202345870

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202345870 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：112111277 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 03 月 24 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/713 (2006.01)* *A61K48/00 (2006.01)*
A61K9/127 (2006.01)

(30)優先權：2022/03/25 美國 63/323,748
2022/09/09 美國 63/405,142
2022/10/27 美國 63/419,924

(71)申請人：美商現代公司 (美國) MODERNATX, INC. (US)
美國

(72)發明人：瑞德 大衛 REID, DAVID (US)；基默 麥可 亞伯特 ZIMMER, MICHAEL ALBERT (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；李協書

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：77 項 圖式數：11 共 258 頁

(54)名稱

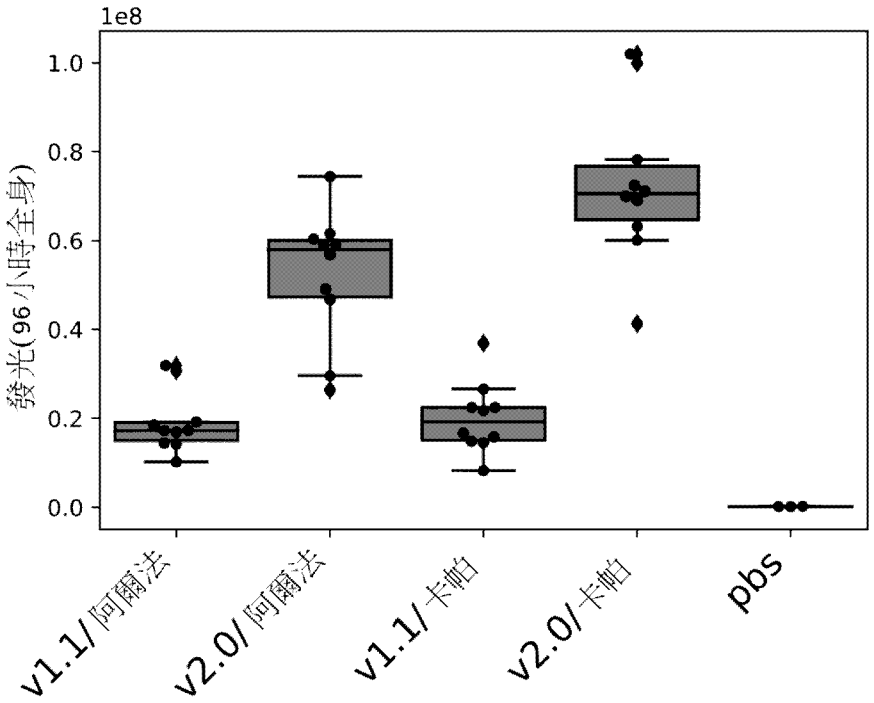
具有延長半衰期之信使核糖核酸

(57)摘要

本揭示案以編碼多肽之多核苷酸及包含該多核苷酸之脂質奈米顆粒為特徵，該多核苷酸包含 5’ UTR、編碼多肽之編碼區、及 3’ UTR。本揭示案之多核苷酸及/或脂質奈米顆粒可藉由增加編碼該多肽之該多核苷酸之半衰期及/或表現持續時間來增加該多肽之水準及/或活性。本文亦揭示使用本揭示案之脂質奈米顆粒來治療受試者之疾病或病症的方法。

The disclosure features a polynucleotide encoding a polypeptide, which polynucleotide comprises a 5’ UTR, a coding region encoding a polypeptide, and a 3’ UTR, and lipid nanoparticles comprising the same. The polynucleotides and/or lipid nanoparticles of the present disclosure can increase the level and/or activity of the polypeptide by increasing the half-life and/or duration of expression of the polynucleotide encoding the polypeptide. Also disclosed herein are methods of treating a disease or disorder in a subject using the lipid nanoparticles of the present disclosure.

指定代表圖：



【圖 1A】

【發明摘要】

【中文發明名稱】具有延長半衰期之信使核糖核酸

【英文發明名稱】MESSENGER RIBONUCLEIC ACIDS WITH EXTENDED HALF-LIFE

【中文】

本揭示案以編碼多肽之多核苷酸及包含該多核苷酸之脂質奈米顆粒為特徵，該多核苷酸包含 5’ UTR、編碼多肽之編碼區、及 3’ UTR。本揭示案之多核苷酸及/或脂質奈米顆粒可藉由增加編碼該多肽之該多核苷酸之半衰期及/或表現持續時間來增加該多肽之水準及/或活性。本文亦揭示使用本揭示案之脂質奈米顆粒來治療受試者之疾病或病症的方法。

【英文】

The disclosure features a polynucleotide encoding a polypeptide, which polynucleotide comprises a 5’ UTR, a coding region encoding a polypeptide, and a 3’ UTR, and lipid nanoparticles comprising the same. The polynucleotides and/or lipid nanoparticles of the present disclosure can increase the level and/or activity of the polypeptide by increasing the half-life and/or duration of expression of the polynucleotide encoding the polypeptide. Also disclosed herein are methods of treating a disease or disorder in a subject using the lipid nanoparticles of the present disclosure.

【指定代表圖】圖 1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】具有延長半衰期之信使核糖核酸

【英文發明名稱】MESSENGER RIBONUCLEIC ACIDS WITH EXTENDED HALF-LIFE

【技術領域】

【先前技術】

【0001】　增加信使核糖核酸(mRNA)效力之努力一直集中在具有開放閱讀框(ORF)之最佳序列設計的 mRNA 上。然而，需要藉由利用 RNA 生物學來進一步改良 mRNA 表現之效力及持久性。

【發明內容】

【0002】　本揭示案*尤其*提供編碼多肽之多核苷酸(例如，mRNA)，其中多核苷酸包含：(a) 5'-UTR (*例如*，如本文描述)；(b)包含終止元件(*例如*，如本文描述)之編碼區域；及(c) 3'-UTR (*例如*，如本文描述)，及包含該多核苷酸之 LNP 組成物。在一實施例中，編碼區域包含編碼肽或多肽酬載，*例如*，治療酬載或預防酬載之多核苷酸序列，*例如*，mRNA，例如，開放閱讀框(ORF)。在一實施例中，與沒有本文所述 5'-UTR、3'-UTR、或終止元件之型式相比，多核苷酸，*例如*，mRNA，或藉由多核苷酸來編碼之多肽具有增加的水準及/或活性，*例如*，表現或半衰期。在一實施例中，多核苷酸，*例如*，mRNA 的水準及/或活性得以增加。在一實施例中，藉由多核苷酸來編碼之多肽的表現水準、活性及/或持續時間得以增加。本文亦揭示使用包含本文揭示之多核苷酸的 LNP 組成物來治療疾病或病症，或促進受試者之所需生物效應的方法。應瞭解例如編碼不論例如細胞內、跨膜抑或分泌之多肽或肽的 ORF 的任何 ORF 可與所揭示元件組合。本揭示案之額外態樣在下文進一步詳細描述。

【0003】　具體而言，在一些實施例中，本文提供包含 5' UTR、編碼多肽之開

放閱讀框、及 3’ UTR 的信使 RNA (mRNA)，其中 3′ UTR 包含：

(i) 與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 之核酸序列至少 98%一致之核苷酸序列；或

(ii) 與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 之核酸序列、或其缺失變異體對應之核苷酸序列，其中 1 至 75 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失，其中核酸序列或其缺失變異體經修飾以便包括：

a) 插入核酸序列或其缺失變異體內之一或多個 miRNA 結合位點，及/或

b) TENT 募集序列、FUT8 募集序列、一或多個鑑別及比率確定(IDR)序列、一或多個核糖體接合偵測檢定(REDA)序列、或插入核酸序列或其缺失變異體內之一或多個 IDR 序列及一或多個 REDA 序列的組合。

【0004】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:139 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:139 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0005】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:140 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:140 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0006】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:141 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:141 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0007】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:142 之核酸序列

至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:142 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0008】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:143 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:143 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0009】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:144 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:144 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0010】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:145 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:145 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0011】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:146 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:146 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0012】　在某些實施例中，本揭示案提供包含與 SEQ ID NO:147 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列的 3′ UTR。在某些實施例中，本揭示案提供包含 SEQ ID NO:147 中所闡明之核酸序列的 3′ UTR。

【0013】　在本揭示案之一些態樣中，3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中核酸序列經修飾以便包括插入核酸序列內之一或多個 miRNA 結合位點。在一些實例中，一或多個 miRNA 結合位點選自 SEQ ID NO:148-157。在一些實施例中，一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:149 之至少一個複本及 SEQ ID NO:150 之至少一個複本。在一些實施例中，一或多個 miRNA 結合位點

包含 SEQ ID NO:150 之至少三個複本。在一些實施例中，一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:149 之至少兩個複本。在一些實施例中，一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:149 之至少兩個複本及 SEQ ID NO:150 之至少一個複本。在一些實施例中，一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:148 之至少三個複本。

【0014】 在本文提供之一些態樣中，3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中核酸序列經修飾以便包括插入核酸序列內之 TENT 募集序列。

【0015】 在本文提供之一些實施例中，3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中核酸序列經修飾以便包括插入核酸序列內之 FUT8 募集序列。

【0016】 在本文提供之一些實例中，3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中核酸序列經修飾以便包括插入核酸序列內之一或多個 IDR 序列。

【0017】 在本文提供之一些態樣中，3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中核酸序列經修飾以便包括插入核酸序列內之一或多個 REDA 序列。

【0018】 在本文提供之一些態樣中，在缺失變異體中，1 至 60 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147

中缺失。在本文提供之一些態樣中，在缺失變異體中，1 至 50 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。在本文提供之一些態樣中，在缺失變異體中，1 至 40 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。在本文提供之一些態樣中，在缺失變異體中，1 至 30 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。在本文提供之一些態樣中，在缺失變異體中，1 至 20 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。在本文提供之一些態樣中，在缺失變異體中，1 至 10 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。在本文提供之一些態樣中，在缺失變異體中，少於 10 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【0019】　在任何上述 mRNA 之某些實施例中，5’ UTR 包含與 SEQ ID NO:50 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致之核苷酸序列。在一些實施例中，5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0020】　在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:139 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0021】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:140 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0022】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:141 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0023】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:142 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0024】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:143 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0025】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:144 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0026】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:145 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0027】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:146 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0028】 在本文提供之某些實施例中，3′ UTR 包含 SEQ ID NO:147 中所闡明之核酸序列，並且其中 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【0029】 在任何上述 mRNA 之某些態樣中，mRNA 包含終止盒。在一些實施例中，終止盒選自 SEQ ID NO:158-174。在一些實施例中，終止盒為 UAAAGCUCCCCGGGG (SEQ ID NO:165)或 UAAGCCCCUCCGGGG (SEQ ID NO:164)。

【0030】 在任何上述 mRNA 之某些態樣中，mRNA 包含 5’末端帽。在一些實施例中，5’末端帽包含 $m^7GpppG_{2'OMe}$、m7G-ppp-Gm-A、m7G-ppp-Gm-AG、Cap0、Cap1、ARCA、肌苷、N1-甲基-鳥苷、2’-氟-鳥苷、7-去氮-鳥苷、8-側氧基-鳥苷、2-胺基-鳥苷、LNA-鳥苷、2-疊氮鳥苷、Cap2、Cap4、5’甲基 G 帽、或其類似物。

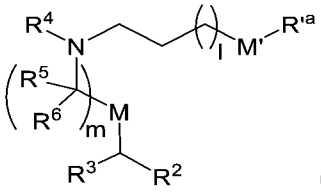
【0031】　在任何上述 mRNA 之某些態樣中，mRNA 包含多聚腺苷酸區域。在一些實施例中，多聚腺苷酸區域為至少約 10、至少約 20、至少約 30、至少約 40、至少約 50、至少約 60、至少約 70、至少約 80、至少約 90 個核苷酸之長度、或至少約 100 個核苷酸之長度。在一些實施例中，多聚腺苷酸區域具有約 10 至約 200、約 20 至約 180、約 50 至約 160、約 70 至約 140、或約 80 至約 120 個核苷酸之長度。在一些實施例中，多聚腺苷酸區域包含 A100-UCUAG-A20-反向去氧胸苷。

【0032】　在任何上述 mRNA 之某些態樣中，mRNA 包含至少一個化學修飾核苷鹼基、糖、主鏈、或其任何組合。在一些實施例中，至少一個化學修飾核苷鹼基選自由以下組成之群：假尿嘧啶(ψ)、N1-甲基假尿嘧啶(m1ψ)、1-乙基假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶(s2U)、4’-硫尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、及其任何組合。

【0033】　在任何上述 mRNA 之某些態樣中，多肽包含分泌蛋白、膜結合蛋白、或細胞間蛋白。在一些實施例中，多肽為細胞介素、抗體、疫苗、受體、酶、激素、轉錄因子、配位體、膜轉運蛋白、結構蛋白、核酸酶、或其組分、變異體或片段。

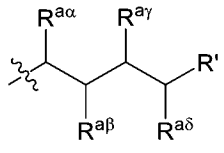
【0034】　本文亦提供包含上述 mRNA 中任一者及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組成物。

【0035】　本文亦提供包含上述 mRNA 中任一者的脂質奈米顆粒。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含：(i)可電離脂質、(ii)磷脂、(iii)結構脂質、及(iv) PEG-脂質。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含式(I)化合物：



(I)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

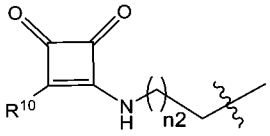
其中 R'^{a} 為 R'^{支鏈}；其中

R'^{支鏈}為：  ；其中 ⟆ 表示附接點；

其中 $R^{a\alpha}$、$R^{a\beta}$、$R^{a\gamma}$、及 $R^{a\delta}$ 各自獨立地選自由 H、C_{2-12} 烷基、及 C_{2-12} 烯基組成之群；

R^2 及 R^3 各自獨立地選自由 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群；

R^4 選自由以下組成之群：$-(CH_2)_nOH$，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，

及  ，

其中 ⟆ 表示附接點；其中

R^{10} 為 $N(R)_2$；各 R 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基、C_{2-3} 烯基、及 H 組成之群；並且 n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R^5 獨立地選自由 C_{1-3} 烷基、C_{2-3} 烯基、及 H 組成之群；

各 R^6 獨立地選自由 C_{1-3} 烷基、C_{2-3} 烯基、及 H 組成之群；

M 及 M'各自獨立地選自由-C(O)O-及-OC(O)-組成之群；

R'為 C_{1-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基；

l 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；並且

m 選自由 5、6、7、8、9、10、11、12、及 13 組成之群。

【0036】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含：

(a) (i)化合物 II、(ii)膽固醇、及(iii) PEG-DMG 或化合物 I；

(b) (i)化合物 VI、(ii)膽固醇、及(iii) PEG-DMG 或化合物 I；

(c) (i)化合物 II、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv) PEG-DMG 或化合物 I；

(d) (i)化合物 VI、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv) PEG-DMG 或化合物 I；

(e) (i)化合物 II、(ii)膽固醇、及(iii)化合物 I；

(f) (i)化合物 II、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv)化合物 I；

(g) (i)化合物 B、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv) PEG-DMG 或化合物 I；

(h) (i)化合物 B、(ii)膽固醇、及(iii)化合物 I；或

(i) (i)化合物 B、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv)化合物 I。

【0037】 在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含化合物 II 及化合物 I。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含化合物 B 及化合物 I。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含化合物 II、DSPC、膽固醇、及化合物 I。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含約 20-60%可電離脂質: 5-25%磷脂: 25-55%膽固醇: 及 0.5-15% PEG 脂質之莫耳比。在一些實施例中，脂質奈米顆粒被調配成用於靜脈內、皮下、肌肉內、鼻內、眼內、直腸、肺部或經口遞送。

【0038】 本文亦提供包含上述脂質奈米顆粒中任一者的醫藥組成物。本文亦提供包含上述脂質奈米顆粒中任一者的細胞。

【0039】 在一些實施例中，本文亦提供增加多肽表現的方法，包括向細胞投與上述脂質奈米顆粒中任一者。

【0040】 本文亦提供向細胞遞送上述脂質奈米顆粒中任一者的方法，包括使細胞*在活體外*、*活體內*或*離體*與脂質奈米顆粒接觸。

【0041】 在一些情況下，本文亦提供向患有疾病或病症之人類受試者遞送上述脂質奈米顆粒中任一者的方法，包括向有需要的人類受試者投與有效量的脂質奈米顆粒。

【0042】 本文亦提供之其他態樣為在有需要的人類受試者中治療、預防疾病或病症、或預防該疾病或病症之症狀的方法，包括向人類受試者投與有效量的上述脂質奈米顆粒中任一者。

【0043】 本文亦提供之其他態樣為在有需要的人類受試者中治療、預防疾病或病症、或預防該疾病或病症之症狀的方法，包括向人類受試者投與有效量的上

述脂質奈米顆粒中任一者。

【0044】　本發明之其他特徵及優勢自以下具體實施方式及圖式、以及自申請專利範圍顯而易知。

【圖式簡單說明】

【0045】

圖 1A-1G 為描繪螢光素酶或藉由具有 v1.1 5’ UTR (SEQ ID NO: 56)或 v2.0 5’ UTR (SEQ ID NO: 50)以及阿爾法 3’ UTR 或卡帕 3’ UTR 之 mRNA 構築體來編碼之靶蛋白表現的圖表。**圖 1A** 示出給藥後 96 小時之全身 ffLuc 活性。**圖 1B** 示出給藥後 72 小時之全身 ffLuc 活性。**圖 1C** 示出給藥後 0-4 天之全身 ffLuc 活性。**圖 1D** 示出肝臟中之表現。**圖 1E** 示出脾臟中之表現。**圖 1F** 示出給藥後 96 小時的血清中之靶蛋白(*亦即*，EPO)表現。**圖 1G** 示出給藥後 0-4 天的血清中之靶蛋白(*亦即*，EPO)表現。

圖 2A-2I 為描繪在各種免疫細胞中，給藥後 1、2、及 3 天的總體平均螢光強度或如藉由具有 v2.0 5’ UTR 以及對照 3’ UTR (在圖例中註明為「三重」)、卡帕 3’ UTR、或愛歐塔 3’ UTR 之 mRNA 構築體來編碼之 mOX40L+細胞之百分比的圖表。**圖 2A** 示出 LSK+造血幹細胞及祖細胞中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2B** 示出脾臟樹突狀細胞中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2C** 示出脾臟巨噬細胞中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2D** 示出脾臟嗜中性球中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2E** 示出脾臟單核球中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2F** 示出脾臟嗜伊紅性球中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2G** 示出脾臟 CD4+ T 細胞中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2H** 示出脾臟 CD8+ T 細胞中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。**圖 2I** 示出脾臟 B 細胞中之平均螢光強度及 mOX40L+細胞%。

圖 3A 為對於用所指示構築體來轉染之細胞，展示指示時間點之 FaDu trio 細胞

株中之 FANCA (各樣品之頂部行)及核仁素(各樣品之底部行)之蛋白水準的影像。相對於負載對照及野生型(WT)平均值來標準化，計算倍數變化 FANCA 表現。

圖 3B 為展示相對於核仁素來標準化並且表示為 WT FaDu 細胞株中之 FANCA 之平均表現之倍數變化的 FANCA 之表現水準的圖表。

圖 4 為展示 FaDu-WT、用 1ug GFP mRNA 構築體來轉染之 FaDu-KO 或用 1ug FANCA 構築體來轉染並且轉染後 24 小時用指示濃度之絲裂黴素 C (MMC)來治療的 FaDu-KO 之存活百分率的圖表。存活在治療後 5 天使用 cell titer Glo 來評估。

圖 5A 為展示在對照(Ctl)或 1,3-丁二烯二環氧化物(DEB)及 MMC 治療細胞中，處於細胞週期之 G2_M 期中之細胞之積累的圖表。WT-GFP 係指用 GFP mRNA 來轉染之 FaDu WT 細胞；KO-GFP 係指用 GFP mRNA 來轉染之 FaDu KO 細胞；FANCA_01-FANCA-04 係指用 FANCA 構築體來轉染之 FaDu KO 細胞。轉染在治療之前 6 小時發生。

圖 5B 為展示呈現為平均值±SD 的**圖 5A** 之資料之 G2M 頻率的圖表。統計顯著性使用學生 t 測試來計算。*P<0.05 **P <0.01，***P <0.001，****P<0.0001。

圖 6A 為展示在對照(Ctl)或 1,3-丁二烯二環氧化物(DEB)及 MMC 治療細胞中，處於細胞週期之 G2_M 期中之細胞之積累的圖表。WT-GFP 係指用 GFP mRNA 來轉染之 FaDu WT 細胞；KO-GFP 係指用 GFP mRNA 來轉染之 FaDu KO 細胞；FANCA_01-FANCA-04 係指用 FANCA 構築體來轉染之 FaDu KO 細胞。轉染在治療之前 72 小時發生。

圖 6B 為展示呈現為平均值±SD 的**圖 6A** 之資料之 G2M 頻率的圖表。統計顯著性使用學生 t 測試來計算。*P<0.05 **P <0.01，***P <0.001，****P<0.0001。

圖 6C 為展示相對於核仁素來標準化並且表示為 WT FaDu 細胞株中之 FANCA

之倍數變化的 FANCA 之表現水準的圖表。

圖 7 示出給藥後 6h 及 48h 之後的卵白蛋白濃度。所評估之 mRNA 具有卡帕 3' UTR (SEQ ID NO:139)及 v1.1 5' UTR (SEQ ID NO:56)或 v2.0 5' UTR (SEQ ID NO:50)。兩種 mRNA 使用相同「阿爾法」過程來製備。

圖 8 為展示當使用包含 v2.0 5' UTR (SEQ ID NO:50)及卡帕 3' UTR (SEQ ID NO:139)之 mRNA 時的抗體反應之條形圖。

圖 9 為展示與當不存在 FUT8 序列時相比，3' UTR 中之 FUT8 序列之效應的條形圖。自左至右顯示：PBS 對照，含有 v1.0 UTR 之 mRNA，具有 v2.0 5' UTR (SEQ ID NO: 50)及再優化編碼序列的 mRNA，具有來自(2)之元件加上帶有「德爾塔」終止盒及「FUT8」序列的 3' UTR (3' UTR 對應於 SEQ ID NO:140)的 mRNA，及兩個陽性對照。

圖 10 為展示編碼紅血球凝聚素之 v2.0 5' UTR mRNA 之存在增加小鼠中之免疫原性的示意圖。

圖 11 為展示 v2.0 5' UTR 及 v2.0 3' UTR 之存在*在活體外*增強編碼紅血球凝聚素之 mRNA 之表現的條形圖。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0046】 本申請案主張 2022 年 3 月 25 日提出申請的美國臨時申請案第 63/323,748 號、2022 年 9 月 9 日提出申請的美國臨時申請案第 63/405,142 號、及 2022 年 10 月 27 日提出申請的美國臨時申請案第 63/419,924 號之優先權益，該等申請案之內容以引用方式併入本文。

【0047】 可以藉由以下方式來優化 mRNA 之效力及持久性：(1)確保遞送至細胞質之 mRNA 與核糖體適當且有效地結合；及(2)使 mRNA 耗費在積極生產所需蛋白產物上之時間最大化。在此等態樣中，mRNA 之序列為性能之重要決定因

素。

【0048】　本文*尤其*揭示 3’未轉譯區(UTR)之序列可經優化以便增加該 mRNA 之效力及/或持久性的發現。在一些實施例中，mRNA 之 3’ UTR 以及 5’ UTR 及/或終止元件之序列的組合可經優化以便例如藉由延長 mRNA 之半衰期及/或表現持續時間來增加該 mRNA 之效力及/或持久性。在一些實施例中，本揭示案提供包含經優化 3’ UTR 的多核苷酸及脂質奈米顆粒組成物，該等優化 3’ UTR 可增加 mRNA 或藉由 mRNA 來編碼之多肽之功效，例如，水準及/或活性。

1.　未轉譯區(UTR)

【0049】　未轉譯區(UTR)為在起始密碼子(5′ UTR)之前並且在終止密碼子(3′ UTR)之後的未轉譯的多核苷酸之核酸區段。在一些實施例中，包含編碼多肽之開放閱讀框(ORF)的本發明之多核苷酸(例如，核糖核酸(RNA))，例如，mRNA 進一步包含 UTR (例如，5′ UTR 或其功能片段、3′ UTR 或其功能片段、或其組合)。

【0050】　UTR 可與多核苷酸中之編碼區同源或異源。在一些實施例中，UTR 與編碼治療酬載或預防酬載之 ORF 同源。在一些實施例中，UTR 與編碼治療酬載或預防酬載之 ORF 異源。

【0051】　在一些實施例中，多核苷酸包含兩個或兩個以上 5′ UTR 或其功能片段，其中之各者具有相同或不同核苷酸序列。在一些實施例中，多核苷酸包含兩個或兩個以上 3′ UTR 或其功能片段，其中之各者具有相同或不同核苷酸序列。

【0052】　在一些實施例中，5′ UTR 或其功能片段、3′ UTR 或其功能片段、或其任何組合為經序列優化的。

【0053】　在一些實施例中，5′ UTR 或其功能片段、3′ UTR 或其功能片段、或其任何組合包含至少一個化學修飾核苷鹼基，*例如*，N1-甲基假尿嘧啶或 5-甲氧基尿嘧啶。

【0054】　UTR 可具有提供調節作用(*例如*，增加或降低之穩定性、定位及/或轉

譯效率)之特徵。可將包含 UTR 之多核苷酸投與細胞、組織或生物體，且可使用常規方法來量測一或多種調節特徵。在一些實施例中，5′ UTR 或 3′ UTR 之功能片段分別包含全長 5′或 3′ UTR 之一或多種調節特徵。

【0055】 天然 5′ UTR 具有在轉譯起始中起作用之特徵。其具有類似 Kozak 序列之印記，該等印記通常已知參與核糖體開始多種基因之轉譯的過程。Kozak 序列具有共有 CCR(A/G)CCAUGG (SEQ ID NO:125)，其中 R 為起始密碼子(AUG)上游三個鹼基的嘌呤(腺嘌呤或鳥嘌呤)，該起始密碼子之後為另一個「G」。亦已知 5′ UTR 可形成參與延伸因子結合的二級結構。

【0056】 藉由工程改造特定標靶器官之大量表現基因中通常可見的特徵，可增強多核苷酸之穩定性及蛋白質產生。例如，引入肝臟表現之 mRNA (諸如白蛋白、血清澱粉樣蛋白 A、載脂蛋白 A/B/E、轉鐵蛋白、阿爾法胎蛋白、紅血球生成素或因子 VIII)的 5′ UTR 可增強多核苷酸在肝細胞株或肝臟中之表現。同樣，對於肌肉(*例如* MyoD、肌凝蛋白、肌紅蛋白、肌細胞生成素、力蛋白(Herculin))、內皮細胞(*例如* Tie-1、CD36)、骨髓細胞(*例如* C/EBP、AML1、G-CSF、GM-CSF、CD11b、MSR、Fr-1、i-NOS)、白血球(*例如* CD45、CD18)、脂肪組織(*例如* CD36、GLUT4、ACRP30、脂聯素)以及肺上皮細胞(*例如* SP-A/B/C/D)，有可能使用來自其他組織特異性 mRNA 之 5′ UTR 來改良彼組織中之表現。

【0057】 在一些實施例中，UTR 選自其蛋白共有共同功能、結構、特徵或性質的轉錄物家族。例如，所編碼之多肽可屬於在特定細胞、組織中或在發育期間之某一時間得以表現的蛋白家族(*亦即*，共有至少一種功能、結構、特徵、定位、起源或表現模式)。來自任何基因或 mRNA 之 UTR 均可與相同或不同蛋白家族之任何其他 UTR 交換，以產生新的多核苷酸。

【0058】 在一些實施例中，5′ UTR 及 3′ UTR 可為異源的。在一些實施例中，5′ UTR 可衍生自與 3′ UTR 不同的物質。

【0059】 國際專利申請公開案第 WO/2014/164253 號(以引用方式整體併入本文)提供可在本發明之多核苷酸中用作 ORF 之側接區域的示例性 UTR 之清單。

【0060】 本申請案之額外示例性 UTR 包括但不限於衍生自以下核酸序列之一或多個 5′ UTR 及/或 3′ UTR：球蛋白，諸如 α-或 β-球蛋白(*例如非洲爪蟾*、小鼠、兔或人類球蛋白)；強 Kozak 轉譯起始信號；CYBA (*例如*人類細胞色素 b-245 α 多肽)；白蛋白(*例如*人類白蛋白 7)；HSD17B4 (羥基類固醇(17-β)去氫酶)；病毒(*例如*菸草蝕刻病毒(TEV)、委內瑞拉馬腦炎病毒(VEEV)、登革熱病毒、巨細胞病毒(CMV；*例如* CMV 即刻早期 1 (IE1))、肝炎病毒(*例如* B 型肝炎病毒)、辛德比斯病毒或 PAV 大麥黃矮病毒)；熱休克蛋白(*例如* hsp70)；轉譯起始因子(*例如* elF4G)；葡萄糖轉運蛋白(*例如* hGLUT1 (人類葡萄糖轉運蛋白 1))；肌動蛋白(*例如*人類 α 或 β 肌動蛋白)；GAPDH；微管蛋白；組蛋白；檸檬酸循環酶；拓撲異構酶(*例如*缺乏 5′ TOP 模體(寡嘧啶束)之 TOP 基因的 5′ UTR)；核糖體蛋白 Large 32 (L32)；核糖體蛋白(*例如*人類或小鼠核糖體蛋白，例如 rps9)；ATP 合酶(*例如* ATP5A1 或粒線體 H^+-ATP 合酶之 β 次單元)；生長激素(*例如*牛(bGH)或人類(hGH))；延伸因子(*例如*延伸因子 1 α1 (EEF1A1))；錳超氧化物歧化酶(MnSOD)；肌細胞增強因子 2A (MEF2A)；β-F1-ATP 酶、肌酸激酶、肌紅蛋白、粒細胞群落刺激因子(G-CSF)；膠原蛋白(*例如* I 型膠原蛋白 α2 (Col1A2)、I 型膠原蛋白 α1 (Col1A1)、VI 型膠原蛋白 α2 (Col6A2)、VI 型膠原蛋白 α1 (Col6A1))；核糖體結合蛋白(*例如*核糖體結合蛋白 I (RPNI))；低密度脂蛋白受體相關蛋白(*例如*LRP1)；心肌營養素樣細胞介素因子(*例如* Nnt1)；鈣網蛋白(Calr)；前膠原蛋白-離胺酸-2-側氧基戊二酸-5-雙加氧酶 1 (Plod1)；及核結合蛋白(*例如* Nucb1)。

【0061】 在一些實施例中，5′ UTR 選自由以下組成之群：β-球蛋白 5′ UTR；含有強 Kozak 轉譯起始信號之 5′ UTR；細胞色素 b-245 α 多肽(CYBA) 5′ UTR；羥基類固醇(17-β)去氫酶(HSD17B4) 5′ UTR；菸草蝕刻病毒(TEV) 5′ UTR；委內

瑞拉馬腦炎病毒(TEEV) 5′ UTR；編碼非結構蛋白之德國麻疹病毒(RV) RNA 的5′近端開放閱讀框；登革熱病毒(DEN) 5′ UTR；熱休克蛋白 70 (Hsp70) 5′ UTR；eIF4G 5′ UTR；GLUT1 5′ UTR；其功能片段及其任何組合。

【0062】 衍生自任何基因或 mRNA 之野生型 UTR 均可併入本揭示案之多核苷酸中。在一些實施例中，*例如*可藉由改變 UTR 相對於 ORF 之方向或位置；或藉由額外核苷酸包涵、核苷酸缺失、核苷酸交換或轉座，相對於野生型或天然 UTR 來改變 UTR 以產生變異體 UTR。在一些實施例中，可使用 5′或 3′UTR 之變異體，例如野生型 UTR 之突變體，或其中一或多個核苷酸添加至 UTR 之末端或自 UTR 之末端移除的變異體。

【0063】 另外，一或多個合成 UTR 可與一或多個非合成 UTR 組合使用。參*見例如* Mandal 及 Rossi, Nat. Protoc. 2013 8(3):568-82，其內容以引用之方式整體併入本文中。

【0064】 UTR 或其部分可以與其中選出該等 UTR 或其部分之轉錄物中相同的方向置放，或可改變方向或位置。因此，5′及/或 3′ UTR 可反向、縮短、加長或與一或多個其他 5′ UTR 或 3′ UTR 組合。

【0065】 在一些實施例中，核酸可包含多個 UTR，*例如*雙重、三重或四重 5′ UTR 或 3′ UTR。例如，雙重 UTR 包含串聯或實質上串聯的同一 UTR 之兩個複本。例如，可使用雙重 β-球蛋白 3′ UTR (參見 US2010/0129877，其內容以引用之方式整體併入本文中)。

【0066】 本發明之多核苷酸可包含特徵之組合。例如，ORF 可側接有包含強 Kozak 轉譯起始信號的 5′ UTR；及/或 3′ UTR，其包含用於模板化添加多聚腺苷酸尾之寡(dT)序列。5′ UTR 可包含來自相同及/或不同 UTR 之第一多核苷酸片段及第二多核苷酸片段(參見*例如* US2010/0293625，以引用之方式整體併入本文中)。

【0067】 其他非 UTR 序列可用作本發明之多核苷酸內的區域或亞區。例如，內含子或內含子序列之部分可併入本發明之多核苷酸中。內含子序列之併入可增加蛋白產生以及多核苷酸表現水準。在一些實施例中，替代 UTR 或除了 UTR 以外，本發明之多核苷酸包含內部核糖體進入位點(IRES) (參見*例如*, Yakubov 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 394(1):189-193，其內容以引用之方式整體併入本文中)。在一些實施例中，多核苷酸包含 IRES 來替代 5′ UTR 序列。在一些實施例中，多核苷酸包含 ORF 及病毒衣殼序列。在一些實施例中，多核苷酸包含合成 5′ UTR 與非合成 3′ UTR 之組合。

【0068】 在一些實施例中，UTR 亦可包括至少一種轉譯增強子多核苷酸、一或多種轉譯增強子元件(統稱為「TEE」，其係指增加由多核苷酸產生之多肽或蛋白的量之核酸序列)。作為非限制性實例，TEE 可以位於轉錄啟動子與起始密碼子之間。在一些實施例中，5′ UTR 包含 TEE。

【0069】 在一態樣中，TEE 為 UTR 中之保守元件，其可促進核酸之轉譯活性，諸如但不限於帽依賴性或帽非依賴性轉譯。

a. 5′ UTR 序列

【0070】 5′ UTR 序列對於核糖體向 mRNA 之募集很重要，並且據報導在轉譯中發揮作用(Hinnebusch A 等人, (2016) Science, 352:6292: 1413-6)。

【0071】 本文*尤其*揭示編碼多肽之多核苷酸，其*尤其*包含 5’ UTR。在一實施例中，本文揭示之多核苷酸包含：(a) 5’-UTR (*例如*，如**表 1** 中提供或其變異體或片段)；(b)編碼區域；及(c)終止元件及 3’-UTR(*例如*，如**表 2** 中提供或其變異體或片段)，及包含該多核苷酸之 LNP 組成物。在一實施例中，多核苷酸包含有包含**表 1** 中提供之序列的 5’-UTR 或其變異體或片段(例如，其功能變異體或片段)。應當理解，此等 5′ UTR 併入自然界中未發現之構築體中，例如，此等 5′ UTR 為合成的，在序列方面自天然存在之 5′ UTR 改變，為自然界中發現之彼等

的截短或加長型式，包含化學修飾鹼基，在 ORF 序列之 5′，不同於它們可能在自然界中發現的彼等，或其類似情況。

【0072】　在一實施例中，5′ UTR 包含**表 1** 中提供之序列或與**表 1** 中提供之 5′ UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列，或其變異體或片段。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0073】　在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 50 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 51 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 52 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 53 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 54 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 55 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 56 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 57 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 58 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0074】　在一實施例中，5′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 64 具有至少 80%、85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0075】 在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:50 之序列。在一實施例中，5′ UTR 由 SEQ ID NO:50 之序列組成。

【0076】 在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:64 之序列。在一實施例中，5′ UTR 由 SEQ ID NO:64 之序列組成。

【0077】 在一實施例中，**表 1** 中提供之 5′ UTR 序列具有作為 A 之第一核苷酸。在一實施例中，**表 1** 中提供之 5′ UTR 序列具有作為 G 之第一核苷酸。在一實施例中，**表 1** 中提供之 5′ UTR 序列具有作為 AG 之兩個第一核苷酸。在一實施例中，**表 1** 中提供之 5′ UTR 序列具有作為 GA 之兩個第一核苷酸。

表 1：5′ UTR 序列

SEQ ID NO:	**序列名稱**	**序列**
50	A1	GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUA GUUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC
51	A5	GGAAAUCCCCACAACCGCCUCAUAUCCAGGCUCAAGAAUAG AGCUCAGUGUUUUGUUGUUUAAUCAUUCCGACGUGUUUUG CGAUAUUCGCGCAAAGCAGCCAGUCGCGCGCUUGCUUUUAA GUAGAGUUGUUUUUCCACCCGUUUGCCAGGCAUCUUUAAUU UAACAUAUUUUUAUUUUUCAGGCUAACCUACGCCGCCACC
52	A6	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA UCUCCCUGAGCUUCAGGGAGCCCCGGCGCCGCCACC
53	A7	GGAAACCCCCCACCCCCGUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGA AGAAAUAUAAGAUCUCCCUGAGCUUCAGGGAGCCCCGGCGC CGCCACC
54	A8	GGAGAACUUCCGCUUCCGUUGGCGCAAGCGCUUUCAUUUUU UCUGCUACCGUGACUAAG
55	A9	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA GCCACC
56	A11 (參考)	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA CCCCGGCGCCGCCACC
57	A2	GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUA GUUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCCGCCGCC
58	A3	GGAAAUCGCAAAAUUUUCUUUUCGCGUUAGAUUUCUUUUA GUUUUCUUUCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCCGCCGCC
59	A4	G G A A A U C G C A A A A (N_2)$_X$ (N_3)$_X$ C U (N_4)$_X$ (N_5)$_X$ C G C G U U A G A U U U C U U U U A G U U U U C U N_6 N_7 C A A C U A G C A A G C U U U U U G U U C U C G C C (N_8 C C)$_X$ (N_2)$_X$ 為尿嘧啶並且 x 為 0 至 5 之整數，*例如*，其中 x=3 或 4； (N_3)$_X$ 為鳥嘌呤並且 x 為 0 至 1 之整數；

		$(N_4)_x$ 為胞嘧啶並且 x 為 0 至 1 之整數； $(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 0 至 5 之整數，*例如*，其中 x=2 或 3； N_6 為尿嘧啶或胞嘧啶； N_7 為尿嘧啶或鳥嘌呤； N_8 為腺嘌呤或鳥嘌呤並且 x 為 0 至 1 之整數。
60	A27	GGAAAAUUUUAGCCUGGAACGUUAGAUAACUGUCCUGUUG UCUUUAUAUACUUGGUCCCCAAGUAGUUUGUCUUCCAAA
61	A12	GGAAACUUUAUUUAGUGUUACUUUAUUUUCUGUUUAUUUG UGUUUCUUCAGUGGGUUUGUUCUAAUUUCCUUGGCCGCC
62	A13	GGAAAAUCUGUAUUAGGUUGGCGUGUUCUUUGGUCGGUUG UUAGUAUUGUUGUUGAUUCGUUUGUGGUCGGUUGCCGCC
63	A14	GGAAAAUUAUUAACAUCUUGGUAUUCUCGAUAACCAUUCG UUGGAUUUUAUUGUAUUCGUAGUUUGGGUUCCUGCCGCC
64	A15	GGAAAUUAUUAUUAUUUCUAGCUACAAUUUAUCAUUGUAU UAUUUUAGCUAUUCAUCAUUAUUUACUUGGUGAUCAACA
65	A16	GGAAAUAGGUUGUUAACCAAGUUCAAGCCUAAUAAGCUUG GAUUCUGGUGACUUGCUUCACCGUUGGCGGGCACCGAUC
66	A17	GGAAAUCGUAGAGAGUCGUACUUAGUACAUAUCGACUAUC GGUGGACACCAUCAAGAUUAUAAACCAGGCCAGA
67	A18	GGAAACCCGCCCAAGCGACCCCAACAUAUCAGCAGUUGCCC AAUCCCAACUCCCAACACAAUCCCCAAGCAACGCCGCC
68	A19	GGAAAGCGAUUGAAGGCGUCUUUUCAACUACUCGAUUAAG GUUGGGUAUCGUCGUGGGACUUGGAAAUUUGUUGUUUCC
69	A20	GGAAACUAAUCGAAAUAAAAGAGCCCCGUACUCUUUUAUUU CUAUUAGGUUAGGAGCCUUAGCAUUUGUAUCUUAGGUA
70	A21	GGAAAUGUGAUUUCCAGCAACUUCUUUUGAAUAUAUUGAA UUCCUAAUUCAAAGCGAACAAAUCUACAAGCCAUAUACC
71	A22	GGAAAUCGUAGAGAGUCGUACUUACGUGGUCGCCAUUGCAU AGCGCGCGAAAGCAACAGGAACAAGAACGCGCC
72	A23	GGAAAUCGUAGAGAGUCGUACUUAGAAUAAACAGAGUCGG GUCGACUUGUCUCUGAUACUACGACGUCACAAUC
73	A24	GGAAAAUUUGCCUUCGGAGUUGCGUAUCCUGAACUGCCCAG CCUCCUGAUAUACAACUGUUCCGCUUAUUCGGGCCGCC
74	A25	GGAAAUCUGAGCAGGAAUCCUUUGUGCAUUGAAGACUUUA GAUUCCUCUCUGCGGUAGACGUGCACUUAUAAGUAUUUG
75	A26	GGAAAGCGAUUGAAGGCGUCUUUUCAACUACUCGAUUAAG GUUGGGUAUCGUCGUGGGACUUGGAAAUUUGUUGCCACC
76	A28	GGAAAUUUUUUUUUGAUAUUAUAAGAGUUUUUUUUUGAUA UUAAGAAAAUUUUUUUUUGAUAUUAGAAGAGUAAGAAGAA AUAUAAGACCCCGGCGCCGCCACC
77	A29	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA GCCAAAAAAAAAAAACC
78	A30	GGAAAUCUCCCUGAGCUUCAGGGAGUAAGAGAGAAAAGAA GAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCCGCCACC
79	A31	GCCRCC，其中 R= A 或 G
80	A32	GGACUCACUAUUUGUUUUCGCGCCCAGUUGCAAAAA

【0078】　在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:50 之變異體。在一實施例

中，SEQ ID NO:50 之變異體包含式 A 之核酸序列：

G G A A A U C G C A A A A $(N_2)_X$ $(N_3)_X$ C U $(N_4)_X$ $(N_5)_X$ C G C G U U A G A U U U C U U U U A G U U U U C U N_6 N_7 C A A C U A G C A A G C U U U U U G U U C U C G C C $(N_8$ C C$)_x$ (SEQ ID NO:59)，

其中：

$(N_2)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 0 至 5 之整數，*例如*，其中 x=3 或 4；

$(N_3)_x$ 為鳥嘌呤並且 x 為 0 至 1 之整數；

$(N_4)_x$ 為胞嘧啶並且 x 為 0 至 1 之整數；

$(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 0 至 5 之整數，*例如*，其中 x=2 或 3；

N_6 為尿嘧啶或胞嘧啶；

N_7 為尿嘧啶或鳥嘌呤；

N_8 為腺嘌呤或鳥嘌呤並且 x 為 0 至 1 之整數。

【0079】　在一實施例中，$(N_2)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 0。在一實施例中，$(N_2)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 1。在一實施例中，$(N_2)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 2。在一實施例中，$(N_2)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 3。在一實施例中，$(N_2)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 4。在一實施例中，$(N_2)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 5。

【0080】　在一實施例中，$(N_3)_x$ 為鳥嘌呤並且 x 為 0。在一實施例中，$(N_3)_x$ 為鳥嘌呤並且 x 為 1。

【0081】　在一實施例中，$(N_4)_x$ 為胞嘧啶並且 x 為 0。在一實施例中，$(N_4)_x$ 為胞嘧啶並且 x 為 1。

【0082】　在一實施例中，$(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 0。在一實施例中，$(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 1。在一實施例中，$(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 2。在一實施例中，$(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 3。在一實施例中，$(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 4。在一實施例中，$(N_5)_x$ 為尿嘧啶並且 x 為 5。

【0083】　在一實施例中，N6 為尿嘧啶。在一實施例中，N6 為胞嘧啶。

【0084】　在一實施例中，N7 為尿嘧啶。在一實施例中，N7 為鳥嘌呤。

【0085】　在一實施例中，N8 為腺嘌呤並且 x 為 0。在一實施例中，N8 為腺嘌呤並且 x 為 1。

【0086】　在一實施例中，N8 為鳥嘌呤並且 x 為 0。在一實施例中，N8 為鳥嘌呤並且 x 為 1。

【0087】　在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:50 之變異體。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性之序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 50%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 60%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 70%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 80%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 90%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 95%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 96%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 97%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 98%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 99%一致性的序列。

【0088】　在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:64 之變異體。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少 64%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性之序列。在一實施例

中，SEQ ID NO: 64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少至少 64%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO: 64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少至少 60%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO: 64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少至少 70%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO: 64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少至少 80%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO: 64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少至少 90%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少 95%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少 96%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少 97%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少 98%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含與 SEQ ID NO:64 具有至少 99%一致性的序列。

【0089】　在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:55 之變異體。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 55%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性之序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 55%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 60%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 70%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 80%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 90%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 95%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 96%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 97%一致

性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 98%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含與 SEQ ID NO:55 具有至少 99%一致性的序列。

【0090】 在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:56 之變異體。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 56%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性之序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 56%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 60%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 70%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 80%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 90%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 95%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 96%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 97%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 98%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含與 SEQ ID NO:56 具有至少 99%一致性的序列。

【0091】 在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:58 之變異體。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 58%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 58%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 60%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具

有至少 70%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 80%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 90%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 95%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 96%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 97%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 98%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含與 SEQ ID NO:58 具有至少 99%一致性的序列。

【0092】　在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:76 之變異體。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 76%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 76%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 60%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 70%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 80%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 90%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 95%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 96%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 97%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 98%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含與 SEQ ID NO:76 具有至少 99%一致性的序列。

【0093】 在一實施例中，5′ UTR 包含 SEQ ID NO:78 之變異體。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 78%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 78%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 60%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 70%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 80%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 90%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 95%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 96%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 97%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 98%一致性的序列。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含與 SEQ ID NO:78 具有至少 99%一致性的序列。

【0094】 在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、或 80%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 5%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 10%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 20%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 30%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 40%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 50%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 60%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至少 70%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含至

少 80%之尿苷含量。

【0095】 在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 5%、10%、20%、30%、40%、64%、60%、70%、或 80%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 5%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 10%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 20%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 30%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 40%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 64%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 60%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 70%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含至少 80%之尿苷含量。

【0096】 在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 5%、10%、20%、30%、40%、55%、60%、70%、或 80%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 5%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 10%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 20%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 30%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 40%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 55%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 60%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 70%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 80%之尿苷含量。

【0097】 在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 5%、10%、20%、30%、40%、56%、60%、70%、或 80%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 5%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含

至少 10%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 20%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 30%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 40%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 56%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 60%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 70%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 80%之尿苷含量。

【0098】　在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 5%、10%、20%、30%、40%、58%、60%、70%、或 80%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 5%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 10%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 20%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 30%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 40%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 58%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 60%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 70%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 80%之尿苷含量。

【0099】　在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 5%、10%、20%、30%、40%、76%、60%、70%、或 80%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 5%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 10%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 20%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 30%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 40%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 76%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID

NO:76之變異體包含至少60%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76之變異體包含至70%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:76之變異體包含至少80%之尿苷含量。

【0100】 在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少5%、10%、20%、30%、40%、78%、60%、70%、或80%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少5%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少10%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少20%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少30%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少40%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少78%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少60%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少70%之尿苷含量。在一實施例中，SEQ ID NO:78之變異體包含至少80%之尿苷含量。

【0101】 在一實施例中，SEQ ID NO:50之變異體包含至少2、3、4、5、6或7個連續尿苷(*例如*，多尿苷束)。在一實施例中，SEQ ID NO:50之變異體中之多尿苷束包含至少1-7、2-7、3-7、4-7、5-7、6-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-6、或3-5個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:50之變異體中之多尿苷束包含4個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:50之變異體中之多尿苷束包含5個連續尿苷。

【0102】 在一實施例中，SEQ ID NO:64之變異體包含至少2、3、4、5、6或7個連續尿苷(例如，多尿苷束)。在一實施例中，SEQ ID NO:64之變異體中之多尿苷束包含至少1-7、2-7、3-7、4-7、5-7、6-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-6、或3-5個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:64之變異體中之多尿苷束包含4個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:64之變異體中之多尿苷束包含5個

連續尿苷。

【0103】　在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含至少 2、3、4、5、6 或 7 個連續尿苷(例如，多尿苷束)。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體中之多尿苷束包含至少 1-7、2-7、3-7、4-7、5-7、6-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-6、或 3-5 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體中之多尿苷束包含 4 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體中之多尿苷束包含 5 個連續尿苷。

【0104】　在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含至少 2、3、4、5、6 或 7 個連續尿苷(例如，多尿苷束)。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體中之多尿苷束包含至少 1-7、2-7、3-7、4-7、5-7、6-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-6、或 3-5 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體中之多尿苷束包含 4 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體中之多尿苷束包含 5 個連續尿苷。

【0105】　在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含至少 2、3、4、5、6 或 7 個連續尿苷(例如，多尿苷束)。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體中之多尿苷束包含至少 1-7、2-7、3-7、4-7、5-7、6-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-6、或 3-5 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體中之多尿苷束包含 4 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體中之多尿苷束包含 5 個連續尿苷。

【0106】　在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含至少 2、3、4、5、6 或 7 個連續尿苷(例如，多尿苷束)。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體中之多尿苷束包含至少 1-7、2-7、3-7、4-7、5-7、6-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-6、或 3-5 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體中之多尿苷束包含 4 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體中之多尿苷束包含 5 個

連續尿苷。

【0107】　在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含至少 2、3、4、5、6 或 7 個連續尿苷(例如，多尿苷束)。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體中之多尿苷束包含至少 1-7、2-7、3-7、4-7、5-7、6-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-6、或 3-5 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體中之多尿苷束包含 4 個連續尿苷。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體中之多尿苷束包含 5 個連續尿苷。

【0108】　在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含 3 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含 4 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:50 之變異體包含 5 個多尿苷束。

【0109】　在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含 3 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含 4 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:64 之變異體包含 5 個多尿苷束。

【0110】　在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含 3 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含 4 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:55 之變異體包含 5 個多尿苷束。

【0111】　在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含 3 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含 4 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:56 之變異體包含 5 個多尿苷束。

【0112】　在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含 1、2、3、4、5、6、7、

8、9、10、11、12、13、14、或 15 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含 3 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含 4 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:58 之變異體包含 5 個多尿苷束。

【0113】 在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含 3 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含 4 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:76 之變異體包含 5 個多尿苷束。

【0114】 在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含 3 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含 4 個多尿苷束。在一實施例中，SEQ ID NO:78 之變異體包含 5 個多尿苷束。

【0115】 在一實施例中，多尿苷束中之一或多者與不同多尿苷束相鄰。在一實施例中，多尿苷束中之各者*例如*全部為彼此相鄰的，*例如*，全部多尿苷束為連續的。

【0116】 在一實施例中，多尿苷束中之一或多者藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、2、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50 或 60 個核苷酸分離。在一實施例中，多尿苷束中之各者*例如*全部藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、2、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50 或 60 個核苷酸分離。

【0117】 在一實施例中，第一多尿苷束及第二多尿苷束為彼此相鄰的。

【0118】 在一實施例中，後續*例如*第三、第四、第五、第六或第七、第八、第九、或第十個多尿苷束藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、2、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50 或 60 個核苷酸與第一多尿苷束、第二多尿苷束、或後續多尿苷束中任一者分離。

【0119】 在一實施例中，第一多尿苷束藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、2、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50 或 60 個核苷酸與後續多尿苷束*例如*第二、第三、第四、第五、第六或第七、第八、第九、或第十個多尿苷束分離。在一實施例中，後續多尿苷束中之一或多者與不同多尿苷束相鄰。

【0120】 在一實施例中，5′UTR 包含 Kozak 序列，*例如*，GCCRCC 核苷酸序列(SEQ ID NO: 79)其中 R 為腺嘌呤或鳥嘌呤。在一實施例中，Kozak 序列安置在 5′ UTR 序列之 3′末端處。

【0121】 在一實施例中，包含本文揭示之 5’ UTR 序列的多核苷酸包含編碼酬載，*例如*，治療或預防酬載的編碼區域。

【0122】 在一態樣中，包含本文揭示之 5’ UTR 序列的多核苷酸(*例如*，mRNA)被調配成 LNP。在一實施例中，LNP 組成物包含：(i)可電離脂質，*例如*，胺基脂質；(ii)固醇或其他結構脂質；(iii)非陽離子輔助脂質或磷脂；及(iv) PEG-脂質。

【0123】 在另一態樣中，本揭示案之 LNP 組成物用於治療疾病或病症之方法中，或抑制受試者之免疫反應之方法中。

【0124】 在一態樣中，包含編碼*例如*如本文描述之治療酬載或預防酬載之本文揭示之多核苷酸的 LNP 組成物可與*例如*如本文描述之額外劑一起投與。

b. 終止元件＋3′ UTR 序列

【0125】 轉譯終止密碼子 UAA、UAG、及 UGA 為遺傳密碼之重要組分並且為 mRNA 之轉譯終止之信號。在蛋白合成過程中，終止密碼子與蛋白釋放因子相互作用，並且此相互作用可以調節核糖體活性，從而影響轉譯(Tate WP 等人, (2018) Biochem Soc Trans, 46(6):1615-162)。

【0126】 3′ UTR 序列已被證明會影響 mRNA 之轉譯、半衰期及亞細胞定位(Mayr C., Cold Spring Harb Persp Biol 2019 年 10 月 1 日;11(10):a034728)。

【0127】 本文*尤其*揭示編碼多肽之多核苷酸，該多核苷酸具有終止元件以及

3’ UTR，其賦予藉由該多核苷酸來編碼之多肽，或多核苷酸本身增加的半衰期、增加的表現及/或增加的活性。在一實施例中，本文揭示之多核苷酸包含：(a) 5’-UTR；(b)編碼區域；及(c)終止元件及 3’-UTR (*例如*，如本文描述)，及包含該多核苷酸之 LNP 組成物。

【0128】　本文*尤其*揭示編碼多肽之多核苷酸，其*尤其*包含 3’ UTR。在一實施例中，本文揭示之多核苷酸包含：(a) 5’-UTR (*例如*，如**表 1** 中提供或其變異體或片段)；(b)編碼區域；及(c)終止元件及 3’-UTR(*例如*，如**表 2** 中提供或其變異體或片段)，及包含該多核苷酸之 LNP 組成物。在一實施例中，多核苷酸包含有包含**表 2** 中提供之序列的 3’-UTR 或其變異體或片段(例如，其功能變異體或片段)。應當理解，此等 3′ UTR 併入自然界中未發現之構築體中，例如，此等 3′ UTR 為合成的，在序列方面自天然存在之 3′ UTR 改變，為自然界中發現之彼等的截短或加長型式，包含化學修飾鹼基，在 ORF 序列之 3′，不同於它們可能在自然界中發現的彼等，或其類似情況。

【0129】　在一實施例中，3′ UTR 包含**表 2** 中提供之序列或與**表 2** 中提供之 3′ UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列，或其變異體或片段。在一實施例中，3′ UTR 包含與 SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 143、SEQ ID NO: 144、SEQ ID NO: 145、SEQ ID NO: 146、或 SEQ ID NO: 147 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

表 2：3’ UTR 序列(終止盒以斜體顯示；miR 結合位點以粗體顯示)

SEQ ID NO:	**序列名稱**	**序列**
SEQ ID NO: 139	D1	*UAAAGCUCCCCGGGG*GCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
SEQ ID NO: 140	D2	*UAAGUCUAA*GCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUGGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
SEQ ID NO:	D3	*UAAAGCUCCCCGGGG***CAAACACCAUUGUCACACUCCA**GCC

141		UCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCC**CAAACACCAU** **UGUCACACUCCA**UCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGC ACCCGUACCCCCC**CAAACACCAUUGUCACACUCCA**GUGGU CUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR122 結合位點以粗體顯示)
SEQ ID NO: 142	D4	*UAAAGCUCCCCGGGG***UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA**GC UGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCC**CAA** **ACACCAUUGUCACACUCCA**UCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCC UUCCUGCACCCGUACCCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC (miR-142-3p 及 miR122 結合位點以粗體顯示)
SEQ ID NO: 143	D5	*UAAAGCUCCCCGGGG*GCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCC UUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCCUGCACCCGU ACCCCCC**CAAACACCAUUGUCACACUCCA**GUGGUCUUUGA AUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR122 結合位點以粗體顯示)
SEQ ID NO: 144	D6	*UAAGCCCCUCCGGGG***CAAACACCAUUGUCACACUCCA**GCC UCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCC**CAAACACCAU** **UGUCACACUCCA**UCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCCUGC ACCCGUACCCCCC**CAAACACCAUUGUCACACUCCA**GUGGU CUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR122 結合位點以粗體顯示)
SEQ ID NO: 145	D7	*UAAGCCCCUCCGGGG***UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA**G CCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCC**UCCAUAAA** **GUAGGAAACACUACA**UCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCC**CGCAUUAUUACUCACGGUACGA**GU GGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR-142-3p 及 miR-126-3p 結合位點以粗體顯示)
SEQ ID NO: 146	D8	*UAAGCCCCUCCGGGG***UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA**G CUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCC**CA** **AACACCAUUGUCACACUCCA**UCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCC CUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCU GAGUGGGCGGC (miR-142-3p 及 miR122 結合位點以粗體顯示)
SEQ ID NO: 147	D9	*UAAGCCCCUCCGGGG*GCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCCUGCACCCG UACCCCCC**CAAACACCAUUGUCACACUCCA**GUGGUCUUUG AAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR122 結合位點以粗體顯示)

【0130】　在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3'-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAAGCUCCCCGGGG*GCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:139**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:139** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、

五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0131】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:139** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0132】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:139** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0133】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:139** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0134】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:139** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:139** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0135】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3’-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAGUCUAA*GCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUGGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:140**)或

其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:140** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0136】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:140** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0137】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:140** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0138】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:140** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0139】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:140** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:140** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0140】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3’-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAAGCUCCCCGGGG*CAAACACCAUUGUCACACUCCAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCCAAACACCAUUGUCA

CACUCCAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCAA ACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCG GC (**SEQ ID NO:141**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:141** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0141】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:141** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0142】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:141** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0143】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:141** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0144】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:141** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:141** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0145】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3’-UTR，其中該序列為(終

止元件以斜體顯示)：*UAAAGCUCCCCGGGG*UCCAUAAAGUAGGAAACACUA CAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCCAAACACC AUUGUCACACUCCAUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUA CCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:142**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:142** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0146】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:142** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0147】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:142** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0148】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:142** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0149】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:142** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:142** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0150】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3'-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAAGCUCCCCGGGG*GCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:143**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:143** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0151】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:143** 提供之 3' UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0152】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:143** 提供之 3' UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0153】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:143** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0154】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:143** 提供之 3′ UTR 序列

或與 **SEQ ID NO:143** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0155】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3’-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAGCCCCUCCGGGG*CAAACACCAUUGUCACACUCCAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:144**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:144** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0156】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:144** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0157】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:144** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0158】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:144** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行

比較。

【0159】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:144** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:144** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0160】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3’-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAGCCCCUCCGGGG*UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:145**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:145** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0161】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:145** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0162】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:145** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0163】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:145** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0164】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:145** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:145** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0165】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3'-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAGCCCCUCCGGGG*UCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:146**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:146** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0166】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:146** 提供之 3' UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0167】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:146** 提供之 3' UTR 序列或其變異

體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0168】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:146** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0169】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:146** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:146** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

【0170】 在一實施例中，多核苷酸包含終止元件及 3’-UTR，其中該序列為(終止元件以斜體顯示)：*UAAGCCCCUCCGGGG*GCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (**SEQ ID NO:147**)或其變異體或片段(例如，缺少 **SEQ ID NO:147** 之核苷酸的前一個、兩個、三個、四個、五個、六個、或更多個核苷酸的片段。

【0171】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:147** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致多核苷酸之半衰期增加，*例如*，多核苷酸之半衰期增加約 1.5-10 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 6 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 7 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 8 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 9 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 10 倍或更大。

【0172】 在一實施例中，具有 **SEQ ID NO:147** 提供之 3’ UTR 序列或其變異體或片段的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性*例如*輸出得以增加。

【0173】 在一實施例中，增加與不具有 3′UTR，具有不同 3′UTR，或不具有 **SEQ ID NO:147** 之 3′UTR 或其變異體或片段的在其他方面相似的多核苷酸進行比較。

【0174】 在一實施例中，多核苷酸包含 **SEQ ID NO:147** 提供之 3′ UTR 序列或與 **SEQ ID NO:147** 提供之 3′UTR 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性的序列。

2. 3’穩定區

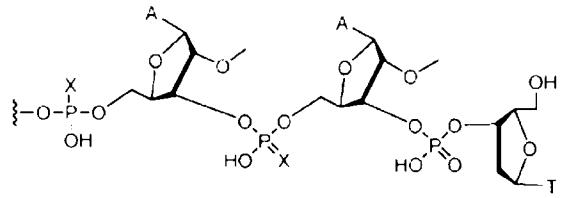
【0175】 本文*尤其*揭示編碼多肽之多核苷酸，其中多核苷酸包含：(a) 5’-UTR (*例如*，如本文描述)；(b)包含終止元件(*例如*，如本文描述)之編碼區域；(c) 3’-UTR (*例如*，如本文描述)，及(d) 3’穩定區。本文亦揭示包含該多核苷酸之 LNP 組成物。

【0176】 在一實施例中，多核苷酸包含例如如本文描述之 3’穩定區，*例如*，穩定尾。含有 3’-穩定區(*例如*，包括替代核苷鹼基、糖，及/或主鏈之 3’-穩定區)的多核苷酸可尤其有效地用於治療性組成物中，因為其可受益於增加的穩定性、較高表現水準。

【0177】 在一實施例中，3’穩定區包含多聚腺苷酸尾，*例如*，包含 80-150 個*例如* 120 個腺嘌呤之多聚腺苷酸尾(SEQ ID NO:123)。在一實施例中，多聚腺苷酸尾包含例如如本文描述之一或多個非腺苷殘基，例如，一或多個鳥苷。在一實施例中，多聚腺苷酸尾包含 UCUAG 序列(SEQ ID NO: 44)。在一實施例中，多聚腺苷酸尾包含 SEQ ID NO: 44 上游的約 80-120 個*例如* 100 個腺嘌呤。在一實施例中，多聚腺苷酸尾包含 SEQ ID NO: 44 下游的約 1-40 個*例如* 20 個腺嘌呤。

【0178】　在一實施例中，3’穩定區包含至少一個替代核苷。在一實施例中，替代核苷為反向胸苷(idT)。在一實施例中，替代核苷安置於 3’穩定區之 3’末端處。

【0179】　在一實施例中，3’穩定區包含式 VII 之結構：



或其鹽，其中各 X 獨立地為 O 或 S，並且 A 表示腺嘌呤並且 T 表示胸腺嘧啶。

【0180】　在一態樣中，本文揭示編碼多肽之多核苷酸，其中多核苷酸包含：(a) 5’-UTR (*例如*，如本文描述)；(b)包含終止元件(*例如*，如本文描述)之編碼區域；(c) 3’-UTR (*例如*，如本文描述)及；(d) 3’穩定區，*例如*，如本文描述。

【0181】　在一態樣中，包含有包含本文揭示之穩定區的多核苷酸的 LNP 組成物包含：(i)可電離脂質，*例如*，胺基脂質；(ii)固醇或其他結構脂質；(iii)非陽離子輔助脂質或磷脂；及(iv) PEG-脂質。

【0182】　在另一態樣中，本揭示案之 LNP 組成物用於治療疾病或病症之方法中，或抑制受試者之免疫反應之方法中。

【0183】　在一態樣中，包含編碼例如如本文描述之治療酬載或預防酬載之本文揭示之多核苷酸的 LNP 組成物可與例如如本文描述之額外劑一起投與。

3.　微小 RNA (miRNA)結合位點

【0184】　本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)可包括調控元件，例如，微小 RNA (miRNA)結合位點、轉錄因子結合位點、結構化 mRNA 序列及/或模體、經工程改造以便充當內源性核酸結合分子之假受體的人工結合位點、及其組合。

【0185】　在一些實施例中，本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)包含編碼所關注之多肽的開放閱讀框(ORF)並且進一步包含一或多個 miRNA 結

合位點。基於天然存在之 miRNA 之組織特異性及/或細胞類型特異性表現，miRNA 結合位點之包含或併入提供本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)、及進而由其編碼之多肽的調控。

【0186】 miRNA *例如*天然存在之 miRNA 係 19-25 個核苷酸長之非編碼 RNA，其結合於核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)且藉由降低該多核苷酸之穩定性或藉由抑制其轉譯來下調基因表現。miRNA 序列包含「種子」區域，*亦即*，成熟 miRNA 之位置 2-8 之區域中之序列。miRNA 種子可包含成熟 miRNA 之位置 2-8 或 2-7。在一些實施例中，miRNA 種子可包含 7 個核苷酸(*例如*，成熟 miRNA 之核苷酸 2-8)，其中對應 miRNA 結合位點中之種子互補位點藉由與 miRNA 位置 1 相對之腺苷(A)來側接。在一些實施例中，miRNA 種子可包含 6 個核苷酸(*例如*，成熟 miRNA 之核苷酸 2-7)，其中對應 miRNA 結合位點中之種子互補位點藉由與 miRNA 位置 1 相對之腺苷(A)來側接。參見例如 Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP; Mol Cell. 2007 年 7 月 6 日;27(1):91-105。可進行靶細胞或組織之 miRNA 剖析以便確定細胞或組織中之 miRNA 之存在或不存在。在一些實施例中，本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)包含一或多個微小 RNA 結合位點、微小 RNA 靶序列、微小 RNA 互補序列、或微小 RNA 種子互補序列。此等序列可與諸如美國公開案 US2005/0261218 及美國公開案 US2005/0059005 中教導之彼等的任何已知微小 RNA 對應，*例如*與其具有互補性，該等公開案中之各者的內容以全文引用方式併入本文。

【0187】 如本文所用，術語「微小 RNA (miRNA 或 miR)結合位點」係指核酸分子內(*例如* DNA 內或 RNA 轉錄物內，包括 5′ UTR 及/或 3′ UTR 中)之序列，其與整個 miRNA 或其區具有充足互補性以與 miRNA 相互作用、締合或結合。在一些實施例中，本揭示案之包含編碼所關注之多肽之 ORF 的核酸分子(*例如*，

RNA，*例如*，mRNA)進一步包含一或多個 miRNA 結合位點。在示例性實施例中，核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之 5’ UTR 及/或 3’ UTR 包含一或多個 miRNA 結合位點。

【0188】 與 miRNA 具有充足互補性之 miRNA 結合位點係指互補程度足以促進 miRNA 介導之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之調控，*例如* miRNA 介導之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之轉譯抑制或降解。在本揭示案之示例性態樣中，與 miRNA 具有充足互補性之 miRNA 結合位點係指互補程度足以促進 miRNA 介導之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)降解，*例如* miRNA 指導的 RNA 誘導之沉默複合物(RISC)介導之 mRNA 裂解。miRNA 結合位點可與例如 19-25 個核苷酸 miRNA 序列、19-23 個核苷酸 miRNA 序列、或 22 個核苷酸 miRNA 序列具有互補性。miRNA 結合位點可僅與 miRNA 之一部分互補，*例如*與天然存在之 miRNA 序列之全長的小於 1、2、3 或 4 個核苷酸之部分互補。當所需調控為 mRNA 降解時，充分或完全互補性(*例如*，在天然存在之 miRNA 之長度的全部或大部分上充分互補或完全互補)為較佳的。

【0189】 在一些實施例中，miRNA 結合位點包括與 miRNA 種子序列具有互補性(*例如*，部分或完全互補性)之序列。在一些實施例中，miRNA 結合位點包括與 miRNA 種子序列具有完全互補性的序列。在一些實施例中，miRNA 結合位點包括與 miRNA 序列具有互補性(*例如*，部分或完全互補性)之序列。在一些實施例中，miRNA 結合位點包括與 miRNA 序列具有完全互補性的序列。在一些實施例中，miRNA 結合位點與 miRNA 序列具有完全互補性，但具有 1、2 或 3 個核苷酸取代、末端添加及/或截短。

【0190】 在一些實施例中，miRNA 結合位點之長度與相應 miRNA 相同。在其他實施例中，在 5′末端、3′末端或兩個末端處，miRNA 結合位點比相應 miRNA 短一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個或

十二個核苷酸。在其他實施例中，在 5′末端、3′末端或兩個末端處，微小 RNA 結合位點比相應微小 RNA 短兩個核苷酸。比相應 miRNA 短的 miRNA 結合位點仍能夠使併入一或多個 miRNA 結合位點之 mRNA 降解或防止 mRNA 轉譯。

【0191】　在一些實施例中，miRNA 結合位點結合於相應成熟 miRNA，該成熟 miRNA 係含有 Dicer 之活性 RISC 之一部分。在另一實施例中，miRNA 結合位點與 RISC 中之相應 miRNA 的結合使含有 miRNA 結合位點之 mRNA 降解或防止 mRNA 經轉譯。在一些實施例中，miRNA 結合位點與 miRNA 具有充足互補性，使得包含 miRNA 之 RISC 複合物裂解包含 miRNA 結合位點之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)。在一些實施例中，miRNA 結合位點具有不完美互補性，使得包含 miRNA 之 RISC 複合物誘導包含 miRNA 結合位點之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中的不穩定性。在另一實施例中，miRNA 結合位點具有不完美互補性，使得包含 miRNA 之 RISC 複合物抑制包含 miRNA 結合位點之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)的轉錄。

【0192】　在一些實施例中，miRNA 結合位點與相應 miRNA 具有一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個或十二個錯配。

【0193】　在一些實施例中，miRNA 結合位點具有分別與相應 miRNA 之至少約十個、至少約十一個、至少約十二個、至少約十三個、至少約十四個、至少約十五個、至少約十六個、至少約十七個、至少約十八個、至少約十九個、至少約二十個或至少約二十一個相鄰核苷酸互補之至少約十個、至少約十一個、至少約十二個、至少約十三個、至少約十四個、至少約十五個、至少約十六個、至少約十七個、至少約十八個、至少約十九個、至少約二十個或至少約二十一個相鄰核苷酸。

【0194】　藉由將一或多個 miRNA 結合位點工程改造至本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中，該核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)可經

靶向用於降解或減少之轉譯，只要可獲得所討論之 miRNA。此可減少遞送核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)時的脫靶效應。舉例而言，若本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)不欲遞送至組織或細胞，而是終止於該組織或細胞，則若 miRNA 之一或多個結合位點經工程改造至核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之 5′ UTR 及/或 3′ UTR 中，則該組織或細胞中之豐富 miRNA 可抑制所關注之基因的表現。

【0195】 例如，熟習此項技術者理解一或多個 miR 結合位點可包含在核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中以便最大限度地減少在除了淋巴細胞以外的細胞類型中之表現。在一個實施例中，可使用 miR122 結合位點。在另一實施例中，可使用 miR126 結合位點。在仍然另一實施例中，可使用此等 miR 結合位點之多個複本或組合。

【0196】 相反，miRNA 結合位點可自其中天然存在該等結合位點之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)序列中移除，以便增加特定組織中之蛋白表現。舉例而言，針對特定 miRNA 之結合位點可自核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中移除以改良含有 miRNA 之組織或細胞中的蛋白表現。

【0197】 對多種組織中之表現的調控可藉由引入或移除一或多個 miRNA 結合位點*例如*一或多個不同 miRNA 結合位點來實現。可基於 miRNA 表現模式及/或其在發育中之組織及/或細胞及/或疾病中的剖析來決定是否移除或插入 miRNA 結合位點。已報導了 miRNA 之鑑別、miRNA 結合位點及其表現模式及在生物學中之作用(*例如* Bonauer 等人, Curr Drug Targets 2010 11:943-949；Anand 及 Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176；Contreras 及 Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011 年 12 月 20 日. doi: 10.1038/leu.2011.356)；Bartel Cell 2009 136:215-233；Landgraf 等人, Cell, 2007 129:1401-1414；Gentner 及 Naldini, Tissue Antigens. 2012 80:393-403 及其中所有參考文獻；該等文獻中之各者以引用之方

式整體併入本文中)。

【0198】 miRNA 及 miRNA 結合位點可對應於任何已知序列，包括描述於美國公開案第 2014/0200261 號、第 2005/0261218 號及第 2005/0059005 號中之非限制性實例，該等公開案中之各者以全文引用之方式併入本文中。

【0199】 其中已知 miRNA 調控 mRNA 且由此調控蛋白表現的組織之實例包括但不限於肝臟(miR-122)、肌肉(miR-133、miR-206、miR-208)、內皮細胞(miR-17-92、miR-126)、骨髓細胞(miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27)、脂肪組織(let-7、miR-30c)、心臟(miR-1d、miR-149)、腎(miR-192、miR-194、miR-204)及肺上皮細胞(let-7、miR-133、miR-126)。

【0200】 具體而言，已知 miRNA 在諸如抗原呈遞細胞(APC)(*例如*，樹突狀細胞及單核球)、單核球、單核球、B 淋巴球、T 淋巴球、顆粒球、自然殺手細胞等之免疫細胞(亦被稱為造血細胞)中差異地表現。免疫細胞特異性 miRNA 涉及免疫原性、自體免疫性、對於感染之免疫反應、發炎、以及基因療法及組織/器官移植之後的不當免疫反應。免疫細胞特異性 miRNA 亦調控造血細胞(免疫細胞)之發育、增殖、分化及細胞凋亡的多個態樣。舉例而言，miR-142 及 miR-146 僅在免疫細胞中表現，尤其在骨髓樹突狀細胞中很豐富。已證明，對核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之免疫反應可藉由向該多核苷酸之 3′-UTR 中添加 miR-142 結合位點來關閉，使得能夠在組織及細胞中進行更穩定基因轉移。miR-142 有效地降解抗原呈遞細胞中之外源性核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)且抑制經轉導細胞之細胞毒性消除(*例如*，Annoni A 等人, blood, 2009, 114, 5152-5161；Brown BD 等人, Nat med. 2006, 12(5), 585-591；Brown BD 等人, blood, 2007, 110(13): 4144-4152，該等文獻中之各者以引用之方式整體併入本文中)。

【0201】 抗原介導之免疫反應可指由外來抗原觸發之免疫反應，該等外來抗原在進入生物體時由抗原呈遞細胞處理且呈現於抗原呈遞細胞之表面上。T 細胞

可識別呈遞之抗原且誘導表現該抗原之細胞的細胞毒性消除。

【0202】 將miR-142結合位點引入本揭示案之核酸分子的5′ UTR及/或3′ UTR中可藉由 miR-142 介導之降解來選擇性地抑制抗原呈遞細胞中之基因表現，從而限制抗原呈遞細胞(*例如*樹突狀細胞)中之抗原呈遞且由此防止在遞送核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之後出現抗原介導的免疫反應。核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)接著穩定表現於標靶組織或細胞中而不會觸發細胞毒性消除。

【0203】 在一個實施例中，已知在免疫細胞，尤其抗原呈遞細胞中表現之miRNA 之結合位點可工程改造至本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中以便經由 miRNA 介導之 RNA 降解來抑制抗原呈遞細胞中之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之表現，從而抑制抗原介導之免疫反應。該核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)在其中未表現免疫細胞特異性 miRNA 之非免疫細胞中維持表現。舉例而言，在一些實施例中，為了防止針對肝臟特異性蛋白之免疫原性反應，可移除任何 miR-122 結合位點且 miR-142 (及/或 mirR-146)結合位點可經工程改造至本揭示案之核酸分子的 5′ UTR 及/或 3′ UTR 中。

【0204】 為了進一步驅動 APC 及巨噬細胞中之選擇性降解及抑制，本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)可在 5′ UTR 及/或 3′ UTR 中包括單獨或與 miR-142 及/或 miR-146 結合位點組合的另一負調控元件。作為非限制性實例，另一負調控元件為組成性衰減元件(CDE)。

