



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109937253 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 30

(21) 申请号 201780069684.2	(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
(22) 申请日 2017.09.14	专利代理师 郑斌 顾晋伟
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109937253 A	(51) Int.Cl. C12N 15/10 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.06.25	(56) 对比文件 WO 2015188933 A1,2015.12.17 US 2011143397 A1,2011.06.16 US 2014328825 A1,2014.11.06 US 2005054847 A1,2005.03.10 US 2005287539 A1,2005.12.29 William P. Kennedy等.Mechanism for De Novo RNA Synthesis and Initiating Nucleotide Specificity by T7 RNA Polymerase.《J.Mol.Biol》.2007,第256-268页. Kenneth H.Mellits等.Removal of double-stranded contaminants from.《Nucleic Acids Research》.1990,第5401-5406页.
(30) 优先权数据 62/394,711 2016.09.14 US	William P. Kennedy等.Mechanism for De Novo RNA Synthesis and Initiating Nucleotide Specificity by T7 RNA Polymerase.《J.Mol.Biol》.2007,第256-268页. Kenneth H.Mellits等.Removal of double-stranded contaminants from.《Nucleic Acids Research》.1990,第5401-5406页.
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.05.10	William P. Kennedy等.Mechanism for De Novo RNA Synthesis and Initiating Nucleotide Specificity by T7 RNA Polymerase.《J.Mol.Biol》.2007,第256-268页. Kenneth H.Mellits等.Removal of double-stranded contaminants from.《Nucleic Acids Research》.1990,第5401-5406页.
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2017/051674 2017.09.14	William P. Kennedy等.Mechanism for De Novo RNA Synthesis and Initiating Nucleotide Specificity by T7 RNA Polymerase.《J.Mol.Biol》.2007,第256-268页. Kenneth H.Mellits等.Removal of double-stranded contaminants from.《Nucleic Acids Research》.1990,第5401-5406页.
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/053209 EN 2018.03.22	William P. Kennedy等.Mechanism for De Novo RNA Synthesis and Initiating Nucleotide Specificity by T7 RNA Polymerase.《J.Mol.Biol》.2007,第256-268页. Kenneth H.Mellits等.Removal of double-stranded contaminants from.《Nucleic Acids Research》.1990,第5401-5406页.
(73) 专利权人 摩登纳特斯有限公司 地址 美国马萨诸塞州	William P. Kennedy等.Mechanism for De Novo RNA Synthesis and Initiating Nucleotide Specificity by T7 RNA Polymerase.《J.Mol.Biol》.2007,第256-268页. Kenneth H.Mellits等.Removal of double-stranded contaminants from.《Nucleic Acids Research》.1990,第5401-5406页.
(72) 发明人 史蒂芬·霍格 威廉·伊萨 爱德华·J·米拉科 珍妮弗·尼尔森 埃米·E·拉比多 加博尔·布托拉	William P. Kennedy等.Mechanism for De Novo RNA Synthesis and Initiating Nucleotide Specificity by T7 RNA Polymerase.《J.Mol.Biol》.2007,第256-268页. Kenneth H.Mellits等.Removal of double-stranded contaminants from.《Nucleic Acids Research》.1990,第5401-5406页.

审查员 林海生

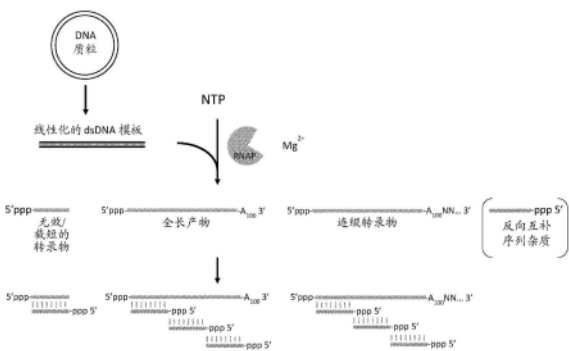
权利要求书3页 说明书68页  
序列表13页 附图37页

(54) 发明名称

高纯度RNA组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗应用的改进的RNA组合物。所述RNA组合物特别适用于人治疗应用(例如, RNA治疗剂)。所述RNA组合物通过改进的方法,具体地讲,改进的体外转录(IVT)方法制备。本发明还涉及用于产生和纯化RNA(例如, 治疗性RNA)的方法,以及使用所述RNA组合物的方法及其治疗应用。



1. 一种产生信使核糖核酸(mRNA)的方法,所述mRNA包含编码疫苗抗原或者治疗性蛋白质或肽的开放阅读框,所述方法包括温育:

(a) 包含脱氧核糖核酸(DNA)、RNA聚合酶、缓冲液、腺苷三磷酸(ATP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)和鸟苷三磷酸(GTP)以及缓冲液的反应混合物,以产生包含所述mRNA的体外转录(IVT)的RNA组合物,

其中:

(1) GTP、ATP、CTP和UTP的浓度的比率为4:2:1:1;或者

(2) 所述反应混合物还包含鸟苷二磷酸(GDP),并且GDP、GTP、ATP、CTP和UTP的浓度的比率为4:2:2:1:1。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述UTP是天然UTP。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述UTP是经修饰的UTP,其中所述经修饰的UTP包含假尿苷( $\psi$ )、N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷或5-甲氧基尿苷。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述经修饰的UTP包含假尿苷或N1-甲基假尿苷。

5. 如权利要求3所述的方法,其中所述经修饰的UTP包含N1-甲基假尿苷。

6. 如权利要求3所述的方法,其中所述经修饰的UTP包含经修饰的糖,其中所述经修饰的糖是2'-O-甲基核糖。

7. 如权利要求1的方法,其中所述RNA聚合酶选自T7聚合酶、T3聚合酶和SP6聚合酶。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述RNA聚合酶是T7聚合酶。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述DNA是cDNA。

10. 如权利要求1所述的方法,其中所述缓冲液包含镁。

11. 如权利要求1所述的方法,其中所述反应混合物还包含二硫苏糖醇(DTT)、亚精胺、RNA酶抑制剂、焦磷酸酶或其组合。

12. 如权利要求1所述的方法,其中所述反应混合物包含RNA酶抑制剂。

13. 如权利要求1所述的方法,其中所述反应混合物在25℃或37℃下温育。

14. 如权利要求1所述的方法,其中所述mRNA包含编码目的多肽的开放阅读框,其中所述目的多肽是治疗性蛋白质或疫苗抗原。

15. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物中反向转录互补产物少于10%的RNA总质量。

16. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物中不存在RNA酶III不敏感片段。

17. 如权利要求1所述的方法,其中大于90%的所述RNA的质量包含单链全长转录物。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物包含处于有义方向的单链部分RNA转录物群并且其中大于75%的处于有义方向的所述单链部分RNA转录物群具有100个核苷酸或更少的核苷酸长度。

19. 如权利要求1所述的方法,其中大于90%的处于有义方向的所述单链部分RNA转录物群具有100个核苷酸或更少的核苷酸长度。

20. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物中少于0.25%的所述RNA的质量为细胞

因子诱导性RNA污染物。

21. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物中少于0.5%的所述RNA的质量为细胞因子诱导性RNA污染物。

22. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物中少于0.5%的所述RNA的质量为反向互补转录产物。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述反向互补转录产物是:

- (i) 包含含有作为所述IVT RNA的至少一部分的反向互补序列的序列的链的dsRNA;或
- (ii) 包含含有含聚U序列的链的dsRNA。

24. 如权利要求23所述的方法,其中

- (i) 包含作为所述IVT RNA的反向互补序列的序列的所述链;或
  - (ii) 包含所述聚U序列的所述链,
- 以5' 三磷酸根(5' -PPP)起始。

25. 如权利要求22所述的方法,其中所述反向互补转录产物包含

- (i) 所述IVT RNA的5' 端的反向互补序列;和/或
- (ii) 所述IVT RNA的3' 端的反向互补序列。

26. 如权利要求23所述的方法,其中所述RNA的反向互补序列包含与编码所述目标多肽的所述RNA的开放阅读框的全部或部分互补的序列。

27. 一种体外转录(IVT)组合物,其包含:

脱氧核糖核酸(DNA)、RNA聚合酶、缓冲液、腺苷三磷酸(ATP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)以及鸟苷三磷酸(GTP),其用于产生RNA,其中所述RNA包含信使RNA(mRNA),其中少于5%的RNA质量是反向互补转录产物,

其中:

- (i) GTP、ATP、CTP和UTP的浓度的比率为4:2:1:1;或者

(ii) 所述体外转录(IVT)组合物还包含鸟苷二磷酸(GDP),并且GDP、GTP、ATP、CTP和UTP的浓度的比率为4:2:2:1:1。

28. 如权利要求27所述的组合物,其中所述UTP是天然UTP。

29. 如权利要求27所述的组合物,其中所述UTP是经修饰的UTP,其中所述经修饰的UTP包含假尿苷( $\psi$ )、N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷或5-甲氧基尿苷。

30. 如权利要求29所述的组合物,其中所述经修饰的UTP包含假尿苷或N1-甲基假尿苷。

31. 如权利要求29所述的组合物,其中所述经修饰的UTP包含N1-甲基假尿苷。

32. 如权利要求29所述的组合物,其中所述经修饰的UTP包含经修饰的糖,其中所述经修饰的糖是2'-O-甲基核糖。

33. 如权利要求27所述的组合物,其中所述RNA聚合酶选自T7聚合酶、T3聚合酶和SP6聚合酶。

34. 如权利要求27所述的组合物,其中所述RNA聚合酶是T7聚合酶。

35. 如权利要求27所述的组合物,其中所述DNA是cDNA。

36. 如权利要求27所述的组合物,其中所述缓冲液包含镁。
37. 如权利要求27所述的组合物,其中所述组合物还包含二硫苏糖醇 (DTT)、亚精胺、RNA酶抑制剂、焦磷酸酶或其组合。
38. 如权利要求27所述的组合物,其中所述组合物包含RNA酶抑制剂。
39. 如权利要求27所述的组合物,其中所述mRNA包含编码目的多肽的开放阅读框,其中所述目的多肽是治疗性蛋白质或疫苗抗原。
40. 如权利要求27的组合物,其中大于约90%的所述mRNA质量包含单链全长转录物。
41. 如权利要求27所述的组合物,其中所述组合物包含处于有义方向的单链部分RNA转录物群,
- 并且其中大于75%的处于有义方向的单链部分RNA转录物群具有100个核苷酸或更少的核苷酸长度。
42. 如权利要求41所述的组合物,其中大于90%的处于有义方向的单链部分RNA转录物群具有100个核苷酸或更少的核苷酸长度。
43. 如权利要求27所述的组合物,其中
- (i) 制备物中少于0.25%的所述RNA的质量为细胞因子诱导性RNA污染物;或者
- (ii) 制备物中少于0.5%的所述RNA的质量为反向互补转录产物。
44. 如权利要求43所述的组合物,其中所述反向互补转录产物是dsRNA,其包含:
- (i) 编码作为所述IVT mRNA的至少一部分的反向互补序列之序列的一条链;或
- (ii) 包含聚U序列的一条链。
45. 如权利要求44所述的组合物,其中
- (i) 编码作为所述IVT mRNA的反向互补序列之序列的所述链以5' 三磷酸根(5' -PPP)起始;或
- (ii) 包含所述聚U序列的所述链以5' 三磷酸根(5' -PPP)起始。
46. 如权利要求43所述的组合物,其中所述反向互补转录产物包含所述IVT mRNA的5' 端的反向互补序列,和/或所述IVT mRNA的3' 端的反向互补序列。



## 高纯度RNA组合物及其制备方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请依据35U.S.C.§119(e)要求2016年9月14日提交的美国临时申请62/394,711的权益,所述临时申请以引用方式整体并入。

[0003] 发明背景

[0004] 设计、合成和在细胞内部递送核酸(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))的能力已经提供了治疗学、诊断学、试剂和生物学测定领域的进步。在核酸的细胞内翻译和至少一种所编码的目标肽或多肽的产生过程中正在取得许多进步。

[0005] mRNA具有巨大的治疗潜力,因为mRNA治疗剂可以瞬时表达基本上任何期望的蛋白质,同时避免病毒和DNA-基核酸递送方法的不利影响。然而,哺乳动物细胞,特别是人细胞含有核酸(包括RNA)的传感器作为先天免疫系统的一部分-并且在开发mRNA治疗剂时希望避免这种感测和免疫应答。

[0006] 理论上,经由化学合成产生的mRNA有望作为mRNA治疗剂,然而,迄今为止这一重要治疗领域的大部分研究都集中在体外转录的(IVT)mRNA上,因为这种酶促过程有利于产生大约1-2或更多kB(大多数mRNA分子的标准长度)的长RNA。

[0007] 早期工作表明,掺入修饰的核苷(特别是假尿苷)减少先天免疫活化并增加mRNA的翻译,但仍然存在I型干扰素(IFN)和促炎细胞因子的残余诱导(Kariko等人(2005) *Immunity* 23(2):165-75)。在核苷修饰的IVT RNA中的污染物的鉴定方面取得了进展,双链RNA(dsRNA)被鉴定为至少部分地对先天免疫活化负责。通过高效液相色谱(HPLC)除去此类污染物导致IFN和炎性细胞因子水平降低,并且继而导致在原代细胞中的表达水平更高(Kariko等人(2011) *Nuc. Acids Res.* 39:e142)。值得注意的是,未修饰的mRNA仍然诱导高水平的细胞因子分泌,但是在HPLC纯化后更好地翻译它们。

[0008] WO 2013/102203描述了RNA酶III处理方法,所述方法用于从IVT mRNA中除去dsRNA,以用于重复或连续转染到人或动物细胞中,特别是用于将细胞从一种分化状态重编程为另一种分化状态。该方法旨在产生具有降低的dsRNA水平和提高的完整ssRNA水平的制剂,如通过更高的重编程因子水平和对细胞的更低毒性所证实的那样。然而,此类方法不适用于制备用于治疗用途、特别是用于人治疗用途的mRNA。已知RNA酶III消化ssRNA以及dsRNA,并且在试图除去dsRNA污染物时,期望的ssRNA产物的完整性必然受损。因此,需要更好地理解IVT生成的mRNA制剂中的污染物的性质,以便更好地控制IVT制剂中污染物的水平和性质。还需要制备用于治疗用途的mRNA的改进方法和根据此类方法产生的高纯度组合物。

### 发明内容

[0009] 本发明至少部分地涉及用于体外RNA合成的新型方法的发现以及相关产品。通过本文所述的方法产生的RNA转录物具有增强的特性,其产生包含所述RNA转录物的在质量和数量上优异的组合物。通过本文所述的方法产生的RNA转录物具有对于mRNA、lncRNA和其他治疗和诊断RNA用途特别重要的增强的特性,诸如改善的免疫沉默和更好的安全谱。

[0010] 具体地讲,本发明的IVT RNA组合物基本上不含常规上与IVT过程相关联的某些不期望的污染物。然而,值得注意的是,本发明的方法通过控制IVT反应中产生的污染物的性质和水平而得到适用于治疗用途的mRNA组合物,即,与尝试在已经产生污染物时除去所述污染物的现有技术所述的方法相反,在初始反应中不产生污染物。不受理论的束缚,据信从一开始就防止在IVT反应中产生不想要的污染物提供了具有更高纯度和效力(可测量的,例如,就组合物中的全长、完整mRNA的翻译增加而言)的改进的组合物。

[0011] 在本发明的一些方面提供了一种包含体外转录的(IVT)RNA和药学上可接受的赋形剂的组合物,其中所述组合物基本上不含反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、或0.55%的RNA总质量是反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约1.0%的RNA质量是反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.5%的RNA质量是反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.25%的RNA质量是反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.1%的RNA质量是反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.05%的RNA质量是反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.01%的RNA质量是反向互补转录产物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.005%的RNA质量是反向互补转录产物。在示例性实施方案中,组合物中的RNA质量通过LC、J2 Elisa、RNA酶III、使用放射性标记的NTP的凝胶电泳、LCMS+/-核酸酶或化学消化、使用标记NTP的NMR、化学/同位素/放射性等标记的NTP、细胞、生物化学方法、RIG-I ATP酶活性或MS或凝胶电泳或本领域已知的适于检测和/或定量含RNA组合物中的RNA的其他方法来确定。

[0012] 在一些实施方案中,反向互补转录产物与RNA的区域完全互补,所述区域是期望或预期的IVT转录产物(例如,mRNA、lncRNA、或旨在用于治疗用途的长度大于50个核苷酸的其他RNA)。与RNA转录物完全互补的产物被认为具有100%的互补性(例如,在反向互补转录产物的长度上。在其他实施方案中,反向互补转录产物与RNA转录物的区域部分互补。在一些实施方案中,反向互补转录产物与RNA转录物的区域70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%互补。在其他实施方案中,反向互补产物与RNA转录物的区域70%-90%、75%-90%、80%-90%、85%-90%、90%-95%、91%-95%、92%-95%、93%-95%、94%-95%、95%-99%、96%-99%、97%-99%、或98%-99%互补。

[0013] 技术人员将会知道,在IVT反应中生成的非预期或不期望的反向互补转录产物不仅可以与作为IVT反应的预期或期望产物的RNA转录物(例如,mRNA、lncRNA、或旨在用于治疗用途的长度大于50个核苷酸的其他RNA)具有互补性,而且还可以与由其产生预期或期望RNA转录物的DNA模板的链具有互补性。不受理论的束缚,据信根据本发明的新型方法减少或消除的污染IVT RNA组合物的某些非预期或不期望的转录产物是由预期或期望的RNA转录产物转录的,存在这样的可能性:污染IVT RNA组合物的某些非预期或不期望的转录产物可由IVT反应中使用的DNA模板转录。虽然可能,但是后一种设想似乎无法通过本文提供的数据证明,所述数据展示,反向互补转录产物主要与mRNA转录物的5'UTR和/或聚A尾互补,而与转录的mRNA中不存在的DNA模板的部分(例如,序列元件)互补的反向互补转录产物显著减少且在一些情况下不可检测。

[0014] 在其他方面,本发明是一种包含编码目标多肽的体外转录的(IVT)RNA和药学上可

接受的赋形剂的组合物,其中所述组合物基本上不含细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.5%的RNA质量是细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.25%的RNA质量是细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.1%的RNA质量是细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.05%的RNA质量是细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.01%的RNA质量是细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.005%的RNA质量是细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中少于约0.001%的RNA质量是细胞因子诱导性RNA污染物。在一些实施方案中,组合物中的RNA质量通过LC或MS或凝胶电泳或本领域已知的其他方法确定。

[0015] 在一些实施方案中,本发明的特征在于一种包含编码目标多肽的体外转录的 (IVT) RNA和药学上可接受的赋形剂的组合物,其中所述组合物具有降低的细胞因子诱导性RNA污染物和/或反向互补转录产物水平。

[0016] 在本文所述的本发明的组合物的一些实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物和/或反向互补转录产物的总和的质量小于组合物中RNA总质量的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、或0.55%、0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.0.25%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、或0.001%。在一些实施方案中,组合物中细胞因子诱导性RNA污染物与RNA转录产物(例如,预期或期望的RNA转录物)的比率为99:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、或1:99。在其他实施方案中,组合物中反向互补转录产物与RNA转录产物(例如,预期或期望的RNA转录物)的比率为99:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、或1:99。

[0017] 污染物的大小可变化。在一些实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物和/或RNA转录产物的长度大于2个核苷酸,最多至且包括全长转录产物(例如,预期或期望的转录产物,例如mRNA转录物)的长度。在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物和/或RNA转录产物的长度大于5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸,各自最多至且包括全长转录产物的长度。在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物和/或RNA转录产物的长度为2-500个核苷酸的长度、10-500个核苷酸的长度、15-500个核苷酸的长度、20-500个核苷酸的长度、30-500个核苷酸的长度、40-500个核苷酸的长度、50-500个核苷酸的长度、100-500个核苷酸的长度、200-500个核苷酸的长度、300-500个核苷酸的长度、400-500个核苷酸的长度、2-200个核苷酸的长度、10-200个核苷酸的长度、15-200个核苷酸的长度、20-200个核苷酸的长度、30-200个核苷酸的长度、40-200个核苷酸的长度、50-200个核苷酸的长度、100-200个核苷酸的长度、200-300个核苷酸的长度、300-400个核苷酸的长度、2-100个核苷酸的长度、10-100个核苷酸的长度、15-100个核苷酸的长度、20-100个核苷酸的长度、30-100个核苷酸的长度、40-100个核苷酸的长度、或50-100个核苷酸的长度。

[0018] 技术人员将会知道,某种结构和/或长度的RNA污染物非常容易刺激不期望或不想要的免疫应答,例如,长度为至少15或至少20或至少25个核苷酸的RNA污染物,特别是本质上是双链的RNA污染物(dsRNA)。可以使用某些本领域认可的方法(例如,酶促和/或纯化工工艺或方法步骤)除去此类污染物。然而,例如mRNA、lncRNA或旨在用于治疗用途的长度大于

50个核苷酸的其他RNA的这种另外的纯化过程或步骤中的每一个引入预期产物的保真度降低的可能性,例如,通过使直接IVT反应产物经受(1)酶促条件(例如,产生RNA片段的RNA酶处理)和/或(2)高温、非生理溶剂条件(例如,HPLC或RP色谱条件),这可能在试图降解或除去污染物的过程中损害RNA产品的质量。

[0019] 在本发明的某些方面,不期望或不想要的污染物是具有例如在一定范围内的大小和质量分布的RNA物类群。例如,某种类型的污染物可以具有少于5%的任何个别污染物物类(即,相同序列、相同长度的RNA物类等)。在其他实施方案中,污染物可以具有少于4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.0%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.05%、0.001%、0.0005%、或0.0001%的任何个别物类。

[0020] 在一些实施方案中,反向互补转录产物是RNA(dsRNA、ssRNA、或具有ds部分和ss部分的ds-ssRNA杂交体),其包含含有作为IVTRNA或RNA(dsRNA、ssRNA或ds-ssRNA)的反向互补序列的序列的链。在其中聚A尾在DNA模板内的聚A:T区带内编码的一些实施方案中,反向互补产物包含含有聚U序列或本领域常用于将聚A尾安装在RNA中的其他方式的链。聚U序列是例如pppU(U)<sub>n</sub>,其中n为1或更大。在一些实施方案中,n为1-100(对于编码的聚A尾,其中靶RNA具有100nt聚A尾。在其他实施方案中,n大于30或为30-200。在示例性实施方案中,反向互补产物以5'三磷酸根(5'-PPP)起始。在其他实施方案中,反向互补产物以5'二磷酸根(5'-PP)或5'一磷酸根(5'-P)起始。

[0021] 在一些实施方案中,反向互补转录产物包含IVT RNA的5'端的反向互补序列和/或IVT RNA的3'端的反向互补序列。在一些实施方案中,IVT RNA的5'端的反向互补序列包含与IVT RNA的5' UTR的全部或部分互补的序列。在其他实施方案中,IVT RNA的3'端的反向互补序列包含与IVT RNA的聚A尾的全部或部分互补的序列。在其他实施方案中,3'端的反向互补序列是无尾RNA的反向互补序列。在其他实施方案中,反向互补转录产物包含与RNA的5'端、3'端、开放阅读框和/或聚A尾或它们的任何组合的全部或部分互补的序列。

[0022] 在本发明的示例性方面,细胞因子诱导性RNA污染物是RNA(dsRNA、ssRNA或ds-ssRNA)。在一些实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是在一些实施方案中包含作为IVT RNA的反向互补序列的反向序列的链或包含含有聚U序列的链的dsRNA或ssRNA。

[0023] 在一些实施方案中,包含作为IVT RNA的反向互补序列的序列的链或包含聚U序列的链以5'三磷酸根(5'-PPP)起始。在一些实施方案中,聚U序列的长度大于20个核苷酸。在一些实施方案中,聚U序列的长度大于30个核苷酸。在其他实施方案中,聚U序列是单链的。在其他实施方案中,聚U序列是双链的。

[0024] 在一些实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物包含IVT RNA的5'端的反向互补序列和/或IVT RNA的3'端的反向互补序列。在一些实施方案中,IVT RNA的5'端的反向互补序列包含与IVT RNA的5' UTR的全部或部分互补的序列。在其他实施方案中,IVT RNA的3'端的反向互补序列包含与IVT RNA的聚A尾的全部或部分互补的序列。在一些实施方案中,反向互补序列包含与5' UTR的前10-15个核苷酸互补的序列。在一些实施方案中,反向互补序列包含与5' UTR的前10-20个核苷酸互补的序列。在一些实施方案中,反向互补序列包含与5' UTR的前10-30个核苷酸互补的序列。在一些实施方案中,反向互补序列包含与5' UTR的前10-40个核苷酸互补的序列。在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物包含与RNA的5'端、3'端、开放阅读框和/或聚A尾或它们的任何组合的全部或部分互补的序列。

[0025] 在一些实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是20个核苷酸或更大的单链三磷酸反向互补序列。在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是25个核苷酸或更大的单链三磷酸反向互补序列。在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是30个核苷酸或更大的单链三磷酸反向互补序列。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为20-200个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为20-100个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为20-50个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为25-200个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为25-100个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为25-50个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为30-200个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为30-100个核苷酸。在一些实施方案中,单链三磷酸反向互补序列的长度为30-50个核苷酸。

[0026] 在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是具有末端三磷酸-A、三磷酸-C、或三磷酸-U的单链反向互补序列。

[0027] 在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是20个核苷酸或更大的双链三磷酸反向互补序列。在一些实施方案中,双链三磷酸反向互补序列为20-200个核苷酸。在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是双链三磷酸反向互补序列,所述序列是完美双链体(perfect duplex)(无单链区域)。在其他实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物是包括单链突出端的双链三磷酸反向互补序列。

[0028] 在本发明的一些方面,在一些实施方案中,dsRNA包含长度在20与100个核苷酸之间的链。在其他实施方案中,dsRNA是长度在约20与约50bp之间的双链体。在其他实施方案中,dsRNA包含长度为1-1,000、5-1,000、10-1,000、100-1,000、500-1,000、1-10、1-20、1-50、1-100、5-10、5-20、5-30、5-50、5-100、5-200、5-300、5-400、10-20、10-30、10-100、10-200、10-300、10-400、10-500、20-25、20-30、20-100、20-200、20-300、20-400、20-500、30-35、30-40、30-100、30-200、30-300、30-400、或30-500个核苷酸的链。在其他实施方案中,dsRNA包含1个核苷酸至全长转录物长度的链。

[0029] 在其他实施方案中,组合物中少于约0.5%的RNA质量是大小大于40个碱基对的dsRNA。

[0030] 可使用已知的分析方法和测定评估产物的纯度。在本发明的示例性方面,通过高效液相色谱(诸如反相色谱、尺寸排阻色谱)、Bioanalyzer芯片-基的电泳系统、ELISA、流式细胞术、聚丙烯酰胺凝胶、重构或替代类型测定来确定反向互补产物或细胞因子诱导性RNA污染物的量。可在对RNA制剂进行或不进行核酸酶处理(P1、RNA酶III、RNA酶H等)的情况下进行测定。还可以进行核酸酶消化产物的电泳/色谱/质谱分析。

[0031] 在一些实施方案中,RNA的质量通过质谱诸如LC-MS、MALDI-TOF(基质辅助激光解吸电离飞行时间)确定。

[0032] 在一些实施方案中,组合物包含长度小于全长转录物,例如比全长少至少100、200、300、400、500、600、700、800、或900个核苷酸的污染转录物。污染转录物可以包括长度小于全长转录物,例如比全长少至少100、200、300、400、500、600、700、800、或900个核苷酸的反向或正向转录产物(转录物)。示例性的正向转录物包括,例如,无效转录物(abortive transcript)。在某些实施方案中,组合物包含少于30个核苷酸的三磷酸聚-U反向互补序

列。在一些实施方案中,组合物包含与全长转录物杂交的任何长度的三磷酸聚-U反向互补序列。在其他实施方案中,组合物包含单链三磷酸正向转录物。在其他实施方案中,组合物包含具有末端三磷酸-G的单链RNA。在其他实施方案中,组合物包含少于12个核苷酸或碱基对的单链或双链RNA(包括正向或反向互补转录物)。在任何这些实施方案中,组合物可包含少于50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或0.5%的这些小于全长转录物中的任一种或其组合。

[0033] 在其他实施方案中,RNA通过包括以下各项的方法产生或可通过所述方法制备:

[0034] (a) 形成包含DNA模板和NTP以及(例如含有T7辅因子(例如镁)的缓冲液)的反应混合物,所述NTP包括腺苷三磷酸(ATP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)、鸟苷三磷酸(GTP)以及任选地鸟苷二磷酸(GDP)。

[0035] (b) 在使得RNA转录的条件下温育反应混合物,

[0036] 其中GTP、CTP、ATP和UTP中的至少一种的浓度比ATP、CTP或UTP中的任何一种或多种的浓度大至少2倍,或反应还包括核苷酸二磷酸(NDP)或核苷酸类似物并且其中NDP或核苷酸类似物的浓度比ATP、CTP或UTP中的任何一种或多种的浓度大至少2倍,在一些实施方案中,GTP的浓度与任一种ATP、CTP或UTP的浓度的比率为至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1或至少6:1。

[0037] GTP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率在一些实施方案中分别为2:1、4:1和4:1。在其他实施方案中,GTP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率分别为3:1、6:1和6:1。反应混合物可包含GTP和GDP并且其中GTP加GDP的浓度与ATP、CTP或UTP中的任一种的浓度的比率为至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1或至少6:1在一些实施方案中,GTP加GDP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率分别为3:1、6:1和6:1。

[0038] 在其他实施方案中,RNA通过包括以下各项的方法产生或可通过所述方法制备:

[0039] (a) 形成包含DNA模板和腺苷三磷酸(ATP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)、鸟苷三磷酸(GTP)和任选地鸟苷二磷酸(GDP)、以及缓冲液含镁缓冲液的反应混合物,

[0040] (b) 在使得RNA转录的条件下温育反应混合物,

[0041] 其中反应中磷酸盐的有效浓度为至少150mM磷酸盐、至少160mM、至少170mM、至少180mM、至少190mM、至少200mM、至少210mM或至少220mM。反应中磷酸盐的有效浓度可以是180mM。在一些实施方案中,反应中磷酸盐的有效浓度为195mM。在其他实施方案中,反应中磷酸盐的有效浓度为225mM。

[0042] 在其他实施方案中,RNA通过包括以下各项的方法产生或可通过所述方法制备:

[0043] (a) 形成包含DNA模板和腺苷三磷酸(ATP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)、鸟苷三磷酸(GTP)和任选地鸟苷二磷酸(GDP)、以及缓冲液含镁缓冲液的反应混合物,

[0044] (b) 在使得RNA转录的条件下温育反应混合物,

[0045] 其中含镁缓冲液包含Mg<sup>2+</sup>并且其中ATP加CTP加UTP加GTP以及任选地GDP的浓度与Mg<sup>2+</sup>浓度的摩尔比为至少1.0、至少1.25、至少1.5、至少1.75、至少1.85、至少3或更高。ATP加CTP加UTP加GTP以及任选地GDP的浓度与Mg<sup>2+</sup>浓度的摩尔比可为1.5。ATP加CTP加UTP加GTP以及任选地GDP的浓度与Mg<sup>2+</sup>浓度的摩尔比在一些实施方案中为1.88。ATP加CTP加UTP加GTP以及任选地GDP的浓度与Mg<sup>2+</sup>浓度的摩尔比在一些实施方案中为3。

[0046] 在一些实施方案中,组合物通过不包括dsRNA酶(例如,RNA酶III)处理步骤的方法

产生。在其他实施方案中,组合物通过不包括反相(RP)色谱纯化步骤的方法产生。在其他实施方案中,组合物通过不包括高效液相色谱(HPLC)纯化步骤的方法产生。

[0047] 在一些实施方案中,RNA是修饰的mRNA。在其他实施方案中,RNA是未修饰的RNA。在其他实施方案中,RNA是lncRNA。在其他实施方案中,RNA的长度大于50个核苷酸。RNA可包括UTP并且UTP是修饰的UTP。

[0048] 在一些实施方案中,反向互补转录产物或细胞因子诱导性物类的量通过包括以下各项的方法间接确定:

[0049] (a)在与用于产生IVT RNA相同的IVT条件下由编码模型RNA的DNA模板产生包含模型RNA的组合物,以及

[0050] (b)通过LC-MS确定包含模型RNA的组合物中反向互补转录产物或细胞因子诱导性物类的量,

[0051] 其中包含模型RNA的组合物中通过LC-MS确定的反向互补转录产物或细胞因子诱导性物类的量指示包含IVT RNA的组合物中反向互补转录产物或细胞因子诱导性物类的量。

[0052] 在其他方面,本发明是一种体外转录的(IVT)RNA组合物,其中RNA不经受RNA酶III处理和/或不经受RP纯化。

[0053] 在其他方面,本发明是一种包含编码目标多肽的体外转录的(IVT)单链RNA和药学上可接受的赋形剂的组合物,其中大于98%的RNA是单链的并且其中单链RNA包含不同长度的转录物。在一些实施方案中,包含不同长度的转录物的单链RNA包括全长转录物和无效转录物。在一些实施方案中,80-98%的单链非全长转录物包含无效转录物。在其他实施方案中,95-98%的单链非全长转录物包含无效转录物。

[0054] 在本发明的其他方面提供了一种使用组合物单位(unit of use composition)。使用组合物单位是编码目标多肽的体外转录的(IVT)单链RNA和药学上可接受的赋形剂,其中组合物不含残余的有机溶剂。

[0055] 在其他方面,本发明是一种包含编码目标多肽的体外转录的(IVT)单链RNA和药学上可接受的赋形剂的组合物,其中所述组合物是非免疫原性的并且其中单链RNA包含不同长度的转录物。在一些实施方案中,包含不同长度的转录物的单链RNA包括全长转录物和片段转录物诸如无效转录物。片段转录物包括例如非全长有义RNA、截短或过早终止的转录物以及通常少于转录产物的前25个核苷酸的无效转录物。

[0056] 在其他方面,本发明是一种制备RNA的方法,其包括

[0057] (a)形成包含DNA模板和NTP以及缓冲液(例如含镁缓冲液)的反应混合物,所述NTP包括腺苷三磷酸(ATP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)、鸟苷三磷酸(GTP)以及任选地鸟苷二磷酸(GDP),以及

[0058] (b)在使得RNA转录的条件下温育反应混合物,

[0059] 其中GTP、CTP、ATP和UTP中的至少一种的浓度比ATP、CTP或UTP中的任何一种或多种的浓度大至少2倍,或反应还包括核苷酸二磷酸(NDP)或核苷酸类似物并且其中NDP或核苷酸类似物的浓度比ATP、CTP或UTP中的任何一种或多种的浓度大至少2倍。在一些实施方案中,GTP的浓度与任一种ATP、CTP或UTP的浓度的比率为至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1或至少6:1,以产生RNA。

[0060] 在一些实施方案中,GTP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率分别为2:1、4:1和4:1。在其他实施方案中,GTP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率分别为3:1、6:1和6:1。在其他实施方案中,反应混合物包含GTP和GDP并且其中GTP加GDP的浓度与ATP、CTP或UTP中的任一种的浓度的比率为至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1或至少6:1在其他实施方案中,GTP加GDP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率分别为3:1、6:1和6:1。

[0061] 本文描述的任何组合物可以是反应混合物,例如,尚未通过其他方法诸如RP色谱纯化的IVT反应的混合物。在其他方面,组合物是备用于治疗性施用于受试者的最终产品。

[0062] 本发明的每个限制可以涵盖本发明的各种实施方案。因此,预期涉及任一种元素或元素组合的本发明的每个限制可包括在本发明的每个方面中。本发明的应用并不限于以下描述中阐述的或在附图中示出的部件的构造和布置的细节。本发明支持其他实施方案并且能够以各种方式实践或执行。

## 附图说明

[0063] 附图并不是按比例绘制的。在附图中,各图中所示的每个相同或几乎相同的部件由相同的数字表示。为了清楚起见,并非每个图纸都可以标注每个部件。在附图中:

[0064] 图1是描绘在BJ成纤维细胞中筛选hEP0化学变体、nLuc和媒介物对照以及短模型RNA-1的IFN- $\beta$ 测定的结果的图。

[0065] 图2示出短模型转录物的LCMS分析的结果。该模型展示出所有三种化学物质中均存在无效物类。顶部迹线示出未修饰的短模型RNA-1;中间迹线示出其中所有尿苷被修饰为假尿苷且所有胞苷用5' O-甲基修饰的短模型RNA;并且底部迹线示出其中一些尿苷和胞苷残基被修饰的短模型RNA1。

[0066] 图3示出模型转录物的LCMS分析的结果。该模型展示出通过IVT制备的模型RNA-4和hEP0的杂质谱。

[0067] 图4示出T7可用于在不存在DNA模板的情况下进行RNA模板化的RNA转录,这在治疗时带来免疫刺激性产物。

[0068] 图5A和5B示出反相(RP)和使用过量GTP的IVT对RNA酶III底物的量的影响。 $\alpha$ 方法和RP纯化均减少了RIII底物。示出了组合两者的累加效应。图5A示出RNA酶III处理的hEP0 G5材料的毛细管电泳分析。图5B示出RNA酶III处理的hEP0 G0材料的毛细管电泳分析。

[0069] 图6示出来自hEP0蛋白表达和IFN- $\beta$ 的转染数据。

[0070] 图7是使用不同方法转录并用RNA酶III处理的短转录物的毛细管电泳分析。数据示出用RNA酶III处理的模型RNA的效果。

[0071] 图8A和8B示出RP-IP纯化方法的结果。图8A示出在使用等摩尔方法的IVT后经受RNA酶III处理的模型RNA-4并且图8B示出在使用过量GTP的IVT后经受RNA酶III处理的模型RNA-4。

[0072] 图9是使用和不使用RNA酶III处理的hEP0的RP分级分离。

[0073] 图10A-10D示出等摩尔(图10A、10B和10C)反应之后的hEP0级分RNA酶III片段分析仪数据。hEP0经过修饰,使得其尿苷碱基为1-甲基假尿苷。使用利用过量GTP的方法,用RNA酶III处理未显示出明显的纯度差异。利用等摩尔,存在相当多的底物。图10D示出在等摩尔条件下未处理或RNA酶III处理之后的hEP0 EQ G5的体外IFN $\beta$ 分析。



- [0074] 图11A-11D示出RP分级分离的hEP0 $\alpha$ +/-RIII处理的毛细管电泳分析。图11A、11B和11C示出在反应中使用过量GTP的IVT的影响。图11D示出使用过量GTP的IVT,其导致无IFN应答。
- [0075] 图12示出J2抗dsRNA ELISA测定的结果。
- [0076] 图13示出通过RNA酶III处理除去dsRNA。
- [0077] 图14示出IVT表征研究的结果,其表明使用过量GTP的IVT对低温诱导的细胞因子尖峰不太敏感。
- [0078] 图15示出IVT表征研究的核酸酶P1结果。
- [0079] 图16A至16B示出通过LCMS进行的在等摩尔方法(图16A)和 $\alpha$ 方法(图16B)中使用G5的不同化学物质中的基于RNA的IVT的杂质分析。
- [0080] 图17示出不同IVT条件下BJ成纤维细胞中的IFN- $\beta$ 。
- [0081] 图18示出dsRNA不可通过牛痘加帽。
- [0082] 图19示出CIP处理对不同dsRNA物类的影响。
- [0083] 图20示出来自体内实验的FA纯度数据。
- [0084] 图21示出BJ成纤维细胞中的IFN- $\beta$ 诱导。
- [0085] 图22示出hEP0的体内表达。
- [0086] 图23A至23D示出来自体内实验的细胞因子Luminex数据。
- [0087] 图24示出体内B细胞活化频率。
- [0088] 图25示出分析短dsRNA的IFN- $\beta$ 测定的结果。该测定是短的5' 三磷酸根化寡聚物的体外分析。
- [0089] 图26示出分析20聚体和聚U/A dsRNA的IFN- $\beta$ 测定的结果。
- [0090] 图27示出关于IFN- $\beta$ 应答的3' 突出端的分析。
- [0091] 图28示出测试具有5' 突出端、完美双链体以及不同长度的3' 突出端的dsRNA标准品的细胞因子测定的结果。
- [0092] 图29是描绘聚U物类的体外分析的图。
- [0093] 图30是描绘ssRNA寡聚物标准品的体外分析的图。
- [0094] 图31是描绘具有不同的5' 官能度的dsRNA寡聚物标准品的体外分析的图。
- [0095] 图32是展示磷酸酶不可以使dsRNA去磷酸化的图。
- [0096] 图33是展示ssRNA杂质剂量响应(BJ成纤维细胞中的IFN $\beta$ )的图。
- [0097] 图34是展示dsRNA杂质剂量响应(BJ成纤维细胞中的IFN $\beta$ )的图。
- [0098] 图35是展示针对正向寡聚物标准品上的修饰的5' 核苷酸的IFN $\beta$ 应答的图。
- [0099] 图36是展示针对反向互补寡聚物标准品上的修饰的5' 核苷酸的IFN $\beta$ 应答的图。
- [0100] 图37是展示针对5' 羟基官能化的dsRNA的IFN $\beta$ 应答的图。
- [0101] 图38是展示 $\alpha$ 方法比等摩尔方法生成更多OH(纯净)的图。
- [0102] 图39是示出1 $\mu$ g mRNA的计算得到的dsRNA的图。
- [0103] 图40是描绘传统的体外转录(IVT)过程和所形成的杂质类型的示意图。

## 具体实施方式

- [0104] 为了加强用于制造蛋白质编码聚合物的方法,已经开发了生成RNA的新方法。已经

发现,可以对体外转录过程作出改变,以产生所具有的特性与使用传统的体外转录(IVT)过程产生的RNA差异巨大的RNA制剂。根据本发明的方法产生的RNA制剂(在本文也称为IVT RNA组合物)具有能够产生包含所述RNA转录物的在质量和数量上优异的组合物的特性。即使在与广泛的纯化方法结合时,使用传统IVT方法产生的RNA在质量和数量上也不同于本发明的RNA制剂。例如,与使用传统IVT制备的RNA制剂(和包含所述RNA制剂的组合物)相比,本发明的RNA制剂(和包含所述RNA制剂的组合物)具有较低的免疫原性。根据本发明的方法产生的RNA制剂(在本文也称为IVT RNA组合物)还具有能够导致在质量和数量上优异的蛋白质产生(例如,在翻译时)的特性。例如,与使用传统IVT制备的RNA制剂相比,由本发明的RNA制剂生成的蛋白质具有较低的免疫原性。

[0105] 另外,由本文所述的RNA制剂产生具有更高纯度的增加的蛋白质表达水平。不受机制的束缚,据信大量蛋白质表达水平是纯化样品中mRNA高完整性的结果。虽然一些纯化程序可以通过降解那些污染物来有效地除去污染物水平,但是药物产品的完整性受到负面影响。例如,在现有技术中断定mRNA样品的RNA酶消化可用于除去RNA污染物。然而,RNA酶消化还通过降解通过IVT反应产生的全长转录物的部分而降低mRNA的完整性。与现有技术IVT/纯化方法相反,使用本发明方法的mRNA的完整性相当高,因为所述方法产生极少乃至不产生将需要使用诸如RNA酶消化的程序除去的双链转录物。

[0106] 通过本文描述的方法产生的RNA是可用于治疗或诊断目的的长度大于30个核苷酸的任何RNA。在一些实施方案中,RNA是长度大于40、50、60、75、100、200、300、400、500、或1,000个核苷酸的RNA。在一些实施方案中,RNA是长度大于1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、或12,000个核苷酸的RNA。在一些实施方案中,RNA是mRNA。在一些实施方案中,RNA是长度为约500至约4000个核苷酸、长度为约1000至约2000个核苷酸、长度为约750至约1800个核苷酸、长度为约1500至约3000个核苷酸、长度为约4000至约7000个核苷酸,或长度为约6000至约12000个核苷酸的RNA。mRNA可以是修饰或未修饰的。在其他实施方案中,RNA是以下各项中的一种或多种:mRNA、修饰的mRNA、未修饰的RNA、lncRNA、自我复制RNA、环状RNA、CRISPR向导RNA。

[0107] 传统的IVT反应通过将DNA模板与RNA聚合酶和等摩尔量的核苷酸三磷酸(包括GTP、ATP、CTP和UTP)一起在转录缓冲液中温育进行。由此反应产生具有5'末端鸟苷三磷酸的RNA转录物。这些反应还导致产生多种杂质,诸如双链和单链RNA,所述杂质是免疫刺激性的并且可能具有累加影响。防止反向互补序列形成的本发明的方法防止了两种物类的固有免疫识别。在一些实施方案中,与使用利用等摩尔NTP的现有技术方法制备的RNA制剂相比,本发明的方法导致产生具有显著降低的T细胞活性的RNA。现有技术试图使用一系列后续纯化步骤除去这些不期望的组分。此类纯化方法是不期望的,因为它们涉及额外的时间和资源,并且还导致在最终产物中掺入残余的有机溶剂,这对于药物产品是不期望的。放大如反相色谱(RP)之类的工艺是劳动力和资本密集型的:利用例如防爆设施、HPLC柱以及额定用于高压、高温、易燃溶剂等的纯化系统。大规模制造的规模和通量受这些因素的限制。还需要后续纯化除去RP过程中利用的烷基铵离子对。相比之下,本文描述的方法甚至加强了当前利用的方法(例如RP)。较低的杂质负载一开始就导致不含细胞因子诱导性污染物的全长RNA的较高的纯化回收率(例如较高质量的材料)。当使用RNA酶III作为制备纯化时,本发明的经过修改的IVT方法的另一个优点是,由于存在较少RNA酶III底物,因此通过RNA酶III处

理生成较少的惰性/外源切割产物(降解但不翻译的那些)。如果仅存在痕量的dsRNA/RNA酶III底物,即使可能是细胞因子沉默的,也存在更多能够翻译蛋白质的最终完整的RNA产物(完整的帽/ORF/聚A)。这导致任何后续纯化的负担减轻。

[0108] 根据本发明的方面,非常令人惊讶地发现,IVT反应中的一个或多个反应参数的操纵产生高度功能性RNA的RNA制剂,而没有使用现有技术方法产生的一种或多种不期望的污染物。可操纵的IVT反应中的一个参数是与反应混合物中的一种或多种其他核苷酸或核苷酸类似物相比核苷酸或核苷酸类似物的相对量(例如,不同的核苷酸量或浓度)。例如,IVT反应可包括过量的核苷酸,例如,核苷酸一磷酸、核苷酸二磷酸或核苷酸三磷酸和/或过量的核苷酸类似物和/或核苷类似物。本发明的方法产生高收率产物,其具有比通过传统IVT方法产生的产物显著更高的纯度。

