

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 12 月 19 日 (19.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/254903 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/85 (2006.01) *A61K 39/135* (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01) *A61K 39/12* (2006.01)

C12N 15/65 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/102811

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 27 日 (27.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310702846.9 2023年6月14日 (14.06.2023) CN

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。

(72) 发明人: 璩良 (QU, Liang); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。尹洁 (YIN, Jie); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433

(CN)。王君华 (WANG, Junhua); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理事务所 (普通合伙) (CENTRAL SOUTH WELL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏省苏州市吴中区石湖西路 188 号吴中万达广场 A 座苏州大学国家科技园 2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: STABLE RNA MOLECULE PREPARED IN VITRO AND USE THEREOF IN PREPARATION OF IN-VIVO IN-SITU CAR TREATMENT PRODUCT

(54) 发明名称: 一种体外制备的稳定的RNA分子及其在体内原位CAR治疗产品制备中的应用

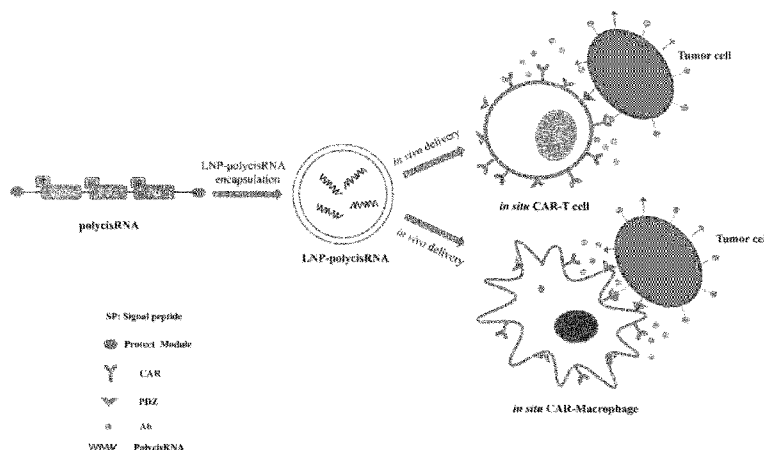


图 5

(57) Abstract: A stable RNA molecule prepared in vitro and a use thereof in preparation of an in-vivo in-situ CAR treatment product, wherein mRNA is redesigned, and protective RNA secondary structures are added to two ends of the mRNA to protect the mRNA from being cut by an RNA exonuclease, thereby improving the stability of RNA; moreover, IRES is used for replacing a 5'-terminal m7G cap structure to recruit ribosomes to start protein translation, so that the mRNA retains a translation function, the stability of the mRNA is improved, and there is no need to add caps and tails to the two ends of the mRNA, thereby greatly reducing the preparation cost of the mRNA, and improving the in-vitro production efficiency of the mRNA. Besides, on this basis, a polycistronic RNA platform is constructed, IRESs are used for expressing a plurality of protein sequences, respectively, making up for the deficiency that monocistronic RNA technology cannot be used to simultaneously express a plurality of functional proteins.

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 一种体外制备的稳定的RNA分子及其在体内原位CAR治疗产品制备中的应用, 重新设计了mRNA, 在mRNA两端添加保护性RNA二级结构来保护mRNA不被RNA外切酶切割, 提高RNA的稳定性, 并使用IRES来替代5'端m7G帽子结构招募核糖体启动蛋白翻译, 使mRNA保留翻译功能, 增加其稳定性, 而不需要在其两端分别加帽加尾, 极大地降低mRNA制备的成本、并提高mRNA体外生产的效率。此外, 在此基础上, 构建了多顺反子RNA平台, 使用IRES来分别表达多个蛋白序列, 弥补了单顺反子RNA技术不能同时表达多个功能性蛋白的不足。

一种体外制备的稳定的 RNA 分子及其在体内原位 CAR 治疗产品制备中的应用

技术领域

本发明涉及一种体外制备的稳定的 RNA 分子及其在体内原位 CAR 治疗产品制备中的应用，属于生物医药技术领域。

背景技术

CAR(Chimeric antigen receptor, 嵌合抗原受体)的概念自 1989 年由科学家 G Gross 提出，发展至今，将 CAR 分子通过基因工程手段体外转导入 T 细胞的 CAR-T (嵌合抗原受体 T 细胞) 疗法已经成为了一种重要的免疫疗法并获批应用于临床上白血病和淋巴瘤的治疗。但该疗法目前仍存在许多问题，在应用上程序繁琐，成本昂贵，通常需要与其他医疗手段联合进行治疗以达到较好效果，且目前针对实体瘤的治疗几乎没有效果。

多顺反子指能够同时编码多个多肽链的一个 mRNA 分子，多存在于原核生物中，在真核生物中较少。目前广泛应用的载体多采用多顺反子表达方案，即利用内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)或自剪切多肽 2A(self-cleaving 2A peptide, 2A)等元件来连接多个基因，实现在单个载体上表达多个基因的目的，该技术以 DNA 质粒为载体，导入目的细胞中存在整合到基因组的风险。

RNA 疫苗技术，包括 mRNA 疫苗技术和 circular RNA 疫苗技术，是近几年取得重大突破的医学技术。虽然该项技术已经在感染性疾病、自身免疫病、遗传病以及癌症的预防和治疗中显示出广阔的应用前景，但是该技术仍然具有巨大的优化和提升空间。目前的 RNA 技术都属于单顺反子 RNA 技术，即一个 RNA 分子只能翻译出一种多肽(单个蛋白亚基或者单个融合蛋白)。因此，在需要同时表达多个功能性蛋白的应用情形下(比如多价疫苗、联合给药等)，当前的单顺反子 RNA 技术则遭遇技术应用瓶颈。

近几年，免疫检查点抑制(ICB)和嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)免疫疗法已经成为重要的癌症治疗手段，但仍存在许多挑战。ICB 疗法的临床反应率很低，只有 20%—30%，对大多数癌症患者几乎无效；CAR-T 疗法虽然在治疗 B 淋巴瘤方面取得了巨大成功，但其仍存在三个严重问题：①耗时、耗资源、极其昂贵的个体化细胞治

疗，而不是“现货型”药物；②仅对部分的血液肿瘤有效，对实体瘤几乎不能杀伤；③严重的副作用，比如细胞因子风暴和杀伤正常细胞等。因此，开发用于癌症治疗的前沿生物技术仍然是迫切所需的。

RNA 治疗技术具备可逆、可调控的优势，RNA 可以直接在细胞质中翻译蛋白发挥功能，不需要转运进细胞核内；且 RNA 没有整合进基因组 DNA 的安全风险。因此，RNA 治疗技术是开发体内原位 CAR 免疫疗法的一个重要契机。2020 年 11 月，Matthias Stephan 团队将编码 Anti-CD19 CAR 跨膜蛋白的 mRNA 直接静脉重复输注进小鼠体内，治疗效果在小鼠模型上达到了过继性细胞疗法的疗效（Parayath *et al.*, *Nature Communications*, 2020）。2022 年 1 月，JOEL G. RURIK 等报道了基于 mRNA 技术的体内重编程 CAR-T 疗法，通过向体内 T 细胞靶向递送 Anti-FAP-CAR mRNA，清除了小鼠体内纤维化心肌细胞（Rurik *et al.*, *Science*, 2022）。

目前，CAR 疗法常通过与多种功能蛋白联合治疗来提高其治疗效果，如细胞因子、单克隆抗体、疫苗、小分子靶向药物等，如果能将 CAR 分子与以上多个功能性蛋白在同一个 RNA 分子上同时在体表达、协同作用，将有助于提高 CAR 疗法的靶向性、肿瘤杀伤效果，有效提高实体瘤治疗响应率。但由于促炎、促免疫细胞浸润的细胞因子与 PDZ 结构域都是属于跨膜或者分泌蛋白，采用当前的单顺反子 RNA 技术在同一个 RNA 分子上进行编码受到技术限制。当前的单顺反子 RNA 技术不能应用于同时表达多个功能性蛋白用于免疫治疗的主要原因在于：（1）脂纳米颗粒（LNP）对 RNA 分子进行包裹时是随机过程、且一个 LNP 颗粒包裹的 RNA 分子数目有限；因此，当用 LNP 对多种单顺反子 RNA 进行包封时，制备的 LNP-RNA 药物批次的平行性、稳定性和有效性都会收到严重制约。（2）由于哺乳动物细胞中分泌型蛋白和膜蛋白分选的特殊机制（信号肽的引导和切割），用一个 RNA 分子翻译一种融合蛋白（各蛋白亚基由 2A 连接而成）的策略仅仅适用于胞质蛋白、核内蛋白或单个跨膜蛋白与其他胞质蛋白的组合，不能适用于多个分泌蛋白或跨膜蛋白的融合翻译；然而应用于疫苗的抗原、治疗性抗体、细胞因子、嵌合抗原受体（CAR）等大多数功能性蛋白都是分泌蛋白或膜蛋白。基于以上原因，开发多顺反子 RNA 技术，即利用一个 RNA 分子同时翻译出多个功能性分泌蛋白或膜蛋白，是当前底层 RNA 技术研究领域所迫切需要的，并且其未来在疾病的治疗中都极具应用开发前景。

此外，在体内环境中，mRNA 半衰期短、稳定性差，裸露的 mRNA 直接进入体内容易被体内广泛存在的 RNA 酶降解；而环状 RNA 虽然比 mRNA 稳定，但容易引起机体产生免疫原性，影响治疗效果，限制了其在医学治疗中的应用。并且，mRNA 在体

外制备时，需要额外添加 5' 端帽子结构以及 3' 端 polyA 尾，而环状 RNA 虽然不需要加帽加尾，但需要进行环化反应，制备工艺程序繁琐，在生产上严重制约了生产效率，并增加了生产成本。

发明内容

为了解决上述问题，本发明提供一种体外制备的稳定的 RNA 分子及其在体内原位 CAR 治疗产品制备中的应用。

本发明的第一个目的是提供一种体外制备的稳定的 RNA 分子，所述 RNA 分子包括：编码目的蛋白的区域；以及，

设置在所述目的蛋白的编码区上游的 IRES 序列；以及，

设置在所述 RNA 分子两端的保护性 RNA 二级结构。

进一步地，所述保护性 RNA 二级结构为小核仁 RNA(SnoRNA)序列或/和 Triplex 序列。

进一步地，所述小核仁 RNA 序列选自 H/ACA box snoRNAs、C/D box snoRNAs、小卡扎尔体 RNA(scaRNAs)中的一种或多种。

进一步地，所述 Triplex 序列为具有三螺旋结构的 RNA 序列。

进一步地，所述 RNA 分子还包括：

5' 端设置在保护性 RNA 二级结构之后的 5' UTR 序列，以及，3' 端设置在保护性 RNA 二级结构之前的 3' UTR 序列。

进一步地，所述目的蛋白为一个或多个。

进一步地，所述目的蛋白为一种或多种抗体；或，一种或多种抗原；或，一种或多种基因编辑酶；或，一种或多种调节因子；或，一种或多种荧光蛋白。

进一步地，所述目的蛋白包括：人凝血因子 IX (hFIX)、肺表面活性蛋白 B 抗体(SP-B)、血管内皮生长因子 A (VEGF-A)、甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶 (hMUT)、人促红细胞生成素 (hEPO)、囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR)、Cas9 内切酶、Cpf1、锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活剂样效应子核酸酶(TALENs)、抗 HIV 抗体、fbr CD19 和 CD22 双特异性抗体、fbr CD3 和 CLDN6 双特异性抗体、Gaussia 荧光素酶 (Glue)、 Firefly 荧光素酶 (Flue)、增强型绿色荧光蛋白 (eGFP)。

