



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105051213 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201480013628. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 14

C12Q 1/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/113(2006. 01)

61/784, 337 2013. 03. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/027587 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/152659 EN 2014. 09. 25

(71) 申请人 夏尔人类遗传性治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·哈特莱因 F·德罗莎

A·迪亚斯

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 邬玥 葛强

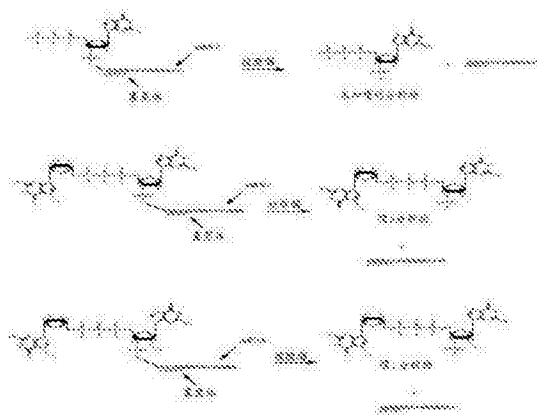
权利要求书3页 说明书22页 附图3页

(54) 发明名称

信使 RNA 加帽效率的定量评估

(57) 摘要

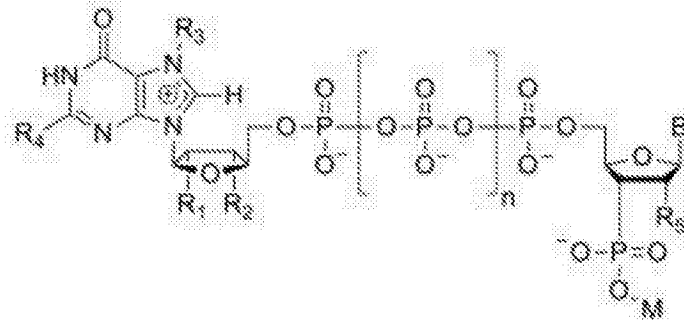
本发明尤其提供了定量 mRNA 加帽效率的方法,特别是体外合成的 mRNA。在一些实施方案中,所述方法包括定量加帽效率和帽的甲基化状态的色谱方法。



1. 一种定量 mRNA 加帽效率的方法,所述方法包括:

- (1) 提供包含加帽 mRNA 和未加帽 mRNA 的 mRNA 样品;
- (2) 在允许与邻近加帽或未加帽的 mRNA 的倒数第二个碱基的所述 mRNA 的 5' 未翻译区中的序列互补的 DNA 寡核苷酸与所述序列复性的条件下使所述 mRNA 样品与所述 DNA 寡核苷酸接触;
- (3) 提供选择性降解 DNA/RNA 杂合体 and / 或未复性 mRNA 的一种或多种核酸酶,得到加帽片段和未加帽片段;
- (4) 通过色谱分离所述加帽片段和未加帽片段;和
- (5) 测定所述加帽片段和未加帽片段的相对量,从而定量 mRNA 加帽效率。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述帽具有式 I 结构:



其中,

B 是核碱基;

R₁选自卤素、OH 和 OCH₃;

R₂选自 H、OH 和 OCH₃;

R₃是 CH₃、CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₃或不存在;

R₄是 NH₂;

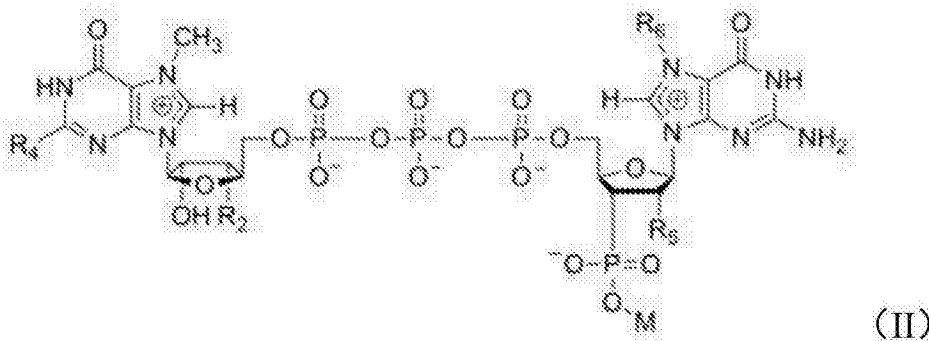
R₅选自 OH、OCH₃和卤素;

n 是 1、2 或 3;并且

M 是所述 mRNA 的核苷酸。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述核碱基是鸟嘌呤。

4. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述帽是具有式 II 结构的 m⁷G 帽或具有式 III 结构的未甲基化帽:

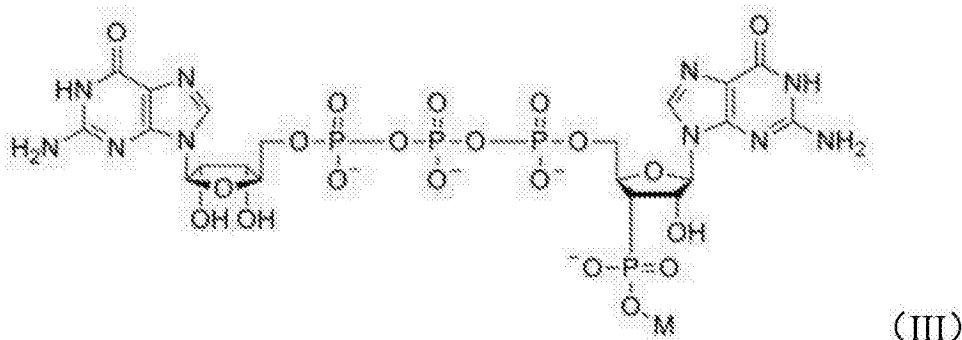


(II)

其中,

R₂是 H 或 CH₃;

- R_4 是 NH_2 ;
 R_5 是 OH 或 OCH_3 ;
 R_6 是 H 或 CH_3 ;并且
 M 是所述 mRNA 的核苷酸 ;或



其中 M 是所述 mRNA 的核苷酸。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的方法,其中步骤 (4) 进一步分离甲基化加帽 RNA 和未甲基化加帽 RNA。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其中甲基化帽包括在 R_3 和 / 或 R_5 位置的甲基化。
7. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述方法还包括定量测定所述加帽 RNA 的甲基化百分比的步骤。
8. 如权利要求 1-7 任一项所述的方法,其中所述 DNA 寡核苷酸长度为 10-80 个核苷酸。
9. 如权利要求 1-8 任一项所述的方法,其中所述 DNA 寡核苷酸两侧都具有一个或多个 RNA 核苷酸。
10. 如权利要求 1-9 任一项所述的方法,其中所述 mRNA 的 5' 未翻译区中的序列在从加帽或未加帽的 mRNA 倒数第二个碱基的 1 或 2 个碱基内。
11. 如权利要求 1-10 任一项所述的方法,其中所述一种或多种核酸酶包括 RNA 酶 H。
12. 如权利要求 1-11 任一项所述的方法,其中所述一种或多种核酸酶包括产生平端加帽片段和未加帽片段的核酸酶。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述核酸酶是核酸酶 S1、RNA 酶 H、或另一种 5' 核酸外切酶。
14. 如权利要求 1-13 任一项所述的方法,其中所述加帽片段和未加帽片段包括所述 mRNA 的不超过 5 个碱基。
15. 如权利要求 1-13 任一项所述的方法,其中所述加帽片段和未加帽片段包括所述 mRNA 的不超过 2 个碱基。
16. 如权利要求 1-15 任一项所述的方法,其中步骤 (4) 包括将所述加帽片段和未加帽片段施加至色谱柱的步骤。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述色谱柱选自由以下组成的组:阴离子交换 HPLC 柱、阳离子交换 HPLC 柱、反相 HPLC 柱、疏水相互作用柱、高效液相色谱柱或尺寸排阻柱。
18. 如权利要求 1-17 任一项所述的方法,其中步骤 (5) 包括测定所述加帽片段和未加帽片段的相对峰面积。

19. 如权利要求 1-18 任一项所述的方法,其中所述 mRNA 样品是体外合成的。
20. 一种生产 mRNA 的方法,包括根据权利要求 1-19 任一项的方法定量 mRNA 加帽效率的步骤。
21. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述方法包括基于定量 mRNA 加帽效率结果而调节生产条件的步骤。
22. 如权利要求 20 或 21 所述的方法,其中所述定量步骤在释放 mRNA 批次之前进行。
23. 根据权利要求 20-22 任一项的方法生产的 mRNA。

信使 RNA 加帽效率的定量评估

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 14 日提交的美国临时专利申请序号 61/784, 337 的优先权, 其公开内容通过引用整体并入本文。

[0003] 背景

[0004] 信使 RNA (“mRNA”) 疗法正成为用于治疗多种疾病的日益重要的方法。有效的 mRNA 疗法需要将 mRNA 有效递送至患者以及在患者体内有效生成由该 mRNA 编码的蛋白。为了优化 mRNA 递送和体内蛋白生成, 通常在构建体的 5' 端需要适当的帽, 其防止 mRNA 降解并促进成功的蛋白翻译。因此, 加帽效率的准确表征对于确定 mRNA 治疗应用的质量是特别重要的。

[0005] 发明概述

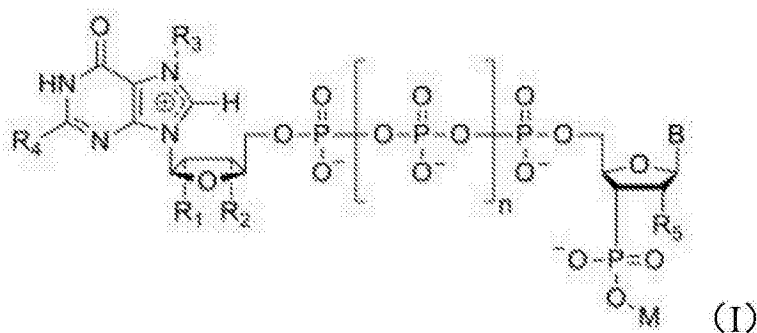
[0006] 本发明提供了用于准确且定量测定 mRNA 加帽效率的改良方法, 特别是体外合成的 mRNA。如上讨论的, 适当的加帽对于成功的体内蛋白生成是重要的。然而, 在本发明之前, 大多数帽测定是定性的, 这不足以评估基于 mRNA 的治疗产品质量和相关的体内使用安全性和效力。事实上, 在本发明之前, 还没有可用的允许在不永久改变样品中 mRNA 的条件下定量加帽效率的方法。

[0007] 如下详细描述, 本发明部分基于通过色谱产生和定量加帽片段和未加帽片段。因此, 本发明提供了用于评估 mRNA 加帽效率的简单、可靠且有效的定量方法。本发明特别用于 mRNA 生产期间的质量控制以及 mRNA 作为最终治疗产品中活性药物成分 (API) 的表征。

[0008] 一方面, 本发明提供了定量 mRNA 加帽效率的方法, 包括以下步骤: (1) 提供包含加帽 mRNA 和未加帽 mRNA 的 mRNA 样品; (2) 在允许与邻近加帽或未加帽的 mRNA 的倒数第二个碱基的所述 mRNA 的 5' 未翻译区中的序列互补的 DNA 寡核苷酸与所述序列复性的条件下使所述 mRNA 样品与所述 DNA 寡核苷酸接触; (3) 提供选择性降解 DNA/RNA 杂合物和 / 或未复性 mRNA 的一种或多种核酸酶, 得到加帽片段和未加帽片段; (4) 通过色谱分离所述加帽片段和未加帽片段; 和 (5) 测定所述加帽片段和未加帽片段的相对量, 从而定量 mRNA 加帽效率。

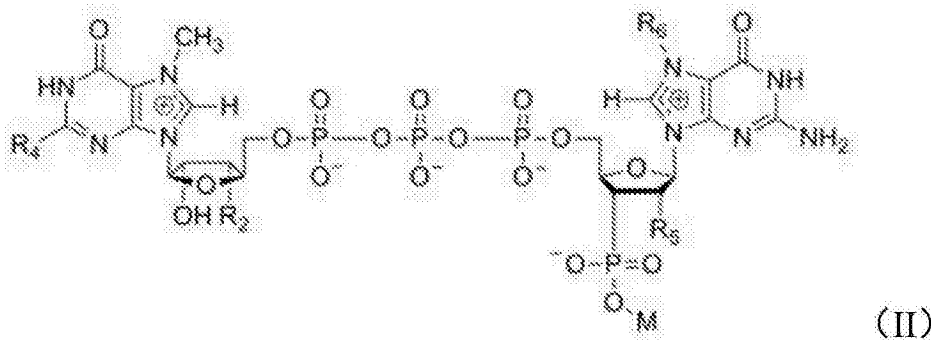
[0009] 在一些实施方案中, 本发明的发明方法可用于定量具有式 I 结构的帽:

[0010]