【0205】 免疫細胞特異性 miRNA 包括但不限於 hsa-let-7a-2-3p、hsa-let-7a-3p、hsa-7a-5p、hsa-let-7c、hsa-let-7e-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-let-7g-3p、hsa-let-7g-5p、hsa-let-7i-3p、hsa-let-7i-5p、miR-10a-3p、miR-10a-5p、miR-1184、hsa-let-7f-1--3p、hsa-let-7f-2--5p、hsa-let-7f-5p、miR-125b-1-3p、miR-125b-2-3p、miR-125b-5p、miR-1279、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-132-3p、miR-132-5p、miR-142-3p、

miR-142-5p、miR-143-3p、miR-143-5p、miR-146a-3p、miR-146a-5p、miR-146b-3p、miR-146b-5p、miR-147a、miR-147b、miR-148a-5p、miR-148a-3p、miR-150-3p、miR-150-5p、miR-151b、miR-155-3p、miR-155-5p、miR-15a-3p、miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-15b-3p、miR-16-1-3p、miR-16-2-3p、miR-16-5p、miR-17-5p、miR-181a-3p、miR-181a-5p、miR-181a-2-3p、miR-182-3p、miR-182-5p、miR-197-3p、miR-197-5p、miR-21-5p、miR-21-3p、miR-214-3p、miR-214-5p、miR-223-3p、miR-223-5p、miR-221-3p、miR-221-5p、miR-23b-3p、miR-23b-5p、miR-24-1-5p,miR-24-2-5p、miR-24-3p、miR-26a-1-3p、miR-26a-2-3p、miR-26a-5p、miR-26b-3p、miR-26b-5p、miR-27a-3p、miR-27a-5p、miR-27b-3p,miR-27b-5p、miR-28-3p、miR-28-5p、miR-2909、miR-29a-3p、miR-29a-5p、miR-29b-1-5p、miR-29b-2-5p、miR-29c-3p、miR-29c-5p,、miR-30e-3p、miR-30e-5p、miR-331-5p、miR-339-3p、miR-339-5p、miR-345-3p、miR-345-5p、miR-346、miR-34a-3p、miR-34a-5p、、miR-363-3p、miR-363-5p、miR-372、miR-377-3p、miR-377-5p、miR-493-3p、miR-493-5p、miR-542、miR-548b-5p、miR548c-5p、miR-548i、miR-548j、miR-548n、miR-574-3p、miR-598、miR-718、miR-935、miR-99a-3p、miR-99a-5p、miR-99b-3p、及 miR-99b-5p。此外，可藉由微陣列雜交及切片機分析在免疫細胞中鑑別新穎 miRNA (*例如*，Jima DD 等人, Blood, 2010, 116:e118-e127；Vaz C 等人, BMC Genomics, 2010, 11,288，其中每一者之內容以引用之方式整體併入本文中。)

【0206】　在一些實施例中，miRNA 結合位點在核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之任何位置(*例如*，5’ UTR 及/或 3’ UTR)處插入本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中。在一些實施例中，5’ UTR 包含 miRNA 結合位點。在一些實施例中，3’ UTR 包含 miRNA 結合位點。在一些實施例中，5’ UTR 及 3’ UTR 包含 miRNA 結合位點。核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之插入

位點可為核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之任何位置，只要 miRNA 結合位點在核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之插入不干擾在對應 miRNA 不存在時的功能性多肽之轉譯；並且在存在 miRNA 的情況下，miRNA 結合位點在核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之插入及 miRNA 結合位點與對應 miRNA 之結合能夠降解多核苷酸或防止核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之轉譯。

【0207】 在一些實施例中，miRNA 結合位點插入包含 ORF 之本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之 ORF 之終止密碼子下游之至少約 30 個核苷酸中。在一些實施例中，miRNA 結合位點插入本揭示案之多核苷酸中之 ORF 之終止密碼子下游之至少約 10 個核苷酸、至少約 15 個核苷酸、至少約 20 個核苷酸、至少約 25 個核苷酸、至少約 30 個核苷酸、至少約 35 個核苷酸、至少約 40 個核苷酸、至少約 45 個核苷酸、至少約 50 個核苷酸、至少約 55 個核苷酸、至少約 60 個核苷酸、至少約 65 個核苷酸、至少約 70 個核苷酸、至少約 75 個核苷酸、至少約 80 個核苷酸、至少約 85 個核苷酸、至少約 90 個核苷酸、至少約 95 個核苷酸、或至少約 100 個核苷酸中。在一些實施例中，miRNA 結合位點插入本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之 ORF 之終止密碼子下游的約 10 個核苷酸至約 100 個核苷酸、約 20 個核苷酸至約 90 個核苷酸、約 30 個核苷酸至約 80 個核苷酸、約 40 個核苷酸至約 70 個核苷酸、約 50 個核苷酸至約 60 個核苷酸、約 45 個核苷酸至約 65 個核苷酸中。

【0208】 miRNA 基因調控可受 miRNA 周圍之序列的影響，諸如但不限於，周圍序列之種類、序列之類型(*例如*，異源、同源、外源、內源、或人工)、周圍序列中之調控元件及/或周圍序列中之結構元件。miRNA 可受 5′ UTR 及/或 3′ UTR 的影響。作為非限制性實例，與相同序列類型之人類 3′UTR 相比，非人類 3′ UTR 可增加 miRNA 序列對於所關注之多肽之表現的調控效應。

【0209】 在一個實施例中，5′ UTR 之其他調控元件及/或結構元件可影響 miRNA 介導之基因調控。調控元件及/或結構元件之一個實例為 5′ UTR 中之結構化 IRES (內部核糖體進入位點)，其為結合轉譯延伸因子以便開始蛋白轉譯所必需的。EIF4A2 與 5'-UTR 中之此二級結構化元件之結合對於 miRNA 介導之基因表現為必需的(Meijer HA 等人, Science, 2013, 340, 82-85，以引用之方式整體併入本文中)。本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)可進一步包括此結構化 5′ UTR 以便增強微小 RNA 介導之基因調控。

【0210】 至少一個 miRNA 結合位點可經工程改造至本揭示案之多核苷酸之 3′ UTR 中。在此情況下，至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少十個、或更多個 miRNA 結合位點可經工程改造至本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之 3′ UTR 中。例如，1 至 10、1 至 9、1 至 8、1 至 7、1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3、2、或 1 個 miRNA 結合位點可經工程改造至本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之 3′ UTR 中。在一個實施例中，併入本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之 miRNA 結合位點可為相同或可不同 miRNA 位點。併入本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之不同 miRNA 結合位點的組合可包括其中併入任何不同 miRNA 位點之一個以上複本的組合。在另一實施例中，併入本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中之 miRNA 結合位點可靶向體內相同或不同組織。作為非限制性實例，經由將組織、細胞類型、或疾病特異性 miRNA 結合位點引入本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*之 3′-UTR 中，mRNA)，特定細胞類型(*例如*，肝細胞、骨髓細胞、內皮細胞、癌細胞等)中之表現程度可降低。

【0211】 在一個實施例中，在本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)中，miRNA 結合位點可經工程改造在 3′ UTR 之 5′末端附近、3′ UTR 之 5′末端與

3′末端之間的大約一半處及/或 3′ UTR 之 3′末端附近。作為非限制性實例，miRNA 結合位點可經工程改造在 3′ UTR 之 5′末端附近及 3′ UTR 之 5′末端與 3′末端之間的大約一半處。如另一個非限制性實例，miRNA 結合位點可經工程改造在 3′ UTR 之 3′末端附近及 3′UTR 之 5′末端與 3′末端之間的大約一半處。作為另一個非限制性實例，miRNA 結合位點可經工程改造在 3′UTR 之 5′末端附近及 3′UTR 之 3′末端附近。

【0212】　在另一實施例中，3′UTR 可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個 miRNA 結合位點。miRNA 結合位點可與 miRNA、miRNA 種子序列，及/或側接種子序列之 miRNA 序列互補。

【0213】　基於不同組織、細胞類型、或生物條件中之 miRNA 之表現模式，本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)可經工程改造以便在特定組織、細胞類型、或生物條件下更有針對性地表現。經過引入組織特異性 miRNA 結合位點，本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)可經設計以便在組織或細胞、或生物條件之背景中最佳蛋白表現。

【0214】　在一些實施例中，本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)可包含 3′ UTR 中之至少一個 miRNA 結合位點以便選擇性地降解免疫細胞中之 mRNA 治療劑以便抑制藉由治療劑遞送導致的不當免疫原性反應。作為非限制性實例，miRNA 結合位點可使得本揭示案之核酸分子(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)在抗原呈遞細胞中更不穩定。此等 miRNA 之非限制性實例在以下**表 3** 中展示。

表 3：miRNA 結合位點序列

序列名稱	SEQ ID NO:	序列
miR122 bs	148	CAAACACCAUUGUCACACUCCA
miR-142-3p bs	149	UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA
miR-126-3p bs	150	CGCAUUAUUACUCACGGUACGA
miR-142	151	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAG CACUACUAACAGCACUGGAGGGUGUAGUG UUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG
miR-142-3p	152	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA

miR-142-5p	153	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
miR-142-5p 結合位點	154	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG
miR-126	155	CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUUGG UACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUACC GUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCACGGCA
miR-126-5p	156	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG
miR-126-5p 結合位點	157	CGCGUACCAAAAGUAAUAAUG

【0215】 在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR122 bs (*亦即*，如以上表 3 展示之 SEQ ID NO: 148)。在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR-142-3p bs (*亦即*，如以上表 3 展示之 SEQ ID NO: 149)。在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR-126-3p bs (*亦即*，如以上表 3 展示之 SEQ ID NO: 150)。

【0216】 在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含一個以上 miRNA 結合位點。在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個 miRNA 結合位點。在一些實施例中，當存在一個以上 miRNA 結合位點時，miRNA 結合位點為相同的。在其中存在一個以上 miRNA 結合位點的一些中，miRNA 結合位點(例如，以上表 3 列出的任何 miRNA 結合位點之任何組合)。在一些實施例中，當存在一個以上 miRNA 結合位點時，約 1-25 個核苷酸可存在於各 miRNA 結合位點之間。例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或 25 個核苷酸可存在於各 miRNA 結合之間。

【0217】 在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR142-3p bs 及 miR-126-3p bs。在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR-142-3p bs 之三個複本。在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR-142-3p bs 之兩個複本。在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR-142-3p bs 之兩個複本及 miR-126-3p bs 之一個複本。在一些實施例中，本文所述核酸分子之 3’ UTR 包含 miR122bs 之三個複本。

4. 核苷酸帽

【0218】 本揭示案亦包括包含 5′帽及本發明之多核苷酸(例如，包括編碼待表現之多肽之核苷酸序列的多核苷酸)的多核苷酸。

【0219】 天然 mRNA 之 5′帽結構涉及核輸出，增加 mRNA 穩定性及結合 mRNA 帽結合蛋白(CBP)，後者經由 CBP 與多聚腺苷酸結合蛋白之結合來形成成熟環狀 mRNA 物質，從而負責細胞中之 mRNA 穩定性及轉譯能力。帽進一步有助於在 mRNA 剪接期間移除 5′近端內含子。

【0220】 內源性 mRNA 分子可為 5′-末端加帽的，從而在 mRNA 分子之末端鳥苷帽殘基與 5′-末端轉錄有義核苷酸之間產生 5′-ppp-5′-三磷酸鍵。然後，此 5′-鳥苷酸帽可經甲基化以便產生 N7-甲基-鳥苷酸殘基。mRNA 之 5′末端末端及/或前末端轉錄核苷酸之核糖可視情況亦經 2′-O-甲基化。經由鳥苷酸帽結構之水解及裂解的 5′-脫帽可靶向諸如 mRNA 分子之核酸分子以便有利於降解。

【0221】 在一些實施例中，本發明之多核苷酸(例如，包含編碼多肽之核苷酸序列之多核苷酸)併入帽部分。

【0222】 在一些實施例中，本發明之多核苷酸包含不可水解帽結構，從而防止脫帽並且由此增加 mRNA 半衰期。因為帽結構水解需要 5′-ppp-5′二磷酸酯鍵之裂解，所以可在加帽反應期間使用經修飾之核苷酸。例如，根據製造商說明書，來自 New England Biolabs (Ipswich, MA)之痘苗加帽酶可與 α-硫基-鳥苷核苷酸一起使用以便產生 5′-ppp-5′帽中之硫代磷酸酯鍵。可使用額外經修飾之鳥苷核苷酸，諸如 α-甲基-膦酸鹽及硒基磷酸核苷酸。

【0223】 額外修飾包括但是不限於在糖環之 2′-羥基上，多核苷酸(如上所述)之 5′-末端及/或 5′-前末端核苷酸之核糖之 2′-O-甲基化。多種不同 5′-帽結構可用於產生充當 mRNA 分子的諸如多核苷酸之核酸分子之 5′-帽。在本文中亦被稱為合成帽類似物、化學帽、化學帽類似物、或結構或功能帽類似物之帽類似物在其

化學結構方面不同於天然(*亦即*，內源性、野生型或生理) 5′-帽，同時保持帽功能。帽類似物可化學(*亦即*，非酶促)或酶促合成及/或連接至本發明之多核苷酸。

【0224】 例如，抗反向帽類似物(ARCA)帽含有藉由 5′-5′-三磷酸基團來連接之兩個鳥嘌呤，其中一個鳥嘌呤含有 N7 甲基以及 3′-O-甲基(*亦即*，N7,3′-O-二甲基-鳥苷-5′-三磷酸-5′-鳥苷(m^7G-3′mppp-G；其可等同地稱為 3′O-Me-m^7G(5′)ppp(5′)G)。另一個未修飾鳥嘌呤之 3′-O 原子變得連接至加帽多核苷酸之 5′-末端核苷酸。N7-及 3′-O-甲基化鳥嘌呤提供加帽多核苷酸之末端部分。

【0225】 另一示例性帽為 mCAP，其類似於 ARCA 但是在鳥苷上具有 2′-O-甲基(*亦即*，N7,2′-O-二甲基-鳥苷-5′-三磷酸-5′-鳥苷，m^7Gm-ppp-G)。

【0226】 另一示例性帽為 $m^7GpppG_{2'OMe}$ 或 m^7G-ppp-Gm-A (*亦即*，N7,鳥苷-5′-三磷酸-2′-O-二甲基-鳥苷-腺苷)。

【0227】 在一些實施例中，帽為二核苷酸帽類似物。作為非限制性實例，二核苷酸帽類似物可在不同磷酸鹽位置處用硼磷酸基團或硒代磷酸基團來修飾，諸如美國專利第 US 8,519,110 號描述之二核苷酸帽類似物，其內容以引用方式整體併入本文。

【0228】 在另一實施例中，帽為帽類似物為在此項技術中已知及/或本文描述的 N7-(4-氯苯氧基乙基)取代二核苷酸形式之帽類似物。N7-(4-氯苯氧基乙基)取代二核苷酸形式之帽類似物的非限制性實例包括 N7-(4-氯苯氧基乙基)-G(5′)ppp(5′)G 及 N7-(4-氯苯氧基乙基)-$m^{3'\text{-}O}$G(5′)ppp(5′)G 帽類似物(*參見，例如* Kore 等人 Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574 描述的各種帽類似物及合成帽類似物之方法；其內容以引用方式整體併入本文)。在另一實施例中，本發明之帽類似物為 4-氯基/溴苯氧基乙基類似物。

【0229】 本發明之多核苷酸亦可在製造(不論 IVT 抑或化學合成)後，使用酶來加帽，以便產生更真實 5′-帽結構。如本文所用，片語「更真實」係指在結構

上或功能上密切反映或模擬內源或野生型特徵的特徵。亦即，與先前技術之合成特徵或類似物等相比，「更真實」特徵更好地代表內源性、野生型、天然或生理細胞功能及/或結構，或者在一或多個方面，優於相應內源性、野生型、天然或生理特徵。本發明之更真實 5′帽結構之非限制性實例為尤其與此項技術中已知之合成 5′帽結構(或與野生型、天然或生理 5′帽結構)相比，具有增強的與帽結合蛋白之結合、增加的半衰期、降低的對 5′核酸內切酶之敏感性及/或減少的 5′脫帽的彼等帽結構。例如，重組痘苗病毒加帽酶及重組 2'-O-甲基轉移酶可在多核苷酸之 5′-末端核苷酸與鳥嘌呤帽核苷酸之間產生規範 5′-5′-三磷酸鍵，其中帽鳥嘌呤含有 N7 甲基化並且 mRNA 之 5′-末端核苷酸含有 2'-O-甲基。此結構稱為 Cap1 結構。與*例如*此項技術中已知之其他 5′帽類似物結構相比，此帽導致更高轉譯能力及細胞穩定性以及細胞促炎細胞介素之活化減少。帽結構包括但不限於 7mG(5′)ppp(5′)N1pN2p (帽 0)、7mG(5′)ppp(5′)N1mpNp (帽 1)、及 7mG(5′)-ppp(5′)N1mpN2mp (帽 2)。

【0230】 作為非限制性實例，在製造後給嵌合多核苷酸加帽可更有效，因為幾乎 100%之嵌合多核苷酸可加帽。此與在*活體外*轉錄反應過程中帽類似物與嵌合多核苷酸連接時的約 80%形成對比。

【0231】 根據本發明，5′末端帽可包括內源性帽或帽類似物。根據本發明，5′末端帽可包含鳥嘌呤類似物。可用鳥嘌呤類似物包括但不限於肌苷、N1-甲基-鳥苷、2′氟-鳥苷、7-去氮-鳥苷、8-側氧基-鳥苷、2-胺基-鳥苷、LNA-鳥苷及 2-疊氮基-鳥苷。

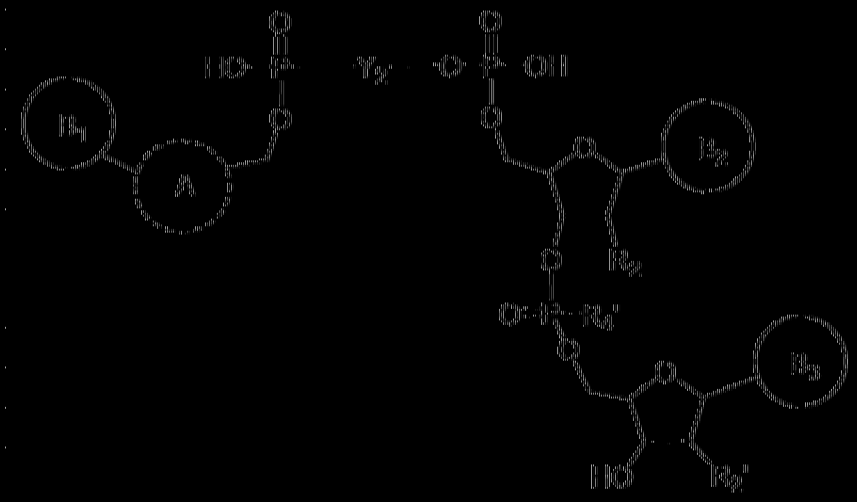
【0232】 本文亦提供示例性帽，包括可用於使用 RNA 聚合酶(例如野生型 RNA 聚合酶或其變異體，例如本文所述之彼等變異體)之核糖核酸(RNA)合成之共轉錄加帽方法中之彼等帽。在一個實施例中，可在「一鍋式」反應中產生 RNA 時添加帽，而不需要單獨加帽反應。因此，在一些實施例中，該等方法包括使多

核苷酸模板與 RNA 聚合酶變異體、核苷三磷酸及前類似物在活體外轉錄反應條件下反應，以產生 RNA 轉錄物。

[0233] 如本文所用，術語「帽」包括反向 G 核苷酸且可包含位於反向 G 核苷酸之 3'的一或多個額外核苷酸，例如位於反向 G 核苷酸之 3'並且位於 5' UTR 例如本文所述 5' UTR 之 5'的 1 個、2 個、3 個或更多個核苷酸。

[0234] 示例性帽包含 GG、GA、或 GGA 之序列，其中加下劃線、以斜體顯示之 G 為反向 G 核苷酸，繼之以 5'-5'-三磷酸基團。

[0235] 在一個實施例中，帽包含式(I)化合物



(I)、或其立體異構物、互變異構物或鹽，其中



；

環 B_1 為經修飾或未經修飾之鳥嘌呤；

環 B_2 及環 B_3 各自獨立地為核苷鹼基或經修飾之核苷鹼基；

X_2 為 O、$S(O)_p$、NR_{24} 或 $CR_{25}R_{26}$，其中 p 為 0、1、或 2；

Y_0 為 O 或 CR_6R_7；

Y1 為 O、$S(O)_n$、CR_6R_7、或 NR_8，其中 n 為 0、1、或 2；

各---為單鍵或不存在，其中當各---為單鍵時，Yi 為 O、$S(O)_n$、CR_6R_7、或 NR_8；並且當各---不存在時，Y_1 為空；

Y_2 為$(OP(O)R_4)_m$，其中 m 為 0、1、或 2，或-O-$(CR_{40}R_{41})u$-Q_0-$(CR_{42}R_{43})v$-，其中 Q_0 為鍵、O、$S(O)_r$、NR_{44}、或 $CR_{45}R_{46}$，r 為 0、1、或 2，並且 u 及 v 中之各者獨立地為 1、2、3 或 4；

各 R_2 及 R_2'獨立地為鹵基、LNA、或 OR_3；

各 R_3 獨立地為 H、C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、或 C_2-C_6 炔基並且 R_3，當為 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、或 C_2-C_6 炔基時，視情況經以下中之一或多者取代：鹵基、OH 及視情況經一或多個 OH 或 OC(O)-C_1-C_6 烷基取代之 C_1-C_6 烷氧基；

各 R_4 及 R_4'獨立地為 H、鹵基、C_1-C_6 烷基、OH、SH、SeH、或 BH_3^-；

R_6、R_7、及 R_8 中之各者獨立地為-Q_1-T_1，其中 Q_1 為鍵或視情況經鹵基、氰基、OH 及 C_1-C_6 烷氧基中之一或多者取代的 C_1-C_3 烷基連接子，並且 T_1 為 H、鹵基、OH、COOH、氰基、或 R_{s1}，其中 R_{s1} 為 C_1-C_3 烷基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、C_1-C_6 烷氧基、C(O)O-C_1-C_6 烷基、C_3-C_8 環烷基、C_6-C_{10} 芳基、$NR_{31}R_{32}$、$(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$、4 至 12 員雜環烷基、或 5 或 6 員雜芳基，並且 R_{s1} 視情況經一或多個選自由以下組成之群的取代基取代：鹵基、OH、側氧基、C_1-C_6 烷基、COOH、C(O)O-C_1-C_6 烷基、氰基、C_1-C_6 烷氧基、$NR_{31}R_{32}$、$(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$、C_3-C_8 環烷基、C_6-C_{10} 芳基、4 至 12 員雜環烷基、及 5 或 6 員雜芳基；

R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13} R_{14}、及 R_{15} 中之各者獨立地為-Q_2-T_2，其中 Q_2 為鍵或視情況經鹵基、氰基、OH 及 C_1-C_6 烷氧基中之一或多者取代的 C_1-C_3 烷基連接子，並且 T_2 為 H、鹵基、OH、NH_2、氰基、NO_2、N_3、R_{s2}、或 OR_{s2}，其中 R_{s2} 為 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、C_3-C_8 環烷基、C_6-C_{10} 芳基、NHC(O)-C_1-C_6 烷基、$NR_{31}R_{32}$、$(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$、4 至 12 員雜環烷基，或 5 或 6 員

雜芳基，並且 R_{s2} 視情況經一或多個選自由以下組成之群的取代基取代：鹵基、

OH、側氧基、C_1-C_6烷基、COOH、C(O)O-C_1-C_6烷基、氰基、C_1-C_6烷氧基、$NR_{31}R_{32}$、$(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$、C_3-C_8環烷基、C_6-C_{10}芳基、4至12員雜環烷基、及5或6員雜芳基；或替代地R_{12}與R_{14}一起為側氧基，或R_{13}與R_{15}一起為側氧基，

R_{20}、R_{21}、R_{22}、及R_{23}中之各者獨立地為-Q_3-T_3，其中Q_3為鍵或視情況經鹵基、氰基、OH及C_1-C_6烷氧基中之一或多者取代的C_1-C_3烷基連接子，並且T_3為H、鹵基、OH、NH_2、氰基、NO_2、N_3、R_{S3}、或OR_{S3}，其中R_{S3}為C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_3-C_8環烷基、C_6-C_{10}芳基、NHC(O)-C_1-C_6烷基、單-C_1-C_6烷基胺基、二-C_1-C_6烷基胺基、4至12員雜環烷基、或5或6員雜芳基，並且R_{S3}視情況經一或多個選自由以下組成之群的取代基取代：鹵基、OH、側氧基、C_1-C_6烷基、COOH、C(O)O-C_1-C_6烷基、氰基、C_1-C_6烷氧基、胺基、單-C_1-C_6烷基胺基、二-C_1-C_6烷基胺基、C_3-C_8環烷基、C_6-C_{10}芳基、4至12員雜環烷基、及5或6員雜芳基；

R_{24}、R_{25}、及R_{26}中之各者獨立地為H或C_1-C_6烷基；

R_{27}及R_{28}中之各者獨立地為H或OR_{29}；或R_{27}及R_{28}一起形成O-R_{30}-O；各R_{29}獨立地為H、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、或C_2-C_6炔基並且R_{29}，當為C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、或C_2-C_6炔基時，視情況經以下中之一或多者取代：鹵基、OH及視情況經一或多個OH或OC(O)-C_1-C_6烷基取代之C_1-C_6烷氧基；

R_{30}為視情況經鹵基、OH及C_1-C_6烷氧基中之一或多者取代的C_1-C_6伸烷基；

R_{31}、R_{32}、及R_{33}中之各者獨立地為H、C_1-C_6烷基、C_3-C_8環烷基、C_6-C_{10}芳基、4至12員雜環烷基、或5或6員雜芳基；

R_{40}、R_{41}、R_{42}、及R_{43}中之各者獨立地為H、鹵基、OH、氰基、N_3、$OP(O)R_{47}R_{48}$、或視情況經一或多個$OP(O)R_{47}R_{48}$取代之C_1-C_6烷基，或一個R_{41}及一個R_{43}，與其連接之碳原子及Q_0一起形成C_4-C_{10}環烷基、4至14員雜環烷基、C_6-C_{10}芳基、

或 5 至 14 員雜芳基，並且環烷基、雜環烷基、苯基、或 5 至 6 員雜芳基中之各者視情況經以下中之一或多者取代：OH、鹵基、氰基、N_3、側氧基、$OP(O)R_{47}R_{48}$、C_1-C_6烷基、C_1-C_6鹵烷基、COOH、$C(O)O$-C_1-C_6烷基、C_1-C_6烷氧基、C_1-C_6鹵代烷氧基、胺基、單-C_1-C_6烷基胺基、及二-C_1-C_6烷基胺基；

R_{44}為 H、C_1-C_6烷基、或胺保護基；

R_{45}及 R_{46}中之各者獨立地為 H、$OP(O)R_{47}R_{48}$、或視情況經一或多個 $OP(O)R_{47}R_{48}$取代的 C_1-C_6烷基，及

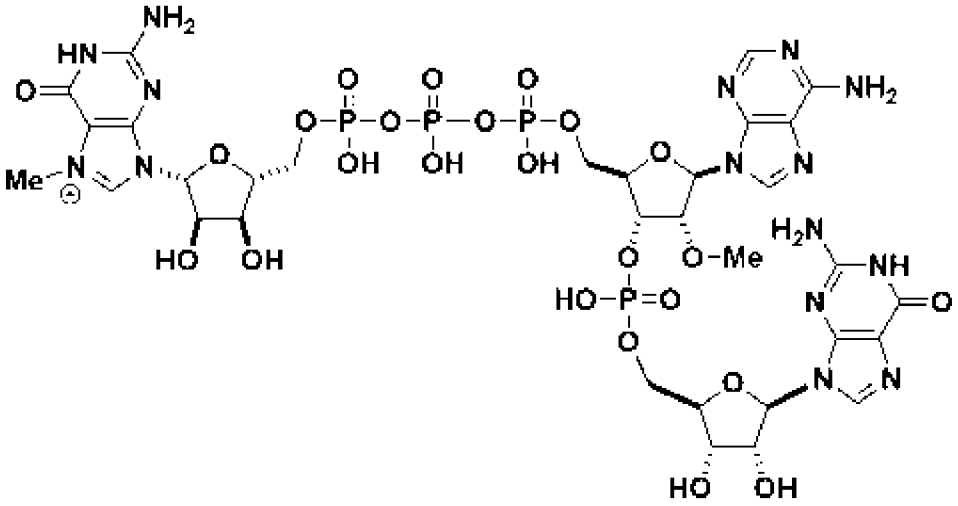
R_{47}及 R_{48}中之各者獨立地為 H、鹵基、C_1-C_6烷基、OH、SH、SeH、或 BH_3。

應瞭解如本文提供之帽類似物可包括 2017 年 4 月 20 日公佈之國際公開案 WO 2017/066797 描述的任何帽類似物，該公開案以引用方式整體併入本文。

【0236】　在一些實施例中，B_2中間位置可為非核糖分子，諸如阿拉伯糖。

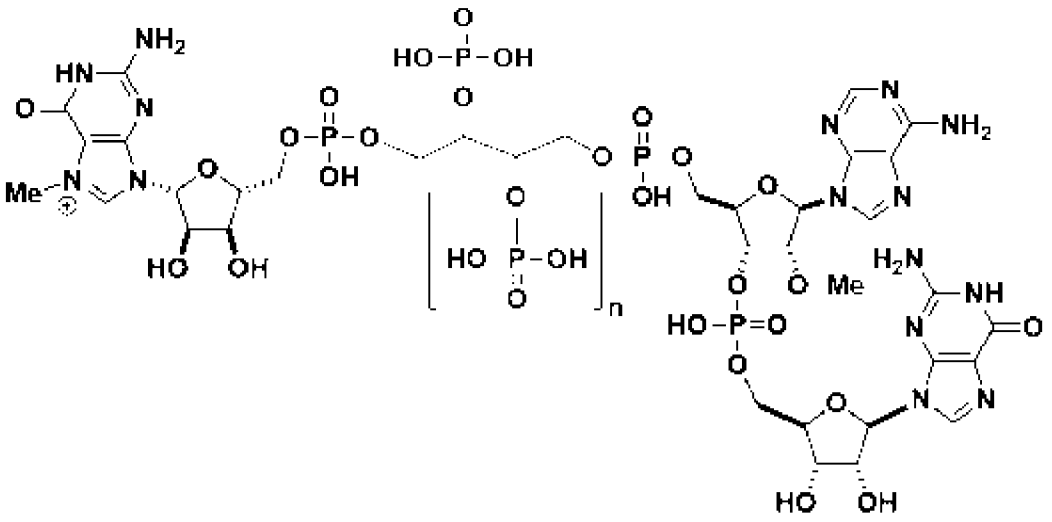
【0237】　在一些實施例中，R_2基於乙基。

【0238】　因此，在一些實施例中，帽包含以下結構：



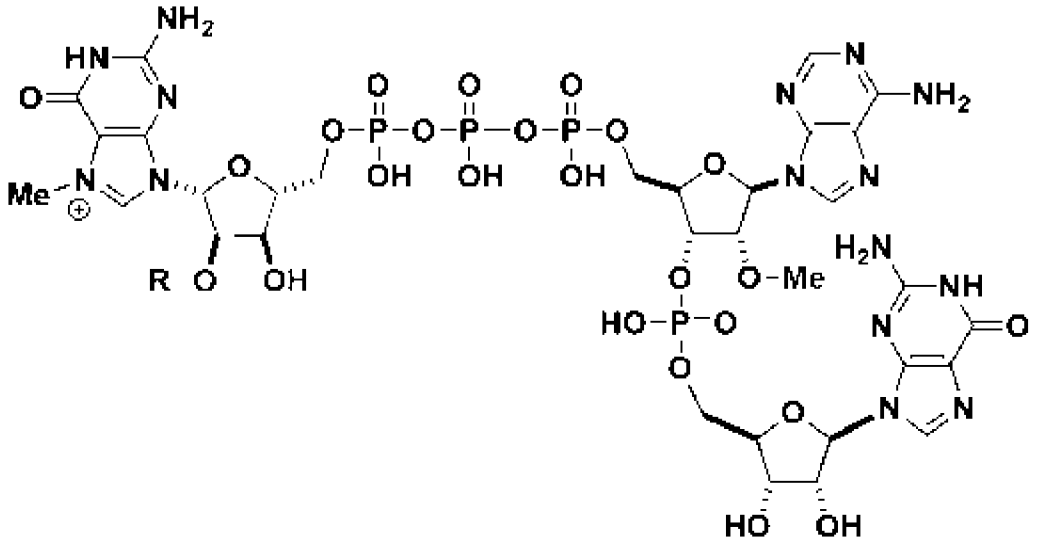
(II)

【0239】　在其他實施例中，帽包含以下結構：



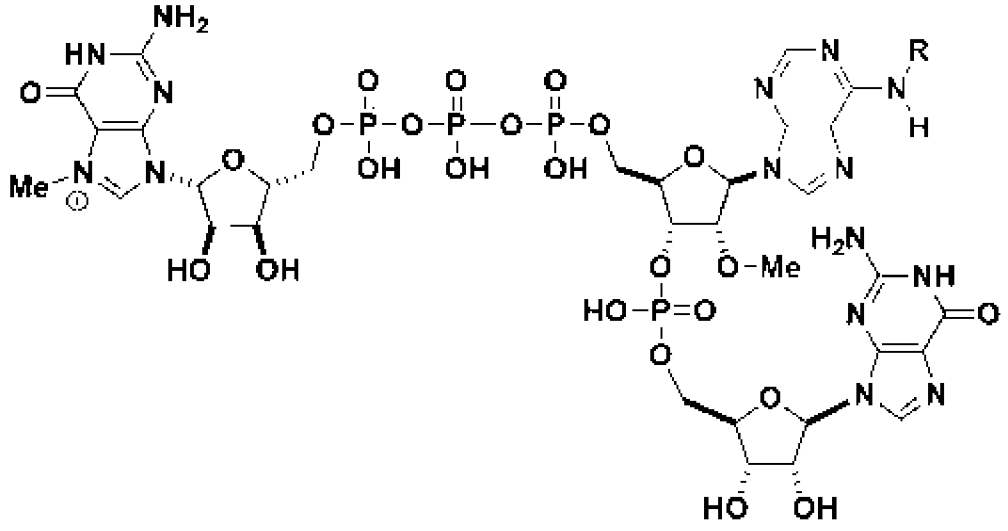
(III)

【0240】 在其他實施例中，帽包含以下結構：



(IV)

【0241】 在其他實施例中，帽包含以下結構：



(V)

【0242】　在一些實施例中，R 為烷基(*例如*，C_1-C_6烷基)。在一些實施例中，R 為甲基(*例如*，C_1烷基)。在一些實施例中，R 為乙基(*例如*，C_2烷基)。

【0243】　在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：GAA、GAC、GAG、GAU、GCA、GCC、GCG、GCU、GGA、GGC、GGG、GGU、GUA、GUC、GUG、及 GUU。在一些實施例中，帽包含 GAA。在一些實施例中，帽包含 GAC。在一些實施例中，帽包含 GAG。在一些實施例中，帽包含 GAU。在一些實施例中，帽包含 GCA。在一些實施例中，帽包含 GCC。在一些實施例中，帽包含 GCG。在一些實施例中，帽包含 GCU。在一些實施例中，帽包含 GGA。在一些實施例中，帽包含 GGC。在一些實施例中，帽包含 GGG。在一些實施例中，帽包含 GGU。在一些實施例中，帽包含 GUA。在一些實施例中，帽包含 GUC。在一些實施例中，帽包含 GUG。在一些實施例中，帽包含 GUU。

【0244】　在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：m^7GpppG、m^7GpppApA、m^7GpppApC、m^7GpppApG、m^7GpppApU、m^7GpppCpA、m^7GpppCpC、m^7GpppCpG、m^7GpppCpU、m^7GpppGpA、m^7GpppGpC、m^7GpppGpG、m^7GpppGpU、m^7GpppUpA、m^7GpppUpC、m^7GpppUpG、及 m^7GpppUpU。

【0245】　在一些實施例中，帽包含 m^7GpppApA。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppApC。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppApG。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppApU。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppCpA。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppCpC。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppCpG。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppCpU。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppGpA。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppGpC。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppGpG。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppGpU。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppUpA。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppUpC。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppUpG。在一些實施例中，帽包含 m^7GpppUpU。

【0246】 在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：$m^7G_{3'OMe}pppApA$、$m^7G_{3'OMe}pppApC$、$m^7G_{3'OMe}pppApG$、$m^7G_{3'OMe}pppApU$、$m^7G_{3'OMe}pppCpA$、$m^7G_{3'OMe}pppCpC$、$m^7G_{3'OMe}pppCpG$、$m^7G_{3'OMe}pppCpU$、$m^7G_{3'OMe}pppGpA$、$m^7G_{3'OMe}pppGpC$、$m^7G_{3'OMe}pppGpG$、$m^7G_{3'OMe}pppGpU$、$m^7G_{3'OMe}pppUpA$、$m^7G_{3'OMe}pppUpC$、$m^7G_{3'OMe}pppUpG$、及 $m^7G_{3'OMe}pppUpU$。

【0247】 在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppApA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppApC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppApG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppApU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppCpA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppCpC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppCpG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppCpU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppGpA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppGpC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppGpG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppGpU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppUpA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppUpC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppUpG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppUpU$。

【0248】 在其他實施例中，帽包含選自以下序列之序列：$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pA$、$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pC$、$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pG$、$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pU$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pA$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pC$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pG$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pU$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pA$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pC$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pG$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pU$、$m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pA$、$m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pC$、$m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pG$、及 $m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pU$。

【0249】 在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pU$。在一些實施例中，帽包含

$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pU$。

【0250】 在其他實施例中，帽包含選自以下序列之序列：$m^7GpppG_{2'OMe}$、$m^7GpppA_{2'OMe}pA$、$m^7GpppA_{2'OMe}pC$、$m^7GpppA_{2'OMe}pG$、$m^7GpppA_{2'OMe}pU$、$m^7GpppC_{2'OMe}pA$、$m^7GpppC_{2'OMe}pC$、$m^7GpppC_{2'OMe}pG$、$m^7GpppC_{2'OMe}pU$、$m^7GpppG_{2'OMe}pA$、$m^7GpppG_{2'OMe}pC$、$m^7GpppG_{2'OMe}pG$、$m^7GpppG_{2'OMe}pU$、$m^7GpppU_{2'OMe}pA$、$m^7GpppU_{2'OMe}pC$、$m^7GpppU_{2'OMe}pG$、及 $m^7GpppU_{2'OMe}pU$。

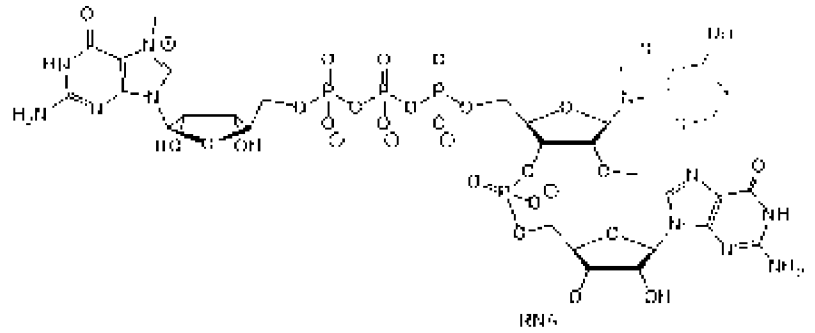
【0251】 在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppA_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppA_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppA_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppA_{2'OMe}pU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppC_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppC_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppC_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppC_{2'OMe}pU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppG_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppG_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppG_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppG_{2'OMe}pU$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppU_{2'OMe}pA$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppU_{2'OMe}pC$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppU_{2'OMe}pG$。在一些實施例中，帽包含 $m^7GpppU_{2'OMe}pU$。

【0252】 在一些實施例中，帽包含 $m^7Gpppm^6A_{2'Ome}pG$。在一些實施例中，帽

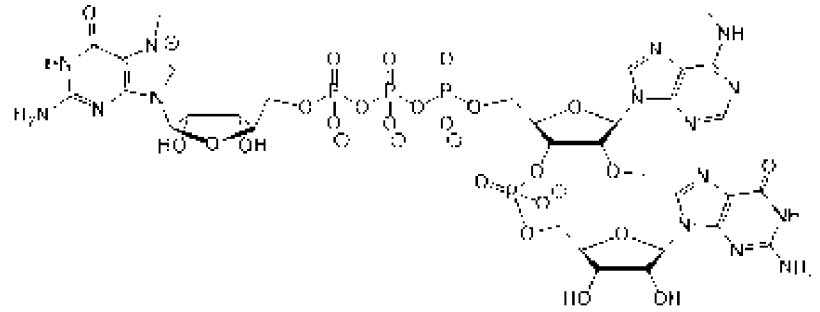
包含 $m^7Gpppe^6A_{2'Ome}pG$。

【0253】 在一些實施例中，帽包含 GAG。在一些實施例中，帽包含 GCG。在一些實施例中，帽包含 GUG。在一些實施例中，帽包含 GGG。

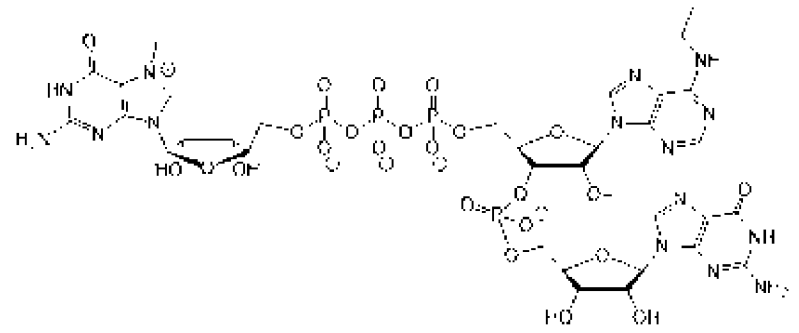
【0254】 在一些實施例中，帽包含以下結構中任一者：



(VI)；



(VII)；或

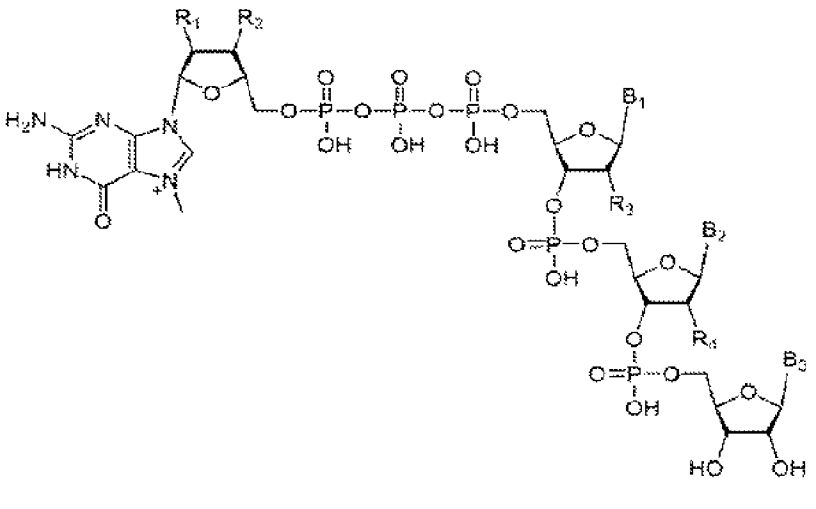


(VIII)。

【0255】 在一些實施例中，帽包含 $^{m7}GpppN_1N_2N_3$，其中 N_1、N_2、及 N_3 為視情況選用的(亦即，可不存在或一或多者可存在)並且獨立地為天然、經修飾或非天然核苷鹼基。在一些實施例中，^{m7}G 進一步*例如*在 3’位置處經甲基化。在一些實施例中，^{m7}G 包含 3’位置處之 O-甲基。在一些實施例中，N_1、N_2、及 N_3 若視情況存在，則獨立地為腺嘌呤、尿嘧啶、胍、胸腺嘧啶、或胞嘧啶。在一些實施例中，N_1、N_2、及 N_3 中之一或多者(或全部)若存在，則*例如*在 2’位置處經甲基化。在一些實施例中，N_1、N_2、及 N_3 中之一或多者(或全部)若存在，則具有 2’

位置處之 O-甲基。

【0256】　在一些實施例中，帽包含以下結構：



(IX)

其中 B_1、B_2、及 B_3 獨立地為天然、經修飾或非天然核苷鹼基；並且 R_1、R_2、R_3、及 R_4 獨立地為 OH 或 O-甲基。在一些實施例中，R_3 為 O-甲基並且 R_4 為 OH。在一些實施例中，R_3 及 R_4 為 O-甲基。在一些實施例中，R_4 為 O-甲基。在一些實施例中，R_1 為 OH，R_2 為 OH，R_3 為 O-甲基，並且 R_4 為 OH。在一些實施例中，R_1 為 OH，R_2 為 OH，R_3 為 O-甲基，並且 R_4 為 O-甲基。在一些實施例中，R_1 及 R_2 中之至少一者為 O-甲基，R_3 為 O-甲基，並且 R_4 為 OH。在一些實施例中，R_1 及 R_2 中之至少一者為 O-甲基，R_3 為 O-甲基，並且 R_4 為 O-甲基。

【0257】　在一些實施例中，B_1、B_3、及 B_3 為天然核苷鹼基。在一些實施例中，B_1、B_2、及 B_3 中之至少一者為經修飾或非天然鹼基。在一些實施例中，B_1、B_2、及 B_3 中之至少一者為 N6-甲基腺嘌呤。在一些實施例中，B_1 為腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、或尿嘧啶。在一些實施例中，B_1 為腺嘌呤，B_2 為尿嘧啶，並且 B_3 為腺嘌呤。在一些實施例中，R_1 及 R_2 為 OH，R_3 及 R_4 為 O-甲基，B_1 為腺嘌呤，B_2 為尿嘧啶，並且 B_3 為腺嘌呤。

【0258】　在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：GAAA、GACA、GAGA、GAUA、GCAA、GCCA、GCGA、GCUA、GGAA、GGCA、GGGA、

GGUA、GUCA、及 GUUA。在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：GAAG、GACG、GAGG、GAUG、GCAG、GCCG、GCGG、GCUG、GGAG、GGCG、GGGG、GGUG、GUCG、GUGG、及 GUUG。在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：GAAU、GACU、GAGU、GAUU、GCAU、GCCU、GCGU、GCUU、GGAU、GGCU、GGGU、GGUU、GUAU、GUCU、GUGU、及 GUUU。在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：GAAC、GACC、GAGC、GAUC、GCAC、GCCC、GCGC、GCUC、GGAC、GGCC、GGGC、GGUC、GUAC、GUCC、GUGC、及 GUUC。

【0259】 在一些實施例中，帽包含選自以下序列之序列：$m^7G_{3'OMe}pppApApN$、$m^7G_{3'OMe}pppApCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppApGpN$、$m^7G_{3'OMe}pppApUpN$、$m^7G_{3'OMe}pppCpApN$、$m^7G_{3'OMe}pppCpCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppCpGpN$、$m^7G_{3'OMe}pppCpUpN$、$m^7G_{3'OMe}pppGpApN$、$m^7G_{3'OMe}pppGpCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppGpGpN$、$m^7G_{3'OMe}pppGpUpN$、$m^7G_{3'OMe}pppUpApN$、$m^7G_{3'OMe}pppUpCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppUpGpN$、及 $m^7G_{3'OMe}pppUpUpN$，其中 N 為天然、經修飾或非天然核苷鹼基。

【0260】 在其他實施例中，帽包含選自以下序列之序列：$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pApN$、$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pGpN$、$m^7G_{3'OMe}pppA_{2'OMe}pUpN$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pApN$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pGpN$、$m^7G_{3'OMe}pppC_{2'OMe}pUpN$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pApN$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pGpN$、$m^7G_{3'OMe}pppG_{2'OMe}pUpN$、$m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pApN$、$m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pCpN$、$m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pGpN$、及 $m^7G_{3'OMe}pppU_{2'OMe}pUpN$，其中 N 為天然、經修飾或非天然核苷鹼基。

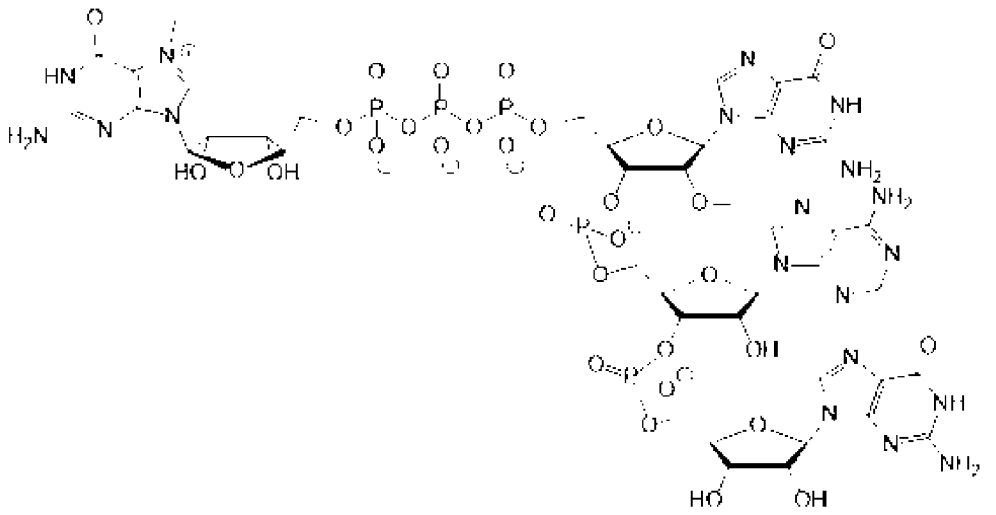
【0261】 在其他實施例中，帽包含選自以下序列之序列：$m^7GpppA_{2'OMe}pApN$、$m^7GpppA_{2'OMe}pCpN$、$m^7GpppA_{2'OMe}pGpN$、$m^7GpppA_{2'OMe}pUpN$、$m^7GpppC_{2'OMe}pApN$、$m^7GpppC_{2'OMe}pCpN$、$m^7GpppC_{2'OMe}pGpN$、$m^7GpppC_{2'OMe}pUpN$、$m^7GpppG_{2'O}$

$_{Me}$pApN、m^7GpppG$_{2'OMe}$pCpN、m^7GpppG$_{2'OMe}$pGpN、m^7GpppG$_{2'OMe}$pUpN、m^7Gp
ppU$_{2'OMe}$pApN、m^7GpppU$_{2'OMe}$pCpN、m^7GpppU$_{2'OMe}$pGpN、及 m^7GpppU$_{2'OMe}$pUp
N，其中 N 為天然、經修飾或非天然核苷鹼基。

【0262】 在其他實施例中，帽包含選自以下序列之序列：m^7G$_{3'OMe}$pppA$_{2'OMe}$p
A$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppA$_{2'OMe}$pC$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppA$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$p
ppA$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppC$_{2'OMe}$pA$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppC$_{2'OMe}$pC$_{2'OMe}$pN、m
^{7}G$_{3'OMe}$pppC$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppC$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppG$_{2'OMe}$pA$_{2'O}$
$_{Me}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppG$_{2'OMe}$pC$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppG$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppG
$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppU$_{2'OMe}$pA$_{2'OMe}$pN、m^7G$_{3'OMe}$pppU$_{2'OMe}$pC$_{2'OMe}$pN、m^7G
$_{3'OMe}$pppU$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、及 m^7G$_{3'OMe}$pppU$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN，其中 N 為天然、經修
飾或非天然核苷鹼基。

【0263】 在其他實施例中，帽包含選自以下序列之序列：m^7GpppA$_{2'OMe}$pA$_{2'OM}$
$_{e}$pN、m^7GpppA$_{2'OMe}$pC$_{2'OMe}$pN、m^7GpppA$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、m^7GpppA$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN、
m^7GpppC$_{2'OMe}$pA$_{2'OMe}$pN、m^7GpppC$_{2'OMe}$pC$_{2'OMe}$pN、m^7GpppC$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、m^7G
pppC$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN、m^7GpppG$_{2'OMe}$pA$_{2'OMe}$pN、m^7GpppG$_{2'OMe}$pC$_{2'OMe}$pN、m^7Gppp
G$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、m^7GpppG$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN、m^7GpppU$_{2'OMe}$pA$_{2'OMe}$pN、m^7GpppU$_{2'O}$
$_{Me}$pC$_{2'OMe}$pN、m^7GpppU$_{2'OMe}$pG$_{2'OMe}$pN、及 m^7GpppU$_{2'OMe}$pU$_{2'OMe}$pN，其中 N 為天
然、經修飾或非天然核苷鹼基。

【0264】 在一些實施例中，帽包含 GGAG。在一些實施例中，帽包含以下結
構：



(X)。

5. 終止元件

【0265】 轉譯終止密碼子 UAA、UAG、及 UGA 為遺傳密碼之重要組分並且為 mRNA 之轉譯終止之信號。在蛋白合成過程中，終止密碼子與蛋白釋放因子相互作用，並且此相互作用可以調節核糖體活性，從而影響轉譯(Tate WP 等人, (2018) Biochem Soc Trans, 46(6):1615-162)。

【0266】 本文*尤其*揭示編碼多肽之多核苷酸，該多核苷酸具有包含終止元件之編碼區域，其賦予藉由該多核苷酸來編碼之多肽，或多核苷酸本身增加的半衰期、增加的表現及/或增加的活性。在一實施例中，多核苷酸包含：(a) 5'-UTR (*例如*，如本文描述)；(b)包含終止元件(*例如*，如本文描述)之編碼區域；及(c) 3'-UTR (*例如*，如本文描述)，及包含該多核苷酸之 LNP 組成物。在一實施例中，多核苷酸包含有包含**表 4** 提供之終止元件的編碼區域。

【0267】 如本文使用之終止元件係指包含終止密碼子之核酸序列。就 DNA 而言，終止密碼子可選自 TGA、TAA 及 TAG，或就 RNA 而言，可選自 UGA、UAA 及 UAG。在一實施例中，終止元件包含兩個連續終止密碼子。在一實施例中，終止元件包含三個連續終止密碼子。在一實施例中，終止元件包含四個連續終止密碼子。在一實施例中，終止元件包含五個連續終止密碼子。

【0268】 在一實施例中，終止元件包含複數個相同終止密碼子。在一實施例

中，終止元件包含複數個不同終止密碼子。

【0269】　在一實施例中，終止元件進一步包含一或多個終止密碼子上游及/或下游之至少 1、2、3、4、5、或 10 個核苷酸。在一實施例中，終止元件進一步包含一或多個終止密碼子上游之至少 1、2、3、4、5、或 10 個核苷酸。在一實施例中，終止元件進一步包含一或多個終止密碼子下游之至少 1、2、3、4、5、或 10 個核苷酸。

【0270】　本發明亦包括包含終止密碼子元件及本文所述多核苷酸的多核苷酸。在一些實施例中，終止密碼子元件包含終止密碼子區域。在一些實施例中，多核苷酸之編碼區域包含終止元件。在一些實施例中，終止元件在多核苷酸中之 3’ UTR 序列上游*例如*之前。

【0271】　在一些實施例中，本發明之多核苷酸可包括 3’非轉譯區(UTR)之前之至少兩個終止密碼子。就 DNA 而言，終止密碼子可選自 TGA、TAA 及 TAG，或就 RNA 而言，可選自 UGA、UAA 及 UAG。在一些實施例中，就 DNA 而言，本發明之多核苷酸包括終止密碼子 TGA，或就 RNA 而言，包括終止密碼子 UGA，及一個額外終止密碼子。在另一實施例中，額外終止密碼子可為 TAA 或 UAA。在另一實施例中，本發明之多核苷酸包括三個連續終止密碼子、四個終止密碼子、或更多。

【0272】　已經觀察到包含**表 4** 提供之序列的終止元件可導致多核苷酸增加的半衰期及/或藉由多核苷酸來編碼之多肽增加的水準或活性。

【0273】　在一實施例中，具有**表 4** 提供之終止元件的多核苷酸導致多核苷酸增加的半衰期或藉由多核苷酸來編碼之多肽增加的水準及/或活性*例如*輸出。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5-20 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，

半衰期之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，半衰期之增加為約 4 倍。在一實施例中，半衰期之增加為約 5 倍或更大。

【0274】　在一實施例中，具有**表 4** 提供之終止元件的多核苷酸導致藉由多核苷酸來編碼之多肽增加的水準及/或活性，*例如*，輸出或表現持續時間。在一實施例中，終止元件導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之水準及/或活性，*例如*，可偵測水準或活性增加約 1.5-20 倍，持續約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、或 14 天。在一實施例中，終止元件導致藉由多核苷酸來編碼之多肽之可偵測水準或活性持續約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、或 14 天。

【0275】　在一實施例中，活性之增加為約 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 倍，或更大。在一實施例中，活性之增加為約 1.5 倍或更大。在一實施例中，活性之增加為約 2 倍或更大。在一實施例中，活性之增加為約 3 倍或更大。在一實施例中，活性之增加為約 4 倍或更大。在一實施例中，活性之增加為約 5 倍或更大。

【0276】　在一實施例中，增加與不具有終止元件，具有不同終止元件，或不具有**表 4** 提供之終止元件的在其他方面相似多核苷酸進行比較。

【0277】　在一實施例中，終止元件包含**表 4** 提供之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 159、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 161、SEQ ID NO: 162、SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 165、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 167 或 SEQ ID NO: 168、SEQ ID NO；169、SEQ ID NO: 173 或 SEQ ID NO: 174 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 158 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 159 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 160 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 161 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 162 之序

列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 163 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 164 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 165 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 166 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 167 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 168 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 169 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 173 之序列。在一實施例中，終止元件包含 SEQ ID NO: 174 之序列。

【0278】 在一些實施例中，多核苷酸包括卡帕終止盒(*亦即*，UAAAGCUCCCCGGGG (SEQ ID NO: 165)或愛歐塔終止盒(*亦即*，UAAGCCCCUCCGGGG (SEQ ID NO: 164)。

【0279】 在一實施例中，(b)之編碼區域包含有包含式 B 之共有序列的終止元件：

X_{-3}-X_{-2}-X_{-1}-U-A-A-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12} (SEQ ID NO: 170)

其中：

X_1 為 G 或 A；

X_2、X_4、X_5 X_6 或 X_7 各自獨立地為 C 或 U；

X_3 為 C 或 A；

X_8、X_{10}、X_{11}、X_{12} X_{-1} 或 X_{-3} 各自獨立地為 C 或 G；

X_9 為 G 或 U；及/或

X_{-2} 為 A 或 U。

【0280】 在一實施例中，X_1 為 G。在一實施例中，X_1 為 A。

【0281】 在一實施例中，X_2 為 C。在一實施例中，X_2 為 U。

【0282】 在一實施例中，X_4 為 C。在一實施例中，X_4 為 U。

【0283】 在一實施例中，X_5 為 C。在一實施例中，X_5 為 U。

【0284】　在一實施例中，X_6為 C。在一實施例中，X_6為 U。

【0285】　在一實施例中，X_7為 C。在一實施例中，X_7為 U。

【0286】　在一實施例中，X_3為 C。在一實施例中，X_3為 A。

【0287】　在一實施例中，X_8為 C。在一實施例中，X_8為 G。

【0288】　在一實施例中，X_{10}為 C。在一實施例中，X_{10}為 G。

【0289】　在一實施例中，X_{11}為 C。在一實施例中，X_{11}為 G。

【0290】　在一實施例中，X_{12}為 C。在一實施例中，X_{12}為 G。

【0291】　在一實施例中，X_{-1}為 C。在一實施例中，X_{-1}為 G。

【0292】　在一實施例中，X_{-3}為 C。在一實施例中，X_{-3}為 G。

【0293】　在一實施例中，X_9為 G。在一實施例中，X_9為 U。

【0294】　在一實施例中，X_{-2}為 A。在一實施例中，X_{-2}為 U。

【0295】　在一實施例中，式 B 之共有序列(SEQ ID NO: 170)具有較高 GC 含量，*例如*，約 50%、60%、70%、80%、90%或 99%之 GC 含量。在一實施例中，GC 含量為約 50%。在一實施例中，GC 含量為約 60%。在一實施例中，GC 含量為約 70%。在一實施例中，GC 含量為約 80%。在一實施例中，GC 含量為約 90%。在一實施例中，GC 含量為約 99%。

【0296】　在一實施例中，(b)之編碼區域包含有包含式 C 之共有序列的終止元件：

X_{-3}-X_{-2}-X_{-1}-U-G-A-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12} (SEQ ID NO: 171)

其中：

X_{-3}、X_{-1}、X_2、X_5、X_6、X_7、X_8、X_9、或 X_{12}各自獨立地為 G 或 C；

X_{-2}、X_3、或 X_4各自獨立地為 A 或 C；

X_1為 A 或 G；及/或

X_{10}或 X_{11}各自獨立地為 C 或 U。

【0297】 在一實施例中，X_{-3}為 G。在一實施例中，X_{-3}為 C。

【0298】 在一實施例中，X_{-1}為 G。在一實施例中，X_{-1}為 C。

【0299】 在一實施例中，X_2為 G。在一實施例中，X_2為 C。

【0300】 在一實施例中，X_5為 G。在一實施例中，X_5為 C。

【0301】 在一實施例中，X_6為 G。在一實施例中，X_6為 C。

【0302】 在一實施例中，X_7為 G。在一實施例中，X_7為 C。

【0303】 在一實施例中，X_8為 G。在一實施例中，X_8為 C。

【0304】 在一實施例中，X_9為 G。在一實施例中，X_9為 C。

【0305】 在一實施例中，X_{12}為 G。在一實施例中，X_{12}為 C。

【0306】 在一實施例中，X_{-2}為 A。在一實施例中，X_{-2}為 C。

【0307】 在一實施例中，X_3為 A。在一實施例中，X_3為 C。

【0308】 在一實施例中，X_4為 A。在一實施例中，X_4為 C。

【0309】 在一實施例中，X_1為 A。在一實施例中，X_1為 G。

【0310】 在一實施例中，X_{10}為 C。在一實施例中，X_{10}為 U。

【0311】 在一實施例中，X_{11}為 C。在一實施例中，X_{11}為 U。

【0312】 在一實施例中，式 C 之共有序列(SEQ ID NO: 171)具有較高 GC 含量，*例如*，約 50%、60%、70%、80%、90%或 99%之 GC 含量。在一實施例中，GC 含量為約 50%。在一實施例中，GC 含量為約 60%。在一實施例中，GC 含量為約 70%。在一實施例中，GC 含量為約 80%。在一實施例中，GC 含量為約 90%。在一實施例中，GC 含量為約 99%。

【0313】 在一實施例中，(b)之編碼區域包含有包含式 D 之共有序列的終止元件：

X_{-3}-X_{-2}-X_{-1}-U-A-G-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12} (SEQ ID NO: 172)

其中：

X_{-3}、X_{-1}、X_2、X_3、X_{10}各自獨立地為 G 或 C；

X_{-2}或 X_9各自獨立地為 A 或 U；

X_1或 X_4各自獨立地為 A 或 G；

X_5或 X_8各自獨立地為 A 或 C；及/或

X_6、X_7、X_{11}或 X_{12}各自獨立地為 C 或 U。

【0314】　在一實施例中，X_{-3}為 G。在一實施例中，X_{-3}為 C。

【0315】　在一實施例中，X_{-1}為 G。在一實施例中，X_{-1}為 C。

【0316】　在一實施例中，X_2為 G。在一實施例中，X_2為 C。

【0317】　在一實施例中，X_3為 G。在一實施例中，X_3為 C。

【0318】　在一實施例中，X_{10}為 G。在一實施例中，X_{10}為 C。

【0319】　在一實施例中，X_{-2}為 A。在一實施例中，X_{-2}為 U。

【0320】　在一實施例中，X_9為 A。在一實施例中，X_9為 U。

【0321】　在一實施例中，X_1為 A。在一實施例中，X_1為 G。

【0322】　在一實施例中，X_4為 A。在一實施例中，X_4為 G。

【0323】　在一實施例中，X_5為 A。在一實施例中，X_5為 C。

【0324】　在一實施例中，X_8為 A。在一實施例中，X_8為 C。

【0325】　在一實施例中，X_6為 C。在一實施例中，X_6為 U。

【0326】　在一實施例中，X_7為 C。在一實施例中，X_7為 U。

【0327】　在一實施例中，X_{11}為 C。在一實施例中，X_{11}為 U。

【0328】　在一實施例中，X_{12}為 C。在一實施例中，X_{12}為 U。

【0329】　在一實施例中，式 D 之共有序列(SEQ ID NO: 172)具有較高 GC 含量，*例如*，約 50%、60%、70%、80%、90%或 99%之 GC 含量。在一實施例中，GC 含量為約 50%。在一實施例中，GC 含量為約 60%。在一實施例中，GC 含量為約 70%。在一實施例中，GC 含量為約 80%。在一實施例中，GC 含量為約 90%。

在一實施例中，GC 含量為約 99%。

表 4：終止元件

SEQ ID NO	序列資訊	序列
158	C1 (參考)	UGAUAAUAG
159	C2	UAAUAGUAA
160	C3	UAAGUCUAA
161	C4	UAAAGCUAA
162	C5	UAAGUCUCC
163	C6	UAAGGCUAA
164	C7	UAAGCCCCUCCGGGG
165	C8	UAAAGCUCCCCGGGG
166	C9	UAAGCCCCU
167	C10	UAAAGCUCC
168	C11	UAGGGUUAA
169	C15	UAAGCACCC
170	C12 (UAA 共有)	X_{-3}-X_{-2}-X_{-1}-U-A-A-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12} 其中： X_1 為 G 或 A； X_2、X_4、X_5 X_6 或 X_7 各自獨立地為 C 或 U； X_3 為 C 或 A； X_8、X_{10}、X_{11}、X_{12} X_{-1} 或 X_{-3} 各自獨立地為 C 或 G； X_9 為 G 或 U；及/或 X_{-2} 為 A 或 U。
171	C13 (UGA 共有)	X_{-3}-X_{-2}-X_{-1}-U-G-A-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12} 其中： X_{-3}、X_{-1}、X_2、X_5、X_6、X_7、X_8、X_9、或 X_{12} 各自獨立地為 G 或 C； X_{-2}、X_3、或 X_4 各自獨立地為 A 或 C； X_1 為 A 或 G；及/或 X_{10} 或 X_{11} 各自獨立地為 C 或 U。
172	C14 (UAG 共有)	X_{-3}-X_{-2}-X_{-1}-U-A-G-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12} 其中： X_{-3}、X_{-1}、X_2、X_3、X_{10} 各自獨立地為 G 或 C； X_{-2} 或 X_9 各自獨立地為 A 或 U； X_1 或 X_4 各自獨立地為 A 或 G； X_5 或 X_8 各自獨立地為 A 或 C；及/或 X_6、X_7、X_{11} 或 X_{12} 各自獨立地為 C 或 U。
173	C16	UGAUAGUAA
174	C17	UAAAGCGCU

【0330】　在一態樣中，本文揭示編碼多肽之多核苷酸，其中多核苷酸包含：(a) 5’-UTR (*例如*，如本文描述)；(b)包含終止元件(*例如*，如**表 4** 提供)之編碼區域；及(c) 3’-UTR (*例如*，如本文描述)。

6. 多聚腺苷酸尾

【0331】 在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸進一步包含多聚腺苷酸尾。在其他實施例中，可併入多聚腺苷酸尾上之末端基團以用於穩定。在其他實施例中，多聚腺苷酸尾包含 des-3’羥基尾。

【0332】 在 RNA 處理期間，腺嘌呤核苷酸(多聚腺苷酸尾)之長鏈可添加至諸如 mRNA 分子之多核苷酸以便增加穩定性。在轉錄之後，轉錄物之 3’末端可立即裂解以便釋放 3’羥基。然後，多聚腺苷酸聚合酶將腺嘌呤核苷酸鏈至添加 RNA。被稱為多聚腺苷酸化之過程添加可例如近似 80 至近似 250 個殘基之間之長度，包括近似 80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240 或 250 個殘基之長度的多聚腺苷酸尾。在一個實施例中，多聚腺苷酸尾為 100 個核苷酸之長度(SEQ ID NO: 121)。

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa (SEQ ID NO:121)

【0333】 多聚腺苷酸尾亦可在構築體自細胞核輸出之後添加。

【0334】 根據本發明，可併入多聚腺苷酸尾上之末端基團以用於穩定。本發明之多核苷酸可包括 des-3’羥基尾。它們亦可包括結構部分或 2'-O 甲基修飾，如 Junjie Li 等人所教導的(Current Biology，第 15 卷，1501-1507，2005 年 8 月 23 日，其內容以引用方式整體併入本文)。

【0335】 本發明之多核苷酸可被設計來編碼具有包括組蛋白 mRNA 之替代多聚腺苷酸尾結構的轉錄物。根據 Norbury，「在人類複製依賴性組蛋白 mRNA 上亦偵測到末端尿苷化。此等 mRNA 之周轉被視為對於預防染色體 DNA 複製完成或抑制後潛在毒性組蛋白之積累很重要。此等 mRNA 之特點為缺少 3′多聚腺苷酸尾，其功能由穩定莖-環結構及其同源莖-環結合蛋白(SLBP)承擔；後者對多聚腺苷酸化 mRNA 執行與 PABP 相同的功能」(Norbury，Cytoplasmic RNA：a

case of the tail wagging the dog，」Nature Reviews Molecular Cell Biology；AOP，2013 年 8 月 29 日線上發布；doi:10.1038/nrm3645)，其內容以引用方式整體併入本文。

【0336】　獨特多聚腺苷酸尾長度對於本發明之多核苷酸提供某些優勢。總體上，當存在時，多聚腺苷酸尾之長度為大於 30 個核苷酸之長度。在另一實施例中，多聚腺苷酸尾為大於 35 個核苷酸之長度(*例如*，至少或大於約 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、及 3,000 個核苷酸)。

【0337】　在一些實施例中，多核苷酸或其區域包括約 30 至約 3,000 個核苷酸(*例如* 30 至 50、30 至 100、30 至 250、30 至 500、30 至 750、30 至 1,000、30 至 1,500、30 至 2,000、30 至 2,500、50 至 100、50 至 250、50 至 500、50 至 750、50 至 1,000、50 至 1,500、50 至 2,000、50 至 2,500、50 至 3,000、100 至 500、100 至 750、100 至 1,000、100 至 1,500、100 至 2,000、100 至 2,500、100 至 3,000、500 至 750、500 至 1,000、500 至 1,500、500 至 2,000、500 至 2,500、500 至 3,000、1,000 至 1,500、1,000 至 2,000、1,000 至 2,500、1,000 至 3,000、1,500 至 2,000、1,500 至 2,500、1,500 至 3,000、2,000 至 3,000、2,000 至 2,500、及 2,500 至 3,000)。

【0338】　在一些實施例中，多聚腺苷酸尾相對於總多核苷酸之長度或多核苷酸之特定區域之長度來設計。此設計可基於編碼區域之長度、特定特徵或區域之長度或基於自多核苷酸表現之最終產物之長度。

【0339】　在此情況下，多聚腺苷酸尾之長度可比多核苷酸或其特徵大 10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 100%。多聚腺苷酸尾亦可被設計成其所屬多核苷酸之一部分。在此情況下，多聚腺苷酸尾可為構築體之總長度、構築體區域或構築體減去多聚腺苷酸尾之總長度的 10、20、30、40、50、60、70、80、或

90%或更大。此外，經工程改造之結合位點及多核苷酸與多聚腺苷酸結合蛋白之偶聯可增強表現。

【0340】　另外，使用多聚腺苷酸尾之 3′末端之經修飾核苷酸，多個不同多核苷酸可經由 PABP (多聚腺苷酸結合蛋白)經由 3′末端來連接在一起。轉染實驗可在相關細胞株中進行並且在轉染後 12 小時、24 小時、48 小時、72 小時及第 7 天，蛋白產生可藉由 ELISA 來分析。

【0341】　在一些實施例中，本發明之多核苷酸被設計成包括多聚腺苷酸-G 四聯體區域。G 四聯體為四個鳥嘌呤核苷酸之環狀氫鍵陣列，可由 DNA 及 RNA 中富含 G 之序列形成。在此實施例中，G 四聯體在多聚腺苷酸尾之末端處併入。在各個時間點，所得多核苷酸針對穩定性、蛋白產生及包括半衰期之其他參數來進行分析。已經發現，多聚腺苷酸-G 四聯體導致自 mRNA 產生的蛋白相當於單獨使用 120 個核苷酸之多聚腺苷酸尾(SEQ ID NO: 51)所見蛋白之至少 75%。

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 51)

【0342】　在一些實施例中，多聚腺苷酸尾為具有間斷非腺苷殘基(例如，鳥苷)的混合多聚腺苷酸尾。在一些實施例中，多聚腺苷酸尾經鳥苷化。不希望受理論束縛，咸信在一些實施例中，混合多聚腺苷酸尾可以保護 mRNA 免於快速去腺苷酸化。

【0343】　在一些實施例中，多聚腺苷酸尾包含一或多個非腺苷殘基。在一些實施例中，非腺苷殘基為鳥苷。在一些實施例中，多聚腺苷酸尾包含 1-20 個，例如，1-15、1-10、1-5、15-20、10-20、5-20、2-15、5-10、1-5、2-10、或 5-15 個非腺苷殘基(例如，鳥苷)。例如，多聚腺苷酸尾可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、或更多個非腺苷殘基(例如，鳥苷)。在一些實施例中，多聚腺苷酸尾中之至少 1%，例如，至少 2%、5%、

10%、15%、20%、或 25%之殘基為非腺苷殘基(例如，鳥苷)。在一些實施例中，多聚腺苷酸尾經鳥苷化，例如，包含一或多個鳥苷殘基。

【0344】 在一實施例中，包含一或多個非腺苷殘基的多聚腺苷酸尾為化學合成的。

【0345】 在一實施例中，3' UTR 包含*例如*如本文描述之 TENT 募集序列，其將一或多個末端核苷酸轉移酶(TENT)募集至包含 3' UTR 之多核苷酸。在一實施例中，TENT 為 TENT4，例如，TENT4A 及/或 TENT4B。不希望受理論束縛，咸信在一些實施例中，一或多個 TENT (例如，TENT4A 及/或 TENT4B)產生具有間斷非腺苷殘基(例如，鳥苷)的混合多聚腺苷酸尾，其保護 mRNA 免於快速去腺苷酸化。

【0346】 示例性 TENT 募集序列包括但是不限於 CACCGCGUUAUCCGUUCCUCGUAGGCUGGUCCUGGGGAACGGGUCGGCGG (SEQ ID NO: 91)及 CCACCCCCAGCGCCACCACCGCUGCCGUCGCCACCGCGUUAUCCGUUCCUCGUAGGCUGGUCCUGGGGAACGGGUCGGCGGCCGGUCGGCUUCUGUUUUA (SEQ ID NO: 92)

【0347】 在一實施例中，TENT 募集序列包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，TENT 募集序列包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列。

【0348】 在一實施例中，TENT 募集序列包含 SEQ ID NO: 92 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，TENT 募集序列包

含 SEQ ID NO: 92 之核苷酸序列。

【0349】 在一實施例中，3’ UTR 包含一或多個(例如，2、3、4、5、或更多個) TENT 募集序列，例如，一或多個本文所述 TENT 募集序列。在一實施例中，3’ UTR 包含一個 TENT 募集序列。在一實施例中，3’ UTR 包含兩個 TENT 募集序列。在一實施例中，3’ UTR 包含三個 TENT 募集序列。在一實施例中，3’ UTR 包含四個 TENT 募集序列。在一實施例中，3’ UTR 包含五個 TENT 募集序列。例如，3’ UTR 中之多個 TENT 募集序列可一致或不同。

【0350】 在一實施例中，3’ UTR 包含 TENT 募集序列，該序列包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含有包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列的 TENT 募集序列。

【0351】 在一實施例中，3’ UTR 包含 TENT 募集序列中之一或多者(例如 2、3、4、5、或更多個)，該序列包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含一個 TENT 募集序列，該序列包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含兩個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含三個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、

98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含四個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含五個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。

【0352】 在一實施例中，3’ UTR 包含有包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列的 TENT 募集序列中之一或多者(例如，2、3、4、5、或更多個)。在一實施例中，3’ UTR 包含兩個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含三個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含四個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列。在一實施例中，3’ UTR 包含五個 TENT 募集序列，每一者包含 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列。

7. 額外 3’ UTR 元件

A) 鑑別及比率確定(IDR)

【0353】 鑑別及比率確定(IDR)序列為生物分子(*例如*，核酸或蛋白)之序列，當與靶生物分子之序列組合時，用來鑑別靶生物分子。通常，IDR 序列為異源序列，其併入或附加於靶生物分子之序列並且可用作鑑別靶分子之參考。因此，在一些實施例中，核酸(*例如*，mRNA)包含(i)所關注之靶序列(*例如*，編碼治療性及/或抗原性肽或蛋白之編碼序列)；及(ii)獨特 IDR 序列。

【0354】 RNA 物質(例如，具有給定編碼序列之 RNA)可包含與其他 RNA 物質(*例如*，具有不同編碼序列之 RNA)之 IDR 序列不同的 IDR 序列。因此，各 IDR

序列鑑別特定 RNA 物質，並且因此可量測 IDR 序列之豐度以便確定組成物中之各 RNA 物質之豐度。使用不同 IDR 序列來鑑別 RNA 物質允許分析含有具有類似編碼序列及/或長度之 RNA 物質的多價 RNA 組成物(例如，含有多個 RNA 物質)，否則可能很難使用全長 RNA 之基於 PCR 或層析之分析來區分。

