(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 116751827 B
(45)授权公告日 2024.01.30

(21)申请号 202310734863.0
(22)申请日 2016.09.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116751827 A
(43)申请公布日 2023.09.15
(30)优先权数据
62/221,248 2015.09.21 US
(62)分案原申请数据
201680067458.6 2016.09.20
(73)专利权人 垂林克生物技术有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 R·I·霍格雷夫 A·列别捷夫 A·P·麦卡弗里 D·施恩
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 吴瑜 顾云峰
(51)Int.Cl.
C12P 19/34(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C07H 21/02(2006.01)
(56)对比文件
EP 0081099 A2,1983.06.15
R.E. Smith等.A unique class of compound, guanosine-nucleoside tetraphosphate G(5')pppp(5')N, synthesized during the in vitro transcription of cytoplasmic polyhedrosis virus of Bombyx mori. Structural determination and mechanism of formation.Journal of Biological Chemistry.1982,第257卷(第1期),第485-494页.
Masahide Ishikawa等.Preparation of eukaryotic mRNA having differently methylated adenosine at the 5'-terminus and the effect of the methyl group in translation.Nucleic Acids Symposium Series.2009,第53卷(第1期),第129-130页.
审查员 冯晓亮

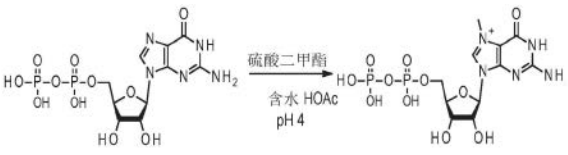
权利要求书7页 说明书33页
序列表（电子公布） 附图23页

(54)发明名称

用于合成5'-加帽RNA的组合物和方法

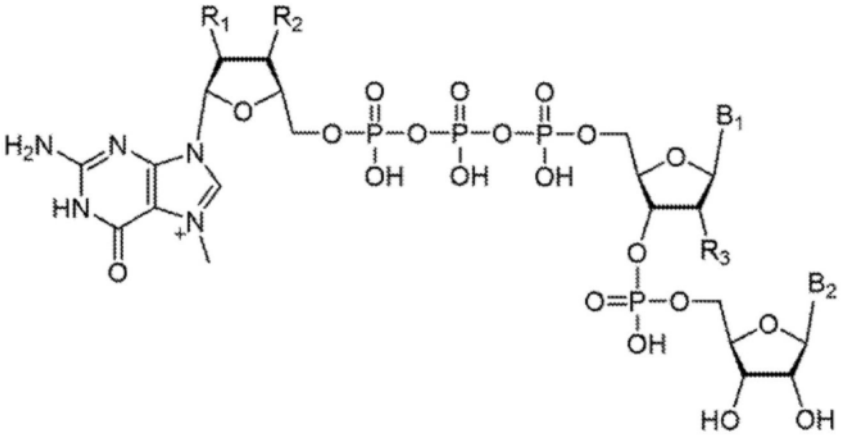
(57)摘要

本文的发明名称为用于合成5'-加帽RNA的组合物和方法。本文提供用于合成5'加帽RNA的方法和组合物,其中起始加帽寡核苷酸引物具有通式形式$^{m7}Gppp[N_{2'ome}]_n[N]_m$,其中$^{m7}G$为N7-甲基化的鸟苷或任何鸟苷类似物,N为任何天然的、修饰的或非天然的核苷,"n"可以是从0至4的任何整数且"m"可以是从1至9的整数。



CN 116751827 B

1.复合体,其包含起始加帽寡核苷酸引物和DNA模板,所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



其中:

B_1和B_2独立地为天然的、修饰的或非天然的核苷碱基;和

R_1、R_2和R_3独立地为OH或O-甲基,

其中所述DNA模板包括含有转录起始位点的启动子区域,所述转录起始位点具有在核苷酸位置+1处的第一核苷酸和在核苷酸位置+2处的第二核苷酸;以及

其中所述起始加帽寡核苷酸引物与所述DNA模板至少在核苷酸位置+1和+2处杂交。

2.权利要求1所述的复合体,其中B_1在核苷酸位置+1处并且B_2在核苷酸位置+2处。

3.权利要求1所述的复合体,其中B_1和B_2是天然的核苷碱基。

4.权利要求1所述的复合体,其中B_1和B_2中的至少一个是修饰的或非天然的碱基。

5.权利要求1所述的复合体,其中B_1和B_2中的至少一个是N6-甲基腺嘌呤。

6.权利要求1所述的复合体,其中B_1是腺嘌呤并且B_2是鸟嘌呤。

7.权利要求1所述的复合体,其中B_1是鸟嘌呤并且B_2是鸟嘌呤。

8.权利要求1所述的复合体,其中B_1是腺嘌呤并且B_2是尿嘧啶。

9.权利要求1所述的复合体,其中R_3为OH。

10.权利要求1所述的复合体,其中R_3为O-甲基。

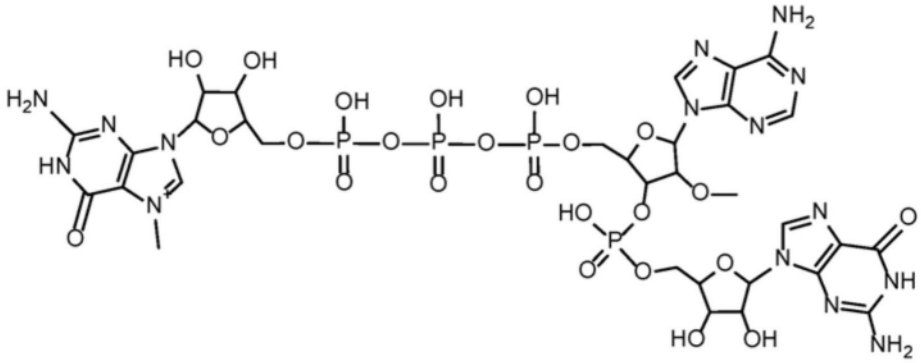
11.权利要求1所述的复合体,其中R_1和R_2中的至少一个为O-甲基,B_1是腺嘌呤并且B_2是鸟嘌呤。

12.权利要求1所述的复合体,其中R_1和R_2中的至少一个为O-甲基,并且B_1和B_2是鸟嘌呤。

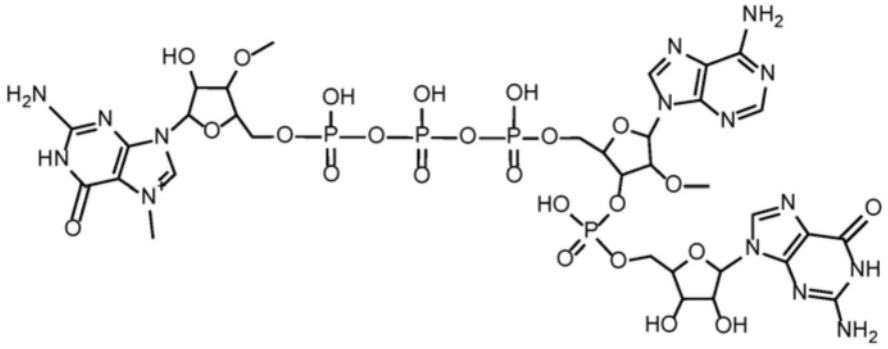
13.权利要求1所述的复合体,其中R_1和R_2中的至少一个为O-甲基,B_1是腺嘌呤并且B_2是尿嘧啶。

14.权利要求1所述的复合体,其中B_1是N6-甲基腺嘌呤并且B_2是天然的、修饰的、或非天然的碱基。

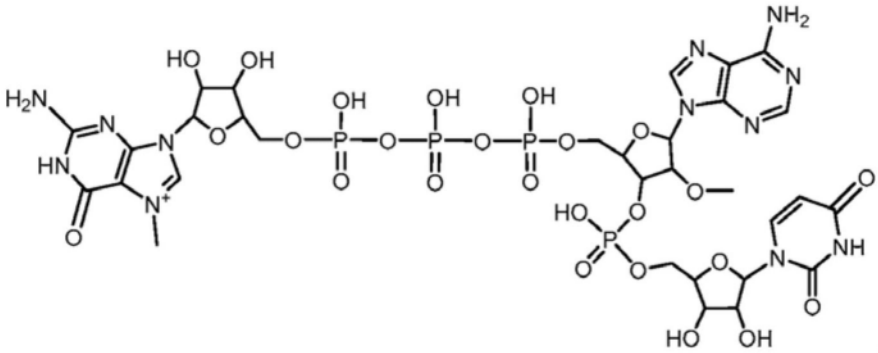
15.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



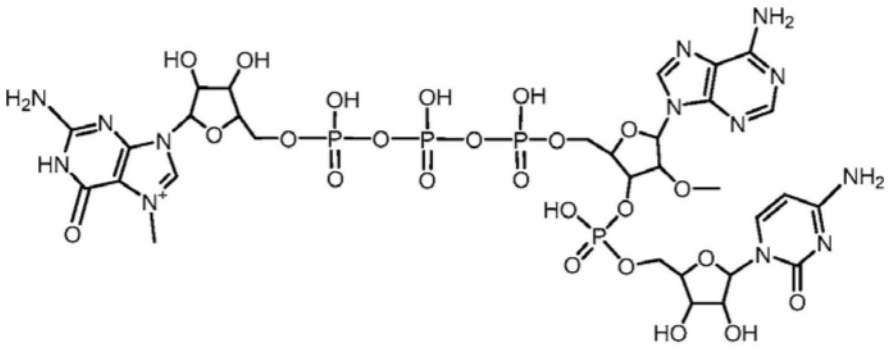
16.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



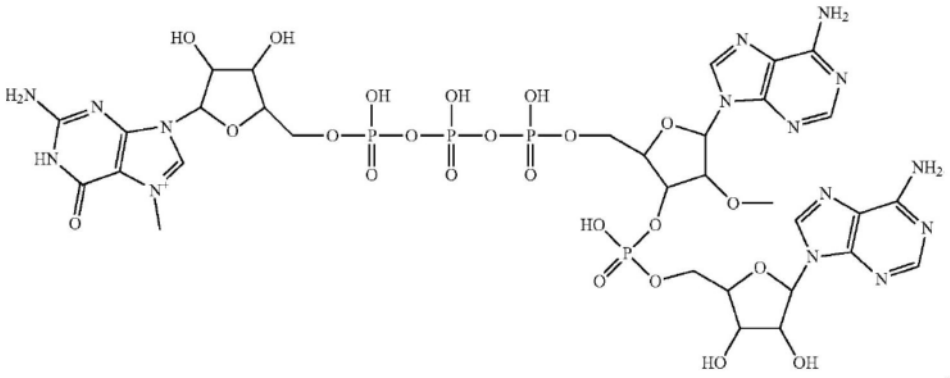
17.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



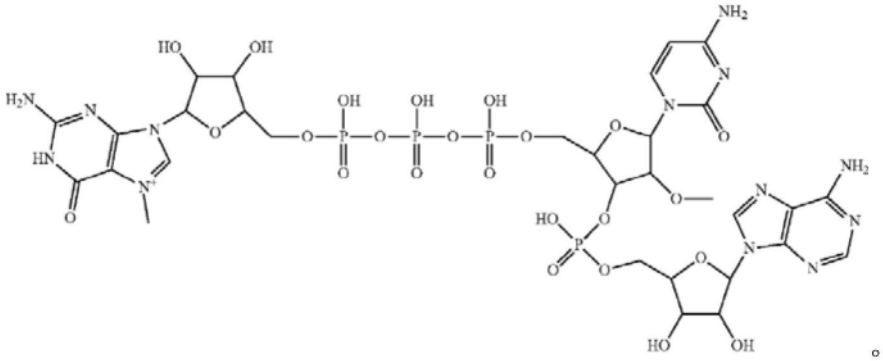
18.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



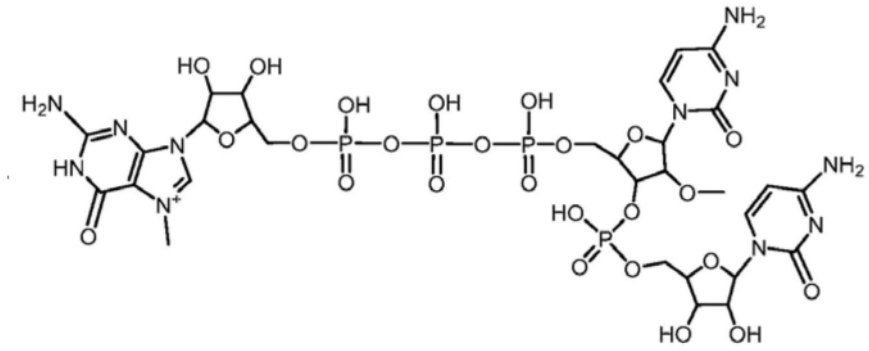
19.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



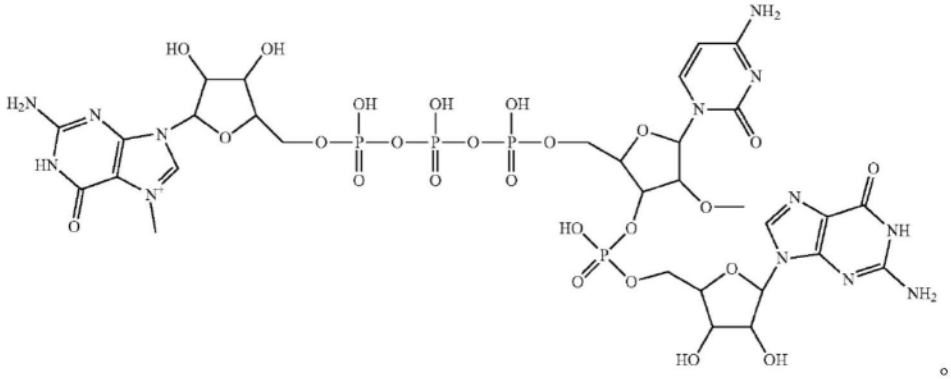
20.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



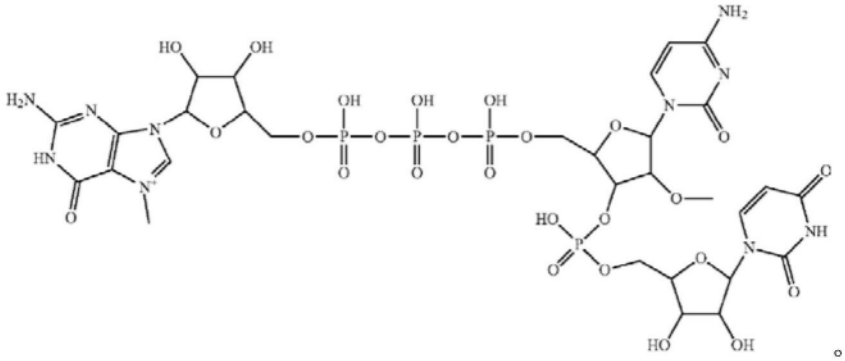
21.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



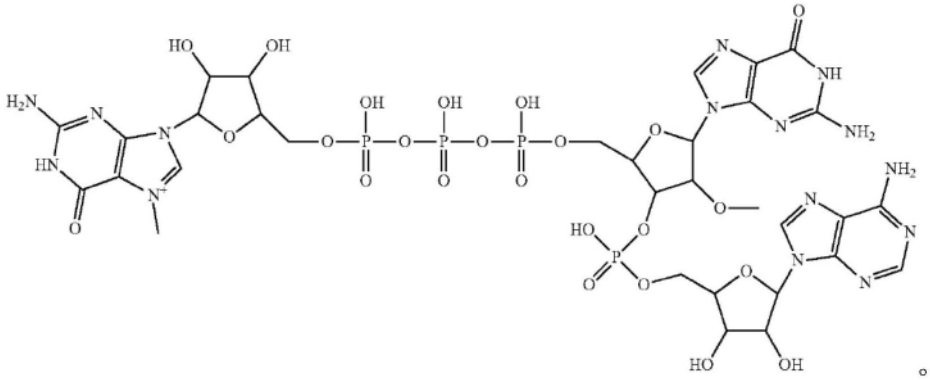
22.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



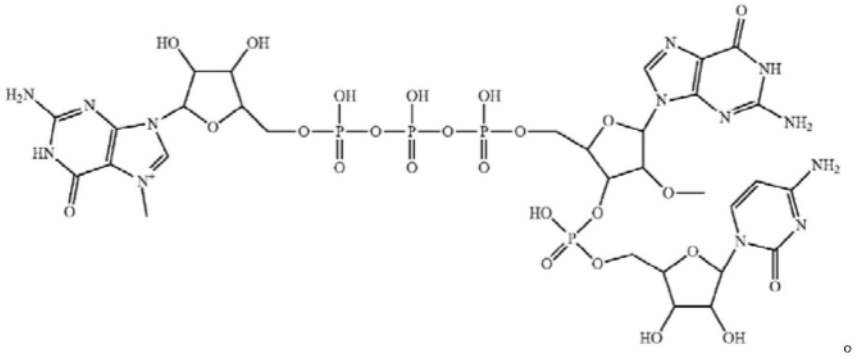
23.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



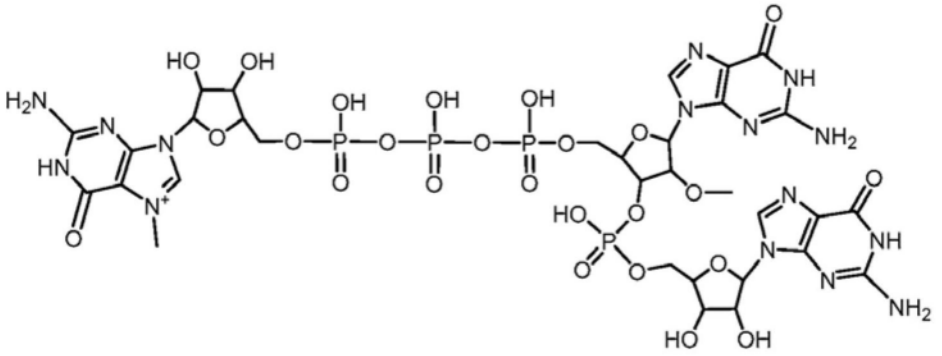
24.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



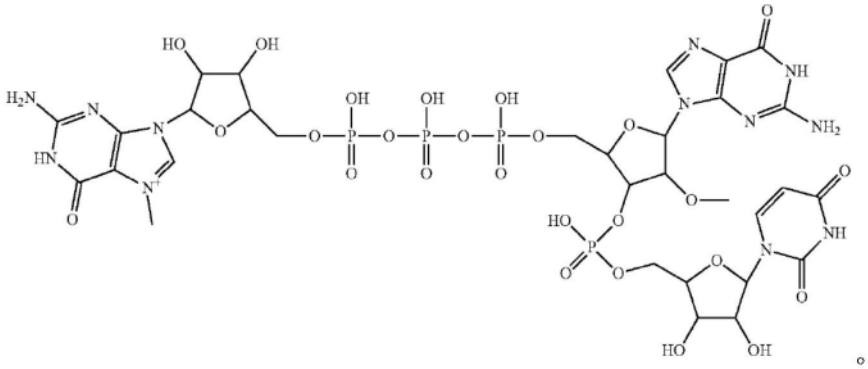
25.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



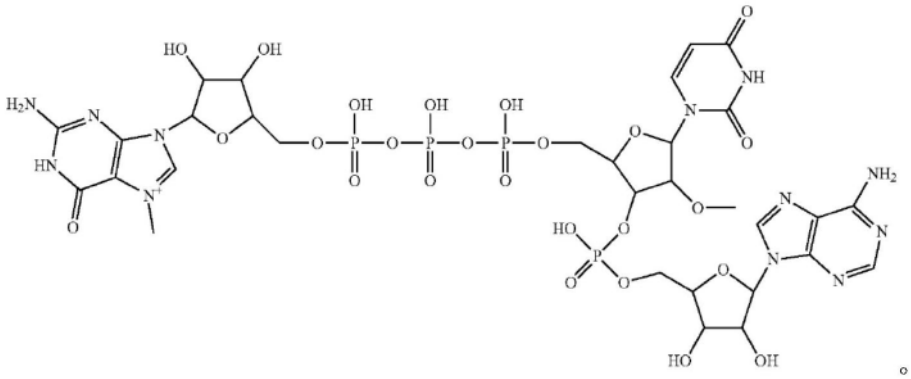
26.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



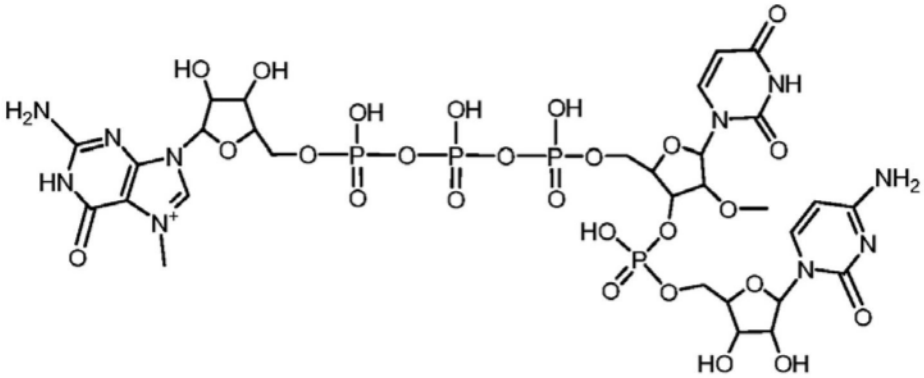
27.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



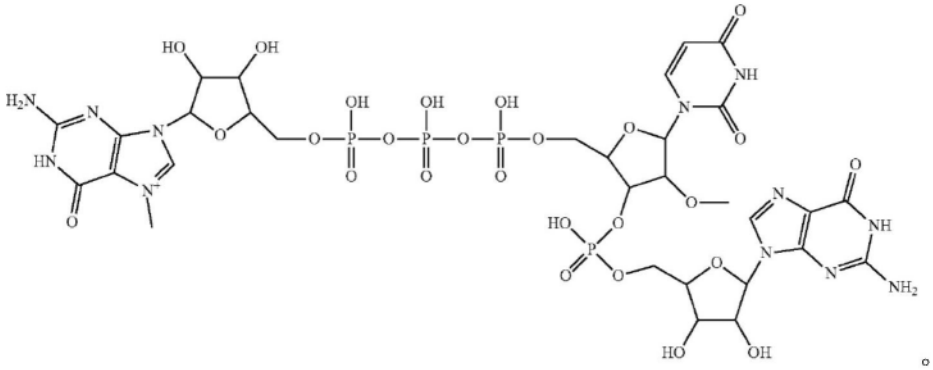
28.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



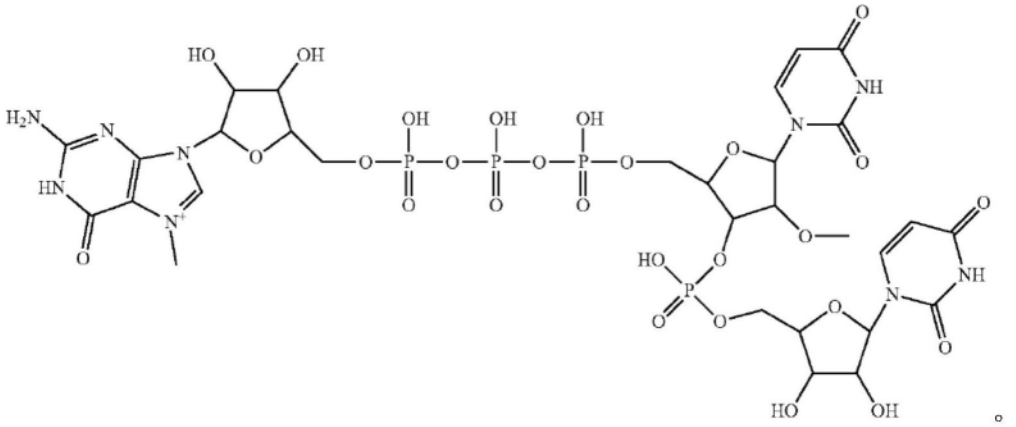
29.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



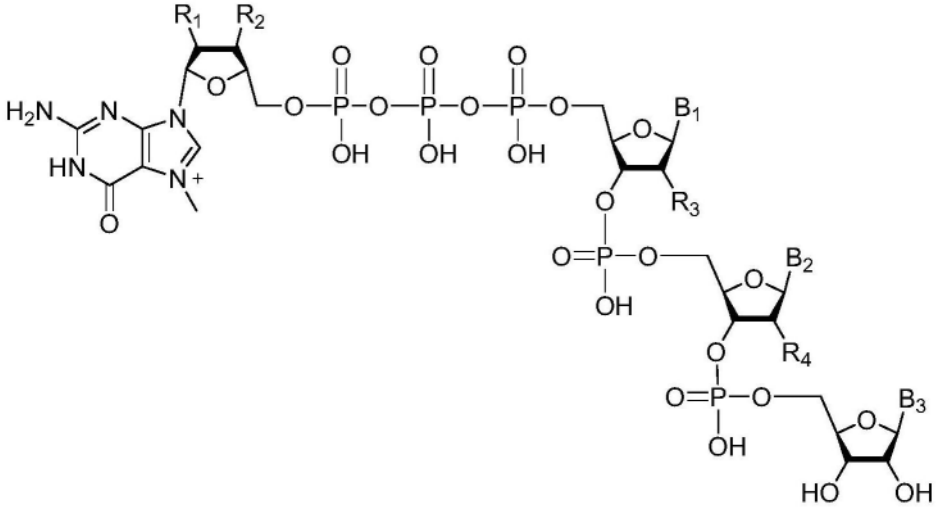
30.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



31.权利要求1所述的复合体,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



32.复合体,其包含起始加帽寡核苷酸引物和DNA模板,其中所述起始加帽寡核苷酸引物包含以下结构:



其中:

B_1、B_2和B_3独立地为天然的、修饰的或非天然的核苷碱基;和

R_1、R_2、R_3和R_4独立地为OH或O-甲基;

其中所述DNA模板包括含有转录起始位点的启动子区域,所述转录起始位点具有在核苷酸位置+1处的第一核苷酸、在核苷酸位置+2处的第二核苷酸和在核苷酸位置+3处的第三核苷酸;以及

其中所述起始加帽寡核苷酸引物与所述DNA模板至少在核苷酸位置+1、+2和+3处杂交。

33.权利要求32所述的复合体,其中R_3为O-甲基并且R_4为OH。

34.权利要求32所述的复合体,其中R_3和R_4为O-甲基。

35.权利要求32所述的复合体,其中R_4为O-甲基。

36.权利要求32所述的复合体,其中R_1为OH、R_2为OH、R_3为O-甲基、并且R_4为OH。

37.权利要求32所述的复合体,其中R_1为OH、R_2为OH、R_3为O-甲基、并且R_4为O-甲基。

38.权利要求32所述的复合体,其中R_1和R_2中的至少一个为O-甲基、R_3为O-甲基、并且R_4为OH。

39.权利要求32所述的复合体,其中R_1和R_2中的至少一个为O-甲基、R_3为O-甲基、并且R_4为O-甲基。

40.权利要求32所述的复合体,其中B_1、B_2和B_3为天然的核苷碱基。

41.权利要求32所述的复合体,其中B_1、B_2和B_3中的至少一个为修饰的或非天然的碱基。

42.权利要求32所述的复合体,其中B_1、B_2和B_3中的至少一个为N6-甲基腺嘌呤。

43.权利要求32所述的复合体,其中B_1是腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶。

44.权利要求32所述的复合体,其中B_1是腺嘌呤、B_2是尿嘧啶并且B_3是腺嘌呤。

45.权利要求32所述的复合体,其中R_1和R_2为OH、R_3和R_4为O-甲基、B_1是腺嘌呤、B_2是尿嘧啶并且B_3是腺嘌呤。

用于合成5'-加帽RNA的组合物和方法

[0001] 本申请是分案申请,原申请的申请日是2016年9月20日,申请号为2016800674586(PCT/US2016/052670),发明名称为"用于合成5'-加帽RNA的组合物和方法"。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2015年9月21日提交的美国临时申请号62/221,248的优先权,在此其内容其整体通过引用并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已经以ASCII格式电子提交的序列表并且其整体在此通过引用并入本文。所述ASCII复本于2016年11月16日创建,其名称为095109-000500PC-1022543_SL.txt且大小为785字节。

发明领域

[0006] 本发明涉及用于合成5'加帽RNA的方法和组合物。在具体方面,本发明涉及新型含"帽"起始寡核苷酸引物,其具有天然的的或修饰的5'-帽0、帽1、帽2或三甲基鸟苷-帽(TMG-帽)结构。在其他的方面,本发明涉及提供用于有效地产生其和使用其制备5'-加帽RNA的方法。

背景技术

[0007] 提供以下描述以帮助读者的理解。所提供的信息或引用的参考文献都不被承认是本发明的现有技术。

[0008] 编码用于治疗应用的生理上重要的蛋白质的信使RNA(mRNA)相对于基于DNA的质粒和病毒载体对于递送遗传物质已经显示出显著优势。这些优势中最重要的是:

[0009] (i)高的安全水平(降低来自病毒或质粒整合的潜在的基因组损害),

[0010] (ii)mRNA递送导致立即蛋白质表达(不像一般伴随质粒发生的延迟响应),

[0011] (iii)mRNA允许对蛋白质表达的稳健剂量依赖性控制,以及

[0012] (iv)与制造质粒和病毒载体相比,大规模合成mRNA的简单性。

[0013] 信使RNA可以编码实质上任何已知的蛋白质并可以通过本领域技术人员已知的多种方法递送至特定的组织和器官。一旦被递送,这些mRNA指导目标组织内的核糖体蛋白质表达,导致按照mRNA分子生产数百种蛋白质。

[0014] 存在于每个活性mRNA分子中的几个结构元件被利用以有效地翻译编码的蛋白质。这些元件的一个是在mRNA的5'-末端上的帽结构,其存在于所有真核生物(和一些病毒)中。天然存在的帽结构包含在鸟嘌呤碱基的N7位甲基化的核糖鸟苷残基。此7-甲基鸟苷(^{7m}G)通过5'-至5'-三磷酸链连接在mRNA分子的5′-末端贯穿本申请,7m和m7可互换使用,具有同等含义。5'-末端上^{7m}Gppp片段的存在对于mRNA成熟至关重要,其:

[0015] 保护mRNA免于被核酸外切酶降解,

[0016] 促进mRNA从核转运至细胞质,以及

[0017] 在翻译起始复合体的装配中起关键作用(Cell 9:645-653,(1976);Nature 266:

235,(1977);Federation of Experimental Biologists Society Letter 96:1-11,(1978);Cell 40:223-24,(1985);Prog.Nuc.Acid Res.35:173-207,(1988);Ann.Rev.Biochem.68:913-963,(1999);J.Biol.Chem.274:30337-3040,(1999))。