[0109] 核苷酸类似物是具有核苷酸的通式结构或在结构上类似于核苷酸或其部分的化合物。具体地讲,核苷酸类似物是含有例如核苷酸的核酸部分、糖部分和/或磷酸基团的类似物的核苷酸。核苷酸包括,例如,核苷酸一磷酸、核苷酸二磷酸和核苷酸三磷酸。如本文所用的核苷酸类似物在结构上类似于核苷酸或其部分,但不具有典型的核苷酸结构(核碱基-核糖-磷酸)。核苷类似物是具有核苷的通式结构或在结构上类似于核苷或其部分的化合物。具体地讲,核苷类似物是含有例如核苷的核酸和/或糖部分的类似物的核苷。

[0110] 如本文所用,核苷三磷酸是指包括与核糖连接的核碱基(即核苷)和三个磷酸的分子(即核苷酸)。核苷酸二磷酸是指相同的分子,但具有两个磷酸部分。核苷酸一磷酸是指相同的分子,但具有一个磷酸部分。核苷酸一磷酸、核苷酸二磷酸和三磷酸在本文中有时分别称为NMP、NDP和NTP。NMP、NDP和NTP中的N是指任何核苷酸,包括天然存在的核苷酸、合成核苷酸以及修饰核苷酸。因此,术语NDP和NTP分别是指其中具有任何天然存在的、合成的或修饰的核苷酸的核苷酸二磷酸和核苷酸三磷酸。

[0111] 天然核苷酸二磷酸包括至少腺苷二磷酸(ADP)、鸟苷二磷酸(GDP)、胞苷二磷酸(CDP)以及尿苷二磷酸(UDP)。天然核苷酸三磷酸包括至少腺苷三磷酸(ATP)、鸟苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)、5-甲基尿苷三磷酸(m5UTP)以及尿苷三磷酸(UTP)。在一些实施方案中,NDP和/或NTP是经过修饰的。例如,修饰的NDP或NTP可具有柄,以使得易于纯化和分离。

[0112] 通过聚合酶诸如T7聚合酶将核苷酸三磷酸添加至RNA链。相比之下,核苷酸二磷酸和一磷酸可引发反应(例如,用作第一转录单体),但不会被T7聚合酶掺入链内(例如,不会被掺入链中的其他任何地方)。在一些情况下,核苷酸二磷酸,诸如GDP,可作为第一单体掺入。例如,如果T7以GDP起始并产生5' GDP,那么可生成功能性RNA。5' GDP起始的RNA仍然是牛痘加帽酶的底物。当在反应中使用过量NMP诸如GMP时,可通过连接帽来提高纯度,因为具有5' P04的转录产物是一种或多种连接酶(例如,一种或多种DNA/RNA连接酶)的底物。

[0113] 可用于本发明的核苷酸类似物在结构上类似于核苷酸或其部分,但是例如不可通过T7聚合。如本文所用的核苷酸/核苷类似物(包括C、T、A、U、G、dC、dT、dA、dU或dG类似物)包括例如,抗病毒核苷酸类似物、磷酸酯类似物(可溶的或固定的、可水解的或不可水解的)、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸,例如,帽类似物,或用于酶促加帽(牛痘或连接酶)的前体/底物、用官能团标记以有利于帽或5'部分(IRES)的连接/缀合的核苷酸、用5' P04标记以有利于帽或5'部分的连接的核苷酸、或用可以化学或酶促切割的官能团/保护基团标记的核

苷酸。抗病毒核苷酸/核苷类似物包括但不限于更昔洛韦、恩替卡韦、替比夫定、阿糖腺苷以及西多福韦。

#### [0114] IVT反应条件

[0115] 在示例性方面,本发明的方法包括通过IVT反应产生RNA。IVT是本领域公认的用于体外生成合成多核苷酸的方法。体外转录的(IVT)RNA可因结构上类似于天然RNA而被工程化以瞬时表达蛋白质。然而,这一药物类别存在固有挑战,特别是与控制IVT RNA的翻译功效和免疫原性相关的挑战。具体地讲,IVT RNA产生不想要的先天免疫效应,并且存在通过HPLC进行的非常严格的纯化程序,其通常作为另外的最终RNA产生步骤应用。除去少量的短双链RNA片段对于实现这种进一步降低的免疫应答至关重要。

[0116] 现有技术中使用的典型反应提供了高保真度的合理高收率的产物。然而,该产物具有基线水平的污染物,其中仅一些污染物可以使用常规纯化方法除去。IVT反应通常包括以下各项:RNA聚合酶,例如T7RNA聚合酶,最终浓度为例如1000-12000U/mL,例如7000U/mL;DNA模板,最终浓度为例如10-70nM,例如40nM;核苷酸(NTP),各自的最终浓度为例如0.5-10mM,例如7.5mM;镁,最终浓度为例如12-60mM,例如40mM的乙酸镁;缓冲液,例如像HEPES或Tris,pH为例如7-8.5,例如40mM Tris HCl,pH 8。在一些实施方案中,可包括5mM二硫苏糖醇(DTT)和/或1mM亚精胺。在一些实施方案中,RNA酶抑制剂被包括在IVT反应中,以确保在转录反应期间没有RNA酶诱导的降解。例如,可以1000U/mL的最终浓度使用鼠RNA酶抑制剂。在一些实施方案中,在IVT反应中包括焦磷酸酶以切割在每个核苷酸被掺入两个无机磷酸盐单元后生成的无机焦磷酸盐。这确保了镁保留在溶液中并且不作为焦磷酸镁沉淀。例如,可以以1U/mL的最终浓度使用大肠杆菌无机焦磷酸酶。

[0117] 典型的体外转录反应包括以下各项:

[0118]	1	模板 cDNA	1.0 µg
	2	10x 转录缓冲液(400 mM Tris-HCl pH 8.0, 190 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT 或 TCEP, 10 mM 亚精胺)	2.0 µL
	3	定制 NTP(各自 25 mM)	7.2 µL
	4	RNA 酶抑制剂	20 U
[0119]	5	T7 RNA 聚合酶	3000 U
	6	dH <sub>2</sub> O	最多至 20.0 µl, 以及
	7	在 37°C 下温育 1 h-5 h。	

[0120] 粗IVT混合物可在4°C下储存4-12小时。然后使用一个单位的不含RNA酶的DNA酶消化原始模板。在37°C下温育15分钟后,使用纯化技术诸如dT树脂、反相HPLC或Ambion的MEGACLEAR™试剂盒(Austin,TX)按照制造商的说明纯化RNA。示例性IVT反应在组分或所用组分的量方面不是限制性的。

[0121] 与传统方法类似,本发明的RNA也可通过形成包含DNA模板和一种或多种NTP(诸如ATP、CTP、UTP、GTP(或前述组分的对应类似物))以及缓冲液的反应混合物产生。然后在使RNA被转录的条件下温育反应。然而,本发明的方法涉及令人惊讶的发现,即过量的一种或多种核苷酸和/或核苷酸类似物的存在可以对最终产物造成显著影响。本发明的方法可用于产生缺乏非预期或不期望杂质且不影响反应效率的高质量产物。

[0122] 本发明的IVT方法涉及反应混合物中核苷酸和/或核苷酸类似物的量(例如,摩尔

量或数量)的更改。在一些方面,一种或多种核苷酸和/或一种或多种核苷酸类似物可以过量添加到反应混合物中。过量的核苷酸和/或核苷酸类似物是大于反应混合物中的一种或多种其他核苷酸诸如NTP的量的任何量。例如,过量的核苷酸和/或核苷酸类似物可以是比反应混合物中的每种或至少一种其他个别NTP的量更大的量或可指比其他NTP的等摩尔量更大的量。

[0123] 在实施方案中,当反应混合物中包括的核苷酸和/或核苷酸类似物为NTP时,NTP可以比反应混合物中包括的所有三种其他NTP更高的浓度存在。其他三种NTP可处于彼此等摩尔浓度。另选地,三种其他NTP中的一种或多种可处于与一种或多种其他NTP不同的浓度。

[0124] 在一些实施方案中,过量的选定NTP比反应混合物中的任何一种或多种其他个别NTP的量2倍或倍数(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大。在其他实施方案中,过量的选定NTP比反应混合物中的全部其他个别NTP的量2倍或倍数(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大。在示例性实施方案中,NTP相对于反应混合物中的其他NTP摩尔过量。例如,过量的NTP可以以与反应混合物中的一种或多种其他NTP的例如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1或更大的摩尔比添加。在其他实施方案中,过量的选定NTP的浓度比反应混合物中的任何一种或多种其他个别NTP的量0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、3.0mM、3.54.0mM、4.5mM、5.0mM、5.5mM、6.0mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、100mM、120mM、150mM或甚至更大,或在60-100mM或4.5-100mM的范围内。在其他实施方案中,过量的选定NTP的浓度比反应混合物中全部其他NTP中的任何一种或多种的量0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、3.0mM、3.54.0mM、4.5mM、5.0mM、5.5mM、6.0mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、100mM、120mM、150mM或甚至更大。

[0125] 在一些情况下,反应混合物中过量的NTP为NTP-1并且反应混合物中的其他NTP为NTP-2、NTP-3和NTP-4。在一些实施方案中,NTP-1以比NTP-2、NTP-3和NTP-4更大的浓度存在于反应混合物中并且其中NTP-2、NTP-3和NTP-4各自处于等摩尔量。在一些实施方案中,NTP-1:NTP-2:NTP-3:NTP-4的比率为至少2:1:1:1、至少3:1:1:1、至少4:1:1:1、至少5:1:1:1、至少6:1:1:1、至少7:1:1:1、至少8:1:1:1、至少9:1:1:1、至少10:1:1:1、至少11:1:1:1、至少12:1:1:1、至少13:1:1:1、至少14:1:1:1、至少15:1:1:1、至少16:1:1:1、至少17:1:1:1、至少18:1:1:1、至少19:1:1:1,各自具有作为20的NTP-1的潜在上限。在一些实施方案中,NTP-1:NTP-2+NTP-3+NTP-4的比率为至少3:3、至少5:3、至少6:3、至少7:3、至少8:3、至少9:3、至少10:3或至少15:3,各自具有20:3的潜在上限。

[0126] 在其他实施方案中,NTP-1以比NTP-2、NTP-3和NTP-4更大的浓度存在于反应混合物中并且NTP-2和NTP-3各自处于等摩尔量并且NTP-4以高于NTP-2和NTP-3且低于NTP-1的浓度存在于反应混合物中。例如,在一些实施方案中,NTP-1:NTP-4:NTP-2:NTP-3的比率为至少3:2:1:1、至少4:3:1:1、至少4:2:1:1、至少5:3:1:1、至少5:3:2:2、至少6:4:2:2、至少8:4:2:2、至少9:2:1:1、至少10:2:1:1、至少11:2:1:1、至少12:2:1:1、至少13:2:1:1、至少14:2:1:1、至少15:2:1:1、至少16:2:1:1、至少17:2:1:1、至少18:2:1:1、至少19:2:1:1,各自具有作为20的NTP-1的潜在上限。

[0127] 在其他实施方案中,NTP-1以比NTP-2、NTP-3和NTP-4更大的浓度存在于反应混合

物中并且NTP-2和NTP-3各自处于等摩尔量并且NTP-4以少于NTP-1、NTP-2和NTP-3的浓度存在于反应混合物中。例如,在一些实施方案中,NTP-1:NTP-3:NTP-2:NTP-4的比率为至少3:2:2:1、至少4:3:3:1、至少4:2:2:1、至少5:3:3:1、至少5:3:3:2、至少6:4:4:2、至少8:4:4:2、至少9:2:2:1、至少10:2:2:1、至少11:2:2:1、至少12:2:2:1、至少13:2:2:1、至少14:2:2:1、至少15:2:2:1、至少16:2:2:1、至少17:2:2:1、至少18:2:2:1、至少19:2:2:1,各自具有作为20的NTP-1的潜在上限。

[0128] 在一些实施方案中,NTP-1为GTP、ATP、UTP或CTP。在一些实施方案中,NTP-2为GTP、ATP、UTP或CTP。在一些实施方案中,NTP-3为GTP、ATP、UTP或CTP。在一些实施方案中,NTP-4为GTP、ATP、UTP或CTP。

[0129] 在一些实施方案中,NTP为GTP并且其以相对于ATP、CTP或UTP中的任一种的浓度至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1、至少8:1、至少9:1、至少10:1、至少11:1、至少12:1、至少13:1、至少14:1、或至少15:1的比率存在于混合物中。GTP与其他NTP的比率可为约2:1至约3:1、约2.5:1至约3.5:1、约3:1至约4:1、约3.5:1至约4.5:1、约4:1至约5:1、约4.5:1至约5.5:1、约5:1至约6:1、约5.5:1至约6.5:1、约6:1至7:1、约6.5:1至约7.5:1、约7:1至约8:1、约7.5:1至约8.5:1、约8:1至约9:1、约8.5:1至约9.5:1、以及约9:1至约10:1。在一个实施方案中,GTP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率可分别为2:1、4:1和4:1。在另一个实施方案中,GTP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率可分别为3:1、6:1和6:1。

[0130] 在实施方案中,当反应混合物中包括的核苷酸和/或核苷酸类似物为NDP或核苷酸类似物时,NDP或核苷酸类似物可以比反应混合物中包括的所有四种NTP更高的浓度存在。四种NTP可处于彼此等摩尔浓度。另选地,四种NTP中的一种或多种可处于与一种或多种其他NTP不同的浓度。

[0131] 在其他实施方案中,过量的选定NDP或核苷酸类似物比反应混合物中的任何一种或多种个别NTP的量2倍或倍数(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大。在其他实施方案中,过量的选定NDP或核苷酸类似物比反应混合物中的全部个别NTP的量2倍或倍数(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大。在示例性实施方案中,NDP或核苷酸类似物相对于反应混合物中的其他NTP处于摩尔过量。例如,过量的NDP或核苷酸类似物可以以与反应混合物中的一种或多种NTP的例如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1或更大的摩尔比添加。在其他实施方案中,过量的选定NDP或核苷酸类似物的浓度比反应混合物中的任何一种或多种个别NTP的量0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、3.0mM、3.54.0mM、4.5mM、5.0mM、5.5mM、6.0mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、100mM、120mM、150mM或甚至更大,或在60-100mM或4.5-100mM的范围内。在其他实施方案中,过量的选定NDP或核苷酸类似物的浓度比反应混合物中全部NTP中的任何一种或多种的量0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、3.0mM、3.54.0mM、4.5mM、5.0mM、5.5mM、6.0mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、100mM、120mM、150mM或甚至更大。

[0132] 在一些情况下,反应混合物中的NTP为NTP-1、NTP-2、NTP-3和NTP-4。在一些实施方案中,NDP或核苷酸类似物以比NTP-1、NTP-2、NTP-3和NTP-4更大的浓度存在于反应混合物中并且其中NTP-1、NTP-2、NTP-3和NTP-4各自处于等摩尔量。在一些实施方案中,NDP或核苷

酸类似物:NTP-1+NTP-2:NTP-3+NTP-4的比率为至少4:4、至少5:4、至少6:4、至少7:4、至少8:4、至少9:4、至少10:4或至少15:4,各自具有20:4的潜在上限。

[0133] 在一些实施方案中,过量的NDP或核苷酸类似物与相等或更大浓度的四种NTP中的一种组合。

[0134] 在其他实施方案中,NDP或核苷酸类似物以比NTP-1、NTP-2、NTP-3和NTP-4更大的浓度存在于反应混合物中并且NTP-1、NTP-2和NTP-3各自处于等摩尔量并且NTP-4以小于或大于NTP-1、NTP-2和NTP-3的浓度存在于反应混合物中。例如,在一些实施方案中,NDP或核苷酸类似物:NTP-1:NTP-3:NTP-2:NTP-4的比率为至少3:2:2:2:1、至少4:3:3:3:1、至少4:2:2:2:1、至少5:3:3:3:1、至少5:3:3:3:2、至少6:4:4:4:2、至少8:4:4:4:2、至少9:2:2:2:1、至少10:2:2:2:1、至少11:2:2:2:1、至少12:2:2:2:1、至少13:2:2:2:1、至少14:2:2:2:1、至少15:2:2:2:1、至少16:2:2:2:1、至少17:2:2:2:1、至少18:2:2:2:1、至少19:2:2:2:1,各自具有作为20的NDP或核苷酸类似物的潜在上限。

[0135] 在其他实施方案中,NDP或核苷酸类似物以比NTP-1、NTP-2、NTP-3和NTP-4更大的浓度存在于反应混合物中并且NTP-2和NTP-3各自处于等摩尔量并且NTP-1和/或NTP-4以小于或大于NTP-2和NTP-3的浓度存在于反应混合物中。在其他实施方案中,NDP或核苷酸类似物以比NTP-1、NTP-2、NTP-3和NTP-4更大的浓度存在于反应混合物中并且NTP-1、NTP-2、NTP-3和NTP-4各自以彼此不同的量存在。

[0136] 在一些实施方案中,反应混合物中的过量核苷酸或核苷酸类似物的上限由溶解度极限决定。

[0137] 在一些实施方案中,NTP是盐NTP。例如,NTP可以是铵NTP、tris NTP、锂NTP、钾NTP或钠NTP。

[0138] 在本发明的一个实施方案中,IVT方法可包括向反应混合物中添加NTP和NDP的组合。组合的NTP和NDP可以过量添加到反应混合物中。过量的NTP和NDP的组合是大于反应混合物中的至少一种其他NTP或所有其他NTP中的一种或多种的量的任何量。例如,过量的NTP和NDP可以是作为比反应混合物中至少一种其他NTP的量更大的量的组合量。

[0139] 因此,在一些实施方案中,IVT反应可包括相对于至少一种其他核苷酸三磷酸等摩尔量的核苷酸三磷酸或当与对应的核苷酸二磷酸组合使用时少于过量的核苷酸三磷酸,只要该核苷酸的总量在反应中过量存在即可。对应的核苷酸二磷酸是指具有与核苷酸三磷酸相同碱基的核苷酸二磷酸。例如,核苷酸三磷酸可以是GTP并且核苷酸二磷酸可以是GDP。

[0140] 在一些实施方案中,组合的NTP和NDP是等摩尔的。在另一个实施方案中,NTP的量大于添加到反应混合物中的组合中的NDP的量。NDP的量可大于添加到反应混合物中的组合中的NTP的量。在一些实施方案中,过量的NTP和NDP组合混合物比反应混合物中其他个别NTP的量2倍或倍数(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大。在每个实施方案中,其他个别NTP可以相同(等摩尔)或不同的量存在于反应混合物中。本文所述的倍数差异是指与反应混合物中的至少一种、至少两种或所有三种其他NTP的比较。

[0141] 在其他实施方案中,NTP比反应混合物中NDP的量2倍或倍数(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大。在其他实施方案中,NDP比反应混合物中NTP的量2倍或倍数(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、

10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大。

[0142] 在本文所述的每个实施方案中，NTP和NDP可以分别是例如GTP和GDP，并且可以比反应混合物中ATP、CTP或UTP中的任一种的量至少6倍或倍数(x)、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x-100x、10x-90x、10x-80x、10x-70x或甚至更大的浓度存在于混合物中。在示例性实施方案中，组合的NTP和NDP相对于反应混合物中的其他个别NTP是摩尔过量的。例如，NTP和NDP组合混合物可以例如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1或更大的摩尔比添加在反应混合物中。GTP和GDP与其他NTP的比率可为约2:1至约3:1、约2.5:1至约3.5:1、约3:1至约4:1、约3.5:1至约4.5:1、约4:1至约5:1、约4.5:1至约5.5:1、以及约5:1至约6:1。在一个实施方案中，GTP的浓度与ATP、CTP和UTP的浓度的比率可分别为3:1、6:1和6:1。

[0143] 在其他实施方案中NTP与NDP的比率以及在一些实施方案中GTP与GDP的比率被认为是相对于反应混合物中嘌呤核苷酸与嘧啶核苷酸的比率(Pu:Py)。在一些实施方案中，反应混合物中GTP:GDP与Pu:Py的比率为2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1或更大。

[0144] 在一些实施方案中，缓冲液含有磷酸盐。磷酸盐的有效浓度为至少150mM、至少160mM、至少170mM、至少180mM、至少190mM、至少200mM、至少210mM、至少220mM、或至少230mM磷酸盐。在一个实施方案中，磷酸盐的有效浓度为180mM。在另一个实施方案中，磷酸盐的有效浓度为195mM。

[0145] 在另一个实施方案中，缓冲液含有镁。缓冲液可具有至少1.0、至少1.1、至少1.2、至少1.25、至少1.3、至少1.4、至少1.5、至少1.6、至少1.7、至少1.75、至少1.8、以及至少1.85或3的ATP加CTP加UTP加GTP以及任选地GDP的浓度与 $Mg^{2+}$ 的摩尔浓度的比率。在其他实施方案中，所述比率为1.0、1.1、1.2、1.25、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.75、1.8、1.85、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、或3或这些变量的任何范围。在一个实施方案中，所述比率为1.5。在另一个实施方案中，所述比率为1.88。在一个实施方案中，所述比率为3。

[0146] 在本发明的示例性方面，IVT反应(反应混合物)包括RNA聚合酶，例如T7、SP6、T3等。在一些实施方案中，聚合酶(例如T7聚合酶)以大于5U/ $\mu$ l、大于10U/ $\mu$ l、大于20U/ $\mu$ l、大于50U/ $\mu$ l、或大于100U/ $\mu$ l的浓度被包括在内。在一些实施方案中，聚合酶(例如T7聚合酶)浓度为约1至约250U/ $\mu$ l的反应混合物的范围，例如，约1至约100U/ $\mu$ l或约100至约250U/ $\mu$ l。在一些实施方案中，T7聚合酶浓度为约30至约60U/ $\mu$ l、约60至约80U/ $\mu$ l、约80至约100U/ $\mu$ l、约100至约150U/ $\mu$ l或约150至约200U/ $\mu$ l的范围。在一些实施方案中，聚合酶(例如T7聚合酶)以7、14、25、50、75、或140的浓度被包括在内。

[0147] 如本文所用，DNA模板是指用于RNA聚合酶的多核苷酸模板。根据本文所述方法有用的DNA模板在一些实施方案中包括编码例如目标多肽的目标基因。在一些实施方案中，DNA模板包括RNA聚合酶启动子，例如位于目标基因5'且与其可操作地连接的T7启动子，以及任选地位于目标基因3'的编码聚A尾的序列。

[0148] 本领域已知的RNA聚合酶可用于本发明的方法。RNA聚合酶包括但不限于噬菌体RNA聚合酶，例如T7RNA聚合酶、T3RNA聚合酶、SP6RNA聚合酶，和/或突变体聚合酶，诸如但不限于能够掺入经修饰核酸的聚合酶。作为非限制性实例，RNA聚合酶可经过修饰，以表现出与未修饰的RNA聚合酶相比掺入2'-修饰的核苷酸三磷酸的能力增加。



[0149] 如本文所用,“目标基因”是指编码目标多肽或蛋白质的多核苷酸。根据上下文,目标基因是指脱氧核糖核酸,例如,DNA模板中的目标基因,其可以转录成RNA转录物;或核糖核酸,例如RNA转录物中的目标基因,其可以在体外、体内、原位或离体翻译以产生编码的目标多肽。目标多肽包括但不限于生物制剂、抗体、疫苗、治疗性蛋白质或肽等。

[0150] “RNA转录物”是指使用DNA模板和RNA聚合酶通过IVT反应产生的核糖核酸。在一些实施方案中,RNA转录物是mRNA并且通常包括目标基因和聚A尾的编码序列。RNA转录物包括mRNA。RNA转录物可以包括修饰,例如修饰的核苷酸。如本文所用,术语RNA转录物包括mRNA、修饰的mRNA“mmRNA”或修饰的mRNA、以及初级构建体,并且可与其互换。

[0151] 纯度

[0152] 根据本发明的方法产生的RNA具有令人惊讶的纯度且具有高完整性。它比根据传统IVT方法产生的RNA制剂具有更少的污染物。在一些实施方案中,它具有比根据传统IVT方法产生的RNA制剂更少的免疫刺激性污染物。污染物是由反应产生的不是期望RNA的RNA片段。在一些实施方案中,RNA片段污染物是反向互补转录产物和/或细胞因子诱导性RNA污染物。在其他实施方案中,RNA片段污染物是双链RNA或免疫原性污染物。

[0153] 在一些实施方案中,本发明的RNA制剂具有比根据传统IVT方法产生的RNA制剂更少的污染物。在一些实施方案中,本发明的RNA制剂具有比根据传统IVT方法产生的RNA制剂少至少10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的污染物。在其他实施方案中,本发明的RNA制剂基本上不含污染物。在其他实施方案中,本发明的RNA制剂100%不含污染物。

[0154] 因此,在一些方面,本发明涉及基本上不含反向互补转录产物的IVT RNA的制备,且无需进一步的纯化步骤。如本文所用,术语“反向互补转录产物”是指由RNA模板化转录产生的RNA分子。在一些实施方案中,反向互补转录产物可以是RNA模板化的转录产物。不受理论的束缚,据信反向互补产物主要是或全部是RNA模板化的转录产物。如果反向互补产物由DNA模板化的转录产物构成,那么产物将包括,例如,与来自DNA模板的T7启动子区互补的核苷酸序列。迄今为止表征的反向互补产物主要不含与例如T7启动子区互补的序列。在一些实施方案中,反向互补转录产物是双链RNA(dsRNA),其可包括编码作为IVT RNA的至少一部分的反向互补序列的序列的一条链。在其他实施方案中,反向互补转录产物可以是一条链包含聚U序列的dsRNA。编码目标多肽的反向互补链或编码聚U序列的链可以5'三磷酸根(5' ppp)起始。RNA模板转录产物可包括IVT RNA的5'端的反向互补序列和/或IVT RNA的3'端的反向互补序列。此外,IVT RNA的5'端的反向互补序列可与IVT RNA的5' UTR的全部或一部分互补。反向互补序列可包含与5' UTR的前10-15、前5-15、前5-20、前10-20、前15-25个核苷酸互补的序列。同样地,IVT RNA的3'端的反向互补序列可与IVT RNA的聚A尾的全部或一部分互补。反向互补转录产物可以从RNA上的任何位置为模板并且因此可以是任何大小或与模板上的任何位置互补。例如,反向互补产物可以是5聚体10聚体15聚体20聚体25聚体40聚体50聚体60聚体70聚体、100聚体、200聚体等,一直到预期或期望产物的全长。

[0155] 本发明的特征在于基本上不含反向互补转录产物的包含IVT RNA和药学上可接受的赋形剂的组合物。在一些实施方案中,在基本上不含反向互补转录产物的IVT RNA中包括构成总RNA质量的少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、

1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、或0.55%、0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.0.25%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、或0.001%的反向互补转录产物。RNA组合物的质量可通过本领域已知的任何手段确定。用于确定RNA质量的方法的实例包括液相色谱和质谱。

[0156] 不受理论的束缚,据信在本发明的一些实施方案中,污染物是在较长RNA的背景中与IVT RNA群结合从而形成双链结构的单链反向互补序列。T7可以无效(有义链)新生RNA以及全长产物新生RNA为模板。RNA模板化的转录物(反义)一旦转录(主要以pppC、pppU和pppA起始),可能与新生的有义RNA保持缔合。另选地,如果的确形成这样的构造,那么它们可以是固有沉默的。2条链的有效缔合是具有5' ppp的dsRNA。5' ppp在一条或多条杂交链上的存在使得结构具有免疫刺激性。即使当反义RNA模板化的转录物与RNA解离时,具有pppC、pppU和pppA的ssRNA的存在仍然是细胞因子诱导性的。由于本发明的方法产生如在J2ELISA和RNA酶III处理中所看到的缺乏dsRNA的RNA,因此产物将不呈现出大的全长RNA的结构。如果用等摩尔或本发明的IVT方法转录,那么RNA可能类似地折叠。

[0157] 在一些实施方案中,本发明的RNA制剂基本上不含细胞因子诱导性RNA污染物。如本文所用,术语“细胞因子诱导性污染物”是指诱导细胞因子生成(例如I型干扰素(IFN $\alpha$ / $\beta$ 诱导))的RNA分子,例如,如在基于细胞的细胞因子诱导测定中所确定的,例如,如在如本说明书的工作实施例中所描述的BJ成纤维细胞/IFN $\beta$ 测定和/或Luminex测定中所确定的。在本发明的示例性方面,术语“细胞因子诱导性”污染物是指诱导细胞因子诱导并且在自然界中基本上是双链的RNA分子。

[0158] 不受理论的束缚,据信由异常聚合酶转录(例如以在IVT反应中产生的期望RNA为模板的转录)产生的双链RNA分子通过激活类似于天然抗病毒免疫应答的先天免疫应答而诱导细胞因子并且包括两种类型的病原体识别受体(PRR):Toll样受体(TLR)和RIG-I样受体(RLR),例如Toll样受体3(TLR3),以及RNA解旋酶,例如RIG-I和MDA5。其他细胞因子诱导性分子的实例包括RNA酶III底物。如本文所用,RNA酶III底物是指易被RNA酶III酶切割的双链RNA分子。

[0159] 在一些实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物可以是具有与IVT RNA或聚U序列互补的反向序列的双链RNA。IVT RNA或聚U序列的反向互补序列可以5' ppp起始。

[0160] 细胞因子诱导性RNA污染物可包括IVT RNA的5'端的反向互补序列和/或IVT RNA的3'端的反向互补序列。此外,IVT RNA的5'端的反向互补序列可与IVT RNA的5' UTR的全部或一部分互补。反向互补序列可包含与5' UTR的前10-15、前5-15、前5-20、前10-20、前15-25个核苷酸互补的序列。在一些实施方案中,反向互补序列可包含与5' UTR内的长度为1-20、1-30、1-40、1-50、1-60、1-70、1-80、1-90、1-100、1-200、1-300、1-400、1-500、1-600、1-700、1-800、1-900、1-1000、1-2000、1-2500、或1-3000个核苷酸的范围互补的序列。在其他实施方案中,反向互补序列可包含与5' UTR内的长度为10-20、10-30、10-40、10-50、1-60、10-70、10-80、10-90、10-100、10-200、10-300、10-400、10-500、10-600、10-700、10-800、10-900、10-1000、10-2000、10-2500、或10-3000个核苷酸的范围互补的序列。在其他实施方案中,反向互补序列可包含与5' UTR内的长度为20-25、20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90、20-100、20-200、20-300、20-400、20-500、20-600、20-700、20-800、20-900、20-1000、20-2000、20-2500、或20-3000个核苷酸的范围互补的序列。同样地,IVT RNA的3'端的反向

互补序列可以与IVT RNA的聚A尾的全部或部分互补。反向互补序列可包含与3' UTR的前10-15、前5-15、前5-20、前10-20、前15-25个核苷酸互补的序列。在一些实施方案中,反向互补序列可包含与3' UTR内的长度为1-20、1-30、1-40、1-50、1-60、1-70、1-80、1-90、1-100、1-200、1-300、1-400、1-500、1-600、1-700、1-800、1-900、1-1000、1-2000、1-2500、1-3000个核苷酸、或1-RNA的全长或最大大小的范围互补的序列。在其他实施方案中,反向互补序列可包含与3' UTR内的长度为10-20、10-30、10-40、10-50、1-60、10-70、10-80、10-90、10-100、10-200、10-300、10-400、10-500、10-600、10-700、10-800、10-900、10-1000、10-2000、10-2500、或10-3000个核苷酸的范围互补的序列。在其他实施方案中,反向互补序列可包含与3' UTR内的长度为20-25、20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90、20-100、20-200、20-300、20-400、20-500、20-600、20-700、20-800、20-900、20-1000、20-2000、20-2500、或20-3000个核苷酸的范围互补的序列。

[0161] 本公开包括一种基本上不含细胞因子诱导性RNA污染物的包含IVT RNA和药学上可接受的赋形剂的组合物。在一些实施方案中,细胞因子诱导性RNA污染物构成RNA质量的少于0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.25%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、或0.001%。RNA组合物的质量可通过本领域已知的任何手段确定。实例包括液相色谱和质谱。

[0162] 污染物的dsRNA诸如细胞因子诱导性RNA污染物和/或反向互补转录产物可为20至50个核苷酸的长度。在其他实施方案中,dsRNA可为20-25、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50、50-55、55-60、60-65、65-70、70-75、75-80、80-85、85-90、90-95、95-100、100-110、110-120、120-130、130-140、140-150、150-160、160-170、170-180、180-190、190-200、200-225、225-250、250-275、275-300、300-325、325-350、350-375、375-400、400-425、425-450、450-475、475-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、以及950-1000个核苷酸的长度。在一些实施方案中,dsRNA的质量大于40个碱基对并且构成RNA组合物的少于约0.5%。

[0163] 污染物链可具有5' ppp端。在一些实施方案中,与等摩尔方法产生的RNA相比,污染物链可具有较低丰度的pppA、pppC和pppU。在另一个实施方案中,与等摩尔方法相比,污染物链可具有较低的pppA:pppG、pppC:pppG和/或pppU:pppG比率。pppNTP可在总核酸酶消化(例如核酸酶P1处理)后通过LC-MS检测。核酸酶P1将RNA和DNA消化成单核苷酸。应存在的唯一三磷酸物类用于起始核苷酸。如果没有形成RNA模板化的转录产物,那么5' PPPG是唯一应该存在的三磷酸,因为这是唯一的靶向起始位点。在核酸酶P1消化后通过LC/MS检测到的5' pppA、5' pppC和/或5' pppU的存在和丰度指示RNA模板化的RNA转录物。

[0164] 除了具有较少杂质,特别是双链杂质之外,相对于组合物中的其他RNA物类,特别是在与使用IVT方法结合纯化步骤(诸如反相色谱或RNA酶III处理)产生的传统的纯化RNA组合物相比时,IVT RNA组合物具有高比例的全长功能性RNA转录物。在一些实施方案中,RNA质量的大于约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.8%包含单链全长转录物。除了单链全长转录物之外,IVT RNA组合物可包括其他单链RNA物类,诸如处于有义方向的单链部分RNA转录物,包括无效转录物。然而,IVT RNA组合物基本上不含RNA酶III不敏感片段。

[0165] 本文所述的RNA组合物可包括除全长RNA转录物之外的其他组分,例如截短转录物

和/或连缀转录物(run-on transcript)。例如, RNA可包括不同长度的转录物, 例如, 比全长转录物更短或更长。因此, 在一些实施方案中, 本发明的RNA制剂包括截短和/或无效的转录物。RNA聚合酶与DNA启动子结合并合成短mRNA转录物。如本文所用, 术语“截短转录物”是指与IVT RNA具有同一性但长度不足且缺乏用以编码目标多肽的所有必需元件的转录物(例如聚A)。在某些情况下, 截短转录物在转录复合物离开启动子之前释放, 称为无效转录物。如本文所用, 术语“无效转录物”是指与IVT RNA具有同一性但长度不足且缺乏用以编码目标多肽的所有必需元件的转录物(例如聚A), 其通常具有15个核苷酸或更少的长度。在本发明的示例性方面, 截短和/或无效转录物存在且不是细胞因子诱导性的。在一个实施方案中, 从样品中除去截短和/或无效转录物。在一些实施方案中, 截短转录物具有100个核苷酸或更少的长度。

[0166] 还已经确定本发明的方法产生具有减小的3' 异质性或3' 端异质性(在本文也称为增加的3' 同质性或3' 端同质性)的组合物。本发明人确定, 传统的等摩尔IVT反应条件可以产生终止于不同3' 残基的转录物(例如, 转录不一致地终止)。开发了工作实施例中展示的测定以检测由传统IVT反应导致的3' 端异质性(所述测定在存在于特定测试转录物的3' 端的非A核碱基之间进行区分)。值得注意的是, 本发明的方法产生具有较低程度的3' 端异质性(或更同质的3' 端)的转录物。例如, 根据传统IVT反应(例如, 等摩尔反应)产生的转录物可以产生其中大于50%的转录物(任选地大于60%、大于70%、大于75%、大于80%或更多)具有不同末端的组合物, 而根据本发明的IVT反应(例如,  $\alpha$ 反应)产生的转录物可以产生其中少于50%(任选地少于40%、少于30%、少于25%、少于20%或更少)的转录物具有不同末端, 即大于50%的转录物具有相同末端, 即终止于相同核碱基(例如, 相对于DNA模板)的组合物。

[0167] 单链部分RNA转录物群内的截短转录物可包括一定范围的大小。例如, 在一些实施方案中, 至少80%的截短转录物群具有100个核苷酸或更少的长度。在其他实施方案中, 至少50%、60%、70%、85%、90%、95%、98%或100%的截短转录物群具有100个核苷酸或更少的长度。

[0168] 本文所述的IVT RNA组合物内的单链RNA群通常不含或基本上不含RNA酶III不敏感片段。如本文所用的“RNA酶III不敏感片段”是指单链转录物, 所述单链转录物与IVT RNA(有义方向)具有同一性, 但长度不足且缺乏用以编码目标多肽的所有必需元件(具有比全长转录物更少的核苷酸), 并且其中所述片段通过酶促(特别是RNA酶III)切割产生。RNA酶III不敏感片段可以例如在与RNA酶III消化相结合的传统IVT方法中产生(如图40所描绘)。

[0169] 如图40所示, 传统IVT/RNA酶III纯化方法的第一步包括在 $Mg^{2+}$ 存在下利用线性dsDNA模板、等摩尔浓度的NTP和RNA聚合酶的转录反应。该反应产生单链截短/无效转录物、全长RNA转录物、连缀转录物以及反向互补序列杂质的混合群。反向互补序列杂质可以结合一些单链RNA或其他杂质, 例如截短转录物, 从而产生双链RNA和/或具有双链和单链区两者的RNA。本领域已经推测RNA酶III可用于降解来自IVT组合物的双链RNA, 从而有效地将其从组合物中除去。然而, RNA酶III还可以降解全长RNA转录物和/或连缀转录物的双链区(例如, 由聚A尾区内的反向互补序列结合产生的双链区), 从而留下长度小于全长RNA转录物的单链片段。这些单链片段是本文描述的RNA酶III不敏感片段。由于这种RNA酶降解, 在IVT过程中生成的显著量的全长转录物损失, 从而导致产物完整性的显著损失。当递送至细胞或

受试者时,这些组合物具有显著较低的蛋白质表达能力。

[0170] 在根据诸如图40所描绘的那些的方法生成的产物的RNA酶III处理之后生成的RNA酶III不敏感片段可包括一定范围的大小。例如,在一些实施方案中,至少80%的无效转录物群具有大于100个核苷酸的长度。在其他实施方案中,RNA酶III不敏感片段群的至少50%、60%、70%、85%、90%、95%、98%或100%具有大于100个核苷酸的长度。

[0171] 不受理论的束缚,据信在用于治疗用途的IVT RNA组合物的制备中,某些物类或污染物(例如,dsRNA物类或污染物)的除去是重要的。相反,IVT RNA组合物中存在残余的截短和/或无效转录物不被认为是必要的;此类物类不被认为诱导不想要的细胞因子和/或对IVT RNA的先天免疫应答。在其他实施方案中,本发明的RNA制剂基本上不含截短或无效转录物。

[0172] 尽管截短/无效转录物可存在于本发明的IVT RNA组合物中,但是RNA酶III不敏感片段不存在于IVT RNA组合物中,因为组合物未用RNA酶III处理。虽然截短转录物和RNA酶III不敏感片段都具有一定范围的大小或长度,但截短转录物的平均长度小于RNA酶III不敏感片段的平均长度。因此,当组合物包含处于有义方向的单链部分RNA转录物群时,大于80%的处于有义方向的单链部分RNA转录物群具有100个核苷酸或更少的核苷酸长度。在一些实施方案中,大于90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的处于有义方向的单链部分RNA转录物群具有100个核苷酸或更少的核苷酸长度。在其他实施方案中,大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%或88%的处于有义方向的单链部分RNA转录物群具有100个核苷酸或更少的核苷酸长度。

[0173] 在一些实施方案中,RNA制剂是具有药学上可接受的载体的药物组合物。在其他实施方案中,RNA制剂是尚未经受进一步的纯化技术的反应产物(例如,IVT反应产物)。除RNA之外,RNA制剂可包括多种其他组分。然而,反应产物基本上不含反向互补转录产物和/或细胞因子诱导性RNA污染物。

#### [0174] 测定

[0175] 包括反向互补转录产物和/或细胞因子诱导性RNA污染物的污染物的量可通过本领域已知的方法确定。用于确定核酸样品纯度的许多方法是本领域已知的。示例性方法包括但不限于以下各项:高效液相色谱(诸如反相色谱、尺寸排阻色谱)、凝胶电泳以及用以评估核酸产生的质量和纯度的翻译测定。RNA制剂质量也可以使用Bioanalyzer芯片-基的电泳系统来确定。可以通过例如将RNA转录物转染到人细胞系中来分析体外功效,所述细胞系例如,HeLA、PBMC、BJ成纤维细胞、Hek 293)。可以使用诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹或流式细胞术的方法对目标多肽的蛋白质表达进行定量。

[0176] 多种方法已用于使用dsRNA特异性抗体对dsRNA进行检测和/或定量。这些包括ELISA,例如夹心ELISA(Sch6nborn等人(1991)Nucleic Acids Res 19:2993-3000)、斑点印迹(用于定量、特异性测试)(Kariko等人(2011)Nucleic Acids Res 39:e142)以及免疫沉淀/免疫印迹。在本发明的示例性方面,可使用ELISA识别污染物。可使用K1/J2或K2/J2测定来确定样品中dsRNA污染物的丰度。示例性ELISA是如下的夹心ELISA。封闭:用蛋白质,例如0.4μg/孔蛋白A预涂微量滴定板,在4℃下过夜。自由结合位点用在缓冲液(例如PBS)中的牛血清白蛋白(BSA)(例如,2%)饱和,然后将板用缓冲液(例如PBS)洗涤并储存于4℃。通过杂交瘤上清液(例如每孔100μl,4℃过夜)的温育将dsRNA特异性J2单克隆抗体(IgG2a)固定到

蛋白A层上。将板用缓冲液(例如,PBS加Tween 20(例如,0.5% (v/v) Tween 20)洗涤多次并将核酸样品添加于缓冲液(例如,TE缓冲液,37℃,2h)中。如上洗涤后,通过顺序与dsRNA特异性K2 IgM单克隆抗体的稀释的杂交瘤上清液(例如,1:2)以及接着的碱性磷酸酶缀合的二抗(例如,1:5000稀释的山羊抗小鼠IgM)一起温育来鉴定结合的核酸(即,J2抗原)。两个温育步骤均在37℃下进行~1-2h。根据本领域公认的方法进行洗涤、底物温育和吸光度读取。

[0177] 使用斑点印迹的类似测定由Kariko等人,Nuc.Acids Res.2011;39(21):e142描述。通过将RNA(200ng)印迹到超荷电(super-charged)的Nytran膜上进行测定,其中将其干燥并用TBS-T缓冲液(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,0.05%Tween-20,pH 7.4)中的5%脱脂奶粉封闭。然后将样品与dsRNA特异性K1或J2单克隆抗体(IgG)一起温育1小时。膜可用TBS-T洗涤并与例如HRP缀合的抗山羊多克隆抗体一起温育。将膜再次洗涤,并使用TMB检测信号。通过添加TMB使信号显影。该测定可用于检测长度大于40个碱基对的dsRNA双链体。

[0178] 细胞因子测定也可用于检测RNA污染物。许多细胞因子测定是本领域已知的。所述测定可测试与不纯的IVT产物相关联的任何细胞因子的诱导。这些细胞因子包括例如,白细胞介素(IL)、干扰素(IFN) $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ ,以及TNF。在一个实施方案中,可使用IFN- $\beta$ 基于细胞的测定。已经显示其结果与如通过LC-MS检测到的RNA酶III底物的存在相关。可使用其他基于细胞的细胞因子测定,例如像IL或多重细胞因子测定。

[0179] 在示例性BJF IFN- $\beta$ 和hEPO表达测定中,将BJ成纤维细胞(ATCC)接种在细胞培养板中。接种后大约24小时,使用脂转染胺(lipofectamine)或其他递送剂用mRNA转染细胞。转染后,收集上清液并使用人IFN- $\beta$  ELISA试剂盒高灵敏度(High Sensitivity)根据制造商的说明(PBL Assay Science)测量IFN- $\beta$ 表达。简而言之,通过间接酶联免疫吸附测定(ELISA)在细胞上清液中测量人IFN- $\beta$ 。将预涂板与细胞上清液一起温育,然后洗涤以除去非特异性结合的材料。通过将孔与抗IFN- $\beta$ 抗体、以及接着的与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗一起温育来分析IFN- $\beta$ 表达。四甲基联苯胺(TMB)是用于检测的HR底物。使用Epo Human ELISA试剂盒(Thermo Fisher)测量人Epo水平。

[0180] 在示例性Luminex测定中,收集来自小鼠的血清以使用Luminex筛选测定技术(R&D Systems)评估细胞因子水平。简而言之,将分析物特异性抗体预涂在颜色编码的珠子上。将珠子、标准品和样品移取到孔中并且固定的抗体结合目标分析物。洗去任何未结合的物质后,向每个孔中添加对于目标分析物特异性的生物素化的抗体混合物。洗涤除去任何未结合的生物素化抗体后,向每个孔中添加与生物素化的检测抗体结合的链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白缀合物(链霉抗生物素蛋白-PE)。最后的洗涤除去未结合的链霉抗生物素蛋白-PE,并将珠子重悬于缓冲液中并使用Luminex分析仪(R&D Systems)读取。第一激光是珠子特异性的并且确定正在检测哪种分析物。第二激光确定PE衍生信号的幅值,其与所结合的分析物的量成正比。

#### [0181] 纯度的替代测定

[0182] 在本发明的示例性方面,可能期望通过使用适于产物和/或杂质的高度定性和/或定量检测的替代测定来确定纯度。因此,本发明设想了通过确定通过相同条件产生的替代RNA(例如,模型RNA)的纯度来确定通过某种IVT方法产生的RNA组合物(例如,IVT RNA)的纯度。以此方式,可以通过替代系统中的高度定性和/或定量检测方法间接地确定纯度,这种

纯度确定与生产系统中产生的IVT RNA的纯度相关。此外,可以使用重构或替代类型的测定来间接确定给定RNA制剂中污染物的量和身份。在一些情况下,可能难以检测低水平的污染物或具有与RNA转录物相似结构特性的污染物。重构系统可用于测试生物活性,诸如免疫刺激活性,例如与污染物相关联的细胞因子活性,其通过重新添加本发明的RNA制剂中缺少的推测污染物,与通过传统IVT方法产生的RNA组合物的生物活性相比较来实现。重构具有推测污染物的本发明的纯RNA制剂可以证明纯RNA制剂中缺乏污染物。

