I874983

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I874983 B**

(45)公告日： 中華民國 114 (2025) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：112116552 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 05 月 04 日

(51)Int. Cl.： ***C12Q1/68*** ***(2018.01)*** ***C12Q1/6844*** ***(2018.01)***

(30)優先權：2022/05/05 美國 63/338,878

2023/05/01 美國 63/499,276

(71)申請人：美商輝瑞大藥廠 (美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：艾爾 羅席 艾默 AL-LOZI, AMER (US)；伯哈塔恰亞 凱夏伯 BHATTACHARYA, KESHAB (US)；董 國剛 DONG, GUOGANG (US)；高許 史瓦普納迪普 GHOSH, SWAPNADIP (US)；傑亨 胡哥 JHUN, HUGO (US)；摩蘭 賈斯汀 凱斯 MORAN, JUSTIN KEITH (US)；帕特爾 優爾米 安基特 PATEL, URMI ANKIT (US)；夸格里亞 莫塔 珍妮佛 茱莉亞 QUAGLIA MOTTA, JENNIFER JULIA (US)；魯索 喬瑟夫 RUSSO, JOSEPH (US)；夏培拉 塔騰達 SHOPERA, TATENDA (ZW)；席姆斯 凱里 林恩 SIMMS, CARRIE LEANNE (CA)；席納南 迪隆 賈洛德 SINANAN, DILLON JAROD (US)；凡德 輔德 麥可 卡西 VANDE VOORDE, MICHAEL CASEY (US)；威里安姆森 珍納 凱瑟琳 WILLIAMSON, JENNA KATHRYN (US)；伍德 尼可 立 WOOD, NICHOLE LEA (US)；鄭曉璐 ZHENG, XIAOLU (CN)；艾倫 馬汀 約翰 ALLEN, MARTIN JOHN (US)；艾立森 丹尼爾 瓦德 ALLISON, DANIEL WARD (US)；艾爾莫 卡里 伊莉莎白 ARMOUR, KALEY ELIZABETH (US)；布林 雪爾比 杭茲琴斯 BREEN, SHELBY HUTCHINS (US)；金善中 KIM, SUN JOONG (KR)；拉麥許 艾斯雷亞 蘇布雷曼尼安 RAMESH, ATHREYA SUBRAMANIAN (US)；里維斯 艾琳 寇特妮 REEVES, ERIN COURTNEY (US)；史密斯 卡蘭納 卡洛琳 SMITH, KARENNA CAROLINE (US)；史瓦葉思 麥可 傑 SWYERS, MICHAEL JAY (US)

(74)代理人：陳長文；蔣大中；朱淑尹

(56)參考文獻：

WO 2017/009376A1

期刊 Frugie. M., et al., "Synthetic polyamines stimulate in vitro transcription by T7 RNA polymerase", Nucleic acids research, Vol. 22(14), July 1994, page 2784-2790.

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：39 共 170 頁

(54)名稱

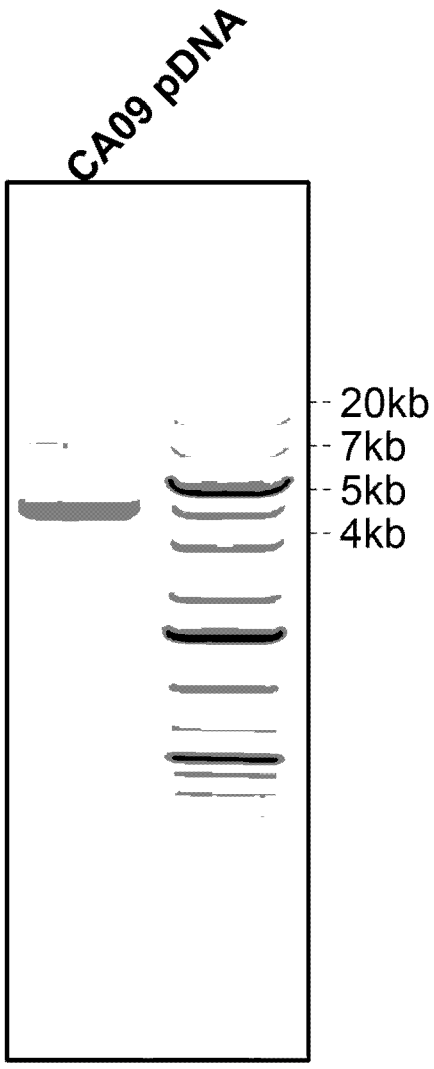
製備核酸之方法

(57)摘要

本發明描述用於在活體外轉錄反應中產生 RNA 分子之方法。本發明亦描述使用活體外轉錄反應系統自環形雙股 DNA 模板產生 mRNA 分子之方法，其中該活體外轉錄反應系統缺乏多元胺。本發明亦描述包含酶促 5'加帽及寡聚(dT)純化之活體外轉錄反應系統。

Described are methods for producing RNA molecules in an in vitrotranscription reaction. Also described are methods for producing an mRNA molecule from a circular double-stranded DNA template using an in vitrotranscription reaction system wherein the in vitrotranscription reaction system lacks a polyamine. Also described are in vitrotranscription reaction systems comprising enzymatic 5´ capping and oligo(dT) purification.

指定代表圖：



【圖1】

公告本

I874983

【發明摘要】

【中文發明名稱】

製備核酸之方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR PRODUCING NUCLEIC ACIDS

【中文】

本發明描述用於在活體外轉錄反應中產生RNA分子之方法。本發明亦描述使用活體外轉錄反應系統自環形雙股DNA模板產生mRNA分子之方法，其中該活體外轉錄反應系統缺乏多元胺。本發明亦描述包含酶促5'加帽及寡聚(dT)純化之活體外轉錄反應系統。

【英文】

Described are methods for producing RNA molecules in an *in vitro* transcription reaction. Also described are methods for producing an mRNA molecule from a circular double-stranded DNA template using an *in vitro* transcription reaction system wherein the *in vitro* transcription reaction system lacks a polyamine. Also described are *in vitro* transcription reaction systems comprising enzymatic 5′ capping and oligo(dT) purification.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

製備核酸之方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR PRODUCING NUCLEIC ACIDS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種用於合成核酸分子之改良方法，特定言之無細胞酶促合成DNA及經由活體外轉錄(IVT)合成RNA分子。

【先前技術】

【0002】 此項技術中需要在不使用質體及細菌醱酵作用(例如，無細胞產生DNA分子)之情況下的改良及高效活體外核酸擴增方法，特定言之用於IVT之DNA分子及模板。此類改良方法可例如促進在流行性或季節性病毒變化期間解決病毒株變化之更快反應時間，因為由細菌醱酵作用產生之質體產生DNA模板之習知多步驟方法可為耗時的。

【發明內容】

【0003】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：環狀雙股DNA(dsDNA)模板、引子、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶；(b)在約30℃與45℃之間的溫度下培育該組合物約三小時與二十四小時之間的時段以獲得經培育之組合物；及(c)使該經培育之組合物與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中該活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液、鎂離子及還

原劑，且其中該活體外轉錄反應系統缺乏多元胺。在一些實施例中，方法進一步包含在使經培育之組合物與活體外轉錄反應系統接觸之前使經培育之組合物與限制性核酸內切酶接觸以獲得經消化之組合物。在一些實施例中，使經培育之組合物與限制性核酸內切酶接觸在與培育組合物相同之反應容器中進行。在一些實施例中，使經培育之組合物與活體外轉錄反應接觸在與培育組合物相同之反應容器中進行。在一些實施例中，本文揭示的產生mRNA分子之方法在培育組合物之前不包含熱變性反應。在一些實施例中，本文揭示的產生mRNA分子之方法在進行活體外轉錄反應之前不包含加熱失活反應。在一些實施例中，本文揭示的產生mRNA分子之方法進一步包含：(d)使用選自由寡聚(dT)磁珠、樹脂及單石組成之群的捕獲方法捕獲mRNA分子。

【0004】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：環狀雙股DNA (dsDNA)模板、引子、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶；(b)在約30℃與45℃之間的溫度下培育該組合物約三小時與八小時之間的時段以獲得經培育之組合物；及(c)使該經培育之組合物與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中該活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液、鎂離子及還原劑，且其中該活體外轉錄反應系統缺乏多元胺。在一些實施例中，時段在約十八小時與二十四小時之間。在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：環狀雙股DNA (dsDNA)模板、引子、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶；(b)在約30℃

與45℃之間的溫度下培育該組合物約三小時與二十四小時之間的時段以獲得經培育之組合物；及(c)使該經培育之組合物與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液、鎂離子及還原劑，其中活體外轉錄反應系統缺乏多元胺，且其中DNA聚合酶為phi29 DNA聚合酶。

【0005】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：環狀雙股DNA (dsDNA)模板、引子、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶；(b)在約30℃與45℃之間的溫度下培育該組合物約三小時與二十四小時之間的時段以獲得經培育之組合物；及(c)使該經培育之組合物與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液、鎂離子及還原劑，其中活體外轉錄反應系統缺乏多元胺，且其中該接觸進一步包含為活體外轉錄反應系統補充核糖核苷酸。在一些實施例中，補充包含核糖核苷酸之連續進料。在一些實施例中，補充包含核糖核苷酸之半連續進料。在一些實施例中，補充包含核糖核苷酸之推注進料。

【0006】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：環狀雙股DNA (dsDNA)模板、引子、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶；(b)在約30℃與45℃之間的溫度下培育該組合物約三小時與二十四小時之間的時段以獲得經培育之組合

物；及(c)使該經培育之組合物與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液、鎂離子及還原劑，其中活體外轉錄反應系統缺乏多元胺，且其中該接觸進一步包含為活體外轉錄反應系統補充鎂離子。在一些實施例中，補充係選自由鎂離子之連續進料、半連續進料及推注進料組成之群。在一些實施例中，接觸進一步包含攪拌。在一些實施例中，攪拌係選自由以下組成之群：在約1.3與約71.7 W/m^3之間的功率/體積、在約1.3與約12.1秒之間的混合時間及在約0.1與約0.4 m/s之間的葉輪外緣速度。

【0007】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：環狀雙股DNA (dsDNA)模板、引子、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶；(b)在約30℃與45℃之間的溫度下培育該組合物約三小時與二十四小時之間的時段以獲得經培育之組合物；及(c)使經培育之組合物與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液、鎂離子及還原劑，其中活體外轉錄反應系統缺乏多元胺，且其中活體外轉錄反應系統進一步包含焦磷酸酶。在一些實施例中，活體外轉錄反應系統進一步包含核糖核酸酶抑制劑。在一些實施例中，活體外轉錄反應系統進一步包含醋酸根離子。在一些實施例中，緩衝液係選自由TRIS及HEPES組成之群。在一些實施例中，核糖核苷酸以約16與約50 mM之間的量存在。在一些實施

例中，RNA聚合酶以約4000與約12000 U/mL之間的量存在。在一些實施例中，焦磷酸酶以約0.25與約8.0 U/mL之間的量存在。在一些實施例中，緩衝液包含在約7.5與約8.5之間的起始pH。在一些實施例中，鎂離子以約12.8與約110 mM之間的量存在。在一些實施例中，鎂離子及核糖核苷酸以約0.8至約2.2 mM Mg/mM NTP之鎂:核糖核苷酸比率存在。在一些實施例中，緩衝液不含有二硫蘇糖醇(DTT)。

【0008】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：複數個直鏈雙股DNA (dsDNA)片段、5'核酸外切酶、DNA聚合酶及DNA連接酶；(b)在約45℃與55℃之間的溫度下培育該組合物以獲得環狀dsDNA模板；及(c)使該環狀dsDNA模板與包含引子或引子酶、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶之滾環擴增(RCA)反應混合物接觸以獲得經擴增之模板；(d)使該經擴增之模板與限制酶接觸以獲得經消化之模板；及(e)使該經消化之模板與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液及鎂離子，且其中步驟(a)至(e)在單一反應容器中依序進行。在一些實施例中，環狀dsDNA模板以至少0.5 ng/mL之RCA反應混合物的濃度存在。在一些實施例中，複數個直鏈dsDNA片段包含所關注基因、啟動子序列、5' UTR、3' UTR及聚腺苷酸序列(poly A sequence)。在一些實施例中，所關注基因編碼在1.0 kb與12.0 kb之間的RNA分子。在一些實施例中，所關注基因缺乏大於5個鹼基對的均聚物序列。在一些實施例中，mRNA分子在活體外轉錄之後加帽。在一些實施例中，mRNA分子

藉由牛痘病毒加帽酶進行酶促加帽。在一些實施例中，mRNA分子在藉由牛痘病毒加帽酶進行加帽之前在30℃或更低之溫度下培育60分鐘或更短時間。

【0009】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含：(a)獲得包含以下之組合物：複數個直鏈雙股DNA (dsDNA)片段、5'核酸外切酶、DNA聚合酶及DNA連接酶；(b)在約45℃與55℃之間的溫度下培育該組合物以獲得環狀dsDNA模板；及(c)使該環狀dsDNA模板與包含引子或引子酶、三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)及DNA聚合酶之滾環擴增(RCA)反應混合物接觸以獲得經擴增之模板；(d)使該經擴增之模板與限制酶接觸以獲得經消化之模板；及(e)使該經消化之模板與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液及鎂離子，其中步驟(a)至(e)在單一反應容器中依序進行，且其中使該經消化之模板與活體外轉錄反應系統接觸進一步包含為活體外轉錄反應系統補充核糖核苷酸，其中該補充包含個別核糖核苷酸之濃度自初始量增加至最終量。在一些實施例中，補充包含選自由以下組成之群的方法：核糖核苷酸之連續進料、核糖核苷酸之半連續進料及核糖核苷酸之推注進料。在一些實施例中，初始量在1 mM與11 mM之間且最終量在11 mM與26 mM之間。在一些實施例中，ATP之初始量為約11 mM，CTP之初始量為約9 mM，GTP之初始量為約1 mM，且pUTP之初始量為約4 mM。在一些實施例中，ATP之最終量為約24 mM，CTP之最終量為約22 mM，GTP之最終量為約16 mM，且pUTP之最終量為約13 mM。在一些實

施例中，補充進一步包含每五分鐘活體外轉錄反應推注進料核糖核苷酸。在一些實施例中，使經消化之模板與活體外轉錄反應系統接觸進一步包含為活體外轉錄反應系統補充鎂離子，其中補充包含使鎂離子之濃度自初始量增加至最終量。在一些實施例中，補充包含選自由以下組成之群的方法：鎂離子之連續進料、鎂離子之半連續進料及鎂離子之推注進料。在一些實施例中，為活體外轉錄反應系統補充鎂離子進一步包含在活體外轉錄反應期間的至少四次鎂離子添加。在一些實施例中，鎂離子之初始量為約25 mM且鎂離子之最終量為約60 mM。在一些實施例中，補充進一步包含對於活體外轉錄反應的前60分鐘，每15分鐘推注進料鎂離子。

【0010】 在一些實施例中，本文揭示的產生mRNA分子之方法包含使用選自由寡聚(dT)磁珠、樹脂及單石組成之群的捕獲方法捕獲藉由活體外轉錄反應產生之mRNA分子。在一些實施例中，方法進一步包含在捕獲mRNA之後洗滌寡聚(dT)磁珠、樹脂或單石。在一些實施例中，洗滌溶液包含選自由以下組成之群的緩衝液：Tris、HEPES、NaPi、KCl、NaCl、脲、精胺酸及EDTA。

【0011】 在一些實施例中，本文揭示產生mRNA分子之方法，其包含使包含DNA模板之組合物與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生mRNA分子，其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，其中活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液及鎂離子，且其中活體外轉錄反應系統缺乏多元胺及還原劑。

【圖式簡單說明】

【0012】 **圖1**為在RCA反應中用作模板之質體dsDNA之瓊脂糖凝膠

圖像。

【0013】 **圖2**為在RCA反應之前不存在及存在熱變性的非線性化RCA DNA之瓊脂糖凝膠影像。

【0014】 **圖3**為在包括及不包括多個純化步驟下之RCA DNA之瓊脂糖凝膠影像。泳道1為未消化、未純化的RCA DNA；泳道2為未消化且純化的RCA DNA；泳道3為在線性化之前或之後不經純化即用SapI線性化的RCA DNA (在有序的單容器一鍋反應中使用)；泳道4為在線性化之前不經純化即用SapI線性化但在線性化之後純化的RCA DNA；泳道5為在用SapI (已添加緩衝液)線性化之前純化的RCA DNA ；泳道6為在用SapI (已添加緩衝液)線性化之前純化且亦在線性化之後純化的RCA DNA；泳道7為線性化後經純化的經SapI消化之pDNA；泳道8為未經純化的經SapI消化之pDNA。

【0015】 **圖4**為使用來自先前RCA反應之RCA DNA作為模板的RCA反應之瓊脂糖凝膠影像。展示使用先前反應物作為下一反應之模板(5 ng模板)的3個有序的RCA反應。初始反應(泳道2及3)使用pDNA作為模板。泳道2、4及6為未切割的RCA DNA且泳道3、5及7經SapI限制消化以展現線性化。

【0016】 **圖5**為具有來自IVT反應之RNA產物的瓊脂糖凝膠影像。RNA產量指示於以下各泳道中。泳道1展示有序的單容器『一鍋』RNA；泳道2展示來自線性化後經純化之RCA DNA模板(標準RCA製程)的RNA；泳道3至4使用未經純化及經純化之未消化RCA DNA模板；泳道5展示使用線性化後經純化之pDNA模板的RNA；泳道6展示使用線性化後未經純化之pDNA模板(一鍋pDNA)的RNA。

【0017】 **圖6**展示不經及經寡聚(dT)-選擇之pDNA或RCA DNA模板產生的mRNA之生物分析儀片段分析的RNA完整性。此等完整性與圖5中泳道1、5及6中之樣本相關。pDNA-CA09指示使用質體模板之IVT；pDNA-CA09一鍋指示使用線性化之後未經純化的質體模板的IVT；RCA-CA09一鍋指示在有序的單一容器一鍋反應中之IVT。

【0018】 **圖7**展示Mg及ATP+CTP+GTP+pUTP對RNA濃度之影響。

【0019】 **圖8**展示Mg及ATP+CTP+GTP+pUTP對RNA完整性之影響。

【0020】 **圖9**展示在60 min DNA消化之後的RNA完整性之DNA酶及鈣2-因子相互作用等高線圖。

【0021】 **圖10**展示在45 min DNA消化之後存在雜質殘餘DNA之鎂及錳2-因子相互作用等高線圖。

【0022】 **圖11**展示描繪殘餘蛋白質輸出之電泳圖。

【0023】 **圖12**為顯示增加進料頻率會改良製程效能之條形圖。

【0024】 **圖13**為描繪實驗2之產量、完整性及5'-加帽結果的條形圖。

【0025】 **圖14**為描繪使用質體DNA (pDNA)及合成DNA (USTAT)之AMBR® 15及AMBR® 250-規模推注進料與連續進料之產量、完整性及5'-加帽結果的條形圖。

【0026】 **圖15**為描繪三個製程之組合條形圖及散點圖，其分別顯示對雜質殘餘DNA之存在及產量的攪拌影響。

【0027】 **圖16**為描繪三個製程之組合條形圖及散點圖，其分別顯示對雜質殘餘DNA之存在及產量的功率/體積影響。

【0028】 **圖17**為描繪兩個製程之條形圖，其顯示對雜質殘餘DNA之存在的焦磷酸酶影響。

【0029】 **圖18**為描繪不同模板濃度對分批IVT製程中之產量的影響的條形圖。

【0030】 **圖19**為描繪分批IVT製程中之不同培育溫度及時間的條形圖。

【0031】 **圖20**為描繪在分批IVT製程中對不同濃度之長RNA分子的不同培育時間及模板濃度的條形圖。

【0032】 **圖21**為描繪在分批IVT製程中對長RNA分子之低於37℃之培育溫度培育2或3小時的條形圖。

【0033】 **圖22**為描繪各NTP對加帽併入之影響的條形圖，

【0034】 **圖23**為描繪乙酸鎂滴定之影響的條形圖。

【0035】 **圖24**為描繪0.4 mM GTP進料IVT製程中之不同加帽類似物濃度的條形圖。

【0036】 **圖25**為描繪0.8 mM GTP進料IVT製程中不同加帽類似物濃度之條形圖。

【0037】 **圖26**為描繪1 mM GTP進料IVT製程中不同加帽類似物濃度之條形圖。

【0038】 **圖27A至圖27B**展示使用0.5至5 ng/mL RCA反應之質體模板濃度的RCA DNA產量(**圖27A**)及在使用BspQI線性化之後使用彼等模板濃度得到之RCA DNA產物之瓊脂糖凝膠(**圖27B**)。

【0039】 **圖28A至圖28B**展示當反應溫度在27至30℃之間變化時的RCA DNA產量(**圖28A**)及在用BspQI線性化之後在彼等溫度下產生之RCA

DNA產物的瓊脂糖凝膠(**圖28B**)。

【0040】 **圖29**展示在用各種濃度之限制酶BspQI消化之前及之後的RCA DNA產物之瓊脂糖凝膠。在所有情況下，如所預期，顯要產物為5.2 kb。

【0041】 **圖30A至圖30B**展示RCA DNA產物用作小規模IVT反應之模板的結果。將市售RCA調配與最佳化USTAT反應進行比較以產生用於在IVT反應(**圖30B**)中轉錄RNA之RCA DNA模板(**圖30A**)。包括經線性化及純化之質體DNA作為用於IVT之對照。藉由片段分析量測RNA完整性。

【0042】 **圖31A至圖31B**展示在250 mL規模下使用USTAT RCA DNA與經線性化、純化之質體DNA作為IVT FB V1之模板的結果。RNA產量及完整性結果展示於**圖31A**中。使用片段分析來量測完整性。量測使用質體DNA或RCA DNA模板產生之產物的加帽mRNA%且展示於**圖31B**中。

【0043】 **圖32A至圖32D**展示對線性化質體對照；經線性化、未純化之質體；及USTAT RCA DNA次世代定序資料之分析。**圖32A**展示各樣品中之序列之間的類似覆蓋度且**圖32B**展示樣品之間不具有任何插入或缺失之高百分比序列。**圖32C**展示整個轉錄模板中之序列覆蓋度且**圖32D**展示在序列模板中未觀測到序列變異體。

【0044】 **圖33**展示在用自質體DNA對照模板或USTAT RCA DNA模板轉錄之RNA轉染之後，HEK293細胞中隨時間推移之GFP蛋白質表現。在轉染混合物中培育0.5 ug或0.05 ug編碼GFP之RNA。

【0045】 **圖34A至圖34B**展示RCA DNA模板在小規模IVT反應中之

結果。將市售反應緩衝液與最佳化USTAT反應進行比較以產生RCA DNA，其中反應產量展示於**圖34A**中。DNA用作IVT反應中之模板(**圖34B**)。使用片段分析(FA)來量測RNA完整性。

【0046】 **圖35**為使用USTAT RCA DNA作為模板之各種大小轉錄物之IVT結果的曲線圖。USTAT RCA反應用隨機引子或引子酶引發。包括線性化之質體模板作為對照。使用FA來量測RNA完整性且藉由UV量測產量。

【0047】 **圖36**為使用USTAT之組裝DNA模板的IVT結果之曲線圖。經組裝之DNA模板在USTAT之前用或不用T5核酸外切酶消化處理。包括USTAT之質體DNA模板作為對照。使用FA來量測RNA完整性。

【0048】 **圖37**為展示在IVT反應期間增加Mg添加頻率得到改良之RNA品質之結果的圖。

【0049】 **圖38**為展示在IVT反應期間添加鎂得到對RNA品質屬性及產量之明顯影響的結果的圖。

【0050】 **圖39**為展示七個RNA構築體之間的BV1與FB V2之比較的圖。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0051】 本申請案根據35U.S.C.§119(e)主張2023年5月1日申請之美國臨時專利申請案序列號63/499,276及2022年5月5日申請之美國臨時專利申請案序列號63/338,878之權益，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0052】 mRNA技術具有治療疾病之巨大潛能。為實現該潛能，需

要用於疫苗或治療目的之高品質mRNA。可進行活體外轉錄(*In vitro transcription*；IVT)以使用三種噬菌體SP6、T7或T3 RNA聚合酶中之一者自DNA模板合成RNA。傳統上，使用分批模式活體外轉錄製得RNA分子，其中將反應組分合併且隨後培育幾個小時。另一種產生RNA分子之方法為分批進料活體外轉錄，其中以某些時間間隔添加反應組分中之任一者。

【0053】 本文揭示用於產生RNA分子(例如，mRNA，包括經修飾之mRNA分子及/或自擴增RNA (saRNA))之分批及分批進料方法，其適用於持續地、可再現地及遵照當前良好作業規範(cGMP)產生具有高純度及效能之臨床級RNA，諸如mRNA。該等方法在活體外轉錄(IVT)反應中使用DNA模板以產生RNA分子且可應用於具有不同5'UTRS、編碼序列長度、3'UTR及3'末端之廣泛多種構築體。在一些態樣中，RNA分子經由層析方法，例如經由使用寡聚(dT)基質純化。在一些態樣中，酶促加帽用於RNA分子之5'加帽。

【0054】 本文亦揭示用於產生RNA分子(例如，mRNA，包括經修飾之mRNA分子、未修飾之mRNA分子及/或saRNA)之多種「一鍋(one pot)」反應方法，其適用於持續地、可再現地及遵照當前良好作業規範(cGMP)產生具有高純度及效能之臨床級RNA，諸如mRNA。該等方法之一或多個步驟(例如，擴增、線性化、IVT及/或加帽)在同一反應容器中進行而各步驟之間不具有中間核酸純化過程。在一些態樣中，該等方法步驟之所有步驟(例如，擴增、線性化、IVT及/或加帽)在同一反應容器中進行而在各步驟之間不具有中間核酸純化過程。

一些定義

【0055】 在整個本申請案中，術語「約」根據其在細胞及分子生物學領域中之普通及一般含義用以指示數值包括用於測定值的量測或定量方法之誤差之固有變化或標準偏差。舉例而言，在一些態樣中，術語「約」可涵蓋在量測值或定量值之25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小值內的一系列值。

【0056】 當與術語「包含(comprising)」結合使用時，詞語「一(a/an)」之使用可意謂「一個」，但其亦與「一或多個」、「至少一個」及「一個或多於一個」之含義相符。

【0057】 片語「及/或」意謂「及」或「或」。為了說明，A、B及/或C包括：單獨的A、單獨的B、單獨的C、A與B之組合、A與C之組合、B與C之組合或A、B及C之組合。換言之，「及/或」作為包含性或操作。

【0058】 片語「基本上所有」定義為「至少95%」；若群組之基本上所有成員具有某一特性，則該群組之至少95%成員具有該特性。在一些情況下，基本上所有意謂等於具有該特性之群組之成員的95%、96%、97%、98%、99%或100%中之任一者、至少為其中之任一者或介於其中任何兩者之間。

【0059】 組合物及方法在使用時可「包含本說明書通篇中所揭示之任何成分或步驟」、「基本上由本說明書通篇中所揭示之任何成分或步驟組成」或「由本說明書通篇中所揭示之任何成分或步驟組成」。在整個本說明書中，除非上下文另外要求，否則詞語「包含(comprising)」(及包含之任何形式，諸如「包含(comprise)」及「包含(comprises)」)、「具有(having)」(及具有之任何形式，諸如「具有(have)」及「具有(has)」)、

「包括(including)」(及包括之任何形式，諸如「包括(includes)」及「包括(include)」)或「含有(containing)」(及含有之任何形式，諸如「含有(contains)」及「含有(contain)」)為包括性或開放性的，且應理解為暗示包括所陳述步驟或要素或者步驟或要素之群組，但不排除包括任何其他步驟或要素或者步驟或要素之群組。經考慮，本文在術語「包含」之上下文中描述的態樣亦可在術語「由...組成」或「基本上由...組成」的上下文中實施。「基本上由」所揭示之成分或步驟中之任一者「組成」的組合物及方法將申請專利範圍之範疇限制於不實質影響所主張發明之基本及新穎特徵的指定材料或步驟。詞語「由...組成(consisting of)」(及由...組成之任何形式，諸如「由...組成(consist of)」及「由...組成(consists of)」)意謂包括且限於接在片語「由...組成」後面的任何內容。因此，片語「由.....組成」指示所列要素為所需或必選的，且不可存在其他要素。

【0060】 在整個說明書中提及「一個實施例」、「一實施例」、「一特定實施例」、「一相關實施例」、「某一實施例」、「一額外實施例」、「另一實施例」、「一些實施例」、「一個態樣」、「一態樣」、「一特定態樣」、「一相關態樣」、「某一態樣」、「一額外態樣」、「另一態樣」、「一些態樣」或其組合意謂結合本發明之至少一個態樣中包括之態樣描述的特定特徵、結構或特性。因此，前述片語在整個本說明書中各處之出現未必皆指代同一態樣。此外，特定特徵、結構或特性可在一或多個態樣中以任何合適方式組合。

【0061】 術語「抑制」或「減少」或此等術語之任何變化形式包括實現所期望結果之任何可量測減少或完全抑制。術語「改良」、「促進」或「增加」或此等術語之任何變化形式包括實現蛋白質或分子之所需結果

或產量的任何可量測增加。

【0062】 如本文所使用，術語「參考」、「標準」或「對照」描述相對於其進行比較的值。舉例而言，將藥劑、個體、群體、樣品或相關值與參考、標準或對照藥劑、個體、群體、樣品或相關值進行比較。參考物、標準物或對照物可實質上同時進行測試及/或測定及/或與藥劑、個體、群體、樣品或相關值之相關測試或測定一起，及/或可在與評定下之藥劑、個體、群體、樣品或相關值相當之條件或情況下測定或表徵。

【0063】 如本文所用，術語「DNA」意謂包括去氧核糖核苷酸殘基(諸如含有核苷酸鹼基腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)及/或胸腺嘧啶(T))的核酸分子。舉例而言，DNA可含有所有或大部分去氧核糖核苷酸殘基。如本文所用，術語「去氧核糖核苷酸」意謂在β-D-呋喃核糖基之2'位置處缺乏羥基的核苷酸。不受任何限制，DNA可涵蓋雙股DNA、反義DNA、單股DNA、分離DNA、合成DNA、以重組方式產生之DNA及經修飾之DNA。

【0064】 如本文中所使用，術語「RNA」意謂包括核糖核苷酸殘基(諸如含有核苷酸鹼基腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)及/或尿嘧啶(U)或N-1-甲基假尿苷)之核酸分子。舉例而言，RNA可含有所有或大部分核糖核苷酸殘基。如本文所用，術語「核糖核苷酸」意謂在β-D-呋喃核糖基之2'位置處具有羥基的核苷酸。在一個態樣中，RNA可為與編碼肽或蛋白質之RNA轉錄本相關的信使RNA (mRNA)。如熟習此項技術者已知，mRNA一般含有5'非轉譯區(5'-UTR)、多肽編碼區及3'非轉譯區(3'-UTR)。不受任何限制，RNA可涵蓋雙股RNA、反義RNA、單股RNA、經分離RNA、合成RNA、以重組方式產生之RNA、環狀RNA、自擴增RNA

(saRNA)及經修飾之RNA (modRNA)。

【0065】 如本文中所涵蓋，不受任何限制，RNA可用作治療及/或預防哺乳動物(包括人類)之多種病況的治療模式。所涵蓋之方法包含向哺乳動物(諸如人類)投與本文所描述之RNA。舉例而言，在一個態樣中，RNA之此類使用方法包括抗原編碼RNA疫苗以誘導穩定中和抗體及伴隨/相伴的T細胞反應，從而以較佳最小疫苗劑量實現保護性免疫接種。所投與之RNA較佳為活體外轉錄RNA。

【0066】 「經分離RNA」定義為一種RNA分子，其可為重組的或已自總基因體核酸分離。「經修飾RNA」或「modRNA」係指與天然存在之RNA相比具有一或多個核苷酸之至少一個添加、缺失、取代及/或改變的RNA分子，例如mRNA分子。此類改變可指將非核苷酸材料添加至內部RNA核苷酸，或添加至RNA之5'及/或3'端。在一個態樣中，此類modRNA含有至少一個經修飾核苷酸，諸如核苷酸之鹼基之改變。舉例而言，經修飾之核苷酸可置換一或多個尿苷及/或胞苷核苷酸。舉例而言，此等置換可針對RNA序列中之尿苷及/或胞苷的每個實例進行，或可僅針對所選擇尿苷及/或胞苷核苷酸進行。RNA中標準核苷酸之此類改變可包括非標準核苷酸，諸如化學合成之核苷酸或去氧核苷酸。舉例而言，RNA序列中至少一個尿苷核苷酸可經1-甲基假尿苷置換。其他此類經改變之核苷酸為熟習此項技術者已知的。此類經改變之RNA被視為天然存在之RNA之類似物。在一些態樣中，RNA藉由使用DNA模板進行活體外轉錄而產生，其中DNA係指含有去氧核糖核苷酸之核酸。在一些態樣中，RNA可為複製子RNA（複製子），尤其自複製RNA或自擴增RNA (saRNA)。

【0067】 如本文所用，「蛋白質」、「多肽」或「肽」係指包含至少兩個胺基酸殘基之分子。如本文所使用，術語「野生型」或「天然」係指在生物體中天然存在之分子之內源性版本。在一些態樣中，採用蛋白質或多肽之野生型型式，然而在本發明之許多態樣中，採用經修飾之蛋白質或多肽以產生免疫反應。上文所描述之術語可互換使用。「經修飾之蛋白質」或「經修飾之多肽」或「變異體」係指化學結構，尤其胺基酸序列相對於野生型蛋白質或多肽改變之蛋白質或多肽。在一些態樣中，經修飾/變異蛋白或多肽具有至少一種經修飾之活性或功能(認識到蛋白質或多肽可具有多種活性或功能)。尤其考慮，經修飾/變異蛋白或多肽可相對於一種活性或功能改變，但在其他態樣中保留野生型活性或功能，諸如免疫原性。當在本文中特定提及蛋白質時，其一般指天然(野生型)或重組(經修飾)蛋白質。蛋白質可自天然的生物體直接分離，藉由重組DNA/外源性表現方法產生或藉由固相肽合成(SPPS)或其他活體外方法產生。在特定態樣中，存在經分離之核酸區段及重組載體，其併有編碼多肽(例如抗原或其片段)之核酸序列。術語「重組」可與多肽或特定多肽之名稱結合使用，且此一般係指由已經活體外操控之核酸分子產生的多肽或作為此類分子之複製產物的多肽。

【0068】 術語「經分離」可指實質上不含細胞材料、細菌材料、病毒材料或其等來源之培養基(例如，當藉由重組DNA技術產生時)或化學前驅體或其他化學物質(例如，當化學合成時)的核酸或多肽。此外，經分離化合物係指可以經分離化合物形式向個體投與之化合物；換言之，若化合物黏附至管柱或嵌入於瓊脂糖凝膠中，則其可不簡單地視為「經分離」。此外，「經分離核酸片段」或「經分離肽」為天然不以片段形式存在及/

或通常不呈功能狀態及/或經由人工干預自天然狀態改變或移除的核酸或蛋白質片段。舉例而言，天然存在於活動物中之DNA並非「經分離的」，但合成DNA或自其天然狀態之共存物質部分或完全分離之DNA為「經分離的」。經分離核酸可以實質上經純化形式存在，或可存在於非天然環境中，諸如已遞送核酸之細胞中。

【0069】 本文中所提及之關於相關技術之所有專利、公開專利申請案、其他公開案及資料庫均以全文引用之方式併入本文中。

DNA模板

【0070】 在一些態樣中，產生RNA分子(例如，mRNA)之方法包括提供包括線性DNA模板之樣品。DNA模板包括編碼所關注基因的序列，該所關注基因編碼例如肽或感興趣之多肽。在一些態樣中，DNA模板包括可操作地連接於編碼所關注基因的序列的RNA聚合酶啟動子序列。在一些態樣中，DNA模板包括可操作地連接於對應RNA聚合酶基因序列之RNA聚合酶啟動子序列，該RNA聚合酶基因序列可操作地連接於次基因體啟動子，該次基因體啟動子可操作地連接於編碼所關注基因的序列。舉例而言，在一些較佳態樣中，DNA模板包括可操作地連接於RdRp基因序列之RNA依賴性RNA聚合酶(RdRp)啟動子序列，該RdRp基因序列可操作地連接於次基因體啟動子，該次基因體啟動子可操作地連接於編碼所關注基因的序列。在一些態樣中，DNA模板缺乏質體主鏈。

【0071】 在一些態樣中，線性DNA模板為用作活體外轉錄之模板的線性化質體DNA。在一些態樣中，細胞，例如細菌細胞，例如大腸桿菌(E. coli)，例如DH10B細胞經質體DNA模板轉染。培養經轉染細胞以複製質體DNA，隨後分離及純化該質體DNA。在一些態樣中，線性DNA模板

在無細胞環境中合成。在一些態樣中，線性DNA模板藉由滾環擴增(RCA)合成。在一些態樣中，RCA包括擴增目標環(amplification target circle；ATC)，其形成上面形成新穎DNA之模板，藉此將初始序列延長為與該環互補之重複序列之連續序列，但每小時僅產生約數千個複本。在一些態樣中，線性DNA模板藉由指數RCA，包括超支化RCA (亦稱為分支擴增)提供。

【0072】 在其他態樣中，線性DNA模板藉由用於合成DNA之無細胞製程提供，該製程包括使DNA模板與至少一種聚合酶在存在核苷酸之情況下接觸以形成反應混合物，其中DNA模板藉由股置換複製擴增，且其中在該製程期間將其他核苷酸連續地或以間隔供應至反應混合物。

【0073】 在一些態樣中，DNA模板亦包括RNA聚合酶啟動子序列，例如T7啟動子，其位於所關注基因的5'處且可操作地連接於該所關注基因。在一些態樣中，DNA模板包括可操作地連接於對應RNA聚合酶基因序列之RNA聚合酶啟動子序列，該RNA聚合酶基因序列可操作地連接於次基因體啟動子，該次基因體啟動子可操作地連接於編碼所關注基因的序列。在一些較佳態樣中，DNA模板包括RNA依賴性RNA聚合酶(RdRp)啟動子序列，其位於次基因體啟動子之5'處且可操作地連接於次基因體啟動子，該次基因體啟動子可操作地連接於編碼所關注基因的序列。如本文中所使用，片語「可操作地連接」係指在兩個或更多個分子、構築體、轉錄物、實體、部分或其類似物之間的功能性連接。舉例而言，可操作地連接於RNA聚合酶啟動子的所關注基因允許轉錄所關注基因。任何RNA聚合酶或其變異體可用於中本文所描述之方法中。RNA聚合酶可選自但不限於噬菌體RNA聚合酶(例如T7 RNA聚合酶)、T3 RNA聚合酶、SP6 RNA

聚合酶及/或突變體聚合酶，例如但不限於能夠併入經修飾之核酸中的聚合酶。

【0074】 如本文中所使用，「所關注基因」係指編碼多肽或所關注蛋白質之聚核苷酸。視上下文而定，所關注基因係指去氧核糖核酸，例如，DNA模板中可轉錄為RNA分子的所關注基因；或核糖核酸，例如RNA分子中可轉譯以活體外、活體內、原位或離體產生編碼之感興趣之多肽的所關注基因。如下文更詳細地描述，感興趣之多肽包括(但不限於)生物製劑、抗體、疫苗、治療蛋白或肽等。

側接區：非轉譯區(UTR)

【0075】 在一些態樣中，用於產生RNA分子之方法包括(a)提供具有線性DNA模板之樣品，該DNA模板包括可操作地連接於編碼所關注基因之序列的RNA聚合酶啟動子序列及5'非轉譯區(UTR)及/或3'UTR。在一些態樣中，DNA模板包括可操作地連接於對應RNA聚合酶基因序列之RNA聚合酶啟動子序列，該RNA聚合酶基因序列可操作地連接於次基因體啟動子，該次基因體啟動子可操作地連接於編碼所關注基因的序列。舉例而言，在一些態樣中，用於產生RNA分子之方法包括(a)提供具有線性DNA模板之樣品，該DNA模板包括RNA依賴性RNA聚合酶(RdRp)啟動子序列，其位於次基因體啟動子之5'處且可操作地連接於次基因體啟動子，該次基因體啟動子可操作地連接於編碼所關注基因的序列；及5'非轉譯區(UTR)及/或3' UTR。

【0076】 DNA模板及RNA分子可包括UTR。基因之非轉譯區(UTR)經轉錄但不轉譯。5' UTR起始於轉錄起始位點且繼續至起始密碼子，但不包括起始密碼子；而3' UTR緊接著起始於終止密碼子且繼續直至轉錄終止

訊號。UTR之調節特徵可併入至本發明之聚核苷酸、初級構築體及/或mRNA中以增強分子之穩定性。亦可併入特異性特徵，以確保轉錄本在被誤導至不希望的器官部位之情況下的受控下調。

【0077】 天然5'UTR具有在轉譯起始中起重要作用之特徵。其具有如Kozak序列之特徵，通常已知該等特徵參與核糖體啟動許多基因轉譯之過程。Kozak序列具有共同的CCR(A/G)CCAUGG，其中R為起始密碼子(AUG)上游三個鹼基之嘌呤(腺嘌呤或鳥嘌呤)，其之後為另一個『G』。亦已知5′UTR形成參與延長因子結合之二級結構。藉由工程改造通常在特定目標器官之大量表現基因中發現的特徵中，吾人可增強聚核苷酸、初級構築體之穩定性及蛋白質產生。舉例而言，使用來自其他組織特異性mRNA之5'UTR以提高表現的原因在於組織可能用於肌肉(MyoD、肌凝蛋白、肌紅蛋白、成肌素、Herculin)，用於內皮細胞(Tie-1、CD36)等。

【0078】 其他非UTR序列可併入5′ (或3′ UTR) UTR中。舉例而言，內含子或內含子之部分序列可併入本文所描述之聚核苷酸、初級構築體或mRNA的側接區中。併入內含子序列可增加蛋白質產量以及mRNA含量。端帽依賴性轉譯涉及將起始前複合物(PIC)募集至mRNA之5'端，接著掃描以發現最佳序列環境中之AUG起始密碼子。AUG識別促進掃描中止、釋放大部分起始因子及募集大核糖體子單元以起始延長。起始密碼子之高效識別取決於其周圍序列。在一些較佳態樣中，DNA模板包括起始密碼子GGG。在一些較佳態樣中，DNA模板包括起始密碼子AGA。在一些態樣中，序列CRCCaugG (R = 嘌呤A或G)可提供真核生物中AUG識別之最佳情形。

【0079】 已知3' UTR中嵌有腺苷及尿苷之延伸部分。此等富AU標

籤在周轉率較高之基因中尤其普遍。基於其序列特徵及功能特性，富AU元件(ARE)可分成三類：I類ARE在富U區域內包括數個分散的AUUUA模體複本。C-Myc及MyoD包括I類ARE。II類ARE具有兩個或更多個重疊UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚體。包括此類型ARE之分子包括GM-CSF及TNF-α。III類ARE之定義不太明確。此等富含U之區域不包括AUUUA模體。c-Jun及成肌素為此類別之兩個充分研究之實例。已知結合至ARE的大部分蛋白質使信使去穩定化，而已記錄到ELAV家族成員(最顯著地，HuR)增加mRNA穩定性。HuR結合至所有三類之ARE。將HuR特異性結合位點工程改造至核酸分子之3' UTR中將引起HuR結合，且因此引起活體內訊息穩定。3'UTR ARE之引入、移除或修飾可用於調節聚核苷酸及初級構築體之穩定性。

【0080】 在對特定聚核苷酸及/或初級構築體進行工程改造時，可引入ARE之一或多個複本以使聚核苷酸及/或初級構築體不太穩定，且藉此減少所得蛋白質之轉譯且減少其產量。同樣，可鑑別出ARE且將其移除或使其突變以增加細胞內穩定性，且因此增加所得蛋白質之轉譯及產量。可在相關細胞株中使用聚核苷酸及/或初級構築體進行轉染實驗，且可在轉染後之不同時間點分析蛋白質產生。舉例而言，可用不同的ARE工程改造分子且藉由使用針對相關蛋白質之ELISA套組來轉染細胞且在轉染後6小時、12小時、24小時、48小時及7天分析所產生之蛋白質。

聚(A)尾

【0081】 在一些態樣中，本文中所揭示之產生RNA分子之方法包括提供具有DNA模板之樣品，該DNA模板具有可操作地連接於編碼所關注基因的序列RNA聚合酶啟動子序列及具有20至100個核苷酸之聚(A)尾序

列。聚(A)尾可防止細胞中RNA分子之降解。因此，在一些態樣中，質體DNA模板包括編碼位於所關注基因的3'處之聚(A)尾的序列。如本文中所使用，「聚(A)尾」係指腺嘌呤核苷酸之鏈。在一些態樣中，聚(A)尾包括5至300個腺嘌呤核苷酸長度，例如至少、至多或約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295或300個腺嘌呤核苷酸長度，或本文中可得到之任何範圍或值。在較佳態樣中，DNA模板包括聚(A)尾，其包括約40個腺嘌呤。在較佳態樣中，DNA模板包括聚(A)尾，其包括約80個腺嘌呤。在一些態樣中，聚(A)尾在DNA模板中編碼。在其他態樣中，聚(A)尾藉由用聚(A)聚合酶進行酶促處理而添加至RNA分子中。在一些態樣中，RNA分子不包括聚(A)尾。

【0082】 在一些態樣中，質體DNA模板上聚(A)尾編碼序列下游緊接著限制性核酸內切酶之識別位點以使質體線性化。質體之線性化可減少轉錄連讀。

【0083】 在一些態樣中，在線性化之後，將質體DNA模板過濾至適當之溶劑，例如水、HEPES及EDTA中。在一較佳態樣中，溶劑包括10 mM HEPES、0.1 mM EDTA及類似者。經由例如超過濾、透濾或例如切向流超過濾/透濾進行過濾。

【0084】 線性DNA模板可在用作活體外轉錄之模板之前經純化。舉例而言，線性DNA模板可以層析方式或藉由乙醇沈澱純化。

活體外轉錄

【0085】 活體外轉錄(IVT)係指允許具有任何序列(大小範圍在短寡核苷酸至若干千鹼基內)之RNA分子之DNA定向合成的程序。在一些態樣中，活體外轉錄涉及DNA模板之工程改造以包括所關注序列上游之噬菌體啟動子序列(例如，T7核噬菌體)，接著使用相應的RNA聚合酶轉錄。在一些態樣中，所得RNA分子隨後經修飾(例如，藉由加帽、剪接、添加聚(A)尾等)。