[0018] 只有那些携带帽结构的mRNA在帽依赖性翻译中具有活性;mRNA的"去帽(decapitation)"导致其对于蛋白质合成的模板活性几乎完全失去(Nature,255:33-37,(1975);J.Biol.Chem.,vol.253:5228-5231,(1978);and Proc.Natl.Acad.Sci.USA,72:1189-1193,(1975))。

[0019] 真核mRNA的另一个元件是在转录物位置1(帽1)处存在2'-O-甲基核苷残基,以及在某些情况下在转录物位置1和2(帽2)处存在2'-O-甲基核苷残基。mRNA的2'-O-甲基化对于在体内mRNA翻译的更高效力而言是需要的(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:3952-3956(1980))并且进一步提高5'-加帽mRNA的核酸酶稳定性。具有帽1(和帽2)的mRNA为独特的标志,其允许细胞识别真正的mRNA 5′末端,并且在一些情况下,区别于源自感染性遗传元件的转录物(Nucleic Acid Research 43:482-492(2015))。

[0020] 初级(primary)mRNA转录物携带在体内始于NTP(一般GTP)的RNA合成起始(起动,initiation)导致的5'-三磷酸基团(5'-pppmRNA)。通过几个酶促步骤发生mRNA转录物的5′-三磷酸化末端向帽结构(帽0)的转化(J.Biol.Chem.250:9322,(1975);J.Biol.Chem.271:11936,(1996);J.Biol.Chem.267:16430,(1992))。这些酶促反应步骤包括:

[0021] 步骤1:RNA三磷酸酶使mRNA的5′-三磷酸基转化为5'-二磷酸基,$pppN_1(pN)_x \rightarrow ppN_1(pN)_x$+无机磷酸根;

[0022] 步骤2:RNA鸟苷酸转移酶利用GTP将GMP残基转移至mRNA的5′-二磷酸基,$ppN_1(pN)_x$+GTP→$G(5')ppp(5')N_1(pN)_x$+无机焦磷酸根;以及

[0023] 步骤3:鸟嘌呤-7-甲基转移酶利用S-腺苷-甲硫氨酸(AdoMet)作为辅因子并将甲基从AdoMet转移至鸟嘌呤碱基的7-氮,$G(5')ppp(5')N_1(pN)_x$+AdoMet→$^{7m}G(5')ppp(5')N_1(pN)_x$+AdoHyc。

[0024] 这些酶促活性导致的RNA被称为"5′加帽RNA"或"加帽RNA",并且导致"加帽RNA"形成的此过程中涉及的酶组合被称为"加帽酶"。加帽酶(包括这些酶的克隆形式)已经被从许多来源鉴定和纯化并且是本领域公知的(Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.66:1-40,(2001);Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.50:101-129,(1995);和Microbiol.Rev.44:175,(1980))。通过加帽酶将帽核苷酸添加至初级RNA的5′-末端而导致的加帽RNA已经被称为具有"帽0结构"的加帽RNA(J.Biol.Chem.269:14974-14981,(1994);J.Biol.Chem.271:11936-11944,(1996))。加帽酶已经用于在体外合成具有帽0结构的加帽RNA(J.Biol.Chem.255:11588,(1980);Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:9573,(1997);J.Biol.Chem.267:16430,(1992);J.Biol.Chem.269:14974,(1994);和J.Biol.Chem.271:11936,(1996))。

[0025] 具有5'-帽0结构的加帽RNA可以在体内通过(核苷-2′-O-)甲基转移酶的作用进一步转化为"Cap1"结构(J.Biol.Chem.269:14974-14981,(1994);J.Biol.Chem.271:11936-11944,(1996);和EMBO 21:2757-2768,(2002))。例如,牛痘mRNA(核苷-2′-O)甲基转移酶可以通过以下反应催化具有帽0结构的5′-加帽RNA的5′-倒数第二个核苷酸的2′-羟基的甲基

化:

[0026] $^{7m}G(5')ppp(5')N_1pN_2(pN)_x$+AdoMet→$^{7m}G(5')ppp(5')N_1^{2'-OMe}pN2(pN)_x$+AdoHyc。

[0027] 据报道,具有帽1结构的二甲基化加帽RNA比具有帽0结构的加帽RNA更有效地被翻译(Nucleic Acids Res.26:3208,(1998))。真核细胞利用另一种(核苷-2′-0)甲基转移酶(例如人细胞中的hMTR2(Nucleic Acids Res.39:4756(2011))催化5′-加帽RNA的第二个被转录核苷酸的2′-羟基的甲基化,以通过以下反应将帽1结构转化为帽2结构:

[0028] $^{7m}G(5')ppp(5')N_1^{2'-OMe}pN_2(pN)_x$+AdoMet→$^{7m}G(5')ppp(5')N_1^{2'-OMe}pN_2^{2'-OMe}(pN)_x$+AdoHyc。

[0029] 大约50%的真核mRNA具有帽2结构。

[0030] 为了生产用于各种生物学研究的长功能性RNA,在二十世纪80年代中期开发了在体外酶促合成初级RNA的方法(Methods Enzymol.180:51-62,(1989);Nucl.Acids Res.,10:6353-6362,(1982);Meth.Enzymol.,180:42-50(1989);Nucl.Acids Res.,12:7035-7056,(1984)和Nucleic Acid Reseach 15:8783-8798,(1987)).

[0031] 在体外转录之后,携带5'-三磷酸基团的原始mRNA转录物可以进一步用加帽酶加帽。然而,体外酶促5'-加帽是昂贵、费力、低效和难以控制的。

[0032] 考虑到这些缺点,开发了另一种用于在体外合成加帽mRNA的方法,其中化学合成的二核苷酸$^{7m}G(5')ppp(5')G$(也被称为mCAP)用于起始转录(RNA 1:957-967,(1995))。mCAP二核苷酸含有成熟mRNA的5'-帽0结构,但不具有帽1和帽2结构特有的2'-O-甲基核苷。

[0033] 然而,存在两个主要缺点归因于利用合成mCAP二核苷酸起始体外转录。第一个是mCAP和pppG对于起始mRNA合成的强竞争性。当用pppG起始mRNA时,由于存在5'-三磷酸基,所得的ppp-mRNA无翻译活性并且有免疫原性。相应地,当用mCAP起始mRNA时,所得的5'-加帽-mRNA有翻译活性并且不那么有免疫原性。

[0034] 为了提高5'-加帽与5'-无帽(或5'-三磷酸化;pppmRNA)mRNA的比率,必须使用相对于pppG过量的$^{7m}GpppG$(4:1至10:1)以有利于生产5′-帽结构mRNA转录物(高达80-90%)。此方式的消极方面是在转录期间GTP供给的快速消耗和对大量可能昂贵的合成mCAP二聚体的需求导致mRNA的总产率显著降低。转录后,为了降低合成的mRNA的免疫原性,需要用碱性磷酸酶另外处理含有5'-加帽mRNA和5'-pppmRNA两者的粗混合物,以从pppmRNA去除无帽5'-三磷酸基团。磷酸酶处理后获得的无帽5'-OH形式的mRNA是无活性的并且不参与在翻译过程中。

[0035] 当使用非对称的mCAP二核苷酸时,可出现另一个缺点,双向起始。存在$^{7m}GpppG$的G或^{7m}G部分的3′-羟基以几乎相等的概率充当转录延伸的起始点的倾向。根据转录反应的条件,其一般导致$^{7m}G(5')pppG(pN)_n$和$G(5')ppp^{7m}G(pN)_n$形式的两种异构RNA以大约相等的比例合成(RNA 1:957-967,(1995))。

[0036] 为了消除用mCAP二核苷酸进行的mRNA合成的双向起始,开发了新型的修饰的mCAP类似物,其中^{7m}G残基的3′-OH基团被OCH_3("OMe")取代:$^{7m}G(3'-O-Me)pppG$(也被称作抗反向帽类似物(Anti-Reverse Cap Analog)(ARCA))。ARCA仅以恰当的正向方向起始mRNA合成(RNA 7:1486-1495(2001))。本领域已知几种类型的ARCA类似物(参见例如美国专利号7,074,596)。然而,仍然需要相对于pppG的大幅摩尔过量的ARCA以确保大部分mRNA转录物分子具有5′-帽结构。进一步缺点是具有帽1结构的mRNA不能用$^{7m}GpppG^{2'-OMe}$帽二聚体(RNA 1:

957,(1995))或其ARCA类似物合成。

[0037] 目前,生产含有帽1结构的活性长mRNA的已知途径由下列组成:5'-三磷酸化mRNA转录物的酶促加帽和酶促2'O-甲基化或mCAP-加帽型或ARCA-加帽型mRNA前体的酶促2'-O-甲基化(Nucleosides,Nucleotides,and Nucleic Acids,25:337-340,(2006)和Nucleosides,Nucleotides,and Nucleic Acids 25(3):307-14,(2006))。两种方式均是相当费力、难以控制的,并且即使有了实质上的优化,两种方式都不能保证加帽并且甲基化的mRNA前体的高产率(J.Gen.Virol.,91:112-121,(2010))。而且,用于制备具有帽2结构的mRNA的方法甚至更难并且结果是不可预测的。用于将帽1转化成帽2的酶不是当前可商业获得的。

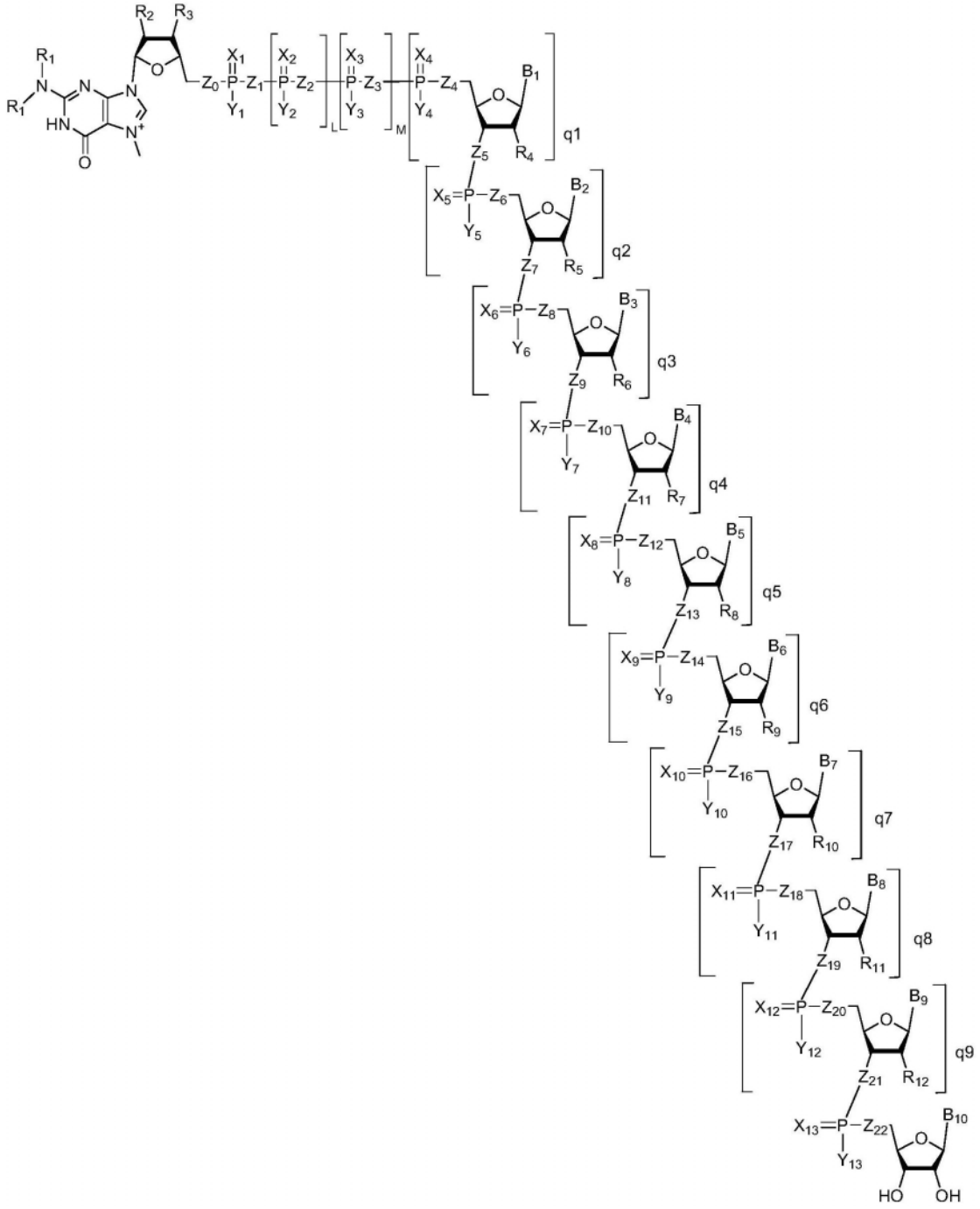
[0038] 在体外合成mRNA的另一个显著复杂性,尤其在大规模制造中,是需要从所有无活性的和在一些情况下有免疫原性的无帽mRNA形式分离和纯化带帽的活性mRNA分子。不幸的是,这些方法不是微不足道的并且通常需要合成具有缀合亲和标签部分的修饰的mCAP类似物,该缀合亲和标签部分允许更容易地分离和纯化加帽RNA转录物。合成具有亲和标签作为报道部分/亲和部分的mCAP类似物的方法和用于从转录反应混合物分离加帽RNA的新方案是本领域已知的(参见例如美国专利8,344,118)。虽然这些方式是有效的,但它们需要使用更昂贵的mCAP类似物并且它们仅允许制备和分离含有帽0结构的mRNA。

[0039] 在体外合成天然的和修饰的RNA用于多种应用中,包括核酶、反义、生物物理和生物化学研究。另外,加帽mRNA转录物用于需要蛋白质合成的应用,如体内表达实验(使用微注射、转染和感染)、体外翻译实验和试验以及在治疗学、诊断学、疫苗开发、标记和检测中的各种应用。

[0040] 因此,在工业中存在对如下允许大规模合成mRNA的组合物和方法的需要:(a)比常规方法少费力,(b)消除或减少转录期间的双向起始,(c)导致mRNA的产率更高,(d)与当前的方法相比成本减少,(e)减少具有不同5'-序列的异种产物的产生,以及(f)不需要另外的酶促反应以将帽1和帽2结构并入到合成的mRNA内。还存在合成含有修饰的和/或非天然的核苷的、携带特定的修饰和/或亲和标签的各种mRNA的需要,该特定的修饰和/或亲和标签诸如荧光染料、放射性同位素、质量标签和/或分子结合对的一个伙伴(partner)如生物素——在分子的5'末端或在分子的5'末端附近。

发明内容

[0041] 本文提供了用于合成5'-加帽RNA的方法和组合物。在本发明的一方面,起始加帽寡核苷酸引物包含式I的通式结构:

[0042] 

[0043] 其中

[0044] B_1至B_{10}中的每一个独立地为天然的、修饰的或非天然的核苷碱基;M为0或1;

[0045] L为0为1;

[0046] q_1为1;

[0047] q_2至q_9中的每一个独立地为0或1;

[0048] R_1为H或甲基;

[0049] R_2和R_3独立地为H、OH、烷基、O-烷基、卤素、胺、叠氮、连接体或可检测标志物;

[0050] X_1至X_{13}中的每一个独立地为O或S;

[0051] Y_1至Y_{13}中的每一个独立地为OH、SH、BH_3、芳基、烷基、O-烷基或O-芳基;

[0052] Z_0为O;

[0053] Z_1至Z_{22}中的每一个独立地为O、S、NH、CH_2、C(卤素)$_2$或CH(卤素);以及

[0054] R_4至R_{12}中的每一个独立地为H、OH、OMe、连接体或可检测标志物。

[0055] 在本发明的另一方面,提供包含式I的含帽起始寡核苷酸引物的RNA分子、包含这种RNA的药物组合物、含有这种RNA的细胞和含有从这种RNA翻译的蛋白质或肽的细胞。

[0056] 在本发明的又另一方面,提供下列方法:在有利于通过多核苷酸模板的RNA聚合酶转录的条件下,将包含式I的含帽起始寡核苷酸引物的RNA分子合成到包含多核苷酸模板和RNA聚合酶的混合物中,并且随后温育得到的混合物足以允许所述模板转录的时间。

附图说明

[0057] 图1示出了从鸟苷5'-二磷酸制备7-甲基鸟苷5-二磷酸($pp^{7m}G$)的示例性方法;

[0058] 图2示出了从$pp^{7m}G$制备7-甲基鸟苷5'-二磷酸咪唑(imidazolide)($Im\text{-}pp^{7m}G$)的示例性方法;

[0059] 图3示出了从3'-O-甲基鸟苷制备3'-O-甲基鸟苷5'-磷酸($pG_{3'\,Ome}$)的示例性方法;

[0060] 图4示出了从pG3'Ome制备3'-O-甲基鸟苷5'-磷酰咪唑(phosphorimidazolide)(Im-pG3'Ome)的示例性方法;

[0061] 图5示出了从$Im\text{-}pG_{3'\,Ome}$制备3'-O-甲基鸟苷5'-二磷酸($ppG_{3'\,Ome}$)的示例性方法;

[0062] 图6示出了用于从$ppG_{3'\,Ome}$制备7-甲基-3'-O-甲基鸟苷5-二磷酸($pp^{7m}G_{3'\,Ome}$)的示例性方法;

[0063] 图7示出了用于从$pp^{7m}G_{3'\,Ome}$制备7-甲基-3'-O-甲基鸟苷5-二磷酸咪唑($Im\text{-}pp^{7m}G_{3'\,Ome}$)的示例性方法;

[0064] 图8示出了用于制备$pN_{2'\,-OR1}pN$寡核苷酸(R_1=H或Me)的一般程序;

[0065] 图9示出了用于合成具有帽0、帽1或帽2结构的起始寡核苷酸的一般程序;

[0066] 图10A示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为O-甲基;X_1为O;X_2为O;X_{13}为O;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_{22}为O;

[0067] 图10B示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为鸟嘌呤;B_{10}为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1为1;q_2至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为H;X_1为O;X_2为O;X_4为O;X_{13}为O;Y_1为OH;Y_2为OH;Y_4为OH;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_4为O;Z_5为O;Z_{22}为O;R_4为O-甲基;

[0068] 图10C示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为鸟嘌呤;B_{10}为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1为1;q_2至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为O-甲基;X_1为O;X_2为O;X_4为O;X_{13}为O;Y_1为OH;Y_2为OH;Y_4为OH;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_4为O;Z_5为O;Z_{22}为O;R_4为O-甲基;

[0069] 图10D示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为腺嘌呤;B_{10}为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1为1;q_2至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为H;X_1为O;X_2为O;X_4为O;X_{13}为O;Y_1为OH;Y_2为OH;Y_4为OH;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_4为O;Z_5为O;Z_{22}为O;R_4为O-甲基;

[0070] 图10E示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为腺嘌呤;B_{10}为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1为1;q_2至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为O-甲基;X_1为O;X_2为O;

X_4为O;X_{13}为O;Y_1为OH;Y_2为OH;Y_4为OH;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_4为O;Z_5为O;Z_{22}为O;R_4为O-甲基;

[0071] 图10F示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为胞嘧啶;B_{10}为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1为1;q_2至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为H;X_1为O;X_2为O;X_4为O;X_{13}为O;Y_1为OH;Y_2为OH;Y_4为OH;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_4为O;Z_5为O;Z_{22}为O;R_4为O-甲基;

[0072] 图10G示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为胞嘧啶;B_{10}为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1为1;q_2至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为O-甲基;X_1为O;X_2为O;X_4为O;X_{13}为O;Y_1为OH;Y_2为OH;Y_4为OH;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_4为O;Z_5为O;Z_{22}为O;R_4为O-甲基;

[0073] 图10H示出了根据式I的实例中采用的起始加帽寡核苷酸引物的结构,其中:B_1为腺嘌呤;B_2为鸟嘌呤;B_{10}为鸟嘌呤;M为O;L为1;q_1为1;q_2为1;q_3至q_9为O;R_1为H;R_2为H;R_3为O-甲基;X_1为O;X_2为O;X_4为O;X_5为O;X_{13}为O;Y_1为OH;Y_2为OH;Y_4为OH;Y_5为OH;Y_{13}为OH;Z_0为O;Z_1为O;Z_2为O;Z_4为O;Z_5为O;Z_6为O;Z_{22}为O;R_4为O-甲基;R_5为O-甲基;

[0074] 图11示出了mRNA共转录地加帽的mRNA的荧光素酶活性;

[0075] 图12A-12H共同示出了用12A)ARCA、12B)$^{m7}GpppG_{2'\,Ome}pG$、12C)$^{m7}G_{3'\,Ome}pppG_{2'\,Ome}pG$、12D)$^{m7}GpppA_{2'\,Ome}pG$、12E)$^{m7}G_{3'\,Ome}pppA_{2'\,-OMe}pG$、12F)$^{m7}GpppC_{2'\,Ome}pG$、12G)$^{m7}G_{3'\,Ome}pppC_{2'\,Ome}pG$、12H)$^{m7}G_{3'\,Ome}pppA_{2'\,Ome}pG_{2'\,Ome}pG$共转录地加帽的mRNA的加帽效率。图12B-12G中的加帽效率等于或显著超过在图12A中观察到的加帽效率;以及

[0076] 图13A-13D共同示出了转录模板上用$^{m7}GpppA_{2'\,Ome}pG$共转录地加帽mRNA的加帽效率和起始保真度,其中图13A示例了利用引物/NTP配制物(配方,formulation)2、在模板位置+1和+2处2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷残基的应用;图13B示例了利用引物/NTP配制物3、在模板位置+1和+2处2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷残基的应用;图13C示例了利用引物/NTP配制物2、在模板位置+1和+2处2'-脱氧胞苷残基的应用;以及图13D示例了利用引物/NTP配制物3在模板位置+1和+2处2'-脱氧胞苷残基的应用;

[0077] 图14A和14B共同示出了在模板位置+1和+2处具有2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷残基的转录模板上vs在模板位置+1和+2处具有胞苷残基的转录模板上用m7GpppA2'OmepG起始加帽寡核苷酸制成的mRNA在分化THP-1细胞中的翻译的比较。

具体实施方式

[0078] 除非另外定义,本文所使用的所有术语具有与该发明所属领域技术人员通常理解的相同的含义。整个公开所引用的所有专利、专利申请和出版物其整体通过引用并入本文。如果本文的术语存在多个定义,以本节中的那些定义为准。

[0079] 如本文结合数值所使用的,术语"大约"或"约"意为指示值加或减30%,包括限定范围内的所有值,包括所述的值。

[0080] 如本文所使用的,术语"核酸"、"核苷酸序列"或"核酸序列"指代寡核苷酸、多核苷酸或其任何片段、任何核糖或脱氧核糖衍生物以及指代含有天然的和/或修饰的核苷酸残基和核苷酸间连接体的天然存在的或合成的分子。这些短语也指代天然的(例如,基因组的)或合成的来源的DNA或RNA,该DNA或RNA可以是单链的、双链的、三链的或四链的并且可

以代表有义链或反义链,或指代任何DNA样或RNA样物质。参照DNA序列,“RNA等价物”由与参照DNA序列相同的线性核苷酸序列组成,除了所有或大部分出现的含氮碱基胸腺嘧啶被尿嘧啶替代,并且糖骨架由核糖代替2’-脱氧核糖组成。适于本文提供的方法和组合物的另外的可选的核酸骨架包括但不限于硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、烷基磷酸三酯、芳基磷酸三酯、烷基磷酸酯、芳基膦酸酯、磷硼酸酯(phosphoboronate)、吗啉代核酸(MNA)、锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)。

[0081] 如本文所使用的,术语“引物”或“寡核苷酸引物”指代核糖-或脱氧核糖-或嵌合核糖/脱氧核糖-寡核苷酸,单链的,可以是天然地存在的或合成的,并且常常包括约2至约10个核苷酸,约3至约8个核苷酸或约3至约5个核苷酸之间的序列。寡核苷酸引物可以含有一个或多个修饰基团。寡核苷酸引物可以包括RNA、DNA和/或其他修饰的核苷。技术人员能够设计并制备适合于转录DNA模板序列的寡核苷酸引物。

[0082] 如本文所使用的,术语“起始加帽寡核苷酸类似物”或“起始加帽寡核苷酸引物”指代在引物的5’-端上含有帽0、帽1、帽2或TMG-帽结构的起始寡核苷酸引物。加帽引物具有未修饰的或开放的3’-OH基团,并且其可以通过将NTP并入到引物的3’端上而通过RNA聚合酶延伸。它能够在含有必要的组分(DNA模板(例如DNA质粒)、RNA聚合酶、核苷5’-三磷酸和合适的缓冲液)的转录系统中在启动子控制下起始体外转录。本文还使用的“起始引物”或“起始寡核苷酸引物”指代作为RNA聚合酶的有效底物的携带末端3’-OH基团的寡核苷酸。在某些实施方式中,起始寡核苷酸引物是RNA聚合酶的底物并且可以通过将NTP并入到引物的3’端而延伸。起始寡核苷酸引物在起始位点与DNA模板互补。

[0083] 如本文所使用的,在起始加帽寡核苷酸引物和NTP的上下文中,术语“未取代的”或“未修饰的”指代还未被修饰的起始加帽寡核苷酸引物和NTP。

[0084] 如本文所使用的,术语“修饰的起始加帽寡核苷酸引物”指代含有一个或多个另外的修饰基团的起始加帽寡核苷酸引物。

[0085] 如本文所使用的,术语“修饰基团”指代可以在一些位置处附接到起始引物的任何化学部分,该位置包括但不限于糖、核苷碱基、三磷酸桥和/或核苷酸间磷酸(例如,美国专利申请号20070281308)。起始加帽寡核苷酸引物的修饰基团可以是与转录的过程相容的任何性质的基团。

[0086] 如本文所使用的,术语“核苷酸间连接体”指代连接寡核苷酸引物或核酸的两个核苷的一个或多个键,并且可以是天然的磷酸二酯连接体或修饰的连接体。

[0087] 如本文所使用的,术语“标记”或“可检测标记”指代可以附接或以其他方式与分子缔合以便可以通过检测该标记直接地或间接地检测该分子的任何化合物或化合物组合。可检测标记可以是放射性同位素(例如,碳、磷、碘、铟、硫、氚等)、质量同位素(例如,H^2、C^{13}或N^{15})、染料或荧光团(例如,花菁、荧光素或香豆素)、半抗原(例如,生物素)或可以被直接地或间接地检测的任何其他试剂。

[0088] 如本文所使用的,术语“杂交”或“特异性杂交”指代在转录反应期间适当严格的条件下使起始加帽寡核苷酸引物退火至DNA模板的过程。与DNA的杂交通过起始加帽寡核苷酸引物进行,在某些实施方式中,该引物的长度为3-10个核苷酸——包括5’-5’反向帽结构。核酸杂交技术是本领域公知的(例如,Sambrook,et.al,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor Press,Plainview,N.Y.(1989);Ausubel,

F.M.,et.al,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Secaucus,N.J.(1994))。

[0089] 如本文所使用的,在起始加帽寡核苷酸引物和DNA模板的复合体的上下文中,术语“互补”、“互补的”或“互补性”指代标准的沃森/克里克(Watson/Crick)碱基配对规则。例如,序列“5’-A-G-T-C-3’”与序列“3’-T-C-A-G-5’”互补。某些非天然的或合成的核苷酸可以被包括在本文所描述的核酸中;这些包括但不限于碱基和糖修饰的核苷、核苷酸和核酸,诸如肌苷、7-脱氮鸟苷、2’-O-甲基鸟苷、2’-氟-2’-脱氧胞苷、假尿苷、锁定核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。互补性不需要是完美的;双链体可以含有错配的碱基对、简并的或不匹配的核苷酸。本领域技术人员可以凭经验考虑到多种变量来确定双链体稳定性,所述变量包括,例如,寡核苷酸的长度、碱基组成和寡核苷酸的序列、错配碱基对的发生率、离子强度、杂交缓冲液的组分和反应条件。

[0090] 互补性可以是“完全的”或“全部的”,其中两条核酸链的所有核苷酸碱基按照公认的碱基配对规则匹配,其可以是“部分的”,其中仅起始加帽寡核苷酸引物的一些核苷酸碱基与DNA靶按照公认的碱基配对规则匹配,或者其可以是“不存在的”,其中两条核酸链的核苷酸碱基都不按照公认的碱基配对规则匹配。起始加帽寡核苷酸引物与DNA模板之间的互补性程度可以对起始加帽寡核苷酸与DNA模板之间的杂交强度和相应地反应效率具有显著影响。术语互补性也可以涉及个别核苷酸使用。例如,可提示寡核苷酸内的一个具体核苷酸的其与另一条链内的一个核苷酸的互补性或其缺乏(lack)(相对于或相比于起始加帽寡核苷酸引物的其余部分与DNA链之间的互补性)。

[0091] 如本文所使用的术语“完全”、“全部”或“完美”互补意为起始加帽寡核苷酸引物的每一个核苷酸碱基均按照公认的碱基配对规则与DNA靶精确地匹配。

[0092] 如本文所使用的,术语“基本上互补”指代在严格杂交条件下杂交的两个序列。本领域技术人员将理解基本上互补的序列不需要沿着其整个长度杂交。具体地,基本上互补的序列可以包含不与靶序列杂交的连续碱基序列,并且可以定位在严格杂交条件下与靶序列杂交的连续碱基序列的3’或5’侧。

[0093] 如本文所使用的,当涉及起始加帽寡核苷酸引物序列和其与DNA模板杂交的能力使用时,术语“特异性的”是当比对起始加帽寡核苷酸引物与DNA链时,与DNA模板的一部分具有至少50%序列同一性的序列。可以优选的更高水平的序列同一性包括至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%,以及最优选100%的序列同一性。

[0094] 如本文所使用的,术语“核苷”包括所有天然地存在的核苷,包括在自然界中发现的所有形式的核苷碱基和呋喃糖苷。天然地存在的核苷中最常发现的碱基环是嘌呤环和嘧啶环。天然地存在的嘌呤环包括,例如,腺嘌呤、鸟嘌呤和N^6-甲基腺嘌呤。天然地存在的嘧啶环包括,例如,胞嘧啶、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶(pseudouracyl)。天然地存在的核苷例如包括但不限于腺苷、鸟苷、胞苷、胸苷、尿苷、肌苷、7-甲基鸟苷或假尿苷的核糖、2’-O-甲基或2’-脱氧核糖衍生物。

[0095] 如本文所使用的,术语“核苷类似物”、“修饰的核苷”或“核苷衍生物”包括如本文所描述的合成的核苷。核苷衍生物还包括具有或不具有保护基的具有修饰的碱基或/和糖部分的核苷,并且包括,例如,2’-脱氧-2’-氟尿苷、5-氟尿苷和类似物。本文提供的化合物和方法包括这种碱基环和其合成类似物、以及非天然的杂环取代的碱基糖和无环