【0355】　多價 RNA 組成物中之各 RNA 物質可包含並非多價 RNA 組成物中之另一種 RNA 物質之 IDR 序列之序列異構物的 IDR 序列(*例如*，IDR 序列不與組成物中之另一個 IDR 序列具有相同數目之腺苷核苷酸、相同數目之胞嘧啶核苷酸、相同數目之鳥嘌呤核苷酸、及相同數目之尿嘧啶核苷酸，即使彼等序列具有不同序列亦如此)。具有一致核苷酸組成導致序列異構物具有相同質量，從而對使用基於質量之鑑別方法(*例如*，質譜)來區分序列異構物提出挑戰。

【0356】　多價 RNA 組成物中之各 RNA 物質可包含具有與多價 RNA 組成物中之每個其他 RNA 物質之 IDR 序列之質量不同之質量的 IDR 序列。例如，各 IDR 序列之質量可與其他 IDR 序列之質量相差至少 9 Da、至少 25 Da、至少 25 Da、或至少 50 Da。使用具有不同質量之 IDR 序列允許包含不同 IDR 序列之 RNA 片段使用基於質量之分析方法(*例如*，質譜)來區分，而不需要 RNA 之反轉錄、擴增、或測序。

【0357】　RNA 組成物中之各 RNA 物質可包含具有不同長度之 IDR 序列。例如，各 IDR 序列可具有獨立地選自 0 至 25 個核苷酸之長度。核酸之長度影響核酸穿過層析管柱之速率，並且因此使用不同 RNA 物質上之不同長度之 IDR 序列允許具有不同 IDR 序列之 RNA 片段使用基於層析之方法(*例如*，LC-UV)來區分。

【0358】　可選擇 IDR 序列以使得沒有 IDR 序列包含起始密碼子「AUG」。IDR 序列中缺少起始密碼子防止 IDR 序列內及/或下游之核苷酸序列發生非所需轉譯。

【0359】　可選擇 IDR 序列以使得沒有 IDR 序列包含限制酶之識別位點。在一

個實例中，沒有 IDR 序列包含 XbaI 之識別位點「UCUAG」。缺少限制酶之識別位點(例如，XbaI 識別位點「UCUAG」)允許限制酶用於產生及修飾用於*活體外*轉錄之 DNA 模板，而不影響 IDR 序列或所轉錄 RNA 之序列。

B) FUT8

【0360】　在一些實施例中，3' UTR 包含 FUT8 序列。例如，FUT8 序列包含以下序列：CUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUG SEQ ID NO: 93。在一實施例中，3' UTR 包含 FUT8 序列，該序列包含 SEQ ID NO: 93 之核苷酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%一致性，或與其相差不超過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之核苷酸序列。在一些實施例中，FUT8 序列可與存在於 3' UTR 中並且如本文描述之任何 miRNA 結合位點組合。

C) 核糖體接合偵測檢定(REDA)

【0361】　REDA 可用於評估所製造核酸之 mRNA 之細胞脂質奈米顆粒-核酸吸收及轉譯的效力及有效性。該檢定併入核糖體接合偵測檢定(REDA)之一些態樣以便量測在細胞中之轉譯步驟期間，與核糖體結合之 mRNA。該檢定不需要涉及實際蛋白表現，而是實情為藉由證明有效 mRNA 吸收及與核糖體締合，並且由此證明有效細胞內轉譯，從而反映諸如 mRNA 之核酸在細胞中產生蛋白之有效性。

【0362】　因此，在一些實施例中，如本文描述之任何 3' UTR 序列包含可在 REDA 中藉由 qPCR 來偵測之序列。

【0363】　RNA 物質(例如，具有給定編碼序列之 RNA)可包含與其他 RNA 物質(*例如*，具有不同編碼序列之 RNA)之 REDA 序列不同的 REDA 序列。因此，各 REDA 序列鑑別特定 RNA 物質，並且因此可量測 REDA 序列之豐度以便確定組成物中之各 RNA 物質之豐度。使用不同 REDA 序列來鑑別 RNA 物質允許

分析含有具有類似編碼序列及/或長度之 RNA 物質的多價 RNA 組成物(例如，含有多個 RNA 物質)，否則可能很難使用全長 RNA 之基於 PCR 或層析之分析來區分。

【0364】 多價 RNA 組成物中之各 RNA 物質可包含並非多價 RNA 組成物中之另一種 RNA 物質之 REDA 序列之序列異構物的 REDA 序列(*例如*，IDR 序列不與組成物中之另一個 REDA 序列具有相同數目之腺苷核苷酸、相同數目之胞嘧啶核苷酸、相同數目之鳥嘌呤核苷酸、及相同數目之尿嘧啶核苷酸，即使彼等序列具有不同序列亦如此)。具有一致核苷酸組成導致序列異構物具有相同質量，從而對使用基於質量之鑑別方法(*例如*，質譜)來區分序列異構物提出挑戰。

【0365】 多價 RNA 組成物中之各 RNA 物質可包含具有與多價 RNA 組成物中之每個其他 RNA 物質之 REDA 序列之質量不同之質量的 REDA 序列。例如，各 REDA 序列之質量可與其他 REDA 序列之質量相差至少 9 Da、至少 25 Da、至少 25 Da、或至少 50 Da。使用具有不同質量之 REDA 序列允許包含不同 IDR 序列之 RNA 片段使用基於質量之分析方法(*例如*，質譜)來區分，而不需要 RNA 之反轉錄、擴增、或測序。

【0366】 RNA 組成物中之各 RNA 物質可包含具有不同長度之 REDA 序列。例如，各 IDR 序列可具有獨立地選自 0 至 25 個核苷酸之長度。核酸之長度影響核酸穿過層析管柱之速率，並且因此使用不同 RNA 物質上之不同長度之 REDA 序列允許具有不同 REDA 序列之 RNA 片段使用基於層析之方法(*例如*，LC-UV)來區分。

【0367】 可選擇 REDA 序列以使得沒有 REDA 序列包含起始密碼子「AUG」。IDR 序列中缺少起始密碼子防止 REDA 序列內及/或下游之核苷酸序列發生非所需轉譯。

【0368】 可選擇 REDA 序列以使得沒有 REDA 序列包含限制酶之識別位點。

在一個實例中，沒有 REDA 序列包含 XbaI 之識別位點「UCUAG」。缺少限制酶之識別位點(例如，XbaI 識別位點「UCUAG」)允許限制酶用於產生及修飾用於*活體外*轉錄之 DNA 模板，而不影響 IDR 序列或所轉錄 RNA 之序列。

8. 起始密碼子區域

【0369】 本發明亦包括包含起始密碼子區域及本文所述多核苷酸的多核苷酸。在一些實施例中，本發明之多核苷酸可具有與起始密碼子區域類似或如同起始密碼子區域一樣起作用的區域。

【0370】 在一些實施例中，多核苷酸之轉譯可在並非起始密碼子 AUG 之密碼子上開始。多核苷酸之轉譯可在諸如但不限於 ACG、AGG、AAG、CTG/CUG、GTG/GUG、ATA/AUA、ATT/AUU、TTG/UUG 之替代起始密碼子上開始(參見 Touriol 等人 Biology of the Cell 95 (2003) 169-178 及 Matsuda 及 Mauro PLoS ONE, 2010 5:11；其中之各者之內容以引用方式整體併入本文)。

【0371】 作為非限制性實例，多核苷酸之轉譯在替代起始密碼子 ACG 上開始。如另一個非限制性實例，多核苷酸轉譯在替代起始密碼子 CTG 或 CUG 上開始。作為另一個非限制性實例，多核苷酸之轉譯在替代起始密碼子 GTG 或 GUG 上開始。

【0372】 側接諸如但不限於起始密碼子或替代起始密碼子的開始轉譯之密碼子的核苷酸已知影響轉譯效率、多核苷酸之長度及/或結構。(參見，例如，Matsuda 及 Mauro PLoS ONE, 2010 5:11；其內容以引用方式整體併入本文)。掩蔽側接開始轉譯之密碼子的任何核苷酸可用於改變轉譯起始位置、轉譯效率、多核苷酸之長度及/或結構。

【0373】 在一些實施例中，可在起始密碼子或替代起始密碼子附近使用掩蔽劑以掩蔽或隱藏密碼子以降低在經掩蔽起始密碼子或替代起始密碼子處開始轉譯的可能性。掩蔽劑之非限制性實例包括反義鎖核酸(LNA)多核苷酸及外顯子連

接複合物(EJC) (參見，例如，Matsuda 及 Mauro 描述掩蔽劑 LNA 多核苷酸及 EJC (PLoS ONE, 2010 5:11)；其內容以引用方式整體併入本文)。

【0374】　在另一個實施例中，掩蔽劑可用於掩蔽多核苷酸之起始密碼子以增加轉譯將在替代起始密碼子上開始的可能性。在一些實施例中，掩蔽劑可用於掩蔽第一起始密碼子或替代起始密碼子以增加轉譯在經掩蔽起始密碼子或替代起始密碼子下游的起始密碼子或替代起始密碼子上開始的機會。

【0375】　在一些實施例中，起始密碼子或替代起始密碼子可位於 miRNA 結合位點之完美互補物內。miRNA 結合位點之完美互補物可以幫助控制類似於掩蔽劑之多核苷酸的轉譯、長度及/或結構。作為非限制性實例，起始密碼子或替代起始密碼子可以位於 miRNA 結合位點之完美互補物的中間。起始密碼子或替代起始密碼子可位於第一核苷酸、第二核苷酸、第三核苷酸、第四核苷酸、第五核苷酸、第六核苷酸、第七核苷酸、第八核苷酸、第九核苷酸、第十核苷酸、第十一核苷酸、第十二核苷酸、第十三核苷酸、第十四核苷酸、第十五核苷酸、第十六核苷酸、第十七核苷酸、第十八核苷酸、第十九核苷酸、第二十核苷酸或第二十一核苷酸之後。

【0376】　在另一個實施例中，可以自多核苷酸序列中移除多核苷酸之起始密碼子以使多核苷酸之轉譯在並非起始密碼子的密碼子上開始。多核苷酸之轉譯可以在經移除起始密碼子之後的密碼子或下游起始密碼子或替代起始密碼子上開始。在一個非限制性實例中，起始密碼子 ATG 或 AUG 作為多核苷酸序列之前 3 個核苷酸經移除，以便在下游起始密碼子或替代起始密碼子上開始轉譯。起始密碼子經移除的多核苷酸序列可進一步包含至少一種用於下游起始密碼子及/或替代起始密碼子的掩蔽劑，以控製或試圖控制轉譯之起始、多核苷酸之長度及/或多核苷酸之結構。

9.　mRNA 元件之組合

【0377】 本文揭示之任何多核苷酸可包含以下元件中之一者、兩者、三者、或全部：*例如*如本文描述之 5'-UTR；編碼區；終止元件+3'-UTR (*例如*，如本文描述)及；視情況*例如*如本文描述之 3'穩定區。本文亦揭示包含該等多核苷酸之 LNP 組成物。

【0378】 在一實施例中，本揭示案之多核苷酸包含**表 1** 描述之 5' UTR 或其變異體或片段及包含 SEQ ID NO:139 之序列之終止元件+3' UTR 或其變異體或片段。在一實施例中，多核苷酸進一步包含*例如*如本文描述之帽結構，或*例如*如本文描述之多聚腺苷酸尾。在一實施例中，多核苷酸進一步包含*例如*如本文描述之 3'穩定區。

【0379】 在一實施例中，本揭示案之多核苷酸包含有包含 SEQ ID NO: 50 之序列的 5' UTR 或其變異體或片段及包含 SEQ ID NO: 139 之序列的終止元件+3' UTR 或其變異體或片段。在一實施例中，多核苷酸進一步包含例如如本文描述之帽結構，或例如如本文描述之多聚腺苷酸尾。在一實施例中，多核苷酸進一步包含例如如本文描述之 3'穩定區。

【0380】 在一實施例中，本揭示案之多核苷酸包含有包含 SEQ ID NO: 56 之序列的 5' UTR 或其變異體或片段及包含 SEQ ID NO: 139 之序列的終止元件+3' UTR 或其變異體或片段。在一實施例中，多核苷酸進一步包含例如如本文描述之帽結構，或例如如本文描述之多聚腺苷酸尾。在一實施例中，多核苷酸進一步包含例如如本文描述之 3'穩定區。

【0381】 在一些實施例中，5' UTR 為 SEQ ID NO: 50 並且 3' UTR 為 SEQ ID NO: 139 或 SEQ ID NO: 144。例如，5' UTR 為 SEQ ID NO: 50 並且 3' UTR 為 SEQ ID NO: 139，或 5' UTR 為 SEQ ID NO: 50 並且 3' UTR 為 SEQ ID NO: 144。在一實施例中，多核苷酸進一步包含例如如本文描述之帽結構，或例如如本文描述之多聚腺苷酸尾。在一實施例中，多核苷酸進一步包含例如如本文描述之 3'

穩定區。

【0382】　在一些實施例中，選自表 3 之 miRNA 結合位點序列中之任何一者或多者可與如表 4 展示之終止盒中任一者組合。另外，在一些實施例中，Tent 募集序列可與選自表 3 之 miRNA 結合位點序列中之任何一者或多者及如表 4 展示之終止盒中任一者組合。此外，在一些實施例中，FUT8 序列可與選自表 3 之 miRNA 結合位點序列中之任何一者或多者及如表 4 展示之終止盒中任一者組合。

10. 治療酬載或預防酬載

【0383】　本文*尤其*揭示具有本文所述 5’ UTR、本文所述 3’ UTR，及/或包含終止元件之編碼區的多核苷酸，該編碼區進一步包含編碼酬載*例如*治療酬載或預防酬載的序列。在一實施例中，編碼區域編碼一個酬載。在一實施例中，編碼區域編碼一個以上酬載，*例如*，2、3、4、5、6、或更多個酬載，*例如*，相同或不同酬載。在一實施例中，編碼各酬載之序列在多核苷酸中為連續的。在一實施例中，編碼各酬載之序列藉由至少 1-1000 個核苷酸來分離。在一些實施例中，治療酬載或預防酬載包含編碼以下各者之 mRNA：分泌蛋白；膜結合蛋白；或細胞間蛋白、或肽、多肽或其生物活性片段。

【0384】　本文亦揭示 LNP，其包含有包含編碼酬載*例如*治療酬載或預防酬載之編碼區的多核苷酸。在一些實施例中，治療酬載或預防酬載包含編碼以下各者之 mRNA：分泌蛋白；膜結合蛋白；或細胞間蛋白、或肽、多肽或其生物活性片段。

【0385】　在一些實施例中，治療酬載或預防酬載包含編碼分泌蛋白、或肽、多肽或其生物活性片段的 mRNA。在一些實施例中，分泌蛋白包含細胞介素、或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，分泌蛋白包含抗體或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，分泌蛋白包含酶或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，分泌蛋白包含激素或其

變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，分泌蛋白包含配位體、或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，分泌蛋白包含疫苗(*例如*，抗原、免疫原性抗原決定基)、或其組分、變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，疫苗為預防疫苗。在一些實施例中，疫苗為治療疫苗，*例如*，癌症疫苗。在一些實施例中，分泌蛋白包含生長因子或其組分、變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，分泌蛋白包含免疫調節劑，*例如*，免疫檢查點促效劑或拮抗劑。

【0386】　在一些實施例中，治療酬載或預防酬載包含編碼膜結合蛋白、或肽、多肽或其生物活性片段之 mRNA。在一些實施例中，膜結合蛋白包含疫苗(*例如*，抗原、免疫原性抗原決定基)、或其組分、變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，疫苗為預防疫苗。在一些實施例中，疫苗為治療疫苗，*例如*，癌症疫苗。在一些實施例中，膜結合蛋白包含配位體、其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，膜結合蛋白包含膜轉運蛋白、其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，膜結合蛋白包含結構蛋白、其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，膜結合蛋白包含免疫調節劑，*例如*，免疫檢查點促效劑或拮抗劑。

【0387】　在一些實施例中，治療酬載或預防酬載包含編碼胞內蛋白、或肽、多肽或其生物活性片段的 mRNA。在一些實施例中，胞內蛋白包含酶、或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，胞內蛋白包含轉錄因子、或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，胞內蛋白包含核酸酶、或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。在一些實施例中，胞內蛋白包含結構蛋白、或其變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。

【0388】　在一些實施例中，治療酬載或預防酬載選自細胞介素、抗體、疫苗(*例如*，抗原、免疫原性抗原決定基)、受體、酶、激素、轉錄因子、配位體、膜

轉運蛋白、結構蛋白、核酸酶、生長因子、免疫調節劑、或其組分、變異體或片段(*例如*，生物活性片段)。

【0389】　在一些實施例中，治療酬載或預防酬載包含蛋白或肽。

【0390】　應瞭解本文揭示之調控元件(例如，5' UTR、終止元件、3' UTR、穩定區(例如，idT 或經修飾之多聚腺苷酸尾)可與編碼本文所述酬載之 ORF 一起使用。應進一步瞭解本文揭示之調控元件可以模組化方式來使用，亦即，可與來自此項技術之其他調控元件組合來用於 mRNA 構築體中(例如，本發明之 5' UTR 與 ORF 及來自此項技術之其他調控區域的組合)，或可與本文揭示之其他調控元件(例如，本發明之 5' UTR 及本發明之 3' UTR 等等)組合使用。應進一步瞭解本發明之終止元件可與缺少終止密碼子之所需 ORF 組合來使用。亦應瞭解當所需 ORF 包含終止密碼子時，額外終止密碼子或終止元件不包含在最終構築體中。在一些實施例中，所需 ORF 中之終止密碼子可用本文所述終止元件來置換。

11. 製造多核苷酸之方法

【0391】　本揭示案亦提供製造本文揭示之多核苷酸或其互補物的方法。在一些態樣中，本文揭示之多核苷酸(*例如*，mRNA)可使用*活體外*轉錄來構建。

【0392】　在其他態樣中，本文揭示之多核苷酸(*例如*，mRNA)可藉由使用寡核苷酸合成器之化學合成來構建。在其他態樣中，本文揭示之多核苷酸(*例如*，mRNA)使用宿主細胞來製造。在某些態樣中，本文揭示之多核苷酸(*例如*，mRNA)藉由 IVT、化學合成、宿主細胞表現、或此項技術中已知之任何其他方法的一或多個組合來製造。

【0393】　天然存在之核苷、非天然存在之核苷、或其組合可完全或部分地置換存在於候選核苷酸序列中的天然存在之核苷並且可併入編碼治療酬載或預防酬載的經序列優化之核苷酸序列(*例如*，mRNA)中。然後，所得 mRNA 可針對其產生蛋白及/或產生治療結果之能力來進行檢查。

【0394】 雖然 RNA 可使用此項技術中熟知之方法來合成製造，但是在一個實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)藉由在導致產生 RNA 轉錄物之條件下，使 DNA 模板與 RNA 聚合酶(*例如*，T7 RNA 聚合酶或 T7 RNA 聚合酶變異體)接觸來合成。

【0395】 在一些態樣中，本揭示案提供執行 IVT (活體外轉錄)反應之方法，包括在核苷三磷酸及緩衝液存在下，在導致產生 RNA 轉錄物之條件下使 DNA 模板與 RNA 聚合酶(*例如*，T7 RNA 聚合酶，諸如 T7 RNA 聚合酶變異體)接觸。

【0396】 本揭示案之其他態樣提供加帽方法，例如，共轉錄加帽方法或此項技術中已知之其他方法。在一個實施例中，加帽方法包含在產生 RNA 轉錄物之*活體外*轉錄反應條件下，使多核苷酸模板與 T7 RNA 聚合酶變異體、核苷三磷酸、及帽類似物反應。

【0397】 IVT 條件通常需要含有啟動子之經純化線性 DNA 模板、核苷三磷酸、包括二硫蘇糖醇(DTT)及鎂離子之緩衝系統、及 RNA 聚合酶。用於轉錄反應中之確切條件視特定應用所需要之 RNA 之量而定。典型 IVT 反應藉由在轉錄緩衝液中，將 DNA 模板與 RNA 聚合酶及包括 GTP、ATP、CTP、及 UTP (或核苷酸類似物)之核苷三磷酸一起孵育來執行。具有 5′末端鳥苷三磷酸之 RNA 轉錄物自此反應中產生。

【0398】 去氧核糖核酸(DNA)僅為 RNA 聚合酶之核酸模板。DNA 模板可包括編碼所關注之多肽(*例如*，抗原多肽)的多核苷酸。在一些實施例中，DNA 模板包括 RNA 聚合酶啟動子(*例如*，T7 RNA 聚合酶啟動子)，其位於編碼所關注多肽之多核苷酸的 5′處且可操作地連接至該多核苷酸。DNA 模板亦可包括編碼位於所關注基因之 3′末端的多聚腺苷酸化(聚腺苷酸)尾之核苷酸序列。

【0399】 所關注之多肽包括但是不限於生物製劑、抗體、抗原(疫苗)、及治療蛋白。術語「蛋白」涵蓋肽。

【0400】　在一些實施例中，RNA 轉錄物為 IVT 反應之產物並且如普通熟習此項技術者瞭解，製造 RNA 分子之 DNA 模板已知基於鹼基互補性。在一些實施例中，RNA 轉錄物為信使 RNA (mRNA)，其包括與多聚腺苷酸尾連接的編碼所關注多肽之核苷酸序列。在一些實施例中，mRNA 為經修飾之 mRNA (mmRNA)，其包括至少一種經修飾之核苷酸。

【0401】　核苷酸包括含氮鹼基、五碳糖(核糖或去氧核糖)及至少一個磷酸基團。核苷酸包括核苷一磷酸、核苷二磷酸及核苷三磷酸。核苷一磷酸(NMP)包括與核糖及單個磷酸連接之核苷鹼基；核苷二磷酸(NDP)包括與核糖及兩個磷酸連接的核苷鹼基；並且核苷三磷酸(NTP)包括與核糖及三個磷酸連接的核苷鹼基。核苷酸類似物為具有核苷酸之一般結構或在結構上與核苷酸類似之化合物。核苷酸類似物例如包括核苷酸之核苷鹼基之類似物、糖之類似物及/或磷酸基團之類似物。

【0402】　核苷包括含氮鹼基及 5 碳糖。因此，核苷加上磷酸基團產生核苷酸。核苷類似物為具有核苷之一般結構或在結構上與核苷類似之化合物。核苷類似物例如包括核苷之核苷鹼基之類似物及/或糖之類似物。

【0403】　應理解，除非另有指示，否則術語「核苷酸」包括天然存在之核苷酸、合成核苷酸及經修飾之核苷酸。如本文所提供之用於*例如*在 IVT 反應中產生 RNA 之天然存在之核苷酸的實例包括腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)及 5-甲基尿苷三磷酸(m^5UTP)。在一些實施例中，使用腺苷二磷酸(ADP)、鳥苷二磷酸(GDP)、胞苷二磷酸(CDP)及/或尿苷二磷酸(UDP)。

【0404】　核苷酸類似物之實例包括但不限於抗病毒核苷酸類似物、磷酸類似物(可溶性或固定化、可水解或不可水解)、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸*例如*帽類似物或用於酶促加帽之前體/受質(痘苗或連接酶)、經官能基標記以有助於

帽或 5′部分(IRES)之連接/偶聯的核苷酸、經 5′ PO_4 標記以有助於帽或 5′部分之連接的核苷酸或經可化學或酶促裂解之官能基/保護基團標記的核苷酸。抗病毒核苷酸/核苷類似物之實例包括但不限於更昔洛韋(Ganciclovir)、恩替卡韋(Entecavir)、替比夫定(Telbivudine)、阿糖腺苷及西多福韋(Cidofovir)。

【0405】 經修飾之核苷酸可包括經修飾之核苷鹼基。例如，本揭示案之 RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)可包括選自假尿苷(ψ)、1-甲基假尿苷(m1ψ)、1-乙基假尿苷、2-硫尿苷、4′-硫尿苷、2-硫基-1-甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫基-1-甲基-假尿苷、2-硫基-5-氮雜-尿苷、2-硫基-二氫假尿苷、2-硫基-二氫尿苷、2-硫基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫基-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫基-1-甲基-假尿苷、4-硫基-假尿苷、5-氮雜-尿苷、二氫假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷(mo5U)及 2′-O-甲基尿苷的經修飾之核苷鹼基。在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括前述經修飾核苷鹼基之至少兩者(*例如*，2 者、3 者、4 者或更多者)之組合。

【0406】 如本文提供之核苷三磷酸(NTP)可包含未經修飾或經修飾之 ATP、經修飾或未經修飾之 UTP、經修飾或未經修飾之 GTP，及/或經修飾或未經修飾之 CTP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含未經修飾之 ATP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含經修飾之 ATP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含未經修飾之 UTP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含經修飾之 UTP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含未經修飾之 GTP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含經修飾之 GTP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含未經修飾之 CTP。在一些實施例中，IVT 反應之 NTP 包含經修飾之 CTP。

【0407】 存在於 IVT 反應中之核苷三磷酸及帽類似物之濃度可變化。在一些實施例中，NTP 及帽類似物以等莫耳濃度存在於反應中。在一些實施例中，反應中的帽類似物(*例如*，三核苷酸帽)與核苷三磷酸之莫耳比大於 1:1。例如，反應

中的帽類似物與核苷三磷酸之莫耳比可為 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、50:1、或 100:1。在一些實施例中，反應中的帽類似物(*例如*，三核苷酸帽)與核苷三磷酸之莫耳比小於 1:1。例如，反應中的帽類似物(*例如*，三核苷酸帽)與核苷三磷酸之莫耳比可為 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:25、1:50、或 1:100。

【0408】 IVT 反應中之 NTP 的組成亦可變化。例如，可使用超過 GTP、CTP 及 UTP 之 ATP。作為非限制性實例，IVT 反應可包括 7.5 毫莫耳濃度之 GTP、7.5 毫莫耳濃度之 CTP、7.5 毫莫耳濃度之 UTP 及 3.75 毫莫耳濃度之 ATP。相同 IVT 反應可包括 3.75 毫莫耳濃度之帽類似物(*例如*，三核苷酸帽)。在一些實施例中，G:C:U:A:帽之莫耳比為 1:1:1:0.5:0.5。在一些實施例中，G:C:U:A:帽之莫耳比為 1:1:0.5:1:0.5。在一些實施例中，G:C:U:A:帽之莫耳比為 1:0.5:1:1:0.5。在一些實施例中，G:C:U:A:帽之莫耳比為 0.5:1:1:1:0.5。

【0409】 在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括選自假尿苷(ψ)、1-甲基假尿苷($m^1\psi$)、5-甲氧基尿苷(mo^5U)、5-甲基胞苷(m^5C)、α-硫基-鳥苷及 α-硫基-腺苷的經修飾之核苷鹼基。在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括前述經修飾核苷鹼基之至少兩者(*例如*，2 者、3 者、4 者或更多者)之組合。

【0410】 在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括假尿苷(ψ)。在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括 1-甲基假尿苷($m^1\psi$)。在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括 5-甲氧基尿苷(mo^5U)。在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括 5-甲基胞苷(m^5C)。在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括 α-硫基-鳥苷。在一些實施例中，RNA 轉錄物(*例如*，mRNA 轉錄物)包括 α-硫基-腺苷。

【0411】 在一些實施例中，多核苷酸(*例如* RNA 多核苷酸，諸如 mRNA 多核

苷酸)針對特定修飾經均一修飾(*例如*，經完全修飾、在整個序列中經修飾)。舉例而言，多核苷酸可經 1-甲基假尿苷($m^1\psi$)均一修飾，意謂 mRNA 序列中之所有尿苷殘基均經 1-甲基假尿苷($m^1\psi$)置換。同樣，可藉由用經修飾之殘基(諸如上文所闡明之彼等殘基中的任一者)進行置換，針對序列中存在之任一類型之核苷殘基對多核苷酸進行均一修飾。或者，多核苷酸(*例如* RNA 多核苷酸，諸如 mRNA 多核苷酸)可未經均一修飾(*例如*，經部分修飾、序列之一部分經修飾)。各可能性代表本發明之一單獨實施例。

【0412】　在一些實施例中，緩衝系統含有參(羥甲基)胺基甲烷。例如，IVT 反應中使用之參(羥甲基)胺基甲烷的濃度可為至少 10 mM、至少 20 mM、至少 30 mM、至少 40 mM、至少 50 mM、至少 60 mM、至少 70 mM、至少 80 mM、至少 90 mM、至少 100 mM 或至少 110 mM 磷酸鹽。在一些實施例中，磷酸鹽之濃度為 20-60 mM 或 10-100 mM。

【0413】　在一些實施例中，緩衝系統含有二硫蘇糖醇(DTT)。例如，IVT 反應中使用之 DTT 的濃度可為至少 1 mM、至少 5 mM 或至少 50 mM。在一些實施例中，IVT 反應中使用之 DTT 的濃度為 1-50 mM 或 5-50 mM。在一些實施例中，IVT 反應中使用之 DTT 的濃度為 5 mM。

【0414】　在一些實施例中，緩衝系統含有鎂。在一些實施例中，存在於 IVT 反應中之 NTP 與鎂離子(Mg^{2+}；*例如* $MgCl_2$)的莫耳比為 1:1 至 1:5。例如，NTP 與鎂離子之莫耳比可為 1:1、1:2、1:3、1:4 或 1:5。

【0415】　在一些實施例中，存在於 IVT 反應中之 NTP 加上帽類似物(*例如*, 三核苷酸帽, 諸如 GAG)與鎂離子(Mg^{2+}；*例如* $MgCl_2$)的莫耳比為 1:1 至 1:5。例如，NTP+三核苷酸帽(*例如*, GAG)與鎂離子之莫耳比可為 1:1、1:2、1:3、1:4 或 1:5。

【0416】　在一些實施例中，緩衝系統含有 Tris-HCl、亞精胺(*例如*，在 1-30 mM 之濃度下)、TRITON® X-100 (聚乙二醇對(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯醚)及/或聚乙二

醇(PEG)。

【0417】　向生長中之RNA鏈之3′端添加核苷三磷酸(NTP)藉由聚合酶來催化，諸如 T7 RNA 聚合酶，例如本揭示案之 T7 RNA 聚合酶變異體(*例如* G47A)中之任何一者或多者。在一些實施例中，RNA 聚合酶(*例如*，T7 RNA 聚合酶變異體)以 0.01 mg/ml 至 1 mg/ml 之濃度存在於反應(*例如*，IVT 反應)中。例如，RNA 聚合酶可以 0.01 mg/mL、0.05 mg/ml、0.1 mg/ml、0.5 mg/ml 或 1.0 mg/ml 之濃度存在於反應中。

【0418】　在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸為 IVT 多核苷酸。傳統上，mRNA 分子之基本組成部分至少包括編碼區、5′ UTR、3′ UTR、5′帽及多聚腺苷酸尾。本揭示案之 IVT 多核苷酸可充當 mRNA，但在其功能及/或結構設計特徵方面與野生型 mRNA 不同，該等特徵用於*例如*克服使用基於核酸之治療劑來有效產生多肽的現有問題。

【0419】　IVT 多核苷酸之初級構築體包含側接有第一側接區域及第二側接區域的經連接核苷酸之第一區域。此第一區域可包括但是不限於所編碼治療酬載或預防酬載。第一側接區域可包括經連接核苷之序列，其充當 5′非轉譯區(UTR)，諸如編碼多肽之天然 5′ UTR 或諸如但不限於異源 5′ UTR 或合成 5′ UTR 之非天然 5′ UTR 的任何核酸之 5′ UTR。編碼治療酬載或預防酬載之 IVT 可在其 5 末端處包含編碼一或多個信號序列的信號序列區域。側接區域可包含有包含一或多個完整或不完整 5′ UTR 序列的經連接核苷酸之區域。側接區域亦可包含 5′末端帽。第二側接區域可包含經連接核苷酸之區域，該區域包含一或多個完整或不完整 3′ UTR，其可編碼治療酬載或預防酬載之天然 3’ UTR，或非天然 3’ UTR 諸如但不限於異源 3’ UTR 或合成 3’ UTR。側接區域亦可包含 3′尾序列。3’尾序列可為但是不限於多聚腺苷酸尾、多聚腺苷酸-G 四聯體及/或莖環序列。

【0420】　IVT 多核苷酸結構之額外及示例性特徵及製造多核苷酸之方法揭示

於 2017 年 5 月 18 日提出申請之國際 PCT 申請案 WO 2017/201325 中，其整個內容以引用形式併入本文。

12. 純化

【0421】　在其他態樣中，本文揭示之多核苷酸(*例如*，mRNA)可經純化。本文所述多核苷酸(*例如*，mRNA)之純化可包括但是不限於多核苷酸清理、品質保證及品質控制。可藉由此項技術已知之方法進行清理，諸如但不限於 AGENCOURT®珠粒(Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA)、聚 T 珠粒、LNATM 寡 T 捕獲探針(EXIQON® Inc, Vedbaek , Denmark)或基於 HPLC 之純化方法，諸如但不限於強陰離子交換 HPLC、弱陰離子交換 HPLC、反相 HPLC (RP-HPLC)及疏水相互作用 HPLC (HIC-HPLC)。當與諸如「經純化多核苷酸」之多核苷酸相關使用時，術語「純化」係指與至少一種污染物分離之多核苷酸。如本文所用，「污染物」為使另一種物質不合適、不純或劣質的任何物質。因此，經純化多核苷酸(*例如*，DNA 及 RNA)以不同於其在自然界中發現之形式或環境存在，或者以不同於在對其進行處理或純化方法之前存在的形式或環境存在。

【0422】　在一些實施例中，本揭示案之經純化多核苷酸(*例如*，mRNA)移除雜質，從而可減少或消除不當免疫反應，*例如*，減少細胞介素活性。

【0423】　在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸(*例如*，mRNA)在投與之前使用管柱層析(*例如*，強陰離子交換 HPLC、弱陰離子交換 HPLC、反相 HPLC (RP-HPLC)、及疏水性相互作用 HPLC (HIC-HPLC)、或(LCMS))來純化。在一些實施例中，與藉由不同純化方法來純化的編碼治療酬載或預防酬載之多核苷酸相比，管柱層析(*例如*，強陰離子交換 HPLC、弱陰離子交換 HPLC、反相 HPLC (RP-HPLC)、及疏水性相互作用 HPLC (HIC-HPLC)、或(LCMS))純化的編碼本文揭示之治療酬載或預防酬載的多核苷酸增加治療酬載或預防酬載之表現。

【0424】　在一些實施例中，管柱層析(*例如*，強陰離子交換 HPLC、弱陰離子

交換 HPLC、反相 HPLC (RP-HPLC)、及疏水性相互作用 HPLC (HIC-HPLC)、或(LCMS))純化的多核苷酸編碼治療酬載或預防酬載。在一些實施例中，經純化多核苷酸編碼治療酬載或預防酬載。

【0425】 在一些實施例中，經純化多核苷酸為至少約 80%純、至少約 85%純、至少約 90%純、至少約 95%純、至少約 96%純、至少約 97%純、至少約 98%純、至少約 99%純、或約 100%純。

【0426】 品質保證及/或品質控制檢查可使用諸如但不限於凝膠電泳、UV 吸收率、或分析 HPLC 之方法來進行。

【0427】 在另一實施例中，多核苷酸可藉由包括但不限於反轉錄酶-PCR 之方法來測序。

13. 多核苷酸之化學修飾

【0428】 如上所述，核酸(*例如*，RNA 核酸，諸如 mRNA 核酸)之經修飾核苷及核苷酸可包含在本發明之多核苷酸中。「核苷」係指含有糖分子(*例如*戊糖或核糖)或其衍生物與有機鹼基(*例如*嘌呤或嘧啶)或其衍生物(在本文中亦稱為「核苷鹼基」)之組合的化合物。「核苷酸」係指包括磷酸基團之核苷。經修飾之核苷酸可藉由諸如化學、酶促或重組之任何可用方法來合成，以包括一或多個經修飾或非天然之核苷。核酸可包含經連接核苷之一個或多個區域。此等區域可具有可變主鏈鍵。該等鍵可為標準磷酸二酯鍵，在該情形下，核酸包含核苷酸區域。

【0429】 經修飾之核苷酸鹼基配對不僅涵蓋標準腺苷-胸腺嘧啶、腺苷-尿嘧啶、或鳥苷-胞嘧啶鹼基對，而且涵蓋在包含非標準或經修飾鹼基的核苷酸及/或經修飾核苷酸之間形成的鹼基對，其中氫鍵供體及氫鍵受體之排列允許例如在具有至少一個化學修飾之彼等核酸中，在非標準鹼基與標準鹼基之間或在兩個互補非標準鹼基結構之間形成氫鍵。此非標準鹼基配對之一個實例為經修飾核苷酸肌苷及腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之間的鹼基配對。鹼/糖或連接子之任何組

合可併入本揭示案之核酸中。

【0430】　在一些實施例中，核酸(*例如* RNA 核酸，諸如 mRNA 核酸)中之經修飾之核苷鹼基包含 N1-甲基-假尿苷(m1ψ)、1-乙基-假尿苷(e1ψ)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)及/或假尿苷(ψ)。在一些實施例中，核酸(*例如* RNA 核酸，諸如 mRNA 核酸)中之經修飾之核苷鹼基包含 5-甲氧基甲基尿苷、5-甲硫基尿苷、1-甲氧基甲基假尿苷、5-甲基胞苷及/或 5-甲氧基胞苷。在一些實施例中，多核糖核苷酸包括上文所提及之任何經修飾核苷鹼基中之至少兩者(*例如* 2 者、3 者、4 者或更多者)之組合，該等核苷鹼基包括(但不限於)化學修飾。

【0431】　在一些實施例中，本揭示案之 RNA 核酸在核酸之一或多個或所有尿苷位置處包含 N1-甲基-假尿苷(m1ψ)取代。

【0432】　在一些實施例中，本揭示案之 RNA 核酸在核酸之一或多個或所有尿苷位置處包含 N1-甲基-假尿苷(m1ψ)取代並且在核酸之一或多個或所有胞苷位置處包含 5-甲基胞苷取代。

【0433】　在一些實施例中，本揭示案之 RNA 核酸在核酸之一或多個或所有尿苷位置處包含假尿苷(ψ)取代。

【0434】　在一些實施例中，本揭示案之 RNA 核酸在核酸之一或多個或所有尿苷位置處包含假尿苷(ψ)取代並且在核酸之一或多個或所有胞苷位置處包含 5-甲基胞苷取代。

【0435】　在一些實施例中，本揭示案之 RNA 核酸在核酸之一或多個或所有尿苷位置處包含尿苷。

【0436】　在一些實施例中，核酸(*例如* RNA 核酸，諸如 mRNA 核酸)針對特定修飾經均一修飾(*例如*，經完全修飾、在整個序列中經修飾)。舉例而言，核酸可經 N1-甲基-假尿苷均一修飾，意謂 mRNA 序列中之所有尿苷殘基均經 N1-甲基-假尿苷置換。同樣，可藉由用經修飾之殘基(諸如上文所闡明之彼等殘基)進行置

換，針對序列中存在之任一類型之核苷殘基對核酸進行均一修飾。

【0437】　本揭示案之核酸可沿著分子之整個長度來部分或完全地經修飾。例如，一或多個或全部或給定類型之核苷酸(*例如*，嘌呤或嘧啶，或 A、G、U、C 中之任何一者或多者或全部)可在本揭示案之核酸中，或在其預定序列區域中(*例如*，在包括或排除多聚腺苷酸尾之 mRNA 中)經均一修飾。在一些實施例中，在本揭示案之核酸中(或在其序列區域中)之所有核苷酸 X 為經修飾之核苷酸，其中 X 可為核苷酸 A、G、U、C 中任一者，或組合 A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C 或 A+G+C 中任一者。

【0438】　核酸可含有約 1%至約 100%經修飾之核苷酸(相對於總核苷酸含量，或相對於一種或多種類型之核苷酸，*亦即*，A、G、U 或 C 中之任何一者或多者)或任何間插百分比(*例如*，1%至 20%、1%至 25%、1%至 50%、1%至 60%、1%至 70%、1%至 80%、1%至 90%、1%至 95%、10%至 20%、10%至 25%、10%至 50%、10%至 60%、10%至 70%、10%至 80%、10%至 90%、10%至 95%、10%至 100%、20%至 25%、20%至 50%、20%至 60%、20%至 70%、20%至 80%、20%至 90%、20%至 95%、20%至 100%、50%至 60%、50%至 70%、50%至 80%、50%至 90%、50%至 95%、50%至 100%、70%至 80%、70%至 90%、70%至 95%、70%至 100%、80%至 90%、80%至 95%、80%至 100%、90%至 95%、90%至 100%、及 95%至 100%)。應瞭解任何剩餘百分比由所存在的未修飾 A、G、U、或 C 來佔據。

【0439】　核酸可含有最小 1%及最大 100%經修飾之核苷酸，或任何間插百分比，諸如至少 5%經修飾之核苷酸、至少 10%經修飾之核苷酸、至少 25%經修飾之核苷酸、至少 50%經修飾之核苷酸、至少 80%經修飾之核苷酸、或至少 90%經修飾之核苷酸。例如，核酸可含有經修飾之嘧啶諸如經修飾之尿嘧啶或胞嘧啶。在一些實施例中，核酸中之至少 5%、至少 10%、至少 25%、至少 50%、至

少 80%、至少 90%或 100%尿嘧啶用經修飾之尿嘧啶(*例如*，5-取代尿嘧啶)來置換。經修飾之尿嘧啶可藉由具有單一獨特結構之化合物來置換，或可藉由具有不同結構(*例如*，2、3、4 或更多個獨特結構)之複數個化合物來置換。在一些實施例中，核酸中之至少 5%、至少 10%、至少 25%、至少 50%、至少 80%、至少 90%或 100%胞嘧啶用經修飾之胞嘧啶(*例如*，5-取代胞嘧啶)來置換。經修飾之胞嘧啶可藉由具有單一獨特結構之化合物來置換，或可藉由具有不同結構(*例如*，2、3、4 或更多個獨特結構)之複數個化合物來置換。

14. 序列優化及其方法

【0440】　在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸包含編碼本文揭示之多肽的序列優化核苷酸序列，*例如*，編碼治療酬載或預防酬載之多核苷酸。在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸包含編碼治療酬載或預防酬載之開放閱讀框(ORF)，其中 ORF 經序列優化。

【0441】　本文揭示之序列優化核苷酸序列不同於對應野生型核苷酸序列及其他已知序列優化核苷酸序列，*例如*，此等序列優化核酸具有獨特組成特徵。

【0442】　在一些實施例中，相對於參考野生型核苷酸序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶核苷鹼基之百分比，序列優化核苷酸序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶核苷鹼基之百分比改變(*例如*，減少)。此序列被稱為尿嘧啶修飾或胸腺嘧啶修飾序列。核苷酸序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶含量之百分比可藉由將序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶之數量除以核苷酸之總數並且乘以 100 來確定。在一些實施例中，與參考野生型序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶含量相比，序列優化核苷酸序列具有較低尿嘧啶或胸腺嘧啶含量。在一些實施例中，本揭示案之序列優化核苷酸序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶含量大於參考野生型序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶含量並且當與參考野生型序列相比時，仍然保持有益效應，*例如*，增加的表現及/或信號轉導反應。

【0443】 在一些實施例中，本揭示案之優化序列含有序列中之獨特範圍之尿嘧啶或胸腺嘧啶(若為 DNA)。優化序列之尿嘧啶或胸腺嘧啶含量可以各種方式來表示，*例如*，相對於理論最小值(%UTM 或%TTM)、相對於野生型(%UWT 或%TWT)、及相對於總核苷酸含量(%UTL 或%TTL)的優化序列之尿嘧啶或胸腺嘧啶含量。對於 DNA，應認識到存在代替尿嘧啶(U)的胸腺嘧啶(T)，並且在出現 U 的位置用 T 取代。對於 RNA，應認識到存在代替胸腺嘧啶(T)的尿嘧啶(U)。當提供 DNA 序列時，藉由將 DNA 序列中之胸腺嘧啶取代為尿嘧啶，熟習此項技術者可容易地獲得 RNA 序列。因此，相對於 RNA 的與*例如*%UTM、%UWT、或%UTL 有關之所有揭示內容同樣適用於相對於 DNA 之%TTM、%TWT、或%TTL。

【0444】 相對於尿嘧啶或胸腺嘧啶理論最小值之尿嘧啶或胸腺嘧啶含量係指藉由將序列優化核苷酸序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶之數量除以預測核苷酸序列中之尿嘧啶或胸腺嘧啶之總數，其中預測序列中之所有密碼子用具有最低可能尿嘧啶或胸腺嘧啶含量之同義密碼子來置換並且乘以 100 來確定的參數。此參數在本文中縮寫為%UTM 或%TTM。

【0445】 在一些實施例中，相對於對應野生型核酸序列，本揭示案之尿嘧啶修飾序列具有減少數量的連續尿嘧啶。例如，兩個連續白胺酸可藉由包括四尿嘧啶簇之序列 CUUUUG 來編碼。此子序列可*例如*用移除尿嘧啶簇之 CUGCUC 來取代。苯基丙胺酸可藉由 UUC 或 UUU 來編碼。因此，即使藉由 UUU 來編碼之苯基丙胺酸藉由 UUC 來置換，同義密碼子仍然含有尿嘧啶對(UU)。因此，序列中之苯基丙胺酸之數量確立尿嘧啶對(UU)之最小數量，在不改變所編碼多肽中之苯基丙胺酸之數量的情況下，該最小數量不能被消除。

【0446】 在一些實施例中，相對於野生型核酸序列，本揭示案之尿嘧啶修飾序列具有減少數量之尿嘧啶三聯體(UUU)。在一些實施例中，相對於野生型核酸

序列中之尿嘧啶對(UU)之數量，尿嘧啶修飾序列具有減少數量之尿嘧啶對(UU)。在一些實施例中，本揭示案之尿嘧啶修飾序列具有與野生型核酸序列中之尿嘧啶對(UU)之最小可能數量對應的尿嘧啶對(UU)之數量。

【0447】　片語「相對於野生型核酸序列中之尿嘧啶對(UU)的尿嘧啶對(UU)」係指藉由將序列優化核苷酸序列中之尿嘧啶對(UU)之數量除以對應野生型核苷酸序列中之尿嘧啶對(UU)之總數並且乘以 100 來確定的參數。此參數在本文中縮寫為%UUwt。在一些實施例中，尿嘧啶修飾序列具有低於 100%之間的%UUwt。

【0448】　在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸包含尿嘧啶修飾序列。在一些實施例中，尿嘧啶修飾序列包含至少一個化學修飾核苷鹼基，*例如*，5-甲氧基尿嘧啶。在一些實施例中，本揭示案之尿嘧啶修飾序列中之至少 95%之核苷鹼基(*例如*，尿嘧啶)為經修飾之核苷鹼基。在一些實施例中，尿嘧啶修飾序列中之至少 95%之尿嘧啶為 5-甲氧基尿嘧啶。

【0449】　在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸為序列優化的。

【0450】　相對於參考序列(*例如*，編碼治療酬載或預防酬載之野生型序列)，序列優化核苷酸序列(核苷酸序列在本文中亦被稱為「核酸」)包含至少一個密碼子修飾。因此，在序列優化核酸中，至少一個密碼子不同於參考序列(*例如*，野生型序列)中之對應密碼子。

【0451】　通常，序列優化核酸藉由包括將參考序列中之密碼子用同義密碼子(*亦即*，編碼相同胺基酸之密碼子)來取代之至少一個步驟來產生。此等取代可例如藉由應用密碼子取代圖譜(*亦即*，提供密碼子優化序列中的編碼各胺基酸之密碼子的表格)，或藉由應用一組規則(*例如*，若甘胺酸與中性胺基酸鄰近，則甘胺酸藉由某一密碼子來編碼，但是若其與極性胺基酸鄰近，則其藉由另一個密碼子來編碼)來實現。除了密碼子取代(*亦即*,「密碼子優化」)以外，本文揭示之序列

優化方法包含不嚴格地針對密碼子優化之額外優化步驟諸如移除有害模體(不穩定模體取代)。包含此等序列優化核酸(*例如*，RNA，*例如*，mRNA)之組成物及調配物可投與有需要之受試者以便促進編碼治療酬載或預防酬載之功能活性物之*活體內*表現。

【0452】　額外及示例性序列優化方法揭示於 2017 年 5 月 18 日提出申請之國際 PCT 申請案 WO 2017/201325 中，其整個內容以引用形式併入本文。

15. 脂質奈米顆粒之脂質含量

【0453】　如以上闡明，相對於脂質，作為本文揭示之遞送載體來使用之 LNP 包含(i)可電離脂質；(ii)固醇或其他結構脂質；(iii)非陽離子輔助脂質或磷脂；及視情況(iv) PEG 脂質。此等種類之脂質在以下更詳細地闡明。

【0454】　在一些實施例中，本發明之核酸被調配成脂質奈米顆粒(LNP)組成物。脂質奈米顆粒通常包含胺基脂質、磷脂、結構脂質及 PEG 脂質組分以及所關注之核酸貨物。本發明之脂質奈米顆粒可使用如在此項技術中通常已知之組分、組成物、及方法來產生，參見例如 PCT/US2016/052352；PCT/US2016/068300；PCT/US2017/037551；PCT/US2015/027400；PCT/US2016/047406；PCT/US2016000129；PCT/US2016/014280；PCT/US2016/014280；PCT/US2017/038426；PCT/US2014/027077；PCT/US2014/055394；PCT/US2016/52117；PCT/US2012/069610；PCT/US2017/027492；PCT/US2016/059575；PCT/US2016/069491；PCT/US2016/069493；及 PCT/US2014/66242，其全部以引用方式整體併入。

【0455】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含相對於其他脂質組分的 20-60%胺基脂質之莫耳比。例如，脂質奈米顆粒可包含 20-50%、20-40%、20-30%、30-60%、30-50%、30-40%、40-60%、40-50%、或 50-60%莫耳比之胺基脂質。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含 20%、30%、40%、50、或 60%莫耳比之胺基脂質。

【0456】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含相對於其他脂質組分的 5-25%磷脂之莫耳比。例如，脂質奈米顆粒可包含 5-30%、5-15%、5-10%、10-25%、10-20%、10-25%、15-25%、15-20%、20-25%、或 25-30%莫耳比之磷脂。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含 5%、10%、15%、20%、25%、或 30%莫耳比之非陽離子脂質。

【0457】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含相對於其他脂質組分的 25-55%結構脂質之莫耳比。例如，脂質奈米顆粒可包含 10-55%、25-50%、25-45%、25-40%、25-35%、25-30%、30-55%、30-50%、30-45%、30-40%、30-35%、35-55%、35-50%、35-45%、35-40%、40-55%、40-50%、40-45%、45-55%、45-50%、或 50-55%莫耳比之結構脂質。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、或 55%莫耳比之結構脂質。

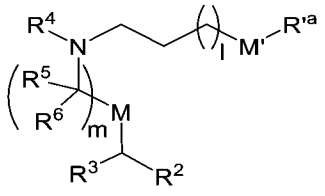
【0458】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含相對於其他脂質組分的 0.5-15% PEG 脂質之莫耳比。例如，脂質奈米顆粒可包含 0.5-10%、0.5-5%、1-15%、1-10%、1-5%、2-15%、2-10%、2-5%、5-15%、5-10%、或 10-15%莫耳比之 PEG 脂質。在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、或 15%莫耳比之 PEG-脂質。

【0459】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含 20-60%胺基脂質、5-25%磷脂、25-55%結構脂質、及 0.5-15% PEG 脂質之莫耳比。

【0460】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含 20-60%胺基脂質、5-30%磷脂、10-55%結構脂質、及 0.5-15% PEG 脂質之莫耳比。

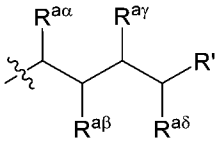
可電離胺基脂質

【0461】　在一些態樣中，本揭示係關於式(I)化合物：



(I)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

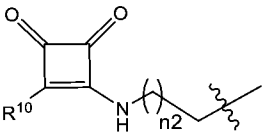
其中 R'a 為 R'支鏈；其中



R'支鏈為：　　；其中 表示附接點；

其中 Raα、Raβ、Raγ、及 Raδ 各自獨立地選自由 H、C2-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，及  ，

其中 表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；並且

n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R5 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

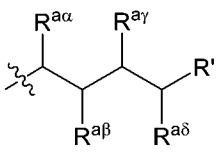
各 R6 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

M 及 M'各自獨立地選自由-C(O)O-及-OC(O)-組成之群；

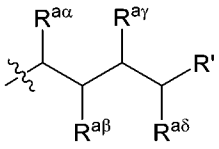
R'為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

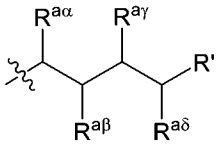
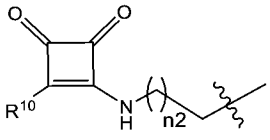
l 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；並且

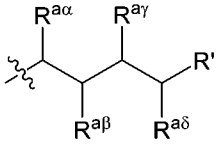
m 選自由 5、6、7、8、9、10、11、12、及 13 組成之群。

【0462】　在式(I)化合物之一些實施例中，R'a 為 R'支鏈；R'支鏈為  ；表示附接點；Raα、Raβ、Raγ、及 Raδ 各自為 H；R2 及 R3 各自為 C1-14 烷基；R4 為-(CH2)nOH；n 為 2；各 R5 為 H；各 R6 為 H；M 及

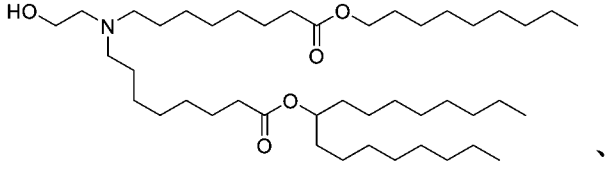
M’各自為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 5；並且 m 為 7。

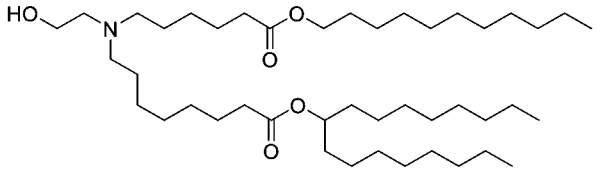
【0463】 在式(I)化合物之一些實施例中，R’a 為 R’支鏈；R’支鏈為  ；  表示附接點；Raα、Raβ、Raγ、及 Raδ 各自為 H；R2 及 R3 各自為 C1-14 烷基；R4 為-(CH2)nOH；n 為 2；各 R5 為 H；各 R6 為 H；M 及 M’各自為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 3；並且 m 為 7。

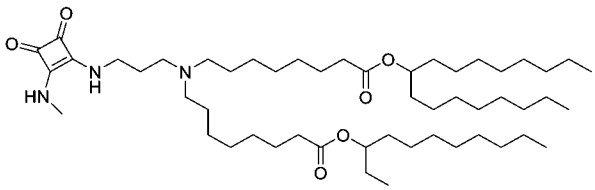
【0464】 在式(I)化合物之一些實施例中，R’a 為 R’支鏈；R’支鏈為  ；  表示附接點；Raα 為 C2-12 烷基；Raβ、Raγ、及 Raδ 各自為 H；R2 及 R3 各自為 C1-14 烷基；R4 為  ；R10 為 NH(C1-6 烷基)；n2 為 2；R5 為 H；各 R6 為 H；M 及 M’各自為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 5；並且 m 為 7。

【0465】 在式(I)化合物之一些實施例中，R’a 為 R’支鏈；R’支鏈為  ；  表示附接點；Raα、Raβ、及 Raδ 各自為 H；Raγ 為 C2-12 烷基；R2 及 R3 各自為 C1-14 烷基；R4 為-(CH2)nOH；n 為 2；各 R5 為 H；各 R6 為 H；M 及 M’各自為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 5；並且 m 為 7。

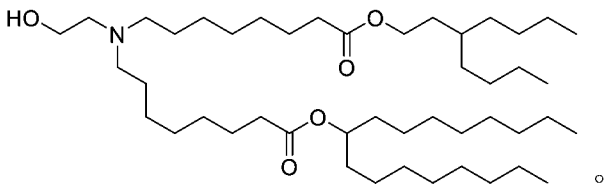
【0466】 在一些實施例中，式(I)化合物選自：

 、

 、

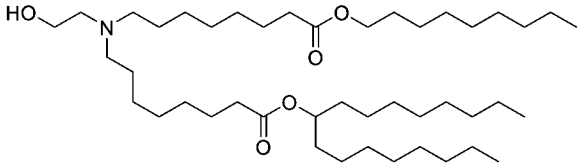


，及



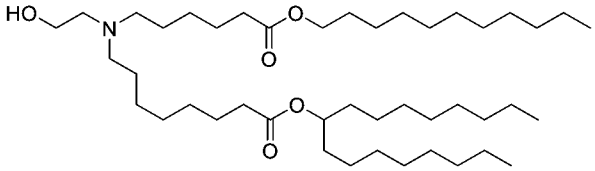
。

【0467】 在一些實施例中，式(I)化合物為：



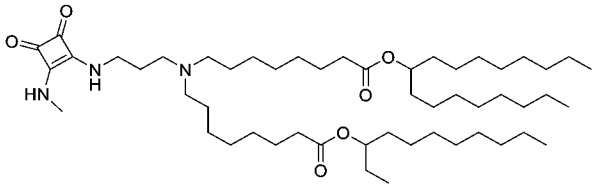
(化合物 II)。

【0468】 在一些實施例中，式(I)化合物為：



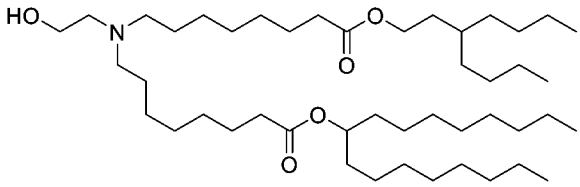
。

【0469】 在一些實施例中，式(I)化合物為：



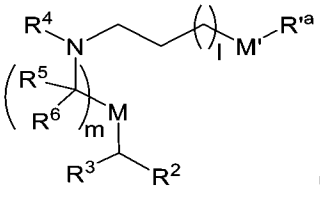
。

【0470】 在一些實施例中，式(I)化合物為：



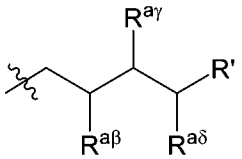
(化合物 B)。

【0471】 在一些態樣中，本揭示係關於式(Ia)化合物：



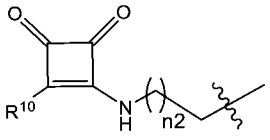
(Ia)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈；其中

R’支鏈為：  ；其中~~~表示附接點；

其中 Raβ、Raγ、及 Raδ 各自獨立地選自由 H、C2-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，及  ，

其中~~~表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；並且

n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R5 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

各 R6 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

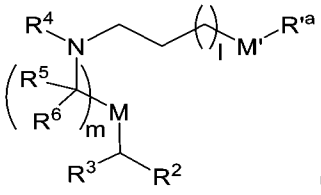
M 及 M’各自獨立地選自由-C(O)O-及-OC(O)-組成之群；

R’為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

l 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；並且

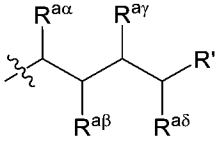
m 選自由 5、6、7、8、9、10、11、12、及 13 組成之群。

【0472】　在一些態樣中，本揭示係關於式(Ib)化合物：



(Ib)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈；其中

R’支鏈為：  ；其中~~~表示附接點；

其中 Raα、Raβ、Raγ、及 Raδ 各自獨立地選自由 H、C2-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 為-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；

各 R5 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

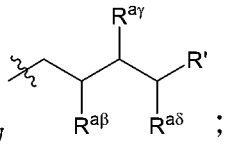
各 R6 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

M 及 M’各自獨立地選自由-C(O)O-及-OC(O)-組成之群；

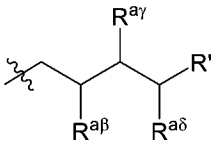
R’為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

l 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；並且

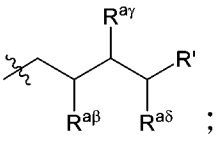
m 選自由 5、6、7、8、9、10、11、12、及 13 組成之群。

【0473】 在式(I)或(Ib)之一些實施例中，R’a 為 R’支鏈；R’支鏈為 

；~表示附接點；Raβ、Raγ、及 Raδ 各自為 H；R2 及 R3 各自為 C1-14 烷基；R4 為-(CH2)nOH；n 為 2；各 R5 為 H；各 R6 為 H；M 及 M’各自為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 5；並且 m 為 7。

【0474】 在式(I)或(Ib)之一些實施例中，R’a 為 R’支鏈；R’支鏈為 

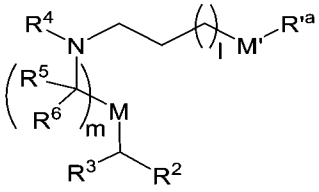
；~表示附接點；Raβ、Raγ、及 Raδ 各自為 H；R2 及 R3 各自為 C1-14 烷基；R4 為-(CH2)nOH；n 為 2；各 R5 為 H；各 R6 為 H；M 及 M’各自為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 3；並且 m 為 7。

【0475】 在式(I)或(Ib)之一些實施例中，R’a 為 R’支鏈；R’支鏈為 

；~表示附接點；Raβ 及 Raδ 各自為 H；Raγ 為 C2-12 烷基；R2 及 R3 各自為 C1-14 烷基；R4 為-(CH2)nOH；n 為 2；各 R5 為 H；各 R6 為 H；M 及 M’各自

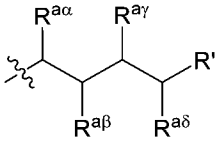
為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 5；並且 m 為 7。

【0476】 在一些態樣中，本揭示係關於式(Ic)化合物：



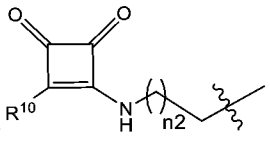
(Ic)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈；其中

R’支鏈為：  ；其中 表示附接點；

其中 Raα、Raβ、Raγ、及 Raδ 各自獨立地選自由 H、C2-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 為  ，

其中 表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R5 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

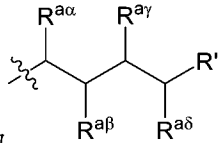
各 R6 獨立地選自由 C1-3 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；

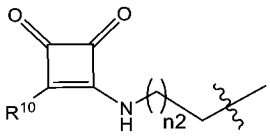
M 及 M’各自獨立地選自由-C(O)O-及-OC(O)-組成之群；

R’為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

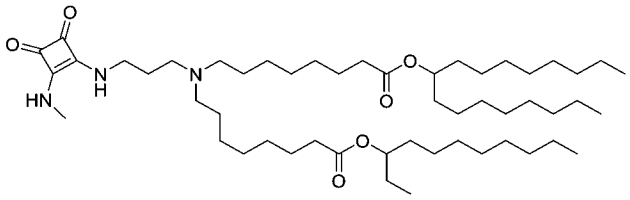
l 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；並且

m 選自由 5、6、7、8、9、10、11、12、及 13 組成之群。

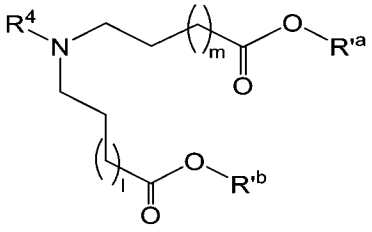
【0477】 在一些實施例中，R’a 為 R’支鏈；R’支鏈為  ；表示附接點；Raβ、Raγ、及 Raδ 各自為 H；Raα 為 C2-12 烷基；R2 及 R3 各自為 C1-

14 烷基；R4 為  ；  表示附接點；R10 為 NH(C1-6 烷基)；n2 為 2；各 R5 為 H；各 R6 為 H；M 及 M’各自為-C(O)O-；R’為 C1-12 烷基；l 為 5；並且 m 為 7。

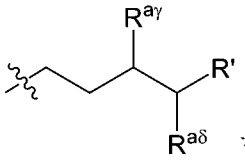
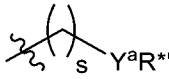
【0478】　在一些實施例中，式(Ic)化合物為：

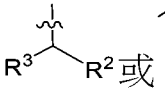
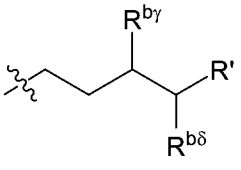
 (化合物 A)。

【0479】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II)化合物：

 (II)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈或 R’環狀；其中

R’支鏈為：  並且 R’環狀為：  ；並且

R’b 為：  或  ；

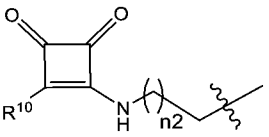
其中  表示附接點；

Raγ 及 Raδ 各自獨立地選自由 H、C1-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群，其中 Raγ 及 Raδ 中之至少一者選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

Rbγ 及 Rbδ 各自獨立地選自由 H、C1-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群，其中 Rbγ 及 Rbδ 中之至少一者選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之

群，及  ，

其中  表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；並且

n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R’獨立地為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

Ya 為 C3-6 碳環；

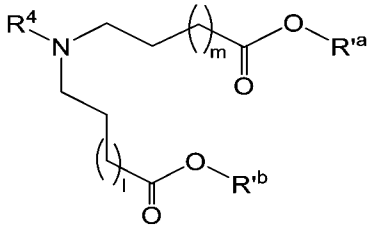
R*”a 選自由 C1-15 烷基及 C2-15 烯基組成之群；並且

s 為 2 或 3；

m 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9；

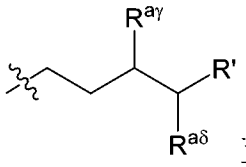
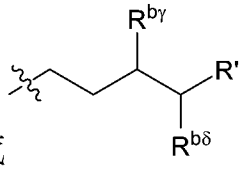
l 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9。

【0480】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-a)化合物：



(II-a)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈或 R’環狀；其中

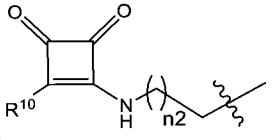
R’支鏈為：  並且 R’b 為：  或  ；

其中  表示附接點；

Raγ 及 Raδ 各自獨立地選自由 H、C1-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群，其中 Raγ 及 Raδ 中之至少一者選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

Rbγ 及 Rbδ 各自獨立地選自由 H、C1-12 烷基、及 C2-12 烯基組成之群，其中 Rbγ 及 Rbδ 中之至少一者選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，及  ，

其中  表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；並且

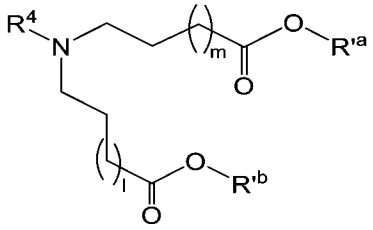
n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R’獨立地為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

m 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9；

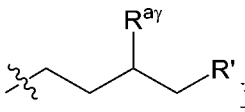
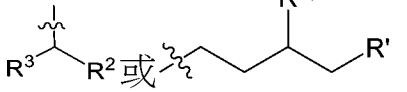
l 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9。

【0481】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-b)化合物：



(II-b)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

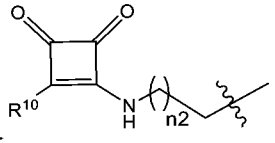
其中 R’a 為 R’支鏈或 R’環狀；其中

R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ；

其中  表示附接點；

Raγ 及 Rbγ 各自獨立地選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，及  ，

其中  表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；並且

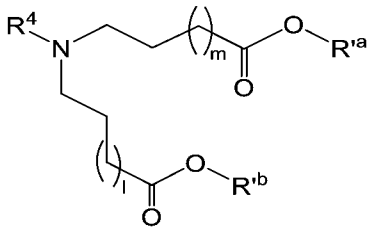
n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R’獨立地為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

m 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9；

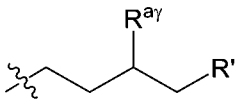
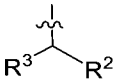
l 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9。

【0482】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-c)化合物：



(II-c)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

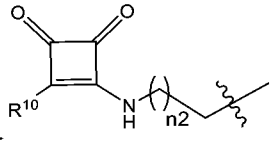
其中 R’a 為 R’支鏈或 R’環狀；其中

R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ；

其中  表示附接點；

其中 Raγ 選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，及  ，

其中  表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；並且

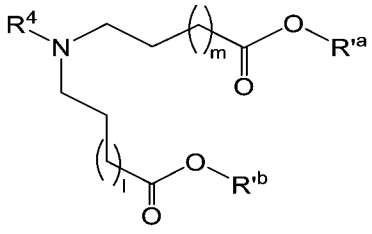
n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

R’為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

m 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9；

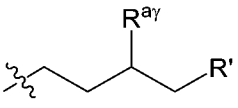
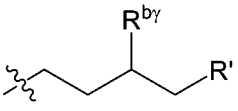
l 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9。

【0483】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-d)化合物：



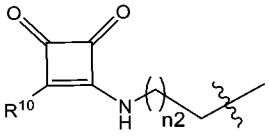
(II-d)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈或 R’環狀；其中

R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ；

其中  表示附接點；

其中 Raγ 及 Rbγ 各自獨立地選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，及  ，

其中  表示附接點；其中

R10 為 N(R)2；各 R 獨立地選自由 C1-6 烷基、C2-3 烯基、及 H 組成之群；並且

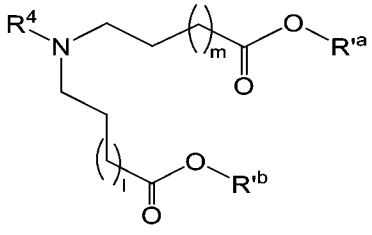
n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R’獨立地為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

m 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9；

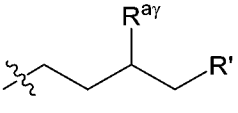
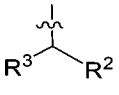
l 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9。

【0484】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-e)化合物：



(II-e)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈或 R’環狀；其中

R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ；

其中  表示附接點；

其中 Raγ 選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

R2 及 R3 各自獨立地選自由 C1-14 烷基及 C2-14 烯基組成之群；

R4 為-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；

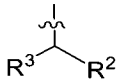
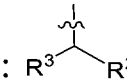
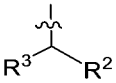
R’為 C1-12 烷基或 C2-12 烯基；

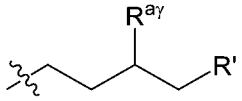
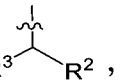
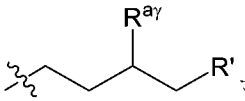
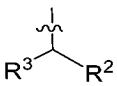
m 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9；

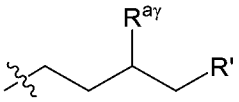
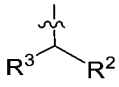
l 選自 1、2、3、4、5、6、7、8、及 9。

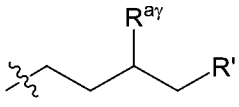
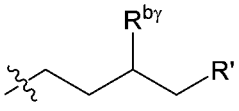
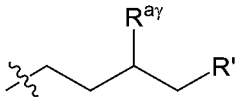
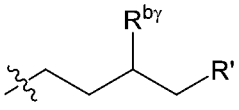
【0485】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，m 及 l 各自獨立地選自 4、5、及 6。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，m 及 l 各自為 5。

【0486】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，各 R’獨立地為 C1-12 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，各 R’獨立地為 C2-5 烷基。

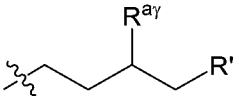
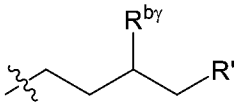
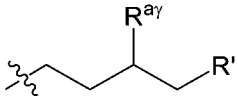
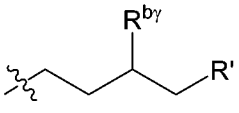
【0487】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’b 為：  並且 R2 及 R3 各自獨立地為 C1-14 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’b 為：  並且 R2 及 R3 各自獨立地為 C6-10 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’b 為：  並且 R2 及 R3 各自為 C8 烷基。

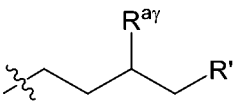
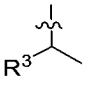
【0488】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ，Raγ 為 C1-12 烷基並且 R2 及 R3 各自獨立地為 C6-10 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ，Raγ 為 C2-6 烷基並且 R2 及 R3 各自獨立地為 C6-10 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-

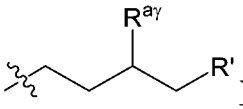
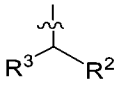
d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ，Raγ 為 C2-6 烷基，並且 R2 及 R3 各自為 C8 烷基。

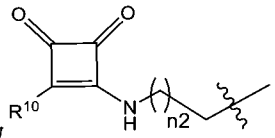
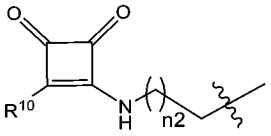
【0489】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，並且 Raγ 及 Rbγ 各自為 C1-12 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，並且 Raγ 及 Rbγ 各自為 C2-6 烷基。

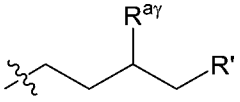
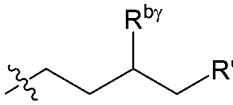
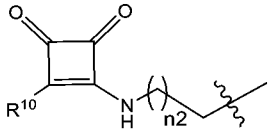
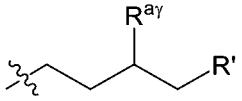
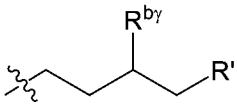
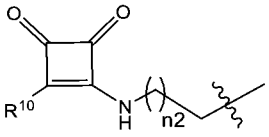
【0490】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，m 及 1 各自獨立地選自 4、5、及 6 並且各 R’獨立地為 C1-12 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，m 及 1 各自為 5 並且各 R’獨立地為 C2-5 烷基。

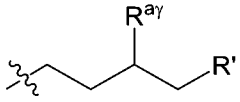
【0491】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，m 及 1 各自獨立地選自 4、5、及 6，各 R’獨立地為 C1-12 烷基，並且 Raγ 及 Rbγ 各自為 C1-12 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，m 及 1 各自為 5，各 R’獨立地為 C2-5 烷基，並且 Raγ 及 Rbγ 各自為 C2-6 烷基。

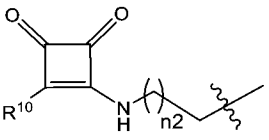
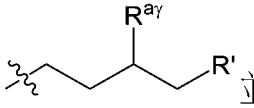
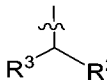
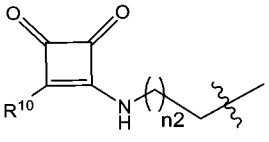
【0492】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ，m 及 1 各自獨立地選自 4、5、及 6，R’為 C1-12 烷基，Raγ 為 C1-12 烷基並且 R2 及 R3 各自獨立地為 C6-10 烷基。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支

鏈為：  並且 R’b 為：  ，m 及 1 各自為 5，R’為 C2-5 烷基，Raγ 為 C2-6 烷基，並且 R2 及 R3 各自為 C8 烷基。

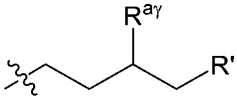
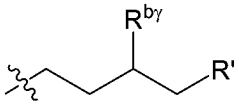
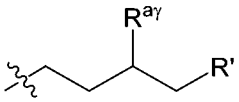
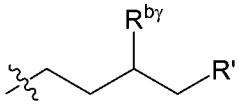
【0493】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R4 為  ，其中 R10 為 NH(C1-6 烷基)並且 n2 為 2。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R4 為  ，其中 R10 為 NH(CH3)並且 n2 為 2。

【0494】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，m 及 1 各自獨立地選自 4、5、及 6，各 R’獨立地為 C1-12 烷基，Raγ 及 Rbγ 各自為 C1-12 烷基，並且 R4 為  ，其中 R10 為 NH(C1-6 烷基)，並且 n2 為 2。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，m 及 1 各自為 5，各 R’獨立地為 C2-5 烷基，Raγ 及 Rbγ 各自為 C2-6 烷基，並且 R4 為  ，其中 R10 為 NH(CH3)並且 n2 為 2。

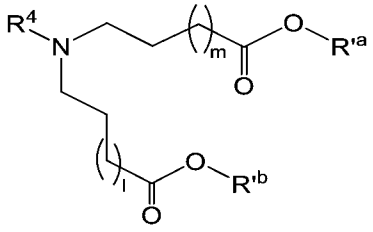
【0495】 在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ，m 及 1 各自獨立地選自 4、5、及 6，R’為 C1-12 烷基，R2 及 R3 各自獨立地為 C6-10 烷基，Raγ 為 C1-12 烷基，

並且 R4 為  ，其中 R10 為 NH(C1-6 烷基)並且 n2 為 2。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ，m 及 l 各自為 5，R’為 C2-5 烷基，Raγ 為 C2-6 烷基，R2 及 R3 各自為 C8 烷基，並且 R4 為  ，其中 R10 為 NH(CH3)並且 n2 為 2。

【0496】　在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R4 為-(CH2)nOH 並且 n 為 2、3、或 4。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R4 為-(CH2)nOH 並且 n 為 2。

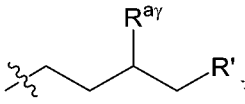
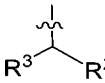
【0497】　在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，m 及 l 各自獨立地選自 4、5、及 6，各 R’獨立地為 C1-12 烷基，Raγ 及 Rbγ 各自為 C1-12 烷基，R4 為-(CH2)nOH，並且 n 為 2、3、或 4。在式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、或(II-e)化合物之一些實施例中，R’支鏈為：  ，R’b 為：  ，m 及 l 各自為 5，各 R’獨立地為 C2-5 烷基，Raγ 及 Rbγ 各自為 C2-6 烷基，R4 為-(CH2)nOH，並且 n 為 2。