[0183] 另外,可使用模型RNA(替代mRNA)。在用于产生IVT RNA的相同IVT条件下,由编码模型RNA的DNA模板产生模型RNA。如本文所用,模型RNA或替代mRNA是指仅由5' UTR、3' UTR和聚A尾组成的非编码RNA转录物。也可使用短模型RNA。短模型RNA是模型RNA的较短型式(仅由5' UTR和较短的聚A尾(A20)组成)。组合物中反向互补转录产物或细胞因子诱导性物类的量通过LC-MS或其他分析方法确定,因为模型RNA的量指示组合物中反向互补转录产物或细胞因子诱导性物类的量。在测定中检测到的污染物的量和性质与使用相同的IVT反应条件生成全长mRNA将获得的污染物的量和性质相关并对其进行预测。

[0184] 本发明的RNA制剂是高质量制剂。在一些实施方案中,由IVT过程直接产生的RNA制剂可无需进一步纯化直接用作研究试剂或诊断或治疗试剂。在一些实施方案中,RNA制剂可经受一个或多个纯化步骤。例如,可使用寡聚物dT色谱从截短的RNA、DNA模板和残余酶中纯化RNA制剂。示例性寡聚物dT色谱测定包括在固相萃取真空歧管上的5mL SPE柱中装入20聚体多聚胸苷琼脂糖(3ml)。将RNA转录物上柱,然后洗涤并洗脱。使用100kDa MWCO Amicon自旋过滤器(EMD Millipore)将寡聚物dT纯化的RNA转录物渗滤到水中并浓缩至1.22mg/mL。回收RNA并且可使用Bioanalyzer凝胶电泳确定浓度。

[0185] 可以在加帽之前或之后进行RNA制剂的分析以确定样品的纯度和质量。另选地,可以在基于聚A捕获的亲和纯化之前或之后进行分析。在另一个实施方案中,可以在任选的另外的纯化步骤(例如阴离子交换色谱等)之前或之后进行分析。

[0186] 质谱涵盖用于鉴定和表征混合物中的化合物的广泛的技术。可使用不同类型的基于质谱的方法分析样品以确定其组成。质谱分析包括通过电离过程将正在分析的样品转化成多个离子。当放置在力场中时,每个所得离子沿着轨迹在场中移动,使得其加速度与其质荷比成反比。由此产生的分子的质谱显示出前体离子的相对丰度相对于其质荷比的图。当使用质谱(例如串联质谱)的后续阶段通过使前体离子经受更高能量来进一步分析样品时,每个前体离子可解离成被称为产物离子的片段。所得片段可以用于提供关于其前体分子的性质和结构的信息。

[0187] MALDI-TOF(基质辅助激光解吸电离飞行时间)质谱提供低挥发性的电离不良或易于片段化的分析物的质量的光谱确定,其通过将它们嵌入吸光材料的基质中并且在其电离且被致使通过挥发飞行时测量分子的重量来实现。在样品上施加电场和磁场的组合,以使电离材料根据分子的各自质量和电荷移动。授予Koster等人的美国专利号6,043,031描述了使用MALDI-TOF和其他质谱方法鉴定DNA内的单碱基突变的示例性方法。

[0188] 基于生物聚合物的特性,HPLC(高效液相色谱)用于生物聚合物的分析分离。HPLC可用于基于大小电荷和碱基组成分离核酸序列。可以使用HPLC分离与另一种核酸具有一个碱基对差异的核酸序列。因此,可使用HPLC差异地分离除单核苷酸之外相同的核酸样品,以鉴定特定核酸片段的存在或不存在。优选地,HPLC是HPLC-UV。



[0189] 在一些实施方案中,可在不使用dsRNA酶步骤的情况下纯化RNA。例如,可不使用RNA酶III。组合物可通过不使用反相色谱纯化步骤的方法产生。在一个实施方案中,可在不使用高效脂质色谱(HPLC)纯化的情况下产生RNA组合物。因此,组合物不含与传统纯化方法相关联的残余的有机试剂或污染物。

[0190] 在一些情况下,本发明的方法用于确定RNA样品的纯度。如本文所用的术语“纯”是指仅具有靶核酸活性剂,使得不相关核酸(即杂质或污染物,包括RNA片段)的存在被减少或消除的材料。例如,纯化的RNA样品包括一种或多种靶核酸或测试核酸,但优选地基本上不含通过所述方法可检测的其他核酸。如本文所用,术语“基本上不含”在材料的分析测试的上下文中操作性地使用。优选地,纯化材料基本上不含包括本文所述的反向互补转录产物和/或细胞因子诱导性RNA污染物的一种或多种杂质或污染物,并且例如具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、或97%的纯度;更优选地,至少98%的纯度,且更优选地至少99%的纯度。在一些实施方案中,纯RNA样品由100%的靶RNA或测试RNA组成,并且不包括其他RNA。

[0191] 在一些实施方案中,毛细管电泳(CE)用于分离RNA。对样品施加电场,以使所述样品经由毛细管通过电解质溶液(诸如含水缓冲溶液)流到目的地小瓶中。分析物基于电泳迁移率不同地迁移并在毛细管的出口端检测。记录输出数据,然后显示为电泳图。它可以与质谱一起使用以确定样品组分的身份。毛细管电泳系统在FRAGMENTANALYZER™中完全自动化,可以检测小到三个碱基对的差异。

[0192] 在一些实施方案中,片段分析仪(FA)可用于定量和纯化RNA。片段分析仪自动进行毛细管电泳和HPLC。

[0193] 在一些实施方案中,RNA分子是mRNA分子。如本文所用,术语“信使RNA”(mRNA)是指编码至少一种目标肽或多肽并且能够在体外、体内、原位或离体翻译以产生所编码的目标肽或多肽的任何多核苷酸。mRNA已通过RNA聚合酶由DNA序列转录,并与核糖体相互作用,合成由DNA编码的遗传信息。一般而言,mRNA被分成两个子类:pre-mRNA和成熟mRNA。前体mRNA(pre-mRNA)是已经通过RNA聚合酶转录但未经过任何转录后加工(例如,5'加帽、剪接、编辑和聚腺苷酸化)的mRNA。成熟mRNA已通过转录后加工进行修饰(例如,剪接以除去内含子且聚腺苷酸化)并且能够与核糖体相互作用以进行蛋白质合成。可以通过多种方法从组织或细胞中分离mRNA。例如,可以在细胞或细胞裂解物上进行总RNA提取,并且可以纯化所得的提取的总RNA(例如,在包含寡聚物-dT珠子的柱上)以获得提取的mRNA。

[0194] 另选地,mRNA可以在无细胞环境中合成,例如通过体外转录(IVT)。如本文所用的“体外转录模板”是指适于在IVT反应中使用,以产生信使RNA(mRNA)的脱氧核糖核酸(DNA)。在一些实施方案中,IVT模板编码5'非翻译区,含有开放阅读框,并编码3'非翻译区和聚A尾。IVT模板的特定核苷酸序列组成和长度将取决于模板编码的目标mRNA。

[0195] “5'非翻译区(UTR)”是指正好位于起始密码子(即,由核糖体翻译的mRNA转录物的第一个密码子)上游(即,5')的mRNA区域,其不编码蛋白质或肽。

[0196] “3'非翻译区(UTR)”是指正好位于终止密码子(即,传导翻译终止信号的mRNA转录物的密码子)下游(即,3')的mRNA区域,其不编码蛋白质或肽。

[0197] “开放阅读框”是以起始密码子(例如,甲硫氨酸(ATG))开始且以终止密码子结束(例如,TAA、TAG或TGA)并且编码蛋白质或肽的连续DNA链段。



[0198] “聚A尾”是位于3'UTR下游,例如正好下游(即,3')的mRNA区域,其含有多个连续的腺苷一磷酸。聚A尾可含有10至300个腺苷一磷酸。例如,聚A尾可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、350、400、450、500、550、或600个腺苷一磷酸。在一些实施方案中,聚A尾含有50至250个腺苷一磷酸。在相关生物环境中(例如,在细胞中、在体内等),聚(A)尾起到保护mRNA免受酶促降解的作用,例如,在细胞质中,并且有助于转录终止、mRNA从细胞核中的输出以及翻译。

[0199] 因此,在一些实施方案中,多核苷酸可包含(a)编码目标多肽的连接核苷酸的第一区域;(b)相对于所述第一区域位于5'的包括5'非翻译区(UTR)的第一末端区域;(c)相对于所述第一区域位于3'的第二末端区域;以及(d)加尾区域。术语多核苷酸和核酸在本文中可互换使用。

[0200] 在一些实施方案中,多核苷酸包括约1至约3,000、10至约3,000、20至约3,000、30至约3,000、40至约3,000、50至约3,000、100至约3,000、200至约3,000个核苷酸(例如,200至500、200至1,000、200至1,500、200至3,000、500至1,000、500至1,500、500至2,000、500至3,000、1,000至1,500、1,000至2,000、1,000至3,000、1,500至3,000、以及2,000至3,000)。

[0201] IVT RNA可用作RNA,但在其功能和/或结构设计特征上与野生型RNA不同,其用于克服使用基于核酸的治疗剂的有效多肽产生的现有问题。例如,IVT RNA可以是结构修饰或化学修饰的。如本文所用,“结构”修饰是其中两个或更多个连接的核苷酸在多核苷酸中插入、缺失、复制、反转或随机化而不对核苷酸本身进行显著化学修饰的修饰。因为化学键必然将被破坏并重新形成以实现结构修饰,所以结构修饰具有化学性质且因此是化学修饰。然而,结构修饰将导致不同的核苷酸序列。例如,多核苷酸“ATCG”可化学修饰为“AT-5meC-G”。相同的多核苷酸可在结构上从“ATCG”修饰为“ATCCCG”。此处,已经插入了二核苷酸“CC”,从而导致对多核苷酸的结构修饰。

[0202] 编码本文所述的多核苷酸的cDNA可使用体外转录(IVT)系统转录。所述系统通常包括转录缓冲液、核苷酸三磷酸(NTP)、RNA酶抑制剂以及聚合酶。NTP可内部制造,可从供应商处选择,或可如本文所述合成。NTP可选自但不限于本文所述的那些,包括天然和非天然(修饰的)NTP。聚合酶可选自但不限于T7RNA聚合酶、T3RNA聚合酶和突变体聚合酶诸如但不限于能够掺入多核苷酸(例如,修饰的核酸)的聚合酶。

#### [0203] 化学修饰的RNA

[0204] 因此,在示例性方面,本发明的多核苷酸可包括至少一种化学修饰。多核苷酸可以包括来自天然或天然存在的多核苷酸的各种取代和/或插入。如本文在多核苷酸中所用,术语“化学修饰”或在适当时,“化学修饰的”是指相对于腺苷(A)、鸟苷(G)、尿苷(U)、胸苷(T)或胞苷(C)核糖或脱氧核糖核苷在其位置、模式、百分比或群中的一个或多个中的修饰。通常,在本文中,这些术语不旨在指天然存在的5'-末端RNA帽部分中的核糖核苷酸修饰。

[0205] 修饰可以是各种不同的修饰。在一些实施方案中,所述区域可含有一个、两个或更多个(任选地不同的)核苷或核苷酸修饰。在一些实施方案中,与未修饰的多核苷酸相比,引入细胞的修饰的多核苷酸可在细胞中表现为降解减少。

[0206] 多核苷酸的修饰包括但不限于下面详细列出的那些。多核苷酸可包含天然存在的、非天然存在的修饰或多核苷酸可包含天然和非天然存在的修饰。

[0207] 本发明的多核苷酸可以包括任何有用的修饰,诸如对糖、核碱基或核苷酸间键(例如连接磷酸酯/磷酸二酯键/磷酸二酯骨架)。嘧啶核碱基的一个或多个原子可被任选取代的氨基、任选取代的硫醇、任选取代的烷基(例如,甲基或乙基)或卤代基(例如,氯代基或氟代基)代替或取代。在某些实施方案中,修饰(例如,一种或多种修饰)存在于糖和核苷酸间键中的每一个中。根据本发明的修饰可以是核糖核酸(RNA)对脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)或其杂交体)的修饰。本文描述了另外的修饰。

[0208] 非天然的修饰核苷酸可在链的合成期间或在合成后引入多核苷酸中,以实现期望的功能或特性。修饰可处于核苷酸间键、嘌呤或嘧啶碱基、或糖上。可在链的末端或链中的任何其他位置引入修饰;利用化学合成或利用聚合酶。多核苷酸的任何区域可以是化学修饰的。

[0209] 本公开提供了由未修饰或修饰的核苷和核苷酸及其组合组成的多核苷酸。如本文所述,“核苷”被定义为含有糖分子(例如,戊糖或核糖)或其衍生物与有机碱(例如嘌呤或嘧啶)或其衍生物(在本文也称为“核碱基”)的组成的化合物。如本文所述,“核苷酸”被定义为包括磷酸基团的核苷。修饰的核苷酸可通过如本文所述的任何有用的方法合成(例如,化学、酶促、或重组以包括一种或多种修饰的或非天然的核苷酸)。多核苷酸可包含连接的核苷酸的一个或多个区域。此类区域可具有可变的骨架连接。连接可以是标准的磷酸二酯键,在这种情况下,多核苷酸将包含核苷酸的区域。碱/糖或接头的任何组合可掺入本发明的多核苷酸中。

[0210] 在一些实施方案中,本发明的RNA包括一种或多种前述的修饰核碱基的组合(例如,2、3或4种前述的修饰核碱基的组合)。

[0211] 可用于本发明的核酸的修饰包括但不限于下表中的那些。

[0212]

名称	符号	碱基	天然存在
2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷	ms2i6A	A	是
2-甲硫基-N6-甲基腺苷	ms2m6A	A	是
2-甲硫基-N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷	ms2t6A	A	是
N6-甘氨酰氨基甲酰基腺苷	g6A	A	是
N6-异戊烯基腺苷	i6A	A	是
N6-甲基腺苷	m6A	A	是
N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷	t6A	A	是
1,2'-O-二甲基腺苷	m1Am	A	是
1-甲基腺苷	m1A	A	是
2'-O-甲基腺苷	Am	A	是
2'-O-核糖基腺苷(磷酸)	Ar(p)	A	是
2-甲基腺苷	m2A	A	是
2-甲硫基-N6 异戊烯基腺苷	ms2i6A	A	是
2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酰氨基甲酰基腺苷	ms2hn6A	A	是
2'-O-甲基腺苷	m6A	A	是
2'-O-核糖基腺苷(磷酸)	Ar(p)	A	是
异戊烯基腺苷	Iga	A	是
N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷	io6A	A	是
N6,2'-O-二甲基腺苷	m6Am	A	是
N6,2'-O-二甲基腺苷	m6Am	A	是
N6,N6,2'-O-三甲基腺苷	m62Am	A	是
N6,N6-二甲基腺苷	m62A	A	是
N6-乙酰基腺苷	ac6A	A	是
N6-羟基正缬氨酰氨基甲酰基腺苷	hn6A	A	是
N6-甲基-N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷	m6t6A	A	是
2-甲基腺苷	m2A	A	是
2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷	ms2i6A	A	是
7-脱氮-腺苷	--	A	否
N1-甲基-腺苷	--	A	否
N6, N6 (二甲基)腺嘌呤	--	A	否
N6-顺式-羟基-异戊烯基-腺苷	--	A	否
$\alpha$ -硫代-腺苷	--	A	否
2(氨基)腺嘌呤	--	A	否
2(氨基丙基)腺嘌呤	--	A	否
2 (甲硫基) N6 (异戊烯基)腺嘌呤	--	A	否
2-(烷基)腺嘌呤	--	A	否

[0213]

2-(氨基烷基)腺嘌呤	--	A	否
2-(氨基丙基)腺嘌呤	--	A	否
2-(卤代)腺嘌呤	--	A	否
2-(卤代)腺嘌呤	--	A	否
2-(丙基)腺嘌呤	--	A	否
2'-氨基-2'-脱氧-ATP	--	A	否
2'-叠氮基-2'-脱氧-ATP	--	A	否
2'-脱氧-2'-a-氨基腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-a-叠氮基腺苷 TP	--	A	否
6(烷基)腺嘌呤	--	A	否
6(甲基)腺嘌呤	--	A	否
6-(烷基)腺嘌呤	--	A	否
6-(甲基)腺嘌呤	--	A	否
7(脱氮)腺嘌呤	--	A	否
8(烯基)腺嘌呤	--	A	否
8(炔基)腺嘌呤	--	A	否
8(氨基)腺嘌呤	--	A	否
8(硫代烷基)腺嘌呤	--	A	否
8-(烯基)腺嘌呤	--	A	否
8-(烷基)腺嘌呤	--	A	否
8-(炔基)腺嘌呤	--	A	否
8-(氨基)腺嘌呤	--	A	否
8-(卤代)腺嘌呤	--	A	否
8-(羟基)腺嘌呤	--	A	否
8-(硫代烷基)腺嘌呤	--	A	否
8-(硫醇)腺嘌呤	--	A	否
8-叠氮基-腺苷	--	A	否
氮杂腺嘌呤	--	A	否
脱氮腺嘌呤	--	A	否
N6(甲基)腺嘌呤	--	A	否
N6-(异戊基)腺嘌呤	--	A	否
7-脱氮-8-氮杂-腺苷	--	A	否
7-甲基腺嘌呤	--	A	否
1-脱氮腺苷 TP	--	A	否
2'氟-N6-Bz-脱氧腺苷 TP	--	A	否
2'-OMe-2-氨基-ATP	--	A	否
2'O-甲基-N6-Bz-脱氧腺苷 TP	--	A	否
2'-a-乙炔基腺苷 TP	--	A	否
2-氨基腺嘌呤	--	A	否
2-氨基腺苷 TP	--	A	否
2-氨基-ATP	--	A	否
2'-a-三氟甲基腺苷 TP	--	A	否
2-叠氮基腺苷 TP	--	A	否

[0214]

2'-b-乙炔基腺苷 TP	--	A	否
2-溴腺苷 TP	--	A	否
2'-b-三氟甲基腺苷 TP	--	A	否
2-氯腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2',2'-二氟腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-a-巯基腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-氨基腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-叠氮基腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-溴腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-氯腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-氟腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-碘腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-巯基腺苷 TP	--	A	否
2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基腺苷 TP	--	A	否
2-氟腺苷 TP	--	A	否
2-碘腺苷 TP	--	A	否
2-巯基腺苷 TP	--	A	否
2-甲氧基-腺嘌呤	--	A	否
2-甲硫基-腺嘌呤	--	A	否
2-三氟甲基腺苷 TP	--	A	否
3-脱氮-3-溴腺苷 TP	--	A	否
3-脱氮-3-氯腺苷 TP	--	A	否
3-脱氮-3-氟腺苷 TP	--	A	否
3-脱氮-3-碘腺苷 TP	--	A	否
3-脱氮腺苷 TP	--	A	否
4'-叠氮基腺苷 TP	--	A	否
4'-碳环腺苷 TP	--	A	否
4'-乙炔基腺苷 TP	--	A	否
5'-同型-腺苷 TP	--	A	否
8-氮杂-ATP	--	A	否
8-溴-腺苷 TP	--	A	否
8-三氟甲基腺苷 TP	--	A	否
9-脱氮腺苷 TP	--	A	否
2-氨基嘌呤	--	A/G	否
7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤	--	A/G	否
7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤	--	A/G	否
7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤	--	A/G	否
2,6-二氨基嘌呤	--	A/G	否
7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤	--	A/G	否
2-硫代胞苷	s2C	C	是
3-甲基胞苷	m3C	C	是
5-甲酰基胞苷	f5C	C	是

[0215]

5-羟甲基胞苷	hm5C	C	是
5-甲基胞苷	m5C	C	是
N4-乙酰基胞苷	ac4C	C	是
2'-O-甲基胞苷	Cm	C	是
2'-O-甲基胞苷	Cm	C	是
5,2'-O-二甲基胞苷	m5 Cm	C	是
5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷	f5Cm	C	是
赖西丁	k2C	C	是
N4,2'-O-二甲基胞苷	m4Cm	C	是
N4-乙酰基-2'-O-甲基胞苷	ac4Cm	C	是
N4-甲基胞苷	m4C	C	是
N4,N4-二甲基-2'-OMe-胞苷 TP	--	C	是
4-甲基胞苷	--	C	否
5-氮杂-胞苷	--	C	否
假异胞苷	--	C	否
吡咯并-胞苷	--	C	否
$\alpha$ -硫代-胞苷	--	C	否
2-(硫代)胞嘧啶	--	C	否
2'-氨基-2'-脱氧-CTP	--	C	否
2'-叠氨基-2'-脱氧-CTP	--	C	否
2'-脱氧-2'-a-氨基胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-a-叠氨基胞苷 TP	--	C	否
3(脱氮)5(氮杂)胞嘧啶	--	C	否
3(甲基)胞嘧啶	--	C	否
3-(烷基)胞嘧啶	--	C	否
3-(脱氮)5(氮杂)胞嘧啶	--	C	否
3-(甲基)胞苷	--	C	否
4,2'-O-二甲基胞苷	--	C	否
5(卤代)胞嘧啶	--	C	否
5(甲基)胞嘧啶	--	C	否
5(丙炔基)胞嘧啶	--	C	否
5(三氟甲基)胞嘧啶	--	C	否
5-(烷基)胞嘧啶	--	C	否
5-(炔基)胞嘧啶	--	C	否
5-(卤代)胞嘧啶	--	C	否
5-(丙炔基)胞嘧啶	--	C	否
5-(三氟甲基)胞嘧啶	--	C	否
5-溴-胞苷	--	C	否
5-碘-胞苷	--	C	否
5-丙炔基胞嘧啶	--	C	否
6-(偶氮)胞嘧啶	--	C	否
6-氮杂-胞苷	--	C	否
氮杂胞嘧啶	--	C	否

[0216]

脱氮胞嘧啶	--	C	否
N4(乙酰基)胞嘧啶	--	C	否
1-甲基-1-脱氮-假异胞苷	--	C	否
1-甲基-假异胞苷	--	C	否
2-甲氧基-5-甲基-胞苷	--	C	否
2-甲氧基-胞苷	--	C	否
2-硫代-5-甲基-胞苷	--	C	否
4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷	--	C	否
4-甲氧基-假异胞苷	--	C	否
4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷	--	C	否
4-硫代-1-甲基-假异胞苷	--	C	否
4-硫代-假异胞苷	--	C	否
5-氮杂-泽布拉林(5-aza-zebularine)	--	C	否
5-甲基-泽布拉林	--	C	否
吡咯并-假异胞苷	--	C	否
泽布拉林	--	C	否
(E)-5-(2-溴-乙烯基)胞苷 TP	--	C	否
2,2'-脱水-胞苷 TP 盐酸盐	--	C	否
2'氟-N4-Bz-胞苷 TP	--	C	否
2'氟-N4-乙酰基-胞苷 TP	--	C	否
2'-O-甲基-N4-乙酰基-胞苷 TP	--	C	否
2'O-甲基-N4-Bz-胞苷 TP	--	C	否
2'-a-乙炔基胞苷 TP	--	C	否
2'-a-三氟甲基胞苷 TP	--	C	否
2'-b-乙炔基胞苷 TP	--	C	否
2'-b-三氟甲基胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-a-巯基胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-氨基胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-叠氮基胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-溴胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-氯胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-氟胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-碘胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-巯基胞苷 TP	--	C	否
2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基胞苷 TP	--	C	否
2'-O-甲基-5-(1-丙炔基)胞苷 TP	--	C	否
3'-乙炔基胞苷 TP	--	C	否
4'-叠氮基胞苷 TP	--	C	否
4'-碳环胞苷 TP	--	C	否
4'-乙炔基胞苷 TP	--	C	否
5-(1-丙炔基)阿糖-胞苷 TP	--	C	否

[0217]

5-(2-氯-苯基)-2-硫代胞苷 TP	--	C	否
5-(4-氨基-苯基)-2-硫代胞苷 TP	--	C	否
5-氨基烯丙基-CTP	--	C	否
5-氟基胞苷 TP	--	C	否
5-乙炔基阿糖-胞苷 TP	--	C	否
5-乙炔基胞苷 TP	--	C	否
5'-同型-胞苷 TP	--	C	否
5-甲氧基胞苷 TP	--	C	否
5-三氟甲基-胞苷 TP	--	C	否
N4-氨基-胞苷 TP	--	C	否
N4-苯甲酰基-胞苷 TP	--	C	否
假异胞苷	--	C	否
7-甲基鸟苷	M7G	G	是
N2,2'-O-二甲基鸟苷	m2Gm	G	是
N2-甲基鸟苷	m2G	G	是
怀俄苷	imG	G	是
1,2'-O-二甲基鸟苷	m1Gm	G	是
1-甲基鸟苷	m1G	G	是
2'-O-甲基鸟苷	Gm	G	是
2'-O-核糖基鸟苷(磷酸)	Gr(p)	G	是
2'-O-甲基鸟苷	Gm	G	是
2'-O-核糖基鸟苷(磷酸)	Gr(p)	G	是
7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷	preQ1	G	是
7-氟基-7-脱氮鸟苷	preQ0	G	是
古嘌呤	G+	G	是
甲基怀俄苷	mimG	G	是
N2,7-二甲基鸟苷	m2,7G	G	是
N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷	m22Gm	G	是
N2,N2,7-三甲基鸟苷	m2,2,7G	G	是
N2,N2-二甲基鸟苷	m22G	G	是
N2,7,2'-O-三甲基鸟苷	m2,7Gm	G	是
6-硫代-鸟苷	--	G	否
7-脱氮-鸟苷	--	G	否
8-氧代-鸟苷	--	G	否
N1-甲基-鸟苷	--	G	否
$\alpha$ -硫代-鸟苷	--	G	否
2(丙基)鸟嘌呤	--	G	否
2-(烷基)鸟嘌呤	--	G	否
2'-氨基-2'-脱氧-GTP	--	G	否
2'-叠氮基-2'-脱氧-GTP	--	G	否
2'-脱氧-2'-a-氨基鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-a-叠氮基鸟苷 TP	--	G	否
6(甲基)鸟嘌呤	--	G	否



[0218]

6-(烷基)鸟嘌呤	--	G	否
6-(甲基)鸟嘌呤	--	G	否
6-甲基-鸟苷	--	G	否
7(烷基)鸟嘌呤	--	G	否
7(脱氮)鸟嘌呤	--	G	否
7(甲基)鸟嘌呤	--	G	否
7-(烷基)鸟嘌呤	--	G	否
7-(脱氮)鸟嘌呤	--	G	否
7-(甲基)鸟嘌呤	--	G	否
8(烷基)鸟嘌呤	--	G	否
8(炔基)鸟嘌呤	--	G	否
8(卤代)鸟嘌呤	--	G	否
8(硫代烷基)鸟嘌呤	--	G	否
8-(烯基)鸟嘌呤	--	G	否
8-(烷基)鸟嘌呤	--	G	否
8-(炔基)鸟嘌呤	--	G	否
8-(氨基)鸟嘌呤	--	G	否
8-(卤代)鸟嘌呤	--	G	否
8-(羟基)鸟嘌呤	--	G	否
8-(硫代烷基)鸟嘌呤	--	G	否
8-(硫醇)鸟嘌呤	--	G	否
氮杂鸟嘌呤	--	G	否
脱氮鸟嘌呤	--	G	否
N(甲基)鸟嘌呤	--	G	否
N-(甲基)鸟嘌呤	--	G	否
1-甲基-6-硫代-鸟苷	--	G	否
6-甲氧基-鸟苷	--	G	否
6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷	--	G	否
6-硫代-7-脱氮-鸟苷	--	G	否
6-硫代-7-甲基-鸟苷	--	G	否
7-脱氮-8-氮杂-鸟苷	--	G	否
7-甲基-8-氧代-鸟苷	--	G	否
N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷	--	G	否
N2-甲基-6-硫代-鸟苷	--	G	否
1-Me-GTP	--	G	否
2'氟-N2-异丁基-鸟苷 TP	--	G	否
2'O-甲基-N2-异丁基-鸟苷 TP	--	G	否
2'-a-乙炔基鸟苷 TP	--	G	否
2'-a-三氟甲基鸟苷 TP	--	G	否
2'-b-乙炔基鸟苷 TP	--	G	否
2'-b-三氟甲基鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2',2'-二氟鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-a-巯基鸟苷 TP	--	G	否

[0219]

2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-氨基鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-叠氮基鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-溴鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-氯鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-氟鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-碘鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-巯基鸟苷 TP	--	G	否
2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基鸟苷 TP	--	G	否
4'-叠氮基鸟苷 TP	--	G	否
4'-碳环鸟苷 TP	--	G	否
4'-乙炔基鸟苷 TP	--	G	否
5'-同型-鸟苷 TP	--	G	否
8-溴-鸟苷 TP	--	G	否
9-脱氮鸟苷 TP	--	G	否
N2-异丁基-鸟苷 TP	--	G	否
1-甲基肌苷	m1I	I	是
肌苷	I	I	是
1,2'-O-二甲基肌苷	m1Im	I	是
2'-O-甲基肌苷	Im	I	是
7-甲基肌苷		I	否
2'-O-甲基肌苷	Im	I	是
环氧腺苷(Epoxyqueuosine)	oQ	Q	是
半乳糖基-腺苷	galQ	Q	是
甘露糖基腺苷	manQ	Q	是
腺苷	Q	Q	是
烯丙基氨基-胸苷	--	T	否
氮杂胸苷	--	T	否
脱氮胸苷	--	T	否
脱氧-胸苷	--	T	否
2'-O-甲基尿苷	--	U	是
2-硫代尿苷	s2U	U	是
3-甲基尿苷	m3U	U	是
5-羧甲基尿苷	cm5U	U	是
5-羟基尿苷	ho5U	U	是
5-甲基尿苷	m5U	U	是
5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷	τm5s2U	U	是
5-牛磺酸甲基尿苷	τm5U	U	是
二氢尿苷	D	U	是
假尿苷	Ψ	U	是
(3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷	acp3U	U	是
1-甲基-3-(3-氨基-5-羧丙基)假尿苷	m1acp3Ψ	U	是
1-甲基假尿苷	m1Ψ	U	是

[0220]

1-甲基-假尿苷	--	U	是
2'-O-甲基尿苷	Um	U	是
2'-O-甲基假尿苷	Ψm	U	是
2'-O-甲基尿苷	Um	U	是
2-硫代-2'-O-甲基尿苷	s2Um	U	是
3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷	acp3U	U	是
3,2'-O-二甲基尿苷	m3Um	U	是
3-甲基-假-尿苷 TP	--	U	是
4-硫代尿苷	s4U	U	是
5-(羧基羟甲基)尿苷	chm5U	U	是
5-(羧基羟甲基)尿苷甲基酯	mchm5U	U	是
5,2'-O-二甲基尿苷	m5Um	U	是
5,6-二氢-尿苷	--	U	是
5-氨基甲基-2-硫代尿苷	nm5s2U	U	是
5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷	ncm5Um	U	是
5-氨基甲酰基甲基尿苷	ncm5U	U	是
5-羧基羟甲基尿苷	--	U	是
5-羧基羟甲基尿苷甲基酯	--	U	是
5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷	cmnm5Um	U	是
5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷	cmnm5s2U	U	是
5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷	--	U	是
5-羧甲基氨基甲基尿苷	cmnm5U	U	是
5-羧甲基氨基甲基尿苷	--	U	是
5-氨基甲酰基甲基尿苷 TP	--	U	是
5-甲氧羰基甲基-2'-O-甲基尿苷	mcm5Um	U	是
5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷	mcm5s2U	U	是
5-甲氧羰基甲基尿苷	mcm5U	U	是
5-甲氧基尿苷	mo5U	U	是
5-甲基-2-硫代尿苷	m5s2U	U	是
5-甲基氨基甲基-2-硒尿苷	mn5se2U	U	是
5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷	mn5s2U	U	是
5-甲基氨基甲基尿苷	mn5U	U	是
5-甲基二氢尿苷	--	U	是
5-氧基乙酸-尿苷 TP	--	U	是
5-氧基乙酸-甲基酯-尿苷 TP	--	U	是
N1-甲基-假-尿苷	--	U	是
尿苷 5-氧基乙酸	cmo5U	U	是
尿苷 5-氧基乙酸甲基酯	mcmo5U	U	是
3-(3-氨基-3-羧丙基)-尿苷 TP	--	U	是
5-(异-戊烯基氨基甲基)-2-硫尿苷 TP	--	U	是
5-(异-戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基尿苷 TP	--	U	是
5-(异-戊烯基氨基甲基)尿苷 TP	--	U	是
5-丙炔基尿嘧啶	--	U	否

[0221]

$\alpha$ -硫代-尿苷	--	U	否
1(氨基烷基氨基-羰基亚乙基)-2(硫代)-假尿嘧啶	--	U	否
1(氨基烷基氨基羰基亚乙基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶	--	U	否
1(氨基烷基氨基羰基亚乙基)-4(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
1(氨基烷基氨基羰基亚乙基)-假尿嘧啶	--	U	否
1(氨基羰基亚乙基)-2(硫代)-假尿嘧啶	--	U	否
1(氨基羰基亚乙基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶	--	U	否
1(氨基羰基亚乙基)-4(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
1(氨基羰基亚乙基)-假尿嘧啶	--	U	否
1 取代的 2(硫代)-假尿嘧啶	--	U	否
1 取代的 2,4-(二硫代)假尿嘧啶	--	U	否
1 取代的 4(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
1 取代的假尿嘧啶	--	U	否
1-(氨基烷基氨基-羰基亚乙基)-2-(硫代)-假尿嘧啶	--	U	否
1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷 TP	--	U	否
1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假-UTP	--	U	否
1-甲基-假-UTP	--	U	否
2(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
2'脱氧尿苷	--	U	否
2'氟尿苷	--	U	否
2-(硫代)尿嘧啶	--	U	否
2,4-(二硫代)假尿嘧啶	--	U	否
2'甲基、2'氨基、2'叠氮基、2'氟-鸟苷	--	U	否
2'-氨基-2'-脱氧-UTP	--	U	否
2'-叠氮基-2'-脱氧-UTP	--	U	否
2'-叠氮基-脱氧尿苷 TP	--	U	否
2'-O-甲基假尿苷	--	U	否
2'脱氧尿苷	2'dU	U	否
2'氟尿苷	--	U	否
2'-脱氧-2'-a-氨基尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-a-叠氮基尿苷 TP	--	U	否
2-甲基假尿苷	m3 $\Psi$	U	否
3(3 氨基-3 羧丙基)尿嘧啶	--	U	否
4(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
4-(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
4-(硫代)尿嘧啶	--	U	否
4-硫代尿嘧啶	--	U	否
5 (1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶	--	U	否
5 (2-氨基丙基)尿嘧啶	--	U	否
5 (氨基烷基)尿嘧啶	--	U	否
5 (二甲基氨基烷基)尿嘧啶	--	U	否
5(胍基烷基)尿嘧啶	--	U	否
5 (甲氧基羰基甲基)-2-(硫代)尿嘧啶	--	U	否

[0222]

5-(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-2-(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-2,4-(二硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-4-(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基氨基甲基)-2-(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基氨基甲基)-2,4-(二硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基氨基甲基)-4-(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(丙炔基)尿嘧啶	--	U	否
5-(三氟甲基)尿嘧啶	--	U	否
5-(2-氨基丙基)尿嘧啶	--	U	否
5-(烷基)-2-(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
5-(烷基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶	--	U	否
5-(烷基)-4-(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
5-(烷基)假尿嘧啶	--	U	否
5-(烷基)尿嘧啶	--	U	否
5-(炔基)尿嘧啶	--	U	否
5-(烯丙基氨基)尿嘧啶	--	U	否
5-(氟基烷基)尿嘧啶	--	U	否
5-(二烷基氨基烷基)尿嘧啶	--	U	否
5-(二甲基氨基烷基)尿嘧啶	--	U	否
5-(胍基烷基)尿嘧啶	--	U	否
5-(卤代)尿嘧啶	--	U	否
5-(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲氧基)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲氧基羰基甲基)-2-(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-2(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-2,4(二硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-4(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-2-(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-2,4(二硫代)假尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)-4(硫代)假尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基)假尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基氨基甲基)-2(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基氨基甲基)-2,4(二硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(甲基氨基甲基)-4(硫代)尿嘧啶	--	U	否
5-(丙炔基)尿嘧啶	--	U	否
5-(三氟甲基)尿嘧啶	--	U	否
5-氨基烯丙基-尿苷	--	U	否
5-溴-尿苷	--	U	否
5-碘-尿苷	--	U	否
5-尿嘧啶	--	U	否
6(偶氮)尿嘧啶	--	U	否

[0223]

6-(偶氮)尿嘧啶	--	U	否
6-氮杂-尿苷	--	U	否
烯丙基氨基-尿嘧啶	--	U	否
氮杂尿嘧啶	--	U	否
脱氮尿嘧啶	--	U	否
N3(甲基)尿嘧啶	--	U	否
假-UTP-1-2-乙酸	--	U	否
假尿嘧啶	--	U	否
4-硫代-假-UTP	--	U	否
1-羧甲基-假尿苷	--	U	否
1-甲基-1-脱氮-假尿苷	--	U	否
1-丙炔基-尿苷	--	U	否
1-牛磺酸甲基-1-甲基-尿苷	--	U	否
1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷	--	U	否
1-牛磺酸甲基-假尿苷	--	U	否
2-甲氧基-4-硫代-假尿苷	--	U	否
2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷	--	U	否
2-硫代-1-甲基-假尿苷	--	U	否
2-硫代-5-氮杂-尿苷	--	U	否
2-硫代-二氢假尿苷	--	U	否
2-硫代-二氢尿苷	--	U	否
2-硫代-假尿苷	--	U	否
4-甲氧基-2-硫代-假尿苷	--	U	否
4-甲氧基-假尿苷	--	U	否
4-硫代-1-甲基-假尿苷	--	U	否
4-硫代-假尿苷	--	U	否
5-氮杂-尿苷	--	U	否
二氢假尿苷	--	U	否
(±)1-(2-羟丙基)假尿苷 TP	--	U	否
(2R)-1-(2-羟丙基)假尿苷 TP	--	U	否
(2S)-1-(2-羟丙基)假尿苷 TP	--	U	否
(E)-5-(2-溴-乙烯基)阿糖-尿苷 TP	--	U	否
(E)-5-(2-溴-乙烯基)尿苷 TP	--	U	否
(Z)-5-(2-溴-乙烯基)阿糖-尿苷 TP	--	U	否
(Z)-5-(2-溴-乙烯基)尿苷 TP	--	U	否
1-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP	--	U	否
1-(2,2,3,3,3-五氟丙基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(2,2-二乙氧基乙基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(2,4,6-三甲基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(2,4,6-三甲基-苄基)假-UTP	--	U	否
1-(2,4,6-三甲基-苯基)假-UTP	--	U	否
1-(2-氨基-2-羧乙基)假-UTP	--	U	否
1-(2-氨基-乙基)假-UTP	--	U	否

[0224]

1-(2-羟乙基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(2-甲氧基乙基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(3,4-双-三氟甲氧基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(3,4-二甲氧基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(3-氨基-3-羧丙基)假-UTP	--	U	否
1-(3-氨基-丙基)假-UTP	--	U	否
1-(3-环丙基-丙-2-炔基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-氨基-4-羧基丁基)假-UTP	--	U	否
1-(4-氨基-苄基)假-UTP	--	U	否
1-(4-氨基-丁基)假-UTP	--	U	否
1-(4-氨基-苯基)假-UTP	--	U	否
1-(4-叠氮基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-溴苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-氯苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-氟苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-碘苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-甲磺酰基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-甲氧基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-甲氧基-苄基)假-UTP	--	U	否
1-(4-甲氧基-苯基)假-UTP	--	U	否
1-(4-甲基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-甲基-苄基)假-UTP	--	U	否
1-(4-硝基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-硝基-苄基)假-UTP	--	U	否
1-(4-硝基-苯基)假-UTP	--	U	否
1-(4-硫代甲氧基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-三氟甲氧基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(4-三氟甲基苄基)假尿苷 TP	--	U	否
1-(5-氨基-戊基)假-UTP	--	U	否
1-(6-氨基-己基)假-UTP	--	U	否
1,6-二甲基-假-UTP	--	U	否
1-[3-(2-{2-[2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-丙酰基]假尿苷 TP	--	U	否
1-{3-[2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-丙酰基}假尿苷 TP	--	U	否
1-乙酰基假尿苷 TP	--	U	否
1-烷基-6-(1-丙炔基)-假-UTP	--	U	否
1-烷基-6-(2-丙炔基)-假-UTP	--	U	否
1-烷基-6-烯丙基-假-UTP	--	U	否
1-烷基-6-乙炔基-假-UTP	--	U	否
1-烷基-6-高烯丙基-假-UTP	--	U	否
1-烷基-6-乙烯基-假-UTP	--	U	否
1-烯丙基假尿苷 TP	--	U	否
1-氨基甲基-假-UTP	--	U	否

[0225]

1-苯甲酰基假尿苷 TP	--	U	否
1-苄氧基甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-苄基-假-UTP	--	U	否
1-生物素-PEG2-假尿苷 TP	--	U	否
1-生物素假尿苷 TP	--	U	否
1-丁基-假-UTP	--	U	否
1-氟基甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-环丁基甲基-假-UTP	--	U	否
1-环丁基-假-UTP	--	U	否
1-环庚基甲基-假-UTP	--	U	否
1-环庚基-假-UTP	--	U	否
1-环己基甲基-假-UTP	--	U	否
1-环己基-假-UTP	--	U	否
1-环辛基甲基-假-UTP	--	U	否
1-环辛基-假-UTP	--	U	否
1-环戊基甲基-假-UTP	--	U	否
1-环戊基-假-UTP	--	U	否
1-环丙基甲基-假-UTP	--	U	否
1-环丙基-假-UTP	--	U	否
1-乙基-假-UTP	--	U	否
1-己基-假-UTP	--	U	否
1-高烯丙基假尿苷 TP	--	U	否
1-羟甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-异丙基-假-UTP	--	U	否
1-Me-2-硫代-假-UTP	--	U	否
1-Me-4-硫代-假-UTP	--	U	否
1-Me- $\alpha$ -硫代-假-UTP	--	U	否
1-甲磺酰基甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-甲氧基甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-甲基-6-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-(4-吗啉代)-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-(4-硫代吗啉代)-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-(取代的苯基)-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-氨基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-叠氮基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-溴-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-丁基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-氯-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-氟基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-二甲基氨基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-乙氧基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-乙基羧酸酯-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-乙基-假-UTP	--	U	否



[0226]

1-甲基-6-氟-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-甲酰基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-羟基氨基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-羟基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-碘-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-异丙基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-甲氧基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-甲基氨基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-苯基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-丙基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-叔丁基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-三氟甲氧基-假-UTP	--	U	否
1-甲基-6-三氟甲基-假-UTP	--	U	否
1-吗啉代甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-戊基-假-UTP	--	U	否
1-苯基-假-UTP	--	U	否
1-新戊酰基假尿苷 TP	--	U	否
1-炔丙基假尿苷 TP	--	U	否
1-丙基-假-UTP	--	U	否
1-丙炔基-假尿苷	--	U	否
1-对甲苯基-假-UTP	--	U	否
1-叔丁基-假-UTP	--	U	否
1-硫代甲氧基甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-硫代吗啉代甲基假尿苷 TP	--	U	否
1-三氟乙酰基假尿苷 TP	--	U	否
1-三氟甲基-假-UTP	--	U	否
1-乙烯基假尿苷 TP	--	U	否
2,2'-脱水-尿苷 TP	--	U	否
2'-溴-脱氧尿苷 TP	--	U	否
2'-F-5-甲基-2'-脱氧-UTP	--	U	否
2'-OMe-5-Me-UTP	--	U	否
2'-OMe-假-UTP	--	U	否
2'-a-乙炔基尿苷 TP	--	U	否
2'-a-三氟甲基尿苷 TP	--	U	否
2'-b-乙炔基尿苷 TP	--	U	否
2'-b-三氟甲基尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2',2'-二氟尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-a-巯基尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-b-氨基尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-b-叠氮基尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-b-溴尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-b-氯尿苷 TP	--	U	否

[0227]

2'-脱氧-2'-b-氟尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-b-碘尿苷 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-b-巯基脲 TP	--	U	否
2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基尿苷 TP	--	U	否
2-甲氧基-4-硫代-尿苷	--	U	否
2-甲氧基尿苷	--	U	否
2'-O-甲基-5-(1-丙炔基)尿苷 TP	--	U	否
3-烷基-假-UTP	--	U	否
4'-叠氮基尿苷 TP	--	U	否
4'-碳环尿苷 TP	--	U	否
4'-乙炔基尿苷 TP	--	U	否
5-(1-丙炔基)阿糖-尿苷 TP	--	U	否
5-(2-呋喃基)尿苷 TP	--	U	否
5-氟基尿苷 TP	--	U	否
5-二甲基氨基尿苷 TP	--	U	否
5'-同型-尿苷 TP	--	U	否
5-碘-2'-氟-脱氧尿苷 TP	--	U	否
5-苯基乙炔基尿苷 TP	--	U	否
5-三氟代甲基-6-氟代尿苷 TP	--	U	否
5-三氟甲基-尿苷 TP	--	U	否
5-乙烯基阿糖尿苷 TP	--	U	否
6-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP	--	U	否
6-(4-吗啉代)-假-UTP	--	U	否
6-(4-硫代吗啉代)-假-UTP	--	U	否
6-(取代-苯基)-假-UTP	--	U	否
6-氨基-假-UTP	--	U	否
6-叠氮基-假-UTP	--	U	否
6-溴-假-UTP	--	U	否
6-丁基-假-UTP	--	U	否
6-氯-假-UTP	--	U	否
6-氰基-假-UTP	--	U	否
6-二甲基氨基-假-UTP	--	U	否
6-乙氧基-假-UTP	--	U	否
6-乙基羧酸酯-假-UTP	--	U	否
6-乙基-假-UTP	--	U	否
6-氟-假-UTP	--	U	否
6-甲酰基-假-UTP	--	U	否
6-羟基氨基-假-UTP	--	U	否
6-羟基-假-UTP	--	U	否
6-碘-假-UTP	--	U	否
6-异丙基-假-UTP	--	U	否
6-甲氧基-假-UTP	--	U	否
6-甲基氨基-假-UTP	--	U	否

[0228]

