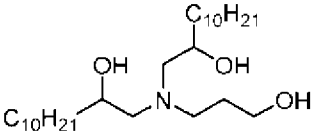
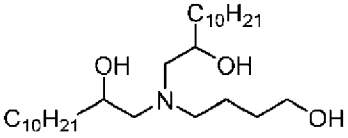
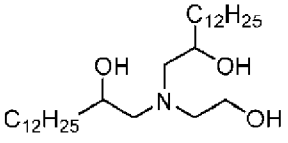
[0466] 在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之

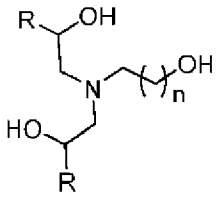
一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。在某些實施例中，R^2及R^3中之一者或各者為  。

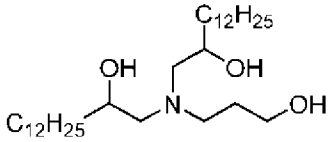
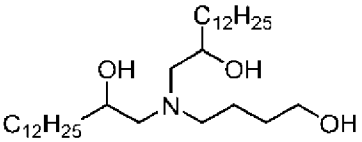
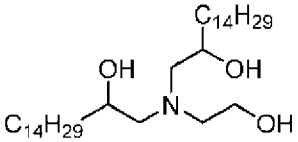
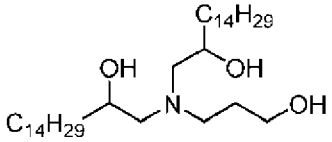
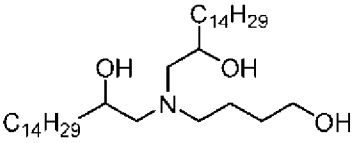
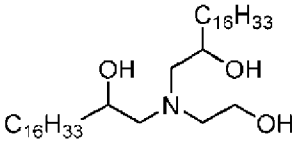
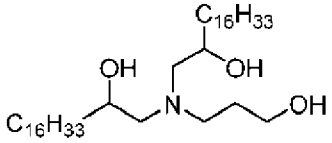
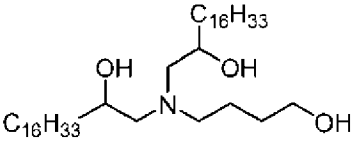
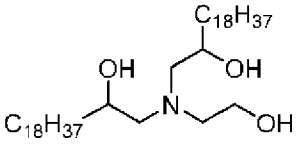
【0467】 在一些實施例中，可離子化脂質描述於表10h中。

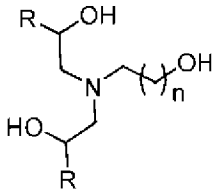
表10h

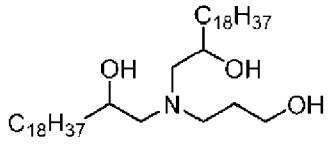
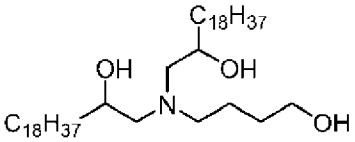
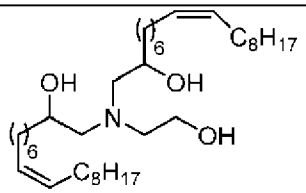
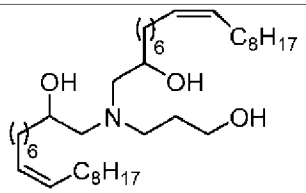
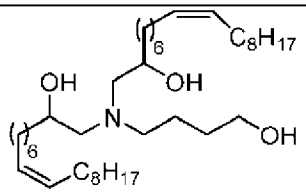
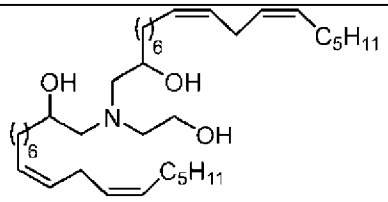
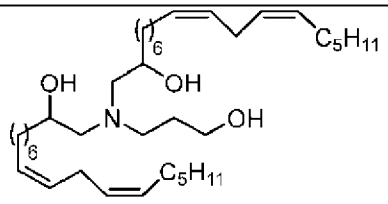


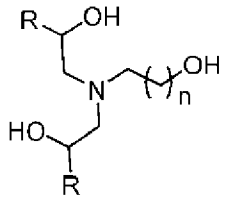
化合物	n	R	結構
1	1	C_8H_{17}	
2	2	C_8H_{17}	
3	3	C_8H_{17}	
4	1	$C_{10}H_{21}$	
5	2	$C_{10}H_{21}$	
6	3	$C_{10}H_{21}$	
7	1	$C_{12}H_{25}$	

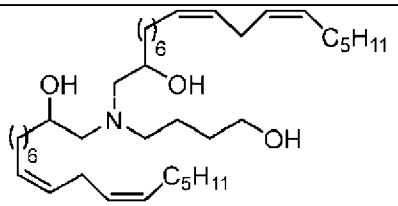
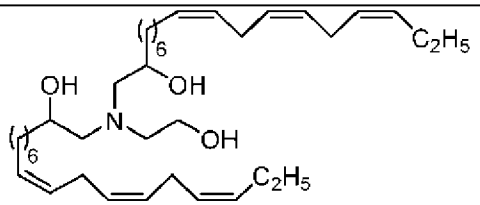
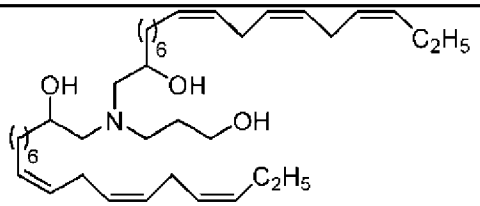
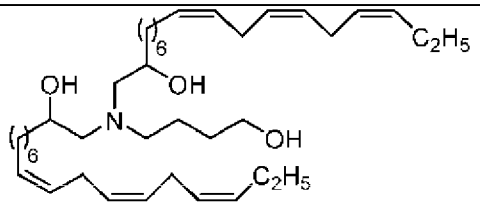
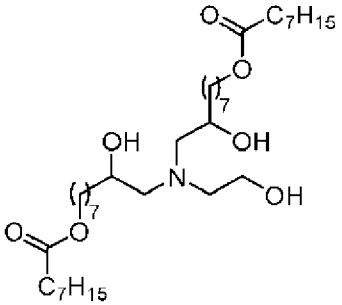


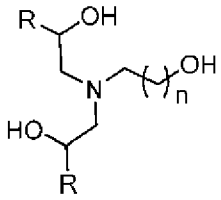
化合物	n	R	結構
8	2	$C_{12}H_{25}$	
9	3	$C_{12}H_{25}$	
10	1	$C_{14}H_{29}$	
11	2	$C_{14}H_{29}$	
12	3	$C_{14}H_{29}$	
13	1	$C_{16}H_{33}$	
14	2	$C_{16}H_{33}$	
15	3	$C_{16}H_{33}$	
16	1	$C_{18}H_{37}$	

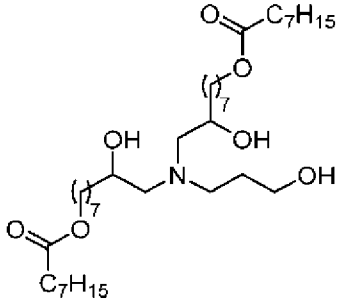
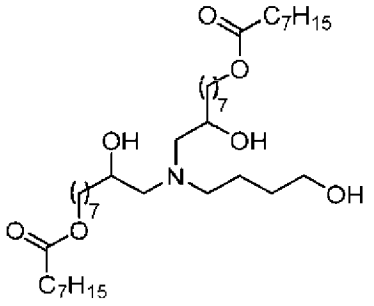
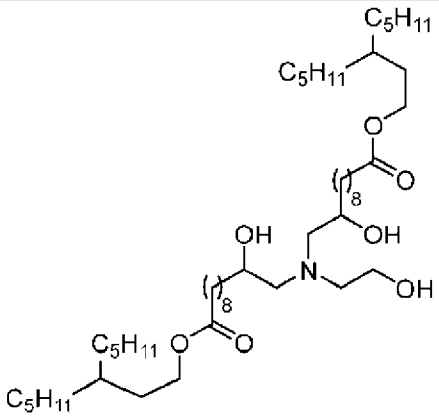


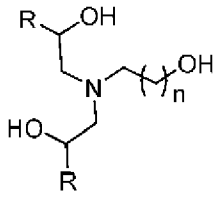
化合物	n	R	結構
17	2	$C_{18}H_{37}$	
18	3	$C_{18}H_{37}$	
19	1	$C_6H_{12}CH=CHC_8H_{17}$	
20	2	$C_6H_{12}CH=CHC_8H_{17}$	
21	3	$C_6H_{12}CH=CHC_8H_{17}$	
22	1	$C_6H_{12}CH=CHCH_2CH=CHC_5H_{11}$	
23	2	$C_6H_{12}CH=CHCH_2CH=CHC_5H_{11}$	

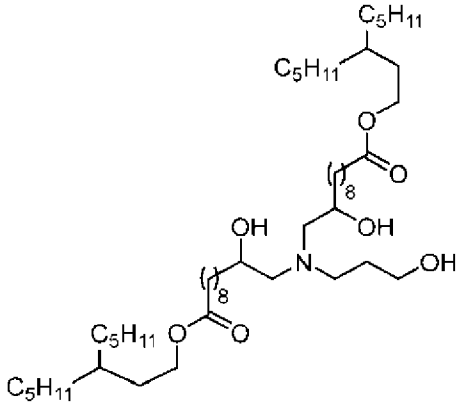
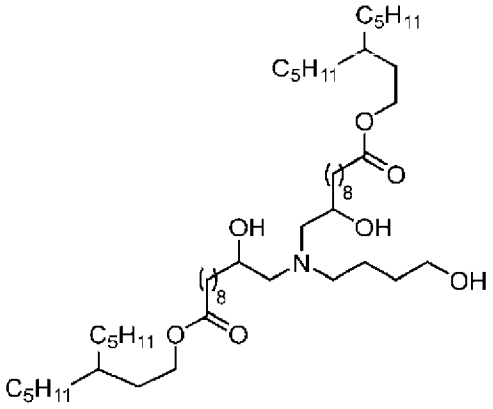


化合物	n	R	結構
24	3	$C_6H_{12}CH=CHCH_2CH=CHC_5H_{11}$	
25	1	$(CH_2)_6CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)CH=CHC_2H_5$	
26	2	$(CH_2)_6CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)CH=CHC_2H_5$	
27	3	$(CH_2)_6CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)CH=CHC_2H_5$	
28	1	$C_7H_{14}O(CO)C_7H_{15}$	



化合物	n	R	結構
29	2	$C_7H_{14}O(CO)C_7H_{15}$	
30	3	$C_7H_{14}O(CO)C_7H_{15}$	
31	1	$C_8H_{16}C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$	



化合物	n	R	結構
32	2	$C_8H_{16}C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$	
33	3	$C_8H_{16}C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$	

5.1其他可離子化脂質

【0468】 在一些實施例中，一或多種(例如兩種或更多種或三種或更多種)可離子化脂質用於本發明之轉移媒劑中。在一些實施例中，轉移媒劑包括第一可離子化脂質(例如如本文中所描述，諸如式(13*)或(14*)之脂質)及一或多種額外可離子化脂質。

【0469】 所關注之脂質，包括可與如本文中所描述之第一可離子化脂質組合使用之可離子化脂質(諸如藉由併入本發明之轉移媒劑中)包括但不限於如以下中所描述的脂質：國際申請案PCT/US2018/058555；國際申請案PCT/US2020/038678；美國公開案US2019/0314524、

WO2019/152848；國際申請案PCT/US2010/061058；國際申請案PCT/US2017/028981、WO2015/095340、WO2014/136086、US2019/0321489、WO2010/053572；美國臨時專利申請案61/617,468；國際專利申請案PCT/US2019/025246；美國專利公開案2017/0190661及2017/0114010；美國公開案20190314284、WO2015/095340、WO2019/152557、WO2019/152848；國際申請案PCT/US2019/015913；美國專利9,708,628；美國專利9,765,022；Wang等人, ACS Synthetic Biology, 1, 403-07 (2012)；WO 2008/042973；美國專利8,071,082，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0470】在一些實施例中，如脂質中所使用之尾基可如以下中所描述：WO2015/095340、WO2019/152557及WO2019/152848，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0471】脂質樣化合物可藉由此項技術中熟知之方法製備。

【0472】在一些實施例中，使用可離子化脂質氯化N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基銨或「DOTMA」。(Felgner等人Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987)；美國專利第4,897,355號)。DOTMA可用可離子化脂質(例如如本文所描述)調配，及/或可與中性脂質二油醯基磷脂醯乙醇胺或「DOPE」或其他陽離子或非陽離子脂質組合成脂質奈米粒子。

【0473】其他合適的脂質包括例如可離子化陽離子脂質，諸如(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-15,18-二烯-1-胺(HGT5000)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-4,15,18-三烯-1-胺(HGT5001)、及(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-5,15,18-三烯-

1-胺(HGT5002)、C12-200 (描述於WO 2010/053572中)、2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊環-4-基)-N,N-二甲基乙胺(DLinKC2-DMA)) (參見WO 2010/042877；Semple等人, Nature Biotech. 28:172-176 (2010))、2-(2,2-二((9Z,2Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊環-4-基)-N,N-二甲基乙胺(DLin-KC2-DMA)、3-(1H-咪唑-4-基)丙酸(3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氫-1H-環戊并[a]菲-3-基酯(ICE)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-15,18-二烯-1-胺(HGT5000)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-4,15,18-三烯-1-胺(HGT5001)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-5,15,18-三烯-1-胺(HGT5002)、5-羧基精胺基甘胺酸-二(十八烷基)醯胺(DOGS)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙胺鎓(DOSPA) (Behr等人Proc. Nat.'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989)；美國專利第5,171,678號；第5,334,761號)、1,2-二油醯基-3-二甲基銨-丙烷(DODAP)、1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷或(DOTAP)。考慮的可離子化脂質亦包括1,2-二硬脂醯氧基-N,N-二甲基-3-胺基丙烷(DSDMA)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基-3-胺基丙烷(DODMA)、1,2-二亞油氧基-N,N-二甲基-3-胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻氧基-N,N-二甲基-3-胺基丙烷(DLenDMA)、氯化N-二油基-N,N-二甲基銨(DODAC)、溴化N,N-二硬脂基-N,N-二甲基銨(DDAB)、溴化N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基銨(DMRIE)、3-二甲胺基-2-(膽固醇-5-烯-3-β-氧基丁-4-氧基)-1-(順式,順式-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(膽固

醇-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧雜戊烯氧基)-3-二甲基-1-(順式,順式-9′,1-2'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N′-二油烯基胺基甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DOcarbDAP)、2,3-二亞油醯基氧基-N,N-二甲基丙胺(DLinDAP)、1,2-N,N′-二亞油基胺甲醯基-3-二甲胺基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亞油醯基胺甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLinCDAP)、2,2-二亞油基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-DMA)、2,2-二亞油基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-XTC2-DMA)或GL67，或其混合物。(Heyes, J.等人, J Controlled Release 107: 276-287 (2005)；Morrissey, D V.等人, Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005)；PCT公開案WO2005/121348A1)。本發明亦考慮使用基於膽固醇之可離子化脂質調配轉移媒劑(例如脂質奈米粒子)。可使用單獨或與其他脂質組合之此類基於膽固醇之可離子化脂質。合適的基於膽固醇之可離子化脂質包括例如DC-膽固醇(N,N-二甲基-N-乙基甲醯胺基膽固醇)及1,4-雙(3-N-油胺基-丙基)哌啡(Gao等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991)；Wolf等人BioTechniques 23, 139 (1997)；美國專利第5,744,335號)。

【0474】 亦考慮諸如基於二烷胺基之脂質、基於咪唑之脂質及基於鋶之脂質的陽離子脂質。舉例而言，亦考慮可離子化脂質3-(1H-咪唑-4-基)丙酸(3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氫-1H-環戊并[a]菲-3-基酯(ICE)之使用，如國際申請案第PCT/US2010/058457號中所揭示，該案以引用之方式併入本文中。

【0475】 亦考慮諸如基於二烷胺基之脂質、基於咪唑之脂質及基於

鈲之脂質的可離子化脂質。舉例而言，某些實施例係針對包含一或多種基於咪唑之可離子化脂質，例如咪唑膽固醇酯或「ICE」脂質3-(1H-咪唑-4-基)丙酸(3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氫-1H-環戊并[a]菲-3-基酯的組合物。

【0476】 在不希望受特定理論束縛之情況下，咸信基於咪唑之陽離子脂質ICE之融合性與藉由咪唑基團促進之胞內體破裂有關，該ICE具有相對於傳統的可離子化脂質低之pKa。胞內體破裂繼而促進滲透膨脹及脂質體膜破裂，接著將裝載於其中之(多種)核酸內容物轉染或胞內釋放至目標細胞中。

【0477】 基於咪唑之可離子化脂質的特徵亦在於其毒性相對於其他可離子化脂質而言降低。

【0478】 在某些實施例中，用於遞送環狀RNA之轉移媒劑組合物包含胺脂質。在某些實施例中，可離子化脂質為胺脂質。在一些實施例中，胺脂質描述於國際專利申請案PCT/US2018/053569中。

【0479】 在一些實施例中，胺脂質為脂質E，其為十八碳-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯。

【0480】 在某些實施例中，胺脂質為脂質E之類似物。在某些實施例中，脂質E類似物為脂質E之縮醛類似物。在特定轉移媒劑組合物中，縮醛類似物為C4-C12縮醛類似物。在一些實施例中，縮醛類似物為C5-C12縮醛類似物。在額外實施例中，縮醛類似物為C5-C10縮醛類似物。在另外實施例中，縮醛類似物係選自C4、C5、C6、C7、C9、C10、C11及

C12縮醛類似物。

【0481】 適用於本文所描述之例如脂質奈米粒子之轉移媒劑中的胺脂質及其他生物可降解脂質在活體內生物可降解。本文所描述之胺脂質具有低毒性(例如在動物模型中在大於或等於10 mg/kg之量下耐受而無副作用)。在某些實施例中，構成胺脂質之轉移媒劑包括其中在8、10、12、24或48小時或3、4、5、6、7或10天內至少75%胺脂質自血漿清除的轉移媒劑。

【0482】 生物可降解脂質包括例如WO2017/173054、WO2015/095340及WO2014/136086之生物可降解脂質。

【0483】 脂質清除率可以熟習此項技術者已知之方法量測。參見例如Maier, M.A.等人Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. Mol. Ther. 2013, 21(8), 1570-78。

【0484】 包含胺脂質之轉移媒劑組合物可引起清除率增加。在一些實施例中，清除率為脂質清除率，例如自血液、血清或血漿清除脂質之速率。在一些實施例中，清除率為RNA清除率，例如自血液、血清或血漿清除環狀RNA之速率。在一些實施例中，清除率為自血液、血清或血漿清除轉移媒劑之速率。在一些實施例中，清除率為自諸如肝組織或脾組織之組織清除轉移媒劑之速率。在某些實施例中，高清除率會產生無顯著副作用之安全分佈。胺脂質及生物可降解脂質可減少循環中及組織中之轉移媒劑積聚。在一些實施例中，循環中及組織中之轉移媒劑積聚減少會產生無顯著副作用之安全分佈。

【0485】 脂質可視其所處之介質之pH而離子化。舉例而言，在弱酸

性介質中，諸如胺脂質之脂質可經質子化且因此帶有正電荷。相反地，在弱鹼性介質，諸如其中pH為大約7.35之血液中，脂質，諸如胺脂質可不經質子化且因此不帶電荷。

【0486】 脂質帶有電荷之能力與其固有pKa有關。在一些實施例中，本發明之胺脂質可各自獨立地具有在約5.1至約7.4範圍內之pKa。在一些實施例中，本發明之生物可利用脂質可各自獨立地具有在約5.1至約7.4範圍內之pKa。舉例而言，本發明之胺脂質可各自獨立地具有在約5.8至約6.5範圍內之pKa。pKa在約5.1至約7.4範圍內之脂質有效用於活體內遞送貨物，例如遞送至肝。此外，已發現，pKa在約5.3至約6.4範圍內之脂質有效用於活體內遞送，例如遞送至腫瘤中。參見例如WO2014/136086。

【0487】 本發明之脂質可具有-S-S- (二硫鍵)鍵。

【0488】 本發明之脂質樣化合物可使用合適的起始物質，經由此項技術中已知之合成途徑製備。該方法可包括用於添加或移除合適的保護基以便最終允許合成脂質樣化合物之額外步驟。另外，可按替代順序或次序執行各種合成步驟以得到所需物質。適用於合成適用的脂質樣化合物之合成化學轉換及保護基方法(保護及脫除保護基)係此項技術中已知的，包括例如R. Larock, Comprehensive Organic Transformations (第2版, VCH Publishers 1999)；P. G. M. Wuts及T. W. Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (第4版, John Wiley and Sons 2007)；L. Fieser及M. Fieser, Fieser and Fieser' s Reagents for Organic Synthesis (John Wiley and Sons 1994)；及L. Paquette編, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis (第2版, John Wiley and Sons 2009)及其後續版本。

某些脂質樣化合物可含有非芳族雙鍵及一或多個不對稱中心。因此，其可以外消旋物及外消旋混合物、單一鏡像異構物、個別非鏡像異構物、非鏡像異構混合物及順式或反式異構形式存在。考慮所有此類異構形式。

【0489】 用於以上化合物及組合物之製備方法在本文中描述於下文及/或在此項技術中已知。

【0490】 熟習此項技術者應瞭解，在本文所描述之方法中，中間化合物之官能基可能需要由適合的保護基保護。此類官能基包括例如羥基、胺基、巰基及羧酸。用於羥基之適合的保護基包括例如三烷基矽基或二芳基烷基矽基(例如三級丁基二甲基矽基、三級丁基二苯基矽基或三甲基矽基)、四氫哌喃基、苯甲基及其類似基團。用於胺基、甲脒基及胍基之適合的保護基包括例如三級丁氧基羰基、苯甲氧基羰基及其類似基團。用於巰基之適合的保護基包括例如-C(O)-R'' (其中R''為烷基、芳基或芳烷基)、對甲氧基苯甲基、三苯甲基及其類似基團。用於羧酸之適合的保護基包括例如烷基、芳基或芳烷基酯。保護基可根據熟習此項技術者已知且如本文所描述之標準技術添加或移除。保護基之使用詳細描述於例如Green, T. W.及P. G. M. Wutz, Protective Groups in Organic Synthesis (1999), 第3版, Wiley中。如熟習此項技術者將瞭解，保護基亦可為聚合物樹脂，如王樹脂(Wang resin)、林克樹脂(Rink resin)或2-氯三苯甲基-氯化物樹脂。

【0491】 熟習此項技術者亦應瞭解，儘管本發明化合物之此類受保護衍生物可能不具有同樣的藥理學活性，但其可投與哺乳動物且此後在體內代謝，從而形成具有藥理學活性之本發明化合物。因此，此類衍生物可描述為前驅藥。本發明化合物之所有前驅藥包括在本發明之範疇內。

【0492】 此外，以游離鹼或游離酸形式存在之所有本發明化合物可藉由熟習此項技術者已知之方法用適當的無機鹼或有機鹼或無機酸或有機酸處理而轉化成其醫藥學上可接受之鹽。本發明化合物之鹽亦可藉由標準技術轉化成其游離鹼或游離酸形式。

【0493】 應瞭解，熟習此項技術者能夠藉由類似方法或藉由將熟習此項技術者已知的其他方法組合來製造此等化合物。亦應理解，熟習此項技術者應能夠藉由使用適當的起始物質且修改合成參數來製造本文中未具體說明之其他式(1)化合物。一般而言，起始物質可自諸如Sigma Aldrich、Lancaster Synthesis公司、Maybridge、Matrix Scientific、TCI及Fluorochem USA等之來源獲得，或根據熟習此項技術者已知之來源合成(參見例如Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 第5版(Wiley, 2000年12月))，或如本發明中所描述來製備。

【0494】 如上文所提及，此等脂質樣化合物可用於遞送醫藥劑。可藉由活體外分析初步篩檢其在遞送醫藥劑中之功效，且隨後藉由動物實驗及臨床試驗進行確認。其他方法亦將對一般熟習此項技術者顯而易見。

【0495】 不受任何理論所束縛，本發明之脂質樣化合物可藉由形成複合物，例如奈米複合物及微米粒子而促進遞送醫藥劑。此類脂質樣化合物之帶正電或帶負電親水性頭結合至醫藥劑之帶相反電荷之部分，且其疏水性部分結合至醫藥劑之疏水性部分。任一結合可為共價的或非共價的。

【0496】 上文所描述之複合物可使用諸如Wang等人, ACS Synthetic Biology, 1, 403-07 (2012)之公開案中所描述之程序來製備。一般而言，其係藉由在諸如乙酸鈉緩衝液或磷酸鹽緩衝鹽水(「PBS」)之緩衝液中培育脂質樣化合物及醫藥劑而獲得。

5.2親水性基團

【0497】 在某些實施例中，選定親水性官能基或部分可改變或以其他方式賦予化合物或該化合物為其組分之轉移媒劑以特性(例如藉由改善該化合物為其組分之脂質奈米粒子的轉染效率)。舉例而言，在本文所揭示之化合物中併入鈲作為親水性頭基可促進此類化合物(或此類化合物為其組分之轉移媒劑)與一或多個目標細胞之細胞膜的融合，藉此增強例如此類化合物之轉染效率。已假設，來自親水性鈲部分之氮形成六員環過渡態，此將穩定性授予至相互作用且因此允許經囊封物質之細胞吸收。(Wender等人, Adv. Drug Del. Rev. (2008) 60: 452-472。) 類似地，將一或多個胺基或部分併入所揭示之化合物中(例如作為頭基)可藉由採用該等胺基之融合性來進一步促進使目標細胞之胞內體/溶酶體膜破裂。此不僅基於組合物之胺基之pKa，且亦基於胺基進行六方相變且與目標細胞表面，亦即囊泡膜融合之能力。(Koltover等人Science (1998) 281: 78-81。) 咸信所得物會促進囊泡膜破裂及脂質奈米粒子內容物釋放至目標細胞中。

【0498】 類似地，在某些實施例中，將例如咪唑作為親水性頭基併入本文所揭示之化合物中可用以促進例如囊封於本發明之轉移媒劑(例如脂質奈米粒子)中之內容物的胞內體或溶酶體釋放。該增強之釋放可藉由質子-海綿介導之破裂機制及/或增強之融合機制中之一或兩者來達成。質子-海綿機制係基於化合物且特定言之該化合物之官能部分或基團緩衝胞內體酸化之能力。此可藉由該化合物或構成該化合物之官能基中之一或多者(例如咪唑)之pKa來操縱或以其他方式控制。因此，在某些實施例中，例如本文所揭示之基於咪唑之化合物(例如HGT4001及HGT4004)的融合性與胞內體破裂特性相關，該等特性由該等咪唑基團促進，該等咪唑基團

具有相對於其他傳統的可離子化脂質而言低之pKa。此類胞內體破裂特性繼而促進滲透膨脹及脂質體膜破裂，接著將裝載或囊封於其中之聚核苷酸物質轉染或胞內釋放至目標細胞中。此現象可適用於除咪唑部分以外具有所需pKa概況之各種化合物。此類實施例亦包括基於多氮之官能基，諸如基於聚胺、多肽(組胺酸)及氮之樹突狀結構。

【0499】 例示性可離子化脂質及/或陽離子脂質描述於以下中：國際PCT專利公開案WO2015/095340、WO2015/199952、WO2018/011633、WO2017/049245、WO2015/061467、WO2012/040184、WO2012/000104、WO2015/074085、WO2016/081029、WO2017/004143、WO2017/075531、WO2017/117528、WO2011/022460、WO2013/148541、WO2013/116126、WO2011/153120、WO2012/044638、WO2012/054365、WO2011/090965、WO2013/016058、WO2012/162210、WO2008/042973、WO2010/129709、WO2010/144740、WO2012/099755、WO2013/049328、WO2013/086322、WO2013/086373、WO2011/071860、WO2009/132131、WO2010/048536、WO2010/088537、WO2010/054401、WO2010/054406、WO2010/054405、WO2010/054384、WO2012/016184、WO2009/086558、WO2010/042877、WO2011/000106、WO2011/000107、WO2005/120152、WO2011/141705、WO2013/126803、WO2006/007712、WO2011/038160、WO2005/121348、WO2011/066651、WO2009/127060、WO2011/141704、WO2006/069782、WO2012/031043、

WO2013/006825、WO2013/033563、WO2013/089151、WO2017/099823、WO2015/095346及WO2013/086354；及美國專利公開案US2016/0311759、US2015/0376115、US2016/0151284、US2017/0210697、US2015/0140070、US2013/0178541、US2013/0303587、US2015/0141678、US2015/0239926、US2016/0376224、US2017/0119904、US2012/0149894、US2015/0057373、US2013/0090372、US2013/0274523、US2013/0274504、US2013/0274504、US2009/0023673、US2012/0128760、US2010/0324120、US2014/0200257、US2015/0203446、US2018/0005363、US2014/0308304、US2013/0338210、US2012/0101148、US2012/0027796、US2012/0058144、US2013/0323269、US2011/0117125、US2011/0256175、US2012/0202871、US2011/0076335、US2006/0083780、US2013/0123338、US2015/0064242、US2006/0051405、US2013/0065939、US2006/0008910、US2003/0022649、US2010/0130588、US2013/0116307、US2010/0062967、US2013/0202684、US2014/0141070、US2014/0255472、US2014/0039032、US2018/0028664、US2016/0317458及US2013/0195920，以上所有之內容以全文引用之方式併入本文中。國際專利申請案WO 2019/131770亦以全文引用之方式併入本文中。

B. **PEG脂質**

【0500】亦考慮在本文所描述之脂質體及醫藥組合物中使用及包括

經聚乙二醇(PEG)修飾之磷脂及衍生脂質，諸如衍生神經醯胺(PEG-CER)，包括N-辛醯基-神經鞘胺醇-1-[丁二醯基(甲氧基聚乙二醇)-2000](C8 PEG-2000神經醯胺)，較佳與本文所揭示之化合物及脂質中之一或多者的組合。所考慮之經PEG修飾之脂質包括但不限於與具有(多個) C6-C20長度之烷基鏈之脂質共價連接的長度為至多5 kDa之聚乙二醇鏈。在一些實施例中，本發明之組合物及方法中所採用之經PEG修飾之脂質為1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油、甲氧基聚乙二醇(2000 MW PEG)「DMG-PEG2000」。將經PEG修飾之脂質添加至脂質遞送媒劑中可防止複雜聚集，且亦可提供用於延長循環壽命且增加脂質-聚核苷酸組合物遞送至目標組織之方式(Klibanov等人, (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237)，或其可經選擇以快速交換出活體內調配物(參見美國專利第5,885,613號)。特別適用之可交換脂質為具有較短醯基鏈(例如C14或C18)之PEG-神經醯胺。本發明之經PEG修飾之磷脂及衍生脂質可佔脂質體脂質奈米粒子中存在之總脂質的約0%至約20%、約0.5%至約20%、約1%至約15%、約4%至約10%或約2%之莫耳比。

【0501】 在一實施例中，經PEG修飾之脂質描述於國際專利申請案第PCT/US2019/015913號或第PCT/US2020/046407號中，其以全文引用之方式併入本文中。在一實施例中，轉移媒劑包含一或多種經PEG修飾之脂質。

【0502】 經PEG修飾之脂質之非限制性實例包括經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺及磷脂酸、PEG-神經醯胺結合物(例如PEG-CerC14或PEG-CerC20)、經PEG修飾之二烷基胺及經PEG修飾之1,2-二醯基氧基丙-3-胺。在一些其他實施例中，經PEG修飾之脂質可為例如PEG-c-DOMG、

PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE。

【0503】 在一些另外其他實施例中，經PEG修飾之脂質包括但不限於1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[胺基(聚乙二醇)] (PEG-DSPE)、PEG-二硬脂基甘油(PEG-DSG)、PEG-二軟脂油基、PEG-二油基、PEG-二硬脂基、PEG-二醯基甘油醯胺(PEG-DAG)、PEG-二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺(PEG-DPPE)或PEG-1,2-二肉豆蔻氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA)。

【0504】 在一些另外其他實施例中，經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基胺基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DOMG或PEG-1。在一些實施例中，經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG(2000)。

【0505】 在一些實施例中，經PEG修飾之脂質包含含有10-70個(例如30-60個)氧基伸乙基(-O-CH_2-CH_2-)單元或其部分之PEG部分。在一些實施例中，經PEG修飾之脂質包含$(OCH_2CH_2)_v$-OR_w，且v為0至70之間的整數(包括性) (例如30至60之間的整數)，w為氫或烷基。

【0506】 在各種實施例中，經PEG修飾之脂質亦可稱為「聚乙二醇化脂質」或「PEG-脂質」。

【0507】 在一個實施例中，PEG-脂質選自由以下組成之群：經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油、經PEG修飾之二烷基甘油及其混合物。

【0508】 在一些實施例中，PEG-脂質之脂質部分包括長度為約C_{14}

至約C_{22}，諸如約C_{14}至約C_{16}之脂質部分。在一些實施例中，例如mPEG-NH_2之PEG部分之大小為約1000、約2000、約5000、約10,000、約15,000或約20,000道爾頓。在一個實施例中，PEG-脂質為PEG2k-DMG。

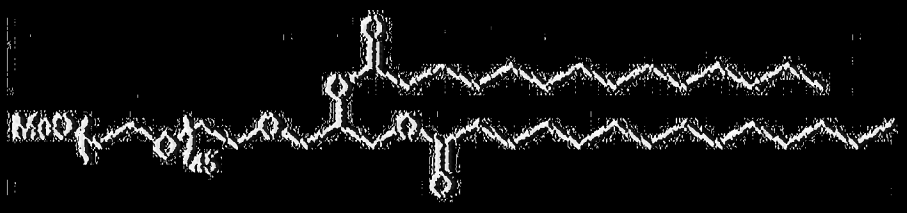
【0509】在一個實施例中，本文所描述之脂質奈米粒子可包含經非可擴散PEG修飾之脂質。非可擴散PEG之非限制性實例包括PEG-DSG及PEG-DSPE。

【0510】PEG-脂質為此項技術中已知的，諸如美國專利第8,158,601號及國際專利公開案第WO2015/130584 A2號中所描述之PEG-脂質，該等案以全文引用之方式併入本文中。

【0511】在各種實施例中，本文所描述之脂質(例如PEG-脂質)可如國際專利公開案第PCT/US2016/000129號所描述進行合成，該案以全文引用之方式併入。

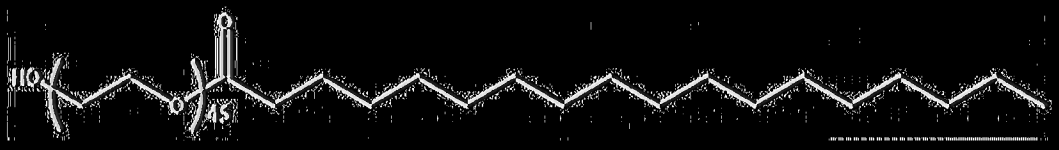
【0512】脂質奈米粒子組合物之脂質組分可包括一或多種諸如PEG或經PEG修飾之脂質的包含聚乙二醇之分子。此類物種可替代地稱為聚乙二醇化脂質。PEG脂質為經聚乙二醇修飾之脂質。PEG脂質可選自包括以下之非限制性群：經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油、經PEG修飾之二烷基甘油及其混合物。舉例而言，PEG脂質可為PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂質。

【0513】在一些實施例中，經PEG修飾之脂質為PEG-DMG之經修飾形式。PEG-DMG具有以下結構：



。

〔0514〕在一典實施例中，經PEG修飾之脂質為PEG-C18或PEG-1之經修飾形式。PEG-1具有以下結構：



。

〔0515〕在一個實施例中，適用於本發明之PEG脂質可為國際公開案第WO2012099755號中所描述之聚乙二醇化脂質，該案之內容以全文引用之方式併入本文中。本文所描述之此等例示性PEG脂質中之任一者可經修飾以在PEG鏈上包含羥基。在某典實施例中，PEG脂質為PEG-OH脂質。在某典實施例中，PEG-OH脂質在PEG鏈上包括一或多個羥基。在某典實施例中，PEG-OH或羥基聚乙二醇化脂質在PEG鏈之末端包含-OH基團。各可能性代表本發明之各別實施例。

〔0516〕在一典實施例中，PEG脂質為式(P1)化合物：



或其鹽或異構物，其中：

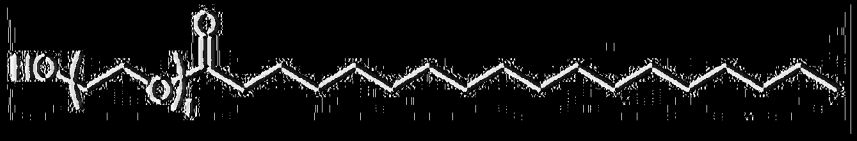
r為1至100之間的整數；

R為C_{10-40}烷基、C_{10-40}烯基或C_{10-40}炔基；且視情況R之一或多個單中其獨立地經以下置換：C_{3-10}伸碳環基、4至10員伸雜環基、C_{6-10}伸芳基、4至10員伸雜芳基、$N(R^N)$、O、S、C(O)、$C(O)N(R^N)$、$NR^NC(O)$、$NR^NC(O)N(R^N)$、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、$OC(O)N(R^N)$、$NR^NC(O)O$、C(O)S、SC(O)、$C(=NR^N)$、

C(=NR^N)N(R^N)、NR^{N}C(=NR^N)、NR^{N}C(=NR^N)N(R^N)、C(S)、C(S)N(R^N)、NR^{N}C(S)、NR^{N}C(S)N(R^N)、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)$_2$、S(O)$_2$O、OS(O)$_2$O、N(R^N)S(O)、S(O)N(R^N)、N(R^N)S(O)N(R^N)、OS(O)N(R^N)、N(R^N)S(O)O、S(O)2、N(R^N)S(O)2、S(O)$_2$N(R^N)、N(R^N)S(O)$_2$N(R^N)、OS(O)$_2$N(R^N)或N(R^N)S(O)$_2$O；及

R^{N}之各例項獨立地為氫、C$_{1-6}$烷基或氮保護基。

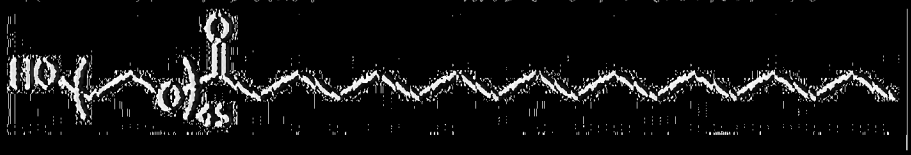
[0517] 舉例而言，R為C17烷基。舉例而言，PEG脂質為式(P1-a)之化合物：



，

或其鹽或異構物，其中r為1至100之間的整數。

[0518] 舉例而言，PEG脂質為下式之化合物：



。

C. 輔助脂質

[0519] 在一些實施例中，本文所描述之轉移媒劑(例如LNP)包含一或多種非陽離子輔助脂質。在一些實施例中，輔助脂質為磷脂。在一些實施例中，輔助脂質為磷脂替代物或置換物。在一些實施例中，磷脂或磷脂替代物可為例如一或多種飽和或(多)不飽和磷脂或磷脂替代物或其組合。一般而言，磷脂包含磷脂部分及一或多種脂肪酸部分。

[0520] 磷脂部分可選自例如由以下組成之非限制性群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯甘油、磷脂醯絲胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂醯膽鹼及神經鞘磷脂。

【0521】 脂肪酸部分可選自例如由以下組成之非限制性群組：月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、軟脂酸、軟脂油酸、硬脂酸、油酸、亞麻油酸、α-次亞麻油酸、芥子酸、植烷酸、花生酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二烷酸、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸。

【0522】 磷脂包括(但不限於)甘油磷脂，諸如磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、磷脂醯甘油及磷脂酸。磷脂亦包括磷神經鞘脂，諸如神經鞘磷脂。

【0523】 在一些實施例中，輔助脂質為1,2-二硬脂醯基-177-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)類似物、DSPC替代物、油酸或油酸類似物。

【0524】 在一些實施例中，輔助脂質為非磷脂醯膽鹼(PC)兩性離子脂質、DSPC類似物、油酸、油酸類似物或DSPC替代物。

【0525】 在一些實施例中，輔助脂質描述於PCT/US2018/053569中。適用於本發明之脂質組合物中之輔助脂質包括例如各種中性、不帶電或兩性離子脂質。此類輔助脂質較佳與本文所揭示之化合物及脂質中之一或多者組合使用。輔助脂質之實例包括但不限於5-十七基苯-1,3-二醇(間苯二酚)、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、磷脂醯膽鹼(PLPC)、1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DAPC)、磷脂醯乙醇胺(PE)、卵磷脂醯膽鹼(EPC)、二月桂醯基磷脂醯膽鹼(DLPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、1-肉豆蔻醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼(MPPC)、1-軟脂醯基-2-肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(PMPC)、1-軟脂醯基-2-硬脂醯基磷脂醯膽鹼(PSPC)、1,2-二花生醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DBPC)、1-硬脂醯基-2-軟脂醯基磷脂醯膽鹼

(SPPC)、1,2-二(二十)碳烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DEPC)、軟脂醯油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、溶血磷脂醯基膽鹼、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二亞油醯基磷脂醯膽鹼、二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、軟脂醯油醯基磷脂醯乙醇胺(POPE)、溶血磷脂醯乙醇胺及其組合。在一個實施例中，輔助脂質可為二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)或二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)。在另一實施例中，輔助脂質可為二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)。輔助脂質用於穩定且改善轉移媒劑之處理。此類輔助脂質較佳與例如本文所揭示之可離子化脂質中之一或多者的其他賦形劑組合使用。在一些實施例中，當與可離子化脂質組合使用時，輔助脂質可佔脂質奈米粒子中存在之總脂質的5%至約90%或約10%至約70%之莫耳比。

D. **結構性脂質**

【0526】在一實施例中，結構性脂質描述於國際專利申請案PCT/US2019/015913中。

【0527】本文所描述之轉移媒劑包含一或多種結構性脂質。結構性脂質併入脂質奈米粒子中可有助於減少其他脂質在粒子中的聚集。結構性脂質可包括(但不限於)膽固醇、糞固醇、麥角固醇、菜籽固醇、番茄次鹼、蕃茄鹼、熊果酸、α-生育酚及其混合物。在某些實施例中，結構性脂質為膽固醇。在某些實施例中，結構性脂質包括膽固醇及皮質類固醇(諸如普賴蘇穠(prednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、普賴松(prednisone)及氫皮質酮(hydrocortisone))或其組合。

【0528】在一些實施例中，結構性脂質為固醇。在某些實施例中，結構性脂質為類固醇。在某些實施例中，結構性脂質為膽固醇。在某些實

施例中，結構性脂質為膽固醇類似物。在某些實施例中，結構性脂質為α-生育酚。

【0529】 本文所描述之轉移媒劑包含一或多種結構性脂質。將結構性脂質併入例如脂質奈米粒子之轉移媒劑中可幫助減少粒子中其他脂質之聚集。在某些實施例中，結構性脂質包括膽固醇及皮質類固醇(諸如普賴蘇穠(prednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、普賴松(prednisone)及氫皮質酮(hydrocortisone))或其組合。

【0530】 在一些實施例中，結構性脂質為固醇。結構性脂質可包括但不限於固醇(例如植物固醇或動物固醇)。

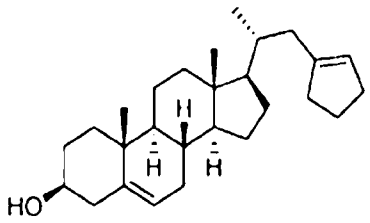
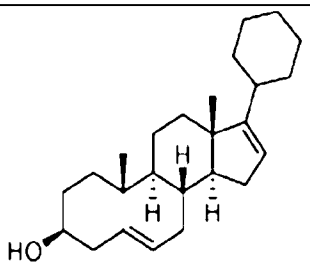
【0531】 在某些實施例中，結構性脂質為類固醇。舉例而言，固醇可包括但不限於膽固醇、β-植物固醇、糞固醇、麥角固醇、植物固醇、菜油固醇、豆固醇、菜子固醇、麥角固醇、番茄次鹼、蕃茄鹼、熊果酸或α-生育酚。

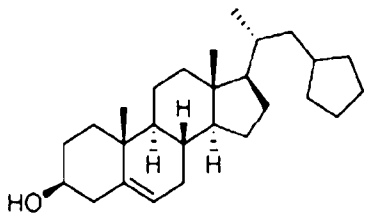
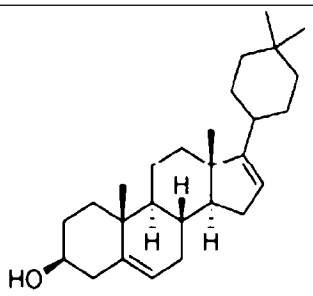
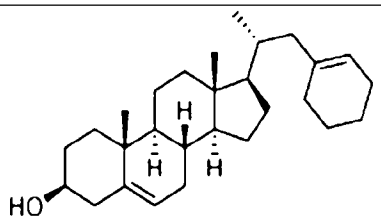
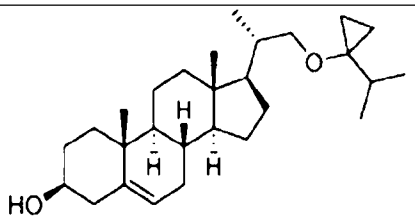
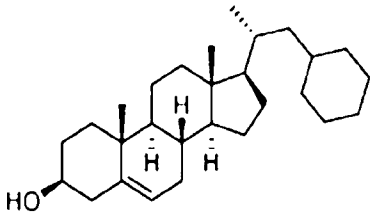
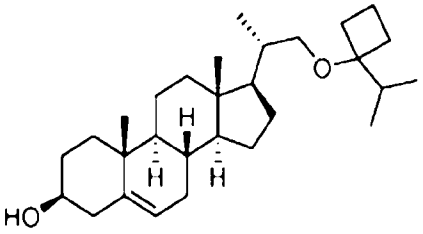
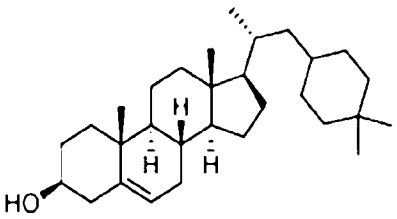
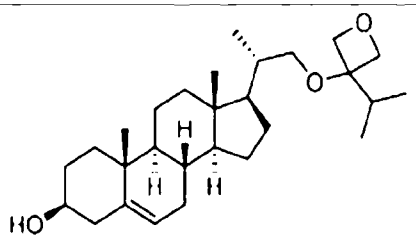
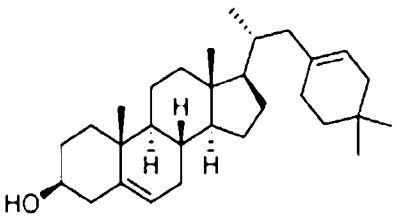
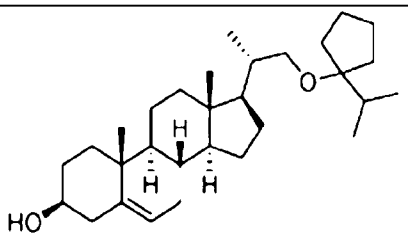
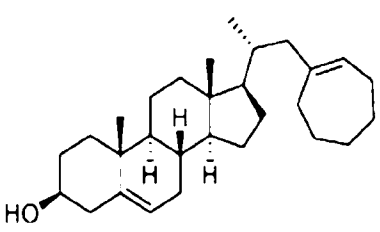
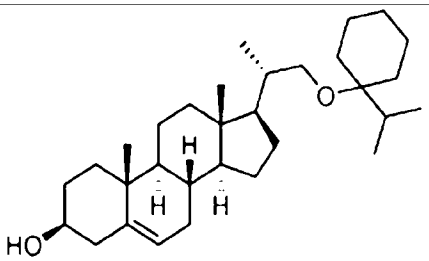
【0532】 在一些實施例中，轉移媒劑包括有效量之例如膽固醇類似物或胺基脂質或其組合之免疫細胞遞送增效脂質，當存在於例如脂質奈米粒子之轉移媒劑中時，相對於缺乏免疫細胞遞送增效脂質之轉移媒劑，該脂質可藉由增強細胞結合及/或吸收、內化、胞內遷移及/或加工及/或胞內體逃逸而起作用，及/或可增強免疫細胞之識別及/或與免疫細胞之結合。因此，儘管不意欲受任何特定機制或理論束縛，但在一個實施例中，本發明之結構性脂質或其他免疫細胞遞送增效脂質結合至C1q，或促進包含該脂質之轉移媒劑與C1q之結合。因此，對於用於將核酸分子遞送至免疫細胞之本發明之轉移媒劑的活體外用途，使用包括C1q之培養條件(例如使用包括血清之培養基或向無血清培養基添加外源性C1q)。對於本發明之

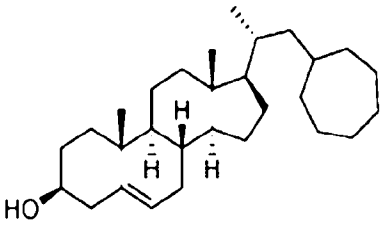
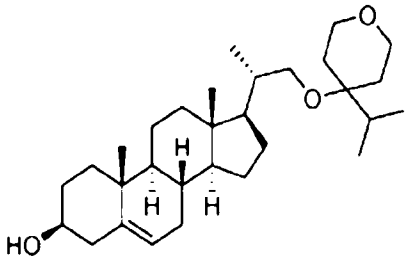
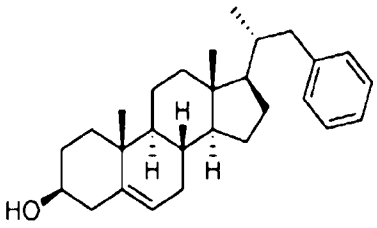
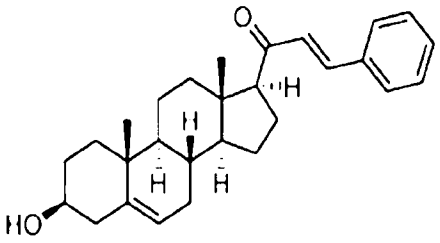
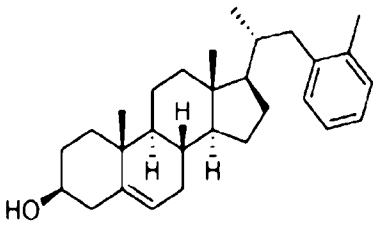
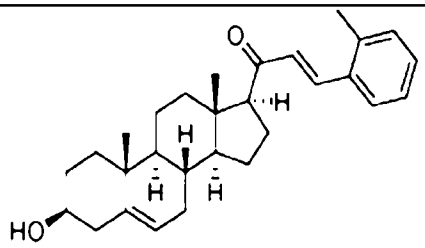
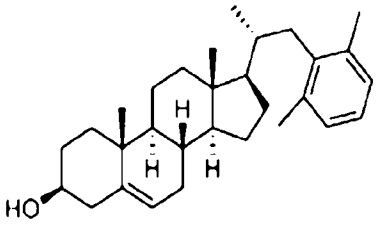
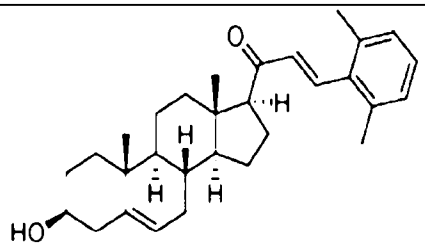
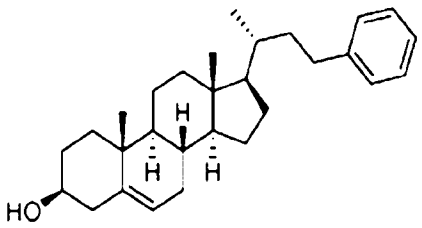
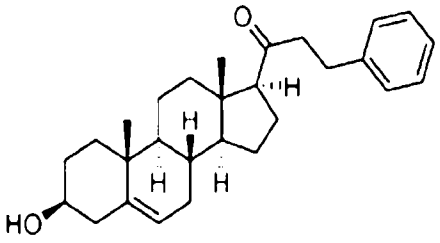
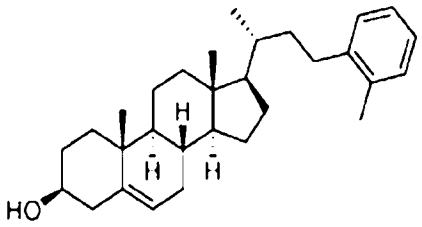
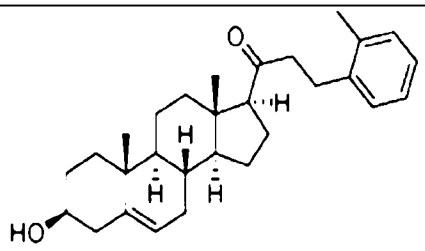
轉移媒劑之活體內用途，對C1q之需求由內源性C1q供應。

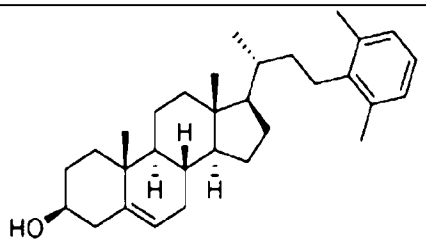
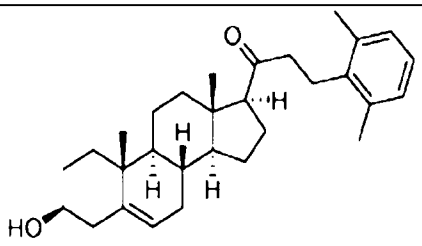
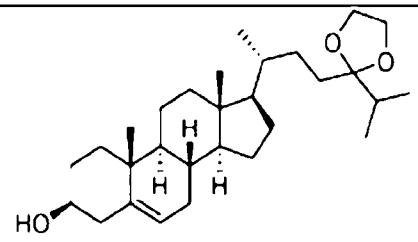
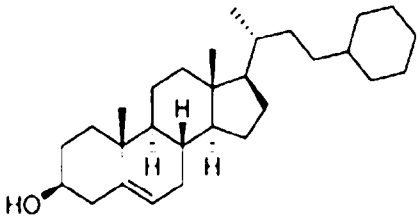
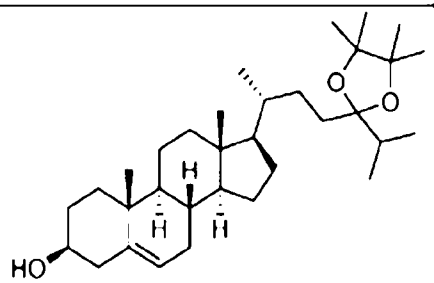
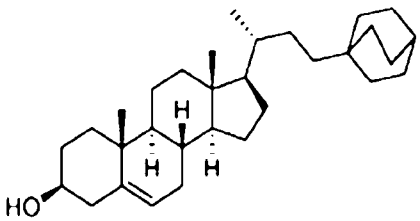
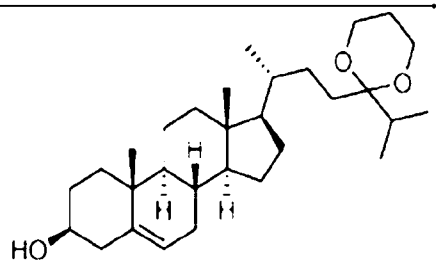
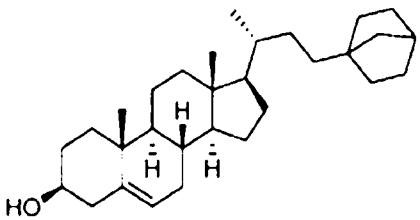
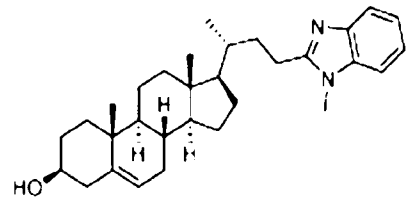
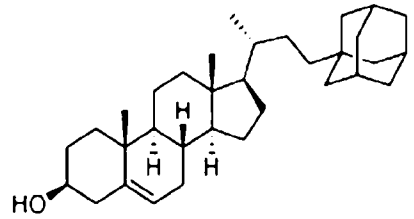
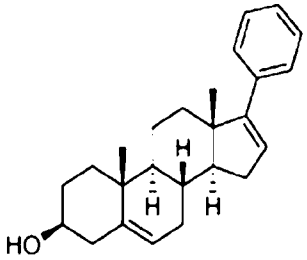
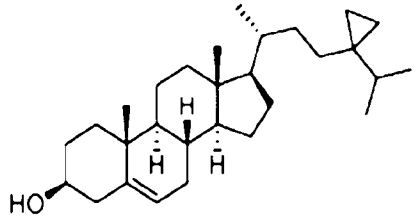
【0533】 在某些實施例中，結構性脂質為膽固醇。在某些實施例中，結構性脂質為膽固醇類似物。在一些實施例中，結構性脂質為表16中之脂質：

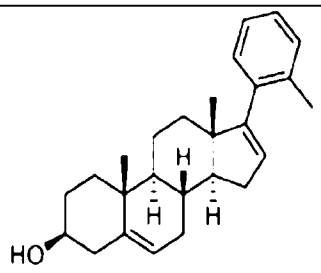
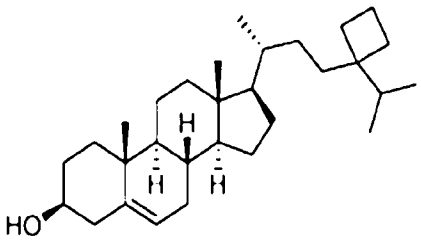
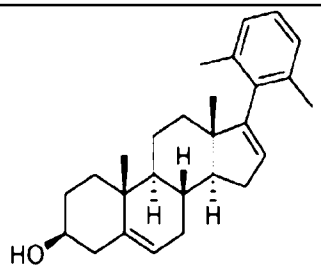
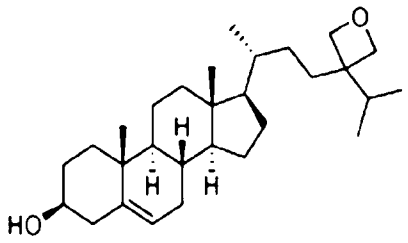
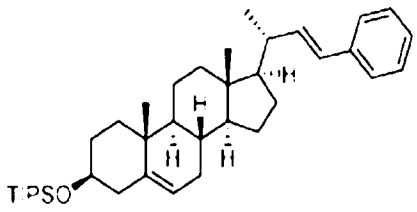
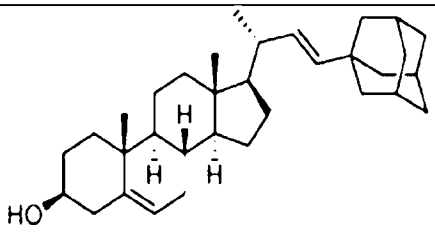
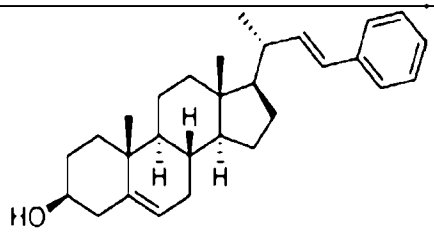
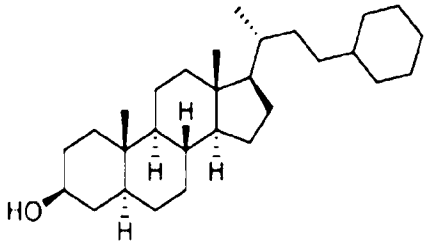
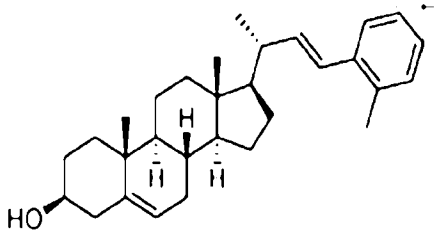
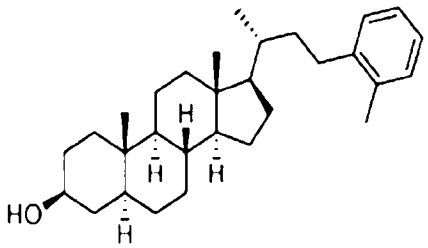
表16

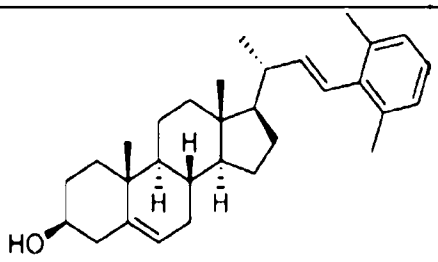
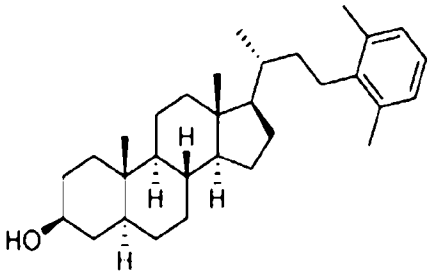
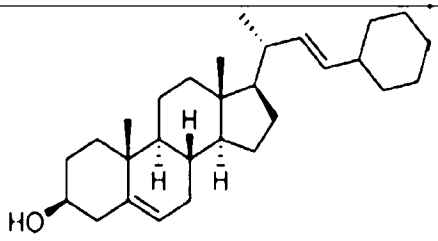
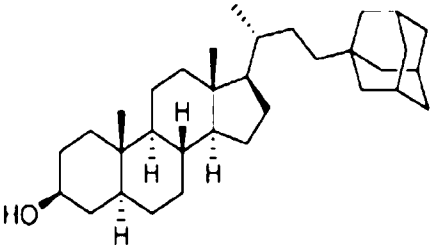
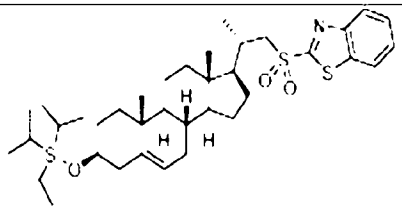
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
1		22	

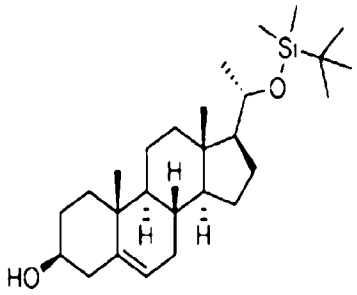
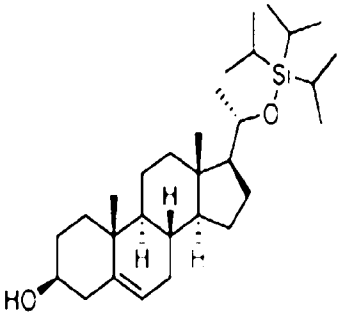
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
2		23	
3		24	
4		25	
5		26	
6		27	
7		28	

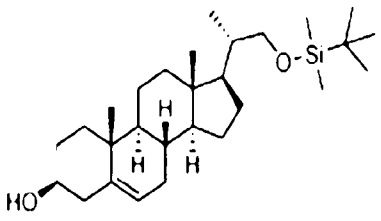
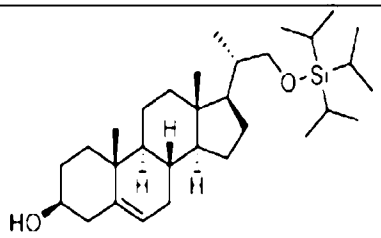
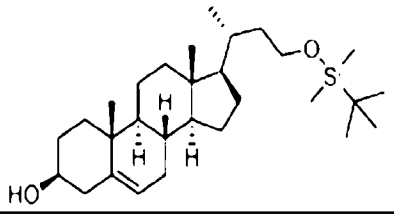
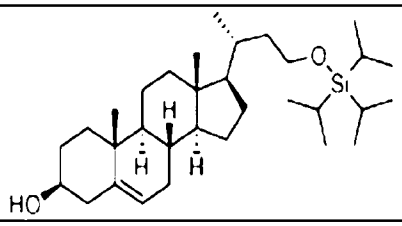
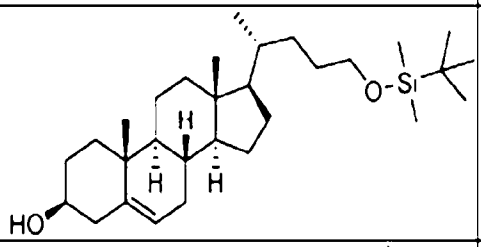
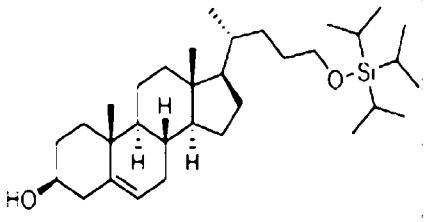
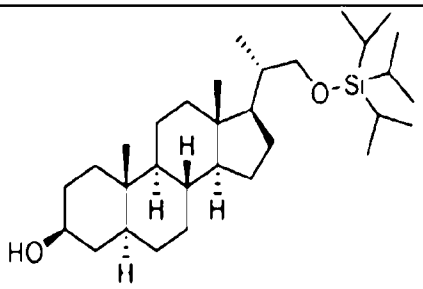
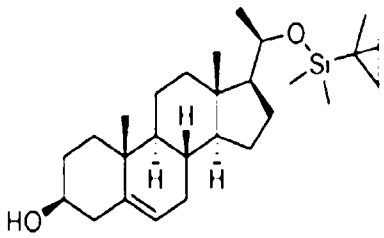
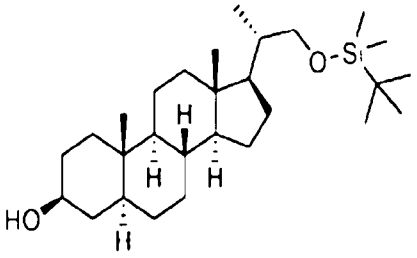
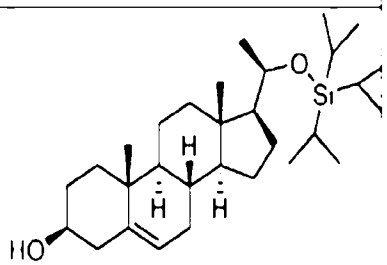
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
8		29	
9		30	
10		31	
11		32	
12		33	
13		34	

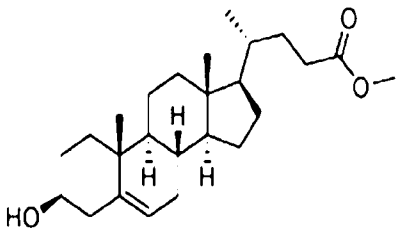
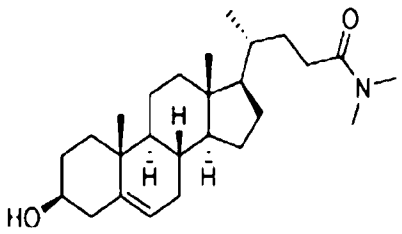
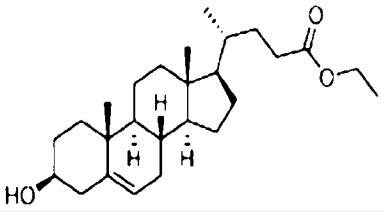
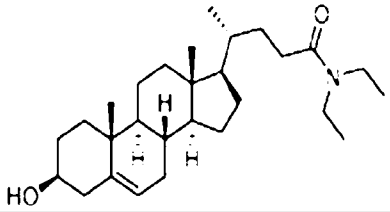
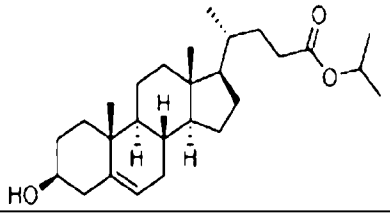
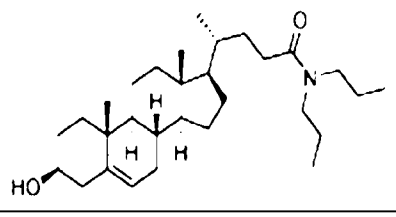
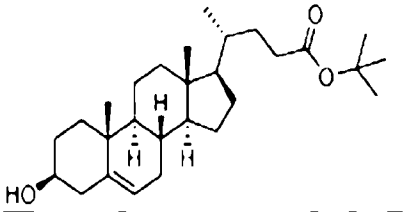
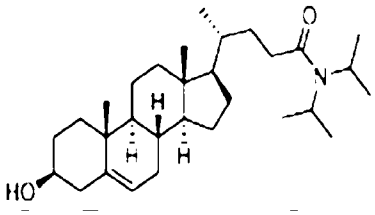
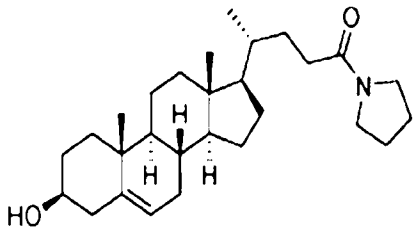
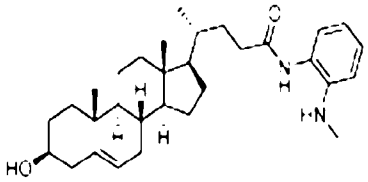
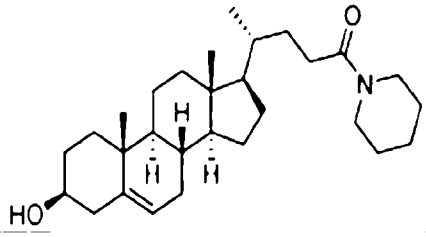
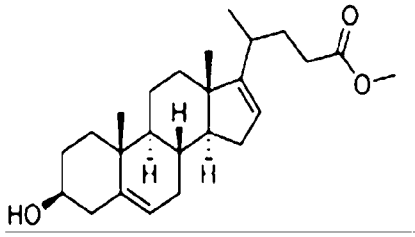
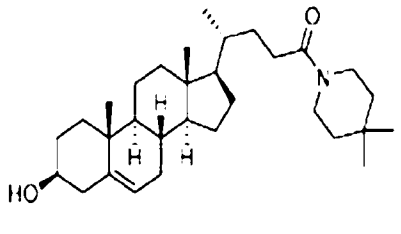
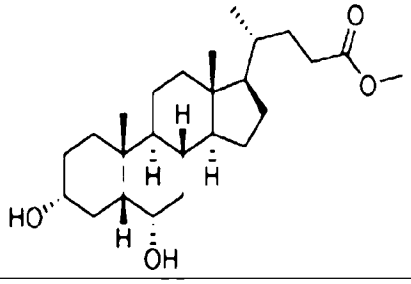
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
14		35	
15		36	
16		37	
17		38	
18		39	
19		40	

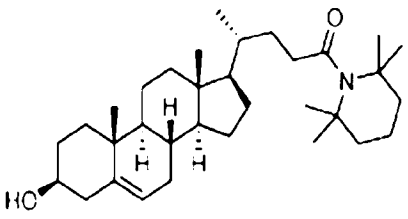
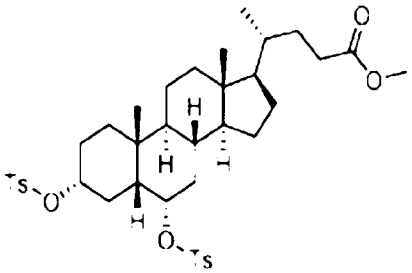
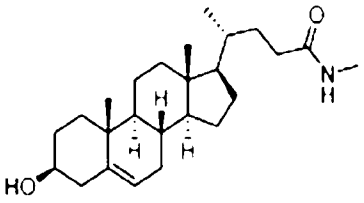
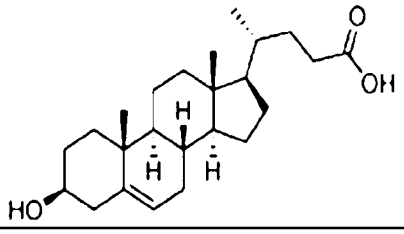
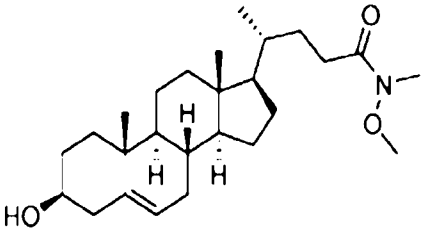
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
20		41	
21		42	
150		165	
154		169	
162		170	

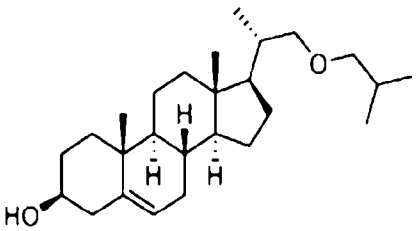
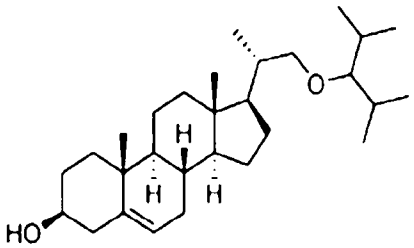
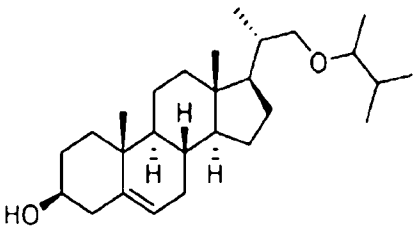
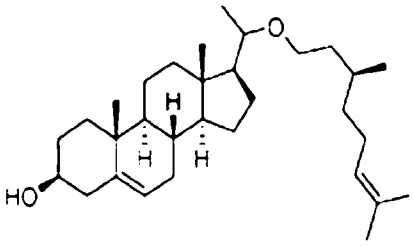
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
163		171	
164		172	
184			

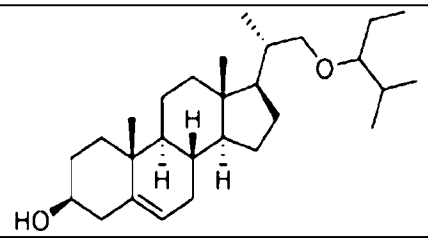
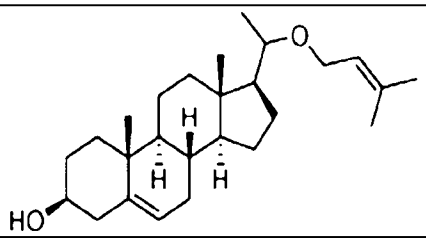
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
43		47	

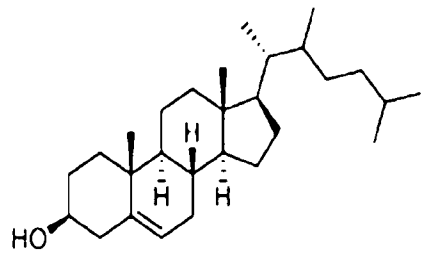
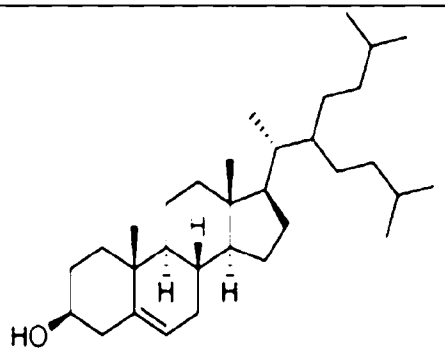
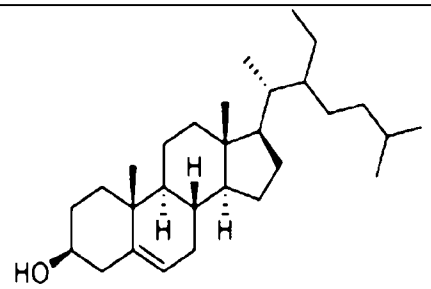
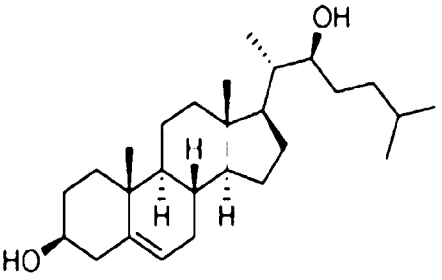
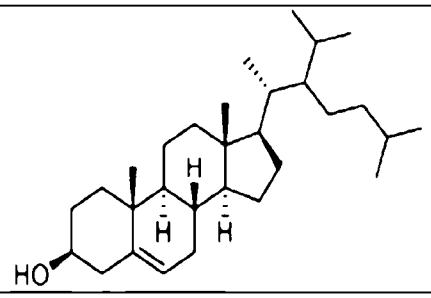
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
44		48	
45		49	
46		50	
175		177	
176		178	

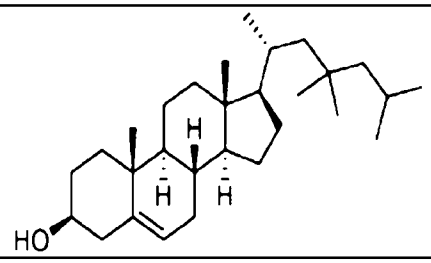
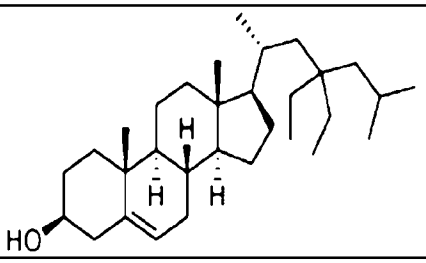
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
51		60	
52		61	
53		62	
54		63	
55		64	
56		65	
57		66	

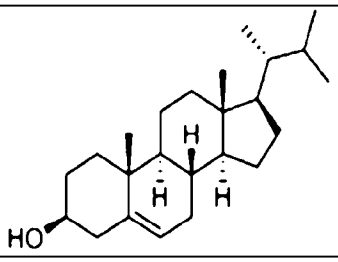
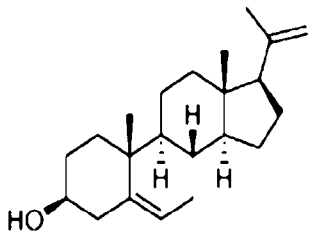
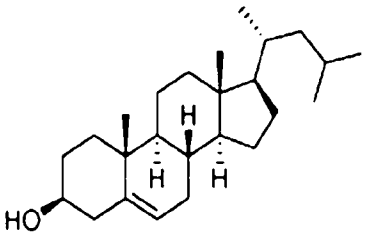
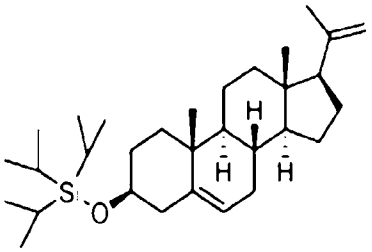
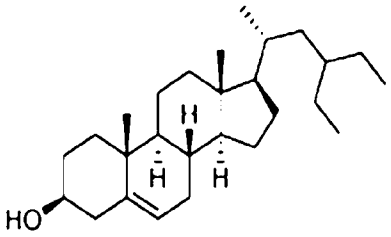
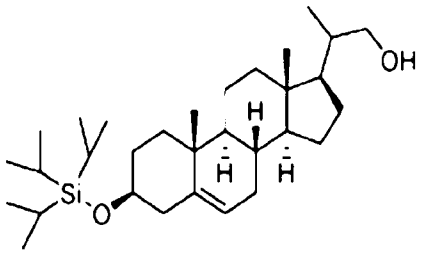
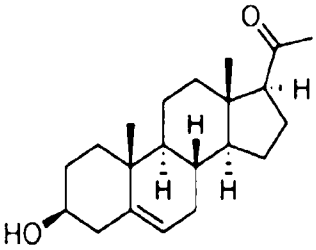
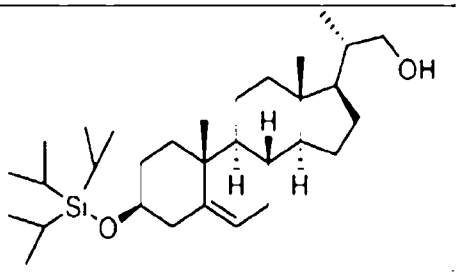
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
58		67	
59		149	
153			

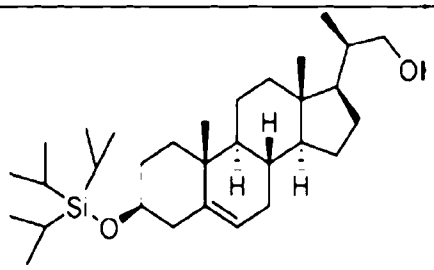
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
68		71	
69		72	

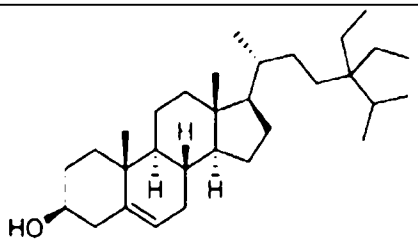
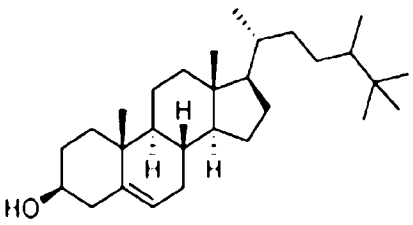
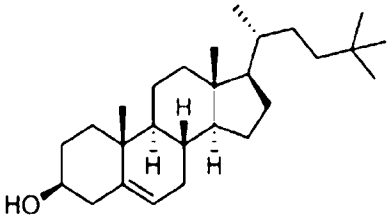
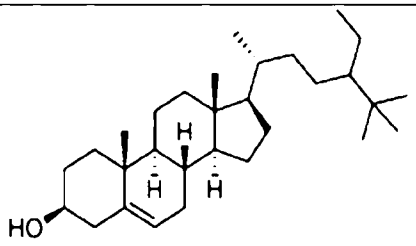
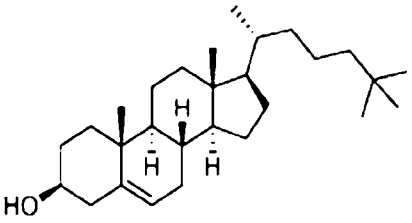
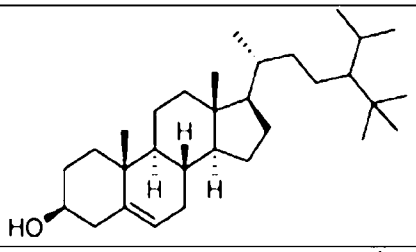
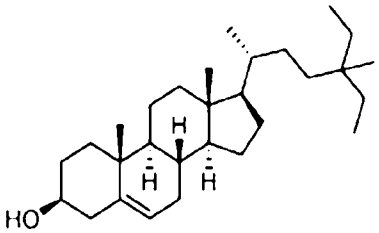
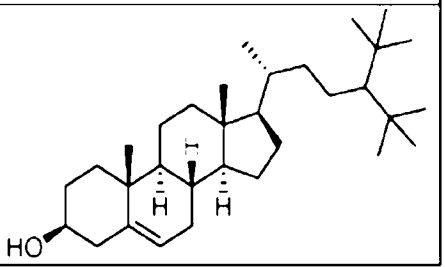
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
70		73	