【0086】 本文所描述用於產生RNA分子(例如mRNA)之方法包括使DNA模板與活體外轉錄(IVT)反應系統接觸。在一些態樣中，IVT反應系統包括RNA聚合酶及核糖核苷酸，其可為天然及/或經修飾之核糖核苷酸。在一些態樣中，IVT反應系統包括轉錄緩衝液、三磷酸核苷酸(NTP)、RNA酶抑制劑及RNA聚合酶。NTP可選自但不限於本文描述之彼等，包括天然及非天然(經修飾的，諸如N-1-甲基假尿苷三磷酸酯) NTP。

RNA聚合酶

【0087】 在一些態樣中，用於產生mRNA轉錄本之RNA聚合酶亦可稱為「DNA依賴性RNA聚合酶」，其將DNA轉錄至RNA分子中。例示性RNA聚合酶包括噬菌體T7、T3、Syn5及SP6 RNA聚合酶或其變異體(包括熱穩定/嗜熱性變異體)，其可用於自DNA模板轉錄mRNA或自擴增RNA。RNA聚合酶表示驅動轉錄之初級機構。RNA聚合酶已經充分分離及純化，使得其適用於活體外產生RNA。在一些態樣中，RNA聚合酶為T7 RNA聚合酶，其係指催化在5'至3'方向上形成RNA的單體T7噬菌體編碼DNA定向RNA聚合酶。野生型T7 RNA聚合酶包括883個胺基酸。其與T3 RNA聚合酶同源且與SP6 RNA聚合酶略微同源。

【0088】 在一些態樣中，RNA聚合酶包括經工程改造之T7 RNA聚合酶變異體，諸如允許在起始活體外轉錄時相對於GTP選擇性併入m7G(5')ppp(5')m7G端帽類似物的變異體。舉例而言，在一些態樣中，RNA聚合酶已經修飾以優先接受端帽(亦稱為RNA端帽、RNA 7-甲基鳥苷端帽或RNA m7G端帽)或端帽類似物(例如，「抗逆轉端帽類似物」(3'-O-Me-m7G(5′)ppp(5′)G；「ARCA」)，或在轉錄起始位點處具有一或多個核苷酸之甲基化端帽類似物(例如，m7G(5′)ppp(5′)N，其中N為任何核苷酸)，以在轉錄起始期間開始轉錄。5'端帽為一些真核初級轉錄物(諸如前驅體信使RNA)之5'端上的經改變之核苷酸。典型端帽結構包括經由5'-5'三磷酸酯橋連接至轉錄本之第一核苷酸的7-甲基鳥苷(m^7G)。端帽類似物可在特定位置處包括例如一個、兩個或更多個甲基(或其他取代基)。端帽分子可藉由酶促加帽而預先在IVT反應中或在合成mRNA之後添加。在IVT反應中先行添加之端帽分子可使mRNA產生更簡單。

核糖核苷酸

【0089】 在本文所描述之方法中，IVT反應系統包括核苷酸(例如，未經修飾之三磷酸核糖核苷酸或經修飾之三磷酸核糖核苷酸)。核苷酸可選自以下中之任一者：天然核苷酸，例如A、G、C及U核糖核苷酸；經修飾之核苷酸(諸如(例如)N-1-甲基假尿苷三磷酸酯)；或其組合。在一些態樣中，核糖核苷酸經Tris緩衝，諸如用Tris鹼滴定至pH 7.3至7.5之100 mM核糖核苷酸水溶液。在一些態樣中，核糖核苷酸呈鈉鹽形式。

【0090】 可併入至經修飾之核苷及核苷酸中且存在於由IVT反應系統產生之RNA分子中的經修飾之核鹼基包括例如m5C (5-甲基胞苷)、m5U (5-甲基尿苷)、m6A (N6-甲基腺苷)、s2U (2-硫代尿苷)、Um (2'-0-

甲基尿苷)、mlA (1-甲基腺苷)；m2A (2-甲基腺苷)；Am (2-1-O-甲基腺苷)；ms2m6A (2-甲硫基-N6-甲基腺苷)；i6A (N6-異戊烯基腺苷)；ms2i6A (2-甲硫基-N6異戊烯基腺苷)；io6A (N6-(順式-羥基異戊烯基)腺苷)；ms2io6A (2-甲硫基-N6-(順式-羥基異戊烯基)腺苷)；g6A (N6-甘胺醯基胺甲醯基腺苷)；t6A (N6-蘇胺醯基胺甲醯基腺苷)；ms2t6A (2-甲硫基-N6-蘇胺醯基胺甲醯基腺苷)；m6t6A (N6-甲基-N6-蘇胺醯基胺甲醯基腺苷)；hn6A (N6-羥基正纈胺醯基胺基甲醯基腺苷)；ms2hn6A (2-甲硫基-N6-羥基正纈胺醯基胺甲醯基腺苷)；Ar(p) (2'-0-核糖苷基腺苷(磷酸酯))；I (肌苷)；mil (1-甲基肌苷)；m'lm (l,2'-0-二甲基肌苷)；m3C (3-甲基胞苷)；Cm (2T-0-甲基胞苷)；s2C (2-硫代胞苷)；ac4C (N4-乙醯基胞苷)；£5C (5-甲酸基胞苷(5-fonnylcytidine))；m5Cm (5,2-0-二甲基胞苷)；ac4Cm (N4乙醯基2TO甲基胞苷)；k2C (立西啶)；mlG (1-甲基鳥苷)；m2G (N2-甲基鳥苷)；m7G (7-甲基鳥苷)；Gm (2'-0-甲基鳥苷)；m22G (N2,N2-二甲基鳥苷)；m2Gm (N2,2'-0-二甲基鳥苷)；m22Gm (N2,N2,2'-0-三甲基鳥苷)；Gr(p) (2'-0-核糖苷基鳥苷(磷酸酯))；yW (懷俄丁苷(wybutosine))；o2yW (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 (甲基鳥苷)；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)；preQo (7-氰基-7-去氮鳥苷)；preQi (7-胺甲基-7-去氮鳥苷)；G* (古嘌苷)；D (二氫尿苷)；m5Um (5,2'-0-二甲基尿苷)；s4U (4-硫代尿苷)；m5s2U (5-甲基-2-硫代尿苷)；s2Um (2-硫基-2'-O-甲基尿苷)；acp3U (3-(3-胺基-3-羧丙基)尿苷)；ho5U (5-羥基尿苷)；mo5U (5-甲氧基尿苷)；cmo5U (尿苷5-氧基乙酸)；mcmo5U (尿苷5-氧基乙酸甲

酯)；chm5U (5-(羧基羥甲基)尿苷))；mchm5U (5-(羧基羥甲基)尿苷甲酯)；mcm5U (5-甲氧基羰基甲基尿苷)；mcm5Um (S-甲氧基羰基甲基-2-O-甲基尿苷)；mcm5s2U (5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷)；nm5s2U (5-胺甲基-2-硫代尿苷)；mnm5U (5-甲基胺基甲基尿苷)；mnm5s2U (5-甲胺基甲基-2-硫代尿苷)；mnm5se2U (5-甲胺基甲基-2-硒基尿苷)；ncm5U (5-胺甲醯基甲基尿苷)；ncm5Um (5-胺甲醯基甲基-2'-0-甲基尿苷)；cmnm5U (5-羧甲基胺基甲基尿苷)；cnmm5Um (5-羧甲基胺基甲基-2-L-O甲基鳥苷)；cmnm5s2U (5-羧甲基胺基甲基-2-硫代尿苷)；m62A(N6,N6-二甲基腺苷)；Tm (2'-0-甲基肌苷)；m4C (N4-甲基胞苷)；m4Cm (N4,2-0-二甲基胞苷)；hm5C (5-羥甲基胞苷)；m3U (3-甲基尿苷)；cm5U (5-羧甲基尿苷)；m6Am (N6,T-0-二甲基腺苷)；rn62Am (N6,N6,0-2-三甲基腺苷)；m2'7G (N2,7-二甲基鳥苷)；m2'2'7G (N2,N2,7-三甲基鳥苷)；m3Um (3,2T-0-二甲基尿苷)；m5D (5-甲基二氫尿苷)；f5Cm (5-甲醯基-2'-0-甲基胞苷)；mlGm (1,2'-0-二甲基鳥苷)；m'Am (1,2-0-二甲基腺苷)益立諾甲基鳥苷)；tm5s2U (S-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷))；imG-14 (4-去甲基鳥苷)；imG2 (異鳥苷)；ac6A (N6-乙醯基腺苷)次黃嘌呤、肌苷、8-側氧基-腺嘌呤、其7-經取代衍生物、二氫尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-胺基尿嘧啶、5-(Ci-C6)-烷基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(C2-Ce)-烯基尿嘧啶、5-(C2-Ce)-炔基尿嘧啶、5-(羥甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羥基胞嘧啶、5-(Ci-C6)-烷基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-(C2-C6)-烯基胞嘧啶、5-(C2-C6)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N2-二甲基鳥嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、8-氮雜鳥嘌呤、7-去氮-7-經取代之鳥嘌呤、7-去氮-7-(C2-C6)

炔基鳥嘌呤、7-去氮-8-經取代之鳥嘌呤、8-羥基鳥嘌呤、6-硫代鳥嘌呤、8-側氧基鳥嘌呤、2-胺基嘌呤、2-胺基-6-氯嘌呤、2,4-二胺基嘌呤、2,6-二胺基嘌呤、8-氮雜嘌呤、經取代之7-去氮嘌呤、7-去氮-7-經取代之嘌呤、7-去氮-8-經取代之嘌呤、氫(無鹼基殘基)、m5C、m5U、m6A、s2U、W或2'-0-甲基-U。額外例示性經修飾之核苷酸包括以下中之任一者：N-1-甲基假尿苷；假尿苷、N6-甲基腺苷、5-甲基胞苷及5-甲基尿苷。

【0091】 在一些態樣中，RNA分子可包括胺基磷酸酯、硫代磷酸酯及/或膦酸甲酯鍵。

【0092】 在一些態樣中，RNA分子不包括經修飾之核苷酸，例如不包括經修飾之核鹼基，且RNA分子中之所有核苷酸為習知的標準核糖核苷酸A、U、G及C，除可包括例如7-甲基鳥苷之視情況5'端帽之外。在其他態樣中，RNA可包括包含7'-甲基鳥苷之5'端帽，且前1個、2個或3個5'核糖核苷酸可在核糖之2'位置處甲基化。

例示性活體外轉錄反應系統

【0093】 在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括以下：RNA聚合酶，例如T7 RNA聚合酶、DNA模板；三磷酸核苷酸(NTP)；鎂；及緩衝液，諸如例如HEPES或Tris (或HEPES及Tris兩者)。

【0094】 在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之RNA聚合酶，例如T7 RNA聚合酶：1000至44000 U/mL，例如至少、至多或約1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950、2000、2050、2100、2150、2200、2250、2300、2350、

2400、2450、2500、2550、2600、2650、2700、2750、2800、2850、2900、2950、3000、3050、3100、3150、3200、3250、3300、3350、3400、3450、3500、3550、3600、3650、3700、3750、3800、3850、3900、3950、4000、4050、4100、4150、4200、4250、4300、4350、4400、4450、4500、4550、4600、4650、4700、4750、4800、4850、4900、4950、5000、5050、5100、5150、5200、5250、5300、5350、5400、5450、5500、5550、5600、5650、5700、5750、5800、5850、5900、5950、6000、6050、6100、6150、6200、6250、6300、6350、6400、6450、6500、6550、6600、6650、6700、6750、6800、6850、6900、6950、7000、7050、7100、7150、7200、7250、7300、7350、7400、7450、7500、7550、7600、7650、7700、7750、7800、7850、7900、7950、8000、8050、8100、8150、8200、8250、8300、8350、8400、8450、8500、8550、8600、8650、8700、8750、8800、8850、8900、8950、9000、9050、9100、9150、9200、9250、9300、9350、9400、9450、9500、9550、9600、9650、9700、9750、9800、9850、9900、9950、10000、10050、10100、10150、10200、10250、10300、10350、10400、10450、10500、10550、10600、10650、10700、10750、10800、10850、10900、10950、11000、11050、11100、11150、11200、11250、11300、11350、11400、11450、11500、11550、11600、11650、11700、11750、11800、11850、11900、11950、12000、12500、13000、13500、14000、14500、15000、15500、16000、16500、17000、17500、18000、18500、19000、19500、20000、20500、21000、21500、22000、22500、23000、

23500、24000、24500、25000、25500、26000、26500、27000、27500、28000、28500、29000、29500、30000、30500、31000、31500、32000、32500、33000、33500、34000、34500、35000、35500、36000、36500、37000、37500、38000、38500、39000、39500、40000、40500、41000、41500、42000、42500、43000、43500或44000 U/mL，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括8U/uL、10U/uL、13U/uL或15U/uL之T7 RNA聚合酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為7000 U/mL之RNA聚合酶，例如T7 RNA聚合酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為8000 U/mL之RNA聚合酶，例如T7 RNA聚合酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為14000 U/mL之RNA聚合酶，例如T7RNA聚合酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為17000 U/mL之RNA聚合酶，例如T7 RNA聚合酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為25000 U/mL之RNA聚合酶，例如T7 RNA聚合酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為40000 U/mL之RNA聚合酶，例如T7 RNA聚合酶。

【0095】 在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之DNA模板，例如至少、至多或約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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、

87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159或160 nM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為40 nM之DNA模板。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為144 nM之DNA模板。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之DNA模板：5至24 nM DNA，例如至少、至多或約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24 nM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之DNA模板：36至144 nM DNA，例如至少、至多或約36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143或144 nM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之DNA模板：例如

至少、至多或約0.01、0.02、0.025、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.075、0.08、0.09、0.1、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、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31、0.32、0.33、0.34、0.35、0.36、0.37、0.38、0.39、0.40、0.41、0.42、0.43、0.44、0.45、0.46、0.47、0.48、0.49或0.50 mg/mL，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為0.025 mg/mL之DNA模板。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為0.05 mg/mL之DNA模板。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為0.075 mg/mL之DNA模板。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為0.1 mg/mL之DNA模板。

【0096】 在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之各三磷酸核苷酸(NTP)：例如至少、至多或約0.4、0.8、1.0、1.25、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。 在一些態樣中，活體外轉錄系統包括起始濃度為以下之各三磷酸核苷酸(NTP)：例如至少、至多或約0.4、0.8、1.0、1.25、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26 mM。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度各自為約8 mM之三磷酸核苷酸(NTP)。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之三磷酸核苷酸ATP：例如至少、至多或約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之三磷酸核

苷酸CTP：例如至少、至多或約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之三磷酸核苷酸GTP：例如至少、至多或約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之UTP或經三磷酸核苷酸修飾之UTP：例如至少、至多或約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。在某些態樣中，反應中NTP之濃度為0.4mM、0.8mM、1mM、1.25mM、3 mM、5mM、6mM、7mM、7.5mM、8mM、8.5mM、9mM、9.5mM或10mM。

【0097】 在一些態樣中，IVT反應系統包括鎂離子，例如呈鎂鹽形式，諸如氯化鎂及乙酸鎂中之任一者。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為以下之鎂：例如至少、至多或約12、13、14、15、16、16.5、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、

128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219或220 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括30 mM之乙酸鎂。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括40 mM之乙酸鎂。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括16.5 mM之乙酸鎂。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括33 mM之乙酸鎂。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括36 mM之乙酸鎂。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括50 mM之乙酸鎂。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括110 mM之乙酸鎂。在一些態樣中，Mg:NTP比率可維持在以下比率：例如至少、至多或約0、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1或2.2 mM Mg/mM NTP，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，一或多種反應組分在活體外轉錄期間藉由臨時推注進料、半連續進料或連續進料來添加。推注進料可以以下間隔遞送：例如至少、至多、或約0、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或35分鐘，或本文中可導出之任何範圍或值。此等組分可包括但不限於一或多種NTP及陽離子，諸如鎂。此等組分可合併成單一

進料，或其可以多個進料形式分開遞送。在一些態樣中，至少1種NTP之連續進料可以例如至少、至多、或約0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5或4 mL/L/min之流動速率遞送。在一些態樣中，諸如鎂之陽離子之連續進料可以以下濃度遞送：例如至少、至多、或約0、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、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95或1.0 mM/min，或本文中可導出之任何範圍或值。

【0098】在一些態樣中，活體外轉錄(IVT)反應系統包括緩衝液。IVT反應系統之例示性緩衝液可包括Tris及/或HEPES。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括pH為以下之緩衝液：例如至少、至多、或約7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4或8.5，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，緩衝液為Tris-HCl，pH 8.0。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括40 mM Tris HCl，pH 8.0。IVT反應系統之替代性緩衝液包括40 mM Tris pH 7.5、80 mM HEPES。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統不包括HEPES。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括HEPES及Tris。在一些態樣中，緩衝液不包含二硫蘇糖醇(DTT)。

【0099】在一些態樣中，RNA酶抑制劑包括於活體外轉錄反應系統中。RNA酶抑制劑可在轉錄反應期間減少RNA酶誘導之降解。舉例而言，小鼠RNA酶抑制劑可以以下之最終濃度利用：40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、

1150或1200 U/mL。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包含最終濃度為100 U/mL之RNA酶抑制劑。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包含最終濃度為1000 U/mL之RNA酶抑制劑。

【0100】 在一些態樣中，焦磷酸酶包括於活體外轉錄反應系統中。焦磷酸酶可使在各核苷酸併入至無機磷酸酯之兩個單元中之後產生的無機焦磷酸鹽裂解，其可降低鎂與焦磷酸鹽共沈澱以形成焦磷酸鎂之可能性。在某些態樣中，焦磷酸酶可於焦磷酸酶緩衝液中稀釋且以0.01mU/uL、0.02mU/uL、0.05mU/uL、0.08mU/uL、0.1mU/uL、0.2mU/uL、0.8mU/uL或2mU/uL之濃度存在於反應中。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為0.25 U/mL之無機焦磷酸酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為0.5 U/mL之無機焦磷酸酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為1 U/mL之無機焦磷酸酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為2 U/mL之無機焦磷酸酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為3 U/mL之無機焦磷酸酶。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括最終濃度為6 U/mL之無機焦磷酸酶。

【0101】 在一些態樣中，活體外轉錄反應系統包括多元胺。例示性多元胺包括精胺、腐胺及亞精胺。在一些態樣中，包括1 mM亞精胺。在一些態樣中，包括2.0 mM亞精胺。在一些態樣中，包括2.15 mM亞精胺。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統缺乏多元胺。在一些態樣中，活體外轉錄反應系統缺乏亞精胺。

【0102】 在一些態樣中，IVT反應系統包括還原劑，諸如DTT (二硫蘇糖醇)，例如至少、至多或約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或40 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，還原劑係選自由以下組成之群：二硫蘇糖醇(DTT)、二硫赤蘚糖醇(DTE)、參(2-羧基乙基)膦(TCEP)及β-巰基乙醇。在一些態樣中，IVT反應系統包括1 mM DTT。在一些態樣中，IVT反應系統包括5 mM DTT。在一些態樣中，IVT反應系統包括10 mM DTT。在一些態樣中，IVT反應系統包括20 mM DTT。在一些態樣中，IVT反應系統缺乏還原劑。在一些態樣中，IVT反應系統不含有DTT。在一些態樣中，IVT反應系統不含有超出T7 RNA聚合酶儲存溶液中存在之DTT之保護性量的添加DTT。

【0103】 在一些態樣中，活體外轉錄反應例如在約37℃下進行約4小時或約240分鐘，例如至少、至多或約4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235或240分鐘，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些較佳態樣中，活體外轉錄反應例如在低於50℃下進行少於4小時，諸如至少、至多或約50℃、49℃、48℃、47℃、46℃、45℃、44℃、43℃、42℃、41℃、40℃、39℃、38℃、37℃、36℃、35℃、34℃、33℃、32℃、31℃、30℃、29℃、28℃、27℃、26℃、25℃、24℃、23℃、22℃、21℃或約20℃下至少、至多或約4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、

145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235或240分鐘，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，活體外轉錄反應在約36℃下進行約120分鐘。在一些態樣中，活體外轉錄反應在約36℃下進行約150分鐘。在一些態樣中，活體外轉錄反應在約37℃下進行約120分鐘。在一些態樣中，活體外轉錄反應在約37℃下進行約150分鐘。

【0104】 在一些態樣中，活體外轉錄反應在約37℃下進行大於120分鐘且小於360分鐘，較佳地大於120分鐘且小於300分鐘，更佳地大於120分鐘且小於260分鐘。在一些較佳態樣中，活體外轉錄反應在約37℃下進行約150分鐘。

【0105】 如本文所揭示，反應系統在約37℃下進行小於4小時產生高產量之高純度RNA。在一些態樣中，每次活體外轉錄反應之產量可為至少0.3 mg RNA/mL IVT反應起始體積至約20 mg RNA/mL IVT反應起始體積。舉例而言，在一些態樣中，RNA分子之總產量可為至少、至多或約0.3 mg RNA/mL、0.4 mg RNA/mL、0.5 mg RNA/mL、0.6 mg RNA/mL、0.7 mg RNA/mL、0.8 mg RNA/mL、0.9 mg RNA/mL、1.0 mg RNA/mL、2 mg RNA/mL、3 mg RNA/mL、4 mg RNA/mL、較佳地至少5 mg RNA/mL、6 mg RNA/mL、7 mg RNA/mL、8 mg RNA/mL、9 mg RNA/mL、10 mg RNA/mL、11 mg RNA/mL、12 mg RNA/mL、13 mg RNA/mL、14 mg RNA/mL、15 mg RNA/mL、16 mg RNA/mL、17 mg RNA/mL、18 mg RNA/mL、19 mg RNA/mL或20 mg RNA/mL IVT反應起始體積，或本文中可導出之任何範圍或值。在較佳態樣中，具有至少90%之預期全長轉錄本的所產生之RNA分子之每次活體外轉錄反應之總產

量可為至少2 mg RNA/mL、3 mg RNA/mL、4 mg RNA/mL，較佳地至少5 mg RNA/mL、6 mg RNA/mL、7 mg RNA/mL、8 mg RNA/mL、9 mg RNA/mL、10 mg RNA/mL、11 mg RNA/mL、12 mg RNA/mL、13 mg RNA/mL、14 mg RNA/mL、15 mg RNA/mL、16 mg RNA/mL、17 mg RNA/mL、18 mg RNA/mL、19 mg RNA/mL或20 mg RNA/mL IVT反應起始體積。在一些態樣中，具有至少90%之預期全長轉錄本的所產生之RNA分子的每次活體外轉錄反應總產量為至少17 mg RNA/mL IVT反應起始體積。

【0106】 在一些態樣中，在使用如本文所描述之DNA模板及RNA聚合酶的IVT反應之後，產生包括未加帽之RNA分子的第一組合物。在一些態樣中，RNA分子包括所關注基因及聚(A)尾之編碼序列。如本文中所使用，RNA分子包括mRNA。RNA分子可包括修飾，諸如經修飾之核苷酸。如本文中所使用，藉由活體外轉錄產生之「RNA分子」可稱為「RNA轉錄本」。「RNA分子」及「RNA轉錄本」可涵蓋經修飾之mRNA「modRNA」、未修飾之mRNA及自擴增RNA (saRNA)中之任一者。在較佳態樣中，RNA分子為saRNA。

【0107】 在一些態樣中，藉由使DNA樣品與本文描述之活體外轉錄反應系統接觸產生RNA分子之方法產生具有未加帽之RNA分子的第一組合物。在一些態樣中，第一組合物中至少30%之RNA分子包括未加帽之RNA分子。在一些態樣中，第一組合物包括至少、至多或約35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%、99%或100%，或本文中可導出之任何範圍或值的未加帽之RNA分子。

RNA分子

【0108】 藉由本文所描述之方法產生之RNA分子可為非編碼及/或編碼RNA。非編碼RNA (ncRNA)分子包括不轉譯成肽或多肽之功能性RNA分子。非編碼RNA分子可包括高度充足且功能上重要的RNA，諸如轉移RNA (tRNA)及核糖體RNA (rRNA)以及RNA，諸如snoRNA、微小RNA、siRNA、snRNA、引導RNA、環狀RNA、exRNA及piRNA及長ncRNA。在一較佳態樣中，RNA分子為包括經修飾之核苷酸的mRNA分子(本文稱為「經修飾之RNA分子」或「經修飾之mRNA分子」)。在一些較佳態樣中，RNA分子為自擴增RNA分子。

【0109】 編碼RNA包括可轉譯成肽或多肽之功能性RNA分子。在一些態樣中，編碼RNA分子包括至少一個編碼至少一種肽或多肽之開放閱讀框架。編碼RNA分子可包括一個(單順反子)、兩個(雙順反子)或更多個(多順反子)開放閱讀框架(ORF)。編碼RNA分子可為信使RNA (mRNA)分子、病毒RNA分子或自擴增RNA分子(saRNA，亦稱為複製子)。較佳地，RNA分子為mRNA。

【0110】 RNA分子可編碼超過一種蛋白質，例如兩種、三種、四種、五種、十種或更多種多肽。替代地或另外，一種RNA分子亦可編碼超過一種抗原，例如編碼不同或相同抗原之雙順反子或三順反子RNA分子。

【0111】 RNA分子之序列可經密碼子最佳化或去最佳化以供在所需宿主(諸如人類細胞)中表現。

【0112】 RNA分子之序列可視需要經修飾，例如以提高RNA之表現或複製效率，或提供額外穩定性或抗降解性。舉例而言，RNA序列可在其密碼子使用方面經修飾，例如以增加RNA之轉譯效率及半衰期。

【0113】 在一些態樣中，RNA分子可包括賦予聚核苷酸適用特性之一或多個結構及/或化學修飾或變異，包括在一些態樣中，缺乏引入聚核苷酸之細胞之先天性免疫反應的實質性誘導。如本文所用，「結構」特徵或修飾為兩個或更多個連接核苷酸在RNA分子中插入、缺失、複製、倒置或隨機化而不對核苷酸本身進行顯著化學修飾的特徵或修飾。因為化學鍵將必然斷裂且重新形成以實現結構修飾，所以結構修飾具有化學性質且因此為化學修飾。然而，結構修飾將產生不同核苷酸序列。舉例而言，聚核苷酸「ATCG」可化學修飾為「AT-5meC-G」。相同聚核苷酸可自「ATCG」結構修飾為「ATCCCG」。此處，已插入二核苷酸「CC」，從而引起聚核苷酸之結構修飾。

【0114】 在一些態樣中，RNA分子可包括除任何5'端帽結構以外的一或多個經修飾之核苷酸。天然存在之核苷修飾為此項技術中已知的。

【0115】 在一些態樣中，藉由本文描述之活體外轉錄反應產生之RNA分子包括至少、至多或約20至至少、至多或約100,000個核苷酸，或本文中可導出之任何範圍或值(例如自30至50、自30至100、自30至250、自30至500、自30至1,000、自30至1,500、自30至3,000、自30至5,000、自30至7,000、自30至10,000、自30至25,000、自30至50,000、自30至70,000、自100至250、自100至500、自100至1,000、自100至1,500、自100至3,000、自100至5,000、自100至7,000、自100至10,000、自100至25,000、自100至50,000、自100至70,000、自100至100,000、自500至

1,000、自500至1,500、自500至2,000、自500至3,000、自500至5,000、自500至7,000、自500至10,000、自500至25,000、自500至50,000、自500至70,000、自500至100,000、自1,000至1,500、自1,000至2,000、自1,000至3,000、自1,000至5,000、自1,000至7,000、自1,000至10,000、自1,000至25,000、自1,000至50,000、自1,000至70,000、自1,000至100,000、自1,500至3,000、自1,500至5,000、自1,500至7,000、自1,500至10,000、自1,500至25,000、自1,500至50,000、自1,500至70,000、自1,500至100,000、自2,000至3,000、自2,000至5,000、自2,000至7,000、自2,000至10,000、自2,000至25,000、自2,000至50,000、自2,000至70,000及自2,000至100,000)。在較佳態樣中，RNA分子包括至少100個核苷酸。舉例而言，在一些態樣中，RNA之長度在100與15,000個核苷酸之間；在7,000與16,000個核苷酸之間；在8,000與15,000個核苷酸之間；在9,000與12,500個核苷酸之間；在11,000與15,000個核苷酸之間；在13,000與16,000個核苷酸之間。在一些態樣中，RNA之長度在約1,600個核苷酸與9,600個核苷酸之間。在較佳態樣中，作為本文描述之活體外轉錄反應的聚核苷酸產物的RNA分子包括所關注基因及聚(A)尾。在一些態樣中，RNA分子進一步包括5' UTR及3' UTR。

【0116】 在一些態樣中，經修飾之mRNA分子編碼單一多肽抗原，或視情況編碼兩個或更多個多肽抗原，該等多肽抗原以序列中之每一者在以胺基酸序列形式表現時保持其一致性的方式連接在一起(例如，串聯連接)。自經修飾之mRNA產生的多肽隨後可以融合多肽形式產生，或以使得產生分離多肽或肽序列之方式經工程改造。在較佳態樣中，經修飾之mRNA分子編碼所關注之單一多肽。

【0117】在一些較佳態樣中，RNA分子為saRNA。「自擴增RNA (Self-amplifying RNA)」、「自擴增RNA (self-amplifying RNA)」及「複製子」係指能夠自我複製之RNA。自擴增RNA分子可藉由使用來源於例如α病毒之複製元件且用編碼所關注多肽之核苷酸序列取代結構病毒多肽來產生。自擴增RNA分子通常為可在遞送至細胞之後直接轉譯的正股分子，且此轉譯提供RNA依賴性RNA聚合酶，其隨後自所遞送RNA產生反義及正義轉錄本。所遞送之RNA使得產生多個子RNA。此等子RNA分子以及共線次基因體轉錄本可自身經轉譯以提供經編碼之所關注基因(例如病毒抗原)之原位表現，或可經轉錄以提供與經轉譯以提供抗原之原位表現的所遞送RNA同義的其他轉錄本。此轉錄序列之總體結果為所引入saRNA之數目擴增，且因此經編碼之所關注基因(例如病毒抗原)變成細胞之主要多肽產物。

【0118】在一些態樣中，自擴增RNA包括至少一或多個選自以下中之任一者的基因：病毒複製酶、病毒蛋白酶、病毒解螺旋酶及其他非結構性病毒蛋白質。在一些態樣中，自擴增RNA亦可包括5'端及3'端牽引複製序列，及視情況存在之編碼所需胺基酸序列(例如所關注抗原)之異源序列。引導異源序列之表現的次基因體啟動子可包括在自擴增RNA中。視情況，異源序列(例如，所關注抗原)可框內融合至自擴增RNA中之其他編碼區及/或可處於內部核糖體進入位點(IRES)之控制下。

【0119】在較佳態樣中，自擴增RNA分子未囊封於病毒樣粒子中。本文所述之自擴增RNA分子可經設計以使得自擴增RNA分子無法誘導傳染性病毒粒子之產生。此可例如藉由省略一或多種編碼在自擴增RNA中產生病毒粒子所需之結構蛋白的病毒基因來實現。舉例而言，當自擴增

RNA分子係基於α病毒，諸如辛畢斯病毒(Sinbis virus，SIN)、勝利基森林病毒(Semliki Forest virus)及委內瑞拉馬腦炎病毒(VEE)時，可省略編碼病毒結構蛋白，諸如衣殼及/或包膜糖蛋白之一或多個基因。

【0120】 在一些態樣中，本文所描述之自擴增RNA分子編碼：(i)可由自擴增RNA分子轉錄RNA之RNA依賴性RNA聚合酶；及(ii)所關注多肽，例如病毒抗原。在一些態樣中，聚合酶可為α病毒複製酶，例如包括α病毒蛋白質nsP4。在一些態樣中，本文所描述之自擴增RNA分子可包括一或多種經修飾之核苷酸(例如假尿苷、N6-甲基腺苷、5-甲基胞苷、5-甲基尿苷)。

【0121】 saRNA構築體可編碼至少一種非結構蛋白(nsP)，該非結構蛋白安置於編碼至少一種所關注肽或多肽之序列的5'或3'。較佳地，編碼至少一種nsP之序列安置於編碼所關注肽或多肽之序列的5'。因此，較佳地編碼至少一種nsP之序列可安置於RNA構築體之5'端處。在一些態樣中，由RNA構築體編碼之至少一種非結構蛋白可為RNA聚合酶nsP4。較佳地，saRNA構築體編碼nsP1、nsP2、nsP3及nsP4。如此項技術中已知，nsP1為病毒加帽酶及複製複合物(RC)之膜錨。nsP2為RNA解螺旋酶及負責ns聚合蛋白質處理之蛋白酶。nsP3與若干宿主蛋白質相互作用且可調節蛋白多ADP核糖基化及單ADP核糖基化。nsP4為核心病毒RNA依賴性RNA聚合酶。在一些態樣中，聚合酶可為α病毒複製酶，例如包含α病毒蛋白質nsP1、nsP2、nsP3及nsP4中之一或多者。

【0122】 儘管除非結構複製酶多肽以外，天然α病毒基因體編碼結構病毒粒子蛋白，但在一些態樣中，自擴增RNA分子不編碼α病毒結構蛋白。在一些態樣中，自擴增RNA可引起在細胞中產生自身的基因體RNA

複本，但不產生包括病毒粒子之RNA。不受理論或機制束縛，不能產生此等病毒粒子意謂與野生型α病毒不同，自擴增RNA分子無法維持自身呈感染形式。在野生型病毒中延續所需之α病毒結構蛋白可不存在於本發明之自擴增RNA中，且其位置可由編碼所關注蛋白之基因獲得，使得次基因體轉錄本編碼免疫原而非結構性α病毒之病毒粒子蛋白。

【0123】 在一些態樣中，自擴增RNA分子可具有兩個開放閱讀框架。第一(5')開放閱讀框架編碼複製酶；第二(3')開放閱讀框架編碼包含所關注抗原之多肽。在一些態樣中，RNA可具有額外(例如下游)開放閱讀框架，例如以編碼其他抗原或編碼輔助多肽。

【0124】 視情況，本文所述之自擴增RNA分子亦可經設計以誘導產生減毒或有毒的感染性病毒粒子，或產生能夠進行單輪後續感染的病毒粒子。

【0125】 當遞送至脊椎動物細胞時，自擴增RNA分子可藉由自身(或自身之反義複本)轉錄而導致產生多個子RNA。自擴增RNA分子可在遞送至細胞之後直接轉譯，且此轉譯提供RNA依賴性RNA聚合酶，其隨後自所遞送RNA產生轉錄本，藉此產生多個子RNA。此等RNA分子相對於所遞送RNA為反義的且可自身經轉譯以提供基因產物之原位表現，或可經轉錄以提供與經轉譯以提供基因產物之原位表現的所遞送RNA同義的其他轉錄本。

【0126】 在一些態樣中，saRNA分子係基於α病毒。α病毒包括披膜病毒科之一組遺傳、結構及血清學相關之節肢動物媒介病毒。α病毒屬內之例示性病毒及病毒亞型包括辛得比斯病毒、勝利基森林病毒、羅斯河病毒(Ross River virus)及委內瑞拉馬腦炎病毒。因此，本文所述之自擴增

RNA可併入RNA複製酶，該RNA複製酶來源於以下中之任一者：勝利基森林病毒(SFV)、辛得比斯病毒(SIN)、委內瑞拉馬腦炎病毒(VEE)、羅斯河病毒(RRV)或屬於α病毒家族之其他病毒。在一些態樣中，本文所述之自擴增RNA可併入來源於突變型或野生型病毒序列之序列，例如已在saRNA中使用VEEV之減毒TC83突變體。

【0127】 基於α病毒之saRNA為可在遞送至細胞之後轉譯之(+)-多股saRNA，其引起複製酶(或複製酶-轉錄酶)之轉譯。複製酶轉譯為自裂解以提供複製複合物之聚合蛋白質，該複製複合物產生(+)-股遞送RNA之基因體(-)-股複本。此等(-)-股轉錄本自身可轉錄，得到(+)-股親本RNA之其他複本且亦得到編碼所需基因產物之次基因體轉錄本。次基因體轉錄本之轉譯由此引起受感染細胞原位表現所需基因產物。適合的α病毒saRNA可使用來自辛得比斯病毒、勝利基森林病毒、東部馬腦炎病毒、委內瑞拉馬腦炎病毒或其突變變異體之複製酶。

【0128】 在一些態樣中，自擴增RNA分子源自或基於除α病毒以外的病毒，較佳地正多股RNA病毒，且更佳地小RNA病毒、黃病毒、風疹病毒屬、瘟病毒、C型肝炎病毒、杯狀病毒或冠狀病毒。適合的野生型α病毒序列為熟知的且可獲自序列保藏處，諸如American Type Culture Collection, Rockville, Md。適合α病毒之代表性實例包括奧拉(Aura) (ATCC VR-368)、比巴魯病毒(Bebaru virus) (ATCC VR-600、ATCC VR-1240)、卡巴斯歐(Cabassou) (ATCC VR-922)、屈公病毒(Chikungunya virus) (ATCC VR-64、ATCC VR-1241)、東部馬腦脊髓炎病毒(ATCC VR-65、ATCC VR-1242)、摩根堡(Fort Morgan) (ATCC VR-924)、蓋塔病毒(Getah virus) (ATCC VR-369、ATCC VR-1243)、克澤拉

格齊(Kyzylagach) (ATCC VR-927)、馬雅羅(Mayaro) (ATCC VR-66)、馬雅羅病毒(Mayaro virus) (ATCC VR-1277)、米德爾堡(Middleburg) (ATCC VR-370)、穆坎布病毒(Mucambo virus) (ATCC VR-580、ATCC VR-1244)、恩杜穆(Ndumu) (ATCC VR-371)、皮春納病毒(Pixuna virus) (ATCC VR-372、ATCC VR-1245)、羅斯河病毒(ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、勝利基森林(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、辛得比斯病毒(ATCC VR-68、ATCC VR-1248)、圖那特(Tonate) (ATCC VR-925)、脆尼特(Triniti) (ATCC VR-469)、烏納(Una) (ATCC VR-374)、委內瑞拉馬腦脊髓炎(ATCC VR-69、ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR-1249、ATCC VR-532)、西方馬腦脊髓炎(ATCC VR-70、ATCC VR-1251、ATCC VR-622、ATCC VR-1252)、瓦塔羅阿(Whataroa) (ATCC VR-926)及Y-62-33 (ATCC VR-375)。

【0129】 在一些態樣中，本文所述之自擴增RNA分子大於其他類型之RNA (例如mRNA)。通常，本文所述之自擴增RNA分子包括至少約4 kb。舉例而言，自擴增RNA可包括至少、至多或約5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、11 kb或12 kb或更大，或本文中可導出之任何範圍或值。在某些實例中，自擴增RNA為約4 kb至約12 kb、約5 kb至約12 kb、約6 kb至約12 kb、約7 kb至約12 kb、約8 kb至約12 kb、約9 kb至約12 kb、約10 kb至約12 kb、約11 kb至約12 kb、約5 kb至約11 kb、約5 kb至約10 kb、約5 kb至約9 kb、約5 kb至約8 kb、約5 kb至約7 kb、約5 kb至約6 kb、約6 kb至約12 kb、約6 kb至約11 kb、約6 kb至約10 kb、約6 kb至約9 kb、約6 kb至約8 kb、約6 kb至約7 kb、約7 kb至約11 kb、約7 kb至約10 kb、約7 kb至約9 kb、約7 kb至約8 kb、約8 kb至約11 kb、約8 kb

至約10 kb、約8 kb至約9 kb、約9 kb至約11 kb、約9 kb至約10 kb或約10 kb至約11 kb。

【0130】在一些態樣中，自擴增RNA分子可編碼單一多肽抗原，或視情況編碼兩個或更多個多肽抗原，該等多肽抗原以序列中之每一者在以胺基酸序列形式表現時保持其一致性的方式連接在一起(例如，串聯連接)。由自擴增RNA產生之多肽接著可以融合多肽之形式產生，或以使得產生分離多肽或肽序列之方式經工程改造。

【0131】在一些態樣中，本文所述之自擴增RNA可編碼包括一系列抗原決定基之一或多種多肽抗原。較佳地，抗原決定基能夠引發輔助T細胞反應或細胞毒性T細胞反應或兩者。在一些態樣中，RNA分子具有3'聚(A)尾，亦即，可連接至RNA之3'端的連續腺苷殘基延伸部分。聚(A)尾可增加RNA分子之半衰期。RNA分子可進一步包括靠近其3'端之聚(A)聚合酶識別序列(例如AAUAAA)。在一些態樣中，3'聚(A)尾具有至少10個連續腺苷殘基且至多300個連續腺苷殘基延伸部分。較佳地，RNA分子包括至少20個連續腺苷殘基且至多40個連續腺苷殘基。在一些較佳態樣中，RNA分子包括約40個連續腺苷殘基。在一些態樣中，RNA分子包括約80個連續腺苷殘基。聚(A)尾可在增強轉譯功效及調節mRNA品質控制及降解之功效中起關鍵調節作用。短序列或超聚腺苷酸化可信號傳導RNA降解。例示性設計包括約40 A、約80 A之聚(A)尾。在一些態樣中，RNA分子進一步包括緊接在聚(A)尾序列下游的核酸內切酶識別位點序列。

【0132】在一些態樣中，藉由本文描述之活體外轉錄反應產生之RNA分子經純化，例如包括可經由例如超過濾、透濾或例如切向流超過濾/透濾進行。

RNA分子之加帽

【0133】 在一些態樣中，本文描述之產生RNA分子之方法進一步包括藉由使未加帽之RNA分子與加帽反應系統接觸來對未加帽之RNA分子加帽以產生加帽之RNA分子，該加帽反應系統包括以下中之任一者：鳥苷酸轉移酶、s-腺苷-L-甲硫胺酸(SAM)、三磷酸鳥苷(GTP)及2'-O-甲基轉移酶及其任何組合。在一些態樣中，RNA之5'端以具有結構m7G(5′)ppp(5')N (端帽0結構)的經修飾之核糖核苷酸或其衍生物加帽，其可在RNA合成期間併入(共轉錄加帽)或可在RNA轉錄之後酶促進行(轉錄後加帽)。在一些較佳態樣中，RNA分子之5'端經由RNA轉錄之後的酶反應以經修飾之核糖核苷酸加帽。在一些態樣中，加帽在RNA分子之純化(例如，切向流過濾)之後進行。

【0134】 用於加帽之例示性酶促反應可包括使用包括mRNA三磷酸酶、鳥苷醯基轉移酶及鳥嘌呤-7-甲基轉移酶之牛痘病毒加帽酶(VCE)，其催化N7-單甲基化端帽0結構之構築。端帽0結構在維持RNA分子之穩定性及轉譯效率方面起重要作用。RNA分子之5'端帽可進一步由2'-O-甲基轉移酶修飾，該2'-O-甲基轉移酶引起端帽1結構(m7Gppp [m2'-O] N)之產生，其可進一步增加轉譯效率。

【0135】 在一些態樣中，RNA分子可使用牛痘鳥苷醯基轉移酶、鳥苷三磷酸及S-腺苷基-L-甲硫胺酸在5'端處酶促加帽，得到端帽0結構。倒置的7-甲基鳥苷端帽經由5'至5'三磷酸橋添加。替代地，使用2′-O-甲基轉移酶與牛痘鳥苷醯基轉移酶得到端帽1結構，其中除端帽0結構以外，2'-OH基團在第一轉錄核苷酸上經甲基化。S-腺苷基-L-甲硫胺酸(SAM)為用作甲基轉移試劑之輔因子。在一些較佳態樣中，RNA酶抑制劑不包括於

酶促加帽反應中。在一較佳態樣中，酶促加帽反應步驟在持續混合下進行。在另一態樣中，RNA分子未經共轉錄加帽。

【0136】 與此項技術中已知的合成5'端帽結構(或野生型、天然或生理5'端帽結構)相比，5'端帽結構之非限制性實例為具有尤其端帽結合多肽之結合增強、半衰期增加、對5'核酸內切酶之敏感性降低及/或5'去帽減少的彼等結構。舉例而言，重組牛痘病毒加帽酶及重組2'-O-甲基轉移酶可在mRNA之5'末端核苷酸與鳥嘌呤端帽核苷酸之間產生典型5'-5'三磷酸鍵，其中端帽鳥嘌呤包括N7甲基化且mRNA之5'末端核苷酸包括2'-O-甲基。此結構稱為端帽1結構。與例如此項技術中已知的其他5'端帽類似物結構相比，此端帽使得轉譯能力及細胞穩定性更高以及細胞促炎性細胞介素之活化減少。端帽結構包括但不限於7mG(5′)ppp(5′)N、pN2p (端帽0)及7mG(5′)ppp(5′)N1mpNp (端帽1)。端帽0為經由5'至5'三磷酸鍵連接至5'核苷酸之N7-甲基鳥苷，其通常被稱作m7G端帽或m7Gppp。在細胞中，端帽0結構對於攜載端帽之mRNA的高效轉譯為至關重要的。起始核苷酸之2'-O位置上的額外甲基化產生端帽1，或被稱作m7GpppNm-，其中Nm表示具有2'-O甲基化之任何核苷酸。在一些態樣中，5'端端帽包括端帽類似物，例如5'端端帽可包括鳥嘌呤類似物。例示性鳥嘌呤類似物包括但不限於肌苷、Nl-甲基-鳥苷、2'氟-鳥苷、7-去氮-鳥苷、8-側氧基-鳥苷、2-胺基-鳥苷、LNA-鳥苷及2-疊氮基-鳥苷。

【0137】 在一些態樣中，加帽區可包括單一端帽或形成端帽之一系列核苷酸。在此態樣中，加帽區之長度可為1至10個核苷酸，例如至少、至多或約1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個，或本文中之任何範圍或值，例如2至9個、3至8個、4至7個、1至5個、5至10個或至少2個或10個