【0498】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-f)化合物：



(II-f)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

其中 R’a 為 R’支鏈或 R’環狀；其中

R’支鏈為：  並且 R’b 為：  ；

其中  表示附接點；

Raγ 為 C1-12 烷基；

R2 及 R3 各自獨立地為 C1-14 烷基；

R4 為-(CH2)nOH，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；

R’為 C1-12 烷基；

m 選自 4、5、及 6；並且

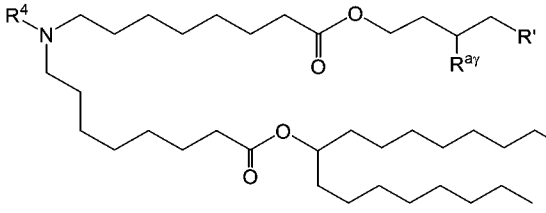
l 選自 4、5、及 6。

【0499】　在式(II-f)化合物之一些實施例中，m 及 l 各自為 5，並且 n 為 2、3、或 4。

【0500】　在式(II-f)化合物之一些實施例中，R’為 C2-5 烷基，Raγ 為 C2-6 烷基，並且 R2 及 R3 各自為 C6-10 烷基。

【0501】　在式(II-f)化合物之一些實施例中，m 及 l 各自為 5，n 為 2、3、或 4，R’為 C2-5 烷基，Raγ 為 C2-6 烷基，並且 R2 及 R3 各自為 C6-10 烷基。

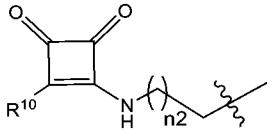
【0502】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-g)化合物：

 (II-g)，其中

Raγ 為 C2-6 烷基；

R’為 C2-5 烷基；並且

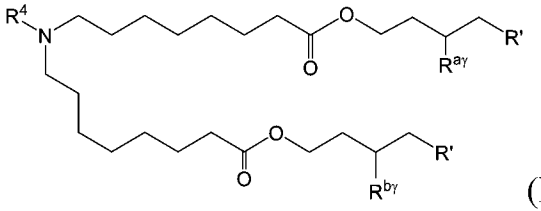
R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 3、4、及 5 組成之群，及

 ，

其中  表示附接點，R10 為 NH(C1-6 烷基)，並且 n2 選自由 1、2、及 3 組成

之群。

【0503】　在一些態樣中，本揭示係關於式(II-h)化合物：

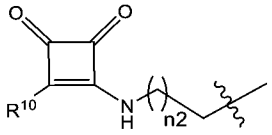


(II-h)，其中

Raγ 及 Rbγ 各自獨立地為 C2-6 烷基；

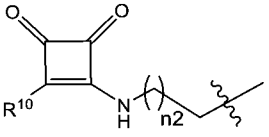
各 R’獨立地為 C2-5 烷基；並且

R4 選自由以下組成之群：-(CH2)nOH，其中 n 選自由 3、4、及 5 組成之群，及



，

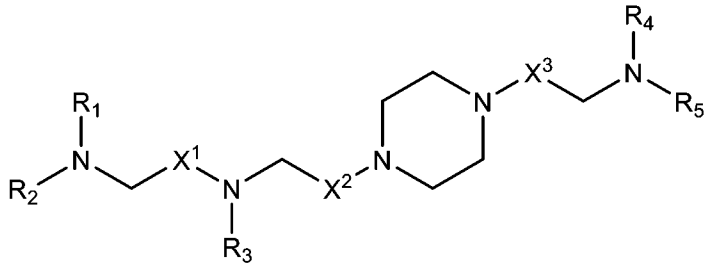
其中 表示附接點，R10 為 NH(C1-6 烷基)，並且 n2 選自由 1、2、及 3 組成之群。

【0504】　在式(II-g)或(II-h)化合物之一些實施例中，R4 為  ，其中

R10 為 NH(CH3)並且 n2 為 2。

【0505】　在式(II-g)或(II-h)化合物之一些實施例中，R4 為-(CH2)2OH。

【0506】　在一些態樣中，本揭示係關於具有式(III)之化合物：



(III)，

或其鹽或異構物，其中

R1、R2、R3、R4、及 R5 獨立地選自由以下組成之群：C5-20 烷基、C5-20 烯基、-R”MR’、-R*YR”、-YR”、及-R*OR”；

各 M 獨立地選自由以下組成之群：-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)2-、芳基、及雜芳基；

X1、X2、及 X3 獨立地選自由以下組成之群：鍵、-CH2-、-(CH2)2-、-CHR-、-CHY-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)-CH2-、-CH2-C(O)-、-C(O)O-CH2-、-OC(O)-CH2-、-CH2-C(O)O-、-CH2-OC(O)-、-CH(OH)-、-C(S)-、及-CH(SH)-；

各 Y 獨立地為 C3-6 碳環；

各 R*獨立地選自由 C1-12 烷基及 C2-12 烯基組成之群；

各 R 獨立地選自由 C1-3 烷基及 C3-6 碳環組成之群；

各 R'獨立地選自由 C1-12 烷基、C2-12 烯基、及 H 組成之群；及

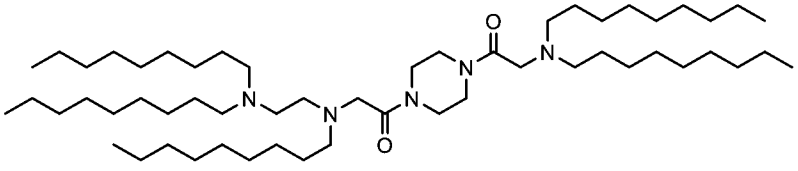
各 R"獨立地選自由 C3-12 烷基及 C3-12 烯基組成之群，並且其中：

i) X1、X2、及 X3 中之至少一者不為-CH2-；及/或

ii) R1、R2、R3、R4、及 R5 中之至少一者為-R"MR'。

【0507】　在一些實施例中，R1、R2、R3、R4、及 R5 各自為 C5-20 烷基；X1 為-CH2-；並且 X2 及 X3 各自為-C(O)-。

【0508】　在一些實施例中，式(III)化合物為：



(化合物 VI)、或或其鹽或異構物。

磷脂

【0509】　本文揭示之脂質奈米顆粒組成物之脂質組成物可包含一或多種磷脂，例如，一或多種飽和或(多)不飽和磷脂或其組合。一般而言，磷脂包含磷脂部分及一或多種脂肪酸部分。

【0510】　磷脂部分可選自例如由磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯甘油、磷

脂醯絲胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂醯膽鹼及鞘磷脂組成之非限制性群。

【0511】 脂肪酸部分可選自例如由月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕櫚酸、棕櫚油酸、硬脂酸、油酸、亞麻油酸、α-次亞麻油酸、芥子酸、植烷酸、花生酸、花生油酸、二十碳五烯酸、二十二酸、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸組成之非限制性群。

【0512】 特定磷脂可促進與膜之融合。舉例而言，陽離子磷脂可與膜(例如細胞膜或細胞內膜)之一或多種帶負電荷之磷脂相互作用。磷脂與膜之融合可容許含脂質組成物(例如 LNP)之一或多種成分(例如治療劑)穿過膜，從而允許例如將一或多種成分遞送至靶組織。

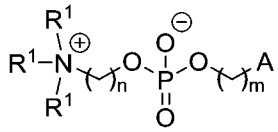
【0513】 亦考慮非天然磷脂物質，包括具有包括分支、氧化、環化及炔烴在內之修飾及取代的天然物質。舉例而言，磷脂可經一或多種炔烴(例如一或多個雙鍵經三鍵置換之烯基)官能化或與其交聯。在適當反應條件下，炔基可在暴露於疊氮化物時經歷銅催化之環加成。此等反應可用於官能化奈米顆粒組成物之脂質雙層以促進膜滲透或細胞識別，或可用於使奈米顆粒組成物與諸如靶向或成像部分(例如染料)之可用組分偶聯。

【0514】 磷脂包括但不限於甘油磷脂，諸如磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、磷脂醯甘油及磷脂酸。磷脂亦包括磷酸鞘脂，諸如鞘磷脂。

【0515】 在一些實施例中，本發明之磷脂包含 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(DSPC)、1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二亞油醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(DLPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-磷酸膽鹼(DMPC)、1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(DOPC)、1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(DPPC)、1,2-二十一醯基-sn-甘油基-磷酸膽鹼(DUPC)、1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(POPC)、1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(18:0 二

醚 PC)、1-油醯基-2-膽固醇基半琥珀醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼(C16 溶血 PC)、1,2-二亞麻醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼、1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼、1,2-二-二十二碳六烯醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼、1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亞油醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亞麻醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二-二十二碳六烯醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)鈉鹽(DOPG)、鞘磷脂及其混合物。

【0516】 在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為 DSPC 之類似物或變異體。在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為式(IV)化合物：



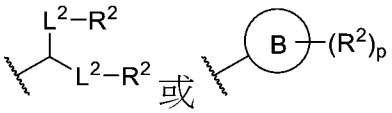
(IV)，

或其鹽，其中：

各 R1 獨立地為視情況經取代之烷基；或視情況兩個 R1 與間插原子連接在一起以便形成視情況經取代之單環碳環基或視情況經取代之單環雜環基；或視情況三個R1與間插原子連接在一起以便形成視情況經取代之雙環碳環基或視情況經取代之雙環雜環基；

n 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10；

m 為 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10；

A 為式：  ；

L2 之各實例獨立地為鍵或視情況經取代之 C1-6 伸烷基，其中視情況經取代之 C1-6 伸烷基之一個亞甲基單元視情況用 O、N(RN)、S、C(O)、C(O)N(RN)、

NRNC(O)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、或NRNC(O)N(RN)來置換；

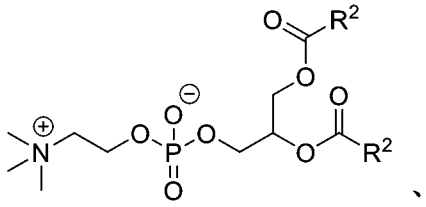
R2之各實例獨立地為視情況經取代之C1-30烷基、視情況經取代之C1-30烯基、或視情況經取代之C1-30炔基；視情況其中R2之一或多個亞甲基單元獨立地用以下各者來置換：視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、N(RN)、O、S、C(O)、C(O)N(RN)、NRNC(O)、NRNC(O)N(RN)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、C(O)S、SC(O)、C(=NRN)、C(=NRN)N(RN)、NRNC(=NRN)、NRNC(=NRN)N(RN)、C(S)、C(S)N(RN)、NRNC(S)、NRNC(S)N(RN)、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)2、S(O)2O、OS(O)2O、N(RN)S(O)、S(O)N(RN)、N(RN)S(O)N(RN)、OS(O)N(RN)、N(RN)S(O)O、S(O)2、N(RN)S(O)2、S(O)2N(RN)、N(RN)S(O)2N(RN)、OS(O)2N(RN)、或N(RN)S(O)2O；

RN之各實例獨立地為氫、視情況經取代之烷基、或氮保護基；

環B為視情況經取代之碳環基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、或視情況經取代之雜芳基；並且

p為1或2；

限制條件為化合物不為式：



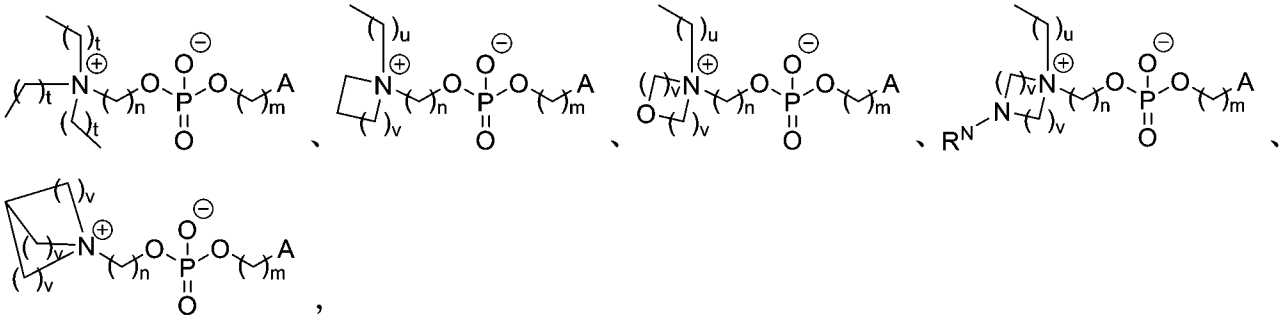
、

其中R2之各實例獨立地為未經取代烷基、未經取代烯基、或未經取代炔基。

【0517】　在一些實施例中，磷脂可為美國申請案第62/520,530號描述之磷脂中之一或多者。

i) 磷脂頭修飾

【0518】　在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含經修飾之磷脂頭(例如，經修飾之膽鹼基團)。在某些實施例中，具有經修飾之頭的磷脂為具有經修飾之四級胺的 DSPC、或其類似物。例如，在式(IV)之實施例中，R1 中之至少一者不為甲基。在某些實施例中，R1 中之至少一者不為氫或甲基。在某些實施例中，式(IV)化合物為以下式中之一者：



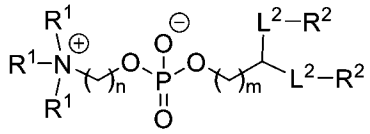
或其鹽，其中：

各 t 獨立地為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10；

各 u 獨立地為 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10；及

各 v 獨立地為 1、2、或 3。

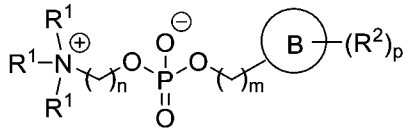
【0519】　在某些實施例中，式(IV)化合物為式(IV-a)：



(IV-a)，

或其鹽。

【0520】　在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含代替甘油酯部分之環狀部分。在某些實施例中，可用於本發明之磷脂為具有代替甘油酯部分之環狀部分的 DSPC、或其類似物。在某些實施例中，式(IV)化合物為式(IV-b)：



、

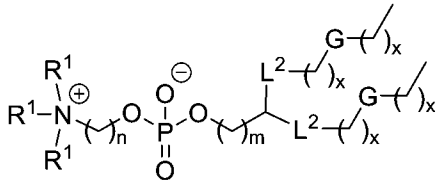
(IV-b)，

或其鹽。

(ii) 磷脂尾修飾

【0521】 在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含經修飾之尾。在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為具有經修飾之尾的DSPC、或其類似物。如本文所述，「經修飾尾」可為具有以下之尾：較短或較長脂族鏈、引入支鏈之脂族鏈、引入取代基之脂族鏈、一或多個亞甲基經環狀或雜原子基團置換之脂族鏈或其任何組合。例如，在某些實施例中，(IV)化合物為式(IV-a)、或其鹽，其中 R2 之至少一個實例為 R2 之各實例為視情況經取代之C1-30 烷基，其中 R2 之一或多個亞甲基單元獨立地用以下各者來置換：視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、N(RN)、O、S、C(O)、C(O)N(RN)、NRNC(O)、NRNC(O)N(RN)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、C(O)S、SC(O)、C(=NRN)、C(=NRN)N(RN)、NRNC(=NRN)、NRNC(=NRN)N(RN)、C(S)、C(S)N(RN)、NRNC(S)、NRNC(S)N(RN)、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)2、S(O)2O、OS(O)2O、N(RN)S(O)、S(O)N(RN)、N(RN)S(O)N(RN)、OS(O)N(RN)、N(RN)S(O)O、S(O)2、N(RN)S(O)2、S(O)2N(RN)、N(RN)S(O)2N(RN)、OS(O)2N(RN)、或 N(RN)S(O)2O。

【0522】 在某些實施例中，式(IV)化合物為式(IV-c)：



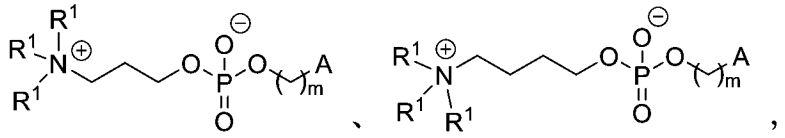
(IV-c)，

或其鹽，其中：

各 x 獨立地為 0-30 之間之整數，包括 0 及 30；且

G 之各實例獨立地選自由以下組成之群：視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、N(RN)、O、S、C(O)、C(O)N(RN)、NRNC(O)、NRNC(O)N(RN)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、C(O)S、SC(O)、C(=NRN)、C(=NRN)N(RN)、NRNC(=NRN)、NRNC(=NRN)N(RN)、C(S)、C(S)N(RN)、NRNC(S)、NRNC(S)N(RN)、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)2、S(O)2O、OS(O)2O、N(RN)S(O)、S(O)N(RN)、N(RN)S(O)N(RN)、OS(O)N(RN)、N(RN)S(O)O、S(O)2、N(RN)S(O)2、S(O)2N(RN)、N(RN)S(O)2N(RN)、OS(O)2N(RN)、或 N(RN)S(O)2O。各可能性代表本發明之一單獨實施例。

【0523】　在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含經修飾之磷酸膽鹼部分，其中將四級胺連接至磷醯基之烷基鏈不為伸乙基(例如，n 不為 2)。因此，在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為式(IV)化合物，其中 n 為 1、3、4、5、6、7、8、9、或 10。例如，在某些實施例中，式(IV)化合物為以下式中之一者：



或其鹽。

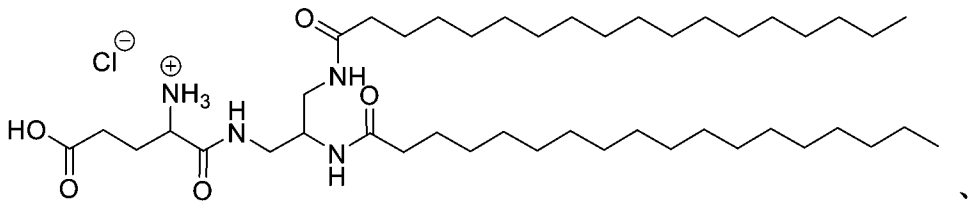
替代脂質

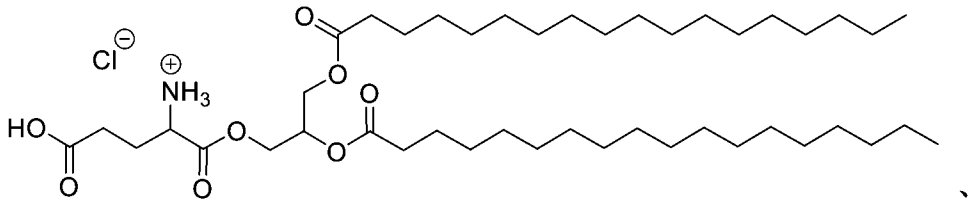
【0524】　在某些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含經修飾之磷酸膽鹼部分，其中將四級胺連接至磷醯基之烷基鏈不為伸乙基(例如，n 不為 2)。因此，在某些實施例中，磷脂可用。

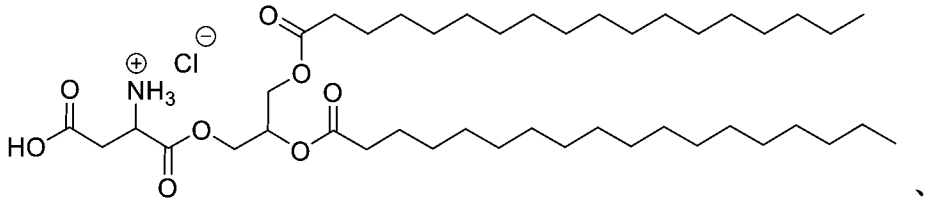
【0525】　在某些實施例中，替代脂質代替本揭示案之磷脂來使用。

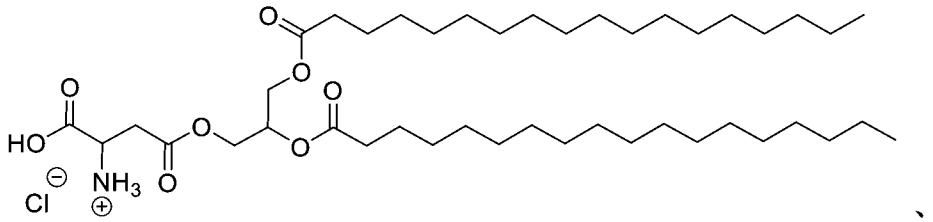
【0526】　在某些實施例中，本發明之替代脂質為油酸。

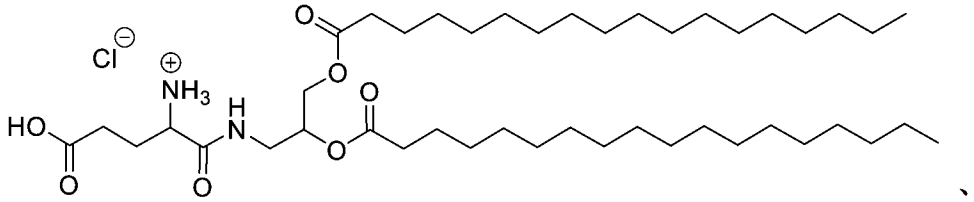
【0527】　在某些實施例中，替代脂質為以下中之一者：

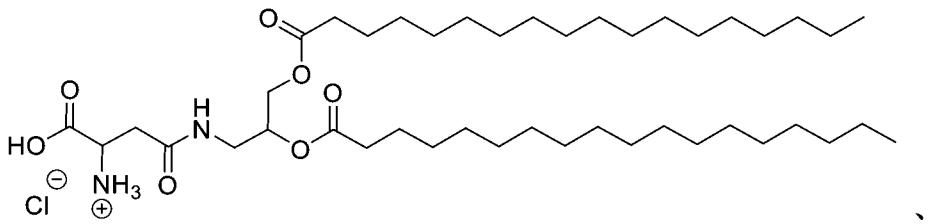
 、

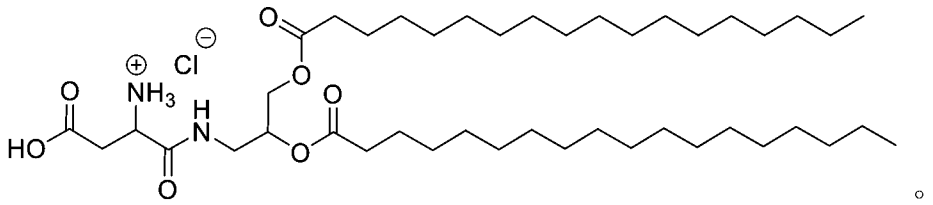
 、

 、

 、

 、

 、及

 。

結構脂質

【0528】　本文揭示之醫藥組成物之脂質組成物可包含一或多種結構脂質。如本文所用，術語「結構脂質」係指固醇且亦指含有固醇部分之脂質。

【0529】　在脂質奈米顆粒中併入結構脂質可能有助於減少其他脂質在顆粒中

聚集。結構脂質可選自包括但不限於膽固醇、糞固醇、植固醇、麥角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜子固醇、番茄鹼、番茄苷、熊果酸、α-生育酚、蒎烷、植物固醇、類固醇及其混合物之群。在一些實施例中，結構脂質為固醇。如本文所定義之「固醇」係由類固醇醇組成之類固醇之亞群。在某些實施例中，結構脂質為類固醇。在某些實施例中，結構脂質為膽固醇。在某些實施例中，結構脂質為膽固醇之類似物。在某些實施例中，結構脂質為 α-生育酚。

【0530】　在一些實施例中，結構脂質可為美國申請案第 62/520,530 號描述之結構脂質中之一或多者。

聚乙二醇(PEG)-脂質

【0531】　本文揭示之醫藥組成物之脂質組成物可包含一或多種聚乙二醇(PEG)脂質。

【0532】　如本文所用，術語「PEG-脂質」係指經聚乙二醇(PEG)修飾之脂質。PEG-脂質之非限制性實例包括 PEG 修飾之磷脂醯乙醇胺及磷脂酸、PEG-神經醯胺偶聯物(例如 PEG-CerC14 或 PEG-CerC20)、PEG 修飾之二烷基胺及 PEG 修飾之 1,2-二醯氧基丙-3-胺。此等脂質亦稱為聚乙二醇化脂質。舉例而言，PEG 脂質可為 PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC 或 PEG-DSPE 脂質。

【0533】　在一些實施例中，PEG-脂質包括但不限於 1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[胺基(聚乙二醇)] (PEG-DSPE)、PEG-二硬脂基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕櫚油基、PEG-二油基、PEG-二硬脂基、PEG-二醯基甘油醯胺(PEG-DAG)、PEG-二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(PEG-DPPE)或 PEG-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA)。

【0534】　在一個實施例中，PEG-脂質選自由經 PEG 修飾之磷脂醯乙醇胺、經

PEG 修飾之磷脂酸、經 PEG 修飾之神經醯胺、經 PEG 修飾之二烷基胺、經 PEG 修飾之二醯基甘油、經 PEG 修飾之二烷基甘油及其混合物組成之群。

【0535】 在一些實施例中，PEG-脂質之脂質部分包括具有約 C14 至約 C22、較佳約 C14 至約 C16 之長度的彼等脂質部分。在一些實施例中，PEG 部分，例如 mPEG-NH2，具有約 1000、2000、5000、10,000、15,000 或 20,000 道爾頓之大小。在一個實施例中，PEG-脂質為 PEG2k-DMG。

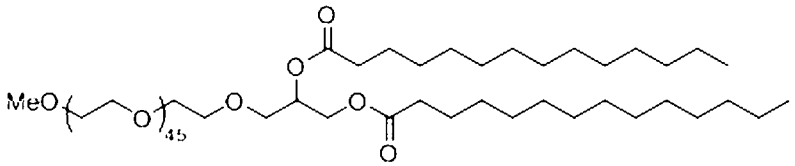
【0536】 在一個實施例中，本文所述之脂質奈米顆粒可包含 PEG 脂質，其為不可擴散 PEG。不可擴散 PEG 之非限制性實例包括 PEG-DSG 及 PEG-DSPE。

【0537】 PEG-脂質為此項技術中所已知，諸如美國專利第 8158601 號及國際公開案第 WO 2015/130584 A2 號中所描述之彼等 PEG-脂質，該等案件以引用之方式整體併入本文中。

【0538】 一般而言，本文所述之各式之一些其他脂質組分(例如 PEG 脂質)可如 2016 年 12 月 10 日提出申請之標題為「Compositions and Methods for Delivery of Therapeutic Agents」的國際專利申請案第 PCT/US2016/000129 號中所述般合成，該案以引用之方式整體併入。

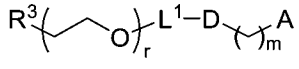
【0539】 脂質奈米顆粒組成物之脂質組分可包括一或多種包含聚乙二醇之分子，諸如 PEG 或 PEG 修飾之脂質。此等物質可替代地稱為聚乙二醇化脂質。PEG 脂質為經聚乙二醇修飾之脂質。PEG 脂質可選自包括以下之非限制性群：PEG 修飾之磷脂醯乙醇胺、PEG 修飾之磷脂酸、PEG 修飾之神經醯胺、PEG 修飾之二烷基胺、PEG 修飾之二醯基甘油、PEG 修飾之二烷基甘油及其混合物。舉例而言，PEG 脂質可為 PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC 或 PEG-DSPE 脂質。

【0540】 在一些實施例中，PEG 修飾之脂質為 PEG DMG 之經修飾形式。PEG-DMG 具有以下結構：



【0541】　在一個實施例中，可用於本發明之 PEG 脂質可為描述於國際公開案第 WO2012099755 號中的聚乙二醇化脂質，該案之內容以引用之方式整體併入本文中。本文所述之此等示例性 PEG 脂質中之任一者均可經修飾以在 PEG 鏈上包含羥基。在某些實施例中，PEG 脂質為 PEG-OH 脂質。如本文一般所定義，「PEG-OH 脂質」(本文中亦稱作「羥基-聚乙二醇化脂質」)係在脂質上具有一或多個羥基(-OH)之聚乙二醇化脂質。在某些實施例中，PEG-OH 脂質在 PEG 鏈上包括一或多個羥基。在某些實施例中，PEG-OH 或羥基-聚乙二醇化脂質在 PEG 鏈之末端包含-OH 基團。各可能性代表本發明之一單獨實施例。

【0542】　在某些實施例中，可用於本發明之 PEG 脂質為式(V)化合物。本文提供式(V)化合物：

 (V)，

或其鹽，其中：

R3 為-ORO；

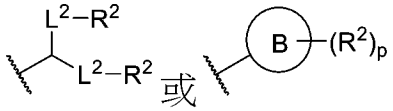
RO 為氫、視情況經取代之烷基或氧保護基；

r 為 1 與 100 之間之整數，包括 1 及 100；

L1 為視情況經取代之 C1-10 伸烷基，其中該視情況經取代之 C1-10 伸烷基之至少一個亞甲基獨立地經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、O、N(RN)、S、C(O)、C(O)N(RN)、NRNC(O)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、或 NRNC(O)N(RN)置換；

D 為藉由點擊化學獲得之部分或在生理條件下可裂解之部分；

m 為 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10；

A 為式：  ；

L2 之各實例獨立地為鍵或視情況經取代之 C1-6 伸烷基，其中視情況經取代之 C1-6 伸烷基之一個亞甲基單元視情況用 O、N(RN)、S、C(O)、C(O)N(RN)、NRNC(O)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、或 NRNC(O)N(RN)來置換；

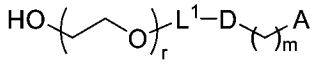
R2 之各實例獨立地為視情況經取代之 C1-30 烷基、視情況經取代之 C1-30 烯基、或視情況經取代之 C1-30 炔基；視情況其中 R2 之一或多個亞甲基單元獨立地用以下各者來置換：視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、N(RN)、O、S、C(O)、C(O)N(RN)、NRNC(O)、NRNC(O)N(RN)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、C(O)S、SC(O)、C(=NRN)、C(=NRN)N(RN)、NRNC(=NRN)、NRNC(=NRN)N(RN)、C(S)、C(S)N(RN)、NRNC(S)、NRNC(S)N(RN)、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)2、S(O)2O、OS(O)2O、N(RN)S(O)、S(O)N(RN)、N(RN)S(O)N(RN)、OS(O)N(RN)、N(RN)S(O)O、S(O)2、N(RN)S(O)2、S(O)2N(RN)、N(RN)S(O)2N(RN)、OS(O)2N(RN)、或 N(RN)S(O)2O；

RN 之各實例獨立地為氫、視情況經取代之烷基、或氮保護基；

環 B 為視情況經取代之碳環基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、或視情況經取代之雜芳基；並且

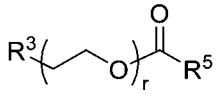
p 為 1 或 2。

【0543】 在某些實施例中，式(V)化合物為 PEG-OH 脂質(亦即，R3 為-ORO，且 RO 為氫)。在某些實施例中，式(V)化合物為式(V-OH)：

 (V-OH)，

或其鹽。

【0544】　在某些實施例中，可用於本發明之 PEG 脂質為聚乙二醇化脂肪酸。在某些實施例中，可用於本發明之 PEG 脂質為式(VI)化合物。本文提供式(VI)化合物：


(VI)，

或其鹽，其中：

R3 為-ORO；

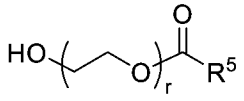
RO 為氫、視情況經取代之烷基或氧保護基；

r 為 1 與 100 之間之整數，包括 1 及 100；

R5 為視情況經取代之 C10-40 烷基、視情況經取代之 C10-40 烯基或視情況經取代之 C10-40 炔基；且視情況 R5 之一或多個亞甲基經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、N(RN)、O、S、C(O)、C(O)N(RN)、NRNC(O)、NRNC(O)N(RN)、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(RN)、NRNC(O)O、C(O)S、SC(O)、C(=NRN)、C(=NRN)N(RN)、NRNC(=NRN)、NRNC(=NRN)N(RN)、C(S)、C(S)N(RN)、NRNC(S)、NRNC(S)N(RN)、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)2、S(O)2O、OS(O)2O、N(RN)S(O)、S(O)N(RN)、N(RN)S(O)N(RN)、OS(O)N(RN)、N(RN)S(O)O、S(O)2、N(RN)S(O)2、S(O)2N(RN)、N(RN)S(O)2N(RN)、OS(O)2N(RN)、或 N(RN)S(O)2O 置換；且

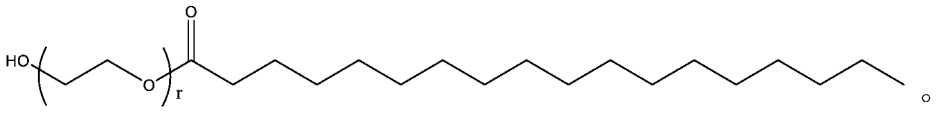
RN 之各實例獨立地為氫、視情況經取代之烷基、或氮保護基.

【0545】　在某些實施例中，式(VI)化合物為式(VI-OH)：


(VI-OH)，

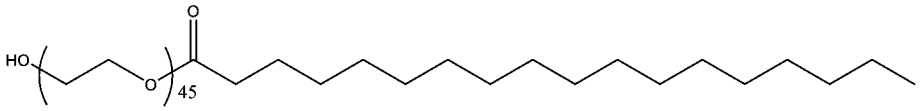
或其鹽。在一些實施例中，r 為 45。

【0546】　在其他實施例中，式(VI)化合物為：



或其鹽。

【0547】　在一個實施例中，式(VI)化合物為



(化合物 I)。

【0548】　在一些態樣中，本文揭示之醫藥組成物之脂質組成物不包含 PEG-脂質。

【0549】　在一些實施例中，PEG-脂質可為描述於美國申請案第 62/520,530 號中之一或多種 PEG 脂質。

【0550】　在一些實施例中，本發明之 PEG 脂質包含 PEG 修飾之磷脂醯乙醇胺、PEG 修飾之磷脂酸、PEG 修飾之神經醯胺、PEG 修飾之二烷基胺、PEG 修飾之二醯基甘油、PEG 修飾之二烷基甘油及其混合物。在一些實施例中，PEG 修飾之脂質為 PEG-DMG、PEG-c-DOMG (亦稱為 PEG-DOMG)、PEG-DSG 及/或 PEG-DPG。

【0551】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含式 I、II 或 III 中之任一者之可電離陽離子脂質、包含 DSPC 之磷脂、結構脂質及包含 PEG-DMG 之 PEG 脂質。

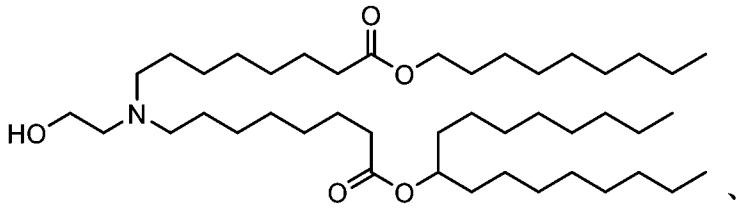
【0552】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含式 I、II 或 III 中之任一者之可電離陽離子脂質、包含 DSPC 之磷脂、結構脂質及包含具有式 VI 之化合物之 PEG 脂質。

【0553】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含式 I、II 或 III 之可電離陽離子脂質、包含具有式 IV 之化合物之磷脂、結構脂質及包含具有式 V 或 VI 之化合物之 PEG 脂質。

【0554】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含式 I、II 或 III 之可電離陽離子脂質、包含具有式 IV 之化合物之磷脂、結構脂質及包含具有式 V 或 VI 之化合物之 PEG 脂質。

【0555】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含式 I、II 或 III 之可電離陽離子脂質、具有式 IV 之之磷脂、結構脂質及包含具有式 VI 之化合物之 PEG 脂質。

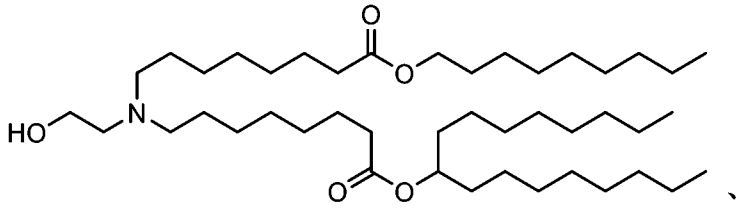
【0556】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含可電離陽離子脂質



、

及包含式 VI 之 PEG 脂質。

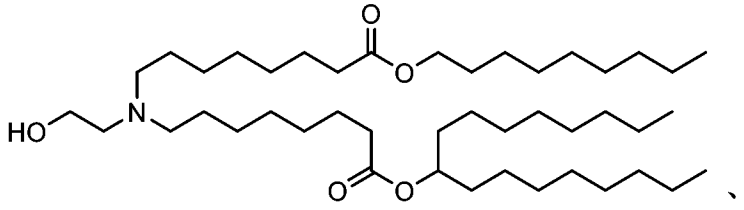
【0557】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含可電離陽離子脂質



、

及包含油酸之替代脂質。

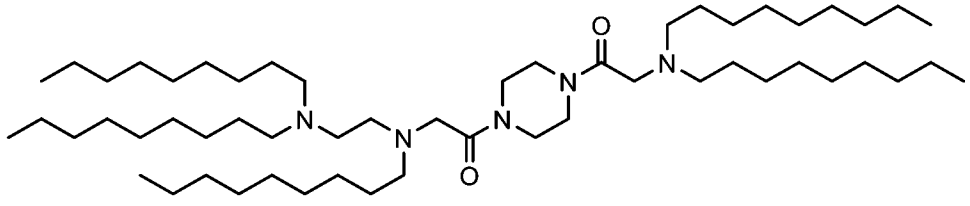
【0558】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含可電離陽離子脂質



、

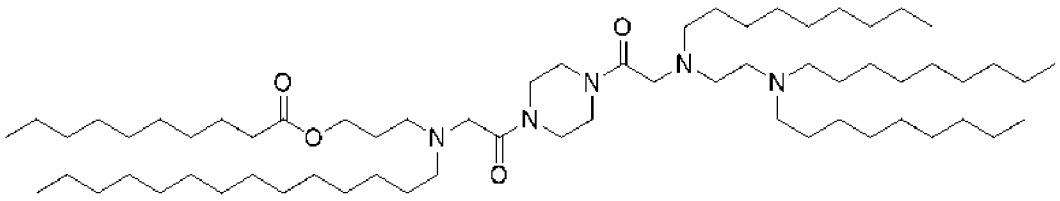
包含油酸之替代脂質、包含膽固醇之結構脂質，及包含具有式 VI 之化合物之 PEG 脂質。

【0559】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含可電離陽離子脂質



包含 DOPE 之磷脂、包含膽固醇之結構脂質、及包含具有式 VI 之化合物之 PEG 脂質。

【0560】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含可電離陽離子脂質



、

包含 DOPE 之磷脂、包含膽固醇之結構脂質、及包含具有式 VI 之化合物之 PEG 脂質。

【0561】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含約 2:1 至約 30:1 之 N:P 比率。

【0562】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含約 6:1 之 N:P 比率。

【0563】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含約 3:1 之 N:P 比率。

【0564】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含約 10:1 至約 100:1 的可電離陽離子脂質組分與 RNA 之 wt/wt 比率。

【0565】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含約 20:1 的可電離陽離子脂質組分與 RNA 之 wt/wt 比率。

【0566】　在一些實施例中，本發明之 LNP 包含約 10:1 的可電離陽離子脂質組分與 RNA 之 wt/wt 比率。

【0567】　在一些實施例中，本發明之 LNP 具有約 50nm 至約 150nm 之平均直徑。

【0568】　在一些實施例中，本發明之 LNP 具有約 70nm 至約 120nm 之平均直徑。

【0569】　如本文所用，術語「烷基(alkyl)」、「烷基(alkyl group)」或「伸烷基」意謂包括一或多個碳原子(例如，一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、十六個、十七

個、十八個、十九個、二十個或二十個以上碳原子)之直鏈或分支鏈、飽和烴，其視情況經取代。注記「C1-14 烷基」意謂視情況經取代之包括 1-14 個碳原子之直鏈或分支鏈、飽和烴。除非另外規定，否則本文所述之烷基係指未經取代及經取代烷基。

【0570】　如本文所用，術語「烯基(alkenyl)」、「烯基(alkenyl group)」或「伸烯基」意謂包括兩個或更多個碳原子(例如，兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、十六個、十七個、十八個、十九個、二十個或二十個以上碳原子)及至少一個雙鍵之直鏈或分支鏈烴，其視情況經取代。注記「C2-14 烯基」意謂視情況經取代之包括 2-14 個碳原子及至少一個碳-碳雙鍵之直鏈或分支鏈烴。烯基可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上碳-碳雙鍵。例如，C18 烯基可包括一或多個雙鍵。包括兩個雙鍵之 C18 烯基可為亞油醯基。除非另外規定，否則本文所述之烯基係指未經取代及經取代烯基。

【0571】　如本文所用，術語「炔基(alkynyl)」、「炔基(alkynyl group)」或「伸炔基」意謂包括兩個或更多個碳原子(例如，兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、十六個、十七個、十八個、十九個、二十個或二十個以上碳原子)及至少一個碳-碳參鍵之直鏈或分支鏈烴，其視情況經取代。注記「C2-14 炔基」意謂視情況經取代之包括 2-14 個碳原子及至少一個碳-碳參鍵之直鏈或分支鏈烴。炔基可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上碳-碳參鍵。例如，C18 炔基可包括一或多個碳-碳參鍵。除非另外規定，否則本文所述之炔基係指未經取代及經取代炔基。

【0572】　如本文所用，術語「碳環(carbocycle)」或「碳環基(carbocyclic group)」意謂視情況經取代之包括一或多個碳原子環之單環或多環系統。環可為三員、四員、五員、六員、七員、八員、九員、十員、十一員、十二員、十三員、十四員、

十五員、十六員、十七員、十八員、十九員或二十員環。注記「C3-6 碳環」意謂包括具有 3-6 個碳原子之單環的碳環。碳環可包括一或多個碳-碳雙鍵或參鍵且可為非芳族的或芳族的(例如，環烷基或芳基)。碳環之實例包括環丙基、環戊基、環己基、苯基、萘基及 1,2-二氫萘基。如本文所用，術語「環烷基」意謂非芳族碳環且可或可不包括任何雙鍵或參鍵。除非另外規定，否則本文所述之碳環係指未經取代及經取代碳環基，亦即視情況經取代之碳環。

【0573】　如本文所用，術語「雜環(heterocycle)」或「雜環基(heterocyclic group)」意謂視情況經取代之包括一或多個環之單環或多環系統，其中至少一個環包括至少一個雜原子。雜原子可為例如氮、氧或硫原子。環可為三員、四員、五員、六員、七員、八員、九員、十員、十一員、十二員、十三員或十四員環。雜環可包括一或多個雙鍵或參鍵且可為非芳族的或芳族的(例如，雜環烷基或雜芳基)。雜環之實例包括咪唑基、咪唑啶基、噁唑基、噁唑啶基、噻唑基、噻唑啶基、吡唑啶基、吡唑基、異噁唑啶基、異噁唑基、異噻唑啶基、異噻唑基、嗎啉基、吡咯基、吡咯啶基、呋喃基、四氫呋喃基、噻吩基、吡啶基、六氫吡啶基、喹啉基及異喹啉基。如本文所用，術語「雜環烷基」意謂非芳族雜環且可或可不包括任何雙鍵或參鍵。除非另外規定，否則本文所述之雜環係指未經取代及經取代雜環基，亦即視情況經取代之雜環。

【0574】　如本文所用，術語「雜烷基」、「雜烯基」或「雜炔基」分別指如本文所定義之烷基、烯基、炔基，其進一步包含一或多個(例如，1、2、3 或 4 個)雜原子(例如，氧、硫、氮、硼、矽、磷)，其中一或多個雜原子插入母體碳鏈內之相鄰碳原子之間且/或一或多個雜原子插入碳原子與母體分子之間，亦即在附接點之間。除非另外規定，否則本文所述之雜烷基、雜烯基、或雜炔基係指未經取代及經取代雜烷基、雜烯基、或雜炔基，亦即，視情況經取代之雜烷基、雜烯基、或雜炔基。

【0575】 如本文所用，「生物可降解基團」係可促進哺乳動物實體中之脂質的更快速代謝之基團。生物可降解基團可選自由但不限於-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)2-、芳基及雜芳基組成之群。如本文所用，「芳基」係視情況經取代之包括一或多個芳環之碳環基。芳基之實例包括苯基及萘基。如本文所用，「雜芳基」係視情況經取代之包括一或多個芳環之雜環基。雜芳基之實例包括吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基及噻唑基。芳基及雜芳基均可視情況經取代。例如，M 及 M'可選自由視情況經取代之苯基、噁唑、及噻唑組成之非限制性群。在本文中之各式中，M 及 M'可獨立地選自上文生物可降解基團之清單。除非另外規定，否則本文所述之芳基或雜芳基係指未經取代及經取代基團，亦即視情況經取代之芳基或雜芳基。

【0576】 除非另外規定，否則烷基、烯基及環基(例如碳環基及雜環基)可視情況經取代。視情況選用之取代基可選自由但不限於鹵素原子(例如，氯化物、溴化物、氟化物或碘化物基團)、羧酸(例如 C(O)OH)、醇(例如羥基、OH)、酯(例如 C(O)OR OC(O)R)、醛(例如 C(O)H)、羰基(例如 C(O)R，或者由 C=O 表示)、醯基鹵(例如-C(O)X，其中 X 係選自溴化物、氟化物、氯化物及碘化物之鹵化物)、碳酸酯(例如 OC(O)OR)、烷氧基(例如 OR)、縮醛(例如-C(OR)2R""，其中各 OR 係可相同或不同之烷氧基且 R""為烷基或烯基)、磷酸酯(例如 P(O)43-)、硫醇(例如 SH)、亞碸(例如 S(O)R)、亞磺酸(例如 S(O)OH)、磺酸(例如 S(O)2OH)、硫醛(例如 C(S)H)、硫酸酯(例如 S(O)42-)、磺醯基(例如 S(O)2)、醯胺(例如 C(O)NR2 或 N(R)C(O)R)、疊氮基(例如 N3)、硝基(例如 NO2)、氰基(例如 CN)、異氰基(例如 NC)、醯氧基(例如 OC(O)R)、胺基(例如 NR2、NRH 或 NH2)、胺甲醯基(例如 OC(O)NR2、OC(O)NRH 或 OC(O)NH2)、磺醯胺(例如 S(O)2NR2、S(O)2NRH、S(O)2NH2、N(R)S(O)2R、N(H)S(O)2R、N(R)S(O)2H 或 N(H)S(O)2H)、烷基、烯

基及環基(例如，碳環基或雜環基)組成之群。在前述任一者中，R 係如本文所定義之烷基或烯基。在一些實施例中，取代基本身本身可進一步經例如本文所定義之一個、兩個、三個、四個、五個或六個取代基取代。例如，C1-6 烷基可進一步經本文所述之一個、兩個、三個、四個、五個或六個取代基取代。

【0577】 含氮之本揭示案化合物可藉由用氧化劑(例如 3-氯過氧基苯甲酸(mCPBA)及/或過氧化氫)處理而轉化為 N-氧化物以提供其他本揭示案化合物。因此，當價態及結構允許時，所有所顯示且主張之含氮化合物均被視為包括如所示之化合物及其 N-氧化物衍生物(其可經指定為 N→O 或 N+-O-)。此外，在其他情況下，本揭示案化合物中之氮可轉化為 N-羥基或 N-烷氧基化合物。例如，N-羥基化合物可藉由利用諸如 m CPBA 之氧化劑氧化母體胺來製備。當價態及結構允許時，所有所顯示且主張之含氮化合物亦被視為涵蓋如所示之化合物及其 N-羥基(亦即 N-OH)及 N-烷氧基(亦即 N-OR，其中 R 為經取代或未經取代 C1-C6 烷基、C1-C6 烯基、C1-C6 炔基、3-14 員碳環或 3-14 員雜環)衍生物。

mRNA-脂質加合物

【0578】 已確定某些可電離脂質易形成脂質-多核苷酸加合物。具體而言，包含三級胺基之可電離脂質可分解成二級胺及反應性醛物質中之一者或二者，該二級胺及反應性醛物質能夠與多核苷酸(諸如 mRNA)相互作用，以形成可電離脂質-多核苷酸加合物雜質，該雜質可藉由反相離子對層析(RP-IP HPLC)偵測。舉例而言，三級胺之氧化可能導致 N-氧化物形成，該 N-氧化物形成可經歷胺處之酸/鹼催化之水解，以生成可與 mRNA 形成加合物之醛及二級胺。因此，在一些態樣中，可電離脂質-多核苷酸加合物雜質為醛-mRNA 加合物雜質。

【0579】 亦已確定該等加合物可破壞 mRNA 轉譯且影響脂質奈米顆粒(LNP)調配之 mRNA 產物之活性。因此，製備及使用具有降低之可電離脂質-多核苷酸加合物雜質含量之 LNP 組成物可能有利，諸如其中小於約 20%、小於約 10%、

小於約 5%或小於約 1%之 mRNA 呈可電離脂質-多核苷酸加合物雜質形式，如可藉由 RP-IP HPLC 量測。因此，根據一些態樣，提供一種 LNP 組成物，其中小於約 10%、小於約 5%或小於約 1%之 mRNA 呈可電離脂質-多核苷酸加合物雜質形式，包括小於 10%、小於 5%或小於 1%，如可藉由 RP-IP HPLC 量測。

【0580】 在一些態樣中，組成物中脂質醛之量小於約 50 ppm，包括小於 50 ppm。另外或替代地，在一些態樣中，組成物中 N-氧化物化合物之量小於約 50 ppm，包括小於 50 ppm。另外或替代地，在一些態樣中，組成物中過渡金屬(諸如 Fe)之量小於約 50 ppm，包括小於 50 ppm。另外或替代地，在一些態樣中，組成物中烷基鹵化合物之量小於約 50 ppm，包括小於 50 ppm。另外或替代地，在一些態樣中，組成物中酐化合物之量小於約 50 ppm，包括小於 50 ppm。另外或替代地，在一些態樣中，組成物中酮化合物之量小於約 50 ppm，包括小於 50 ppm。另外或替代地，在一些態樣中，組成物中偶聯二烯化合物之量小於約 50 ppm，包括小於 50 ppm。

【0581】 在一些態樣中，組成物對於可電離脂質-多核苷酸加合物雜質之形成係穩定的。在一些態樣中，當在約 25℃或低於 25℃之溫度下儲存時，組成物中可電離脂質-多核苷酸加合物雜質之量以每天小於約 2%之平均速率(包括以每天小於 2%之平均速率)增加。在一些態樣中，當在約 5℃或低於 5℃之溫度下儲存時，組成物中可電離脂質-多核苷酸加合物雜質之量以每天小於約 0.5%之平均速率(包括以每天小於 0.5%之平均速率)增加。在一些態樣中，當在冷藏溫度(視情況其中冷藏溫度為約 5℃)下儲存時，組成物中可電離脂質-多核苷酸加合物雜質之量以每天小於約 0.5%之平均速率增加。

【0582】 可藉由抑制 N-氧化物及醛中之一者或二者形成之方法製備具有降低之可電離脂質-多核苷酸加合物雜質含量的脂質載體(例如 LNP)組成物。該等方法可包括諸如藉由以下方式處理包含包括三級胺基之可電離脂質之組成物，以

抑制 N-氧化物及醛中之一者或兩者之形成：用還原劑處理該組成物；用螯合劑處理該組成物；調整該組成物之 pH 值；調整該組成物之溫度；及調整該組成物中之緩衝液。該等方法可包括在將可電離脂質與多核苷酸合併之前，實施以下各項中之一或多者：用清除劑處理可電離脂質；用還原處理劑處理可電離脂質；用還原劑處理可電離脂質；用螯合劑處理可電離脂質；用還原劑處理多核苷酸；及用螯合劑處理多核苷酸。

【0583】　根據前述中之任一者，清除劑、還原處理劑及/或還原劑可為與醛、酮、酐及/或二烯化合物反應之劑。清除劑可包含選自以下中之一或多者：(O-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羥基胺鹽酸鹽) (PFBHA)、甲氧基胺(例如，甲氧基胺鹽酸鹽)、苄氧基胺(例如，苄氧基胺鹽酸鹽)、乙氧基胺(例如，乙氧基胺鹽酸鹽)、4-[2-(胺基氧基)乙基]嗎啉二鹽酸鹽、丁氧基胺(例如，第三丁氧基胺鹽酸鹽)、4-二甲基胺基吡啶(DMAP)、1,4-二氮雜二環[2.2.2]辛烷(DABCO)、三乙胺(TEA)、六氫吡啶 4-甲酸酯(BPPC)及其組合。還原處理劑可包含硼化合物(*例如*硼氫化鈉及/或雙(頻哪醇基)二硼)。還原處理劑可包含硼化合物，諸如硼氫化鈉及雙(頻哪醇基)二硼)中之一者或二者。螯合劑可包含固定化亞胺基二乙酸。還原劑可包含固定化還原劑，諸如二氧化矽上之固定化二苯基膦(Si-DPP)、瓊脂糖上之固定化硫醇(Ag-硫醇)、二氧化矽上之固定化半胱胺酸(Si-半胱胺酸)、二氧化矽上之固定化硫醇(Si-硫醇)或其組合。還原劑可包含游離還原劑，諸如偏亞硫酸氫鉀、巰基乙酸鈉、參(2-羧乙基)膦(TCEP)、硫代硫酸鈉、N-乙醯半胱胺酸、麩胱甘肽、二硫蘇糖醇(DTT)、胱胺、二硫赤蘚糖醇(DTE)、二氯二苯基三氯乙烷(DDT)、高半胱胺酸、硫辛酸或其組合。

【0584】　根據前述中之任一者，pH 值可為或調整為約 7 至約 9 之 pH 值。

【0585】　根據前述中之任一者，緩衝液可選自磷酸鈉、檸檬酸鈉、琥珀酸鈉、組胺酸、組胺酸-HCl、蘋果酸鈉、碳酸鈉及 TRIS (參(羥甲基)胺基甲烷)。根據前

述中之任一者，緩衝液可為 TRIS，且可為或調整為約 20 mM 至約 150 mM TRIS。

【0586】　根據前述中之任一者，組成物之溫度可為或調整為 25℃或更小。

【0587】　該組合物亦可包含游離還原劑或抗氧化劑。

16. 示例性額外 LNP 組分

界面活性劑

【0588】　在某些實施例中，本揭示案之脂質奈米顆粒視情況包括一或多種界面活性劑。

【0589】　在某些實施例中，界面活性劑為兩親性聚合物。如本文所用，兩親性「聚合物」係包含寡聚物或聚合物之兩親性化合物。

【0590】　例如，兩親性聚合物可包含寡聚物片段，諸如兩個或更多個 PEG 單體單元。例如，本文所述之兩親性聚合物可為 PS 20。

【0591】　例如，兩親性聚合物為嵌段共聚物。

【0592】　例如，兩親性聚合物為凍乾保護劑。

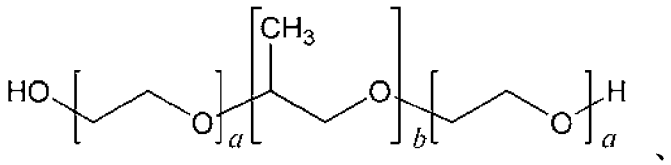
【0593】　例如，在約 30℃及大氣壓下，兩親性聚合物在水中具有小於 2 x10-4 M 之臨界膠束濃度(CMC)。

【0594】　例如，在約 30℃及大氣壓下，兩親性聚合物在水中具有約 0.1 $x10^{-4}$ M 與約 1.3 $x10^{-4}$ M 之間之範圍內的臨界膠束濃度(CMC)。

【0595】　例如，在冷凍或凍乾之前，*例如*調配物中之兩親性聚合物之濃度在約其 CMC 與約 30 倍之 CMC (*例如*，其 CMC 之多達約 25 倍、約 20 倍、約 15 倍、約 10 倍、約 5 倍、或約 3 倍)之間的範圍內。

【0596】　例如，兩親性聚合物選自泊洛沙姆(Pluronic®)、泊洛沙胺(Tetronic®)、聚氧乙烯二醇山梨醇酐烷基酯(聚山梨醇酯)及聚乙烯基吡咯啶酮(PVP)。

【0597】　例如，兩親性聚合物為泊洛沙姆。例如，兩親性聚合物為以下結構：



其中 a 為 10 與 150 之間之整數並且 b 為 20 與 60 之間之整數。例如，a 為約 12 並且 b 為約 20，或 a 為約 80 並且 b 為約 27，或 a 為約 64 並且 b 為約 37，或 a 為約 141 並且 b 為約 44，或 a 為約 101 並且 b 為約 56。

【0598】　例如，兩親性聚合物為 P124、P188、P237、P338、或 P407。

【0599】　例如，兩親性聚合物為 P188 (*例如*，泊洛沙姆 188，CAS 編號 9003-11-6，亦稱為 Kolliphor P188)。

【0600】　例如，兩親性聚合物為泊洛沙胺，*例如*，tetronic 304 或 tetronic 904。

【0601】　例如，兩親性聚合物為聚乙烯吡咯啶酮(PVP)，諸如具有 3 kDa、10 kDa、或 29 kDa 之分子量的 PVP。

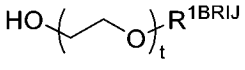
【0602】　例如，兩親性聚合物為聚山梨醇酯，諸如 PS 20。

【0603】　在某些實施例中，界面活性劑為非離子界面活性劑。

【0604】　在一些實施例中，脂質奈米顆粒包含界面活性劑。在一些實施例中，界面活性劑為兩親性聚合物。在一些實施例中，界面活性劑為非離子界面活性劑。

【0605】　例如，非離子界面活性劑選自由以下組成之群：聚乙二醇醚(Brij)、泊洛沙姆、聚山梨醇酯、山梨醇酐、及其衍生物。

【0606】　例如，聚乙二醇醚為式(VIII)化合物：


(VIII)，

或其鹽或異構物，其中：

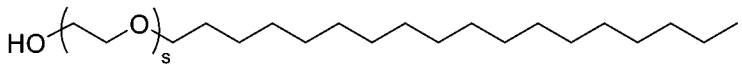
t 為 1 與 100 之間之整數；

R^{1BRIJ} 獨立地為 C_{10-40} 烷基、C_{10-40} 烯基、或 C_{10-40} 炔基；並且視情況 R^{5PEG} 之一或

多個亞甲基獨立地用以下各者來置換：C_{3-10}伸碳環基、4至10員伸雜環基、C_{6-10}伸芳基、4至10員伸雜芳基、-$N(R^N)$-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)$N(R^N)$-、-$NR^NC(O)$-、-$NR^NC(O)N(R^N)$-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)$N(R^N)$-、-$NR^NC(O)O$-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)$N(R^N)$-、-$NR^NC(=NR^N)$-、-$NR^NC(=NR^N)N(R^N)$-、-C(S)-、-C(S)$N(R^N)$-、-$NR^NC(S)$-、-$NR^NC(S)N(R^N)$-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-$OS(O)_2$-、-$S(O)_2O$-、-$OS(O)_2O$-、-$N(R^N)S(O)$-、-S(O)$N(R^N)$-、-$N(R^N)S(O)N(R^N)$-、-OS(O)$N(R^N)$-、-$N(R^N)S(O)O$-、-$S(O)_2$-、-$N(R^N)S(O)_2$-、-$S(O)_2N(R^N)$-、-$N(R^N)S(O)_2N(R^N)$-、-$OS(O)_2N(R^N)$-、或-$N(R^N)S(O)_2O$-；及

R^N之各實例獨立地為氫、C_{1-6}烷基、或氮保護基

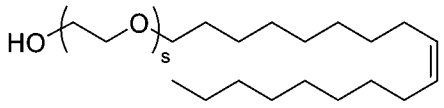
【0607】　在一些實施例中，R^{1BRIJ}為C_{18}烷基。例如，聚乙二醇醚為式(VIII-a)化合物：



(VIII-a)，

或其鹽或異構物。

【0608】　在一些實施例中，R^{1BRIJ}為C_{18}烯基。例如，聚乙二醇醚為式(VIII-b)化合物：



(VIII-b)，

或其鹽或異構物

【0609】　在一些實施例中，泊洛沙姆選自由以下組成之群：泊洛沙姆101、泊洛沙姆105、泊洛沙姆108、泊洛沙姆122、泊洛沙姆123、泊洛沙姆124、泊洛沙姆181、泊洛沙姆182、泊洛沙姆183、泊洛沙姆184、泊洛沙姆185、泊洛沙姆188、泊洛沙姆212、泊洛沙姆215、泊洛沙姆217、泊洛沙姆231、泊洛沙姆234、泊洛沙姆235、泊洛沙姆237、泊洛沙姆238、泊洛沙姆282、泊洛沙姆284、

泊洛沙姆 288、泊洛沙姆 331、泊洛沙姆 333、泊洛沙姆 334、泊洛沙姆 335、泊洛沙姆 338、泊洛沙姆 401、泊洛沙姆 402、泊洛沙姆 403、及泊洛沙姆 407。

【0610】 在一些實施例中，聚山梨醇酯為 Tween® 20、Tween® 40、Tween® 60、或 Tween® 80。

【0611】 在一些實施例中，山梨醇酐之衍生物為 Span® 20、Span® 60、Span® 65、Span® 80、或 Span® 85。

【0612】 在一些實施例中，脂質奈米顆粒中之非離子界面活性劑之濃度在約 0.00001 % w/v 至約 1 % w/v，*例如*，約 0.00005 % w/v 至約 0.5 % w/v，或約 0.0001 % w/v 至約 0.1 % w/v 範圍內。

【0613】 在一些實施例中，脂質奈米顆粒中之非離子界面活性劑之濃度在約 0.000001 wt%至約 1 wt%，*例如*，約 0.000002 wt%至約 0.8 wt%，或約 0.000005 wt%至約 0.5 wt%範圍內。

【0614】 在一些實施例中，脂質奈米顆粒中之 PEG 脂質之濃度在約 0.01 莫耳%至約 50 莫耳%，*例如*，約 0.05 莫耳%至約 20 莫耳%、約 0.07 莫耳%至約 10 莫耳%、約 0.1 莫耳%至約 8 莫耳%、約 0.2 莫耳%至約 5 莫耳%、或約 0.25 莫耳%至約 3 莫耳%範圍內。

佐劑

【0615】 在一些實施例中，本發明之 LNP 視情況包括一或多種佐劑，*例如*哌喃葡萄糖基脂質佐劑(GLA)、CpG 寡去氧核苷酸(*例如* A 或 B 類)、聚(I:C)、氫氧化鋁及 Pam3CSK4。

其他組分

【0616】 本發明之 LNP 可視情況包括除了前述部分描述之彼等以外的一或多種組分。例如，脂質奈米顆粒可包括一或多種較小疏水性分子諸如維生素(*例如*，維生素 A 或維生素 E)或固醇。

【0617】　脂質奈米顆粒亦可包括一或多種滲透性增強劑分子、碳水化合物、聚合物、表面改變劑、或其他組分。滲透性增強劑分子可為例如美國專利申請公開案第 2005/0222064 號所述之分子。碳水化合物可包括單糖(*例如*葡萄糖)及多醣(*例如*糖原及其衍生物及類似物)。

【0618】　聚合物可包括於脂質奈米顆粒中及/或用於囊封或部分地囊封脂質奈米顆粒。聚合物可為生物可降解的及/或生物相容性的。聚合物可選自但不限於聚胺、聚醚、聚醯胺、聚酯、聚胺基甲酸酯(polycarbamate)、聚脲、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚醯亞胺、聚碸、聚胺基甲酸酯(polyurethane)、聚乙炔、聚乙烯、聚乙烯亞胺、聚異氰酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈及聚丙烯酸酯。在一些實施例中，聚合物可包括聚(己內酯) (PCL)、乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA)、聚(乳酸) (PLA)、聚(L-乳酸) (PLLA)、聚(乙醇酸) (PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸) (PLLGA)、聚(D,L-丙交酯) (PDLA)、聚(L-丙交酯) (PLLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己內酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己內酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PPO-共-D,L-丙交酯)、聚氰基丙烯酸烷酯、聚胺基甲酸酯、聚-L-離胺酸(PLL)、甲基丙烯酸羥基丙酯(HPMA)、聚乙二醇、聚-L-麩胺酸、聚(羥基酸)、聚酐、聚原酸酯、聚(酯醯胺)、聚醯胺、聚(酯醚)、聚碳酸酯、聚伸烷基(諸如聚乙烯及聚丙烯)、聚伸烷基二醇(諸如聚(乙二醇) (PEG))、聚氧化烯(PEO)、聚伸烷基對苯二甲酸酯(諸如聚(對苯二甲酸乙二酯))、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醚、聚乙烯酯(諸如聚(乙酸乙烯酯))、聚鹵化乙烯(諸如聚(氯乙烯) (PVC))、聚乙烯吡咯啶酮(PVP)、聚矽氧烷、聚苯乙烯、聚胺基甲酸酯、衍生化纖維素(諸如烷基纖維素、羥基烷基纖維素、纖維素醚、纖維素酯、硝基纖維素、羥基丙基纖維素、羧基甲基纖維素)、丙烯酸聚合物(諸如聚((甲基)丙烯酸甲酯) (PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸異丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸

異癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸異丙酯)、聚(丙烯酸異丁酯)、聚(丙烯酸十八烷酯)及其共聚物及混合物)、聚二噁烷酮及其共聚物、聚羥基烷酸酯、聚丙烯富馬酸酯、聚甲醛、泊洛沙姆、泊洛沙胺、聚(原酸)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己內酯)、三亞甲基碳酸酯、聚(N-丙烯醯基嗎啉) (PAcM)、聚(2-甲基-2-噁唑啉) (PMOX)、聚(2-乙基-2-噁唑啉) (PEOZ)及聚甘油。

【0619】 表面改變劑可包括但不限於陰離子蛋白(例如牛血清白蛋白)、界面活性劑(例如陽離子界面活性劑，諸如二甲基二(十八烷基)-溴化銨)、糖或糖衍生物(例如環糊精)、核酸、聚合物(例如肝素、聚乙二醇及泊洛沙姆)、化痰劑(例如乙醯基半胱胺酸、艾蒿、菠羅蛋白酶、木瓜蛋白酶、大青屬(clerodendrum)、溴己新(bromhexine)、羧甲司坦(carbocisteine)、依普拉酮(eprazinone)、美司鈉(mesna)、胺溴索(ambroxol)、索布瑞醇(sobrerol)、多米奧醇(domiodol)、來托司坦(letosteine)、司替羅寧(stepronin)、硫普羅寧(tiopronin)、凝溶膠蛋白、胸腺素 β4、阿法鏈道酶(dornase alfa)、奈替克新(neltenexine)及厄多司坦(erdosteine))及 DNA 酶(例如 rhDNase)。表面改變劑可安置於奈米顆粒內及/或 LNP 之表面上(例如，藉由塗佈、吸附、共價連接或其他方法)。

【0620】 脂質奈米顆粒亦可包含一或多種官能化脂質。例如，脂質可用炔基官能化，該炔基在適當反應條件下暴露於疊氮化物時可進行環加成反應。詳言之，脂質雙層可以此方式經可用於促進膜滲透、細胞識別或成像之一或多種基團官能化。LNP 之表面亦可與一或多種可用抗體偶聯。可用於靶向細胞遞送、成像及膜滲透之官能基及偶聯物係此項技術中熟知的。

【0621】 除了此等組分以外，脂質奈米顆粒可包括可用於醫藥組成物中之任何物質。例如，脂質奈米顆粒可包括一或多種醫藥學上可接受之賦形劑或附屬成分，諸如但不限於一或多種溶劑、分散介質、稀釋劑、分散助劑、懸浮助劑、造

粒助劑、崩解劑、填充劑、助流劑、液體載體、黏合劑、表面活性劑、等張劑、增稠或乳化劑、緩衝劑、潤滑劑、油、防腐劑及其他物質。亦可包括諸如蠟、乳酪、著色劑、塗佈劑、調味劑及芳香劑之賦形劑。醫藥學上可接受之賦形劑係此項技術中熟知的(參見例如 Remington 之 The Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)。

【0622】 稀釋劑之實例可包括但不限於碳酸鈣、碳酸鈉、磷酸鈣、磷酸二鈣、硫酸鈣、磷酸氫鈣、磷酸鈉、乳糖、蔗糖、纖維素、微晶纖維素、高嶺土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化鈉、乾澱粉、玉米澱粉、粉糖及/或其組合。造粒劑及分散劑可選自由馬鈴薯澱粉、玉米澱粉、木薯澱粉、乙醇酸澱粉鈉、黏土、褐藻酸、瓜爾膠、柑橘渣、瓊脂、膨潤土、纖維素及木製品、天然海綿、陽離子交換樹脂、碳酸鈣、矽酸鹽、碳酸鈉、交聯聚(乙烯-吡咯啶酮) (交聯聚維酮)、羧基甲基澱粉鈉(乙醇酸澱粉鈉)、羧基甲基纖維素、交聯羧基甲基纖維素鈉(交聯羧甲纖維素)、甲基纖維素、預膠凝澱粉(澱粉 1500)、微晶澱粉、水不溶性澱粉、羧基甲基纖維素鈣、矽酸鎂鋁(VEEGUM®)、月桂基硫酸鈉、四級銨化合物及/或其組合組成之非限制性清單。

【0623】 表面活性劑及/或乳化劑可包括但不限於天然乳化劑(*例如*,阿拉伯樹膠、瓊脂、褐藻酸、褐藻酸鈉、黃芪膠、軟骨素、膽固醇、黃原膠、果膠、明膠、蛋黃、酪蛋白、羊毛脂肪、膽固醇、蠟及卵磷脂)、膠體黏土(*例如*,膨潤土[矽酸鋁]及 VEEGUM® [矽酸鋁鎂])、長鏈胺基酸衍生物、高分子量醇(*例如*,硬脂醇、鯨蠟醇、油醇、三乙酸甘油酯單硬脂酸酯、乙二醇二硬脂酸酯、甘油單硬脂酸酯及丙二醇單硬脂酸酯、聚乙烯醇)、卡波姆(*例如*,羧基聚亞甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物及羧乙烯基聚合物)、角叉菜膠、纖維素衍生物(*例如*,羧甲基纖維素鈉、粉狀纖維素、羥甲基纖維素、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、甲基纖維素)、山梨醇酐脂肪酸酯(*例如*,聚氧乙烯山梨醇酐單月桂酸酯[TWEEN®20]、聚

氧乙烯山梨醇酐[TWEEN® 60]、聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯[TWEEN®80]、山梨醇酐單棕櫚酸酯[SPAN®40]、山梨醇酐單硬脂酸酯[SPAN®60]、山梨醇酐三硬脂酸酯[SPAN®65]、單油酸甘油酯、山梨醇酐單油酸酯[SPAN®80])、聚氧乙烯酯(*例如*聚氧乙烯單硬脂酸酯[MYRJ® 45]、聚氧乙烯氫化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧亞甲基硬脂酸酯及 SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(*例如* CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚(*例如*，聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ® 30])、聚(乙烯基吡咯啶酮)、二甘醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸鈉、油酸鉀、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂基硫酸鈉、PLURONIC®F 68、POLOXAMER® 188、西曲溴銨、氯化十六烷基吡啶、苯紮氯銨、多庫酯鈉及/或其組合。

【0624】 黏合劑可為澱粉(*例如*玉米澱粉及澱粉糊)；明膠；糖(*例如* 蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇)；天然及合成膠(*例如*阿拉伯膠、褐藻酸鈉、愛爾蘭苔蘚提取物、潘瓦爾膠(panwar gum)、加蒂膠(ghatti gum)，伊薩波爾豆殼之黏液(mucilage of isapol husks)、羧甲基纖維素、甲基纖維素、乙基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、微晶纖維素、乙酸纖維素、聚(乙烯基吡咯啶酮)、矽酸鋁鎂(VEEGUM®)及落葉松阿拉伯半乳聚糖)；褐藻酸鹽；聚環氧乙烷；聚乙二醇；無機鈣鹽；矽酸；聚甲基丙烯酸酯；蠟；水；醇；及其組合，或任何其他合適黏合劑。

【0625】 防腐劑之實例可包括但不限於抗氧化劑、螯合劑、抗微生物防腐劑、抗真菌防腐劑、醇防腐劑、酸性防腐劑及/或其他防腐劑。抗氧化劑之實例包括但不限於α生育酚、抗壞血酸、抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基茴香醚、丁基化羥基甲苯、一硫代甘油、偏亞硫酸氫鉀、丙酸、沒食子酸丙酯、抗壞血酸鈉、亞硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉及/或亞硫酸鈉。螯合劑之實例包括乙二胺四乙酸(EDTA)、檸檬酸單水合物、依地酸二鈉、依地酸二鉀、依地酸、富馬酸、蘋果酸、磷酸、依地酸鈉、酒石酸及/或依地酸三鈉。抗微生物防腐劑之實例包括但

不限於苯紮氯銨、苄索氯銨、苄醇、布羅波爾、溴棕三甲銨、西吡氯銨、洛赫西定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪脲、苯酚、苯氧乙醇、苯基乙醇、硝酸苯汞、丙二醇及/或硫柳汞。抗真菌防腐劑之實例包括但不限於對羥基苯甲酸丁酯、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羥基苯甲酸、苯甲酸鉀、山梨酸鉀、苯甲酸鈉、丙酸鈉及/或山梨酸。醇防腐劑之實例包括但不限於乙醇、聚乙二醇、苄醇、苯酚、酚類化合物、雙酚、氯丁醇、羥基苯甲酸酯及/或苯基乙醇。酸性防腐劑之實例包括但不限於維生素 A、維生素 C、維生素 E、β-胡蘿蔔素、檸檬酸、乙酸、去氫抗壞血酸、抗壞血酸、山梨酸及/或植酸。其他防腐劑包括但不限於生育酚、乙酸生育酚、甲磺酸去鐵胺、溴棕三甲銨、丁基化羥基茴香醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、乙二胺、月桂基硫酸鈉(SLS)、月桂基醚硫酸鈉(SLES)、亞硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鉀、偏亞硫酸氫鉀、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、對羥基苯甲酸甲酯、GERMALL® 115、GERMABEN®II、NEOLONE™、KATHON™及/或 EUXYL®。

【0626】 緩衝劑之實例包括但不限於檸檬酸鹽緩衝溶液、乙酸鹽緩衝溶液、磷酸鹽緩衝溶液、氯化銨、碳酸鈣、氯化鈣、檸檬酸鈣、葡乳醛酸鈣、葡庚糖酸鈣、葡萄糖酸鈣、d-葡萄糖酸、甘油磷酸鈣、乳酸鈣、乳糖酸鈣、丙酸、乙醯丙酸鈣、戊酸、磷酸氫鈣、磷酸、磷酸三鈣、二羥基磷酸鈣(calcium hydroxide phosphate)、乙酸鉀、氯化鉀、葡萄糖酸鉀、鉀混合物、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、磷酸鉀混合物、乙酸鈉、碳酸氫鈉、氯化鈉、檸檬酸鈉、乳酸鈉、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、磷酸鈉混合物、緩血酸胺、胺基-磺酸酯緩衝液(例如 HEPES)、氫氧化鎂、氫氧化鋁、褐藻酸、無熱原質水、等張生理食鹽水、林格氏溶液、乙醇及/或其組合。潤滑劑可選自由硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸、矽石、滑石、麥芽、山嵛酸甘油酯、氫化植物油、聚乙二醇、苯甲酸鈉、乙酸鈉、氯化鈉、白

胺酸、月桂基硫酸鎂、月桂基硫酸鈉及其組合組成之非限制性群。

【0627】　油之實例包括但不限於扁桃仁、杏仁、鱷梨、巴西棕櫚、佛手柑、黑加侖籽、琉璃苣、刺檜、甘菊、芥花、香菜、卡瑙巴(carnauba)、蓖麻、肉桂、可可脂、椰子、魚肝、咖啡、玉米、棉籽、鵪鶉、桉樹、月見草、魚、亞麻仁、香草醇、葫蘆、葡萄子、榛子、海索草、肉豆蔻酸異丙酯、荷荷巴(jojoba)、夏威夷核果、熏衣草花、薰衣草、檸檬、山蒼子、澳洲堅果、錦葵、芒果核、池花籽、貂、肉豆蔻、橄欖、橙、大西洋胸棘鯛、棕櫚、棕櫚仁、桃仁、花生、罌粟籽、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、紅花、白檀、山茶花、咸油、沙棘、芝麻、乳木果油、矽酮、大豆、向日葵、茶樹、薊、椿花、香根草、胡桃及小麥胚芽油以及硬脂酸丁酯、辛酸三酸甘油酯、癸酸三酸甘油酯、環甲基矽酮、癸二酸二乙酯、二甲矽油 360、西甲矽油、肉豆蔻酸異丙酯、礦物油、辛基十二醇、油醇、矽酮油及/或其組合。

【0628】　額外及示例性脂質奈米顆粒及化合物揭示於 2020 年 9 月 18 日提出申請之國際申請案第 PCT/US2020/051609 號中，其整個內容以引用方式併入本文。