进一步地，所述目的蛋白为多个时，每个目的蛋白的编码区上游的 IRES 序列均不相同。

进一步地，所述 IRES 来自以下病毒的 IRES 序列：陶拉综合征病毒、铁人三项瘤病毒、泰勒脑脊髓炎病毒、猿猴病毒 40、红火火蚁病毒 1、禾谷缢管蚜病毒、网状内皮组织增生症病毒、富曼脊髓灰质炎病毒 1、克什米尔蜂病毒、人鼻病毒 2、人免疫缺陷病毒 1 型、Himetobi

P 病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、GB 肝炎病毒、口蹄疫病毒、人肠道病毒 71、马鼻炎病毒、脑心肌炎病毒、果蝇 C 病毒、蟋蟀麻痹病毒、牛病毒性腹泻病毒 1、黑蜂王细胞病毒、蚜虫致死性麻痹病毒、禽类脑脊髓炎病毒、急性蜜蜂麻痹病毒、木槿褪绿环斑病毒、经典猪瘟病毒、猿猴小核糖核酸病毒、芜菁皱缩病毒、柯萨奇病毒 B3 或柯萨奇病毒 A。

进一步地，在目的蛋白为多个时，多个目的蛋白的编码区上游的 IRES 序列为不同序列。

进一步地，5'UTR 序列选自 RNA 结合蛋白家族或 YTHDF 家族；3'UTR 序列选自人 α -珠蛋白 1 (HBA1)、人 α -珠蛋白 2 (HBA2) 小鼠 α -珠蛋白、人 β -珠蛋白、xrRNA 或 Apt-eIF4G。

本发明的第二个目的是提供所述体外制备的稳定的 RNA 分子的制备方法，包括如下步骤：

S1、分别扩增 RNA 聚合酶启动子、保护性 RNA 二级结构序列、5' UTR 序列、3' UTR 序列、IRES 序列和目的蛋白的编码基因序列，连接到空载体上得到表达载体；

S2、将 S1 步骤得到的表达载体经过酶切线性化，经过体外转录合成所述 RNA 分子。

进一步地，所述方法还包括采用递送系统封装所述 RNA 分子。

进一步地，所述递送系统包括脂质纳米颗粒、脂质体、脂质复合物、高分子材料、胶束、多肽、鱼精蛋白中的一种或多种。

本发明的第三个目的是提供所述体外制备的稳定的 RNA 分子的应用，所述应用包括疫苗产品制备或体内原位 CAR 治疗产品制备中的应用。

本发明的 polycisRNA 有效解决了以下问题：

(1) 目前个体化过继细胞治疗中因异体移植免疫排斥引发的耗时、耗资源、成本极其昂贵的制约问题：基于本发明的多顺反子 RNA 技术，可以开发出 isCAR-T/isCAR-M “现货型”新型免疫疗法，以多顺反子 RNA 为载体，在体内原位直接生成 CAR-免疫细胞，并通过多种效应蛋白协同作用，增强疗效；因 mRNA 的特性使开发的免疫疗法避免了个体化治疗复杂的过程，并具有剂量-时间依赖性疗效特性，临床安全性很高。

(2) 本发明针对 mRNA 结构进行改造，去除 5'帽子结构和 3'polyA 尾且保留 mRNA 蛋白翻译功能，并依赖 SnoRNA 序列或 Triplex 序列提高 mRNA 稳定性，在生产过程中仅需以 DNA 为模板进行体外转录即可得到产品，无需加帽加尾或环化环节，极大的节约了生产时间，降低了生产成本。

(3) 本发明仅以一个 mRNA 分子表达多种效应蛋白，不同于以单顺反子 RNA 表达不同蛋白所需的多个 mRNA 分子，在成药过程中避免了药物成分均一性问题，提高了安全性和药物批次平行性，为后期临床应用提供了保障。

本发明的有益效果是：

本发明重新设计了 mRNA，在 mRNA 两端添加保护性 RNA 二级结构来保护 mRNA 不被 RNA 外切酶切割，提高 RNA 的稳定性，并使用 IRES 来替代 5’ 端 m7G 帽子结构招募核糖体启动蛋白翻译，使 mRNA 保留翻译功能，增加其稳定性，而不需要在其两端分别加帽加尾，极大地降低 mRNA 制备的成本、并提高 mRNA 体外生产的效率。此外，本发明在此基础上，构建了多顺反子 RNA 平台，使用 IRES 来分别表达多个蛋白序列，弥补了单顺反子 RNA 技术不能同时表达多个功能性蛋白的不足。

附图说明：

图 1 为向 293T 细胞中转染编码绿色荧光蛋白线性 RNA 72 小时后的流式细胞分析结果图；

图 2 为实施例 1 构建的质粒 IVT 后得到的线性 RNA 转染 293T 细胞 48 小时后进行流式细胞分析的绿色荧光蛋白阳性细胞数目结果图；

图 3 为图 2 分析结果的柱状图分析；

图 4 为图 2 流式细胞分析的 MFI 结果分析图；

图 5 为实施例 3 CAR 疗法的概念图。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步说明，以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施，但所举实施例不作为对本发明的限定。

缩略语：

GFP Green fluorescent protein 绿色荧光蛋白

ORF Open reading frame 开放阅读框

IRES Internal ribosome entry site 内部核糖体进入位点

UTR Untranslated region 非翻译区

HEK Human embryonic kidney 人胚胎肾脏

EMCV Encephalomyocarditis virus 脑心肌炎病毒

表 1 常用保护性 RNA 二级结构序列

snoRNA116-13 (SEQ ID NO.1)	gagtgagatcttgaccaatgatgacttcatacatgcattccttggaagctgaacaaaatgagtgggaa ctctgtactatcatcttagttgaactgaggtccaccgggggctaa
snoRNA116-14 (SEQ ID NO.2)	aagattgtgtgtggatcgatgatgacttccatatatacattccttggaagctgaacaaaatgagtgaaac tctataccgtcattctcgtcgaactgaggtccagcacattactccaacag
Triplex-c14	aaaggttttctttcctgagaaatttctcaggttttgcttttaaaaaaaaaagcaaaa

(SEQ ID NO.3)	
Triplex (SEQ ID NO.4)	gattcgtcagtaggggtgttaaagggttttcttttctgagaaaaaacctttgttttctcaggttttgcttttgg cctttccctagctttaaaaaaaaaaaaagcaaaa
SNORD49B (SEQ ID NO.5)	ctgatgatacttgaataggaagtgccgtcagaagcgataactgacga
SNORD49A (SEQ ID NO.6)	tgctctgatgaaatcactaataggaagtgccgtcagaagcgataactgacgaagactactcctgtctgatt

表 2 常用 IRES 序列

HRV B3 IRES (SEQ ID NO.7)	ttaaaacagcggatgggtacccaccatccgaccactgggtgtagtactctggtactctgtacctttgtacgcctgttcttccc attgtacccttctgaactccaaccaagtaacgttagaagctcaacatttagtacaacaggaagcaccacatccagtgggtg tttagtacaagcacttctgtttcccgagcgaggtataggctgtaccactgccaaaaaccttaaccgttatccgccaacca actacgtaaaagctagtagtattatgttttaactaggcggttcgatcaggtggatttccctccactagtttggtcgatgaggct aggaattccccacgggtgaccgtgtcctagcctgcgtggcgccaaccagcttatgctgggacgccttttatagacatggt gtgaagactcgcattgtgcttgggtgtgattcctccggcccctgaatgcggctaaccttaaccctggagccttgtgcacaaacc agtgatgataaggtcgtaatgagcaattccgggacgggaccgactacttgggtgtccgtgttcttatttttcttattattgtctt atggtcacagcatatataacatatactgtgac
HRV B4 IRES (SEQ ID NO.8)	ttaaaacagcggatgggtttccaccatccgaccactgggtgtagtctggtattttgtacctttgcacgcctgttccatt tgtacccttcctaatctccttccccgtaacgttagaagtttggaaattttaagtaacaataggaagcgccacatccagtgggtg ttgcgtacaaatacttctgtttaccggagcgaggtatagggtgtaccacggccttaaccgttatccgccaatca actacgtaacggctagtagtattcttcttggatttgggtgttcgatcaggtgggtatccccactagctgtggtcgatgaggctagg aattccccacggcgaccgtgtcctagcctgcgtggcgccaaccagcttttctgggacgccttttcaaagacatggtgtg aagacctgcatgtgcttgggtgtgagtcctccggcccctgaatgcggctaaccttaaccctggagcccagcagcataatccaa tgttgttgggtcgtaatgagcaattccgggacgggaccgactacttgggtgtccgtgttcttattcttattcttattgtcttatg gtcacagcatatataatataactgtgac
HRV B93 IRES (SEQ ID NO.9)	ttaaaacagtgatgggtttcctaccatccgaccactgggtgtagtctggtatattgtacctttgcacgcctgtttccat tgtacccttcctaaattcctccccatgaacgttagaagtttaagaacataaatgtacaataggaagcatcacatccagtgggt gtatggtacaagcacttctgtttatccggagcgaggtataagcggtaccactgctgaaagccttaaccgttaaccgccaat caactacgtaacggctagtagtattcttcttgaatctggcggttcgatcaggtgggttccccactagtttggtcgatgaggcta ggagtccccacggcgaccgtgtcctagcctgcgtggcgccaaccagcatttctgggacgcctttttagacatggtg tgaagacctgcatgtgcttgattgtgagtcctccggcccctgaatgcggctaaccttaacccggagccttgtacataatcca atgtcattaaggtcgtaatgagcaattcgggacgggaccgactacttgggtgtccgtgttcttattcttattcttattgtctta tggtcacagcatatataatacatataactgtgac
HRV EV107 IRES (SEQ ID NO.10)	ttaaaacagcctgtgggtgttccaccgcagggccactggcgctagcacactgggtatcccggtaccctgtgcgcctgtt ttataaccctcccccttagtaacttagaagtagtattcaaacggtcgacaggcggtcagtcaccaactgagtcagtgacca

	agcacttctgttaccgggactgagtatcaataagctgttcacacggctgaaggagaaacgttcttaccggccaattact tcgagaaacctagtagaccatgaaggttgcgcagtgtttcgtccacacacccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccg cattccccacggcgaccgtggcggtggctgcgttggcgccctgccatggggcaacccatgggacgttcaatactgacat ggtgtgaagagtctattgagctaattgtagtctccggcccctgaatggcgctaataccaactgtggagcagatactcaca accagttagcggtctgtcgtaacgggcaactccgcagcggaaccgactacttgggtgtccgtgtttttttattcttacttg gctgcttatggtgacaattgacaaattgttaccatatagtattggattggccatccggtgacaaacagagctattgtttacttg tttgttggttcataccattaaattacaaggtcttagaaactctcaactttttttgacactcaatacagcaaa
--	--

