(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0021170
(43) 공개일자 2024년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/67 (2006.01) *A61K 31/7125* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/67 (2013.01)
A61K 31/7125 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7042287
(22) 출원일자(국제) 2022년05월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/028849
(87) 국제공개번호 WO 2022/241045
국제공개일자 2022년11월17일
(30) 우선권주장
63/187,752 2021년05월12일 미국(US)
63/288,522 2021년12월10일 미국(US)

(71) 출원인
더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
미국 02142 매사 추세츠주 캠브리지 메인 스트리트 415
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77
(72) 발명자
왕, 샤오
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
스, 하이링
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
아디트함, 아브히섹
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
(74) 대리인
양영준, 김영

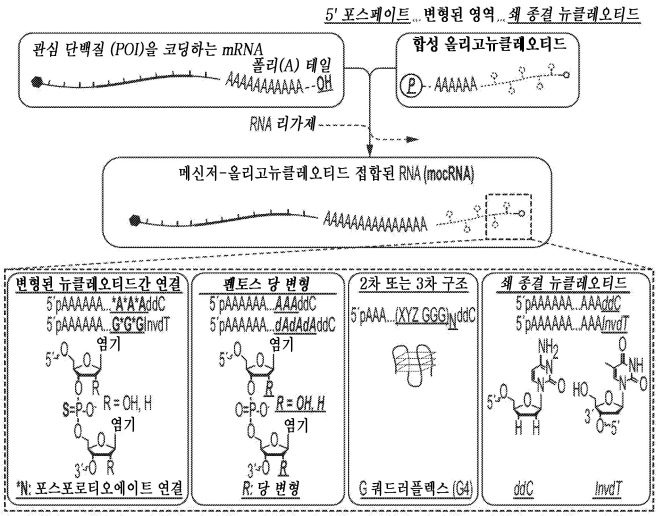
전체 청구항 수 : 총 241 항

(54) 발명의 명칭 **변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 및 그의 용도**

(57) 요 약

변형된 뉴클레오티드 및/또는 2차 구조를 함유하는 폴리(A) 테일을 갖는 변형된 mRNA 및 변형된 비-코딩 RNA가 본원에 개시되어 있으며, 이는 테일링 핵산을 RNA의 3' 말단 단부에 라이게이션함으로써 제조될 수 있다. 또한, 본원에 제공된 하나 이상의 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 조성물, 및 치료 또는 농업 적용을 위해 상기 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 37/04 (2018.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 변형된 mRNA로서:

(i) 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 (ORF); 및

(ii) 폴리-A 영역,

여기서 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 여기서 폴리-A 영역의 마지막 10개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드인

변형된 mRNA.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리-A 영역이 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 25개 이상의 아데노신 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 여기서 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드인 변형된 mRNA.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 4개 이상이 변형된 뉴클레오티드인 변형된 mRNA.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 2개 이상의 연속 뉴클레오티드가 변형된 뉴클레오티드간 연결에 의해 연결되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상의 연속 뉴클레오티드가 데옥시리보뉴클레오티드, 2'-변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트-연결된 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택된 변형된 뉴클레오티드인 변형된 mRNA.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 3개 이상의 변형된 뉴클레오티드가 폴리-A 영역의 3' 말단에 위치된 연속 뉴클레오티드인 변형된 mRNA.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 6개 이상의 연속 뉴클레오티드가 동일한 유형의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드간 변형을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%가 변형된 뉴클레오티드인 변형된 mRNA.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 15, 20 또는 25개가 변형된 뉴클레오티드인 변형된 mRNA.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA가 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서 ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있는 것인 변형된 mRNA.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA가 원형 mRNA이고, 여기서 폴리-A 영역은 3' UTR과 5' UTR 사이에 있는 것인 변형된 mRNA.

청구항 12

하기를 포함하는 변형된 mRNA로서:

(i) 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 (ORF);

(ii) 폴리-A 영역;

(iii) 2차 구조를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 구조적 서열의 하나 이상의 카피,

여기서 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역에 대해 3'에 있고, 여기서 변형된 mRNA는 2차 구조를 포함하고, 여기서 2차 구조는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 것인

변형된 mRNA.

청구항 13

제12항에 있어서, 폴리-A 영역이 25개 이상의 아데노신 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 변형된 mRNA가 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서 ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있는 것인 변형된 mRNA.

청구항 15

제14항에 있어서, 변형된 mRNA가 원형 mRNA이고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 5' UTR 사이에 있는 것인 변형된 mRNA.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 G-쿼드러플렉스 서열인 변형된 mRNA.

청구항 17

제16항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 RNA G-쿼드러플렉스 서열인 변형된 mRNA.

청구항 18

제17항에 있어서, RNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 19

제18항에 있어서, 변형된 mRNA가 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 20

제16항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 DNA G-쿼드러플렉스 서열인 변형된 mRNA.

청구항 21

제20항에 있어서, DNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 22

제21항에 있어서, 변형된 mRNA가 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 23

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 텔로미어 반복 서열인 변형된 mRNA.

청구항 24

제23항에 있어서, 텔로미어 반복 서열이 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 25

제24항에 있어서, 변형된 mRNA가 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 26

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA의 2차 구조가 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머인 변형된 mRNA.

청구항 27

제12항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역이 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 28

제1항 내지 제11항 및 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 핵염기를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 29

제28항에 있어서, 변형된 핵염기가 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산

토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 당을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 31

제30항에 있어서, 변형된 당이 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 32

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 2' 변형을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 33

제32항에 있어서, 2' 변형이 잠금-핵산 (LNA) 변형, 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 34

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 포스페이트를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 35

제34항에 있어서, 변형된 포스페이트가 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 36

제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 37

제36항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 38

제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 39

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 40

제27항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 41

제40항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 42

제41항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 3' 말단 뉴클레오티드의 3' 위치에 히드록시를 포함하지 않는 것인 변형된 mRNA.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 역전된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 46

제45항에 있어서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 디데옥시시티딘을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 펩티드-결합 서열을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 48

제47항에 있어서, 펩티드-결합 서열이 폴리-A 결합 단백질 (PABP)-결합 서열인 변형된 mRNA.

청구항 49

제1항 내지 제11항 및 제27항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA가 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오시드는 상이한 구조를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 50

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 51

제50항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%가 아데노신 뉴클레오티드인 변형된 mRNA.

청구항 53

제1항 내지 제10항, 제12항, 제14항 및 제16항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA가 선형 mRNA이고, 여기서 선형 mRNA는 5' 캡을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 54

제53항에 있어서, 5' 캡이 7-메틸구아노신을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 55

제54항에 있어서, 5' 캡이 7-메틸구아노신을 변형된 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 추가로 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 56

제53항에 있어서, 5' 캡이 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트가 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐메틸렌비스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트인 변형된 mRNA.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA가 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 5' UTR을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA가 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 ORF를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 60

하기를 포함하는 변형된 비-코딩 RNA로서:

(i) 비-코딩 RNA 서열; 및

(ii) 폴리-A 영역,

여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA 서열에 대해 3'에 있고 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 여기서 폴리-A 영역의 마지막 10개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드인

변형된 비-코딩 RNA.

청구항 61

제60항에 있어서, 폴리-A 영역이 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 25개 이상의 아데노신 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 여기서 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 4개 이상이 변형된 뉴클레오티드인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 63

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 2개 이상의 연속 뉴클레오티드가 변형된 뉴클레오티드간 연결에 의해 연결되는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 64

제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상의 연속 뉴클레오티드가 데옥시리보뉴클레오티드, 2'-변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트-연결된 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택된 변형된 뉴클레오티드인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 65

제60항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 3개 이상의 변형된 뉴클레오티드가 폴리-A 영역의 3' 말단에 위치된 연속 뉴클레오티드인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 66

제60항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 6개 이상의 연속 뉴클레오티드가 동일한 유형의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드간 변형을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 67

제60항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%가 변형된 뉴클레오티드인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 68

제60항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개가 변형된 뉴클레오티드인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 69

제60항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 원형 비-코딩 RNA이고, 여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA 서열에 대해 5'에 있는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 70

제60항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 2차 구조를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 추가로 포함하고,

여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역에 대해 3'에 있고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 2차 구조를 포함하고,

여기서 2차 구조는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 것인

변형된 비-코딩 RNA.

청구항 71

제70항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 원형 mRNA이고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 비-코딩 RNA 서열 사이에 있는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 구조적 서열이 G-쿼드러플렉스 서열인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 73

제72항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 RNA G-쿼드러플렉스 서열인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 74

제73항에 있어서, RNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 75

제74항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 76

제72항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 DNA G-쿼드러플렉스 서열인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 77

제76항에 있어서, DNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 78

제77항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 79

제70항 또는 제71항에 있어서, 구조적 서열이 텔로미어 반복 서열인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 80

제79항에 있어서, 텔로미어 반복 서열이 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 81

제80항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 82

제70항 또는 제71항에 있어서, 비-코딩 RNA의 2차 구조가 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 83

제60항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 핵염기를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 84

제83항에 있어서, 변형된 핵염기가 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피

닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 85

제60항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 당을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 86

제85항에 있어서, 변형된 당이 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 87

제60항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 2' 변형을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 88

제87항에 있어서, 2' 변형이 잠금-핵산 (LNA) 변형, 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 89

제57항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 포스페이트를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 90

제89항에 있어서, 변형된 포스페이트가 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 91

제60항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 92

제91항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 93

제60항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 94

제60항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 95

제60항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 96

제95항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 97

제96항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 98

제60항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 비-코딩 RNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 3' 말단 뉴클레오티드의 3' 위치에 히드록시를 포함하지 않는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 99

제60항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 비-코딩 RNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 역전된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 101

제100항에 있어서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 디데옥시시티딘을 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 102

제60항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오시드는 상이한 구조를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 103

제60항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 104

제103항에 있어서, 폴리-A 영역이 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 105

제60항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%가 아데노신 뉴클레오티드인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 106

제1항 내지 제11항 및 제27항 내지 제59항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA를 생산하는 방법으로서, 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 제1 RNA를 RNA 리가제의 존재 하에 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 테일링 핵산에 라이게이션하는 것을 포함하며, 이로써 RNA 리가제는 RNA의 3' 뉴클레오티드와 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 변형된 mRNA를 생산하는 것인 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 변형된 mRNA가 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서 ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있는 것인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 변형된 mRNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 mRNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 5' UTR에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 폴리-A 영역에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 mRNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 원형 mRNA의 3' UTR과 5' UTR 사이에 있는 것인 방법.

청구항 109

제107항에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하며:

(i) 변형된 mRNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

(ii) 변형된 mRNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 mRNA를 생산하는 단계; 및

(iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 mRNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

이로써 원형화 리가제는 변형된 mRNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 mRNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 mRNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 3' UTR과 5' UTR 사이에 있는 것인

방법.

청구항 110

제12항 내지 제59항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA를 생산하는 방법으로서, 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 RNA를 RNA 리가제의 존재 하에 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 테일링 핵산에 라이게이션하는 것을 포함하며, 이로써 리가제는 RNA의 3' 뉴클레오티드와 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 변형된 mRNA를 생산하는 것인 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 변형된 mRNA가 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서 ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있고, 여기서 폴리-A 영역은 3' UTR과 구조적 서열의 하나 이상의 카피 사이에 있는 것인 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 변형된 mRNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 mRNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 5' UTR에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 mRNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 원형 mRNA의 폴리-A 영역과 5' UTR 사이에 있는 것인 방법.

청구항 113

제111항에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하며:

(i) 변형된 mRNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

(ii) 변형된 mRNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 mRNA를 생산하는 단계; 및

(iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 mRNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

이로써 원형화 리가제는 변형된 mRNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 mRNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 mRNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 3' UTR과 5' UTR 사이에 있는 것인

방법.

청구항 114

제109항 또는 제113항에 있어서, 변형된 mRNA가 스캐폴드 핵산의 존재 하에 원형화되고, 여기서 스캐폴드 핵산은 변형된 mRNA와 혼성화할 수 있는 핵산이고, 여기서 변형된 mRNA는 스캐폴드 핵산에 결합될 때 원형 2차 구조를 형성하는 것인 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 스캐폴드 핵산이 하기를 포함하며:

(a) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제1 혼성화 서열, 여기서 제1 혼성화 서열은 변형된 mRNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드에 상보적임; 및

(b) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제2 혼성화 서열, 여기서 제2 혼성화 서열은 변형된 mRNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드에 상보적임;

여기서 변형된 mRNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드는 제1 혼성화 서열과 혼성화하고, 변형된 mRNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드는 제2 혼성화 서열과 혼성화하는 것인

방법.

청구항 116

제114항 또는 제115항에 있어서, 제1 혼성화 서열의 마지막 뉴클레오티드 및 제2 혼성화 서열의 제1 뉴클레오티드가 스캐폴드 핵산에서 인접하고 임의의 다른 뉴클레오티드에 의해 분리되지 않는 것인 방법.

청구항 117

제109항 또는 제113항에 있어서, 변형된 mRNA가 하기를 포함하며:

(i) 오픈 리딩 프레임에 대해 5'에 있는 제1 자기-혼성화 서열;

(ii) 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있는 제2 자기-혼성화 서열;

(iii) 제1 자기-혼성화 서열에 대해 5'에 있는 제1 비-혼성화 서열; 및

(iv) 제2 자기-혼성화 서열에 대해 3'에 있는 제2 비-혼성화 서열,

여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 있고,

여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 없는 것인

방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 제1 및 제2 자기-혼성화 서열의 혼성화가 변형된 mRNA의 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드가 100 Å 미만의 거리에 의해 분리되는 2차 구조를 형성하는 것인 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드가 90 Å 미만, 80 Å 미만, 70 Å 미만, 60 Å 미만, 50 Å 미만, 40 Å 미만, 30 Å 미만, 20 Å 미만 또는 10 Å 미만의 거리에 의해 분리되는 것인 방법.

청구항 120

제109항 및 제113항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 원형화 리가제가 T4 RNA 리가제인 방법.

청구항 121

제110항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 G-쿼드러플렉스 서열인 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 RNA G-쿼드러플렉스 서열인 방법.

청구항 123

제122항에 있어서, RNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 124

제123항에 있어서, 테일링 핵산이 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 방법.

청구항 125

제121항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 DNA G-쿼드러플렉스 서열인 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, DNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 127

제126항에 있어서, 테일링 핵산이 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 방법.

청구항 128

제110항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 텔로미어 반복 서열인 방법.

청구항 129

제128항에 있어서, 텔로미어 반복 서열이 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 테일링 핵산이 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 방법.

청구항 131

제110항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2

개의 뉴클레오티드를 포함하는 압타머 서열이고, 여기서 압타머는 표적 분자에 결합할 수 있는 2차 구조인 방법.

청구항 132

제110항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 133

제106항, 제107항 및 제132항 중 어느 한 항에 있어서, RNA의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 히드록실 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 히드록실 기를 포함하지 않는 것인

방법.

청구항 134

제106항, 제107항 및 제132항 중 어느 한 항에 있어서, RNA의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 히드록실 기를 포함하지 않고;

여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 히드록실 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

여기서 RNA 리가제가 RtcB 리가제인

방법.

청구항 135

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%가 변형된 뉴클레오티드인 방법.

청구항 136

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개가 변형된 뉴클레오티드인 방법.

청구항 137

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 핵염기를 포함하는 것인 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 변형된 핵염기가 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-

메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 139

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 140

제139항에 있어서, 변형된 당이 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 141

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 2' 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 142

제141항에 있어서, 2' 변형이 잠금-핵산 (LNA) 변형, 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 143

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 포스페이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 144

제143항에 있어서, 변형된 포스페이트가 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 145

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 146

제145항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 147

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 148

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 149

제106항, 제107항 및 제132항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 150

제149항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 151

제140항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 152

제106항, 제107항, 제110항, 제111항 및 제132항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산의 3' 말단 뉴클레오티드가 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함하는 것인 방법.

청구항 153

제106항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오티드는 상이한 구조를 포함하는 것인 방법.

청구항 154

제106항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%가 아데노신 뉴클레오티드인 방법.

청구항 155

제106항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역이 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 156

제155항에 있어서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역이 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 157

제106항, 제107항, 제110항, 제111항 및 제121항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 mRNA가 선형 mRNA이고, 여기서 선형 mRNA는 5' 캡을 포함하는 것인 방법.

청구항 158

제157항에 있어서, 5' 캡이 7-메틸구아노신을 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 159

제158항에 있어서, 5' 캡이 7-메틸구아노신을 변형된 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 추가로 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 160

제157항에 있어서, 5' 캡이 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 161

제159항 또는 제160항에 있어서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트가 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐메틸렌비스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트인 변형된 mRNA.

청구항 162

제106항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 리가제가 T4 RNA 리가제인 방법.

청구항 163

제60항 내지 제105항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법으로서, 비-코딩 RNA 서열을 포함하는 제1 RNA를 RNA 리가제의 존재 하에 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 테일링 핵산에 라이게이션하는 것을 포함하며, 이로써 RNA 리가제는 RNA의 3' 뉴클레오티드와 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 것인 방법.

청구항 164

제163항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 비-코딩 RNA 서열에 대해 3'에 있는 폴리-A 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 165

제164항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 비-코딩 RNA 서열에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 폴리-A 영역에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA의 3'와 5' 뉴클레오티드 사이에 있는 것인 방법.

청구항 166

제164항에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하며:

(i) 변형된 비-코딩 RNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

(ii) 변형된 비-코딩 RNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 단계; 및

(iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 비-코딩 RNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

이로써 원형화 리가제는 변형된 비-코딩 RNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 비-코딩 RNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA의 3'와 5' 뉴클레오티드 사이에 있는 것인

방법.

청구항 167

제163항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 비-코딩 RNA 서열과 구조적 서열의 하나 이상의 카피 사이에 있는 폴리-A 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 169

제168항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 비-코딩 RNA 서열에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 원형 비-코딩 RNA의 비-코딩 RNA 서열 사이에 있는 것인 방법.

청구항 170

제168항에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하며:

(i) 변형된 비-코딩 RNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

(ii) 변형된 비-코딩 RNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 단계; 및

(iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 비-코딩 RNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

이로써 원형화 리가제는 변형된 비-코딩 RNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 비-코딩 RNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 비-코딩 RNA 서열 사이에 있는 것인

방법.

청구항 171

제166항 또는 제170항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 스캐폴드 핵산의 존재 하에 원형화되고, 여기서 스캐폴드 핵산은 변형된 비-코딩 RNA와 혼성화할 수 있는 핵산이고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 스캐폴드 핵산에 결합될 때 원형 2차 구조를 형성하는 것인 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 스캐폴드 핵산이 하기를 포함하며:

(a) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제1 혼성화 서열, 여기서 제1 혼성화 서열은 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드에 상보적임; 및

(b) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제2 혼성화 서열, 여기서 제2 혼성화 서열은 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드에 상보적임;

여기서 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드는 제1 혼성화 서열과 혼성화하고, 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드는 제2 혼성화 서열과 혼성화하는 것인

방법.

청구항 173

제171항 또는 제172항에 있어서, 제1 혼성화 서열의 마지막 뉴클레오티드 및 제2 혼성화 서열의 제1 뉴클레오티

드가 스캐폴드 핵산에서 인접하고 임의의 다른 뉴클레오티드에 의해 분리되지 않는 것인 방법.

청구항 174

제166항 또는 제170항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 하기를 포함하며:

(i) 오픈 리딩 프레임에 대해 5'에 있는 제1 자기-혼성화 서열;

(ii) 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있는 제2 자기-혼성화 서열;

(iii) 제1 자기-혼성화 서열에 대해 5'에 있는 제1 비-혼성화 서열; 및

(iv) 제2 자기-혼성화 서열에 대해 3'에 있는 제2 비-혼성화 서열,

여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 있고,

여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 없는 것인

방법.

청구항 175

제174항에 있어서, 제1 및 제2 자기-혼성화 서열의 혼성화가 변형된 비-코딩 RNA의 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드가 100 Å 미만의 거리에 의해 분리되는 2차 구조를 형성하는 것인 방법.

청구항 176

제175항에 있어서, 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드가 90 Å 미만, 80 Å 미만, 70 Å 미만, 60 Å 미만, 50 Å 미만, 40 Å 미만, 30 Å 미만, 20 Å 미만 또는 10 Å 미만의 거리에 의해 분리되는 것인 방법.

청구항 177

제166항 및 제170항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 원형화 리가제가 T4 RNA 리가제인 방법.

청구항 178

제168항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 G-쿼드러플렉스 서열인 방법.

청구항 179

제178항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 RNA G-쿼드러플렉스 서열인 방법.

청구항 180

제179항에 있어서, RNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 181

제180항에 있어서, 테일링 핵산이 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 방법.

청구항 182

제178항에 있어서, G-쿼드러플렉스가 DNA G-쿼드러플렉스 서열인 방법.

청구항 183

제182항에 있어서, DNA G-쿼드러플렉스 서열이 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 184

제183항에 있어서, 테일링 핵산이 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 방법.

청구항 185

제168항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 텔로미어 반복 서열인 방법.

청구항 186

제185항에 있어서, 텔로미어 반복 서열이 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 187

제186항에 있어서, 테일링 핵산이 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함하는 것인 방법.

청구항 188

제168항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 서열이 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 압타머 서열이고, 여기서 압타머는 표적 분자에 결합할 수 있는 2차 구조인 방법.

청구항 189

제163항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, RNA의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 히드록실 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 히드록실 기를 포함하지 않는 것인

방법.

청구항 190

제163항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, RNA의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 히드록실 기를 포함하지 않고;

여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드가 5' 말단 히드록실 기를 포함하고;

여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드가 3' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

여기서 RNA 리가제가 RtcB 리가제인

방법.

청구항 191

제163항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%가 변형된 뉴클레오티드인 방법.

청구항 192

제163항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개가 변형된 뉴클레오티드인 방법.

청구항 193

제163항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 핵염기를 포함하는 것인 방법.

청구항 194

제193항에 있어서, 변형된 핵염기가 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화

아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 195

제163항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 196

제195항에 있어서, 변형된 당이 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 197

제163항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 2' 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 198

제197항에 있어서, 2' 변형이 잠금-핵산 (LNA) 변형, 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 199

제163항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드가 변형된 포스페이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 200

제199항에 있어서, 변형된 포스페이트가 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니딘 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 201

제163항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 202

제201항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 203

제163항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 204

제163항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 205

제163항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 206

제205항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 207

제206항에 있어서, 테일링 핵산이 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함하는 것인 방법.

청구항 208

제163항 내지 제168항 및 제178항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산의 3' 말단 뉴클레오티드가 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함하는 것인 방법.

청구항 209

제163항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 테일링 핵산이 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오티드는 상이한 구조를 포함하는 것인 방법.

청구항 210

제163항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%가 아데노신 뉴클레오티드인 방법.

청구항 211

제163항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역이 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 212

제211항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역이 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 213

제163항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 리가제가 T4 RNA 리가제인 방법.

청구항 214

제106항 내지 제162항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA.

청구항 215

제1항 내지 제59항 및 제214항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 항원 또는 치료용 단백질을 코딩하는 것인 변형된 mRNA.

청구항 216

제215항에 있어서, 항원이 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원생동물 항원 또는 진균 항원인 변형된 mRNA.

청구항 217

제215항에 있어서, 치료용 단백질이 효소, 전사 인자, 세포 표면 수용체, 성장 인자 또는 응고 인자인 변형된 mRNA.

청구항 218

제1항 내지 제59항 및 제215항 내지 제217항 중 어느 한 항에 있어서, 오픈 리딩 프레임이 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 219

제218항에 있어서, 변형된 mRNA가 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 220

제219항에 있어서, 변형된 mRNA가 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는 것인 변형된 mRNA.

청구항 221

제163항 내지 제213항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 222

제60항 내지 제105항 및 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 비-코딩 RNA가 가이드 RNA (gRNA), 프라임 편집 가이드 RNA (pegRNA) 또는 긴 비-코딩 RNA (lncRNA)인 변형된 비-코딩 RNA.

청구항 223

제1항 내지 제59항 및 제214항 내지 제220항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA 또는 제60항 내지 제105항, 제221항 및 제222항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 지질 나노입자.

청구항 224

제1항 내지 제59항 및 제214항 내지 제220항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA 또는 제60항 내지 제105항, 제221항 및 제222항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 세포.

청구항 225

제224항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 세포.

청구항 226

제225항에 있어서, 세포가 인간 세포인 세포.

청구항 227

제1항 내지 제59항 및 제214항 내지 제220항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA, 제60항 내지 제105항, 제221항 및 제222항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA, 제223항의 지질 나노입자, 또는 제224항 내지 제226항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 조성물.

청구항 228

제227항의 조성물 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 229

제1항 내지 제59항 및 제214항 내지 제220항 중 어느 한 항의 mRNA, 제60항 내지 제105항, 제221항 및 제222항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA, 또는 제223항의 지질 나노입자를 세포에 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 230

제1항 내지 제59항 및 제214항 내지 제220항 중 어느 한 항의 mRNA, 제60항 내지 제105항, 제221항 및 제222항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA, 제223항의 지질 나노입자, 제224항 내지 제226항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제227항 또는 제228항의 조성물을 대상체에 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 231

대상체를 백신접종하는 방법으로서, 제1항 내지 제59항 및 제214항 내지 제220항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA, 제223항의 지질 나노입자, 제224항 내지 제226항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제227항 또는 제228항의 조성물을 대상체에 도입하는 것을 포함하고, 여기서 변형된 mRNA의 오픈 리딩 프레임은 항원을 코딩하는 것인 방법.

청구항 232

대상체에서 효소를 대체하는 방법으로서, 제1항 내지 제59항 및 제214항 내지 제220항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA, 제223항의 지질 나노입자, 제224항 내지 제226항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제227항 또는 제228항의 조성물을 대상체에 도입하는 것을 포함하고, 여기서 변형된 mRNA의 오픈 리딩 프레임은 효소를 코딩하는 것인 방법.

청구항 233

대상체의 게놈을 변형하는 방법으로서, 제60항 내지 제105항, 제221항 및 제222항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA, 제223항의 지질 나노입자, 또는 제227항 또는 제228항의 조성물을 대상체에 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 234

제230항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 포유동물인 방법.

청구항 235

제234항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 236

제1항 내지 제105항 및 제214항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한, 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자, 세포 또는 조성물.

청구항 237

제106항 내지 제213항 중 어느 한 항의 RNA 및 테일링 핵산을 포함하는 키트.

청구항 238

제237항에 있어서, RNA 리가제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 239

제228항의 제약 조성물 및 전달 디바이스를 포함하는 키트.

청구항 240

하기를 포함하는, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 정제하는 방법:

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항의 변형된 mRNA 또는 제60항 내지 제105항 중 어느 한 항의 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 혼합물을 정제 배지와 접촉시키며, 여기서 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 정제 배지와 상호작용하여 변형된 RNA-정제 배지 접합체를 형성하는 것인 단계;

혼합물로부터 변형된 RNA-정제 배지 접합체를 분리하는 단계; 및

변형된 RNA-정제 배지 접합체로부터 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 용매로 용리시키는 단계.

청구항 241

제240항에 있어서, 정제 배지가 상자성 비드를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2021년 5월 12일에 출원된 미국 가출원 번호 63/187,752 (발명의 명칭: "변형된 mRNA 및 그의 용도") 및 2021년 12월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 63/288,522 (발명의 명칭: "변형된 mRNA 및 그의 용도")의 이익을 주장하며, 이들 각각의 전체 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] EFS-WEB을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하고, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2022년 5월 10일에 생성된 상기 ASCII 카피는 명칭이 B119570130WO00-SEQ-JQM이고 크기가 9,854 바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 메신저 RNA (mRNA) 기술은 강력하고 프로그램화가능하고 원하는 서열을 갖는 mRNA의 빠른 생산이 가능하기 때문에 통상적인 소분자 치료제 및 백신 접근법에 대한 새로운 대안으로 떠오르고 있다. mRNA 치료제는 빠르게 발전하는 분야이며, 혈관 재생 인자부터 COVID-19, 인플루엔자 및 지카 바이러스에 대한 백신에 이르기까지 치료용 단백질의 발현에 사용되어 왔다. 최근의 임상적 성공에도 불구하고, mRNA 치료제는 여전히 불안정성, 독성, 단기간 효능 및 잠재적 알레르기 반응이라는 문제에 직면해 있다. 생체내 효능을 증진시키기 위해 mRNA의 안정성을 증가시키는 것은 임상 적용을 위한 mRNA 치료제의 타당성을 증가시키기 위해 해결해야 하는 중요한 문제로 남아있다.

발명의 내용

[0006] 세포내 안정성을 개선하여 이에 의해 단백질 생산을 증진시키기 위한 변형된 뉴클레오티드 및/또는 구조적 특색을 갖는 변형된 mRNA, 뿐만 아니라 이러한 변형된 mRNA를 제조하고 사용하는 방법이 본원에 제공된다. 통상적인 mRNA는 3' 단부에 다중 아데노신 뉴클레오티드를 갖는 폴리-A 테일을 포함하며, 이는 3' 뉴클레오티드를 제거하는 세포성 엑소뉴클레아제에 의해 분해될 수 있다. 엑소뉴클레아제가 폴리-A 테일을 제거하고 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오티드를 제거하기 시작하면, mRNA는 코딩된 단백질로 번역될 수 없다. 3' 엑소뉴클레아제 활성에 더 저항성이 있는 mRNA는 더 천천히 분해되며 그러므로 더 안정적이고 세포내 증가된 반감기를 가지며, 주어진 mRNA 분자로부터 더 많은 단백질이 생산될 수 있다. mRNA의 핵염기, 당 또는 포스페이트 연결에 대한 하나 이상의 구조적 변형을 함유하는 변형된 뉴클레오티드는 3' 엑소뉴클레아제 활성을 방해하여 mRNA를 더욱 안

정적으로 만들 수 있다. 그러나, 3' 엑소뉴클레아제를 억제하는 동일한 구조적 변형은 또한 폴리아데닐화 효소가 이를 폴리-A 테일에 혼입하는 능력을 방해하여 변형된 뉴클레오티드를 폴리-A 테일에 혼입하는 것을 어렵게 만들 수 있다. 놀랍게도, 기존에 존재하는 폴리-A 테일을 함유하는 mRNA의 3' 단부에 3개 정도의 변형된 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 라이게이션하는 것은 올리고뉴클레오티드 자기-라이게이션을 방지하기 위해 차단 3' 말단 뉴클레오티드 이외에 변형된 뉴클레오티드를 갖지 않는 올리고뉴클레오티드의 라이게이션과 비교하여 mRNA 안정성의 현저한 개선을 초래한다 (도 5). 2차 구조를 형성할 수 있는 구조적 서열, 예컨대 G-쿼드러플렉스 또는 압타머를 함유하는 올리고뉴클레오티드의 라이게이션에 의해 안정성의 유사한 개선이 관찰되었다. 이러한 구조적 서열은 엑소뉴클레아제가 3' 말단 뉴클레오티드에 접근하는 것을 방지하는 것으로 생각된다. 다중 유형의 변형된 뉴클레오티드 및 구조적 서열이 단독으로 및 서로 조합되어 둘 다 3' 말단에 첨가되었을 때 mRNA에 개선된 안정성을 부여하여, 변형된 mRNA가 RNase-매개 분해에 더 강한 저항성을 갖게 하였으며, 이는 대조군 mRNA에 비해 이들 변형된 mRNA로부터 증가된 단백질 생산을 초래하였다. 이들 결과는 엑소뉴클레아제 활성을 방해하기 위해 mRNA의 폴리-A 테일을 변형하는 이러한 접근법이 변형된 mRNA의 생산에 광범위한 유용성을 제공한다는 것을 나타낸다. 추가적으로, 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA는 선형 mRNA의 말단 단부를 라이게이션하여 원형 mRNA를 생산함으로써 원형화될 수 있다. mRNA의 안정성을 개선하기 위한 본원에 기재된 기술은 또한 비-코딩 RNA의 안정성을 개선하는데 적합할 수 있는데, 그 이유는 비-코딩 RNA가 또한 3' 엑소뉴클레아제 활성에 취약하기 때문이다.

[0007] 따라서, 본 개시내용은 일부 측면에서 하기를 포함하는 변형된 mRNA로서:

[0008] (i) 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 (ORF); 및

[0009] (ii) 폴리-A 영역,

[0010] 여기서 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 여기서 폴리-A 영역의 마지막 10개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드인

[0011] 변형된 mRNA를 제공한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 25개 이상의 아데노신 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다.

[0013] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 4개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다.

[0014] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 2개 이상의 연속 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드간 연결에 의해 연결된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상의 연속 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 2'-변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트-연결된 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택된 변형된 뉴클레오티드이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 3개 이상의 변형된 뉴클레오티드는 폴리-A 영역의 3' 말단에 위치된 연속 뉴클레오티드이다.

[0017] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 6개 이상의 연속 뉴클레오티드는 동일한 유형의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드간 변형을 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 10개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다.

[0019] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0021] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서

ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 원형 mRNA이고, 여기서 폴리-A 영역은 3' UTR과 5' UTR 사이에 있다.

[0023] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 변형된 mRNA로서:

[0024] (i) 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 (ORF);

[0025] (ii) 폴리-A 영역;

[0026] (iii) 2차 구조를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 구조적 서열의 하나 이상의 카피,

[0027] 여기서 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역에 대해 3'에 있고, 여기서 변형된 mRNA는 2차 구조를 포함하고, 여기서 2차 구조는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 것인

[0028] 변형된 mRNA를 제공한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 25개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역에 대해 3'에 있고, 여기서 변형된 mRNA는 2차 구조를 포함하고, 여기서 2차 구조는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서 ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있다.

[0031] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 원형 mRNA이고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 5' UTR 사이에 있다.

[0032] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0033] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0034] 일부 실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호(SEQ ID NO): 2의 핵산 서열을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0036] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0037] 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0039] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 텔로미어 반복 서열이다.

[0040] 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함한다.

[0041] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0042] 일부 실시양태에서, mRNA의 2차 구조는 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머이다.

[0043] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0044] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기는 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-

7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0046] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 변형된 당은 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 2' 변형은 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 변형된 포스페이트는 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0051] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0052] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0053] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0054] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0055] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0056] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0057] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0058] 일부 실시양태에서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 3' 말단 뉴클레오티드의 3' 위치에 히드록시를 포함하지 않는다.

[0059] 일부 실시양태에서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 역전된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0060] 일부 실시양태에서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함한다.

[0061] 일부 실시양태에서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘을 포함한다.

[0062] 일부 실시양태에서, mRNA는 펩티드-결합 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드-결합 서열은 폴리-A 결합 단백질 (PABP)-결합 서열이다.

[0063] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오시드는 상이한 구조를 포함한다.

[0064] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0065] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 아데노신 뉴클레오티드이다.

[0067] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 선형 mRNA이고, 여기서 선형 mRNA는 5' 캡을 포함한다.

[0068] 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 포함한다.

[0069] 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 변형된 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 추가로 포함한다.

[0070] 일부 실시양태에서, 5' 캡은 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트는 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐메틸렌비스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트이다.

[0072] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 5' UTR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 ORF를 포함한다.

[0073] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 변형된 비-코딩 RNA로서:

[0074] (i) 비-코딩 RNA 서열; 및

[0075] (ii) 폴리-A 영역,

[0076] 여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA 서열에 대해 3'에 있고 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 여기서 폴리-A 영역의 마지막 10개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드인

[0077] 변형된 비-코딩 RNA를 제공한다.

[0078] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 25개 이상의 아데노신 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이고, 여기서 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다.

[0079] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 4개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다.

[0080] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 2개 이상의 연속 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드간 연결에 의해 연결된다.

[0081] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상의 연속 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 2'-변형된 뉴클레오티드, 및 포스포로티오에이트-연결된 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택된 변형된 뉴클레오티드이다.

[0082] 일부 실시양태에서, 3개 이상의 변형된 뉴클레오티드는 폴리-A 영역의 3' 말단에 위치된 연속 뉴클레오티드이다.

[0083] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 6개 이상의 연속 뉴클레오티드는 동일한 유형의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드간 변형을 포함한다.

[0084] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0085] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0086] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 원형 비-코딩 RNA이고, 여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA 서열에 대해 5'에 있다.

[0087] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 2차 구조를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 추가로 포함하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역에 대해 3'에 있고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 2차 구조를 포함하고, 여기서 2차 구조는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 원형 mRNA이고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 비-코딩 RNA 서열 사이에 있다.

[0089] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0090] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0091] 일부 실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 포함한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0094] 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함한다.

[0095] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0096] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 텔로미어 반복 서열이다.

[0097] 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함한다.

[0098] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0099] 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 2차 구조는 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머이다.

[0100] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다.

[0101] 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기는 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-

우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0102] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, 변형된 당은 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0104] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 2' 변형은 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다.

[0107] 일부 실시양태에서, 변형된 포스페이트는 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0108] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 3' 말단 뉴클레오티드의 3' 위치에 히드록시를 포함하지 않는다.

[0116] 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 역전된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0117] 일부 실시양태에서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함한다.

[0118] 일부 실시양태에서, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘을 포함한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오시드는 상이한 구조를 포함한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0121] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0122] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 아데노신 뉴클레오티드이다.

[0123] 일부 측면에서, 본 개시내용은 변형된 mRNA를 생산하는 방법으로서, 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 제1 RNA를 RNA 리가제의 존재 하에 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 테일링 핵산에 라이게이션하는 것을 포함하며, 이로써 RNA 리가제는 RNA의 3' 뉴클레오티드와 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 변형된 mRNA를 생산하는 것인 방법을 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서 ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있다.

[0125] 일부 실시양태에서, 방법은 변형된 mRNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 mRNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 5' UTR에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 폴리-A 영역에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 mRNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 원형 mRNA의 3' UTR과 5' UTR 사이에 있다.

[0126] 일부 실시양태에서, 방법은 하기 단계를 추가로 포함하며:

[0127] (i) 변형된 mRNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

[0128] (ii) 변형된 mRNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 mRNA를 생산하는 단계; 및

[0129] (iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 mRNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

[0130] 이로써 원형화 리가제는 변형된 mRNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 mRNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 mRNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 3' UTR과 5' UTR 사이에 있다.

[0131] 일부 측면에서, 본 개시내용은 변형된 mRNA를 생산하는 방법으로서, 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 RNA를 RNA 리가제의 존재 하에 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 테일링 핵산에 라이게이션하는 것을 포함하며, 이로써 리가제는 RNA의 3' 뉴클레오티드와 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 변형된 mRNA를 생산하는 것인 방법을 제공한다.

[0132] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함하고, 여기서 ORF는 5' UTR과 3' UTR 사이에 있고, 여기서 3' UTR은 ORF와 폴리-A 영역 사이에 있고, 여기서 폴리-A 영역은 3' UTR과 구조적 서열의 하나 이상의 카피 사이에 있다.

[0133] 일부 실시양태에서, 방법은 변형된 mRNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 mRNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 5' UTR에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 mRNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 원형 mRNA의 폴리-A 영역과 5' UTR 사이에 있다.

[0134] 일부 실시양태에서, 방법은 하기 단계를 추가로 포함하며:

[0135] (i) 변형된 mRNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

[0136] (ii) 변형된 mRNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 mRNA를 생산하는 단계; 및

[0137] (iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 mRNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

[0138] 이로써 원형화 리가제는 변형된 mRNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 mRNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 mRNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 3' UTR과 5' UTR 사이에 있다.

[0139] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 스캐폴드 핵산의 존재 하에 원형화되고, 여기서 스캐폴드 핵산은 변형된 mRNA와 혼성화할 수 있는 핵산이고, 여기서 변형된 mRNA는 스캐폴드 핵산에 결합될 때 원형 2차 구조를 형성한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 스캐폴드 핵산은 하기를 포함하며:

[0141] (a) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제1 혼성화 서열, 여기서 제1 혼성화 서열은 변형된 mRNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드에 상보적임; 및

[0142] (b) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제2 혼성화 서열, 여기서 제2 혼성화 서열은 변형된 mRNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드에 상보적임;

[0143] 여기서 변형된 mRNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드는 제1 혼성화 서열과 혼성화하고, 변형된 mRNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드는 제2 혼성화 서열과 혼성화한다.

[0144] 일부 실시양태에서, 제1 혼성화 서열의 마지막 뉴클레오티드 및 제2 혼성화 서열의 제1 뉴클레오티드는 스캐폴드 핵산에서 인접하고 임의의 다른 뉴클레오티드에 의해 분리되지 않는다.

[0145] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 하기를 포함하며:

[0146] (i) 오픈 리딩 프레임에 대해 5'에 있는 제1 자기-혼성화 서열;

[0147] (ii) 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있는 제2 자기-혼성화 서열;

[0148] (iii) 제1 자기-혼성화 서열에 대해 5'에 있는 제1 비-혼성화 서열; 및

[0149] (iv) 제2 자기-혼성화 서열에 대해 3'에 있는 제2 비-혼성화 서열,

[0150] 여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 있고,

[0151] 여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 없다.

[0152] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 자기-혼성화 서열의 혼성화는 변형된 mRNA의 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드가 100 Å 미만의 거리에 의해 분리되는 2차 구조를 형성한다.

[0153] 일부 실시양태에서, 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드는 90 Å 미만, 80 Å 미만, 70 Å 미만, 60 Å 미만, 50 Å 미만, 40 Å 미만, 30 Å 미만, 20 Å 미만 또는 10 Å 미만의 거리에 의해 분리된다.

[0154] 일부 실시양태에서, 원형화 리가제는 T4 RNA 리가제이다.

[0155] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0156] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0157] 일부 실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 포함한다.

[0158] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0159] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0160] 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함한다.

[0161] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0162] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 텔로미어 반복 서열이다.

[0163] 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함한다.

[0164] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하

는 압타머 서열이고, 여기서 압타머는 표적 분자에 결합할 수 있는 2차 구조이다.

[0166] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0167] 일부 실시양태에서, RNA의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

[0168] 여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 기를 포함하고;

[0169] 여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

[0170] 여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 기를 포함하지 않는다.

[0171] 일부 실시양태에서, RNA의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 히드록실 기를 포함하지 않고;

[0172] 여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

[0173] 여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 히드록실 기를 포함하고;

[0174] 여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

[0175] 여기서 RNA 리가제는 RtcB 리가제이다.

[0176] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0177] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0178] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기는 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0180] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다.

[0181] 일부 실시양태에서, 변형된 당은 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0182] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다.

[0183] 일부 실시양태에서, 2' 변형은 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0184] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다.

[0185] 일부 실시양태에서, 변형된 포스페이트는 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0186] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0187] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0188] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0189] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0190] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0191] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0192] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0193] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함한다.

[0194] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오티드는 상이한 구조를 포함한다.

[0195] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 아데노신 뉴클레오티드이다.

[0196] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0197] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0198] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 선형 mRNA이고, 여기서 선형 mRNA는 5' 캡을 포함한다.

[0199] 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 포함한다.

[0200] 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 변형된 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 추가로 포함한다.

[0201] 일부 실시양태에서, 5' 캡은 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함한다.

[0202] 일부 실시양태에서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트는 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐메틸렌비

스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트이다.

[0203] 일부 실시양태에서, RNA 리가제는 T4 RNA 리가제이다.

[0204] 일부 측면에서, 본 개시내용은 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법으로서, 비-코딩 RNA 서열을 포함하는 제1 RNA를 RNA 리가제의 존재 하에 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 테일링 핵산에 라이게이션하는 것을 포함하며, 이로써 RNA 리가제는 RNA의 3' 뉴클레오티드와 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 것인 방법을 제공한다.

[0205] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 비-코딩 RNA 서열에 대해 3'에 있는 폴리-A 영역을 포함한다.

[0206] 일부 실시양태에서, 방법은 변형된 비-코딩 RNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 비-코딩 RNA 서열에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 폴리-A 영역에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA의 3'와 5' 뉴클레오티드 사이에 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 방법은 하기 단계를 추가로 포함하며:

[0208] (i) 변형된 비-코딩 RNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

[0209] (ii) 변형된 비-코딩 RNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 단계; 및

[0210] (iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 비-코딩 RNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

[0211] 이로써 원형화 리가제는 변형된 비-코딩 RNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 비-코딩 RNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA의 3'와 5' 뉴클레오티드 사이에 있다.

[0212] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 추가로 포함한다.

[0213] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 비-코딩 RNA 서열과 구조적 서열의 하나 이상의 카피 사이에 있는 폴리-A 영역을 포함한다.

[0214] 일부 실시양태에서, 방법은 변형된 비-코딩 RNA를 리보자임의 존재 하에 원형화하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 3' 인트론 및 5' 인트론을 포함하고, 여기서 3' 인트론은 비-코딩 RNA 서열에 대해 5'에 있고, 여기서 5' 인트론은 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 대해 3'에 있으며, 이로써 리보자임은 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드와 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 5' 인트론 또는 3' 인트론을 포함하지 않는 원형 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 원형 비-코딩 RNA의 비-코딩 RNA 서열 사이에 있다.

[0215] 일부 실시양태에서, 방법은 하기 단계를 추가로 포함하며:

[0216] (i) 변형된 비-코딩 RNA의 제1 뉴클레오티드에 5' 말단 포스페이트 기를 도입하는 단계;

[0217] (ii) 변형된 비-코딩 RNA의 하나 이상의 3' 말단 뉴클레오티드를 절단하여 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 단계; 및

[0218] (iii) 단계 (ii)에서 생산된 변형된 비-코딩 RNA를 원형화 리가제의 존재 하에 원형화하는 단계;

[0219] 이로써 원형화 리가제는 변형된 비-코딩 RNA의 3' 뉴클레오티드와 변형된 비-코딩 RNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 원형 변형된 비-코딩 RNA를 생산하고, 여기서 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 비-코딩 RNA 서열 사이에 있다.

[0220] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 스캐폴드 핵산의 존재 하에 원형화되고, 여기서 스캐폴드 핵산은 변형된 비-코딩 RNA와 혼성화할 수 있는 핵산이고, 여기서 변형된 비-코딩 RNA는 스캐폴드 핵산에 결합될 때 원형 2차 구조를 형성한다.

[0221] 일부 실시양태에서, 스캐폴드 핵산은 하기를 포함하며:

[0222] (a) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제1 혼성화 서열, 여기서 제1 혼성화 서열은 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드에 상보적임; 및

[0223] (b) 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 제2 혼성화 서열, 여기서 제2 혼성화 서열은 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드에 상보적임;

[0224] 여기서 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드는 제1 혼성화 서열과 혼성화하고, 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드는 제2 혼성화 서열과 혼성화한다.

[0225] 일부 실시양태에서, 제1 혼성화 서열의 마지막 뉴클레오티드 및 제2 혼성화 서열의 제1 뉴클레오티드는 스캐폴드 핵산에서 인접하고 임의의 다른 뉴클레오티드에 의해 분리되지 않는다.

[0226] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 하기를 포함하며:

[0227] (i) 오픈 리딩 프레임에 대해 5'에 있는 제1 자기-혼성화 서열;

[0228] (ii) 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있는 제2 자기-혼성화 서열;

[0229] (iii) 제1 자기-혼성화 서열에 대해 5'에 있는 제1 비-혼성화 서열; 및

[0230] (iv) 제2 자기-혼성화 서열에 대해 3'에 있는 제2 비-혼성화 서열,

[0231] 여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 있고, 여기서 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 없다.

[0232] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 자기-혼성화 서열의 혼성화는 변형된 비-코딩 RNA의 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드가 100 Å 미만의 거리에 의해 분리되는 2차 구조를 형성한다.

[0233] 일부 실시양태에서, 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드는 90 Å 미만, 80 Å 미만, 70 Å 미만, 60 Å 미만, 50 Å 미만, 40 Å 미만, 30 Å 미만, 20 Å 미만 또는 10 Å 미만의 거리에 의해 분리된다.

[0234] 일부 실시양태에서, 원형화 리가제는 T4 RNA 리가제이다.

[0235] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0236] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0237] 일부 실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 포함한다.

[0238] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0239] 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스는 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다.

[0240] 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함한다.

[0241] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 3의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0242] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 텔로미어 반복 서열이다.

[0243] 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4의 핵산 서열을 포함한다.

[0244] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0245] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 압타머 서열이고, 여기서 압타머는 표적 분자에 결합할 수 있는 2차 구조이다.

[0246] 일부 실시양태에서, RNA의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

[0247] 여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 기를 포함하고;

[0248] 여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

[0249] 여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 기를 포함하지 않는다.

[0250] 일부 실시양태에서, RNA의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 히드록실 기를 포함하지 않고;

[0251] 여기서 RNA의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 포스페이트 기를 포함하고;

[0252] 여기서 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 히드록실 기를 포함하고;

[0253] 여기서 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고;

[0254] 여기서 RNA 리가제는 RtcB 리가제이다.

[0255] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0256] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0257] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다.

[0258] 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기는 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0259] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다.

[0260] 일부 실시양태에서, 변형된 당은 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0261] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다.

[0262] 일부 실시양태에서, 2' 변형은 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0263] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다.

[0264] 일부 실시양태에서, 변형된 포스페이트는 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0265] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0266] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0267] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0268] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0269] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0270] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0271] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 23개의 데옥시리보스 당을 포함한다.

[0272] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 디데옥시우리딘 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함한다.

[0273] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 제1 변형된 뉴클레오티드 및 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 변형된 뉴클레오티드는 상이한 구조를 포함한다.

[0274] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 아데노신 뉴클레오티드이다.

[0275] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0276] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0277] 일부 실시양태에서, RNA 리가제는 T4 RNA 리가제이다.

[0278] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 의해 생산된 변형된 mRNA를 제공한다.

[0279] 일부 실시양태에서, mRNA는 항원 또는 치료용 단백질을 코딩한다.

[0280] 일부 실시양태에서, 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원생동물 항원 또는 진균 항원이다.

[0281] 일부 실시양태에서, 치료용 단백질은 효소, 전사 인자, 세포 표면 수용체, 성장 인자 또는 응고 인자이다.

[0282] 일부 실시양태에서, 오픈 리딩 프레임은 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0283] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 포유동물 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0284] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0285] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 의해 생산된 변형된 비-코딩 RNA를 제공한다.

[0286] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 가이드 RNA (gRNA), 프라임 편집 가이드 RNA (pegRNA) 또는 긴 비-코딩 RNA (lncRNA)이다.

[0287] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA 중 어느 하나를 포함하는 지질 나노입자를 제공한다.

[0288] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA 중 어느 하나를 포함하는 세포를 제공한다.

[0289] 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다.

[0290] 일부 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다.

[0291] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자 또는 세포 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0292] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자 또는 세포 중 어느 하나, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0293] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA 또는 지질 나노입자 중 어느 하나를 세포에 도입하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0294] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자, 세포 또는 조성물 중 어느 하나를 대상체에 도입하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0295] 일부 측면에서, 본 개시내용은 대상체를 백신접종하는 방법으로서, 본원에 제공된 변형된 mRNA, 지질 나노입자, 세포 또는 조성물 중 어느 하나를 대상체에 도입하는 것을 포함하고, 여기서 mRNA의 오픈 리딩 프레임은 항원을 코딩하는 것인 방법을 제공한다.

[0296] 일부 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 효소를 대체하는 방법으로서, 상본원에 제공된 변형된 mRNA, 지질 나노입자, 세포 또는 조성물 중 어느 하나를 대상체에 도입하고, 여기서 mRNA의 오픈 리딩 프레임은 효소를 코딩하는 것인 방법을 제공한다.

[0297] 일부 측면에서, 본 개시내용은 대상체의 게놈을 변형하는 방법으로서, 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA 또는 조성물 중 어느 하나를 대상체에 도입하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0298] 일부 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다.

[0299] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0300] 일부 측면에서, 본 개시내용은 약제로서 사용하기 위한, 본원에 제공된 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자, 세포 또는 조성물 중 어느 하나를 제공한다.