或更少個核苷酸。在一些態樣中，不存在端帽。

【0138】 在一些態樣中，第一及第二操作區之長度可介於以下範圍內：3至40個核苷酸，例如至少、至多或約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或40個，或本文中可導出之任何範圍或值，例如5至30個、10至20個、15個或至少4個或30個或更少個核苷酸，且除了起始及/或終止密碼子，可包含一或多個訊號及/或限制序列。

【0139】 在一些態樣中，本文描述之自擴增RNA分子具有5'端帽(例如，7-甲基鳥苷)。此端帽可增強RNA之活體內轉譯。在一些態樣中，自擴增RNA可包括(除了任何5'端帽結構)具有經修飾之核鹼基的一或多個核苷酸。在一些態樣中，RNA分子僅包括核苷之間的磷酸二酯鍵。在一些態樣中，RNA分子可包括胺基磷酸酯、硫代磷酸酯及/或膦酸甲酯鍵。

【0140】 在一些態樣中，本文描述之經修飾之mRNA分子具有5'端帽(例如，7-甲基鳥苷)。此端帽可增強RNA之活體內轉譯。在一些態樣中，經修飾之mRNA可包括(除了任何5'端帽結構)具有經修飾之核鹼基的一或多個核苷酸。在一些態樣中，RNA分子僅包括核苷之間的磷酸二酯鍵。在一些態樣中，RNA分子可包括胺基磷酸酯、硫代磷酸酯及/或膦酸甲酯鍵。

【0141】 在一個態樣中，加帽反應系統包括如下進行之酶促5'加帽。最終1×緩衝液添加包括以下：至少、至多或約50 mM Tris HCl，pH 8，5 mM KCl、1 mM MgCl2、0.5 mM GTP、0.2 mM S-腺苷-甲硫胺酸及1 mM二硫蘇糖醇。在一些態樣中，最終1×緩衝液不包括二硫蘇糖醇。

【0142】 在一些態樣中，加帽反應在進行IVT反應之容器中進行。在此等態樣中，IVT反應在加帽反應之前經稀釋3倍與10倍之間，例如至少、至多或約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一些態樣中，IVT反應用Tris pH 7.0緩衝液稀釋。

【0143】 為降解來自IVT反應之殘餘DNA模板，可添加DNA酶I。在一些態樣中，DNA酶I以至少、至多或約1 U/μg之DNA至10 U/μg之DNA之間的濃度，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10 U/μg之DNA或本文中可導出之任何範圍或值添加。除了DNA酶I，$CaCl_2$可以在至少、至多或約0.1 mM至4 mM之間的濃度以DNA酶I之輔因子形式添加，例如0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或4.0 mM，或本文中可導出之任何範圍或值。

【0144】 在一些態樣中，將焦磷酸酶添加至加帽反應中。焦磷酸酶幫助降解焦磷酸鹽，該焦磷酸鹽為藉由IVT反應或藉由加帽反應產生之抑制性副產物。

【0145】 在一些態樣中，加帽反應在37℃下進行30分鐘至2小時，例如至少、至多或約30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、

113、114、115、116、117、118、119或120分鐘，或本文中可導出之任何範圍或值。在一些態樣中，加帽反應在高於20℃且低於50℃之溫度，例如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℃下進行。

【0146】在一些態樣中，對未加帽之RNA分子加帽的步驟產生總RNA分子(加帽及未加帽)之至少、至多或約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%加帽之RNA分子，或本文中可導出之任何範圍或值。純度可如本文所描述，例如經由逆相HPLC或基於片段分析儀或生物分析儀晶片之電泳測定且藉由例如全長RNA分子相對於總峰之峰面積來量測。

純化

【0147】在一些態樣中，藉由本文所描述之方法產生之RNA分子可與DNA酶I及$CaCl_2$接觸以在活體外轉錄反應之後酶促消化DNA模板。在一些態樣中，諸如在大規模(大於10 mL之反應體積)操作期間，IVT反應可包括DNA酶I及$CaCl_2$添加以及用EDTA及蛋白酶K之額外處理。EDTA可淬滅任何陽離子性金屬物種，包括鎂，且蛋白酶K可消化IVT反應中存在之蛋白質，從而減小其大小。

【0148】在一些態樣中，本文所描述之方法並不包括使藉由本文所描述之方法產生之RNA分子與DNA酶I接觸以在活體外轉錄反應之後酶促消化DNA模板。

【0149】 在一些態樣中，線性DNA模板自活體外轉錄反應系統移除，例如DNA模板經由層析自RNA分子分離。在一些態樣中，RNA分子結合至親和力基質，而DNA模板流動通過且經移除。在一些態樣中，基於聚(A)捕獲之親和純化為寡聚(dT)純化。舉例而言，多胸苷配位體可固定至衍生化層析樹脂。純化機制可涉及RNA分子之聚(A)尾與寡核苷酸配位體之雜交，其中DNA模板將未結合。在較佳態樣中，不包括聚(A)延伸部分(中止在活體外轉錄期間形成之轉錄本及其他截短物)之RNA分子將不結合至樹脂且將不與親和配位體形成雙螺旋體。可隨後利用低離子強度緩衝液或競爭性結合寡核苷酸溶液自樹脂溶離聚腺苷酸化RNA。

【0150】 較佳地，純化材料實質上不含一或多種雜質或污染物，包括本文描述之線性DNA模板及/或反向補體轉錄產物，且例如為至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%或97%純；更佳地，至少98%純且更佳地仍至少99%純。

【0151】 用於產生RNA分子之方法可在活體外轉錄之後包括額外純化步驟，例如離子交換層析法步驟、疏水性相互作用層析(HIC)步驟、陶瓷羥基磷灰石(CHA)層析步驟及/或超過濾/透濾步驟。在一較佳態樣中，具有既定序列之RNA分子之該合成以大規模合成形式進行。

【0152】 如本文中所使用，術語「大規模」係指約毫克量，較佳地至少一公克之該RNA分子之反應產量。在一些態樣中，在大規模合成RNA之生物反應器中進行活體外轉錄反應。因此，生物反應器可經調適以進行本文所描述之方法。在一些態樣中，生物反應器經調適以進行分批法(其中活體外轉錄之所有組分在反應開始時供應)、分批進料法(其中最初提供活體外轉錄組分，且在具有或不具有定期產物收集之過程期間連續

或以遞增方式供應額外的活體外轉錄組分)或連續(亦稱為灌注)法(其中固定組件(諸如模板及/或一或多種酶)且在該過程中連續的、逐步或間歇地添加及移除其他組分及/或產物)。在一些態樣中，用於合成具有既定序列之RNA分子之生物反應器(較佳地大規模)為經模組化設計之活體外轉錄反應器系統，其包括用於在序列最佳化反應混合物中進行活體外RNA轉錄反應之反應模組、用於暫時捕獲經轉錄之RNA分子的捕獲模組及用於控制反應混合物之組分進料至反應模組中的控制模組。反應模組較佳地包括用於自反應混合物分離核苷酸之過濾膜，且藉由控制模組控制反應混合物之組分之進料係基於核苷酸之量測濃度。

【0153】 如本文中所使用，術語「生物反應器」係指其中在指定條件下進行活體外轉錄反應的腔室或試管或管柱。生物反應器可經熱調節以準確地保持特定溫度，通常在25℃與45℃之間。在一些態樣中，生物反應器保持約25℃之溫度。在一些態樣中，生物反應器保持約30℃之溫度。在一些態樣中，生物反應器保持約37℃之溫度。生物反應器之體積可在至少1、10、100或200公升或更大或兩者之間任何體積範圍內。在一些態樣中，IVT反應之體積為至少10L、30L或50L。在一些態樣中，IVT反應之體積為至少100L。在一些態樣中，DNA模板係獲自醱酵作用，其中細胞在初始生長期(或生長期)期間生長持續更長或更短時間量，視從業者之需求及細胞本身之要求而定。在一些態樣中，細胞生長足以達成預定細胞密度之時段。在一些態樣中，細胞生長足以實現以下預定細胞密度之時段：約1×10^6個細胞/毫升、約5×10^6個細胞/毫升、約1×10^7個細胞/毫升、約5×10^7個細胞/毫升、約1×10^8個細胞/毫升或約5×10^8個細胞/毫升。在一些態樣中，細胞生長足以實現以下預定光密度(OD_{600})之時段：約10、

15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295或300。在一些態樣中，細胞生長足以達成如下之細胞密度的時段，該細胞密度為若使細胞不受干擾地生長，則細胞最終將達至之最大細胞密度的給定百分比。舉例而言，細胞可生長足以達成以下所需活細胞密度之時段：1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或99%之最大細胞密度。在一些態樣中，細胞生長直至細胞密度每天增加不超過培養物之15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在一些態樣中，細胞生長直至細胞密度每天增加不超過培養物之5%。在一些態樣中，使細胞在限定時段內生長。舉例而言，視細胞培養物之起始濃度及細胞之固有生長速率而定，細胞可生長0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20天或更多天，較佳地4至10天。可在該過程期間攪拌或振盪細胞培養物。在一些態樣中，生物反應器經組態以包括攪拌。生物反應器可為提供可變攪拌速率之經攪拌細胞。在一些態樣中，生物反應器包含攪拌速度至少0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1,000 RPM (或對應的功率/體積、葉尖速度或混合時間)。在一些態樣中，生物反應器包含150 RPM之攪拌速度(等效於1.3 W/m^3之功率/體積)。在一些態樣中，生物反應器包含250 RPM之攪拌速

度(等效於5.9 W/m^3之功率/體積)。在一些態樣中，生物反應器包含600 RPM之攪拌速度(等效於71.7 W/m^3之功率/體積)。在一些態樣中，生物反應器包含混合時間至少1.0、1.2、1.3、1.5、2.0、5.0、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60秒。在一些態樣中，生物反應器包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9 m/s之葉輪外緣速度。在一些態樣中，生物反應器可組態有流入或進料線及出口。在一些較佳態樣中，生物反應器包括用於自反應混合物分離小分子及大分子，尤其用於在反應混合物中自較大(例如，大於至少7,000 nt) mRNA產物分離核苷酸、焦磷酸鹽及其他低分子量組分的過濾膜。在此類流動系統中引入過濾膜，例如超過濾膜可用於自低分子量組分(諸如核苷酸及焦磷酸鹽)分離高分子量組分(諸如例如，多肽及/或聚核苷酸)。在一些態樣中，過濾膜將固定之DNA模板、RNA聚合酶及合成之RNA分子選擇性地保留在反應模組之反應器核心中，而諸如三磷酸核苷酸(NTP)之較小分子可通過過濾膜至反應模組之獨立較小隔室，亦即過濾隔室中。隨後可例如藉由在包括低分子量組分之經分離流體中進行光譜分析來量測核苷酸濃度。替代地，核苷酸濃度可藉由線上HPLC系統量測。在此反應器系統中應用NTP混合允許在活體外轉錄反應期間即時量測核苷酸濃度以監測活體外轉錄反應之進展。在一些態樣中，生物反應器包含靜態或攪拌式管反應。在一些態樣中，生物反應器包含Sartorius AMBR系統，包括但不限於AMBR15、AMBR250模組化及AMBR250 HT系統。在一些態樣中，生物反應器包含Eppendorf BioBlu系統。在一些態樣中，生物反應器包含利用Tecan液體處理器之孔盤反應。在一些態樣中，生物反應器包含由Mettler Toledo EasyMax 102或402合成工作台控制之容器。

RNA分子之表徵及分析

【0154】 藉由本文所描述之方法產生之RNA分子可使用各種方法分析及表徵。可在加帽之前或之後進行分析。替代地，可在基於聚(A)捕捉之親和純化之前或之後進行分析。在另一態樣中，可在額外純化步驟，例如陰離子交換層析及其類似步驟之前或之後進行分析。舉例而言，RNA轉錄本完整性可使用電泳(使用片段分析儀毛細管或生物分析儀晶片系統)或經由逆相HPLC方法測定。在一些情況下，片段分析儀可使毛細管電泳及HPLC自動化。在其他態樣中，分別使用分析型逆相HPLC來分析RNA模板純度。加帽效率可使用例如總核酸酶消化，隨後二核苷酸帽物種相對於未加帽GTP物種之LC-UV或LC-MS定量來分析。活體外效力可藉由例如將RNA分子轉染至人類細胞株中來分析。可使用諸如ELISA或流式細胞分析技術之方法來定量所關注多肽之蛋白質表現。免疫原性可藉由例如將RNA分子轉染至指示先天性免疫刺激之細胞株(例如PBMC)中來分析。可使用例如諸如ELISA之方法來分析細胞介素誘導，從而定量細胞介素，例如干擾素-α。

【0155】 本文描述之產生RNA分子之方法可產生RNA分子，亦即至少30%全長轉錄本，或至少、至多或約35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%全長轉錄本，或本文中可導出之任何範圍或值。純度可如本文所描述，例如經由逆相HPLC或基於生物分析儀晶片之電泳來測定且藉由例如全長RNA分子相對於總峰之峰面積來量測。

所關注基因

【0156】本發明之DNA模板及所得RNA分子包括所關注基因。所關注基因編碼選自以下之所關注多肽：例如生物製劑、抗體、疫苗、治療多肽或肽、細胞穿透肽、分泌多肽、質膜多肽、細胞質或細胞骨架多肽、胞內膜結合多肽、核多肽、與人類疾病相關之多肽、由人類基因體編碼之靶向部分或彼等多肽，對於該人類基因體而言，尚未鑑別出治療適應症但仍用於研究及探索之領域中。特定所關注基因之序列容易由熟習此項技術者使用公開及私有資料庫(例如GenBank)鑑別。

【0157】在一些態樣中，RNA分子包括較佳衍生自與感染性疾病相關之病原體的抗原之編碼區，該抗原較佳選自衍生自以下病原體之抗原：鮑氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*)、邊蟲屬(*Anaplasma genus*)、嗜吞噬細胞無形體(*Anaplasma phagocytophilum*)、巴西鉤蟲(*Ancylostoma braziliense*)、十二指腸鉤蟲(*Ancylostoma duodenale*)、溶血隱秘桿菌(*Arcanobacterium haemolyticum*)、似蚓蛔線蟲(*Ascaris lumbricoides*)、曲黴菌屬(*Aspergillus* genus)、星狀病毒科(Astroviridae)、巴貝蟲屬(*Babesia* genus)、炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*)、蠟樣芽胞桿菌(*Bacillus cereus*)、漢賽巴爾通體(*Bartonella henselae*)、BK病毒、人芽囊原蟲(*Blastocystis hominis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*)、包柔螺旋體種(*Borrelia* genus)、包柔螺旋體屬(*Borrelia* spp)、布氏桿菌屬(*Brucella* genus)、馬來絲蟲(*Brugia malayi*)、布尼亞病毒科(Bunyaviridae family)、洋蔥伯克霍爾德菌(*Burkholderia cepacia*)及其他伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia*)物種、鼻疽伯克霍爾德氏菌

(*Burkholderia mallei*)、類鼻疽伯克霍爾德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、杯狀病毒科(Caliciviridae family)、曲狀桿菌屬(*Campylobacter* genus)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、念珠菌屬、沙眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎嗜衣原體(*Chlamydophila pneumoniae*)、鸚鵡披衣菌(*Chlamydophila psittaci*)、CJD朊病毒、華支睾吸蟲(*Clonorchis sinensis*)、肉毒桿菌(*Clostridium botulinam*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、產氣莢膜梭菌、梭菌屬(*Clostridium* spp)、破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)、球孢子菌屬(*Coccidioides* spp)、冠狀病毒、白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、貝氏考克斯菌(*Coxiella burnetii*)、克里米亞-岡果出血熱病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)、新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、隱孢子蟲(*Cryptosporidium* genus)、巨細胞病毒(CMV)、登革病毒(Dengue viruses) (DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4)、脆雙核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)、埃博拉病毒(Ebolavirus；EBOV)、棘球絛蟲(*Echinococcus* genus)、恰菲埃里希體(*Ehrlichia chaffeensis*)、尤溫艾利希氏體(*Ehrlichia ewingii*)、艾利希體屬(*Ehrlichia genus*)、痢疾內阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、腸球菌(*Enterococcus* genus)、腸病毒屬、腸病毒、主要的科沙奇(Coxsackie) A病毒及腸病毒71 (EV71)、表皮癬菌屬(*Epidermophyton* spp)、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr Virus；EBV)、大腸桿菌O157:H7、0111及0104:H4、肝片吸蟲(*Fasciola hepatica*)及巨大肝蛭(*Fasciola gigantica*)、FFI朊病毒、絲蟲目總科(Filarioidea superfamily)、黃病毒屬(Flaviviruses)、土拉熱弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*)、梭桿菌屬(*Fusobacterium*

genus)、白地絲黴菌(*Geotrichum candidum*)、腸賈第蟲(*Giardia intestinalis*)、頷口蟲屬(*Gnathostoma* spp)、GSS朊病毒、瓜納里托病毒(Guanarito virus)、杜克雷嗜血桿菌(*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)、幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)、亨尼帕病毒(Henipavirus) (亨德拉病毒尼帕病毒)、A型肝炎病毒、B型肝炎病毒(HBV)、C型肝炎病毒(HCV)、D型肝炎病毒、E型肝炎病毒、單純疱疹病毒1及2 (HSV-1及HSV-2)、莢膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum)*、HIV (人免疫缺陷病毒)、威尼克外瓶黴(*Hortaea werneckii)*、人類波卡病毒(HBoV)、人類疱疹病毒6 (HHV-6)及人類疱疹病毒7 (HHV-7)、人類間質肺炎病毒(hMPV)人類乳頭瘤病毒(HPV)、人類副流行性感冒病毒(HPIV)、日本腦炎病毒、JC病毒、胡寧病毒(Junin virus)、金氏菌(Kingella kingae)、肉芽腫克雷伯氏菌(*Klebsiella granulomatis)*、庫魯朊病毒(Kuru prion)、賴薩病毒(Lassa virus)、嗜肺性軍團菌(*Legionella pneumophila)*、利什曼原蟲屬(*Leishmania* genus)、鉤端螺旋體屬(*Leptospira* genus)、單核球增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes)*、淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、馬丘波病毒(Machupo virus)、馬拉色菌屬(*Malassezia* spp)、馬堡病毒(Marburg virus)、麻疹病毒、橫川後殖吸蟲(*Metagonimus yokagawai)*、微孢子目門(Microsporidia phylum)、傳染性軟疣病毒(MCV)、腮腺炎病毒(Mumps virus)、麻風分支桿菌及彌漫型痲瘋分枝桿菌(*Mycobacterium lepromatosis)*、結核分支桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、潰瘍分枝桿菌(*Mycobacterium ulcerans)*、肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)、變形纖毛蟲(*Naegleria fowleri*)、美洲鉤蟲(*Necator americanus*)、淋病奈瑟

氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、奈瑟氏腦膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、星形土壤絲菌(*Nocardia asteroides*)、諾卡菌屬(*Nocardia* spp)、人蟠尾絲蟲(*Onchocerca volvulus*)、恙蟲病東方體(Orientia tsutsugamushi)、正黏病毒科(Orthomyxoviridae family) (包括流感，諸如禽流感及人類流感)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、並殖吸蟲屬(*Paragonimus* spp)、衛氏並殖吸蟲(*Paragonimus westermani*)、細小病毒B19、巴氏桿菌屬(*Pasteurella* genus)、瘧原蟲屬(*Plasmodium* genus)、傑氏肺囊蟲(*Pneumocystis jirovecii*)、脊髓灰白質炎病毒、狂犬病病毒(Rabies virus、呼吸道融合性病毒(RSV)、鼻病毒、鼻病毒、痘立克次體(*Rickettsia akari*)、立克次體菌屬(*Rickettsia genus*)、普氏立克次體(*Rickettsia prowazekii*)、落磯山熱立克次體(*Rickettsia rickettsii*)、傷寒立克次體(*Rickettsia typhi*)、東非瑞夫特河谷羊熱病病毒(Rift Valley fever virus)、輪狀病毒(Rotavirus)、德國麻疹病毒(Rubella virus)、薩比亞病毒(Sabia virus)、沙門氏菌屬(*Salmonella* genus)、疥蟎(*Sarcoptes scabiei*)、冠狀病毒(例如，SARS-CoV-2)、住血吸蟲屬(*Schistosoma* genus)、志賀桿菌屬(*Shigella* genus)、辛諾柏病毒(Sin Nombre virus)、漢坦病毒(Hantavirus)、申克孢子絲菌(*Sporothrix schenckii*)、葡萄球菌屬(*Staphylococcus genus*)、葡萄球菌屬(*Staphylococcus genus*)、無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化膿性鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)、腸類圓線蟲(*Strongyloides stercoralis*)、絛蟲屬(*Taenia genus*)、有鉤絛蟲(*Taenia solium*)、蜱傳腦炎病毒(Tick-borne encephalitis virus；TBEV)、犬蛔蟲(*Toxocara canis*)或貓蛔蟲(*Toxocara cati*)、剛地弓形蟲(*Toxoplasma*

gondii)、梅毒螺旋體(*Treponema pallidum*)、旋毛蟲(*Trichinella spiralis*)、陰道毛滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)、毛癬菌屬(*Trichophyton* spp)、毛首鞭形線蟲(*Trichuris trichiura*)、布氏錐蟲(*Trypanosoma brucei*)、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)、解脲支原體(*Ureaplasma urealyticum*)、水痘帶狀疱疹病毒(VZV)、水痘帶狀疱疹病毒(VZV)、主要痘瘡或次要痘瘡、vCJD朊病毒、委內瑞拉馬腦炎病毒、霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*)、西尼羅病毒(West Nile virus)、西部馬腦炎病毒、潘氏絲狀蟲(*Wuchereria bancrofti*)、黃熱病毒(Yellow fever virus)、小腸大腸炎耶氏桿菌(*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫耶爾森菌(*Yersinia pestis*)及假結核耶爾森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)。

【0158】在一些態樣中，本發明之RNA分子編碼病毒多肽或其片段，包括其天然存在或經工程改造之變異體，以預防人類之病毒。在一些態樣中，病毒多肽不包含冠狀病毒多肽。在一些態樣中，病毒多肽不包含嚴重急性呼吸道症候群(SARS)病毒多肽。在一些態樣中，病毒多肽不包含SARS-CoV-2多肽。

【0159】因此，在一些態樣中，本發明之RNA分子不編碼冠狀病毒多肽或其片段，包括其天然存在或經工程改造之變異體。在一些態樣中，本發明之RNA分子不編碼SARS病毒多肽或其片段，包括其天然存在或經工程改造之變異體。在一些態樣中，本發明之RNA分子不編碼SARS-CoV-2病毒多肽或其片段，包括其天然存在或經工程改造之變異體。

【0160】在其他態樣中，本發明之RNA分子不用於預防人類之冠狀病毒。在一些態樣中，本發明之RNA分子不用於預防人類之SARS病毒。在一些態樣中，本發明之RNA分子不用於預防人類之SARS-CoV-2。

實例

【0161】 下文為用於實施本發明之特定態樣的實例。該等實例僅出於說明性目的提供，且不意欲以任何方式限制本發明之範疇。已儘力確保關於所用數字(例如量、溫度等)之準確性，但當然應該允許一些實驗誤差及偏差。

【0162】 除非另外指明，否則本發明之實踐將採用本領域技術內之蛋白化學、生物化學、DNA重組技術及藥理學之習知方法。

實例1

藉由合成片段之組裝形成dsDNA微環

【0163】 藉由PCR自pVV-0513 (一種含有mod flu-HA轉錄卡匣之質體)擴增3' UTR及聚(A)序列。卡那黴素抗性載體質體PFE-pUC-Kan 3藉由消化線性化。使用NEBUILDER® HiFi DNA組裝選殖套組(NEW ENGLAND BIOLABS®)將兩個片段(3' UTR-pA及T7p-5' UTR)組裝至線性化pUC-Kan主鏈中以產生質體pREG5。自pREG5切出含有調節序列(3' UTR、聚(A)、T7啟動子、5' UTR)之片段。

【0164】 將調節序列與獲自IDT®之合成抗原序列組裝以產生dsDNA極小環模板。

【0165】 組裝之後，反應物用T5核酸外切酶處理以移除任何剩餘線性片段，僅保留環狀dsDNA以用作RCA之模板。

【0166】 T5核酸外切酶藉由用不耐熱蛋白酶K消化接著對蛋白酶K加熱失活來移除。

實例2

用環狀dsDNA作為起始模板之RCA反應

【0167】 在一些態樣中，用於mRNA產生之另一簡化非法利用以合成方式構築之環狀雙股DNA，其經由phi29 DNA聚合酶或其突變體藉由多股置換滾環擴增(RCA)進行等溫擴增。

【0168】 一至五ng圖1中所示之環狀超螺旋dsDNA模板(含有可轉錄卡匣)可用於滾環擴增(RCA)反應(表1)以產生模板之10^5倍擴增，從而產生dsDNA串聯體。

表1：用EQUIPHI29™ DNA聚合酶之RCA反應

試劑	最終濃度	
10X EQUIPHI29™反應緩衝液	1	X
DTT	4.00	mM
無機酵母焦磷酸酶	0.001-0.01	U/μL
dATP	1.00-2.00	mM
dCTP	1.00-2.00	mM
dTTP	1.00-2.00	mM
dGTP	1.00-2.00	mM
3'核酸外切酶抗性隨機六聚體	1-50	μM
EQUIPHI29™ DNA聚合酶	0.50	U/μL
環狀dsDNA模板	1-5	ng/mL
達至反應體積的不含核酸酶之水		

【0169】 將以上混合物在存在或不存在熱變性之情況下輕緩地混合，且隨後在30至45℃下培育3至6小時至隔夜。培育後，EQUIPHI29™聚合酶可在65℃下加熱失活10 min。較佳地，EQUIPHI29™聚合酶並未加熱失活。反應可實現1.5至2 mg/mL之DNA。

【0170】 由以上反應產生之RCA DNA串聯體展示於**圖2**中之瓊脂糖凝膠影像中，不存在及存在熱變性，以及**圖3**泳道1至2 (不存在及存在RCA後純化)。

【0171】 此等實驗展示RCA反應可在30至45℃之溫度下進行3至6小時或隔夜。另外，可移除BSA且使用不同的dNTP濃度及phi29聚合酶成功地產生用於IVT反應之RCA模板。最後，可自RCA反應製程省略在RCA培

育之前的熱變性步驟及RCA之後的加熱失活、預線性化，而對由RCA產生之模板產生的RNA之完整性無影響。移除此兩個步驟使得商業製造變得容易且允許等溫過程，同時仍出人意料地產生相較於質體DNA之品質mRNA，如以下實例中所示。

實例3

在不純化之情況下消化RCA DNA

【0172】另外，在一些態樣中，由環狀dsDNA模板產生的實例2之RCA DNA可藉由一或多種限制性核酸內切酶進行酶促消化以產生線性化DNA片段以在「一鍋」反應中用作活體外轉錄反應之模板，在酶消化之前不對RCA DNA進行純化。典型反應需要DNA模板之純化、DNA模板於緩衝液中之復原，隨後DNA模板之酶消化。如本文所描述，整個反應(亦即，擴增及線性化)可在同一反應容器中進行而不損失材料，此係因為不需要轉移至不同容器以進行不同反應步驟。

【0173】RCA DNA可用限制性核酸內切酶消化以產生線性化dsDNA而不需要DNA純化或額外的緩衝試劑。將2至3 U SapI(10 U/μL，NEB™，#R0659)/微克RCA DNA吸移至RCA反應容器中且在37℃下在加熱塊中培育8小時至隔夜。如**圖3**中所示，將泳道3及4 (在線性化之前無純化)與泳道5及6 (在純化之情況下)進行比較，可使用瓊脂糖凝膠電泳觀測切割產物。

實例4

用RCA DNA作為起始模板之RCA反應

【0174】視情況，在一些態樣中，有序的多步驟RCA反應(將先前RCA反應之RCA DNA用作其他輪滾環擴增之起始模板)用於實現少至1至

5 ng之模板DNA起始材料動達至10^{10}增加的DNA擴增倍數。

【0175】 由實例3產生之RCA DNA串聯體用作使用RCA DNA作為起始模板之第二RCA反應的模板。第二RCA反應與表1中所描述之反應一致，除了獲自實例3中之反應的5 ng之RCA DNA (RCADNA模板1)取代為環狀dsDNA質體(質體模板)作為RCA之模板以產生RCA DNA反應模板2。由第二RCA反應產生之RCA DNA串聯體展示於**圖4**之瓊脂糖凝膠影像，泳道4 (未切割模板)及5 (經限制消化，線性化模板)中。

【0176】 由第二RCA反應產生之RCA DNA反應模板2隨後用作第三RCA反應之模板。第三RCA反應與第二RCA反應一致，除了5 ng之RCA DNA反應模板2經取代為RCA DNA反應模板1作為RCA之模板以產生RCA反應模板3。由第二RCA反應產生之RCA DNA串聯體展示於**圖4**之瓊脂糖凝膠影像，泳道6 (未切割模板)及7 (經限制消化，線性化模板)中。

【0177】 此等結果證明，使用RCA DNA作為起始模板之RCA反應可重複多達3次，而不損失產量或品質。

實例5

使用線性化DNA作為模板之IVT

【0178】 由環狀dsDNA (質體DNA或微型環)或RCA DNA模板產生之線性化DNA可用作用於活體外轉錄之模板。

【0179】 來自實例2至4之線性化RCA DNA用作IVT模板以產生mRNA。線性化RCA DNA使用乙醇/2.5 M $NH_4CH_3CO_2$沈澱純化且再懸浮於無核酸酶之水中。RCA DNA隨後用作IVT反應中之模板，如下表2 (Trilink協定)中所示。RCA DNA以0.05 mg/mL最終濃度補充。

表2：用線性RCA DNA作為模板之IVT反應

試劑	最終濃度	
Tris緩衝液，pH 8.0	40	mM
NTP混合物	20	mM
無機酵母焦磷酸酶	0.002	U/μL
RNA酶抑制劑	0.5	U/μL
T7聚合酶	8	U/μL
MgOAc	16.5	mM
亞精胺	2	mM
DTT	10	mM
RCA DNA	50	ng/μL
達至反應體積的不含核酸酶之水		

【0180】 將以上反應物輕緩地渦旋且在37℃下培育120 min。添加DNA酶I及$CaCl_2$，且將反應混合物在37℃下培育。藉由LiCl沈澱純化反應物。將反應混合物離心，所得離心塊用乙醇洗滌，且將反應物進一步離心。將最終離心塊再懸浮於水中且在nanodrop上量測RNA濃度。如**圖5**中所示，產物可使用瓊脂糖凝膠電泳觀測而不經進一步純化。

實例6

純化由線性化RCA DNA模板產生之mRNA以增加RNA完整性

【0181】 在一些態樣中，根據實例5產生之活體外轉錄反應混合物可藉由寡聚(dT)親和力捕獲來純化以進一步富集全長mRNA產物。使用寡聚(dT)捕獲純化由線性化RCADNA模板產生之mRNA可使RNA完整性增加等於或超出由線性化質體DNA產生之RNA完整性。

【0182】 由線性化RCA DNA產生之聚腺苷酸化mRNA可藉由使用寡聚(dT)磁性珠粒(DYNABEADS™ 寡聚(dT)25，INVITROGEN™)捕獲來富集全長轉錄本。將RNA再懸浮於等體積之結合緩衝液(Tris-HCl，pH 7.5；LiCl；EDTA)中且與等體積之磁性珠粒混合於結合緩衝液中。將混合物在室溫下在旋轉下培育，且移除未結合之部分。在使用Tris-HCl，

pH 7.5溶離RNA之前，用洗滌緩衝液B (Tris-HCl，pH 7.5；LiCl；EDTA)洗滌珠粒兩次。在一些態樣中，隨後將RNA沈澱於LiCl中，接著在4℃下離心。所得離心塊隨後用乙醇洗滌且進一步在4℃下離心，且將最終離心塊再懸浮於水中。

【0183】 mRNA之完整性藉由片段分析進行評估。將自質體DNA轉錄的經寡聚(dT)選擇之mRNA用作對照。如**圖6**中所示，在寡聚(dT)選擇之後，來自RCA DNA模板之mRNA之RNA完整性經改良等於獲自質體DNA模板化RNA之RNA完整性。因此，IVT反應之後的寡聚(dT)純化步驟為富集具有高完整性之RNA產量的創意解決方案。

實例7

產生未加帽mRNA之有序的單容器反應

【0184】 可在單反應容器中依序進行環狀dsDNA (質體或微型環)之RCA反應，接著限制酶線性化及IVT，從而產生mRNA而無需任何前述純化步驟。該方法允許DNA定向合成具有任何序列，大小範圍在短寡核苷酸至若干千鹼基內的RNA分子。

【0185】 在一些態樣中，由RCA反應產生之DNA (質體或DNA)可線性化且在單容器中之逐步反應中用作IVT反應之模板而無需純化或體積轉移。對於RCA單容器反應，模板可為少至1 ng之環狀超螺旋dsDNA。不需要模板DNA之熱變性。用於此類逐步單容器「一鍋」RCA反應之RCA反應組分如同上表1。

【0186】 將反應混合物輕緩地渦旋且在30℃下培育25小時。隨後，將RCA反應物在相同容器中用限制性核酸內切酶消化以產生線性化dsDNA而無需DNA純化或額外緩衝試劑。將2至3 U SapI (10 U/μL，

NEB，#R0659)/微克RCA DNA吸移至RCA反應容器中且在37℃下培育8小時至隔夜。如**圖3**，泳道3中所示，來自重複反應之切割產物可藉由瓊脂糖凝膠電泳觀測而無需任何純化。

【0187】 整個消化反應(線性化質體DNA或線性化RCA DNA)可用於相同容器中之後續IVT步驟而無需純化。根據上表2，將IVT試劑直接添加至酶消化之反應物中。對於IVT，使用無核酸酶之水將DNA濃度調節至50 ng/μL。輕緩地混合試劑，且將反應物在37℃下培育120分鐘。添加DNA酶I及$CaCl_2$達至最終濃度為5 U DNA酶I/μg RCA DNA及10 mM $CaCl_2$，且將反應物在37℃下再培育40 min。添加500 mM EDTA及0.6 U/μL之蛋白酶K達至50 mM EDTA及0.001 U/μL之蛋白酶K的濃度，且將反應物在37℃下再培育10 min。

【0188】 可藉由LiCl沈澱純化反應物。將混合物在4℃下離心，所得離心塊用乙醇洗滌且進一步在4℃下離心，且將最終離心塊再懸浮於水中且在50℃下加熱10分鐘以將RNA溶解至溶液中。在nanodrop上量測濃度且通常產生2.0至5.0 mg/mL之未加帽RNA。

【0189】 使用片段分析評估所得RNA之完整性。使用線性化質體DNA產生之RNA用作對照。在捕獲及用寡聚(dT)純化後，RNA完整性進一步增加超出僅沈澱的情況。

實例8

活體外轉錄反應

【0190】 改變轉錄緩衝液組分以測定對活體外轉錄(IVT)效能及產物品質屬性之最有影響的槓桿。所研究之反應組分及濃度範圍展示於下表3中。

【0191】 以高通量小規模模型進行反應。整個實驗中恆定參數之清單可見於表37中。RNA樣品藉由沈澱純化且藉由UV量測濃度。藉由片段分析儀(FA)測定RNA完整性。基於RNA之產量≥1.85 mg/mL、適應該模型及經濟考慮因素鑑別出參數範圍。下表3展示試劑及其研究範圍。在各因子之可能的64個高低組合中的16個下產生2-級因子實驗設計(DoE)。亦運行2個複製中心點。

表3：DOE1因子及範圍

製程參數	名稱	單位	目標	所研究之範圍	低(-1)	中心(0)	高(+1)	一個單位*
A	Tris	mM	40	20-60	20	40	60	20
B	亞精胺	mM	2.5	0-5	0	2.5	5	2.5
C	DTT	mM	10	0-20	0	10	20	10
D	曲拉通(Triton)	%	0.005	0-0.01	0	0.005	0.01	0.005
E	DMSO	%	0.835	0-1.67	0	0.835	1.67	0.835
F	PEG-8000	%	2	0-4	0	2	4	2

*注意：一個單位表示一個編碼單元之實際單元數目。

【0192】 對於UV濃度及完整性，產生能夠偵測所有主要效應及兩個因子相互作用之模型。使用p-值<0.05之準則判定參數是否顯著。

【0193】 整個實驗中觀測到之RNA濃度及完整性的範圍在表4中列出。完整性及濃度值在測試範圍內為可接受的，其指示該製程可在該等範圍內安全地操作。

表4：DOE1反應

反應	單位	最小值	最大值	平均值	標準差
UV濃度	mg/mL	3.96	4.41	4.14	1.11
完整性	%	80.97	92.33	87.58	3.75

【0194】 濃度及完整性模型之擬合統計資料顯示於表5中。基於對R^2值之分析，研發針對完整性之相對強模型。

表5：DOE1模型概述

模型	R^2	經調節之R^2	經預測之R^2
UV濃度	0.6666	0.5777	0.3396
完整性	0.9136	0.9034	0.8838

【0195】 在表6中所示之UV濃度模型中，僅PEG-8000濃度及Tris與亞精胺之間的相互作用項為統計學上顯著的。此等參數中之每一者之係數極小，所以在測試範圍內改變各參數導致可忽略的濃度變化。因此，確定此等項為統計學上顯著的，但在其測試範圍中實際上不顯著。

表6：DOE1 UV濃度模型

參數	p-值	統計學上顯著？	係數估算	實際上顯著？
A - Tris	0.6664	N	-0.0080	N
B - 亞精胺	0.0604	N	-0.0371	N
F - PEG-8000	0.0172	Y	0.0465	N
AB (Tris及亞精胺相互作用項)	0.0006	Y	0.0792	N
截距	N/A	N/A	4.14	N/A

【0196】 在完整性模型中，Tris及亞精胺為統計學上顯著的。然而，Tris濃度(20至60 mM)實際上並不顯著，此係因為資料之係數估算在FA分析可變性內。出人意料地，添加亞精胺與顯著降低之完整性相關。亞精胺通常視為活體外轉錄反應之關鍵組分[Kartje等人，J Biol Chem 296 (2021)]。亞精胺為多元胺，咸信其有助於聚合酶與DNA分子解離及在新穎DNA分子上引發RNA合成。如表6及表7中所示，亞精胺出於增強完整性而不顯著影響濃度的目的可自反應中移除。

表7：DOE1完整性模型

參數	p-值	統計學上顯著？	係數估算	實際上顯著?
A - Tris	0.0053	Y	-0.9300	N
B - 亞精胺	<0.0001	Y	-3.78	Y
截距	N/A	N/A	4.14	N/A

【0197】 有趣的是，DTT濃度在測試範圍中不為統計學上顯著的。

DTT為還原劑，其通常包括於IVT反應中以保護諸如T7聚合酶之酶避免蛋白質氧化[Kartje等人，J Biol Chem 296 (2021)]。此等反應中使用之T7聚合酶含有少量DTT以保護酶用於長期儲存，但似乎在反應進展期間不需要額外DTT保護T7。

【0198】 如本文所證實，出於增強完整性的目的，可在不存在亞精胺之情況下運行該製程。此外，不存在亞精胺、DTT、曲拉通、DMSO及PEG-8000之流線型IVT基質可用於該製程，從而產生簡化對製造操作、改良中間物溶液之穩定性及降低成本。

實例9

增強活體外轉錄反應

【0199】 評估以下因子以確定最顯著的IVT且保證進一步最佳化研究：各NTP之濃度、T7濃度、焦磷酸酶濃度、初始pH、Mg/NTP比率、時間及溫度。選擇Mg/NTP比率作為相對於Mg濃度之因子，因為Mg與NTP含量之間存在互相依賴性。已知NTP會螯合Mg離子且若超過某一Mg/NTP比率臨限值，則mRNA產生將顯著減少 [Kartje等人, J Biol Chem 296:100175 (2021)；Young等人, Biotechnol Bioeng 56(2):210-220 (1997)；Thomen等人, Biophysical Journal 95(5) 2423-2433 (2008)]。

【0200】 如實例8中，基於IVT反應之結果確定範圍，且隨後進一步調整以確保模型中之反應及使成本降至最低。

【0201】 在具有不同含量之ATP、CTP、GTP及pUTP；T7濃度；焦磷酸酶濃度；初始反應pH；及乙酸Mg之小規模高通量模型中進行反應。以在0.8至2.2範圍內之比率，乙酸mg視NTP濃度而變化。此相當於12.8至110 mM Mg之操作範圍。為簡單起見，ATP:CTP:GTP:pUTP之比

率維持在1:1:1:1；例如16 mM總NTP相當於4 mM ATP、4 mM CTP、4 mM GTP及4 mM pUTP。將反應物在不同溫度下培育不同時段。所有其他一致參數可見於表41中。藉由沈澱純化RNA樣品且藉由UV量測濃度。

【0202】 各測試參數之水準擷取於表8中。設計由各參數之128個可能高/低組合中之16個組成且含有2個中心複本。

表8：DOE2因子及範圍

製程參數	名稱	單位	目標	研究範圍	低 (-1)	中心 (0)	高 (+1)	一個單位*
A	總NTP	mM	33	16-50	16	33	50	17
B	T7	U/mL	8000	4000-12000	4000	8000	12000	4000
C	焦磷酸酶	U/mL	4.125	0.25-8	0.25	4.125	8	3.875
D	pH	pH	8.0	7.5-8.5	7.5	8.0	8.5	0.5
E	Mg比率	mM Mg/mM NTP	1.5	0.8-2.2	0.8	1.5	2.2	0.7
F	時間	Min	150	60-240	60	150	240	90
G	溫度	(℃)	37	30-44	30	37	44	7

*注意：一個單位表示一個編碼單元之實際單元數目。

【0203】 對於捕獲所有主要效應及雙因子相互作用之UV濃度，在Design Expert中產生模型。p值<0.05之準則用於判定各參數是否顯著。

【0204】 在Design Expert中產生的UV濃度之模型的效能顯示於表9中。經預測之R^2較低且不與經調節之R^2一致；此指示模型在其預測濃度之能力方面受限。

表9：DOE2模型概述

模型名稱	R^2	經調節之R^2	經預測之R^2
UV濃度	0.7204	0.6330	0.4300

【0205】 資料之一個可能模型展示於表10中。由表8中記錄之「目標」範圍組成的中點對照具有比其餘條件更高的濃度。此產生資料之顯著曲率，且此由A^2項中存在之高係數指示。許多不同模型為可能的，包括測

試參數中任一者之二次模型(可能因為所有因子以中點對照為中心)。儘管大多數參數可併入二次模型中，但已規劃經由其他實驗測試焦磷酸酶、初始pH及時間。剩餘參數繼續進行進一步最佳化。

表10：DOE2 UV濃度模型

參數	p-值	統計學上顯著?	係數估算	實際上顯著?
A – 總NTP	0.0627	N	-0.6879	Y
B - T7	0.0282	Y	0.8701	Y
F – 時間	0.0255	Y	0.8806	Y
G – 溫度	0.0330	Y	0.8418	Y
A^2	0.0005	Y	-4.39	Y
截距	N/A	N/A	6.67	N/A

【0206】 在總NTP、T7、焦磷酸酶、初始pH、Mg比率、時間及溫度之所有測試範圍中成功地產生RNA。

實例10

增強活體外轉錄反應之精細化

【0207】 基於前述實例中所描述之實驗之結果，確定NTP含量、T7 RNA聚合酶濃度、Mg濃度及溫度將進一步最佳化。此實驗之目標為使RNA濃度之此等參數中之每一者得設定點最佳化。Mg作為相對於組合Mg:NTP比率的各別參數進行測試，以讀取Mg及NTP濃度之各別效應。

【0208】 在具有不同含量之ATP、CTP、GTP及pUTP；T7濃度；及乙酸Mg濃度之高通量小規模模型中進行反應。為簡單起見，ATP:CTP:GTP:pUTP之比率固定在1:1:1:1。舉例而言，20 mM之總NTP濃度係指各自5 mM之ATP、CTP、GTP及pUTP。固定參數之進一步描述可見於表41中。所有不同參數顯示於表11中。使用改良之全因子DOE設計以在指定範圍下測試參數。設計由6個中心、8個軸及16個因子點組成。對於實驗簡化，相對於在設計空間外部之設定點，分別在37℃及

30℃下運行操作4及15。RNA樣品藉由沈澱純化且藉由UV估算濃度。藉由片段分析儀(FA)測定完整性百分比。

表11：DOE3設計

製程參數	名稱	單位	Min	Max	Mid	低α	高α	一個單位*
A	總NTP	mM	20	36	28	2	2	8
B	T7	U/mL	8000	14000	11000	2	2	3000
C	Mg	mM	20	36	28	2	2	8
D	溫度	(℃)	30	37	33.5	1	1	3.5

*注意：一個單位表示一個編碼單元之實際單元數目。

【0209】 基於此實驗中收集之資料在Jmp及Design Expert中產生使RNA濃度最佳化之模型。如表12中所示，R^2、經調節之R^2及經預測之R^2較高，其表明模型成分擬合。

表12：DOE3模型效能

模型名稱	R^2	經調節之R^2	經預測之R^2
UV濃度	0.9090	0.8680	0.7506

【0210】 來自Design Expert之UV濃度模型可見於表13中。所有四個測試參數為統計學上顯著的，因為各參數之$p<0.05$。在Jmp中產生預測分析儀。預測概況之各曲線圖內顯示之範圍為顯著的且不可由實驗可變性解釋。針對總NTP及Mg項以及Mg及溫度項，鑑別出相互作用項。

表13：UV濃度之DOE3模型

參數	p-值	統計學上顯著?	係數估算
A – 總NTP	0.0002	Y	-0.7294
B - T7	0.0047	Y	0.5053
C - Mg	<0.0001	Y	0.9381
D – 溫度	0.0002	Y	0.8317
AC	0.0001	Y	0.9286
CD	0.0089	Y	0.5642
A^2	<0.0001	Y	-0.8826
C^2	<0.0001	Y	-0.7149
D^2	0.0047	Y	-0.9357
截距	N/A	N/A	5.33

【0211】 在Jmp中產生預測分析儀以預測在各參數之什麼水準下mRNA濃度將最大化。合意性概況表明總ATP、CTP、GTP及pUTP在大約28 mM下最佳化，T7在較高濃度下最佳化，Mg在約33至36 mM下最大化，且溫度在大約36℃下最佳化。

