



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118541346 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 23

(21) 申请号 202280082544.X

(22) 申请日 2022.11.08

(30) 优先权数据

63/277,055 2021.11.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/049313 2022.11.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/081526 EN 2023.05.11

(71) 申请人 奥纳治疗公司

地址 美国

(72) 发明人 A·T·霍霍塔 J·杨 K·考夫曼

T·巴恩斯 R·A·韦塞尔霍夫特

A·M·贝克尔 G·莫兹

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 王娜

(51) Int.Cl.

C07C 229/12 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

权利要求书11页 说明书264页 附图89页

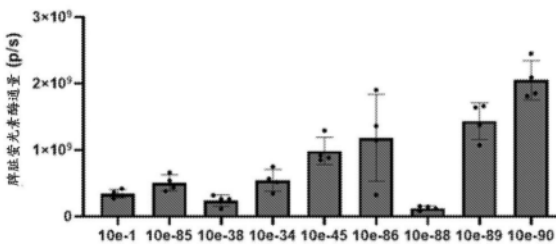
(54) 发明名称

用于递送环状多核苷酸的脂质纳米颗粒组合物

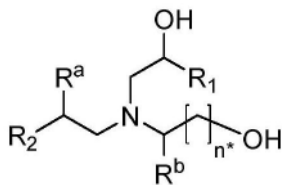
(57) 摘要

本文中公开了新型脂质,其可以与其它脂质组分诸如辅助脂质、结构脂质和胆固醇组合使用以形成用于在体外和在体内递送治疗剂诸如核酸(例如,环状多核苷酸)的脂质纳米颗粒。

脾脏整个组织表达



1. 由式 (13*) 表示的可电离脂质:



式 (13*)

或其药学上可接受的盐, 其中:

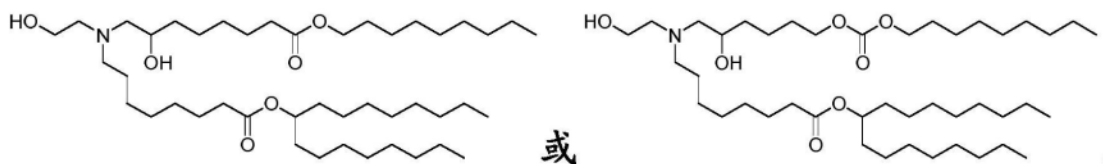
n^* 是 1 至 7 之间的整数;

R^a 是氢或羟基;

R^b 是氢或 C_1 - C_6 烷基;

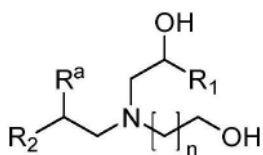
R_1 和 R_2 各自独立地是直链或支链 C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基或 C_1 - C_{30} 杂烷基, 其任选地被一个或多个取代基取代, 所述取代基选自氧代、卤素、羟基、氰基、烷基、烯基、醛、杂环基烷基、羟基烷基、二羟基烷基、羟基烷基氨基烷基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、(杂环基) (烷基) 氨基烷基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、炔基、烷氧基、氨基、二烷基氨基、氨基烷基羰基氨基、氨基羰基烷基氨基、(氨基羰基烷基) (烷基) 氨基、烯基羰基氨基、羟基羰基、烷氧基羰基、烷基羰基氧基、烷基碳酸酯、烯基氧基羰基、烯基羰基氧基、烯基碳酸酯、炔基氧基羰基、炔基羰基氧基、炔基碳酸酯、氨基羰基、氨基烷基氨基羰基、烷基氨基烷基氨基羰基、二烷基氨基烷基氨基羰基、杂环基烷基氨基羰基、(烷基氨基烷基) (烷基) 氨基羰基、烷基氨基烷基羰基、二烷基氨基烷基羰基、杂环基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亚砷、烷基亚砷烷基、烷基磺酰基和烷基砷烷基;

前提条件是, 所述可电离脂质不是



2. 权利要求 1 所述的可电离脂质, 其中 R^b 是 C_1 - C_6 烷基。

3. 权利要求 1 所述的可电离脂质, 其中 R^b 是 H 且所述可电离脂质由式 (13) 表示:



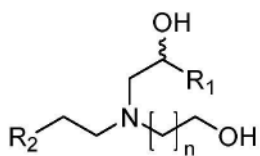
式 (13)

其中 n 是 1 至 7 之间的整数。

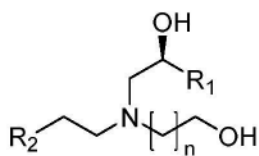
4. 权利要求 3 所述的可电离脂质, 其中 n 是 1、2、3 或 4。

5. 权利要求 1-4 中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_a 是氢。

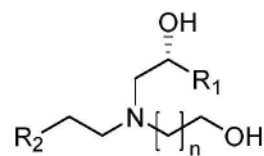
6. 权利要求 2 所述的可电离脂质, 其中所述可电离脂质由式 (13a-1)、式 (13a-2) 或式 (13a-3) 表示:



式(13a-1)



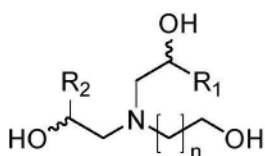
式(13a-2)



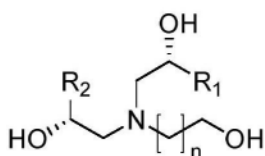
式(13a-3)。

7. 权利要求1-4中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_a 是羟基。

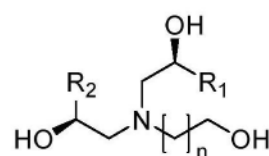
8. 权利要求7所述的可电离脂质, 其中所述可电离脂质由式(13b-1)、式(13b-2)或式(13b-3)表示:



式(13b-1)

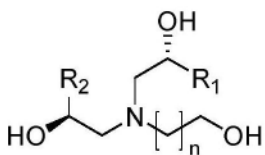


式(13b-2)

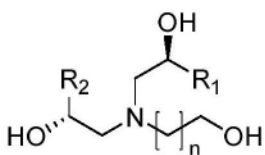


式(13b-3)。

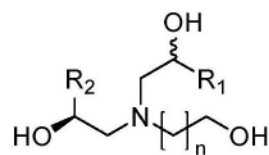
9. 权利要求7所述的可电离脂质, 其中所述可电离脂质由式(13b-4)、式(13b-5)、式(13b-6)、式(13b-7)、式(13b-8)或式(13b-9)表示:



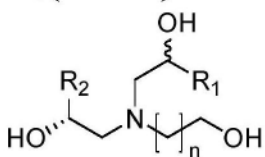
式(13b-4)



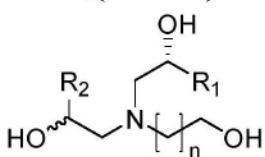
式(13b-5)



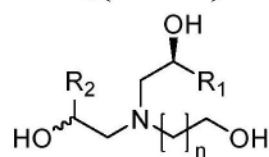
式(13b-6)



式(13b-7)



式(13b-8)



式(13b-9)。

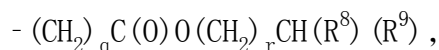
10. 权利要求1-9中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基或 C_1 - C_{20} 杂烷基, 其任选地被一个或多个取代基取代, 所述取代基选自 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_1 - C_{20} 烷氧基羰基、 C_1 - C_{20} 烷基羰基氧基、 C_1 - C_{20} 烷基碳酸酯、 C_2 - C_{20} 烯基氧基羰基、 C_2 - C_{20} 烯基羰基氧基、 C_2 - C_{20} 烯基碳酸酯、 C_2 - C_{20} 炔基氧基羰基、 C_2 - C_{20} 炔基羰基氧基和 C_2 - C_{20} 炔基碳酸酯。

11. 权利要求1-10中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_1 和 R_2 中的至少一个是未被取代的直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基、 C_6 - C_{30} 烯基或 C_6 - C_{30} 杂烷基。

12. 权利要求1-11中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_1 和 R_2 中的至少一个是被 $-O(CO)R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 或 $-O(CO)OR^6$ 取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基, 其中每个 R^6 独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基或 C_2 - C_{20} 烯基。

13. 权利要求12所述的可电离脂质, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是被 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 或 $-OC(O)OR^6$ 取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基, 其中每个 R^6 独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基或 C_2 - C_{20} 烯基。

14. 权利要求1-13中的任一项所述的可电离脂质, 其中所述 R_1 和 R_2 中的至少一个选自:



- $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$, 和
- $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) \text{O} (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$,

其中:

q 是0至12之间的整数,

r 是0至6之间的整数,

R^8 是H或 R^{10} , 且

R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2 - C_{12} -烯基。

15. 权利要求14所述的可电离脂质, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地选自:

- $(\text{CH}_2)_q \text{C}(\text{O}) \text{O} (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$,
- $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$, 和
- $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) \text{O} (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$,

其中:

q 是0至12之间的整数,

r 是0至6之间的整数,

R^8 是H或 R^{10} , 且

R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2 - C_{12} -烯基。

16. 权利要求14所述的可电离脂质, 其中 R_1 是未被取代的直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基。

17. 权利要求14或15所述的可电离脂质, 其中 R_1 是 $(\text{CH}_2)_q \text{C}(\text{O}) \text{O} (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$ 。

18. 权利要求14或15所述的可电离脂质, 其中 R_1 是 $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$ 。

19. 权利要求14或15所述的可电离脂质, 其中 R_1 是 $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) \text{O} (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$ 。

20. 权利要求16-19中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_2 是未被取代的直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基。

21. 权利要求16-19中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_2 是 $(\text{CH}_2)_q \text{C}(\text{O}) \text{O} (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$ 。

22. 权利要求16-19中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_2 是 $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$ 。

23. 权利要求16-19中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_2 是 $(\text{CH}_2)_q \text{OC}(\text{O}) \text{O} (\text{CH}_2)_r \text{CH}(\text{R}^8) (\text{R}^9)$ 。

24. 权利要求14-23中的任一项所述的可电离脂质, 其中 q 是1至6之间的整数。

25. 权利要求14-23中的任一项所述的可电离脂质, 其中 q 是3、4、5或6。

26. 权利要求14-25中的任一项所述的可电离脂质, 其中 r 是0。

27. 权利要求14-25中的任一项所述的可电离脂质, 其中 r 是1至6之间的整数。

28. 权利要求14-25中的任一项所述的可电离脂质, 其中 r 是1。

29. 权利要求14-25中的任一项所述的可电离脂质, 其中 r 是2。

30. 权利要求14-29中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R^8 是H。

31. 权利要求14-29中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R^8 是 R^{10} 。

32. 权利要求31所述的可电离脂质, 其中 R^9 和 R^{10} 各自独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基。

33. 权利要求32所述的可电离脂质, 其中 R^9 和 R^{10} 各自独立地是未被取代的直链 C_4 - C_8 烷基。

基。

34. 权利要求33所述的可电离脂质, 其中 R^9 和 R^{10} 各自独立地是未被取代的直链 C_6 - C_8 烷基。

35. 权利要求1-9中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_1 和 R_2 各自是 $-(CH_2)_m-L-R'$, 其中:
m是0至10的整数;

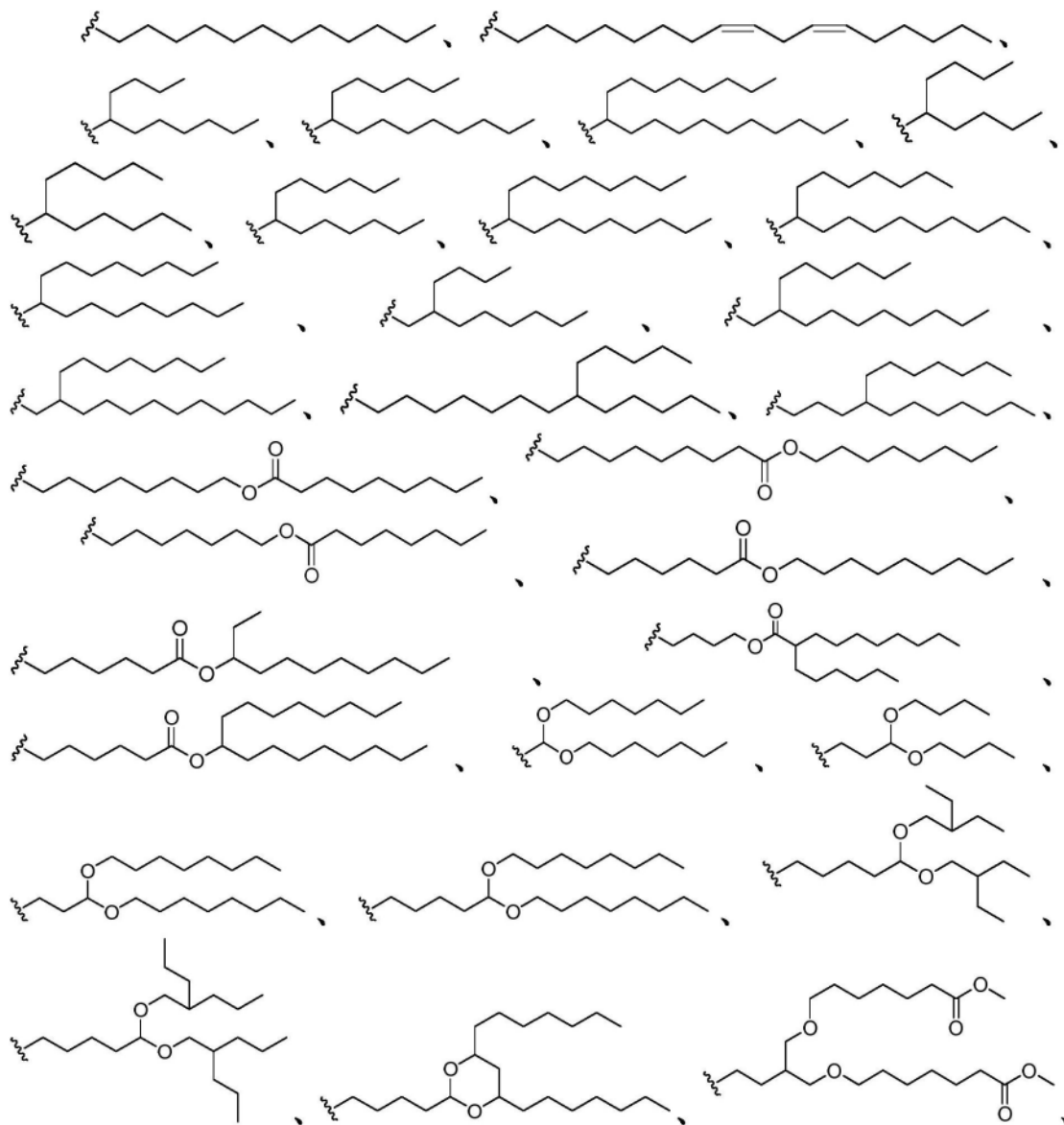
L不存在, 或者是 $-C(H)(R^L)-*$ 、 $-OC(O)-*$ 或 $-C(O)O-*$, 其中“ $-*$ ”指示与 R' 的连接点;

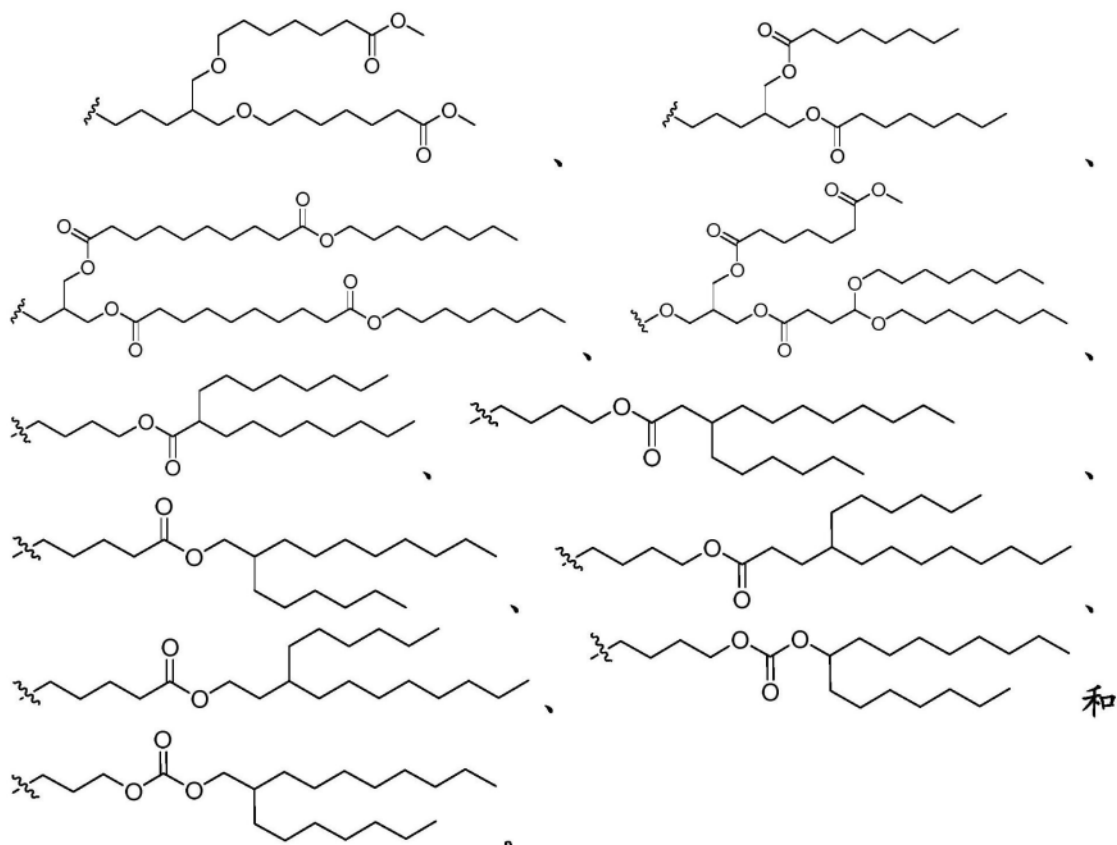
R' 选自: C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基、 C_1 - C_{30} 烷氧基、2-30元亚杂烷基和3-12元杂环基, 其中2-30元亚杂烷基任选地被一个或多个 R'' 取代, 且3-12元杂环基任选地被一个或多个 C_1 - C_{30} 烷基取代;

R^L 选自: C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基、 C_1 - C_{30} 烷氧基、2-30元亚杂烷基, 其中3-12元亚杂烷基任选地被一个或多个 R'' 取代,

R'' 各自独立地选自: 氧代、 C_1 - C_{30} 烷氧基、 $-C(O)-C_1-C_{30}$ 烷基、 $-C(O)-C_1-C_{30}$ 烷氧基和 $-C(O)-C_1-C_{30}$ 亚烷基- $C(O)-C_1-C_{30}$ 烷氧基。

36. 权利要求1-14和35中的任一项所述的可电离脂质, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地选自:

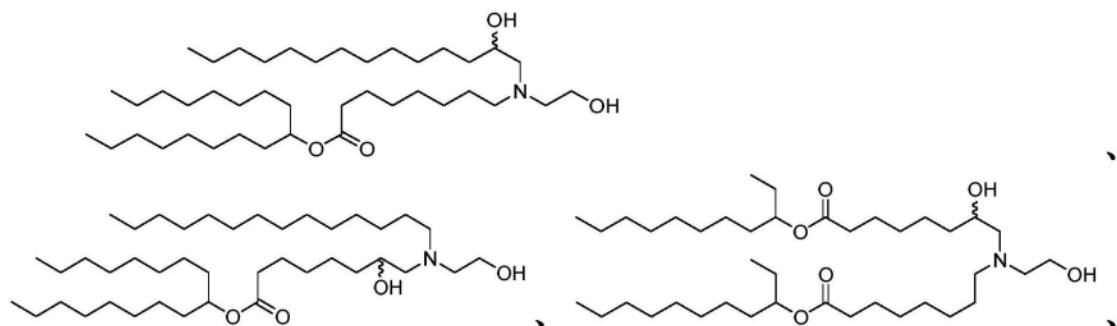


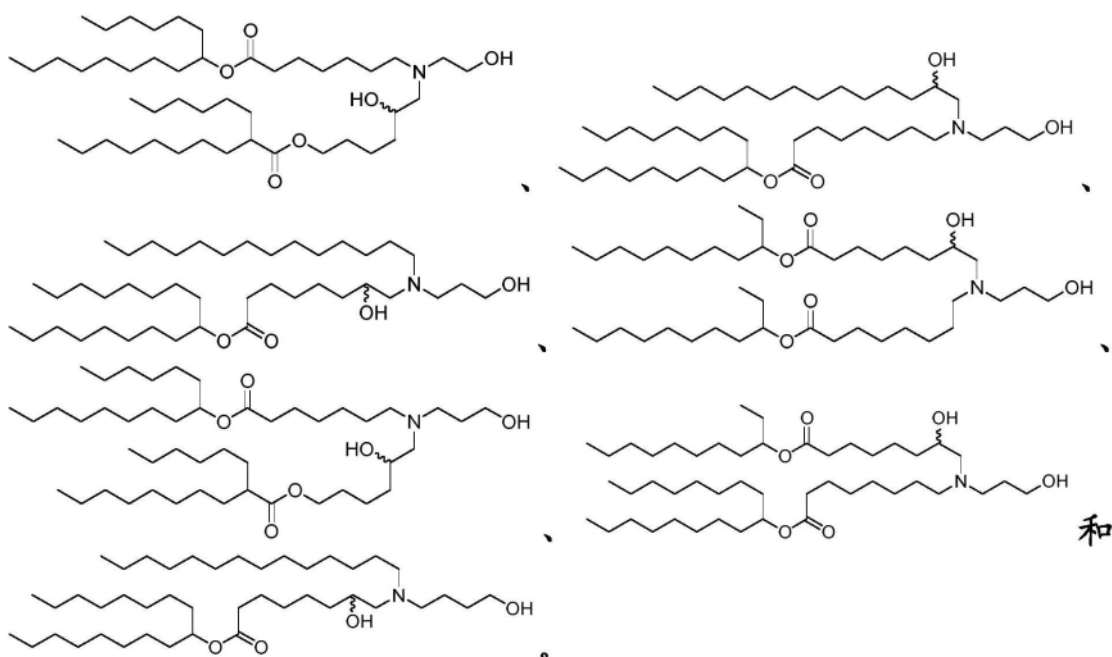


37. 权利要求1-14和35-36中的任一项所述的可电离脂质,其中 R_1 和 R_2 是相同的。

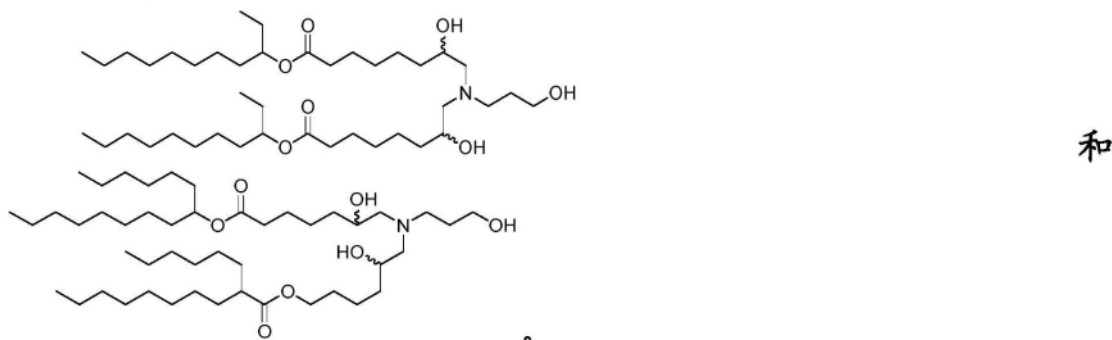
38. 权利要求1-14和35-36中的任一项所述的可电离脂质,其中 R_1 和 R_2 是不同的。

39. 权利要求1-38中的任一项所述的可电离脂质,其中所述可电离脂质选自:





40. 权利要求1-38中的任一项所述的可电离脂质,其中所述可电离脂质选自:



41. 权利要求1-38中的任一项所述的可电离脂质,其中所述可电离脂质选自表10e。

42. 一种包含转移媒介物的药物组合物,其中所述转移媒介物包含权利要求1-41中的任一项所述的可电离脂质。

43. 权利要求42所述的药物组合物,其中所述药物组合物进一步包含RNA多核苷酸。

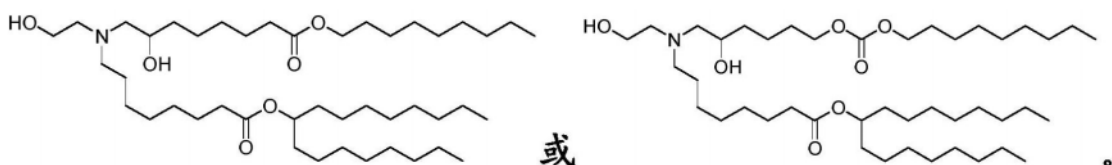
44. 权利要求44所述的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸是直链或环状RNA多核苷酸。

45. 权利要求43或44所述的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸。

46. 一种药物组合物,其包含:

c. RNA多核苷酸,其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸,和

d. 转移媒介物,其包含选自以下的可电离脂质:



47. 权利要求42-46中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含纳米颗粒,诸如脂质纳米颗粒、芯-壳纳米颗粒、可生物降解的纳米颗粒、可生物降解的脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒或可生物降解的聚合物纳米颗粒。

48. 权利要求43-47中的任一项所述的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸被包封在所述转移媒介物中,任选地其中所述包封效率是至少约80%。

49. 权利要求43-48中的任一项所述的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸包含表达序列。

50. 权利要求49所述的药物组合物,其中所述第一表达序列编码治疗性蛋白。

51. 权利要求50所述的药物组合物,其中所述第一表达序列编码细胞因子或其功能片段、转录因子、免疫检查点抑制剂或嵌合抗原受体(CAR)。

52. 权利要求43-51中的任一项所述的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸按以下顺序包含:

a. 5' 增强的外显子元件,

b. 核心功能元件,和

c. 3' 增强的外显子元件。

53. 权利要求52所述的药物组合物,其中所述核心功能元件包含翻译起始元件(TIE)。

54. 权利要求53所述的药物组合物,其中所述TIE包含非翻译区(UTR)或其片段。

55. 权利要求54所述的药物组合物,其中所述UTR或其片段包含IRES或真核IRES。

56. 权利要求53-55中的任一项所述的药物组合物,其中所述TIE包含适体复合物,任选地其中所述适体复合物包含至少两个适体。

57. 权利要求52-56中的任一项所述的药物组合物,其中所述核心功能元件包含编码区。

58. 权利要求57所述的药物组合物,其中所述编码区编码治疗性蛋白。

59. 权利要求58所述的药物组合物,其中所述治疗性蛋白是嵌合抗原受体(CAR)。

60. 权利要求52-59中的任一项所述的药物组合物,其中所述核心功能元件包含非编码区。

61. 权利要求52-60中的任一项所述的药物组合物,其中所述3' 增强的外显子元件包含5' 外显子片段,和任选的3' 内部间隔区和/或3' 内部双链体元件,其中所述3' 内部间隔区和/或3' 内部双链体元件各自独立地位于5' 外显子片段上游,任选地其中所述3' 内部间隔区是约10至约60个核苷酸长度的聚腺苷酸或聚腺苷酸-胞苷酸序列。

62. 权利要求52-61中的任一项所述的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸通过RNA多核苷酸的环化制成,所述RNA多核苷酸按以下顺序包含:

a. 5' 增强的内含子元件,

b. 5' 增强的外显子元件,

c. 核心功能元件,

d. 3' 增强的外显子元件,和

e. 3' 增强的内含子元件。

63. 权利要求62所述的药物组合物,其中所述5' 增强的内含子元件包含:

3' 内含子片段,其包含3' I组内含子剪接位点二核苷酸的第一核苷酸或第一和第二核苷酸;和任选的

位于3' 内含子片段上游的5' 亲和标签,

位于3' 内含子片段上游的5' 外部间隔区,和/或

位于所述5' 增强的内含子元件的5' 末端处的先导非翻译序列。

64. 权利要求43-63中的任一项所述的药物组合物, 其中所述RNA多核苷酸是约100个核苷酸至约10,000个核苷酸的长度, 诸如约100个核苷酸至约15,000个核苷酸的长度。

65. 权利要求43-64中的任一项所述的药物组合物, 其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸, 且其中所述组合物在人细胞中或在人体内的治疗效果持续时间大于或等于参考组合物的治疗效果持续时间,

其中所述参考包含 (1) 具有与环状RNA多核苷酸相同的表达序列的参考线性RNA多核苷酸来代替环状RNA多核苷酸; 和/或 (2) 不是权利要求1-41中的任一项所述的可电离脂质的可电离脂质。

66. 权利要求65所述的药物组合物, 其中所述药物组合物具有至少约10、至少约20、至少约30、至少约40、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约90或至少约100小时的在人体内的治疗效果持续时间。

67. 权利要求43-66中的任一项所述的药物组合物, 其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸, 且其中所述组合物在人细胞中或在人体内具有的功能半衰期大于或等于预定阈值的功能半衰期。

68. 权利要求67所述的药物组合物, 其中所述组合物具有至少约20小时的功能半衰期。

69. 权利要求42-68中的任一项所述的药物组合物, 其中所述转移媒介物进一步包含结构脂质和PEG修饰的脂质。

70. 权利要求69中的任一项所述的药物组合物, 其中所述结构脂质结合C1q和/或与缺乏所述结构脂质的对照转移媒介物相比促进包含所述脂质的转移媒介物与C1q的结合和/或与缺乏所述结构脂质的对照转移媒介物相比增加C1q-结合的转移媒介物向免疫细胞中的摄取。

71. 权利要求70所述的药物组合物, 其中所述免疫细胞是T细胞、NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。

72. 权利要求69-71中的任一项所述的药物组合物, 其中所述结构脂质是胆固醇。

73. 权利要求72所述的药物组合物, 其中所述结构脂质是 β -谷甾醇。

74. 权利要求72所述的药物组合物, 其中所述结构脂质不是 β -谷甾醇。

75. 权利要求69-74中的任一项所述的药物组合物, 其中所述PEG修饰的脂质是DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基氨基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DMG或PEG-1。

76. 权利要求75所述的药物组合物, 其中所述PEG修饰的脂质是DSPE-PEG (2000)。

77. 权利要求42-76中的任一项所述的药物组合物, 其中所述转移媒介物进一步包含辅助脂质。

78. 权利要求77所述的药物组合物, 其中所述辅助脂质是DSPC或DOPE。

79. 权利要求42-78中的任一项所述的药物组合物, 其中所述转移媒介物包含DSPC、胆固醇和DMG-PEG (2000)。

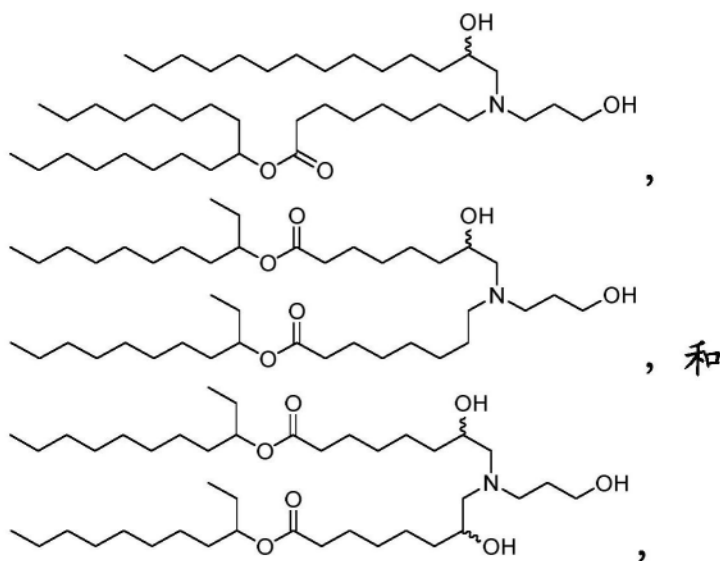
80. 权利要求69-79中的任一项所述的药物组合物, 其中所述转移媒介物包含按摩尔比计约0.5%至约4%PEG修饰的脂质。

81. 权利要求69-80中的任一项所述的药物组合物, 其中所述转移媒介物包含按摩尔比

计约1%至约2%PEG修饰的脂质。

82. 权利要求42-81中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含:

e. 可电离脂质,其选自:



或其混合物,

f. 选自DOPE或DSPC的辅助脂质,

g. 胆固醇,和

h. 选自DSPE-PEG (2000) 或DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质。

83. 权利要求77-82中的任一项所述的药物组合物,其中可电离脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

84. 权利要求77-83中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

85. 权利要求84所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DSPE-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DSPE-PEG (2000) 的摩尔比是约62:4:33:1。

86. 权利要求84所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DSPE-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DSPE-PEG (2000) 的摩尔比是约53:5:41:1。

87. 权利要求77-82中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

88. 权利要求87所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是约50:10:38.5:1.5。

89. 权利要求87所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是约41:

12:45:2。

90. 权利要求87所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000)的PEG-脂质,且其中可电离脂质: DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000)的摩尔比是约45:9:44:2。

91. 权利要求77-82中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DSPE-PEG (2000)的PEG-脂质,且其中可电离脂质: DSPC:胆固醇:DSPE-PEG (2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

92. 权利要求77-82中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质且所述PEG-脂质是C14-PEG (2000),且其中可电离脂质: DOPE:胆固醇: C14-PEG (2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

93. 权利要求77-82中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DMG-PEG (2000)的PEG-脂质,其中可电离脂质: DOPE:胆固醇:DMG-PEG (2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

94. 权利要求43-93中的任一项所述的药物组合物,所述药物组合物具有约3至约9的脂质:磷酸酯 (IL:P) 摩尔比,诸如约3、约4、约4.5、约5、约5.5、约5.7、约6、约6.2、约6.5或约7。

95. 权利要求43-94中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物被配制用于所述RNA多核苷酸的内体释放。

96. 权利要求42-95中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物能够结合载脂蛋白E (APOE) 或基本上不具有APOE结合位点。

97. 权利要求42-96中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物能够实现向细胞中的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 依赖性摄取或LDLR非依赖性摄取。

98. 权利要求42-97中的任一项所述的药物组合物,其中所述转移媒介物具有小于约120nm的直径和/或不会形成具有超过300nm的直径的聚集体。

99. 权利要求45-98中的任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物基本上不具有线性RNA。

100. 权利要求42-99中的任一项所述的药物组合物,所述药物组合物进一步包含可操作地连接至所述转移媒介物的靶向部分。

101. 权利要求100所述的药物组合物,其中所述靶向部分特异性地或间接地结合免疫细胞抗原,其中所述免疫细胞抗原是选自CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、 β 7整联蛋白、 β 2整联蛋白和C1qR的T细胞抗原。

102. 权利要求101所述的药物组合物,所述药物组合物进一步包含含有转移媒介物结合部分和细胞结合部分的衔接分子,其中所述靶向部分特异性地结合所述转移媒介物结合部分,并且所述细胞结合部分特异性地结合靶细胞抗原,

任选地其中所述靶细胞抗原是选自T细胞抗原、NK细胞抗原、NKT细胞抗原、巨噬细胞抗原或嗜中性粒细胞抗原的免疫细胞抗原。

103. 权利要求100-102中的任一项所述的药物组合物,其中所述靶向部分是小分子(例如,甘露糖、凝集素、阿西维辛、生物素或地高辛配基),和/或所述靶向部分是单链Fv (scFv) 片段、纳米抗体、肽、基于肽的大环、微体 (minibody)、小分子配体诸如叶酸盐、精氨酸基甘

氨酰天冬氨酸 (RGD) 或酚溶性调控蛋白 α 1肽 (PSMA1)、重链可变区、轻链可变区或其片段。

104. 权利要求43-103中的任一项所述的药物组合物,其中所述组合物中小于1重量%的多核苷酸是双链RNA、DNA夹板或三磷酸化的RNA。

105. 权利要求43-104中的任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物中小于1重量%的多核苷酸和蛋白是双链RNA、DNA夹板、三磷酸化的RNA、磷酸酶蛋白、蛋白连接酶和加帽酶。

106. 一种治疗或预防疾病、障碍或病症的方法,所述方法包括施用有效量的权利要求42-105中的任一项所述的药物组合物。

107. 一种治疗有此需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求42-105中的任一项所述的药物组合物。

用于递送环状多核苷酸的脂质纳米颗粒组合物

发明领域

[0001] 本发明总体上涉及新型脂质,其可以与其它脂质组分,诸如辅助脂质、结构脂质和胆固醇组合使用以形成用于在体外和在体内递送治疗剂诸如核酸(例如,环状多核苷酸)的脂质纳米颗粒。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2021年11月8日提交的美国临时申请第63/277,055号的权益和优先权,其内容出于所有目的在此通过引用整体并入。