[0301] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 RNA 및 테일링 핵산을 포함하는 키트를 제공한다.

[0302] 일부 실시양태에서, 키트는 RNA 리가제를 추가로 포함한다.

[0303] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 제약 조성물 중 어느 하나 및 전달 디바이스를 포함하는 키트를 제공한다.

[0304] 일부 측면에서, 본 개시내용은 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 정제하는 방법으로서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 혼합물을 정제 배지와 접촉시키며, 여기서 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 정제 배지와 상호작용하여 변형된 RNA-정제 배지 접합체를 형성하는 것인 단계, 혼합물로부터 변형된 RNA-정제 배지 접합체를 분리하는 단계, 및 변형된 RNA-정제 배지 접합체로부터 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 용매로 용리시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0305] 일부 실시양태에서, 정제 배지는 상자성 비드를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0306] 도 1은 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 mRNA를 제조하는 방법에서 사용될 수 있는, m^6Am, m^1A, 슈도우리딘, m^6A, m^7G, ac^4C, Nm 및 m^5C를 포함하는 자연 발생 변형된 뉴클레오시드의 구조를 보여준다.

도 2a는 변형된 선형 mRNA (설계 A) 및 변형된 원형 mRNA (설계 B)의 설계를 보여준다. 채워진 원은 단백질 생산을 개선하는 오픈 리딩 프레임의 변형된 뉴클레오티드를 나타낸다. 열린 원은 RNA 안정성을 개선하는 폴리(A) 영역의 변형된 뉴클레오티드를 나타낸다. 도 2b는 5'에서 3' 순서로 5' UTR, 오픈 리딩 프레임, 3' UTR 및

폴리-A 테일을 함유하는 전형적인 mRNA의 요소 배열을 보여준다.

도 3은 비변형된 mRNA에 비해 변형된 mRNA로부터의 단백질 생산의 상대적 효율에 관한 데이터를 보여준다. 녹색 형광 단백질 (GFP)을 코딩하는 변형된 mRNA를 합성하고 폴리아데닐화하여 폴리(A) 테일을 첨가하였으며, 폴리아데닐화 반응은 표시된 바와 같이 제한된 양 (5% 또는 25%)의 변형된 아데노신 트리포스페이트를 포함하였다. mCherry를 코딩하는 비변형된 mRNA를 합성하고, 정준 뉴클레오티드를 사용하여 폴리아데닐화하였다. 변형된 및 비변형된 mRNA의 혼합물을 세포에 형질감염시켰고, 형질감염 후 1-3일차에 GFP/mCherry의 비율을 측정하였다.

도 4a는 코딩 서열을 변경되지 않은 상태로 두는 특이적 폴리(A) 테일 변형에 사용된 실험 계획의 개요를 보여준다. 세포성 엑소뉴클레아제는 폴리(A) 테일을 탈아데닐화하지만, 폴리(A) 폴리머라제에 의한 변형된 뉴클레오시드 트리포스페이트 (NTP)의 무작위 혼입은 mRNA의 3' 단부의 분해를 늦출 수 있다. (서열식별번호: 1) 도 4b는 mRNA의 3' 단부에 화학적으로 정의된 구조를 설치하는데 사용된 실험 계획의 개요를 보여준다. 정의된 조성을 갖는 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드는 주형-코딩된 폴리(A) 서열을 함유하는 GFP-코딩 mRNA의 3' 단부에 라이게이션되었다. 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드의 라이게이션은 비천연 뉴클레오티드간 연결의 생성 및 정의된 양의 변형된 뉴클레오티드의 각 mRNA의 단부로의 혼입을 허용하였다.

도 5는 mRNA 둘 다의 HeLa 세포로의 형질감염 후 24, 48 및 72시간에 비변형된 mRNA에 의해 코딩된 mCherry의 존재비로 정규화된 변형된 mRNA에 의해 코딩된 GFP의 존재비의 바플롯을 보여준다. 평균 +/- SD. P 값은 그래프패드 프리즘 7.01에 의해 일관된 SD를 가정하지 않고 비쌍체 t-테스트로 계산되었다. *P < 0.01, **P < 0.001, ***P < 0.0001, ****P < 0.00001.

도 6a는 일부 RNA 또는 DNA 뉴클레오티드에 라이게이션된 mRNA에 대한 RNase H 활성을 보여주는 대표적인 RNase H 검정을 보여준다. 시험관내 전사된 mRNA에 대해 라이게이션을 수행한 후, 방법 섹션에 기재된 바와 같이 AMPure 비드 클린업에 의해 정제하였다. 모든 샘플을 별도의 겔에서 무결성에 대해 특징화하였다. 겔에 표시된 샘플을 모두 방법 섹션에 기재된 RNase H 검정 프로토콜을 사용하여 처리하였다. 표시된 래더는 400 ng의 센추리-플러스 RNA 마커이다. 도 6b는 라이게이션에서 기질로서 사용된 선택된 RNA/DNA 올리고에 대해 수행된 이. 콜라이(*E. coli*) RNase R 소화 검정을 보여준다. 쇄-종결 뉴클레오티드는 RNase R 소화를 방지하지 않지만, 23개의 데옥시아데노신 뉴클레오티드 및 말단 디데옥시시티딘을 함유하는 mRNA는 RNase R 분해에 대해 강력한 안정성을 나타내었다. 래더는 좌측에 나열된 길이를 갖는 ssDNA 프라이머를 함유한다.

도 7a는 라이게이션에 사용된 합성 올리고의 화학적 변형 및 구조의 개요와 함께 메신저-올리고뉴클레오티드 접합된 RNA (mocRNA) 합성의 개략도를 보여준다. 정의된 조성을 갖는 화학적으로 합성된 올리고를 주형-코딩된 60 nt 폴리(A) 서열 (GFP-60A)을 함유하는 인간화 몬스터 녹색 형광 단백질 (GFP) mRNA의 3' 단부에 라이게이션하여 번역가능한 mocRNA를 생산하였다. 도 7b는 mocRNA의 라이게이션 반응 효율을 정량화하는데 사용된 RNase H 검정의 개략도를 보여준다. 라이게이션에 사용된 올리고뉴클레오티드는 30 nt였다. DNA 프로브는 프로브의 5' 단부가 폴리(A) 테일의 106 nt 상류에 있도록 mRNA의 3' UTR을 표적화한다. 이는 5' mRNA 단편 (824 nt) 및 3' mRNA 단편을 생성한다 (비라이게이션된 mRNA의 경우 60 nt 폴리(A) 테일을 포함하는 166 nt; 라이게이션된 mRNA의 경우 ~200 nt). 3' 절단 생성물은 라이게이션 시 변성 겔에서 밴드 이동을 나타낸다. M, 마커, 센추리-플러스 RNA 마커.

도 8a는 형질감염 후 24시간, 48시간 및 72시간에 mCherry 형광 신호 및 모의 라이게이션 대조군으로 정규화된 GFP 형광 신호의 바플롯을 보여준다. 회색 파선, y = 1. 평균 ± s.d, 각각의 막대 아래에 표시된 n 관측 시야 (FOV). 각 조건은 적어도 3개의 생물학적 복제를 가졌고, 그 중 4개의 FOV가 각각으로부터 이미지화되었다. P 값은 샘플 29rA_ddC와의 다중 비교를 통해 보통의 이원 ANOVA (던넷(Dunnett) 다중 비교 테스트, 시점에 걸친 평균의 비교)에 의해 계산되었다. ***P < 0.001, ****P < 0.0001. 도 8b는 동일한 공초점 이미지화 설정 하에 표시된 RNA 구축물의 형질감염 후 48시간에 HeLa 세포에서 mCherry 형광, GFP 형광 및 훽스트 핵 염색의 대표적인 별도의 및 오버레이 이미지를 보여준다. 스케일 바, 25 μm. 도 8c는 형질감염 후 48시간에 벌크 GFP/mCherry RNA 비율 (RT-qPCR, 평균 ± s.e.m., 또한 표 7 참조) 및 벌크 GFP/mCherry 형광 비율 (평균 ± s.d.)의 평균의 상관관계를 보여준다. 도 8d는 동일한 공초점 이미지화 설정 하에 획득된 표시된 mRNA 벡터로 형질감염 후 48시간에 고정된 HeLa 세포에서 제자리 GFP RNA 및 mCherry RNA를 나타내는 STARmap 앰플리콘의 대표적인 이미지를 보여준다. 핵은 DAPI 염색으로 표시된다. 공동-편재화된 GFP 및 mCherry 앰플리콘 (삽도; 우측 칼럼에 표시됨)은 잠재적으로 지질 형질감염 소포 (백색 화살표)였으며, 그러므로 RNA 종의 하류 STARmap 정량화로부터 배제되었다.

도 9a는 태그부착되지 않은 루시퍼라제와 비교하여 반딧불이 루시퍼라제-데그론의 동역학적 특징화를 보여준다. 각 단백질을 코딩하는 mRNA를 HeLa 세포에 형질감염시키고, 이를 시간 = 0에 시클로헥시미드 (CHX)로 처리하였다. 생성된 상대적 발광 유닛 (RLU)을 CHX 처리 후 2시간 간격으로 세포에서 측정하여 단백질에 대한 붕괴 반감기를 추정하였다. 도 9b는 모의 라이게이션 신호로 정규화된 반딧불이 루시퍼라제-데그론 RLU를 보여준다 (형질감염 후 8시간). 각 시점의 상응하는 정규화된 반딧불이 RLU 값은 각 시점의 모의 라이게이션과 비교하여 보통의 일원 ANOVA 테스트를 사용하여 유의성에 대해 테스트되었다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. 도 9c는 mocRNA-형질감염된 HeLa 세포로부터 24, 48 및 72시간 시점에 촬영된 대표적인 STARmap 이미지 (채널 오버레이)를 보여준다. 이미지는 각 관측 시야로부터 수득된 Z-스택으로부터 단일 슬라이스로서 촬영되었다. 모의 라이게이션, 24시간 샘플의 백색 화살표는 대표적인 형질감염 소포 (큰 크기 및 중첩 GFP/mCherry 신호의 영역)를 보여준다. 회색 반점은 GFP mRNA 또는 mCherry mRNA를 나타낸다. 핵은 DAPI 염색에 의해 표시된다. 이미지 대비는 이미지제이(ImageJ)의 이미지 간에 동일하게 조정되었다. 도 9d는 mocRNA-형질감염된 HeLa 세포에서의 STARmap mRNA 카운트 및 정량화의 시간 경과를 보여준다. GFP 및 mCherry mRNA 종은 큰 응집체 (즉, 형질감염 소포)를 배제하고 카운트된다. 각 실험 조건에 대해 3개의 생물학적 복제를 수행하며, 각 샘플로부터 4개의 FOV를 취한다. 바이올린 플롯 요소: 라인, 하부/상부 인접 값; 막대, 사분위수간 범위; 백색 도트, 중앙값. 단일 세포 번호는 상응하는 분포 위에 나열되어 있다. 통계 테스트는 각각의 시점에서 29rA_ddC와 비교와 함께 웰치 t 테스트를 사용하여 수행된다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

도 10a는 변형된 뉴클레오티드 트리포스페이트 (NTP)의 혼입을 통해 mRNA 엑소- 및 엔도뉴클레아제 저항성을 증가시키는 일반적인 화학적 전략의 개략도를 보여준다. X, 변형된 뉴클레오시드. 도 10b는 E-PAP 및 IVT 스파이크인 반응에 사용된 아데노신-5'-O(1-티오트리포스페이트) (S-ATP)의 화학 구조를 보여준다. RNA에 혼입될 때 알파 포스페이트의 황 변형은 포스포로티오에이트 (PS) 연결과 동일하다 (도 7b에 표시). 도 10c는 포스포로티오에이트 (PS) 연결을 mRNA에 혼입하는 상이한 전략을 도시하는 개략도를 보여준다. 아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트) (S-ATP)의 RNA 폴리머라제 (즉, 공동-전사) 및 폴리(A) 폴리머라제 혼입을 사용하여 mRNA에 뉴클레아제-저항성 PS 연결을 설치하였다. 삽도: mRNA의 길이 분포에 대한 각 변형 전략의 효과를 보여주는 변성 겔. 회색 A: 화학적으로 변형된 아데노신, 검은색 A: 비변형된 아데노신. M, 마커, 센추리-플러스 RNA 마커. 도 10d는 HeLa 세포로의 형질감염 후 각 시점 (24시간, 48시간 및 72시간)에서 mCherry 및 비처리된 mRNA 대조군의 평균으로 정규화된, 변형된 GFP mRNA 생성된 다양한 전략으로부터의 GFP 단백질 존재비의 바플롯을 보여준다. 평균 ± s.d.; n, 각각의 막대 아래에 표시된 FOV 수. 각 조건은 적어도 3개의 생물학적 복제로 이루어졌으며, 그 중 4개의 FOV가 각각으로부터 이미지화되었다. 파선: y = 1. P 값은 도면에서 특정되지 않은 한 비처리된 mRNA와의 다중 비교를 통해 보통의 이원 ANOVA (던넷 다중 비교 테스트, 시점에 걸친 평균의 비교)에 의해 계산된다. **P < 0.01, ****P < 0.0001.

도 11a는 형질감염 후 24시간 및 48시간에 뉴런에서 mCherry 및 "비처리된" 대조군으로 정규화된 GFP 단백질 존재비의 바플롯을 보여준다. 평균 ± s.d., n (FOV) = 18. 각 조건은 적어도 3개의 생물학적 복제로 이루어졌으며, 그 중 6개의 FOV/스택이 각각으로부터 이미지화되었다. 회색 파선: y = 1. P 값은 각 별도의 시점에 대해 비처리된 샘플과 비교하여 보통의 이원 ANOVA (던넷 다중 비교 테스트)를 사용하여 계산되었다. ****P < 0.0001. 도 11b는 동일한 공초점 현미경검사 설정 하에 이미지화된 형질감염 후 24시간에 뉴런에서 GFP 및 mCherry 형광의 대표적인 이미지를 보여준다. 핵은 훽스트 염색에 의해 표시된다. 스케일 바, 25 μm.

도 12는 IVT GFP-60A mRNA 및 합성 올리고의 라이게이션에 의해 제조된 mocRNA 벡터를 보여주는 대표적인 RNase H 검정을 보여준다. DNA 프로브는 프로브의 5' 단부가 폴리(A) 테일의 106 nt 상류에 있도록 mRNA의 3' UTR을 표적화한다. 이는 5' mRNA 단편 (824 nt) 및 3' mRNA 단편을 생성한다 (60 nt 폴리(A)를 포함하는 166 nt, 레인 1 & 2). 3' 절단 생성물은 라이게이션 시 변성 겔에서 밴드 이동을 나타낸다. M, 센추리-플러스 RNA 마커인 마커. 라이게이션된 및 비라이게이션된 테일은 이에 따라 라벨링된다.

도 13a는 표시된 mRNA 벡터로 형질감염된 후 24시간, 48시간 및 72시간에 HeLa 세포에서 GFP 및 mCherry 형광 비율 (ln[1 + 비율])의 단일-세포 정량화의 바이올린 플롯을 보여준다. 바이올린 플롯 요소, 라인, 하부/상부 인접 값; 막대, 사분위수간 범위; 백색 도트, 중앙값. 괄호 안에 표시된 n. P 값은 대조군으로서 샘플 29rA_ddC와 비교하여 웰치 t 테스트 (비쌍체, 양측)에 의해 계산된다. **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. 도 13b는 리포펙타민-매개 형질감염 후 48시간에 HeLa 세포에서 GFP 및 mCherry RNA의 STARmap 특징화의 대표적인 이미지 스택 최대 투영을 보여준다. 리포펙타민-매개 소포에 포획된 GFP 및 mCherry mRNA 종은 중첩되어 나타나고 크고 병합된 초점을 형성하였다. 소포로부터 방출된 mRNA 종은 시토졸에서 개별 도트로서

나타났으며, 각각은 단일 mRNA 분자를 나타낸다. 스케일 바, 20 μm. 도 13c는 STARmap에 의해 정량화된 GFP/mCherry mRNA 카피 수 (앰플리콘)의 단일-세포 분석을 보여준다. 바이올린 플롯 요소: 라인, 하부/상부 인접 값; 막대, 사분위수간 범위; 백색 도트, 중앙값. 괄호 안의 세포 수. 회색 파선, 샘플 29rA_ddC의 중앙값. P 값은 대조군으로서 샘플 29rA_ddC와 비교하여 웰치 t 테스트 (비쌍체, 양측)에 의해 계산된다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. 도 13d는 형질감염 후 48시간에 단일-세포 GFP/mCherry RNA 비율 및 단일-세포 GFP/mCherry 형광 비율의 중앙값의 상관관계를 보여준다.

도 14a는 길이-조정된 PS+G4 올리고 (26rA_G4_C9orf72_RNA_6xSrG, 26rA_G4_C9orf72_DNA_6xSG, 및 26rA_G4_telo_DNA_6xSG)에 라이게이션된 GFP-60A mocRNA를 보여준다. mCherry mRNA 내부 대조군과 함께 GFP mocRNA의 HeLa 세포로의 형질감염 후 형광 시간 경과 측정을 수행하였다. 각 샘플에 대한 얻어진 GFP/mCherry 형광 값은 각 시점의 6xSr(AG)에 대한 평균 값에 대해 추가로 정규화되었다. 통계 테스트는 보통의 이원 ANOVA (던넷 다중 비교 테스트, 시점에 걸친 평균의 비교)를 사용하여 수행되었으며, 비교는 6xSr(AG)에 대해 수행되었다. ****P < 0.0001. 도 14b는 반딧불이-PEST mocRNA 구축물의 시험관내 번역을 보여준다. 토끼 망상적혈구 용해물은 비변형된 내부 레닐라(Renilla) 루시퍼라제 대조군과 함께 반딧불이-PEST mocRNA 구축물을 위한 시험관내 번역 시스템으로서 사용되었다. 반딧불이 RLU / 레닐라 RLU는 상이한 mocRNA에 의해 부여되는 번역 증진의 가능한 모드를 비교하기 위해 각 반응으로부터 측정되었다. 통계 테스트는 "모의 라이게이션" 샘플과의 비교를 통해 일원 ANOVA (비파라메트릭, 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis), 던(Dunn) 다중 비교 테스트)를 사용하여 수행되었다. *P < 0.05. 도 14c는 mocRNA 구축물을 코딩하는 반딧불이-데그론의 동역학적 특징화를 보여준다. 레닐라 (내부 대조군) RLU는 형질감염 후 8시간에 모의 라이게이션 값으로 정규화되었다. 각 시점의 상응하는 mocRNA 값은 모의 라이게이션과 비교하여 일원 ANOVA (크루스칼-왈리스 테스트, 던 다중 비교 테스트)를 사용하여 유의성에 대해 테스트되었다. 내부 대조군 신호는 상이한 샘플 간에 일관된 것으로 나타났다.

도 15는 이. 콜라이 폴리(A) 폴리머라제 (E-PAP)에 의해 폴리(A) 테일링에 적용된 GFP mRNA를 보여주며, 다양한 양의 화학적으로 변형된 ATP 유도체가 스파이크인되었다. 테일-비변형된 mCherry 형질감염 대조군 (E-PAP 테일링된, 100% ATP)과 함께 테일-변형된 GFP mRNA를 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 막대는 각 상응하는 시점에서 100% ATP, E-PAP 테일링된 GFP mRNA 샘플의 평균에 의해 정규화된 GFP/mCherry 형광을 나타낸다. 백분율은 각 반응에서 변형된 및 비변형된 ATP 간에 사용된 상대적 몰비를 나타낸다. 화학적으로 변형된 GFP mRNA를 비변형된 mCherry mRNA와 함께 공동-형질감염시켰으며, 얻어진 GFP/mCherry 형광 비율을 HeLa 세포 배양에서 형질감염 후 24, 48 및 72시간에 측정하였다. ATP: 아데노신 5' 트리포스페이트; m6ATP: N6-메틸아데노신 5' 트리포스페이트; 2'-O-me ATP: 2' O-메틸아데노신-5'-트리포스페이트; S-ATP: 아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트); dATP: 2'-데옥시아데노신 5'-트리포스페이트; 아미노-dATP: 2'-아미노-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트. 평균 ± s.d. n = 4. 회색 파선: y = 1. P 값은 보통의 이원 ANOVA (던넷 다중 비교 테스트, 시점에 걸친 평균의 비교)에 의해 계산되며, E-PAP 테일링 (100% ATP)과의 비교를 수행하였다. ****P < 0.0001.

도 16a는 도 8의 공초점 현미경검사 이미지로부터 HeLa 세포 수의 정량화를 보여준다. 훽스트-염색된 핵을 셀프로파일러(CellProfiler)에서 세그먼트화하고, 각 mocRNA 조건 및 시점에 대해 각 관측 시야 (FOV)의 세포 수를 계산하였다. 세포 수는 모든 시점에서 모의 라이게이션 조건에 대한 평균 세포 수로 정규화되었다. 보통의 이원 ANOVA (던넷 다중 비교 테스트, 시점에 걸친 평균의 비교)를 사용하여 "라이게이션 없음" 샘플과의 비교를 수행하였다. *P < 0.05, **P < 0.01. 도 16b는 형질감염된 HeLa 세포에서 선천적 면역 반응의 RT-qPCR 정량화를 보여준다. 각 GFP-60A 라이게이션 구축물로 형질감염된 샘플에서 IFNB1 mRNA의 RT-qPCR은 인간 ACTB mRNA로 정규화되고, 모의 라이게이션 샘플에 대해 다시 정규화되었다. 값은 유의성 테스트 및 그래프 작성 전에 추가로 log10 변환되었다. 각 조건은 적어도 3개의 생물학적 복제로 이루어졌으며, 생물학적 샘플당 3개의 기술적 복제가 있다. (각 생물학적 조건에 대한) 3개의 기술적 복제의 평균은 개별 포인트로서 표시되므로 각 데이터 포인트는 특이적 생물학적 복제 (생물학적 복제의 평균 + s.e.m)에 상응한다. 비변형된 GFP mRNA는 N1-메틸슈도우리딘 치환이 없는 (즉, 100% 우리딘 함유) IVT hMGFP mRNA (E-PAP 폴리(A) 테일링된)를 지칭한다. Log10-정규화된 샘플은 웰치 t 테스트 (비쌍체, 양측, 파라메트릭)를 사용하여 유의성에 대해 분석되었다. 샘플은 쌍별 비교를 위해 29rA_ddC mocRNA라고 언급되었다. 각 조건 (n)에 사용된 생물학적 복제의 수는 상응하는 샘플 위의 괄호 안에 표시된다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. 도 16c는 mocRNA 형질감염으로부터 결정된 죽은 래트 피질 뉴런의 분획을 보여준다. 일차 래트 피질 뉴런 배양물을 250 ng mCherry mRNA 내부 대조군과 함께 250 ng GFP-60A mocRNA로 형질감염시켰다. 그 후, 훽스트를 사용하여 살아있는 핵 및 죽은 핵을 염색하고 NucRed Dead (647)를 사용하여 죽은 핵을 염색하여 형질감염 후 24- 또는 48-시간에 세포를 이미지화하였다. 각 형질감염 조건에서 총 핵에 대한 죽은 핵의 상대적 수를 계산하여 백분율 죽은 세포를 제공하였다. 50 ng에서의 폴리(I:C)를 독성에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 보통의 이원

ANOVA (던넷 다중 비교 테스트, 시점에 걸친 평균의 비교)를 사용하여 비교를 수행하였으며, 형질감염 전용 샘플과의 비교를 수행하였다. **P < 0.01.

도 17은 "모의 라이게이션" 샘플 값의 평균으로 정규화된 72-시간 반딧불이 RLU / 레닐라 RLU를 보여준다. n = 18인 29rA_ddC를 제외하고 각 조건에 대해 n = 9이다. 이는 3개의 생물학적 복제 x 3개의 기술적 복제 (생물학적 복제당), 또는 29rA_ddC의 경우 6개의 생물학적 복제 x 3개의 기술적 복제에 상응한다. 반딧불이 루시퍼라제-코딩 mRNA를 사용하여 MocRNA 구축물을 제조하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민 메신저맥스(LMRNA001)를 사용하여 반딧불이 루시퍼라제 mRNA (250 ng) 및 비라이게이션된 레닐라 루시퍼라제 mRNA (250 ng)를 HeLa 세포에 공동-형질감염시켰다. 6시간 인큐베이션 후 HeLa 세포를 재시딩하고, 프로메가(Promega) 이중-Glo 루시퍼라제 검정 시스템 (E2920)을 사용하여 형질감염 후 72시간에 발광을 측정하였다.

도 18a는 생체내 생물발광 이미지화의 실험 절차를 보여준다. 제조업체의 프로토콜에 따라 생체내-jetRNA (폴리플러스: 101000013)를 사용하여 비처리된 또는 6xSr(AG)_invdT 접합된 반딧불이 루시퍼라제 mRNA (2 μg)를 좌측 허벅지 또는 우측 허벅지에 근육내 주사하였다. mRNA 주사 후 6시간에 루시페린 (150 mg/kg, VivoGlo™)을 복강내 주사하였다. 15분 후, 생체내 생물발광 이미지화를 수행하였다. "ug"는 μg를 지칭한다. 도 18b는 생체내 생물발광이 3분의 노출 시간 하에 측정되었음을 보여준다. 비처리된 및 6xSr(AG)_invdT 접합된 반딧불이 루시퍼라제 mRNA의 주사 측면은 이미지의 하단에 표시된다. 도 18c는 비처리된 또는 6xSr(AG)_invdT 접합된 반딧불이 루시퍼라제 mRNA에 의해 생성된 생체내 생물발광의 통계적 결과를 보여준다. * p < 0.05. 쌍체 T-테스트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0307] 세포내 안정성을 개선하여 이에 의해 단백질 생산을 증진시키기 위한 mRNA의 폴리-A 테일에 있거나 이의 하류에 있는 변형된 뉴클레오티드 및/또는 구조적 특색을 갖는 변형된 mRNA가 본원에 제공된다. 또한, 테일링 핵산을 mRNA의 3' 말단에 라이게이션하여 라이게이션에 의해 생산된 변형된 mRNA의 3'에 정의된 수의 변형된 핵산 또는 구조적 서열을 도입함으로써 변형된 mRNA를 제조하는 방법이 제공된다. 추가적으로, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA 중 하나 이상을 포함하는 제약 조성물, 및 본원에 기재된 변형된 mRNA를 생산하기 위한 시약을 함유하는 키트를 제공한다. 통상적인 mRNA는 3' 단부에 다중 아데노신 뉴클레오티드를 갖는 폴리-A 테일을 포함하며, 이는 3' 뉴클레오티드를 제거하는 세포성 엑소뉴클레아제에 의해 분해될 수 있다. 엑소뉴클레아제가 폴리-A 테일을 제거하고 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오티드를 제거하기 시작하면, mRNA는 코딩된 단백질로 번역될 수 없다. 세포 내 mRNA 안정성의 일차 결정요인 중 하나는 폴리-A 테일을 분해하는데 필요한 시간이므로, 3' 엑소뉴클레아제 활성에 더 저항성이 있는 mRNA는 더 천천히 분해된다. 본 개시내용의 변형된 mRNA는 더 긴 반감기를 갖고, 그러므로 세포에서 더 안정적이다. 세포 내에서 mRNA가 더 안정적일수록 분해되는데 시간이 더 오래 걸리며, 그러므로 더 긴 반감기를 갖는 주어진 RNA 분자로부터 더 많은 단백질이 번역될 수 있다. mRNA의 핵염기, 당 및/또는 포스페이트 연결에 대한 하나 이상의 구조적 변화를 함유하는 변형된 뉴클레오티드는 3' 엑소뉴클레아제 활성을 방해하여 mRNA를 더욱 안정적으로 만들 수 있다. 그러나, 3' 엑소뉴클레아제를 억제하는 동일한 구조적 변형은 또한 폴리아데닐화 효소가 이를 폴리-A 테일에 혼입하는 능력을 방해할 수 있으며, 이는 통상적인 폴리아데닐화 방법을 통해 폴리-A 테일에 변형된 뉴클레오티드를 첨가하는 것을 방해할 수 있다. 놀랍게도, 기존에 존재하는 폴리-A 테일을 함유하는 mRNA의 3' 단부에 3개만큼 적은 변형된 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 라이게이션하는 것은 mRNA 안정성의 현저한 개선을 초래하였다. 엑소뉴클레아제가 3' 말단 뉴클레오티드에 접근하는 것을 방지하는 2차 구조를 형성할 수 있는 구조적 서열, 예컨대 G-쿼드러플렉스 또는 압타머를 함유하는 올리고뉴클레오티드의 라이게이션은 또한 이러한 2차 구조가 없는 RNA에 비해 mRNA 안정성을 현저히 개선하였다. 다중 부류의 변형된 뉴클레오티드 및 구조적 서열이 단독으로 및 서로 조합하여 둘 다 3' 말단에 첨가되었을 때 mRNA의 안정성을 증가시켰으며, 이는 mRNA의 폴리-A 테일을 변형하여 엑소뉴클레아제 활성을 방해하는 것이 변형된 mRNA의 생산의 광범위한 유용성을 제공한다는 것을 시사한다. 세포내 증가된 안정성을 가지며 그러므로 주어진 RNA 분자로부터 더 많은 코딩된 단백질을 생산하는 능력을 갖는 변형된 mRNA는 백신 및 다른 RNA-기반 요법, 예컨대 필수 효소, 응고 인자, 전사 인자 또는 세포 표면 수용체를 코딩하는 mRNA의 전달에서 사용하기에 유용하다.

[0308] 정의

[0309] 본원에서 사용된 바와 같은 "메신저 RNA" ("mRNA")는 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 및 폴리-A 영역을 포함하는 핵산을 지칭한다. mRNA는 또한 오픈 리딩 프레임에 대해 5' (상류)에 있는 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 오픈 리딩 프레임에 대해 3' (하류)에 있는 3' 비번역 영역을 포함할 수 있다.

[0310] 본원에서 사용된 바와 같은 "단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임"은 오픈 리딩 프레임이 번역될 때 단백질의 생산을 유발하는 코딩 서열을 포함하는 핵산 서열을 지칭한다. 핵산 서열은 RNA 서열일 수 있으며, 이 경우 RNA 서열의 번역은 단백질의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 생성한다. 핵산 서열은 DNA 서열일 수 있으며, 이 경우 RNA 폴리머라제가 DNA 서열을 사용하여 DNA 서열에 상보적인 RNA 서열을 포함하는 RNA 분자를 전사하고 RNA 서열의 번역이 단백질의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 생성할 때 단백질이 생성된다. 오픈 리딩 프레임은 전형적으로 출발 코돈, 예컨대 RNA 서열에서 AUG (DNA 서열에서 ATG)로 시작하고, 정지 코돈, 예컨대 RNA 서열에서 UAG, UAA 또는 UGA (DNA 서열에서 TAG, TAA 또는 TGA)로 끝나며, 출발 코돈의 G와 정지 코돈의 T 또는 U 사이의 염기 수는 3의 배수 (예를 들어, 3, 6, 9)이다.

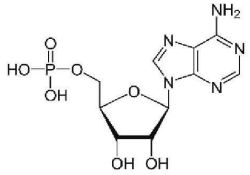
[0311] 번역될 수 있는 RNA 분자는 메신저 RNA 또는 mRNA로 지칭된다. DNA 또는 RNA 서열은 코돈을 통해 유전자를 코딩한다. 코돈은 DNA 또는 RNA와 같은 핵산 서열 내의 3개 뉴클레오티드 그룹을 지칭한다. 안티코돈은 제1 핵산의 코돈이 코돈 및 안티코돈의 염기 사이의 수소 결합을 통해 제2 핵산의 안티코돈과 회합하도록 코돈에 상보적인 전달 RNA (tRNA)와 같은 핵산 내의 3개 뉴클레오티드 그룹을 지칭한다. 예를 들어, mRNA 상의 코돈 5'-AUG-3'은 tRNA 상의 상응하는 안티코돈 3'-UAC-5'를 갖는다. 번역 동안, 번역될 코돈에 상보적인 안티코돈을 갖는 tRNA는 mRNA 상의 코돈과 회합하여 일반적으로 번역될 코돈에 상응하는 아미노산을 전달하거나 번역의 종결 및 리보솜으로부터 번역된 폴리펩티드의 방출을 용이하게 한다.

[0312] 번역은 RNA 코딩 서열을 사용하여 폴리펩티드의 생산을 지시하는 프로세스이다. 번역의 제1 단계는 개시이며, 여기서 리보솜은 mRNA와 회합하고, 제1 아미노산을 운반하는 제1 전달 RNA (tRNA)는 제1 코돈 또는 출발 코돈과 회합한다. 번역의 다음 단계인 신장은 3개의 단계를 수반한다. 첫째, 출발 코돈 뒤의 코돈 또는 제2 코돈에 상보적인 안티코돈을 갖고 제2 아미노산을 운반하는 제2 tRNA는 mRNA와 회합한다. 둘째, 제1 아미노산의 말단 비-측쇄 카르복실산 모이어티의 탄소 원자는 운반된 제2 아미노산의 말단 비-측쇄 아미노 모이어티의 질소와 반응하여 2개 아미노산 사이에 펩티드 결합을 형성하며, 제2 아미노산은 제2 tRNA에 결합되고, 제1 아미노산은 제2 아미노산에 결합되지만 제1 tRNA에는 결합되지 않는다. 셋째, 제1 tRNA는 mRNA로부터 해리되고, 리보솜은 mRNA를 따라 전진하여, 제1 tRNA가 리보솜과 회합된 위치가 이제 제2 tRNA에 의해 점령되고 이전에 제2 tRNA에 의해 점령된 위치가 이제 mRNA와 회합할 추가 아미노산을 운반하는 추가 tRNA가 없다. 1) 아미노산을 운반하는 tRNA의 회합, 2) 성장하는 폴리펩티드에 추가 아미노산을 첨가하는 펩티드 결합의 형성, 및 3) mRNA를 따른 리보솜의 전진의 이들 3개의 단계는 리보솜이 번역의 종결을 초래하는 정지 코돈에 도달할 때까지 계속된다. 일반적으로, 정지 코돈과 회합하는 tRNA는 아미노산을 운반하지 않으므로, 신장 단계 동안 아미노산을 운반하지 않는 tRNA의 회합은 폴리펩티드가 리보솜으로부터 방출되도록 폴리펩티드와 폴리펩티드의 최종 아미노산을 운반하는 tRNA 사이의 결합의 절단을 초래한다. 대안적으로, 리보솜은 정지 코돈과 회합하는 tRNA가 없으면 mRNA로부터 해리되어 폴리펩티드를 방출할 수 있다.

[0313] 본원에서 사용된 바와 같은 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 2개 이상의 공유결합적으로 결합된 뉴클레오티드를 포함하는 유기 분자를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "뉴클레오티드"는 1) 질소성 염기 (핵염기)에 공유결합적으로 결합된 당을 포함하는 뉴클레오시드; 및 2) 뉴클레오시드의 당에 공유결합적으로 결합된 포스페이트 기를 포함하는 유기 분자를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드는 전형적으로 포스포디에스테르 결합에 의해 연결되며, 여기서 제1 뉴클레오티드의 당의 3' 탄소는 브릿징 포스페이트 기에 의해 제2 핵산의 당의 5' 탄소에 연결된다. 전형적으로, 브릿징 포스페이트는 포스페이트의 인 원자에만 결합된 2개의 비-브릿징 산소 원자 및 2개의 브릿징 산소 원자를 포함하며, 이들 각각은 인 원자를 제1 뉴클레오티드의 3' 탄소 또는 제2 뉴클레오티드의 5' 탄소에 연결한다. 핵산의 뉴클레오티드 순서를 설명하는 핵산 서열에서, 제1 뉴클레오티드의 3' 탄소가 제2 뉴클레오티드의 5' 탄소에 연결된 경우 제1 뉴클레오티드는 제2 뉴클레오티드에 대해 5' (상류)에 있다고 한다. 유사하게, 제2 뉴클레오티드의 5' 탄소가 제1 뉴클레오티드의 3' 탄소에 연결된 경우 제2 뉴클레오티드는 제1 뉴클레오티드에 대해 3' (하류)에 있다고 한다. 핵산 서열은 전형적으로 5' 뉴클레오티드로 출발하여 3' 뉴클레오티드로 끝나는 5'에서 3' 순서로 판독된다.

[0314] 본원에서 사용된 바와 같은 "변형된 뉴클레오티드"는 아데노신 뉴클레오티드, 시티딘 뉴클레오티드, 구아닌 뉴클레오티드 또는 우라실 뉴클레오티드의 정준 구조가 아닌 구조를 갖는 뉴클레오티드를 지칭한다. 분자의 정준 구조는 분자의 명칭으로 지칭되는 구조인 것으로 일반적으로 관련 기술분야에 공지된 구조를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "변형된 뉴클레오티드"는 또한 정준이 아닌 핵염기 또는 당 (리보스 또는 데옥시리보스)을 포함하는 뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. "변형된 뉴클레오티드"는 또한 정준 뉴클레오시드간 연결이 아닌 (즉, 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이 아닌) 뉴클레오시드간 연결을 통해 제2 뉴클레오티드에 공유결합적으로 연결된 뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 아데닌

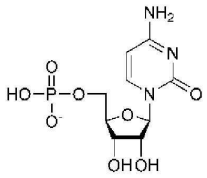
염기, 리보스 당 및 하나 이상의 포스페이트 기를 포함하는 아데노신 리보뉴클레오티드의 정준 구조는 아데노신 모노포스페이트의 형태로 하기 표시된다:



[0315] (AMP).

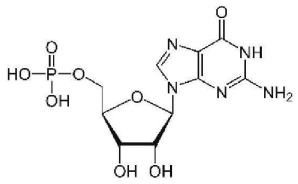
[0316] AMP의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 및 포스페이트의 산소 원자 및/또는 당의 3' 산소 원자가 핵산 서열의 인접한 뉴클레오티드에 결합된 구조를 지칭한다.

[0317] 시토신 염기, 리보스 당 및 하나 이상의 포스페이트 기를 포함하는 시토신 뉴클레오티드의 정준 구조는 시티딘 모노포스페이트의 형태로 하기 표시된다:



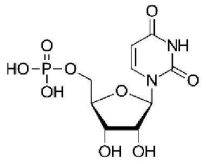
[0318] (CMP). CMP의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 및 포스페이트의 산소 원자 및/또는 당의 3' 산소 원자가 핵산 서열의 인접한 뉴클레오티드에 결합된 구조를 지칭한다.

[0319] 구아닌 염기, 리보스 당 및 하나 이상의 포스페이트 기를 포함하는 구아닌 뉴클레오티드의 정준 구조는 구아노신 모노포스페이트의 형태로 하기 표시된다:



[0320] (GMP). GMP의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 및 포스페이트의 산소 원자 및/또는 당의 3' 산소 원자가 핵산 서열의 인접한 뉴클레오티드에 결합된 구조를 지칭한다.

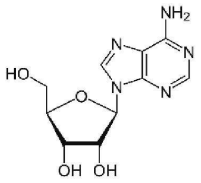
[0321] 우라실 염기, 리보스 당 및 하나 이상의 포스페이트 기를 포함하는 우라실 뉴클레오티드의 정준 구조는 우리딘 모노포스페이트의 형태로 하기 표시된다:



[0322] (UMP). UMP의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 및 포스페이트의 산소 원자 및/또는 당의 3' 산소 원자가 핵산 서열의 인접한 뉴클레오티드에 결합된 구조를 지칭한다.

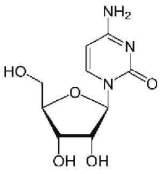
[0323] 변형된 뉴클레오티드의 구조는 뉴클레오티드의 당, 질소성 염기 또는 포스페이트의 하나 이상의 변형으로 인해 정준 뉴클레오티드의 구조와 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 아데닌 뉴클레오시드, 시토신 뉴클레오시드, 구아닌 뉴클레오시드 또는 우라실 뉴클레오시드의 정준 구조가 아닌 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이

[0324] 아데닌 뉴클레오시드인 아데노신의 정준 구조의 예는 아래에 재현되어 있다:



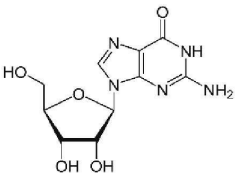
[0325] (아데노신). 아데노신의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 핵산 서열에서 5' 탄소가 5' 포스페이트에 결합된 구조, 및 핵산 서열에서 3' 산소 원자가 인접한 뉴클레오티드의 5' 포스페이트 기에 결합된 구조를 지칭한다.

[0326] 시토신 뉴클레오시드인 시티딘의 정준 구조의 예는 아래에 재현되어 있다:



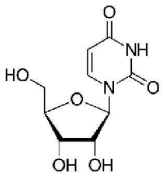
[0327] (시티딘). 시티딘의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 핵산 서열에서 5' 탄소가 5' 포스페이트에 결합된 구조, 및 핵산 서열에서 3' 산소 원자가 인접한 뉴클레오티드의 5' 포스페이트 기에 결합된 구조를 지칭한다.

[0328] 구아닌 뉴클레오시드인 구아노신의 정준 구조의 예는 아래에 재현되어 있다:



[0329] (구아노신). 구아노신의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 핵산 서열에서 5' 탄소가 5' 포스페이트에 결합된 구조, 및 핵산 서열에서 3' 산소 원자가 인접한 뉴클레오티드의 5' 포스페이트 기에 결합된 구조를 지칭한다.

[0330] 우라실 뉴클레오시드인 우리딘의 정준 구조의 예는 아래에 재현되어 있다:



[0331] (우리딘). 우리딘의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기 및/또는 당의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화된 구조, 핵산 서열에서 5' 탄소가 5' 포스페이트에 결합된 구조, 및 핵산 서열에서 3' 산소 원자가 인접한 뉴클레오티드의 5' 포스페이트 기에 결합된 구조를 지칭한다.

[0332] 본원에서 사용된 바와 같은 "구조적 서열"은 서로 상호작용하여 구조적 서열을 포함하는 핵산에서 2차 구조를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열을 지칭한다.

[0333] 본원에서 사용된 바와 같은 "압타머"는 표적 분자에 결합할 수 있는 2차 구조를 포함하는 핵산을 지칭한다.

[0334] 본원에서 사용된 바와 같은 "리가제"는 2개의 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성할 수 있는 효소를 지칭하고, "라이게이션" 프로세스는 2개의 뉴클레오티드 사이에 공유 결합이 형성되는 것을 지칭한다.

[0335] 본원에서 사용된 바와 같은 "테일링 핵산"은 또 다른 핵산의 3' 단부에 라이게이션된 핵산을 지칭한다.

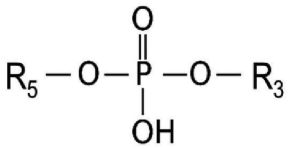
[0336] 변형된 mRNA

[0337] 일부 측면에서, 본 개시내용은 i) 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드; 및/또는 ii) 구조적 서열의 하나 이상의 카피 (반복 유닛)를 포함하는 변형된 mRNA를 제공하며, 변형된 뉴클레오티드 및/또는 구조적 서열은 mRNA의 폴리-A 영역의 일부이거나 이에 대해 3'에 있다. mRNA의 폴리-A 영역 (폴리(A) 영역 또는 폴리(A) 테일이라고도 함)은 다중 연속 아데노신 뉴클레오티드, 전형적으로 50-300개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함하는, 오픈 리딩 프레임에 대해 3' (하류)에 있는 mRNA의 영역이며, 연속 아데노신 뉴클레오티드의 하류에 있는 다중 비-아데노신 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 세포에서, 전구체 메신저 RNA (pre-mRNA)를 생성하는 DNA 서열의 전사 후, 폴리아데닐화 효소, 예컨대 폴리-A 폴리머라제 (PAP)에 의해 폴리-A 테일이 첨가되어, RNA의 3' 단부에 다

중 연속 아데노신 뉴클레오티드의 긴 서열을 초래한다. 폴리-A 영역은 mRNA에 의해 코딩된 단백질의 생산에 중요한 다중 역할을 한다. 첫째, 폴리-A 영역은 폴리-A 결합 단백질 (PABP)에 대한 부착 부위를 제공하며, 이는 핵 내 mRNA와 회합하고 세포질로의 외수송을 촉진한다 (예를 들어 문헌 [Tudek et al. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018. 373(1762):20180169] 참조). 추가적으로, mRNA 내 폴리-A 테일의 존재는 번역의 개시를 용이하게 한다 (예를 들어 문헌 [Gallie. *Genes & Dev*. 1991. 5:2108-2116] 및 [Munroe et al. *Mol Cell Biol*. 1990. 10(7):3441-3455] 참조). 최종적으로, 폴리-A 테일은 mRNA로부터 3' 뉴클레오티드를 제거하는 폴리뉴클레오티드 포스포릴라제 (PNPase)와 같은 엑소뉴클레아제의 활성으로부터 오픈 리딩 프레임을 보호함으로써 mRNA를 안정화시킨다. 엑소뉴클레아제가 뉴클레오티드를 제거함에 따라 mRNA는 점점 더 짧아지고, 일단 오픈 리딩 프레임의 하류에 있는 모든 뉴클레오티드가 제거되면, 엑소뉴클레아제에 의해 제거된 뉴클레오티드는 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오티드가 될 것이다. 오픈 리딩 프레임으로부터의 뉴클레오티드의 제거는 코딩된 단백질의 번역을 방지한다. 추가적으로, 오픈 리딩 프레임 근처의 mRNA와 엑소뉴클레아제의 회합은 리보솜 및 tRNA가 mRNA와 회합하는 것을 입체적으로 방해함으로써 번역을 억제할 수 있다. 폴리-A 테일의 제거는 종종 mRNA 분해의 속도-제한 단계로서 인용되며, 세포 내 mRNA의 수명은 폴리-A 테일을 제거하는데 필요한 시간에 의해 결정된다 (예를 들어 문헌 [Dreyfus *et al.*, *Cell*. 2002. 111(5):611-613] 참조). mRNA의 폴리-A 테일의 조성은 다양하지만, 효모 세포에서는 대략 75개의 아데노신 뉴클레오티드 및 포유동물 세포에서는 250개의 아데노신 뉴클레오티드를 함유한다.

[0338] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 mRNA의 폴리-A 영역에 있거나 폴리-A 영역에 대해 3' (하류)에 있는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 정준 아데노신 뉴클레오티드가 아닌 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 아데노신 뉴클레오티드가 아닌 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 다중 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열에 대해 3' (하류)에 있는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함하며, 이는 정준 아데노신 뉴클레오티드 또는 변형된 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 25-500개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함하며, 이는 정준 아데노신 뉴클레오티드 또는 변형된 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 25-300개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 110개, 적어도 120개, 적어도 130개, 적어도 140개, 적어도 150개, 적어도 160개, 적어도 170개, 적어도 180개, 적어도 190개 또는 적어도 200개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다.

[0339] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA의 변형된 뉴클레오티드 중 하나 이상은 변형된 포스페이트 기를 포함한다. 변형된 포스페이트 기는 포스페이트의 정준 구조와 상이한 포스페이트 기이다. 포스페이트의 정준 구조의 예는 하기 표시된다:



[0340] , 여기서 R_5 및 R_3은 정준 포스페이트가 결합된 원자 또는 분자이다. 예를 들어, 핵산 서열의 포스페이트의 경우, R_5는 핵산의 상류 뉴클레오티드를 지칭할 수 있고, R_3은 핵산의 하류 뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 포스페이트의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화되거나 포스페이트의 산소 원자가 핵산 서열에서 인접한 뉴클레오티드에 결합된 구조를 지칭한다. 핵산에서 정준 포스페이트를 치환할 수 있는 변형된 포스페이트 기의 비제한적인 예는 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트를 포함한다.

[0341] 본원에 제공된 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 핵염기를 포함한

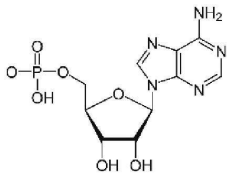
다: 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 당을 포함한다: 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 핵염기는 2'-O-(비치환된 C_{1-6} 알콕시)-(비치환된 C_{1-6} 알킬) 핵염기 (예를 들어, 2'-O-(비치환된 C_{1-6} 알콕시)-(비치환된 C_{1-6} 알킬) RNA 핵염기)이다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 핵염기는 2'-O-메톡시-에틸 핵염기 (예를 들어, 2'-O-메톡시-에틸 RNA 핵염기)이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2' 변형은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe).

[0342] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트를 포함한다: 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니딘 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트.

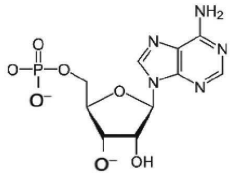
[0343] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 하나 초과의 유형의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 적어도 제1 변형된 뉴클레오티드, 및 제1 변형된 뉴클레오티드와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 뉴클레오티드는 핵염기, 당 및/또는 포스페이트 기의 차이로 인해 구조가 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 적어도 제1 변형된 포스페이트, 및 제1 변형된 포스페이트와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 제1 변형된 뉴클레오시드 및 제2 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0344] 본 개시내용의 측면은 25개 이상의 아데닌 뉴클레오티드를 갖는 폴리-A 영역을 포함하는 변형된 mRNA에 관한 것

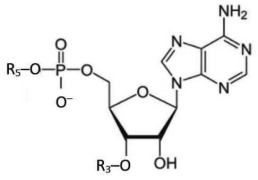
이다. 특정 실시양태에서, 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상 또는 50개 이상의 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리-A 영역은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 10 내지 15개, 15 내지 20개, 20 내지 25개, 25 내지 35개, 35 내지 50개, 50 내지 70개, 또는 70 내지 100개의 아데노신 뉴클레오티드 (경계값 포함)를 포함한다. 아데닌 뉴클레오티드는 아데닌 뉴클레오시드 및 포스페이트 기를 포함하는 뉴클레오티드이다. 아데닌 뉴클레오시드는 당 및 아데닌 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 25개 이상의 정준 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다. 정준 아데노신 뉴클레오티드는 아래 아데노신 모노포스페이트 (AMP)의 구조로 배열된 바와 같이 아데닌 염기, 리보스 당 및 포스페이트 기를 포함한다:



. 일부 실시양태에서, 포스페이트의 히드록실 기 및/또는 리보스의 3' 히드록실 기 중 하나 이상은 탈양성자화되어 -OH 기 대신 산소 이온을 포함하며, 이는 하기 구조로 표시된 바와 같다:

[0345] 

. mRNA의 핵산 서열에 존재할 때, 정준 아데노신은 하기 구조를 포함하고 하기 방식으로 인접한 뉴클레오티드에 연결된다:

[0346] 

, 여기서 R_5는 mRNA에서 아데노신 뉴클레오티드에 대해 5' (상류)에 있는 인접한 뉴클레오티드이고, R_3은 mRNA에서 아데노신 뉴클레오티드에 대해 3' (하류)에 있는 인접한 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 정준 아데노신 뉴클레오티드는 선형 mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드 (마지막 뉴클레오티드)이고, R_3은 수소이고, 3' 말단 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 (-OH) 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정준 아데노신 뉴클레오티드는 선형 mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드 (마지막 뉴클레오티드)이고, R_3은 전자이다.