17. 使用 LNP 組成物之方法

【0629】　本揭示案提供 LNP 組成物，其可*例如在活體外*或*活體內*遞送至細胞*例如*靶細胞。對於*活體外*蛋白表現，藉由將 LNP 及細胞*離體*孵育來使細胞與 LNP 接觸。此細胞可隨後引入*活體內*。對於*活體內*蛋白表現，藉由將 LNP 投與受試者來使細胞與 LNP 接觸，由此增加或誘導受試者內之細胞中或上之蛋白表現。例如，在一個實施例中，LNP 靜脈內投與。在另一實施例中，LNP 肌肉內投與。在其他實施例中，LNP 藉由選自由皮下、經鼻內及腫瘤內組成之群之途徑來投與。

【0630】　對於*在活體外*遞送，在一個實施例中，藉由將 LNP 及靶細胞*離體*孵

育來使細胞與 LNP 接觸。在一實施例中，細胞為人類細胞。各種類型細胞已被證明可藉由 LNP 來轉染。

【0631】　在另一實施例中，細胞與 LNP 接觸*例如*至少 30 分鐘、至少 1 小時、至少 2 小時、至少 3 小時、至少 4 小時、至少 5 小時、至少 6 小時、至少 12 小時或至少 24 小時。

【0632】　在一個實施例中，細胞與 LNP 接觸以進行單次治療/轉染。在另一實施例中，細胞與 LNP 接觸以進行多次治療/轉染(*例如*，相同細胞之兩次、三次、四次或更多次治療/轉染)。

【0633】　在另一實施例中，對於*活體內*遞送，藉由將 LNP 投與受試者來使細胞與 LNP 接觸，由此將核酸遞送至受試者內之細胞。例如，在一個實施例中，LNP 靜脈內投與。在另一實施例中，LNP 肌肉內投與。在其他實施例中，LNP 藉由選自由皮下、經鼻內及腫瘤內組成之群之途徑來投與。

【0634】　在一態樣中，本文提供增加細胞中之治療酬載或預防酬載之表現的方法，包括向細胞投與本文揭示之 LNP 組成物。

【0635】　在一相關態樣中，本文提供在增加細胞中之治療酬載或預防酬載之表現的方法中使用的 LNP 組成物。

【0636】　在另一態樣中，本揭示案提供增加受試者中之治療酬載或預防酬載之表現的方法，包括向受試者投與有效量的本文揭示之 LNP 組成物。

【0637】　在一相關態樣中，本文提供在增加受試者中之治療酬載或預防酬載之表現的方法中使用的 LNP 組成物。

【0638】　在另一個態樣中，本文提供遞送本文揭示之 LNP 組成物的方法。

【0639】　在一相關態樣中，本文提供在將 LNP 組成物遞送至細胞之方法中使用的 LNP 組成物。

【0640】　在一實施例中，該方法或使用包括*在活體外*、*活體內*或*離體*使細胞

與 LNP 組成物接觸。

【0641】　在一實施例中，LNP 本揭示案之組成物*例如離體或活體內*與細胞接觸並且可用於將分泌多肽、胞內多肽或跨膜多肽遞送至受試者。

【0642】　在一態樣中，本揭示案提供將本文揭示之 LNP 組成物遞送至患有*例如*如本文描述之疾病或病症之受試者的方法。

【0643】　在一相關態樣中，本文提供在將 LNP 組成物遞送至患有*例如*如本文描述之疾病或病症之受試者的方法中使用的 LNP 組成物。

【0644】　在另一態樣中，本文提供調節受試者之免疫反應的方法，包括向有需要之受試者投與有效量的本文揭示之 LNP 組成物。

【0645】　在一相關態樣中，本文提供在調節受試者之免疫反應之方法中使用的 LNP 組成物，包括向受試者投與有效量的 LNP 組成物。

【0646】　在另一態樣中，本文提供將分泌多肽、胞內多肽或跨膜多肽遞送至受試者的方法。

【0647】　在一態樣中，本文提供治療、預防疾病或病症，或預防其症狀的方法，包括向有需要之受試者投與有效量的本文揭示之 LNP 組成物。

【0648】　在一相關態樣中，本文提供在治療、預防受試者之疾病或病症，或預防其症狀的方法中使用之 LNP 組成物，包括向有需要之受試者投與有效量的 LNP 組成物。

【0649】　在一些實施例中，供使用之方法或組成物導致編碼治療酬載或預防酬載之 mRNA 之表現及/或水準得以增加。

【0650】　在一些實施例中，供使用之方法或組成物導致編碼治療酬載或預防酬載之 mRNA 之表現及/或水準得以維持。

【0651】　在一些實施例中，供使用之方法或組成物導致治療酬載或預防酬載之表現及/或水準得以增加。

【0652】　在一些實施例中，供使用之方法或組成物導致治療酬載或預防酬載之表現及/或水準得以維持。

【0653】　在一些實施例中，本文所述功能效應中任一者與具有以下條件之細胞進行比較：

(a) 未與本文揭示之 LNP 組成物接觸；或

(b) 未與 LNP 接觸，該 LNP 包含多核苷酸，該多核苷酸包含本文所述 5' UTR、本文所述 3' UTR 及/或包含本文所述終止元件之編碼區域。

18. 組合療法

【0654】　在一些實施例中，本文揭示之供使用之治療方法或組成物包括投與本文揭示之 LNP 以及額外劑。在一實施例中，額外劑為*例如*自體免疫疾病之疾病或病症的標準護理。在一實施例中，額外劑為 mRNA。

【0655】　在一些態樣中，本發明方法或組成物之受試者已用一或多種標準護理療法來治療。在其他態樣中，本發明方法或組成物之受試者對於一或多種標準護理療法或抗癌療法不作出反應。

19. 醫藥組成物

【0656】　本揭示案提供包含本文揭示之任何 LNP 組成物的醫藥調配物。

【0657】　在本揭示案之一些實施例中，多核苷酸與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑組合調配在組成物及複合物中。醫藥組成物可視情況包含一或多種其他活性物質，*例如*治療及/或預防活性物質。本揭示案之醫藥組成物可為無菌及/或無熱原的。醫藥劑之調配及/或製造中之一般考慮因素可見於例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第 21 版, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 中。

【0658】　在一些實施例中，組成物投與人類、人類患者或受試者。出於本揭示案之目的，片語「活性成分」一般係指包含如本文所述待遞送之多核苷酸

【0659】 儘管本文所提供之醫藥組成物之描述主要係關於適於投與人類之醫藥組成物，但熟練技術者應理解該等組成物一般適於投與任何其他動物，*例如*非人類動物，*例如*非人類哺乳動物。為使組成物適合於投與各種動物而對適合於投與人類的醫藥組成物進行修改為眾所周知的，並且普通熟練獸醫藥理學家僅藉由普通(若有任何需要)實驗就可以設計及/或進行此修改。預期投與醫藥組成物之受試者包括但是不限於人類及/或其他靈長類動物；哺乳動物。

【0660】 在一些實施例中，本揭示案之多核苷酸被調配成用於皮下、靜脈內、腹膜內、肌肉內、關節內、滑膜內、胸骨內、鞘內、肝內、病灶內、顱內、心室內、經口、吸入噴霧、肺部、局部、直腸、鼻腔、口腔、陰道、或植入儲庫肌肉內、皮下、或皮內遞送。在其他實施例中，多核苷酸被調配用於皮下或靜脈內遞送。

【0661】 本文所述醫藥組成物之調配物可藉由藥理學技術中已知或以後開發之任何方法來製備。一般而言，此類製備方法包括以下步驟：使活性成分與賦形劑及/或一或多種其他輔助成分締合，且接著有需要或必要時，將產物分成、成形及/或封裝成所需單一劑量或多劑量單元。

【0662】 根據本揭示案之醫藥組成物中之活性成分、醫藥學上可接受之賦形劑及/或任何其他成分之相對量視所治療受試者之身份、體型及/或病狀且進一步視待投與組成物之途徑而變化。舉例而言，組成物可包含 0.1%與 100%之間，*例如*，0.5%與 50%之間、1%與 30%之間、5%與 80%之間、或至少 80% (w/w)之活性成分。

20. 調配物及遞送

【0663】 包含本揭示案之 mRNA 的多核苷酸可使用一或多種賦形劑來調配。

【0664】 一或多個賦形劑之功能為*例如*：(1)增加穩定性；(2)增加細胞轉染；(3)允許持續或延遲釋放(*例如*，自多核苷酸之儲庫調配物)；(4)改變生物分佈(*例*

如，將多核苷酸靶向輸送至特定組織或細胞類型)；(5)增加*活體內*所編碼蛋白之轉譯；及/或(6)改變*活體內*所編碼蛋白之釋放概況。除傳統賦形劑(諸如任何及所有溶劑、分散介質、稀釋劑或其他液體載體、分散或懸浮助劑、表面活性劑、等張劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑)以外，本揭示案之賦形劑可包括但不限於類脂質、脂質體、脂質奈米顆粒、聚合物、脂質複合物(lipoplex)、核心-殼體奈米顆粒、肽、蛋白、經多核苷酸轉染之細胞(*例如*用於移植至受試者中)、玻尿酸酶、奈米顆粒模擬物及其組合。因此，本揭示案之調配物可包括一或多種賦形劑，每一者之量共同增加多核苷酸之穩定性、增加多核苷酸對細胞之轉染、增加多核苷酸編碼蛋白之表現，及/或改變多核苷酸編碼蛋白之釋放概況。此外，本揭示案之多核苷酸可使用自組裝核酸奈米顆粒來調配。

【0665】　本文所述醫藥組成物之調配物可藉由藥理學技術中已知或以後開發之任何方法來製備。一般而言，此類製備方法包括使活性成分與賦形劑及/或一或多種其他輔助成分締合的步驟。

【0666】　根據本揭示案之醫藥組成物可作為單一單位劑量及/或作為複數個單一單位劑量製備、包裝及/或批量銷售。如本文所用，「單位劑量」係指包含預定量之活性成分之醫藥組成物之離散量。活性成分之量一般等於投與受試者之活性成分的劑量，及/或此劑量之合宜分率，諸如此劑量之一半或三分之一。

【0667】　根據本揭示案之醫藥組成物中之活性成分、醫藥學上可接受之賦形劑及/或任何其他成分之相對量可視所治療受試者之身份、體型及/或病狀且進一步視待投與組成物之途徑而變化。例如，組成物可包含 0.1%與 99% (w/w)之間的活性成分。舉例而言，組成物可包含 0.1%與 100%之間，*例如*，0.5 與 50%之間、1-30%之間、5-80%之間、至少 80% (w/w)之活性成分。

【0668】　在一些實施例中，本文所述調配物含有至少一種多核苷酸。作為非限制性實例，調配物含有 1、2、3、4 或 5 種多核苷酸。

【0669】 醫藥調配物可另外包含醫藥學上可接受之賦形劑，如本文使用，其包括但不限於適合於所需特定劑型的任何及所有溶劑、分散介質、稀釋劑或其他液體載體、分散或懸浮助劑、表面活性劑、等張劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、及其類似物。用於調配醫藥組成物之各種賦形劑及用於製備組成物之技術為此項技術中已知(參見 Remington: The Science and Practice of Pharmacy，第 21 版，A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)。在本揭示案之範圍內可以考慮使用習知賦形劑介質，除非任何習知賦形劑介質可能與物質或其衍生物不相容，例如藉由產生任何不當生物學效應或在其他方面以有害方式與醫藥組成物之任何其他成分相互作用。

【0670】 在一些實施例中，脂質奈米顆粒之粒徑增加及/或減少。粒徑之變化可能能夠有助於對抗生物反應，例如但不限於炎症，或者可能增加遞送至哺乳動物之經修飾 mRNA 的生物效應。

【0671】 用於製造醫藥組成物的醫藥學上可接受之賦形劑包括但不限於惰性稀釋劑、表面活性劑及/或乳化劑、防腐劑、緩衝劑、潤滑劑及/或油。此等賦形劑可視情況包括在本揭示案之醫藥調配物中。

【0672】 在一些實施例中，多核苷酸在奈米結構中或與奈米結構一起投與、調配在奈米結構中或與奈米結構一起遞送，該等奈米結構可螯合諸如膽固醇之分子。此等奈米結構之非限制性實例及製造此等奈米結構之方法描述於美國專利公開案第 US20130195759 號中。此等奈米結構之示例性結構顯示在美國專利公開案第 US20130195759 號中，並且可包括核心及圍繞核心之殼體。

【0673】 包含本揭示案之 mRNA 的多核苷酸可使用在此項技術中已知之任何方法來遞送至細胞。例如，包含本揭示案之 mRNA 的多核苷酸可藉由基於脂質之遞送，*例如*，轉染，或藉由電穿孔來遞送至細胞。

21. 定義

【0674】 為可更容易地理解本揭示案，首先定義某些術語。如本申請案中所使用，除了如本文另外明確提供以外，以下術語之各者應具有以下闡明之含義。額外定義在整個申請案中闡明。

【0675】 本發明包括精確該組之一成員存在於給定產物或方法中、用於該產物或方法中、或在其他方面與該產物或方法相關之實施例。本發明包括多於一或全部組成員存在於給定產物或方法中、用於該產物或方法中、或在其他方面與該產物或方法相關之實施例。

【0676】 在此說明書及所附申請專利範圍中，單數形式「一(a、an)」及「該」包括複數個提及物，除非內容另有明確指示。術語「一(a 或 an)」以及術語「一或多個」及「至少一個」在本文中可互換使用。在某些態樣中，術語「一(a 或 an)」意指「單一」。在其他態樣中，術語「一(a 或 an)」包括「兩個或更多個」或「多個」。

【0677】 此外，「及/或」在本文中使用時應視為特別揭示兩種規定特徵或組分中之每一者，其中包含或不包含另一者。因此，如本文中諸如「A 及/或 B」之片語中所用之術語「及/或」意欲包括「A 及 B」、「A 或 B」、「A」(單獨)及「B」(單獨)。同樣地，如在諸如「A、B、及/或 C」之片語中所用之術語「及/或」意欲包括以下態樣中之各者：A、B、及 C；A、B、或 C、A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 及 C；A 及 B；B 及 C；A (單獨)；B (單獨)；及 C (單獨)。

【0678】 除非另外定義，否則本文所用之全部技術及科學術語皆具有本揭示案相關領域之熟習此項技藝者通常理解的相同含義。舉例而言，以下出版物為熟習此項技術者提供本揭示案中所用的許多術語之綜合詞典：the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第 2 版, 2002, CRC Press；The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第 3 版, 1999, Academic Press；及 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修訂版, 2000,

Oxford University Press。

【0679】　本文中無論何處用語言「包含」描述態樣，均亦提供以「由……組成」及/或「基本上由……組成」描述之其他類似態樣。

【0680】　單位、前綴及符號皆以其國際單位制(Système International de Unites，(SI))公認形式表示。數值範圍包括定義該範圍之數值。在列舉數值範圍的情況下，應當理解，亦具體揭示在該範圍之所列舉上限與下限之間的每個間插整數值及其每個分數，連同此等值之間的每個子範圍。任何範圍之上限及下限可獨立地包括在該範圍內或排除在該範圍之外，並且包括上限及下限中之任一者、不包括上限及下限中之任一者或同時包括上限及下限的每個範圍亦涵蓋在本發明內。在明確列舉數值的情況下，應當理解與所列舉數值大致相同數量或量之數值亦在本發明之範圍內。在揭示組合的情況下，該組合之要素的每個子組合亦得以具體揭示並且在本發明之範圍內。相反，在單獨揭示不同要素或要素群組的情況下，亦揭示其組合。當本揭示案之任一要素被揭示為具有複數個替代物時，在此亦揭示本揭示案之實例，其中每一替代物經單一地排除或以與其他替代物之任何組合之方式排除；本揭示案之一個以上要素可具有此類排除，且在此揭示具有此類排除的要素之所有組合。

【0681】　核苷酸由其普遍接受之單字母代碼來指代。除非另有說明，否則核酸以 5′至 3′方向自左至右書寫。核苷鹼基在本文中藉由 IUPAC-IUB 生化命名委員會推薦的通常已知之單字母符號來提及。因此，A 代表腺嘌呤，C 代表胞嘧啶，G 代表鳥嘌呤，T 代表胸腺嘧啶，U 代表尿嘧啶。

【0682】　胺基酸在本文中藉由其通常已知之三字母符號或藉由 IUPAC-IUB 生化命名委員會推薦的單字母符號來提及。除非另有說明，否則胺基酸序列自左至右以胺基至羧基方向書寫。

【0683】　*約*：在整個說明書及申請專利範圍中與數值結合使用之術語「約」表

示熟習此項技術者熟悉且可接受之準確度區間，該準確度區間為±10%。

【0684】　在給出範圍的情況下，端點包括在內。此外，除非另有說明或另外由上下文及一般熟習此項技術者之理解清楚，否則表述為範圍的值可在本發明之不同實施例中採用所說明之範圍內的任何特定值或子範圍，除非上下文另有明確說明，否則至該範圍之下限之十分之一單位。

【0685】　*尿苷含量*：術語「尿苷含量」或「尿嘧啶含量」為可互換的，並且係指特定核酸序列中存在的尿嘧啶或尿苷之量。尿苷含量或尿嘧啶含量可表示為絕對值(序列中尿苷或尿嘧啶之總數)或相對值(尿苷或尿嘧啶相對於核酸序列中核苷鹼基總數之百分比)。

【0686】　*終止元件*。如本文使用之術語「終止元件」係指包含終止密碼子之核酸序列。就 DNA 而言，終止密碼子可選自 TGA、TAA 及 TAG，或就 RNA 而言，可選自 UGA、UAA 及 UAG。在一實施例中，終止元件包含兩個連續終止密碼子。在一實施例中，終止元件包含三個連續終止密碼子。在一實施例中，終止元件包含四個連續終止密碼子。在一實施例中，終止元件包含五個連續終止密碼子。在一實施例中，終止元件進一步包含一或多個終止密碼子上游及/或下游之至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 個核苷酸。

【0687】　*3'穩定區*。如本文所用之術語「3'穩定區」係指使得或變得穩定之區域。3'穩定區可存在於核酸序列之 3'末端。在一實施例中，3'穩定區包含*例如*如本文描述之多聚腺苷酸尾。在一實施例中，3'穩定區包含替代核苷，*例如*，反向胸苷。

【0688】　*序列一致性*：序列之間的序列一致性之計算可如下進行。為了確定兩個核苷酸序列之一致性百分比，為了最佳比較目的，將序列進行比對(*例如*，可在第一及第二核苷酸序列中之一者或兩者中引入間隙以用於最佳比對)。在一些實施例中，為了比較目的而進行比對之參考序列之長度為參考序列長度之至

少 50%，例如至少 60%、70%、80%、90%或 100%。對相應核苷酸位置之核苷酸進行比較。當第一個序列中之個位置藉由與第二個序列中相應位置相同的核苷酸來佔據時，則分子在該位置為相同的。兩個序列之間的一致性百分比隨著藉由序列共享的一致位置之數量而變，同時考慮到為了兩個序列之最佳比對而需要引入的間隙之數量及每個間隙之長度。一致性百分比通常係指匹配殘基之數量與比對總長度的比率。兩個序列之間的序列比較及一致性百分比的確定可使用數學演算法來完成。在一些實施例中，使用成對序列比對程式或多序列比對程式來確定兩個核苷酸序列之間的一致性百分比。示例性序列比對程式包括但不限於 lalign 程式(embnet.vital-it.ch; Huang 及 Miller, (1991) *Adv. Appl. Math.* 12:337-357)；the Clustal Omega 程式(www.ebi.ac.uk; Sievers 等人 (2011) *Mol. Syst. Biol.* 7:539)。在一些實施例中，使用程式之預設參數。本文描述之核苷酸序列可用作「查詢序列」以對公共資料庫進行搜尋以例如鑑定其他家族成員或相關序列。此等搜尋可使用 BLAST®程式 (blast.ncbi.nlm.nhi.gov; Altschul 等人 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10)來執行。例如，可以用 blastn 程式進行 BLAST 核苷酸搜尋以獲得與本文描述之核苷酸序列一致或相似之核苷酸序列。在一些實施例中，使用程式之預設參數。

【0689】 *替代核苷*。如本文使用的涉及核苷酸、核苷、或多核苷酸(諸如本發明之多核苷酸，*例如*，mRNA 分子)的術語「替代核苷」係指相對於 A、G、U 或 C 核糖核苷酸之改變。總體上，在本文中，此等術語不意指天然存在之 5'-末端 mRNA 帽部分中之核糖核苷酸改變。改變可為各種不同改變。在一些實施例中，當多核苷酸為 mRNA 時，編碼區、側接區及/或末端區(*例如*，3'-穩定區)可含有一個、兩個、或更多個(視情況不同)核苷或核苷酸改變。在一些實施例中，與未改變的多核苷酸相比，引入細胞之替代多核苷酸可表現出在細胞中之降解減少。

【0690】 *投與：*如本文使用，「投與」係指將組成物遞送至受試者或患者的方

法。投與方法可被選擇來靶向遞送(*例如*,特異性遞送)至身體的特定區域或系統。例如，投與可為非經腸(*例如*，皮下、皮內、靜脈內、腹膜內、肌肉內、關節內、動脈內、滑膜內、胸骨內、鞘內、病灶內、或顱內注射、以及任何合適輸注技術)、經口、經皮或皮內、皮間、直腸、陰道內、局部(*例如*，藉由散劑、軟膏、乳膏、凝膠、洗劑，及/或滴劑)、黏膜、鼻腔、口腔、腸內、玻璃體、腫瘤內、舌下、鼻內；藉由氣管內滴注、支氣管滴注，及/或吸入；作為經口噴霧劑及/或散劑、鼻腔噴霧劑，及/或氣溶膠，及/或經由門靜脈導管。較佳投與方式為靜脈內或皮下。

【0691】 *抗體分子*：在一個實施例中，抗體分子可用於靶向所需細胞類型。如本文使用，「抗體分子」係指天然存在之抗體、工程改造抗體、或其片段，*例如*，天然存在之抗體或工程改造抗體之抗原結合部分。抗體分子可包括*例如*抗體或其抗原結合片段(*例如*，Fab、Fab'、F(ab')2、Fv 片段、scFv 抗體片段、二硫化物連接 Fv (sdFv)、由 VH 及 CH1 域組成之 Fd 片段、線性抗體、單域抗體諸如 sdAb (VL 或 VH)、奈米抗體、或駱駝科 VHH 域)、抗原結合纖連蛋白 III 型(Fn3)支架諸如纖連蛋白多肽微型抗體、配位體、細胞介素、趨化因子、或 T 細胞受體(TCR)。示例性抗體分子包括但是不限於人源化抗體分子、完整 IgA、IgG、IgE 或 IgM 抗體；雙特異性或多特異性抗體(*例如*，Zybodies®等)；抗體片段諸如 Fab 片段、Fab'片段、F(ab')2 片段、Fd'片段、Fd 片段、及分離 CDR 或其組；單鏈 Fv；多肽-Fc 融合；單域抗體(*例如*，鯊魚單域抗體諸如 IgNAR 或其片段)；駱駝抗體；掩蔽抗體(*例如*，Probodies®)；Small Modular ImmunoPharmaceuticals (「SMIPsTM」)；單鏈或串聯雙功能抗體(TandAb®)；VHH；Anticalins®；Nanobodies®；微型抗體；BiTE®；錨蛋白重複蛋白或 DARPINs®；Avimers®；DART；TCR 樣抗體；Adnectins®；Affilins®；Trans-bodies®；Affibodies®；TrimerX®；MicroProteins；Fynomer®，Centyrins®；及 KALBITOR®s。

【0692】 *接觸*：如本文所用，術語「接觸」意謂在兩個或更多個實體之間建立物理連接。例如，使細胞與 mRNA 或脂質奈米顆粒組成物接觸意謂使細胞及 mRNA 或脂質奈米顆粒共有物理連接。*在活體內*、*在活體外*、及*離體*使細胞與外部實體接觸之方法在生物領域中為熟知的。在本揭示案之示例性實施例中，使哺乳動物細胞與組成物(*例如*，本揭示案之奈米顆粒、或醫藥組成物)接觸的步驟*在活體內*執行。例如，使脂質奈米顆粒組成物與可安置於有機體(*例如*，哺乳動物)內之細胞(例如，哺乳動物細胞)接觸可藉由任何合適投與途徑(*例如*，非經腸投與有機體，包括靜脈內、肌肉內、皮內、及皮下投與)來執行。對於存在於*活體外*之細胞，組成物(*例如*，脂質奈米顆粒)與細胞可例如藉由將組成物添加至細胞之培養基來接觸並且可涉及或導致轉染。另外，一種以上細胞可藉由奈米顆粒組成物來接觸。

【0693】 *遞送*：如本文使用，術語「遞送」意謂將實體提供至目的地。例如，將治療劑及/或預防劑遞送至受試者可涉及將包括治療劑及/或預防劑之 LNP 投與受試者(*例如*，藉由靜脈內、肌肉內、皮內、肺部或皮下途徑)。將 LNP 投與哺乳動物或哺乳動物細胞可涉及使一或多種細胞與脂質奈米顆粒接觸。

【0694】 *有效量*：如本文使用，劑之術語「有效量」為足以實現有益或所需結果例如臨床結果之量，並且因此，「有效量」視其應用之情況而定。例如，在本揭示案之脂質組成物(*例如*，LNP)中之靶細胞遞送增強脂質之量的情況下，靶細胞遞送增強脂質之有效量為與缺少靶細胞遞送增強脂質之脂質組成物(*例如*，LNP)相比，足以實現有益或所需結果之量。藉由脂質組成物(*例如*，LNP)來實現之有益或所需結果之非限制性實例包括增加所轉染細胞之百分比及/或增加與脂質組成物(*例如*，LNP)締合/藉由其來囊封之核酸所編碼的蛋白之表現水準。在投與含有靶細胞遞送增強脂質之脂質奈米顆粒以使得有效量之脂質奈米顆粒藉由受試者中之靶細胞來吸收的情況下，含有靶細胞遞送增強脂質之 LNP 之有效量

為與缺少靶細胞遞送增強脂質之 LNP 相比，足以實現有益或所需結果之量。受試者中之有益或所需結果之非限制性實例包括與缺少靶細胞遞送增強脂質之 LNP 相比，增加轉染細胞之百分比，增加與含有靶細胞遞送增強脂質之 LNP 締合/藉由其來囊封之核酸所編碼的蛋白之表現水準及/或增加與含有靶細胞遞送增強脂質之 LNP 締合/藉由其來囊封之核酸或其編碼蛋白之*活體內*治療效果。在一些實施例中，當投與患有或易患感染、疾病、病症，及/或病狀之受試者時，治療有效量之含有靶細胞遞送增強脂質之 LNP 足以治療感染、疾病、病症，及/或病狀，改良其症狀，診斷，預防，及/或延遲其發作。在另一實施例中，有效量之脂質奈米顆粒足以導致在至少約 5%、10%、15%、20%、25%或更多靶細胞中表現所需蛋白。例如，含有靶細胞遞送增強脂質之 LNP 之有效量可為導致在單次靜脈內注射之後，轉染至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、或 35%靶細胞的量。

【0695】 *表現：*如本文使用，核酸序列之「表現」係指以下事件中之一或多者：(1)自 DNA 序列產生 RNA 模板(*例如*，藉由轉錄)；(2)處理 RNA 轉錄物(*例如*，藉由剪接、編輯、5′帽形成，及/或 3′末端處理)；(3)RNA 轉譯成多肽或蛋白；及(4)多肽或蛋白之轉譯後修飾。

【0696】 *離體*：如本文使用，術語「*離體*」係指在有機體(*例如*，動物、植物、或微生物或其細胞或組織)外部發生的事件。*離體*事件可在相對於天然(*例如*，*活體內*)環境最低限度地改變的環境中發生。

【0697】 *片段：*如本文使用之「片段」係指部分。例如，蛋白之片段可包括藉由對自培養細胞分離或經由重組 DNA 技術來獲得之全長蛋白進行消化來獲得的多肽。蛋白之片段可為例如包括一或多個功能域以使得蛋白之片段保留蛋白之功能活性的蛋白之部分。

【0698】 *異源：*如本文使用，「異源」指示序列(*例如*，胺基酸序列或編碼胺

基酸序列之多核苷酸)通常不存在於給定多肽或多核苷酸中。例如，對應於一個蛋白之域或模體的胺基酸序列可相對於第二蛋白為異源的。

【0699】 *分離*：如本文使用，術語「分離」係指從與其締合(不論在自然界中抑或在實驗環境中)之至少一些組分中分離的物質或實體。分離物質可具有涉及其所締合之物質的不同純度水準。分離物質及/或實體可與至少約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、或更多的其最初締合之其他組分分離。在一些實施例中，分離劑為超過約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、或超過約 99%純。如本文使用，若物質基本上不含其他組分，則其為「純的」。

【0700】 *Kozak 序列*：術語「Kozak 序列」(亦被稱為「Kozak 共有序列」)係指增強基因或開放閱讀框之表現的轉譯啟始增強子元件，並且在真核生物中，位於 5’ UTR 中。在分析起始密碼子(AUG)周圍之單一突變對於前胰島素原基因之轉譯的效應(Kozak (1986) Cell 44:283-292)之後，Kozak 共有序列最初定義為序列 GCCRCC (SEQ ID NO: 43)，其中 R=嘌呤。本文揭示之多核苷酸包含 Kozak 共有序列，或其衍生物或修飾。(轉譯增強子組成物之實例及其使用方法，參見以引用方式整體併入本文之 Andrews 等人之美國專利第 5,807,707 號；以引用方式整體併入本文之 Chernajovsky 之美國專利第 5,723,332 號；以引用方式整體併入本文之 Wilson 之美國專利第 5,891,665 號。)

【0701】 *脂質體*：如本文使用，「脂質體」意指包括封閉水性內部之含脂質膜的結構。脂質體可具有一或多個脂質膜。脂質體包括單層(single-layered)脂質體(在此項技術中亦稱為單層(unilamellar)脂質體)及多層(multi-layered)脂質體(在此項技術中亦稱為多層(multilamellar)脂質體)。

【0702】 *修飾*：如本文使用「修飾」係指本揭示案之分子之改變的狀態或結

構，*例如*，多核苷酸(*例如*，mRNA)之組成或結構之變化。*例如*多核苷酸之分子可以包括化學、結構，及/或功能的多種方式來修飾。例如，分*例如*多核苷酸之子可藉由併入一或多個 RNA 元件來在結構上經修飾，其中 RNA 元件包含提供一或多種功能(*例如*，轉譯調控活性)的序列及/或 RNA 次級結構。因此，本揭示案之*例如*多核苷酸之分子可包含一或多個修飾(*例如*，可包括一或多個化學、結構、或功能修飾，包括其任何組合)。在一個實施例中，本揭示案之*例如* mRNA 分子之多核苷酸藉由引入*例如*相對於天然核糖核苷酸 A、U、G、及 C 的非天然核苷及/或核苷酸來修飾。諸如帽結構之非規範核苷酸不被視為「經修飾」，雖然其不同於 A、C、G、U 核糖核苷酸之化學結構。

【0703】 *mRNA*：如本文使用，「mRNA」係指信使核糖核酸。mRNA 可天然地或非天然地存在。例如，mRNA 可包括經修飾及/或非天然存在之組分諸如一或多種核苷鹼基、核苷、核苷酸、或連接子。mRNA 可包括帽結構、鏈終止核苷、莖環、多聚腺苷酸序列，及/或多聚腺苷酸化信號。mRNA 可具有編碼多肽之核苷酸序列。mRNA 之轉譯，例如，哺乳動物細胞內部之 mRNA 之*活體內*轉譯，可產生多肽。傳統上，mRNA 分子之基本組分至少包括編碼區、5'-非轉譯區(5'-UTR)、3' UTR、5'帽及多聚腺苷酸序列。在一實施例中，mRNA 為環狀 mRNA。

【0704】 *奈米顆粒*：如本文使用，「奈米顆粒」係指以下顆粒，該顆粒具有小於約 1000nm 之尺度的任何一種結構特徵，與相同材料之整體樣品相比，該特徵表現出新穎性質。常規地，奈米顆粒具有小於約 500 nm、小於約 200 nm、或約 100 nm 之尺度的任何一種結構特徵。亦常規地，奈米顆粒具有約 50 nm 至約 500 nm，約 50 nm 至約 200 nm 或約 70 至約 120 nm 之尺度的任何一種結構特徵。在示例性實施例中，奈米顆粒為具有約 1-1000 nm 之一或多個尺度的顆粒。在其他示例性實施例中，奈米顆粒為具有約 10-500 nm 之一或多個尺度的顆粒。在其他

示例性實施例中，奈米顆粒為具有約 50-200 nm 之一或多個尺度的顆粒。球形奈米顆粒具有例如約 50-100 或 70-120 奈米之間的直徑。奈米顆粒最通常在其運輸及性質方面表現為一個單元。應注意將奈米顆粒與對應整體材料區分開之新穎性質通常以低於 1000nm 之大小尺度，或以約 100nm 之大小出現，但是例如對於呈橢圓形、管形、及其類似形狀之顆粒而言，奈米顆粒可具有更大大小。雖然大多數分子之大小符合以上概述，但是個別分子通常不被稱為奈米顆粒。

【0705】 *核酸：*如本文使用，術語「核酸」以其最廣泛意義來使用並且涵蓋包括核苷酸之聚合物的任何化合物及/或物質。此等聚合物通常被稱為多核苷酸。本揭示案之示例性核酸或多核苷酸包括但不限於核糖核酸(RNA)、去氧核糖核酸(DNA)、DNA-RNA 雜合物、RNAi 誘導劑、RNAi 試劑、siRNA、shRNA、miRNA、反義 RNA、核酶、催化 DNA、誘導三螺旋形成之 RNA、蘇糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA，包括具有 β-D-核糖構形之 LNA、具有 α-L-核糖構形之 α-LNA (LNA 之非鏡像異構物)、具有 2′-胺基官能化之 2′-胺基-LNA 及具有 2′-胺基官能化之 2′-胺基-α-LNA)或其雜合物或組合。

【0706】 *核苷鹼基*：如本文使用，術語「核苷鹼基」(或者「核苷酸鹼基」或「含氮鹼基」)係指向核酸或其部分或區段賦予經改良之性質(*例如*，結合親和力、核酸酶抗性、化學穩定性)的存在於核酸中之嘌呤或嘧啶雜環化合物，包括天然存在之嘌呤及嘧啶的任何衍生物或類似物。腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶為主要存在於天然核酸中之核苷鹼基。如在此項技術中已知及/或本文描述的其他天然、非天然，及/或合成核苷鹼基可併入核酸中。除非另外規定，否則本文所述 SEQ ID NO 之核苷鹼基序列涵蓋天然核苷鹼基及經化學修飾核苷鹼基(例如，SEQ ID NO 中之「U」標識涵蓋尿嘧啶及經化學修飾尿嘧啶)。

【0707】 *核苷/核苷酸*：如本文使用，術語「核苷」係指含有與核苷鹼基(*例如*，嘌呤或嘧啶)、或衍生物或其類似物(在本文中亦稱為「核苷鹼基」)共價連接之糖

分子(*例如*，RNA 中之核糖或 DNA 中之去氧核糖)、或衍生物或其類似物，但是缺少核苷間連接基團(*例如*，磷酸基團)的化合物。如本文使用，術語「核苷酸」係指與核苷間連接基團(*例如*，磷酸基團)、或其任何衍生物、類似物、或修飾物共價鍵結的核苷，其向核酸或其部分或區段賦予經改良之化學及/或功能性質(*例如*，結合親和力、核酸酶抗性、化學穩定性)。

【0708】 *開放閱讀框*：如本文使用，縮寫為「ORF」之術語「開放閱讀框」係指編碼多肽之 mRNA 分子之區段或區域。ORF 包含以起始密碼子來開始並且以終止密碼子來結束的不重疊、同框密碼子之連續鏈段，並且藉由核糖體來轉譯。

【0709】 *患者：*如本文所用，「患者」係指可尋求或需要治療、要求治療、正在接受治療、將接受治療之受試者，或處於針對特定疾病或病狀受過訓練的專業人員之護理下的受試者。在具體實施例中，患者為人類患者。在一些實施例中，患者為患有*例如*如本文描述之自體免疫疾病的患者。

【0710】 *醫藥學上可接受*：本文所用之片語「醫藥學上可接受」指在合理之醫學判斷範疇內適用於與人類及動物之組織接觸而無過度毒性、刺激性、過敏反應或其他問題或併發症，與合理效益/風險比相稱的彼等化合物、材料、組成物及/或劑型。

【0711】 *醫藥學上可接受之賦形劑：*如本文所用之片語「醫藥學上可接受之賦形劑」指除本文所述化合物以外(例如能夠懸浮或溶解活性化合物之媒劑)且具有在患者中實質上無毒且非炎性之特性的任何成分。賦形劑可包括例如：抗黏劑、抗氧化劑、黏合劑、塗層、壓縮助劑、崩解劑、染料(顏色)、潤膚劑、乳化劑、填充劑(稀釋劑)、成膜劑或塗層、調味劑、芳香劑、助流劑(流動增強劑)、潤滑劑、防腐劑、印刷油墨、吸附劑、懸浮或分散劑、甜味劑及水合水。示例性賦形劑包括但不限於：丁基化羥基甲苯(BHT)、碳酸鈣、磷酸鈣(磷酸氫鈣)、硬脂酸鈣、交聯羧甲纖維素、交聯聚乙烯吡咯啶酮、檸檬酸、交聯聚維酮、半胱胺

酸、乙基纖維素、明膠、羥基丙基纖維素、羥基丙基甲基纖維素、乳糖、硬脂酸鎂、麥芽糖醇、甘露糖醇、甲硫胺酸、甲基纖維素、對羥基苯甲酸甲酯、微晶纖維素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚維酮、預膠化澱粉、對羥基苯甲酸丙酯、棕櫚酸視黃酯、蟲膠、二氧化矽、羧基甲基纖維素鈉、檸檬酸鈉、乙醇酸澱粉鈉、山梨糖醇、澱粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化鈦、維生素 A、維生素 E、維生素 C 及木糖醇。

【0712】 *醫藥學上可接受之鹽：*如本文所用，「醫藥學上可接受之鹽」指所揭示化合物之如下衍生物，其中母體化合物因現有酸或鹼部分轉化為其鹽形式(*例如*藉由使遊離鹼基與合適有機酸反應)而經修飾。醫藥學上可接受之鹽之實例包括但不限於鹼性殘基(諸如胺)之無機酸或有機酸鹽；酸性殘基(諸如羧酸)之鹼鹽或有機鹽；及其類似物。代表性酸加成鹽包括乙酸鹽、乙酸、己二酸鹽、褐藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯磺酸、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙烷磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫溴酸鹽、鹽酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙烷磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲烷磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、丁二酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及其類似物。代表性鹼金屬或鹼土金屬鹽包括鈉、鋰、鉀、鈣、鎂及其類似物；以及無毒銨、四級銨及胺陽離子，包括但不限於銨、四甲基銨、四乙基銨、甲基胺、二甲基胺、三甲基胺、三乙基胺、乙基胺及其類似物。本揭示案之醫藥學上可接受之鹽包括由例如無毒無機酸或有機酸形成的母體化合物之習知無毒鹽。本揭示案之醫藥學上可接受之鹽可藉由習知化學方法由含

有鹼性或酸性部分的母體化合物合成。通常，此等鹽可藉由在水或有機溶劑，或兩者之混合物中，使此等化合物之游離酸或鹼形式與化學計算量之合適鹼或酸反應來製備；通常，非水性介質如醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇、或乙腈為較佳的。合適鹽之清單可見於 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第 1418 頁，*Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl 及 C.G. Wermuth (編), Wiley-VCH, 2008，及 Berge 等人, *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977)中，該等文獻中之每一者均以引用之方式整體併入本文中。

【0713】 *多肽*：如本文所用，術語「多肽」或「所關注之多肽」係指典型地藉由肽鍵接合之胺基酸殘基的聚合物，其可天然地(*例如*，經分離或經純化)或以合成方式產生。

【0714】 *RNA*：如本文所用，「RNA」係指可天然或非天然存在之核糖核酸。例如，RNA 可包括經修飾及/或非天然存在之組分諸如一或多種核苷鹼基、核苷、核苷酸、或連接子。RNA 可包括帽結構、鏈終止核苷、莖環、多聚腺苷酸序列，及/或多聚腺苷酸化信號。RNA 可具有編碼所關注多肽之核苷酸序列。例如，RNA 可為信使 RNA (mRNA)。編碼特定多肽之 mRNA 之轉譯，例如，哺乳動物細胞內部之 mRNA 之*活體內*轉譯，可產生所編碼的多肽。RNA 可選自由小干擾 RNA (siRNA)、不對稱干擾 RNA (aiRNA)、微小 RNA (miRNA)、Dicer-受質 RNA (dsRNA)、小髮夾 RNA (shRNA)、mRNA、長鏈非編碼 RNA (lncRNA)及其混合物組成之非限制性群。

【0715】 *RNA 元件*：如本文所用，術語「RNA 元件」係指提供生物學功能且/或具有生物學活性(*例如*，轉譯調節活性)的 RNA 分子之部分、片段或區段。藉由併入諸如本文所述之彼等的一或多種 RNA 元件來對多核苷酸進行的修飾，將一或多種合意功能性質提供給經修飾之多核苷酸。如本文描述之 RNA 元件可為

天然存在、非天然存在、合成、工程改造、或其任何組合。例如，提供調控活性之天然存在之 RNA 元件包括在病毒、原核及真核有機體(*例如*，人類)之轉錄組中發現的元件。特定真核 mRNA 及經轉譯病毒 RNA 中之 RNA 元件已被證明涉及在細胞中介導許多功能。示例性天然 RNA 元件包括但是不限於轉譯啟始元件(*例如*，內部核糖體進入位點(IRES)，參見 Kieft 等人，(2001) RNA 7(2):194-206)，轉譯增強子元件(*例如*，APP mRNA 轉譯增強子元件，參見 Rogers 等人，(1999) J Biol Chem 274(10):6421-6431)，mRNA 穩定性元件(*例如*，富含 AU 元件(ARE)，參見 Garneau 等人，(2007) Nat Rev Mol Cell Biol 8(2):113-126)，轉譯抑制元件(參見*例如*，Blumer 等人，(2002) Mech Dev 110(1-2):97-112)，蛋白結合 RNA 元件(*例如*，鐵反應元件，參見 Selezneva 等人，(2013) J Mol Biol 425(18):3301-3310)，細胞質多聚腺苷酸元件(Villalba 等人，(2011) Curr Opin Genet Dev 21(4):452-457)，及催化 RNA 元件(*例如*，核酶，參見 Scott 等人，(2009) Biochim Biophys Acta 1789(9-10):634-641)。

【0716】 *實質上*：如本文所用，術語「實質上」係指展現所關注特徵或性質之全部或幾乎全部範圍或程度之定性條件。生物技術之一般技術者應瞭解，生物及化學現象極少(若有)進行至完成及/或進行至完全或達成或避免絕對結果。因此，術語「實質上」在本文中用於捕獲許多生物及化學現象中固有之潛在不完全性。

【0717】 *罹患*：「罹患」疾病、病症及/或病狀之個體已診斷出或表現出疾病、病症及/或病狀之一或多種症狀。

【0718】 *治療劑*：術語「治療劑」係指當投與受試者時具有治療、診斷及/或防治作用及/或引發所要生物及/或藥理學作用之任何劑。在一些實施例中，治療劑包含或為治療酬載。在一些實施例中，治療劑包含或者為小分子或生物製品(*例如*抗體分子)。

【0719】 *轉染*：如本文使用，術語「轉染」係指將物質(*例如*，多核苷酸，諸

如 mRNA)引入細胞中之方法。

【0720】 *轉譯調控活性*：如本文使用，術語「轉譯調控活性」(與「轉譯調控功能」可互換使用)係指調節(*例如*，調控、影響、控制、改變)包括 PIC 及/或核糖體活性之轉譯機構活性的生物功能、機制、或過程。在一些態樣中，所需轉譯調控活性促進及/或增強 mRNA 轉譯之轉譯保真度。在一些態樣中，所需轉譯調控活性減少及/或抑制洩漏掃描。

【0721】 *受試者*：如本文使用，術語「受試者」係指*例如*為了實驗、診斷、預防，及/或治療目的，可投與根據本揭示案之組成物的任何有機體。典型受試者包括動物(*例如*哺乳動物，諸如小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類動物及人類)及/或植物。在一些實施例中，受試者可為患者。

【0722】 *治療*：如本文所用，術語「治療」係指部分地或完全地緩解、改善、改良、減輕特定感染、疾病、病症及/或病狀，延遲其發作，抑制其進展，降低其嚴重程度，及/或降低其一或多種症狀或特徵之發生率。例如，「治療」癌症可係指抑制腫瘤之存活、生長，及/或擴散。出於減少發展與疾病、病症及/或病狀相關之病變之風險的目的，治療可投與未展現疾病、病症及/或病狀之病徵的受試者，及/或投與僅展現疾病、病症及/或疾患之早期病徵的受試者。

【0723】 *預防*：如本文所用，術語「預防」係指部分或完全抑制特定感染、疾病、病症和/或病狀之一或多種症狀或特徵的發作。

【0724】 *未修飾*：如本文使用，「未修飾」係指以任何方式改變之前的任何物質、化合物或分子。未修飾可能但是不一定係指野生型或天然形式之生物分子。分子可經歷一系列修飾，其中各經修飾之分子可充當用於後續修飾之「未修飾」起始分子。

【0725】 *變異體*：如本文使用，術語「變異體」係指具有野生型分子之至少 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%活

性，或與其結構相似性的分子，*例如*，如藉由此項技術認可之檢定來量測。

22. 等效內容及範圍

【0726】　熟習此項技術者將認識到，或能夠僅使用常規實驗確定根據本文所述之揭示案的特定實施例之多種等效物。本揭示案範圍不意欲局限於以下實施方式，而是如隨附申請專利範圍中所陳述。

【0727】　除非相反指示或另外自上下文清楚，否則在申請專利範圍中，諸如「一個(種)」及「該(等)」之冠詞可意謂一個(種)或超過一個(種)。除非相反指示或另外自上下文清楚，否則在一組之一或多個成員之間包括「或」之申請專利範圍或描述在組成員之一者、多於一者、或全部存在於給定產物或方法中、用於該產品或方法中、或另外與該產物或方法相關時被視為滿足條件的。本揭示案包括精確該組之一成員存在於給定產物或方法中、用於該產物或方法中、或在其他方面與該產物或方法相關之實施例。本揭示案包括多於一或全部組成員存在於給定產物或方法中、用於該產物或方法中、或在其他方面與該產物或方法相關之實施例。

【0728】　亦應注意，術語「包含(comprising)」意欲為開放性的且允許但不需要包括額外要素或步驟。因此當術語「包含」在本文中使用時，亦涵蓋且揭示術語「由.....組成」。

【0729】　在給出範圍的情況下，端點包括在內。此外，應瞭解除非另有說明或另外由上下文及一般熟習此項技術者之理解清楚，否則表述為範圍的值可在本揭示案之不同實施例中採用所說明之範圍內的任何特定值或子範圍，除非上下文另有明確說明，否則至該範圍之下限之十分之一單位。

【0730】　所有引用之來源，例如本文引用之參考文獻、出版物、資料庫、資料庫條目及技術，即使未在引用中明確陳述，亦以引用之方式併入本申請案中。在引用之來源與本申請案之陳述有衝突的情況下，應以本申請案中之陳述為準。

實例

【0731】 本發明在以下實例中進一步描述，其不限制申請專利範圍中描述的本發明之範圍。

【0732】 與實例 1 及 2 之 5’及 3’ UTR 相關之序列資訊提供於以下表 5 及 6 中。

表 5：5’ UTR 序列

名稱：	序列：
v1.1 5’ UTR	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCC CGGCGCCGCCACC (SEQ ID NO:56)
v2.0 5’ UTR	GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUU UUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC (SEQ ID NO:50)

表 6：具有加下劃線之終止元件序列的 3’ UTR

名稱：	序列：
阿爾法 3’ UTR/對照 3’ UTR	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCG UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO:180)
卡帕 3’ UTR	UAAAGCUCCCCGGGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCG UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO:139)
愛歐塔 3’ UTR	UAAGCCCCUCCGGGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCG UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO:181)

實例 1. 具有 v1.1 5’ UTR 或 v2.0 5’ UTR 以及阿爾法 3’ UTR 或卡帕 3’ UTR 之 mRNA 的活體內效應

【0733】 此實例描述螢火蟲螢光素酶發光(ffluc)及/或藉由具有 v1.1 5’ UTR 或 v2.0 5’ UTR 以及阿爾法 3’ UTR(在本文中亦稱為「對照 3’ UTR)或卡帕 3’ UTR 之 mRNA 來編碼之靶蛋白的*活體內*評估。

【0734】 為了評估兩種 3’ UTR(「阿爾法」或「卡帕」)在小鼠中之*活體內*效應，藉由彈丸靜脈內尾靜脈注射，向 CD-1 小鼠靜脈內給予 0.25 mg/kg 之調配 ffLuc mRNA 或 hEPO mRNA 化合物 II /DMG (50%化合物 II，10% DSPC，38.5 膽固醇，1.5% PEG-DMG 2500 MW)。mRNA 構築體具有 v1.1 5’ UTR 或 v2.0 5’

UTR。給藥後 0-4 天(或 0-96 小時)，對動物進行成像。各組中具有 10 只動物。亦收集血清並且藉由 ELISA 來分析 hEPO 蛋白水準(12 小時、48 小時、及 96 小時)。第 4 天(*亦即*，96 小時)將小鼠處死；解剖肝臟及脾臟並且分析發光。

【0735】　此實驗之結果展示於**圖 1A-1G 中**。具有 v2.0 5' UTR 及卡帕 3' UTR 之 mRNA 構築體導致最高全身發光(**圖 1A-1C**)、肝臟發光(**圖 1D**)、及脾臟發光(**圖 1E**)。對於血清中之靶蛋白(*亦即*，EPO)表現，觀察到類似效應(**圖 1F-1G**)。

實例 2. 具有 v2.0 5' UTR 以及卡帕 3' UTR 或愛歐塔 3' UTR 之 mRNA 之活體內效應

【0736】　此實例描述免疫細胞中的藉由具有 v2.0 5' UTR 以及對照 3' UTR (v1.1)、卡帕 3' UTR、或愛歐塔 3' UTR 之 mRNA 來編碼之靶蛋白表現(密碼子優化 mOX40L)的*活體內*評估。

【0737】　為了評估與對照 3' UTR 相比，兩種 3' UTR (「卡帕」或「愛歐塔」)在小鼠中之*活體內*效應，向 C57BL/6 小鼠靜脈內給予在含有化合物 II 及化合物 I 之 LNP 中調配的 0.50 mg/kg mOX40L_D99K mRNA。mRNA 構築體具有 v2.0 5' UTR、密碼子優化 mOX40L_D99K ORF、及卡帕 3' UTR 或愛歐塔 3' UTR。對於 LSK+造血幹細胞及祖細胞(**圖 2A**)、脾臟樹突狀細胞(**圖 2B**)、脾臟巨噬細胞(**圖 2C**)、脾臟嗜中性球(**圖 2D**)、脾臟單核球(**圖 2E**)、脾臟嗜伊紅性球(**圖 2F**)、脾臟 CD4+T 細胞(**圖 2G**)、脾臟 CD8+T 細胞(**圖 2H**)、及脾臟 B 細胞(**圖 2I**)，在給藥後 1、2、及 3 天評估 OX40L 之平均螢光強度及 mOX40L+細胞之百分比。

【0738】　含有愛歐塔 3' UTR 或卡帕 3' UTR 之 mRNA 與大部分免疫細胞中之 mOX40L 之增加之表現相關。

實例 3. 合成編碼 FANCA 之 mRNA

【0739】　編碼人類 Fanconi 貧血互補組 A (FANCA)多肽之 mRNA 可例如藉由使用 SEQ ID NO:1 提供之 ORF 序列(胺基酸)來構建。*參見*以下表 7。

【0740】 編碼 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列之示例性序列優化核苷酸序列提供於 SEQ ID NO:2 中。編碼 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列之另一示例性序列優化核苷酸序列提供於 SEQ ID NO:3 中。編碼 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列之額外示例性序列優化核苷酸序列提供於 SEQ ID NO:14-17 中。*參見*以下表 7。

【0741】 mRNA 序列包括側接 ORF 序列(核苷酸)之 5′及 3′ UTR 區域。在示例性構築體中，5′ UTR 及 3′ UTR 序列分別為 SEQ ID NO:64 及 139。

5′ UTR:

GGAAAUUAUUAUUAUUUCUAGCUACAAUUUAUCAUUGUAUUAUUUUA GCUAUUCAUCAUUAUUUACUUGGUGAUCAACA (SEQ ID NO:64)

3′ UTR:

UAAAGCUCCCCGGGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUG AAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO:139)

【0742】 在另一個示例性構築體中，5′ UTR 及 3′ UTR 序列分別為 SEQ ID NO:50 及 139。

5′ UTR:

GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUC GCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC (SEQ ID NO:50)

3′ UTR:

UAAAGCUCCCCGGGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUG AAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO:139)

【0743】 FANCA mRNA 序列被製備成經修飾之 mRNA。具體而言，在活體外轉錄期間，經修飾之 mRNA 可使用 N1-甲基假尿苷-5′-三磷酸來產生以便確保

mRNA 含有 100% N1-甲基假尿苷代替尿苷。或者，在活體外轉錄期間，經修飾之 mRNA 可使用 N1-甲氧尿苷-5′-三磷酸來產生以便確保 mRNA 含有 100% 5-甲氧尿苷代替尿苷。此外，FANCA-mRNA 可使用引入多聚腺苷酸尾之引子來合成，並且使用經由 m^7G-ppp-Gm-AG 四核苷酸之共轉錄加帽，併入 m^7G-ppp-Gm-AG 5′cap1，從而在兩個 mRNA 上產生帽結構。或者，在 DNA 模板之 Gibson 組裝期間，可合成 FANCA-mRNA 並且引入多聚腺苷酸尾。

【0744】　用於以下實例中之 FANCA 構築體序列在下文描述。「G5」意味著 mRNA 中之所有尿嘧啶(U)藉由 N1-甲基假尿嘧啶來置換。

表 7：FANCA 序列

	mRNA 名稱	**ORF 序列(胺基酸)**	**ORF 序列(核苷酸)**	**5′ UTR 序列**	**3′ UTR 序列**	**構築體序列**
SEQ ID NO:		**1**	**2**	**64**	**139**	**4**
	FANCA_01 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW	AUGUCCGACUCCUGGGUGCCCAACUC CGCUAGCGGACAAGAUCCAGGUGGCC GCAGGAGAGCGUGGGCUGAACUGCU UGCCGGGCGAGUGAAGCGCGAGAAG UACAACCCCGAGCGCGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGCGCCGUACGGCUGCUGC GCAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUG CUGCUGGAGGUGGAGGGGCCCCUGUG CAAGAAGCUGAGCCUGUCCAAGGUGA UCGACUGCGACAGCAGCGAGGCCUAC GCCAACCACAGCUCCUCCUUCAUCGG CUCCGCCCUGCAGGAUCAAGCUAGCC GGCUGGGCGUUCCAGUGGGCAUCCUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCAGCGU GGGCCAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG AGACCAGCCACCCCGUGCUGCUGACC GUGGAGCAGCGCAAGAAGCUGUCAA GCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCUG CUGGCCCACAGCAUGUUCUCCCGCCU GAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGAAG AUCCAGUCCAGCCUGCUACUGGAGGC CGUGUGGCACUUACACGUGCAGGGCA UCGUGAGCCUGCAGGAGCUACUGGAG AGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGGG GUCCUGGCUGUUCCGCAACCUGUGCU GCCUGUGCGAGCAGAUGGAAGCCUCC UGCCAACACGCCGACGUUGCACGGGC AAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUG UUCGUGCUGCGCGGGUUCCAGAAGAA CUCAGACCUCCGGAGGACCGUGGAGC CUGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUG GACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUU UGCCCUGGACGCUCUCGCUGCCGGAG UGCAGGAGGAGAGCUCCACCCACAAG	GGAAAU UAUUAU UAUUUC UAGCUA CAAUUU AUCAUU GUAUUA UUUUAG CUAUUC AUCAUU AUUUAC UUGGUG AUCAAC A	UAAAGC UCCCCG GGGGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCC CAGCCC CUCCUC CCCUUC CUGCAC CCGUAC CCCCGU GGUCUU UGAAUA AAGUCU GAGUGG GCGGC	SEQ ID NO:4 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:64 之 5′ UTR、SEQ ID NO:2 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:139 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		FGVFSGHTL	AUCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGU			
		GSVISTDPLK	UCUCCGGCCACACCCUGGGCUCCGUG			
		RFFSHTLTQI	AUCUCCACCGAUCCCCUGAAGCGGUU			
		LTHSPVLKA	CUUCUCCCACACCCUGACCCAGAUCC			
		SDAVQMQR	UGACCCACUCCCCUGUGCUGAAGGCC			
		EWSFARTHP	AGCGACGCCGUGCAGAUGCAGCGCGA			
		LLTSLYRRL	GUGGUCCUUCGCCCGCACCCAUCCCC			
		FVMLSAEEL	UGCUGACCAGCCUGUACCGGCGGCUG			
		VGHLQEVLE	UUCGUGAUGCUGUCCGCCGAGGAGCU			
		TQEVHWQR	GGUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGG			
		VLSFVSALV	AGACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGC			
		VCFPEAQQL	GUGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGU			
		LEDWVARL	GGUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGC			
		MAQAFESC	UCCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUG			
		QLDSMVTAF	AUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCA			
		LVVRQAALE	GCUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCC			
		GPSAFLSYA	UGGUGGUGCGUCAAGCAGCCCUGGAG			
		DWFKASFGS	GGCCCAAGCGCCUUCCUGAGCUACGC			
		TRGYHGCSK	CGACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGGU			
		KALVFLFTF	CCACCCGCGGGUACCACGGCUGCUCC			
		LSELVPFESP	AAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUUAC			
		RYLQVHILH	CUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCG			
		PPLVPGKYR	AGUCGCCCCGCUACCUGCAGGUGCAC			
		SLLTDYISLA	AUCCUGCACCCACCCCUGGUCCCUGG			
		KTRLADLKV	CAAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACU			
		SIENMGLYE	ACAUCUCCCUGGCCAAGACCCGGCUG			
		DLSSAGDIT	GCCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAA			
		EPHSQALQD	CAUGGGCCUGUACGAGGACCUGUCCA			
		VEKAIMVFE	GCGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCAC			
		HTGNIPVTV	AGCCAGGCCCUGCAGGACGUGGAGAA			
		MEASIFRRP	GGCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCG			
		YYVSHFLPA	GCAACAUCCCCGUGACCGUGAUGGAG			
		LLTPRVLPK	GCUAGUAUCUUCCGGCGGCCCUACUA			
		VPDSRVAFI	CGUGUCCCACUUCCUGCCCGCCCUGC			
		ESLKRADKI	UGACACCCCGGGUGCUGCCCAAGGUG			
		PPSLYSTYC	CCCGACAGUCGCGUCGCCUUCAUCGA			
		QACSAAEEK	GAGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUCC			
		PEDAALGVR	CGCCCUCCCCUGUACUCCACCUACUGC			
		AEPNSAEEP	CAGGCUUGCUCCGCCGCCGAGGAGAA			
		LGQLTAALG	GCCCGAGGACGCAGCCUUAGGAGUAC			
		ELRASMTDP	GCGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAG			
		SQRDVISAQ	CCACUGGGCCAGUUGACCGCUGCCCU			
		VAVISERLR	GGGAGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCG			
		AVLGHNED	ACCCCAGCCAACGCGACGUGAUCAGC			
		DSSVEISKIQ	GCCCAGGUGGCCGUGAUCAGCGAGAG			
		LSINTPRLEP	GCUGCGGGCAGUGCUGGGCCACAACG			
		REHMAVDL	AGGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGC			
		LLTSFCQNL	AAGAUCCAGCUGAGCAUCAACACACC			
		MAASSVAPP	CAGGCUGGAGCCCAGAGAGCACAUGG			
		ERQGPWAA	CCGUGGACCUGCUGCUGACCUCCUUC			
		LFVRTMCGR	UGCCAGAACCUGAUGGCCGCAAGCAG			
		VLPAVLTRL	CGUGGCUCCUCCAGAACGCCAAGGCC			
		CQLLRHQGP	CUUGGGCUGCCCUGUUCGUGCGCACC			
		SLSAPHVLG	AUGUGUGGCCGCGUCCUGCCAGCAGU			
		LAALAVHL	GCUGACCCGGCUGUGCCAGCUUCUGC			
		GESRSALPE	GGCACCAAGGGCCCUCCCUGAGCGCU			
		VDVGPPAPG	CCCCACGUGCUUGGGUUGGCCGCCCU			
		AGLPVPALF	CGCUGUGCACCUGGGCGAGAGCAGGA			
		DSLLTCRTR	GCGCCCUUCCCGAGGUGGACGUGGGU			
		DSLFFCLKF	CCUCCAGCCCCAGGUGCCGGACUCCC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		CTAAISYSL	CGUGCCAGCCCUGUUCGACAGCCUGC			
		CKFSSQSRD	UGACUUGUCGCACCCGGGACUCCCUG			
		TLCSCLSPG	UUCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGC			
		LIKKFQFLM	CGCCAUCUCCUACUCCCUGUGCAAGU			
		FRLFSEARQ	UCUCCAGCCAGUCCCGGGACACCCUG			
		PLSEEDVAS	UGCUCCUGCCUGUCUCCCGGCCUGAU			
		LSWRPLHLP	CAAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCC			
		SADWQRAA	GCCUGUUCAGCGAAGCACGCCAGCCC			
		LSLWTHRTF	CUGUCCGAGGAGGACGUGGCCUCCCU			
		REVLKEEDV	GUCCUGGCGACCCCUGCACCUGCCCU			
		HLTYQDWL	CCGCCGAUUGGCAGCGCGCCGCCCUU			
		HLELEIQPEA	AGCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCG			
		DALSDTERQ	CGAGGUGCUGAAGGAGGAAGACGUG			
		DFHQWAIHE	CACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCA			
		HFLPESSAS	CCUGGAGCUGGAGAUCCAGCCCGAAG			
		GGCDGDLQ	CCGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGC			
		AACTILVNA	CAGGACUUUCACCAGUGGGCCAUCCA			
		LMDFHQSSR	CGAGCACUUUCUGCCCGAGAGCAGCG			
		SYDHSENSD	CCAGUGGAGGCUGCGACGGCGACCUG			
		LVFGGRTGN	CAAGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAA			
		EDIISRLQEM	CGCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCU			
		VADLELQQ	CCCGCAGCUACGACCACUCCGAGAAC			
		DLIVPLGHT	AGCGACCUGGUGUUUGGAGGCCGCAC			
		PSQEHFLFEI	CGGGAACGAGGACAUCAUCAGCCGCC			
		FRRRLQALT	UGCAGGAGAUGGUGGCCGACCUGGA			
		SGWSVAASL	GCUCCAGCAGGACCUGAUCGUGCCAC			
		QRQRELLM	UGGGGCACACCCCAAGCCAGGAGCAC			
		YKRILLRLPS	UUCCUGUUCGAGAUCUUCCGCAGACG			
		SVLCGSSFQ	CCUGCAGGCACUGACCUCCGGCUGGA			
		AEQPITARC	GUGUGGCCGCAAGCCUGCAGCGCCAA			
		EQFFHLVNS	CGCGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGAU			
		EMRNFCSHG	CCUGCUGCGCCUGCCCUCCUCCGUGC			
		GALTQDITA	UGUGCGGCUCCUCCUUCCAGGCCGAG			
		HFFRGLLNA	CAGCCCAUCACCGCCCGGUGCGAGCA			
		CLRSRDPSL	GUUCUUCCACCUGGUGAACAGCGAGA			
		MVDFILAKC	UGCGGAACUUCUGCUCUCACGGCGGC			
		QTKCPLILTS	GCUCUGACCCAGGACAUCACCGCCCA			
		ALVWWPSL	CUUCUUCCGCGGCCUGCUGAACGCCU			
		EPVLLCRWR	GCCUGCGGAGCAGGGACCCCAGCCUG			
		RHCQSPLPR	AUGGUCGACUUCAUCCUGGCCAAGUG			
		ELQKLQEGR	CCAGACCAAGUGUCCCCUGAUCCUGA			
		QFASDFLSP	CCAGCGCCCUGGUUUGGUGGCCCUCA			
		EAASPAPNP	CUGGAGCCCGUGCUCCUGUGUCGCUG			
		DWLSAAAL	GAGGCGGCACUGCCAGUCACCCCUGC			
		HFAIQQVRE	CCCGAGAGCUGCAGAAGCUGCAGGAG			
		ENIRKQLKK	GGCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCCU			
		LDCEREELL	GUCACCAGAGGCAGCCUCUCCCGCUC			
		VFLFFFSLM	CUAACCCCGAUUGGCUAUCCGCGGCC			
		GLLSSHLTS	GCUCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGGU			
		NSTTDLPKA	GCGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCAGC			
		FHVCAAILE	UGAAGAAGCUGGACUGCGAGAGGGA			
		CLEKRKISW	GGAGCUGCUUGUGUUCCUGUUCUUCU			
		LALFQLTES	UCAGCCUGAUGGGCCUGCUGUCCUCC			
		DLRLGRLLL	CACCUGACCAGCAACUCCACCACCGA			
		RVAPDQHTR	CCUGCCCAAGGCCUUCCACGUGUGCG			
		LLPFAFYSLL	CCGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAGAAG			
		SYFHEDAAI	CGGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCUGUU			
		REEAFLHVA	CCAGCUGACCGAGAGCGACCUGCGCC			
		VDMYLKLV	UGGGGAGACUGCUGCUGCGCGUGGCU			
		QLFVAGDTS	CCCGACCAGCACACCAGGCUGCUGCC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		TVSPPAGRS LELKGQGNP VELITKARL FLLQLIPRCP KKSFSHVAE LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	CUUCGCCUUCUACUCCCUGCUGUCCU ACUUCCACGAGGACGCCGCCAUCCGG GAGGAGGCCUUCCUGCACGUGGCCGU GGACAUGUACCUGAAGCUGGUGCAGC UGUUCGUGGCCGGCGACACCUCCACC GUGAGCCCUCCUGCUGGCCGAAGCCU GGAGCUGAAGGGCCAGGGCAACCCCG UGGAGCUGAUCACCAAGGCCCGCCUG UUCCUGCUGCAGCUGAUCCCUCGCUG CCCCAAGAAGAGCUUCAGCCACGUGG CCGAGCUGCUGGCUGACAGGGGAGAC UGCGACCCCGAGGUGAGCGCUGCCCU GCAGAGCCGUCAACAAGCGGCCCCUG ACGCCGAUCUGAGCCAGGAGCCCCAC CUGUUC			
SEQ ID NO		**1**	**3**	**50**	**139**	**5**
	FANCA_02 化學：G5 帽：m7Gp-ppGm-A 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW FGVFSGHTL GSVISTDPLK RFFSHTLTQI LTHSPVLKA SDAVQMQR EWSFARTHP LLTSLYRRL FVMLSAEEL	AUGAGCGACAGCUGGGUGCCUAAUA GCGCCAGCGGACAGGAUCCUGGUGGA AGGAGAAGGGCGUGGGCAGAGCUAC UGGCUGGACGGGUGAAGCGAGAGAA GUACAACCCCGAGCGAGCACAGAAGC UGAAGGAGUCAGCCGUGAGACUGCU GCGGAGCCACCAAGACCUGAACGCCU UACUGCUGGAAGUGGAGGGACCCCUG UGCAAGAAGCUGAGCCUGAGCAAGG UGAUCGACUGCGACAGCAGCGAGGCC UACGCCAACCACAGCAGCAGCUUCAU CGGCAGCGCAUUGCAGGACCAAGCUU CUAGGCUAGGCGUCCCCGUUGGUAUC CUGAGCGCCGGUAUGGUAGCAAGCAG CGUGGGCCAGAUUUGUACCGCACCUG CCGAGACUAGCCACCCCGUGCUUCUG ACCGUGGAGCAGCGGAAGAAGCUGA GCAGCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUAC CUGCUUGCGCACAGCAUGUUCAGCCG GCUGAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGA AGAUCCAGAGCAGCCUGCUGCUGGAA GCCGUGUGGCAUCUGCACGUGCAGGG CAUCGUGAGCCUGCAGGAGCUGCUGG AAAGCCACCCAGACAUGCACGCCGUA GGGAGUUGGCUGUUCCGGAACCUGU GCUGCCUGUGCGAGCAGAUGGAGGCC AGCUGUCAACACGCUGACGUAGCUCG CGCAAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGA UGUUCGUGCUGCGGGGCUUCCAGAAG AACAGCGACCUCAGACGGACCGUGGA ACCCGAGAAGAUGCCACAGGUGACAG UGGACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAU UUUCGCGUUAGACGCACUAGCCGCAG GCGUUCAGGAGGAGAGCAGCACCCAC AAGAUAGUGCGGUGCUGGUUCGGCG UGUUCUCUGGCCACACACUGGGGAGC GUGAUCAGCACCGAUCCCCUGAAGCG GUUCUUCAGCCACACCCUGACCCAGA UCCUGACCCAUAGCCCCGUGCUGAAG GCAAGCGACGCCGUGCAGAUGCAGCG UGAGUGGAGCUUCGCACGGACCCAUC CGCUACUGACCAGCCUAUACCGGCGC	GGAAAU CGCAAA AUUUGC UCUUCG CGUUAG AUUUCU UUUAGU UUUCUC GCAACU AGCAAG CUUUUU GUUCUC GCC	UAAAGC UCCCCG GGGGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCC CAGCCC CUCCUC CCCUUC CUGCAC CCGUAC CCCCGU GGUCUU UGAAUA AAGUCU GAGUGG GCGGC	SEQ ID NO:5 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:50 之 5′ UTR、SEQ ID NO:3 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:139 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		VGHLQEVLE	CUGUUCGUGAUGCUAUCCGCCGAGGA			
		TQEVHWQR	GUUGGUCGGACACCUGCAGGAGGUGC			
		VLSFVSALV	UGGAGACCCAGGAGGUGCACUGGCAG			
		VCFPEAQQL	AGAGUGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCU			
		LEDWVARL	GGUGGUGUGCUUUCCCGAGGCACAGC			
		MAQAFESC	AGCUGCUGGAAGACUGGGUAGCUCG			
		QLDSMVTAF	GCUUAUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCU			
		LVVRQAALE	GCCAGCUGGACAGCAUGGUGACCGCC			
		GPSAFLSYA	UUUCUCGUGGUGAGGCAAGCAGCCCU			
		DWFKASFGS	AGAAGGCCCUAGCGCCUUUCUGAGCU			
		TRGYHGCSK	ACGCCGACUGGUUCAAAGCCAGCUUC			
		KALVFLFTF	GGCUCCACUCGGGGUUACCACGGCUG			
		LSELVPFESP	CAGCAAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGU			
		RYLQVHILH	UCACCUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCC			
		PPLVPGKYR	UUCGAGUCACCCCGGUACCUGCAGGU			
		SLLTDYISLA	GCACAUCCUGCAUCCACCACUGGUCC			
		KTRLADLKV	CCGGGAAAUACCGGAGCCUGCUGACC			
		SIENMGLYE	GACUACAUCAGCCUGGCCAAGACUCG			
		DLSSAGDIT	GCUGGCAGACCUGAAGGUGAGCAUCG			
		EPHSQALQD	AGAACAUGGGCCUGUACGAGGAUCU			
		VEKAIMVFE	GAGCAGCGCUGGCGACAUCACAGAAC			
		HTGNIPVTV	CGCACAGCCAGGCCUUGCAGGACGUG			
		MEASIFRRP	GAGAAGGCCAUCAUGGUGUUCGAGC			
		YYVSHFLPA	ACACCGGCAACAUCCCCGUGACCGUG			
		LLTPRVLPK	AUGGAGGCCAGCAUUUUCCGCCGGCC			
		VPDSRVAFI	AUACUACGUUAGCCACUUCCUGCCCG			
		ESLKRADKI	CACUGCUGACUCCACGCGUGCUGCCA			
		PPSLYSTYC	AAGGUCCCCGAUAGCAGAGUGGCUUU			
		QACSAAEEK	CAUCGAGAGCCUGAAACGGGCCGACA			
		PEDAALGVR	AGAUCCCACCUAGCCUGUACAGCACC			
		AEPNSAEEP	UACUGCCAAGCUUGUAGCGCUGCCGA			
		LGQLTAALG	GGAGAAACCGGAAGACGCUGCACUGG			
		ELRASMTDP	GUGUUAGGGCCGAGCCCAAUAGCGCA			
		SQRDVISAQ	GAGGAACCCUUGGGCCAACUGACUGC			
		VAVISERLR	UGCACUUGGUGAGCUUCGGGCAAGCA			
		AVLGHNED	UGACCGACCCCUCUCAACGGGACGUG			
		DSSVEISKIQ	AUCAGCGCCCAAGUGGCCGUGAUCAG			
		LSINTPRLEP	CGAGCGGUUACGUGCCGUGCUGGGCC			
		REHMAVDL	ACAACGAGGACGACAGCAGCGUGGAG			
		LLTSFCQNL	AUCAGCAAGAUCCAGCUGAGCAUCAA			
		MAASSVAPP	UACGCCUCGACUGGAACCUCGGGAGC			
		ERQGPWAA	ACAUGGCCGUGGACCUGCUGCUGACC			
		LFVRTMCGR	AGCUUCUGCCAGAACUUGAUGGCCGC			
		VLPAVLTRL	UAGCAGUGUGGCUCCACCCGAACGGC			
		CQLLRHQGP	AAGGACCUUGGGCUGCGCUGUUCGUC			
		SLSAPHVLG	AGGACCAUGUGUGGCCGGGUUCUUCC			
		LAALAVHL	CGCUGUGUUGACCCGGCUUUGCCAGC			
		GESRSALPE	UGCUGCGGCAUCAAGGGCCAUCUUUG			
		VDVGPPAPG	UCCGCACCUCACGUUCUGGGUCUUGC			
		AGLPVPALF	UGCUCUGGCCGUGCAUCUGGGCGAGA			
		DSLLTCRTR	GCAGAUCGGCACUGCCGGAAGUGGAC			
		DSLFFCLKF	GUGGGACCUCCUGCACCUGGUGCAGG			
		CTAAISYSL	UCUUCCCGUGCCAGCCUUAUUCGACA			
		CKFSSQSRD	GCCUGCUUACCUGCCGUACUCGGGAC			
		TLCSCLSPG	AGCCUGUUCUUCUGCCUGAAGUUCUG			
		LIKKFQFLM	CACCGCCGCCAUCAGCUACAGCCUGU			
		FRLFSEARQ	GCAAGUUCAGCAGCCAGAGCCGGGAC			
		PLSEEDVAS	ACUCUGUGUAGCUGUCUGAGCCCUGG			
		LSWRPLHLP	CCUCAUCAAGAAGUUCCAGUUCCUGA			
		SADWQRAA	UGUUCAGAUUAUUUAGCGAGGCUCG			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		LSLWTHRTF	GCAACCUCUGAGCGAGGAGGACGUUG			
		REVLKEEDV	CCAGCCUGAGUUGGCGUCCCCUACAC			
		HLTYQDWL	CUUCCCAGCGCCGAUUGGCAGAGGGC			
		HLELEIQPEA	UGCUCUGUCCCUGUGGACUCACCGCA			
		DALSDTERQ	CUUUCCGGGAGGUGCUGAAGGAGGA			
		DFHQWAIHE	GGACGUGCACCUGACCUACCAGGACU			
		HFLPESSAS	GGCUGCACCUGGAGCUCGAGAUACAG			
		GGCDGDLQ	CCCGAAGCUGACGCCCUGUCAGACAC			
		AACTILVNA	CGAGCGGCAGGACUUCCACCAGUGGG			
		LMDFHQSSR	CCAUCCACGAGCACUUCCUGCCUGAG			
		SYDHSENSD	AGCAGCGCCUCAGGAGGGUGUGACGG			
		LVFGGRTGN	GGACCUGCAAGCAGCCUGCACCAUCC			
		EDIISRLQEM	UGGUGAACGCCCUGAUGGACUUCCAC			
		VADLELQQ	CAGAGCAGCCGGAGCUACGACCACAG			
		DLIVPLGHT	CGAGAACAGCGAUCUAGUCUUCGGCG			
		PSQEHFLFEI	GCAGAACAGGUAACGAGGACAUCAUC			
		FRRRLQALT	AGCCGGCUGCAGGAGAUGGUGGCCGA			
		SGWSVAASL	CCUGGAACUGCAGCAGGACCUGAUUG			
		QRQRELLM	UCCCCUUGGGUCACACCCCUAGCCAG			
		YKRILLRLPS	GAGCACUUCCUGUUCGAGAUUUUCAG			
		SVLCGSSFQ	GAGGCGGCUGCAAGCACUGACCAGCG			
		AEQPITARC	GCUGGUCUGUCGCUGCUUCCCUUCAG			
		EQFFHLVNS	CGUCAGCGGGAGCUGCUGAUGUACAA			
		EMRNFCSHG	GCGGAUUCUGCUGCGGCUACCCAGCA			
		GALTQDITA	GUGUGCUGUGCGGCUCUAGCUUUCAA			
		HFFRGLLNA	GCCGAGCAGCCAAUCACCGCUCGCUG			
		CLRSRDPSL	CGAGCAGUUCUUCCACCUGGUGAACA			
		MVDFILAKC	GCGAGAUGCGGAAUUUCUGUUCCCAC			
		QTKCPLILTS	GGAGGUGCUCUGACCCAGGACAUCAC			
		ALVWWPSL	CGCCCAUUUCUUCCGGGGCCUGCUGA			
		EPVLLCRWR	ACGCUUGUCUCCGAUCGAGAGACCCC			
		RHCQSPLPR	AGCCUGAUGGUGGACUUCAUCCUGGC			
		ELQKLQEGR	CAAGUGCCAGACCAAGUGUCCCCUGA			
		QFASDFLSP	UCCUGACCUCUGCCCUGGUGUGGUGG			
		EAASPAPNP	CCUUCACUGGAGCCCGUGUUGCUGUG			
		DWLSAAAL	UCGCUGGCGGAGACAUUGUCAAUCAC			
		HFAIQQVRE	CACUGCCACGGGAGCUGCAGAAGCUG			
		ENIRKQLKK	CAAGAGGGUCGGCAAUUCGCCUCGGA			
		LDCEREELL	CUUUCUGUCUCCUGAAGCUGCUAGCC			
		VFLFFFSLM	CUGCCCCUAAUCCUGACUGGUUGUCU			
		GLLSSHLTS	GCGGCCGCACUACACUUUGCCAUCCA			
		NSTTDLPKA	GCAGGUGCGGGAGGAGAACAUCCGG			
		FHVCAAILE	AAGCAGCUGAAGAAACUGGACUGCG			
		CLEKRKISW	AGCGGGAAGAGCUGCUGGUGUUCCU			
		LALFQLTES	GUUCUUCUUCAGCCUGAUGGGCCUGC			
		DLRLGRLLL	UGAGCUCACACCUGACCAGCAACAGC			
		RVAPDQHTR	ACUACCGACCUGCCCAAAGCCUUCCA			
		LLPFAFYSLL	CGUGUGCGCUGCCAUCCUGGAGUGCC			
		SYFHEDAAI	UGGAGAAGCGGAAGAUCAGCUGGCU			
		REEAFLHVA	GGCCCUGUUCCAGCUGACAGAGUCUG			
		VDMYLKLV	AUCUUCGGCUGGGGCGGUUACUCCUG			
		QLFVAGDTS	AGAGUAGCACCCGAUCAGCAUACCAG			
		TVSPPAGRS	GCUGCUCCCCUUCGCAUUCUACAGCC			
		LELKGQGNP	UGCUGAGCUACUUCCACGAAGACGCC			
		VELITKARL	GCCAUACGCGAGGAAGCUUUCCUGCA			
		FLLQLIPRCP	CGUGGCCGUGGACAUGUACCUGAAGC			
		KKSFSHVAE	UGGUGCAGCUGUUCGUUGCUGGCGAC			
		LLADRGDC	ACCAGCACCGUGUCACCUCCUGCAGG			
		DPEVSAALQ	CAGGAGCCUGGAGCUGAAAGGUCAG			
		SRQQAAPDA	GGCAACCCCGUGGAGCUGAUCACCAA			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		DLSQEPHLF	GGCCCGGCUGUUCCUGCUUCAGCUGA UACCCCGGUGCCCCAAGAAGAGCUUU AGCCACGUGGCCGAACUGCUGGCAGA CCGGGGUGAUUGCGACCCAGAAGUGU CAGCCGCCCUUCAAAGCCGGCAACAA GCUGCCCCUGACGCCGACUUGAGCCA GGAGCCGCACCUGUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**14**	**50**	**139**	**23**
	FANCA_03 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW FGVFSGHTL GSVISTDPLK RFFSHTLTQI LTHSPVLKA SDAVQMQR EWSFARTHP LLTSLYRRL FVMLSAEEL VGHLQEVLE TQEVHWQR VLSFVSALV VCFPEAQQL LEDWVARL MAQAFESC QLDSMVTAF LVVRQAALE	AUGAGCGACAGCUGGGUGCCCAACAG UGCUUCCGGGCAGGAUCCCGGCGGUA GAAGACGGGCUUGGGCUGAGCUGCU GGCCGGCAGGGUGAAGCGGGAGAAG UACAACCCCGAGCGGGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGUGCCGUGCGGCUGCUGC GGAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUC CUGCUGGAGGUCGAGGGCCCACUGUG CAAGAAGCUCAGCCUGAGCAAGGUGA UCGACUGUGACAGCAGCGAGGCCUAC GCCAACCACAGCUCCAGCUUCAUCGG CAGCGCCCUGCAGGACCAGGCCAGCA GACUGGGCGUGCCCGUGGGCAUCCUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCUCGGU GGGCCAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG AGACCAGCCACCCCGUGCUGCUCACC GUGGAGCAGCGGAAGAAGCUGAGCA GCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCUG CUGGCCCACAGCAUGUUCUCCCGGCU GAGCUUUUGCCAAGAGCUGUGGAAG AUCCAGAGCUCCCUGCUGCUGGAGGC CGUGUGGCACCUUCACGUGCAGGGCA UCGUGAGCCUGCAGGAACUGCUGGAG AGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGGG CAGCUGGCUGUUCCGGAACCUGUGCU GCCUGUGCGAGCAGAUGGAGGCUAGC UGCCAGCACGCCGACGUGGCACGGGC CAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUGU UCGUGCUGCGGGGCUUCCAGAAGAAU AGCGACCUACGGCGGACCGUGGAGCC CGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUGG ACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUUC GCCCUGGACGCUCUGGCCGCUGGCGU GCAGGAGGAGAGCAGCACCCACAAGA UCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGUUC AGCGGCCACACCCUGGGCAGCGUGAU CAGCACCGACCCACUGAAGCGGUUCU UCAGCCACACCCUCACCCAGAUCCUG ACCCACAGCCCCGUGCUGAAGGCCAG CGACGCCGUGCAGAUGCAGCGGGAGU GGAGCUUCGCCCGGACCCACCCACUG CUGACUAGCCUGUACCGGCGGCUGUU CGUGAUGCUGAGCGCAGAGGAGCUG GUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGGA GACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGGG UGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGUG GUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGCU CCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUGA UGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCAG CUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCCU	GGAAAU CGCAAA AUUUGC UCUUCG CGUUAG AUUUCU UUUAGU UUUCUC GCAACU AGCAAG CUUUUU GUUCUC GCC	UAAAGC UCCCCG GGGGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCC CAGCCC CUCCUC CCCUUC CUGCAC CCGUAC CCCCGU GGUCUU UGAAUA AAGUCU GAGUGG GCGGC	SEQ ID NO:23 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:50 之 5′ UTR、SEQ ID NO:14 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:139 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		GPSAFLSYA	GGUGGUGCGGCAGGCUGCCCUGGAAG			
		DWFKASFGS	GCCCCAGCGCUUUCCUGAGCUACGCC			
		TRGYHGCSK	GACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGCUC			
		KALVFLFTF	CACCCGGGGCUACCACGGCUGCAGCA			
		LSELVPFESP	AGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUCACC			
		RYLQVHILH	UUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCGA			
		PPLVPGKYR	GUCACCCCGGUACCUGCAGGUGCACA			
		SLLTDYISLA	UCCUGCAUCCUCCGCUGGUGCCCGGC			
		KTRLADLKV	AAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACUA			
		SIENMGLYE	CAUCAGCCUGGCCAAGACCCGGCUGG			
		DLSSAGDIT	CCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAAC			
		EPHSQALQD	AUGGGCCUGUACGAGGACCUGAGCAG			
		VEKAIMVFE	CGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCACA			
		HTGNIPVTV	GCCAGGCCCUGCAAGACGUGGAGAAG			
		MEASIFRRP	GCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCGG			
		YYVSHFLPA	CAACAUCCCCGUGACCGUCAUGGAGG			
		LLTPRVLPK	CCAGCAUCUUCCGGCGGCCCUACUAC			
		VPDSRVAFI	GUGAGCCACUUCCUGCCCGCCCUGCU			
		ESLKRADKI	GACCCCACGGGUGCUGCCCAAGGUGC			
		PPSLYSTYC	CCGACAGCCGGGUGGCCUUCAUCGAG			
		QACSAAEEK	AGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUCCC			
		PEDAALGVR	ACCCAGCCUGUACAGCACCUACUGCC			
		AEPNSAEEP	AGGCCUGCUCUGCCGCCGAGGAGAAG			
		LGQLTAALG	CCCGAGGACGCCGCAUUAGGCGUGCG			
		ELRASMTDP	GGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAAC			
		SQRDVISAQ	CCCUGGGGCAGCUGACCGCAGCCCUG			
		VAVISERLR	GGAGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCGA			
		AVLGHNED	CCCCAGCCAGCGGGACGUGAUCAGCG			
		DSSVEISKIQ	CCCAGGUGGCCGUCAUCAGCGAGCGG			
		LSINTPRLEP	CUGCGGGCAGUGCUGGGCCACAACGA			
		REHMAVDL	GGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGCA			
		LLTSFCQNL	AGAUCCAGCUGAGCAUCAACACCCCA			
		MAASSVAPP	CGGCUGGAACCUCGGGAGCACAUGGC			
		ERQGPWAA	CGUGGACCUGCUGCUGACCAGCUUCU			
		LFVRTMCGR	GCCAGAACCUGAUGGCCGCCUCUAGC			
		VLPAVLTRL	GUGGCCCCACCAGAACGGCAGGGUCC			
		CQLLRHQGP	CUGGGCUGCCCUGUUCGUGCGGACCA			
		SLSAPHVLG	UGUGCGGCCGGGUUCUGCCCGCUGUG			
		LAALAVHL	CUGACCCGGCUGUGCCAGCUGCUGCG			
		GESRSALPE	GCACCAGGGCCCUAGCCUGAGCGCUC			
		VDVGPPAPG	CCCACGUGCUGGGCCUAGCUGCCCUG			
		AGLPVPALF	GCCGUGCACCUUGGGGAGUCCCGAAG			
		DSLLTCRTR	CGCCCUGCCCGAGGUGGACGUGGGCC			
		DSLFFCLKF	CUCCAGCCCCAGGUGCUGGCCUUCCC			
		CTAAISYSL	GUGCCCGCUCUGUUCGACAGUCUGCU			
		CKFSSQSRD	GACCUGCCGGACCCGGGACAGCCUGU			
		TLCSCLSPG	UCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGCC			
		LIKKFQFLM	GCCAUCAGCUACAGCCUGUGCAAGUU			
		FRLFSEARQ	CAGCAGCCAGAGCCGGGACACCCUGU			
		PLSEEDVAS	GCAGCUGCCUGAGCCCCGGCCUGAUC			
		LSWRPLHLP	AAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCCG			
		SADWQRAA	GCUGUUCAGCGAAGCCCGGCAGCCCC			
		LSLWTHRTF	UGAGCGAGGAGGACGUCGCCAGCCUG			
		REVLKEEDV	UCCUGGAGACCCCUGCACCUGCCCAG			
		HLTYQDWL	CGCCGACUGGCAGAGAGCCGCCCUGA			
		HLELEIQPEA	GCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCGG			
		DALSDTERQ	GAGGUGCUGAAGGAAGAGGACGUGC			
		DFHQWAIHE	ACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCAC			
		HFLPESSAS	CUGGAGCUGGAGAUUCAGCCCGAGGC			
		GGCDGDLQ	CGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGGC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		AACTILVNA LMDFHQSSR SYDHSENSD LVFGGRTGN EDIISRLQEM VADLELQQ DLIVPLGHT PSQEHFLFEI FRRRLQALT SGWSVAASL QRQRELLM YKRILLRLPS SVLCGSSFQ AEQPITARC EQFFHLVNS EMRNFCSHG GALTQDITA HFFRGLLNA CLRSRDPSL MVDFILAKC QTKCPLILTS ALVWWPSL EPVLLCRWR RHCQSPLPR ELQKLQEGR QFASDFLSP EAASPAPNP DWLSAAAL HFAIQQVRE ENIRKQLKK LDCEREELL VFLFFFSLM GLLSSHLTS NSTTDLPKA FHVCAAILE CLEKRKISW LALFQLTES DLRLGRLLL RVAPDQHTR LLPFAFYSLL SYFHEDAAI REEAFLHVA VDMYLKLV QLFVAGDTS TVSPPAGRS LELKGQGNP VELITKARL FLLQLIPRCP KKSFSHVAE LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	AGGAUUUCCACCAGUGGGCCAUCCAC GAGCAUUUCCUGCCCGAGAGCAGCGC CAGCGGCGGCUGUGACGGCGACCUGC AGGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAAC GCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCAG CCGGAGCUACGACCACAGCGAGAACA GCGACCUGGUGUUCGGCGGACGGACC GGCAACGAGGACAUCAUCAGCCGGCU GCAGGAGAUGGUCGCCGACCUGGAGU UGCAGCAGGACCUGAUCGUGCCCCUG GGCCACACUCCCAGCCAGGAGCACUU CCUGUUCGAGAUCUUCCGCCGGAGAC UGCAGGCCCUGACCUCAGGCUGGAGC GUGGCCGCCAGCCUGCAACGGCAGCG GGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGAUCC UGCUGCGGCUGCCCAGCAGCGUGCUG UGCGGCAGCAGCUUCCAGGCCGAGCA GCCCAUCACGGCCCGGUGCGAGCAGU UCUUCCACCUGGUGAACAGCGAGAUG CGGAACUUCUGCAGCCACGGAGGCGC CCUGACCCAGGACAUCACCGCCCACU UCUUCCGGGGCCUGCUGAACGCCUGC CUGCGGAGCAGAGACCCCAGCCUGAU GGUGGACUUCAUCCUGGCCAAGUGCC AGACCAAGUGUCCCCUGAUCCUGACC UCCGCCCUGGUGUGGUGGCCCAGCCU GGAGCCCGUGCUUCUGUGUCGGUGGC GGCGGCACUGCCAGAGCCCUCUGCCC CGGGAGCUGCAGAAGCUGCAGGAGG GCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCCUG UCUCCCGAGGCCGCUAGCCCAGCCCC AAACCCCGACUGGCUGAGCGCUGCCG CCCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGGUG CGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCAGCU GAAGAAGCUGGACUGCGAGCGGGAG GAGCUGCUCGUGUUCCUCUUCUUCUU CAGCCUCAUGGGCCUUCUGAGCAGCC ACCUGACCAGCAACAGCACCACCGAC CUGCCCAAGGCCUUCCACGUGUGCGC CGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAGAAGC GGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCUGUUC CAGCUGACCGAGAGCGACCUGCGGCU GGGCCGACUGCUGCUGCGGGUGGCCC CAGACCAGCACACCCGGCUGCUGCCC UUCGCCUUCUACAGCCUGCUGAGCUA CUUCCACGAGGACGCUGCCAUCCGGG AGGAGGCCUUUCUGCACGUGGCAGUG GACAUGUACCUGAAGCUGGUGCAGCU GUUCGUGGCCGGCGACACCAGCACCG UGUCACCACCAGCCGGCCGCUCCCUG GAGCUGAAGGGCCAGGGCAACCCCGU GGAGCUGAUCACCAAGGCCCGGCUGU UCCUGCUGCAGCUGAUCCCACGGUGC CCCAAGAAGAGCUUCAGCCACGUGGC CGAGCUGCUUGCCGACCGGGGAGACU GCGACCCCGAGGUGAGCGCCGCCUUG CAGAGCCGGCAGCAGGCCGCACCUGA CGCCGACCUGAGCCAGGAGCCCCACC UGUUC			
SEQ		**1**	**15**	**50**	**139**	**24**