6-甲基-假-UTP	--	U	否
6-苯基-假-UTP	--	U	否
6-苯基-假-UTP	--	U	否
6-丙基-假-UTP	--	U	否
6-叔丁基-假-UTP	--	U	否
6-三氟甲氧基-假-UTP	--	U	否
6-三氟甲基-假-UTP	--	U	否
$\alpha$ -硫代-假-UTP	--	U	否
假尿苷 1-(4-甲基苯磺酸)TP	--	U	否
假尿苷 1-(4-甲基苯甲酸)TP	--	U	否
假尿苷 TP 1-[3-(2-乙氧基)]丙酸	--	U	否
假尿苷 TP 1-[3-{2-(2-[2-(2-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸	--	U	否
假尿苷 TP 1-[3-{2-(2-[2-{2(2-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸	--	U	否
假尿苷 TP 1-[3-{2-(2-[2-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸	--	U	否
假尿苷 TP 1-[3-{2-(2-乙氧基)-乙氧基}]丙酸	--	U	否
假尿苷 TP 1-甲基膦酸	--	U	否
假尿苷 TP 1-甲基膦酸二乙基酯	--	U	否
假-UTP-N1-3-丙酸	--	U	否
假-UTP-N1-4-丁酸	--	U	否
假-UTP-N1-5-戊酸	--	U	否
假-UTP-N1-6-己酸	--	U	否
假-UTP-N1-7-庚酸	--	U	否
假-UTP-N1-甲基-对苯甲酸	--	U	否
假-UTP-N1-对苯甲酸	--	U	否
怀丁苷(Wybutosine)	YW	W	是
羟基怀丁苷	OHyW	W	是
异怀俄苷	imG2	W	是
过氧怀丁苷	o2yW	W	是
未修饰的羟基怀丁苷	OHyW*	W	是
4-去甲基怀俄苷	imG-14	W	是

[0229] 在一些实施方案中,修饰的核碱基为假尿苷( $\psi$ )、N1-甲基假尿苷( $m^1\psi$ )、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷、或2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,本发明的RNA包括一种或多种前述的修饰核碱基的组合(例如,2、3或4种前述的修饰核碱基的组合)。

[0230] 在一些实施方案中,修饰的核碱基为1-甲基-假尿苷( $m^1\psi$ )、5-甲氧基-尿苷( $m^5U$ )、5-甲基-胞苷( $m^5C$ )、假尿苷( $\psi$ )、 $\alpha$ -硫代-鸟苷、或 $\alpha$ -硫代-腺苷。在一些实施方案中,本发明的mRNA包括一种或多种前述的修饰核碱基的组合(例如,2、3或4种前述的修饰核碱基的组合)。

[0231] 在一些实施方案中, RNA包含假尿苷( $\psi$ )和5-甲基-胞苷( $m^5C$ )。在一些实施方案中, RNA包含1-甲基-假尿苷( $m^1\psi$ )。在一些实施方案中, RNA包含1-甲基-假尿苷( $m^1\psi$ )和5-甲基-胞苷( $m^5C$ )。在一些实施方案中, RNA包含2-硫代尿苷( $s^2U$ )。在一些实施方案中, RNA包含2-硫代尿苷和5-甲基-胞苷( $m^5C$ )。在一些实施方案中, RNA包含5-甲氧基-尿苷( $mo^5U$ )。在一些实施方案中, RNA包含5-甲氧基-尿苷( $mo^5U$ )和5-甲基-胞苷( $m^5C$ )。在一些实施方案中, RNA包含2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中, RNA包含2'-O-甲基尿苷和5-甲基-胞苷( $m^5C$ )。在一些实施方案中, RNA包含N6-甲基-腺苷( $m^6A$ )。在一些实施方案中, RNA包含N6-甲基-腺苷( $m^6A$ )和5-甲基-胞苷( $m^5C$ )。

[0232] 在某些实施方案中, 针对特定修饰均匀地修饰(即, 完全修饰、在整个序列中进行修饰)本发明的RNA。例如, RNA可用5-甲基-胞苷( $m^5C$ )均匀修饰, 这意味着RNA序列中的所有胞嘧啶残基均被5-甲基-胞苷( $m^5C$ )代替。类似地, 通过用诸如上文所述那些的修饰残基代替, 可以针对序列中存在的任何类型的核苷酸残基均匀地修饰本发明的RNA。

[0233] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基为修饰的胞嘧啶。具有修饰的胞嘧啶的示例性核碱基、核苷和核苷酸包括N4-乙酰基-胞苷( $ac4C$ )、5-甲基-胞苷( $m5C$ )、5-卤代-胞苷(例如, 5-碘-胞苷)、5-羟甲基-胞苷( $hm5C$ )、1-甲基-假尿苷、2-硫代-胞苷( $s2C$ )、2-硫代-5-甲基-胞苷。

[0234] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基为修饰的尿苷。具有修饰的尿苷的示例性核碱基、核苷和核苷酸包括5-氰基尿苷或4'-硫代尿苷。

[0235] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基为修饰的腺嘌呤。具有修饰的腺嘌呤的示例性核碱基、核苷和核苷酸包括7-脱氮-腺嘌呤、1-甲基-腺苷( $m1A$ )、2-甲基-腺嘌呤( $m2A$ )、N6-甲基-腺苷( $m6A$ )、以及2,6-二氨基嘌呤。

[0236] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基为修饰的鸟嘌呤。具有修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基、核苷和核苷酸包括肌苷( $I$ )、1-甲基-肌苷( $m1I$ )、怀俄苷( $imG$ )、甲基怀俄苷( $mimG$ )、7-脱氮-鸟苷、7-氰基-7-脱氮-鸟苷( $preQ0$ )、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷( $preQ1$ )、7-甲基-鸟苷( $m7G$ )、1-甲基-鸟苷( $m1G$ )、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷。

[0237] 在一个实施方案中, 本发明的多核苷酸, 诸如IVT多核苷酸, 可具有所有或任何相同核苷酸类型的均匀化学修饰, 或仅通过向下滴定所有或任何相同的核苷酸类型中的相同的起始修饰而产生的修饰群, 或任何相同核苷酸类型的化学修饰的测量百分比, 但具有随机掺入, 诸如其中所有尿苷被尿苷类似物(例如, 假尿苷)代替。在另一个实施方案中, 多核苷酸在整个多核苷酸中可具有两种、三种或四种相同核苷酸类型的均匀化学修饰(诸如所有尿苷和所有胞嘧啶等等以相同方式修饰)。当本发明的多核苷酸经过化学和/或结构修饰时, 所述多核苷酸可被称为“修饰的多核苷酸”。

[0238] 一般而言, 编码目标多肽的IVT多核苷酸(例如, IVT RNA)的长度大于约30个核苷酸的长度(例如, 至少或大于约35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500和3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000或最多至且包括100,000个核苷酸)。

[0239] 在一些实施方案中, IVT多核苷酸(例如, IVT RNA)包括约30至约100,000个核苷酸

(例如,30至50、30至100、30至250、30至500、30至1,000、30至1,500、30至3,000、30至5,000、30至7,000、30至10,000、30至25,000、30至50,000、30至70,000、100至250、100至500、100至1,000、100至1,500、100至3,000、100至5,000、100至7,000、100至10,000、100至25,000、100至50,000、100至70,000、100至100,000、500至1,000、500至1,500、500至2,000、500至3,000、500至5,000、500至7,000、500至10,000、500至25,000、500至50,000、500至70,000、500至100,000、1,000至1,500、1,000至2,000、1,000至3,000、1,000至5,000、1,000至7,000、1,000至10,000、1,000至25,000、1,000至50,000、1,000至70,000、1,000至100,000、1,500至3,000、1,500至5,000、1,500至7,000、1,500至10,000、1,500至25,000、1,500至50,000、1,500至70,000、1,500至100,000、2,000至3,000、2,000至5,000、2,000至7,000、2,000至10,000、2,000至25,000、2,000至50,000、2,000至70,000、以及2,000至100,000)。

[0240] 在一些实施方案中,如本文所述的核酸为嵌合多核苷酸。嵌合多核苷酸或RNA构建体维持类似于IVT多核苷酸的模块组织,但嵌合多核苷酸包含一种或多种结构和/或化学修饰或改变,其赋予多核苷酸有用的特性。因此,作为本发明的修饰RNA分子的嵌合多核苷酸被称为“嵌合的修饰RNA”或“嵌合RNA”。嵌合多核苷酸具有在大小和/或化学修饰模式、化学修饰位置、化学修饰百分比或化学修饰群以及前述的组合上不同的部分或区域。

#### [0241] 目标多肽

[0242] 在本发明的一些实施方案中,是以下各项中的一种或多种:mRNA、修饰的mRNA、未修饰的RNA、lncRNA、自我复制RNA、环状RNA、CRISPR向导RNA等。在实施方案中,RNA为编码多肽的RNA,诸如mRNA或自我复制RNA。

[0243] 在本发明的示例性方面,高纯度的RNA组合物用于产生目标多肽,例如治疗性蛋白质、疫苗抗原等。在一些实施方案中,核酸是治疗性RNA。如本文所用,术语“治疗性mRNA”是指编码治疗性蛋白质的mRNA。治疗性蛋白质介导宿主细胞或受试者中的多种效应,以便治疗疾病或改善疾病的征候和症状。例如,治疗性蛋白质可以代替缺乏或异常的蛋白质,增强内源蛋白质的功能,为细胞提供新功能(例如,抑制或激活内源细胞活性,或用作另一种治疗性化合物(例如,抗体-药物缀合物)的递送剂。治疗性mRNA可用于治疗以下疾病和病状:细菌感染、病毒感染、寄生虫感染、细胞增殖病症、遗传病症、以及自身免疫病症。

[0244] 因此,本发明的多核苷酸可用作治疗剂或预防剂。它们被提供用于医学。例如,本文所述的RNA可以施用于受试者,其中多核苷酸在体内翻译以产生治疗性肽。提供了用于诊断、治疗或预防人和其他哺乳动物的疾病或病状的组合物、方法、试剂盒以及试剂。本发明的活性治疗剂包括多核苷酸、含有多核苷酸的细胞或由多核苷酸翻译的多肽。

[0245] 可诱导多核苷酸在细胞、组织或生物体中翻译。这种翻译可以在体内、离体、在培养物中或在体外。使细胞、组织或生物体与有效量的包含含有RNA多核苷酸的多核苷酸的组合物接触。

[0246] “有效量”的多核苷酸至少部分地基于靶组织、靶细胞类型、施用方式、多核苷酸和多核苷酸的其他组分的物理特征(例如,大小、修饰核苷酸的程度)、以及其他决定因素提供。一般而言,有效量的多核苷酸在细胞中提供诱导或增强的肽产生,优选地比含有编码相同肽的对应的未修饰多核苷酸的组合物更有效。增加的肽产生可通过增加的细胞转染、多核苷酸的增加的蛋白质翻译、减少的核酸降解(如例如通过修饰的多核苷酸的蛋白质翻译的持续时间增加所证明的)或宿主细胞中改变的肽产生来证明。

[0247] 本发明的RNA可被设计成编码选自几种靶类别中的任一种的目标多肽,包括但不限于生物制剂、抗体、疫苗、治疗性蛋白质或肽、细胞穿透肽、分泌蛋白、质膜蛋白、细胞质或细胞骨架蛋白、细胞内膜结合蛋白、核蛋白、与人疾病相关联的蛋白质、靶向部分或由人基因组编码的尚未鉴定出其治疗适应症,但仍然在研究和发现领域具有实用性的那些蛋白质。“治疗性蛋白质”是指当施用于细胞时具有治疗、诊断、和/或预防效果和/或引起期望的生物学和/或药理学作用的蛋白质。

[0248] 本文公开的RNA可编码一种或多种生物制剂。如本文所用,“生物制剂”是通过本文提供的方法产生的基于多肽的分子并且可用于治疗、治愈、减轻、预防或诊断严重或危及生命的疾病或医学病状。根据本发明的生物制剂包括但不限于过敏原提取物(例如用于过敏注射和测试)、血液组分、基因疗法产品、用于移植的人组织或细胞产品、疫苗、单克隆抗体、细胞因子、生长因子、酶、溶栓剂、以及免疫调节剂等。

[0249] 根据本发明,目前市售或开发的一种或多种生物制剂可由本发明的RNA编码。不受理论的束缚,据信将已知生物制剂的编码多核苷酸掺入本发明的RNA中将导致改善的治疗功效,这至少部分是由于构建体设计的特异性、纯度和/或选择性。

[0250] 本文公开的RNA可编码一种或多种抗体或其片段。术语“抗体”包括单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、以及单链分子)、以及抗体片段。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文与“抗体”可互换使用。如本文所用,术语“单克隆抗体”是指获自大致均匀抗体群的抗体,即构成所述群的个别抗体是相同的,除了可少量存在的可能的天然存在突变和/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化)。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。

[0251] 本文的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的对应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的对应序列相同或同源,以及所述抗体的片段,只要其表现出期望的生物活性即可。本文感兴趣的嵌合抗体包括但不限于包含源于非人灵长类动物(例如旧大陆猴(Old World Monkey)、猿等)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0252] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,优选为完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体;线性抗体;纳米抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0253] 五类免疫球蛋白IgA、IgD、IgE、IgG和IgM中的任一种都可由本发明的RNA编码,包括分别被称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 的重链。还包括的是编码子类 $\gamma$ 和 $\mu$ 的多核苷酸序列。因此,抗体的任何子类可部分或整体编码,并包括以下子类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。根据本发明,目前市售或开发的一种或多种抗体或片段可由本发明的RNA编码。

[0254] 在本发明的RNA中编码的抗体可用于治疗许多治疗领域中的病状或疾病,诸如但不限于血液、心血管、CNS、中毒(包括抗蛇毒血清)、皮肤病学、内分泌学、胃肠道、医学成像、肌肉骨骼、肿瘤学、免疫学、呼吸、感觉和抗感染。

[0255] 在一个实施方案中,本文公开的RNA可编码单克隆抗体和/或其变体。抗体的变体还可包括但不限于取代变体、保守氨基酸取代、插入变体、缺失变体和/或共价衍生物。在一个实施方案中,本文公开的RNA可编码免疫球蛋白Fc区。在另一个实施方案中, RNA可编码变

体免疫球蛋白Fc区。

[0256] 本文公开的mRNA可编码一种或多种疫苗抗原。如本文所用,“疫苗抗原”是提高对特定疾病或感染剂的免疫力的生物制剂。根据本发明,目前市售或开发的一种或多种疫苗抗原可由本发明的RNA编码。

[0257] 在本发明的RNA中编码的疫苗抗原可用于治疗许多治疗领域中的病状或疾病,诸如但不限于癌症、过敏症和传染病。在一些实施方案中,癌症疫苗可以是多联体或编码肽表位的单独RNA或其组合形式的个性化癌症疫苗。

[0258] 本发明的RNA可被设计成编码一种或多种抗微生物肽(AMP)或抗病毒肽(AVP)。已经从广泛多种动物中分离和描述了AMP和AVP,诸如但不限于微生物、无脊椎动物、植物、两栖动物、鸟、鱼以及哺乳动物。本文所述的抗微生物多肽可通过一种或多种有包膜病毒(例如,HIV、HCV)阻断细胞融合和/或病毒进入。例如,抗微生物多肽可包含与一个区域相对应的合成肽或由其组成,所述区域例如,病毒包膜蛋白(例如,HIV-1gp120或gp41)的跨膜亚基的至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个氨基酸的连续序列。HIV-1gp120或gp41的氨基酸和核苷酸序列描述于例如Kuiken等人,(2008)“HIV Sequence Compendium,”洛斯阿拉莫斯国家实验室(Los Alamos National Laboratory)。

[0259] 在一些实施方案中,抗微生物多肽可与对应的病毒蛋白质序列具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、100%的序列同源性。在一些实施方案中,抗微生物多肽可与对应的病毒蛋白质序列具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、或100%的序列同源性。

[0260] 在其他实施方案中,抗微生物多肽可包含与一个区域相对应的合成肽或由其组成,所述区域例如,衣壳结合蛋白的结合结构域的至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、或60个氨基酸的连续序列。在一些实施方案中,抗微生物多肽可与衣壳结合蛋白的对应序列具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、或100%的序列同源性。

[0261] 本文所述的抗微生物多肽可阻断蛋白酶二聚化并抑制病毒前蛋白切割(例如,HIV Gag-pol加工)成功能蛋白,从而防止一种或多种有包膜病毒(例如,HIV、HCV)的释放。在一些实施方案中,抗微生物多肽可与对应的病毒蛋白质序列具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、100%的序列同源性。

[0262] 在其他实施方案中,抗微生物多肽可包含与一个区域相对应的合成肽或由其组成,所述区域例如,蛋白酶结合蛋白的结合结构域的至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、或60个氨基酸的连续序列。在一些实施方案中,抗微生物多肽可与蛋白酶结合蛋白的对应序列具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、100%的序列同源性。

[0263] RNA疫苗抗原或抗微生物肽可治疗的传染病的非限制性列表呈现如下:人免疫缺陷病毒(HIV),HIV导致分枝杆菌感染、AIDS相关的恶病质、AIDS相关的巨细胞病毒感染、HIV相关肾病、脂肪营养不良、AID相关的隐球菌性脑膜炎、AIDS相关的中性粒细胞减少症、耶氏肺孢子菌(*Pneumocystis jiroveci*) (卡氏肺孢子菌(*Pneumocystis carinii*))感染、AID相关的弓形虫病、甲型、乙型、丙型、丁型或戊型肝炎、疱疹、带状疱疹(水痘)、德国麻疹(风疹病毒)、黄热病、登革热等(黄病毒)、流感(流感病毒)、出血性传染病(马尔堡或埃博拉病毒)、细菌性传染病诸如军团病(军团菌)、胃溃疡(螺杆菌)、霍乱(弧菌)、大肠杆菌感染、葡萄球菌感染、沙门氏菌感染或链球菌感染、破伤风(破伤风梭菌(*Clostridium tetani*))、原生动物传染病(疟疾、昏睡病、利什曼病、弓形虫病,即由疟原虫、锥体虫、利什曼原虫和弓形

虫引起的感染)、白喉、麻风病、麻疹、百日咳、狂犬病、破伤风、肺结核、伤寒、水痘、腹泻感染诸如阿米巴病、艰难梭菌相关的腹泻(CDAD)、隐孢子虫病、贾第鞭毛虫病、环孢子虫病和轮状病毒性肠胃炎、脑炎诸如日本脑炎、西方马脑炎和蜱传脑炎(TBE)、真菌性皮肤病诸如念珠菌病、甲真菌病、头癣(*Tinea capitis/scal ringworm*)、体癣(*Tinea corporis/body ringworm*)、股癣(*Tinea cruris/jock itch*)、孢子丝菌病和脚癣/运动员脚(*Athlete's foot*)、脑膜炎诸如b型流感嗜血杆菌(Hib)、脑膜炎、病毒性脑膜炎球菌感染和肺炎球菌感染、被忽视热带病诸如阿根廷出血热、利什曼病、线虫/蛔虫感染、罗斯河病毒感染和西尼罗河病毒(WNV)疾病、非HIV STD诸如滴虫病、人乳头瘤病毒(HPV)感染、性传播的衣原体疾病、软性下疳和梅毒、非脓毒性细菌感染诸如蜂窝组织炎、莱姆病、MRSA感染、假单胞菌、葡萄球菌感染、南欧斑疹热、钩端螺旋体病、风湿热、肉毒杆菌中毒、立克次体病和乳突炎、寄生虫感染诸如囊虫病、包虫病、吸虫(*Trematode/Fluke*)感染、旋毛虫病、巴贝西虫病、皮下蝇蛆病(*Hypodermiiasis*)、裂头绦虫病和锥虫病、呼吸道感染(诸如腺病毒感染、曲霉菌感染、禽(H5N1)流感、流感、RSV感染、严重急性呼吸综合征(SARS)、肺炎、军团病、球孢子菌病和猪(H1N1)流感)、败血症(诸如菌血症、败血症/败血性休克、早产儿败血症)、尿道感染(诸如阴道感染(细菌)、阴道感染(真菌)和淋球菌感染)、病毒性皮肤病(诸如B19细小病毒感染、疣、生殖器疱疹、口面部疱疹、带状疱疹、内耳感染、胎儿巨细胞病毒综合征)、食源性疾病(诸如布鲁氏菌病(布鲁氏菌属物种)、产气荚膜梭菌( $\epsilon$ 毒素)、大肠杆菌O157:H7(大肠杆菌)、沙门氏菌病(沙门氏菌属物种)、志贺氏菌病(志贺氏菌属)、弧菌病和李斯特菌病)、生物恐怖主义和潜在流行病(诸如埃博拉出血热、拉沙热、马尔堡出血热、鼠疫、炭疽病、尼帕病毒疾病、汉坦病毒、天花、鼻疽病(鼻疽伯克霍尔德菌)、类鼻疽(类鼻疽伯克霍尔德菌)、鹦鹉热(鹦鹉热衣原体)、Q热(贝氏立克次氏体)、兔热病(土拉弗朗西斯菌)、风疹、腮腺炎以及脊髓灰质炎。

[0264] 本文公开的RNA可编码一种或多种经验证或“测试中”的治疗性蛋白质或肽。根据本发明,目前市售或开发的一种或多种治疗性蛋白质或肽可由本发明的RNA编码。在本发明的RNA中编码的治疗性蛋白质和肽可用于治疗许多治疗领域中的病状或疾病,诸如但不限于血液、心血管、CNS、中毒(包括抗蛇毒血清)、皮肤病学、内分泌学、遗传学、泌尿生殖器、胃肠道、肌肉骨骼、肿瘤学、和免疫学、呼吸、感觉和抗感染。

[0265] 本文公开的RNA可编码一种或多种细胞穿透多肽。如本文所用,“细胞穿透多肽”或CPP是指可促进分子的细胞摄取的多肽。本发明的细胞穿透多肽可含有一种或多种可检测标记。多肽可部分标记或整个完全标记。RNA可完全、部分或根本不编码可检测标记。细胞穿透肽还可包括信号序列。如本文所用,“信号序列”是指在蛋白质翻译期间结合在新生蛋白质的氨基末端的氨基酸残基的序列。信号序列可用于传导细胞穿透多肽的分泌的信号。

[0266] 在一个实施方案中,RNA还可编码融合蛋白。可通过将带电蛋白与治疗性蛋白质可操作地连接来产生融合蛋白。如本文所用,“可操作地连接”是指治疗性蛋白质和带电蛋白以允许在引入细胞时表达复合物的方式连接。如本文所用,“带电蛋白”是指携带正、负或总体中性电荷的蛋白质。优选地,治疗性蛋白质可在融合蛋白的形成中与带电蛋白共价连接。表面电荷与总氨基酸或表面氨基酸的比率可以为大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9。

[0267] 由RNA编码的细胞穿透多肽可在翻译后形成复合物。复合物可包含与细胞穿透多



肽连接(例如共价连接)的带电蛋白。

[0268] 在一个实施方案中,细胞穿透多肽可包含第一结构域和第二结构域。第一结构域可包含超荷电多肽。第二结构域可包含蛋白质结合配偶体。如本文所用,“蛋白质结合配偶体”包括但不限于抗体及其功能片段、支架蛋白或肽。细胞穿透多肽还可包含蛋白质结合配偶体的细胞内结合配偶体。细胞穿透多肽可以能够引入RNA的细胞中分泌。细胞穿透多肽也可以能够穿透第一细胞。

[0269] 在一个实施方案中, RNA可编码可包含蛋白质结合配偶体的细胞穿透多肽。蛋白质结合配偶体可包括但不限于抗体、超荷电抗体或功能片段。可将RNA引入其中引入了包含蛋白质结合配偶体的细胞穿透多肽的细胞中。

[0270] 人和其他真核细胞通过膜细分成许多功能不同的区室。每个膜结合区室或细胞器含有对细胞器功能必不可少的不同蛋白质。细胞使用为位于蛋白质内的氨基酸基序的“分选信号”使蛋白质靶向特定的细胞器。被称为信号序列、信号肽或前导序列的一种类型的分选信号将一类蛋白质引导至被称为内质网(ER)的细胞器。

[0271] 通过信号序列靶向ER的蛋白质可以作为分泌蛋白释放到细胞外空间中。类似地,驻留在细胞膜上的蛋白质也可以通过将蛋白质保持在膜上的“接头”的蛋白水解切割而分泌到细胞外空间中。不受理论的束缚,本发明的分子可用于开发上述细胞运输。因此,在本发明的一些实施方案中,提供了表达分泌蛋白的RNA。在一个实施方案中,这些可用于制造大量有价值的人基因产品。

[0272] 在本发明的一些实施方案中,提供了表达质膜的蛋白质的RNA。

[0273] 在本发明的一些实施方案中,提供了表达细胞质或细胞骨架蛋白的RNA。

[0274] 在本发明的一些实施方案中,提供了表达细胞内膜结合蛋白的RNA。

[0275] 在本发明的一些实施方案中,提供了表达核蛋白的RNA。

[0276] 在本发明的一些实施方案中,提供了表达与人疾病相关联的蛋白质的RNA。

[0277] RNA可具有天然或天然存在的RNA或编码天然或天然存在的肽的核苷酸序列。另选地, RNA可具有与天然或天然存在的RNA的核苷酸序列具有百分比同一性的核苷酸序列,或mRNA可具有与天然或天然存在的肽的核苷酸序列具有百分比同一性的编码肽的核苷酸序列。如本领域中已知的术语“同一性”是指两个或更多个肽的序列之间的关系,如通过比较序列所确定的。在本领域中,同一性还指肽之间的序列相关性程度,如通过两个或更多个氨基酸残基的链串之间的匹配数所确定的。同一性衡量两个或更多个序列中较小序列与空位对齐(如果有的话)之间的相同匹配的百分比,空位对齐是通过特定数学模型或计算机程序(也就是“算法”)处理的。通过已知方法可以容易地计算相关肽的同一性。此类方法包括但不限于Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第1部分, Griffin, A.M., 和Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和Devereux, J. 编, M. Stockton Press, New York, 1991; 以及Carillo等人, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988) 中描述的那些。

[0278] 因此, 在一些实施方案中, RNA编码的肽是可具有与参考多肽相同或相似活性的多

肽变体。另选地,相对于参考多肽,变体可具有改变的活性(例如,增加或降低)。一般而言,本发明的特定多核苷酸或多肽的变体将与所述特定参考多核苷酸或多肽具有至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%的序列同一性,如通过本文所述且本领域技术人员已知的序列比对程序和参数所确定的。此类比对工具包括BLAST套组的那些(Stephen F. Altschul、Thomas L. Madden、Alejandro A. **Schäffer**、Jinghui Zhang、Zheng Zhang、Webb Miller和David J. Lipman(1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)。在本文,特别是在“同一性”的定义中描述了其他工具。BLAST算法中的默认参数包括,例如,预期阈值10、字长28、匹配/不匹配分数1、-2,空位罚分线性。可以应用任何过滤器以及选择物种特异性重复序列,例如智人。

[0279] 根据本发明,多核苷酸包括用以编码一种或多种目标多肽或其片段的RNA。目标多肽可包括但不限于完整多肽、多个多肽或多肽片段。如本文所用,术语“目标多肽”是指选择在本发明的初级构建体中编码的任何多肽。如本文所用,“多肽”意指最通常通过肽键连接在一起的氨基酸残基(天然或非天然)的聚合物。如本文所用,该术语是指任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。在一些情况下,所编码的多肽小于约50个氨基酸,那么将该多肽称为肽。如果多肽是肽,那么其长度将为至少约2、3、4或至少5个氨基酸残基。因此,多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段以及前述的其他等同物、变体和类似物。多肽可以是单个分子或可以是多分子复合物,诸如二聚体、三聚体或四聚体。它们还可包含单链或多链多肽,诸如抗体或胰岛素,并且可以缔合或连接。最常见的二硫键存在于多链多肽中。术语多肽还可适用于其中一个或多个氨基酸残基为对应的天然存在氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物。

[0280] 术语“多肽变体”是指其氨基酸序列不同于天然或参考序列的分子。与天然或参考序列相比,氨基酸序列变体可在氨基酸序列内的某些位置具有取代、缺失和/或插入。通常,变体将与天然或参考序列具有至少约50%的同一性,并且优选地,它们将与天然或参考序列具有至少约80%、更优选地至少约90%的同一性。

[0281] 在一些实施方案中,提供了“变体模拟物”。如本文所用,术语“变体模拟物”是含有模拟活化序列的一个或多个氨基酸的变体模拟物。例如,谷氨酸盐可用作磷-苏氨酸和/或磷-丝氨酸的模拟物。另选地,变体模拟物可导致减活或含有模拟物的失活产物,例如,苯丙氨酸可用作酪氨酸的失活取代;或丙氨酸可用作丝氨酸的失活取代。

[0282] 本发明设想了几种基于多肽的组合物,包括变体和衍生物。这些包括取代、插入、缺失和共价变体和衍生物。术语“衍生物”与术语“变体”同义使用,但通常是指相对于参考分子或起始分子已以任何方式被修饰和/或改变的分子。

[0283] 因此,编码相对于参考序列含有取代、插入和/或添加、缺失以及共价修饰的多肽(特别是本文公开的多肽序列)的RNA包括在本发明的范围内。例如,可以将序列标签或氨基酸(诸如一种或多种赖氨酸)添加到本发明的肽序列中(例如,在N末端或C末端)。序列标签可以用于肽纯化或定位。赖氨酸可用于增加肽溶解度或允许生物素化。另选地,位于肽或蛋白质的氨基酸序列的羧基和氨基末端区域的氨基酸残基可任选地缺失,从而提供截短的序列。取决于序列的用途,例如,当作为可溶或与固体支持体连接的较大序列的一部分的序列

表达时,某些氨基酸(例如,C末端或N末端残基)可替代性地缺失。

[0284] 当提及多肽时,“取代变体”是在天然或起始序列中除去至少一个氨基酸残基且在相同位置在其位置中插入不同氨基酸的那些。取代可以是单个,其中分子中只有一个氨基酸被取代,或它们可以是多个,其中两个或更多个氨基酸在同一分子中被取代。

[0285] 如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是指用相似大小、电荷或极性的不同氨基酸取代通常存在于序列中的氨基酸。保守取代的实例包括非极性(疏水性)残基诸如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸对另一种非极性残基的取代。同样地,保守取代的实例包括一种极性(亲水性)残基对另一种的取代,诸如在精氨酸与赖氨酸之间、谷氨酰胺与天冬酰胺之间、以及甘氨酸与丝氨酸之间。另外,碱性残基诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸对另一种的取代,或一种酸性残基诸如天冬氨酸或谷氨酸对另一种酸性残基的取代是保守取代的另外的实例。非保守取代的实例包括非极性(疏水性)氨基酸残基诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸对极性(亲水性)残基诸如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸的取代和/或极性残基对非极性残基的取代。

[0286] 当提及多肽时,“插入变体”是具有紧邻天然或起始序列的特定位置处的氨基酸插入的一个或多个氨基酸的那些。“紧邻”氨基酸意指与氨基酸的 $\alpha$ -羧基或 $\alpha$ -氨基官能团连接。

[0287] 当提及多肽时,“缺失变体”是除去了天然或起始氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的那些。通常,缺失变体将在分子的特定区域中缺失一个或多个氨基酸。

[0288] 当提及多肽时,“共价衍生物”包括用有机蛋白质或非蛋白质衍生剂修饰天然或起始蛋白质、和/或翻译后修饰。传统上通过使蛋白质的靶向氨基酸残基与能够与选定侧链或末端残基反应的有机生化试剂反应,或通过利用在选定重组宿主细胞中起作用的翻译后修饰的机制来引入共价修饰。所得的共价衍生物可用于旨在鉴定对于生物活性、对于免疫测定或对于制备用于重组糖蛋白的免疫亲和纯化的抗蛋白质抗体来说重要的残基的程序中。此类修饰在本领域普通技术的范围内并且在无过度实验的情况下进行。

[0289] 某些翻译后修饰是重组宿主细胞对所表达多肽的作用的结果。谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基常常在翻译后脱酰氨基得到对应的谷氨酰胺基和天冬酰胺基残基。另选地,这些残基在温和酸性条件下脱酰氨基。这些残基的任一形式可存在于根据本发明产生的多肽中。

[0290] 其他翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酸基或苏氨酸基残基的羟基基团的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基基团的甲基化(T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86页(1983))。

[0291] 如本文所用,当提及多肽时,术语“结构域”是指具有一种或多种可鉴定的结构或功能特征或性质(例如,结合能力、用作蛋白质-蛋白质相互作用的位点)的多肽的基序。

[0292] 如本文所用,当提及多肽时,术语“位点”在其涉及基于氨基酸的实施方案时与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义地使用。位点表示肽或多肽内的可在本发明的基于多肽的分子内修饰、操纵、改变、衍生化或变化的位置。

[0293] 如本文所用,当提及多肽时,术语“末端(termini)”或“末端(terminus)”是指肽或多肽的末尾。这种末尾不仅仅限于肽或多肽的第一或最后位点,而且可包括末端区域中的

另外氨基酸。本发明的基于多肽的分子可被表征为具有N末端(由具有自由氨基基团(NH<sub>2</sub>)的氨基酸封端)和C末端(由具有自由羧基基团(COOH)的氨基酸封端)两者。本发明的蛋白质在一些情况下由通过二硫键或通过非共价力(多聚体、低聚物)集合在一起的多个多肽链组成。这些种类的蛋白质将具有多个N末端和C末端。另选地,可修饰多肽的末端,以使它们根据情况可以基于非多肽的部分(诸如有机缀合物)开始或结束。

[0294] 一旦任何特征已被鉴定或定义为待由本发明的RNA编码的多肽的期望组分,就可通过移动、交换、反转、缺失、随机化或复制来进行这些特征的若干操纵和/或修饰中的任一种。此外,应理解,特征的操纵可导致与对本发明分子的修饰相同的结果。例如,涉及使结构域缺失的操纵将导致正如修饰核酸以编码小于全长分子将产生的那样的分子长度的改变。

[0295] 修饰和操纵可通过本领域已知的方法实现,诸如但不限于定点诱变。然后可使用体外或体内测定(诸如本文描述的那些)或本领域中已知的任何其他合适的筛选测定来测试所得修饰分子的活性。

[0296] 制剂/药物组合物

[0297] 本发明提供任选地与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合的多核苷酸及其药物组合物。药物组合物可任选地包含一种或多种另外的活性物质,例如治疗和/或预防活性物质。本发明的药物组合物可以是无菌和/或无热原的。在配制和/或制造药剂方面的一般考虑因素可见于,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy第21版, Lippincott Williams&Wilkins, 2005(通过引用整体并入本文)。

[0298] 在一些实施方案中,向人,即人患者或受试者施用组合物。出于本公开的目的,短语“活性成分”通常是指多核苷酸,例如待如本文所描述递送的编码多核苷酸的mRNA。

[0299] 本文所述的药物组合物的制剂可通过药理学领域已知或以后开发的任何方法制备。通常,此类制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分缔合,并且然后如果必要和/或希望,使产品划分、成形和/或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0300] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂、和/或任何另外成分的相对量将取决于所治疗的受试者的身份、尺寸和/或病状并且进一步取决于待施用组合物的途径而改变。举例来说,组合物可包含在0.1%与100%之间,例如在0.5%与50%之间、1%至30%之间、5%与80%之间、至少80% (w/w)的活性成分。

[0301] 本发明的多核苷酸可以使用一种或多种赋形剂配制以便:(1)增加稳定性;(2)增加细胞转染;(3)允许(例如,从贮库制剂)持续或延迟释放;(4)改变生物分布(例如,靶向特定组织或细胞类型);(5)增加体内编码的蛋白质的翻译;和/或(6)改变体内编码的蛋白质的释放谱。除了传统赋形剂诸如任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂、或其他液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂之外,本发明的赋形剂可包括但不限于类脂质(lipidoid)、脂质体、脂质纳米颗粒、聚合物、脂质复合物、核-壳纳米颗粒、肽、蛋白质、用多核苷酸转染的细胞、透明质酸酶、纳米颗粒模拟物以及其组合。

[0302] 在一些实施方案中,可以使用一种或多种脂质体、脂质复合物、或脂质纳米颗粒配制本发明的核酸分子。在一个实施方案中,核酸分子的药物组合物包括脂质纳米颗粒(LNP)。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒是基于MC3的脂质纳米颗粒。

[0303] 在一个实施方案中,多核苷酸可配制在脂质-聚阳离子复合物中。脂质-聚阳离子

复合物的形成可通过本领域已知的方法完成。作为非限制性实例,聚阳离子可包括阳离子肽或多肽,诸如但不限于聚赖氨酸、聚鸟氨酸和/或聚精氨酸。在另一个实施方案中,多核苷酸可配制在脂质-聚阳离子复合物中,所述脂质-聚阳离子复合物还可包括非阳离子脂质,诸如但不限于胆固醇或二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0304] 脂质体制剂可受(但不限于)以下因素影响:阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和度和PEG化的性质、所有组分的比率以及生物物理参数诸如大小。在Semple等人(Semple等人Nature Biotech.2010 28:172-176;以引用方式整体并入本文)的一个实例中,脂质体制剂由57.1%阳离子脂质、7.1%二棕榈酰磷脂酰胆碱、34.3%胆固醇以及1.4%PEG-c-DMA组成。作为另一个实例,改变阳离子脂质的组成可更有效地将siRNA递送至各种抗原呈递细胞(Basha等人Mol Ther.2011 19:2186-2200;其以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,脂质体制剂可包含约35%至约45%的阳离子脂质、约40%至约50%的阳离子脂质、约50%至约60%的阳离子脂质和/或约55%至约65%的阳离子脂质。在一些实施方案中,脂质体中脂质与RNA的比率可为约5:1至约20:1、约10:1至约25:1、约15:1至约30:1和/或至少30:1。

[0305] 在一些实施方案中,可增加或减小脂质纳米颗粒(LNP)制剂中的PEG比率和/或可将PEG脂质的碳链长度从C14修改至C18以改变LNP制剂的药物代谢动力学和/或生物分布。作为非限制性实例,LNP制剂可相比于阳离子脂质、DSPC和胆固醇含有约0.5%至约3.0%、约1.0%至约3.5%、约1.5%至约4.0%、约2.0%至约4.5%、约2.5%至约5.0%和/或约3.0%至约6.0%的PEG-c-DMG(R-3-[( $\omega$ -甲氧基-聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基])-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺)(在本文还称为PEG-DMG)的脂质摩尔比。在另一个实施方案中,PEG-c-DMG可被PEG脂质代替,所述PEG脂质诸如但不限于PEG-DSG(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油、甲氧基聚乙二醇)、PEG-DMG(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油)和/或PEG-DPG(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油、甲氧基聚乙二醇)。阳离子脂质可选自本领域已知的任何脂质,诸如但不限于DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200和DLin-KC2-DMA。

[0306] 在一个实施方案中,将多核苷酸配制在可包含至少一种脂质的纳米颗粒中。脂质可选自但不限于DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、聚乙二醇化脂质以及氨基醇脂质。在另一方面,脂质可以是阳离子脂质,诸如但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA以及氨基醇脂质。氨基醇阳离子脂质可以是在美国专利公布号US20130150625中描述的和/或通过所述专利中描述的方法制备的脂质,所述专利以引用方式整体并入本文。作为非限制性实例,阳离子脂质可以是2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]-2-{[(9Z,2Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US20130150625中的化合物1);2-氨基-3-[(9Z)-十八碳-9-烯-1-基氧基]-2-{[(9Z)-十八碳-9-烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US20130150625中的化合物2);2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[(辛基氧基)甲基]丙-1-醇(US20130150625中的化合物3);以及2-(二甲基氨基)-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]-2-{[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US20130150625中的化合物4);或其任何药学上可接受的盐或立体异构体。

[0307] 脂质纳米颗粒制剂通常包含脂质,具体地讲,可电离的阳离子脂质,例如2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基

丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、或9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319),并且还包含中性脂质、固醇以及能够减少颗粒聚集的分子,例如PEG或PEG修饰的脂质。

[0308] 在一个实施方案中,脂质纳米颗粒制剂基本上由以下各项组成:(i)至少一种选自由以下各项组成的组的脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);(ii)选自DSPC、DPPC、POPC、DOPE和SM的中性脂质;(iii)固醇,例如胆固醇;以及(iv)PEG-脂质,例如,PEG-DMG或PEG-cDMA,处于约20-60%阳离子脂质:5%-25%中性脂质:25-55%固醇:0.5-15%PEG-脂质的摩尔比。

[0309] 在一个实施方案中,制剂包括按摩尔计约25%至约75%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319),例如按摩尔计约35%至约65%、约45%至约65%、约60%、约57.5%、约50%或约40%。

[0310] 在一个实施方案中,制剂包括按摩尔计约0.5%至约15%的中性脂质,例如按摩尔计约3%至约12%、约5%至约10%或约15%、约10%、或约7.5%。示例性中性脂质包括但不限于DSPC、POPC、DPPC、DOPE和SM。在一个实施方案中,制剂包括按摩尔计约5%至约50%的固醇(例如,按摩尔计约15%至约45%、约20%至约40%、约40%、约38.5%、约35%、或约31%。示例性固醇为胆固醇。在一个实施方案中,制剂包括按摩尔计约0.5%至约20%的PEG或PEG修饰的脂质(例如,按摩尔计约0.5%至约10%、约0.5%至约5%、约1.5%、约0.5%、约1.5%、约3.5%、或约5%。在一个实施方案中,PEG或PEG修饰的脂质包含平均分子量为2,000Da的PEG分子。在其他实施方案中,PEG或PEG修饰的脂质包含平均分子量小于2,000,例如约1,500Da、约1,000Da、或约500Da的PEG分子。示例性PEG修饰的脂质包括但不限于PEG-二硬脂酰甘油(PEG-DMG)(在本文也称为PEG-C14或C14-PEG)、PEG-cDMA。

[0311] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计25-75%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);0.5-15%的中性脂质;5-50%的固醇;以及0.5-20%的PEG或PEG修饰的脂质。

[0312] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计35-65%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);3-12%的中性脂质;15-45%的固醇;以及0.5-10%的PEG或PEG修饰的脂质。

[0313] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计45-65%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);5-10%的中性脂质;25-40%的固醇;以及0.5-10%的PEG

或PEG修饰的脂质。

[0314] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计约60%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);约7.5%的中性脂质;约31%的固醇;以及约1.5%的PEG或PEG修饰的脂质。

[0315] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计约50%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);约10%的中性脂质;约38.5%的固醇;以及约1.5%的PEG或PEG修饰的脂质。

[0316] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计约50%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);约10%的中性脂质;约35%的固醇;约4.5%或约5%的PEG或PEG修饰的脂质;以及约0.5%的靶向脂质。

[0317] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计约40%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);约15%的中性脂质;约40%的固醇;以及约5%的PEG或PEG修饰的脂质。

[0318] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计约57.2%的选自以下各项的阳离子脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);约7.1%的中性脂质;约34.3%的固醇;以及约1.4%的PEG或PEG修饰的脂质。

[0319] 在一个实施方案中,本发明的制剂包括按摩尔计约57.5%的选自为PEG-cDMA的PEG脂质的阳离子脂质(PEG-cDMA在Reyes等人(J.Controlled Release,107,276-287(2005)中进一步论述,其内容以引用方式整体并入本文)、约7.5%的中性脂质、约31.5%的固醇、以及约3.5%的PEG或PEG修饰的脂质。

[0320] 在优选的实施方案中,脂质纳米颗粒制剂基本上由处于约20-70%阳离子脂质:5-45%中性脂质:20-55%胆固醇:0.5-15%PEG修饰的脂质的摩尔比;更优选地处于约20-60%阳离子脂质:5-25%中性脂质:25-55%胆固醇:0.5-15%PEG修饰的脂质的摩尔比的脂质混合物组成。

[0321] 在特定实施方案中,摩尔脂质比率为大约50/10/38.5/1.5(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如,DSPC/Chol/PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG、PEG-DSG或PEG-DPG)、57.2/7.1134.3/1.4(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如,DPPC/Chol/PEG修饰的脂质,例如PEG-cDMA)、40/15/40/5(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如,DSPC/Chol/PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG)、50/10/35/4.5/0.5(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如,DSPC/Chol/PEG修饰的脂

质,例如PEG-DSG)、50/10/35/5(阳离子脂质/中性脂质,例如,DSPC/Chol/PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG)、40/10/40/10(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如, DSPC/Chol/PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)、35/15/40/10(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如, DSPC/Chol/PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)或52/13/30/5(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如, DSPC/Chol/PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)。

[0322] 示例性的脂质纳米颗粒组合物及其制备方法描述于例如Semple等人(2010) Nat.Biotechnol.28:172-176; Jayarama等人(2012), Angew.Chem.Int.Ed., 51:8529-8533; 以及Maier等人(2013) Molecular Therapy 21,1570-1578(其各自的内容以引用方式整体并入本文)。

[0323] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米颗粒制剂可包含阳离子脂质、PEG脂质和结构脂质并任选地包含非阳离子脂质。作为非限制性实例,脂质纳米颗粒可包含约40-60%的阳离子脂质、约5-15%的非阳离子脂质、约1-2%的PEG脂质以及约30-50%的结构脂质。作为另一个非限制性实例,脂质纳米颗粒可包含约50%的阳离子脂质、约10%的非阳离子脂质、约1.5%的PEG脂质以及约38.5%的结构脂质。作为另一个非限制性实例,脂质纳米颗粒可包含约55%的阳离子脂质、约10%的非阳离子脂质、约2.5%的PEG脂质以及约32.5%的结构脂质。在一个实施方案中,阳离子脂质可以是本文所述的任何阳离子脂质,诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA和L319。

[0324] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米颗粒制剂可以是4组分脂质纳米颗粒。脂质纳米颗粒可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构脂质。作为非限制性实例,脂质纳米颗粒可包含约40-60%的阳离子脂质、约5-15%的非阳离子脂质、约1-2%的PEG脂质以及约30-50%的结构脂质。作为另一个非限制性实例,脂质纳米颗粒可包含约50%的阳离子脂质、约10%的非阳离子脂质、约1.5%的PEG脂质以及约38.5%的结构脂质。作为另一个非限制性实例,脂质纳米颗粒可包含约55%的阳离子脂质、约10%的非阳离子脂质、约2.5%的PEG脂质以及约32.5%的结构脂质。在一个实施方案中,阳离子脂质可以是本文所述的任何阳离子脂质,诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA和L319。