[0004] 发明背景

[0005] 在过去的几十年里,核酸治疗学已经迅速发展并已经成为治疗多种疾病的基础。可用的核酸疗法包括但不限于使用用于将期望遗传信息插入宿主细胞中的DNA或病毒载体和/或被构建成编码治疗性蛋白的RNA。DNA和病毒载体递送有其自身的缺点和挑战,使得它们不太适合RNA疗法。例如,在某些情况下,引入的DNA可能在无意中插入完整的基因中并产生突变,所述突变阻碍甚至完全消除内源基因的功能,从而导致必需酶的消除或有害地减少的产生或对调节细胞生长至关重要的基因的中断。基于病毒载体的疗法可以导致不利的免疫应答。与DNA或病毒载体相比,RNA是一种实质上更安全的且更有效的基因治疗剂,因为它能够编码细胞核外的蛋白并发挥其功能。这样,RNA就不会涉及稳定整合到转染细胞的基因组中的风险。

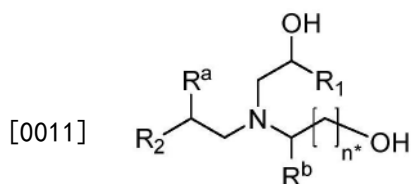
[0006] RNA疗法常规地由工程改造线性信使RNA (mRNA) 组成。尽管比DNA或病毒载体更有效,但线性mRNA在稳定性、免疫原性、翻译效率和递送方面也面临着其自身的一系列挑战。由于线性mRNA帽存在挑战,这些挑战中的一些可能导致尺寸限制和/或线性mRNA的破坏。为了克服这些限制,可以使用环状多核苷酸或环状RNA。由于共价闭合的连续环,环状RNA可用于设计和产生RNA的稳定形式。RNA分子的环化为研究RNA结构和功能提供了便利,尤其是对于容易折叠成无活性构象的分子(Wang和Ruffner, 1998)。环状RNA对于体内应用也可以特别有趣和有用,特别是在基于RNA的基因表达的控制和治疗(包括蛋白替代疗法和疫苗接种)的研究领域中。

[0007] 为了进一步促进RNA多核苷酸的有效递送,可以使用纳米颗粒递送系统。本文公开的发明提供了一种使用经工程改造的多核苷酸和脂质纳米颗粒组合物(包含新型脂质)的强效治疗方法。

[0008] 概述

[0009] 本申请提供了可电离脂质和有关的转移媒介物、组合物和方法。所述转移媒介物可以包含可电离脂质(例如,本文公开的可电离脂质)、PEG修饰的脂质和/或结构脂质,从而形成包封治疗剂(例如,RNA多核苷酸诸如环状RNA)的脂质纳米颗粒。包含这样的环状RNA和转移媒介物的药物组合物特别适合于在体内免疫细胞中有效表达蛋白。本申请还提供了前体RNA和可用于产生前体或环状RNA的材料,其具有提高的环化效率和/或与有效的环状RNA纯化方法兼容。

[0010] 在一个方面,本文提供了由式(13*)表示的可电离脂质:



式(13*)

[0012] 或其药学上可接受的盐,其中:

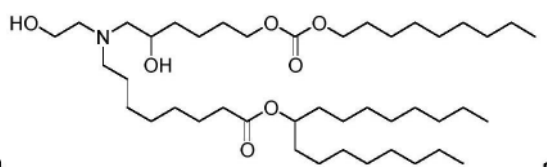
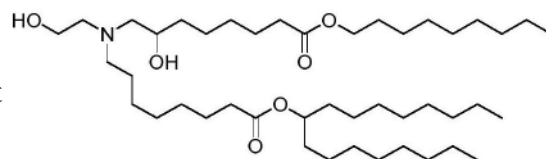
[0013] n^* 是1至7之间的整数;

[0014] R^a 是氢或羟基;

[0015] R^b 是氢或 C_1-C_6 烷基;

[0016] R_1 和 R_2 各自独立地是直链或支链 C_1-C_{30} 烷基、 C_2-C_{30} 烯基或 C_1-C_{30} 杂烷基,其任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自氧代、卤素、羟基、氰基、烷基、烯基、醛、杂环基烷基、羟基烷基、二羟基烷基、羟基烷基氨基烷基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、(杂环基)(烷基)氨基烷基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、炔基、烷氧基、氨基、二烷基氨基、氨基烷基羰基氨基、氨基羰基烷基氨基、(氨基羰基烷基)(烷基)氨基、烯基羰基氨基、羟基羰基、烷氧基羰基、烷基羰基氧基、烷基碳酸酯、烯基氧基羰基、烯基羰基氧基、烯基碳酸酯、炔基氧基羰基、炔基羰基氧基、炔基碳酸酯、氨基羰基、氨基烷基氨基羰基、烷基氨基烷基氨基羰基、二烷基氨基烷基氨基羰基、杂环基烷基氨基羰基、(烷基氨基烷基)(烷基)氨基羰基、烷基氨基烷基羰基、二烷基氨基烷基羰基、杂环基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亚砷、烷基亚砷烷基、烷基磺酰基和烷基砷烷基;

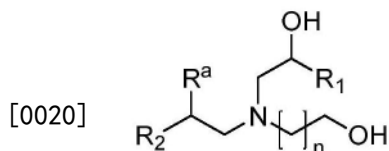
[0017] 前提条件是,所述可电离脂质不是



或

[0018] 在某些实施方案中, R^b 是 C_1-C_6 烷基。

[0019] 在某些实施方案中, R^b 是H且所述可电离脂质由式(13)表示:

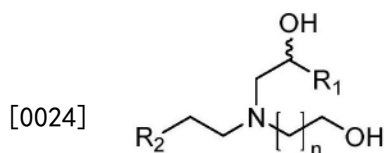


式(13)

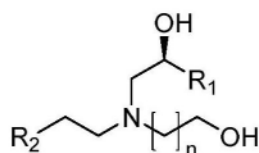
[0021] 其中 n 是1至7之间的整数。

[0022] 在某些实施方案中, n 是1、2、3或4。

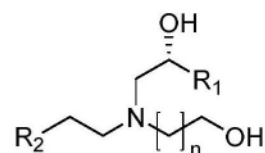
[0023] 在某些实施方案中, R_a 是氢。在某些实施方案中,所述可电离脂质由式(13a-1)、式(13a-2)或式(13a-3)表示:



式(13a-1)

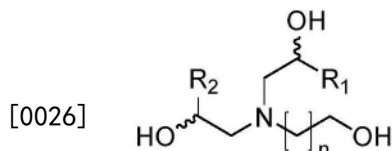


式(13a-2)

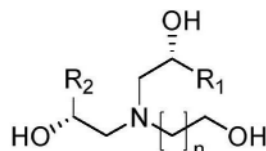


式(13a-3)

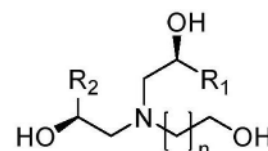
[0025] 在某些实施方案中, R_a 是羟基。在某些实施方案中, 所述可电离脂质由式 (13b-1)、式 (13b-2) 或式 (13b-3) 表示:



式(13b-1)

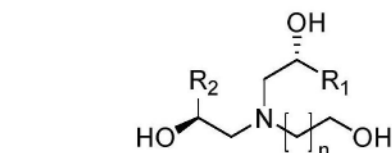


式(13b-2)

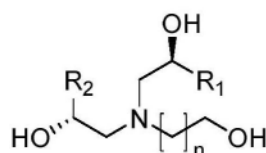


式(13b-3)

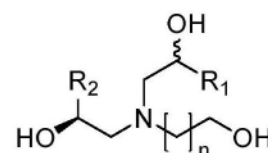
[0027] 在某些实施方案中, 所述可电离脂质由式 (13b-4)、式 (13b-5)、式 (13b-6)、式 (13b-7)、式 (13b-8) 或式 (13b-9) 表示:



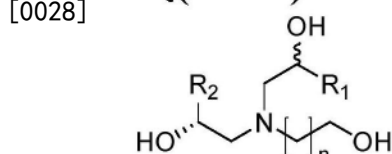
式(13b-4)



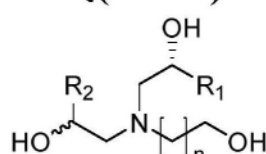
式(13b-5)



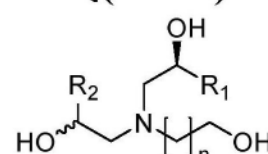
式(13b-6)



式(13b-7)



式(13b-8)



式(13b-9)

[0029] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基或 C_1 - C_{20} 杂烷基, 其任选地被一个或多个取代基取代, 所述取代基选自 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_1 - C_{20} 烷氧基羰基、 C_1 - C_{20} 烷基羰基氧基、 C_1 - C_{20} 烷基碳酸酯、 C_2 - C_{20} 烯基氧基羰基、 C_2 - C_{20} 烯基羰基氧基、 C_2 - C_{20} 烯基碳酸酯、 C_2 - C_{20} 炔基氧基羰基、 C_2 - C_{20} 炔基羰基氧基和 C_2 - C_{20} 炔基碳酸酯。

[0030] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是未被取代的直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基、 C_6 - C_{30} 烯基或 C_6 - C_{30} 杂烷基。在某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是被 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 或 $-OC(O)OR^6$ 取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基, 其中每个 R^6 独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基或 C_2 - C_{20} 烯基。在某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地是被 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 或 $-OC(O)OR^6$ 取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基, 其中每个 R^6 独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基或 C_2 - C_{20} 烯基。

[0031] 在某些实施方案中, 所述 R_1 和 R_2 中的至少一个选自:

[0032] $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 、 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 和 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 其中:

[0033] q 是 0 至 12 之间的整数,

[0034] r 是 0 至 6 之间的整数,

[0035] R^8 是 H 或 R^{10} , 且

[0036] R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2 - C_{12} -烯基。

[0037] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地选自:

[0038] $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 、 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 和 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,

[0039] 其中:

[0040] q 是0至12之间的整数,

[0041] r 是0至6之间的整数,

[0042] R^8 是H或 R^{10} ,且

[0043] R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2 - C_{12} -烯基。

[0044] 在某些实施方案中, R_1 是未被取代的直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 。在某些实施方案中,其中 R_2 是未被取代的直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基。在某些实施方案中, R_2 是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 。在某些实施方案中, R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 。在某些实施方案中, R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 。

[0045] 在某些实施方案中, q 是1至6之间的整数。在某些实施方案中, q 是3、4、5或6。在某些实施方案中, r 是0。在某些实施方案中, r 是1至6之间的整数。在某些实施方案中, r 是1。在某些实施方案中, r 是2。

[0046] 在某些实施方案中, R^8 是H。在某些实施方案中, R^8 是 R^{10} 。

[0047] 在某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 各自独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基。在某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 各自独立地是未被取代的直链 C_4 - C_8 烷基。在某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 各自独立地是未被取代的直链 C_6 - C_8 烷基。

[0048] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自是 $-(CH_2)_m-L-R'$,其中:

[0049] m 是0至10的整数;

[0050] L 不存在,或者是 $-C(H)(R^L)-*$ 、 $-OC(O)-*$ 或 $-C(O)O-*$,其中“ $-*$ ”指示与 R' 的连接点;

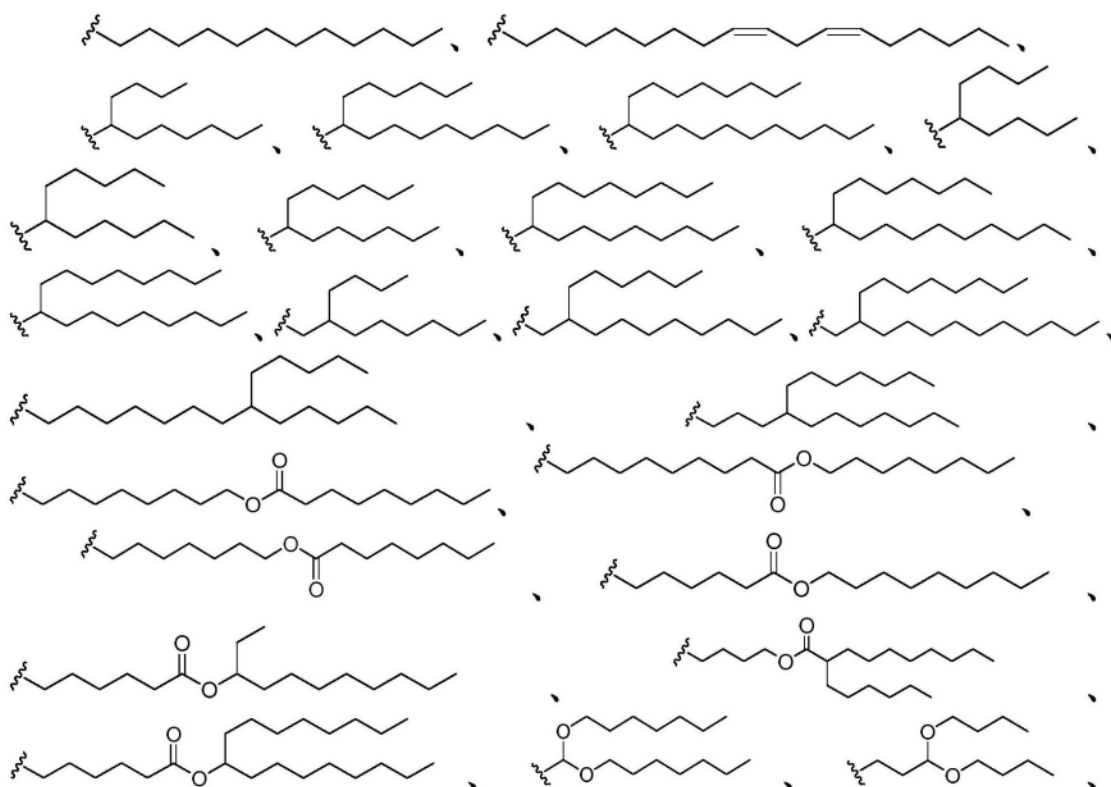
[0051] R' 选自: C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基、 C_1 - C_{30} 烷氧基、2-30元亚杂烷基和3-12元杂环基,其中2-30元亚杂烷基任选地被一个或多个 R'' 取代,且3-12元杂环基任选地被一个或多个 C_1 - C_{30} 烷基取代;

[0052] R^L 选自: C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基、 C_1 - C_{30} 烷氧基、2-30元亚杂烷基,其中3-12元亚杂烷基任选地被一个或多个 R'' 取代,

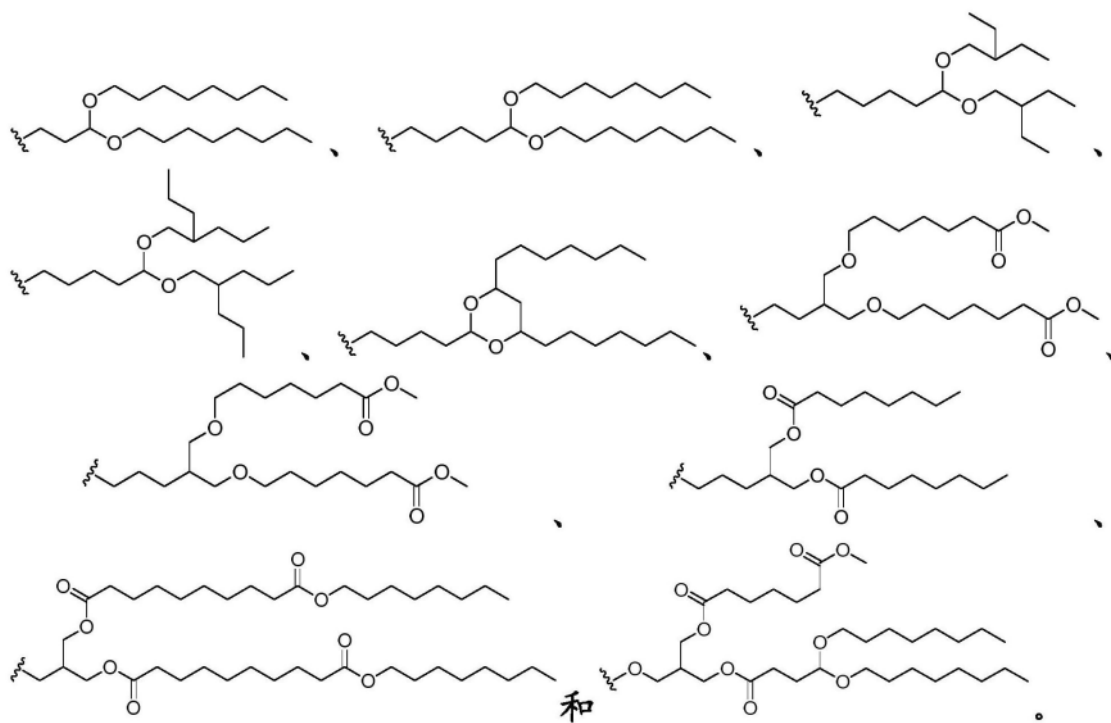
[0053] R'' 各自独立地选自:氧代、 C_1 - C_{30} 烷氧基、 $-C(O)-C_1$ - C_{30} 烷基、 $-C(O)-C_1$ - C_{30} 烷氧基和 $-C(O)-C_1$ - C_{30} 亚烷基- $C(O)-C_1$ - C_{30} 烷氧基。

[0054] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地选自:

[0055]



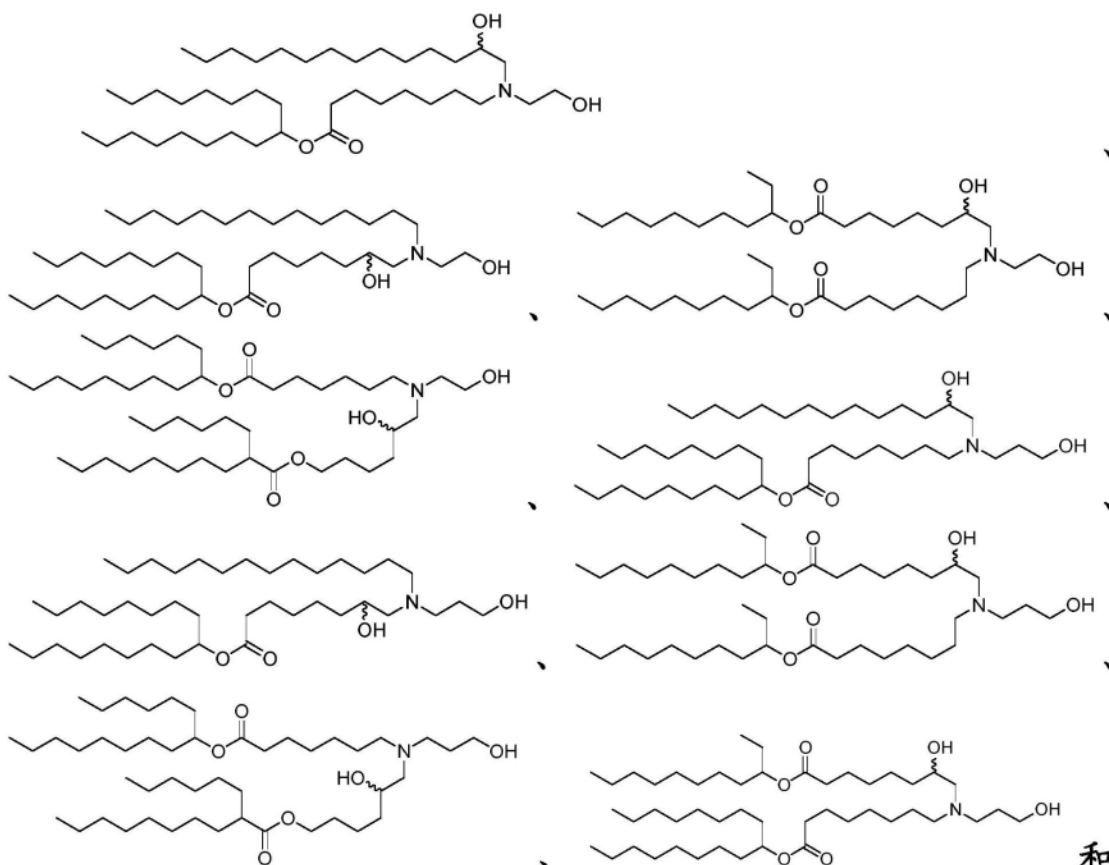
[0056]



[0057] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 是相同的。在某些实施方案中, R_1 和 R_2 是不同的。

[0058] 在某些实施方案中, 所述可电离脂质选自:

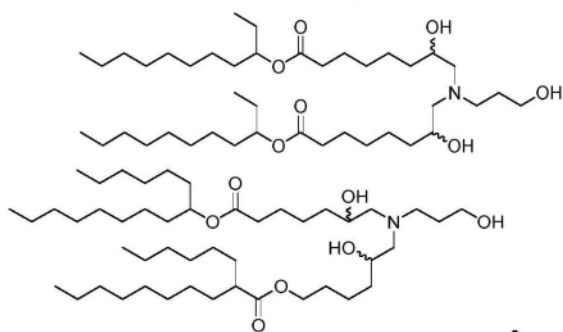
[0059]



[0060]

[0061] 在某些实施方案中,所述可电离脂质选自:

[0062]



[0063] 在某些实施方案中,所述可电离脂质选自表10e。

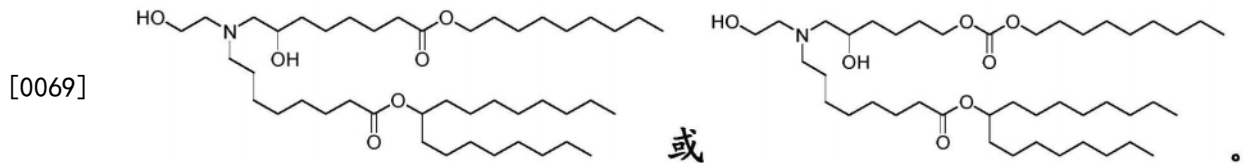
[0064] 在另一个方面,本公开内容提供了一种包含转移媒介物的药物组合物,其中所述转移媒介物包含上面描述的可电离脂质。

[0065] 在某些实施方案中,所述药物组合物进一步包含RNA多核苷酸。在某些实施方案中,所述RNA多核苷酸是直链或环状RNA多核苷酸。在某些实施方案中,所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸。

[0066] 在另一个方面,本公开内容提供了一种药物组合物,其包含:

[0067] a. RNA多核苷酸,其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸,和

[0068] b. 转移媒介物,其包含选自以下的可电离脂质:



[0070] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含纳米颗粒,诸如脂质纳米颗粒、芯-壳纳米颗粒、可生物降解的纳米颗粒、可生物降解的脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒或可生物降解的聚合物纳米颗粒。

[0071] 在某些实施方案中,所述RNA多核苷酸被包封在所述转移媒介物中。在某些实施方案中,所述RNA多核苷酸以至少80%的包封效率被包封在所述转移媒介物中。

[0072] 在某些实施方案中,所述环状RNA多核苷酸包含第一表达序列。在某些实施方案中,所述第一表达序列编码治疗性蛋白。在某些实施方案中,所述第一表达序列编码细胞因子或其功能片段。在其它实施方案中,所述第一表达序列编码转录因子。在其它实施方案中,所述第一表达序列编码免疫检查点抑制剂。在其它实施方案中,所述第一表达序列编码嵌合抗原受体(CAR)。

[0073] 在某些实施方案中,所述环状RNA多核苷酸按以下顺序包含:(a) 5' 增强的外显子元件,(b) 核心功能元件,和(c) 3' 增强的外显子元件。在某些实施方案中,所述核心功能元件包含翻译起始元件(TIE)。在某些实施方案中,所述TIE包含非翻译区(UTR)或其片段。在某些实施方案中,所述UTR或其片段包含IRES或真核IRES。在某些实施方案中,所述TIE包含适体复合物,任选地其中所述适体复合物包含至少两种适体。

[0074] 在某些实施方案中,所述核心功能元件包含编码区。在某些实施方案中,所述编码区编码治疗性蛋白。在某些实施方案中,所述治疗性蛋白是嵌合抗原受体(CAR)。

[0075] 在某些实施方案中,所述核心功能元件包含非编码区。

[0076] 在某些实施方案中,在本文公开的药物组合物中包含的RNA多核苷酸是约100个核苷酸(nt)至约10,000个核苷酸的长度。在某些实施方案中,所述RNA多核苷酸是约100个核苷酸至约15,000个核苷酸的长度。

[0077] 在某些实施方案中,在本文公开的药物组合物中的转移媒介物进一步包含结构脂质和PEG修饰的脂质。

[0078] 在某些实施方案中,所述结构脂质结合C1q和/或与缺乏所述结构脂质的对照转移媒介物相比促进包含所述脂质的转移媒介物与C1q的结合和/或与缺乏所述结构脂质的对照转移媒介物相比增加C1q-结合的转移媒介物向免疫细胞中的摄取。在某些实施方案中,其中所述免疫细胞是T细胞、NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。在某些实施方案中,所述结构脂质是胆固醇。在某些实施方案中,所述结构脂质是 β -谷甾醇。在某些实施方案中,所述结构脂质不是 β -谷甾醇。

[0079] 在某些实施方案中,所述PEG修饰的脂质是DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基氨基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DMG或PEG-1。在某些实施方案中,所述PEG修饰的脂质是DSPE-PEG(2000)。

[0080] 在某些实施方案中,所述转移媒介物进一步包含辅助脂质。在某些实施方案中,所述辅助脂质是DSPC或DOPE。

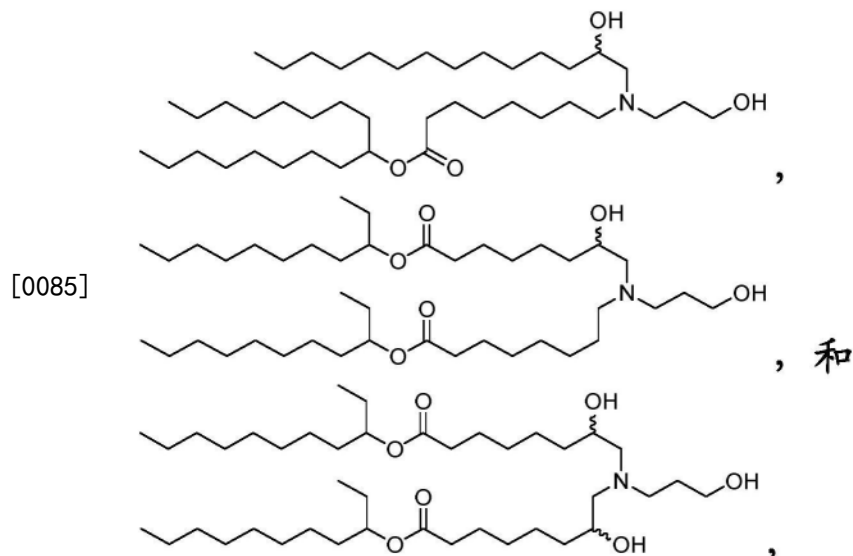
[0081] 在某些实施方案中,在本文公开的药物组合物中包含的转移媒介物包含DSPC、胆

固醇和DMG-PEG(2000)。

[0082] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含按摩尔比计约0.5%至约4%PEG修饰的脂质。在某些实施方案中,所述转移媒介物包含按摩尔比计约1%至约2%PEG修饰的脂质。

[0083] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含:

[0084] a. 可电离脂质,其选自:



[0086] 或其混合物,

[0087] b. 选自DOPE或DSPC的辅助脂质,

[0088] c. 胆固醇,和

[0089] d. 选自DSPE-PEG(2000)或DMG-PEG(2000)的PEG-脂质。

[0090] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含可电离脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG-脂质,其中可电离脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。在某些实施方案中,所述可电离脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG-脂质中的每种的摩尔比是在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%或0.01%内。

[0091] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DMG-PEG(2000)的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DMG-PEG(2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。在某些实施方案中,可电离脂质:DOPE:胆固醇:DSPE-PEG(2000)的摩尔比是约62:4:33:1。在某些实施方案中,可电离脂质:DOPE:胆固醇:DSPE-PEG(2000)的摩尔比是约53:5:41:1。

[0092] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG(2000)的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG(2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。在某些实施方案中,可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG(2000)的摩尔比是约50:10:38.5:1.5。在某些实施方案中,可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG(2000)的摩尔比是约41:12:45:2。在某些实施方案中,可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG(2000)的摩尔比是约45:9:44:2。

[0093] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DSPE-PEG(2000)的

PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DSPE-PEG (2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

[0094] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质且所述PEG-脂质是C14-PEG (2000),且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:C14-PEG (2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

[0095] 在某些实施方案中,所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DMG-PEG (2000)的PEG-脂质,其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DMG-PEG (2000)的摩尔比是约45:9:44:2、约50:10:38.5:1.5、约41:12:45:2、约62:4:33:1或约53:5:41:1。

[0096] 在某些实施方案中,本公开内容的药物组合物具有约3至约9的脂质:磷酸酯(IL:P)摩尔比,诸如约3、约4、约4.5、约5、约5.5、约5.7、约6、约6.2、约6.5或约7。

[0097] 在某些实施方案中,所述转移媒介物被配制用于内体释放RNA多核苷酸。在某些实施方案中,所述转移媒介物能够结合载脂蛋白E (APOE) 或基本上不具有APOE结合位点。在某些实施方案中,所述转移媒介物能够实现向细胞中的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 依赖性摄取或LDLR非依赖性摄取。

[0098] 在某些实施方案中,所述转移媒介物具有小于约120nm的直径和/或不会形成具有超过300nm的直径的聚集体。

[0099] 在某些实施方案中,本公开内容的药物组合物基本上不具有线性RNA。

[0100] 在某些实施方案中,进一步包含可操作地连接至所述转移媒介物的靶向部分。在某些实施方案中,所述靶向部分特异性地或间接地结合免疫细胞抗原,其中所述免疫细胞抗原是选自CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、 β 7整联蛋白、 β 2整联蛋白和C1qR的T细胞抗原。

[0101] 在某些实施方案中,所述靶向部分是小分子。在某些实施方案中,所述小分子是甘露糖、凝集素、阿西维辛、生物素或地高辛配基。在某些实施方案中,所述小分子结合免疫细胞上的胞外酶,其中所述胞外酶选自CD38、CD73、腺苷2a受体和腺苷2b受体。在某些实施方案中,所述靶向部分是单链Fv (scFv) 片段、纳米抗体、肽、基于肽的大环、微体 (minibody)、小分子配体诸如叶酸盐、精氨酸基甘氨酸天冬氨酸 (RGD) 或酚溶性调控蛋白 α 1肽 (PSMA1)、重链可变区、轻链可变区或其片段。

[0102] 在某些实施方案中,本公开内容的药物组合物具有小于1重量%的多核苷酸,且所述组合物中的多核苷酸是双链RNA、DNA夹板或三磷酸化的RNA。在某些实施方案中,所述药物组合物具有小于1重量%的多核苷酸,且所述药物组合物中的蛋白是双链RNA、DNA夹板、三磷酸化的RNA、磷酸酶蛋白、蛋白连接酶或加帽酶。

[0103] 在另一个方面,本文提供了一种治疗或预防疾病、障碍或病症的方法,所述方法包括施用有效量的上面和本文描述的药物组合物。

[0104] 在另一个方面,本文提供了一种治疗有此需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效量的上面和本文描述的药物组合物。

[0105] 附图简述

[0106] 图1A-1E描绘了在用包含高斯萤光素酶表达序列和各种IRES序列的环状RNA转染以后24小时,HEK293、HepG2 (图1B) 或1C1C7 (图1C) 细胞的上清液中的发光。

[0107] 图2A-2C描绘了在用包含高斯萤光素酶表达序列和具有不同长度的各种IRES序列的环状RNA转染以后24小时,HEK293 (图2A)、HepG2 (图2B) 或1C1C7 (图2C) 细胞的上清液中的

发光。

[0108] 图3A和图3B描绘了通过发光测量的3天内HepG2 (图3A) 或1C1C7 (图3B) 细胞中所选IRES构建体的稳定性。

[0109] 图4A和图4B描绘了Jurkat细胞中所选IRES构建体的蛋白表达,如通过细胞上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光来测量的。

[0110] 图5A和图5B描绘了通过发光测量的3天内Jurkat细胞中所选IRES构建体的稳定性。

[0111] 图6A和图6B描绘了编码高斯萤光素酶的修饰的线性的、未纯化的环状RNA或纯化的环状RNA的24小时发光 (图6A) 或3天相对发光 (图6B) 的对比。

[0112] 图7A-7F描绘了在用修饰的线性的、未纯化的环状或纯化的环状RNA电穿孔Jurkat细胞以后,IFN γ (图7A)、IL-6 (图7B)、IL-2 (图7C)、RIG-I (图7D)、IFN- β 1 (图7E) 和TNF α (图7F) 的转录物诱导。

[0113] 图8A-8C描绘了在人原代单核细胞 (图8A) 和巨噬细胞 (图8B和图8C) 中编码高斯萤光素酶的环状RNA和修饰的线性的RNA的发光的对比。

[0114] 图9A和图9B描绘了在用包含高斯萤光素酶表达序列和不同的IRES序列的环状RNA转导以后,在原代T细胞的上清液中的3天相对发光 (图9A) 或24小时发光 (图9B)。

[0115] 图10A-10C描绘了用包含高斯萤光素酶表达序列的环状RNA或修饰的线性的RNA转导以后在原代T细胞上清液中的24小时发光 (图10A),或3天相对发光 (图10B),以及在PBMC中的24小时发光 (图10C)。

[0116] 图11A和图11B描绘了具有不同置换位点的RNA构建体的HPLC色谱图 (图11A) 和环化效率 (图11B)。

[0117] 图12A和图12B描绘了具有不同内含子和/或置换位点的RNA构建体的HPLC色谱图 (图12A) 和环化效率 (图12B)。

[0118] 图13A和图13B描绘了具有或没有同源性臂的3种RNA构建体的HPLC色谱图 (图13A) 和环化效率 (图13B)。

[0119] 图14描绘了具有各种长度和GC含量的、没有同源性臂或具有同源性臂的3种RNA构建体的环化效率。

[0120] 图15A和15B描绘的HPLC色谱图显示了强同源性臂对提高的剪接效率的贡献、环化效率和所选构建体中的切口之间的关系、以及假定表现出提高的环化效率的置换位点和同源性臂的组合。

[0121] 图16显示了模拟电穿孔的 (左) 或用编码CAR的环状RNA电穿孔 (右) 并与表达GFP和萤火虫萤光素酶的Raji细胞共培养的T细胞的荧光图像。

[0122] 图17显示了模拟电穿孔的 (顶) 或用编码CAR的环状RNA电穿孔 (底) 并与表达GFP和萤火虫萤光素酶的Raji细胞共培养的T细胞的明视野 (左)、荧光 (中心) 和覆盖 (右) 图像。

[0123] 图18描绘了模拟电穿孔的或用编码不同CAR序列的环状RNA电穿孔的T细胞对Raji靶细胞的特异性裂解。

[0124] 图19A和图19B描绘了在用包含高斯萤光素酶表达序列和不同IRES序列的直链或环状RNA转导后24小时Jurkat细胞 (左) 或静息原代人CD3+T细胞 (右) 的上清液中的发光 (图19A) 和3天相对发光 (图19B)。

[0125] 图20A-20F描绘了在用修饰的线性的、未纯化的环状或纯化的环状RNA电穿孔人CD3+T细胞以后,IFN- β 1(图20A)、RIG-I(图20B)、IL-2(图20C)、IL-6(图20D)、IFN γ (图20E)和TNF α (图20F)的转录物诱导。

[0126] 图21A和图21B描绘了通过检测萤火虫发光确定的用编码CAR的circRNA电穿孔的人原代CD3+T细胞对Raji靶细胞的特异性裂解(图21A),以及用不同量的编码CAR序列的环状或线性RNA电穿孔以后24小时的IFN γ 转录物诱导(图21B)。

[0127] 图22A和图22B描绘了通过检测萤火虫发光确定的以不同E:T比率用编码CAR的环状或线性RNA电穿孔的人原代CD3+T细胞对靶细胞或非靶细胞的特异性裂解。

[0128] 图23描绘了在电穿孔后1、3、5和7天用编码CAR的RNA电穿孔的人CD3+T细胞对靶细胞的特异性裂解。

[0129] 图24描绘了用编码CD19或BCMA靶向CAR的环状RNA电穿孔的人CD3+T细胞对靶细胞的特异性裂解。

[0130] 图25显示了在与含有编码GFP或CD19 CAR的环状RNA的试验脂质纳米颗粒一起温育后,在人PBMC中GFP(图25A)和CD19CAR(图25B)的表达。