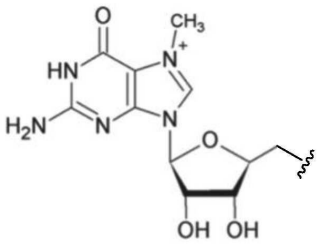
[0347] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, mRNA는 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 포함한다. 5' 및 3' UTR은 mRNA에 의해 코딩된 단백질의 아미노산을 코딩하지 않는 mRNA 내의 서열이고, 그러므로 오픈 리딩 프레임의 일부가 아니다. 5' UTR은 오픈 리딩 프레임에 대해 5' (상류)에 있다. 3' UTR은 오픈 리딩 프레임에 대해 3' (하류)에 있다. 일부 실시양태에서, 3' UTR은 오픈 리딩 프레임에 대해 3'에 있고 mRNA의 폴리-A 영역에 대해 5' (상류)에 있는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0348] 본원에 제공된 mRNA의 일부 실시양태에서, mRNA는 5'에서 3' 순서로 하기를 포함한다: 1) 5' UTR; 2) 오픈 리딩 프레임; 3) 3' UTR; 및 4) 폴리-A 영역 (도 2b). 일부 실시양태에서, 5' UTR의 마지막 뉴클레오티드는 오픈 리딩 프레임의 제1 뉴클레오티드에 대해 5' (상류)에 있다. 일부 실시양태에서, 오픈 리딩 프레임의 제1 뉴클레오티드는 5' UTR의 마지막 뉴클레오티드에 대해 3' (하류)에 있고, 오픈 리딩 프레임의 마지막 뉴클레오티드는 3' UTR의 제1 염기에 대해 5' (상류)에 있다. 일부 실시양태에서, 오픈 리딩 프레임은 5' UTR의 마지막 뉴클레오티드와 3' UTR의 제1 뉴클레오티드 사이에 있다. 일부 실시양태에서, 3' UTR의 제1 뉴클레오티드는 오픈 리딩 프레임의 마지막 뉴클레오티드에 대해 3' (하류)에 있고, 3' UTR의 마지막 뉴클레오티드는 폴리-A 영역의 제1 염기에 대해 5' (상류)에 있다. 일부 실시양태에서, 3' UTR은 오픈 리딩 프레임의 마지막 뉴클레오티드와 폴리-A 영역의 제1 뉴클레오티드 사이에 있다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 제1 뉴클레오티드는 3' UTR의 마지막 뉴클레오티드에 대해 3' (하류)에 있다.

[0349] 일부 실시양태에서, mRNA는 선형 mRNA이다. 선형 mRNA는 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드를 갖는 mRNA이다. 선형 mRNA의 5' 말단 뉴클레오티드는 mRNA의 하나의 인접한 뉴클레오티드에만 공유결합적으로 결합되며, 인접한 뉴클레오티드는 mRNA의 핵산 서열에서 5' 말단 뉴클레오티드에 대해 3'에서 발생한다. 선형

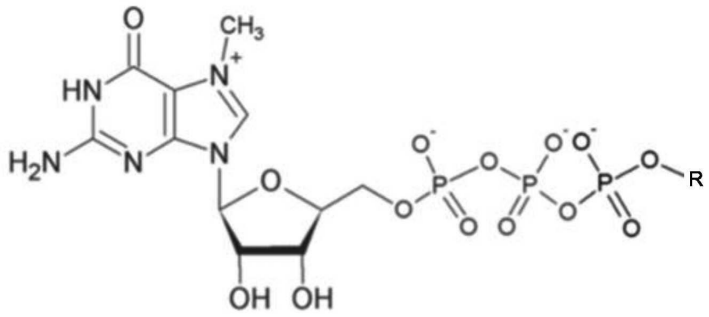
mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 mRNA의 하나의 인접한 뉴클레오티드에만 공유결합적으로 결합되며, 인접한 뉴클레오티드는 mRNA의 핵산 서열에서 3' 말단 뉴클레오티드에 대해 5'에서 발생한다. 선형 mRNA의 모든 뉴클레오티드를 5'에서 3' 순서로 포함하는 핵산 서열에서, 5' 말단 뉴클레오티드는 서열의 제1 뉴클레오티드이고, 3' 말단 뉴클레오티드는 서열의 마지막 뉴클레오티드이다.

[0350] 본원에 제공된 선형 mRNA의 일부 실시양태에서, mRNA는 5' 캡을 포함한다. 진핵생물 세포에서 생산되는 대부분의 mRNA는 pre-mRNA의 성숙 mRNA로의 프로세싱 동안 첨가되는 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 mRNA 생산, 외수송 및 번역 프로세스에서 다중 역할을 한다. 첫째, pre-mRNA로부터 인트론의 제거를 매개하는 스플라이소솜의 어셈블리는 5' 캡에 대한 핵 캡-결합 복합체 (CBC)의 결합을 필요로 한다. 또한, CBC와 핵공 사이의 상호작용은 5' 단부로 시작하여 mRNA의 세포질로의 외수송을 매개한다. 최종적으로, 5' 캡에 결합된 CBC는 번역의 개시에 필요한 다중 인자, 예컨대 CBP80, CTIF, eIF3g, eIF4III, Met-tRNAi 및 리보솜 서브유닛의 동원을 매개한다 (예를 들어 문헌 [Ramanathan et al. *Nucleic Acids Res.* 2016. 44(16):7511-7526] 참조). 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 7-메틸구아노신은 하기 구조를 포함한다:

[0351] 

.

[0352] 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 변형된 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트는 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐메틸렌비스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트이다. 일부 실시양태에서, 7-메틸구아노신은 5'에서 5' 트리포스페이트 브릿지에 의해 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 하기 구조를 포함한다:

[0353] 

[0354] 여기서 R은 mRNA의 제1 전사된 뉴클레오티드의 5' 탄소이다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함한다.

[0355] 일부 실시양태에서, mRNA는 원형 mRNA이다. 원형 mRNA는 5' 말단 뉴클레오티드 또는 3' 말단 뉴클레오티드를 갖지 않는 mRNA이다. 원형 mRNA의 모든 뉴클레오티드는 1) 5' 인접한 뉴클레오티드; 및 2) 3' 인접한 뉴클레오티드 둘 다에 공유결합적으로 결합된다. 원형 mRNA의 모든 뉴클레오티드를 5'에서 3' 순서로 포함하는 핵산 서열을 갖는 원형 mRNA에서, 핵산 서열의 마지막 뉴클레오티드는 핵산 서열의 제1 뉴클레오티드에 공유결합적으로 결합된다. 5' UTR, 3' UTR 및 폴리-A 영역을 갖는 원형 mRNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 3' UTR에 대해 3' (하류) 및 5' UTR에 대해 5' (상류)에 있다.

[0356] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 mRNA의 폴리-A 영역에 대해 3'에 있는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 구조의 뉴클레오티드는 수소 결합에 의해 상호작용한다. 일부 실시양태에서, 2차 구조는 G-쿼드러플렉스이다. G-쿼드러플렉스 또는 G-쿼드러플렉스는 구아닌-풍부 핵산 서열에 의해 형성된 2차 구조이다. 구아닌-풍부 핵산 서열은 다중 구아닌 뉴클레오티드를 포함한다. 전형적으로, 구아닌-풍부 핵산 서열 내 뉴클레오티드의 적어도 50%는 구아닌 뉴클레오티드이다. G-쿼드러플렉스는 4개의 구아닌 (G-테트라드)을 함유하는 적어도 하나의 평면을 포함하며, 각 구아닌은 후그스틴

(Hoogsteen) 수소 결합에 의해 2개의 다른 구아닌과 결합한다. 후그스틴 수소 결합은 정준 염기 쌍형성 (A:T, A:U 및 G:C) 이외의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 질소성 염기 사이의 수소 결합을 지칭한다. G-테트라드의 구아닌은 G-테트라드를 안정화시키기 위해 양이온, 예컨대 칼륨 이온을 포함할 수 있는 빈 공간을 둘러싸고 있다. G-쿼드러플렉스는 평행 방향으로 배열된 적어도 2개의 G-테트라드를 포함한다.

[0357] 하나 이상의 구조적 서열을 포함하는 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 G-쿼드러플렉스 서열이다. G-쿼드러플렉스 서열을 포함하는 핵산은 G-쿼드러플렉스 서열의 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 G-쿼드러플렉스를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 구아닌 뉴클레오티드가 아닌 하나 이상의 스페이서 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 2)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 서열식별번호: 2의 뉴클레오티드 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 서열식별번호: 3의 뉴클레오티드 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 텔로미어 반복 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4 또는 5 중 하나로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 서열식별번호: 4의 뉴클레오티드 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0358] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 압타머 서열이다. 압타머에 의해 결합될 수 있는 표적 분자의 비제한적인 예는 시토카인, 세포 표면 수용체 및 전사 인자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 의해 형성된 2차 구조는 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머이다. 예시적인 압타머는 관련 기술분야에 공지되어 있고, CD4, CTLA-4, TGF-β 수용체 및 수용체 티로신 키나제와 같은 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 다중 RNA 구조를 포함한다. 예를 들어 문헌 [Germer et al. *Int J Biochem Mol Biol*., 2013. 4(1):27-40]을 참조한다.

[0359] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 구조적 서열의 1-20개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 구조적 서열의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개 또는 적어도 9개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 구조적 서열의 약 4개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 다중 상이한 구조적 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 적어도 제1 구조적 서열, 및 제1 구조적 서열과 상이한 핵산 서열을 포함하는 제2 구조적 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 적어도 하나의 G-쿼드러플렉스 서열 및 적어도 하나의 텔로미어 반복 서열을 포함한다.

[0360] 본원에 제공된 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 핵염기를 포함한다: 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-

6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 당을 포함한다: 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2' 변형은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe).

[0361] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트를 포함한다: 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다.

[0362] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 하나 초과의 유형의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 적어도 제1 변형된 뉴클레오시드, 및 제1 변형된 뉴클레오시드와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 적어도 제1 변형된 포스페이트, 및 제1 변형된 포스페이트와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0363] 본원에 제공된 2차 구조를 포함하는 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, mRNA는 5' UTR 및 3' UTR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' UTR은 오픈 리딩 프레임에 대해 5' (상류)에 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 5'에서 3' 순서로 하기를 포함한다: 1) 5' UTR; 2) 오픈 리딩 프레임; 3) 3' UTR; 4) 폴리-A 영역; 및 5) 구조적 서열의 하나 이상의 카피. 일부 실시양태에서, 3' UTR은 오픈 리딩 프레임에 대해 3' (하류)에 있다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 3' UTR에 대해 3' (하류)에 있다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피 및 구조적 서열에 의해 형성된 2차 구조는 폴리-A 영역에 대해 3' (하류)에 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는

선형 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 선형 mRNA는 5' 캡을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 변형된 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 7-메틸구아노신은 5'에서 5' 트리포스페이트 브릿지에 의해 mRNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트는 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐메틸렌비스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트이다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함한다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 순차적 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다.

[0364] 본원에 제공된 2차 구조를 포함하는 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 5'에서 3' 순서로 하기를 포함한다: 1) 5' UTR; 2) 오픈 리딩 프레임; 3) 3' UTR; 4) 폴리-A 영역; 및 5) 구조적 서열의 하나 이상의 카피. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA는 원형 mRNA이다. 원형 mRNA의 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 폴리-A 영역과 5' UTR 사이에 있다. 일부 실시양태에서, 2차 구조는 폴리-A 영역과 5' UTR 사이에 있다.

[0365] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0366] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0367] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 아데노신 뉴클레오티드이다. 폴리-A 영역의 하나 이상의 아데노신 뉴클레오티드는 정준 아데노신 뉴클레오티드 또는 정준 아데노신 뉴클레오티드와 상이한 구조를 포함하는 변형된 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다. 변형된 아데노신 뉴클레오티드의 비제한적인 예는 N6-이소펜테닐아데노신 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데노신 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데노신 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데노신 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데노신 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데노신 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데노신 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데노신 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데노신 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데노신 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데노신 (ms2hn6A), 2'-O-리보실아데노신 (포스페이트) (Ar(p)), N6,N6-디메틸아데노신 (m62A), N6,2'-O-디메틸아데노신 (m6Am),

N6,N6,O-2'-트리메틸아데노신 (m62Am), 1,2'-O-디메틸아데노신 (m1Am), N6-아세틸아데노신 (ac6A), 2'-티오아데노신 (2'SA), 5'-티오아데노신 (5'SA), 2'-O-(2-아지도에틸)-아데노신, 2'-아지도-아데노신, 데옥시아데노신 (dA), 디데옥시아데노신 (ddA), 및 아미노-데옥시아데노신 (아미노-dA)을 포함한다.

[0368] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 정준 아데노신 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 아데노신 뉴클레오티드 (예를 들어, 정준 또는 비-정준 아데노신 뉴클레오티드)가 아닌 1개 이상의 뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%는 아데노신 뉴클레오티드가 아닌 뉴클레오티드이다.

[0369] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 110개, 적어도 120개, 적어도 130개, 적어도 140개, 적어도 150개, 적어도 160개, 적어도 170개, 적어도 180개, 적어도 190개, 적어도 200개, 적어도 210개, 적어도 220개, 적어도 230개, 적어도 240개, 적어도 250개, 적어도 260개, 적어도 270개, 적어도 280개, 적어도 290개 또는 적어도 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 200 내지 약 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 250개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0370] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 순차적 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA의 폴리-A 영역은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다.

[0371] 변형된 비-코딩 RNA

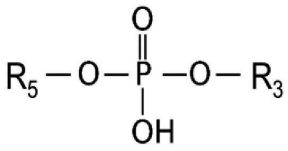
[0372] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 세포 내 mRNA의 안정성을 개선하기 위한 본원에 개시된 임의의 기술 (예를 들어, 3' 엑소뉴클레아제 활성을 향한 mRNA의 저항성을 개선함으로써)이 또한 세포 내 단백질을 코딩하지 않는 RNA ("비-코딩" RNA)의 안정성을 개선하기에 적합할 수 있다는 것을 쉽게 인식할 것이다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용은 i) 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드; 및/또는 ii) 구조적 서열의 하나 이상의 카피 (반복 유닛)를 포함하는 변형된 비-코딩 RNA를 제공하며, 변형된 뉴클레오티드 및/또는 구조적 서열은 RNA의 일부이거나 이에 대해 3'에 있다. 본원에 기재된 비-코딩 RNA는 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 포함하지 않는다. 비-코딩 RNA는 3' 폴리-A 영역을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 3' 폴리-A 영역을 포함하지 않는 비-코딩 RNA는 3' 폴리-A 영역을 포함하도록 변형될 수 있다 (예를 들어, 본원에 개시되거나 관련 기술분야에 달리 공지

된 방법에 의해 폴리-A 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 비-코딩 RNA를 라이게이션함으로써). 비-코딩 RNA는 세포의 mRNA 전사체 또는 게놈 서열의 일부와 상보성의 영역을 포함하는 RNA일 수 있다. 비-코딩 RNA는 게놈 편집에 적합한 비-코딩 RNA일 수 있다. 비-코딩 RNA의 예는 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 긴 비-코딩 RNA (lncRNA), 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR)/Cas9 게놈 편집을 위한 가이드 RNA (gRNA), 비-CRISPR/Cas9 gRNA (예를 들어, RNA (ADAR)-동원 gRNA에 작용하는 아데노신 데아미나제), 또는 프라임 편집 가이드 RNA (pegRNA)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어 문헌 [Chen, et al., *Acta Pharm Sin B*. 2021; 11(2):340-354]; [Chen, et al., *Adv Drug Deliv Rev*. 2021; 168:246-258.]; [Hendel, et al., *Nat Biotechnol*. 2015; 33:985-989]; [Qu, et al., *Nat Biotechnol*. 2019; 37(9):1059-1069]; [Yi, et al., *Nat Biotechnol*. 2022. Epub ahead of print]; 및 [Nelson, et al., *Nat Biotechnol*. 2022; 40(3):402-410]을 참조한다. 변형된 mRNA를 생성하기 위한 본원에 기재된 임의의 기술은 또한 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 변형된 비-코딩 RNA를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0373] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA는 3' 폴리-A 영역을 포함하는 비-코딩 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA는 전형적으로 3' 폴리-A 영역을 포함하지 않는 비-코딩 RNA (예를 들어, gRNA)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA는 폴리-A 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 3' 단부에서 5' 단부로 라이게이션되어, 이에 의해 본원에 기재된 폴리-A 영역을 포함하는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 비-코딩 RNA를 포함한다. 비-코딩 RNA는 본원에 개시되거나 관련 기술분야에 달리 공지된 임의의 방법에 의해 폴리-A 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 라이게이션될 수 있다.

[0374] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 비-코딩 RNA에 존재하는 폴리-A 영역에 있거나 폴리-A 영역에 대해 3' (하류)에 있는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 정준 아데노신 뉴클레오티드가 아닌 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 아데노신 뉴클레오티드가 아닌 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 다중 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열에 대해 3' (하류)에 있는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함하며, 이는 정준 아데노신 뉴클레오티드 또는 변형된 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 25-500개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함하며, 이는 정준 아데노신 뉴클레오티드 또는 변형된 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 25-300개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 110개, 적어도 120개, 적어도 130개, 적어도 140개, 적어도 150개, 적어도 160개, 적어도 170개, 적어도 180개, 적어도 190개 또는 적어도 200개의 연속 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다.

[0375] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA의 변형된 뉴클레오티드 중 하나 이상은 변형된 포스페이트 기를 포함한다. 변형된 포스페이트 기는 포스페이트의 정준 구조와 상이한 포스페이트 기이다. 포스페이트의 정준 구조의 예는 하기 표시된다:



[0376] , 여기서 R_5 및 R_3은 정준 포스페이트가 결합된 원자 또는 분자이다. 예를 들어, 핵산 서열의 포스페이트의 경우, R_5는 핵산의 상류 뉴클레오티드를 지칭할 수 있고, R_3은 핵산의 하류 뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 포스페이트의 정준 구조는 또한 포스페이트의 하나 이상의 히드록실 기가 탈양성자화되거나 포스페이트의 산소 원자가 핵산 서열에서 인접한 뉴클레오티드에 결합된 구조를 지칭한다. 핵산에서 정준 포스페이트를 치환할 수 있는 변형된 포스페이트 기의 비제한적인 예는 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니딘 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트를 포함한다.

[0377] 본원에 제공된 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형

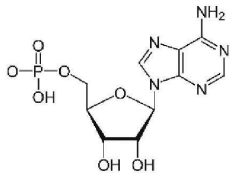
된 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 핵염기를 포함한다: 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 당을 포함한다: 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 핵염기는 2'-O-(비치환된 C_{1-6} 알콕시)-(비치환된 C_{1-6} 알킬) 핵염기 (예를 들어, 2'-O-(비치환된 C_{1-6} 알콕시)-(비치환된 C_{1-6} 알킬) RNA 핵염기)이다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 핵염기는 2'-O-메톡시-에틸 핵염기 (예를 들어, 2'-O-메톡시-에틸 RNA 핵염기)이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2' 변형은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe).

[0378] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트를 포함한다: 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트.

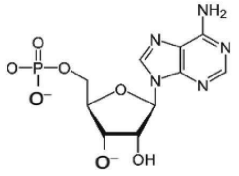
[0379] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 하나 초과의 유형의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 변형된 뉴클레오티드, 및 제1 변형된 뉴클레오티드와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 뉴클레오티드는 핵염기, 당 및/또는 포스페이트 기의 차이로 인해 구조가 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 변형된 포스페이트, 및 제1 변

형된 포스페이트와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 제1 변형된 뉴클레오시드 및 제2 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

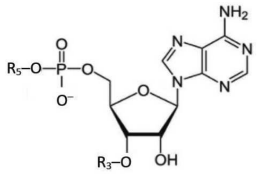
[0380] 본 개시내용의 측면은 25개 이상의 아데닌 뉴클레오티드를 갖는 폴리-A 영역을 포함하는 변형된 비-코딩 RNA에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA의 3' 단부에 있고 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상 또는 50개 이상의 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리-A 영역은 비-코딩 RNA의 3' 단부에 있고 10 내지 15개, 15 내지 20개, 20 내지 25개, 25 내지 35개, 35 내지 50개, 50 내지 70개, 또는 70 내지 100개의 아데노신 뉴클레오티드 (경계값 포함)를 포함한다. 아데닌 뉴클레오티드는 아데닌 뉴클레오시드 및 포스페이트 기를 포함하는 뉴클레오티드이다. 아데닌 뉴클레오시드는 당 및 아데닌 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 25개 이상의 정준 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다. 정준 아데노신 뉴클레오티드는 아래 아데노신 모노포스페이트 (AMP)의 구조로 배열된 바와 같이 아데닌 염기, 리보스 당 및 포스페이트 기를 포함한다:



[0381] . 일부 실시양태에서, 포스페이트의 히드록실 기 및/또는 리보스의 3' 히드록실 기 중 하나 이상은 탈양성자화되어 -OH 기 대신 산소 이온을 포함하며, 이는 하기 구조로 표시된 바와 같다:



[0382] . 비-코딩 RNA의 핵산 서열에 존재할 때, 정준 아데노신은 하기 구조를 포함하고 하기 방식으로 인접한 뉴클레오티드에 연결된다:



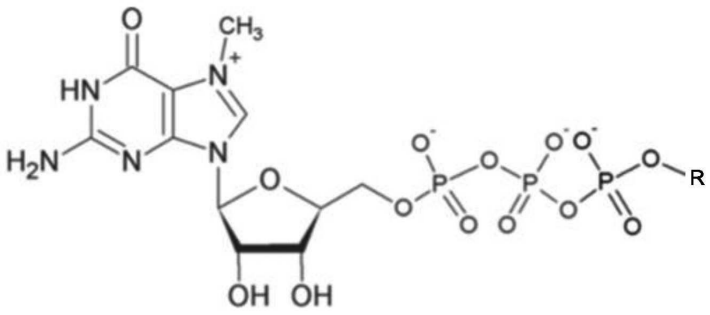
[0383] , 여기서 R_5는 비-코딩 RNA에서 아데노신 뉴클레오티드에 대해 5' (상류)에 있는 인접한 뉴클레오티드이고, R_3은 비-코딩 RNA에서 아데노신 뉴클레오티드에 대해 3' (하류)에 있는 인접한 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 정준 아데노신 뉴클레오티드는 선형 비-코딩 RNA의 3' 말단 뉴클레오티드 (마지막 뉴클레오티드)이고, R_3은 수소이고, 3' 말단 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 (-OH) 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정준 아데노신 뉴클레오티드는 선형 비-코딩 RNA의 3' 말단 뉴클레오티드 (마지막 뉴클레오티드)이고, R_3은 전자이다.

[0384] 본원에 제공된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA는 5'에서 3' 순서로 하기를 포함한다: 1) 비-코딩 RNA; 및 2) 비-코딩 RNA 1의 3' 단부 내에 존재하거나 이에 라이게이션된 폴리-A 영역. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA에 라이게이션된 폴리-A 영역의 제1 뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 마지막 뉴클레오티드에 대해 3' (하류)에 있다.

[0385] 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA는 선형 비-코딩 RNA이다. 선형 비-코딩 RNA는 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드를 갖는 비-코딩 RNA이다. 선형 비-코딩 RNA의 5' 말단 뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 하나의 인접한 뉴클레오티드에만 공유결합적으로 결합되며, 인접한 뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 핵산 서열에서 5' 말단 뉴클레오티드에 대해 3'에서 발생한다. 선형 비-코딩 RNA의 3' 말단 뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 하나의 인접한 뉴클레오티드에만 공유결합적으로 결합되며, 인접한 뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 핵산 서열에서 3' 말단 뉴클레오티드에 대해 5'에서 발생한다. 선형 비-코딩 RNA의 모든 뉴클레오티드를 5'에서 3' 순서로 포함하는 핵산 서열에서, 5' 말단 뉴클레오티드는 서열의 제1 뉴클레오티드이고, 3' 말단 뉴클레오티드는 서열의 마지막 뉴클레오티드이다.

[0386] 본원에 제공된 선형 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA는 5' 캡을 포함한다. 일부 실시양태에서,

5' 캡은 7-메틸구아노신을 변형된 비-코딩 RNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트는 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐 메틸렌비스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트이다. 일부 실시양태에서, 7-메틸구아노신은 5'에서 5' 트리포스페이트 브릿지에 의해 비-코딩 RNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 하기 구조를 포함한다:



[0387]

[0388] 여기서 R은 비-코딩 RNA의 제1 전사된 뉴클레오티드의 5' 탄소이다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함한다.

[0389] 일부 실시양태에서, 선형 비-코딩 RNA는 5' 캡을 포함하지 않는다.

[0390] 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA는 원형 비-코딩 RNA이다. 원형 비-코딩 RNA는 5' 말단 뉴클레오티드 또는 3' 말단 뉴클레오티드를 갖지 않는 비-코딩 RNA이다. 원형 비-코딩 RNA의 모든 뉴클레오티드는 1) 5' 인접한 뉴클레오티드; 및 2) 3' 인접한 뉴클레오티드 둘 다에 공유결합적으로 결합된다. 원형 비-코딩 RNA의 모든 뉴클레오티드를 5'에서 3' 순서로 포함하는 핵산 서열을 갖는 원형 비-코딩 RNA에서, 핵산 서열의 마지막 뉴클레오티드는 핵산 서열의 제1 뉴클레오티드에 공유결합적으로 결합된다. 원형 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 3' 단부 내에 존재하거나 이에 라이게이션된 폴리-A 영역의 마지막 뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 제1 뉴클레오티드에 대해 5'에 있다.

[0391] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 비-코딩 RNA 내에 존재하거나 이에 라이게이션된 폴리-A 영역에 대해 3'에 있는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 구조의 뉴클레오티드는 수소 결합에 의해 상호작용한다. 일부 실시양태에서, 2차 구조는 G-쿼드러플렉스이다. G-쿼드러플렉스 또는 G-쿼드러플렉스는 구아닌-풍부 핵산 서열에 의해 형성된 2차 구조이다.

[0392] 하나 이상의 구조적 서열을 포함하는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 G-쿼드러플렉스 서열이다. G-쿼드러플렉스 서열을 포함하는 핵산은 G-쿼드러플렉스 서열의 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 G-쿼드러플렉스를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 구아닌 뉴클레오티드가 아닌 하나 이상의 스페이서 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 2)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 서열식별번호: 2의 뉴클레오티드 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 서열식별번호: 3의 뉴클레오티드 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 텔로미어 반복 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4 또는 5 중 하나로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 서열식별번호: 4의 뉴클레오티드 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다.

[0393] 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 압타머 서열이다. 압타머에 의해 결합될 수 있는 표적 분자의 비제한적인 예는 시토카인, 세포 표면 수용체 및 전사 인자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 의해 형성된 2차 구조는 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머이다. 예시적인 압타머는 관련 기술분야에 공지되어 있고, CD4, CTLA-4, TGF-β 수용체 및 수용체 티로신 키나제와 같은 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 다중 RNA 구조를 포함한다. 예를 들어 문헌 [Germer et al. *Int J Biochem Mol Biol.*, 2013. 4(1):27-40]을 참조한다.

[0394] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 구조적 서열의 1-20개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 구조적 서열의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개 또는 적어도 9개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 구조적 서열의 약 4개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 다중 상이한 구조적 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 구조적 서열, 및 제1 구조적 서열과 상이한 핵산 서열을 포함하는 제2 구조적 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 하나의 G-쿼드러플렉스 서열 및 적어도 하나의 텔로미어 반복 서열을 포함한다.

[0395] 본원에 제공된 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 핵염기를 포함한다: 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 당을 포함한다: 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2' 변형은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트를 포함한다: 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니

디노프로필 포스포라미데이트. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 순차적 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다.

[0396] 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 하나 초과의 유형의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 변형된 뉴클레오시드, 및 제1 변형된 뉴클레오시드와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 변형된 포스페이트, 및 제1 변형된 포스페이트와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0397] 본원에 제공된 2차 구조를 포함하는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 5'에서 3' 순서로 하기를 포함한다: 1) 5' 비-코딩 RNA; 2) 비-코딩 RNA의 3' 단부 내에 존재하거나 이에 라이게이션된 폴리-A 영역; 및 3) 구조적 서열의 하나 이상의 카피. 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피 및 구조적 서열에 의해 형성된 2차 구조는 폴리-A 영역에 대해 3' (하류)에 있다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA는 선형 비-코딩 RNA이다. 일부 실시양태에서, 선형 비-코딩 RNA는 5' 캡을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 변형된 비-코딩 RNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 7-메틸구아노신은 5'에서 5' 트리포스페이트 브릿지에 의해 비-코딩 RNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 5' 캡의 하나 이상의 포스페이트는 포스포로티오에이트, 트리아졸 고리, 디할로겐메틸렌비스포스포네이트, 이미도디포스페이트, 및 메틸렌비스(포스포네이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트이다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G를 포함한다. 일부 실시양태에서, 선형 비-코딩 RNA는 5' 캡을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 순차적 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은

적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다.

[0398] 본원에 제공된 2차 구조를 포함하는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 5'에서 3' 순서로 하기를 포함한다: 1) 비-코딩 RNA; 2) 비-코딩 RNA 내에 존재하거나 이에 라이게이션된 폴리-A 영역; 및 3) 구조적 서열의 하나 이상의 카피. 일부 실시양태에서, 변형된 비-코딩 RNA는 원형 비-코딩 RNA이다. 원형 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피는 비-코딩 RNA 내에 존재하거나 이에 라이게이션된 폴리-A 영역과 비-코딩 RNA의 5' 뉴클레오티드 사이에 있다.

[0399] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0400] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0401] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 아데노신 뉴클레오티드이다. 폴리-A 영역의 하나 이상의 아데노신 뉴클레오티드는 정준 아데노신 뉴클레오티드 또는 정준 아데노신 뉴클레오티드와 상이한 구조를 포함하는 변형된 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다. 변형된 아데노신 뉴클레오티드의 비제한적인 예는 N6-이소펜테닐아데노신 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데노신 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데노신 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데노신 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데노신 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데노신 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데노신 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데노신 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데노신 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데노신 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데노신 (ms2hn6A), 2'-O-리보실아데노신 (포스페이트) (Ar(p)), N6,N6-디메틸아데노신 (m62A), N6,2'-O-디메틸아데노신 (m6Am), N6,N6,O-2'-트리메틸아데노신 (m62Am), 1,2'-O-디메틸아데노신 (m1Am), N6-아세틸아데노신 (ac6A), 2'-티오아데노신 (2'SA), 5'-티오아데노신 (5'SA), 2'-O-(2-아지도에틸)-아데노신, 2'-아지도-아데노신, 데옥시아데노신 (dA), 디데옥시아데노신 (ddA), 및 아미노-데옥시아데노신 (아미노-dA)을 포함한다.

[0402] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 정준 아데노신 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 아데노신 뉴클레오티드 (예를 들어, 정준 또는 비-정준 아데노신 뉴클레오티드)가 아닌 1개 이상의 뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%는 아데노신 뉴클레오티드가 아닌 뉴클레오티드이다.

[0403] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 110개, 적어도 120개, 적어도 130개, 적어도 140개, 적어도 150개, 적어도 160개, 적어도 170개, 적어도 180개, 적어도

190개, 적어도 200개, 적어도 210개, 적어도 220개, 적어도 230개, 적어도 240개, 적어도 250개, 적어도 260개, 적어도 270개, 적어도 280개, 적어도 290개 또는 적어도 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 200 내지 약 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 250개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0404] 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 순차적 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다.

[0405] 변형된 mRNA 및 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법

[0406] 일부 측면에서, 본 개시내용은 변형된 mRNA를 생산하는 방법으로서, RNA, 예컨대 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 RNA 또는 비-코딩 RNA를 리가제의 존재 하에 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 테일링 핵산에 라이게이션하는 것을 포함하며, 이로써 리가제는 RNA의 3' 뉴클레오티드와 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드 사이에 공유 결합을 형성하여 변형된 RNA (예를 들어, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA)를 생산하는 것인 방법을 제공한다. 리가제가 2개의 선형 핵산 사이에 공유 결합을 형성할 때, 새로운 핵산이 생성되며, 생성된 핵산은 두 핵산 모두의 핵산 서열을 포함한다. 제1 핵산의 3' 말단 뉴클레오티드를 제2 핵산의 5' 말단 뉴클레오티드에 라이게이션하는 것은 제3 핵산을 생성하며, 제3 핵산은 제1 핵산 및 제2 핵산의 서열을 포함하고, 제2 핵산 서열은 제1 핵산 서열에 대해 3' (하류)에 있다. RNA 리가제에 의한 라이게이션은 여러 단계로 발생한다. 첫째, 리가제의 아미노산 (예를 들어, 리신)의 아미노 ($-NH_2$) 기는 아데노신 트리포스페이트 (ATP)의 포스페이트 기에 결합하여, 아데노신 모노포스페이트 (AMP) 기가 RNA 리가제에 결합된다. 둘째, 제2 핵산의 5' 말단 포스페이트는 RNA 리가제-결합된 AMP의 포스페이트를 대체한다. 최종적으로, 제1 핵산의 3' 말단 히드록실 기의 산소는 제2 핵산의 5' 말단 포스페이트의 인 원자에 결합한다. 이 최종 단계는 핵산의 말단 뉴클레오티드 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성하여, 이에 의해 연속적 당-포스페이트 백본을 갖는 단일 핵산을 형성한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 RNA 리가제이다. 일부 실시양태에서, RNA 리가제는 T4 RNA 리가제이다.

[0407] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산이 라이게이션된 RNA는 시험관내 전사 (IVT)에 의해 합성된다. IVT는 RNA 폴리머라제에 의한 DNA 주형의 전사를 통해 RNA, 예컨대 전구체 mRNA (pre-mRNA), mRNA 또는 비-코딩 RNA가 생성되는 프로세스이다. 일반적으로, DNA 주형은 전사될 DNA 서열의 상류에 있는 프로모터, 예컨대 박테리오파지 프로모터를 포함한다. RNA 폴리머라제는 프로모터에 결합하고, DNA 서열의 전사를 시작하여, DNA 서열의 티미딘 (T) 뉴클레오티드가 RNA 서열의 우라실 (U) 뉴클레오티드로 대체되는 것을 제외하고는 주형에 존재하는 핵산 서열로 RNA 전사체를 생성한다. IVT에 의해 생산된 RNA 전사체는 예컨대 5' 캡의 첨가, RNA로부터 하나 이상의 뉴클레오티드의 절단, 또는 폴리-A 영역을 연장하기 위한 폴리아데닐화에 의한 테일링 핵산의 라이게이션 전에 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 주형은 IVT가 폴리-A 영역을 갖는 mRNA 또는 비-코딩 RNA를 생산하도록 폴리-A 영역을 포함한다. 예를 들

어 문헌 [Becker et al. *Methods Mol Biol.*, 2011. 703:29-41]을 참조한다.

[0408] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, RNA의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 기를 포함하고, 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 포스페이트 기를 포함한다. RNA의 3' 말단 히드록실 기 및 테일링 핵산의 5' 말단 포스페이트 기의 조합은 2개의 핵산의 효율적인 라이게이션을 허용한다. 일부 실시양태에서, RNA는 5' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않는다. RNA는 5' 캡의 첨가 또는 또 다른 화학적 변형으로 인해 5' 말단 포스페이트 기가 결여될 수 있다. 5' 말단 포스페이트는 또한 포스파타제 효소에 의해 RNA로부터 제거되어 5' 말단 포스페이트가 결여된 RNA를 생성할 수 있다. RNA 상의 5' 말단 포스페이트 기의 결여는 RNA 리가제가 mRNA 또는 비-코딩 RNA의 다중 카피를 함께 라이게이션하는 것을 방지한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 3' 말단 히드록실 기를 포함하지 않는다. 테일링 핵산의 마지막 뉴클레오티드가 3' 히드록실 기를 함유하지 않는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 디데옥시구아노신, 디데옥시티미딘, 또는 역전된-데옥시티미딘을 포함하는 경우 RNA는 3' 말단 히드록실 기가 결여될 수 있다. 테일링 핵산 상의 3' 말단 히드록실 기의 결여는 RNA 리가제가 다중 테일링 핵산을 함께 라이게이션하는 것을 방지한다. 일부 실시양태에서, RNA의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고; RNA의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 기를 포함하고; 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 포스페이트 기를 포함하고; 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 히드록실 기를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 순차적 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산을 RNA에 라이게이션하는데 사용되는 리가제는 RNA 리가제이다. 일부 실시양태에서, RNA 리가제는 T4 RNA 리가제이다. 일부 실시양태에서, T4 RNA 리가제는 T4 RNA 리가제 1이다. 일부 실시양태에서, T4 RNA 리가제는 T4 RNA 리가제 2이다.

[0409] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, RNA의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 히드록실 기를 포함하지 않고, RNA의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 포스페이트 기를 포함하고, 테일링 핵산의 5' 뉴클레오티드는 5' 말단 히드록실 기를 포함하고, 테일링 핵산의 3' 뉴클레오티드는 3' 말단 포스페이트 기를 포함하지 않고, RNA 리가제는 RtcB 리가제이며, 이는 3' 말단 포스페이트 기를 포함하는 제1 뉴클레오티드를 5' 말단 히드록실 기를 포함하는 제2 뉴클레오티드에 라이게이션한다.

[0410] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 제조하는 방법의 일부 실시양태는 원형 mRNA 또는 원형 비-코딩 RNA를 생산하는 것을 추가로 포함한다. 선형 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA가 RNA 및 테일링 핵산을 라이게이션함으로써 생산된 후, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 원형화는 여러 추가 단계를 포함한다. 첫째, 5' 말단 포스페이트는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 제1 뉴클레오티드에 도입되며, 이 프로세스는 인산화로 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 5' 말단 포스페이트는 키나제에 의해 도입된다. "키나제"는 "인산화"로 지칭되는 프로세스에서 포스페이트 기를 분자에 도입하여 포스페이트 기와 분자 사이에 공유 결합을 형성하는 효소를 지칭한다. 둘째, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 조작되어 3' 말단 히드록실 기를 갖는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 변형된 RNA의 하나 이상의 마지막 뉴클레오티드를 절단함으로써 조작되어 3' 말단 히드록실

기를 갖는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 제한 효소, 리보자임 또는 엔도리보뉴클레아제에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 하나 이상의 마지막 뉴클레오티드의 절단은 변형된 RNA의 제1 뉴클레오티드의 인산화 전에 발생한다. 일부 실시양태에서, 절단은 인산화 후에 발생한다. 한쪽 단부에 말단 포스페이트 기 및 다른 단부에 말단 히드록실 기를 포함하는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 양쪽 말단 뉴클레오티드의 라이게이션에 의해 원형화될 수 있다. 선형 핵산의 말단 뉴클레오티드를 라이게이션하여 원형 핵산을 생성하는 RNA 리가제는 "원형화 리가제"라고 불릴 수 있다. 일부 실시양태에서, 원형화 리가제는 RNA 리가제이다. 일부 실시양태에서, 원형화 리가제는 SplintR 리가제이다. 일부 실시양태에서, 원형화 리가제는 T4 RNA 리가제이다. 일부 실시양태에서, 원형화 리가제는 T4 RNA 리가제 1이다. 일부 실시양태에서, 원형화 리가제는 T4 RNA 리가제 2이다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 5' 말단 히드록실 기 및 3' 말단 포스페이트 기를 포함하고, 원형화 리가제는 RtcB 리가제이고, 이는 3' 말단 포스페이트 및 5' 말단 히드록실 기를 갖는 뉴클레오티드를 라이게이션할 수 있다. 라이게이션이 발생하기 위해, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 5' 및 3' 말단 뉴클레오티드는 RNA 리가제가 두 뉴클레오티드 사이에 결합을 형성할 만큼 충분히 가까워야 한다. 라이게이션이 발생할 만큼 선형 핵산의 두 뉴클레오티드를 충분히 가깝게 배치하고 RNA를 원형화하는 방법은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어 문헌 [Petkovic *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2015. 43(4):2454-2465] 참조). 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA가 스캐폴드 핵산에 혼성화 (결합)될 때 원형 2차 구조를 형성하도록 변형된 RNA에 혼성화 (수소 결합)할 수 있는 스캐폴드 핵산과 함께 인큐베이션된다.

[0411] RNA가 원형 2차 구조를 형성할 때, 5' 및 3' 말단 뉴클레오티드는 물리적으로 매우 근접해 있으며, 이는 RNA 리가제가 이들 사이에 공유 결합을 형성하는데 필요하다. mRNA 또는 비-코딩 RNA를 원형화하는 방법의 일부 실시양태에서, RNA의 하나 이상의 마지막 뉴클레오티드는 스캐폴드 핵산의 제1 혼성화 서열에 결합되고, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 하나 이상의 제1 뉴클레오티드는 제1 혼성화 서열에 대해 3' (하류)에 있는 스캐폴드 핵산의 제2 혼성화 서열에 결합된다. 일부 실시양태에서, 제1 혼성화 서열은 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 제1 혼성화 서열은 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제1 혼성화 서열은 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 30개 이상, 35개 이상, 40개 이상, 45개 이상 또는 50개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 제1 혼성화 서열의 뉴클레오티드 중 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 최대 100%는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 마지막 N개의 뉴클레오티드에 상보적이며, 여기서 N은 제1 혼성화 서열의 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 혼성화 서열은 5개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 제2 혼성화 서열은 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제2 혼성화 서열은 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 30개 이상, 35개 이상, 40개 이상, 45개 이상 또는 50개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 제2 혼성화 서열의 뉴클레오티드 중 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 최대 100%는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 마지막 N개의 뉴클레오티드에 상보적이며, 여기서 N은 제2 혼성화 서열의 길이이다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드는 제1 혼성화 서열과 혼성화한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드는 제2 혼성화 서열과 혼성화한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 처음 5개 뉴클레오티드는 제1 혼성화 서열과 혼성화하고, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 적어도 마지막 5개 뉴클레오티드는 제2 혼성화 서열과 혼성화한다. 일부 실시양태에서, 제1 혼성화 서열의 마지막 뉴클레오티드 및 제2 혼성화 서열의 제1 뉴클레오티드는 스캐폴드 핵산에서 인접하고, 임의의 다른 뉴클레오티드에 의해 분리되지 않는다.

[0412] 본원에 제공된 원형 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 스캐폴드 핵산은 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA에 의한 원형 2차 구조의 형성을 촉진하는데 사용되지 않는다. 대신, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 3' 단부의 제2 혼성화 서열에 상보적인 5' 단부의 제1 혼성화 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각 혼성화 서열은 적어도 5개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각 혼성화 서열은 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 45개 또는 적어도 50개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0413] 본원에 제공된 원형 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 스캐폴드 핵산 및 원형화 리가제의 사용을 통해 원형화되지 않고, 오히려 2개의 뉴클레오티드 사이의 공유 결합의 형성과 같은 반응을 촉매하는 핵산인 리보자임에 의해 원형화된다. 일부 실시양태에서, 원형화 전에, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 mRNA의 5' UTR 또는 비-코딩 mRNA의 제1 뉴클레오티드에 대해 5' (상류)에 있

는 3' 인트론, 및 폴리-A 영역 및/또는 mRNA 또는 비-코딩 RNA의 하나 이상의 구조적 서열에 대해 3' (하류)에 있는 5' 인트론을 포함한다. 인트론을 제거하기 위해 pre-mRNA의 스플라이싱을 촉매하는 리보자임 및 다른 효소는 5' 인트론에 대해 5'에 있는 뉴클레오티드와 3' 인트론에 대해 3'에 있는 뉴클레오티드 사이의 공유 결합의 형성을 촉매하여, 원형 mRNA 또는 비-코딩 RNA의 형성을 초래할 수 있다. 예를 들어 문헌 [Wesselhoeft et al., Nat Commun. 2018. 9:2629]을 참조한다.

[0414] 본원에 제공된 원형 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 스캐폴드 핵산의 사용을 통해 원형화되지 않고, 오히려 mRNA 또는 비-코딩 RNA의 5' 및 3' 말단 뉴클레오티드를 근접하게 배치하는 비-코딩 RNA의 mRNA에 의해 2차 구조의 형성을 촉진하는 상보적 서열의 사용을 통해 원형화된다. 일부 실시양태에서, 원형화 전에 변형된 mRNA는 (i) 오픈 리딩 프레임에 대해 5' 또는 비-코딩 RNA에 대해 5'에 있는 제1 자기-혼성화 서열; (ii) 오픈 리딩 프레임에 대해 3' 또는 비-코딩 RNA에 대해 3'에 있는 제2 자기-혼성화 서열; (iii) 제1 자기-혼성화 서열에 대해 5'에 있는 제1 비-혼성화 서열; 및 (iv) 제2 자기-혼성화 서열에 대해 3'에 있는 제2 비-혼성화 서열을 포함한다. 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 있지만, 제1 및 제2 자기-혼성화 서열은 서로 혼성화할 수 없다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 자기-혼성화 서열의 혼성화는 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드가 100 Å 미만의 거리에 의해 분리되는 2차 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 5' 말단 뉴클레오티드 및 3' 말단 뉴클레오티드는 90 Å 미만, 80 Å 미만, 70 Å 미만, 60 Å 미만, 50 Å 미만, 40 Å 미만, 30 Å 미만, 20 Å 미만 또는 10 Å 미만의 거리에 의해 분리된다. 예를 들어 문헌 [Carmona, Ellese Marie. 2019. Circular RNA: Design Criteria for Optimal Therapeutical Utility. Doctoral dissertation, Harvard University, Graduate School of Arts & Sciences]; [Petkovic et al. *Nucleic Acids Res.*, 2015. 43(4):2454-2465]; 및 WO 2020/237227을 참조한다.

[0415] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 상기 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역에 대해 3'에 있는 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 구조적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 뉴클레오티드는 수소 결합에 의해 상호작용한다. 일부 실시양태에서, 2차 구조는 G-쿼드러플렉스이다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 구아닌 뉴클레오티드가 아닌 하나 이상의 스페이서 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 2)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 2의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 3의 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 텔로미어 반복 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4 또는 5 (각각 TAGGGT 또는 TACCCT) 중 하나로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 서열식별번호: 4의 핵산 서열의 적어도 3개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 압타머 서열이다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 의해 형성된 2차 구조는 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머이다. mRNA 또는 비-코딩 RNA에 의한 압타머의 형성은 mRNA 또는 비-코딩 RNA가 표적 분자, 예컨대 수용체를 함유하는 세포의 주어진 영역에 편재화되는 것을 허용한다.

[0416] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 구조적 서열의 1-20개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 구조적 서열의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개 또는 적어도 9개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 구조적 서열의 약 4개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 다중 상이한 구조적 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 구조적 서열, 및 제1 구조적 서열과 상이한 핵산 서열을 포함하는 제2 구조적 서열을 포함한다.

[0417] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴

클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 핵염기를 포함한다: 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 당을 포함한다: 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2' 변형은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트를 포함한다: 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니디늄 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 구아닌 뉴클레오티드 및 적어도 3개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 3개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 20개의 데옥시리보스 당을 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지

않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 2' 변형을 포함하는 적어도 6개의 순차적 뉴클레오티드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 적어도 6개의 포스포로티오에이트 및 3개의 구아닌 뉴클레오시드를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 G-쿼드러플렉스 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA의 폴리-A 영역은 텔로미어 반복 서열의 적어도 3개 카피 및 적어도 6개의 포스포로티오에이트를 포함하고, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 3' 말단 히드록실을 포함하지 않는 3' 말단 뉴클레오티드는 디데옥시시티딘 또는 역전된-데옥시티미딘이다.

[0418] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 하나 초과의 유형의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 변형된 뉴클레오시드, 및 제1 변형된 뉴클레오시드와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 적어도 제1 변형된 포스페이트, 및 제1 변형된 포스페이트와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0419] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0420] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0421] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 아데노신 뉴클레오티드이다. 폴리-A 영역의 하나 이상의 아데노신 뉴클레오티드는 정준 아데노신 뉴클레오티드 또는 정준 아데노신 뉴클레오티드와 상이한 구조를 포함하는 변형된 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다.

[0422] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 뉴클레오티드 중 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%는 정준 아데노신 뉴클레오티드이다.

[0423] 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 110개, 적어도 120개, 적어도 130개, 적어도 140개, 적어도 150개, 적어도 160개, 적어도 170개, 적어도 180개, 적어도 190개, 적어도 200개, 적어도 210개, 적어도 220개, 적어도 230개, 적어도 240개, 적어도 250개, 적어도 260개, 적어도 270개, 적어도 280개, 적어도 290개 또는 적어도 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 200 내지 약 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 250개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0424] 본원에 제공된 변형된 mRNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, RNA는 테일

링 핵산의 라이게이션 전에 오픈 리딩 프레임 및 폴리-A 영역을 포함한다. 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, RNA는 비-코딩 RNA를 포함하고, 테일링 핵산의 라이게이션 전에 폴리-A 영역을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, RNA의 폴리-A 영역은 적어도 25-500개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 110개, 적어도 120개, 적어도 130개, 적어도 140개, 적어도 150개, 적어도 160개, 적어도 170개, 적어도 180개, 적어도 190개, 적어도 200개, 적어도 210개, 적어도 220개, 적어도 230개, 적어도 240개, 적어도 250개, 적어도 260개, 적어도 270개, 적어도 280개, 적어도 290개 또는 적어도 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 200 내지 약 300개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 250개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0425] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, 테일링 핵산은 적어도 10-500개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 150개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 110개, 적어도 120개, 적어도 130개, 적어도 140개, 적어도 150개, 적어도 160개, 적어도 170개, 적어도 180개, 적어도 190개 또는 적어도 200개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역은 약 10 내지 약 50개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0426] 본원에 제공된 변형된 mRNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, RNA는 5'에서 3' 순서로 5' UTR, 오픈 리딩 프레임, 3' UTR 및 폴리-A 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 오픈 리딩 프레임은 5' UTR과 3' UTR 사이에 있다. 일부 실시양태에서, 3' UTR은 오픈 리딩 프레임과 폴리-A 영역 사이에 있다.

[0427] 본원에 제공된 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, RNA는 5'에서 3' 순서로 비-코딩 RNA 및 임의로 폴리-A 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 영역의 제1 뉴클레오티드는 비-코딩 RNA의 마지막 뉴클레오티드에 대해 3'에 있다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, 비-코딩 RNA는 폴리-A 테일을 포함하지 않는다. 따라서, 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 테일링 핵산을 비-코딩 RNA의 3' 단부에 라이게이션하여, 이에 의해 폴리-A 영역을 포함하는 변형된 비-코딩 RNA를 생산함으로써 비-코딩 RNA의 3' 단부에 첨가되는 본원에 기재된 폴리-A 영역을 포함한다.

[0428] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, RNA는 5' 캡을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아노신을 RNA의 인접한 뉴클레오티드에 연결하는 하나 이상의 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 캡은 테일링 핵산의 라이게이션 후에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 라이게이션 전에, RNA는 5' 캡을 포함하지 않는다 (예를 들어, RNA는 5' 캡을 포함하지 않는 mRNA 또는 비-코딩 RNA임).