表 3 其他 IRES 序列

iCV A20	ttaaaacagctctggggtgtaccaccccagaggcccacgtggcggttagtactccggtattacggtaccctgtacgctgtttatactccct ccctcgtaacttagaagcacaaaaccaagttcaatagaaggggtgcaaaccagtaccaccacgaacaagcatttctgttccccgggtgat gttgtatagactgcccgcggttgaaagcaacggtagcgttaccgctcaagtagtctcgagaagcctagtattaccttgaatcttcgatgcgt tgcgttcagcactcgaccctggagttagcttagctgatgagctggacgtccctcaccggtgacggtgtccaggctgctgttggcggttac ctatggctaaccgcataggacgctagtgtgaacaaggtgtgaagagcctattgagctacttgagagtcctcggccctgaatggcggtaat cctaaccatggagcaggcggtcacagaccagtgtactgctgtatgcgaagtctatggcggaaccgactacttgggtgtccgtgtttc cttttttttattatggctgtatggtagacaatcattgattgtatcataaagcgaattggattggccatccggtgaaagcgagacttactattactt acttgttggacttaccacacttaatacattatttctagggtgctactgtatagcaattagaatcaaacagttgcatcata
iEch oV- E11	ttaaaacagcctgtgggtgtaccaccccacaggggccactggcgctagcacactgggtatcacggtacccttgtgcgctgtttataccccct tcccgcaaccgcaaattagaagcaaagctaaccgcatgcatagcggatgcgcatgccagccgcattttgatcaagtagtctgtttccccgg accgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgtccgttaccgaccaactacttcgagaaacctagtaacatcatgaatgt tgcaggggcgtttcgatcagcacgaccctggtgtatagatcaggctgatgagtcaccgcattccccacgggtgaccgtggcggtgtgctgtg cggcctgcctatggggtgaccataggacgctctaatacggacatggtgcgaagagtctattgagctagttggtagctcctccggccctgaat gcggttaactcctaactgcggacgacataccctaatccaaggggcagtggtgcgaacgggcaactctgcagcgggaaccgactacttgggt gtccgtgttctttttttatactggtgcttatggtgacaatctcagagttgttaccatatagtattggattggccatccggtgagcaacagagc tgcatttatcagttgttggcttatacctctaatacacagggttttttttttgaacgctgtattcatcttaaccctcaataaggcaaa
iSim ianE V-A	gagtgtccacccaacaggcccactgggtgtgtactctgttattacggtacctttgtacgcctattttttcccccccttttgaacttagaagt taataataaacacgctcactaggtgcactacatccagtagtgaatgagcaagcacttctgtctccccgggagggtatattggtacgtgtgc aaacggcggaataatcctaccgttaaccgcccactactccgagaagcctagtacctaattggattatcaatggagttgcgtcagcagg tgaccctgacctgcagctccggctgatggacctgggtttccccacaggcgactgtggccagggtcggtgacggcgccgcccacccccct ggggtgggacgccttgataatgacaaggtgggaagagcctattgggttagctgtttctccggccctctgaatgcggtaaccttaaccccag agcatatggttagcaacccagctactagtatgtcataatgcgtaagctgggagtgaggaccgactacttggagagtcctgtttctattgttttaa tcaatcttatggtgacaatttatagtgccctgagattgattggtgtgtctttgacaattattgagacatcacatagacata
iCov id19	attaaaggtttataccttcccaggttaacaaaccaacacatttgcattctttagatctgttcttaaacgaactttaaaatctgtgtggctgtcact cgggtgcatgcttagtgcactcacgcagtataataaactaattactgtcgttgacaggacacgagtaactcgctctatcttgcagggtgctta cggtttcgtccgtgttgacggcatcatcagcacatctagggttcgtccgggtgtgaccgaaaggtaag
iHR V-A 57	ttgtttgatgccagttttatctcccccccaattgcaacttagaagatglacacaaagaccaataggcagtggtcaccagaccactgaagggtc aagcacttctgtctccccgggtcaaagttgatgtccaacaggggcaaaaacaaacttagatcgttatccgcaaagtgctacgcaaagcttag taccatctttgagagcctatggttggctgctccactgaaccccacagtagacctggcagatgaggctagaagacccccactggcgacagtggt ctacgtgcgtggtgctgctgcacaccttacgggtgtgaagccatatgttgacaaggtgcgaagagccccgtgtgctcactttgagctcctcg gccctgaatgttgctaaccttaacctgcagctagtgcacacaagccagtggtgtgtagtgcgaatgagcaattgcgggatgggaccaact acttgggtgtccgtgttccacttttaccctttatttgcctatggtgacaatatatatagatatattggcacc
iEch oV1 1	ttaaaacagcctgtgggtgtaccaccccacaggggccactggcgctagcacactgggtatcacggtacccttgtgcgctgtttataccccct tcccgcaaccgcaaattagaagcaaagctaaccgcatgcatagcggatgcgcatgccagccgcattttgatcaagtagtctgtttccccgg accgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgtccgttaccgaccaactacttcgagaaacctagtaacatcatgaatgt tgcaggggcgtttcgatcagcacgaccctggtgtatagatcaggctgatgagtcaccgcattccccacgggtgaccgtggcggtgtgctgtg cggcctgcctatggggtgaccataggacgctctaatacggacatggtgcgaagagtctattgagctagttggtagctcctccggccctgaat gcggttaactcctaactgcggacgacataccctaatccaaggggcagtggtgcgaacgggcaactctgcagcgggaaccgactacttgggt gtccgtgttctttttttatactggtgcttatggtgacaatctcagagttgttaccatatagtattggattggccatccggtgagcaacagagc tgcatttatcagttgttggcttatacctctaatacacagggttttttttttgaacgctgtattcatcttaaccctcaataaggcaaa
iCrP V	ttctagcactagtaaagcaaaaatgtgatcttgcgtgttaatacaatttgagaggtaataaattacaagtagtgctattttgtattaggttagcta tttagctttacgttccaggatgcctagtggcagccccacaatatccaggaagccctctgcgggttttcagattaggtagtcgaaaaacctaag aaatttacctgtacattcaagataatctagccacc
iHR V-A 89	ttaaaactgggagtggtgttccactcactccaccatgcgggtgtgtactctgttattacggttaactttgtacgccagttttccacccttccc ataataacttagaagttgtacaatatgaccaataggtgacaatcatccagactgtcaaaggtaagcacttctgttccccgggtcaatgagg atatgtttaccaaaggcaaaaaccttagagatcgttatccccacactgcctacacagagccagtagccatttttgatataattgggtgtgctgc ccctgcaaacccagcagtagacctggcagatgaggctggacattccccactggcgacagtggtccagcctgcgtggtgctgctcaccctt