[0131] 图26描绘了用包含抗-鼠CD19 CAR表达序列和不同IRES序列的环状RNA脂转染的1C1C7细胞中抗-鼠CD19 CAR的表达。

[0132] 图27显示了抗-鼠CD19 CAR对鼠T细胞的细胞毒性。CD19 CAR由环状RNA编码和表达,其通过电穿孔进入鼠T细胞中。

[0133] 图28A和图28B对比了由环状RNA表达的抗-人CD19 CAR的表达水平与由线性mRNA表达的抗-人CD19 CAR的表达水平。

[0134] 图29A和图29B对比了由环状RNA表达的抗-人CD19 CAR的细胞毒性效应与由线性mRNA表达的抗-人CD19 CAR的细胞毒性效应。

[0135] 图30描绘了由单个环状RNA表达的两个CAR(抗-人CD19 CAR和抗-人BCMACAR)在T细胞中的细胞毒性。

[0136] 图31A描绘了在内含子中具有嵌入聚腺苷酸(聚A)序列的示例性RNA构建体设计。图31B显示了未纯化的环状RNA的色谱图迹线。图31C显示了亲和力纯化的环状RNA的色谱图迹线。图46D显示了使用不同的IVT条件和纯化方法制备的环状RNA的免疫原性。(市售=市售IVT混合物;定制=定制的IVT混合物;Aff=亲和纯化;Enz=酶纯化;GMP:GTP比率=8、12.5或13.75)。

[0137] 图32A描绘了具有专用结合序列的示例性RNA构建体设计,作为聚腺苷酸的替代品,用于杂交纯化。图32B显示了未纯化的环状RNA的色谱图迹线。图32C显示了亲和力纯化的环状RNA的色谱图迹线。

[0138] 图33A显示了编码肌养蛋白的未纯化的环状RNA的色谱图迹线。图33B显示了编码肌养蛋白的酶纯化的环状RNA的色谱图迹线。

[0139] 图34A和图34B对比了在3'内含子片段/5'内部双链体区域和IRES之间具有不同5'间隔区的纯化circRNA在Jurkat细胞中的表达(图34A)和稳定性(图34B)。(AC=在间隔区序列中仅使用A和C;UC=在间隔区序列中仅使用U和C。)

[0140] 图35显示了含有指示的原始的或修饰的IRES元件的环状RNA在原始T细胞中的发光表达水平和表达稳定性。

[0141] 图36显示了含有指示的原始的或修饰的IRES元件的环状RNA在HepG2细胞中的发光表达水平和表达稳定性。

[0142] 图37显示了含有指示的原始的或修饰的IRES元件的环状RNA在1C1C7细胞中的发光表达水平和表达稳定性。

[0143] 图38显示了含有插入的非翻译区(UTR)的IRES元件或混合IRES元件的环状RNA在HepG2细胞中的发光表达水平和表达稳定性。“Scr”是指混杂的(Scrambled),其用作对照。

[0144] 图39显示了含有IRES和可变终止密码子盒的环状RNA在1C1C7细胞中的发光表达水平和表达稳定性,其中所述环状RNA可操作地连接至高斯萤光素酶编码序列。

[0145] 图40显示了含有IRES和插入在高斯萤光素酶编码序列的起始密码子之前的可变非翻译区(UTR)的环状RNA在1C1C7细胞中的发光表达水平和表达稳定性。

[0146] 图41显示了来自含有位于hEPO编码序列下游的两个miR-122靶位点的环状RNA在Huh7细胞中表达人促红细胞生成素(hEPO)的水平。

[0147] 图42A和图42B显示了当用表达抗-CD19 CAR的包封环状RNA的LNP处理时外周血(图42A)和脾(图42B)中的CAR表达水平。使用抗-CD20(aCD20)和编码萤光素酶的环状RNA(oLuc)进行对比。

[0148] 图43A-43C显示了抗-CD19 CAR表达的总频率、抗-CD19 CAR在细胞表面上表达的频率以及编码抗-CD19 CAR的IRES特异性环状RNA在T细胞上抗肿瘤应答的影响。图43A显示了抗-CD19 CAR几何平均荧光强度,图43B显示了抗-CD19 CAR表达的百分比,且图43C显示了用抗-CD19 CAR进行的靶细胞裂解百分比。(CK=山羊嶺病毒;AP=姬鼠小核糖核酸病毒;CK*=密码子优化的山羊嶺病毒;PV=副牛病毒;SV=Salivirus)。

[0149] 图44显示了当用IRES特异性环状RNA构建体处理时A20 FLuc靶细胞的CAR表达水平。

[0150] 图45A和图45B显示了原代人T细胞中环状RNA的细胞溶质蛋白(图45A)和表面蛋白(图45B)的发光表达水平。

[0151] 图46A-46F显示了当用IRES特异性环状构建体处理时在人T细胞中的发光表达。将环状RNA构建体的表达与线性mRNA进行对比。图46A、图46B和图46G提供了多个供体细胞中的高斯萤光素酶表达。图46C、图46D、图46E和图46F提供了多个供体细胞中的萤火虫萤光素酶表达。

[0152] 图47A和图47B显示了在用包含环状RNA的脂质纳米颗粒处理后人T细胞中的抗-CD19 CAR和抗-BCMACAR(图47B)表达,所述环状RNA编码表达萤火虫萤光素酶的K562细胞的抗-CD19或抗-BCMACAR。

[0153] 图48A和图48B显示了通过体外电穿孔递送以特定抗原依赖性方式编码抗-CD19 CAR的环状RNA所导致的抗-CD19 CAR表达水平。图48A显示了用抗-CD19 CAR裂解Nalm6细胞。图48B显示了用抗-CD19 CAR裂解K562细胞。

[0154] 图49A-49E显示了在含有LNP和表达绿色荧光蛋白(GFP)的环状RNA的溶液中使用ApoE3介导的LNP转染。图49A显示了活-死结果。图49B、图49C、图49D和图49E提供了多个供体的表达频率。

[0155] 图50A-50C显示了编码稳定化的(双脯氨酸突变体)SARS-CoV2刺突蛋白的RNA分子的环化效率。图50A显示了约4.5kb SARS-CoV2刺突编码circRNA的体外转录产物。图50B显

示了在将刺突编码circRNA转染进293细胞中以后通过流式细胞计量术测量的刺突蛋白表面表达的直方图。转染的293细胞在转染后24小时用CR3022一级抗体和APC-标记的二级抗体进行染色。图50C显示了转染刺突编码circRNA以后在293细胞上的刺突蛋白表面表达的流式细胞计量术图。转染的293细胞在转染后24小时用CR3022一级抗体和APC-标记的二级抗体进行染色。

[0156] 图51A和图51B提供了多种受控的辅助策略。在图中指出的circRNA是使用GTP为指示分子在体外进行的未纯化的有义环状RNA剪接反应。3p-circRNA包括(entails)纯化的有义环状RNA以及混合的含有三磷酸化5'末端的纯化的反义环状RNA。图51A显示了野生型和MAVS敲除的A549细胞中的体外IFN- β 诱导,且图51B显示了使用所示策略生成的配制的circRNA的体内细胞因子应答。

[0157] 图52A-52C显示了含有环状RNA构建体的LNP的肌肉内递送。图52A提供了6小时后的活体全身通量,且图52B提供了在1 μ g剂量的LNP-环状RNA构建体后6小时的全身IVIS。图52C提供了在24小时阶段内的离体表达分布。

[0158] 图53A和图53B显示了来自单个脂质制剂的多个环状RNA的表达。图53A提供了来自含有环状RNA构建体的单一和混合组LNP的hEPO滴度,而图53B提供了来自含有环状RNA构建体的单一或混合组LNP的生物发光表达的总通量。

[0159] 图54A-54C显示了编码刺突SARS-CoV2蛋白的环状RNA的SARS-CoV2刺突蛋白表达。图54A显示了刺突CoV2表达的频率;图54B显示了刺突CoV2表达的几何平均荧光强度(gMFI);且图54C将构建体的gMFI表达与表达频率进行了对比。

[0160] 图55描绘了线性RNA多核苷酸前体的一般序列构建体(10)。所提供的序列以5'到3'的顺序示出了5'增强的内含子元件(20)、5'增强的外显子元件(30)、核心功能元件(40)、3'增强的外显子元件(50)和3'增强的内含子元件(60)。

[0161] 图56描绘了5'增强的外显子元件(20)的各种示例性迭代。如图所示,5'增强的外显子元件(20)的一种迭代按5'到3'的顺序包含以下序列:先导非翻译序列(21)、5'亲和标签(22)、5'外部双链体区域(24)、5'外部间隔区(26)和3'内含子片段(28)。

[0162] 图57描绘了5'增强的外显子元件(30)的各种示例性迭代。如图所示,5'增强的外显子元件(30)的一种迭代按5'到3'的顺序包含:3'外显子片段(32)、5'内部双链体区域(34)和5'内部间隔区(36)。

[0163] 图58描绘了核心功能元件(40)的各种示例性迭代。如图所示,核心功能元件(40)的一种迭代包含TIE(42)、编码区(46)和终止区(例如,终止密码子或终止盒)(48)。另一种迭代显示了包含非编码区(47)的核心功能元件(47)。

[0164] 图59描绘了3'增强的外显子元件(50)的各种示例性迭代。如图所示,3'增强的外显子元件(50)的迭代之一按以下5'到3'的顺序包含:3'内部间隔区(52)、3'内部双链体区域(54)和5'外显子片段(56)。

[0165] 图60描绘了3'增强的内含子元件(60)的各种示例性迭代。如图所示,3'增强的内含子元件(60)的迭代之一按以下顺序包含:5'内含子片段(62)、3'外部间隔区(64)、3'外部双链体区域(66)、3'亲和标签(68)和末端非翻译序列(69)。

[0166] 图61描绘了翻译起始元件(TIE)(42)的各种示例性迭代。如一种迭代所示的TIE(42)序列仅仅是IRES(43)。在另一种迭代中,TIE(42)是适体(44)。在两种不同的迭代中,

TIE(42)是适体(44)和IRES(43)组合。在另一种迭代中,TIE(42)是适体复合物(45)。

[0167] 图62显示了示例性线性RNA多核苷酸前体(10),其按以下5'到3'的顺序包含:先导非翻译序列(21)、5'亲和标签(22)、5'外部双链体区域(24)、5'外部间隔区(26)、3'内含子片段(28)、3'外显子片段(32)、5'内部双链体区域(34)、5'内部间隔区(36)、TIE(42)、编码元件(46)、终止区(48)、3'内部间隔区(52)、3'内部双链体区域(54)、5'外显子片段(56)、5'内含子片段(62)、3'外部间隔区(64)、3'外部双链体区域(66)、3'亲和标签(68)和末端非翻译序列(69)。

[0168] 图63显示了示例性线性RNA多核苷酸前体(10),其按以下5'到3'的顺序包含:先导非翻译序列(21)、5'亲和标签(22)、5'外部双链体区域(24)、5'外部间隔区(26)、3'内含子片段(28)、3'外显子片段(32)、5'内部双链体区域(34)、5'内部间隔区(36)、编码元件(46)、终止区(48)、TIE(42)、3'内部间隔区(52)、3'内部双链体区域(54)、5'外显子片段(56)、5'内含子片段(62)、3'外部间隔区(64)、3'外部双链体区域(66)、3'亲和标签(68)和末端非翻译序列(69)。

[0169] 图64显示了示例性线性RNA多核苷酸前体(10),其按以下5'到3'的顺序包含:先导非翻译序列(21)、5'亲和标签(22)、5'外部双链体区域(24)、5'外部间隔区(26)、3'内含子片段(28)、3'外显子片段(32)、5'内部双链体区域(34)、5'内部间隔区(36)、非编码元件(47)、3'内部间隔区(52)、3'内部双链体区域(54)、5'外显子片段(56)、5'内含子片段(62)、3'外部间隔区(64)、3'外部双链体区域(66)、3'亲和标签(68)和末端非翻译序列(69)。

[0170] 图65显示了剪接后形成的一般环状RNA(8)结构。如图所示的环状RNA包括5'外显子元件(30)、核心功能元件(40)和3'外显子元件(50)。

[0171] 图66A-66E显示了辅助元件(70)(例如,miRNA结合位点)可以被包含在线性RNA多核苷酸中的各种方式。图66A显示了在间隔区包含辅助元件(70)的线性RNA多核苷酸。图66B显示了包含位于每个外部双链体区域和外显子片段之间的辅助元件(70)的线性RNA多核苷酸。图66C描绘了在间隔区内的辅助元件(70)。图66D显示了位于核心功能元件内的辅助元件(70)的各种迭代。图66E显示了位于内核糖体进入位点(IRES)内的辅助元件(70)。

[0172] 图67A-67C显示了在体外以不同剂量在原代人(图67A)、小鼠(图67B)和食蟹猴(图67C)肝细胞中筛选用编码萤火虫萤光素酶且具有TIE的环状RNA配制的LNP。

[0173] 图68A-68C显示了在体外用不同剂量的三种不同供体在原代人肝细胞中筛选用编码萤火虫萤光素酶且具有TIE的环状RNA配制的LNP。

[0174] 图69显示了在HeLa、HEK293和HUH7人细胞模型中,用编码GFP且具有TIE的环状RNA配制的LNP的体外表达。

[0175] 图70显示了在原代人肝细胞中,用编码GFP蛋白且具有TIE的环状RNA配制的LNP的体外表达。

[0176] 图71A和图71B显示了在小鼠成肌细胞(图71A)和原代人肌肉成肌细胞(图71B)细胞中,编码萤火虫萤光素酶且具有TIE的环状RNA的体外表达。

[0177] 图72A和图72B显示了编码萤火虫萤光素酶且具有TIE的环状RNA在成肌细胞和分化的原代人骨骼肌肌管中的体外表达。图72A提供了从人供体1接收的细胞的相关数据;图72B提供了从人供体2接收的细胞的相关数据。

[0178] 图73A和图73B显示了不同大小的环状RNA的无细胞体外翻译。在图73A中,试验了

编码萤火虫萤光素酶的环状RNA和编码萤火虫萤光素酶的线性mRNA的表达。在图73B中,给人和小鼠细胞提供编码ATP7B蛋白的环状RNA。试验的某些环状RNA经过了密码子优化。使用表达萤火虫萤光素酶的环状RNA进行对比。

[0179] 图74显示了在小鼠脾脏中的mOX40L表达,其来自包含表10e的脂质1 (10e-1) 或表10f的脂质15 (10f-15) 的LNP,脂质:磷酸酯比率(IL:P) 为5.7 (5.7A参数制剂),包封编码mOX40L的环状RNA。

[0180] 图75显示了使用LNP或阴性对照(PBS) 递送的萤火虫萤光素酶的环状RNA表达,所述LNP用包含不同数目的 β -羟基基团的可电离脂质配制。使用的可电离脂质从左到右包含:表10e、脂质85 (10e-85);表10e、脂质89 (10e-89);表10f、脂质22 (10f-22);表10e、脂质86 (10e-86);和表10e、脂质90 (10e-90)。

[0181] 图76显示了在静脉内施用后,使用表10e中的可电离脂质(从左至右:脂质1、85、38、34、45、86、88、89、90) 配制的LNP递送的萤火虫萤光素酶在脾脏中的oRNA表达。测量了脾脏中的总萤光素酶通量。

[0182] 图77显示了使用包含表10e的可电离脂质(从左至右:脂质1、脂质85、脂质38、脂质34、脂质45、脂质86、脂质88、脂质89、脂质90) 的LNP递送的编码mOX40L的环状RNA在静脉内施用后的脾T细胞表达。

[0183] 图78显示了当在小鼠中用包封的编码CD-19嵌合抗原受体(CAR) 蛋白的环状RNA治疗时在小鼠体内的B细胞耗竭。通过包含表10e的可电离脂质(1、16、85、45、86或90) 的LNP来递送环状RNA。在图78中,在血细胞中观察到B细胞发育不良。图上的虚线指示Wasabi对照B细胞发育不良。B细胞%被归一化为Wasabi对照。

[0184] 图79显示了在Na1m6模型中施用表10e中的LNP-oRNA构建体、脂质16、45或86后的肿瘤生长动力学。测量了受试小鼠的总通量。

[0185] 详细描述

[0186] 本发明尤其提供了可电离脂质和有关的转移媒介物、组合物和方法。在某些实施方案中,所述转移媒介物包含可电离脂质(例如,本文公开的可电离脂质)、PEG修饰的脂质和/或结构脂质,从而形成适合用于递送核酸的脂质纳米颗粒。在某些实施方案中,所述核酸可以是RNA,诸如siRNA、mRNA或环状RNA。所述核酸可以编码治疗剂。在某些实施方案中,所述核酸被包封在转移媒介物中。

[0187] 本文还公开了RNA疗法、以及有关的组合物和方法。在某些实施方案中,所述RNA疗法尤其允许实现增加的RNA稳定性、表达和延长的半衰期。

[0188] 本文还公开了用于制备环状RNA的DNA模板(例如,载体)。在某些实施方案中,所述DNA模板包含3' 增强的内含子片段、3' 增强的外显子片段、核心功能元件、5' 增强的外显子片段和5' 增强的内含子片段。在某些实施方案中,这些元件按照上述顺序位于DNA模板中。

[0189] 另外的实施方案包括环状RNA多核苷酸,包括使用本文提供的DNA模板制备的环状RNA多核苷酸(例如,包含3' 增强的外显子元件、核心功能元件和5' 增强的外显子元件的环状RNA),包含这样的环状RNA的组合物,包含这样的环状RNA的细胞,使用和制备这样的DNA模板、环状RNA、组合物和细胞的方法。

[0190] 在某些实施方案中,本文提供了包括将本文提供的环状RNA多核苷酸施用到细胞中以进行治疗或产生有用蛋白的方法。在某些实施方案中,所述方法有利于在真核细胞内

产生具有比线性RNA更长的半衰期的期望多肽,这是由于环状RNA对核糖核酸酶的抗性。

[0191] 环状RNA多核苷酸缺乏外切核酸酶介导的降解期望的游离端,从而使它们能够抵抗多种RNA降解机制,并且与等同线性RNA相比具有更长的半衰期。环化可以允许稳定化通常具有短半衰期的RNA多核苷酸,并可以在多种应用中提高外源mRNA的整体效力。在一个实施方案中,通过蛋白合成评估的本文提供的环状RNA多核苷酸在真核细胞(例如,哺乳动物细胞,诸如人细胞)中的功能半衰期是至少20小时(例如,至少80小时)。

[0192] 在以下章节中详细描述了本发明的各个方面。章节的使用并不意味着限制本发明。每个章节可以适用于本发明的任何方面。在本申请中,“或”的使用是指“和/或”,除非另外说明。

[0193] 1. 定义

[0194] 本文中使用的术语“circRNA”或“环状多核糖核苷酸”或“环状RNA”或“oRNA”互换使用并表示通过共价键形成环状结构的多核糖核苷酸。

[0195] 本文中使用的术语“DNA模板”表示能够转录线性RNA多核苷酸的DNA序列。例如,但不旨在限制,DNA模板可以包括DNA载体、PCR产物或质粒。

[0196] 本文中使用的术语“3' I组内含子片段”表示与天然I组内含子(包括剪接位点二核苷酸)的3'-近端具有75%或更高相似性的序列。

[0197] 本文中使用的术语“5' I组内含子片段”表示与天然I组内含子(包括剪接位点二核苷酸)的5'-近端具有75%或更高相似性的序列。

[0198] 本文中使用的术语“置换位点”表示在I组内含子中在内含子的置换之前进行切割的位点。该切割会产生3'和5' I组内含子片段,所述片段置换在要环化的前体RNA片段的任一侧上。

[0199] 本文中使用的术语“剪接位点”表示部分地或完全地被包含在I组内含子中的二核苷酸,并且在RNA环化过程中,该二核苷酸之间的磷酸二酯键被断裂。(本文中使用的“剪接位点”表示在剪接反应过程中其之间的磷酸二酯键发生断裂的一个或多个二核苷酸。“5' 剪接位点”表示内含子的天然5'二核苷酸,例如I组内含子,而“3' 剪接位点”表示内含子的天然3'二核苷酸)。

[0200] 本文中使用的术语“表达序列”表示编码产物(例如,肽或多肽、调节核酸或非编码核酸)的核酸序列。编码肽或多肽的一种示例性表达序列可以包含多个核苷酸三联体,其中每个可以编码一个氨基酸并被称为“密码子”。

[0201] 本文中使用的“编码元件”或“编码区”是位于表达序列内并编码一种或多种蛋白或多肽(例如,治疗性蛋白)的区域。

[0202] 本文中使用的“非编码元件”或“非编码核酸”是位于表达序列内的区域。但该序列本身并不编码蛋白或多肽,而是可能具有其它调节功能,包括但不限于允许整体多核苷酸充当特定细胞的生物标志物或辅助剂。

[0203] 本文中使用的术语“治疗性蛋白”表示当以翻译的核酸的形式直接地或间接地施用给受试者时,具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引发期望生物学和/或药理学作用的任何蛋白。

[0204] 本文中使用的术语“免疫原性的”表示诱导对物质的免疫应答的潜力。当生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞暴露于免疫原性物质时,可能诱导免疫应答。术语“非免疫

原性的”表示缺乏或不存在对某种物质超过可检测阈值的免疫应答。当生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞暴露于非免疫原性物质时,不会检测到免疫应答。在某些实施方案中,本文提供的非免疫原性的环状多核糖核苷酸在通过免疫原性测定测量时不会诱导高于预定阈值的免疫应答。在某些实施方案中,当生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞暴露于本文提供的非免疫原性的环状多核糖核苷酸时,不会检测到先天性免疫应答。在某些实施方案中,当生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞暴露于本文提供的非免疫原性的环状多核糖核苷酸时,不会检测到适应性免疫应答。

[0205] 本文中使用的术语“环化效率”表示所得环状多核糖核苷酸与其线性起始材料相比的测量值。

[0206] 本文中使用的术语“翻译效率”表示从核糖核苷酸转录物产生蛋白或肽的速率或量。在某些实施方案中,翻译效率可以表示为每给定量的编码蛋白或肽的转录物所产生的蛋白或肽的量。

[0207] 术语“核苷酸”表示核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、其修饰形式或其类似物。核苷酸包括嘌呤类物质,例如,腺嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤、及其衍生物和类似物,以及嘧啶类物质,例如,胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、及其衍生物和类似物。核苷酸类似物包括在碱基、糖和/或磷酸酯的化学结构中具有修饰的核苷酸,包括但不限于5'-位嘧啶修饰、8'-位嘌呤修饰、在胞嘧啶环外胺处的修饰和5-溴-尿嘧啶的取代;以及2'-位糖修饰,包括但不限于糖修饰的核糖核苷酸,其中2'-OH被诸如H、OR、R、卤素、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂或CN之类的基团替代,其中R是本文定义的烷基部分。核苷酸类似物也意在包括具有以下物质的核苷酸:碱基诸如肌苷、腺苷、黄嘌呤;糖诸如2'-甲基核糖;非天然的磷酸二酯键诸如甲基磷酸酯、硫代磷酸酯和肽键。核苷酸类似物包括5-甲氧基尿苷、1-甲基假尿苷和6-甲基腺苷。

[0208] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中互换地用于描述由核苷酸(例如,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)组成的任何长度的聚合物,例如,大于约2个碱基、大于约10个碱基、大于约100个碱基、大于约500个碱基、大于1000个碱基或高达约10,000个或更多个碱基,并且可以酶促地或合成地产生(例如,如美国专利号5,948,902和在其中引用的参考文献中所述),其可以以类似于两个天然存在的核酸的序列特异性方式与天然存在的核酸杂交,例如可以参与沃森-克里克碱基配对相互作用。天然存在的核酸由核苷酸构成,所述核苷酸包括鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶(分别为G、C、A、T和U)。

[0209] 本文中使用的术语“核糖核酸”和“RNA”是指由核糖核苷酸组成的聚合物。

[0210] 本文中使用的术语“脱氧核糖核酸”和“DNA”是指由脱氧核糖核苷酸组成的聚合物。

[0211] “分离的”或“纯化的”通常表示分离某种物质(例如,在某些实施方案中,化合物、多核苷酸、蛋白、多肽、多核苷酸组合物或多肽组合物),使得所述物质占其所在样品的相当大百分比(例如,大于1%、大于2%、大于5%、大于10%、大于20%、大于50%或更多,通常最高达约90%-100%)。在某些实施方案中,基本上纯化的组分占样品的至少50%、80%-85%或90%-95%。用于纯化目标多核苷酸和多肽的技术是本领域中众所周知的,并且包括例如离子交换色谱法、亲和色谱法和密度沉降法。通常,当某种物质在样品中的存在量相对于样品中其它组分而言超过其天然存在的含量时,该物质是经纯化的。

[0212] 本文中使用的术语“双链化的”、“双链的”或“杂交的”表示由两条含有互补序列的

核酸单链的杂交形成的核酸。在大多数情况下,基因组DNA是双链的。序列可以完全互补或部分互补。

[0213] 本文中使用的关于RNA的“非结构化”表示通过RNAfold软件或类似预测工具无法预测其会与其自身或同一RNA分子中的其它序列形成结构(例如,发夹环)的RNA序列。在某些实施方案中,可以使用核酸酶保护测定来对非结构化RNA进行功能表征。

[0214] 本文中使用的关于RNA的“结构化”表示通过RNAfold软件或类似预测工具预测将与其自身或同一RNA分子中的其它序列形成结构(例如,发夹环)的RNA序列。

[0215] 本文中使用的两个“双链体序列”、“双链体区”、“双链体区域”、“同源性臂”或“同源区域”可以是在序列特异性相互作用中在热力学上有利于交叉配对的任何两个区域。在某些实施方案中,两个双链体序列、双链体区域、同源性臂或同源区域与彼此的反向互补物具有足够水平的序列同一性,以充当杂交反应的底物。如本文中使用的,当多核苷酸序列与反向互补物或“互补”序列相同或具有序列同一性时,它们具有“同源性”。同源区域与对应同源区域的反向互补物之间的序列同一性百分比可以是允许发生杂交的任何序列同一性百分比。在某些实施方案中,本发明的多核苷酸的内部双链体区域能够与另一个内部双链体区域形成双链体,并且不会与外部双链体区域形成双链体。

[0216] 本文中使用的“亲和序列”或“亲和标签”是多核苷酸序列的区域,该多核苷酸序列的范围从1个核苷酸到数百个或数千个核苷酸,其含有一组重复的核苷酸,用于辅助纯化多核苷酸序列的目的。例如,亲和序列可以包含、但不限于聚腺苷酸或聚AC序列。

[0217] 本文中使用的“间隔区”表示多核苷酸序列中沿着多核苷酸序列分隔两个其它元件的区域,其范围从1个核苷酸到数百或数千个核苷酸。所述序列可以是限定的,或可以是随机的。间隔区通常是非编码的。在某些实施方案中,间隔区包括双链体区域。

[0218] 因为核酸磷酸二酯键发生在取代基单核苷酸的糖部分的5' 碳和3' 碳处,所以说线性核酸分子具有“5' -端”(5' 末端)和“3' -端”(3' 末端)。多核苷酸中与5' 碳形成新连接的末端核苷酸是其5' 末端核苷酸。多核苷酸中与3' 碳形成新连接的末端核苷酸是其3' 末端核苷酸。本文使用的末端核苷酸是位于3' -端或5' -端的末端位置处的核苷酸。

[0219] 本文中使用的“先导非翻译序列”是位于多核苷酸序列的最上5' 端处的1个核苷酸到数百个核苷酸范围内的多核苷酸序列区域。所述序列可以是限定的,或可以是随机的。一种先导非翻译序列是非编码的。

[0220] 本文中使用的“先导非翻译序列”是位于多核苷酸序列的最下3' 端处的1个核苷酸到数百个核苷酸范围内的多核苷酸序列区域。所述序列可以是限定的,或可以是随机的。一种先导非翻译序列是非编码的。

[0221] “转录”是指RNA聚合酶使用DNA分子作为模板形成或合成RNA分子。本发明关于用于转录的RNA聚合酶没有限制。例如,在某些实施方案中,可以使用T7-型RNA聚合酶。

[0222] “翻译”是指核糖体以RNA模板为基础形成多肽分子。

[0223] 应当理解,本文所用术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在限制。如在本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指示。因而,例如,对“一个细胞”的提及包括两个或更多个细胞的组合,或整个细胞培养物;对“一种多核苷酸”的提及实际上包括该多核苷酸的多个拷贝。除非特别说明或者从上下文显而易见,否则本文中使用的术语“或”理解为是包含性的。除非在

本文以及下文说明书的剩余部分中进行了定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0224] 除非特别说明或者从上下文显而易见,否则本文中使用的术语“约”应理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。“约”可以理解为在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%或0.01%以内。除非从上下文另外清楚,否则本文提供的所有数值均由术语“约”修饰。

[0225] 本文中使用的术语“编码”广义上表示利用聚合物大分子中的信息来指导产生不同于第一种分子的第二种分子的任何过程。所述第二种分子可能具有与第一种分子的化学性质不同的化学结构。

[0226] “共同施用”是指将本文提供的治疗剂与一种或多种另外的治疗剂在时间上足够接近地联合施用,使得本文提供的治疗剂可以增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。

[0227] 本文中使用的术语“治疗”和“预防”及其衍生词语并不一定暗示100%或完全的治疗或预防。相反,存在不同程度的治疗或预防,本领域的普通技术人员认为其具有潜在的益处或治疗效果。本文公开的方法所提供的治疗或预防可以包括治疗或预防疾病的一种或多种病症或症状。此外,就本文的目的而言,“预防”可以涵盖延迟疾病或其症状或病症的发生。

[0228] 本文中使用的“内核糖体进入位点”或“IRES”表示大小范围为从10个核苷酸到1000个核苷酸或更大的RNA序列或结构元件,其能够在不存在典型RNA帽结构的情况下启动多肽的翻译。IRES通常是约500个核苷酸至约700个核苷酸的长度。

[0229] 本文中使用的“适体”通常指单个确定序列的寡核苷酸或所述核苷酸的混合物,其中所述混合物保留与靶分子(例如,真核起始因子、40S核糖体、聚胞苷酸(聚C)结合蛋白、聚腺苷酸结合蛋白、聚嘧啶束-结合蛋白、Argonaute蛋白家族、异质核内核糖核蛋白K和La以及有关的RNA-结合蛋白)特异性地结合的性质。因而,本文中使用的“适体”表示单数和复数核苷酸序列,如上文所定义。术语“适体”意在表示能够结合蛋白或其它分子的单链或双链核酸。一般而言,适体优选包含约10至约100个核苷酸,优选约15至约40个核苷酸,更优选约20至约40个核苷酸,因为其长度落在这些范围内的寡核苷酸易于通过常规技术制备。任选地,适体可以进一步包含最少约6个核苷酸,优选10个,且更优选14或15个核苷酸,这些核苷酸是实现特异性结合所必需的。

[0230] “真核起始因子”或“eIF”表示用于组装启动真核翻译期望的起始tRNA、40S和60S核糖体亚基的蛋白或蛋白复合物。

[0231] 本文中使用的“内核糖体进入位点”或“IRES”表示大小范围为10个核苷酸到1000个核苷酸或更大的RNA序列或结构元件,其能够在不存在典型RNA帽结构的情况下启动多肽的翻译。IRES通常是约500个核苷酸至约700个核苷酸的长度。

[0232] 本文中使用的“miRNA位点”表示在多核苷酸内的一段核苷酸,其能够与天然miRNA序列的至少8个核苷酸形成双链体。

[0233] 本文中使用的“内切核酸酶位点”表示在多核苷酸内能够被内切核酸酶蛋白识别和切割的一段核苷酸。

[0234] 本文中使用的“双顺反子RNA”表示包含编码两种不同蛋白的两个表达序列的多核苷酸。这些表达序列可以被编码可切割肽(诸如蛋白酶切割位点)的核苷酸序列分开。它们也可以被核糖体跳跃元件分开。

[0235] 本文中使用的术语“核糖体跳跃元件”表示编码能够导致由一个RNA分子的翻译产生两条肽链的短肽序列的核苷酸序列。尽管不希望受理论约束,但据推测核糖体跳跃元件通过以下方式发挥作用:(1)终止第一条肽链的翻译并重新启动第二条肽链的翻译;或(2)通过编码的肽的内在蛋白酶活性或通过环境中的另一种蛋白酶(例如,胞质溶胶)来切割核糖体跳跃元件所编码的肽序列中的肽键。

[0236] 本文中使用的术语“共制剂”表示包含两种或更多种核酸或一种核酸和其它活性药物物质的纳米颗粒制剂。通常,所述比例是等摩尔的,或者以两种或更多种核酸或该核酸和其它活性药物物质的比例量来定义。

[0237] 本文中使用的“转移媒介物”包括标准药物载体、稀释剂、赋形剂等中的任一种,其通常用于与生物活性剂(包括核酸)的施用关联使用。

[0238] 本文中使用的短语“脂质纳米颗粒”表示包含一种或多种脂质(例如,在某些实施方案中,阳离子脂质、非阳离子脂质和PEG修饰的脂质)的转移媒介物。

[0239] 本文中使用的短语“可电离脂质”表示在选定的pH(诸如生理pH 4)下带有净正电荷并在其它pH(诸如生理pH 7)下带有中性电荷的多种脂质物质中的任一种。

[0240] 在某些实施方案中,本文公开的脂质(例如,可电离脂质)包含一个或多个可切割基团。术语“切割”和“可切割的”在本文中用于指,在主题官能团内的原子或相邻的原子之间的一个或多个化学键(例如,共价键、氢键、范德华力和/或离子相互作用中的一种或多种)发生断裂(例如,水解)或在暴露于选定条件后(例如,在暴露于酶促条件后)能够断裂。在某些实施方案中,所述可切割基团是二硫化物官能团,并且在特定实施方案中是在暴露于选定的生物条件(例如,细胞内条件)后能够被切割的二硫化物基团。在某些实施方案中,所述可切割基团是在暴露于选定的生物条件后能够被切割的酯官能团。例如,二硫化物基团可以酶促地或通过水解、氧化或还原反应来切割。在这样的二硫化物官能团断裂后,可以释放出与其结合的一个或多个官能部分或基团(例如,一个或多个头部基团和/或尾部基团)。示例性的可切割基团可以包括但不限于二硫化物基团、酯基团、醚基团及其任何衍生物(例如烷基酯和芳基酯)。在某些实施方案中,所述可切割基团不是酯基团或醚基团。在某些实施方案中,可切割基团与一个或多个官能部分或基团(例如,至少一个头部基团和至少一个尾部基团)结合(例如,通过氢键、范德华力、离子相互作用和共价键中的一种或多种结合)。在某些实施方案中,所述官能部分或基团中的至少一个是亲水的(例如,包含咪唑、胍盐、氨基、亚胺、烯胺、任选地被取代的烷基氨基和吡啶基中的一种或多种的亲水头部基团)。

[0241] 本文中使用的术语“亲水的”用于定性地表示官能团偏好水,并且通常这样的基团是水溶性的。例如,本文公开了包含与一个或多个亲水基团(例如,亲水头部基团)结合的可切割二硫化物(S—S)官能团的化合物,其中这样的亲水基团包含或选自咪唑、胍盐、氨基、亚胺、烯胺、任选地被取代的烷基氨基(例如,烷基氨基诸如二甲基氨基)和吡啶基。

[0242] 在某些实施方案中,构成本文公开的化合物的部分的官能团中的至少一个在性质上是疏水的(例如,包含天然存在的脂质诸如胆固醇的疏水尾部基团)。本文中使用的术语

“疏水的”用于定性地表示官能团是避水的,并且通常这样的基团不溶于水。例如,本文公开了包含与一个或多个疏水基团结合的可切割官能团(例如,二硫化物(S—S)基团)的化合物,其中这样的疏水基团包含一种或多种天然存在的脂质诸如胆固醇和/或任选地被取代的、不同饱和的或不饱和的C6-C20烷基和/或任选地被取代的、不同饱和的或不饱和的C6-C20酰基。

[0243] 本文描述的化合物还可以包含一个或多个同位素置换。例如,H可以是任何同位素形式,包括¹H、²H(D或氘)和³H(T或氚);C可以是任何同位素形式,包括¹²C、¹³C和¹⁴C;O可以是任何同位素形式,包括¹⁶O和¹⁸O;F可以是任何同位素形式,包括¹⁸F和¹⁹F;等。