[0429] 테일링 핵산을 mRNA 또는 비-코딩 RNA에 라이게이션하는 것을 포함하는, 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 측면에서, 테일링 핵산은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기 및/또는 변형된 당을 포함하는 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기 및 변형된 당을 포함하는 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 핵염기를 포함한다: 크산틴, 알릴아미노우라실, 알릴아미노티미딘, 하이포크산틴, 디곡시게닌화 아데닌, 디곡시게닌화 시토신, 디곡시게닌화 구아닌, 디곡시게닌화 우라실, 6-클로로퓨린리보시드, N6-메틸아데닌, 메틸슈도우라실, 2-티오시토신, 2-티오우라실, 5-메틸우라실, 4-티오티미딘, 4-티오우라실, 5,6-디히드로-5-메틸우라실, 5,6-디히드로우라실, 5-[(3-인돌릴)프로피온아미드-N-알릴]우라실, 5-아미노알릴시토신, 5-아미노알릴우라실, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 5-카르복시시토신, 5-카르복시메틸에스테르우라실, 5-카르복시우라실, 5-플루오로우라

실, 5-포르밀시토신, 5-포르밀우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸우라실, 5-히드록시우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메톡시시토신, 5-메톡시우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-프로파르길아미노시토신, 5-프로파르길아미노우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 6-아자시토신, 6-아자우라실, 6-클로로퓨린, 6-티오구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노아데닌, 7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 8-아자아데닌, 8-아지도아데닌, 8-클로로아데닌, 8-옥소아데닌, 8-옥소구아닌, 아라아데닌, 아라시토신, 아라구아닌, 아라우라실, 비오틴-16-7-데아자-7-프로파르길아미노구아닌, 비오틴-16-아미노알릴시토신, 비오틴-16-아미노알릴우라실, 시아닌 3-5-프로파르길아미노시토신, 시아닌 3-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 3-아미노알릴시토신, 시아닌 3-아미노알릴우라실, 시아닌 5-6-프로파르길아미노시토신, 시아닌 5-6-프로파르길아미노우라실, 시아닌 5-아미노알릴시토신, 시아닌 5-아미노알릴우라실, 시아닌 7-아미노알릴우라실, 답실-5-3-아미노알릴우라실, 데스티오비오틴-16-아미노알릴-우라실, 데스티오비오틴-6-아미노알릴시토신, 이소구아닌, N1-에틸슈도우라실, N1-메톡시메틸슈도우라실, N1-메틸아데닌, N1-메틸슈도우라실, N1-프로필슈도우라실, N2-메틸구아닌, N4-비오틴-OBEA-시토신, N4-메틸시토신, N6-메틸아데닌, O6-메틸구아닌, 슈도이소시토신, 슈도우라실, 티에노시토신, 티에노구아닌, 티에노우라실, 크산토신, 3-데아자아데닌, 2,6-디아미노아데닌, 2,6-디아미노구아닌, 5-카르복스아미드-우라실, 5-에티닐우라실, N6-이소펜테닐아데닌 (i6A), 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌 (ms2i6A), 2-메틸티오-N6-메틸아데닌 (ms2m6A), N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (io6A), 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데닌 (ms2io6A), N6-글리시닐카르바모일아데닌 (g6A), N6-트레오닐카르바모일아데닌 (t6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데닌 (ms2t6A), N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데닌 (m6t6A), N6-히드록시노르발릴카르바모일아데닌 (hn6A), 2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데닌 (ms2hn6A), N6,N6-디메틸아데닌 (m62A), 및 N6-아세틸아데닌 (ac6A). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 당을 포함한다: 2'-티오리보스, 2',3'-디데옥시리보스, 2'-아미노-2'-데옥시리보스, 2' 데옥시리보스, 2'-아지도-2'-데옥시리보스, 2'-플루오로-2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메틸데옥시리보스, 3'-아미노-2',3'-디데옥시리보스, 3'-아지도-2',3'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보스, 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시리보스, 3'-O-메틸리보스, 5'-아미노리보스, 5'-티오리보스, 5-니트로-1-인돌릴-2'-데옥시리보스, 5'-비오틴-리보스, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결된, 2'-O,4'-C-아미노-연결된 리보스, 및 2'-O,4'-C-티오-연결된 리보스. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 2' 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2' 변형은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 잠금-핵산 (LNA) 변형 (즉, 리보스의 2' 산소 및 4' 탄소에 결합된 추가 탄소 원자를 포함하는 뉴클레오티드), 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시-에틸 (2'-MOE), 및 2'-O-메틸화 (2'-OMe). 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 포스페이트를 포함한다: 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트, 티오포스페이트, 5'-O-메틸포스포네이트, 3'-O-메틸포스포네이트, 5'-히드록시포스포네이트, 히드록시포스파네이트, 포스포로셀레노에이트, 셀레노포스페이트, 포스포라미데이트, 카르보포스포네이트, 메틸포스포네이트, 페닐포스포네이트, 에틸포스포네이트, H-포스포네이트, 구아니딘 고리, 트리아졸 고리, 보라노포스페이트 (BP), 메틸포스포네이트, 및 구아니디노프로필 포스포라미데이트.

[0430] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 하나 초과의 유형의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 제1 변형된 뉴클레오시드, 및 제1 변형된 뉴클레오시드와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 제1 변형된 포스페이트, 및 제1 변형된 포스페이트와 상이한 구조를 갖는 제2 변형된 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0431] 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 뉴클레오티드 중 1% 내지 90%는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 뉴클레오티드 중 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 16%, 적어도 18%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50%는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 3개 이상은 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산의 마지막 25개 뉴클레오티드 중 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개는 변형된 뉴클레오티드이다.

[0432] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 하나 이상의 구조적 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 G-쿼드러플렉스 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 RNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부

실시양태에서, RNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 2)를 포함한다. 일부 실시양태에서, G-쿼드러플렉스 서열은 DNA G-쿼드러플렉스 서열이다. 일부 실시양태에서, DNA G-쿼드러플렉스 서열은 핵산 서열 GGGGCC (서열식별번호: 3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 텔로미어 반복 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4 또는 5 (각각 TAGGGT 또는 TACCCT) 중 하나로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 텔로미어 반복 서열은 서열식별번호: 4로서 기재된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열은 상호작용하여 압타머를 형성할 수 있는 적어도 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 압타머 서열이다. 일부 실시양태에서, 구조적 서열의 하나 이상의 카피에 의해 형성된 2차 구조는 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머이다.

[0433] 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법의 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 구조적 서열의 1-20개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 구조적 서열의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개 또는 적어도 9개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 구조적 서열의 약 4개 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 다중 상이한 구조적 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 테일링 핵산은 적어도 제1 구조적 서열, 및 제1 구조적 서열과 상이한 핵산 서열을 포함하는 제2 구조적 서열을 포함한다. 상이한 제1 및 제2 구조적 서열 각각은 본원에 제공된 임의의 구조적 서열 또는 상이한 서열일 수 있다. 추가 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 생산하는 방법은 또한 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 단리하는 (예를 들어, 정제하는, 풍부화하는) 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 단리하는 (예를 들어, 정제하는, 풍부화하는) 방법은 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 혼합물 (예를 들어, 라이게이션 혼합물)을 정제 배지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 정제 배지와 상호작용하여 변형된 RNA-정제 배지 접합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 변형된 RNA-정제 배지 접합체를 형성한 정제 배지는 하나 이상의 물리적 또는 화학적 특성, 예컨대 크기 (질량) 또는 전하 (그러나 이에 제한되지는 않음)에 의해 혼합물로부터 분리된다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 변형된 RNA-정제 배지 접합체를 용매로 처리함으로써 정제 배지로부터 용리된다 (즉, 정제 배지로부터 분리된다). 일부 실시양태에서, 용매는 수성 용매 (예를 들어, 물)이다. 특정 실시양태에서, 용매는 2개 이상 (예를 들어, 3개)의 용매의 혼합물이다. 특정 실시양태에서, 용매는 물 및 유기 용매 (예를 들어, 아세토니트릴, 메탄올, 에탄올, 테트라히드로푸란)의 혼합물이다. 특정 실시양태에서, 용매는 이동상 변형 성분을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 이동상 변형 성분은 산 (예를 들어, 트리플루오로아세트산, 아세트산, 포름산, 인산), 염기 (암모니아, 수산화암모늄, 중탄산암모늄), 또는 염 (포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 암모늄 포르메이트, 또는 보레이트)이다. 일부 실시양태에서, 정제 배지는 고체 정제 배지이다. 일부 실시양태에서, 정제 배지는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정제 배지는 수지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정제 배지는 상자성 비드를 포함한다. RNA의 정제에 적합한 정제 배지의 예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 다양한 상업적으로 이용가능한 정제 배지를 포함한다 (예를 들어 문헌 [벡크만 쿨터 라이프 사이언시스(Beckman Coulter Life Sciences) # A63987] 참조). 특정 실시양태에서, 이 단락에 기재된 단계는 0 내지 20℃, 20 내지 25℃, 25 내지 36℃, 36 내지 38℃ (경계값 포함)의 온도에서 수행된다. 특정 실시양태에서, 이 단락에 기재된 단계는 0.9 내지 1.1 atm (경계값 포함)의 압력에서 수행된다.

[0434] 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 조성물 및 사용 방법

[0435] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 테일링 핵산을 RNA에 라이게이션하는 것을 포함하는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 의해 제조된다. 변형된 mRNA를 포함하는 조성물은 외래 항원에 대해 대상체를 백신접종하거나 병태 또는 장애를 치료하기 위해 치료용 단백질을 발현시키기 위해 변형된 mRNA를 세포에 전달하는데 유용하다. 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 조성물은 세포 또는 대상체에서 유전자의 발현을 조정하거나 세포 또는 대상체의 게놈을 편집하는데 유용하며, 병태 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 조성물은 또한 예컨대 농업적 용도를 위해 질환이 없는 대상체에서 원하는 효과를 발휘하는데 유용하다. 예를 들어, 생물학적 살충제 또는 성장-증대 인자를 코딩하는 mRNA 또는 게놈 편집을 위한 비-코딩 RNA는 각각 해충에 대한 식물의 관용성을 증가시키거나 작물 수율을 증가시키는 방식으로 성장을 조정하는데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA 또는 이의 조성물은 식물 또는 식물 세포에 대한 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 전달 및/또는 안정성을 증진시키는데 사용될 수 있으며, 관련 기술분야에서 잘 확립된 식물 게놈 조작을 위한 기술을 증대시

키는데 사용될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Stoddard, et al. PLoS One. 2016;11(5):e0154634]을 참조한다.

[0436] 일부 실시양태에서, mRNA의 오픈 리딩 프레임은 대상체의 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 본원에서 사용된 바와 같은 "코돈-최적화된"은 세포에서 더 효율적으로 번역되는 코돈의 우선적인 사용을 지칭한다. 다중 코돈은 동일한 아미노산을 코딩할 수 있으며, 각 코돈의 번역 속도 및 효율은 상보적 안티코돈을 포함하는 아미노아실-tRNA의 세포내 농도와 같은 다중 인자에 의해 결정된다. 핵산 서열의 코돈 최적화는 대체된 코돈과 동일한 아미노산을 코딩하지만 그보다 더 효율적으로 번역되는 코돈으로 하나 이상의 코돈을 대체하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 트레오닌 (Thr)은 ACA, ACC, ACG 또는 ACT (RNA에서 ACU)에 의해 코딩될 수 있지만, 포유동물 숙주 세포에서는 ACC가 가장 흔하게 사용되는 코돈이며; 다른 종에서는, 코돈-최적화를 위해 상이한 Thr 코돈이 바람직할 수 있다. 그러므로 코돈-최적화된 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA는 코돈-최적화되지 않은 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA보다 더 효율적으로 번역되고 주어진 시간 내에 더 많은 폴리펩티드를 생산할 것으로 예상된다. 일부 실시양태에서, 오픈 리딩 프레임은 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0437] 본원에 제공된 변형된 mRNA의 일부 실시양태에서, 오픈 리딩 프레임은 항원 또는 치료용 단백질을 코딩한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "치료용 단백질"은 질환 또는 장애를 갖고 있거나 발병할 위험이 있는 대상체, 예컨대 인간 대상체에서 발현될 때 질환의 하나 이상의 징후 또는 증상을 예방, 감소 또는 경감시키는 단백질을 지칭한다. 치료용 단백질은 대상체에서 돌연변이된 유전자에 의해 코딩되는 필수 효소 또는 전사 인자일 수 있다. 예를 들어, 인간의 IPEX 증후군은 FOXP3+ 조절성 T 세포의 발달을 방해하고 자가면역 및 염증성 장애에 대한 증가된 감수성을 초래하는 FOXP3 유전자의 돌연변이에 의해 야기된다. 따라서 mRNA로부터 필수 효소 또는 전사 인자의 발현은 대상체에서 효소 또는 전사 인자를 코딩하는 유전자의 돌연변이를 보상할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "항원"은 대상체에서 발현될 때 대상체에서 항원에 결합하는 항체의 생성을 유발하는 분자 (예를 들어, 단백질)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항원은 바이러스로부터 유래된 단백질 (바이러스 항원) 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 항원은 박테리아로부터 유래된 단백질 (박테리아 항원) 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 항원은 원생동물로부터 유래된 단백질 (원생동물 항원) 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 항원은 진균으로부터 유래된 단백질 (진균 항원) 또는 이의 단편이다. 전장 단백질의 단편은 전장 단백질의 아미노산 서열에 존재하지만 그보다 짧은 아미노산 서열을 갖는 단백질을 지칭한다.

[0438] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 지질 나노입자를 제공한다. 지질 나노입자는 지질의 응집체를 형성하는 하나 이상의 지질, 또는 내부 표면 및 외부 표면을 갖는 봉입된 구조를 포함하는 조성물을 지칭한다. mRNA 또는 비-코딩 RNA를 전달하기 위한 지질 나노입자의 제형화에 사용되는 지질은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 이온화가능한 아미노 지질, 비-양이온성 지질, 스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜-변형된 지질을 포함한다. 예를 들어 문헌 [Buschmann et al. *Vaccines*. 2021. 9(1):65]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 지질 나노입자의 지질에 의해 둘러싸여 있고 지질 나노입자의 내부에 존재한다. 일부 실시양태에서, mRNA 또는 비-코딩 RNA는 지질 나노입자의 지질 전반에 걸쳐 분산된다. 일부 실시양태에서, 지질 나노입자는 이온화가능한 아미노 지질, 비-양이온성 지질, 스테롤 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-변형된 지질을 포함한다.

[0439] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA 중 어느 하나를 포함하는 인간 세포이다. "세포"는 모든 공지된 독립적으로 살아있는 유기체의 기본 구조적 및 기능적 유닛이다. 이는 생물로 분류되는 생명체의 가장 작은 단위이다. 일부 유기체, 예컨대 대부분의 박테리아는 단세포 (단일 세포로 이루어짐)이다. 다른 유기체, 예컨대 식물, 진균, 및 소, 말, 닭, 칠면조, 양, 돼지, 개, 고양이 및 인간을 포함한 동물은 다세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 내 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 반감기는 15-900분이다. 일부 실시양태에서, 세포 내 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 반감기는 30-600분이다. 일부 실시양태에서, 세포 내 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 반감기는 60-300분이다. 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 반감기는 적어도 15분, 적어도 20분, 적어도 25분, 적어도 30분, 적어도 35분, 적어도 40분, 적어도 45분, 적어도 50분, 적어도 55분, 적어도 60분이다. 일부 실시양태에서, 세포 내 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA의 반감기는 적어도 30분, 적어도 60분, 적어도 90분, 적어도 120분, 적어도 150분, 적어도 180분, 적어도 210분, 적어도 240분, 적어도 270분, 적어도 300분, 적어도 330분, 적어도 360분, 적어도 390분, 적어도 420분, 적어도 450분, 적어도 480분, 적어도 510분, 적어도 540분, 적어도 570분, 적어도 600분, 적어도 630분, 적어도 660분, 적어도 690분, 적어도 720분, 적어도 750분, 적어도 780분, 적어도 810분, 적어도 840분 또는 적어도 870분이다.

[0440] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자 또는 세포 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 제공된 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자 또는 세포 중 어느 하나, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이다. 제약상 허용되는 부형제, 담체, 완충제, 안정화제, 등장화제, 보존제 또는 항산화제, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 물질. 이러한 물질은 무독성이어야 하며 활성 성분의 효능을 방해해서는 안된다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 투여 경로, 예를 들어 비경구, 근육내, 피내, 설하, 협측, 안구, 비강내, 피하, 척수강내, 종양내, 경구, 질 또는 직장에 따라 달라질 수 있다.

[0441] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 변형된 mRNA, 변형된 비-코딩 RNA, 지질 나노입자, 세포, 조성물 또는 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 다양한 시약 또는 물질 (예를 들어, 하나 이상의 지질 나노입자, 세포, 조성물 또는 제약 조성물)과 함께, 또는 관련 기술분야에 공지된 특정 생산, 정제, 제형화 및 전달 프로세스 및 기술, 예컨대 미국 특허 번호 9950065, 10576146, 11045418, 8754062, 10808242, 9957499, 10155785, 11059841, 10876104, 10975369, 9580711, 9670152, 9850202, 9896413, 10399937, 10052284, 10959953 및 10961184에 예시되어 있지만 이에 제한되지는 않는 것들로 사용될 수 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0442] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 투여는 비경구, 근육내, 피내, 설하, 협측, 안구, 비강내, 피하, 척수강내, 종양내, 경구, 질 또는 직장이다.

[0443] 일부 실시양태에서, 조성물은 시간 경과에 따라 핵산이 상대적으로 안정적이도록 50℃ 미만, 40℃ 미만, 30℃ 미만, 20℃ 미만, 10℃ 미만, 0℃ 미만, -10℃ 미만, -20℃ 미만, -30℃ 미만, -40℃ 미만, -50℃ 미만, -60℃ 미만, -70℃ 미만 또는 -80℃ 미만에서 저장되어야 한다.

[0444] 일부 실시양태에서, 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA는 생체내 전기천공에 의해 대상체의 세포에 도입된다. 생체내 전기천공은 전기 펄스를 사용하여 대상체의 세포에 핵산 또는 다른 분자를 도입하는 프로세스이며, 세포막 및/또는 세포벽을 통한 핵산 또는 다른 분자의 통과를 촉진한다. 예를 들어 문헌 [Somiari et al. *Molecular Therapy.*, 2000. 2(3):178-187]을 참조한다. 전달될 핵산 또는 분자는 예컨대 주사에 의해 대상체에게 투여되고, 전기 펄스가 주사 부위에 적용되며, 이로써 전기는 투여 부위에서 세포로의 핵산의 유입을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 전기천공의 효율을 증가시키는 다른 요소, 예컨대 완충제 및/또는 부형제와 함께 투여된다.

[0445] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 RNA 및 임의의 테일링 핵산을 포함하는 키트를 제공한다. RNA 및 테일링 핵산은 RNA 리가제의 존재 하에 조합되어 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA, 예컨대 본원에 제공된 변형된 mRNA 또는 변형된 비-코딩 RNA 중 하나를 생산할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 리가제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 RNA 리가제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 T4 RNA 리가제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 T4 RNA 리가제 1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 T4 RNA 리가제 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 RtcB RNA 리가제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 라이게이션을 수행하기 위한 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 리가제에 의해 요구되는 에너지를 제공하기 위해 뉴클레오티드 트리포스페이트, 예컨대 ATP를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 시간 경과에 따라 핵산이 상대적으로 안정적이도록 50℃ 미만, 40℃ 미만, 30℃ 미만, 20℃ 미만, 10℃ 미만, 0℃ 미만, -10℃ 미만, -20℃ 미만, -30℃ 미만, -40℃ 미만, -50℃ 미만, -60℃ 미만, -70℃ 미만 또는 -80℃ 미만에서 저장되어야 한다.

[0446] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 제약 조성물 중 어느 하나 및 전달 디바이스를 포함하는 키트를 제공한다. 전달 디바이스는 대상체에게 조성물을 투여하는데 적합한 기계 또는 장치, 예컨대 주사기 또는 바늘을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 키트는 시간 경과에 따라 제약 조성물의 핵산이 상대적으로 안정적이도록 50℃ 미만, 40℃ 미만, 30℃ 미만, 20℃ 미만, 10℃ 미만, 0℃ 미만, -10℃ 미만, -20℃ 미만, -30℃ 미만, -40℃ 미만, -50℃ 미만, -60℃ 미만, -70℃ 미만 또는 -80℃ 미만에서 저장되어야 한다.

[0447] 실시예

[0448] 본 개시내용을 더욱 완전히 이해할 수 있도록, 하기 실시예를 기재한다. 실시예는 본원에 제공된 변형된 mRNA, 제약 조성물, 키트 및 방법을 예시하기 위해 제공되며 어떤 방식으로든 그 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0449] 실시예 1: 변형된 mRNA의 생산.

[0450] 5' 비번역 영역 (UTR), 원하는 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임 및 3' UTR을 코딩하는 DNA 주형의 시험관내 전사 (IVT)에 의해 변형된 mRNA를 생산한다. DNA 주형은 또한 3' UTR을 코딩하는 주형의 하류에 있는 반복된 티미딘 염기 (폴리(T) 서열)를 함유하는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 폴리(T) DNA 서열로부터 RNA를 전사할 때, RNA 폴리머라제는 항상 DNA 주형을 따라 진행하지 않고 전사된 RNA에 다중 아데노신 염기를 첨가하면서 더듬거린다. 이는 RNA의 3' 단부에 첨가되는 폴리(A) 테일로 공지된 아데노신 염기만을 함유하는 긴 RNA 서열의 첨가를 초래한다 (도 1).

[0451] 대안적으로, 폴리(A) 테일이 없는 RNA 전사체는 폴리(T) 서열을 함유하지 않는 DNA 주형의 시험관내 전사에 의해 생산될 수 있으며, 폴리(A) 테일은 테일링 반응에서 별도로 이들 전사체에 첨가될 수 있다. RNA 분자의 3' 단부에 뉴클레오티드를 첨가할 수 있는 효소, 예컨대 폴리(A) 폴리머라제 (PAP)의 존재 하에 아데노신 트리포스페이트 (ATP) 또는 변형된 ATP와 함께 RNA 분자를 인큐베이션한다. ATP 및 하나 이상의 변형된 ATP의 혼합물과 함께 RNA 및 폴리아데닐화 효소의 인큐베이션은 폴리(A) 테일의 첨가를 초래한다. 상기 기재된 이들 방법 중 하나에 의해 생산된 변형된 mRNA는 선형 mRNA이며, 이는 5' 및 3' 말단 뉴클레오티드를 갖는다.

[0452] 변형된 mRNA는 5' 또는 3' 단부가 없는 단일-가닥 mRNA 분자인 원형 mRNA일 수 있다 (도 2a). 원형 mRNA는 원형화될 선형 mRNA를 i) mRNA의 3' 단부에 있는 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열 (3' DNA 보체), 및 ii) mRNA의 5' 단부에 있는 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열 (5' DNA 보체)을 포함하는 또 다른 단일-가닥 핵산, 예컨대 DNA 올리고뉴클레오티드와 함께 인큐베이션함으로써 생산되며, 여기서 3' DNA 보체는 DNA 올리고뉴클레오티드 상의 5' DNA 보체의 바로 하류 (3')에 있다. mRNA는 상보적 올리고뉴클레오티드와 혼성화하여, mRNA의 3' 말단 뉴클레오티드가 mRNA의 5' 말단 뉴클레오티드에 대해 5'에 있도록 한다. 리가제, 예컨대 SplintR 리가제는 mRNA의 두 말단 염기 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성하여, 말단 뉴클레오티드를 갖지 않는 원형 mRNA 분자의 형성을 초래한다.

[0453] 실시예 2: mRNA로부터의 단백질 생산 효율에 대한 변형된 염기의 효과.

[0454] GFP 또는 mCherry를 코딩하고 폴리(A) 테일이 결여된 RNA를 시험관내 전사에 의해 생산하였다. 뉴클레오티드의 상이한 조성물을 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 RNA를 폴리아데닐화하여 상이한 폴리(A) 테일을 갖는 mRNA를 생산하였다. a) ATP, b) 95% ATP 및 5% 변형된 ATP의 혼합물, c) 75% ATP 및 25% 변형된 ATP의 혼합물, 또는 d) 음성 대조군으로서 ATP 없음 (비테일링)을 사용하여 GFP를 코딩하는 RNA를 폴리아데닐화하였다. 테스트된 변형된 ATP는 m6ATP, 2'OMeATP, 티오-ATP, dATP 및 아미노-dATP를 포함하였다. mCherry를 코딩하는 RNA를 ATP로 폴리아데닐화하여 정준 폴리(A) 테일을 갖는 대조군 mRNA를 생산하였다. GFP-코딩 mRNA 및 대조군 mCherry-코딩 mRNA의 혼합물을 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 후 1, 2 및 3일에, 각 세포 집단에서 생산된 GFP 및 mCherry 단백질의 양을 형광 현미경검사에 의해 정량화하고, 생산된 GFP/mCherry의 비율을 계산하였다. 폴리(A) 테일에 변형된 ATP를 함유하는 각각의 GFP-코딩 mRNA는 ATP만을 사용한 폴리아데닐화에 의해 생산된 GFP-코딩 mRNA에 비해 더 큰 GFP/mCherry 비율을 초래하였다 (도 3). 일반적으로, 폴리아데닐화 반응에서 25% 변형된 ATP의 사용은 오직 5% 변형된 ATP의 사용보다 GFP/mCherry 비율의 더 현저한 증가를 초래하였으며, 이는 변형된 아데노신의 폴리(A) 테일에의 더 빈번한 포함이 변형된 mRNA로부터의 단백질 생산 효율을 추가로 개선하였음을 나타낸다.

[0455] 실시예 3: 변형된 mRNA의 생화학적 및 기능적 특징화.

[0456] 변형된 염기인 폴리(A) 테일과 같은 mRNA의 주어진 영역 내 염기의 비율 및 순도를 포함하는 다중 생화학적 파라미터에 따라 변형된 mRNA를 특징화한다. NMR 분광학을 사용하여 조성물 내 mRNA의 동일성을 평가한다. 겔 전기영동을 사용하여 mRNA를 함유하는 조성물의 순도를 평가하며, 순수한 조성물은 겔에 단일 밴드를 생성하는 단일 mRNA 종을 함유하고, 불순수한 조성물은 겔에 다중 밴드 또는 얼룩진 밴드를 생성하는 상이한 크기의 다중 mRNA 분자를 함유한다. 액체 칼럼 질량 분광분석법 (LC/MS)을 사용하여 변형된 뉴클레오티드의 혼입을 평가한다. 변형된 뉴클레오티드는 정준 뉴클레오티드와 상이하며 일반적으로 더 큰 분자량을 가지므로, 더 많은 변형된 뉴클레오티드의 mRNA로의 혼입은 mRNA 분자의 질량의 더 큰 이동 (대개 증가)을 초래할 것이다.

[0457] 세포-기반 스크린을 사용하여 단백질 번역에 대한 변형된 염기의 효과를 평가한다. 정준 염기를 포함하는 비변형된 mRNA와 병행하여 변형된 mRNA를 인간 세포의 별도의 집단으로 형질감염시킨다. 형질감염 후, 유동 세포계측법 및 ELISA를 포함한 관련 기술분야에 공지된 다중 방법 중 하나에 의해 단백질 생산 속도를 평가한다. 형질감염 후 원하는 시점에 형질감염된 세포를 용해시키고, 핵산을 단리하고, 역전사에 의해 용해물 내 mRNA로부

터 cDNA를 제조하고, 정량적 PCR을 사용하여 형질감염된 mRNA에 상응하는 cDNA의 양을 정량화함으로써 형질감염된 세포 내의 변형된 또는 비변형된 mRNA의 안정성을 평가한다. 관련 기술분야에 공지된 다중 방법 중 하나, 예컨대 톨-유사 수용체 또는 어댑터 단백질의 인산화된 신호전달 도메인에 대한 ELISA, 또는 외래 RNA, 예컨대 OAS1의 검출에 의해 활성화된 유전자의 qRT-PCR-기반 정량화를 사용하여 형질감염된 mRNA에 의한 선천적 면역 반응의 유도를 정량화한다.

[0458] 치료적 접근법에서, 변형된 mRNA를 인간 또는 동물 대상체에게 투여하여, 대상체의 세포 리보솜이 mRNA에 의해 코딩된 단백질 또는 단백질들을 생산하게 한다. mRNA는 생물발광 단백질, 예컨대 루시퍼라제를 코딩할 수 있어, 루시퍼라제 이미지화 시스템을 사용하여 대상체의 단백질 생산 효율을 측정할 수 있다. mRNA는 항원을 코딩할 수 있어, 대상체의 세포에서의 항원의 생산이 대상체가 항원에 특이적인 항체 및/또는 T 세포를 생산하도록 초래한다. 항원에 대한 대상체에 의해 생성된 면역 반응은 항원에 특이적인 항체를 정량화하기 위한 ELISA, 중화 항체를 정량화하기 위한 중화 검정, 및 T 세포 또는 항원-특이적 T 세포를 포함한 다중 유형의 면역 세포를 정량화하기 위한 유동 세포계측법을 포함하여 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 평가된다.

[0459] 실시예 4: 라이게이션에 의한 변형된 mRNA의 생산.

[0460] 도입

[0461] 메신저 RNA (mRNA) 치료제 및 백신은 SARS-CoV-2에 대한 mRNA 백신의 최근 임상 시험 및 승인에 의해 입증된 바와 같이 새로운 부류의 약물로서 빠르게 확립되고 있다.[1,2] mRNA 벡터는 프로그램화가능성, 생체내 단백질의 빠른 생산, 상대적으로 낮은 제조 비용, 및 동시에 다중 단백질을 표적화하는 잠재적 확장성으로 인해 통상적인 단백질-기반 약물에 대한 유망한 대안으로서 간주된다.[3-5] mRNA는 생체내 트랜스제닉 단백질을 강력하게 생성하는 것으로 나타났지만, mRNA의 상대적으로 짧은 반감기는 이 치료 플랫폼의 임상 적용을 제한할 수 있다.[3,6] 이 문제는 이전에 일부 백신 연구의 경우에서와 같이 RNA의 다중 주사 (예를 들어 "부스터" 용량)를 사용한 동물 연구 동안 회피되었지만,[7-9] 이 전략은 잠재적으로 치료적 적용 및 광범위한 분포를 제한할 수 있다.

[0462] 화학적 변형은 생체내 적용을 위해 번역 잠재성을 부스트시키고 mRNA의 독성을 감소시키는 효과적인 전략이다. 변형된 UTP 유도체 (예를 들어 슈도우리딘 & N1-메틸슈도우리딘)의 혼입은 RNA 형질감염 시 선천적 면역 독성을 감소시키기 위해 광범위하게 사용되어 왔다.[10-12] 원형 mRNA는 선형 대응물에 비해 증진된 반감기를 갖는 것으로 보고되었으며, 이는 분해가능한 5' 및 3' RNA 단부의 결여로 인한 것으로 추정된다.[13-15] 그러나, 원형 mRNA는 변형된 뉴클레오티드의 혼입을 강력하게 관용하지 않는 IRES 요소에 대한 의존성으로 인해 전반적으로 더 낮은 발현 수준으로 어려움을 겪고 있다.[15] 추가적으로, 엑소뉴클레아제-저항성 뉴클레오티드는 mRNA 몸체 및 mRNA 폴리(A) 테일에 혼입되었으며, RNA 반감기의 가변적 증가가 보고되었다.[16,17] RNA 폴리머라제에 의한 변형된 뉴클레오시드 트리포스페이트 (NTP)의 mRNA 몸체로의 무작위 혼입이 가능성을 보여주지만, 이 전략은 테스트될 수 있는 NTP의 화학적 공간을 극적으로 감소시키며, 이는 많은 변형된 NTP가 리보솜 기계에 의해 잘 관용되지 않으며 그러므로 전반적 번역 효율을 감소시키기 때문이다.[18-20] 대안적 전략은 효소적 폴리(A) 테일링 동안 변형된 NTP를 선택적으로 혼입하는 것이다.[16,17] 유망하지만, 이 전략은 폴리(A) 폴리머라제 효소에 의존하는데, 이는 3개의 효소에 의해 관용되는 작은 화학적 레퍼토리의 한계 및 변형된 뉴클레오티드를 부위-특이적 방식으로 혼입할 수 없다는 한계에 직면해 있다.

[0463] 합성 변형된 RNA 올리고뉴클레오티드의 3' 단부 라이게이션을 통해 증진된 단백질 생산 능력을 갖는 mRNA 벡터를 생성하기 위한 대안적 전략이 본원에 기재되어 있다. 진핵생물의 정준 mRNA 분해 경로는 전형적으로 3' 탈아데닐화로 시작하여 디캡핑 복합체의 동원 및 5' 및 3' 세포성 엑소뉴클레아제에 대한 mRNA의 노출이 뒤따르는 것으로 생각된다[21]. 엑소뉴클레아제-저항성 폴리(A) 테일을 보유하는 mRNA는 세포에서 비변형된 폴리(A) 테일을 갖는 mRNA에 비해 탈아데닐화에 저항하고 더 많은 단백질을 생산하는 능력에 대해 테스트되었다.

[0464] 결과

[0465] 폴리(A) 테일링 동안 예비 변형된 ATP 혼입

[0466] 다중 화학적으로 변형된 ATP 유도체를 폴리(A) 안정화 활성에 대해 스크리닝하였다. 구체적으로, 변형된 ATP는 이전에 기재된 유사한 테일링 프로토콜을 사용하여 GFP mRNA 주형을 사용하여 폴리(A) 테일링 반응에 스파이크

되었다 (도 4a).[17] 변형된 폴리(A) 테일을 갖는 GFP-코딩 mRNA 및 비변형된 폴리(A) 테일을 갖는 mCherry-코딩 mRNA를 HeLa 세포에 공동-형질감염시켰다. 각 형질감염은 오직 한 가지 유형의 변형된 GFP-코딩 mRNA, 및 대조군 mCherry-코딩 mRNA를 함유하였다. 3일 시간 경과에 걸쳐 상대적 GFP/mCherry 형광 비율을 측정함으로써, 폴리(A) 테일로의 변형된 NTP 혼입의 결과로 mRNA 번역 반감기의 약간의 차이가 관찰되었다.

[0467] 3일에 걸쳐 HeLa 세포에서 형광을 모니터링한 결과, 특히 dATP (2'-데옥시아데노신) 및 알파-티올 ATP (아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트))에 대해 변형된 ATP 스파이크인을 사용한 폴리(A) 테일링 반응의 결과로 형광 단백질 생산이 증가한 것으로 나타났다 (도 1). 이. 콜라이 폴리(A) 폴리머라제는 변형된 ATP를 산발적으로 및 화학량론적 수준에서 혼입할 가능성이 높다. 이. 콜라이 폴리(A) 폴리머라제가 일부 변형된 뉴클레오티드를 완전히 배제하여 폴리아데닐화 반응에서 변형된 ATP의 존재에도 불구하고 비변형된 폴리(A) 테일을 생성하는 것도 가능하다.

[0468] 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드 라이게이션은 번역 수명을 증진시킨다

[0469] 부위-특이적 화학적 변형의 상이한 설계를 테스트하고 대안적 뉴클레오티드간 연결을 혼입하기 위해, 대안적 변형 전략을 추구하였으며, 여기서 기존에 존재하는 폴리(A) 테일을 함유하는 mRNA의 3' 단부에 합성 올리고뉴클레오티드를 라이게이션하였다 (도 4b). GFP 코딩 서열 및 폴리(A) 테일-코딩 서열을 함유하는 DNA 주형으로부터 시험관내 전사를 사용하여 균질한 길이를 갖는 GFP-코딩 mRNA 집단을 생성하였다. 3' UTR을 표적화하는 RNase H 반응을 사용하여 3' 올리고뉴클레오티드 라이게이션의 효율을 결정하였으며, 이는 겔 상의 라이게이션된 및 비라이게이션된 mRNA 3' 단부의 명확한 분리를 초래하였다 (도 6a). T4 RNA 리가제 I (프로메가)을 사용한 라이게이션은 RNase H 반응에 의해 입증된 바와 같이 거의 100% 효율로 작동하는 것으로 관찰되었다 (도 6a).

[0470] 상이한 화학적 변형의 효능을 비교하기 위해, 모든 올리고뉴클레오티드를 29개 뉴클레오티드 길이로 설계하였다. 각 올리고뉴클레오티드는 mRNA의 3' 단부에 대한 라이게이션을 용이하게 하기 위한 5' 포스페이트, 및 올리고뉴클레오티드의 자기-라이게이션을 방지하기 위한 3' 히드록실 기가 결여된 3' 차단기 (디데옥시C [ddC] 또는 역전된-dT [InvdT])를 함유하였다. 이는 라이게이션이 mRNA에 올리고뉴클레오티드의 하나 및 오직 하나의 카피를 부착하는 것을 보장하였다. 또한, T4 RNA 리가제 I 반응에 대한 비구조화된 핸들을 제공하기 위해 올리고뉴클레오티드의 5' 단부에 있는 적어도 6-8개의 뉴클레오티드는 비변형된 rA 뉴클레오티드였다. 변형된 RNA 및 DNA 올리고뉴클레오티드 서열은 표 1에서 찾을 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 선행 단락에 기재된 GFP-코딩 mRNA의 3' 단부에 라이게이션되었으며, 이는 이전에 기재된 RNase H 프로토콜을 사용하는 특징화의 용이성을 위해 ~60개 뉴클레오티드 주형-코딩된 폴리(A) 테일을 함유한다.

[0471] 표 1: 테일링 올리고뉴클레오티드의 서열.

변형된 올리고뉴클레오티드 서열 명칭	서열 (IDT 포맷)	염기	무수 분자량
29xrA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArA/3ddC/ (SEQ ID NO: 6)	29	9838.2
3xSrA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArA*rA* rA*rA/3ddC/ (SEQ ID NO: 7)	29	9886.4
3xSrA_InvdT	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA* rA*rA*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 8)	29	9917.4
3xSrG_InvdT	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArG* rG*rG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 9)	29	9965.4
3xdA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArAA AA/3ddC/ (SEQ ID NO: 10)	29	9790.2
23xdA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA AAA AAA	29	9470.3

[0472]

	AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ddC/ (SEQ ID NO: 11)		
G4_telo_DNA_GtoC	/5Phos/rArArA rArArA TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CC/3ddC/ (SEQ ID NO: 12)	29	9118.9
G4_telo_DNA_WT	/5Phos/rArArA rArArA TAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG GG/3ddC/ (SEQ ID NO: 13)	29	9599.2
6xSr(AG)	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA* rA*rA*rG* rG*rG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 14)	29	10013.6
G4_C9orf72_RNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA rArGrG rGrGrC rCrGrG rGrGrC rCrGrG rGrGrC* rC*rG*rG* rG*rG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 15)	29	10077.4
G4_C9orf72_DNA_6xSG	/5Phos/rArArA rArArA rAGG GGC CGG GGC CGG GGC* C*G*G* G*G*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 16)	29	9725.5
G4_telo_DNA_6xSG	/5Phos/rArArA rArArA TAG GGT TAG GGT TAG GGT* T*A*G* G*G*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 17)	29	9726.5

[0473]

[0474] 라이게이션된 변형된 GFP-코딩 mRNA를 비라이게이션된 mCherry mRNA (E-PAP 폴리(A)-테일링된)와 함께 HeLa 세포에 형질감염시켰고, 이는 내부 형질감염 대조군 역할을 하였다. 세포 샘플을 이미지화하여 형질감염 후 24시간, 48시간 및 72시간에 상대적 GFP/mCherry 형광 강도 비율을 정량화하여, 번역 수명에 대한 특정 3' 단부 변형의 효과를 추정하였다.

[0475] 29개의 비변형된 rA 연결 및 3' ddC (29xrA_ddC)를 함유하는 대조군 올리고뉴클레오티드의 라이게이션은 비라이게이션된 및 모의 라이게이션 대조군과 비교하여 HeLa 세포 배양에서 GFP 형광을 약간 증가시켰다 (50-55%, 표 2). 이는 폴리(A) 테일이 28개 뉴클레오티드만큼 연장되었기 때문일 가능성이 높으며 아마도 부분적으로 쇄-종결 ddC 뉴클레오티드의 존재 때문일 수 있다. 추가적으로, 3개의 순차적 포스포로티오에이트 (PS) 연결 (3xSrA_ddC, 3xSrA_InvdT 및 3xSrG_InvdT)을 함유하는 올리고뉴클레오티드의 라이게이션 생성물은 각 시점에서 29 nt 폴리(rA) 대조군 올리고와 비교하여 140%-210% 증가된 GFP 생산을 보여주었다 (도 5). 이러한 관찰은 일반적으로 안티센스 올리고뉴클레오티드 요법에서 사용된 바와 같은 뉴클레아제-저항성 활성을 보유하는 포스포로티오에이트 연결과 일치한다.[22]

[0476] 표 2: 도 5에 표시된 GFP/mCherry 형광 비율의 통계.

24시간	모의	라이게이션 없음	29rA_ddC	3xSrA_ddC	3xSrA_InvdT	3xSrG_InvdT	6xSr(AG)	3xdA_ddC	23xdA_ddC
평균	1	1.05	1.59	2.73	2.31	2.78	2.90	1.60	1.66
표준편차	0.032	0.33	0.47	0.23	0.57	0.44	0.26	0.30	0.30
평균의 표준오차	0.0057	0.074	0.13	0.067	0.16	0.127	0.074	0.091	0.088
평균의 하위 95% CI	0.99	0.90	1.30	2.58	1.95	2.5	2.73	1.40	1.47
평균의 상위 95% CI	1.01	1.21	1.89	2.87	2.68	3.06	3.06	1.8	1.85
48시간	모의 라이게이션	라이게이션 없음	29rA_ddC	3xSrA_ddC	3xSrA_InvdT	3xSrG_InvdT	6xSr(AG)	3xdA_ddC	23xdA_ddC
평균	1	1.05	1.54	2.63	2.43	3.07	3.39	1.45	1.49
표준편차	0.052	0.36	0.48	0.41	0.71	0.55	0.45	0.28	0.28
평균의 표준오차	0.0092	0.081	0.14	0.12	0.21	0.16	0.13	0.081	0.080
평균의 하위 95% CI	0.98	0.88	1.24	2.37	1.98	2.72	3.11	1.27	1.32
평균의 상위 95% CI	1.02	1.21	1.85	2.90	2.88	3.42	3.68	1.63	1.67
72시간	모의 라이게이션	라이게이션 없음	29rA_ddC	3xSrA_ddC	3xSrA_InvdT	3xSrG_InvdT	6xSr(AG)	3xdA_ddC	23xdA_ddC
평균	1	1.15	1.69	3.64	2.76	3.20	3.77	1.58	1.64
표준	0.089	0.42	0.64	0.84	1.01	0.70	0.55	0.36	0.35

[0477]

편차									
평균의 표준 오차	0.016	0.093	0.19	0.24	0.29	0.20	0.16	0.11	0.10
평균의 하위 95% CI	0.97	0.96	1.28	3.10	2.12	2.76	3.42	1.35	1.42
평균의 상위 95% CI	1.03	1.35	2.09	4.17	3.40	3.64	4.11	1.81	1.86

24시간	모의 라이게이션	라이게이션 없음	G4_telo_DNA GtoC	G4_telo_DNA WT	G4_C9orf72_RNA 6xSrG	G4_C9orf72_DNA 6xSG	G4_telo_DNA 6xSG
평균	1	1.05	1.76	2.71	2.46	3.02	2.47
표준 편차	0.032	0.33	0.69	0.27	0.70	0.80	1.04
평균의 표준 오차	0.0057	0.074	0.20	0.078	0.201	0.23	0.30
평균의 하위 95% CI	0.99	0.90	1.32	2.54	2.02	2.51	1.81
평균의 상위 95% CI	1.01	1.21	2.20	2.88	2.91	3.52	3.12
48시간	모의 라이게이션	라이게이션 없음	G4_telo_DNA_GtoC	G4_telo_DNA_WT	G4_C9orf72_RNA_6xSrG	G4_C9orf72_DNA_6xSG	G4_telo_DNA_6xSG
평균	1	1.05	1.51	2.63	2.95	3.41	3.37
표준 편차	0.052	0.36	0.66	0.31	1.02	1.03	1.25
평균의 표준 오차	0.0092	0.081	0.19	0.089	0.29	0.30	0.36
평균의 하위 95% CI	0.98	0.88	1.09	2.44	2.31	2.76	2.57
평균의 상위 95% CI	1.02	1.21	1.93	2.83	3.60	4.07	4.17

[0478]

72시간	모의 라이게이션	라이게이션 없음	G4_telo_DNA_GtoC	G4_telo_DNA_WT	G4_C9orf72_RNA_6xSrG	G4_C9orf72_DNA_6xSG	G4_telo_DNA_6xSG
평균	1	1.15	1.78	2.86	2.87	3.43	3.14
표준 편차	0.089	0.42	0.83	0.30	1.04	1.08	1.28
평균의 표준 오차	0.016	0.093	0.24	0.086	0.30	0.31	0.37
평균의 하위 95% CI	0.97	0.96	1.25	2.67	2.21	2.75	2.32
평균의 상위 95% CI	1.03	1.35	2.31	3.05	3.53	4.11	3.95

[0479]

[0480] 자세한 P 값은 샘플 1 v.s. 샘플 2: 72시간 비교의 포맷으로 나열된다. 모의 라이게이션 v.s. 29rA_ddC: 4e-7; 29rA_ddC v.s. 3XSrA_ddC: 2e-6; 29rA_ddC v.s. 3XSrA_InvdT: 0.005; 29rA_ddC v.s. 3XSrG_InvdT: 1e-5; 29rA_ddC v.s. 6XSr(AG): <1e-15; 29rA_ddC v.s. G4_telo_DNA_WT: 9e-6. 29rA_ddC v.s. G4_C9orf72_RNA_6xSrG: 0.003; 29rA_ddC v.s. G4_C9orf72_DNA_6xSrG: 8e-5; 29rA_ddC v.s. G4_telo_DNA_6xSG: 0.002.

[0481] 놀랍게도, 3x티오-rG_invdT 연결은 모든 시점에서 3xthio-rA_invdT보다 약간 더 큰 GFP 형광을 나타내었지만 (170%-200% vs. 140%-180% 정규화된 GFP/mCherry), 이 차이는 상대적으로 작았다 (표 2; 도 5). 이 결과는 구아노신에 비해 아데닌에 대한 mRNA 탈아데닐화 효소의 특이성과 관련이 있을 수 있다.[23,24] 그러나, 이들 짧고 비구조화된 서열 차이는 mRNA 번역 수명을 변경하는데 상대적으로 작은 역할을 하였다. 또한, 3xSrA_ddC 및 3xSrA_InvdT는 각각 170%-210% 및 140%-180% 정규화된 GFP/mCherry 생산을 보여주었다 (모든 시점을 고려; 표 2). 이는 라이게이션에서 사용된 작은 쇄-종결 뉴클레오티드 (3' 디데옥시-C & 3' 역전된 dT)의 동일성을 변화시키는 것이 mRNA 안정성에 대한 약간의 증진을 초래할 수 있음을 시사한다.

[0482] RNase-저항성 포스포로티오에이트 연결의 성공을 고려하여, 올리고뉴클레오티드의 RNA 뉴클레오티드를 RNase-저항성 DNA 뉴클레오티드로 대체하여 단백질 번역 수율에 대한 효과를 결정하였다. 예기치 않게, 23개의 데옥시아데노신을 함유하는 올리고뉴클레오티드 (23xdA_ddC)는 시험관내 RNase R 소화에 대한 올리고뉴클레오티드의 저항성에도 불구하고 (도 6b), 번역 반감기를 실질적으로 증진시키지 못하였다 (도 5). 그러나, DNA 쿼드러플렉스 (텔로미어-유래) ssDNA 서열은 비구조화된 23개의 데옥시아데노신 및 "G에서 C로" ssDNA 올리고 대조군 라이게이션보다 일관적으로 더 큰 안정화 효과를 나타내었다 (도 5). 비구조화된 3' ssDNA 단부를 보유하는 mRNA는 세포성 ssDNA 엑소뉴클레아제에 감수성일 수 있거나, 또는 대안적으로 mRNA와 상동성을 보유하는 경우 RNase H 활성을 촉발할 수 있다는 가설을 세웠다.[25-27]

[0483] 최종적으로, 증가된 수의 포스포로티오에이트 변형, 뿐만 아니라 쿼드러플렉스 (G4) 2차 구조와의 조합을 갖는 올리고뉴클레오티드와의 라이게이션을 탐구하여 이들 변형이 변형된 mRNA를 안정화시키기 위해 상승작용적으로 작용할 수 있는지 여부를 결정하였다. 비구조화된 ssRNA 올리고의 6개의 순차적 포스포로티오에이트 연결 (6xSr(AG))은 모든 시점에 걸쳐 0.26-0.6의 표준 편차로 가장 일관된 수준의 안정화를 제공하였다 (표 2; 도 5). 6개의 순차적 포스포로티오에이트 연결을 함유하는 ssDNA 및 ssRNA G4 올리고 (G4_C9orf72_RNA_6xSrG, G4_C9orf72_DNA_6xSrG 및 G4_telo_DNA_6xSG)는 또한 대조군 올리고에 비해 증진된 번역을 초래하였지만, 이들 구축물의 성능은 상이한 복제물 사이에서 더 가변적이었으며, 이는 각각 0.7-1; 0.8-1.1; 및 1.0-1.3의 S.D. 범위를 나타낸다 (표 2; 도 5).

[0484] HeLa 세포 시간 경과 실험은 포스포로티오에이트 연결을 혼입하는 mRNA가 시간 경과에 따라 증가된 GFP/mCherry 신호를 가짐을 입증하였다 (도 5). 이들 화학적 변형은 mRNA당 번역 효율을 증가시킴으로써 직접적으로 작용하거나 mCherry-코딩 내부 대조군 mRNA에 비해 RNA 분해 속도를 감소시킴으로써 간접적으로 작용하여, 이에 의해 관찰된 GFP/mCherry 신호를 증가시킬 수 있다.

[0485] 논의

[0486] 세포질성 mRNA 붕괴의 이전 연구는 폴리(A) 테일 단축을 주요 mRNA 분해 경로에서 속도-제한 단계로서 확인하였다 (예를 들어, 탈아데닐화-의존적 붕괴). 이 모델에 따라, 폴리(A) 테일의 단축은 mRNA 벡터의 비활성화에서 속도-제한 단계로서 조사되었다.

[0487] mRNA의 3' 단부에 뉴클레아제-저항성 화학적 연결을 함유하는 올리고뉴클레오티드를 라이게이션하는 것은 며칠 (24-72시간)에 걸쳐 mRNA 번역 활성을 증가시켜 6xSr(AG) 구축물의 경우 세포 배양에서 최대 170%-220% 더 많은 단백질 발현을 초래하기에 충분하다. 이 전략은 다양한 목적을 위해 mRNA 벡터에서 변형된 뉴클레오티드 유도체의 화학적 공간을 확장할 수 있다.

[0488] 이들 결과는 폴리(A) 단축이 세포질성 mRNA 분해의 이전 모델과 일치하는 치료용 mRNA 번역 효능의 주요 결정요인임을 시사한다. 이들 결과는 증진된 mRNA 안정화를 위해 mRNA 테일을 뉴클레아제-저항성, 폴리(A) 결합 단백질 (PABP)-결합 압타머/올리고뉴클레오티드로 대체한다는 사실을 알려준다. 본원에 자세히 설명된 전략은 또한 다른 유형의 변형, 예컨대 가수분해-저항성 7-메틸구아노신 5' 캡,[28,29] 변형된 5' UTR 영역,[30] 또는 mRNA 몸체의 엔도뉴클레아제/가수분해-저항성 변형된 뉴클레오티드와 호환가능하다. 이러한 라이게이션 전략은 일반적으로 mRNA 치료제를 쉽게 합성되고 화학적으로-변형된 압타머, 예컨대 펩티드 핵산,[31] 잠금 핵산,[32] 또는 다른 화학적 그룹과 조합하는데 적합하다.

[0489] 방법

[0490] 플라스미드 클로닝, 특징화 및 정제

[0491] pCS2 벡터 내 hMGFP 및 mCherry-코딩 플라스미드 (각각 WX28 및 WX26)를 수득하였다. 이들 플라스미드는 (5'

에서 3' 순서로): SP6 프로모터 서열, 5' UTR, 형광 단백질 코딩 서열 (CDS), 3' UTR 및 NotI 제한 부위를 함유하였다.