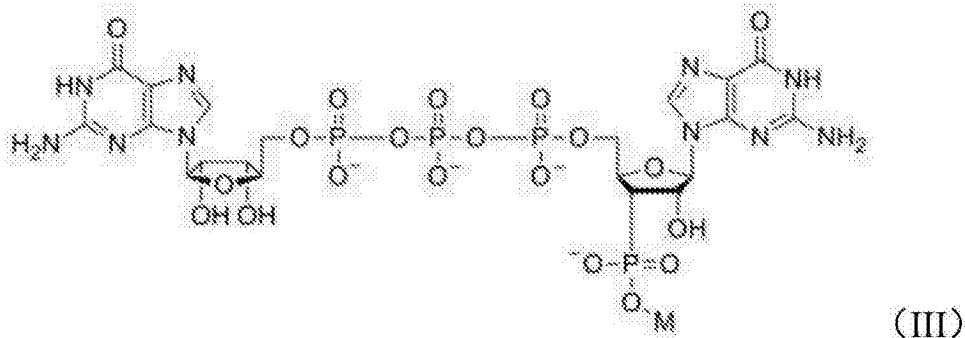


[0011] 其中,

- [0012] B 是核碱基；
- [0013] R_1 选自卤素、OH 和 OCH_3 ；
- [0014] R_2 选自 H、OH 和 OCH_3 ；
- [0015] R_3 是 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH_2CH_2CH_3$ 或不存在；
- [0016] R_4 是 NH_2 ；
- [0017] R_5 选自 OH、 OCH_3 和卤素；
- [0018] n 是 1、2 或 3；并且
- [0019] M 是该 mRNA 的核苷酸。
- [0020] 在一些实施方案中，该核碱基是鸟嘌呤。
- [0021] 在一些实施方案中，本发明的发明方法可用于定量具有式 II 结构的 m^7G 帽或具有式 III 结构的未甲基化帽：
- [0022]



- [0023] 其中，
- [0024] R_2 是 H 或 CH_3 ；
- [0025] R_4 是 NH_2 ；
- [0026] R_5 是 OH 或 OCH_3 ；
- [0027] R_6 是 H 或 CH_3 ；并且
- [0028] M 是该 mRNA 的核苷酸。
- [0029]



- [0030] 其中 M 是所述 mRNA 的核苷酸。
- [0031] 在一些实施方案中，步骤 (4) 进一步分离甲基化加帽 RNA 和未甲基化加帽 RNA。在一些实施方案中，甲基化的帽包括在如式 I 所示 R_3 和 / 或 R_5 位置的甲基化。在一些实施方案中，根据本发明的发明方法还包括定量测定所述加帽 RNA 的甲基化百分比的步骤。
- [0032] 在一些实施方案中，适合的 DNA 寡核苷酸长度大约 10-80 个核苷酸（例如，长度

约 10-75、10-70、10-65、10-60、10-55、10-50、10-45、10-40、10-35、10-30、10-25、10-20、或 10-15 个核苷酸)。在一些实施方案中,适合的 DNA 寡核苷酸长度是或大于约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 或 80 个核苷酸。在一些实施方案中,适合的 DNA 寡核苷酸的一侧或两侧具有一个或多个 RNA 核苷酸(例如,1、2、3、4、5 或更多个 RNA 核苷酸)。

[0033] 在一些实施方案中,适合的 DNA 寡核苷酸与在从加帽或未加帽的 mRNA 倒数第二个碱基的 1、2、3、4 或 5 个碱基内的所述 mRNA 的 5' 未翻译区中的序列互补。

[0034] 在一些实施方案中,选择性降解 DNA/RNA 杂合体和 / 或未复性 RNA 的一种或多种核酸酶包括 RNA 酶 H。在一些实施方案中,选择性降解 DNA/RNA 杂合体和 / 或未复性 RNA 的一种或多种核酸酶包括产生平端加帽片段和未加帽片段的核酸酶。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶包括核酸酶 S1 和 / 或 RNA 酶 H、或另一种 5' 核酸外切酶。

[0035] 在一些实施方案中,来自步骤 (3) 的加帽片段和未加帽片段包括所述 mRNA 的不超过 5 个碱基(例如,不超过 4、3、2 或 1 个)。在一些实施方案中,来自步骤 (3) 的加帽片段和未加帽片段包括所述 mRNA 的不超过 2 个碱基。

[0036] 在一些实施方案中,本文描述的发明方法的步骤 (4) 包括将所述加帽片段和未加帽片段施加至色谱柱的步骤。在一些实施方案中,适合的色谱柱选自由以下组成的组:阴离子交换 HPLC 柱、阳离子交换 HPLC 柱、反相 HPLC 柱、疏水相互作用柱、高效液相色谱柱或尺寸排阻柱。

[0037] 在一些实施方案中,本文描述的发明方法的步骤 (5) 包括测定所述加帽片段和未加帽片段的相对峰面积。

[0038] 在一些实施方案中,根据本发明的发明方法用于定量体外合成的 mRNA 样品的 mRNA 加帽效率。

[0039] 本发明还尤其提供了用于进行本文描述的发明方法的组合物和试剂盒。在一些实施方案中,本发明提供了定量 mRNA 加帽效率的试剂盒,包括以下一种或多种:(1) 与邻近加帽或未加帽的 mRNA 的倒数第二个碱基的待定量的 mRNA 的 5' 未翻译区中的序列互补的 DNA 寡核苷酸;(2) 用于 DNA 与 RNA 之间复性的一种或多种试剂;(3) 选择性降解 DNA/RNA 杂合体和 / 或未复性 mRNA 的一种或多种核酸酶(例如, RNA 酶 H 和 / 或核酸酶 S1);和 (4) 用于进行色谱(例如色谱柱)的一种或多种试剂。

[0040] 而在另一方面,本发明提供了生产 mRNA 的方法,包括根据本文描述的方法定量 mRNA 加帽效率的步骤。在一些实施方案中,根据本发明的生产方法包括基于定量 mRNA 加帽效率结果来调整生产条件的步骤。在一些实施方案中,定量步骤在释放 mRNA 批次之前进行。

[0041] 本发明还尤其提供了根据本文描述的方法生产的 mRNA。

[0042] 如本申请中使用的,术语“约”和“大约”作为等同物使用。本申请中有或没有约 / 大约而使用的任何数值意思涵盖相关领域普通技术人员理解的任何正常波动。

[0043] 本发明的其他特征、目的和优点在随后详述中是明显的。但应理解,详述表明本发明的实施方案,仅作为示例而非限制给出。对于本领域技术人员而言,本发明范围内的各种变化和调整将根据详述而变得显而易见。

[0044] 附图简述

[0045] 附图为了示例说明目的而绝非限制。

[0046] 图 1 描绘了在色谱分离之前包括 mRNA 的酶操作的示例性实施方案。使用 DNA 寡核苷酸引物复性邻近可能存在的帽 0 或帽 1 结构的 mRNA。提供核酸酶以消化 DNA:RNA 杂合体中的 RNA,从而产生加帽或未加帽的分析物。

[0047] 图 2 是本发明各个实施方案中存在的示例性 mRNA 加帽结构和未加帽结构的图。

[0048] 图 3 是说明如通过 ELISA 测量的、分泌的人类 α -半乳糖苷酶 (GLA) 蛋白水平的定量的条线图。检测到的蛋白是其从经由单剂量脂质纳米颗粒 (30ug 包封的 GLA mRNA) 静脉内递送的 GLA mRNA 在施用后 6 小时生成的结果。

[0049] 定义

[0050] 为了更容易理解本发明,首先定义某些术语。说明书通篇给出了以下术语和其他术语的额外定义。

[0051] 亲和力:如本领域已知的,“亲和力”是特定配体结合(例如,非共价结合)紧密度的量度和/或特定配体与其配偶体解离的速率或频率。如本领域已知的,许多技术的任何一个可用于测定亲和力。在许多实施方案中,亲和力代表特异性结合的量度。

[0052] 退火或杂交:如本文使用的,术语“退火”、“杂交”和语法等同物指足够互补以经由瓦特生-克里克 (Watson-Crick) 碱基配对或非正则碱基配对形成复合物的核苷酸序列之间形成复合物(还称为双链体或杂交体)。还要理解,退火或杂交序列不需要具有提供给稳定杂交体的完美互补性。在许多情况下,稳定杂交体会在少于约 10% 碱基错配时形成。因此,如本文使用的,术语“互补的”指在特定条件下与其互补体形成稳定双链体的核酸分子,一般情况是存在约 90% 或更大同源性(例如,约 95% 或更大、约 98% 或更大、或约 99% 或更大同源性)。本领域技术人员理解如何估计和调节杂交条件的严格性,使得至少具有所需水平互补性的序列会稳定杂交,而具有较低互补性的那些则不会。有关杂交条件和参数的实例,参见例如 Sambrook 等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,1989,第二版,Cold Spring Harbor Press:Plainview,NY and Ausubel,“Current Protocols in Molecular Biology”,1994,John Wiley&Sons:Secaucus,NJ。如果所有核酸碱基匹配,则两个核酸分子之间的互补性称为“完全”、“全部”或“完美”,否则称为“部分”。

[0053] 大约:如本文使用的,应用至一个或多个关注值的术语“大约”或“约”指与参考值类似的值。在某些实施方案中,除非另外说明或者根据上下文明显的,术语“大约”或“约”指在任一方向(大于或小于)落入该参考值 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更小的值范围(除了此类数字会超出可能值的 100% 的情况)。

[0054] 色谱:如本文使用的,术语“色谱”指分离混合物的技术。通常,将混合物溶解于称为“流动相”的流体中,流动相携带混合物通过容纳称为“固定相”的另一种物质的结构。柱色谱是其中固定床在管(即,柱)内的分离技术。

[0055] 化合物和剂:术语“化合物”和“剂”在本文可互换使用。它们指任何天然存在或非天然存在的(即,合成的或重组的)分子,例如生物大分子(例如,核酸、多肽或蛋白),有机或无机分子,或从生物材料例如细菌、植物、真菌或动物(特别是哺乳动物,包括人)细胞或组织制成的提取物。化合物可以是单一分子或者至少两个分子的混合物或复合物。

[0056] 对照:如本文使用的,术语“对照”具有其本领域理解的含义,作为结果对比的标准。通常,对照通过分离变量以得出有关此类变量的结论而用于增加实验完整性。在一些

实施方案中,对照是与测试反应或测定同时进行以提供对比者的反应或测定。在一个实验中,应用“测试”(即,变量被测试)。在第二个实验“对照”中,不应用测试的变量。在一些实施方案中,对照是历史对照(即,之前进行的测试或测定,或者之前已知的量或结果)。在一些实施方案中,对照是或包括印刷或以其他方式保留的记录。对照可以是阳性对照或阴性对照。

[0057] 试剂盒:如本文使用的,术语“试剂盒”指用于递送材料的任何递送系统。此类递送系统可以包括允许储存、运输或递送各种诊断或治疗试剂(例如,在适当容器中的寡核苷酸、抗体、酶等)和/或支持材料(例如,缓冲剂,用于进行测定的书写说明书,等)从一个地方至另一个地方的系统。例如,试剂盒包括含有相关反应试剂和/或支持材料的一个或多个外壳(例如,盒子)。如本文使用的,术语“片段化试剂盒”指包括两个或多个单独容器的递送系统,该容器各自包含总体试剂盒组分的子部分。容器可以一起或单独递送至预期接受者。例如,第一容器可以包含用于测定的酶,而第二容器包含寡核苷酸。术语“片段化试剂盒”预期涵盖包含美国联邦食品、药品和化妆品法案的第 520(e) 章下管理的分析物特异性试剂(ASR)的试剂盒,但不限于此。实际上,术语“片段化试剂盒”包括包含各自包含总体试剂盒组分的子部分的两个或多个单独容器的任何递送系统。相反,“组合试剂盒”指在单一容器(例如,在容纳所需组分每一个的单一盒子)中包含所有组分的递送系统。术语“试剂盒”包括片段化试剂盒和组合试剂盒。

[0058] 核苷:如本文使用的,术语“核苷”或“核碱基”指与糖类例如 D-核糖(RNA 中)或 2'-脱氧-D-核糖(DNA 中)通过糖类的异头碳(糖类的 1'-碳原子)与核碱基之间的 N-糖苷键连接的腺嘌呤(“A”)、鸟嘌呤(“G”)、胞嘧啶(“C”)、尿嘧啶(“U”)、胸腺嘧啶(“T”)及其类似物。当核碱基是嘌呤例如 A 或 G 时,核糖一般连接至嘌呤杂环的 N9-位。当核碱基是嘧啶例如 C、T 或 U 时,糖一般连接至杂环的 N1-位。糖类可以是取代或未取代的。取代的核糖包括但不限于其中碳原子的一个或多个(例如 2'-碳原子)经相同或不同 C1、F、-R、-OR、-NR₂或卤素基团的一个或多个取代的那些,其中每个 R 独立为 H、C₁-C₆烷基或 C₅-C₁₄芳基。核糖实例包括核糖、2'-脱氧核糖、2',3'-二脱氧核糖、2'-卤代核糖、2'-氟代核糖、2'-氯代核糖和 2'-烷基核糖,例如 2'-O-甲基、4'- α -异头核苷酸、1'- α -异头核苷酸(Asseline 等人,NUCL. ACIDS RES., 19:4067-74[1991])、2'-4'-和 3'-4'-连接的和和其他“锁定的”或“LNA”双环糖修饰(WO 98/22489;WO 98/39352;WO 99/14226)。

[0059] 核苷酸:如本文使用的术语“核苷酸”表示磷酸化形式的核苷(核苷的磷酸酯),作为单体单元或者多核苷酸多聚物内。“核苷酸 5'-三磷酸”指在 5' 位置具有三磷酸基团的核苷酸,有时表示为“NTP”或“dNTP”和“ddNTP”,以特别指出核糖的结构特征。三磷酸基团可以包括各种氧部分的硫取代,例如 α -硫代-核苷酸 5'-三磷酸。核苷酸可以单-、二-或三-磷酸化形式存在。核苷酸中存在的核糖的碳原子用上撇号(')指定,以使其区别于碱基中的骨架编号。关于多核苷酸和核酸化学的综述,参见 Shabarova, Z. 和 Bogdanov, A. *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, VCH, New York, 1994。