[0325] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米颗粒制剂可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构脂质。作为非限制性实例,脂质纳米颗粒包含约50%的阳离子脂质DLin-KC2-DMA、约10%的非阳离子脂质DSPC、约1.5%的PEG脂质PEG-DOMG和约38.5%的结构脂质胆固醇。作为非限制性实例,脂质纳米颗粒包含约50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA、约10%的非阳离子脂质DSPC、约1.5%的PEG脂质PEG-DOMG和约38.5%的结构脂质胆固醇。作为非限制性实例,脂质纳米颗粒包含约50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA、约10%的非阳离子脂质DSPC、约1.5%的PEG脂质PEG-DMG和约38.5%的结构脂质胆固醇。作为另一个非限制性实例,脂质纳米颗粒包含约55%的阳离子脂质L319、约10%的非阳离子脂质DSPC、约2.5%的PEG脂质PEG-DMG和约32.5%的结构脂质胆固醇。

[0326] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸可配制在直径为约10至约100nm,诸如但不限于约10至约20nm、约10至约30nm、约10至约40nm、约10至约50nm、约10至约60nm、约10至约70nm、约10至约80nm、约10至约90nm、约20至约30nm、约20至约40nm、约20至约50nm、约20至约60nm、约20至约70nm、约20至约80nm、约20至约90nm、约20至约100nm、约30至约40nm、约30至约50nm、约30至约60nm、约30至约70nm、约30至约80nm、约30至约90nm、约30至约100nm、约



40至约50nm、约40至约60nm、约40至约70nm、约40至约80nm、约40至约90nm、约40至约100nm、约50至约60nm、约50至约70nm、约50至约80nm、约50至约90nm、约50至约100nm、约60至约70nm、约60至约80nm、约60至约90nm、约60至约100nm、约70至约80nm、约70至约90nm、约70至约100nm、约80至约90nm、约80至约100nm和/或约90至约100nm的脂质纳米颗粒中。

[0327] 在一个实施方案中,脂质纳米颗粒可具有约10至500nm的直径。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒的直径可大于100nm、大于150nm、大于200nm、大于250nm、大于300nm、大于350nm、大于400nm、大于450nm、大于500nm、大于550nm、大于600nm、大于650nm、大于700nm、大于750nm、大于800nm、大于850nm、大于900nm、大于950nm或大于1000nm。在一些实施方案中,阳离子脂质纳米颗粒具有50-150nm的平均直径。在一些实施方案中,阳离子脂质纳米颗粒具有80-100nm的平均直径。

[0328] 根据本公开的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂、和/或任何另外成分的相对量可取决于所治疗的受试者的身份、尺寸和/或病状并且进一步取决于待施用组合物的途径而改变。例如,组合物可包含在0.1%与99% (w/w) 之间的活性成分。举例来说,组合物可包含在0.1%与100%之间,例如在.5%与50%之间、1%至30%之间、5%与80%之间、至少80% (w/w) 的活性成分。

[0329] 在一个实施方案中,含有本文所述的多核苷酸的组合物配制在包含MC3、胆固醇、DSPC和PEG2000-DMG、柠檬酸三钠缓冲液、蔗糖和注射用水的脂质纳米颗粒中。作为非限制性实例,组合物包含:2.0mg/mL药物物质、21.8mg/mL的MC3、10.1mg/mL胆固醇、5.4mg/mL的DSPC、2.7mg/mL的PEG2000-DMG、5.16mg/mL柠檬酸三钠、71mg/mL蔗糖以及约1.0mL注射用水。

[0330] 本发明的多核苷酸可通过产生治疗有效结果的任何途径施用。本发明提供了包括将根据本发明的多核苷酸施用于有需要的受试者的方法。根据受试者的种类、年龄和一般状况、疾病的严重程度、特定组合物、其施用模式、其作用模式等,所需的精确量将在受试者之间变化。根据本发明的组合物通常配制成便于施用和剂量均匀的剂量单位形式。然而,应当理解,本发明的组合物的总每日用量可由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何具体患者的具体治疗有效、预防有效、或适当成像的剂量水平将取决于多种因素,所述因素包括所治疗的病症和病症的严重程度;所采用的具体化合物的活性;所采用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所采用的具体化合物的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗持续时间;与所采用的具体化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域中熟知的类似因素。

[0331] 在某些实施方案中,根据本发明的组合物可以足以递送每天约0.0001mg/kg至约100mg/kg、约0.001mg/kg至约0.05mg/kg、约0.005mg/kg至约0.05mg/kg、约0.001mg/kg至约0.005mg/kg、约0.05mg/kg至约0.5mg/kg、约0.01mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、或约1mg/kg至约25mg/kg受试者体重的剂量水平一天一次或多次施用,以获得期望的治疗、诊断、预防或成像作用。可一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周递送期望的剂量。在某些实施方案中,可使用多次施用(例如,两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、或更多次施用)递送期望的剂量。当采用多次施用时,可使用分次给药方案,诸如本文所述的那些。

[0332] 本文所述的多核苷酸药物组合物可配制成本文所述的剂型,诸如鼻内、气管内或可注射的(例如,静脉内、眼内、玻璃体内、肌内、皮肤内、心脏内、腹膜内、以及皮下)。

[0333] 本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含任选地与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合的多核苷酸(例如,RNA分子)和多核苷酸组合物和/或复合物。

[0334] 本发明提供任选地与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合的多核苷酸(例如,RNA分子)以及相关的药物组合物和复合物。药物组合物可任选地包含一种或多种另外的活性物质,例如治疗和/或预防活性物质。本发明的药物组合物可以是无菌和/或无热原的。在配制和/或制造药剂方面的一般考虑因素可见于,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(通过引用整体并入本文)。

[0335] 在一些实施方案中,向人,即人患者或受试者施用组合物。出于本公开的目的,短语“活性成分”通常是指待如本文所描述递送的多核苷酸(例如,RNA分子)。

[0336] 虽然本文提供的药物组合物的描述主要涉及适用于向人施用的药物组合物,但是熟练的业内人士将理解此类组合物通常适用于向任何其他动物例如非人动物(例如,非人哺乳动物)施用。改变适用于向人施用的药物组合物以便使得组合物适用于向各种动物施用是众所周知的,并且普通兽医药理学家可以仅仅通过普通实验(如果需要)来设计和/或进行此种改变。所设想的向其施用药物组合物的受试者包括但不限于人和/或其他灵长类动物;哺乳动物,包括商业上相关的哺乳动物诸如牛、猪、马、绵羊、猫、犬、小鼠和/或大鼠;和/或鸟,包括商业上相关的鸟,诸如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0337] 本文所述的药物组合物的制剂可通过药理学领域已知或以后开发的任何方法制备。通常,此类制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分缔合,并且然后如果必要和/或希望,使产品划分、成形和/或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0338] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂、和/或任何另外成分的相对量将取决于所治疗的受试者的身份、尺寸和/或病状并且进一步取决于待施用组合物的途径而改变。举例来说,组合物可包含在0.1%与100%之间,例如在0.5%与50%之间、1%至30%之间、5%与80%之间、至少80%(w/w)的活性成分。

[0339] 本发明的应用并不限于以下描述中阐述的或在附图中示出的部件的构造和布置的细节。本发明支持其他实施方案并且能够以各种方式实践或执行。此外,本文所使用的措辞和术语是出于描述的目的并且不应被视为限制性的。本文中“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“涉及”及其变化形式的使用意在涵盖其后列出的项及其等同物以及附加项。

[0340] 实施例

[0341] 实施例1.多核苷酸的制造

[0342] 根据本发明,多核苷酸和或其部分或区域的制造可使用在2013年3月15日提交的标题为“Manufacturing Methods for Production of RNA Transcripts”(代理人案号M500)的W02014/152027中教导的方法实现,所述专利的内容以引用方式整体并入本文。

[0343] 纯化方法可包括国际申请W02014/152030和W02014/152031中教导的那些,所述申请各自以引用方式整体并入本文。

[0344] 多核苷酸的检测和表征方法可如W02014/144039中所教导的那样进行,所述专利

以引用方式整体并入本文。

[0345] 本公开的多核苷酸的表征可使用选自由以下各项组成的组的程序来实现：多核苷酸作图、逆转录酶测序、电荷分布分析、以及RNA杂质的检测，其中表征包括确定RNA转录物序列、确定RNA转录物的纯度、或确定RNA转录物的电荷异质性。此类方法在例如W02014/144711和W02014/144767中教导，所述专利各自的内容以引用方式整体并入本文。

[0346] 实施例2. 嵌合多核苷酸合成

[0347] 引言

[0348] 根据本发明，嵌合多核苷酸的两个区域或部分可使用三磷酸根化学物质连结或连接。

[0349] 根据这种方法，具有100个核苷酸或更少的第一区域或部分用5' 一磷酸根和末端3' desOH或封闭的OH化学合成。如果区域长于80个核苷酸，那么其可合成为用于连接的两条链。

[0350] 如果使用体外转录 (IVT) 将第一区域或部分合成为非位置修饰的区域或部分，那么可接着通过随后对3' 末端加帽来转化5' 一磷酸根。

[0351] 一磷酸根保护基团可选自本领域已知的那些中的任一种。

[0352] 嵌合多核苷酸的第二区域或部分可使用化学合成或IVT方法合成。IVT方法可包括可以利用具有修饰的帽的引物的RNA聚合酶。另选地，可化学合成最长达130个核苷酸的帽并且将其联接至IVT区域或部分。

[0353] 应注意，对于连接方法，用DNA T4连接酶连接、然后用DNA酶处理应容易地避免级联。

[0354] 整个嵌合多核苷酸不需要用磷酸根-糖主链制造。如果所述区域或部分中的一个编码多肽，那么优选的是，这一区域或部分包含磷酸根-糖主链。

[0355] 然后使用任何已知的点击化学、正点击化学、solulink、或本领域技术人员已知的其他生物缀合物化学进行连接。

[0356] 合成路线

[0357] 使用一系列起始区段制备嵌合多核苷酸。此类区段包括：

[0358] (a) 包含正常3' OH的加帽且受保护的5' 区段 (SEG.1)

[0359] (b) 5' 三磷酸根区段，其可包括多肽的编码区并且包含正常的3' OH (SEG.2)

[0360] (c) 包含虫草素或不包含3' OH的嵌合多核苷酸的3' 端 (例如，尾) 的5' 一磷酸根区段 (SEG.3)

[0361] 在合成 (化学或IVT) 后，将区段3 (SEG.3) 用虫草素处理，并且然后用焦磷酸酶处理以产生5' 一磷酸根。

[0362] 然后使用RNA连接酶将区段2 (SEG.2) 连接至SEG.3。然后将连接的多核苷酸纯化并用焦磷酸酶处理以切割二磷酸根。然后纯化经处理的SEG.2-SEG.3构建体并且将SEG.1连接至5' 末端。可进行嵌合多核苷酸的进一步纯化步骤。

[0363] 在嵌合多核苷酸编码多肽的情况下，连接的或连结的区段可表示为：5' UTR (SEG.1)、开放阅读框或ORF (SEG.2) 以及3' UTR+聚A (SEG.3)。

[0364] 每个步骤的收率可高达90-95%。

[0365] 实施例3：用于产生DNA模板的PCR

[0366] 由Kapa Biosystems (Woburn, MA) 使用2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix执行用于制备cDNA的PCR程序。该体系包括2x KAPA ReadyMix 12.5μl; 正向引物(10uM) 0.75μl; 反向引物(10uM) 0.75μl; 模板cDNA-100ng; 以及dH2O, 稀释至25.0μl。反应条件为: 95℃, 5min; 以及25个循环: 98℃, 20sec, 接着58℃, 15sec, 接着72℃, 45sec, 接着72℃, 5min; 接着4℃。

[0367] 使用Invitrogen的PURELINK™ PCR微型试剂盒 (Carlsbad, CA) 根据制造商的说明清洗反应物(至5μg)。更大的反应物将需要使用具有更大容量的产品清洗。清洗后, 将cDNA使用NANODROP™定量并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析, 以确认cDNA是预期大小。然后使cDNA进行测序分析, 之后进行体外转录反应。

#### [0368] 实施例4. 短模型RNA-1的IVT和IFN-β分析

[0369] IVT反应可“加标”有特定核苷酸, 从而导致最少的细胞因子应答污染物和更好的收率。在一种方法中, GTP与其他NTP的比率增加, 导致总NTP负载较高且NTP:Mg<sup>2+</sup>摩尔比增大, 如表1所示。这些特定的核苷酸被称为短模型RNA。短模型RNA的目标是概括说明在全长RNA中观察到的等摩尔(现有技术) 相对于本发明方法的相同细胞因子信号/效应。该构建体足够小以通过LC/MS检测全长杂质, 这对于全长RNA目前是不可行的。

#### [0370] 表1. 核苷酸制剂

	等摩尔	α	GDP α
[GDP] mM	0	0	30
[GTP] mM	7.5	30	15
[ATP] mM	7.5	15	15
[CTP] mM	7.5	7.5	7.5
[UTP] mM	7.5	7.5	7.5
总[核苷酸] mM	30	60	75
[Mg <sup>2+</sup> ] mM	40	40	40
核苷酸:Mg <sup>2+</sup>	0.75	1.50	1.88
有效[磷酸盐]	90	180	195
T7 (U/μl 反应)	7	14	14

[0372] 为了确定使用两种不同的IVT方法制备的短模型转录物是否独立于实验过程(即, 粗IVT、超滤或dT纯化的) 模拟针对全长转录物观察到的体外(BJ成纤维细胞) IFNβ应答, 建立了研究。生成在与靶RNA相同的IVT条件下且由相同的DNA模板双链体产生的替代RNA, 即短模型RNA-1。在BJ成纤维细胞中的IFN-β测定中, 细胞因子应答模拟全长RNA的细胞因子应答(图1)。使用等摩尔IVT方法制备的短模型转录物具有比使用αIVT方法制备的材料更高的IFNβ应答。细胞因子应答在超滤和dT纯化后保留。

[0373] 此外, 短模型RNA-1 (所有尿苷被修饰为假尿苷且所有胞苷通过5' O-甲基修饰) 的杂质谱分析显示, 在等摩尔方法中存在反向互补序列(dsRNA), 但在α反应中不存在。鉴定了9种不同的物类-两者之间的重叠峰代表无效物类, 而仅在等摩尔制剂中看到的峰是反向互补物类。对具有不同量的尿苷和胞苷修饰的物类进行筛选, 并且在所有三种中发现了反向互补物类和无效物类(图2)。无效转录物是有义的且反向互补是反义转录物。IFN-β水平在三者之间也有所变化(图2)。顶部是G0=标准A、G、C、U, 中部是G5=标准A、G、C和1-甲基假U, 并且底部是G6=标准A、G、C和5-甲氧基尿苷。在3种不同化学物质中由2种不同方法制备的

短模型转录物通过LCMS确定具有相似的杂质谱,尽管在BJF测定中存在差异,其似乎对不同的化学物质敏感。

[0374] LCMS分析的模型转录物和完整转录物在25C下持续6h IVT制备。使用等摩尔和 $\alpha$ 方法在25C下持续6h制备短转录物和全长转录物(不是我们的正常IVT,所述正常IVT为37C 2h)。低温IVT反应( $<30C$ )产生比37C更大的反向互补RNA丰度。通过LCMS分析样品的杂质谱。使用这两种方法制备的样品均含有无效/截短产物。使用等摩尔方法制备的转录物含有不同长度的聚U物类。即使在25C下, $\alpha$ 方法仍然减轻了反向互补序列的形成,其中丰度大于使用等摩尔方法的标准条件(图3)。

[0375] 互补/反义RNA的检测

[0376] 免疫刺激性杂质看起来由RNA模板化的RNA转录驱动,因为T7聚合掉了新生转录的RNA。所生成的所得的互补/反义RNA(dsRNA)显示出混合碱基、聚U组分、以及5'三磷酸根(5' ppp),其以任何碱基起始。进行RNA模板化转录。将反相纯化的hEPO G5(冷)以4mg/mL(与体外转录反应的典型收率一致)与除DNA模板(其被确定低于通过qPCR进行体外转录所需的阈值)之外的所有IVT组分一起温育,以探索RNA模板化转录现象。通过UPLC和体外BJF IFN $\beta$ 测定对材料进行分析。UPLC分析展示出异常RNA转录产物,并最值得注意的是,经由RNA模板化转录(在不存在DNA模板的情况下)产生聚U物类。用RNA和所有IVT组分进行的反应是IFN $\beta$ 热的,而不使用RNA进行的反应是冷的。(图4)。

[0377] 可以从反相(RP)纯化的转录RNA中清除双链RNA。进行RNA酶III处理的hEPO G5材料的毛细管电泳分析。使用等摩尔或 $\alpha$ 条件制备hEPO G5,并通过RP纯化一部分。然后将样品用RNA酶III处理并通过毛细管电泳分析。通过 $\alpha$ 方法制备的材料含有比通过等摩尔方法制备的材料更少的RNA酶III底物。RP纯化从等摩尔和 $\alpha$ 材料中清除大部分RNA酶III底物。 $\alpha$ 方法和反相纯化似乎提供RNA酶III底物(例如dsRNA)的协同减少(图5A)。进行RNA酶III处理的hEPO G0材料的毛细管电泳分析。使用等摩尔方法制备hEPO G0,并通过RP纯化一部分。然后将样品用RNA酶III处理并通过毛细管电泳分析(蓝色:经过处理的;黑色:未处理的)。RP纯化的材料比未经RP纯化的材料(现有技术)含有更少的RNA酶III底物(图5B)。

[0378] RNA酶III是dsRNA特异性核酸酶。使RNA制备物经受RNA酶III处理,持续固定的时间。RNA纯度/杂质谱在RNA酶III处理之前和之后比较,并通过HPLC或毛细管电泳测量。降解的全长产物的量与RNA制备物中存在的dsRNA杂质的水平成比例。如表观大小/滞留时间/的变化所指示的降解的量被认为是RNA酶III底物的量。缺乏dsRNA的样品在RNA酶III处理之前和之后应显示出几乎相同的纯度。如通过HPLC或毛细管电泳所见,含有显著量的dsRNA的样品将显示出大量切割产物的形成和未处理原料中存在的全长RNA的耗竭。(例如,如果80%的原始mRNA在RNA酶III处理后仍然存在,那么20%是RNA酶III的底物。

[0379] 进行来自图5A和5B的样品的IFN $\beta$ 和hEPO表达分析。对经过处理和未处理的样品进行分析,以确定RNA酶III处理如何影响在BJ成纤维细胞中(体外)的IFN $\beta$ 应答和hEPO表达。据发现,hEPO A100G5等摩尔材料对于未处理和经过RIII处理的样品表达相似。等摩尔经处理的-RP样品的细胞因子水平在用RIII处理后降低。hEPO A100 G5 $\alpha$ 材料均相似表达且具有零/低IFN $\beta$ 应答。TL材料不表达。然而,RIII处理使+和-RP样品的CK水平降低。G0 hEPO A100材料观察到来自RNA酶III处理的最大效果。在RNA酶III处理后,+和-RP纯化样品均观察到表达的增加和IFN $\beta$ 水平的降低(图6)。

[0380] 对使用不同方法转录且用RNA酶III处理的短转录物进行毛细管电泳分析。调查是短的模型转录物是否可用于表征RNA酶III处理的效果?将替代RNA构建体使用等摩尔或 $\alpha$ 方法转录,然后用RNA酶III处理并通过毛细管电泳分析。根据CE,等摩尔材料表现为含有最多的RNA酶III底物,而 $\alpha$ 方法材料不含任何底物。使用RNA酶III处理,模型RNA峰在片段分析仪上偏移5-7个核苷酸。等摩尔IVT形成比主峰短216个核苷酸的急剧的第二峰,其也用含有ORF的mRNA观察到(图7)。因此,使用模型RNA和LC/MS,可以精确地表征什么组分被切割,并通过推导,确定什么组分剩余。HPLC纯化方法显示出切割产物分离和富集后的聚U(图9)。对用RNA酶III处理的RNA替代物2EQ转录物(与图7中的顶图相同的构建体...替代性分析)进行RP分析。在用RNA酶III处理替代RNA转录物后,通过RP分析观察到几种物类。由于该RP方法是尾选择性方法,我们假设这些早期洗脱峰是短寡聚物和/或尾变体(图8A)。对使用 $\alpha$ 方法转录的RNA替代物2 $\alpha$ 构建体(转录物用RNA酶III处理)进行RP分析。我们在用RIII处理的替代RNA $\alpha$ 材料的RP迹线中没有观察到额外杂质峰的任何演变和总体纯度的明显变化。因此,我们可以得出结论, $\alpha$ 方法不产生与等摩尔方法相同的dsRNA物类(图8B)。

[0381] 通过RNA酶III获得的dsRNA丰度和来自RP级分的细胞因子数据

[0382] 对使用和不使用RNA酶III处理的hEPO进行RP分级分离。通过反相HPLC纯化经由等摩尔和 $\alpha$ 方法转录的hEPO G5 mRNA。跨洗脱梯度收集级分。级分用RNA酶III处理,随后通过毛细管电泳进行分析,从而比较未处理的RNA和RNA酶III处理的RNA(重叠)。还将RNA级分转染到BJ成纤维细胞中,并在RNA酶III处理之前和之后评估IFN-B诱导(图9)。

[0383] 进行RP分级分离的hEPO EQ+/-RIII处理的毛细管电泳分析。将hEPO EQ用RNA酶III处理,然后进行RP纯化、分级分离,并通过CE进行分析(蓝色:经过RIII处理的;黑色:未处理的)。含有RNA杂质的早期等摩尔级分(级分1-6)表示dsRNA/RNA酶III底物的可观丰度。dsRNA在早期级分中富集。这通过高INF-B水平证实。等摩尔级分7-9表示通过CE实现的dsRNA/RNA酶III底物的较低水平,这也通过降低的IFN-B水平证实。每个级分的RNA酶III处理将IFN-B诱导降低至基础水平,这再次证实IFN-B杂质由dsRNA组成(图10A-C)。未经处理或RNA酶III处理之后的hEPO EQ G5的体外IFN $\beta$ 分析(图10D)。

[0384] 进行RP分级分离的hEPO $\alpha$ +/-RIII处理的毛细管电泳分析。将hEPO $\alpha$ 用RNA酶III处理,然后RP纯化,分级分离,并通过CE进行分析(蓝色:经过RIII处理的;黑色:未处理的)(图11A-C)。未经处理或RNA酶III处理之后的hEPO  $\alpha$ G5的体外IFN $\beta$ 分析(图11D)。所有级分均通过毛细管电泳表示出痕量水平的dsRNA(RNA酶III底物),因为重叠电泳图实质上是相同的。这通过处理和未处理级分中基础水平的IFN-B证实。尽管在早期级分中存在非全长/截短的RNA杂质,但用 $\alpha$ 方法转录的RNA缺乏dsRNA。

[0385] dsRNA丰度的ELISA检测

[0386] 开发J2/K2dsRNA ELISA以测量dsRNA丰度。将平板用J2单克隆(IgG)抗体包被,然后封闭。然后将目标RNA以给定浓度添加并温育1小时。添加K2单克隆抗体(IgM),并添加HRP缀合的抗IgM山羊多克隆抗体。添加TMB以使信号显影。该测定检测长度大于40个碱基对的双链体。J2可以帮助确定RIII端点。用RP或RNA酶III处理观察到dsRNA的敲低(图12)。J2测定表明与 $\alpha$ 相比,等摩尔材料中的dsRNA明显更多。RP过程从EQ样品中除去dsRNA材料,其程度与RIII处理类似。与等摩尔IVT产物相比, $\alpha$ 反应mRNA在原料中具有较少dsRNA。此外,观察到dT纯化的RNA酶III材料中的敲低大于TrisRP。该测定还示出,通过RNA酶III处理除去了

dsRNA (图13)。虽然通过J2检测到的dsRNA水平基于构建体/方法/化学物质变化,但RNA酶III处理看起来将大多数dsRNA水平降低至基线。核酸酶P1处理后的LCMS分析显示FFB mRNA中存在另外的NTP,因为与 $\alpha$ 反应组相比,以非G起始的反向互补序列在等摩尔组中以更高的丰度存在(表2)。

[0387] 表2.

	pppA ng/mL	pppG ng/mL	pppC ng/mL	pppU ng/mL
[0388] <b>G5 hEPO, 等摩尔, 未加帽</b>	<b>31</b>	<b>172</b>	<b>53</b>	<b>BQL</b>
<b>G5 hEPO, 本发明的制剂 未加帽</b>	<b>12</b>	<b>159</b>	<b>BQL</b>	<b>BQL</b>

[0389] 低温IVT中RNA模板化转录的减轻

[0390] 进行使用不同方法和化学物质制备的hEPO构建体的IFN $\beta$ 应答。如IVT表征研究中所示, $\alpha$ 反应对低温诱导的细胞因子尖峰不太敏感(图14)。当在25C下进行I,标准等摩尔IVT产生增强的IFN-B诱导性杂质丰度。对使用不同方法制备的hEPO构建体进行总核苷酸分析。当在37C和25C下进行IVT时, $\alpha$ 方法条件(GDP和GTP)均减轻外来IFN-B诱导性杂质形成。核酸酶P1研究中的对照区域中的核苷酸分布是一致的(灰色框)并且相同的hEPO质粒显示出一致的切割(图15)。在等摩尔IVT方法在25C运行的情况下,尿苷/1-甲基假U的丰度高于37C,这可能是由于聚U的进化, $\alpha$ 方法(GDP和GTP)显示出一致的核苷酸分布,即使在25C下,进一步支持杂质形成的减轻。条高度差异可能是由浓度差异造成的。在25℃标准IVT的情况下,U含量随着时间的推移增加。经摩尔校正的核苷酸组成在表3和4中给出。G和U是理论值,而A被高估且C被低估。在 $\alpha$ 反应的情况下,跨温度条件的偏差较小,并且对于标准IVT,在U中观察到最高偏差。

[0391] 表3.

	%A	%G	%C	%U
GDP 37C 2h	35.5	27.9	18.3	18.3
GDP 25C 6h	35.2	28.1	18.4	18.2
GDP 25C过夜	34.8	27.7	19.3	18.2
GTP 37C 2h	35.2	27.5	18.9	18.4
GTP 25C 6h	35.2	27.5	19.1	18.3
GTP 25C过夜	35.1	27.7	19.0	18.2
G537C 2h	35.4	26.8	19.5	18.3
G525C 6h	33.8	27.7	18.3	20.1
G525C过夜	32.1	26.5	17.1	24.3
G037C 2h	36.5	26.7	19.1	17.6
G025C 6h	33.0	24.4	17.1	25.6
理论	31.7%	27.3%	22.4%	18.6%

[0393] 表4. 标准偏差

[0394]		A	G	C	U
	GDP	0.34	0.23	0.53	0.04
	GTP	0.07	0.15	0.06	0.09
	G5标准品	1.66	0.60	1.20	3.08
	G0标准品	2.53	1.65	1.43	5.61

[0395] “强制”RNA模板化转录

[0396] 通过LCMS进行使用G5eGFP EQ的不同化学物质中的基于RNA的IVT的杂质分析。使用4mg/mL eGFP G5等摩尔RNA且没有DNA模板建立IVT(在不同的化学物质中)。由RNA模板化转录生成聚U物类。RNA模板化转录独立于化学物质发生。将反相纯化的eGFP G5(冷)以4mg/mL(与体外转录反应的典型收率一致)与除DNA模板(其被确定低于通过qPCR进行体外转录所需的阈值)之外的所有IVT组分一起温育,以探索RNA模板化转录现象。通过LC/MS分析材料(图16A(等摩尔方法),16B( $\alpha$ 方法))。

[0397] 进行RNA模板化IVT产物的IFN $\beta$ 分析。材料来自图16。在基于RNA的IVT之后,对样品进行体外分析以确定LCMS分析(聚U物类)与IFN $\beta$ 应答之间是否存在相关性。 $\alpha$ (A100)基于RNA的IVT产生具有低于等摩尔材料的CK应答的材料。(G0或G5);再次表明 $\alpha$ 方法减轻了RNA模板化转录产物的形成。所有G6均是冷的;(本质上是冷的,尽管形成杂质)(图17)。

[0398] 执行不能通过牛痘加帽的dsRNA,以确定dsRNA是否可被加帽。将具有5'三磷酸根的正向和反向互补寡聚物退火,然后使用牛痘进行加帽处理以确定dsRNA是否可被加帽。可以使用牛痘将pppF寡聚物(含有5' pppG)加帽为cap1。pppRC寡聚物(含有5' pppU)不可以使用牛痘进行加帽。具有pppF+pppRC的dsRNA不可以使用牛痘进行加帽(图18)。

[0399] 使用CIP对dsRNA进行去磷酸化,以确定小牛肠磷酸酶是否使具有不同的5'/3'突出端的dsRNA去磷酸化?将各种F和RC寡聚物退火,然后用CIP处理,并通过LCMS分析去磷酸化效率。具有5'突出端的dsRNA可以完全去磷酸化。完美的双链体dsRNA可以部分去磷酸化。具有3'突出端的dsRNA不可完全去磷酸化。这证明了为什么磷酸酶在降低CK应答方面不是100%有效的(图19)。

[0400] 进行在电泳图中表示的前述体内研究中给予的mRNA的CE纯度。(图20)。结构可起作用,因为5'UTR可影响 $\alpha$ 反应的有效性(图20)。

[0401] 体内研究

[0402] RIII处理显示出在未修饰和完全修饰(所有尿苷均为1-甲基假尿苷)物类两种情况下小鼠中不同的细胞因子敲低。它可用于将细胞因子敲低至接近基础水平的独立方法。雌性小鼠(n=5/组)用0.5mg/kg的选定测试材料注射一次。

[0403] 对使用不同IVT方法和纯化排列转录的G0和G5hEP0 mRNA进行IFN $\beta$ 分析,以确定用不同化学物质、方法和处理生成的材料的IFN $\beta$ 应答(体外;BJ成纤维细胞)。+RIII、+RP和 $\alpha$ 方法对G5中的体外IFN $\beta$ 应答具有相似的作用(减少)。G0证明 $\alpha$ +RIII优于等摩尔+RIII(图21)。

[0404] 通过ELISA进行使用G0或G5化学物质、等摩尔或 $\alpha$ 方法以及RNA酶III处理制备的hEP0的体内(Balb-C小鼠)表达,以确定使用各种方法(化学物质、IVT方法、RIII处理)制备的hEP0如何影响表达。与图12、20、21、22相同的材料。在使用通过不同方法生成的RNA的hEP0表达中没有显著差异(图22)。

[0405] 在使用和不使用RNA酶III处理的情况下使用不同的IVT方法和纯化排列转录的体



内 (Ba1b-C小鼠) G0和G5hEP0 mRNA的细胞因子 (luminex) 小组利用与图12、20、21、22相同的材料进行测定。用0.5mpk配制的RNA处理Ba1b-C小鼠后的细胞因子分析。未处理的 $\alpha$ 材料与IP10中的EQ材料 (G5) 具有相似的CK应答。结合RNA酶III处理的 $\alpha$ 方法总体看起来比等摩尔比较物 (+RNA酶III) 赋予更少的免疫刺激活性, 尤其是在G0中。RIII处理降低了CK应答 (图23A-23D)。

[0406] 进行来自使用G0或G5化学物质、等摩尔或 $\alpha$ 方法和RNA酶III处理制备的hEP0处理的Ba1b-C小鼠的脾脏的B细胞活化, 在用使用各种方法制备的hEP0处理之后分析活化B细胞 (CD86+CD69+) 的应答。B细胞活化大致与细胞因子 (luminex) 小组相关。相对于未处理的对照, RIII处理降低了CK应答 (图24)。

[0407] 进行短5' 三磷酸根化寡聚物的体外分析以确定短5' 三磷酸根化寡聚物是否在体外刺激IFN $\beta$ 应答 (BJF, IFN $\beta$ )。ssRNA和dsRNA (<12个核苷酸或碱基对) 在BJF中不刺激IFN $\beta$  (图25)。

[0408] 进行聚U和dsRNA标准品的体外分析以确定是否使用在BJF中刺激IFN $\beta$ 应答的5' 三磷酸根化的寡聚物标准品。>20bp的pppF+pppRC dsRNA是免疫刺激性的。5' 三磷酸根化的聚U不是免疫刺激性的, 如ssRNA或dsRNA <25nt或bp (图26)。

[0409] 对具有3' 突出端的dsRNA标准品进行体外分析, 以确定对于dsRNA标准品, 对IFN $\beta$ 应答是否存在3' 突出端长度依赖性。3' 突出端越长, IFN $\beta$ 应答越低 (图27)。

[0410] 对具有5' 突出端、完美双链体和不同长度的3' 突出端的dsRNA标准品进行体外分析, 以确定对IFN $\beta$ 应答是否存在突出端长度/同一性依赖性。ssRNA pppRC寡聚物是热的。具有5' 突出端 (和~20bp双链体) 的dsRNA的免疫刺激性低于完美双链体。具有3' 突出端的dsRNA具有与完美双链体相当或较少的免疫刺激。dsRNA双链体越长, CK应答越高 (图28)。

[0411] 对聚U物类进行体外分析, 以确定聚U物类刺激IFN $\beta$ 应答所需的物质。具有5' 三磷酸根的ssRNA聚U标准品具有轻微的免疫刺激性。作为具有OH-F30 (30bp双链体) 的dsRNA, 存在累加CK应答。然而, 聚U标准品在全长mRNA (A100) 的存在下不具有免疫刺激性 (图29)。

[0412] 对ssRNA寡核苷酸标准品进行体外分析, 以确定ssRNA标准品的IFN $\beta$ 应答是什么。(F或正向寡聚物代表无效或截短物类; R或RC或反向互补寡聚物代表通过RNA模板化转录生成的反向互补物类)。具有5' 三磷酸根的正向寡聚物不刺激IFN $\beta$ 。具有5' 三磷酸根的反向互补寡聚物在长度>25nt时刺激IFN $\beta$  (图30)。

[0413] 对具有不同5' 官能度的dsRNA寡聚物标准品进行体外分析, 以确定5' 官能度 (三磷酸根相对于羟基) 是否影响IFN $\beta$ 应答。F寡聚物上的5' 三磷酸根和RC寡聚物上的5' 羟基在>20bp时刺激IFN $\beta$ 。F寡聚物上的5' 三磷酸根和RC寡聚物上的5' 三磷酸根在>25bp时刺激IFN $\beta$ 。F寡聚物上的5' 羟基和RC寡聚物上的5' 三磷酸根在>20bp时刺激IFN $\beta$ 。在>20bp时只需要一个三磷酸根刺激IFN $\beta$  (图31)。

[0414] 对经过CIP处理的dsRNA寡聚物标准品进行IFN $\beta$ 分析。用CIP处理具有不同突出端长度的dsRNA寡聚物标准品并分析IFN $\beta$ 应答。通过LCMS观察到去磷酸化 (即5' 突出端) 的样品 (图19) 不像未处理的样品那样多的刺激IFN $\beta$ 。未通过CIP去磷酸化的样品 (即完美双链体和3' 突出端) 在IFN $\beta$ 应答+/-CIP中没有变化 (图32)。

[0415] 进行ssRNA杂质剂量响应 (BJ成纤维细胞中的IFN $\beta$ ) , 以确定体外ssRNA杂质标准品的剂量依赖性如何 (BJF, IFN $\beta$ )。刺激应答需要多少任一类型的杂质。<20聚体ssRNA (RC) 不

热。 $>30$ 聚体ssRNA(RC)在约 $>1\text{ng/uL}$ (或 $>2.5\text{ng/转染}$ )时刺激IFN $\beta$ 。对ssRNA CK应答(RC)存在明显的长度依赖性。寡聚物越长,CK应答越高(图33)。

[0416] 进行dsRNA杂质剂量响应(BJ成纤维细胞中的IFN $\beta$ ),以确定体外dsRNA杂质标准品的剂量依赖性(BJF, IFN $\beta$ )。20-30bp的dsRNA在 $\sim >1\text{ng/uL}$ ( $>2.5\text{ng/转染}$ )时刺激IFN $\beta$ 。 $>30\text{bp}$ 的dsRNA在 $\sim 0.1\text{ng/uL}$ ( $>0.25\text{ng/转染}$ )时刺激IFN $\beta$ 。需要 $>30\text{bp}$  dsRNA的 $>1000\times$ 稀释液来沉默IFN $\beta$ 应答,这表明仅仅几个分子的这些杂质就足以刺激应答。对dsRNA CK应答具有明显的长度依赖性,双链体越长,CK应答越高(图34)。

[0417] 进行正向寡聚物标准品上的修饰的5'核苷酸的IFN $\beta$ 应答,以确定5'核苷酸(三磷酸化的)是否影响CK应答。当向F寡聚物中添加5' A/C/U时,CK应答被诱导。5' 非G不改变IFN $\beta$ 应答(仍然是冷的)。这表明存在序列依赖性(因为RC是热的)(图35)。

[0418] 进行反向互补寡聚物标准品上的修饰的5'核苷酸的IFN $\beta$ 应答,以确定5'核苷酸(三磷酸化的)是否影响CK应答。当向RC寡聚物中添加5' G时,CK应答被诱导。RC寡聚物上的5' pppG使IFN $\beta$ 应答沉默。这表明无论序列同一性如何,5' G都将使CK应答沉默(图36)。

[0419] 进行5'羟基官能化的dsRNA的IFN $\beta$ 应答,以确定5'官能度(ppp相对于OH)对dsRNA中的细胞因子应答的影响程度。测试了5' ppp-F/5' ppp-RC双链体至5' OH-F/5' OH-RC。对于具有5' PPP或5' OH的 $>30\text{bp}$  dsRNA存在IFN $\beta$ 应答。这表明无论5'官能度如何, $>30\text{bp}$ 的dsRNA均刺激BJF中的IFN $\beta$ 应答(图37)。

[0420] 启示

[0421] 作为IVT副产物的RNA模板化转录在 $\alpha$ 反应方法的情况下大大减少且几乎消除。作为减轻反向互补序列形成的结果,解决了两种目标杂质:dsRNA(具有5' ppp)和以非pppG(pppA、pppC和pppU)起始的RNA。

[0422] 在小于 $37^\circ\text{C}$ 的IVT反应温度(例如, $25^\circ\text{C}$ )下,RNA模板化转录增强。在IVT反应正在进行时达到 $37^\circ\text{C}$ 加热的斜坡时间可导致更高的杂质水平,特别是在 $25^\circ\text{C}$ 至 $37^\circ\text{C}$ 的时间斜坡增加时。 $\alpha$ 反应方法在 $25^\circ\text{C}$ 时更令人接受,因为在环境温度下检测到痕量RNA模板化转录物类。

[0423] RP在 $\alpha$ 反应情况下比在等摩尔方法情况下更有效。 $\alpha$ 反应的杂质负载较低,这可导致分离的改善。人们可以更明确地解决“纯度”并可潜在地增加负载挑战,从而提高产量。使用GDP  $\alpha$ 反应,单个RP循环足以将未修饰的物类敲低至基线,而使用等摩尔IVT,获得未修饰物类的两种级分需要2至3个顺序RP循环。

[0424] 实施例5.用 $\alpha$ 方法生成的RNA具有 $<40\%$ 的连缀转录物

[0425] 使用等摩尔或 $\alpha$ 方法生成hEP0 RNA。用RNA酶T1消化RNA并且通过LCMS分析尾片段。具有3' mP的尾片段表示连缀转录物。 $\alpha$ 方法生成被计算为32780Da的3' OH(纯净)和被计算为32860Da的5' OH/3' mP(连缀)。等摩尔方法生成32861Da的5' OH/3' mP(连缀)和量少得多的3' OH(纯净)(图38)。

[0426] 实施例6.总消化表明来自等摩尔方法的RNA比用 $\alpha$ 方法制备的RNA具有更高的非GTP 5'核苷酸丰度

[0427] 使用四种不同的条件生成短开放阅读框RNA: $37^\circ\text{C}$ ,2小时(标准)相对于 $25^\circ\text{C}$ ,6小时以及等摩尔相对于 $\alpha$ 。将各RNA酶促消化成单核苷酸,然后通过LCMS分析5'核苷酸丰度(例如pppG或GTP、pppA或ATP等)。5' G是第一模板化核苷酸,这意味着如果生成不纯的RNA群,那

么将存在作为ATP、CTP或UTP的大部分5' 核苷酸(例如等摩尔方法),并且如果生成纯RNA群,那么大多数5' 核苷酸将是GTP(例如 $\alpha$ 方法)。

[0428] 实施例7.通过 $\alpha$ 方法生成的短开放阅读框RNA生成较少反向互补序列

[0429] 使用含有 $^{32}\text{P}$ -GTP或 $^{32}\text{P}$ -CTP的等摩尔或 $\alpha$ 方法在G0(野生型)和G5( $m^1\psi$ )化学物质中生成短开放阅读框RNA。 $^{32}\text{P}$ -GTP标记无效转录物并且 $^{32}\text{P}$ -CTP标记反向互补转录物。G0与G5化学物质之间不存在无效或RC谱差异。等摩尔和 $\alpha$ 方法具有相似的无效谱。等摩尔方法比 $\alpha$ 方法生成更多的反向互补序列。

[0430] 实施例8.RNA酶T1消化指示连缀转录物群

[0431] RNA酶T1是一种内切核酸酶,其在鸟苷核苷酸后特异性地切割RNA,从而留下5' 氢氧根和3' 一磷酸根。对于在3' 端含有模板化鸟苷核苷酸的构建体,与含有3' 氢氧根的纯净转录物相比,RNA酶T1可用于区分留下3' 一磷酸根的连缀转录物群。hEPO RNA使用等摩尔或 $\alpha$ 方法生成,然后用RNA酶T1消化并通过质谱进行分析。对3' 寡聚物片段进行分析并对其3' 异质性进行定量。用等摩尔方法生成的RNA含有大约70-80%的连缀转录物,而用 $\alpha$ 方法生成的RNA含有30-40%的连缀转录物。

[0432] 实施例9.用以确定样品纯度的RNA的总消化

[0433] 使用等摩尔或 $\alpha$ 方法在37°C或25°C温育下生成短模型RNA构建体(替代RNA 1)。通过寡聚物dT树脂纯化每个样品以除去未反应的NTP。使用S1和全能核酸酶将每个样品酶促消化成单核苷酸。通过质谱分析在5' 端三磷酸化的5' 核苷酸的丰度。将提取的离子峰积分并将%NTP丰度列于表5中。由于5' GTP是第一模板化核苷酸,因此通过高%GTP值指示纯RNA群。同样地,通过相对低的GTP丰度指示不纯的RNA群。使用EQ方法生成的样品具有>5%的非GTP 5' 核苷酸,而使用 $\alpha$ 方法生成的样品具有<5%的非GTP 5' 核苷酸。

[0434] 表5.