[0492] Q5® 부위-지정 돌연변이유발 키트 (NEB)를 사용하여 정방향 프라이머 상의 폴리(A) & 역방향 프라이머 상의 폴리(T)를 코딩하는 프라이머를 사용하여 플라스미드에 대한 PCR을 수행하였다. 이어서 KLD 효소 처리를 수행한 후, 자이모퓨어(ZymoPURE) 플라스미드 미니프렙 키트를 사용하는 단리, 및 제네위즈(Genewiz)를 통한 생어(Sanger) 시퀀싱을 위해 NEB Stabl 세포로의 형질전환을 수행하였다.

[0493] mRNA 합성 및 특징화

[0494] SP6 프로모터, 이어서 hMGFP CDS 및 주형-코딩된 폴리(A) 테일을 함유하는 WX28xEsp3i 플라스미드로부터 GFP mRNA를 합성하였다. 플라스미드는 폴리(A) 영역의 바로 3'에 위치된 단일 Esp3i 부위에 의해 선형화되었다. 그 후, 선형화된 플라스미드를 자이모 리서치(Zymo Research)로부터의 DNA 클린 & 컨선트레이터-25(DNA Clean & Concentrator-25) 키트를 사용하여 정제하였다.

[0495] mMESSAGE mMACHINE™ SP6 전사 키트로부터의 SP6 효소 및 반응 완충액을 사용하여 5' 캡핑된 변형된 mRNA를 제조하였다. 키트에 의해 제공된 2X NTP/캡 용액을 하기를 함유하는 2X NTP/캡 제제로 대체하였다: 10 mM ATP, 10 mM CTP, 2 mM GTP, 8 mM 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G RNA 캡 구조 유사체, 및 10 mM N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트. 슈퍼라제-인(Superase-In) RNase 억제제를 1:20 (v/v)의 최종 농도로 첨가하였다. IVT 반응 어셈블리 및 37℃에서 2-4시간 동안 인큐베이션 후, 반응물을 1시간 동안 37℃에서 1-2 μl의 TURBO DNase로 처리한 후, 메가클리어(MEGAclear)™ 전사 클린업 키트를 사용하여 반응물을 정제하였다.

[0496] 슈퍼라제-인 RNase 억제제를 정제된 mRNA 샘플에 1:50 (v/v)의 최종 농도로 첨가하고, 장기간 저장을 위해 -80℃에서 샘플을 저장하였다. 라이게이션 전 농도를 추정하기 위해 나노드롭에 의해 정제된 mRNA를 측정하였지만, 세포-기반 테스트를 위한 형질감염 직전 정규화를 위해 큐비트(Qubit) RNA HS 검정을 사용하여 mRNA를 측정하였다.

[0497] 비변형된 폴리(A) 폴리머라제-테일링된 mRNA의 제조를 위해, NotI-HF를 사용하여 WX28 및 WX26 플라스미드의 선형화에 의해 dsDNA 주형을 생성하고, 자이모 DNA 클린 & 컨선트레이터-25를 사용하여 소화된 생성물을 칼럼 정제하였다. TURBO DNase 소화 후, E-PAP 폴리(A) 테일링 키트를 사용한 폴리(A) 테일링의 추가 단계를 포함시킴을 제외하고, 상기 기재된 프로토콜을 사용하여 시험관내 전사를 수행하였다. mRNA의 정제 및 저장을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다 (예를 들어, 메가클리어 전사 클린업 키트 사용).

[0498] 변형된 이. 콜라이 폴리(A) 폴리머라제 테일링

[0499] 변형된 E-PAP 테일링 실험의 경우, 기질은 선형화된 WX28 주형 상의 IVT로부터 생성된 비테일링 GFP mRNA였다. 프로토콜은 E-PAP 폴리(A) 테일링 키트로부터의 효소 및 완충액을 활용하였다. 특정 백분율의 ATP가 변형된 ATP 유도체 (XATP)에 의해 대체되도록 "총 10 mM" ATP 스톡 용액을 각 변형된 ATP 스파이크인에 대해 제조하였다. 예를 들어, 25% dATP 샘플은 2.5 mM dATP, 7.5 mM ATP 스톡 용액의 어셈블리를 필요로 하였다. 테일링 반응을 하기와 같이 어셈블리하였다:

[0500] 1.5 μg 비테일링 GFP mRNA

[0501] 5 μl 5X E-PAP 완충액

[0502] 2.5 μl 10 mM XATP:ATP 스톡 용액 (각 샘플마다 상이함)

[0503] 2.5 μl 25 mM MnCl2

[0504] 1 μl 슈퍼라제-인 RNase 억제제

[0505] 1 μl E-PAP 효소

[0506] 뉴클레아제-무함유 물을 사용하여 최대 25 μl의 총 부피

[0507] 반응물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 0.5 μl의 500 mM EDTA를 첨가하여 켄칭하였다. 그 후, 모나크(Monarch) RNA 클린업 키트 (50 μg)를 사용하여 이들 테일링된 mRNA를 칼럼 정제하였다. 슈퍼라제-인 RNase 억제제를 정제된 mRNA에 1:50 (v/v)의 최종 희석으로 첨가하고, 형질감염 전에 mRNA를 -80℃에서 저장하였다.

[0508] 하기 변형된 ATP 유도체 (XATP)를 폴리아데닐화 실험에서 사용하였다: 아데노신 5'-트리포스페이트 (ATP); N6-메틸아데노신-5'-트리포스페이트 (m6A); 2'-O-메틸아데노신-5'-트리포스페이트; 아데노신-5'-O-(1-티오트리포스

페이트); 데옥시아데노신 트리포스페이트 (dATP); 2'-아미노-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트.

[0509] 변형된 올리고뉴클레오티드 3' 단부 라이게이션

[0510] T4 RNA 리가제 I을 사용하여 라이게이션 반응을 수행하였다. 반응을 하기와 같이 어셈블리하였다:

[0511] 2 μg 캡핑된 mRNA

[0512] 200 pmol 화학적으로 변형된 올리고

[0513] 2 μl 슈퍼라제-인 RNase 억제제

[0514] 20 μl 50% PEG-8000

[0515] 5 μl 100% DMSO

[0516] 5 μl 10X T4 RNA 리가제 완충액

[0517] 5 μl T4 RNA 리가제 (프로메가)

[0518] 최대 50 μl의 총 부피 (뉴클레아제-무함유 물 사용)

[0519] 반응물을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 1 μl의 500 mM EDTA, pH 8.0의 첨가를 통해 반응물을 불활성화시켰다. 1 부피의 뉴클레아제-무함유 물 (예를 들어 50 μl)을 첨가한 후, 1 μl의 슈퍼라제-인을 함유하는 0.5 부피의 AMPure XP (예를 들어 25 μl)를 첨가함으로써 반응물을 희석하였다. 반응물을 제조업체의 프로토콜에 따라 정제하였고, 슈퍼라제-인을 함유하는 뉴클레아제-무함유 물을 1:50 (v/v) 비율로 사용하여 AMPure 비드로부터 mRNA를 용리하였다.

[0520] RNase H 겔-기반 검정에 따라 불완전한 라이게이션의 경우, 반응으로부터 DMSO를 생략한 변형된 조건을 사용하여 라이게이션을 수행하였다. 이는 일반적으로 필요시 더 효율적인 라이게이션을 초래하였다.

[0521] RNase H 검정

[0522] 염화칼륨 (KCl) 스톡 용액을 제조하고, RNase H 검정 전에 ssDNA 올리고를 mRNA에 어닐링하는데 사용하였다. KCl 스톡 용액은 50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 1:200 (v/v) 슈퍼라제-인 RNase 억제제를 함유하였고, 뉴클레아제-무함유 물을 사용하여 최종 부피에 도달하였다. ssDNA 프로브를 IDT로부터 주문하였으며 서열 GCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCAC (서열식별번호: 18)를 가졌다.

[0523] 상기 언급된 ssDNA 프로브에 mRNA를 어닐링하기 위해 하기 반응물을 제조하였다:

[0524] 200 ng mRNA 샘플 (정제된)

[0525] 2 pmol ssDNA 프로브

[0526] 2 μl 스톡 용액: 50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 1:200 슈퍼라제-인

[0527] 최대 10 μl 부피 (뉴클레아제-무함유 물 사용)

[0528] 반응물을 70℃에서 5분 동안 변성시킨 후, 벤치탑 써모사이클러에서 0.2℃/초의 속도로 실온 (25℃)으로 냉각하였다. 프로브 어닐링 후, 1 μl의 열안정성 RNase H 및 1 μl의 10X 완충액을 각 반응물에 첨가하고, 이를 50℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 반응물 인큐베이션 후, 1 μl의 프로테이나제 K를 첨가함으로써 샘플을 소화시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 샘플을 50 mM의 최종 농도로 EDTA로 보충된 1 부피의 겔 로딩 완충액 II와 혼합하였다.

[0529] 6% 노벡스(Novex)™ TBE-우레아 겔에 로딩 및 분해 전에 1X 로딩 완충액 중 샘플을 70℃에서 3-5분 동안 변성시켰다.

[0530] 올리고뉴클레오티드의 RNase R 소화

[0531] 1X RNase R 반응 완충액 및 10 유닛의 RNase R을 함유하는 10 μl 총 반응 부피에서 200 ng의 올리고를 인큐베이션하였다. 반응물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 1 μl의 프로테이나제 K로 소화시키고, 1X 겔 로딩 완충액 II에서 변성시켰다. 이를 15% 노벡스 TBE-우레아 겔에서 실행하였다.

[0532] 포유동물 세포 배양 및 mRNA 형질감염

[0533] HeLa 세포 (CCL-2, ATCC)를 5% CO_2와 함께 37℃ 인큐베이터에서 10% FBS를 함유하는 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) 배양 배지에서 유지하고, 3일마다 1:8의 비율로 계대배양하였다. 훽스트 염색 및 현미경검사 이미지화를 통해 정기적으로 세포 배양에 마이코플라스마 오염이 없음을 확인하였다.

[0534] mRNA 형질감염 전날, 세포를 12-웰 플레이트의 개별 웰에 75% 컨플루언스로 시딩하였다. 다음 날, 500 ng mCherry (내부 대조군) mRNA 및 합성 테일을 갖는 500 ng GFP mRNA (큐비트에 의해 결정된 농도)를 3 uL 리포펙타민 메신저맥스 형질감염 시약을 사용하여 각 웰에 형질감염시켰다. mCherry mRNA만을 함유하거나 형질감염 시약만을 함유하거나 형질감염되지 않은 세포를 함유하는 추가 대조군을 포함시켰다. 6시간 인큐베이션 후, 리포펙타민/mRNA 형질감염 혼합물을 제거하고, 세포를 DPBS로 1회 헹구고, 형질감염 후 24시간, 48시간 및 72시간에 형광 단백질 정량화를 위해 트립신화하여 각각 6:4:3의 비율로 3개의 유리 바닥 24-웰 플레이트 (폴리-D-리신 코팅됨)에 재시딩하였다.

[0535] 형광 단백질의 공초점 이미지화 및 정량화

[0536] 형광 단백질 이미지화 전에, 배양 배지를 제거하고, 세포를 DPBS로 1회 헹군 후, 핵 염색 배지 (훽스트 33342를 1:2000 희석한 플루오로브라이트(FluoroBrite) DMEM)에서 37℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0537] 핵 (훽스트), GFP 및 mCherry의 공초점 이미지를 900 nm*900 nm의 픽셀 크기에서 10X 공기 대물렌즈를 사용하여 라이카 스텔라리스(Leica Stellaris) 8에 의해 촬영하였다. 각 웰에 대해 각 사분면으로부터 하나씩 4개의 대표적인 관측 시야를 확보하였다. 비교할 모든 샘플에 대해 동일한 이미지화 설정을 사용하였다. 여기/검출 파장은 "여기 파장/~[검출 파장 범위]" 포맷이었다: 훽스트: 다이오드 405 nm/~[430-480]nm; GFP: WLL 489 nm/~[500-576]nm; mCherry: WLL 587 nm/~[602-676]nm.

[0538] STARmap를 사용하여 형질감염된 세포 배양에서 mRNA 정량화

[0539] 개별 mRNA 분자를 바코드 DNA 콜로니로서 검출하는 이미지화-기반 방법인 STARmap[33]을 사용하여 형질감염된 세포에서 mCherry 및 GFP mRNA 양을 측정하였다. 왕(Wang) 등에 의해 기재된 세포 배양을 위한 STARmap 절차를 따랐다.[33]

[0540] 간략하게, 형광 단백질 이미지화 후, 세포를 실온에서 10분 동안 1.6%PFA/1XPBS로 고정한 후, 다음 단계 전에 -20℃ (최대 1주)에서 미리 냉각된 메탄올을 사용하여 추가 고정 및 투과화를 수행하였다. 후속적으로, 메탄올을 제거하고, 세포를 실온에서 15분 동안 PBSTR/글리신/tRNA (0.1% 트윈-20, 0.5% 슈퍼라제-인, 100 mM 글리신, 1% 효모 tRNA를 함유하는 PBS)로 재수화시킨 후, PBSTR로 1회 세척하였다. 그 후, 샘플을 혼성화 완충액 (2XSSC, 10% 포름아미드, 1% 트윈-20, 20 mM RVC, 0.5% 슈퍼라제-인, 1% 효모 tRNA, 100 nM 각 프로브)에서 40℃에서 밤새 mCherry 및 GFP mRNA 서열을 표적화하는 SNAIL 프로브와 혼성화하였다. 그 후, 세포를 37℃에서 PBSTR로 2회 (각 세척당 20분) 세척하고, 37℃에서 고염 세척 완충액 (4XSSC가 포함된 PBSTR)으로 1회 세척한 후, 실온에서 PBSTR로 1회 헹궜다. 프라이머에 인접한 자물쇠 프로브를 원형화하기 위해 실온에서 2시간 동안 라이게이션 반응을 수행하였다. PBSTR로 2회 세척한 후, 아미노-dUTP가 스파이크인된 상태에서 30℃에서 2시간 동안 Phi29를 사용하여 프라이머로부터 롤링 서클 증폭을 개시하였다. PBSTR로 2회 더 세척한 후, DNA 앰플리콘을 실온에서 2시간 동안 PBST 완충액에서 20 mM MA-NHS에 의해 중합가능하도록 변형하였다. 그 후, 샘플을 히드로겔-세포 하이브리드로 전환시킨 후, 실온에서 밤새 형광 단백질의 프로테이나제 K 소화를 수행하였다. 샘플을 PBST로 3회 세척한 후, 세척 및 이미지화 완충액 (2XSSC, 10% 포름아미드)에서 형광 검출 올리고뉴클레오티드로 37℃에서 1시간 동안 염색하였다. 최종적으로, 샘플을 실온에서 세척 및 이미지화 완충액으로 3회 세척하고, DAPI로 염색한 후, 세척 및 이미지화 완충액에서 이미지화를 수행하였다.

[0541] 공초점 이미지화 스택을 283 nm*283 nm의 픽셀 크기에서 40X 오일 대물렌즈를 사용하여 라이카 스텔라리스 8로 촬영하였다. 14-um 스택을 15 단계에 대해 1 um/단계로 이미지화하였다. 각 웰에 대해 각 사분면으로부터 하나씩 4개의 대표적인 관측 시야를 확보하였다.

[0542] 표 3: SNAIL 프로브 서열

mCherry-01	/5Phos/ACATTATTGGTGCCGCGCAGCTTCACCTAATTATTACTGAGGCATACACTAAAGATA (SEQ ID NO: 19)
mCherry-02	/5Phos/ACATTACTTCTTGGCCTTGTAGGTGGTAATTATTACTGAGGCATACACTAAAGATA (SEQ ID NO: 20)
mCherry-03	/5Phos/ACATTACACGGTCACCACGCCGCCGTAATTATTACTGAGGCATACACTAAAGATA (SEQ ID NO: 21)
mCherry-11	ACGGGGCCGTCGGAGGGGAATAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 22)
mCherry-12	GGCGCCGGGCAGCTGCACGGTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 23)
mCherry-13	GTCCTGCAGGGAGGAGTCCTGGTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 24)
hMGFP-01	/5Phos/ACATTAAGTCGCAGCGGTAGTGGCCAATTATTACTGAAATCGTAGACTAAGATA (SEQ ID NO: 25)
hMGFP-02	/5Phos/ACATTACATTAGCAGGGAAGTTGACCCCGTAATTATTACTGAAATCGTAGACTAAGATA (SEQ ID NO: 26)
hMGFP-03	/5Phos/ACATTAGCTTCGGCGTGCTCGTACAGCTAATTATTACTGAAATCGTAGACTAAGATA (SEQ ID NO: 27)
hMGFP-11	CCTCCCTCCAAGAGCAGTGCCATTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 28)
hMGFP-12	TGCGCTGCATCACCGGGCTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 29)
hMGFP-13	CCTGGCGGGGTAGTCCGCTGTGTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 30)

[0543]

[0544] 형광 검출 프로브 서열

[0545] mCherry 앰플리콘 검출 프로브: /5Alexa647N/CATACACTAAAGATAACAT (서열식별번호: 31)

[0546] hMGFP 앰플리콘 검출 프로브: /5Alex546N/TCGTAGACTAAGATAACAT (서열식별번호: 32)

참고문헌

1. Polack, F. P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 383, 2603–2615 (2020).

2. Lombardi, A. *et al.* Mini Review Immunological Consequences of Immunization With COVID-19 mRNA Vaccines: Preliminary Results. *Front. Immunol.* 12, 657711 (2021).

3. Sahin, U., Karikó, K. & Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 759–780 (2014).

4. Dammes, N. & Peer, D. Paving the Road for RNA Therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 755–775 (2020).

5. Weng, Y. *et al.* The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnol. Adv.* 40, 107534 (2020).

6. Chen, C.-Y. A., Ezzeddine, N. & Shyu, A.-B. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 448, 335–357 (2008).

7. Petsch, B. *et al.* Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat. Biotechnol.* 30, 1210–1216 (2012).

8. Richner, J. M. *et al.* Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell* 170, 273–283.e12 (2017).

9. Tai, W. *et al.* A novel receptor-binding domain (RBD)-based mRNA vaccine against SARS-CoV-2. *Cell Res.* 30, 932–935 (2020).

10. Karikó, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther.* 16, 1833–1840 (2008).

11. Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23, 165–175 (2005).

12. Andries, O. *et al.* N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J. Control. Release* 217, 337–344 (2015).

13. Wesselhoeft, R. A., Kowalski, P. S. & Anderson, D. G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. *Nat. Commun.* 9, 2629 (2018).

[0547]

14. Wesselhoeft, R. A. *et al.* RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo. *Mol. Cell* 74, 508–520.e4 (2019).

15. Carmona, E. M. Circular RNA: Design Criteria for Optimal Therapeutical Utility. (Harvard University, 2019).

16. Anhäuser, L., Hüwel, S., Zobel, T. & Rentmeister, A. Multiple covalent fluorescence labeling of eukaryotic mRNA at the poly(A) tail enhances translation and can be performed in living cells. *Nucleic Acids Res.* 47, e42 (2019).

17. Strzelecka, D. *et al.* Phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression. *RNA* 26, 1815–1837 (2020).

18. Li, B., Luo, X. & Dong, Y. Effects of Chemically Modified Messenger RNA on Protein Expression. *Bioconjug. Chem.* 27, 849–853 (2016).

19. Aurup, H., Siebert, A., Benseler, F., Williams, D. & Eckstein, F. Translation of 2′-modified mRNA in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* 22, 4963–4968 (1994).

20. Choi, J. *et al.* 2′-O-methylation in mRNA disrupts tRNA decoding during translation elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 208–216 (2018).

21. Łabno, A., Tomecki, R. & Dziembowski, A. Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 3125–3147 (2016).

22. Eckstein, F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 24, 374–387 (2014).

23. Stowell, J. A. W. *et al.* Reconstitution of Targeted Deadenylation by the Ccr4-Not Complex and the YTH Domain Protein Mmi1. *Cell Rep.* 17, 1978–1989 (2016).

24. Chen, J., Chiang, Y.-C. & Denis, C. L. CCR4, a 3′-5′ poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J.* 21, 1414–1426 (2002).

25. Cerritelli, S. M. & Crouch, R. J. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J.* 276, 1494–1505 (2009).

26. Yang, Y.-G., Lindahl, T. & Barnes, D. E. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* 131, 873–886 (2007).

27. Takahashi, A. *et al.* Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat. Commun.* 9, 1249 (2018).

28. Rydzik, A. M. *et al.* mRNA cap analogues substituted in the tetraphosphate chain with CX2: identification of O-to-CCl2 as the first bridging modification that confers resistance to

[0548]

decapping without impairing translation. *Nucleic Acids Res.* 45, 8661–8675 (2017).

29. Strenkowska, M. *et al.* Towards mRNA with superior translational activity: synthesis and properties of ARCA tetraphosphates with single phosphorothioate modifications. *New J. Chem.* 34, 993–1007 (2010).

30. Kawaguchi, D. *et al.* Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates the Rate of Translation Initiation to Provide More Efficient Protein Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 59, 17403–17407 (2020).

31. Wu, J.-C. *et al.* Recent advances in peptide nucleic acid for cancer bionanotechnology. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 798–805 (2017).

32. Doessing, H. & Vester, B. Locked and unlocked nucleosides in functional nucleic acids. *Molecules* 16, 4511–4526 (2011).

33. Wang, X. *et al.* Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* 361, (2018).

34. Zangi, Lior, et al. "Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and nduces vascular regeneration after myocardial infarction." *Nature Biotechnology*. 31.10 (2013): 898.

35. Bahl, Kapil, et al. "Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses." *Molecular Therapy*. 25.6 (2017): 1316-1327.

36. Richner, Justin M., et al. "Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection." *Cell*. 168.6 (2017): 1114-1125.

[0549]

[0550] 실시예 5: 포유동물 세포에서 고도로 효율적인 단백질 발현을 위한 화학적으로 변형된 mocRNA.

[0551] SARS-CoV-21,2에 대한 메신저 RNA (mRNA) 백신의 최근 임상 시험 및 승인에 의해 입증된 바와 같이, mRNA는 통상적인 단백질-기반 약물에 대한 떠오르고 있는 유망한 대안이다. 이는 주로 프로그램화가능성, 생체내 단백질의 빠른 생산, 상대적으로 낮은 제조 비용, 및 동시에 다중 단백질을 생산하는 잠재적 확장성 때문이다[3-5]. 그러나, mRNA는 생체내에서 치료용 단백질을 강력하게 생성하는 것으로 나타났지만[3,6-8], 상대적으로 짧은 수명으로 인해 다량의 단백질 생산이 필요한 임상 적용이 제한될 수 있다[3,9]. 치료용 단백질의 의도된 기능에 따라, mRNA 약물의 투여량 및 치료 지속시간은 수십 배로 달라질 수 있다. 백신의 경우, 나노그램에서 마이크로그램 범위의 항원 발현만으로도 면역 반응을 유발하는데 충분할 수 있다[3]. 그러나, 성장 인자, 호르몬 또는 항체의 경우, 치료 용량은 마이크로그램에서 밀리그램까지, 또는 잠재적으로 최대 그램 양의 단백질까지 다양할 수 있다[3]. 높은 단백질 생산을 달성하기 위해 단순히 mRNA 양을 확장하는 것은 mRNA의 형질감염에 내재된 선천적 면역 자극으로 인해 용량-의존적 독성을 유발할 수 있다[3]. 이러한 인자의 조합은 특히 mRNA 수명 및/또는 번역 효율의 증진을 통해 투여량을 증가시키지 않고도 트랜스제닉 단백질 생산을 부스트하기 위한 mRNA 벡터 조작의 필요성을 유도한다.

[0552] 화학적 변형은 mRNA 벡터의 성능을 증진시키는 효과적인 방법이다. "비변형된" 아데노신 (A), 구아노신 (G), 시티딘 (C) 및 우리딘 (U)으로 이루어진 시험관내 전사 (IVT)에 의해 제조된 외인성 mRNA는 단백질 발현을 억압하는 선천적 면역 독성을 강하게 촉발한다[10-12]. 변형된 U 유도체, 예컨대 슈도우리딘 및 N1-메틸슈도우리딘의 혼입은 구체적으로 톨-유사 수용체 인식의 차단을 통해 선천적 면역 독성을 감소시킴으로써 번역을 증가시키는데 광범위하게 사용되어 왔다[10-14]. 그러나, 이 전략은 현재 많은 변형된 뉴클레오시드 트리포스페이트 (NTP)가 RNA 폴리머라제 또는 리보솜 기계에 의해 관용되지 않기 때문에 혼입에 이용가능한 mRNA 변형의 화학적 공간을 제한한다. 더욱이, mRNA의 단백질-코딩 영역 내 특정 화학적 변형은 잠재적으로 손상된 번역을 야기할 수 있다[14-16]. 코딩 영역을 변형시키지 않고 mRNA 안정성을 증가시키는 대안적 전략은 mRNA 폴리(A) 테일의 효소적 연장 동안 변형된 NTP를 선택적으로 혼입하는 것이며, 이는 특히 세포 내 엑소뉴클레아제에 민감하다[17,18]. 유망하지만, 이 전략은 폴리(A) 폴리머라제에 의존하며, 이는 다시 제한된 화학적 레퍼토리, 가변적인 효소적 혼입 효율, 및 폴리(A) 테일 길이의 가변적인 분포의 생성에 직면한다[18].

[0553] 상기 언급된 한계를 극복하기 위해, 증대된 단백질 생산 능력을 갖는 mRNA-기반 발현 시스템인 메신저-올리고뉴클레오티드 접합된 RNA (mocRNA)를 효율적으로 구축하기 위한 라이게이션-기반 전략을 개발하였다. 이 접근법에서, 합성 올리고뉴클레오티드 (올리고)는 주형-코딩된 폴리(A) 테일을 함유하는 mRNA의 3' 단부와 라이게이션된다 (도 7a 및 7b). 이는 화학적 변형을 RNA 벡터로 정확하고 모듈화하여 코딩하는 것을 가능하게 하며, 이는 RNA 폴리머라제-매개 혼입을 사용해서는 불가능하다. 폴리(A) 테일의 단축은 세포 mRNA 붕괴의 중요한 단계로서 확인되며, 폴리(A) 테일은 캡-의존적 번역에 필수적이다[19,20]. 그러므로, mocRNA 시스템의 개념 증명으로서, 폴리(A) 테일을 보호하기 위해 다양한 뉴클레아제-저항성 모티프[21]를 합성 올리고뉴클레오티드에서 설계하고 테스트하였는데, 이는 mRNA 벡터의 대안적 변이체와 비교하여 우수한 단백질 발현을 입증하였다.

[0554] 결과 및 논의

[0555] 라이게이션에 의한 mocRNA의 고도로 효율적인 합성

[0556] 시험관내 전사된 (IVT) mRNA와 합성 올리고 사이의 접합을 가능하게 하기 위해, 각 올리고를 하기 요소로 설계하였다 (도 7a, 표 4): (1) T4 RNA 리가제 I에 의해 IVT mRNA의 3' 말단과 라이게이션하기 위한 올리고의 5' 단부에 있는 5' 포스페이트 및 적어도 6개의 비구조화된 RNA 뉴클레오티드; (2) 올리고 자기-라이게이션을 방지하기 위한 3' 차단기 (2'-3'-디데옥시시티딘 [ddC] 또는 역전된-2'-데옥시티미딘 [InvdT]); (3) 번역 증진의 신뢰성 있는 비교를 가능하게 하기 위한 폴리(A) 영역의 필적하는 길이. 올리고의 3' 차단기는 반응에서 큰 몰 과량의 올리고를 가능하게 하여 IVT mRNA의 mocRNA 생성물로의 거의 100% 전환을 보장한다 (도 7a 및 7b, 표 4).

[0557] 표 4: mocRNA 합성에 사용된 올리고뉴클레오티드의 서열.

변형된 올리고뉴클레오티드 서열 명칭	서열 (IDT 포맷)
29rA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArA/3ddC/ (SEQ ID NO: 6)
3xSrA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rA*rA* rA*rA/3ddC/ (SEQ ID NO: 7)
3xSrA_InvdT	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA* rA*rA*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 8)
3xSrG_InvdT	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArG* rG*rG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 9)
6xSr(AG)	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA* rA*rA*rG* rG*rG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 14)
3xdA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArAA AA/3ddC/ (SEQ ID NO: 10)
23xdA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ddC/ (SEQ ID NO: 11)
G4_telo_DNA_GtoC	/5Phos/rArArA rArArA TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CC/3ddC/ (SEQ ID NO: 12)
G4_telo_DNA_WT	/5Phos/rArArA rArArA TAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG GG/3ddC/ (SEQ ID NO: 13)

[0558]

G4_C9orf72_RNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA rArGrG rGrGrC rCrGrG rGrGrC rCrGrG rGrGrC* rC*rG*rG* rG*rG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 15)
G4_C9orf72_DNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA rAGG GGC CGG GGC CGG GGC* C*G*G* G*G*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 16)
G4_telo_DNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA TAG GGT TAG GGT TAG GGT* T*A*G* G*G*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 17)
26rA_G4_C9orf72_RNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArG rGrGrG rCrCrG rGrGrG rCrCrG rGrGrG rC*rC*rG* rG*rG*rG* /3InvdT/ (SEQ ID NO: 33)
26rA_G4_C9orf72_DNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArAG GGG CCG GGG CCG GGG C*C*G* G*G*G* /3InvdT/ (SEQ ID NO: 34)
26rA_G4_telo_DNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArAT AGG GTT AGG GTT AGG GT*T* A*G*G* G*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 35)

[0559]

[0560] RNA 염기: r_ ; RNA 포스포로티오에이트 염기: r_* ; DNA 포스포로티오에이트 염기: _* ; 5' 포스페이트 변형: /5Phos/ ; 2'-3'-디데옥시시티딘 [ddC] 변형: /3ddC/ ; 역전된-2'-데옥시티미딘 [InvdT] 변형: /3InvdT/.

[0561] mocRNA 발현 시스템을 입증하기 위해, 인간화 몬스터 녹색 형광 단백질 (GFP)에 이어서 주형-코딩된 폴리(A) 테일 (플라스미드: pCS2_GFP-60A)을 함유하는 플라스미드 주형을 클로닝하였으며, 이는 균질한 폴리(A) 길이를 갖는 번역가능한 mRNA를 보장하다. GFP-코딩 mRNA (GFP-60A)를, 5' 항-역방향 캡 유사체 (ARCA) 및 우리딘의 N1-메틸슈도우리딘으로의 100% 대체를 갖는 SP6 폴리머라제에 의한 IVT를 사용하여 합성하였다. IVT mRNA를 T4 RNA 리가제 I을 사용하는 3' 올리고 라이게이션에 의해 mocRNA로 추가로 변형하였다. RNase H 및 3' 비번역 영역 (UTR)을 표적화하는 DNA 올리고를 사용하여 서열-특이적 RNA 절단을 통해 접합 효율을 결정한 후, 접합된 및 비접합된 mRNA 3' 단부를 분해하기 위해 겔 전기영동을 수행하였다. RNase H 검정은 상기 언급된 GFP-60A mRNA를 사용하는 모든 mocRNA 구축물에 대해 거의 100% 접합 효율을 나타내었으며 (도 7b, 12a), 이는 이러한 접합 전략의 일반적인 이용가능성을 시사한다.

[0562] 뉴클레아제-저항성 mocRNA는 인간 세포에서 단백질 생산 및 RNA 안정성을 증가시킨다

[0563] 내인성 탈아데닐화 기계가 3'에서 5'로의 엑소뉴클레아제 복합체이고 탈아데닐화가 세포 내부 정준 RNA 붕괴의 속도-제한 단계라는 점을 고려하면, 폴리(A) 테일 이후 3' 말단에 뉴클레아제-저항성 요소를 도입하는 것이 폴리(A) 테일을 무손상 상태로 유지함으로써 RNA 번역 능력을 증가시키는 효과적인 방법이라는 가설을 세웠다. 이를 위해, 3' 말단 데아데닐라제-저항성 변형, 예컨대 포스포로티오에이트 PS 연결[18] 및 A-to-G 치환[22]를 함유하는 합성 올리고 (3xSrA_ddC, 3xSrA_InvdT, 및 3xSrG_InvdT, 및 6xSr(AG), 표 4)를 사용하여 mocRNA 구축물을 합성하였다. GFP-코딩 mocRNA 구축물을 내부 형질감염 대조군 역할을 하는 E-PAP 폴리(A) 테일링된 mCherry mRNA와 함께 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 공초점 현미경검사로 형질감염 후 24시간, 48시간 및 72시간 시점에 GFP/mCherry 형광 강도 비율을 정량화하였다. 형광 정량화는 29 nt-길이 폴리(A) 트랙트에 이어서 3' ddC (29rA_ddC)를 함유한 대조군 mocRNA 구축물이 모의 라이게이션 대조군 (리가제로 처리되었으나 변형된 올리고가 없는 GFP-60A mRNA)과 비교하여 GFP 형광을 최대 69%만큼 증가시켰음을 보여주었다. 이러한 증가는 폴리(A) 테일의 연장 및 아마도 쇄-종결 뉴클레오티드의 존재로 인한 것일 가능성이 높았다. 말단 PS 연결을 함유하는 모든 올리고 중에서, 6개의 순차적 포스포로티오에이트를 갖는 비구조화된 단일-가닥 (ss) RNA 올리고 (6xSr(AG), 표 4의 서열)는 테스트된 다른 변형된 올리고와 비교하여 GFP의 가장 높은 발현을 일관적으로 제공하였다 (24-72시간에 290%-377%, "모의 라이게이션"으로 정규화됨) (도 8a-8b; 표 6).

[0564] 표 6: 도 8a로부터의 GFP/mCherry 형광 비율 데이터에 대한 통계 ("모의 라이게이션" 샘플로 정규화됨).

	24시간 통계			48시간 통계			72시간 통계		
	평균	s.d.	s.e.m	평균	s.d.	s.e.m.	평균	s.d.	s.e.m.
모의 라이게이션	1	0.032	0.006	1	0.052	0.0092	1	0.089	0.016
라이게이션 없음	1.05	0.33	0.07	1.05	0.36	0.081	1.15	0.42	0.093
29rA_ddC	1.59	0.47	0.13	1.54	0.48	0.14	1.69	0.64	0.19
3xSrA_ddC	2.73	0.23	0.07	2.63	0.41	0.12	3.64	0.84	0.24
3xSrA_InvdT	2.31	0.57	0.16	2.43	0.71	0.21	2.76	1.01	0.29
3xSrG_InvdT	2.78	0.44	0.127	3.07	0.55	0.16	3.2	0.7	0.2
6xSr(AG)	2.9	0.26	0.074	3.39	0.45	0.13	3.77	0.55	0.16
3xdA_ddC	1.6	0.3	0.091	1.45	0.28	0.081	1.58	0.36	0.11
23xdA_ddC	1.66	0.3	0.088	1.49	0.28	0.08	1.64	0.35	0.1
G4_telo_ DNA_GtoC	1.76	0.69	0.2	1.51	0.66	0.19	1.78	0.83	0.24
G4_telo_ DNA_WT	2.71	0.27	0.078	2.63	0.31	0.089	2.86	0.3	0.086
G4_C9orf72_ RNA_6xSrG	2.46	0.7	0.201	2.95	1.02	0.29	2.87	1.04	0.3
G4_C9orf72_ DNA_6xSrG	3.02	0.8	0.23	3.41	1.03	0.3	3.43	1.08	0.31
G4_telo_ DNA_6xSrG	2.47	1.04	0.3	3.37	1.25	0.36	3.14	1.28	0.37

[0565]

[0566] PS-변형된 mocRNA의 성공을 고려하여, 3' 말단 RNase-저항성 DNA 연결이 단백질 번역을 유사하게 증가시킬 수 있다는 가설을 세웠다. 텔로미어-유래 DNA 쿼드러플렉스 (G4_telo_DNA_WT) 서열은 비구조화된 "G에서 C로" DNA 올리고 대조군 라이게이션과 비교하여 단백질 번역을 유의하게 증진시켰다 (24-72시간에 150%-170%) (도 8a 및 8b; 표 6). 이들 결과는 3' 단부에 비구조화된 ssDNA를 함유하는 mocRNA가 세포 뉴클레아제, 예컨대 ssDNA-특이적 뉴클레아제[23,24] 및 일부 ssDNase 활성을 함유하는 CCR4 (탈아데닐화 복합체의 구성성분)[25]에 대한 감수성을 유지할 수 있음을 시사한다. 대안적 가능성은 비구조화된 ssDNA가 mRNA 서열과 부분적으로 상보적인 경우 RNase H를 통해 mRNA 분해를 촉발할 수 있다는 것이다[26]. 종합적으로, 이들 결과는 3' 말단에 구조화된 DNA 쿼드러플렉스를 함유하는 mocRNA가 단백질 발현을 가장 효과적으로 증가시킬 수 있는 반면, 비구조화된 ssDNA 테일은 발현을 다소 덜 증진시킬 수 있음을 나타낸다.

[0567] PS 변형을 G4 2차 구조와 조합하는 것이 mocRNA를 상승작용적으로 안정화시킬 수 있는지 여부를 추가로 탐구하였다. 6개의 순차적 PS 연결을 함유하는 ssDNA 및 ssRNA G4 올리고 (G4_C9orf72_RNA_6xSrG, G4_C9orf72_DNA_6xSrG, 및 G4_telo_DNA_6xSrG)는 비구조화된 6xSr(AG) 올리고를 함유하는 mocRNA와 유사한 수준의 증진된 번역을 초래하였다 (도 8a 및 8b; 표 6).

[0568] mocRNA의 증진된 번역은 mRNA 분해 동역학에 영향을 주지 않고 감소된 RNA 분해 속도 또는 mRNA당 번역 효율의 직접적인 증가로 인한 것일 수 있다. 번역 증진 메커니즘을 검증하기 위해, 형질감염 후 48시간에 다양한 mocRNA 라이게이션 구축물로 형질감염된 HeLa 세포에 대해 RT-qPCR 정량화를 수행하였다 (표 7). 상대적 GFP/mCherry RNA 비율은 각 구축물에 대해 관찰된 벌크 GFP/mCherry 단백질 형광 비율과 잘 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌으며 (도 8c, 피어슨 r = 0.84, P = 2e-4; 도 13b 및 13c), 이는 변형된 올리고가 주로 세포 내 mRNA 양을 안정화시킴으로써 단백질 번역을 증진시킨다는 것을 시사한다.

[0569] 표 7: 도 8c 및 16b로부터의 RT-qPCR 데이터 (48시간 시점)에 대한 통계

	GFP/(mCherry+hActb), "모의 라이게이션"으로 정규화됨		IfnB1 / hActb, "모의 라이게이션"으로 정규화됨	
	평균	s.d.	평균	s.d.
모의 라이게이션	1.09	0.5	1.02	0.2
라이게이션 없음	0.92	0.28	1.42	0.73
29rA_ddC	0.76	0.13	1.2	0.37
3xSrA_ddC	1.67	0.11	1.09	0.41
3xSrA_InvdT	1.15	0.24	1.15	0.38
3xSrG_InvdT	1.51	0.2	1.24	0.28
6xSr(AG)	2.13	0.29	1.23	0.41
3xdA_ddC	0.82	0.05	1.15	0.45
23xdA_ddC	0.91	0.04	1.28	0.58
G4_telo_DNA_GtoC	1.11	0.25	1.25	0.27
G4_telo_DNA_WT	0.99	0.08	1.74	0.86
G4_C9orf72_RNA_6xSrG	2.37	0.57	1.28	0.45
G4_C9orf72_DNA_6xSrG	2.39	0.6	1.1	0.44
G4_telo_DNA_6xSrG	2.38	0.11	1.31	0.4
mCherry 단독	0.0005	0.0001	1.04	0.27
비변형된 GFP mRNA	-	-	3.24	0.37
200 ng 폴리(I:C)	-	-	40	6
500 ng 폴리(I:C)	-	-	100	20
형질감염 단독	-	-	2	1

[0570]

[0571] 지질-매개 형질감염 및 엔도솜 파열의 확률론적 성질을 고려하면, 개별 세포에 걸쳐 형질감염된 mRNA의 수에 큰 변동이 있을 수 있다[27]. mocRNA의 관찰된 번역 증진이 전체 세포 집단에 걸쳐 번역의 일반적인 증가를 나타내는지, 또는 작은 세트의 고발현 세포로부터 비롯된 것인지 특징화하기 위해, GFP/mCherry 단백질 형광 및 RNA 카피 수의 비율을 단일-세포 수준에서 정량화하였다. GFP/mCherry 형광 비율의 단일-세포 형광 분석 (도 13a)은 벌크 측정에서 관찰된 경향을 요약하였다 (도 8a). 형질감염된 세포 내 mRNA 존재비는 세포하 해상도에서 고정된 세포 또는 조직 샘플 내 표적 mRNA 서열의 카피 수를 식별할 수 있는 제자리 전사체 방법인 STARmap[28]을 사용하여 추가로 정량화하였다 (도 8d, 13b). STARmap 이미지에서, 형광 반점은 각각 유리 "시토졸성" GFP-mocRNA 또는 mCherry mRNA에 상응한다. 큰 세포내 과립은 GFP-mocRNA 및 mCherry mRNA의 많은 카피를 함유하는 지질 형질감염 소포에 상응할 가능성이 높다 (도 8d). RT-qPCR은 mRNA (시토졸성 및 형질감염 시약에 함유됨)의 벌크 측정을 제공하는 반면, STARmap은 이들 2개 신호의 공간적 분리를 가능하게 하여 큰 응집체로부터 신호를 필터링함으로써 개별 시토졸성 mRNA의 직접적인 정량화를 가능하게 한다. 중요하게는, 단일-세포 수준에서 시토졸성 RNA 분획의 정량화는 mocRNA의 안정화 효과가 또한 전체 세포 집단에 걸쳐 발생한다는 것을 나타낸다 (도 13c 및 13d).

[0572] 단백질 및 RNA 동역학은 세포 내 mocRNA의 증가된 안정성을 보여준다

[0573] PS+G4 올리고의 초기 스크린으로부터 관찰된 번역은 상이한 길이 (6xSr(AG)에서 26 A 및 G4_C9orf72_RNA_6xSrG, G4_C9orf72_DNA_6xSrG, 및 G4_telo_DNA_6xSrG에서 6 A)에 의한 폴리(A) 테일의 연장에 의해 잠재적으로 교란될 수 있는 것처럼 보였다. 이 점을 직접적으로 해결하기 위해, 6xSr(AG)와 유사한 수의 A를 함유하는 재설계된 더 긴 PS+G4 올리고 사이에 비교를 수행하였다: 26rA_G4_C9orf72_RNA_6xSrG, 26rA_G4_C9orf72_DNA_6xSrG, 및 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG. HeLa 발현 시간 경과는 6xSr(AG)가 발현 증진에서 26A-함유 C9orf72 올리고보다 성능이 뛰어남을 나타내었다. 그러나, 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG는 6xSr(AG)에 비해 약간의 번역 증진을 나타내었다 (24-72시간 사이에 17-24%, 도 14a). 이들 데이터는 특이적 텔로미어 구조가 PS 연결에 의해 부여되는 안정화를 넘어 상대적으로 낮은 수준의 추가 안정화를 첨가할 수 있음을 시사한다. 6xSr(AG)와 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG mocRNA 사이의 유사한 발현 수준으로 인해, 이들 두 올리고를 단백질 발현의 하류 동역학적 분석에서 검사하였다.

[0574] 다양한 시점에서 mocRNA 번역의 동역학을 특징화하기 위해, 데그론-태그부착된 반딧불이 루시퍼라제를 코딩하는 mocRNA를 생성하였다. 데그론 (마우스 오르니틴 데카르복실라제[29]로부터 유래된 PEST)은 HeLa 세포에서 루시퍼라제 반감기를 20.4시간에서 추정된 0.92시간으로 감소시켰다 (도 9a). 가장 성능이 좋은 두 가지 올리고인 6xSr(AG) 및 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG 중 하나를 함유하는 루시퍼라제-PEST mocRNA를 생성하였으며, HeLa 세포로의 mRNA 형질감염 후 시간의 함수로서 발광을 기록하였다. 형질감염 후 8시간에, 6xSr(AG) 및 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG mocRNA (루시퍼라제-데그론을 코딩함)는 모의 라이게이션보다 약간 더 큰 수준의 번역

을 나타내었다 (각각 44% 및 39% 더 큰 신호). 그러나, 48 및 72시간까지, mocRNA 둘 다는 모의 라이게이션보다 실질적으로 성능이 뛰어났으며, 6xSr(AG)는 각각 10배 및 15배 더 많은 신호를 나타내었고, 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG는 15배 및 25배 더 많은 신호를 나타내었다 (도 9b). 공동-형질감염된 레닐라 루시퍼라제 mRNA 내부 대조군의 번역에서는 필적하는 유의한 차이가 관찰되지 않았기 때문에, 이러한 번역 증진은 샘플 간의 형질감염 효율의 차이로 인한 것이 아니었다 (도 14c). mocRNA 번역의 관찰된 동역학은 모의 라이게이션과 달리 이들 시점 (번역을 가능하게 함)에서 무손상 폴리(A) 테일을 보유하는 6xSr(AG) 및 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG와 일치한다. 또한, mocRNA에 대해 수행된 시험관내 번역 실험은 mocRNA와 대조군 사이의 번역 효율에 있어서 실질적인 차이를 보여주지 않았다 (도 14b). 이는 mocRNA로부터의 증가된 단백질 발현이 증진된 번역 개시 효율보다는 증진된 mRNA 수명에 주로 기인함을 나타낸다.

[0575] mocRNA 붕괴의 동역학은 HeLa 세포로의 형질감염 후 24, 48 및 72시간에 STARmap을 사용하여 제자리 mRNA 시각화를 수행함으로써 세포에서 추가로 검증되었다 (도 9c). 29rA_ddC, 6xSr(AG) 또는 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG를 함유하는 GFP-60A mocRNA를 HeLa 세포에 형질감염시키고, 시간 경과에 따라 상대적 mRNA 존재비를 정량화하였다. 6xSr(AG) mocRNA 샘플은 각 시점에서 29rA_ddC보다 1.7-2.5배 더 높은 GFP/mCherry mRNA 카운트 비율 (단일 세포로부터의 평균)을 나타내었다. 추가적으로, 26rA_G4_telo_DNA_6xSrG는 각 시점에서 29rA_ddC 대조군과 비교하여 1.7-3.1배 더 높은 GFP/mCherry mRNA 카운트 비율을 가졌다 (도 9d).

[0576] mocRNA는 mRNA 변형을 위한 대안적 전략보다 성능이 뛰어난다

[0577] 이전 연구는 이. 콜라이 폴리(A) 폴리머라제 (E-PAP)에 의해 폴리(A) 테일에 혼입된 PS 연결이 mRNA 안정성을 증진시킬 수 있다고 보고하였다[18]. 따라서, 폴리(A) 테일의 E-PAP 변형 전략을 또한 탐구하였다. 우리딘 대신 N1-메틸슈도우리딘을 함유하는 캡핑된 GFP mRNA에 대한 폴리(A) 테일링 반응에 XATP 스파이크인을 도입함으로써 화학적으로 변형된 ATP 유도체 (XATP) 패널을 스크리닝하였다 (도 15). HeLa 세포를 내부 형질감염 대조군, 테일-비변형된 mCherry mRNA (100% ATP, E-PAP 테일링된)와 함께 다양한 테일-변형된 GFP mRNA로 공동-형질감염시키고, 3일 시간 경과에 걸쳐 GFP/mCherry 형광 비율을 모니터링하였다. HeLa 세포 실험에서 초기 스크린은 XATP 스파이크인에 의한 폴리(A) 변형이 비변형된 폴리(A) 구축물과 비교하여 정규화된 GFP 생산을 증가시켰음을 나타내었다 (특히 dATP (2'-데옥시아데노신 트리포스페이트, 정규화된 GFP/mCherry의 25-62% 증가) 및 S-ATP (아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트), 42-91% 증가)의 경우) (도 15). S-ATP 스파이크인은 GFP 발현의 가장 큰 증진을 초래하였고 (이전에 보고된 연구[18]와 일치), 그러므로 상이한 mRNA 변형 전략을 비교하는데 사용되었다 (도 10a).

[0578] S-ATP에 의해 기능화된 6xSr(AG) 내지 GFP-60A mRNA를 IVT 또는 E-PAP 혼입 (도 10a 내지 10c)을 통해 RNA 길이 균질성 및 단백질 생산에서 비교하였다. mocRNA 및 IVT-변형된 구축물은 균질한 길이 분포를 나타낸 반면, E-PAP-테일링된 mRNA는 테일링 길이의 넓은 분포를 가지며, S-ATP 스파이크인 백분율이 증가할수록 길이는 더 짧아진다 (도 10c). 내부 형질감염 대조군으로서 mCherry mRNA (100% A로 테일링된 E-PAP)를 사용하여, GFP/mCherry 형광 비율을 HeLa 세포에서 형질감염 후 24, 48 및 72시간에 정량화하였다. 비처리된 GFP-60A 대조군으로 정규화한 후, 6xSr(AG) mocRNA는 형질감염 후 다양한 시간에 GFP 발현의 가장 높은 증진을 초래하였다 (24시간: 214 ± 45%; 48시간: 289 ± 68%; 72시간: 286 ± 32%; 평균 ± s.d.) (도 10d). 모든 E-PAP 테일링된 mRNA 구축물 중에서, 25% S-ATP 스파이크인은 비처리된 GFP-60A 대조군과 비교하여 GFP 발현의 가장 높은 증진을 가졌다 (24시간, 93 ± 21% 증가). S-ATP의 IVT-매개 혼입은 작은 백분율의 변형된 ATP에 유익한 것으로 입증되었다 (24시간, 5% S-ATP: 160 ± 7%). 비처리된 GFP-60A mRNA와 비교하여 25% S-ATP에서 리포터의 감소된 번역 (54 ± 5%)이 관찰되었다. 전반적으로, mRNA 테일의 상이한 변형 방법 간의 이러한 체계적인 비교는 E-PAP 및 IVT- 변형된 mRNA에 비해 mocRNA의 우수한 성능을 입증하였다 (도 10d).

[0579] mocRNA 구축물은 일차 래트 피질 뉴런 배양에서 단백질 발현을 증진시킨다

[0580] 뉴런은 다양한 뇌 및 신경계-관련 질환의 주요 치료 표적이다[30,31]. DNA 플라스미드의 화학적/지질-매개 형질감염은 유사분열 후 세포, 예컨대 뉴런에서 제한된 발현 효율을 나타내지만, mRNA 형질감염은 더 높은 효율로 뉴런에 트랜스제닉 단백질 발현을 도입하는 대안이다[32]. mocRNA가 일차 세포 배양에서 단백질 생산을 증가시킬 수 있는지 여부를 탐구하기 위해, 변형된 구축물을 래트 피질 뉴런의 일차 배양에서 테스트하였다.

[0581] 6xSr(AG) 올리고 및 비라이게이션된 대조군에 의해 제조된 GFP mocRNA를 형질감염 후 24시간 및 48시간에 비교를 위해 mCherry mRNA (100% rA로 테일링된 E-PAP, 형질감염 대조군)로 공동-형질감염시켰다 (도 11a). 비라

이게이션된 GFP 샘플과 비교하여, 6xSr(AG) mocRNA 샘플의 GFP 발현은 두 시점 모두에서 한 자릿수 더 높은 발현을 나타내었다 (24시간: 1015 ± 190%; 48시간: 1061 ± 210) (도 11a-11b, 표 8). 이들 결과는 mocRNA가 통상적인 mRNA 벡터와 비교하여 뉴런 세포 배양에서 단백질 발현의 강력한 증진을 제공할 수 있음을 입증하였다.