[0060] 核酸:术语“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”或“寡核苷酸”在本文可互换使用。它们指核苷酸单体或其类似物的聚合物,例如脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)及其组合。核苷酸来源可以是基因组的、合成的或半合成的。除非另外说明,这些术语涵盖具有合成骨架的核酸样结构以及扩增产物。如本领域技术人员理解的,这些聚合物的长度(即,其

含有的核苷酸的数目)可以广泛变化,通常取决于其预期功能或用途。多核苷酸可以是线性的、分支线性或环状分子。多核苷酸还具有结合的反离子,例如 H^+ 、 NH_4^+ 、三烷基铵、 Mg^{2+} 、 Na^+ 等。多核苷酸可以完全由脱氧核糖核苷酸、完全由核糖核苷酸或其嵌合混合物构成。多核苷酸可以由核苷酸间核碱基和糖类似物构成。

[0061] 在一些实施方案中,术语“寡核苷酸”在本文用于指包括约 5 至约 150 个核苷酸,例如约 10 至约 100 个核苷酸、约 15 至约 75 个核苷酸、或约 15 至约 50 个核苷酸的多核苷酸。贯穿本说明书,无论何时寡核苷酸由字母(例如,选自四碱基字母:A、C、G 和 T,其分别指腺苷、胞苷、鸟苷和胸苷)序列表示时,核苷酸以从左到右 5' 至 3' 顺序表示。“多核苷酸序列”指核苷酸单体沿聚合物的序列。除非另外指明,无论何时表示多核苷酸序列,要理解核苷酸从左到右为 5' 至 3' 取向。

[0062] 核酸、多核苷酸和寡核苷酸可以包括标准核苷酸碱基或经核苷酸同种型类似物取代,包括但不限于 iso-C 和 iso-G 碱基,其可以比标准碱基或多或少允许杂交,并且优先与互补同种型类似物碱基杂交。例如, Benner 等人, (1987) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 52, 53-63 描述了许多此类同种型碱基。天然存在的核苷酸单体的类似物包括例如 7- 去氮杂腺嘌呤、7- 去氮杂鸟嘌呤、7- 去氮杂 -8- 氮杂鸟嘌呤、7- 去氮杂 -8- 氮杂腺嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、肌苷、水粉蕈素、硝基吡咯 (Bergstrom, J. Amer. Chem. Soc., 117 : 1201-1209 [1995])、硝基吡啶、2- 氨基嘌呤、2- 氨基 -6- 氯代嘌呤、2, 6- 二氨基嘌呤、次黄嘌呤、假尿苷、假胞嘧啶、假异胞嘧啶、5- 丙炔基胞嘧啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤 (Seela, 美国专利号 6, 147, 199)、7- 去氮杂鸟嘌呤 (Seela, 美国专利号 5, 990, 303)、2- 氮杂嘌呤 (Seela, WO 01/16149)、2- 硫代嘧啶, 6- 硫代鸟嘌呤、4- 硫代胸腺嘧啶、4- 硫代尿嘧啶、0-6- 甲基鸟嘌呤、N-6- 甲基腺嘌呤、0-4- 甲基胸腺嘧啶、5, 6- 二氢胸腺嘧啶、5, 6- 二氢尿嘧啶、4- 甲基吡啶、吡啶并 [3, 4-D] 嘧啶、“PPG” (Meyer, 美国专利号 6, 143, 877 和 6, 127, 121 ;Gall, WO 01/38584) 和亚乙烯基腺嘌呤 (Fasman (1989) 于 Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 第 385-394 页, CRC Press, Boca Raton, Fla.)。

[0063] 术语“3' ”指来自相同多核苷酸或寡核苷酸的另一区域或位置的多核苷酸或寡核苷酸 3' (即,下游) 中的区域或位置。术语“5' ”指来自相同多核苷酸或寡核苷酸的另一区域或位置的多核苷酸或寡核苷酸 5' (即,上游) 中的区域或位置。如本文涉及核酸分子使用的,术语“3' 末端”和“3' 端”指包含与末端戊糖的 3' 碳连接的游离羟基的核酸末端。如本文涉及核酸分子使用的,术语“5' 末端”和“5' 端”指包含与末端戊糖的 5' 碳连接的游离羟基或磷酸基团的核酸分子末端。在本发明的一些实施方案中,寡核苷酸引物包含在其 5' 端的多聚腺苷片段。

[0064] 靶:如本文使用的,术语“靶”指关注的分子。

[0065] 详述

[0066] 本发明尤其提供了用于定量 mRNA 加帽效率的改良方法。在一些实施方案中,本发明提供了基于以下而定量 mRNA 加帽效率的方法:产生加帽片段和未加帽片段,通过色谱分离所述加帽片段和未加帽片段,并且测定所述加帽片段和未加帽片段的相对量。在一些实施方案中,可以通过以下来产生加帽和未加帽的 mRNA:在允许与邻近加帽或未加帽的 mRNA 的倒数第二个碱基的 mRNA 的 5' 未翻译区中的序列互补的 DNA 寡核苷酸与所述序列复性的条件下使所述 mRNA 样品与所述 DNA 寡核苷酸接触;并通过一种或多种核酸酶(例如,核

酸酶 S1、RNA 酶 H、和 / 或其他 5' 外切核酸酶) 选择性降解 DNA/RNA 杂合体和 / 或未复性 mRNA。在一些实施方案中, 基于色谱的方法可以进一步分离甲基化加帽 mRNA 和未甲基化加帽 mRNA 并测定甲基化状态和加帽 mRNA 的百分比。

[0067] 本发明的各个实施方案用于定量体外 mRNA 合成期间的加帽效率。因此, 本发明提供了用于生产 mRNA 和特别是用于评估具有治疗应用的 mRNA 的安全性、效力和商业可行性的重要的质量控制方法。

[0068] 本发明的各个方面详细描述于以下章节。章节的用途不是要限制本发明。每个章节可以应用于本发明的任何方面。在本申请中, 除非另外说明, “或” 的使用表示“和 / 或”。

[0069] mRNA 加帽和 / 或甲基化

[0070] 通常, 真核 mRNA 在其 5' - 端具有“帽”结构, 其在翻译中起重要作用。例如, 帽在 mRNA 代谢中起关键作用, 并且需要达到不同程度用于细胞核中 RNA 转录物的加工和成熟、mRNA 从细胞核转运至细胞质、mRNA 稳定性、和 mRNA 有效翻译成蛋白。5' 帽结构参与真核细胞和真核病毒 mRNA 的蛋白合成的起始以及 mRNA 加工和体内稳定性 (参见例如, Shatkin, A. J., CELL, 9 :645-653 (1976) ;Furuichi, 等人, NATURE, 266 :235 (1977) ;FEDERATION OF EXPERIMENTAL BIOLOGISTS SOCIETY LETTER 96 :1-11 (1978) ;Sonenberg, N., PROG. NUC. ACID RES MOL BIOL, 35 :173-207 (1988))。存在作为 mRNA 翻译起始所需机器组分的特异性帽结合蛋白 (参见例如, Shatkin, A. J., CELL, 40 :223-24 (1985) ;Sonenberg, N., PROG. NUC. ACID RES MOL BIOL, 35 :173-207 (1988))。mRNA 的帽由翻译起始因子 eIF4E 识别 (Gingras, 等人, ANN. REV. BIOCHEM. 68 :913-963 (1999) ;Rhoads, R. E., J. BIOL. CHEM. 274 :30337-3040, (1999))。5' 帽结构还提供对 5' - 外切核酸酶活性的抗性, 并且其缺乏导致 mRNA 的快速降解 (参见例如, Ross, J., MOL. BIOL. MED. 5 :1-14 (1988) ;Green, M. R. 等人, CELL, 32 :681-694 (1983))。因为许多真核细胞基因和真核病毒基因的初级转录物需要加工以去除这些转录物编码区内的插入序列 (内含子), 帽的益处还扩展至这种前 mRNA 的稳定化。

[0071] 在体外, 已经报道在许多体外翻译系统例如兔网织红细胞裂解物或小麦胚芽翻译系统中, 加帽 RNA 比未加帽转录物更有效地翻译 (参见例如, Shimotohno, K., 等人, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 74 :2734-2738 (1977) ;Paterson and Rosenberg, NATURE, 279 :692 (1979))。还认为该效果部分由于保护 RNA 免受体外翻译系统中存在的核糖核酸外切酶以及其他因子。

[0072] 天然存在的帽结构包括经由三磷酸桥连接至第一转录核苷酸 5' - 末端的 7- 甲基鸟苷, 得到 $m^7G(5')ppp(5')N$ 的二核苷酸帽, 其中 N 是任何核苷。在体内, 帽经酶促添加。帽在细胞核中添加, 并且由酶鸟苷酰基转移酶催化。帽至 RNA 的 5' 末端的添加发生在转录起始刚刚开始之后。末端核苷通常是鸟苷, 并且与所有其他核苷酸成反向, 即 $G(5')ppp(5')GpNpNp$ 。

[0073] 通过体外转录生成的 mRNA 的常见帽是 $m^7G(5')ppp(5')G$, 其已经在体外用 T7 或 SP6RNA 聚合酶转录中用作二核苷酸帽, 以获得在其 5' 端具有帽结构的 RNA。体外合成加帽 mRNA 的流行方法采用形式 $m^7G(5')ppp(5')G$ (“ m^7GpppG ”) 的预先形成的二核苷酸作为转录起始子。使用伪对称二核苷酸 $m^7G(5')ppp(5')G$ 的缺点是 G 或 m^7G 部分的 3' -OH 倾向作用为转录延长的起始亲核体。换言之, m^7G 和 G 部分两者上 3' -OH 的存在导致达一半 mRNA 以

不适当取向加入帽。这导致大致相等比例的形式 $m^7G(5')pppG(pN)_n$ 和 $G(5')pppm^7G(pN)_n$ 的两种异构体 RNA 的合成, 取决于转录反应的离子条件。异构体形式的变化可以不利地影响体外翻译, 并且是同质治疗产品所不希望的。

[0074] 迄今为止, 体外翻译实验中使用的合成的二核苷酸帽的通常形式是抗反向帽类似物 (“ARCA”), 其一般是修饰的帽类似物, 其中 2' 或 3' OH 基团被 $-OCH_3$ 替代。ARCA 和三-甲基化帽类似物以正向加入。在核糖环的 2' 或 3' OH 基团处 m^7G 的化学修饰导致帽仅以正向加入, 即使 2' OH 基团不参与硫酸二酯键 (Jemielity, J. 等人, “Novel ‘anti-reverse’ cap analogs with superior translational properties”, RNA, 9 :1108-1122(2003))。已经建立了鸟苷在 N7 处的甲基化以及 3' O-甲基化和 5' 二磷酸合成的选择性程序 (Kore, A. 和 Parmar, G. NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, AND NUCLEIC ACIDS, 25 :337-340, (2006) 和 Kore, A. R., 等人 NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, AND NUCLEIC ACIDS 25 (3) :307-14, (2006))。

[0075] RNA 转录通常开始于核苷三磷酸 (通常是嘌呤, A 或 G)。体外转录通常包括噬菌体 RNA 聚合酶例如 T7、T3 或 SP6, 包含噬菌体聚合酶启动子的 DNA 模板, 核苷酸 (ATP、GTP、CTP 和 UTP), 以及包含镁盐的缓冲液。加帽 RNA 的合成包括转录反应中帽类似物 (例如, m^7GpppG) 的加入, 其在一些实施方案中通过添加重组鸟苷酰基转移酶而加入。过量的 m^7GpppG 比 GTP (4 :1) 增加了每个转录物具有 5' 帽的机会。用于体外转录的 mRNA 加帽的试剂盒是商业途径可获得的, 包括 mMESSAGE mMACHINE® 试剂盒 (Ambion, Inc., Austin, Tex.)。这些试剂盒通常产生 80% 加帽 RNA 至 20% 未加帽 RNA, 但是总 RNA 产率较低, 因为 GTP 浓度变成限速的, 因为 GTP 是转录物延长所需要的。然而, 目前没有允许在不永久改变样品中 mRNA 的条件下定量加帽效率的可用技术 / 方法。

[0076] 估计加帽效率的方法是本领域已知的。例如, T7RNA 聚合酶可以与帽二核苷酸、所有四种核糖核苷酸三磷酸、 $[\alpha -^{32}P]$ GTP 和短 DNA 模板一起孵育, 其中 G 是在启动子之后指定的第一核糖核苷酸 (参见 Grudzien, E. 等人 “Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNA with high translation efficiency”, RNA, 10 :1479-1487(2004))。G 残基 5' 侧上任何核苷酸通过最近邻转移在 RNA 酶 T2 降解之后获得 ^{32}P - 标记的 3' - 磷酸基团。然后使用离子交换色谱拆分标记的核苷 3' - 单磷酸, 源自 RNA 内部位置, 来自 5' - 端产物。5' - 端产物具有两个类型。未加帽的 RNA 产生标记的鸟苷 5' - 三磷酸 3' - 单磷酸 ($p3Gp^*$; 其中 * 指示标记的磷酸基团)。加帽 RNA 产生各种 5' - 端结构, 取决于使用的帽类似物的性质 (当帽类似物是 m^7Gp3G 时, m^7Gp3Gp^* 和 $Gp3m^7Gp^*$)。