	cttgggtgagaagcctaattattgacaaggtgtgaagagccgctgtgctcagtggtcttcccgccctgaatgtggctaaccttaaccttg cagccgttggccataatccaatgggttgcggtcgtaatgcgtaagtgcgggatgggaccaactacttgggtgctcgtgttctgtttctttga ttgcattttatggtgacaatttatagtgatagattgtcatc
iHR V-B 26	ttaaaacagcggtggttatcccaccacccgacccactgggtgtgtacactggatattgtaccttgtatgctgttgcacctccccacccttc caattacccttaccgaattgtattatgcggtaacattagaagaagtgaacacagtgcaataggacgtatcacatccagtgtataaagcaca agcaattctgttccccggagctggatagactgctaactggttgaaggtccttaaccgttatccgccaaccaactacgacacggctagtaa tatcatgtttgtcttgagcgttcgatcaggtgaattccccattcactagtttggctgatgaggctgagaactccccacaggtgactgtgtcagcc tgcgtggcgccaaccacgacggtgggacgcccactgatatagacatgggtgaagaccaattgtgcttgggtgtgactcctccggcccc tgaatgcggctaacctcaacccggagcctttagtgtaagccaacacatacaaggctcgtaatgggaactctgggacgggaccgactact ttgggtgctcgtgttctttattttatctttgtgtctattggttacaagtattgattgaacc
iBE V1	ttaaaacagcctgggggtgtaccacccctggggccacgcgccagctacttggtagcgtagtaccttgtacgctgttttccccaccct taataaattaagattaccactgctgtggggagtagtcgactccgacccgatacgtcgcaccagtgaactggttcgcttagaaccttgcacg gagcagctggtatccccccgtaactagaagcctggacaaaccgaccaatagaggcgtttagccagcagcgcaacggtcaagcactt ctgtttccccggcgcatgctgcttaccgccccgctactgcgggaagcctagtaggaccccaatcgagcgcggttgcgttcagccac aaccacagtggtgactctgaggaatgggactcgcctacccccacagcaatgtggtggctgtcgcgtgtgtcctcgggtcgtcgttgagc gatcaccgcaactctgagtaaggctcaagagcctactgcgtaggctgggttctcctccggagccgtgaatgctgtaatccaacctccgag cgtgtgcgcacaaccagtggtgctacgtcgtaatgcgtaagtggaggcgaacagactacttccggtactcgtgttcttaattttgttcatta ttacatggtgacattgactgacattgtgaattgccccgctgccttgaacatagctcttattacttgattgcatttcacaaaacaacccaactca ctgttgaactgttgactcgcagctacttgaacttacagtacaatcacattcaca
iEch oV1	ttaaaacagcctgtgggtgttcccaccacagggcccactgggcttagcacactggtatcacggtaccttgtgcgctgtttatactcccc ccctaaggaaactttagaagcaaagcaattgtgatcaatagtggtatggcacaccagtcatactttagatcaagcacttctgttccccggactt agtaccaatagactgctcaagcgggtgaaggggaaaacgctcgttatccggccaactactcagagaaacctagtagcaccatgaaagtgc ggagtgttcgtcagcacttccccggttagatcaggctgatgagtcaccgtattcccacggcgaccgtgacggtggtcgtgtggcggc ctgcccattgggtaacccatgggacgctctaaaacagacacggtgcgaagagctattgagctagtgtgtagctcctccggccccctgaatgcg gccaatcctaactgcggagcacatactcccaatccaggagcagtggtgcgtaatgggtaactctgcagcggaaccgactacttgggtgtc cgtgttcttttattctacattgactgcttatggtgacaattgaaagattgtaccatatagctattggattggtcatccggtgagcaatagagctatt gtttatcaattgttgattgtaccactcaactttctgtttgagaacactcaactacatcttactgctaaacacatcaaa
iHR V-A 21	ttaaaactgggtccaggtgttcccacctggatctctattggagttgtactctatttccggtaattttgtacgccagtttatctcccctccccaat tgcaacttagaagttatcaatatgaccaataggcggtagttagccaaactaccagaggtaagcacttctgttccccggtaaaagtgtatag ctccaacagggcaaaaacaactgagatcgttatccgcaaagtgcctacgcaaagcctagtaacaccttgaagattatggttggctgttccg ctatttcccatagtagacctggcagatgaggctagaaattccccactggcgacagtggtttagcctgctggtgctgctgcaccccttgggtg cgaagccatacattggacaaggtgtgaagagccccgtgtgctcactttagtctcctccggccccctgaatgtggctaaccttaacctgcagta gtgcatgtaatccaacatgttgctagtcgtaatgagcaattgcgggacgggaccaactacttgggtgtccgtgttcttcttttaattattgct tatggtgacaatatataaacaatatattgacacc
iPV 1	ttaaaacagctgtgggtgttaccacccagagggccacgctggcggttagtactccggtattgctgtaccctgtacgctgtttatactccct tccgtaacttagagcgcacaaaaccaagttcaatgaagggggtacaaccagttaccaccggaacaagcacttctgttccccgggtgatg tcgtatagactgcttgcgtggttgaagacgaggtatcgttatccgcttagtactcagagaagcccagttaccacctcggaatctcgatgctgtg cgctcagcactcaacccagagtgtagcttaggctgatgagctggacatccctcaccggtgacggtggtccaggctgctgtggcgccctac ctatggctaacgccatgggacgctagtgtgaacaagggtgtgaagagcctattgagctacataagaatcctccggccccctgaatgcggtaat cccaacctcgagcaggtggtcacaaccagtgattggctgtcgtgaacgcgcaagtccgtggcggaaccgactacttgggtgtccgtgtt ccttttattttattgtgctgcttatggtgacaatcacagattgtatcataaagcgaattggattggccatccggtgaaagtgagactcattatctac tgttgcgtggtacgctccattgagtggttactctaagtacaattcaacagttatttcaatcagacaattgtatcacc
iEM CV	ccccctccccccccccccctaacgttactggccgaagcggcttgaataaggccggtgtgctgttgtctatgttattttccaccatattgccgt cttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctgacgagcattcctagggtcttccccctcgcgcaaaaggaatgaaggtctgt tgaatgctgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaaacagctctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccacct ggcgacaggtgctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaagggcgacacacccagtgccacgttgtgagttggata gttgtggaaagagtc aaatgctctcctaagcgtattcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctg gggctcgggtacacatgcttcatgtgtttagtcgaggttaaaaaaacgttaggccccccgaaccacgggacggtgttcttcttgaaaaa cacgatgataatatggccacaacc
iHC V	gccagccccgattgggggagacactccaccatagatcactccccctgtgaggaactactgtcttcacgcagaaagcgtctagccatggcggt agtatgagagtcgtgcagcctccaggacccccctcccgaggagaccatagtggtctgcggaaccgggtgagtagaccggaattgccagga cgaccgggtcttcttggatcaacccgctcaatgcctggagattggcggtgcccccgcaagactgtagccgagtagtgtgggtcgcgaa aggccttgggtactgctgatagggtgttgcgagtgccccgggaggtctcgttagaccgtgcaccatgagcacgaatcctaaacctcaaag aaaaaccaaacgtaac
iCV B5	ttaaaacagcctgtgggtgttcccaccgcagggcccactgggcccagcactctggtatcacggtaccttgtgcgctgttttaaaaccctc tcccaatttgaaacttagaagcaataacacctgatcaatagtaggcatgacacgccaagcctgtttagatcaagcacttctgttccccggact gagtatcaataaactgcttgcggtcgaaggagaaaacgtccgttaccgactaactactcagaaacccagtaacaccatggaaattg cggagtggttactcagcacattccagtgtagatcaggtcgtatgagtcaccgacttccccacgggtgacggtggcggtggtcgtgtggcg cctgcccattggggcaacccatgggacgcttcaatatggacatgggtgaagagctattgagctagttagtagtctcggccccctgaatgcg gctaactctaactgcggagcagctgctcctcattccagggggtggcgtgtcgtgaacgggcaactctgcagcggaaccgactacttgggtgtcc gtgttcttttaattttatactggctgcttatggtgacaattgaaagattgttgcataatagctattggattggccatccggtatccaacagagcaattg tgaccttttggattgtaccacttaccagaacaagtttcatcactgtgttacctattagactaaacacagaaaa

iSwi neV esic ular	ttaaacagcctgtgggtgttccacccacagggcccactgggcgctagcacactggtatcacggtacctttgtgcgctgtttgacttaccct ccccaaacgcaacttagaagcacaactaaatggtcaataggcgggctcagatgccaactgagtcgcatcaagcacttctgttaccgccgga ctgagtagcaataggtgtcagcggtgaaggggaaaccgttctgtaccgactaactctcgagaaacctagtaccaccatgaaagt gcgagcgtttcgtccgcacacccaggtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcaaaccacggcgaccgtggcggtggtgctgctg gcggtcgtccatgggcaactcatgggacgttcaactgacatggtgcgaagagtctattgagctagtgtgtagtctccggccctgaa tgcggtaatcctaactgcggagcagataccacgcaccagtggtgagctgtgtaattgggcaactctgcagcggaaccgactactttgg gtgtccgtgtttcctttgttatactggctacttatggtgacaattgagagattgaaccatattgctattggattggccaccggcgacgaatag aacagttgcttaccgtttgttagtctcgtatcactgaactcaaatccttaaacacccttaatttcgtcataacgctcaatcgttaaa
iHR V-A 2	atccaggtgttccacctggatttccacagggagtggtactctgttattacggttaacttgtacgagtttatctccctccccatgttaacttag aagttttcacaaagaccaatagccggaatcagccagattactgaaggtcaagcacttctgtttcccggtcaatgttgatgtccaaacagg gcaaaaacaactgcgatcgttaaccgcaaagcgctacgcaaagcttagtagcatctttgaaatcgtttggtgctgcatccgcatcttccct ggtagacctggcagatgaggctagaatacccccactggcgacagtgtttagcctgctggtgctgcacacctatgggtgtgaagcca aacaatggacaaggtgtgaagagccccgtgtgctcgtttgagtcctccggccccctgaatgtggtaaccttaaccctgcagctagagcagct aaccatgtgtatctagctgaatgagcaattgcgggatgggaccaactactttgggtgtcgtgttctacttttcttattattgttatggtgac aatatatacaatataatattggcacc
iHR V-C 3	ttaaagctggatcatggtgttccacccatgattaccacgcgggtgcagtggttctgtattacggtacatttccataccagttttatacaccacccc cgaaactcatagaagttgtacacaatgaccaatagggtgtggccatccaggtcgtaaatggtcaagcacttctgtttcccgccgacccctgtat acgttccacccgagggcgaataatgaggtgtcgttatccgcaaagtgcctacgaaaagcctagtaaacatttgaacccatggtgtgctgct cagctgtttaccaacagtagacctggcagatgaggctagacattccccaccagcgatggtgtgctagcctgcgtggtgctgcacacct gccccgtgtgaagccagaaagtggacaaggtgtgaagagcctattgtgtcactttgagtcctccggccccctgaatgtggtaaccctaacc ccgtagctgtgcatgtaaccaacatgtatgcagtcgtaattgggcaactatgggatgggaccaactactttgggtgtcgtgttctctgtttactt ttcattgtctatggtgacaattgtatctgatacactgtgtacc
iHR V-C 11	ttaaactggatacaggtgttccacctgtatcaccaagtggtgtggtgctctgtattcgggtacgtttgcacgccagttgtaccccttcccttt acgtaacttagaagtttacacaagaccaataggcgggtggttaattccataccactaacggtcaataacttctgtttcccggtatgcgaggaa taggtcctaaaagggtgtaagccactaggtgtcgttatccgcatgtgtactacgcaaagcctagtattaccttgaataattctgtgctgctcc accagatacccccactggttagacctggcagatgaggcaggaacttaccacactggcgacagtggctcctgctgctggtgctgctgcacacccc ttacggggtgtgaagcccagaaacagacaaggtgtgaagagccccgtgtgctactagtgagtcctccggccccctgaatgcggtaattctac cccacagctgttcacgcaaaccagcgtgtatgcagtcgtaattgagcaattgtgggatggaaccgactactttgggtgtccgtgttcttttattc ctattattgttattggtgacaatattgatattatcagttgttcac
iCV B1	ttaaacagcctgtgggtgttccacccacagggcccactgggcgctagcactctggtatcacggtacctttgtgcgctgtttacatccccctccc caaatgtaattagaagttcacacaccgatcattagcaagcgtggcacaccagccatgtttgatcaagcacttctgttaccgggactgagt atcaatagaccgctaaccggttgaaggagaaaacgttcttaccggccaactacttgcgaacacccatggaagtgcgga gtgttctgctcagcactacccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccggttccccacggcgaccgtggcggtggtgctggttggcggtcgt ctacgggggaaaccgtaggacgctctaatacagacatggtgcgaagagtctattgagctagtgtgtaacctccggccccctgaatgcggct aatcctaactgcggagcacataccctcaaacagggggcagtggtgtcgaacgggcaactctgcagcggaaccgactactttgggtgtccg gtttcattttattcctatactggctgcttatggtgacaattgttaccatagttattgattggccatccgggtgactaacagagcaattat atatctcttgttgggtttataccacttagctgaaagaggttaaacactacatctcatcattaaactaaatacaacaaa
iPV 2	ttaaacagcctgtgggtgttccacccacagggcccactgggcgctagcactctggtatcgcggtacctttgtacgctgttttatactccct tccccgtaacttagaagcacaacgtccaagttcaatagaaggggtacaaccagtagaccaccagcaacaagcacttctgttccccgggtg aggctgtataggctgttccacggcctaaaagcggtgatccgttatccgctcagtagtctcgagaagcctagtatcaccttgaatctcgtatgcg ttgctcacaactcaacccagagtgtagcttaggtcgatgagtcgtgacgttctcaccggcgacggtggtccaggctgctgttggcgccct acctgtggcccaaagccacaggacgctagttgtgaacaaggtgtgaagagcctattgagctacctgagagtcctccggccccctgaatgcgg ctaactcaaccacggagcagggcagtggaatccagcgaccagcctgtcgaacgcgcaagttcgtggcggaaccgactactttgggtgtc cgtgttctttttttacaatggctgttatggtgacaattattgatattatcataaagcaaatggattggccatccgggtgagaattgattattaa attactcttctgttgggattgtcctttgaaatcctgtgcactcacacctattggaattacctcattgttagatattattaccact
iHR V-B 17	ttaaacagcggatgggttccaccatccgaccactgggtgtgtagtactctggtattttgtacctttgtacgctgttttccctacctcccaacct aaacaatcctgtaacttagaagacttaaatcatcgtacaatagggtgtgtcacatccagtgacggctagtagaagcacttctgttccccggga gcggagtataaatggccaccgctgtcaaaagcttcaaccgttatccgcaatfaactacgcaacggctagtagaactctgttatttttagggcgt tcgatcaggtgagtagaaacccctcactagctgtgctgatgaggtgagaattccccacgggcgaccgtgtctcagcctgctgtggcgccagcc cagctaattgctggagcgccttaattgtgacatgggtgtgaagaccacgctgtgcttaattgtgagtcctccggccccctgaatgcggtaacctaa accctggagccttgagacacaatccagtggtggcaaggtcgaatgagtaattccgggacgggaccgactactttgggtgtccgtgttctttta tttcaaatgttcttatggtcacaatataagtaataattgtgatc
iEch oV- E15	ttaaacagcctgtgggtgtaccacccacagggcccactgggcgctagcactctggtattacggtacccctgtgcgctgttttatacacc gccccaaagcaaacgtagatgtaacgcacttatgatcaatagcaggcgtggcactccagccacgttatgatcaagcacttctgttccccgg accgagtagtaatagactgtcacgcggtcgaaggagaaaacgttctgttaccgaccagctacttgcgagaacccatagtaactccatggagg ttgacagagtgttctgtcagcacttccccgtgtatagcaggtgatgagtcaccggttctcagggcgaccgtggcggtggtgctgctgttggc gctgtcctatgggtataccataggacgctctaatactgacatggtgcgaagagctattgagctagtgttgcctccggccccctgaatgcg gtaactcctaactgcggagcacatacccccacccagggggcagtggtgtcgaacgggtaactctgcagcggaaccgactactttgggtgtc cgtgttcttttattcttactattgctgttatggtgacaattgagagattgtaccatatagtattgattggccatccagtgactaacagagctatt attacccttttgttggctcgtatcacttgggtttaaagaggttagtactttattgtcattatattactaaacacagagaaa
iEV 71	ttaaacagcctgtgggtgtaccacccacagggcccactgggcgcaagcactctggtacccctgggtacctttgtgcgctgttttatacacc ccccagtgaaacttagaagcagcaaacacgatcaatagcgggcataacgctccagttatgtcttgatcaagcacttctgttccccggact