【0212】 此實驗之最佳執行條件稱為「DOE3 F1」且含有36 mM總ATP/CTP/GTP/pUTP；14,000 U/mL T7；及36 mM Mg。反應溫度為37℃。此條件具有6.9 mg/mL之所得mRNA濃度且89%之完整性。然而，具有不同參數之多個成功操作表明該製程為穩固的且可在寬範圍下運行。

實例11

T7及溫度

【0213】 基於前述實例，鑑別出反應產量在較高含量之T7 RNA聚合酶下最佳化。出於此原因，在此實驗中探究較高T7含量之影響。另外，關注研究溫度進一步作為IVT反應中之參數。此外，降低溫度可增強完整性係可行的。

【0214】 在高通量小規模模型中進行實驗。運行表37中所描述的命名DOE3 Opt之條件作為單次單因子(one factor at a time；OFAT)實驗中之對照，且在表14及表15中標記為條件A。在剩餘條件中，操控T7或溫度。

【0215】 藉由沈澱純化RNA樣品且藉由UV量測濃度。藉由片段分析儀(FA)測定完整性百分比。隨著T7濃度增加，所得mRNA濃度在實驗可變性內保持相當。當T7濃度自17000增加至40000 U/mL時，觀測到完整性降低6%。此等結果顯示於表14及表15中。

表14：T7濃度OFAT結果

條件	溫度(℃)	T7濃度(U/mL)	所得mRNA濃度(mg/mL)	完整性(%)
A (DOE3 Opt)	36	17000	5.2	87
B	36	25000	5.7	84
C	36	40000	5.2	81

【0216】 隨著溫度自36℃降低至32℃，濃度及完整性不受顯著影響；所有結果均在預期之分析可變性內。此等結果顯示於表15中。

表15：溫度OFAT結果

條件	T7濃度(U/mL)	溫度(℃)	所得mRNA濃度(mg/mL)	完整性(%)
A (DOE3 Opt)	17000	36	5.2	87
B	17000	34	4.4	88
C	17000	32	5.0	89

【0217】 此實驗表明該製程能夠在測試之溫度及T7聚合酶範圍內產生品質mRNA。

實例12

線性化質體DNA濃度

【0218】 此實驗確定起始DNA濃度是否影響完整性及產量且評估0.025至0.075 mg/mL DNA之範圍。

【0219】 在高通量小規模模型中進行此實驗。在表16中表示為條件B之對照為表37中表示為DOE3 F1之製程。剩餘條件具有相同參數，但具有不同含量之線性化質體DNA。藉由沈澱純化RNA樣品且藉由UV量測濃度。藉由片段分析儀(FA)測定完整性百分比。

【0220】 此實驗之結果顯示於表16中。當DNA濃度在0.025與0.075 mg/mL之間變化時，mRNA濃度受影響。當DNA濃度自0.025 mg/mL增加至0.05 mg/mL時，mRNA濃度顯著增加，但DNA濃度自0.05 mg/mL增加至0.075 mg/mL對所得mRNA濃度不具有較大影響。完整性保持在此範圍

內之分析可變性內，從而指示未觀測到對完整性之影響。

表16：DNA OFAT結果

條件	pDNA濃度(mg/mL)	所得mRNA濃度(mg/mL)	完整性(%)
A	0.025	4.2	82
B (DOE3 F1)	0.05	6.5	83
C	0.075	7.1	80

實例13

Mg及總NTP對IVT效能之影響

【0221】 表17中展示之ANOVA模型含有總NTP與Mg之間(標記為AC)的顯著相互作用項。關注於證實該模型。另外，需要其他確認研究以補充資料。此實驗之目標為確定28至44 mM不同總和之ATP+CTP+GTP+pUTP的影響。在各NTP含量下，評估四種不同Mg/NTP含量：1.1、1.3、1.4及1.6。如表17中所示，在具有不同含量之NTP及不同含量之Mg的小規模高通量模型中進行實驗。所有其他參數獲自表37中所列出之條件DOE3 Opt。RNA樣品藉由沈澱純化且藉由UV估算濃度。藉由片段分析儀測定完整性百分比。

表17：Mg/NTP實驗中之不同參數

ATP+CTP+GTP+pUTP (mM)	Mg/NTP比率	Mg (mM)
28	1.1	32
28	1.3	36
28	1.4	40
28	1.6	44
36	1.1	41
36	1.3	46
36	1.4	51
36	1.6	57
44	1.1	50
44	1.3	57
44	1.4	63
44	1.6	69

【0222】 Mg濃度及總ATP+CTP+GTP+pUTP對IVT反應效能之影響

展示於**圖9A至圖9B**中。添加超過28 mM之NTP顯著增加RNA濃度。然而，觀測到使Mg含量增加過高同時保持NTP濃度恆定亦可影響RNA濃度。

實例14

二價金屬對殘餘DNA之影響

【0223】 進行此DOE實驗以研究在DNA消化步驟期間二價金屬：鈣、鎂及錳之影響。表18展示具有軸點之四因子DOE設計。使用低的1×濃度及高第10×濃度自標準協定(THERMO FISHER® DNA酶I)獲得鈣濃度範圍。鎂範圍分別使用低1 mM及高10 mM以解釋自焦磷酸鹽複合之鎂損失。錳之低及高範圍模擬鈣之範圍。在DNA酶消化期間在30 min、45 min及60 min處獲得時間過程樣品。

【0224】 使用自動化微生物反應器系統且使用具有DNA酶I消化之製程FB V1作為基線。在此實驗中完成之反應使用具有0.05 U/mL焦磷酸酶濃度之改良製程FB V1以確定殘餘DNA趨勢。鈣、鎂、錳及DNA酶濃度在DOE範圍內變化且添加直至DNA酶I酶添加。針對DOE研究之濃度提供於下表18中。實驗輸出為RNA產量、完整性及殘餘DNA。

表18：不同參數及DOE設計

製程參數	名稱	單位	目標	低 (-1)	中心 (0)	高 (+1)	一個單位*
A	DNA酶	U/mg DNA	6000	2000	6000	10000	4000
B	鈣	mM	2.75	0.5	2.75	5	2.25
C	錳	mM	5.5	1	5.5	10	4.5
D	鎂	mM	2.75	0.5	2.75	5	2.25

【0225】 此DOE設計之結果展示DNA酶I酶濃度及鈣濃度範圍對30分鐘及45分鐘時間點之殘餘DNA趨勢不具有影響，然而，對60分鐘標記

之完整性具有影響(**圖9**)。錳及鎂展示對30分鐘(資料未展示)及45分鐘(**圖10**)時間點之殘餘DNA趨勢的影響。**圖10**中之等高線圖表明錳及鎂濃度之低點產生最低殘餘DNA雜質。

實例15

蛋白酶K分析

【0226】 在IVT完成之後及下游純化之前，用諸如蛋白酶K (ProK)之蛋白酶分解蛋白質對於進一步淬滅IVT反應為理想的且降低諸如DNA酶I之蛋白質的脫靶行為風險。此外，較大蛋白質之分解藉由諸如UF/DF、層析等之純化方法促進穩固清除率。蛋白酶K描述為常用於純化RNA之酶[Tullis及Rubin，Anal Biochem 107(1):260-264 (1980)]。批量IVT反應經組裝(「Conf Opt」)且在條件「Conf Opt」下在表37中所描述之鑑別設定點經歷DNA酶消化。DNA酶消化參數包括1 mM、2000DNA酶I (U/mg pDNA)，在36℃之DNA酶消化溫度下持續45分鐘DNA酶消化時間。此主體混合物分成較小等分試樣且使用表19中所描述之參數用蛋白酶K進一步消化。對於消化步驟(THERMO FISHER®蛋白酶K)在50℃下大約1.5至30 U/mL之ProK的推薦範圍經延展至0.5 U/mL之下限且經改良以在36℃之反應溫度下運行45分鐘以防止對mRNA的損壞。

【0227】 在ProK消化之前使用EDTA減少反應內游離$CaCl_2$之含量，因為$CaCl_2$可能抑制ProK消化DNA酶之能力[Tullis及Rubin，Anal Biochem 107(1):260-264 (1980)]。50 mM EDTA足以淬滅實例8中所描述之IVT反應，因此將50 mM EDTA用作實驗之起始點。在培育期之後，將樣品快速冷凍且提供以在Perkin Elmer LabChip上進行殘餘蛋白質分析。亦藉由片段分析儀(FA)量測完整性。

表19：ProK消化條件

條件	製程	EDTA 濃度(mM)	ProK 濃度(U/mL)	完整性(%)	殘餘蛋白質
A	Conf Opt	50	30	84	未偵測到
B		50	15	85	未偵測到
C		50	1.5	85	未偵測到
D	FB V1	75	1.5	92	未偵測到
E		75	1.0	92	未偵測到
F		75	0.5	94	未偵測到

【0228】 完整性結果列於表19中。完整性似乎不會受調節蛋白酶K之含量影響。藉由殘餘蛋白質分析證實所有ProK條件下之完全蛋白質消化。在殘餘蛋白質分析上運行表19中所列出之列A、B及C(「Conf Opt」)之條件且所得電泳圖展示於**圖11**中。使用標記FB V1之分批進料製程獲得列D、E及F(「FB V1」)之條件且描述於表65中。未經ProK消化之樣品作為對照運行。此對照在約19秒及23秒含有分別對應於DNA酶I及T7之峰。對於給與1.5 U/mL ProK之樣品，此等峰不再可見，其表明消化成功。此外，此表明1.5 U/mL及高於1.5 U/mL之ProK範圍足以消化，對所測試之濃度範圍下之完整性無影響。亦對列D、E及F之條件進行殘餘蛋白質分析，且所得電泳圖顯示類似結果(資料未展示)，其中在對照樣品中分別在19秒及23秒觀測到相同 的DNA酶I及T7峰，但給與0.5、1.0及1.5 U/mL ProK之樣品在彼等停留時間不具有任何偵測峰。

實例16

IVT對於各種RNA構築體之一般適用性

【0229】 此實驗之目標為評估本文中研發之IVT分批法是否可適用於具有各種尺寸及組成之其他RNA分子。為此目的，使用製程BV1製造RNA#2。亦評估亞精胺對製程效能之影響。下表20中所示之資料表明製程BV1製造出高品質RNA。此外，如表20中所示，移除亞精胺提高RNA

加帽效率，其進一步證實可自IVT製程移除亞精胺。

表20：製程BV1對RNA#2之一般適用性

條件	亞精胺(mM)	DTT (mM)	所得RNA濃度 (mg/mL)	完整性(%)	5'端帽(%)
A	0	0	8.77	93.2	91.1
B	2.15	0	8.98	91.5	86.6
C	0	20	9.62	92.7	91.4
D	2.15	20	8.96	90.9	86.5

【0230】 接著，使用比RNA#2大約5.7×之RNA#3評估改良的製程BV1 (概述於表37中)。改良的製程BV1經模組化且可容易地針對酶促及共轉錄過程進行調整。此處，使用加帽分子實施共轉錄過程，但亦可使用類似物加帽分子(表21)。RNA樣品藉由沈澱純化且測定IVT產量(如藉由UV量測)、完整性(如藉由片段分析儀量測)、5'端帽(如藉由LC-UV量測)及殘餘DNA（如藉由定量聚合酶鏈反應量測）(表22)。此實例證實使用較大RNA構築體的高加帽效率及RNA完整性以及改良的製程BV1在製造各種RNA中之可撓性。

表21：實驗參數

變化之參數	1 mL反應中測試之值	100 mL反應中測試之值
5'加帽類似物之濃度(mM)	2 - 9	6
焦磷酸酶之濃度(U/mL)	0.02 - 0.5	0.25
IVT時間(min)	150 - 210	150
溫度(℃)	25 - 36	36

【0231】 RNA產量與IVT溫度正相關，且藉由將溫度增加36℃使RNA產量增加約18倍。此外，所有條件均使用較大構築體產生>70%的足夠高的RNA完整性。

表22：使用改良的製程BV1測定IVT溫度對IVT效能之影響

條件	IVT時間(min)	IVT溫度(℃)	mRNA產量(g/L)	完整性(%)
A	150	36	7.1	71
C		33	3.4	77
E		30	1.5	74
G		27	0.6	81
I		25	0.4	82

【0232】 接著，評估IVT時間(150至210 min)及焦磷酸酶濃度(0.02至0.5 U/mL)之影響。如下文表23至表26中所示，增加IVT時間導致RNA產量增加>20%，然而，亦觀測到完整性之略微降低。此外，評估幾個條件之加帽效率且其全部>90%，表明改良的製程BV1在產生高品質RNA中之穩固性。

表23：IVT時間及0.5 U/mL焦磷酸酶濃度對反應效能之影響

條件	IVT時間(min)	IVT溫度(℃)	焦磷酸酶(U/mL)	mRNA產量(g/L)	完整性(%)	5'端帽(%)
A	150	36	0.5	7.8	69	N/A

表24：IVT時間及0.25 U/mL焦磷酸酶濃度對反應效能之影響

條件	IVT時間(min)	IVT溫度(℃)	焦磷酸酶(U/mL)	mRNA產量(g/L)	完整性(%)	5'端帽(%)
B	150	36	0.25	7.7	68	94
E	210			9.2	63	93

表25：IVT時間及0.1 U/mL焦磷酸酶濃度對反應效能之影響

條件	IVT時間(min)	IVT溫度(℃)	焦磷酸酶(U/mL)	mRNA產量(g/L)	完整性(%)	5'端帽(%)
H	150	36	0.1	7.4	68	N/A
K	210			9.0	62	N/A

表26：IVT時間及0.02 U/mL焦磷酸酶濃度對反應效能之影響

條件	IVT時間(min)	IVT溫度(℃)	焦磷酸酶(U/mL)	mRNA產量(g/L)	完整性(%)	5'端帽(%)
N	150	36	0.02	5.3	69	N/A
Q	210			7.5	68	96

【0233】 亦評估加帽分子濃度。測試2至9 mM之濃度範圍且如表27

中所示，在RNA濃度與加帽分子之間觀測到劑量依賴性反應。

表27：加帽分子濃度對反應效能之影響

條件	IVT時間 (min)	IVT溫度(℃)	加帽類似物 (mM)	mRNA產量 (g/L)
A	150	36	2	3.1
B			4	5.8
C			6	8.2
D			7.2	8.3
E			9	7.2

【0234】 為證實改良的製程BV1可擴展，在AMBR® 250多平行生物反應器系統(SARTORIUS®)上實施100 mL規模IVT操作。如表28中所示，資料與1 mL規模相當，且其亦展示極低的殘餘DNA雜質。

表28：RNA#3在AMBr 250系統中之規模放大IVT

條件	mRNA產量 (g/L)	5'端帽(%)	殘餘DNA (ng/mg 產物)
A	8.7	98	< 1

【0235】 為進一步改良mRNA完整性，使用POROS™寡聚(dT)25 (THERMO FISHER®) 及寡聚(dT)18單石(SARTORIUS BIA SEPARATIONS®)純化研發mRNA親和力層析步驟。兩個步驟均結合10mM Tris/500 mM KCl/0.1mM EDTA，pH 7.2中之mRNA，且用10 mM Tris/0.1mM EDTA，pH 7.2溶離。如下表29中所示，當藉由親和力步驟純化時，對於非親和力純化材料，mRNA完整性自61%改良達至79%。

表29：mRNA親和力層析

條件	池完整性(%)
非親和力純化池	61
POROS寡聚(dT)25溶離池	76
Sartorius BIA分離寡聚(dT)18單石溶離池	79

【0236】 此實例中之資料表明具有多個不同尺寸之RNA構築體的製程BV1之一般適用性及可擴展性。此製程應用於RNA#3且展現相當的產

物品質及低雜質。

實例17

分批進料製程之研發

【0237】 此實驗之目標為藉由經由推注進料、半連續及或連續方式[Kern及Davis，Biotechnol Prog 13(6):747-56(1997)]以上文所描述之製程BV1為起始物質來研發分批進料製程。此處，使用自動化微生物反應器系統測定進料方法。實驗設計展示於下表30中且初始基線NTP自Henderson等認[Henderson等人，Curr Protoc 1(2):e39(2021)]調適。此外，利用使用不同初始GTP濃度之途徑[mMESSAGE mMACHINE®套組使用者指南(公開案號1340M Rev. G) THERMO FISHER]評估對加帽效率之影響同時經由進料維持總濃度[Kern及Davis, Biotechnol Prog 13(6):747-56 (1997)]。

表30：分批進料評估實驗之概述

條件	製程	總NTP(mM)	起始NTP(mM)	起始GTP(mM)	推注進料間隔(min)
A	BV1		9	9	N/A
B	分批進料	各自9 mM	5	5	5
C					10
D					25
E				2.5	5
F					10
G					25
H				1	5
I					10
J					25

【0238】 使用自動化微生物反應器系統且藉由分別將焦磷酸酶濃度降低至0.25 U/mL及將溫度增加至37℃來改良製程BV1。此改良的製程BV1用作此等實驗中之基線。實驗輸出為RNA產量、完整性、加帽效率及殘餘NTP。

【0239】 如**圖12**中所示，在所有條件下RNA完整性相當。然而，以5 min間隔之高頻率NTP進料排程具有相較於其10 min及25 min對應物更佳的產量。此外，降低初始GTP濃度在所有進料排程中使加帽效率增加(最高為93%)。具有1及2.5 mM之GTP濃度的分批進料製程具有比分批法更佳的加帽效率。接著，評估150 min IVT之後的殘餘NTP且一些NTP較低(資料未展示)。為此目的完成追蹤實驗以評估增加的NTP濃度。

【0240】 BV1製程在此第二分批進料研發實驗中用作基線對照。最佳分批進料製程(最高加帽效率為93%，上表30中之條件H)藉由將NTP濃度適度地調節至**圖9A至圖9B**中描述之類似範圍而進一步用於追蹤實驗且DNA模板濃度在根據實例12之結果線性化質體DNA (pDNA)擴展，其表明隨著pDNA濃度增加產量得到提高。實驗設計展示於下表31中。

表31：評估較高NTP及DNA濃度之實驗2反應條件

製程	DNA濃度(mg/mL)	最終ATP & CTP (mM)	最終GTP (mM)
製程BV1	0.05	9	9
	0.1		9
條件H	0.05	9	9
	0.1	9	9
		10	9
		10	10
		12	9
		12	10

【0241】 此實驗之結果展示於**圖13**中。當ATP/CTP增加12 mM且最終GTP濃度增加至10 mM時，產量及5'端帽%分別提高至11.1 mg/mL及97%。因此，具有0.1 g/L 質體DNA、12 mM最終ATP及CTP以及10 mM最終GTP (列出於表31中)之條件H繼續作為製程FB V1用於進一步研發。

實例18

規模放大、連續進料模擬及合成DNA

【0242】 此實驗之目標為證實製程FB V1之可擴展性及本文中研發之推注進料或半連續進料在技術上藉由在製程FB V1中產生相當高品質的RNA而等效於連續進料。另一目標為證實製程FB V1一般可適用，原因在於其產生在規模上相當的高品質RNA(使用pDNA或以合成方式產生DNA，例如統一有序的模板擴增及轉錄[USTAT]製程)。NTP進料經由推注或半連續進料及連續進料使用自動化微生物反應器系統實施。

【0243】 如**圖14**中所示，推注進料或半連續進料產生與連續進料對應物相當的RNA品質及產量。資料亦展示連續進料製程使用pDNA或以合成方式產生之DNA (USTAT)製造具有高及相當品質的RNA。此外，製程FB V1亦可在如**圖14**中所示之多個規模上擴展。總之，此等資料展示製程FB V1針對各種DNA模板源之一般可擴展性及適用性。

實例19

在IVT反應中實施MG推注進料

【0244】 如**圖7**中所示，過高或過低含量之Mg會影響RNA濃度。重要地，不僅資料展示鎂濃度具有最佳操作範圍，而且在IVT期間之添加策略可最佳化。

【0245】 由於隨時間推移更多NTP添加至反應系統中，Mg:NTP比率可能不會保持一致。此外，在整個反應中形成的Mg2+及焦磷酸鹽之沈澱物可使金額用於諸如**圖17**中所示之T7的酶的Mg量降低且報導於其他處[[Kartje等人，J Biol Chem 296 (2021)]。出於此等原因，研究Mg之逐步遞送以便改良RNA品質屬性而不會負面低影響產量且在整個反應中保持更一致的Mg:NTP比率。

【0246】 已描述逐步進料NTP及$MgCl_2$之混合物的反應系統，其中

基於CIMac PrimaS™ HPLC線上量測殘餘NTP來起始三個進料階段[Skok等人，Chem Ing Tech 94(12):1-9 (2022)]。不同於先前所描述之彼等系統，本文描述之製程並未分成多個進料階段且不依賴於CIMac PrimaS™ HPLC系統之量測。另外，進料由乙酸Mg組成且使NTP含量進一步最佳化，進而展現加帽%之整體益處。

【0247】 IVT反應組裝有不同起始含量之ATP、CTP、GTP及pUTP及乙酸Mg。在整個反應中，使用ATP、CTP、GTP及pUTP之組合進料以達成表32中所列出之總含量。一些條件係每35分鐘以乙酸Mg之推注進料，而其他條件「先前負載(front loaded)」有目標量之乙酸Mg。在分析量測之前沈澱樣品。藉由UV量測濃度，藉由片段分析儀(FA)量測完整性，且藉由LC-UV方法量測端帽%。

【0248】 如表32中所示，先前負載有Mg之條件具有比其接受Mg推注之對應物較低的加帽%。在一對條件中，Mg推注進料似乎會使加帽提高大約15%。各對在實驗及分析可變性內具有相當的mRNA產量，但此可能因為Mg:NTP比率在所有測試條件中保持一致。

表32：Mg推注進料對IVT效能之影響

起始/最終ATP及CTP (mM)	起始/最終 GTP (mM)	起始/最終 pUTP (mM)	起始 Mg (mM)	最終 Mg (mM)	Mg 遞送方法	mRNA 產量 (g/L 起始)	完整性 (%)	5'端帽 (%)
7/12	3/12	7/11	43	43	先前負載	6.8	80	66
7/12	3/12	7/11	36	43	推注進料	7.2	81	72
9/14	5/14	9/13	50	50	先前負載	7.9	78	56
9/14	5/14	9/13	36	50	推注進料	8.5	80	66
11/16	7/16	11/15	57	57	先前負載	8.8	81	52
11/16	7/16	11/15	36	57	推注進料	8.7	80	67

【0249】 此實例表明逐步進料Mg之益處。舉例而言，在此實例中，Mg之逐步進料提高5'端帽，從而表明Mg之逐步遞送為提高加帽之策

略。Mg推注進料途徑亦可在不同Mg:NTP目標比率下表明逐步進料為維持產量所必需得。

實例20

加帽分子濃度及規模放大

【0250】 此實例研究將加帽分子濃度降低至2.5 mM同時仍維持95%加帽之可行性。如實例19中所示：在IVT反應中實施Mg大丸劑、逐步進料Mg可增強加帽。出於此原因，亦在此實例中探究起始Mg同時將終止Mg保持恆定在36 mM。另一目標為判定Mg進料策略是否可擴展且可經由連續進料進行。

【0251】 此實例包括兩個獨立實驗。一個在15 mL反應器中進行而另一個實驗在100 mL反應器中進行。各實驗中之恆定參數列出於表38中且不同參數展示於表33中。在8 mL系統中，每5分鐘遞送ATP/CTP/GTP/經修飾UTP之進料且每15分鐘遞送MgAc之單獨進料。在90 mL系統中，連續進料NTP及MgAc之組合進料。 藉由UV方法量測濃度，藉由片段分析儀(FA)量測完整性，且藉由LC-UV分析評估加帽%。

【0252】 如表33中所示，8 mL規模下之所有反應良好進行。所有測試條件下之mRNA產量及片段分析儀(FA)完整性係在檢定及分析可變性內。在條件B與F之間觀測道加帽大約3%之邊際增加，其僅略微高於預期之分析變化。因為5'端帽在操縱台上如此高，所以Mg推注進料並未對端帽%貢獻很多，但在GTP過度進料時，其仍可有助於整體製程穩固性。基於此等結果，將加帽分子濃度降低至低於2.5 mM為可行的。

表33：加帽分子及Mg評估8 mL

條件	加帽分子濃度(mM)	起始Mg (mM)	最終Mg (mM)	mRNA產量 (g/L起始)	FA完整性 (%)	5'端帽(%)
A	4	36	36	10.6	91	96
B	2.5	36	36	10.7	91	94
C	4	24	36	10.3	93	97
D	2.5	24	36	10.2	93	95
E	4	18	36	10.6	93	98
F	2.5	18	36	10.5	93	97

【0253】 將條件B之反應濃度及完整性與90 mL條件(表34)之效能進行比較。RNA濃度及完整性係愛實驗變化內，其表明該製程可規模放大且組合之Mg:NTP進料可能使操作簡單化。其亦提供以下支持：Mg推注與含有Mg之連續進料相當。

表34：AMBr15於EasyMax效能之比較

起始規模	NTP及Mg進料遞送策略	RNA濃度(mg/mL)	完整性(%)
8 mL	每5分鐘遞送NTP推注。每15分鐘遞送Mg進料。	6.8	93
90 mL	單一進料由在整個反應中連續遞送之NTP及Mg構成。	7.7	92

【0254】 如本文所顯示，加帽分子可以2.5 mM (且可能更低)使用且製程可以5-min推注、連續進料、單獨的Mg及NTP進料及/或組合之Mg/NTP進料運行。

實例21

高NTP進料

【0255】 此實例探索可以36 mM先前負載之乙酸Mg進料斗最高NTP含量。在實例10中，觀測到NTP與Mg之間的相互作用項。出於此原因，關注於確定在廣泛多種NTP濃度內如何穩固製程。

【0256】 此實例在自動化小規模生物反應器系統中以8 mL起始體積進行。所有恆定參數列出於表38中。液體處理器用於每5分鐘添加不同量

的含有ATP、CTP、GTP及pUTP之進料以達至表35中所列出之總含量。藉由UV量測濃度，藉由FA量測完整性，且藉由LC-UV分析評估加帽%。

【0257】 該製程在廣泛範圍之NTP濃度內展示穩固性。每個反應在45至79 mM範圍內之總NTP下產生大量mRNA。在實例10中，分批製程展示NTP之較低最佳範圍。總之，此等結果表明分批進料製程可操控具有高產量及改良產物品質特徵之較高總NTP。

表35：高NTP進料結果

條件	起始ATP/CTP (mM)	總ATP/CTP (mM)	起始GTP (mM)	總GTP (mM)	起始pUTP (mM)	總pUTP (mM)	mRNA產量(g/L起始)	完整性(%)
A	5	12	1	10	5	9	10.3	91
B	5	15	1	14	5	11	12.4	92
C	5	18	1	18	5	12	14.5	92
D	7	14	1.4	10	7	11	11.8	91
E	7	17	1.4	14	7	13	13.8	93
F	7	20	1.4	18	7	14	14.6	93
G	9	16	1.8	10	9	13	11.0	93
H	9	19	1.8	14	9	15	12.4	92
I	9	22	1.8	18	9	16	13.3	93

實例22

攪拌對殘餘DNA之影響

【0258】 對於患者安全性，原料藥中之雜質需要良好的控制及最小化。難以自IVT製程中移除之雜質中之一者為殘餘DNA (resDNA)。探究多個參數對resDNA之影響。此處，攪拌及混合參數經鑑別且展示為影響resDNA之關鍵因子。

【0259】 在此實驗中在自動化微生物反應器系統中也能夠RNA#1進行三個製程。利用DNA酶消化之製程FB V1用作基線以研究混合參數對resDNA雜質之影響。此等反應由製程FB V1在攪拌速率及焦磷酸酶濃度方面改良。**圖15**及**圖16**中示出之三個製程在多個供應商之三種不同焦磷

酸酶含量下評估下文所描述之攪拌範圍。 所研究之攪拌速率介於150至600 RPM範圍內(**圖15**)，且與功率/體積(**圖16**)、混合時間及葉輪外緣速度之範圍同義。此等範圍列於下表36中。此等四個混合量測以及未列出之其他混合因子可類似地用於降低殘餘DNA雜質含量。

表36：所研究之混合參數範圍

攪拌(RPM)	功率/體積(W/m^3)	混合時間(S)	葉輪外緣速度(m/s)
150 - 600	1.3 - 71.7	1.3 - 12.1	0.1 - 0.4

【0260】 此實驗之結果強調攪拌速率對殘餘DNA雜質之影響，因為隨著攪拌速率或功率/體積、混合時間或葉輪外緣速度增加，殘餘DNA含量在所有三個製程中一致地降低。因此，可有意地調節攪拌速率以降低IVT反應中之殘餘DNA雜質。此實例表明所研究之攪拌速率範圍對應於多個影響混合特徵之參數，包括諸如功率/體積、葉輪外緣速度及混合時間之參數，且此等混合參數可類似地調節以降低resDNA雜質。

表37：分批製程參數

參數	**設定點**							
	實例8：DOE1	實例9：DOE2	實例10：DOE3	DOE3 F1	DOE3 Opt	Conf Opt	BV1	改良之BV1
5'端帽類似物分子(mM)	4	4	4	4	4	9	4	參見實例16中之表21
ATP (mM)	5	N/A	N/A	9	7	9	9	9
CTP (mM)	5	N/A	N/A	9	7	9	9	9
GTP (mM)	5	N/A	N/A	9	7	9	9	9
修飾之UTP (mM)	5	N/A	N/A	9	7	9	9	9 (UTP)
Tris濃度(mM)	N/A	40	40	40	40	40	40	40
Tris緩衝液pH	8.0	N/A	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
鎂(mM)	16.5	N/A	N/A	36	33	50	36	36
亞精胺(mM)	N/A	2	0	0	0	0	0	0
DTT (mM)	N/A	10	0	0	0	0	0	0
Triton (%)	N/A	0	0	0	0	0	0	0
DMSO (%)	N/A	0	0	0	0	0	0	0
PEG-8000 (%)	N/A	0	0	0	0	0	0	0
DNA 濃度(mg/mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.075	0.05	0.05

RNA 酶抑制劑(U/mL)	1000	1000	100	100	100	100	100	100
焦磷酸酶(U/mL)	2	N/A	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	參見實例16中之表21
T7聚合酶(U/mL)	8000	N/A	N/A	14000	17000	25000	14000	14000
總IVT時間(min)	120	N/A	150	150	150	150	150	參見實例16中之表21
溫度(℃)	37	N/A	N/A	37	36	36	37	參見實例16中之表21

表38：分批進料製程參數

參數	**設定點**				
製程名稱	**FB V1**	實例19：在IVT反應中實施Mg推注進料	實例20：濃度，規模放大：8 mL	實例20：濃度，規模放大：90 mL	實例21：高NTP進料
5'端帽類似物分子(mM)	4	2.5	2.5	2.5	2.5
起始ATP (mM)	5	N/A	5	5	N/A
最終ATP (mM)	12	N/A	12	12	N/A
起始CTP (mM)	5	N/A	5	5	N/A
最終CTP (mM)	12	N/A	12	12	N/A
起始GTP (mM)	1	N/A	1	1	N/A
最終GTP (mM)	10	N/A	10	10	N/A
起始修飾之UTP (mM)	5	N/A	5	5	N/A
最終修飾之UTP (mM)	9	N/A	9	9	N/A
NTP遞送策略	不同	每5 min推注	每5 min推注	組合之連續Mg/NTP進料	每5 min推注
Tris緩衝液，pH 8.0 (mM)	40	40	40	40	40
HEPES緩衝液，pH 8.0 (mM)	0	0	0	0	0
起始Mg (mM)	36	N/A	N/A	18	36
最終Mg (mM)	36	N/A	36	36	36
Mg遞送策略	N/A	每35 min進行單獨推注進料	每15 min進行單獨推注進料	組合之連續Mg/NTP進料	N/A
亞精胺(mM)	0	0	0	0	0
DTT (mM)	0	0	0	0	0
質體DNA模板(mg/mL)	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1
RNA酶抑制劑(U/mL)	100	100	100	100	100
焦磷酸酶(U/mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
T7聚合酶(U/mL)	14000	14000	14000	14000	14000
總IVT時間(min)	150	150	150	150	150
溫度(℃)	37	37	37	37	37

實例23

質體

【0261】 在以下實例中使用若干質體。GFP質體(5854 bp)包括GFP之編碼序列(綠色螢光蛋白)及緊接在聚(A)尾序列下游之BsaI限制性核酸內切酶識別位點。自擴增(SA)質體(13,826 bp)包括NSP及RSV F蛋白質及緊接在聚(A)尾序列下游之LguI限制性核酸內切酶識別位點。B球蛋白質體(5101 bp)編碼RSV F蛋白質及緊接在聚(A)尾序列道下游之限制性核酸內切酶識別位點。GFP質體及B球蛋白質體兩者皆使用β-球蛋白之5'及3' UTR。GFP質體RNA之聚(A)尾為96個A (分段式)且B球蛋白及SA質體之聚(A)尾為80個A。使攜帶所需質體之大腸桿菌菌株在具有卡那黴素之物動物LB培養液中生長且用Plasmid Giga套組(QIAGEN®)處理所得細胞糊狀物以分離及純化質體DNA。藉由瓊脂糖凝膠電泳證實質體DNA均質性。

【0262】 質體線性化係在37℃下在18小時培育下進行。質體GFP用1.5U/ug BsaI限制酶線性化，SA質體用0.5U/ug之LguI線性化，且B球蛋白質體用1.5U/ug之LguI線性化。使用瓊脂糖凝膠電泳證實線性化。

【0263】 將所有活體外轉錄反應組分(除ribolock、焦磷酸酶及T7 RNA聚合酶以外)在冰上解凍10至15分鐘，將反應組分合併，且將反應物培育2或3小時。在反應完成之後，藉由用6U/uL或8U/ul DNA酶I及1至2mM $CaCl_2$處理30分鐘來移除DNA模板。在反應中使用T7 RNA聚合酶及焦磷酸酶(均為THERMO FISHER SCIENTIFIC®)。將ATP、CTP、UTP、N1甲基假尿苷(P-UTP)及GTP (THERMO FISHER SCIENTIFIC®)儲存於推薦之溫度下且視需要使用。視需要使用DTT及亞精胺(均為

SIGMA ALDRICH®)。

【0264】RNA在冰箱中在-80℃下藉由氯化鋰沈澱隔夜。集結粒隨後用冷凍的100%乙醇洗滌三次，接著添加無核酸酶之水以乾燥集結粒。RNA定量及產量計算為mg/mL IVT反應(NANODROP TECHNOLOGIES®)。

實例24

NTP濃度

【0265】研究IVT反應中不同濃度之NTP，例如5mM (總20mM NTP)、6mM (總24mM NTP)、7mM (總28mM NTP)及8mM (總32mM NTP)以覆蓋廣泛範圍之NTP。在反應中預先添加端帽類似物以在此分批模式IVT方法進展中產生加帽之mRNA。由亨德森等人[Henderson等人, Curr Protoc 1(2):e39 (2021)]描述之IVT方法具有5mM之各NTP及4mM CleancapAG (3OMe)。對於不同NTP濃度，個別NTP/CleancapAG (3OMe)比率維持在1.25。可測定鎂之最佳濃度(T7 RNA聚合酶之輔因子)以在最大可達成產量下維持≥90% RNA完整性及≥90%端帽併入。所測試之另一假設為Mg+2濃度是否應超過總NTP 4至6mM。因此，研究不同濃度之MgOAC2以尋找在不同NTP濃度下作用相當的基線濃度。在IVT反應期間，因為NTP藉由T7 RNA聚合酶併入，所以釋放焦磷酸鹽，其在反應中與鎂及沈澱物形成複合物[Kern & Davis，Biotech progress 13(6):747-756 (1997)]。焦磷酸酶可添加於反應中致使焦磷酸鹽斷裂成單磷酸而使得鎂游離且可用於反應中。一些基團已展示IVT反應中之焦磷酸酶使得RNA產量增加[Cunningham & Ofengand, Biotechniques 9(6):713-714 (1990)]，而其他基團已展示焦磷酸酶在增加RNA產量方面無影響

[Samnuan等人，F1000Research 11:333 (2022)]。鑒於此等不同觀測結果，此實例在較低濃度之焦磷酸酶下測試以研究廣泛範圍。為得到不同IVT條件之最大RNA產量，將GFP模板濃度保持在0.1ug/uL。所研究之T7 RNA聚合酶濃度範圍為8U/uL及10U/uL且反應物具有1U/ul之Ribolock RNA酶抑制劑(THERMO FISHER SCIENTIFIC®)、10 mM DTT、2 mM亞精胺及37℃之反應培育溫度，如表39中所示。反應之產量、加帽%及RNA完整性%展示於表40中。

表39：IVT製程參數

IVT組分	濃度	反應中之最終濃度			
Tris HCL緩衝液pH8	mM	40	40	40	40
各NTP	mM	5	6	7	8
Cleancap AG(3OMe)	mM	4	4.8	5.6	6.4
Ribolock	U/uL	1	1	1	1
反應中之總NTP	mM	20	24	28	32
鎂	mM	24,26,28,30,32	28,30,32	30,32,34,36	30,32,34,36,38
DTT	mM	10	10	10	10
亞精胺	mM	2	2	2	2
焦磷酸酶，無動物來源(AOF)	mU/uL	0.02	0.02	0.02	0.02
T7 RNA聚合酶，AOF	U/uL	8,10	8,10	8,10	8,10
溫度	℃	37	37	37	37
培育時間	分鐘	120	120	120	120

表40：IVT製程結果

樣品ID	CleancapAG(3OMe) mM	MgOAC2 mM	Each NTP mM	T7 RNA聚合酶 U/uL	mM Mg+2，與總NTP相比	產量(mg/mL)	端帽%	RNA完整性%
1	6.4	30	8	8	-2	7.11	99	91.5
2	6.4	32	8	8	0	7.36	99	93.5
3	6.4	34	8	8	2	7.28	99	93
4	6.4	36	8	8	4	7.49	100	94.3
5	6.4	38	8	8	6	7.00	98	94.2
6	6.4	30	8	10	-2	8.27	99	93.7
7	6.4	32	8	10	0	8.05	99	93.7
8	6.4	34	8	10	2	7.91	98	94.2

9	6.4	36	8	10	4	8.24	99	95
10	6.4	38	8	10	6	7.46	99	94.9
11	5.6	30	7	8	2	6.69	98	93.8
12	5.6	32	7	8	4	7.15	98	94.2
13	5.6	34	7	8	6	6.54	98	93
14	5.6	36	7	8	8	7.84	98	94.8
15	5.6	30	7	10	2	7.25	98	94.1
16	5.6	32	7	10	4	7.30	98	94.8
17	5.6	34	7	10	6	6.96	97	94
18	5.6	36	7	10	8	6.61	98	94.3
19	4.8	28	6	8	4	6.33	96	92.1
20	4.8	30	6	8	6	5.85	96	94.3
21	4.8	32	6	8	8	5.88	96	94.6
22	4.8	28	6	10	4	6.50	98	93.9
23	4.8	30	6	10	6	5.73	89	93.7
24	4.8	32	6	10	8	5.83	94	92.9
25	4	24	5	8	4	5.51	97	93.1
26	4	26	5	8	6	4.97	91	91.8
27	4	28	5	8	8	4.86	95	92.6
28	4	30	5	8	10	4.84	80	90.5
29	4	32	5	8	12	5.83	93	89.5
30	4	24	5	10	4	4.94	97	91.4
31	4	26	5	10	6	4.49	95	91.9
32	4	28	5	10	8	4.14	88	87.4
33	4	30	5	10	10	5.25	84	90.2
34	4	32	5	10	12	5.50	95	90.9

【0266】 選擇7mM NTP濃度及5.6mM之端帽濃度以得到9.2mg/mL之最大目標產量。選擇32mM MgOAC2，因為其對於不同NTP濃度之作用相當。Mg+2比總NTP高4mM，其中RNA完整性及端帽併入對於大多數IVT條件維持高於90%。

實例25

DTT、亞精胺及焦磷酸酶濃度

【0267】 還原劑DTT可防止反應中之酶氧化。研究5、10及20 mM之DTT濃度以測定最佳濃度。多元胺亞精胺可幫助T7 RNA聚合酶自DNA模板解離且快速移動至另一DNA模板上以用於RNA合成，藉此增加轉錄效率。未檢測亞精胺對RNA屬性之作用，選擇0 mM及2 mM濃度。如表41中所示，研究0.01 mU/uL及0.02 mU/uL之焦磷酸酶濃度。反應之產

量、加帽%及RNA完整性%展示於表42中。如表43中所示，亦研究對照反應中之不同RNA酶抑制劑濃度。

表41：IVT製程參數(DTT、亞精胺、焦磷酸酶)

IVT組分	單位	研究之不同濃度
T7 RNA聚合酶，AOF	U/uL	8, 10
DTT	mM	5, 10, 20
亞精胺	mM	0, 2
焦磷酸酶，AOF	mU/uL	0.01, 0.02

表42：IVT製程結果

樣品ID	焦磷酸酶mU/uL	DTT mM	亞精胺mM	T7 RNA聚合酶U/uL	產量(mg/mL)	端帽%	RNA完整性%
35	0.01	5	0	10	5.85	99	94.3
36	0.01	5	2	10	7.3	97	94.4
37	0.01	10	0	10	4.64	100	94.4
38	0.01	10	2	10	6.35	98	94.2
39	0.01	20	0	10	4.91	99	94.4
40	0.01	20	2	10	5.6	98	94.1
41	0.02	5	0	10	6.09	98	94.5
42	0.02	5	2	10	6.75	96	94.5
43	0.02	10	0	10	6.97	98	93.6
44	0.02	10	2	10	6.34	98	94.4
45	0.02	20	0	10	6.88	100	92.9
46	0.02	20	2	10	6.65	98	93.8
47	0.01	5	0	8	5.29	100	95.5
48	0.01	5	2	8	5.78	98	94.1
49	0.01	10	0	8	4.41	100	94.7
50	0.01	10	2	8	5.23	98	94.9
51	0.01	20	0	8	4.85	100	94.7
52	0.01	20	2	8	4.93	99	94.8
53	0.02	5	0	8	5.6	100	93.5
54	0.02	5	2	8	6.61	99	93.3
55	0.02	10	0	8	7.14	100	94.4
56	0.02	10	2	8	6.49	98	94.3
57	0.02	20	0	8	7.11	98	94.6
58	0.02	20	2	8	6.05	98	94.5

表43：IVT製程參數(RNA酶抑制劑濃度)

樣品ID	Ribolock mU/uL	產量(mg/mL)	端帽%	RNA完整性%
59	1	5.75	96	87.6
60	0.2	5.60	96	88.5
61	0.08	5.65	96	88.2
62	0. 04	5.65	96	86.8
63	無ribolock	5.60	97	66.2

【0268】 80%之反應顯示10 U/uL之T7 RNA聚合酶下之較高產量(參見表42)，因此，選擇10 U/之T7 RNA聚合酶。在不同濃度之DTT下見到RNA品質屬性不存在許多差異。然而，因為DTT有助於維持反應中之酶活性，所以選擇5mM之DTT濃度。亞精胺之存在顯示在0.01 mU/uL之較低焦磷酸酶濃度下產量增加，但其並不展示在0.02 mU/uL之焦磷酸酶濃度下對產量之相同影響。選擇2mM之亞精胺濃度。不含Ribolock RNA酶抑制劑之對照IVT反應顯示較低RNA完整性。將Ribolock濃度降低至0.08 U/uL，因為其在維持RNA完整性時與1 U/uL一樣有效。在降低Triton X-100含量下見到類似結果(參見表45)。

實例26

端帽及焦磷酸酶濃度

【0269】 研究不同濃度之端帽及焦磷酸酶以測定所研發分批IVT方法之最低端帽濃度及焦磷酸酶是否增加RNA產量同時維持高端帽併入及RNA完整性。所研究之端帽類似物濃度(mM)為1、2、2.5、3、3.5、4、4.5及5.6，且所研究之焦磷酸酶濃度(mU/uL)為0.01、0.02、0.05、0.1、0.2及2。反應之產量、加帽%及RNA完整性%展示於表44中。

表44：IVT製程結果

樣品ID	焦磷酸酶 mU/uL	CleancapAG (3OMe) mM	個別NTP/端帽比率	產量 (mg/mL)	端帽%	RNA完整性%
64	0.01	5.6	1.25	6.77	98	93
65		4.5	1.55	6.72	97	93.3
66		4	1.75	5.76	98	93.3
67		3.5	2	5.73	98	93.5
68		3	2.33	6.54	95	92.5
69		2.5	2.8	6.09	88	93
70		2	3.5	5.51	91	92.9
71		1	7	6.78	71	92.6
72	0.02	5.6	1.25	7.57	97	92.9
73		4.5	1.55	7.32	96	92.2
74		4	1.75	7.49	97	93.3

75		3.5	2	7.48	97	92.8
76		3	2.33	7.44	93	92
77		2.5	2.8	7.29	95	93.2
78		2	3.5	7.03	90	91.6
79		1	7	7.05	85	91.7
80	0.05	5.6	1.25	7.61	98	92.2
81		4.5	1.55	7.67	97	91.3
82		4	1.75	7.53	97	91.5
83		3.5	2	7.21	95	92
84		3	2.33	7.45	95	91.8
85		2.5	2.8	7.12	92	90.8
86		2	3.5	6.74	88	91.4
87		1	7	6.91	72	91.9
88	0.1	5.6	1.25	7.75	98	90.6
89		4.5	1.55	7.29	97	89.2
90		4	1.75	7.81	97	88.1
91		3.5	2	7.30	94	89.3
92		3	2.33	7.89	97	88.6
93		2.5	2.8	7.51	97	88.7
94		2	3.5	7.23	89	87.7
95		1	7	7.20	73	86.8
96	0.2	5.6	1.25	7.44	97	87.1
97		4.5	1.55	7.22	97	85.7
98		4	1.75	7.78	97	86.5
99		3.5	2	7.60	96	86.8
100		3	2.33	7.62	91	86.7
101		2.5	2.8	7.58	84	85.7
102		2	3.5	7.43	76	84.9
103		1	7	7.49	63	84.3
104	2	5.6	1.25	7.21	93	80.3
105		4.5	1.55	8.45	95	82.8
106		4	1.75	8.00	86	81.5
107		3.5	2	7.16	77	79.2
108		3	2.33	7.65	71	80.7
109		2.5	2.8	7.33	77	81
110		2	3.5	7.50	58	80.6
111		1	7	7.18	46	80