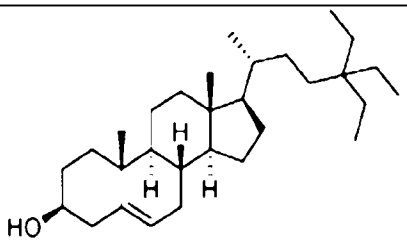
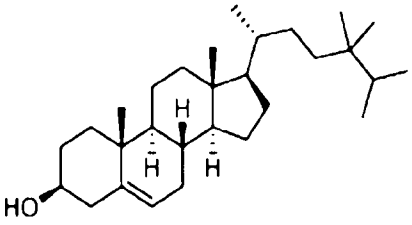
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
74		77	
75		78	
76			

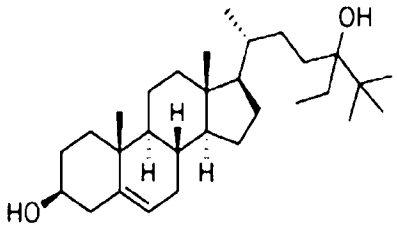
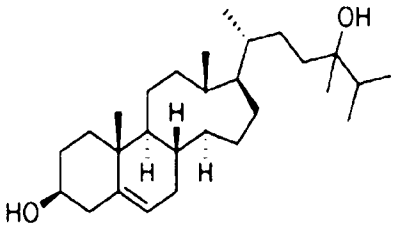
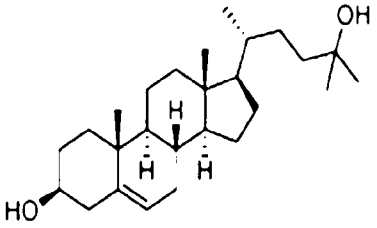
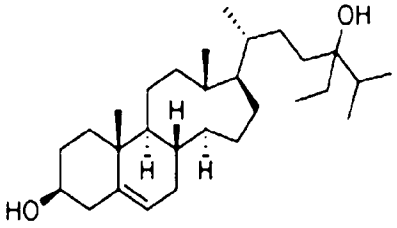
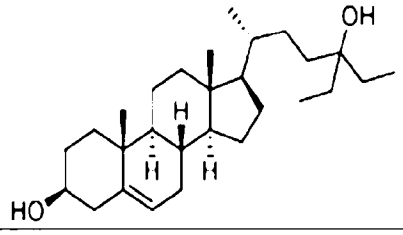
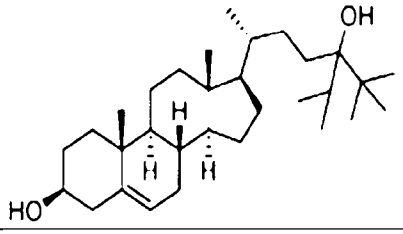
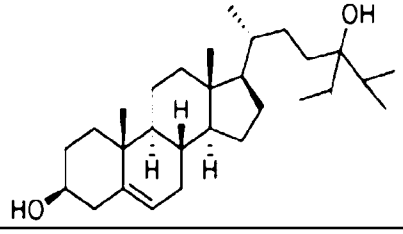
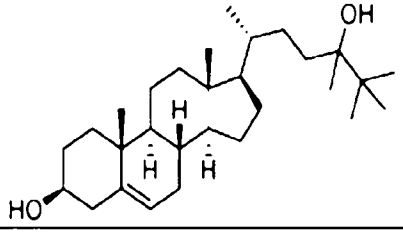
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
79		80	

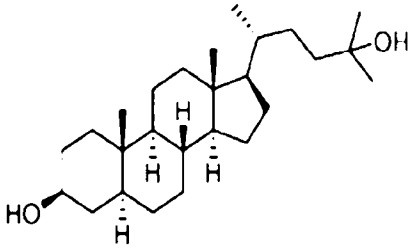
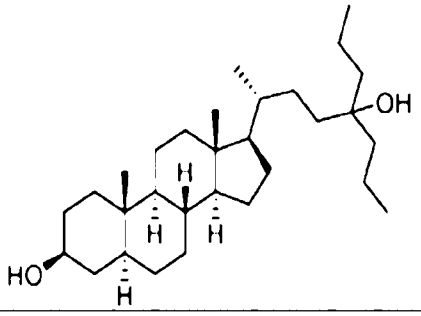
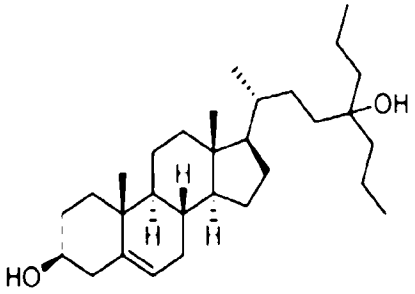
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
81		85	
82		86	
83		87	
84		152	

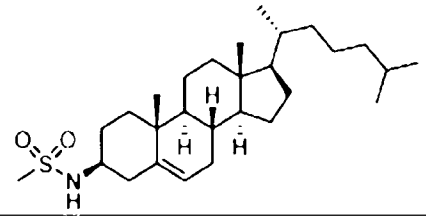
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
157			

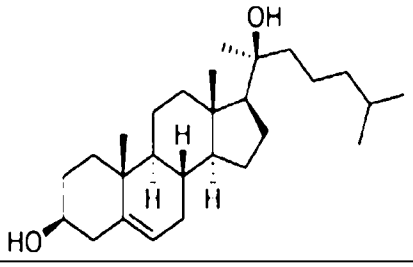
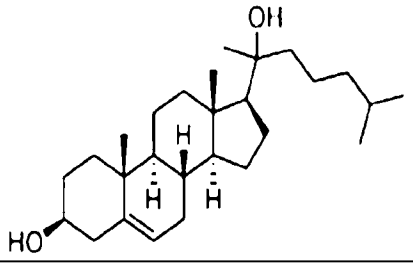
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
88		93	
89		94	
90		95	
91		96	

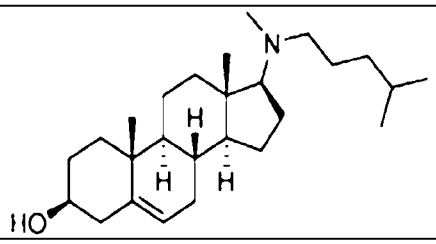
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
92		97	

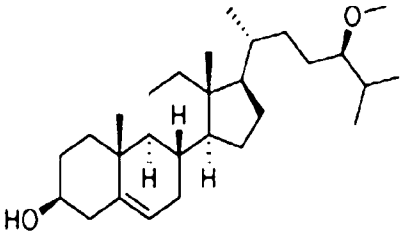
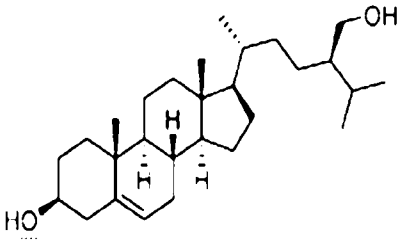
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
98		102	
99		103	
100		104	
101		105	

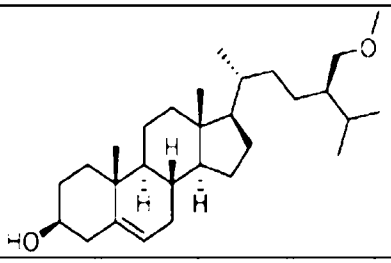
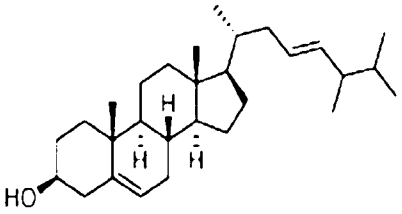
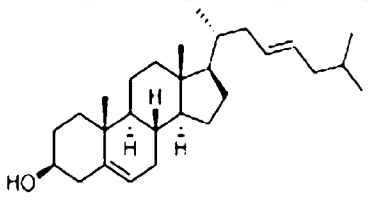
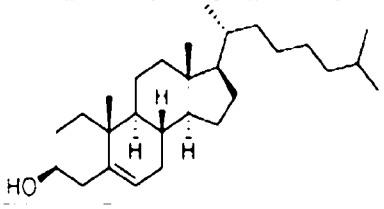
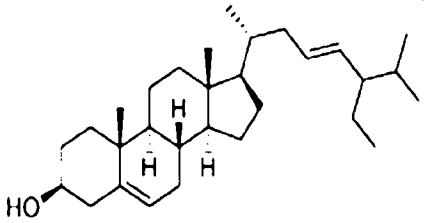
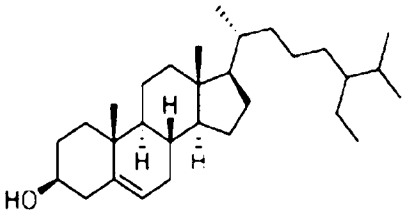
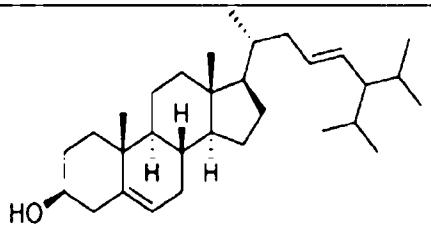
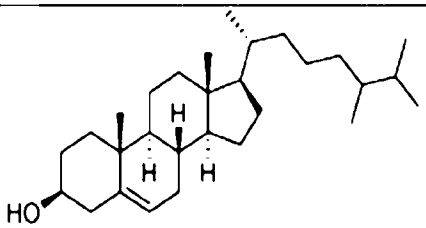
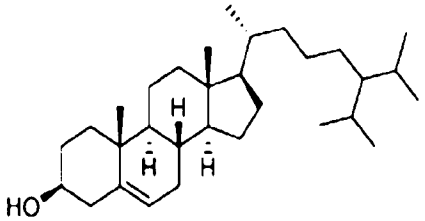
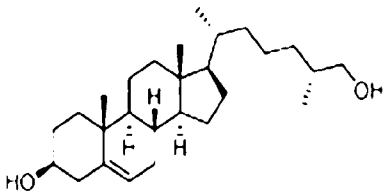
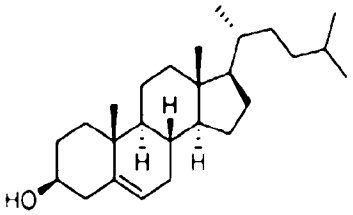
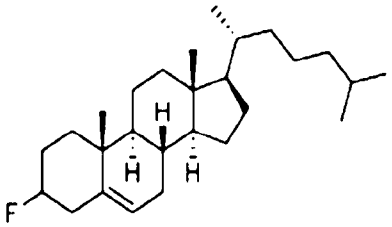
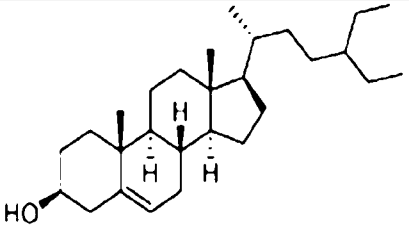
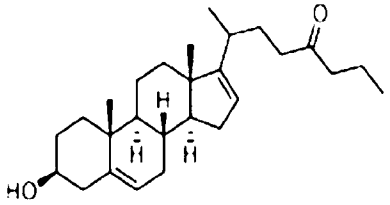
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
180		182	
181			

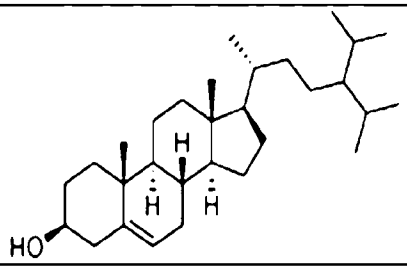
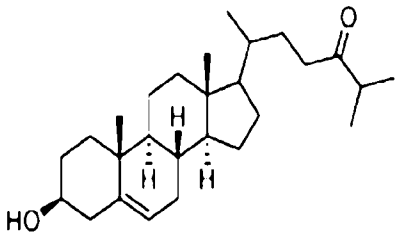
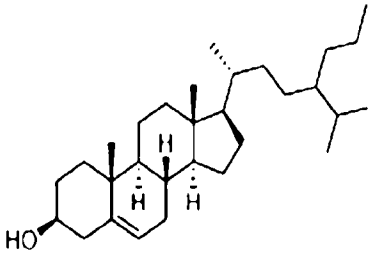
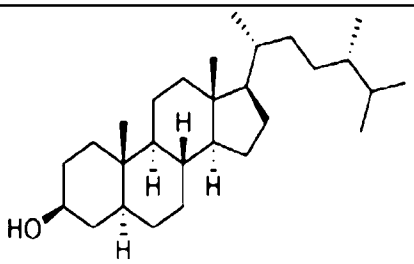
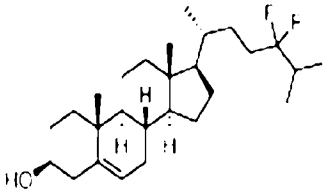
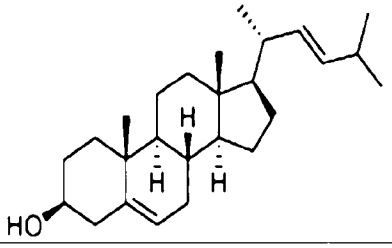
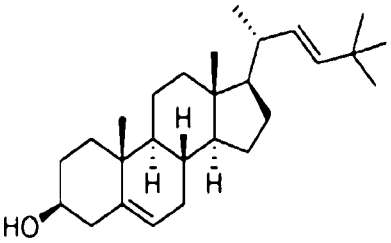
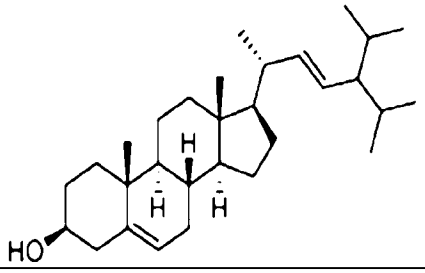
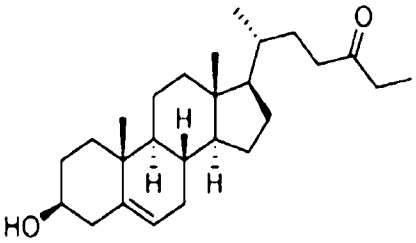
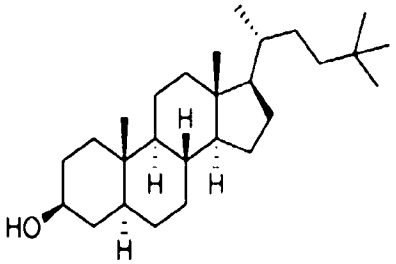
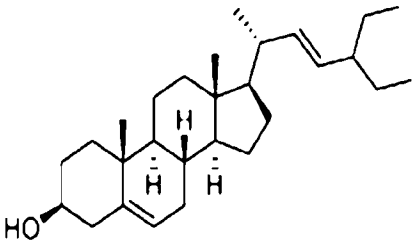
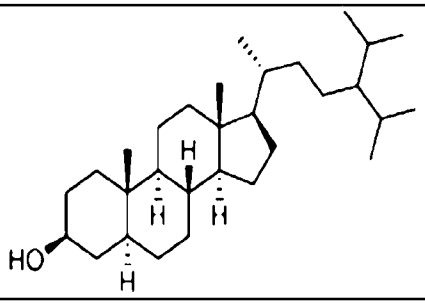
化合物編號S-	結構
106	

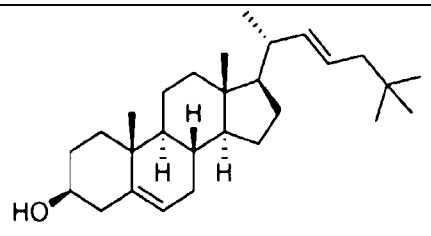
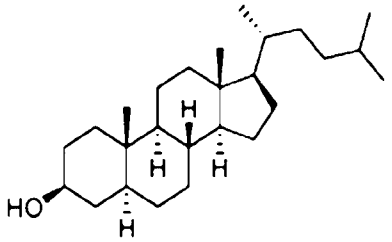
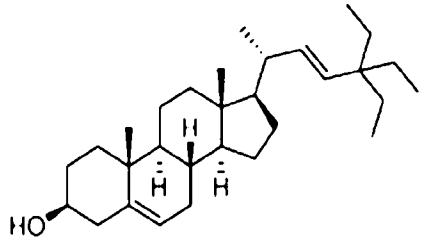
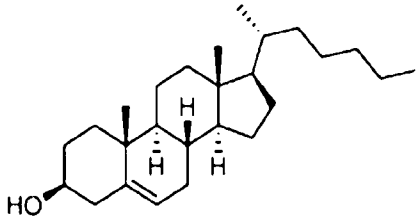
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
107		108	

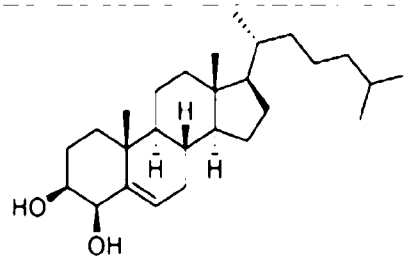
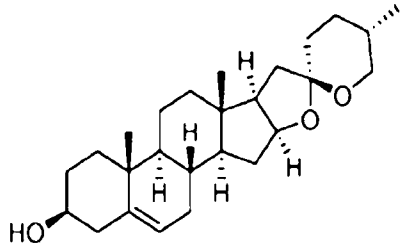
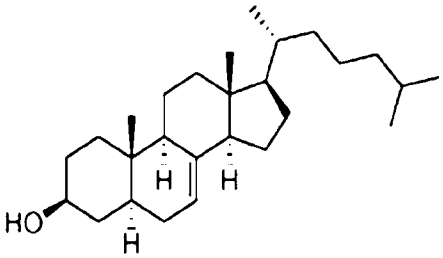
化合物編號S-	結構
109	

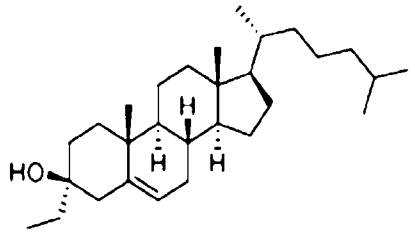
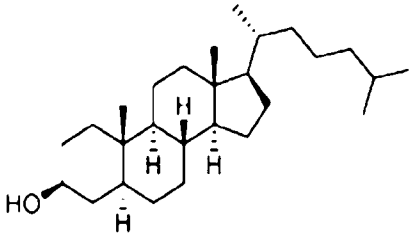
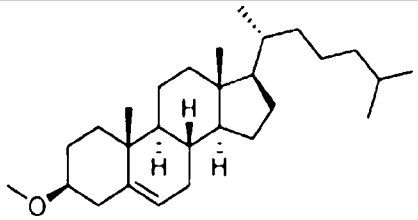
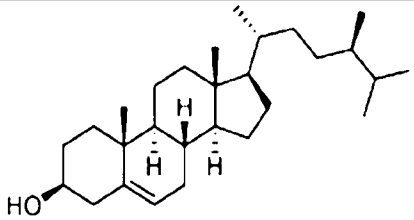
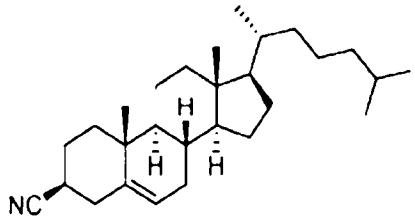
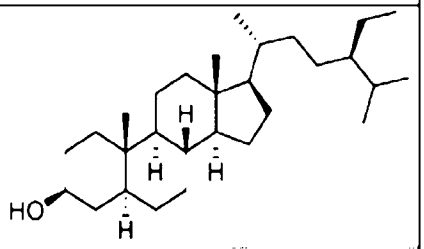
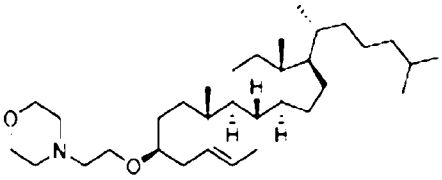
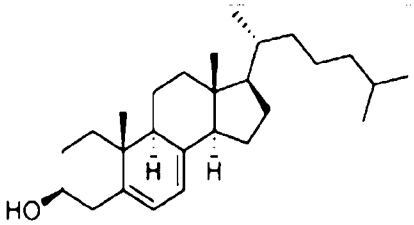
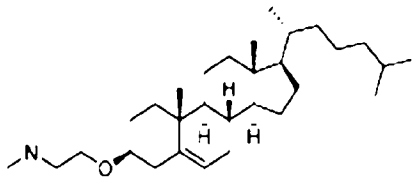
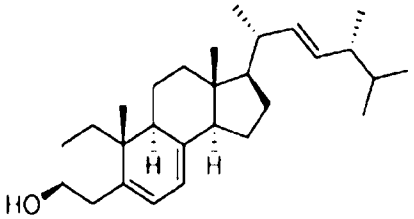
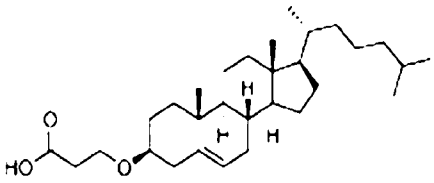
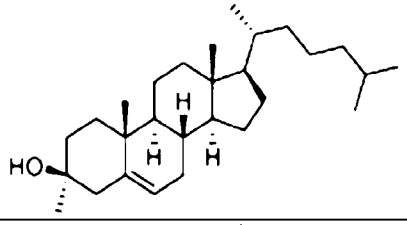
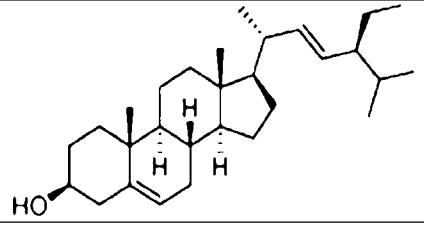
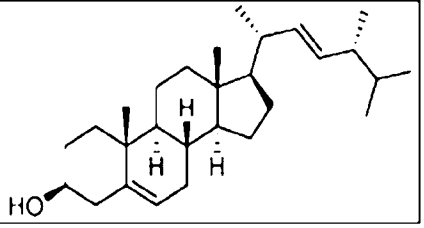
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
110		121	

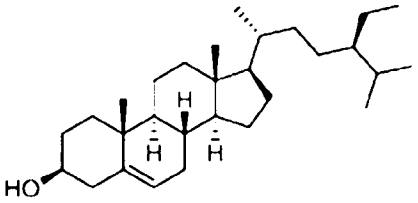
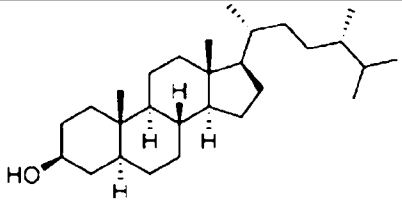
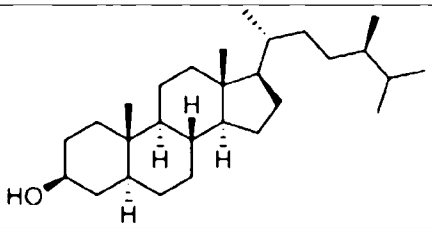
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
111		122	
112		123	
113		124	
114		125	
115		126	
116		127	
117		128	

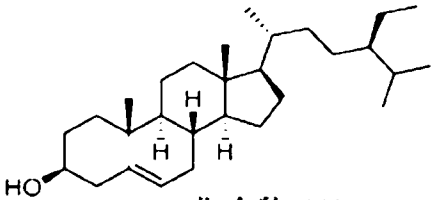
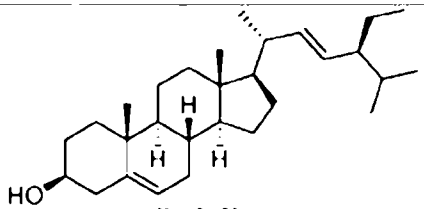
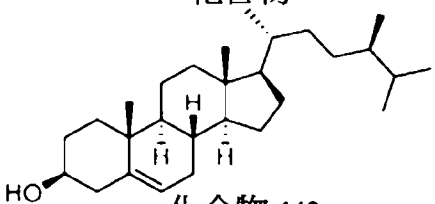
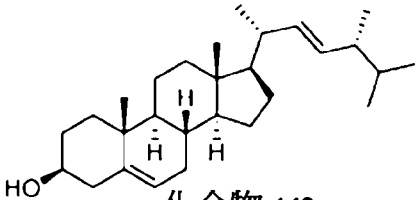
化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
118		129	
119		130	
120		155	
156		167	
158		168	
160		173	

化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
161		174	
166		179	

化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
131		133	
132			

化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
134		142	
135		143	
136		144	
137		145	
138		146	
139		147	
140		148	

化合物編號S-	結構	化合物編號S-	結構
141		151	
159			

組合物S-編號	結構	
183	 化合物 141	 化合物140
	 化合物 143	 化合物 148

E. **脂質奈米粒子(LNP)調配物**

【0534】本文所描述之脂質奈米粒子(LNP)之形成可藉由此項技術中已知之任何方法實現。舉例而言，如美國專利公開案第US2012/0178702 A1號中所描述，該案以全文引用之方式併入本文中。脂質奈米粒子組合物及其製造方法之非限制性實例描述於例如Semple等人(2010) Nat. Biotechnol. 28:172-176；Jayarama等人(2012), Angew. Chem. Int. Ed., 51:8529-8533；及Maier等人(2013) Molecular Therapy 21, 1570-1578 (該等文獻中之各者之內容以全文引用之方式併入本文中)中。

【0535】 在一個實施例中，LNP調配物可藉由例如國際專利公開案第WO 2011/127255號或第WO 2008/103276號中所描述之方法來製備，該等案中之各者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0536】 在一個實施例中，本文所描述之LNP調配物可包含聚陽離子組合物。作為非限制性實例，聚陽離子組合物可為選自美國專利公開案第US2005/0222064 A1號之式1-60之組合物，該案之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0537】 在一個實施例中，脂質奈米粒子可藉由美國專利公開案第US2013/0156845 A1號及國際專利公開案第WO2013/093648 A2號或第WO2012/024526 A2號中所描述之方法來調配，該等案中之各者以全文引用之方式併入本文中。

【0538】 在一個實施例中，本文所描述之脂質奈米粒子可在無菌環境中藉由美國專利公開案第US2013/0164400 A1號中所描述之系統及/或方法來製造，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0539】 在一個實施例中，LNP調配物可在諸如美國專利第8,492,359號中所描述之核酸-脂質粒子之奈米粒子中調配，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0540】 奈米粒子組合物可視情況包含一或多個包衣。舉例而言，可將奈米粒子組合物調配於具有包衣之膠囊、膜或錠劑中。包括本文所描述之組合物的膠囊、膜或錠劑可具有任何適用的大小、抗張強度、硬度或密度。

【0541】 在一些實施例中，本文所描述之脂質奈米粒子可使用包含微流體混合器之方法合成。例示性微流體混合器可包括但不限於：切口叉

指式微混合器(slit interdigital micromixer)，包括但不限於由Precision Nanosystems (Vancouver, BC, Canada)、Microinnova (Allerheiligen bei Wildon, Austria)製造之切口叉指式微混合器；及/或交錯魚脊式微混合器(staggered herringbone micromixer ，SHM) (Zhigaltsev, I.V.等 人(2012) Langmuir. 28:3633-40；Belliveau, N.M.等人Mol. Ther. Nucleic. Acids. (2012) 1:e37；Chen, D.等人J. Am. Chem. Soc. (2012) 134(16):6948-51；該等文獻中之各者以全文引用之方式併入本文中)。

【0542】 在一些實施例中，包含SHM之LNP產生方法進一步包含混合至少兩個輸入流，其中藉由微觀結構誘發之混雜平流(MICA)造成混合。根據此方法，流體流流過以魚脊形圖案存在之通道，從而引起旋轉流動且使流體圍繞彼此摺疊。此方法亦可包含用於流體混合之表面，其中表面在流體循環期間改變取向。使用SHM產生LNP之方法包括美國專利公開案第US2004/0262223 A1號及第US2012/0276209 A1號中所揭示之方法，該等案中之各者以全文引用之方式併入本文中。

【0543】 在一個實施例中，脂質奈米粒子可使用微混合器調配，微混合器諸如但不限於來自Institut fur Mikrotechnik Mainz公司(Mainz Germany)之切口叉指式微結構化混合器(SIMM-V2)或標準切口叉指式微混合器(SSIMM)或Caterpillar (CPMM)或衝擊噴流(IJMM)。在一個實施例中，使用微流體技術產生脂質奈米粒子(參見Whitesides (2006) Nature. 442: 368-373；及Abraham等人(2002) Science. 295: 647-651；該等文獻中之各者以全文引用之方式併入本文中)。作為非限制性實例，受控微流體調配物包括在微通道中以低雷諾數(Reynolds number)混合穩定壓力驅動流之被動方法(參見例如Abraham等人(2002) Science. 295: 647651；該

文獻以全文引用之方式併入本文中)。

【0544】 在一個實施例中，本發明之環狀RNA可在使用微混合器晶片產生之脂質奈米粒子中調配，微混合器晶片諸如但不限於來自Harvard Apparatus (Holliston, MA)、Dolomite Microfluidics (Royston, UK)或Precision Nanosystems (Van Couver, BC, Canada)之微混合器晶片。微混合器晶片可用於以分流及重組合機制快速混合兩個或更多個流體流。

【0545】 在一些實施例中，本發明之LNP包含約40%至約60%之間的莫耳比之可離子化脂質、約3.5%至約14%之間的莫耳比之輔助脂質、約28%至約50%之間的莫耳比之結構性脂質及約0.5%至約5%之間的莫耳比之PEG-脂質，包括所有端點。在一些實施例中，可離子化脂質、輔助脂質、結構性脂質及PEG-脂質在LNP中之總莫耳百分比為100%。

【0546】 在一些實施例中，LNP中可離子化脂質的莫耳比為LNP中存在之總脂質的約40%至約60%。在一些實施例中，LNP中可離子化脂質之莫耳比為LNP中存在之總脂質的約40%、約41%、約42%、約43%、約44%、約45%、約46%、約47%、約48%、約49%、約50%、約51%、約52%、約53%、約54%、約55%、約56%、約57%、約58%、約59%或約60%。在一些實施例中，可離子化脂質由式(7)表示。在一些實施例中，可離子化脂質由式(8)表示。所有值均包括所有端點。

【0547】 在一些實施例中，LNP中輔助脂質的莫耳比為LNP中存在之總脂質的約3.5%至約14%。在一些實施例中，LNP中輔助脂質之莫耳比為LNP中存在之總脂質的約3、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%或約14%。在一些實施例中，輔助脂質為DSPC。在一些實施例中，輔助脂質為DOPE。所有值均包括所有

端點。

【0548】 在一些實施例中，LNP中結構性脂質的莫耳比為LNP中存在之總脂質的約28%至約50%。在一些實施例中，LNP中結構性脂質之莫耳比為LNP中存在之總脂質的約28%、約29%、約30%、約31%、約32%、約33%、約34%、約35%、約36%、約37%、約38%、約39%、約40%、約41%、約42%、約43%、約44%、約45%、約46%、約47%、約48%、約49%或約50%。在一些實施例中，結構性脂質為膽固醇。所有值均包括所有端點。

【0549】 在一些實施例中，LNP中PEG-脂質之莫耳比為LNP中存在之總脂質的約0.5%至約5%。在一些實施例中，LNP中PEG-脂質之莫耳比為LNP中存在之總脂質的約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.1%、約1.2%、約1.3%、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%、約2.0%、約2.1%、約2.2%、約2.3%、約2.4%、約2.5%、約2.6%、約2.7%、約2.8%、約2.9%、約3.0%、約3.1%、約3.2%、約3.3%、3.4%、約3.5%、約4.0%、約4.5%或約5%。在一些實施例中，PEG-脂質為DSPE-PEG(2000)。在一些實施例中，PEG-脂質為DMG-PEG(2000)。所有值均包括所有端點。

【0550】 在一些實施例中，LNP中可離子化脂質:輔助脂質:結構性脂質:PEG-脂質之莫耳比為約45:9:44:2。在一些實施例中，LNP中可離子化脂質:輔助脂質:結構性脂質:PEG-脂質之莫耳比為約50:10:38.5:1.5。在一些實施例中，LNP中可離子化脂質:輔助脂質:結構性脂質:PEG-脂質之莫耳比為約41:12:45:2。在一些實施例中，LNP中可離子化脂質:輔助脂質:結構性脂質:PEG-脂質之莫耳比為約62:4:33:1。在一些實施例中，

LNP中可離子化脂質:輔助脂質:結構性脂質:PEG-脂質之莫耳比為約53:5:41:1。在一些實施例中，可離子化脂質、輔助脂質、結構性脂質及PEG-脂質中之各者之莫耳比在陳述值之10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%或0.01%內。

【0551】 在一個實施例中，脂質奈米粒子之直徑可為約10 nm至約100 nm，諸如但不限於約10 nm至約20 nm、約10 nm至約30 nm、約10 nm至約40 nm、約10 nm至約50 nm、約10 nm至約60 nm、約10 nm至約70 nm、約10 nm至約80 nm、約10 nm至約90 nm、約20 nm至約30 nm、約20 nm至約40 nm、約20 nm至約50 nm、約20 nm至約60 nm、約20 nm至約70 nm、約20 nm至約80 nm、約20 nm至約90 nm、約20 nm至約100 nm、約30 nm至約40 nm、約30 nm至約50 nm、約30 nm至約60 nm、約30 nm至約70 nm、約30 nm至約80 nm、約30 nm至約90 nm、約30 nm至約100 nm、約40 nm至約50 nm、約40 nm至約60 nm、約40 nm至約70 nm、約40 nm至約80 nm、約40 nm至約90 nm、約40 nm至約100 nm、約50 nm至約60 nm、約50 nm至約70 nm、約50 nm至約80 nm、約50 nm至約90 nm、約50 nm至約100 nm、約60 nm至約70 nm、約60 nm至約80 nm、約60 nm至約90 nm、約60 nm至約100 nm、約70 nm至約80 nm、約70 nm至約90 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約90 nm、約80 nm至約100 nm及/或約90 nm至約100 nm。在一個實施例中，脂質奈米粒子之直徑可為約10 nm至500 nm。在一個實施例中，脂質奈米粒子之直徑可大於100 nm、大於150 nm、大於200 nm、大於250 nm、大於300 nm、大於

350 nm、大於400 nm、大於450 nm、大於500 nm、大於550 nm、大於600 nm、大於650 nm、大於700 nm、大於750 nm、大於800 nm、大於850 nm、大於900 nm、大於950 nm或大於1000 nm。各可能性代表本發明之各別實施例。

【0552】 在一些實施例中，奈米粒子(例如脂質奈米粒子)之平均直徑為10-500 nm、20-400 nm、30-300 nm或40-200 nm。在一些實施例中，奈米粒子(例如脂質奈米粒子)之平均直徑為50-150 nm、50-200 nm、80-100 nm或80-200 nm。

【0553】 在一些實施例中，本文所描述之脂質奈米粒子之直徑可為小於0.1 μm至高達1 mm，諸如但不限於小於0.1 μm、小於1.0 μm、小於5 μm、小於10 μm、小於15 μm、小於20 μm、小於25 μm、小於30 μm、小於35 μm、小於40 μm、小於50 μm、小於55 μm、小於60 μm、小於65 μm、小於70 μm、小於75 μm、小於80 μm、小於85 μm、小於90 μm、小於95 μm、小於100 μm、小於125 μm、小於150 μm、小於175 μm、小於200 μm、小於225 μm、小於250 μm、小於275 μm、小於300 μm、小於325 μm、小於350 μm、小於375 μm、小於400 μm、小於425 μm、小於450 μm、小於475 μm、小於500 μm、小於525 μm、小於550 μm、小於575 μm、小於600 μm、小於625 μm、小於650 μm、小於675 μm、小於700 μm、小於725 μm、小於750 μm、小於775 μm、小於800 μm、小於825 μm、小於850 μm、小於875 μm、小於900 μm、小於925 μm、小於950 μm、小於975 μm。

【0554】 在另一實施例中，LNP之直徑可為約1 nm至約100 nm、約1 nm至約10 nm、約1 nm至約20 nm、約1 nm至約30 nm、約1 nm至約40

nm、約1 nm至約50 nm、約1 nm至約60 nm、約1 nm至約70 nm、約1 nm至約80 nm、約1 nm至約90 nm、約5 nm至約100 nm、約5 nm至約10 nm、約5 nm至約20 nm、約5 nm至約30 nm、約5 nm至約40 nm、約5 nm至約50 nm、約5 nm至約60 nm、約5 nm至約70 nm、約5 nm至約80 nm、約5 nm至約90 nm、約10至約50 nM、約20至約50 nm、約30至約50 nm、約40至約50 nm、約20至約60 nm、約30至約60 nm、約40至約60 nm、約20至約70 nm、約30至約70 nm、約40至約70 nm、約50至約70 nm、約60至約70 nm、約20至約80 nm、約30至約80 nm、約40至約80 nm、約50至約80 nm、約60至約80 nm、約20至約90 nm、約30至約90 nm、約40至約90 nm、約50至約90 nm、約60至約90 nm及/或約70至約90 nm。各可能性代表本發明之各別實施例。

【0555】 奈米粒子組合物可為相對均質的。多分散性指數可用於指示奈米粒子組合物之均質性，例如奈米粒子組合物之粒徑分佈。小(例如小於0.3)多分散性指數一般指示窄粒徑分佈。奈米粒子組合物可具有約0至約0.25之多分散性指數，諸如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在一些實施例中，奈米粒子組合物之多分散性指數可為約0.10至約0.20。各可能性代表本發明之各別實施例。

【0556】 奈米粒子組合物之ζ電位可用於指示組合物之動電位。舉例而言，ζ電位可描述奈米粒子組合物之表面電荷。具有相對低之正或負電荷之奈米粒子組合物一般為合乎需要的，此係因為更多高電荷物種可能會不合需要地與細胞、組織及體內其他元件相互作用。在一些實施例中，

奈米粒子組合物之ζ電位可為約-20 mV至約+20 mV、約-20 mV至約+15 mV、約-20 mV至約+10 mV、約-20 mV至約+5 mV、約-20 mV至約0 mV、約-20 mV至約-5 mV、約-20 mV至約-10 mV、約-20 mV至約-15 mV、約-20 mV至約+20 mV、約-20 mV至約+15 mV、約-20 mV至約+10 mV、約-20 mV至約+5 mV、約-20 mV至約0 mV、約0 mV至約+20 mV、約0 mV至約+15 mV、約0 mV至約+10 mV、約0 mV至約+5 mV、約+5 mV至約+20 mV、約+5 mV至約+15 mV或約+5 mV至約+10 mV。各可能性代表本發明之各別實施例。

【0557】 治療劑之囊封效率描述在製備之後經囊封或以其他方式與奈米粒子組合物結合之治療劑相對於所提供之初始量的量。囊封效率宜較高(例如接近100%)。可例如藉由在用一或多種有機溶劑或清潔劑分解奈米粒子組合物之前及之後將含有奈米粒子組合物之溶液中之治療劑的量進行比較來量測囊封效率。可使用螢光以量測溶液中之游離治療劑(例如核酸)之量。對於本文所描述之奈米粒子組合物，治療劑之囊封效率可為至少50%，例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施例中，囊封效率可為至少80%。在某些實施例中，囊封效率可為至少90%。各可能性代表本發明之各別實施例。在一些實施例中，脂質奈米粒子之多多樣性值小於0.4。在一些實施例中，脂質奈米粒子在中性pH下具有淨中性電荷。在一些實施例中，脂質奈米粒子之平均直徑為50-200 nm。

【0558】 脂質奈米粒子調配物之特性可受包括但不限於以下之因素影響：陽離子脂質組分之選擇、陽離子脂質之飽和度、非陽離子脂質組分

之選擇、非陽離子脂質之飽和度、結構性脂質組分之選擇、聚乙二醇化性質、所有組分之比率及諸如尺寸之生物物理學參數。如本文所描述，PEG脂質組分之純度對LNP之特性及效能亦至關重要。

F. **用於脂質奈米粒子(LNP)之方法**

【0559】在一個實施例中，脂質奈米粒子調配物可藉由國際公開案第WO2011127255號或第WO2008103276號中所描述之方法來製備，該等案中之各者以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，脂質奈米粒子調配物可如國際公開案第WO2019131770號中所描述，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0560】在一些實施例中，環狀RNA係根據美國專利申請案15/809,680中所描述之方法來調配。在一些實施例中，本發明提供將環狀RNA囊封於轉移媒劑中之方法，其包含以下步驟：使脂質形成為預成形之轉移媒劑(亦即在不存在RNA之情況下形成)，且接著將預成形之轉移媒劑與RNA組合。在一些實施例中，與在無預先形成脂質奈米粒子之步驟之情況下(例如將脂質直接與RNA組合)製備之相同RNA調配物相比，新穎調配方法產生在活體外及活體內均具有較高效力(肽或蛋白質表現)及較高功效(生物學上相關之終點改善)以及潛在較好的耐受性之RNA調配物。

【0561】對於RNA之某些陽離子脂質奈米粒子調配物，為了達成RNA之高度囊封，必須加熱於緩衝液(例如檸檬酸鹽緩衝液)中之RNA。在彼等過程或方法中，在調配過程(亦即，加熱單獨組分)之前需要進行加熱，此係因為調配後(奈米粒子形成後)加熱並不會提高脂質奈米粒子中RNA之囊封效率。相比之下，在本發明之新穎方法之一些實施例中，加熱RNA之次序似乎不影響RNA囊封百分比。在一些實施例中，不需要在

調配過程之前或之後對包含預先形成之脂質奈米粒子之溶液、包含RNA之溶液及包含經脂質奈米粒子囊封之RNA之混合溶液中的一或多者進行加熱(亦即維持在環境溫度下)。

【0562】 RNA可提供於待與脂質溶液混合之溶液中，以使得RNA可囊封於脂質奈米粒子中。合適的RNA溶液可為任何含有待以各種濃度囊封之RNA之水溶液。舉例而言，合適的RNA溶液可含有濃度為或大於約0.01 mg/ml、0.05 mg/ml、0.06 mg/ml、0.07 mg/ml、0.08 mg/ml、0.09 mg/ml、0.1 mg/ml、0.15 mg/ml、0.2 mg/ml、0.3 mg/ml、0.4 mg/ml、0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml、0.8 mg/ml、0.9 mg/ml或1.0 mg/ml之RNA。在一些實施例中，合適的RNA溶液可含有濃度在約0.01-1.0 mg/ml、0.01-0.9 mg/ml、0.01-0.8 mg/ml、0.01-0.7 mg/ml、0.01-0.6 mg/ml、0.01-0.5 mg/ml、0.01-0.4 mg/ml、0.01-0.3 mg/ml、0.01-0.2 mg/ml、0.01-0.1 mg/ml、0.05-1.0 mg/ml、0.05-0.9 mg/ml、0.05-0.8 mg/ml、0.05-0.7 mg/ml、0.05-0.6 mg/ml、0.05-0.5 mg/ml、0.05-0.4 mg/ml、0.05-0.3 mg/ml、0.05-0.2 mg/ml、0.05-0.1 mg/ml、0.1-1.0 mg/ml、0.2-0.9 mg/ml、0.3-0.8 mg/ml、0.4-0.7 mg/ml或0.5-0.6 mg/ml範圍內之RNA。

【0563】 通常，合適的RNA溶液亦可含有緩衝劑及/或鹽。一般而言，緩衝劑可包括HEPES、Tris、硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀或磷酸鈉。在一些實施例中，緩衝劑之適合濃度可在約0.1 mM至100 mM、0.5 mM至90 mM、1.0 mM至80 mM、2 mM至70 mM、3 mM至60 mM、4 mM至50 mM、5 mM至40 mM、6 mM至30 mM、7 mM至20 mM、8 mM至15 mM或9 mM至12 mM範圍內。

【0564】 例示性鹽可包括氯化鈉、氯化鎂及氯化鉀。在一些實施例中，RNA溶液中鹽之適合濃度可在約1 mM至500 mM、5 mM至400 mM、10 mM至350 mM、15 mM至300 mM、20 mM至250 mM、30 mM至200 mM、40 mM至190 mM、50 mM至180 mM、50 mM至170 mM、50 mM至160 mM、50 mM至150 mM或50 mM至100 mM範圍內。

【0565】 在一些實施例中，合適的RNA溶液之pH可在約3.5-6.5、3.5-6.0、3.5-5.5、3.5-5.0、3.5-4.5、4.0-5.5、4.0-5.0、4.0-4.9、4.0-4.8、4.0-4.7、4.0-4.6或4.0-4.5範圍內。

【0566】 可使用各種方法製備適用於本發明之RNA溶液。在一些實施例中，RNA可直接溶解於本文所描述之緩衝溶液中。在一些實施例中，可藉由在與用於囊封之脂質溶液混合之前將RNA儲備溶液與緩衝溶液混合來產生RNA溶液。在一些實施例中，可藉由在即將與用於囊封之脂質溶液混合之前將RNA儲備溶液與緩衝溶液混合來產生RNA溶液。

【0567】 根據本發明，脂質溶液含有適合於形成用於囊封RNA之轉移媒劑的脂質混合物。在一些實施例中，合適的脂質溶液為基於乙醇的。舉例而言，合適的脂質溶液可含有溶解於純乙醇(亦即100%乙醇)中之所需脂質之混合物。在另一實施例中，合適的脂質溶液為基於異丙醇的。在另一實施例中，合適的脂質溶液為基於二甲亞碸的。在另一實施例中，合適的脂質溶液為包括但不限於乙醇、異丙醇及二甲亞碸之適合溶劑之混合物。

【0568】 合適的脂質溶液可含有各種濃度之所需脂質之混合物。在一些實施例中，合適的脂質溶液可含有總濃度在約0.1-100 mg/ml、0.5-90 mg/ml、1.0-80 mg/ml、1.0-70 mg/ml、1.0-60 mg/ml、1.0-50

mg/ml、1.0-40 mg/ml、1.0-30 mg/ml、1.0-20 mg/ml、1.0-15 mg/ml、1.0-10 mg/ml、1.0-9 mg/ml、1.0-8 mg/ml、1.0-7 mg/ml、1.0-6 mg/ml或1.0-5 mg/ml範圍內之所需脂質之混合物。

G. **脂質體**

【0569】 在某些實施例中，脂質體或其他脂質雙層囊泡揭示於本文中且可用作組分或整個轉移媒劑以便於或增強環狀RNA至一或多個目標細胞之遞送及釋放。脂質體之特徵通常在於具有藉由一或多個形成微觀袋或囊泡之雙層之膜與外部介質螯合的內部空間。脂質體之雙層膜通常由包含在空間上分離之疏水性域或親水性域之脂質，亦即合成或天然來源之兩親媒性分子形成(Lasic, D及Papahadjopoulos, D.編Medical Applications of Liposomes. Elsevier, Amsterdam, 1998)。

【0570】 在一些實施例中，環狀RNA經囊封，或脂質體可使用包括但不限於機械分散、溶劑分散及/或清潔劑移除之各種方法來製備。此等方法中之各者包括自有機溶劑乾燥脂質、將脂質分散於水性介質中、調整脂質體之大小及純化脂質體懸浮液之步驟(Gomez等人, ACS Omega. 2019. 4(6): 10866-10876)。脂質體之各種其他製備方法可見於Akbarzadeh等人, Nanoscale Res Lett. 2013; 8(1): 102中。在一些實施例中，環狀RNA可被動地裝載(亦即，環狀RNA在脂質體形成期間經囊封)或主動地裝載(亦即，在脂質體形成之後)。

【0571】 在一些實施例中，本文揭示之脂質體可包含一或多個雙層。在某些實施例中，脂質體可包含多層囊泡或單層囊泡。

【0572】 在某些實施例中，如本文所描述之脂質體包含天然衍生或工程改造之磷脂。在一些實施例中，脂質體可進一步包含有助於整體脂質

體結構之穩定性之PEG-脂質。包括但不限於皮質類固醇及其他類固醇之其他改善可用於幫助維持脂質體之結構及穩定性。

H. **樹枝狀聚合物**

【0573】 在某些實施例中，用於輸送環狀RNA之轉移媒劑包含樹枝狀聚合物。「樹枝狀聚合物」之使用描述了轉移媒劑之建築模體。在一些實施例中，樹枝狀聚合物包括但不限於含有內部核心及一或多個自內部核心延伸或連接出之層(亦即，產生)。在一些實施例中，產生物可含有一或多個分支點及連接至最外產生件之末端基之外表面。在某些實施例中，分支點可大部分為單分散的且含有圍繞內部核心建構之對稱分支單元。

【0574】 樹枝狀聚合物之合成可包含發散方法、彙集生長、超核心及分支單體生長、雙重指數生長、樂高化學(lego chemistry)、點擊化學及此項技術中可用之其他方法(Mendes L.等人, Molecules. 2017. 22 (9): 1401進一步描述此等方法)。

I. **基於聚合物之遞送**

【0575】 在某些實施例中，如本文所描述，用於環狀RNA聚核苷酸之轉移媒劑包含聚合物奈米粒子。在一些實施例中，聚合物奈米粒子包括奈米膠囊及奈米球。在一些實施例中，奈米膠囊由聚合殼包圍之油性核構成。在一些實施例中，環狀RNA含於核心內且聚合殼控制環狀RNA之釋放。另一方面，奈米球包含連續聚合物網，其中環狀RNA保留或吸收至表面上。在一些實施例中，由於陽離子與帶負電核酸及細胞膜存在有利的靜電相互作用，因此使用陽離子聚合物來囊封環狀RNA。

【0576】 聚合物奈米粒子可藉由各種方法製備。在一些實施例中，聚合物奈米粒子可藉由奈米沈澱、乳液技術、溶劑蒸發、溶劑擴散、反向

鹽析或此項技術之其他方法來製備。

J. **聚合物-脂質雜交體**

【0577】在某些實施例中，如本文所描述，用於環狀RNA聚核苷酸之轉移媒劑包含聚合物-脂質雜合奈米粒子(LPHNP)。在一些實施例中，LPHNP包含包膜於脂質雙層內之聚合物核心。在一些實施例中，聚合物核心囊封環狀RNA聚核苷酸。在一些實施例中，LPHNP進一步包含外部脂質雙層。在某些實施例中，此外部脂質雙層包含PEG-脂質、輔助脂質、膽固醇或此項技術中已知有助於基於脂質之奈米粒子之穩定性的其他分子。最接近聚合物核心之脂質雙層減少了LPHNP形成期間捕獲之環狀RNA的損失，且藉由防止水自轉移媒劑外部擴散至聚合物核心中來防止聚合物核降解(Mukherjee等人, In J. Nanomedicine. 2019; 14: 1937-1952)。

【0578】存在各種研發及調配LPHNP之方法。在某些實施例中，使用此項技術中可用之一步法或兩步法研發LPHNP。在一些實施例中，用於形成LPHNP之一步法係經由奈米沈澱或乳化-溶劑蒸發進行。在某些實施例中，兩步法包括奈米沈澱、乳化-溶劑蒸發、高壓均質化或此項技術中可用之其他方法。

K. **基於肽之遞送**

【0579】在某些實施例中，可使用基於肽之遞送機制輸送環狀RNA。在一些實施例中，基於肽之遞送機制包含脂蛋白。基於待遞送藥物之大小，脂蛋白可為低密度脂蛋白(LDL)或高密度脂蛋白(HDL)。如US8734853B2中所見，高密度脂蛋白能夠在活體內及活體外輸送核酸。

【0580】在特定實施例中，脂質組分包括膽固醇。在更多特定實施

例中，脂質組分包括膽固醇與膽固醇油酸酯之組合。

【0581】 HDL-核酸粒子可具有任何大小，但在特定實施例中，粒子具有約100埃至約500埃之分子大小。在更特定實施例中，粒子具有約100埃至約300埃之分子大小。大小可視併入粒子中之核酸組分之大小而定。

【0582】 HDL-核酸粒子可具有廣泛範圍之分子量。重量視併入粒子中之核酸之大小而定。舉例而言，在一些實施例中，粒子具有在約100,000道爾頓至約1,000,000道爾頓之間的分子量。在更多特定實施例中，粒子具有在約100,000道爾頓至約500,000道爾頓之間的分子量。在特定實施例中，粒子具有在約100,000道爾頓至約300,000道爾頓之間的分子量。

【0583】 本發明之HDL-核酸粒子可藉由不同方法製造。舉例而言，核酸(例如siRNA)可藉由將核酸與由相鄰帶正電胺基酸構成之肽或多肽合併來中和。舉例而言，如上文所論述，胺基酸序列可包括2個或更多個連續離胺酸殘基。胺基酸序列之正電荷中和帶負電核酸分子。接著，可使用Lacko等人(2002)中所描述之方法將核酸囊封於HDL粒子中。

L. **碳水化合物載劑**

【0584】 在某些實施例中，可使用碳水化合物載劑或糖-奈米膠囊輸送環狀RNA聚核苷酸。在某些實施例中，碳水化合物載劑包含經糖裝飾之奈米粒子、肽結合型樹枝狀聚合物及醣結合型樹枝狀聚合物、基於多醣之奈米粒子及此項技術中可用之其他基於碳水化合物之載劑。如本文所描述，碳水化合物分子之併入可經由合成方式進行。

【0585】 在一些實施例中，碳水化合物載劑包含多醣。此等多醣可

由目標細胞之微生物細胞壁製成。舉例而言，已顯示包含甘露聚糖碳水化合物之碳水化合物載劑成功地遞送mRNA (Son等人, Nano Lett. 2020. 20(3): 1499-1509)。

M. **經聚醣裝飾之奈米粒子/糖奈米粒子**

【0586】 在某些實施例中，如本文所提供，用於環狀RNA之轉移媒劑為糖奈米粒子(GlycoNP)。如此項技術中已知，糖奈米粒子含有包含金、氧化鐵、半導體奈米粒子或其組合之核心。在一些實施例中，使用碳水化合物使糖奈米粒子功能化。在某些實施例中，糖奈米粒子包含碳奈米管或石墨烯。在一個實施例中，糖奈米粒子包含基於多醣之GlycoNP (例如基於幾丁聚醣之GlycoNP)。在某些實施例中，糖奈米粒子為糖樹枝狀聚合物。

7. 蛋白質與IRES之組合

【0587】 在某些實施例中，如本文所提供，由環狀RNA聚核苷酸編碼之有效裝載可經由使用轉譯起始元件(TIE)內之特異性內部核糖體進入位點(IRES)最佳化。在一些實施例中，環狀RNA內之IRES特異性可顯著增強編碼元件內經編碼之特異性蛋白質的表現。

8. 靶向

A. **靶向方法**

【0588】 本發明亦考慮藉由被動及主動靶向方式差別靶向目標細胞及組織。被動靶向現象利用活體內轉移媒劑天然分佈模式而不依賴於使用額外賦形劑或用於增強目標細胞識別轉移媒劑之方式。舉例而言，經受網狀內皮系統細胞之吞噬作用之轉移媒劑可能會積聚於肝或脾中，且因此可提供用於被動地導引組合物至此類目標細胞之遞送的方式。

【0589】 或者，本發明考慮活性靶向，其涉及使用可結合(共價或非共價)至轉移媒劑以促進該轉移媒劑在某些目標細胞或目標組織處之定位的靶向部分。舉例而言，靶向可藉由在轉移媒劑中或轉移媒劑上包括一或多個內源性靶向部分來介導，以促進向目標細胞或組織之分佈。目標組織識別靶向部分有效地促進轉移媒劑及/或其內容物在目標細胞及組織中之組織分佈及細胞吸收(例如在轉移媒劑中或轉移媒劑上包括脂蛋白元-E靶向配體促進了轉移媒劑之識別及與由肝細胞表現之內源性低密度脂蛋白受體的結合)。如本文所提供，該組合物可包含能夠增強該組合物對目標細胞之親和力的部分。靶向部分可在調配期間或調配後連接至脂質粒子之外部雙層。此等方法為此項技術中熟知的。另外，一些脂質粒子調配物可採用諸如PEAA、血球凝集素、其他脂肽(參見美國專利申請案第08/835,281號及第60/083,294號，該等案以引用之方式併入本文中)及可用於活體內及/或胞內遞送之其他特徵的促融聚合物。在其他一些實施例中，本發明之組合物展現改善之轉染功效，及/或展現增強之針對所關注目標細胞或組織之選擇性。因此，考慮包含一或多個能夠增強組合物及其核酸內容物針對目標細胞或組織之親和力之部分(例如肽、適體、寡核苷酸、維生素或其他分子)的組合物。合適的部分可視情況結合或連接至轉移媒劑之表面。在一些實施例中，靶向部分可跨越轉移媒劑之表面或囊封於轉移媒劑內。合適的部分及係基於其物理、化學或生物特性(例如目標細胞表面標記或構件之選擇性親和力及/或識別)來進行選擇。細胞特異性目標位點及其對應靶向配體可廣泛變化。選擇合適的靶向部分以使得採用目標細胞之獨特特徵，因此允許組合物區分目標細胞與非目標細胞。舉例而言，本發明之組合物可包括選擇性增強對肝細胞之識別或對肝細胞之親和力(例如

藉由受體介導之對此類表面標記之識別及與此類表面標記之結合)的表面標記(例如脂蛋白元-B或脂蛋白元-E)。作為一實例，將預期使用半乳糖作為靶向部分以將本發明組合物導引至實質肝細胞，或者將預期使用含有糖殘基之甘露糖作為靶向配體以將本發明之組合物導引至肝內皮細胞(例如含有可優先結合於肝細胞中存在之去唾液酸醣蛋白受體之糖殘基的甘露糖)。(參見Hillery A M等人「Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists」(2002) Taylor & Francis Inc.) 因此，已結合至轉移媒劑中存在之部分(例如脂質奈米粒子)之此類靶向部分之呈現促進目標細胞及組織中本發明之組合物的識別及吸收。合適的靶向部分之實例包括一或多種肽、蛋白質、適體、維生素及寡核苷酸。

【0590】 在特定實施例中，轉移媒劑包含靶向部分。在一些實施例中，靶向部分將受體介導之胞吞作用選擇性介導至特定細胞群體中。在一些實施例中，靶向部分能夠結合至T細胞抗原。在一些實施例中，靶向部分能夠結合至NK、NKT或巨噬細胞抗原。在一些實施例中，靶向部分能夠結合至選自CD3、CD4、CD8、PD-1、4-1BB及CD2之群之蛋白質。在一些實施例中，靶向部分為單鏈Fv (scFv)片段、奈米抗體、肽、基於肽之大環、微型抗體、重鏈可變區、輕鏈可變區或其片段。在一些實施例中，靶向部分選自T細胞受體模體抗體、T細胞α鏈抗體、T細胞β鏈抗體、T細胞γ鏈抗體、T細胞δ鏈抗體、CCR7抗體、CD3抗體、CD4抗體、CD5抗體、CD7抗體、CD8抗體、CD11b抗體、CD11c抗體、CD16抗體、CD19抗體、CD20抗體、CD21抗體、CD22抗體、CD25抗體、CD28抗體、CD34抗體、CD35抗體、CD40抗體、CD45RA抗體、CD45RO抗體、CD52抗體、CD56抗體、CD62L抗體、CD68抗體、CD80抗體、

CD95抗體、CD117抗體、CD127抗體、CD133抗體、CD137 (4-1BB)抗體、CD163抗體、F4/80抗體、IL-4Rα抗體、Sca-1抗體、CTLA-4抗體、GITR抗體GARP抗體、LAP抗體、顆粒酶B抗體、LFA-1抗體、運鐵蛋白受體抗體及其片段。在一些實施例中，靶向部分為淋巴球上之胞外酶之小分子結合劑。胞外酶之小分子結合劑包括A2A抑制劑CD73抑制劑、CD39或腺苷受體A2aR及A2bR。潛在小分子包括AB928。

【0591】在一些實施例中，轉移媒劑如Shobaki N, Sato Y, Harashima H. Mixing lipids to manipulate the ionization status of lipid nanoparticles for specific tissue targeting. Int J Nanomedicine. 2018;13:8395-8410. 公開於2018年12月10日中所描述經調配及/或靶向。在一些實施例中，轉移媒劑由3種脂質類型構成。在一些實施例中，轉移媒劑由4種脂質類型構成。在一些實施例中，轉移媒劑由5種脂質類型構成。在一些實施例中，轉移媒劑由6種脂質類型構成。

B. **目標細胞**

【0592】在需要將核酸遞送至免疫細胞之情況下，免疫細胞代表目標細胞。在一些實施例中，本發明之組合物在差別基礎上轉染目標細胞(亦即，不轉染非目標細胞)。亦可製備用於優先靶向包括但不限於T細胞、B細胞、巨噬細胞及樹突狀細胞之各種目標細胞的本發明之組合物。

【0593】在一些實施例中，目標細胞缺乏所關注之蛋白質或酶。舉例而言，在需要將核酸遞送至肝細胞之情況下，肝細胞代表目標細胞。在一些實施例中，本發明之組合物在差別基礎上轉染目標細胞(亦即，不轉染非目標細胞)。亦可製備用於優先靶向包括但不限於以下之各種目標細胞的本發明之組合物：肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、內皮細

胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神經細胞(例如腦膜細胞、星形細胞、運動神經元細胞、背根節細胞及前角運動神經元細胞)、感光受體細胞(例如桿狀體及錐體)、視網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心臟細胞、脂肪細胞、血管平滑肌細胞、心肌細胞、骨骼肌細胞、β細胞、腦垂體細胞、滑液襯裡細胞、卵巢細胞、睾丸細胞、纖維母細胞、B細胞、T細胞、網狀紅血球、白血球、顆粒球及腫瘤細胞。

【0594】 可製備用於優先分佈至諸如心臟、肺、腎、肝及脾中之目標細胞的本發明之組合物。在一些實施例中，本發明之組合物分佈至肝或脾之細胞中以便於包含於其中之環狀RNA之遞送及隨後肝之細胞(例如肝細胞)或脾之細胞(例如免疫細胞)對其之表現。靶向細胞可充當能夠產生且全身分泌功能蛋白或酶之生物「儲集器」或「儲槽」。因此，在本發明之一個實施例中，轉移媒劑可靶向肝細胞或免疫細胞及/或在遞送時優先分佈至肝臟或脾臟之細胞。在一實施例中，在轉染目標肝細胞或免疫細胞之後，媒劑中所裝載之環狀RNA經轉譯，且產生、排出及全身分佈功能蛋白產物。在其他實施例中，除肝細胞以外之細胞(例如，肺、脾臟、心臟、眼或中樞神經系統之細胞)可充當用於蛋白質生產之儲槽位置。

【0595】 在一個實施例中，本發明之組合物促進個體之一或多種功能蛋白及/或酶之內源性產生。在本發明之一實施例中，轉移媒劑包含編碼缺陷型蛋白質或酶之環狀RNA。在此類組合物分佈至目標組織且隨後轉染此類目標細胞後，可在活體內轉譯裝載至轉移媒劑(例如脂質奈米粒子)中之外源性環狀RNA以產生由外源性投與之環狀RNA編碼之功能蛋白質或酶(例如個體所缺乏之蛋白質或酶)。因此，本發明之組合物利用個體轉譯外源性或以重組方式製備之環狀RNA以產生經內源性轉譯之蛋白質

或酶且藉此產生(且在適用時分泌)功能蛋白質或酶的能力。經表現或轉譯之蛋白質或酶之特徵亦可在於活體內包括天然轉譯後修飾，該等修飾通常可能不存在於以重組方式製備之蛋白質或酶中，藉此進一步降低經轉譯之蛋白質或酶之免疫原性。

【0596】 投與編碼缺陷型蛋白質或酶之環狀RNA避免了對將核酸遞送至目標細胞內之特定胞器的需要。更確切而言，在轉染目標細胞且將核酸遞送至目標細胞之細胞質後，可轉譯轉移媒劑之環狀RNA內容物且表現功能蛋白質或酶。

【0597】 在一些實施例中，環狀RNA包含一或多個miRNA結合位點。在一些實施例中，環狀RNA包含一或多個由miRNA識別之miRNA結合位點，該miRNA存在於一或多個非目標細胞或非目標細胞類型(例如庫弗細胞(Kupffer cell)或肝細胞)中且不存在於一或多個目標細胞或目標細胞類型(例如肝細胞或T細胞)中。在一些實施例中，環狀RNA包含一或多個由miRNA識別之miRNA結合位點，與一或多個目標細胞或目標細胞類型(例如肝細胞或T細胞)相比，該miRNA以增加之濃度存在於一或多個非目標細胞或非目標細胞類型(例如庫弗細胞或肝細胞)中。認為miRNA藉由與RNA分子內之互補序列配對而起作用，從而引起基因靜默。

【0598】 在一些實施例中，本發明之組合物在差別基礎上轉染目標細胞或分佈至目標細胞(亦即，不轉染非目標細胞)。亦可製備用於優先靶向包括但不限於以下之各種目標細胞的本發明之組合物：肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、內皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神經細胞(例如腦膜細胞、星形細胞、運動神經元細胞、背根節細胞及前角運動神經元細胞)、感光受體細胞(例如桿狀體及錐體)、視網膜色

素上皮細胞、分泌細胞、心臟細胞、脂肪細胞、血管平滑肌細胞、心肌細胞、骨骼肌細胞、β細胞、腦垂體細胞、滑液襯裡細胞、卵巢細胞、睾丸細胞、纖維母細胞、B細胞、T細胞、網狀紅血球、白血球、顆粒球及腫瘤細胞。

9. 醫藥組合物

【0599】 在某些實施例中，本文提供包含本文所提供之治療劑的組合物(例如醫藥組合物)。在一些實施例中，治療劑為本文提供之環狀RNA聚核苷酸。在一些實施例中，治療劑為本文所提供之載體。在一些實施例中，治療劑為包含本文所提供之環狀RNA或載體之細胞(例如人類細胞，諸如人類T細胞)。在某些實施例中，該組合物進一步包含醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，本文提供之組合物包含本文提供之治療劑與其他醫藥活性劑或藥物(諸如能夠靶向B細胞抗原之抗炎藥或抗體，例如抗CD20抗體，例如利妥昔單抗(rituximab))的組合。

【0600】 就醫藥組合物而言，醫藥學上可接受之載劑可為習知使用之彼等者中之任一者，且僅受化學-物理考慮因素(諸如溶解性及缺乏與活性劑之反應性)及投與途徑限制。本文所描述之例如媒劑、佐劑、賦形劑及稀釋劑之醫藥學上可接受之載劑為熟習此項技術者所熟知且公眾容易獲得。較佳地，醫藥學上可接受之載劑為對(多種)治療劑呈化學惰性之載劑及在使用條件下無有害副作用或毒性之載劑。

【0601】 載劑選擇將部分由特定治療劑以及用於投與治療劑之特定方法決定。因此，存在本文所提供之醫藥組合物之各種合適的配方。

【0602】 在某些實施例中，醫藥組合物包含防腐劑。在某些實施例中，合適的防腐劑可包括例如對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、苯

甲酸鈉及氯化烷基二甲基苄基銨(benzalkonium chloride)。視情況而言，可使用兩種或更多種防腐劑之混合物。防腐劑或其混合物通常以總組合物之約0.0001%至約2重量%的量存在。

【0603】 在一些實施例中，醫藥組合物包含緩衝劑。在一些實施例中，合適的緩衝劑可包括例如檸檬酸、檸檬酸鈉、磷酸、磷酸鉀及各種其他酸及鹽。可視情況使用兩種或更多種緩衝劑之混合物。緩衝劑或其混合物通常以總組合物之約0.001%至約4重量%的量存在。

【0604】 在一些實施例中，醫藥組合物中治療劑之濃度可變化，例如小於約1%，或至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 約50重 量%或 更多，且可根據所選擇之特定投與模式，主要按流體體積及黏度進行選擇。

【0605】 以下用於經口、氣溶膠、非經腸(例如，皮下、靜脈內、動脈內、肌肉內、皮內、腹膜內及鞘內)及局部投與之調配物僅為例示性的，且絕非限制性的。可使用超過一種途徑來投與本文提供之治療劑，且在某些情況下，特定途徑可提供比另一種途徑更直接且更有效的反應。

【0606】 適合於經口投與之調配物可包含以下或由以下組成：(a)液體溶液，諸如有效量之治療劑溶解於諸如水、鹽水或果汁之稀釋劑中；(b)膠囊、藥囊、錠劑、口含錠及糖衣錠，各含有預定量之呈固體或顆粒形式之活性成分；(c)粉末；(d)在適合液體中之懸浮液；及(e)合適的乳液。液體調配物可包括諸如水及例如乙醇、苯甲醇及聚乙烯醇之醇的稀釋劑，伴隨或不伴隨添加醫藥學上可接受之界面活性劑。膠囊形式可為含有例如界面活性劑、潤滑劑及惰性填充劑(諸如乳糖、蔗糖、磷酸鈣及玉米澱粉)之普通硬殼或軟殼明膠類型。錠劑形式可包括以下中之一或多者：

乳糖、蔗糖、甘露醇、玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、褐藻酸、微晶纖維素、阿拉伯膠、明膠、瓜爾豆膠、膠態二氧化矽、交聯羧甲纖維素鈉、滑石、硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸鋅、硬脂酸、及其他賦形劑、著色劑、稀釋劑、緩衝劑、崩解劑、濕潤劑、防腐劑、調味劑及其他藥理學上相容的賦形劑。口含錠形式可包含具有調味劑之治療劑，調味劑通常為蔗糖、阿拉伯膠或黃蓍。除此項技術中已知之此類賦形劑之外，丸粒亦可包含含有惰性基質之治療劑，惰性基質諸如明膠及甘油或蔗糖及阿拉伯膠、乳液、凝膠及其類似物。

【0607】 適合於非經腸投與之調配物包括可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑及使調配物與預期接受者血液等張之溶質的水性及非水性等張無菌注射溶液；及可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑之水性及非水性無菌懸浮液。在一些實施例中，本文所提供之治療劑可在含生理學上可接受之稀釋劑之醫藥載劑中投與，諸如無菌液體或液體混合物，包括水；鹽水；水性右旋糖及相關糖溶液；醇，諸如乙醇或十六醇；二醇，諸如丙二醇或聚乙二醇；二甲亞碸、甘油；縮酮，諸如2,2-二甲基-1,3-二氧戊環-4-甲醇；醚；聚(乙二醇) 400；油；脂肪酸；脂肪酸酯或甘油酯或乙醯化脂肪酸甘油酯，伴隨或不伴隨添加醫藥學上可接受之界面活性劑，諸如肥皂或洗滌劑；懸浮劑，諸如果膠、卡波姆(carbomer)、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素或羧甲基纖維素；或乳化劑及其他醫藥佐劑。

【0608】 在一些實施例中，可用於非經腸調配物中之油包括石油、動物油、植物油或合成油。油之特定實例包括花生、大豆、芝麻、棉籽、玉米、橄欖、石蠟脂及礦物油。用於非經腸調配物中之合適的脂肪酸包括油酸、硬脂酸及異硬脂酸。油酸乙酯及肉豆蔻酸異丙酯為合適的脂肪酸酯

之實例。

【0609】 用於非經腸調配物之某些實施例中之合適的皂包括脂肪鹼金屬、銨及三乙醇胺鹽，且合適的洗滌劑包括(a)陽離子洗滌劑，諸如二甲基二烷基鹵化銨及烷基吡啶鎓鹵化物；(b)陰離子清潔劑，諸如烷基、芳基及烯烴磺酸酯、烷基、烯烴、醚及單甘油酸酯硫酸鹽以及磺基丁二酸鹽；(c)非離子清潔劑，諸如脂肪胺氧化物、脂肪酸烷醇醯胺及聚氧乙烯聚丙烯共聚物；(d)兩性清潔劑，諸如烷基-β-胺基丙酸酯及2-烷基-咪唑啉四級銨鹽；及(e)其混合物。

【0610】 在一些實施例中，非經腸調配物含有例如約0.5%至約25重量%之呈溶液之治療劑。可使用防腐劑及緩衝劑。為了將注射部位處之刺激減至最小或消除，此類組合物可含有一或多種親水親油平衡值(hydrophile-lipophile balance；HLB)為例如約12至約17之非離子界面活性劑。此類調配物中界面活性劑之數量將通常例如在約5%至約15重量%範圍內。合適的界面活性劑包括諸如去水山梨醇單油酸酯之聚乙二醇去水山梨醇脂肪酸酯及藉由將環氧丙烷與丙二醇縮合而形成之環氧乙烷與疏水性鹼之高分子量加合物。非經腸調配物可存在於單位劑量或多劑量密封容器，諸如安瓿及小瓶中，且可在經冷凍乾燥(凍乾)條件下儲存，僅需要在即將使用之前添加無菌液體賦形劑，例如注射用水。即用型注射溶液及懸浮液可由先前所描述之種類之無菌散劑、顆粒及錠劑製備。

【0611】 在某些實施例中，本文提供可注射調配物。關於可注射組合物之有效醫藥載劑的要求係一般熟習此項技術者熟知的(參見例如Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker及Chalmers編, 第238-250頁(1982)，及ASHP

Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 第4版, 第622-630頁(1986))。

【0612】 在一些實施例中，本文提供局部調配物。在本文所提供之某些實施例之情形下，包括可用於經皮藥物釋放之局部調配物的局部調配物適用於施用至皮膚。在一些實施例中，可將單獨或與其他合適的組分組合之治療劑製成經由吸入投與之氣霧劑調配物。可將此等氣霧劑調配物置於諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮氣及其類似物之可接受之加壓推進劑中。亦可諸如在噴霧器或霧化器中將其調配為用於非按壓製劑之藥品。此類噴霧調配物亦可用於噴塗黏膜。

【0613】 在某些實施例中，可將本文所提供之治療劑調配為諸如環糊精包合複合物之包合複合物或脂質體。脂質體可用於使治療劑靶向特定組織。脂質體亦可用於延長治療劑之半衰期。許多方法可用於製備脂質體，如例如Szoka等人, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980)及美國專利4,235,871、4,501,728、4,837,028及5,019,369中所描述。

【0614】 在一些實施例中，本文所提供之治療劑係在定時釋放型、延遲釋放型或持續釋放型遞送系統中調配以使得組合物之遞送在使所治療之部位致敏之前發生且遞送時間足以使所治療之部位致敏。此類系統可避免治療劑之重複投與，藉此增加個體及醫師之便利性，且可尤其適用於本文所提供之某些組合物實施例。在一個實施例中，本發明之組合物經調配以使得其適用於其中所含之環狀RNA的延長釋放。可適宜地以延長之給藥間隔向個體投與此類延長釋放型組合物。舉例而言，在一個實施例中，一天兩次、每天或每隔一天向個體投與本發明組合物。在一個實施例中，每週兩次、每週一次、每十天、每兩週、每三週、每四週、每月一次、每六週、每八週、每三個月、每四個月、每六個月、每八個月、每九個月或

每年一次向個體投與本發明組合物。

【0615】 在一些實施例中，由本發明聚核苷酸編碼之蛋白質由目標細胞在持續量之時間內產生。舉例而言，可在投與之後超過一小時、超過四小時、超過六小時、超過12小時、超過24小時、超過48小時或超過72小時產生蛋白質。在一些實施例中，多肽在投與之後約六小時以峰值水準表現。在一些實施例中，多肽表現至少持續在治療水準下。在一些實施例中，多肽在投與之後至少以治療水準表現超過一小時、超過四小時、超過六小時、超過12小時、超過24小時、超過48小時或超過72小時。在一些實施例中，多肽可在患者組織(例如肝或肺)中以治療水準偵測到。在一些實施例中，可偵測多肽含量係來自在投與之後經超過一小時、超過四小時、超過六小時、超過12小時、超過24小時、超過48小時或超過72小時之時間段的環狀RNA組合物之連續表現。

【0616】 在某些實施例中，由本發明聚核苷酸編碼之蛋白質以高於正常生理水準之水準產生。相較於對照，蛋白質含量可增加。在一些實施例中，對照為正常個體中或正常個體群體中多肽之基線生理含量。在其他實施例中，對照為在缺乏相關蛋白質或多肽之個體中或在缺乏相關蛋白質或多肽之個體群體中之多肽之基線生理水準。在一些實施例中，對照可為投與組合物之個體中相關蛋白質或多肽之正常水準。在其他實施例中，對照為在其他治療性干預後，例如在直接注射對應多肽後，在一或多個可比時間點之多肽之表現量。

【0617】 在某些實施例中，由本發明聚核苷酸編碼之蛋白質之含量可在投與之後3天、4天、5天或1週或更長時間偵測到。可在組織(例如肝或肺)中觀測到含量增加之蛋白質。

【0618】 在一些實施例中，該方法產生由本發明聚核苷酸編碼之蛋白質的持續循環半衰期。舉例而言，可偵測到蛋白質達長於經由皮下注射蛋白質或編碼蛋白質之mRNA觀測到之半衰期的數小時或數天。在一些實施例中，蛋白質之半衰期為1天、2天、3天、4天、5天或1週或更長。

【0619】 許多類型之釋放遞送系統為可用的且為一般熟習技術者所已知。其包括基於聚合物之系統，諸如聚(交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己內酯、聚酯醯胺、聚原酸酯、聚羥基丁酸及聚酸酐。含有前述聚合物之藥物之微膠囊描述於例如美國專利5,075,109中。遞送系統亦包括非聚合物系統，該等非聚合物系統為包括以下之脂質：諸如膽固醇之固醇、膽固醇酯及脂肪酸，或中性脂肪，諸如單酸甘油酯、二酸甘油酯及三酸甘油酯；水凝膠釋放系統；矽橡膠(sylastic)系統；基於肽之系統；蠟包衣；使用習知結合劑及賦形劑之壓縮錠劑；部分融合之植入物；及其類似物。具體實例包括但不限於：(a)侵蝕系統，其中活性組合物以基質內之形式包含在內，諸如美國專利4,452,775、4,667,014、4,748,034及5,239,660中所描述之彼等，及(b)擴散系統，其中活性組分以受控速率自聚合物滲透，諸如美國專利3,832,253及3,854,480中描述。另外，可使用基於泵之硬體遞送系統，其中一些適於植入。

【0620】 在一些實施例中，治療劑可直接或經由鍵聯部分間接結合至靶向部分。用於使治療劑與靶向部分結合之方法為此項技術中已知的。參見例如Wadwa等人, J, Drug Targeting 3:111 (1995)及美國專利5,087,616。

【0621】 在一些實施例中，將本文所提供之治療劑調配為儲槽形式以使得治療劑釋放至投與其之身體中之方式相對於體內時間及位置而言為

受控的(參見例如美國專利4,450,150)。治療劑之儲槽形式可為例如包含治療劑及諸如聚合物之多孔或無孔物質的植入式組合物，其中治療劑經該物質及/或無孔物質降解物囊封或擴散在整個該物質及/或無孔物質降解物中。隨後，將儲槽植入體內所需位置中，且以預定速率自植入物中釋放治療劑。

10. 治療方法

A. **治療區域及相關疾病/病症**

【0622】 在某些態樣中，本文提供治療及/或預防例如自體免疫病症或癌症之病況之方法。

【0623】 在某些實施例中，本文所提供之治療劑與一或多種額外治療劑共同投與(例如，在同一醫藥組合物中或在獨立醫藥組合物中)。在一些實施例中，可首先投與本文所提供之治療劑，且可其次投與一或多種額外治療劑，或反之亦然。或者，本文所提供之治療劑及一或多種額外治療劑可同時投與。

【0624】 在一些實施例中，個體為哺乳動物。在一些實施例中，本文所提及之哺乳動物可為任何哺乳動物，包括但不限於嚙齒目之哺乳動物，諸如小鼠及倉鼠；或兔形目之哺乳動物，諸如兔。哺乳動物可來自食肉目，包括貓科動物(貓)及犬科動物(犬)。哺乳動物可來自偶蹄目，包括牛科動物(奶牛)及豬科動物(豬)；或奇蹄目，包括馬科動物(馬)。哺乳動物可為靈長目、四足猴目或猴目(猴)或類人猿目(人類及猿)。較佳地，哺乳動物為人類。

11. 額外實施例

【0625】 本發明藉由以下非限制性例示性實施例進一步描述：

實施例1. 一種醫藥組合物，其包含：

a. RNA聚核苷酸，及

b. 包含由式(13)表示之可離子化脂質之轉移媒劑：



式(13)