	gagtatcaatagactgctcgcgcggtgaaggagaaaacgttcgttatccggctagctacttcgggaacacatgaaagttgc ggagagcttcgtcagcactccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggcgaccgtggcggtgctgcttggcgg cctgcccattgggtaacccatggggcgctctaatacggacatggtgtgaagagctactgagctagtagtctccggccccctgaatgcg gctaatcccaactgcggagcacacgcccacaagccagcgggtagcgtgctgaacgggtaacttgcagcggaaaccgactacttgggtgt ccgtgtttctttatcttatactggctgcttatggtgacaattaaagaattgtaccatatagtctattggattggccatccggtgtgcaacagagcaa ttgtttacctattcattgtttcgtaccattaaccttgaagtcgtgaccacccttaactacatcttgacccttaacacagctaaac
iHR V-A 9	ttaaaactggatctgggtgttcccactcagatctcccacgtggagtagtacactattattacggtaaatcttgtagccagtttataatccccttacc caagtaacttagaagataaacaacaaagaccaataggagatgatcatccagatcatcataggtaagcacttctgtttccccgggtcaagggtg atatgtcttaacagggcaaaaacagctgagatcgttatccgcaaaagcgctacgcaaaagcctagtaactatctggaagttgctgtggttgcg ctccgcatatcccattggtagactggcagatgaggctagaaattcccactggtagacagtggttagcctgctgctgctgacacccct gggtgtgaaaccaagtaattggacaggggtgaagagccccgtgtgctgctttagtcctccggccccctgaatgtggctaacccttaaccctgc agctagggcacacaatccagtggtatctagtcgtaatgagcaattgctgggatgggaccaactacttgggtgtccgtgttctgttttctttatgt ttgcttatggtgacaatatatagtaatatattggcatc
iSim ianV 4	ttaaaatagctgctgggtgttcccactccagcagggccactgggctgatactctggtattgctgggtaccttgtatgcctattttacctcccttcccc tgaacttagaagaaagaacaaacacgctcactaggtagacatccagcagtgtaatgagcaagcacttctgtttccccggaagggat atatggtacgctgtgcaaacggcggaattaatcctaccgttaaccgcccactctactccgagaagcctagtaactaattgaactatcaatgga gttgcgctcagcaggtgaccctgacctgccagctccggctgatggacctgggcatccccacaggcgactgtggcccagggtcgcgtggcgg ccggcccactctttagtggtggacgcttgataatgacaagggtgggaagagcctattgggttagctgtgttccctccggcctcgaatgcggct aaccttaaccccgagcatatggtggcaaccagccactggtatgtcgaacgcgtaagtcgtgggatgggaccgactacttggagagtc gtgtttcattattttcttattgaaatcttatggtgacaattgggagttactcgggtgacgattgattattacttctgaaaacgtagagatagaatca acaca
iEV- D94	ttaaaacagcctgtgggtgttcccacccagaggcccacgtggcgccagtagtactctggtatcacgggtaccttgtacgcctgtttatatcccct cccccgcaacttagaagaaaacaaatcaagttcactaggaggggtacaaaccagtagccaccagcaacaagcacttctgtttccccggtg atgtcgtatagactgtaaccacggtgaaaacgattgatccgttatccgctctgtacttcgaaaagcccagtagcaccttggaaatcttcgatgcgt tgcgctcagcactcaaccccagagtgtagcttaggtcgatgagcttgacactcctaccggcgacggtgtgcccagggtcgttggcgccct acctgtgttccaaagccacaggacgctagtgtgaacaagggtgtgaagagcctattgagctacaagagaatcctccggccccctgaatgcgg ctaactctaaccacggagcaagggtacacaaccagtgatatctgtcgtgaacgcgcaagtcgttggcggaaccgactacttgggtgtccg gtttcctttttttatcatggctgcttatggtgacaatctaagattgtatcatatagctgttggattggccatccggtaatttatgagatttgagcatt gctgtttcttcaacaatttccatttcatgtcatttcagcagctaaa
iSim ianA 5	ttaaaatagcctgtgggtgttcccacccacagggcccaagtggtgtagtacttgggtattccgggtaccttgtacacattttacaaacccctacc ctgttaaccttagaagcaattatttaaccgctcactagggggtgtgctatccaagcacatcaagagcaagcacttctgttccccgggagggg ctaattgtagcgtgtgcccacggcggaatgagccctaccgttaaccggcagctacttccgggaagcccagtaactacattgaaactttgag gctgtactcagcacataaccccaatgtgtatgttctggtcgatgagccttggcatccccacaggcgactgtggccaaggctgcgttggcgg ccagcctgcggaccaaagtcgtaggacgcctaattgtggacatggtgtgaagagcctactgagtagactgtatgctccggccccctga atgcgggctaactctaaccctggagcatccgctgcaaccagtagctaggggtcgtaatgcgtaagtcgtggatggaaccgactacttggg tgtccgtgttctgttttctacatctgggtgcttatggtgtacaactaattgttgaatcattggcagtgcgcgctgaccacgcgattattgatattccatt tgttgatactccaatagtgtaactcatatacacaaactttaccactgatcaagataaaa
iPV 3	ttaaaacagctcgtgggtgttcccacccacagaggcccacgtggcgccagtagtactctggtattgctgggtaccttgtacgcctgtttatactccct cccccggtgcaacttagaagaaatccacaaagttcaatagaggggtgcaaaccagcaccaccacgaacaagcacttctgtttccccggt gatgtcgtataagctgtaccacaggtgaaggcgacggatccgttatccgcttgtagtacttcgagaagcctagtagtattaccttggaaatcttcgacg cgttgcgctcagcacttaccocagtgtagcttaggtcgatgagcttggcagccccacggcgacggtgtgcccagggtcgttggcgg cctaccatggctatcaccatgggacgctagtgtgaacaagggtgtgaagagcctattgagctaccaagagtcctccggccccctgaatgcg gctaactctaaccacggagcaaggtcctcaaccacggggatggctgtcgaacgcgaaagtcgttggcggaaccgactacttgggtgtc cgtgttctttttttatgtatggctgcttatggtgacaatcaaaggtgttaccataaagcaatttgattggccatccgggtgagaatcaacat attatctactgttgttgggttttcttcttactgaacaatacctctaataataactgctatattgtcaataagacattatcatcaca
iHR V-C 54	ttaaaacagctgtgtggtgttcccaccaccagggcacactgtgctgtacactgggattccgggtcacttgtacgcctgtttgtatccccccaa cttatgtaatttagaagatgtacacaacgcccattaggatgcggcgaaccaggtccgcttagggcaagcacttctgtttccccgggtgtgtga atagacttaacaggggtgaagctgtagcactcgttatccgcgaactactacgcgaatgttagtagcatctgtgtgcaattgggatttcgctcc gcagaaaacccatctgtagattagggaatgaggtacacatacccactggcgacagtggtgtagcctgctggtgtccctaccagggcc atcttggcctgggattccacttacaagacaggggtgtgaaggcactagtggtgtagtctccggccccctgaatgcgggtaacttaacc ccgtagccccgcgaagtaaccaactgttaggtggtcgtaatgagtaattacgggatggaaccgactacttgggtgtccgtgttcttcttattct tatatttgcacatctatggttacaacataagtaatc
iHR V-A 100	ttaaaactgaatccagattgttccatctggatttccatcatggagttgtagtctattattccggtaattttgtacgcaggtttatcaccccttccccgt aacttagaagttgaaacaaaagaccaataggaggttaactatccaagtactataggtcaagcacttctgtttccccgggtcaaaagtgtatgtc ccaccaggggcaaaaacaattgagatcgttatccgcaaaagtgcctacgcaaaagcctagtagtatctgaaaagcatgtggttgggtcctccgct gtacccacagtaaacctggcagatgaggtcagaagtccccactggtagacagtggttagcctgctggtgctgctgcactctttagtgcg aagccatattgttgacaagggtgtgaagagccccgtgtgctcactttagtcctccggccccctgaatgtggctaacccttaaccctgcagtagtgc atgcaatccagcatgtggctagtcgtaatgagcaattgctgggatgggaccaactacttgggtgtccgtgttctcactttttcttataattgcttat gggtgacaatatatagtgatatattgacacc
iHR V-B 37	ttaaacagcggatgggtatccaccatccgaccactgggtgtagtactctggtattttgtaccttgtacgcctgttgttccctaatgtaccaccct aaaacttctaccaagtaacgttagaagttcatcaacaagtaacaataggaagcatcacatccagtggtgtttgtacaagcacttctgtttcc cggagcgaggtataggctgtaccactgcggaagccttaaccggtatccgcaaccaactacgtaaaagcctagtagtatcatcatgtttaaaat