【0270】RNA完整性隨焦磷酸酶增加而降低。RNA產量自0.01 mU/uL之焦磷酸酶增加至0.02 mU/uL。然而，產量與焦磷酸酶自0.02 mU/uL增加至2 mU/uL一致，其表明反應條件在鎂及焦磷酸酶方面為平衡的。加帽效率藉由降低端帽濃度而降低。3 mM之端帽濃度在高達0.1 mU/uL之不同焦磷酸酶濃度下同等良好地起作用，且仍維持>90%端帽。對於大多數條件觀測到產量隨著端帽降低而降低。

實例27

RNA分子之研發分批模式IVT方法

【0271】 前述實例之教示用於研發含有以下之分批模式IVT反應：Tris HCl緩衝液(40 mM濃度及8之pH)、Ribolock (0.08 U/uL)、端帽類似物(3mM或4mM)、ATP (7 mM)、CTP (7 mM)、GTP (7 mM)、P-UTP/UTP(7 mM)、Mg(OAc)2 (32 mM)、DTT (5 mM)、亞精胺(2 mM)、DNA模板(0.1 ug/uL)；焦磷酸酶，AOF(0.02 mU/uL)；T7 RNA聚合酶，AOF (10 U/uL)，在37℃下進行靜態反應攪拌及運行120分鐘。使用降低含量之Triton X-100之對照反應的結果(比表43中所示之結果低100倍)展示於表45中。

表45：IVT製程結果

樣品ID	Ribolock mU/uL	產量(mg/mL)	端帽%	RNA完整性%
59c	1	5.52	95	88
60c	0.2	5.54	96	87
61c	0.08	5.26	95	87
62c	0.04	5.44	97	88.4
63c	無ribolock	5.47	94	58.2

實例28

模板濃度

【0272】 為研究最佳模板濃度，研究一系列模板濃度。最佳模板濃度可幫助降低下游DNA雜質。研發之IVT方法具有0.1 ug/uL之DNA模板濃度。此等實驗之結果展示於**圖18**中且表明增加模板濃度不會導致主要產量差異。因此，模板濃度可降至0.05 ug/uL。

實例29

培育溫度及時間

【0273】 為研究培育溫度是否對完整RNA之合成有任何影響，研究

IVT之不同溫度及培育時間。如**圖19**中所示，隨著IVT之培育溫度降至25℃，觀測到RNA產量降低。月90%之RNA完整性在30℃下維持2及3小時之培育時間。然而，在20℃溫度下，端帽併入最低(約50%)。

實例30

對長RNA分子實施分批模式IVT製程

【0274】 上文所描述之分批模式IVT方法在長RNA分子(約9.48KB自擴增RNA)上在37℃下測試2或3小時之培育時間，且具有0.05、0.075或0.1 ug/uL之模板濃度。除了所測試之參數，不向反應中添加端帽分子。如**圖20**中所示，在37℃下，較大RNA分子(約9.48KB)之RNA完整性為約60%至70%完整性且0.05 ug/uL、0.075 ug/uL及0.1 ug/uL之DNA濃度對於產量及RNA完整性具有一致結果。因此，選擇0.05ug/uL之較低DNA濃度。另外，較長培育時間導致RNA完整性降低。因此，測試較低的培育溫度。

實例31

測試較低IVT培育溫度及時間

【0275】 探究較低培育溫度以確定其是否可產生較高量之完整RNA分子。在0.05 ug/uL之模板濃度下在2或3小時之培育時間下測試20℃、25℃及30℃之溫度。如**圖21**中所示，相較於37℃ (**圖20**)，較大RNA分子之培育溫度降低產生較高RNA完整性。在25℃及30℃下，RNA完整性≤77%。選擇25℃用於培育溫度。另外，相較於2小時培育時間，培育時間增加至3小時產生略微高的RNA產量。

實例32

測試MG2+濃度以增加RNA完整性

【0276】 為達成≥80% RNA完整性之目標，進行鎂滴定以在針對長RNA分子之焦磷酸酶及NTP濃度下平衡反應。另外，測試兩個培育時間以獲得最佳產量及RNA完整性。如表46中所示，隨著鎂濃度降至26mM，RNA完整性增加2%至4%。28mM濃度之Mg2+為針對長RNA分子之所選濃度選擇，因為達成≥80%之RNA完整性，且RNA產量仍最佳。另外，選擇3小時培育以確保獲得≥5 mg/mL產量。

表46：Mg2+滴定結果

樣品ID	Mg2+濃度(mM)	產量(mg/mL)	RNA完整性%	培育(小時)	溫度
SA13	24	4.9	79.8	2	25℃
SA14	26	4.74	81.9		
SA15	28	4.92	81.4		
SA16	30	4.82	80.6		
SA17	32	4.88	80		
SA18	24	5.2	81.3	3	
SA19	26	5.07	81.4		
SA20	28	5.2	81.1		
SA21	30	5.2	78.3		
SA22	32	5.32	77.1		

實例33

焦磷酸酶滴定及產量

【0277】 進行焦磷酸酶滴定試驗以測試RNA產量是否可增加同時維持RNA完整性。在在25℃下3小時培育時間及26或28 mM之Mg2+濃度下測試0.02、0.05、0.08、0.1、0.15、0.2及2 mM之焦磷酸酶濃度。如表47中所示，反應中之焦磷酸酶濃度增加導致RNA產量在某些濃度下增加約1至2 mg。然而，增加濃度導致RNA完整性降低；因此，所選焦磷酸酶濃度為0.02 mU/uL。

表47：焦磷酸酶滴定結果

樣品ID	產量(mg/mL)	焦磷酸酶濃度(mU/uL)	Mg 2+濃度(mM)	RNA完整性%
SA32	4.7	0.02	26	79.1
SA33	5.76	0.05		74.2
SA34	6.78	0.08		76.3
SA35	7.19	0.1		75.4
SA36	5.56	0.15		68.9
SA37	6.04	0.2		71.3
SA38	5.98	2		57.7
SA39	4.84	0.02	28	81.2
SA40	5.19	0.05		72.2
SA41	5.84	0.08		68.9
SA42	6.27	0.1		71.6
SA43	6.18	0.15		69.3
SA44	6.94	0.2		68.1
SA45	5.76	2		48.3

實例34

長RNA分子之分批模式IVT方法

【0278】前述實例之教示用於研發含有以下之長RNA分子之分批模式IVT反應：Tris HCl緩衝液(40 mM濃度及8之pH)、Ribolock (0.08 U/uL)、ATP (7 mM)、CTP (7 mM)、GTP (7 mM)、UTP (7 mM)、Mg(OAc)2 (28 mM)、DTT (5 mM)、亞精胺(2 mM)、DNA模板(0.05 ug/uL)；焦磷酸酶，AOF (0.02 mU/uL)；T7 RNA聚合酶，AOF (10 U/uL)，及在25℃下運行180分鐘。

實例35

進料IVT研發-增加NTP濃度以增加RNA產量

【0279】除了降低端帽濃度，進料IVT方法之目標為在約1mM端帽下增加RNA產量。為增加產量，在分批模式IVT中增加NTP濃度。如表48中所示，增加NTP濃度導致分批模式IVT中之加帽效率降低同時仍維持RNA完整性。因為目標產量為約12.5 mg/mL，選擇9.5mM之各NTP濃度用於分批進料IVT。以下實例探索Mg2+、T7及焦磷酸酶滴定以增加RNA

產量且平衡反應。

表48：增加之NTP濃度結果

樣品ID	產量(mg/mL)	NTP (mM)	CleancapAG (3OMe) (mM)	RNA完整性%	端帽%
FM07	7.01	7	1	93.1	88
FM08	7.12	7.5		93.7	87
FM09	7.32	8		92.6	88
FM10	6.46	8.5		92.7	83
FM11	6.66	9		92.5	82
FM12	5.21	9.5		92.1	81
FM13	4.78	10		91.5	71
FM14	7.83	7	4	93.5	98
FM15	8.15	7.5		93.6	97
FM16	8.61	8		93.5	97
FM17	7.81	8.5		93.7	98
FM18	7.88	9		93.5	98
FM19	6.55	9.5		92.8	97
FM20	5.78	10		91.6	93

實例36

特異性NTP對加帽效率之影響

【0280】 以確定四種NTP中任一者是否對端帽併入有影響，測試NTP與端帽之兩個不同比率。所測試的兩個NTP與端帽比率為1.25及3.5。對於樣品中所有未測試之其他NTP，NTP濃度保持在9.5mM，且端帽濃度為1mM。端帽類似物係指CleancapAG(3OMe)。如**圖22**中所示，相較於所有其他NTP之濃度降低，降低GTP濃度導致端帽併入較高。對於所測試得兩個GTP與端帽比率，端帽併入為≥90%。對於所有其他NTP，端帽併入隨著NTP濃度降低。此顯示GTP之初始濃度會影響端帽百分比。因此，選擇GTP進料以繼續前進。

實例37

增加RNA產量

【0281】 在研究進料策略之前，IVT進一步最佳化以在基線1mM端帽濃度下增加產量。為增加RNA產量，研究乙酸鎂濃度範圍，接著測試

多種焦磷酸酶及T7 RNA聚合酶濃度。在此實例中，NTP之濃度為9.5 mM且端帽之濃度為1 mM。如**圖23**中所示，隨著鎂濃度增加，RNA完整性略微下降。RNA產量介於6至7.5 mg/mL範圍內。選擇36mM之鎂作為反應中之平衡濃度且避免對RNA完整性之任何負面影響。

【0282】 為進一步增加產量，測試各種T7 RNA聚合酶及焦磷酸酶濃度。如表49中所示，隨著焦磷酸酶增加，大多數條件之RNA產量增加。然而，在0.1 mU/uL焦磷酸酶及13 U/uL及15 U/uL之T7 RNA聚合酶下，產量略微降低。因此，選擇0.08 mU/uL焦磷酸酶。在15 U/uL及13 U/uL之T7 RNA聚合酶及0.08 mU/uL之焦磷酸酶下，達成≤10 mg/mL產量。然而，選擇15 U/uL以確保達成最大可能產量。

表49：T7 RNA聚合酶及焦磷酸酶之不同濃度

樣品ID	產量mg/mL	RNA完整性%	端帽%	T7 RNA聚合酶(U/uL)	焦磷酸酶(mU/uL)
FM40A	5	93.9	66	10	0.02
FM40B	7.6	95.3	84	13	0.02
FM40C	7.2	94.7	84	15	0.02
FM41A	6.7	93.5	77	10	0.04
FM41B	6.3	94	83	13	0.04
FM41C	8.7	93.4	85	15	0.04
FM42A	6	95.1	77	10	0.06
FM42B	8.1	95.7	83	13	0.06
FM42C	9.2	95.3	84	15	0.06
FM43A	8.5	94	78	10	0.08
FM43B	9.5	94.4	79	13	0.08
FM43C	10	95	84	15	0.08
FM44A	8.65	92.9	78	10	0.1
FM44B	8.3	92.7	81	13	0.1
FM44C	8.65	92.5	75	15	0.1

實例38

測定在時間間隔期間使用之GTP量

【0283】 為測定研發之IVT製程中不同時間間隔下消耗之GTP量，在以下GTP濃度下進行反應：0.4 mM、0.8 mM及1 mM。在不同時間點停

止反應且測試NTP殘餘物。在第一反應中，將0.4 mM之GTP添加至研發之IVT製程中。在4、5、8、10、12或15分鐘停止反應。在進入反應之4分鐘，仍存在殘餘GTP。因此，選擇進料濃度為0.4 mM GTP之4-分鐘GTP進料時間間隔以在進料IVT研究中進行測試。

【0284】 在第二反應中，將0.8 mM之GTP添加至研發之IVT製程中。在5、8、10、12或15分鐘停止反應且測試殘餘GTP。在進入反應之8分鐘，仍存在殘餘GTP。因此，選擇進料濃度為0.8 mM GTP之5-分鐘及8-分鐘GTP進料時間間隔以在進料IVT研究中進行測試。

【0285】 在第三反應中，將1 mM之GTP添加至研發之IVT製程中。在5、8、10、12或15分鐘停止反應且測試殘餘GTP。在進入反應之8分鐘，仍存在殘餘GTP。因此，選擇進料濃度為1 mM GTP之5-分鐘及8-分鐘GTP進料時間間隔以在進料IVT研究中進行測試。

實例39

測定GTP:端帽類似物之量

【0286】 在以下實例中，測試不同GTP與端帽比率以確定在具有GTP與進料之量的反應中端帽類似物之濃度可如何低。基線GTP/端帽比率為0.25，對於ARCA端帽類似物G為較佳的。在此實例中，測試三個不同GTP濃度，且端帽濃度介於0.1 mM至4 mM之範圍內。如表50中所示，在反應中顯示≥90%端帽%之最低端帽濃度為0.4 mM。0.4mM端帽及高於0.4mM之任何濃度實現≥90%端帽。另外，0.4 mM、0.8 mM及1 mM GTP濃度實現約90%端帽併入。因此，在以下研究中測試不同GTP:端帽比率及不同GTP進料濃度。

表50：GTP/端帽之不同比率

樣品ID	CleancapAG (3OMe) mM	GTP mM	GTP/端帽比率	RNA完整性 %	端帽 %	產量mg RNA/mL反應物
FM56	0.1		4	73	72	0.3
FM57	0.4		1	59.6	95	0.58
FM58	0.7		0.57	71	96	0.63
FM59	1		0.4	64.7	94	0.4
FM60	1.3		0.307	64.3	94	0.42
FM61	1.6	0.4	0.25	70.7	93	0.35
FM62	0.4		2	71	93	0.59
lFM63	0.7		1.14	71.4	95	0.97
FM64	1		0.8	73.8	97	0.78
FM65	1.3		0.61	79.1	98	0.83
FM66	1.6		0.5	75.6	97	0.99
FM67	3.2	0.8	0.25	75.1	94	0.75
FM68	0.4		2.5	78.3	93	0.81
FM69	0.7		1.428	76.8	94	1.23
FM70	1		1	79.5	96	1.11
FM71	1.3		0.769	78.5	96	0.95
FM72	1.6		0.625	75.1	98	1.2
FM73	4	1	0.25	79	97	1.26
對照	1	9.5	9.5	94.8	75	9.72

實例40

不同GTP進料濃度

【0287】 在以下實例中，測試不同GTP進料濃度。在第一研究中，每4分鐘進料0.4 mM之GTP。總之，在IVT製程期間添加9.5 mM GTP。測試不同端帽類似物濃度以確定最佳條件。如**圖24**中所示，增加增加類似物導致端帽併入較高。0.4mM GTP進料下≥0.7mM端帽濃度為基線條件，得到>90%端帽、90% RNA完整性及約9 mg/mL產量。

【0288】 在第二研究中，每5或8分鐘進料0.8 mM之GTP。亦測試各種端帽類似物濃度。如**圖25**中所示，相較於5-分鐘進料，每8分鐘進料0.8mM GTP產生較高產量及增加之端帽併入。在此研究中，在≥1 mM端帽下每8分鐘進料0.8mM GTP為基線條件，得到約90% RNA完整性、約90%端帽併入及約7.5至10mg /mL之產量。

【0289】 在第三研究中，每5或8分鐘進料1 mM之GTP。再次，測試不同端帽類似物濃度。如**圖26**中所示，同樣相較於5-分鐘進料，8-分鐘進料產生略高度產量。根據此等結果，基線最佳條件為0.7mM端帽類似物及每8分鐘1mM GTP進料，得到≥7mg /mL產量同時仍維持約90%之RNA完整性及約90%之端帽併入。

實例41

在不同RCA模板濃度下之RCA反應

【0290】 在以下實例中，在滾環擴增(RCA)反應(如表51中所描述)中使用少至二分之一至五(0.5至5)奈克之環狀超螺旋雙股DNA (dsDNA)模板(含有可轉錄卡匣)以產生模板之10^5至10^6倍擴增，從而得到dsDNA串聯體，如**圖27A**中所示且在**圖27B**中之線性化之後。

表51：用phi29 DNA聚合酶之RCA反應

試劑	最終濃度	
反應緩衝液含有：Tris-HCl、$(NH_4)_2SO_4$、$MgCl_2$、KCl、DTT	1	X
無機酵母焦磷酸酶	1	U/mL
dATP	0.5-1.00	mM
dCTP	0.5-1.00	mM
dTTP	0.5-1.00	mM
dGTP	0.5-1.00	mM
3'核酸外切酶抗性隨機六聚體	1-10	μM
phi29 DNA聚合酶	0.50	U/μL
環狀dsDNA模板	0.5-5	ng/mL
達至反應體積的不含核酸酶之水		

【0291】 將以上混合物在存在或不存在熱變性之情況下混合，且隨後在30℃下培育25至30小時。培育之後，phi29聚合酶可在65℃下加熱失活10 min。較佳地，聚合酶未進行加熱失活。反應可實現0.5至0.85

mg/mL之DNA。

【0292】 如本文所顯示，RCA反應可在27至30℃之溫度下進行25至30小時(參見**圖28**)。另外，可移除BSA，調節RCA緩衝液組合物，且使用不同dNTP濃度及phi29聚合酶以成功地產生用於活體外轉錄反應之RCA模板。最後，在RCA培育之前的熱變性步驟及在RCA後(但在線性化之前)之加熱失活步驟可自RCA反應過程省略。移除此兩個步驟使得商業製造變得容易且允許等溫過程，同時仍出人意料地產生相較於質體DNA之品質mRNA，如下文所示。

實例42

在不純化之情況下消化RCA DNA

【0293】 在以下實例中，由環狀dsDNA模板產生之RCA DNA可藉由一或多種限制性核酸內切酶進行酶促消化以產生線性化DNA片段用作活體外轉錄反應之模板，而在酶消化之前不對RCA DNA進行純化。典型反應需要DNA模板之純化、DNA模板於緩衝液中之復原，隨後DNA模板之酶消化。如本文所描述，整個反應(亦即，擴增及線性化)可在同一反應容器中進行而不損失材料，此係因為不需要轉移至不同容器以進行不同反應步驟。

【0294】 RCA DNA可用限制性核酸內切酶消化以產生線性化dsDNA而不需要DNA純化或額外的緩衝試劑。將0.8至2.2 U之BspQI (10 U/μL，NEB™#0712)/微克RCA DNA吸移至RCA反應容器中且在37℃下在加熱塊中培育隔夜。如**圖29**中所示，可使用瓊脂糖凝膠電泳觀測切割產物。

實例43

使用未經純化之線性化DNA模板之IVT

【0295】 線性化RCA DNA或線性化質體DNA可在用限制性核酸內切酶消化後不經純化即用作活體外轉錄之模板。通常，DNA模板在用於IVT反應之前需要純化且再懸浮於緩衝液中。出人意料地，此純化步驟可去除而對IVT反應之RNA之產量或品質不具有影響。

【0296】 如以上實例中製備之線性化RCA DNA將用作IVT模板以在消化後不經純化即產生mRNA。另外，不經純化之線性化質體DNA可包括為IVT之模板。線性化DNA亦可使用乙醇/2.5 M $NH_4CH_3CO_2$沈澱純化且再懸浮於無核酸酶之水中。各DNA樣品將用作使用表52中所示之參數的IVT反應中的模板。DNA將以0.1 mg/mL最終濃度補充。

表52：用線性RCA DNA作為模板之USTAT v1 IVT反應

試劑	最終濃度	
Tris乙酸鹽；pH 8.0	50	mM
乙酸Mg	40	mM
NTP混合物	40	mM
無機酵母焦磷酸酶	0.003	U/μL
RNA酶抑制劑	0.5	U/μL
T7聚合酶	11	U/μL
亞精胺	3.5	mM
DTT	12.5	mM
RCA DNA	100	ng/μL
達至反應體積的不含核酸酶之水		

【0297】 將以上反應物輕緩地渦旋且在37℃下培育150 min。將添加DNA酶I及1 M $CaCl_2$，且將反應混合物在37℃下培育。產物隨後將藉由LiCl沈澱純化。濃度將在nanodrop上量測且RNA完整性將使用片段分析進行評估。使用線性化純化的質體DNA產生之RNA將用作對照。

實例44

統一有序的模板擴增及轉錄

【0298】 線性化RCA DNA或線性化質體DNA可在用限制性核酸內切酶消化後不經純化即用作活體外轉錄之模板。通常，DNA模板在用於IVT反應之前需要純化且再懸浮於緩衝液中。出人意料地，此純化步驟可去除而對IVT反應之RNA之產量或品質不具有影響。

【0299】 可在單反應容器中依序進行環狀dsDNA (質體或合成)之RCA反應，接著限制酶線性化及IVT，從而產生mRNA而無需任何前述純化步驟。該方法允許DNA定向合成具有任何序列，大小範圍在短寡核苷酸至若干千鹼基內的RNA分子。

【0300】 由RCA反應產生之DNA可線性化且用作單一容器中之逐步反應中之IVT反應之模板而不需要純化或體積轉移，稱為統一有序的模板擴增及轉錄(USTAT)。此單一容器反應之模板可為每毫升RCA反應物少至0.5 ng之環狀超螺旋dsDNA，而對RNA產量或品質不具任何影響。不需要模板DNA之熱變性。用於此類逐步單容器RCA反應之RCA反應組分如同上表51。

【0301】 RCA反應如同表51使用每毫升反應體積0.5 ng 質體DNA來組裝。包括使用商業緩衝液條件之類似反應以進行比較。將反應混合物輕緩地渦旋且在30℃培育25至30小時。隨後，將RCA反應物在相同容器中用限制性核酸內切酶消化以產生線性化dsDNA而無需DNA純化或額外緩衝試劑。將1.0 U之BspQI (10 U/μL，NEB，#R0712)/微克RCA DNA吸移至RCA反應容器中且在37℃下培育20至25小時。

【0302】 消化反應之產物可不需要純化而用於後續IVT步驟中。線性化RCA DNA直接用於如同表52中之IVT反應中。包括線性化之質體DNA模板作為對照。將反應物輕緩地渦旋且在37℃下培育150 min。添加

DNA酶I及1 M $CaCl_2$，且將反應混合物在37℃下培育。藉由LiCl沈澱純化產物且使用Nanodrop來量測濃度。使用片段分析評估RNA完整性。結果展示於**圖30**中。

實例45

USTAT與IVT反應之改良組合

【0303】 統一有序的模板擴增及轉錄(USTAT)在與IVT反應之改良組合時可產生較高品質RNA產物。

【0304】 進行RCA反應，消化產物，且DNA如同實例44不經進一步純化即用作IVT之模板。在一第二態樣中，質體DNA使用2 U BspQI/微克DNA線性化且不經純化即用作IVT之模板。包括IVT之線性化純化的質體DNA模板作為對照。

【0305】 使用以上DNA模板之IVT反應使用三種IVT反應條件中之一者進行：表52中所示之USTAT v1 IVT反應、如表37中所示之分批IVT反應(BV1)或如表38中所示之分批進料IVT反應(FB V1)。反應可視情況包括用於共轉錄加帽之組分及/或修飾之NTP。RCA DNA或質體DNA以0.05至0.1 mg/mL最終濃度補充。

【0306】 藉由沈澱純化RNA樣品且藉由UV量測濃度。所得RNA之完整性使用片段分析評估且進行加帽之mRNA之部分的評估。在IVT中使用USTAT V1、BV1或FB V1 IVT製程之RCA DNA模板相較於線性化質體模板(純化之對照或未純化的)的結果展示於表53中。

表53：RCA DNA模板與線性化質體之比較

反應	IVT製程	DNA	產量(g/L)	5'端帽(%)	完整性(%)
A	USTAT V1	線性化pDNA	9.0	66	91.9
B		未純化之線性化pDNA	8.7	67	87.6
C		USTAT RCA	6.7	49	84.4
D	BV1	線性化pDNA	8.5	82	84.1
E		未純化之線性化pDNA	8.7	81	83.0
F		USTAT RCA	9.5	70	87.4
G	FB V1	線性化pDNA	13.1	93	92.5
H		未純化之線性化pDNA	13.0	94	92.1
I		USTAT RCA	11.2	87	87.5

實例46

USTAT反應之可擴展性

【0307】 統一有序的模板擴增及轉錄(USTAT)反應之體積可增加以實現產生較大量之RNA。

【0308】 RCA DNA擴增反應以100 mL規模進行且如同實例44中使用BspQI使產物線性化。DNA以0.1 mg/mL補充至表38中所示之FB V1 IVT反應中。包括使用線性化純化之質體DNA模板的反應作為對照。RNA樣品藉由沈澱純化且藉由UV測定濃度。RNA完整性藉由FA測定且加帽%藉由LC-UV分析評估。結果展示於**圖31**中。

實例47

線性化USTAT RCA DNA之次世代定序

【0309】 次世代定序可用於評估在RCA反應中擴增之DNA相對於質體模板的序列保真度。針對插入/缺失之存在或任何序列變異體，評估線性化且純化之質體DNA、線性化但未純化之質體DNA及線性化RCA DNA的序列。如**圖32**中所示，在轉錄模板內未觀測到變異體。

實例48

細胞培養物中之USTAT RNA表現

【0310】 使用USTAT產生之RNA可轉染至HEK293細胞中，得到類似於使用衍生自質體DNA模板之RNA觀測到的蛋白質表現。

【0311】 各自含有編碼GFP之轉錄卡匣的USTAT RCA DNA或線性化質體對照DNA用作如表37中IVT反應之模板。運行反應兩次以產生未加帽以及經共轉錄加帽之RNA。RNA使用氯化鋰沈澱純化，再懸浮於水中且使用Nanodrop來量測濃度。每孔轉染總共5 ug之RNA，具有0.5 ug或0.05 ug之加帽RNA且其餘為未加帽RNA。在藉由FACS (BD FACSMELODY™)評估GFP表現之前，使經轉染細胞恢復1小時。每5000個計數中的GPF表現細胞之數目展示於**圖33**中。僅使用未加帽之RNA地對照轉染並不展現可量測的GFP表現。

實例49

使用不同大小之模板的USTAT反應

【0312】 USTAT反應可用於產生1.4 kb至超過10 kb之各種大小的RNA。含有不同大小之RNA的轉錄卡匣的質體集用作如實例44 (統一有序的模板擴增及轉錄)中USTAT RCA中之模板。將線性化DNA添加至包含表37中之組分的IVT反應中。RNA使用氯化鋰沈澱純化且再懸浮於水中。使用具有不同大小之IVT轉錄本模板之構築體的反應之產量及完整性展示於表54中。展示RCA DNA產量、RNA產量及RNA完整性。包括質體DNA模板作為對照。使用FA來量測RNA完整性。

表54：使用不同大小之IVT轉錄本模板的反應之比較

構築體	轉錄大小(kb)	RCA DNA產量(mg/mL)	RNA產量(mg/mL)	完整性(%)
pDNA C09	1.8	0.874	4.8	85
pDNA 89	1.4	0.874	5.1	77
pDNA 92	4.3	0.978	5.6	81
pDNA 93	5.9	0.920	5.2	73
pDNA 94	7.7	0.854	5.0	57
pDNA 96	11	0.890	5.3	54
pDNA對照	1.8	n/a	5.4	91

實例50

一步模板組裝及USTAT

【0313】 環狀dsDNA模板可由線性dsDNA片段組裝以在DNA擴增之前不需任何清除或純化步驟而用於USTAT反應。此允許在單一容器中依序進行模板組裝、DNA擴增、線性化及IVT，而不需純化步驟。線性dsDNA片段可藉由活體外DNA合成、酶消化質體之片段或藉由PCR來產生。

【0314】 含有所關注基因(GOI)之序列的線性dsDNA片段係獲自商業供應商(IDT)或藉由PCR來產生。包括啟動子序列、5'及3' UTR及聚A序列之第二片段集藉由使用酶消化自質體分離片段或藉由PCR來產生。作為替代例，單一dsDNA片段藉由PCR自質體擴增以在下一步驟環化。將線性dsDNA與酶及緩衝液於反應中合併(NEBuilder HiFi組裝混合物或類似物)且使用每毫升反應體積0.5 ng DNA將所得環狀dsDNA與如表51中之RCA反應組分直接合併。此反應用於產生如實例44中之mRNA。

【0315】 將線性化RCA DNA直接用於如表52中之IVT反應。將反應輕緩地渦旋且在37℃下培育150分鐘，接著藉由LiCl沈澱純化。使用

Nanodrop來量測RNA濃度且使用片段分析評估RNA完整性。結果展示於下表55中。

表55：微型環USTAT模板與質體DNA之比較

模板	片段1	片段2	RCA DNA產量(mg/mL)	RNA產量(mg/mL)	RNA完整性
m01	合成	消化	0.856	8.0	76
m02	PCR	消化	0.864	7.7	74
m03	PCR	PCR	0.712	7.7	75
m04	合成	PCR	1.620	7.0	66
m05	僅PCR		0.674	7.3	77
pDNA CA09	n/a	n/a	0.732	7.3	76

實例51

在緩衝液變化下之USTAT

【0316】 統一有序的模板擴增及轉錄(USTAT)之緩衝液調配物之組分可經調整以最佳化mRNA產物品質。在以下實例中，評估反應組分之變化以及添加降低DNA模板對mRNA完整性及產量之影響。

【0317】 RCA反應如表56中使用每毫升反應體積0.05 ng質體DNA進行組裝。包括使用商業緩衝液組合物之反應作為對照。將反應混合物輕緩地渦旋且在30℃下培育22至30小時。隨後，將RCA反應物在相同容器中用限制性核酸內切酶消化以產生線性化dsDNA而無需DNA純化或額外緩衝試劑。將1.0 U之BspQI (NEW ENGLAND BIOLABS)/毫升RCA反應物吸移至RCA反應容器中且在37℃下培育20至25小時。RCA DNA產量展示於**圖34A**中。線性化DNA直接用作IVT之模板。

表56：在緩衝液組合物選項下之USTAT反應

試劑	最終濃度	
反應緩衝液含有：Tris緩衝液、$(NH_4)_2SO_4$、$MgCl_2$、KCl、DTT或Tris緩衝液、$(NH_4)_2SO_4$、$MgCl_2$、NaCl、DTT	1	X
無機酵母焦磷酸酶	0.5	U/mL
dATP	0.5-1.00	mM
dCTP	0.5-1.00	mM
dTTP	0.5-1.00	mM
dGTP	0.5-1.00	mM
3'核酸外切酶抗性隨機引子	1-10	μM
phi29 DNA聚合酶	0.50	U/μL
環狀dsDNA模板	0.05-5	ng/mL
達至反應體積的不含核酸酶之水		

【0318】 DNA以0.1 mg/mL補充至如表37中所示之BV1 IVT反應中。RNA樣品藉由沈澱純化且藉由UV測定濃度。RNA完整性藉由FA測定且結果展示於**圖34B**中。

實例52

不同啟始選項及模板長度下之USTAT

【0319】 使用產生不同長度之mRNA的USTAT之dsDNA模板進行啟始選項之評估。含有1.4 kb至11 kb之不同大小RNA之轉錄卡匣的質體集用作USTAT RCA之模板。反應如表56中進行組裝且包括隨機引子或10 ug/mL引子酶以產生phi29 DNA聚合酶之啟始位點。線性化RCA DNA及對應線性化質體模板對照用作如實例51中BV1 IVT之模板。RNA樣品藉由沈澱純化且濃度藉由UV測定。RNA完整性藉由FA測定且結果展示於**圖35**中。

實例53

USTAT之合成模板組裝的改良

【0320】線性dsDNA片段可組裝且直接用作用於mRNA產生之USTAT反應中的模板，其提供全合成模板產生的機會。已併入合成策略之若干改良。模板序列之設計參數經改良以包括重新編碼所關注基因以消除大於5 bp之均聚物序列。此改良將減少在均聚物序列中藉由phi29產生的插入或缺失之發生率。第二，因為組裝dsDNA不需核酸外切酶處理或純化步驟即用作USTAT之模板，所以調整組裝設計以消除T7啟動子下游之序列且減少攜載至IVT步驟之任何線性片段的潛在轉錄。

【0321】含有所關注基因及5' UTR序列之線性dsDNA片段係獲自商業供應商。自質體DNA消化含有T7 RNA聚合酶啟動子、3' UTR及聚A序列之第二片段。根據先前所描述之方法[Gibson等人，Nat Methods 6 (2009)]使用含有DNA聚合酶、T5核酸外切酶及Taq連接酶之反應混合物組裝片段。出於比較，在具有及不具有T5核酸外切酶消化步驟之情況下進行各組裝反應且使用每毫升反應物0.05 ng DNA將所組裝之DNA與如表56中之USTAT組分直接混合。線性化RCA DNA用作如實例51中BV1 IVT之模板。RNA樣品藉由沈澱純化且濃度藉由UV測定。RNA完整性藉由FA測定且結果展示於**圖36**中。

實例54

轉錄後酶促加帽

【0322】經由牛痘病毒加帽酶進行轉錄後酶促加帽適用於較長RNA分子以及所有其他大小之RNA。藉由實例37中描述之活體外轉錄方法形成的未加帽RNA如製造商(NEW ENGLAND BIOLABS)建議藉由牛痘病毒加帽酶進行轉錄後酶促加帽以產生端帽1 RNA。RNA亦在不同溫度下預處理以瞭解預處理溫度對RNA完整性%及端帽%的影響。此等結果展示於

表57中。

表57：在不同溫度下預處理RNA之影響

編號	預加熱RNA溫度	RNA完整性%	端帽%
未加帽58	N/A	81.3	N/A
VCE1	65℃，在冰上持續5min (對照)	69.9	100
VCE2	37℃持續5min	73.9	100
VCE3	25℃持續5min	74.4	100

【0323】 表57展示在25℃之低溫下預加熱RNA對RNA完整性%之損失影響很小。在測試之所有條件下，端帽併入維持>90%。

【0324】 為瞭解RNA完整性%在酶促加帽反應溫度後是否維持較低，未加帽RNA分別在培育溫度25℃及30℃下進行轉錄後酶促加帽30 min及60min。此等結果展示於表58中。

表58：RNA之時間及預處理的影響

編號	預加熱RNA溫度	反應溫度	反應培育時間	RNA完整性%	端帽%
未加帽58	N/A	N/A	N/A	78.7	N/A
VCE4	25C	25C	30 mins	77.6	97
VCE5			60 mins	77.2	100
VCE6		30C	30 mins	78.4	99
VCE7			60 mins	67.3	100

【0325】 表58展示較低反應溫度25℃及30℃及培育時間30 min產生RNA完整性%之較小損失。在培育溫度30℃下60min存在RNA完整性%之較高損失。

實例55

IVT反應中緩衝劑之探索

【0326】 HEPES可用作IVT反應中之緩衝劑以製造RNA [Kern及Davis，Biotechnol Prog 15:174-84 (1999)]。為評估HEPES對BV1製程之影響，進行OFAT (單次單因子)研究。在探索上文所描述之Tris之範圍之後模型化，此實驗測試20至60 mM HEPES之濃度及7.5至8.5之pH。不向

反應中添加Tris pH 8.0且替代地使用HEPES，但如表37中所描述之BV1之所有其他參數均保持一致。如表59中所示，在較高pH及較高HEPES濃度下，IVT產量可略微降低。然而，所有測試條件均對IVT反應有效且產生完整mRNA。

表59：HEPES及pH單次單因子分析

條件	起始HEPES含量(mM)	目標HEPES pH	產量(g/L起始體積)	完整性(%)
A	20	7.5	8.5	93
B	20	8	8.4	94
C	20	8.5	8.5	94
D	40	7.5	8.5	95
E	40	8	8.3	95
F	40	8.5	6.9	95
G	60	7.5	8.3	95
H	60	8	7.2	95
I	60	8.5	5.4	94

【0327】 進行另一研究以確定緩衝劑Tris是否可經由其他原材料而非儲備溶液遞送。Tris緩衝之NTP作為鈉穩定之NTP的替代例進行探索。此等Tris NTP用未指定量之Tris鹼(THERMO FISHER)滴定至7.3至7.5 之pH。將NaOH添加至實驗條件中以保持起始pH恆定。如表37中所描述之製程BV1以高通量方式運行。表60中所示之條件A使用鈉穩定之NTP，而條件B至E使用Tris NTP。Tris NTP之使用與FA略微降低相關，但仍具有適當的產物品質。出人意料地，不具有NTP中供應之物以外的任何額外Tris的條件B與對照最相當地進行。此表明，若個別IVT原材料具有充分緩衝能力，則可能不會總是需要額外緩衝液來穩定反應系統。

表60：Tris NTP及Tris儲備溶液

條件	儲備溶液之Tris濃度(mM)	Tris或鈉NTP?	產量(g/L起始體積)	完整性(%)
A	40	鈉	8.02	95
B	0	Tris	7.55	88
C	10	Tris	6.57	87
D	20	Tris	7.16	88
E	30	Tris	6.73	88

實例56

IVT平台分批製程應用

【0328】本文描述之IVT製程通常適用於廣泛多種mRNA構築體。本文描述之方法加快製程進展且實現拯救生命之產物的更快遞送。為證實此方法之成功應用，使用製程BV1 (描述於表37中)產生特有mRNA分子。對於此等反應，RNA酶抑制劑自100 U/mL增加至1000 U/mL以降低質體DNA製劑的RNA酶污染物風險，但所有其他參數符合BV1 (描述於表37中)。在一系列小規模高通量IVT反應中，進行一系列OFAT (單次單因子)研究。在此等條件中之每一者中，改變5' UTR、編碼序列或序列長度。如表61中所示，在13種不同構築體設計中，IVT BV1製程有效於產生mRNA。

表61：對5' UTR、編碼序列及編碼序列長度之BV1製程評估

構築體名稱(kb)	不同參數	產量(g/L起始體積)
RNA11 (0.7)	5' UTR #1	5.69
RNA12 (0.7)	5' UTR #2	5.86
RNA13 (0.7)	5' UTR #3	6.90
RNA14 (0.7)	5' UTR #4	4.81
RNA15 (0.7)	編碼序列	6.03
RNA16 (0.6)	編碼序列	7.95
RNA17 (0.9)	編碼序列	6.06
RNA18 (1.7)	編碼序列	6.62
RNA19 (1.4)	編碼序列	7.11
RNA20 (2.0)	編碼序列	7.20
RNA21 (3.0)	編碼序列	8.33
RNA22 (4.3)	編碼序列	5.42
RNA23 (5.9)	編碼序列	5.61

【0329】在一組獨立的7種質體DNA構築體中進一步評估製程BV1。當執行此評估時，不對BV1製程做出修改。表62中所示之資料進一步證實BV1可成功地在具有廣泛多種編碼序列之構築體中產生mRNA。此外，BV1中產生之mRNA具有高品質，及高FA完整性值及>80%之5'加帽百分比。

表62：對不同編碼序列之BV1製程評估

構築體名稱(kb)	產量(g/L起始體積)	完整性(%)	5'端帽(%)
RNA1 (2.13)	8.8	94	83
RNA5 (2.16)	8.5	91	84
RNA6 (1.87)	9.2	92	87
RNA7 (2.16)	8.8	79	83
RNA8 (1.87)	9.0	94	83
RNA9 (2.16)	8.8	92	84
RNA10 (1.87)	9.5	87	84

實例57

IVT分批進料反應中之NTP強化

【0330】為增強通常可適用於多個構築體(例如，大小、UTR等)之IVT製程，分批進料製程藉由強化NTP含量來進一步精細化。此實驗之目標為測定可進料之NTP含量同時仍製造高品質mRNA (例如，高完整性及加帽效率)及產量。NTP顯著增加且如表63中所示，NTP可增加，同時維持高品質mRNA (亦即，完整性>90%及加帽效率>85%)及RNA產量>10 g/L起始體積。此外，儘管資料亦在如藉由較低產量(例如，分別為10.6與14.5 g/L，條件J及K)所指示之高NTP下顯示Mg濃度侷限性，但Mg濃度增加之一些條件(例如，K)出人意料地顯示加帽效率降低。此觀測結果與表63中之資料一致，表63顯示初始Mg含量增加會影響加帽效率。

表63：NTP強化影響產率、完整性及5'端帽

條件	ATP (mM)		CTP (mM)		GTP (mM)		pUTP (mM)		鎂(mM)		產量(g/L，起始體積)	完整性(%)	5'端帽(%)
	起始	最終	起始	最終	起始	最終	起始	最終	起始	最終			
A	5	18	5	18	1	15	6	13	36	36	13.4	94	89
B	5	18	5	18	1	13	6	13	36	36	14.0	93	91
C	5	18	5	18	1	11	6	13	36	36	13.5	94	90
D	7	20	7	20	1	15	6	13	36	36	13.0	95	91
E	7	20	7	20	1	13	6	13	36	36	13.6	95	92
F	7	20	7	20	1	11	6	13	36	36	12.5	94	92
G	9	22	5	18	1	15	6	13	36	36	13.9	95	92
H	9	22	5	18	1	13	6	13	36	36	14.2	95	92
I	9	22	5	18	1	11	6	13	36	36	13.1	94	92
J	11	24	9	22	1	16	4	15	36	36	10.6	95	91
K	11	24	9	22	1	16	4	15	50	50	14.5	94	86
L	9	26	5	22	1	15	6	15	36	36	11.1	94	89
M	9	26	5	22	1	15	6	15	50	50	13.7	94	89

實例58

IVT反應中之MG添加策略

【0331】 為研究IVT反應中Mg濃度之影響，在具有強化NTP濃度之分批進料製程中評估Mg添加策略。在此研究中，表63之J列之條件(稱為『製程FBV1.1』)用作此實例之基線製程。此製程之具體細節列出於表65中。此處，評估兩個Mg添加策略：1)在IVT反應開始時添加總體積之Mg(『全面負載』)；及2)在IVT反應開始時以較低濃度之Mg為起始物質且進料剩餘Mg以達至所指示之總或最終濃度。**圖37**展示Mg含量增加至50 mM顯著增加mRNA產量。然而，增加之產量出乎意料地在先前負載增加之Mg含量時導致加帽效率降低。出人意料地，在IVT反應期間進料一些Mg會增加加帽效率。重要地是，Mg添加之頻率增加會導致5'加帽效率之進一步出人意料的提高。

【0332】 接著，進一步探究總Mg濃度對RNA品質屬性及產量之影響。如**圖38**中所示，增加先前負載之Mg使得RNA 5'加帽效率顯著降低，

及對RNA完整性及產量具有極小負面影響。然而，起始較低的初始Mg濃度及經由進料補充剩餘Mg明顯地提高加帽效率。有趣的是，起始甚至更低的Mg濃度及進料剩餘達至總量上的加帽效率進一步增加，如藉由總共60 mM Mg濃度但具有不同起始Mg濃度之條件所示。總之，此等資料表明在此工作中研發之進料策略顯著地改良RNA品質屬性及產量。如本文中所描述，增加先前負載之Mg濃度水準會不利地影響RNA品質。然而，進料Mg濃度會提高加帽效率，對完整性及產量具有極小甚至無影響。在此等資料中，使用4種Mg推注進料以使濃度達至總量(例如，對於以36 mM Mg為起始物質之條件，在IVT期間以等間隔時間點添加各自3.5mM之4種進料使總量達至50mM且類似地以25mM起始以60mM終止得到各自8.75mM之4種進料)。**圖38**中之虛線展示整體趨勢。

實例59

IVT培育時間、加帽分子濃度及GTP濃度對IVT效能之影響

【0333】 此實驗之目標為在NTP強化分批進料方法中研究加帽分子濃度、最終GTP濃度及增加之IVT時間對產量、完整性及5'端帽之影響。在此實例中，使用自動化微生物反應器系統且使用製程FB V1.2作為基線製程(具體細節提供於表65中)。製程FB V1.2之各條件的修改概述與下文表64中。如表64中所示，相較於在150分鐘運行之相同條件，在180分鐘之IVT時間觀測到產量增加。另外，相較於13.5 mM，當以16 mM之最終GTP濃度為目標時，產量增加至高於16 g/L。相較於150分鐘，在180分鐘觀測到對完整性無影響。另外，在150與180分鐘之間觀測到對5'端帽無重大影響。在加帽RNA%與加帽分子濃度之間觀測到劑量依賴性關係，其中4 mM 5'端帽類似物產生最高的加帽RNA%。總體而言，此資料表明NTP

強化之成效及IVT組分進料策略(例如，Mg)對於在180分鐘之目標IVT時間增強RNA品質屬性及產量之重要性。此製程可因此進行修改(例如，修改總IVT培育時間)以適應一系列RNA構築體大小。

表64：加帽分子濃度、最終GTP及總IVT時間對產量、完整性及5'端帽之影響

條件	製程	5'端帽類似物(mM)	最終GTP (mM)	總IVT時間(min)	產量(g/L起始體積)	完整性(%)	5'端帽(%)
A	FB V1.2	4	16	150	15.7	93	93
B		2.5	16	150	15.0	94	88
C		2	16	150	14.5	93	86
D		4	13.5	150	14.5	93	94
E		2.5	13.5	150	14.3	94	91
F		2	13.5	150	13.6	94	89
G		4	16	180	16.6	94	94
H		2.5	16	180	16.1	94	90
I		4	13.5	180	15.1	94	95
J		2.5	13.5	180	15.1	94	91

實例60

IVT平台分批進料製程應用

【0334】在此實例中，使用製程FB V2證實此分批進料製程在多種不同背景之RNA構築體中之一般適用性、製程穩固性及成功應用。此FB V2製程之具體細節列出於表65。如**圖39**中所示，所有七種RNA構築體相較於其BV1對應物在FB V2中明顯地增加產量(>約16 g/L)、RNA完整性(>約80%)及加帽效率(>93%)。