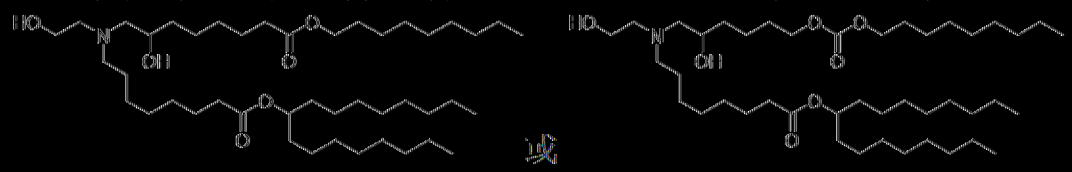
其中：

n為1至4之間的整數；

R^a為氫或羥基；

R_1及R_2各自獨立地為視情況經一或多個選自由以下組成之群之取代基取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_6-C_{30}雜烷基：側氧基、鹵基、羥基、氰基、烷基、烯基、醛、雜環基烷基、羥烷基、二羥烷基、羥基烷基胺基烷基、胺基烷基、烷胺基烷基、二烷胺基烷基、(雜環基)(烷基)胺基烷基、雜環基、雜芳基、烷基雜芳基、炔基、烷氧基、胺基、二烷胺基、胺基烷基羰基胺基、胺基羰基烷胺基、(胺基羰基烷基)(烷基)胺基、烯基羰基胺基、羥基羰基、烷基氧基羰基、胺基羰基、胺基烷基胺基羰基、烷基胺基烷基胺基羰基、二烷基胺基烷基胺基羰基、雜環基烷基胺基羰基、(烷胺基烷基)(烷基)胺基羰基、烷基胺基烷基羰基、二烷基胺基烷基羰基、雜環基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基硫基、烷基磺醯基、烷基磺酸烷基、烷基磺醯基及烷基磺酸烷基；

其限制條件為該可離子化脂質不為

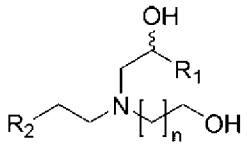


或

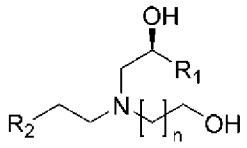
。

實施例2. 如實施例1之醫藥組合物，其中R_a為氫。

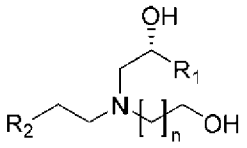
實施例3. 如實施例2之醫藥組合物，其中該可離子化脂質由式(13a-1)、式(13a-2)或式(13a-3)表示：



式(13a-1)



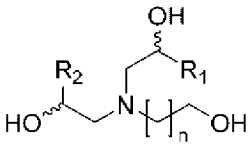
式(13a-2)



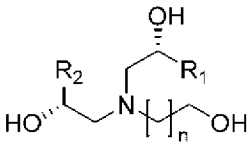
式(13a-3)。

實施例4. 如實施例1之醫藥組合物，其中R_a為羥基。

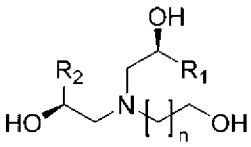
實施例5. 如實施例4之醫藥組合物，其中該可離子化脂質由式(13b-1)、式(13b-2)或式(13b-3)表示：



式(13b-1)

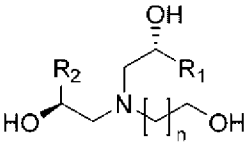


式(13b-2)

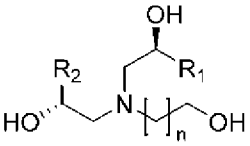


式(13b-3)。

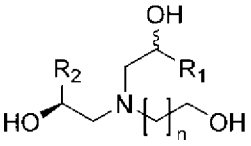
實施例6. 如實施例4之醫藥組合物，其中該可離子化脂質由式(13b-4)、式(13b-5)、式(13b-6)、式(13b-7)、式(13b-8)或式(13b-9)表示：



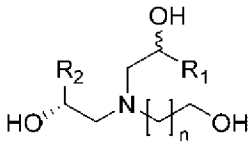
式(13b-4)



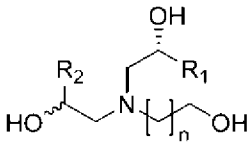
式(13b-5)



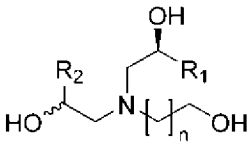
式(13b-6)



式(13b-7)

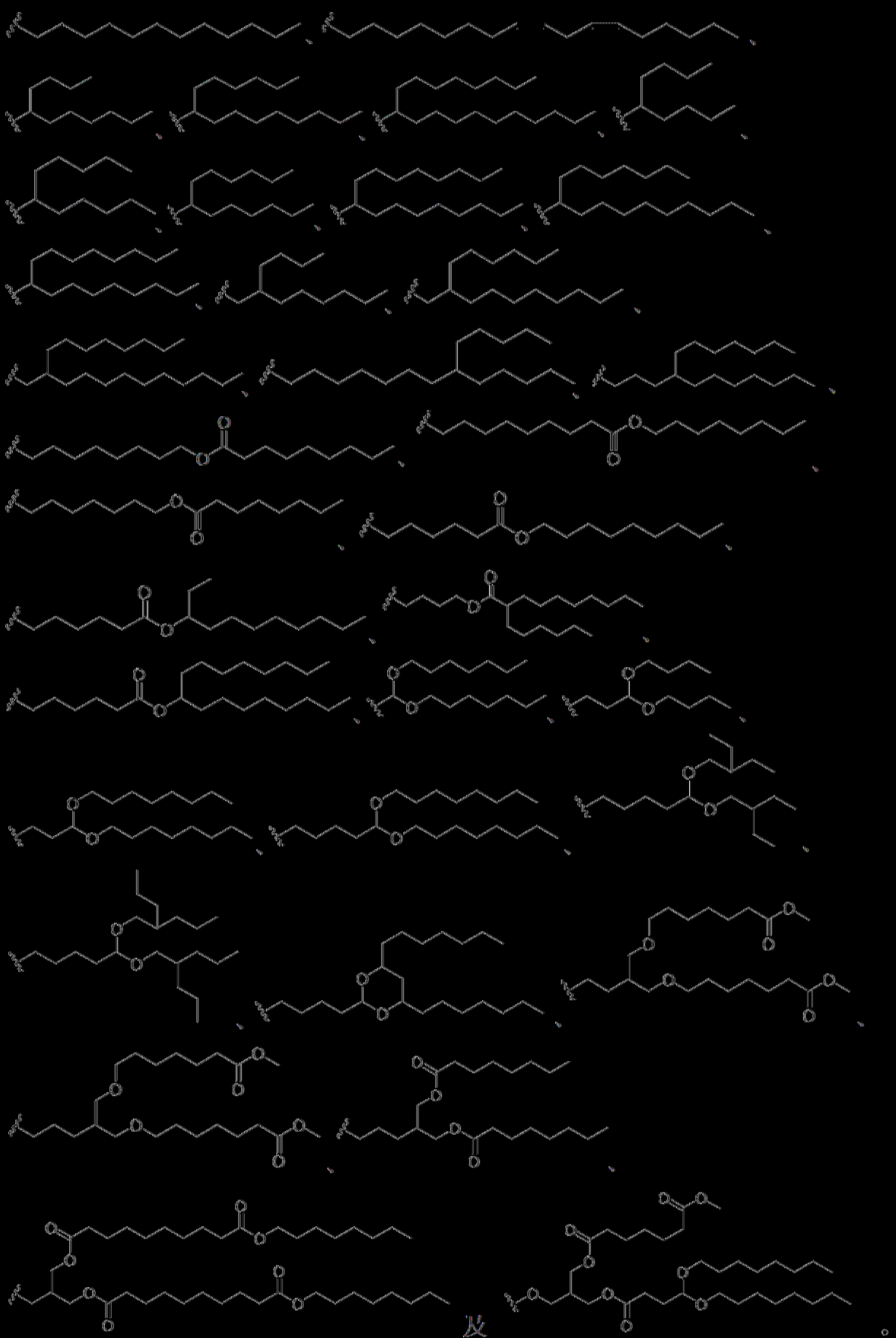


式(13b-8)



式(13b-9)。

實施例7. 如實施例1至6中任一項之醫藥組合物，其中R_1及R_2各自獨立地選自由以下組成之群：



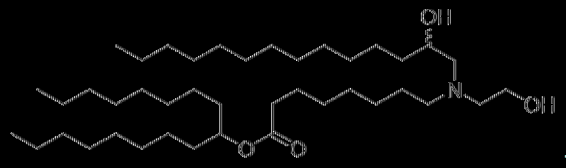
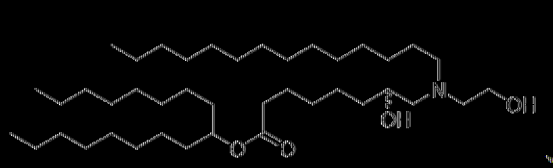
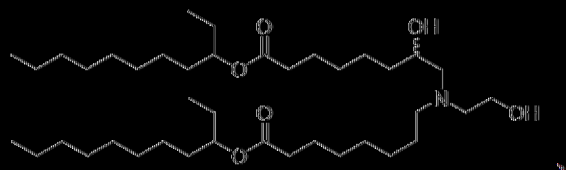
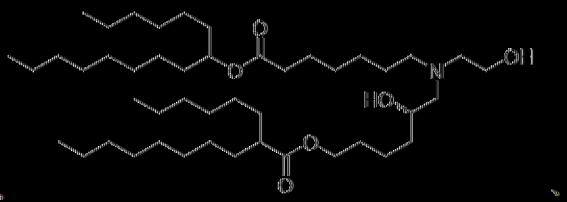
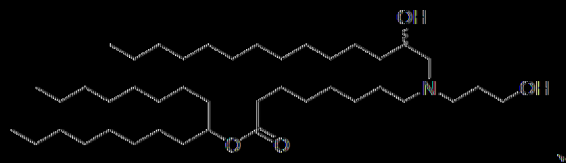
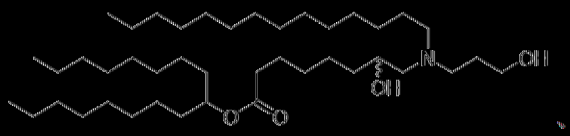
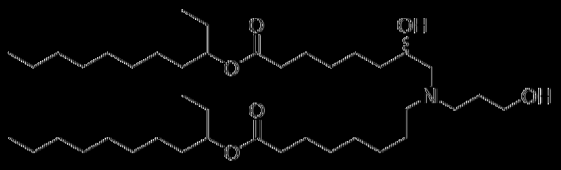
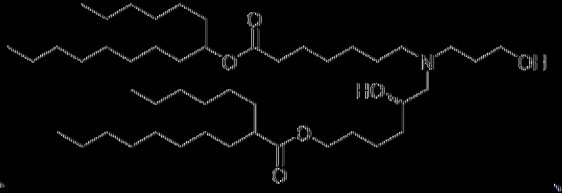
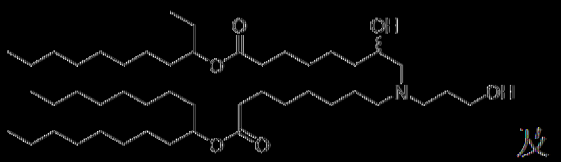
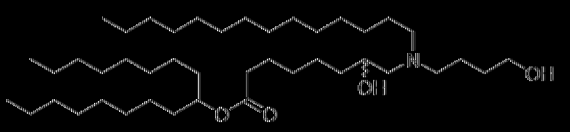
及

。

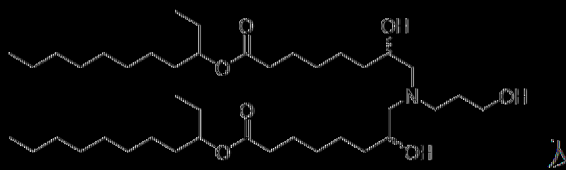
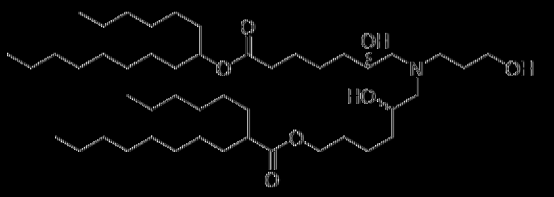
實施例8. 如實施例1至7中任一項之醫藥組合物，其中R_1及R_2相同。

實施例9. 如實施例1至7中任一項之醫藥組合物，其中R_1及R_2不同。

實施例10. 如實施例1至9中任一項之醫藥組合物，其中該可離子化脂質選自由以下組成之群：


、

、

、

、

、

、

、

、

及

。

實施例11. 如實施例1至9中任一項之醫藥組合物，其中該可離子化脂質選自由以下組成之群：


及

。

實施例12. 如實施例1至9中任一項之醫藥組合物，其中該可離子化脂質選自表10c。

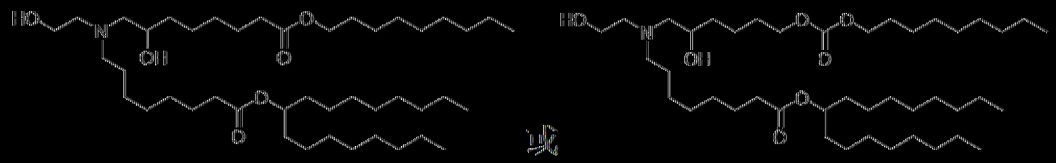
實施例13. 如實施例1至12中任一項之醫藥組合物，其中該RNA炎核苷酸為線性或環狀RNA炎核苷酸。

實施例14. 如實施例1至13中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸為環狀RNA聚核苷酸。

實施例15. 一種醫藥組合物，其包含：

a. RNA聚核苷酸，其中該RNA聚核苷酸為環狀RNA聚核苷酸，及

b.包含選自以下之可離子化脂質之轉移媒劑：



或

。

實施例16. 如實施例1至15中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸囊封於該轉移媒劑中。

實施例17. 如實施例1至16中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸以至少80%之囊封效率囊封於該轉移媒劑中。

實施例18. 如實施例1至14中任一項之醫藥組合物，其中該RNA包含第一表現序列。

實施例19. 如實施例18之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼治療性蛋白質。

實施例20. 如實施例19之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼細胞介素或其功能片段。

實施例21. 如實施例19之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼轉錄因子。

實施例22. 如實施例19之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼免疫檢查點抑制劑。

實施例23. 如實施例19之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼嵌合抗原受體(CAR)。

實施例24. 如實施例1至23中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸進一步包含第二表現序列。

實施例25. 如實施例24之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸進一步包含內部核糖體進入位點(IRES)。

實施例26. 如實施例25之醫藥組合物，其中該第一及該第二表現序列由核糖體跳躍元件或編碼蛋白酶裂解位點之核苷酸序列間隔開。

實施例27. 如實施例24或26中任一項之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼第一T細胞受體(TCR)鏈，且該第二表現序列編碼第二TCR鏈。

實施例28. 如實施例1至27中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸包含一或多個微小RNA結合位點。

實施例29. 如實施例28之醫藥組合物，其中該微小RNA結合位點被肝臟中表現之微小RNA識別。

實施例30. 如實施例28或29之醫藥組合物，其中該微小RNA結合位點被miR-122識別。

實施例31. 如實施例1至30中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸包含與相比於在參考人類細胞中，在人類免疫細胞中更大蛋白質表現相關的第一IRES。

實施例32. 如實施例31之醫藥組合物，其中該人類免疫細胞為T細胞、NK細胞、NKT細胞、巨噬細胞或嗜中性球。

實施例33. 如實施例31或32之醫藥組合物，其中該參考人類細胞為肝細胞。

實施例34. 如實施例1至33中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚

核苷酸按以下次序包含：

a. 5'增強型外顯子元件，

b. 核心功能元件，及

c. 3'增強型外顯子元件。

實施例35. 如實施例1至34中任一項之醫藥組合物，其進一步包含剪接後內含子片段。

實施例36. 如實施例34或35之醫藥組合物，其中該5'增強型外顯子元件包含3'外顯子片段。

實施例37. 如實施例34至36中任一項之醫藥組合物，其中該5'增強型外顯子元件包含位於該3'外顯子片段下游之5'內部雙螺旋體區。

實施例38. 如實施例34至37中任一項之醫藥組合物，其中該5'增強型外顯子元件包含位於該3'外顯子片段下游之5'內部間隔子。

實施例39. 如實施例38之醫藥組合物，其中該5'內部間隔子之長度為約10至約60個核苷酸。

實施例40. 如實施例38或39之醫藥組合物，其中該5'內部間隔子包含聚A或聚A-C序列。

實施例41. 如實施例40之醫藥組合物，其中該聚A或聚A-C序列包含約10-50個核苷酸之長度。

實施例42. 如實施例34至41中任一項之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含轉譯起始元件(TIE)。

實施例43. 如實施例42中任一項之醫藥組合物，其中該轉譯起始元件(TIE)包含非轉譯區(UTR)或其片段。

實施例44. 如實施例43之醫藥組合物，其中該UTR或其片段包含

病毒內部核糖體進入位點(IRES)或真核IRES。

實施例45. 如實施例44之醫藥組合物，其中該IRES選自表17，或為其功能片段或變體。

實施例46. 如實施例44或45之醫藥組合物，其中該IRES具有完全或部分來自以下各者之序列：桃拉症候群病毒、錐蝽病毒、蒂勒氏腦脊髓炎病毒、猿猴病毒40、紅火蟻病毒1、禾穀縊管蚜病毒、網狀內皮細胞增生病病毒、人類脊髓灰白質炎病毒1、斯氏珀蝽腸病毒、喀什米爾蜂病毒、人類鼻病毒2、玻璃葉蟬病毒-1、1型人類免疫缺乏病毒、玻璃葉蟬病毒-1、P型虱病毒、C型肝炎病毒、A型肝炎病毒、GB型肝炎病毒、口蹄疫病毒、人類腸病毒71、馬鼻炎病毒、茶尺蠖微小RNA病毒樣病毒、腦心肌炎病毒、C型果蠅病毒、人類柯薩奇病毒B3、十字花科植物菸草花葉病毒、蟋蟀麻痺病毒、牛病毒性腹瀉病毒1、黑蜂王台病毒、蚜蟲致死性麻痺病毒、禽類腦脊髓炎病毒、急性蜂麻痺病毒、木槿黃化輪斑病毒、典型豬瘟病毒、人類FGF2、人類SFTPA1、人類AML1/RUNX1、果蠅觸角足、人類AQP4、人類AT1R、人類BAG-1、人類BCL2、人類BiP、人類c-IAPl、人類c-myc、人類eIF4G、小鼠NDST4L、人類LEF1、小鼠HIF1α、人類n.myc、小鼠Gtx、人類p27kipl、人類PDGF2/c-sis、人類p53、人類Pim-1、小鼠Rbm3、果蠅收割者、犬科動物奔跑者、果蠅Ubx、人類UNR、小鼠UtrA、人類VEGF-A、人類XIAP、無毛果蠅、釀酒酵母TFIID、釀酒酵母YAP1、菸草蝕刻病毒、蕪菁皺病毒、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV pEC9、小雙節RNA病毒、HCV QC64、人類科薩病毒E/D、人類科薩病毒F、人類科薩病毒JMY、鼻病毒NAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、薩利病毒A

SH1、薩利病毒FHB、薩利病毒NG-J1、人類雙埃柯病毒1、克羅希病毒B、Yc-3、羅沙病毒M-7、香巴病毒A、帕西病毒A、帕西病毒A 2、埃可病毒E14、人類雙埃柯病毒5、愛知病毒、A型肝炎病毒HA16、馮皮病毒、CVA10、腸病毒C、腸病毒D、腸病毒J、人類佩吉病毒2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、佩吉病毒A 1220、帕西病毒A3、薩佩洛病毒、羅沙病毒B、巴庫薩病毒、震顫病毒A、豬帕西病毒1、PLV-CHN、帕西病毒A、西西尼病毒、C型肝炎病毒K、C型肝炎病毒A、BVDV1、邊界病病毒、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573雙順反病毒、湖北微小RNA病毒樣病毒、CRPV、赤背條鼠微小RNA病毒(Apodemus Agrarius Picornavirus)、山羊脊病毒、細小病毒、薩利病毒A BN5、薩利病毒A BN2、薩利病毒A 02394、薩利病毒A GUT、薩利病毒A CH、薩利病毒A SZ1、薩利病毒FHB、CVB3、CVB1、埃可病毒7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24或eIF4G之適體。

實施例47. 如實施例42至46中任一項之醫藥組合物，其中該轉譯起始元件(TIE)包含適體複合物。

實施例48. 如實施例42之醫藥組合物，其中適體複合物包含至少兩種適體。

實施例49. 如實施例34至48中任一項之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含編碼區。

實施例50. 如實施例49之醫藥組合物，其中該編碼區編碼治療性蛋白質。

實施例51. 如實施例50之醫藥組合物，其中該治療性蛋白質為嵌合抗原受體(CAR)、細胞介素、轉錄因子、T細胞受體(TCR)、B細胞受體

(BCR)、配體、免疫細胞活化或抑制受體、重組融合蛋白、嵌合突變蛋白或融合蛋白或其功能片段。

實施例52. 如實施例51之醫藥組合物，其中該治療性蛋白質為抗原。

實施例53. 如實施例52之醫藥組合物，其中該抗原為來自以下各者之病毒多肽：腺病毒；單純疱疹，1型；單純疱疹，2型；腦炎病毒、乳頭狀瘤病毒、水痘-帶狀疱疹病毒；埃-巴二氏病毒(Epstein-barr virus)；人類巨細胞病毒；人類疱疹病毒，8型；人類乳頭狀瘤病毒；BK病毒；JC病毒；天花；脊髓灰質炎病毒；B型肝炎病毒；人類波卡病毒(Human bocavirus)；小病毒B19；人類星狀病毒；諾沃克病毒(Norwalk virus)；柯薩奇病毒(coxsackievirus)；A型肝炎病毒；脊髓灰白質炎病毒；鼻病毒；嚴重急性呼吸道症候群病毒；C型肝炎病毒；黃熱病病毒；登革熱病毒；西尼羅河病毒(West Nile virus)；風疹病毒；E型肝炎病毒；人類免疫缺乏病毒(HIV)；流感病毒；瓜納里托病毒(Guanarito virus)；胡寧病毒(Junin virus)；拉沙病毒(Lassa virus)；馬丘波病毒(Machupo virus)；薩比亞病毒(Sabia virus)；克里米亞-剛果出血熱病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)；伊波拉病毒(Ebola virus)；馬堡病毒(Marburg virus)；麻疹病毒；腮腺炎病毒；副流感病毒；呼吸道融合病毒；人類偏肺病毒；亨德拉病毒(Hendra virus)；尼帕病毒(Nipah virus)；狂犬病病毒；D型肝炎；輪狀病毒；環狀病毒；科羅拉多壁蝨熱病毒(Coltivirus)；班納病毒(Banna virus)；人類腸病毒；漢坦病毒(Hanta virus)；西尼羅河病毒；中東呼吸症候群冠狀病毒；日本腦炎病毒；水泡性疹病毒；SARS-CoV-2；東部馬腦炎，或前述任何兩者或更多者之組合。

實施例54. 如實施例34至53中任一項之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含終止密碼子或終止卡匣。

實施例55. 如實施例34至53中任一項之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含非編碼區。

實施例56. 如實施例34至53中任一項之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含輔助或調節元件。

實施例57. 如實施例56之醫藥組合物，其中該輔助或調節元件包含miRNA結合位點或其片段、限制位點或其片段、RNA編輯模體或其片段、拉鏈碼(zip code)元件或其片段、RNA運輸元件或其片段，或其組合。

實施例58. 如實施例56之醫藥組合物，其中該輔助或調節元件包含對於IRES異側作用因子(ITAF)之結合域。

實施例59. 如實施例34至58中任一項之醫藥組合物，其中該3'增強型外顯子元件包含5'外顯子片段。

實施例60. 如實施例59之醫藥組合物，其中該3'增強型外顯子元件包含位於該5'外顯子片段上游之3'內部間隔子。

實施例61. 如實施例60之醫藥組合物，其中該3'內部間隔子為聚A或聚A-C序列。

實施例62. 如實施例60或61之醫藥組合物，其中該3'內部間隔子之長度為約10至約60個核苷酸。

實施例63. 如實施例59至62中任一項之醫藥組合物，其中該3'增強型外顯子元件包含位於該5'外顯子片段上游之3'內部雙螺旋體元件。

實施例64. 如實施例1至63中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚

核苷酸係經由按以下次序包含以下之RNA聚核苷酸之環化製備：

a. 5'增強型內含子元件，

b. 5'增強型外顯子元件，

c. 核心功能元件，

d. 3'增強型外顯子元件，及

e. 3'增強型內含子元件。

實施例65. 如實施例64之醫藥組合物，其中該5'增強型內含子元件包含3'內含子片段。

實施例66. 如實施例65之醫藥組合物，其中該3'內含子片段包含3' I組內含子剪接位點二核苷酸之第一或第一及第二核苷酸。

實施例67. 如實施例64或65之醫藥組合物，其中該5'增強型內含子元件包含位於該3'內含子片段上游之5'親和標籤。

實施例68. 如實施例65至67中任一項之醫藥組合物，其中該5'增強型內含子元件包含位於該3'內含子片段上游之5'外部間隔子。

實施例69. 如實施例64至68中任一項之醫藥組合物，其中該5'增強型內含子元件包含位於該5'增強型內含子元件之5'端的前導非轉譯序列。

實施例70. 如實施例64至69中任一項之醫藥組合物，其中該3'增強型內含子元件包含5'內含子片段。

實施例71. 如實施例64至70中任一項之醫藥組合物，其中該3'增強型內含子元件包含位於該5'內含子片段下游之3'外部間隔子。

實施例72. 如實施例64至71中任一項之醫藥組合物，其中該3'增強型內含子元件包含位於該5'內含子片段下游之3'親和標籤。

實施例73. 如實施例64至72中任一項之醫藥組合物，其中該3'增強

型內含子元件包含位於該5'增強型內含子元件之3'端的3'末端非轉譯序列。

實施例74. 如實施例64至73中任一項之醫藥組合物，其中該5'增強型內含子元件包含位於該3'內含子片段上游之5'外部雙螺旋體區，且該3'增強型內含子元件包含位於該5'內含子片段下游之3'外部雙螺旋體區。

實施例75. 如實施例74之醫藥組合物，其中該5'外部雙螺旋體區及該3'外部雙螺旋體區相同。

實施例76. 如實施例74之醫藥組合物，其中該5'外部雙螺旋體區及該3'外部雙螺旋體區不同。

實施例77. 如實施例66至76中任一項之醫藥組合物，其中該I組內含子包含部分或完全來自細菌噬菌體、病毒載體、細胞器基因體或核rDNA基因。

實施例78. 如實施例77之醫藥組合物，其中該核rDNA基因包含來源於真菌、植物或藻類之核rDNA基因或其片段。

實施例79. 如實施例1至78中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸含有至少約80%、至少約90%、至少約95%或至少約99%之天然存在之核苷酸。

實施例80. 如實施例1至79中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸由天然存在之核苷酸組成。

實施例81. 如實施例34至80中任一項之醫藥組合物，其中該表現序列經密碼子最佳化。

實施例82. 如實施例1至81中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸經最佳化以缺乏至少一個存在於等效經預最佳化聚核苷酸中之微小

RNA結合位點。

實施例83. 如實施例1至82中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸經最佳化以缺乏至少一個能夠結合至微小RNA之微小RNA結合位點，該微小RNA存在於表現該RNA聚核苷酸之細胞中。

實施例84. 如實施例1至83中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸經最佳化以缺乏至少一個存在於等效預最佳化聚核苷酸中之核酸內切酶易感位點。

實施例85. 如實施例1至84中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸經最佳化以缺乏能夠被其內表現該核酸內切酶之細胞中存在之核酸內切酶裂解的至少一個核酸內切酶易感位點。

實施例86. 如實施例1至85中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸經最佳化以缺乏至少一個存在於等效預最佳化聚核苷酸中之RNA編輯易感位點。

實施例87. 如實施例1至86中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸之長度為約100nt至約10,000nt。

實施例88. 如實施例1至87中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸之長度為約100nt至約15,000nt。

實施例89. 如實施例1至88中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸為環狀RNA聚核苷酸，且其中該環狀RNA聚核苷酸比具有與該環狀RNA聚核苷酸相同的表現序列之參考線性RNA聚核苷酸更緊湊。

實施例90. 如實施例1至89中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸為環狀RNA聚核苷酸，且其中該組合物在人類細胞中之治療作用的持續時間大於或等於包含具有與該環狀RNA聚核苷酸相同的表現序列

之參考線性RNA聚核苷酸之組合物的治療作用持續時間。

實施例91. 如實施例90之醫藥組合物，其中該參考線性RNA聚核苷酸為線性、未經修飾或經核苷修飾、完全加工之mRNA，其包含帽1結構及長度至少80nt之聚A尾。

實施例92. 如實施例1至91中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸為環狀RNA聚核苷酸，且其中該組合物在人類活體內治療作用的持續時間大於包含具有與該環狀RNA聚核苷酸相同的表現序列之參考線性RNA聚核苷酸之組合物的治療作用持續時間。

實施例93. 如實施例1至92中任一項之醫藥組合物，其中該組合物在人類活體內之治療作用持續時間為至少約10、至少約20、至少約30、至少約40、至少約50、至少約60、至少約70、至少約80、至少約90或至少約100小時。

實施例94. 如實施例1至93中任一項之醫藥組合物，其中該組合物在人類細胞中之功能半衰期大於或等於預定臨限值。

實施例95. 如實施例1至94中任一項之醫藥組合物，其中該組合物在人類活體內之功能半衰期大於預定臨限值。

實施例96. 如實施例94或95之醫藥組合物，其中該功能半衰期係藉由功能蛋白分析測定。

實施例97. 如實施例96之醫藥組合物，其中該功能蛋白分析為活體外螢光素酶分析。

實施例98. 如實施例96之醫藥組合物，其中該功能蛋白分析包含量測患者血清或組織樣品中由該RNA聚核苷酸之表現序列編碼之蛋白質的水準。

實施例99. 如實施例94至98中任一項之醫藥組合物，其中該預定臨限值為包含與該RNA聚核苷酸相同的表現序列之參考線性RNA聚核苷酸的功能半衰期。

實施例100. 如實施例1至99中任一項之醫藥組合物，其中該組合物具有至少約20小時之功能半衰期。

實施例101. 如實施例1至100中任一項之醫藥組合物，其進一步包含結構性脂質及經PEG修飾之脂質。

實施例102. 如實施例101之醫藥組合物，其中相較於缺乏該結構性脂質之對照轉移媒劑，該結構性脂質與C1q結合及/或促進包含該脂質之轉移媒劑與C1q的結合，及/或相較於缺乏該結構性脂質之對照轉移媒劑，該結構性脂質增加免疫細胞中C1q結合轉移媒劑之攝取。

實施例103. 如實施例97至102中任一項之醫藥組合物，其中該免疫細胞為T細胞、NK細胞、NKT細胞、巨噬細胞或嗜中性球。

實施例104. 如實施例101至103中任一項之醫藥組合物，其中該結構性脂質為膽固醇。

實施例105. 如實施例102之醫藥組合物，其中該結構性脂質為β-植物固醇。

實施例106. 如實施例102之醫藥組合物，其中該結構性脂質不為β-植物固醇。

實施例107. 如實施例101至106中任一項之醫藥組合物，其中該經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基胺基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DOMG或PEG-1。

實施例108. 如實施例107之醫藥組合物，其中該經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG(2000)。

實施例109. 如實施例1至108中任一項之醫藥組合物，其進一步包含輔助脂質。

實施例110. 如實施例109之醫藥組合物，其中該輔助脂質為DSPC或DOPE。

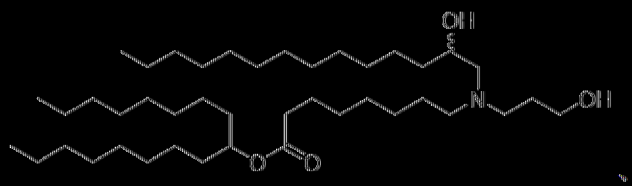
實施例111. 如實施例1至110中任一項之醫藥組合物，其進一步包含DSPC、膽固醇及DMG-PEG(2000)。

實施例112. 如實施例102至111中任一項之醫藥組合物，其中按莫耳比計，該轉移媒劑包含約0.5%至約4%之經PEG修飾之脂質。

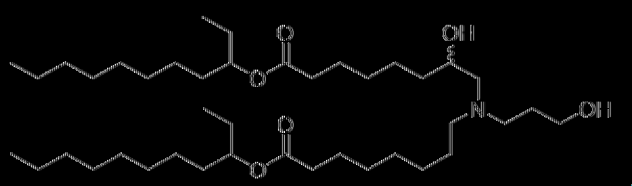
實施例113. 如實施例102至112中任一項之醫藥組合物，其中按莫耳比計，該轉移媒劑包含約1%至約2%之經PEG修飾之脂質。

實施例114. 如實施例1至113中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含：

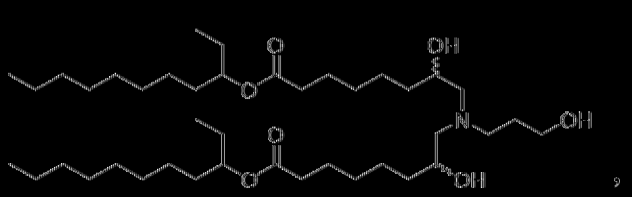
a. 選自以下之可離子化脂質：



、



及



，

或其混合物，

b. 選自DOPE或DSPC之輔助脂質，

c. 膽固醇，及

d. 選自DSPE-PEG(2000)或DMG-PEG(2000)之PEG-脂質。

實施例115. 如實施例114之醫藥組合物，其中可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質之莫耳比為45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

實施例116. 如實施例114之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

實施例117. 如實施例117之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

實施例118. 如實施例117之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為62:4:33:1。

實施例119. 如實施例114之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為53:5:41:1。

實施例120. 如實施例114之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為45:9:44:2、

50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

實施例121. 如實施例120之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為50:10:38.5:1.5。

實施例122. 如實施例120之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為41:12:45:2。

實施例123. 如實施例120之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為45:9:44:2。

實施例124. 如實施例114之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

實施例125. 如實施例114之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及C14-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:C14-PEG(2000)之莫耳比為45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

實施例126. 如實施例114之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

實施例127. 如實施例1至126中任一項之醫藥組合物，其脂質與磷

酸酯(IL:P)莫耳比為約3至約9。

實施例128. 如實施例1至127中任一項之醫藥組合物，其脂質與磷酸酯(IL:P)莫耳比為約3、約4、約4.5、約5、約5.5、約5.7、約6、約6.2、約6.5或約7。

實施例129. 如實施例1至128中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑經調配以用於該RNA聚核苷酸之胞內體釋放。

實施例130. 如實施例1至129中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑能夠結合至APOE。

實施例131. 如實施例1至130中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑與脂蛋白元E (APOE)之相互作用小於裝載有具有與該RNA聚核苷酸相同的表現序列之參考線性RNA的等效轉移媒劑。

實施例132. 如實施例1至131中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑之外表面實質上不含APOE結合位點。

實施例133. 如實施例1至132中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑之直徑小於約120 nm。

實施例134. 如實施例1至133中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑不形成直徑超過300 nm之聚集物。

實施例135. 如實施例1至134中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑具有小於約30小時之活體內半衰期。

實施例136. 如實施例1至135中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑能夠依賴低密度脂蛋白受體(LDLR)攝取至細胞中。

實施例137. 如實施例1至136中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑能夠不依賴LDLR而攝取至細胞中。

實施例138. 如實施例1至137中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物實質上不含線性RNA。

實施例139. 如實施例1至138中任一項之醫藥組合物，其進一步包含可操作地連接至該轉移媒劑之靶向部分。

實施例140. 如實施例139之醫藥組合物，其中該靶向部分特異性結合或間接結合免疫細胞抗原。

實施例141. 如實施例140之醫藥組合物，其中該免疫細胞抗原為T細胞抗原。

實施例142. 如實施例141之醫藥組合物，其中該T細胞抗原選自由以下組成之群：CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、β7整合素、β2整合素及C1qR。

實施例143. 如實施例142之醫藥組合物，其進一步包含轉接分子，該轉接分子包含轉移媒劑結合部分及細胞結合部分，其中該靶向部分特異性結合該轉移媒劑結合部分且該細胞結合部分特異性結合目標細胞抗原。

實施例144. 如實施例143之醫藥組合物，其中該目標細胞抗原為免疫細胞抗原。

實施例145. 如實施例144之醫藥組合物，其中該免疫細胞抗原為T細胞抗原、NK細胞、NKT細胞、巨噬細胞或嗜中性球。

實施例146. 如實施例145之醫藥組合物，其中該T細胞抗原選自由以下組成之群：CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、β7整合素、β2整合素、CD25、CD39、CD73、A2a受體、A2b受體及C1qR。

實施例147. 如實施例140或143之醫藥組合物，其中該免疫細胞抗原為巨噬細胞抗原。

實施例148. 如實施例147之醫藥組合物，其中該巨噬細胞抗原選自由以下組成之群：甘露糖受體、CD206及C1q。

實施例149. 如實施例139至148中任一項之醫藥組合物，其中該靶向部分為小分子。

實施例150. 如實施例149之醫藥組合物，其中該小分子為甘露糖、凝集素、阿西維辛、生物素或地高辛。

實施例151. 如實施例149之醫藥組合物，其中該小分子結合至免疫細胞上之胞外酶，其中該胞外酶選自由以下組成之群：CD38、CD73、腺苷2a受體及腺苷2b受體。

實施例152. 如實施例139至148中任一項之醫藥組合物，其中該靶向部分為單鏈Fv (scFv)片段、奈米抗體、肽、基於肽之巨環、微型抗體、小分子配體(諸如葉酸、精胺醯甘胺醯天冬胺酸(RGD)或酚可溶性調控蛋白α1肽(PSMA1))、重鏈可變區、輕鏈可變區或其片段。

實施例153. 如實施例1至152中任一項之醫藥組合物，其中該可離子化脂質在細胞膜中之半衰期小於約2週。

實施例154. 如實施例1至153中任一項之醫藥組合物，其中該可離子化脂質在細胞膜中之半衰期小於約1週。

實施例155. 如實施例1至154中任一項之醫藥組合物，其中該可離子化脂質在細胞膜中之半衰期小於約30小時。

實施例156. 如實施例1至155中任一項之醫藥組合物，其中該可離子化脂質在細胞膜中之半衰期小於該RNA聚核苷酸之功能半衰期。

實施例157. 一種治療或預防疾病、病症或病狀之方法，其包含投與有效量之如實施例1至156中任一項之醫藥組合物。

實施例158. 如實施例157之方法，其中該疾病、病症或病狀與選自ASCII表L及M之多肽的異常表現、活性或定位相關。

實施例159. 如實施例157或158之方法，其中該RNA聚核苷酸編碼治療性蛋白質。

實施例160. 如實施例159之方法，其中脾中之治療性蛋白質表現高於肝臟中之治療性蛋白質表現。

實施例161. 如實施例160之方法，其中脾中之治療性蛋白質表現為至少約2.9×肝臟中之治療性蛋白質表現。

實施例162. 如實施例160之方法，其中該治療性蛋白質在肝臟中不以功能性水準表現。

實施例163. 如實施例160之方法，其中該治療性蛋白質在肝臟中不以可偵測水準表現。

實施例164. 如實施例160之方法，其中脾中之治療性蛋白質表現為總治療性蛋白質表現之至少約50%。

實施例165. 如實施例160之方法，其中脾中之治療性蛋白質表現為總治療性蛋白質表現之至少約63%。

實施例166. 如實施例1至156中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含奈米粒子及視情況存在之可操作地連接至該奈米粒子之靶向部分。

實施例167. 如實施例166之醫藥組合物，其中該奈米粒子為脂質奈米粒子、核-殼奈米粒子、可生物降解奈米粒子、可生物降解脂質奈米粒子、聚合物奈米粒子或可生物降解聚合物奈米粒子。

實施例168. 如實施例166或167之醫藥組合物，其包含靶向部分，

其中該靶向部分介導受體介導之內吞作用或在不存在細胞分離或純化下選擇性地直接融合至選定細胞群體或組織之細胞中。

實施例169. 如實施例166至168中任一項之醫藥組合物，其中該靶向部分為scfv、奈米抗體、肽、微型抗體、聚核苷酸適體、重鏈可變區、輕鏈可變區或其片段。

實施例170. 如實施例166至169中任一項之醫藥組合物，其中該組合物中小於1重量%之該等聚核苷酸為雙股RNA、DNA夾板或三磷酸化RNA。

實施例171. 如實施例166至170中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物中小於1重量%之該等聚核苷酸及該等蛋白質為雙股RNA、DNA夾板、三磷酸化RNA、磷酸酶蛋白質、蛋白質連接酶及加帽酶。

實施例172. 一種治療有需要之個體之方法，其包含投與治療有效量之如實施例166至171中任一項之醫藥組合物。

實施例173. 如實施例172之方法，其中該靶向部分為scFv、奈米抗體、肽、微型抗體、重鏈可變區、輕鏈可變區、TCR之胞外域或其片段。

實施例174. 如實施例172或173之方法，其中該奈米粒子包含一或多種陽離子脂質、可離子化脂質或聚β-胺基酯。

實施例175. 如實施例172至174中任一項之方法，其中該奈米粒子包含一或多種非陽離子脂質。

實施例176. 如實施例172至175中任一項之方法，其中該奈米粒子包含一或多種經PEG修飾之脂質、聚麩胺酸脂質或玻尿酸脂質。

實施例177. 如實施例172至176中任一項之方法，其中該奈米粒子包含膽固醇。

實施例178. 如實施例172至177中任一項之方法，其中該奈米粒子包含花生四烯酸或油酸。

實施例179. 如實施例172至178中任一項之方法，其中該醫藥組合物包含靶向部分，其中該靶向部分在不存在細胞選擇或純化之情況下選擇性地介導受體介導之內吞作用進入選定細胞群體之細胞中。

實施例180. 如實施例172至179中任一項之方法，其中該奈米粒子包含超過一種環狀RNA聚核苷酸。

實施例181. 一種DNA載體，其編碼如實施例64至78中任一項之RNA聚核苷酸。

實施例182. 如實施例181之DNA載體，其進一步包含轉錄調控序列。

實施例183. 如實施例182之DNA載體，其中該轉錄調控序列包含啟動子及/或強化子。

實施例184. 如實施例183之DNA載體，其中該啟動子包含T7啟動子。

實施例185. 如實施例181至184中任一項之DNA載體，其中該DNA載體包含環狀DNA。

實施例186. 如實施例181至185中任一項之DNA載體，其中該DNA載體包含線性DNA。

實施例187. 一種原核細胞，其包含如實施例181至186中任一項之DNA載體。

實施例188. 一種真核細胞，其包含如實施例1至187中任一項之RNA聚核苷酸。

實施例189. 如實施例189之真核細胞，其中該真核細胞為人類細胞。

實施例190. 一種產生環狀RNA聚核苷酸之方法，該方法包含在適合環化之條件下培育如實施例64至78中任一項之RNA聚核苷酸。

實施例191. 一種產生環狀RNA聚核苷酸之方法，該方法包含在適合轉錄之條件下培育如實施例181至186中任一項之DNA。

實施例192. 如實施例191之方法，其中該DNA在活體外轉錄。

實施例193. 如實施例191之方法，其中該等適合條件包含三磷酸腺苷(ATP)、鳥嘌呤三磷酸酯(GTP)、胞嘧啶三磷酸酯(CTP)、尿苷三磷酸酯(UTP)及RNA聚合酶。

實施例194. 如實施例191之方法，其中該等適合條件進一步包含鳥嘌呤單磷酸酯(GMP)。

實施例195. 如實施例194之方法，其中GMP濃度與GTP濃度之比率在約3:1至約15:1範圍內，視情況約4:1、5:1或6:1。

實施例196. 一種產生環狀RNA聚核苷酸之方法，該方法包含在適合在細胞中轉錄DNA之條件下培養如實施例187之原核細胞。

實施例197. 如實施例190至196中任一項之方法，其進一步包含純化環狀RNA聚核苷酸。

實施例198. 如實施例197之方法，其中該環狀RNA聚核苷酸係藉由使用與結合至固體表面之第一或第二間隔子雜交的親和寡核苷酸進行負向選擇而純化。

實施例199. 如實施例198之方法，其中該第一或第二間隔子包含聚A序列，且其中該親和寡核苷酸為脫氧胸腺嘧啶寡核苷酸。

實例

【0626】 Wesselhoeft等人(2019) RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration *In vivo*. Molecular Cell. 74(3), 508-520及Wesselhoeft等人(2018) Engineering circular RNA for Potent and Stable Translation in Eukaryotic Cells. Nature Communications. 9, 2629係以全文引用之方式併入。

【0627】 參考以下實例進一步詳細描述本發明，但本發明不意欲限於以下實例。此等實例涵蓋該等說明之任何及所有變化，旨在向一般技術者提供如何製得及使用本發明之完整揭示內容及描述，且並不意欲限制被視為本發明之內容的範疇。

實例1

【0628】 ***實例1A：****外部雙螺旋體區允許使用經排列內含子外顯子(permuted intron exon；PIE)環化策略來環化長前驅體RNA。*

【0629】 將含有全長腦心肌炎病毒(EMCV) IRES之1.1 kb序列、高斯螢光素酶(GLuc)表現序列及經排列內含子-外顯子(PIE)構築體之兩個短外顯子片段插入T4噬菌體之胸苷酸合酶(Td)基因中之經排列I組催化性內含子中之3'內含子與5'內含子之間。藉由失控轉錄來合成前驅體RNA。藉由在存在鎂離子及GTP之情況下加熱前驅體RNA來嘗試環化，但未獲得剪接產物。

【0630】 設計完美互補的9個核苷酸長之雙螺旋體區及19個核苷酸長之雙螺旋體區，且在前驅體RNA之5'端及3'端添加。藉由前驅體RNA帶之消失評定，對於9個核苷酸雙螺旋體區，添加此等同源臂將剪接效率自0%提高至16%，且對於19個核苷酸雙螺旋體區，提高至48%。

【0631】 用核糖核酸酶R處理剪接產物。跨經核糖核酸酶R處理之剪接反應物之推定剪接接合點的定序顯露已連接之外顯子，且用靶向寡核苷酸之核糖核酸酶H消化經核糖核酸酶R處理之剪接反應物產生單帶，此與經核糖核酸酶H消化之線性前驅體產生之雙帶形成對比。此表明環狀RNA為含有9個或19個核苷酸長之外部雙螺旋體區之前驅體RNA之剪接反應的主要產物。

【0632】 ***實例1B：****保存IRES及PIE剪接位點之二級結構之間隔子提高環化效率。*

【0633】 設計一系列間隔子且將其插入3' PIE剪接位點與IRES之間。此等間隔子經設計以保存或破壞IRES、3' PIE剪接位點及/或5'剪接位點中之內含子序列內之二級結構。添加經設計以保存二級結構之間隔子序列產生87%剪接效率，而添加破壞性間隔子序列不產生可偵測剪接。

實例2

【0634】 ***實例2A：****除外部雙螺旋體區之外的內部雙螺旋體區產生剪接氣泡且允許轉譯若干表現序列。*

【0635】 將間隔子設計為非結構化的、不與內含子及IRES序列同源且含有間隔子-間隔子雙螺旋體區。將此等間隔子插入含有外部雙螺旋體區、EMCV IRES及用於高斯螢光素酶(總長度：1289 nt)、螢火蟲螢光素酶(2384 nt)、eGFP (1451 nt)、人類紅血球生成素(1313 nt)及Cas9核酸內切酶(4934 nt)之表現序列的構築體中之5'外顯子與IRES之間以及3'外顯子與表現序列之間。達成所有5種構築體之環化。利用T4噬菌體及念珠藻屬內含子進行之構築體環化大致等同。較短序列之環化效率較高。為了量測轉譯，將各構築體轉染至HEK293細胞中。以發光量測，經高斯螢光素酶

及螢火蟲螢光素酶轉染之細胞產生穩固反應，在經紅血球生成素環狀RNA轉染之細胞之培養基中可偵測到人類紅血球生成素，且自經EGFP 環狀RNA轉染之細胞觀測到EGFP螢光。相較於僅sgRNA之對照，將Cas9環狀RNA與針對GFP之sgRNA共同轉染至組成性表現GFP之細胞中，在高達97%之細胞中產生剝蝕螢光。

【0636】 ***實例2B：****使用CVB3 IRES增加蛋白質產量。*

【0637】 製造具有內部雙螺旋體區及外部雙螺旋體區以及不同的含有高斯螢光素酶或螢火蟲螢光素酶表現序列之IRES的構築體。在轉染後24小時以發光量測HEK293細胞上清液中之蛋白質產量。在兩種情況下，柯薩奇病毒B3 (CVB3) IRES構築體產生大部分蛋白質。

【0638】 ***實例2C：****使用聚A或聚AC間隔子提高蛋白質產量。*

【0639】 將三十個核苷酸長之聚A或聚AC間隔子添加在具有各IRES之構築體中之IRES與剪接接合點之間，從而產生實例2B中之蛋白質。在轉染後24小時以發光量測HEK293細胞上清液中之高斯螢光素酶活性。相比於不具有間隔子之對照構築體，兩種間隔子均改善每一構築體中之表現。

實例3

【0640】 *經環狀RNA轉染之HEK293或希拉細胞產生比經相當未經修飾或經修飾線性RNA轉染之HEK293或希拉細胞多的蛋白質。*

【0641】 將經HPLC純化之編碼高斯螢光素酶之環狀RNA (CVB3-GLuc-pAC)與典型未經修飾之加5'甲基鳥苷帽及加3'聚A尾之線性GLuc mRNA及市售的經核苷修飾(假尿苷、5-甲基胞嘧啶)之線性GLuc mRNA (來自Trilink)進行比較。在轉染後24 h量測發光，顯露環狀RNA在

HEK293細胞中產生比未經修飾線性mRNA多811.2%之蛋白質，且產生比經修飾mRNA多54.5%之蛋白質。在希拉細胞中獲得類似結果及經最佳化之編碼人類紅血球生成素之環狀RNA與經5-甲氧基尿苷修飾之線性mRNA的比較結果。

【0642】 經6天收集發光資料。在HEK293細胞中，與未經修飾線性mRNA之43小時及經修飾線性mRNA之45小時相比，環狀RNA轉染產生80小時蛋白質生產半衰期。在希拉細胞中，與未經修飾線性mRNA之44小時及經修飾線性mRNA之49小時相比，環狀RNA轉染產生116小時蛋白質生產半衰期。環狀RNA在兩種細胞類型中在其壽命內產生比未經修飾線性mRNA及經修飾線性mRNA兩者實質上多之蛋白質。

實例4

【0643】 ***實例4A：****藉由核糖核酸酶消化、HPLC純化及磷酸酶處理純化環狀RNA會降低免疫原性。經完全純化之環狀RNA的免疫原性顯著低於未經純化或經部分純化之環狀RNA的免疫原性。蛋白質表現穩定性及細胞活力視細胞類型及環狀RNA純度而定。*

【0644】 用以下轉染人類胎腎293 (HEK293)細胞及人類肺癌A549細胞：

a. 未經純化GLuc 環狀RNA剪接反應產物，

b. 剪接反應物之核糖核酸酶R消化產物，

c. 剪接反應物之核糖核酸酶R消化及HPLC純化產物，或

d. 剪接反應物之核糖核酸酶消化、HPLC純化及磷酸酶處理產物。

【0645】 與未經轉染對照相比，剪接反應物之核糖核酸酶R消化不足以阻止A549細胞中之細胞介素釋放。

【0646】 相較於未經純化剪接反應物，添加HPLC純化亦不足以阻止細胞介素釋放，但介白素-6 (IL-6)顯著減少且干擾素-α1 (IFNα1)顯著增加。

【0647】 在HPLC純化之後及在核糖核酸酶R消化之前添加磷酸酶處理大大減少所評定之所有經上調細胞介素在A549細胞中之表現。分泌單核球趨化蛋白1 (MCP1)、IL-6、IFNα1、腫瘤壞死因子α (TNFα)及IFNγ誘導蛋白-10 (IP-10)下降至不可偵測或未經轉染之基線水準。

【0648】 HEK293細胞中不存在實質性細胞介素釋放。當經較高純度環狀RNA轉染時，A549細胞具有提高之GLuc表現穩定性及細胞活力。經完全純化之環狀RNA具有與經轉染293細胞之穩定性表現型類似的穩定性表現型。

【0649】 ***實例4B：****環狀RNA不產生顯著免疫原性且不為RIG-I配體。*

【0650】 用以下轉染A549細胞：

a. 未經純化環狀RNA，

b. 高分子量(線性及環狀串連) RNA，

c. 環狀(帶切口) RNA，

d. 經純化環狀RNA之早期溶離份(與帶切口RNA峰重疊更多)，

e. 經純化環狀RNA之晚期溶離份(與帶切口RNA峰重疊更少)，

f. 在環化期間截除之內含子，或

g. 媒劑(亦即，未經轉染對照)。

【0651】 單獨地合成前驅體RNA，且由於難以自剪接反應物獲得適當地純之線性前驅體RNA，因此以剪接位點缺失突變體(DS)形式將該前

驅體RNA純化。量測各情況下之細胞介素釋放及細胞活力。

【0652】 觀測到回應於存在於剪接反應物內之大部分物種以及前驅體RNA的穩固IL-6、RANTES及IP-10釋放。早期環狀RNA溶離份引發與其他非環狀RNA溶離份相當之細胞介素反應，此指示即使相對小之數量之線性RNA污染物亦能夠在A549細胞中誘導實質性細胞免疫反應。晚期環狀RNA溶離份不引發超過未經轉染對照之細胞介素反應的細胞介素反應。對於晚期環狀RNA溶離份，轉染後36小時之A549細胞活力與所有其他溶離份相比顯著較大。

【0653】 分析在用晚期環狀RNA HPLC溶離份、前驅體RNA或未經純化剪接反應物轉染A549細胞後之RIG-I及IFN-β1轉錄本誘導。對於晚期環狀RNA溶離份，RIG-I及IFN-β1轉錄本誘導與前驅體RNA及未經純化剪接反應物相比較弱。單獨剪接反應物之核糖核酸酶R處理不足以去除此效應。向環狀RNA中添加極少量之RIG-I配體3p-hpRNA誘導實質性RIG-I轉錄。在希拉細胞中，經核糖核酸酶R消化之剪接反應物之轉染誘導RIG-I及IFN-β1，但經純化環狀RNA並不如此。總體而言，與A549細胞相比，希拉細胞對污染性RNA物種之敏感性較低。

【0654】 監測在用剪接反應物或經完全純化之環狀RNA轉染A549細胞後前8小時內之RIG-I、IFN-β1、IL-6及RANTES轉錄本誘導的時程實驗不顯露針對環狀RNA之暫態反應。經純化環狀RNA類似地未能在RAW264.7鼠巨噬細胞中誘導促炎性轉錄本。

【0655】 用含有EMCV IRES及EGFP表現序列之經純化環狀RNA轉染A549細胞。此未能產生促炎性轉錄本之實質性誘導。此等資料表明，剪接反應物之非環狀組分負責先前研究中所觀測到之免疫原性，且環狀

RNA不為RIG-I之天然配體。

實例5

【0656】 *環狀RNA避免TLR偵測。*

【0657】 用多個線性或環狀RNA構築體轉染TLR 3、7及8報導子細胞株，且量測分泌胚胎鹼性磷酸酶(SEAP)。

【0658】 藉由使內含子及同源臂序列缺失來構築線性化RNA。隨後，用磷酸酶(在加帽之後的加帽RNA之情況下)處理線性RNA構築體且藉由HPLC將其純化。

【0659】 所嘗試之轉染中無一者在TLR7報導細胞中產生反應。藉由加帽線性化RNA、聚腺苷酸化線性化RNA、帶切口環狀RNA HPLC溶離份及早期環狀RNA溶離份活化TLR3及TLR8報導細胞。晚期環狀RNA溶離份及m1ψ-mRNA不在任何細胞株中引起TLR介導之反應。

【0660】 在第二實驗中，使用以下兩種方法線性化環狀RNA：在存在鎂離子之情況下熱處理環狀RNA及DNA寡核苷酸引導之核糖核酸酶H消化。兩種方法均產生大部分全長線性RNA及少量完整環狀RNA。用環狀RNA轉染TLR3、7及8報導細胞，藉由熱降解環狀RNA，或藉由核糖核酸酶H降解環狀RNA，且在轉染後36小時量測SEAP分泌。TLR8報導細胞分泌回應於經降解環狀RNA之兩種形式的SEAP，但針對環狀RNA轉染不產生比模擬物轉染大之反應。對於降解或完整條件，在TLR3及TLR7報導細胞中未觀測到活化，儘管藉由經活體外轉錄之線性化RNA活化TLR3。

實例6

【0661】 *未經修飾環狀RNA產生相比於線性RNA增加之持續活體內蛋白質表現。*

【0662】 對小鼠進行注射，且用未經修飾及經m1ψ修飾之人類紅血球生成素(hEpo)線性mRNA及環狀RNA轉染HEK293細胞。等莫耳轉染m1ψ-mRNA及未經修飾環狀RNA在HEK293細胞中產生穩固蛋白質表現。與GLuc線性mRNA及環狀RNA相比，hEpo線性mRNA及環狀RNA在等重量轉染HEK293及A549細胞後展現類似的相對蛋白質表現模式及細胞活力。

【0663】 在小鼠中，在將hEpo環狀RNA或線性mRNA注射至內臟脂肪中之後，在血清中偵測到hEpo。在注射未經修飾環狀RNA之後偵測到之hEpo比在注射未經修飾mRNA或m1ψ-mRNA之後偵測到之hEpo衰減更慢，且在注射後42小時仍存在。在注射未經純化環狀RNA剪接反應物或未經修飾線性mRNA後，血清hEpo快速減少。注射未經純化剪接反應物產生在血清中可偵測到之細胞介素反應，對於包括經純化環狀RNA之其他RNA未觀測到該細胞介素反應。

實例7

【0664】 *環狀RNA可活體內或活體外經由脂質奈米粒子有效地遞送。*

【0665】 將經純化環狀RNA調配至具有可離子化類脂質cKK-E12之脂質奈米粒子(LNP)中(Dong等人, 2014；Kauffman等人, 2015年)。該等粒子形成具有與含有市售的經5moU修飾之對照線性mRNA之粒子之平均大小、多分散性指數及囊封效率類似的平均大小、多分散性指數及囊封效率的均勻多層結構。

【0666】 當囊封於LNP中且添加至HEK293細胞中時，經純化hEpo環狀RNA展現比5moU-mRNA大之表現。LNP-RNA在HEK293細胞中之

表現穩定性與藉由轉染劑遞送之RNA之表現穩定性類似，5moU-mRNA及環狀RNA之略微延遲衰減除外。未經修飾環狀RNA及5moU-mRNA均未能活體外活化RIG-I/IFN-β1。

【0667】 在小鼠中，藉由局部注射將LNP-RNA遞送至內臟脂肪組織或靜脈內遞送至肝。在兩種情況下遞送後6小時，環狀RNA之血清hEpo表現較低，但與5moU-mRNA之血清hEpo表現相當。在脂肪注射未經修飾LNP-環狀RNA之後偵測到之血清hEpo比在脂肪注射LNP-5moU-mRNA之後偵測到之血清hEpo衰減更慢，其中血清中存在之表現衰減延遲與活體外標註之表現衰減延遲類似，但在靜脈內注射LNP-環狀RNA或LNP-5moU-mRNA之後的血清hEpo以大致相同速率衰減。在此等情況中之任一者下，血清細胞介素或局部RIG-I、TNFα或IL-6轉錄本誘導未增加。

實例8

【0668】 *HEK293、HepG2及1C1C7細胞中IRES之表現及功能穩定性。*

【0669】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及不同IRES之構築體環化。使用脂染胺MessengerMax將100 ng各環化反應物單獨地轉染至20,000個HEK293細胞、HepG2細胞及1C1C7細胞中。在24小時後評定各上清液中之發光作為蛋白質表現之量度。在HEK293細胞中，包括克羅希病毒B、薩利病毒FHB、愛知病毒、薩利病毒HG-J1及腸病毒J IRES之構築體在24小時產生大部分發光(圖1A)。在HepG2細胞中，包括愛知病毒、薩利病毒FHB、EMCV-Cf及CVA3 IRES之構築體在24小時產生高發光(圖1B)。在1C1C7細胞中，包括薩利病毒FHB、愛知病毒、薩利病毒NG-J1及薩利病毒A SZ-1 IRES之構築體在24小時產生高發

光(圖1C)。

【0670】 觀測到較大IRES在24小時產生較高發光之趨勢。較短總序列長度傾向於提高環化效率，因此選擇高表現及相對短之IRES可產生改良之構築體。在HEK293細胞中，使用克羅希病毒B IRES之構築體產生最高發光，尤其與類似長度之其他IRES相比(圖2A)。針對IRES大小繪製之IRES構築體在HepG2及1C1C7細胞中之表現係在圖2B及圖2C中。

【0671】 經3天量測選定IRES構築體在HepG2及1C1C7細胞中之功能穩定性。在用100 ng各環化反應物轉染20,000個細胞之後每24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光，接著進行完全培養基替換。薩利病毒A GUT及薩利病毒FHB在HepG2細胞中展現最高功能穩定性，且薩利病毒N-J1及薩利病毒FHB在1C1C7細胞中產生最穩定表現(圖3A及圖3B)。

實例9

【0672】 *Jurkat細胞中IRES之表現及功能穩定性。*

【0673】 使2組包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及先前測試之IRES子集之構築體環化。用1 μg各環化反應物電穿孔60,000個Jurkat細胞。在電穿孔後24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。將CVB3 IRES構築體包括於兩組中以用於組間比較及與先前確定之IRES功效的比較。CVB1及薩利病毒A SZ1 IRES構築體在24 h產生最大表現。資料可見於圖4A及圖4B中。

【0674】 經3天量測各輪經電穿孔Jurkat細胞中IRES構築體之功能穩定性。在用1 μg各環化反應物電穿孔60,000個細胞，接著進行完全培養基替換之後，每24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光(圖5A及圖5B)。

【0675】 薩利病毒A SZ1及薩利病毒A BN2 IRES構築體具有與其他構築體相比高之功能穩定性。

實例10

【0676】 *Jurkat細胞中環狀RNA及線性RNA之表現、功能穩定性及細胞介素釋放。*

【0677】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及薩利病毒FHB IRES之構築體環化。包括高斯螢光素酶表現序列及~150 nt聚A尾且經修飾以用5-甲氧基尿苷(5moU)置換100%尿苷之mRNA為市售的且購自Trilink。已顯示5moU核苷酸修飾改善mRNA穩定性及表現(Bioconjug Chem. 2016年3月16日;27(3):849-53)。量測且比較Jurkat細胞中經修飾mRNA、環化反應物(不純)及藉由粒徑排阻HPLC純化之環狀RNA (純)的表現(圖6A)。在用1 μg各RNA物種電穿孔60,000個細胞之後24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。

【0678】 在用1 μg各RNA物種電穿孔60,000個細胞，接著進行完全培養基替換之後每24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。經3天之Jurkat細胞中經修飾mRNA及環狀RNA之功能穩定性資料比較結果係在圖6B中。

【0679】 在用1 μg上文所描述之各RNA物種及3p-hpRNA (5'三磷酸酯髮夾RNA，其為已知RIG-I促效劑)電穿孔60,000個Jurkat細胞之後18小時量測IFNγ (圖7A)、IL-6 (圖7B)、IL-2 (圖7C)、RIG-I (圖7D)、IFN-β1 (圖7E)及TNFα (圖7F)轉錄本誘導。

實例11

【0680】 *單核球及巨噬細胞中環狀RNA及線性RNA之表現。*

【0681】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及薩利病毒FHB IRES之構築體環化。包括高斯螢光素酶表現序列及~150 nt聚A尾且經修飾以用5-甲氧基尿苷(5moU)置換100%尿苷之mRNA購自Trilink。量測人類原代單核球(圖8A)及人類原代巨噬細胞(圖8B)中環狀mRNA及經修飾mRNA之表現。在用1 μg各RNA物種電穿孔60,000個細胞之後24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。亦在電穿孔人類原代巨噬細胞之後4天量測發光且每24小時量測培養基變化(圖8C)。在各情況下，發光差異為統計學上顯著的($p < 0.05$)。

實例12

【0682】 *原代T細胞中IRES之表現及功能穩定性。*

【0683】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及先前測試之IRES子集之構築體環化，且藉由粒徑排阻HPLC純化反應產物。用1 μg各環狀RNA電穿孔150,000個原代人類CD3+ T細胞。在電穿孔後24小時量測上清液中來自高斯螢光素酶之發光(圖9A)。愛知病毒及CVB3 IRES構築體在24小時具有大部分表現。

【0684】 亦在電穿孔3天之後每24小時量測發光以便比較各構築體之功能穩定性(圖9B)。具有薩利病毒A SZ1 IRES之構築體為最穩定的。

實例13

【0685】 *原代T細胞及PBMC中環狀RNA及線性RNA之表現及功能穩定性。*

【0686】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及薩利病毒A SZ1 IRES或薩利病毒FHB IRES之構築體環化。包括高斯螢光素酶表現序列及~150 nt聚A尾且經修飾以用5-甲氧基尿苷(5moU)置換

100%尿苷之mRNA購自Trilink。量測人類原代CD3+ T細胞中薩利病毒ASZ1 IRES經HPLC純化之環狀mRNA及經修飾mRNA之表現。量測人類PBMC中薩利病毒FHB經HPLC純化之環狀mRNA、未經純化環狀mRNA及經修飾mRNA之表現。在用1 μg各RNA物種電穿孔150,000個細胞之後24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。原代人類T細胞之資料係在圖10A及圖10B中，且PBMC之資料係在圖10C中。在各情況下，經純化環狀RNA與未經純化環狀RNA或線性RNA之間的表現差異為顯著的($p < 0.05$)。

【0687】 在經3天電穿孔之後每24小時量測原代T細胞上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光以便比較構築體功能穩定性。資料示於圖10B中。在第2天及第3天對於原代T細胞之經純化環狀RNA與線性RNA之間的來自第1天量測之相對發光差異為顯著的。

實例14

【0688】 *利用念珠藻屬內含子中之排列位點之環化效率。*

【0689】 產生包括CVB3 IRES、高斯螢光素酶表現序列、念珠藻屬內含子/外顯子區、間隔子、內部雙螺旋體區及同源臂之RNA構築體。以HPLC量測使用傳統的念珠藻屬內含子排列位點及P9中之5個連續排列位點的構築體環化效率。P9中之5個連續排列位點之HPLC層析圖示於圖11A中。

【0690】 量測各種排列位點處之環化效率。環化效率經定義為以下中之各者之HPLC層析圖曲線下面積：環狀RNA/(環狀RNA+前驅體RNA)。各排列位點處之環化效率之分級定量係在圖11B中。選擇3個排列位點(指示於圖11B中)用於進一步研究。

【0691】 藉由活體外轉錄(IVT)環化此實例中之環狀RNA，隨後經由旋轉管柱將其純化。若包括與Mg^{2+}及鳥苷核苷酸一起培育之額外步驟，則所有構築體之環化效率可能較高；然而，移除此步驟允許用於環狀RNA構築體之間的比較及其最佳化。此水準之最佳化尤其可用於維持大RNA構築體，諸如編碼嵌合抗原受體之大RNA構築體的高環化效率。

實例15

【0692】 *替代性內含子之環化效率。*

【0693】 產生含有可變物種來源之經排列第1組內含子或排列位點及包括CVB3 IRES、高斯螢光素酶表現序列、間隔子、內部雙螺旋體區及同源臂之若干恆定元件的前驅體RNA。環化資料可見於圖12中。圖12A顯示解析前驅體、環狀RNA及內含子之層析圖。圖12B提供隨內含子構築體而變之基於圖12A中所示之層析圖之環化效率的分級定量。

【0694】 藉由活體外轉錄(IVT)環化此實例中之環狀RNA，隨後進行旋轉管柱純化。若包括與Mg^{2+}及鳥苷核苷酸一起培育之額外步驟，則所有構築體之環化效率可能較高；然而，移除此步驟允許用於環狀RNA構築體之間的比較及其最佳化。此水準之最佳化尤其可用於維持大RNA構築體，諸如編碼嵌合抗原受體之大RNA構築體的高環化效率。

實例16

【0695】 *利用同源臂呈現或長度之環化效率。*

【0696】 產生包括CVB3 IRES、高斯螢光素酶表現序列、念珠藻屬內含子/外顯子區、間隔子及內部雙螺旋體區之RNA構築體。測試具有30nt 25% GC同源臂或不具有同源臂的呈現3個念珠藻屬內含子排列位點之構築體(「NA」)。在無與Mg^{2+}一起培育之步驟之情況下使此等構築體

環化。量測且比較環化效率。資料可見於圖13中。各缺乏同源臂之構築體之環化效率較高。圖13A提供環化效率之分級定量；圖13B提供解析前驅體、環狀RNA及內含子之層析圖。

【0697】 對於3個排列位點中之各者，產生具有10 nt、20 nt及30 nt臂長度以及25%、50%及75% GC之構築體。量測此等構築體之剪接效率且與不具有同源臂之構築體進行比較(圖14)。剪接效率經定義為游離內含子相對於剪接反應物中之總RNA的比例。

【0698】 圖15A (左側)含有顯示強同源臂對改善之剪接效率之貢獻的HPLC層析圖。左上：75% GC含量，10 nt同源臂。左中：75% GC含量，20 nt同源臂。左下：75% GC含量，30 nt同源臂。

【0699】 圖15A (右側)顯示指示在環狀RNA峰上呈現為肩之與增加之切口配對的提高之剪接效率的HPLC層析圖。右上：75% GC含量，10 nt同源臂。右中：75% GC含量，20 nt同源臂。右下：75% GC含量，30 nt同源臂。

【0700】 圖15B (左側)顯示經假設展現改善之環化效率的排列位點與同源臂之選定組合。

【0701】 圖15B (右側)顯示經假設展現改善之環化效率、經大腸桿菌聚A聚合酶處理的排列位點與同源臂之選定組合。

【0702】 藉由活體外轉錄(IVT)環化此實例中之環狀RNA，隨後進行旋轉管柱純化。若包括與鳥苷核苷酸一起之額外Mg^{2+}培育步驟，則所有構築體之環化效率可能較高；然而，移除此步驟允許用於環狀RNA構築體之間的比較及其最佳化。此水準之最佳化尤其可用於維持大RNA構築體，諸如編碼嵌合抗原受體之大RNA構築體的高環化效率。

實例17

【0703】 *編碼嵌合抗原受體之環狀RNA。*

【0704】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、Kymriah嵌合抗原受體(CAR)表現序列及CVB3 IRES之構築體環化。用500 ng環狀RNA電穿孔100,000個人類原代CD3+ T細胞且與穩定地表現GFP及螢火蟲螢光素酶之Raji細胞共培養24小時。效應物:目標比(E:T比)為0.75:1。對100,000個人類原代CD3+ T細胞進行模擬電穿孔且共培養作為對照(圖16)。

【0705】 對100,000個人類原代CD3+ T細胞組進行模擬電穿孔或用1 μg環狀RNA對其進行電穿孔，隨後與穩定地表現GFP及螢火蟲螢光素酶之Raji細胞共培養48小時。E:T比10:1 (圖17)。

【0706】 以螢火蟲發光偵測測定Raji目標細胞之比溶胞率定量(圖18)。將經模擬電穿孔或經編碼不同CAR序列之環狀RNA電穿孔之100,000個人類原代CD3+ T細胞與穩定地表現GFP及螢火蟲螢光素酶之Raji細胞共培養48小時。比溶胞率%經界定為1-[CAR條件發光]/[模擬條件發光]。E:T比10:1。

實例18

【0707】 *Jurkat細胞及靜息人類T細胞中環狀RNA及線性RNA之表現及功能穩定性。*

【0708】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及先前測試之IRES子集之構築體環化，且藉由粒徑排阻HPLC純化反應產物。用1 μg環狀RNA或5moU-mRNA電穿孔150,000個Jurkat細胞。在電穿孔後24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光(圖19A左側)。用1 μg環狀RNA或5moU-mRNA電穿孔150,000個靜息原代人類CD3+ T細胞

(刺激後10天)。在電穿孔後24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光(圖19A右側)。

【0709】 在電穿孔、接著為完全培養基替換之後每24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。功能穩定性資料示於圖19B中。在各情況下，環狀RNA具有比線性RNA更高程度的功能穩定性，其中Jurkat細胞中之差異更明顯。

實例19

【0710】 *用線性RNA或不同環狀RNA構築體電穿孔之細胞之IFN-β1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFNγ及TNFα轉錄本誘導。*

【0711】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、高斯螢光素酶表現序列及先前測試之IRES子集之構築體環化，且藉由粒徑排阻HPLC純化反應產物。用1 μg環狀RNA、5moU-mRNA或免疫刺激性陽性對照聚肌苷:胞嘧啶電穿孔150,000個CD3+人類T細胞。在電穿孔後18小時量測IFN-β1 (圖20A)、RIG-I (圖20B)、IL-2 (圖20C)、IL-6 (圖20D)、IFN-γ (圖20E)及TNF-α (圖20F)轉錄本誘導。

實例20

【0712】 *用不同量之環狀RNA或線性RNA電穿孔的表現CAR之細胞對目標細胞之比溶胞率及IFNγ轉錄本誘導；在不同E:T比下之表現CAR之細胞對目標細胞及非目標細胞之比溶胞率。*

【0713】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、抗CD19 CAR表現序列及CVB3 IRES之構築體環化，且藉由粒徑排阻HPLC純化反應產物。將經模擬電穿孔或用不同數量之編碼抗CD19 CAR序列之環狀RNA電穿孔的150,000個人類原代CD3+ T細胞與穩定地表現GFP及螢火蟲螢光素酶之

Raji細胞以2:1之E:T比共培養12小時。以螢火蟲發光偵測測定Raji目標細胞之比溶胞率(圖21A)。比溶胞率%定義為1-[CAR條件發光]/[模擬條件發光]。在電穿孔後24小時量測IFNγ轉錄本誘導(圖21B)。

【0714】 對150,000個人類原代CD3+ T細胞進行模擬電穿孔或用500 ng環狀RNA或編碼抗CD19 CAR序列之m1ψ-mRNA對其進行電穿孔，隨後與穩定地表現螢火蟲螢光素酶之Raji細胞以不同E:T比共培養24小時。以螢火蟲發光偵測測定Raji目標細胞之比溶胞率(圖22A)。比溶胞率經定義為1-[CAR條件發光]/[模擬條件發光]。

【0715】 亦將表現CAR之T細胞與穩定地表現螢火蟲螢光素酶之Raji或K562細胞以不同E:T比共培養24小時。以螢火蟲發光偵測測定Raji目標細胞或K562非目標細胞之比溶胞率(圖22B)。比溶胞率%定義為1-[CAR條件發光]/[模擬條件發光]。

實例21

【0716】 *經編碼CAR之環狀RNA或線性RNA電穿孔之T細胞對目標細胞之比溶胞率。*

【0717】 使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、抗CD19 CAR表現序列及CVB3 IRES之構築體環化，且藉由粒徑排阻HPLC純化反應產物。用各自編碼靶向CD19之CAR的500 ng環狀RNA或等莫耳數量之m1ψ-mRNA電穿孔人類原代CD3+ T細胞。經7天將Raji細胞以10:1之E:T比添加至CAR-T細胞培養物中。在1、3、5及7天量測兩種構築體之比溶胞率% (圖23)。

實例22

【0718】 *表現抗CD19 CAR或抗BCMA CAR之T細胞對Raji細胞之比溶胞率。*

【0719】使包括念珠藻屬內含子/外顯子區、抗CD19或抗BCMA CAR表現序列及CVB3 IRES之構築體環化，且藉由粒徑排阻HPLC純化反應產物。用500 ng環狀RNA電穿孔150,000個原代人類CD3+ T細胞，隨後以2:1之E:T比與Raji細胞共培養。在電穿孔後12小時量測比溶胞率% (圖24)。

實例23

【0720】*表現抗原之環狀RNA及線性RNA之表現、功能穩定性及細胞介素轉錄本誘導。*

【0721】使包括一或多個抗原表現序列之構築體環化，且藉由粒徑排阻HPLC純化反應產物。用環狀RNA或mRNA電穿孔抗原呈現細胞。

【0722】經由ELISA量測活體外抗原產生。視情況而言，在電穿孔之後每24小時量測抗原生產。在用編碼抗原之環狀RNA或線性RNA電穿孔抗原呈現細胞之後18小時量測細胞介素轉錄本誘導或釋放。所測試之細胞介素可包括IFN-β1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFNγ、RANTES及TNFα。

【0723】使用經純化環狀RNA、經純化環狀RNA加反義環狀RNA以及未經純化環狀RNA量測活體外抗原生產及細胞介素誘導以便尋找最佳地保留表現及免疫刺激之比率。

實例24

【0724】*動物模型中之活體內抗原及抗體表現。*

【0725】為了評定編碼抗原之環狀RNA促進活體內抗原表現及抗體生產之能力，經由肌肉內注射將遞增劑量之編碼一或多種抗原之RNA引入小鼠中。

【0726】向小鼠注射一次，28天後收集血液，隨後再次注射，且其

後14天收集血液。經由ELISA量測針對所關注之抗原的中和抗體。

實例25

【0727】 *防止感染。*

【0728】 為了評定編碼抗原之環狀RNA防止或治癒感染之能力，經由肌肉內注射將編碼病毒(諸如流感)之一或多種抗原的RNA引入小鼠中。

【0729】 小鼠接受初始注射及編碼一或多種抗原之環狀RNA的加強注射。藉由經2週之體重減輕及死亡率測定諸如流感之病毒防護。

實例26

【0730】 ***實例26A：****化合物合成*

【0731】 代表性本發明之可離子化脂質之合成描述於PCT申請案PCT/US2016/052352、PCT/US2016/068300、PCT/US2010/061058、PCT/US2018/058555、PCT/US2018/053569、PCT/US2017/028981、PCT/US2019/025246、PCT/US2018/035419、PCT/US2019/015913、PCT/US2020/063494及具有公開號20190314524、20190321489及20190314284之美國申請案中，該等案中之各者之內容以全文引用之方式併入本文中。

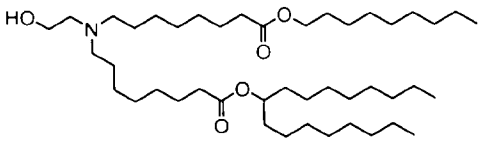
【0732】 ***實例26B：****化合物合成*

【0733】 本發明之代表性可離子化脂質之合成描述於美國專利公開案第US20170210697A1號中，該案之內容以全文引用之方式併入本文中。

實例27

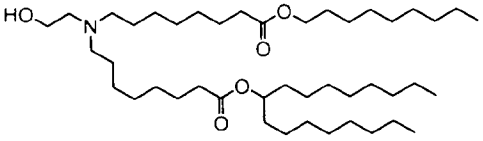
【0734】 *器官之蛋白質表現*

【0735】 產生編碼FLuc之環狀RNA或線性RNA且將其裝載至具有

以下調配物之轉移媒劑中：50%由  表示之可離子化脂質、10% DSPC、1.5% PEG-DMG、38.5%膽固醇。以0.2 mg/kg向CD-1小鼠給藥，且在6小時(活體IVIS)及24小時(活體IVIS及離體IVIS)量測發光。量測肝、脾、腎、肺及心臟之總通量(所關注之區域上之光子/秒)。

實例28

【0736】 *脾中之表現分佈*

【0737】 產生編碼GFP之環狀RNA或線性RNA且將其裝載至具有以下調配物之轉移媒劑中：50%由  表示之可離子化脂質、10% DSPC、1.5% PEG-DMG、38.5%膽固醇。向CD-1小鼠投與該調配物。在脾細胞上運行流式細胞分析技術以測定跨細胞類型之表現分佈。

實例29

【0738】 ***實例29A***：*奈米粒子組合物之產生*

【0739】 為了研究用於將環狀RNA遞送至細胞之安全且有效的奈米粒子組合物，製備且測試一系列調配物。具體言之，使奈米粒子組合物之脂質組分中之特定元素及其比率最佳化。

【0740】 可在1個流體流中或用諸如微流體及兩個流體流之T-接合點混合之混合方法製造奈米粒子，其中之一者含有環狀RNA且另一者具有脂質組分。

【0741】 藉由將可離子化脂質、視情況選用之輔助脂質(諸如

DOPE、DSPC或油酸，可獲自Avanti Polar Lipids，Alabaster，AL)、PEG脂質(諸如1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇，亦稱為PEG-DMG，可獲自Avanti Polar Lipids、Alabaster，AL)及結構性脂質(諸如膽固醇)合併來製備呈約例如40或50 mM於例如乙醇之溶劑中之濃度的脂質組合物。溶液應冷藏儲存在例如-20℃下。將脂質合併，得到所需莫耳比(參見例如下表17a及表17b)，且用水及乙醇稀釋至例如在約5.5 mM與約25 mM之間的最終脂質濃度。

表17a

調配物編號	描述
1	將C12-200、DOPE、Chol及DMG-PEG2K (40:30:25:5)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1 mg/mL儲備液製備環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。
2	將DODAP、DOPE、膽固醇及DMG-PEG2K (18:56:20:6)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1 mg/mL儲備液製備EPO環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。最終濃度=1.35 mg/mL EPO環狀RNA (經囊封)。Zave=75.9 nm (Dv(50)=57.3 nm；Dv(90)=92.1 nm)。
3	將HGT4003、DOPE、膽固醇及DMG-PEG2K (50:25:20:5)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1 mg/mL儲備液製備環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。
4	將ICE、DOPE及DMG-PEG2K (70:25:5)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1 mg/mL儲備液製備環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。
5	將HGT5000、DOPE、膽固醇及DMG-PEG2K (40:20:35:5)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1

	mg/mL儲備液製備EPO環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。最終濃度=1.82 mg/mL EPO mRNA (經囊封)。Zave=105.6 nm (Dv(50)=53.7 nm；Dv(90)=157 nm)。
6	將HGT5001、DOPE、膽固醇及DMG-PEG2K (40:20:35:5)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1 mg/mL儲備液製備EPO環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。
7	將HGT5001、DOPE、膽固醇及DMG-PEG2K (35:16:46.5:2.5)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1 mg/mL儲備液製備EPO環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。
8	將HGT5001、DOPE、膽固醇及DMG-PEG2K (40:10:40:10)之50 mg/mL乙醇溶液之等分試樣混合且用乙醇稀釋至3 mL最終體積。單獨地，由1 mg/mL儲備液製備EPO環狀RNA之緩衝水溶液(10 mM檸檬酸鹽/150 mM NaCl，pH 4.5)。將脂質溶液快速注射至環狀RNA水溶液中且振盪，得到於20%乙醇中之最終懸浮液。過濾所得奈米粒子懸浮液，用1×PBS (pH 7.4)透濾，濃縮且儲存於2-8℃下。