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
ID NO:						
	FANCA_04 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW FGVFSGHTL GSVISTDPLK RFFSHTLTQI LTHSPVLKA SDAVQMQR EWSFARTHP LLTSLYRRL FVMLSAEEL VGHLQEVLE TQEVHWQR VLSFVSALV VCFPEAQQL LEDWVARL MAQAFESC QLDSMVTAF LVVRQAALE GPSAFLSYA DWFKASFGS TRGYHGCSK KALVFLFTF LSELVPFESP RYLQVHILH PPLVPGKYR SLLTDYISLA	AUGAGCGACAGCUGGGUGCCCAACAG CGCCAGUGGCCAAGACCCCGGCGGUC GGAGACGAGCGUGGGCUGAGCUGCU GGCCGGACGGGUGAAGCGGGAGAAG UACAACCCCGAGCGGGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGCGCUGUGCGGCUGCUGC GGAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUG CUGCUGGAGGUGGAGGGCCCACUGUG CAAGAAGCUGAGCCUGAGCAAGGUG AUCGACUGCGACAGCAGCGAGGCCUA CGCCAACCACAGCAGCAGCUUCAUCG GCAGCGCCCUGCAGGACCAGGCCAGC AGACUGGGCGUGCCCGUGGGCAUCCU GAGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCAGCG UGGGCCAGAUCUGCACCGCCCCGGCC GAGACAAGCCACCCCGUGCUGCUGAC CGUGGAGCAGCGGAAGAAGCUGAGC AGCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCU GCUGGCCCACAGCAUGUUCAGCCGGC UGAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGAA GAUCCAGAGCAGCCUGCUGCUGGAGG CCGUGUGGCACCUGCACGUGCAGGGC AUCGUGAGCCUGCAGGAGCUGCUGGA GAGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGG GCAGCUGGCUGUUCCGGAACCUGUGC UGCCUGUGCGAGCAGAUGGAGGCCAG CUGCCAGCACGCCGACGUGGCUCGGG CCAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUG UUCGUGCUGCGGGGCUUCCAGAAGAA CAGCGACCUGCGGCGGACCGUAGAGC CCGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUG GACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUU CGCACUCGACGCCCUGGCCGCUGGUG UGCAGGAGGAGAGCAGCACCCACAAG AUCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGU UCAGCGGCCACACCCUGGGCAGCGUG AUCAGCACCGAUCCCCUGAAGCGGUU CUUCAGCCACACCCUGACCCAGAUCC UGACCCACAGCCCCGUGCUGAAGGCC AGCGACGCCGUGCAGAUGCAGCGGGA GUGGAGCUUCGCCCGGACCCAUCCCC UGCUGACCAGCCUGUACCGGCGGCUG UUCGUGAUGCUGAGCGCCGAGGAGCU GGUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGG AGACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGG GUGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGU GGUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGC UGCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUG AUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCA GCUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCC UGGUGGUAAGGCAAGCCGCCCUGGAG GGUCCCAGCGCCUUCCUGAGCUACGC CGACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGCA GCACCCGGGGCUACCACGGCUGCAGC AAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUCAC CUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCG AGUCACCCCGGUACCUGCAGGUGCAC AUCCUGCACCCACCCCUGGUGCCCGG	GGAAAU CGCAAA AUUUGC UCUUCG CGUUAG AUUUCU UUUAGU UUUCUC GCAACU AGCAAG CUUUUU GUUCUC GCC	UAAAGC UCCCCG GGGGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCC CAGCCC CUCCUC CCCUUC CUGCAC CCGUAC CCCCGU GGUCUU UGAAUA AAGUCU GAGUGG GCGGC	SEQ ID NO:24 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:50 之 5′ UTR、SEQ ID NO:15 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:139 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		KTRLADLKV	CAAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACU			
		SIENMGLYE	ACAUCAGCCUGGCCAAGACCCGGCUG			
		DLSSAGDIT	GCCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAA			
		EPHSQALQD	CAUGGGCCUGUACGAGGACCUGAGCA			
		VEKAIMVFE	GCGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCAC			
		HTGNIPVTV	AGCCAGGCCCUGCAGGACGUGGAGAA			
		MEASIFRRP	GGCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCG			
		YYVSHFLPA	GCAACAUCCCCGUGACCGUGAUGGAG			
		LLTPRVLPK	GCCAGCAUCUUCCGGCGGCCCUACUA			
		VPDSRVAFI	CGUGAGCCACUUCCUGCCCGCCCUGC			
		ESLKRADKI	UGACUCCCCGGGUGCUGCCCAAGGUG			
		PPSLYSTYC	CCCGACAGCCGGGUGGCCUUCAUCGA			
		QACSAAEEK	GAGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUUC			
		PEDAALGVR	CUCCCAGCCUGUACAGCACCUACUGC			
		AEPNSAEEP	CAGGCCUGCAGUGCCGCCGAGGAGAA			
		LGQLTAALG	GCCCGAAGACGCCGCUCUGGGCGUGA			
		ELRASMTDP	GAGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAG			
		SQRDVISAQ	CCUUUGGGCCAGCUGACAGCAGCCCU			
		VAVISERLR	UGGCGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCG			
		AVLGHNED	ACCCCAGCCAGCGGGACGUGAUCAGC			
		DSSVEISKIQ	GCCCAGGUGGCCGUGAUCUCCGAGAG			
		LSINTPRLEP	ACUGCGGGCCGUGCUGGGCCACAACG			
		REHMAVDL	AGGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGC			
		LLTSFCQNL	AAGAUCCAGCUGAGCAUCAACACUCC			
		MAASSVAPP	CCGGCUGGAGCCCAGGGAGCACAUGG			
		ERQGPWAA	CCGUGGACCUGCUGCUGACCAGCUUC			
		LFVRTMCGR	UGCCAGAACCUGAUGGCCGCCUCAAG			
		VLPAVLTRL	CGUGGCCCCUCCAGAGCGGCAAGGCC			
		CQLLRHQGP	CUUGGGCGGCCCUGUUCGUGCGGACC			
		SLSAPHVLG	AUGUGCGGCCGGGUGUUGCCUGCCGU			
		LAALAVHL	GCUGACCCGGCUGUGCCAGCUGCUGC			
		GESRSALPE	GGCACCAGGGCCCUAGCCUGAGCGCU			
		VDVGPPAPG	CCCCACGUGCUGGGGCUGGCCGCCUU			
		AGLPVPALF	AGCAGUGCACCUGGGCGAGUCACGGA			
		DSLLTCRTR	GCGCCCUGCCCGAGGUGGACGUGGGC			
		DSLFFCLKF	CCUCCUGCGCCAGGAGCAGGGCUUCC			
		CTAAISYSL	CGUGCCCGCCCUGUUCGACAGCCUGC			
		CKFSSQSRD	UGACCUGCCGGACCCGGGACAGCCUG			
		TLCSCLSPG	UUCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGC			
		LIKKFQFLM	CGCCAUCAGCUACAGCCUGUGCAAGU			
		FRLFSEARQ	UCAGCAGCCAGAGCCGGGACACCCUG			
		PLSEEDVAS	UGCAGCUGCCUGAGCCCCGGCCUGAU			
		LSWRPLHLP	CAAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCC			
		SADWQRAA	GGCUGUUCAGCGAGGCCCGGCAACCC			
		LSLWTHRTF	CUGAGCGAGGAGGACGUGGCCAGCCU			
		REVLKEEDV	GAGCUGGCGGCCCCUGCACCUUCCCA			
		HLTYQDWL	GCGCCGACUGGCAACGCGCCGCCCUG			
		HLELEIQPEA	AGCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCG			
		DALSDTERQ	GGAGGUGCUGAAGGAGGAGGACGUG			
		DFHQWAIHE	CACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCA			
		HFLPESSAS	CCUGGAGCUGGAGAUUCAGCCCGAGG			
		GGCDGDLQ	CCGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGG			
		AACTILVNA	CAGGACUUCCACCAGUGGGCCAUCCA			
		LMDFHQSSR	CGAGCACUUCCUGCCCGAGAGCAGUG			
		SYDHSENSD	CCAGCGGCGGCUGUGACGGCGACCUG			
		LVFGGRTGN	CAGGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAA			
		EDIISRLQEM	CGCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCA			
		VADLELQQ	GCCGGAGCUACGACCACAGCGAGAAC			
		DLIVPLGHT	AGCGACCUGGUGUUCGGAGGCCGGAC			
		PSQEHFLFEI	CGGCAACGAGGACAUCAUCAGCCGGC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		FRRRLQALT SGWSVAASL QRQRELLM YKRILLRLPS SVLCGSSFQ AEQPITARC EQFFHLVNS EMRNFCSHG GALTQDITA HFFRGLLNA CLRSRDPSL MVDFILAKC QTKCPLILTS ALVWWPSL EPVLLCRWR RHCQSPLPR ELQKLQEGR QFASDFLSP EAASPAPNP DWLSAAAL HFAIQQVRE ENIRKQLKK LDCEREELL VFLFFFSLM GLLSSHLTS NSTTDLPKA FHVCAAILE CLEKRKISW LALFQLTES DLRLGRLLL RVAPDQHTR LLPFAFYSLL SYFHEDAAI REEAFLHVA VDMYLKLV QLFVAGDTS TVSPPAGRS LELKGQGNP VELITKARL FLLQLIPRCP KKSFSHVAE LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	UGCAGGAGAUGGUGGCCGACCUGGA GCUGCAGCAGGACCUGAUCGUGCCCC UGGGCCACACCCCUAGCCAGGAGCAC UUCCUGUUCGAGAUCUUUCGGCGGCG GCUGCAAGCGCUGACCAGCGGUUGGA GCGUGGCCGCCUCCCUGCAACGGCAG CGGGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGA UCCUGCUGCGGCUGCCCAGCAGCGUG CUGUGCGGCAGCAGCUUCCAGGCCGA GCAGCCCAUCACCGCCCGGUGCGAGC AGUUCUUCCACCUGGUGAACAGCGAG AUGCGGAACUUCUGCAGCCACGGUGG CGCCCUGACCCAGGACAUCACCGCCC ACUUCUUCCGGGGCCUGCUGAACGCC UGCCUGCGUAGCCGGGACCCCAGCCU GAUGGUGGACUUCAUCCUGGCCAAGU GCCAGACCAAGUGCCCACUGAUCCUG ACCAGCGCCCUGGUGUGGUGGCCCAG CCUGGAGCCCGUGCUGCUGUGCCGGU GGCGACGGCACUGCCAGUCACCGCUG CCCCGGGAGCUGCAGAAGCUGCAGGA GGGCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCC UGAGCCCCGAGGCUGCCAGCCCUGCC CCGAACCCCGACUGGCUGAGUGCCGC CGCCCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGG UGCGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCA GCUGAAGAAGCUGGACUGCGAGCGG GAGGAGCUGCUGGUGUUCCUGUUCU UCUUCAGCCUGAUGGGCCUGCUGAGC AGCCACCUGACCAGCAACAGCACCAC CGACCUGCCCAAGGCCUUCCACGUGU GCGCCGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAG AAGCGGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCU GUUCCAGCUGACCGAGUCUGACCUGC GCCUGGGCAGGCUGCUGCUGCGGGUG GCUCCCGACCAGCACACCCGGCUGCU GCCCUUCGCCUUCUACAGCCUGCUGA GCUACUUCCACGAGGACGCCGCCAUC CGGGAGGAGGCCUUCCUGCACGUGGC CGUGGACAUGUACCUGAAGCUGGUGC AGCUGUUCGUGGCCGGCGACACCAGC ACUGUAUCUCCACCGGCUGGGCGGUC CCUGGAGCUGAAGGGCCAGGGCAACC CCGUGGAGCUGAUCACCAAGGCCCGG CUGUUCCUGCUGCAGCUGAUCCCACG GUGCCCCAAGAAGAGCUUCAGCCACG UGGCCGAGCUGCUGGCCGACCGGGGA GACUGCGACCCCGAGGUUAGUGCCGC CCUCCAGAGCCGGCAGCAAGCCGCCC CUGACGCCGACCUGAGCCAGGAGCCC CACCUGUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**16**	**50**	**139**	**25**
	FANCA_05 化學：G5 帽：C1 多聚腺	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL	AUGUCCGACUCUUGGGUCCCCAACUC CGCCUCUGGUCAAGAUCCGGGAGGAA GGAGACGUGCCUGGGCGGAACUGUU AGCCGGACGUGUGAAGAGGGAGAAG UACAAUCCCGAGCGCGCACAGAAGCU CAAGGAAUCCGCAGUUAGGCUCCUCC	GGAAAU CGCAAA AUUUGC UCUUCG CGUUAG AUUUCU	UAAAGC UCCCCG GGGGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU	SEQ ID NO:25 自 5′至 3′末端由以下組成：

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
	苷酸尾：100nt	LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW FGVFSGHTL GSVISTDPLK RFFSHTLTQI LTHSPVLKA SDAVQMQR EWSFARTHP LLTSLYRRL FVMLSAEEL VGHLQEVLE TQEVHWQR VLSFVSALV VCFPEAQQL LEDWVARL MAQAFESC QLDSMVTAF LVVRQAALE GPSAFLSYA DWFKASFGS TRGYHGCSK KALVFLFTF LSELVPFESP RYLQVHILH PPLVPGKYR SLLTDYISLA KTRLADLKV SIENMGLYE DLSSAGDIT EPHSQALQD VEKAIMVFE HTGNIPVTV MEASIFRRP YYVSHFLPA	GCUCUCACCAGGACCUCAACGCACUG CUCCUCGAGGUCGAGGGACCACUCUG CAAGAAGCUCUCCCUCUCCAAGGUCA UCGACUGCGACUCCUCCGAGGCCUAC GCCAACCACUCCUCCUCCUUCAUCGG CUCCGCCCUCCAAGAUCAAGCUUCCC GCCUCGGAGUUCCUGUGGGCAUCCUA AGCGCCGGGAUGGUCGCAUCUUCCGU CGGCCAGAUUUGCACAGCACCCGCCG AGACAUCCCAUCCUGUCCUUCUCACC GUCGAGCAGCGCAAGAAGCUCUCCUC CCUCCUCGAGUUUGCCCAGUACCUCC UCGCCCACUCCAUGUUCUCCCGCCUC UCCUUCUGCCAGGAGCUCUGGAAGAU CCAGUCCUCCCUCCUGCUCGAAGCCG UCUGGCAUCUCCACGUCCAGGGCAUC GUCUCCCUCCAGGAGCUCCUCGAAUC CCAUCCAGACAUGCACGCCGUCGGUU CUUGGCUCUUCCGCAACCUCUGCUGC CUCUGCGAGCAGAUGGAAGCCUCCUG CCAACACGCUGACGUCGCUCGAGCCA UGCUCUCCGACUUCGUCCAGAUGUUC GUCCUCCGCGGCUUCCAGAAGAAUUC CGACCUCCGUCGCACAGUCGAGCCUG AGAAGAUGCCUCAGGUCACCGUCGAC GUCCUCCAGAGAAUGCUCAUCUUCGC ACUGGACGCACUAGCUGCAGGCGUCC AGGAGGAGUCCUCCACCCACAAGAUC GUCCGCUGUUGGUUCGGCGUCUUUAG CGGGCACACCUUGGGGUCAGUCAUCU CCACCGAUCCCCUCAAGCGCUUCUUC UCCCACACCCUCACCCAGAUCCUCAC CCACUCCCCAGUCCUCAAAGCCUCCG ACGCCGUCCAGAUGCAACGCGAGUGG UCCUUUGCCCGAACCCACCCACUCCU CACCUCCCUCUACCGCAGGCUCUUCG UCAUGCUCUCCGCCGAAGAACUCGUC GGCCACUUGCAGGAGGUCCUCGAGAC CCAAGAAGUCCACUGGCAGCGCGUCC UCUCCUUCGUCUCCGCCCUCGUCGUC UGUUUUCCAGAGGCCCAGCAGCUCCU UGAGGAUUGGGUGGCACGGCUCAUG GCUCAGGCCUUCGAGUCCUGCCAGCU CGACUCCAUGGUCACCGCCUUUCUUG UUGUCCGCCAAGCUGCUCUCGAGGGU CCUUCGGCAUUCCUGAGCUACGCCGA CUGGUUCAAGGCCUCCUUCGGUAGCA CAAGGGGCUACCACGGUUGCUCCAAG AAGGCCCUCGUCUUCCUCUUCACCUU CCUCUCCGAGCUCGUCCCCUUCGAGA GUCCCCGCUACCUCCAGGUCCACAUC CUCCAUCCUCCUCUGGUCCCCGGAAA GUACCGCUCCCUCCUCACCGACUACA UCUCCCUCGCUAAGACCCGACUCGCC GACUUGAAGGUCUCCAUCGAGAACAU GGGCCUCUACGAAGAUCUCUCCAGUG CAGGCGACAUCACCGAGCCACACUCC CAAGCCCUCCAGGACGUCGAGAAGGC CAUCAUGGUCUUCGAGCACACCGGCA ACAUCCCCGUCACCGUCAUGGAGGCC	UUUAGU UUUCUC GCAACU AGCAAG CUUUUU GUUCUC GCC	GCCCCU UGGGCC UCCCCC CAGCCC CUCCUC CCCUUC CUGCAC CCGUAC CCCCGU GGUCUU UGAAUA AAGUCU GAGUGG GCGGC	SEQ ID NO:50 之 5′ UTR、SEQ ID NO:16 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:139 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		LLTPRVLPK	UCCAUCUUCAGACGCCCCUACUACGU			
		VPDSRVAFI	CUCCCACUUUCUCCCUGCCCUCCUAA			
		ESLKRADKI	CCCCUCGGGUACUCCCCAAGGUCCCC			
		PPSLYSTYC	GACUCCAGAGUCGCCUUCAUCGAGUC			
		QACSAAEEK	CCUCAAGCGCGCAGACAAGAUCCCAC			
		PEDAALGVR	CAUCCCUCUACUCCACCUAUUGUCAA			
		AEPNSAEEP	GCCUGUUCUGCCGCCGAAGAGAAACC			
		LGQLTAALG	CGAGGACGCCGCAUUAGGCGUCCGUG			
		ELRASMTDP	CAGAGCCCAACUCAGCUGAGGAGCCA			
		SQRDVISAQ	CUGGGCCAGCUAACAGCUGCACUAGG			
		VAVISERLR	CGAGCUGAGGGCGAGUAUGACCGACC			
		AVLGHNED	CUUCCCAGCGAGACGUCAUCUCCGCC			
		DSSVEISKIQ	CAAGUCGCCGUCAUUUCCGAACGCUU			
		LSINTPRLEP	GAGGGCAGUGCUGGGCCACAACGAGG			
		REHMAVDL	ACGACUCCUCCGUCGAGAUCUCCAAG			
		LLTSFCQNL	AUCCAGCUCUCCAUCAAUACACCUCG			
		MAASSVAPP	CCUGGAACCCCGAGAGCACAUGGCCG			
		ERQGPWAA	UCGACCUCCUCCUCACCUCCUUCUGC			
		LFVRTMCGR	CAGAACUUGAUGGCUGCCUCCUCCGU			
		VLPAVLTRL	UGCUCCUCCGGAAAGACAAGGUCCCU			
		CQLLRHQGP	GGGCCGCUCUCUUUGUCCGCACCAUG			
		SLSAPHVLG	UGUGGACGAGUGCUCCCAGCUGUCCU			
		LAALAVHL	CACUCGCCUCUGCCAGUUGCUCCGCC			
		GESRSALPE	ACCAAGGACCCUCACUCUCUGCACCG			
		VDVGPPAPG	CACGUACUGGGACUCGCAGCACUCGC			
		AGLPVPALF	AGUCCACCUCGGAGAAUCCCGCUCUG			
		DSLLTCRTR	CUCUCCCAGAAGUGGACGUGGGACCU			
		DSLFFCLKF	CCUGCACCUGGUGCUGGCUUGCCCGU			
		CTAAISYSL	ACCAGCUCUCUUCGACUCCCUCCUCA			
		CKFSSQSRD	CGUGCAGAACCCGCGACUCCCUCUUC			
		TLCSCLSPG	UUCUGCCUCAAGUUCUGCACCGCCGC			
		LIKKFQFLM	CAUCUCCUACUCCCUCUGCAAGUUCA			
		FRLFSEARQ	GCUCCCAGUCACGCGACACCCUCUGC			
		PLSEEDVAS	UCCUGCUUGUCCCCUGGCCUCAUCAA			
		LSWRPLHLP	GAAGUUCCAGUUCCUCAUGUUCCGCC			
		SADWQRAA	UCUUCUCCGAGGCCAGACAACCCCUC			
		LSLWTHRTF	UCCGAGGAGGACGUGGCUUCCCUCAG			
		REVLKEEDV	UUGGAGACCCCUCCACUUGCCUUCCG			
		HLTYQDWL	CCGAUUGGCAAAGAGCCGCGCUCUCU			
		HLELEIQPEA	CUCUGGACCCAUCGCACCUUCCGCGA			
		DALSDTERQ	GGUCCUCAAGGAGGAGGACGUCCACC			
		DFHQWAIHE	UCACCUACCAGGACUGGCUCCACCUC			
		HFLPESSAS	GAGCUCGAGAUCCAACCCGAAGCAGA			
		GGCDGDLQ	CGCCCUCUCCGACACCGAACGCCAGG			
		AACTILVNA	ACUUCCACCAGUGGGCCAUCCACGAG			
		LMDFHQSSR	CACUUCCUCCCCGAAAGCAGUGCUUC			
		SYDHSENSD	CGGUGGUUGCGACGGGGAUCUCCAAG			
		LVFGGRTGN	CCGCUUGCACCAUCCUCGUCAACGCC			
		EDIISRLQEM	CUCAUGGACUUCCACCAGUCCUCCCG			
		VADLELQQ	CUCCUACGACCACUCCGAGAACUCCG			
		DLIVPLGHT	ACCUAGUGUUUGGCGGCCGCACUGGA			
		PSQEHFLFEI	AACGAGGACAUCAUCUCCCGCCUCCA			
		FRRRLQALT	GGAGAUGGUGGCCGAUCUCGAGCUCC			
		SGWSVAASL	AGCAGGAUCUCAUCGUCCCUCUCGGC			
		QRQRELLM	CACACACCUUCGCAGGAGCACUUCCU			
		YKRILLRLPS	CUUCGAAAUCUUCAGAAGACGCCUCC			
		SVLCGSSFQ	AAGCGCUCACUUCCGGUUGGUCUGUG			
		AEQPITARC	GCCGCAAGUCUCCAACGCCAGAGGGA			
		EQFFHLVNS	ACUCCUCAUGUACAAGCGCAUCCUCC			
		EMRNFCSHG	UACGCCUCCCUUCCUCCGUCCUCUGU			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		GALTQDITA HFFRGLLNA CLRSRDPSL MVDFILAKC QTKCPLILTS ALVWWPSL EPVLLCRWR RHCQSPLPR ELQKLQEGR QFASDFLSP EAASPAPNP DWLSAAAL HFAIQQVRE ENIRKQLKK LDCEREELL VFLFFFSLM GLLSSHLTS NSTTDLPKA FHVCAAILE CLEKRKISW LALFQLTES DLRLGRLLL RVAPDQHTR LLPFAFYSLL SYFHEDAAI REEAFLHVA VDMYLKLV QLFVAGDTS TVSPPAGRS LELKGQGNP VELITKARL FLLQLIPRCP KKSFSHVAE LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	GGGUCCUCCUUCCAGGCAGAACAGCC CAUCACUGCCCGCUGUGAGCAGUUCU UCCACCUCGUCAACUCCGAGAUGCGC AACUUCUGUUCACACGGCGGUGCACU CACCCAAGACAUCACCGCGCACUUCU UCCGCGGACUCCUGAACGCCUGCUUG AGAUCCCGCGACCCAUCCCUCAUGGU CGACUUCAUCCUCGCCAAGUGCCAGA CCAAGUGUCCCCUCAUCCUCACCAGU GCCCUCGUUUGGUGGCCCUCCCUUGA ACCCGUCCUCCUCUGCAGGUGGAGAC GCCACUGUCAGUCUCCGUUACCCCGC GAGCUCCAGAAACUCCAGGAGGGACG CCAGUUCGCUUCCGACUUCCUCUCAC CCGAAGCUGCUAGCCCAGCACCCAAC CCUGACUGGUUAUCCGCCGCCGCUUU GCACUUCGCCAUCCAGCAAGUGCGCG AGGAGAACAUCCGCAAGCAGCUCAAG AAGCUCGACUGCGAGCGAGAGGAGCU CCUCGUUUUCCUCUUCUUCUUCUCCC UCAUGGGCCUCCUCUCAUCCCACCUC ACCUCCAACUCCACCACCGACUUGCC CAAGGCCUUUCACGUCUGUGCCGCCA UCCUCGAGUGCCUCGAGAAGCGCAAG AUCUCCUGGCUCGCCCUCUUCCAGCU AACAGAGUCCGACCUGAGACUCGGUC GCCUCCUACUCAGAGUCGCACCCGAC CAGCACACUCGCCUCCUCCCCUUCGC AUUCUACUCCCUCCUCUCCUACUUCC ACGAAGACGCAGCAAUCCGCGAGGAG GCCUUCCUUCACGUCGCCGUCGACAU GUACCUCAAGCUCGUCCAGCUCUUUG UCGCGGGCGACACGAGUACAGUUAGC CCUCCAGCAGGUAGGUCCCUCGAGCU UAAAGGCCAGGGCAACCCAGUCGAGC UCAUCACCAAGGCCCGCCUGUUCCUG CUACAGCUCAUCCCACGCUGCCCCAA GAAGUCCUUCUCCCACGUAGCCGAAC UCCUCGCCGAUCGCGGAGAUUGCGAC CCCGAAGUUUCCGCUGCCUUGCAGUC ACGGCAGCAAGCAGCCCCAGACGCAG ACCUCUCACAGGAGCCCCACCUCUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**17**	**50**	**139**	**26**
	FANCA_06 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS	AUGUCAGAUUCCUGGGUGCCCAACUC CGCUAGCGGACAAGAUCCAGGUGGCC GCAGGAGAGCCUGGGCUGAACUGCUU GCCGGGAGAGUGAAGAGAGAGAAGU ACAACCCAGAGCGCGCCCAGAAGUUA AAGGAGAGCGCCGUAAGACUGCUGCG CAGCCACCAAGACUUAAACGCUCUGC UGCUGGAGGUGGAGGGGCCCCUGUGC AAGAAGCUGAGCCUGUCCAAGGUGA UCGAUUGUGACAGCAGCGAGGCUUAC GCCAAUCAUUCAUCUUCCUUCAUCGG CUCAGCACUGCAGGAUCAAGCAAGCC GGCUGGGCGUUCCAGUUGGCAUACUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCAGCGU GGGACAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG	GGAAAU CGCAAA AUUUGC UCUUCG CGUUAG AUUUCU UUUAGU UUUCUC GCAACU AGCAAG CUUUUU GUUCUC GCC	UAAAGC UCCCCG GGGGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCC CAGCCC CUCCUC CCCUUC CUGCAC CCGUAC CCCCGU	SEQ ID NO:26 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:50 之 5′ UTR、SEQ ID NO:17 之 ORF 序列、

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		HPVLLTVEQ	AGACCUCACAUCCCGUUCUGCUGACA		GGUCUU	及 SEQ
		RKKLSSLLE	GUUGAGCAACGCAAGAAGCUGUCAA		UGAAUA	ID
		FAQYLLAHS	GCCUGCUGGAGUUCGCACAGUACCUG		AAGUCU	NO:139
		MFSRLSFCQ	UUAGCCCACAGCAUGUUUUCCCGCUU		GAGUGG	之 3′
		ELWKIQSSL	AAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGAAG		GCGGC	UTR
		LLEAVWHL	AUCCAGUCAAGUCUGCUACUGGAGGC			
		HVQGIVSLQ	CGUGUGGCACUUACACGUGCAGGGUA			
		ELLESHPDM	UCGUGUCACUGCAAGAGCUACUGGAG			
		HAVGSWLF	AGCCAUCCCGAUAUGCACGCCGUGGG			
		RNLCCLCEQ	GUCUUGGCUGUUCCGCAAUCUGUGCU			
		MEASCQHA	GCCUGUGCGAACAGAUGGAAGCCUCC			
		DVARAMLS	UGCCAACACGCCGACGUUGCUAGAGC			
		DFVQMFVL	AAUGCUGAGUGACUUCGUUCAGAUG			
		RGFQKNSDL	UUCGUGCUGCGCGGGUUCCAGAAGAA			
		RRTVEPEKM	CUCAGAUCUCCGGAGGACCGUGGAGC			
		PQVTVDVLQ	CUGAGAAGAUGCCCCAGGUAACCGUG			
		RMLIFALDA	GACGUGCUGCAGCGGAUGUUAAUCU			
		LAAGVQEES	UUGCCCUGGACGCUCUCGCUGCCGGA			
		STHKIVRCW	GUGCAGGAGGAGAGCUCCACCCACAA			
		FGVFSGHTL	GAUCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUG			
		GSVISTDPLK	UUUUCCGGCCAUACCUUAGGCUCCGU			
		RFFSHTLTQI	GAUCUCCACCGAUCCCCUGAAACGGU			
		LTHSPVLKA	UCUUCUCCCACACACUGACCCAGAUA			
		SDAVQMQR	CUGACCCACUCCCCCUGUGUUAAAGGC			
		EWSFARTHP	UAGCGACGCCGUGCAAAUGCAACGCG			
		LLTSLYRRL	AGUGGUCCUUUGCCCGCACCCAUCCA			
		FVMLSAEEL	CUGCUGACCAGUCUGUACCGGCGGCU			
		VGHLQEVLE	GUUUGUUAUGCUGUCCGCCGAGGAG			
		TQEVHWQR	UUAGUGGGCCACCUGCAGGAGGUUCU			
		VLSFVSALV	GGAAACCCAGGAGGUGCAUUGGCAGC			
		VCFPEAQQL	GCGUGUUAAGCUUCGUGAGCGCCCUG			
		LEDWVARL	GUGGUGUGCUUUCCCGAGGCCCAGCA			
		MAQAFESC	GUUACUGGAGGACUGGGUGGCCCGGC			
		QLDSMVTAF	UGAUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGC			
		LVVRQAALE	CAGCUGGACAGCAUGGUGACCGCCUU			
		GPSAFLSYA	CCUGGUGGUACGUCAAGCUGCCCUGG			
		DWFKASFGS	AGGGCCCAAGCGCCUUCCUGAGUUAC			
		TRGYHGCSK	GCUGACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGG			
		KALVFLFTF	GUCCACCCGCGGGUACCACGGCUGCU			
		LSELVPFESP	CCAAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUU			
		RYLQVHILH	ACCUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCAUU			
		PPLVPGKYR	UGAGUCUCCCCGCUACCUGCAGGUGC			
		SLLTDYISLA	ACAUCCUGCACCCACCCCUGGUCCCU			
		KTRLADLKV	GGAAAGUACAGAUCACUGUUAACCG			
		SIENMGLYE	ACUACAUCUCUCUGGCCAAGACCCGG			
		DLSSAGDIT	UUAGCCGACCUGAAGGUGUCUAUCGA			
		EPHSQALQD	GAAUAUGGGCCUGUACGAGGACCUG			
		VEKAIMVFE	UCCAGCGCCGGCGAUAUCACCGAGCC			
		HTGNIPVTV	CCACAGCCAAGCCUUACAGGACGUGG			
		MEASIFRRP	AGAAGGCCAUUAUGGUGUUCGAGCA			
		YYVSHFLPA	CACCGGCAAUAUCCCCGUGACCGUAA			
		LLTPRVLPK	UGGAGGCUUCUAUCUUCCGGCGGCCC			
		VPDSRVAFI	UACUACGUGUCCCACUUCCUGCCCGC			
		ESLKRADKI	CCUGUUAACACCCAGAGUGUUACCCA			
		PPSLYSTYC	AGGUGCCCGACAGUCGCGUUGCCUUC			
		QACSAAEEK	AUAGAGAGCUUAAAGAGAGCCGACA			
		PEDAALGVR	AGAUCCCUCCUAGUUUAUACUCCACC			
		AEPNSAEEP	UACUGCCAGGCUUGCUCCGCCGCCGA			
		LGQLTAALG	GGAGAAGCCCGAGGACGCAGCCUUAG			
		ELRASMTDP	GAGUAAGAGCUGAGCCCAACUCAGCC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		SQRDVISAQ	GAGGAGCCACUGGGCCAGUUAACCGC			
		VAVISERLR	UGCCCUGGGAGAGUUACGGGCCUCUA			
		AVLGHNED	UGACCGACCCCAGCCAACGCGACGUU			
		DSSVEISKIQ	AUCUCUGCCCAAGUGGCAGUGAUAAG			
		LSINTPRLEP	CGAGAGGCUGCGGGCAGUAUUAGGA			
		REHMAVDL	CACAACGAGGACGACAGCAGCGUGGA			
		LLTSFCQNL	GAUCAGUAAGAUCCAAUUAAGCAUC			
		MAASSVAPP	AACACACCCAGGCUGGAGCCCAGAGA			
		ERQGPWAA	GCACAUGGCCGUGGACCUGCUGUUAA			
		LFVRTMCGR	CCUCCUUCUGUCAGAACUUAAUGGCC			
		VLPAVLTRL	GCAAGUAGCGUGGCUCCUCCAGAACG			
		CQLLRHQGP	CCAAGGUCCUUGGGCUGCCUUAUUCG			
		SLSAPHVLG	UUCGCACCAUGUGUGGCCGCGUCCUG			
		LAALAVHL	CCAGCAGUGCUGACCCGGCUGUGCCA			
		GESRSALPE	GUUACUGCGGCACCAAGGGCCCUCCC			
		VDVGPPAPG	UGAGCGCUCCUCACGUGCUUGGGUUG			
		AGLPVPALF	GCCGCCCUCGCUGUACACUUAGGUGA			
		DSLLTCRTR	AAGCAGAAGCGCCCUUCCUGAGGUGG			
		DSLFFCLKF	ACGUGGGUCCUCCAGCCCCAGGUGCC			
		CTAAISYSL	GGACUCCCCGUGCCAGCCCUGUUCGA			
		CKFSSQSRD	CAGCUUACUGACUUGUCGCACCCGGG			
		TLCSCLSPG	ACUCCCUGUUCUUUUGUCUGAAGUUC			
		LIKKFQFLM	UGCACCGCCGCCAUCUCCUACUCACU			
		FRLFSEARQ	GUGCAAGUUCUCUAGCCAGUCCCGGG			
		PLSEEDVAS	AUACCCUGUGCUCCUGCCUGUCUCCA			
		LSWRPLHLP	GGCCUGAUCAAGAAGUUCCAGUUCCU			
		SADWQRAA	GAUGUUCAGACUGUUCUCAGAAGCA			
		LSLWTHRTF	AGACAGCCUCUGUCCGAGGAGGACGU			
		REVLKEEDV	GGCCUCCUUAUCCUGGCGACCCCUGC			
		HLTYQDWL	ACCUGCCCUCCGCUGAUUGGCAAAGA			
		HLELEIQPEA	GCUGCACUUAGCCUGUGGACCCACCG			
		DALSDTERQ	GACAUUUCGCGAGGUGCUGAAAGAA			
		DFHQWAIHE	GAAGACGUACACCUGACCUACCAAGA			
		HFLPESSAS	CUGGCUGCACCUGGAGCUGGAGAUCC			
		GGCDGDLQ	AGCCUGAAGCCGACGCCCUGAGCGAC			
		AACTILVNA	ACCGAGCGCCAAGACUUUCACCAGUG			
		LMDFHQSSR	GGCCAUACACGAGCACUUUCUGCCCG			
		SYDHSENSD	AGUCAAGCGCCAGUGGAGGCUGCGAC			
		LVFGGRTGN	GGUGAUCUGCAAGCAGCCUGCACCAU			
		EDIISRLQEM	CUUAGUGAACGCCCUGAUGGACUUCC			
		VADLELQQ	ACCAAUCUUCCCGCAGCUACGACCAC			
		DLIVPLGHT	UCCGAGAACAGCGACCUGGUGUUUGG			
		PSQEHFLFEI	AGGCCGCACUGGGAACGAGGACAUCA			
		FRRRLQALT	UUAGCCGCCUGCAAGAAAUGGUGGCU			
		SGWSVAASL	GACCUGGAACUCCAACAGGACUUAAU			
		QRQRELLM	CGUACCUCUGGGGCACACACCAAGCC			
		YKRILLRLPS	AGGAGCACUUCUUAUUUGAGAUAUU			
		SVLCGSSFQ	UAGAAGACGCUUACAAGCACUGACUU			
		AEQPITARC	CAGGCUGGAGUGUAGCUGCAAGCCUG			
		EQFFHLVNS	CAACGCCAACGCGAGCUGCUGAUGUA			
		EMRNFCSHG	UAAGCGGAUACUGCUGCGCCUGCCCU			
		GALTQDITA	CCUCUGUACUGUGCGGCUCCUCCUUC			
		HFFRGLLNA	CAGGCCGAGCAGCCCAUCACCGCCCG			
		CLRSRDPSL	GUGUGAGCAGUUCUUCCACCUGGUGA			
		MVDFILAKC	ACAGCGAGAUGCGGAACUUCUGUUCU			
		QTKCPLILTS	CACGGAGGCGCUCUGACCCAAGACAU			
		ALVWWPSL	CACAGCCCACUUCUUCCGCGGCCUGC			
		EPVLLCRWR	UGAACGCCUGUCUGCGGUCAAGGGAC			
		RHCQSPLPR	CCCAGCCUGAUGGUCGACUUCAUACU			
		ELQKLQEGR	GGCAAAGUGUCAGACCAAGUGUCCCC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		QFASDFLSP EAASPAPNP DWLSAAAL HFAIQQVRE ENIRKQLKK LDCEREELL VFLFFFSLM GLLSSHLTS NSTTDLPKA FHVCAAILE CLEKRKISW LALFQLTES DLRLGRLLL RVAPDQHTR LLPFAFYSLL SYFHEDAAI REEAFLHVA VDMYLKLV QLFVAGDTS TVSPPAGRS LELKGQGNP VELITKARL FLLQLIPRCP KKSFSHVAE LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	UGAUCCUGACCAGCGCUCUGGUUUGG UGGCCAUCACUGGAGCCCGUACUCCU GUGUCGCUGGAGGCGGCAUUGCCAGU CACCUUUACCCCGAGAACUGCAGAAG CUGCAGGAGGGCCGGCAGUUUGCCAG CGACUUCCUGUCACCAGAGGCAGCCU CUCCCGCUCCUAACCCCGAUUGGCUA UCCGCGGCCGCUCUGCACUUCGCCAU CCAGCAGGUGCGGGAGGAGAACAUAC GGAAACAACUGAAGAAAUUAGACUG CGAGAGAGAGGAGUUACUUGUGUUC CUGUUCUUCUUCAGUCUGAUGGGCCU GCUGUCCUCCCACCUGACCAGCAAUU CAACCACCGACCUGCCCAAGGCCUUC CACGUUUGUGCCGCCAUCCUGGAGUG CCUGGAGAAGCGGAAGAUUAGCUGG UUAGCCCUGUUUCAGCUGACCGAGAG UGAUUUACGCCUGGGGAGACUGCUG UUACGCGUGGCUCCCGACCAGCACAC CAGGCUGCUGCCUUUCGCCUUCUACA GUCUGUUAUCCUACUUCCACGAGGAC GCCGCCAUCAGAGAGGAGGCCUUCCU GCACGUGGCCGUGGACAUGUACUUAA AGCUGGUGCAGCUGUUUGUGGCCGGC GAUACCUCCACAGUAAGCCCUCCUGC UGGCAGAAGCCUGGAGCUGAAGGGCC AGGGUAACCCCGUAGAGCUGAUUACU AAGGCCCGCCUGUUUCUGCUGCAACU GAUCCCUCGCUGCCCCAAGAAGAGCU UUAGCCACGUGGCCGAAUUACUGGCU GACAGGGGAGACUGUGAUCCUGAGG UGAGCGCUGCCUUACAGAGCCGUCAA CAAGCGGCCCCUGACGCCGAUUUAAG CCAAGAGCCUCACCUCUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**2**	**50**	**117**	**27**
	FANCA_07 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM	AUGUCCGACUCCUGGGUGCCCAACUC CGCUAGCGGACAAGAUCCAGGUGGCC GCAGGAGAGCGUGGGCUGAACUGCU UGCCGGGCGAGUGAAGCGCGAGAAG UACAACCCCGAGCGCGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGCGCCGUACGGCUGCUGC GCAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUG CUGCUGGAGGUGGAGGGGCCCCUGUG CAAGAAGCUGAGCCUGUCCAAGGUGA UCGACUGCGACAGCAGCGAGGCCUAC GCCAACCACAGCUCCUCCUUCAUCGG CUCCGCCCUGCAGGAUCAAGCUAGCC GGCUGGGCGUUCCAGUGGGCAUCCUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCAGCGU GGGCCAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG AGACCAGCCACCCCGUGCUGCUGACC GUGGAGCAGCGCAAGAAGCUGUCAA GCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCUG CUGGCCCACAGCAUGUUCUCCCGCCU GAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGAAG AUCCAGUCCAGCCUGCUACUGGAGGC CGUGUGGCACUUACACGUGCAGGGCA UCGUGAGCCUGCAGGAGCUACUGGAG	GGAAAU CGCAAA AUUUGC UCUUCG CGUUAG AUUUCU UUUAGU UUUCUC GCAACU AGCAAG CUUUUU GUUCUC GCC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCCACC GCGUUA UCCGUU CCUCGU AGGCUG GUCCUG GGGAAC GGGUCG GCGGGU ACCCCC GUGGUC UUUGAA UAAAGU CUGAGU GGGCGG C	SEQ ID NO:27 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:50 之 5′ UTR、SEQ ID NO:2 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:117 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		HAVGSWLF	AGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGGG			
		RNLCCLCEQ	GUCCUGGCUGUUCCGCAACCUGUGCU			
		MEASCQHA	GCCUGUGCGAGCAGAUGGAAGCCUCC			
		DVARAMLS	UGCCAACACGCCGACGUUGCACGGGC			
		DFVQMFVL	AAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUG			
		RGFQKNSDL	UUCGUGCUGCGCGGGUUCCAGAAGAA			
		RRTVEPEKM	CUCAGACCUCCGGAGGACCGUGGAGC			
		PQVTVDVLQ	CUGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUG			
		RMLIFALDA	GACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUU			
		LAAGVQEES	UGCCCUGGACGCUCUCGCUGCCGGAG			
		STHKIVRCW	UGCAGGAGGAGAGCUCCACCCACAAG			
		FGVFSGHTL	AUCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGU			
		GSVISTDPLK	UCUCCGGCCACACCCUGGGCUCCGUG			
		RFFSHTLTQI	AUCUCCACCGAUCCCCUGAAGCGGUU			
		LTHSPVLKA	CUUCUCCCACACCCUGACCCAGAUCC			
		SDAVQMQR	UGACCCACUCCCCUGUGCUGAAGGCC			
		EWSFARTHP	AGCGACGCCGUGCAGAUGCAGCGCGA			
		LLTSLYRRL	GUGGUCCUUCGCCCGCACCCAUCCCC			
		FVMLSAEEL	UGCUGACCAGCCUGUACCGGCGGCUG			
		VGHLQEVLE	UUCGUGAUGCUGUCCGCCGAGGAGCU			
		TQEVHWQR	GGUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGG			
		VLSFVSALV	AGACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGC			
		VCFPEAQQL	GUGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGU			
		LEDWVARL	GGUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGC			
		MAQAFESC	UCCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUG			
		QLDSMVTAF	AUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCA			
		LVVRQAALE	GCUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCC			
		GPSAFLSYA	UGGUGGUGCGUCAAGCAGCCCUGGAG			
		DWFKASFGS	GGCCCAAGCGCCUUCCUGAGCUACGC			
		TRGYHGCSK	CGACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGGU			
		KALVFLFTF	CCACCCGCGGGUACCACGGCUGCUCC			
		LSELVPFESP	AAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUUAC			
		RYLQVHILH	CUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCG			
		PPLVPGKYR	AGUCGCCCCGCUACCUGCAGGUGCAC			
		SLLTDYISLA	AUCCUGCACCCACCCCUGGUCCCUGG			
		KTRLADLKV	CAAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACU			
		SIENMGLYE	ACAUCUCCCUGGCCAAGACCCGGCUG			
		DLSSAGDIT	GCCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAA			
		EPHSQALQD	CAUGGGCCUGUACGAGGACCUGUCCA			
		VEKAIMVFE	GCGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCAC			
		HTGNIPVTV	AGCCAGGCCCUGCAGGACGUGGAGAA			
		MEASIFRRP	GGCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCG			
		YYVSHFLPA	GCAACAUCCCCGUGACCGUGAUGGAG			
		LLTPRVLPK	GCUAGUAUCUUCCGGCGGCCCUACUA			
		VPDSRVAFI	CGUGUCCCACUUCCUGCCCGCCCUGC			
		ESLKRADKI	UGACACCCCGGGUGCUGCCCAAGGUG			
		PPSLYSTYC	CCCGACAGUCGCGUCGCCUUCAUCGA			
		QACSAAEEK	GAGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUCC			
		PEDAALGVR	CGCCCUCCCUGUACUCCACCUACUGC			
		AEPNSAEEP	CAGGCUUGCUCCGCCGCCGAGGAGAA			
		LGQLTAALG	GCCCGAGGACGCAGCCUUAGGAGUAC			
		ELRASMTDP	GCGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAG			
		SQRDVISAQ	CCACUGGGCCAGUUGACCGCUGCCCU			
		VAVISERLR	GGGAGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCG			
		AVLGHNED	ACCCCAGCCAACGCGACGUGAUCAGC			
		DSSVEISKIQ	GCCCAGGUGGCCGUGAUCAGCGAGAG			
		LSINTPRLEP	GCUGCGGGCAGUGCUGGGCCACAACG			
		REHMAVDL	AGGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGC			
		LLTSFCQNL	AAGAUCCAGCUGAGCAUCAACACACC			
		MAASSVAPP	CAGGCUGGAGCCCAGAGAGCACAUGG			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		ERQGPWAA	CCGUGGACCUGCUGCUGACCUCCUUC			
		LFVRTMCGR	UGCCAGAACCUGAUGGCCGCAAGCAG			
		VLPAVLTRL	CGUGGCUCCUCCAGAACGCCAAGGCC			
		CQLLRHQGP	CUUGGGCUGCCCUGUUCGUGCGCACC			
		SLSAPHVLG	AUGUGUGGCCGCGUCCUGCCAGCAGU			
		LAALAVHL	GCUGACCCGGCUGUGCCAGCUUCUGC			
		GESRSALPE	GGCACCAAGGGCCCUCCCUGAGCGCU			
		VDVGPPAPG	CCCCACGUGCUUGGGUUGGCCGCCCU			
		AGLPVPALF	CGCUGUGCACCUGGGCGAGAGCAGGA			
		DSLLTCRTR	GCGCCCUUCCCGAGGUGGACGUGGGU			
		DSLFFCLKF	CCUCCAGCCCCAGGUGCCGGACUCCC			
		CTAAISYSL	CGUGCCAGCCCUGUUCGACAGCCUGC			
		CKFSSQSRD	UGACUUGUCGCACCCGGGACUCCCUG			
		TLCSCLSPG	UUCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGC			
		LIKKFQFLM	CGCCAUCUCCUACUCCCUGUGCAAGU			
		FRLFSEARQ	UCUCCAGCCAGUCCCGGGACACCCUG			
		PLSEEDVAS	UGCUCCUGCCUGUCUCCCGGCCUGAU			
		LSWRPLHLP	CAAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCC			
		SADWQRAA	GCCUGUUCAGCGAAGCACGCCAGCCC			
		LSLWTHRTF	CUGUCCGAGGAGGACGUGGCCUCCCU			
		REVLKEEDV	GUCCUGGCGACCCCUGCACCUGCCCU			
		HLTYQDWL	CCGCCGAUUGGCAGCGCGCCGCCCUU			
		HLELEIQPEA	AGCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCG			
		DALSDTERQ	CGAGGUGCUGAAGGAGGAAGACGUG			
		DFHQWAIHE	CACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCA			
		HFLPESSAS	CCUGGAGCUGGAGAUCCAGCCCGAAG			
		GGCDGDLQ	CCGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGC			
		AACTILVNA	CAGGACUUUCACCAGUGGGCCAUCCA			
		LMDFHQSSR	CGAGCACUUUCUGCCCGAGAGCAGCG			
		SYDHSENSD	CCAGUGGAGGCUGCGACGGCGACCUG			
		LVFGGRTGN	CAAGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAA			
		EDIISRLQEM	CGCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCU			
		VADLELQQ	CCCGCAGCUACGACCACUCCGAGAAC			
		DLIVPLGHT	AGCGACCUGGUGUUUGGAGGCCGCAC			
		PSQEHFLFEI	CGGGAACGAGGACAUCAUCAGCCGCC			
		FRRRLQALT	UGCAGGAGAUGGUGGCCGACCUGGA			
		SGWSVAASL	GCUCCAGCAGGACCUGAUCGUGCCAC			
		QRQRELLM	UGGGGCACACCCCAAGCCAGGAGCAC			
		YKRILLRLPS	UUCCUGUUCGAGAUCUUCCGCAGACG			
		SVLCGSSFQ	CCUGCAGGCACUGACCUCCGGCUGGA			
		AEQPITARC	GUGUGGCCGCAAGCCUGCAGCGCCAA			
		EQFFHLVNS	CGCGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGAU			
		EMRNFCSHG	CCUGCUGCGCCUGCCCUCCUCCGUGC			
		GALTQDITA	UGUGCGGCUCCUCCUUCCAGGCCGAG			
		HFFRGLLNA	CAGCCCAUCACCGCCCGGUGCGAGCA			
		CLRSRDPSL	GUUCUUCCACCUGGUGAACAGCGAGA			
		MVDFILAKC	UGCGGAACUUCUGCUCUCACGGCGGC			
		QTKCPLILTS	GCUCUGACCCAGGACAUCACCGCCCA			
		ALVWWPSL	CUUCUUCCGCGGCCUGCUGAACGCCU			
		EPVLLCRWR	GCCUGCGGAGCAGGGACCCCAGCCUG			
		RHCQSPLPR	AUGGUCGACUUCAUCCUGGCCAAGUG			
		ELQKLQEGR	CCAGACCAAGUGUCCCCUGAUCCUGA			
		QFASDFLSP	CCAGCGCCCUGGUUUGGUGGCCCUCA			
		EAASPAPNP	CUGGAGCCCGUGCUCCUGUGUCGCUG			
		DWLSAAAL	GAGGCGGCACUGCCAGUCACCCCUGC			
		HFAIQQVRE	CCCGAGAGCUGCAGAAGCUGCAGGAG			
		ENIRKQLKK	GGCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCCU			
		LDCEREELL	GUCACCAGAGGCAGCCUCUCCCGCUC			
		VFLFFFSLM	CUAACCCCGAUUGGCUAUCCGCGGCC			
		GLLSSHLTS	GCUCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGGU			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		NSTTDLPKA FHVCAAILE CLEKRKISW LALFQLTES DLRLGRLLL RVAPDQHTR LLPFAFYSLL SYFHEDAAI REEAFLHVA VDMYLKLV QLFVAGDTS TVSPPAGRS LELKGQGNP VELITKARL FLLQLIPRCP KKSFSHVAE LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	GCGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCAGC UGAAGAAGCUGGACUGCGAGAGGGA GGAGCUGCUUGUGUUCCUGUUCUUCU UCAGCCUGAUGGGCCUGCUGUCCUCC CACCUGACCAGCAACUCCACCACCGA CCUGCCCAAGGCCUUCCACGUGUGCG CCGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAGAAG CGGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCUGUU CCAGCUGACCGAGAGCGACCUGCGCC UGGGGAGACUGCUGCUGCGCGUGGCU CCCGACCAGCACACCAGGCUGCUGCC CUUCGCCUUCUACUCCCUGCUGUCCU ACUUCCACGAGGACGCCGCCAUCCGG GAGGAGGCCUUCCUGCACGUGGCCGU GGACAUGUACCUGAAGCUGGUGCAGC UGUUCGUGGCCGGCGACACCUCCACC GUGAGCCCUCCUGCUGGCCGAAGCCU GGAGCUGAAGGGCCAGGGCAACCCCG UGGAGCUGAUCACCAAGGCCCGCCUG UUCCUGCUGCAGCUGAUCCCUCGCUG CCCCAAGAAGAGCUUCAGCCACGUGG CCGAGCUGCUGGCUGACAGGGGAGAC UGCGACCCCGAGGUGAGCGCUGCCCU GCAGAGCCGUCAACAAGCGGCCCCUG ACGCCGAUCUGAGCCAGGAGCCCCAC CUGUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**2**	**80**	**117**	**28**
	FANCA_08 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ	AUGUCCGACUCCUGGGUGCCCAACUC CGCUAGCGGACAAGAUCCAGGUGGCC GCAGGAGAGCGUGGGCUGAACUGCU UGCCGGGCGAGUGAAGCGCGAGAAG UACAACCCCGAGCGCGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGCGCCGUACGGCUGCUGC GCAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUG CUGCUGGAGGUGGAGGGGCCCCUGUG CAAGAAGCUGAGCCUGUCCAAGGUGA UCGACUGCGACAGCAGCGAGGCCUAC GCCAACCACAGCUCCUCCUUCAUCGG CUCCGCCCUGCAGGAUCAAGCUAGCC GGCUGGGCGUUCCAGUGGGCAUCCUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCAGCGU GGGCCAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG AGACCAGCCACCCCGUGCUGCUGACC GUGGAGCAGCGCAAGAAGCUGUCAA GCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCUG CUGGCCCACAGCAUGUUCUCCCGCCU GAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGAAG AUCCAGUCCAGCCUGCUACUGGAGGC CGUGUGGCACUUACACGUGCAGGGCA UCGUGAGCCUGCAGGAGCUACUGGAG AGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGGG GUCCUGGCUGUUCCGCAACCUGUGCU GCCUGUGCGAGCAGAUGGAAGCCUCC UGCCAACACGCCGACGUUGCACGGGC AAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUG UUCGUGCUGCGCGGGUUCCAGAAGAA CUCAGACCUCCGGAGGACCGUGGAGC CUGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUG	GGACUC ACUAUU UGUUUU CGCGCC CAGUUG CAAAAA	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCCACC GCGUUA UCCGUU CCUCGU AGGCUG GUCCUG GGGAAC GGGUCG GCGGGU ACCCCC GUGGUC UUUGAA UAAAGU CUGAGU GGGCGG C	SEQ ID NO:28 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:80 之 5′ UTR、SEQ ID NO:2 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:117 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		RMLIFALDA	GACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUU			
		LAAGVQEES	UGCCCUGGACGCUCUCGCUGCCGGAG			
		STHKIVRCW	UGCAGGAGGAGAGCUCCACCCACAAG			
		FGVFSGHTL	AUCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGU			
		GSVISTDPLK	UCUCCGGCCACACCCUGGGCUCCGUG			
		RFFSHTLTQI	AUCUCCACCGAUCCCCUGAAGCGGUU			
		LTHSPVLKA	CUUCUCCCACACCCUGACCCAGAUCC			
		SDAVQMQR	UGACCCACUCCCCUGUGCUGAAGGCC			
		EWSFARTHP	AGCGACGCCGUGCAGAUGCAGCGCGA			
		LLTSLYRRL	GUGGUCCUUCGCCCGCACCCAUCCCC			
		FVMLSAEEL	UGCUGACCAGCCUGUACCGGCGGCUG			
		VGHLQEVLE	UUCGUGAUGCUGUCCGCCGAGGAGCU			
		TQEVHWQR	GGUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGG			
		VLSFVSALV	AGACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGC			
		VCFPEAQQL	GUGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGU			
		LEDWVARL	GGUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGC			
		MAQAFESC	UCCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUG			
		QLDSMVTAF	AUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCA			
		LVVRQAALE	GCUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCC			
		GPSAFLSYA	UGGUGGUGCGUCAAGCAGCCCUGGAG			
		DWFKASFGS	GGCCCAAGCGCCUUCCUGAGCUACGC			
		TRGYHGCSK	CGACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGGU			
		KALVFLFTF	CCACCCGCGGGUACCACGGCUGCUCC			
		LSELVPFESP	AAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUUAC			
		RYLQVHILH	CUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCG			
		PPLVPGKYR	AGUCGCCCCGCUACCUGCAGGUGCAC			
		SLLTDYISLA	AUCCUGCACCCACCCCUGGUCCCUGG			
		KTRLADLKV	CAAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACU			
		SIENMGLYE	ACAUCUCCCUGGCCAAGACCCGGCUG			
		DLSSAGDIT	GCCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAA			
		EPHSQALQD	CAUGGGCCUGUACGAGGACCUGUCCA			
		VEKAIMVFE	GCGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCAC			
		HTGNIPVTV	AGCCAGGCCCUGCAGGACGUGGAGAA			
		MEASIFRRP	GGCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCG			
		YYVSHFLPA	GCAACAUCCCCGUGACCGUGAUGGAG			
		LLTPRVLPK	GCUAGUAUCUUCCGGCGGCCCUACUA			
		VPDSRVAFI	CGUGUCCCACUUCCUGCCCGCCCUGC			
		ESLKRADKI	UGACACCCCGGGUGCUGCCCAAGGUG			
		PPSLYSTYC	CCCGACAGUCGCGUCGCCUUCAUCGA			
		QACSAAEEK	GAGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUCC			
		PEDAALGVR	CGCCCUCCCUGUACUCCACCUACUGC			
		AEPNSAEEP	CAGGCUUGCUCCGCCGCCGAGGAGAA			
		LGQLTAALG	GCCCGAGGACGCAGCCUUAGGAGUAC			
		ELRASMTDP	GCGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAG			
		SQRDVISAQ	CCACUGGGCCAGUUGACCGCUGCCCU			
		VAVISERLR	GGGAGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCG			
		AVLGHNED	ACCCCAGCCAACGCGACGUGAUCAGC			
		DSSVEISKIQ	GCCCAGGUGGCCGUGAUCAGCGAGAG			
		LSINTPRLEP	GCUGCGGGCAGUGCUGGGCCACAACG			
		REHMAVDL	AGGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGC			
		LLTSFCQNL	AAGAUCCAGCUGAGCAUCAACACACC			
		MAASSVAPP	CAGGCUGGAGCCCAGAGAGCACAUGG			
		ERQGPWAA	CCGUGGACCUGCUGCUGACCUCCUUC			
		LFVRTMCGR	UGCCAGAACCUGAUGGCCGCAAGCAG			
		VLPAVLTRL	CGUGGCUCCUCCAGAACGCCAAGGCC			
		CQLLRHQGP	CUUGGGCUGCCCUGUUCGUGCGCACC			
		SLSAPHVLG	AUGUGUGGCCGCGUCCUGCCAGCAGU			
		LAALAVHL	GCUGACCCGGCUGUGCCAGCUUCUGC			
		GESRSALPE	GGCACCAAGGGCCCUCCCUGAGCGCU			
		VDVGPPAPG	CCCCACGUGCUUGGGUUGGCCGCCCU			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		AGLPVPALF	CGCUGUGCACCUGGGCGAGAGCAGGA			
		DSLLTCRTR	GCGCCCUUCCCGAGGUGGACGUGGGU			
		DSLFFCLKF	CCUCCAGCCCCAGGUGCCGGACUCCC			
		CTAAISYSL	CGUGCCAGCCCUGUUCGACAGCCUGC			
		CKFSSQSRD	UGACUUGUCGCACCCGGGACUCCCUG			
		TLCSCLSPG	UUCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGC			
		LIKKFQFLM	CGCCAUCUCCUACUCCCUGUGCAAGU			
		FRLFSEARQ	UCUCCAGCCAGUCCCGGGACACCCUG			
		PLSEEDVAS	UGCUCCUGCCUGUCUCCCGGCCUGAU			
		LSWRPLHLP	CAAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCC			
		SADWQRAA	GCCUGUUCAGCGAAGCACGCCAGCCC			
		LSLWTHRTF	CUGUCCGAGGAGGACGUGGCCUCCCU			
		REVLKEEDV	GUCCUGGCGACCCCUGCACCUGCCCU			
		HLTYQDWL	CCGCCGAUUGGCAGCGCGCCGCCCUU			
		HLELEIQPEA	AGCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCG			
		DALSDTERQ	CGAGGUGCUGAAGGAGGAAGACGUG			
		DFHQWAIHE	CACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCA			
		HFLPESSAS	CCUGGAGCUGGAGAUCCAGCCCGAAG			
		GGCDGDLQ	CCGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGC			
		AACTILVNA	CAGGACUUUCACCAGUGGGCCAUCCA			
		LMDFHQSSR	CGAGCACUUUCUGCCCGAGAGCAGCG			
		SYDHSENSD	CCAGUGGAGGCUGCGACGGCGACCUG			
		LVFGGRTGN	CAAGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAA			
		EDIISRLQEM	CGCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCU			
		VADLELQQ	CCCGCAGCUACGACCACUCCGAGAAC			
		DLIVPLGHT	AGCGACCUGGUGUUUGGAGGCCGCAC			
		PSQEHFLFEI	CGGGAACGAGGACAUCAUCAGCCGCC			
		FRRRLQALT	UGCAGGAGAUGGUGGCCGACCUGGA			
		SGWSVAASL	GCUCCAGCAGGACCUGAUCGUGCCAC			
		QRQRELLM	UGGGGCACACCCCAAGCCAGGAGCAC			
		YKRILLRLPS	UUCCUGUUCGAGAUCUUCCGCAGACG			
		SVLCGSSFQ	CCUGCAGGCACUGACCUCCGGCUGGA			
		AEQPITARC	GUGUGGCCGCAAGCCUGCAGCGCCAA			
		EQFFHLVNS	CGCGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGAU			
		EMRNFCSHG	CCUGCUGCGCCUGCCCUCCUCCGUGC			
		GALTQDITA	UGUGCGGCUCCUCCUUCCAGGCCGAG			
		HFFRGLLNA	CAGCCCAUCACCGCCCGGUGCGAGCA			
		CLRSRDPSL	GUUCUUCCACCUGGUGAACAGCGAGA			
		MVDFILAKC	UGCGGAACUUCUGCUCUCACGGCGGC			
		QTKCPLILTS	GCUCUGACCCAGGACAUCACCGCCCA			
		ALVWWPSL	CUUCUUCCGCGGCCUGCUGAACGCCU			
		EPVLLCRWR	GCCUGCGGAGCAGGGACCCCAGCCUG			
		RHCQSPLPR	AUGGUCGACUUCAUCCUGGCCAAGUG			
		ELQKLQEGR	CCAGACCAAGUGUCCCCUGAUCCUGA			
		QFASDFLSP	CCAGCGCCCUGGUUUGGUGGCCCUCA			
		EAASPAPNP	CUGGAGCCCGUGCUCCUGUGUCGCUG			
		DWLSAAAL	GAGGCGGCACUGCCAGUCACCCCUGC			
		HFAIQQVRE	CCCGAGAGCUGCAGAAGCUGCAGGAG			
		ENIRKQLKK	GGCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCCU			
		LDCEREELL	GUCACCAGAGGCAGCCUCUCCCGCUC			
		VFLFFFSLM	CUAACCCCGAUUGGCUAUCCGCGGCC			
		GLLSSHLTS	GCUCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGGU			
		NSTTDLPKA	GCGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCAGC			
		FHVCAAILE	UGAAGAAGCUGGACUGCGAGAGGGA			
		CLEKRKISW	GGAGCUGCUUGUGUUCCUGUUCUUCU			
		LALFQLTES	UCAGCCUGAUGGGCCUGCUGUCCUCC			
		DLRLGRLLL	CACCUGACCAGCAACUCCACCACCGA			
		RVAPDQHTR	CCUGCCCAAGGCCUUCCACGUGUGCG			
		LLPFAFYSLL	CCGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAGAAG			
		SYFHEDAAI	CGGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCUGUU			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		REEAFLHVA VDMYLKLV QLFVAGDTS TVSPPAGRS LELKGQGNP VELITKARL FLLQLIPRCP KKSFSHVAE LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	CCAGCUGACCGAGAGCGACCUGCGCC UGGGGAGACUGCUGCUGCGCGUGGCU CCCGACCAGCACACCAGGCUGCUGCC CUUCGCCUUCUACUCCCUGCUGUCCU ACUUCCACGAGGACGCCGCCAUCCGG GAGGAGGCCUUCCUGCACGUGGCCGU GGACAUGUACCUGAAGCUGGUGCAGC UGUUCGUGGCCGGCGACACCUCCACC GUGAGCCCUCCUGCUGGCCGAAGCCU GGAGCUGAAGGGCCAGGGCAACCCCG UGGAGCUGAUCACCAAGGCCCGCCUG UUCCUGCUGCAGCUGAUCCCUCGCUG CCCCAAGAAGAGCUUCAGCCACGUGG CCGAGCUGCUGGCUGACAGGGGAGAC UGCGACCCCGAGGUGAGCGCUGCCCU GCAGAGCCGUCAACAAGCGGCCCCUG ACGCCGAUCUGAGCCAGGAGCCCCAC CUGUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**2**	**80**	**140**	**29**
	FANCA_09 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW FGVFSGHTL GSVISTDPLK RFFSHTLTQI LTHSPVLKA SDAVQMQR	AUGUCCGACUCCUGGGUGCCCAACUC CGCUAGCGGACAAGAUCCAGGUGGCC GCAGGAGAGCGUGGGCUGAACUGCU UGCCGGGCGAGUGAAGCGCGAGAAG UACAACCCCGAGCGCGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGCGCCGUACGGCUGCUGC GCAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUG CUGCUGGAGGUGGAGGGGCCCCUGUG CAAGAAGCUGAGCCUGUCCAAGGUGA UCGACUGCGACAGCAGCGAGGCCUAC GCCAACCACAGCUCCUCCUUCAUCGG CUCCGCCCUGCAGGAUCAAGCUAGCC GGCUGGGCGUUCCAGUGGGCAUCCUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCAGCGU GGGCCAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG AGACCAGCCACCCCGUGCUGCUGACC GUGGAGCAGCGCAAGAAGCUGUCAA GCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCUG CUGGCCCACAGCAUGUUCUCCCGCCU GAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGAAG AUCCAGUCCAGCCUGCUACUGGAGGC CGUGUGGCACUUACACGUGCAGGGCA UCGUGAGCCUGCAGGAGCUACUGGAG AGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGGG GUCCUGGCUGUUCCGCAACCUGUGCU GCCUGUGCGAGCAGAUGGAAGCCUCC UGCCAACACGCCGACGUUGCACGGGC AAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUG UUCGUGCUGCGCGGGUUCCAGAAGAA CUCAGACCUCCGGAGGACCGUGGAGC CUGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUG GACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUU UGCCCUGGACGCUCUCGCUGCCGGAG UGCAGGAGGAGAGCUCCACCCACAAG AUCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGU UCUCCGGCCACACCCUGGGCUCCGUG AUCUCCACCGAUCCCCUGAAGCGGUU CUUCUCCCACACCCUGACCCAGAUCC UGACCCACUCCCCUGUGCUGAAGGCC	GGACUC ACUAUU UGUUUU CGCGCC CAGUUG CAAAAA	UAAGCC CCUCCG GGGGCC UCCACC GCGUUA UCCGUU CCUCGU AGGCUG GUCCUG GGGAAC GGGUCG GCGGGU ACCCCC GUGGUC UUUGAA UAAAGU CUGAGU GGGCGG C	SEQ ID NO:29 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:80 之 5′ UTR、SEQ ID NO:2 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:140 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		EWSFARTHP	AGCGACGCCGUGCAGAUGCAGCGCGA			
		LLTSLYRRL	GUGGUCCUUCGCCCGCACCCAUCCCC			
		FVMLSAEEL	UGCUGACCAGCCUGUACCGGCGGCUG			
		VGHLQEVLE	UUCGUGAUGCUGUCCGCCGAGGAGCU			
		TQEVHWQR	GGUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGG			
		VLSFVSALV	AGACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGC			
		VCFPEAQQL	GUGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGU			
		LEDWVARL	GGUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGC			
		MAQAFESC	UCCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUG			
		QLDSMVTAF	AUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCA			
		LVVRQAALE	GCUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCC			
		GPSAFLSYA	UGGUGGUGCGUCAAGCAGCCCUGGAG			
		DWFKASFGS	GGCCCAAGCGCCUUCCUGAGCUACGC			
		TRGYHGCSK	CGACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGGU			
		KALVFLFTF	CCACCCGCGGGUACCACGGCUGCUCC			
		LSELVPFESP	AAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUUAC			
		RYLQVHILH	CUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCG			
		PPLVPGKYR	AGUCGCCCCGCUACCUGCAGGUGCAC			
		SLLTDYISLA	AUCCUGCACCCACCCCUGGUCCCUGG			
		KTRLADLKV	CAAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACU			
		SIENMGLYE	ACAUCUCCCUGGCCAAGACCCGGCUG			
		DLSSAGDIT	GCCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAA			
		EPHSQALQD	CAUGGGCCUGUACGAGGACCUGUCCA			
		VEKAIMVFE	GCGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCAC			
		HTGNIPVTV	AGCCAGGCCCUGCAGGACGUGGAGAA			
		MEASIFRRP	GGCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCG			
		YYVSHFLPA	GCAACAUCCCCGUGACCGUGAUGGAG			
		LLTPRVLPK	GCUAGUAUCUUCCGGCGGCCCUACUA			
		VPDSRVAFI	CGUGUCCCACUUCCUGCCCGCCCUGC			
		ESLKRADKI	UGACACCCCGGGUGCUGCCCAAGGUG			
		PPSLYSTYC	CCCGACAGUCGCGUCGCCUUCAUCGA			
		QACSAAEEK	GAGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUCC			
		PEDAALGVR	CGCCCUCCCUGUACUCCACCUACUGC			
		AEPNSAEEP	CAGGCUUGCUCCGCCGCCGAGGAGAA			
		LGQLTAALG	GCCCGAGGACGCAGCCUUAGGAGUAC			
		ELRASMTDP	GCGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAG			
		SQRDVISAQ	CCACUGGGCCAGUUGACCGCUGCCCU			
		VAVISERLR	GGGAGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCG			
		AVLGHNED	ACCCCAGCCAACGCGACGUGAUCAGC			
		DSSVEISKIQ	GCCCAGGUGGCCGUGAUCAGCGAGAG			
		LSINTPRLEP	GCUGCGGGCAGUGCUGGGCCACAACG			
		REHMAVDL	AGGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGC			
		LLTSFCQNL	AAGAUCCAGCUGAGCAUCAACACACC			
		MAASSVAPP	CAGGCUGGAGCCCAGAGAGCACAUGG			
		ERQGPWAA	CCGUGGACCUGCUGCUGACCUCCUUC			
		LFVRTMCGR	UGCCAGAACCUGAUGGCCGCAAGCAG			
		VLPAVLTRL	CGUGGCUCCUCCAGAACGCCAAGGCC			
		CQLLRHQGP	CUUGGGCUGCCCUGUUCGUGCGCACC			
		SLSAPHVLG	AUGUGUGGCCGCGUCCUGCCAGCAGU			
		LAALAVHL	GCUGACCCGGCUGUGCCAGCUUCUGC			
		GESRSALPE	GGCACCAAGGGCCCUCCCUGAGCGCU			
		VDVGPPAPG	CCCCACGUGCUUGGGUUGGCCGCCCU			
		AGLPVPALF	CGCUGUGCACCUGGGCGAGAGCAGGA			
		DSLLTCRTR	GCGCCCUUCCCGAGGUGGACGUGGGU			
		DSLFFCLKF	CCUCCAGCCCCAGGUGCCGGACUCCC			
		CTAAISYSL	CGUGCCAGCCCUGUUCGACAGCCUGC			
		CKFSSQSRD	UGACUUGUCGCACCCGGGACUCCCUG			
		TLCSCLSPG	UUCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGC			
		LIKKFQFLM	CGCCAUCUCCUACUCCCUGUGCAAGU			
		FRLFSEARQ	UCUCCAGCCAGUCCCGGGACACCCUG			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		PLSEEDVAS	UGCUCCUGCCUGUCUCCCGGCCUGAU			
		LSWRPLHLP	CAAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCC			
		SADWQRAA	GCCUGUUCAGCGAAGCACGCCAGCCC			
		LSLWTHRTF	CUGUCCGAGGAGGACGUGGCCUCCCU			
		REVLKEEDV	GUCCUGGCGACCCCUGCACCUGCCCU			
		HLTYQDWL	CCGCCGAUUGGCAGCGCGCCGCCCUU			
		HLELEIQPEA	AGCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCG			
		DALSDTERQ	CGAGGUGCUGAAGGAGGAAGACGUG			
		DFHQWAIHE	CACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCA			
		HFLPESSAS	CCUGGAGCUGGAGAUCCAGCCCGAAG			
		GGCDGDLQ	CCGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGC			
		AACTILVNA	CAGGACUUUCACCAGUGGGCCAUCCA			
		LMDFHQSSR	CGAGCACUUUCUGCCCGAGAGCAGCG			
		SYDHSENSD	CCAGUGGAGGCUGCGACGGCGACCUG			
		LVFGGRTGN	CAAGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAA			
		EDIISRLQEM	CGCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCU			
		VADLELQQ	CCCGCAGCUACGACCACUCCGAGAAC			
		DLIVPLGHT	AGCGACCUGGUGUUUGGAGGCCGCAC			
		PSQEHFLFEI	CGGGAACGAGGACAUCAUCAGCCGCC			
		FRRRLQALT	UGCAGGAGAUGGUGGCCGACCUGGA			
		SGWSVAASL	GCUCCAGCAGGACCUGAUCGUGCCAC			
		QRQRELLM	UGGGGCACACCCCAAGCCAGGAGCAC			
		YKRILLRLPS	UUCCUGUUCGAGAUCUUCCGCAGACG			
		SVLCGSSFQ	CCUGCAGGCACUGACCUCCGGCUGGA			
		AEQPITARC	GUGUGGCCGCAAGCCUGCAGCGCCAA			
		EQFFHLVNS	CGCGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGAU			
		EMRNFCSHG	CCUGCUGCGCCUGCCCUCCUCCGUGC			
		GALTQDITA	UGUGCGGCUCCUCCUUCCAGGCCGAG			
		HFFRGLLNA	CAGCCCAUCACCGCCCGGUGCGAGCA			
		CLRSRDPSL	GUUCUUCCACCUGGUGAACAGCGAGA			
		MVDFILAKC	UGCGGAACUUCUGCUCUCACGGCGGC			
		QTKCPLILTS	GCUCUGACCCAGGACAUCACCGCCCA			
		ALVWWPSL	CUUCUUCCGCGGCCUGCUGAACGCCU			
		EPVLLCRWR	GCCUGCGGAGCAGGGACCCCAGCCUG			
		RHCQSPLPR	AUGGUCGACUUCAUCCUGGCCAAGUG			
		ELQKLQEGR	CCAGACCAAGUGUCCCCUGAUCCUGA			
		QFASDFLSP	CCAGCGCCCUGGUUUGGUGGCCCUCA			
		EAASPAPNP	CUGGAGCCCGUGCUCCUGUGUCGCUG			
		DWLSAAAL	GAGGCGGCACUGCCAGUCACCCCUGC			
		HFAIQQVRE	CCCGAGAGCUGCAGAAGCUGCAGGAG			
		ENIRKQLKK	GGCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCCU			
		LDCEREELL	GUCACCAGAGGCAGCCUCUCCCGCUC			
		VFLFFFSLM	CUAACCCCGAUUGGCUAUCCGCGGCC			
		GLLSSHLTS	GCUCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGGU			
		NSTTDLPKA	GCGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCAGC			
		FHVCAAILE	UGAAGAAGCUGGACUGCGAGAGGGA			
		CLEKRKISW	GGAGCUGCUUGUGUUCCUGUUCUUCU			
		LALFQLTES	UCAGCCUGAUGGGCCUGCUGUCCUCC			
		DLRLGRLLL	CACCUGACCAGCAACUCCACCACCGA			
		RVAPDQHTR	CCUGCCCAAGGCCUUCCACGUGUGCG			
		LLPFAFYSLL	CCGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAGAAG			
		SYFHEDAAI	CGGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCUGUU			
		REEAFLHVA	CCAGCUGACCGAGAGCGACCUGCGCC			
		VDMYLKLV	UGGGGAGACUGCUGCUGCGCGUGGCU			
		QLFVAGDTS	CCCGACCAGCACACCAGGCUGCUGCC			
		TVSPPAGRS	CUUCGCCUUCUACUCCCUGCUGUCCU			
		LELKGQGNP	ACUUCCACGAGGACGCCGCCAUCCGG			
		VELITKARL	GAGGAGGCCUUCCUGCACGUGGCCGU			
		FLLQLIPRCP	GGACAUGUACCUGAAGCUGGUGCAGC			
		KKSFSHVAE	UGUUCGUGGCCGGCGACACCUCCACC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		LLADRGDC DPEVSAALQ SRQQAAPDA DLSQEPHLF	GUGAGCCCUCCUGCUGGCCGAAGCCU GGAGCUGAAGGGCCAGGGCAACCCCG UGGAGCUGAUCACCAAGGCCCGCCUG UUCCUGCUGCAGCUGAUCCCUCGCUG CCCCAAGAAGAGCUUCAGCCACGUGG CCGAGCUGCUGGCUGACAGGGGAGAC UGCGACCCCGAGGUGAGCGCUGCCCU GCAGAGCCGUCAACAAGCGGCCCCUG ACGCCGAUCUGAGCCAGGAGCCCCAC CUGUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**14**	**50**	**117**	**30**
	FANCA_010 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW FGVFSGHTL GSVISTDPLK RFFSHTLTQI LTHSPVLKA SDAVQMQR EWSFARTHP LLTSLYRRL FVMLSAEEL VGHLQEVLE TQEVHWQR VLSFVSALV VCFPEAQQL LEDWVARL	AUGAGCGACAGCUGGGUGCCCAACAG UGCUUCCGGGCAGGAUCCCGGCGGUA GAAGACGGGCUUGGGCUGAGCUGCU GGCCGGCAGGGUGAAGCGGGAGAAG UACAACCCCGAGCGGGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGUGCCGUGCGGCUGCUGC GGAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUC CUGCUGGAGGUCGAGGGCCCACUGUG CAAGAAGCUCAGCCUGAGCAAGGUGA UCGACUGUGACAGCAGCGAGGCCUAC GCCAACCACAGCUCCAGCUUCAUCGG CAGCGCCCUGCAGGACCAGGCCAGCA GACUGGGCGUGCCCGUGGGCAUCCUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCUCGGU GGGCCAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG AGACCAGCCACCCCGUGCUGCUCACC GUGGAGCAGCGGAAGAAGCUGAGCA GCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCUG CUGGCCCACAGCAUGUUCUCCCGGCU GAGCUUUUGCCAAGAGCUGUGGAAG AUCCAGAGCUCCCUGCUGCUGGAGGC CGUGUGGCACCUUCACGUGCAGGGCA UCGUGAGCCUGCAGGAACUGCUGGAG AGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGGG CAGCUGGCUGUUCCGGAACCUGUGCU GCCUGUGCGAGCAGAUGGAGGCUAGC UGCCAGCACGCCGACGUGGCACGGGC CAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUGU UCGUGCUGCGGGGCUUCCAGAAGAAU AGCGACCUACGGCGGACCGUGGAGCC CGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUGG ACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUUC GCCCUGGACGCUCUGGCCGCUGGCGU GCAGGAGGAGAGCAGCACCCACAAGA UCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGUUC AGCGGCCACACCCUGGGCAGCGUGAU CAGCACCGACCCACUGAAGCGGUUCU UCAGCCACACCCUCACCCAGAUCCUG ACCCACAGCCCCGUGCUGAAGGCCAG CGACGCCGUGCAGAUGCAGCGGGAGU GGAGCUUCGCCCGGACCCACCCACUG CUGACUAGCCUGUACCGGCGGCUGUU CGUGAUGCUGAGCGCAGAGGAGCUG GUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGGA GACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGGG UGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGUG GUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGCU	GGAAAU CGCAAA AUUUGC UCUUCG CGUUAG AUUUCU UUUAGU UUUCUC GCAACU AGCAAG CUUUUU GUUCUC GCC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCCACC GCGUUA UCCGUU CCUCGU AGGCUG GUCCUG GGGAAC GGGUCG GCGGGU ACCCCC GUGGUC UUUGAA UAAAGU CUGAGU GGGCGG C	SEQ ID NO:30 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:50 之 5′ UTR、SEQ ID NO:14 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:117 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		MAQAFESC	CCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUGA			
		QLDSMVTAF	UGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCAG			
		LVVRQAALE	CUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCCU			
		GPSAFLSYA	GGUGGUGCGGCAGGCUGCCCUGGAAG			
		DWFKASFGS	GCCCCAGCGCUUUCCUGAGCUACGCC			
		TRGYHGCSK	GACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGCUC			
		KALVFLFTF	CACCCGGGGCUACCACGGCUGCAGCA			
		LSELVPFESP	AGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUCACC			
		RYLQVHILH	UUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCGA			
		PPLVPGKYR	GUCACCCCGGUACCUGCAGGUGCACA			
		SLLTDYISLA	UCCUGCAUCCUCCGCUGGUGCCCGGC			
		KTRLADLKV	AAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACUA			
		SIENMGLYE	CAUCAGCCUGGCCAAGACCCGGCUGG			
		DLSSAGDIT	CCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAAC			
		EPHSQALQD	AUGGGCCUGUACGAGGACCUGAGCAG			
		VEKAIMVFE	CGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCACA			
		HTGNIPVTV	GCCAGGCCCUGCAAGACGUGGAGAAG			
		MEASIFRRP	GCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCGG			
		YYVSHFLPA	CAACAUCCCCGUGACCGUCAUGGAGG			
		LLTPRVLPK	CCAGCAUCUUCCGGCGGCCCUACUAC			
		VPDSRVAFI	GUGAGCCACUUCCUGCCCGCCCUGCU			
		ESLKRADKI	GACCCCACGGGUGCUGCCCAAGGUGC			
		PPSLYSTYC	CCGACAGCCGGGUGGCCUUCAUCGAG			
		QACSAAEEK	AGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUCCC			
		PEDAALGVR	ACCCAGCCUGUACAGCACCUACUGCC			
		AEPNSAEEP	AGGCCUGCUCUGCCGCCGAGGAGAAG			
		LGQLTAALG	CCCGAGGACGCCGCAUUAGGCGUGCG			
		ELRASMTDP	GGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAAC			
		SQRDVISAQ	CCCUGGGGCAGCUGACCGCAGCCCUG			
		VAVISERLR	GGAGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCGA			
		AVLGHNED	CCCCAGCCAGCGGGACGUGAUCAGCG			
		DSSVEISKIQ	CCCAGGUGGCCGUCAUCAGCGAGCGG			
		LSINTPRLEP	CUGCGGGCAGUGCUGGGCCACAACGA			
		REHMAVDL	GGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGCA			
		LLTSFCQNL	AGAUCCAGCUGAGCAUCAACACCCCA			
		MAASSVAPP	CGGCUGGAACCUCGGGAGCACAUGGC			
		ERQGPWAA	CGUGGACCUGCUGCUGACCAGCUUCU			
		LFVRTMCGR	GCCAGAACCUGAUGGCCGCCUCUAGC			
		VLPAVLTRL	GUGGCCCCACCAGAACGGCAGGGUCC			
		CQLLRHQGP	CUGGGCUGCCCUGUUCGUGCGGACCA			
		SLSAPHVLG	UGUGCGGCCGGGUUCUGCCCGCUGUG			
		LAALAVHL	CUGACCCGGCUGUGCCAGCUGCUGCG			
		GESRSALPE	GCACCAGGGCCCUAGCCUGAGCGCUC			
		VDVGPPAPG	CCCACGUGCUGGGCCUAGCUGCCCUG			
		AGLPVPALF	GCCGUGCACCUUGGGGAGUCCCGAAG			
		DSLLTCRTR	CGCCCUGCCCGAGGUGGACGUGGGCC			
		DSLFFCLKF	CUCCAGCCCCAGGUGCUGGCCUUCCC			
		CTAAISYSL	GUGCCCGCUCUGUUCGACAGUCUGCU			
		CKFSSQSRD	GACCUGCCGGACCCGGGACAGCCUGU			
		TLCSCLSPG	UCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGCC			
		LIKKFQFLM	GCCAUCAGCUACAGCCUGUGCAAGUU			
		FRLFSEARQ	CAGCAGCCAGAGCCGGGACACCCUGU			
		PLSEEDVAS	GCAGCUGCCUGAGCCCCGGCCUGAUC			
		LSWRPLHLP	AAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCCG			
		SADWQRAA	GCUGUUCAGCGAAGCCCGGCAGCCCC			
		LSLWTHRTF	UGAGCGAGGAGGACGUCGCCAGCCUG			
		REVLKEEDV	UCCUGGAGACCCCUGCACCUGCCCAG			
		HLTYQDWL	CGCCGACUGGCAGAGAGCCGCCCUGA			
		HLELEIQPEA	GCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCGG			
		DALSDTERQ	GAGGUGCUGAAGGAAGAGGACGUGC			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		DFHQWAIHE	ACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCAC			
		HFLPESSAS	CUGGAGCUGGAGAUUCAGCCCGAGGC			
		GGCDGDLQ	CGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGGC			
		AACTILVNA	AGGAUUUCCACCAGUGGGCCAUCCAC			
		LMDFHQSSR	GAGCAUUUCCUGCCCGAGAGCAGCGC			
		SYDHSENSD	CAGCGGCGGCUGUGACGGCGACCUGC			
		LVFGGRTGN	AGGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAAC			
		EDIISRLQEM	GCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCAG			
		VADLELQQ	CCGGAGCUACGACCACAGCGAGAACA			
		DLIVPLGHT	GCGACCUGGUGUUCGGCGGACGGACC			
		PSQEHFLFEI	GGCAACGAGGACAUCAUCAGCCGGCU			
		FRRRLQALT	GCAGGAGAUGGUCGCCGACCUGGAGU			
		SGWSVAASL	UGCAGCAGGACCUGAUCGUGCCCCUG			
		QRQRELLM	GGCCACACUCCCAGCCAGGAGCACUU			
		YKRILLRLPS	CCUGUUCGAGAUCUUCCGCCGGAGAC			
		SVLCGSSFQ	UGCAGGCCCUGACCUCAGGCUGGAGC			
		AEQPITARC	GUGGCCGCCAGCCUGCAACGGCAGCG			
		EQFFHLVNS	GGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGAUCC			
		EMRNFCSHG	UGCUGCGGCUGCCCAGCAGCGUGCUG			
		GALTQDITA	UGCGGCAGCAGCUUCCAGGCCGAGCA			
		HFFRGLLNA	GCCCAUCACGGCCCGGUGCGAGCAGU			
		CLRSRDPSL	UCUUCCACCUGGUGAACAGCGAGAUG			
		MVDFILAKC	CGGAACUUCUGCAGCCACGGAGGCGC			
		QTKCPLILTS	CCUGACCCAGGACAUCACCGCCCACU			
		ALVWWPSL	UCUUCCGGGGCCUGCUGAACGCCUGC			
		EPVLLCRWR	CUGCGGAGCAGAGACCCCAGCCUGAU			
		RHCQSPLPR	GGUGGACUUCAUCCUGGCCAAGUGCC			
		ELQKLQEGR	AGACCAAGUGUCCCCUGAUCCUGACC			
		QFASDFLSP	UCCGCCCUGGUGUGGUGGCCCAGCCU			
		EAASPAPNP	GGAGCCCGUGCUUCUGUGUCGGUGGC			
		DWLSAAAL	GGCGGCACUGCCAGAGCCCUCUGCCC			
		HFAIQQVRE	CGGGAGCUGCAGAAGCUGCAGGAGG			
		ENIRKQLKK	GCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCCUG			
		LDCEREELL	UCUCCCGAGGCCGCUAGCCCAGCCCC			
		VFLFFFSLM	AAACCCCGACUGGCUGAGCGCUGCCG			
		GLLSSHLTS	CCCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGGUG			
		NSTTDLPKA	CGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCAGCU			
		FHVCAAILE	GAAGAAGCUGGACUGCGAGCGGGAG			
		CLEKRKISW	GAGCUGCUCGUGUUCCUCUUCUUCUU			
		LALFQLTES	CAGCCUCAUGGGCCUUCUGAGCAGCC			
		DLRLGRLLL	ACCUGACCAGCAACAGCACCACCGAC			
		RVAPDQHTR	CUGCCCAAGGCCUUCCACGUGUGCGC			
		LLPFAFYSLL	CGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAGAAGC			
		SYFHEDAAI	GGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCUGUUC			
		REEAFLHVA	CAGCUGACCGAGAGCGACCUGCGGCU			
		VDMYLKLV	GGGCCGACUGCUGCUGCGGGUGGCCC			
		QLFVAGDTS	CAGACCAGCACACCCGGCUGCUGCCC			
		TVSPPAGRS	UUCGCCUUCUACAGCCUGCUGAGCUA			
		LELKGQGNP	CUUCCACGAGGACGCUGCCAUCCGGG			
		VELITKARL	AGGAGGCCUUUCUGCACGUGGCAGUG			
		FLLQLIPRCP	GACAUGUACCUGAAGCUGGUGCAGCU			
		KKSFSHVAE	GUUCGUGGCCGGCGACACCAGCACCG			
		LLADRGDC	UGUCACCACCAGCCGGCCGCUCCCUG			
		DPEVSAALQ	GAGCUGAAGGGCCAGGGCAACCCCGU			
		SRQQAAPDA	GGAGCUGAUCACCAAGGCCCGGCUGU			
		DLSQEPHLF	UCCUGCUGCAGCUGAUCCCACGGUGC			
			CCCAAGAAGAGCUUCAGCCACGUGGC			
			CGAGCUGCUUGCCGACCGGGGAGACU			
			GCGACCCCGAGGUGAGCGCCGCCUUG			
			CAGAGCCGGCAGCAGGCCGCACCUGA			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
			CGCCGACCUGAGCCAGGAGCCCCACC UGUUC			
SEQ ID NO:		**1**	**2**	**61**	**117**	**31**
	FANCA_011 化學：G5 帽：C1 多聚腺苷酸尾：100nt	MSDSWVPN SASGQDPGG RRRAWAEL LAGRVKRE KYNPERAQ KLKESAVRL LRSHQDLNA LLLEVEGPL CKKLSLSKV IDCDSSEAY ANHSSSFIGS ALQDQASRL GVPVGILSA GMVASSVG QICTAPAETS HPVLLTVEQ RKKLSSLLE FAQYLLAHS MFSRLSFCQ ELWKIQSSL LLEAVWHL HVQGIVSLQ ELLESHPDM HAVGSWLF RNLCCLCEQ MEASCQHA DVARAMLS DFVQMFVL RGFQKNSDL RRTVEPEKM PQVTVDVLQ RMLIFALDA LAAGVQEES STHKIVRCW FGVFSGHTL GSVISTDPLK RFFSHTLTQI LTHSPVLKA SDAVQMQR EWSFARTHP LLTSLYRRL FVMLSAEEL VGHLQEVLE TQEVHWQR VLSFVSALV VCFPEAQQL LEDWVARL MAQAFESC QLDSMVTAF LVVRQAALE GPSAFLSYA DWFKASFGS TRGYHGCSK KALVFLFTF LSELVPFESP	AUGUCCGACUCCUGGGUGCCCAACUC CGCUAGCGGACAAGAUCCAGGUGGCC GCAGGAGAGCGUGGGCUGAACUGCU UGCCGGGCGAGUGAAGCGCGAGAAG UACAACCCCGAGCGCGCCCAGAAGCU GAAGGAGAGCGCCGUACGGCUGCUGC GCAGCCACCAGGACCUGAACGCCCUG CUGCUGGAGGUGGAGGGGCCCCUGUG CAAGAAGCUGAGCCUGUCCAAGGUGA UCGACUGCGACAGCAGCGAGGCCUAC GCCAACCACAGCUCCUCCUUCAUCGG CUCCGCCCUGCAGGAUCAAGCUAGCC GGCUGGGCGUUCCAGUGGGCAUCCUG AGCGCCGGCAUGGUGGCCAGCAGCGU GGGCCAGAUCUGCACCGCUCCCGCCG AGACCAGCCACCCCGUGCUGCUGACC GUGGAGCAGCGCAAGAAGCUGUCAA GCCUGCUGGAGUUCGCCCAGUACCUG CUGGCCCACAGCAUGUUCUCCCGCCU GAGCUUCUGCCAGGAGCUGUGGAAG AUCCAGUCCAGCCUGCUACUGGAGGC CGUGUGGCACUUACACGUGCAGGGCA UCGUGAGCCUGCAGGAGCUACUGGAG AGCCACCCCGACAUGCACGCCGUGGG GUCCUGGCUGUUCCGCAACCUGUGCU GCCUGUGCGAGCAGAUGGAAGCCUCC UGCCAACACGCCGACGUUGCACGGGC AAUGCUGAGCGACUUCGUGCAGAUG UUCGUGCUGCGCGGGUUCCAGAAGAA CUCAGACCUCCGGAGGACCGUGGAGC CUGAGAAGAUGCCCCAGGUGACCGUG GACGUGCUGCAGCGGAUGCUGAUCUU UGCCCUGGACGCUCUCGCUGCCGGAG UGCAGGAGGAGAGCUCCACCCACAAG AUCGUGCGGUGCUGGUUCGGCGUGU UCUCCGGCCACACCCUGGGCUCCGUG AUCUCCACCGAUCCCCUGAAGCGGUU CUUCUCCCACACCCUGACCCAGAUCC UGACCCACUCCCCUGUGCUGAAGGCC AGCGACGCCGUGCAGAUGCAGCGCGA GUGGUCCUUCGCCCGCACCCAUCCCC UGCUGACCAGCCUGUACCGGCGGCUG UUCGUGAUGCUGUCCGCCGAGGAGCU GGUGGGCCACCUGCAGGAGGUGCUGG AGACCCAGGAGGUGCACUGGCAGCGC GUGCUGAGCUUCGUGAGCGCCCUGGU GGUGUGCUUCCCCGAGGCCCAGCAGC UCCUGGAGGACUGGGUGGCCCGGCUG AUGGCCCAGGCCUUCGAGAGCUGCCA GCUGGACAGCAUGGUGACCGCCUUCC UGGUGGUGCGUCAAGCAGCCCUGGAG GGCCCAAGCGCCUUCCUGAGCUACGC CGACUGGUUCAAGGCCAGCUUCGGGU CCACCCGCGGGUACCACGGCUGCUCC AAGAAGGCCCUGGUGUUCCUGUUUAC	GGAAAC UUUAUU UAGUGU UACUUU AUUUUC UGUUUA UUUGUG UUUCUU CAGUGG GUUUGU UCUAAU UUCCUU GGCCGC C	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCCACC GCGUUA UCCGUU CCUCGU AGGCUG GUCCUG GGGAAC GGGUCG GCGGGU ACCCCC GUGGUC UUUGAA UAAAGU CUGAGU GGGCGG C	SEQ ID NO:31 自 5′至 3′末端由以下組成：SEQ ID NO:61 之 5′ UTR、SEQ ID NO:2 之 ORF 序列、及 SEQ ID NO:117 之 3′ UTR