[0077] 然而, 这些方法的主要缺点是整个样品被赋予放射性或者以其他方式被破坏, 并因此不能用于随后的治疗应用。尽管在理论上, 单独的定量反应可以与治疗合成反应同时进行, 但是这种安排是不够的。由于操作者自身失误和反应条件的微小变化, 同时但分开的样品本身是可变的。这对于使用标准曲线的定量尤其如此, 其中标准曲线上一个给定日的点的值可能与下一日不同。为了在计算加帽效率中获得准确结果, 希望使用从治疗合成反应获得的代表性样品, 其是可以相对于对照评价加帽效率并且代表治疗性合成反应中加帽效率的样品。

[0078] 因此, 本发明提供了直接定量样品 (例如, 来自体外合成反应的代表性小份样品) 中 mRNA 加帽效率的改良方法。本发明的一些实施方案包括定量 mRNA 加帽效率的色谱方法。这些方法部分基于以下发现: 酶操作的多样性可用于增加多核苷酸色谱分离的分离度 (图

1)。因此,通过经由酶操作放大色谱分离的能力,本发明实施方案增加了定量的效率、质量和通量。例如,本文描述的色谱方法不仅可以定量加帽效率,它们还可以提供有关帽修饰的信息(例如,在特定帽位置的甲基化状态)。因此,本发明实施方案可以同时定量加帽效率和帽修饰效率(例如,甲基化效率)。该定量提供了对蛋白生成具有显著影响的 mRNA 药物产品的重要表征。

[0079] 本发明的色谱实施方案可用于定量本文所述帽结构和帽类似物的任何一个以及帽内的各种修饰。特定实施方案利用特定核酸酶的天然生物活性以提供加帽效率和帽鸟嘌呤碱基(例如, N-7 位置)的甲基化效率的定量信息。其他实施方案还可以同时定量倒数第二个碱基的核糖环的 2'-O 位置的甲基化(帽 1 结构,参见图 2)。本发明实施方案可用于定量许多 RNA 物类的加帽效率,包括体外转录的 mRNA、分离的真核 mRNA 和病毒 RNA。

[0080] 通过使用与邻近加帽或未加帽的 mRNA 的倒数第二个碱基的 mRNA 的 5' 未翻译区中的序列互补的 DNA 寡核苷酸而促进酶操作(图 1)。在允许所述 DNA 寡核苷酸与未翻译区中指定序列复性的条件下向包含加帽 mRNA 和未加帽 mRNA 的 mRNA 样品添加所述 DNA 寡核苷酸。然后提供选择性降解 DNA/RNA 杂合体 and / 或未复性 mRNA 的核酸酶,得到加帽和未加帽的 5' 片段(图 1)。在一些实施方案中,至少一部分片段是双链的。在一些实施方案中,双链部分至少部分是 RNA:RNA 杂合体。在一些实施方案中,双链部分至少部分是 DNA:RNA 杂合体。由核酸酶处理得到的片段可以是平端或交错切口。在一些实施方案中,片段是 2-20 个核苷酸(包括可能存在的帽核苷酸);即,由核酸酶处理得到的片段可以是 20 个核苷酸、19 个核苷酸、18 个核苷酸、17 个核苷酸、16 个核苷酸、15 个核苷酸、14 个核苷酸、13 个核苷酸、12 个核苷酸、11 个核苷酸、10 个核苷酸、9 个核苷酸、8 个核苷酸、7 个核苷酸、6 个核苷酸、5 个核苷酸、4 个核苷酸、3 个核苷酸或 2 个核苷酸。在一些实施方案中,加帽片段和未加帽片段包括 mRNA 的不超过 5 个碱基。在一些实施方案中,加帽片段和未加帽片段包括 mRNA 的不超过 2 个碱基。

[0081] 然后通过色谱拆分(即,相互分离)加帽片段和未加帽片段。然后可以通过标准定量色谱技术,例如 HPLC 峰积分定量加帽片段和未加帽片段的量。

[0082] 本发明实施方案不受 DNA 寡核苷酸类型或大小的限制。在一些实施方案中,寡核苷酸包括 10-80 个核苷酸;例如 10 个核苷酸、15 个核苷酸、20 个核苷酸、25 个核苷酸、30 个核苷酸、35 个核苷酸、40 个核苷酸、45 个核苷酸、50 个核苷酸或更多。可以选择 DNA 寡核苷酸的大小以产生所需长度的加帽片段(如果存在)。还可以设计 DNA 寡核苷酸与 5' 未翻译区的任何区域杂交,取决于希望在哪裂解;即,可以将 DNA 寡核苷酸置于 5' 未翻译区内以产生任何大小的加帽片段(如果存在)。特别地,包含在每一侧具有 RNA 碱基(例如,1-15)(即,“gapmer”)的小段 DNA 碱基(例如,约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20 个核苷酸)的适当设计的寡核苷酸可以与 mRNA 分析物复性。设计这样的结合 mRNA 的 5' 未翻译区的互补碱基的寡核苷酸允许通过 RNA 酶 H 的 DNA/RNA 杂合体识别而选择裂解。相似地,适当设计的寡核苷酸可以包含仅在一端(例如,5' 端或 3' 端)具有 RNA 碱基(例如,1-15)的小段 DNA 碱基(例如,约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20 个核苷酸)。

[0083] 在优选实施方案中,设计寡核苷酸邻近 mRNA 构建体的帽和 / 或倒数第二个碱基直接结合,允许得到的裂解碱基由 mRNA 构建体的最初两个(或几个)碱基组成。不希望受任何特定理论束缚,认为希望产生小的加帽片段和未加帽片段以提高色谱分离度;即,提高加

帽片段和未加帽片段的分离并定量相对量。一般而言,片段越小,分离和定量越好。在一些实施方案中,DNA 寡核苷酸的第一个碱基在 mRNA 的倒数第二个碱基结合。在一些实施方案中,DNA 寡核苷酸的第一个碱基邻近 mRNA 的倒数第二个碱基结合(即,在式 1 的 M 处)。在一些实施方案中,DNA 寡核苷酸的第一个碱基从 mRNA 的倒数第二个碱基结合至少 2 个核苷酸、至少 3 个核苷酸、至少 4 个核苷酸、至少 5 个核苷酸、至少 6 个核苷酸、至少 7 个核苷酸、至少 8 个核苷酸、至少 9 个核苷酸或至少 10 个核苷酸。

[0084] 本发明实施方案不受核酸酶身份的限制。可以使用能够裂解或消化 DNA:RNA 杂合体的至少一个链的任何核酸酶。如上所述,可以在单个反应中使用多个核酸酶以实现加帽片段的生成或产生加帽片段(如果存在)和平端加帽片段。在一些实施方案中,适当的核酸酶是 RNA 酶 H 或具有 RNA 酶 H 样生物活性的酶。RNA 酶 H 是普遍存在酶家族,分成两个不同的系统发育亚型,1 型和 2 型,其任何一个可用于特定实施方案。RNA 酶 H 统一具有如下常见能力:结合与互补 DNA 单链杂交的单链(ss)RNA,然后降解 RNA:DNA 杂合体的 RNA 部分。虽然 RNA 酶 H 已经参与 DNA 复制和识别以及修复,但是其生理作用还没有完全被理解。在体外,酶还会结合双链(ds)DNA、ssDNA、ssRNA 和 dsRNA,即使具有比它们结合 RNA:DNA 杂合体更低的亲和力。由于酶的普遍存在,有几种文献已知的 RNA 酶 H 的序列,其每一个的氨基酸序列在一定程度上变化。如美国专利号 5,500,370,美国专利号 5,268,289 公开了热稳定的 RNA 酶 H。美国专利号 6,376,661 公开了人类 RNA 酶 H 及其组合物和用途。美国专利号 6,001,652 公开了人类 2 型 RNA 酶 H。美国专利号 6,071,734 公开了来自 HBV 聚合酶的 RNA 酶 H。所有这些 RNA 酶 H 可用于本发明的一个或多个实施方案。

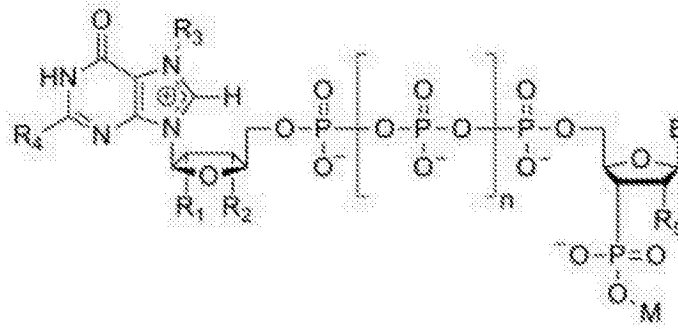
[0085] 在一些实施方案中,适当的核酸酶是 S1 核酸酶。在一些实施方案中,使用了多个核酸酶;例如 RNA 酶 H 和 S1 核酸酶。可以单独或组合用于本发明实施方案的其他核酸酶包括 **Benzonase®**、核酸酶 P1、磷酸二酯酶 II、RNA 酶 A 和 RNA 酶 T1。一些实施方案还包括添加单链 DNA 核酸酶以最终产生或修饰片段。在一些实施方案中,可以希望加热样品(例如,至约 60°C)或将样品应用至加热的色谱柱以实现加帽片段的生成。

[0086] 然后将核酸酶处理的样品施加至色谱柱以分离加帽片段和未加帽片段。除了分离加帽片段和未加帽片段,色谱可以拆分并定量甲基化帽和未甲基化鸟嘌呤帽。在一些实施方案中,甲基化的倒数第二个碱基(2'-O-甲基化碱基)可以与在该位置未甲基化的帽分离(拆分)并定量。目前的色谱方案可以区分可以从体外合成过程产生的物类的任何组合。色谱实施方案的各个方面在下文更详细讨论。

[0087] mRNA 帽

[0088] 本文所述的本发明方法一般适于定量任何类型的 mRNA 帽。在一些实施方案中,帽具有式 I 结构:

[0089]



[0090] 其中 B 是核碱基, R₁选自卤素、OH 和 OCH₃, R₂选自 H、OH 和 OCH₃, R₃是 CH₃、CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₃或不存在, R₄是 NH₂, R₅选自 OH、OCH₃和卤素, n 是 1、2 或 3, 并且 M 是核苷酸, 即, mRNA 的第三碱基。在特定实施方案中, B 是鸟嘌呤, 但可以是任何核碱基。在一些实施方案中, 帽是 m⁷G(5')ppp(5')G, 其中 2'-O-甲基残基存在于碱基 1 的核糖环的 2' OH 基团 (即在式 1 的 R₅位置)。

[0091] 帽类似物可以是或者包括任何修饰的“G”碱基 (例如, 一种或多种修饰的鸟嘌呤核苷酸)。适合的帽类似物包括但不限于选自由以下组成的组的化学结构: m⁷GpppG、m⁷GpppA、m⁷GpppC; 未甲基化的帽类似物 (例如, GpppG); 二甲基化的帽类似物 (例如, m^{2,7}GpppG)、三甲基化的帽类似物 (例如, m^{2,2,7}GpppG)、二甲基化的对称帽类似物 (例如, m⁷Gpppm⁷G) 或抗反向帽类似物 (例如, ARCA; m^{7,2'}OmeGpppG、m^{7,2'}dGpppG、m^{7,3'}OmeGpppG、m^{7,3'}dGpppG 及其四磷酸衍生物) (参见例如, Jemielity, J. 等人, “Novel ‘anti-reverse’ cap analogs with superior translational properties”, RNA, 9:1108-1122(2003))。

[0092] 在一个优选实施方案中, 帽是经由三磷酸桥连接至第一转录的核苷酸的 5'-末端的 7-甲基鸟苷酸 (“m⁷G”), 得到 m⁷G(5')ppp(5')N, 其中 N 是任何核苷。本发明实施方案中使用的 m⁷G 帽的一个优选实施方案是 m⁷G(5')ppp(5')G。

[0093] 在一些实施方案中, mRNA 是未加帽的 (图 2A)。未加帽的 mRNA 可以存在于样品中 (即, 作为体外转录反应中不完全加帽的结果) 和 / 或可用作定量样品中未加帽物类水平的对照。在一些实施方案中, 帽是帽 0 结构 (图 2B)。帽 0 结构缺少与碱基 1 和 2 连接的核糖的 2'-O-甲基残基。在一些实施方案中, 帽是帽 1 结构 (图 2C)。帽 1 结构具有在碱基 1 处的 2'-O-甲基残基。在一些实施方案中, 帽是帽 2 结构。帽 2 结构具有与碱基 1 和 2 两者连接的 2'-O-甲基残基。

[0094] 许多 m⁷G 帽类似物是本领域已知的, 其许多是商业途径可获得的。这些包括上述 m⁷GpppG 以及 ARCA 3'-OCH₃和 2'-OCH₃帽类似物 (Jemielity, J. 等人, RNA, 9:1108-1122(2003))。用于本发明实施方案的其他帽类似物包括 N7-苄基化的二核苷四磷酸类似物 (描述于 Grudzien, E. 等人, RNA, 10:1479-1487(2004))、硫代磷酸帽类似物 (描述于 Grudzien-Nogalska, E., 等人, RNA, 13:1745-1755(2007)) 和通过引用并入本文的美国专利号 8,093,367 和 8,304,529 中描述的帽类似物 (包括生物素酰化的帽类似物)。