【0742】在一些實施例中，轉移媒劑具有如表17a中所描述之調配物。

表17b

組成(mol%)	組分
40:20:38.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
45:15:38.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
50:10:38.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
55:5:38.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
60:5:33.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
45:20:33.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
50:20:28.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
55:20:23.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
60:20:18.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
40:15:43.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
50:15:33.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG

55:15:28.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
60:15:23.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
40:10:48.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
45:10:43.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
55:10:33.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
60:10:28.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
40:5:53.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
45:5:48.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
50:5:43.5:1.5	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
40:20:40:0	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
45:20:35:0	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
50:20:30:0	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
55:20:25:0	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
60:20:20:0	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG
40:15:45:0	化合物:磷脂:植固醇*:PEG-DMG

【0743】 在一些實施例中，轉移媒劑具有如表17b中所描述之調配物。

【0744】 對於包括環狀RNA之奈米粒子組合物，將呈0.1 mg/ml濃度之環狀RNA於去離子水中之溶液在例如pH在3與4之間的50 mM檸檬酸鈉緩衝液之緩衝液中稀釋以形成儲備溶液。或者，將呈0.15 mg/ml濃度之環狀RNA於去離子水中之溶液在例如pH在3與4.5之間的6.25 mM乙酸鈉緩衝液之緩衝液中稀釋以形成儲備溶液。

【0745】 藉由將脂質溶液與包括環狀RNA之溶液以在約5:1與約50:1之間的脂質組分與環狀RNA wt:wt比合併來製備包括環狀RNA及脂質組分之奈米粒子組合物。使用例如基於NanoAssemblr微流體之系統以在約10 ml/min與約18 ml/min之間或在約5 ml/min與約18 ml/min之間的流動速率將脂質溶液快速注射至環狀RNA溶液中，產生水與乙醇比在約1:1與約4:1之間的懸浮液。

【0746】 可藉由透析處理奈米粒子組合物以移除乙醇且達成緩衝液

交換。使用Slide-A-Lyzer卡匣(Thermo Fisher Scientific Inc.，Rockford，IL)以磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) pH 7.4以為主要產物體積200倍之體積透析調配物兩次，其中分子量截止值為10 kDa或20 kDa。隨後，在4℃下透析調配物隔夜。經由0.2 μm無菌過濾器(Sarstedt，Nümbrecht，Germany)將所得奈米粒子懸浮液過濾至玻璃小瓶中且用捲曲密封件密封。一般獲得0.01 mg/ml至0.15 mg/ml奈米粒子組合物溶液。

【0747】 上文所描述之方法誘導奈米沈澱及粒子形成。

【0748】 可使用包括但不限於T-接合點及直接注射之替代性方法以達成相同奈米沈澱。B. 奈米粒子組合物表徵

【0749】 可在測定粒徑之1×PBS及測定ζ電位之15 mM PBS中使用Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd，Malvern，Worcestershire，UK)以測定奈米粒子組合物之粒徑、多分散性指數(PDI)及ζ電位。

【0750】 可使用紫外線可見光譜法以測定奈米粒子組合物中之環狀RNA之濃度。將100 μL含經稀釋調配物之1×PBS添加至900 μL甲醇與氯仿之4:1 (v/v)混合物中。在混合後，在DU 800分光光度計(Beckman Coulter，Beckman Coulter Inc.，Brea，CA)上記錄例如在230 nm與330 nm之間的溶液之吸光度譜。可基於組合物中所使用之環狀RNA之消光係數及在例如260 nm之波長下的吸光度與在例如330 nm之波長下的基線值之間的差異來計算奈米粒子組合物中之環狀RNA的濃度。

【0751】 QUANT-IT™ RIBOGREEN® RNA分析(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)可用於評估奈米粒子組合物對環狀RNA之囊封。將樣品在TE緩衝溶液(10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA，pH 7.5)中稀

釋至大致5 μg/mL或1 μg/mL之濃度。將50 μL經稀釋樣品轉移至聚苯乙烯96孔盤中，且將50 μL TE緩衝液或50 μL之2%-4% Triton X-100溶液添加至孔中。將盤在37℃溫度下培育15分鐘。將RIBOGREEN®試劑以1:100或1:200稀釋於TE緩衝液中，且將100 μL此溶液添加至各孔中。可使用螢光盤讀取器(Wallac Victor 1420多標記計數器；Perkin Elmer，Waltham，MA)量測在例如約480 nm之激發波長及例如約520 nm之發射波長下之螢光強度。自樣品中之各者之螢光值減去空白試劑之螢光值，且藉由將完整樣品(不添加Triton X-100)之螢光強度除以破裂樣品(由添加Triton X-100造成)之螢光值來測定游離環狀RNA百分比。

【0752】 ***實例29B：****活體內調配物研究*

【0753】 為了監測各種奈米粒子組合物如何有效地將環狀RNA遞送至靶向細胞，製備不同的包括環狀RNA之奈米粒子組合物且投與嚙齒動物群體。向小鼠靜脈內、肌肉內、動脈內或瘤內投與單次劑量，包括具有脂質奈米粒子調配物之奈米粒子組合物。在一些情況下，可使小鼠吸入劑量。劑量大小可在0.001 mg/kg至10 mg/kg範圍內，其中對於小鼠之各1 kg體重，10 mg/kg描述包括10 mg含環狀RNA之奈米粒子組合物的劑量。亦可採用包括PBS之對照組合物。

【0754】 在將奈米粒子組合物投與小鼠後，可藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)、生物發光成像或其他方法量測特定調配物之劑量遞送概況、劑量反應及毒性以及其劑量。亦可評定蛋白質表現之時程。用於評估之自嚙齒動物收集之樣品可包括血液及組織(例如來自肌內注射部位之肌肉組織及內部組織)；樣品收集可涉及處死動物。

【0755】 藉由投與包括環狀RNA之組合物誘導之較高水準之蛋白質

表現將指示較高環狀RNA轉譯及/或奈米粒子組合物環狀RNA遞送效率。因為不認為非RNA組分會影響轉譯機制本身，因此較高水準之蛋白質表現可能指示相對於其他奈米粒子組合物較高的由給定奈米粒子組合物進行之環狀RNA遞送效率或其之不存在。

實例30

【0756】 *奈米粒子組合物表徵*

【0757】 可在測定粒徑之1×PBS及測定ζ電位之15 mM PBS中使用Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd，Malvern，Worcestershire，UK)以測定轉移媒劑組合物之粒徑、多分散性指數(PDI)及ζ電位。

【0758】 可使用紫外線可見光譜法以測定轉移媒劑組合物中之治療劑及/或預防劑(例如RNA)之濃度。將100 μL含經稀釋調配物之1×PBS添加至900 μL甲醇與氯仿之4:1 (v/v)混合物中。在混合後，在DU 800分光光度計(Beckman Coulter，Beckman Coulter Inc.，Brea，CA)上記錄例如在230 nm與330 nm之間的溶液之吸光度譜。可基於組合物中所使用之治療劑及/或預防劑之消光係數及在例如260 nm之波長下之吸光度與在例如330 nm之波長下之基線值之間的差異來計算轉移媒劑組合物中之治療劑及/或預防劑的濃度。

【0759】 對於包括RNA之轉移媒劑組合物，可使用QUANT-IT™ RIBOGREEN® RNA分析(Invitrogen Corporation Carlsbad，CA)以評估轉移媒劑組合物對RNA之囊封。將樣品在TE緩衝溶液(10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA，pH 7.5)中稀釋至大致5 μg/mL或1 μg/mL之濃度。將50 μL經稀釋樣品轉移至聚苯乙烯96孔盤中，且將50 μL TE緩衝液或50 μL之

2%-4% Triton X-100溶液添加至孔中。將盤在37℃溫度下培育15分鐘。將RIBOGREEN®試劑以1:100或1:200稀釋於TE緩衝液中，且將100 μL此溶液添加至各孔中。可使用螢光盤讀取器(Wallac Victor 1420多標記計數器；Perkin Elmer, Waltham, MA)量測在例如約480 nm之激發波長及例如約520 nm之發射波長下之螢光強度。自樣品中之各者之螢光值減去空白試劑之螢光值，且藉由將完整樣品(不添加Triton X-100)之螢光強度除以破裂樣品(由添加Triton X-100造成)之螢光值來測定游離RNA百分比。

實例31

【0760】 *T細胞靶向*

【0761】 為了使轉移媒劑靶向T細胞，使例如抗CD8抗體之T細胞抗原結合劑與轉移媒劑之表面偶合。在存在含EDTA之PBS之情況下用過量DTT輕度還原抗T細胞抗原抗體以暴露游離鉸鏈區硫醇。為了移除DTT，使抗體通過去鹽管柱。使用異雙功能交聯劑SM(PEG)24以使抗體錨定至裝載環狀RNA之轉移媒劑之表面(胺基存在於PEG脂質之頭基中，藉由DTT產生抗體上之游離硫醇基，SM(PEG)24在胺與硫醇基之間交聯)。首先，將轉移媒劑與過量SM(PEG)24一起培育且離心以移除未反應之交聯劑。隨後，將經活化轉移媒劑與過量經還原抗T細胞抗原抗體一起培育。使用離心過濾裝置移除未結合抗體。

實例32

【0762】 *使用RV88之含有RNA之轉移媒劑。*

【0763】 在此實例中，使用2-D渦旋微流晶片用陽離子脂質RV88合成含有RNA之轉移媒劑以遞送環狀RNA。

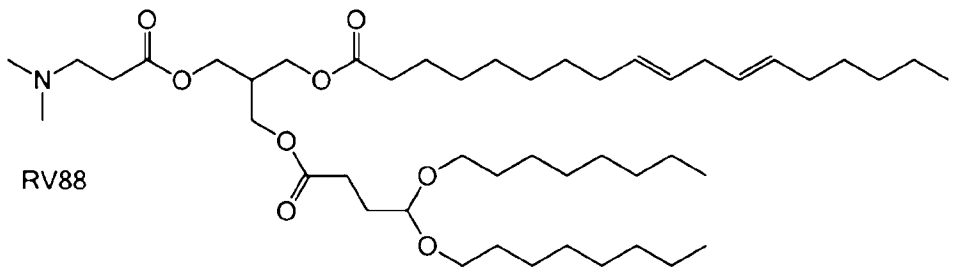


表18a

材料及儀器	供應商	目錄號
1M Tris-HCl。pH 8.0。無菌	Teknova	T1080
5M氯化鈉溶液	Teknova	S0250
QB檸檬酸鹽緩衝液。pH 6 0 (100 mM)	Teknova	Q2446
無核酸酶水	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV88	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
膽固醇	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
乙醇	Acros Organic	615090010
5 mL硼矽酸鹽玻璃小瓶	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25去鹽管柱	GE Healthcare	VWR Cat. #95055-984
Quant-iT RiboGreen RNA分析套組	Molecular Probes/ Life Technologies	R11490
黑色96孔微量盤	Greiner	655900

【0764】 RV88、DSPC及膽固醇全部在硼二氧化矽小瓶中在乙醇中以10 mg/ml之濃度製備。脂質14:0-PEG2K PE亦在硼二氧化矽玻璃小瓶中以4 mg/ml之濃度製備。藉由音波處理含脂質之乙醇2 min來達到呈儲備濃度之脂質之溶解。接著，在設定在170 rpm下在37℃下之回轉式傾斜振盪器上加熱溶液10 min。接著，在26℃下平衡小瓶最少45 min。接著，藉由添加如表18b中所示之體積之儲備脂質來使脂質混合。接著，用乙醇調節溶液以使得最終脂質濃度為7.92 mg/ml。

表18b

組成	MW	%	nmol	mg	儲備液 (mg/ml)	µl	乙醇 (µl)
RV88	794.2	40%	7200	5.72	10	571.8	155.3
DSPC	790.15	10%	1800	1.42	10	142.2	
膽固醇	386.67	46%	8640	3.34	10	334.1	
PEG2K	2693.3	2%	360	0.97	4	242.4	

【0765】 將RNA製備為具有75 mM pH 6.0檸檬酸鹽緩衝液及1.250 mg/ml濃度之RNA的儲備溶液。接著，用75 mM pH 6.0檸檬酸鹽緩衝液將RNA濃度調整至0.1037 mg/ml，平衡至26℃。接著，將溶液在26℃下培育最少25 min。

【0766】 用乙醇清潔微流體腔室，且藉由用RNA溶液裝載注射器且用乙醇脂質裝載另一注射器來製備neMYSIS注射泵。兩個注射器均經裝載且處於neMESYS軟體之控制下。接著，將溶液以2之水相與有機相比率及22 ml/min之總流動速率(對於RNA為14.67 ml/min且對於脂質溶液為7.33 ml/min)施用至混合晶片。兩個泵同步地啟動。以4×1 ml溶離份收集自微流體晶片流動之混合器溶液，其中第一溶離份作為廢料被丟棄。藉由使用G-25微型去鹽管柱將含有RNA-脂質體之殘餘溶液交換為10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA pH 7.5。在緩衝液交換之後，分別經由DLS分析及Ribogreen分析表徵物質大小及RNA截留(entrapment)。

實例33

【0767】 *使用RV94之含有RNA之轉移媒劑。*

【0768】 在此實例中，使用2-D渦旋微流晶片用陽離子脂質RV94合成含有RNA之脂質體以遞送環狀RNA。

RV94

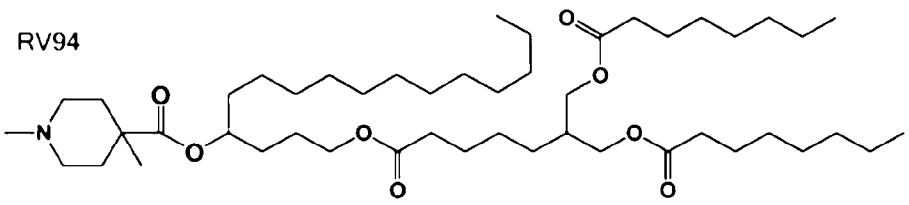


表19

材料及儀器	供應商	目錄號
1M Tris-HCl。pH 8.0。無菌	Teknova	T1080
5M氯化鈉溶液	Teknova	S0250
Q8檸檬酸鹽緩衝液。pH 6 0 (100 mM)	Teknova	Q2446
無核酸酶水	Ambton	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV94	GVKbio	
DSPC	Lipoid	556500
膽固醇	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
乙醇	Acros Organic	615090010
5 mL硼矽酸鹽玻璃小瓶	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25去鹽管柱	GE Healthcare	VWR Cat. #95055-984
Quant-iT RiboGreen RNA分析套組	Molecular Probes/Life Technologies	R11490
黑色96孔微量盤	Greiner	655900

【0769】 如實例29中一般，使用表20中提及之材料量將脂質製備為7.92 mg/ml之最終脂質濃度。

表20

組成	MW	%	nmol	mg	儲備液 (mg/ml)	µl	乙醇(µl)
RV94	808.22	40%	2880	2.33	10	232.8	155.3
DSPC	790.15	10%	720	0.57	10	56.9	
膽固醇	386.67	48%	3456	1.34	10	133.6	
PEG2K	2693.3	2%	144	0.39	4	97.0	

【0770】 將環狀RNA水溶液製備為具有75 mM pH 6.0檸檬酸鹽緩衝液、1.250 mg/ml 環狀RNA之儲備溶液。接著，用75 mM pH 6.0檸檬酸鹽緩衝液將RNA濃度調整至0.1037 mg/ml，平衡至26℃。接著，將溶液在

26℃下培育最少25 min。

【0771】 用乙醇清潔微流體腔室，且藉由用RNA溶液裝載注射器且用乙醇脂質裝載另一注射器來製備neMYSIS注射泵。兩個注射器均經裝載且處於neMESYS軟體之控制下。隨後，將溶液以2之水相與有機相比及22 ml/min之總流動速率(對於RNA為14.67 ml/min且對於脂質溶液為7.33 ml/min)施用至混合晶片 。兩個泵同步地啟動。以4×1 ml溶離份收集自微流體晶片流動之混合器溶液，其中第一溶離份作為廢料被丟棄。如上文所描述，藉由使用G-25微型去鹽管柱將含有環狀RNA-轉移媒劑之殘餘溶液交換為10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA pH 7.5。在緩衝液交換之後，分別經由DLS分析及Ribogreen分析表徵物質大小及RNA截留。脂質體之生物物理學分析示於表21中。

表21

樣品名稱	NP比率	TFR	比率	RNA囊封量	RNA囊封產率	大小	
		ml/min	(水/有機相)	(μg/ml)	%	d.nm	PDI
SAM-RV94	8	22	2	31.46	86.9	113.1	0.12

實例34

【0772】 *用於管線中混合之一般方案。*

【0773】 製備個別儲備溶液及單獨儲備溶液-一者含有脂質且另一者含有環狀RNA。藉由溶解於90%乙醇中來製備含有所需脂質或脂質混合物、DSPC、膽固醇及PEG脂質之脂質儲備液。殘餘10%為低pH檸檬酸鹽緩衝液。脂質儲備液之濃度為4 mg/mL。此檸檬酸鹽緩衝液之pH可在pH 3與pH 5之間的範圍內，此視所採用之脂質之類型而定。環狀RNA亦以4 mg/mL之濃度溶解於檸檬酸鹽緩衝液中。製備5 mL各儲備溶液。

【0774】 儲備溶液為完全清澈的，且在與環狀RNA合併之前確保脂質完全溶解。可加熱儲備溶液以完全溶解脂質。該過程中所用之環狀RNA可為未經修飾或經修飾寡核苷酸，且可與諸如膽固醇之親脂性部分結合。

【0775】 藉由將各溶液泵送至T-接合點來合併個別儲備液。使用雙頭Watson-Marlow泵以同時控制兩個物料流之啟動及終止。將1.6 mm聚丙烯管進一步精簡至0.8 mm管以便增大線性流動速率。將聚丙烯管線(ID = 0.8 mm)連接至T-接合點之任一側。對於4.1 mm^3之所得體積，聚丙烯T具有1.6 mm之線性邊緣。將聚丙烯管線之大端(1.6 mm)中之各者置放於含有經溶解脂質儲備液或經溶解環狀RNA之試管中。在T-接合點之後，將單一管置放在合併流離開之處。接著，將管延伸至具有2×體積之PBS之容器中，快速攪拌該容器。泵之流動速率係在300 rpm或110 mL/min之設定下。移除乙醇且藉由透析交換為PBS。接著，使用離心或透濾將脂質調配物濃縮至適當工作濃度。

【0776】 C57BL/6小鼠(Charles River Labs，MA)經由尾部靜脈注射接受鹽水或經調配之環狀RNA。在投與後之各種時間點，藉由眶後放血收集血清樣品。使用顯色分析(Biophen FVTI，Aniara Corporation，OH)測定樣品中之因子VII蛋白之血清含量。為了測定因子VII之肝RNA含量，處死動物，且收取肝且在液氮中速凍。自冷凍組織製備組織溶解物，且使用分支鏈DNA分析(QuantiGene分析，Panomics，CA)定量因子VII之肝RNA含量。

【0777】 在C57BL/6小鼠中靜脈內(彈丸)注射後48小時評定經FVTI siRNA治療之動物中之FVII活性。遵循製造商說明書以微量盤規模使用市

售的用於測定血清或組織中之蛋白質含量之套組量測FVII。針對未經治療之對照小鼠測定FVII減少，且結果表示為殘餘FVII %。在各新穎脂質體組合物之篩選中使用兩個劑量水準(0.05 mg/kg及0.005 mg/kg FVII siRNA)。

實例36

【0778】 *使用預先形成之囊泡的環狀RNA調配物。*

【0779】 使用預先形成之囊泡方法製造含有陽離子脂質之轉移媒劑。將陽離子脂質、DSPC、膽固醇及PEG-脂質分別以40/10/40/10之莫耳比溶解於乙醇中。將脂質混合物添加至水性緩衝液(50 mM檸檬酸鹽，pH 4)中且混合，分別達到30% (vol/vol)及6.1 mg/mL之最終乙醇及脂質濃度，且在擠出之前使其在室溫下平衡2 min。在22℃下使用Lipex擠出機(Northern Lipids，Vancouver，BC)經由兩個堆疊的80 nm孔徑過濾器(Nuclepore)擠出水合脂質直至以Nicomp分析測定，獲得70-90 nm之囊泡直徑。對於不形成小囊泡之陽離子脂質混合物，用較低pH緩衝液(50 mM檸檬酸鹽，pH 3)水合脂質混合物以使DSPC頭基上之磷酸酯基質子化幫助形成穩定的70-90 nm囊泡。

【0780】 將FVII環狀RNA (溶解於含有30%乙醇之50 mM檸檬酸鹽pH 4水溶液中)添加至囊泡中，以~5 mL/min之速率預平衡至35℃且混合。在達成0.06 (wt wt)之最終目標環狀RNA/脂質比之後，將混合物在35℃下再培育30 min以允許囊泡再組構(re-organization)及FVII RNA囊封。接著，移除乙醇，且藉由透析或切向流透濾用PBS (155 mM NaCl、3 mM Na_2HPO_4、1 mM KH_2PO_4，pH 7.5)置換外部緩衝液。在移除未經囊封RNA之後使用粒徑排阻旋轉管柱或離子交換旋轉管柱測定最終經囊封

環狀RNA與脂質比。

實例37

【0781】 ***實例37A：****經工程改造之環狀RNA表現三特異性抗原結合蛋白*

【0782】 環狀RNA經設計以包括：(1) 3'後剪接I組內含子片段；(2)內部核糖體進入位點(IRES)；(3)三特異性抗原結合蛋白編碼區；及(4) 3'雙螺旋體區。三特異性抗原結合蛋白區經構築以產生將結合至例如GPC3之目標抗原的例示性三特異性抗原結合蛋白。

【0783】 ***實例37B：****產生scFv CD3結合域*

【0784】 人類CD3ε鏈典型序列為Uniprot登錄號P07766。人類CD3γ鏈典型序列為Uniprot登錄號P09693。人類CD3δ鏈典型序列為Uniprot登錄號P043234。經由諸如親和力成熟之已知技術產生針對CD3ε、CD3γ或CD3δ之抗體。在使用鼠抗CD3抗體作為起始物質之情況下，需要人源化鼠抗CD3抗體用於臨床環境，其中小鼠特異性殘基可在接受本文所描述之三特異性抗原結合蛋白治療之個體中誘導人類抗小鼠抗原(HAMA)反應。藉由使來自鼠抗CD3抗體之CDR區接枝至適當的人類生殖系受體構架上，視情況包括對CDR及/或構架區進行其他修飾來實現人源化。

【0785】 因此，使用人類或人源化抗CD3抗體產生用於三特異性抗原結合蛋白之CD3結合域之scFv序列。獲得編碼人類或人源化VL域及VH域之DNA序列，且視情況最佳化構築體之密碼子以用於在來自智人之細胞中表現。其中VL域及VH域在scFv中呈現之次序為變化的(亦即，VL-VH或VH-VL取向)，且「G4S」或「G_4S」次單元$(G_4S)_3$之三個複本連接

可變域以產生scFv域。抗CD3 scFv質體構築體可具有視情況選用之Flag、His或其他親和標籤，且電穿孔至HEK293或其他合適的人類或哺乳動物細胞株中且純化。驗證分析包括利用FACS之結合分析、使用Proteon之動力學分析及表現CD3之細胞之染色。

【0786】 ***實例37C：****產生scFv磷脂肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)結合域*

【0787】 磷脂肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)為存在於肝細胞癌上、但不存在於健康正常肝組織上之細胞表面蛋白之一。常常觀測到其在肝細胞癌中增加且與HCC患者之不良預後相關。已知其活化Wnt傳訊。已產生包括MDX-1414、HN3、GC33及YP7之GPC3抗體。

【0788】 與以上用於產生與CD3之scFv結合域之方法類似地產生結合至GPC-3或另一目標抗原的scFv。

【0789】 ***實例37D：****活體外表現三特異性抗原結合蛋白*

【0790】 使用CHO細胞表現系統(Flp-In®，Life Technologies)，其為CHO-K1中國倉鼠卵巢細胞(ATCC，CCL-61)之衍生物(Kao及Puck, Proc. Natl. Acad Sci USA 1968; 60(4):1275-81)。根據Life Technologies提供之標準細胞培養物方案繼代培養黏附細胞。

【0791】 為了適應在懸浮液中生長，自組織培養物燒瓶剝離細胞且置於無血清培養基中。將適應懸浮液之細胞低溫保存在具有10% DMSO之培養基中。

【0792】 藉由轉染適應懸浮液之細胞來產生穩定地表現分泌性三特異性抗原結合蛋白之重組CHO細胞株。在用抗生素潮黴素B選擇期間，一週兩次量測活細胞密度，且將細胞離心且以0.1×10^6個活細胞/毫升之最大密度再懸浮於新鮮選擇培養基中。在選擇2-3週之後回收穩定地表現三特

異性抗原結合蛋白之細胞池，此時將細胞轉移至振盪燒瓶中之標準培養基中。藉由執行蛋白質凝膠電泳或流式細胞分析技術確認重組分泌蛋白之表現。將穩定細胞池低溫保存在含有DMSO之培養基中。

【0793】 在具有經穩定地轉染之CHO細胞株之10天饋料批式培養物中藉由分泌至細胞培養物上清液中產生三特異性抗原結合蛋白。10天後以通常> 75%之培養物活力收取細胞培養物上清液。每隔一天自生產培養物收集樣品，且評定細胞密度及活力。在收取之日，在進一步使用之前，藉由離心及真空過濾清除細胞培養物上清液。

【0794】 藉由SDS-PAGE分析細胞培養物上清液中之蛋白質表現效價及產物完整性。

【0795】 ***實例37E：****純化三特異性抗原結合蛋白*

【0796】 在兩步驟程序中自CHO細胞培養物上清液純化三特異性抗原結合蛋白。使構築體在第一步驟中進行親和層析，接著在第二步驟中在Superdex 200上進行製備型粒徑排阻層析(SEC)。樣品經緩衝液交換且藉由超濾濃縮至>1 mg/mL純度之典型濃度，且藉由SDS PAGE在還原及非還原條件下評估最終樣品之均質性(通常>90%)，隨後分別使用抗(半衰期延伸域)或抗個體基因型抗體以及藉由分析型SEC進行免疫墨點。將經純化蛋白質以等分試樣儲存於-80℃下直至使用。

實例38

【0797】 *具有半衰期延長域之經工程改造之環狀RNA之表現具有與不具有半衰期延長域之經工程改造之環狀RNA之表現相比改善的藥物動力學參數*

【0798】 以0.5 mg/kg肌肉內彈丸注射向石蟹獼猴投與在實例37之環

狀RNA分子上編碼之三特異性抗原結合蛋白。另一石蟹獼猴組接受大小相當的具有與CD3及GPC-3之結合域、但缺乏半衰期延長域之在環狀RNA分子上編碼之蛋白質。第三組及第四組分別接受具有CD3及半衰期延長域結合域之在環狀RNA分子上編碼之蛋白質及具有GPC-3及半衰期延長域之蛋白質。兩種由環狀RNA編碼之蛋白質與三特異性抗原結合蛋白大小相當。各測試組由5隻猴組成。在指定時間點獲取血清樣品，連續稀釋，且使用與CD3及/或GPC-3之結合ELISA測定蛋白質濃度。

【0799】 使用測試品血漿濃度執行藥物動力學分析。當針對給藥後時間繪製時，各測試品之群組平均血漿資料符合多指數概況。藉由具有彈丸輸入及分佈及消除階段之一級速率常數的標準二室模型擬合資料。用於最佳擬合用於靜脈內投與之資料之一般等式為：$c(t)=Ae^{-at}+Be^{-pt}$，其中分別地，c(t)為時間t之血漿濃度，A及B為Y軸上之截距，且a及β為分佈及消除階段之表觀一級速率常數。a-相為初始清除率相位且反映蛋白質至動物之全部胞外液中之分佈，而衰變曲線之第二或β-相部分代表真血漿清除率。用於擬合此類等式之方法為此項技術中所熟知的。舉例而言，A=D/V(a-k21)/(a-p)、B=D/V(p-k21)/(a-p)以及a及β (對於α>β)為以下二次方程式之根: $r^2+(k12+k21+k10)r+k21k10=0$，其使用以下估計參數：V=分佈體積，k10=消除速率，k12=自腔室1至腔室2之轉移速率且k21=自腔室2至腔室1之轉移速率，且D=投與劑量。

【0800】 資料分析：使用KaleidaGraph (KaleidaGraph™ 3.09版版權1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.)製作濃度相對於時間概況圖。報導為小於可報導值(LTR)之值不包括於PK分析中且不以圖形方式呈現。藉由隔室分析，使用WinNonlin軟體(WinNonlin® Professional 3.1版

WinNonlin™版 權1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, Calif)測定藥物動力學參數。如Ritschel W A及Kearns G L, 1999, EST: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 第5版, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D C中所描述計算藥物動力學參數。

【0801】 預期在實例37之環狀RNA分子上編碼之三特異性抗原結合蛋白具有與缺乏半衰期延長域之蛋白質相比改善之藥物動力學參數，諸如消除半衰期延長。

實例39

【0802】 *三特異性抗原結合蛋白之細胞毒性*

【0803】 在實例37之環狀RNA分子上編碼之三特異性抗原結合蛋白介導對GPC-3+目標細胞之T細胞依賴性細胞毒性時對其進行活體外評估。

【0804】 在存在實例37之三特異性抗原結合蛋白之情況下將經螢光標記之GPC3目標細胞與作為效應細胞之隨機供體或T細胞之經分離PBMC一起培育。在37℃下在含濕氣培育箱中培育4 h之後，在光譜螢光計中測定螢光染料自目標細胞至上清液中之釋放。在無實例37之三特異性抗原結合蛋白之情況下培育之目標細胞及藉由在培育結束時添加皂素而完全溶解之目標細胞分別充當陰性對照及陽性對照。

【0805】 基於所量測之殘餘活目標細胞，根據下式計算比細胞溶解百分比：[1-(活目標(樣品)數目/活目標(自發性)數目)] × 100%。藉由非線性回歸/4參數邏輯擬合使用GraphPad軟體計算S形劑量反應曲線及EC50值。藉由4參數邏輯擬合分析，使用Prism軟體，使用所獲得之給定抗體濃

度之溶解值計算S形劑量反應曲線。

實例40

【0806】 *具有環狀RNA之脂質奈米粒子調配物*

【0807】 使用Precision Nanosystems Ignite儀器用『NextGen』混合腔室形成脂質奈米粒子(LNP)。將含有呈16:1:4:1或62:4:33:1莫耳比之重量比之可離子化脂質10c-7、DSPC、膽固醇及DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.)的乙醇相與含有環狀RNA及25 mM乙酸鈉緩衝液pH 5.2之水相合併。使用3:1水與乙醇混合比。接著，在1 L水中透析所調配之LNP且經18小時交換2次。使用0.2 μm過濾器過濾透析的LNP。在活體內給藥之前，將LNP稀釋於PBS中。藉由動態光散射測定LNP大小。使用Malvern Panalytical Zetasizer Pro量測具有1 mL含20 μg/mL LNP之PBS (pH 7.4)的光析槽以獲得Z平均值。記錄Z平均值及多分散性指數。

【0808】 ***40.1****脂質10c-7及10c-8之調配物*

【0809】 使用Precision Nanosystems Ignite儀器用『NextGen』混合腔室形成脂質奈米粒子(LNP)。將含有呈16:1:4:1或62:4:33:1莫耳比之重量比之可離子化脂質10c-7或脂質10c-28、DOPE、膽固醇及DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.)的乙醇相與含有環狀RNA及25 mM乙酸鈉緩衝液pH 5.2之水相合併。使用3:1水與乙醇混合比。接著，在1 L水中透析所調配之LNP且經18小時交換2次。使用0.2 μm過濾器過濾透析的LNP。在活體內給藥之前，將LNP稀釋於PBS中。藉由動態光散射測定LNP大小。使用Malvern Panalytical Zetasizer Pro量測具有1 mL含20 μg/mL LNP之PBS (pH 7.4)的光析槽以獲得Z平均值。記錄Z平均值及多分散性指數。

實例41

【0810】 *活體外遞送綠色螢光蛋白(GFP)或嵌合抗原受體(CAR)*

【0811】用囊封GFP之LNP轉染人類PBMC (Stemcell Technologies)且藉由流式細胞分析技術進行檢驗。將來自五個不同供體之PBMC (PBMC A-E)與一種含有編碼GFP或CD19-CAR之環狀RNA之LNP組合物(200 ng)一起在37℃下在RPMI、2%人類血清、IL-2 (10 ng/mL)及50 μM BME中活體外培育。在無LNP之情況下培育之PBMC用作陰性對照。在LNP培育後24、48或72小時之後，分析細胞之CD3、CD19、CD56、CD14、CD11b、CD45、可固定活-死及有效裝載物(GFP或CD19-CAR)。

【0812】代表性資料呈現於圖27A及圖27B中，該等圖顯示測試LNP能夠將環狀RNA遞送至原代人類免疫細胞中，從而引起蛋白質表現。

實例42

【0813】 *多個IRES變體可介導鼠CD19 CAR活體外表現*

【0814】多個編碼抗鼠CD19 CAR之環狀RNA構築體含有獨特IRES序列且經脂質體轉染至1C1C7細胞株中。在脂肪轉染之前，使1C1C7細胞在完全RPMI中擴增數天，一旦細胞擴增至適當數目，1C1C7細胞用四個不同環狀RNA構築體進行脂質體轉染(Invitrogen RNAiMAX)。24小時後，將1C1C7細胞與經His標記之重組鼠CD19 (Sino Biological)蛋白一起培育，接著用二級抗His抗體染色。之後，經由流式細胞分析技術分析細胞。

【0815】代表性資料呈現於圖26中，其顯示源自指定病毒(赤背條

鼠(apodemus agrarius)微小RNA病毒、山羊脊病毒、細小病毒及薩利病毒)之IRES能夠驅動抗小鼠CD19 CAR在鼠T細胞中表現。

實例43

【0816】 *鼠CD19 CAR介導腫瘤細胞活體外殺滅*

【0817】 將編碼抗小鼠CD19 CAR之環狀RNA電穿孔至鼠T細胞中以評定CAR介導之細胞毒性。對於電穿孔，使用ThermoFisher之氖氣轉染系統用編碼抗小鼠CD19 CAR之環狀RNA電穿孔T細胞，隨後靜置隔夜。對於細胞毒性分析，將經電穿孔T細胞與Fluc+目標細胞及非目標細胞以1:1比率在含有10% FBS、IL-2 (10 ng/mL)及50 μM BME之完全RPMI中共培養且在37℃下培育隔夜。在共培養後24小時，使用螢光素酶分析系統量測細胞毒性(Promega Brightglo螢光素酶系統)以偵測Fluc+目標細胞及非目標細胞之溶解。所示值係相對於未經轉染之模擬物訊號來計算。

【0818】 代表性資料呈現於圖27中，其顯示由環狀RNA表現之抗小鼠CD19 CAR在活體外鼠T細胞中具有功能性。

實例44

【0819】 *相較於由mRNA表現之CD19 CAR，由環狀RNA表現之CD19 CAR具有更高產率及更大細胞毒性作用*

【0820】 將自N端至C端包括FMC63衍生之scFv、CD8跨膜域、4-1BB共刺激域及CD3ζ胞內域的編碼抗CD19嵌合抗原受體之環狀RNA電穿孔至人類周邊T細胞中以評估表面表現及CAR介導之細胞毒性。為了進行比較，在此實驗中將經環狀RNA電穿孔之T細胞與經mRNA電穿孔之T細胞進行比較。對於電穿孔，使用市售的自供體人類PBMC進行之T細胞分

離套組(Miltenyi Biotec)自人類PBMC分離CD3+ T細胞。分離之後，用抗CD3/抗CD28 (Stemcell Technologies)刺激T細胞且在37℃下在含有10% FBS、IL-2 (10 ng/mL)及50 μM BME之完全RPMI中擴增5天。在刺激後五天，使用ThermoFisher之氖氣轉染系統用編碼抗人類CD19 CAR之環狀RNA電穿孔T細胞，且接著靜置隔夜。對於細胞毒性分析，將經電穿孔T細胞與Fluc+目標細胞及非目標細胞以1:1比率在含有10% FBS、IL-2 (10 ng/mL)及50 μM BME之完全RPMI中共培養且在37℃下培育隔夜。在共培養後24小時，使用螢光素酶分析系統量測細胞毒性(Promega Brightglo螢光素酶系統)以偵測Fluc+目標細胞及非目標細胞之溶解。此外，獲取經電穿孔T細胞之等分試樣，且在分析之日進行染色以用於活-死可固定染色、CD3、CD45及嵌合抗原受體(FMC63)。

【0821】 代表性資料呈現於圖28及圖29中。圖28A及圖28B顯示，與由線性mRNA表現之抗人類CD19 CAR相比，由環狀RNA表現之抗人類CD19 CAR之表現量更高且長度更長。圖29A及圖29B顯示，相對於由線性mRNA表現之抗人類CD19 CAR，由環狀RNA表現之抗人類CD19 CAR發揮更大的細胞毒性作用。

實例45

【0822】 *由單一環狀RNA功能性表現兩個CAR*

【0823】 將編碼嵌合抗原受體之環狀RNA電穿孔至人類周邊T細胞中以評定表面表現及CAR介導之細胞毒性。此研究之目的為評估編碼兩個CAR之環狀RNA是否可以隨機方式用2A (P2A)或IRES序列表現。對於電穿孔，商業上購買CD3+ T細胞(Cellero)且用抗CD3/抗CD28 (Stemcell Technologies)刺激，且在37℃下在含有10% FBS、IL-2 (10 ng/mL)及50

μM BME之完全RPMI中擴增5天。在刺激後四天，使用ThermoFisher之氖氣轉染系統用編碼抗人類CD19 CAR、抗人類CD19 CAR-2A-抗人類BCMA CAR及抗人類CD19 CAR-IRES-抗人類BCMA CAR之環狀RNA電穿孔T細胞，接著靜置隔夜。對於細胞毒性分析，將經電穿孔T細胞與表現人類CD19或BCMA抗原之Fluc+ K562細胞以1:1比率在含有10% FBS、IL-2 (10 ng/mL)及50 μM BME之完全RPMI中共培養且在37℃下培育隔夜。在共培養後24小時，使用螢光素酶分析系統量測細胞毒性(Promega BrightGlo螢光素酶系統)以偵測Fluc+目標細胞之溶解。

【0824】 代表性資料呈現於圖30中，其顯示兩個CAR可由相同環狀RNA構築體功能性表現且發揮細胞毒性效應功能。

實例46

【0825】 ***實例46A：****內置式聚A序列及親和純化以產生免疫靜默環狀RNA*

【0826】 將聚A序列(20-30 nt)插入RNA構築體(具有內含子中之內置式聚A序列之前驅體RNA)之5'端及3'端中。可替代地使用例如大腸桿菌聚A聚合酶或酵母聚A聚合酶(其需要使用額外酶)使前驅體RNA及內含子轉錄後聚腺苷酸化。

【0827】 藉由活體外轉錄(IVT)環化此實例中之環狀RNA且藉由經市售oligo-dT樹脂洗滌來將其親和純化以自剪接反應物選擇性移除加聚A標籤之序列(包括游離內含子及前驅體RNA)。用含有呈不同比率之鳥苷單磷酸酯(GMP)及鳥苷三磷酸酯(GTP) (GMP:GTP = 8、12.5或13.75)的商用IVT套組(New England Biolabs)或定製IVT混合物(Orna Therapeutics)執行IVT。在一些實施例中，可優先包括呈高GMP:GTP比之GMP作為第一

核苷酸，從而產生大部分加單磷酸酯帽之前驅體RNA。作為比較，可替代地藉由用Xrn1、核糖核酸酶R及去氧核糖核酸酶I處理(酶純化)來純化環狀RNA產物。

【0828】 接著，評定使用親和純化或酶純化方法製備之環狀RNA之免疫原性。簡言之，將所製備之環狀RNA轉染至A549細胞中。24小時後，使細胞溶解，且以qPCR量測相對於模擬物樣品之干擾素β-1誘導。3p-hpRNA (一種三磷酸化RNA)用作陽性對照。

【0829】 圖31B及31C表明，當聚A序列包括於在剪接期間移除且存在於未經剪接前驅體分子中之元件上時，負向選擇親和純化自剪接反應物移除非環狀產物。圖31D顯示，用測試IVT條件及純化方法製備之環狀RNA全部為免疫靜止的。此等結果表明，負向選擇親和純化等效於或優於用於環形RNA純化之酶純化，且定製環狀RNA合成條件(IVT條件)可減少對GMP過量之依賴以達成最大免疫靜止。

【0830】 ***實例46B：****用於環狀RNA產生之專用結合位點及親和純化*

【0831】 吾人可包括經特定設計之序列(DBS，專用結合位點)代替聚A標籤。

【0832】 可使用諸如可結合至樹脂之經特定設計之互補寡核苷酸的專用結合位點(DBS)代替聚A標籤以選擇性耗乏前驅體RNA及游離內含子。在此實施例中，將DBS序列(30nt)插入至前驅體RNA之5'及3'端中。轉錄RNA，且經連接至樹脂之定製互補寡核苷酸洗滌經轉錄產物。

【0833】 圖32B及圖32C表明，在剪接期間移除之元件中包括所設計之DBS序列使得能夠經由負向親和純化移除剪接反應物中的未經剪接之前驅體RNA及游離內含子組分。

【0834】 ***實例46C：****產生編碼肌肉萎縮蛋白之環狀RNA*

【0835】 藉由活體外轉錄RNA前驅體，隨後使用Xrn1、去氧核糖核酸酶1及核糖核酸酶R之混合物進行酶純化以降解殘餘線性組分，來產生編碼肌肉萎縮蛋白之12 kb之12,000 nt環狀RNA。圖33顯示成功地產生編碼肌肉萎縮蛋白之環狀RNA。

實例47

【0836】 *3'內含子片段與IRES之間的5'間隔子改善環狀RNA表現*

【0837】 將在3'內含子片段與IRES之間具有不同5'間隔子之經純化環狀RNA在Jurkat細胞中之表現量進行比較。簡言之，在用250 ng各RNA電穿孔60,000個細胞之後24小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。

【0838】 另外，將在3'內含子片段與IRES之間具有不同5'間隔子之經純化環狀RNA在Jurkat細胞中之穩定性進行比較。簡言之，在用250 ng各RNA電穿孔60,000個細胞之後經2天量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光且相對於第1天表現進行標準化。

【0839】 結果示於圖34A及圖34B中，其指示添加間隔子可增強IRES功能及所添加間隔子之序列一致性及長度的重要性。潛在解釋為間隔子恰好在IRES之前添加且可能藉由使IRES與諸如內含子片段之其他結構化元件分離摺疊而起作用。

實例48

【0840】 此實例描述山羊脊病毒IRES之5'端或3'端之缺失掃描。IRES邊界一般表徵不佳且需要經驗分析，且此實例可用於定位驅動轉譯所需之核心功能序列。簡言之，用可操作地連接至高斯螢光素酶編碼序列

之經截短IRES元件產生環狀RNA構築體。經截短IRES元件具有自5'端或3'端移除之指定長度的核苷酸序列。在用RNA電穿孔原代人類T細胞之後24小時及48小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。表現穩定性經計算為48小時時間點之表現量相對於24小時時間點之表現量的比率。

【0841】 如圖35中所示，自IRES之5'端缺失超過40個核苷酸減少表現且破壞IRES功能。表現穩定性相對不受IRES元件之截短影響，但表現量實質上因自IRES之3'端缺失141個核苷酸而降低，而自3'端缺失57或122個核苷酸對表現量具有正面影響。

【0842】 亦觀測到，6-核苷酸起始前序列之缺失降低螢光素酶報導子之表現量。用經典kozak序列(GCCACC)置換6-核苷酸序列不具有顯著影響，但至少維持表現。

實例49

【0843】 此實例描述包括山羊脊病毒(CKV) IRES、細小病毒IRES、森鼠微小RNA病毒(AP) IRES、脊病毒SZAL6 IRES、克羅希病毒B (CrVB) IRES、CVB3 IRES及SAFV IRES之選定IRES序列的修飾(例如截短)。IRES元件之序列提供於SEQ ID NO: 348-389中。簡言之，用可操作地連接至高斯螢光素酶編碼序列之經截短IRES元件產生環狀RNA構築體。用環狀RNA轉染HepG2細胞。在轉染後24小時及48小時評定上清液中之發光。表現穩定性經計算為48小時時間點之表現量相對於24小時時間點之表現量的比率。

【0844】 如圖36中所示，截短體具有視IRES之屬性(identity)而變之作用，IRES之屬性可視常常在IRES間不同之用於轉譯之起始機制及蛋白質因子而定。5'缺失及3'缺失可有效地合併，例如在CKV IRES之情形

下。在一些情況下，添加典型Kozak序列顯著地改善表現(如SAFV中，完全與完全+K)或減弱表現(如CKV中，5d40/3d122與5d40/3d122+K)。

實例50

【0845】此實例描述包括轉譯起始元件處之突變的CK-739、AP-748及PV-743 IRES序列之修飾。簡言之，用可操作地連接至高斯螢光素酶編碼序列之經修飾IRES元件產生環狀RNA構築體。在用RNA轉染1C1C7細胞之後24小時及48小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。

【0846】CUG為最常發現之替代性起始位點，但亦表徵許多其他者。此等三聯體可在起始密碼子之前存在於IRES掃描束中且可能會影響正確多肽之轉譯。產生了四個替代起始位點突變，其中IRES序列提供於SEQ ID NO: 378-380中。如圖**37**中所示，CK-739 IRES中之替代性轉譯起始位點之突變影響正確多肽之轉譯，在一些情況下正面地影響，而在其他情況下負面地影響。所有替代性轉譯起始位點之突變皆降低轉譯量。

【0847】作為在起始密碼子之前的6個核苷酸之替代性Kozak序列亦可能會影響表現量。在「6 nt起始前」群組中之CK-739 IRES及第1-5號樣品中，起始密碼子上游之6-核苷酸序列分別為gTcacG、aaagtc、gTcacG、gtcatg、gcaaac及acaacc。如圖37中所示，在起始密碼子之前的某些6-核苷酸序列之取代影響轉譯。

【0848】亦觀測到AP-748及PV-743 IRES序列中之5'端及3'端缺失減少表現。然而，在具有長掃描束之CK-739 IRES中，轉譯相對不受掃描束中之缺失影響。

實例51

【0849】 此實例描述藉由插入5'及/或3'非轉譯區(UTR)及產生IRES雜交體進行之選定IRES序列之修飾。簡言之，用可操作地連接至高斯螢光素酶編碼序列之經修飾IRES元件產生環狀RNA構築體。在用RNA轉染HepG2細胞之後24小時及48小時量測上清液中分泌性高斯螢光素酶之發光。

【0850】 插入有UTR之IRES序列提供於SEQ ID NO: 390-401中。如圖53中所示，在IRES之3'端之後及在起始密碼子之前的5' UTR之插入略微增加來自山羊脊病毒(CK) IRES之轉譯，但在一些情況下，消除來自薩利病毒SZ1 IRES之轉譯。在終止卡匣右後方之3' UTR之插入對兩個IRES序列無影響。

【0851】 雜交CK IRES序列提供於SEQ ID NO: 390-401中。CK IRES用作基礎，且CK IRES之特定區域經例如SZ1及AV (愛知病毒)之其他IRES序列之外觀類似結構置換。如圖38中所示，某些雜交合成IRES序列為功能性的，此指示雜交IRES可使用來自顯示類似預測結構之不同IRES序列之部分來構築，同時使此等結構缺失會完全消除IRES功能。

實例52

【0852】 此實例描述藉由引入終止密碼子或卡匣變體進行之環狀RNA之修飾。簡言之，用可操作地連接至高斯螢光素酶編碼序列、接著為可變終止密碼子卡匣之IRES元件產生環狀RNA構築體，該等卡匣包括高斯螢光素酶編碼序列之各框架中之終止密碼子及閱讀框中之兩個終止密碼子。用環狀RNA轉染1C1C7細胞。在轉染後24小時及48小時評定上清液中之發光。

【0853】 終止密碼子卡匣之序列闡述於SEQ ID NO: 406-412中。如

圖39中所示，某些終止密碼子卡匣提高表現量，但其對表現穩定性幾乎無影響。特定言之，具有兩個框架1 (高斯螢光素酶編碼序列之閱讀框)終止密碼子(第一者為TAA，接著為框架2終止密碼子及框架3終止密碼子)之終止卡匣有效地促進功能性轉譯。

實例53

【0854】 此實例描述藉由插入5' UTR變體進行之環狀RNA之修飾。簡言之，用在IRES之3'端與起始密碼子之間插入有5' UTR變體之IRES元件產生環狀RNA構築體，IRES可操作地連接至高斯螢光素酶編碼序列。用環狀RNA轉染1C1C7細胞。在轉染後24小時及48小時評定上清液中之發光。

【0855】 5' UTR變體之序列闡述於SEQ ID NO: 402-405中。如圖**40**中所示，當添加36-核苷酸非結構化/低GC間隔子序列(UTR2)時，具有典型Kozak序列之CK IRES (UTR4)更有效，此表明富含GC之Kozak序列可能會干擾核心IRES摺疊。使用具有kozak序列之較高級GC/結構化間隔子不顯示相同效益(UTR3)，此可能歸因於間隔子自身對IRES摺疊之干擾。在不需要間隔子之情況下使kozak序列突變成gTcacG (UTR1)將轉譯增強至與替代性Kozak+間隔子相同的水準。

實例54

【0856】 此實例描述環狀RNA中之miRNA目標位點對表現量之影響。簡言之，用可操作地連接至人類紅血球生成素(hEPO)編碼序列之IRES元件產生環狀RNA構築體，其中將2個串聯miR-122目標位點插入構築體中。用環狀RNA轉染表現miR-122之Huh7細胞。在轉染後24小時及48小時藉由夾心ELISA評定上清液中之hEPO表現。

【0857】 如圖41中所示，廢除hEPO表現量，其中將miR-122目標位點插入環狀RNA中。此結果表明自環狀RNA之表現可由miRNA調節。因此，細胞類型或組織特異性表現可藉由併入細胞類型中表現之miRNA之目標位點來達成，其中重組蛋白之表現為不合需要的。

實例55

【0858】 *含有抗CD19 CAR之LNP及環狀RNA構築體活體內減少血液及脾中之B細胞。*

【0859】 將編碼抗CD19 CAR表現之環狀RNA構築體囊封於如上文所描述之脂質奈米粒子內。為了比較，將編碼螢光素酶表現之環狀RNA囊封於單獨的脂質奈米粒子內。

【0860】 每隔一天向6至8週齡C57BL/6小鼠注射LNP溶液，在各小鼠內總計4次LNP注射。在最後一次LNP注射之後24小時，收取小鼠之脾及血液，染色且經由流式細胞分析技術進行分析。如**圖42A**及**圖42B**中所示，相較於經LNP-編碼螢光素酶之環狀RNA治療之小鼠，含有LNP-編碼抗CD19 CAR之環狀RNA構築體之小鼠引起周邊血液及脾中之CD19+ B細胞統計學上顯著地減少。

實例56

【0861】 *編碼CAR之環狀RNA內所含之IRES序列改善CAR表現及T細胞之細胞毒性。*

【0862】 用200 ng含有獨特IRES及鼠抗CD19 1D3ζ CAR表現序列之環狀RNA構築體電穿孔經活化鼠T細胞。此等構築體中所含之IRES完全或部分衍生自山羊脊病毒、森鼠微小RNA病毒、細小病毒或薩利病毒。山羊脊病毒衍生之IRES另外經密碼子最佳化。作為對照，無IRES之含有

野生型ξ小鼠CAR之環狀RNA係用於比較。在電穿孔後24小時針對CD-19 CAR對T細胞進行染色以評定表面表現且接著與A20 Fluc目標細胞共培養。接著，在將T細胞與目標細胞共培養之後24小時針對Fluc+ A20細胞之細胞毒性殺滅評估分析。

【0863】 如**圖43A**、**圖43B**、**圖43C**及**圖44**中所見，獨特IRES能夠增加T細胞表現CAR蛋白之頻率及細胞表面上之CAR表現量。CAR蛋白之表現頻率及細胞表面上之CAR表現量增加引起抗腫瘤反應改善。

實例57

【0864】 *原代人類T細胞中由環狀RNA構築體表現之胞質蛋白及表面蛋白。*

【0865】 環狀RNA構築體含有編碼螢光胞質報導子或表面抗原報導子之序列。螢光報導子包括綠色螢光蛋白、mCitrine、mWasabi、Tsapphire。表面報導子包括CD52及Thy1.1^{bio}。用抗CD3/抗CD28抗體活化原代人類T細胞，且在活化後6天用含有報導子序列之環狀RNA電穿孔。在電穿孔後24小時收取T細胞且經由流式細胞分析技術進行分析。用市售抗體(例如Biolegend、Miltenyi及BD)染色表面抗原。

【0866】 如**圖45A**及**圖45B**中所見，胞質蛋白及表面蛋白可在原代人類T細胞中由編碼蛋白質之環狀RNA表現。

實例58

【0867】 *含有獨特IRES序列之環狀RNA具有相比於線性mRNA改善之轉譯表現。*

【0868】 環狀RNA構築體含有獨特IRES以及用於螢火蟲螢光素酶(FLuc)之表現序列。

【0869】 富集來自2個供體之人類T細胞且用抗CD3/抗CD28抗體刺激。在增殖若干天之後，收取經活化T細胞且用等莫耳之表現FLuc有效裝載物之mRNA或環狀RNA電穿孔。研究包括衍生自山羊脊病毒、森鼠微小RNA病毒及細小病毒之IRES序列的各種IRES序列以評定7天中有效裝載物表現之表現量及持久性。在7天中，用Promega Brightglo溶解T細胞以評定生物發光。

【0870】 如**圖46C**、**圖46D**、**圖46E**、**圖46F**及**圖46G**中所示，相較於線性mRNA，IRES在環狀RNA內之存在可使胞質蛋白之轉譯及表現增加數個數量級且可改善表現。發現此種情況在多個人類T細胞供體中一致。

實例59

【0871】 ***實例59A：****LNP-編碼抗CD19之環狀RNA介導K562細胞之人類T細胞殺滅。*

【0872】 環狀RNA構築體含有編碼抗CD19抗體之序列。接著，將環狀RNA構築體囊封於脂質奈米粒子(LNP)內。

【0873】 用抗CD3/抗CD28刺激人類T細胞且保持增殖多至6天。在第6天，將LNP-環狀RNA及ApoE3 (1 μg/mL)與T細胞共培養以介導轉染。24小時後，用200 ng編碼抗CD19抗體之環狀RNA電穿孔Fluc+ K562細胞且稍後在第7天共培養。在共培養後48小時，經由Fluc表現針對K562細胞之CAR表現及細胞毒性殺滅評定分析。

【0874】 如**圖47A**及**圖47B**中所示，存在自LNP介導之CAR活體外遞送至T細胞進行之抗CD19 CAR之T細胞表現及其以特異性抗原依賴性方式溶解經工程改造之K562細胞中之腫瘤細胞之能力。

【0875】 ***實例59B：****LNP-編碼抗BCMA抗體之環狀RNA介導K562細胞之人類T細胞殺滅。*

【0876】 環狀RNA構築體含有編碼抗BCMA抗體之序列。接著，將環狀RNA構築體囊封於脂質奈米粒子(LNP)內。

【0877】 用抗CD3/抗CD28刺激人類T細胞且保持增殖多至6天。在第6天，將LNP-環狀RNA及ApoE3 (1 μg/mL)與T細胞共培養以介導轉染。24小時後，用200 ng編碼抗BCMA抗體之環狀RNA電穿孔Fluc+ K562細胞且稍後在第7天共培養。在共培養後48小時，經由Fluc表現針對K562細胞之CAR表現及細胞毒性殺滅評定分析。

【0878】 如**圖47B**中所示，存在自LNP介導之CAR活體外遞送至T細胞進行之BCMA CAR之T細胞表現及其以特異性抗原依賴性方式溶解經工程改造之K562細胞中之腫瘤細胞之能力。

實例60

【0879】 *抗CD19 CAR T細胞展現活體外抗腫瘤活性。*

【0880】 用抗CD3/抗CD28活化人類T細胞且用200 ng表現抗CD19 CAR之環狀RNA電穿孔一次。將經電穿孔之T細胞與FLuc+ Nalm6目標細胞及非目標Fluc+K562細胞共培養以評估CAR介導之殺滅。在共培養後24小時之後，溶解T細胞且檢驗由目標細胞及非目標細胞進行之殘餘FLuc表現以評定總計8天中之表現及表現穩定性。

【0881】 如**圖48A**及**圖48B**中所示，T細胞以特異性抗原依賴性方式表現環狀RNA CAR構築體。結果亦表明與編碼CAR之線性mRNA相比改善之編碼CAR之環狀RNA的細胞毒性以及功能表面受體之遞送。

實例61

【0882】 *ApoE3介導之環狀RNA之有效LNP轉染*

【0883】 用抗CD3/抗CD28刺激人類T細胞且保持增殖多至6天。在第6天，在存在或不存在ApoE3 (1 μg/mL)之情況下將脂質奈米粒子(LNP)及表現綠色螢光蛋白溶液之環狀RNA與T細胞共培養。24小時後，將T細胞針對活/死T細胞染色，且在流式細胞儀上分析活T細胞之GFP表現。

【0884】 如**圖49A**、**圖49B**、**圖49C**、**圖49D**及**圖49E**中所示，有效LNP轉染可由經活化T細胞上之ApoE3介導，接著為顯著有效裝載表現。在多個供體中展現此等結果。

實例62

【0885】 此實例說明活體外SARS-CoV2棘蛋白表現之表現。使用MessengerMax轉染劑將編碼SARS-CoV2穩定型棘蛋白之環狀RNA轉染至293細胞中。在轉染後24小時，用CR3022抗棘一級抗體及經APC標記之二級抗體染色293細胞。

【0886】 **圖50A**顯示由活體外轉錄反應產生之大致4.5 kb編碼SARS-Cov2穩定型棘蛋白之RNA的環化效率。**圖50B**及**圖73C**顯示相對於經模擬轉染之細胞，在用MessengerMax轉染劑進行環狀RNA轉染之後293細胞上之SARS-CoV2穩定型棘蛋白表現。

【0887】 **圖54A**及**圖54B**顯示在使用MessengerMax轉染劑進行一組含有可變IRES序列、經密碼子最佳化之編碼區及穩定SARS-CoV2棘蛋白之環狀RNA轉染之後293細胞上之SARS-CoV2穩定型棘蛋白細胞表現百分比及gMFI。**圖54C**顯示MFI與百分比之間的關係。

實例63

【0888】 此實例顯示在IV注射0.2 mg/kg囊封於脂質奈米粒子調配

物中之環狀RNA製劑之後的活體內細胞介素反應。用作為前驅體RNA起始劑之GTP及剪接核苷酸合成之環狀RNA剪接反應物引起比經純化環狀RNA及線性m1ψ-mRNA大之細胞介素反應，此係歸因於在剪接反應物中存在三磷酸化5'端。量測在靜脈內注射經LNP調配之環狀RNA製劑之後6小時抽取之血液的IL-1β、IL-6、IL-10、IL-12p70、RANTES、TNFα含量。注射PBS之小鼠用作對照。

【0889】 如**圖51**中所見，用作為前驅體RNA起始劑之GTP及剪接核苷酸合成之環狀RNA剪接反應物引起比經純化環狀RNA及線性m1ψ-mRNA大之細胞介素反應，此係歸因於在剪接反應物中存在三磷酸化5'端。

實例64

【0890】 此實例說明不同劑量之含有環狀RNA之脂質奈米粒子之肌肉內遞送。對小鼠給藥0.1 μg、1 μg或10 μg之調配於脂質奈米粒子中之環狀RNA。在注射螢光素之後6小時進行全身IVIS成像(**圖52A**及**圖52B**)。在24小時進行離體IVIS成像。肝、四頭肌及腓之通量值示於**圖52C**中。**圖53B**及**圖53C**顯示環狀RNA表現存在於小鼠肌肉組織中。

實例65

【0891】 此實例說明LNP調配物中之多個環狀RNA之表現。編碼hEPO或fLuc之環狀RNA構築體係在單一及混合集合之LNP中給藥。測定血清中之hEPO濃度(**圖53A**)及利用IVIS成像之總通量(**圖53B**)。結果表明，環狀RNA hEPO或fLuc構築體有效地單獨地調配或共同調配經表現蛋白質。

實例66

【0892】 ***實例66A：****肝細胞塗鋪及培養*

【0893】 將原代人類肝細胞(PHH)、原代小鼠肝細胞(PMH)、原代石蟹獼猴肝細胞(PCH)解凍且再懸浮於肝細胞解凍培養基(Xenotech，目錄號K8600/K8650)中，接著進行離心。丟棄上清液，且將所集結之細胞再懸浮於肝細胞塗鋪培養基(Xenotech，目錄號K8200)中。經由血球計計數細胞，且將其以對於PHH 25,000個細胞/孔、對於PMH 25,000個細胞/孔及對於PCH 50,000個細胞/孔之密度塗鋪於100 μL塗鋪培養基中之經Bio-coat膠原蛋白-I塗佈之96孔盤上。使所塗鋪之細胞在組織培養培育箱中在37℃及5% CO_2氛圍下沈降且黏附6小時。在培育之後，檢查細胞之單層形成，之後抽吸塗鋪培養基且用100 μL培養基(Xenotech, 目錄號K8300)置換。每24小時置換培養基達實驗持續時間。

【0894】 ***實例66B：****活體外篩選原代人類、小鼠及石蟹獼猴肝細胞中之經LNP調配之編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA*

【0895】 產生包含TIE及編碼螢火蟲螢光素酶之編碼元件的環狀RNA構築體且將其轉染至LNP中。將各種濃度之與環化RNA (oRNA)一起調配之LNP稀釋於補充有3%胎牛血清(FBS)之肝細胞培養基(ThermoFisher，目錄號A3160401)中。自細胞抽吸培養基，之後將100 μL LNP/FBS/培養基混合物添加至細胞中。

【0896】 在原代人類(**圖67A**)、小鼠(**圖67B**)及石蟹獼猴(**圖67C**)肝細胞中偵測到螢光素酶活性。在轉染後24小時，自培育箱移出盤且使其平衡至室溫達15 min。將100 μL體積之螢火蟲螢光素酶一步輝光分析工作溶液(Pierce，目錄號16196)添加至各孔中。將盤置於微量盤振盪器(ThermoFisher，目錄號S72050)上且在300 rpm下混合3 min。混合後，使

盤在室溫下培育10 min。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5儀器讀取發光。

【0897】 如**圖67A**、**圖67B**及**圖67C**中所見，當用LNP活體外轉染時含有TIE之環狀RNA能夠以劑量依賴性方式驅動來自多個物種之原代肝細胞中之螢火蟲螢光素酶蛋白質表現。

【0898】 ***實例66C：****活體外篩選多個原代人類肝細胞供體中之經LNP調配之編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA*

【0899】 產生包含TIE及編碼螢火蟲螢光素酶之編碼元件的環狀RNA構築體且將其轉染至LNP中。將各種濃度之與環化RNA (oRNA)一起調配之LNP稀釋於補充有3%胎牛血清(FBS)之肝細胞培養基(ThermoFisher，目錄號A3160401)中。自細胞抽吸培養基，之後將100 μL LNP/FBS/培養基混合物添加至細胞中。

【0900】 在原代人類(**圖68A**)、小鼠(**圖68B**)及石蟹獼猴(**圖68C**)肝細胞中偵測到螢光素酶活性。在轉染後24小時，自培育箱移出盤且使其平衡至室溫達15 min。將100 μL體積之螢火蟲螢光素酶一步輝光分析工作溶液(Pierce，目錄號16196)添加至各孔中。將盤置於微量盤振盪器(ThermoFisher，目錄號S72050)上且在300 rpm下混合3 min。混合後，使盤在室溫下培育10 min。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5儀器讀取發光。

【0901】 如**圖68A**、**圖68B**及**圖68C**中所見，當用LNP活體外轉染時含有TIE之環狀RNA能夠以劑量依賴性方式驅動來自多個人類供體之原代肝細胞中之螢火蟲螢光素酶蛋白質表現。

實例67

【0902】 *多個人類細胞模型中與編碼GFP之環狀RNA一起調配之LNP之活體外表現。*

【0903】 產生包含TIE及編碼GFP蛋白之編碼元件的環狀RNA構築體。將LNP與環狀RNA構築體一起調配。接著，將各種濃度之含有環狀RNA構築體之LNP稀釋於補充有3%胎牛血清(FBS)之肝細胞培養基(ThermoFisher，目錄號A3160401)中。自細胞抽吸培養基，之後將100 μL LNP/FBS/培養基混合物添加至細胞中。

【0904】 如先前所描述用經LNP調配之oRNA轉染希拉(人類子宮頸腺癌；ATCC，目錄號CCL-2)、HEK293 (人類胎腎；ATCC，目錄號CRL-1573)及HUH7 (人類肝細胞癌；JCRB，目錄號JCRB0403)。在轉染後二十四小時，移除培養基且以胰蛋白酶處理細胞。用補充有10% FBS之PBS中和經胰蛋白酶處理之細胞，收取，且轉移至管。將管離心以集結細胞且抽吸上清液。在溶解之前，將集結粒儲存於-80℃下。為了溶解，將細胞在冰上解凍且用每孔100 μL RIPA緩衝液(Boston Bio Products，目錄BP-115)加新鮮添加之1 mM DTT及250 U/mL Benzonase (EMD Millipore，目錄號71206-3)以及由完全蛋白酶抑制劑混合液(Sigma，目錄號11697498001)組成之蛋白酶抑制劑混合物溶解。將細胞保持在冰上30分鐘，此時添加NaCl (1 M最終濃度)。使細胞溶解物充分混合且保留於冰上30 min。將全細胞萃取物(WCE)離心以集結碎片。使用Bradford分析(Bio-Rad，目錄號500-0001)來評定溶解物之蛋白質含量。根據製造商之方案完成Bradford分析程序。在使用之前將萃取物儲存於-20℃下。執行西方墨點法以評定GFP蛋白質含量。將全細胞萃取物溶解物與勒姆利緩衝液(Laemmli buffer)混合且在95℃下變性10 min。根據製造商方案使用

NuPage系統於4-12% Bis-Tris凝膠(ThermoFisher，目錄號NP0335BOX)上運行西方墨點法，接著濕轉移至0.45 μm硝化纖維素膜(ThermoFisher，目錄號LC2001)上。轉移之後，用水徹底沖洗膜且用麗春紅S溶液(Ponceau S solution) (Boston Bio Products，目錄號ST-180)染色以確認完成及甚至轉移。在室溫下在實驗室搖盪器上使用含5%乳粉之TBS封閉墨點30分鐘。用1× TBST (Boston BioProducts，目錄號IBB-180)沖洗墨點，且用小鼠加dylight 680標籤之抗GFP單株抗體(ThermoFisher，目錄號MA515256D680)以1:1,000於1× TBST中探測。以1:4,000在1× TBST中使用抗β-肌動蛋白或GAPDH作為內參考物(ThermoFisher，目錄號AM4302/AM4300)且同時與GFP一級抗體一起培育。將墨點密封在包中且在4℃下保持於實驗室搖盪器上隔夜。培育之後，在1× TBST中沖洗墨點3次，各持續5分鐘，且用小鼠二級抗體(ThermoFisher，目錄號PI35519)各自以1:25,000在1× TBST中在室溫下探測30分鐘。在培育之後，在1× TBST中沖洗墨點3次，各持續5分鐘。目測墨點且使用Licor Odyssey系統加以分析。

【0905】 如**圖69**中所示，當用LNP活體外轉染時含TIE之環狀RNA能夠以劑量依賴性方式在多樣人類細胞株(例如希拉、HEK293及HUH7細胞)中表現GFP蛋白。

實例68

【0906】 *原代人類肝細胞中與編碼GFP之環狀RNA一起調配之LNP之活體外表現。*

【0907】 產生包含TIE及編碼GFP蛋白之編碼元件的環狀RNA構築體。將各種濃度之含有環化RNA (oRNA)之LNP稀釋於補充有3%胎牛血

清(FBS)之肝細胞培養基(ThermoFisher，目錄號A3160401)中。自細胞抽吸培養基，之後將100 μL LNP/FBS/培養基混合物添加至細胞中。

【0908】 將原代人類肝細胞(PHH)解凍且再懸浮於肝細胞解凍培養基(Xenotech，目錄號K8600/K8650)中，接著離心。丟棄上清液，且將所集結之細胞再懸浮於肝細胞塗鋪培養基(Xenotech，目錄號K8200)中。經由血球計計數細胞，且將其以對於PHH 25,000個細胞/孔、對於PMH 25,000個細胞/孔及對於PCH 50,000個細胞/孔之密度塗鋪於100 μL塗鋪培養基中之經Bio-coat膠原蛋白-I塗佈之96孔盤上。使所塗鋪之細胞在組織培養培育箱中在37℃及5% CO_2氛圍下沈降且黏附6小時。在培育之後，檢查細胞之單層形成，之後抽吸塗鋪培養基且用100 μL培養基(Xenotech, 目錄號K8300)置換。每24小時置換培養基達實驗持續時間。

【0909】 如先前所描述用經LNP調配之oRNA轉染原代人類肝細胞。在轉染後二十四小時，移除培養基且以胰蛋白酶處理細胞。用補充有10% FBS之PBS中和經胰蛋白酶處理之細胞，收取，且轉移至管。將管離心以集結細胞且抽吸上清液。在溶解之前，將集結粒儲存於-80℃下。為了溶解，將細胞在冰上解凍且用每孔100 μL RIPA緩衝液(Boston Bio Products，目錄BP-115)加新鮮添加之1 mM DTT及250 U/mL Benzonase (EMD Millipore，目錄號71206-3)以及由完全蛋白酶抑制劑混合液(Sigma，目錄號11697498001)組成之蛋白酶抑制劑混合物溶解。將細胞保持在冰上30分鐘，此時添加NaCl (1 M最終濃度)。使細胞溶解物充分混合且保留於冰上30 min。將全細胞萃取物(WCE)離心以集結碎片。使用Bradford分析(Bio-Rad，目錄號500-0001)來評定溶解物之蛋白質含量。根據製造商之方案完成Bradford分析程序。在使用之前將萃取物儲存於-

20℃下。執行西方墨點法以評定GFP蛋白質含量。將全細胞萃取物溶解物與勒姆利緩衝液混合且在95℃下變性10 min。根據製造商方案使用NuPage系統於4-12% Bis-Tris凝膠(ThermoFisher，目錄號NP0335BOX)上運行西方墨點法，接著濕轉移至0.45 μm硝化纖維素膜(ThermoFisher，目錄號LC2001)上。轉移之後，用水徹底沖洗膜且用麗春紅S溶液(Boston Bio Products，目錄號ST-180)染色以確認完成及甚至轉移。在室溫下在實驗室搖盪器上使用含5%乳粉之TBS封閉墨點30分鐘。用1× TBST (Boston BioProducts，目錄號IBB-180)沖洗墨點，且用小鼠加dylight 680標籤之抗GFP單株抗體(ThermoFisher，目錄號MA515256D680)以1:1,000於1× TBST中探測。以1:4,000在1× TBST中使用抗β-肌動蛋白或GAPDH作為內參考物(ThermoFisher，目錄號AM4302/AM4300)且同時與GFP一級抗體一起培育。將墨點密封在包中且在4℃下保持於實驗室搖盪器上隔夜。培育之後，在1× TBST中沖洗墨點3次，各持續5分鐘，且用小鼠二級抗體(ThermoFisher，目錄號PI35519)各自以1:25,000在1× TBST中在室溫下探測30分鐘。在培育之後，在1× TBST中沖洗墨點3次，各持續5分鐘。目測墨點且使用Licor Odyssey系統加以分析。

【0910】 如**圖70**中之西方墨點法中所示，當用LNP活體內轉染時含有TIE之環狀RNA能夠成功地編碼原代人類肝細胞中之GFP蛋白。

實例69

【0911】 *使用脂染胺之小鼠肌母細胞及原代人類骨骼肌肌母細胞中編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA中之螢火蟲螢光素酶活體外表現。*

【0912】 環狀RNA構築體包含TIE及編碼螢火蟲螢光素酶蛋白之編碼元件。

【0913】將原代人類骨骼肌(HSkM)細胞(Lonza，目錄號20TL356514)在37℃水浴中解凍且以建議接種密度(3,000至5,000/cm^2)塗鋪在SkGM-2 BulletKit生長培養基(Lonza，目錄號CC-3245)中，且使其生長隔夜。使用ReagentPack繼代培養物試劑(Lonza，目錄號CC-5034)剝離細胞且以建議接種密度塗鋪於組織培養物級96孔盤上，且使其在組織培養培育箱中在37℃及5% CO_2氛圍下生長隔夜或在每2天更換生長培養基之情況下達到70-80%匯合度。

【0914】對於一種96孔盤反應，將0.3 μL脂染胺-3000轉染劑(Lipo3K) (ThermoFisher，目錄號L3000015)與5 μL Opti-MEM還原型血清培養基(ThermoFisher，目錄號51985091)混合。在單獨管中，根據反應，將螢火蟲螢光素酶(f.luc) oRNA (10-200 ng)與5 μL Opti-MEM及0.2 μL P3000TM增強劑試劑(ThermoFisher，目錄號L3000015)合併。將等體積之Lipo3K/Opti-MEM混合物與oRNA/Opti-MEM混合物合併且在室溫下培育15 min。將Lipo3K/oRNA混合物添加至待轉染之各孔中且在37℃及5% CO_2氛圍下置於組織培養培育箱中24小時。

【0915】24小時後，自培育箱移出轉染盤且使其平衡至室溫達15分鐘。將100 μL體積之螢火蟲螢光素酶一步輝光分析工作溶液(Pierce，目錄號16196)添加至各孔中。將盤置於微量盤振盪器(ThermoFisher，目錄號S72050)上且在300 rpm下混合3分鐘。混合後，使盤在室溫下培育10分鐘。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5儀器讀取發光。

【0916】如**圖71A**及**圖71B**中所示，當用脂染胺活體外轉染時包含TIE之環狀RNA能夠以劑量依賴性方式驅動來自不同物種之肌母細胞中之螢火蟲螢光素酶蛋白質表現。

實例70

【0917】 *分化原代人類骨骼肌肌管中編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA中之螢火蟲螢光素酶之活體外表現*

【0918】 環狀RNA構築體包含TIE及編碼螢火蟲螢光素酶蛋白之編碼元件。

【0919】 將原代人類骨骼肌(HSkM)細胞(Lonza，目錄號20TL356514)在37℃水浴中解凍且以建議接種密度(3,000至5,000/cm^2)塗鋪在SkGM-2 BulletKit生長培養基(Lonza，目錄號CC-3245)中，且使其生長隔夜。使用ReagentPack繼代培養物試劑(Lonza，目錄號CC-5034)剝離細胞且以建議接種密度塗鋪於組織培養物級96孔盤上，且使其在組織培養培育箱中在37℃及5% CO_2氛圍下生長隔夜或在每2天更換生長培養基之情況下達到70-80%匯合度。一旦細胞達到70-80%匯合度，則移除生長培養基，在1×PBS (Gibco，目錄號10010023)中洗滌細胞兩次，且更換為由F-10 (1X) (Gibco，目錄號11550-043)組成、補充有2%馬血清(Gibco，目錄號26050088)及1% Pen-Strep (Gibco，目錄號15140-122)之分化培養基。每天更換培養基，持續5至6天直至幾乎所有肌母細胞融合以形成肌管。

【0920】 對於一種96孔盤反應，將0.3 μL脂染胺-3000轉染劑(Lipo3K) (ThermoFisher，目錄號L3000015)與5 μL Opti-MEM還原型血清培養基(ThermoFisher，目錄號51985091)混合。在單獨管中，根據反應，將螢火蟲螢光素酶(f.luc) oRNA (10-200 ng)與5 μL Opti-MEM及0.2 μL P3000TM增強劑試劑(ThermoFisher，目錄號L3000015)合併。將等體積之Lipo3K/Opti-MEM混合物與oRNA/Opti-MEM混合物合併且在室溫下

培育15 min。將Lipo3K/oRNA混合物添加至待轉染之各孔中且在37℃及5% CO_2氛圍下置於組織培養培育箱中24小時。

【0921】 24小時後，自培育箱移出轉染盤且使其平衡至室溫達15分鐘。將100 μL體積之螢火蟲Luc一步輝光分析工作溶液(Pierce，目錄號16196)添加至各孔中。將盤置於微量盤振盪器(ThermoFisher，目錄號S72050)上且在300 rpm下混合3分鐘。混合後，使盤在室溫下培育10分鐘。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5儀器讀取發光。

【0922】 如**圖72A**及**圖72B**中所示，當用脂染胺活體外轉染時包含TIE之環狀RNA能夠以劑量依賴性方式驅動多個人類供體中貫穿分化狀態之原代肌肉細胞(例如在肌母細胞及分化肌管中)中之螢火蟲螢光素酶蛋白質表現。

實例71

【0923】 *含有TIE之環狀RNA之無細胞活體外轉譯*

【0924】 完成無細胞兔網狀紅血球活體外轉譯分析(Promega，目錄號L4540)以由各種RNA模板表徵蛋白質產物。在分析中使用線性mRNA及環狀oRNA模板，且根據製造商方案組裝反應組分。在分析之前，使RNA模板在65℃下變性3分鐘且緊接著在冰上冷卻。將所有反應組分組裝在冰上。將作為完全胺基酸混合物之Flexi兔網狀紅血球套組組分(Promega，目錄號L5061)、RNAsin TIEuclease抑制劑(Promega，目錄號N2111)及超越(transcend) tRNA (Promega，目錄號L5061)添加至經變性RNA模板中。將反應物渦旋混合且在30℃下培育60分鐘，且接著置於冰上。

【0925】 將反應混合物添加至1×樣品緩衝液(ThermoFisher，目錄

號NP0007)中且在70℃下加熱15分鐘。將經變性蛋白質樣品裝載至4-12% Bis-Tris凝膠(ThermoFisher，目錄號NPO335BOX)上。完成凝膠電泳，且將凝膠濕轉移至0.45 μm硝化纖維素膜(ThermoFisher，目錄號LC2001)上。轉移後，在新鮮製造之具有0.5% Tween-20之TBS (Boston Bioproducts Inc，目錄號IBB-180)中在搖盪之情況下封閉膜1小時。在搖盪之情況下以1:2,500稀釋度將膜與鏈黴抗生物素蛋白-AP (Promega，目錄號V5591)一起培育45 min。用以下四個循環沖洗膜：兩次用TBST且兩次用去離子水，每次沖洗持續1 min。將膜與Western Blue受質(Promega，目錄號S3841)一起培育45分鐘，且在水中沖洗膜且在LICOR Odyssey CLx成像系統上掃描。

【0926】 如**圖73A**及**圖73B**中所示，包含TIE之環狀RNA能夠驅動無細胞溶解物中之蛋白質表現，與任何細胞類型無關。**圖73A**繪示由線性或環狀RNA輸入物表現螢火蟲螢光素酶。**圖73B**繪示相較於野生型天然序列(WT)，利用不同密碼子最佳化(co)途徑之人類及小鼠ATP7B蛋白之表現。表現ARP7B蛋白之經密碼子最佳化之環狀RNA及表現螢火蟲螢光素酶之環狀RNA為蛋白質全長蛋白質表現提供防護。

實例72

【0927】 *TIE選擇方法*

【0928】 鑑別推定TIE以用於基因庫中之序列之活性評定。簡言之，鑑別核糖病毒域及長度大於1 kb之未分類病毒序列。基於推定CDS起始位點及終止位點萃取5' UTR及基因間UTR，其中最小長度截止值為250 nt。亦收集反向序列用於負向有義CDS標註。對於預期不含有TIE序列之屬，隨機選擇每個屬之幾個非編碼區。揀選複製品、含> 10 nt重複序列之

序列、具有XbaI位點及BamHI位點之序列及低品質序列(非acgt)，接著經由CDHit以對於叢集而言80%序列類似性截止值使序列叢集；選擇來自各叢集之代表性序列用於進一步研究。對於未分類序列或預期含有TIE之序列，選擇所有5' UTR及基因間UTR；揀選複製品、含> 10 nt重複序列之序列、具有XbaI位點及BamHI位點之序列及低品質序列(非acgt)，隨後經由CDHit以對於叢集而言95% (低風險，已知IRES)序列類似性截止值使序列叢集；選擇來自各叢集之代表性序列用於進一步研究。對於兩種策略，消除短於300 nt或由於序列複雜性而不能合成之序列。

【0929】 **實例73**

【0930】 ***實例73A：****原代人類T細胞中之TIE活性*

【0931】 將含有推定TIE之核酸序列在高斯螢光素酶報導子序列之起始密碼子之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。合成且純化含有TIE之oRNA。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA活體外轉染至T細胞中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示較高TIE功能。相對於24小時在48小時之較高發光指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。

【0932】 ***實例73B：****原代人類肝細胞中之TIE活性*

【0933】 將含有推定TIE之核酸序列在高斯螢光素酶報導子序列之起始密碼子之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。合成且純化含有TIE之oRNA。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA活體外轉染至肝細胞中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。

在24小時之較高發光指示較高TIE功能。相對於24小時在48小時之較高發光指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。

【0934】 ***實例73C：****原代人類肌管中之TIE活性*

【0935】 將含有推定TIE之核酸序列在高斯螢光素酶報導子序列之起始密碼子之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。合成且純化含有TIE之oRNA。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA活體外轉染至人類肌管中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示較高TIE功能。相對於24小時在48小時之較高發光指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。

實例74

【0936】 *TIE組織向性*

【0937】 將選定含TIE之oRNA調配至LNP中。將LNP-oRNA轉染至T細胞、肝細胞及肌管中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示較高TIE功能。相對於24小時在48小時之較高發光可指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。將細胞類型間的TIE活性進行比較，且標示由TIE組織偏好造成之差異。差異可為顯示組織特異性表現及促進增強之轉譯起始、降解或穩定性之TIE接合蛋白的結果。