(acyclic)取代的碱基糖。可以用于本发明的其他核苷衍生物包括,例如,LNA核苷、卤素取代的嘌呤(例如,6-氟嘌呤)、卤素取代的嘧啶、N^6-乙基腺嘌呤、N^4-(烷基)-胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶和类似物(美国专利号6,762,298)。

[0096] 如本文所使用的,术语“通用碱基”、“简并碱基”、“通用碱基类似物”和“简并碱基类似物”包括,例如,具有人工碱基的核苷类似物,在某些实施方式中,该人工碱基可被RNA聚合酶识别为天然NTP(例如,ATP、UTP、CTP和GTP)之一或其他特定NTP的替身。通用碱基或简并碱基公开在Loakes,D.,Nucleic Acids Res.,29:2437-2447(2001);Crey-Desbiolles,C.,et.al.,Nucleic Acids Res.,33:1532-1543(2005);Kincaid,K.,et.al.,Nuclei Acids Res.,33:2620-2628(2005);Preparata,FP,Oliver,JS,J.Comput.Biol.753-765(2004);以及Hill,F.,et.al.,Proc Natl Acad.Sci.U S A,95:4258-4263(1998))中。

[0097] 如本文所使用的,术语“修饰的NTP”指代具有结合在任何位置处的化学部分的核苷5'-三磷酸,该位置包括糖、碱基、三磷酸链或这三种位置的任何组合。这种NTP的实例可以在例如“Nucleoside Triphosphates and Their Analogs:Chemistry,Biotechnology and Biological Applications”,Vaghefi,M.,ed.,Taylor and Francis,Boca Raton(2005)中找到。

[0098] 如本文所使用的,术语“修饰的寡核苷酸”包括,例如,含有修饰的核苷、修饰的核苷酸间连接体或具有修饰的核苷和核苷酸间连接体的任何组合的寡核苷酸。寡核苷酸的核苷酸间连接体修饰的实例包括硫代磷酸酯、磷酸三酯和甲基膦酸酯衍生物(Stec,W.J.,et.al.,Chem.Int.Ed.Engl.,33:709-722(1994);Lebedev,A.V.,et.al.,E.,Perspect.Drug Discov.Des.,4:17-40(1996);以及Zon,et.al.,美国专利申请号20070281308)。核苷酸间连接体修饰的其他实例可以在Waldner,et.al.,Bioorg.Med.Chem.Letters6:2363-2366(1996)中找到。

[0099] 如本文所使用的,术语“启动子”指代指导和控制具体DNA序列(例如基因)的转录起始的dsDNA模板的区域。启动子位于DNA上的相同链和上游上(接近有义链的5'区域)。启动子一般与待转录的DNA序列紧邻(或与之部分地重叠)。启动子中的核苷酸位置相对于DNA转录开始的转录开始位点被指定(位置+1)。起始寡核苷酸引物与启动子序列的起始位点(其在某些实施方式中,在位置+1和+2处,并且在起始四聚体的情况下,在位置+1、+2和+3处)互补。

[0100] 如本文所使用的,术语“转录”或“转录反应”指代本领域已知的用于酶促制备与DNA模板互补的RNA从而生产DNA序列的多个RNA拷贝的方法。在转录反应中合成的RNA分子称为“RNA转录物”、“原始转录物”或“转录物”。涉及本文提供的组合物和方法的转录反应采用“起始加帽寡核苷酸引物”。DNA模板的转录可以是指数性的、非线性的或线性的。DNA模板可以是双链线性DNA、部分双链线性DNA、环状双链DNA、DNA质粒、PCR扩增子,与RNA聚合酶相容的修饰的核酸模板。

[0101] 如本文所使用的,术语“酰基”表示基团-C(O)R^a,其中R^a为氢、低级烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基和类似基团。

[0102] 如本文所使用的,术语“取代的酰基”表示基团-C(O)$R^{a'}$,其中$R^{a'}$为取代的低级烷基、取代的环烷基、取代的杂环基、取代的芳基、取代的杂芳基和类似基团。

[0103] 如本文所使用的,术语“酰氧基”表示基团-OC(O)R^b,其中R^b为氢、低级烷基、取代的低级烷基、环烷基、取代的环烷基、杂环基、取代的杂环基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基和类似基团。

[0104] 如本文所使用的,术语“烷基”指代烃的单键链,在一些实施方式中1-20个碳原子范围内的,并且在一些实施方式中1-8个碳原子范围内的烃的单键链;实例包括包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基、辛基、十二烷基和类似基团。

[0105] 如本文所使用的,术语“低级烷基”指代直链或支链的烃,在一些实施方式中,1-6个碳原子范围内的,并且在一些实施方式中2-5个碳原子范围内的直链或支链的烃。实例包括乙基、丙基、异丙基和类似基团。

[0106] 如本文所使用的,术语“链烯基”指代直链或支链烃基,其具有一个或多个双键,并且,除非另外指定,含有约2至约20个碳原子,并且在一些实施方式中约2至约10个范围内的碳原子,并且在一些实施方式中约2至约8个范围内的碳原子,并且在一些实施方式中约2至约6个范围内的碳原子。链烯基的实例包括乙烯基、烯丙基、1,4-丁二烯基、异丙烯基和类似基团。

[0107] 如本文所使用的,术语“链烯基芳基”指代链烯基取代的芳基,并且“取代的链烯基芳基”指代进一步带有如本文所述的一个或多个取代基的链烯基芳基。

[0108] 如本文所使用的,术语“亚链烯基(alkenylene)”指代这样的二价直链或支链烃基:具有至少一个碳-碳双键,并且一般含有2-20个碳原子,并且在一些实施方式中,2-12个范围内的碳原子,并且在一些实施方式中,2-8个范围内的碳原子,并且“取代的亚链烯基”指代进一步带有如本文所述的一个或多个取代基的亚链烯基。

[0109] 如本文所使用的,术语“亚烷基”指代这样的二价烃基:含有1-20个碳原子,并且在一些实施方式中1-15个范围内的碳原子,直链或支链,其中两个氢原子从相同的碳原子或从不同的碳原子被移除。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基(-CH2-)、亚乙基(-CH2CH2-)和类似基团。

[0110] 如本文所使用的,术语“炔基”指代这样的直链或支链烃基:具有一个或多个三键,并且含有约2-20个碳原子,并且在一些实施方式中约2-10个范围内的碳原子,并且在一些实施方式中约2-8个范围内的碳原子,并且在一些实施方式中约2-6个范围内的碳原子。炔基的实例包括乙炔基、丙炔基(炔丙基)、丁炔基和类似基团。

[0111] 如本文所使用的,术语“炔基芳基”指代炔基取代的芳基,并且“取代的炔基芳基”指代进一步带有如本文所述的一个或多个取代基的炔基芳基。

[0112] 如本文所使用的,术语“烷氧基”表示基团-OR^c,其中R^c为如定义的低级烷基、取代的低级烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂烷基、杂芳基烷基、环烷基、取代的环烷基、环杂烷基或取代的环杂烷基。

[0113] 如本文所使用的,术语“低级烷氧基”表示基团-OR^d,其中R^d为低级烷基。

[0114] 如本文所使用的,术语“烷基芳基”指代烷基取代的芳基,并且“取代的烷基芳基”指代进一步带有如本文所述的一个或多个取代基的烷基芳基。

[0115] 如本文所使用的,术语“烷硫基(alkylthio)”指代基团-S-R^h,其中R^h为烷基。

[0116] 如本文所使用的,术语“取代的烷硫基”指代基团-S-R^i,其中R^i为取代的烷基。

[0117] 如本文所使用的,术语“亚炔基”指代这样的二价直链或支链烃基:具有至少一个碳-碳三键的,并且一般具有约2-12个范围内的碳原子,并且在一些实施方式中约2-8个范围内的碳原子,并且“取代的亚炔基”指代进一步带有如本文所述的一个或多个取代基的亚炔基。

[0118] 如本文所使用的,术语“酰氨基”表示基团-C(O)$NR^{j}R^{j'}$,其中R^{j}和$R^{j'}$可以独立地为氢、低级烷基、取代的低级烷基、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基。

[0119] 如本文所使用的,术语“取代的酰氨基”表示基团-C(O)$NR^{k}R^{k'}$,其中R^{k}和$R^{k'}$独立地为氢、低级烷基、取代的低级烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基,然而,前提是R^{k}和$R^{k'}$中的至少一个不是氢。$R^{k}R^{k'}$与氮组合可以形成任选地取代的杂环或杂芳基环。

[0120] 如本文所使用的,术语“氨基”或“胺”表示基团-$NR^{n}R^{n'}$,其中R^{n}和$R^{n'}$可以独立地为如本文定义的氢、低级烷基、取代的低级烷基、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基。“二价胺”表示基团-NH-。“取代的二价胺”表示基团-NR-,其中R为低级烷基、取代的低级烷基、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基。

[0121] 如本文所使用的,术语“取代的氨基”或“取代的胺”表示基团-$NR^{p}R^{p'}$,其中R^{p}和$R^{p'}$独立地为氢、低级烷基、取代的低级烷基、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基,然而,前提是R^{p}和$R^{p'}$中的至少一个不是氢。$R^{p}R^{p'}$与氮组合可以形成任选地取代的杂环或杂芳基环。

[0122] 如本文所使用的,术语“芳酰基”指代芳基羰基类,如苯甲酰基,并且“取代的芳酰基”指代进一步带有如本文所述的一个或多个取代基的芳酰基。

[0123] 如本文所使用的,单独的或组合中的术语“芳基”指代苯基、萘基或稠合芳族杂环,其任选地具有5-10个环成员并且在一些实施方式中5-6个环成员的环烷基,和/或任选地被下列中的1至3个基团或取代基取代:卤素、羟基、烷氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、酰氧基、芳氧基、杂芳氧基、任选地被烷基、芳基或杂芳基单取代或二取代的氨基、脒基、任选地被烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的尿素、任选地被烷基、芳基或杂芳基N-单取代或N,N-二取代的氨基磺酰基、烷基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、杂芳基磺酰基氨基、烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基或类似基团。

[0124] 如本文所使用的,术语“芳氧基”表示基团-OAr,其中Ar为芳基或取代的芳基。

[0125] 如本文所使用的,术语“碳环”指代具有由连接的碳原子构成的单环或多个稠环的饱和的、不饱和的或芳族的基团。该环(一个或多个)可以任选地是未取代的或被以下基团取代的:例如,卤素、低级烷基、烷氧基、烷硫基、乙炔(-C≡CH)、氨基、酰氨基、叠氮基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环、杂芳基、取代的杂芳基、硝基($-NO_2$)、氰基(-CN)、巯基(-SH)、磺酰胺基($-S(O)_2NH_2$)和类似基团。

[0126] 如本文所使用的,术语“胍基”表示基团-$N=C(NH_2)_2$,并且“取代的胍基”表示基团-$N=C(NR_2)_2$,其中每个R独立地为如本文所述的H、烷基、取代的烷基、芳基或取代的芳基。

[0127] 如本文所使用的,术语“卤”或“卤素”指代所有卤素,即,氯(Cl)、氟(F)、溴(Br)和碘(I)。

[0128] 如本文所使用的,术语“杂芳基”指代这样的含有5或6个环原子的单环芳族环结构或具有8-10个原子的二环芳族基团:含有独立地选自基团O、S和N的一个或多个,并且在一

些实施方式中1-4个,并且在一些实施方式中1-3个,并且在一些实施方式中1-2个杂原子,并且任选地被下列中的1-3个基团或取代基取代:卤素、羟基、烷氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、酰氧基、芳氧基、杂芳氧基、任选地被烷基、芳基或杂芳基单取代或二取代的氨基、脒基、任选地被烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的尿素、任选地被烷基、芳基或杂芳基N-单取代或N,N-二取代的氨基磺酰基、烷基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、杂芳基磺酰基氨基、烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基或类似基团。杂芳基还旨在包括氧化的S或N,诸如亚磺酰基、磺酰基和叔环氮的N-氧化物。碳原子或氮原子是杂芳基环结构的附接点,从而保持稳定的芳族环。杂芳基的实例为邻苯二甲酰亚胺、吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、喹唑啉基、噌呤基、吲哚基、喹啉基、嘧啶基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、噻吩基、异噁唑基、氧杂噻二唑基(oxathiadiazolyl)、异噻唑基、四唑基、咪唑基、三嗪基、呋喃基、苯并呋喃基、吲哚基和类似基团。取代的杂芳基含有附接在可利用的碳或氮上以产生稳定化合物的取代基。

[0129] 如本文所使用的,术语“取代的杂芳基”指代任选地被一个或多个官能团单取代或多取代的杂环,该官能团为例如,卤素、低级烷基、低级烷氧基、烷硫基、乙炔、氨基、酰氨基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环、取代的杂环、杂芳基(hetaryl)、取代的杂芳基(substituted hetaryl)、硝基、氰基、巯基、磺酰胺基和类似基团。

[0130] 如本文所使用的,术语“杂环”指代具有单环(例如,吗啉代、吡啶基或呋喃基)或多个稠环(例如,萘基吡啶基、喹喔啉基、喹啉基、吲哚嗪基(indolizinyl)或苯并[b]噻吩基)并且在环内具有碳原子和至少一个杂原子(诸如N、O或S)的饱和的、不饱和的或芳族的基团,其可以任选地是未取代的或被以下基团取代的:例如,卤素、低级烷基、低级烷氧基、烷硫基、乙炔、氨基、酰氨基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环、杂芳基、取代的杂芳基、硝基、氰基、巯基、磺酰胺基和类似基团。

[0131] 如本文所使用的,术语“取代的杂环”指代被1或多个(例如,1、2或3个)选自以下基团的取代基取代的杂环:任选地取代的烷基、任选地取代的链烯基、任选地取代的炔基、卤素、羟基、烷氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、酰氧基、芳基、取代的芳基、芳氧基、杂芳氧基、氨基、酰氨基、脒基、任选地被烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的尿素、任选地被烷基、芳基或杂芳基N-单取代或N,N-二取代的氨基磺酰基、烷基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、杂芳基磺酰基氨基、烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基、酰基、羧基、杂环、取代的杂环、杂芳基、取代的杂芳基、硝基、氰基、巯基、磺酰氨基和氧代,该取代基附接在任何可利用的点处以产生稳定化合物。

[0132] 如本文所使用的,术语“烃基”指代任何这样的有机基团:其中其骨架仅包含碳和氢。因此,烃基包括烷基、环烷基、链烯基、环链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、芳基链烯基、链烯基芳基、芳基炔基、炔基芳基和类似基团。

[0133] 如本文所使用的,术语“取代的烃基”指代进一步带有一个或多个选自以下的取代基的任何上面提到的烃基:羟基、烃氧基、取代的烃氧基、烷硫基、取代的烷硫基、芳硫基(arylthio)、取代的芳硫基、氨基、烷基氨基、取代的烷基氨基、羧基、-C(S)SR、-C(O)SR、-C(S)NR_2,其中每个R独立地为氢、烷基或取代的烷基、硝基、氰基、卤素、-SO_3M或-OSO_3M,其中M为H、Na、K、Zn、Ca,或葡甲胺(meglumine)、胍基、取代的胍基、烃基、取代的烃基、烃基羰基、取代的烃基羰基、烃氧基羰基、取代的烃氧基羰基、烃基羰氧基

(hydrocarbylcarbonyloxy)、取代的烃基羰氧基、酰基、酰氧基、杂环、取代的杂环、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳基羰基、取代的杂芳基羰基、氨基甲酰基、单烷基氨基甲酰基、二烷基氨基甲酰基、芳基氨基甲酰基、氨基甲酸基、二硫代氨基甲酸基、芳酰基、取代的芳酰基、有机磺酰基、取代的有机磺酰基、有机亚磺酰基、取代的烷基亚磺酰基、烷基磺酰基氨基、取代的烷基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、取代的芳基磺酰基氨基、磺酰氨基、砜基和类似基团,包括上述基团中的两个和或更多个通过诸如下列的连接体/间隔体(spacer)部分附接到烃基部分:-O-、-S-、-NR-——其中R为氢、烷基或取代的烷基、-C(O)-、-C(S)-、-C(=NR')-、-C(=CR'$_2$)-——其中R'为烷基或取代的烷基、-O-C(O)-、-O-C(O)-O-、-O-C(O)-NR-(或-NR-C(O)-O-)、-NR-C(O)-、-NR-C(O)-NR-、-S-C(O)-、-S-C(O)-O-、-S-C(O)-NR-、-O-S(O)$_2$-、-O-S(O)$_2$-O-、-O-S(O)$_2$-NR-、-O-S(O)-、-O-S(O)-O-、-O-S(O)-NR-、-O-NR-C(O)-、-O-NR-C(O)-O-、-O-NR-C(O)-NR-、-NR-O-C(O)-、-NR-O-C(O)-O-、-NR-O-C(O)-NR-、-O-NR-C(S)-、-O-NR-C(S)-O-、-O-NR-C(S)-NR-、-NR-O-C(S)-、-NR-O-C(S)-O-、-NR-O-C(S)-NR-、-O-C(S)-、-O-C(S)-O-、-O-C(S)-NR-(或-NR-C(S)-O-)、-NR-C(S)-、-NR-C(S)-NR-、-S-S(O)$_2$-、-S-S(O)$_2$-O-、-S-S(O)$_2$-NR-、-NR-O-S(O)-、-NR-O-S(O)-O-、-NR-O-S(O)-NR-、-NR-O-S(O)$_2$-、-NR-O-S(O)$_2$-O-、-NR-O-S(O)$_2$-NR-、-O-NR-S(O)-、-O-NR-S(O)-O-、-O-NR-S(O)-NR-、-O-NR-S(O)$_2$-O-、-O-NR-S(O)$_2$-NR-、-O-NR-S(O)$_2$-、-O-P(O)R$_2$-、-S-P(O)R$_2$-或-NR-P(O)R$_2$-,其中每个R独立地为氢、烷基或取代的烷基、和类似基团。

[0134] 如本文所使用的,术语"羟基(hydroxyl或hydroxy)"指代基团-OH。

[0135] 如本文所使用的,术语"氧代"指代与附接的碳双键键合的氧取代基。

[0136] 如本文所使用的,术语"亚磺酰基"表示基团-S(O)-。

[0137] 如本文所使用的,术语"取代的亚磺酰基"表示基团-S(O)R^t,其中R^{t}为低级烷基、取代的低级烷基、环烷基、取代的环烷基、环烷基烷基、取代的环烷基烷基、杂环基、取代的杂环基、杂环基烷基、取代的杂环基烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳烷基、取代的杂芳烷基、芳烷基或取代的芳烷基。

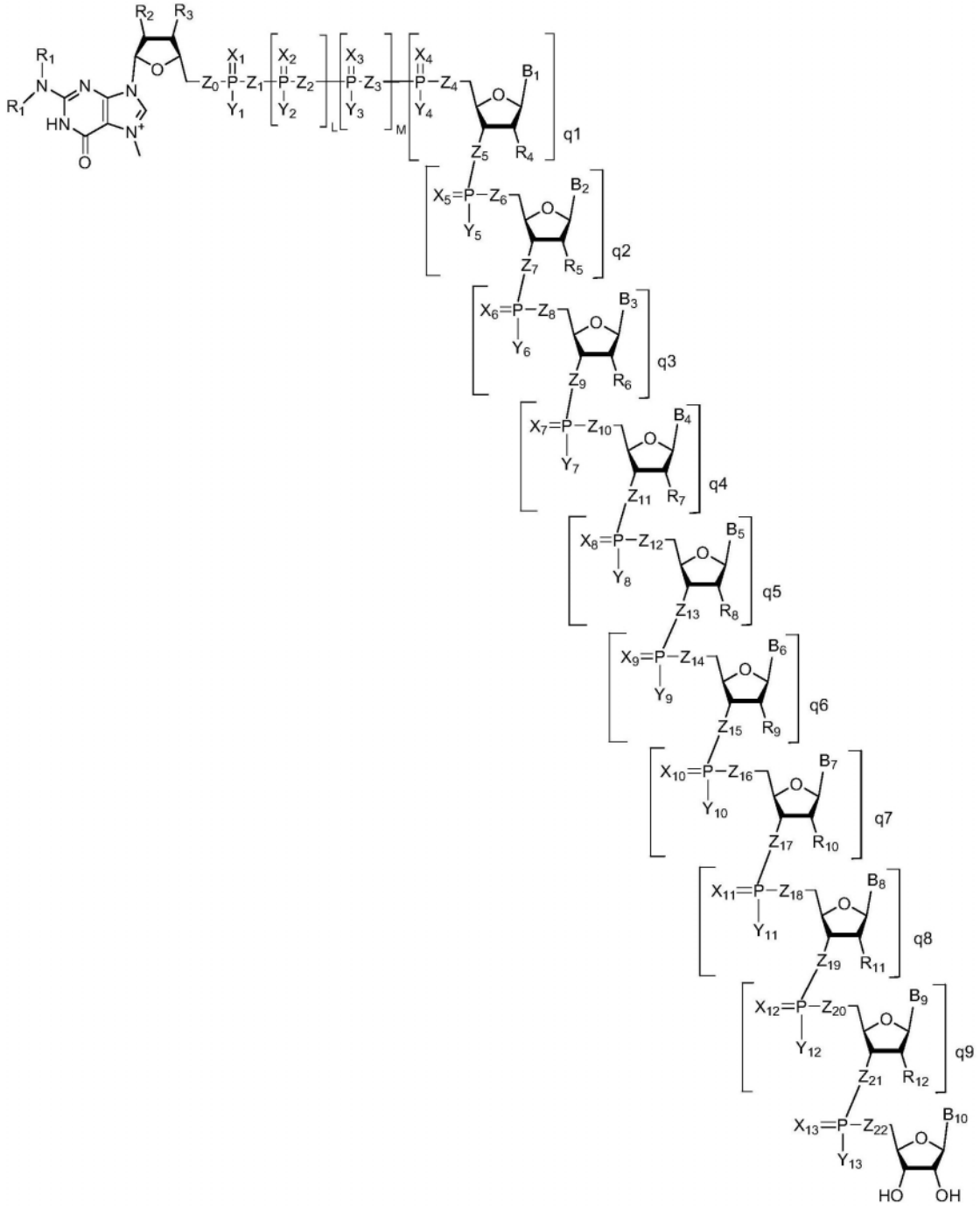
[0138] 如本文所使用的,术语"磺酰基"表示基团-S(O)$_2$-。

[0139] 如本文所使用的,术语"取代的磺酰基"表示基团-S(O)$_2$R^t,其中R^{t}为低级烷基、取代的低级烷基、环烷基、取代的环烷基、环烷基烷基、取代的环烷基烷基、杂环基、取代的杂环基、杂环基烷基、取代的杂环基烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳烷基、取代的杂芳烷基、芳烷基或取代的芳烷基。

[0140] 如本文所使用的,术语"硫酰基"表示基团-S(O)$_2$-。

[0141] 本发明提供用于合成5'加帽RNA的方法和组合物,其中起始加帽寡核苷酸引物具有通式形式^{m7}Gppp[N$_{2'Ome}$]$_n$[N]$_m$,其中^{m7}G为N7-甲基化的鸟苷或任何鸟苷类似物,N为任何天然的、修饰的或非天然的核苷,"n"可以是从1至4的任何整数并且"m"可以是从1至9的整数。在本发明的一方面,起始加帽寡核苷酸引物具有式I的结构:

[0142]



式I

[0143] 其中：

[0144] B_1至B_{10}的每一个独立地为天然的、修饰的或非天然的核苷碱基；M为0或1；

[0145] L为0或1；

[0146] q1为1；

[0147] q_2至q_9的每一个独立地为0或1；

[0148] R_1为H或甲基；

[0149] R_2和R_3独立地为H、OH、烷基、O-烷基、胺、叠氮基、卤素、连接体或可检测标志物；

[0150] X_1至X_{13}的每一个独立地为O或S；

[0151] Y_1至Y_{13}的每一个独立地为OH、SH、BH_3、芳基、烷基、O-烷基或O-芳基；

[0152] Z_0为O；Z_1至Z_{22}的每一个独立地为O、S、NH、CH_2、C(卤素)$_2$或CH(卤素)，以及

[0153] R_4至R_{12}的每一个独立地为H、OH、OMe或可检测标志物。

[0154] 在某些实施方式中，起始加帽寡核苷酸引物为三聚体(q^2-q^9=0)、四聚体(q^3-q^9=0)、五聚体(q^4-q^9=0)、六聚体(q^5-q^9=0)、七聚体(q^6-q^9=0)、八聚体(q^7-q^9=0)、九聚体(q^8-q^9=0)、十聚体(q^9=0)或十一聚体。起始加帽寡核苷酸三聚体引物的多个实例在下表I中列出：

[0155] 表I

[0156]

	起始加帽寡核苷酸引物的序列
	m^7GpppApA
	m^7GpppApC
	m^7GpppApG
	m^7GpppApU
	m^7GpppCpA
	m^7GpppCpC
	m^7GpppCpG
	m^7GpppCpU
	m^7GpppGpA
	m^7GpppGpC
	m^7GpppGpG
	m^7GpppGpU
	m^7GpppUpA
	m^7GpppUpC
	m^7GpppUpG
	m^7GpppUpU
	$m^7G_{3'Ome}$pppApA
	$m^7G_{3'Ome}$pppApC
	$m^7G_{3'Ome}$pppApG
	$m^7G_{3'Ome}$pppApU
	$m^7G_{3'Ome}$pppCpA
	$m^7G_{3'Ome}$pppCpC
	$m^7G_{3'Ome}$pppCpG
	$m^7G_{3'Ome}$pppCpU
	$m^7G_{3'Ome}$pppGpA
	$m^7G_{3'Ome}$pppGpC
	$m^7G_{3'Ome}$pppGpG
	$m^7G_{3'Ome}$pppGpU
	$m^7G_{3'Ome}$pppUpA
	$m^7G_{3'Ome}$pppUpC
	$m^7G_{3'Ome}$pppUpG
	$m^7G_{3'Ome}$pppUpU
	$m^7G_{3'Ome}pppA_{2'Ome}$pA
	$m^7G_{3'Ome}pppA_{2'Ome}$pC
	$m^7G_{3'Ome}pppA_{2'Ome}$pG

[0157]

	$m^7G_{3'Ome}pppA_{2'Ome}pU$
	$m^7G_{3'Ome}pppC_{2'Ome}pA$
	$m^7G_{3'Ome}pppC_{2'Ome}pC$
	$m^7G_{3'Ome}pppC_{2'Ome}pG$
	$m^7G_{3'Ome}pppC_{2'Ome}pU$
	$m^7G_{3'Ome}pppG_{2'Ome}pA$
	$m^7G_{3'Ome}pppG_{2'Ome}pC$
	$m^7G_{3'Ome}pppG_{2'Ome}pG$
	$m^7G_{3'Ome}pppG_{2'Ome}pU$
	$m^7G_{3'Ome}pppU_{2'Ome}pA$
	$m^7G_{3'Ome}pppU_{2'Ome}pC$
	$m^7G_{3'Ome}pppU_{2'Ome}pG$
	$m^7G_{3'Ome}pppU_{2'Ome}pU$
	$m^7GpppA_{2'Ome}pA$
	$m^7GpppA_{2'Ome}pC$
	$m^7GpppA_{2'Ome}pG$
	$m^7GpppA_{2'Ome}pU$
	$m^7GpppC_{2'Ome}pA$
	$m^7GpppC_{2'Ome}pC$
	$m^7GpppC_{2'Ome}pG$
	$m^7GpppC_{2'Ome}pU$
	$m^7GpppG_{2'Ome}pA$
	$m^7GpppG_{2'Ome}pC$
	$m^7GpppG_{2'Ome}pG$
	$m^7GpppG_{2'Ome}pU$
	$m^7GpppU_{2'Ome}pA$
	$m^7GpppU_{2'Ome}pC$
	$m^7GpppU_{2'Ome}pG$
	$m^7GpppU_{2'Ome}pU$

[0158] 本发明涵盖的其他起始加帽寡核苷酸引物包括具有已知的或新的碱基类似物的那些引物。用于合成起始加帽寡核苷酸引物的方法在下面的实例中举例说明。

[0159] 转录

[0160] 在真核细胞中,信使RNA(mRNA)的转录由RNA聚合酶II完成。这是具有复杂调控的复杂多亚基(亚单位,subunit)酶。为了在体外进行大规模转录,研究通常使用源自T7、T3、SP6、K1-5、K1E、K1F或K11噬菌体的单亚基噬菌体聚合酶。该族聚合酶具有~17个核苷酸的简单最小启动子序列,其不需要辅助蛋白并且具有对起始核苷酸序列的最小限制。虽然本申请重点讨论T7 RNA聚合酶(T7 RNAP),但本领域技术人员将理解本发明可以用其他RNA聚合酶实践。

[0161] T7 RNAP以至少两种蛋白质状态存在。第一种被称为"无效(顿挫型,abortive)复合体"并且与转录起始相关。第二种是非常进行性的构象,称为"延伸复合体"。体外转录可以分成六个步骤:1)RNA聚合酶结合启动子序列,2)转录起始,3)非进行性延伸,被称为无效转录,在此期间聚合酶频繁地释放DNA模板和短小的无效转录物,4)开放复合体转化为封闭复合体,5)进行性延伸,以及6)转录终止。转录期间产生的大量RNA由长度为2-8个核苷酸的短小无效片段组成(Biochemistry 19:3245-3253(1980);Nucleic Acids Res.9:31-45(1981);Nucleic Acids Res.15:8783-8798(1987);Biochemistry 27:3966-3974(1988))。合成约10-14个碱基后,RNA聚合酶从无效循环逃脱,同时失去与启动子DNA的序列特异性接

触,并且形成进行性延伸复合体,其中RNA链以序列非依赖性方式延伸(J.Mol.Biol.183:165-177(1985);Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.83:3614-3618(1986);Mol.Cell Biol.7:3371-3379(1987))。

[0162] 最具活性的III类T7启动子的共有序列包括转录起始位点上游的17bp序列,和下游的6bp序列(Cell 16:815-25.(1979))。第一个被转录核苷酸的位置通常被称为RNA的+1转录物核苷酸,第二个被转录核苷酸为+2转录物核苷酸,依此类推(表2)。在转录期间,两条链解链(熔解,melted)以形成转录泡并且双链体的下链(表2中的3'至5'所示)为用于转录的模板。对于转录物核苷酸+3及以后,模板链主要通过沃森-克里克碱基配对相互作用来限定被转录核苷酸的特性(identity)。此处,编码第一个RNA转录物核苷酸的核苷酸被限定为模板的+1核苷酸。在表2所示的实例中,+1转录物核苷酸为G,且+1模板核苷酸为C。同样地,+4转录物核苷酸为A,且+4模板核苷酸为T。

[0163] 表2

[0164]