[0244] 当描述本发明时,其可能包括化合物及其药学上可接受的盐、含有这样的化合物的药物组合物以及使用这样的化合物和组合物的方法,除非另外指出,否则下列术语(如果存在的话)具有下列含义。还应当理解,当在本文中描述时,下面定义的任何部分可以被多种取代基取代,并且相应的定义旨在包括如下所述的范围内的这样的取代部分。除非另外说明,否则术语“取代”将如下所述进行定义。应当进一步理解,术语“基团”和“残基”当在本文中使用时可以视为可互换的。

[0245] 当列出值的范围时,意图包括该范围内的每个值和子范围。例如,“C1-6烷基”意图涵盖C1、C2、C3、C4、C5、C6、C1-6、C1-5、C1-4、C1-3、C1-2、C2-6、C2-5、C2-4、C2-3、C3-6、C3-5、C3-4、C4-6、C4-5和C5-6烷基。

[0246] 在某些实施方案中,本文公开的化合物包含例如至少一个亲水头部基团和至少一个疏水尾部基团,每个基团与至少一个可切割基团结合,从而使这样的化合物具有两亲性。如本文用于描述化合物或组合物时,术语“两亲的”是指能够溶解在极性的(例如,水)和非极性的(例如,脂质)环境中。例如,在某些实施方案中,本文公开的化合物包含至少一个亲脂尾部基团(例如,胆固醇或C6-C20烷基)和至少一个亲水头部基团(例如,咪唑),每个基团与可切割基团(例如,二硫化物)结合。

[0247] 应当指出,用于描述本发明的化合物和特别是构成这样的化合物的官能团的术语“头部基团”和“尾部基团”为了易于提及被用于描述一个或多个官能团相对于其它官能团的方向。例如,在某些实施方案中,亲水头部基团(例如,胍盐)与可切割官能团(例如,二硫化物基团)结合(例如,通过氢键、范德华力、离子相互作用和共价键中的一种或多种),所述可切割官能团又与疏水尾部基团(例如,胆固醇)结合。

[0248] 本文中使用的术语“烷基”表示直链和支链C1-C40烃(例如,C6-C20烃),并且包括饱和的和不饱和的烃。在某些实施方案中,所述烷基可以包含一个或多个环烷基和/或一个或多个杂原子诸如氧、氮或硫,并且可以任选地被取代基(例如,烷基、卤素、烷氧基、羟基、氨基、芳基、醚、酯或酰胺中的一种或多种)取代。在某些实施方案中,考虑的烷基包括(9Z, 12Z)-十八碳-9,12-二烯。命名诸如例如“C6-C20”的使用意图表示具有所述范围碳原子的烷基(例如,直链或支链并且包括烯烃和烷基)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至10个碳原子(“C1-10烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至9个碳原子(“C1-9烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至8个碳原子(“C1-8烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至7个碳原子(“C1-7烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至6个碳原子(“C1-6烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至5个碳原子(“C1-5烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至4个碳原子(“C1-4烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至3个碳

原子(“C1-3烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1至2个碳原子(“C1-2烷基”)。在某些实施方案中,烷基基团具有1个碳原子(“C1烷基”)。C1-6烷基基团的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、己基等。

[0249] 本文中使用的“烯基”表示具有2至20个碳原子、一个或多个碳-碳双键(例如,1、2、3或4个碳-碳双键)以及任选的一个或多个碳-碳三键(例如,1、2、3或4个碳-碳三键)的直链或支链烃基残基(“C2-20烯基”)。在某些实施方案中,烯基不含有任何三键。在某些实施方案中,烯基基团具有2至10个碳原子(“C2-10烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2至9个碳原子(“C2-9烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2至8个碳原子(“C2-8烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2至7个碳原子(“C2-7烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2至6个碳原子(“C2-6烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2至5个碳原子(“C2-5烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2至4个碳原子(“C2-4烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2至3个碳原子(“C2-3烯基”)。在某些实施方案中,烯基基团具有2个碳原子(“C2烯基”)。一个或多个碳-碳双键可以是内部的(诸如在2-丁烯基中)或末端的(诸如在1-丁烯基中)。C2-4烯基基团的实例包括乙烯基(C2)、1-丙烯基(C3)、2-丙烯基(C3)、1-丁烯基(C4)、2-丁烯基(C4)、丁二烯基(C4)等。C2-6烯基基团的实例包括前述C2-4烯基基团以及戊烯基(C5)、戊二烯基(C5)、己烯基(C6)等。烯基的另外实例包括庚烯基(C7)、辛烯基(C8)、辛三烯基(C8)等。

[0250] 本文中使用的“炔基”表示具有2至20个碳原子、一个或多个碳-碳三键(例如,1、2、3或4个碳-碳三键)以及任选的一个或多个碳-碳双键(例如,1、2、3或4个碳-碳双键)的直链或支链烃基残基(“C2-20炔基”)。在某些实施方案中,炔基不含有任何双键。在某些实施方案中,炔基基团具有2至10个碳原子(“C2-10炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2至9个碳原子(“C2-9炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2至8个碳原子(“C2-8炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2至7个碳原子(“C2-7炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2至6个碳原子(“C2-6炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2至5个碳原子(“C2-5炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2至4个碳原子(“C2-4炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2至3个碳原子(“C2-3炔基”)。在某些实施方案中,炔基基团具有2个碳原子(“C2炔基”)。所述一个或多个碳-碳三键可以是内部的(诸如在2-丁炔基中)或末端的(诸如在1-丁炔基中)。C2-4炔基基团的实例包括但不限于乙炔基(C2)、1-丙炔基(C3)、2-丙炔基(C3)、1-丁炔基(C4)、2-丁炔基(C4)等。C2-6炔基基团的实例包括前述C2-4炔基基团以及戊炔基(C5)、己炔基(C6)等。炔基的另外实例包括庚炔基(C7)、辛炔基(C8)等。

[0251] 本文中使用的“亚烷基”、“亚烯基”和“亚炔基”分别表示烷基、烯基和炔基的二价残基。当为特定的“亚烷基”、“亚烯基”或“亚炔基”基团提供碳的范围或数目时,应当理解,所述范围或数目表示线性碳二价链中的碳的范围或数目。“亚烷基”、“亚烯基”和“亚炔基”基团可以被本文描述的一个或多个取代基取代或未被取代。

[0252] 本文中使用的术语“芳基”表示在环部分中含有六至十个碳的芳族基团(例如,单环、二环和三环结构)。所述芳基基团可以任选地通过可用的碳原子被取代,并且在某些实施方案中可以包括一个或多个杂原子诸如氧、氮或硫。在某些实施方案中,芳基基团具有六个环碳原子(“C6芳基”;例如,苯基)。在某些实施方案中,芳基基团具有十个环碳原子(“C10芳基”;例如,萘基诸如1-萘基和2-萘基)。

[0253] 术语“杂烷基”表示非环状稳定的直链或支链或其组合,其包括至少一个碳原子和至少一个选自O、N、P、Si和S的杂原子,且其中氮和硫原子可以任选地被氧化,并且氮杂原子可以任选地被季铵化。杂原子O、N、P、S和Si可以位于杂烷基基团的任何内部位置处,或烷基基团与分子的其余部分连接的位置处。示例性的杂烷基基团包括但不限于: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 和 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 。至多两个或三个杂原子可以是连续的,诸如例如 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。在提到“杂烷基”、接着提到具体的杂烷基基团诸如 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{B}}\text{R}^{\text{C}}$ 等的情况下,应当理解,术语杂烷基和 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{NR}^{\text{B}}\text{R}^{\text{C}}$ 并不重复或相互排斥。相反,列举具体的杂烷基基团以增加清晰度。因而,术语“杂烷基”在本文中不应解释为排除特定的杂烷基基团,诸如 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{B}}\text{R}^{\text{C}}$ 等。

[0254] 类似地,除非另外说明,否则术语“亚杂烷基”本身或作为另一个取代基的部分是指,源自杂烷基的二价残基,例如但不限于 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。亚杂烷基基团可被描述为例如2-7元亚杂烷基,其中术语“元”表示在部分内的非氢原子。就亚杂烷基基团而言,杂原子还可以占据链末端的任一个或两个(例如亚烷基氧基、亚烷基二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等)。此外,就亚烷基和亚杂烷基连接基团而言,连接基团的方向并不由连接基团通式的书写方向来指示。例如,式 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 可以代表 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 和 $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ 。

[0255] 本文中使用的“杂芳基”表示5-10元单环或二环 $4n+2$ 芳族环系统的残基(例如,在环状阵列中具有6或10个共享电子),其具有在该芳族环系统中提供的环碳原子和1-4个环杂原子,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-10元杂芳基”)。在含有一个或多个氮原子的杂芳基基团中,连接点可以是碳或氮原子,只要化合价允许。杂芳基二环环系统可以包括在一个或两个环中的一个或多个杂原子。“杂芳基”包括这样的环系统:其中如上定义的杂芳基环与一个或多个碳环基或杂环基基团稠合,其中连接点是在杂芳基环上,并且在这样的情况下,环成员的数目继续表示杂芳基环系统中环成员的数目。“杂芳基”还包括这样的环系统:其中如上定义的杂芳基环与一个或多个芳基基团稠合,其中连接点是在芳基或杂芳基环上,并且在这样的情况下,环成员的数目表示在稠合的多环(芳基/杂芳基)环系统中环成员的数目。在其中一个环不含有杂原子的二环杂芳基基团(例如,吡啶基、喹啉基、咪唑基等)中,连接点可以是在任一个环上,即带有杂原子的环(例如,2-吡啶基)或不含有杂原子的环(例如,5-咪唑基)。

[0256] 术语“环烷基”表示源自环烷烃的3-12、3-8、4-8或4-6个碳的单价饱和环状、二环或桥连环状(例如,金刚烷基)烃基,本文中称为例如“C4-8环烷基”。示例性的环烷基基团包括但不限于环己烷类、环戊烷类、环丁烷类和环丙烷类。

[0257] 本文中使用的“杂环基”或“杂环的”表示具有环碳原子和1至4个环杂原子的3至10元非芳族环系统的残基,其中每个杂原子独立地选自氮、氧、硫、硼、磷和硅(“3-10元杂环基”)。在含有一个或多个氮原子的杂环基基团中,连接点可以是碳或氮原子,只要化合价允许。杂环基基团可以是单环的(“单环杂环基”)或稠合的、桥连的或螺环的系统诸如二环系统(“二环杂环基”),并且可以是饱和的或可以是部分不饱和的。杂环基二环环系统可以包括在一个或两个环中的一个或多个杂原子。“杂环基”还包括这样的环系统:其中如上定义的杂环基环与一个或多个碳环基基团稠合,其中连接点是在碳环基或杂环基环上;或如下

的环系统:其中如上定义的杂环基环与一个或多个芳基或杂芳基基团稠合,其中连接点是在杂环基环上,并且在这样的情况下,环成员的数目继续表示杂环基环系统中环成员的数目。术语“杂环”、“杂环基”、“杂环基环”、“杂环基团”、“杂环部分”和“杂环残基”可以互换使用。

[0258] 本文中使用的“氰基”表示-CN。

[0259] 本文中使用的术语“卤”和“卤素”表示选自氟(氟,F)、氯(氯,Cl)、溴(溴,Br)和碘(碘,I)的原子。在某些实施方案中,所述卤素基团为氟或氯。

[0260] 本文中使用的术语“烷氧基”表示通过氧原子连接至另一个部分的烷基基团(-O(烷基))。非限制性实例包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基。

[0261] 本文中使用的“氧代”表示-C=O。

[0262] 一般而言,术语“被取代”,无论之前有无术语“任选地”,是指基团上存在的至少一个氢(例如,连接到基团的碳或氮原子上的氢)被可允许的取代基替代,例如,在取代后产生稳定化合物的取代基,例如,不会自发地经历转化(诸如通过重排、环化、消除或其它反应)的化合物。除非另有说明,否则“取代的”基团具有在该基团的一个或多个可取代的位置处的取代基,并且当任何给定的结构中的一个以上位置被取代时,所述取代基在每个位置是相同或不同的。

[0263] 本文中使用的“药学上可接受的盐”表示这样的盐:其在合理的医学判断范围内,适合用于接触人类和低等动物的组织,没有不适当的毒性、刺激、变应性应答等,并且与合理的收益/风险比相称。药学上可接受的盐是本领域众所周知的。例如,Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences(1977)66:1-19中详细描述了药学上可接受的盐。本发明的化合物的药学上可接受的盐包括衍生自合适的无机和有机酸和碱的那些盐。药学上可接受的无毒的酸加成盐的实例是氨基与以下酸形成的盐:无机酸诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸,或有机酸诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸,或通过使用本领域所用的其它方法(诸如离子交换)形成的盐。其它药学上可接受的盐包括:己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。从适当的碱衍生出的药学上可接受的盐包括碱金属、碱土金属、铵和 $N+(C_{1-4}\text{烷基})_4$ 盐。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。其它药学上可接受的盐包括,在适当时,使用抗衡离子诸如卤素离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根和芳基磺酸根形成的无毒铵、季铵和胺阳离子。

[0264] 在典型的实施方案中,本发明意图涵盖本文公开的化合物,以及这样的化合物的药学上可接受的盐、药学上可接受的酯、互变异构形式、多晶型物和前药。在某些实施方案中,本发明包括本文所述化合物的药学上可接受的加成盐、药学上可接受的酯、加成盐的溶剂化物(例如,水合物)、互变异构形式、多晶型物、对映异构体、对映异构体的混合物、立体

异构体或立体异构体的混合物(纯的或者作为外消旋或非外消旋混合物)。

[0265] 本文描述的化合物可以包含一个或多个不对称中心,并且因此可以以不同的异构形式存在,例如,对映异构体和/或非对映异构体。例如,本文描述的化合物可以是各对映异构体、非对映异构体或几何异构体的形式,或者可以是立体异构体的混合物的形式,所述混合物包括外消旋混合物以及富含一种或多种立体异构体的混合物。通过本领域技术人员已知的方法,可以从混合物中分离出异构体,所述方法包括手性高压液相色谱法(HPLC)以及手性盐的形成和结晶;或者可以通过不对称合成来制备优选的异构体。参见,例如,Jacques等人,Enantiomers, Racemates and Resolutions(Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen等人, Tetrahedron 33:2725(1977); Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); 和 Wilen, Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions第268页(E.L. Eliel, 编, Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972)。本发明还包括作为基本上不含其它异构体的单个异构体和可替换地作为不同异构体的混合物的本文描述的化合物。

[0266] 在某些实施方案中,所述化合物和以这样的化合物为组分的转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)表现出增强的(例如,增加的)转染一个或多个靶细胞的能力。因此,本文还提供了转染一个或多个靶细胞的方法。这样的方法通常包括使一个或多个靶细胞与本文公开的化合物和/或药物组合物接触、使得所述一个或多个靶细胞被其中包封的环状RNA转染的步骤。本文中使用的术语“转染”表示一种或多种包封的材料(例如,核酸和/或多核苷酸)向细胞中的细胞内引入,或优选地向靶细胞内引入。术语“转染效率”表示被经受转染的靶细胞吸收、向其引入和/或由其表达的这样的包封的材料(例如,多核苷酸)的相对量。在某些实施方案中,可以通过在转染后靶细胞产生的报告多核苷酸产物的量来估计转染效率。在某些实施方案中,转移媒介物具有高转染效率。在某些实施方案中,转移媒介物具有至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%转染效率。

[0267] 本文中使用的术语“脂质体”通常表示由排列成一个或多个球形双层的脂质(例如,两亲脂质)组成的囊泡。在某些实施方案中,所述脂质体是脂质纳米颗粒(例如,包含一种或多种本文公开的可电离脂质化合物的脂质纳米颗粒)。这样的脂质体可以是单层或多层囊泡,其具有由亲脂性材料形成的膜和水性内部,所述水性内部含有要递送至一个或多个靶细胞、组织和器官的包封的circRNA。在某些实施方案中,本文描述的组合物包含一个或多个脂质纳米颗粒。可以用于形成所考虑的脂质体和脂质纳米颗粒的合适脂质(例如,可电离脂质)的实例包括本文公开的一种或多种化合物(例如,HGT4001、HGT4002、HGT4003、HGT4004和/或HGT4005)。这样的脂质体和脂质纳米颗粒还可以包含另外的可电离脂质诸如C12-200、DLin-KC2-DMA和/或HGT5001、辅助脂质、结构脂质、PEG修饰的脂质、MC3、DLinDMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE、HGT5000、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、DMDMA、DODAC、DlendMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、Klin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003和其组合。

[0268] 本文中使用的短语“非阳离子脂质”、“非阳离子辅助脂质”和“辅助脂质”互换使用,并表示任何中性、两性离子或阴离子脂质。

[0269] 本文中使用的短语“阴离子脂质”表示在选定的pH(诸如生理pH)带有净负电荷的多种脂质种类中的任一种。

[0270] 本文中使用的短语“可生物降解的脂质”或“可降解的脂质”表示在宿主环境中以几分钟、几小时或几天的量级被分解的多种脂质种类中的任一种,在理想情况下,所述分解使得它们的毒性更小并且不可能随着时间的推移在宿主中积累。对脂质的常见修饰包括酯键、二硫键等以增加脂质的生物可降解性。

[0271] 本文中使用的短语“可生物降解的PEG脂质”或“可降解的PEG脂质”表示多种脂质种类中的任一种,其中PEG分子在宿主环境中以几分钟、几小时或几天的量级从脂质中切割,这在理想情况下使其免疫原性更低。对PEG脂质的常见修饰包括酯键、二硫键等以增加脂质的生物可降解性。

[0272] 在本发明的某些实施方案中,制备转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)以包封一种或多种材料或治疗剂(例如,circRNA)。将期望治疗剂(例如,circRNA)掺入转移媒介物中的过程在本文中被称作或“负载”或“包封”(Lasic,等人,FEBS Lett., 312:255-258,1992)。转移媒介物负载的或包封的材料(例如,circRNA)可以完全地或部分地位于转移媒介物的内部空间中、转移媒介物的双层膜内或与转移媒介物的外表面结合。

[0273] 本文中使用的术语“结构脂质”表示甾醇以及含有甾醇部分的脂质。

[0274] 如本文中定义的,“甾醇”是由类固醇组成的类固醇亚组。

[0275] 本文中使用的术语“PEG”是指任何聚乙二醇或其它聚亚烷基醚聚合物。

[0276] 如本文一般定义的,“PEG-OH脂质”(在本文中也称作“羟基-PEG化的脂质”)是在脂质上具有一个或多个羟基(-OH)基团的PEG化脂质。

[0277] 本文中使用的“磷脂”是包含磷酸酯部分和一个或多个碳链(诸如不饱和脂肪酸链)的脂质。

[0278] 本文公开的所有核苷酸序列可以表示RNA序列或相应的DNA序列。应当理解,在DNA中的脱氧胸苷(dT或T)被转录为RNA中的尿苷(U)。因此,本文在核苷酸序列中可互换地使用“T”和“U”。

[0279] 本文中使用的叙述“序列同一性”或例如包含“与……具有50%同一性的序列”表示,在对比窗口上在逐个核苷酸的基础上或在逐个氨基酸的基础上序列具有同一性的程度。因此,可以如下计算“序列同一性百分比”:在对比窗口上对比两个最佳比对的序列,确定在两个序列中出现相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以对比窗口中的位置总数(即,窗口大小),并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。包括与本文所述的任何参考序列具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸和多肽,通常其中多肽变体保持参考多肽的至少一种生物活性。

[0280] 在多核苷酸构建体中的表达序列可以被“切割位点”序列分开,其使得由表达序列编码的多肽一旦被翻译就能被细胞分开表达。

[0281] “自切割肽”表示这样的肽:其在两个相邻氨基酸之间没有肽键的情况下被翻译,或者所述肽起作用,使得当产生包含蛋白和自切割肽的多肽时,而无需任何外部切割活性,它立即被切割或分离成独特且离散的第一和第二多肽。

[0282] $\alpha\beta$ TCR的 α 和 β 链一般被认为各具有两个结构域或区域,即可变结构域/区域和恒定

结构域/区域。可变结构域由可变区域和连接区域的连结组成。因此,在本说明书中和权利要求书中,术语“TCR α 可变结构域”表示TRAV和TRAJ区域的连结,且术语TCR α 恒定结构域表示细胞外TRAC区域,或C端截短的TRAC序列。同样,术语“TCR β 可变结构域”表示TRBV和TRBD/TRBJ区域的连结,且术语TCR β 恒定结构域表示细胞外TRBC区域,或C端截短的TRBC序列。

[0283] 本文中使用的术语“双链化的”、“双链的”或“杂交的”表示由两条含有互补序列的核酸单链的杂交形成的核酸。在大多数情况下,基因组DNA是双链的。序列可以完全互补或部分互补。

[0284] 本文中使用的“自身免疫”被定义为对非感染性自身抗原的持续和进行性免疫反应,所述非感染性自身抗原不同于侵入哺乳动物和人并在其中持续存在的细菌、病毒、真菌或寄生生物的感染性非自身抗原。自身免疫病症包括硬皮病、格雷夫斯氏病、克罗恩氏病、舍格伦病、多发性硬化、桥本氏病、银屑病、重症肌无力、自身免疫性多内分泌腺病综合征、I型糖尿病(T1DM)、自身免疫性胃炎、自身免疫性葡萄膜视网膜炎、多发性肌炎、结肠炎和甲状腺炎、以及以人狼疮为代表的全身自身免疫性疾病。本文所用的“自身抗原”或“自体抗原”表示对于哺乳动物而言天然的并且在所述哺乳动物中具有免疫原性的抗原或表位。

[0285] 本文中使用的短语“阳离子脂质”表示在选定的pH(诸如生理pH)携带净正电荷的多种脂质种类中的任一种。

[0286] 术语“抗体”(Ab)包括但不限于与抗原特异性地结合的糖蛋白免疫球蛋白。一般而言,抗体可以包含通过二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)或其抗原结合分子。每条H链可以包含重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区可以包含三个恒定结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链可以包含轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区可以包含一个恒定结构域CL。VH和VL区域可以进一步细分为高变异性区域,其被称为互补决定区(CDR),散布着更为保守的区域,其被称为框架区(FR)。每个VH和VL可以包含三个CDR和四个FR,从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。Ab的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分。抗体可以包括例如单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、经工程改造的抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、抗体融合物(有时在本文中被称作“抗体缀合物”)、异源缀合物抗体、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链可变片段(scFv)、骆驼源化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的可变片段(sdFv)、抗-独特型(抗-id)抗体(包括,例如,抗-抗-Id抗体)、微体、结构域抗体、合成抗体(有时在本文中被称作“抗体模拟物”)以及上述任一种的抗原结合片段。在某些实施方案中,本文描述的抗体表示多克隆抗体群体。

[0287] 免疫球蛋白可以源自任何常见同种型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG亚类也是本领域技术人员众所周知的,并且包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。“同种型”表示由重链恒定区基因编码的Ab类别或亚类(例如,IgM或IgG1)。术语“抗体”包括例如天然存在的和非天然存在的Ab;单克隆和多克隆Ab;嵌合和人源化Ab;人或非人Ab;全合成Ab;和单链Ab。非人Ab可以通过重组方法进行人源化,以降低其在人类中的免疫原性。

若无明确说明,且除非上下文另外指示,否则术语“抗体”也包括任何前述免疫球蛋白的抗原结合片段或抗原结合部分,并且包括单价和二价片段或部分,以及单链Ab。

[0288] “抗原结合分子”、“抗原结合部分”或“抗体片段”表示包含分子的来源抗体的抗原结合部分(例如,CDR)的任何分子。抗原结合分子可以包括抗原互补决定区(CDR)。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、dAb、直链抗体、scFv抗体和由抗原结合分子形成的多特异性抗体。肽体(即包含肽结合结构域的Fc融合分子)是合适的抗原结合分子的另一个实例。在某些实施方案中,所述抗原结合分子结合肿瘤细胞上的抗原。在某些实施方案中,所述抗原结合分子结合参与过度增殖性疾病的细胞上的抗原或病毒或细菌抗原。在某些实施方案中,所述抗原结合分子结合BCMA。在其它实施方案中,所述抗原结合分子是抗体片段,包括其一个或多个互补决定区(CDR),其特异性地结合抗原。在其它实施方案中,所述抗原结合分子是单链可变片段(scFv)。在某些实施方案中,所述抗原结合分子包含 avimers或由 avimers 组成。

[0289] 本文中使用的术语“可变区”或“可变结构域”互换使用并且在本领域中是常见的。所述可变区通常表示抗体的一部分,通常是轻链或重链的一部分,通常是成熟重链中氨基端约110至120个氨基酸和成熟轻链中氨基端约90至115个氨基酸,其序列在抗体之间有较大差异,并用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。序列的变异性集中在被称为互补决定区(CDR)的那些区域中,而可变结构域中更高度保守的区域被称为框架区(FR)。不希望受任何特定机理或理论束缚,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施方案中,所述可变区是人可变区。在某些实施方案中,所述可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人框架区(FR)。在特定实施方案中,所述可变区是灵长类动物(例如,非人灵长类动物)可变区。在某些实施方案中,所述可变区包含啮齿动物或鼠CDR和灵长类动物(例如,非人灵长类动物)框架区(FR)。

[0290] 术语“VL”和“VL结构域”互换使用以表示抗体或其抗原结合分子的轻链可变区。

[0291] 术语“VH”和“VH结构域”互换使用以表示抗体或其抗原结合分子的重链可变区。

[0292] 通常使用多种CDR定义:Kabat编号、Chothia编号、AbM编号或接触编号。AbM定义是Oxford Molecular的AbM抗体建模软件所使用的两者之间的妥协。接触定义是基于对可用复杂晶体结构的分析。术语“Kabat编号”和类似术语是本领域所公认的并表示抗体或其抗原结合分子的重链和轻链可变区中的氨基酸残基的编号系统。在某些方面,可以根据Kabat编号系统来确定抗体的CDR(参见,例如,Kabat EA&Wu TT(1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391和Kabat EA等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。使用Kabat编号系统,在抗体重链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置31至35,其任选地可以包括一个或两个另外的氨基酸,在35之后(在Kabat编号方案中称为35A和35B)(CDR1)、氨基酸位置50至65(CDR2)和氨基酸位置95至102(CDR3)。使用Kabat编号系统,在抗体轻链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置24至34(CDR1)、氨基酸位置50至56(CDR2)和氨基酸位置89至97(CDR3)。在一个具体实施方案中,本文所述抗体的CDR已经根据Kabat编号方案确定。在某些方面,抗体的CDR可以根据Chothia编号方案来确定,其表示免疫球蛋白结构环的位置(参见,例如,Chothia C&Lesk AM,(1987),J Mol Biol 196:901-917;Al-Lazikani B等人,(1997)J Mol Biol 273:927-948;Chothia C等人,(1992)J Mol Biol

227:799-817;Tramontano A等人,(1990)J Mol Biol215(1):175-82;和美国专利号7,709,226)。通常,当使用Kabat编号惯例时,Chothia CDR-H1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDR-H2环存在于重链氨基酸52至56处,且Chothia CDR-H3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDR-L1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDR-L2环存在于轻链氨基酸50至56处,且Chothia CDR-L3环存在于轻链氨基酸89至97处。当使用Kabat编号惯例对Chothia CDR-HI环进行编号时,其末端根据环的长度在H32和H34之间变化(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果35A和35B均不存在,则环在32处结束;如果仅存在35A,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。在一个具体实施方案中,本文所述抗体的CDR已经根据Chothia编号方案进行确定。

[0293] 本文中使用的术语“恒定区”和“恒定结构域”是可互换的,且具有本领域的常见含义。恒定区是这样的抗体部分,例如轻链和/或重链的羧基端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但其可以表现出各种效应功能,诸如与Fc受体的相互作用。免疫球蛋白分子的恒定区通常具有相对于免疫球蛋白可变结构域而言更保守的氨基酸序列。

[0294] “结合亲和力”通常表示在分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则本文中使用的“结合亲和力”表示内在结合亲和力,其反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(KD或Kd)表示。通过本领域已知的多种方式,包括但不限于平衡解离常数(KD)和平衡缔合常数(KA或Ka),可以测量和/或表达亲和力。KD由 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 的商计算得出,而KA由 $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ 的商计算得出。 k_{on} 表示例如抗体与抗原的结合速率常数,且 k_{off} 表示例如抗体与抗原的解离速率常数。通过本领域普通技术人员已知的技术,诸如**BIACORE®**或KinExA,可以确定 k_{on} 和 k_{off} 。

[0295] 本文中使用的“保守氨基酸置换”是其中用具有类似侧链的氨基酸残基替换氨基酸残基的置换。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已经在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸),酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。在某些实施方案中,在抗体或其抗原结合分子的一个或多个CDR内或一个或多个框架区内的一个或多个氨基酸残基可以被具有相似侧链的氨基酸残基替代。

[0296] 本文中使用的术语“异源”是指来自除天然存在的序列之外的任何来源。

[0297] 本文中使用的“表位”是本领域的术语,并表示抗体可以特异性地结合的抗原的局部区域。例如,表位可以是多肽的连续氨基酸(线性或连续表位),或表位可以例如由一个或多个多肽的两个或更多个不连续区域(构象的、非线性的、不连续的或非连续的表位)聚集在一起。在某些实施方案中,抗体所结合的表位可以通过例如NMR光谱法、X-射线衍射晶体学研究、ELISA测定、氢/氘交换与质谱法(例如,液相色谱法电喷射质谱法)联用、基于阵列的寡肽扫描测定和/或诱变定位(mapping)(例如定点诱变定位)来确定。对于X射线晶体学,可以使用本领域中的任何已知方法实现结晶(例如,Giege R等人,(1994)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4):339-350;McPherson A(1990)Eur J Biochem 189:1-23;Chayen NE(1997)Structure 5:1269-1274;McPherson A(1976)J Biol

Chem 251:6300-6303)。抗体:抗原晶体可以使用众所周知的X-射线衍射技术进行研究,并可以使用计算机软件诸如X-PLOR(Yale University,1992,由Molecular Simulations, Inc.发布;参见例如Meth Enzymol(1985)第114和115卷,Wyckoff HW等人编;美国专利公开号2004/0014194)和BUSTER(Bricogne G(1993)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1):37-60;Bricogne G(1997)Meth Enzymol 276A:361-423,Carter CW编;Roversi P等人,(2000)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10):1316-1323)进行精修。

[0298] 如本文中使用的,如果抗原与第一结合分子、抗体或其抗原结合分子之间的相互作用阻断、限制、抑制或以其它方式降低参考结合分子、参考抗体或其抗原结合分子与抗原相互作用的能力,则抗原结合分子、抗体或其抗原结合分子与参考抗体或其抗原结合分子“交叉竞争”。交叉竞争可以是完全的,例如结合分子与抗原的结合完全阻断了参考结合分子的结合抗原的能力,或者它可以是部分的,例如结合分子与抗原的结合降低了参考结合分子的结合抗原的能力。在某些实施方案中,与参考抗原结合分子交叉竞争的抗原结合分子与参考抗原结合分子结合相同的或重叠的表位。在其它实施方案中,与参考抗原结合分子交叉竞争的抗原结合分子与参考抗原结合分子结合不同的表位。可以使用多种类型的竞争性结合测定来确定一种抗原结合分子是否与另一种抗原结合分子竞争,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA);固相直接或间接酶免疫测定(EIA);夹心竞争测定(Stahli等人,1983,Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Kirkland等人,1986,J. Immunol. 137:3614-3619);固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(Harlow和Lane,1988,Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记物的固相直接标记RIA(Morel等人,1988,Molec. Immunol. 25:7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung, 等人,1990,Virology 176:546-552);和直接标记RIA(Moldenhauer等人,1990,Scand. J. Immunol. 32:77-82)。

[0299] 本文中使用的术语“免疫特异性地结合”、“免疫特异性地识别”、“特异性地结合”和“特异性地识别”在抗体上下文中是类似术语,并表示与抗原(例如,表位或免疫复合物)结合的分子,因为这样的结合是本领域技术人员所理解的。例如,特异性地结合抗原的分子可以结合其它肽或多肽,一般具有较低的亲和力,如通过例如免疫测定、**BIACORE®**、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments, Boise, ID)或本领域已知的其它测定法所测定的。在一个具体实施方案中,特异性地结合抗原的分子与该抗原结合的 K_A 至少为所述分子与另一种抗原结合的 K_A 的 $2\log$ 、 $2.5\log$ 、 $3\log$ 、 $4\log$ 或更大。

[0300] “抗原”表示引发免疫应答或能够被抗体或抗原结合分子结合的任何分子。免疫应答可以涉及抗体产生,或特定免疫活性细胞的活化,或两者。本领域技术人员将容易地理解,任何大分子,包括几乎所有的蛋白或肽,可以充当抗原。抗原可以是内源表达的,即由基因组DNA表达,或者可以是重组表达的。抗原可以是某种组织(诸如癌细胞)特有的,或者它可以广泛表达。此外,较大分子的片段可以充当抗原。在某些实施方案中,抗原是肿瘤抗原。

[0301] 术语“自体”表示源自它在以后将被重新引入的同一个体的任何材料。例如,本文描述的经工程改造的自体细胞疗法(eACT™)方法包括从患者收集淋巴细胞,然后对其进行工程改造以表达例如CAR构建体,并然后施用回同一患者。

[0302] 术语“同种异体的”表示源自一个个体的任何材料,其然后被引入同一物种的另一个个体,例如同种异体T细胞移植。

[0303] “癌症”表示以体内异常细胞的失控生长为特征的一大组各种疾病。失调的细胞分裂和生长导致恶性肿瘤的形成,所述肿瘤侵入邻近组织并且还可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部位。“癌症”或“癌组织”可以包括肿瘤。特定癌症可能对化疗或放疗有应答,或癌症可能是难治的。难治的癌症表示不适合外科手术干预的癌症,并且该癌症最初对化疗或放疗没有应答,或者该癌症随着时间的推移变得没有应答。

[0304] 本文中使用的“抗肿瘤作用”表示一种生物学作用,其可以表现为肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数目的减少、肿瘤细胞增殖的减少、转移灶数目的减少、总体或无进展存活期的增加、预期寿命的增加或与肿瘤相关的各种生理学症状的改善。抗肿瘤作用也可能表示预防肿瘤的发生,例如疫苗。

[0305] 本文中使用的“细胞因子”表示一个细胞响应于与特定抗原的接触而释放的非抗体蛋白,其中所述细胞因子与第二个细胞相互作用以介导第二个细胞中的应答。本文中使用的“细胞因子”意在表示由一个细胞群体释放的、作为细胞间介质作用于另一个细胞的蛋白。细胞因子可以由细胞内源性表达或施用给受试者。细胞因子可能由免疫细胞(包括巨噬细胞、B细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞)释放以传播免疫应答。细胞因子可能在受体细胞中诱导各种应答。细胞因子可能包括稳态细胞因子、趋化因子、促炎细胞因子、效应物和急性期蛋白。例如,稳态细胞因子(包括白介素(IL)7和IL-15)促进免疫细胞存活和增殖,而促炎细胞因子可能促进炎症应答。稳态细胞因子的实例包括但不限于IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-15和干扰素(IFN) γ 。促炎细胞因子的实例包括但不限于IL-1a、IL-1b、IL-6、IL-13、IL-17a、IL-23、IL-27、肿瘤坏死因子(TNF) $-\alpha$ 、TNF- β 、成纤维细胞生长因子(FGF) 2、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、可溶性细胞间粘附分子1(sICAM-1)、可溶性血管粘附分子1(sVCAM-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF-C、VEGF-D和胎盘生长因子(PLGF)。效应物的实例包括但不限于粒酶A、粒酶B、可溶性的Fas配体(sFasL)、TGF- β 、IL-35和穿孔蛋白。急性期蛋白的实例包括但不限于C-反应蛋白(CRP)和血清淀粉样蛋白A(SAA)。