表65：分批進料IVT製程參數

參數	設定點			
製程名稱	**FB V1**	**FB V1.1**	**FB V1.2**	**FB V2**
5'端帽類似物分子(mM)	4	4	4	4
起始ATP (mM)	5	11	11	11
最終ATP (mM)	12	24	24	24
起始CTP (mM)	5	9	9	9
最終CTP (mM)	12	22	22	22
起始GTP (mM)	1	1	1	1
最終GTP (mM)	10	16	16	16
起始經修飾之UTP (mM)	5	4	4	4
最終經修飾之UTP (mM)	9	15	13	13
NTP遞送策略	變化	每5 min推注	每5 min推注	每5 min推注
Tris緩衝液，pH 8.0 (mM)	40	40	40	40
HEPES緩衝液，pH 8.0 (mM)	0	0	0	0
起始Mg (mM)	36	36	25	25
最終Mg (mM)	36	36	60	60
Mg遞送策略	N/A	N/A	前60分鐘內每15分鐘進行單獨推注進料	前60分鐘內每15分鐘進行單獨推注進料
亞精胺(mM)	0	0	0	0
DTT (mM)	0	0	0	0
質體DNA模板(mg/mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
DNA類型	DNA1	DNA1	DNA1	變化
RNA酶抑制劑(U/mL)	100	100	100	100
焦磷酸酶(U/mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
T7聚合酶(U/mL)	14000	14000	14000	14000
總IVT時間(min)	150	150	150	180
溫度(℃)	37	37	37	37

【0335】類似地，在具有不同編碼序列長度之若干構築體中測試製程FB V2。隨著構築體長度增加，假設將存在過早T7轉錄終止及mRNA降解之更多機會。因此，關注於測定藉由FB V2產生之mRNA對於長構築體是否具有可接受之完整性。對於高達6 kb之所有構築體，如下表66中所示，完整性高於80%。此表明FB V2為適合於廣泛多種構築體之平台製程。

表66：製程FB V2中構築體長度之影響

製程	構築體名稱(kb)	產量(g/L起始體積)	完整性(%)
FB V2	RNA 1 (1.9)	15.2	92
	RNA 22 (4.3)	14.4	80
	RNA 23 (5.9)	12.1	81

實例61

殘餘核苷酸對殘餘DNA雜質之影響

【0336】在此實例中，測定在IVT分批進料期間強化NTP對殘餘DNA之影響。FB V1經調節為0.05 U/mL焦磷酸酶及150 RPM以產生具有高殘餘DNA之反應。使用自動化生物反應器系統進行研究。表67至表69展示調節NTP對調節之FB V1的影響。ATP之含量自12增加至22 mM使得殘餘DNA之含量降低。CTP及pUTP之含量分別自12增加至22 mM及自9增加至15 mM展示殘餘DNA進一步降低。此實驗之結果表明，至少一種NTP之較高殘餘含量可用以提高殘餘DNA雜質。

表67：殘餘ATP對產物品質之影響

製程	總ATP (mM)	ResATP (uM)	殘餘DNA (ng/mg產物)	產量(g/L起始體積)	完整性(%)
FB V1 (0.05 U/mL焦磷酸酶) (150 RPM)	12	1647	438	10.2	95
	17	5432	401	10.7	95
	22	9132	370	10.3	94

表68：殘餘CTP對產物品質之影響

製程	總CTP (mM)	ResCTP (uM)	殘餘DNA (ng/mg產物)	產量(g/L起始體積)	完整性(%)
FB V1 (0.05 U/mL焦磷酸酶) (150 RPM)	12	859	438	10.2	95
	17	4460	162	9.7	93
	22	8645	9	8.4	94

表69：殘餘pUTP對產物品質之影響

製程	總pUTP (mM)	Res(pUTP) (uM)	殘餘DNA (ng/mg產物)	產量(g/L起始體積)	完整性(%)
FB V1 (0.05 U/mL焦磷酸酶) (150 RPM)	9	1838	438	10.2	95
	15	6083	40	9.2	94

實例62

寡聚(dT) mRNA親和力研究

【0337】為進一步改良mRNA完整性，使用POROS™寡聚(dT)25 (THERMO FISHER®)及寡聚(dT)18單石(SARTORIUS BIA SEPARATIONS®)純化研發mRNA親和力層析步驟。兩個步驟均結合10mM Tris/500 mM KCl/0.1mM EDTA，pH 7.2中之mRNA，且用10 mM Tris/0.1mM EDTA，pH 7.2溶離。如下表70中所示，當藉由親和力步驟純化時，對於非親和力純化材料，mRNA完整性自61%改良達至79%。

表70：mRNA親和力層析

體積	池完整性(%)
非親和力純化池	61
POROS寡聚(dT)25溶離池	75
Sartorius BIA分離寡聚(dT)18單石溶離池	79

【0338】mRNA親和力層析步驟進一步經由以各種鹽濃度評估一系列緩衝液組分(例如NaPi、Tris、HEPES、KCl、NaCl、EDTA等)來研發以使完整性改良及整體回收率最佳化。如下表71中所示，POROS™寡聚(dT)25 (THERMO FISHER®)與寡聚(dT)18單石(SARTORIUS BIA SEPARATIONS®)管柱之間的製程對於含有HEPES、Tris、NaPi、KCL及NaCl緩衝物之緩衝液產生相當的完整性改良。

表71：緩衝液組分對mRNA完整性及回收率之影響

運行描述	樹脂			單石	
	第2次運行	第3次運行	第5次運行	第7次運行	第11次運行
平衡/負載/第1次洗滌條件	10mM Tris + 500 mM KCl + 0.1 mM EDTA, pH 7.2	10mM Tris + 500 mM KCl + 0.1 mM EDTA, pH 7.2	10mM Tris + 500 mM KCl + 0.1 mM EDTA, pH 7.2	10mM Tris + 500 mM KCl + 0.1 mM EDTA, pH 7.2	50mM NaPi, 400mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7.0
第2次洗滌		10mM Tris + 750 mM KCl + 0.1 mM EDTA, pH 7.2		50 mM NaPi, 5 mM EDTA, pH 7.0	50mM NaPi, 5mM EDTA, pH 7.0
中間鹽洗滌液		10mM Tris + 250 mM KCl + 0.1 mM EDTA, pH 7.2	10mM Tris + 250 mM KCl + 0.1 mM EDTA, pH 7.2		
操作	自第1次洗滌至溶離之20 CV線性梯度	30 CV洗滌至溶離	自第1次洗滌至溶離之30 CV線性梯度	分步溶離	分步溶離
溶離	10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.2	10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.2	10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.2	10 mM Tris, pH 7.0	10 mM HEPES, pH 7.0
洗提	WFI	WFI	WFI	WFI	WFI
負載完整性(%)	60.9	53	62	71	63
負載完整性DS-LMS (%)	NMT 3	8	NMT 3	NMT 3	NMT 3
溶離池完整性(%)	75	72	80	79	76
溶離池完整性DS-LMS (%)	NMT 3	5	NMT 3	NMT 3	NMT 3

【0339】 為進一步改良完整性及測定製程相關之雜質移除(例如，片段、殘餘DNA、LMS等)，使用一系列鹽(例如，NaCl、KCl等)、變性劑(脲、精胺酸等)及螯合劑(例如，EDTA、檸檬酸鹽等)之洗滌研究使用2000核苷酸modRNA藉由在含有寡聚(dT)25樹脂之96孔培養盤上進行高通量篩選來探索。寡聚(dT)樹脂填充管柱用10mM Tris/500 mM

KCl/0.1mM EDTA，pH 7.2平衡。mRNA結合至管柱且用10mM Tris/500 mM KCl/0.1mM EDTA，pH 7.2洗滌。將樹脂自管柱移除且藉由自動化液體處理系統轉移至96孔盤。各孔用含有下表72中所示之以下範圍之鹽的Tris緩衝液，pH 7.2洗滌。

表72：測試之洗滌溶液之範圍

中間洗滌溶液	測試之濃度	相互作用
KCl	50 - 1000 mM	離子
NaCl	50 - 1000 mM	離子
$MgCl_2$	2 - 200 mM	離子
精胺酸	50 - 1000 mM	離子性氫鍵結
脲	50 - 2000 mM	氫鍵結
EDTA + 200 mM KCl	1 - 200 mM	金屬錯合

【0340】使用10mM Tris、1mM EDTA，pH 7.2溶離各條件。分析高產量之溶離池地殘餘DNA。將具有殘餘DNA之高對數下降值(LRV)的條件提供用於藉由片段分析儀之mRNA完整性，如下表73中所示：

表73：殘餘DNA分析及mRNA完整性

樣品名稱	ResDNA (ng/mg)	DNA對數下降 (LR)	完整性%	FA完整性% DS-LMS
負載	44839.44		81.0	11.9
50mM精胺酸	47.65	3.0	83.4	10.5
1000mM精胺酸	50.06	3.0	80.2	8.3
200mM EDTA, 200mM KCl	50.22	3.0	76.3	NMT 3
1mM EDTA, 200mM KCl	53.11	2.9	76.0	NMT 3
50mM KCl	22.31	3.3	81.8	9.2
250mM KCl	44.48	3.0		
2mM MgCl2	61.96	2.9	66.9	NMT 3
20mM MgCl2	64.97	2.8	73.1	NMT 3
50mM NaCl	55.58	2.9	83.7	10.5

1000mM NaCl	69.01	2.8	81.7	12.5
2000mM脲	23.81	3.3	80.8	9.2
50mM脲	70.14	2.8	81.1	9.4

【0341】 根據盤篩選測定KCl、NaCl、精胺酸及脲，得到充分降低之殘餘DNA，維持或改良mRNA完整性，且在一些情況下減小DS-LMS。使用表74中所示之洗滌溶液範圍將此等條件按比例調整至robocolumn中。殘餘DNA分析及mRNA完整性之結果展示於表75中。

表74：在Robocolumn中測試之洗滌溶液之範圍

中間洗滌溶液	測試之濃度	相互作用
KCl	50 - 1000 mM	離子
NaCl	50 - 1000 mM	離子
精胺酸	50 - 1000 mM	離子性氫鍵結
脲	50 - 2000 mM	氫鍵結

表75：Robocolumn中之殘餘DNA分析及mRNA完整性

洗滌鹽	洗滌鹽濃度	mRNA完整性(%)	DS LMS (%)	ResDNA (ng DNA/mg RNA)	對數DNA下降(LR ng DNA)
負載		80.0	11.83	28636.37	
精胺酸	50	80.8	12.23	57.31	3.0
精胺酸	500	77.4	14.07	38.76	3.1
精胺酸	1000	78.3	12.83	153.78	2.6
KCl	50	81.0	12.23	83.43	2.9
KCl	500	79.4	13.97	157.56	2.5
KCl	1000	79.7	13.17	999.14	1.8
NaCl	50	79.7	13.13	69.48	2.9
NaCl	500	81.3	12.83	173.65	2.4
NaCl	1000	81.5	13.2	1016.64	1.8
脲	50	82.4	11.7	200.97	2.4
脲	1000	83.9	10.9	62.63	2.9
脲	2000	86.3	8.63	108.49	2.9

【0342】 產生殘餘DNA之較大下降的條件規模放大至樹脂及單石管柱以用於2000核苷酸(如表76中所示)及10000核苷酸(如表77中所示)mRNA。觀測到DS-LMS減小，且完整性在各條件中守恆或改良。NaCl及KCl觀測到類似效能且僅KCl繼續用於研究。根據盤篩選，EDTA表明對

製程之潛能改良，所以向該實驗中添加EDTA設計支路。

表76：2000核苷酸mRNA之殘餘DNA及mRNA分析

mRNA大小	2000 nT mRNA					
樹脂或單石	樹脂					
方法步驟	A	B	C	D	E	F
平衡/負載條件	10 mM Tris, 500 mM KCl, 20 mM EDTA, pH 7.2					
洗滌	50 mM精胺酸	50 mM精胺酸，20 mM EDTA	1000 mM脲	1000 mM脲，20 mM EDTA	50 mM KCl	50 mM KCl, 20 mM EDTA
溶離	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.2					
負載完整性(%)	80	80	80	80	80	80
負載完整性DS-LMS (%)	12	12	12	12	12	12
負載殘餘DNA(ng/mg)	22441	22441	22441	22441	22441	22441
溶離池完整性(%)		82	86	82	76	81
溶離完整性DS-LMS (%)		12	8	12	11	12
溶離池殘餘DNA (ng/mg)	337	227	557	252	281	229
殘餘DNA LRV	2.02	2.22	1.96	2.11	2.17	2.11

表77：10000核苷酸mRNA之殘餘DNA及mRNA分析

mRNA大小	10000 nt mRNA												
樹脂或單石	樹脂							單石					
方法步驟	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F
平衡/負載條件	10 mM Tris, 500 mM KCl, 20 mM EDTA, pH 7.2						50 mM NaPi, 400 mM NaCl, 5mM EDTA, pH 6.5	10 mM Tris, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.2					
洗滌	50 mM精胺酸	50 mM精胺酸，20 mM EDTA	1000 mM脲	1000 mM脲，20 mM EDTA	50 mM KCl	50 mM KCl, 20 mM EDTA	50 mM NaPi, 5mM EDTA, pH 7.0	50 mM精胺酸	50 mM精胺酸，20 mM EDTA	1000 mM脲	1000 mM脲，20 mM EDTA	50 mM KCl	50 mM KCl, 20 mM EDTA

溶離	10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, pH 7.1							10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, pH 7.1					
負載完整性(%)	76	76	76	76	76	76	75	76	76	76	76	76	76
負載完整性DS-LMS(%)	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3
負載殘餘DNA(ng/mg)	8015	8015	8015	8015	8015	8015	8015	8015	8015	8015	8015	8015	8015
溶離池完整性(%)		86	86	88	85	88	88		83	87	86	87	84
溶離完整性DS-LMS(%)		NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3		NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3	NMT 3
溶離池殘餘DNA (ng/mg)	364	289	338	315	324	335		300	334	258	345	321	407
殘餘DNA LRV	1.34	1.44	1.37	1.41	1.39	1.38		1.43	1.38	1.49	1.37	1.4	1.29

【0343】 對於2000核苷酸mRNA，在所有條件下觀測到2個對數下降值(LRV)降低。對於10000核苷酸mRNA，在各條件下觀測到1.3至1.5 LRV。儘管藉由LRV計算之降低對於10000核苷酸mRNA較小，但溶離池中殘餘DNA之絕對含量相同，與mRNA長度無關。較低LRV可為針對10000核苷酸之負載中顯著較低殘餘DNA的假影。負載中之較低殘餘DNA對於IVT製程為固有的，其在2000核苷酸製程中利用較低DNA模板。對於2000核苷酸mRNA中之1000脲條件觀測到一些DS-LMS降低。在mRNA長度下，針對樹脂及單石之1000 mM脲條件引起最高完整性改良中之一者。一般而言，在針對10000核苷酸mRNA之單石與樹脂之間觀測到相當底完整性改良。條件A產生無法恢復mRNA完整性資料之樣品。將條件G添加至實驗之樹脂組中以在完整性改良方面比較NaPi及NaCl與Tris及KCl製程。結果產生在條件之間相同的完整性改良。

【0344】 針對條件A至G，在10000核苷酸mRNA之負載及溶離池量測雙股RNA (dsRNA)，展示於下表78中。觀測到一些降低，但並非顯著

降低。眾所周知，來自IVT混合物之dsRNA由與其他mRNA或轉向轉錄形成互補鹼對之截短/中止物種製成。在兩種情況下，有可能dsRNA具有聚A尾，且因此仍將結合。各條件下略微降低指示移除非聚A尾雜質亦減少一些dsRNA，如藉由方法所量測。對於脲+EDTA條件觀測到進一步降低指示中止/截短物種與互補mRNA之間的氫鍵結斷裂可能係關鍵的。溫度與氫鍵結之間的關係對於寡核苷酸中之雙股核酸而言很好理解，特定言之，隨著溫度增加，雙股物種之互補鹼基對之間的氫鍵減弱，導致轉化為單股物種。未來實驗將預期針對緩衝組合物及溫度最佳化之洗滌步驟將導致移除雙股物種同時保留目標mRNA。

表78：dsRNA存在

條件	dsRNA - ELISA (pg/mg)	
	RESIN	MONOLITH
寡聚(dT)負載	3174	3174
*50 mM精胺酸***	2797	3289
50 mM精胺酸，20 mM EDTA	2700	2703
1000 mM脲	2234	2540
1000 mM脲，20 mM EDTA	2503	2442
50 mM KCl*	2520	2661
50 mM KCl, 20 mM EDTA	2703	2594

【0345】 對於範圍在2000至10000個核苷酸內之mRNA長度，針對POROS™ 寡聚(dT)25 (THERMO FISHER®)及寡聚(dT)18單石(SARTORIUS BIA SEPARATIONS®)之共同研發製程鑑別出由Tris、HEPES、NaPi、KCl、NaCl、脲、精胺酸及EDTA之組合構成的緩衝液引起完整性改良及/或殘餘DNA之移除。

【0346】 本文中描述之實例及實施例僅為達成說明之目的且熟習此項技術者所提出之各種修改或變化將包括在本申請案之精神及範圍及隨附申請專利範圍之範疇內。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種產生mRNA分子之方法，其包含：

(a) 獲得包含以下之組合物：

a. 複數個直鏈雙股DNA (dsDNA)片段，

b. 5'核酸外切酶，

c. DNA聚合酶，及

d. DNA連接酶；

(b) 在約45℃與55℃之間的溫度下培育該組合物以獲得環狀dsDNA模板；及

(c) 使該環狀dsDNA模板與包含以下之滾環擴增(rolling circle amplification；RCA)反應混合物接觸：

a. 引子或引子酶，

b. 三磷酸去氧核糖核苷酸(dNTP)，及

c. DNA聚合酶

以獲得經擴增之模板；

(d) 使該經擴增之模板與限制酶接觸以獲得經消化之模板；及

(e) 使該經消化之模板與包含RNA聚合酶及核糖核苷酸之活體外轉錄反應系統在足以活體外轉錄之條件下接觸以產生該mRNA分子，

其中該接觸進行約120分鐘與約260分鐘之間，

其中該接觸在25℃與45℃之間的溫度下進行，

其中該活體外轉錄反應系統進一步包含緩衝液及鎂離子，及

其中步驟(a)至(e)在單一反應容器中依序進行。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該環狀dsDNA模板以至少0.5 ng/mL之RCA反應混合物的濃度存在。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中該複數個直鏈dsDNA片段包含所關注基因、啟動子序列、5' UTR、3' UTR及聚A序列。

【請求項4】

如請求項3之方法，其中該所關注基因編碼在1.0 kb與12.0 kb之間的RNA分子。

【請求項5】

如請求項3之方法，其中該所關注基因缺乏大於5個鹼基對的均聚物序列。

【請求項6】

如請求項1之方法，其中該mRNA分子在活體外轉錄之後加帽。

【請求項7】

如請求項6之方法，其中該mRNA分子藉由牛痘病毒加帽酶進行酶促加帽。

【請求項8】

如請求項7之方法，其中該mRNA分子在藉由該牛痘病毒加帽酶進行加帽之前，在30℃或更低的溫度下培育60分鐘或更短時間。

【請求項9】

如請求項1之方法，其中使該經消化之模板與活體外轉錄反應系統接觸進一步包含核糖核苷酸補充該活體外轉錄反應系統，其中補充包含使個

別核糖核苷酸之濃度自初始量增加至最終量。

【請求項10】

如請求項9之方法，其中補充包含選自由以下組成之群的方法：核糖核苷酸之連續進料、核糖核苷酸之半連續進料及核糖核苷酸之推注進料。

【請求項11】

如請求項9之方法，其中該初始量在1 mM與11 mM之間且該最終量在11 mM與26 mM之間。

【請求項12】

如請求項11之方法，其中ATP之初始量為約11 mM，CTP之初始量為約9 mM，GTP之初始量為約1 mM，且pUTP之初始量為約4 mM。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中ATP之最終量為約24 mM，CTP之最終量為約22 mM，GTP之最終量為約16 mM，且pUTP之最終量為約13 mM。

【請求項14】

如請求項13之方法，其中該補充進一步包含每五分鐘該活體外轉錄反應推注進料核糖核苷酸。

【請求項15】

如請求項1之方法，其中使該經消化之模板與活體外轉錄反應系統接觸進一步包含用鎂離子補充該活體外轉錄反應系統，其中補充包含使該鎂離子之濃度自初始量增加至最終量。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中補充包含選自由以下組成之群的方法：鎂離子之連續進料、鎂離子之半連續進料及鎂離子之推注進料。

【請求項17】

如請求項16之方法，其中用鎂離子補充該活體外轉錄反應系統進一步包含在該活體外轉錄反應期間的至少四次鎂離子添加。

【請求項18】

如請求項15之方法，其中該鎂離子之初始量為約25 mM且該鎂離子之最終量為約60 mM。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中該補充進一步包含對於該活體外轉錄反應的前60分鐘，每15分鐘推注進料該鎂離子。

【請求項20】

如請求項1至19中任一項之方法，其進一步包含：

(f) 使用選自由寡聚(dT)磁珠、樹脂及單石組成之群的捕獲方法捕獲該mRNA分子。

【請求項21】

如請求項20之方法，其進一步包含在捕獲該mRNA之後，用洗滌溶液洗滌該捕獲方法。

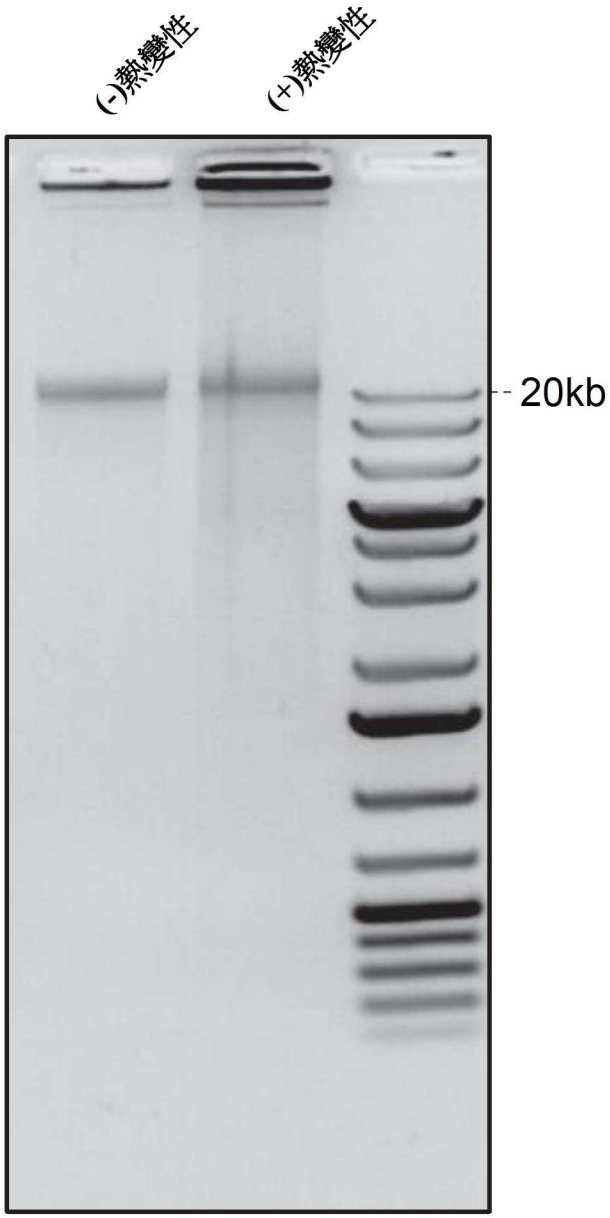
【請求項22】

如請求項21之方法，其中該洗滌溶液包含選自由以下組成之群的緩衝液：Tris、HEPES、NaPi、KCl、NaCl、脲、精胺酸及EDTA。

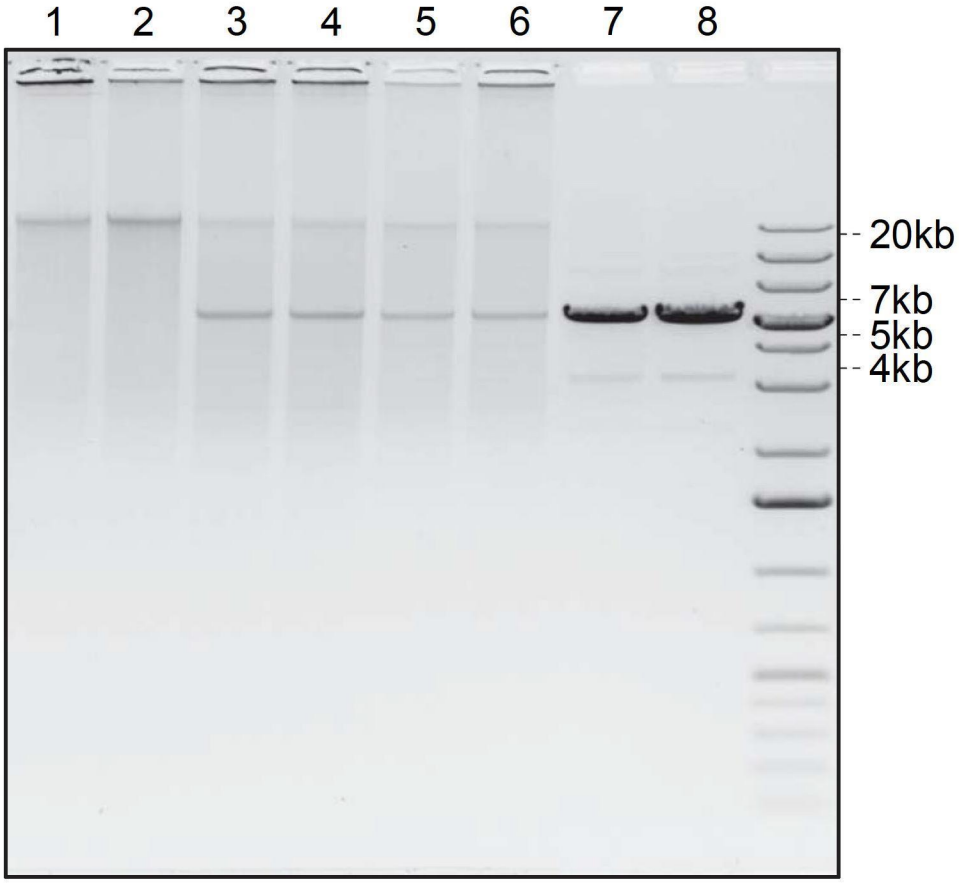
【發明圖式】



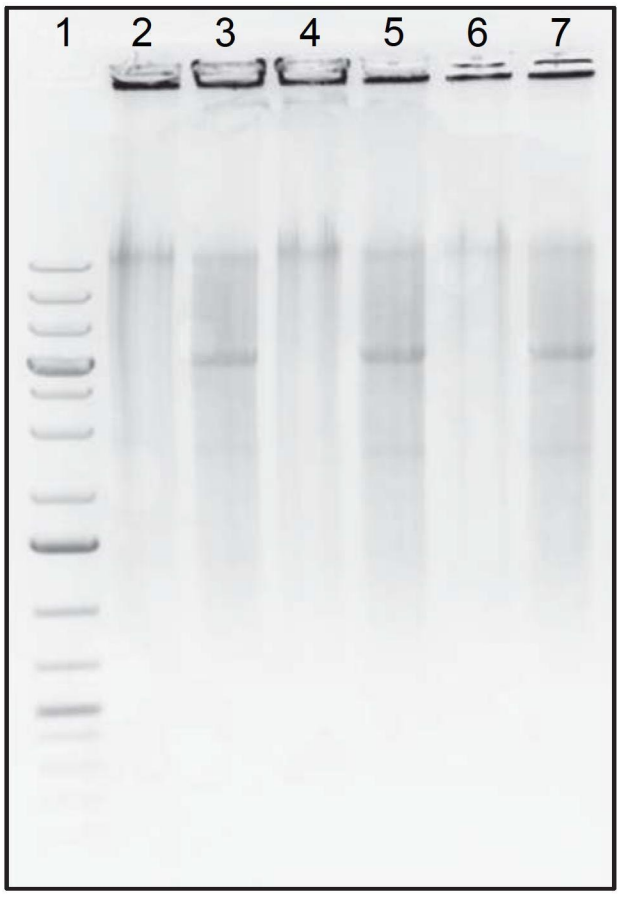
【圖1】



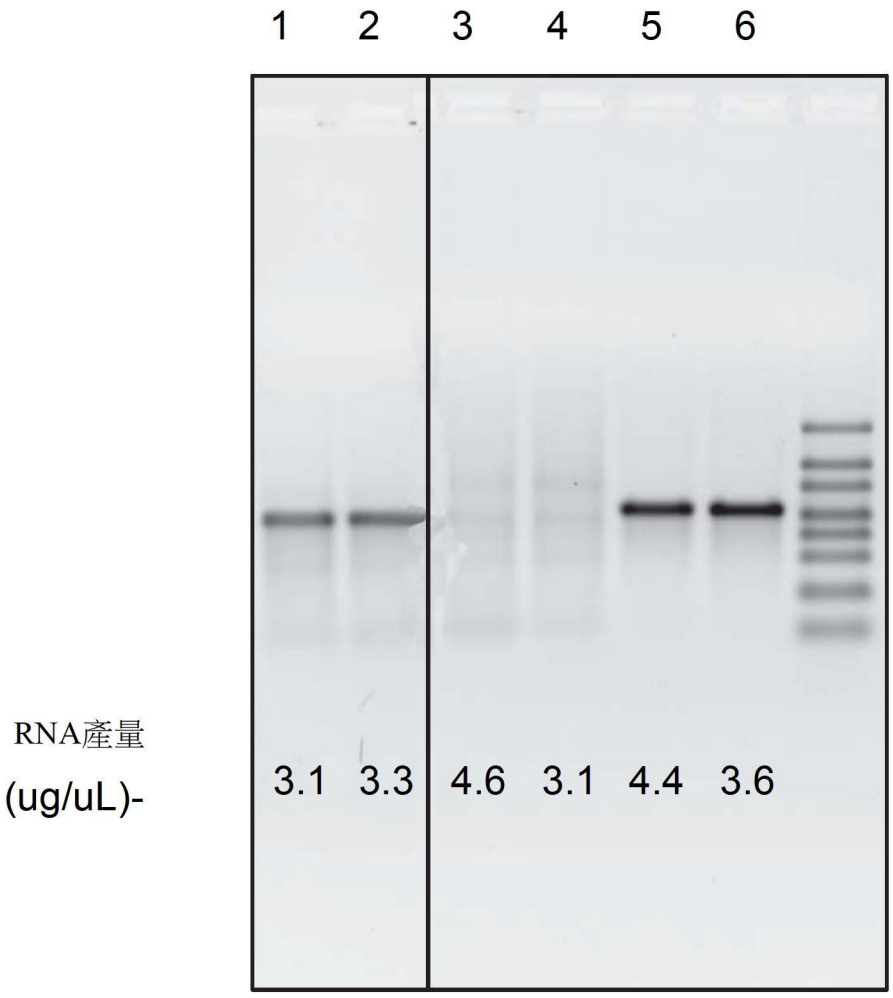
【圖2】



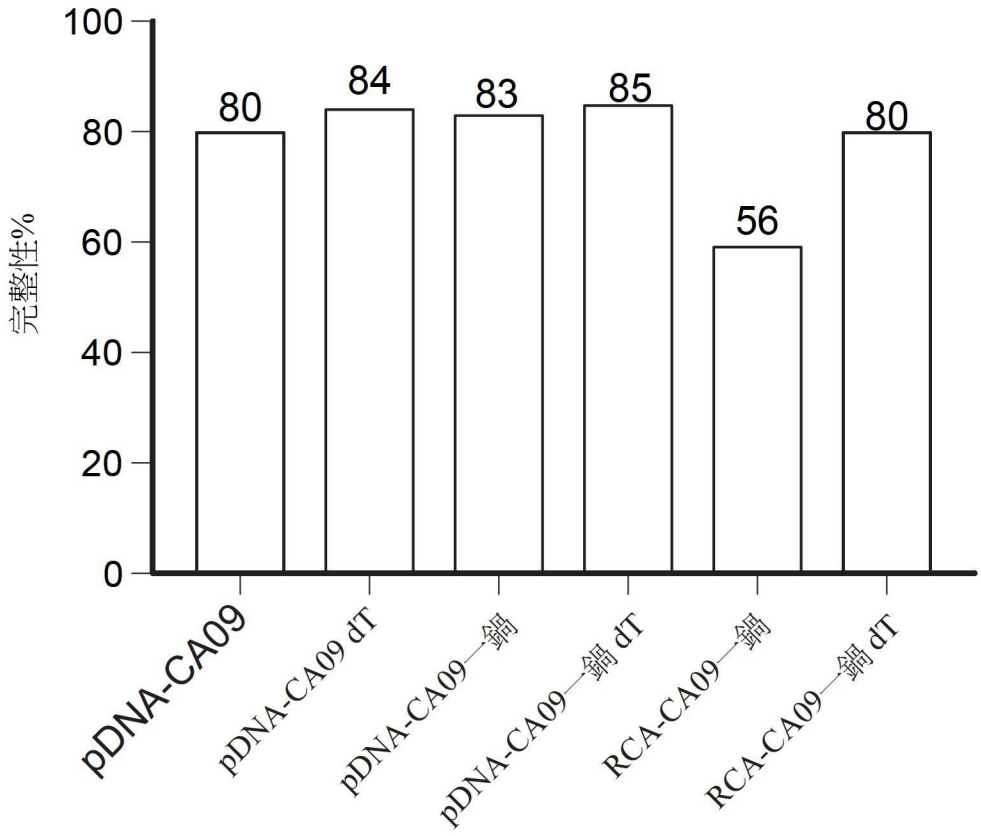
【圖3】



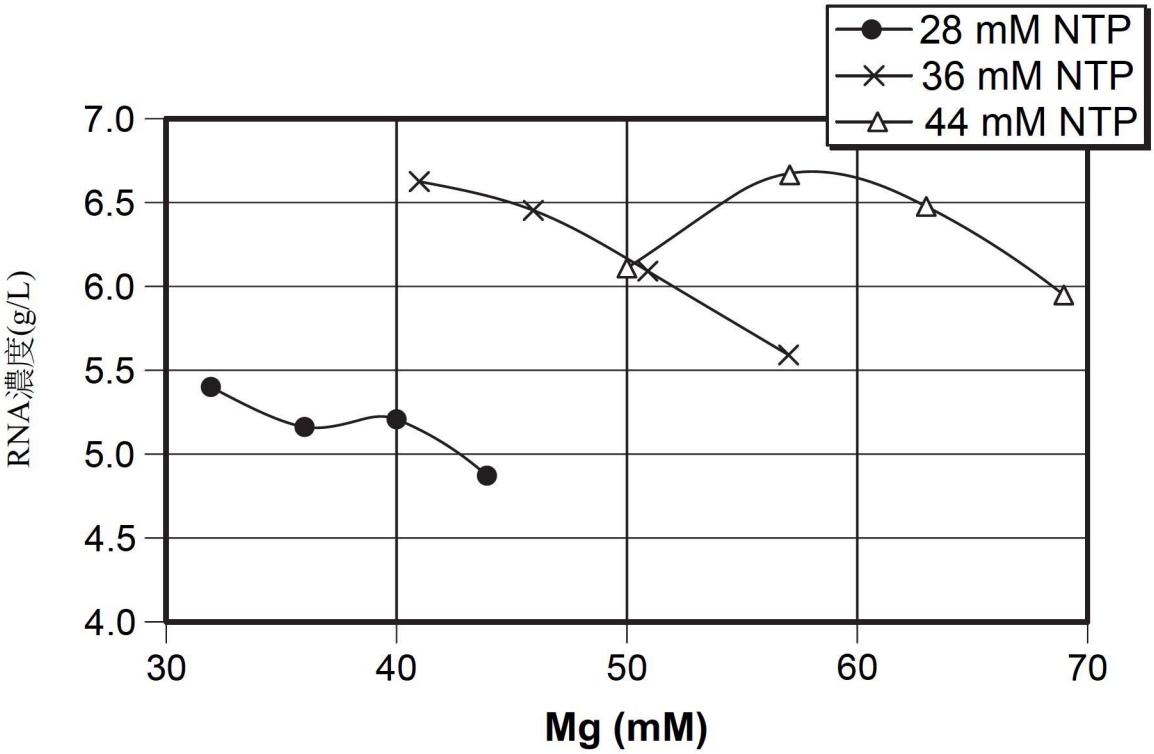
【圖4】



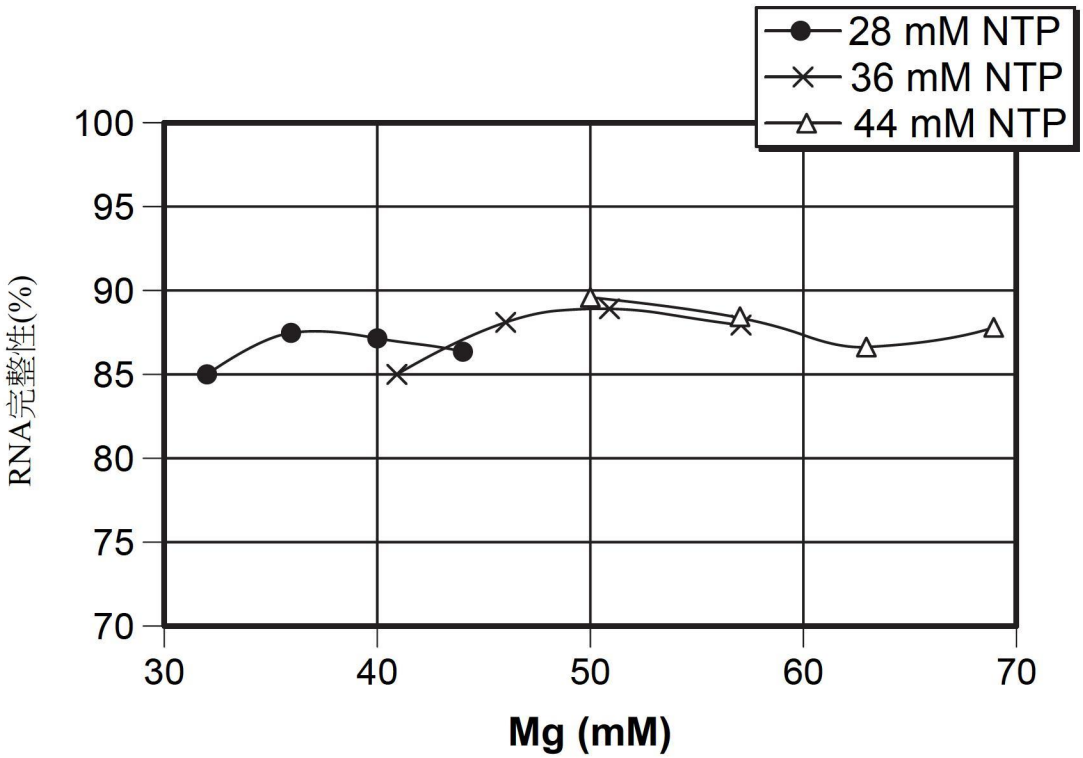
【圖5】


100
80
60
40
20
0
完整性%
80
84
83
85
56
80
pDNA-CA09
pDNA-CA09 dT
pDNA-CA09—鍋
pDNA-CA09—鍋 dT
RCA-CA09—鍋
RCA-CA09—鍋 dT

【圖6】


28 mM NTP
36 mM NTP
44 mM NTP
RNA濃度(g/L)
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
30
40
50
60
70
Mg (mM)

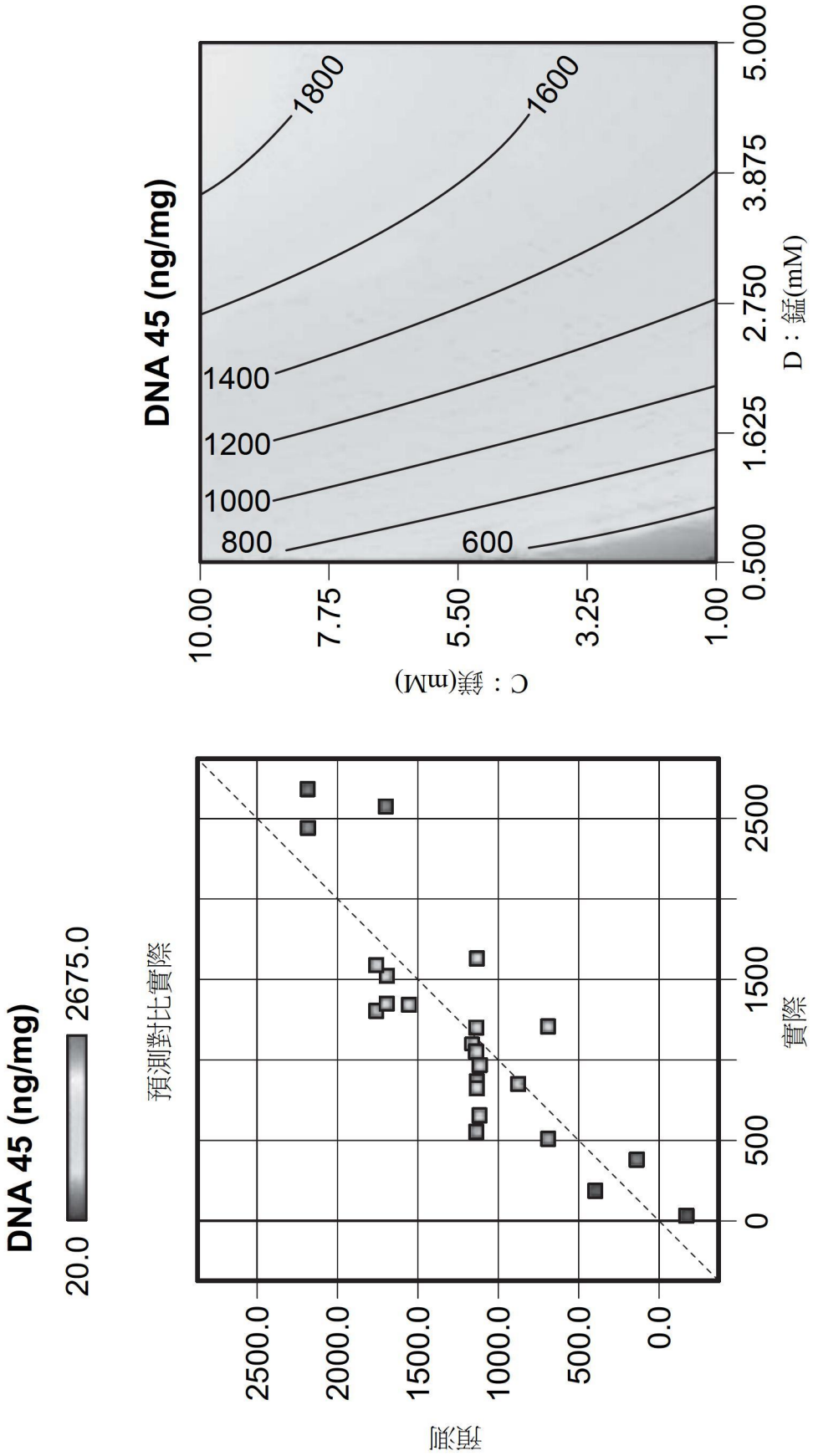
【圖7】


28 mM NTP
36 mM NTP
44 mM NTP
RNA完整性(%)
100
95
90
85
80
75
70
30
40
50
60
70
Mg (mM)

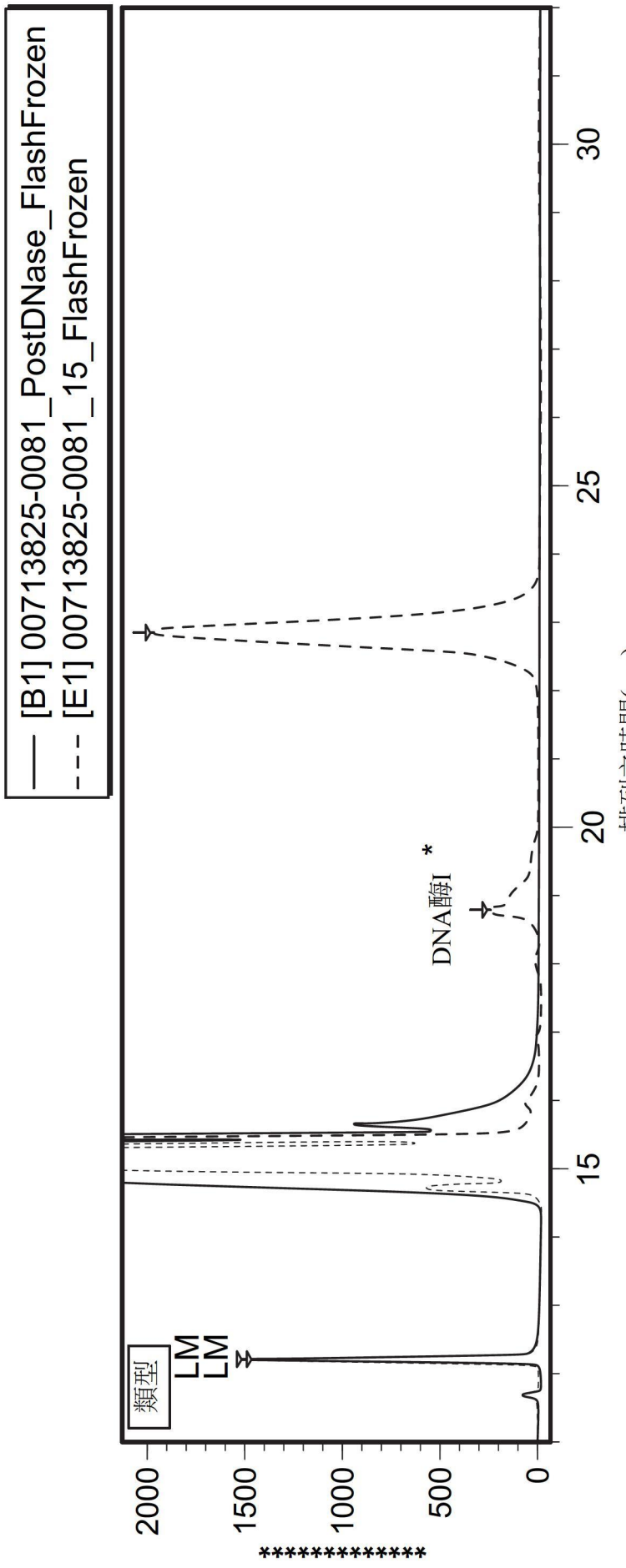
【圖8】

完整性60 (%)
88.00
94.00
預測對比實際
預測
實際
88
89
90
91
92
93
94
A：DNA酶(U/mg DNA)
10000.0
8000.0
6000.0
4000.0
2000.0
B：鈣(mM)
0.500
1.625
2.750
3.875
5.000
90
90.5
91
91.5
92
92.5
93