[0095] 加帽 mRNA 的生成

[0096] 适合本文公开的定量方法的加帽 mRNA 可以通过本领域已知的任何方法生成。

[0097] 在一些实施方案中, 加帽 mRNA 通过体外转录生成, 最初由 Krieg 和 Melton (METHODS ENZYMOL., 1987, 155:397-415) 开发用于使用 RNA 噬菌体聚合酶合成 RNA。通常, 这些反应至少包括噬菌体 RNA 聚合酶 (T7、T3 或 SP6)、包含噬菌体聚合

酶启动子的 DNA 模板、核苷酸 (ATP、CTP、GTP 和 UTP) 和包含镁盐的缓冲液。可以通过增加核苷酸浓度、调节镁浓度并通过包括无机焦磷酸酶而优化 RNA 合成产率 (美国专利号 5,256,555;Gurevich, 等人, ANAL. BIOCHEM. 195:207-213(1991);Sampson, J. R. 和 Uhlenbeck, O. C., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 85, 1033-1037(1988);Wyatt, J. R., 等人, BIOTECHNIQUES, 11:764-769(1991))。一些实施方案利用用于体外转录物大规模合成的商业试剂盒 (例如, MEGAscript®, Ambion)。这些反应中合成的 RNA 通常由在核糖 5' 位置具有三磷酸的 5' 端核苷酸表征。通常,根据使用的 RNA 聚合酶和启动子组合,该核苷酸是鸟苷,尽管其可以是腺苷 (参见例如, Coleman, T. M., 等人, NUCLEIC ACIDS RES., 32:e14(2004))。在这些反应中,所有四种核苷酸通常以等摩尔浓度包括,并且它们中没有一个是限制性的。

[0098] 本发明的一些实施方案是浴反应一即,所有组分被组合,然后在约 37°C 孵育以促进 RNA 聚合,直至反应终止。通常,浴反应为了便利而使用,并且为获得从此类反应为其实验所需的大量 RNA。在一些实施方案中,“分批补料”系统 (参见例如, JEFFREY A. KERN, BATCH AND FED-BATCH STRATEGIES FOR LARGE-SCALE PRODUCTION OF RNA BY IN VITRO TRANSACTION(University of Colorado)(1997)) 用于增加体外转录反应的效率。组合所有组分,但是然后将额外量的一些试剂随时间添加,例如核苷酸和镁,以试图维持恒定的反应条件。此外,在一些实施方案中,可以通过随时间监测并按需要添加 KOH 而将反应 pH 维持在 7.4。

[0099] 为了通过体外转录而合成加帽 RNA,将帽类似物 (例如, N-7 甲基 GpppG;即, m⁷GpppG) 加入转录反应中。在一些实施方案中, RNA 聚合酶将如任何其他核苷酸一样容易地加入帽类似物;即,对于帽类似物没有偏见。在一些实施方案中,通过酶鸟苷酰基转移酶在 5' 端加入帽类似物。在一些实施方案中,仅在 5' 端加入帽类似物,因为其不具有 5' 三磷酸。在一些实施方案中,使用 T7、T3 和 SP6RNA 聚合酶,其各自启动子的 +1 核苷酸通常是 G 残基,并且如果 GTP 和 m⁷GpppG 两者以相等浓度存在于转录反应中,则它们各自具有在 +1 位置加入的相等机会。在一些实施方案中, m⁷GpppG 以比 GTP 高几倍的浓度存在于这些反应中,以增加转录物具有 5' 帽的机会。在一些实施方案中, mMESSAGE mMACHINE® 试剂盒 (目录号 1344, Ambion, Inc.) 根据生产商说明书使用,其中推荐帽比 GTP 比率为 4:1 (6mM:1.5mM)。在一些实施方案中,随着反应中帽类似物比 GTP 比率增加,加帽 RNA 比未加帽 RNA 的比率成比例增加。加帽效率的考虑必须与产率考虑相平衡。增加转录反应中帽类似物比 GTP 的比率产生了总 RNA 的较低产率,因为当帽和 GTP 总浓度维持恒定时 GTP 浓度变为限制性的。因此,最终 RNA 产率取决于 GTP 浓度,这是延长转录物所必需的。其他核苷酸 (ATP、CTP、UTP) 过量存在。

[0100] 在特定实施方案中,通过体外转录从编码选择基因的质粒 DNA 模板合成 mRNA。在一些实施方案中,体外转录包括通过经由鸟苷酰基转移酶的 GTP 酶促轭合添加 5' 帽结构,帽 1 (图 2C),其在碱基 1 的核糖环的 2' OH 基团具有 2' -O- 甲基残基。在一些实施方案中,体外转录包括通过经由鸟苷酰基转移酶的 GTP 酶促轭合添加 5' 帽结构,帽 0 (图 2B),其缺少 2' -O- 甲基残基。在一些实施方案中,体外转录包括通过经由鸟苷酰基转移酶的 GTP 酶促轭合添加本文公开的任何帽结构的 5' 帽。在一些实施方案中,通过添加与多聚 A 聚合酶轭合的 ATP 而加入长度大约 200 个核苷酸 (如通过凝胶电泳测定的) 的 3' 多聚 (A) 尾。在

一些实施方案中,多聚(A)尾长度大约100-250个核苷酸。在一些实施方案中,多聚(A)尾长度约50-300个核苷酸。在一些实施方案中,体外转录产物包括5'和3'未翻译区。

[0101] 色谱分离

[0102] 本发明实施方案利用色谱提供高度拆分的(例如,单碱基分离度)加帽片段和未加帽片段。可以通过薄层色谱(“TLC”)或高效液相色谱(“HPLC”)有效拆分片段。在本发明上下文中,术语“HPLC”包括各种HPLC方法以及低压或常压液相色谱方法,其可以用于实施本发明的一些实施方案。在一些实施方案中,可以通过尺寸排阻色谱-高效液相色谱(SEC-HPLC)和/或反相高效液相色谱(RP-HPLC)(例如,使用十八烷基(C18)-键合的二氧化硅的柱,并在酸性pH下进行,使用TFA作为反离子)的一种或多种来拆分片段。在本发明的一些实施方案中,色谱图上的主要峰是加帽mRNA片段。可以改变或优化以提高分离度的参数包括梯度条件、有机修饰剂、反离子、温度、柱孔径和粒度、溶剂组成和流速。

[0103] 本文描述的定量方法可以包括离子交换色谱-HPLC(例如,阴离子交换-HPLC和/或阳离子交换-HPLC)的一个或多个步骤。如本领域技术人员已知的,离子交换剂(例如,阴离子交换剂和/或阳离子交换剂)可以基于涉及基质和连接的荷电基团的各种材料。例如,可以使用以下基质,其中所提到的材料可以或多或少的交联:基于琼脂糖(例如Sepharose™ CL-6B、Sepharose™ Fast Flow和Sepharose™ High Performance)、基于纤维素(例如DEAE Sephacel®)、基于右旋糖(例如SEPHADEX®)、基于二氧化硅和基于合成聚合物。

[0104] 可以根据已知方法制备离子交换树脂。通常,允许树脂结合其反离子的平衡缓冲液可以在加载包含多核苷酸和一种或多种污染物的样品或组合物至树脂之前穿过离子交换树脂。方便地,平衡缓冲液可以与加载缓冲液相同,但这不是必须的。在本发明的一个任选实施方案中,可以在洗脱多核苷酸之后用再生缓冲液再生离子交换树脂,使得柱可以被再利用。一般,再生缓冲液的盐浓度和/或pH可以使得基本上所有的污染物和感兴趣的多核苷酸从离子交换树脂洗脱。一般,再生缓冲液具有非常高的盐浓度,以从离子交换树脂洗脱污染物和片段。

[0105] 例如,本发明的一些实施方案包括使样品经受阴离子交换色谱。可以如通过引用并入本文的Ausser, W. A. 等人, “High-resolution analysis and purification of synthetic oligonucleotides with strong anion-exchange HPLC”, BIOTECHNIQUES, 19:136-139(1995)所述进行核苷酸片段的高分离度分析。对于阴离子交换树脂,共价连接至基质的荷电基团可以是例如二乙基氨基乙基(DEAE)、季氨基乙基(QAE)和/或季铵(Q)。在一些实施方案中,采用的阴离子交换树脂是Q Sepharose柱。例如,可以使用例如Q Sepharose™ Fast Flow、Q Sepharose™ High Performance、Q Sepharose™ XL、Capto™ Q、DEAE、TOYOPEARL Gigacap® Q、Fractogel® TMAE(trimethylamino ethyl, a quarternary ammonia resin)、Eshmuno™ Q、Nuvia™ Q或UNOsphere™ Q进行阴离子交换色谱。可以在本发明范围内使用其他阴离子交换剂,包括但不限于季胺树脂或“Q-树脂”(例如, Capto™-Q、Q-Sepharose®, QAE Sephadex®);二乙基氨基乙烷树脂(例如, DEAE-Trisacryl®, DEAE Sepharose®, 苯甲酰化萘甲酰化 DEAE、二乙基

氨基乙基 Sephacel[®]) ; Amberjet[®] 树脂 ; Amberlyst[®] 树脂 ; Amber lite[®] 树脂 (例如, Amberlite[®] IRA - 67、Amberlite[®] 强碱性、Amberlite[®] 弱碱性)、消胆胺树脂、ProPac[®] 树脂 (例如, ProPac[®] SAX - 10、ProPac[®] WAX - 10、ProPac[®] WCX - 10) ; TSK-GEL[®] 树脂 (例如, TSK gel DEAE - NPR ; TSKgel DEAE - 5PW) ; 和 Acclaim[®] 树脂。

[0106] 阴离子交换色谱的典型流动相包括相对极性溶液, 例如水, 乙腈, 有机醇例如甲醇、乙醇和异丙醇, 或含有 2-(N-吗啉代)-乙磺酸 (MES) 的溶液。因此, 在某些实施方案中, 流动相包括约 0%、1%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或约 100% 极性溶液。在某些实施方案中, 在分离过程期间任何给定时间, 流动相包括约 1% 至约 100%、约 5% 至约 95%、约 10% 至约 90%、约 20% 至约 80%、约 30% 至约 70% 或约 40% 至约 60% 极性溶液。

[0107] 在一些实施方案中, 使样品经受阳离子交换色谱, 例如磺丙基 (SP) 阳离子交换色谱。在一个典型实施方案中, 阳离子交换色谱包括磺丙基 (SP) 阳离子交换色谱, 但是可以使用其他阳离子色谱膜或树脂, 例如 MUSTANG[™] S 膜、S-Sepharose[™] 树脂或 Blue Sepharose[™] 树脂。可以在优化的温度下进行阳离子交换色谱以增强靶结合和 / 或减少杂质结合。

[0108] 在一些实施方案中, 使样品经受疏水相互作用色谱 (HIC)。疏水相互作用色谱利用给定分子对极性或非极性环境的吸引, 就核酸而言, 该倾向由核苷酸及其上修饰的疏水性或亲水性决定。因此, 基于其对疏水基质的不同程度吸引而分级分离核酸, 所述疏水基质通常是具有链长为 2 - 18 个碳的烷基连接体臂的惰性支持体。固定相由连接至亲水聚合物骨架 (例如, 交联 Sepharose[™]、右旋糖或琼脂糖) 的小的非极性基团 (丁基、辛基或苯基) 组成。在一些实施方案中, 疏水相互作用色谱包括苯基色谱。在其他实施方案中, 疏水相互作用色谱包括丁基色谱或辛基色谱。

[0109] 在一些实施方案中, 通过反相 HPLC 拆分片段。反相 HPLC 由非极性固定相和中等极性流动相组成。在一些实施方案中, 固定相是用例如 RMe_2SiCl 处理过的二氧化硅, 其中 R 是直链烷基例如 $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ 或 C_8H_{17} 。因此对于性质上更非极性的分子而言保留时间更长, 允许极性分子更容易洗脱。保留时间通过向流动相添加极性溶剂而增加, 并且通过添加更疏水的溶剂而减少。特定 RNA 分子作为分析物的特征可以在其保留特征中发挥重要作用。一般而言, 具有更非极性官能团 (例如, 甲基) 的分析物导致更长的保留时间, 因为其增加了分子的疏水性。可适用于本发明实施方案的、使用反相 HPLC 高度分离 RNA 物类的方案是本领域已知的 (参见例如, 美国授权前公开 2010/0048883 ; Gilar, M., "Analysis and purification of synthetic oligonucleotides by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection", ANAL. BIOCHEM., 298:196-206 (2001))。

[0110] 本发明的特定实施方案利用本文公开的各种色谱分离的组合。例如, 本发明的特定实施方案可以利用反相离子对色谱, 由此分离基于疏水性和与分子结合的阴离子的数目, 其可用于以单个 HPLC 步骤纯化片段。基质可以是基于二氧化硅的 (例如, Murray 等人, ANAL. BIOCHEM., 218:177-184 (1994))。可以在特定实施方案中使

用非极性惰性聚合物树脂（参见例如，Huber, C. G., “High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers”, *ANAL. BIOCHEM.*, 212:351-358(1993)）。其他组合可能是等效的，并且必须就片段尺寸和待拆分的修饰来评价。

[0111] 在一些实施方案中，可以使用 HPLC 系统通过强阴离子交换色谱确定加帽效率概况和 / 或甲基化概况。一般而言，未加帽 mRNA 吸附至强阴离子交换柱的固定正电荷，使用预定流速流动相的递增离子强度梯度以其与正电荷柱离子相互作用强度成比例地从柱洗脱加帽物类（携带正电荷的帽）。更多负电荷（更多酸性）未加帽物类比更少负电荷（更少酸性）加帽物类更晚洗脱。