[0435]

	%GTP	%ATP	%CTP	%UTP
替代RNA 1,等摩尔,37°C	94.4	0.8	3.8	1.2
替代RNA 1, $\alpha$ ,37°C	97.4	0.3	2.3	0.0
替代RNA 1,等摩尔,25°C	68.1	5.0	12.3	21.6
替代RNA 1, $\alpha$ ,25°C	97.6	0.2	1.9	0.4

[0436] 实施例10.dsRNA ELISA指示dsRNA的存在

[0437] 使用等摩尔或 $\alpha$ 方法生成hEPO RNA构建体,并通过单独或与反相纯化(+RP)结合的寡聚物dT树脂(-RP)进行纯化。使用dsRNA特异性抗体进行的ELISA用于确定使用不同方法生成的RNA的纯度的相对差异。使用等摩尔方法生成的RNA含有比使用 $\alpha$ 方法生成的RNA显著更多的dsRNA(图39)。反相纯化提高了-RP RNA的纯度。

[0438] 实施例11.放射性测序凝胶分析确定样品纯度

[0439] 使用等摩尔或 $\alpha$ 方法生成短模型RNA构建体(替代RNA 1)。每个IVT反应都含有标记无效转录物的 $^{32}\text{P}$ -GTP或标记反向互补转录物的 $^{32}\text{P}$ -CTP。通过测序凝胶分析RNA样品。基于 $^{32}\text{P}$ -GTP数据,在两种方法之间不存在无效转录物丰度差异。基于 $^{32}\text{P}$ -CTP数据,等摩尔方法比 $\alpha$ 方法生成更多的反向互补序列。

[0440] 实施例12.掺杂在mRNA中的dsRNA的体内分析

[0441] 反相纯化的hEPO mRNA掺杂有5%、0.5%或0.05%w/w的与完整hEPO构建体的前60

个核苷酸相对应的60bp dsRNA。将mRNA样品配制在MC3中,然后通过IV以0.5mpk给予C57BL/6和Balb-c小鼠。24小时后,收获脾脏并匀浆以产生单细胞悬浮液。对脾细胞进行B细胞标志物染色,然后通过流式细胞术分析。基于它们的CD86和CD69标志物表达对活化的B细胞群进行分析。60bp dsRNA具有以下序列:

	60 聚体 5' UTR Epo	GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUA
[0442]	F	AGAGCCACCAUGGGAGUGCACG
	60 聚体 5' UTR Epo	CGUGCACUCCCAUGGUGGCUCUUAUAUUUCUUCUUCACUC
	R	UUCUUUUCUCUCUUAUUUCCC

[0443] 接受通过 $\alpha$ 方法生成的hEP0 mRNA的组具有比接受具有掺杂的dsRNA的hEP0的组更低的B细胞活化。还在6h时收集血清并通过细胞因子luminex小组进行分析。来自luminex小组的IP-10、IFN- $\gamma$ 和IFN- $\alpha$ 标志物的表达趋势与来自B细胞活化分析的趋势一致,表明掺杂样品中的dsRNA触发I型干扰素途径,这导致B细胞活化。

[0444] 等效方案

[0445] 本领域技术人员仅仅使用常规实验将认识到或者能够确定本文所述的发明的具体实施方案的许多等效方案。此类等效方案旨在涵盖于下列权利要求中。

[0446] 本文公开的所有参考文献,包括专利文献,均以引用方式整体并入。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> Moderna Therapeutics, Inc.	
[0003]	<120> 高纯度RNA组合物及其制备方法	
[0004]	<130> M1378.70047W000	
[0005]	<140> 尚未分配	
[0006]	<141> 与此同时	
[0007]	<150> US 62/394,711	
[0008]	<151> 2016-09-14	
[0009]	<160> 32	
[0010]	<170> PatentIn 3.5版	
[0011]	<210> 1	
[0012]	<211> 12	
[0013]	<212> RNA	
[0014]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0015]	<220>	
[0016]	<223> 合成多核苷酸	
[0017]	<400> 1	
[0018]	cucuuaauuc cc	12
[0019]	<210> 2	
[0020]	<211> 49	
[0021]	<212> RNA	
[0022]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0023]	<220>	
[0024]	<223> 合成多核苷酸	
[0025]	<220>	
[0026]	<221> 尚未归类的特征	
[0027]	<222> (1) .. (1)	
[0028]	<223> 通过OH修饰	
[0029]	<220>	
[0030]	<221> 尚未归类的特征	
[0031]	<222> (49) .. (49)	
[0032]	<223> 通过ppp修饰	
[0033]	<400> 2	
[0034]	ggaaaauaga gagaaaagac ccuuuauucu cucuuuucuu cucauucuu	49
[0035]	<210> 3	
[0036]	<211> 55	
[0037]	<212> RNA	
[0038]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

[0039]	<220>		
[0040]	<223>	合成多核苷酸	
[0041]	<220>		
[0042]	<221>	尚未归类的特征	
[0043]	<222>	(1) .. (1)	
[0044]	<223>	通过OH修饰	
[0045]	<220>		
[0046]	<221>	尚未归类的特征	
[0047]	<222>	(55) .. (55)	
[0048]	<223>	通过ppp修饰	
[0049]	<400>	3	
[0050]	gggaaauaag agagaaaaga agagucccuu uauucucucu uuucuuuca uucuu		55
[0051]	<210>	4	
[0052]	<211>	60	
[0053]	<212>	RNA	
[0054]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0055]	<220>		
[0056]	<223>	合成多核苷酸	
[0057]	<220>		
[0058]	<221>	尚未归类的特征	
[0059]	<222>	(1) .. (1)	
[0060]	<223>	通过OH修饰	
[0061]	<220>		
[0062]	<221>	尚未归类的特征	
[0063]	<222>	(60) .. (60)	
[0064]	<223>	通过ppp修饰	
[0065]	<400>	4	
[0066]	gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa cccuuuauuc ucucuuuucu ucucauucuu		60
[0067]	<210>	5	
[0068]	<211>	65	
[0069]	<212>	RNA	
[0070]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0071]	<220>		
[0072]	<223>	合成多核苷酸	
[0073]	<220>		
[0074]	<221>	尚未归类的特征	
[0075]	<222>	(1) .. (1)	
[0076]	<223>	通过OH修饰	
[0077]	<220>		

[0078]	<221>	尚未归类的特征	
[0079]	<222>	(65) .. (65)	
[0080]	<223>	通过ppp修饰	
[0081]	<400>	5	
[0082]		gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaucccuu uauucucucu uuucuucuca	60
[0083]		uucuu	65
[0084]	<210>	6	
[0085]	<211>	70	
[0086]	<212>	RNA	
[0087]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0088]	<220>		
[0089]	<223>	合成多核苷酸	
[0090]	<220>		
[0091]	<221>	尚未归类的特征	
[0092]	<222>	(1) .. (1)	
[0093]	<223>	通过OH修饰	
[0094]	<220>		
[0095]	<221>	尚未归类的特征	
[0096]	<222>	(70) .. (70)	
[0097]	<223>	通过ppp修饰	
[0098]	<400>	6	
[0099]		gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauaauag cccuuuauuc ucucuuuucu	60
[0100]		ucucauucuu	70
[0101]	<210>	7	
[0102]	<211>	12	
[0103]	<212>	RNA	
[0104]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0105]	<220>		
[0106]	<223>	合成多核苷酸	
[0107]	<220>		
[0108]	<221>	尚未归类的特征	
[0109]	<222>	(1) .. (1)	
[0110]	<223>	通过ppp修饰	
[0111]	<400>	7	
[0112]		gggaaauaag ag	12
[0113]	<210>	8	
[0114]	<211>	12	
[0115]	<212>	RNA	
[0116]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

[0117]	<220>		
[0118]	<223>	合成多核苷酸	
[0119]	<220>		
[0120]	<221>	尚未归类的特征	
[0121]	<222>	(1) .. (1)	
[0122]	<223>	通过ppp修饰	
[0123]	<400>	8	
[0124]	cucuuauuuc cc		12
[0125]	<210>	9	
[0126]	<211>	16	
[0127]	<212>	RNA	
[0128]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0129]	<220>		
[0130]	<223>	合成多核苷酸	
[0131]	<220>		
[0132]	<221>	尚未归类的特征	
[0133]	<222>	(1) .. (1)	
[0134]	<223>	通过ppp修饰	
[0135]	<220>		
[0136]	<221>	尚未归类的特征	
[0137]	<222>	(16) .. (16)	
[0138]	<223>	通过ppp修饰	
[0139]	<400>	9	
[0140]	gggaaauacc cuuuau		16
[0141]	<210>	10	
[0142]	<211>	24	
[0143]	<212>	RNA	
[0144]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0145]	<220>		
[0146]	<223>	合成多核苷酸	
[0147]	<220>		
[0148]	<221>	尚未归类的特征	
[0149]	<222>	(1) .. (1)	
[0150]	<223>	通过ppp修饰	
[0151]	<220>		
[0152]	<221>	尚未归类的特征	
[0153]	<222>	(24) .. (24)	
[0154]	<223>	通过ppp修饰	
[0155]	<400>	10	



[0156]	gggaaauaag agcccuuuau ucuc	24
[0157]	<210> 11	
[0158]	<211> 20	
[0159]	<212> RNA	
[0160]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0161]	<220>	
[0162]	<223> 合成多核苷酸	
[0163]	<220>	
[0164]	<221> 尚未归类的特征	
[0165]	<222> (1) .. (1)	
[0166]	<223> 通过ppp修饰	
[0167]	<220>	
[0168]	<221> 尚未归类的特征	
[0169]	<222> (20) .. (20)	
[0170]	<223> 通过ppp修饰	
[0171]	<400> 11	
[0172]	gggaaauacc cuuuauucuc	20
[0173]	<210> 12	
[0174]	<211> 20	
[0175]	<212> RNA	
[0176]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0177]	<220>	
[0178]	<223> 合成多核苷酸	
[0179]	<220>	
[0180]	<221> 尚未归类的特征	
[0181]	<222> (1) .. (1)	
[0182]	<223> 通过ppp修饰	
[0183]	<220>	
[0184]	<221> 尚未归类的特征	
[0185]	<222> (20) .. (20)	
[0186]	<223> 通过ppp修饰	
[0187]	<400> 12	
[0188]	gggaaauaag agcccuuuau	20
[0189]	<210> 13	
[0190]	<211> 31	
[0191]	<212> RNA	
[0192]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0193]	<220>	
[0194]	<223> 合成多核苷酸	

[0195]	<220>		
[0196]	<221>	尚未归类的特征	
[0197]	<222>	(1) .. (1)	
[0198]	<223>	通过ppp修饰	
[0199]	<220>		
[0200]	<221>	尚未归类的特征	
[0201]	<222>	(31) .. (31)	
[0202]	<223>	通过ppp修饰	
[0203]	<400>	13	
[0204]	gggaaauaag agaaaagaag agucccuuua u		31
[0205]	<210>	14	
[0206]	<211>	35	
[0207]	<212>	RNA	
[0208]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0209]	<220>		
[0210]	<223>	合成多核苷酸	
[0211]	<220>		
[0212]	<221>	尚未归类的特征	
[0213]	<222>	(1) .. (1)	
[0214]	<223>	通过ppp修饰	
[0215]	<220>		
[0216]	<221>	尚未归类的特征	
[0217]	<222>	(35) .. (35)	
[0218]	<223>	通过ppp修饰	
[0219]	<400>	14	
[0220]	gggaaauaag agaaaagaag agucccuuua uucuc		35
[0221]	<210>	15	
[0222]	<211>	40	
[0223]	<212>	RNA	
[0224]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0225]	<220>		
[0226]	<223>	合成多核苷酸	
[0227]	<220>		
[0228]	<221>	尚未归类的特征	
[0229]	<222>	(1) .. (1)	
[0230]	<223>	通过ppp修饰	
[0231]	<220>		
[0232]	<221>	尚未归类的特征	
[0233]	<222>	(40) .. (40)	

[0234]	<223>	通过ppp修饰	
[0235]	<400>	15	
[0236]		gggaaauaag agagaaaaga cccuuuauuc ucucuuuuuc	40
[0237]	<210>	16	
[0238]	<211>	41	
[0239]	<212>	RNA	
[0240]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0241]	<220>		
[0242]	<223>	合成多核苷酸	
[0243]	<220>		
[0244]	<221>	尚未归类的特征	
[0245]	<222>	(1) .. (1)	
[0246]	<223>	通过OH修饰	
[0247]	<220>		
[0248]	<221>	尚未归类的特征	
[0249]	<222>	(41) .. (41)	
[0250]	<223>	通过ppp修饰	
[0251]	<400>	16	
[0252]		aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaauuuuuu uuuuuuuuuuu u	41
[0253]	<210>	17	
[0254]	<211>	45	
[0255]	<212>	RNA	
[0256]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0257]	<220>		
[0258]	<223>	合成多核苷酸	
[0259]	<220>		
[0260]	<221>	尚未归类的特征	
[0261]	<222>	(1) .. (1)	
[0262]	<223>	通过OH修饰	
[0263]	<220>		
[0264]	<221>	尚未归类的特征	
[0265]	<222>	(45) .. (45)	
[0266]	<223>	通过ppp修饰	
[0267]	<400>	17	
[0268]		aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaauuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuu	45
[0269]	<210>	18	
[0270]	<211>	49	
[0271]	<212>	RNA	
[0272]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

[0273]	<220>		
[0274]	<223>	合成多核苷酸	
[0275]	<220>		
[0276]	<221>	尚未归类的特征	
[0277]	<222>	(1) .. (1)	
[0278]	<223>	通过OH修饰	
[0279]	<220>		
[0280]	<221>	尚未归类的特征	
[0281]	<222>	(49) .. (49)	
[0282]	<223>	通过ppp修饰	
[0283]	<400>	18	
[0284]		aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaauuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	49
[0285]	<210>	19	
[0286]	<211>	43	
[0287]	<212>	RNA	
[0288]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0289]	<220>		
[0290]	<223>	合成多核苷酸	
[0291]	<220>		
[0292]	<221>	尚未归类的特征	
[0293]	<222>	(1) .. (1)	
[0294]	<223>	通过ppp修饰	
[0295]	<220>		
[0296]	<221>	尚未归类的特征	
[0297]	<222>	(43) .. (43)	
[0298]	<223>	通过ppp修饰	
[0299]	<400>	19	
[0300]		gggaaauaag agaaaagaag agucccuuuu uucucucuuu ucu	43
[0301]	<210>	20	
[0302]	<211>	40	
[0303]	<212>	RNA	
[0304]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0305]	<220>		
[0306]	<223>	合成多核苷酸	
[0307]	<220>		
[0308]	<221>	尚未归类的特征	
[0309]	<222>	(1) .. (1)	
[0310]	<223>	通过ppp修饰	
[0311]	<220>		

[0312]	<221>	尚未归类的特征	
[0313]	<222>	(40) .. (40)	
[0314]	<223>	通过ppp修饰	
[0315]	<400>	20	
[0316]		gggaaauaag agagaaaaga cccuuuauuc ucucuuuuuc	40
[0317]	<210>	21	
[0318]	<211>	40	
[0319]	<212>	RNA	
[0320]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0321]	<220>		
[0322]	<223>	合成多核苷酸	
[0323]	<220>		
[0324]	<221>	尚未归类的特征	
[0325]	<222>	(1) .. (1)	
[0326]	<223>	通过ppp修饰	
[0327]	<220>		
[0328]	<221>	尚未归类的特征	
[0329]	<222>	(40) .. (40)	
[0330]	<223>	通过OH修饰	
[0331]	<400>	21	
[0332]		gggaaauaag agagaaaaga cccuuuauuc ucucuuuuuc	40
[0333]	<210>	22	
[0334]	<211>	40	
[0335]	<212>	RNA	
[0336]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0337]	<220>		
[0338]	<223>	合成多核苷酸	
[0339]	<220>		
[0340]	<221>	尚未归类的特征	
[0341]	<222>	(1) .. (1)	
[0342]	<223>	通过OH修饰	
[0343]	<220>		
[0344]	<221>	尚未归类的特征	
[0345]	<222>	(40) .. (40)	
[0346]	<223>	通过ppp修饰	
[0347]	<400>	22	
[0348]		gggaaauaag agagaaaaga cccuuuauuc ucucuuuuuc	40
[0349]	<210>	23	
[0350]	<211>	45	

[0351]	<212>	RNA	
[0352]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0353]	<220>		
[0354]	<223>	合成多核苷酸	
[0355]	<220>		
[0356]	<221>	尚未归类的特征	
[0357]	<222>	(1) .. (1)	
[0358]	<223>	通过OH修饰	
[0359]	<220>		
[0360]	<221>	尚未归类的特征	
[0361]	<222>	(45) .. (45)	
[0362]	<223>	通过ppp修饰	
[0363]	<400>	23	
[0364]		gggaaauaag agagaaaaga agagucccuu uauucucucu uuucu	45
[0365]	<210>	24	
[0366]	<211>	50	
[0367]	<212>	RNA	
[0368]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0369]	<220>		
[0370]	<223>	合成多核苷酸	
[0371]	<220>		
[0372]	<221>	尚未归类的特征	
[0373]	<222>	(1) .. (1)	
[0374]	<223>	通过OH修饰	
[0375]	<220>		
[0376]	<221>	尚未归类的特征	
[0377]	<222>	(50) .. (50)	
[0378]	<223>	通过ppp修饰	
[0379]	<400>	24	
[0380]		gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa cccuuuauuc ucucuuuuu	50
[0381]	<210>	25	
[0382]	<211>	55	
[0383]	<212>	RNA	
[0384]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0385]	<220>		
[0386]	<223>	合成多核苷酸	
[0387]	<220>		
[0388]	<221>	尚未归类的特征	
[0389]	<222>	(1) .. (1)	

[0390]	<223>	通过OH修饰	
[0391]	<220>		
[0392]	<221>	尚未归类的特征	
[0393]	<222>	(55) .. (55)	
[0394]	<223>	通过ppp修饰	
[0395]	<400>	25	
[0396]		gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaucccuu uauucucucu uuucu	55
[0397]	<210>	26	
[0398]	<211>	60	
[0399]	<212>	RNA	
[0400]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0401]	<220>		
[0402]	<223>	合成多核苷酸	
[0403]	<220>		
[0404]	<221>	尚未归类的特征	
[0405]	<222>	(1) .. (1)	
[0406]	<223>	通过OH修饰	
[0407]	<220>		
[0408]	<221>	尚未归类的特征	
[0409]	<222>	(60) .. (60)	
[0410]	<223>	通过ppp修饰	
[0411]	<400>	26	
[0412]		gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag cccuuuauuc ucucuuuucu	60
[0413]	<210>	27	
[0414]	<211>	67	
[0415]	<212>	RNA	
[0416]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0417]	<220>		
[0418]	<223>	合成多核苷酸	
[0419]	<220>		
[0420]	<221>	尚未归类的特征	
[0421]	<222>	(1) .. (1)	
[0422]	<223>	通过OH修饰	
[0423]	<220>		
[0424]	<221>	尚未归类的特征	
[0425]	<222>	(67) .. (67)	
[0426]	<223>	通过ppp修饰	
[0427]	<400>	27	
[0428]		gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccccc uuuaucucu	60

[0429]	cuuuucu	67
[0430]	<210> 28	
[0431]	<211> 26	
[0432]	<212> RNA	
[0433]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0434]	<220>	
[0435]	<223> 合成多核苷酸	
[0436]	<400> 28	
[0437]	gacucuucuu uucucucuua uuuccc	26
[0438]	<210> 29	
[0439]	<211> 31	
[0440]	<212> RNA	
[0441]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0442]	<220>	
[0443]	<223> 合成多核苷酸	
[0444]	<400> 29	
[0445]	guucuacuc uucuuuucuc ucuauuuucc c	31
[0446]	<210> 30	
[0447]	<211> 36	
[0448]	<212> RNA	
[0449]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0450]	<220>	
[0451]	<223> 合成多核苷酸	
[0452]	<400> 30	
[0453]	gauuucuucu uacucuucuu uucucucuua uuuccc	36
[0454]	<210> 31	
[0455]	<211> 60	
[0456]	<212> RNA	
[0457]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0458]	<220>	
[0459]	<223> 合成多核苷酸	
[0460]	<400> 31	
[0461]	gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug ggagugcacg	60
[0462]	<210> 32	
[0463]	<211> 60	
[0464]	<212> RNA	
[0465]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0466]	<220>	
[0467]	<223> 合成多核苷酸	



[0468] <400> 32

[0469] cgugcacucc caugguggcu cuuauuuuc uucuuacucu uuuuuucucu cuuauuuccc 60

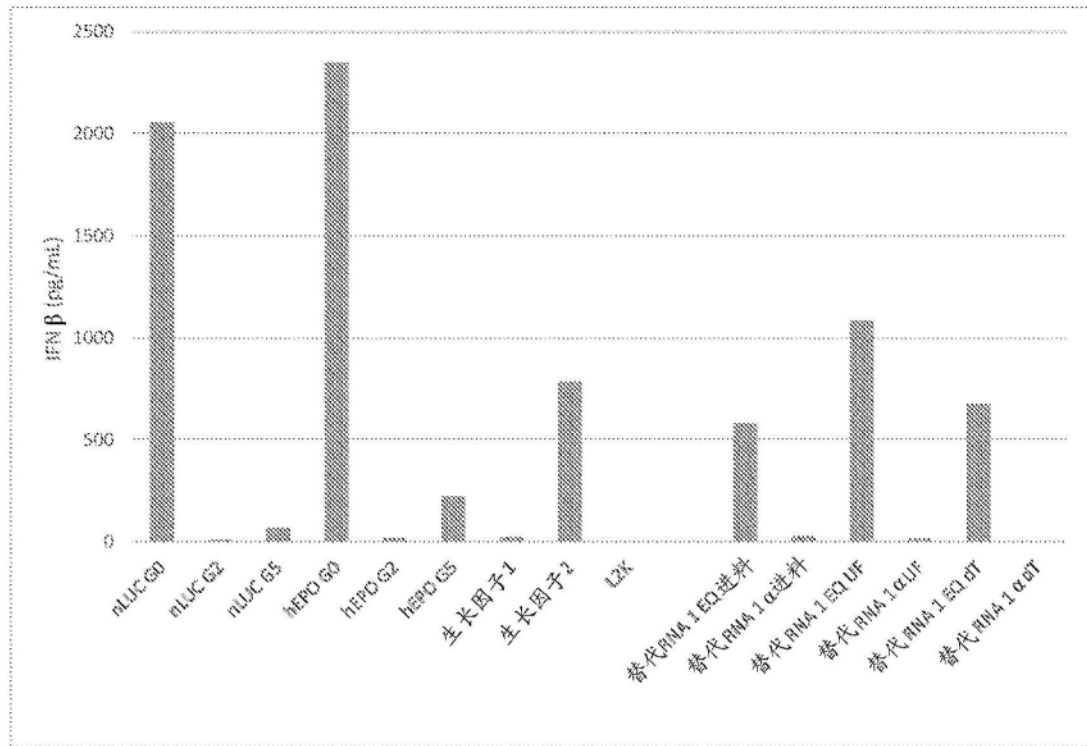


图1

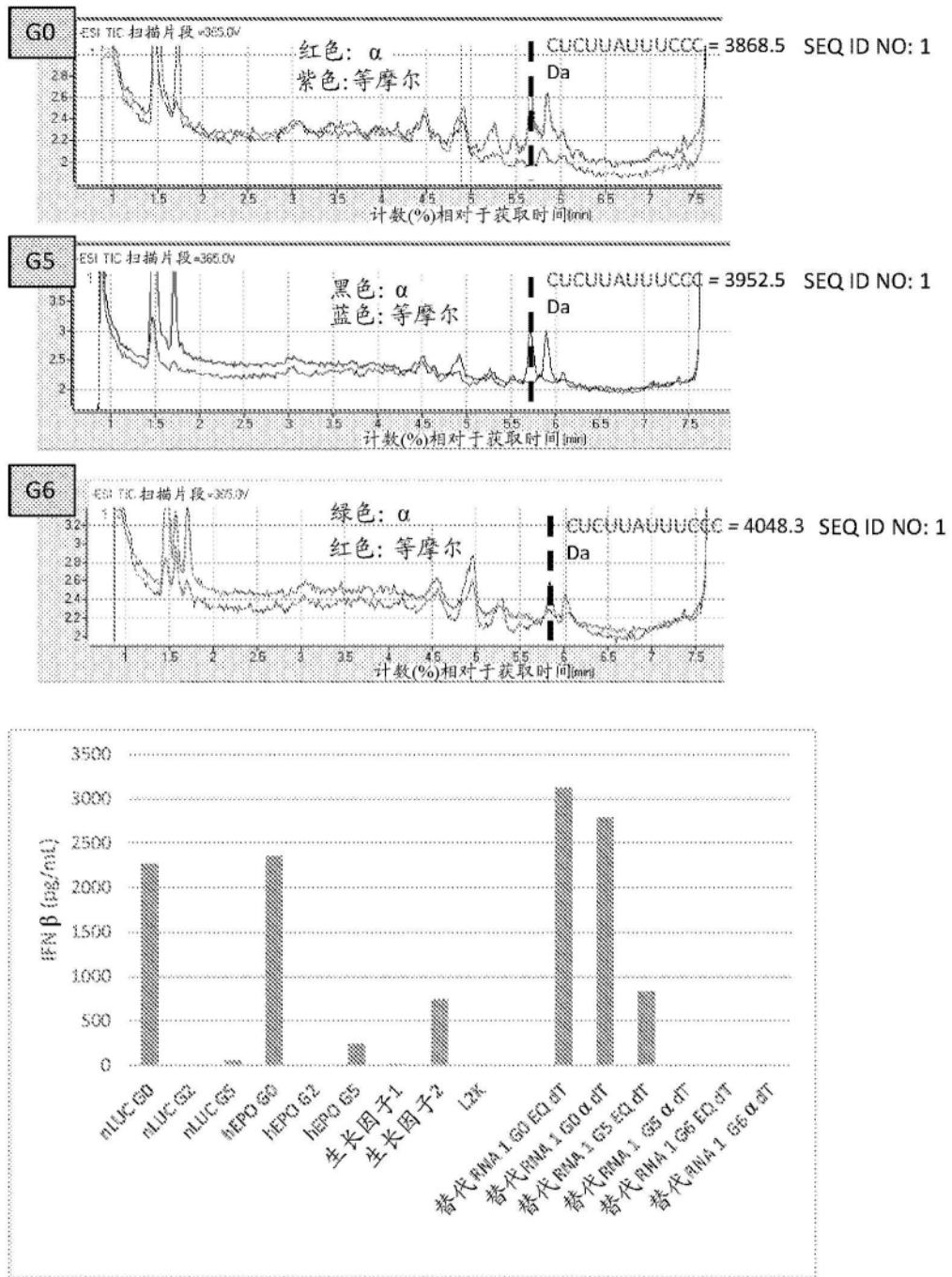


图2

替代  
RNA 2 EQ

替代  
RNA 2  $\alpha$

hEPO EQ

hEPO  $\alpha$

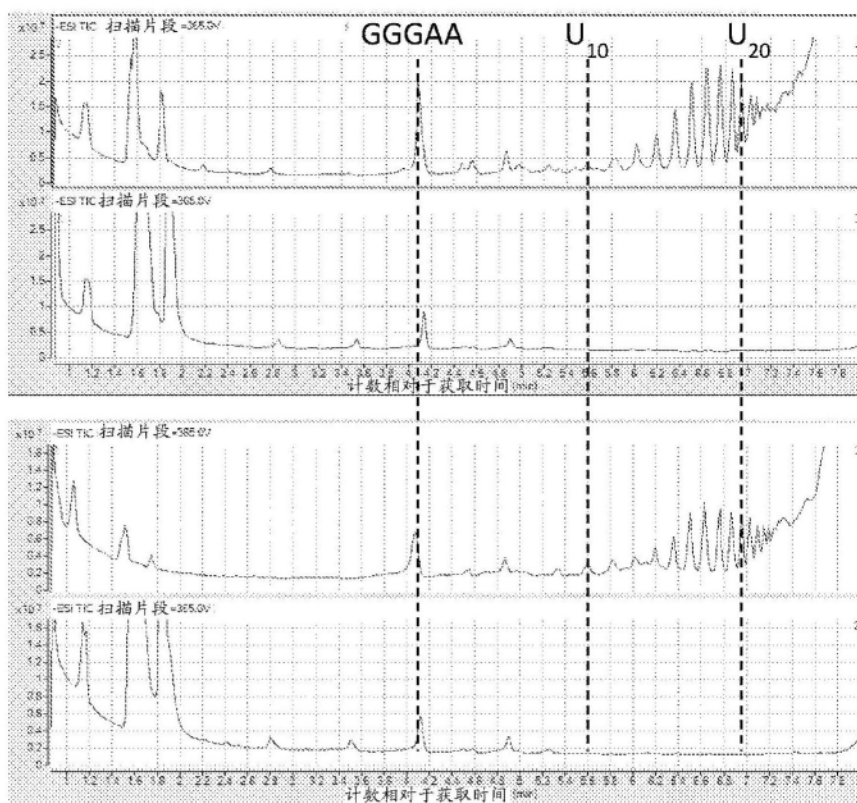


图3

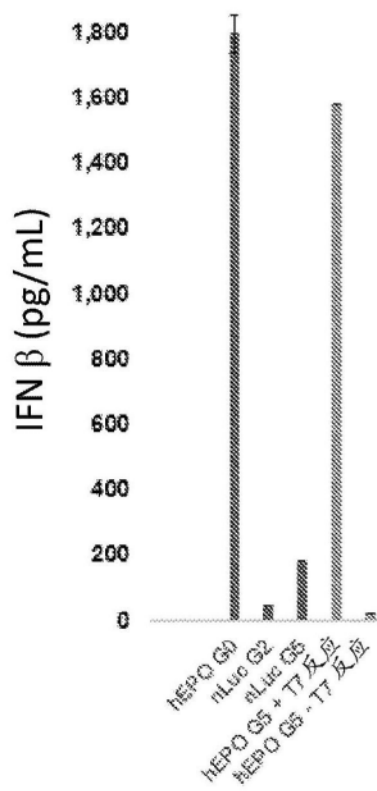
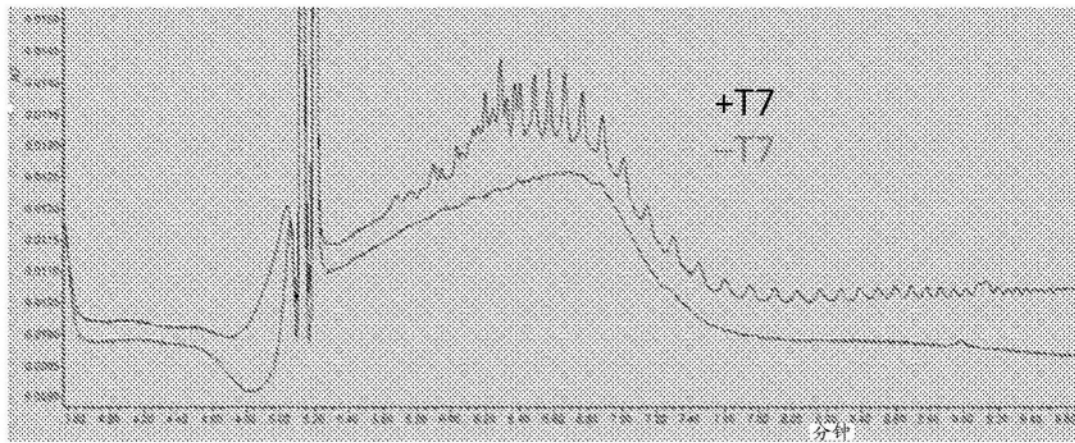