	aggcggtcgcaggtggtacccccctccactagttggtcgatgaggctaggaactccccacgggtgaccgtgtcctagcctcggtggcggc caaccagctctgctgggacgccttttatggacatggtgtgaagactcgcgtgcttggtgtgactcctccggccccctgaatgcggtaacc ttaaccgagcctgtgttgcaatccagtaacattagggtcgtaatgagcaattcgggacgggaccgactacttgggtgtccgtgtttctca ttttctattattgtctatgggtcacagcatatataacgtatatactgtgac
iHR V-B 92	ttaaaacagcggtatgggtatcccaccatccggcccactgggtgtagtactctggtacattgtaccttgtacgcctgtttccccctctgtacccg ccctcaagctccttgcccaagtaacgttagaagttgaacattggtacaataggaagcatcacatccagtggtgtactgtacaaacacttctgtt gccccggagcggaggtatagatggtccccaccgtcaaaagccttaaccgttatccgcaatcaactacgtaattggctagtagcaccttggattt aagttggcgttcgatcaggtggttaacccccactagtttggctcgatgaggctaggaattccccacgggtgaccgtgtcctagcctcggtggcgg ccaaccagcatcggctgggacgccaattaatgacatggtgtgaagacctgcatgtgcttgattgtgagtcctccggccccctgaatgcggcta accctaaccgagccttgcagcacaatccaggtgtgtaaggctgtaatgagcaattctgggatgggaccgactacttgggtgtccgtgtt ctatttttctgaattttcttatgggtcacagcatatatacattatatactgtgac
iHR V-A 1	ttaaaactgggtgtgggtgttcccaccacaccaccaatgggtgtgtagtactctgttattccggtaactttgtacgccagttttccctccccccc atccttttacgtaacttagaagtttaataacaagaccaatagtaggaactctccaggtgtctaaggtaagcacttctgtttccccgggtgatgt tgatagtctcaacagggcaaaaaacaacagataccgttatccgcaaaagtgcctacacagagcttagtaggattctgaaagatcttgggtggt cggtcagctgcataccagcagtagaccttgcagatgaggctggacattccccactggtaacagtggtccagcctcggtggctgctgcgca cctctcatgaggtgtgaagccaaagatcggacaggggtgtgaagagccgctgtgctcactttgagtcctccggccccctgaatgcggtaacc ttaaactgcagccatggctcataagccaatgagttatggtcgtaacgagtaattgcgggatgggaccgactacttgggtgtccgtgttact tttctttattaattgcttatgggtgacaatataatattgatataatattggcatc
iHR V-B 14	tactctggtattatgtaccttgtacgcctgttcttccctacaaccccttctaaaactcccaccatgaaacgttagaagcttgacatttaagtaca ataggtggcaccacatccagtggtgtctacgtacaagcacttctgtttccccggagcgaggtataggctgtaccactgcaaaaagccttaac cggtatccgccaaccaactacgtaacagctagtagtcatctgttcttactggacgttcgatcaggtggattccccctccactagtttggctgatga ggctaggagctccccacgggtgaccgtgtcctagcctgctggcgcccaaccagctcatgctgggacgccccttaaggacatggtgtgaa gactcgatgtgctgtgtgtgagtcctccggccccctgaatgcggctaacccttaaccctggagccttatgccagcaaccagtggtgtgaaggtcg taacgagcaattccgggatgggaccgactacttgggtgtccgtgttctattttcttatattgtcttatgggtcacagcatatataaagtataact gtgac
iHR V-B 97	ttaaaacagcggtatgggttcccaccatccgaccactgggtgtagtctggtattttgtaccttgcacgcctgtttcccccttgtacccatcctg aatttctccctctgcaacgttagaagtttgtgaaataaaagtacaataggaagcatcacatccagtggtgttcagtacaagcactcctgtttcc ccggagcggaggtataggtgtacccacgaccgaaagccttaaccgttatccgcaatcaactacataacggctagtagtcatcatgtttttgatc tggcggtcgcaggtggttccccactagctggtcgatgaggctaggaattccccacggcgaccgtgtcctagcctgctggtggcgccagc ccagcttatgctgggacgccttttaagacatggtgtgaagacctgcatgtgcttgattgtgagtcctccggccccctgaatgcggctaaccctaa ccctggagcccgacagcataatccaatgttgggtcgtaatgagcaattccgggatgggaccgactacttgggtgtccgtgttcttttattct tatattgtcttatgggtcacagcatatataatgataatatactgtgac
Hu man XIA P	ctgtaaaaaacaacttgcctgaatataatgattcattataacaattatgcatagatttaataatctgcatatttatgcttcatgttttctaa ttaatgatttgacatggttaataattataatattctgcacacagtttacatattatgtaaaataagcatttaaaaattattagttttattctgctgctt aaatattactttctcaaaaagagaaaaaacaataatgctagattttactttatgacttgatgtgtgtaattgtcgaactctagatttagaattag aatgtttcttagcgtgtgtgattttatgtcataagtggaatttgtagtctcctataacaaaagctgtgtgctgtgttcacattttggatttcta atataatgttctcttttagaaaagggtggacaagtcctattttcaagaga

表 4 5' UTR 序列序列

polyAC	aacaaaaaaaaacaaaaaaaaaaccaaaaaacaaaacacataattgactaa
PABPv1	aaataattgactaa
PABPv2	cacaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaaactaattgactaa
PABPv3	aaaaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaaataattgactaa
PABPv4	aaaaaaaaaaaacaaaaacaaacaaaaaaaaaaaaaaaaataattgactaa
PCBPv1	ccctctccttccctctccttccctctccttccctctccttaattgactaa
PCBPv2	atatattatctttattatctttaattttatcttttataattgactaa
PCBPv3	ccctccccccccctccccccccctccccccccctcccctaattgactaa
PCBPv4	ccccctccctctcctttatcttaattttatcttttataattgactaa
YTHDFv1	tgctggacctggactgcaggacctggacttgaggacttaattgactaa
YTHDFv2	tgcaggactcctggacctggactggacggacggacggactaattgactaa
YTHDFv3	actggacttgaggacctggactggactggactaggacataattgactaa
YTHDFv4	gaaggacggacggacggacggacggacggacggactaattgactaa
xrRNA	agcgtaacctccatccgagttgcaagagagggaaacgcagctcttaattgactaa

Apt-eIF4G	actcactattgttttcgcgccaggtgcaaaaagtgctgaattgactaa
-----------	--

表 5 3' UTR 序列

Random 50bp	aacggaacgtatatcaacgcaatgaagccggaggattggcgtgggaatc
PABPv2	cacaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaa
HBA1 short 3' UTR	gctggagcctcgggtggccatgctcttggcccttgggctccccagccctcctcccttctgcaccc
HBA1 full 3' UTR	gctggagcctcgggtggccatgctcttggcccttgggctccccagccctcctcccttctgcacccgtaccccggtgtcttgaataaagtctga
HBA2 PR	cccgtgggctcccaacgggcccctcctccctccttgacc
3x HBA2 MR	cccaacgggcccctcctcccccaacgggcccctcctcccccaacgggcccctcctccc
3x 15-lipoxygenase MR	ccccaccctctcccaagccccaccctctcccaagccccaccctctcccaag
3x alpha(I)-collagen MR	cccagcccactttcccaacccagcccactttcccaacccagcccactttcccaaa
3x tyrosine hydroxylase MR	tctccatccccttccaaccttcttccatccccttccaaccttcttccatccccttccaaccttctt
Mouse alpha-globin 3' UTR	ttaattaagctgccttctgcgggcttgccttctggccatgcccttcttctcccttgacactgtaccttggcttgaataaagcctgagtaggaag
Human beta-globin 3' UTR	gctcgtttcttgctgtcaatttctattaaaggtccttgttccctaagtccaactactaaactgggggatattatgaagggccttgagcatctggattctgcct
AES motif	ctggtagtgcacgcaatgctagctgcccttcccgctctgggtaccccgagctccccgacctcgggtcccaggtagtctcccacctccacctgccccactcaccacctctgctagttccagacacctcc
AES motif + mtRNR1 motif	ctcgagctggtagtgcacgcaatgctagctgcccttcccgctctgggtaccccgagctccccgacctcgggtccagggtatgctcccacctccacctgccccactcaccacctctgctagttccagacacctcccaagcagcagcaatgcagctcaaaacgcttagcctagccacacccccacgggaaacagcagtgattaacctttagcaataaacgaaagttaactaagctatactaaccacgggttggtcaatttctgcccagccacacccctggagctagc
RPS27A 3' UTR	acaagtagttgtgtatgcgttaataaaaaagaaggaaactcgtactta
Sindbis virus HuR BR	taatcattattattttctttattttattcacataattttgttttaa

实施例 1:

1) 载体构建

PCR 扩增 T7 启动子、SnoRNA116-14 序列、5' UTR 序列、CVB3 IRES 序列、编码绿

色荧光蛋白序列、3' UTR 序列、SnoRNA116-13 序列，将 CVB3 IRES 序列、编码绿色荧光蛋白序列依次连入载体骨架，然后在两端添加随机生成的序列生成 Random1-Random2 线性 RNA，两端分别添加 snoRNA116-14、snoRNA116-13 序列，生成 snoRNA1-snoRNA2 线性 RNA；在 IRES 前添加 5'UTR 序列，编码绿色荧光蛋白序列后添加 3' UTR 序列，形成骨架载体，在两端保护结构位点分别添加 snoRNA 或/和 Triplex 序列或/和随机序列，形成 snoRNA1-snoRNA2(U) Random1-snoRNA2(U)、Random3-snoRNA(U)、Triplex-snoRNA2 (U) snoRNA1-Random2(U)、snoRNA1-Triplex110 (U) 线性 RNA。

根据本发明所构建载体，可用限制性内切酶 PmeI 酶切质粒，使其由环状质粒变为线性质粒。再利用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录 (IVT) 反应，不需要 mRNA 制备过程中额外的加帽加尾反应，也不需要环状 RNA 体外转录 (IVT) 反应后一系列的环化、去线性 RNA 等步骤，即可一步产生稳定的线性 RNA。

2) 制备递送系统

采用脂质体(lipo2000)将纯化的线性 RNA 封装在其中。将线性 RNA 与 lipo2000 以 1: 1.5 的比例混合转染 293T 细胞，在转染 72 小时后进行流式细胞术分析，实验结果见图 2~4。结果说明本发明所构建的线性 RNA 分子能够在细胞内稳定表达绿色荧光蛋白，并具有优化空间；其中，以 5'端为 sno116-14,3'端为 Triplex 的线性 RNA 分子表达效果更好。而两端都为随机序列的线性 RNA 分子的表达效果较差。

实施例 2：传染病疫苗

本实施例以新冠疫苗为例：

1) 载体构建

PCR 扩增 T7 启动子、SnoRNA 或/和 Triplex 序列、5' UTR 序列、IRES1 序列、IRES2 序列、IRES3 序列、3' UTR 序列、SnoRNA 或/和 Triplex 序列，并通过 Gibson Assemble 连接到含有筛选标记的载体上，构成 polycisRNA-EV 空载体。然后，PCR 扩增针对不同 SARS-CoV 亚型的 RBD 抗原编码序列，克隆到 polycisRNA-EV 主干中，构建相应的 polycisRNA 质粒进行接下来的 IVT 反应。