[0112] 在某些实施方案中，通过与片段相关的甲基化概况来表征加帽片段。通常，甲基化概况反映并定量帽鸟嘌呤碱基（N-7 位置）的甲基化效率。其他实施方案还可以同时定量倒数第二个碱基（帽 1 结构）核糖环 2'-O 位置的甲基化。在一些实施方案中，可以通过进行单独或与离子交换色谱组合的反相 HPLC 来确定甲基化概况。在一些实施方案中，“甲基化概况”指一组值，代表在向柱添加流动相之后的时间点从柱洗脱的甲基化加帽片段的量。如上所述，性质上更非极性的甲基化帽和倒数第二个核苷酸的保留时间相对于更容易洗脱的极性分子是增加的。保留时间可以通过向流动相添加极性溶剂而增加，并且通过添加更疏水溶剂而减少。

[0113] 在一些实施方案中，使用高效液相色谱（“UPLC”）拆分加帽片段和未加帽片段，并任选提供有关甲基化状态的其他定量信息。UPLC 一般指使用小于 2.5 μm 树脂粒径的 HPLC 技术，其甚至以降低的流速和线性速度提供了显著的效率增益。通过使用小颗粒，可以拓展速度和峰容量（每单位时间拆分的峰数目）。此类技术利用色谱原理运行分离，使用填充了更小颗粒的柱和 / 或更高流速以增加速度，具有更好的分离度和灵敏度（参见例如，Swartz, M. E., “Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): an introduction”, *SEPARATION SCIENCE REDEFINED*(2005)）。

[0114] 在某些实施方案中，色谱分离（例如，HPLC）可以与质谱（“MS”）结合。LC-MS 方法在本领域已知用于寡核苷酸分离和鉴别，使用与 MS 检测相容的水性三乙基铵 - 六氟异丙基醇 (TEA HFIP) 缓冲液 (Apffel, A. 等人, “New procedure for the use of HPLC-ESI MS for the analysis of nucleotides and oligonucleotides”, *J. CHROMATOGR. A*, 777:3-21(1997))。可选地，三乙基碳酸氢铵流动相可用于寡核苷酸分离，柱后向洗脱剂添加乙腈。可以选择离子配对缓冲液以产生最佳的 MS 检测灵敏度。

[0115] 如 Gilar, M., *ANAL. BIOCHEM.*, 298:196-206(2001) 所述，还可以使用 2.5 μm 全孔 C18 吸收剂填充的反相 HPLC 柱进行加帽片段的定量分析。可以优化以增强固定相中寡核苷酸质量转移的参数包括升高的温度、小的吸收剂粒径和缓慢流动相流速。用 UV 检测的三乙基乙酸铵 (TEAA) 缓冲液和优化的 TEA - HFIP 流动相可用于加帽片段的 LC-MS 分离和表征。

[0116] 在一些实施方案中，通过在 HPLC 色谱图中各自峰面积的自动积分而实现加帽片段及其甲基化状态的定量。数据可以表示为面积百分比值，其指特定物类积分峰面积相对于整个色谱图总积分峰面积的百分比。

[0117] 在一些实施方案中，可以通过其他适当方法，例如基于质谱 (MS) 的检测来实现加帽片段和未加帽片段的定量。认为本领域技术人员可以识别定量如本文所述加帽片段和未

加帽片段的其他可适用方法。

[0118] 试剂盒

[0119] 本发明还提供了包括用于进行根据本发明的发明方法的各种试剂和材料的试剂盒。本文描述的定量程序可以由诊断实验室、试验实验室或商业实验室进行。本发明提供了可用于这些不同环境的试剂盒。

[0120] 例如,用于通过酶操作和色谱分离而定量 mRNA 样品中 mRNA 加帽效率的材料和试剂可以在一个试剂盒中组装在一起。在某些实施方案中,本发明试剂盒包括色谱柱和任选地用于在柱上分离加帽 mRNA 片段的剂,以及根据本发明方法使用该试剂盒的说明书。

[0121] 每个试剂盒可以优选包括赋予程序特异性的试剂。因此,为了检测/定量 mRNA 加帽效率,试剂盒可以包括在目标 mRNA 帽邻近特异性复性的设计序列的核酸试剂。试剂盒还可以包括用于产生加帽片段的核酸酶;例如 RNA 酶 H 和/或 S1 核酸酶。试剂盒还可以包括体外转录和加帽试剂、酶及其使用说明书。

[0122] 根据本发明的试剂盒或其他产品可以包括一个或多个容纳各种试剂的容器。适合的容器包括例如瓶、管形瓶、注射器(例如,预填充注射器)、安瓿瓶。该容器可以由多种材料例如玻璃或塑料制成。

[0123] 在一些实施方案中,本发明试剂盒可以包括适当的对照水平或用于测定如本文所述的对照水平的对照样品。在一些实施方案中,本发明试剂盒可以包括用于根据本发明的一种或多种方法使用该试剂盒的说明书,并且可以包括体外转录和加帽的说明书。

实施例

[0124] 实施例 1 :mRNA 的合成

[0125] 通过体外转录从编码每个基因的质粒 DNA 模板合成萤火虫荧光素酶 (FFL) 和人类促红细胞生成素 (EPO) mRNA。体外转录包括通过经由鸟苷酰基转移酶的酶促耦合 GTP 而添加 5' 帽结构帽 1,其在碱基 1 的核糖环的 2' OH 基团具有 2' -O- 甲基残基。通过添加与多聚 A 多聚酶结合的 ATP 而加入长度大约 200 个核苷酸(如通过凝胶电泳测定的)的 3' 多聚(A)尾(参见以下详细的反应条件)。体外转录产物包括 5' 和 3' 未翻译区,其在以下序列中分别表示为 X 和 Y:

[0126] 人类促红细胞生成素 (EPO) mRNA (SEQ ID NO :1)

[0127] X₁AUGGGGGUGCAGCAAUGUCCUGGCCUGUGGGCUUCUCCUGUCCUGCGUCUCCUCUGGGCCUCCAGUCCUGGGCGCCCCACCACGCCUCAUCUGUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAUAUCACGACGGGCUGUGCUGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAUAUCACUGUCCAGACACCAAAGUUAUUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGGAGGUCGGGCAGCAGGCCGUAGAAGUCUGGCAGGGCCUGGCCUCUGUCGGAAGCUGUCCUGCGGGGCCAGGCCUGUUGGUCAACUCUCCAGCCGUGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAAGCCGUCAGUGGCCUUCGCAGCCUACCCACUCUGCUUCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCAUCUCCCUCCAGAUGC GGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAACAAUCACUGCUGACACUUCCGCAAACUCUCCGAGUCUACUCCAAUUUCCUCCGGGAAAGCUGAAGCUGUACACAGGGGAGGCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGAY₁

[0128] 密码子优化的萤火虫荧光素酶 (FFL) mRNA (SEQ ID NO :2)

[0129] X₂AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGACCGCCGCGGAGCAGCUGCACAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUUUCGAG

GUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUAC
 AAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCUUCUUGCCCGUGUUGGGUGCCCGUUCUUCGUGG
 UGGCUGUGGGCCCGAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCACCCGUC
 GUAUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAAGAUCCUCAACGUGCAAAAAGAGCUACCGAUCUAACAAAAGAUCAUCAU
 CAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUACACCUUCGUGACUUCCCAUUUGCCACCCGGCUUCA
 ACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUUCGACCCGGGACAAAACCAUCGCCCGAUCUAUGAACAGUAGUGGCAGUACC
 GGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGGACCCCAUCUUCGG
 CAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGG
 GCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUCUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGAC
 UUAUAGAUUCAUUCGCCCUGCUGGUGCCACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGA
 CCUAAGCAACUUGCACGAGAUCCGAGCGGCGGGGCGCCGUCAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAAACGCU
 UCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUCACCCCGAAGGGGAC
 GACAAGCCUGGGCGAGUAGGCAAGGUGGUGCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCCGUAAGACACU
 GGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCAUGAUCUAGAGCGGCUACGUUAAACAACCCCGAGGCUA
 CAAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCGUCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUC
 AUCGUGGACCCGGCUGAAGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGCAUCCUGCU
 GCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGUGCGCCGGCCUGCCCGACGACGAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGAGUCG
 UCGUGCUGGAACACGGUAAAAACCAUGACCCGAGAAGGAGAUUCGUGGACUAGUGGCCAGCCAGGUUACAACCCGCCAAG
 AAGCUGCGGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCCG
 CGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAY₂

[0130] X₁/Y₁ 和 X₂/Y₂ 的 5' 和 3' UTR 序列如下：

[0131] X₁ =

[0132] GGACAGAUCCGUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCUAGAGAAGACACCCGGACCCGAUCCAG
 CCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ
 ID NO :3)

[0133] X₂ = GGAUCCUACC (SEQ ID NO :4)

[0134] Y₁ =

[0135] CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCC

[0136] ACUCCAGUGCCCACCGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO :5)

[0137] Y₂ = UUUGAAUU (SEQ ID NO :6)

[0138] mRNA 的合成在完全无 RNA 酶的条件下进行。所有管、管形瓶、吸液管头、吸液管、缓
 冲液等都要求无核酸酶。从线性化 DNA 模板合成信使 RNA。为了生成所需的 mRNA 前体 (IVT)
 构建体,用无 RNA 酶的水制备 ~ 100ug 线性化 DNA、rNTP (3.33mM)、DTT (10mM)、T7RNA 聚合
 酶、RNA 酶抑制剂、焦磷酸酶和反应缓冲液 (10x、800mM Hepes (pH8.0)、20mM 亚精胺、250mM
 MgCl₂、pH 7.7) 的混合物至终体积 2.24ml。反应混合物在 37°C 孵育 20-120 分钟。完成之
 后,相应地用 DNA 酶 I 处理混合物另外 15 分钟并猝灭。

[0139] 来自前述 IVT 步骤的纯化的 mRNA 产物在 65°C 变性 10 分钟。单独地,部分
 GTP (20mM)、S-腺苷基蛋氨酸、RNA 酶抑制剂、2'-O-甲基转移酶和鸟苷酰基转移酶与反
 应缓冲液 (10x、500mM Tris-HCl (pH8.0)、60mM KCl、12.5mM MgCl₂) 混合在一起至终体积

8. 3ml。变性后,冰上冷却 mRNA,然后添加至反应混合物。组合的溶液在 37℃ 孵育 20-90 分钟。完成之后,添加小份 ATP(20mM)、多聚 A 聚合酶和加尾反应缓冲液(10x、500mM Tris-HCl(pH8.0)、2.5M NaCl、100mM MgCl₂),将总反应混合物在 37℃ 进一步孵育约 20-45 分钟。完成后,最终反应混合物被相应地猝灭和纯化。

[0140] 实施例 2: 色谱定量加帽效率

[0141] 本实施例说明加帽以及甲基化的色谱定量。具体地,20 碱基 DNA 寡核苷酸被设计并合成与体外合成的加帽 mRNA 的 5' UTR 互补,特别结合在从 5' 帽 1 或 2 个碱基内,并且优选结合在邻近 mRNA 倒数第二个(即,从 5' 端第三个核苷酸,作为帽核苷酸的最后两个核苷酸。DNA 寡核苷酸与帽相邻 5' UTR 的结合确立了对 RNA 酶 H 介导的裂解敏感的 DNA:RNA 杂合体的明确区域。在一些实施方案中,DNA 寡核苷酸任一端具有 1-15 个 RNA 核苷酸。在一些实施方案中,DNA 寡核苷酸在 3' 端具有 1-15 个 RNA 核苷酸。

[0142] 向包含杂交的体外合成 mRNA 的样品 RNA 溶液添加 RNA 酶 H。RNA 酶 H 在 DNA:RNA 杂合体区域裂解体外合成的加帽 mRNA,从而产生加帽片段。在某些实施方案中,使用 S1 核酸酶和其他核酸酶实现该裂解以产生通过选择的帽分析物在 5' 端标记的平端片段。该片段优选长度为 2-10 个核苷酸,包括帽核苷酸。总体上,该过程以帽存在和帽修饰的增加了分离度提供更小的分子。

[0143] 裂解之后,将 RNA 溶液加载至适当的色谱柱以定量分析加帽 mRNA 和未加帽 mRNA。在一个示例性实施方案中,柱是阴离子交换 HPLC 柱,并且通过改编本领域技术人员已知的方法纯化片段(参见例如,Wincott,F. 等人,“Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes), NUCLEIC ACIDS RES 23:2677-2684(1995); Anderson,A.C. 等人,“HPLC purification of RNA for crystallography and NMR”, RNA, 2:110-117, (1996))。通过积分对应于加帽物类和未加帽物类的色谱峰来测定样品中加帽片段的量。数据可以峰面积或加帽峰面积与未加帽峰面积比率的形式提供。

[0144] 同时,使用相同的分析方法,评估了 N-7 位置鸟嘌呤帽的百分比甲基化。而且,当合成“帽 1”结构基序时,可以分离在倒数第二个碱基的核糖环的 2' -O 位置甲基化的物类(图 2)。可以通过许多方法实现通过 HPLC 对甲基化核苷酸的测量,包括并入电化学检测的方法;参见例如,Park and Ames(PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 85:7467-7470(1988)),其通过引用并入本文。该方法提供了定量帽评估以及定量甲基化评估的强大组合。