图4

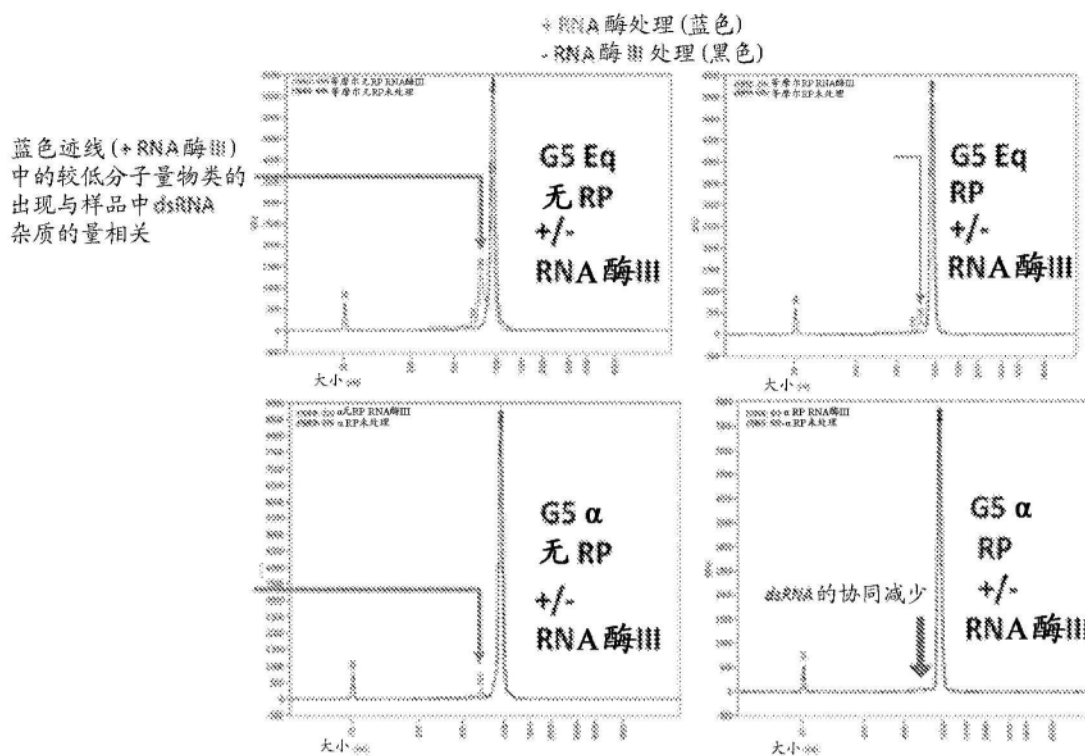


图5A

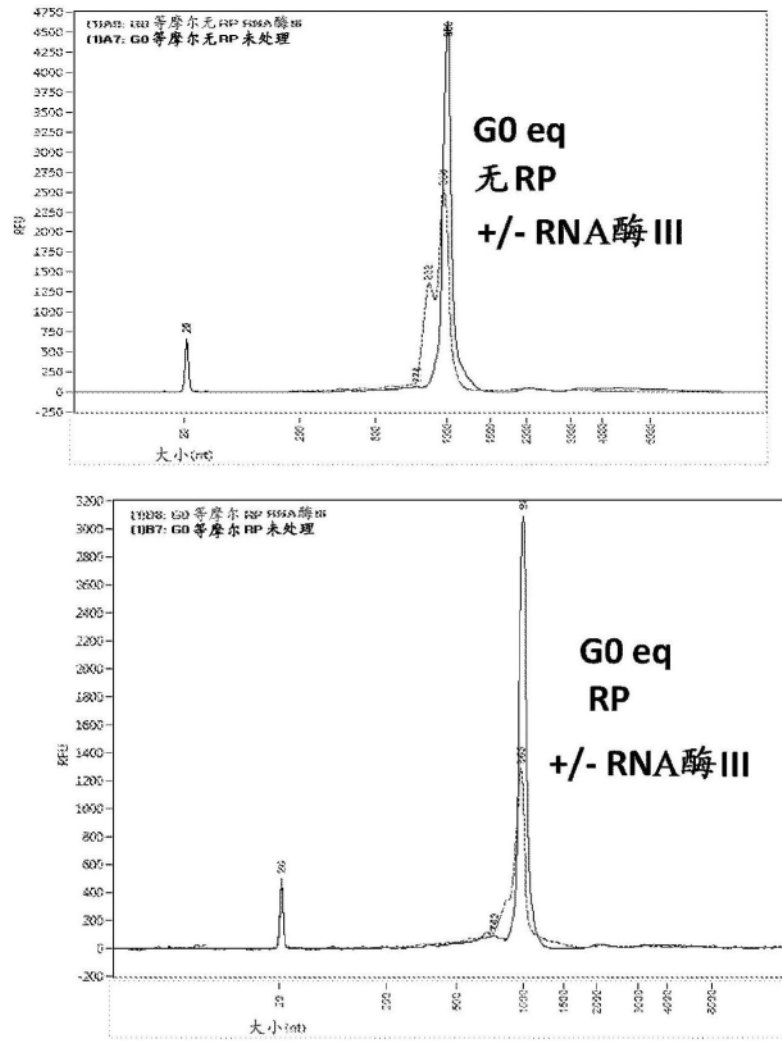


图5B

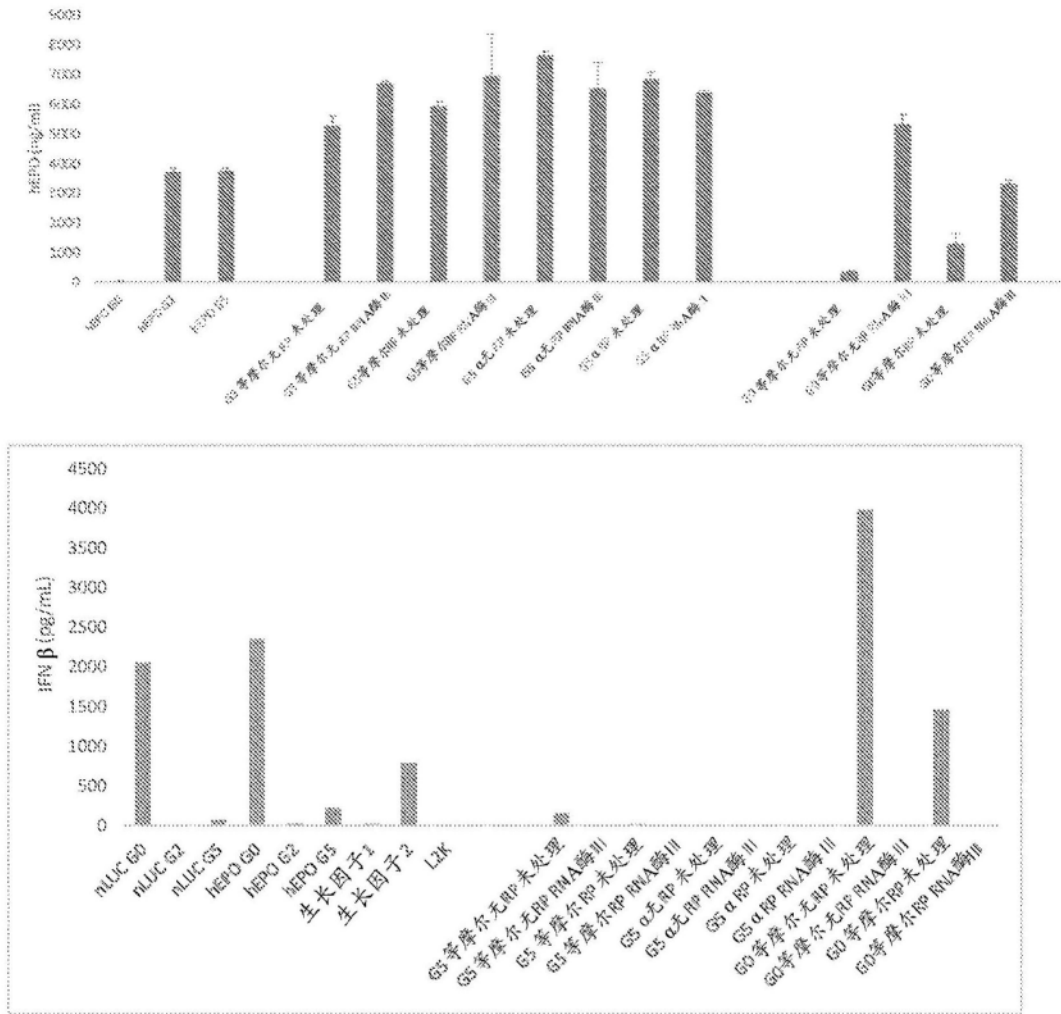


图6



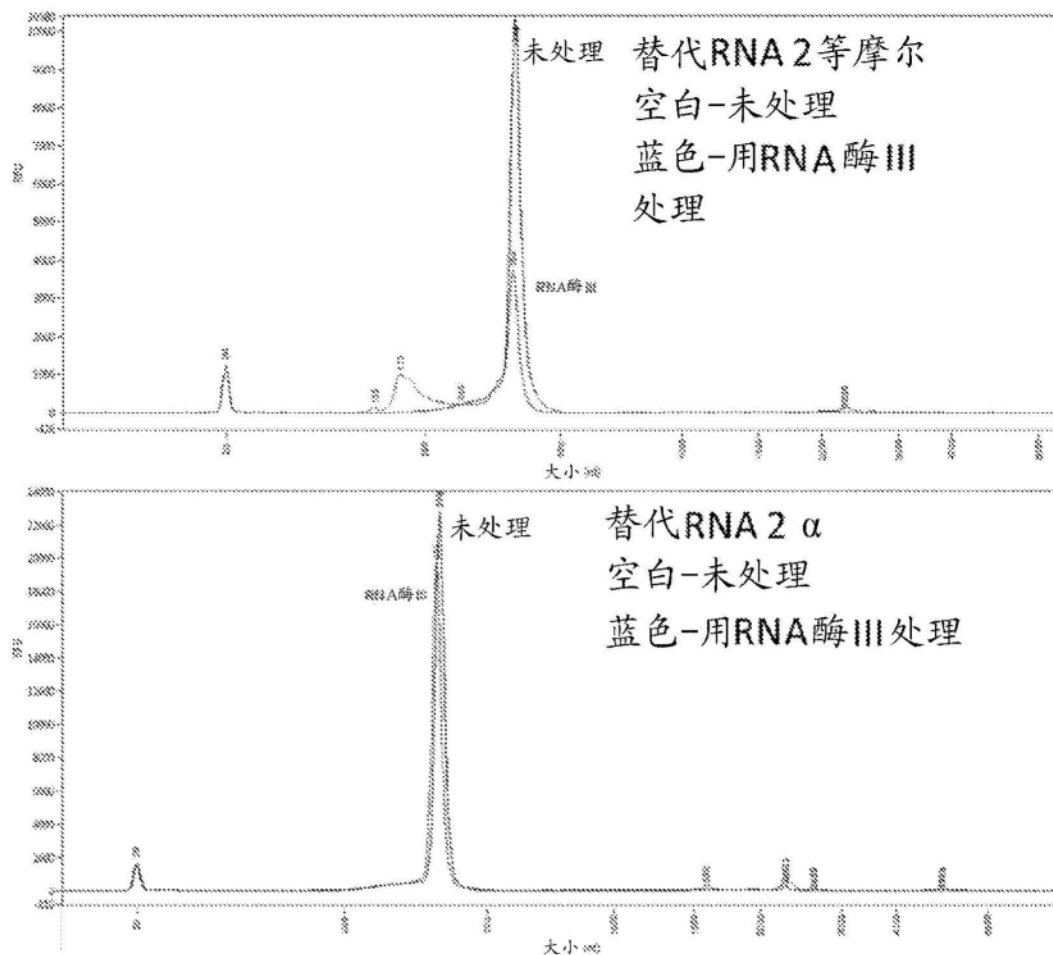


图7

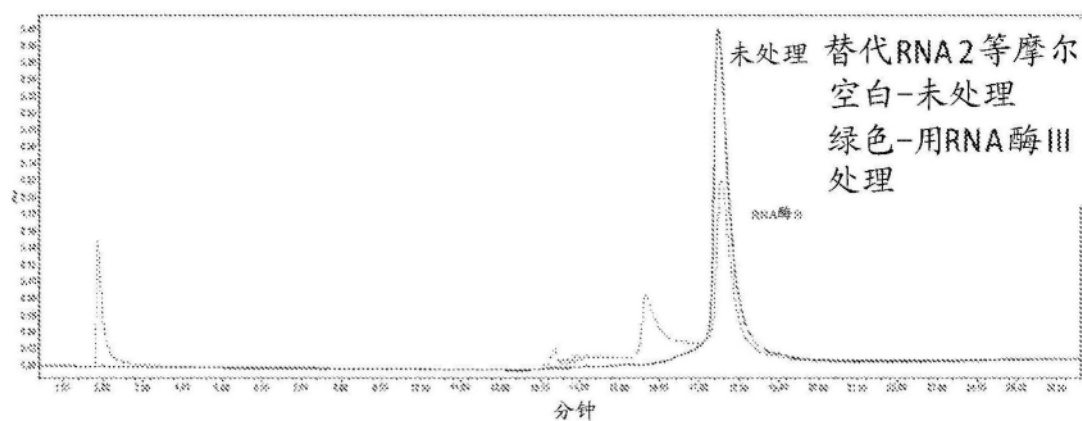


图8A

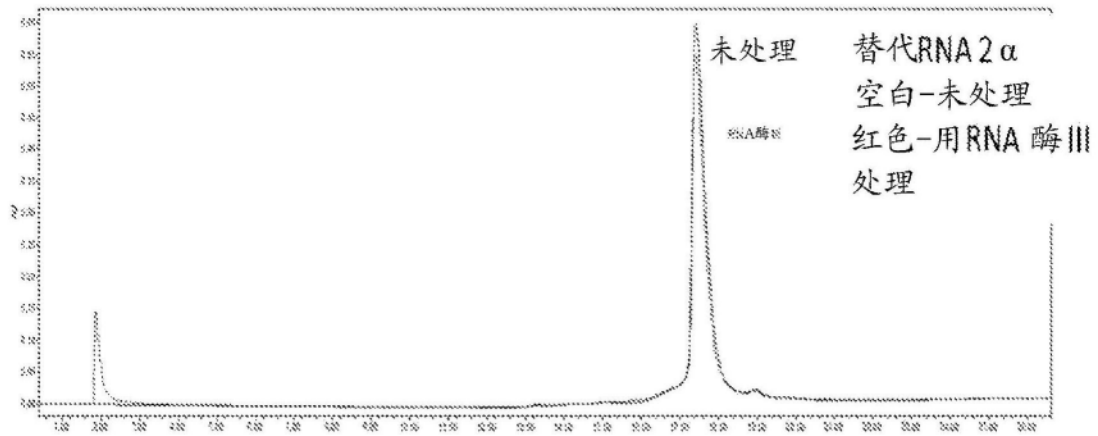


图8B

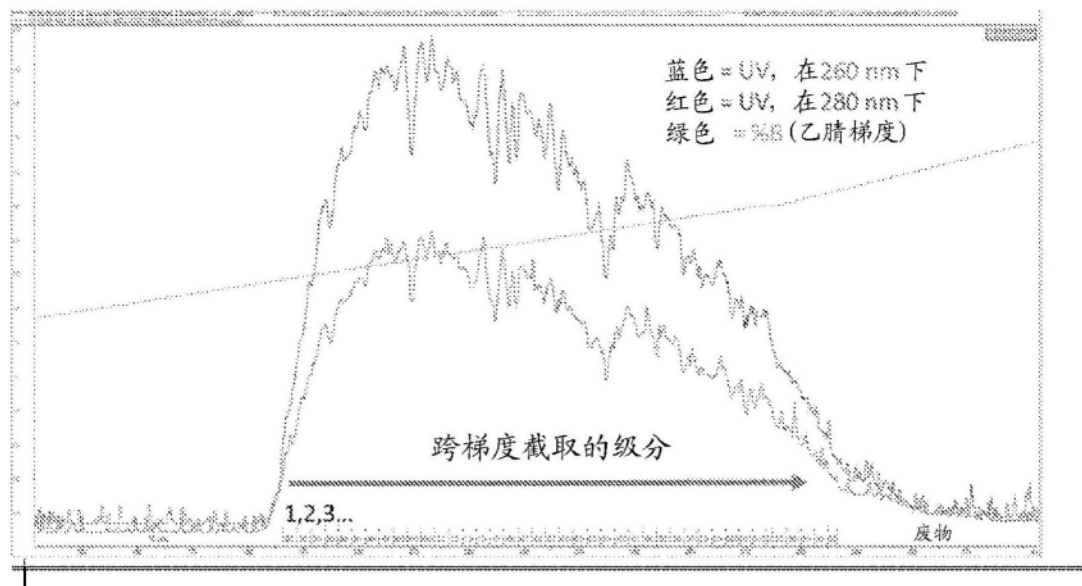


图9

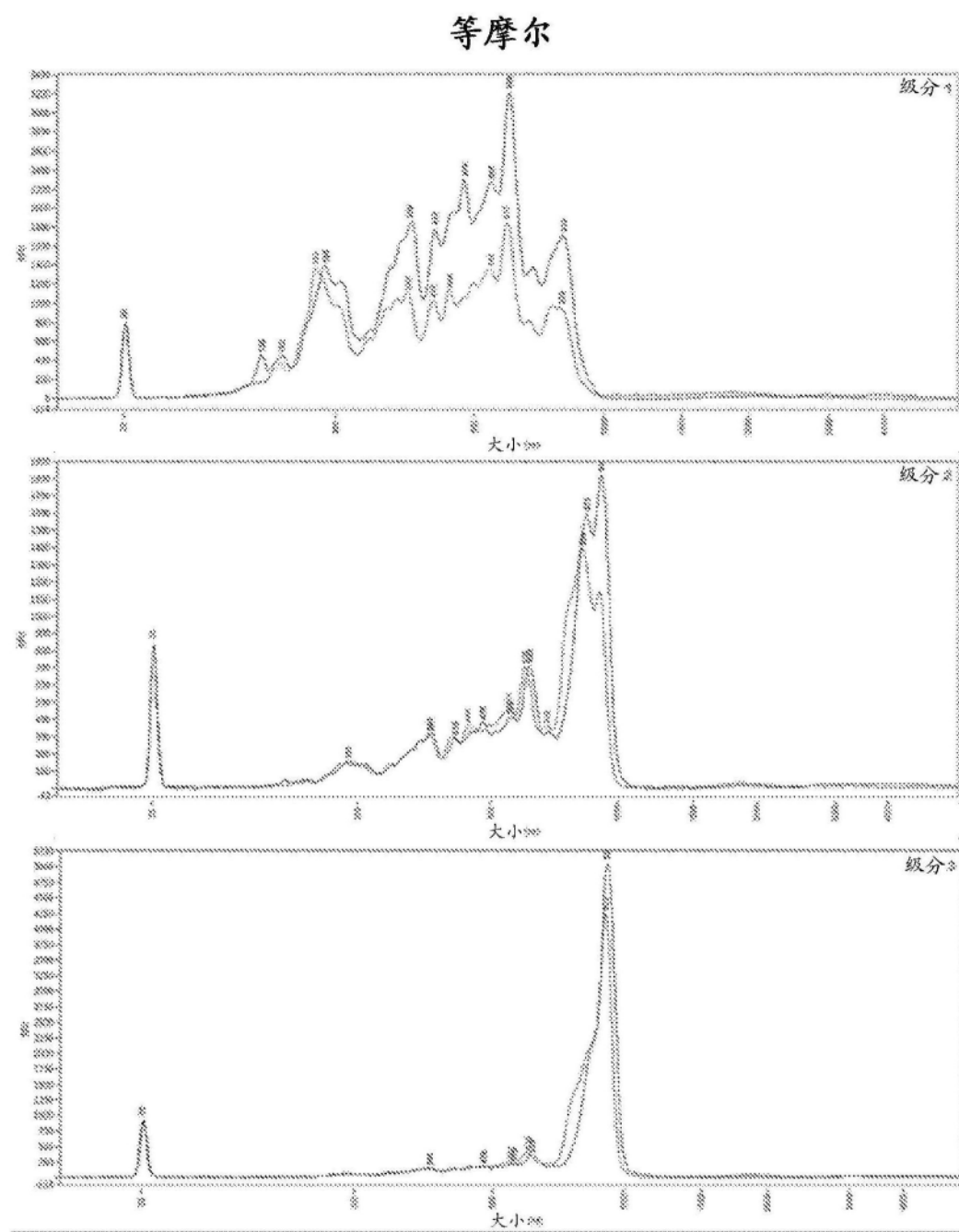


图10A

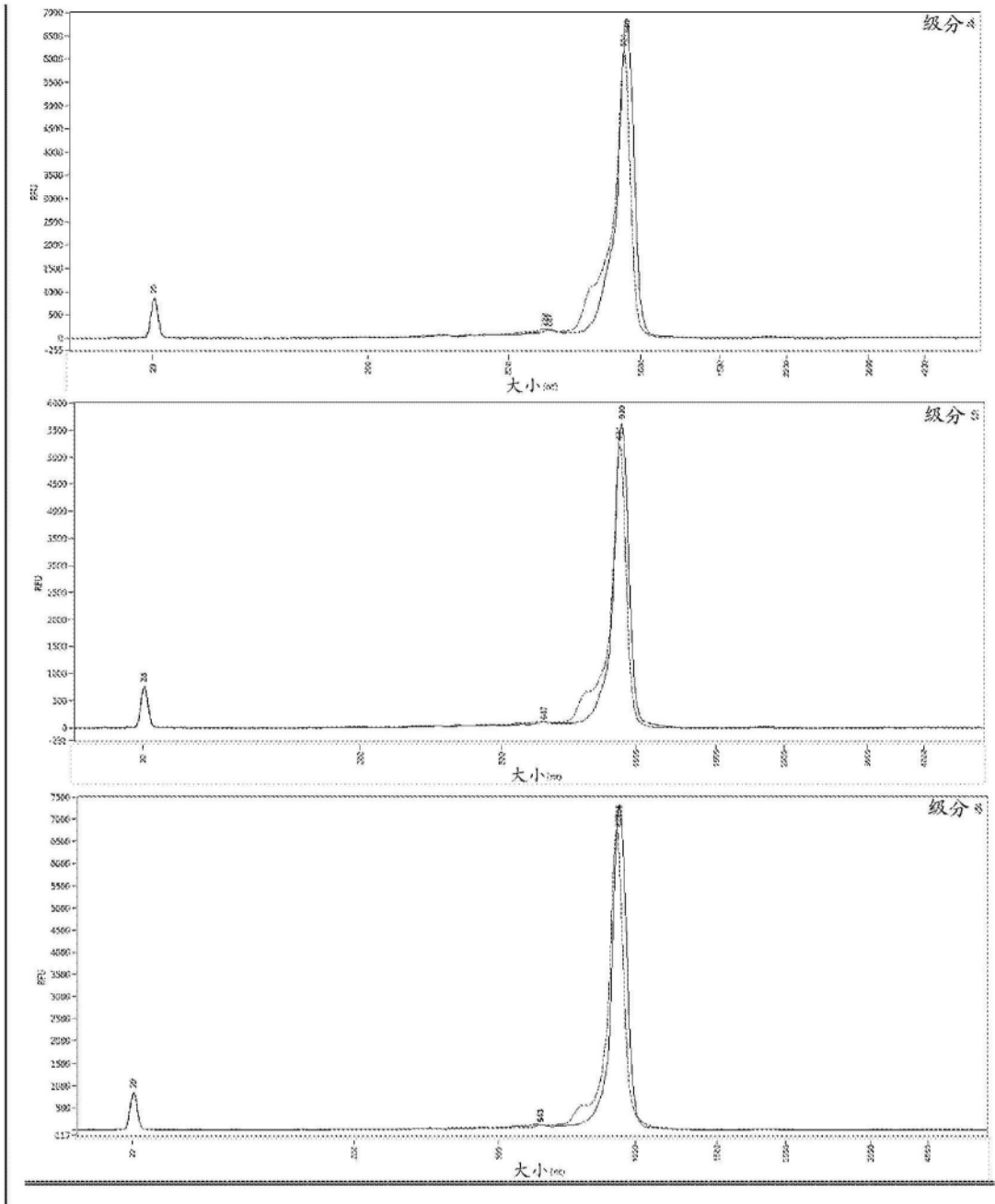


图10B

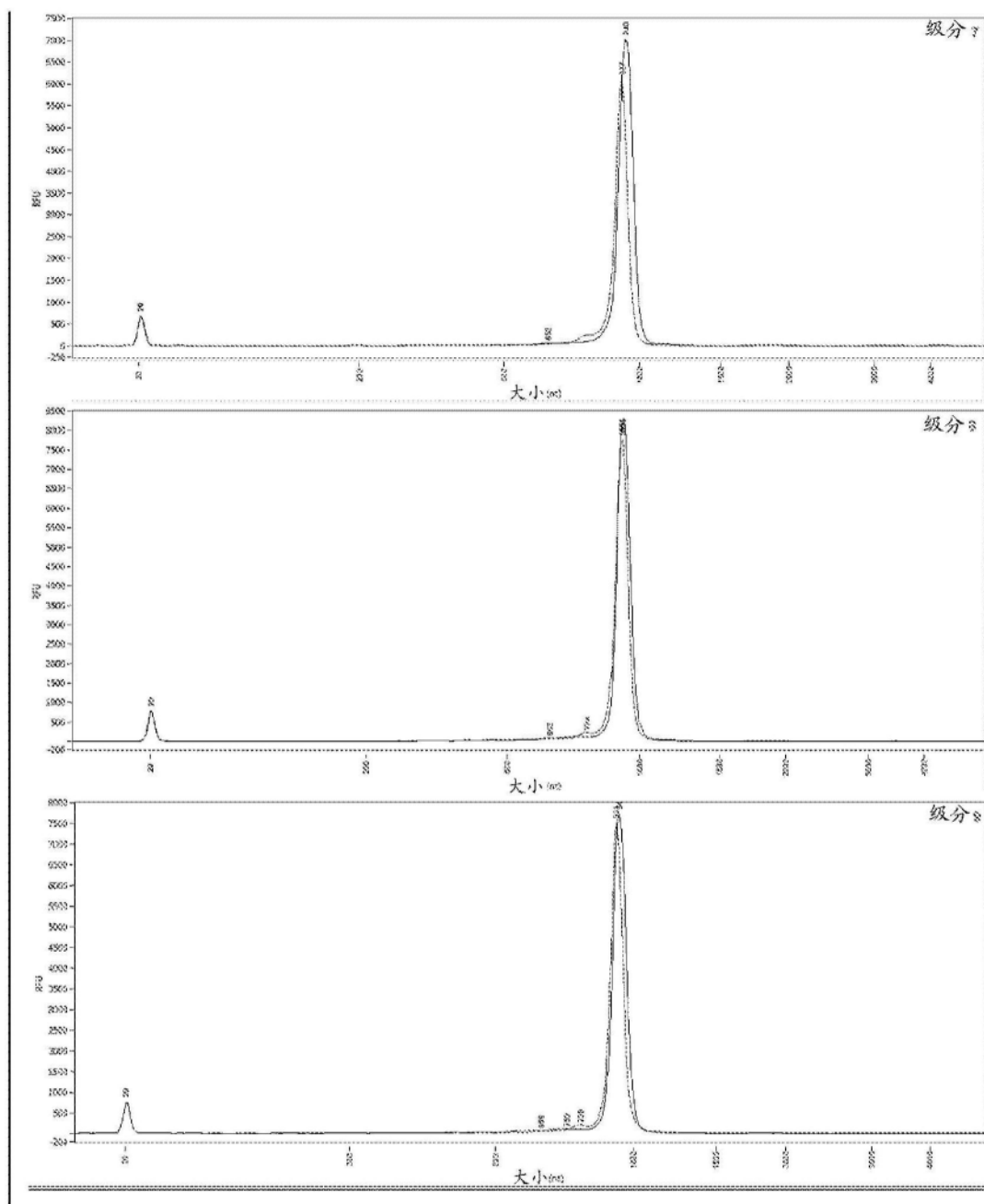


图10C

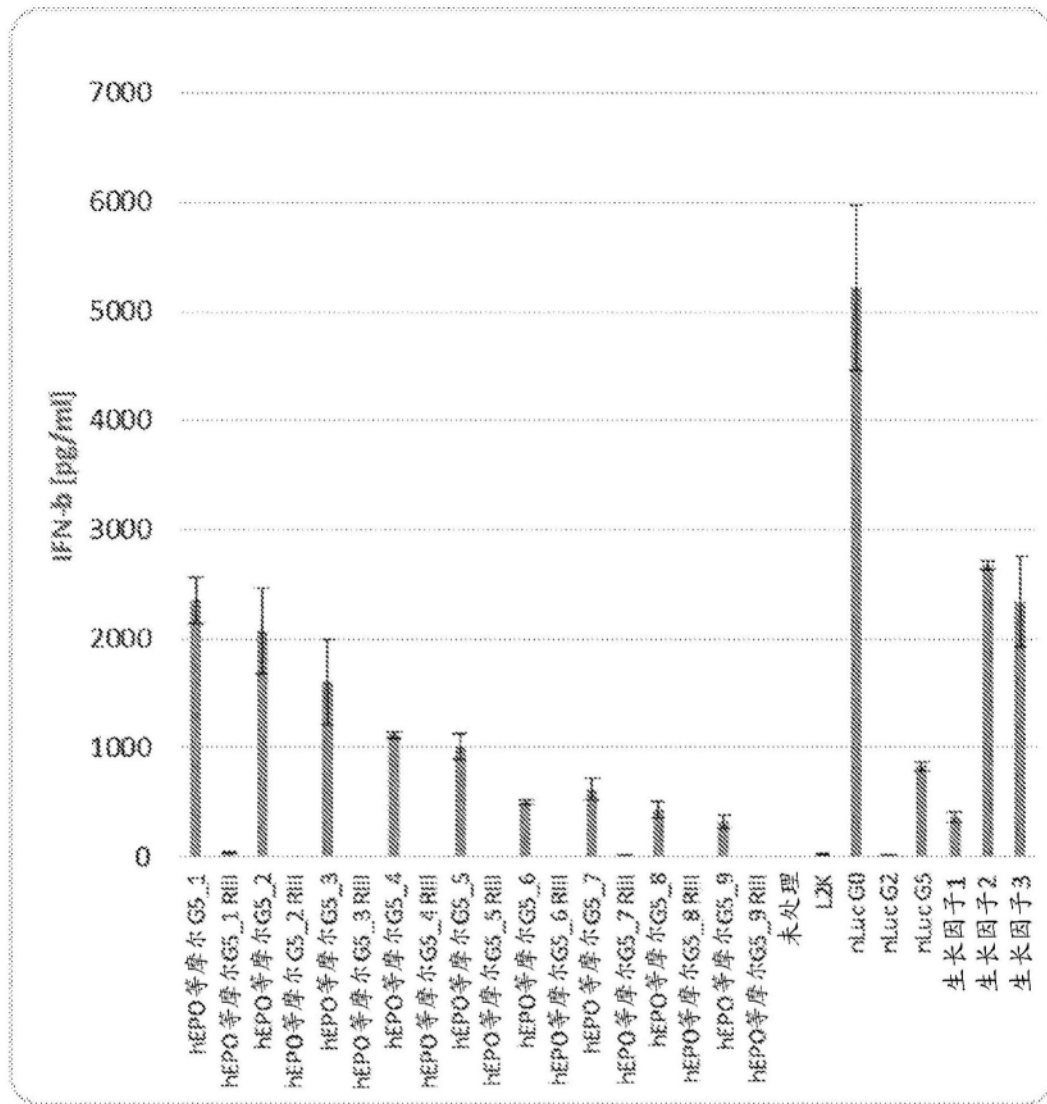


图10D

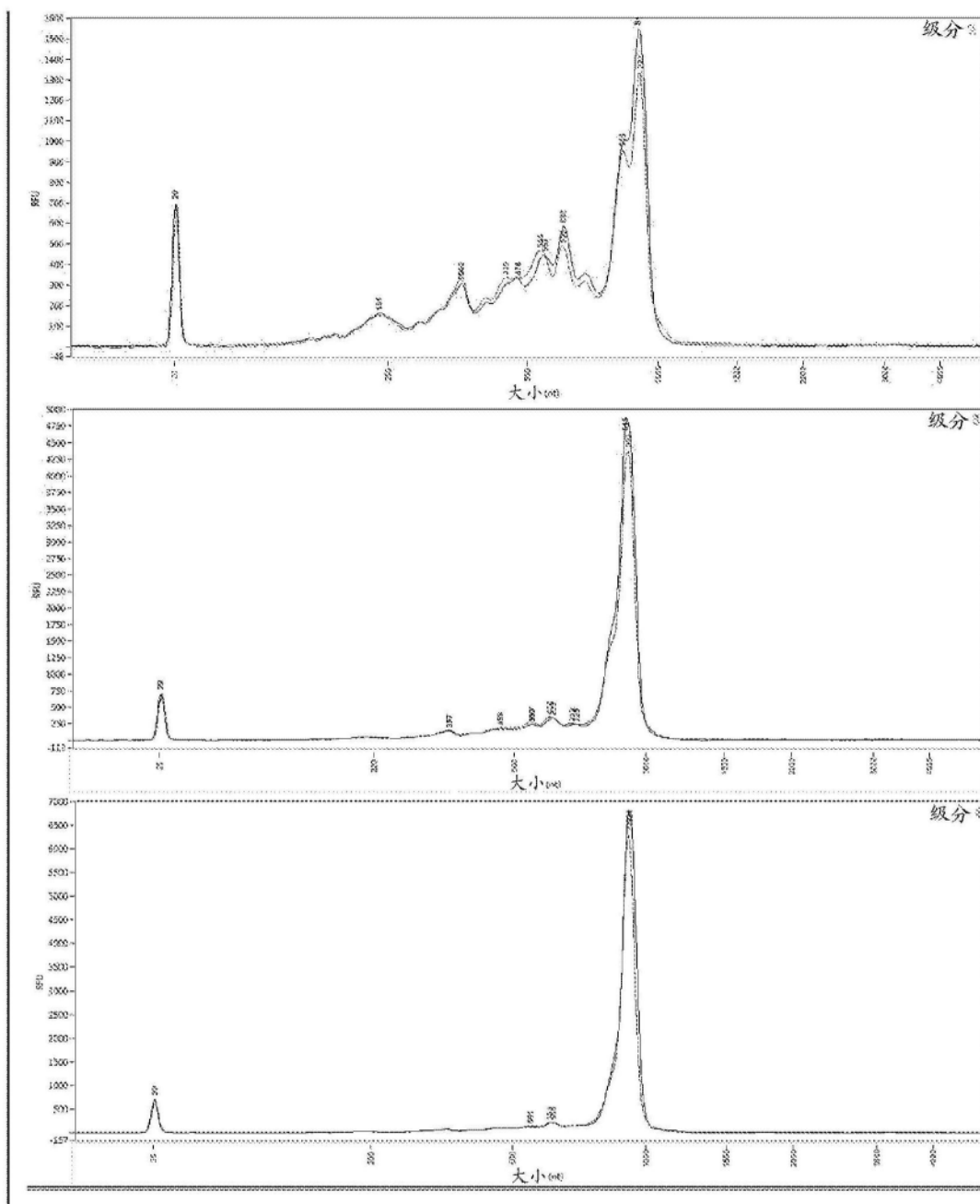


图11A

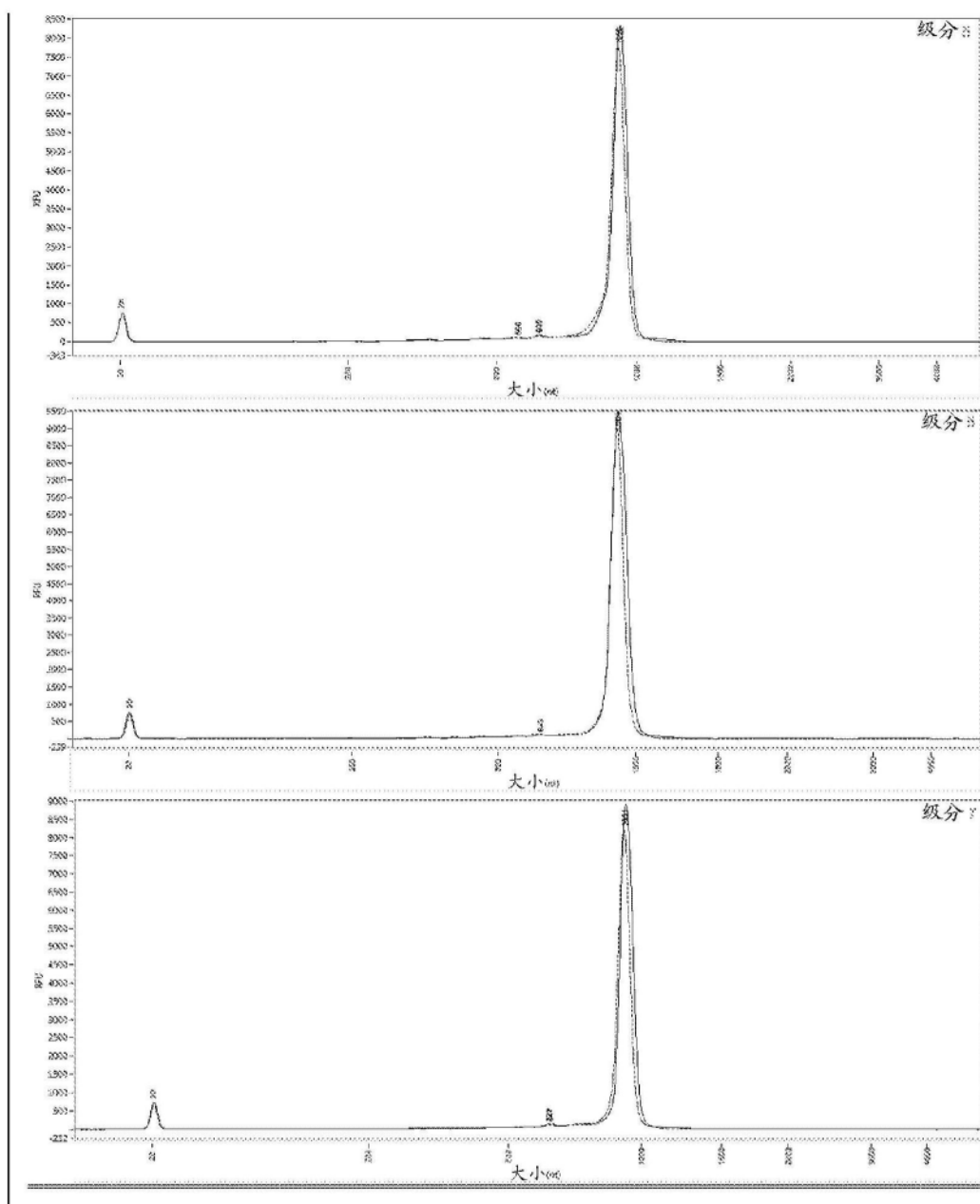


图11B



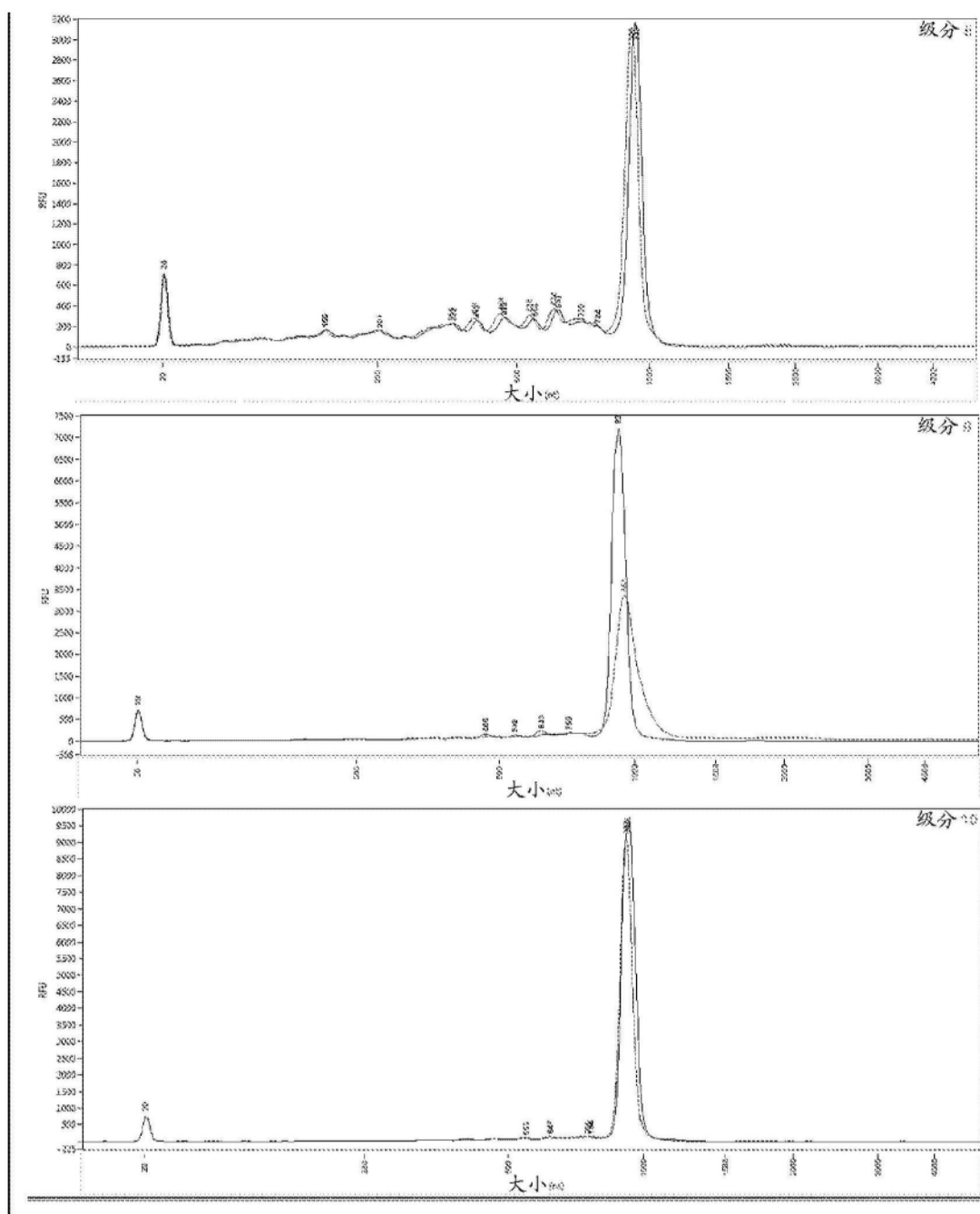


图11C

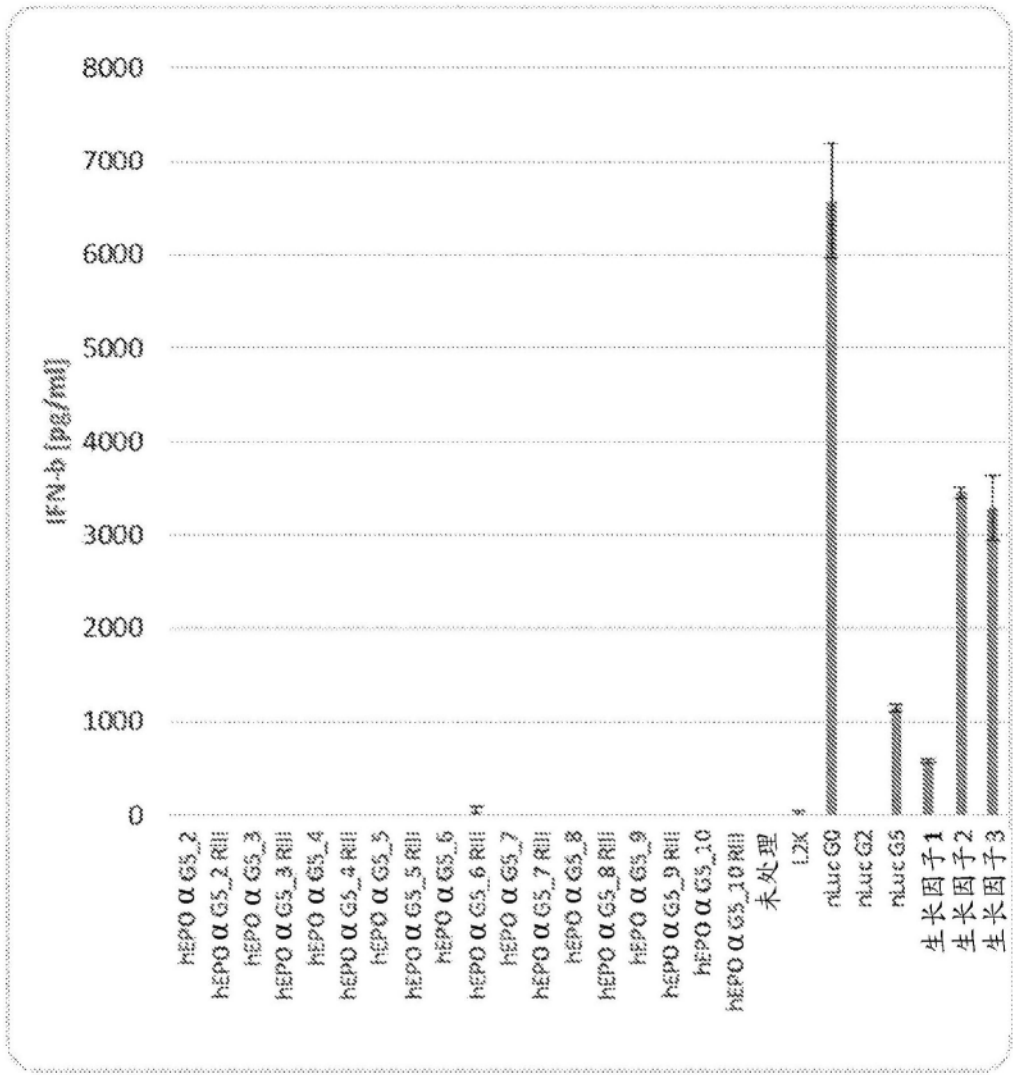


图11D



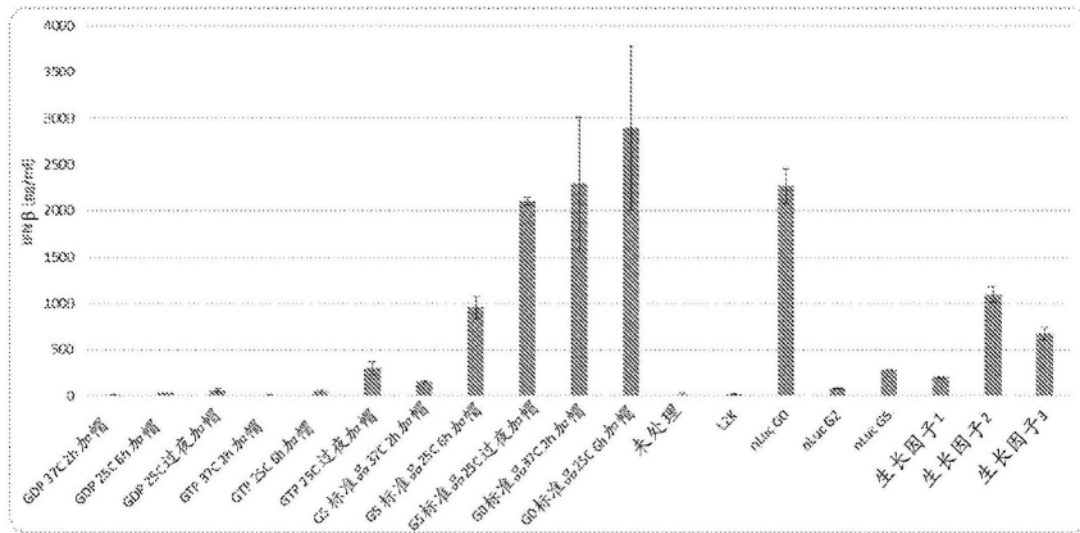


图14

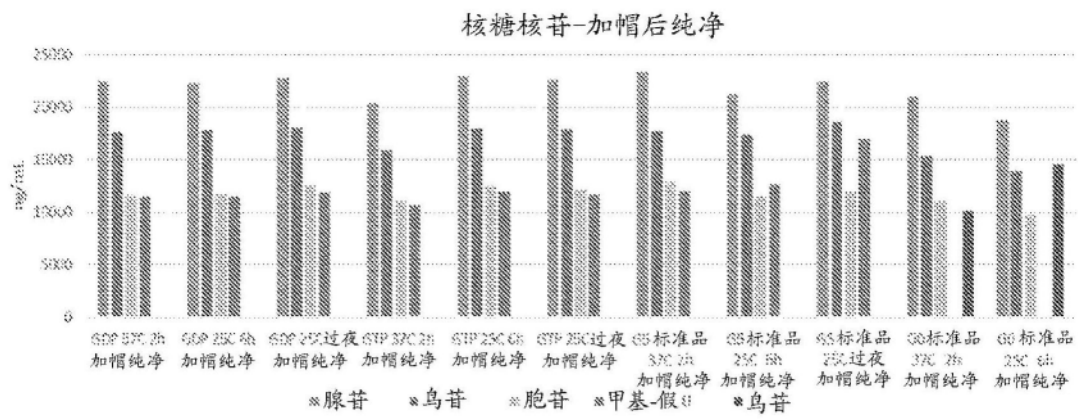


图15

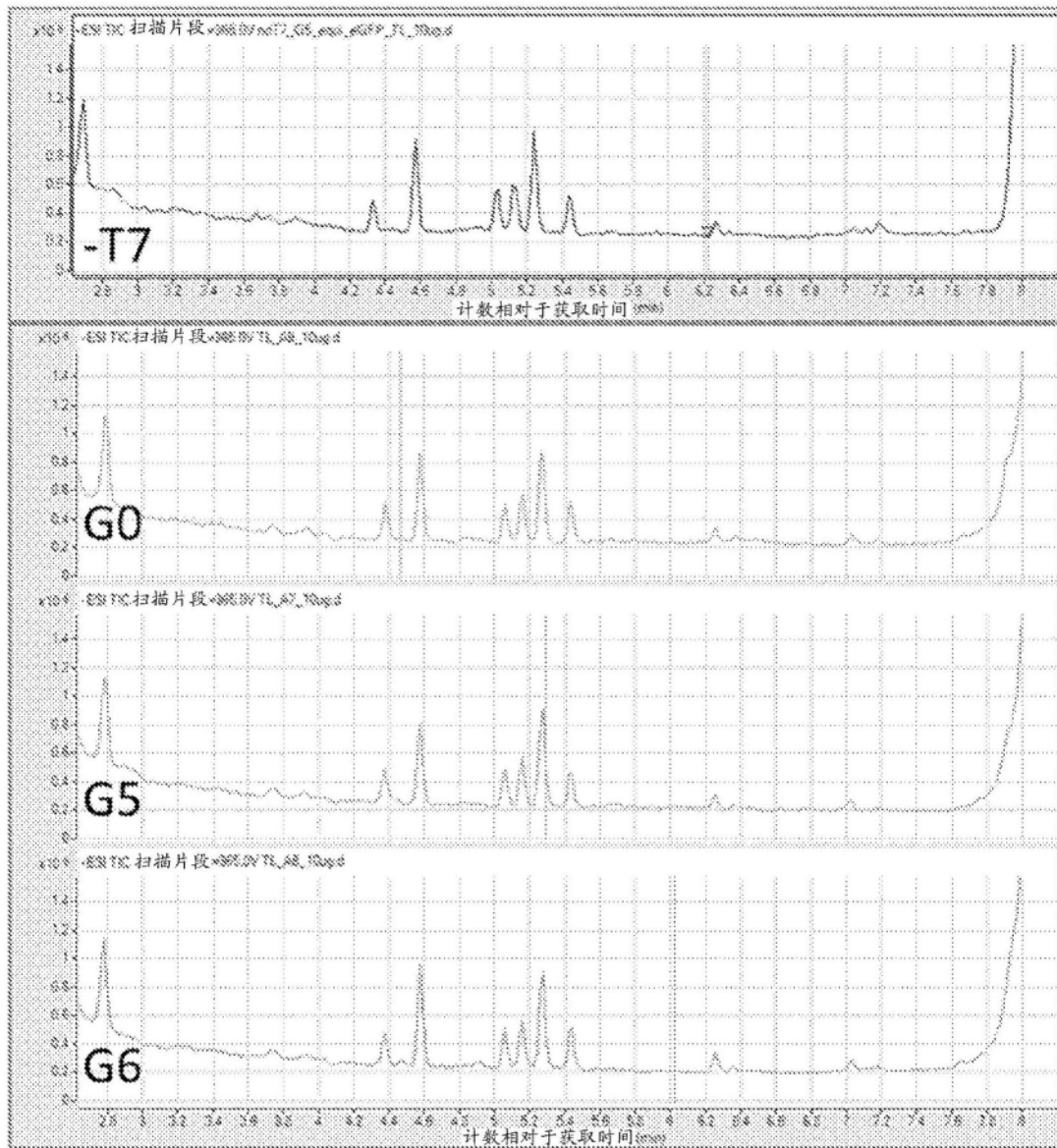


图16A

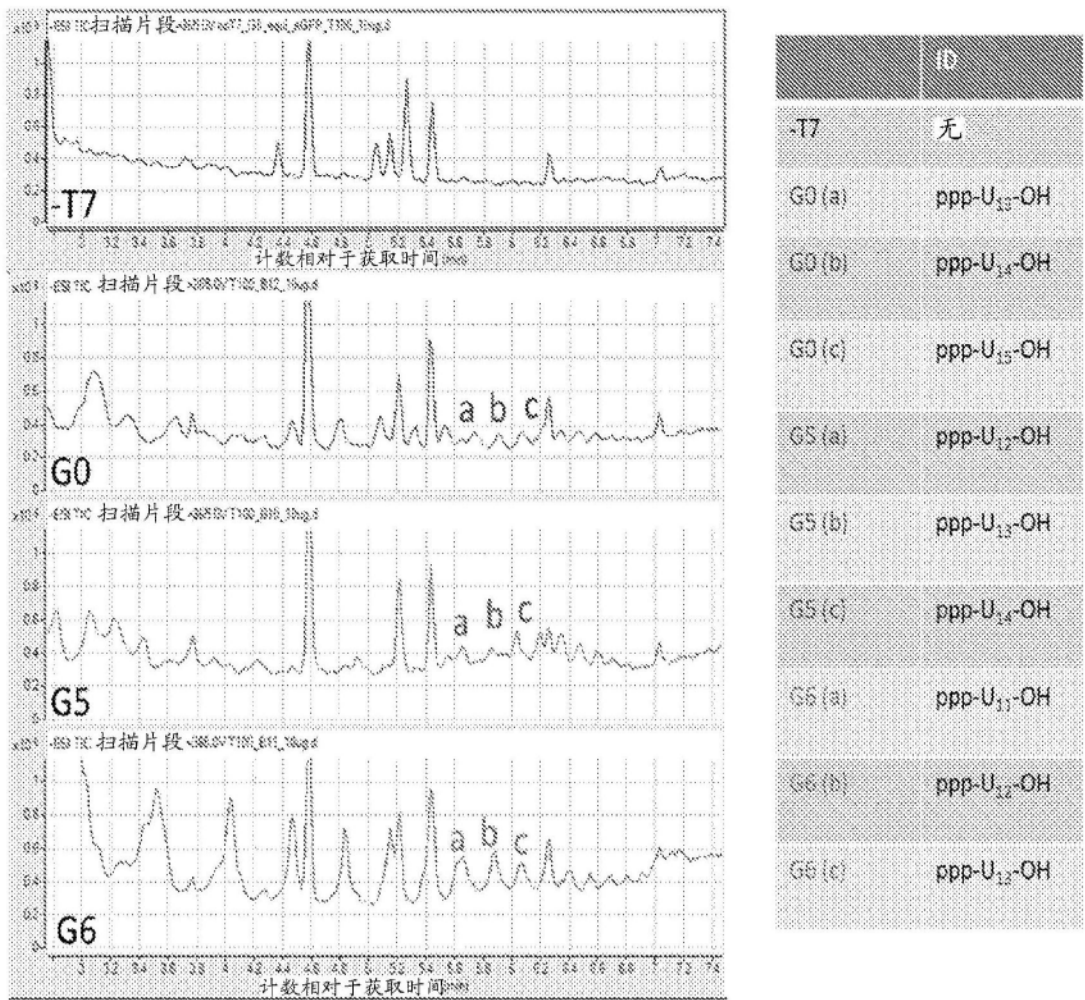


图16B

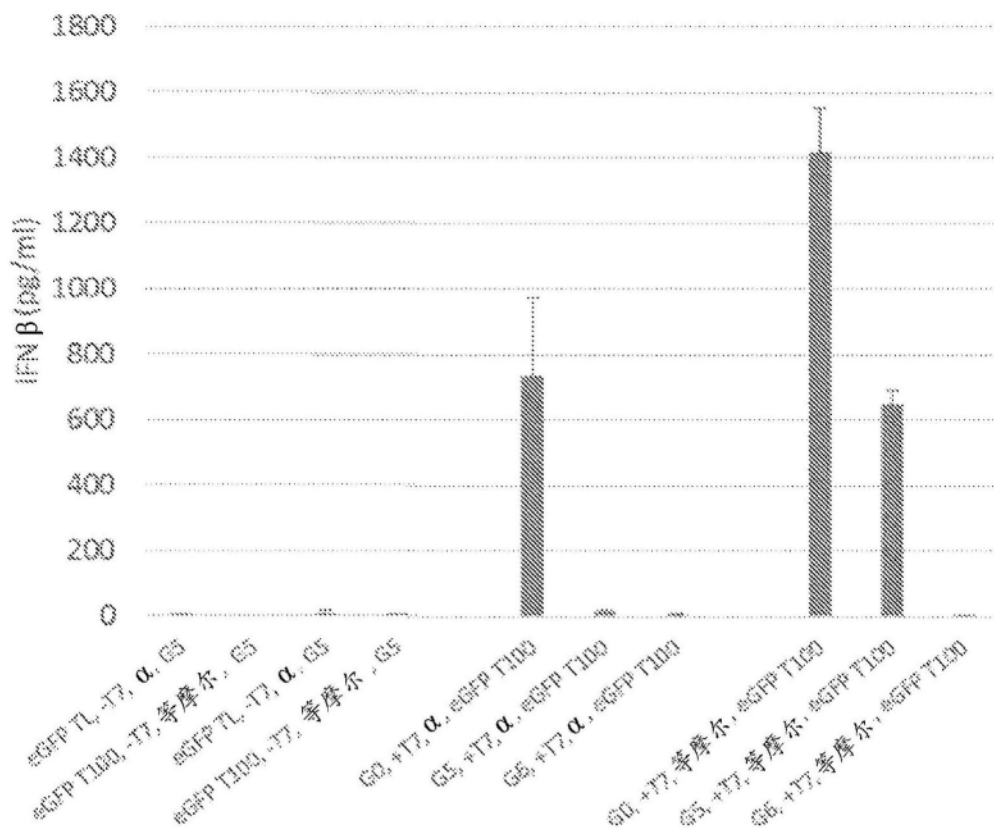


图17

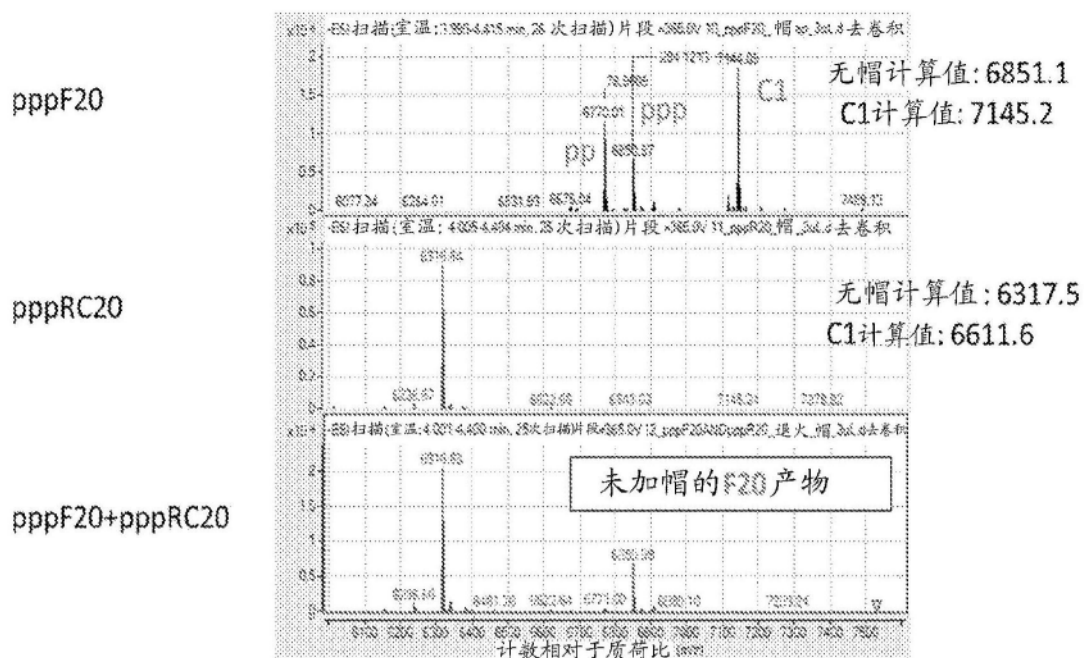


图18

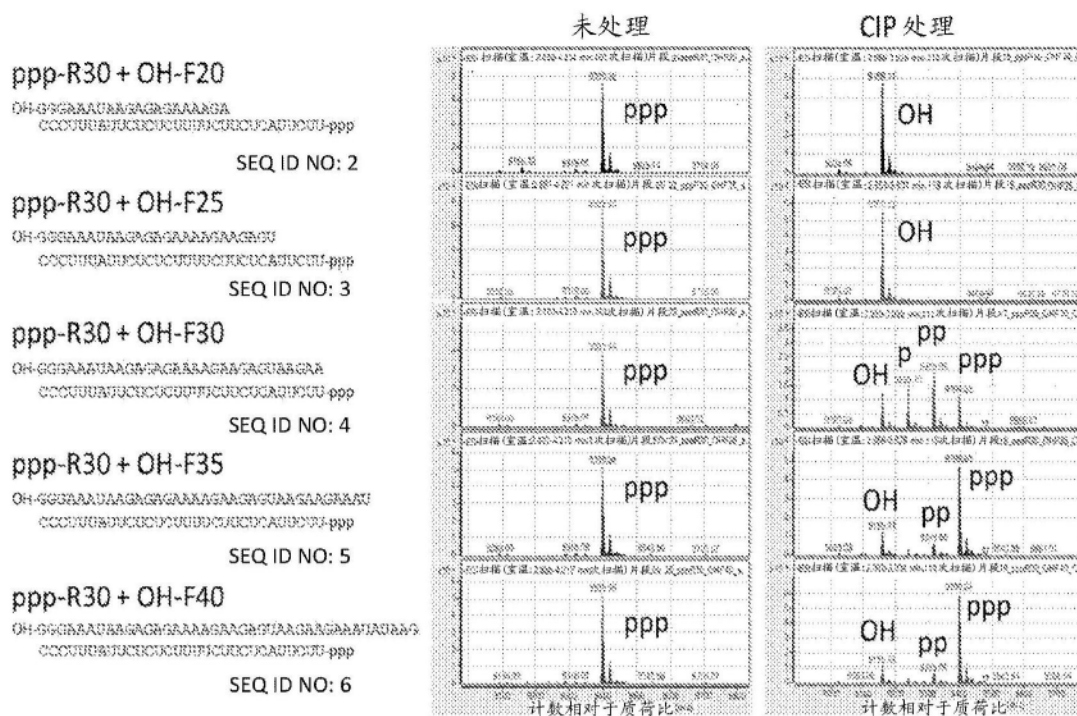


图19