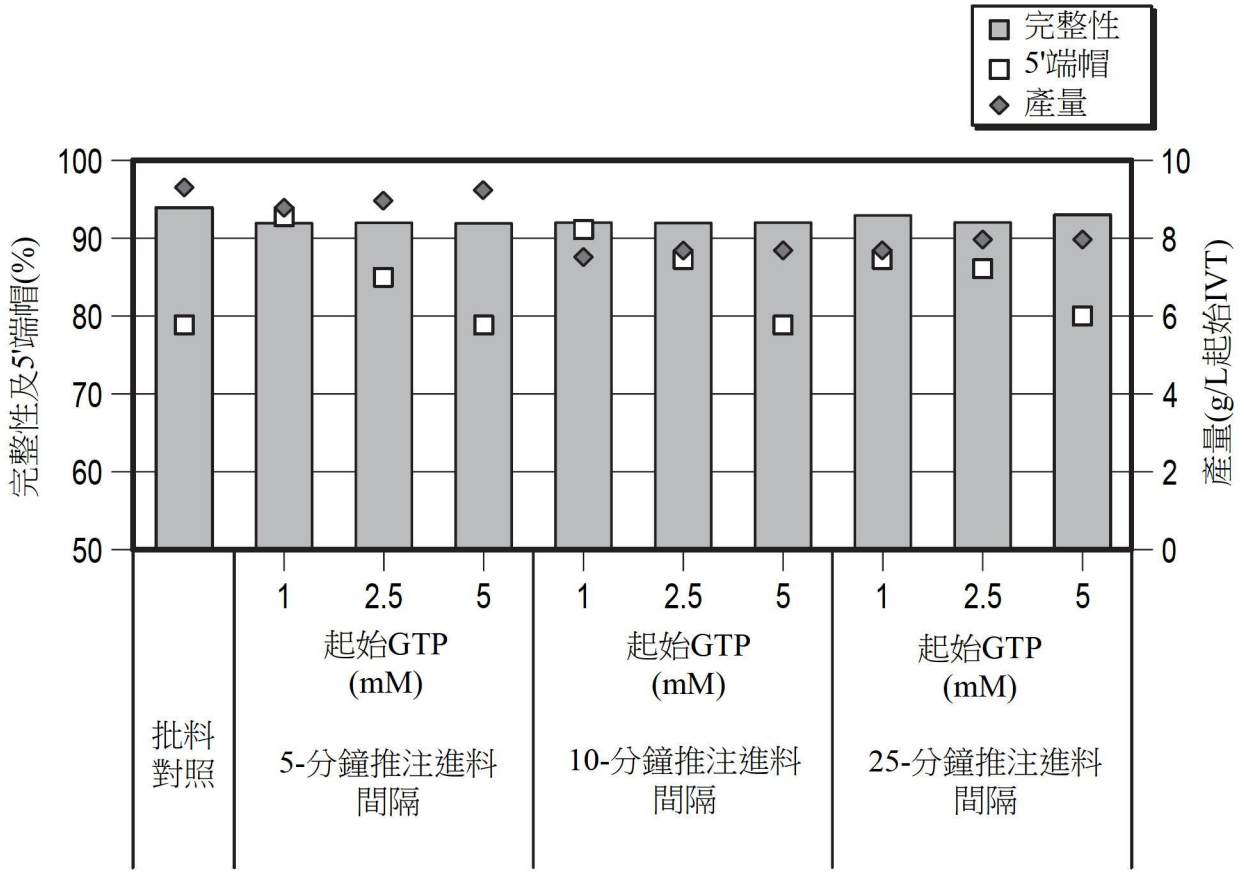
【圖9】


DNA 45 (ng/mg)
2675.0
20.0
預測對比實際
預測
實際
2500.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
0
500
1500
2500
DNA 45 (ng/mg)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
C：鎂(mM)
D：錳(mM)
10.00
7.75
5.50
3.25
1.00
0.500
1.625
2.750
3.875
5.000

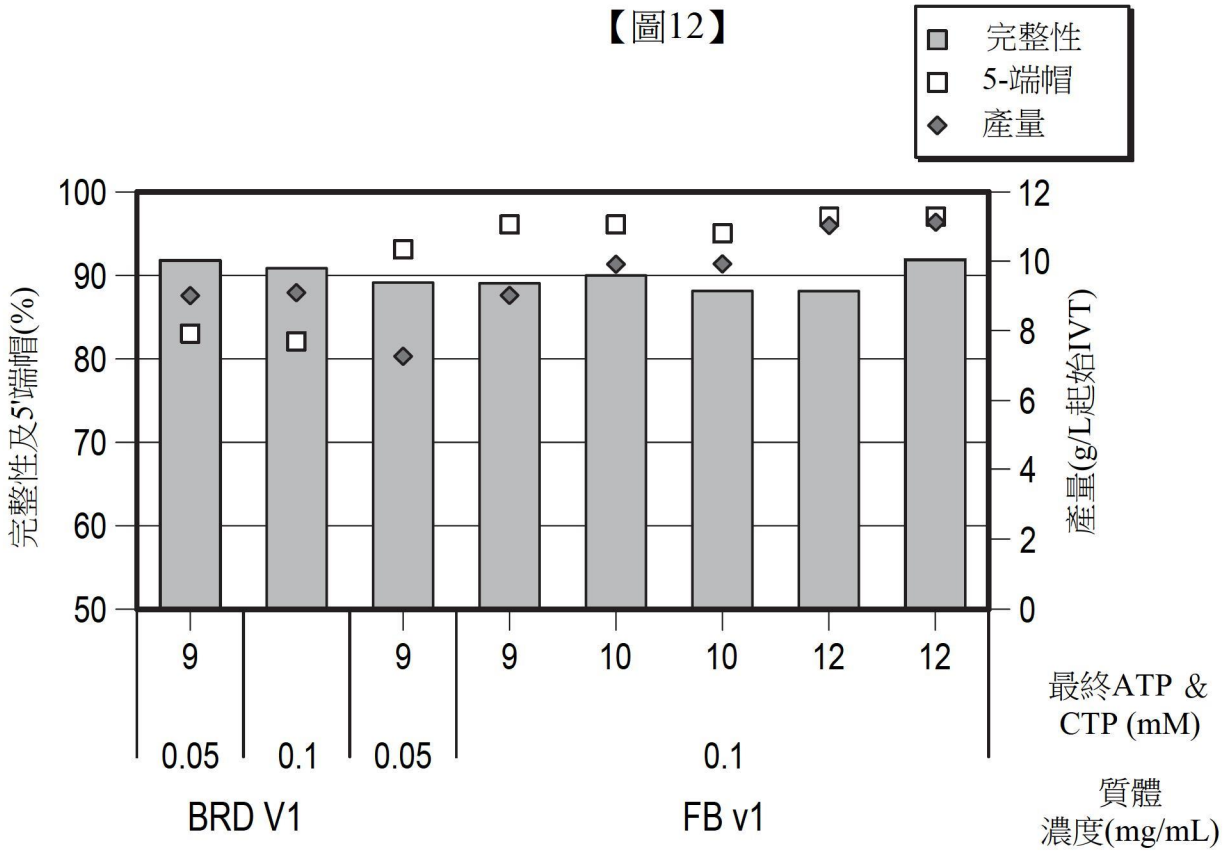
【圖10】


[B1] 00713825-0081_PostDNase_FlashFrozen
[E1] 00713825-0081_15_FlashFrozen
類型
LM
LM
DNA酶I
*
2000
1500
1000
500
0
****
15
20
25
30
排列之時間(sec)

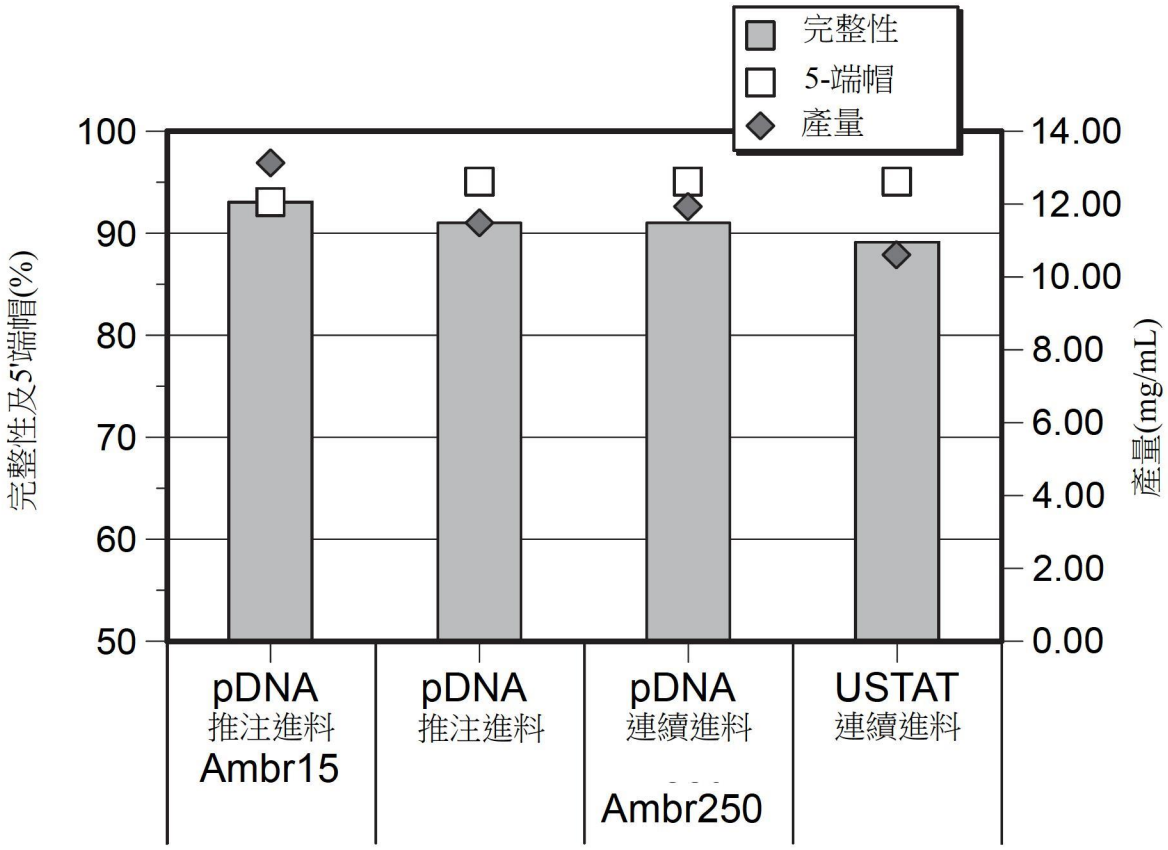
【圖11】


完整性
5'端帽
產量
完整性及5'端帽(%)
產量(g/L起始IVT)
100
90
80
70
60
50
10
8
6
4
2
0
1
2.5
5
起始GTP
(mM)
批料
對照
5-分鐘推注進料
間隔
10-分鐘推注進料
間隔
25-分鐘推注進料
間隔

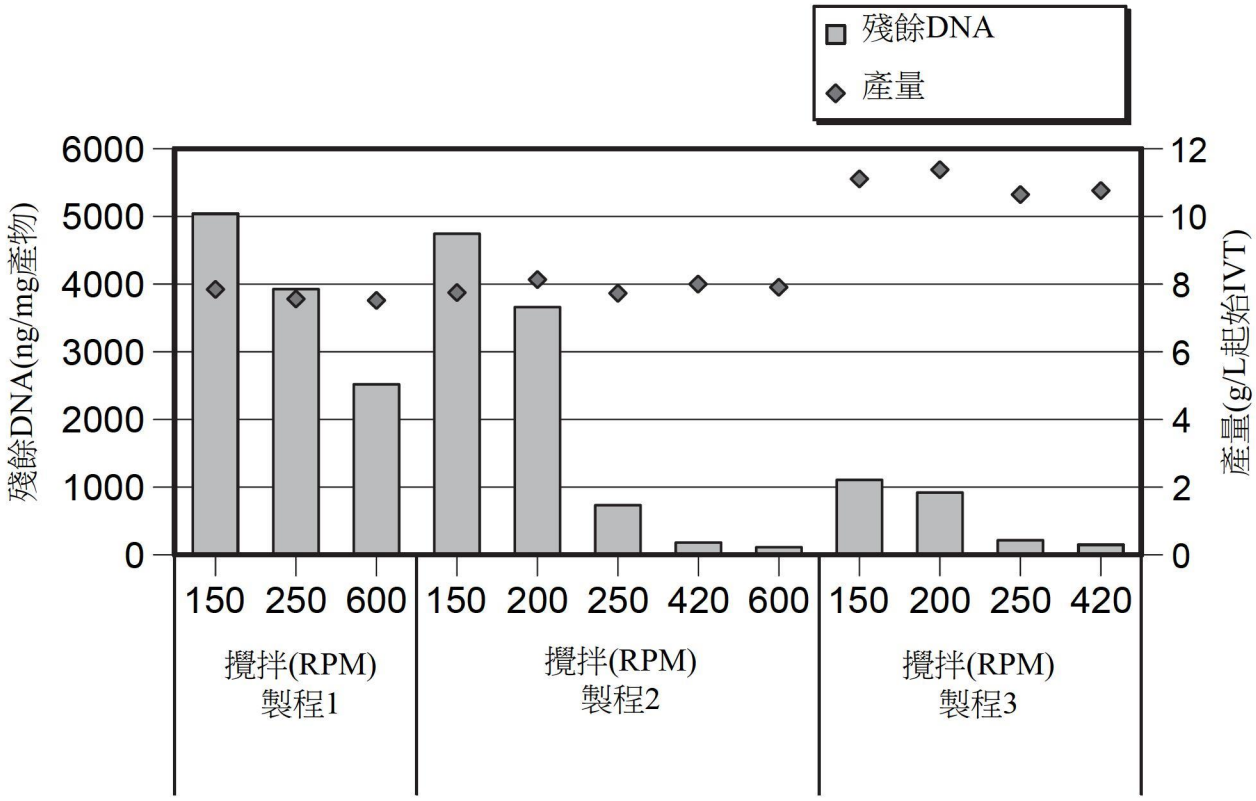
【圖12】


完整性
5-端帽
產量
完整性及5'端帽(%)
產量(g/L起始IVT)
100
90
80
70
60
50
12
10
8
6
4
2
0
9
10
12
0.05
0.1
BRD V1
FB v1
最終ATP &
CTP (mM)
質體
濃度(mg/mL)

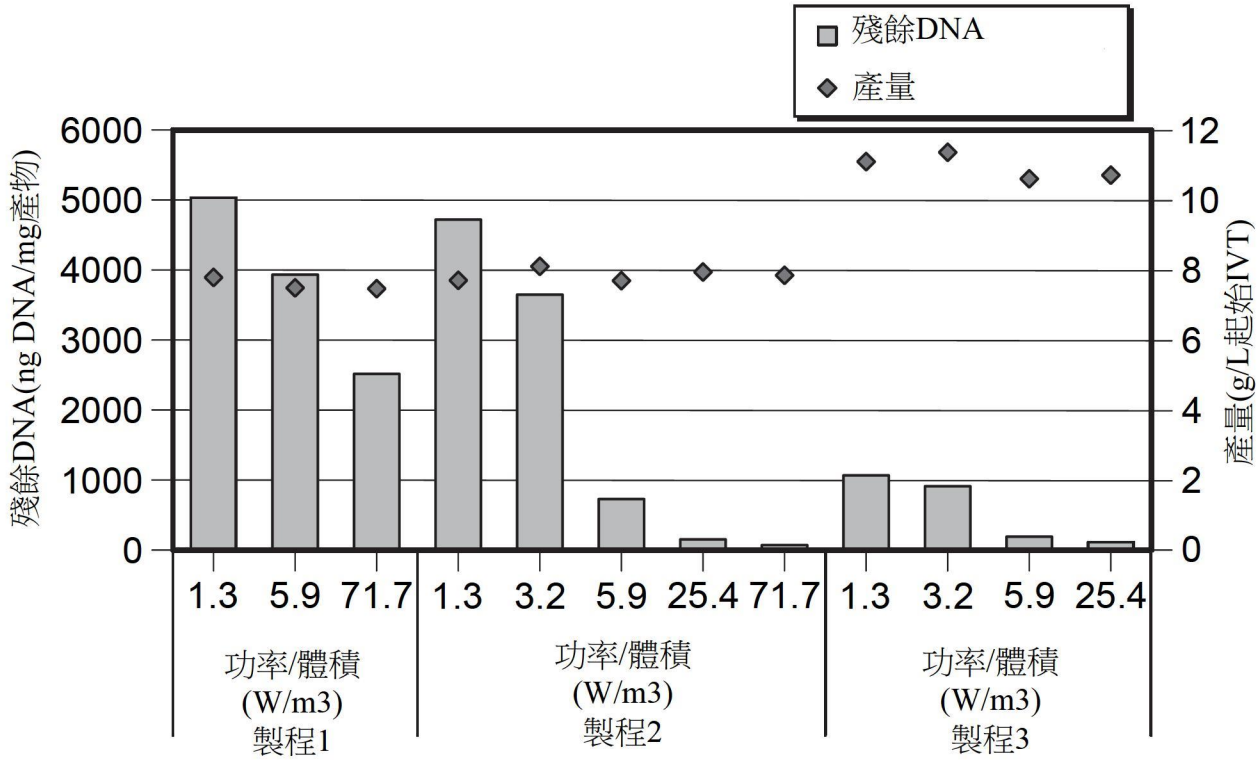
【圖13】


完整性
5-端帽
產量
100
90
80
70
60
50
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
完整性及5'端帽(%)
產量(mg/mL)
pDNA
推注進料
Ambr15
pDNA
推注進料
pDNA
連續進料
Ambr250
USTAT
連續進料

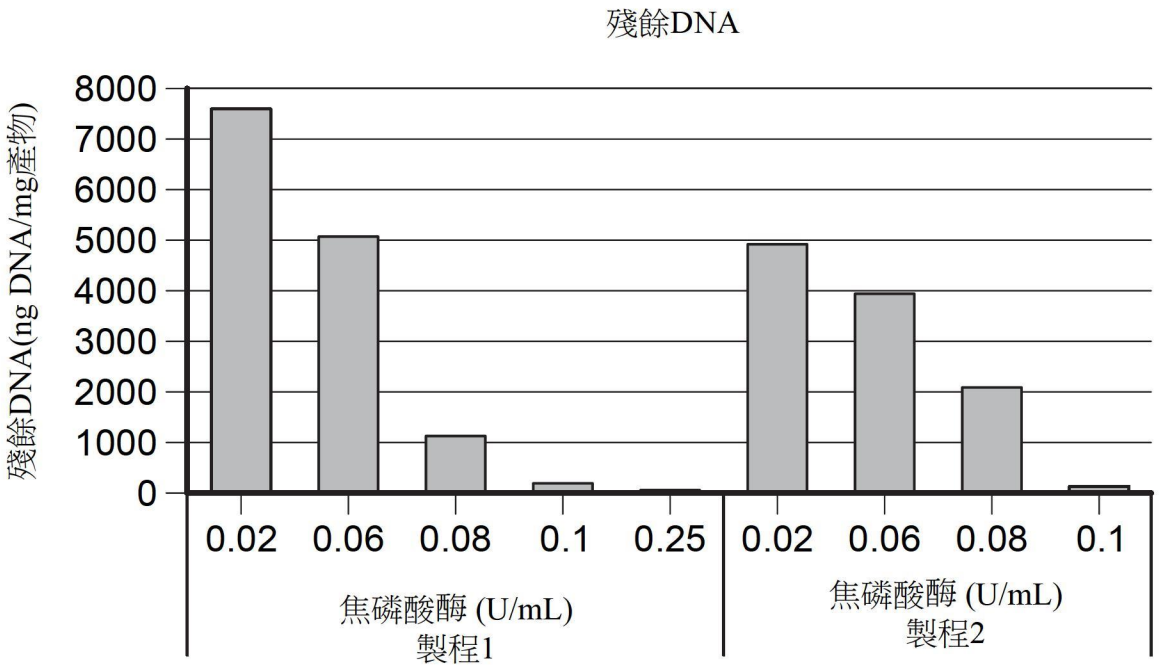
【圖14】


殘餘DNA
產量
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
12
10
8
6
4
2
0
殘餘DNA(ng/mg產物)
產量(g/L起始IVT)
150 250 600
攪拌(RPM)
製程1
150 200 250 420 600
攪拌(RPM)
製程2
150 200 250 420
攪拌(RPM)
製程3

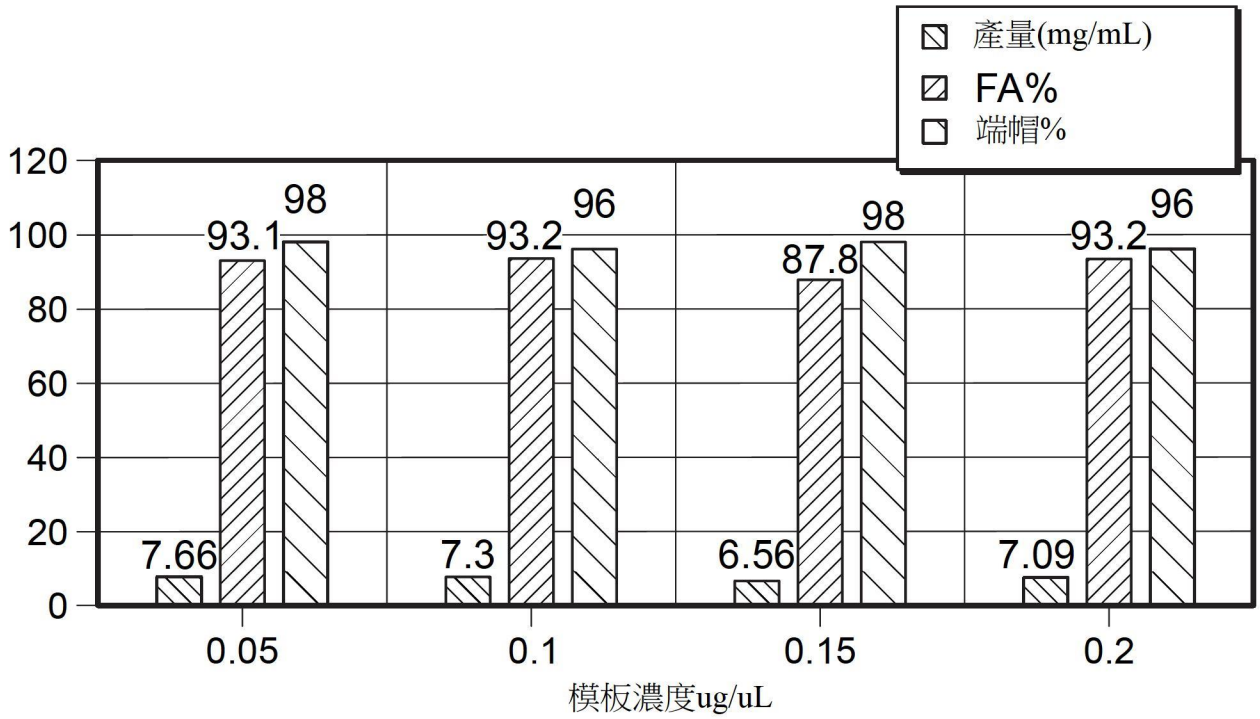
【圖15】


殘餘DNA
產量
殘餘DNA(ng DNA/mg產物)
產量(g/L起始IVT)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
12
10
8
6
4
2
0
1.3 5.9 71.7 1.3 3.2 5.9 25.4 71.7 1.3 3.2 5.9 25.4
功率/體積 (W/m3) 製程1
功率/體積 (W/m3) 製程2
功率/體積 (W/m3) 製程3

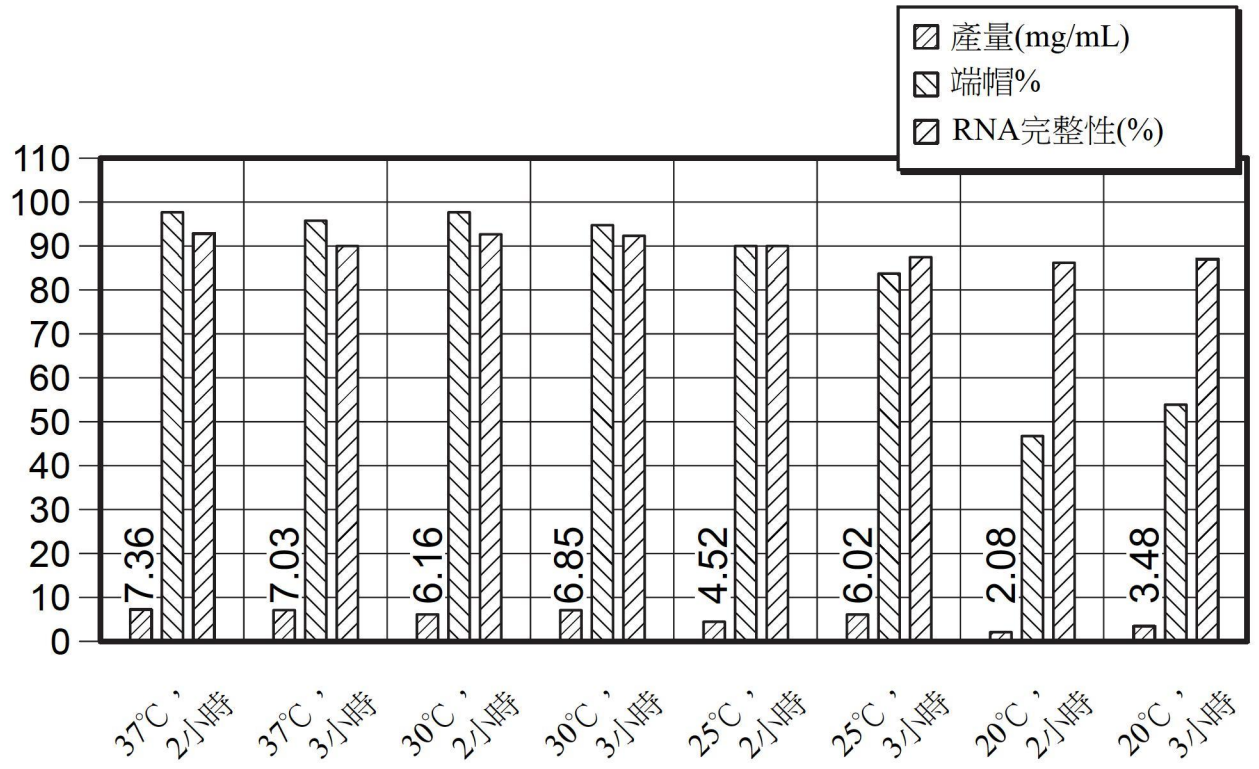
【圖16】


殘餘DNA
殘餘DNA(ng DNA/mg產物)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.02 0.06 0.08 0.1 0.25 0.02 0.06 0.08 0.1
焦磷酸酶 (U/mL) 製程1
焦磷酸酶 (U/mL) 製程2

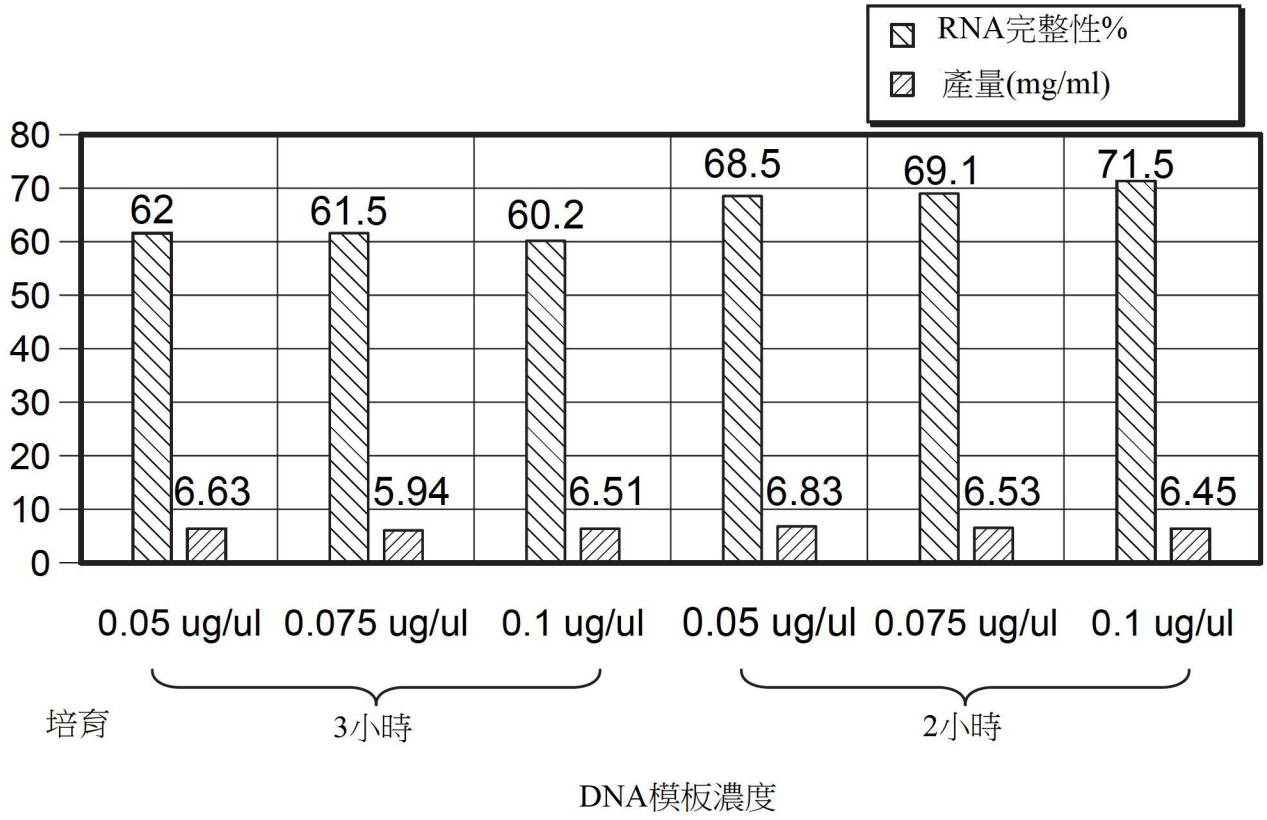
【圖17】


產量(mg/mL)
FA%
端帽%
120
100
80
60
40
20
0
93.1
98
93.2
96
87.8
98
93.2
96
7.66
7.3
6.56
7.09
0.05
0.1
0.15
0.2
模板濃度ug/uL

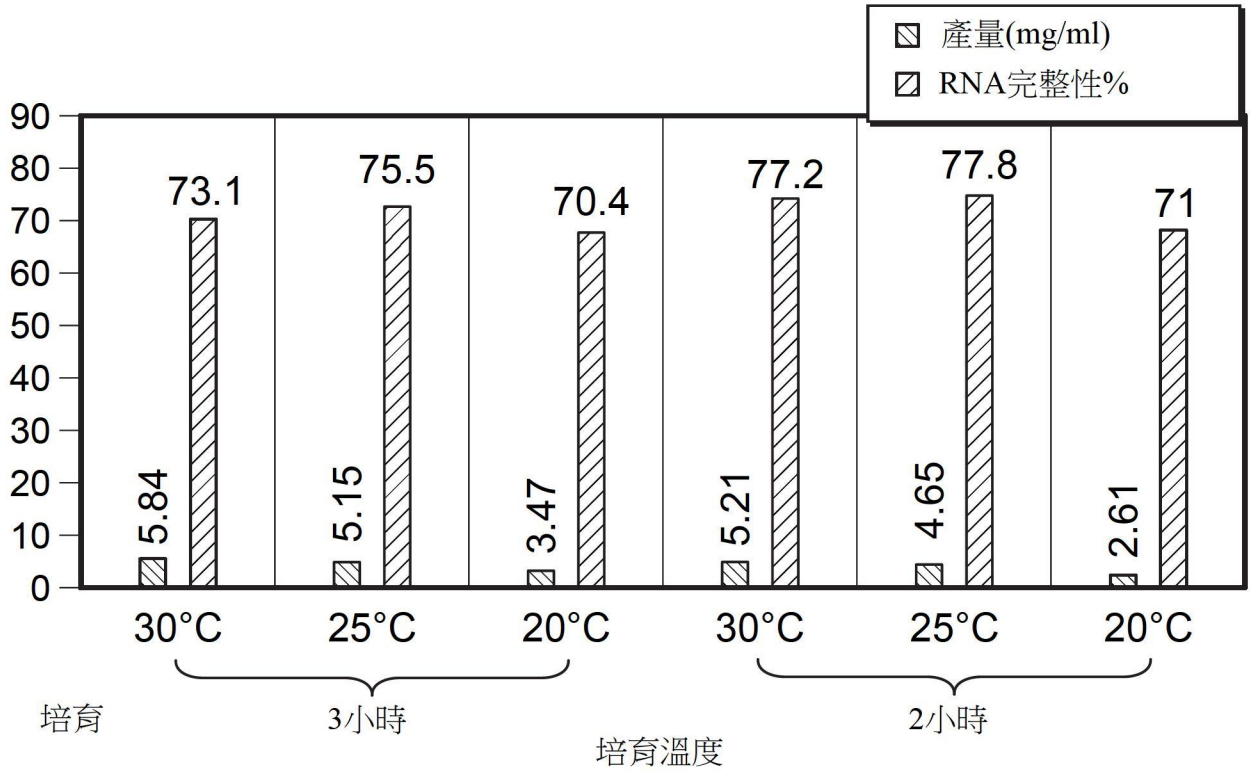
【圖18】


產量(mg/mL)
端帽%
RNA完整性(%)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
7.36
7.03
6.16
6.85
4.52
6.02
2.08
3.48
37°C，2小時
37°C，3小時
30°C，2小時
30°C，3小時
25°C，2小時
25°C，3小時
20°C，2小時
20°C，3小時
IVT溫度，培育小時

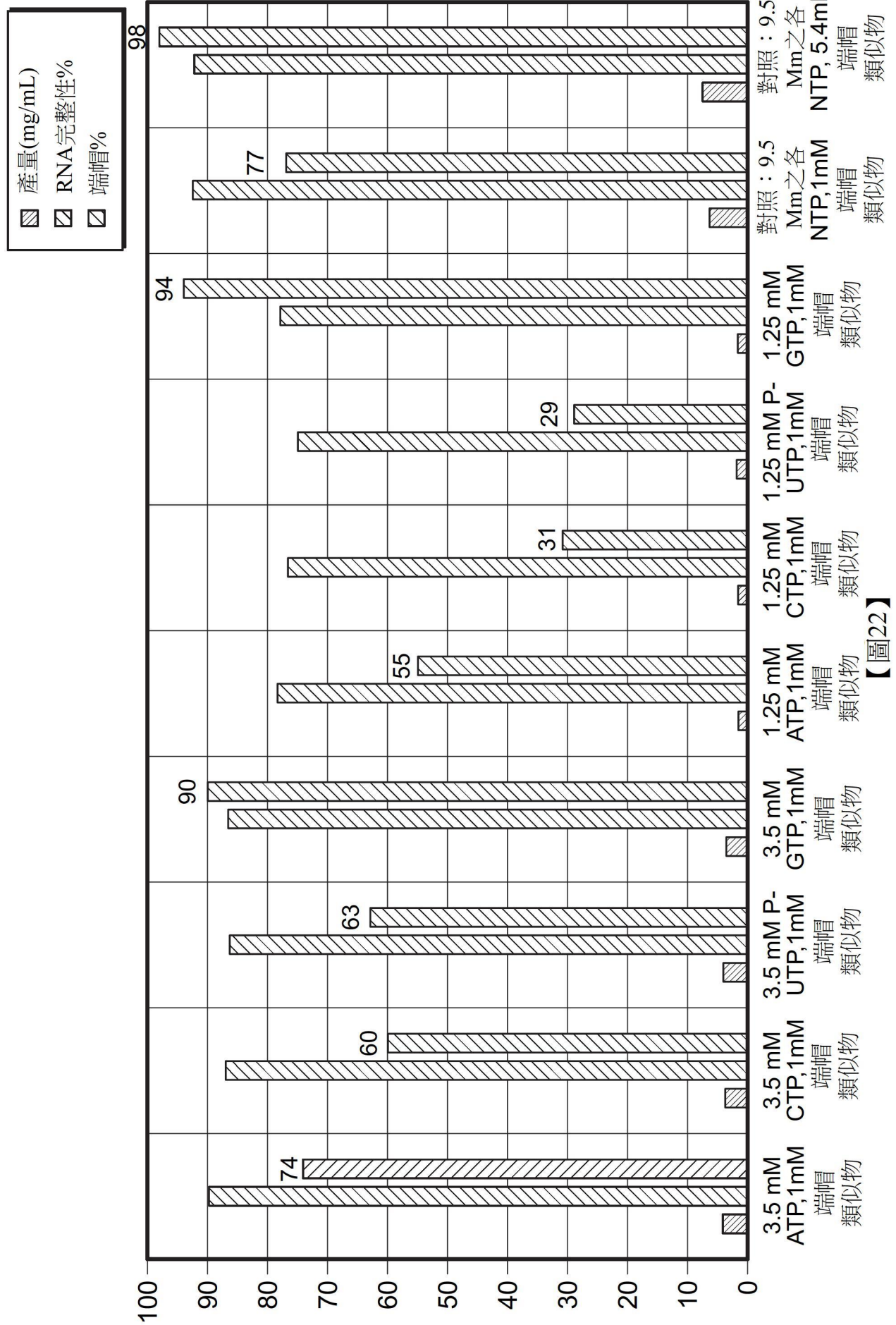
【圖19】


RNA完整性%
產量(mg/ml)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
62
61.5
60.2
68.5
69.1
71.5
6.63
5.94
6.51
6.83
6.53
6.45
0.05 ug/ul
0.075 ug/ul
0.1 ug/ul
0.05 ug/ul
0.075 ug/ul
0.1 ug/ul
培育
3小時
2小時
DNA模板濃度

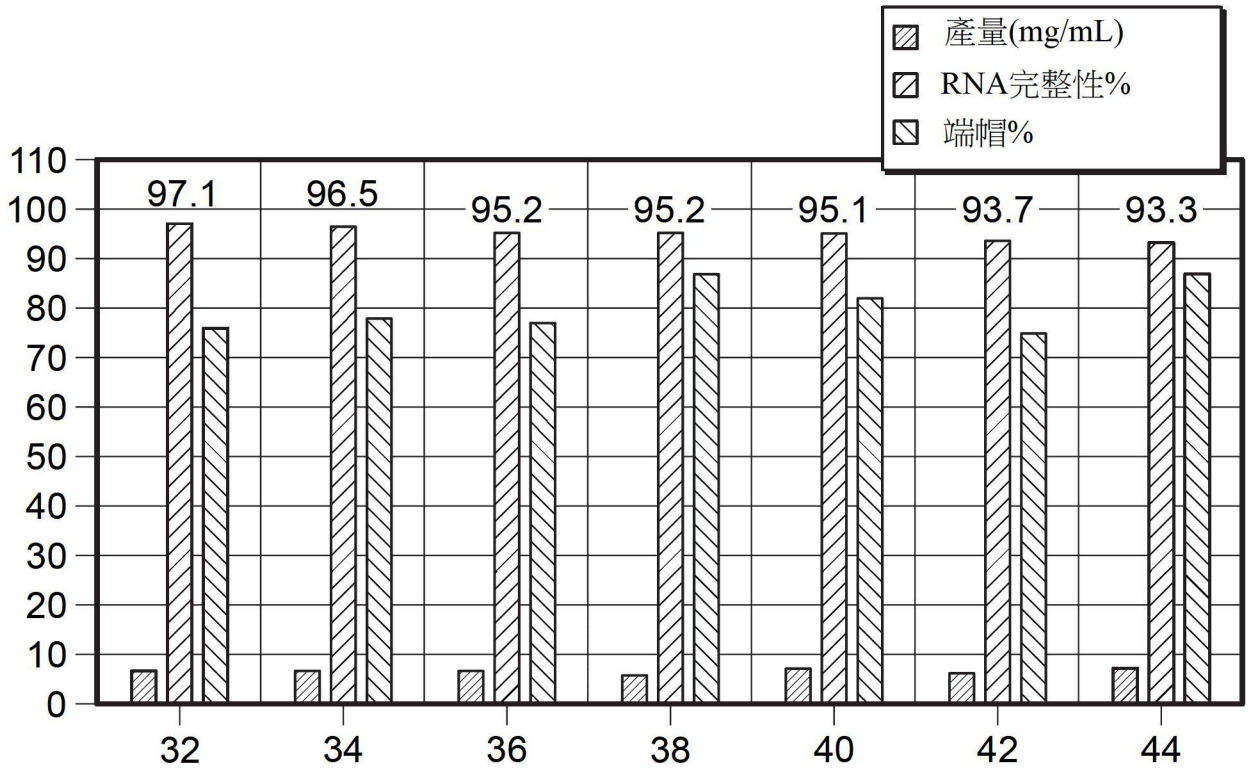
【圖20】


產量(mg/ml)
RNA完整性%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
73.1
75.5
70.4
77.2
77.8
71
5.84
5.15
3.47
5.21
4.65
2.61
30°C
25°C
20°C
30°C
25°C
20°C
培育
3小時
2小時
培育溫度

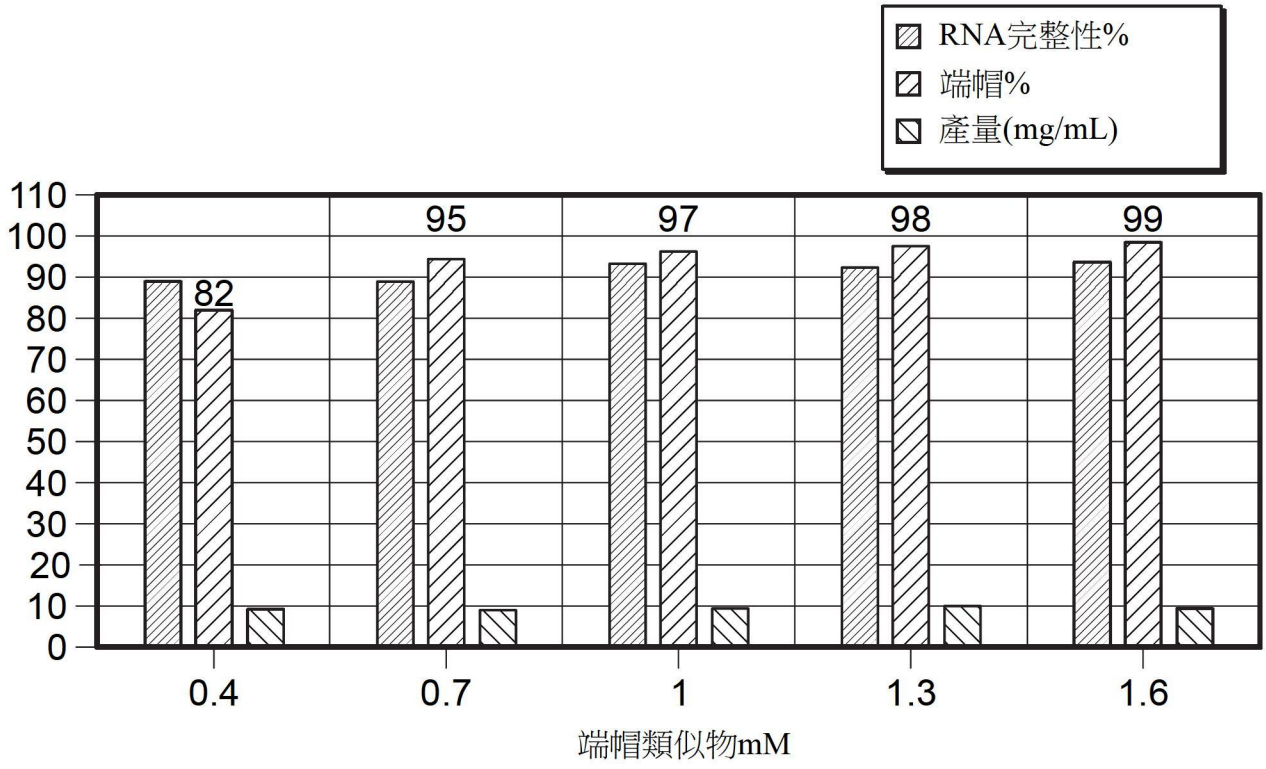
【圖21】


產量(mg/mL)
RNA完整性%
端帽%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
74
60
63
90
55
31
29
94
77
98
3.5 mM ATP,1mM 端帽類似物
3.5 mM CTP,1mM 端帽類似物
3.5 mM P-UTP,1mM 端帽類似物
3.5 mM GTP,1mM 端帽類似物
1.25 mM ATP,1mM 端帽類似物
1.25 mM CTP,1mM 端帽類似物
1.25 mM P-UTP,1mM 端帽類似物
1.25 mM GTP,1mM 端帽類似物
對照：9.5 Mm之各NTP,1mM 端帽類似物
對照：9.5 Mm之各NTP, 5.4mM 端帽類似物