實例75

【0938】 ***實例75A：****TIE缺失掃描*

【0939】 將選定的自TIE之5'端或3'端具有進行性缺失之TIE序列在

高斯螢光素酶報導子序列之起始密碼子之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。合成且純化含有TIE變體之oRNA。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA轉染至人類原代T細胞中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示較高TIE功能。相對於24小時在48小時之較高發光可指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。歸因於進行性缺失之表現或穩定性減少鑑別TIE之核心功能單元。

【0940】 ***實例75B：****TIE變體產生及鑑別*

【0941】 使選定的含TIE之oRNA合成質體進行易錯PCR以將隨機突變引入PCR產物中。PCR產物用作用於oRNA合成之模板。將經純化oRNA調配至LNP中且轉染至原代人類T細胞中。在轉染後6、24、48及72小時藉由HPLC自T細胞收取多核糖體溶離份。自多核糖體溶離份萃取與各多核糖體溶離份結合之RNA且藉由NGS定序。分析在各時間點富集各多核糖體溶離份之TIE突變以鑑別1)維持或改善TIE之轉譯活性及/或2)改善oRNA穩定性的突變。

【0942】 ***實例75C：****TIE單一及多變體驗證*

【0943】 將含有單獨或組合的來自實例6之推定有益TIE突變之核酸序列在高斯螢光素酶報導子序列之起始密碼子之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。合成且純化含有TIE變體之oRNA。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA轉染至人類原代T細胞中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示較高TIE

功能。相對於24小時在48小時之較高發光指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。

實例76

【0944】 ***實例76A：****真核TIE之選擇*

【0945】 選擇真核TIE。使用若干資料庫鑑別推定真核TIE。選定TIE包括長度為40-1578個核苷酸之序列且可含有或可不含有所鑑別之修飾(m6A)位點。

【0946】 ***實例76B：****含有經修飾之核苷酸(m6A)之TIE*

【0947】 將含有推定TIE之核酸序列在高斯螢光素酶報導子序列之編碼區之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。在滴定經修飾核苷酸之情況下合成oRNA。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA轉染至T細胞、肝細胞及肌管中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之含有經修飾核苷酸之TIE之較高發光指示修飾對增強之功能的必要性。相對於24小時在48小時之較高發光指示含有經修飾核苷酸之TIE增強oRNA穩定性。

實例77

【0948】 *經歷氧化及/或低氧應激之細胞中之TIE表現*

【0949】 將含有推定TIE之核酸序列在高斯螢光素酶報導子序列之編碼區之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。用過氧化氫處理肝細胞以誘導氧化應激或用CoCl2處理肝細胞以誘導低氧應激。將LNP-oRNA活體外轉染至肝細胞中(在低氧應激、氧化應激或未經處理下)。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置

換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示較高TIE功能。相對於24小時在48小時之較高發光可指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。

實例78

【0950】 *作為TIE之適體*

【0951】 將含有針對轉譯起始因子(亦即eIF4E、eIF4G、eIF4a)之適體的核酸序列在高斯螢光素酶報導子序列之編碼區之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA轉染至肝細胞中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示較高TIE功能。相對於24小時在48小時之較高發光可指示歸因於TIE功能之較高oRNA穩定性。

實例79

【0952】 *串聯TIE*

【0953】 將病毒、真核及/或適體TIE之選定組合在高斯螢光素酶報導子序列之編碼區之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。在滴定經修飾核苷酸之情況下合成oRNA。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA轉染至T細胞、肝細胞及肌管中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之含有多個TIE之構築體之較高發光指示TIE之協同作用。相對於24小時在48小時之較高發光可指示在一個構築體中具有多個TIE增強oRNA穩定性。

實例80

【0954】 ***實例80A：****增強帽非依賴性轉譯之編碼適體*

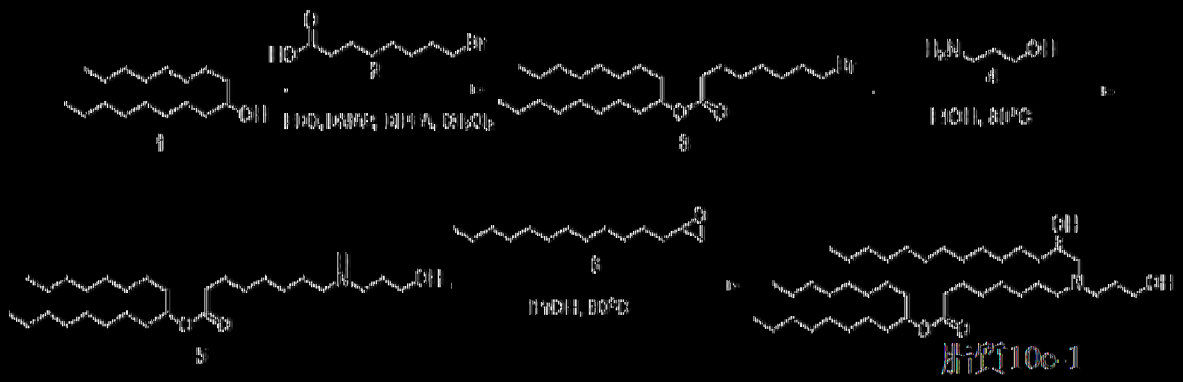
【0955】 已知結合至eIF4E、eIF4a及其他轉譯起始子之某些適體藉由迫使蛋白質採取非功能性構形來抑制轉譯。將含有針對轉譯起始因子(亦即eIF4E、eIF4a)之適體的核酸序列在功能TIE及高斯螢光素酶報導子序列之編碼區之前插入環狀RNA (oRNA)構築體中。將經純化oRNA調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA轉染至肝細胞中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示對帽非依賴性轉譯之偏好。相對於24小時在48小時之較高發光指示歸因於對帽依賴性轉譯之抑制的較高oRNA穩定性。

【0956】 ***實例80B：****增強帽非依賴性轉譯之編碼適體*

【0957】 共同轉染oRNA及適體。已知結合至eIF4E、eIF4a及其他轉譯起始子之某些適體藉由迫使蛋白質採取非功能性構形來抑制轉譯。將含有針對轉譯起始因子(亦即eIF4E、eIF4a)之適體的核酸序列與含有TIE及高斯螢光素酶報導子之編碼區之環狀RNA (oRNA)共同轉染。將經純化適體及oRNA一起調配至脂質奈米粒子中。將LNP-oRNA轉染至肝細胞中。收取上清液且在轉染後24小時及48小時進行置換，且使用含腔腸素之偵測試劑及光度計測定由oRNA進行之高斯螢光素酶表現。在24小時之較高發光指示對帽非依賴性轉譯之偏好。相對於24小時在48小時之較高發光可指示歸因於對帽依賴性轉譯之抑制的較高oRNA穩定性。

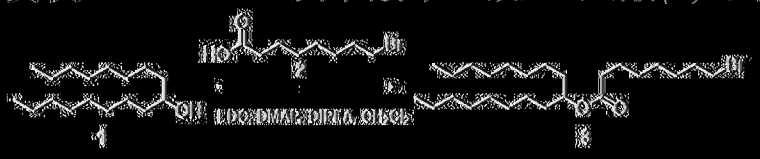
實例81

【0958】 ***實例81.1*** *8-((3-羥丙基)(2-羥基十四烷基)胺基)辛酸十七烷-9-基酯(**脂質10e-1**)之合成*



脂質10c-1

[0959] *實例81.1.1　8-溴辛酸十七烷-9-基酯(3)之合成*



[0960] 向8-溴辛酸2 (10 g，44.82 mmol)及十七烷-9-醇1 (9.6 g，37.35 mmol)於CH_2Cl_2 (300 mL)中之混合物中添加DMAP (900 mg，7.48 mmol)、DIPEA (26 mL，149.7 mmol)及EDC (10.7 g，56.03 mmol)。反應物在室溫下攪拌隔夜。在濃縮反應混合物之後，將粗殘餘物溶解於乙酸乙酯(300 mL)中，用1N HCl、飽和$NaHCO_3$、水及鹽水洗滌。有機層經無水Na_2SO_4乾燥。蒸發溶劑，且藉由急驟層析(SiO_2：己烷 100%至30% EtOAc/己烷)純化粗殘餘物，且獲得無色油狀產物3 (5 g，29%)。

[0961] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 4.86 (m, 1H), 3.39 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.5-1.4 (m, 8H), 1.35-1.2 (m, 26H), 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 6H)。

[0962] *實例81.1.2　8-((3-羥丙基)胺基)辛酸十七烷-9-基酯之合成(5)*

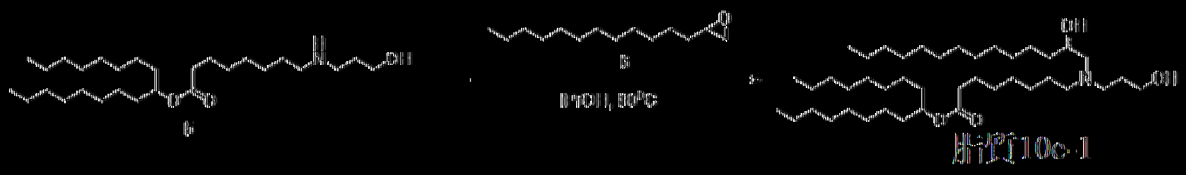


[0963] 向8-溴辛酸1-辛基壬酯3 (7.4 g，16.03 mmol)於EtOH (200 mL)中之溶液中添加3-胺基-1-丙醇4 (24.4 mL，320 mmol)，且在70℃下

加熱反應溶液隔夜。MS顯示預期產物：[APCI+]: [MH+]+456.4。在濃縮反應混合物之後，將粗殘餘物溶解於甲基三級丁基醚(500 mL)中，用飽和$NaHCO_3$、水及鹽水洗滌。有機層經無水Na_2SO_4乾燥。蒸發溶劑，且藉由急驟層析(SiO_2：CH_2Cl_2 100%至10% MeOH/含1% NH_4OH之CH_2Cl_2)純化粗殘餘物且獲得無色油狀產物5 (6.6 g，88%)。

[0964] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 4.84 (m, 1H), 3.80 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 2.87 (t, J = 5.76 Hz, 2H), 2.59 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.5-1.4 (m, 5H), 1.35-1.2 (m, 32H), 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 6H). MS (APCI+): 456.4 (M+1)。

[0965] *實例81.1.3　8-((3-羥丙基)(2-羥基十四烷基)胺基)辛酸十七烷-9-基酯(7)之合成*



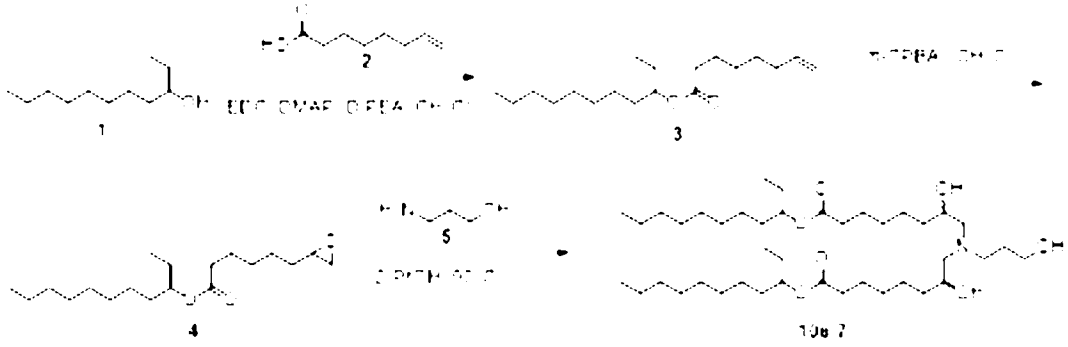
脂質10c-1

[0966] 將化合物5 (6.6 g，14.5 mmol)及1,2-環氧十四烷(3.68 g，17.4 mmol)於異丙醇(150 mL)中之混合物加熱至回流隔夜。MS顯示預期產物：[APCI+]: [MH+]+668.6。濃縮反應混合物，且藉由急驟層析(SiO_2：CH_2Cl_2 100%至10% MeOH/含1% NH_4OH之CH_2Cl_2)純化粗產物，獲得呈無色油狀之脂質10c-1 (6.34 g，65%)。

[0967] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 4.85 (m, 1H), 3.76 (t, J = 5.49 Hz, 2H), 3.68 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.59 (m, 2H), 2.38 (m, 3H), 2.27 (m, 2H), 1.58-1.68 (m, 2H), 1.48 (m, 6H),1.24 (m, 56H), 0.87 (m, 9H). MS (APCI+): 668.6 (M+1)。

[0968] *實例81.2　8,8'-((3-羥丙基)亞氨基)雙(1-羥基辛酸)二(十*

*烷-3-基酯) (**10e-7**)之合成*



【0969】 ***實例81.2.1*** *辛-7-烯酸十一烷-3-基酯(**3**)之合成*

【0970】 向辛-7-烯酸2 (10 g，70.3 mmol)及十一烷-3-醇1 (10 g，58.6 mmol)於CH_2Cl_2 (300 mL)中之混合物中添加DMAP (1.4 g，11.6 mmol)、DIPEA (40 mL，232 mmol)及EDC (16.9 g，87.9 mmol)。反應物在室溫下攪拌隔夜。在濃縮反應混合物之後，將粗殘餘物溶解於三級丁基甲基醚(500 mL)中，用1N HCl、飽和$NaHCO_3$、水及鹽水洗滌。有機層經無水Na_2SO_4乾燥。蒸發溶劑且藉由急驟層析(SiO_2：己烷=100%至20% EtOAc/己烷)純化粗殘餘物，且獲得無色油狀產物3 (17.2 g，98%)。

【0971】 ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 5.88-5.72 (m, 1H), 5.02-4.91 (m, 1H), 4.80 (m, 1H), 2.28 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.05-2.03 (m, 2H), 1.62-1.49 (m, 6H), 1.37-1.25 (m, 16H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 6H)。

【0972】 ***實例81.2.2*** *6-(環氧乙烷-2-基)己酸十一烷-3-基酯(**4**)之合成*

【0973】 在0℃冰水浴，向辛-7-烯酸十一烷-3-基酯3 (17.2 g，58.1 mmol)於CH_2Cl_2 (300 mL)中之混合物中一次性添加間氯過氧苯甲酸(mCPBA，<77%) (19.5 g，87 mmol)。反應物在室溫下攪拌隔夜。過濾白色沈澱物(間苯甲酸)且將濾液用CH_2Cl_2 (200 mL)稀釋，用10% $Na_2S_2O_3$、飽和$NaHCO_3$、水及鹽水洗滌。有機層經無水Na_2SO_4乾燥。蒸

發溶劑且藉由急驟層析(SiO_2：己烷=100%至30% EtOAc/己烷)純化粗殘餘物，且獲得無色油狀產物3 (17.1 g，97%)。

【0974】 ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 4.80 (m, 1H), 2.89-2.86 (m, 1H), 3.39 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.74 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 2.47 (dd, J = 4.9, 2.2 Hz, 1H), 2.28 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 1.74-1.46 (m, 10H), 1.35-1.2 (m, 13H) 0.87 (m, 6H)。

【0975】 ***實例81.2.3*** *8,8'-((3-羥丙基)氮二基)雙(7-羥基辛酸)二(十一烷-3-基酯) (**10e-7**)之合成*

【0976】 向6-(環氧乙烷-2-基)己酸十一烷-3-基酯4 (8 g，25.6 mmol)於異丙醇(50 mL)中之溶液中添加3-胺基-1-丙醇(769.1 mg，10.2 mmol)，且在90℃下加熱反應溶液隔夜。MS顯示預期產物：[APCI]: $[MH]^+$700.6。在濃縮反應混合物之後，藉由急驟層析(SiO_2：CH_2Cl_2=100%至10% MeOH/CH_2Cl_2)純化粗殘餘物，且獲得無色油產物(5.1 g，71%)。

【0977】 ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 4.81 (m, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.73 (m, 2H), 2.78 (m, 2H), 2.52-2.43 (m, 4H), 2.28 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.68-1.48 (m, 15H), 1.35-1.17 (m, 37H), 0.88-0.83 (m, 12H). MS ($APCI^+$): 700.6 (M+1)。

實例82

【0978】 *脂質奈米粒子調配程序*

【0979】 在測定粒徑之1×PBS及測定ζ電位之15 mM PBS中使用Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)以測定奈米粒子組合物之粒徑、多分散性指數(PDI)及ζ電位。使用

Malvern Panalytical Zetasizer Pro量測具有1 mL含20 μg/mL LNP之PBS (pH 7.4)的光析槽以獲得Z平均值。記錄Z平均值及多分散性指數。藉由動態光散射測定LNP大小。

【0980】 可使用紫外線可見光譜法以測定奈米粒子組合物中之環狀RNA之濃度。將100 μL含經稀釋調配物之1×PBS添加至900 μL甲醇與氯仿之4:1 (v/v)混合物中。在混合後，在DU 800分光光度計(Beckman Coulter，Beckman Coulter Inc.，Brea，CA)上記錄例如在230 nm與330 nm之間的溶液之吸光度譜。可基於組合物中所使用之環狀RNA之消光係數及在例如260 nm之波長下的吸光度與在例如330 nm之波長下的基線值之間的差異來計算奈米粒子組合物中之環狀RNA的濃度。

【0981】 對於轉移媒劑之pK_a，進行TNS分析。將5 μL之60 μg/mL 2-(對甲苯胺基)萘-6-磺酸(TNS)及5 μL之30 μg RNA/mL脂質奈米粒子添加至具有在pH 2-12範圍內之HEPES緩衝液的各孔中。接著，在室溫下振盪混合物5分鐘，且使用盤讀取器讀取螢光(激發322 nm，發射431 nm)。計算螢光訊號之反曲點以測定粒子之pK_a。

【0982】 對於包括RNA之轉移媒劑組合物，可使用QUANT-IT™ RIBOGREEN® RNA分析(Invitrogen Corporation Carlsbad，CA)以評估轉移媒劑組合物對RNA之囊封。將奈米粒子溶液以2 μg/mL之理論oRNA濃度稀釋於三乙二胺四乙酸(TE)緩衝液中。製備在2 μg/mL至0.125 μg/mL範圍內之稀釋於TE緩衝液中之標準oRNA溶液。將粒子及標準品分別塗鋪在具有TE緩衝液及4% Triton-X兩者之黑色96孔盤中(Triton-X用作界面活性劑來溶解奈米粒子)。培育(37℃，以350 rpm持續15分鐘)後，將Quant-iT™ RiboGreen™ RNA試劑添加至所有孔中，且進行第二次培育

(37℃，以350 rpm持續3分鐘)。使用SPECTRAmax® GEMINI XS微量盤光譜螢光計(Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA)來量測螢光。使用標準曲線計算各粒子溶液中oRNA之濃度。自經溶解粒子與未溶解粒子之間偵測到的oRNA比計算囊封效率。

實例83

【0983】 *脾免疫細胞中mOX40L之表現。*

【0984】 包含表10e之脂質1及表10f之脂質15的脂質奈米粒子用編碼mOX40L之環狀RNA，以5.7之可離子化脂質與磷酸酯比率(IL:P)調配。此等LNP之可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質莫耳比為50:10:38.5:1.5。使用PBS進行LNP之透析。以1 mg/kg，對C57BL/6雌性小鼠(6-8週，n=4)靜脈內給藥包含表10e之脂質1或表10f之脂質15的LNP。在24小時，自小鼠收集脾用於流式細胞分析技術分析。比較T細胞、骨髓細胞、B細胞及NK細胞中表10e之脂質1及表10f之脂質15的mOX40L轉染。

【0985】 如**圖74**中所示，相較於包含表10f之脂質15之彼等者，表10e之脂質1在脾免疫細胞中引起相當或更高水準之mOX40L轉染。

調配物	可離子化脂質	輔助脂質	PEG-脂質	透析	Z-平均值(nm)	PDI	RNA囊封效率(%)
10e-1 (5.7A)	表10e，脂質1	DSPC	DMG-PEG(2000)	1X PBS	79	0.03	95
10f-15 (5.7A)	表10f，脂質15	DSPC	DMG-PEG(2000)	1X PBS	69	0.09	98

實例84

【0986】 *相較於LNP調配物內涵蓋之線性RNA，LNP調配物內涵蓋之環狀RNA的螢光表現。*

【0987】 製備LNP以含有編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA或編碼螢火蟲螢光素酶之線性RNA (mRNA)。含有線性RNA之LNP亦經5-甲氧基尿苷(5-moU)修飾。調配此等LNP以含有表10e之脂質1或脂質7，其中此等LNP之可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質莫耳比為50:10:38.5:1.5。使用1×PBS進行LNP之透析。測定LNP構築體之大小、多分散指數(PDI)及RNA截留。

【0988】 如下表中所見，LNP調配物中之各者中環狀RNA之囊封效率大於相同調配物中線性RNA之囊封效率。

調配物	可離子化脂質	輔助脂質	PEG-脂質	RNA	Z-平均值(nm)	PDI	RNA囊封效率(%)
10e-1 (5.7A)	表10e，脂質1	DSPC	DMG-PEG(2000)	FLuc oRNA	82	0.05	95
				FLuc mRNA 5MoU	89	0.05	90
10e-7 (5.7A)	表10e，脂質7	DSPC	DMG-PEG(2000)	oRNA	86	0.02	97
				FLuc mRNA 5MoU	86	0.04	94

實例85

【0989】 *調配的LNP使用PBS或TSS進行透析。*

【0990】 LNP用環狀RNA，以5.7之可離子化脂質與磷酸酯比率(IL:P)及50:10:38.5:1.5之可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質比率調配。接著，此等LNP使用1×PBS或1×TSS進行透析。兩種調配的LNP具有大於90%之環狀RNA囊封效率比。

調配物	可離子化脂質	輔助脂質	PEG-脂質	透析	Z-平均值(nm)	PDI	RNA囊封效率(%)
10e-1 (5.7A)	表10e，脂質1	DSPC	DMG-PEG(2000)	1X PBS	87	0.06	94
				1X TSS	68	0.04	92

實例86

【0991】 *可離子化脂質中具有變化的B-羥基之編碼螢火蟲螢光素酶*

之LNP-環狀RNA之處理後的小鼠脾蛋白質表現

【0992】 對C57BL/6小鼠(雌性，6-8週，n = 4隻/組)靜脈內注射0.5 mg/kg囊封於LNP中之編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA或PBS對照。LNP用不同可離子化脂質(表10e，脂質85、86、89或90；或表10f脂質22)調配，且如下表中所描述調配。在6小時之後，對小鼠腹膜內注射D-螢光素(200 μL，15 mg/mL)。在15分鐘之後，將小鼠安樂死且收集其脾臟。使用IVIS光譜活體內成像系統(PerkinElmer)離體量測全組織發光，且使用Living Image®軟體(PerkinElmer)定量總通量。

【0993】 如**圖75**中所示，脾中螢光素酶表現增加與LNP之可離子化脂質組分中存在之B-羥基之數目增加相關。

調配物	可離子化脂質	輔助脂質	PEG-脂質	可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質(mol%)	Z-平均值(nm)	PDI	RNA囊封效率(%)
10e-85 (5.7A)	表10e，脂質85	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	81	0.08	91
10e-89 (5.7A)	表10e，脂質89	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	82	0.04	92
10f-22 (5.7A)	表10f，脂質22	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	78	0.08	93
10e-86 (5.7A)	表10e，脂質86	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	79	0.1	92
10e-90 (5.7A)	表10e，脂質90	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	86	0.04	92

實例87

【0994】 *編碼螢火蟲螢光素酶且包含來自表10e之可離子化脂質之LNP-環狀RNA之處理後的小鼠全脾蛋白質表現*

【0995】 對C57BL/6小鼠(雌性，6-8週，n = 4隻/組)靜脈內注射0.5 mg/kg囊封於LNP中之編碼螢火蟲螢光素酶之環狀RNA或PBS對照。LNP

用來自表10e之不同可離子化脂質(脂質1、脂質85、脂質38、脂質34、脂質45、脂質86、脂質88、脂質89、脂質90)調配。LNP用環狀RNA，以5.7之可離子化脂質與磷酸酯比率(IL:P)及50:10:38.5:1.5之可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質比率調配。在6小時之後，對小鼠腹膜內注射D-螢光素(200 μL，15 mg/mL)。在15分鐘之後，將小鼠安樂死且收集其脾臟。使用IVIS光譜活體內成像系統(PerkinElmer)離體量測全組織發光，且使用Living Image®軟體(PerkinElmer)定量總通量。

【0996】 如圖76中所見，在靜脈內投與構築體後，LNP-環狀RNA能夠在小鼠脾中表現螢火蟲螢光素酶。

實例88

【0997】 *脾T細胞中mOX40L之表現。*

【0998】 包含來自表10e之可離子化脂質(脂質1、16、85、34、45、86、88、89、90)或PBS(陰性對照)之脂質奈米粒子用編碼mOX40L之環狀RNA，以5.7之可離子化脂質與磷酸酯比率(IL:P)調配。此等LNP之可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質莫耳比為50:10:38.5:1.5。以1 mg/kg，對C57BL/6雌性小鼠(6-8週，n=4)靜脈內給藥。在24小時時，自小鼠收集脾用於流式細胞分析技術分析，測試體重減輕且在血液收集之後量測血清丙胺酸轉胺酶(ALT)。量測脾T細胞中之mOX40L表現。

【0999】 如**圖77**中所示，表10e之脂質1引起脾T細胞中mOX40L之表現。關於體重減輕或ALT，未量測到實質性副作用。

調配物	可離子化脂質	輔助脂質	PEG-脂質	可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質(mol%)	Z-平均值(nm)	PDI	RNA囊封效率(%)
10e-1 (5.7A)	表10e，脂質1	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	73	0.05	94
10e-16 (5.7A)	表10e，脂質16	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	76	0.10	95
10e-85 (5.7A)	表10e，脂質85	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	74	0.04	95
10e-34 (5.7A)	表10e，脂質34	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	72	0.03	97
10e-45 (5.7A)	表10e，脂質45	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	75	0.04	98
10e-86 (5.7A)	表10e，脂質86	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	79	0.05	94
10e-88 (5.7A)	表10e，脂質88	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	67	0.01	95
10e-89 (5.7A)	表10e，脂質89	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	73	0.01	95
10e-90 (5.7A)	表10e，脂質90	DSPC	DMG-PEG(2000)	50:10:38.5:1.5	87	0.02	94

實例89

【1000】 *編碼aCD19-CAR之LNP-環狀RNA在處理後的B細胞耗乏水準*

【1001】 在第0、2、5及7天，向C57BL/6小鼠(雌性，6-8週，n=4隻/組)靜脈內注射囊封於LNP中之編碼aCD19-CAR之1 mg/kg 環狀RNA或囊封於LNP中之編碼mWasabi之對照環狀RNA。LNP用不同可離子化脂質(表10e，脂質1、16、85、45、86或90)形成。LNP用環狀RNA，以5.7之可離子化脂質與磷酸酯比率(IL:P)及50:10:38.5:1.5之可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質比率調配。在第8天，進行心臟穿刺以收集血液，且血液進行染色，固定且按照製造商之方案用BD FACS裂解溶液溶解。

為了評定血液中B細胞之頻率，對單細胞懸浮液進行死細胞(LiveDead Near IR, Invitrogen)染色且以1:200，用抗小鼠抗體(CD45，30-F11、或BUV563 [血 液]，BD；CD3，17A2、APC，Biolegend；B220，RA3-6B2、PE，Biolegend；CD11b，M1/70、BV421，Biolegend)進行染色。使用BD FACSSymphony流式細胞儀執行流式細胞分析技術。B細胞耗乏由活CD45+免疫細胞中B220+ B細胞之百分比定義。

【1002】 所得血液B細胞發育不全繪示於**圖78**中。如**圖78**中所示，LNP-環狀RNA構築體能夠表現aCD19-CAR。

實例90

【1003】 *Nalm6模型中LNP-oRNA構築體投與後之腫瘤生長動力學*

【1004】 對NSG小鼠移植Nalm6-螢光素酶腫瘤細胞，且3天後移植人類PBMC。第二天開始，小鼠每隔一天用媒劑(PBS)或抗CD19 LNP-oCAR化合物，以2 mg/kg之劑量處理4次。LNP用環狀RNA，以5.7之可離子化脂質與磷酸酯比率(IL:P)及50:10:38.5:1.5之可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質比率調配。接著，動物經由IVIS進行全身成像以監測來自Nalm6細胞之螢光素酶表現。作為在各成像時間點時之螢光素酶表現之總通量繪製Nalm6腫瘤負荷。

【1005】 如圖79中所示，各自包含不同可離子化脂質之所有三種抗CD19 oCAR LNP在此Nalm6模型中能夠減緩腫瘤生長。

參考文獻併入

【1006】 本說明書中所提及之全部公開案、專利及專利申請案皆以引用之方式併入本文中，其引用程度如同特定地且個別地指示各個別公開案、專利或專利申請案以引用之方式併入本文中一般。

【符號說明】

【1007】

8: 環狀RNA

10: 線性RNA聚核苷酸前驅體

20: 5'增強型內含子元件

21: 前導非轉譯序列

22: 5'親和標籤

24: 5'外部雙螺旋體區

26: 5'外部間隔子

28: 3'內含子片段

30: 5'增強型外顯子元件

32: 3'外顯子片段

34: 5'內部雙螺旋體區

36: 5'內部間隔子

40: 核心功能元件

42: TIE

43: IRES

44: 適體

45: 適體複合物

46: 編碼區

47: 非編碼區/核心功能元件

48: 終止區

50: 3'增強型外顯子元件

52: 3'內部間隔子

54: 3'內部雙螺旋體區

56: 5'外顯子片段

60: 3'增強型內含子元件

62: 5'內含子片段

64: 3'外部間隔子

66: 3'外部雙螺旋體區

68: 3'親和標籤

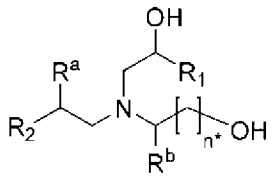
69: 末端非轉譯序列

70: 輔助元件

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種由式(13*)表示之可離子化脂質：



式(13*)

或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

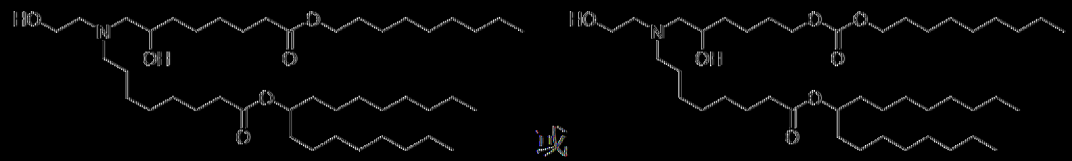
n^*為1至7之間的整數；

R^a為氫或羥基；

R^b為氫或C_1-C_6烷基；

R_1及R_2各自獨立地為視情況經一或多個選自以下之取代基取代之直鏈或分支鏈C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基或C_1-C_{30}雜烷基：側氧基、鹵基、羥基、氰基、烷基、烯基、醛、雜環基烷基、羥烷基、二羥烷基、羥基烷基胺基烷基、胺基烷基、烷胺基烷基、二烷胺基烷基、(雜環基)(烷基)胺基烷基、雜環基、雜芳基、烷基雜芳基、炔基、烷氧基、胺基、二烷胺基、胺基烷基羰基胺基、胺基羰基烷胺基、(胺基羰基烷基)(烷基)胺基、烯基羰基胺基、羥基羰基、烷基氧基羰基、烷基羰氧基、烷基碳酸酯、烯氧基羰基、烯基羰氧基、烯基碳酸酯、炔氧基羰基、炔基羰氧基、炔基碳酸酯、胺基羰基、胺基烷基胺基羰基、烷基胺基烷基胺基羰基、二烷基胺基烷基胺基羰基、雜環基烷基胺基羰基、(烷胺基烷基)(烷基)胺基羰基、烷基胺基烷基羰基、二烷基胺基烷基羰基、雜環基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亞碸、烷基亞碸烷基、烷基磺醯基及烷基碸烷基；

其限制條件為該可離子化脂質不為



或

。

[請求項2]

如請求項1之可離子化脂質，其中R^b為C_1-C_6烷基。

[請求項3]

如請求項1之可離子化脂質，其中R^b為H且該可離子化脂質由式(13)表示：



式(13)

其中n為1至7之間的整數。

[請求項4]

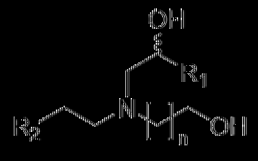
如請求項3之可離子化脂質，其中n為1、2、3或4。

[請求項5]

如請求項1至4中任一項之可離子化脂質，其中R_a為氫。

[請求項6]

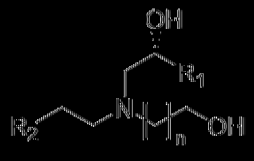
如請求項2之可離子化脂質，其中該可離子化脂質由式(13a-1)、式(13a-2)或式(13a-3)表示：



式(13a-1)



式(13a-2)



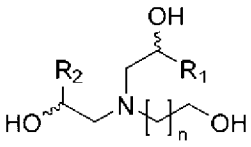
式(13a-3)。

[請求項7]

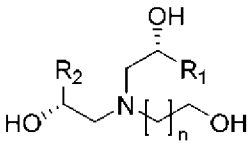
如請求項1至4中任一項之可離子化脂質，其中R_a為羥基。

【請求項8】

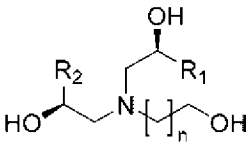
如請求項7之可離子化脂質，其中該可離子化脂質由式(13b-1)、式(13b-2)或式(13b-3)表示：



式(13b-1)



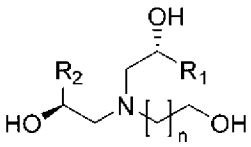
式(13b-2)



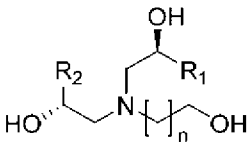
式(13b-3)。

【請求項9】

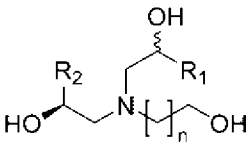
如請求項7之可離子化脂質，其中該可離子化脂質由式(13b-4)、式(13b-5)、式(13b-6)、式(13b-7)、式(13b-8)或式(13b-9)表示：



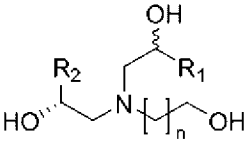
式(13b-4)



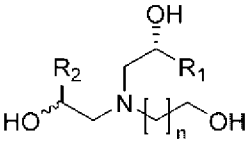
式(13b-5)



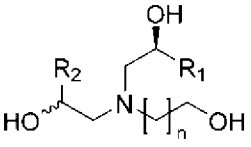
式(13b-6)



式(13b-7)



式(13b-8)



式(13b-9)。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2各自獨立地為視情況經一或多個選自以下之取代基取代之直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基或C_1-C_{20}雜烷基：C_1-C_{20}烷氧基、C_1-C_{20}烷基氧基羰基、C_1-C_{20}烷基羰氧基、C_1-C_{20}烷基碳酸酯、C_2-C_{20}烯氧基羰基、C_2-C_{20}烯基羰氧基、C_2-C_{20}烯基碳酸酯、C_2-C_{20}炔氧基羰基、C_2-C_{20}炔基羰氧基及C_2-C_{20}炔基碳酸酯。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2中之至少一者為未經取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_6-C_{30}雜烷基。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2中之至少一者為經-O(CO)R^6、-C(O)OR^6或-O(CO)OR^6取代之直鏈C_1-C_{12}烷基，其中各R^6獨立地為直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。

【請求項13】

如請求項12之可離子化脂質，其中R_1及R_2各自獨立地為經-OC(O)R^6、-C(O)OR^6或-OC(O)OR^6取代之直鏈C_1-C_{12}烷基，其中各R^6獨立地為直鏈或分支鏈C_1-C_{20}烷基或C_2-C_{20}烯基。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2中之至少一者選自：

-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【請求項15】

如請求項14之可離子化脂質，其中R_1及R_2各自獨立地選自：

$-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

$-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，及

$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$，

其中：

q為0至12之間的整數，

r為0至6之間的整數，

R^8為H或R^{10}，及

R^9及R^{10}獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基或未經取代之直鏈C_2-C_{12}烯基。

【請求項16】

如請求項14之可離子化脂質，其中R_1為未經取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基。

【請求項17】

如請求項14或15之可離子化脂質，其中R_1為$-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。

【請求項18】

如請求項14或15之可離子化脂質，其中R_1為$-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。

【請求項19】

如請求項14或15之可離子化脂質，其中R_1為$-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。

【請求項20】

如請求項16至19中任一項之可離子化脂質，其中R_2為未經取代之直鏈或分支鏈C_6-C_{30}烷基。

【請求項21】

如請求項16至19中任一項之可離子化脂質，其中R_2為-$(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。

【請求項22】

如請求項16至19中任一項之可離子化脂質，其中R_2為-$(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。

【請求項23】

如請求項16至19中任一項之可離子化脂質，其中R_2為-$(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$。

【請求項24】

如請求項14至23中任一項之可離子化脂質，其中q為1至6之間的整數。

【請求項25】

如請求項14至23中任一項之可離子化脂質，其中q為3、4、5或6。

【請求項26】

如請求項14至25中任一項之可離子化脂質，其中r為0。

【請求項27】

如請求項14至25中任一項之可離子化脂質，其中r為1至6之間的整數。

【請求項28】

如請求項14至25中任一項之可離子化脂質，其中r為1。

【請求項29】

如請求項14至25中任一項之可離子化脂質，其中r為2。

【請求項30】

如請求項14至29中任一項之可離子化脂質，其中R^8為H。

【請求項31】

如請求項14至29中任一項之可離子化脂質，其中R^8為R^{10}。

【請求項32】

如請求項31之可離子化脂質，其中R^9及R^{10}各自獨立地為未經取代之直鏈C_1-C_{12}烷基。

【請求項33】

如請求項32之可離子化脂質，其中R^9及R^{10}各自獨立地為未經取代之直鏈C_4-C_8烷基。

【請求項34】

如請求項33之可離子化脂質，其中R^9及R^{10}各自獨立地為未經取代之直鏈C_6-C_8烷基。

【請求項35】

如請求項1至9中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2各自為-$(CH_2)_m$-L-R'，其中：

m為0至10之整數；

L為不存在、-C(H)(R^L)-*、-OC(O)-*或-C(O)O-*，其中「-*」指示與R'之連接點；

R'選自由以下組成之群：C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基、C_1-C_{30}烷氧基、

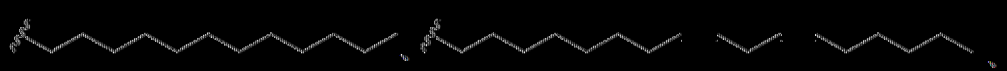
2-30員伸雜烷基及3-12員雜環基，其中2-30員伸雜烷基視情況經一或多個R''取代，且3-12員雜環基視情況經一或多個C_1-C_{30}烷基取代；

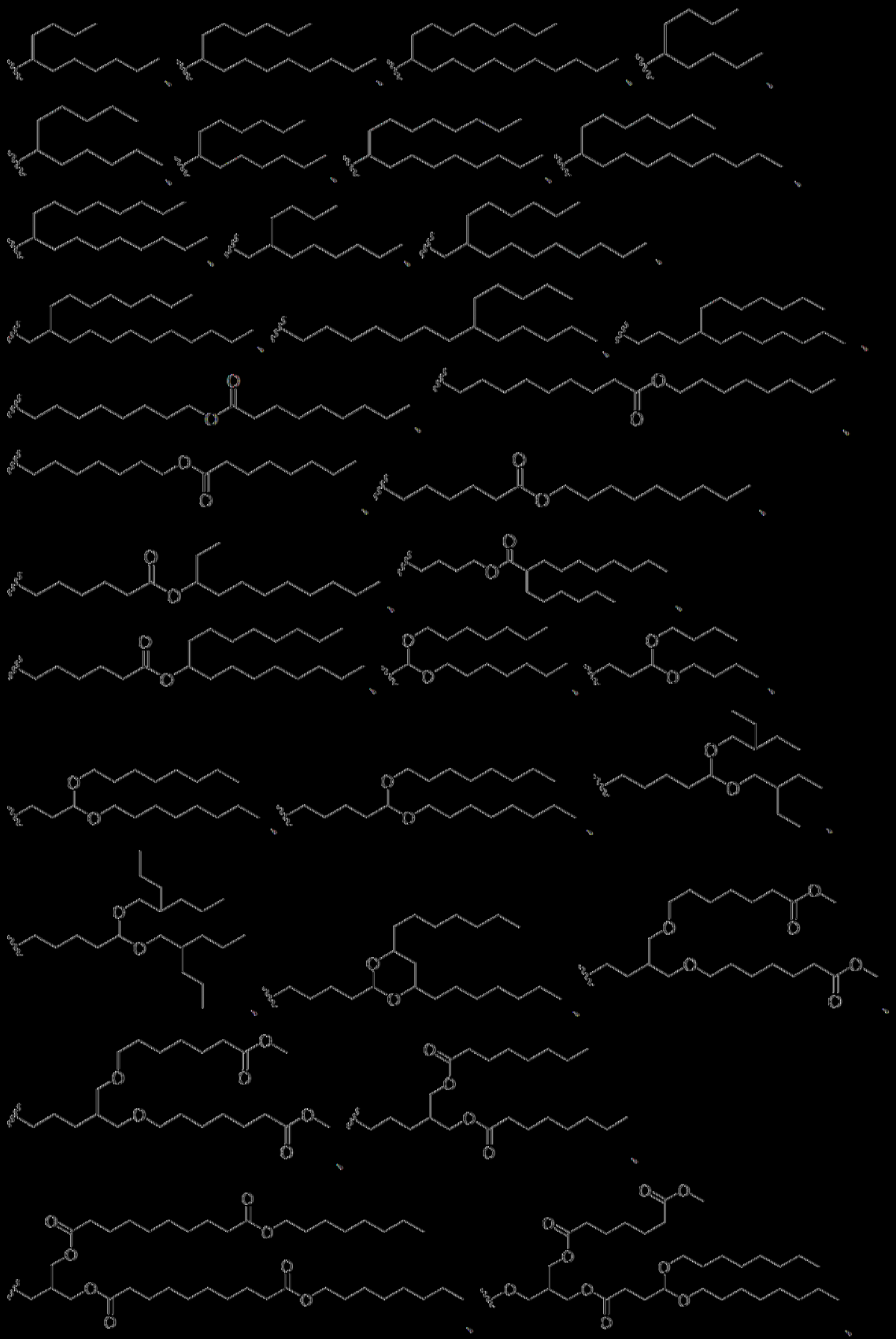
R'選自由以下組成之群：C_1-C_{30}烷基、C_2-C_{30}烯基、C_1-C_{30}烷氧基、2-30員伸雜烷基，其中3-12員伸雜烷基視情況經一或多個R''取代，

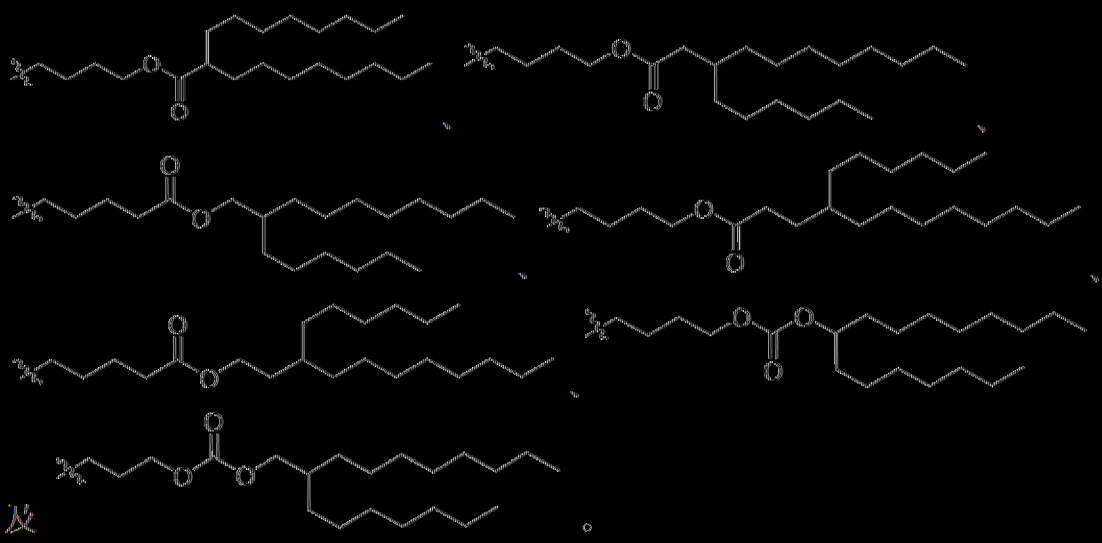
R''各自獨立地選自由以下組成之群：側氧基、C_1-C_{30}烷氧基、-C(O)-C_1-C_{30}烷基、-C(O)-C_1-C_{30}烷氧基及-C(O)-C_1-C_{30}伸烷基-C(O)-C_1-C_{30}烷氧基。

|(請求項36)|

如請求項1至14及35中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2各自獨立地選自由以下組成之群：







及

[請求項37]

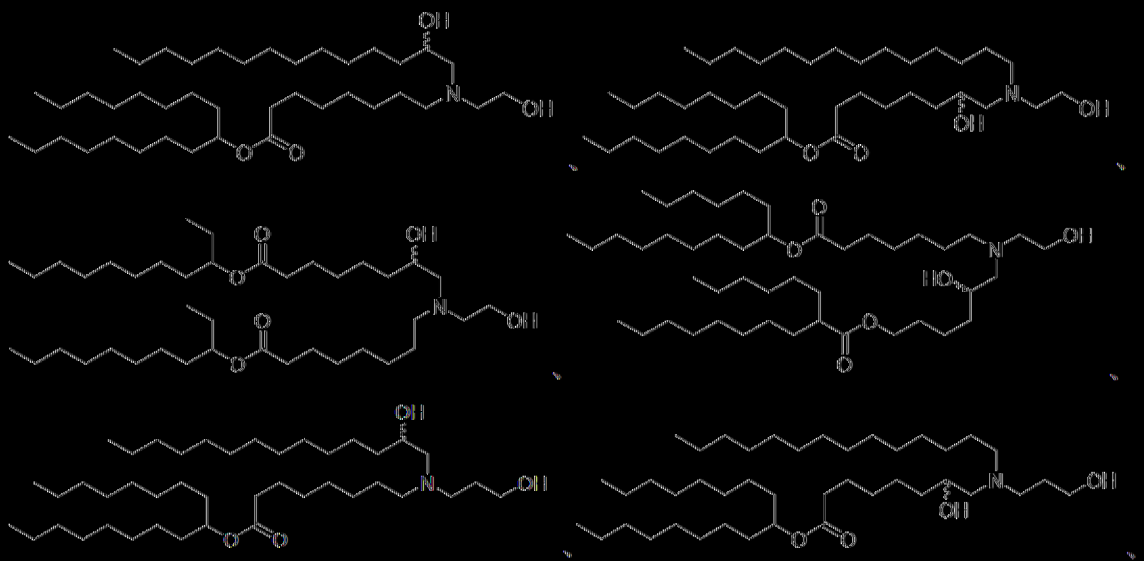
如請求項1至14及35至36中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2相同。

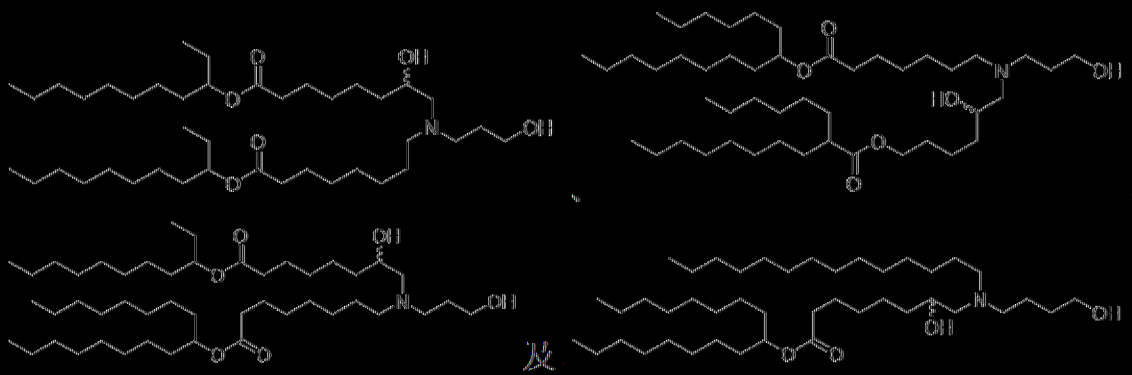
[請求項38]

如請求項1至14及35至36中任一項之可離子化脂質，其中R_1及R_2不同。

[請求項39]

如請求項1至38中任一項之可離子化脂質，其中該可離子化脂質選自由以下組成之群：



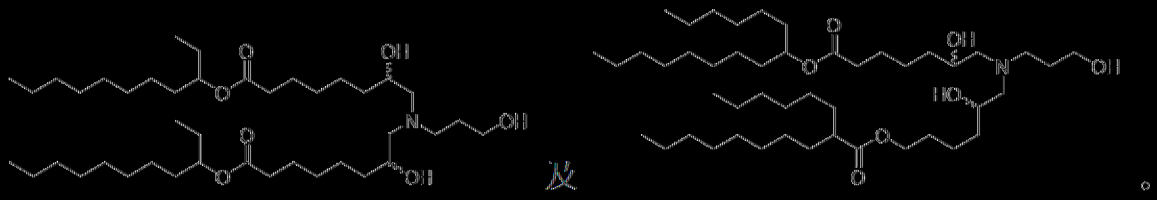


及

。

[請求項40]

如請求項1至38中任一項之可離子化脂質，其中該可離子化脂質選自由以下組成之群：



及

。

[請求項41]

如請求項1至38中任一項之可離子化脂質，其中該可離子化脂質選自表10c。

[請求項42]

一種包含轉移媒劑之腎藥組合物，其中該轉移媒劑包含如請求項1至41中任一項之可離子化脂質。

[請求項43]

如請求項42之腎藥組合物，其中該腎藥組合物進一步包含RNA紫核苷酸。

[請求項44]

如請求項44之腎藥組合物，其中該RNA紫核苷酸為直鏈或環狀RNA紫核苷酸。

[請求項45]

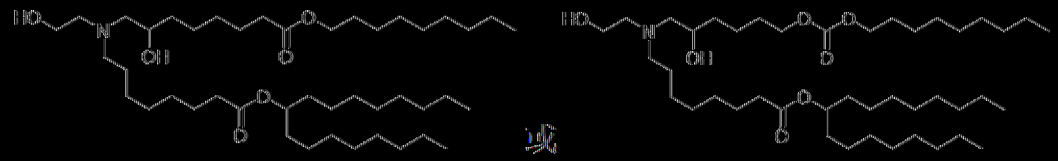
如請求項43或44之醫藥組合物，其中該RNA紫核苷酸為環狀RNA紫核苷酸。

[請求項46]

一種醫藥組合物，其包含：

c. RNA紫核苷酸，其中該RNA紫核苷酸為環狀RNA紫核苷酸，及

d. 包含選自以下之可離子化脂質之轉移媒劑：



或

。

[請求項47]

如請求項42至46中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含奈米粒子，諸如脂質奈米粒子、核-殼奈米粒子、可生物降解奈米粒子、可生物降解脂質奈米粒子、紫合物奈米粒子或可生物降解紫合物奈米粒子。

[請求項48]

如請求項43至47中任一項之醫藥組合物，其中該RNA紫核苷酸囊封於該轉移媒劑中，視情況其中囊封效率為至少約80%。

[請求項49]

如請求項43至48中任一項之醫藥組合物，其中該RNA紫核苷酸包含表現序列。

[請求項50]

如請求項49之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼治療性蛋白質。

[請求項51]

如請求項50之醫藥組合物，其中該第一表現序列編碼細胞介素或其

功能片段、轉錄因子、免疫檢查點抑制劑或嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor；CAR)。

【請求項52】

如請求項43至51中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸按以下次序包含：

a. 5'增強型外顯子元件，

b. 核心功能元件，及

c. 3'增強型外顯子元件。

【請求項53】

如請求項52之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含轉譯起始元件(translation initiation element；TIE)。

【請求項54】

如請求項53之醫藥組合物，其中該TIE包含非轉譯區(untranslated region；UTR)或其片段。

【請求項55】

如請求項54之醫藥組合物，其中該UTR或其片段包含IRES或真核IRES。

【請求項56】

如請求項53至55中任一項之醫藥組合物，其中該TIE包含適體複合物，視情況其中該適體複合物包含至少兩種適體。

【請求項57】

如請求項52至56中任一項之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含編碼區。

【請求項58】

如請求項57之醫藥組合物，其中該編碼區編碼治療性蛋白質。

【請求項59】

如請求項58之醫藥組合物，其中該治療性蛋白質為嵌合抗原受體(CAR)。

【請求項60】

如請求項52至59中任一項之醫藥組合物，其中該核心功能元件包含非編碼區。

【請求項61】

如請求項52至60中任一項之醫藥組合物，其中該3'增強型外顯子元件包含

5'外顯子片段，及視情況

3'內部間隔子及/或3'內部雙螺旋體元件，其中該3'內部間隔子及/或3'內部雙螺旋體元件各自獨立地位於該5'外顯子片段上游，視情況其中該3'內部間隔子係長度為約10至約60個核苷酸之聚A或聚A-C序列。

【請求項62】

如請求項52至61中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸係經由RNA聚核苷酸之環化製得，該RNA聚核苷酸按以下次序包含：

a. 5'增強型內含子元件，

b. 5'增強型外顯子元件，

c. 核心功能元件，

d. 3'增強型外顯子元件，及

e. 3'增強型內含子元件。

【請求項63】

如請求項62之醫藥組合物，其中該5'增強型內含子元件包含：

3'內含子片段，其包含3' I組內含子剪接位點二核苷酸之第一或第一及第二核苷酸；及視情況

位於該3'內含子片段上游之5'親和標籤，

位於該3'內含子片段上游之5'外部間隔子，及/或

位於該5'增強型內含子元件之5'端的前導非轉譯序列。

【請求項64】

如請求項43至63中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸之長度為約100nt至約10,000nt，諸如長度為約100nt至約15,000nt。

【請求項65】

如請求項43至64中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸為環狀RNA聚核苷酸，且其中該組合物在人類細胞中或人類活體內之治療作用持續時間大於或等於參考組合物之治療作用持續時間，

其中該參考物包含(1)替代該環狀RNA聚核苷酸之參考線性RNA聚核苷酸，其具有與該環狀RNA聚核苷酸相同的表現序列；及/或(2)不為如請求項1至41中任一項之可離子化脂質的可離子化脂質。

【請求項66】

如請求項65之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在人類活體內之治療作用持續時間為至少約10、至少約20、至少約30、至少約40、至少約50、至少約60、至少約70、至少約80、至少約90或至少約100小時。

【請求項67】

如請求項43至66中任一項之醫藥組合物，其中該RNA聚核苷酸為環

狀RNA聚核苷酸，且其中該組合物在人類細胞中或在人類活體內之功能半衰期大於或等於預定臨限值的功能半衰期。

【請求項68】

如請求項67之醫藥組合物，其中該組合物之功能半衰期為至少約20小時。

【請求項69】

如請求項42至68中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑進一步包含結構性脂質及經PEG修飾之脂質。

【請求項70】

如請求項69之醫藥組合物，其中相較於缺乏該結構性脂質之對照轉移媒劑，該結構性脂質與C1q結合及/或促進包含該脂質之轉移媒劑與C1q的結合，及/或相較於缺乏該結構性脂質之對照轉移媒劑，該結構性脂質增加免疫細胞中C1q結合轉移媒劑之攝取。

【請求項71】

如請求項70之醫藥組合物，其中該免疫細胞為T細胞、NK細胞、NKT細胞、巨噬細胞或嗜中性球。

【請求項72】

如請求項69至71中任一項之醫藥組合物，其中該結構性脂質為膽固醇。

【請求項73】

如請求項72之醫藥組合物，其中該結構性脂質為β-植物固醇。

【請求項74】

如請求項72之醫藥組合物，其中該結構性脂質不為β-植物固醇。

【請求項75】

如請求項69至74中任一項之醫藥組合物，其中該經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基胺基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DOMG或PEG-1。

【請求項76】

如請求項75之醫藥組合物，其中該經PEG修飾之脂質為DSPE-PEG(2000)。

【請求項77】

如請求項42至76中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑進一步包含輔助脂質。

【請求項78】

如請求項77之醫藥組合物，其中該輔助脂質為DSPC或DOPE。

【請求項79】

如請求項42至78中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC、膽固醇及DMG-PEG(2000)。

【請求項80】

如請求項69至79中任一項之醫藥組合物，其中按莫耳比計，該轉移媒劑包含約0.5%至約4%之經PEG修飾之脂質。

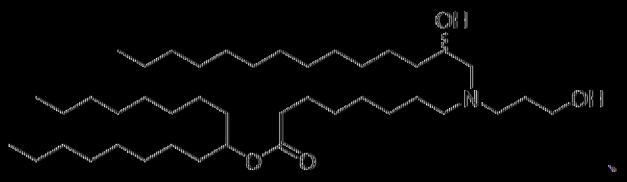
【請求項81】

如請求項69至80中任一項之醫藥組合物，其中按莫耳比計，該轉移媒劑包含約1%至約2%之經PEG修飾之脂質。

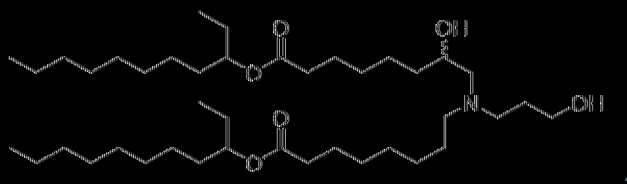
【請求項82】

如請求項42至81中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含：

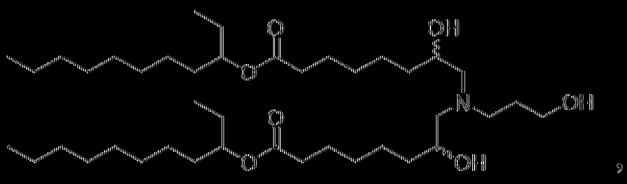
c. 選自以下之可離子化脂質：



、



及



，

或其混合物，

f. 選自DOPE或DSPC之輔助脂質，

g. 膽固醇，及

h. 選自DSPE-PEG(2000)或DMG-PEG(2000)之PEG-脂質。

[請求項83]

如請求項77至82中任一項之醫藥組合物，其中可離子化脂質:輔助脂質:膽固醇:PEG-脂質之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

[請求項84]

如請求項77至83中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

[請求項85]

如請求項84之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為約62:4:33:1。

【請求項86】

如請求項84之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為約53:5:41:1。

【請求項87】

如請求項77至82中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

【請求項88】

如請求項87之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約50:10:38.5:1.5。

【請求項89】

如請求項87之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約41:12:45:2。

【請求項90】

如請求項87之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固

醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2。

【請求項91】

如請求項77至82中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DSPC之輔助脂質及DSPE-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DSPC:膽固醇:DSPE-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

【請求項92】

如請求項77至82中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及C14-PEG(2000)之PEG-脂質，且其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:C14-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

【請求項93】

如請求項77至82中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑包含DOPE之輔助脂質及DMG-PEG(2000)之PEG-脂質，其中可離子化脂質:DOPE:膽固醇:DMG-PEG(2000)之莫耳比為約45:9:44:2、約50:10:38.5:1.5、約41:12:45:2、約62:4:33:1或約53:5:41:1。

【請求項94】

如請求項43至93中任一項之醫藥組合物，其脂質與磷酸酯(IL:P)莫耳比為約3至約9，諸如約3、約4、約4.5、約5、約5.5、約5.7、約6、約6.2、約6.5或約7。

【請求項95】

如請求項43至94中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑經調配以用於該RNA聚核苷酸之胞內體釋放。

【請求項96】

如請求項42至95中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑能夠與脂蛋白元E (APOE)結合或實質上不含APOE結合位點。

【請求項97】

如請求項42至96中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑能夠依賴低密度脂蛋白受體(low density lipoprotein receptor；LDLR)攝取或不依賴LDLR攝取至細胞中。

【請求項98】

如請求項42至97中任一項之醫藥組合物，其中該轉移媒劑之直徑小於約120 nm且/或不形成直徑超過300 nm之聚集物。

【請求項99】

如請求項45至98中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物實質上不含線性RNA。

【請求項100】

如請求項42至99中任一項之醫藥組合物，其進一步包含以可操作方式連接至該轉移媒劑之靶向部分。

【請求項101】

如請求項100之醫藥組合物，其中該靶向部分特異性或間接結合免疫細胞抗原，其中該免疫細胞抗原為選自由以下組成之群的T細胞抗原：CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、β7整合素、β2整合素及C1qR。

【請求項102】

如請求項101之醫藥組合物，其進一步包含轉接分子，該轉接分子包含轉移媒劑結合部分及細胞結合部分，其中該靶向部分特異性結合該轉移

媒劑結合部分，且該細胞結合部分特異性結合目標細胞抗原，

視情況其中該目標細胞抗原為選自以下之免疫細胞抗原：T細胞抗原、NK細胞抗原、NKT細胞抗原、巨噬細胞抗原或嗜中性球抗原。

【請求項103】

如請求項100至102中任一項之醫藥組合物，其中該靶向部分為小分子(例如甘露糖、凝集素、阿西維辛(acivicin)、生物素或地高辛(digoxigenin))，及/或該靶向部分為單鏈Fv (scFv)片段、奈米抗體、肽、基於肽之巨環、微型抗體、小分子配體(諸如葉酸、精胺醯甘胺醯天冬胺酸(RGD)或酚可溶性調控蛋白α1肽(PSMA1))、重鏈可變區、輕鏈可變區或其片段。

【請求項104】

如請求項43至103中任一項之醫藥組合物，其中該組合物中小於1重量%之該等聚核苷酸為雙股RNA、DNA夾板(DNA splints)或三磷酸化RNA。

【請求項105】

如請求項43至104中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物中小於1重量%之該等聚核苷酸及蛋白質為雙股RNA、DNA夾板、三磷酸化RNA、磷酸酶蛋白質、蛋白質連接酶及加帽酶。

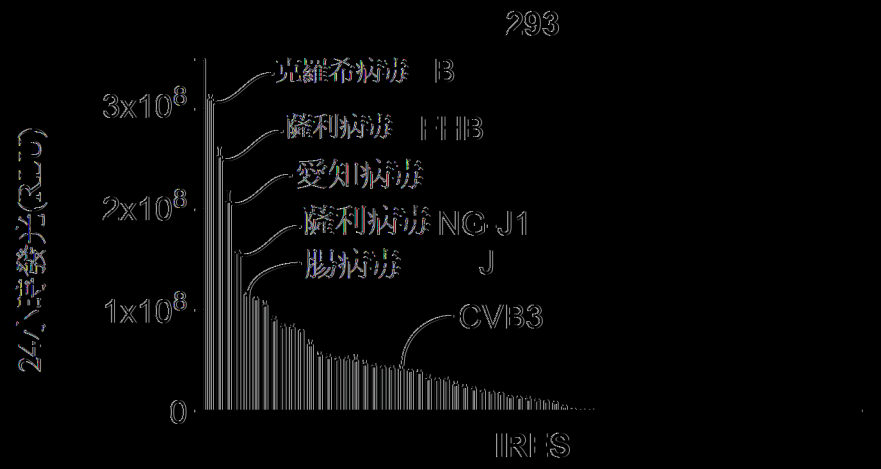
【請求項106】

一種治療或預防疾病、病症或病狀之方法，其包含投與有效量之如請求項42至105中任一項之醫藥組合物。

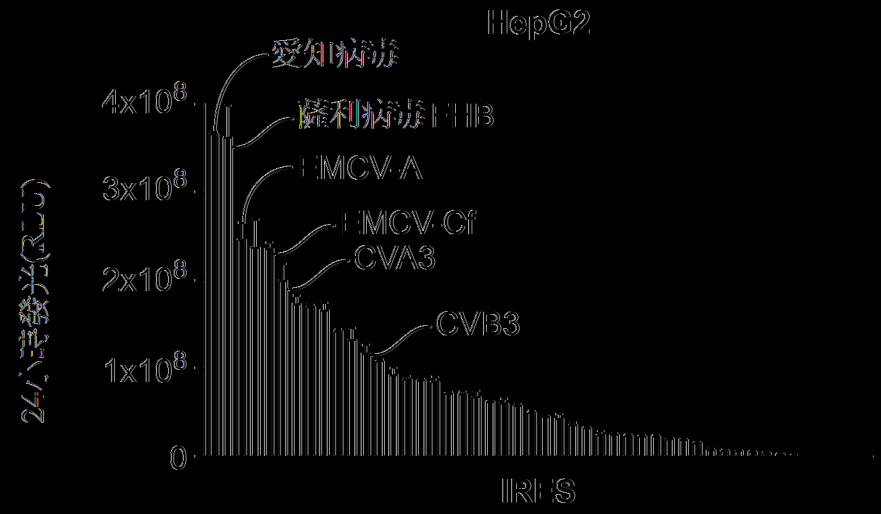
【請求項107】

一種治療有需要之個體之方法，其包含投與治療有效量之如請求項42至105中任一項之醫藥組合物。

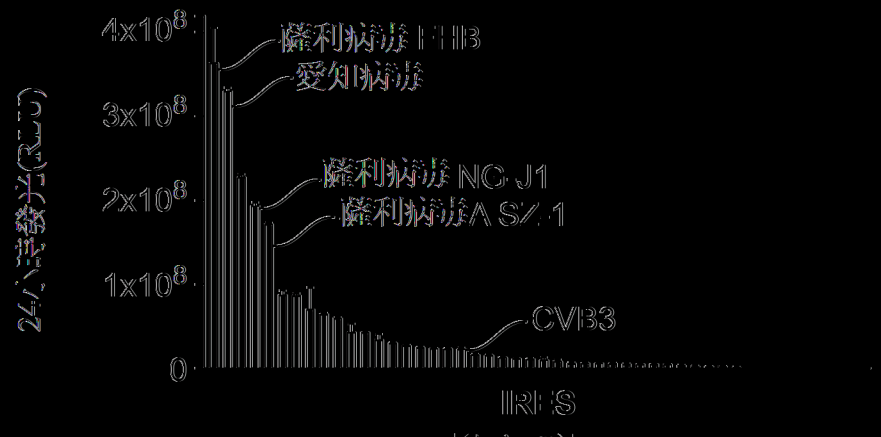
【發明圖式】



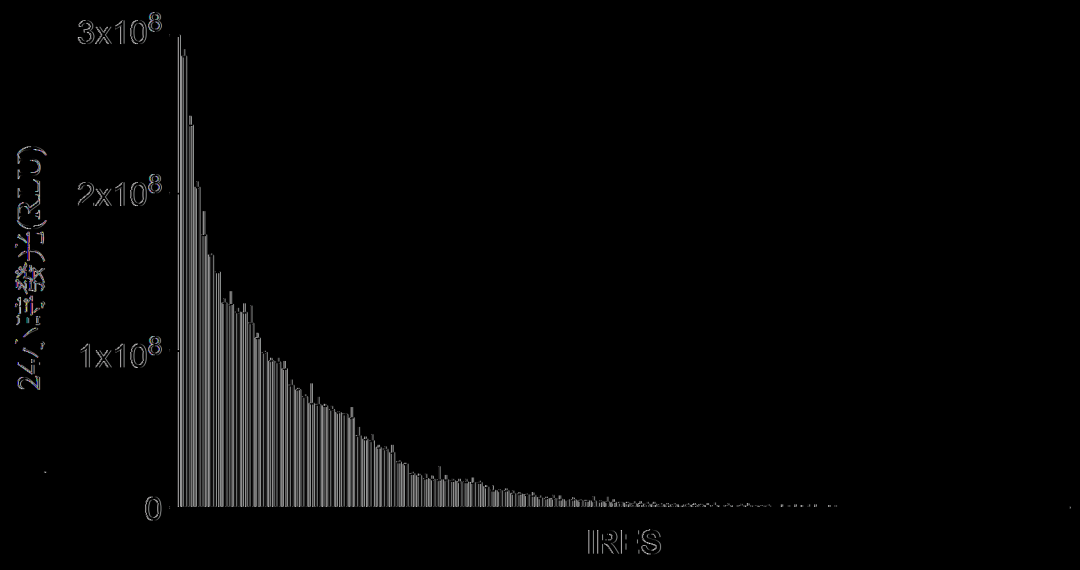
【圖1A】



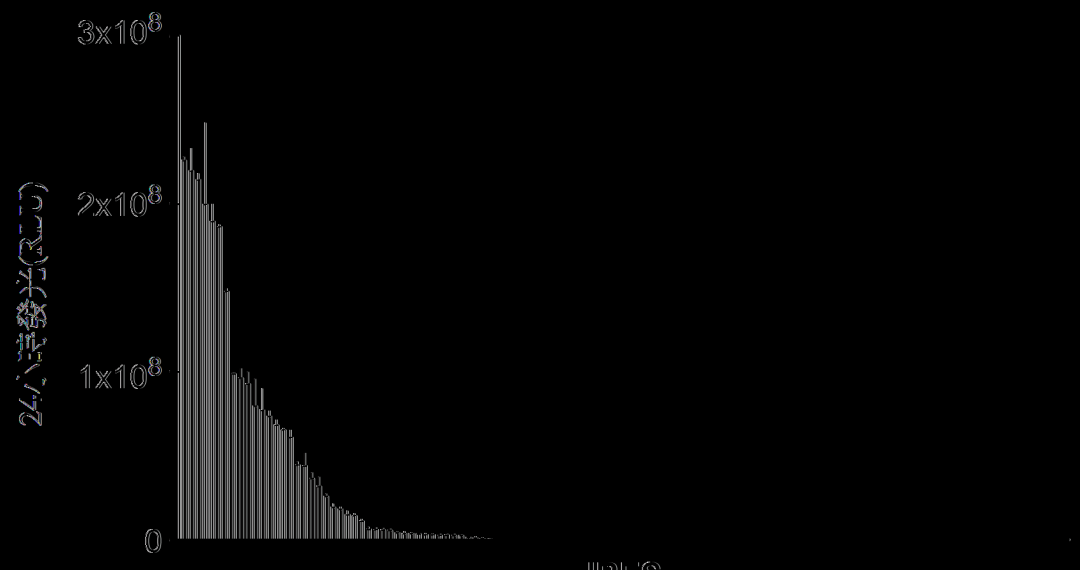
【圖1B】



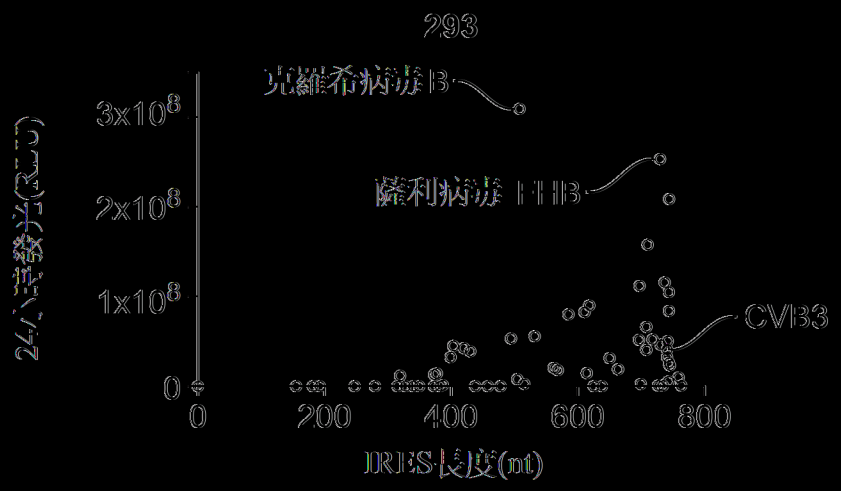
【圖1C】


3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
24小時發光(RLU)
IRES

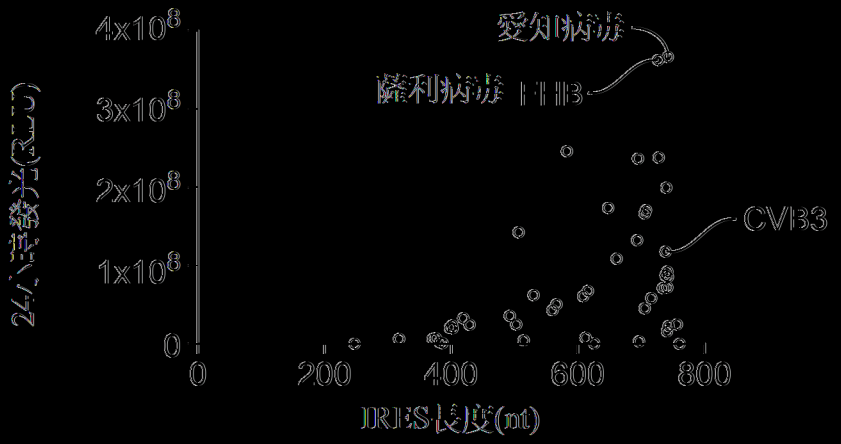
(圖1D)


3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
24小時發光(RLU)
IRES

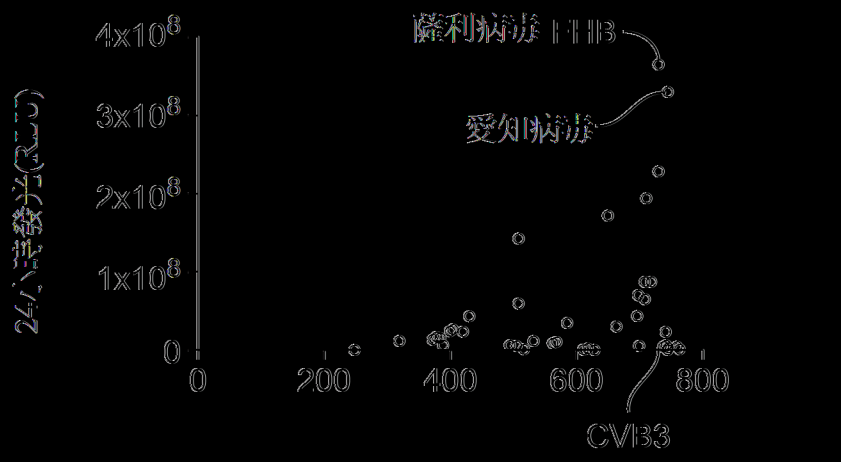
(圖1E)


293
兒麻希病毒B
腸利病毒 EHB
CVB3
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
0
200
400
600
800
24小時發光(RLU)
IRES長度(nt)

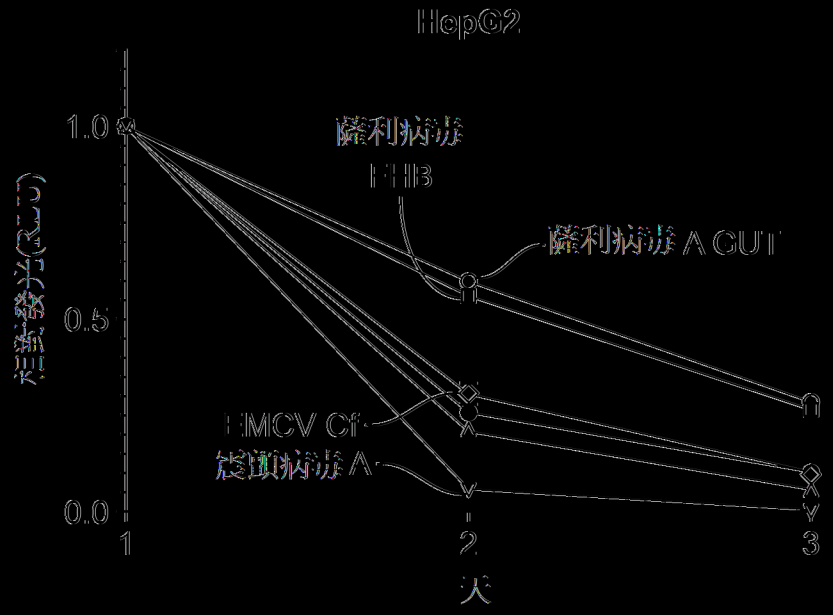
(圖2A)


HepG2
愛知I病毒
腸利病毒 EHB
CVB3
4x10^8
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
0
200
400
600
800
24小時發光(RLU)
IRES長度(nt)

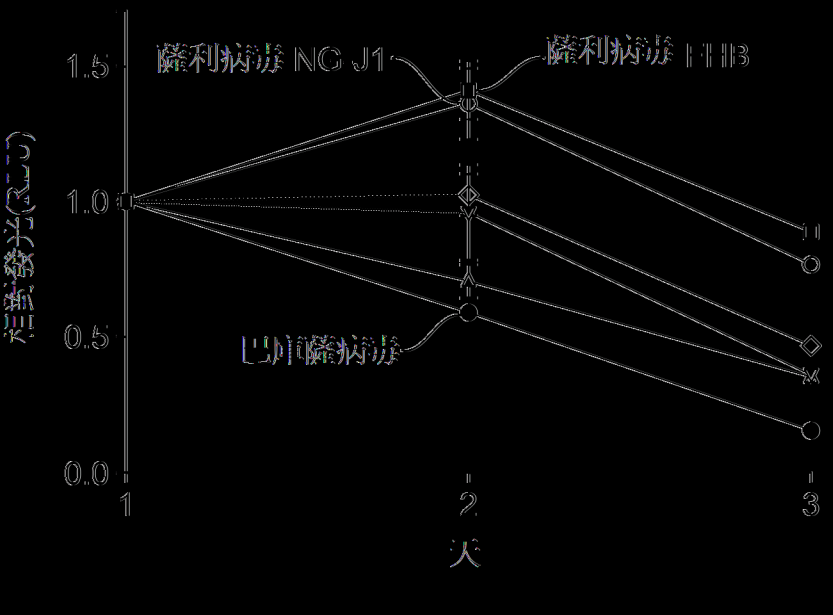
(圖2B)


1C1C7
腸利病毒 EHB
愛知I病毒
CVB3
4x10^8
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
0
200
400
600
800
24小時發光(RLU)
IRES長度(nt)

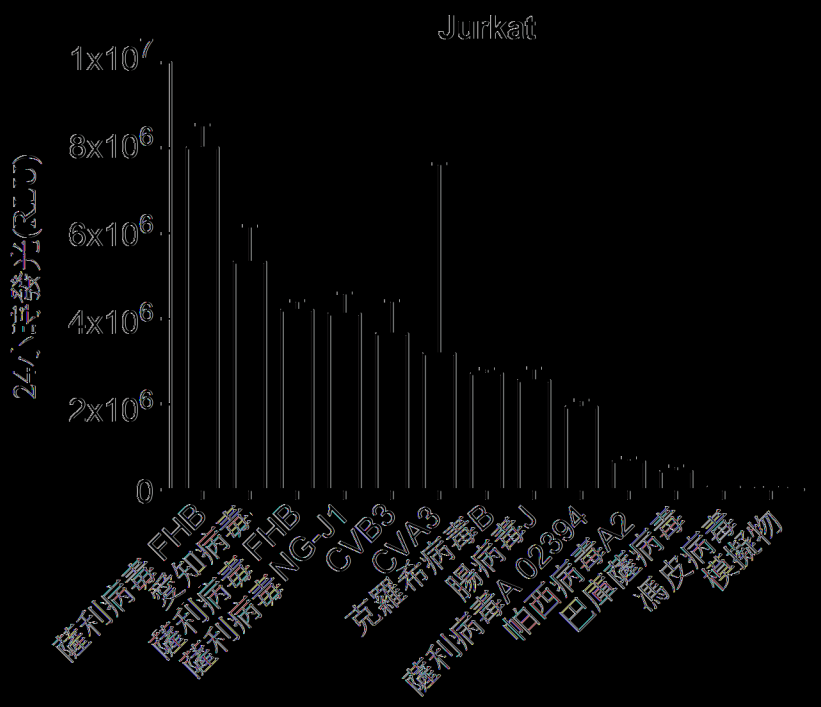
(圖2C)


HepG2
1.0
0.5
0.0
1
2
3
天
薩利病毒
HBV
薩利病毒 ΔCUT
HMCV Cf
怎頭病毒 A

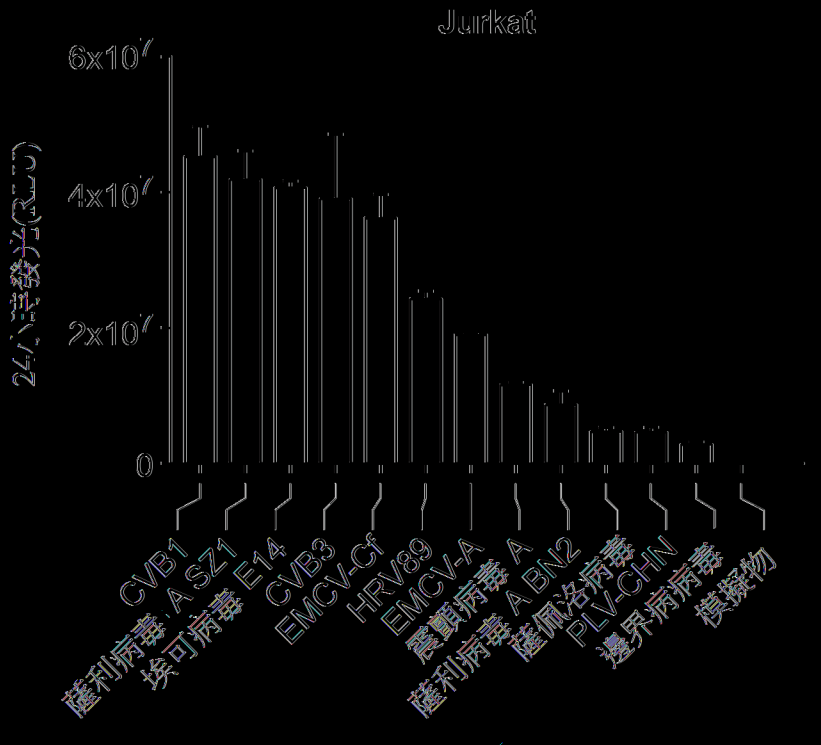
(圖3A)