[0582] 표 8: 도 11a로부터의 GFP/mCherry 형광 비율 데이터에 대한 통계 ("모의 라이게이션" 샘플로 정규화됨).

24시간 통계	mCherry 단독	비처리된 mRNA	6xSr(AG)
평균	0.24	1.00	10.15
s.d.	0.19	0.19	1.90
s.e.m.	0.04	0.04	0.45
샘플 크기	12	12	12
48시간 통계	mCherry 단독	비처리된 mRNA	6xSr(AG)
평균	0.47	1.00	10.61
s.d.	0.32	0.26	2.10
s.e.m.	0.07	0.06	0.49
샘플 크기	12	12	12

[0583]

[0584] s.d.: 표준 편차; s.e.m: 평균의 표준 오차.

[0585] mocRNA는 치료용 mRNA와 유사한 독성 프로파일을 유지한다

[0586] 비변형된 IVT mRNA는 형질감염 시 강한 면역 반응을 촉발하며, 이는 단백질 생산을 억압한다[10-12]. 우리딘의 N1-메틸슈도우리딘으로의 100% 대체는 면역 독성을 최소화하기 위한 치료용 mRNA (및 mocRNA) 제제에서 사용되지만[12], 쇄-종결 뉴클레오티드, PS 연결, 또는 합성 올리고에 의해 mocRNA에 도입된 공유결합적 DNA-RNA 결합이 추가적인 세포 독성을 촉발할지 여부를 추가로 평가하였다. 먼저, 세포 증식 및 생존성의 실질적인 감소에 대해 체크하기 위해 도 8에 표시된 이미지화 데이터로부터 세포 수를 정량화하였다. 임의의 mocRNA 조건과 비라이게이션된 mRNA 대조군 사이에서는 HeLa 세포 수의 유의한 감소가 관찰되지 않았다 (도 16a). 추가적으로, HeLa 세포에서의 선천적 면역 자극을 도 8에 표시된 형질감염 후 48시간 샘플에 대한 IFNB1 mRNA의 RT-qPCR 측정을 통해 측정하였다. IFNB1 상향조절은 외래 RNA 종을 인식하는 선천적 면역 센서인 RIG-I 및 MDA5 활성화의 결과이다[33-35]. 비변형된 GFP mRNA (100% 우리딘) 및 폴리(I:C) 형질감염 (강력한 RIG-I 효능제[36])의 양성 대조군은 29rA_ddC mocRNA 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 IFNB1 mRNA 상향조절을 유도하였다 (웰치 t-테스트). 그러나, 임의의 mocRNA, 비라이게이션된 mRNA 및 형질감염 단독 대조군 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (도 16b). 이들 결과는 적어도 본 연구에서 탐구된 구축물에 대해 mocRNA가 비처리된 mRNA를 넘어 선천적 면역 반응을 본질적으로 증가시키지 않는다는 것을 나타낸다.

[0587] 최종적으로, 형질감염된 래트 피질 뉴런 배양물에서 살아있는-죽은 세포 염색을 사용하여 뉴런에서 mocRNA-매개 독성을 분석하였다 (훽스트 염색 및 NucRed Dead 647 사용). mocRNA 및 통상적인 mRNA 형질감염 사이의 세포 독성의 차이에 대해 테스트하기 위해 각 배양 조건에서 죽은 뉴런의 백분율을 계산하였다. 형질감염 대조군과 비교하여 6xSr(AG) 라이게이션에 의해 야기되는 뉴런 독성의 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (도 16c). 종합하면, 이들 결과는 본 연구에서 확인된 변형이 테스트된 세포 배양에서 mRNA의 독성 프로파일을 실질적으로 변경하지 않았음을 시사한다.

[0588] 요약 및 결론

[0589] 화학적으로 변형된 폴리(A) 테일을 합성하기 위해 폴리(A) 폴리머라제를 활용하는 기존 방법은 종종 배치 간 균질성을 복잡하게 만들 수 있고 변형 부위를 정밀하게 제어할 수 없는 테일 길이의 넓은 분포를 초래한다. 대조적으로, mocRNA 합성은 거의 100% 수율을 나타내고, mRNA 균질성을 완전히 보존할 수 있으며, 이는 mRNA 치료제 개발을 위한 기존 파이프라인과 호환가능하게 만든다. 더 중요하게는, mocRNA 발현 시스템은 RNA 폴리머라제에 의해 혼입될 수 없는 화학적 변형을 도입할 수 있고, 변형 부위의 정밀한 제어를 가능하게 하여 RNA 변형 효과를 최대화한다. 제1 입증으로서, 3' 말단에 클러스터링된 뉴클레아제-저항성 모티프를 갖는 mocRNA는 mRNA 백

터의 폴리(A) 테일을 보호함으로써 단백질 발현을 증진시켰다. 형광 단백질 측정은 3' 말단 PS 연결을 함유하는 mocRNA가 인간 HeLa 세포주에서 2-4배 (도 8a) 및 일차 래트 피질 뉴런 배양물에서 10배 (도 11a)만큼 단백질 생산을 증가시켰다는 것을 입증하였다. 조합된 벌크 RT-qPCR 측정 및 단일-세포 분해된 제자리 STARmap 측정은 3' 말단 PS 변형 및 특이적 텔로미어 서열을 함유하는 mocRNA가 주로 RNA를 안정화시킴으로써 단백질 발현을 개선한다는 것을 나타낸다 (도 8a, 14a)[37]. 이들 mocRNA 구축물은 IVT 및 폴리아데닐화 동안 변형된 NTP의 무작위 혼입에 의존하는 mRNA 벡터의 기존 변이체보다 더 높은 번역 능력을 갖는다[14,15,18] (도 10d).

[0590] 요약하면, mocRNA를 합성하기 위한 모듈식의 프로그램화가능하고 효과적인 전략을 개발하여, RNA 벡터의 다양하고 정밀한 화학적 변형을 가능하게 하여 단백질 번역 능력 및 RNA 안정성을 증진시켰다. mocRNA는 잠재적으로 다른 유형의 변형 전략, 예컨대 폴리(A) 결합 단백질 (PABP)-결합 올리고 (예를 들어 문헌 [Barragan-Iglesias, et al. Nat Commun, 9(1):10] 참조)[38], 가수분해-저항성 7-메틸구아노신 캡[39,40], 변형된 5' UTR 영역[41], 및 mRNA 몸체 내 다른 유형의 변형된 뉴클레오티드[42]와 조합될 수 있다. mocRNA 설계는 유기 합성을 효소적 합성과 통합하여 화학적 모이어티를 다양화하고 RNA-기반 단백질 발현 시스템의 기능적 효능을 부스트하기 위한 일반화가능한 플랫폼 역할을 할 수 있다.

[0591] 방법

[0592] 플라스미드 클로닝, 특징화 및 정제

[0593] hMGFP 및 mCherry-코딩 플라스미드 (각각 pCS2_hMGFP 및 pCS2_mCherry)를 샤오 왕(Xiao Wang)으로부터 얻었다. 이들 플라스미드는 SP6 프로모터 서열, 5' UTR, 형광 단백질 코딩 서열 (CDS), 3' UTR, 및 NotI 제한 절단 부위를 (순서적으로) 함유하였다. 서열은 원본 참고문헌[43]에서 찾을 수 있다.

[0594] Q5® 부위-지정 돌연변이유발 키트 (NEB: E0554S)를 사용하여 부위-특이적 변형을 함유하는 프라이머 (표 4)를 사용하여 주형 플라스미드에 대한 PCR을 수행하였다. 이어서 KLD 효소 처리를 수행한 후, 자이모퓨어 플라스미드 미니프렙 키트를 사용한 단리를 위해 NEB Stabl 세포 (NEB: C3040H)로 형질전환하고, 제네위즈를 통해 생어 시퀀싱을 수행하였다.

[0595] Esp3I 부위 앞에 60xA 주형-코딩된 폴리(A) 테일의 부위-특이적 설치를 위해, Q5 부위-지정 돌연변이유발을 사용하여 2회 순차적 클로닝 라운드를 수행하였다. 제1 클로닝 라운드는 이전 NotI 제한 부위의 5'에 Esp3I 제한 부위를 설치하였다 (Esp3i_insert_F 및 Esp3i_insert_R). 얻어진 생어 시퀀싱-검증된 플라스미드를 60xA 폴리(A) 테일의 설치를 위한 주형으로서 사용하였다 (60A_insert_F 및 60A_insert_R). 제2 클로닝 라운드로부터 선택된 클론을 생어 시퀀싱을 사용하여 검증하였다. 프라이머 서열에 대한 보충 표 4를 참조한다. Esp3I 부위 이전에 ~60 nt 긴 주형-코딩된 테일을 함유하는 구축물의 명칭은 pCS2_hMGFP-60A였다.

[0596] PCR을 사용하여 pCS2_hMGFP-60A 벡터로부터 hMGFP 코딩 영역을 결실시킴으로써 먼저 반딧불이 루시퍼라제 구축물을 생성하였다. 다음으로, 반딧불이 루시퍼라제 코딩 서열을 pmirGLO 이중-루시퍼라제 miRNA 표적 발현 벡터 (프로메가: E1330)로부터 PCR 증폭시켰으며, 관심 벡터에 대한 15-20개의 뉴클레오티드 상보적 오버행 영역을 함유하도록 설계된 PCR 프라이머를 사용하였다. 벡터 및 삽입물을 NEBuilder HiFi DNA 어셈블리 마스터 믹스 (NEB: E2621S)를 사용하여 어셈블리하고, Stabl 세포로 형질전환하고, 생어 시퀀싱에 의해 서열-검증하였다. pmirGLO 벡터로부터의 레닐라 루시퍼라제 코딩 서열을 제외하고는 반딧불이 루시퍼라제와 유사한 프로세스에 의해 레닐라 루시퍼라제 구축물을 클로닝하였다.

[0597] 불안정화된 반딧불이 루시퍼라제 구축물 (즉, 반딧불이-PEST)은 마우스 오르니틴 데카르복실라제로부터 유래된 데그론을 함유한다[29]. 상기 언급된 반딧불이 루시퍼라제 벡터는 NEBuilder HiFi 방법을 사용하여 PEST 서열을 코딩하는 진블록(GeneBlock) (IDT, 인간 코돈-최적화된)이 삽입된 정지 코돈 주위에서 PCR-선형화되었다.

[0598] mRNA 합성 및 특징화

[0599] SP6 프로모터, 이어서 hMGFP CDS 및 주형-코딩된 폴리(A) 테일을 함유하는 pCS2_hMGFP-60A 플라스미드로부터 GFP mRNA를 합성하였다. 플라스미드는 폴리(A) 영역의 바로 3'에 위치된 단일 Esp3I 부위에 의해 선형화되었으며, 이는 클로닝 동안 설치되었다. 그 후, 선형화된 플라스미드를 자이모 리서치 (D4033)로부터의 DNA 클린 & 컨선트레이터-25 키트를 사용하여 정제하고, 아가로스 겔 전기영동을 통해 순도에 대해 체크하였다. mMESSAGE mMACHINE™ SP6 전사 키트 (써모피셔 사이언티픽: AM1340)로부터의 SP6 효소 및 반응 완충액을 사용하여 캡핑된

변형된 mRNA를 제조하였다. 키트에 의해 제공된 2X NTP/캡 용액을 하기를 함유하는 2X NTP/캡 제제로 대체하였다: 10 mM ATP (NEB: N0451AVIAL), 10 mM CTP (NEB: N0454AVIAL), 2 mM GTP (NEB: N0452AVIAL), 8 mM 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G RNA 캡 구조 유사체 (NEB: S1411S), 및 10 mM N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트 (트리링크 바이오테크놀로지스(TriLink Biotechnologies): N-1081-1). 슈퍼라제-인 RNase 억제제 (써모피셔 사이언티픽: AM2694)를 1:20 (v/v)의 최종 농도로 첨가하였다. IVT 반응 어셈블리 및 37℃에서 2-4시간 동안 인큐베이션 후, 반응물을 1시간 동안 37℃에서 1-2 μl의 TURBO DNase (AM1340에서 제공됨)로 처리한 후, 메가클리어™ 전사 클린업 키트 (써모피셔 사이언티픽: AM1908)를 사용하여 반응물을 정제하였다. 슈퍼라제-인 RNase 억제제를 정제된 mRNA 샘플에 1:50 (v/v)의 최종 농도로 첨가하고, 장기간 저장을 위해 -80℃에서 샘플을 저장하였다. 라이게이션 전 농도를 추정하기 위해 나노드롭에 의해 정제된 mRNA를 측정하였고, 세포-기반 테스트를 위한 형질감염 직전 정규화를 위해 큐비트 RNA HS 검정 (써모피셔 사이언티픽: Q32852)을 사용하여 mRNA 및 mocRNA를 측정하였다.

[0600] 폴리(A) 폴리머라제-테일링된 mRNA의 제조를 위해 (도 15), NotI-HF (NEB: R3189S)를 사용하여 pCS2_hMGFP 및 pCS2_mCherry 플라스미드의 선형화에 의해 생성된 dsDNA 주형을 사용하고, 자이모 DNA 클린 & 컨선트레이터-25를 사용하여 소화된 생성물을 칼럼 정제하였다. TURBO DNase 소화 후, E-PAP 폴리(A) 테일링 키트 (써모피셔 사이언티픽: AM1350)를 사용한 폴리(A) 테일링의 추가 단계를 포함시킴을 제외하고, 상기 기재된 프로토콜을 사용하여 시험관내 전사를 수행하였다. mRNA의 정제 및 저장을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다 (예를 들어, 메가클리어 전사 클린업 키트 사용).

[0601] 도 10에 대해, 상기 나열된 것에 변형된 프로토콜을 사용하여 아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트) 스파이크인 mRNA를 합성하였다. 아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트) (S-ATP)를 공동-전사 혼입 실험에 사용하였다. 이전에 개봉된 스톡 튜브를 사용하였을 때 S-ATP 혼입의 질적 차이가 관찰되었는데, 이는 아마도 산화 때문일 수 있다. 이러한 이유로, 모든 테일링 실험 전에 새로운 튜브를 사용하여 이들 실험에서 교란 인자로서 가능한 산화의 효과를 제한하였다. S-ATP 시험관내 전사 반응을 상기 나열된 것과 동일한 설정으로 수행하였지만, 반응물 중 최종 5 mM ATP는 4.75 mM ATP + 0.25 mM S-ATP (5% S-ATP 혼입)로 대체되거나 3.75 mM ATP + 1.25 mM S-ATP (25% S-ATP)로 대체하였다. 60xA 주형-코딩된 폴리(A) 테일을 갖는 GFP 코딩 서열을 함유하는 IVT 주형을 사용하였다.

[0602] 변형된 이. 콜라이 폴리(A) 폴리머라제 테일링

[0603] 도 15에서 변형된 E-PAP 테일링 실험의 경우, 기질은 NotI-HF 선형화된 pCS2_hMGFP 주형 상의 IVT로부터 생성된 비테일링 GFP mRNA (상기 IVT 프로토콜 참조)였다. 이 프로토콜은 E-PAP 폴리(A) 테일링 키트 (써모피셔 사이언티픽: AM1350)로부터의 효소 및 완충액을 활용하였다. 특정 백분율의 ATP가 변형된 ATP 유도체 (XATP)에 의해 대체되도록 "총 10 mM" ATP 스톡 용액을 각 변형된 ATP 스파이크인에 대해 제조하였다. 예를 들어, 25% dATP 샘플은 2.5 mM dATP, 7.5 mM ATP 스톡 용액의 어셈블리를 필요로 하였다. 테일링 반응을 하기와 같이 어셈블리하였다: 1.5 μg의 비테일링 GFP mRNA; 5 μl의 5X E-PAP 완충액; 2.5 μl의 10 mM XATP:ATP 스톡 용액 (각 샘플마다 상이함); 2.5 μl의 25 mM MnCl2; 1 μl의 슈퍼라제-인 RNase 억제제; 1 μl의 E-PAP 효소; 및 뉴클레아제-무함유 물 최대 25 μl의 총 부피. 반응물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 0.5 μl의 500 mM EDTA를 첨가하여 켄칭하였다. 그 후, 모나크 RNA 클린업 키트 (50 μg)를 사용하여 이들 테일링된 mRNA를 칼럼 정제하였다 (NEB: T2040S). 슈퍼라제-인 RNase 억제제를 정제된 mRNA에 1:50 (v/v)의 최종 희석으로 첨가하고, 형질감염 전에 mRNA를 -80℃에서 저장하였다.

[0604] 하기 변형된 ATP 유도체 (XATP)를 이들 실험에서 사용하였다: 아데노신 5'-트리포스페이트 (ATP) (NEB: P0756S); N6-메틸아데노신-5'-트리포스페이트 (트리링크 바이오테크놀로지스: N-1013-1); 2'-O-메틸아데노신-5'-트리포스페이트 (트리링크 바이오테크놀로지스: N-1015-1); 아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트) (트리링크 바이오테크놀로지스: N-8005-1); dATP 용액 (NEB: N0440S); 2'-아미노-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (트리링크 바이오테크놀로지스: N-1046-1).

[0605] 도 10 (방법 비교)에 표시된 변형된 E-PAP-테일링의 경우, 주형-코딩된 60A 테일을 함유하는 hMGFP-코딩 mRNA를 사용하여 E-PAP 테일링을 수행하였다 (도 15와 대조적으로). 아데노신-5'-O-(1-티오트리포스페이트) (S-ATP)를 공동-전사 또는 변형된 폴리(A) 테일링 실험에 사용하였다. 이전에 개봉된 스톡 튜브를 사용하였을 때 S-ATP 혼입의 질적 차이가 관찰되었는데, 이는 아마도 산화 때문일 수 있다. 이러한 이유로, 모든 테일링 실험 전에 새로운 튜브를 사용하여 이들 실험에서 교란 인자로서 가능한 산화의 효과를 제한하였다. EPAP 테일링 반응 (S-ATP 스파이크인 포함)은 달리 상기 기재된 프로토콜과 일관적으로 설정되었다.

[0606] 변형된 올리고 3' 단부 라이게이션

[0607] T4 RNA 리가제 I (프로메가: M1051)을 사용하여 라이게이션 반응을 수행하였다. 반응을 하기와 같이 어셈블리하였다: 2 μg의 GFP mRNA; 200 pmol의 합성 올리고; 2 μl의 슈퍼라제-인 RNase 억제제; 20 μl의 50% PEG-8000; 5 μl의 100% DMSO; 5 μl의 10X T4 RNA 리가제 완충액; 5-7.5 μl의 T4 RNA 리가제 (프로메가); 및 50 μl의 총 반응 부피까지의 뉴클레아제-무함유 물. 반응물을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 1 μl의 500 mM EDTA, pH 8.0의 첨가를 통해 반응물을 불활성화시켰다. 1 부피의 뉴클레아제-무함유 물 (예를 들어, 50 μl)을 첨가한 후, 1 μl의 슈퍼라제-인을 함유하는 0.5 부피의 AMPure XP (벡크만 쿨터(Beckman Coulter): A63880) (예를 들어, 25 μl)를 첨가함으로써 반응물을 희석하였다. 반응물을 제조업체의 프로토콜에 따라 정제하였고, 슈퍼라제-인을 함유하는 뉴클레아제-무함유 물을 1:50 (v/v) 비율로 사용하여 AMPure 비드로부터 mRNA를 용리하였다. 겔 상에 잔류 올리고를 함유하는 것으로 보이는 mRNA 샘플을 AMPure XP 비드를 사용하여 두 번째로 정제하였다.

[0608] RNase H 겔-기반 검정에 따라 불완전한 라이게이션의 경우, 반응으로부터 DMSO를 생략한 변형된 조건을 사용하여 라이게이션을 수행하였다. 이는 일반적으로 더 효율적인 라이게이션을 초래하였다. 도 9 내지 11에 표시된 라이게이션-제조된 샘플의 경우, 일반적으로 더 효율적이기 때문에 변형된 프로토콜을 라이게이션에 사용하였다. 반딧불이 루시퍼라제 및 반딧불이-PEST mRNA 라이게이션의 경우, 1:1 비드 부피 대 mRNA 부피를 사용하여 2 x 연속 Ampure XP 비드 클린업을 사용하여 이들을 정제하였다. 예를 들어, 50 μl의 Ampure XP 비드를 사용하여 50 μl 라이게이션 반응을 클린업하였다. 생성물 mRNA의 용리 후, 용리된 mRNA 생성물과 동일한 부피의 비드를 사용하여 제2 클린업을 수행하였다.

[0609] RNase H 검정

[0610] 염화칼륨 (KCl) 스톡 용액을 RNase H 검정 전에 ssDNA 올리고를 mRNA에 어닐링하는데 사용하였다. 어닐링 스톡 용액은 50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 1:200 (v/v) 슈퍼라제-인 RNase 억제제를 함유하였고, 뉴클레아제-무함유 물을 사용하여 최종 부피에 도달하였다. ssDNA 프로브 (RNaseH_probe_GFP)를 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스 (IDT)로부터 주문하였다. 서열은 표 5에 나열되어 있다.

[0611] 표 5: 클로닝, RT-qPCR, RNase H 검정 및 STARmap 특징화에 사용된 올리고뉴클레오티드.

프라이머 명칭	서열 (5′에서 3′)
클로닝	
Esp3i_insert_F	AGAGACGTTCGCGGCCGCGGCGCC (SEQ ID NO: 36)
Esp3i_insert_R	TTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC (SEQ ID NO: 37)
60A_insert_F	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGACGTTCGCGGCCGCGGCGCC (SEQ ID NO: 38)
60A_insert_R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC (SEQ ID NO: 39)
RNase H 검정	
RNaseH_probe_GFP	GCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCAC (SEQ ID NO: 18)
RT-qPCR 정량화	
hMGFP_qPCR_F	TGACATTCTCACCACCGTGT (SEQ ID NO: 40)
hMGFP_qPCR_R	AGTCGTCCACACCCTTCATC (SEQ ID NO: 41)
mCherry_qPCR_F	TTCTTGGCCATGTAGGTGGTC (SEQ ID NO: 42)
mCherry_qPCR_R	AGGACGGCGAGTTCATCTAC (SEQ ID NO: 43)
hActb_qPCR_F	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC (SEQ ID NO: 44)
hActb_qPCR_R	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT (SEQ ID NO: 45)

[0612]

Origene_IFNB1_qPCR_F	CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC (SEQ ID NO: 46)
Origene_IFNB1_qPCR_R	TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA (SEQ ID NO: 47)
STARmap: SNAIL 프로브	
mCherry-01	/5Phos/ACATTATTGGTGCCGCGCAGCTTCACCTAATTATTACTGAGGCATACACTAAAGATA (SEQ ID NO: 19)
mCherry-02	/5Phos/ACATTACTTCTTGGCCTTGTAGGTGGTAATTATTACTGAGGCATACACTAAAGATA (SEQ ID NO: 20)
mCherry-03	/5Phos/ACATTACACGGTCACCACGCCGCCGTAATTATTACTGAGGCATACACTAAAGATA (SEQ ID NO: 21)
mCherry-11	ACGGGGCCGTCGGAGGGGAATAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 22)
mCherry-12	GGCGCCGGGCAGCTGCACGGTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 23)
mCherry-13	GTCCTGCAGGGAGGAGTCCTGGTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 24)
hMGFP-01	/5Phos/ACATTAAGTCGCAGCGGTAGTGGCCAATTATTACTGAAATCGTAGACTAAGATA (SEQ ID NO: 25)
hMGFP-02	/5Phos/ACATTACATTAGCAGGGAAGTTGACCCCGTAATTATTACTGAAATCGTAGACTAAGATA (SEQ ID NO: 26)
hMGFP-03	/5Phos/ACATTAGCTTCGGCGTGCTCGTACAGCTAATTATTACTGAAATCGTAGACTAAGATA (SEQ ID NO: 27)
hMGFP-11	CCTCCCTCCAAGAGCAGTGCCATTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 28)
hMGFP-12	TGCGCTGCATCACCGGGCTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 29)

[0613]

hMGFP-13	CCTGGCGGGGTAGTCCGCTGTGTAATGTTATCTT (SEQ ID NO: 30)
STARmap: 형광 검출 프로브	
mCherry_detect_Alexa647	/5Alexa647N/CATACACTAAAGATAACAT (SEQ ID NO: 31)
hMGFP_detect_Alexa546	/5Alex546N/TCGTAGACTAAGATAACAT (SEQ ID NO: 32)

[0614]

[0615] 상기 언급된 ssDNA 프로브에 mRNA를 어닐링하기 위해 하기 반응물을 제조하였다: 200 ng의 정제된 mRNA 샘플(라이게이션된 또는 비라이게이션된); 2 pmol의 RNaseH_probe_GFP; 2 μl의 어닐링 스톡 용액 (50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 1:200 슈퍼라제-인); 및 뉴클레아제-무함유 물 10 μl의 최대 총 부피. 반응물을 70℃에서 5분 동안 변성시킨 후, 벤치탑 써모사이클러에서 0.2℃/초의 속도로 실온으로 냉각하였다. 프로브 어닐링 후, 1 μl의 열안정성 RNase H (NEB: M0523S) 및 1 μl의 10X 완충액을 각 반응물에 첨가하고, 이를 50℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 반응물 인큐베이션 후, 1 μl의 프로테이나제 K (써모피셔 사이언티픽: 25530049)를 첨가함으로써 샘플을 소화시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 샘플을 50 mM의 최종 농도로 EDTA로 보충된 1 부피의 겔 로딩 완충액 II (써모피셔 사이언티픽: AM8546G)와 혼합하였다. 6% 노벡스™ TBE-우레아 겔에 로딩 및 분해 전에 1X 로딩 완충액 중 샘플을 70℃에서 3-5분 동안 변성시키고 (써모피셔 사이언티픽: EC68655BOX), 1x 트리스-보레이트-EDTA (TBE) 완충액에서 실행하였다. 겔에 사용된 래더는 센추리-플러스 RNA 마커 (써모피셔 사이언티픽: AM7145)였다. 모든 겔을 5-15분 동안 1x TBE 완충액 중 1x SYBR Gold (써모피셔 사이언티픽: S11494)로 염색한 후, BioRad ChemiDoc MP 이미지화 시스템 (12003154) 또는 MP 이미저 (Universal Hood III)를 사용하여 시각화하고, 상응하는 이미지 Lab 소프트웨어를 사용하여 이미지를 내보내었

다.

[0616] 포유동물 세포 배양 및 mRNA 형질감염

[0617] HeLa 세포 (CCL-2, ATCC)를 5% CO_2와 함께 37℃ 인큐베이터에서 10% FBS를 함유하는 DMEM 배양 배지 (써모피셔 11995)에서 유지하고, 3일마다 1:8의 비율로 계대배양하였다. 헥스트 염색 및 현미경검사 이미지화를 통해 정기적으로 세포 배양에 마이코플라스마 오염이 없음을 확인하였다.

[0618] mRNA 형질감염 전날, 세포를 12-웰 플레이트의 개별 웰에 75% 컨플루언스로 시딩하였다. 다음 날, 500 ng mCherry (내부 대조군) mRNA 및 합성 테일 또는 다른 변형을 갖는 500 ng GFP mRNA (큐비트에 의해 결정된 농도)를 3 μL 리포펙타민™ 메신저맥스™ 형질감염 시약 (써모피셔, LMRNA003)을 사용하여 각 웰에 형질감염시켰다. mCherry mRNA만을 함유하거나 형질감염 시약만을 함유하거나 형질감염되지 않은 세포를 함유하는 추가 대조군을 포함시켰다. 6시간 인큐베이션 후, 리포펙타민/mRNA 형질감염 혼합물을 제거하고, 세포를 DPBS로 1회 헹구고, 형질감염 후 24시간, 48시간 및 72시간에 형광 단백질 정량화를 위해 트립신화하여 각각 6:4:3의 비율로 3개의 유리-바닥 24-웰 플레이트 (MatTek, P24G-1.5-13-F, 폴리-D-리신 코팅됨)에 재시딩하였다.

[0619] 신선하게 해리된 래트 일차 피질 뉴런은 브로드 연구소(Broad Institute)의 셍 랩(Sheng Lab)에서 친절하게 제공되었다. 간략하게, CO_2-안락사된 임신한 스프라구 돌리 래트 (찰스 리버 래보러토리즈(Charles River Laboratories))로부터의 배아 18일차 (E18) 배아로부터 래트 피질 뉴런 배양물을 준비하였다. 배아 피질을 100 U/mL 페니실린/스트렙토마이신 (깁코(Gibco), 15140-122)이 보충된 빙냉 행크 균형 염 용액 (HBSS, 깁코, 14175-095)에서 절개하였다. 피질 조직을 4℃ PBS (시그마, D8537)로 3회 세척하고, 0.25% 트립신-EDTA (깁코, 25200-056)에서 20분 동안 37℃에서 소화시킨 후, 실온 PBS로 3회 다시 세척하였다. 피질 조직을 37℃ NBActiv4 배지 (브레인비츠(Brainbits), NB4-500)에서 부드럽게 해리시키고, 300xg에서 5분 동안 원심분리하였다. 펠릿을 신선한 NBActiv4에 재현탁하고, 70 μm 필터 (코닝(Corning), 352350)를 통해 통과시켰다.

[0620] 뉴런을 0.5 mL NbActiv4 배지에서 폴리-D-리신 코팅된 (시그마, A-003-E, 50 μg/mL, 적어도 1시간 동안 실온에서, 이어서 멸균 증류된 H_2O로 3회 헹구고 공기 건조됨) 24-웰 유리-바닥 플레이트 (MatTek, P24G-1.5-13-F)에서 $1\times10^5/cm^2$의 밀도로 시딩하였으며, 배지의 절반은 4일마다 교체하였다. 5DIV에서, 1.5 μL 리포펙타민™ 메신저맥스™ 형질감염 시약 (써모피셔, LMRNA003)과 혼합된 합성 테일 (큐비트에 의해 결정된 농도)을 갖는 250 ng mCherry (내부 대조군) mRNA 및 250 ng GFP mRNA로 24-웰 플레이트의 뉴런을 형질감염시켰다. 뉴런을 형질감염 혼합물과 함께 2시간 동안 인큐베이션한 후, 일반 배양 배지로 다시 교체하였다 (절반은 오래된 것, 절반은 신선한 것). 래트 뉴런 배양을 위한 절차는 광범위한 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Broad Institutional Animal Care and Use Committee)에서 사용하도록 검토 및 승인되었다. 동물과 관련된 모든 절차는 미국 국립 보건원의 실험실 동물 관리 및 사용 지침을 준수하였다.

[0621] 형광 단백질의 공초점 이미지화 및 정량화

[0622] 형광 단백질 이미지화 전에, 배양 배지를 제거하고, 세포를 DPBS로 1회 헹군 후, 핵 염색 배지 (헥스트 33342 [써모피셔, 62249]를 1:2000 희석한 플루오로브라이트™ DMEM [써모피셔, A1896701])에서 37℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0623] HeLa 세포의 경우, 핵 (헥스트), GFP 및 mCherry의 공초점 이미지를 900 nm × 900 nm의 픽셀 크기에서 10X 공기 대물렌즈를 사용하여 라이카 스텔라리스 8에 의해 촬영하였다. 각 웰에 대해 각 사분면으로부터 하나씩 4개의 대표적인 관측 시야를 확보하였다. 뉴런의 경우, 핵 (헥스트), GFP 및 mCherry의 공초점 이미지 스택을 450 nm*450 nm의 픽셀 크기 및 9 단계에 대해 1 μm의 단계 크기에서 25X 물 침지 대물렌즈를 사용하여 라이카 스텔라리스 8에 의해 촬영하였다. 각 웰에 대해 6개의 대표적인 관측 시야를 확보하였다 (도 11). 뉴런의 독성 측정을 위해, NucRed Dead 647 (인비트로젠(Invitrogen): R37113)을 이미지화 전에 플루오로브라이트 염색 배지에 첨가하고, 상응하는 채널을 사용하여 죽은 세포의 핵에 대한 이미지를 수득하였다. 비교할 모든 샘플에 대해 동일한 이미지화 설정을 사용하였다. 여기/검출 파장은 하기와 같다: 헥스트: 다이오드 405 nm/~[430-480]nm; GFP: WLL 489 nm/~[500-576]nm; mCherry: WLL 587 nm/~[602-676]nm. 셀프로파일러 4.0.744를 사용하여 헥스트의 객체 수 (예를 들어, 총 핵 수) 대 NucRed Dead 채널 (예를 들어, 죽은 핵)을 계산하여 각 관측 시야에서 죽은 뉴런의 분율을 산출하였다.

[0624] 배양된 뉴런의 벌크 분석을 위해 (도 8a), 먼저 각 이미지에서 mCherry 강도 및 GFP 강도를 측정하였다. "형질감염 단독" 샘플의 mCherry 채널 및 GFP 채널의 평균 형광 신호를 배경 신호로서 간주하였다. 각 도면에서 배

경 신호를 뺀다. 최종적으로, 각 이미지에서 GFP 강도와 mCherry 강도 사이의 비율을 계산하였다. 그리고, 그래프패드 프리즘 9에 의해 결정된 각 샘플 내의 가외치를 제거하였다. 모든 "비처리된 mRNA" 샘플에서 GFP 강도와 mCherry 강도 사이의 비율 평균을 계산하고 1로 정규화하였다.

[0625] 원시 이미지 스택의 최대 투영 이미지에 대한 분석을 수행하였다. 셀프로파일러 4.0.7을 단일-세포 단백질 정량화에 사용하였다 (도 13a). HeLa 세포의 단일-세포 분석을 위해, 먼저 훽스트-염색된 핵을 일차 객체로서 식별하였다. 그 후, 훽스트 채널, mCherry 채널 및 GFP 채널을 병합하고, 후속적으로 그레이 스케일 이미지로 변환하였다. 이러한 그레이 스케일 이미지에서 세포를 2차 객체로서 식별하였다. 세포 세그먼트화 후, 각 세포에서 mCherry 강도 및 GFP 강도를 측정하였다. 최종적으로, 각 세포에서 GFP 강도와 mCherry 강도 사이의 비율을 계산하였다. 배치 효과를 제거하기 위해, 상이한 배치의 모든 "모의 라이게이션" 샘플에서 GFP 강도와 mCherry 강도 사이의 평균 비율을 계산하고 1로 정규화하였다. 모든 "모의 라이게이션" 샘플에서 GFP 강도와 mCherry 강도 사이의 평균 비율은 동일하다고 가정하였다. 대조군 샘플 (형질감염 시약 단독 또는 형질감염되지 않은 세포)과 유사한 강도를 함유한 세포는 성공적으로 형질감염되지 않은 것으로 간주되어 이 분석에서 배제되었다.

[0626] 반딧불이 루시퍼라제 데그론 특징화

[0627] GFP mRNA 형질감염을 위해 상기 언급된 프로토콜을 사용하여 HeLa 세포를 반딧불이-60A 또는 반딧불이-데그론-60A mRNA로 형질감염시켰다. 루시퍼라제 붕괴 측정을 위해, 세포를 24시간 동안 성장시킨 후, 100 ug/mL 시클로헥시미드 (CHX)를 함유하는 배지로 옮겨 번역을 중단하였다. CHX 첨가 후 다양한 시점에서, 세포를 용해시키고, 프로메가 이중-Glo 루시퍼라제 검정 시스템 (프로메가: E2920)을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 루시퍼라제-데그론 mocRNA 시간 경과에 대해, 이전에 기재된 바와 같이 mocRNA를 생성하였다. 250 ng의 반딧불이-PEST mocRNA를 내부 대조군으로서 250 ng의 레닐라 루시퍼라제 mRNA (E-PAP-테일링된)와 함께 24 웰-플레이트에서 HeLa 세포에 공동-형질감염시켰다. 형질감염 후 6시간에, 명시된 바와 같이 다양한 시점에서 용해를 위해 세포를 4개의 별도의 불투명 백색 플레이트에 재시딩하였다.

[0628] 시험관내 번역 실험을 위해, 100 ng의 각 반딧불이-PEST mocRNA를 200 ng의 레닐라 mRNA (E-PAP-테일링된)와 혼합하여 내부 대조군 역할을 하였다. 이들을 65℃에서 5분 동안 변성시키고, 얼음 위에 배치하고, 50 μl 토끼 망상적혈구 용해물 반응 (프로메가: L4960)을 위한 주형 역할을 하기 위해 첨가하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 어셈블리하고 인큐베이션하였다. 1.5시간 인큐베이션 후, 2 μl의 각 반응물을 20 μl 1xPBS에 희석하고, 프로메가 이중-Glo 검정을 사용하여 측정하였다. 테스트된 각 조건에 대해 3개의 생물학적 복제 각각에 대해 3개의 기술적 복제를 취하였다.

[0629] RNA 단리 및 cDNA 제조

[0630] HeLa 세포를 12-웰 플라스틱 플레이트에 ~75% 컨플루언시로 시딩하고, 앞서 기재된 프로토콜을 사용하여 mRNA로 형질감염시켰다. 양성 대조군의 제조를 위해, 200 ng 폴리(I:C), 500 ng 폴리(I:C) (인비보젠(InvivoGen): tlrl-picw), 또는 500 ng 비변형된 GFP mRNA (N1-메틸슈도우리딘의 우리딘으로의 100% 대체를 함유하고, 100% rATP를 사용하여 테일링된 E-PAP 폴리(A)였음) 중 하나를 3 μl 리포펙타민 메신저맥스 (써모피셔 사이언티픽)를 사용하여 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 및 세포 재시딩 후, 세포를 형질감염 후 48시간에 수집하고, 배지를 제거하고, -80℃에서 RNA 저장을 위해 350 μl 트리졸을 각 웰에 피펫팅하였다. 60A 주형-코딩된 테일을 함유하지 않는 pCS2_hMGFP 주형으로부터 비변형된 GFP mRNA를 제조하였다. 비변형된 GFP mRNA는 N1-메틸슈도우리딘 대신 100% UTP를 함유하였고, E-PAP 테일링을 사용하여 폴리(A) 테일링되었다.

[0631] 다이렉트-졸 RNA 미니프렙 키트(Direct-zol RNA Miniprep Kit) (자이모 리서치: R2051)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 트리졸-저장된 샘플로부터 총 RNA를 추출하였다. 임의의 DNase 소화를 또한 제조업체의 프로토콜에 따라 수행하였다. 그 후, 단리된 RNA를 RNA 클린 & 컨선트레이터-5 (자이모 리서치: R1013)를 사용하여 농축하고, 1:100 슈퍼라제-인을 함유하는 뉴클레아제-무함유 물에서 용리하였다. 그 후, -80℃에서 저장 전에 나노드롭을 사용하여 RNA를 정량화하였다.

[0632] 슈퍼스크립트(SuperScript) IV 역전사효소 (써모피셔 사이언티픽: 18090200)를 사용하여 총 RNA의 역전사를 수행하였다. 500 ng의 총 RNA를 1 μl의 무작위 프라이머 믹스 (NEB: S1330S)와 혼합하여 총 부피를 13 μl로 만들었다. 이 혼합물을 65℃에서 5분 동안 가열한 후, 반응 어셈블리의 다음 단계 동안 즉시 얼음 위에 배치하였다. 그 후, 하기 시약 및 부피를 13 μl 어닐링된 혼합물에 첨가하였다: 4 μl의 5X SSIV 반응 완충액; 1 μl (0.5 mM 최종)의 10 mM dNTP 믹스 (써모피셔 사이언티픽: 18427013); 1 μl의 100 mM DTT; 0.5 μl의 슈퍼라제

RNase-In; 및 1 μl의 슈퍼스크립트 IV RT 효소 (200 U/μl).

[0633] 반응물을 혼합한 후, 23℃에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 50℃에서 10분 동안 인큐베이션하고, 80℃에서 10분 동안 인큐베이션에 의해 종결하였다. 선택된 cDNA 반응물의 일부를 저장하여 보정/희석 곡선에 대한 표준으로서 사용하였다. 그러나, 모든 샘플을 RT-qPCR에 의해 정량화하기 위해, 뉴클레아제-무함유 물을 첨가하여 이들 cDNA 반응으로부터 5x 희석액을 제조하고, 사용하기 전에 -80℃에서 저장하였다.

[0634] RT-qPCR

[0635] 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스 (써모피셔 사이언티픽: 4367659)를 사용하여 투명 라이트사이클러 (LightCycler) 384-웰 플레이트 (로슈(Roche): 04729749001)에서 RT-qPCR을 수행하였다. 각 반응물은 1 μl의 cDNA 주형 (이전에 5x 희석됨); 정방향 및 역방향 프라이머 각각 500 nM (최종 농도) (서열에 대해 표 5 참조); 및 10 μl의 2x 파워 SYBR 그린 마스터 믹스를 함유하였다. Bio-Rad CFX384 터치 실시간 PCR 검출 시스템에서 프로세싱 전에 반응 총 부피를 총 20 μl를 만들었다. hMGFP, mCherry 및 hActb에 사용된 사이클링 설정은 다음과 같았다: 10분 동안 95℃ (x1); 10초 동안 95℃, 30초 동안 60℃, [플레이트 판독값] (x40), 이어서 용융 곡선 분석 (65.0℃ 내지 95.0℃, 0.5℃ 증분 + [플레이트 판독값]). IFNB1 qPCR의 경우, 사용된 사이클링 설정은 다음과 같았다: 10분 동안 95℃ (x1); 10초 동안 95℃, 15초 동안 57℃, 30초 동안 60℃, [플레이트 판독값] (x40), 이어서 용융 곡선 분석 (65.0℃ 내지 95.0℃, 0.5℃ 증분 + [플레이트 판독값]).

[0636] 표준 곡선이 필요한 상대적 정량화 방법을 사용하여 상대적 mRNA 양을 계산하였다. "양성 대조군" 샘플을 표준으로서 선택하고, 2배 희석 시리즈를 수행하여 표준 곡선을 생성하였으며, 이로부터 각 측정된 유전자에 대한 반응 효율 (E)을 계산하였다 (로그-로그 척도의 선형 피팅 사용). GFP & mCherry 정량화를 위해, 비라이게이션된 GFP-60 mRNA + mCherry 형질감염의 생물학적 복제 중 하나에 상응하는 cDNA 스톡 용액을 표준으로서 선택하였다. IFNB1 정량화를 위해, 500 ng 폴리(I:C) 형질감염 조건에 대한 생물학적 복제 중 하나를 표준으로서 사용하였다. hActb 정량화를 위해, "형질감염 조건 단독" 샘플 중 하나로부터의 cDNA를 표준으로서 사용하였다. 알려지지 않은 샘플의 모든 cDNA 측정이 표준 곡선에 의해 결정된 선형성 범위 내에 있도록 보장하기 위해, RT-qPCR에 의해 측정하기 전에 (이전에 언급된 바와 같이) 모든 cDNA 스톡을 5x 희석하였다.

[0637] 표준 곡선의 선형 피팅 (각 희석에 대한 3x 기술적 복제)에 따라, PCR 반응 효율을 계산하였다 (GFP: 2.05; mCherry: 2.24; IFNB1: 2.11; hActb: 2.09). 테스트할 각 cDNA 샘플에 대해 3개의 기술적 복제를 수행하였으며, 기술적 복제 Cq 값을 평균하여 각 생물학적 복제에 상응하는 값을 수득하였다. 특정 샘플 (예를 들어, "모의 라이게이션")에 대한 정규화를 수행하기 위해, 정규화 표준에 대한 생물학적 복제의 Cq 값을 평균하여 "표준 Cq"를 제공하였다. 그 후, 각 테스트 샘플의 Cq 값을 이 "표준 Cq"에서 빼서 dCq 값을 제공하였다. 반응 효율 (E)은 이들 dCq 값의 거듭제곱으로 상승되어, 각 생물학적 테스트 샘플에 대해 개별적인 "배수 변화"를 제공하였다. mCherry & hActb 둘 다에 의해 GFP를 정규화하기 위해, 이전에 계산된 mCherry & hActb "배수 변화"의 기하 평균을 취하였다. 그 후, GFP "배수 변화"를 이들 정규화 인자로 나누어, GFP의 정량화에 사용된 최종 값을 생성하였다 (도 8c, 표 7). IFNB1의 정규화를 위해, 각 샘플에 대한 hActb 값을 직접 사용하였다 (기하 평균 계산 없이) (표 7). 각 그래프에 표시된 데이터 포인트는 모든 생물학적 복제에 대해 수행된 3개의 기술적 복제의 평균에 상응한다. 특정 조건에 대한 음성 대조군 (예를 들어, N.T.C. 및 형질감염 단독)은 Cq 값을 생성하지 않는 경우 계산에서 생략되었다.

[0638] STARmap를 사용하여 형질감염된 세포 배양에서 mRNA 정량화

[0639] 개별 mRNA 분자를 바코드 DNA 콜로니로서 판독하는 이미지화-기반 방법인 STARmap[28]를 사용하여 형질감염된 세포에서 mCherry 및 GFP mRNA 양을 측정하였다. 간행된 바와 같이 세포 배양을 위한 STARmap 절차를 따랐다[28]. 간략하게, 형광 단백질 이미지화 후, 세포를 실온에서 10분 동안 1.6%PFA PFA (일렉트론 마이크로스코프 사이언시스(Electron Microscope Sciences), 15710-S) / 1XPBS (깁코, 10010-023)로 고정한 후, 다음 단계 전에 -20℃ (최대 1주)에서 미리 냉각된 메탄올을 사용하여 추가 고정 및 투과화를 수행하였다. 후속적으로, 메탄올을 제거하고, 세포를 실온에서 15분 동안 PBSTR/글리신/YtRNA (0.1% 트윈-20 [TEKNOVA INC, 100216-360], 0.5% 슈퍼라제-인 [인비트로젠™, AM2696], 100 mM 글리신, 1% 효모 tRNA를 함유하는 PBS)로 재수화시킨 후, PBSTR로 1회 세척하였다. 그 후, 샘플을 혼성화 완충액 (2XSSC [시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), S6639], 10% 포름아미드 [칼바이오켐(Calbiochem), 655206], 1% 트윈-20, 20 mM RVC [리보뉴클레오시드 바나딜 복합체, 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), S1402S], 0.5% 슈퍼라제-인, 1% 효모 tRNA, 100 nM 각 프로브)에서 40℃에서 밤새 mCherry 및 GFP mRNA 서열을 표적화하는 SNAIL 프로브와 혼성화하였다 ("SNAIL 프로브" 서열에 대한

표 5 참조). 그 후, 세포를 37℃에서 PBSTR로 2회 (각 세척당 20분) 세척하고, 37℃에서 고염 세척 완충액 (4XSSC가 포함된 PBSTR)으로 1회 세척한 후, 실온에서 PBSTR로 1회 헹궜다. 프라이머에 인접한 자물쇠 프로브를 원형화하기 위해 실온에서 2시간 동안 라이게이션 반응을 수행하였다. PBSTR로 2회 세척한 후, 아미노-dUTP (인비트로젠™, AM8439)가 스파이크인된 상태에서 30℃에서 2시간 동안 Phi29 (써모피셔, EP0094)를 사용하여 프라이머로부터 롤링 서클 증폭을 개시하였다. PBSTR로 2회 더 세척한 후, DNA 앰플리콘을 실온에서 2시간 동안 PBST 완충액에서 20 mM MA-NHS (시그마-알드리치, 730300-1G)에 의해 중합가능하도록 변형하였다. 그 후, 샘플을 히드로겔-세포 하이브리드로 전환시킨 후, 실온에서 밤새 형광 단백질의 프로테이나제 K (인비트로젠™, 25530049) 클리어링을 수행하였다. 샘플을 PBST로 3회 세척한 후, 세척 및 이미지화 완충액 (2XSSC, 10% 포름아미드)에서 형광 검출 올리고로 37℃에서 1시간 동안 염색하였다 ("형광 검출 프로브" 서열에 대한 표 5 참조). 최종적으로, 샘플을 실온에서 세척 및 이미지화 완충액으로 3회 세척하고, DAPI로 염색한 후, 세척 및 이미지화 완충액에서 이미지화를 수행하였다. 공초점 이미지화 스택을 283 nm*283 nm의 픽셀 크기에서 40X 오일 대물렌즈를 사용하여 라이카 스텔라리스 8 또는 SP8로 촬영하였다. 14-μm 스택을 1 μm/단계 * 15 단계로 이미지화하였다. 각 웰에 대해 각 사분면으로부터 하나씩 4개의 대표적인 관측 시야를 확보하였다. 비교할 모든 샘플에 대해 동일한 이미지화 설정을 사용하였다. 여기/검출 파장은 하기와 같다: DAPI: 다이오드 405 nm/~[420-489]nm; Alexa546: WLL 557 nm/~[569-612]nm; Alexa647: WLL 653 nm/~[668-738]nm.

[0640] 앰플리콘 카운트-기반 STARmap 형광 이미지 분석을 위해 MATLAB 2021a 및 셀프로파일러 4.0.7을 사용하였다 (도 8c). 먼저, 이미지에서 연장된 최대값을 찾아 각 형광 채널 (GFP, mCherry)의 앰플리콘 중심을 식별하였다. 그 후, 각 형광 도트의 중심을 중심으로 하는 3*3*3 복셀 부피를 정의하였다. 각 복셀 부피 내에서, mCherry 및 GFP 채널의 통합된 강도를 계산하고, mCherry 강도와 GFP 강도 간의 비율을 앰플리콘 분류에 사용하였다. 배치의 모든 이미지에 대해 이들 측정을 수행한 후, 모든 측정을 함께 풀링하고, log(mCherry/GFP) 값의 분포를 플롯하였다. 분포 플롯 상의 최저점 (국소 최소값)에 상응하는 비율 값을 컷오프 값으로서 식별하였다. 0보다 작은 제1 컷오프 값은 컷오프1로 기록되었으며, 0보다 큰 제1 컷오프 값은 컷오프2로 기록되었다. 컷오프1보다 더 작은 log(mCherry/GFP) 값을 갖는 임의의 앰플리콘을 GFP 앰플리콘으로서 식별하였다. 컷오프2보다 더 큰 log(mCherry/GFP) 값을 갖는 임의의 앰플리콘을 mCherry 앰플리콘으로서 식별하였다. 컷오프1과 컷오프2 사이의 log(mCherry/GFP) 값을 갖는 임의의 앰플리콘을 과립으로서 식별하였다. 앰플리콘 분류 정보, 뿐만 아니라 모든 앰플리콘의 위치를 파일에 저장하였다. 벌크 STARmap 정량화에서, 각 도면에서, GFP 앰플리콘의 수와 mCherry 앰플리콘의 수 간의 비율을 계산하고 GFP mRNA의 양을 반영하는데 사용하였다. 단일-세포 STARmap 정량화에서, 단일-세포 단백질 정량화에서의 세포 세그먼트화와 동일한 방법을 사용하여 세포 세그먼트화를 수행하였고, 세그먼트화 마스크를 uint16 이미지로서 저장하였다. 앰플리콘은 마스크의 위치에 따라 세포에 할당되었다. 각 세포의 GFP 앰플리콘의 수와 mCherry 앰플리콘의 수 간의 비율을 계산하고, 단일 세포의 GFP mRNA의 양을 반영하는데 사용하였다. GFP 앰플리콘이 없거나 mCherry 앰플리콘이 없는 세포는 성공적으로 형질감염되지 않은 것으로 간주되어 이들 분석에서 배제되었다.

참고문헌

1. Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J.L., Pérez, M.G., Moreira, E.D., Zerbini, C., et al. (2020) Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. N. Engl. J. Med. 383, 2603–2615.

2. Lombardi, A., Bozzi, G., Ungaro, R., Villa, S., Castelli, V., Mangioni, D., Muscatello, A., Gori, A., and Bandera, A. (2021) Mini Review Immunological Consequences of Immunization With COVID-19 mRNA Vaccines: Preliminary Results. Front. Immunol. 12, 657711.