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		RYLQVHILH	CUUCCUGAGCGAGCUGGUGCCCUUCG			
		PPLVPGKYR	AGUCGCCCCGCUACCUGCAGGUGCAC			
		SLLTDYISLA	AUCCUGCACCCACCCCUGGUCCCUGG			
		KTRLADLKV	CAAGUACCGGAGCCUGCUGACCGACU			
		SIENMGLYE	ACAUCUCCCUGGCCAAGACCCGGCUG			
		DLSSAGDIT	GCCGACCUGAAGGUGAGCAUCGAGAA			
		EPHSQALQD	CAUGGGCCUGUACGAGGACCUGUCCA			
		VEKAIMVFE	GCGCCGGCGACAUCACCGAGCCCCAC			
		HTGNIPVTV	AGCCAGGCCCUGCAGGACGUGGAGAA			
		MEASIFRRP	GGCCAUCAUGGUGUUCGAGCACACCG			
		YYVSHFLPA	GCAACAUCCCCGUGACCGUGAUGGAG			
		LLTPRVLPK	GCUAGUAUCUUCCGGCGGCCCUACUA			
		VPDSRVAFI	CGUGUCCCACUUCCUGCCCGCCCUGC			
		ESLKRADKI	UGACACCCCGGGUGCUGCCCAAGGUG			
		PPSLYSTYC	CCCGACAGUCGCGUCGCCUUCAUCGA			
		QACSAAEEK	GAGCCUGAAGCGGGCCGACAAGAUCC			
		PEDAALGVR	CGCCCUCCCCUGUACUCCACCUACUGC			
		AEPNSAEEP	CAGGCUUGCUCCGCCGCCGAGGAGAA			
		LGQLTAALG	GCCCGAGGACGCAGCCUUAGGAGUAC			
		ELRASMTDP	GCGCCGAGCCCAACAGCGCCGAGGAG			
		SQRDVISAQ	CCACUGGGCCAGUUGACCGCUGCCCU			
		VAVISERLR	GGGAGAGCUGCGGGCCAGCAUGACCG			
		AVLGHNED	ACCCCAGCCAACGCGACGUGAUCAGC			
		DSSVEISKIQ	GCCCAGGUGGCCGUGAUCAGCGAGAG			
		LSINTPRLEP	GCUGCGGGCAGUGCUGGGCCACAACG			
		REHMAVDL	AGGACGACAGCAGCGUGGAGAUCAGC			
		LLTSFCQNL	AAGAUCCAGCUGAGCAUCAACACACC			
		MAASSVAPP	CAGGCUGGAGCCCAGAGAGCACAUGG			
		ERQGPWAA	CCGUGGACCUGCUGCUGACCUCCUUC			
		LFVRTMCGR	UGCCAGAACCUGAUGGCCGCAAGCAG			
		VLPAVLTRL	CGUGGCUCCUCCAGAACGCCAAGGCC			
		CQLLRHQGP	CUUGGGCUGCCCUGUUCGUGCGCACC			
		SLSAPHVLG	AUGUGUGGCCGCGUCCUGCCAGCAGU			
		LAALAVHL	GCUGACCCGGCUGUGCCAGCUUCUGC			
		GESRSALPE	GGCACCAAGGGCCCUCCCUGAGCGCU			
		VDVGPPAPG	CCCCACGUGCUUGGGUUGGCCGCCCU			
		AGLPVPALF	CGCUGUGCACCUGGGCGAGAGCAGGA			
		DSLLTCRTR	GCGCCCUUCCCGAGGUGGACGUGGGU			
		DSLFFCLKF	CCUCCAGCCCCAGGUGCCGGACUCCC			
		CTAAISYSL	CGUGCCAGCCCUGUUCGACAGCCUGC			
		CKFSSQSRD	UGACUUGUCGCACCCGGGACUCCCUG			
		TLCSCLSPG	UUCUUCUGCCUGAAGUUCUGCACCGC			
		LIKKFQFLM	CGCCAUCUCCUACUCCCUGUGCAAGU			
		FRLFSEARQ	UCUCCAGCCAGUCCCGGGACACCCUG			
		PLSEEDVAS	UGCUCCUGCCUGUCUCCCGGCCUGAU			
		LSWRPLHLP	CAAGAAGUUCCAGUUCCUGAUGUUCC			
		SADWQRAA	GCCUGUUCAGCGAAGCACGCCAGCCC			
		LSLWTHRTF	CUGUCCGAGGAGGACGUGGCCUCCCU			
		REVLKEEDV	GUCCUGGCGACCCCUGCACCUGCCCU			
		HLTYQDWL	CCGCCGAUUGGCAGCGCGCCGCCCUU			
		HLELEIQPEA	AGCCUGUGGACCCACCGGACCUUCCG			
		DALSDTERQ	CGAGGUGCUGAAGGAGGAAGACGUG			
		DFHQWAIHE	CACCUGACCUACCAGGACUGGCUGCA			
		HFLPESSAS	CCUGGAGCUGGAGAUCCAGCCCGAAG			
		GGCDGDLQ	CCGACGCCCUGAGCGACACCGAGCGC			
		AACTILVNA	CAGGACUUUCACCAGUGGGCCAUCCA			
		LMDFHQSSR	CGAGCACUUUCUGCCCGAGAGCAGCG			
		SYDHSENSD	CCAGUGGAGGCUGCGACGGCGACCUG			
		LVFGGRTGN	CAAGCCGCCUGCACCAUCCUGGUGAA			
		EDIISRLQEM	CGCCCUGAUGGACUUCCACCAGAGCU			

	mRNA 名稱	ORF 序列(胺基酸)	ORF 序列(核苷酸)	5′ UTR 序列	3′ UTR 序列	構築體序列
		VADLELQQ	CCCGCAGCUACGACCACUCCGAGAAC			
		DLIVPLGHT	AGCGACCUGGUGUUUGGAGGCCGCAC			
		PSQEHFLFEI	CGGGAACGAGGACAUCAUCAGCCGCC			
		FRRRLQALT	UGCAGGAGAUGGUGGCCGACCUGGA			
		SGWSVAASL	GCUCCAGCAGGACCUGAUCGUGCCAC			
		QRQRELLM	UGGGGCACACCCCAAGCCAGGAGCAC			
		YKRILLRLPS	UUCCUGUUCGAGAUCUUCCGCAGACG			
		SVLCGSSFQ	CCUGCAGGCACUGACCUCCGGCUGGA			
		AEQPITARC	GUGUGGCCGCAAGCCUGCAGCGCCAA			
		EQFFHLVNS	CGCGAGCUGCUGAUGUACAAGCGGAU			
		EMRNFCSHG	CCUGCUGCGCCUGCCCUCCUCCGUGC			
		GALTQDITA	UGUGCGGCUCCUCCUUCCAGGCCGAG			
		HFFRGLLNA	CAGCCCAUCACCGCCCGGUGCGAGCA			
		CLRSRDPSL	GUUCUUCCACCUGGUGAACAGCGAGA			
		MVDFILAKC	UGCGGAACUUCUGCUCUCACGGCGGC			
		QTKCPLILTS	GCUCUGACCCAGGACAUCACCGCCCA			
		ALVWWPSL	CUUCUUCCGCGGCCUGCUGAACGCCU			
		EPVLLCRWR	GCCUGCGGAGCAGGGACCCCAGCCUG			
		RHCQSPLPR	AUGGUCGACUUCAUCCUGGCCAAGUG			
		ELQKLQEGR	CCAGACCAAGUGUCCCCUGAUCCUGA			
		QFASDFLSP	CCAGCGCCCUGGUUUGGUGGCCCUCA			
		EAASPAPNP	CUGGAGCCCGUGCUCCUGUGUCGCUG			
		DWLSAAAL	GAGGCGGCACUGCCAGUCACCCCUGC			
		HFAIQQVRE	CCCGAGAGCUGCAGAAGCUGCAGGAG			
		ENIRKQLKK	GGCCGGCAGUUCGCCAGCGACUUCCU			
		LDCEREELL	GUCACCAGAGGCAGCCUCUCCCGCUC			
		VFLFFFSLM	CUAACCCCGAUUGGCUAUCCGCGGCC			
		GLLSSHLTS	GCUCUGCACUUCGCCAUCCAGCAGGU			
		NSTTDLPKA	GCGGGAGGAGAACAUCCGGAAGCAGC			
		FHVCAAILE	UGAAGAAGCUGGACUGCGAGAGGGA			
		CLEKRKISW	GGAGCUGCUUGUGUUCCUGUUCUUCU			
		LALFQLTES	UCAGCCUGAUGGGCCUGCUGUCCUCC			
		DLRLGRLLL	CACCUGACCAGCAACUCCACCACCGA			
		RVAPDQHTR	CCUGCCCAAGGCCUUCCACGUGUGCG			
		LLPFAFYSLL	CCGCCAUCCUGGAGUGCCUGGAGAAG			
		SYFHEDAAI	CGGAAGAUCAGCUGGCUGGCCCUGUU			
		REEAFLHVA	CCAGCUGACCGAGAGCGACCUGCGCC			
		VDMYLKLV	UGGGGAGACUGCUGCUGCGCGUGGCU			
		QLFVAGDTS	CCCGACCAGCACACCAGGCUGCUGCC			
		TVSPPAGRS	CUUCGCCUUCUACUCCCUGCUGUCCU			
		LELKGQGNP	ACUUCCACGAGGACGCCGCCAUCCGG			
		VELITKARL	GAGGAGGCCUUCCUGCACGUGGCCGU			
		FLLQLIPRCP	GGACAUGUACCUGAAGCUGGUGCAGC			
		KKSFSHVAE	UGUUCGUGGCCGGCGACACCUCCACC			
		LLADRGDC	GUGAGCCCUCCUGCUGGCCGAAGCCU			
		DPEVSAALQ	GGAGCUGAAGGGCCAGGGCAACCCCG			
		SRQQAAPDA	UGGAGCUGAUCACCAAGGCCCGCCUG			
		DLSQEPHLF	UUCCUGCUGCAGCUGAUCCCUCGCUG			
			CCCCAAGAAGAGCUUCAGCCACGUGG			
			CCGAGCUGCUGGCUGACAGGGGAGAC			
			UGCGACCCCGAGGUGAGCGCUGCCCU			
			GCAGAGCCGUCAACAAGCGGCCCCUG			
			ACGCCGAUCUGAGCCAGGAGCCCCAC			
			CUGUUC			

實例 4. 表現 FANCA mRNA

【0745】 mRNA FANCA_01 (SEQ ID NO:4)及 FANCA_02 (SEQ ID NO:5)各自

使用編碼 FANCA (SEQ ID NO:1)之密碼子優化 ORF 及包括 5′ UTR 及 3′ UTR 之 mRNA 控制元件來產生。

【0746】 FaDu 細胞獲自範可尼貧血癌細胞株資源(Fanconi Anemia Cancer Cell Line Resource)，並且源自散發性頭頸部鱗狀細胞癌(ATCC #HTB43)。在 CAS9 介導之 FANCA 基因 N 末端缺失靶向，從而導致 FANCA 蛋白表現及功能喪失後，FANCA 剔除(KO)細胞株無性系地衍生自 FaDu 細胞株。

【0747】 FaDu，Tg (補充有用 GFP mRNA 來轉染之無性系衍生 FANCA-/-亞株的轉殖基因)，及 FaDu-KO 細胞在 6 孔板中轉染(250,000-300,000 個細胞/孔)的前一天下午經接種。早晨之後，根據製造商說明書，使用 Lipofectamine MessengerMAX (Invitrogen, ref# LMRNA003)，以 1.5:1 ul/ug 比率之脂質體:mRNA 之比率，細胞用指示數量之 FANCA_01-FANCA_11 mRNA 或用 GFP mRNA (作為對照)來轉染。培養基在轉染後 6 小時更換並且用合適指示治療劑來置換。在 1XNuPAGE LDS 樣品緩衝液中轉染之後 6、24、48、或 72 小時，將細胞裂解。FANCA 蛋白表現藉由使用 Cell Signaling 14657 抗體的西方墨點法來確定。對於核仁素，蛋白負載使用 Cell Signaling 87792 抗體來標準化。相對於模擬治療 FaDu 細胞中之平均表現，FANCA/核仁素之倍數變化表現。

【0748】 **圖 3A** 為展示指示時間點之 FaDu trio 細胞株中之 FANCA 及核仁素之蛋白水準的西方墨點法影像。相對於負載對照及野生型(WT)平均值來標準化，計算倍數變化 FANCA 表現。FANCA mRNA *在活體外*表現蛋白多達三天。

【0749】 **圖 3B** 為展示相對於 WT 中之平均表現的 FANCA/核仁素之倍數變化表現的圖表。轉染後多達 72 小時，所有 FANCA 構築體保持與 WT 可比較或更高的蛋白表現水準。

實例 5. 用 MMC 治療之後，FANCA mRNA 救援細胞存活

【0750】 FA 患者通常對於鏈間 DNA 交聯劑(諸如 DEB 及 MMC)具有增加的

敏感性。為了確定是否 FANCA mRNA 之表現可將 FANCA 缺陷細胞自 G2_M 期中之細胞週期停滯中救援出來，在其 PBS (模擬)、DEB 或 MMC 治療之後 24 小時，將 FaDu，Tg、及 FaDu-KO 細胞用 1 ug 之 GFP mRNA 或 FANCA mRNA 來轉染。在 MMC 的情況下，將其在 1 小時治療之後移除。四十八小時後，將細胞收集，固定並且在 RNA 酶 A 存在下，用 DAPI 染色以便進行細胞週期分析。為了確定是否 FANCA mRNA 之表現可將 FANCA 缺陷細胞自對於 MMC 之敏感性中救援出來，在其 PBS (模擬)或不同濃度之 MMC 治療之後 6 小時，將 FaDu，Tg、及 FaDu-KO 細胞用 1 ug 之 GFP mRNA 或 FANCA mRNA 來轉染。在 MMC 存在下培養之後五天，隨後將經治療細胞使用 Cell Titer Glo 試劑(Promega #G7570)來裂解以便釋放總 ATP 並且發光在 Bio-Tek Synergy H1 上讀取。每個資料點之五個重複物相對於未治療或轉染對照來標準化。

【0751】 **圖 4** 為展示 FaDu-WT、用 1ug GFP mRNA 構築體來轉染之 FaDu-KO 或用 1ug FANCA 構築體來轉染並且轉染後 24 小時用指示濃度之 MMC 來治療的 FaDu-KO 之存活百分率的圖表。存活在治療後 5 天使用 cell titer Glo 來評估。

【0752】 FANCA 剔除細胞中之 FANCA 之再表現將存活率救援至類似於野生型之水準。

實例 6. FANCA mRNA 部分地救援細胞週期

【0753】 為了確定是否在用 DEB 或 MMC 治療之後，FANCA mRNA 之表現可將 FANCA 缺陷細胞自 G2_M 期中之細胞週期停滯中救援出來，GFP 或 FANCA (1ug) mRNA 轉染 FaDu，Tg、及 FaDu-KO 細胞用 PBS 來模擬治療或用 0.05 ug/ml MMC (Sigma，ref# M0503)治療 1 小時或用 0.1 ug/ml DEB (Sigma，ref# 90474)治療 48 小時。在用 mRNA 構築體來轉染之後，將細胞模擬治療或用 MMC 或 DEB 治療 6 小時(圖 3A-圖 3B)或 72 小時(圖 4A-圖 4B)。添加治療後 48 小時，細胞使用 0.25%胰蛋白酶來收穫並且用 PBS 洗滌。

【0754】 根據製造商說明書，死細胞使用 LIVE/DEAD 可固定遠紅外(Invitrogen，ref# L10120)染色劑來標記，然後使用 BD Cytofix/Cytoperm (BD，ref# 554714)來固定。固定之後，細胞在含有 1 ug/ml 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) (Invitrogen，ref# D21490)及 100ug/ml RNaseA (Thermo Scientific, ref# EN0531)之 PBS 中重構 15 分鐘，然後使用 SONY-SH800Z 來分析。

【0755】 **圖 5A** 為展示用 1 ug 之 FANCA mRNA 或 GFP mRNA 來轉染，繼之以 6 小時後用對照(PBS)、DEB、或 MMC 來治療之後，處於細胞週期之 G2_M 期中之細胞之積累的圖表。與 GFP 轉染 FaDu-WT 及 FaDu KO 細胞相比，細胞週期分析證明用 DEB 及 MMC 治療之後 48 小時，1 ug 之 FANCA mRNA 構築體之轉染導致細胞週期之 G2_M 期中之 FaDu KO 細胞之積累的部分救援。

【0756】 **圖 5B** 為展示呈現為平均值±SD 的**圖 5A** 之資料之 G2M 頻率的圖表。

【0757】 **圖 6A** 為展示用 1 ug 之 FANCA mRNA 或 GFP mRNA 來轉染，繼之以 72 小時後用對照(PBS)、DEB、或 MMC 來治療之後，處於細胞週期之 G2_M 期中之細胞之積累的圖表。與 GFP 轉染 FaDu-WT 及 FaDu KO 細胞相比，細胞週期分析證明用 DEB 及 MMC 治療之後 48 小時，1 ug 之 FANCA mRNA 構築體之轉染導致細胞週期之 G2_M 期中之 FaDu KO 細胞之積累的部分救援。

【0758】 **圖 6B** 為展示呈現為平均值±SD 的**圖 6A** 之資料之 G2M 頻率的圖表。

【0759】 **圖 6C** 為展示相對於核仁素來標準化並且表示為 WT FaDu 細胞株中之 FANCA 之倍數變化的 FANCA 之表現水準的圖表。

實例 7. 具有 v2.0 5' UTR 以及卡帕 3' UTR 之 mRNA 之活體內效應

【0760】 此實例描述疫苗誘導免疫反應之*活體內*評估。

【0761】 為了評估在與 v1.1 5' UTR (SEQ ID NO: 56)或 v2.0 5' UTR (SEQ ID NO: 50)組合時，卡帕 3' UTR (SEQ ID NO: 139)在小鼠中所具有的*活體內*效應，向 CL57BL/6 小鼠(N=8)肌肉內注射在 8-((2-羥乙基)(6-側氧基-6-(十一烷氧基)己

基)胺基)辛酸十七烷-9-基酯中調配之 2 μg 之 mRNA。mRNA 編碼分泌蛋白卵白蛋白。給藥後 6h 及 48h，獲得 50 μl 之血液並且產生血清。血清中之卵白蛋白濃度藉由 ELISA 來評估(**圖 7**)。

【0762】 間隔 28 天投與兩個劑量。在兩個時間點：第 28 天(亦即敏化後 4 週)及第 43 天(亦即補強後 2 週)，評估血清中之抗體水準。抗體水準表示為端點效價，亦即可偵測到抗體與塗佈有卵白蛋白抗原之板之結合的血清之最大稀釋度。

【0763】 結果示出包含 v2.0 5' UTR (SEQ ID NO: 50)及卡帕 3' UTR (SEQ ID NO: 139)之 mRNA 在敏化後增加抗體反應約 25x 並且在補強後約 5x (**圖 8**)。

實例 8. 具有 3' UTR 中之 FUT8 序列的活體內效應

【0764】 為了評估 3' UTR 中之 FUT8 序列對於 mRNA 所具有的效應，編碼所關注蛋白之 mRNA 被調配成 LNP (化合物 II+GL67)，然後鋪在原代人類支氣管上皮細胞模型上。評估多個序列變異體：

1) 歷史參考序列(v1.0 UTR)

2) 具有 v2.0 5' UTR (SEQ ID: NO: 50)及再優化編碼序列之 mRNA

3) 具有來自(2)之元件加上帶有「德爾塔」終止盒及「FUT8」序列的 3' UTR (3' UTR 對應於 SEQ ID NO:140)的 mRNA。

【0765】 另外，對可救援突變基因之活性的兩個陽性對照進行評估。

【0766】 圖 9 示出 3' UTR 中之 FUT8 序列之效應。結果示出具有 FUT8 增加靶蛋白活性。

實例 9. v2.0 5' UTR 增強編碼紅血球凝聚素之 mRNA 在小鼠中之免疫原性

【0767】 *向 BALB/c* 小鼠注射編碼四種紅血球凝聚素(HA)蛋白(HA1、HA2、HA3、及 HA4)之四種 mRNA 之共調配物，該等 mRNA 具有 v2.0 5' UTR 及 v1.1 3' UTR 與愛歐塔終止盒(分別為 SEQ ID NO: 50 及 180)。具體而言，帶有 UTR 之 HA mRNA 在 SM-102 LNP 中共調配。LNP 以 3 週敏化-補強時間間隔來肌肉內

給予。在代表劑量 1 後及劑量 2 後(圖式中之 d21 及 d36)的指示天數，評估血清中之抗體水準。評估以下劑量：1 μg、0.2 μg、及 0.04 μg，以及作為對照之單獨 PBS。對於所有 4 種血凝素(HA)而言，大部分在劑量 1 後觀察到增加的抗體效價。在劑量 2 後，在脾臟中未觀察到對於 H1 及 H3 HA 之 CD4 T 細胞反應的影響。在劑量 2 後，在脾臟中觀察到針對 H1 HA 之較高 CD8 CD107a T 細胞反應(參見，例如，圖 10)。在劑量 1 後及劑量 2 後，亦觀察到 6 小時之增加的 IP-10 水準。通常，第一劑量之後及在中間劑量水準下，v2.0 5' UTR 之存在增強免疫原性。

實例 10. v2.0 5' UTR 及卡帕 3' UTR 之組合增強編碼紅血球凝聚素之 mRNA 之活體外表現

【0768】 與實例 9 相似，細胞用編碼四種紅血球凝聚素(HA)蛋白(HA1、HA2、HA3、及 HA4)之四種 mRNA 之共調配物來轉染，該等 mRNA 具有 v1.1 5' UTR 及 v1.1 3' UTR (分別為 SEQ ID NO: 56 及 180)或 v2.0 5' UTR 及卡帕 3' UTR (分別為 SEQ ID NO: 50 及 SEQ ID NO: 139)。再一次，帶有任一組 UTR 之 HA mRNA 在 SM-102 LNP 中共調配。LNP 以 3 週敏化-補強時間間隔來肌肉內給予。在代表劑量 1 後及劑量 2 後的指示天數，評估血清中之抗體水準。細胞亦用四種不同已知流感疫苗(CR9114、CR8059、5e04、及 2B06)來治療。在用 mRNA 給藥後 24h、48h、及 72h，監測 MFI 陽性細胞之數目。如圖 11 展示，對於低劑量之共調配 mRNA 而言，四種 HA 蛋白之表現之增加主要在 72 小時觀察到。

其他實施例

【0769】 應當理解，儘管已結合本發明之詳細描述描述本發明，但前述描述意欲示出而非限制由所附申請專利範圍之範圍限定的本發明之範圍。其他態樣、優勢、及改進在以下申請專利範圍之範圍內。

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】　一種信使 RNA (mRNA)，其包含 5’ UTR、編碼多肽之開放閱讀框及 3’ UTR，其中該 3′ UTR 包含：

(i) 與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 之核酸序列至少 98%一致之核苷酸序列；或

(ii) 與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 之核酸序列、或其缺失變異體對應之核苷酸序列，其中 1 至 75 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失，其中該核酸序列或其缺失變異體經修飾以便包括：

a) 插入該核酸序列或其缺失變異體內之一或多個 miRNA 結合位點，及/或

b) TENT 募集序列、FUT8 募集序列、一或多個鑑別及比率確定(IDR)序列、一或多個核糖體接合偵測檢定(REDA)序列、或插入該核酸序列或其缺失變異體內之一或多個 IDR 序列及一或多個 REDA 序列的組合。

【請求項 2】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 3】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:139 中所闡明之核酸序列。

【請求項 4】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:140 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 5】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:140 中所

闡明之核酸序列。

【請求項 6】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:141 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 7】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:141 中所闡明之核酸序列。

【請求項 8】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:142 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 9】　如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:142 中所闡明之核酸序列。

【請求項 10】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:143 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 11】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:143 中所闡明之核酸序列。

【請求項 12】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:144 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 13】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:144 中所闡明之核酸序列。

【請求項 14】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:145 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 15】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:145 中所闡明之核酸序列。

【請求項 16】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:146 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 17】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:146 中所

闡明之核酸序列。

【請求項 18】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:147 之核酸序列至少 99%一致之核苷酸序列。

【請求項 19】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:147 中所闡明之核酸序列。

【請求項 20】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中該核酸序列經修飾以便包括插入該核酸序列內之一或多個 miRNA 結合位點。

【請求項 21】 如請求項 20 之 mRNA，其中該一或多個 miRNA 結合位點選自 SEQ ID NO:148-157。

【請求項 22】 如請求項 20 之 mRNA，其中該一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:149 之至少一個複本及 SEQ ID NO:150 之至少一個複本。

【請求項 23】 如請求項 20 之 mRNA，其中該一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:150 之至少三個複本。

【請求項 24】 如請求項 20 之 mRNA，其中該一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:149 之至少兩個複本。

【請求項 25】 如請求項 20 之 mRNA，其中該一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:149 之至少兩個複本及 SEQ ID NO:150 之至少一個複本。

【請求項 26】 如請求項 20 之 mRNA，其中該一或多個 miRNA 結合位點包含 SEQ ID NO:148 之至少三個複本。

【請求項 27】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ

ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中該核酸序列經修飾以便包括插入該核酸序列內之 TENT 募集序列。

【請求項 28】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中該核酸序列經修飾以便包括插入該核酸序列內之 FUT8 募集序列。

【請求項 29】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中該核酸序列經修飾以便包括插入該核酸序列內之一或多個 IDR 序列。

【請求項 30】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含與 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO: 147 之核酸序列對應之核苷酸序列，其中該核酸序列經修飾以便包括插入該核酸序列內之一或多個 REDA 序列。

【請求項 31】 如請求項 1 之 mRNA，其中在該缺失變異體中，1 至 60 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【請求項 32】 如請求項 1 之 mRNA，其中在該缺失變異體中，1 至 50 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、

SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【請求項 33】 如請求項 1 之 mRNA，其中在該缺失變異體中，1 至 40 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【請求項 34】 如請求項 1 之 mRNA，其中在該缺失變異體中，1 至 30 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【請求項 35】 如請求項 1 之 mRNA，其中在該缺失變異體中，1 至 20 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【請求項 36】 如請求項 1 之 mRNA，其中在該缺失變異體中，1 至 10 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【請求項 37】 如請求項 1 之 mRNA，其中在該缺失變異體中，少於 10 個連續核苷酸自 SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、或 SEQ ID NO:147 中缺失。

【請求項 38】 如前述請求項中任一項之 mRNA，其中該 5' UTR 包含與 SEQ ID NO:50 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致之

核苷酸序列。

【請求項 39】 如前述請求項中任一項之 mRNA，其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 40】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:139 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 41】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:140 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 42】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:141 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 43】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:142 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 44】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:143 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 45】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:144 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 46】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:145 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 47】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:146 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 48】 如請求項 1 之 mRNA，其中該 3′ UTR 包含 SEQ ID NO:147 中所闡明之核酸序列，並且其中該 5’ UTR 包含 SEQ ID NO:50 中所闡明之核酸序列。

【請求項 49】 如前述請求項中任一項之 mRNA，其中該 mRNA 包含終止盒。

【請求項 50】 如請求項 49 之 mRNA，其中該終止盒選自 SEQ ID NO:158-174。

【請求項 51】 如請求項 50 之 mRNA，其中該終止盒為 UAAAGCUCCCCGGGG (SEQ ID NO:165)或 UAAGCCCCUCCGGGG (SEQ ID NO:164)。

【請求項 52】 如前述請求項中任一項之 mRNA，其中該 mRNA 包含 5’末端帽。

【請求項 53】 如請求項 52 之 mRNA，其中該 5’末端帽包含 $m^7GpppG_{2'OMe}$、m7G-ppp-Gm-A、m7G-ppp-Gm-AG、Cap0、Cap1、ARCA、肌苷、N1-甲基-鳥苷、2’-氟-鳥苷、7-去氮-鳥苷、8-側氧基-鳥苷、2-胺基-鳥苷、LNA-鳥苷、2-疊氮鳥苷、Cap2、Cap4、5’甲基 G 帽、或其類似物。

【請求項 54】 如前述請求項中任一項之 mRNA，其中該 mRNA 包含多聚腺苷酸區域。

【請求項 55】 如請求項 54 之 mRNA，其中該多聚腺苷酸區域為至少約 10、至少約 20、至少約 30、至少約 40、至少約 50、至少約 60、至少約 70、至少約 80、至少約 90 個核苷酸之長度、或至少約 100 個核苷酸之長度。

【請求項 56】 如請求項 54 之 mRNA，其中該多聚腺苷酸區域具有約 10 至約 200、約 20 至約 180、約 50 至約 160、約 70 至約 140、或約 80 至約 120 個核苷酸之長度。

【請求項 57】 如請求項 54 至 56 中任一項之 mRNA，其中該多聚腺苷酸區域

包含 A100-UCUAG-A20-反向去氧胸苷。

【請求項 58】 如前述請求項中任一項之 mRNA，其中該 mRNA 包含至少一個化學修飾核苷鹼基、糖、主鏈、或其任何組合。

【請求項 59】 如請求項 58 之 mRNA，其中該至少一個化學修飾核苷鹼基選自由以下組成之群：假尿嘧啶(ψ)、N1-甲基假尿嘧啶(m1ψ)、1-乙基假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶(s2U)、4'-硫尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、及其任何組合。

【請求項 60】 如前述請求項中任一項之 mRNA，其中該多肽包含分泌蛋白、膜結合蛋白、或細胞間蛋白。

【請求項 61】 如請求項 60 之 mRNA，其中該多肽為細胞介素、抗體、疫苗、受體、酶、激素、轉錄因子、配位體、膜轉運蛋白、結構蛋白、核酸酶、或其組分、變異體或片段。

【請求項 62】 一種醫藥組成物，其包含如前述請求項中任一項之 mRNA 及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項 63】 一種脂質奈米顆粒，其包含如請求項 1 至 61 中任一項之 mRNA。

【請求項 64】 如請求項 63 之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒包含：

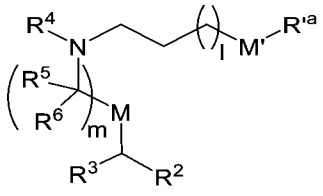
(i) 可電離脂質，

(ii) 磷脂，

(iii) 結構脂質，及

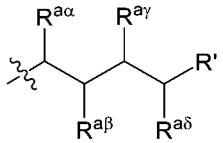
(iv) PEG-脂質。

【請求項 65】 如請求項 63 或 64 之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒包含式(I)化合物：



(I)或其 N-氧化物，或其鹽或異構物，

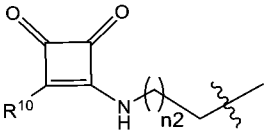
其中 R'a 為 R'支鏈；其中



R'支鏈為：　　；其中 表示附接點；

其中 $R^{a\alpha}$、$R^{a\beta}$、$R^{a\gamma}$、及 $R^{a\delta}$ 各自獨立地選自由 H、C_{2-12} 烷基、及 C_{2-12} 烯基組成之群；

R^2 及 R^3 各自獨立地選自由 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群；

R^4 選自由以下組成之群：$-(CH_2)_nOH$，其中 n 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群，及  ，

其中 表示附接點； 其中

R^{10} 為 $N(R)_2$；各 R 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基、C_{2-3} 烯基、及 H 組成之群；並且 n2 選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及 10 組成之群；

各 R^5 獨立地選自由 C_{1-3} 烷基、C_{2-3} 烯基、及 H 組成之群；

各 R^6 獨立地選自由 C_{1-3} 烷基、C_{2-3} 烯基、及 H 組成之群；

M 及 M' 各自獨立地選自由-C(O)O-及-OC(O)-組成之群；

R' 為 C_{1-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基；

l 選自由 1、2、3、4、及 5 組成之群；並且

m 選自由 5、6、7、8、9、10、11、12、及 13 組成之群。

【請求項 66】 如請求項 63-65 中任一項之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒包含：

(a) (i)化合物 II、(ii)膽固醇、及(iii) PEG-DMG 或化合物 I；

(b) (i)化合物 VI、(ii)膽固醇、及(iii) PEG-DMG 或化合物 I；

(c) (i)化合物 II、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv) PEG-DMG 或化合物 I；

(d) (i)化合物 VI、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv) PEG-DMG 或化合物 I；

(e) (i)化合物 II、(ii)膽固醇、及(iii)化合物 I；

(f) (i)化合物 II、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv)化合物 I；

(g) (i)化合物 B、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv) PEG-DMG 或化合物 I；

(h) (i)化合物 B、(ii)膽固醇、及(iii)化合物 I；或

(i) (i)化合物 B、(ii) DSPC 或 DOPE、(iii)膽固醇、及(iv)化合物 I。

【請求項 67】 如請求項 63-65 中任一項之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒包含化合物 II 及化合物 I。

【請求項 68】 如請求項 63-65 中任一項之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒包含化合物 B 及化合物 I。

【請求項 69】 如請求項 63-65 中任一項之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒包含化合物 II、DSPC、膽固醇、及化合物 I。

【請求項 70】 如請求項 63-69 中任一項之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒包含約 20-60%可電離脂質: 5-25%磷脂: 25-55%膽固醇: 及 0.5-15% PEG 脂質之莫耳比。

【請求項 71】 如請求項 63-70 中任一項之脂質奈米顆粒，其中該脂質奈米顆粒被調配成用於靜脈內、皮下、肌肉內、鼻內、眼內、直腸、肺部或經口遞送。

【請求項 72】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 63 至 71 中任一項之脂質奈米顆粒。

【請求項 73】 一種細胞，其包含如請求項 63 至 71 中任一項之脂質奈米顆粒。

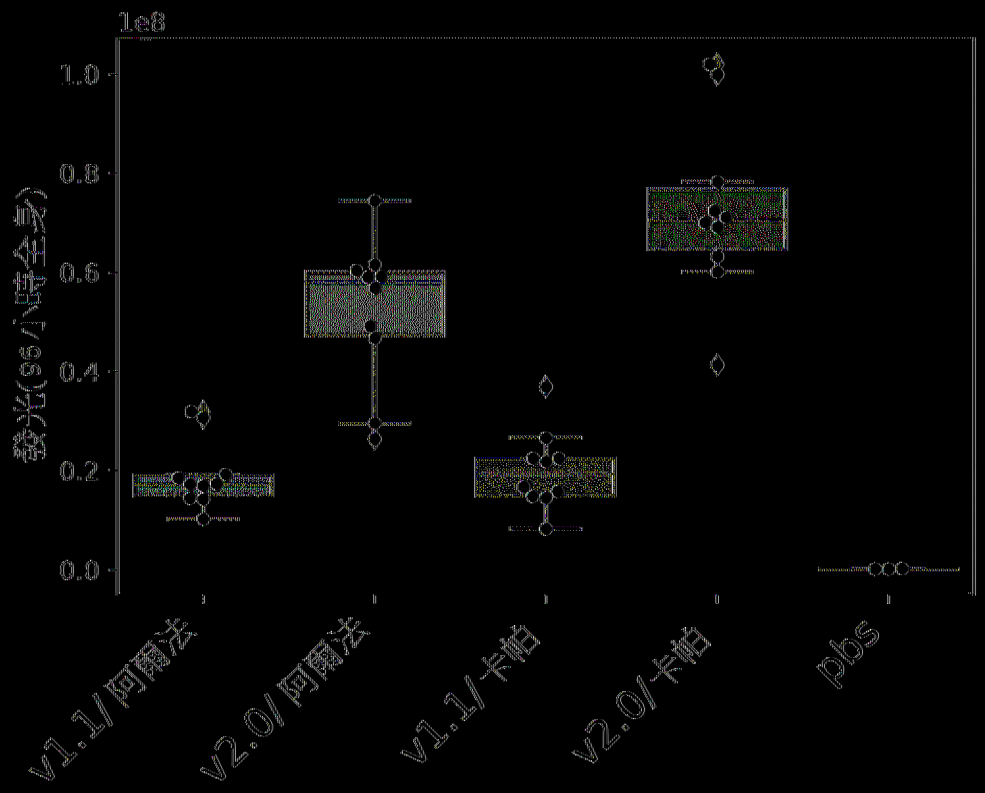
【請求項 74】 一種增加多肽之表現的方法，其包括向細胞投與如請求項 63 至 71 中任一項之脂質奈米顆粒。

【請求項 75】 一種向細胞遞送如請求項 63 至 71 中任一項之脂質奈米顆粒的方法，其包括使該細胞在活體外、活體內或離體與該脂質奈米顆粒接觸。

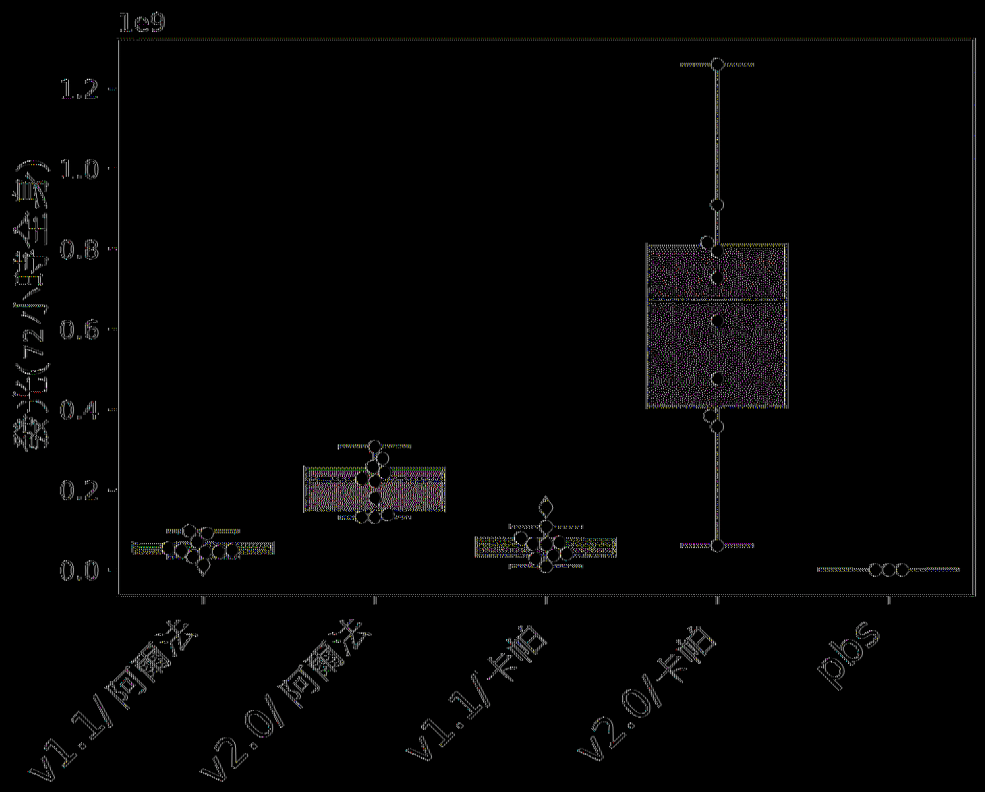
【請求項 76】 一種向患有疾病或病症之人類受試者遞送如請求項 63 至 71 中任一項之脂質奈米顆粒的方法，其包括向有需要的該人類受試者投與有效量的該脂質奈米顆粒。

【請求項 77】 一種在有需要的人類受試者中治療、預防疾病或病症、或預防該疾病或病症之症狀的方法，其包括向該人類受試者投與有效量的如請求項 63 至 71 中任一項之脂質奈米顆粒。

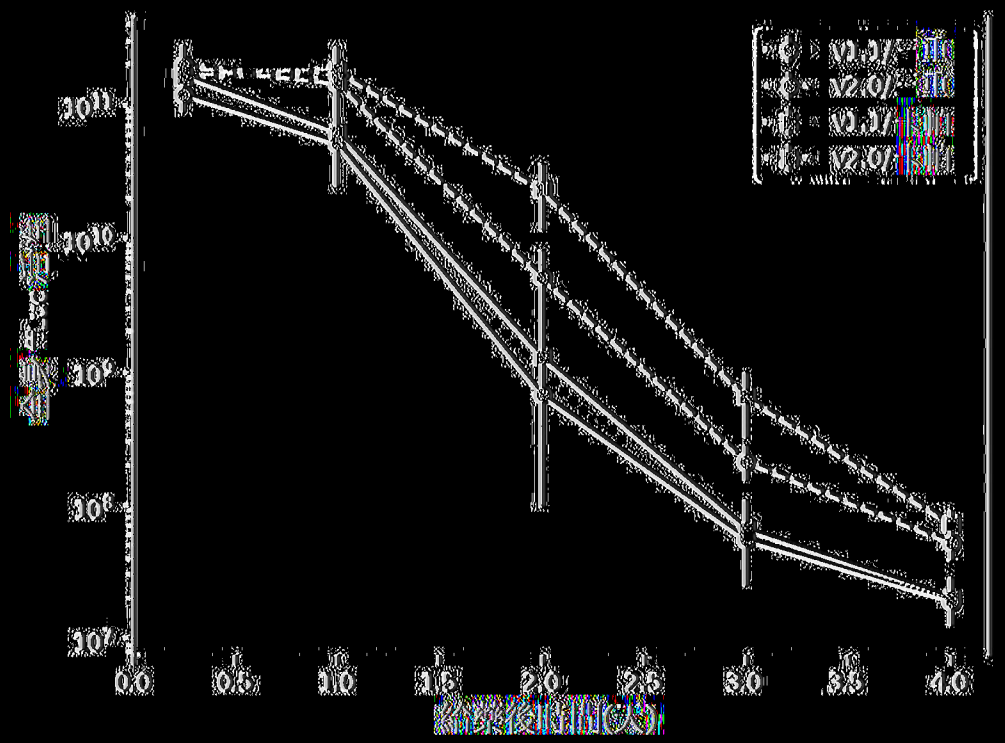
【發明圖式】


1e8
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
v1.1/阿爾法
v2.0/阿爾法
v1.1/卡帕
v2.0/卡帕
pbs

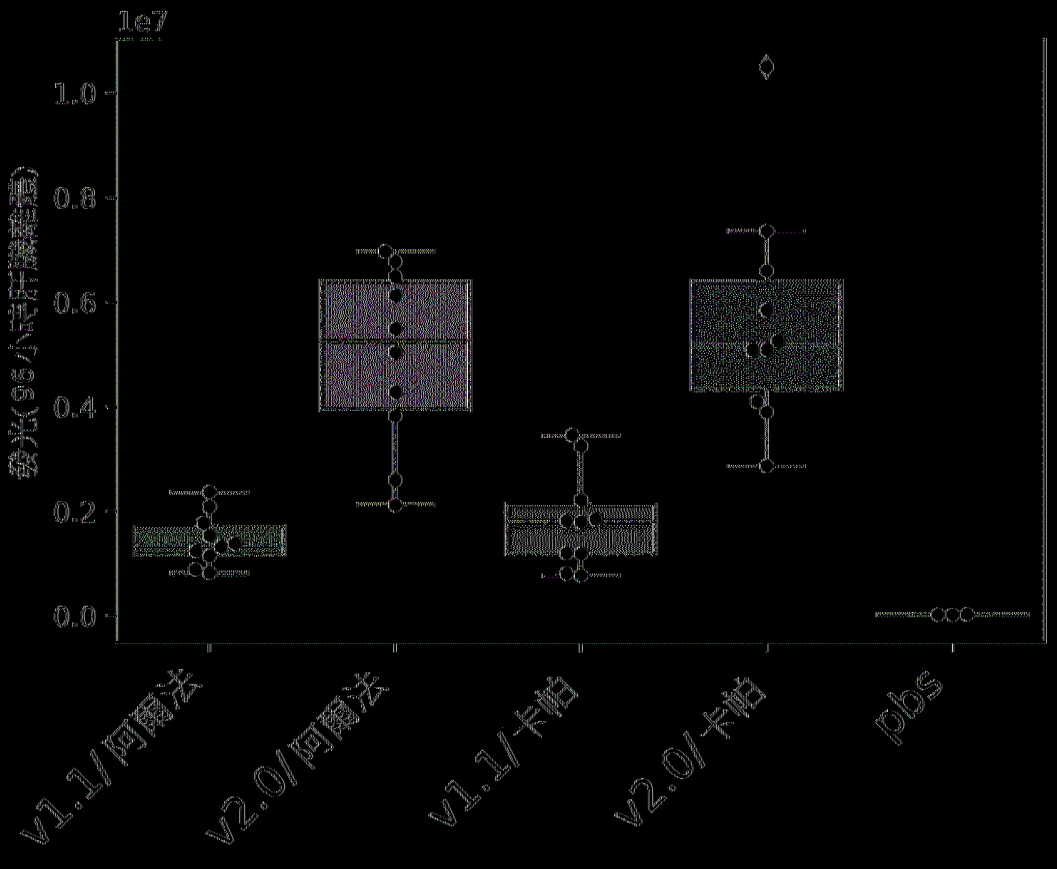
【圖 1A】


1e9
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
v1.1/阿爾法
v2.0/阿爾法
v1.1/卡帕
v2.0/卡帕
pbs