1C1C7
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
天
薩利病毒 NC J1
薩利病毒 HBV
巴加薩病毒

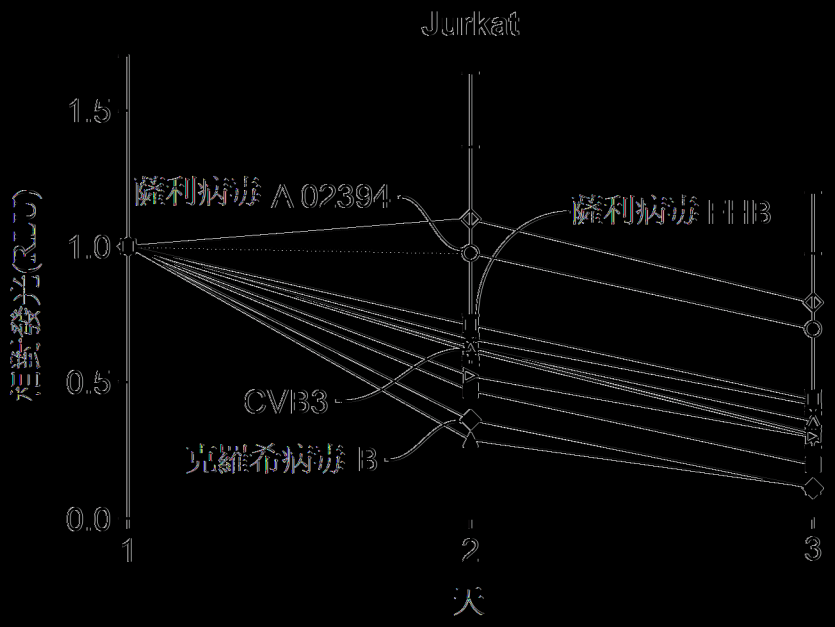
(圖3B)


Jurkat
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
24小时发光(RLU)
萨利病毒 FHB
爱知病毒
萨利病毒 FHB
萨利病毒NG-J1
CVB3
CVA3
克罗希病毒B
肠病毒J
萨利病毒A 02394
帕西病毒A2
巴厘萨病毒
鸡皮病毒
模拟物
IRES

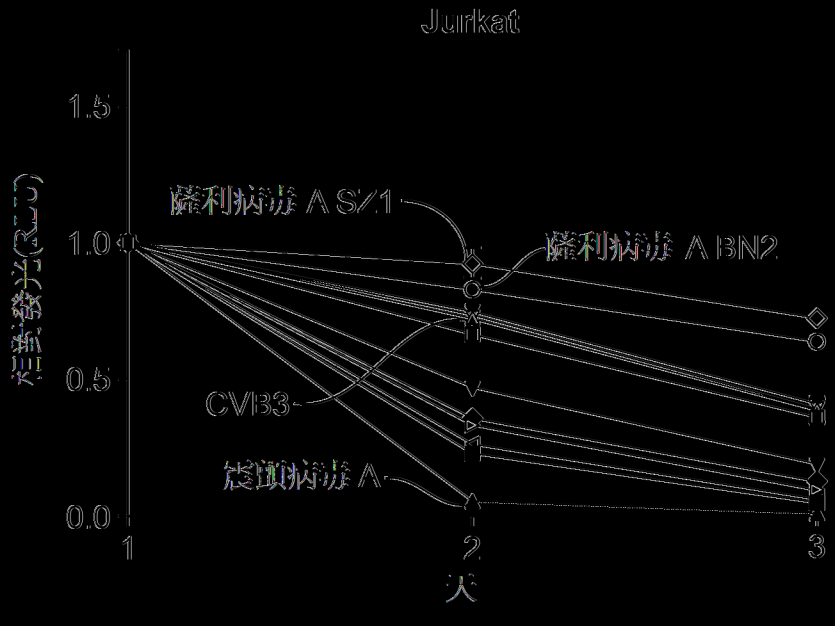
(图4A)


Jurkat
6x10^7
4x10^7
2x10^7
0
24小时发光(RLU)
CVB1
萨利病毒 A SZ1
埃可病毒 E14
CVB3
EMCV-Cf
HRV89
EMCV-A
鼠疱病毒 A
萨利病毒 A BN2
萨佩洛病毒
PLV-CHN
蔓界病病毒
模拟物
IRES

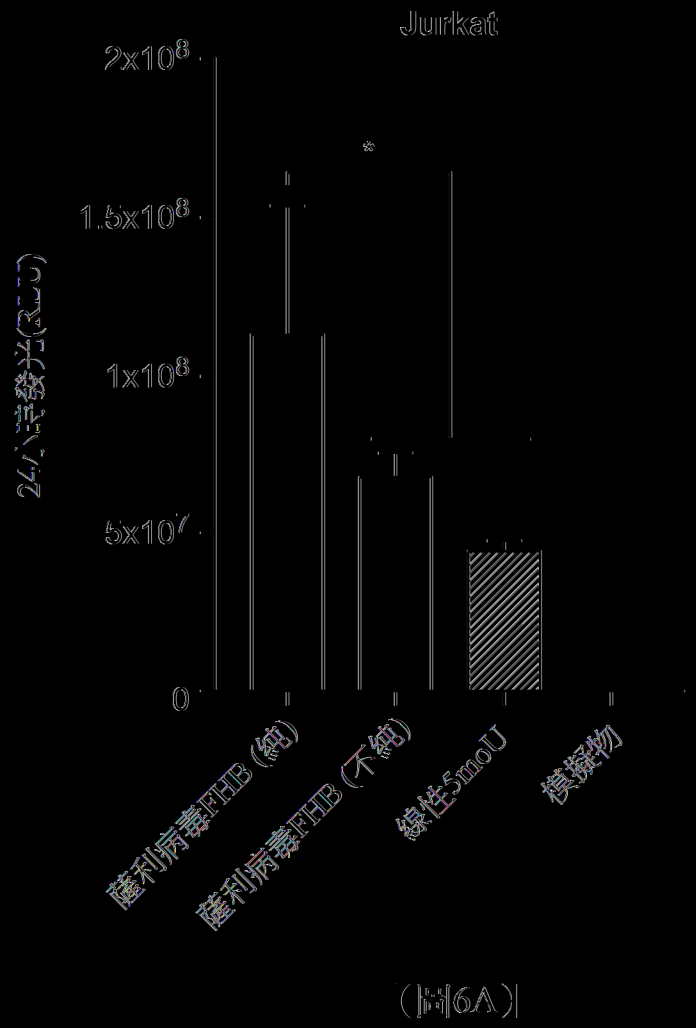
(图4B)


Jurkat
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
天
腺利病毒 A 02394
腺利病毒 1 HB
CVB3
克維希病毒 B

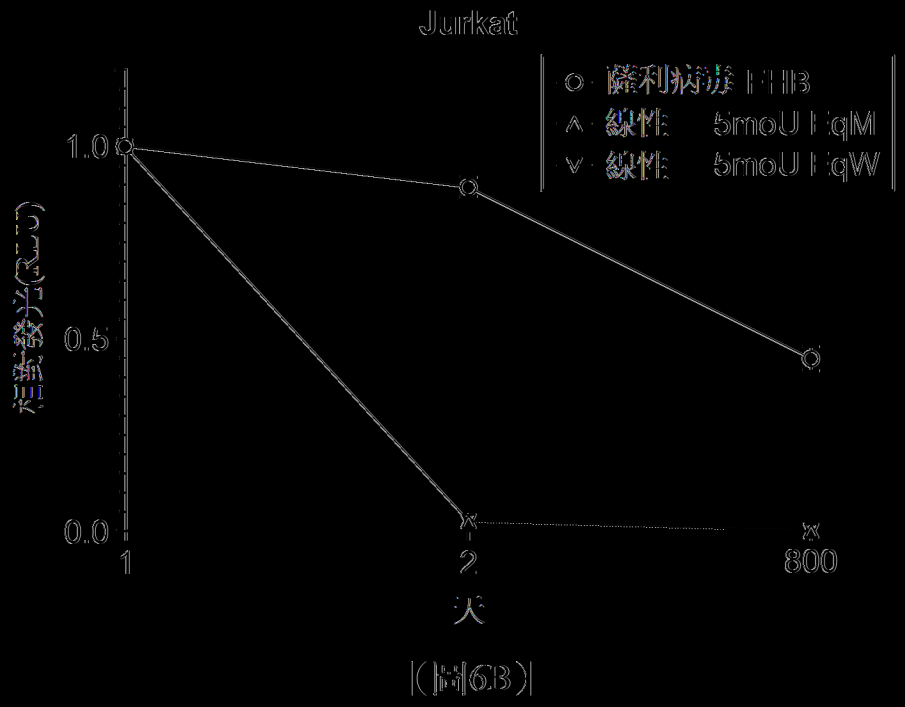
(圖5A)


Jurkat
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
天
腺利病毒 A S71
腺利病毒 A BN2
CVB3
震顫病毒 A

(圖5B)


Jurkat
2x10^8
1.5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
24小時發光(RLU)
*
薩利病毒FHB (純)
薩利病毒FHB (不純)
綠柱5mgU
模擬物

(圖6A)



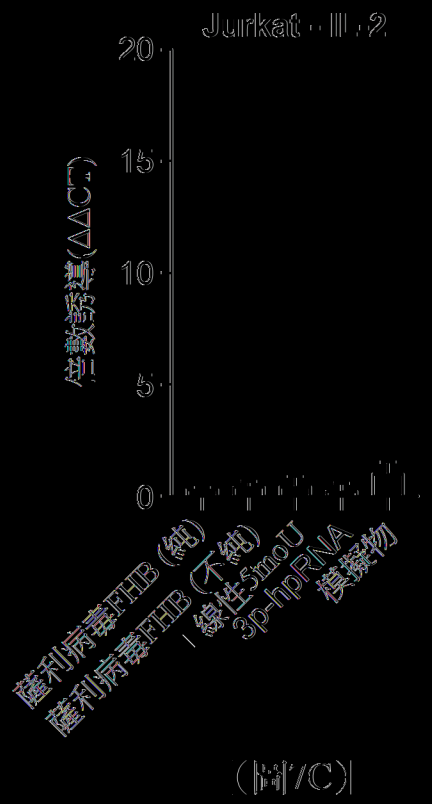
|(圖6B)|

Jurkat - IFN-γ
60
40
20
0
ND ND ND ND ND
薩利病毒FHB (純)
薩利病毒FHB (不純)
線性5moU
3p-hpRNA
模擬物

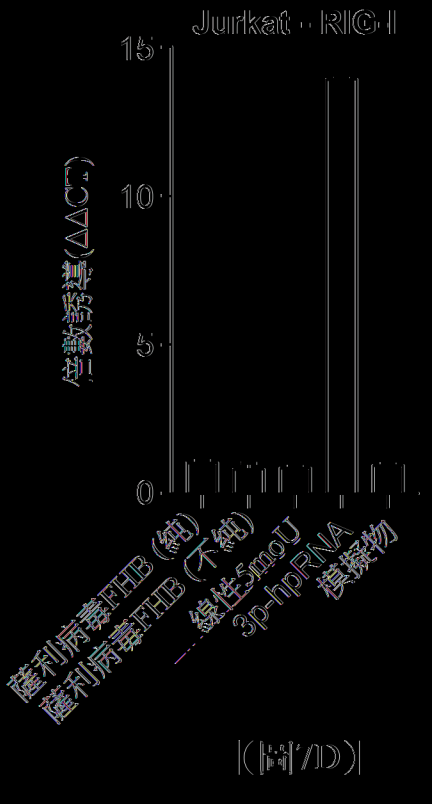
(圖7A)

Jurkat - IL-6
60
40
20
0
ND ND ND ND ND
薩利病毒FHB (純)
薩利病毒FHB (不純)
線性5moU
3p-hpRNA
模擬物

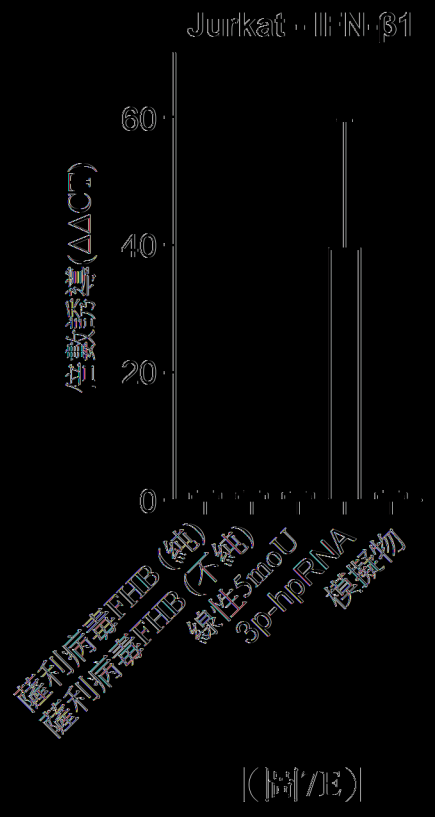
(圖7B)


Jurkat - III - 2
20
15
10
5
0
相對表現量(ΔΔCT)
薩利病毒FHB (純)
薩利病毒FHB (不純)
線性5moU
3p-hpRNA
模擬物

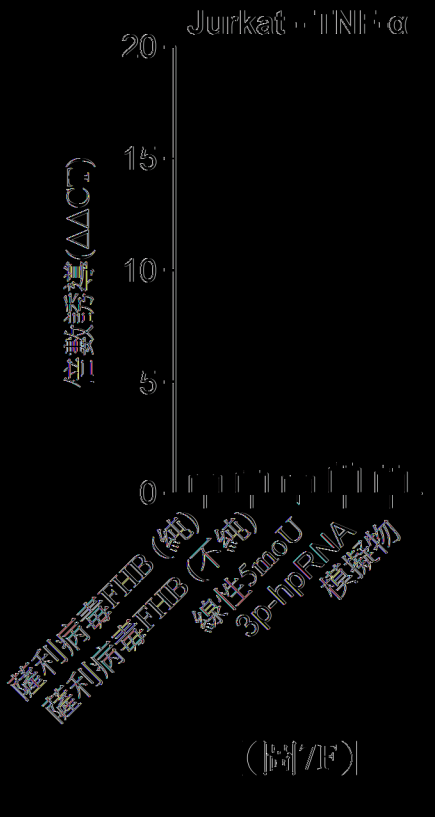
(圖7C)


Jurkat - RIG-I
15
10
5
0
相對表現量(ΔΔCT)
薩利病毒FHB (純)
薩利病毒FHB (不純)
線性5moU
3p-hpRNA
模擬物

(圖7D)


Jurkat - IL-1β
60
40
20
0
相對表現量(ΔΔCT)
薩利病毒FHB (純)
薩利病毒FHB (不純)
線性5moU
3p-hpRNA
模擬物

圖(E)


Jurkat - TNF-α
20
15
10
5
0
相對表現量(ΔΔCT)
薩利病毒FHB (純)
薩利病毒FHB (不純)
線性5moU
3p-hpRNA
模擬物

圖(F)

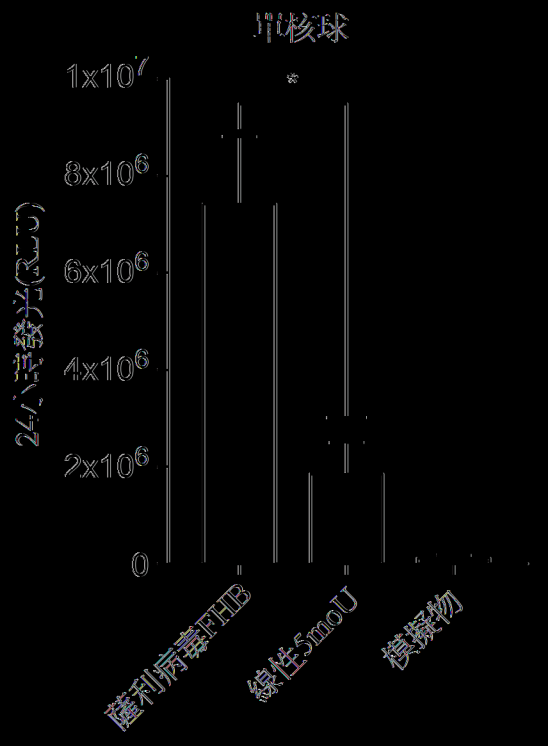

單核球
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
24小時發光(RLU)
*
薩利病毒HB
線性5moU
模擬物

圖8A

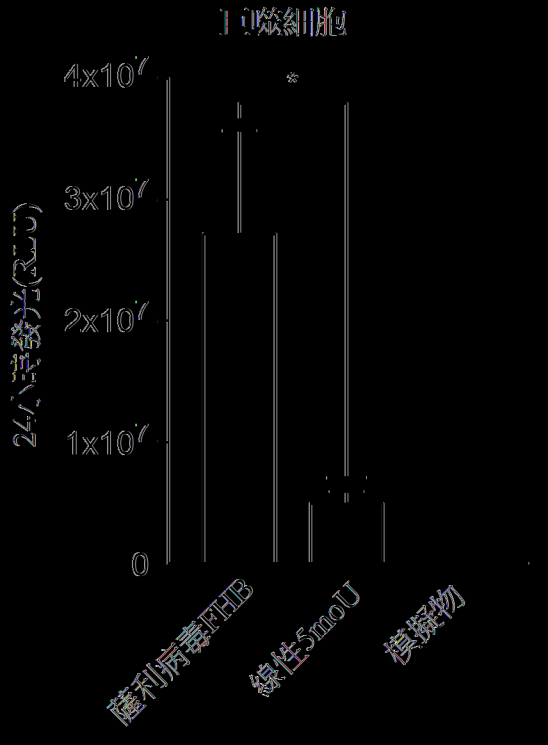
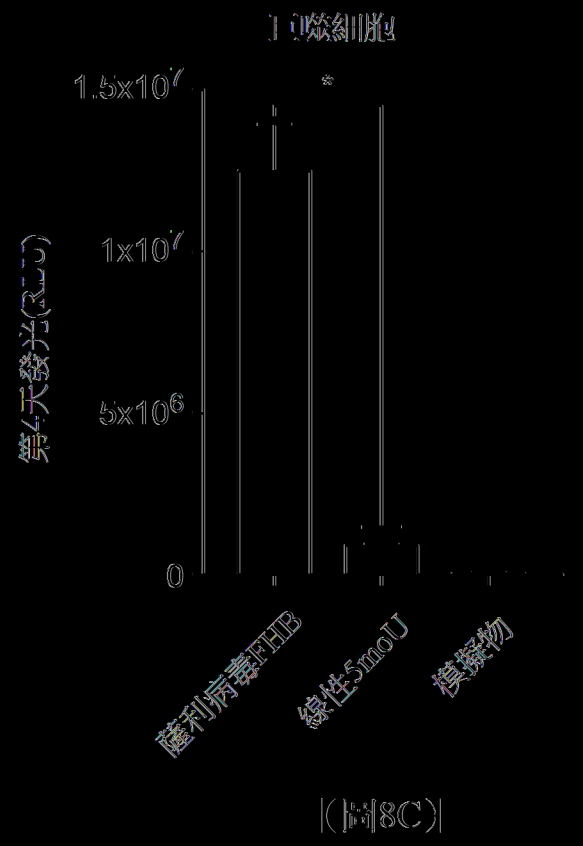
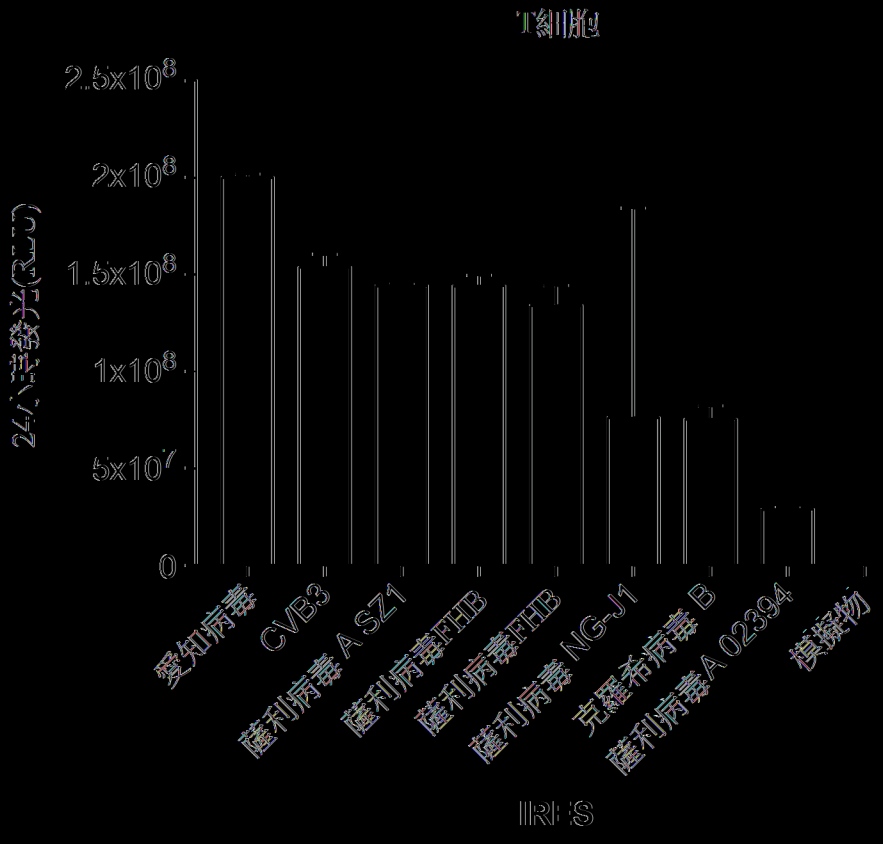
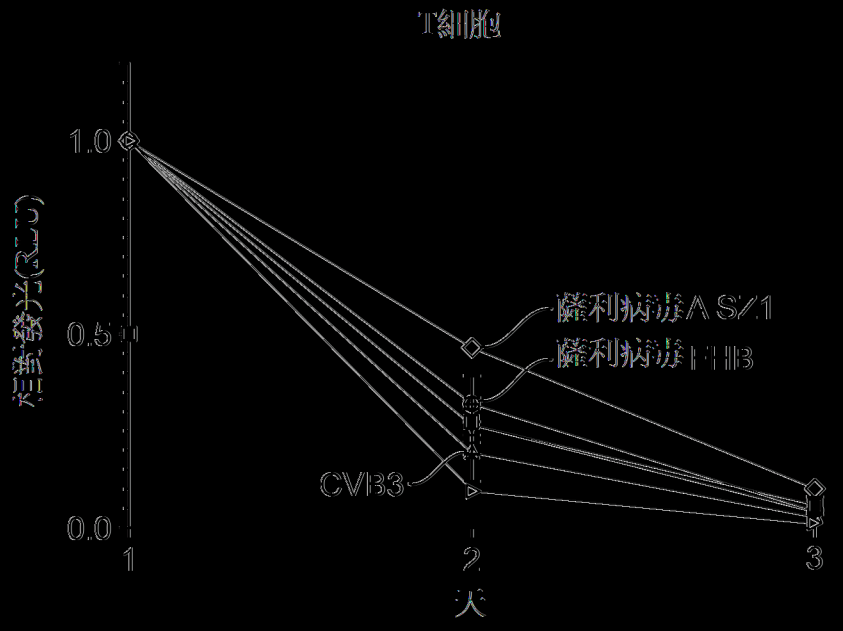

T吸細胞
4x10^7
3x10^7
2x10^7
1x10^7
0
24小時發光(RLU)
*
薩利病毒HB
線性5moU
模擬物

圖8B

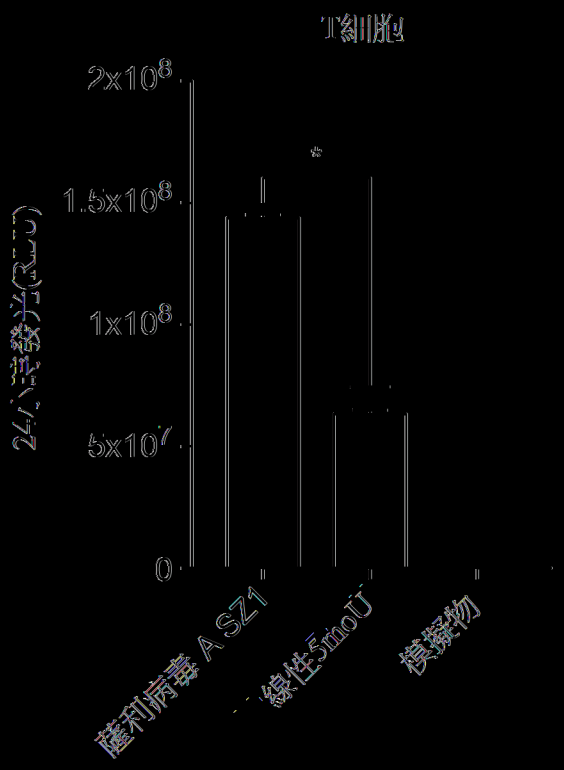

T吸細胞
1.5x10⁷
1x10⁷
5x10⁶
0
*
(CFU/孔)菌落形成
陸利病毒EHB
線性5mgU
模擬物
|(|8C)|


T細胞
2.5x10^8
2x10^8
1.5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
24小時後之IFN-γ濃度(pg/mL)
愛知病毒
CVB3
薩利病毒A SZ1
薩利病毒FHB
薩利病毒FHB
薩利病毒 NG-J1
克羅希病毒 B
薩利病毒A 02394
模擬物
IRES

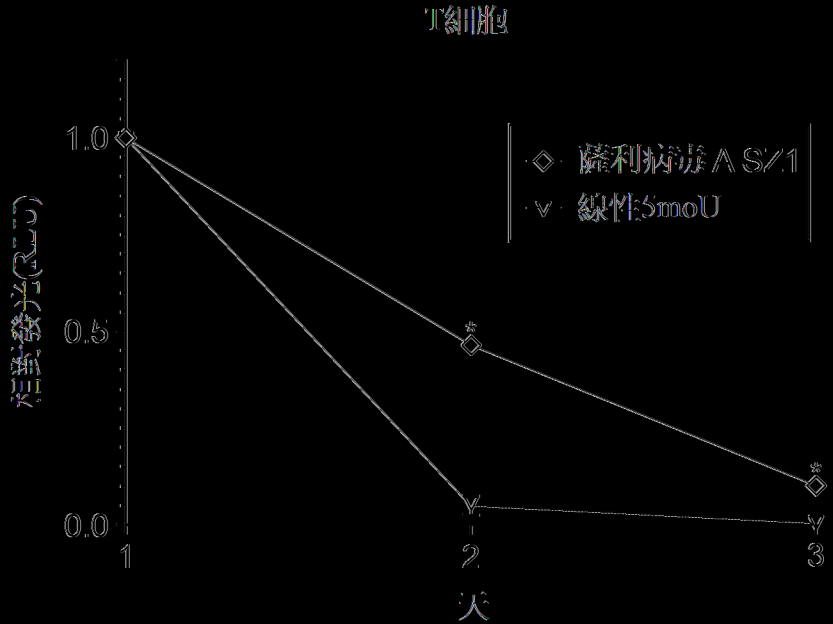
(圖9A)


T細胞
1.0
0.5
0.0
相對細胞活力(CTL)
薩利病毒A SZ1
薩利病毒FHB
CVB3
1
2
3
天

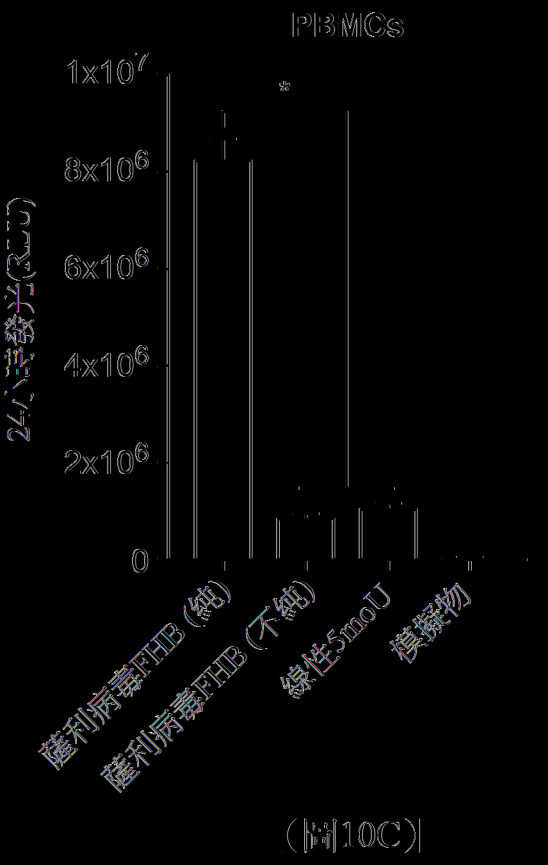
(圖9B)


T細胞
2x10^8
1.5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
24小時後の細胞数(RLU)
麻疹ウイルスAIS21
弱毒性5moU
模擬物

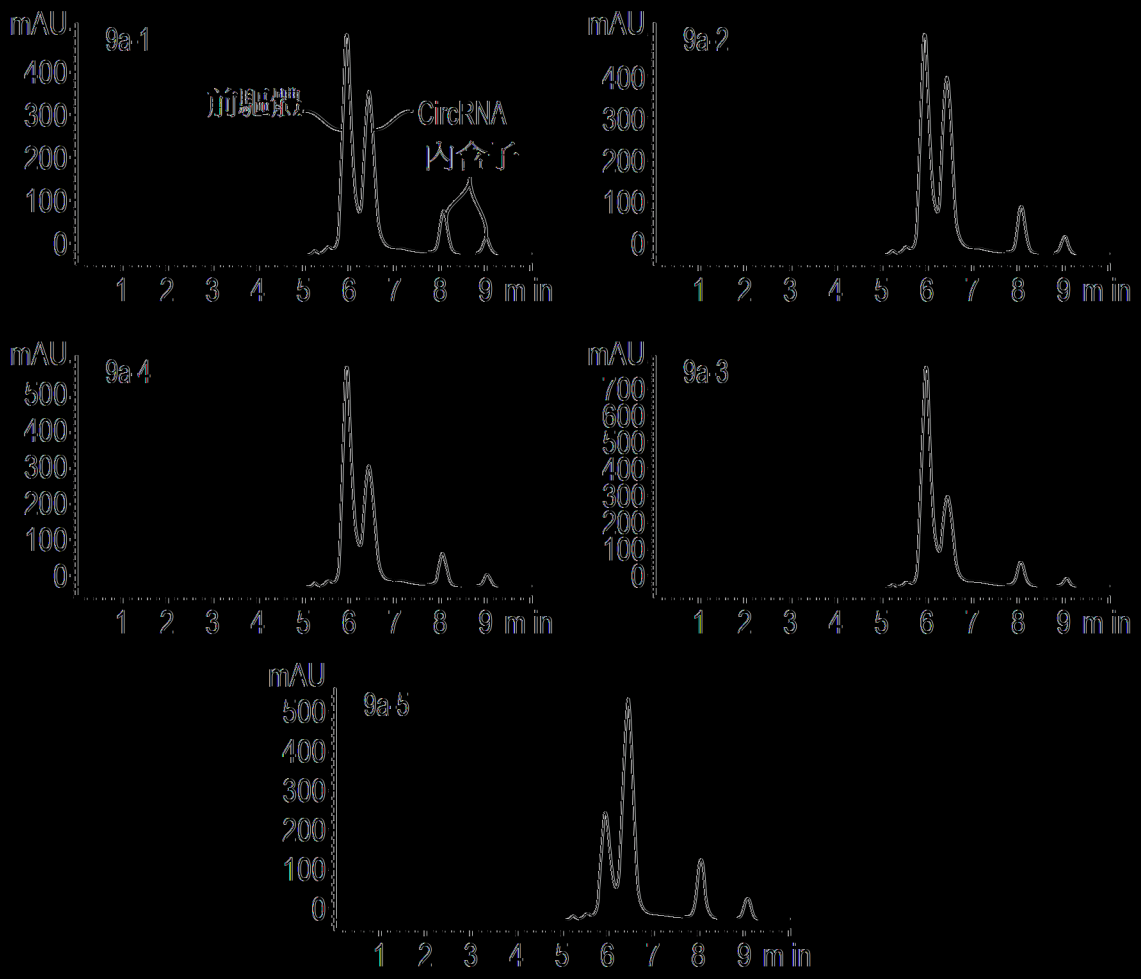
(図10A)


T細胞
1.0
0.5
0.0
正規化された細胞数(RLU)
麻疹ウイルスAIS21
弱毒性5moU
1
2
3
日

(図10B)

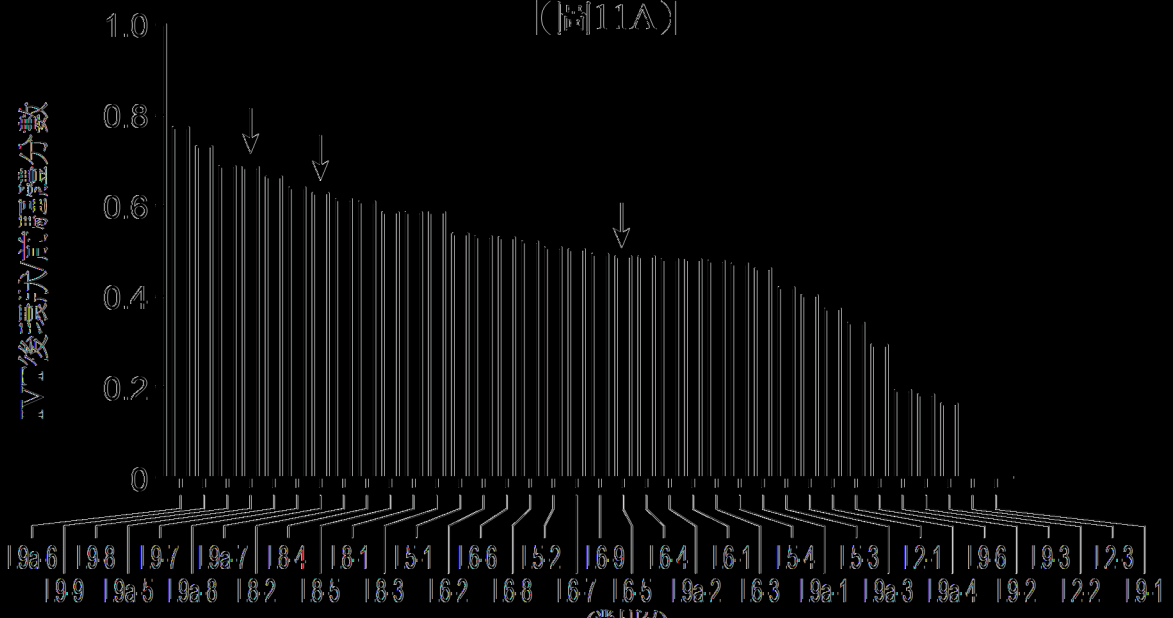

PBMCs
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
萘利病毒FHB (純)
萘利病毒FHB (不純)
線性5moU
模擬物

(圖10C)



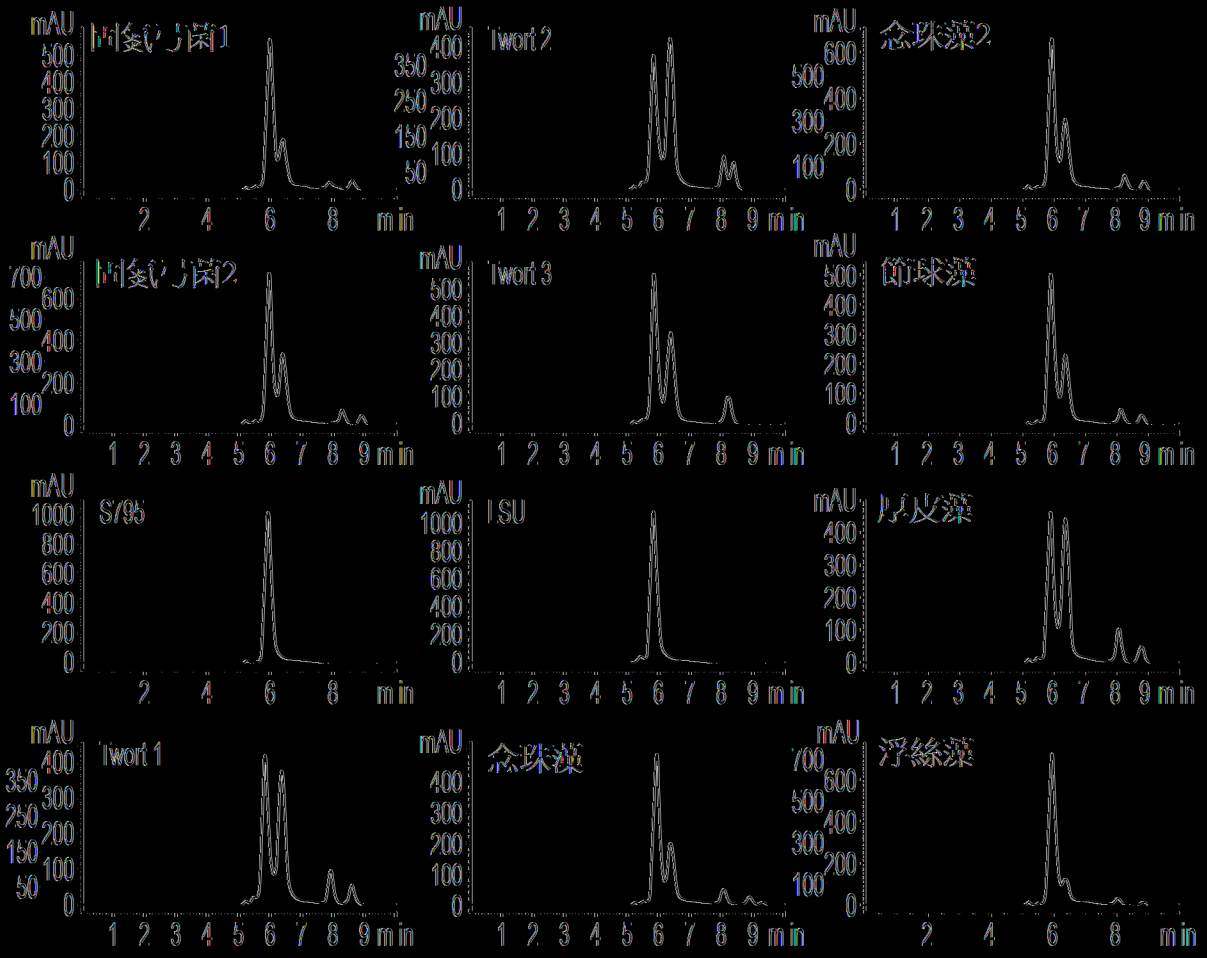
內含子排列

[圖11A]

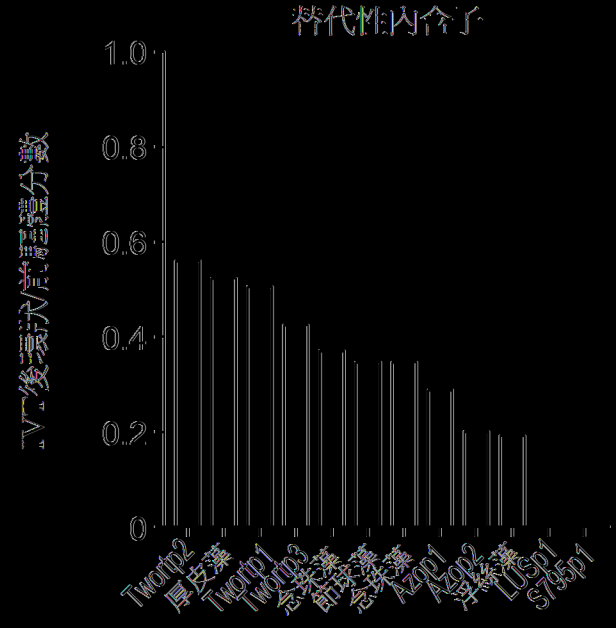


排列補綴體

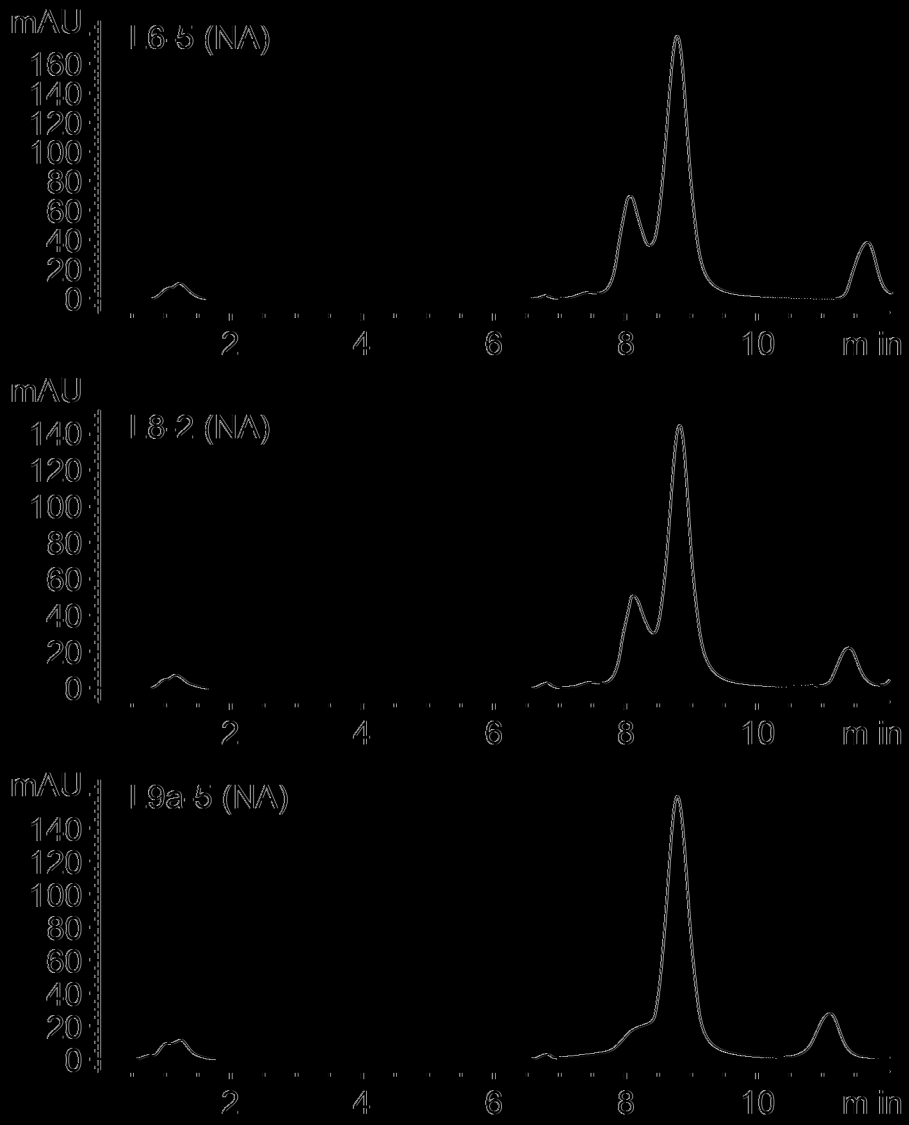
[圖11B]


mAU
min
Tworp1
Tworp2
Tworp3
念珠藻1
念珠藻2
節球藻
厚皮藻
浮絲藻
S795
LSU

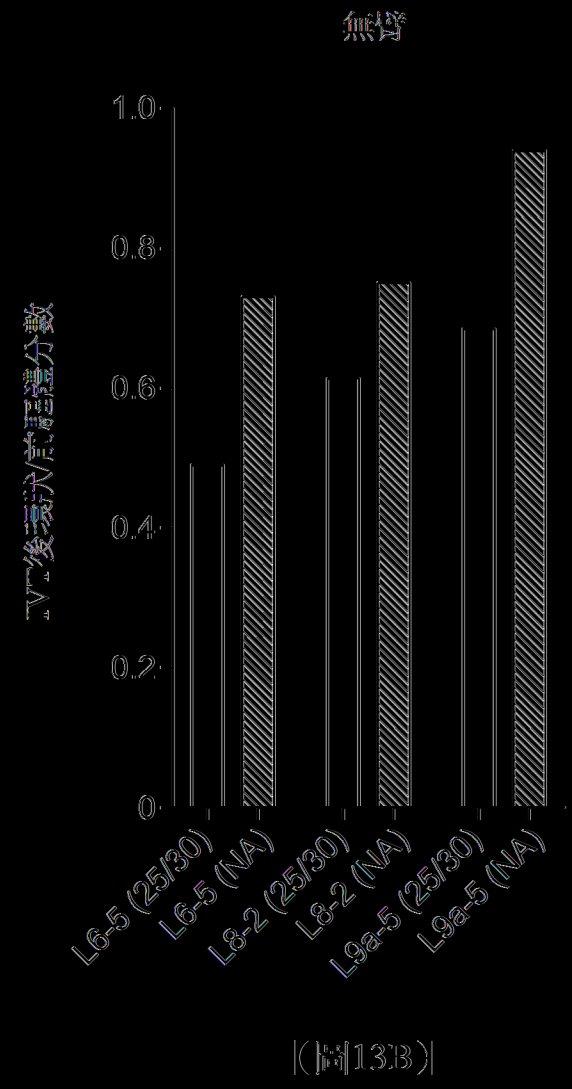
（圖12A）


替代性內含子
VT後演算法無證分數
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Tworp2
厚皮藻
Tworp1
Tworp3
念珠藻1
節球藻
念珠藻2
Azop1
Azop2
浮絲藻
Lsp1
s795p1
內含子精簡版

（圖12B）

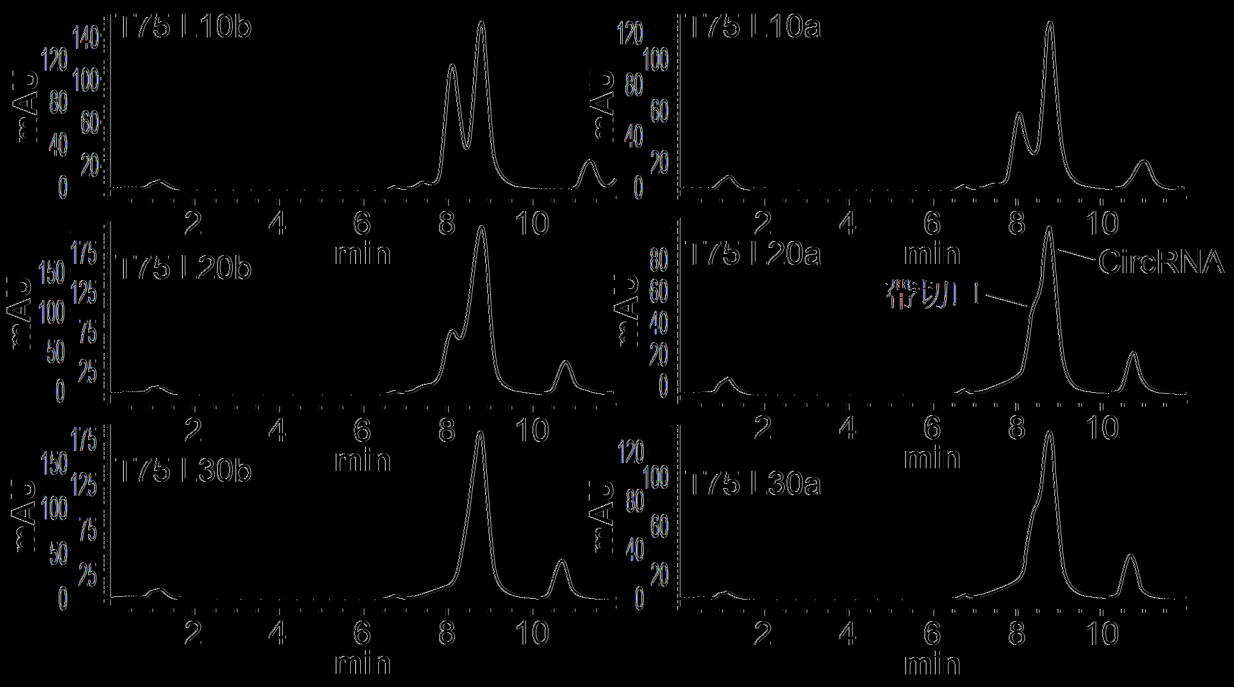

mAU
I 6.5 (NA)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
min
mAU
I 8.2 (NA)
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
min
mAU
I 9a.5 (NA)
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
min

(圖13A)

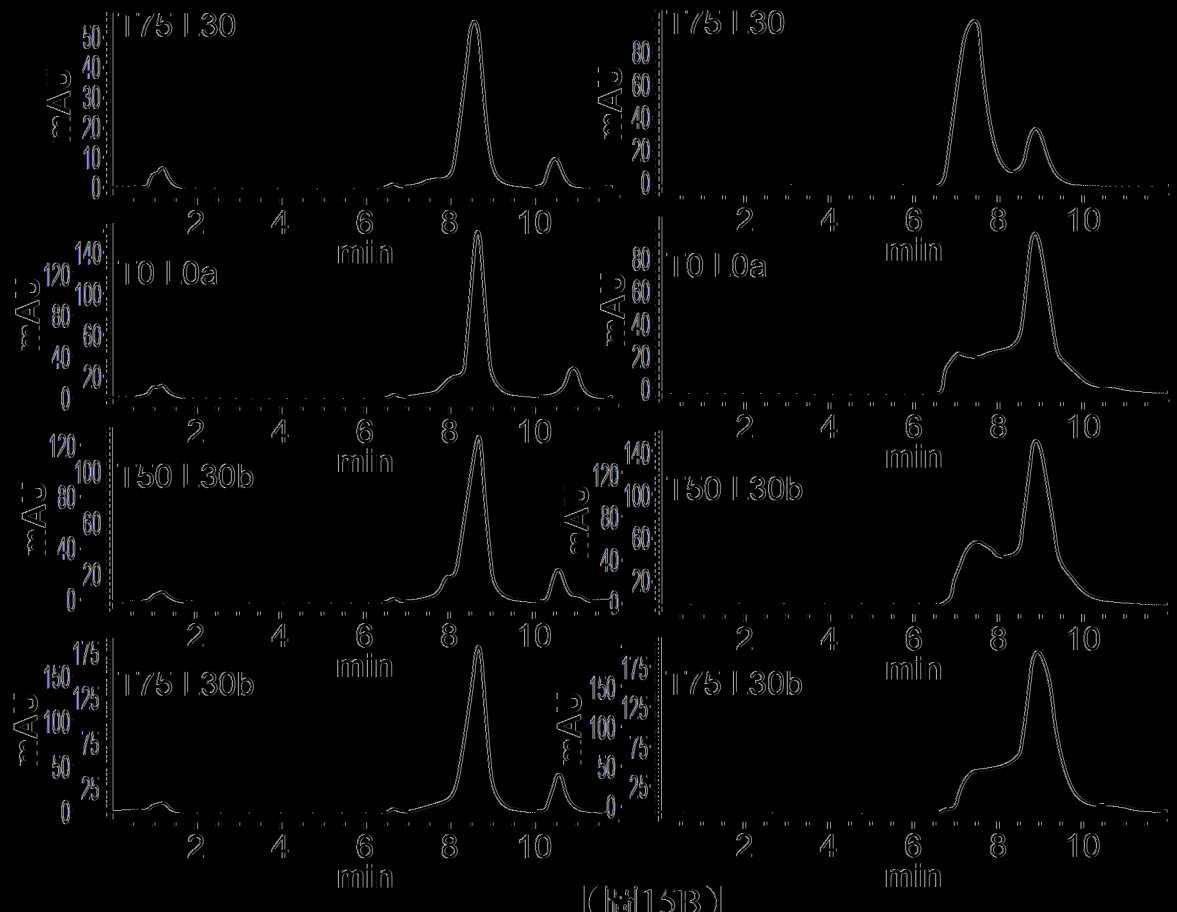

無肾
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
L6-5 (25/30)
L6-5 (NA)
L8-2 (25/30)
L8-2 (NA)
L9a-5 (25/30)
L9a-5 (NA)

|(圖13B)|

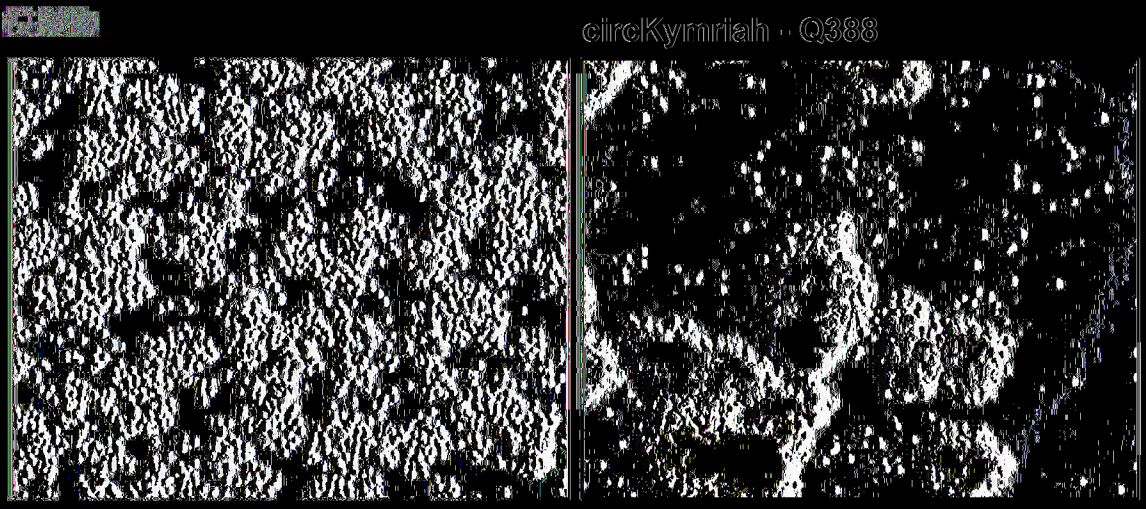
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
25%
50%
75%
0
0.20
0.30
25%
50%
75%
0
0.20
0.30
25%
50%
75%
0
0.20
0.30
25%
50%
75%
0
0.20
0.30


175 | 10b
175 | 10a
175 | 20b
175 | 20a
175 | 30b
175 | 30a
mAU
min
帶切口
CircRNA

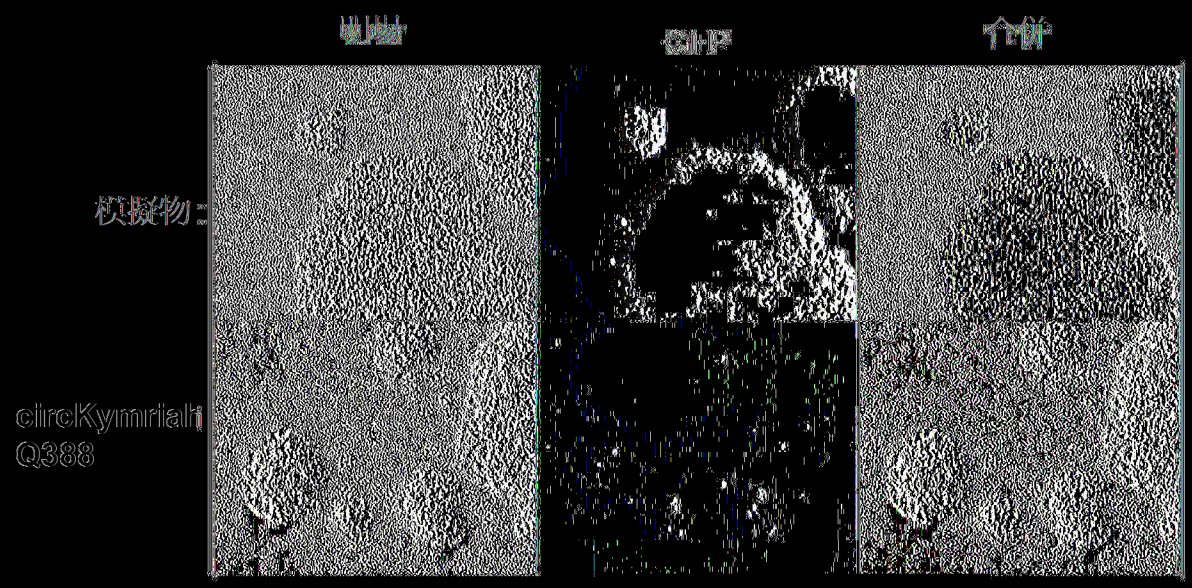
(圖15A)


175 | 30
10 | 0a
150 | 30b
175 | 30b
mAU
min

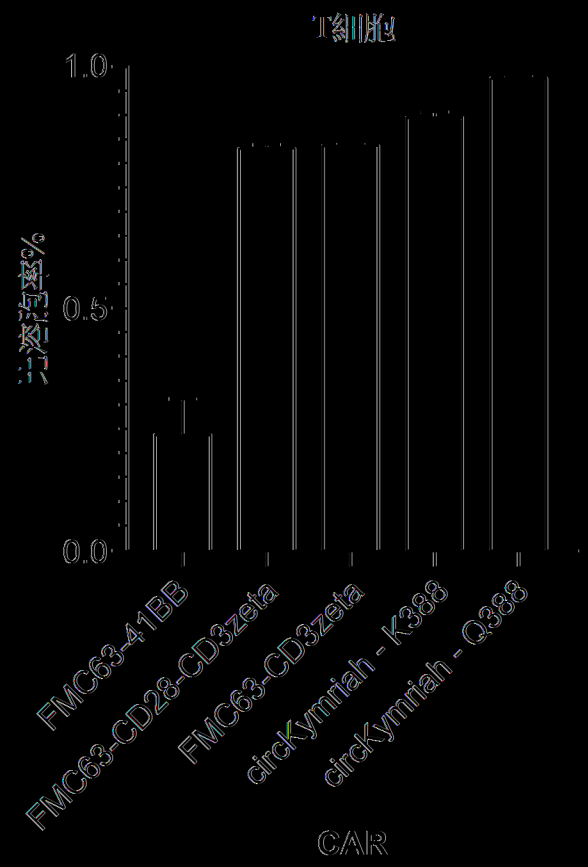
(圖15B)



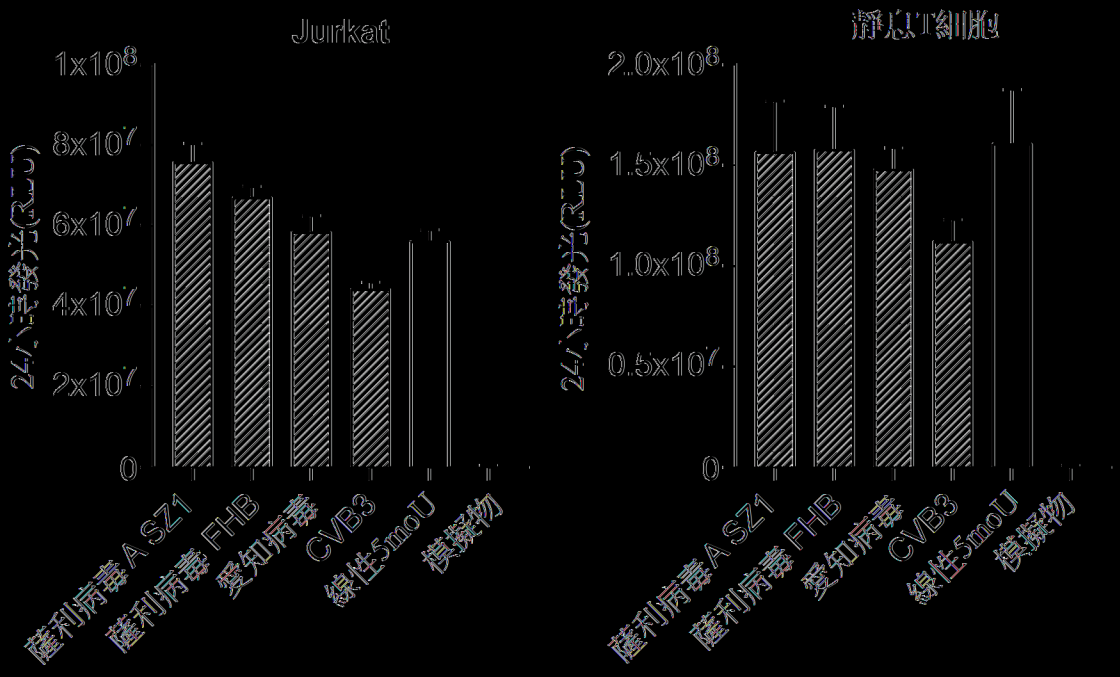
[圖16]



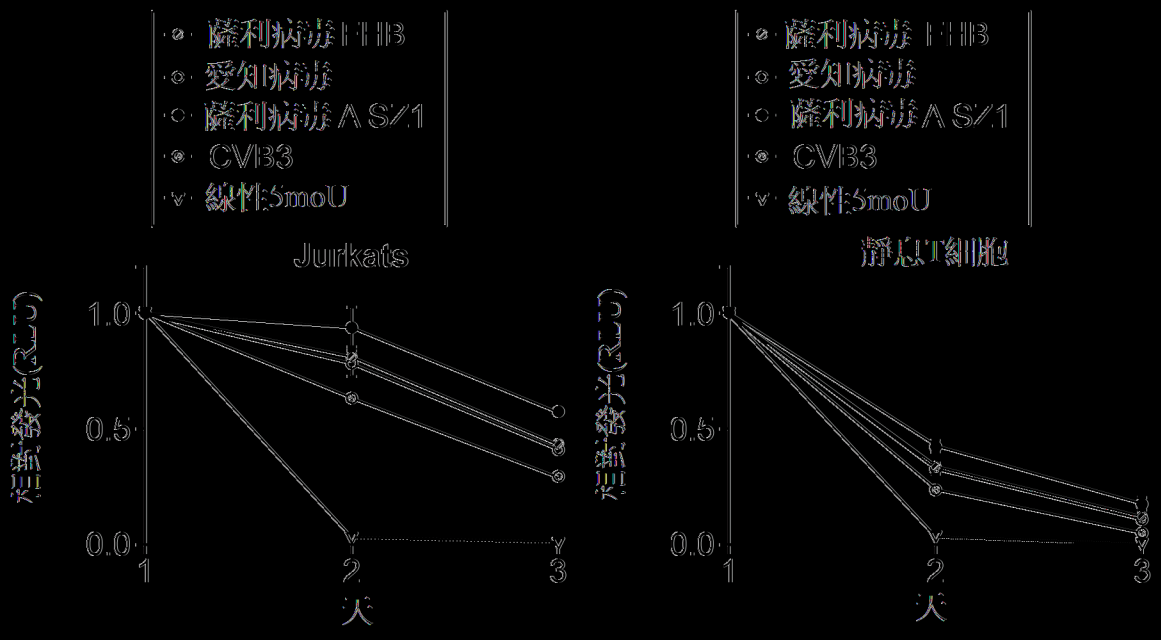
（圖17）


T細胞
1.0
0.5
0.0
FMC63-41BB
FMC63-CD28-CD3zeta
FMC63-CD3zeta
circKymriah - K388
circKymriah - Q388
CAR

|(圖18)|


Jurkat
静息T細胞
24小時後的細胞數(RLU)
1x10^8
8x10^7
6x10^7
4x10^7
2x10^7
0
2.0x10^8
1.5x10^8
1.0x10^8
0.5x10^7
隆利病毒A SZ1
隆利病毒 FHB
愛知病毒
CVB3
線性5moU
模擬物

|(圖19A)|


隆利病毒 FHB
愛知病毒
隆利病毒A SZ/1
CVB3
線性5moU
Jurkats
靜息T細胞
細胞存活率(RLU)
1.0
0.5
0.0
1
2
3
天

|(圖19B)|

IFN-β1
100
75
10
5
0
相對表現量(ΔΔCT)
感染流感病毒H3N2 (天)
感染流感病毒H3N2 (天)
感染流感病毒H1N1 (天)
感染SARS-CoV-2 (天)
感染SARS-CoV-2 (天)
健康對照

(圖20A)

RIG-I
25
20
15
10
5
0
相對表現量(ΔΔCT)
感染流感病毒H3N2 (天)
感染流感病毒H3N2 (天)
感染流感病毒H1N1 (天)
感染SARS-CoV-2 (天)
感染SARS-CoV-2 (天)
健康對照

(圖20B)

10
8
6
4
2
0
Ⅲ.2
相對表現量(ΔΔCT)
測試菸葉B3(大包)
測試菸葉B3(小包)
測試菸葉B3(小包)
測試菸葉C-1(小包)
綠色5mm口含錠
空白C
陽性對照物

(圖20C)

10
8
6
4
2
0
Ⅲ.6
相對表現量(ΔΔCT)
測試菸葉B3(大包)
測試菸葉B3(小包)
測試菸葉B3(小包)
測試菸葉C-1(小包)
綠色5mm口含錠
空白C
陽性對照物

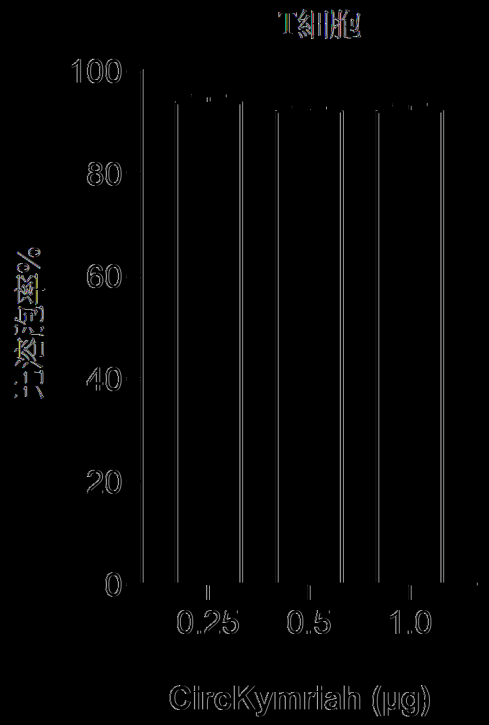
(圖20D)

IFN-γ
相對表現量(ΔΔCT)
10
8
6
4
2
0
對照組
感染5min D.C
感染5min D.C+實施例3萃取物(低)
感染5min D.C+實施例3萃取物(中)
感染5min D.C+實施例3萃取物(高)

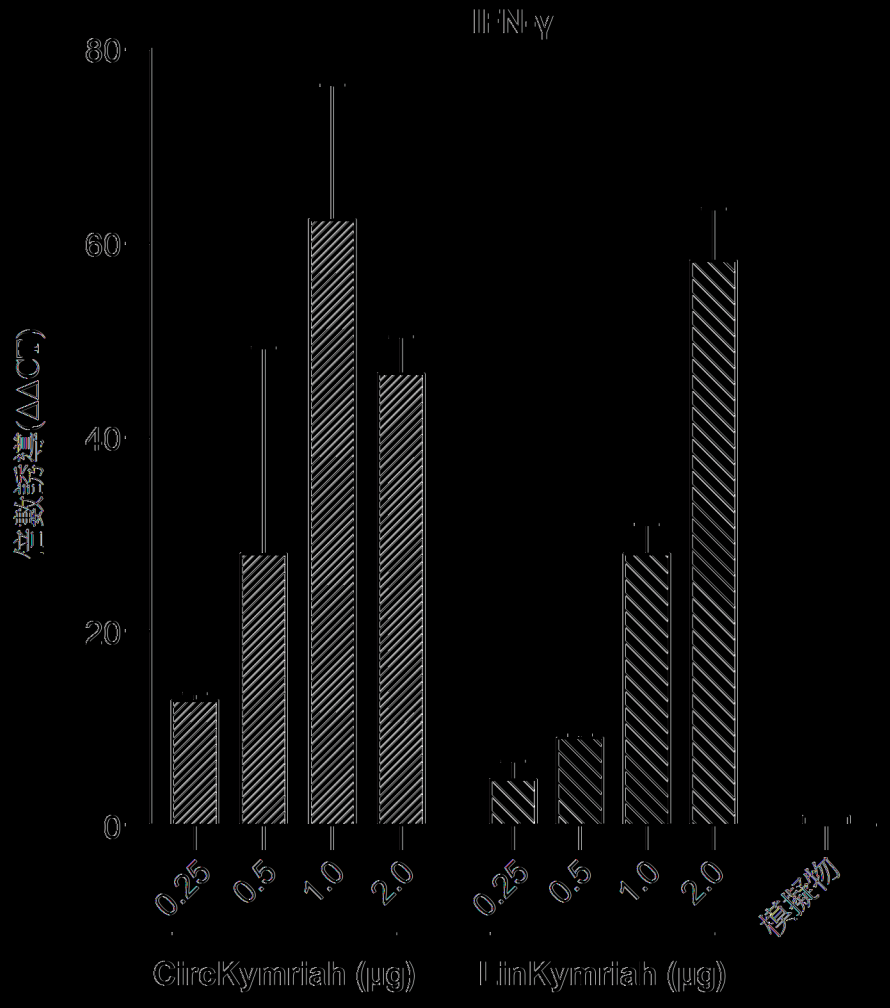
(圖20E)

TNF-α
相對表現量(ΔΔCT)
10
8
6
4
2
0
對照組
感染5min D.C
感染5min D.C+實施例3萃取物(低)
感染5min D.C+實施例3萃取物(中)
感染5min D.C+實施例3萃取物(高)

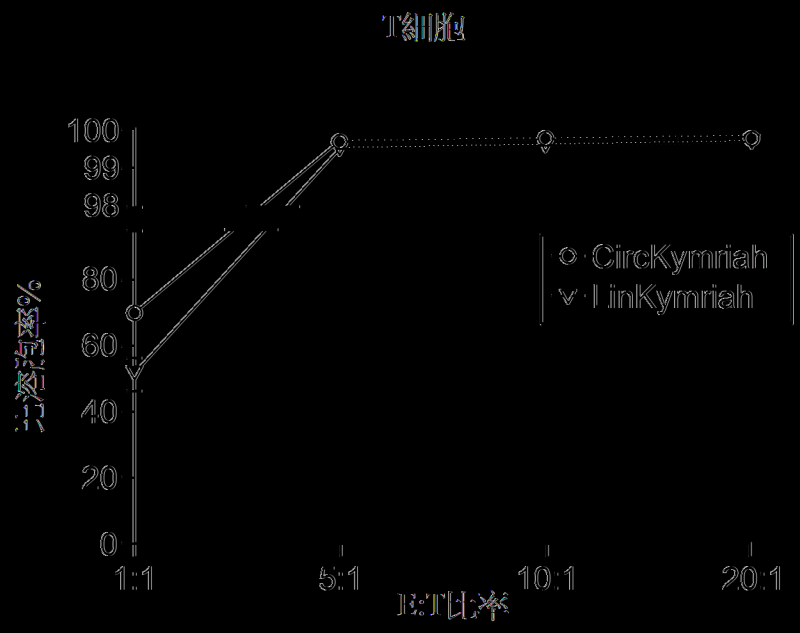
(圖20F)



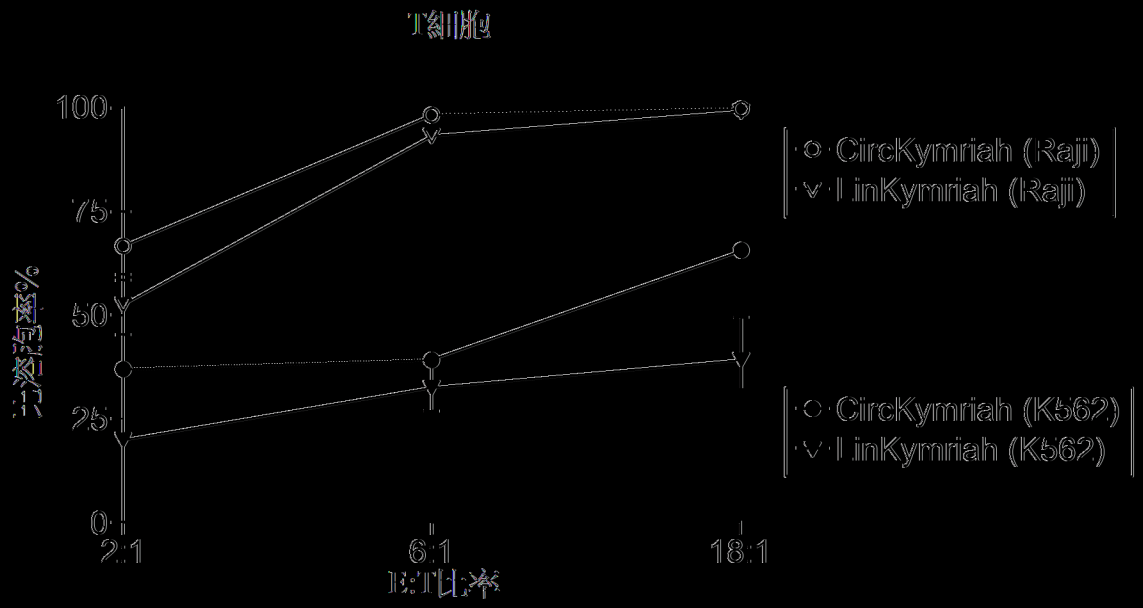
|(圖21A)|


IFN-γ
80
60
40
20
0
0.25
0.5
1.0
2.0
0.25
0.5
1.0
2.0
模擬物
CircKymriah (μg)
LinKymriah (μg)

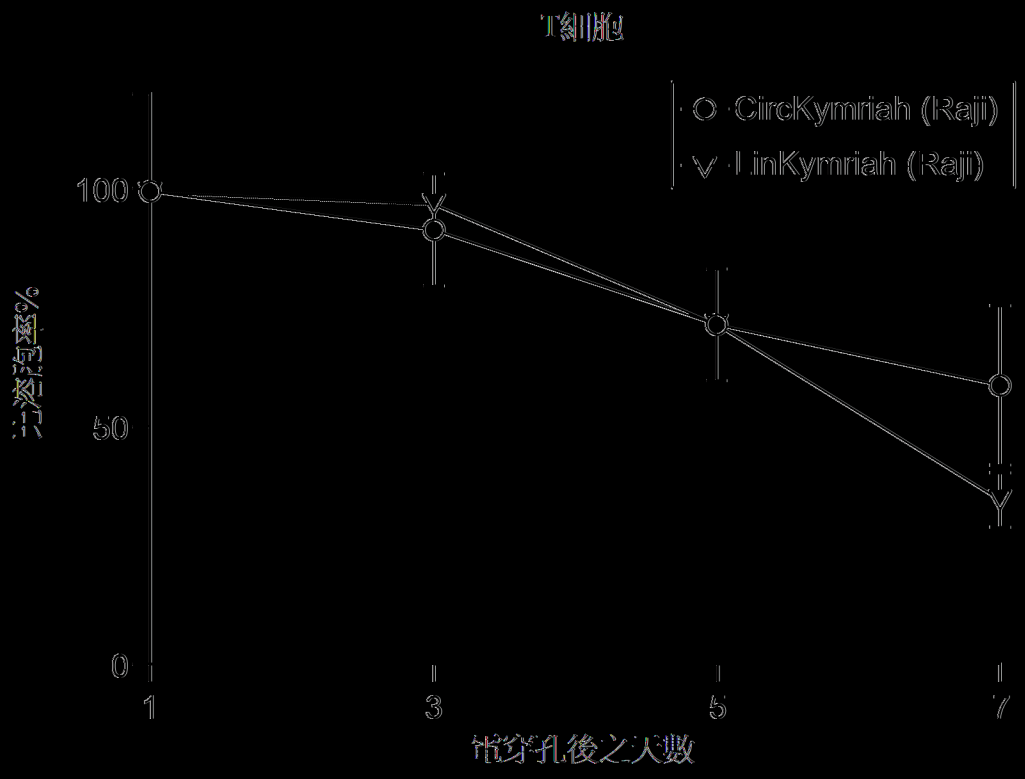
[圖21B]


T細胞
100
99
98
80
60
40
20
0
特異的溶解%
CircKymriah
LinKymriah
1:1
5:1
10:1
20:1
E:T比率

(図22A)


T細胞
100
75
50
25
0
特異的溶解%
CircKymriah (Raji)
LinKymriah (Raji)
CircKymriah (K562)
LinKymriah (K562)
2:1
6:1
18:1
E:T比率

(図22B)



（圖23）

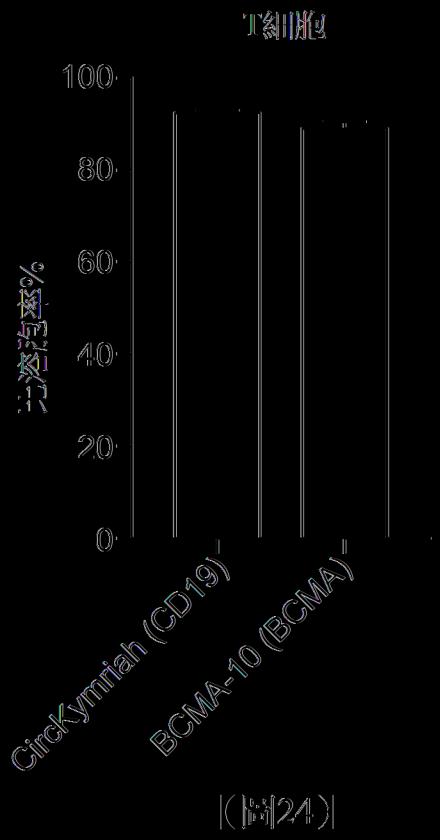
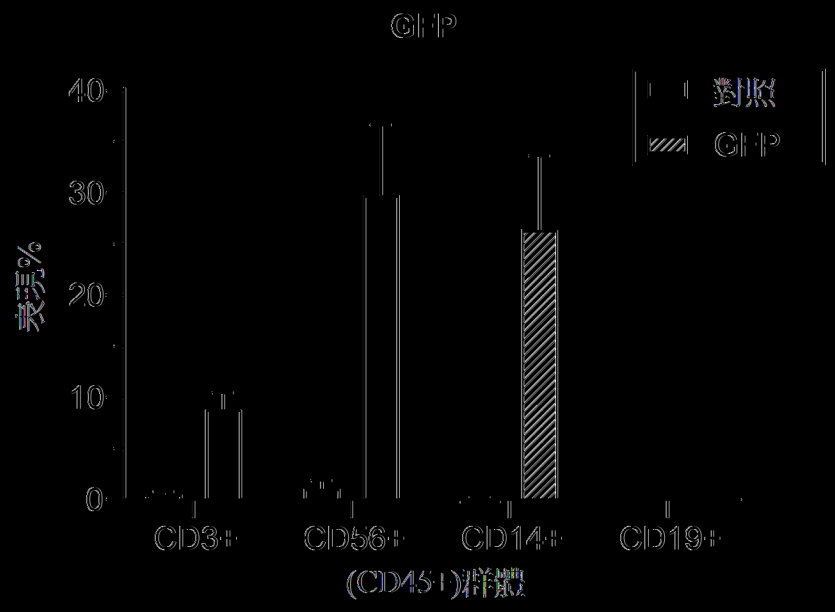
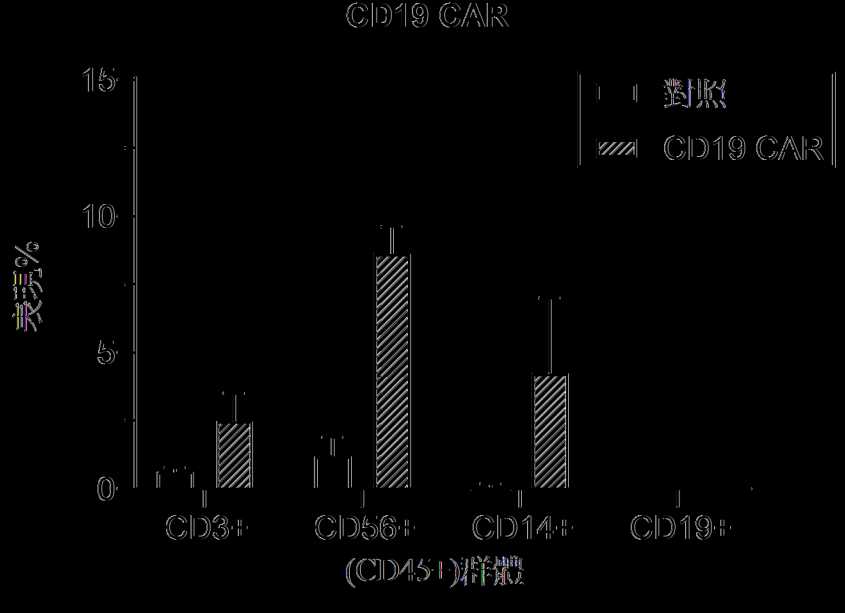