[0306] 本文中使用的术语“淋巴细胞”包括天然杀伤(NK)细胞、T细胞或B细胞。NK细胞是一类细胞毒性的(对细胞有毒的)淋巴细胞,其代表先天性免疫系统的主要组分。NK细胞排斥肿瘤和被病毒感染的细胞。它通过细胞凋亡或程序性细胞死亡的过程起作用。它们被称为“天然杀手”,因为它们不需要活化就能杀死细胞。T细胞在细胞介导的免疫(不涉及抗体)中发挥主要作用。T细胞受体(TCR)将T细胞与其它淋巴细胞类型区分开。胸腺(免疫系统的—个特殊器官)是T细胞成熟的主要部位。T细胞有多种类型,包括:辅助性T细胞(例如,CD4+细胞)、细胞毒性的T细胞(也被称作TC、细胞毒性T淋巴细胞、CTL、T杀伤细胞、细胞裂解T细胞、CD8+T细胞或杀伤性T细胞)、记忆T细胞((i) 干记忆细胞(TSCM),与原初细胞一样,是CD45RO $^-$ 、CCR7 $^+$ 、CD45RA $^+$ 、CD62L $^+$ (L-选择蛋白)、CD27 $^+$ 、CD28 $^+$ 和IL-7Ra $^+$,但也表达大量的CD95、IL-2R、CXCR3和LFA-1,并表现出记忆细胞特有的许多功能属性);(ii) 中枢记忆细胞(TCM)表达L-选择蛋白和CCR7,它们分泌IL-2,但不分泌IFN γ 或IL-4,以及(iii) 效应记忆细胞(TEM)不表达L-选择蛋白或CCR7,但产生效应细胞因子(如IFN γ 和IL-4)、调节性T细胞(Treg、抑制性T细胞或CD4 $^+$ CD25 $^+$ 或CD4 $^+$ FoxP3 $^+$ 调节性T细胞)、天然杀伤T细胞(NKT)和 γ δ T细胞。另一个方面,B细胞在体液免疫(涉及抗体)中起主要作用。B细胞产生抗体,能够充当抗原呈递细胞(APC),并在通过抗原相互作用活化后转变为短寿命和长寿命的记忆B细胞和

浆细胞。在哺乳动物中,未成熟的B细胞在骨髓中形成。

[0307] 术语“遗传工程改造的”或“经工程改造的”表示改造细胞的基因组的方法,所述基因组包括但不限于编码或非编码区或其部分或插入编码区或其部分。在某些实施方案中,被修饰的细胞是淋巴细胞,例如T细胞,其可以从患者或供体获得。可以修饰细胞以表达外源构建体,诸如,例如,嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR),其被整合到细胞的基因组中。

[0308] “免疫应答”表示免疫系统的细胞(例如T淋巴细胞、B淋巴细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞和嗜中性粒细胞)以及由这些细胞或肝中的任一种产生的可溶性大分子(包括Ab、细胞因子和补体)的作用,其导致选择性靶向、结合、损害、破坏和/或从脊椎动物体内消除入侵病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌细胞或其它异常细胞,或者,在自身免疫性或病理性炎症的情况下,消除正常人细胞或组织。

[0309] 本文中使用的“共刺激信号”表示与主要信号(诸如TCR/CD3连接)组合导致T细胞应答(诸如,但不限于增殖和/或关键分子的上调或下调)的信号。

[0310] 本文中使用的“共刺激配体”包括在抗原呈递细胞上的分子,该分子特异性地结合T细胞上的同源共刺激性分子。共刺激配体的结合提供了介导T细胞应答的信号,所述T细胞应答包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体会诱导除了由刺激分子提供的主要信号之外的信号,例如,通过T细胞受体(TCR)/CD3复合物与载有肽的主要组织相容性复合物(MHC)分子的结合。共刺激配体可以包括但不限于3/TR6、4-1BB配体、结合Toll样受体的激动剂或抗体、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD30配体、CD40、CD7、CD70、CD83、疱疹病毒进入介质(HVEM)、人白细胞抗原G(HLA-G)、ILT4、免疫球蛋白样转录物(ILT)3、可诱导的共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、特异性地结合B7-H3的配体、淋巴毒素 β 受体、MHC I类链相关蛋白A(MICA)、MHC I类链相关蛋白B(MICB)、OX40配体、PD-L2或程序性死亡(PD)LI。共刺激配体包括但不限于与在T细胞上存在的共刺激分子特异性地结合的抗体,诸如,但不限于4-1BB、B7-H3、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD7、ICOS、与CD83特异性地结合的配体、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、天然杀伤细胞受体C(NKG2C)、OX40、PD-1或肿瘤坏死因子超家族成员14(TNFSF14或LIGHT)。

[0311] “共刺激分子”是在T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性地结合,从而介导T细胞的共刺激应答,诸如,但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于4-1BB/CD137、B7-H3、BAFFR、BLAME(SLAMF8)、BTLA、CD 33、CD 45、CD100(SEMA4D)、CD103、CD134、CD137、CD154、CD16、CD160(BY55)、CD 18、CD19、CD19a、CD2、CD22、CD247、CD27、CD276(B7-H3)、CD28、CD29、CD3(α ; β ; δ ; ϵ ; γ ; ζ)、CD30、CD37、CD4、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD5、CD64、CD69、CD7、CD80、CD83配体、CD84、CD86、CD8 α 、CD8 β 、CD9、CD96(Tactile)、CD1-1a、CD1-1b、CD1-1c、CD1-1d、CDS、CEACAM1、CRT AM、DAP-10、DNAM1(CD226)、Fc γ 受体、GADS、GITR、HVEM(LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、ICOS、Ig α (CD79a)、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、整联蛋白、ITGA4、ITGA4、ITGA6、IT GAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1、LIGHT、LIGHT(肿瘤坏死因子超家族成员14; TNFSF14)、LTBR、Ly9(CD229)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1(CD1 1a/CD18)、MHC I类分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80(KLRF1)、OX40、PAG/Cbp、PD-1、PSGL1、SELPLG(CD162)、信号传递淋巴细胞活化分子、SLAM(SLAMF1; CD150; IPO-3)、SLAMF4(CD244; 2B4)、SLAMF6(NTB-A;

Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNF、TNF α 、TNFR2、Toll配体受体、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6或其片段、截短物或组合。

[0312] 本文中使用的“疫苗”表示用于产生免疫力以预防和/或治疗疾病的组合物。因此，疫苗是包含抗原的药物，并且旨在用于人类或动物中用于在施用给人或动物后产生特异性防御和保护物质。

[0313] 本文中使用的“新抗原”表示由表达的蛋白中的肿瘤特异性突变产生的一类肿瘤抗原。

[0314] 本文中使用的“融合蛋白”是具有至少两个结构域的蛋白，所述结构域由单独的基因编码，所述基因已经连接以转录单个肽。

[0315] 2. DNA模板、前体RNA和环状RNA

[0316] 根据本发明，本文提供的DNA模板（例如，包含3' 增强的内含子元件、3' 增强的外显子元件、核心功能元件、5' 增强的外显子元件和5' 增强的内含子元件）的转录导致能够环化的前体线性RNA多核苷酸的形成。在某些实施方案中，该DNA模板包含载体、PCR产物、质粒、微环DNA、粘粒、人工染色体、互补DNA (cDNA)、染色体外DNA (ecDNA) 或其中的片段。在某些实施方案中，所述微环DNA可以是线性化的或非线性化的。在某些实施方案中，所述质粒可以是线性化的或非线性化的。在某些实施方案中，所述DNA模板可以是单链的。在其它实施方案中，所述DNA模板可以是双链的。在某些实施方案中，所述DNA模板完全地或部分地来自病毒、细菌或真核载体。

[0317] 本文提供的发明包含在前体线性RNA多核苷酸的剪接之前与前体线性RNA多核苷酸具有相同序列的DNA模板（例如，3' 增强的内含子元件、3' 增强的外显子元件、核心功能元件和5' 增强的外显子元件、5' 增强的内含子元件）。在某些实施方案中，所述线性前体RNA多核苷酸在环化过程中经历剪接，从而导致3' 增强的内含子元件和5' 增强的内含子元件的去除。在某些实施方案中，得到的环状RNA多核苷酸缺少3' 增强的内含子片段和5' 增强的内含子片段，但保留3' 增强的外显子片段、核心功能元件和5' 增强的外显子元件。

[0318] 在某些实施方案中，所述前体线性RNA多核苷酸在一个或多个鸟苷核苷酸或核苷（例如，GTP）和二价阳离子（例如，Mg²⁺）存在下温育时发生环化。在某些实施方案中，所述3' 增强的外显子元件、5' 增强的外显子元件和/或核心功能元件完全地或部分地促进前体线性RNA多核苷酸的环化以形成本文提供的环状RNA多核苷酸。

[0319] 在某些实施方案中，在细胞内产生本文提供的环状RNA。在某些实施方案中，前体RNA使用DNA模板（例如，在某些实施方案中，使用本文提供的载体）在细胞质中通过细菌噬菌体RNA聚合酶转录，或在细胞核中通过宿主RNA聚合酶II转录，并然后环化。

[0320] 在某些实施方案中，本文提供的环状RNA被注射到动物（例如，人）中，使得由环状RNA分子编码的多肽在动物体内表达。

[0321] 在某些实施方案中，本文提供的DNA（例如，载体）、线性RNA（例如，前体RNA）和/或环状RNA多核苷酸的长度是在300至10000、400至9000、500至8000、600至7000、700至6000、800至5000、900至5000、1000至5000、1100至5000、1200至5000、1300至5000、1400至5000和/或1500至5000个核苷酸之间。在某些实施方案中，所述多核苷酸的长度是至少300个核苷酸、400个核苷酸、500个核苷酸、600个核苷酸、700个核苷酸、800个核苷酸、900个核苷酸、1000个核苷酸、1100个核苷酸、1200个核苷酸、1300个核苷酸、1400个核苷酸、1500个核苷酸、

酸、2000个核苷酸、2500个核苷酸、3000个核苷酸、3500个核苷酸、4000个核苷酸、4500个核苷酸或5000个核苷酸。在某些实施方案中,所述多核苷酸的长度不超过3000个核苷酸、3500个核苷酸、4000个核苷酸、4500个核苷酸、5000个核苷酸、6000个核苷酸、7000个核苷酸、8000个核苷酸、9000个核苷酸或10000个核苷酸。在某些实施方案中,本文提供的DNA、线性RNA和/或环状RNA多核苷酸的长度是约300个核苷酸、400个核苷酸、500个核苷酸、600个核苷酸、700个核苷酸、800个核苷酸、900个核苷酸、1000个核苷酸、1100个核苷酸、1200个核苷酸、1300个核苷酸、1400个核苷酸、1500个核苷酸、2000个核苷酸、2500个核苷酸、3000个核苷酸、3500个核苷酸、4000个核苷酸、4500个核苷酸、5000个核苷酸、6000个核苷酸、7000个核苷酸、8000个核苷酸、9000个核苷酸或10000个核苷酸。

[0322] 在某些实施方案中,本文提供的环状RNA具有比包含相同表达序列的mRNA更高的功能稳定性。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA具有比包含相同表达序列、5moU修饰、优化的UTR、帽和/或聚腺苷酸尾巴的mRNA更高的功能稳定性。

[0323] 在某些实施方案中,本文提供的环状RNA多核苷酸具有至少5小时、10小时、15小时、20小时、30小时、40小时、50小时、60小时、70小时或80小时的功能半衰期。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA多核苷酸具有5-80、10-70、15-60和/或20-50小时的功能半衰期。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA多核苷酸具有比编码相同蛋白的等同线性RNA多核苷酸更大的功能半衰期(例如,至少1.5倍、至少2倍)。在某些实施方案中,可以通过检测功能性蛋白合成来评估功能半衰期。

[0324] 在某些实施方案中,本文提供的环状RNA多核苷酸具有至少5小时、10小时、15小时、20小时、30小时、40小时、50小时、60小时、70小时或80小时的半衰期。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA多核苷酸具有5-80、10-70、15-60和/或20-50小时的半衰期。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA多核苷酸具有比编码相同蛋白的等同线性RNA多核苷酸更大的半衰期(例如,至少1.5倍、至少2倍)。在某些实施方案中,所述环状RNA多核苷酸或其药物组合物在人细胞中具有大于或等于预定阈值的功能半衰期。在某些实施方案中,通过功能蛋白测定来确定功能半衰期。例如在某些实施方案中,通过体外萤光素酶测定来确定功能半衰期,其中在1、2、3、4、5、6、7或14天内每1、2、6、12或24小时在表达环状RNA多核苷酸的人细胞(例如HepG2)的培养基中测量高斯萤光素酶 (GLuc) 的活性。在其它实施方案中,通过体内测定来确定功能半衰期,其中在1、2、3、4、5、6、7或14天内每1、2、6、12或24小时测量患者血清或组织样品中由环状RNA多核苷酸的表达序列编码的蛋白的水平。在某些实施方案中,所述预定阈值是包含与环状RNA多核苷酸相同的表达序列的参考线性RNA多核苷酸的功能半衰期。

[0325] 在某些实施方案中,本文提供的环状RNA可以具有比等同线性mRNA更高的表达量级,例如,在将RNA施用至细胞后24小时具有更高的表达量级。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA具有比包含相同表达序列、5moU修饰、优化的UTR、帽子和/或聚腺苷酸尾巴的mRNA更高的表达量级。

[0326] 在某些实施方案中,当暴露于生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞时,本文提供的环状RNA可能具有比等同mRNA更低的免疫原性。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA与当暴露于生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞时细胞因子的受调节产生相关。例如,在某些实施方案中,与包含相同表达序列的mRNA相比,本文提供的环状RNA与当暴露

于生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞时IFN- β 1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN γ 和/或TNF α 的减少的产生相关。在某些实施方案中,与包含相同表达序列的mRNA相比,本文提供的环状RNA与当暴露于生物体的免疫系统或某种类型的免疫细胞时更少的IFN- β 1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN γ 和/或TNF α 转录物诱导相关。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA具有比包含相同表达序列的mRNA更低的免疫原性。在某些实施方案中,本文提供的环状RNA具有比包含相同表达序列、5moU修饰、优化的UTR、帽和/或聚腺苷酸尾巴的mRNA更低的免疫原性。

[0327] 在某些实施方案中,本文提供的环状RNA可以原样转染到细胞中,或者可以以DNA载体形式转染并在细胞中转录。来自转染的DNA载体的环状RNA的转录可以通过添加的聚合酶或由转染到细胞中的核酸编码的聚合酶进行,或优选地通过内源性聚合酶进行。

[0328] A. 增强的内含子元件和增强的外显子元件

[0329] 如本文中本发明所述,增强的内含子元件和增强的外显子元件可以包含间隔区、双链体区域、亲和序列、内含子片段、外显子片段和各种非翻译元件。在增强的内含子元件或增强的外显子元件内的这些序列被排列以优化环化或蛋白表达。

[0330] 在某些实施方案中,本文提供的DNA模板、前体线性RNA多核苷酸和环状RNA包含第一个(5')和/或第二个(3')间隔区。在某些实施方案中,所述DNA模板或前体线性RNA多核苷酸在增强的内含子元件中包含一个或多个间隔区。在某些实施方案中,所述DNA模板、前体线性RNA多核苷酸在增强的外显子元件中包含一个或多个间隔区。在某些实施方案中,所述DNA模板或线性RNA多核苷酸包含在3' 增强的内含子片段中的间隔区和在5' 增强的内含子片段中的间隔区。在某些实施方案中,DNA模板、前体线性RNA多核苷酸或环状RNA包含在3' 增强的外显子片段中的一个间隔区和在5' 增强的外显子片段中的另一个间隔区,以辅助由于在整体序列中产生的对称性而进行的环化或蛋白表达。

[0331] 在某些实施方案中,包括在3' I组内含子片段和核心功能元件之间的一个间隔区可以通过阻止它们相互作用来保留那些区域中的二级结构,从而提高剪接效率。在某些实施方案中,第一个(在3' I组内含子片段和核心功能元件之间)和第二个(在两个表达序列和核心功能元件之间)间隔区包含另外的碱基配对区域,所述区域据预测彼此碱基配对,而不是与第一个和第二个双链体区域碱基配对。在其它实施方案中,第一个(在3' I组内含子片段和核心功能元件之间)和第二个(在核心功能元件之一和5' I组内含子片段之间)间隔区包含另外的碱基配对区域,所述区域据预测彼此碱基配对,而不是与第一个和第二个双链体区域碱基配对。在某些实施方案中,这样的间隔区碱基配对使I组内含子片段彼此紧密接近,从而进一步提高剪接效率。此外,在某些实施方案中,在第一个和第二个双链体区域之间的碱基配对的组合,以及单独地,在第一个和第二个间隔区之间的碱基配对,会促进含有在相邻碱基配对区域侧翼的I组内含子片段的剪接泡的形成。典型的间隔区是具有一种或多种以下性能连续序列:1) 据预测会避免干扰近端结构,例如,IRES、表达序列、适体或内含子;2) 长度为至少7个核苷酸且不超过100个核苷酸;3) 位于3' 内含子片段之后且相邻和/或位于5' 内含子片段之前且相邻;和4) 含有以下一种或多种:a) 至少5个核苷酸长度的非结构化区域,b) 至少距离远端序列5个核苷酸长度的碱基配对区域,包括另一个间隔区,以及c) 至少7个核苷酸长度的结构化区域,其范围限于间隔区的序列。间隔区可以具有几个区域,包括非结构化区域、碱基配对区域、发夹/结构化区域及其组合。在一个实施方案中,所述间隔区具有高GC含量的结构化区域。在一个实施方案中,在间隔区内的区域与在同一间

隔区内的另一个区域碱基配对。在一个实施方案中,在间隔区内的区域与在另一个间隔区内的区域碱基配对。在一个实施方案中,间隔区包含一个或多个发夹结构。在一个实施方案中,间隔区包含一个或多个发夹结构,所述发夹结构具有4至12个核苷酸的茎和2至10个核苷酸的环。在一个实施方案中,在3' I组内含子片段和核心功能元件之间存在另外的间隔区。在一个实施方案中,该另外的间隔区阻止IRES或TIE适体的结构化区域干扰3' I组内含子片段的折叠,或减少这种情况发生的程度。在某些实施方案中,所述5' 间隔区序列的长度为至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或30个核苷酸。在某些实施方案中,所述5' 间隔区序列的长度不超过100、90、80、70、60、50、45、40、35或30个核苷酸。在某些实施方案中,所述5' 间隔区序列的长度为5至50、10至50、20至50、20至40和/或25至35个核苷酸。在某些实施方案中,所述5' 间隔区序列的长度为10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸。在一个实施方案中,所述5' 间隔区序列是聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述5' 间隔区序列是聚AC序列。在一个实施方案中,间隔区包含约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的聚AC含量。在一个实施方案中,间隔区包含约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的聚嘧啶(C/T或C/U)含量。

[0332] 在某些实施方案中,本文提供的DNA模板和前体线性RNA多核苷酸和环状RNA多核苷酸包含第一个(5')双链体区域和第二个(3')双链体区域。在某些实施方案中,所述DNA模板和前体线性RNA多核苷酸包含位于3' 增强的内含子片段内的5' 外部双链体区域和位于5' 增强的内含子片段内的3' 外部双链体区域。在某些实施方案中,所述DNA模板、前体线性RNA多核苷酸和环状RNA多核苷酸包含位于3' 增强的外显子片段内的5' 内部双链体区域和位于5' 增强的外显子片段内的3' 内部双链体区域。在某些实施方案中,所述DNA多核苷酸和前体线性RNA多核苷酸包含5' 外部双链体区域、5' 内部双链体区域、3' 内部双链体区域和3' 外部双链体区域。

[0333] 在某些实施方案中,所述第一个和第二个双链体区域可以形成完美的或不完美的双链体。因此,在某些实施方案中,至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的第一个和第二个双链体区域可以彼此碱基配对。在某些实施方案中,预测双链体区域与RNA中的非预期序列(例如,非双链体区域序列)具有小于50%(例如,小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%)碱基配对。在某些实施方案中,在前体RNA链的末端上包括这样的双链体区域,并且邻近或非常靠近I组内含子片段,使得I组内含子片段彼此紧密接近,从而提高剪接效率。在某些实施方案中,所述双链体区域是3至100个核苷酸长度(例如,3-75个核苷酸长度、3-50个核苷酸长度、20-50个核苷酸长度、35-50个核苷酸长度、5-25个核苷酸长度、9-19个核苷酸长度)。在某些实施方案中,所述双链体区域是约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸长度。在某些实施方案中,所述双链体区域具有约9至约50个核苷酸的长度。在一个实施方案中,所述双链体区域具有约9至约19个核苷酸的长度。在某些实施方案中,所述双链体区域具有约20至约40个核苷酸的长度。在某些实施方案中,所述双链体区域具有约30个核苷酸的长度。

[0334] 在其它实施方案中,所述DNA模板、前体线性RNA多核苷酸或环状RNA多核苷酸不包含任何双链体区域以优化翻译或环化。

[0335] 如本文所提供的,DNA模板或前体线性RNA多核苷酸可以包含亲和标签。在某些实施方案中,所述亲和标签位于3' 增强的内含子元件中。在某些实施方案中,所述亲和标签位于5' 增强的内含子元件中。在某些实施方案中,两个(3' 和5') 增强的内含子元件各自包含一个亲和标签。在一个实施方案中,3' 增强的内含子元件的亲和标签的长度与5' 增强的内含子元件中的亲和标签的长度相同。在某些实施方案中,3' 增强的内含子元件的亲和标签的序列与5' 增强的内含子元件中的亲和标签的序列相同。在某些实施方案中,放置亲和序列以优化寡-dT纯化。

[0336] 在某些实施方案中,亲和标签包含聚腺苷酸区域。在某些实施方案中,所述聚腺苷酸区域是至少15、30或60个核苷酸长度。在某些实施方案中,一个或两个聚腺苷酸区域是15-50个核苷酸长度。在某些实施方案中,一个或两个聚腺苷酸区域是20-25个核苷酸长度。所述聚腺苷酸序列在环化后被除去。因此,与聚腺苷酸序列杂交的寡核苷酸,诸如与固体表面(例如,树脂)缀合的脱氧胸腺嘧啶寡核苷酸(寡(dT)),可以用于将环状RNA与其前体RNA分开。

[0337] 在某些实施方案中,所述3' 增强的内含子元件包含先导非翻译序列。在某些实施方案中,所述先导非翻译序列是3' 增强的内含子片段的5' 末端。在某些实施方案中,所述先导非翻译序列包含转录起始位点(TSS)的最后一个核苷酸。在某些实施方案中,所述TSS选自病毒、细菌或真核DNA模板。在一个实施方案中,所述先导非翻译序列包含TSS的最后一个核苷酸和0至100个另外的核苷酸。在某些实施方案中,所述TSS是终端间隔区。在一个实施方案中,在RNA T7聚合酶翻译后,所述先导非翻译序列含有在5' 末端处的鸟苷。

[0338] 在某些实施方案中,所述5' 增强的内含子元件包含尾部非翻译序列。在某些实施方案中,所述5' 尾部非翻译序列位于5' 增强的内含子元件的3' 末端处。在某些实施方案中,所述尾部非翻译序列是部分限制酶切消化序列。在一个实施方案中,所述尾部非翻译序列完全地或部分地是用于线性化DNA模板的限制酶切消化位点。在某些实施方案中,所述限制酶切消化位点完全地或部分地来自天然病毒、细菌或真核DNA模板。在某些实施方案中,所述尾部非翻译序列是末端限制位点片段。

[0339] a. 增强的内含子片段

[0340] 根据本发明,3' 增强的内含子元件和5' 增强的内含子元件各自包含内含子片段。在某些实施方案中,3' 内含子片段是与包括3' 剪接位点二核苷酸的天然I组内含子的3' 近端片段具有至少75%同源性(例如,至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源性)的连续序列。通常,5' 内含子片段是与包括5' 剪接位点二核苷酸的天然I组内含子的5' 近端片段具有至少75%同源性(例如,至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源性)的连续序列。在某些实施方案中,所述3' 内含子片段包括3' I组剪接位点二核苷酸的第一个核苷酸。在某些实施方案中,所述5' 内含子片段包括5' I组剪接位点二核苷酸的第一个核苷酸。在其它实施方案中,所述3' 内含子片段包括3' I组内含子片段剪接位点二核苷酸的第一个和第二个核苷酸;且所述5' 内含子片段包括3' I组内含子片段二核苷酸的第一个和第二个核苷酸。

[0341] b. 增强的外显子片段

[0342] 在某些实施方案中,如本文所提供的,所述DNA模板、线性前体RNA多核苷酸和环状RNA多核苷酸各自包含增强的外显子片段。在某些实施方案中,按照5'到3'的顺序,3'增强的外显子元件位于核心功能元件上游。在某些实施方案中,按照5'到3'的顺序,5'增强的内含子元件位于核心功能元件下游。

[0343] 根据本发明,3'增强的外显子元件和5'增强的外显子元件各自包含外显子片段。在某些实施方案中,所述3'增强的外显子元件包含3'外显子片段。在某些实施方案中,所述5'增强的外显子元件包含5'外显子片段。在某些实施方案中,如本文所提供的,所述3'外显子片段和5'外显子片段各自包含I组内含子片段和外显子序列的1至100个核苷酸。在某些实施方案中,3'内含子片段是与包括3'剪接位点二核苷酸的天然I组内含子的3'近端片段具有至少75%同源性(例如,至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源性)的连续序列。通常,5'I组内含子片段是与包括5'剪接位点二核苷酸的天然I组内含子的5'近端片段具有至少75%同源性(例如,至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同源性)的连续序列。在某些实施方案中,所述3'外显子片段包含3'I组内含子剪接位点二核苷酸的第二个核苷酸和外显子序列的1至100个核苷酸。在某些实施方案中,所述5'外显子片段包含5'I组内含子剪接位点二核苷酸的第一个核苷酸和外显子序列的1至100个核苷酸。在某些实施方案中,所述外显子序列部分地或完全地包含来自病毒、细菌或真核DNA载体的天然存在的外显子序列。在其它实施方案中,所述外显子序列进一步包含合成的、遗传修饰的(例如,含有修饰的核苷酸)或其它经工程改造的外显子序列。

[0344] 在一个实施方案中,当3'内含子片段包含3'I组剪接位点二核苷酸的两个核苷酸并且5'内含子片段包含5'I组剪接位点二核苷酸的两个核苷酸时,位于5'增强的外显子元件和3'增强的外显子元件内的外显子片段不包含I组剪接位点二核苷酸。

[0345] c.增强的内含子元件和增强的外显子元件的示例置换

[0346] 举例来说,且无意是限制性的,在某些实施方案中,3'增强的内含子元件按以下5'到3'的顺序包含:先导非翻译序列、5'亲和标签、任选的5'外部双链体区域、5'外部间隔区和3'内含子片段。在相同的实施方案中,3'增强的外显子元件按以下5'到3'的顺序包含:3'外显子片段、任选的5'内部双链体区域、任选的5'内部双链体区域和5'内部间隔区。在相同的实施方案中,5'增强的外显子元件按以下5'到3'的顺序包含:3'内部间隔区、任选的3'内部双链体区域和5'外显子片段。在相同的实施方案中,3'增强的内含子元件按以下5'到3'的顺序包含:5'内含子片段、3'外部间隔区、任选的3'外部双链体区域、3'亲和标签和尾部非翻译序列。

[0347] B.核心功能元件

[0348] 在某些实施方案中,所述DNA模板、线性前体RNA多核苷酸和环状RNA多核苷酸包含核心功能元件。在某些实施方案中,所述核心功能元件包含编码或非编码元件。在某些实施方案中,所述核心功能元件可以含有编码和非编码元件。在某些实施方案中,所述核心功能元件进一步包含在编码或非编码元件上游的翻译起始元件(TIE)。在某些实施方案中,所述核心功能元件包含终止元件。在某些实施方案中,所述终止元件位于TIE和编码元件下游。在某些实施方案中,所述终止元件位于编码元件下游,但位于TIE上游。在某些实施方案中,当编码元件包含非编码区时,核心功能元件缺少TIE和/或终止元件。

[0349] a. 编码或非编码元件

[0350] 在某些实施方案中,本文的多核苷酸包含编码或非编码元件或两者的组合。在某些实施方案中,所述编码元件包含表达序列。在某些实施方案中,所述编码元件编码至少一种治疗性蛋白。

[0351] 在某些实施方案中,所述环状RNA编码两种或更多种多肽。在某些实施方案中,所述环状RNA是双顺反子RNA。编码两种或更多种多肽的序列可以由核糖体跳跃元件或编码蛋白酶切割位点的核苷酸序列隔开。在某些实施方案中,所述核糖体跳跃元件编码明脉扁刺蛾(thosea-asigna)病毒2A肽(T2A)、猪捷申病毒-1 2A肽(P2A)、口蹄疫病毒2A肽(F2A)、马鼻炎A病毒2A肽(E2A)、细胞质多角体病毒2A肽(BmCPV 2A)或家蚕(B.mori)软化病毒2A肽(BmIFV 2A)。

[0352] b. 翻译起始元件(TIE)

[0353] 如本文提供的,在某些实施方案中,所述核心功能元件包含至少一个翻译起始元件(TIE)。TIE的设计目的是提高编码的蛋白的翻译效率。因此,仅包含非编码元件的最佳核心功能元件缺乏任何TIE。在某些实施方案中,包含一个或多个编码元件的核心功能元件将进一步包含一个或多个TIE。

[0354] 在某些实施方案中,TIE包含非翻译区(UTR)。在某些实施方案中,本文提供的TIE包含内核糖体进入位点(IRES)。包含IRES允许来自环状RNA的一个或多个开放阅读框(例如,形成表达序列的开放阅读框)的翻译。所述IRES元件吸引真核核糖体翻译起始复合物并促进翻译起始。参见,例如,Kaufman等人,Nuc.Acids Res. (1991) 19:4485-4490;Gurtu等人,Biochem.Biophys.Res.Comm. (1996) 229:295-298;Rees等人,BioTechniques (1996) 20:102-110;Kobayashi等人,BioTechniques (1996) 21:399-402;和Mosser等人,BioTechniques 1997 22 150-161。

[0355] i. 天然的TIE:病毒和真核/细胞内核糖体进入位点(IRES)

[0356] 许多IRES序列是可用的,并包括源自多种病毒的序列,诸如来自小核糖核酸病毒的前导序列,诸如脑心肌炎病毒(EMCV)UTR(Jang等人,J.Virol. (1989) 63:1651-1660)、脊髓灰质炎前导序列、甲型肝炎病毒前导序列、丙型肝炎病毒IRES、人鼻病毒2型IRES(Dobrikova等人,Proc.Natl.Acad.Sci. (2003) 100(25):15125-15130)、来自口蹄疫病毒的IRES元件(Ramesh等人,Nucl.Acid Res. (1996) 24:2697-2700)、贾第虫病毒IRES(Garlapati等人,J.Biol.Chem. (2004) 279(5):3389-3397)等。

[0357] 为了驱动蛋白表达,环状RNA包含可操作地连接至蛋白编码序列的IRES。本文公开了对IRES和附属序列的修饰以增加或减少IRES活性,例如,通过截短IRES的5'和/或3'端、在IRES的5'端添加间隔区、修饰在翻译起始位点5'端的6个核苷酸(Kozak序列)、修饰替代翻译起始位点、以及创建嵌合的/杂交的IRES序列。在某些实施方案中,本文公开的环状RNA中的IRES序列包含相对于天然IRES的这些修饰中的一种或多种。

[0358] 在某些实施方案中,所述IRES是以下病毒的IRES序列:桃拉综合征病毒、吸血猎蝽病毒、泰勒氏脑脊髓炎病毒、猿猴病毒40、红火蚁病毒1、禾谷缢管蚜病毒、网状内皮组织增殖病病毒、人脊髓灰质炎病毒1、斯氏珀蝽肠病毒、克什米尔蜜蜂病毒、人鼻病毒2、假桃病毒叶蝉病毒-1、人免疫缺陷病毒1型、Himetobi P病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、GB肝炎病毒、口蹄疫病毒、人肠道病毒71、马鼻炎病毒、茶尺蠖(Ectropis obliqua)小核糖核酸样

病毒、脑心肌炎病毒、果蝇C病毒、人柯萨奇病毒B3、十字花科烟草花叶病毒、蟋蟀麻痹病毒、牛病毒性腹泻病毒1、黑蜂王台病毒、蚜虫致死性麻痹病毒、禽脑脊髓炎病毒、急性蜜蜂麻痹病毒、木槿褪绿环斑病毒、古典猪瘟病毒、人FGF2、人SFTPA1、人AML1/RUNX1、果蝇触角足突变、人AQP4、人AT1R、人BAG-1、人BCL2、人BiP、人c-IAP1、人c-myc、人eIF4G、小鼠NDST4L、人LEF1、小鼠HIF1 α 、人n.myc、小鼠Gtx、人p27kip1、人PDGF2/c-sis、人p53、人Pim-1、小鼠Rbm3、果蝇reaper、犬Scamper、果蝇Ubx、人UNR、小鼠UtrA、人VEGF-A、人XIAP、无毛果蝇、酿酒酵母TFIID、酿酒酵母YAP1、烟草蚀纹病毒、芜菁皱缩病毒、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV pEC9、细小双RNA病毒、HCV QC64、人Cosavirus E/D、人Cosavirus F、人Cosavirus JMY、鼻病毒NAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、Salivirus A SH1、Salivirus FHB、Salivirus NG-J1、人副肠孤病毒1、克罗希病毒B(Crohivirus B)、Yc-3、Rosavirus M-7、Shanbavirus A、Pasivirus A、Pasivirus A 2、埃可病毒E14、人副肠孤病毒5、爱知病毒、甲型肝炎病毒HA16、Phopivirus、CVA10、肠道病毒C、肠道病毒D、肠道病毒J、人Pegivirus 2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、Pegivirus A 1220、Pasivirus A 3、萨佩罗病毒、Rosavirus B、Bakunsa病毒、震颤病毒A(Tremovirus A)、猪Pasivirus 1、PLV-CHN、Pasivirus A、Sicininivirus、丙型肝炎病毒K、丙型肝炎病毒A、BVDV1、边缘病病毒、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573双顺反子病毒、湖北小核糖核酸样病毒、CRPV、Salivirus ABN5、Salivirus A BN2、Salivirus A 02394、Salivirus A GUT、Salivirus A CH、Salivirus A SZ1、Salivirus FHB、CVB3、CVB1、埃可病毒7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24或eIF4G的适体。

[0359] 在某些实施方案中,所述IRES完全地或部分地来自真核或细胞IRES。在某些实施方案中,所述IRES来自人基因,其中所述人基因是ABCF1、ABCG1、ACAD10、ACOT7、ACSS3、ACTG2、ADCYAP1、ADK、AGTR1、AHCYL2、AHI1、AKAP8L、AKR1A1、ALDH3A1、ALDOA、ALG13、AMMECR1L、ANGPTL4、ANK3、AOC3、AP4B1、AP4E1、APAF1、APBB1、APC、APH1A、APOBEC3D、APOM、APP、AQP4、ARHGAP36、ARL13B、ARMC8、ARMCX6、ARPC1A、ARPC2、ARRDC3、ASAP1、ASB3、ASB5、ASCL1、ASMTL、ATF2、ATF3、ATG4A、ATP5B、ATP6V0A1、ATXN3、AURKA、AURKA、AURKA、AURKA、B3GALNT1、B3GNTL1、B4GALT3、BAAT、BAG1、BAIAP2、BAIAP2L2、BAZ2A、BBX、BCAR1、BCL2、BCS1L、BET1、BID、BIRC2、BPGM、BPIFA2、BRINP2、BSG、BTN3A2、C12orf43、C14orf93、C17orf62、C1orf226、C21orf62、C2orf15、C4BPB、C4orf22、C9orf84、CACNA1A、CALCOCO2、CAPN11、CASP12、CASP8AP2、CAV1、CBX5、CCDC120、CCDC17、CCDC186、CCDC51、CCN1、CCND1、CCNT1、CD2BP2、CD9、CDC25C、CDC42、CDC7、CDCA7L、CDIP1、CDK1、CDK11A、CDKN1B、CEACAM7、CEP295NL、CFLAR、CHCHD7、CHIA、CHIC1、CHMP2A、CHRNA2、CLCN3、CLEC12A、CLEC7A、CLECL1、CLRN1、CMSS1、CNIH1、CNR1、CNTN5、COG4、COMMD1、COMMD5、CPEB1、CPS1、CRACR2B、CRBN、CREM、CRYBG1、CSDE1、CSF2RA、CSNK2A1、CSTF3、CTCFL、CTH、CTNNA3、CTNNB1、CTNNB1、CTNND1、CTSL、CUTA、CXCR5、CYB5R3、CYP24A1、CYP3A5、DAG1、DAP3、DAP5、DAXX、DCAF4、DCAF7、DCLRE1A、DCP1A、DCTN1、DCTN2、DDX19B、DDX46、DEFB123、DGKA、DGKD、DHRS4、DHX15、DIO3、DLG1、DLL4、DMD UTR、DMD ex5、DMKN、DNAH6、DNAL4、DUSP13、DUSP19、DYNC1I2、DYNLRB2、DYRK1A、ECI2、ECT2、EIF1AD、EIF2B4、EIF4G1、EIF4G2、EIF4G3、ELANE、ELOVL6、ELP5、EMCN、ENO1、EPB41、ERMN、ERVV-1、ESRRG、ETFB、ETFBKMT、ETV1、ETV4、EXD1、EXT1、EZH2、FAM111B、FAM157A、FAM213A、FBXO25、FBXO9、FBXW7、FCMR、FGF1、FGF1、FGF1A、FGF2、FGF2、FGF-9、FHL5、FMR1、