【圖22】

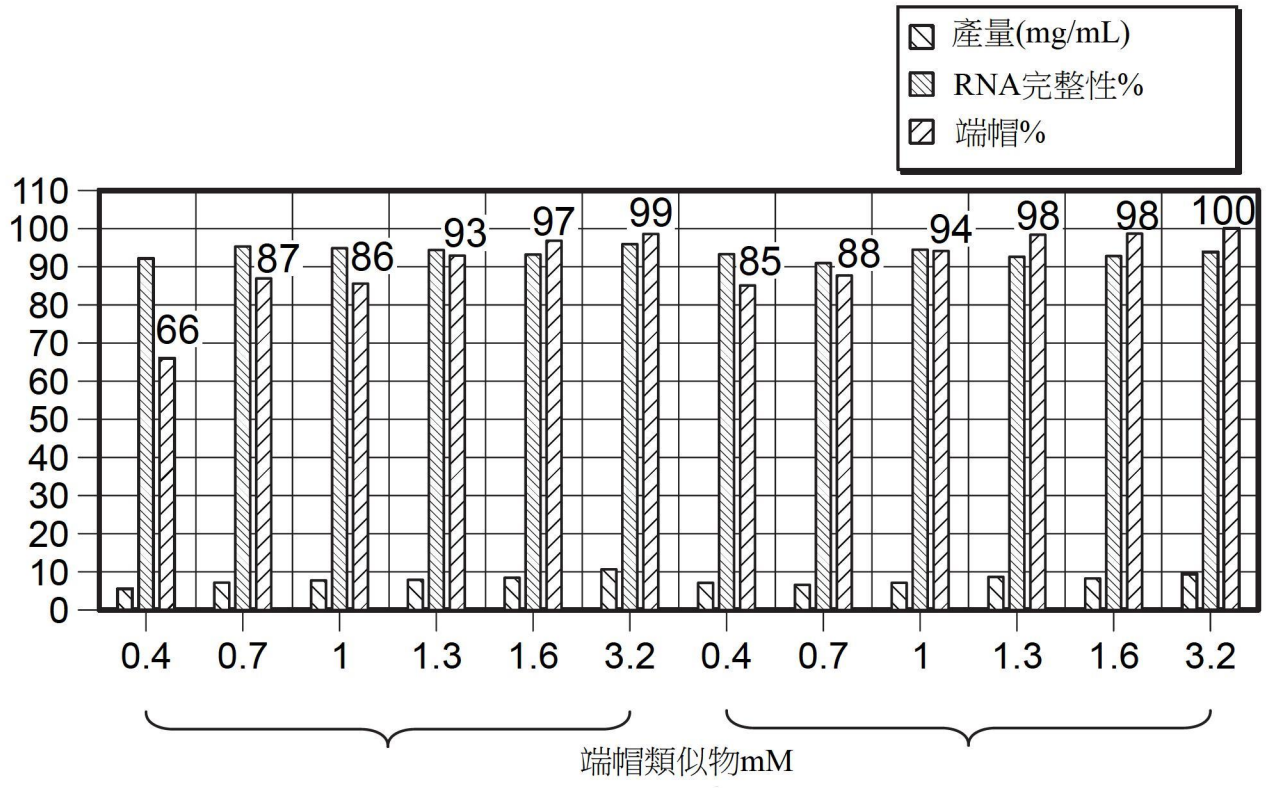


【圖23】

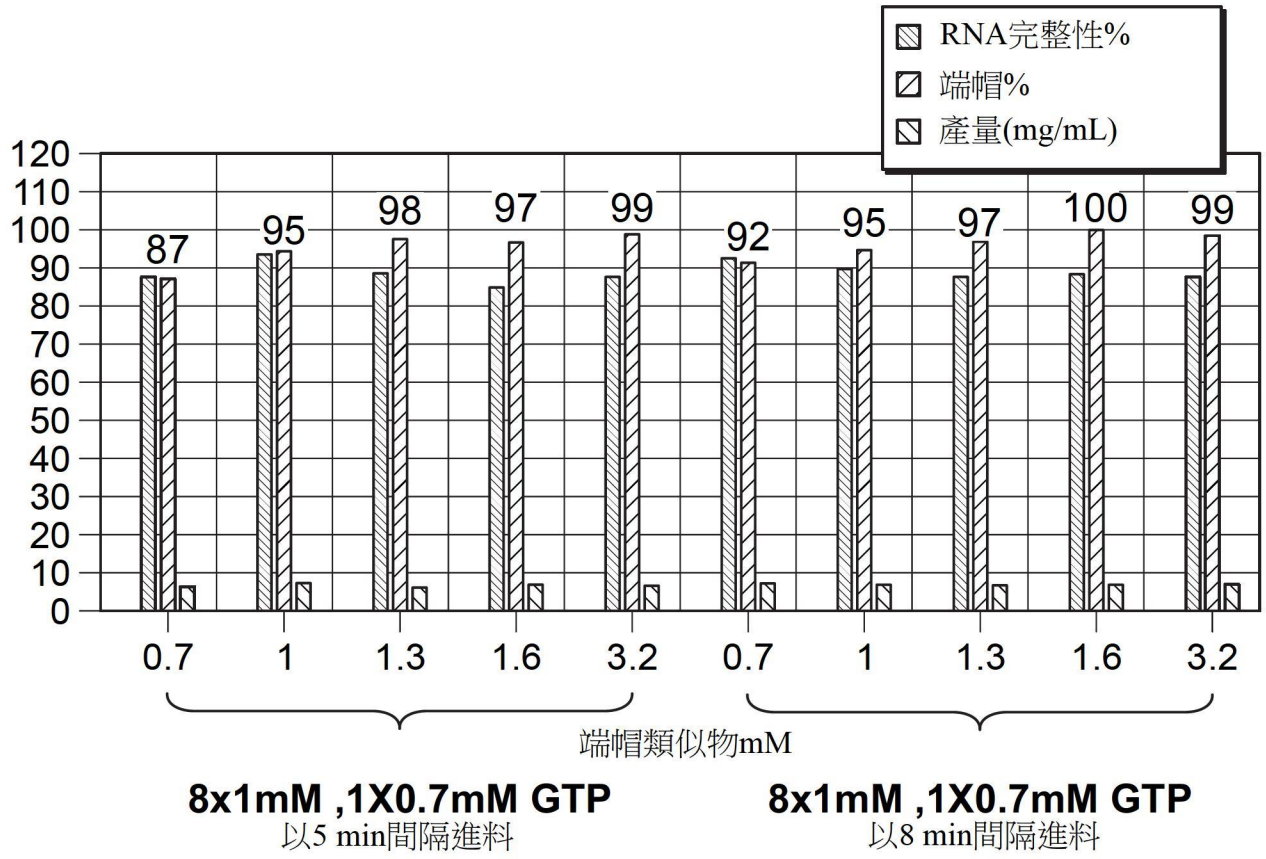


22x0.4mM,1X0.3mM GTP以4 min間隔進料

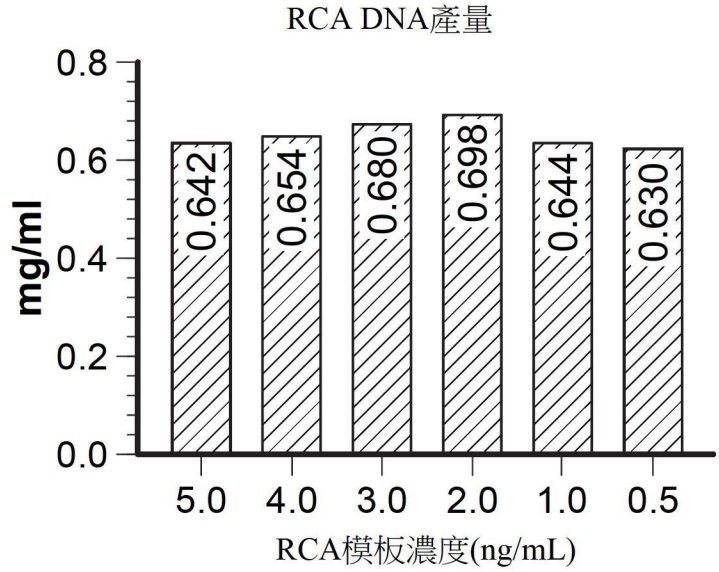
【圖24】


產量(mg/mL)
RNA完整性%
端帽%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
66
87
86
93
97
99
85
88
94
98
98
100
0.4
0.7
1
1.3
1.6
3.2
0.4
0.7
1
1.3
1.6
3.2
端帽類似物mM
10x0.8mM ,1X0.7mM GTP
以5 min間隔進料
10x0.8mM ,1X0.7mM GTP
以8 min間隔進料

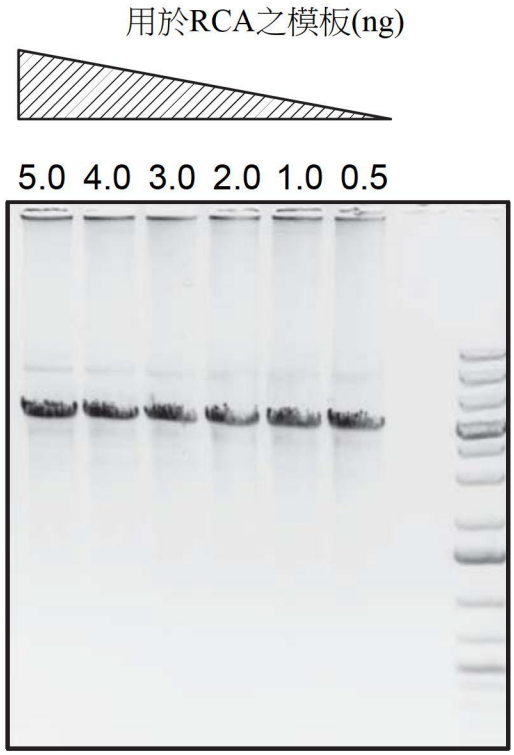
【圖25】


RNA完整性%
端帽%
產量(mg/mL)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
87
95
98
97
99
92
95
97
100
99
0.7
1
1.3
1.6
3.2
0.7
1
1.3
1.6
3.2
端帽類似物mM
8x1mM ,1X0.7mM GTP
以5 min間隔進料
8x1mM ,1X0.7mM GTP
以8 min間隔進料

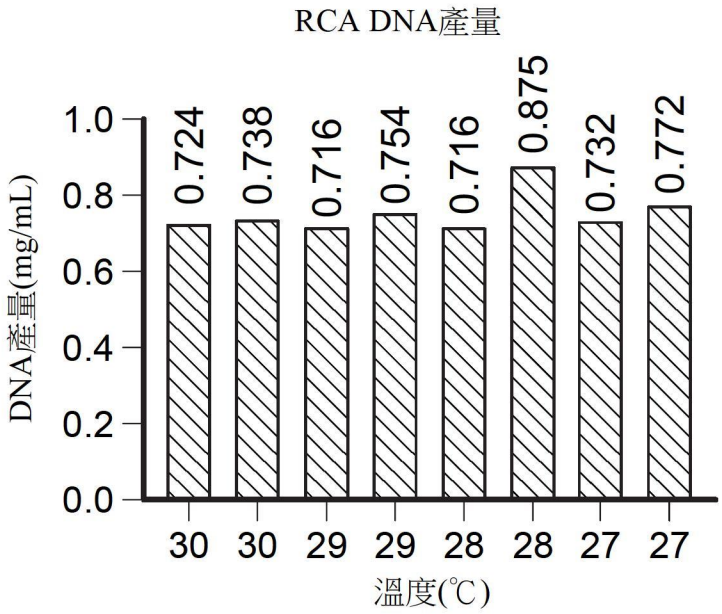
【圖26】



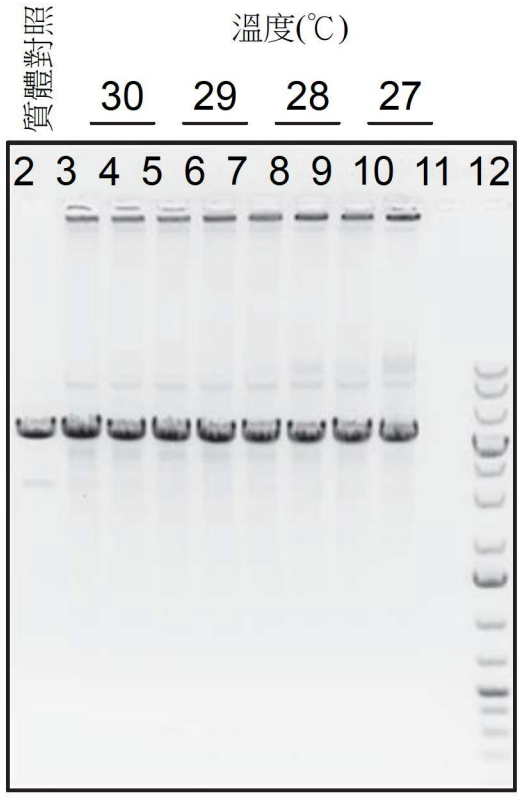
【圖27A】



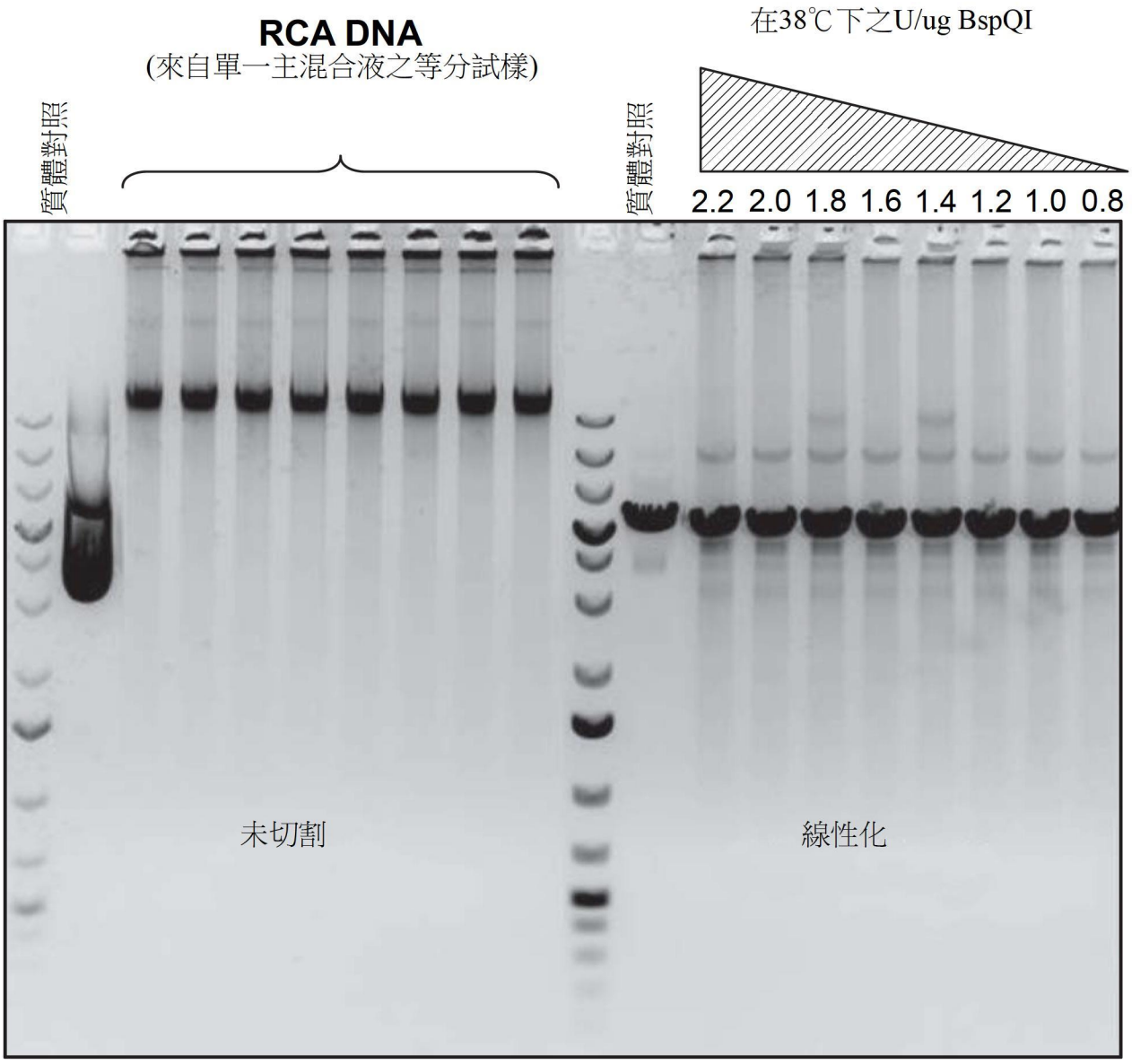
【圖27B】



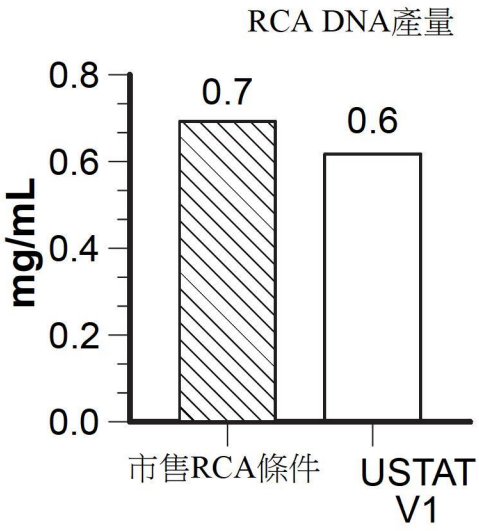
【圖28A】



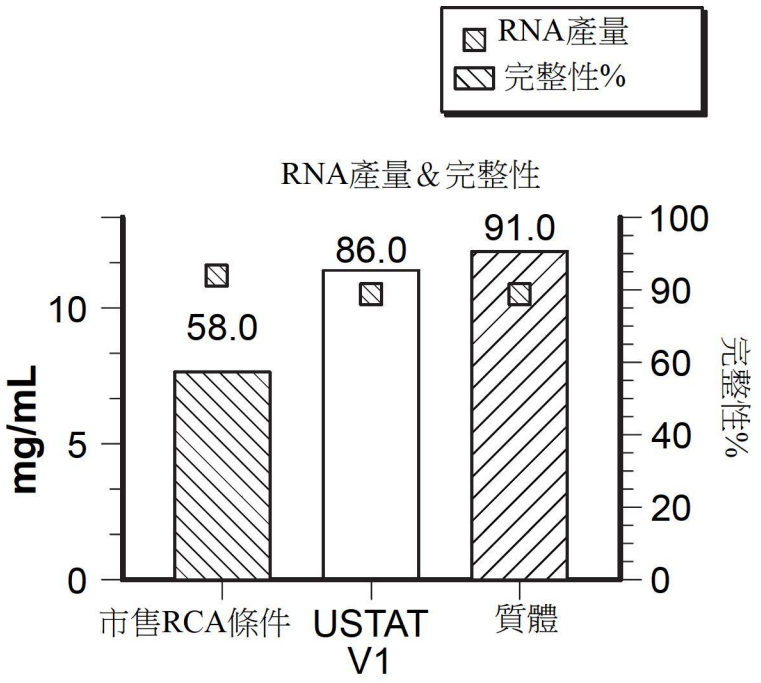
【圖28B】


RCA DNA
(來自單一主混合液之等分試樣)
在38℃下之U/ug BspQI
質體對照
質體對照
2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0.8
未切割
線性化

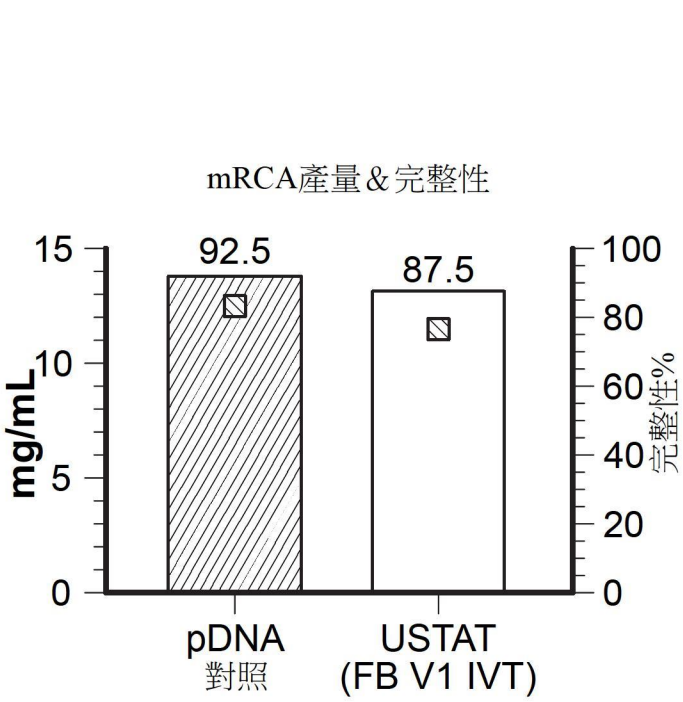
【圖29】



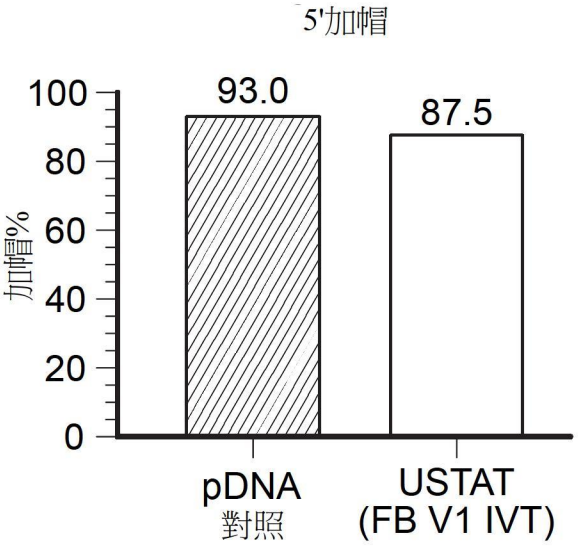
【圖30A】



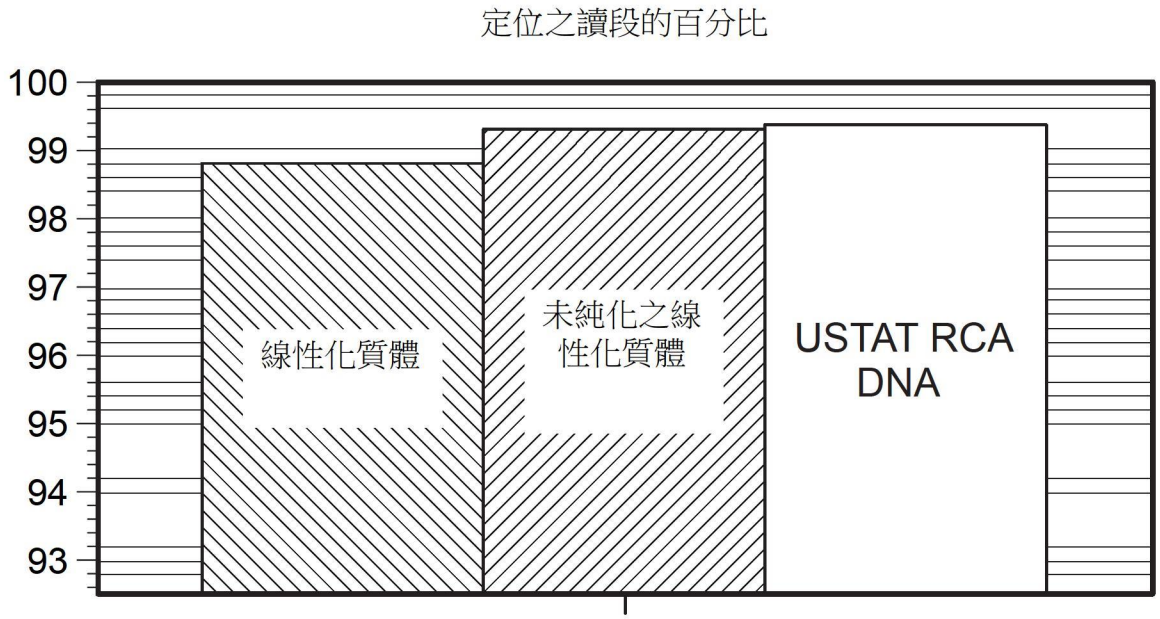
【圖30B】



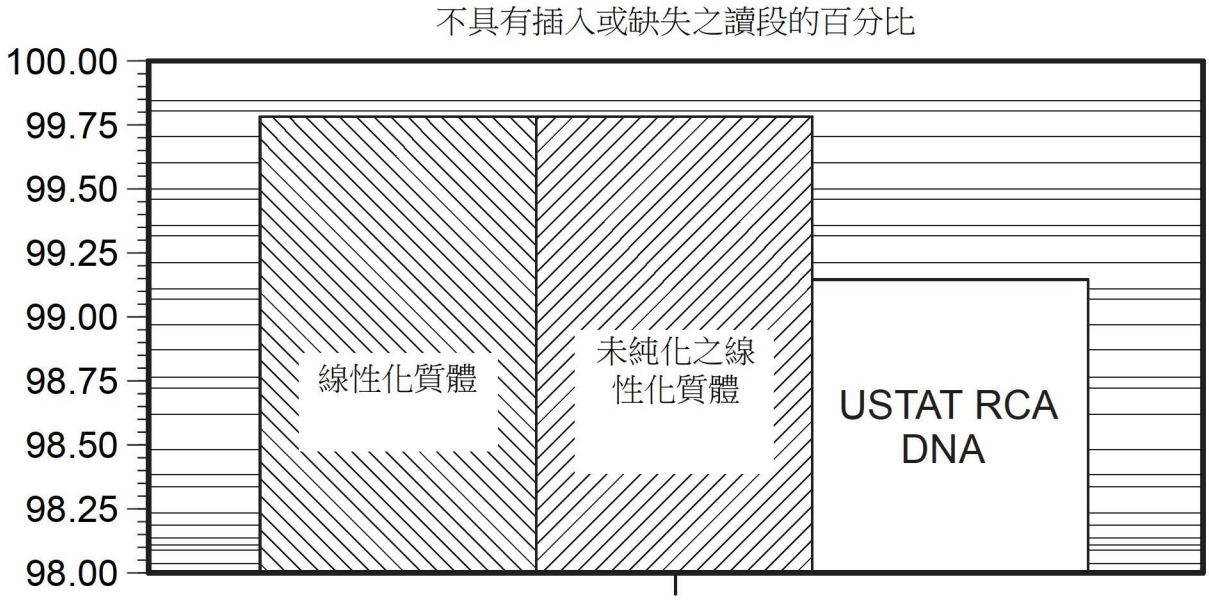
【圖31A】



【圖31B】


定位之讀段的百分比
100
99
98
97
96
95
94
93
線性化質體
未純化之線性化質體
USTAT RCA DNA

【圖32A】


不具有插入或缺失之讀段的百分比
100.00
99.75
99.50
99.25
99.00
98.75
98.50
98.25
98.00
線性化質體
未純化之線性化質體
USTAT RCA DNA

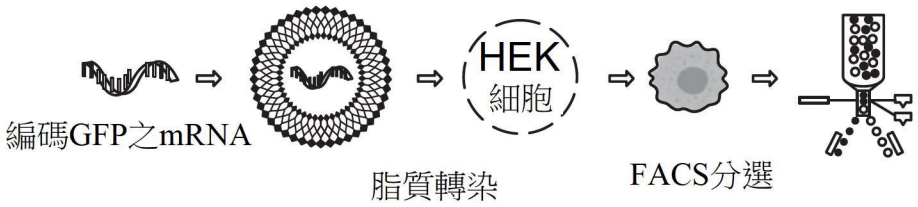
【圖32B】

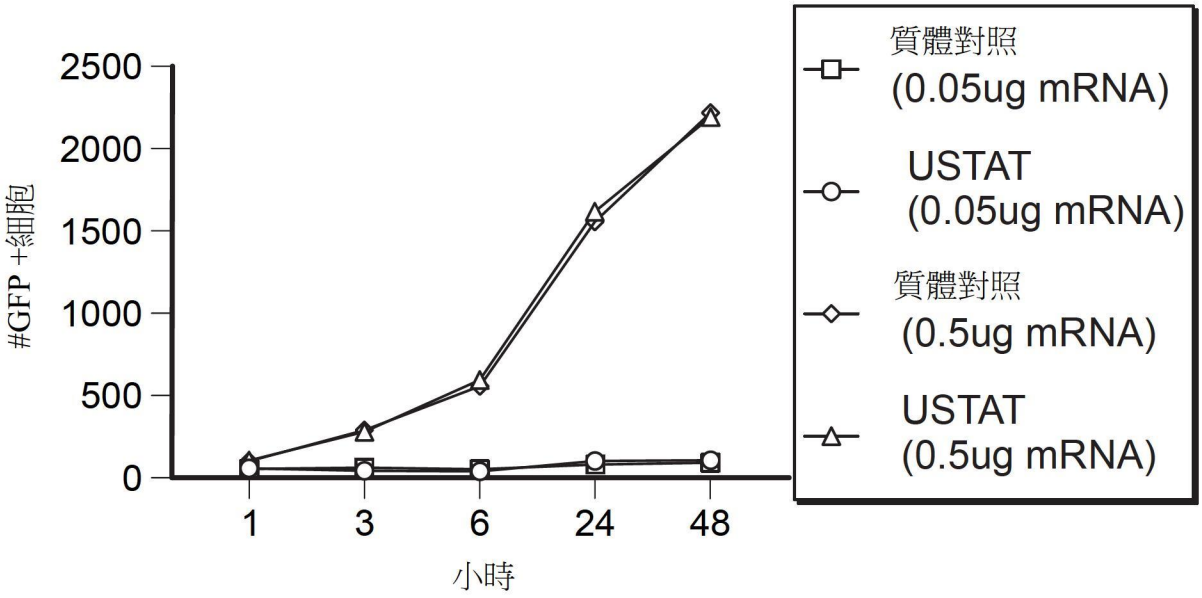
歸一化序列涵蓋範圍
線性化質體
USTAT對照質體
歸一化涵蓋範圍
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
3000 3500 4000 4500 5000
3000 3500 4000 4500 5000
3000 3500 4000 4500 5000
質體上之位置

【圖32C】

序列變異體
線性化質體
USTAT對照質體
USTAT
變異等位基因百分比
100
80
60
40
20
0
0 2000 4000
0 2000 4000
0 2000 4000
質體上之位置

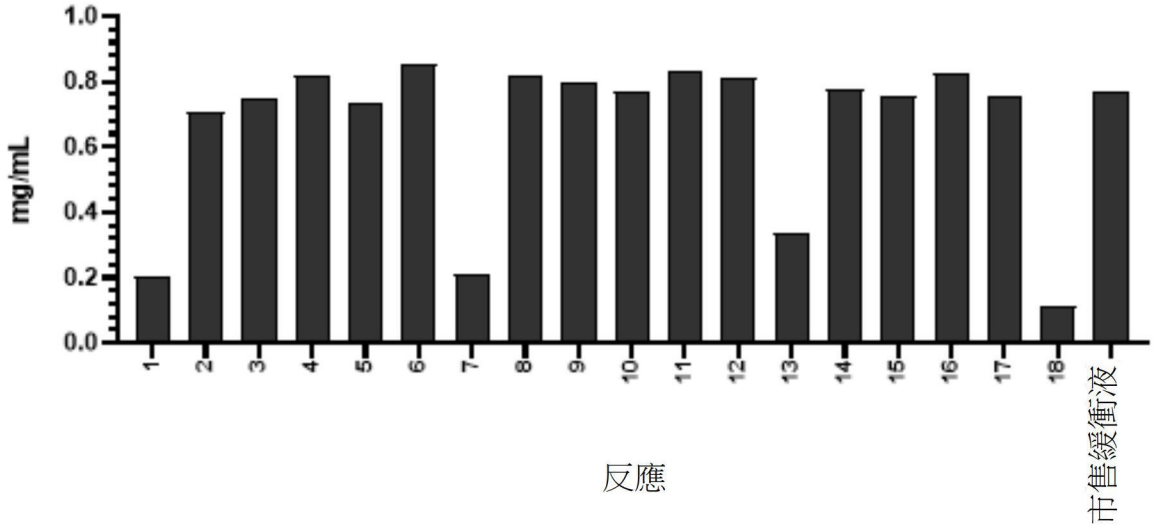
【圖32D】


編碼GFP之mRNA
HEK
細胞
脂質轉染
FACS分選


#GFP +細胞
2500
2000
1500
1000
500
0
1
3
6
24
48
小時
質體對照
(0.05ug mRNA)
USTAT
(0.05ug mRNA)
質體對照
(0.5ug mRNA)
USTAT
(0.5ug mRNA)

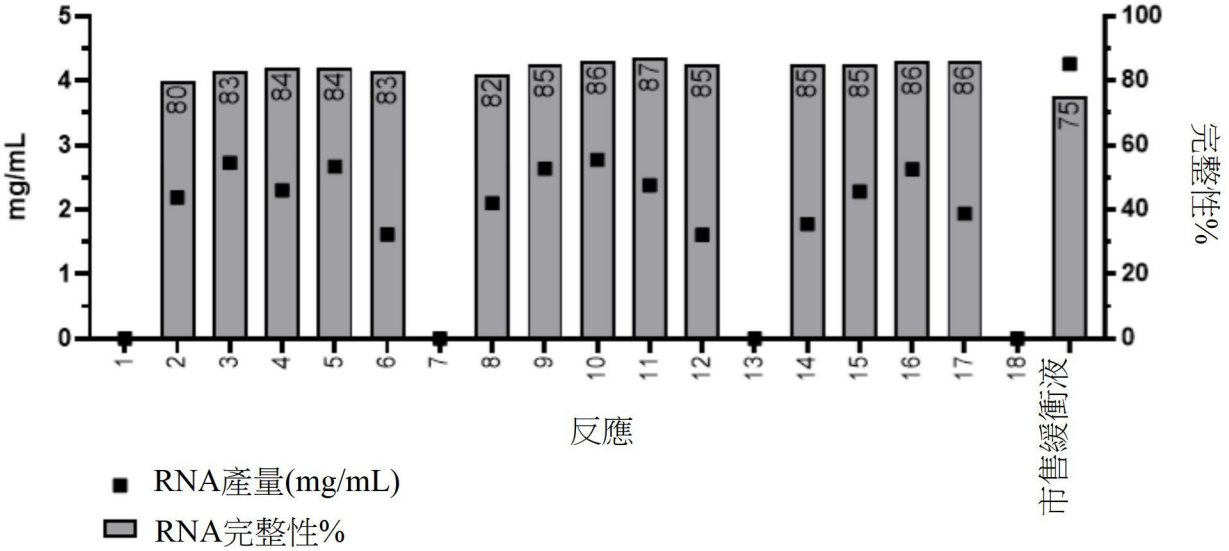
【圖33】

RCA DNA 產量

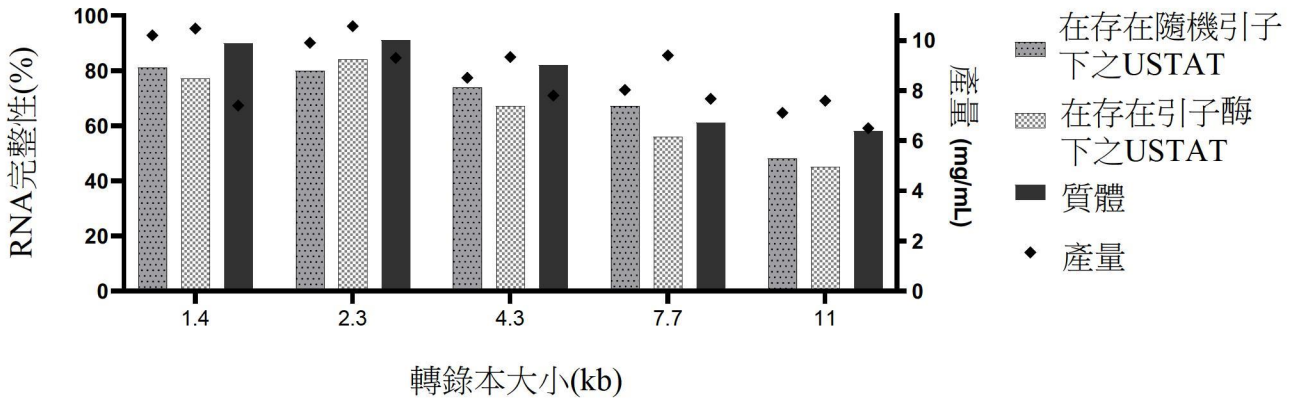


【圖34A】

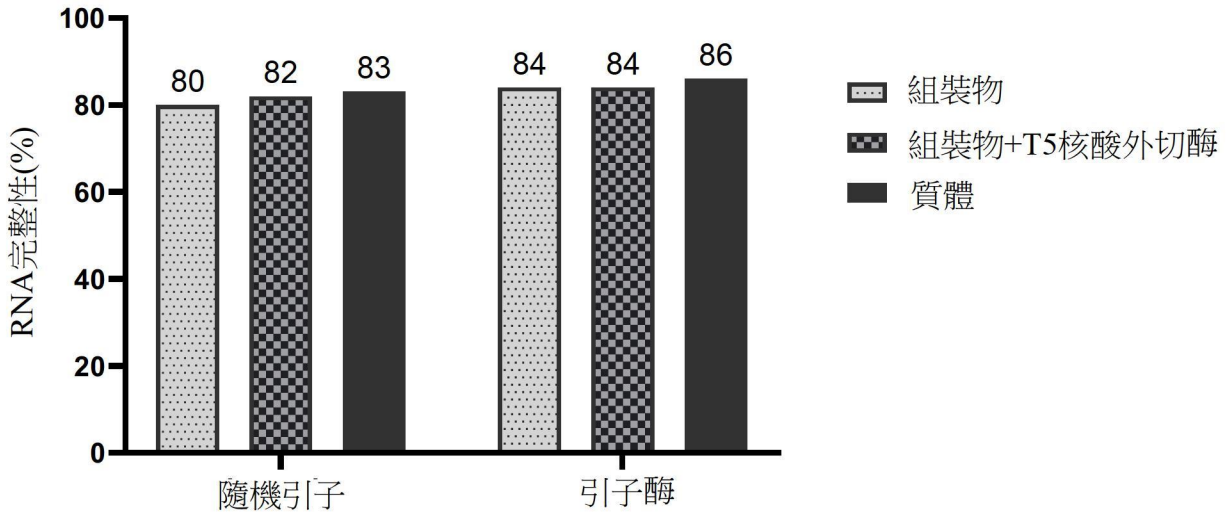
RNA完整性＆產量



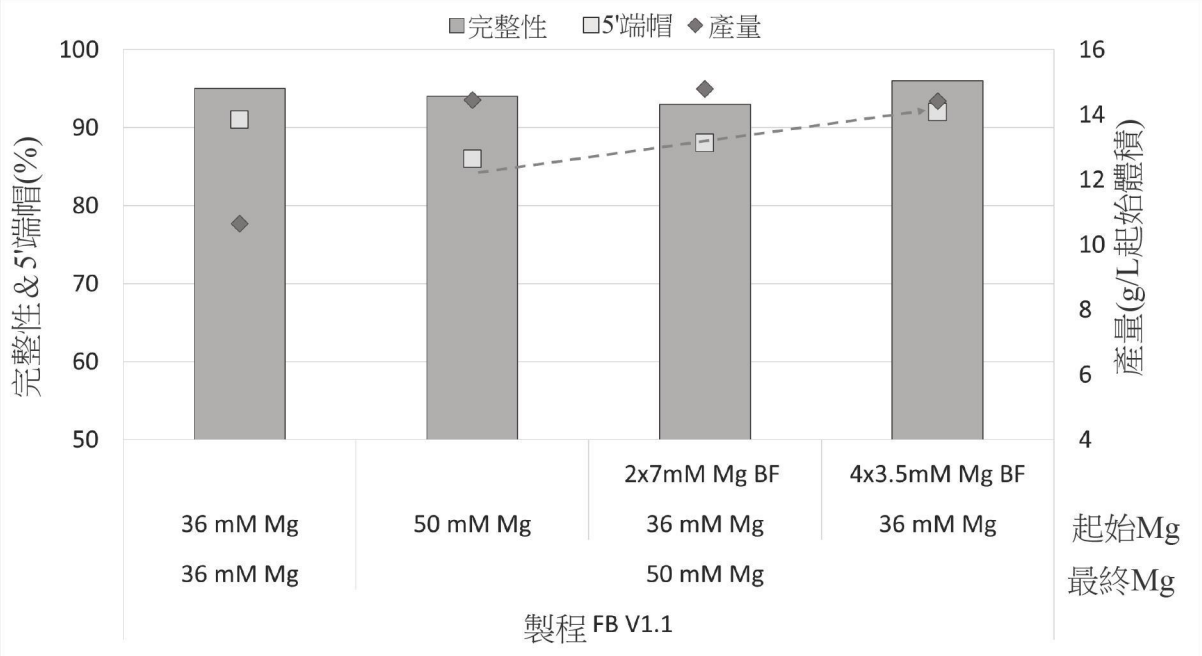
【圖34B】


RNA完整性(%)
100
80
60
40
20
0
1.4
2.3
4.3
7.7
11
轉錄本大小(kb)
10
8
6
4
2
0
產量 (mg/mL)
在存在隨機引子下之USTAT
在存在引子酶下之USTAT
質體
產量

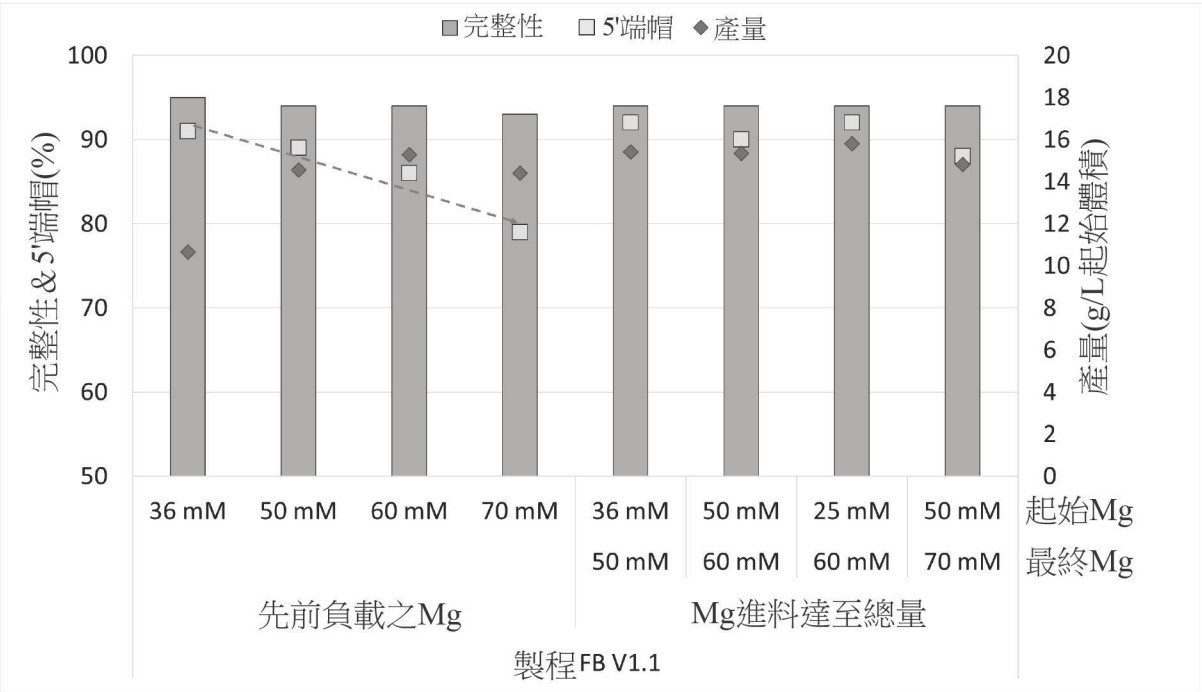
【圖35】


RNA完整性(%)
100
80
60
40
20
0
80
82
83
84
84
86
隨機引子
引子酶
組裝物
組裝物+T5核酸外切酶
質體

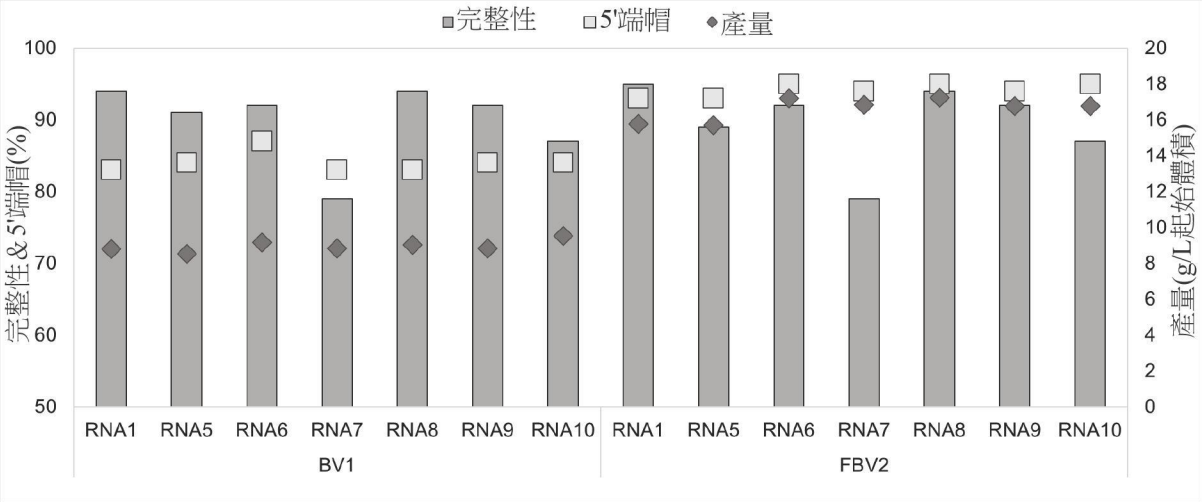
【圖36】


■完整性 □5'端帽 ◆產量
完整性 & 5'端帽(%)
產量(g/L起始體積)
100
90
80
70
60
50
16
14
12
10
8
6
4
2x7mM Mg BF
4x3.5mM Mg BF
36 mM Mg
50 mM Mg
36 mM Mg
36 mM Mg
起始Mg
36 mM Mg
50 mM Mg
最終Mg
製程 FB V1.1

【圖37】


■完整性 □5'端帽 ◆產量
完整性 & 5'端帽(%)
產量(g/L起始體積)
100
90
80
70
60
50
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
36 mM
50 mM
60 mM
70 mM
36 mM
50 mM
25 mM
50 mM
起始Mg
50 mM
60 mM
60 mM
70 mM
最終Mg
先前負載之Mg
Mg進料達至總量
製程FB V1.1

【圖38】


■完整性
□5'端帽
◆產量
完整性&5'端帽(%)
產量(g/L起始體積)
100
90
80
70
60
50
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
RNA1
RNA5
RNA6
RNA7
RNA8
RNA9
RNA10
BV1
RNA1
RNA5
RNA6
RNA7
RNA8
RNA9
RNA10
FBV2

【圖39】