[0145] 实施例 3: mRNA 5' 加帽对体内蛋白生成的评价

[0146] 在本实施例中,我们评价了 mRNA 5' 加帽对体内蛋白生成的影响及其对基于 mRNA 疗法效力的潜在影响。具体地,我们评价了 5' 加帽对 α -半乳糖苷酶 A(α -Gal A) 的体内生成的影响, α -半乳糖苷酶 A(α -Gal A) 在 Fabry 病中是缺陷的。Fabry 病是 X 连锁的遗传性溶酶体贮积病,特征为严重肾损伤、血管角质瘤和心血管异常,包括心室扩大和二尖瓣闭锁不全。Fabry 病还影响外周神经系统,引起四肢令人痛苦的灼痛发作。Fabry 病由酶 α -半乳糖苷酶 A(α -Gal A) 缺陷引起。 α -Gal A 是切割各种糖萜化合物的末端 α -半乳糖基部分的溶酶体羧基水解酶。Fabry 病导致中性鞘糖脂、三己糖酰基鞘氨醇(CTH) 的代谢阻断以及该酶底物在细胞内和血流中的累积。

[0147] 已经分离并测序了编码人类 α -Gal A, GLA 的 cDNA 和基因。人类 α -Gal A 表达为 429-氨基酸多肽,其 N 端 31 个氨基酸是信号肽。已经在中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞(Desnick

等人, 美国专利号 5, 356, 804 ;Ioannou 等人, J. CELL BIOL. 119 :1137(1992)) ;和昆虫细胞 (Calhoun 等人, WO 90/11353) 中表达了人类酶。

[0148] 罹患 Fabry 病的个体可以通过用人类 α -Gal A 的酶替代疗法来治疗 (参见例如, 美国专利号 6, 458, 574, 通过引用并入本文)。调节或补充 α -Gal A 缺陷表达并由此缓解潜在缺陷的其他方法将用于开发相关疾患的适当疗法。此类方法包括能够校正现有基因缺陷和 / 或给一个或多个靶细胞提供有益功能的细胞内递送核酸 (例如, GLA mRNA) 的方法。在成功递送至靶组织和细胞之后, 组合物和核酸转染靶细胞, 并且可以将核酸 (例如, GLA mRNA) 翻译成关注的基因产物 (例如, α -GAL A) 或可以其他方式调节 / 调整关注基因产物的存在或表达。之前已经描述了此类方法; 参见例如美国授权前公开 2011/0244026, 通过引用并入本文。

[0149] 在本实施例中, 我们评价了 5' 加帽对体内蛋白生成的影响。通过体外转录从编码基因的质粒 DNA 模板合成人类 GLA mRNA, 随后添加 5' 帽结构, 帽 0 或帽 1 (Fechter, P. 等人, J. GEN. VIROLOGY, 86 :1239-1249(2005))。还添加了如通过凝胶电泳测定的长度大约 200 个核苷酸的 3' 多聚 (A) 尾。GLA mRNA 中存在的 5' 和 3' 未翻译区表示为 SEQ ID NO : 7 中的 X 和 Y, 如下所示:

[0150] α -半乳糖苷酶 (GLA)mRNA (SEQ ID NO :7) :

[0151] XAUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCGCUUCGCUUCCUGGCCUCGUUUC
CUGGGACAUCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUGGCAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUGCACUGGGAGC
GCUUCAUGUGCAACCUUGACUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCUCUUAUGGAGAUGGCAGAG
CUCAUGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCAUUGAUGACUGUUGGAUGGCUCUCCCAAAG
AGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAGACCCUCAGCGCUUCCUCAUGGGAUUCGCCAGCUAGCUAAUUAUGUUCACA
GCAAAGGACUGAAGCUAGGGAUUUUUGCAGAUUGGAAAUAAAACCUGCGCAGGCUUCCUGGGAGUUUUGGAUAC
UACGACAUUGAUGCCCAGACCUUUGCUGACUGGGGAGUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUUGUACUGUGACAGUUU
GGAAAAUUUGGCAGAUUGGUUAUAAAGCACAUUGCCUUGGCCUGAAUAGGACUGGCAGAAGCAUUGUGUACUCCUGUG
AGUGGCCUCUUUAUUGUGGCCUUUCAAAAAGCCAAUUAUCAGAAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGCGAAAU
UUUGCUGACAUUGAUGAUUCCUGGAAAAGUAUAAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUUUUAACCAGGAGAGAAUUGU
UGAUGUUGCUGGACCAGGGGUUGGAAUGACCCAGAUUAGUUAGUGAUUGGCAACUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGC
AAGUAAUCUCAGAUUGGCCUCUGGGCUAUCAUUGGCUGCUCCUUUAUUCAGUCUAAUGACCUCGACACAUCAGCCCU
CAAGCCAAAGCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAUUGCCAUCAUCAGGACCCCUUGGGCAAGCAAGGGUACCAGCU
UAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUGGGAACGACCUCUCUCAGGCUUAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAACGGC
AGGAGAUUGGUGGACCUCGCUCUUUAUACCAUCGCAGUUGCUUCCUGGGUAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUGCCUGC
UUCAUCACACAGCUCUCCUCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUGGACUUAAGGUUAAGAAGUCACAUAAA
UCCACAGGCACUGUUUUGCUUCAGCUAGAAAAUACAUGCAGAUUGUCAUUAAAAGACUUAUUUAAAY

[0152] X = GGAUCCUACC (SEQ ID NO :4)

[0153] Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO :6)

[0154] 一些实施方案中还使用了具有多聚 A 插入物 (CO-GLA- 多聚 A) 的密码子优化的 α -半乳糖苷酶 (SEQ ID NO :8) :

[0155] X₁AUGCAGCUGAGGAACCCAGAGCUCCAUCUCGGAUGUGCACUGGCACUUAGAUUUCGCGCUUGUGU
CGUGGGACAUCCCGGAGCCAGGGCGUGGAUAAUGGGCUCGCCCGACUCCACAAUGGGUUGGCUGCACUGGGAG

CGCUUUAUGUGCAAUCUGGACUGCCAGGAAGAGCCCGAUAGCUGUAUUUCGGAGAAGCUCUUC AUGGAAAUGGCGGA
 GUUGAUGGUGUCCGAAGGGUGGAAGGAUGCGGGAUAGAGUAUCUGUGUAUCGAUGACUGCUGGAUGGCACCCGACG
 GAGAUUCGGAGGGGCGAUUGCAGGCCGACCCUCAGCGCUUCCCUCAUGGAAUUCGGCAGCUGGCCAACUACGUACAC
 UCAAAAAGGACUUAAGUUGGGGAUCUACGCGGACGUCGGUAAUAAGACAUGCGCUGGGUUCGGGGAGCUUCGGAUA
 CUAUGAUUAUGAUGCCCAGACCUUCGCGGACUGGGGAGUGGACUUGCUUAAGUUUGAUGGUUGUUACUGUGACUCAU
 UGGAACCUUGGCGGAUGGGUAUAAACAUAUGUCCUUGGCCUUGAAUCGGACAGGGCGGUCGAUCGUCUACAGCUGC
 GAAUGGCCUUUGUAUAUGUGGCCGUUCCAGAAACCCAACUACACCGAAAUCGCCAGUAUUGCAAUCACUGGAGAAA
 CUUCGCCGAUAUCGACGAUUCGUGGAAAUCAUCAAGUCCAUCUCGACUGGACGUCCUUAACCAAGAGAGAAUCG
 UAGAUGUGGCCGACCGGGAGGAUGGAACGACCCUGAUUUGCUUGUAUUGGCAACUUUGGACUCUCGUGGAACCAG
 CAAGUAACGCAAAUGGCACUCUGGGCUAUC AUGGCUGCGCCCCUGUUC AUGUCAACGACCUCAGGCACAUCUCGCC
 GCAGGCGAAAGCCUUGCUUCAAGAUAAAGGACGUCAUCGCGAUUUAUCAGGACCCGUCUGGGGAAGCAGGGCUAUCAGC
 UUAGACAGGGCGACAAUUUUGAGGUCUGGGAGCGACCCUGAGCGGACUCGCAUGGGCGGUGGCAAUGAUCAAUAGG
 CAGGAAAUUGGUGGGCCGAGGUCGUACACUAUCGCCGUCGCGUCGUUGGGAAAGGGUGUGGCGUGUAAUCCAGCGUG
 CUUUUAUCACCCAACUGCUGCCCGUCAAGCGCAAACUGGGUUUUUACGAAUGGACGAGCAGACUUCGCUCACACAUUA
 ACCCAACGGGUACGGUGUUGCUCCAGCUCGAGAAUACAAUGCAAUGUCACUUAAGAUUUGCUCUGACGGGUGGCA
 UCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAA
 AAUUAAGUUGCAUCAAA
 AAA

[0156] 将 GLA mRNA 以 1mg/mL 的终浓度在 -80 °C 储存直至使用时。经由吸收 (γ max 260nm) 测定所有 mRNA 浓度。

[0157] 适合体内递送 GLA 帽 0mRNA、GLA 帽 1mRNA、GLA mRNA 和其他对照的制剂包括采用一种或多种阳离子脂质、辅助脂质和 PEG 化脂质的各种比率的多组分脂质混合物。阳离子脂质可以包括 (但不排他地) DOTAP (1,2-二油烯基-3-三甲基铵丙烷)、DODAP (1,2-二油烯基-3-二甲基铵丙烷)、DOTMA (1,2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷)、DLinDMA (Heyes, J. ;Palmer, L. ;Bremner, K. ;MacLachlan, I., “Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids” J. CONTR. REL., 107 : 276-287 (2005))、DLin-KC2-DMA (Semple, S. C. 等 人 “Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery”, NATURE BIOTECH., 28 :172-176 (2010))、C12-200 (Love, K. T. 等人 “Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing”, PROC NATL ACAD SCI. USA, 107 :1864-1869 (2010))、HGT4003、ICE、基于二烷基氨基、基于咪唑、基于胍盐等。阳离子脂质可以包括 (但不排他地) DSPC (1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DPPC (1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DOPE (1,2-二油烯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DPPE (1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DMPE (1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DOPG (, 2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油))、胆固醇等。PEG 化脂质可以包括 (但不排他地) 与具有 C6-C20 长度的烷基链的脂质共价连接的长度达 5kDa 的聚乙二醇链。通过在 0.1% Triton-X 100 存在和不存在下进行 Ribogreen 测定来计算 mRNA 的脂质包封。使用 Malvern Zetasizer 仪器分别在 1x PBS 和 1mM KCl 溶液中测定颗粒尺寸 (动态光散射 (DLS)) 和 ζ 电势。

[0158] C12-200、DOPE、Chol 和 DMG-PEG2K 的 50mg/mL 乙醇溶液小份混合并用乙醇稀释至

3mL 终体积。单独地,从 1mg/mL 储液制备 CO-GLA mRNA(帽 0 或帽 1)的水缓冲溶液(10mM 柠檬酸盐/150mM NaCl,pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进入 mRNA 水溶液并振摇以产生 20% 乙醇中的最终悬液。过滤得到的纳米颗粒悬液,用 1x PBS(pH 7.4)透滤,浓缩并在 2-8°C 储存。终浓度 = 0.72mg/mL GLA mRNA(包封的)。Zave = 85.5nm(Dv(50) = 61.9nm ;Dv(90) = 113nm)。

[0159] 为了确定当 mRNA 包封进入基于 C12-200 的脂质时加入 GLA mRNA 的帽类型是否影响蛋白生成,进行了实验,其中野生型(CD-1)小鼠用加帽 GLA mRNA 物类注射并随后监测人类 GLA 蛋白生成。加帽 mRNA 物类包括帽 0(在 2' - 0 位置未甲基化)和帽 1(2' -0 甲基化)。

[0160] 在每次实验开始时使用大约 6-8 周大的雄性 CD-1 小鼠进行前述研究。通过相等总剂量的 30 微克包封的 GLA、EPO、FIX 或 AIAT mRNA 的尾静脉单次快速浓注而引入样品。以六小时测定 GLA 蛋白的血清浓度。在剂量施用后 6 小时(±5%)通过 CO₂窒息而处死所有动物,随后进行胸廓切开术和末端心脏血液收集。经由对处死动物心脏穿刺收集全血(最大可获得的体积)进入血清分离管,允许在室温下凝结至少 30 分钟,以 9300g 在 22°C ±5°C 离心 10 分钟,并萃取血清。对于以六小时的中间血液收集,经由面部静脉穿刺或剪尾来收集大约 40-50 μL 全血。从非治疗动物收集的样品用作与研究动物对比的基线 GLA 水平。收获每个小鼠的肝和脾,分成三部分并储存在 10% 中性缓冲福尔马林或快速冷冻并储存在 80°C。

[0161] 通过酶联免疫吸附测定(“ELISA”)测量人类 GLA 蛋白生成。采用绵羊抗 Replagal G-188IgG 作为捕获抗体,兔抗 Replagal IgG 作为第二(检测)抗体来进行标准 ELISA 程序。辣根过氧化物酶(HRP)轭合的山羊抗兔 IgG 用于活化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液。在 20 分钟之后使用 2N H₂SO₄猝灭反应。经由在 Molecular Device Flex Station 仪器上的吸收(450nm)而监测检测。未处理的小鼠血清和人类 Replagal® 蛋白分别用作阴性和阳性对照。

[0162] 如图 3 所示,在静脉内注射以基于 C12-200 的脂质纳米颗粒加载的 CO-GLA mRNA 的加帽物类后,可以在 6 小时内小鼠血清中检测人类 GLA 蛋白的实质水平。值得注意的是,相对于帽 0 结构的 mRNA,当采用具有帽 1 结构的 mRNA 时,蛋白生成存在明显且统计学上显著的增加。这些结果说明具有表征和定量 mRNA 合成过程的加帽和甲基化效率的能力的重要性。