转录物中的位置		
转录物序列	pppGGGAGA	
启动子上链	5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGA...-3′	SEQ ID NO. 1
启动子下链	3′-ATTATGCTGAGTGATATCCCTCT...-5′	SEQ ID NO. 2
模板中的位置		

[0165] 不同于DNA聚合酶,T7 RNAP在不存在引物的情况下起始RNA合成。起始中的第一步骤被称为从头(de novo)RNA合成,其中RNA聚合酶识别DNA模板上的特定序列,选择与在位置+1和+2处的模板残基互补的第一对核苷酸三磷酸,并且催化形成磷酸二酯键以形成二核苷酸。起始核苷酸对聚合酶具有的亲和力比延伸期间使用的那些低。对于第一起始NTP,Kd值为2mM,且对于第二起始NTP,Kd值为80μM,而在延伸期间,对于NTP,Kd为大约5μM(J.Mol.Biol.(2007)370,256-268)。已经发现从头合成是转录期间的限速步骤。T7 RNAP展现出对GTP作为起始核苷酸的强烈偏向(J.Biol.Chem.248:2235-2244(1973))。在基因组中的17个T7启动子中,15个以GTP(并且13个以pppGpG)起始,而在转录延伸期间不存在明显的NTP偏好(J.Mol.Biol.370:256-268(2007))。T7 RNA聚合酶很少在位置+1处编码A的启动子上起始;取而代之,转录主要以位置+2处编码的G起始(J.Biol.Chem.278:2819-2823(2003))。

[0166] 在从头RNA合成期间,起始核苷酸的结合主要通过由碱基堆叠创造的自由能、聚合酶残基、起始核苷酸的鸟嘌呤部分之间的特异性相互作用和碱基互补性相互作用实现(J.Mol.Biol.370:256-268(2007))。

[0167] 已知T7 RNAP还可以用短小寡核苷酸引物起始。例如,已知T7基因组中的13个启动子用pppGpG起始(J.Mol.Biol.370:256-268(2007))。数个小组示出T7 RNAP可以从二核苷酸引物起始(Biochemistry 24:5716-5723(1985))。Axelrod等证实了无帽GpA二核苷酸可以从分别为2'-脱氧胞苷和2'-脱氧胸苷的+1和+2模板核苷酸("CT"模板)起始。其反应条件为200微摩尔(μM)二聚体和100μM ATP、CTP、GTP和UTP。其反应混合物还含有100μM 3'dATP、3'dCTP、3'dUTP或50μM 3'dGTP。他们仅观察到GpA起始的RNA,而没有观察到GpA起始的RNA和来自GTP起始的5'三磷酸RNA的混合物。这可能是由于所采用的反应条件。对于第一起始

鸟苷,100μM GTP远低于2mM Kd的T7聚合酶(J.Mol.Biol.(2007)370,256-268)。由于GTP与起始寡核苷酸竞争起始,使用低GTP浓度有利于GpA起始,但导致低转录产率(估计最大计算产率为<150ug/mL的反应)。当在"CT"模板上用ApG、CpG、UpG或GpG起始转录时,他们观察到具有另外的非模板化的5'核苷酸(分别为A、C、U或G)的RNA转录物的形成。

[0168] Axelrod等还使用无帽GpG二核苷酸在模板核苷酸+1和+2是2'-脱氧胞苷("CC"模板)的启动子上起始RNA合成。他们观察到起始的低保真度并观察到三种不同的转录产物。他们陈述,"放射自显影照片的检查指示每个三联体的一个成员由在正常(+1)位置用GpG起始得到,每个三联体的第二个成员由在异常(-1)位置用GpG起始得到,并且每个三联体的第三个成员由在正常位置用鸟苷三磷酸起始得到。因此,GpG对于ø10启动子("CC"模板),以及对于ø1.1A启动子("CT"模板)是相对弱的起始子,并且不能阻止在所使用的浓度下通过鸟苷三磷酸的正常起始"。他们没有观察到通过ø10启动子("CC"模板)用GpA二核苷酸起始。CpA、ApC和ApA没有在上述"TC"和"CC"模板中的任何一个上充当起始子,大概因为这些不能在位置+1和+2处与模板核苷酸杂交。Axelrod等描述的方法被设计用于生产非常少量的测序用的放射性的转录物,并且不适用于大规模生产有用的药物量的RNA。如果使用更大浓度(~5mM)的起始二聚体和NTP(包括GTP)以增加RNA的产率,则预期的结果是低比例的以起始二聚体开始的RNA,因为在更接近于Kd(2mM)的NTP浓度下,GTP与二聚体有效地竞争从+1核苷酸起的起始,产生大比例的用pppG开始的RNA。

[0169] Pitulle等示出,用T7 RNAP转录可以用无帽寡核苷酸(2聚体至6聚体)起始(Gene,112:101-105(1992))。这些寡核苷酸具有5'-OH或5'单磷酸。他们还用生物素-ApG结构的寡核苷酸起始转录。在该研究中所使用的所有寡核苷酸均含有3'端G。Pitulle等还示出,2'-O-甲基残基和脱氧残基可以被包括在引物序列内以产生在RNA的5'-端处或5'-端附近具有2'-O-甲基化或2'-脱氧残基的RNA转录物。在该出版物中清楚的是,任何起始寡核苷酸的3'端鸟苷残基与+1模板核苷酸配对。这导致非模板化的核苷酸附加到被转录RNA的5'端。具体而言,作者陈述,"由于除了Y-末端的G之外不需要与模板DNA碱基配对,此区段中的序列变化也是很可能的"。因此所有的起始寡核苷酸引物仅在位置+1处与模板核苷酸"C"互补,而不与之后位置(+2、+3等)处的任何核苷酸互补。这在该小组随后的方法论文中得到确认(Methods Mol Biol.74:99-110(1997),Methods Mol.Biol.252:9-17,(2004))。他们的方法不同于本文描述的方法——其中起始加帽寡核苷酸引物的所有核苷酸与位置+1和之后位置处的模板核苷酸完全互补。Kleineidam等通过用2'-脱氧或2'-O-甲基糖修饰的二聚体或三聚体起始创建了5'修饰的tRNA转录物(Nucleic Acids Research 21:1097-1101(1993))。再次,作者陈述引物的3'-端鸟苷在+1模板核苷酸"C"处起始。

[0170] Ishikawa等的另一个研究示出,^{m7}GpppApG、^{m7}Gppp^{m6}ApG、^{m7}GpppA$_{2'\,Ome}$pG或^{m7}Gppp^{m6}A$_{2'\,Ome}$pG结构的加帽起始寡核苷酸三聚体可以在模板位置+1和+2处具有2'-脱氧胞苷残基的模板上起始转录("CC"模板;Nucleic Acids Symposium Series No.53:129(2009))。作者陈述,"来自使用^{m7}G5'pppG案例的不同结果可以是由^{m7}G5'pppN1pG中的额外腺苷(N1)和T7启动子中-1位置处的2'-脱氧胸苷之间的碱基配对造成的。"该方法明确区别于在本发明中所描述的方法——其中起始加帽寡核苷酸三聚体的+1和+2核苷酸与模板核苷酸的+1和+2配对。Ishikawa等使用了6mM起始寡核苷酸三聚体、0.9mM GTP和各7.5mM的ATP、CTP和UTP。作者使用了相对于竞争性GTP大于6倍过量的加帽起始寡核苷酸引物(转录

反应中最昂贵的核苷酸组分),以驱动转录反应相对于pppRNA倾向加帽RNA,这增加了合成RNA的总成本。在另一方面,低浓度的GTP(0.9mM)限制了转录反应中RNA总产率(理论上到少于1.4mg/mL)。相反,本文所描述的方法不需要限制任何NTP的浓度以获得有效的RNA加帽和RNA的更高产率(2至6mg/mL)两者,并且因此允许以商业上有用的成本生产高质量的mRNA。

[0171] 以上讨论的出版物均没有直接地测量RNA加帽效率,所以那些研究中的加帽程度是未知的。

[0172] 重要的是,以上所描述的所有研究中,+1模板核苷酸是2'-脱氧胞苷(Biochemistry 24:5716-5723(1985),Gene,112:101-105(1992),Methods Mol.Biol.74:99-110(1997),Methods Mol.Biol.252:9-17,(2004),Nucleic Acids Research 21:1097-1101(1993),Nucleic Acids Symposium Series No.53:129(2009))。

[0173] 自用寡核苷酸引物进行转录起始研究公开以来超过20年中,还没有发表过用含有5'-至5'反向帽结构的起始寡核苷酸引物进行转录起始的实例,直到在Nucleic Acids Symposium Series No.53:129(2009)中的短报告公开。

[0174] 本文提供的用于制备5'-加帽RNA的方法和组合物包括但不限于mRNA、小核RNA(snRNA)、小核仁RNA(snoRNA)、小卡哈尔体(cajal body)特异性RNA(scaRNA)。这些方法涉及使用含帽的寡核苷酸引物、核苷5'-三磷酸(NTP)和RNA聚合酶进行DNA模板化的和启动子控制的RNA合成。在某些方面,该方法使用起始加帽寡核苷酸引物,其在RNA合成中,特别地在加帽mRNA合成中提供效用。起始寡核苷酸引物具有类似天然RNA分子的帽0、帽1、帽2或TMG-帽的结构,其包括在RNA的倒数第二帽1和相邻于倒数第二帽2的5'-位置处的2'-O-甲基化的核苷单元。天然的帽0结构不具有2'-O-甲基化的核苷单元。

[0175] 用于制备RNA的方法和组合物,所述RNA包括但不限于mRNA、snRNA、snoRNA、scaRNA、转运RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)和转运-信使RNA(tmRNA)——其携带在分子的5'-端处或5'-端附近的修饰。这些方法涉及使用具有或不具有帽的起始寡核苷酸引物、核苷5'-三磷酸(NTP)和RNA聚合酶进行DNA模板化的和启动子控制的RNA合成。在某些方面,该方法使用修饰的起始寡核苷酸引物,所述修饰的起始寡核苷酸引物携带在RNA合成中;特别地在5'-修饰的RNA的合成中提供效用的结构修饰。

[0176] 起始加帽寡核苷酸引物具有开放的3'-OH基团,其通过向引物的3'端添加核苷酸单元而允许在DNA模板上RNA聚合酶介导的RNA合成起始。起始加帽寡核苷酸引物在转录起始位点处(即,起始位点位置更接近于启动子序列的3'-端并且可以与启动子序列重叠)与模板DNA序列基本上互补。在某些实施方式中,起始加帽寡核苷酸引物主要在始于引物的3'端的一个方向("正向")指导RNA的合成。在某些方面和实施方式中,起始加帽寡核苷酸引物对于RNA的合成起始胜过任何核苷5'-三磷酸,由此最大化用起始加帽寡核苷酸引物开始的RNA的生产,并且最小化用5'-三磷酸核苷(一般GTP)开始的RNA的生产。

[0177] 通过体外转录的mRNA制造利用了高活性噬菌体RNA聚合酶(T3、T7、SP6以及其他)。RNA聚合酶在特定启动子的控制下工作,该启动子被并入DNA质粒构建体中模板核苷酸序列前。转录过程通常从嘌呤核苷5'-三磷酸(一般GTP)开始,并继续持续直到RNA聚合酶遇到终止序列或完成DNA模板。

[0178] 如上讨论的,含有帽0的mCAP二核苷酸类似物(^{7m}G(5')ppp(5')N)已经被用于起始体外转录(例如,RNA 1:957-967(1995))。使用这些二核苷酸类似物产生的加帽RNA分子含

有帽0。然而,只有约50％的合成加帽RNA分子具有正确的帽0“正向”定向。为了将具有帽0的RNA转化为具有帽1的RNA,必须使用(核苷-2′-O)甲基转移酶进行另外的酶促反应。然而这种转化可能不是定量的;不容易控制并且难以将剩余的帽0RNA与帽1RNA分离。另外,来自NTP(具体地GTP)对起始转录的竞争进一步减少了活性加帽RNA分子的产量。

[0179] 另外,诸如$^{7m}G_{3'\,Ome}$(5′)ppp(5′)N的修饰的二核苷酸类似物和携带核糖上3’和/或2’位置被阻断的修饰^{7m}G残基的其他相关ARCA类似物已经被用于在体外转录的起始(例如,RNA 7:1486-1495(2001))。这些ARCA帽类似物仅以“正向”方向指导RNA合成,并且因此产生在5’-端上具有(天然的)帽0的RNA分子(具有对^{7m}G残基的2’和/或3’修饰)。与使用标准二核苷酸类似物(^{7m}G(5′)ppp(5′)N)制备的RNA相比,这种RNA在翻译系统中更具活性。为了将具有ARCA帽0的RNA转化为具有ARCA帽1的RNA,必须用类似于先前讨论的二核苷酸类似物所需的(核苷-2′-O)甲基转移酶进行另外的酶促反应。该方法与关于mCAP二核苷酸类似物详述的方法具有相同的缺点;将具有帽0的RNA转化为具有ARCA帽1的RNA可能不是定量的;该反应不容易控制,难以将剩余的帽0RNA与帽1RNA分离,并且来自NTP(具体地GTP)对转录起始的竞争进一步减少了活性加帽RNA分子的产量。

[0180] 具有3’-末端鸟苷残基的短小寡核苷酸引物(2至6聚体)已经被用于体外转录的起始(Pitulle,C.et.al.,Gene,112:101-105(1992))。这些寡核苷酸引物含有修饰的和未修饰的核糖核苷残基(例如,修饰的核糖核苷残基包括2’-O-甲基化的核苷残基和2’-脱氧核糖核苷残基)。较短的寡核苷酸引物(二聚体至四聚体)对于转录的起始基本上胜过GTP,而与GTP相比,较长的引物(五聚体至六聚体)在转录的起始中效率低得多。这可能是因为这些较长的引物(如它们所被设计)与DNA模板在起始位点具有低百分比的互补性。相比之下,二聚体AG(如所被设计)与DNA模板在起始位点互补。在本节中讨论的使用寡核苷酸引物产生的RNA分子具有内部2’-O-甲基化的核苷,但不含有5’-帽0、帽1、帽2或TMG-帽。为了将不具有帽结构的RNA转化为具有帽1、帽2或TMG-帽结构的RNA,将必须进行使用加帽酶的另外的酶促反应。然而,这种转化与上述那些具有相同的缺点。

[0181] 已经化学制备了含有帽结构和内部2’-O-甲基化核苷残基的其他短RNA寡核苷酸(Ohkuboet.al.,Org.Letters 15:4386-4389(2013))。使用T4 DNA连接酶和互补DNA碎片(splinter)寡核苷酸将这些短加帽寡核苷酸与长RNA的“去帽(decapitated)”(不具有5’-帽结构)片段连接。使用该化学-酶促方法合成的最终RNA具有内部2’-O-甲基化核苷残基和5’-TMG-帽结构两者。然而,使用该连接方式仅制备出短加帽RNA(<200聚体)。而且,产率低(15-30％)。不容易控制和优化T4 DNA连接反应,并且需要使用聚丙烯酰胺凝胶电泳的费力分离过程和从剩余无帽RNA中分离加帽RNA。通过PAGE方法从剩余无帽mRNA中分离长(500-10000个碱基)加帽mRNA是不可行的。

[0182] 最后,5’-修饰的核苷或5’-修饰的单核苷酸或5’-修饰的二核苷酸(一般是鸟苷的衍生物),已经被用于起始体外RNA转录(Gene,112:101-105(1992)和Bioconjug.Chem.,10371-378(1999))。这些起始核苷和核苷酸可以携带标记或亲和基团(例如生物素),并且当在RNA的5’-端上并入时,将允许容易的检测、分离和纯化合成的RNA。该5’标记的或标签化的RNA对于一些应用可能是必要的。然而,该策略不用于制备具有帽0、帽1、帽2或TMG-帽结构的mRNA。

[0183] 在本发明的某些方面,提供了式I的起始加帽寡核苷酸引物的组合物。在相关方

面,提供了使用式I的起始加帽寡核苷酸引物合成RNA的方法。

[0184] 起始加帽寡核苷酸引物

[0185] 本发明的起始加帽寡核苷酸引物具有可以在起始位点与DNA模板上的序列互补的杂交序列。用于本文提供的方法和组合物中的引物的杂交序列的长度取决于几个因素,包括模板核苷酸序列的特性和该引物与DNA模板杂交或在体外转录期间使用的温度。用于转录的起始加帽寡核苷酸引物的特定核苷酸序列的期望长度的确定可以容易被本领域的普通技术人员或通过常规实验法确定。例如,核酸或寡核苷酸的长度可以基于期望的杂交特异性或选择性确定。

[0186] 在一些实施方式中,起始加帽寡核苷酸引物(包括反向5'-5'帽核苷酸)的核苷酸长度在3个至约9个之间,在一些实施方式中,起始加帽寡核苷酸引物(包括帽)的核苷酸长度在3个至约7个之间,在一些实施方式中,起始加帽寡核苷酸引物(包括帽)的核苷酸长度在3个至约5个之间,并且在一些实施方式中,起始加帽寡核苷酸引物(包括帽)的核苷酸长度为约3个。起始加帽寡核苷酸引物内的杂交序列的长度可以等于或短于起始加帽寡核苷酸引物的总长度。

[0187] 杂交序列的存在促使起始加帽寡核苷酸引物主要仅以期望的方向(即,"正向"方向)在起始位点与DNA模板的互补序列对齐。在正向方向,RNA转录物始于反向鸟苷残基(即,^{7m}G(5′)ppp(5′)N…)。DNA模板(图1)上引物对齐的正向方向相对于不正确的"反向"方向的优势地位通过杂交复合体的热力学维持。后者是通过起始加帽寡核苷酸引物的杂交序列的长度和与DNA模板的杂交所涉及的碱基的特性来确定的。在期望的正向方向下的杂交也可以取决于DNA模板和起始加帽寡核苷酸引物杂交的或用于体外转录期间的温度和反应条件。

[0188] 与用标准GTP、ATP、CTP或UTP起始的效力相比,本发明的起始加帽寡核苷酸引物增强了转录起始的效力。在一些实施方式中,当RNA的合成主要始于起始加帽寡核苷酸引物而非始于转录混合物中的任何NTP时,认为转录的起始增强。转录起始的增强效率导致RNA转录物的更高的产率。转录起始的增强的效率可以相对于用无起始加帽引物的常规方法进行的RNA合成增加约10%、约20%、约40%、约60%、约80%、约90%、约100%、约150%、约200%或约500%。在某些实施方式中,"起始加帽寡核苷酸引物"对于转录的起始胜过任何NTP(包括GTP)。本领域普通技术人员能够容易地确定底物活性的水平和起始加帽寡核苷酸引物的效力。确定底物效力的方法的一个实例在实施例13中说明。在某些实施方式中,起始从加帽寡核苷酸引物而不是从NTP发生,其导致转录的mRNA的更高的加帽水平。

[0189] 在一些方面,提供了利用具有取代或修饰的起始加帽寡核苷酸引物合成RNA的方法。在一些方面,起始加帽寡核苷酸引物的取代和修饰不显著损害RNA的合成。可以进行常规测试合成以确定用修饰的起始加帽寡核苷酸引物是否可以获得期望的合成结果。本领域技术人员可以进行这种常规实验法以确定是否可以获得期望的结果。起始加帽寡核苷酸引物的取代或修饰包括,例如,一个或多个修饰的核苷碱基、一个或多个修饰的糖、一个或多个修饰的核苷酸间连接体和/或一个或多个修饰的三磷酸桥。

[0190] 可以包括本文提供的方法和组合物的一个或多个修饰基团的修饰起始加帽寡核苷酸引物可以通过将NTP并入到开放的3'-OH基团上而在DNA模板上通过RNA聚合酶延伸。起始加帽寡核苷酸引物可以包括天然的RNA核苷和DNA核苷、修饰的核苷或核苷类似物。起始

加帽寡核苷酸引物可以含有天然的核苷酸间磷酸二酯连接体或其修饰形式或其组合。

[0191] 在一个实施方式中,修饰基团可以是热不稳定的基团,其以随着酶反应介质的温度升高而增加的速率从修饰的起始加帽寡核苷酸引物解离。寡核苷酸和NTP的热不稳定基团的实例被描述于Nucleic Acids Res.,36:e131(2008),Collect.Symp.Ser.,10:259-263(2008)和Analytical Chemistry,81:4955-4962(2009)中。

[0192] 在一些方面,提供了合成RNA的方法,其中至少一个或多个NTP被添加到转录反应,可以具有如本文所公开的修饰。在一些方面,该至少一个NTP的修饰不显著损害RNA聚合酶介导的RNA合成。NTP的修饰可以包括,例如,一个或多个修饰的核苷碱基、一个或多个修饰的糖、一个或多个修饰的5'-三磷酸。修饰的NTP可以并入到起始加帽寡核苷酸引物的3'端上并且其并不阻断转录并支持引物的进一步延伸。

[0193] 在另一个实施方式中,起始加帽寡核苷酸引物的修饰基团可以是可检测标记或可检测标志物。因此,在转录之后,含有可检测标记或标志物的靶RNA可以通过尺寸、质量、颜色和/或亲和捕获来鉴定。在一些实施方式中,可检测标记或标志物为荧光染料;并且亲和捕获标记为生物素。在某些实施方式中,转录反应的一个或多个组分(起始加帽寡核苷酸引物和/或NTP)可以用可检测标记或标志物进行标记。因此,在转录后,RNA分子可以例如通过尺寸、质量、亲和捕获或颜色来鉴定。在一些实施方式中,可检测标记为荧光染料;并且亲和捕获标记为生物素。

[0194] 标准化学和酶促合成方法可以被用于合成本发明的"起始加帽寡核苷酸引物",并且在本文的实施例章节中被公开。

[0195] 试剂盒

[0196] 还考虑包括用于实施转录的"起始加帽寡核苷酸引物"的试剂盒。例如,试剂盒可以含有用于合成普通RNA(例如,FLuc mRNA)的所有转录试剂。更具体地,试剂盒可以含有:"起始加帽寡核苷酸引物";标记用于转录的容器;实施RNA合成的说明;和选自一种或多种修饰的或未修饰的起始加帽寡核苷酸引物、一种或多种未修饰的NTP、一种或多种修饰的NTP(例如,假尿苷5'-三磷酸)、RNA聚合酶、其他酶、反应缓冲液、镁和DNA模板的一种或多种试剂。

[0197] 本发明的起始加帽寡核苷酸引物相对于当前的方法和组合物具有显著优势,涉及各种起始核苷、核苷酸和寡核苷酸的使用或含有帽0结构的聚磷酸二核苷酸衍生物(诸如mCAP和ARCA)的使用。起始加帽寡核苷酸引物是与现有的转录系统和试剂相容的,并且不需要另外的酶或试剂。另外,使用起始加帽寡核苷酸引物使得若干非酶促和酶促步骤(诸如加帽和2'-O-甲基化)是不必要的,因此减少了RNA合成的过程复杂性和成本。

[0198] 虽然本文描述的示例性方法涉及T7 RNA聚合酶介导的转录反应,但本领域已知的用于转录反应的多种其他RNA聚合酶可以与本发明的组合物和方法一起应用。包括可以利用的天然的或突变的变体在内的其他酶包括,例如,SP6和T3 RNA聚合酶和来自其他来源的RNA聚合酶(包括热稳定的RNA聚合酶)。

[0199] 一些核酸复制和扩增方法可以包括转录作为该过程的一部分。在这些方法中有:转录介导的扩增(TMA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)、DNA和RNA测序以及本领域已知的其他核酸延伸反应。技术人员将理解其他方法可以代替转录方法或与转录方法(包括在将来开发的转录反应的变型)一起使用。

[0200] 治疗用途

[0201] 本发明还考虑生产含有起始加帽寡核苷酸引物的mRNA以用作药物组合物中的治疗剂、在细胞中引入含有起始加帽寡核苷酸引物的RNA以治疗细胞的医学状况或者将含有起始加帽寡核苷酸引物的RNA引入到利用那些RNA产生可以对宿主细胞具有治疗作用的蛋白质的细胞中。

[0202] 一种用于利用含有起始加帽寡核苷酸引物的RNA治疗状况的方法包括向患有或疑似患有状况的对象给予含有式I的起始加帽寡核苷酸引物的RNA或包含这种RNA的组合物的步骤,该状况的症状/症状学可以严重程度降低或被消除。

[0203] 当在4mg/ml或更低的浓度下在药学上可接受的载体和/或药学上可接受的盐中配制时,含有式I“化合物”的起始加帽寡核苷酸引物的RNA,相对于单独使用该药学上可接受的载体未治疗的个体,有效地产生至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的症状和/或症状学降低。

[0204] 药物组合物可以被配制用于通过注射或本领域技术人员已知的用于治疗具体状况的其他合适的途径进行给予。用于肠胃外给予的可注射组合物一般含有在适当的溶液和/或药物载体(如无菌生理盐水)中的活性化合物。该组合物还可以被配制为在在脂质或磷脂中的悬浮液、在脂质体悬浮液中或在含水乳液中。

[0205] 本领域技术人员已知用于制备多种组合物和/或配制物的方法。参见Remington's pharmaceutical Sciences(19th Ed.,Williams&Wilkins,1995)。待给予的组合物将含有对于增加靶细胞或组织中期望蛋白质的表达而言在药学上安全且有效量的一定量选定化合物。

[0206] 在一些实施方式中,药物组合物含有至少0.1%(w/v)的如上描述的化合物,在一些实施方式中,药物组合物含有大于0.1%,在一些实施方式中,药物组合物含有上至约10%的化合物,在一些实施方式中,药物组合物含有上至约5%的化合物,并且在一些实施方式中,药物组合物含有上至约1%(w/v)的化合物。适当浓度的选择取决于诸如活性剂递送的期望剂量、频率和方法的因素。

[0207] 对于对象(诸如哺乳动物或人)的治疗,基于诸如对象的体重和整体健康情况、所治疗的状况、症状的严重程度等的因素确定剂量。确定剂量和浓度以产生期望的好处,同时避免任何不期望的副作用。对于人类患者,主题化合物的一般剂量在约0.0005至500mg/天的范围内,并且在一些实施方式中,在约1-100mg/天之间的范围内。例如,较高剂量方案包括,例如50-100mg/天、75-100mg/天或50-75mg/天,并且较低剂量方案包括,例如1-50mg/天、25-50mg/天或1-25mg/天。

[0208] 通过以下非限制性实施例说明本发明的各个方面。这些实施例是用于说明的目的,而不是对本发明的任何实践的限制。应该理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以做出变化和修改。本领域普通技术人员容易知道如何合成或商业上获得本文所描述的试剂和组分。

[0209] 实施例1

[0210] 由鸟苷5'-二磷酸制备7-甲基鸟苷5-二磷酸(pp^{7m}G)(图1)

[0211] 向搅拌中的鸟苷5'-二磷酸(2.5mmol)在40.0mL水中的溶液,添加乙酸以将溶液的pH调节至4.0。经30分钟的时间向该混合物滴加硫酸二甲酯(4.0mL),并且将该反应混合物

在室温下搅拌4小时,同时使用0.1M NaOH溶液将反应混合物的pH维持在约4.0。4小时后,用CH_2Cl_2(3×50mL)萃取反应混合物以去除未反应的硫酸二甲酯。将水层用水稀释至500mL,用1M TEAB调节至pH 6.5,并且装载于DEAE Sephadex柱(3×50cm)上。使用0-1M TEAB,pH 7.5(3L)的线性梯度洗脱产物。将含有纯$pp^{7m}G$(三乙铵盐)的部分合并,蒸发,并在高真空下干燥以得到精细白色粉末(产率:80%)。类似的程序公开在Bioorgan.Med.Chem.Letters 17:5295-5299(2007)中。

[0212] 实施例2

[0213] 由$pp^{7m}G$制备7-甲基鸟苷5'-二磷酸咪唑($Im\text{-}pp^{7m}G$)

[0214] (图2)

[0215] 将$pp^{7m}G$的三乙铵盐(0.4mmol)与咪唑(4mmol)、三苯膦(2mmol)和2,2'-二吡啶基二硫化物(2mmol)在干燥DMF(20mL)中反应8小时。通过将反应混合物倒入250mL的0.2M高氯酸钠溶液中沉淀粗$Im\text{-}pp^{7m}G$。将混合物冷却至-20℃并通过离心收集得到的沉淀,用丙酮(3×50mL)洗涤并在高真空下干燥。$Im\text{-}pp^{7m}G$的分离产率为大约100%。类似的程序公开在Nucleosides,Nucleotides,and Nucleic Acids 24:1131-1134(2005)和J.Org.Chem.64:5836-5840(1999)中。

[0216] 实施例3

[0217] 由3'-O-甲基鸟苷制备3'-O-甲基鸟苷5'-磷酸($pG(_{3'\,Ome})$)

[0218] (图3)

[0219] 在60-70℃下,将3'-O-甲基鸟苷(10mmol)溶解在磷酸三乙酯(40mL)中。将混合物在冰水浴中冷却至0℃,添加氯氧化磷(30mmol)并将混合物在氩气下在室温下搅拌3小时。通过在搅拌下缓慢添加1M TEAB(100mL;pH 8.5)猝灭反应。将该混合物搅拌8小时并用1L的水稀释。将得到的溶液装载到DEAE Sephadex柱(3×40cm)上并用线性梯度0.05至1.0M(3L)的TEAB(pH 7.5)洗脱产物。将含有纯产物的部分组合,蒸发至固体残余物并与甲醇(4×50mL)共蒸发以得到呈白色固体的$pG(_{3'\,Ome})$(三乙铵盐)(产率60%)。类似的程序公开在美国专利申请序列号2012/0156751中。

[0220] 实施例4

[0221] 由$pG(_{3'\,Ome})$制备3'-O-甲基鸟苷5'-磷酰咪唑($Im\text{-}pG(_{3'\,Ome})$)

[0222] (图4)

[0223] 将$pG(_{3'\,Ome})$的三乙铵盐(0.5mmol)与咪唑(5mmol)、三苯膦(2.5mmol)和2,2'-二吡啶基二硫化物(2.5mmol)在干燥DMF(25mL)中反应5小时。通过将反应混合物倒入400mL的0.2M高氯酸钠的丙酮溶液中沉淀粗$Im\text{-}pG(_{3'\,Ome})$。将混合物冷却至-20℃并通过离心收集得到的沉淀,用丙酮(3×60mL)洗涤并在高真空下干燥(产率:100%)。类似的程序公开在美国专利申请序列号2012/0156751中。

[0224] 实施例5

[0225] 由$Im\text{-}pG(_{3'\,Ome})$制备3'-O-甲基鸟苷5'-二磷酸($ppG(_{3'\,Ome})$)

[0226] (图5)

[0227] 将固体氯化锌(14.0mmol)以小份添加到$Im\text{-}pG(_{3'\,Ome})$(7.0mmol)的干燥DMF(40mL)溶液。将混合物在氩气下搅拌15分钟直到所有固体溶解。添加1M三丁基磷酸铵(tributylammonium phosphate)的DMF(40mL)溶液并将混合物在室温下搅拌。5小时后,将

混合物用200mL的水稀释并用二氯甲烷(2×200mL)萃取。将水层用水(1L)稀释,装载到DEAE Sephadex柱(5×40cm)上并用0.05至1.0M(6L)TEAB(pH 7.5)的线性梯度洗脱。将含有纯产物的部分组合,蒸发并与甲醇(4×50mL)共蒸发以得到呈白色固体的ppG($_{3',OMe}$)(三乙铵盐)(产率:60%)。类似的程序公开在美国专利申请序列号2012/0156751中。

[0228] 实施例6

[0229] 由ppG($_{3',OMe}$)制备7-甲基-3'-O-甲基鸟苷5-二磷酸(pp^{7m}G($_{3',OMe}$))

[0230] (图6)

[0231] 制备ppG($_{3',OMe}$)(三乙铵盐;3.0mmol)在50mL水中的溶液并添加冰乙酸以将溶液的pH调节至4.0。经30分钟时间向该混合物滴加硫酸二甲酯(10.0mL)并将反应混合物在室温下搅拌4小时,同时使用0.1M NaOH溶液维持pH为4.0±0.5。4小时后,将反应混合物用CH_2Cl_2(3×150mL)萃取以去除未反应的硫酸二甲酯。将水层调节至pH 5.5,用水(500mL)稀释并装载到DEAE Sephadex柱(3×50cm)上。将产物使用0-1.0M TEAB,pH 7.5(3L)的线性梯度洗脱。将含有纯pp^{7m}G$_{3',OMe}$(三乙铵盐)的部分合并,蒸发,并在高真空下干燥以得到精细白色粉末(产率:80%)。类似的程序公开在RNA 9:1108-1122(2003);Nucleoside Nucleotides& Nucleic acids 25:337-340(2006);和美国专利申请序列号2012/0156751中。

[0232] 实施例7

[0233] 由pp^{7m}G($_{3',OMe}$)制备7-甲基-3'-O-甲基鸟苷5-二磷酸咪唑(Im-pp^{7m}G($_{3',OMe}$))

[0234] (图7)

[0235] 利用实施例1中描述的方案制备Im-pp^{7m}G($_{3',OMe}$)。类似的程序公开在RNA14:1119-1131(2008)中。

[0236] 实施例8

[0237] 用于制备pN($_{2'-OR1}$)pN二核苷酸(R_1=H或Me)的一般程序

[0238] (图8)

[0239] 将亚磷酰胺单体(i)(1.0mmol)和2',3',N-保护的核苷(ii)(1.0mmol)在含有2.5摩尔当量的活化剂(四唑)的10mL乙腈中反应。在室温下搅拌60分钟后,将中间产物用碘从P(III)氧化成P(V)状态并且用二氯甲烷(200mL)和盐水(200mL)萃取。将有机层用硫酸钠干燥并蒸发至固体泡沫(中间体(iii)).