根据本发明所构建载体，可用限制性内切酶 PmeI 酶切质粒，使其由环状质粒变为线性质粒。再利用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录 (IVT) 反应，不需要 mRNA 制备过程中额外的加帽加尾反应，也不需要环状 RNA 体外转录 (IVT) 反应后一系列的环化、去线性 RNA 等步骤，即可一步产生稳定的线性 polycisRNA。

2) 制备递送系统

采用脂质的纳米颗粒(LNP)将纯化的 polycisRNA 封装在其中。由此产生的 polycisRNA/

递送纳米颗粒组件经过浓缩、缓冲液交换和无菌过滤。然后最终评估并按此顺序制备成疫苗，可直接向人体内注射预防疾病。

实施例 3：癌症疫苗

本实施例以肺癌为例：

1) 载体构建

PCR 扩增 T7 启动子、SnoRNA 或/和 Triplex 序列、5' UTR 序列、IRES1 序列、IRES2 序列、IRES3 序列、3' UTR 序列、SnoRNA 或/和 Triplex 序列，并通过 Gibson Assmble 连接到含有筛选标记的载体上，构成 polycisRNA-EV 空载体。然后，PCR 扩增肺癌细胞表面抗原多肽、程序性死亡受体 1 (PD-1) 抗体和表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体编码序列，依次克隆到 IRES1 序列、IRES2 序列、IRES3 序列的下游，构建相应的 polycisRNA 质粒进行接下来的 IVT 反应。

将 polycisRNA 质粒用限制性内切酶 PmeI 酶切质粒，使其由环状质粒变为线性质粒。再利用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录 (IVT) 反应，一步产生稳定的线性 polycisRNA。

2) 制备递送系统

可以使用常用的递送系统包括脂质纳米颗粒(LNP)、脂质体、脂质复合物、高分子材料、胶束、多肽、鱼精蛋白、电穿孔等将 polycisRNA 进行递送。本实施例使用脂质的纳米颗粒(LNP)，将纯化的 polycisRNA 封装在其中。由此产生的 polycisRNA/递送纳米颗粒组件经过浓缩、缓冲液交换和无菌过滤。然后最终评估并按此顺序包装制备成疫苗，向癌症患者体内注射以治疗疾病。

实施例 4：CAR 疗法

1) PCR 扩增 T7 启动子、SnoRNA 或/和 Triplex 序列、5' UTR 序列、IRES1 序列、IRES2 序列、IRES3 序列、3' UTR 序列、SnoRNA 或/和 Triplex 序列，并通过 Gibson Assmble 连接到含有筛选标记的载体上，构成 polycisRNA-EV 空载体。然后，PCR 扩增嵌合抗原受体 (CAR)、细胞因子(IL2 等)和程序性死亡受体 1(PD-1)抗体编码序列，克隆到 polycisRNA-EV 主干中，依次克隆到 IRES1 序列、IRES2 序列、IRES3 序列的下游，构建相应的 polycisRNA 质粒进行接下来的 IVT 反应。

将 polycisRNA 质粒用限制性内切酶 PmeI 酶切质粒，使其由环状质粒变为线性质粒。再利用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录 (IVT) 反应，一步产生稳定的线性 polycisRNA。

2) 制备递送系统

使用能够靶向 T 细胞的脂质纳米颗粒(LNP)作为递送系统，将纯化的 polycisRNA 封装在其中，根据需要将一定剂量的 LNP-polycisRNA 注入体内以进行相应的治疗。

以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例，本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换，均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

权 利 要 求 书

1、一种体外制备的稳定的 RNA 分子，其特征在于，所述 RNA 分子包括：

编码目的蛋白的区域；以及，

设置在所述目的蛋白的编码区上游的 IRES 序列；以及，

5 设置在所述 RNA 分子两端的保护性 RNA 二级结构。

2、根据权利要求 1 所述的 RNA 分子，其特征在于，所述保护性 RNA 二级结构为小核仁 RNA 序列或/和 Triplex 序列。

3、根据权利要求 1 所述的 RNA 分子，其特征在于，所述 RNA 分子还包括：

10 5' 端设置在保护性 RNA 二级结构之后的 5' UTR 序列，以及 3' 端设置在保护性 RNA 二级结构之前的 3' UTR 序列。

4、根据权利要求 1 所述的 RNA 分子，其特征在于，所述目的蛋白为一个或多个。

5、根据权利要求 1 所述的 RNA 分子，其特征在于，所述目的蛋白为一种或多种抗体；或，一种或多种抗原；或，一种或多种基因编辑酶；或，一种或多种调节因子；或，一种或多种荧光蛋白。

15 6、根据权利要求 2 所述的 RNA 分子，其特征在于，所述小核仁 RNA 序列选自 H/ACA box snoRNAs、C/D box snoRNAs、小卡扎尔体 RNA 中的一种或多种。

7、根据权利要求 1 所述的 RNA 分子，其特征在于，所述 IRES 来自以下病毒的 IRES 序列：陶拉综合征病毒、铁人三项瘤病毒、泰勒脑脊髓炎病毒、猿猴病毒 40、红火火蚁病毒、禾谷缢管蚜病毒、网状内皮组织增生症病毒、富曼脊髓灰质炎病毒 1、克什米尔蜂病毒、人鼻病毒 2、人免疫缺陷病毒 1 型、Himetobi P 病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、GB 肝炎病毒、口蹄疫病毒、人肠道病毒 71、马鼻炎病毒、脑心肌炎病毒、果蝇 C 病毒、蟋蟀麻痹病毒、牛病毒性腹泻病毒 1、黑蜂王细胞病毒、蚜虫致死性麻痹病毒、禽类脑脊髓炎病毒、急性蜜蜂麻痹病毒、木槿褪绿环斑病毒、经典猪瘟病毒、猿猴小核糖核酸病毒、芜菁皱缩病毒、柯萨奇病毒 B3 或柯萨奇病毒 A。

25 8、根据权利要求 3 所述的 RNA 分子，其特征在于，5'UTR 选自 RNA 结合蛋白家族或 YTHDF 家族；3'UTR 选自人 α -珠蛋白 1、人 α -珠蛋白 2、小鼠 α -珠蛋白、人 β -珠蛋白、xrRNA 或 Apt-eIF4G。

9、一种权利要求 1~8 任一项所述体外制备的稳定的 RNA 分子的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

30 S1、分别扩增 RNA 聚合酶启动子、保护性 RNA 二级结构序列、5' UTR 序列、3' UTR

序列、IRES 序列和目的蛋白的编码基因序列，连接到空载体上得到表达载体；

S2、将 S1 步骤得到的表达载体经过酶切线性化，经过体外转录合成所述 RNA 分子。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括采用递送系统封装所述 RNA 分子。