[0163] 等同替代和范围

[0164] 使用不超过常规实验,本领域技术人员会发现或能够确认本文描述的本发明具体实施方案的许多等同替代。本发明范围不是要限于上述说明书,而是以所附权利要求提出。

[0165] 在权利要求书中,除非相反指示或者以其他方式从上下文明显指示,冠词例如“一个”、“一种”和“所述”可以表示一个或多个。因此,例如,对“一个抗体”的提及包括多个这种抗体,并且对“细胞”的体积包括对本领域技术人员已知的一个或多个细胞的体积,诸如此类。除非相反指示或者以其他方式从上下文明显指示,认为在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或说明满足该组成员的一个、多于一个或全部存在、用于或以其他方式与给定产品或方法相关的情况。本发明包括其中该组的确切一个成员存在、用于或以其他方式与给定产品或方法相关的实施方案。本发明包括其中该组成员的多于一个或

全部存在、用于或以其他方式与给定产品或方法相关的实施方案。而且，要理解，本发明涵盖其中来自所列权利要求的一个或多个的一个或多个限定、要素、条款、描述性术语等被引入另一个权利要求的所有变化、组合和变换。例如，从属于另一权利要求的任何权利要求可以被调整以包括从属于相同基础权利要求的任何其他权利要求中存在的一个或多个限定。而且，除非另外指明或者除非这对于本领域普通技术人员而言明显会产生矛盾或不一致，当权利要求引述组合物时，要理解包括为本文公开的任何目的使用该组合物的方法，并且包括根据本文公开的制备方法或本领域已知的其他方法的任何一个制备该组合物的方法。

[0166] 当要素以清单、例如以马库什组形式提出时，要理解，也公开了要素的每个亚组，并且任何要素可以从该组去除。应该理解，一般而言，当本发明或本发明的方面被称为包括特定要素、特征等时，本发明的某些实施方案或本发明的方面由或基本上由此类要素、特征等组成。为了简单的目的，那些实施方案在本文没有以这些语言具体提出。要注意，术语“包括”预期是开放性的，并且允许加入其他要素或步骤。

[0167] 当给定范围时，包括端点。而且，要理解，除非另外指明或以其他方式从上下文文明显并为本领域普通技术人员所理解，以范围表示的值可以在本发明的不通过实施方案中采取该范围内的任何具体值或子范围，至该范围下限值单位的十分之一，除非上下文清楚地另外指明。

[0168] 此外，要理解，落入现有技术的本发明的任何特定实施方案可以从权利要求的任何一个或多个明确排除。因为认为此类实施方案是本领域普通技术人员已知的，它们可以被排除，即使排除没有在本文明确提出。本发明组合物的任何特定实施方案可以为任何原因而从任何一个或多个权利要求排除，无论是否涉及现有技术存在。

[0169] 上述讨论并贯穿本文的出版物仅仅为其在本申请申请日之前公开而提供。在这里没有什么被解释为承认本发明人无权借助在先公开而先于此类公开。

[0170] 其他实施方案

[0171] 本领域普通技术人员将容易理解，前文仅代表本发明的某些优选实施方案。可以在不背离本发明精神或范围的情况下对上述方法和组合物做出各种变化和调整，如所附权利要求书中所提出的。

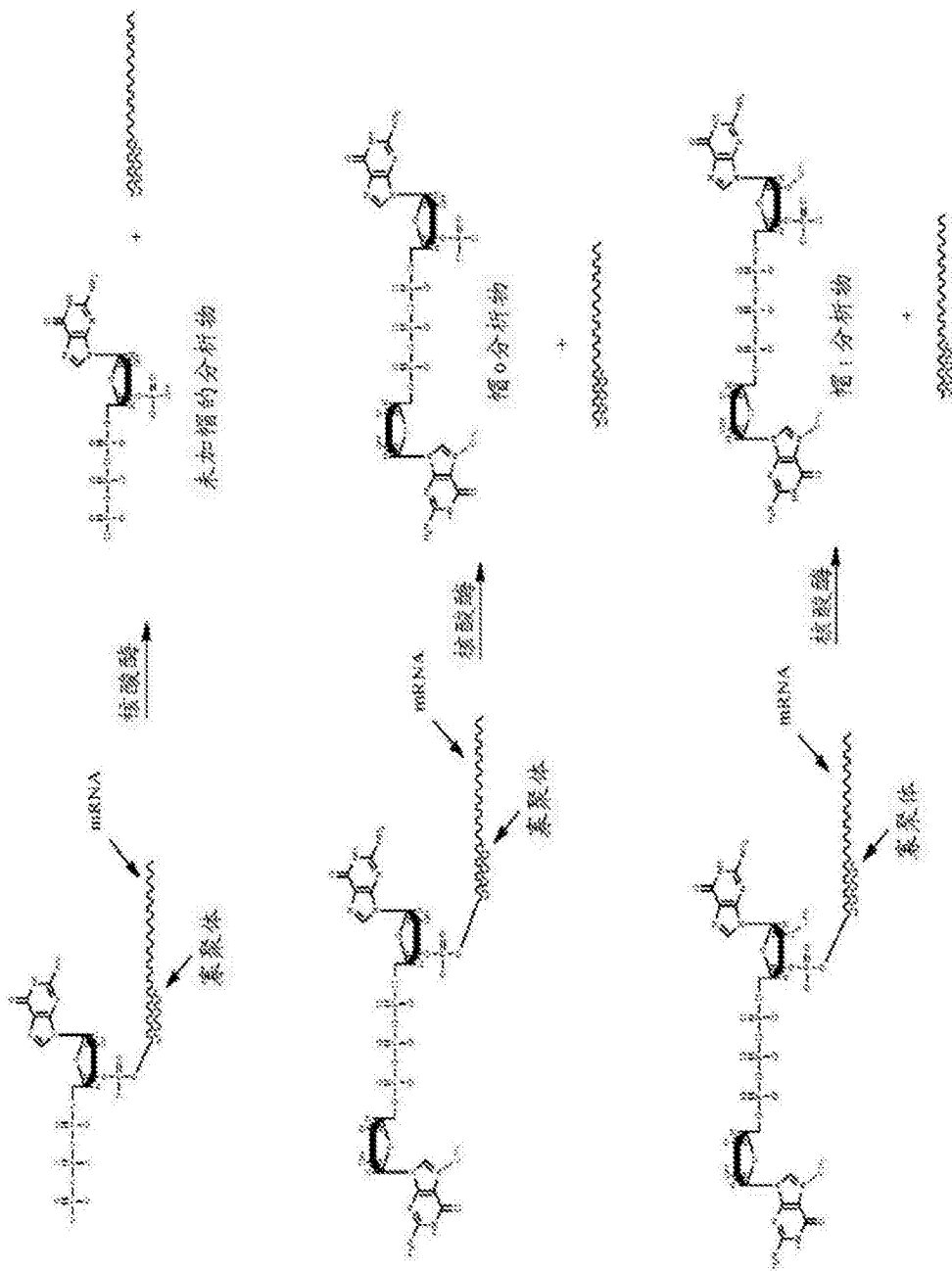


图 1

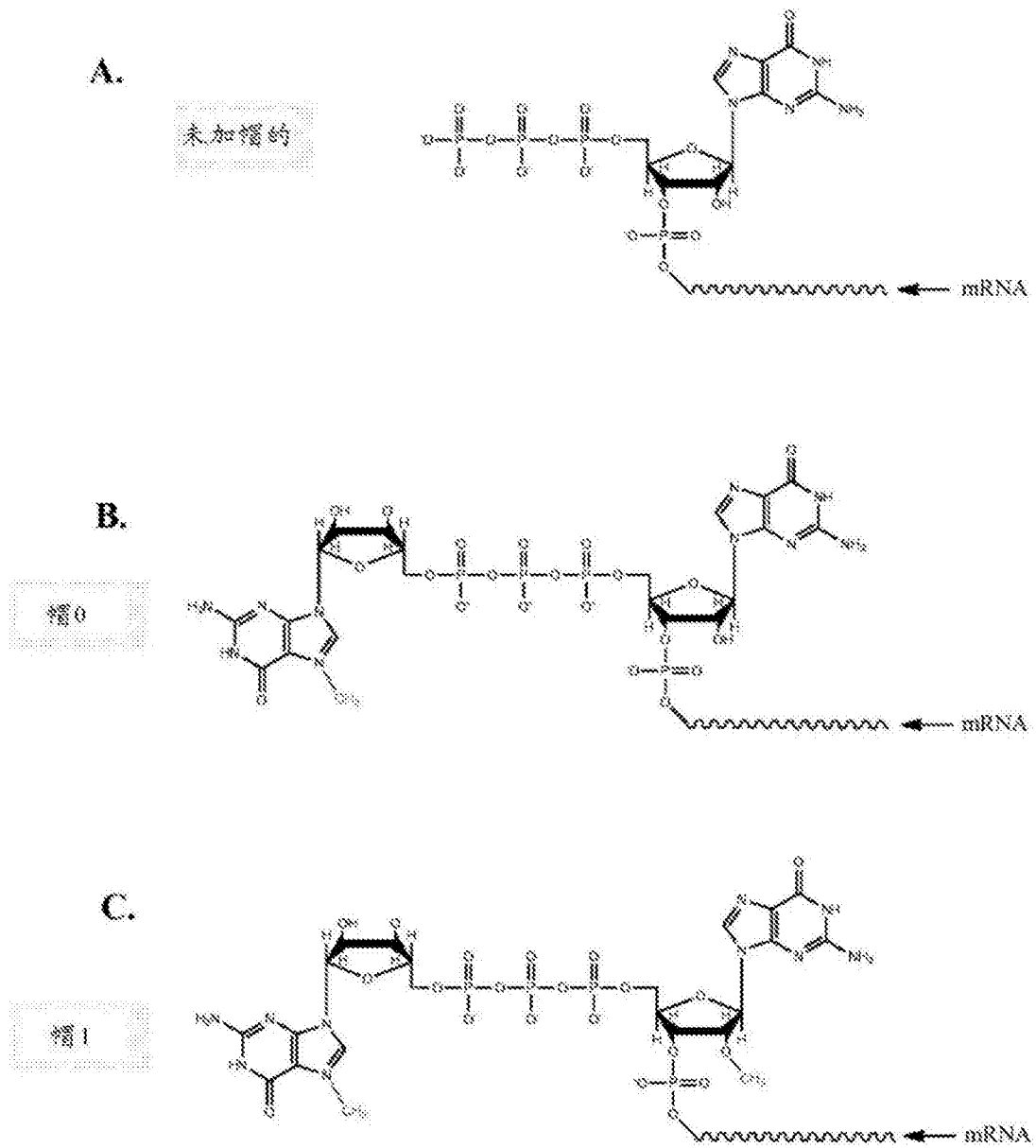


图 2

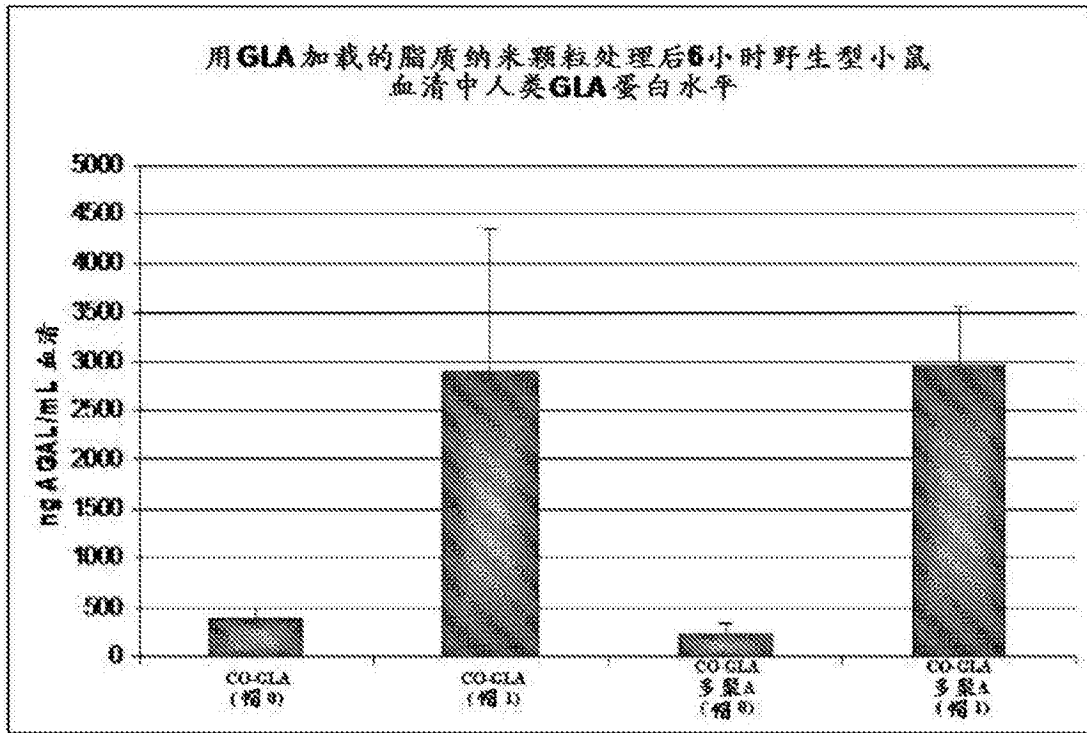


图 3