FN1、FOXP1、FTH1、FUBP1、G3BP1、GABBR1、GALC、GART、GAS7、胃泌素、GATA1、GATA4、GFM2、GHR、GJB2、GLI1、GLRA2、GMNN、GPAT3、GPATCH3、GPR137、GPR34、GPR55、GPR89A、GPRASP1、GRAP2、GSDMB、GSTO2、GTF2B、GTF2H4、GUCY1B2、HAX1、HCST、HIGD1A、HIGD1B、HIPK1、HIST1H1C、HIST1H3H、HK1、HLA-DRB4、HMBS、HMGA1、HNRNPC、HOPX、HOXA2、HOXA3、HPCAL1、HR、HSP90AB1、HSPA1A、HSPA4L、HSPA5、HYPK、IFFO1、IFT74、IFT81、IGF1、IGF1R、IGF1R、IGF2、IL11、IL17RE、IL1RL1、IL1RN、IL32、IL6、ILF2、ILVBL、INSR、INTS13、IP6K1、ITGA4、ITGAE、KCNE4、KERA、KIAA0355、KIAA0895L、KIAA1324、KIAA1522、KIAA1683、KIF2C、KIZ、KLHL31、KLK7、KRR1、KRT14、KRT17、KRT33A、KRT6A、KRTAP10-2、KRTAP13-3、KRTAP13-4、KRTAP5-11、KRTCAP2、LACRT、LAMB1、LAMB3、LANCL1、LBX2、LCAT、LDHA、LDHAL6A、LEF1、LINC-PINT、LMO3、LRRRC4C、LRRRC7、LRTOMT、LSM5、LTB4R、LYRM1、LYRM2、MAGEA11、MAGEA8、MAGEB1、MAGEB16、MAGEB3、MAPT、MARS、MC1R、MCCC1、METTL12、METTL7A、MGC16025、MGC16025、MIA2、MIA2、MITF、MKLN1、MNT、MORF4L2、MPD6、MRFAP1、MRPL21、MRPS12、MSI2、MSLN、MSN、MT2A、MTFR1L、MTMR2、MTRR、MTUS1、MYB、MYC、MYCL、MYCN、MYL10、MYL3、MYLK、MYO1A、MYT2、MZB1、NAP1L1、NAV1、NBAS、NCF2、NDRG1、NDST2、NDUFA7、NDUFB11、NDUFC1、NDUFS1、NEDD4L、NFAT5、NFE2L2、NFE2L2、NFIA、NHEJ1、NHP2、NIT1、NKRF、NME1-NME2、NPAT、NR3C1、NRBF2、NRF1、NTRK2、NUDCD1、NXF2、NXT2、ODC1、ODF2、OPTN、OR10R2、OR11L1、OR2M2、OR2M3、OR2M5、OR2T10、OR4C15、OR4F17、OR4F5、OR5H1、OR5K1、OR6C3、OR6C75、OR6N1、OR7G2、p53、P2RY4、PAN2、PAQR6、PARP4、PARP9、PC、PCBP4、PCDHGC3、PCLAF、PDGFB、PDZRN4、PELO、PEMT、PEX2、PFKM、PGBD4、PGLYRP3、PHLDA2、PHTF1、PI4KB、PIGC、PIM1、PKD2L1、PKM、PLCB4、PLD3、PLEKHA1、PLEKHB1、PLS3、PML、PNMA5、PNN、POC1A、POC1B、POLD2、POLD4、POU5F1、PPIG、PQBP1、PRAME、PRPF4、PRR11、PRRT1、PRSS8、PSMA2、PSMA3、PSMA4、PSMD11、PSMD4、PSMD6、PSME3、PSMG3、PTBP3、PTCH1、PTHLH、PTPRD、PUS7L、PVRIG、QPRT、RAB27A、RAB7B、RABGGTB、RAET1E、RALGDS、RALYL、RARB、RCVRN、REG3G、RFC5、RGL4、RGS19、RGS3、RHD、RINL、RIPOR2、RITA1、RMDN2、RNA酶1、RNA酶4、RNF4、RPA2、RPL17、RPL21、RPL26L1、RPL28、RPL29、RPL41、RPL9、RPS11、RPS13、RPS14、RRBP1、RSU1、RTP2、RUNX1、RUNX1T1、RUNX1T1、RUNX2、RUSC1、RXRG、S100A13、S100A4、SAT1、SCHIP1、SCMH1、SEC14L1、SEMA4A、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白A1 (SERPINA1)、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白B4 (SERPINB4)、SERTAD3、SFTPD、SH3D19、SHC1、SHMT1、SHPRH、SIM1、SIRT5、SLC11A2、SLC12A4、SLC16A1、SLC25A3、SLC26A9、SLC5A11、SLC6A12、SLC6A19、SLC7A1、SLFN11、SLIRP、SMAD5、SMARCA1、SMN1、SNCA、SNRNP200、SNRNPB2、SNX12、SOD1、SOX13、SOX5、SP8、SPARCL1、SPATA12、SPATA31C2、SPN、SPOP、SQSTM1、SRBD1、SRC、SREBF1、SRPK2、SSB、SSB、SSBP1、ST3GAL6、STAB1、STAMPB、STAU1、STAU1、STAU1、STAU1、STAU1、STK16、STK24、STK38、STMN1、STX7、SULT2B1、SYK、SYNPR、TAF1C、TAGLN、TANK、TAS2R40、TBC1D15、TBXAS1、TCF4、TDGF1、TDP2、TDRD3、TDRD5、TESK2、THAP6、THBD、THTPA、TIAM2、TKFC、TKTL1、TLR10、TM9SF2、TMC6、TMC02、TMED10、TMEM116、TMEM126A、TMEM159、TMEM208、TMEM230、TMEM67、TMPRSS13、TMUB2、TNFSF4、TNIP3、TP53、TP53、TP73、TRAF1、TRAK1、TRIM31、TRIM6、TRMT1、TRMT2B、TRPM7、TRPM8、TSPEAR、TTC39B、TTLL11、TUBB6、TXLNB、TXNIP、TXNL1、TXNRD1、TYROBP、U2AF1、UBA1、UBE2D3、UBE2I、UBE2L3、UBE2V1、UBE2V2、UMPS、UNG、UPP2、USMG5、USP18、UTP14A、UTRN、UTS2、VDR、VEGFA、VEGFA、VEPH1、VIPAS39、VPS29、VSIG10L、WDHD1、WDR12、WDR4、WDR45、WDYHV1、WRAP53、XIAP、XPNPEP3、YAP1、YWHAZ、YY1AP1、ZBTB32、ZNF146、ZNF250、ZNF385A、ZNF408、ZNF410、ZNF423、

ZNF43、ZNF502、ZNF512、ZNF513、ZNF580、ZNF609、ZNF707或ZNRD1。

[0360] ii.合成的TIE:适体复合物、修饰的核苷酸、IRES变体和其它经工程改造的TIE

[0361] 如本文所述,在某些实施方案中,翻译起始元件(TIE)包含合成的TIE。在某些实施方案中,合成的TIE包含适体复合物、合成的IRES或其它能够启动线性RNA或环状RNA多核苷酸的翻译的经工程改造的TIE。

[0362] 在某些实施方案中,一个或多个适体序列能够结合真核起始因子的组分以增强或启动翻译。在某些实施方案中,适体可以用于通过促进特定真核起始因子(eIF)来增强体内和体外翻译(例如,在W02019081383A1中的适体能够结合真核起始因子4F(eIF4F)。在某些实施方案中,适体或适体复合物可以能够结合EIF4G、EIF4E、EIF4A、EIF4B、EIF3、EIF2、EIF5、EIF1、EIF1A、40S核糖体、PCBP1(聚胞苷酸结合蛋白)、PCBP2、PCBP3、PCBP4、PABP1(聚腺苷酸结合蛋白)、PTB、Argonaute蛋白家族、HNRNPK(异质核内核糖核蛋白K)或La蛋白。

[0363] c.终止序列

[0364] 在某些实施方案中,所述核心功能元件包含终止序列。在某些实施方案中,所述终止序列包含终止密码子。在一个实施方案中,所述终止序列包含终止盒。在某些实施方案中,所述终止盒包含至少2个终止密码子。在某些实施方案中,所述终止盒包含至少2个终止密码子框架。在同一个实施方案中,在终止盒中的终止密码子的框架各自包含1个、2个或更多个终止密码子。在某些实施方案中,所述终止盒包含LoxP或RoxStopRox、或frt侧翼终止盒。在同一个实施方案中,所述终止盒包含lox-stop-lox终止盒。

[0365] C.变体

[0366] 在某些实施方案中,本文提供的环状RNA多核苷酸包含修饰的RNA核苷酸和/或修饰的核苷。在某些实施方案中,所述修饰的核苷是 m^5C (5-甲基胞苷)。在另一个实施方案中,所述修饰的核苷是 m^5U (5-甲基尿苷)。在另一个实施方案中,所述修饰的核苷是 m^6A (N^6 -甲基腺苷)。在另一个实施方案中,所述修饰的核苷是 s^2U (2-硫代尿苷)。在另一个实施方案中,所述修饰的核苷是 Ψ (假尿苷)。在另一个实施方案中,所述修饰的核苷是Um(2'-O-甲基尿苷)。在其它实施方案中,所述修饰的核苷是 m^1A (1-甲基腺苷); m^2A (2-甲基腺苷);Am(2'-O-甲基腺苷); $ms^2 m^6A$ (2-甲硫基- N^6 -甲基腺苷); i^6A (N^6 -异戊烯基腺苷); $ms^2 i^6A$ (2-甲硫基- N^6 -异戊烯基腺苷); io^6A (N^6 -(顺式-羟基异戊烯基)腺苷); $ms^2 io^6A$ (2-甲硫基- N^6 -(顺式-羟基异戊烯基)腺苷); g^6A (N^6 -甘氨酸基氨甲酰基腺苷); t^6A (N^6 -苏氨酸基氨甲酰基腺苷); $ms^2 t^6A$ (2-甲硫基- N^6 -苏氨酸基氨甲酰基腺苷); $m^6 t^6A$ (N^6 -甲基- N^6 -苏氨酸基氨甲酰基腺苷); hn^6A (N^6 -羟基正缬氨酸基氨甲酰基腺苷); $ms^2 hn^6A$ (2-甲硫基- N^6 -羟基正缬氨酸基氨甲酰基腺苷);Ar(p)(2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯));I(肌苷); m^1I (1-甲基肌苷); m^1Im (1,2'-O-二甲基肌苷); m^3C (3-甲基胞苷);Cm(2'-O-甲基胞苷); s^2C (2-硫代胞嘧啶); ac^4C (N^4 -乙酰基胞苷); f^5C (5-甲酰基胞苷); m^5Cm (5,2'-O-二甲基胞苷); ac^4Cm (N^4 -乙酰基-2'-O-甲基胞苷); k^2C (赖胞苷(lysidine)); m^1G (1-甲基鸟苷); m^2G (N^2 -甲基鸟苷); m^7G (7-甲基鸟苷);Gm(2'-O-甲基鸟苷); m^2_2G (N^2,N^2 -二甲基鸟苷); m^2Gm ($N^2,2'$ -O-二甲基鸟苷); m^2_2Gm ($N^2,N^2,2'$ -O-三甲基鸟苷);Gr(p)(2'-O-核糖基鸟苷(磷酸酯));yW(怀丁苷); o_2yW (过氧怀丁苷);OHyW(羟基怀丁苷);OHyW*(低修饰的羟基怀丁苷);imG(怀俄苷);mimG(甲基怀俄苷);Q(嘌呤);oQ(环氧嘌呤);galQ(半乳糖基-嘌呤);manQ(甘露糖基-嘌呤);preQ₀(7-氰基-7-脱氮鸟苷);preQ₁(7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷);G⁺(古嘌呤);D(二氢尿苷); m^5Um (5,2'-O-二甲基尿苷); s^4U (4-

硫代尿苷); m^5s^2U (5-甲基-2-硫代尿苷); s^2Um (2-硫代-2'-O-甲基尿苷); acp^3U (3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷); ho^5U (5-羟基尿苷); mo^5U (5-甲氧基尿苷); cmo^5U (尿苷5-氧基乙酸); $mcmo^5U$ (尿苷5-氧基乙酸甲酯); chm^5U (5-(羧基羟甲基)尿苷); $mchm^5U$ (5-(羧基羟甲基)尿苷甲酯); mcm^5U (5-甲氧基羰基甲基尿苷); mcm^5Um (5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基尿苷); mcm^5s^2U (5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷); nm^5S^2U (5-氨基甲基-2-硫代尿苷); mnm^5U (5-甲基氨基甲基尿苷); mnm^5s^2U (5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷); mnm^5se^2U (5-甲基氨基甲基-2-硒代尿苷); ncm^5U (5-氨甲酰基甲基尿苷); ncm^5Um (5-氨甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷); $cmnm^5U$ (5-羧甲基氨基甲基尿苷); $cmnm^5Um$ (5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷); $cmnm^5s^2U$ (5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷); m^6_2A (N^6, N^6 -二甲基腺苷); Im (2'-O-甲基肌苷); m^4C (N^4 -甲基胞苷); m^4Cm ($N^4, 2'$ -O-二甲基胞苷); hm^5C (5-羟甲基胞苷); m^3U (3-甲基尿苷); cm^5U (5-羧甲基尿苷); m^6Am ($N^6, 2'$ -O-二甲基腺苷); m^6_2Am ($N^6, N^6, 0-2'$ -三甲基腺苷); $m^{2,7}G$ ($N^2, 7$ -二甲基鸟苷); $m^{2,2,7}G$ ($N^2, N^2, 7$ -三甲基鸟苷); m^3Um (3,2'-O-二甲基尿苷); m^5D (5-甲基二氢尿苷); f^5Cm (5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷); m^1Gm (1,2'-O-二甲基鸟苷); m^1Am (1,2'-O-二甲基腺苷); τm^5U (5-牛磺酸甲基尿苷); τm^5s^2U (5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷)); $imG-14$ (4-脱甲基怀俄苷); $imG2$ (异怀俄苷); 或 ac^6A (N^6 -乙酰基腺苷)。

[0367] 在某些实施方案中,所述修饰的核苷可以包括选自以下的化合物:吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、 N^4 -乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、 N^4 -甲基胞苷、5-羟甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉林、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、 N^6 -甲基腺苷、 N^6 -异戊烯基腺苷、 N^6 -(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基- N^6 -(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、 N^6 -甘氨酸基氨甲酰基腺苷、 N^6 -苏氨酸基氨甲酰基腺苷、2-甲硫基- N^6 -苏氨酸基氨甲酰基腺苷、 N^6, N^6 -二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、怀俄苷、怀丁苷、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、 N^2 -甲基鸟苷、 N^2, N^2 -二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、 N^2 -甲基-6-硫代-鸟苷和 N^2, N^2 -二甲基-6-硫代-鸟苷。在另一个实施方案中,所述修饰独立地选自5-甲基胞嘧啶、假尿苷和1-甲基假尿苷。

[0368] 在某些实施方案中,所述修饰的核糖核苷包括5-甲基胞苷、5-甲氧基尿苷、1-甲

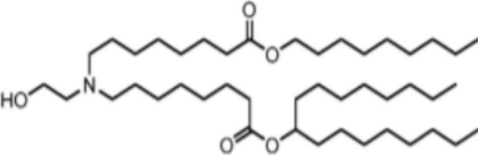
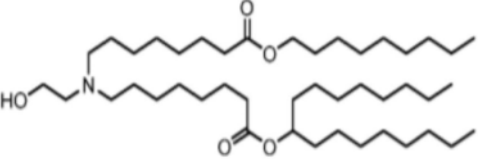
基-假尿苷、N6-甲基腺苷和/或假尿苷。在某些实施方案中,这样的修饰的核苷提供了另外的稳定性和对免疫活化的抵抗力。

[0369] 在特定实施方案中,多核苷酸可以是密码子优化的。密码子优化的序列可以是这样的序列,其中编码多肽的多核苷酸中的密码子已经被替换以增加所述多肽的表达、稳定性和/或活性。影响密码子优化的因素包括但不限于下列一项或多项:(i)两种或更多种生物体或基因或合成构建的偏好表之间的密码子偏好的变化,(ii)生物体、基因或基因组内密码子偏好程度的变化,(iii)密码子(包含环境)的系统性变化,(iv)根据其解码tRNA的密码子的变化,(v)根据GC%的密码子的变化,无论是整体还是在三联体的一个位置,(vi)与参考序列(例如天然存在的序列)的相似程度的变化,(vii)密码子频率截止的变化,(viii)从DNA序列转录的mRNA的结构性质,(ix)关于密码子置换集的设计所基于的DNA序列的功能的先前知识,和/或(x)每种氨基酸的密码子集合的系统变化。在某些实施方案中,密码子优化的多核苷酸可以最大限度地减少核酶碰撞和/或限制表达序列和核心功能元件之间的结构干扰。

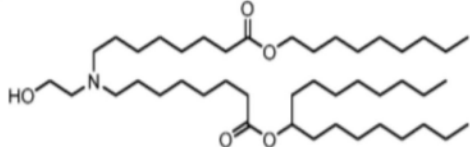
[0370] 3.有效负载

[0371] 在某些实施方案中,所述表达序列编码治疗性蛋白。在某些实施方案中,所述治疗性蛋白选自下表中所列的蛋白。

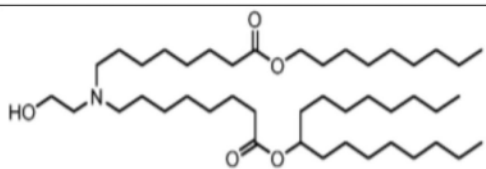
[0372]

有效负载	序列	靶细胞/器官	优选的递送制剂
CD19 CAR	序列 309-314 中的任一个	T 细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) β-谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)
BCMA CAR	MALPVTALLLPLALL LHAARPDIVLTQSPAS LAVSLGERATINCRAS ESVSVIGAHLIHWYQ QKPGQPPKLLIYLASN LETGVPARFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDAAIY YCLQSRIFPRTFGQGT KLEIKGSTSGSGKPGS GEGSTKGQVQLVQSG SELKKPGASVKVSKK ASGYTFTDYSINWVR QAPGQGLEWMGWIN TETREPAYAYDFRGR FVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARD YSYAMDYWGQGTLV	T 细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) β-谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)

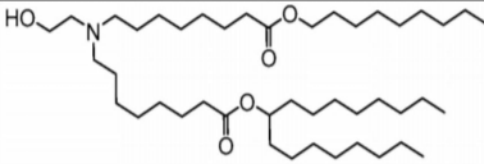
[0373]

	TVSSAAATTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCG VLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPP R		
MAGE-A 4 TCR	TCR α 链: KNQVEQSPQSLIILEG KNCTLQCNYTVSPFSN LRWYKQDTGRGPVSL TIMTFSENTKSNGRYT ATLDADTKQSSLHITA SQLSDSASYICVVNHS GGSYIPTFGRGTSLIV HPYIQKPDPAVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACAN	T 细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) β-谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)

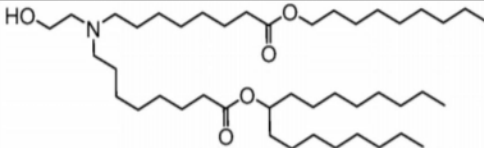
[0374]

	AFNNSIIPEDTFFPSPE SS TCR β 链: DVKVTQSSRYLVKRT GEKVFLECVQDMDHE NMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDI PEGYSVSREKKERFSL ILESASTNQTSMYLCA SSFLMTSGDPYEQYFG PGTRLTVTEDLKNVF PPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPD HVELSWVWNGKEVH SGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD		
NY-ESO TCR	TCR α 细胞外序列 MQEVTQIPAALSVPE GENLVLNCSFTDSAIY NLQWFRQDPGKGLTS LLLIQSSQREQTSGRL NASLDKSSGRSTLYIA ASQPGDSATYLC AVR PTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPY	T 细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) β-谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)

[0375]

	TCR β 细胞外序列 MGVTQTPKFQVLKTG QSMTLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLR LIHYSVGAGITDQGEV PNGYNVSRSTTEDFPL RLLSAAPSQTSVYFCA SSYVGNTGELFFGEGS RLTVL		
EPO	APPRLICDSRVLERYL LEAKEAENITTGCAE HCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAV EVWQGLALLSEAVLR GQALLVNSSQPWEPL QLHVDKAVSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPP DAASAAPLRTITADTF RKLFRVYSNFLRGKL KLYTGEACRTGDR	肾或骨髓	
PAH	MSTAVLENPGLGRKL SDFGQETSYIEDNCNQ NGAISLIFSLKEEVGA LAKVLRLFEENDVNL THIESRPSRLKKDEYE FFTHLDKRSLPALTNII KILRHDIGATVHELRSR DKKKDTPWFPRTIQ	肝细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) 胆固醇(38.5 摩尔%) PEG-DMG (1.5%)

[0376]

	ELDRFANQILSYGAEL DADHPGFKDPVYRAR RKQFADIAYNYRHGQ PIPRVEYMEEEKKTW GTVFKTLKSLYKTHA CYEYNHIFPLLEKYCG FHEDNIPQLEDVSQFL QTCTGFRLRPVAGLL SSRDFLGGLAFRVFHC TQYIRHGSKPMYTPE PDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLG APDEYIEKLATIIYWFT VEFGLCKQGDSIKAY GAGLLSSFGEQYCLS EKPKLLPLELEKTAIQ NYTVTEFQPLYVAES FNDAKEKVRNFAATIP RPFVRYDPYTQRIEV LDNTQQLKILADSINS EIGILCSALQKIK		或 MC3 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) 胆固醇(38.5 摩尔%) PEG-DMG (1.5%)
CPS1	LSVKAQTAHIVLEDG TKMKGYSFGHPSSVA GEVVFNTGLGGYPEA ITDPAYKGQILTMANP IIGNGGAPDTTALDEL GLSKYLESNGIKVSGL LVLDYSKDYNHWLAT KSLGQWLQEEKVPAI	肝细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) 胆固醇(38.5 摩尔%) PEG-DMG (1.5%)

[0377]

YGV DTRMLTKIIRDK GTMLGKIEFEGQPVD FVDPNKQNLIAEVSTK DVKVYGKGNPTKVVA VDCGIKNNVIRLLVKR GAEVHLPWNHDFTK MEYDGILIAGGPGNP ALAEPLIQNVRKILES DRKEPLFGISTGNLIT GLAAGAKTYKMSMA NRGQNQPVLNITNKQ AFITAQNHGYALDNT LPAGWKPLFVNVNDQ TNEGIMHESKPFFAV QFHPEVTPGPIDTEYL FDSFFSLIKKGKATTIT SVLPKPALVASRVEVS KVLILGSGGLSIGQAG EFDYSGSQAVKAMKE ENVKTVLMNPNIASV QTNEVGLKQADTVYF LPITPQFVTEVIKAEQ PDGLILGMGGQTALN CGVELFKRGVLKEYG VKVLGTSVESIMATED RQLFSDKLNEINEKIA PSFAVESIEDALKAAD TIGYPVMIRSAYALGG LGSGICPNRETLMCLS	或 MC3 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) 胆固醇(38.5 摩尔%) PEG-DMG (1.5%)
---	--

[0378]

TKAFAMTNQILVEKS VTGWKEIEYEVVRDA DDNCVTVCNMENVDA MGVHTGDSVVVAPAQ TLSNAEFQMLRRTSIN VVRHLGIVGECNIQFA LHPTSMEYCHIEVNAR LSRSSALASKATGYPL AFIAAKIALGIPLPEIK NVVSGKTSACFEPSLD YMVTKIPRWDLDRFH GTSSRIGSSMKSVGEV MAIGRTFEESFQKAL RMCHPSIEGFTPRLP MNKEWPSNLDLRKEL SEPSSTRIYAIKAIDD NMSLDEIEKLTYIDK WFLYKMRDILNMEKT LKGLNSESMTETLK RAKEIGFSDKQISKCL GLTEAQTRELRLLKKN IHPWVKQIDTLAAEYP SVTNYLYVTYNGQEH DVNFDDHGMMVLGC GPYHIGSSVEFDWCA VSSIRTLRQLGKKTVV VNCNPETVSTDFDECD KLYFEELSLERILDIY HQEACGGCHISVGGQI		
---	--	--

[0379]

PNNLAVPLYKNGVKI MGTSPLQIDRAEDRSI FSAVLDELKVAQAPW KAVNTLNEALEFAKS VDYPCLLRPSYVLGS AMNVVFSEDEMKKFL EEATRVSQEHPVVL KFVEGAREVEMDAVG KDGRVISHAISEHVED AGVHSGDATLMLPTQ TISQGAIEKVKDATTRK IAKAFAISGPFNVQFL VKGNDVLVIECNLRA SRSFPFVSKTLGVDFI DVATKVMIGENVDEK HLPTLDHPIIPADYVAI KAPMFSWPRLRDADP ILRCEMASTGEVACF GEGIHATAFLKAMLST GFKIPQKGILIGIQQSF RPRFLGVAEQLHNEG FKLFATEATSDWLNA NNVPATPVAWPSQEG QNPSLSSIRKLIRDGSI DLVINLPNNNTKFBVHD NYVIRRTAVDSGIPLL TNFQVTKLFAEAVQK SRKVDSKSLFHYRQYS AGKAA		
---	--	--

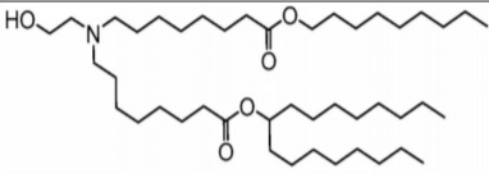
[0380]

Cas9	MKRNYILGLDIGITSV GYGIIDYETRDVIDAG VRLFKEANVENNEGR RSKRGARRLKRRRRH RIQRVKLLFDYNLL TDHSELGINPYEARV KGLSQKLSEEEFSAAL LHLAKRRGVHNVNEV EEDTGNELSTKEQISR NSKALEEKYVAELQL ERLKKDGEVRGSINR FKTSYVKEAKQLLK VQKAYHQLDQSFIDT YIDLLETRRTYYEGPG EGSPFGWKDIKEWYE MLMGHCTYFPEELRS VKYAYNADLYNALND LNNLVITRDENEKLEY YEKFQIENVFKQKKK PTLKQIAKEILVNEED IKGYRVTSTGKPEFTN LKVYHDIKDITARKEI IENAELLDQIAKILTIY QSSEDIQEELTNLSE LTQEEIEQISNLKGYT GTHNLSLKAINLILDE LWHTNDNQIAIFNRL KLVPKKVDLSQQKEI PTTLVDDFILSPVVKR	免疫细胞	(50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) β-谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)
------	--	------	--

[0381]

SFIQSIKVINAIHKKYG LPNDIIIELAREKNSKD AQKMINEMQKRNRQ TNERIEEIHRTTGKEN AKYLIEKIKLHDMQE GKCLYSLEAIPLEDLL NNPFNYEVDHIIPRSVS FDNSFNKVLVKQEE NSKKGNRTPFQYLSSS DSKISYETFKKHILNL AKGKGRISKTKKEYL LEERDINRFSVQKDFI NRNLVDTRYATRGLM NLLRSYFRVNNLDVK VKSINGGFTSFLRRK WKFKKERNKGYKHH AEDALIIANADFIFKE WKKLDKAKKVMENQ MFEEKQAESMPEIET EQEYKEIFITPHQIKHI KDFKDYKYSHRVDKK PNRELINDTLYSTRKD DKGNTLIVNNLNGLY DKDNDKLKKLINKSP EKLLMYHHPQTYQ KLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKY SKKDNGPVIKKIKYY GNKLNAHLDITDDYP		
--	--	--

[0382]

	NSRNKVVKLSLKPYR FDVYLDNGVYKFVTV KNLDVIKKENYYEVN SKCYEEAKKLKKISN QAEFIASFYNNDLIKIN GELYRVIGVNNDLLN RIEVNMIDITYREYLE NMNDKRPPRIIKTIAS KTQSIKKYSTDILGNL YEVKSKKHPQIIKKG		
ADAMTS 13	AAGGILHLELLVAVG PDVFQAHQEDTERYV LTNLNIGAELLRDPSL GAQFRVHLVKMVILT EPEGAPNITANLTSSL LSVCGWSQTINPEDDT DPGHADLVLYITRFDL ELPDGNRQVRGVTQL GGACSPTWSCLITEDT GFDLGVTIAHEIGHSF GLEHDGAPGSGCGPS GHVMASDGAAPRAGL AWSPCSRRQLLSLLSA GRARCVWDPPRPQPG SAGHPPDAQPGLYYS ANEQCRVAFGPKAVA CTFAREHLDMCQALS CHTDPLDQSSCSRLLV PLLDGTECGVEKWCS	肝细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) 胆固醇(38.5 摩尔%) PEG-DMG (1.5%) 或 MC3 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) 胆固醇(38.5 摩尔%) PEG-DMG (1.5%)

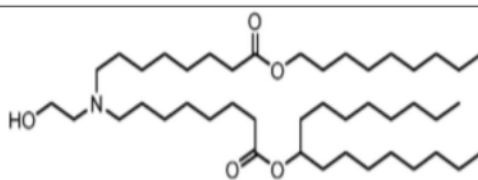
[0383]

KGRCRSLVELTPIAAV HGRWSSWGPRSPCSR SCGGGVVTRRRQCNN PRPAFGGRACVGADL QAEMCNTQACEKTQL EFMSQQCARTDGQPL RSSPGGASFYHWGAA VPHSQGDALCRHMCR AIGESFIMKRGDSFLD GTRCMPSPGPREDGTL SLCVSGSCRTFGCDG RMDSQQVWDRCQVC GGDNSTCSPRKGSFTA GRAREYVTFLTVPN LTSVYIANHRPLFTHL AVRIGGRYVVAGKMS ISPNTTYPSSLLEDGRV EYRVALTEDRLPRLE EIRIWGPLQEDADIQV YRRYGEEYGNLTRPD ITFTYFQPKPRQAWV WAAVRGPCSVSCGAG LRWVNYSCLDQARKE LVETVQCQGSQQPPA WPEACVLEPCPPYWA VGDFGPCSASC GGGL RERPVRVCVEAQGSLL KTLPPARCRAQAQQP AVALET CNPQPCPAR		
--	--	--

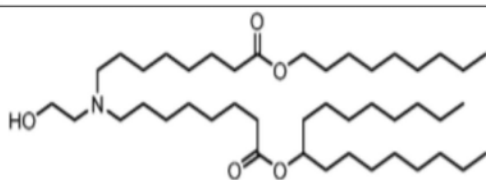
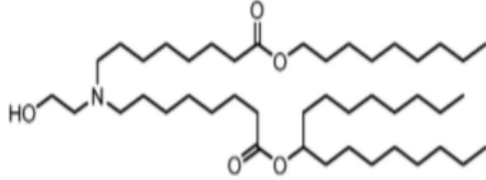
[0384]

WEVSEPSSCTSAGGA GLALENETCVPGADG LEAPVTEGPGSVDEK LPAPEPCVGMSCPPG WGHLDATSAGEKAPS PWGSIRTGAQAAHVW TPAAGSCSVSCGRGL MELRFLCMDSALRVP VQEELCGLASKPGSR REVCQAVPCPARWQY KLAACSVSCGRGVVR RILYCARAHGEDDGE EILLDTQCQGLPRPEP QEACSLEPCPPRWKV MSLGPCSASCGLGTA RRSVACVQLDQGQDV EVDEAACAALVRPEA SVPCLIADCTYRWHV GTWMECSVSCGDGIQ RRRDTCLGPQAQAPV PADFCQHLPKPVTVR GCWAGPCVGQGTPSL VPHEEAAAPGRTTAT PAGASLEWSQARGLL FSPAPQPRLLPGPQE NSVQSSACGRQHLEP TGTIDMRGPGQADCA VAIGRPLGEVVTLRVL ESSLNCSAGDMLLLW		
---	--	--

[0385]

	GRLTWRKMCRKLLD MTFSSKTNTLVVRQR CGRPGGGVLLRYGSQ LAPETFYRECDMQLF GPWGEIVSPSLSPATS NAGGCRLFINVAPHA RIAIHALATNMGAGT EGANASYILIRDTHSL RTTAFHGQQVLYWES ESSQAEMEFSEGFLKA QASLRGQYWTLQSW VPQMOPQSWKGKE GT		
FOXP3	MPNPRPGKPSAPSLAL GPSPGASPSWRAAPK ASDLLGARGPGGTFQ GRDLRGGAHASSSSL NPMPPSQLQLPTLPLV MVAPSGARLGPLPHL QALLQDRPHFMHQLS TVDAHARTPVLQVHP LESPAMISLTPPTTAT GVFSLKARPGLPPGIN VASLEWVSREPALLC TFPNPSAPRKDSTLSA VPQSSYPLLANGVCK WPGCEKVFEEDFL KHCQADHLLDEKGRA QCLLQREMVQSLEQQ	免疫细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) β-谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)

[0386]

	LVLEKEKLSAMQAHL AGKMALTKASSVASS DKGSCCIVAAGSQGP VVPASWGPREADSL FAVRRHLWGSHGNST FPEFLHNMDYFKFHN MRPPFTYATLIRWAIL EAPEKQRTLNEIYHW FTRMFAFFRNHPATW KNAIRHNLSLHKCFV RVESEKGAVWTVDEL EFRKKRSQRPSRCSNP TPGP		
IL-10	SPGQGTQSENSCTHFP GNLPNMLRDLRDAFS RVKTFFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLG CQALSEMIQFYLEE MPQAENQDPDIKAHV NSLGENLKTLLRLRLR RCHRFLPCENKSKAV EQVKNAFNKLQEKG YKAMSEFDIFINYIEA YMTMKIRN	免疫细胞	 (50 摩尔%) DSPC (10 摩尔%) β-谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)
IL-2	APTSSTKKTQLQLEH LLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSK	免疫细胞	 (50 摩尔%)

[0387]

	NFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITF CQSIISTLT		DSPC (10 摩尔%) β -谷甾醇(28.5 摩尔%) 胆固醇(10 摩尔%) PEG DMG (1.5 摩尔%)
BCSP31 (BCSP_B RUME)	MKFGSKIRRLAVAAV AGAIALGASFAVAQAP TFFRIGTGGTAGTYYP IGGLIANAISGAGEKG VPGLVATAVSSNGSVA NINAIKSGALESFTQ SDVAYWAYNGTGLYD GKGKVEDLRLLATLY PETIHIVARKDANIKS VADLKGKRVSLDEPG SGTIVDARIVLEAYGL TEDDIKAEHLKPGPA GERLKD GALDAYFFV GGYPTGAISELAISNGI SLVPISGPEADKILEK YSFFSKDVVPAGAYK DVAETPTLAVAAQWV TSAKQPDDLIYNITKV LWNEDTRKALDAGH AKGKLIK LDSATSSLG IPLHPGAERFYKEAGV LK	免疫细胞	
MOMP (MOMP6 _CHLP6)	MKKLLKSALLFAATG SALSLQALPVG NPAEP SLLDGTMWEGASGD	免疫细胞	

[0388]

	PCDPCATWCDAISIRA GYYGDYVFDRVLKVD VNKTFSGMAATPTQA TGNASNTNQPEANGR PNIA YGRHMQDAEWF SNA AFLALNIWDRFDI FCTLGASNGYFKASSA AFNLVGLIGFSAASSIS TDLPMQLPNVGITQG VVEFYTDTSFSWSVG ARGALWECGCATLG AEFQYAQSNPKIEML NVTSSPAQFVIHKPRG YKGASSNFPLPITAGT TEATDTKSATIKYHE WQVGLALS YRLNML VPYIGVNWSRATFDA DTIRIAQPKLKSEILNI TTWNPSLIGSTTALPN NSGKDVLS DVLQIASI QINKMKSRKACGVAV GATLIDADKWSITGEA RLINERAAHMNAQFR F		
FomA	MKKLALVLGLLL VVG SVASAKEVMPAPTPAP EKVVEYVEKPVIVYR DREVAPAWRPNGSVD VQYRWYGEVEKKNP	免疫细胞	

[0389]