3. Sahin, U., Karikó, K., and Türeci, Ö. (2014) mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. Nat. Rev. Drug Discov. 13, 759–780.

4. Dammes, N., and Peer, D. Paving the Road for RNA Therapeutics. (2020) Trends Pharmacol. Sci. 41, 755–775.

5. Weng, Y., Li, C., Yang, T., Hu, B., Zhang, M., Guo, S., Xiao, H., Liang, X.J. and Huang, Y. (2020) The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. Biotechnol. Adv. 40, 107534.

6. Petsch, B., Schnee, M., Vogel, A.B., Lange, E., Hoffmann, B., Voss, D., Schlake, T., Thess, A., Kallen, K.J., Stitz, L., et al. (2012) Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. Nat. Biotechnol. 30, 1210–1216.

7. Richner, J.M., Jagger, B.W., Shan, C., Fontes, C.R., Dowd, K.A., Cao, B., Himansu, S., Caine, E.A., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., et al. (2017) Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. Cell 170, 273–283.e12.

8. Tai, W., Zhang, X., Drelich, A., Shi, J., Hsu, J.C., Luchsinger, L., Hillyer, C.D., Tseng, C.T.K., Jiang, S. and Du, L. (2020) A novel receptor-binding domain (RBD)-based mRNA vaccine against SARS-CoV-2. Cell Res. 30, 932–935.

9. Chen, C., Ezzeddine, N., and Shyu, A. (2008) Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. Methods Enzymol. 448, 335–357.

10. Karikó, K., Muramatsu, H., Welsh, F.A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S. and Weissman, D. (2008) Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. Mol. Ther. 16, 1833–1840.

[0641]

11. Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., and Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. (2005) Immunity 23, 165–175.

12. Andries, O., McCafferty, S., De Smedt, S.C., Weiss, R., Sanders, N.N. and Kitada, T. (2015) N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. J. Control. Release 217, 337–344.

13. Kormann, M.S., Hasenpusch, G., Aneja, M.K., Nica, G., Flemmer, A.W., Herber-Jonat, S., Huppmann, M., Mays, L.E., Illenyi, M., Schams, A., et al. (2011) Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. Nature Biotechnology 29, 154-157.

14. Li, B., Luo, X., and Dong, Y. (2016) Effects of Chemically Modified Messenger RNA on Protein Expression. Bioconjug. Chem. 27, 849–853.

15. Aurup, H., Siebert, A., Benseler, F., Williams, D., and Eckstein, F. (1994) Translation of 2'-modified mRNA in vitro and in vivo. Nucleic Acids Res. 22, 4963–4968.

16. Choi, J., Indrisiunaite, G., DeMirci, H., Ieong, K.W., Wang, J., Petrov, A., Prabhakar, A., Rechavi, G., Dominissini, D., He, C., et al. (2018) 2'-O-methylation in mRNA disrupts tRNA decoding during translation elongation. Nat. Struct. Mol. Biol. 25, 208–216.

17. Anhäuser, L., Hüwel, S., Zobel, T., and Rentmeister, A. (2019) Multiple covalent fluorescence labeling of eukaryotic mRNA at the poly(A) tail enhances translation and can be performed in living cells. Nucleic Acids Res. 47, e42.

18. Strzelecka, D., Smietanski, M., Sikorski, P.J., Warminski, M., Kowalska, J. and Jemielity, J. (2020) Phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression. RNA 26, 1815–1837.

19. Łabno, A., Tomecki, R., and Dziembowski, A. (2016) Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. Biochim. Biophys. Acta 1863, 3125–3147.

20. Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2007) The highways and byways of mRNA decay. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 113-126.

21. Eckstein, F. (2014) Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. Nucleic Acid Ther. 24, 374–387.

22. Stowell, J.A., Webster, M.W., Kögel, A., Wolf, J., Shelley, K.L., and Passmore, L.A.

[0642]

(2016) Reconstitution of Targeted Deadenylation by the Ccr4-Not Complex and the YTH Domain Protein Mmi1. Cell Rep. 17, 1978–1989.

23. Yang, Y, Lindahl, T., and Barnes, D. (2007) Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. Cell 131, 873–886.

24. Takahashi, A., Loo, T.M., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Miyata, K., Barber, G.N., et al. (2018) Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. Nat. Commun. 9, 1249.

25. Chen, J., Chiang, Y., and Denis, C. (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. EMBO J. 21, 1414–1426.

26. Cerritelli, S. and Crouch, R. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. (2009) FEBS J. 276, 1494–1505.

27. Leonhardt, C., Schwake, G., Stögbauer, T.R., Rappl, S., Kuhr, J.T., Ligon, T.S., and Rädler, J.O. (2014) Single-cell mRNA transfection studies: delivery, kinetics and statistics by numbers. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 10, 679-688.

28. Wang, X., Allen, W., Wright, M., Sylwestrak, E., Samusik, N., Vesuna, S., Evans, K., Liu, C., Ramakrishnan, C., Liu, J., et al. (2018) Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. Science 361, eaat5691.

29. Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C., and Kain, S.R. (1998) Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. Journal of Biological Chemistry 273.52, 34970-34975.

30. Lin, C.Y., Perche, F., Ikegami, M., Uchida, S., Kataoka, K., and Itaka, K. (2016) Messenger RNA-based therapeutics for brain diseases: An animal study for augmenting clearance of beta-amyloid by intracerebral administration of neprilysin mRNA loaded in polyplex nanomicelles. Journal of Controlled Release 235, 268-275.

31. Williams, D.J., Puhl, H.L., and Ikeda, S.R. (2010) A simple, highly efficient method for heterologous expression in mammalian primary neurons using cationic lipid-mediated mRNA transfection. Frontiers in Neuroscience 4, 181.

32. Ingusci, S., Verlengia, G., Soukupova, M., Zucchini, S., and Simonato, M. (2019) Gene therapy tools for brain diseases. Frontiers in Pharmacology 10, 724.

[0643]

33. Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2005) Regulation of the type I IFN induction: a current view. International Immunology 17, 1367-1378.

34. Wienert, B., Shin, J., Zelin, E., Pestal, K., and Corn, J.E. (2018) In vitro–transcribed guide RNAs trigger an innate immune response via the RIG-I pathway. PLoS biology 16, e2005840.

35. Linehan, M.M., Dickey, T.H., Molinari, E.S., Fitzgerald, M.E., Potapova, O., Iwasaki, A., and Pyle, A.M. (2018) A minimal RNA ligand for potent RIG-I activation in living mice. Science Advances 4, e1701854.

36. Hausmann, S., Marq, J.B., Tapparel, C., Kolakofsky, D., and Garcin, D. (2008) RIG-I and dsRNA-induced IFNβ activation. PLoS One 3, e3965.

37. Cao Z., Huang, C.C., and Tan, W. (2006) Nuclease resistance of telomere-like oligonucleotides monitored in live cells by fluorescence anisotropy imaging. Analytical Chemistry 78, 1478-1484.

38. Barragán-Iglesias, P., Lou, T.F., Bhat, V.D., Megat, S., Burton, M.D., Price, T.J., and Campbell, Z.T. (2018) Inhibition of Poly (A)-binding protein with a synthetic RNA mimic reduces pain sensitization in mice. Nature Communications 9, 1-17.

39. Rydzik, A.M., Warminski, M., Sikorski, P.J., Baranowski, M.R., Walczak, S., Kowalska, J., Zuberek, J., Lukaszewicz, M., Nowak, E., Claridge, T.D., et al. (2017) mRNA cap analogues substituted in the tetraphosphate chain with CX2: identification of O-to-CCl2 as the first bridging modification that confers resistance to decapping without impairing translation. Nucleic Acids Res. 45, 8661–8675.

40. Strenkowska, M., Kowalska, J., Lukaszewicz, M., Zuberek, J., Su, W., Rhoads, R.E., Darzynkiewicz, E., and Jemielity, J. (2010) Towards mRNA with superior translational activity: synthesis and properties of ARCA tetraphosphates with single phosphorothioate modifications. New J. Chem. 34, 993–1007.

41. Kawaguchi, D., Kodama, A., Abe, N., Takebuchi, K., Hashiya, F., Tomoike, F., Nakamoto, K., Kimura, Y, Shimizu, Y., and Abe, H. (2020) Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates the Rate of Translation Initiation to Provide More Efficient Protein Synthesis. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 59, 17403–17407.

42. Boo, S. and Kim, Y. (2020) The emerging role of RNA modifications in the regulation of mRNA stability. Experimental & molecular medicine 52, 400-408.

[0644]

43. Zhao, B.S., Wang, X., Beadell, A.V., Lu, Z., Shi, H., Kuuspalu, A., Ho, R.K., and He, C. (2017) m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. Nature 542, 475-478.

44. Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., Moffat, J., et al. (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. Genome biology 7, 1-11.

[0645]

[0646] 실시예 6: 화학적으로 변형된 mocRNA는 생체내에서 효율적인 단백질 발현을 제공한다.

[0647] 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드에 라이게이션된 치료용 mRNA인 메신저-올리고뉴클레오티드 접합된 RNA (mocRNA)가 기재되어 있다. 치료용 mRNA는 (5'에서 3'로) 하기를 함유한다: (1) mRNA 캡 유사체 (NEB: S1411); (2) 5' 비번역 영역 (UTR); (3) 단백질-코딩 영역 (루시퍼라제 리포터); (4) 3' UTR; 및 (5) 폴리(A) 테일 (20 내지 200 nt). mRNA는 발현을 증가시키기 위해 우리딘의 N1-메틸슈도우리딘 (트리링크 바이오테크놀로지스: N1081)으로의 100% 치환을 함유한다.

[0648] 화학적으로-합성된 올리고뉴클레오티드 (표 9)를 치료용 mRNA의 3' 단부에 라이게이션함으로써 mocRNA를 합성한다. 뉴클레아제-저항성 그룹을 함유하는 올리고뉴클레오티드는 탈아데닐화로부터 폴리(A) 테일을 보호하고, HeLa 세포 배양에서 더 긴 시점에서 발현을 증가시킨다 (도 17). 또한, 마우스에의 mocRNA 주사는 비처리된 mRNA와 비교하여 루시퍼라제 리포터의 발현을 증가시킨다 (도 18a-18c).

[0649] 이들 올리고뉴클레오티드는 세포에서 이러한 RNA의 안정성을 증진시키기 위해 비-단백질 코딩 RNA의 3' 단부에

유사하게 라이게이션될 수 있다.

[0650] 표 4: mocRNA 합성에 사용된 올리고뉴클레오티드의 추가 서열.

변형된 올리고뉴클레오티드 서열 명칭	서열 (IDT 포맷)
29rA_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArA/3ddC/ (SEQ ID NO: 6)
6xSr(AG)_invdT	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA* rA*rA*rG* rG*rG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 14)
6xSr(AG)_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA* rA*rA*rG* rG*rG*/3ddC/ (SEQ ID NO: 48)
26rA_G4_telo_DNA_6xSrG	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArAT AGG GTT AGG GTT AGG GT*T* A*G*G* G*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 35)
6xAG_LNA_invdT	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArA+A +A+A+G +G+G/3InvdT/ (SEQ ID NO: 49)
6xLNA_AG_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArA+A +A+A+G +G+G/3ddC/ (SEQ ID NO: 50)
6xAG_2OMe_PS_invdT	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArAmA mAmAmA mAmAmA* mA*mA*mG* mG*mG*/3InvdT/ (SEQ ID NO: 51)
6x2MOE_PS_AG_ddC	/5Phos/rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArA/i2MOErA/* /i2MOErA/*/i2MOErA/*/i2MOErG/* /i2MOErG/*/i2MOErG/*/3ddC/ (SEQ ID NO: 52)

[0651]

[0652] RNA 염기: rN ; RNA 포스포로티오에이트 염기: rN* ; DNA 포스포로티오에이트 염기: N* ; 2'-O-메틸 포스포로티오에이트 염기: mN*; 잠금 핵산 [LNA] 염기: +N; 내부 2'-O-메톡시-에틸 RNA 염기: /i2MOErN/ ; 5' 포스페이트 변형: /5Phos/ ; 2'-3'-디데옥시시티딘 [ddC] 변형: /3ddC/ ; 역전된-2'-데옥시티미딘 [InvdT] 변형: /3InvdT/.

[0653] 등가물 및 범주

[0654] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 일상적인 실험만을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범주는 상기 설명에 제한되는 것이 아니라 첨부된 청구범위에 기재된 바와 같다.

[0655] 청구범위에서, 단수형은 달리 명시되지 않거나 문맥상 달리 명백하지 않는 한 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"이 포함된 청구항 또는 설명은 달리 명시되지 않거나 문맥에서 달리 명백하지 않는 한 그룹 구성원 중 하나, 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 프로세스에 존재하거나, 사용되거나, 달리 관련되는 경우 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 그룹의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 프로세스에 존재하거나, 사용되거나, 달리 관련되는 실시양태를 포함한다. 본 발명은 또한 그룹 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 프로세스에 존재하거나, 사용되거나, 달리 관련되는 실시양태를 포함한다.

[0656] 또한, 본 발명은 청구항 중 하나 이상 또는 설명의 관련 부분으로부터 하나 이상의 제한, 요소, 조항, 설명 용어 등이 또 다른 청구항에 도입된 모든 변경, 조합 및 순열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속된 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속된 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 또한, 청구항이 조성물을 인용하는 경우, 달리 명시되지 않는 한, 또는 모순 또는 불일치가 발생할 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백하지 않는 한, 본원에 개시된 임의의 목적을 위해 조성물을 사용하는 방법이 포함되고, 본원에 개시된 임의의 제조 방법 또는 관련 기

술분야에 공지된 다른 방법에 따라 조성물을 제조하는 방법이 포함된다는 것이 이해되어야 한다.

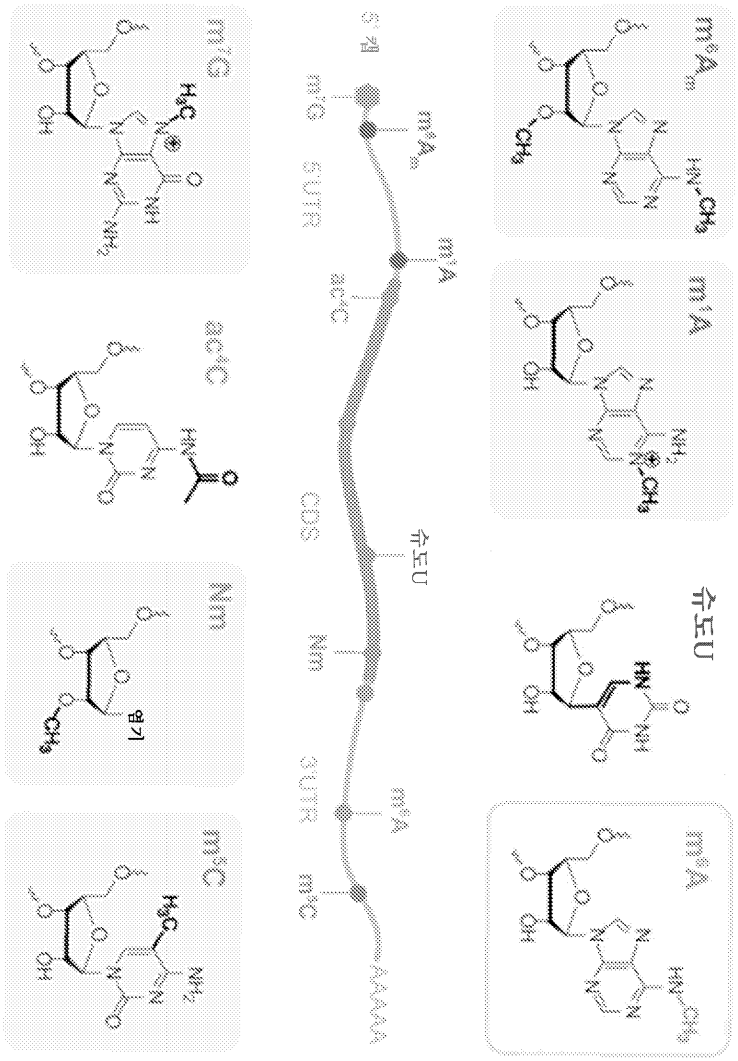
[0657] 요소가 예를 들어 마쿠쉬(Markush) 그룹 포맷으로 목록으로 제시되는 경우, 요소의 각 서브그룹이 또한 개시되고 임의의 요소(들)가 그룹으로부터 제거될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 용어 "포함하는"는 개방형으로 의도되며, 추가적인 요소 또는 단계의 포함을 허용한다는 점에 유의해야 한다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정 요소, 특색, 단계 등을 포함하는 것으로 언급되는 경우, 본 발명의 특정 실시양태 또는 본 발명의 측면은 이러한 요소, 특색, 단계 등으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진다는 것이 이해되어야 한다. 단순화를 위해, 이러한 실시양태는 본원의 내용에 구체적으로 설명되지 않았다. 그러므로 하나 이상의 요소, 특색, 단계 등을 포함하는 본 발명의 각 실시양태에 대해, 본 발명은 또한 이러한 요소, 특색, 단계 등으로 이루어지거나 본질적으로 이루어지는 실시양태를 제공한다.

[0658] 범위가 주어지는 경우, 종료점이 포함된다. 또한, 달리 명시되지 않거나 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해 및/또는 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 본 발명의 상이한 실시양태에서 언급된 범위 내에서 범위의 하한 단위의 10분의 1까지 임의의 특정 값을 가정할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 달리 명시되지 않거나 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해 및/또는 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 주어진 범위 내의 임의의 하위 범위를 가정할 수 있으며, 여기서 하위 범위의 종료점은 범위의 하한 단위의 10분의 1과 동일한 정확도로 표현된다는 것이 이해되어야 한다.

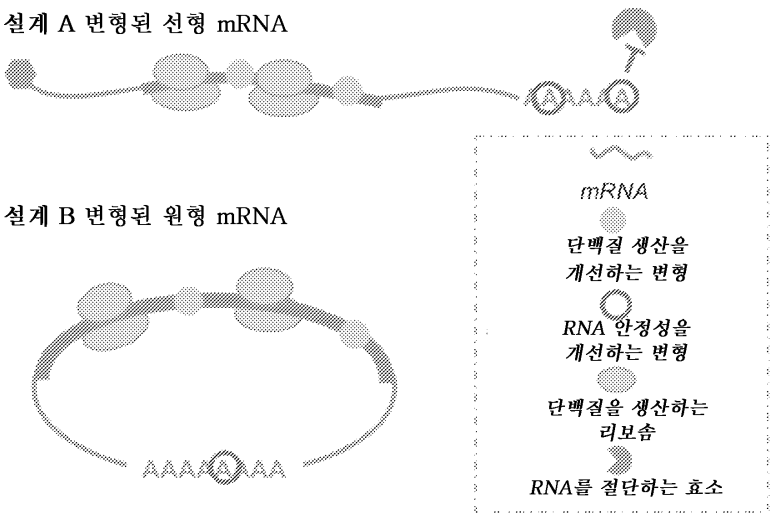
[0659] 또한, 본 발명의 임의의 특정 실시양태는 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 명시적으로 배제될 수 있음이 이해되어야 한다. 범위가 주어지는 경우, 범위 내의 임의의 값은 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 명시적으로 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물 및/또는 방법의 임의의 실시양태, 요소, 특색, 적용 또는 측면은 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 배제될 수 있다. 간결함을 위해, 하나 이상의 요소, 특색, 목적 또는 측면이 배제된 모든 실시양태는 본원에서 명시적으로 설명되지 않는다.

도면

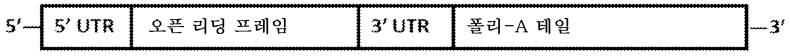
도면1


5' 캡
m⁷G
5'UTR
m⁶A
ac⁴C
CDS
슈도U
Nm
3'UTR
m⁶A
m⁵C
AAAAA
m⁶A
m¹A
슈도U
m⁶A
Nm
m⁵C
ac⁴C

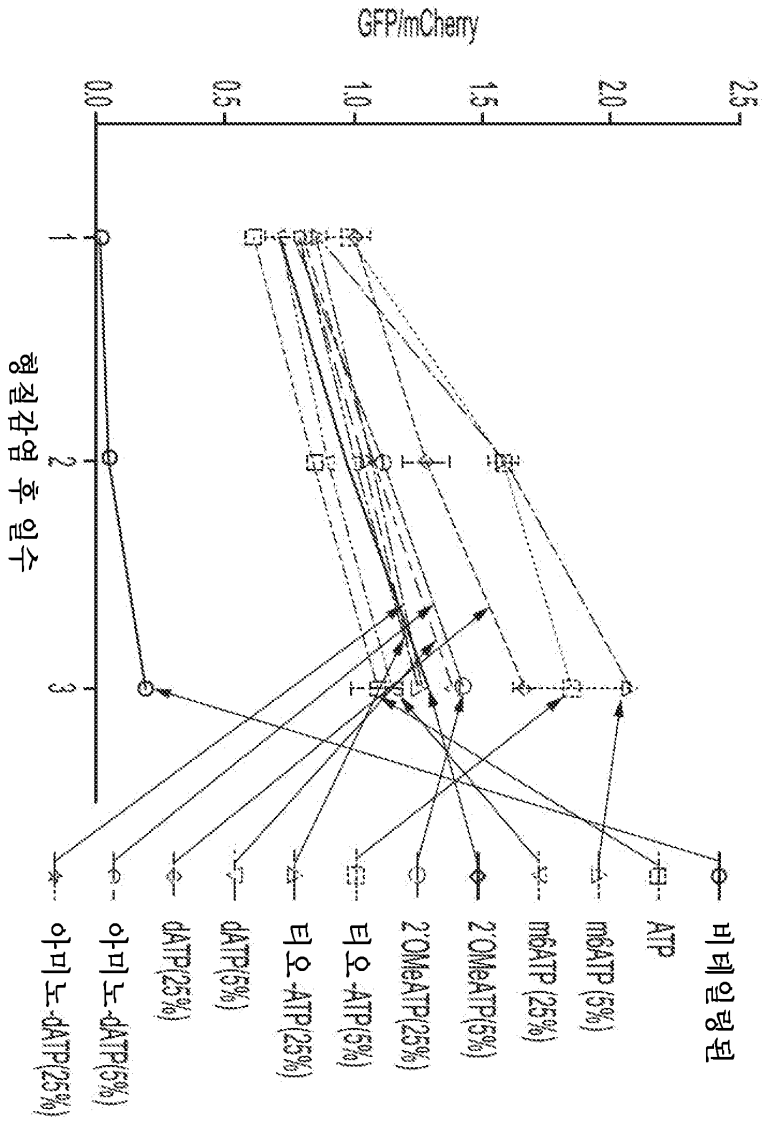
도면2a


설계 A 변형된 선형 mRNA
설계 B 변형된 원형 mRNA
AAAAAAA
mRNA
단백질 생산을 개선하는 변형
RNA 안정성을 개선하는 변형
단백질을 생산하는 리보솜
RNA를 절단하는 효소

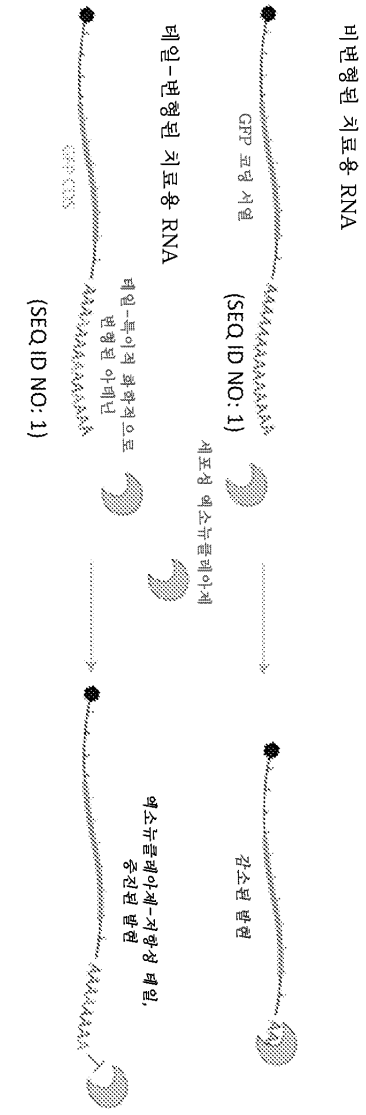
도면2b


5'
5' UTR
오픈 리딩 프레임
3' UTR
폴리-A 테일
3'

도면3


GFP/mCherry
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
형질감염 후 일수
1
2
3
아미노-dATP(25%)
아미노-dATP(5%)
dATP(25%)
dATP(5%)
티오-ATP(25%)
티오-ATP(5%)
2'OMeATP(25%)
2'OMeATP(5%)
m6ATP (25%)
m6ATP (5%)
ATP
비히클 대조

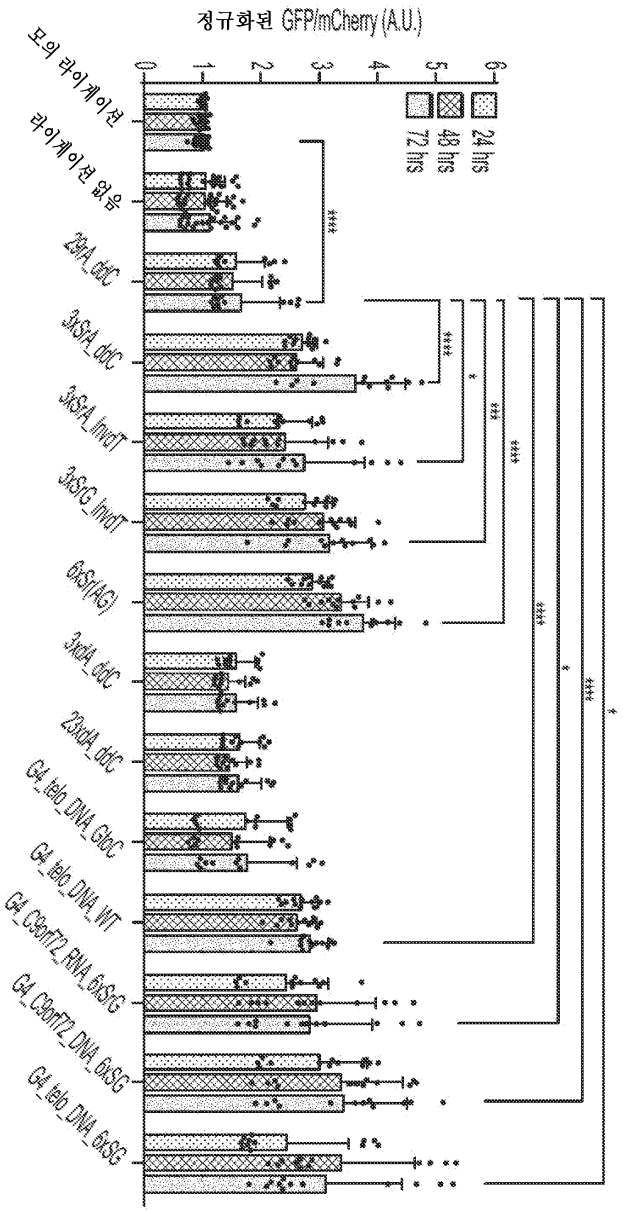
도면4a


비변형된 치료용 RNA
GFP 코딩 서열
(SEQ ID NO: 1)
세포성 엑소뉴클레아제
테일-변형된 치료용 RNA
테일-특이적 화학적으로 변형된 아데닌
GFP CDS
(SEQ ID NO: 1)
간수된 테일
엑소뉴클레아제-저항성 테일, 온전한 테일

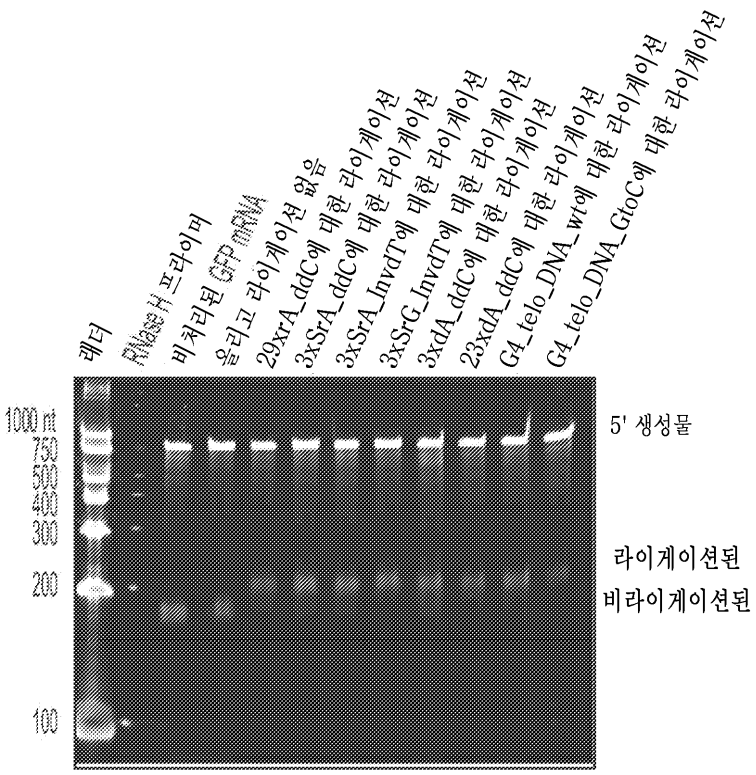
도면4b

테일 변형을 위한 전략
GFP 코딩 서열
효소적
라이게이션
3세 종결 뉴클레오티드
변형된 뉴클레오티드간 연결
펜토스 당 변형
2차 또는 3차 구조 효과
티오-포스페이트 연결
염기
염기

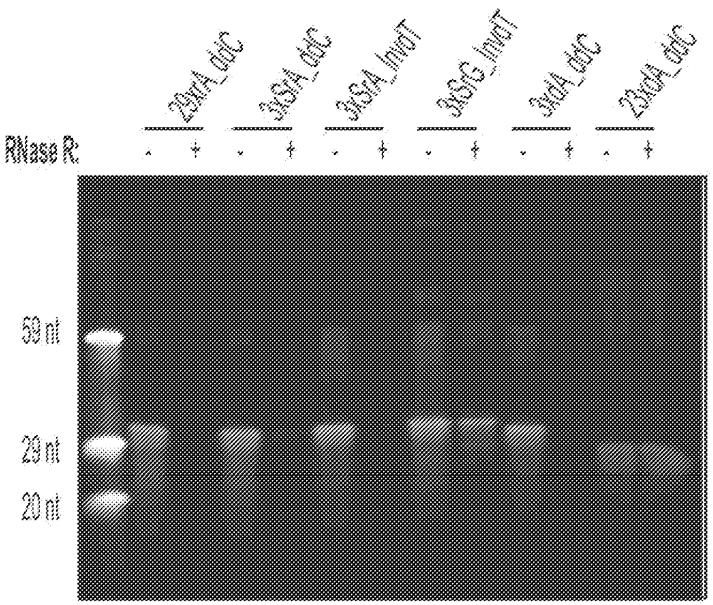
도면5


정규화된 GFP/mCherry (A.U.)
0
1
2
3
4
5
6
72 hrs
48 hrs
24 hrs
모의 라이게이션
라이게이션 없음
23nt_ddC
3xSrA_ddC
3xSrA_InvdT
3xSrG_InvdT
6xSr(AC)
3xCrA_ddC
23xCrA_ddC
G4_telo_DNA_GddC
G4_telo_DNA_WT
G4_C9orf72_RNA_6xSrG
G4_C9orf72_DNA_6xSG
G4_telo_DNA_6xSG

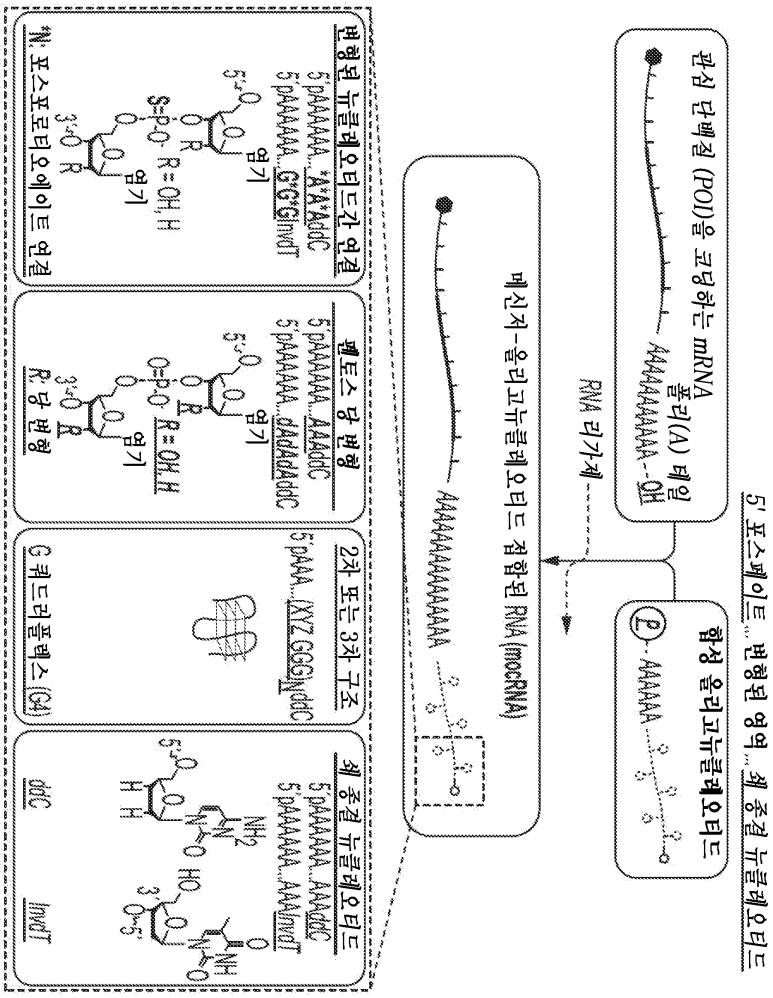
도면6a


래더
RNase H 프라이머
비처리된 GFP mRNA
올리고 라이게이션 없음
29xrA_ddC에 대한 라이게이션
3xSrA_ddC에 대한 라이게이션
3xSrA_InvdT에 대한 라이게이션
3xSrG_InvdT에 대한 라이게이션
3xdA_ddC에 대한 라이게이션
23xdA_ddC에 대한 라이게이션
G4_telo_DNA_wt에 대한 라이게이션
G4_telo_DNA_GtoC에 대한 라이게이션
1000 nt
750
500
400
300
200
100
5' 생성물
라이게이션된
비라이게이션된

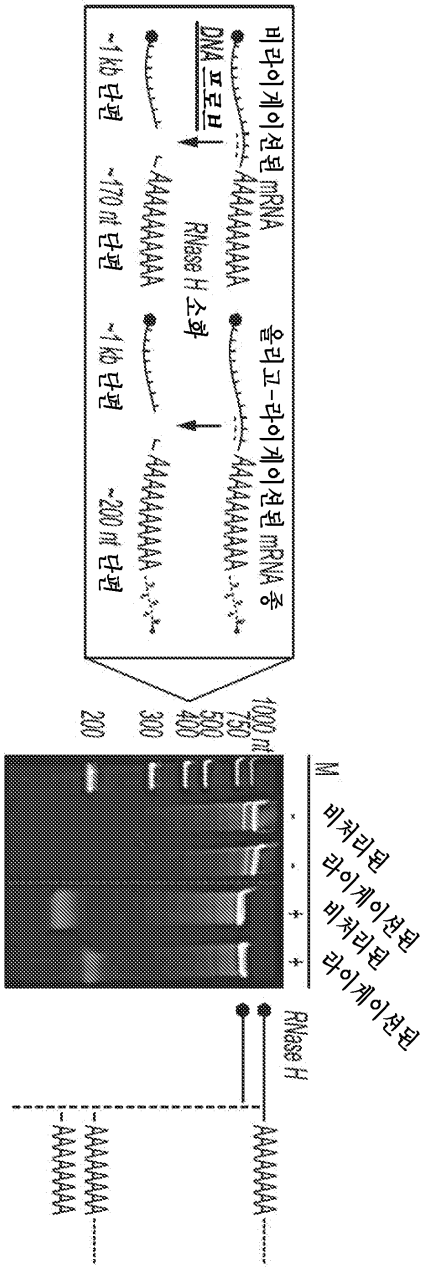
도면6b


29xrA_ddC
3xSrA_ddC
3xSrA_InvdT
3xSrG_InvdT
3xdA_ddC
23xdA_ddC
RNase R:
-
+
-
+
-
+
-
+
-
+
-
+
59 nt
29 nt
20 nt

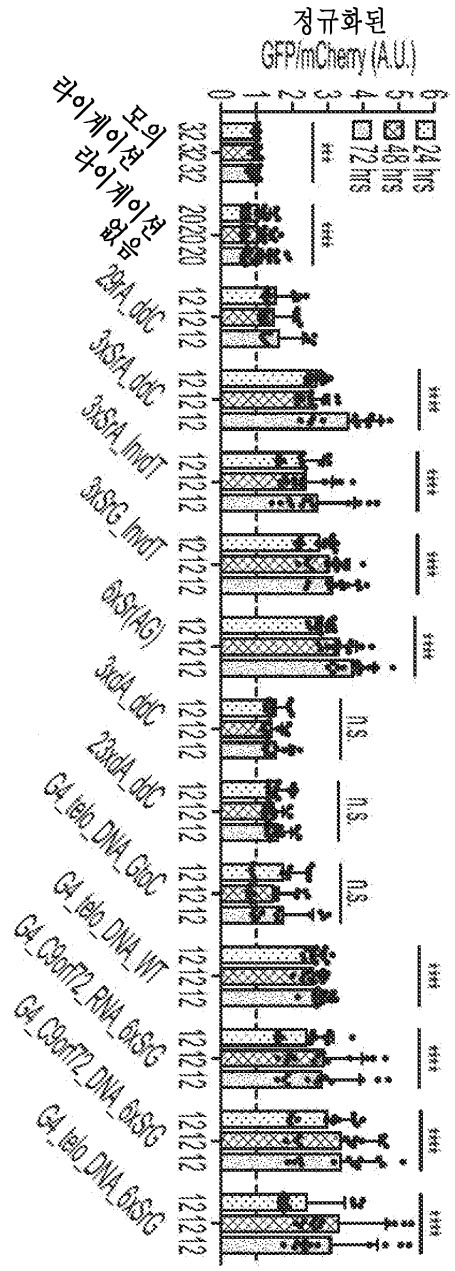
도면7a


5' 포스페이트, 변형된 영역, 쇄 종결 뉴클레오티드
관심 단백질 (POI)을 코딩하는 mRNA
폴리(A) 테일
AAAAAAAAAA-OH
RNA 리가제
합성 올리고뉴클레오티드
AAAAA
메신저-올리고뉴클레오티드 접합된 RNA (mocRNA)
AAAAAAAAAAAAAA
변형된 뉴클레오티드간 연결
5'pAAAAA...*A*A*AddC
5'pAAAAA...G*C*GInvdT
염기
R = OH, H
포스포로티오에이트 연결
퓨토스 당 변형
5'pAAAAA...AAAddC
5'pAAAAA...dAdAdAddC
염기
R = OH, H
R: 당 변형
2차 또는 3차 구조
5'pAAA...(XYZ GGG)nddC
G 쿼드러플렉스 (G4)
쇄 종결 뉴클레오티드
5'pAAAAA...AAAddC
5'pAAAAA...AAAInvdT
ddC
InvdT

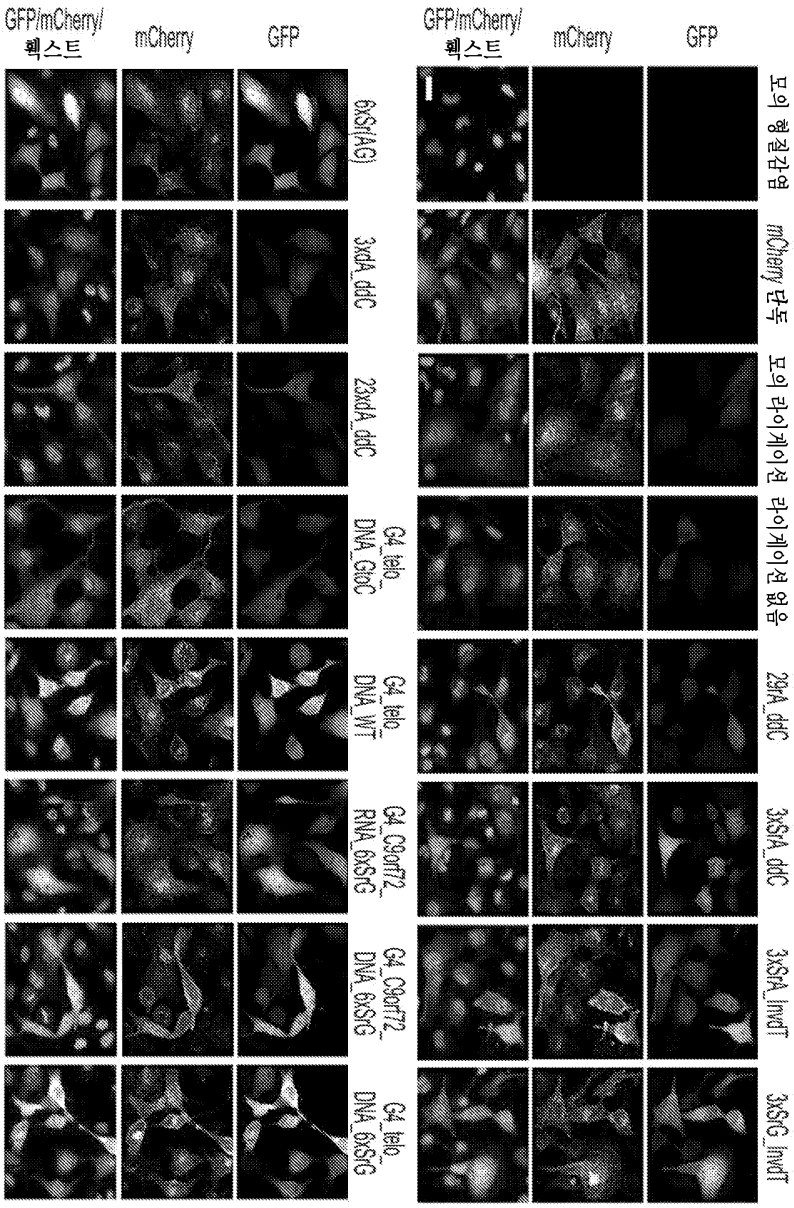
도면7b


비라이게이션된 mRNA
AAAAAAAAAA
DNA 프로브
RNase H 소화
~AAAAAAAAAA
~1 kb 단편
~170 nt 단편
올리고-라이게이션된 mRNA 종
AAAAAAAAAA
~AAAAAAAAAA
~1 kb 단편
~200 nt 단편
1000 nt
750
500
400
300
200
M
비처리된
라이게이션된
비처리된
라이게이션된
RNase H
AAAAAAA
~AAAAAAA
~AAAAAAA

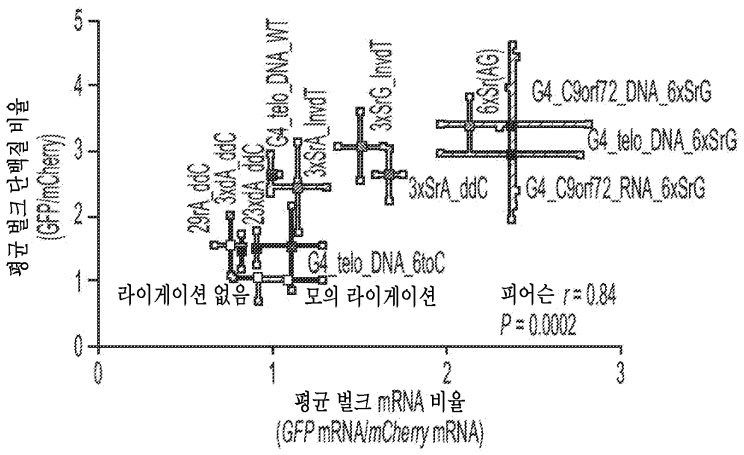
도면8a


정규화된
GFP/mCherry (A.U.)
0
1
2
3
4
5
6
24 hrs
48 hrs
72 hrs
모의
라이게이션
라이게이션
없음
2xA_ddC
3xSA_ddC
3xSA_lmdT
3xSG_lmdT
6xSA(AG)
3xdA_ddC
2xdA_ddC
G4_telo_DNA_CtoC
G4_telo_DNA_WT
G4_C9orf72_RNA_6xSG
G4_C9orf72_DNA_6xSG
G4_telo_DNA_6xSG
n.s
****

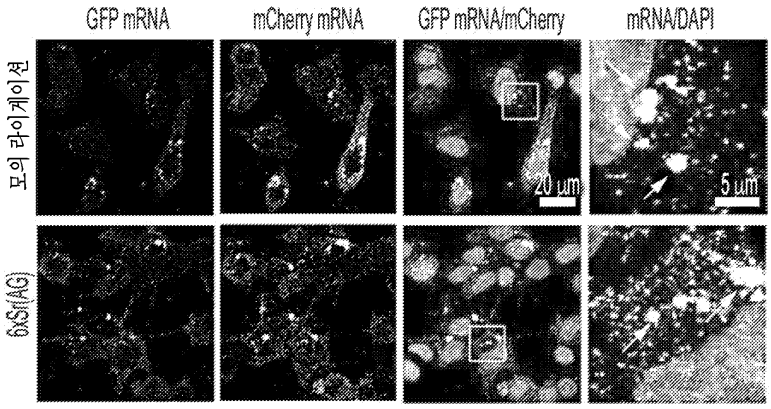
도면8b


GFP/mCherry/
퀵스트
mCherry
GFP
6xSr(AG)
3xdA_ddC
23xdA_ddC
G4_telo_
DNA_6toC
G4_telo_
DNA_WT
G4_C9orf72_
RNA_6xSrG
G4_C9orf72_
DNA_6xSrG
G4_telo_
DNA_6xSrG
모의 형질감염
mCherry 단독
모의 라이게이션
라이게이션 없음
29rA_ddC
3xSrA_ddC
3xSrA_InvdT
3xSrG_InvdT

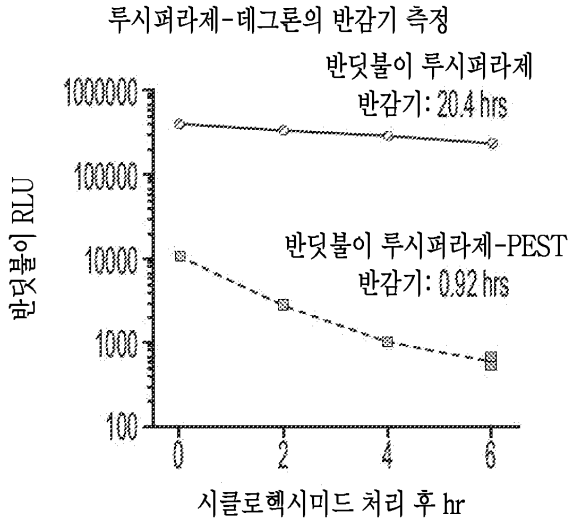
도면8c


평균 벌크 단백질 비율
(GFP/mCherry)
평균 벌크 mRNA 비율
(GFP mRNA/mCherry mRNA)
29rA_ddC
3xdA_ddC
23xdA_ddC
G4_telo_DNA_WT
3xSrA_InvdT
3xSrG_InvdT
6xSr(AG)
G4_C9orf72_DNA_6xSrG
G4_telo_DNA_6xSrG
3xSrA_ddC
G4_C9orf72_RNA_6xSrG
G4_telo_DNA_6toC
라이게이션 없음
모의 라이게이션
피어슨 r = 0.84
P = 0.0002