[0240] 为去除DMT-保护基团,将中间体(iii)溶解在10mL的80%乙酸中,并且在反应完成(约1-2小时)后,将混合物蒸发并与甲醇(5×30mL)共蒸发以去除乙酸。将粗5'-OH二聚体(iv)使用在二氯甲烷中的5%甲醇作为洗脱剂通过硅胶色谱法分离并纯化。

[0241] 将5'-OH二聚体(iv)(1.0mmol)用2当量的双-氰乙基-N,N-二异丙基-亚磷酰胺和2当量的活化剂(四唑)在10mL的乙腈中亚磷酸化(phosphitylated)。在室温下搅拌30分钟后,将5'-亚磷酸化二聚体用碘从P(III)氧化至P(V)状态并用二氯甲烷(150mL)和盐水(150mL)萃取。将有机层蒸发至油状残留物,与甲醇(2×30mL)共蒸发,溶解在12mL甲醇中并添加浓氨水(12mL)。将混合物在室温下保持超过48小时,直到完成pN$_{2',OR1}$pN二聚体(v)的脱保护。将混合物蒸发并与甲醇(2×30mL)共蒸发。

[0242] 当R=甲基时,将粗二聚体(v)直接通过阴离子交换和反相色谱法纯化(步骤5)。将各部分蒸发以得到呈白色固体的最终的pN$_{2',OR1}$pN二聚体(v)(v;R_1=甲基;三乙铵盐)(35%总产率)。

[0243] 当R＝TBDMS时,将粗二聚体(v)用HF-3TEA混合物处理(步骤4B)以去除2'-OTBDMS保护基团(Org.Biomol.Chem.3:3851-3868(2005)和Nucl.Acids Res.22:2430-2431(1994))。当反应完成时,将混合物用0.05M TEAB稀释并通过阴离子交换和反向色谱法纯化(步骤5)。将各部分蒸发以得到呈白色固体的最终的$pN_{2',OR1}pN$二聚体(v)(R_1＝H;三乙铵盐)(30％总产率)。

[0244] 实施例9

[0245] 用于合成具有帽0、帽1或帽2结构的起始寡核苷酸的一般程序(实施例中使用5'-

[0246] 磷酸化二核苷酸)

[0247] (图9)

[0248] A方式1:

[0249] 向Im-pp^{7m}G($_{3',Ome}$)或Im-pp^{7m}G(2mmol;钠盐形式)和5'-磷酸化二核苷酸(1mmol;三乙铵盐)在DMF(50mL)中的悬浮液缓慢添加无水的$ZnCl_2$(1g),同时将混合物在35℃下搅拌。24小时后,通过添加25mM的EDTA水溶液(500mL)终止反应并通过1M碳酸氢钠溶液中和。将混合物用水稀释至1L并装载到DEAE Sephadex柱(3×50cm)上。将产物使用0-1M碳酸氢铵,pH 7.2(2L)的线性梯度洗脱。将含有纯产物的部分合并,蒸发,并在高真空下干燥以得到精细白色粉末(产率:60％)。类似的方式公开在美国专利申请序列号2012/0156751;Bioorg.Med.Chem.Lett.17:5295-5299(2007)和RNA14:1119-1131(2008)中。

[0250] B.方式2:

[0251] 将Im-pp^{7m}G($_{3',Ome}$)或Im-pp^{7m}G(2mmol)溶解在含有$MnCl_2$(2mmol)的N-甲基吗啉缓冲液(0.2M,pH 7.0,10mL)中,并添加到固体5'-磷酸化二核苷酸(1mmol;三乙铵盐)。在室温下搅拌反应。24-40小时后,用10mL的0.25M EDTA溶液终止反应。将混合物装载到DEAE Sephadex柱(3×50cm)上。将产物使用0-1.0M碳酸氢铵,pH 7.2(2L)的线性梯度洗脱。将含有纯产物的部分合并,蒸发,并在高真空下干燥以得到精细白色粉末(产率50％)。类似的方式公开在Bioorganic&Medicinal Chemistry 21:7921-7928(2013),Nucleic Acids Research 37:1925-1935(2009);J.Org.Chem.64:5836-5840(1999)中。(注:1.可以使用5'-磷酸化的三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体寡核苷酸代替在实施例9中说明的5'-磷酸化二核苷酸。2.为了制备具有帽0的起始加帽寡核苷酸,5'-磷酸化寡核苷酸在最先的5'-核苷残基上不具有2'-O-甲基,例如pApG。3.为了制备具有帽1的起始加帽寡核苷酸,5'-磷酸化寡核苷酸在第一个5'-核苷残基上携带一个2'-O-甲基,例如pA($_{2',Ome}$)pG。4.为了制备具有帽2的起始加帽寡核苷酸,5'-磷酸化寡核苷酸在第一个和第二个5'-核苷残基上携带两个2'-O-甲基,例如pA($_{2',Ome}$)pG($_{2',Ome}$)pG)。

[0252] 实施例10

[0253] 根据式I的起始加帽寡核苷酸引物的结构

[0254] 图10示出了根据结构I的实例中使用的起始加帽寡核苷酸引物的结构。A)$^{m7}G_{3',Ome}$pppG、B)^{m7}GpppG$_{2',Ome}$pG、C)$^{m7}G_{3',Ome}$pppG$_{2',Ome}$pG、D)^{m7}GpppA$_{2',Ome}$pG、E)$^{m7}G_{3',Ome}$pppA$_{2',Ome}$pG、F)^{m7}GpppC$_{2',Ome}$pG、G)$^{m7}G_{3',Ome}$pppC$_{2',Ome}$pG、H)^{m7}GpppA$_{2',Ome}$pG$_{2',Ome}$pG。

[0255] 实施例11

[0256] 用ARCA引物在体外转录

[0257] 编码萤火虫荧光素酶的双链DNA转录模板通过聚合酶链反应生成。+1模板核苷酸

为2'-脱氧胞苷。转录反应与25ug/mL转录模板、40mM Tris-HCl(pH 8.0)、27mM $MgCl_2$、2mM亚精胺、10mM DTT、0.002% Triton x-100、1000单位/mL鼠RNA酶抑制剂(New England Biolabs目录#M0314)、2单位/mL无机焦磷酸酶(New England Biolabs目录#M2403)、4000单位/mL T7 RNA聚合酶(New England Biolabs目录#M0251)、6mM ARCA($^{m7}G_{3',Ome}$pppG)、1.5mM GTP、7.5mM ATP、7.5mM CTP和7.5mM UTP组合。转录在37℃下温育2小时。用10mM Tris-HCl(pH 7.6)、2.5mM $MgCl_2$、0.5mM $CaCl_2$和100单位/mL DNA酶I(New England Biolabs目录#M0303)补充反应并在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱并通过将溶液调节至50mM Bis-Tris-Propane HCl(pH 6.0)、1mM $MgCl_2$、0.1mM$ZnCl_2$和250单位/mg南极磷酸酶(New England Biolabs目录#M0289)而去磷酸化。将反应在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱。

[0258] 实施例12

[0259] 用三聚体起始加帽寡核苷酸引物在体外转录

[0260] 表1指示了用于转录的一些起始加帽寡核苷酸引物。通过聚合酶链反应生成每个三聚体的特定双链萤火虫荧光素酶DNA转录模板。这些模板的不同之处在于模板核苷酸+1和+2。对于给定的三聚体,模板核苷酸+1与B_1(该核苷酸注定成为转录物核苷酸+1)互补。同样地,模板核苷酸+2与B_{10}(该核苷酸注定成为转录物核苷酸+2;参见实施例10))互补。转录反应与25ug/mL转录模板、40mM Tris-HCl(pH 8.0)、27mM $MgCl_2$、2mM亚精胺、10mM DTT、0.002% Triton x-100、1000单位/mL鼠RNA酶抑制剂(New England Biolabs目录#M0314)、2单位/mL无机焦磷酸酶(New England Biolabs目录#M2403)、4000单位/mL T7 RNA聚合酶(New England Biolabs目录#M0251)和6mM起始加帽寡核苷酸引物、1.5mM GTP和各7.5mM的ATP、CTP和UTP组合。在随后的实施例中,该引物/NTP配制物将被称为引物/NTP配制物1。本领域技术人员清楚,其他聚合酶,诸如T7、T3或SP6 RNA聚合酶,可以用于代替T7 RNA聚合酶,通过使用其对应的启动子而执行相同的功能。转录反应混合物在37℃下温育2小时。用10mM Tris-HCl(pH 7.6)、2.5mM $MgCl_2$、0.5mM $CaCl_2$和100单位/mL DNA酶I(New England Biolabs目录#M0303)补充反应,并且在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱,并通过将溶液调节至50mM Bis-Tris-Propane HCl(pH 6.0)、1mM $MgCl_2$、0.1mM $ZnCl_2$和250单位/mg南极磷酸酶(New England Biolabs目录#M0289)而去磷酸化。将反应在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱。

[0261] 实施例13

[0262] 用四聚体起始加帽寡核苷酸引物$^{7m}G_{3',Ome}pppA_{2',Ome}pG_{2',Ome}pG$在体外转录

[0263] 起始加帽寡核苷酸引物$^{7m}G_{3',OMe}pppA_{2',OMe}pG_{2',OMe}pG$用于转录。按照具有下列改变的实施例11进行转录。通过聚合酶链反应生成四聚体的特定双链DNA转录模板。模板核苷酸+1(2'-脱氧胸苷)与腺苷(注定成为转录物核苷酸+1的引物第一个核苷酸)互补。同样地,模板核苷酸+2(2'-脱氧胞苷)与鸟苷(注定成为转录物核苷酸+2的引物第二核苷酸)互补。同样地,模板核苷酸+3(2'-脱氧胞苷)与鸟苷(注定成为转录物核苷酸+3的引物第三个核苷酸)互补。转录反应与25ug/mL转录模板、4 0mM Tris-HCl(pH 8.0)、27mM $MgCl_2$、2mM亚精胺、

10mM DTT、0.002% Triton x-100、1000单位/mL鼠RNA酶抑制剂(New England Biolabs目录#M0314)、2单位/mL无机焦磷酸酶(New England Biolabs目录#M2403)、4000单位/mLT7 RNA聚合酶(New England Biolabs目录#M0251)、6mM起始加帽寡核苷酸引物$^{7m}G_{3'\,OMe}pppA_{2'\,OMe}pG_{2'\,OMe}pG$、1.5mM的GTP、7.5mM的ATP、7.5mM的UTP和7.5mM的CTP组合。本领域技术人员清楚,其他聚合酶,诸如T7、T3或SP6 RNA聚合酶,可以用于代替T7 RNA聚合酶,通过使用其对应的启动子执行相同的功能。转录反应混合物在37℃下温育2小时。用10mM Tris-HCl(pH 7.6)、2.5mM $MgCl_2$、0.5mM $CaCl_2$和100单位/mL DNA酶I(New England Biolabs目录#M0303)补充反应,并且在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱,并通过将溶液调节至50mM Bis-Tris-Propane HCl(pH 6.0)、1mM $MgCl_2$、0.1mM $ZnCl_2$和250单位/mg南极磷酸酶(New England Biolabs目录#M0289)而去磷酸化。将反应在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱。

[0264] 实施例14

[0265] 在模板位置+1和+2处分别具有2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷残基的转录模板上,用$^{m7}GpppA_{2'\,Ome}pG$起始加帽寡核苷酸引物在体外转录。

[0266] 使用分别在模板位置+1和+2处的2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷残基的双链萤火虫荧光素酶DNA转录模板一起。两个转录反应与25ug/mL转录模板、40mM Tris-HCl(pH 8.0)、27mM $MgCl_2$、2mM亚精胺、10mM DTT、0.002% Triton X-100、1000单位/mL鼠RNA酶抑制剂(New England Biolabs目录#M0314)、2单位/mL无机焦磷酸酶(New England Biolabs目录#M2403)、4000单位/mL T7 RNA聚合酶(New England Biolabs目录#M0251)组合。两个转录的不同之处在于起始加帽寡核苷酸的量、NTP的量和NTP的特性。第一个转录设计为模拟Ishikawa等(Nucleic Acids Symposium Series No.53:129(2009))的转录条件。该转录反应含有6mM的$^{m7}GpppA_{2'\,Ome}pG$起始加帽寡核苷酸引物、0.9mM GTP和7.5mM的ATP、CTP和UTP。在随后的实施例中,该引物/NTP配制物将被称为引物/NTP配制物2。在该配制物中,起始寡核苷酸引物相对于GTP大于6倍过量。第二个转录使用5mM的$^{m7}GpppA_{2'\,Ome}pG$起始加帽寡核苷酸引物、5mM GTP、ATP、CTP和假尿苷三磷酸(ΨTP)。在随后的实施例中,该引物/NTP配制物将被称为引物/NTP配制物3。在引物/NTP配制物3中,为了产生商业上有用量的RNA,增加了GTP浓度。本领域技术人员清楚,其他聚合酶,诸如T7、T3或SP6 RNA聚合酶,可以用于代替T7 RNA聚合酶,通过使用其对应的启动子执行相同的功能。将转录反应混合物在37℃下温育2小时。用10mM Tris-HCl(pH 7.6),2.5mM $MgCl_2$、0.5mM $CaCl_2$和100单位/mL DNA酶I(New England Biolabs目录#M0303)补充反应并在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱,并通过将溶液调节至50mM Bis-Tris-Propane HCl(pH 6.0)、1mM $MgCl_2$、0.1mM $ZnCl_2$和250单位/mg南极磷酸酶(New England Biolabs目录#M0289)而去磷酸化。对于引物/NTP配制物2,将反应在37℃下温育1小时,并且对于引物/NTP配制物3,将反应在37℃下温育3小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasyMaxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱。关于引物/NTP配制物2和3的纯化转录产率分别为0.7毫克/毫升转录反应(mg/mL)和3.9mg/mL转录反应。关于引物/NTP配制物3的产率大大优于关于引物/NTP配制物2获得的产率。

[0267] 实施例15

[0268] 在模板位置+1和+2处具有胞苷残基的转录模板上,用$^{m7}GpppA_{2',0me}pG$起始加帽寡核苷酸引物在体外转录

[0269] 使用双链萤火虫荧光素酶DNA转录模板,其中+1和+2模板核苷酸为胞苷,并且因此不完全与$^{m7}GpppA_{2',0me}pG$起始加帽寡核苷酸引物互补。两个转录反应与25ug/mL转录模板、40mM Tris-HCl(pH 8.0)、27mM $MgCl_2$、2mM亚精胺、10mM DTT、0.002% Triton X-100、1000单位/mL鼠RNA酶抑制剂(New England Biolabs目录#M0314)、2单位/mL无机焦磷酸酶(New England Biolabs目录#M2403)、4000单位/mL T7 RNA聚合酶(New England Biolabs目录#M0251)组合。两个转录的不同之处在于起始加帽寡核苷酸和NTP的量。第一个转录设计为模拟Ishikawa等(Nucleic Acids Symposium Series No.53:129(2009))的转录条件。该转录反应含有引物/NTP配制物2。第二个转录使用引物/NTP配制物3。本领域技术人员清楚,其他聚合酶,诸如T7、T3或SP6 RNA聚合酶,可以用于代替T7 RNA聚合酶,通过使用其对应的启动子执行相同的功能。将转录反应混合物在37℃下温育2小时。用10mM Tris-HCl(pH 7.6)、2.5mM $MgCl_2$、0.5mM $CaCl_2$和100单位/mL DNA酶I(New England Biolabs目录#M0303)补充反应并在37℃下温育1小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)或通过反相高效液相色谱法来纯化。通过将溶液调节至50mM Bis-Tris-Propane HCl(pH 6.0)、1mM $MgCl_2$、0.1mM $ZnCl_2$和250单位/mg南极磷酸酶(New England Biolabs目录#M0289),将mRNA去磷酸化。对于引物/NTP配制物2,将反应在37℃下温育1小时,并且对于引物/NTP配制物3,将反应在37℃下温育3小时。将得到的mRNA根据制造商的说明使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen目录#75162)纯化。将mRNA在水中洗脱。关于引物/NTP配制物2和3的纯化转录产率分别地为0.6毫克/毫升转录反应(mg/mL)和3.9mg/mL转录反应。关于引物/NTP配制物3的产率大大优于关于引物/NTP配制物2获得的产率。

[0270] 实施例16

[0271] 在Huh-7细胞中翻译mRNA

[0272] (图11)

[0273] 在培养的肝细胞中评估用起始加帽寡核苷酸引物生成的荧光素酶mRNA的翻译活性,一式三份。将Huh-7细胞在37℃、5%CO_2的气氛下,在补充有10% FBS、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸和青霉素/链霉素的DMEM中培养。将细胞用400ng的mRNA转染。为了比较,将细胞也用Cap0荧光素酶mRNA转染,该Cap0荧光素酶mRNA通过用ARCA起始而生成。在20小时时,收获细胞并根据制造商的建议使用ONE-Glo荧光素酶试验系统试剂盒(Promega目录#E6120)测量荧光素酶活性。根据制造商的建议使用GloMax-Multi+检测系统仪器测量发光。检测所有测试的mRNA的荧光素酶活性(图11)。用起始加帽寡核苷酸引物或3'-O-甲基起始加帽寡核苷酸引物生成的mRNA的翻译效率类似于ARCA加帽的RNA的事实表明它们被有效地共转录地加帽了。

[0274] 实施例17

[0275] 确定通过使用用ARCA或采用引物/NTP配制物1的起始加帽寡核苷酸引物共转录加帽而生成的mRNA的加帽效率的试验

[0276] (图12A-12H)

[0277] 对于测试的每种起始加帽寡核苷酸引物,将足以通过液相色谱质谱法(LC-MS)检

测的量的mRNA进行加帽试验。在该试验中,从全长mRNA的5'端切割小片段并通过LC-MS分析。切割mRNA之前,将其用南极磷酸酶(New England Biolabs目录#M0289)处理以将无帽单磷酸、二磷酸和三磷酸转化为5'OH以促进分析。然后将磷酸酶处理过的mRNA切割并纯化。将纯化的RNA进行LC-MS分析。图12示出了LC迹线(traces)。将相应于无帽(磷酸酶处理后的5'OH)和帽1的LC峰以观察到的质量指示。插图示意图示出了起始寡核苷酸引物在转录模板上的比对。请注意,在示意图中"|"指示加帽起始核苷酸与模板核苷酸的一个碱基对。下标"m"指示2'-O-甲基且上标"m7"指示碱基甲基化。为了比较,将用ARCA共转录加帽的mRNA进行加帽试验。使用下式进行加帽效率的估计:(加帽峰的强度)/[(加帽峰的强度)+(5'OH峰的强度)]。在图12中观察到的%加帽为A)$^{m7}G_{3'Ome}$pppG=79%、B)^{m7}GpppG$_{2'Ome}$pG=89%、C)$^{m7}G_{3'Ome}$ppp$G_{2'Ome}$pG=87%、D)^{m7}GpppA$_{2'Ome}$pG=99%、E)$^{m7}G_{3'Ome}$pppA$_{2'Ome}$pG=99%、F)^{m7}GpppC$_{2'Ome}$pG=98%、G)$^{m7}G_{3'Ome}$pppC$_{2'Ome}$pG=97%、H)^{m7}GpppA$_{2'Ome}$p$G_{2'Ome}$pG=50%。在每种情况中,用起始三聚体加帽寡核苷酸引物共转录加帽的转录物的加帽效率大于关于$^{m7}G_{3'Ome}$pppG(ARCA)观察到的加帽效率。

[0278] 实施例18

[0279] 在模板位置+1和+2处具有2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷残基的转录模板上vs在模板位置+1和+2处具有胞苷残基的转录模板上用^{m7}GpppA$_{2'Ome}$pG起始加帽寡核苷酸加帽的比较

[0280] (图13A-13D)

[0281] 将在实施例14和15中制成的mRNA进行加帽试验以确定在模板位置+1和+2处具有2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷残基vs在模板位置+1和+2处具有胞苷残基的转录模板的转录物的加帽相对效率和特异性。将足以通过液相色谱质谱法(LC-MS)检测的足量的mRNA进行加帽试验。在该试验中,从全长mRNA的5'端切割小片段并通过LC-MS分析。切割mRNA之前,将其用南极磷酸酶(New England Biolabs目录#M0289)处理以将无帽单磷酸、二磷酸和三磷酸转化为5'OH以促进分析。然后将磷酸酶处理过的mRNA切割并纯化。将纯化的RNA进行LC-MS分析。图13示出了LC迹线。将相应于无帽和帽1的LC峰以观察到的质量指示。插图示意图示出了起始寡核苷酸引物在转录模板上的比对。下标"m"指示2'-O-甲基且上标"m7"指示碱基甲基化。将图13A和13B转录物分别使用引物/NTP配制物2和引物/NTP配制物3、从在模板核苷酸+1和+2处分别具有2'-脱氧胸苷和2'-脱氧胞苷的模板转录。图13C和13D分别是使用引物/NTP配制物2和引物/NTP配制物3、从在模板核苷酸+1和+2处具有2'-脱氧胞苷的模板转录的转录物。当^{m7}GpppA$_{2'Ome}$pG起始寡核苷酸与+1和+2核苷酸完全互补时,观察到的主要产物为用^{m7}GpppA$_{2'Ome}$pG...起始的期望的模板化的帽1转录物(图13A和13B)。对于图13A和13B,使用以下式进行加帽效率的估计:(加帽峰的强度)/[(加帽峰的强度)+(5'OH峰的强度)],并且用引物/NTP配制物2和用引物/NTP配制物3的加帽效率分别为99%和96%。仅检测到少量异常的起始产物。相反,当模板核苷酸+1和+2为胞苷时,在^{m7}GpppA$_{2'Ome}$pG起始寡核苷酸和这些模板核苷酸之间不存在完美的互补性。图13C和13D示出了以两种对位(register)起始的起始加帽寡核苷酸。在第一种对位中,3'鸟苷起始加帽寡核苷酸残基与+1模板胞苷配对以产生具有另外的非模板化的5'腺苷的转录物(帽1+A)。请注意,在示意图中"|"指示加帽起始核苷酸与模板核苷酸的一个碱基对。指定的模板核苷酸位置被指示。在第二种对位中,3'鸟苷起始加帽寡核苷酸残基与+2模板胞苷配对并且+1起始加帽寡核苷酸

腺苷不与+1模板核苷酸形成完全的杂合体。这产生了模板化的5’鸟苷已经被非模板化的腺苷替代的转录物(帽1,G至A)。使用下式进行加帽效率的估计:(加帽峰“Cap1+A”+“Cap1 G至A”的强度)/[(加帽峰“帽1+A”+“帽1G至A”的强度)+(5’OH峰的强度)]。图13C和13D中计算的加帽效率为97％和77％。注意以下惊人的发现:当起始加帽寡核苷酸引物与相应的模板+1和+2核苷酸完全互补时,加帽效率和模板化的转录起始保真度要高得多。另外,用我们的方法,可以在不降低驱动加帽的NTP的浓度的情况下实现有效的加帽,这允许高得多的转录产率。因此,我们描述的加帽方法不同于且优于Ishikawa等的加帽方法。

[0282] 实施例19

[0283] (图14A-14B)

[0284] 在模板位置+1和+2处具有2’-脱氧胸苷和2’-脱氧胞苷残基的转录模板上vs在模板位置+1和+2处具有胞苷残基的转录模板上用$^{m7}GpppA_{2',Ome}pG$起始加帽寡核苷酸制成的mRNA在分化的THP-1细胞中的翻译的比较

[0285] 为了评估在实施例14和15中生成的荧光素酶mRNA的表达,将mRNA转染到THP-1细胞(ATCC,目录#TIB-202)中,一式六份(复本)。在补充有10％ FBS、丙酮酸钠和青霉素/链霉素的ATCC配制的RPMI-1640(ATCC,目录#30-2001)中,在37℃、5％ CO2的气氛下培养THP-1细胞。在佛波醇酯12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA;Cell Signaling Technologies,目录#4174)的存在下,将细胞接种在24-孔板格式(每孔2E+05个细胞)中以诱导分化。接种后72小时,将细胞用每孔100ng的mRNA转染。为了比较,还用Cap0荧光素酶mRNA转染细胞,该Cap0荧光素酶mRNA通过用ARCA起始而生成。在转染后20小时,收获细胞并根据制造商的建议使用ONE-Glo荧光素酶试验系统试剂盒(Promega目录#E6120)测量荧光素酶活性。根据制造商的建议使用GloMax-Multi+检测系统仪器测量发光。将作为六份复本的平均值+/-平均值标准偏差的数据制图。使用非配对t-检验分析数据以生成p值作为显著性的度量。指示了在对之间的p-值。比较了在THP-1细胞中用$^{m7}GpppA_{2',Ome}pG$起始加帽寡核苷酸并且用在模板位置+1和+2处包含2’-脱氧胸苷和2’-脱氧胞苷残基的模板(“TC”模板)vs在模板位置+1和+2处具有胞苷残基的转录模板(“CC”模板)生成的转录物的翻译。用A)引物/NTP配制物2或B)引物/NTP配制物3进行了转录。通过这两种配制物(配方),,当$^{m7}GpppA_{2',Ome}pG$起始加帽寡核苷酸引物如本发明中所述与模板核苷酸+1和+2(“TC”模板)完全互补时,在培养的THP-1细胞中的翻译都是显著更优的。在图14B中,我们还评估了用“TC”模板制成的并用ARCA(帽0)加帽的mRNA的活性。这是用于产生共转录加帽mRNA的当前工业标准。ARCA加帽的RNA具有比在$^{m7}GpppA_{2',Ome}pG$起始加帽寡核苷酸引物与模板核苷酸+1和+2(“TC”模板)完全互补情况下制成的转录物显著更低的活性。

[0286] 总之,这里所示的实施例证明,相对于先前公开的方法,这里所描述的方法生成具有以下组合的RNA:1)高产率、2)高加帽程度,3)模板化的转录的高保真度,以及4)在细胞中更优的活性。

[0287] 本文说明性描述的发明可以在不存在本文没有具体地公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下适当地实践。因此,例如,在描述本发明的上下文中(尤其在所附权利要求的上下文中),术语“一个”、“一种”和“该(所述,the)”和类似的语言将被解释为覆盖单数和复数,除非本文另外指示或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”、“含有”等应当被广义地解读而没有限制(例如,意为“包括但不限于”)。本文中数值范围的

列举仅仅是旨在充当个体地指代落入该范围的每个单独值的速记法,除非本文另外指示,并且每个单独值并入说明书中,如同其在本文中被个体地列举一样。本文所描述的所有方法可以以任何适当的顺序进行,除非本文另外指示或另外与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅仅旨在更好阐明本发明而不是造成对本发明的范围的限制,除非另外声明。说明书中的任何语言都不应该被解释为表示任何未声明的要素是对本发明实践所必需的。另外,本文所采用的术语和表达已经用作描述而不是限制的术语,并且在使用这种术语和表达时不意排除示出和描述的特征的任何等价物或其部分,而是要知道本发明所要求保护的范围内可以进行各种修改。因此,应该理解虽然已经参照某些实施方式和任选的特征具体地公开了本发明,但本领域技术人员可以采取本文所公开的其中实施的发明的修改和变化,并且这种修改和变化被认为是在本发明的范围内。因此,应该理解虽然已经通过参照某些实施方式和任选的特征具体地公开了本发明,但本领域技术人员可以采取本文所公开的其中实施的发明的修改、改进和变化,并且这种修改、改进和变化被认为是在本发明的范围内。本文所提供的材料、方法和实例是某些实施方式的代表,是示例性的,而不是旨在作为对本发明的范围的限制。

[0288] 本文已经宽泛地和总体地描述了本发明。落入上位公开的每个窄类和下位组也构成本发明的部分。这包括具有将任何主题从大类排除的附带条件或消极限制的一般性描述——无论该排除物是否在本文中被具体列举。

[0289] 另外,在就马库什组描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明还由此就马库什组的任何个体成员或成员子组被描述。