5 11、权利要求 1~8 任一项所述体外制备的稳定的 RNA 分子的应用，其特征在于，所述应用包括疫苗产品制备或体内原位 CAR 治疗产品制备中的应用。

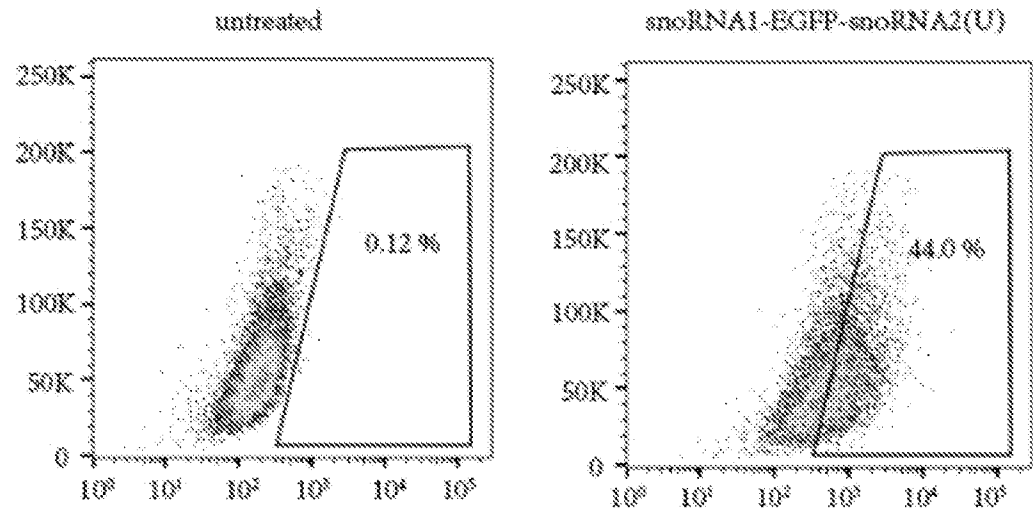


图 1

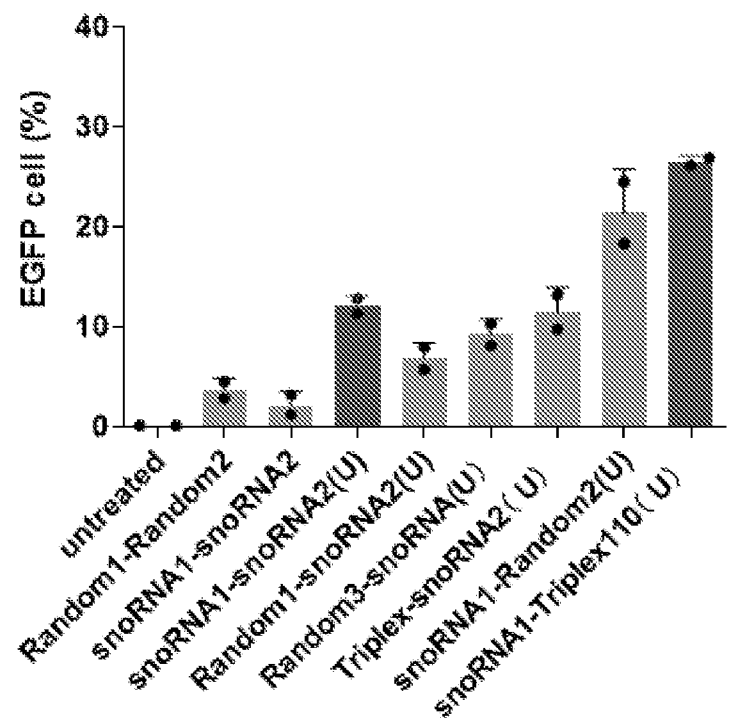


图 2

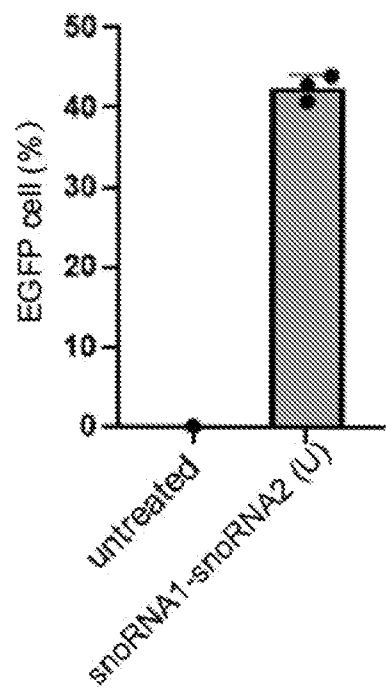


图 3

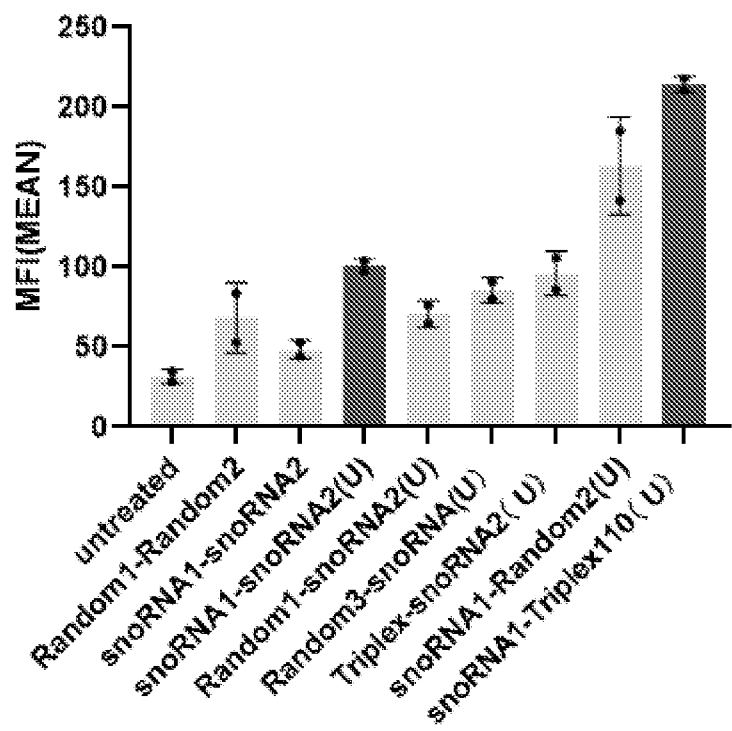


图 4

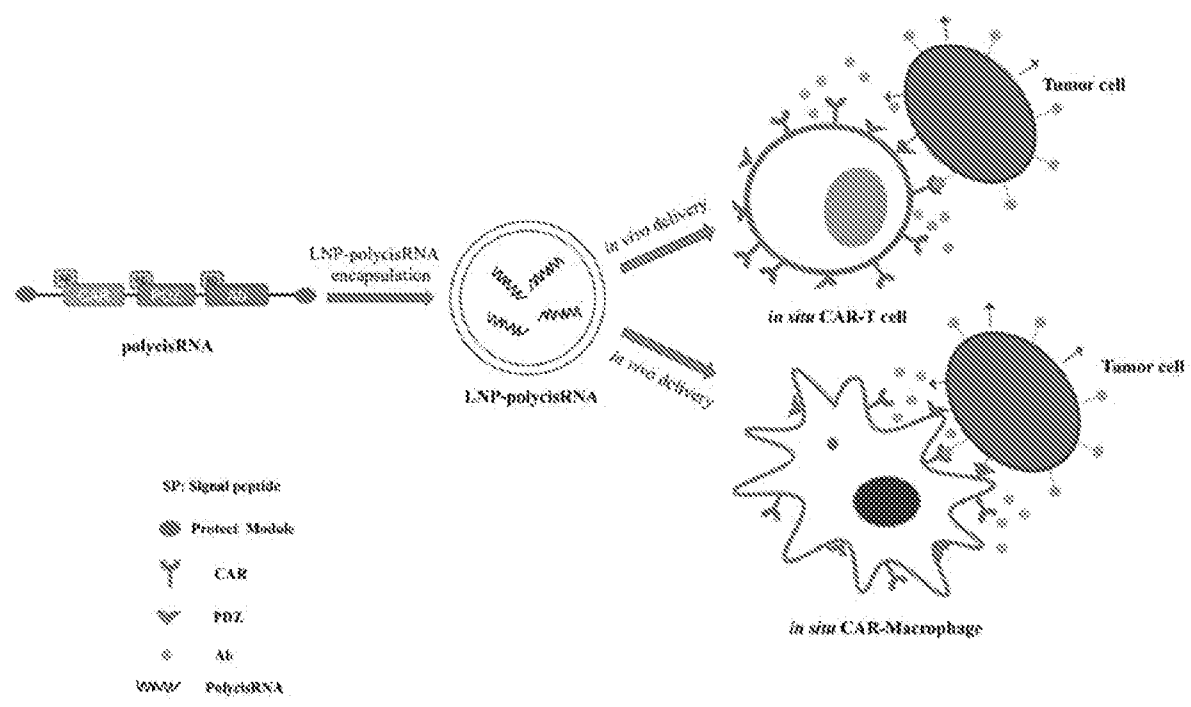


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/102811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/85(2006.01)i; C12N15/64(2006.01)i; C12N15/65(2006.01)i; A61K39/135(2006.01)i; A61K39/12(2006.01)i; A61P31/14(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, HimmPat, CNKI, Web of Science, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 读秀, DUXIU, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System, NCBI, EBI, STNext: 申请人/发明人, RNA, 小核仁RNA, 核仁小RNA, Triplex, snoRNA, scaRNA, 内部核糖体进入位点, Internal ribosome entry site, IRES, UTR, Untranslated region, 非翻译区, 序列1-10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 202204464 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 29 September 2022 (2022-09-29) claims 1-51, and description, paragraphs 191 and 217	1-11
Y	WO 202204466 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 29 September 2022 (2022-09-29) claims 1-53, and description, paragraph 216	1-11
Y	陈玲玲 等 (CHEN, Lingling et al.). "非编码RNA研究进展 (Progress in Non-coding RNA Research)" 中国科学: 生命科学 (Science in China(Series C)), Vol. 49, No. 12, 10 December 2019 (2019-12-10), pages 1573-1605 page 1575, section 1.2, and figure 1	1-11
A	CN 115768890 A (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 07 March 2023 (2023-03-07) claims 1-99	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 December 2023

Date of mailing of the international search report

19 December 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/102811

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 116004696 A (ZHENGZHOU BEIBEI BIOTECH. CO., LTD.) 25 April 2023 (2023-04-25) claims 1-7	1-11
A	侯书婷 等 (HOU, Shuting et al.). "体外转录mRNA药物的技术进展和应用前景 (In vitro Transcribed (IVT) mRNA Drugs: Technical Progress and Application Prospect)" <i>药学报 (Acta Pharmaceutica Sinica)</i> , Vol. 58, No. 8, 30 May 2023 (2023-05-30), pages 2047-2058 abstract	1-11
A	SOLODUSHKO, V. et al. "Terminal hairpins improve protein expression in IRES-initiated mRNA in the absence of a cap and polyadenylated tail" <i>GENE THERAPY</i> , Vol. 30, 24 February 2023 (2023-02-24), pages 620-627 abstract	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/102811

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/102811

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022204464	A1	29 September 2022	TW	202300650	A	01 January 2023
WO	2022204466	A1	29 September 2022	TW	202305130	A	01 February 2023
CN	115768890	A	07 March 2023	EP	4136228	A1	22 February 2023
				WO	2021211776	A1	21 October 2021
				US	2021324389	A1	21 October 2021
CN	116004696	A	25 April 2023	None			

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

A. 主题的分类 C12N15/85(2006.01)i; C12N15/64(2006.01)i; C12N15/65(2006.01)i; A61K39/135(2006.01)i; A61K39/12(2006.01)i; A61P31/14(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C12N A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, HimmPat, CNKI, Web of Science, 百度学术, 读秀, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STNext: 申请人/发明人, RNA, 小核仁RNA, 核仁小RNA, Triplex, snoRNA, scaRNA, 内部核糖体进入位点, Internal ribosome entry site, IRES, UTR, Untranslated region, 非翻译区, 序列1-10																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2022204464 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1-51, 说明书第191、217段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2022204466 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1-53, 说明书第216段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>陈玲玲 等. "非编码RNA研究进展" 中国科学:生命科学, 第49卷, 第12期, 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10), 第1573-1605页 第1575页1.2节, 图1</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 115768890 A (加州理工学院) 2023年3月7日 (2023 - 03 - 07) 权利要求1-99</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 116004696 A (郑州贝贝生物科技有限公司) 2023年4月25日 (2023 - 04 - 25) 权利要求1-7</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	WO 2022204464 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1-51, 说明书第191、217段	1-11	Y	WO 2022204466 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1-53, 说明书第216段	1-11	Y	陈玲玲 等. "非编码RNA研究进展" 中国科学:生命科学, 第49卷, 第12期, 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10), 第1573-1605页 第1575页1.2节, 图1	1-11	A	CN 115768890 A (加州理工学院) 2023年3月7日 (2023 - 03 - 07) 权利要求1-99	1-11	A	CN 116004696 A (郑州贝贝生物科技有限公司) 2023年4月25日 (2023 - 04 - 25) 权利要求1-7	1-11
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
Y	WO 2022204464 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1-51, 说明书第191、217段	1-11																		
Y	WO 2022204466 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1-53, 说明书第216段	1-11																		
Y	陈玲玲 等. "非编码RNA研究进展" 中国科学:生命科学, 第49卷, 第12期, 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10), 第1573-1605页 第1575页1.2节, 图1	1-11																		
A	CN 115768890 A (加州理工学院) 2023年3月7日 (2023 - 03 - 07) 权利要求1-99	1-11																		
A	CN 116004696 A (郑州贝贝生物科技有限公司) 2023年4月25日 (2023 - 04 - 25) 权利要求1-7	1-11																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期 2023年12月13日		国际检索报告邮寄日期 2023年12月19日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		授权官员 冯晓亮 电话号码 (+86) 010-53961927																		

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	侯书婷 等. "体外转录mRNA药物的技术进展和应用前景" 药科学报, 第58卷, 第8期, 2023年5月30日 (2023 - 05 - 30), 第2047-2058页 摘要	1-11
A	SOLODUSHKO, V.等. "Terminal hairpins improve protein expression in IRES-initiated mRNA in the absence of a cap and polyadenylated tail" GENE THERAPY, 第30卷, 2023年2月24日 (2023 - 02 - 24), 第620-627页 摘要	1-11

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/102811

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2022204464	A1	2022年9月29日	TW	202300650	A	2023年1月1日
WO	2022204466	A1	2022年9月29日	TW	202305130	A	2023年2月1日
CN	115768890	A	2023年3月7日	EP	4136228	A1	2023年2月22日
				WO	2021211776	A1	2021年10月21日
				US	2021324389	A1	2021年10月21日
CN	116004696	A	2023年4月25日	无			