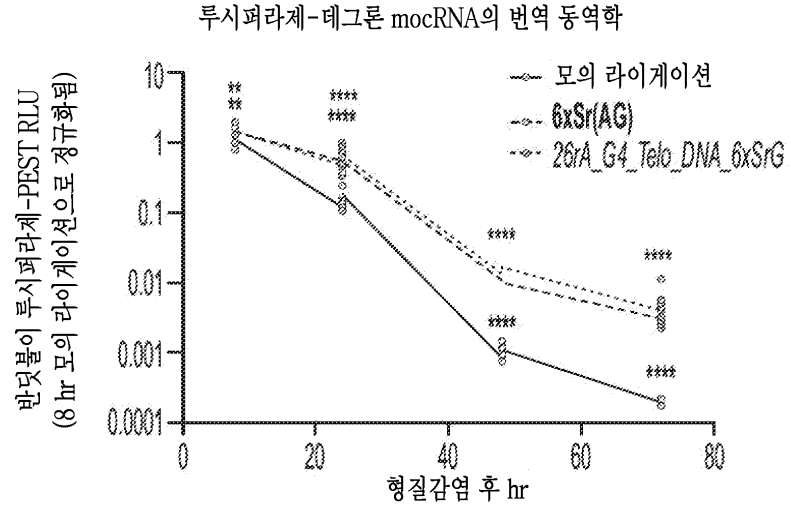
도면8d



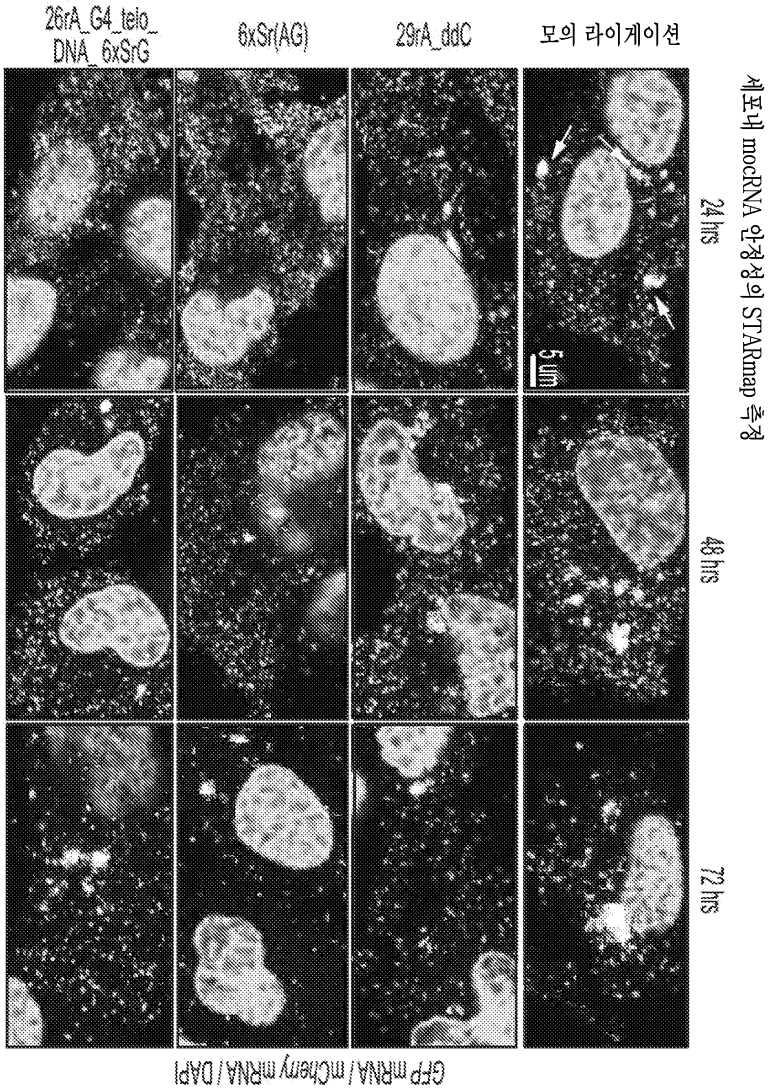
도면9a



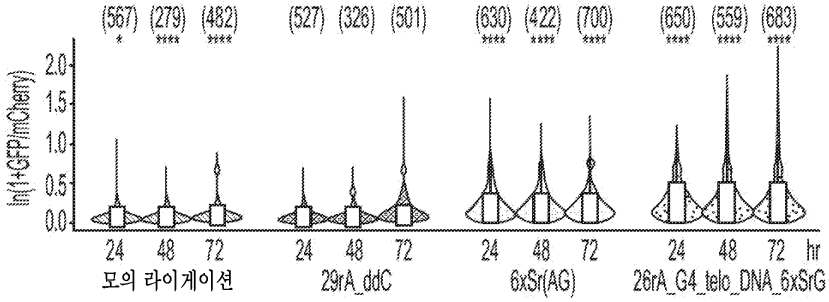
도면9b



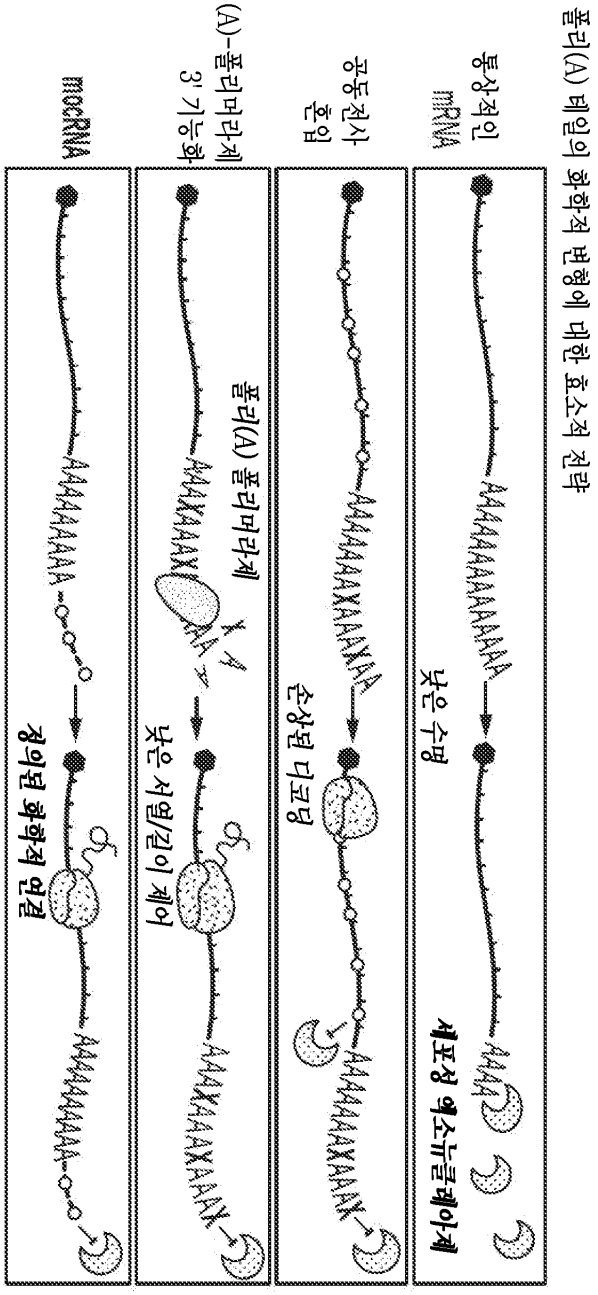
도면9c


26rA_G4_telo_DNA_6xSrG
6xSr(AG)
29rA_ddC
모의 라이게이션
세포내 mocRNA 안정성의 STARmap 측정
24 hrs
48 hrs
72 hrs
5 um
GFP mRNA / mChemy mRNA / DAPI

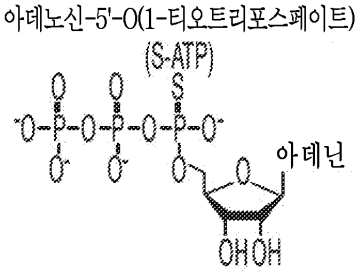
도면9d


(567) (279) (482) (527) (326) (501) (630) (422) (700) (650) (559) (683)
ln(1+GFP/mCherry)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
24 48 72 24 48 72 24 48 72 24 48 72 hr
모의 라이게이션
29rA_ddC
6xSr(AG)
26rA_G4_telo_DNA_6xSrG

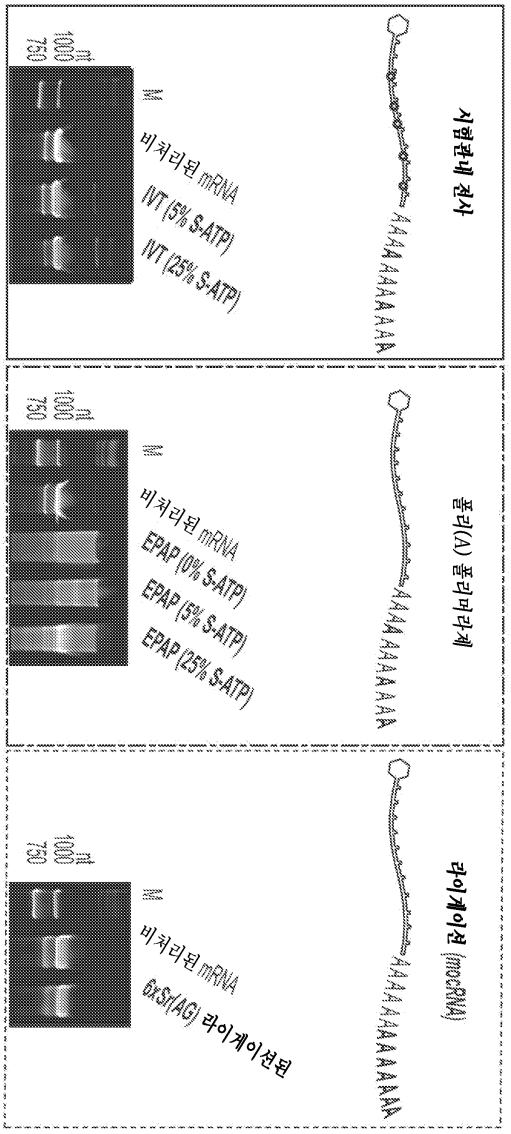
도면10a


폴리(A) 테일의 화학적 변형에 대한 효소적 전략
통상적인 mRNA
AAAAAAAAAAAA
낮은 수명
세포성 엑소뉴클레아제
공동전사 혼입
AAAAAAAXAAAXAA
손상된 디코딩
AAAAAAAXAAAX
폴리(A)-폴리머라제 3' 기능화
폴리(A) 폴리머라제
AAAXAAAX
낮은 서열/길이 제어
AAAXAAAXAAAX
mocRNA
AAAAAAAA
정의된 화학적 연결
AAAAAAAA

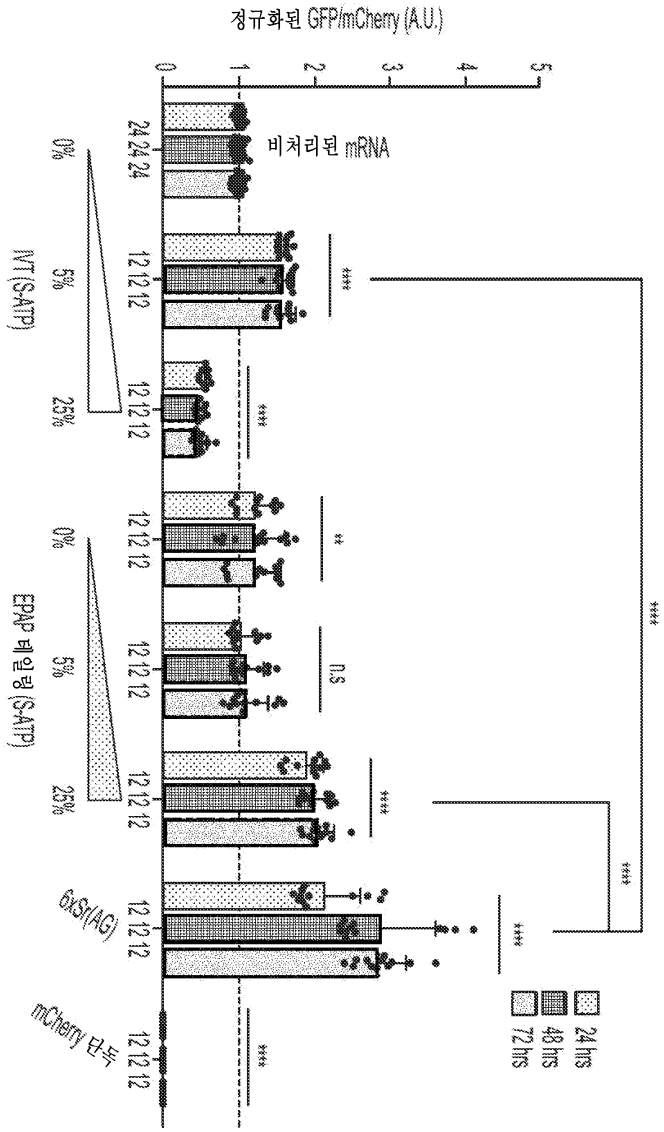
도면10b


아데노신-5'-O(1-티오트리포스페이트)
(S-ATP)
아데닌
OH OH

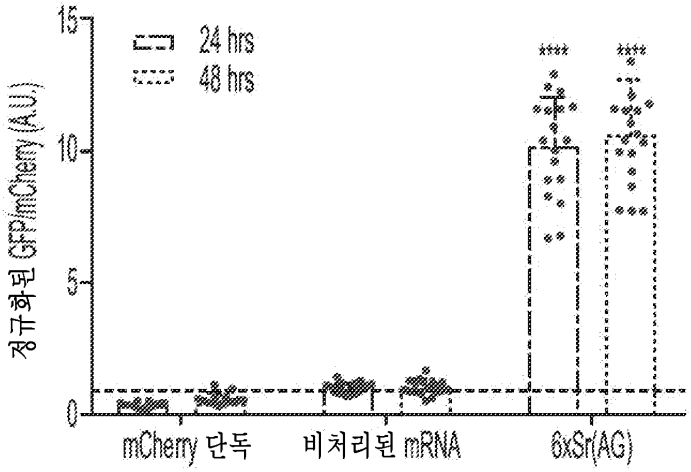
도면10c


시험관내 전사
AAAA AAAAAAA
M
비처리된 mRNA
IVT (5% S-ATP)
IVT (25% S-ATP)
1000
750
폴리(A) 폴리머라제
AAAA AAAAAAA
M
비처리된 mRNA
EPAP (0% S-ATP)
EPAP (5% S-ATP)
EPAP (25% S-ATP)
1000
750
라이게이션 (modRNA)
AAAA AAAAAAA
M
비처리된 mRNA
GxSr(AG) 라이게이션된
1000
750

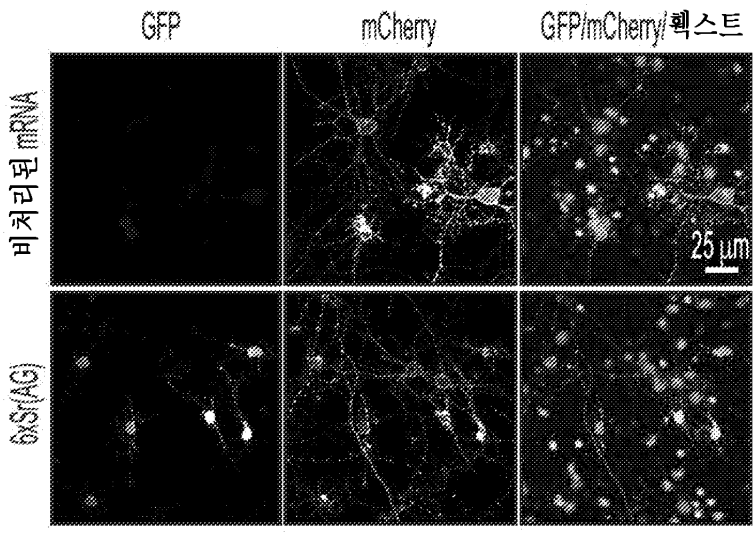
도면10d


정규화된 GFP/mCherry (A.U.)
0
1
2
3
4
5
비처리된 mRNA
LVT (SAP)
EPAV 페이로딩 (SAP)
0%
5%
25%
6xSr(AG)
mCherry 단독
n.s
24 hrs
48 hrs
72 hrs

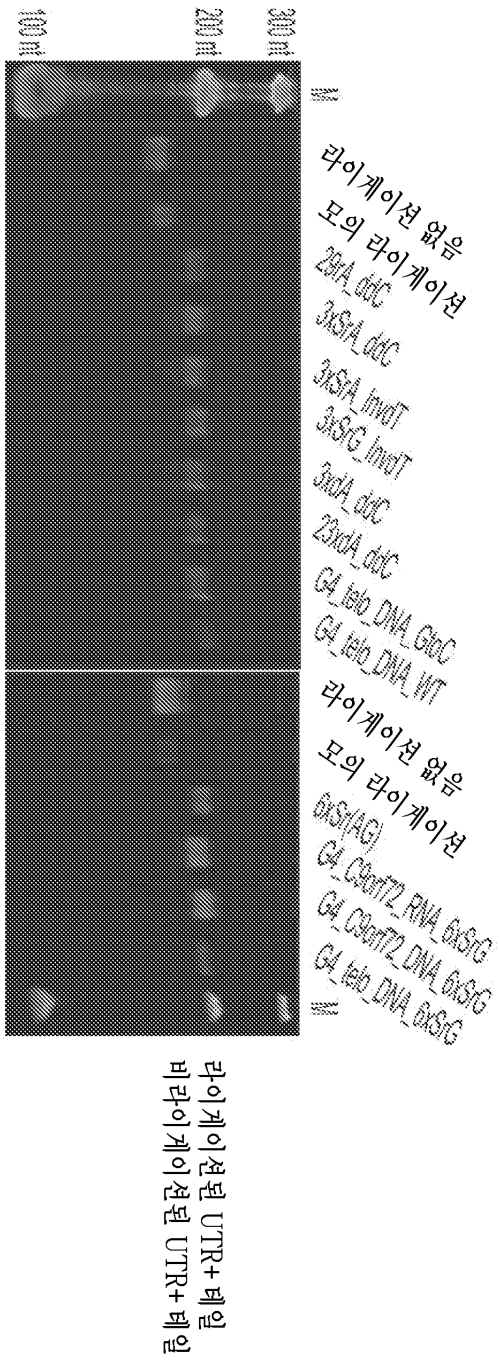
도면11a


정규화된 GFP/mCherry (A.U.)
0
5
10
15
24 hrs
48 hrs
mCherry 단독
비처리된 mRNA
6xSr(AG)

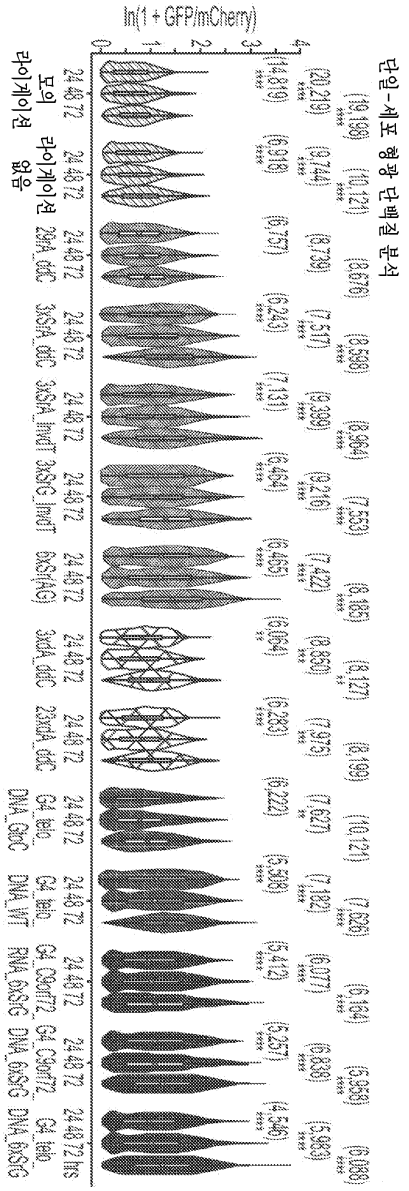
도면11b



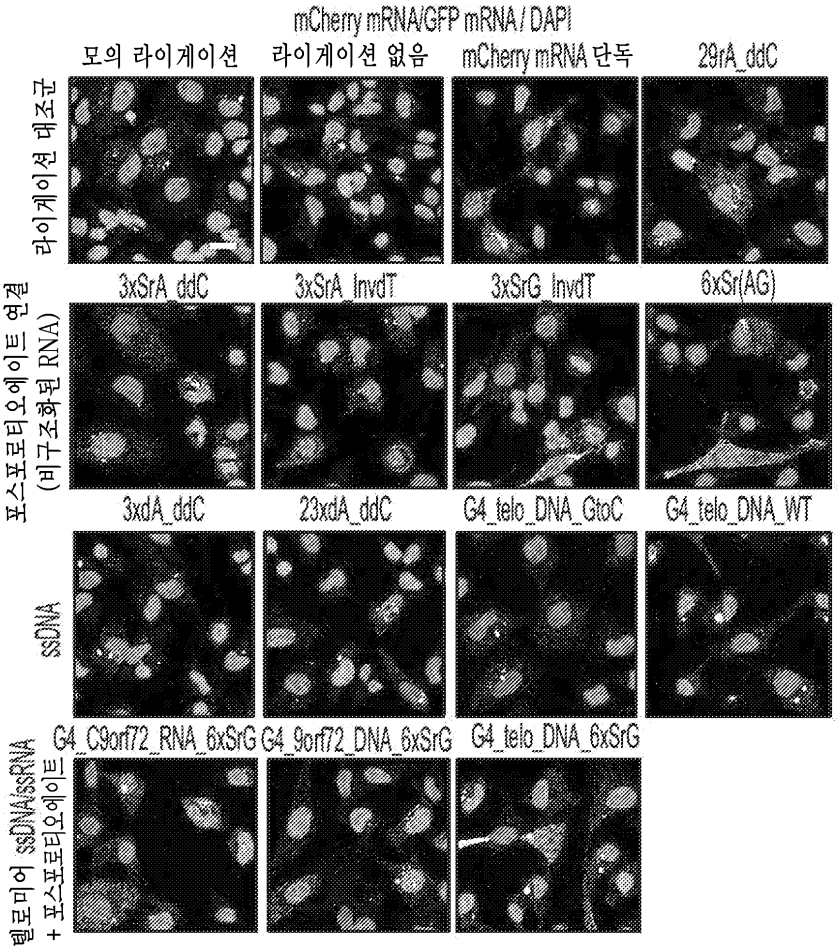
도면12


300 nt
200 nt
100 nt
M
라이게이션 없음
모의 라이게이션
2'dA_ddC
3'dA_ddC
3'dA_InvdT
3'dG_InvdT
3'dA_ddC
2'dA_ddC
G4_Heb_DNA_GddC
G4_Heb_DNA_WT
라이게이션 없음
모의 라이게이션
6dG(AG)
G4_C3ortT2_RNA_6dGG
G4_C3ortT2_DNA_6dGG
G4_Heb_DNA_6dGG
M
라이게이션된 UTR+테일
비라이게이션된 UTR+테일

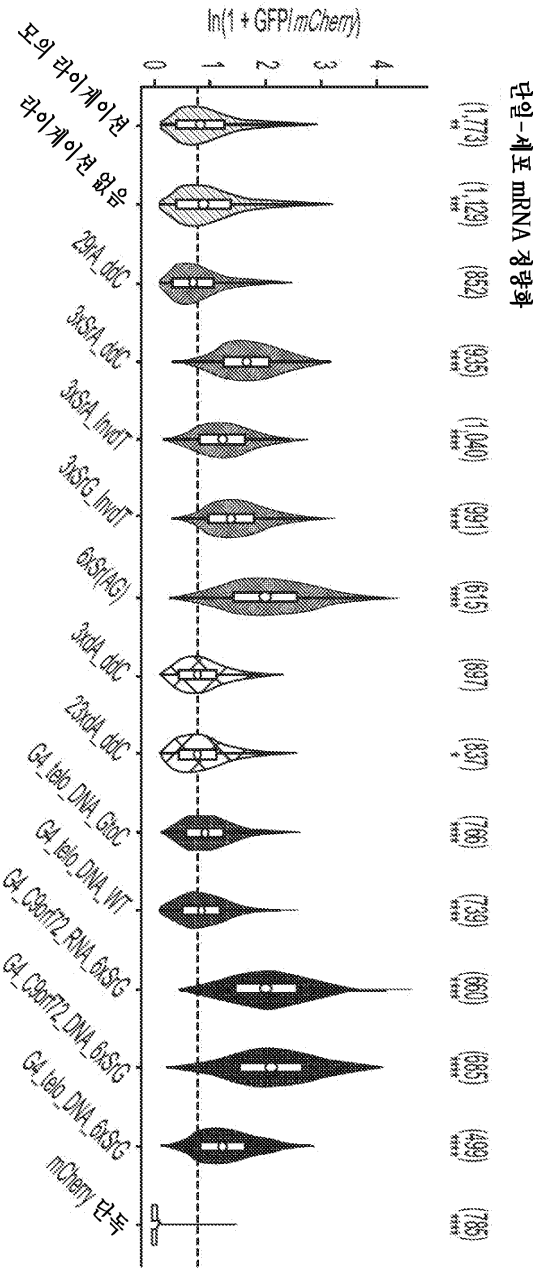
도면13a


ln(1 + GFP/mCherry)
0
1
2
3
4
단일-세포 형광 단백질 분석
(20,219)
(19,198)
(14,819)
(10,121)
(9,744)
(6,910)
(8,676)
(8,739)
(8,757)
(8,508)
(7,517)
(6,249)
(8,964)
(9,399)
(7,131)
(9,216)
(7,559)
(9,464)
(8,185)
(7,422)
(8,457)
(8,127)
(8,850)
(9,004)
(8,199)
(7,975)
(6,280)
(10,121)
(7,627)
(9,222)
(7,205)
(7,182)
(9,508)
(9,194)
(6,077)
(5,412)
(6,839)
(6,559)
(5,257)
(5,963)
(4,546)
(6,080)
24 48 72
24 48 72
24 48 72

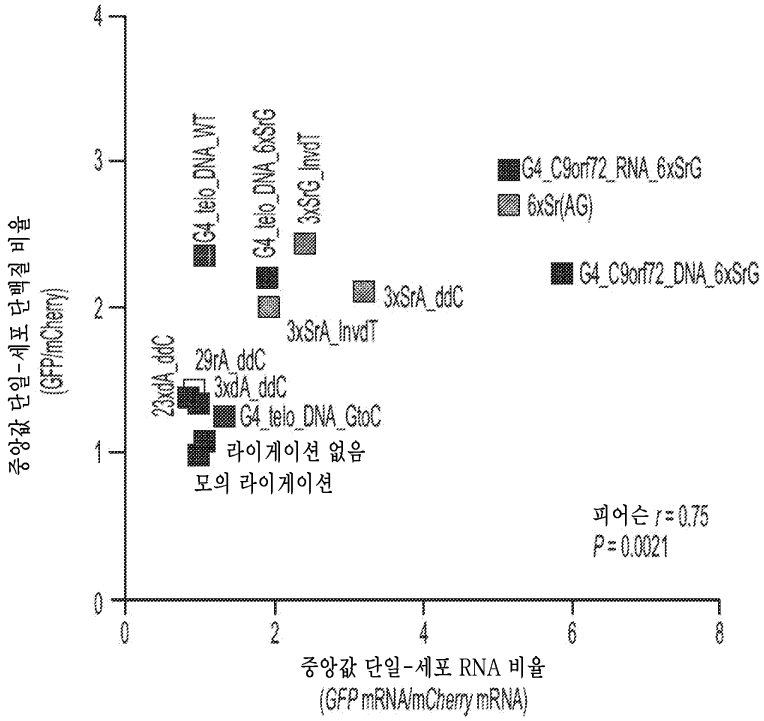
도면13b


mCherry mRNA/GFP mRNA / DAPI
모의 라이게이션
라이게이션 없음
mCherry mRNA 단독
29rA_ddC
라이게이션 대조군
3xSrA_ddC
3xSrA_InvdT
3xSrG_InvdT
6xSr(AG)
포스포로티오에이트 연결 (비구조화된 RNA)
3xdA_ddC
23xdA_ddC
G4_telo_DNA_GtoC
G4_telo_DNA_WT
ssDNA
G4_C9orf72_RNA_6xSrG
G4_9orf72_DNA_6xSrG
G4_telo_DNA_6xSrG
헬로미어 ssDNA/ssRNA + 포스포로티오에이트

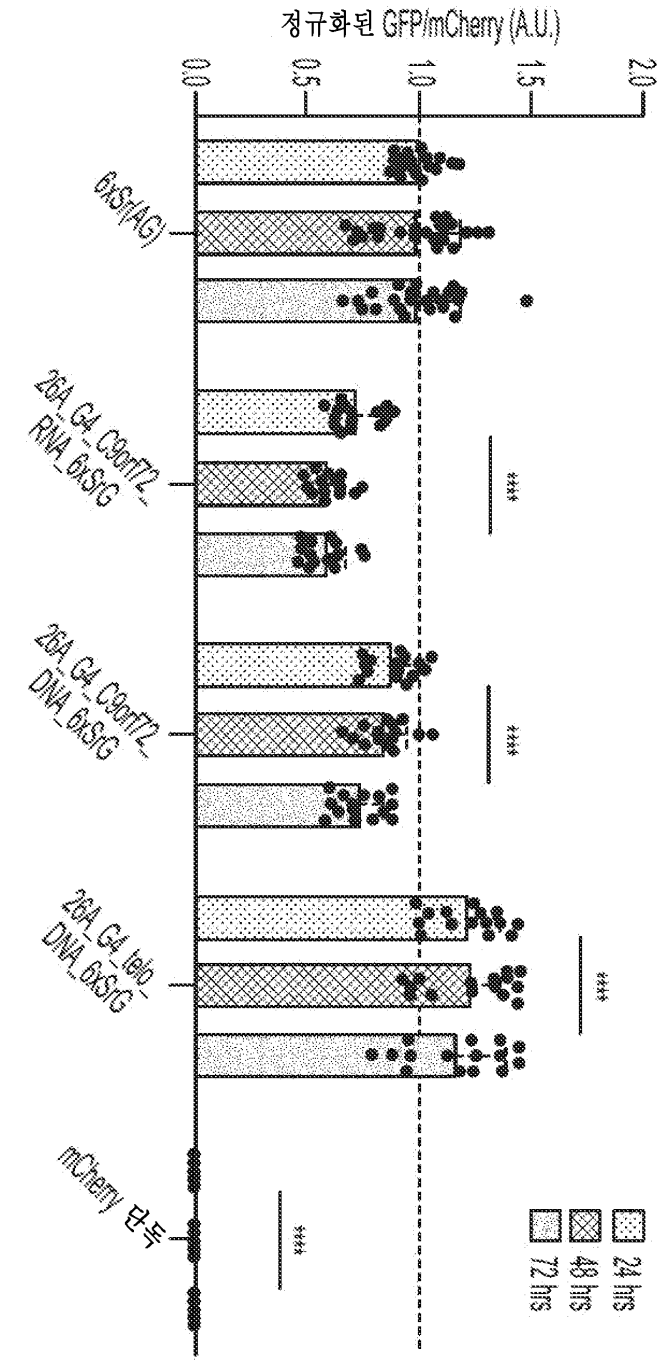
도면13c


ln(1 + GFP/mCherry)
0
1
2
3
4
모의 라이게이션
라이게이션 없음
23nA_ddC
3dSiA_ddC
3dSiA_InvdT
3dSiG_InvdT
6dSi(AG)
3dDA_ddC
23ddA_ddC
G4_lebb_DNA_GddC
G4_lebb_DNA_WT
G4_C9orf72_RNA_6dSiG
G4_C9orf72_DNA_6dSiG
G4_lebb_DNA_6dSiG
mCherry 단독
단일-세포 mRNA 정량화
(1773)
(1,129)
(632)
(935)
(1,040)
(991)
(615)
(697)
(457)
(766)
(757)
(1,008)
(965)
(499)
(765)

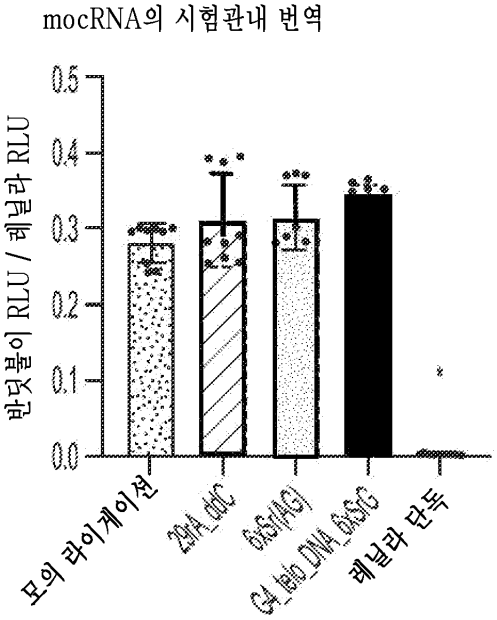
도면13d


중앙값 단일-세포 단백질 비율
(GFP/mCherry)
중앙값 단일-세포 RNA 비율
(GFP mRNA/mCherry mRNA)
C4_telo_DNA_WT
G4_telo_DNA_6xSrG
3xSrG_InvdT
G4_C9orf72_RNA_6xSrG
6xSr(AG)
G4_C9orf72_DNA_6xSrG
3xSrA_ddC
3xSrA_InvdT
23xdA_ddC
29rA_ddC
3xdA_ddC
G4_telo_DNA_GtoC
라이게이션 없음
모의 라이게이션
피어슨 r = 0.75
P = 0.0021
0
1
2
3
4
0
2
4
6
8

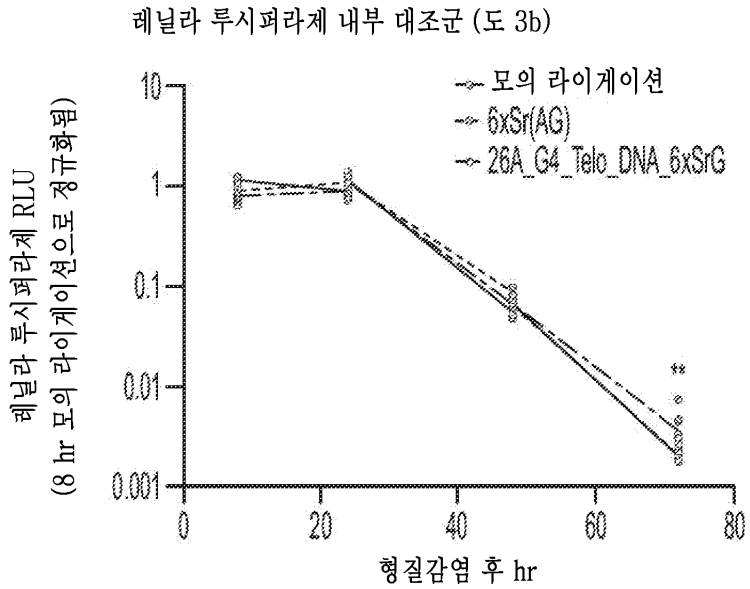
도면14a


정규화된 GFP/mCherry (A.U.)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
6xS1(AG)
26A_G4_C3ort72_RNA_6xSIG
26A_G4_C3ort72_DNA_6xSIG
26A_G4_Ig60_DNA_6xSIG
mCherry 단독
****
24 hrs
48 hrs
72 hrs

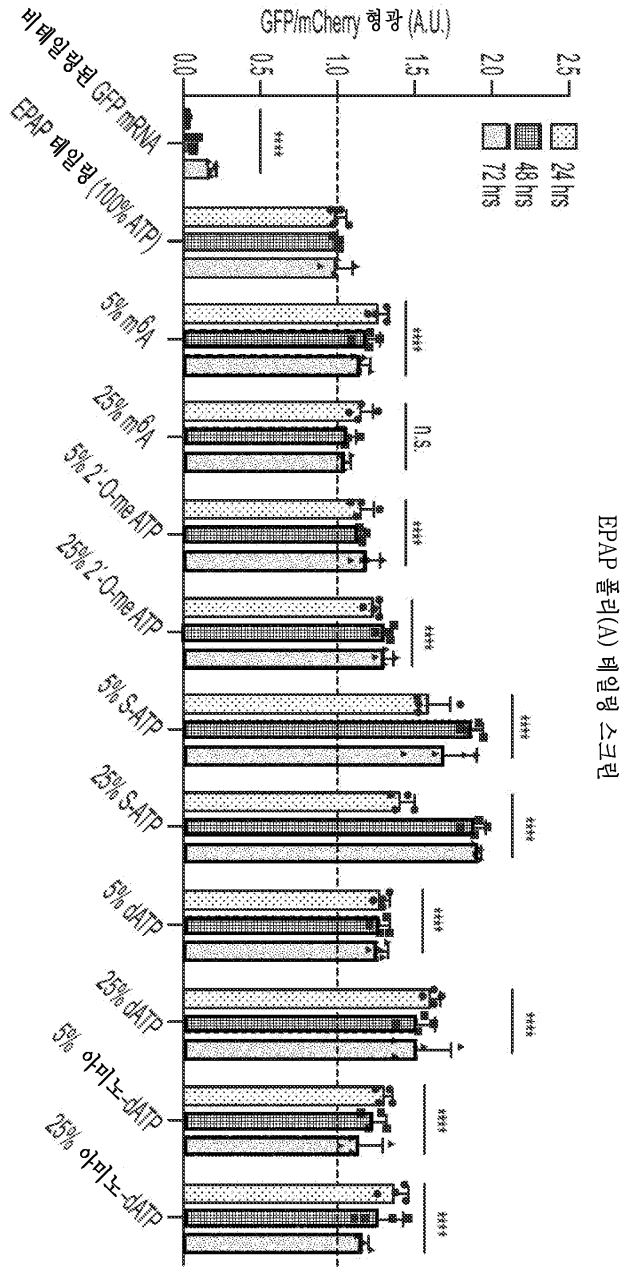
도면14b


mocRNA의 시험관내 번역
반딧불이 RLU / 레닐라 RLU
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
모의 라이게이션
26A_ddC
6xSr(AG)
G4_Telo_DNA_6xSrG
레닐라 단독

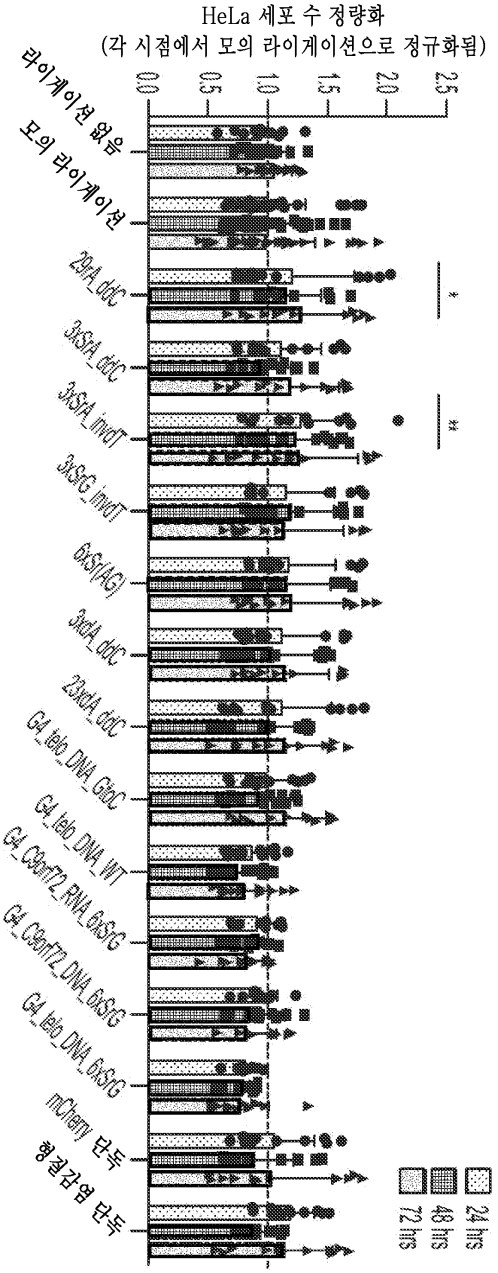
도면14c


레닐라 투시퍼라제 내부 대조군 (도 3b)
레닐라 투시퍼라제 RLU
(8 hr 모의 라이게이션으로 정규화됨)
10
1
0.1
0.01
0.001
0
20
40
60
80
형질감염 후 hr
모의 라이게이션
6xSr(AG)
26A_G4_Telo_DNA_6xSrG

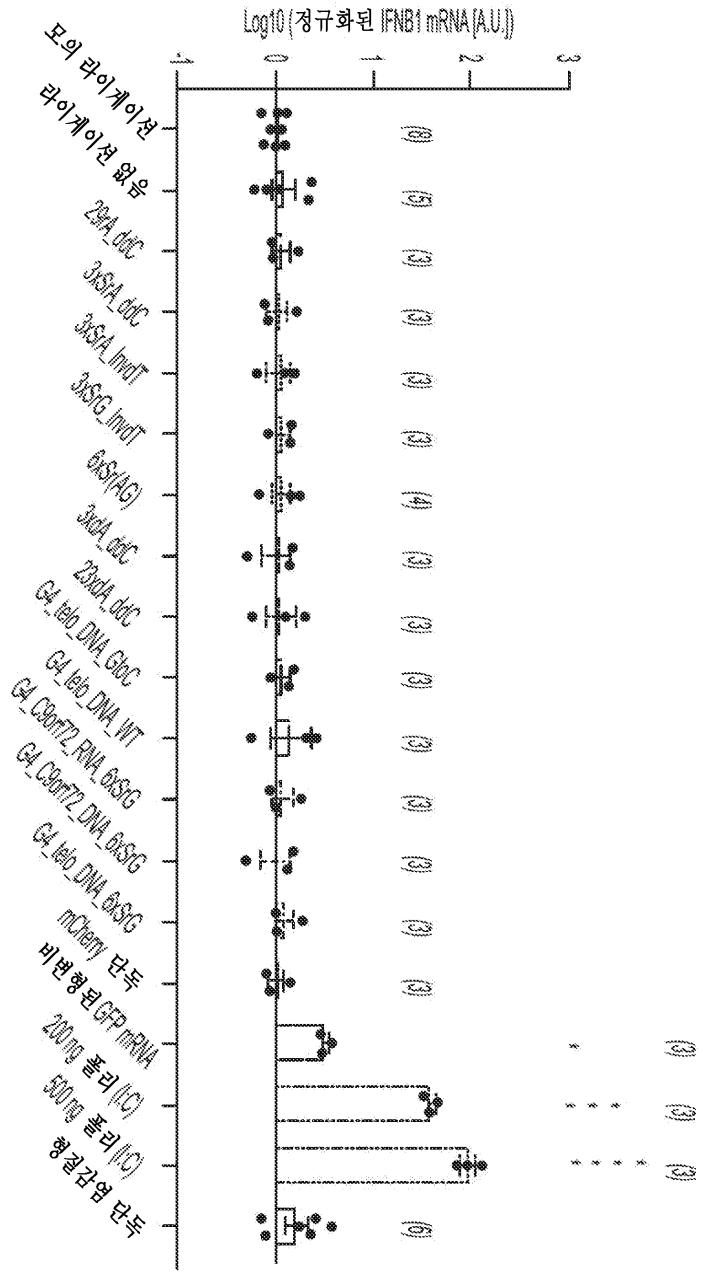
도면15


EPAP 폴리(A) 테일링 스크린
GFP/mCherry 형광 (A.U.)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
24 hrs
48 hrs
72 hrs
비테일링된 GFP mRNA
EPAP 테일링 (100% ATP)
5% mN6A
25% mN6A
5% 2'-O-me ATP
25% 2'-O-me ATP
5% S-ATP
25% S-ATP
5% dATP
25% dATP
5% 아미노-dATP
25% 아미노-dATP
****
n.s.

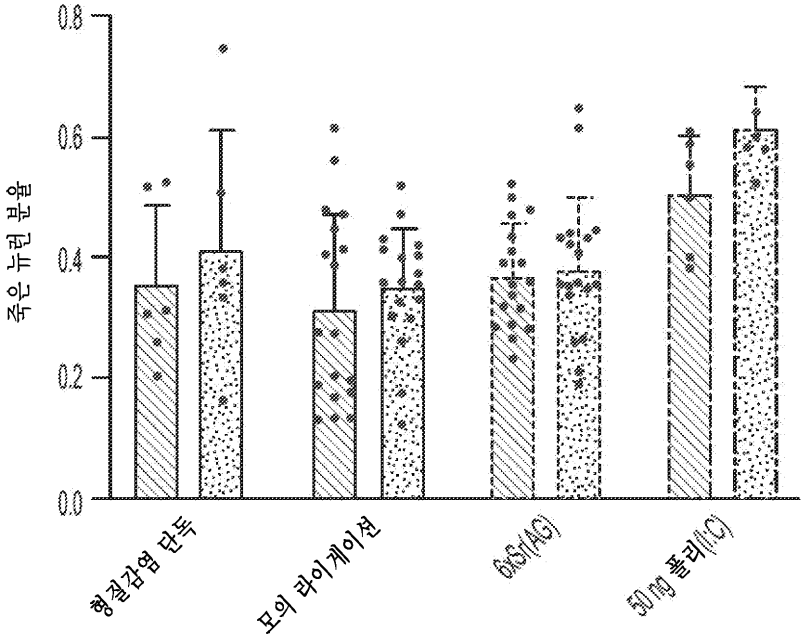
도면16a


HeLa 세포 수 정량화
(각 시점에서 모의 라이게이션으로 정규화됨)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
라이게이션 없음
모의 라이게이션
23rA_ddC
3rSrA_ddC
3rSrA_invdT
3rSrG_invdT
6rS(AG)
3rdA_ddC
23rdA_ddC
G4_lebb_DNA_GbbC
G4_lebb_DNA_WT
G4_C9orf72_RNA_6rSrG
G4_C9orf72_DNA_6rSrG
G4_lebb_DNA_6rSrG
mCherry 단독
형질감염 단독
24 hrs
48 hrs
72 hrs

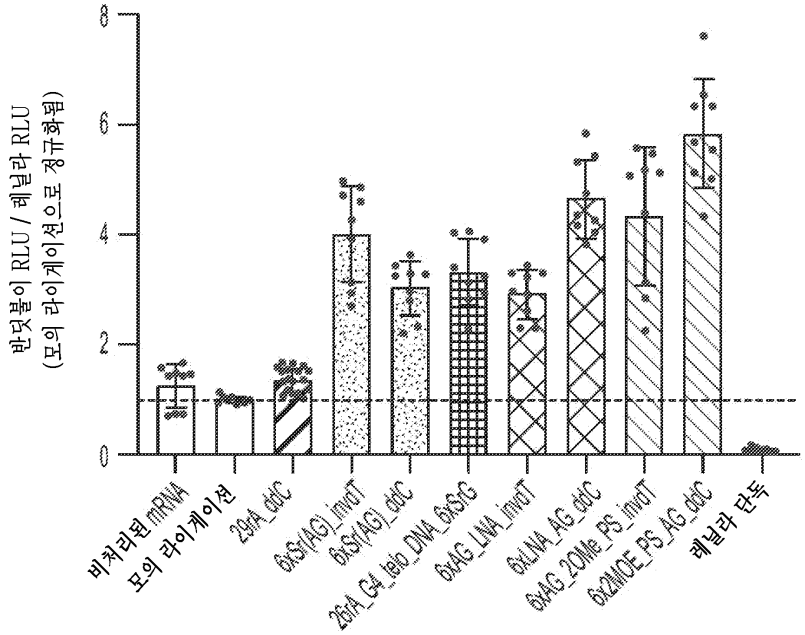
도면16b


Log10 (정규화된 IFNB1 mRNA (A.U.))
-1
0
1
2
3
모의 라이게이션
라이게이션 없음
2'-F-A_ddC
3'-S-A_ddC
3'-S-A_InvdT
3'-S-G_InvdT
6-S-(AG)
3'-dA_ddC
2'-3'-dA_ddC
G4_Ieb0_DNA_GddC
G4_Ieb0_DNA_WT
G4_C9orf72_RNA_6-S-G
G4_C9orf72_DNA_6-S-G
G4_Ieb0_DNA_6-S-G
mCherry 단독
비변형된 GFP mRNA
200 ng 폴리 (I:C)
500 ng 폴리 (I:C)
형질감염 단독
(8)
(5)
(3)
(3)
(3)
(3)
(4)
(3)
(3)
(3)
(3)
(3)
(3)
(3)
(3)
(3)
(3)
(3)
(6)

도면16c


죽은 뉴런 분율
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
형질감염 단독
모의 라이게이션
6xS(AG)
50 nM 폴리(I:C)

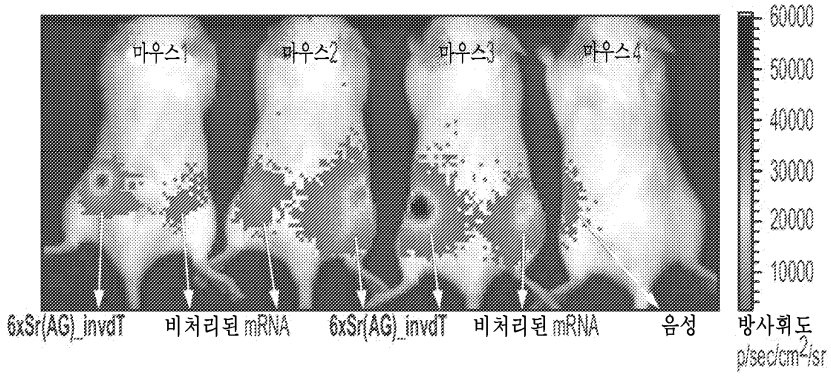
도면17


반딧불이 RLU / 레닐라 RLU
(모의 라이게이션으로 정규화됨)
0
2
4
6
8
비처리된 mRNA
모의 라이게이션
2bA_ddC
6xS(AG)_invT
6xS(AG)_ddC
2bA_G4_teto_DNA_6xSG
6xAG_LNA_invT
6xLNA_AG_ddC
6xAG_2OMe_PS_invT
6x2MOE_PS_AG_ddC
레닐라 단독

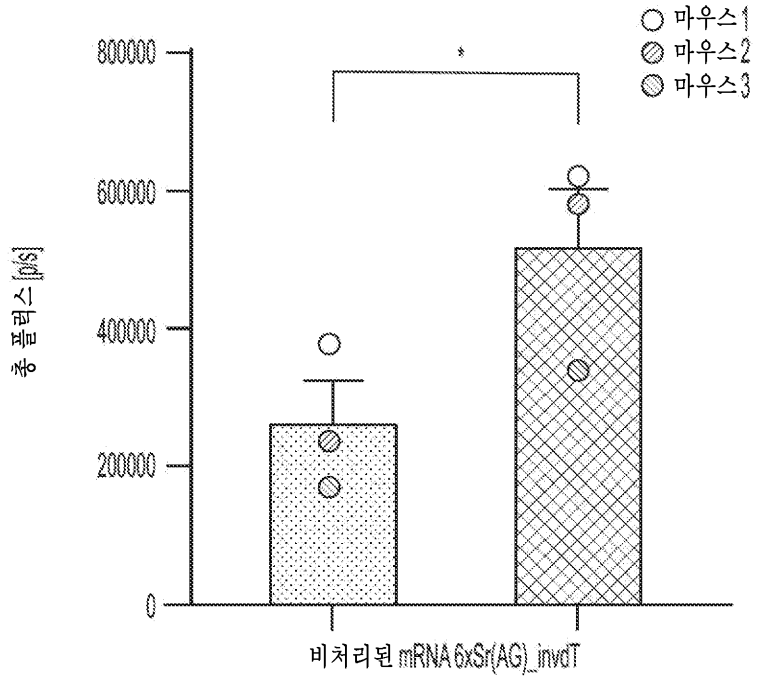
도면18a



도면18b



도면18c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Broad Institute, Inc.

Massachusetts Institute of Technology

<120> MODIFIED MRNA, MODIFIED NON-CODING RNA, AND USES THEREOF

<130> B1195.70130WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 63/288,522

<151> 2021-12-10

<150> US 63/187,752

<151> 2021-05-12

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

aaaaaaaaaa aaaa 14

<210> 2

<211> 6

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

ggggcc 6

<210> 3

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

ggggcc 6

<210> 4

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

tagggt 6

<210> 5

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

taccct 6

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaac 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaac 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaat 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggt 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaac 30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaac 30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

aaaaaatacc cttaccctta cccttacccc 30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

aaaaaatagg gttagggtta gggttagggc 30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggt 30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

aaaaaaaggg gccggggccg gggccggggt 30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

aaaaaaaggg gccggggccg gggccggggt 30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

aaaaaatagg gttagggtta gggttagggt 30

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcac 36

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

acattattgg tgccgcgcag cttcacctaa ttattactga ggcatacact aaagata 57

<210> 20

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

acattacttc ttggccttgt aggtggtaat tattactgag gcatacacta aagata 56

<210> 21

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

acattacacg gtcaccacgc cgccgtaatt attactgagg catacactaa agata 55

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

acggggccgt cggaggggaa taatgttatc tt 32

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

ggcgccgggc agctgcacgg taatgttatc tt 32

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

gtcctgcagg gaggagtcct ggtaatgtta tctt 34

<210> 25

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

acattaagtc gcagcggtag tggccaatta ttactgaaat cgtagactaa gata 54

<210> 26

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

acattacatt agcagggaag ttgaccccgt aattattact gaaatcgtag actaagata 59

<210> 27

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

acattagctt cggcgtgctc gtacagctaa ttattactga aatcgtagac taagata 57

<210> 28

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

cctccctcca agagcagtgc cattaatgtt atctt 35

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

tgcgctgcat caccgggcta atgttatctt 30

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

cctggcgggg tagtccgctg tgtaatgtta tctt 34

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

catacactaa agataacat 19

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

tcgtagacta agataacat 19

<210> 33

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggg ccggggccgg ggccggggt 49

<210> 34

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggg ccggggccgg ggccggggt 49

<210> 35

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaatagg gttagggtta gggttagggt 50

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

agagacgttc gcggccgcgg cgcc 24

<210> 37

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

ttaaaaaacc tcccacacct ccccctgaac ctgaaac 37

<210> 38

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagag acgttcgcgg ccgcggcgcc 60

<210> 39

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

ttttttttt ttttttttt ttttttttt tcctcccaca cctccccctg aacctgaaac 60

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

tgacattctc accaccgtgt 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

agtcgtccac acccttcatc 20

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

ttcttggcca tgtaggtggt c 21

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

aggacggcga gttcatctac 20

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

caccattggc aatgagcggt tc 22

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

aggtctttgc ggatgtccac gt 22

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

cttggattcc tacaaagaag cagc 24

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

tcctccttct ggaactgctg ca 22

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggc 30

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggt 30

<210> 50

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggc 30

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggt 30

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggc 30