	KDDKDENWATGKVN AGRLQTLTKVNFTEK QTLEVRTRNHHTLND TDANNKKSNGAADEY RLRHFYNFGKLGSSK VNATSRVEFKQKTND GEKSLGASVLDFAD YIYSNNFFKVDKLGLR PGYKYVWKGHNGE EGTPTVHNEYHLAFE SDFTLPFNFALNLEYD LSYNRYREKFETTDG LKKAEWYGELTAVLS NYTPLYKAGAFELGF NAEGGYDTYNMHQY KRIGGEDGTSVDRRD YELYLEPTLQVSYKPT DFVKLYAAAGADYRN RITGESEVKRWRWQP TASAGMKVTF		
MymA	MNQHFDVLIIGAGLS GIGTACHVTAEFPDK TIALLERERLGGTW DLFRYPGVRSDSDF TFGYKFRPWRDVKVL ADGASIRQYIADTATE FGVDEKIHVGLKVNT AEWSSRQCRWTVAG VHEATGETRITYTCDY	免疫细胞	

[0390]

	LISCTGYNYDAGYLP DFPGVHRFGGRCVHP QHWPELDYSGKKVV VIGSGATAVTLVPAM AGSNPGSAAHVTMLQ RSPSYIFSLPAVDKISE VLGRFLPDRWVYEF RRRNIAIQRKLYQAC RRWPKLMRRLLLWE VRRRLGRSVDMSNFT PNYLPWDERLCAVPN GDLFKTLASGAASVV TDQIETFTEKGILCKS GREIEADIIVTATGLNI QMLGGMRLIVDGAEY QLPEKMTYKGVLLN APNLAWIIGYTNASW TLKSDIAGAYLCRLLR HMADNGYTVATPRDA QDCALDVGMFDQLNS GYVKRGQDIMPRQGS KHPWRVLMHYEKDA KILLEDPIDDGVLHFA AAAQDHAAA		
ESAT6	MTEQQWNFAGIEAAA SAIQGNVTSIHSLLE GKQSLTKLAAAWGGS GSEAYQGVQQKWDA TATELNNALQNLARTI	免疫细胞	

[0391]

	SEAGQAMASTEGNVT GMFA		
PorB	MKKSLIALTLAALPV AAMADVTLYGTIKAG VETYRFVAHNGAQAS GVETATEIADLGSKIG FKGQEDLGNGLKAIW QLEQKAYVSGTNTGW GNRQSFIGLKGGFGK VRVGRLNSVLKDTGG FNPWEGKSEYLSLSNI ARPEERPISVRYDSPE FAGFSGSVQYVPNDNS GENKSESYHAGFNYK NSGFFVQYAGSYKRH NYTTEKHQIHLVGG YDHDALYASVAVQQQ DAKLAWPDDNSHNSQ TEVATTVAIRFGNVT PRVSYAHGFKGSVYE ANHDNTYDQVVVGAE YDFSKRTSALVSAGW LQEGKGA	免疫细胞	
PVL (Panton Valentine 杀白细胞 素)	FVGYKPYSQNPRDYF VPDNELPPLVHSGFNP SFIATVSHEKSGDTS EFEITYGRNMDVTHA TRRTTHYGNSYLEGS RIHNAFVNRNYTVKY	免疫细胞	

[0392]

	EVNWKTHEIKVKGHN		
孔蛋白	EVKLSGDARMGVMY NGDDWNFSSRSRVLF TMSGTTDSGLEFGASF KAHESVGAETGEDGT VFLSGAFGKIEMGDA LGASEALFGDLYEVG YTDLDDRGGNDIPYL TGDERLTAEDNPVLL YTYSAGAFSVAASMS DGKVGETSEDDAQEM AVAAAYTFGNYTVGL GYEKIDSPDTALMAD MEQLELAAIAKFGAT NVKAYYADGELDRDF ARAVFDLTPVAAAAT AVDHKAYGLSVDSTF GATTVGGYVQVLDID TIDDVTTYGLGASYDL GGGASIVGGIADNDLP NSDMVADLGVKFKF	免疫细胞	
OmpA	MKKTAIAIAVALAGF ATVAQAAPKDNTWYT GAKLGWSQYHDTGFI NNNGPTHEENQLGAGA FGGYQVNPYVGFEMG YDWLGRMPYKGSVE NGAYKAQGVQLTAKL GYPITDDLDIYTRLGG	免疫细胞	

[0393]

	MVWRADTKSNVYGK NHDTGVSPVFAGGVE YAITPEIATRLEYQWT NNIGDAHTIGTRPDNG MLSLGVSYRFGQGEA APVVAPAPAPAPEVQT KHFTLKSDVLFNFK ATLKPEGQAALDQLY SQLSNLDPKDGSVVVL GYTDRIGSDAYNQGL SERRAQSVVDYLISKG IPADKISARGMGESNP VTGNTCDNVKQRAAL IDCLAPDRRVEIEVKG IKDVVTQPQA		
MOMP	AGVATATGTKSATIN YHEWQVGASLSYRLN SLVPYIGVQWSRATFD ADNIRIAQPKLPTAVL NLTAWNPSLLGNATA LSTTDSFSDF	免疫细胞	
PepO	MTTYQDDFYQAVNG KWAETAVIPDDKPRT GGFSDLADEIEALML DTTDAWLAGENIPDD AILKNFVKFHRLVAD YAKRDEVGVSILPLI EEYQSLKSFSEFVANI AKYELAGLPNEFPFSV	免疫细胞	

[0394]

APDFMNAQLNVLWAE APSILLPDTTTYEEGN EKAEELRGIWRQSQE KLLPQFGFSTEEIKDL LDKVIELDKQLAKYV LSREEGSEYAKLYHP YVWADFKKLAPELPL DSIFEKILGQVPDKVI VPEERFWTEFAATYY SEANWDLLKANLIVD AANAYNAYLTDDIRV ESGAYSRALSGTPQA MDKQKAAFYLAQGPF SQALGLWYAGQKFSP EAKADVESKVARMI E VYKSRL ETADWL APATRE KAITKL NVITPH I GYPEKL PETYAK KVI DESLSL VENAQN LAKI TIAHTW SKWNKP VDR SEWHMP AHLVN AYY DPQQNQ IVFPAA ILQE PFYSLD QSSSANY GGI GAVIAH EISHAF DTNG ASFDEH GSLNDW WTQ EDYAAF KERTDK IVA QFDGLE SHGAKV NGK LTVSE NVADLG GVAC ALEAAQ SEEDFS ARDF		
---	--	--

[0395]

	FINFATIWRMKAREE YMQMLASIDVHAPGE LRTNVTLTNFDAFHE TFDIKEGDAMWRAPK DRVIIW		
OmpU	MNKTLIALAVSAAAV ATGAYADGINQSGDK AGSTVYSAKGTSLEV GGRAEARLSLKDGA QDNSRVRLNFLGKAEI NDSLYGVGFYEGEFT TNDQGKNASNNSLDN RYTYAGIGGTYGEVT YGKNDGALGVITDFT DIMSYHGNTAAEKIA VADRVDNMLAYKGQ FGDLGVKASYRFADR NAVDAMGNVVTETNA AKYSDNGEDGYLSAI YTFGDTGFNVGAGYA DQDDQNEYMLAASYR MENLYFAGLFTDGEL AKDVDYTGVELAAGY KLGQAAFTATYNNAE TAKETSADNFAIDATY YFKPNFRSYISYQFNL LDSDKVGKVASDEL AIGLRYDF	免疫细胞	
二氧四氢	MKGGAGVPDLPSLDA	免疫细胞	

[0396]

蝶啶合酶	SGVRLAIVASSWHGKI CDALLDGARKVAAGC GLDDPTVVRVLGAIEI PVVAQELARNHDAVV ALGVVIRGQTPHFDY VCDAVTQGLTRVSLD SSTPIANGVLTTNTEE QALDRAGLPTSAEDK GAQATVAALATALTL RELRAHS		
Omp16	MKKLTKVLLVAGSVA VLAACGSSKKDESAG QMFGGYSVQDLQQR YNTVYFGFDKYNIEG EYVQILDAHAAFLNA TPATKVVEGNTDER GTPEYNIALGQRRAD AVKHYSAGKVQAGQ VSTVSYGEEKPAVLG HDEAAYSKNRRAVLA Y	免疫细胞	
Omp19	MGISKASLLSLAAAGI VLAGCQSSRLGNLDN VSPPPPPAPVNAVPA TVQKGNLDSPTQFPN APSTDMSAQSGTQVA SLPPASAPDLTPGAVA GVWNASLGGQSKIA TPQTKYGQGYRAGPL	免疫细胞	

[0397]

	RCPGELANLASWAVN GKQLVLYDANGGTVA SLYSSGQGRFDGQTT GGQAVTLRS		
CobT	MQILADLLNTIPAIDS TAMSRAQRHIDGLLK PVGSLGKLEVLAIQLA GMPGLNGIPHVGGKA VLVMCADHGVWEEG VAISPKEVTAIQAENM TRGTTGVCVLAEQAG ANVHVIDVGIDTAEP PGLINMRVARGSGNIA SAPAMSRRQAEKLLL DVICYTQELAKNGVT LFGVGELGMANTTPA AAIVSTITGRDPEEVV GIGANLPTDKLANKID VVRRAITLNQPNPQD GVDVLAKVGGFDLVG IAGVMLGAASCGLPV LLDGFLSYAAALAAC QMSPAIPYLIPSHLS AEKGARIALSHLGLEP YLNMEMRLGEGSGA ALAMPIIEAACAIYNN MGELAASNIVLPGNT TSDLNS	免疫细胞	
RpfE	MKNARTTLIAAAIAG	免疫细胞	

[0398]

	TLVTTSPAGIANADDA GLDPNAAAGPDAVGF DPNLPPAPDAAPVDTP PAPEDAGFDPNLPPPL APDFLSPPAEEAPPVP VAYSVNWDIAIAQCES GGNWSINTGNGYYGG LRFTAGTWRANGGSG SAANASREEQIRVAEN VLRSQGIRAWPVCGR RG		
Rv0652	MAKLSTDELLDAFKE MTLLELSDFVKKFEE TFEVTAAAPVAVAAA GAAPAGAAVEAAEEQ SEFDVILEAAGDKKIG VIKVVREIVSGLGLKE AKDLVDGAPKPLEK VAKEAADEAKAKLEA AGATVTVK	免疫细胞	
HBHA	MAENSNIDDIKAPLLA ALGAADLALATVNELI TNLRERAEETRTDTRS RVEESRARLTKLQED LPEQLTELREKFTAEE LRKAAEGYLEAATSR YNELVERGEAALERL RSQQSFEEVSARAEGY VDQAVELTQEALGTV	免疫细胞	

[0399]

	ASQTRAVGERAAKLV GIELPKKAAPAKKAA PAKKAAPAKKAAAKK APAKKAAAKKVTQK		
NhhA	MNKIYRIIWNSALNA WVAVSELTRNHTKRA SATVATAVLATLLFAT VQASTTDDDDLYLEP VQRTAVVLSFRSDKE GTGEKEVTEDSNWGV YFDKKGVLTAGTITL KAGDNLKIKQNTNEN TNASSFTYSLKKDLTD LTSVGTEKLSFSANSN KVNITSDTKGLNFAK KTAETNGDTTVHLNG IGSTLTDTLLNTGATT NVTNDNVTDDEKKRA ASVKDVLNAGWNIKG VKPGTTASDNVDFVR TYDTVEFLSADTKTTT VNVESKDNGKRTEVK IGAKTSVIKEKDGLV TGKDKGENDSSTDKG EGLVTAKEVIDAVNK AGWRMKTTTANGQT GQADKFETVTSGTNV TFASGKGTTATVSKD DQGNITVMYDVNVGD	免疫细胞	

[0400]

	ALNVNQLQNSGWNLD SKAVAGSSGKVISGNV SPSKGKMDET VNINA GNNIEITRNGKNIDIAT SMTPQFSSVSLGAGAD APTLSVDDEGALNVG SKDANKPVRITNVAPG VKEGDVTNVAQLKGV AQNLNNHIDNVDGNA RAGIAQAIATAGLVQ AYLPGKSMMMAIGGGT YRGEAGYAIGYSSISD GGNWIIGKTASGNSR GHFGASASVGYQW		
DnaJ	MAKQDY YEILGVSKT AEEREIRKAYKRLAM KYHPDRNQGDKEAEA KFKEIKEAYEVLTD SQ KRAAYDQYGHAAFEQ GGMGGGGF GGGADF SDIFGDVFGDIFGGGR GRQRAARGADLRYN MELTLEEAVRGVTKE IRIPTLEECDVCHGSG AKPGTQPQTCPTCHG SGQVQMRQGFFAVQ QTCPHCQGRGTLIKD PCNKCHGHGRVERSK TLSVKIPAGVDTGDRI	免疫细胞	

[0401]

	RLAGEGEAGEHGAPA GDLYVQVQVKQHPIF EREGNNLYCEVPINFA MAALGGEIEVPTLDG RVKLKVPGETQTGKL FRMRGKGVKSVRGG AQGDLLCRVVVETPV GLNERQKQLLQELQE SFGGPTGEHNSPRSKS FFDGVKKFFDDLTR		
肺炎链球菌溶血素	MANKAVNDFILAMNY DKKKLLTHQGESIEN RFIKEGNQLPDEFVVI ERKKRSLSTNTSDISV TATNDSRLYPGALLV VDETLLENNPTLLAV DRAPMTYSIDLPGLAS SDSFLQVEDPSNSSVR GAVNDLLAKWHQDY GQVNNVPARMQYEKI TAHSMEQLKVKFGSD FEKTGNSLDIDFNSVH SGEKQIQIVNFKQIYY TVSVDAVKNP GDVFQ DTVTVEDLKQRGISAE RPLVYISSVAYGRQVY LKLETTSKSDEVEAAF EALIKGVKVAPQTEW KQILDNTEVKAVILGG	免疫细胞	

[0402]

	DPSSGARVVTGKVDM VEDLIQEGSRFTADHP GLPISYTTSFRLDNVV ATFQNSTDYVETKVT AYRNGDLLLDHSGAY VAQYYITWDELSYDH QGKEVLTPKAWDRN GQDLTAHFTTSIPLKG NVRNLSVKIRECTGLA WEWWRTVYEKTDLP LVRKRTISIWGTTLYP QVEDKVEND		
鞭毛蛋白 (FLIC_ ECOLI 鞭 毛蛋白 OS= 大肠杆菌 (菌株 K12))	MAQVINTNSLSLITQN NINKNQSALSSSIERLS SGLRINSAKDDAAGQ AIANRFTSNIKGLTQA ARNANDGISVAQTTE GALSEINNNLQRVREL TVQATTGTNSEDLS IQDEIKSRLDEIDRVSG QTQFNGVNVLAKN GS MKIQVGANDNQTTID LKQIDAKTLGLDGFS VKNNDTVTTSAPVTA FGATTTNNIKLTGITL STEAATDTGGTNPASI EGVYTDNGNDYYAKI TGGDNDGKYYAVTVA NDGTVTMATGATANA	免疫细胞	

[0403]

	TVTDANTTKATTITSG GTPVQIDNTAGSATAN LGAVSLVKLQDSKGN DTDYALKDTNGNLY AADVNETTGAVSVKTI TYTDSSGAASSPTAVK LGGDDGKTEVVDIDG KTYDSADLNGGNLQT GLTAGGEALTAVANG KTTDPLKALDDAIASV DKFRSSLGAVQNRDL SAVTNLNNTTTNLSEA QSRIQDADYATEVSN MSKAQHQQAGNSVL AKANQVPQQVLSLLQ G		
IFN-α (IFNA1_ 人干扰素 α-1/13)	MASPFALLMVLVLS CKSSCSLGCDLPETHS LDNRRTLMLLAQMSR ISPSSCLMDRHDFGFP QEEFDGNQFQKAPAS VLHELIQQIFNLFTTK DSSAAWDEDLLDKFC TELYQQLNDLEACVM QEERVGETPLMNADS ILAVKKYFRRITLYLT EKKYSPCAWEVVRAE IMRSLSLSTNLQERLR RKE	免疫细胞	

[0404]

IFN- γ (IFN_ 人干扰素 γ)	MKYTSYILAFQLCIVL GSLGCYCQDPYVKEA ENLKKEYFNAGHSDVA DNGTLFLGILKNWKE ESDRKIMQSQIVSFYF KLFKNFKDDQSIQKSV ETIKEDMNVKFFNSN KKKRDDFEKLTNYSV TDLNVQRKAIHELIQV MAELSPAAGTGKRKR SQMLFRGRRASQ		
IL-2 (IL2_ 人白介素 -2)	MYRMQLLSCIALSLA LVTNSAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	免疫细胞	
白介素-12 p35 亚基	MWPPGSASQPPPSPA AATGLHPAARPVSLQ CRLSMCPAR	免疫细胞	
p40	MGKKQNRKTGNSKT QSASPPPKERSSSPATE QSWMENDFDELREEG FRRSNYSELREDIQT GKEVENFEKNLEECIT	免疫细胞	

[0405]

	RISNTEKCLKELMEL KTKTRELREECRSLRS RCDQLEERVVSAMEDE MNEMKREGKFREKRI KRNEQTLQEIWVYVK RPNLRLIGVPESDVEN GTKLENTLQDIIQENF PNLARQANVQIQEIQR TPQRYSSRRATPRHII VRFTKVEMKEKMLR AAREKGRVTLKGKPI RLTADLLAETLQARR EWGPIFNILKGKNFQP RISYPAKLSFISEGEIK YFIDKQMLRDFVTTR PALKELLKEALNMER NNRYQLLQNHAKM		
IL-15 (IL15_ 人白介素 -15)	MRISKPHLRSISIQCYL CLLLNSHFLTEAGIHV FILGCFSAGLPKTEAN WVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLELQ VISLESGDASIHTVE NLILANNSLSSNGNVT ESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFIN S	免疫细胞	
IL-18	MAAEPVEDNCINFVA		

[0406]

(IL18_人白介素-18)	MKFIDNTLYFIAEDDE NLESDYFGKLESKLSV IRNLNDQVLFIDQGNR PLFEDMTDSDCRDNA PRTIFIISMYKDSQPRG MAVTISVKCEKISTLS CENKIISFKEMNPPDN IKDTKSDIIFQRSVPG HDNKMQFESSYEGY FLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQ NED		
IL-21	MRSSPGNMERIVICL MVIFLGTLVHKSSSQG QDRHMIRMRLIDIV DQLKNYVNDLVPEFL PAPEDVETNCEWSAFS CFQKAQLKSANTGNN ERIINVSIIKKLRKPPS TNAGRRQKHRLTCPS CDSYEKKPPKEFLERF KSLQKMIHQHLSSR THGSEDS	免疫细胞	
GM-CSF	MWLQSLLLLGTVACS ISAPARSPSPSTQPWE HVNAIQEARRLLNLSR DTAAEMNETVEVISE MFDLQEPTCLQTRLE LYKQGLRGSLTKLKG	免疫细胞	

[0407]

	PLTMMASHYKQHCPP TPETSCATQHITFESFK ENLKDFLLVIPFDCWE PVQE		
IL-1 β	MAEVP ELASEMMAYY SGNEDDLFFEADGPK QMKCSFQDL DLCPLD GGIQLRISDHHYSKGF RQAASVVVAMDCLRK MLVPCPQTFQENDLS TFFPFIFEEPIFFDTW DNEAYVHDAPVRSLN CTRLDSQQKSLVMSG PYELKALHLQGQDME QQVVFSMSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNL YLSCVLKDDKPTLQL ESVDPKNYPKKKMEK RFVFNKIEINNKLFE SAQFPNWIYSTSAEN MPVFLGGTKGGQDIT DFTMQFVSS	免疫细胞	
IL-6	MNSFSTSAFGPVAFSL GLLLVLPAAFPAPVPP GEDSKDVAAPHRQPL TSSEIDKQIRYILDGI SALRKETCNKSNMCE SSKEALAENNLNLPK MAEKDGC FQSGFNEE	免疫细胞	

[0408]

	TCLVKIITGLLEFEVY LEYLQNRFESSEEQAR AVQMSTKVLIQFLQK KAKNLDAITTPDPTTN ASLLTKLQAQNQWLQ DMTTHLILRSFKEFLQ SSLRALRQM		
TNF-a	MSTESMIRDVELAEE ALPKKTGGPQGSRRRC LFLSLFSFLIVAGATTL FCLLHFGVIGPQREEF PRDLSLISPLAQAVRSS SRTPSDKPVAHVVANP QAEGQLQWLNRRAN ALLANGVELRDNQLV VPSEGLYLIYSQVLFK GQGCPSTHVLLTHTIS RIAVSYQTKVNLLSAI KSPCQRETPEGAEAK PWYEPIYLGGVFQLE KGDRLSAEINRPDYLD FAESGQVYFGHIAL	免疫细胞	
IL-7	MFHVSFRYIFGLPPLI LVLLPVASSDCDIEGK DGKQYESVLMVSIQ LLDSMKEIGSNCLNNE FNFFKRHICDANKEG MFLFRAARKLRQFLK MNSTGDFDLHLLKVS	免疫细胞	

[0409]

	EGTTILLNCTGQVKG RKPAALGEAQPTKSL EENKSLKEQKKLNDL CFLKRLLQEIKTCWN KILMGTKEH		
IL-17a	MTPGKTSLVSLLLLLS LEAIVKAGITIPRNPG CPNSEDKNFPRTVMV NLNIHNRNTNTNPKRS SDYYNRSTSPWNLHR NEDPERYPSVIWEAK CRHLGCINADGNVDY HMNSVPIQQEILVLRR EPPHCPNSFRLEKILV SVGCTCVTPIVHHVA	免疫细胞	
FLt3-配 体	MTVLAPAWSPTTYLL LLLLLSSGLSGTQDCS FQHSPISDFAVKIREL SDYLLQDYPVTVASNL QDEELCGGLWRLVLA QRWMERLKTVAGSK MQGLLERVNTEIHFV TKCAFQPPPSCLRFVQ TNISRLLQETSEQLVA LKPWITRQNFRCLEL QCQPDSSTLPPPWSPR PLEATAPTAPQPPLLL LLLLPVGLLLLAAAW CLHWQRTRRRRTPRPG	免疫细胞	

[0410]

	EQVPPVPSPQDLLLVE H		
抗 -CTLA4 (伊匹木单 抗)	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSS YTMHWVRQAPGKGL EWVTFISYDGNNKYY ADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDT AIYYCARTGWLGPFD YWGQGTLLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVY TLP PSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLD SDGSFFLYSKLTVDKS	免疫细胞	

[0411]

	RWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP GK		
抗-PD1 (nivo)	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNK NTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKY GPCCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFL	免疫细胞	

[0412]

	YSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK		
抗-41BB (乌托鲁单抗)	EVQLVQSGAEVKKPG ESLRISCKGSGYSFST YWISWVRQMPGKGL EWMGKIYPGDSYTN SPSFQQQVTISADKSI TAYLQWSSLKASDTA MYYCARGYGIFDYW GQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVE RKCCVECPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFN STFRVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSDGSFF	免疫细胞	
[0413]	LYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK		

[0414] 在某些实施方案中,所述表达序列编码治疗性蛋白。在某些实施方案中,所述表达序列编码细胞因子,例如,IL-12p70、IL-15、IL-2、IL-18、IL-21、IFN- α 、IFN- β 、IL-10、TGF- β 、IL-4或IL-35或其功能片段。在某些实施方案中,所述表达序列编码免疫检查点抑制剂。在某些实施方案中,所述表达序列编码激动剂(例如,TNFR家族成员诸如CD137L、OX40L、ICOSL、LIGHT或CD70)。在某些实施方案中,所述表达序列编码嵌合抗原受体。在某些实施方案中,所述表达序列编码抑制性受体激动剂(例如,PDL1、PDL2、半乳糖凝集素-9、VISTA、B7H4或MHCII)或抑制性受体(例如,PD1、CTLA4、TIGIT、LAG3或TIM3)。在某些实施方案中,所述表达序列编码抑制性受体拮抗剂。在某些实施方案中,所述表达序列编码一条或多条TCR链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)。在某些实施方案中,所述表达序列编码分泌型T细胞或免疫细胞连接物(例如,双特异性抗体诸如BiTE,靶向例如,CD3、CD137或CD28和肿瘤表达的蛋白例如CD19、CD20或BCMA等)。在某些实施方案中,所述表达序列编码转录因子(例如,FOXP3、HELIOS、TOX1或TOX2)。在某些实施方案中,所述表达序列编码免疫抑制性酶(例如,IDO或CD39/CD73)。在某些实施方案中,所述表达序列编码GvHD(例如,抗-HLA-A2 CAR-Treg)。

[0415] 在某些实施方案中,多核苷酸编码由超过一个基因编码的亚基组成的蛋白。例如,蛋白可以是异源二聚体,其中蛋白的每条链或亚基由单独的基因编码。在转移媒介物中可能递送超过一个circRNA分子,并且每个circRNA编码一个单独的蛋白亚基。可替换地,可以工程改造单个circRNA来编码超过一个亚基。在某些实施方案中,编码各个亚基的单独circRNA分子可以在单独的转移媒介物中施用。

[0416] A. 抗原识别受体

[0417] a. 嵌合抗原受体(CARS)

[0418] 嵌合抗原受体(CAR或CAR-T)是遗传工程改造的受体。这些工程改造的受体可以通过本文描述的环状RNA插入免疫细胞(包括T细胞)中并由其表达。利用CAR,可以对单个受体进行编程,使其既能识别特定抗原,又能在与该抗原结合时活化免疫细胞来攻击和摧毁带有该抗原的细胞。当这些抗原存在于肿瘤细胞上时,表达CAR的免疫细胞可以靶向并杀死肿瘤细胞。在某些实施方案中,由多核苷酸编码的CAR包含(i)特异性地结合靶抗原的抗原结合分子,(ii)铰链结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及(iii)活化结构域。

[0419] 在某些实施方案中,根据本公开内容的CAR的取向包括与共刺激结构域和活化结构域串联的抗原结合结构域(诸如scFv)。所述共刺激结构域可以包含细胞外部分、跨膜部分和细胞内部分中的一个或多个。在其它实施方案中,可以串联使用多个共刺激结构域。

[0420] i. 抗原结合结构域

[0421] 通过掺入与靶向的抗原相互作用的抗原结合分子,可以工程改造CAR以与该抗原(诸如细胞表面抗原)结合。在某些实施方案中,所述抗原结合分子是其抗体片段,例如一个或多个单链抗体片段(scFv)。scFv是具有连接在一起的抗体的重链和轻链的可变区的单链抗体片段。参见美国专利号7,741,465,和6,319,494以及Eshhar等人,Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45:131-136。scFv保留了亲本抗体的与靶抗原特异性相互作用的能力。scFv在嵌合抗原受体中是有用的,因为它们可以被工程改造成与其它CAR组分一起表达为单链的一部分。同上。也参见Krause等人,J.Exp.Med.,第188卷,第4期,1998(619-626); Finney等人,Journal of Immunology,1998,161:2791-2797。应当理解,抗原结合分子通常被包含在CAR的细胞外部分内,使得它能够识别并结合感兴趣的抗原。在本发明范围内考虑

了双特异性的和多特异性的CAR,其对超过一种感兴趣的靶标具有特异性。

[0422] 在某些实施方案中,所述抗原结合分子包含单链,其中重链可变区和轻链可变区通过接头连接。在某些实施方案中,VH位于接头的N端,且VL位于接头的C端。在其它实施方案中,VL位于接头的N端,且VH位于接头的C端。在某些实施方案中,所述接头包含至少约5个、至少约8个、至少约10个、至少约13个、至少约15个、至少约18个、至少约20个、至少约25个、至少约30个、至少约35个、至少约40个、至少约45个、至少约50个、至少约60个、至少约70个、至少约80个、至少约90个或至少约100个氨基酸。

[0423] 在某些实施方案中,所述抗原结合分子包含纳米抗体。在某些实施方案中,所述抗原结合分子包含DARPin。在某些实施方案中,所述抗原结合分子包含anticalin或能够特异性结合靶蛋白的其它合成蛋白。

[0424] 在某些实施方案中,所述CAR包含对选自以下的抗原具有特异性的抗原结合结构域:CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、C-型凝集素样分子-1、CD33、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂GD3、TNF受体家族成员B细胞成熟(BCMA)、Tn抗原((Tn Ag)或(GaINAc-Ser/Thr))、前列腺特异性的膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、Fms样酪氨酸激酶3(FLT3)、肿瘤相关的糖蛋白72(TAG72)、CD38、CD44v6、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、B7H3(CD276)、KIT(CD117)、白介素-13受体亚基 α -2、间皮素、白介素11受体 α (IL-11Ra)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、蛋白酶丝氨酸21、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Lewis(Y)抗原、CD24、血小板来源的生长因子受体 β (PDGFR- β)、阶段特异性的胚胎抗原-4(SSEA-4)、CD20、叶酸受体 α 、HER2、HER3、粘蛋白1、细胞表面相关的(MUC1)、表皮生长因子受体(EGFR)、神经细胞粘附分子(NCAM)、前列腺酶、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、突变的延伸因子2(ELF2M)、肝配蛋白B2、成纤维细胞活化蛋白 α (FAP)、胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体)、碳酸酐酶IX(CAIX)、蛋白酶体(Prosome, Macropain)亚基, β 型,9(LMP2)、糖蛋白100(gp100)、由裂点簇区(BCR)和Abelson鼠白血病病毒癌基因同系物1(Abl)组成的癌基因融合蛋白(bcr-abl)、酪氨酸酶、肝配蛋白A型受体2(EphA2)、岩藻糖基GM1、唾液酸基Lewis粘附分子(sLe)、神经节苷脂GM3、转谷氨酰胺酶5(TGS5)、高分子量-黑素瘤相关的抗原(HMWMAA)、o-乙酰基-GD2神经节苷脂(OAcGD2)、叶酸受体 β 、肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关的(TEM7R)、紧密连接蛋白6(CLDN6)、促甲状腺激素受体(TSHR)、G蛋白偶联受体C类5组,成员D(GPRC5D)、染色体X开放阅读框61(CXORF61)、CD97、CD179a、间变性淋巴瘤激酶(ALK)、聚唾液酸、胎盘特异性的1(PLAC1)、globoH糖神经酰胺(GloboH)的己糖部分、乳腺分化抗原(NY-BR-1)、尿空斑蛋白2(UPK2)、甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1)、肾上腺素受体 β 3(ADRB3)、泛连接蛋白3(PANX3)、G蛋白偶联受体20(GPR20)、淋巴细胞抗原6复合物、基因座K 9(LY6K)、嗅觉感受器51E2(OR51E2)、TCR γ 交替读码框蛋白(TARP)、肾母细胞瘤蛋白(WT1)、癌症/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、癌症/睾丸抗原2(LAGE-1a)、MAGE家族成员(包括MAGE-A1、MAGE-A3和MAGE-A4)、位于染色体12p上的ETS易位-变体基因6(ETV6-AML)、精子蛋白17(SPA17)、X抗原家族,成员1A(XAGE1)、结合血管生成素的细胞表面受体2(Tie 2)、黑素瘤癌症睾丸抗原-1(MAD-CT-1)、黑素瘤癌症睾丸抗原-2(MAD-CT-2)、Fos相关的抗原1、肿瘤蛋白p53(p53)、p53突变体、prostein、surviving、端粒末端转移酶、前列腺癌肿瘤抗原-1、被T细胞识别的黑素瘤抗原1、大鼠肉瘤(Ras)突变体、人端粒末端转移酶反转录酶(hTERT)、肉瘤易位断点、细胞凋亡的

黑素瘤抑制剂 (ML-IAP)、ERG (跨膜蛋白酶、丝氨酸2 (TMPRSS2) ETS融合基因)、N-乙酰基葡萄糖胺基-转移酶V (NA17)、成对盒蛋白Pax-3 (PAX3)、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、v-myc禽髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤来源的同系物 (MYCN)、Ras同系物家族成员C (RhoC)、酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP-2)、细胞色素P450 1B1 (CYP1B1)、CCCTC-结合因子 (锌指蛋白) 样、被T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3 (SART3)、成对盒蛋白Pax-5 (PAX5)、顶体蛋白原结合蛋白sp32 (OY-TES1)、淋巴细胞特异性的蛋白酪氨酸激酶 (LCK)、A激酶锚蛋白4 (AKAP-4)、滑膜肉瘤、X断点2 (SSX2)、晚期糖化终产物的受体 (RAGE-1)、肾广泛存在蛋白1 (renal ubiquitous 1, RU1)、肾广泛存在蛋白2 (RU2)、豆荚蛋白 (legumain)、人乳头状瘤病毒E6 (HPV E6)、人乳头状瘤病毒E7 (HPV E7)、肠羧基酯酶、突变的热激蛋白70-2 (mut hsp70-2)、CD79a、CD79b、CD72、白细胞相关的免疫球蛋白样受体1 (LAIR1)、IgA受体的Fc片段 (FCAR或CD89)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2 (LILRA2)、CD300分子样家族成员f (CD300LF)、C-型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A)、骨髓间质细胞抗原2 (BST2)、含有EGF样模块的粘蛋白样激素受体样2 (EMR2)、淋巴细胞抗原75 (LY75)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)、Fc受体样5 (FCRL5)、MUC16、5T4、8H9、 $\alpha v \beta 0$ 整联蛋白、 $\alpha v \beta 6$ 整联蛋白、甲胎蛋白 (AFP)、B7-H6、ca-125、CA9、CD44、CD44v7/8、CD52、E-钙粘着蛋白、EMA (上皮膜抗原)、上皮糖蛋白-2 (EGP-2)、上皮糖蛋白-40 (EGP-40)、ErbB4、上皮肿瘤抗原 (ETA)、叶酸结合蛋白 (FBP)、激酶插入物结构域受体 (KDR)、k-轻链、L1细胞粘附分子、MUC18、NKG2D、癌胚胎抗原 (h5T4)、肿瘤/睾丸-抗原1B、GAGE、GAGE-1、BAGE、SCP-1、CTZ9、鼠尾草、CAGE、CT10、MART-1、免疫球蛋白 λ 样多肽1 (IGLL1)、乙型肝炎表面抗原结合蛋白 (HBsAg)、病毒衣壳抗原 (VCA)、早期抗原 (EA)、EBV核抗原 (EBNA)、HHV-6p41早期抗原、HHV-6B U94潜在抗原、HHV-6B p98晚期抗原、巨细胞病毒 (CMV) 抗原、大T抗原、小T抗原、腺病毒抗原、呼吸道合胞体病毒 (RSV) 抗原、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、副流感1型抗原、副流感2型抗原、副流感3型抗原、副流感4型抗原、人变性肺病毒 (HMPV) 抗原、丙型肝炎病毒 (HCV) 核心抗原、HIV p24抗原、人T细胞淋巴营养病毒 (HTLV-1) 抗原、梅克尔细胞多瘤病毒小T抗原、梅克尔细胞多瘤病毒大T抗原、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒 (KSHV) 溶解核抗原和KSHV潜在核抗原。在某些实施方案中, 抗原结合结构域包含SEQ ID NO:321和/或322。

[0425] ii. 铰链/间隔区结构域

[0426] 在某些实施方案中, 本公开内容的CAR包含铰链或间隔区结构域。在某些实施方案中, 所述铰链/间隔区结构域可以包含截短的铰链/间隔区结构域 (THD), 所述THD结构域是完整铰链/间隔区结构域 (“CHD”) 的截短形式。在某些实施方案中, 细胞外结构域来自或源自 (例如, 包含其全部或片段) ErbB2、血型糖蛋白A (GpA)、CD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD4、CD7、CD8a、CD8 [T CD1 1a (IT GAL)、CD1 1b (IT GAM)、CD1 1c (ITGAX)、CD1 1d (IT GAD)、CD18 (ITGB2)、CD19 (B4)、CD27 (TNFRSF7)、CD28、CD28T、CD29 (ITGB1)、CD30 (TNFRSF8)、CD40 (TNFRSF5)、CD48 (SLAMF2)、CD49a (ITGA1)、CD49d (ITGA4)、CD49f (ITGA6)、CD66a (CEACAM1)、CD66b (CEACAM8)、CD66c (CEACAM6)、CD66d (CEACAM3)、CD66e (CEACAM5)、CD69 (CLEC2)、CD79A (B-细胞抗原受体复合物相关的 α 链)、CD79B (B-细胞抗原受体复合物相关的 β 链)、CD84 (SLAMF5)、CD96 (触觉)、CD100 (SEMA4D)、CD103 (ITGAE)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD158A (KIR2DL1)、CD158B1 (KIR2DL2)、CD158B2 (KIR2DL3)、CD158C (KIR3DP1)、CD158D (KIRDL4)、CD158F1 (KIR2DL5A)、CD158F2 (KIR2DL5B)、CD158K (KIR3DL2)、CD160