[0290] 本文提及的所有出版物。专利申请、专利和其他参考文献其整体均通过引用明确地并入,如同每一个均个体地通过引用而并入。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0291] 申请人保留从任何这种文章、专利、专利申请或其他物理的或电子的文件将任何和所有材料和信息物理上并入该申请的权利。

[0292] 其他实施方式在所附权利要求中提出。

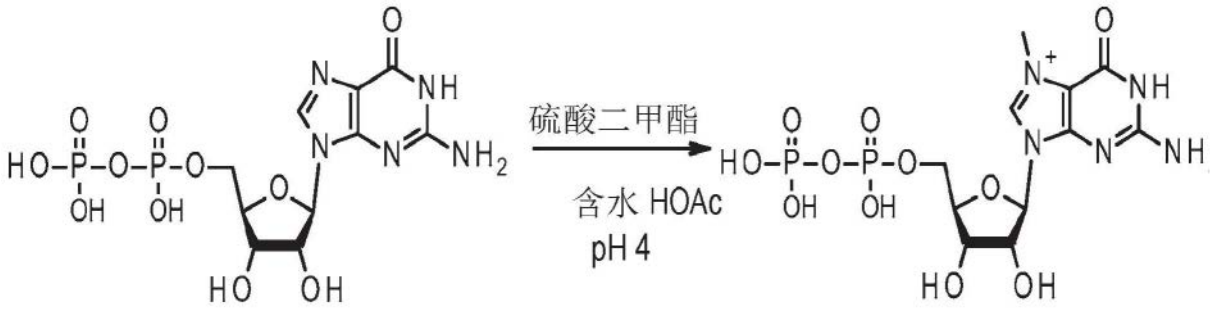


图1

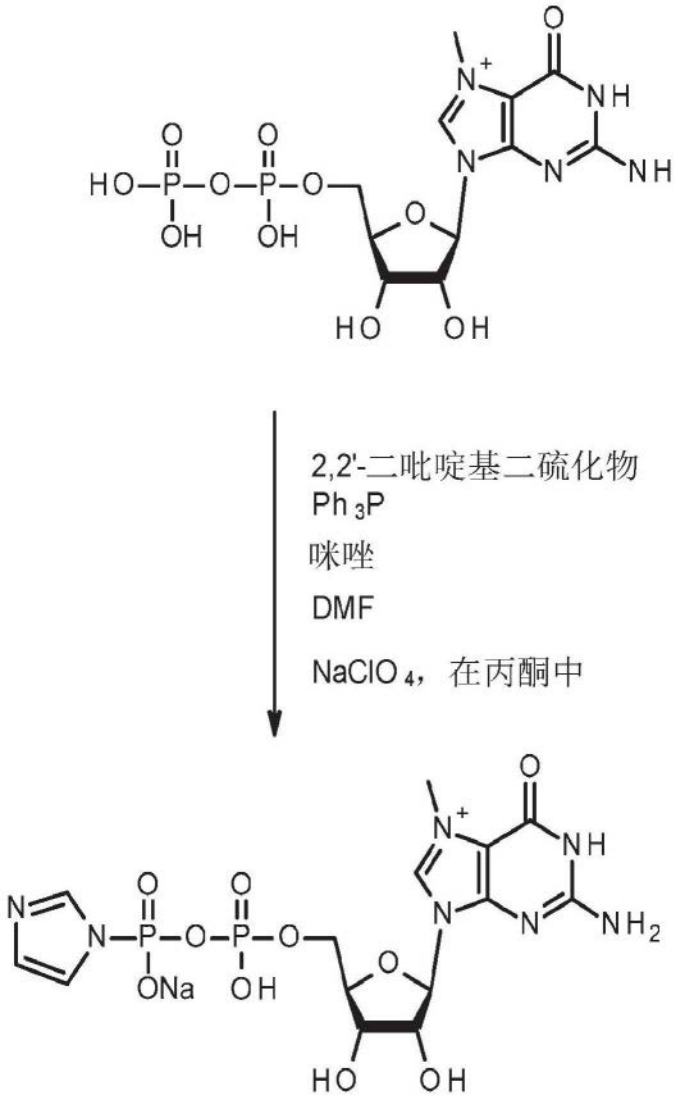


图2

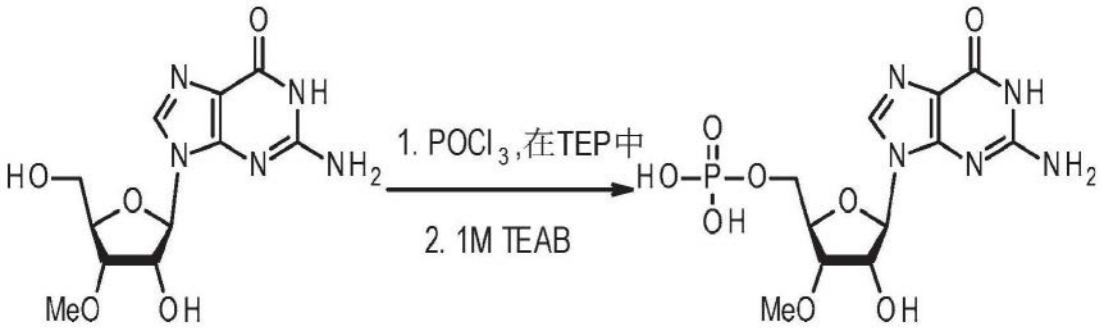

1. POCl3,在TEP中
2. 1M TEAB

图3

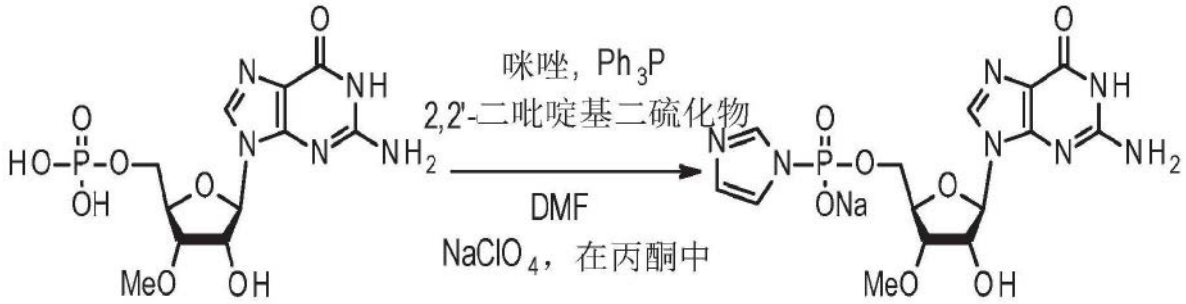

咪唑，Ph3P
2,2'-二吡啶基二硫化物
DMF
NaClO4，在丙酮中

图4

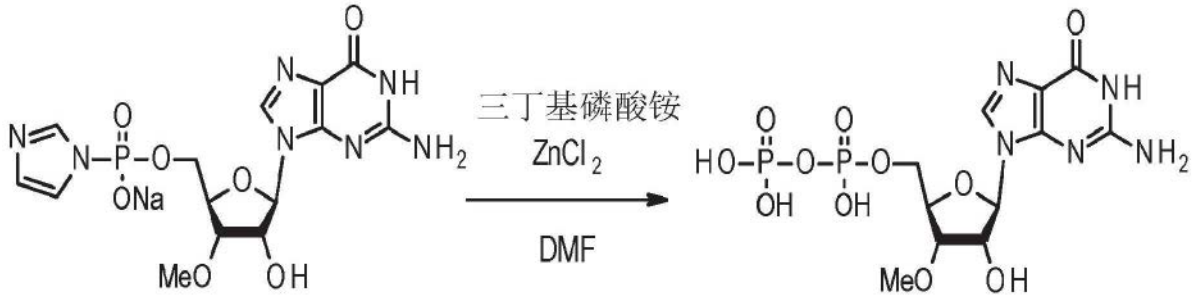

三丁基磷酸铵
ZnCl2
DMF

图5

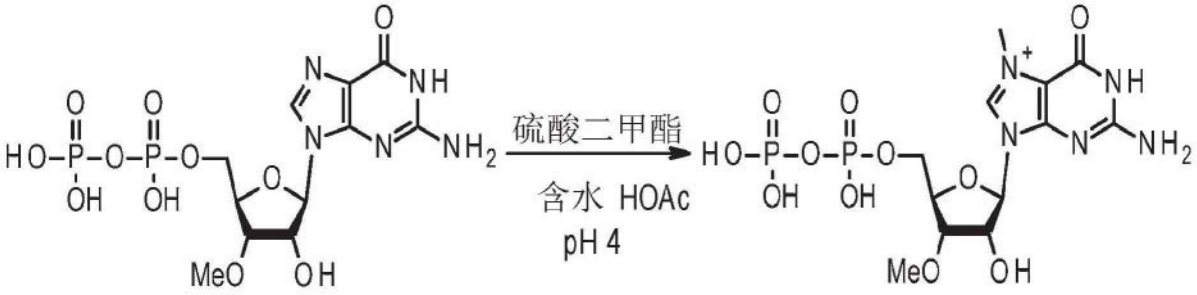

硫酸二甲酯
含水 HOAc
pH 4

图6

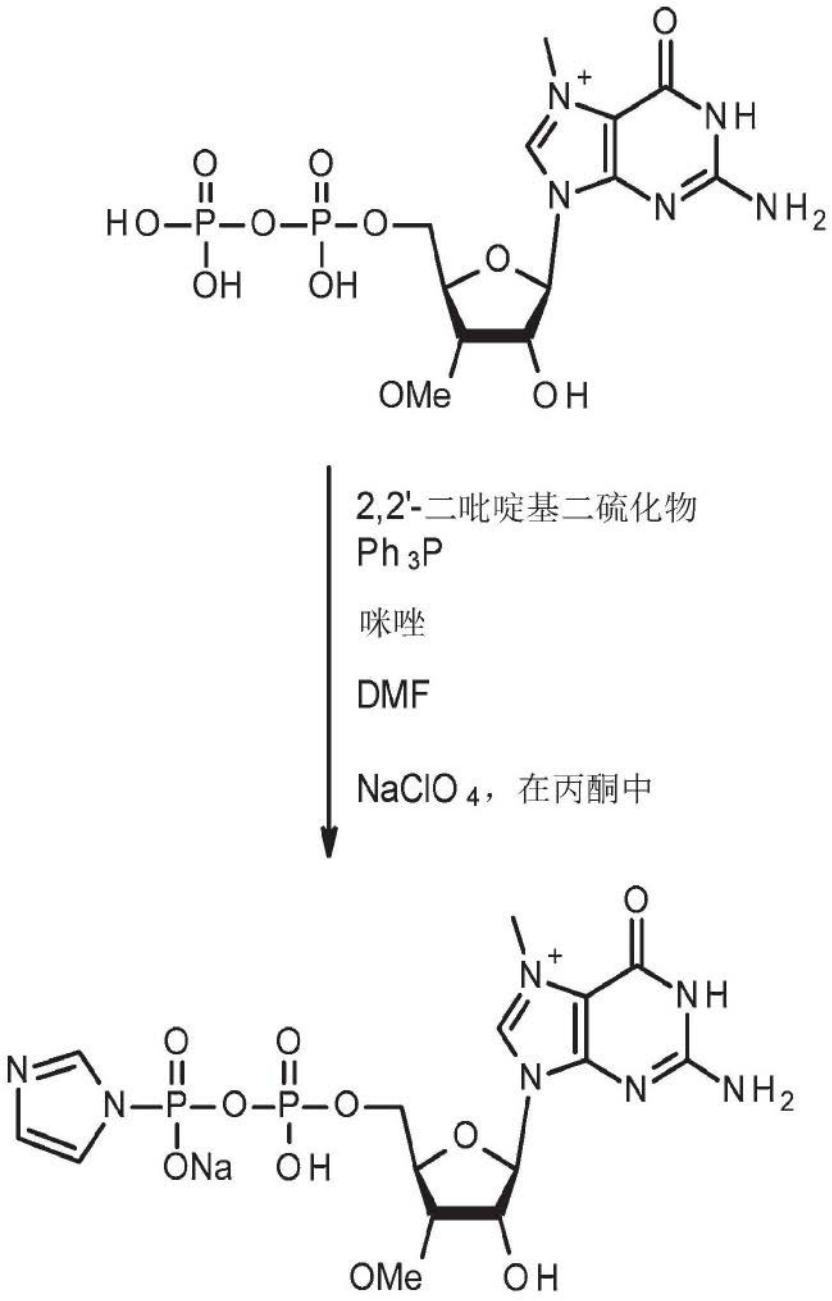
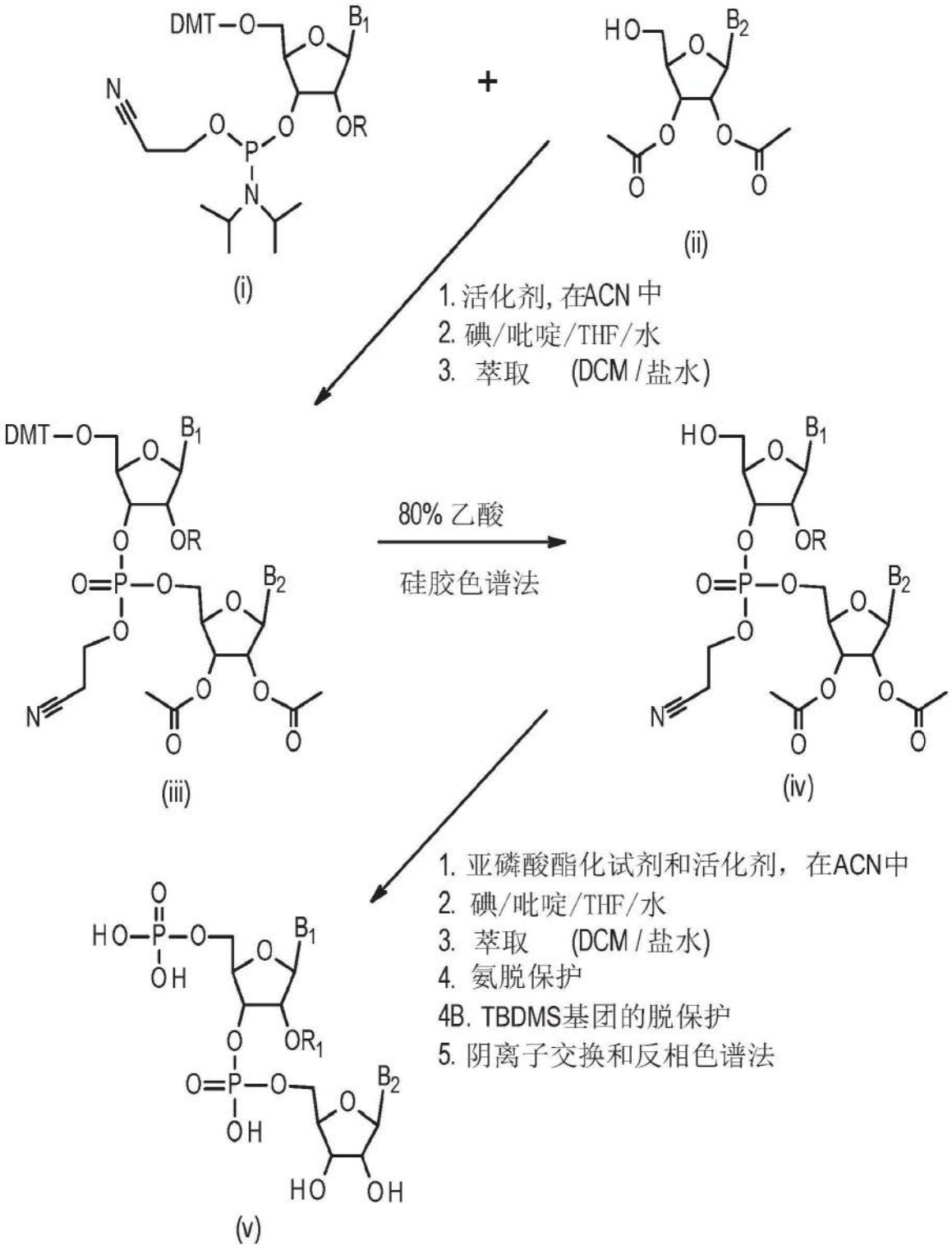