圖24


GFP
對照
GFP
40
30
20
10
0
%陽性
CD3+
CD56+
CD14+
CD19+
(CD45+)群體

|(圖25A)|


CD19 CAR
對照
CD19 CAR
15
10
5
0
%陽性
CD3+
CD56+
CD14+
CD19+
(CD45+)群體

|(圖25B)|

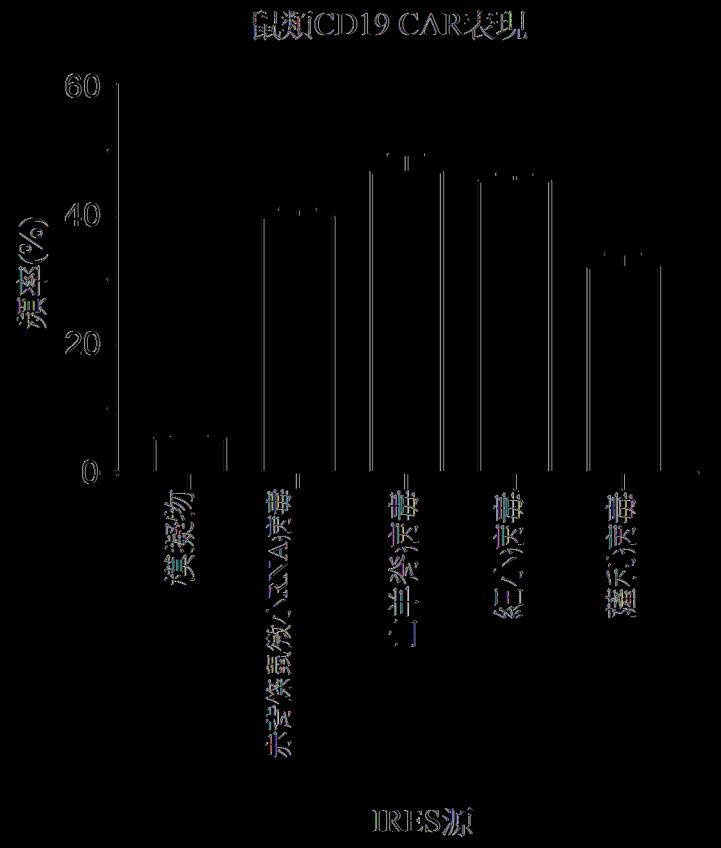

陽性率(%)
60
40
20
0
無病毒
不完全病毒(ΔNA)
病毒
病毒
病毒
IRES源

圖26

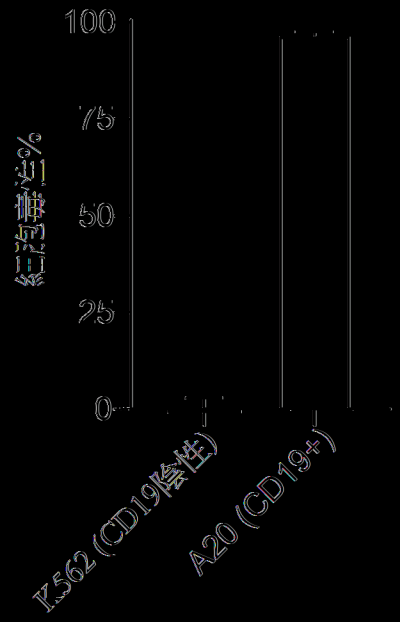
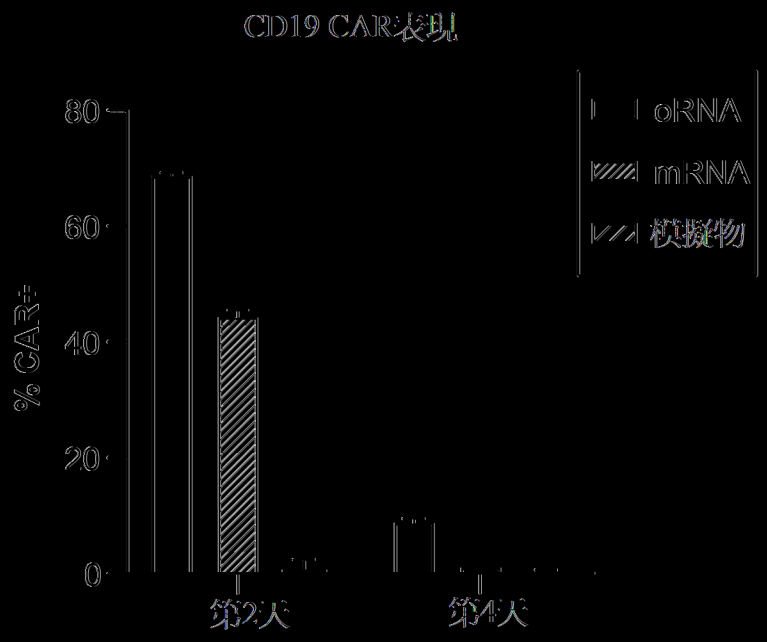
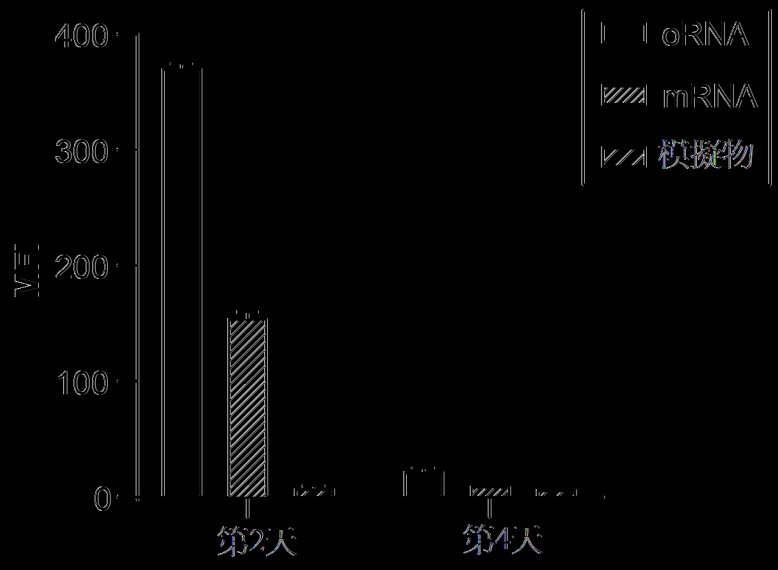

細胞毒性(%)
100
75
50
25
0
K562 (CD19陰性)
A20 (CD19+)

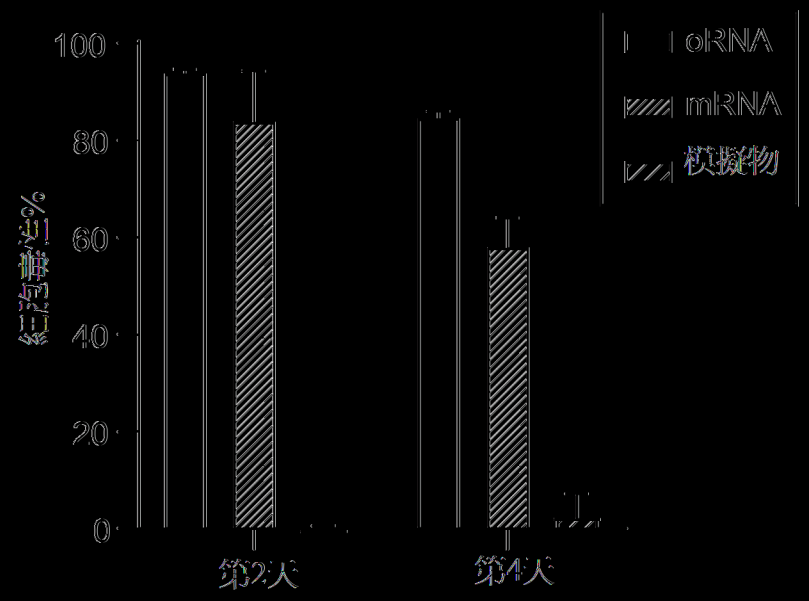
圖27


CD19 CAR表現
80
60
40
20
0
% CAR+
oRNA
mRNA
模擬物
第2天
第4天

(圖28A)

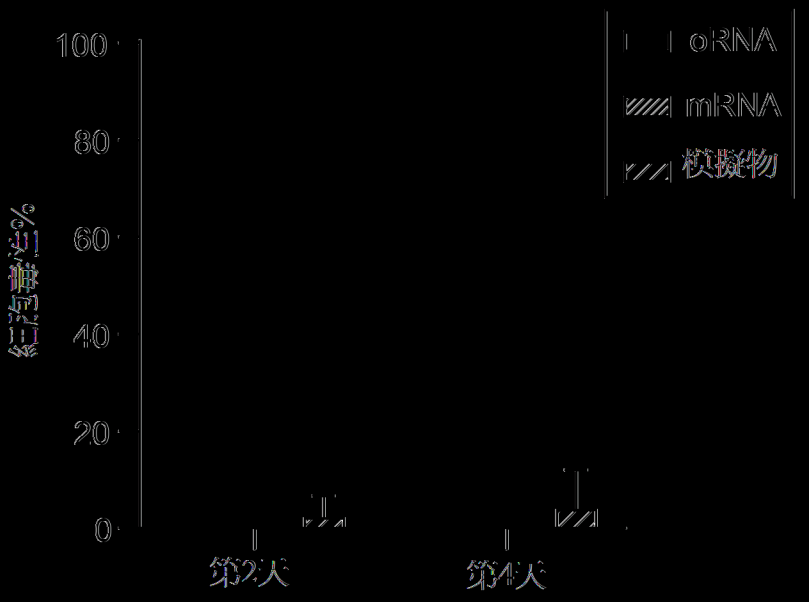

CD19 CAR表現
400
300
200
100
0
VCN
oRNA
mRNA
模擬物
第2天
第4天

(圖28B)



（圖29A）

K562 (CD19陰性)



（圖29B）

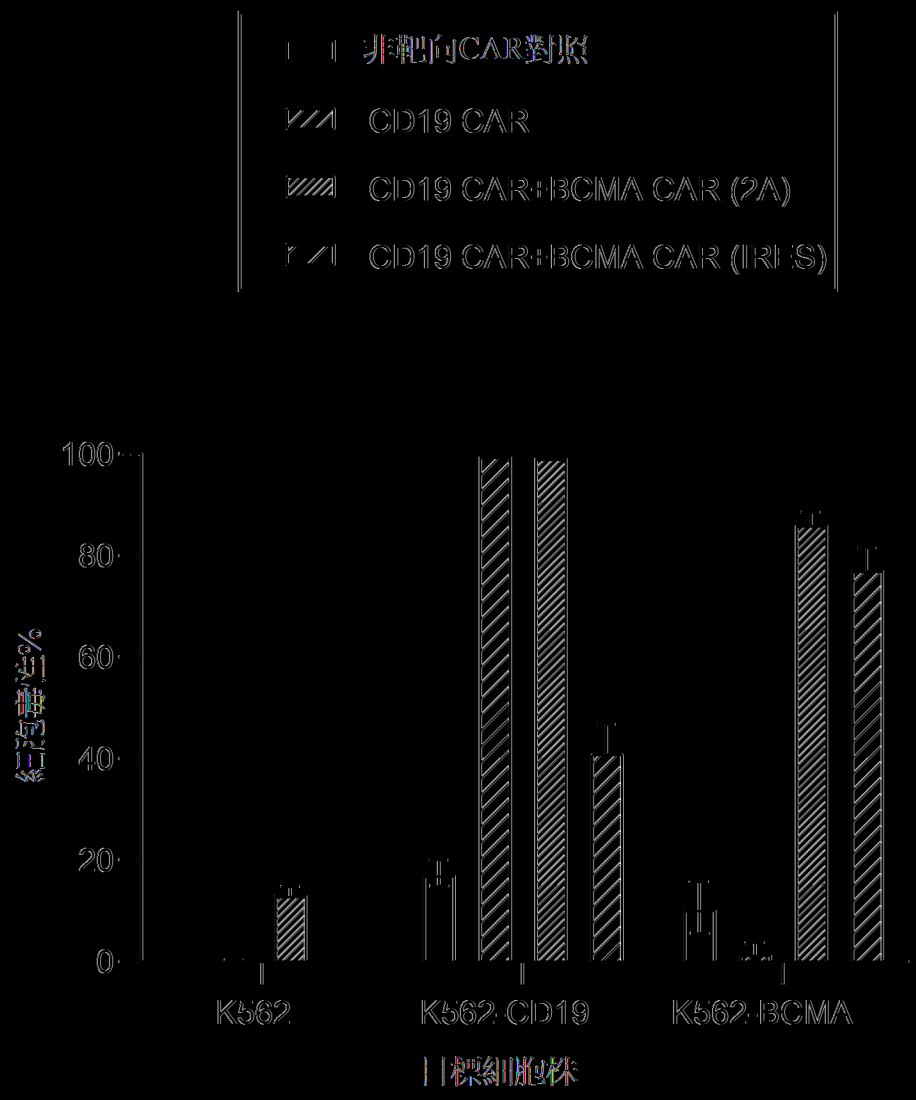
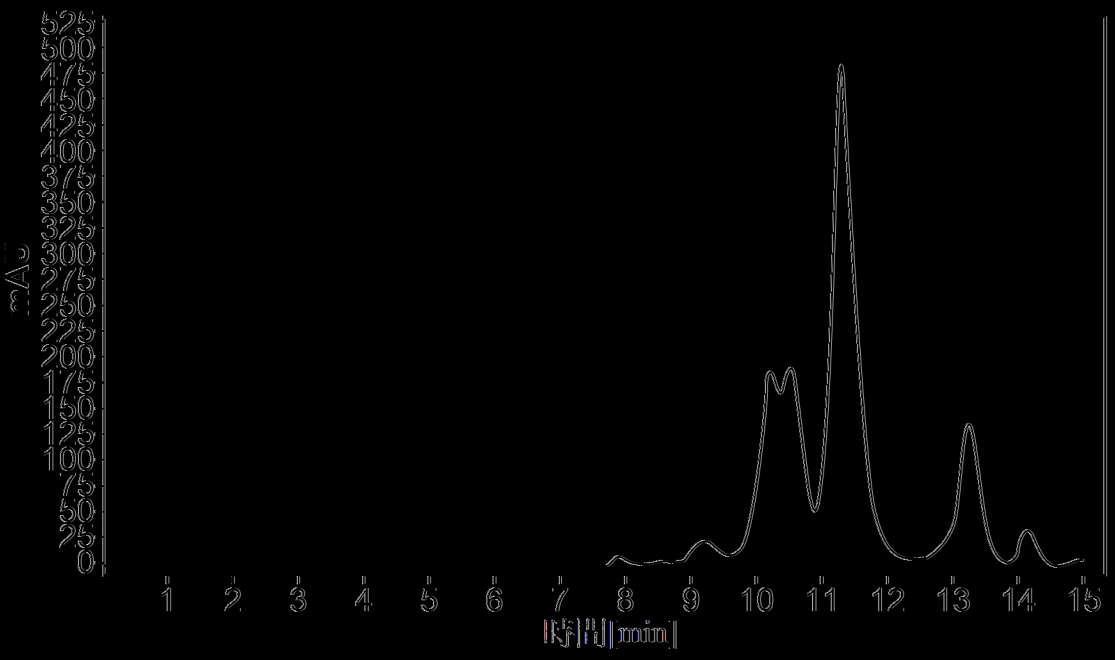

非靶向CAR對照
CD19 CAR
CD19 CAR:BCMA CAR (2A)
CD19 CAR:BCMA CAR (IRES)
100
80
60
40
20
0
K562
K562-CD19
K562-BCMA
標細胞株

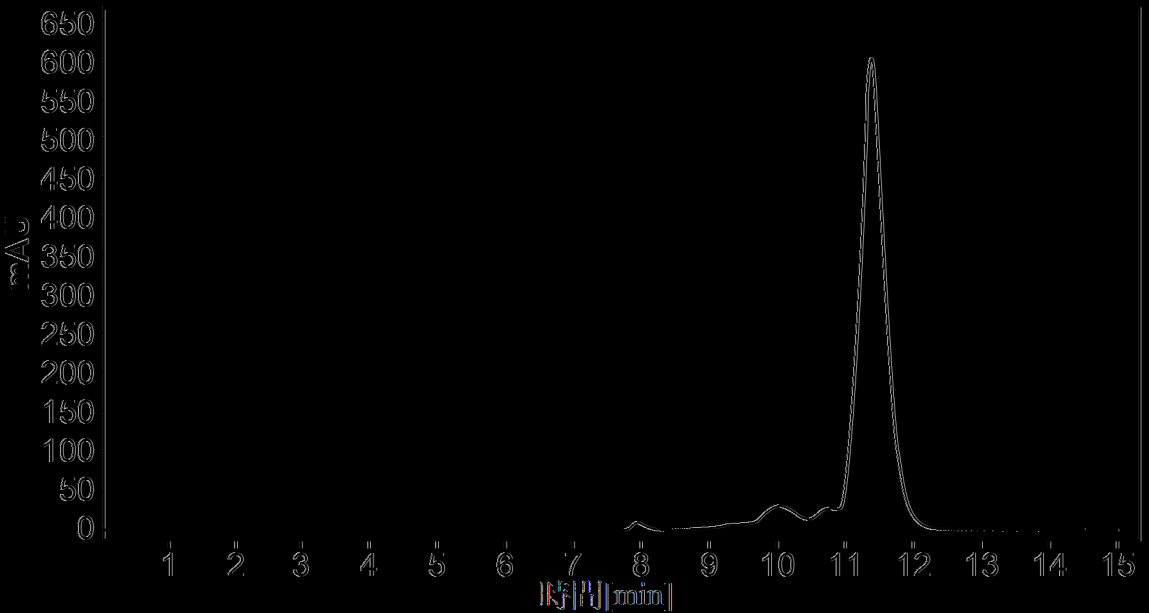
圖30

|pA|S|3'內含子|H|S|R|S| gluc |S|H|5'內含子|S|pA|

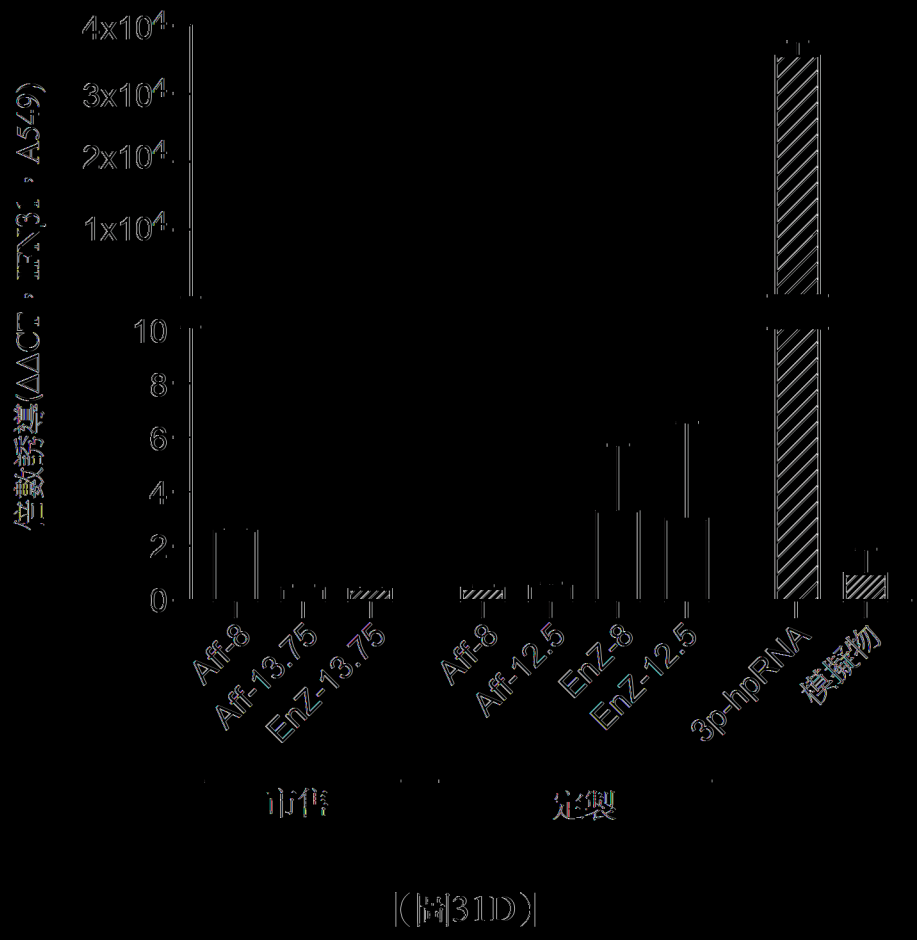
(圖31A)



(圖31B)

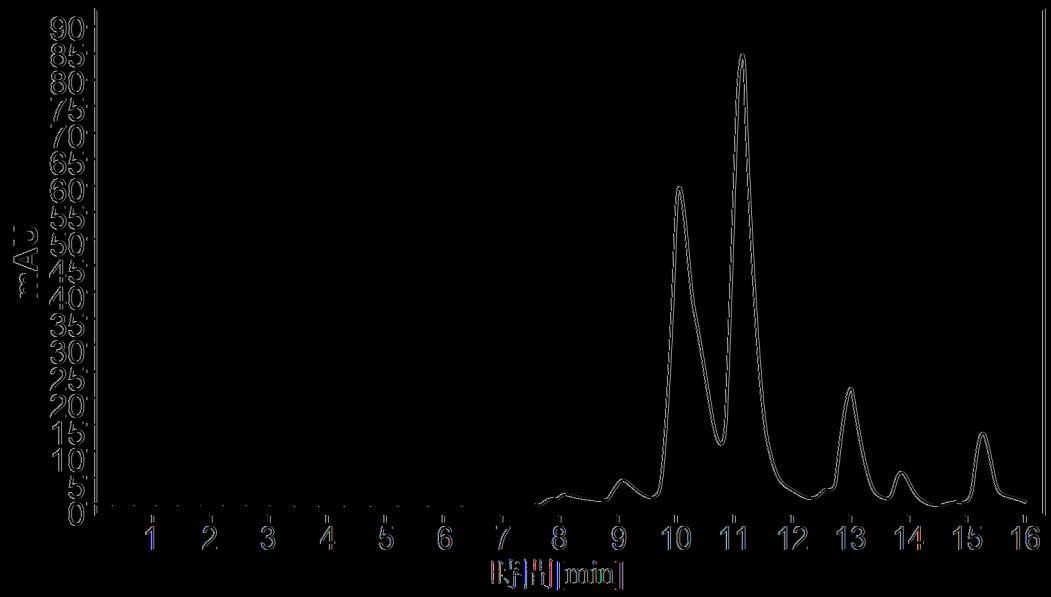


(圖31C)

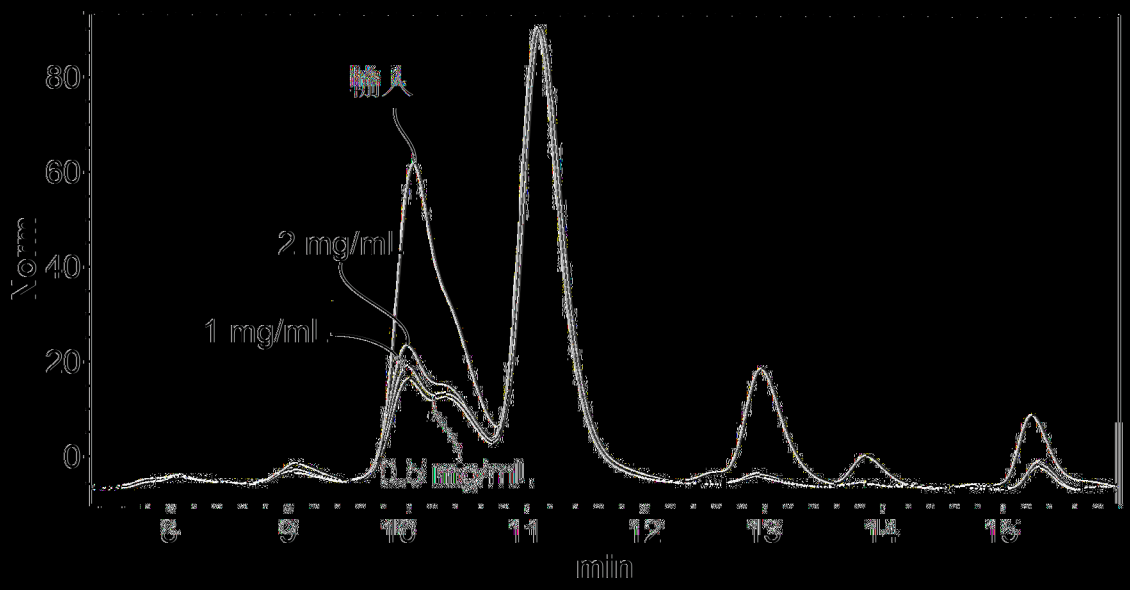

4x10⁴
3x10⁴
2x10⁴
1x10⁴
10
8
6
4
2
0
Aff-8
Aff-13.75
EnZ-13.75
Aff-8
Aff-12.5
EnZ-8
EnZ-12.5
3p-hpRNA
模擬物
市售
定製



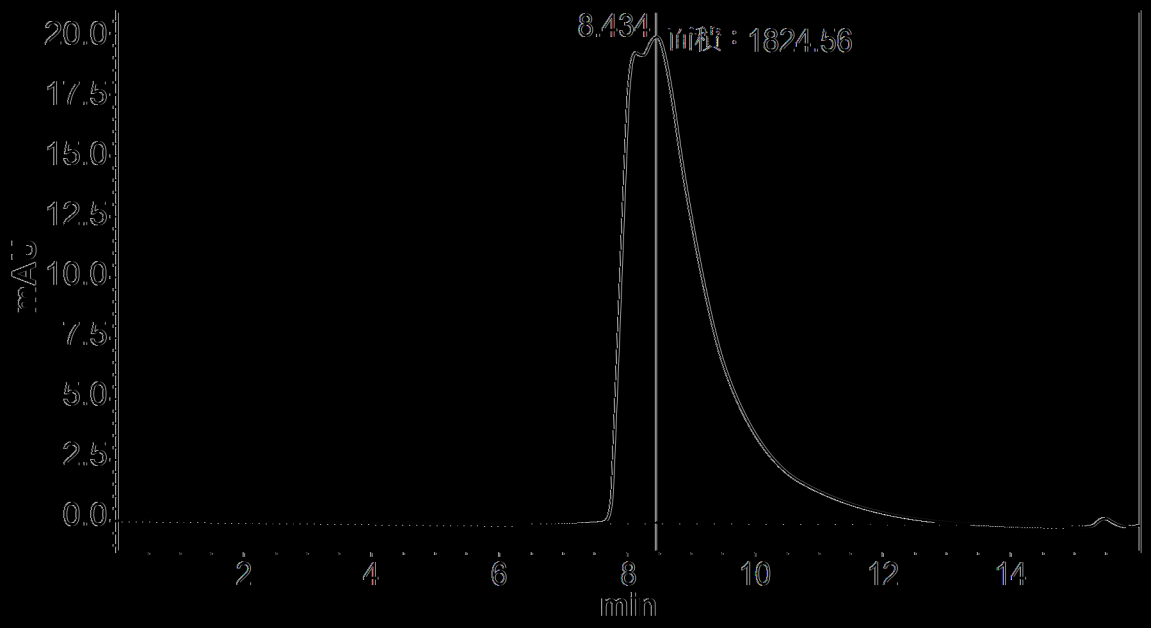
(圖32A)



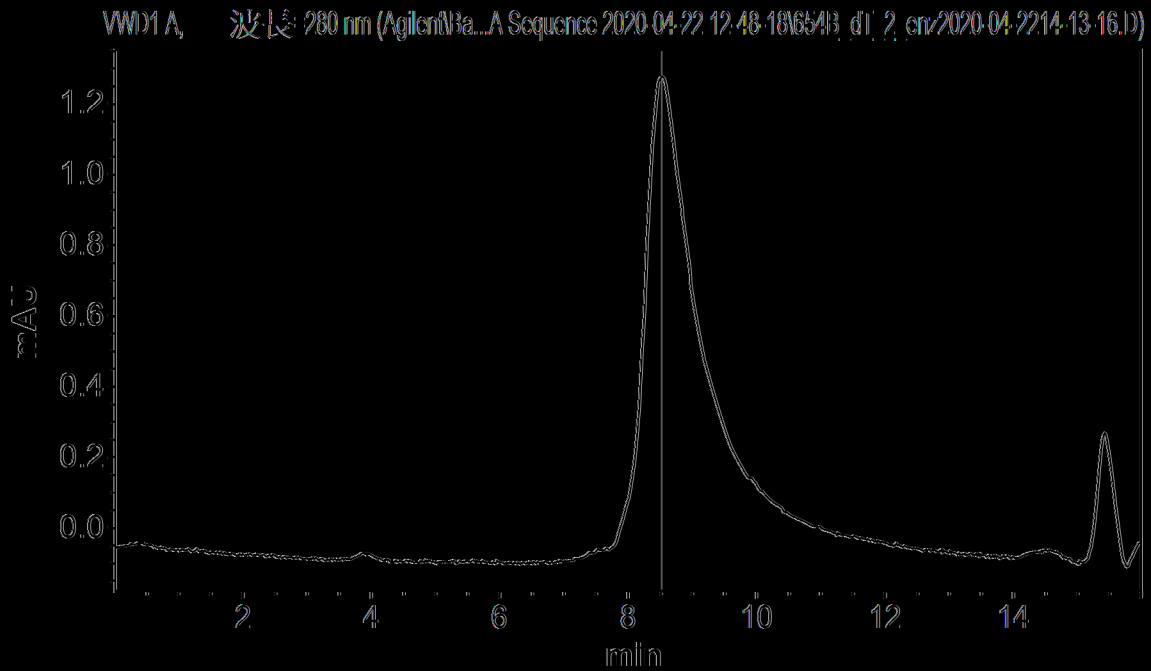
(圖32B)



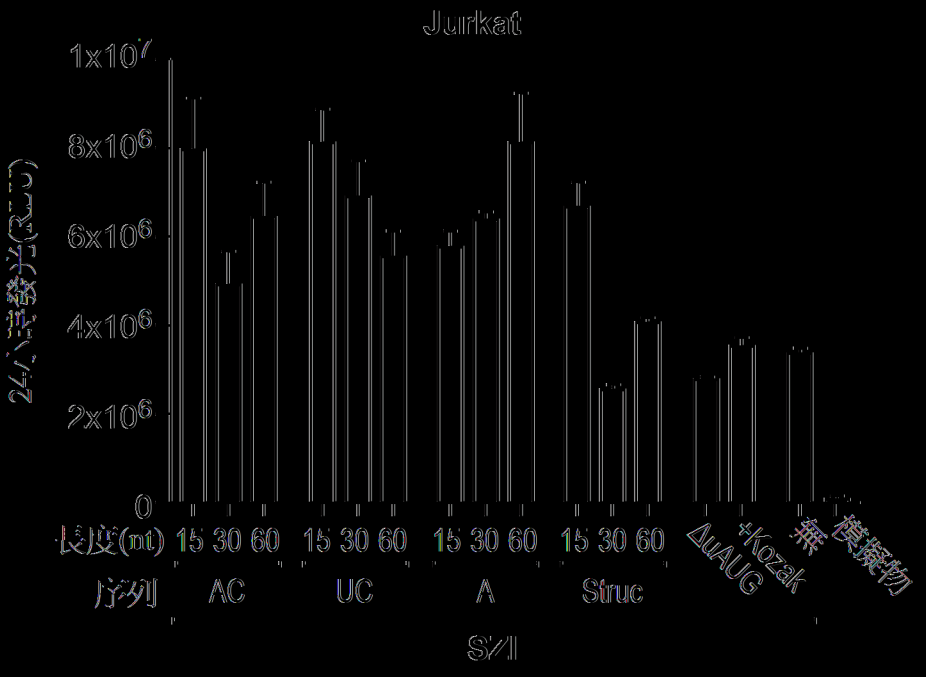
(圖32C)


8.434
面積：1824.56
20.0
17.5
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
mAU
2
4
6
8
10
12
14
min

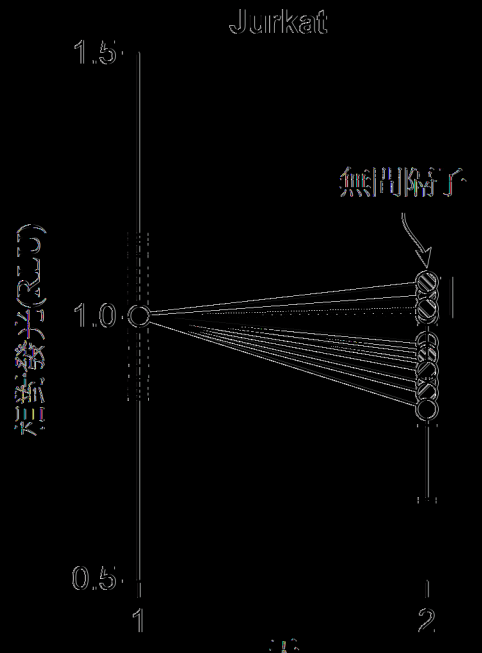
（圖33A）


VWD1 A, 波長: 280 nm (Agilent\Ba...A Sequence 2020-04-22 12-48-18\654B_dl_2_en/2020-04-2214-13-16.D)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mAU
2
4
6
8
10
12
14
min

（圖33B）


Jurkat
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
長度(nt) 15 30 60 15 30 60 15 30 60 15 30 60
序列 AC UC A Struc
ΔuAUG
+Kozak
無
模擬物
S/I

(圖34A)


Jurkat
1.5
1.0
0.5
無開始子
1
2
天

(圖34B)

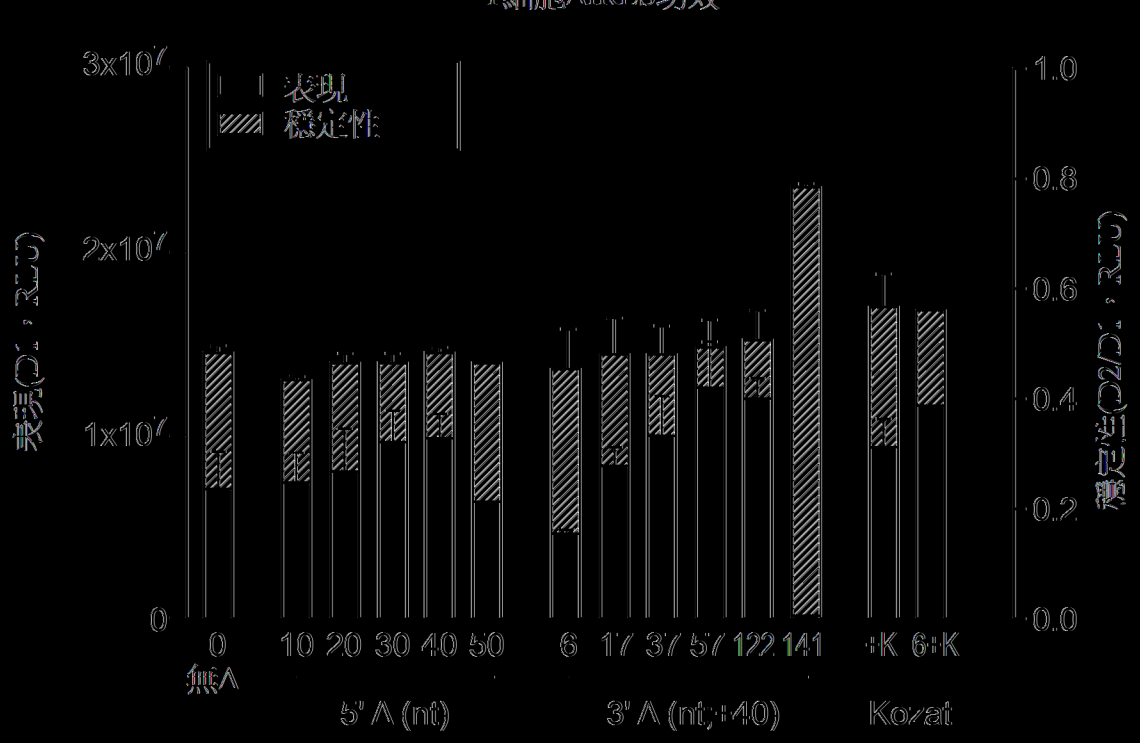
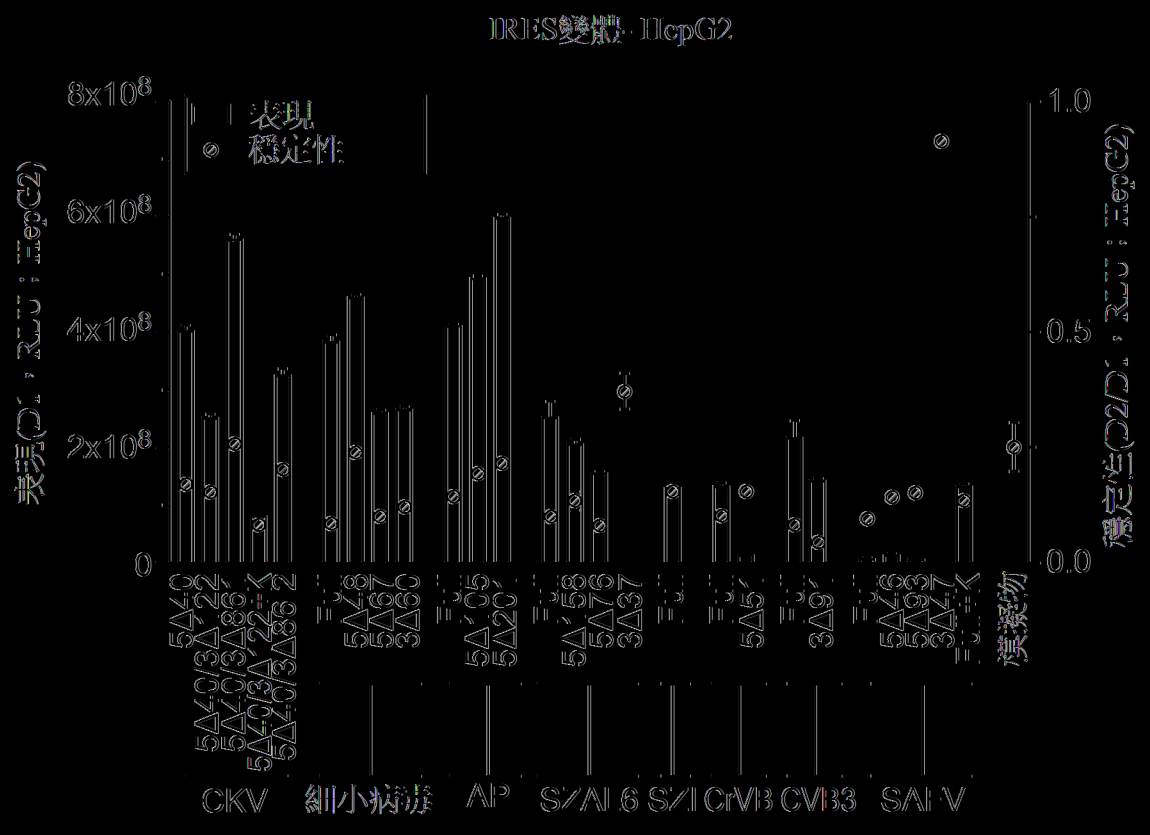
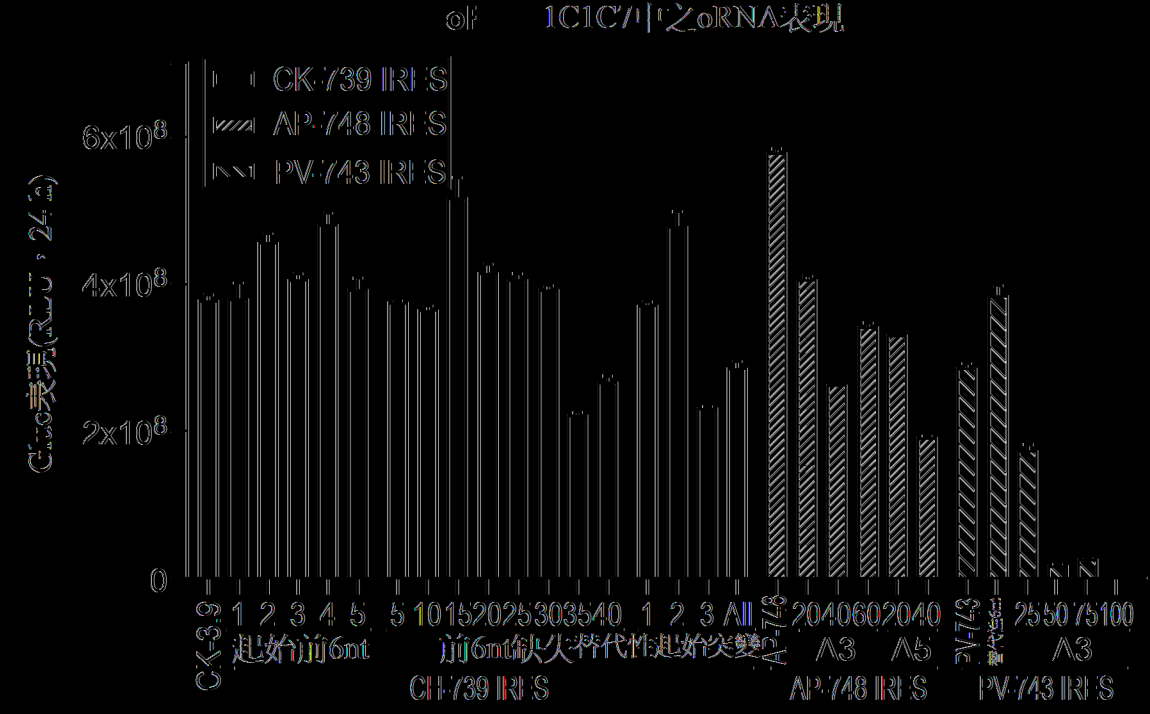

T細胞AIRES功效
表現
穩定性
3x10⁷
2x10⁷
1x10⁷
0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
無Λ
10
20
30
40
50
6
17
37
57
122
141
+K
6+K
5' Λ (nt)
3' Λ (nt)+40)
Korat

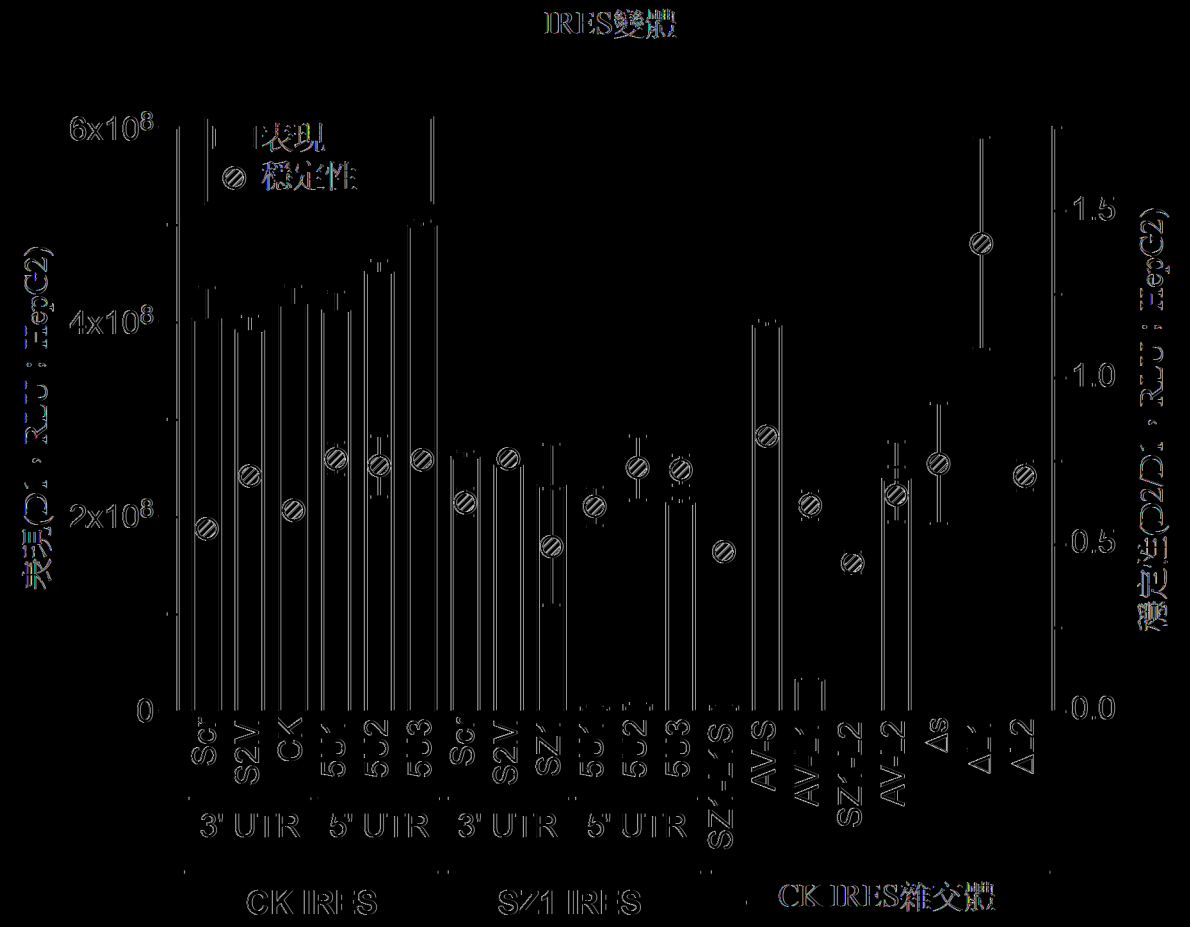
圖35


IRES變異 HepG2
表現
穩定性
8x10^8
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
1.0
0.5
0.0
CKV
細小病毒
AP
SVA
6
SVI
CVB
CVB3
SAV

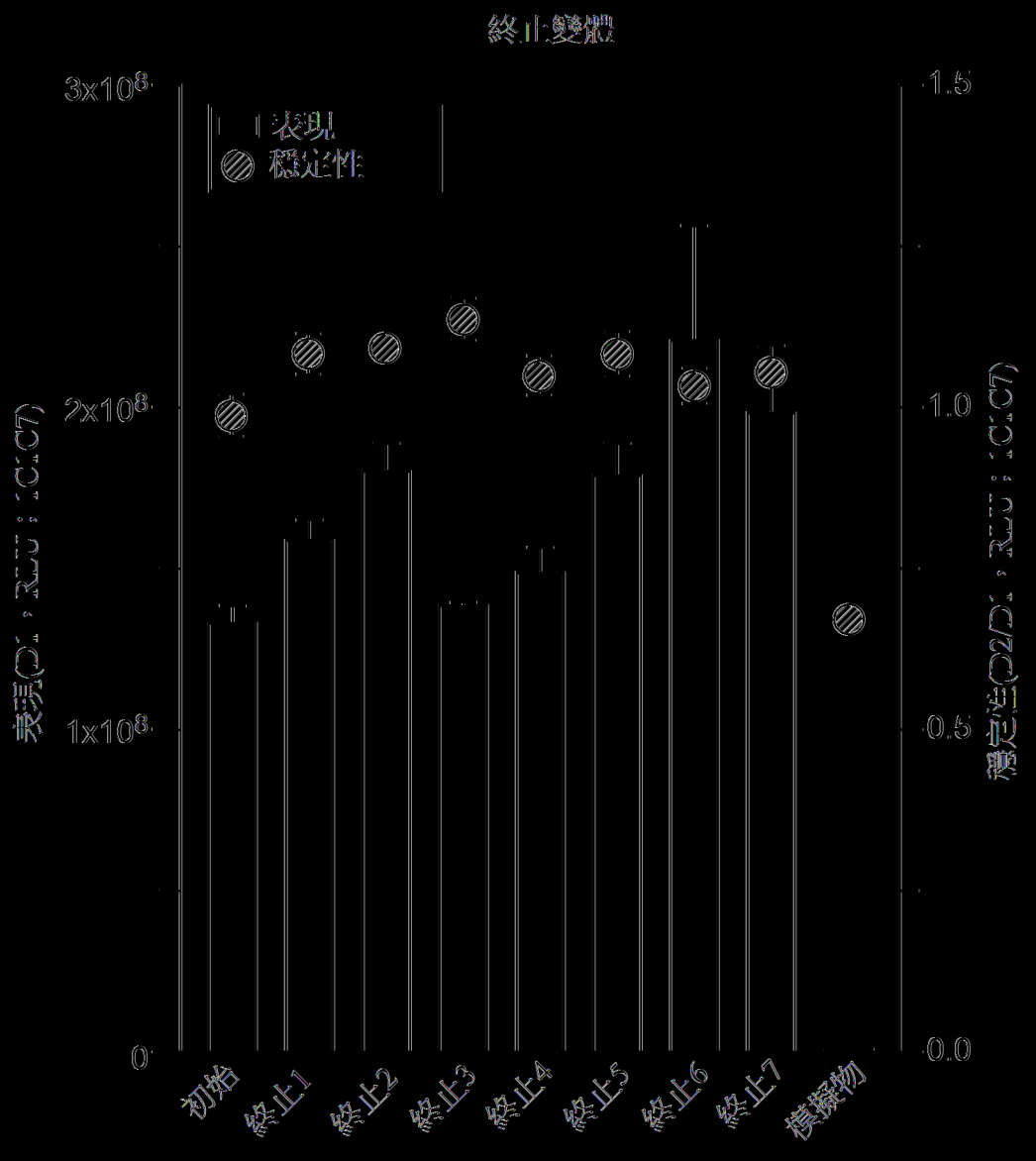
(圖36)


1C1C/中之oRNA表現
CK-739 IRES
AP-748 IRES
PV-743 IRES
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
起始前6nt
前6nt缺失替代性起始突變
CH-739 IRES
AP-748 IRES
PV-743 IRES

(圖37)


IRES變體
表現
穩定性
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
1.5
1.0
0.5
0.0
3'UTR
5'UTR
3'UTR
5'UTR
CK IRES
S71 IRES
CK IRES雜交體

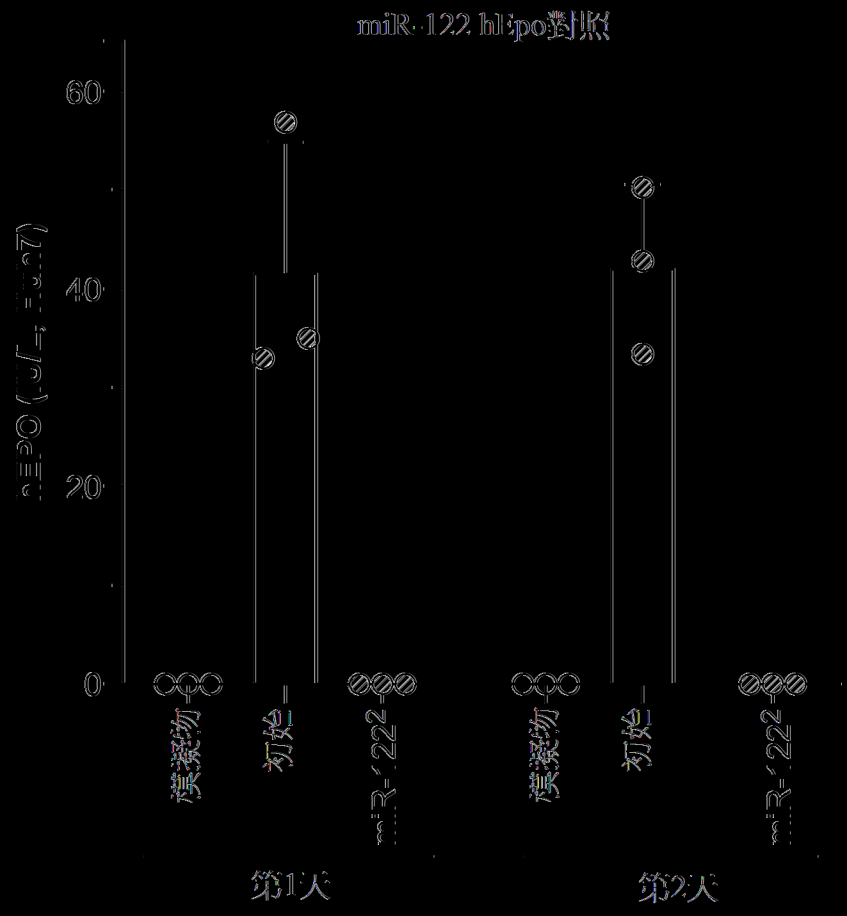
|(圖38)|


終止變體
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
1.5
1.0
0.5
0.0
表現
穩定性
初始
終止1
終止2
終止3
終止4
終止5
終止6
終止7
模擬物

（圖39）

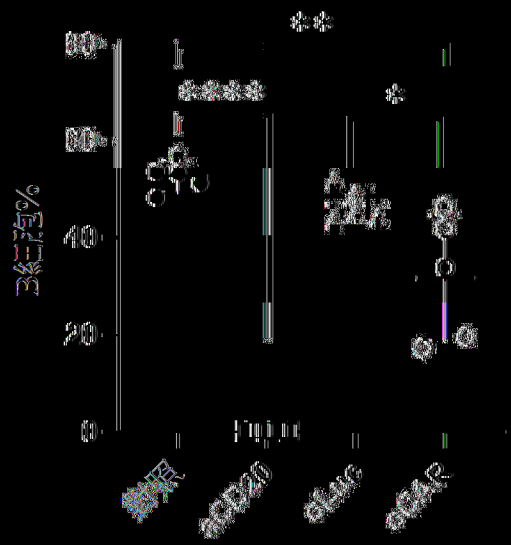
5' UTR變體
表現
穩定性
4x10^8
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
1.5
1.0
0.5
0.0
初始
UTR1
UTR2
UTR3
UTR4
模擬物

圖40


miR-122 hEpo對照
60
40
20
0
hEpo (pg/mL)
對照組
miR-122
對照組
miR-122
第1天
第2天

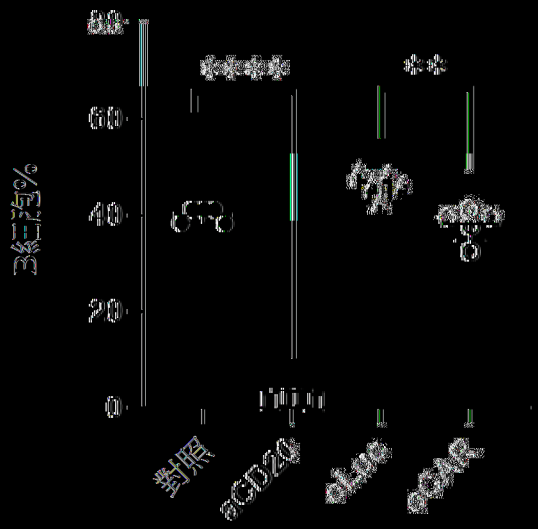
（圖41）

周邊血液

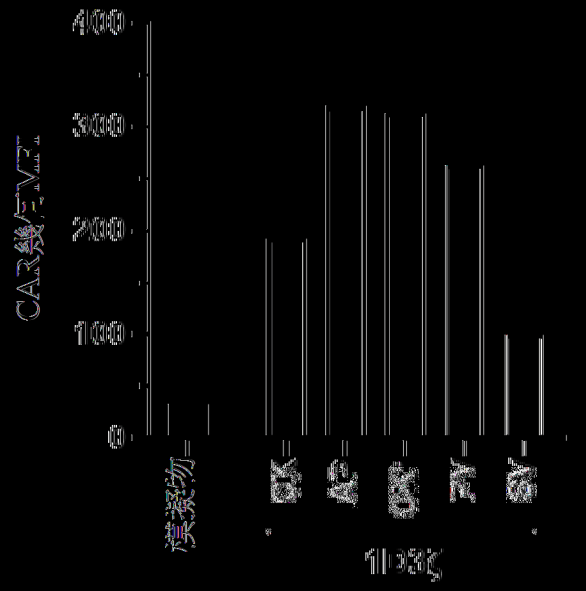


（圖42A）

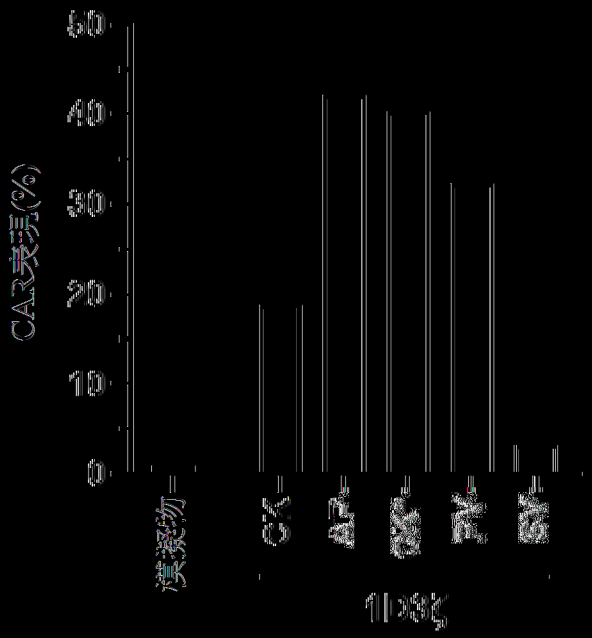
胰臟



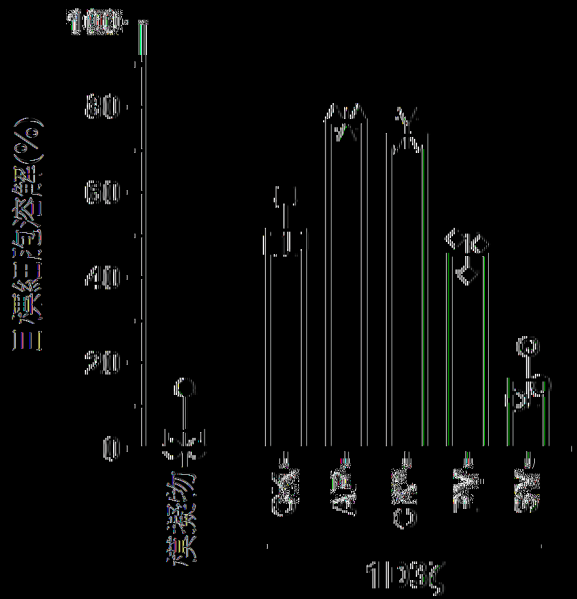
（圖42B）



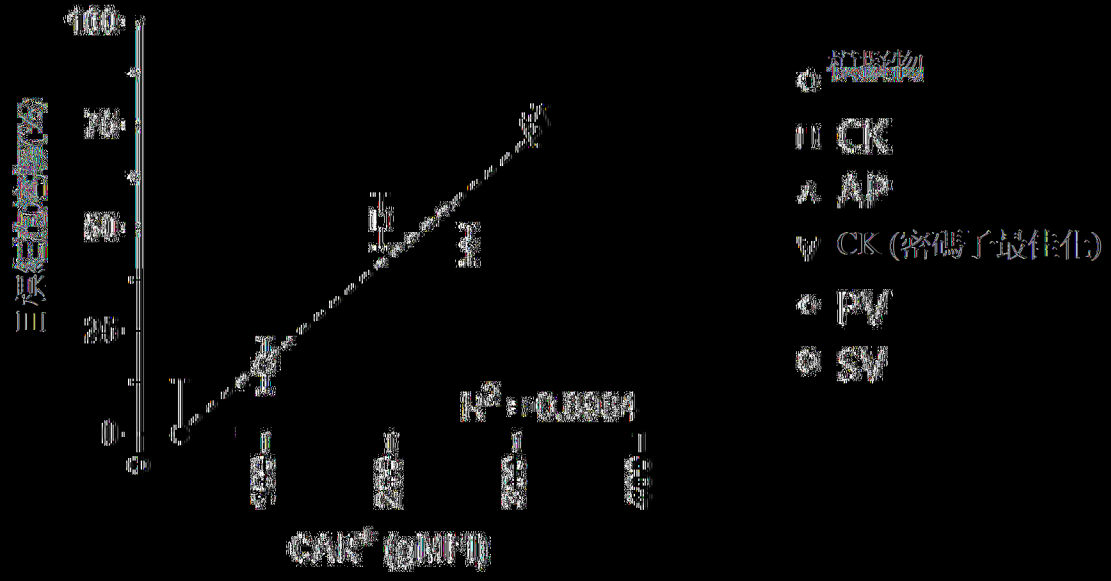
(圖43A)



(圖43B)



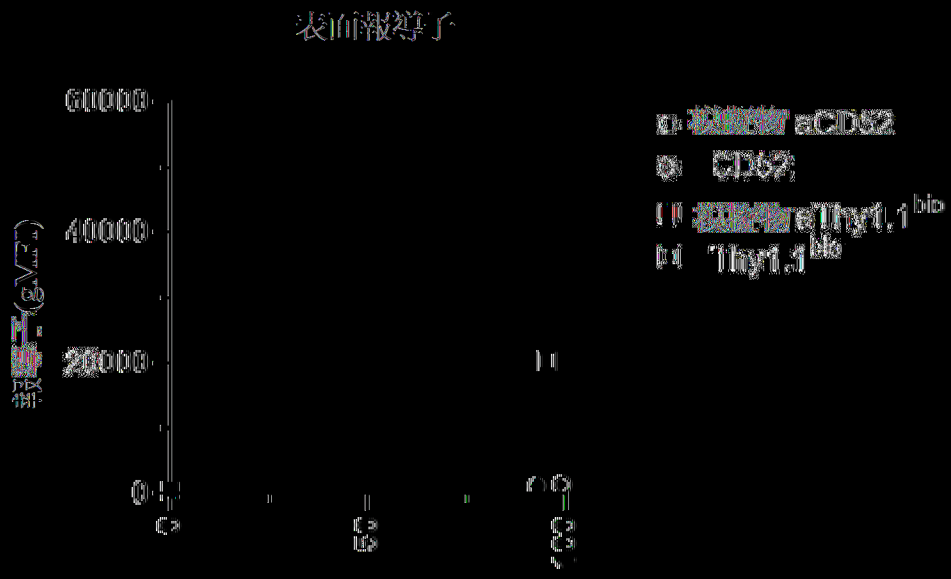
(圖43C)



|(圖44)|

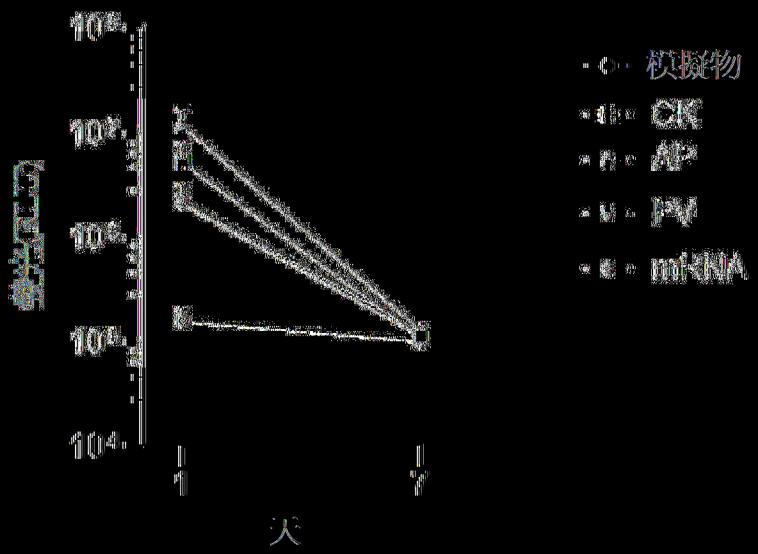

螢光報導子
40000
30000
20000
10000
0
螢光報導子(%)

(圖45A)


表面報導子
60000
40000
20000
0
表面報導子(%)

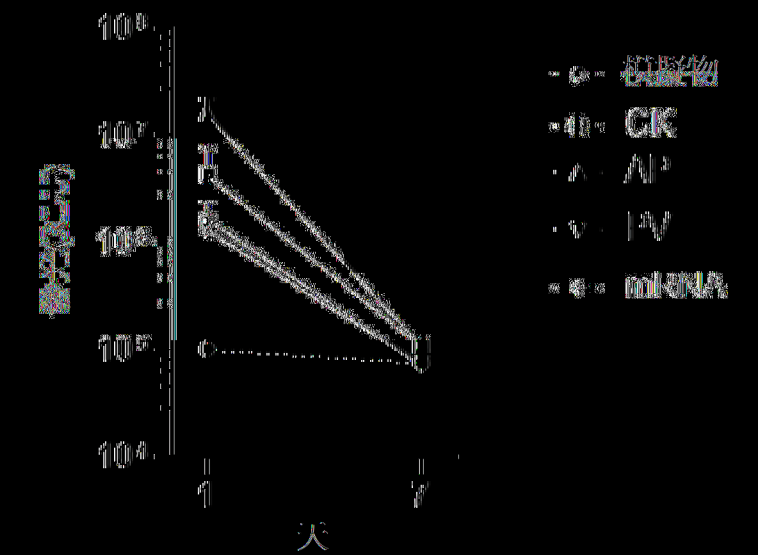
(圖45B)

供試A



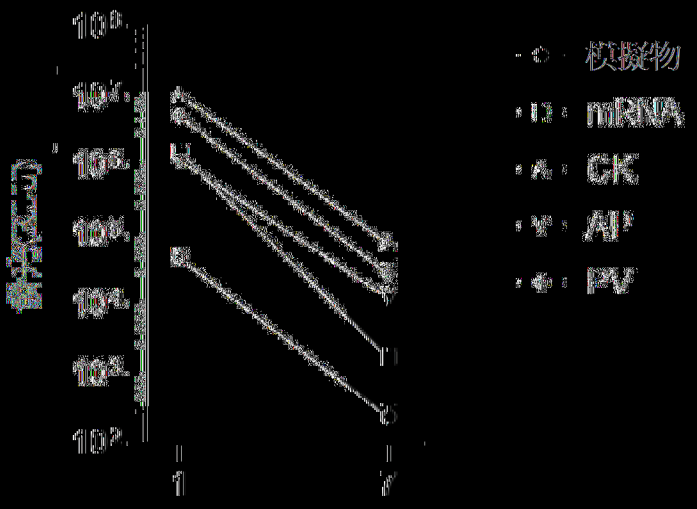
|(圖46A)|

供試B



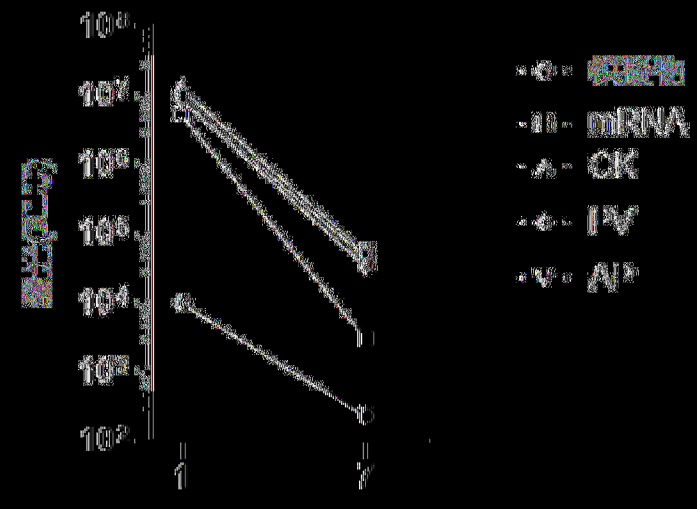
|(圖46B)|

供體A



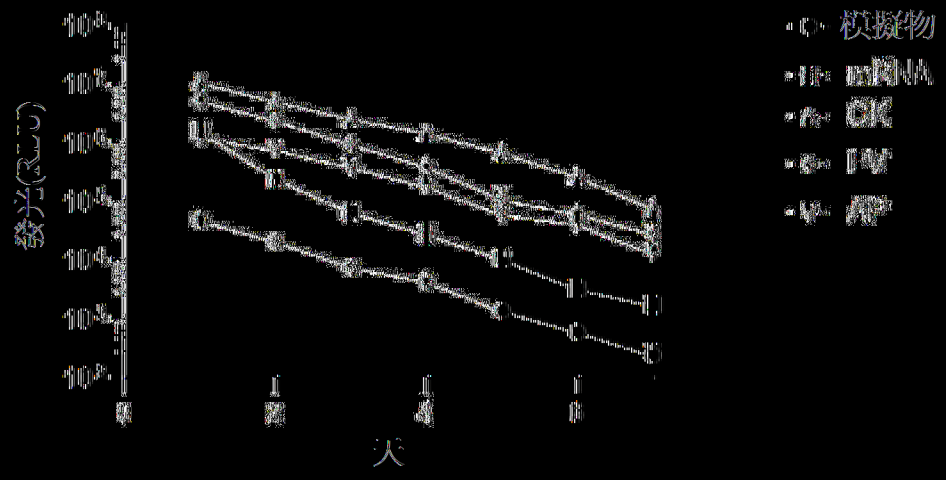
|(圖46C)|

供體B



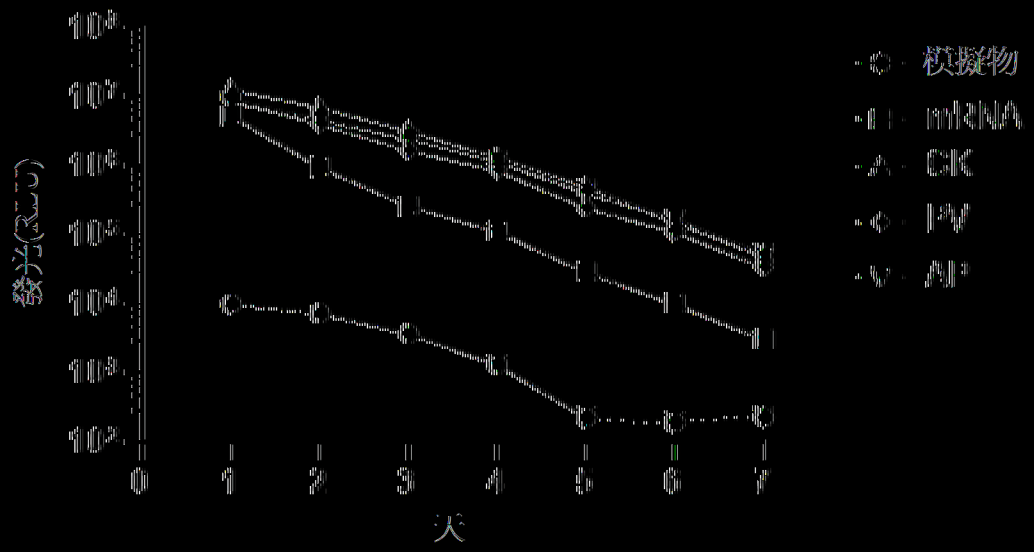
|(圖46D)|

供試A

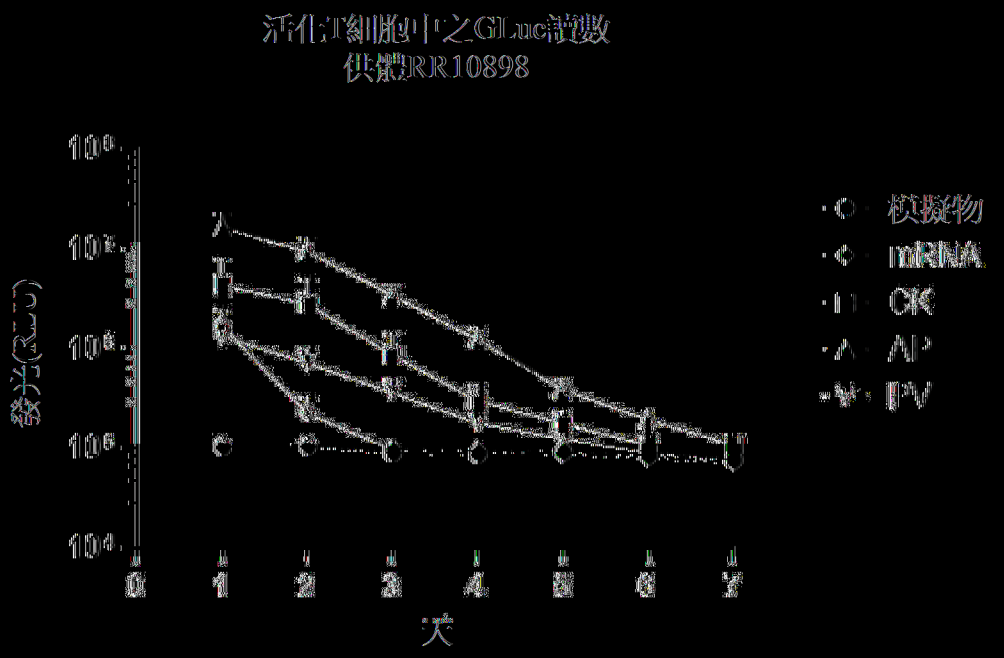


(図46E)

供試B



(図46F)


肝化T細胞中之GLuc轉數
供體RR10898
10^6
10^5
10^4
0
1
2
3
4
5
6
7
天
模擬物
mRNA
CK
AP
PV

|(圖46G)|

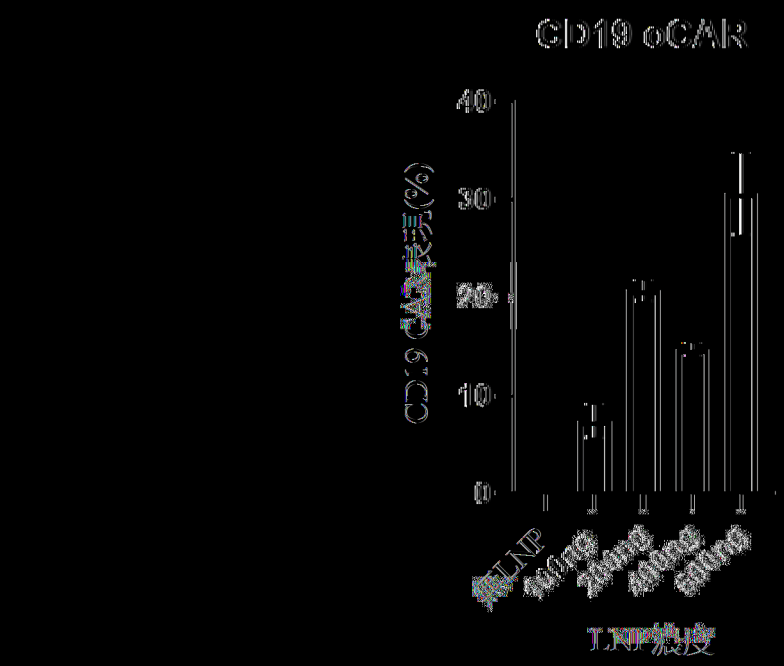

CD19 oCAR
40
30
20
10
0
CD3ζ
LNP
TNP濃度

圖4A

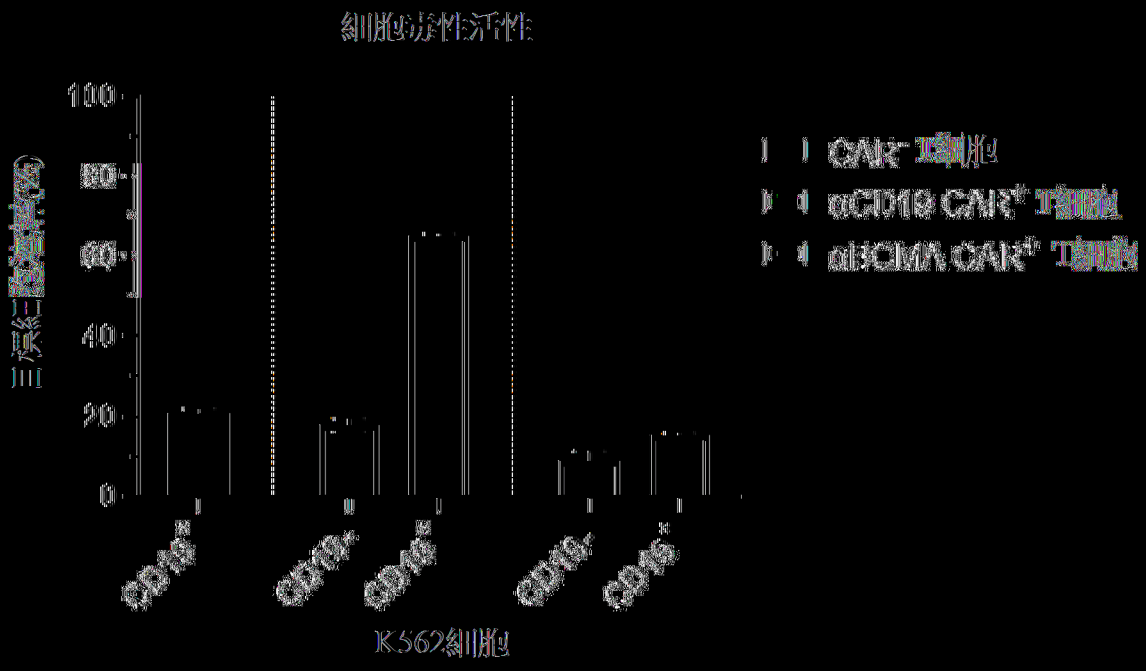
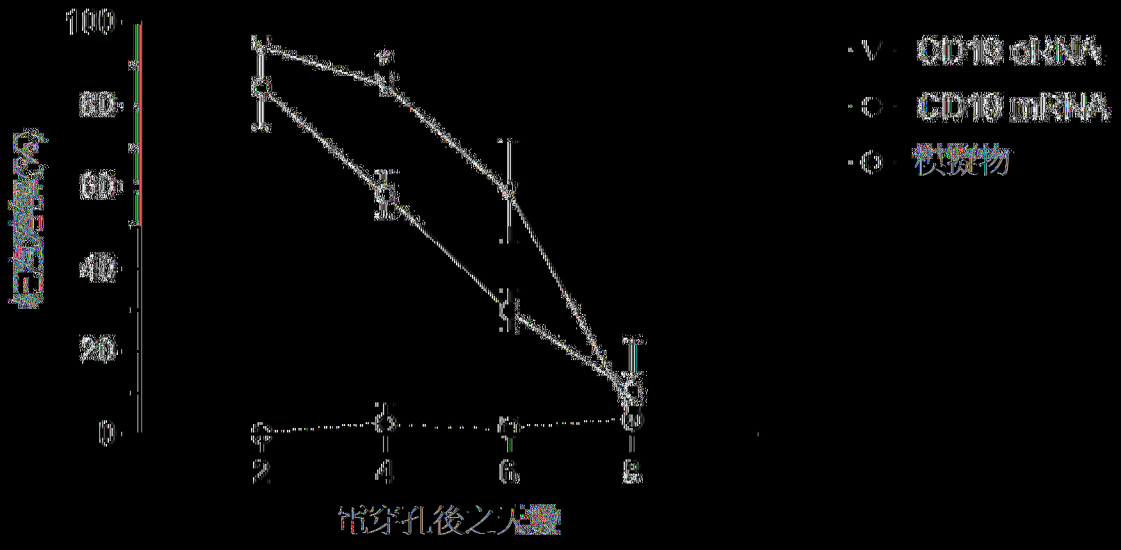

細胞毒性活性
100
80
60
40
20
0
CAR- T細胞
αCD19 CAR+ T細胞
αBCMA CAR+ T細胞
K562細胞

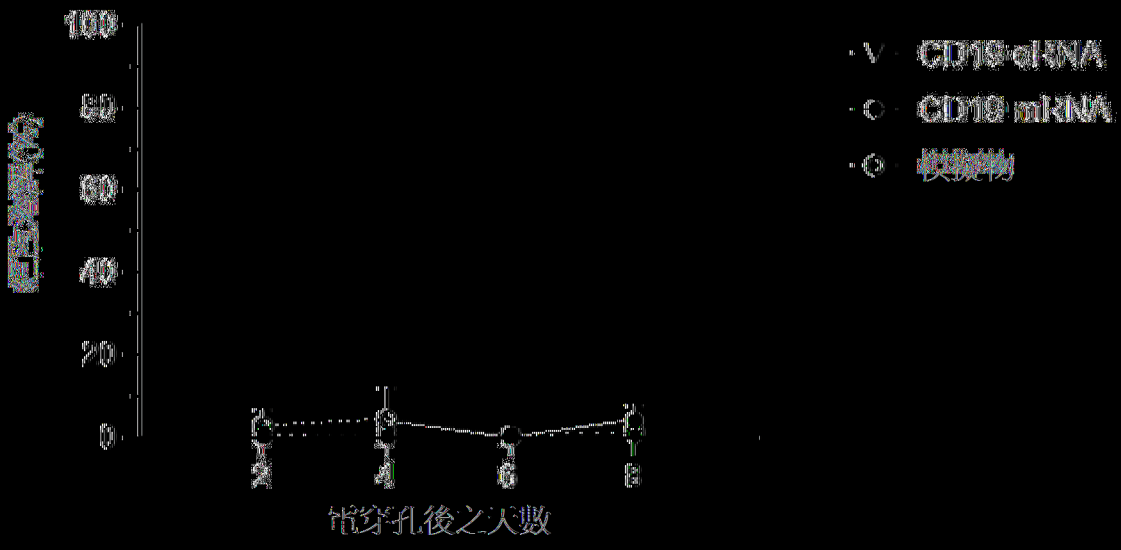
圖4B

用αCD19 CAR進行Nalm6溶解



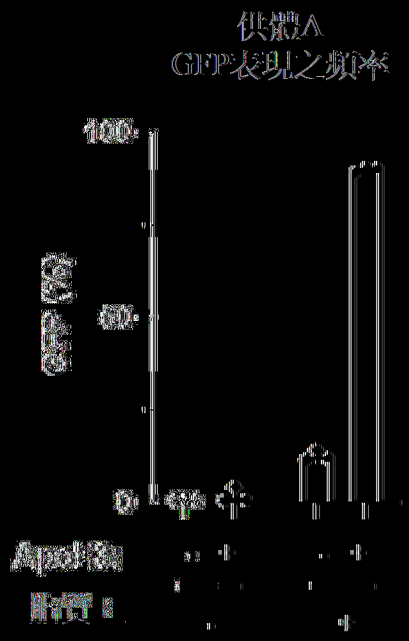
(圖48A)

用αCD19 CAR進行K562溶解

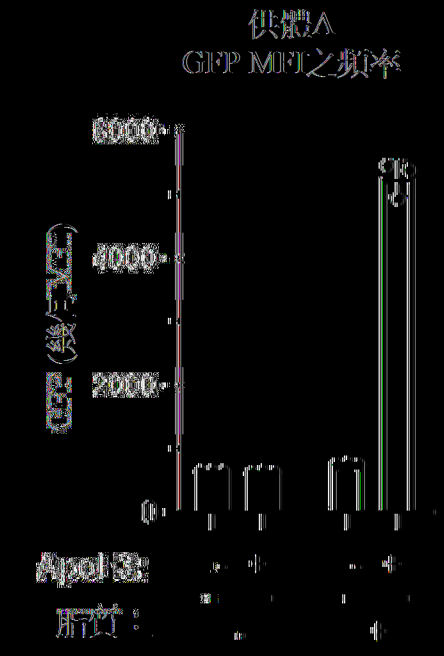


(圖48B)