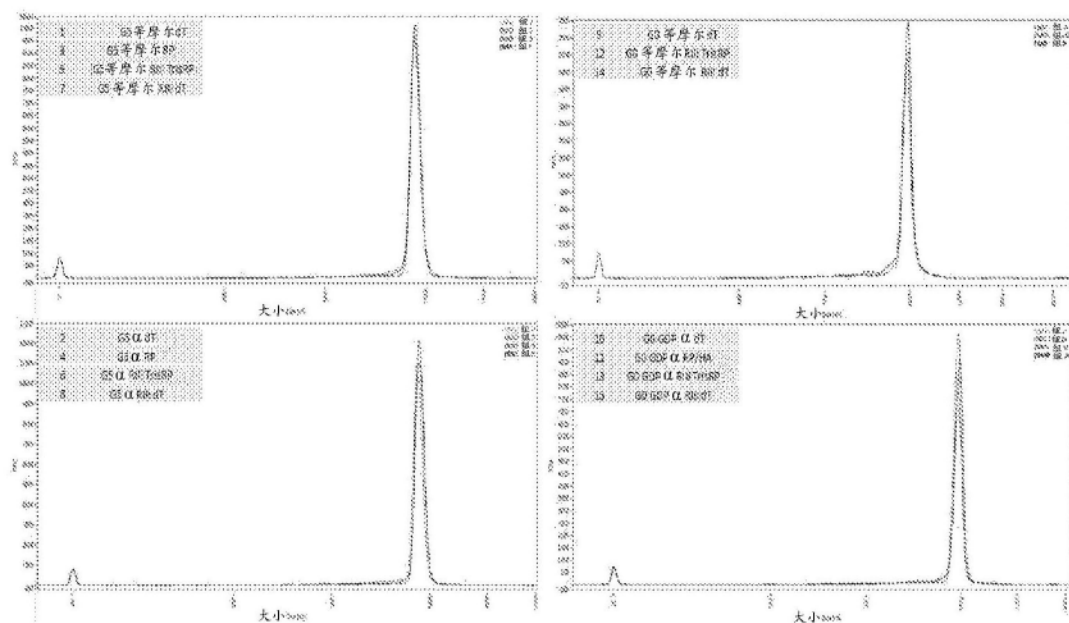


图20



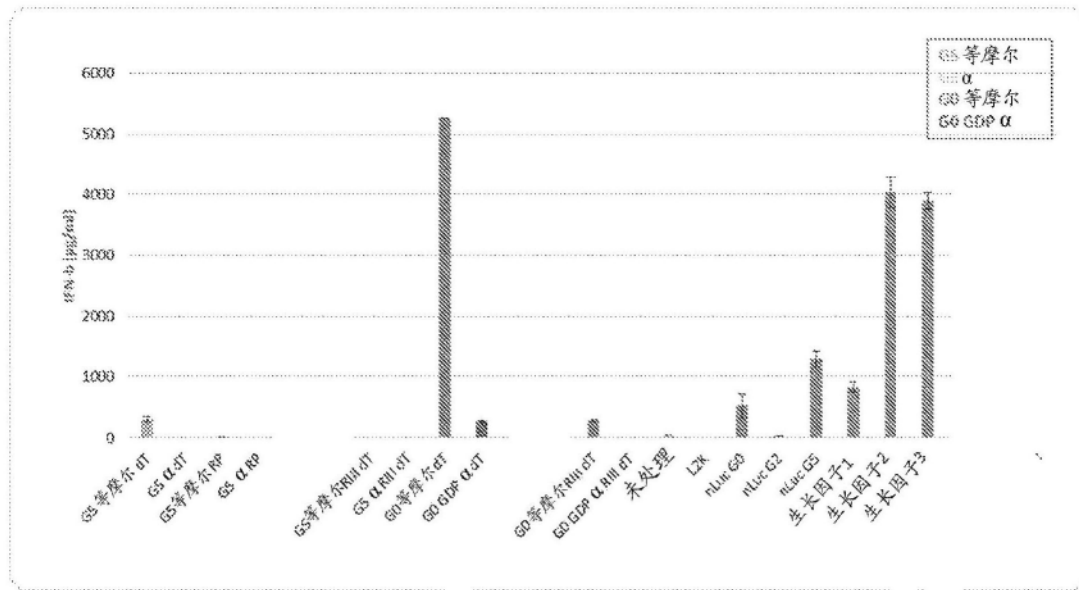


图21

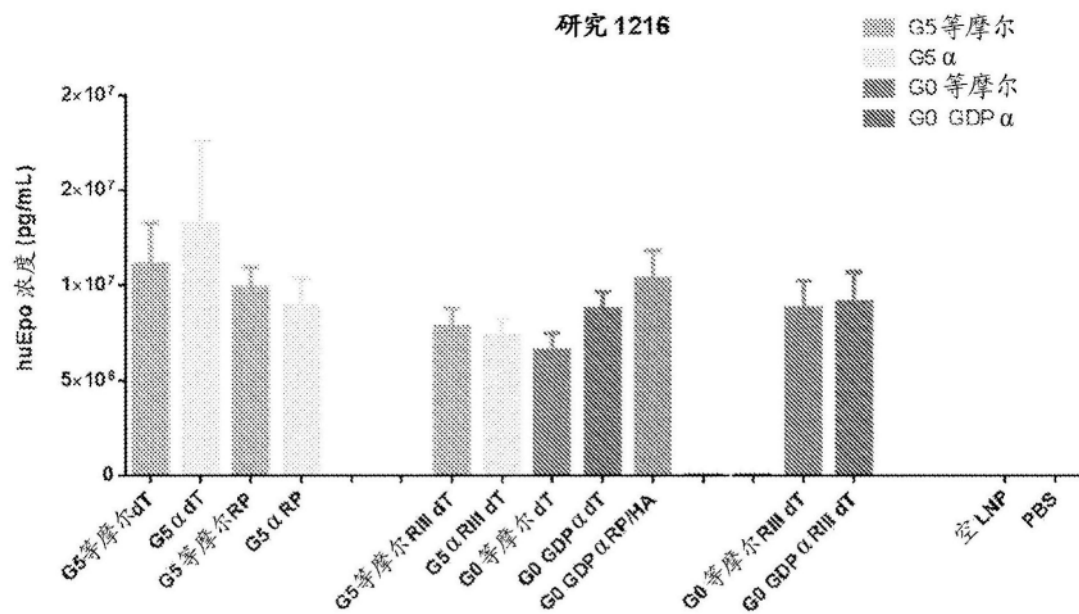


图22

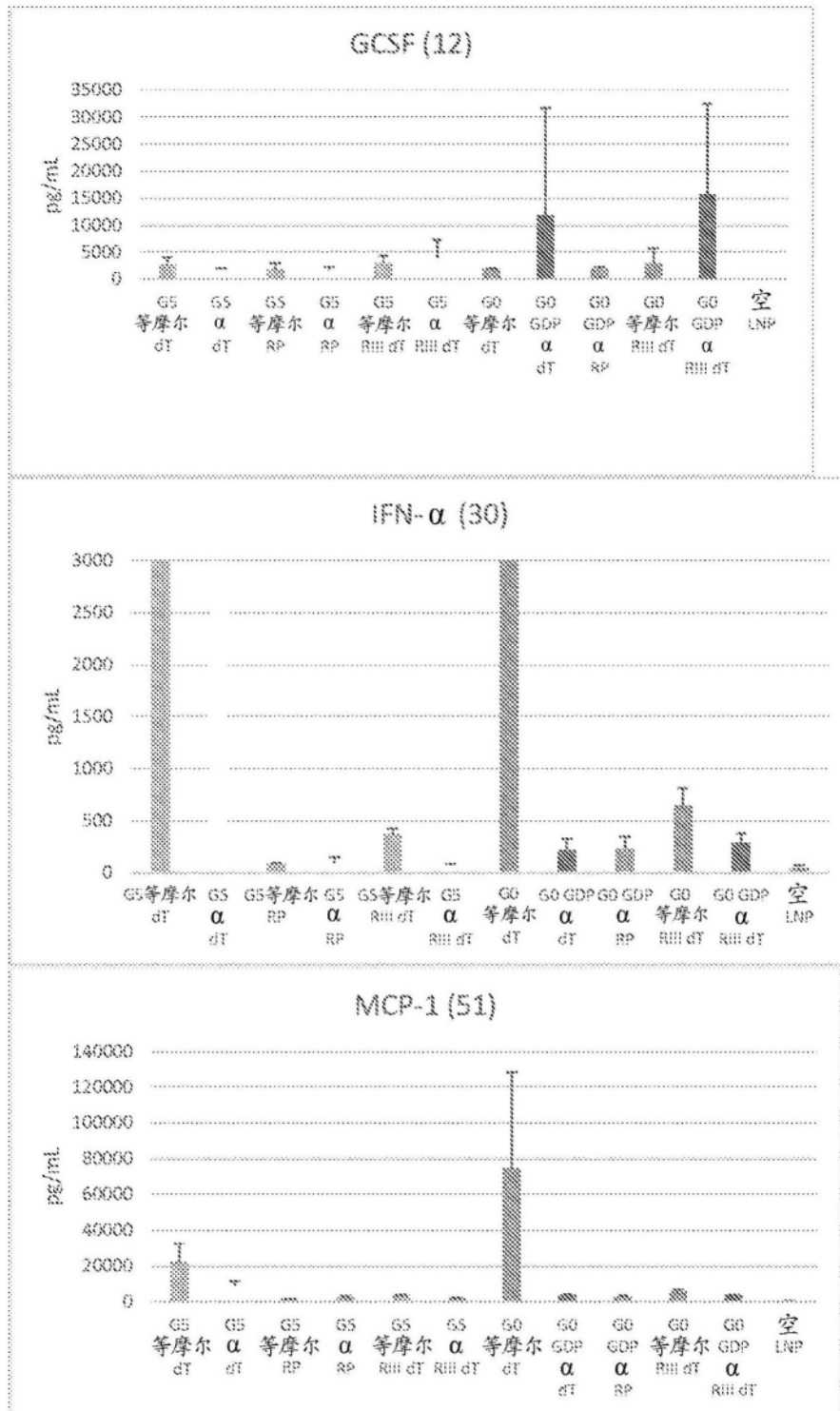


图23A

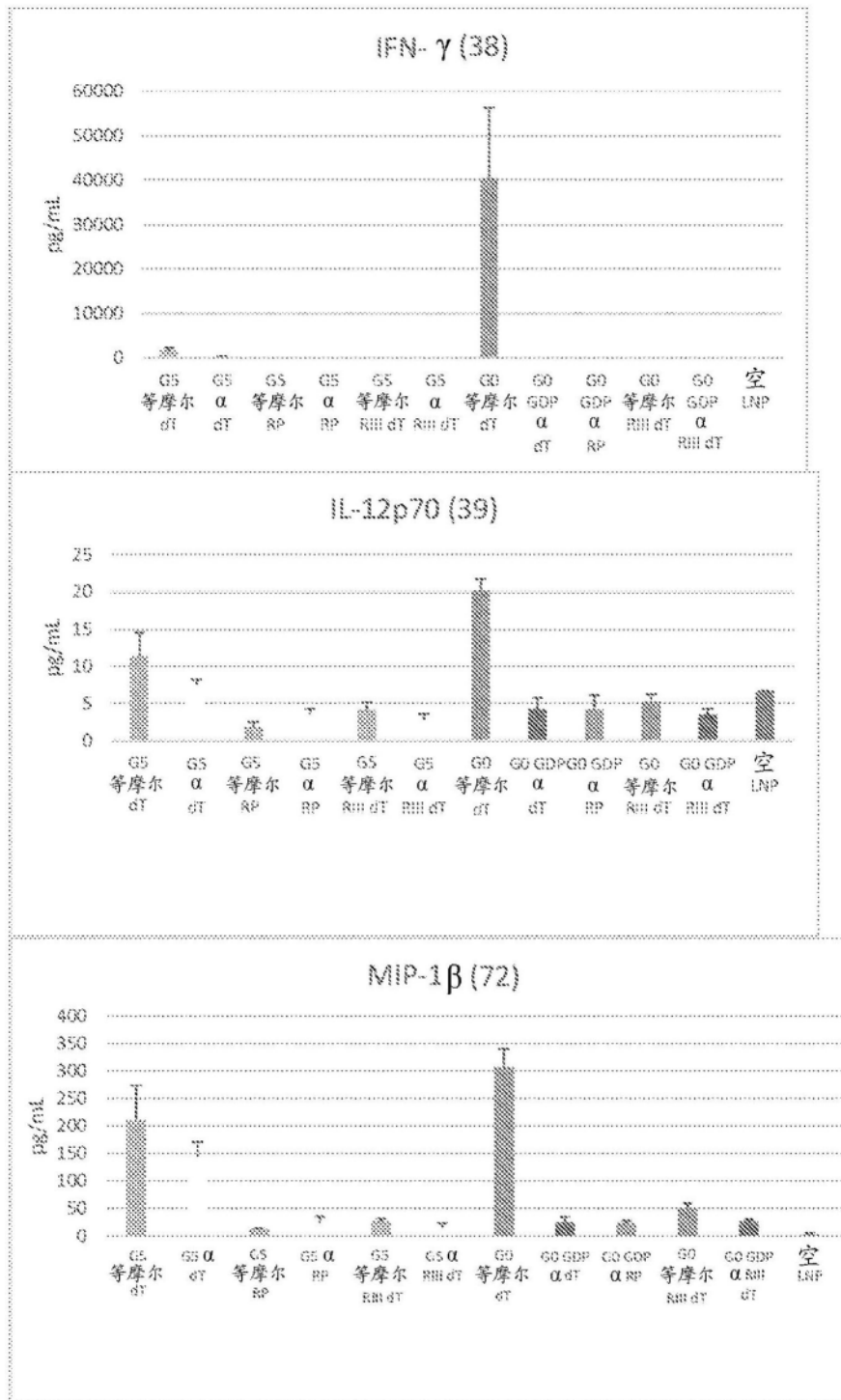


图23B

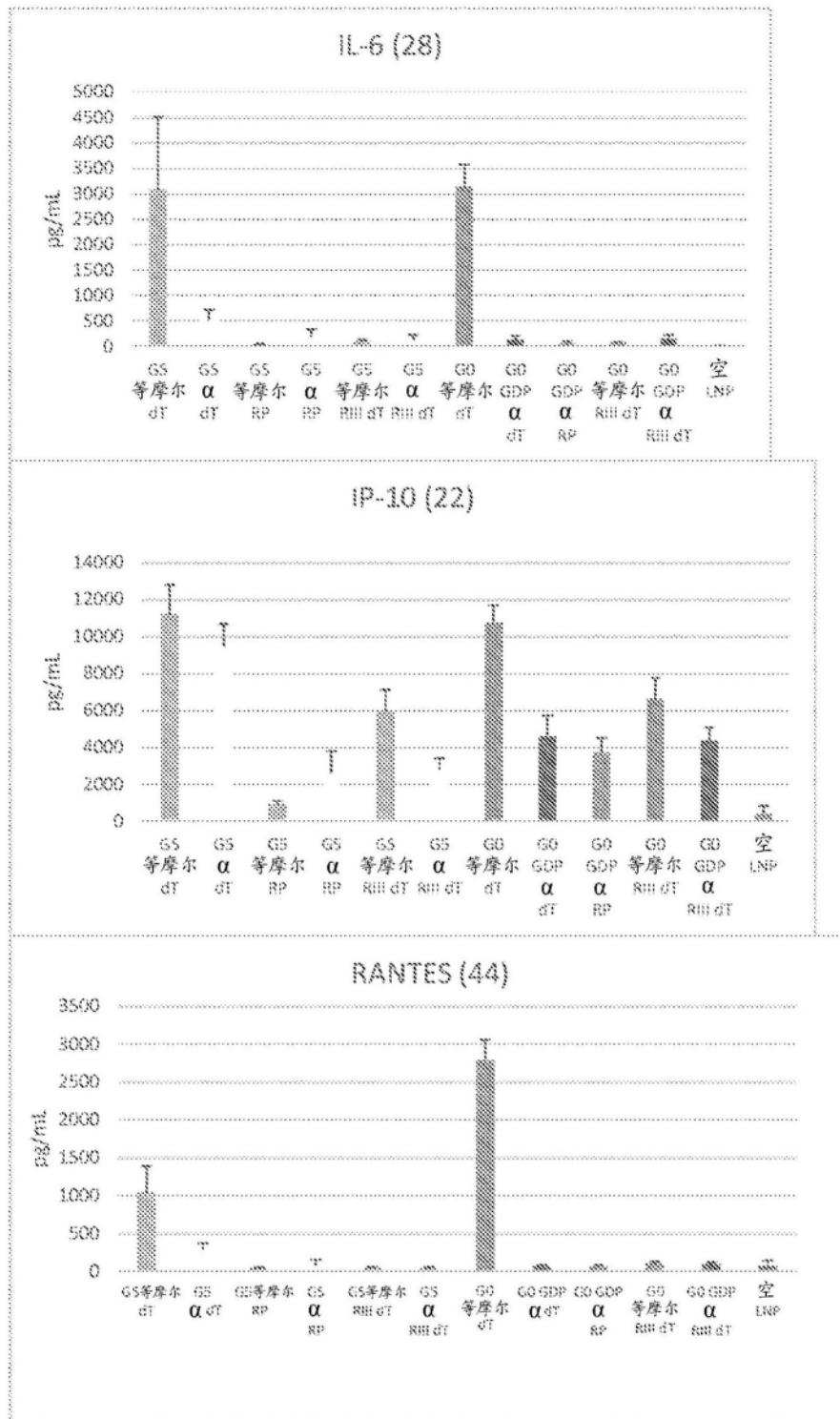


图23C

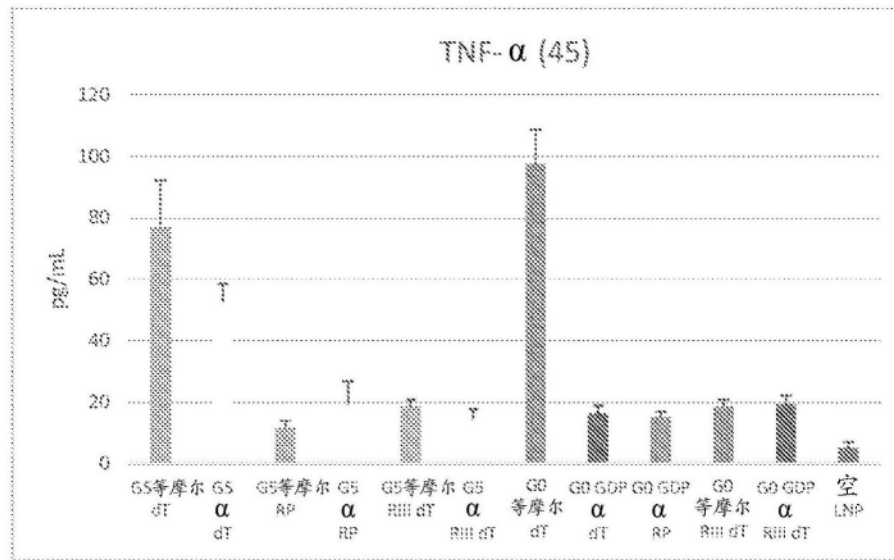


图23D

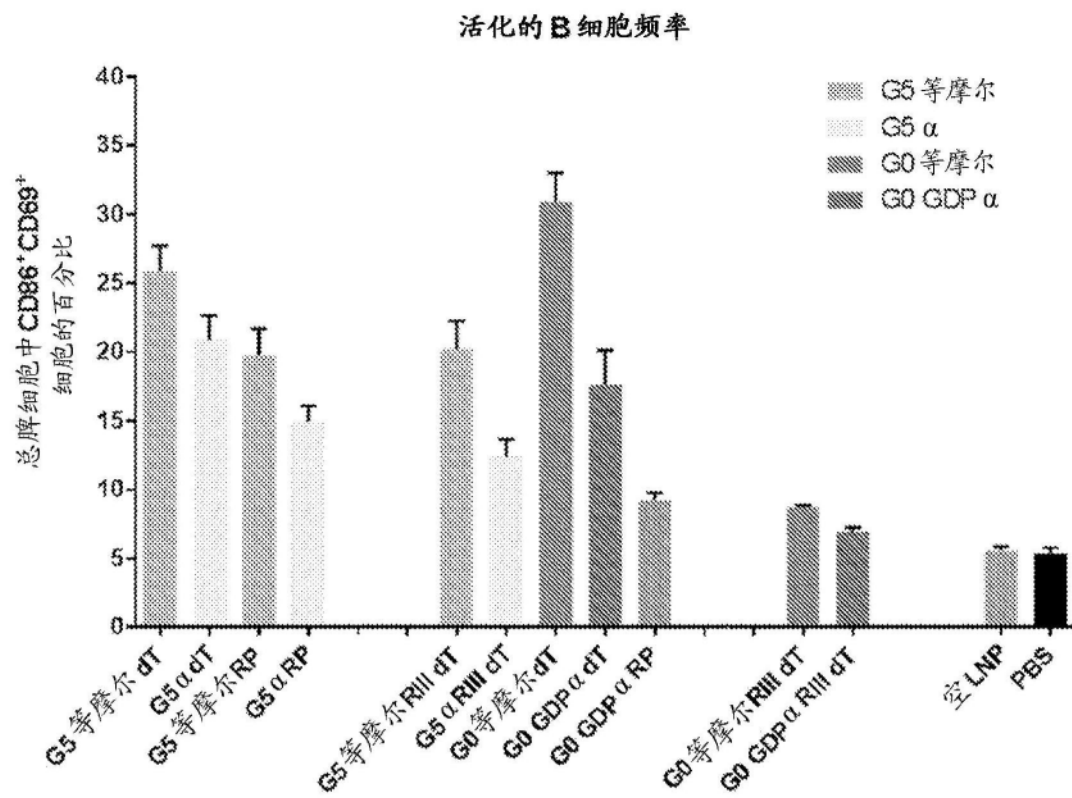


图24

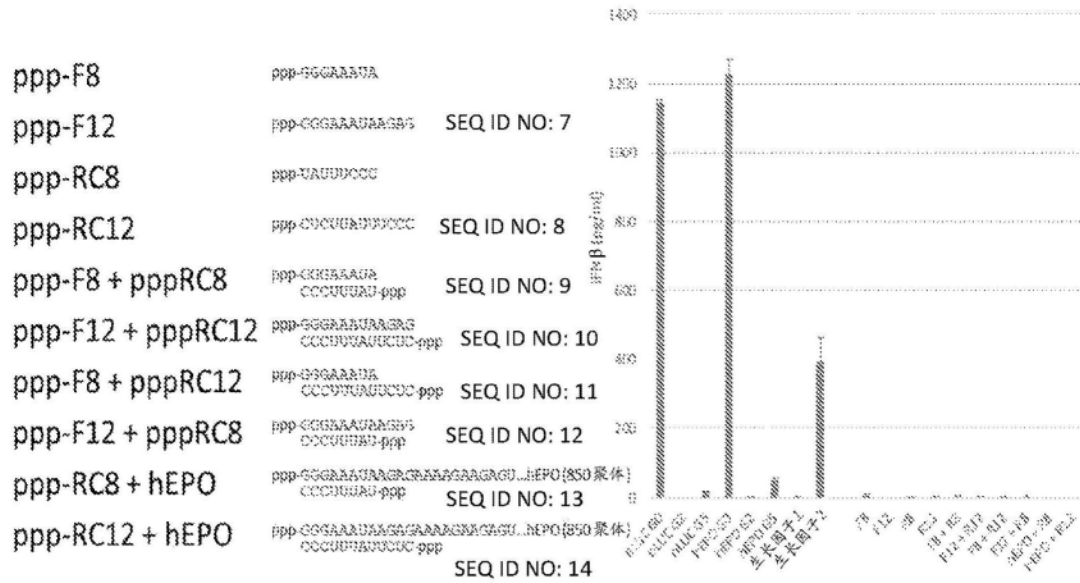


图25

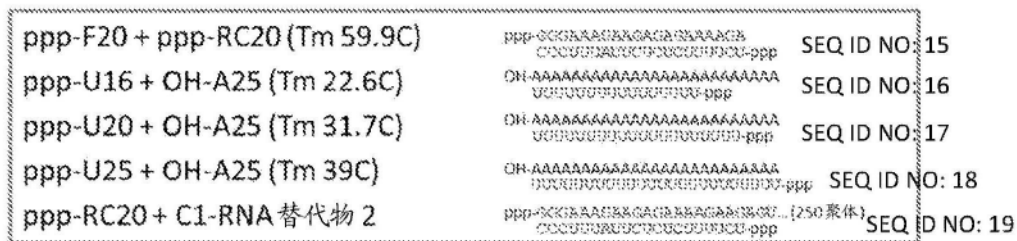


图26



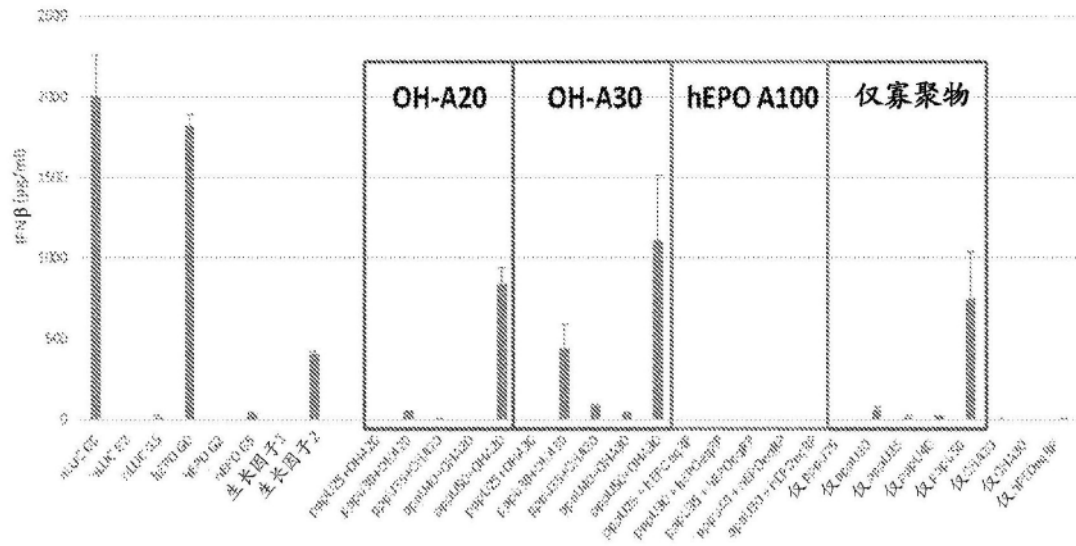


图29

ppp正向寡聚物

ppp反向寡聚物

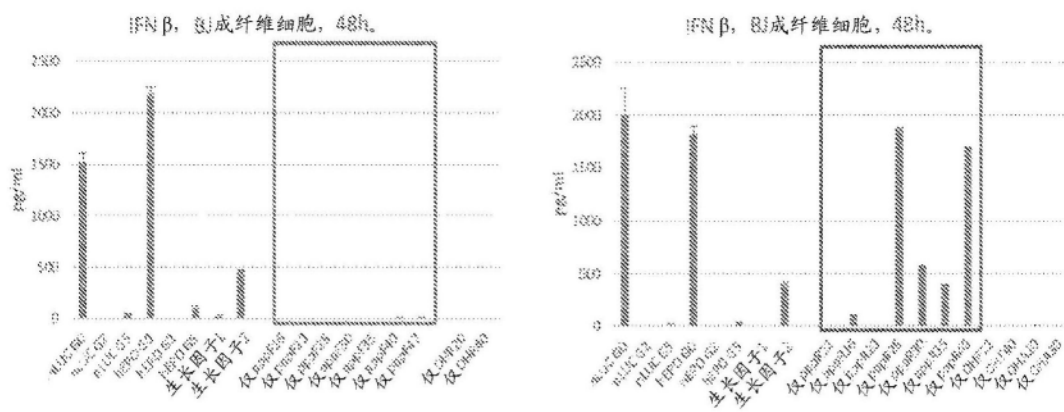


图30



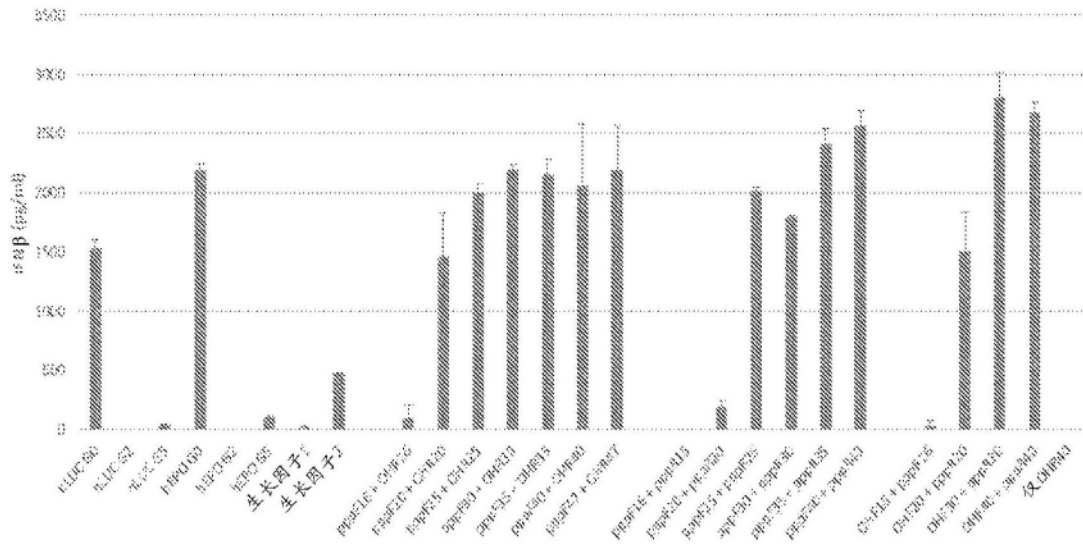


图31

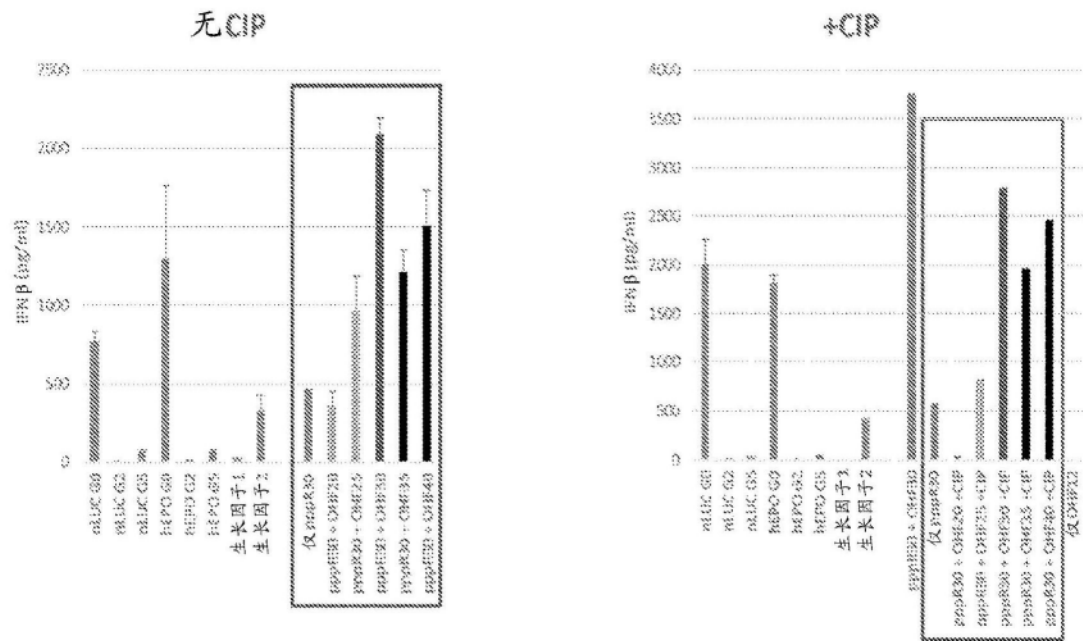


图32

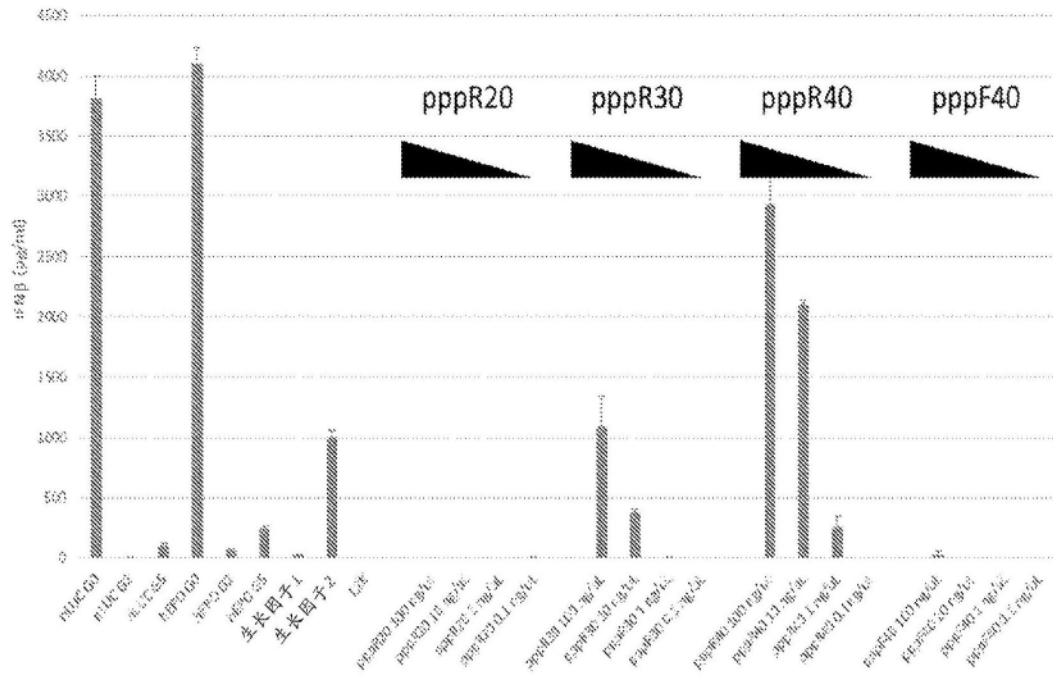


图33

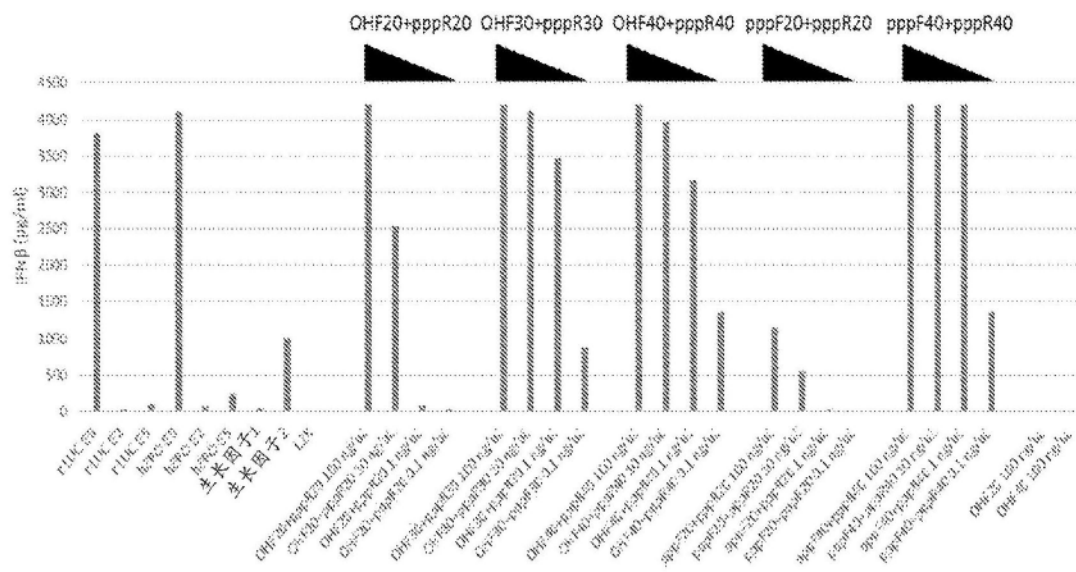


图34

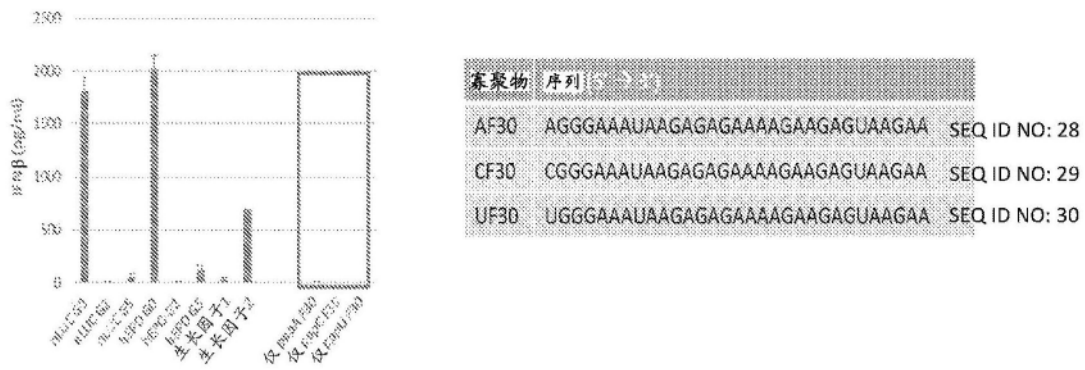


图35

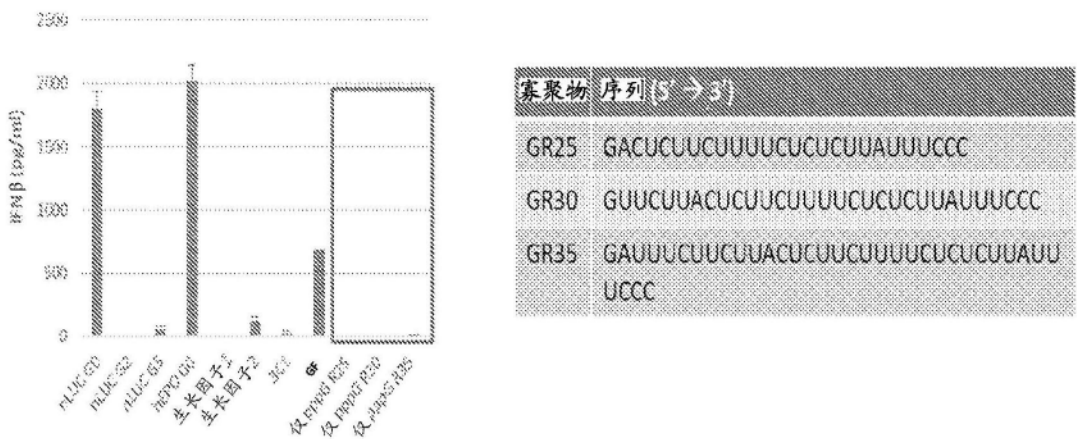


图36

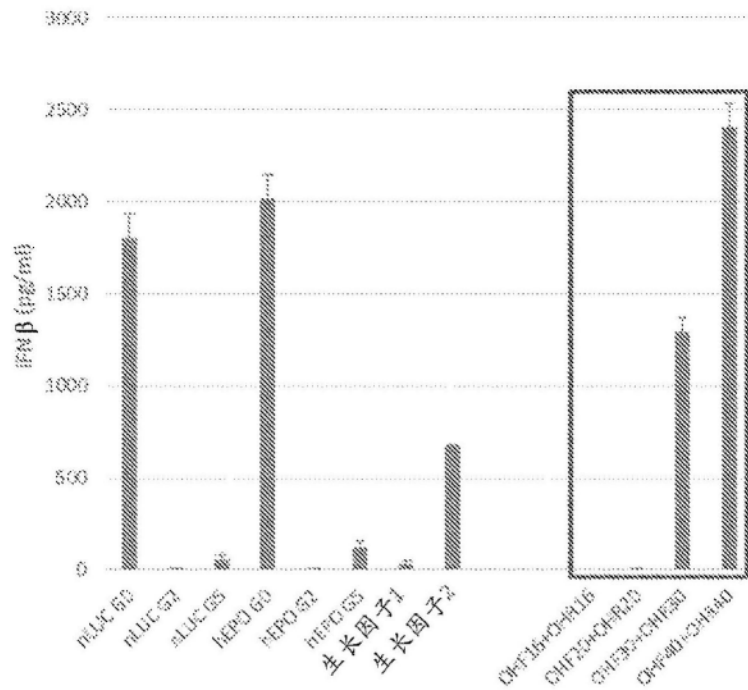


图37

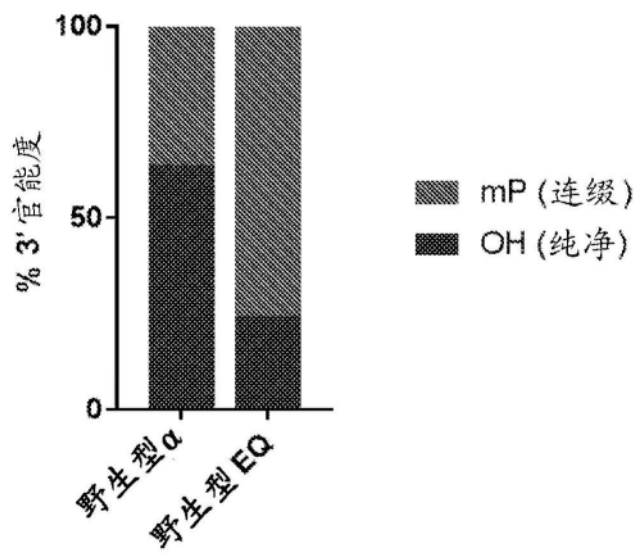


图38

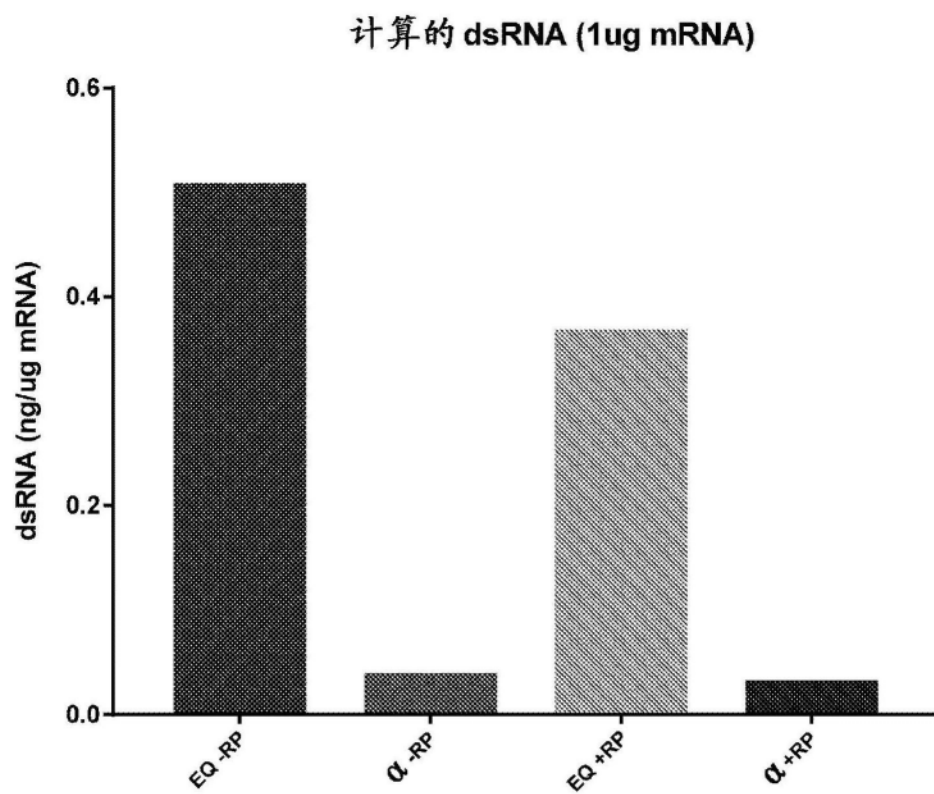


图39

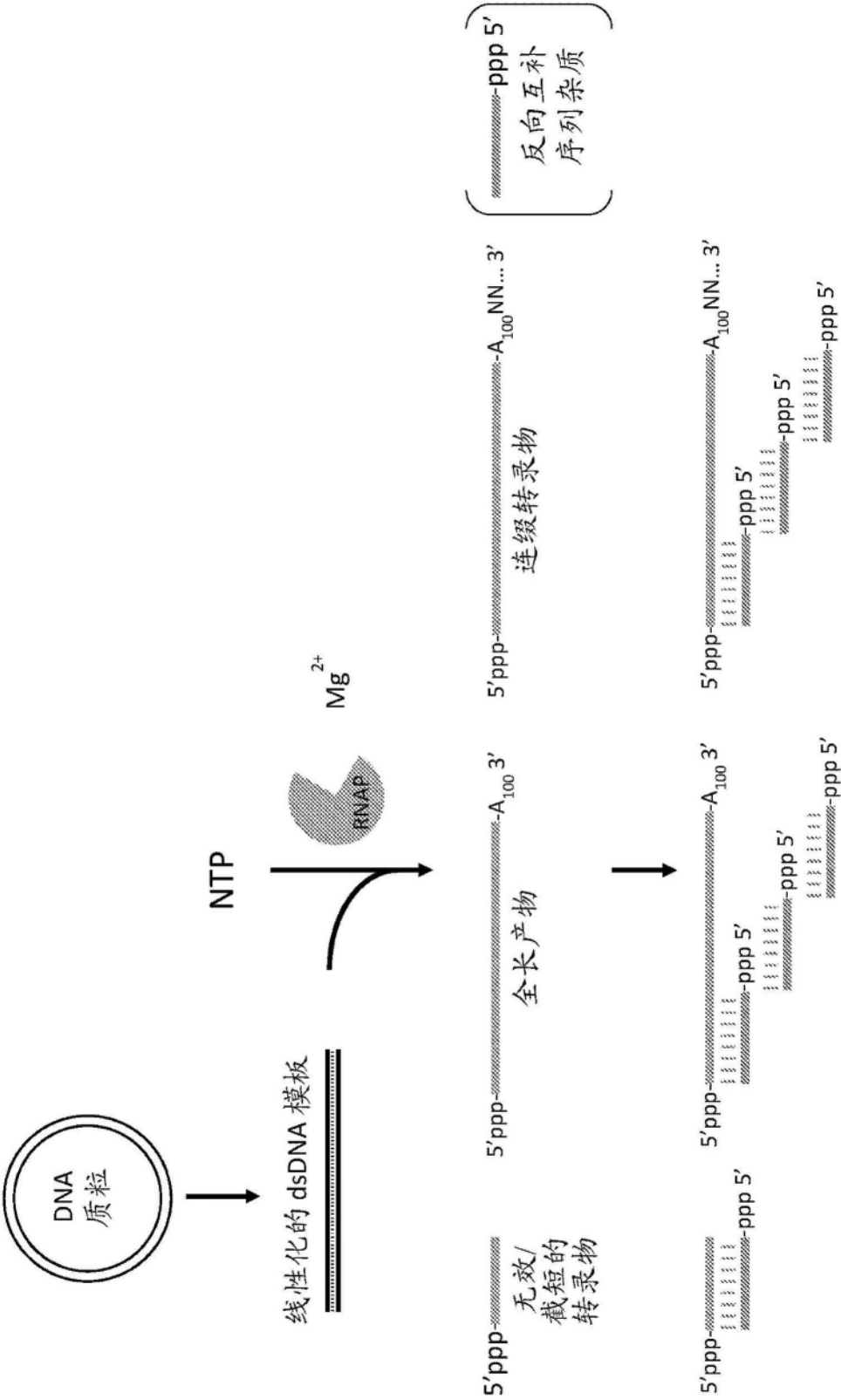


图40