图7



B1 和 B2 是适当地保护的或未保护的核苷碱基
R = Me 或 TBDMS; R_1 = Me 或H

图8

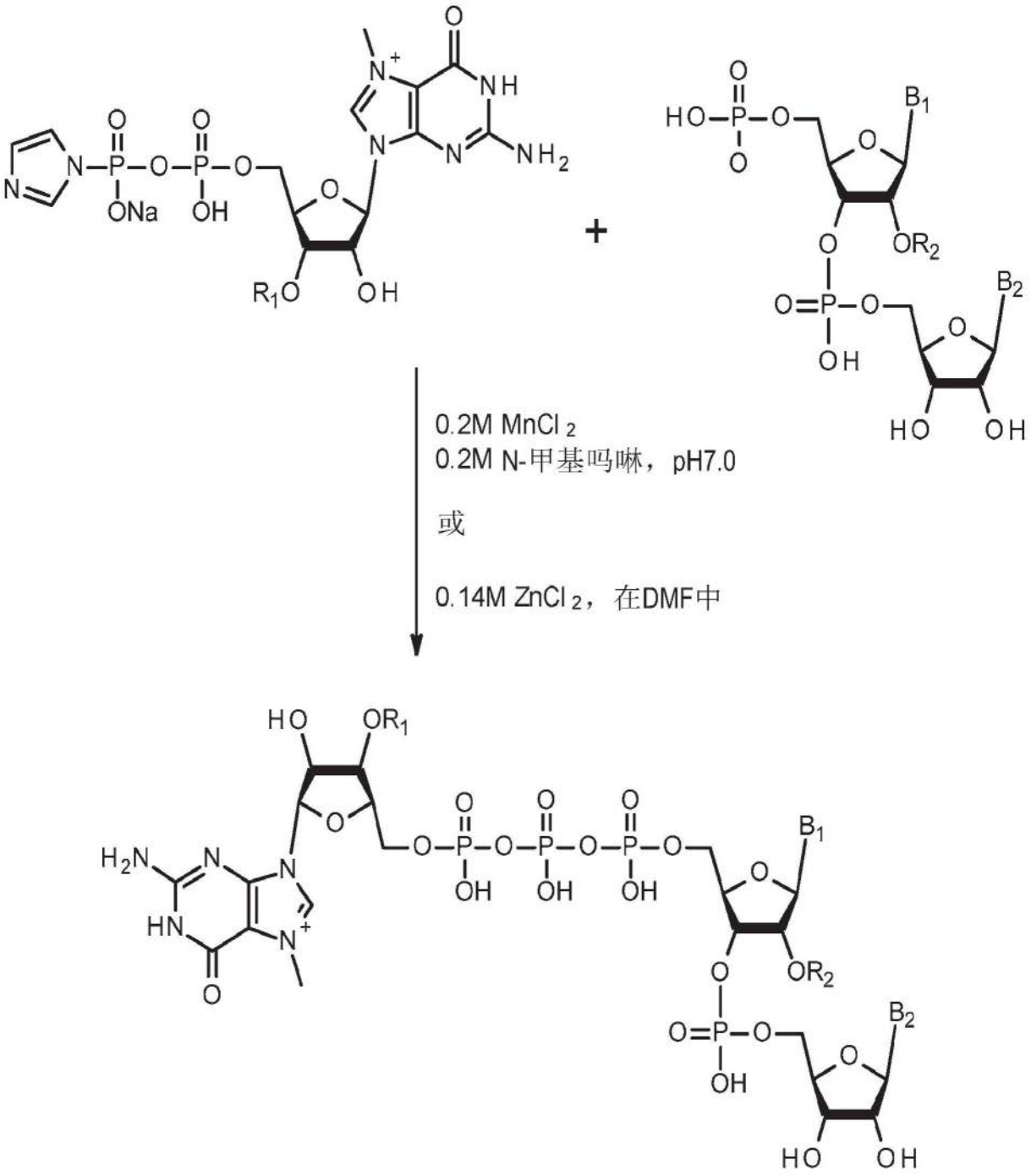


图9

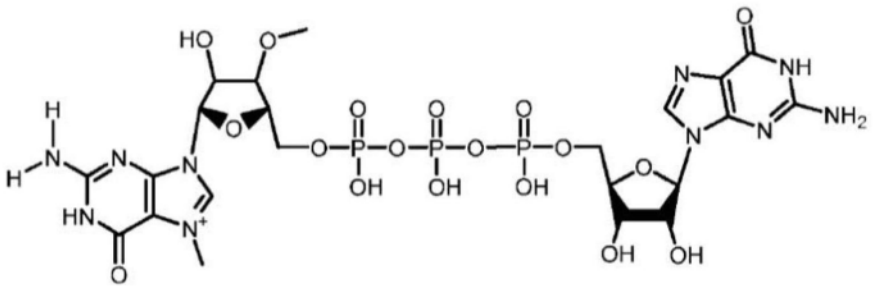


图10A

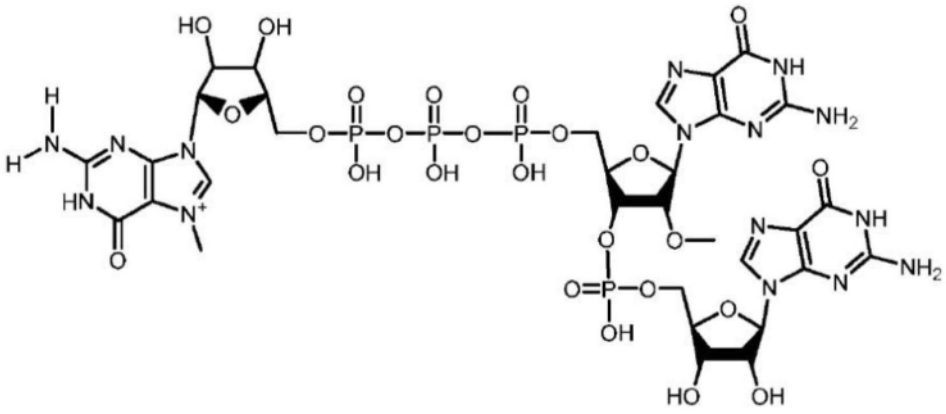


图10B

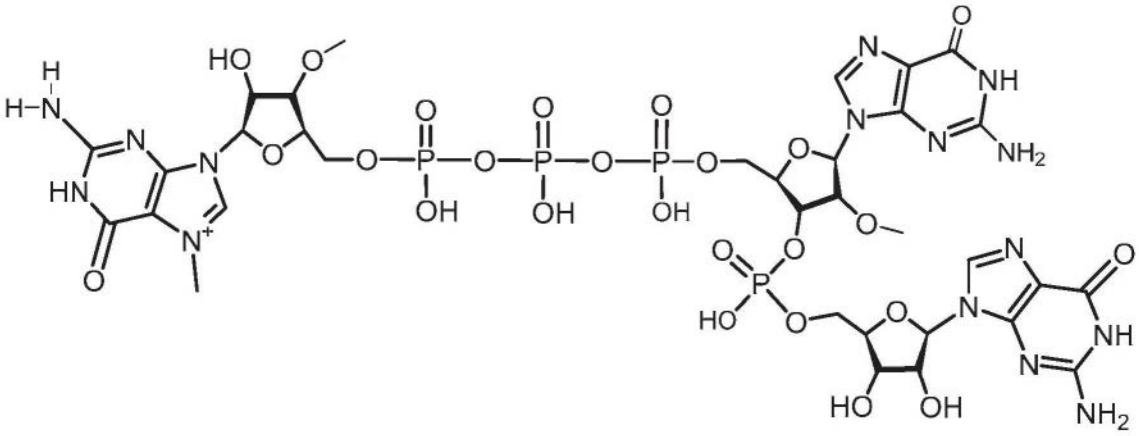


图10C

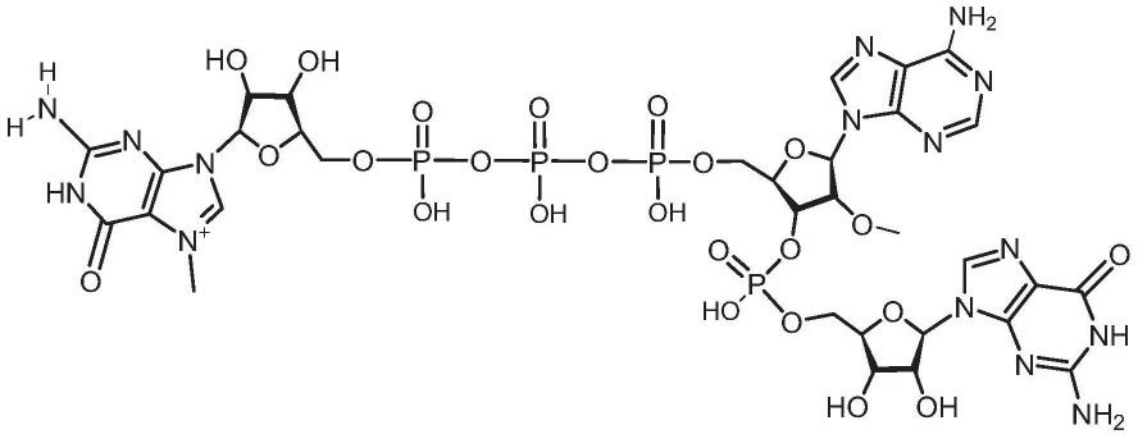


图10D

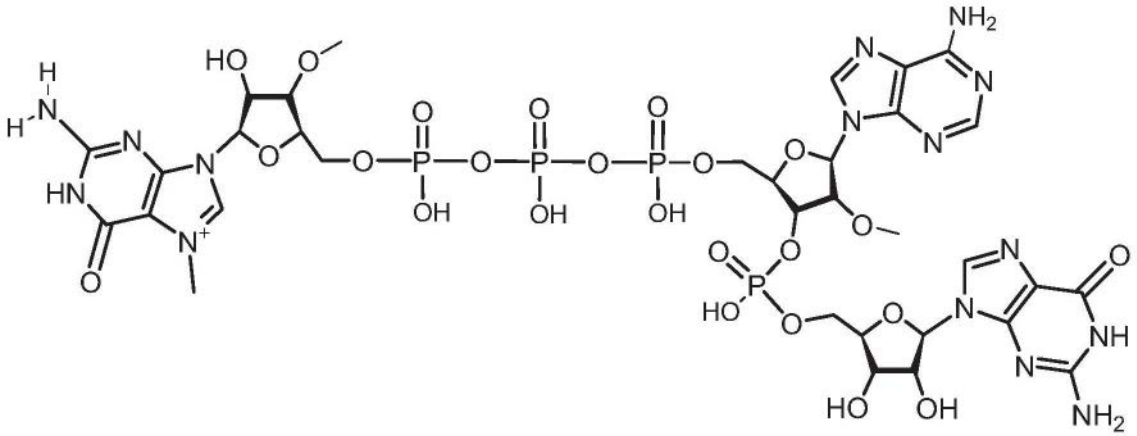


图10E

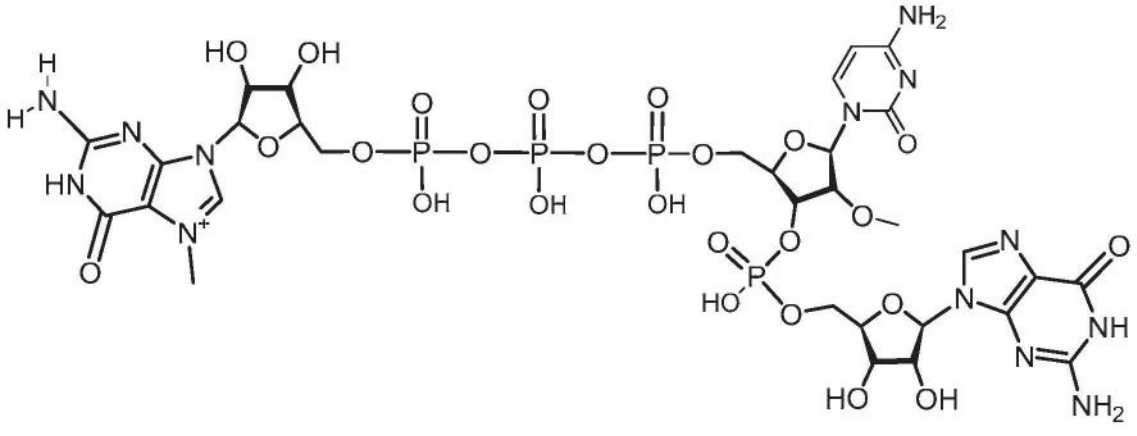


图10F

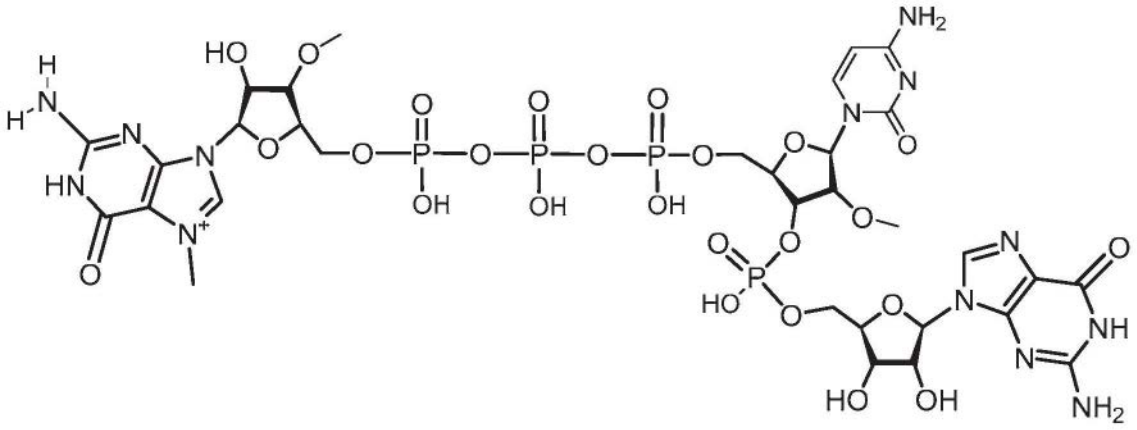


图10G

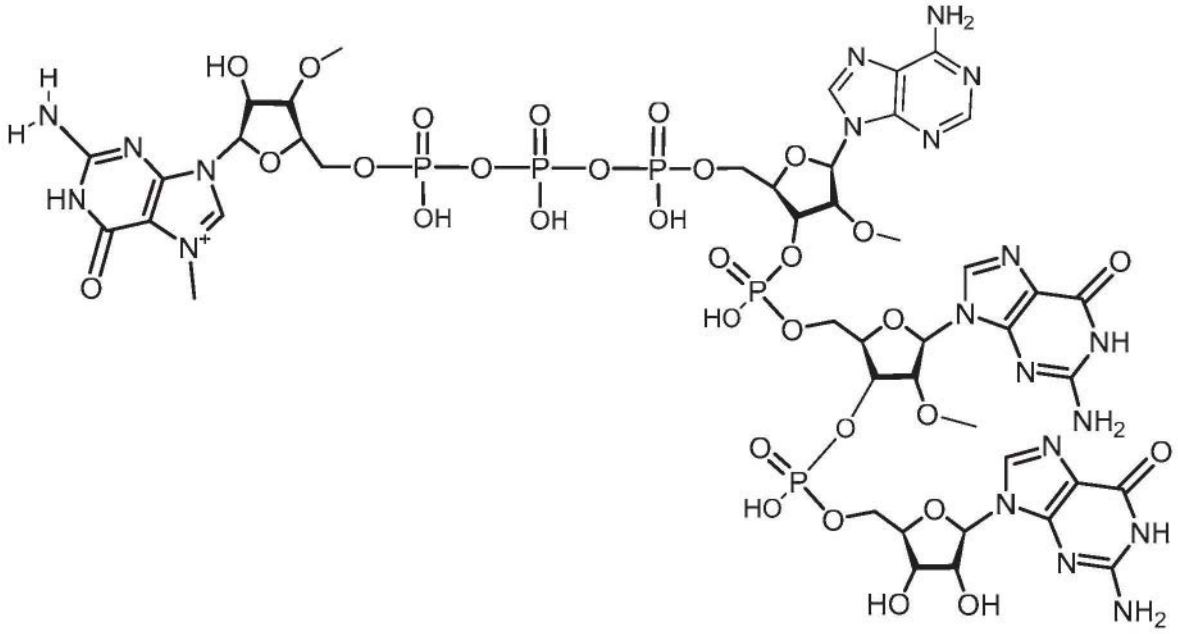


图10H

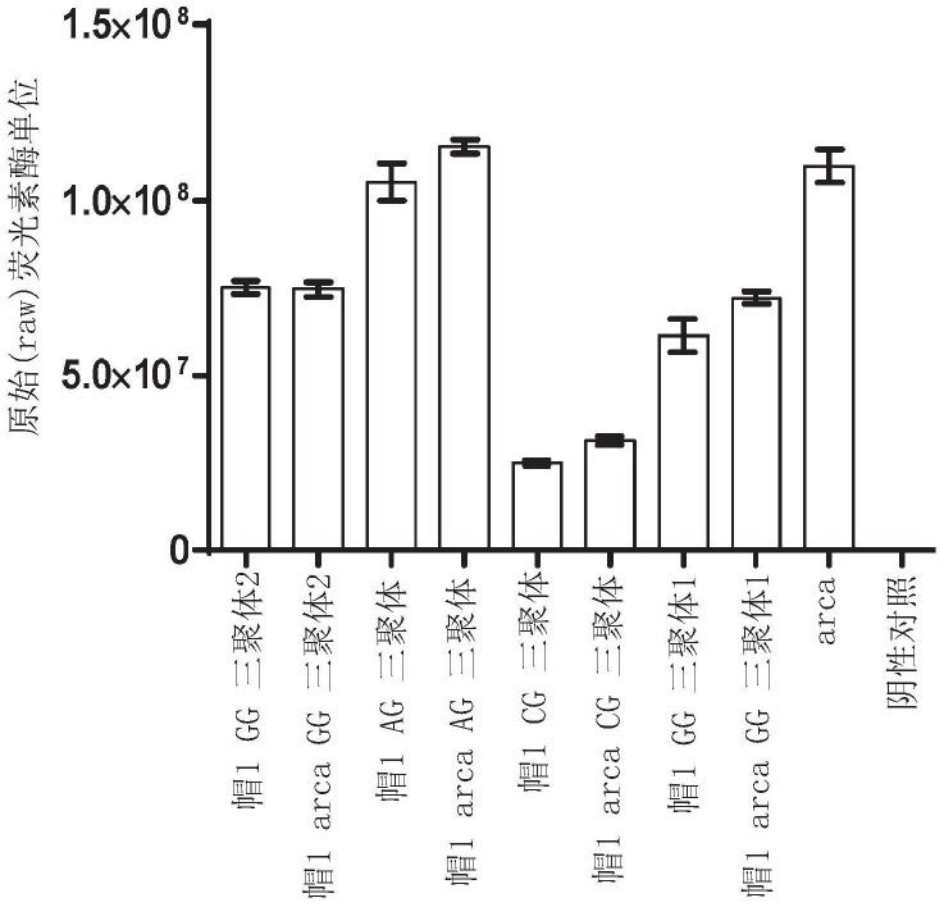

1.5×10⁸
1.0×10⁸
5.0×10⁷
0
原始(raw)荧光素酶单位
帽1 GG 三聚体2
帽1 arca GG 三聚体2
帽1 AG 三聚体
帽1 arca AG 三聚体
帽1 CG 三聚体
帽1 arca CG 三聚体
帽1 GG 三聚体1
帽1 arca GG 三聚体1
arca
阴性对照

图11

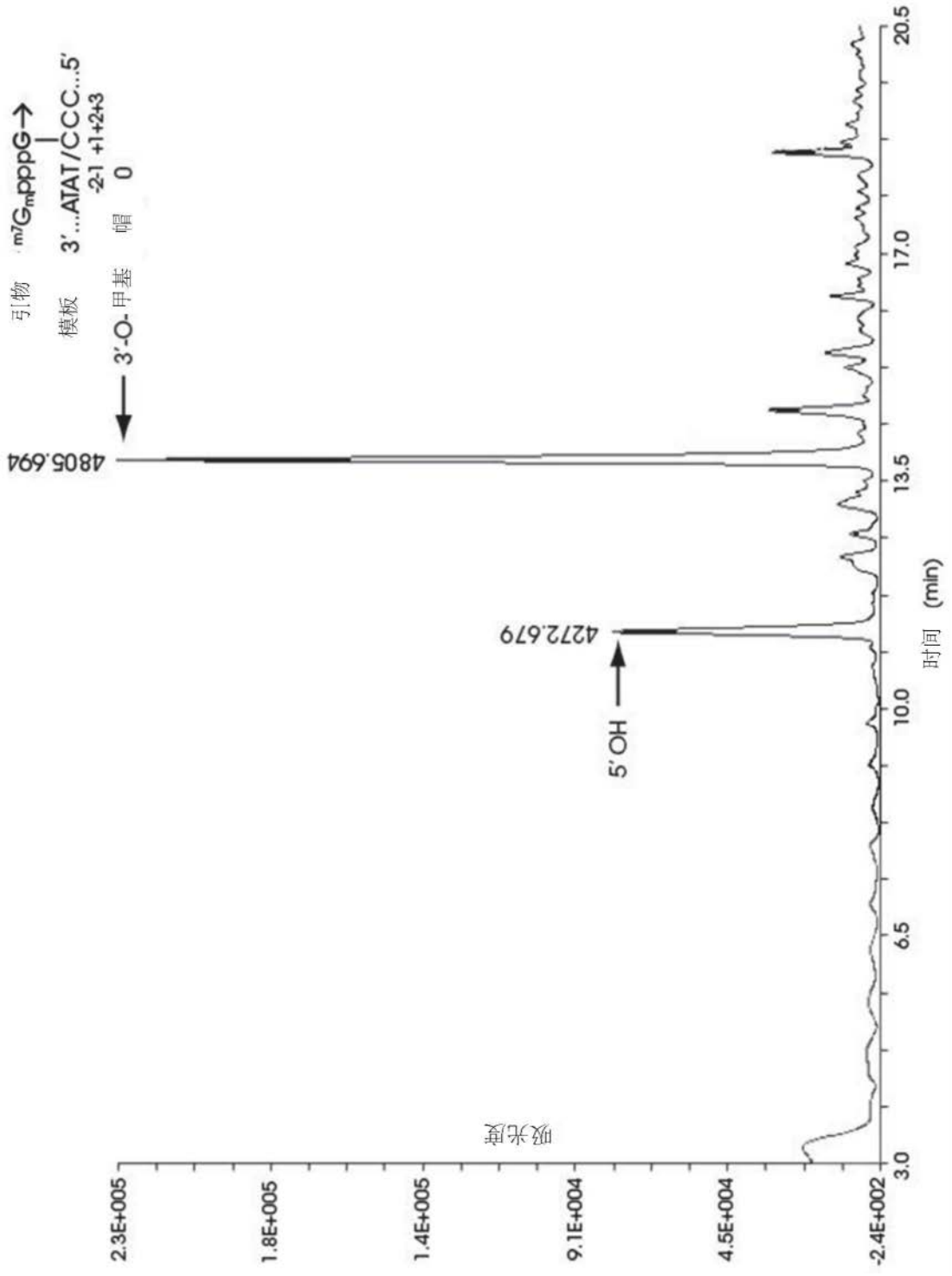

引物 $^{m7}G_mpppG$→
模板 3'...ATAT/CCC...5'
-2-1 +1+2+3
3'-O-甲基 帽 0
4805.694
4272.679
5'OH
吸光度
时间 (min)
2.3E+005
1.8E+005
1.4E+005
9.1E+004
4.5E+004
-2.4E+002
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5

图12A

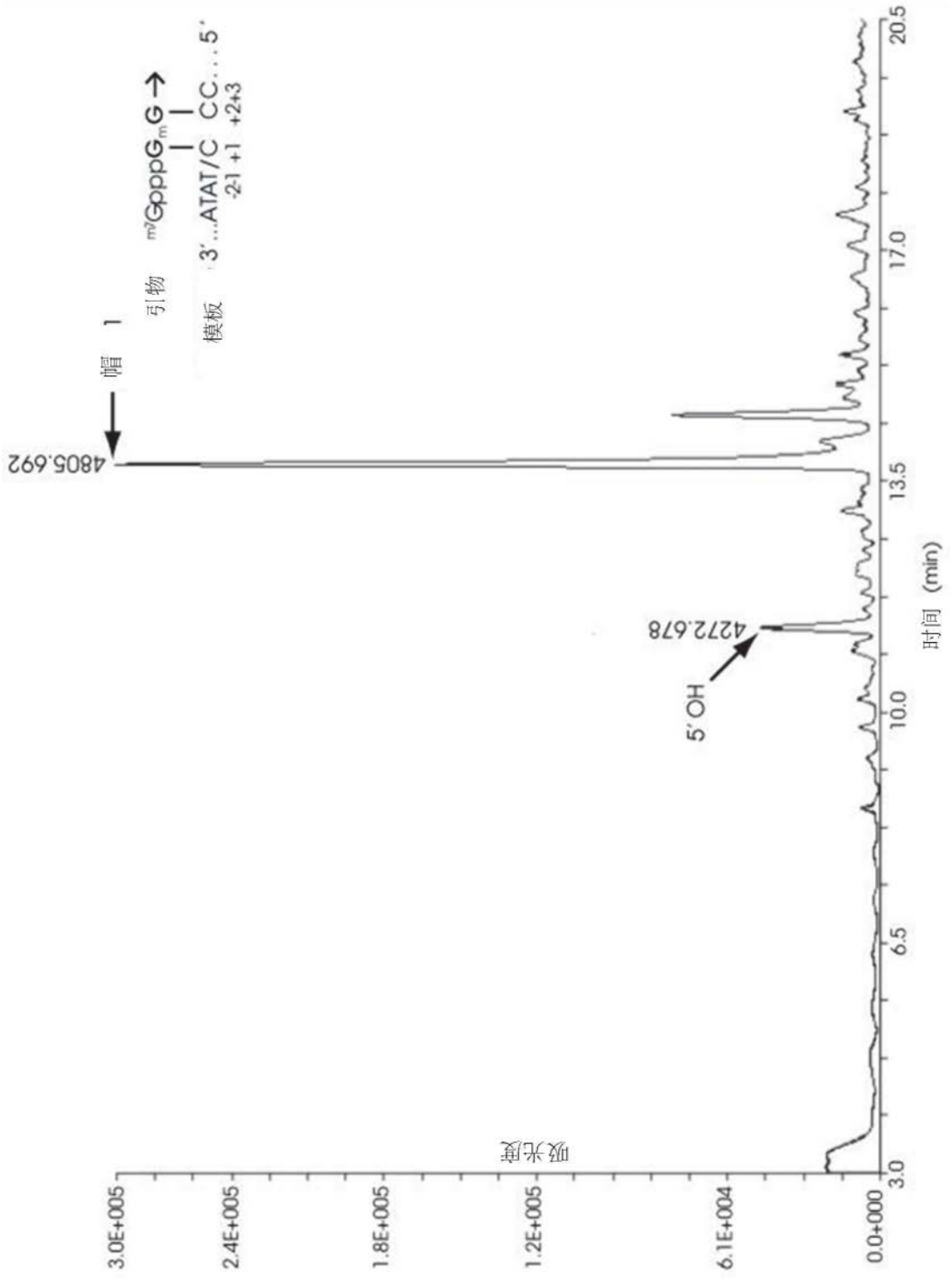

帽 1
引物 m7GpppGmG→
模板 3'...ATAT/C CC....5'
-2 1 +1 +2 +3
4805.692
4272.678
5'OH
吸光度
时间 (min)
3.0E+005
2.4E+005
1.8E+005
1.2E+005
6.1E+004
0.0+000
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5

图12B

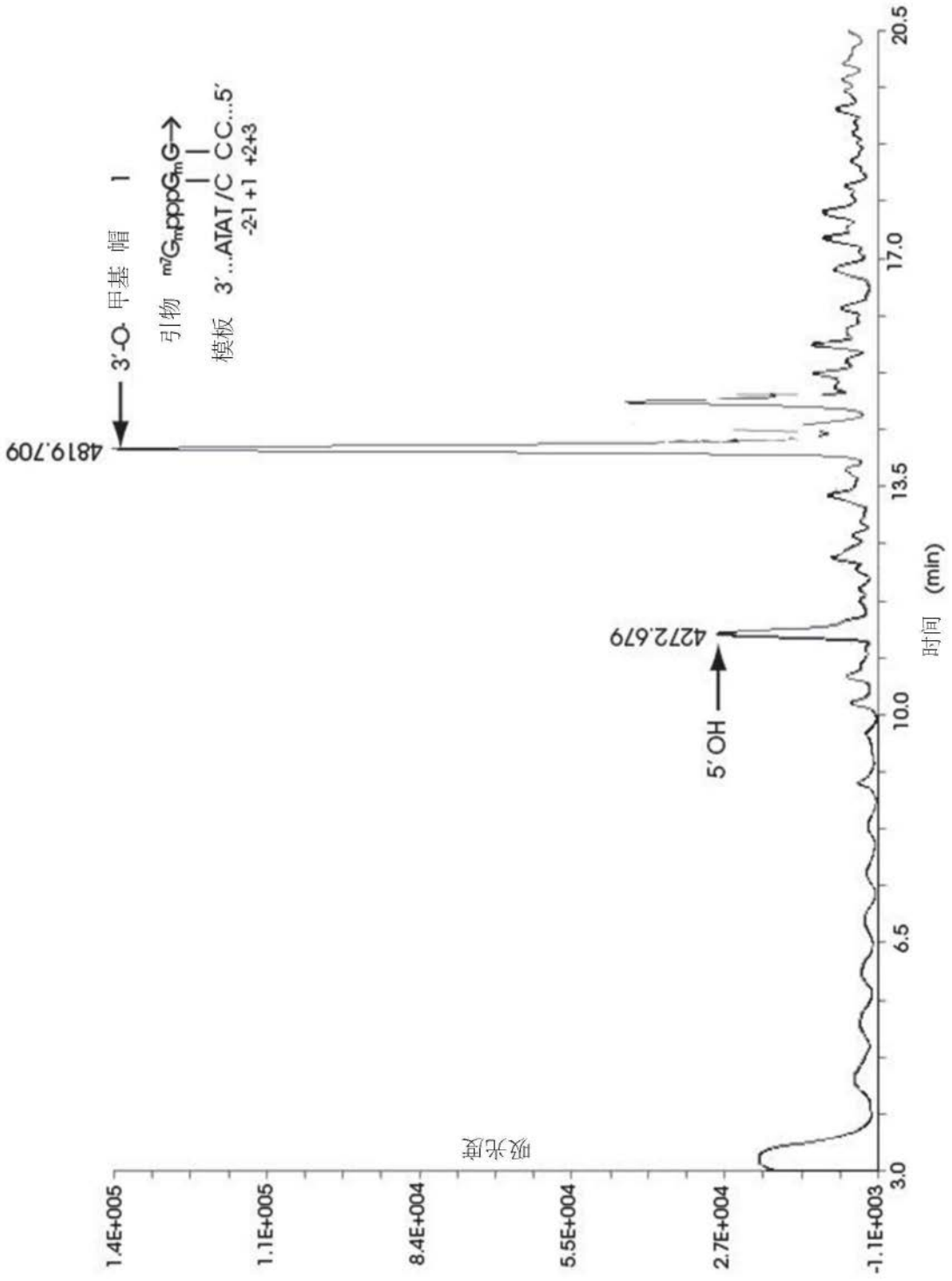

3'-O- 甲基 帽 1
引物 m7GmpppGmG→
模板 3'...ATAT /C CC...5'
-2-1 +1 +2+3
4819.709
4272.679
5' OH
吸光度
时间 (min)
1.4E+005
1.1E+005
8.4E+004
5.5E+004
2.7E+004
-1.1E+003
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5

图12C

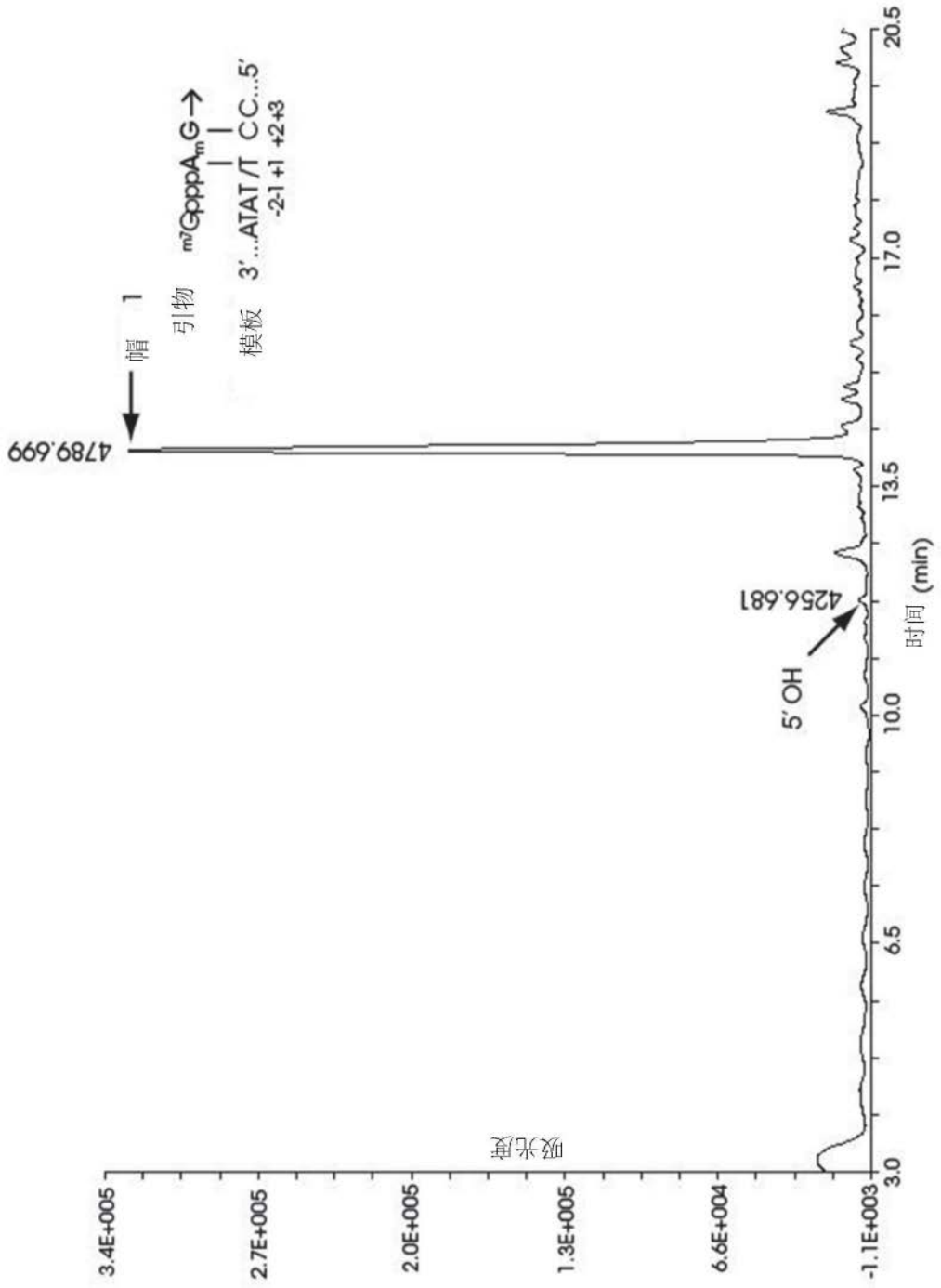

4789.699
帽 1
引物 m7GpppAmG→
模板 3'...ATAT/T CC...5'
-2-1 +1 +2+3
4256.681
5'OH
吸光度
时间 (min)
3.4E+005
2.7E+005
2.0E+005
1.3E+005
6.6E+004
-1.1E+003
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5

图12D

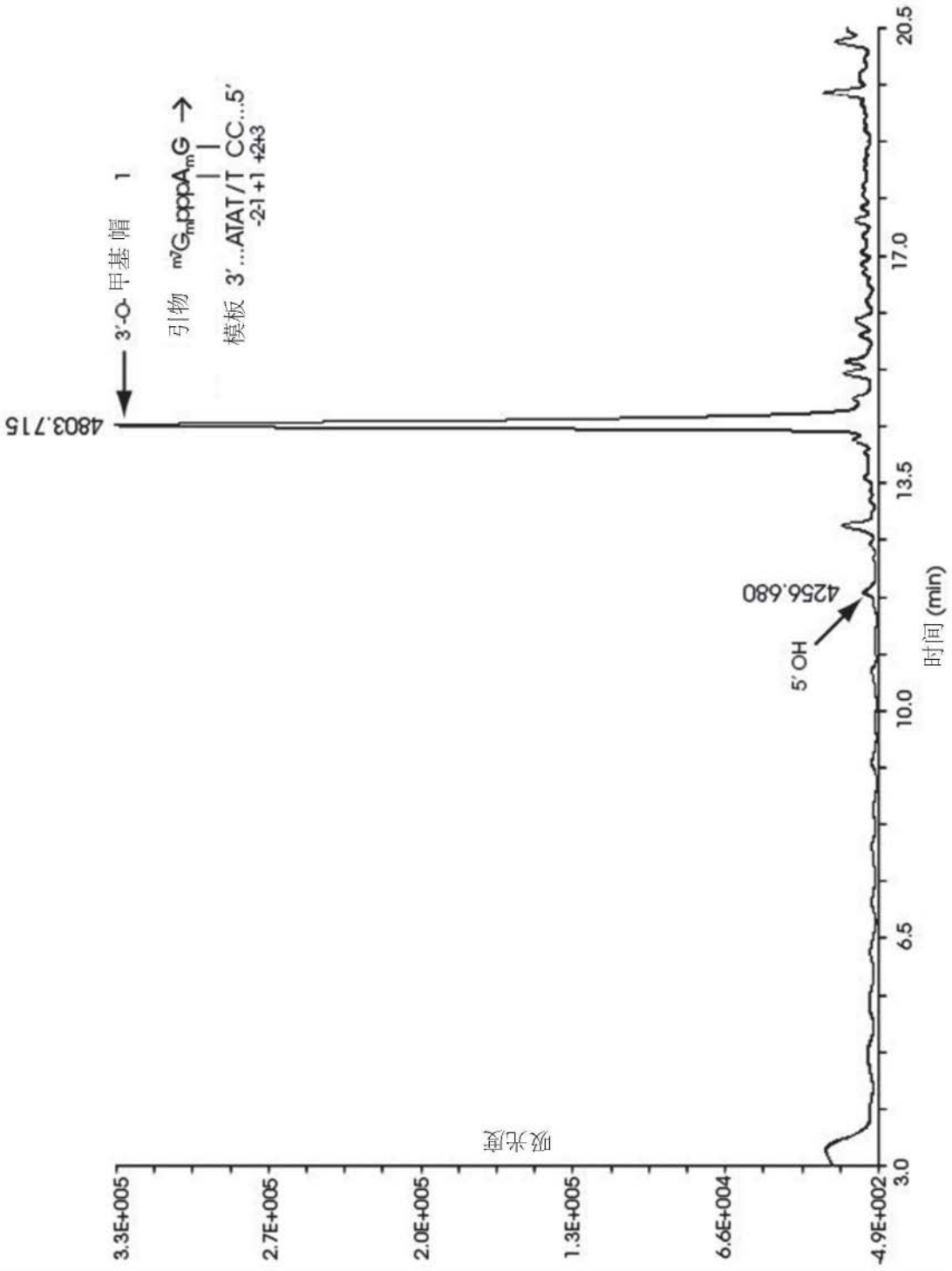

4803.715
3'-O-甲基 帽 1
引物 m7GmpppAmG →
模板 3'...ATAT/T CC...5'
-2 -1 +1 +2 +3
4256.680
5'OH
吸光度
时间 (min)
3.3E+005
2.7E+005
2.0E+005
1.3E+005
6.6E+004
-4.9E+002
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5

图12E

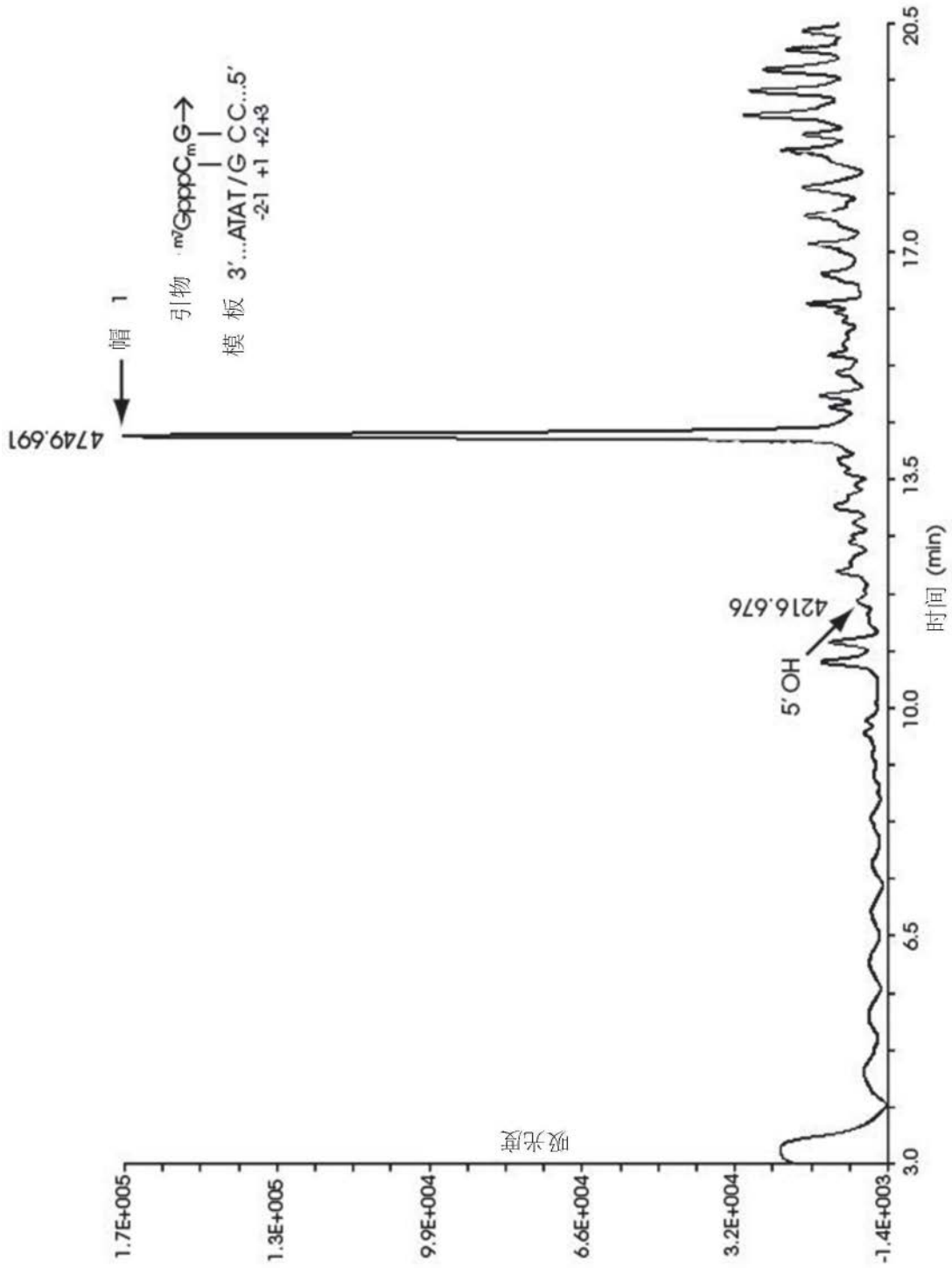

帽 1
引物 m7GpppCmG→
模板 3'...ATAT/G CC...5'
-2-1 +1 +2+3
4749.691
4216.676
5'OH
吸光度
时间 (min)
1.7E+005
1.3E+005
9.9E+004
6.6E+004
3.2E+004
-1.4E+003
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5