【圖 1B】


v1.1/阿爾法
v2.0/阿爾法
v1.1/卡帕
v2.0/卡帕
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0

|(圖 1C)|


1e7
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
v1.1/阿爾法
v2.0/阿爾法
v1.1/卡帕
v2.0/卡帕
pbs

|(圖 1D)|

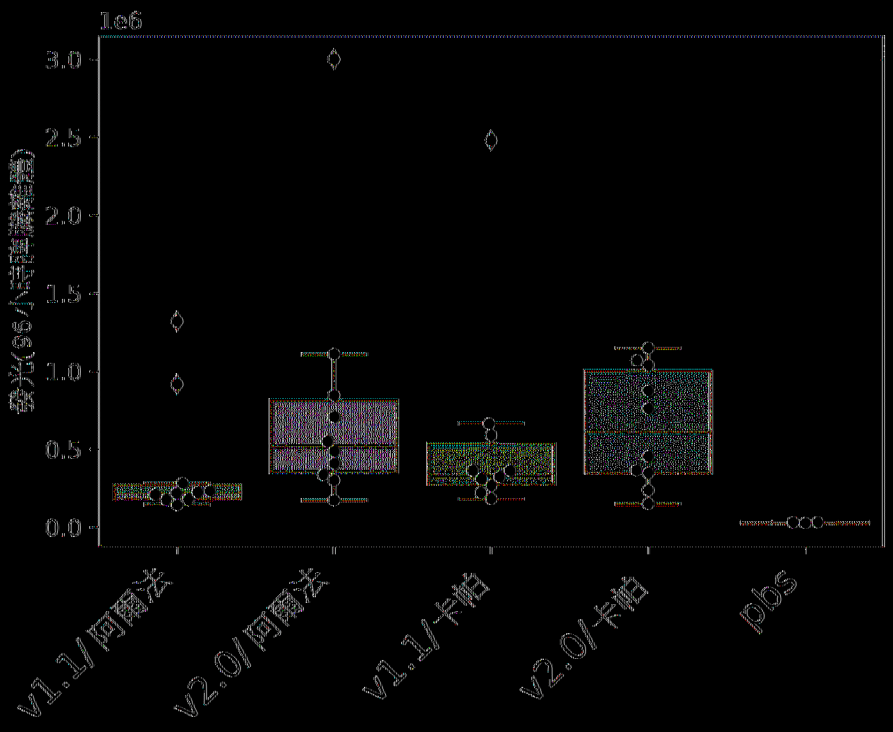

1e6
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
v1.1/ 阿爾法
v2.0/ 阿爾法
v1.1/ 卡帕
v2.0/ 卡帕
pbs

圖 1E

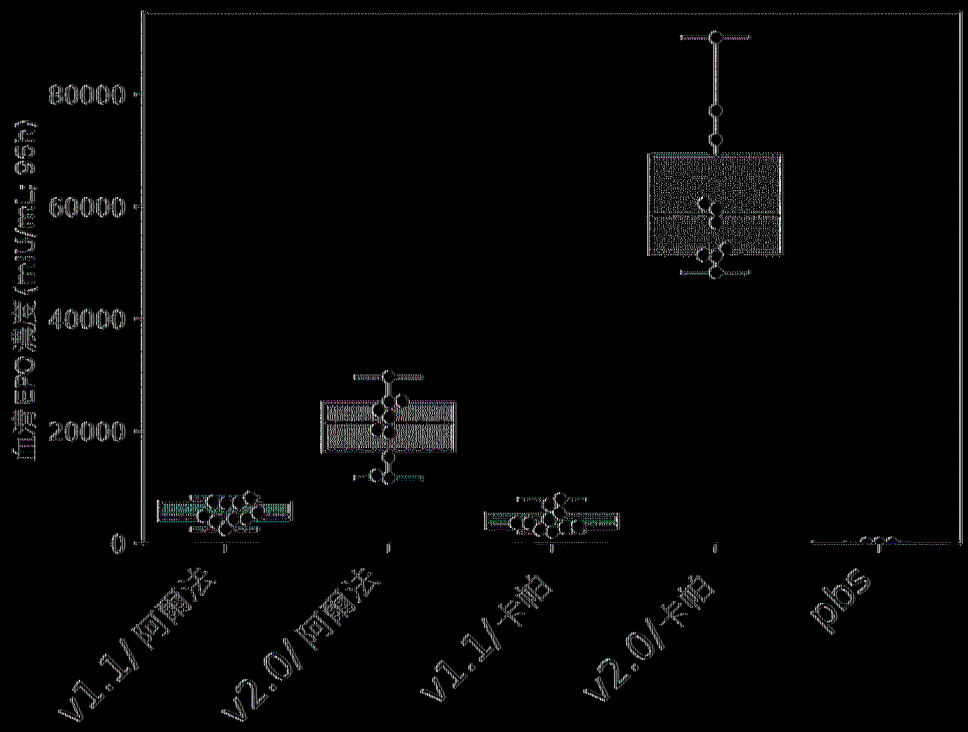
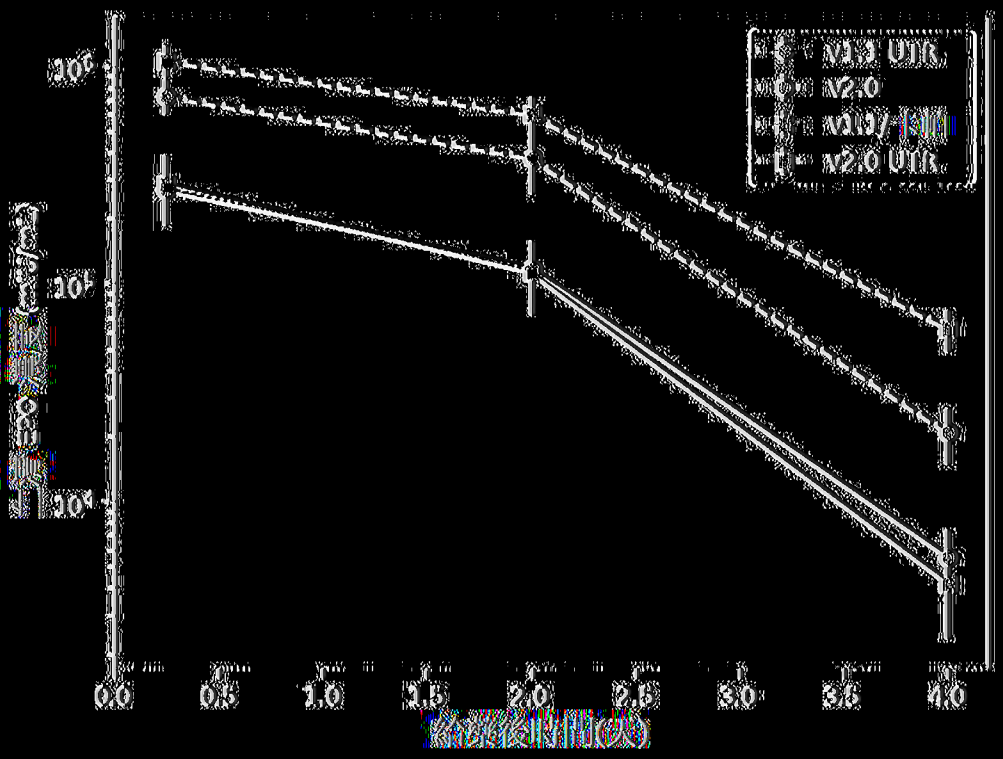
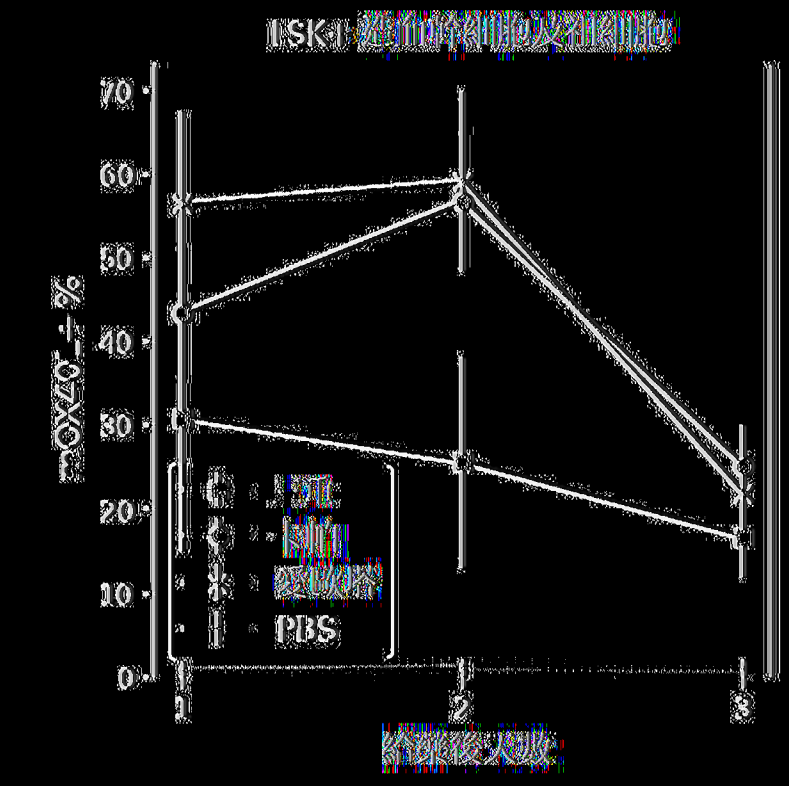
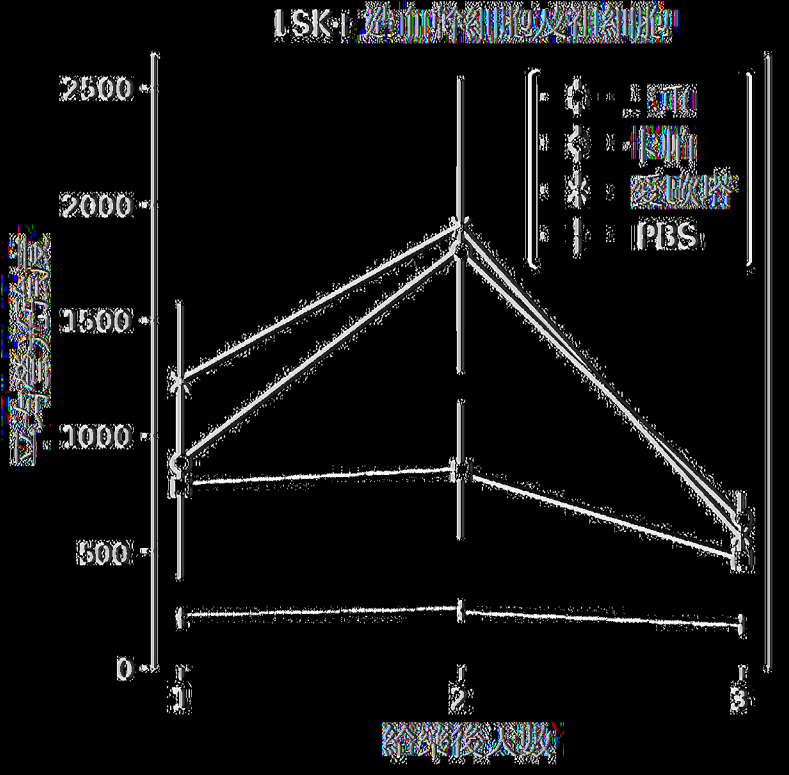

80000
60000
40000
20000
0
v1.1/ 阿爾法
v2.0/ 阿爾法
v1.1/ 卡帕
v2.0/ 卡帕
pbs

圖 1F

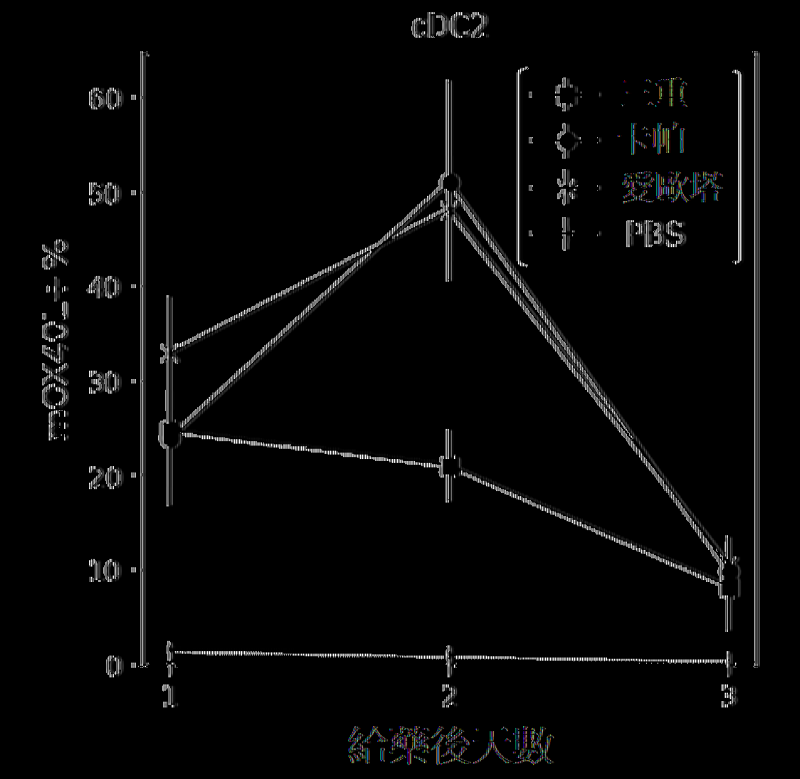


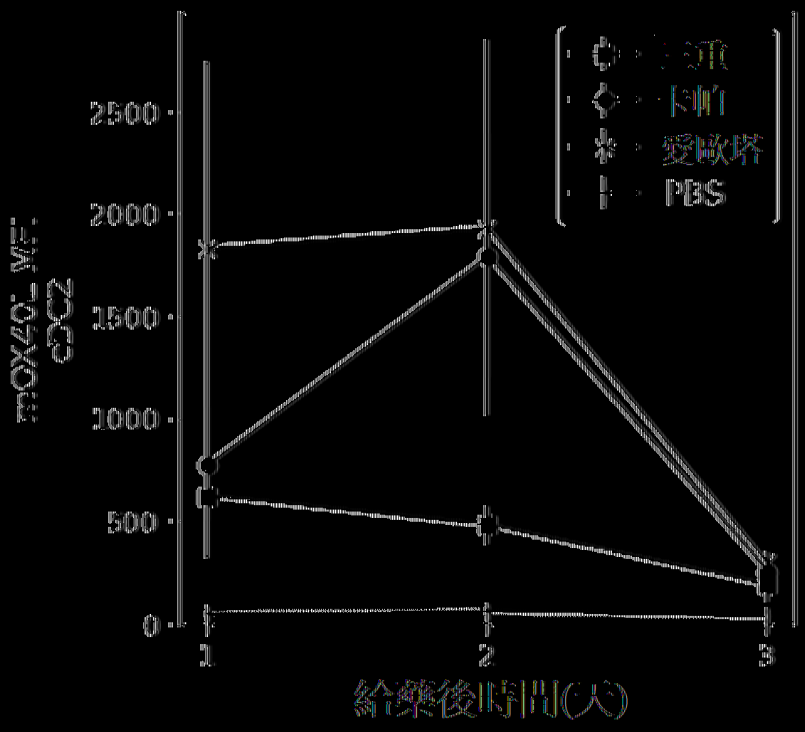
[圖 1G]


LSK+ 造血幹細胞及祖細胞
70
60
50
40
30
20
10
0
%
PBS
1
2
3
給藥後天數

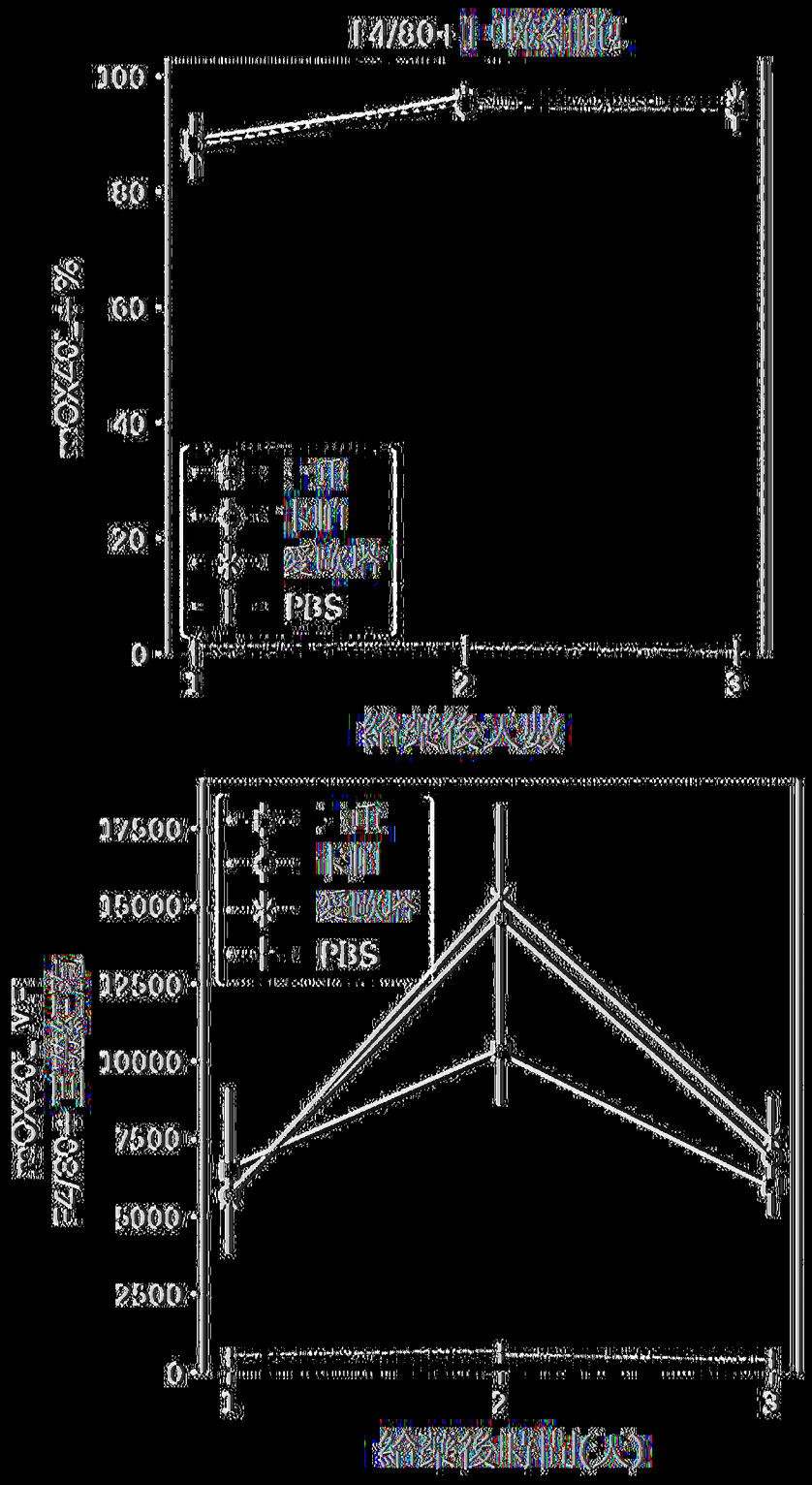

LSK+ 造血幹細胞及祖細胞
2500
2000
1500
1000
500
0
PBS
1
2
3
給藥後天數

[圖 2A]

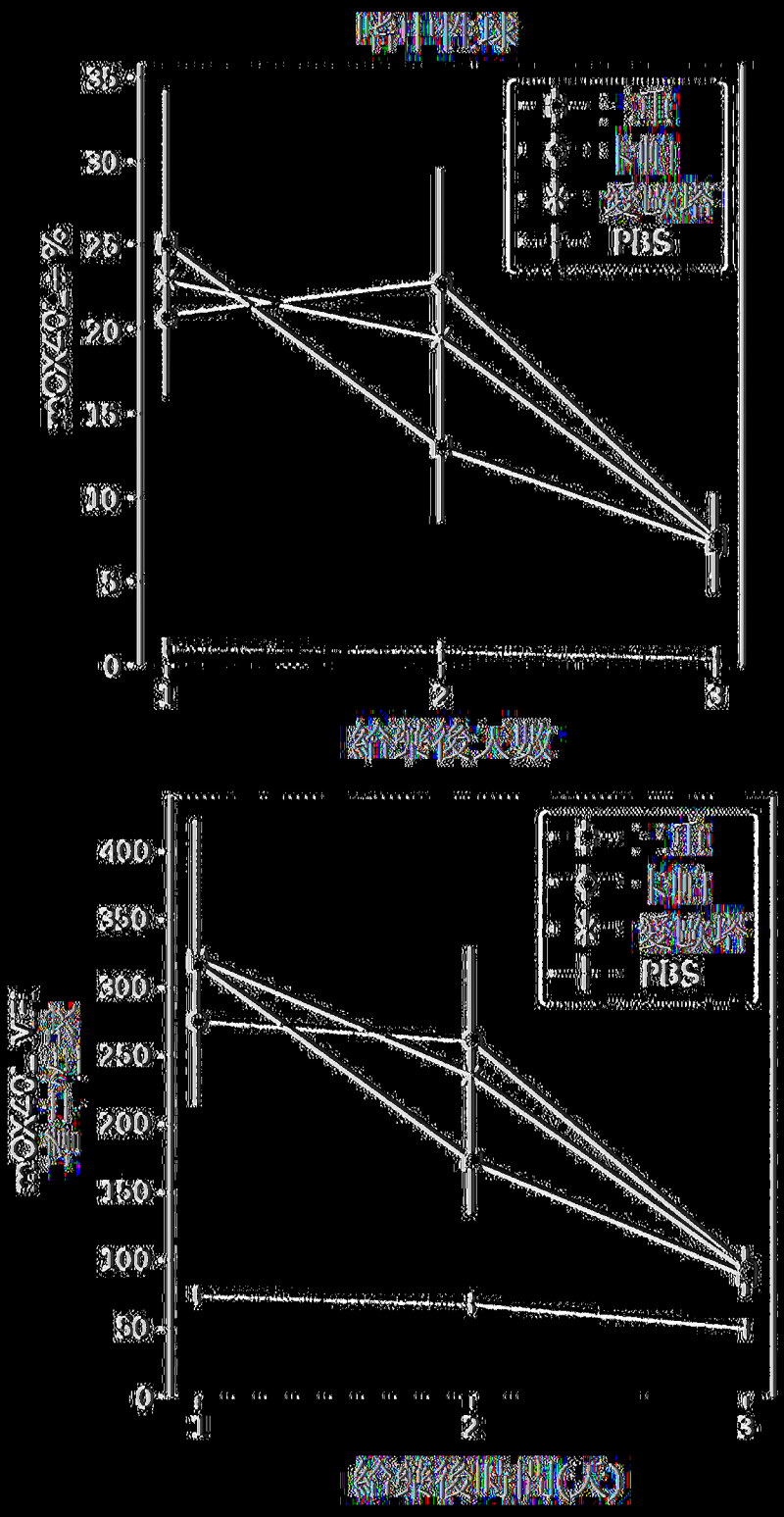

cDC2
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
給藥後天數
PBS
愛欧塔
卡帕
貝


2500
2000
1500
1000
500
0
1
2
3
給藥後時間(天)
PBS
愛欧塔
卡帕
貝

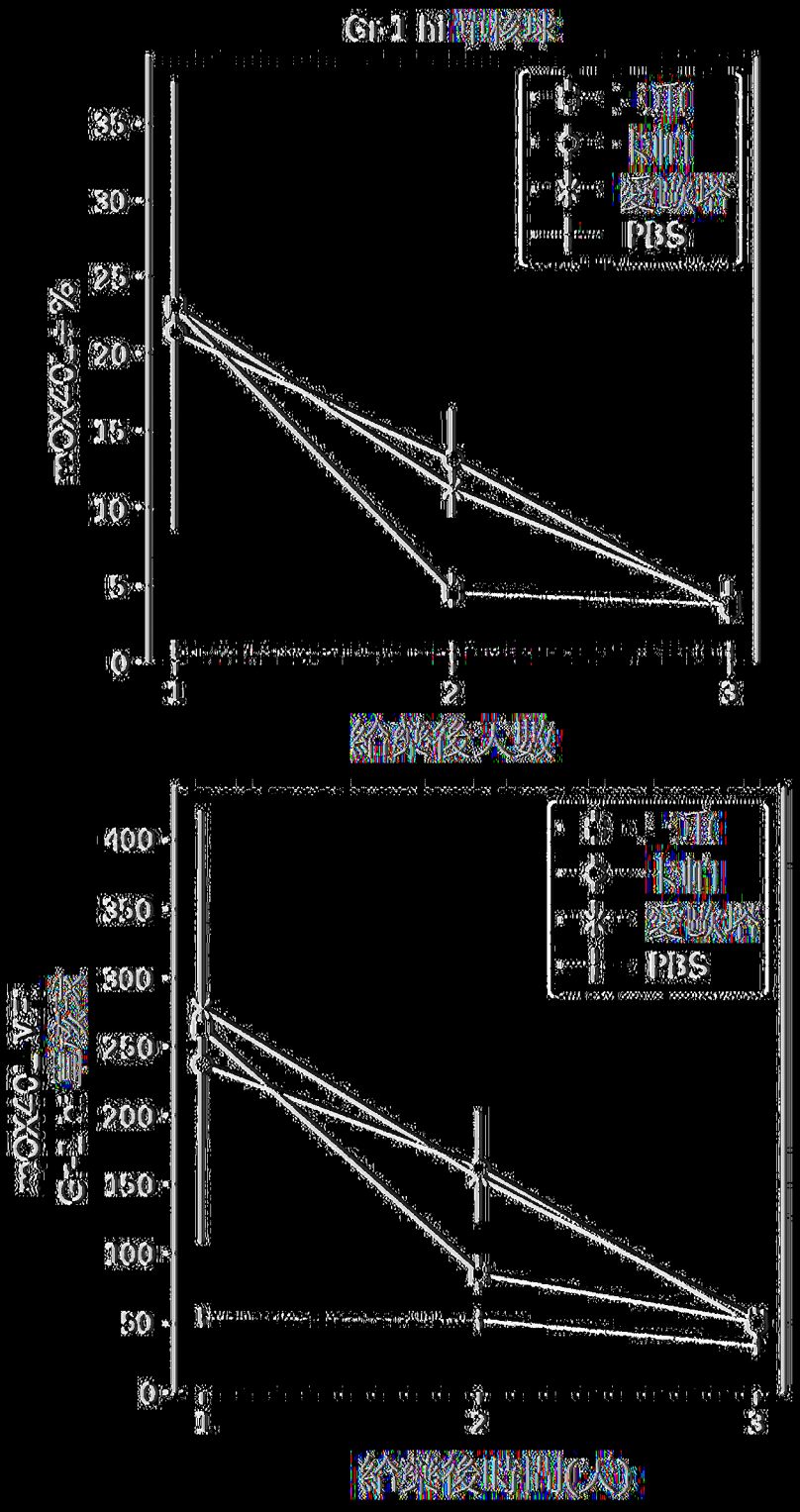
[圖 2B]


14/80-1 II 感染前比
100
80
60
40
20
0
%
PBS
1
2
3
給藥後天數
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
PBS
1
2
3
給藥後時間(天)

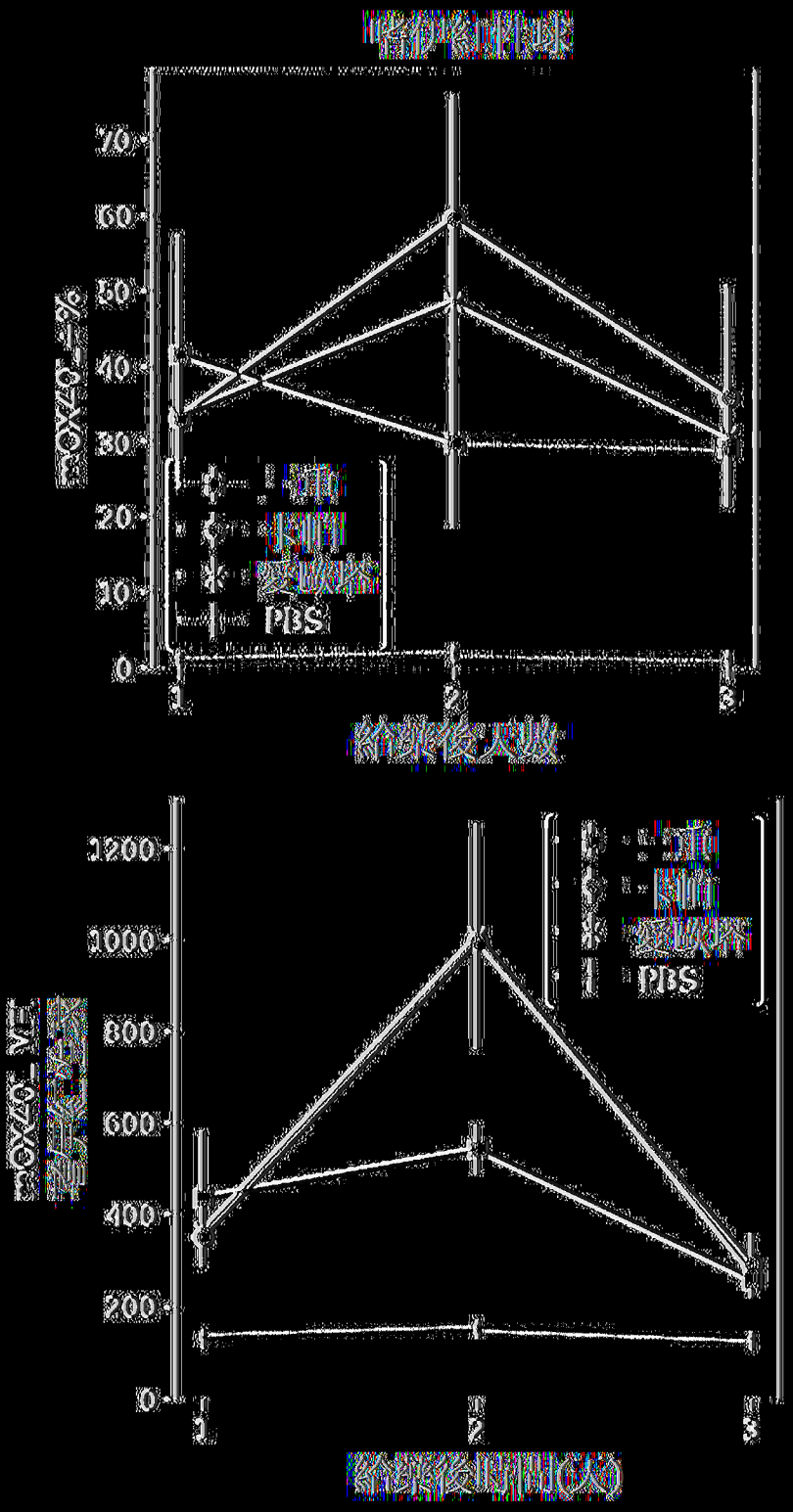
[圖 2C]


腫瘤體積
35
30
25
20
15
10
5
0
1
2
3
PBS
給藥後天數
400
350
300
250
200
150
100
50
0
給藥後時間(天)

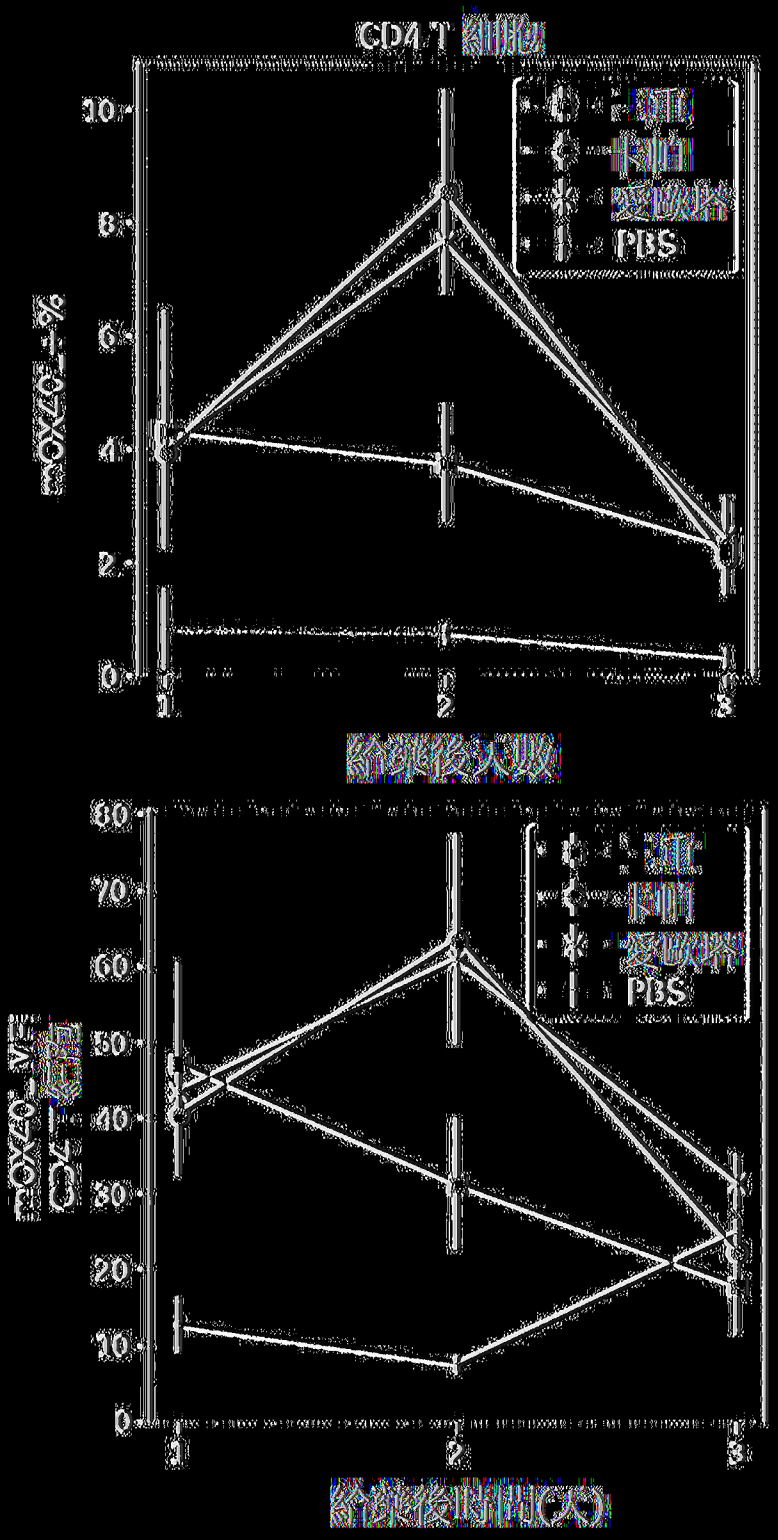
[圖 2D]


Gr.1 hI-IL-6R
PBS
%
0
5
10
15
20
25
30
35
1
2
3
PBS
0
50
100
150
200
250
300
350
400
1
2
3

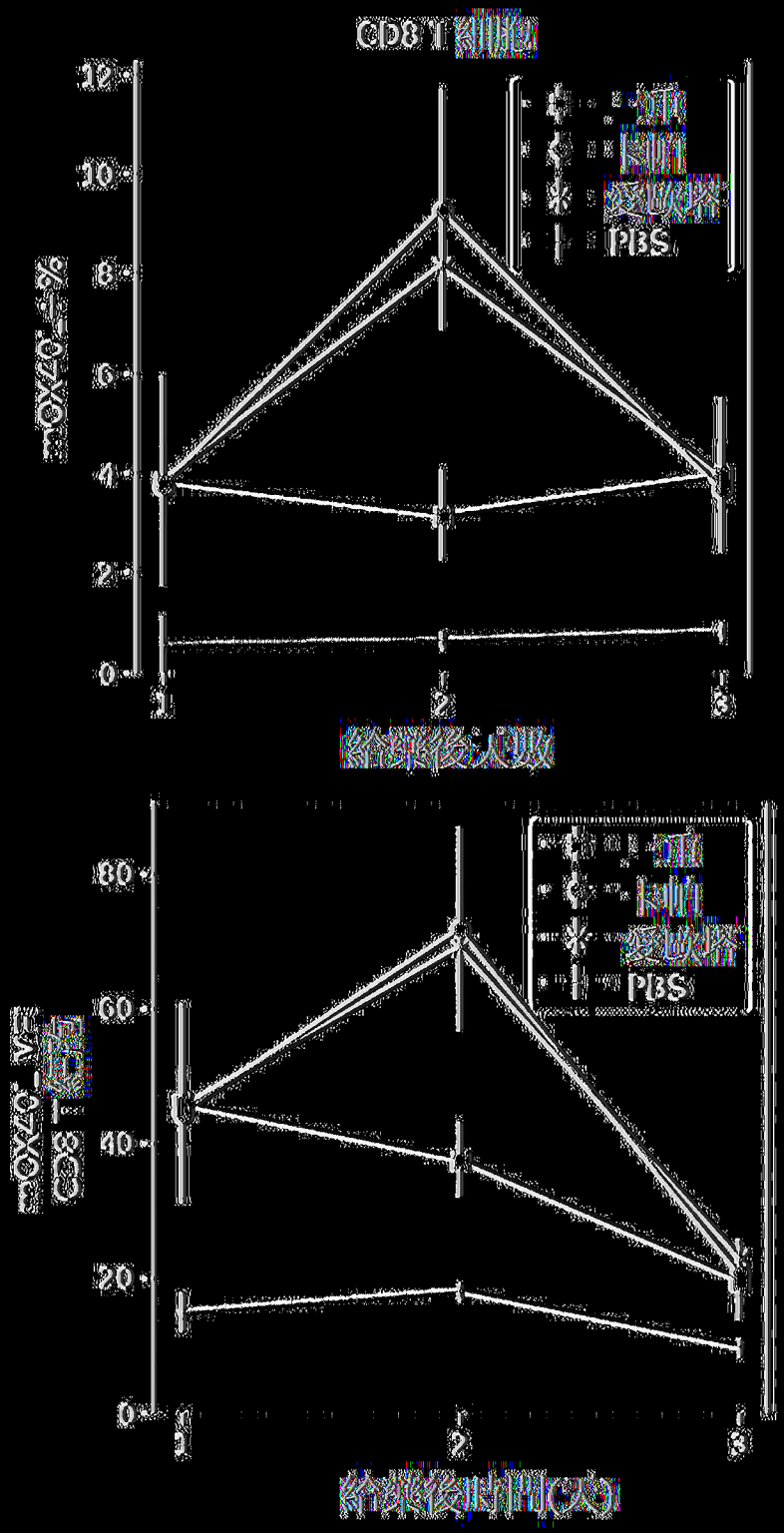
[圖 2E]


嗜伊紅性球
70
60
50
40
30
20
10
0
%
1
2
3
給藥後天數
1200
1000
800
600
400
200
0
1
2
3
給藥後時間(天)

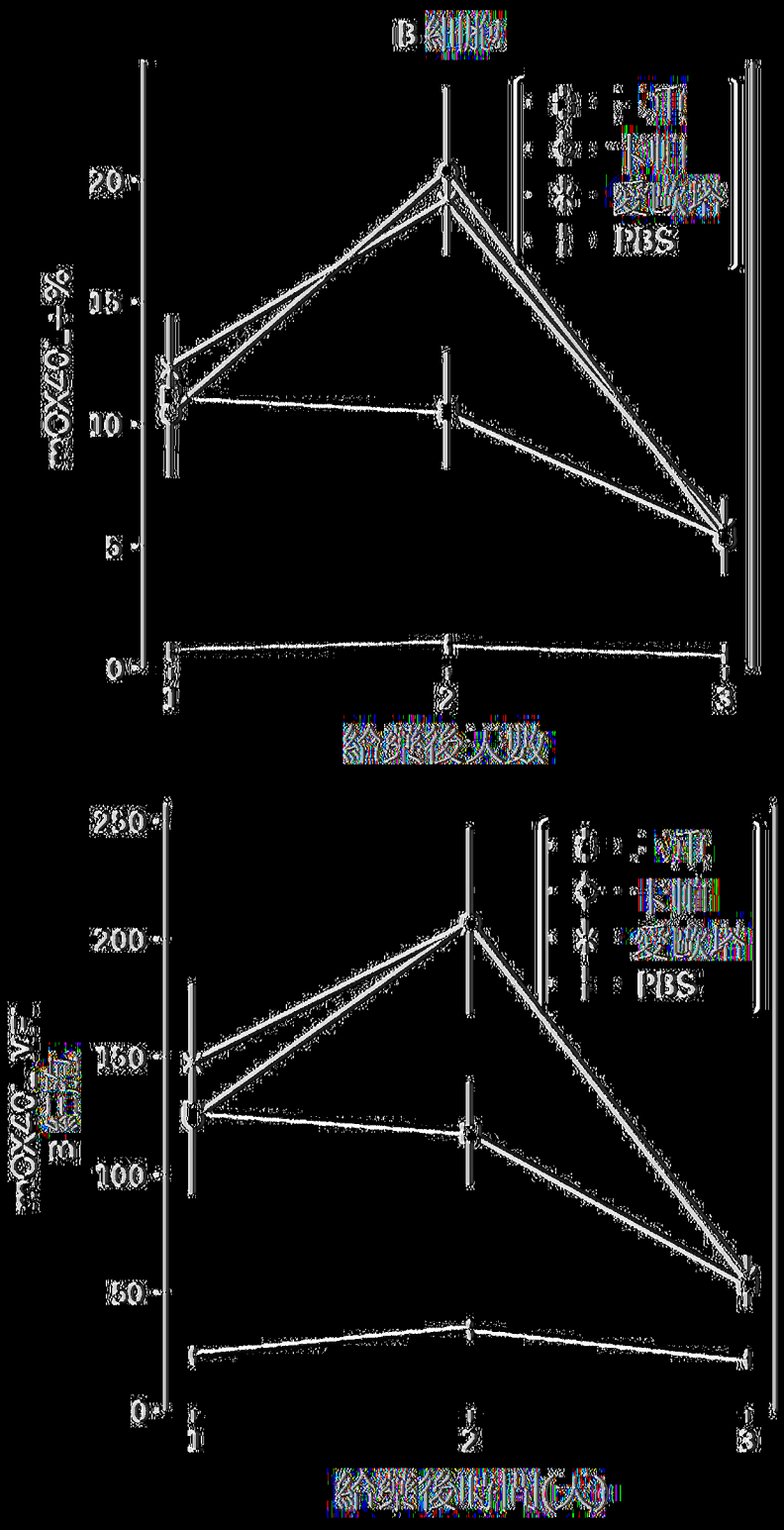
[圖 2F]



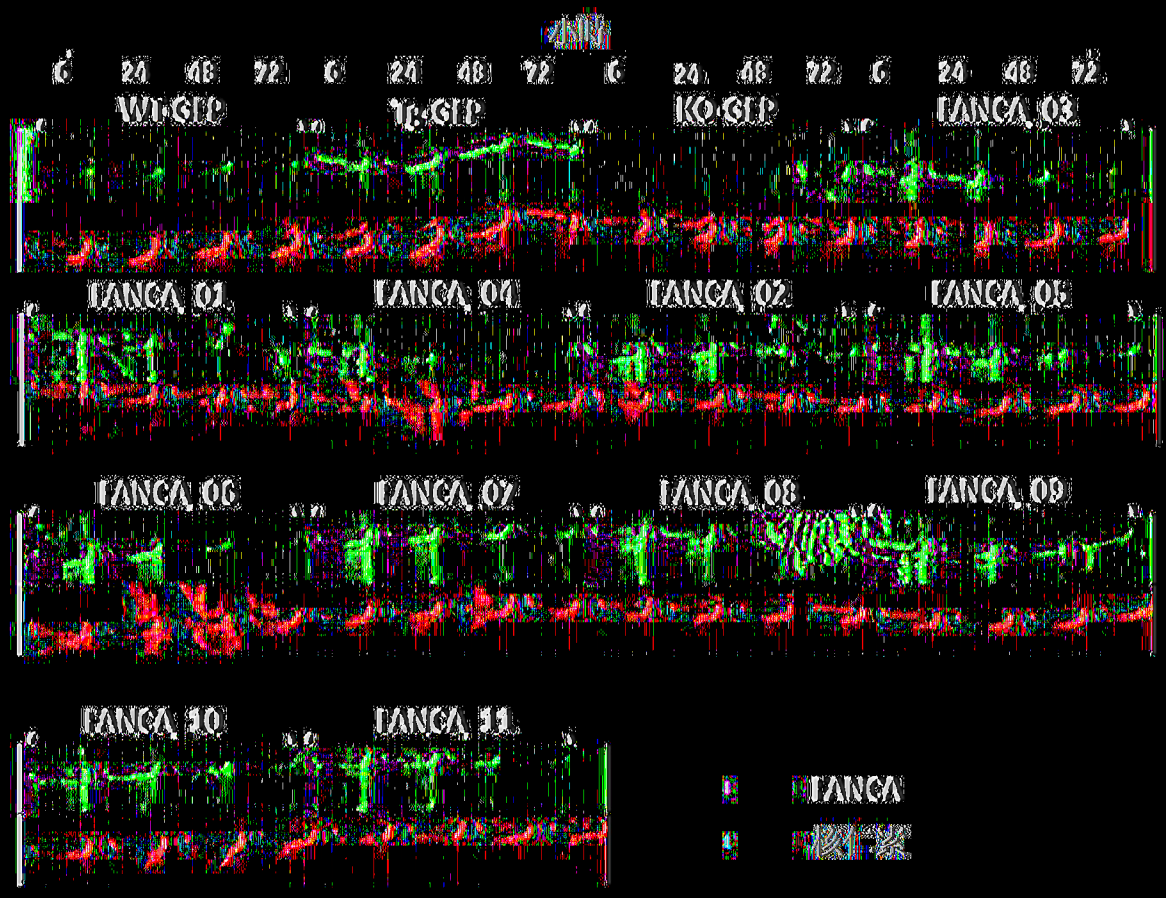
[圖 2G]


CD8+T細胞
12
10
8
6
4
2
0
%-1-07XO-
1
2
3
給藥後天數
PBS
80
60
40
20
0
%-07XO-
給藥後時間(天)

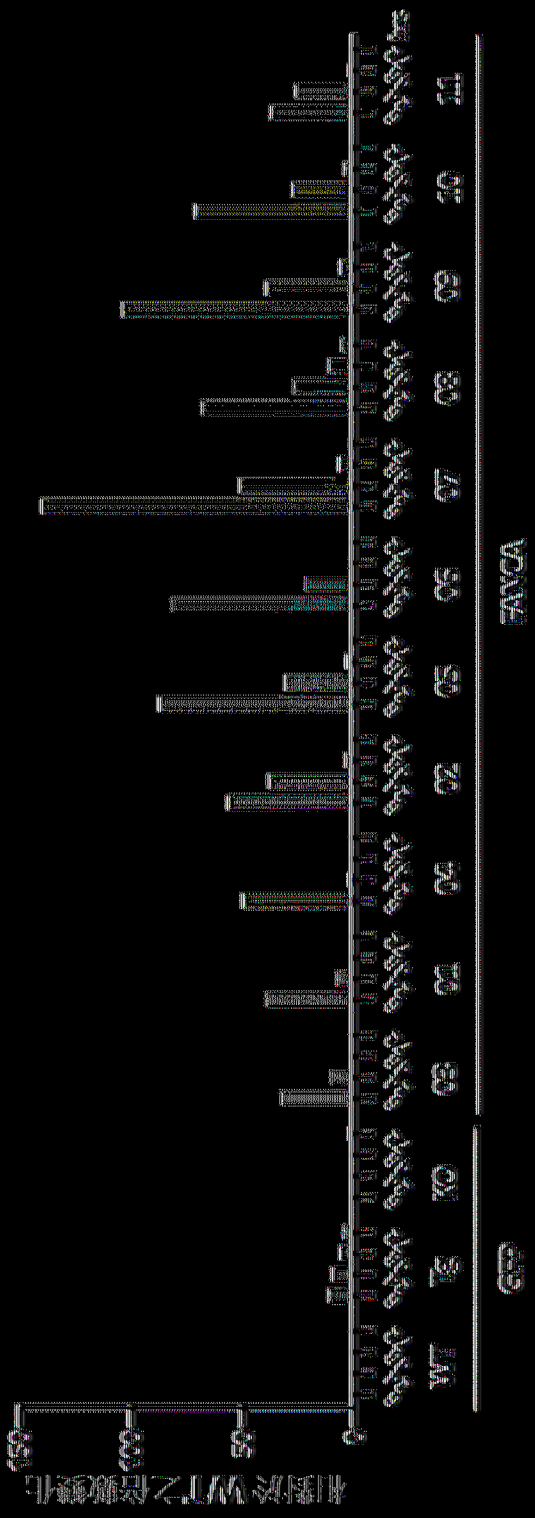
[圖 2D]



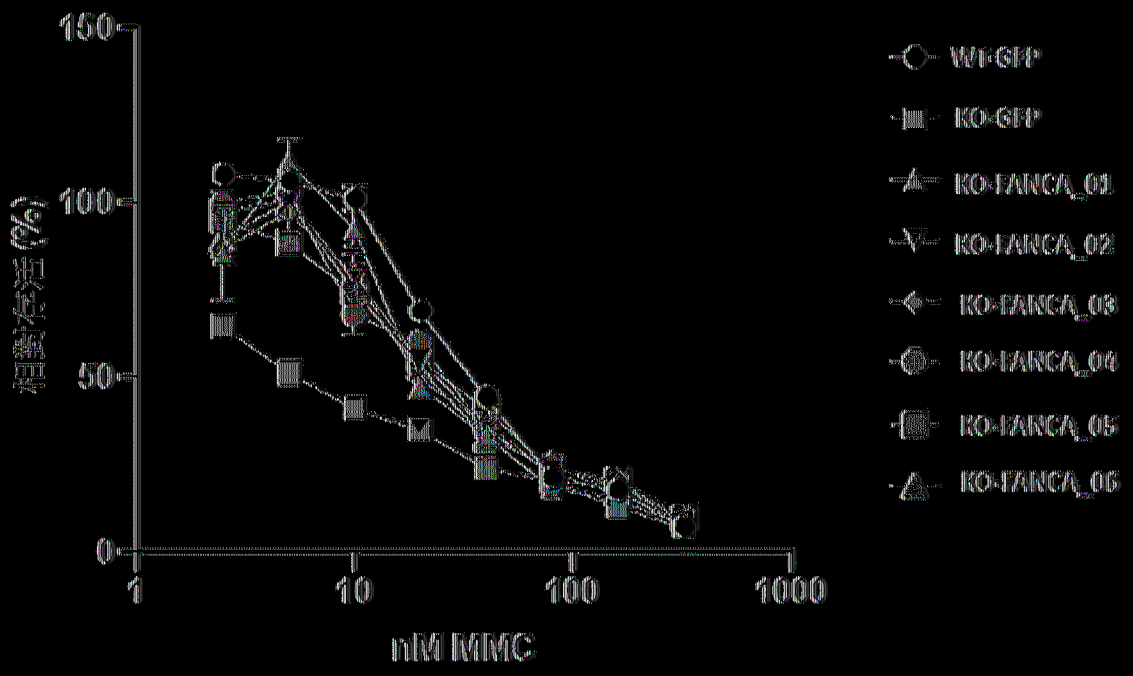
[圖 2D]


6
24
48
72
WI-GEP
TE-GEP
KO-GEP
TANCA_03
TANCA_01
TANCA_04
TANCA_02
TANCA_05
TANCA_06
TANCA_07
TANCA_08
TANCA_09
TANCA_10
TANCA_11
TANCA
核仁素

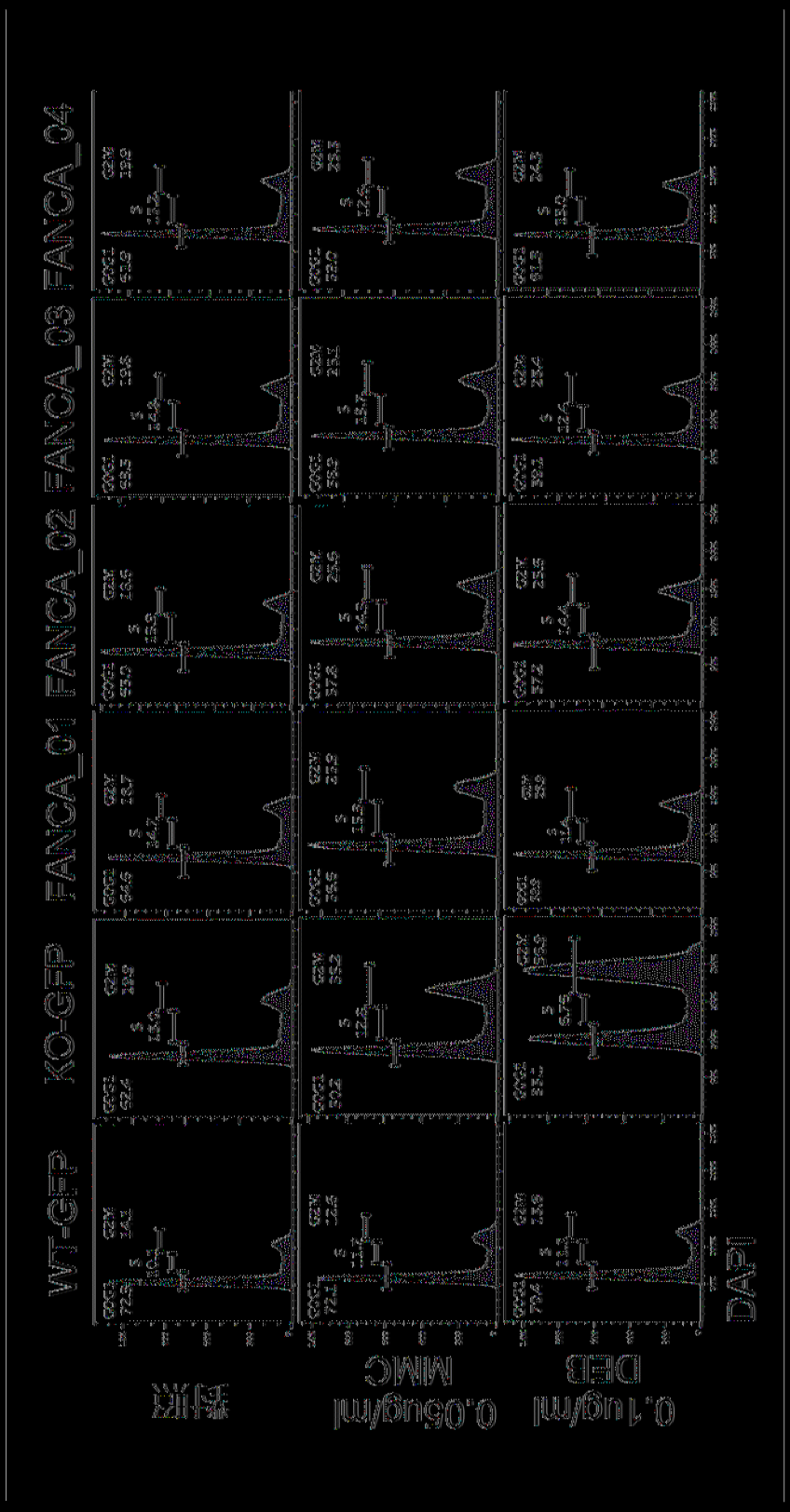
[(圖 3A)]



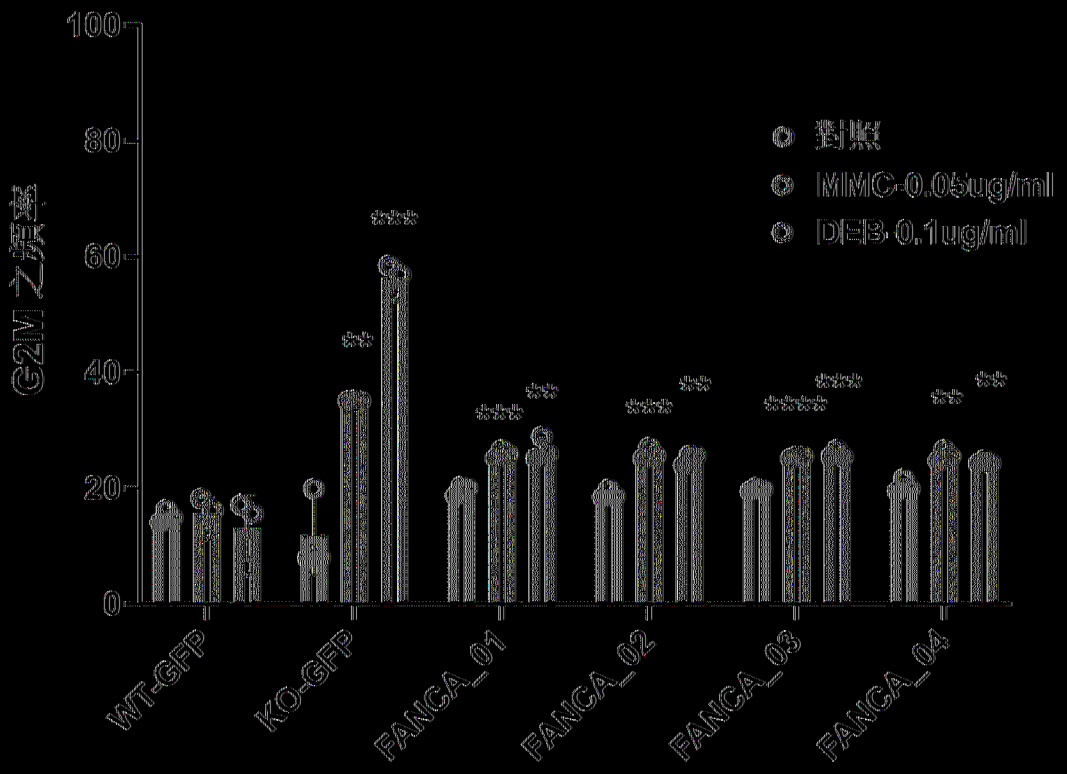
[(同 3B)]


150
100
50
0
1
10
100
1000
nM MMC
WT-GFP
KO-GFP
KO-FANCA_01
KO-FANCA_02
KO-FANCA_03
KO-FANCA_04
KO-FANCA_05
KO-FANCA_06

[圖 4]


WT-GFP
KO-GFP
FANCA_01
FANCA_02
FANCA_03
FANCA_04
DAPI
對照
0.05ug/ml MMC
0.1ug/ml DEB

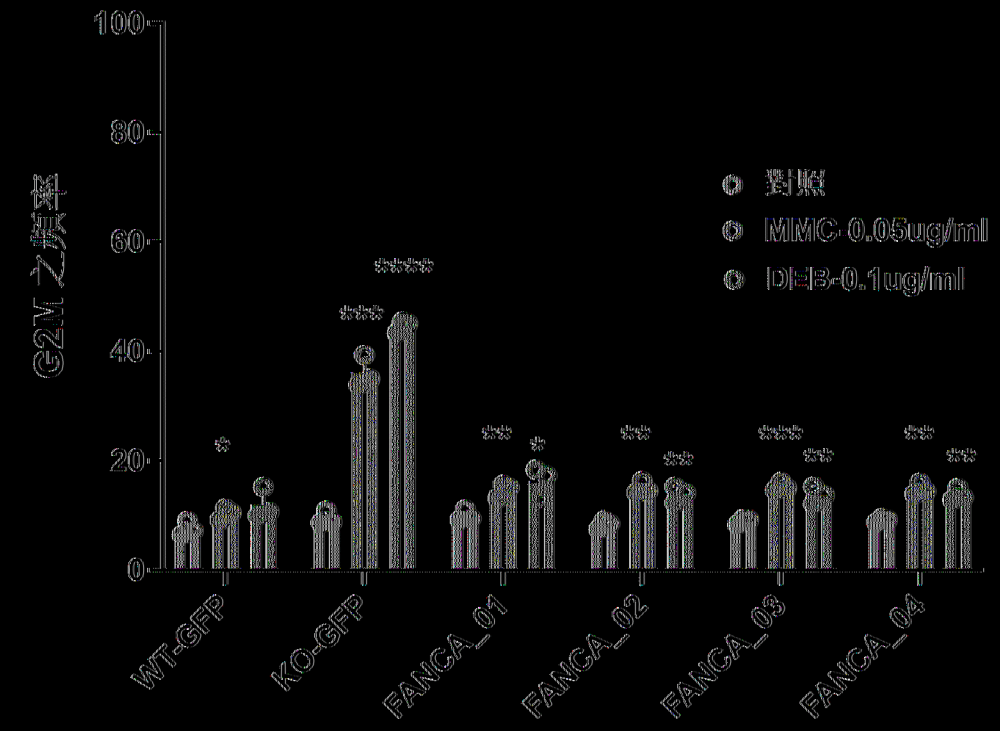
[圖 5A]


G2M 之細胞 %
100
80
60
40
20
0
對照
MMC-0.05ug/ml
DEB-0.1ug/ml
WT-GFP
KO-GFP
FANCA_01
FANCA_02
FANCA_03
FANCA_04

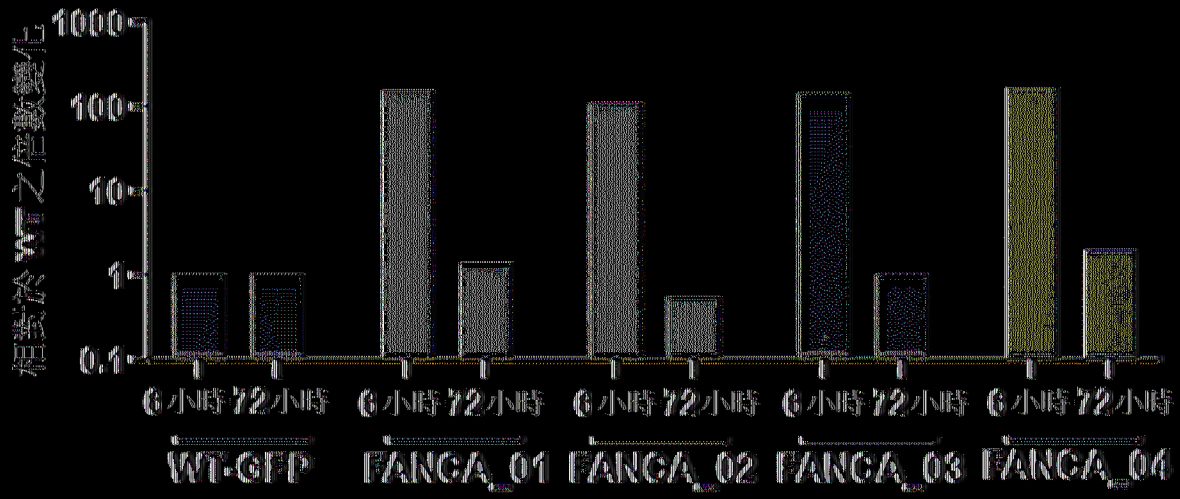
[圖 5B]

WLCP
FAVCA
FAVCA
FAVCA
FAVCA
FAVCA
FAVCA
0.1 ug/m
DEP
0.05 ug/m
MMC
對照

【圖 6A】


G2M 之百分比
100
80
60
40
20
0
對照
MMC-0.05ug/ml
DEB-0.1ug/ml
WT-GFP
KO-GFP
FANCA_01
FANCA_02
FANCA_03
FANCA_04

[圖 6B]


每毫升血液中之細胞數(個)
1000
100
10
1
0.1
6小時 72小時
WT-GFP
FANCA_01
FANCA_02
FANCA_03
FANCA_04

[圖 6C]

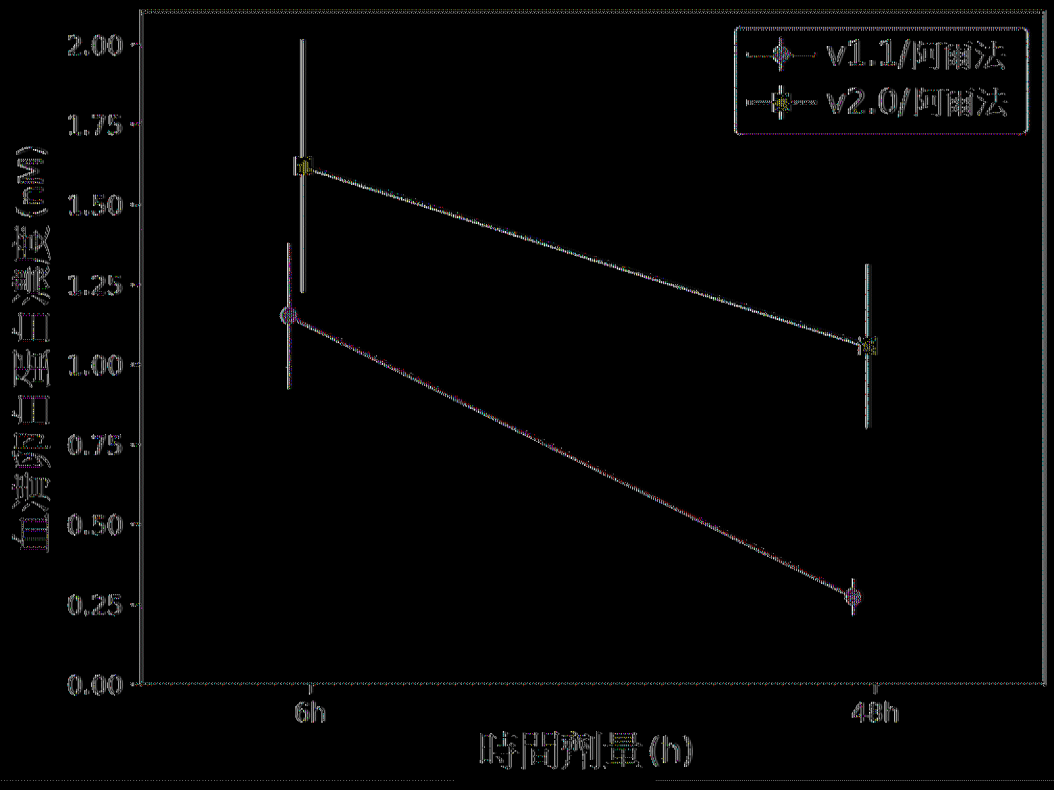
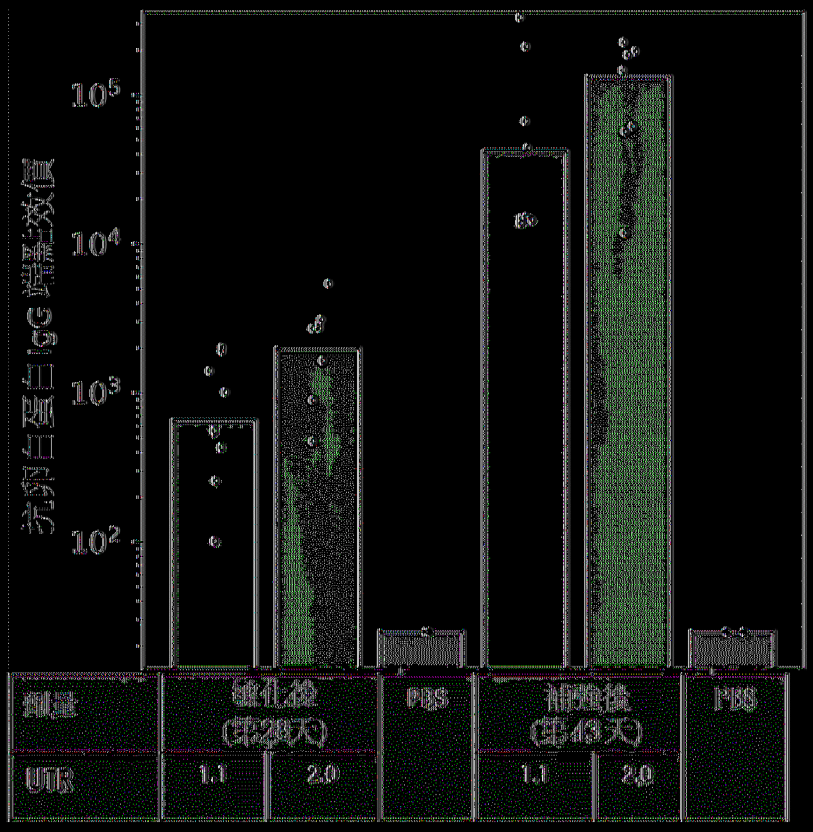
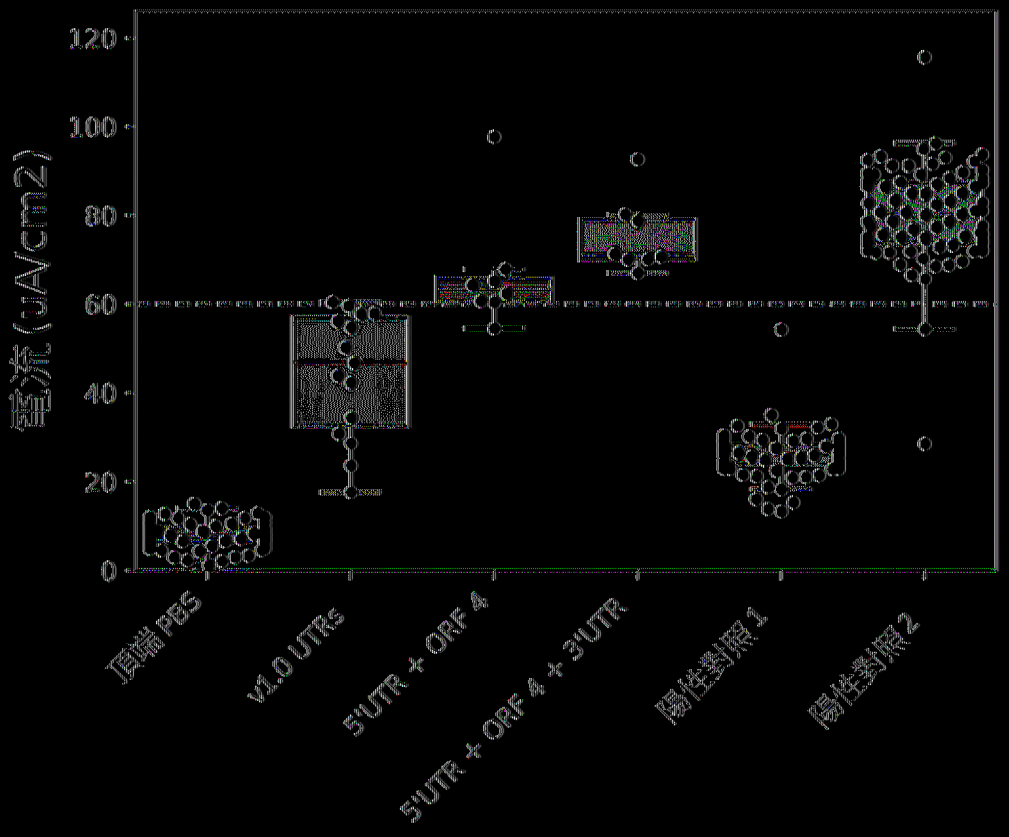

v1.1/阿爾法
v2.0/阿爾法
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
6h
48h
時間劑量 (h)
地表血壓 (mmHg)

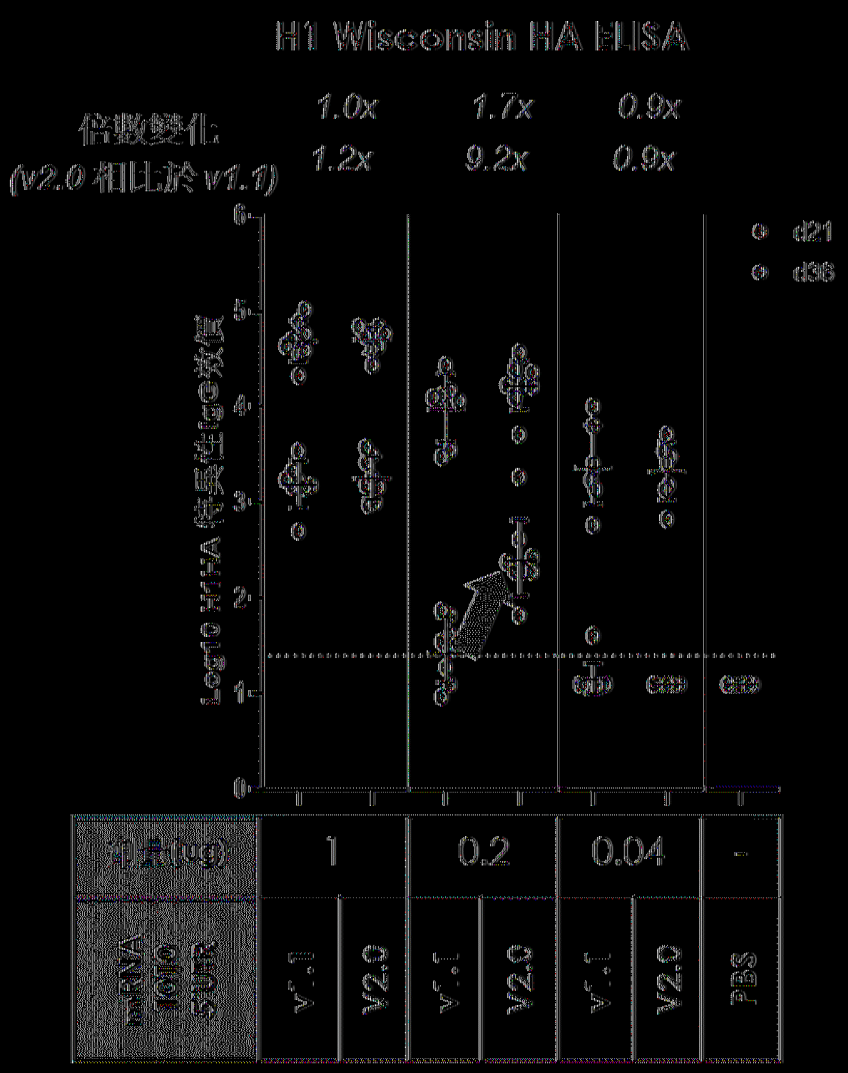
圖 7


抗SARS-CoV-2 IgG抗體效價
10^5
10^4
10^3
10^2
測量
UTR
強化後
(第28天)
PBS
補強後
(第48天)
PBS
1.1
2.0
1.1
2.0

|(圖 8)|


120
100
80
60
40
20
0
頂端 (uA/cm2)
頂端 PBS
V1.0 UTRs
5'UTR + ORF 4
5'UTR + ORF 4 + 3'UTR
陽性對照 1
陽性對照 2

[圖 9]


H1 Wisconsin HA ELISA
倍數變化:
(v2.0 相比於 v1.1)
1.0x
1.7x
0.9x
1.2x
9.2x
0.9x
d21
d36
Log10 HA 特異性抗體效價
0
1
2
3
4
5
6
d0
d21
d36
抗原(ug)
1
0.2
0.04
-
mRNA
(LNP)
蛋白質
(Alum)
v1.1
v2.0
v1.1
v2.0
v1.1
v2.0
PBS

[(圖 10)]

CR8059
2B06
5E04
CR9114
mRNA-1010V1.24h
mRNA-1010V1.48h
mRNA-1010V1.72h
mRNA-1010V2.0_24h
mRNA-1010V2.0_48h
mRNA-1010V2.0_72h
5'及3' V2.0UTR
Bnt293參照
編碼HEV-7 mRNA
4種不同mAb:
CR9114 (A及B抗体)
CR8059 (B抗体重鏈)
5E04 (B抗体重鏈)
2B06 (B抗体重鏈)
mRNA劑量
%細胞 + HBV
24h
48h
72h

[(圖 11)]