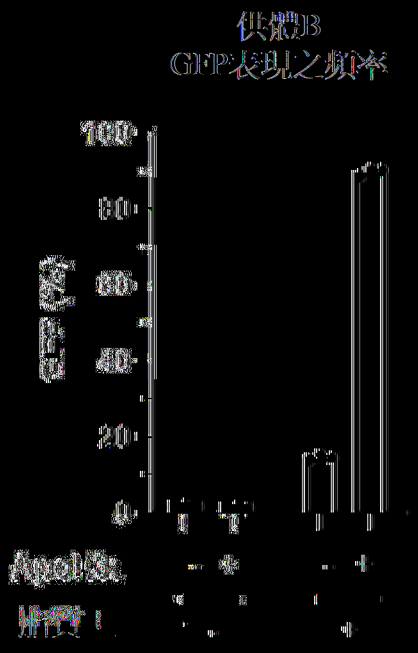
Apple
Apple
Apple
Apple
Apple
Apple
Apple
Apple


供體A
GEP表現之頻率
100
60
0
Apoli3a
肝臟

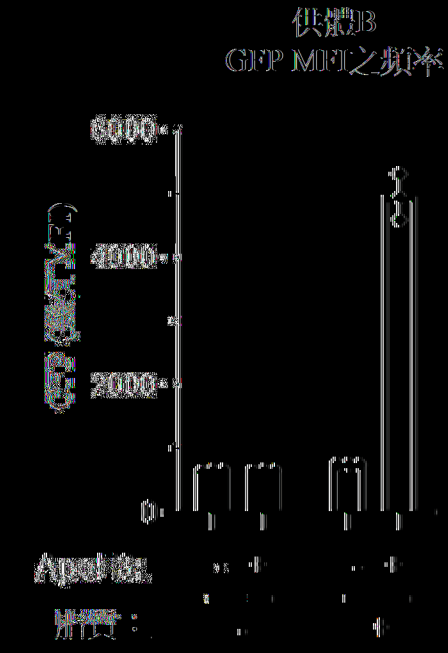
(圖49B)


供體A
GEP MFI之頻率
6000
4000
2000
0
Apoli3a
肝臟

(圖49C)


供體B
GFP表現之頻率
100
80
60
40
20
0
Apoi效應
非實際

(圖49D)

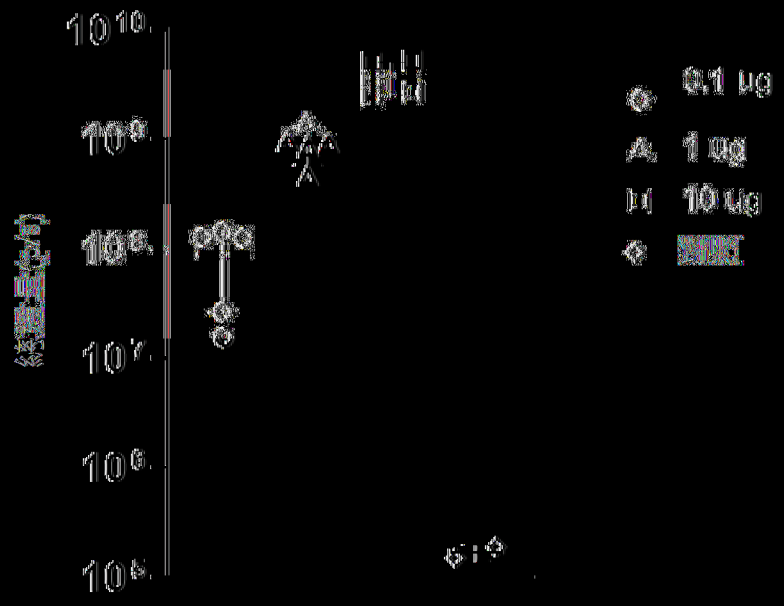

供體B
GFP MFI之頻率
6000
4000
2000
0
Apoi效應
非實際

(圖49E)

GX-OFF
GX-ON
無線訊
H1S10
H1S10
H1S10

濃度大約介於及高
濃度大約介於及高
濃度大約介於及高

IM注射後6小時之活體全身通量

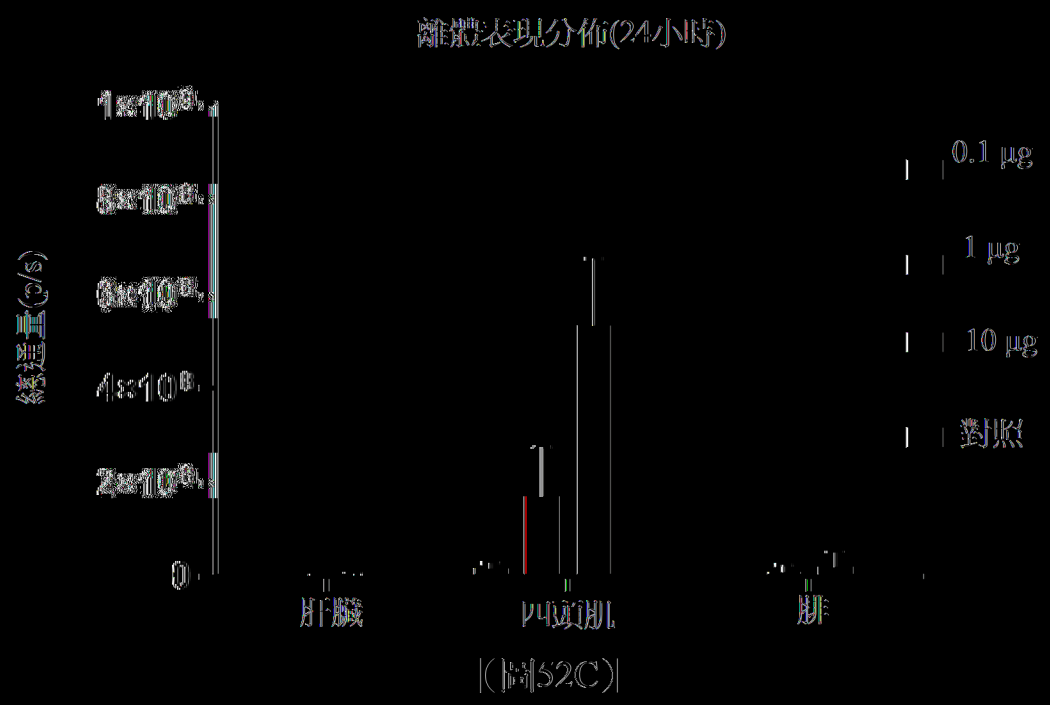


(圖52A)

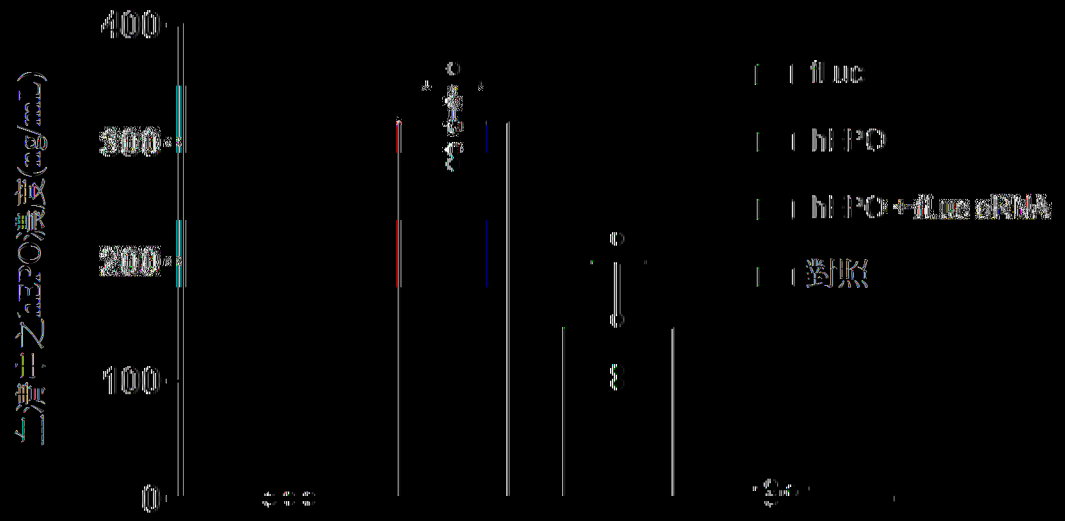
全身IVIS：
在6小時時1 μg IM劑量



(圖52B)

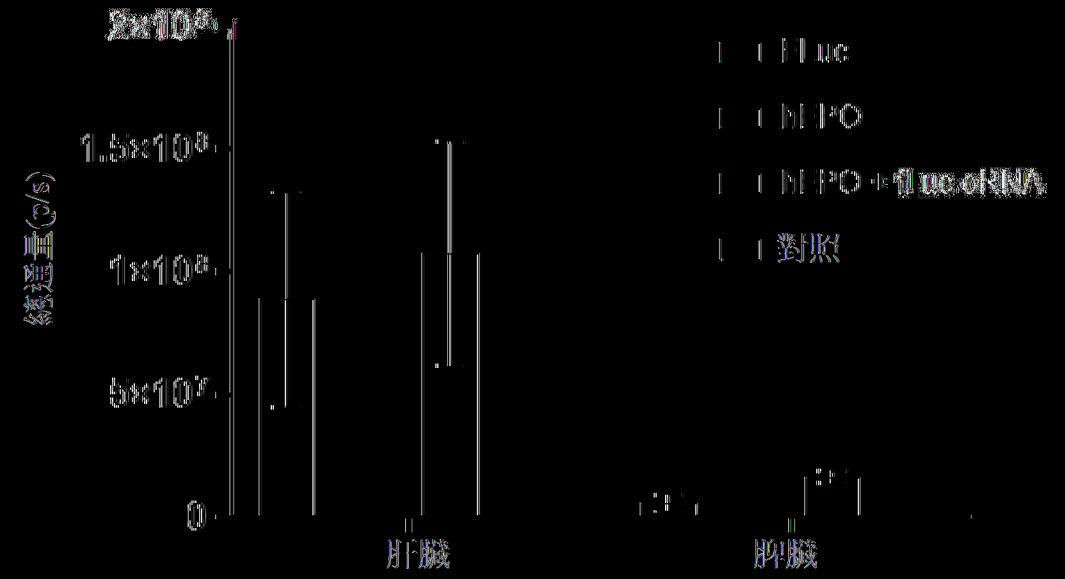

離體表現分佈(24小時)
1×10⁸
8×10⁷
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
螢光訊號強度(p/s)
0.1 μg
1 μg
10 μg
對照
肝臟
卵巢前期
脾
(圖52C)

來自單一及混合調oRNA LNP之hEPO效價

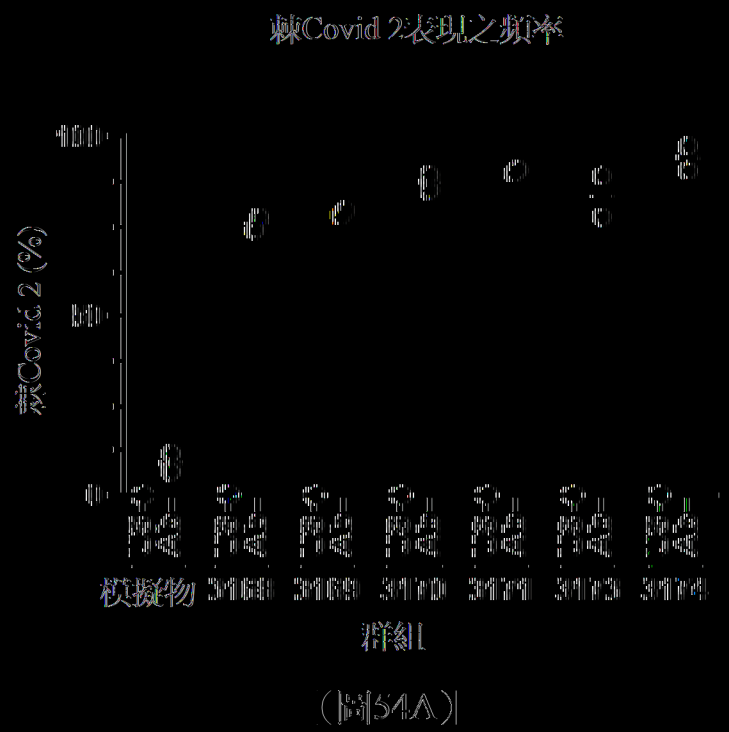


(圖53A)

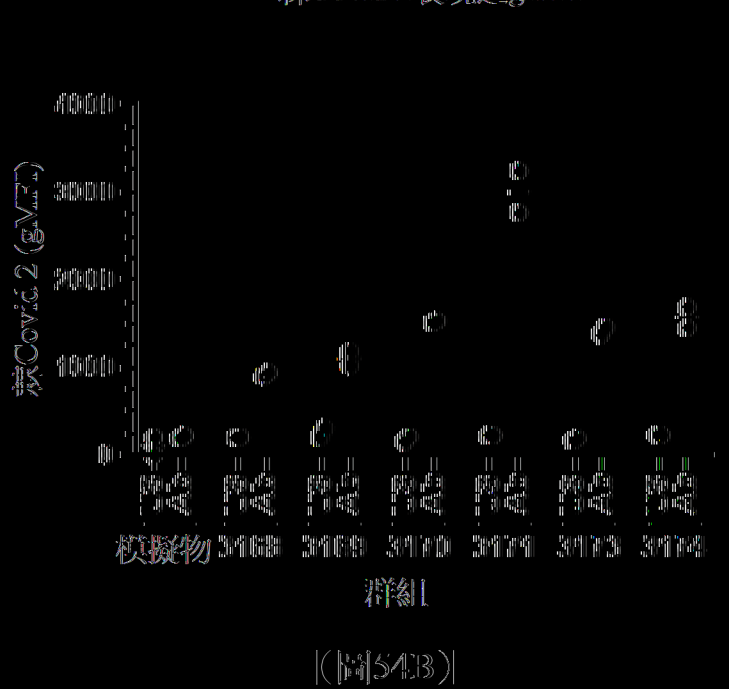
來自單一及混合調oRNA LNP之生物發光



(圖53B)

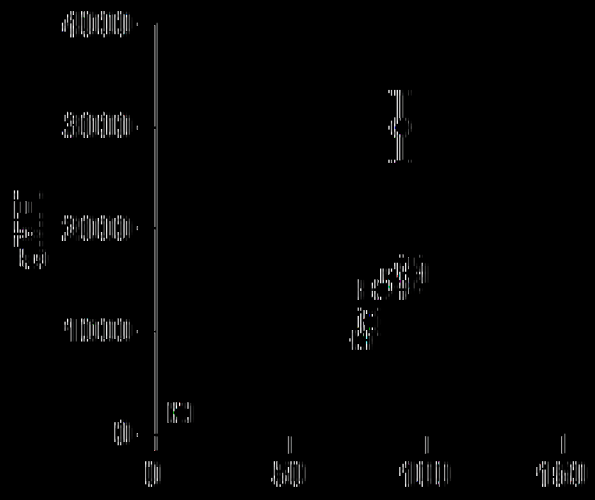

棘Covid 2表現之頻率
棘Covid 2表現(%)
100
50
0
模擬物
3168
3169
3170
3171
3173
3174
群組1

(圖54A)


棘Covid 2表現之gMFI
棘Covid 2表現(gMFI)
4000
3000
2000
1000
0
模擬物
3168
3169
3170
3171
3173
3174
群組1

(圖54B)

相對於頻率之gMOI



[(時]54C)]

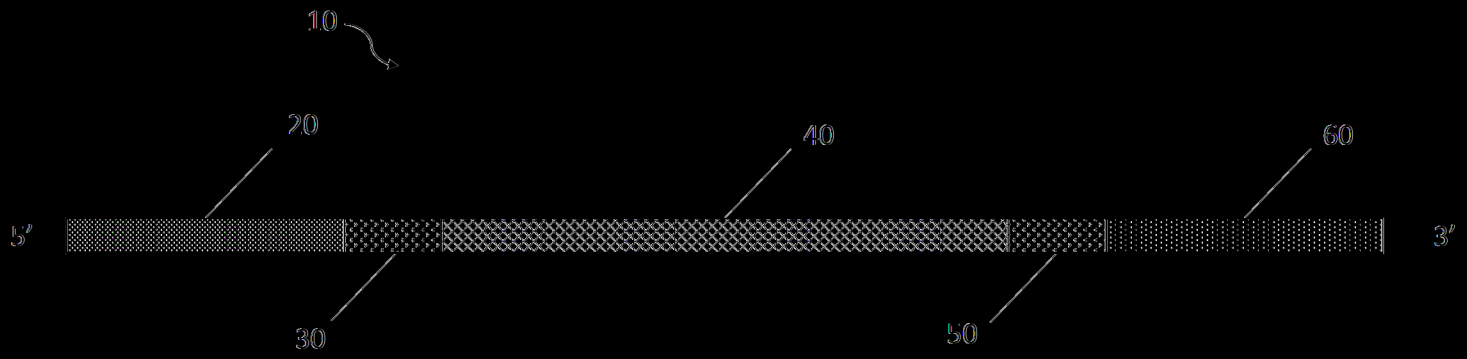
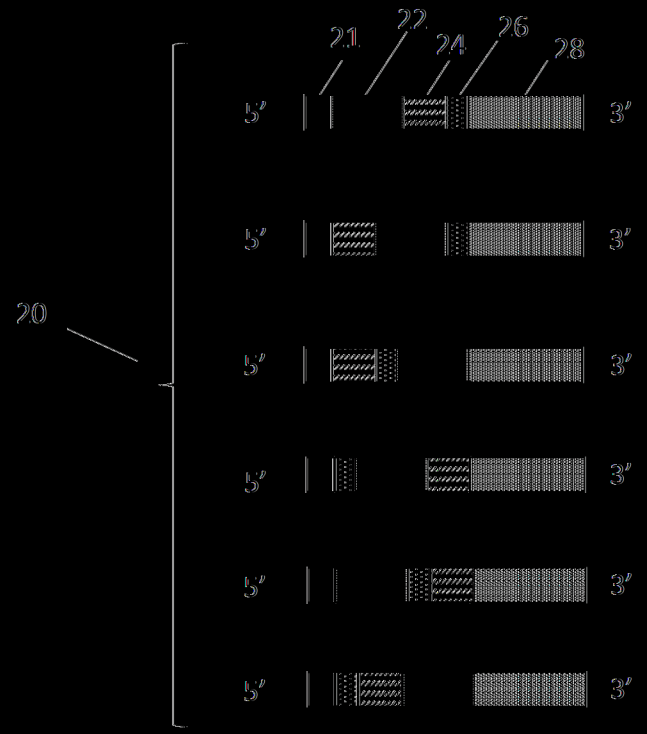
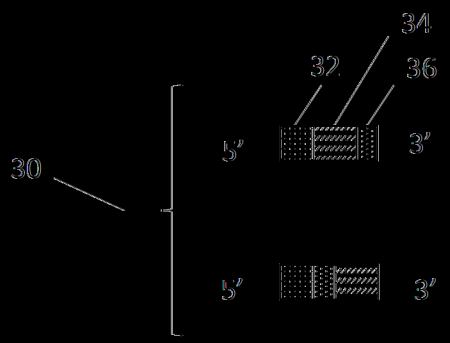


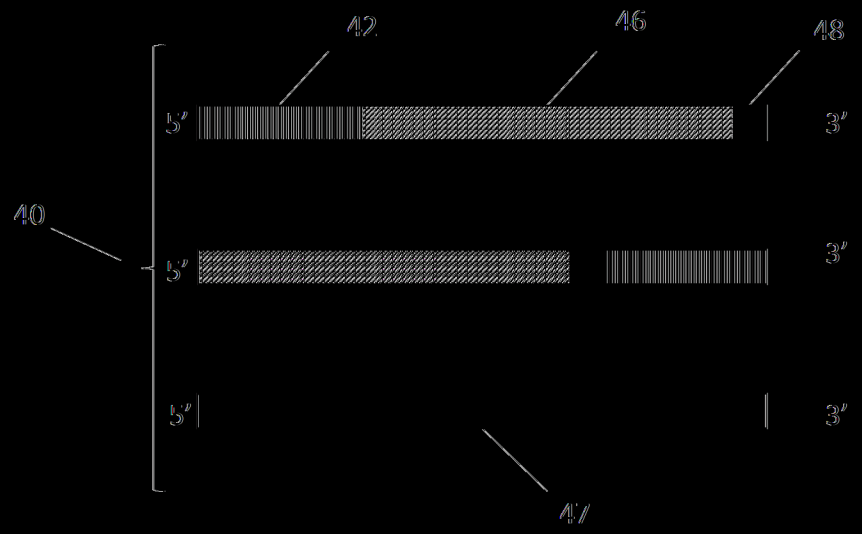
圖 5



(無)56)



(圖5')



|(圖58)|

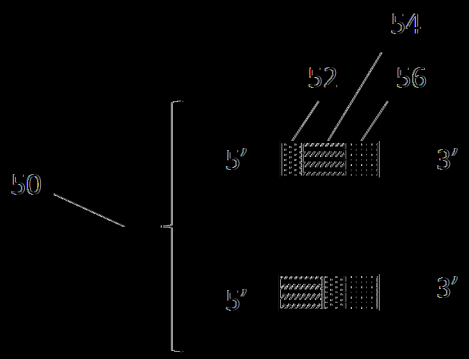
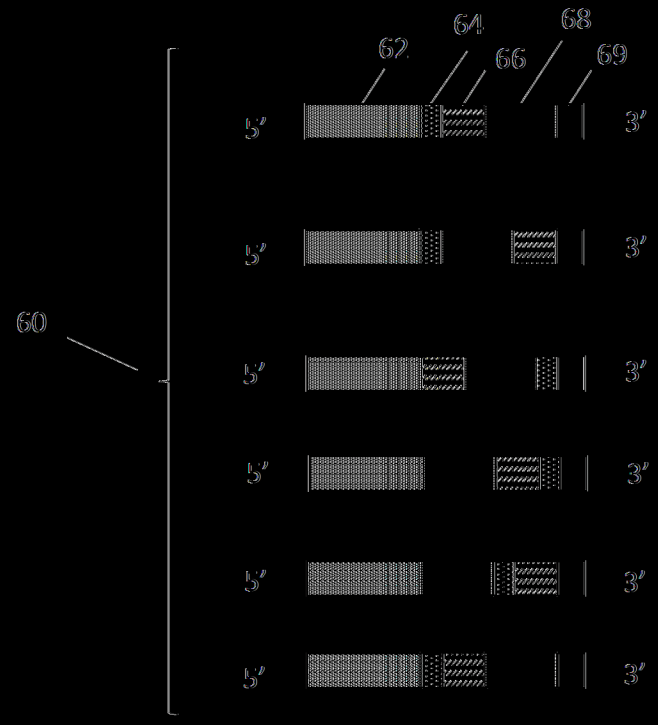
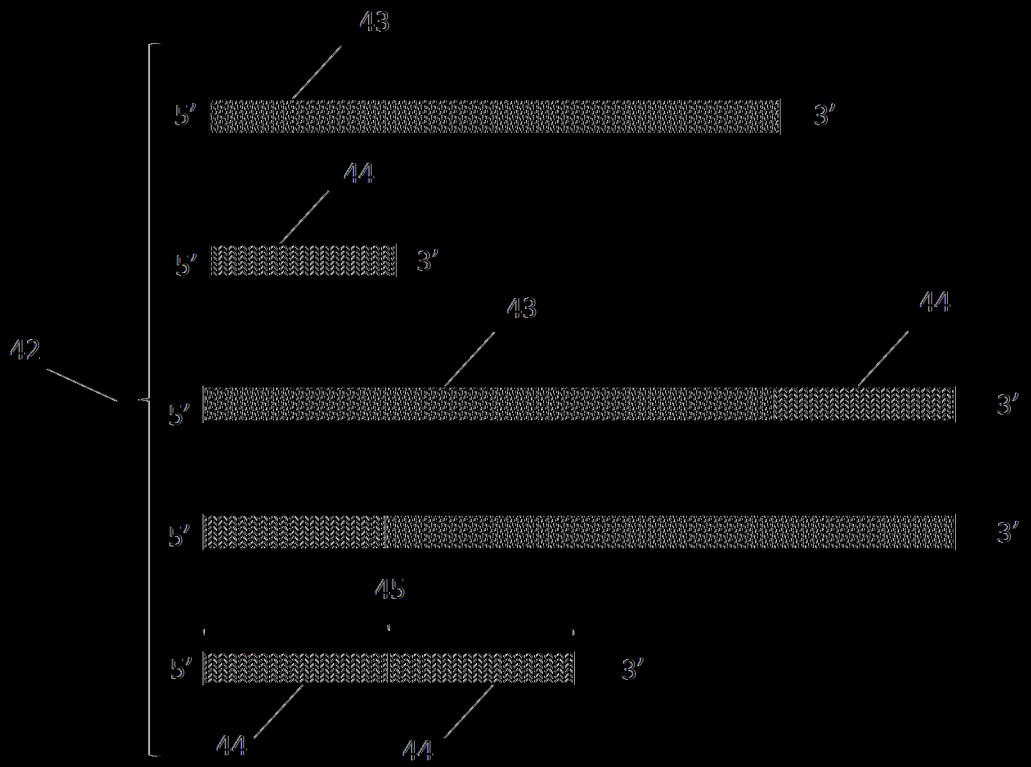


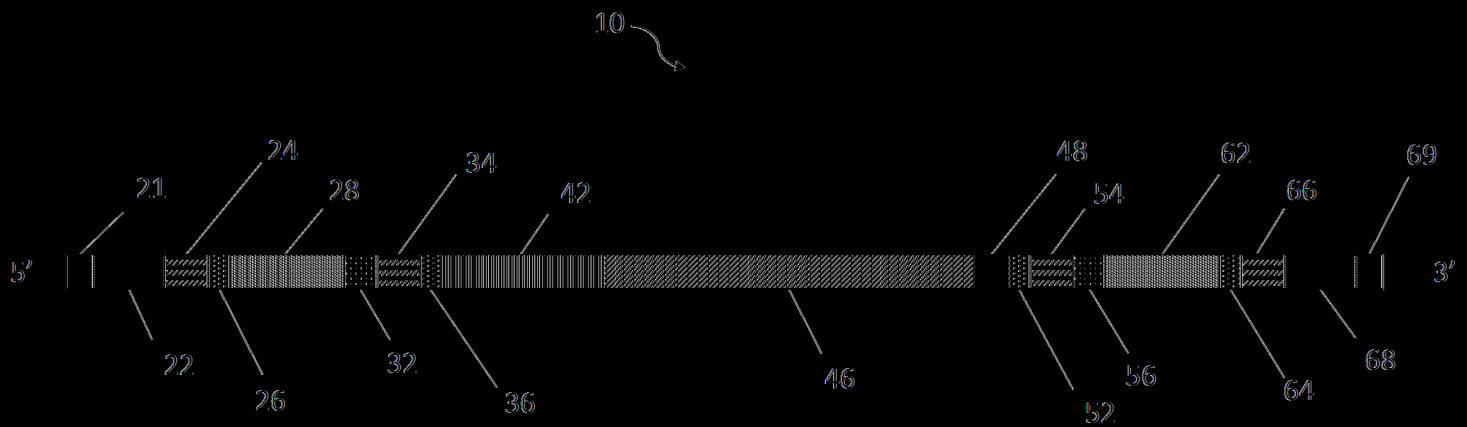
圖59



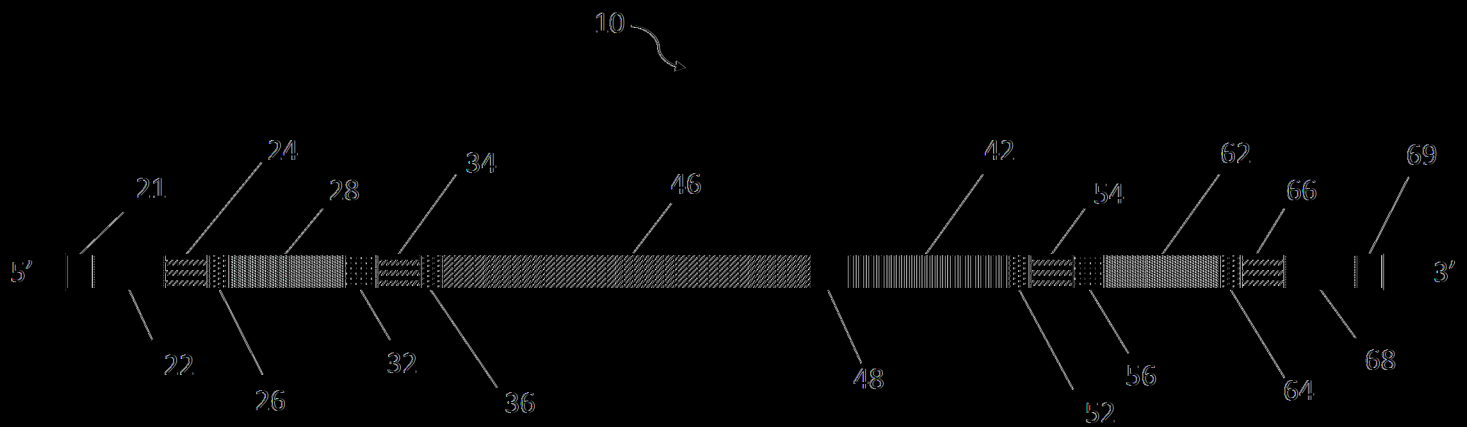
圖(Fig.)60



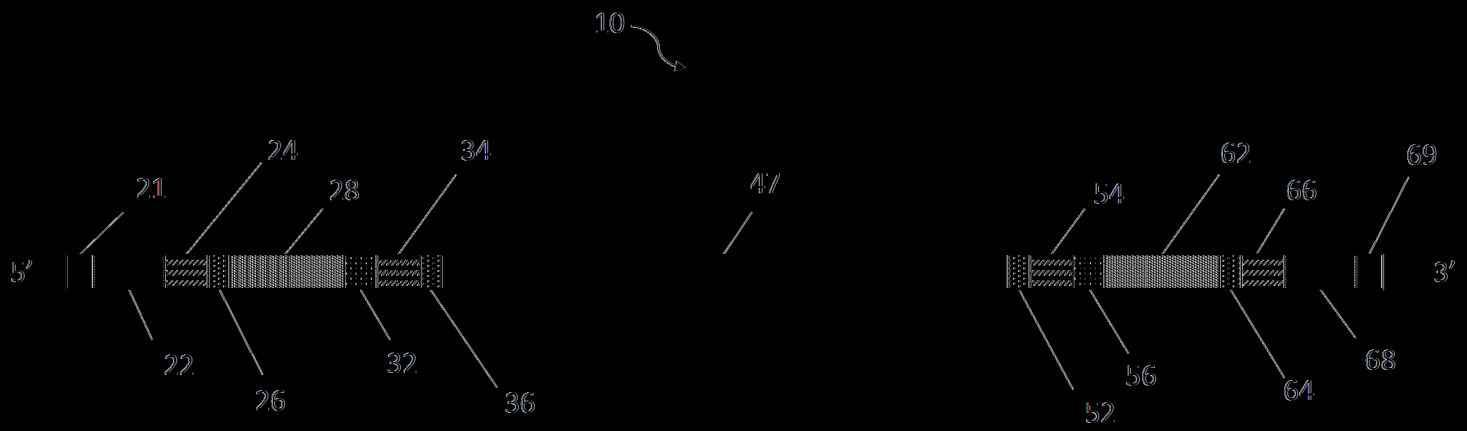
(圖61)



(圖62)



(無)63)



(圖64)

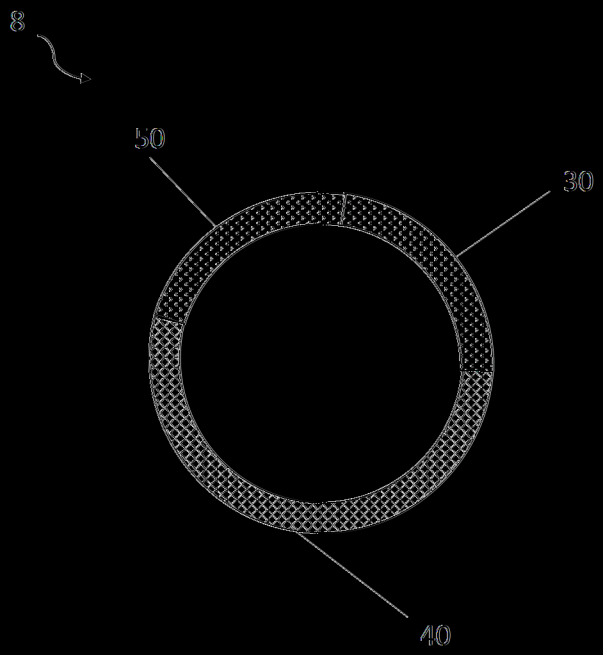
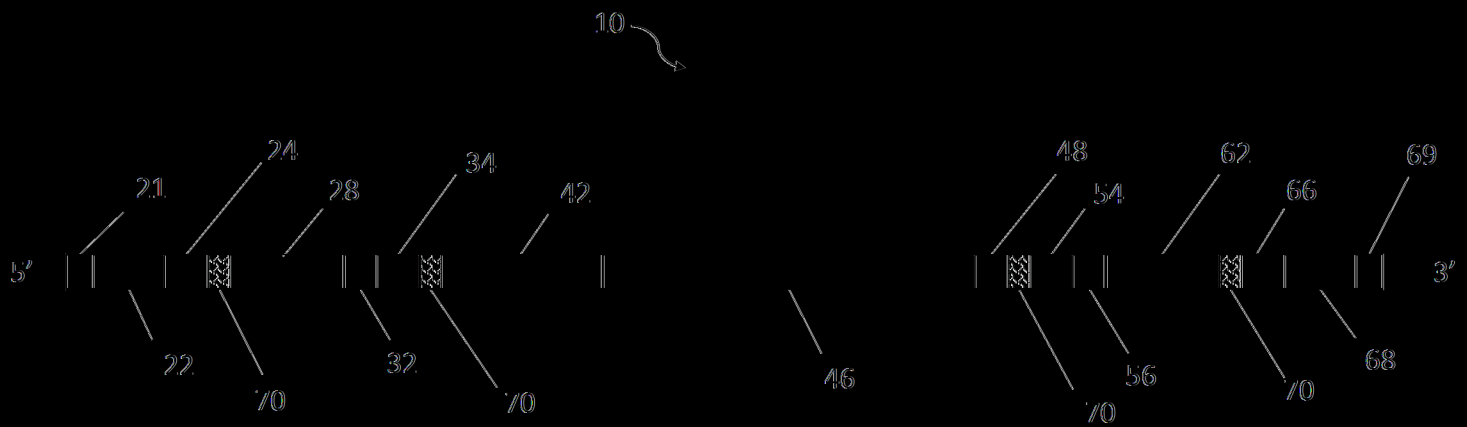
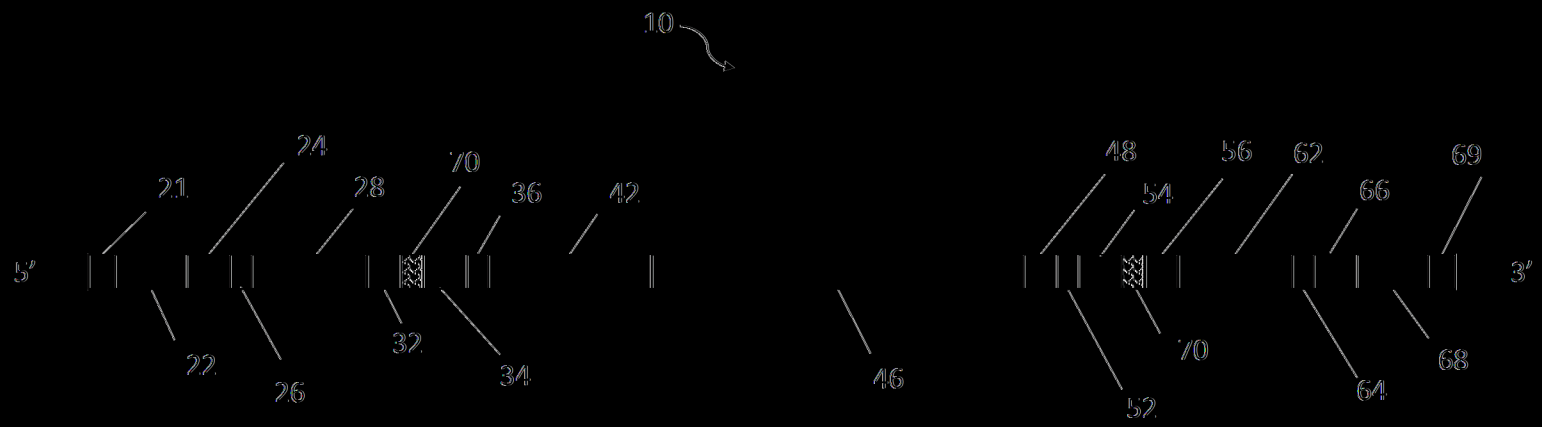


圖65



(圖66A)



(圖66B)

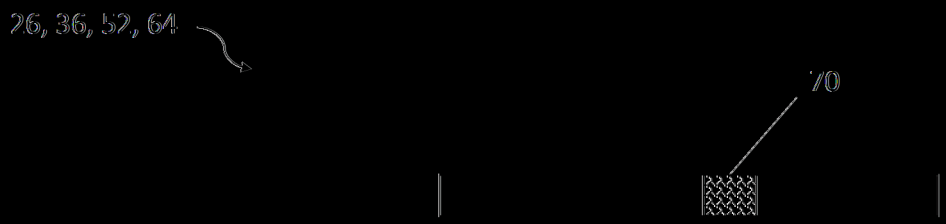
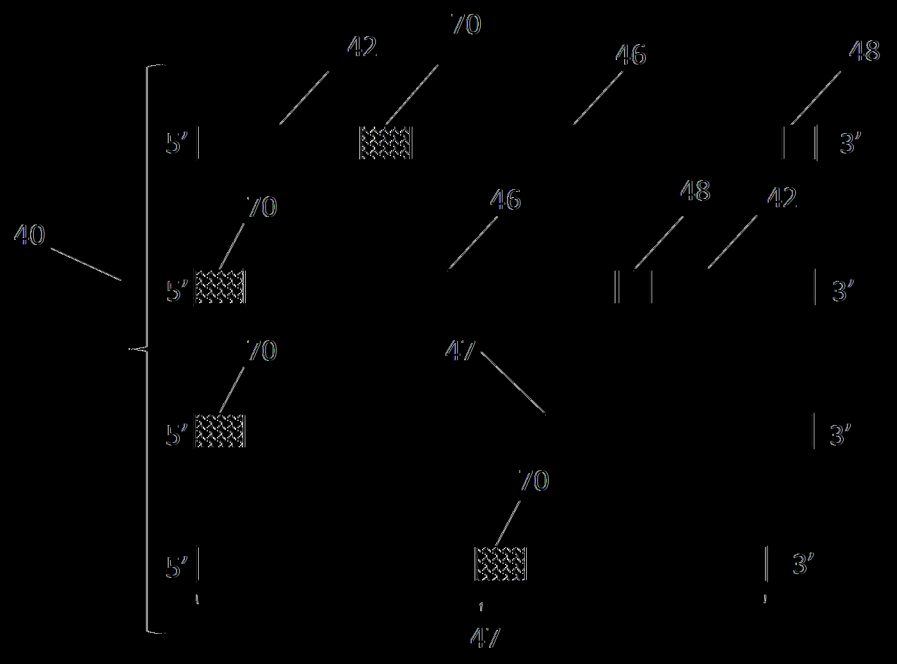
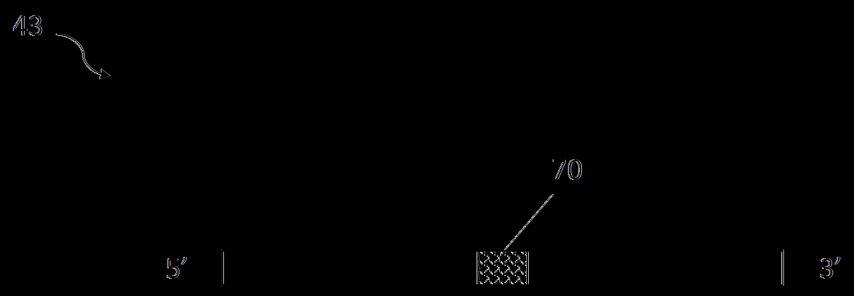


圖66C



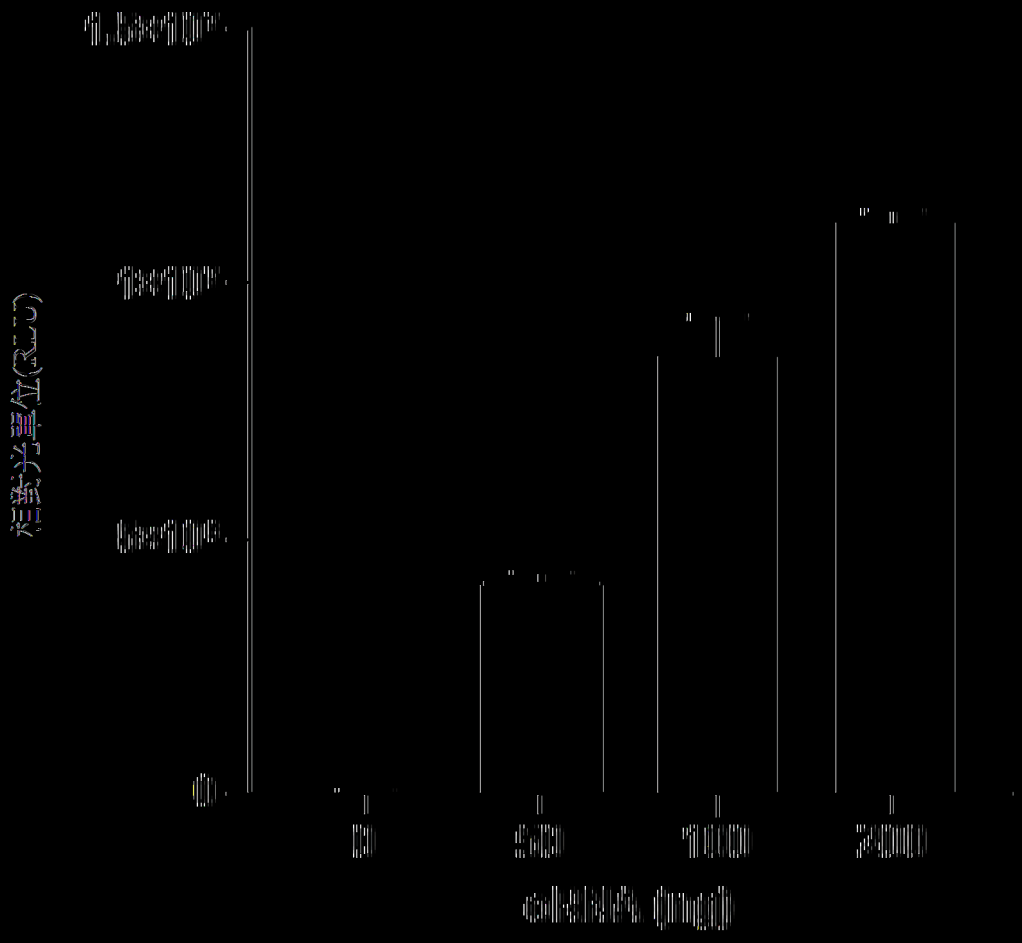
(圖6D)



47

|(圖66E)|

人類



（図6A）

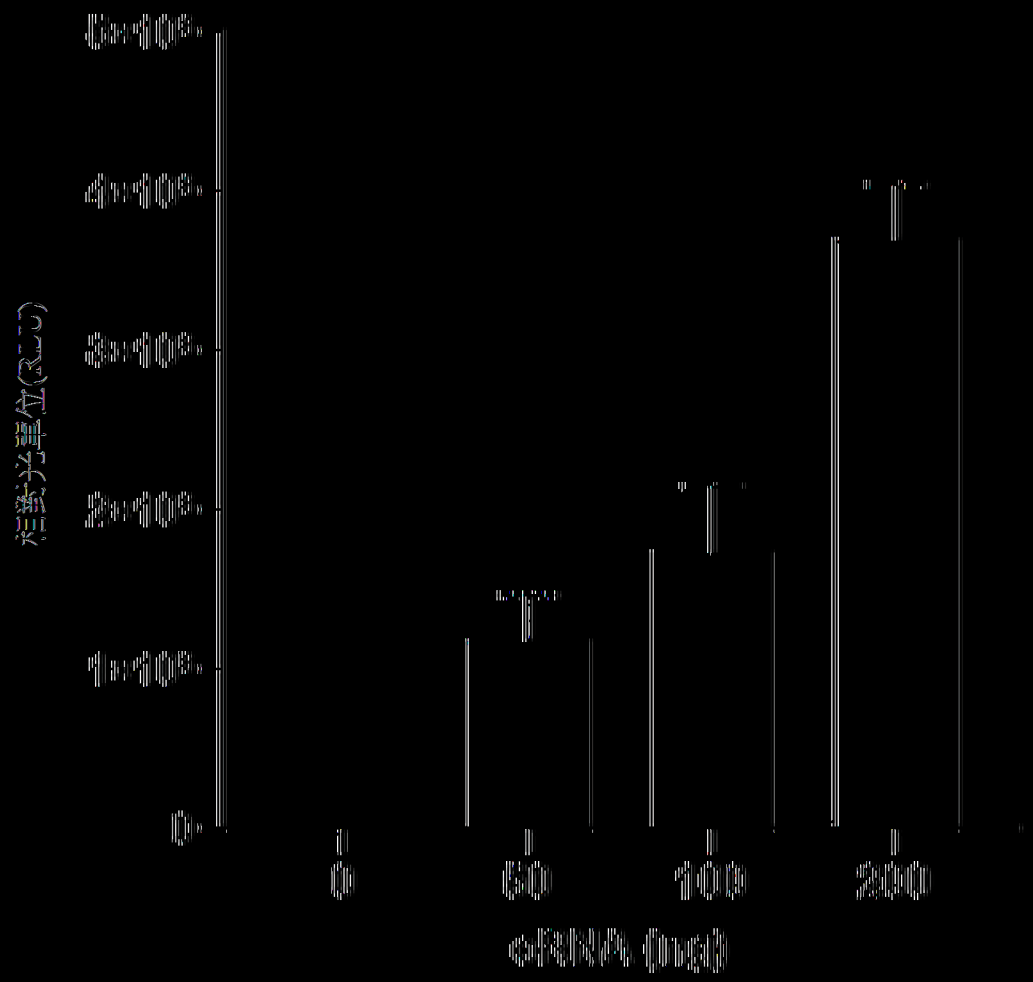
小鼠

腫瘤體積(mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
50
100
200
days after tumor implantation
(Day 67)

イ 螢猴

|(時6/C)|

供試1

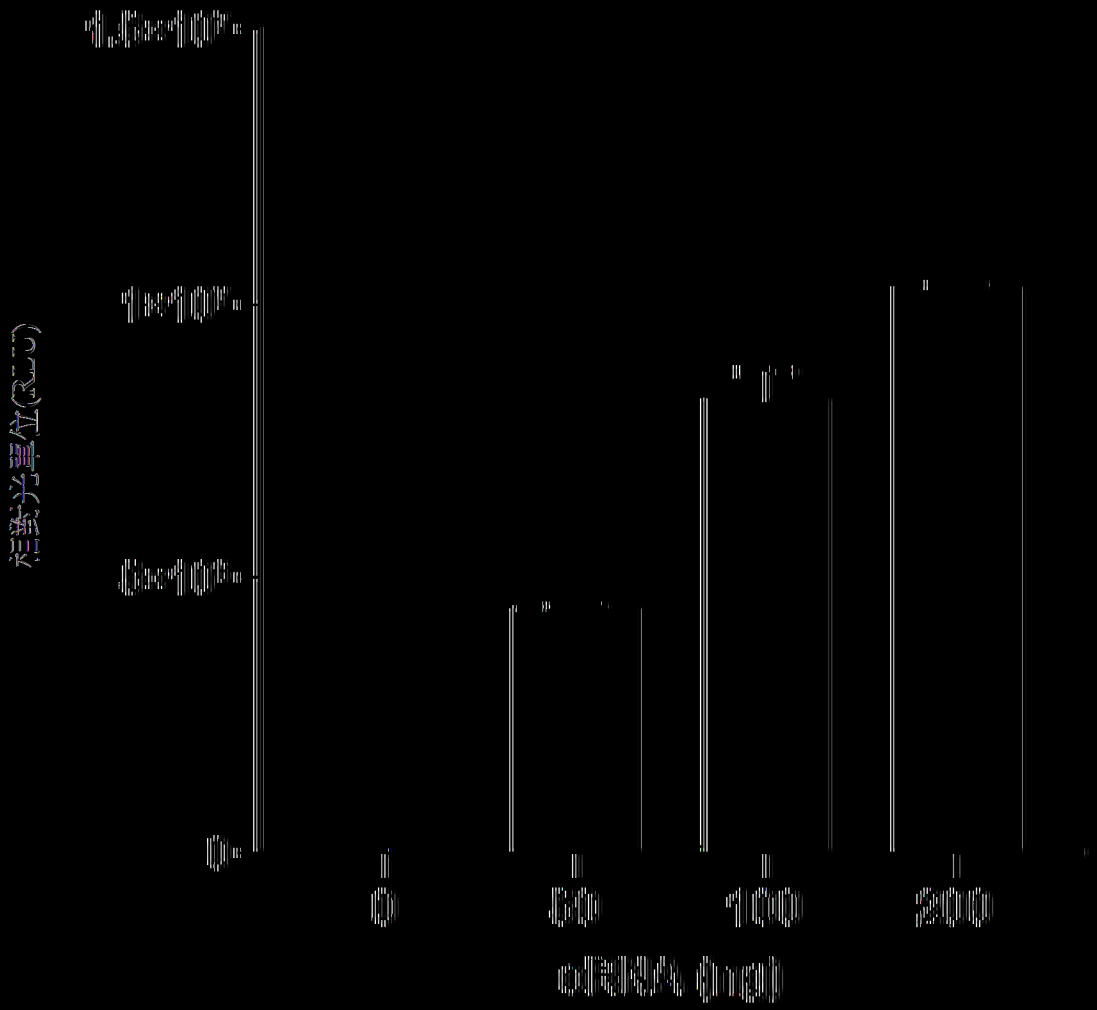


|(Fig68A)|

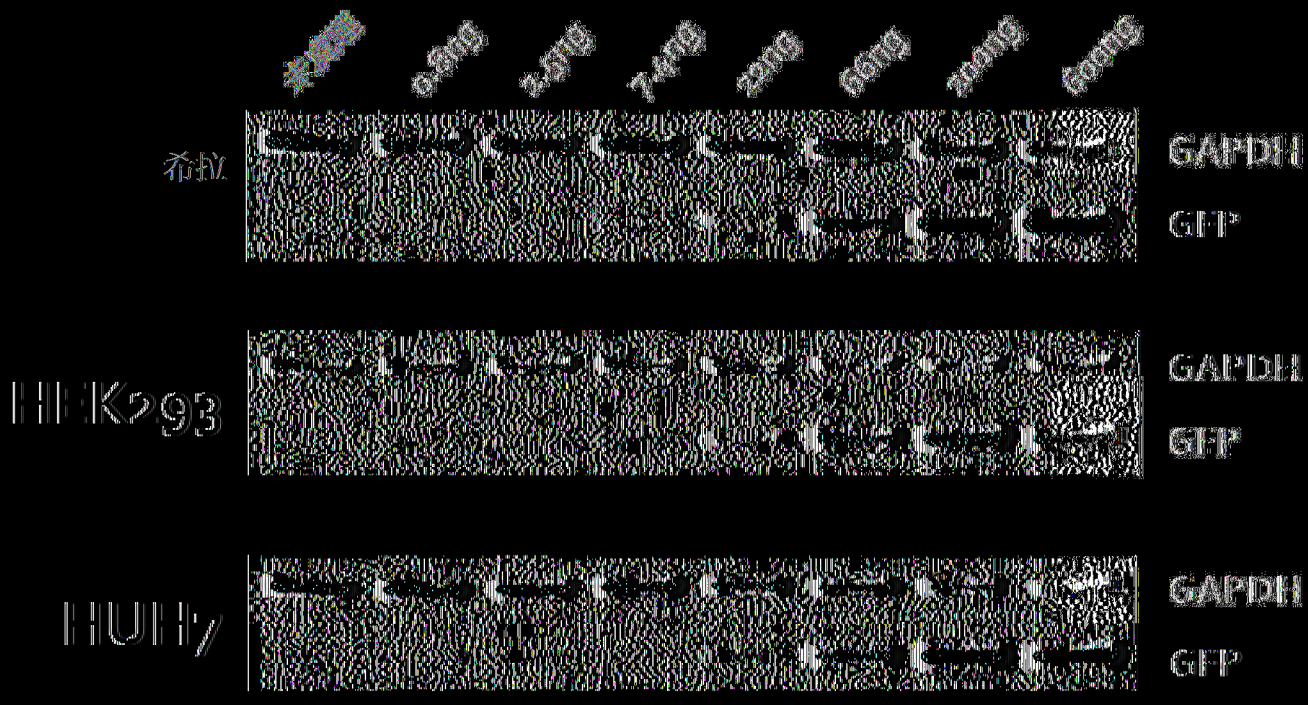
供試2

(時間(分))

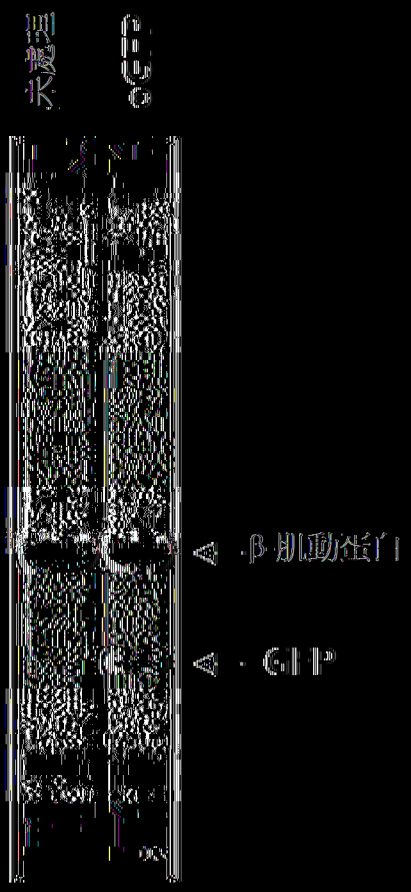
供試3



(n=3, 68℃)


未處理
0.5mM
1.5mM
2.5mM
5mM
7.5mM
10mM
12.5mM
15mM
希拉
HEK293
HUH7
GAPDH
GFP
GAPDH
GFP
GAPDH
GFP

（圖69）



(圖7/0)

小鼠C_2C_{12}細胞

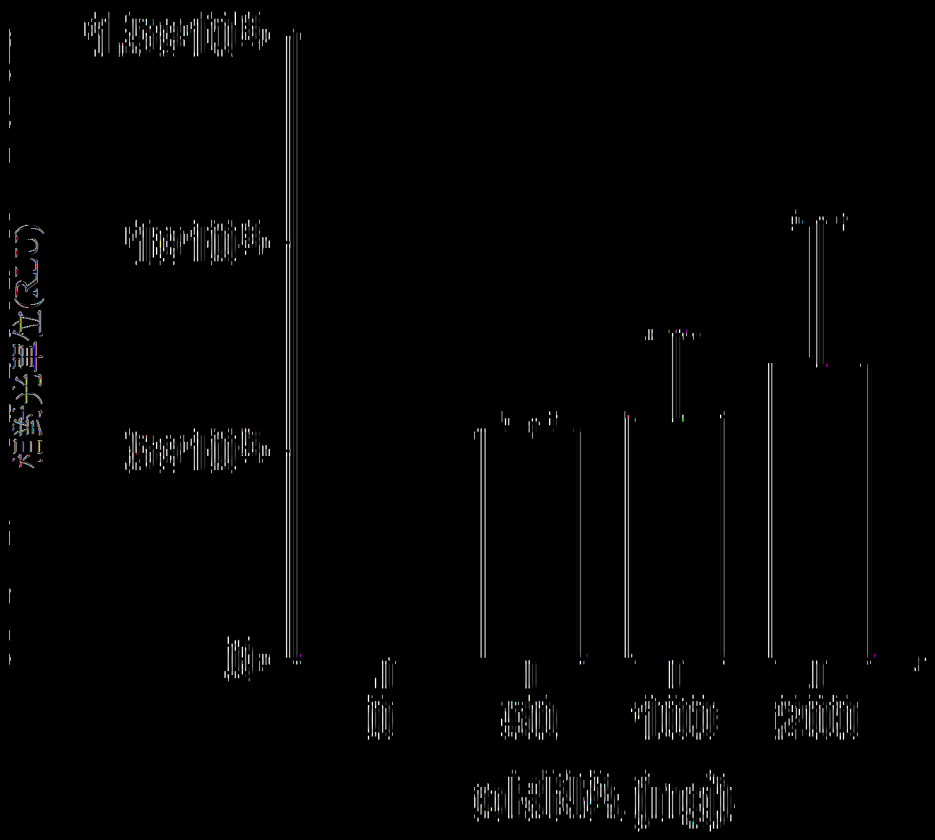
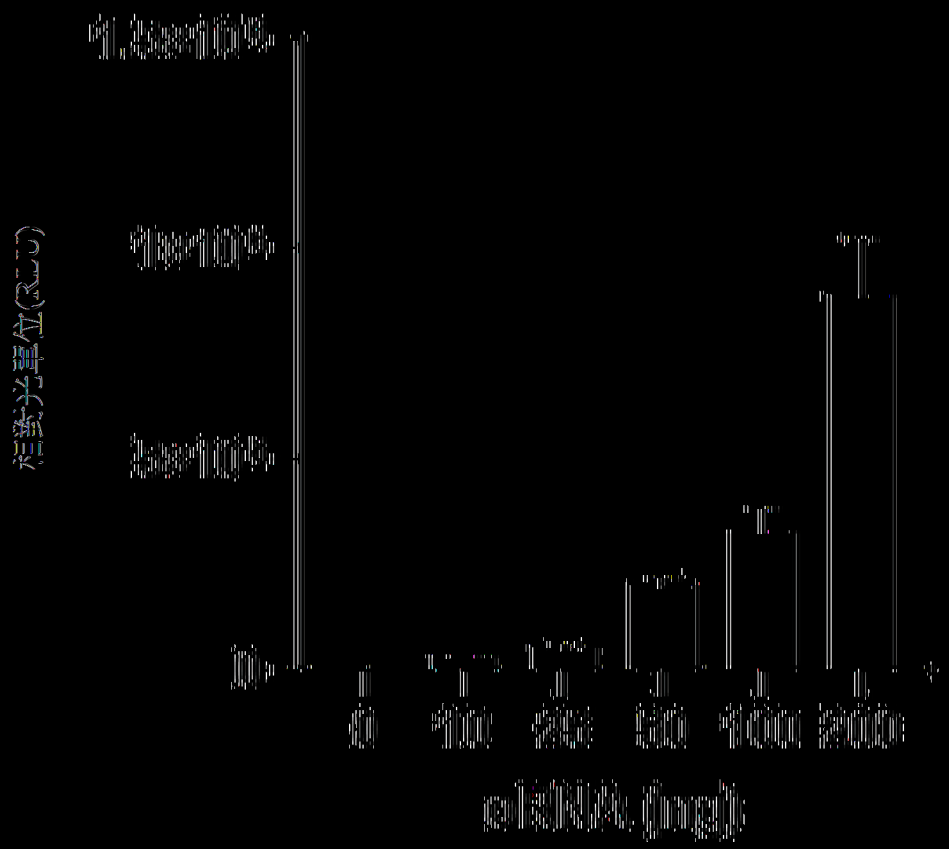


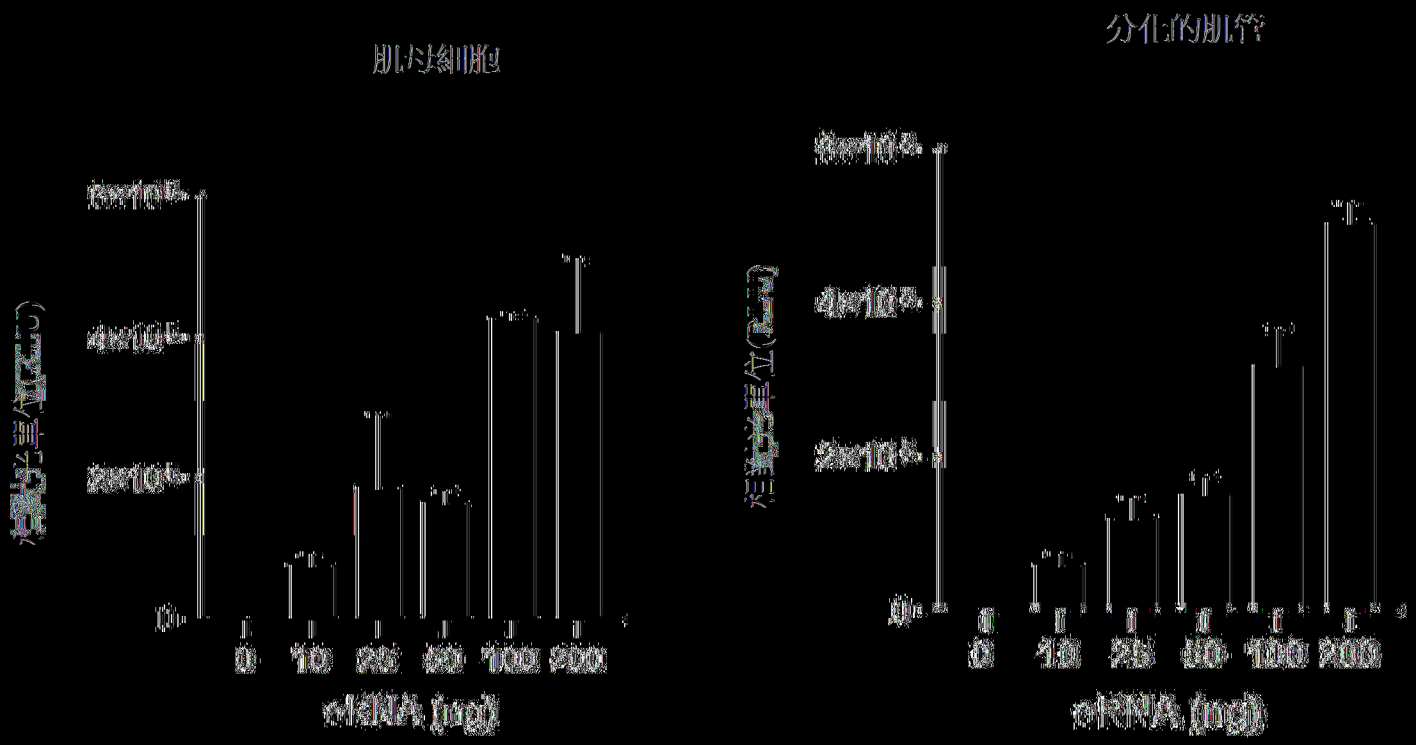
圖1A

人類近代肌肉細胞



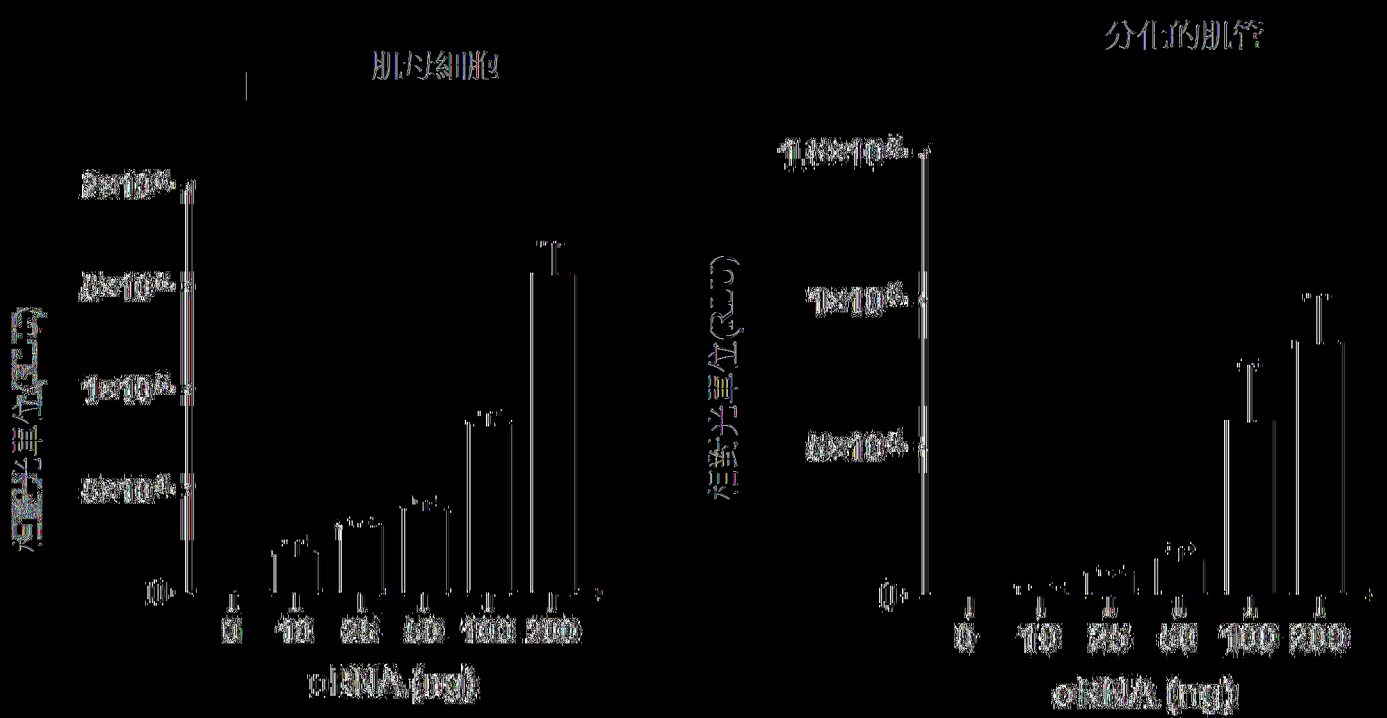
[圖/1B]

人類供體1



|(圖7A)|

人類供試2


肌肉細胞
分化的肌管
定量光子計數(RLU)
0
5×10⁴
1×10⁵
1.5×10⁵
2×10⁵
0
10
25
50
100
200
oRNA (nM)

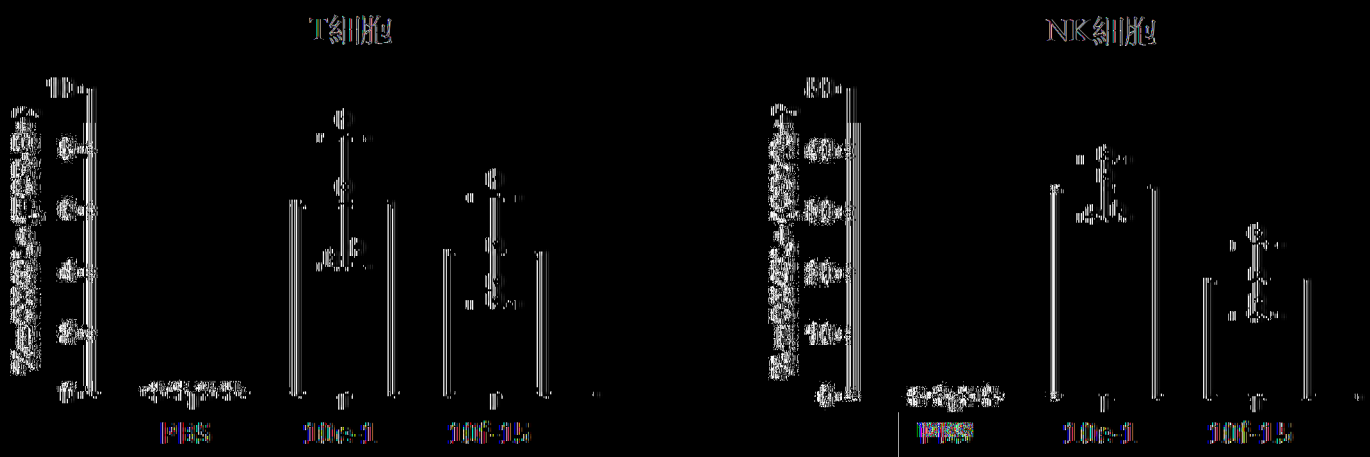
(圖7/28)

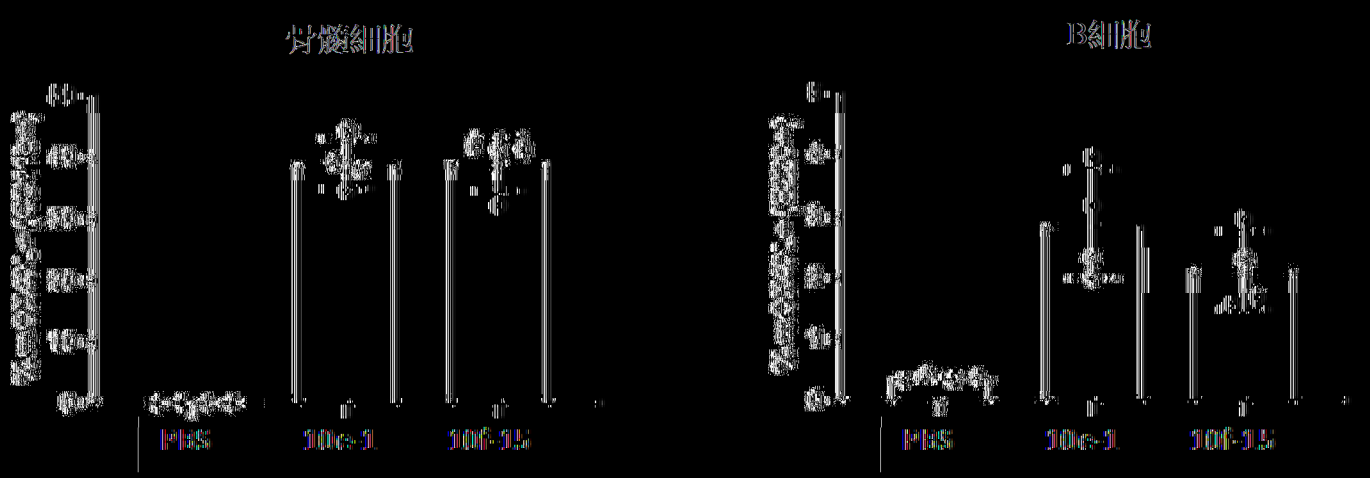
圖 73A

co：培養了最佳化

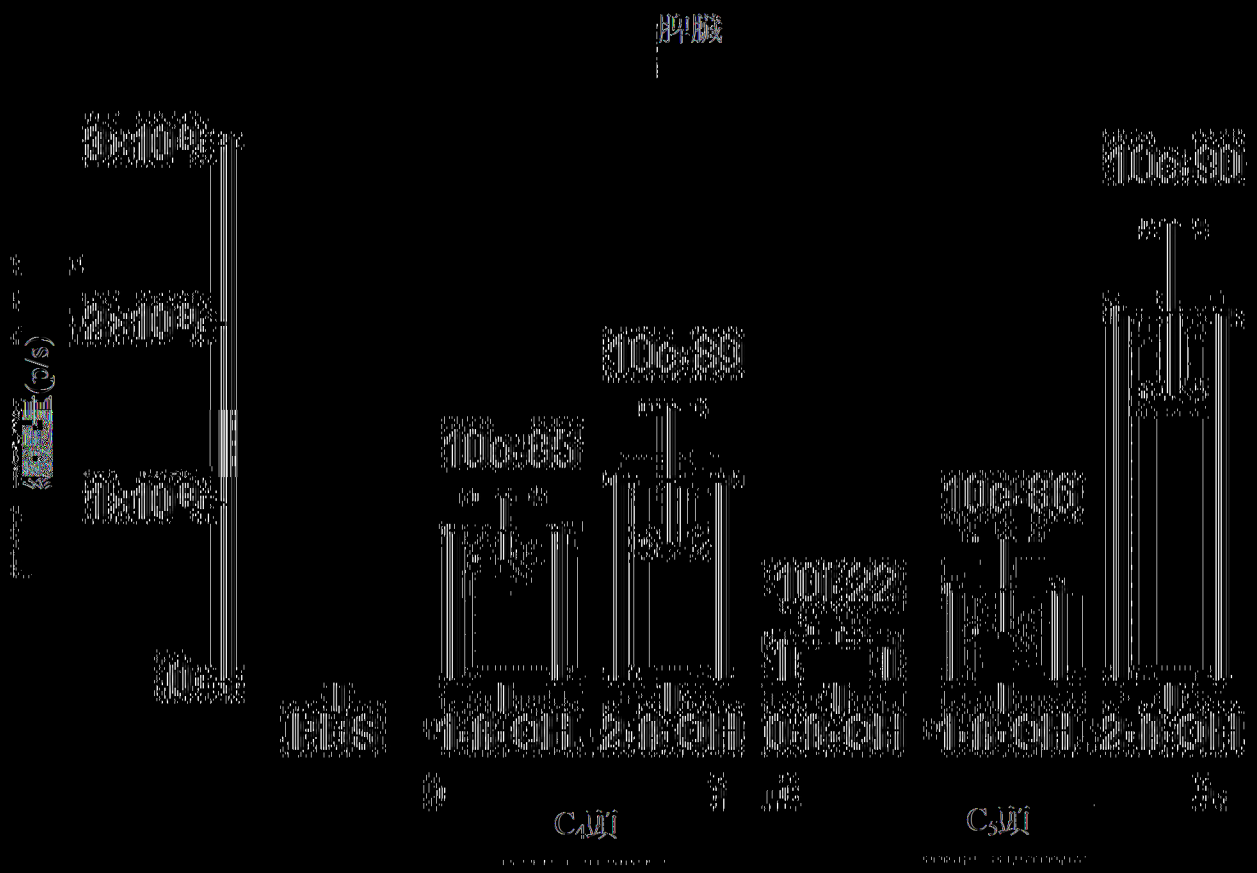
WT：野生型

|(圖7B)|


T細胞
NK細胞
PBS
10e-1
10e-15
PBS
10e-1
10e-15

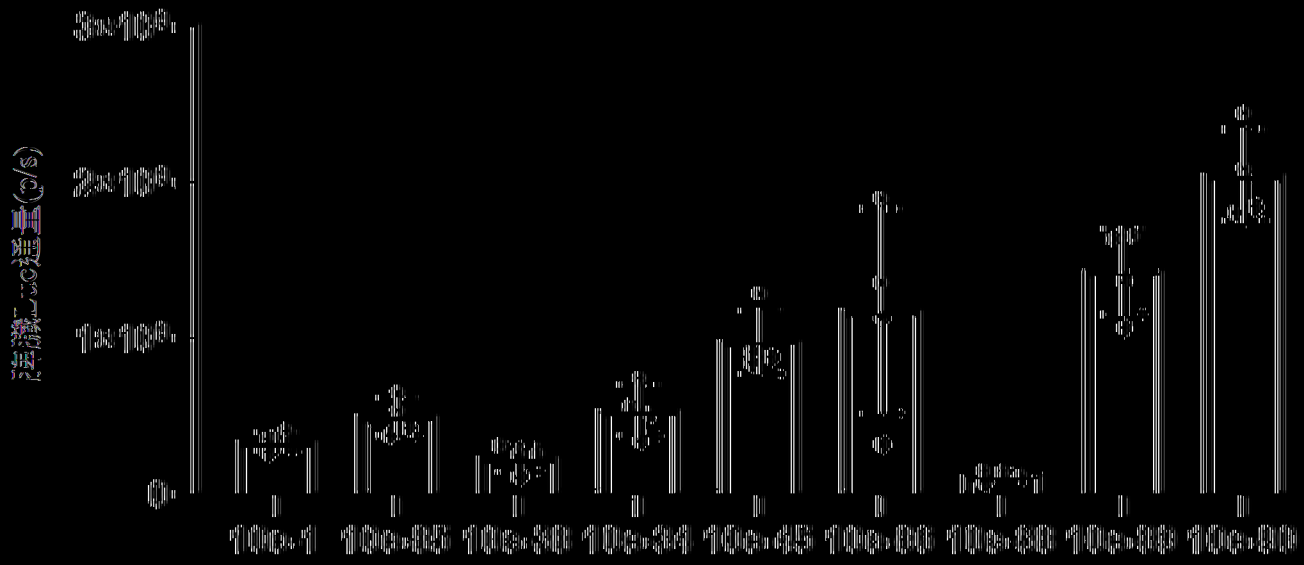

骨髓細胞
B細胞
PBS
10e-1
10e-15
PBS
10e-1
10e-15

(圖4)



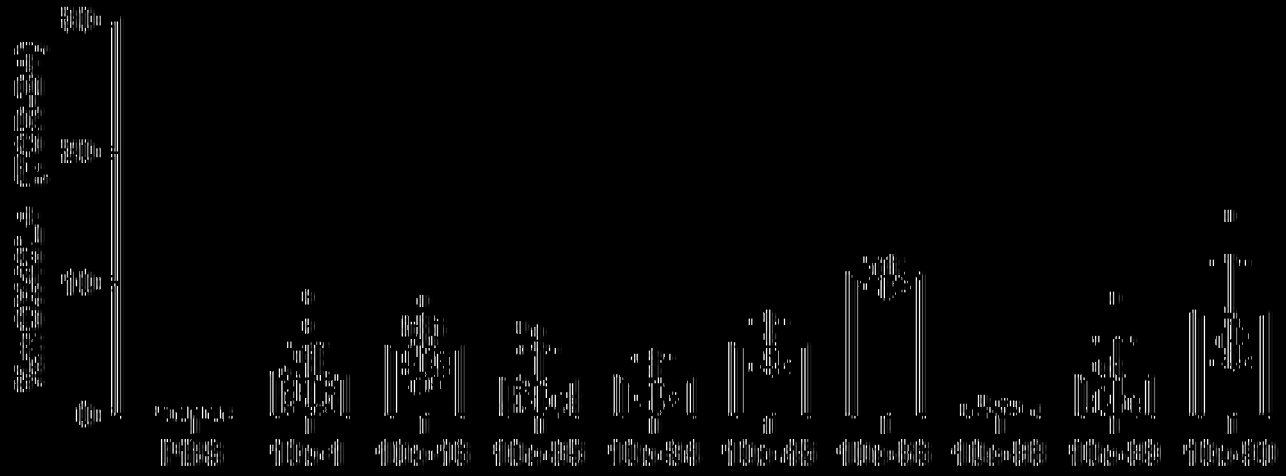
|(圖7/5)|

脾臟全組織表現


時間序列-數據
3x10⁸
2x10⁸
1x10⁸
0
10:01 10:15 10:30 10:34 10:45 10:00 10:30 10:00 10:00

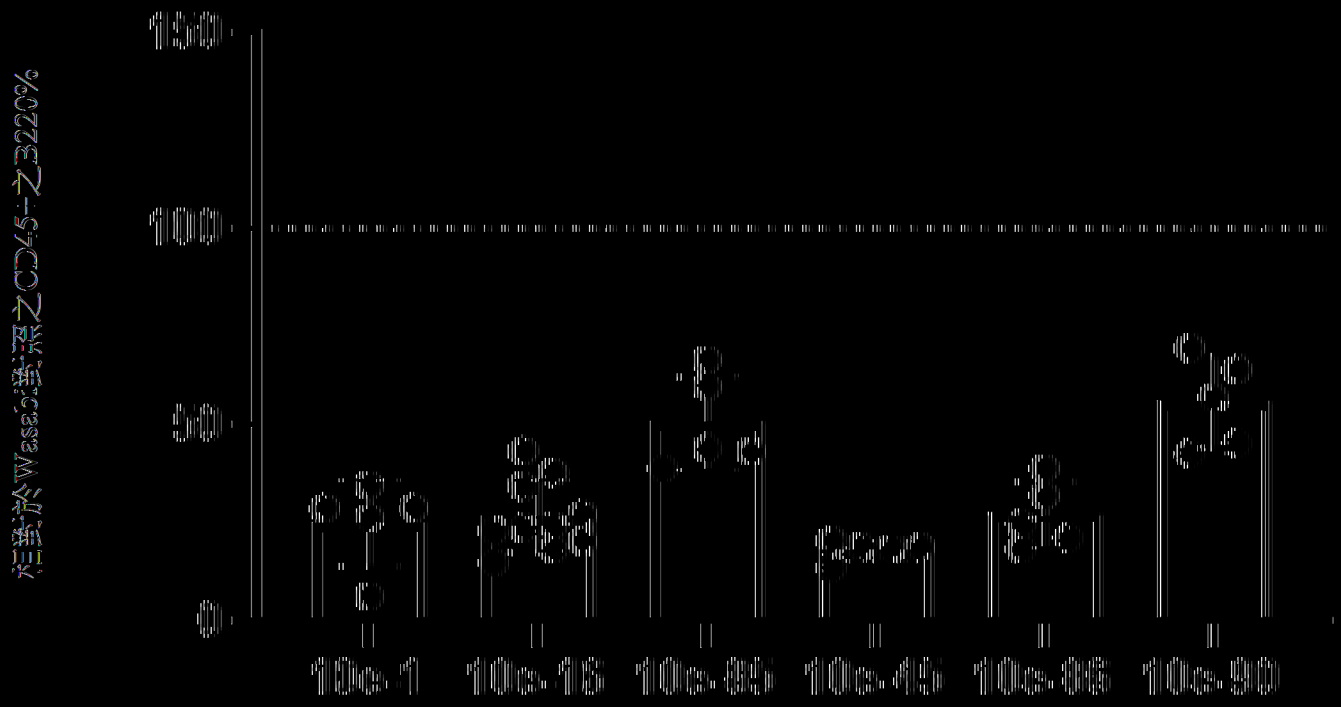
|(|圖7/6)|

胰臟T細胞表現



|(‘’)|

個体的血液B細胞發育不全資料



|(圖/8)|

EBVCA抗体
EBNA抗体
Zta抗体
時間
EBV感染
EBV増殖
EBV関連腫瘍
EBV関連疾患
EBV感染細胞
EBV増殖細胞
EBV関連腫瘍細胞
EBV関連疾患細胞