图12F

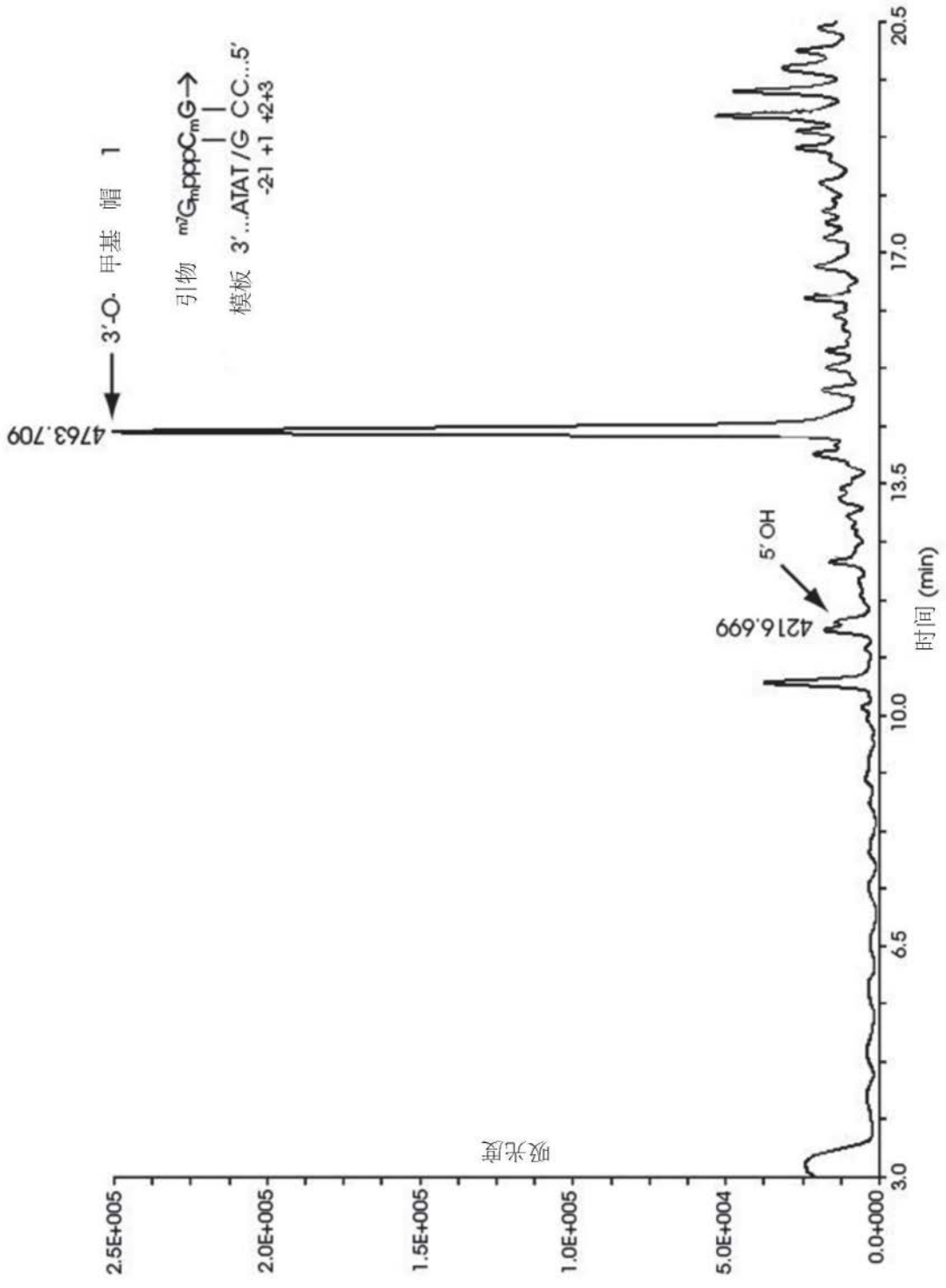

4763.709
3'-O- 甲基 帽 1
引物 m7GmpppCmG→
模板 3'...ATAT/G CC...5'
-2 1 +1 +2 +3
4216.699
5'OH
吸光度
时间 (min)
2.5E+005
2.0E+005
1.5E+005
1.0E+005
5.0E+004
0.0+000
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5

图12G

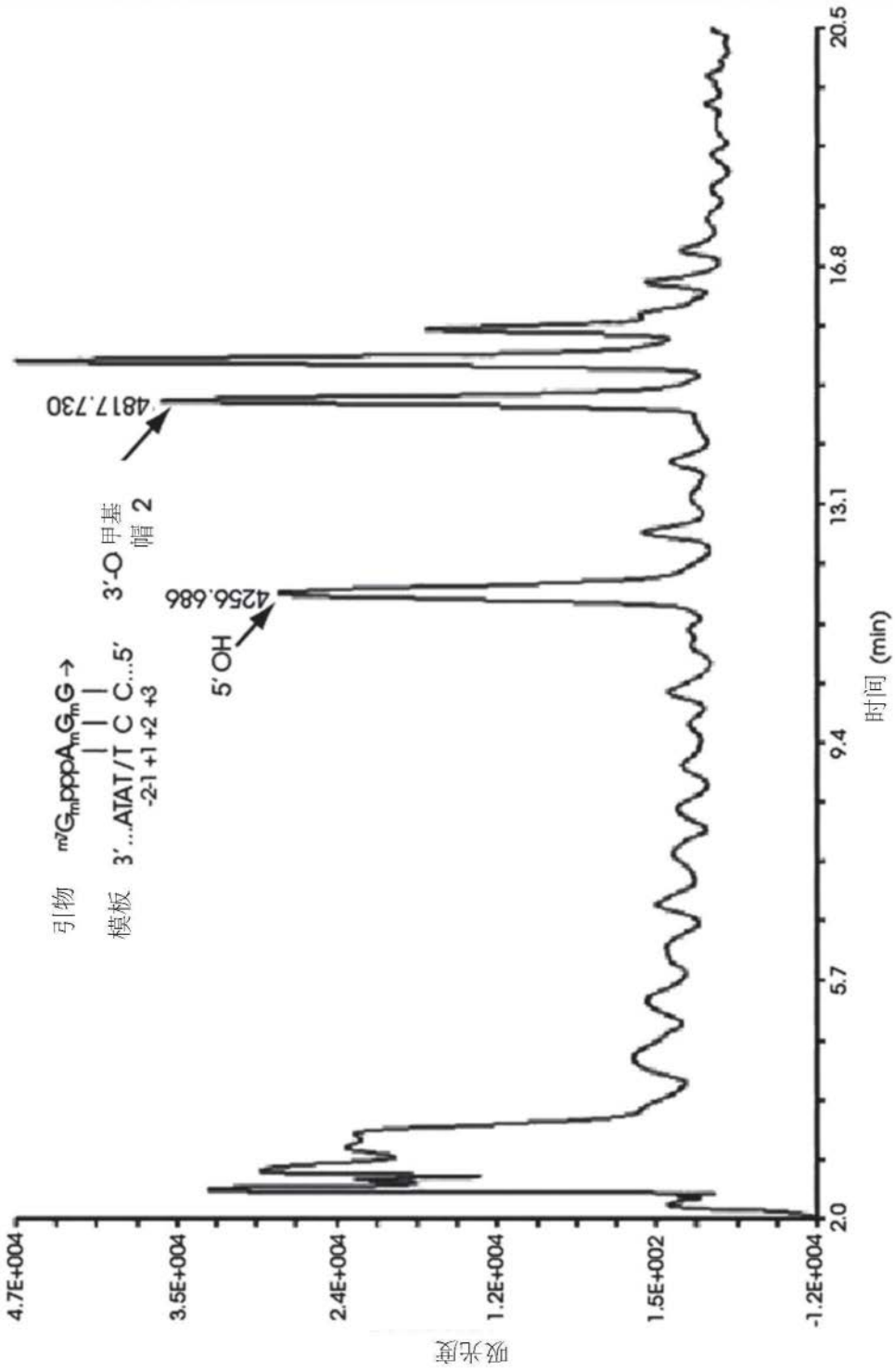

4817.730
4256.686
3′-O 甲基帽 2
5′OH
引物 m7GmpppAmGmG→
模板 3′...ATAT/T C C...5′
-2 -1 +1 +2 +3
吸光度
4.7E+004
3.5E+004
2.4E+004
1.2E+004
1.5E+002
-1.2E+004
2.0
5.7
9.4
13.1
16.8
20.5
时间 (min)

图12H

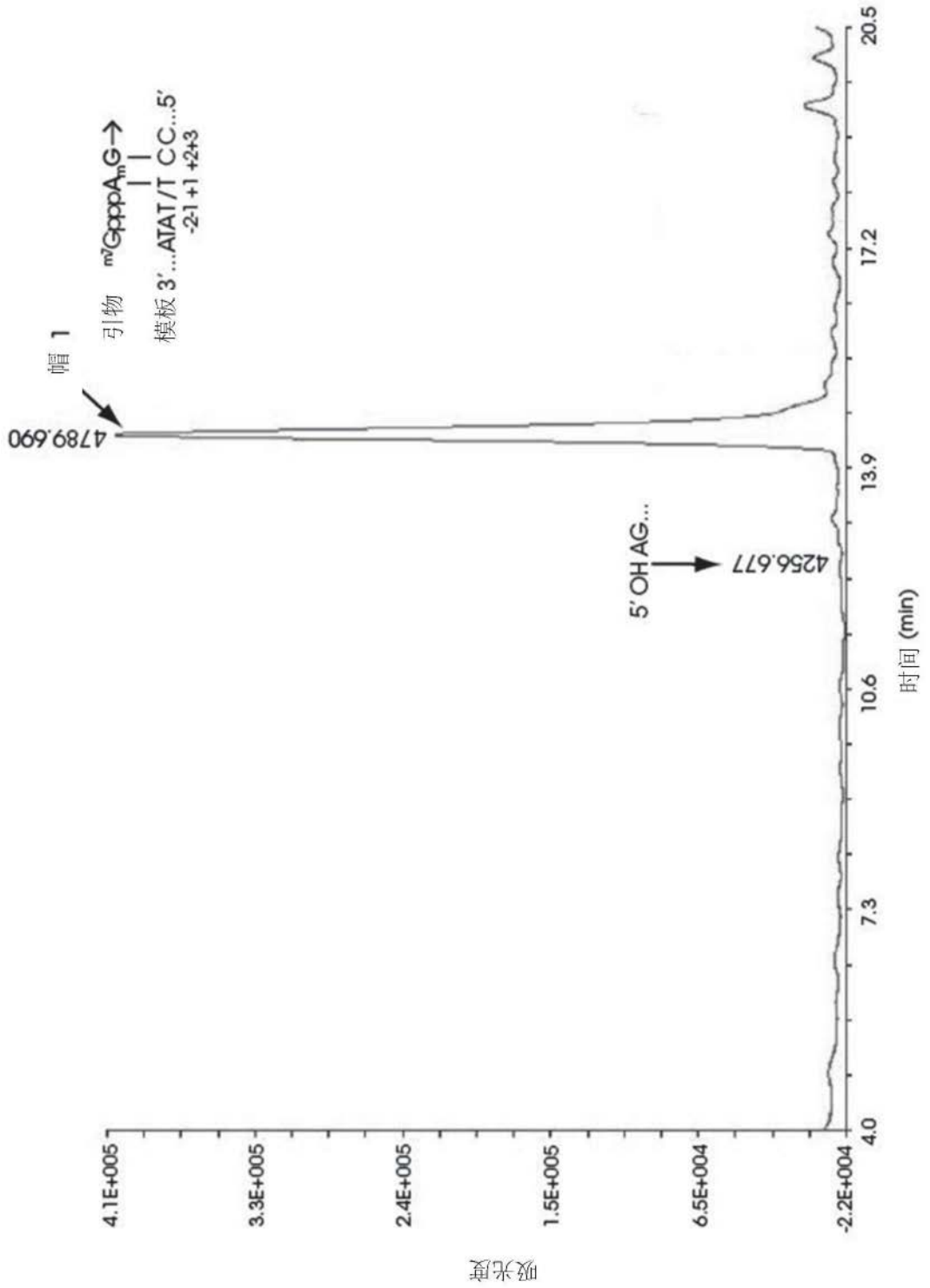

帽 1
引物 m7GpppAmG→
模板 3'...ATAT/T CC...5'
-2-1 +1 +2+3
4789.690
5' OH AG...
4256.677
4.1E+005
3.3E+005
2.4E+005
1.5E+005
6.5E+004
-2.2E+004
4.0
7.3
10.6
13.9
17.2
20.5
时间 (min)
吸光度

图13A

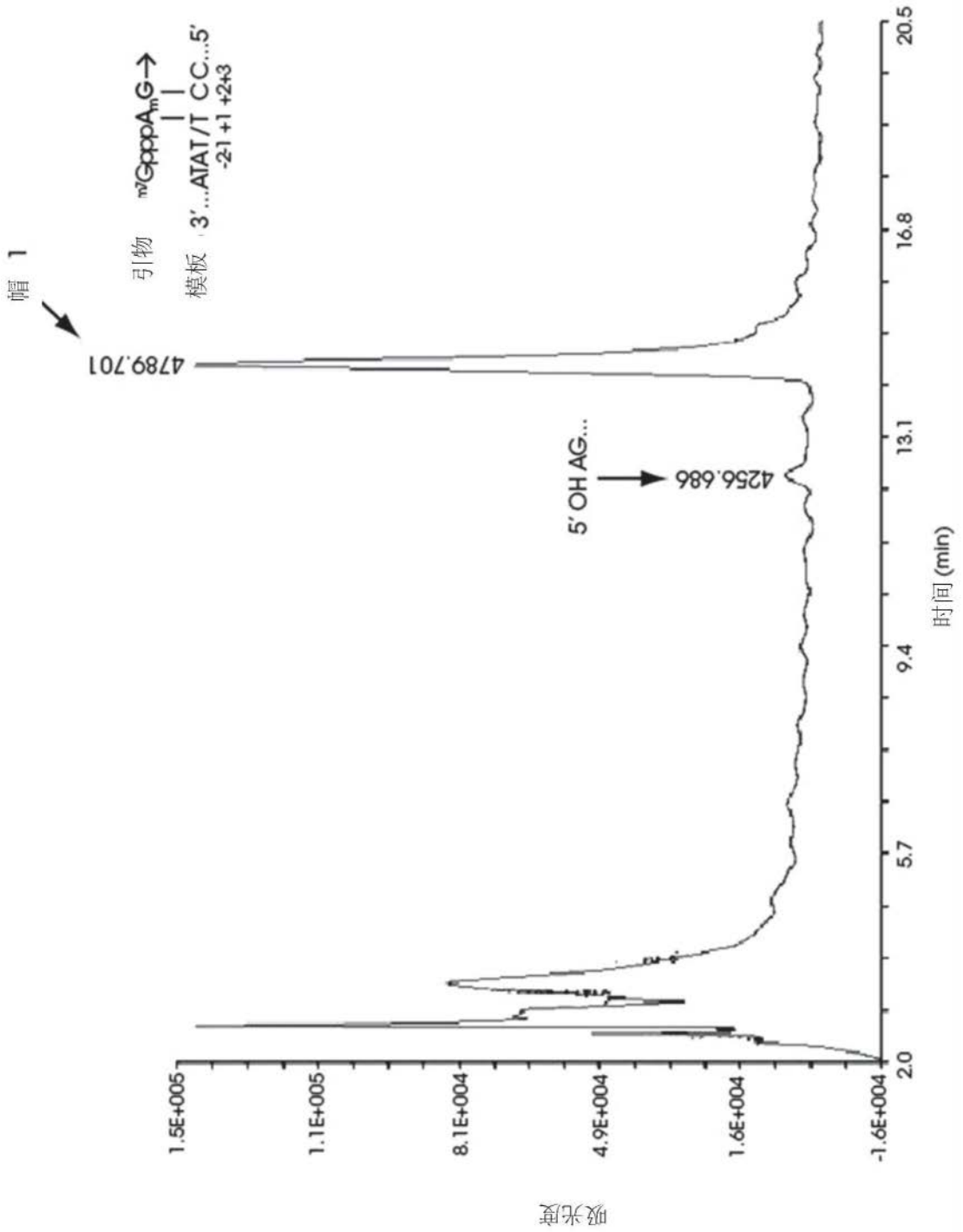

帽 1
引物 ^{m7}GpppA$_m$G→
模板 3'...ATAT/T CC...5'
-21 +1 +2+3
4789.701
5' OH AG...
4256.686
1.5E+005
1.1E+005
8.1E+004
4.9E+004
1.6E+004
-1.6E+004
2.0
5.7
9.4
13.1
16.8
20.5
时间 (min)
吸光度

图13B

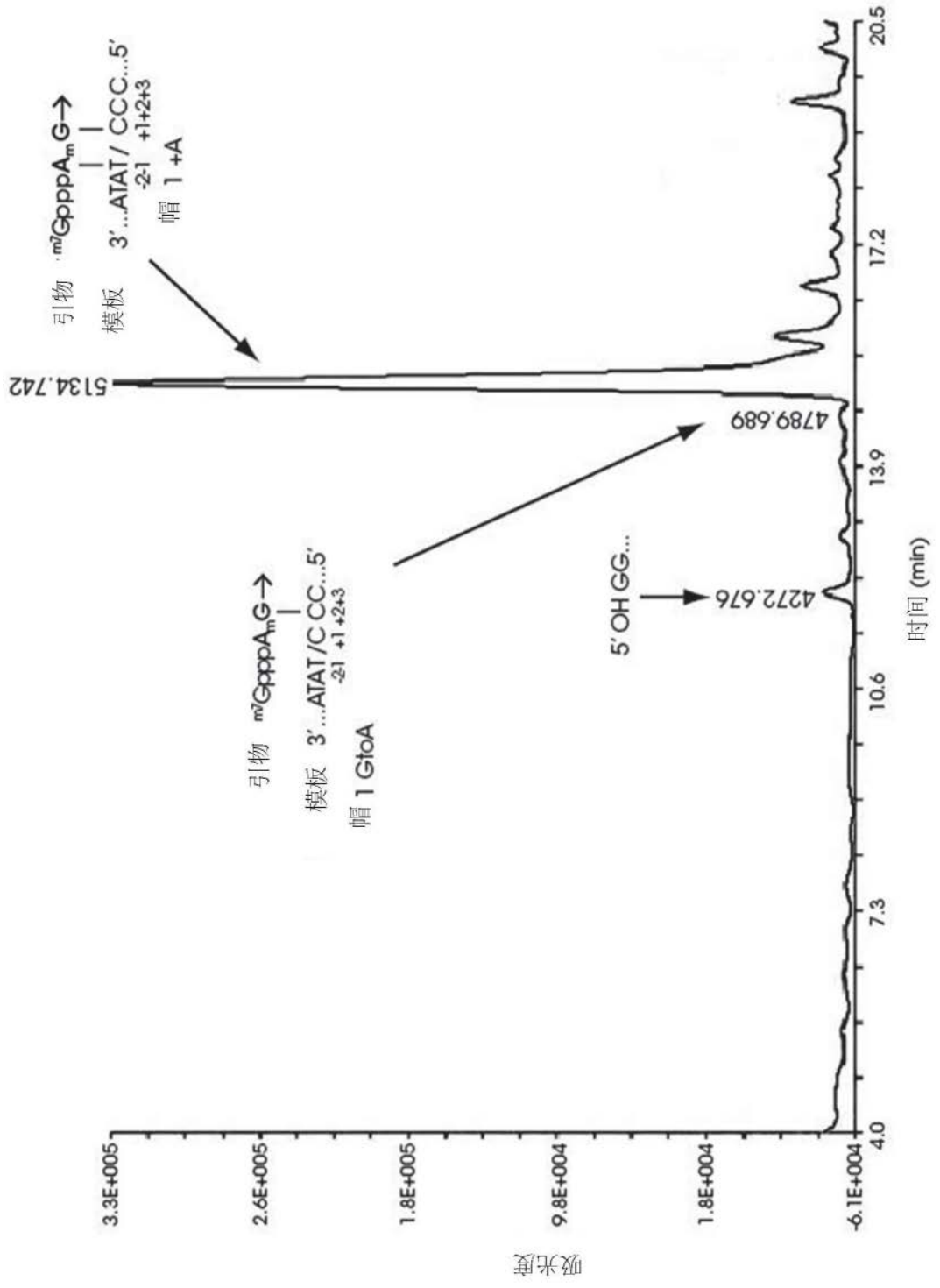

引物 m7GpppAmG→
模板 3'...ATAT/CCC...5'
-2-1 +1+2+3
帽 1 +A
5134.742
引物 m7GpppAmG→
模板 3'...ATAT/C CC...5'
-2-1 +1 +2+3
帽 1 GtoA
4789.689
5' OH GG...
4272.676
3.3E+005
2.6E+005
1.8E+005
9.8E+004
1.8E+004
-6.1E+004
4.0
7.3
10.6
13.9
17.2
20.5
时间 (min)
吸光度

图13C

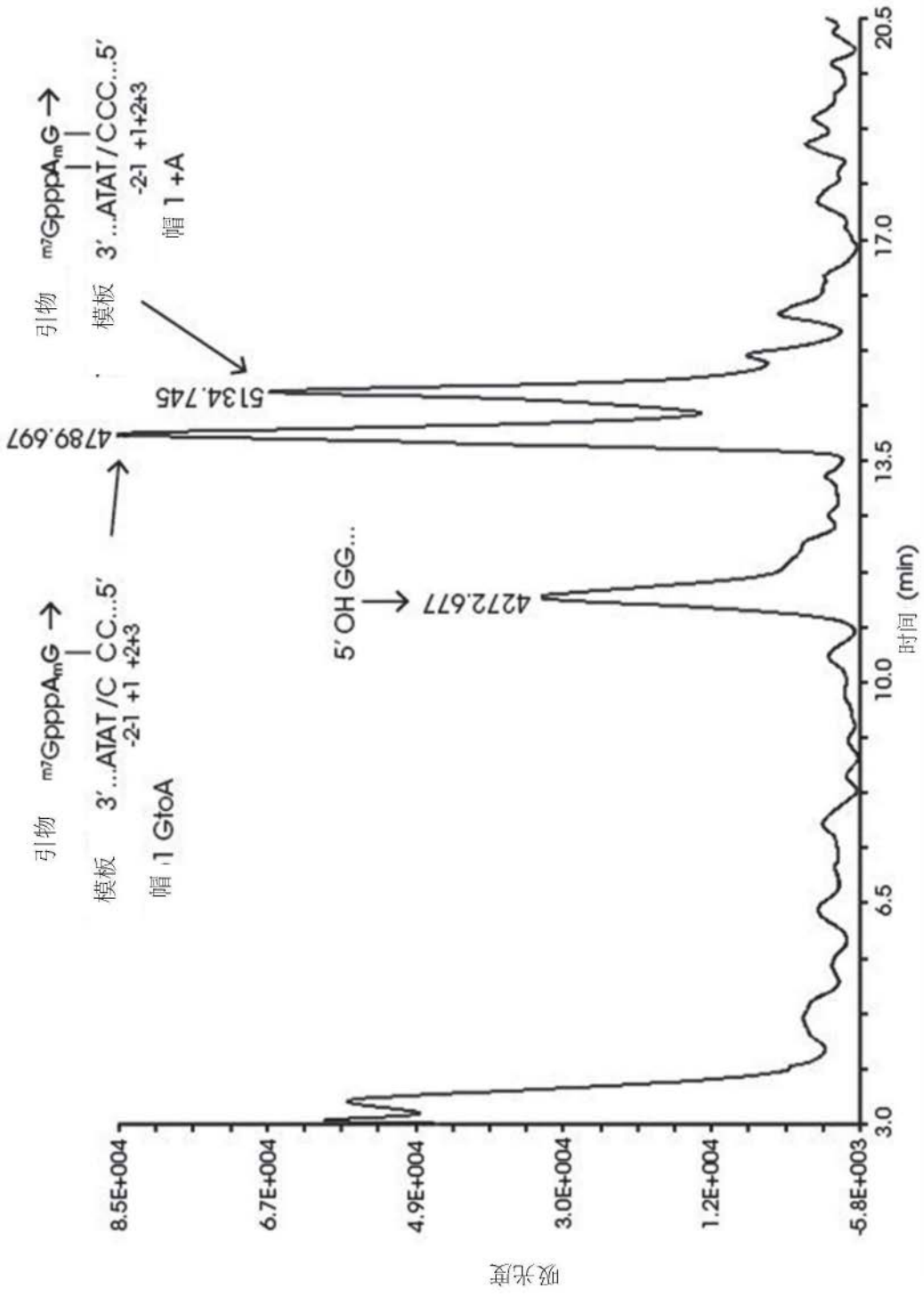

吸光度
8.5E+004
6.7E+004
4.9E+004
3.0E+004
1.2E+004
-5.8E+003
3.0
6.5
10.0
13.5
17.0
20.5
时间 (min)
4272.677
5' OH GG...
4789.697
5134.745
引物 m7GpppAmG →
模板 3'...ATAT/CCC...5'
-2-1 +1+2+3
帽 1 +A
引物 m7GpppAmG →
模板 3'...ATAT/C CC...5'
-2-1 +1 +2+3
帽 1 GtoA

图13D

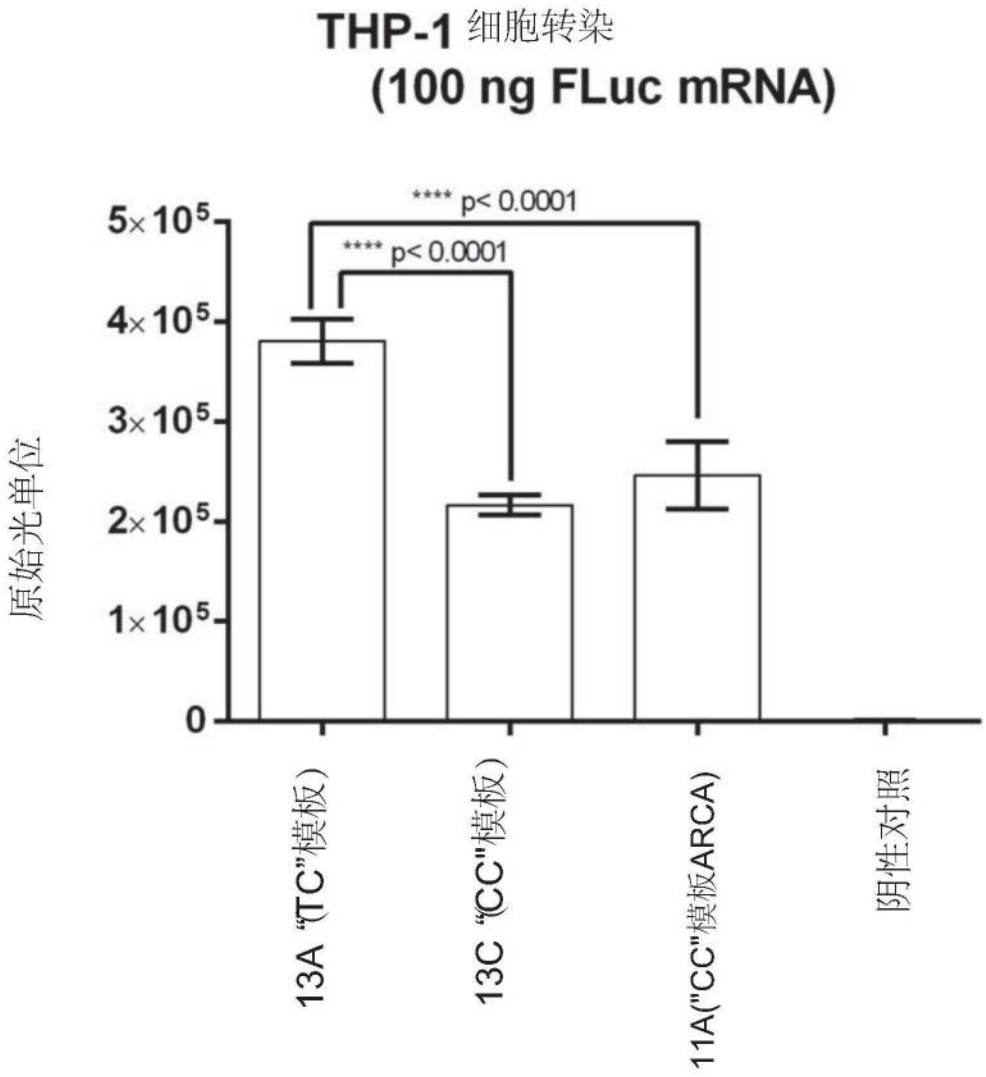

THP-1 细胞转染
(100 ng FLuc mRNA)
**** p< 0.0001
**** p< 0.0001
5×10^5
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
原始光单位
13A "TC"模板)
13C "CC"模板)
11A("CC"模板ARCA)
阴性对照

图14A

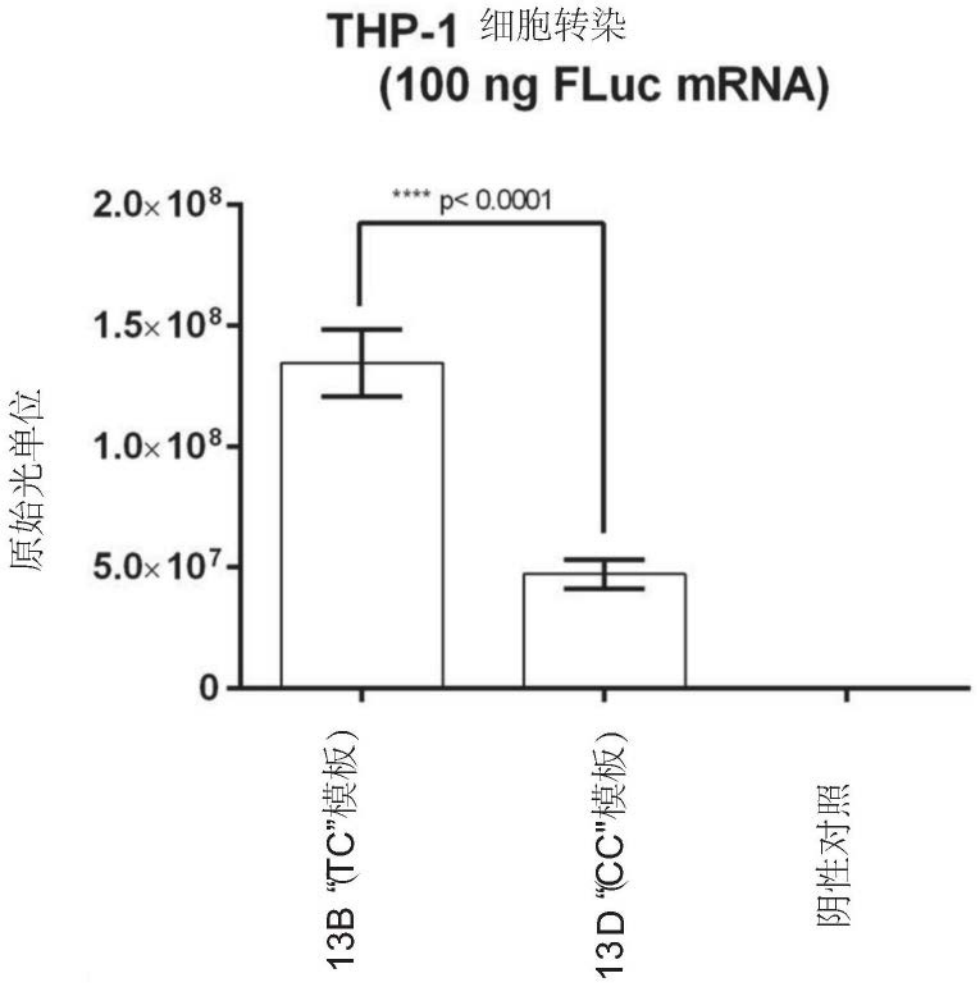

THP-1 细胞转染
(100 ng FLuc mRNA)
**** p< 0.0001
2.0×10^8
1.5×10^8
1.0×10^8
5.0×10^7
0
原始光单位
13B "TC"模板)
13D "CC"模板)
阴性对照

图14B