(BY55)、CD162 (SELPLG)、CD226 (DNAM1)、CD229 (SLAMF3)、CD244 (SLAMF4)、CD247 (CD3- ζ)、CD258 (LIGHT)、CD268 (BAFFR)、CD270 (TNFSF14)、CD272 (BTLA)、CD276 (B7-H3)、CD279 (PD-1)、CD314 (NKG2D)、CD319 (SLAMF7)、CD335 (NK-p46)、CD336 (NK-p44)、CD337 (NK-p30)、CD352 (SLAMF6)、CD353 (SLAMF8)、CD355 (CRT AM)、CD357 (TNFRSF18)、可诱导的T细胞共刺激物 (ICOS)、LFA-1 (CD11a/CD18)、NKG2C、DAP-10、ICAM-1、NKp80 (KLRF1)、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、LFA-1、SLAMF9、LAT、GADS (GrpL)、SLP-76 (LCP2)、PAG1/CBP、CD83配体、Fc γ 受体、MHC 1类分子、MHC2类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、活化NK细胞受体、Toll配体受体和片段或其组合。铰链或间隔区结构域可以源自天然的或合成的来源。

[0427] 在某些实施方案中,铰链或间隔区结构域位于抗原结合分子(例如,scFv)和跨膜结构域之间。以这种方向,铰链/间隔区结构域提供了抗原结合分子与表达CAR的细胞膜表面之间的距离。在某些实施方案中,铰链或间隔区结构域来自或源自免疫球蛋白。在某些实施方案中,铰链或间隔区结构域选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、IgM的铰链/间隔区区域或其片段。在某些实施方案中,铰链或间隔区结构域包含、来自或源自CD8 α 的铰链/间隔区区域。在某些实施方案中,铰链或间隔区结构域包含、来自或源自CD28的铰链/间隔区区域。在某些实施方案中,铰链或间隔区结构域包含CD8 α 的铰链/间隔区区域的片段或CD28的铰链/间隔区区域的片段,其中所述片段是小于整个铰链/间隔区区域的任何片段。在某些实施方案中,CD8 α 铰链/间隔区区域的片段或CD28铰链/间隔区区域的片段包含排除在CD8 α 铰链/间隔区区域或CD28铰链/间隔区区域的N-端或C-端或两者处的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或至少20个氨基酸的氨基酸序列。

[0428] iii. 跨膜结构域

[0429] 本公开内容的CAR可以进一步包含跨膜结构域和/或细胞内信号传递结构域。所述跨膜结构域可以设计为与CAR的细胞外结构域融合。同样,它可以与CAR的细胞内结构域融合。在某些实施方案中,使用与CAR中的结构域之一自然结合的跨膜结构域。在某些情况下,可以选择或修饰跨膜结构域(例如,通过氨基酸置换)以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域的结合,以最大限度地减少与受体复合物的其它成员的相互作用。所述跨膜结构域可以源自天然的或合成的来源。在所述来源是天然来源的情况下,所述结构域可以源自任何膜结合的蛋白或跨膜蛋白。

[0430] 跨膜区域可以源自(即包含)受体酪氨酸激酶(例如,ErbB2)、血型糖蛋白A (GpA)、4-1BB/CD137、活化NK细胞受体、免疫球蛋白蛋白、B7-H3、BAFFR、BFAME (SEAMF8)、BTEA、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD30、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD7、CD84、CD8 α 、CD8 β 、CD96 (Tactile)、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDS、CEACAM1、CRT AM、细胞因子受体、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fc γ 受体、GADS、GITR、HVEM (EIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、Ig α (CD79a)、IE-2R β 、IE-2R γ 、IE-7R α 、可诱导的T细胞共刺激物 (ICOS)、整联蛋白、ITGA4、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAE、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、EAT、LFA-1、LFA-1、与CD83特异性地结合的配体、LIGHT、LIGHT、LTBR、Ly9 (CD229)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1; CD11a/CD18)、MHC 1类分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80

(KLRF1)、OX-40、PAG/Cbp、程序性死亡蛋白-1 (PD-1)、PSGL1、SELPLG (CD162)、信号传递淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、SLAM (SLAMF1; CD150; IP0-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A; Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNF受体蛋白、TNFR2、TNFSF14、Toll配体受体、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6或其片段、截短物或组合。

[0431] 在某些实施方案中,合适的细胞内信号传递结构域包括但不限于活化性巨噬细胞/髓样细胞受体CSFR1、MYD88、CD14、TIE2、TLR4、CR3、CD64、TREM2、DAP10、DAP12、CD169、DECTIN1、CD206、CD47、CD163、CD36、MARCO、TIM4、MERTK、F4/80、CD91、C1QR、LOX-1、CD68、SRA、BAI-1、ABCA7、CD36、CD31、乳铁蛋白或其片段、截短物或组合。

[0432] 在某些实施方案中,受体酪氨酸激酶可以源自(例如,包含)胰岛素受体 (InsR)、胰岛素样生长因子I受体 (IGF1R)、胰岛素受体相关的受体 (IRR)、血小板来源的生长因子受体 α (PDGFR α)、血小板来源的生长因子受体 β (PDGFR β)、KIT原癌基因受体酪氨酸激酶 (Kit)、集落刺激因子1受体 (CSFR)、fms有关的酪氨酸激酶3 (FLT3)、fms有关的酪氨酸激酶1 (VEGFR-1)、激酶插入物结构域受体 (VEGFR-2)、fms有关的酪氨酸激酶4 (VEGFR-3)、成纤维细胞生长因子受体1 (FGFR1)、成纤维细胞生长因子受体2 (FGFR2)、成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3)、成纤维细胞生长因子受体4 (FGFR4)、蛋白酪氨酸激酶7 (CCK4)、神经营养性的受体酪氨酸激酶1 (trkA)、神经营养性的受体酪氨酸激酶2 (trkB)、神经营养性的受体酪氨酸激酶3 (trkC)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体2 (ROR2)、肌肉相关的受体酪氨酸激酶 (MuSK)、MET原癌基因、受体酪氨酸激酶 (MET)、巨噬细胞刺激1受体 (Ron)、AXL受体酪氨酸激酶 (Axl)、TYRO3蛋白酪氨酸激酶 (Tyro3)、MER原癌基因、酪氨酸激酶 (Mer)、具有免疫球蛋白样和EGF样结构域的酪氨酸激酶1 (TIE1)、TEK受体酪氨酸激酶 (TIE2)、EPH受体A1 (EphA1)、EPH受体A2 (EphA2)、(EPH受体A3) EphA3、EPH受体A4 (EphA4)、EPH受体A5 (EphA5)、EPH受体A6 (EphA6)、EPH受体A7 (EphA7)、EPH受体A8 (EphA8)、EPH受体A10 (EphA10)、EPH受体B1 (EphB1)、EPH受体B2 (EphB2)、EPH受体B3 (EphB3)、EPH受体B4 (EphB4)、EPH受体B6 (EphB6)、ret原癌基因 (Ret)、受体样酪氨酸激酶 (RYK)、盘状结构域受体酪氨酸激酶1 (DDR1)、盘状结构域受体酪氨酸激酶2 (DDR2)、c-ros癌基因1、受体酪氨酸激酶 (ROS)、细胞凋亡相关的酪氨酸激酶 (Lmr1)、狐猴酪氨酸激酶2 (Lmr2)、狐猴酪氨酸激酶3 (Lmr3)、白细胞受体酪氨酸激酶 (LTK)、ALK受体酪氨酸激酶 (ALK) 或丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶1 (STYK1)。

[0433] iv. 共刺激结构域

[0434] 在某些实施方案中,所述CAR包含共刺激结构域。在某些实施方案中,所述共刺激结构域包含4-1BB (CD137)、CD28或二者和/或细胞内T细胞信号传递结构域。在一个优选的实施方案中,所述共刺激结构域是人CD28、人4-1BB或二者,并且所述细胞内T细胞信号传递结构域是人CD3 ζ (ζ)。4-1BB、CD28、CD3 ζ 可以分别包含少于整个4-1BB、CD28或CD3 ζ 。嵌合抗原受体可以掺入共刺激(信号传递)结构域来增强其效力。参见美国专利号7,741,465和6,319,494,以及Krause等人和Finney等人(出处同上),Song等人,Blood 119:696-706 (2012); Kalos等人,Sci Transl. Med. 3:95 (2011); Porter等人,N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011),和Gross等人,Amur. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56:59-83 (2016)。

[0435] 在某些实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:318或320的氨基酸序列。

[0436] v. 细胞内信号传递结构域

[0437] 本文公开的经工程改造的T细胞的细胞内(信号传递)结构域可以向活化结构域提供信号传递,其进而活化免疫细胞的至少一种正常效应功能。例如,T细胞的效应功能可能是细胞裂解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。

[0438] 在某些实施方案中,合适的细胞内信号传递结构域包括(例如,包含)、但不限于4-1BB/CD137、活化NK细胞受体、免疫球蛋白蛋白、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD 19a、CD2、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3δ、CD3ε、CD3 γ、CD30、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD7、CD84、CD8α、CD8β、CD96 (触觉)、CD1 1a、CD1 1b、CD1 1c、CD1 1d、CDS、CEACAM1、CRT AM、细胞因子受体、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fc γ 受体、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、IA4、ICAM-1、Igα (CD79a)、IL-2Rβ、IL-2R γ、IL-7Rα、可诱导的T细胞共刺激物 (ICOS)、整联蛋白、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、与CD83特异性地结合的配体、LIGHT、LTBR、Ly9 (CD229)、Ly108、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1; CD1-1a/CD18)、MHC 1类分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRP1)、OX-40、PAG/Cbp、程序性死亡-1 (PD-1)、PSGL1、SELPLG (CD162)、信号传递淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TNF受体蛋白、TNFR2、TNFSF14、Toll配体受体、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6或其片段、截短物或组合。

[0439] CD3是在天然T细胞上的T细胞受体的元件,并且已经被证明是CAR中重要的细胞内活化元件。在某些实施方案中,所述CD3是CD3ζ。在某些实施方案中,所述活化结构域包含与SEQ ID NO:319的多肽序列具有至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0440] b. T细胞受体 (TCR)

[0441] TCR使用国际免疫遗传学 (IMGT) TCR命名法进行描述,并链接到TCR序列的IMGT公共数据库。天然α-β异源二聚体TCR具有α链和β链。在广义上,每条链可以包含可变区、连接区和恒定区,并且β链通常还含有在可变区和连接区之间的短多样性区域,但是该多样性区域通常被认为是连接区的一部分。每个可变区可以包含嵌入在框架序列中的三个CDR (互补决定区),其中一个是为名为CDR3的高变区。存在几种类型的α链可变(Vα)区域和几种类型的β链可变(Vβ)区域,它们通过其框架、CDR1和CDR2序列以及部分定义的CDR3序列来区分。在IMGT命名法中,Vα类型以唯一的TRAV编号来表示。因此,“TRAV21”定义了具有独特框架和CDR1及CDR2序列的TCR Vα区域,以及部分地由从TCR到TCR保留的氨基酸序列定义的CDR3序列,但其也包括从TCR到TCR变化的氨基酸序列。以相同的方式,“TRBV5-1”定义了具有独特框架和CDR1及CDR2序列的TCR Vβ区域,但仅具有部分地定义的CDR3序列。

[0442] TCR的连接区同样由独特的IMGT TRAJ和TRBJ命名法定义,而恒定区则由IMGT TRAC和TRBC命名法定义。

[0443] β链多样性区域在IMGT命名法中由缩写TRBD表示,并且如提及的,连接的TRBD/TRBJ区域通常一起被视为连接区域。

[0444] 由IMGT命名法定义的独特序列是TCR领域的工作人员广泛了解和可访问的。例如,可以在IMGT公共数据库中找到它们。“T cell Receptor Factsbook”, (2001) LeFranc和LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8也公开了由IMGT命名法定义的序列,但由

于其出版日期和随之而来的时间滞后,其中的信息有时需要通过参考IMGT数据库来确认。

[0445] 天然TCR以异源二聚体 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 形式存在。但是,由 $\alpha\alpha$ 或 $\beta\beta$ 同源二聚体组成的重组TCR先前已经被证实结合肽MHC分子。因此,本发明的TCR可以是异源二聚体 $\alpha\beta$ TCR,或可以是 $\alpha\alpha$ 或 $\beta\beta$ 同源二聚体TCR。

[0446] 为了用于过继疗法, $\alpha\beta$ 异源二聚体TCR可以例如作为具有细胞质和跨膜结构域的全长链进行转染。在某些实施方案中,本发明的TCR可以在各个恒定结构域的残基之间引入二硫键,例如如WO 2006/000830中所述。

[0447] 本发明的TCR,特别是 α - β 异源二聚体TCR,可以包含 α 链TRAC恒定结构域序列和/或 β 链TRBC1或TRBC2恒定结构域序列。可以通过截短或置换来修饰 α 和 β 链恒定结构域序列,以删除在TRAC的外显子2的Cys4与TRBC1或TRBC2的外显子2的Cys2之间的天然二硫键。还可以通过用半胱氨酸残基置换TRAC的Thr 48和TRBC1或TRBC2的Ser 57来修饰 α 和/或 β 链恒定结构域序列,所述半胱氨酸在TCR的 α 和 β 恒定结构域之间形成二硫键。

[0448] 通过任何适当的方法可以测定结合亲和力(与平衡常数 K_D 成反比)和结合半衰期(表示为 $T_{1/2}$)。应当理解,TCR的亲和力加倍会导致 K_D 减半。将 $T_{1/2}$ 计算为 $\ln 2$ 除以解离速率(k_{off})。因此, $T_{1/2}$ 加倍会导致 k_{off} 减半。TCR的 K_D 和 k_{off} 值通常针对TCR的可溶形式进行测量,所述可溶形式是被截短以除去细胞质和跨膜结构域残基的那些形式。因此,应当理解,如果给定TCR的可溶形式具有所述特征,则该TCR对亲本TCR具有改进的结合亲和力和/或结合半衰期。优选地,使用相同的测定方案测量给定TCR的结合亲和力或结合半衰期数次,例如3次或更多次,并取结果的平均值。

[0449] 由于本发明的TCR在过继疗法中具有实用性,因此本发明包括呈递本发明的TCR的非天然存在的和/或纯化的和/或经工程改造的细胞,尤其是T细胞。存在许多适合用编码本发明的TCR的核酸(诸如DNA、cDNA或RNA)转染T细胞的方法(参见例如Robbins等人,(2008) J Immunol. 180:6116-6131)。表达本发明的TCR的T细胞将适用于基于过继疗法的癌症治疗,诸如胰腺癌和肝癌的治疗。本领域技术人员将知道,存在许多可以用于实现过继疗法的合适方法(参见例如Rosenberg等人,(2008) Nat Rev Cancer 8(4):299-308)。

[0450] 本领域众所周知,本发明的TCR在被转染的细胞表达时可能发生翻译后修饰。糖基化是一种这样的修饰,它可以包含将寡糖部分共价连接到TCR链中的确定氨基酸。例如,天冬酰胺残基或丝氨酸/苏氨酸残基是寡糖连接的已知位置。特定蛋白的糖基化状态取决于许多因素,包括蛋白序列、蛋白构象和某些酶的可用性。此外,糖基化状态(即寡糖类型、共价键和连接总数)可以影响蛋白功能。因此,在产生重组蛋白时,控制糖基化通常是期望的。转染的TCR的糖基化可能受转染的基因的突变控制(Kuball J等人,(2009), J Exp Med 206(2):463-475)。这样的突变也被涵盖在本发明中。

[0451] TCR可以对以下抗原具有特异性:MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-A13、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、BAGE-1、RAGE-1、LB33/MUM-1、PRAME、NAG、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (AGE-B4)、酪氨酸酶、脑糖原磷酸化酶、Melan-A、MAGE-C1、MAGE-C2、NY-ESO-1、LAGE-1、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、 α -辅肌动蛋白-4、Bcr-Abl融合蛋白、Casp-8、 β -连环蛋白、cdc27、cdk4、cdkn2a、coa-1、dek-can融合蛋白、EF2、ETV6-AML1融合蛋白、LDLR-岩藻糖

基转移酶AS融合蛋白、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-2和3、新-PAP、肌球蛋白I类、OS-9、pml-RARa融合蛋白、PTPRK、K-ras、N-ras、磷酸三糖异构酶、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、Mage-C2、NA-88、Lage-2、SP17和TRP2-Int2、(MART-I)、gp100 (Pmel 17)、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、p15 (58)、CEA、NY-ESO (LAGE)、SCP-1、Hom/Mel-40、p53、H-Ras、HER-2/neu、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、EBNA、人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原E6和E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -连环蛋白、CDK4、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、PSCA、CT7、端粒末端转移酶、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、13HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3 (CA27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\170K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90 (Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白)、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0452] c. B-细胞受体 (BCR)

[0453] B-细胞受体 (BCR) 或B-细胞抗原受体是在B细胞表面上形成I型跨膜蛋白的免疫球蛋白分子。BCR在识别特定抗原后能够将活化信号传递到B细胞。在B细胞与抗原结合之前，BCR将保持处于未受刺激或“静止”阶段。抗原与BCR的结合导致启动体液免疫应答的信号传递。

[0454] BCR由成熟的B细胞表达。这些B细胞与免疫球蛋白 (Ig) 一起在识别和标记病原体中起作用。典型的BCR包含膜结合的免疫球蛋白 (例如，mIgA、mIgD、mIgE、mIgG和mIgM)，以及相关的和Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) 异源二聚体 (α/β)。这些膜结合的免疫球蛋白是由两条相同的重链和两条轻链组成的四聚体。在BCR内，膜结合的免疫球蛋白能够通过跨质膜的信号传输对抗原结合作出应答，从而导致B细胞活化，并进而导致克隆扩增和特异性抗体产生 (Friess M等人. (2018), Front. Immunol. 2947 (9))。Ig α /Ig β 异源二聚体负责将信号传导到细胞内部。

[0455] Ig α /Ig β 异源二聚体信号传递依赖于位于异源二聚体的每个胞质尾部的基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM) 的存在。ITAM包含被9-12个氨基酸 (例如，酪氨酸、亮氨酸和/或缬氨酸) 隔开的两个酪氨酸残基。在抗原结合后，BCR的ITAM的酪氨酸会被Src-家族酪氨酸激酶Blk、Fyn或Lyn磷酸化 (Janeway C等人, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (Garland Science, 2001年第5版))。

[0456] d. 其它嵌合蛋白

[0457] 除了上文提供的嵌合蛋白之外，环状RNA多核苷酸可以编码在本领域中可用的多种其它嵌合蛋白。所述嵌合蛋白可以包括重组融合蛋白、嵌合的突变蛋白或其它融合蛋白。

[0458] B. 免疫调节性配体

[0459] 在某些实施方案中，所述环状RNA多核苷酸编码免疫调节性配体。在某些实施方案中，所述免疫调节性配体可以是免疫刺激性的；而在其它实施方案中，所述免疫调节性配体可以是免疫抑制性的。

[0460] 1. 细胞因子：干扰素、趋化因子、白介素、生长因子和其它

[0461] 在某些实施方案中，所述环状RNA多核苷酸编码细胞因子。在某些实施方案中，所述细胞因子包含趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。趋化因子是由急性

和慢性炎症中多种细胞类型产生的趋化性细胞因子,其动员和活化白细胞。干扰素包括通过TLR刺激来响应于特定细胞外分子而诱导的一类分泌性 α -螺旋细胞因子(Borden, Molecular Basis of Cancer(第四版)2015)。白介素是由白细胞表达的细胞因子。

[0462] IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-27 β 、IFN γ 和/或TGF β 1的描述和/或氨基酸序列在本文中以及在www.uniprot.org数据库中以登录号P60568(IL-2)、P29459(IL-12A)、P29460(IL-12B)、P13232(IL-7)、P22301(IL-10)、P40933(IL-15)、Q14116(IL-18)、Q14213(IL-27 β)、P01579(IFN γ)和/或P01137(TGF β 1)提供。

[0463] C. 转录因子

[0464] 调节性T细胞(Treg)对于维持体内平衡、控制炎症应答的强度和持续时间以及预防自身免疫和变应性应答而言是重要的。

[0465] 总体而言,人们认为Treg主要参与抑制免疫应答,部分功能是作为免疫系统的“自我检查”,以防止过度反应。具体来说,Treg参与维持对自身抗原、花粉或食物等无害物质的耐受性,以及消除自身免疫性疾病。

[0466] Treg遍布全身,包括但不限于肠道、皮肤、肺和肝脏。此外,Treg细胞也可能存在于身体中不直接暴露于外部环境的某些隔室,诸如脾脏、淋巴结和甚至脂肪组织。已知或怀疑这些Treg细胞群体中的每一种具有一种或多种独特特征,并且可以在Lehtimaki和Laheesmaa,Regulatory T cells control immune responses through their non-redundant tissue specific features,2013,FRONTIERS IN IMMUNOL.,4(294):1-10(其公开内容特此整体并入)中找到另外信息。

[0467] 通常,已知Treg需要TGF- β 和IL-2才能适当活化和发育。表达大量IL-2受体(IL-2R)的Treg依赖于由活化的T细胞产生的IL-2。已知Treg产生IL-10和TGF- β ,它们都是强效的免疫抑制细胞因子。此外,已知Treg抑制抗原呈递细胞(APC)的刺激T细胞的能力。APC抑制的一种假设机制是通过CTLA-4,它由Foxp3+Treg表达。人们认为CTLA-4可能与APC上的B7分子结合,并通过引起内化来阻断这些分子或将其除去,从而导致降低的B7可用性并无法为免疫应答提供足够的共刺激。关于Treg的起源、分化和功能的另外讨论,可以参见Dhamne等人,Peripheral and thymic Foxp3+regulatory T cells in search of origin, distinction, and function,2013,Frontiers in Immunol.,4(253):1-11,其公开内容特此整体并入。

[0468] D. 检查点抑制剂和激动剂

[0469] 如本文所提供的,在某些实施方案中,环状RNA的编码元件编码一种或多种检查点抑制剂或激动剂。

[0470] 在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是程序性死亡-配体1(PD-L1,也被称作B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(可诱导的T细胞共刺激物)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷脂酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGIT、VISTA、VTCN1或其任何组合的抑制剂。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是IDO1、CTLA4、PD-1、LAG3、PD-L1、TIM3或其组合的抑制剂。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是PD-L1的抑制剂。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是PD-1的抑

制剂。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是CTLA-4的抑制剂。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是LAG3的抑制剂。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是TIM3的抑制剂。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是IDO1的抑制剂。

[0471] 如本文描述的,至少在一个方面,本发明涵盖免疫检查点拮抗剂的应用。这样的免疫检查点拮抗剂包括免疫检查点分子诸如细胞毒性的T-淋巴细胞抗原4 (CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)、程序性死亡-配体1 (PDL-1)、淋巴细胞-活化基因3 (LAG-3) 和T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3 (TIM-3) 的拮抗剂。CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3或TIM-3的拮抗剂分别干扰CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3或TIM-3的功能。CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3和TIM-3的这样的拮抗剂可以包括分别特异性地结合CTLA-4、PD-1、PDL-1、LAG-3和TIM-3并抑制和/或阻断生物活性和功能的抗体。

[0472] E. 其它

[0473] 在某些实施方案中,在一个或多个编码元件内编码的有效负载是激素、FC融合蛋白、抗凝剂、凝血因子、与缺陷和遗传疾病相关的蛋白、伴侣蛋白、抗微生物蛋白、酶(例如,代谢酶)、结构蛋白(例如,通道或核孔蛋白)、蛋白变体、小分子、抗体、纳米抗体、工程改造的非体抗体(non-body antibody)或其组合。

[0474] 4. 另外的辅助元件(序列元件)

[0475] 如在本发明中所述,环状RNA多核苷酸、线性RNA多核苷酸和/或DNA模板可以进一步包含辅助元件。在某些实施方案中,这些辅助元件可以被包括在环状RNA、线性RNA多核苷酸和/或DNA模板的序列内,以增强环化、翻译或二者。在某些实施方案中,辅助元件是特异性地位于相应多核苷酸的增强的内含子元件、增强的外显子元件或核心功能元件之间或之内的序列。作为一个实例,但无意是限制性的,辅助元件包括IRES反式作用因子区域、miRNA结合位点、限制位点、RNA编辑区域、结构或序列元件、颗粒位点、邮政编码(zip code)元件、RNA运输元件或本领域中发现的增强、促进在环状RNA多核苷酸内编码的蛋白的环化和/或翻译的另一种专门序列。

[0476] A. IRES反式作用因子

[0477] 在某些实施方案中,所述辅助元件包含IRES反式作用因子(ITAF)区域。在某些实施方案中,所述IRES反式作用因子区域通过结合PCBP1-PCBP4(聚胞苷酸结合蛋白)、PABP1(聚腺苷酸结合蛋白)、PTB(聚嘧啶束结合)、Argonaute蛋白家族、HNRNPK(异质核内核糖核蛋白K蛋白)或La蛋白来调节翻译的起始。在某些实施方案中,所述IRES反式作用因子区域包含聚腺苷酸、聚胞苷酸、聚AC或聚嘧啶束。

[0478] 在某些实施方案中,所述ITAF区域位于核心功能元件内。在某些实施方案中,所述ITAF区域位于TIE内。

[0479] B. miRNA结合位点

[0480] 在某些实施方案中,所述辅助元件包含miRNA结合位点。在某些实施方案中,所述miRNA结合位点位于5' 增强的内含子元件、5' 增强的外显子元件、核心功能元件、3' 增强的外显子元件和/或3' 增强的内含子元件内。

[0481] 在某些实施方案中,其中所述miRNA结合位点位于增强的内含子元件或增强的外显子元件中的间隔区内。在某些实施方案中,所述miRNA结合位点包含整个间隔区区域。

[0482] 在某些实施方案中,所述5' 增强的内含子元件和3' 增强的内含子元件各自包含相

同的miRNA结合位点。在另一个实施方案中,5' 增强的内含子元件的miRNA结合位点包含与3' 增强的内含子元件在长度或核苷酸上不同的miRNA结合位点。在一个实施方案中,所述5' 增强的外显子元件和3' 增强的外显子元件包含相同的miRNA结合位点。在其它实施方案中,所述5' 增强的外显子元件和3' 增强的外显子元件包含在长度或核苷酸上不同的miRNA结合位点。

[0483] 在某些实施方案中,所述miRNA结合位点在环状RNA多核苷酸、线性RNA多核苷酸前体和/或DNA模板内彼此相邻。在某些实施方案中,一个miRNA结合位点的第一个核苷酸位于第二个miRNA结合位点的第一个核苷酸最后一个核苷酸之后。

[0484] 在某些实施方案中,所述miRNA结合位点位于核心功能元件的翻译起始元件(TIE)内。在一个实施方案中,所述miRNA结合位点位于内核糖体进入位点(IRES)之前、之后或之内。在另一个实施方案中,所述miRNA结合位点位于适体复合物之前、之后或内部。

[0485] 通过miRNA命名法定义的独特序列是微RNA领域中的工作者广泛了解和可得的。例如,可以在miRDB公共数据库中找到它们。

[0486] 5. 多核苷酸的产生

[0487] 可以使用分子生物学的标准技术来制备本文提供的DNA模板。例如,本文提供的载体的各种元件可以使用重组方法获得,诸如通过从细胞中筛选cDNA和基因组文库,或通过从已知包括它们的DNA模板获得多核苷酸。

[0488] 本文提供的DNA模板的各种元件也可以基于已知序列合成产生,而不是克隆。完整序列可以由通过标准方法制备的重叠寡核苷酸组装并组装成完整序列。参见,例如,Edge, Nature (1981) 292:756; Nambair等人, Science (1984) 223:1299; 和Jay等人, J. Biol. Chem. (1984) 259:631 1。

[0489] 因此,特定的核苷酸序列可以由携带期望序列的DNA模板获得,或者使用本领域已知的各种寡核苷酸合成技术完全地或部分地合成,诸如在适当的情况下定点诱变和聚合酶链式反应(PCR)技术。一种获得编码期望DNA模板元件的核苷酸序列的方法是通过退火在常规的自动化多核苷酸合成仪中产生的重叠合成寡核苷酸的互补组,随后用适当的DNA连接酶连接并通过PCR扩增所连接的核苷酸序列。参见,例如, Jayaraman等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:4084-4088。此外,可以使用寡核苷酸指导的合成(Jones等人, Nature (1986) 54:75-82)、预先存在的核苷酸区域的寡核苷酸指导诱变(Riechmann等人, Nature (1988) 332:323-327和Verhoeyen等人, Science (1988) 239:1534-1536)、以及使用T4 DNA聚合酶对缺口寡核苷酸的酶促填充(Queen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:10029-10033)。

[0490] 通过在允许DNA模板编码的前体RNA的转录的条件下温育本文提供的DNA模板,可以生成本文提供的前体RNA。例如,在某些实施方案中,如下合成前体RNA:在允许体外转录的条件下温育本文提供的DNA模板与兼容的RNA聚合酶,所述DNA模板包含位于其5' 双链体序列和/或表达序列上游的RNA聚合酶启动子。在某些实施方案中,将DNA模板在细胞内通过细菌噬菌体RNA聚合酶温育,或在细胞核内通过宿主RNA聚合酶II温育。

[0491] 在某些实施方案中,本文提供了一种通过使用本文提供的DNA模板作为模板(例如,本文提供的载体,其具有位于5' 双链体区域上游的RNA聚合酶启动子)进行体外转录来生成前体RNA的方法。

[0492] 在某些实施方案中,得到的前体RNA可以用于如下生成环状RNA(例如,本文提供的环状RNA多核苷酸):在镁离子和鸟苷核苷酸或核苷存在下在发生RNA环化的温度(例如,20℃至60℃之间)温育它。

[0493] 因此,在某些实施方案中,本文提供了一种制备环状RNA的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使用本文提供的载体(例如,5' 增强的内含子元件、5' 增强的外显子元件、核心功能元件、3' 增强的外显子元件和3' 增强的内含子元件)作为模板通过转录(例如,失控转录)合成前体RNA,并在二价阳离子(例如,镁离子)和GTP存在下温育所得前体RNA,使其环化以形成环状RNA。在某些实施方案中,本文公开的前体RNA能够在没有镁离子和GTP存在下和/或没有与镁离子和GTP温育的步骤的情况下发生环化。已经发现,环状RNA相对于相应的mRNA具有降低的免疫原性,这至少部分地因为mRNA含有免疫原性的5' 帽。当从某些启动子(例如,T7启动子)转录DNA载体以产生前体RNA时,应当理解,前体RNA的5' 端是G。为了降低含有低水平的污染物线性mRNA的环状RNA组合物的免疫原性,可以在转录过程中提供相对于GTP过量的GMP,使得大多数转录物含有不可加帽的5' GMP。因此,在某些实施方案中,在过量GMP存在下进行转录。在某些实施方案中,在GMP浓度与GTP浓度之比在约3:1至约15:1的范围内,例如,约3:1至约10:1、约3:1至约5:1、约3:1、约4:1或约5:1,进行转录。

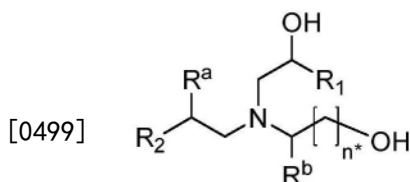
[0494] 在某些实施方案中,包含环状RNA的组合物已经被纯化。环状RNA可以通过本领域中常用的任何已知方法来纯化,诸如柱色谱法、凝胶过滤色谱法和尺寸排阻色谱法。在某些实施方案中,纯化包括以下步骤中的一个或多个:磷酸酶处理、HPLC尺寸排阻纯化和RNA酶R消化。在某些实施方案中,纯化按次序包括以下步骤:RNA酶R消化、磷酸酶处理和HPLC尺寸排阻纯化。在某些实施方案中,纯化包括反相HPLC。在某些实施方案中,纯化的组合物含有比未纯化的RNA更少的双链RNA、DNA夹板、三磷酸化的RNA、磷酸酶蛋白、蛋白连接酶、加帽酶和/或缺口RNA。在某些实施方案中,纯化的组合物比未纯化的组合物具有更低的免疫原性。在某些实施方案中,暴露于纯化的组合物的免疫细胞比暴露于未纯化的组合物的免疫细胞产生更少的TNF α 、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN γ 和/或1型干扰素,例如,IFN- β 1。

[0495] 6. 转移媒介物和其它递送机制的概述

[0496] A. 可电离脂质

[0497] 在某些实施方案中,本文公开了可电离脂质,其可用作转移媒介物的组分以促进或增强环状RNA向一个或多个靶细胞的递送和释放(例如,通过渗透或与这样的靶细胞的脂质膜融合)。在某些实施方案中,可电离脂质包含一个或多个可切割的官能团(例如二硫化物),其允许例如亲水性功能头部基团从化合物的亲脂性功能尾部基团分离(例如,在暴露于氧化、还原或酸性条件时),从而促进一个或多个靶细胞的脂质双层中的相变。

[0498] 在各种实施方案中,本公开内容的可电离脂质是式(13*)的化合物:



式(13*)

[0500] 其中:

[0501] n^* 是1至7之间的整数,

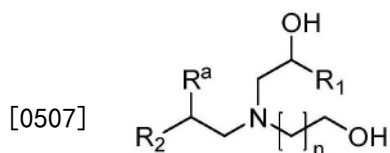
[0502] R^a 是氢或羟基,

[0503] R^b 是氢或 C_1 - C_6 烷基,

[0504] R_1 和 R_2 各自独立地是直链或支链 C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基或 C_1 - C_{30} 杂烷基,其任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自氧代、卤素、羟基、氰基、烷基、烯基、醛、杂环基烷基、羟基烷基、二羟基烷基、羟基烷基氨基烷基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、(杂环基)(烷基)氨基烷基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、炔基、烷氧基、氨基、二烷基氨基、氨基烷基羰基氨基、氨基羰基烷基氨基、(氨基羰基烷基)(烷基)氨基、烯基羰基氨基、羟基羰基、烷氧基羰基、烷基羰基氧基、烷基碳酸酯、烯基氧基羰基、烯基羰基氧基、烯基碳酸酯、炔基氧基羰基、炔基羰基氧基、炔基碳酸酯、氨基羰基、氨基烷基氨基羰基、烷基氨基烷基氨基羰基、二烷基氨基烷基氨基羰基、杂环基烷基氨基羰基、(烷基氨基烷基)(烷基)氨基羰基、烷基氨基烷基羰基、二烷基氨基烷基羰基、杂环基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亚砷、烷基亚砷烷基、烷基磺酰基和烷基砷烷基。

[0505] 在式(13*)的某些实施方案中, R^b 是 C_1 - C_6 烷基。在式(13*)的某些实施方案中, R^b 是甲基。在式(13*)的某些实施方案中, R^b 是乙基。

[0506] 在式(13*)的某些实施方案中, R^b 是H且所述可电离脂质具有式(13):



式(13)

[0508] 其中 n 是1至7之间的整数。在式(13)的某些实施方案中, n 是1至4之间的整数。

[0509] 在式(13*)和式(13)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 是相同的。在式(13*)和式(13)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 是不同的。

[0510] 在式(13*)和式(13)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地是任选地被取代的直链或支链烷基、烯基或杂烷基,其中在任选地被取代的直链或支链基团中存在的碳原子的总数是30个碳或更少,诸如6-30个碳原子或6-20个碳原子。

[0511] 在式(13*)和式(13)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是未被取代的直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基、 C_6 - C_{30} 烯基或 C_6 - C_{30} 杂烷基。

[0512] 在式(13*)和式(13)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地是直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基、 C_6 - C_{30} 烯基或 C_9 - C_{20} 杂烷基,其任选地被一个或多个取代基(例如,如上所述)取代。在式(13*)和式(13)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 独立地选自直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基、 C_6 - C_{30} 烯基或 C_9 - C_{20} 杂烷基,其被烷氧基羰基、烷基羰基氧基、烷基碳酸酯、烯基氧基羰基、烯基羰基氧基、烯基碳酸酯取代。

[0513] 在式(13*)和式(13)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基或 C_1 - C_{20} 杂烷基,其任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基各自独立地选自直链或支链 C_1 - C_{20} 烷氧基、直链或支链 C_1 - C_{20} 烷氧基羰基、直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基羰基氧基、直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基碳酸酯、直链或支链 C_2 - C_{20} 烯基氧基羰基、直链或支链 C_2 - C_{20} 烯基羰基氧基、直链或支链 C_2 - C_{20} 烯基碳酸酯、直链或支链 C_2 - C_{20} 炔基氧基羰基、直链或支链 C_2 -

C₂₀炔基羰基氧基和直链或支链C₂-C₂₀炔基碳酸酯。

[0514] 在式 (13*) 和式 (13) 的某些实施方案中, R₁和R₂中的至少一个是被-O(CO)R⁶、-C(O)OR⁶或-O(CO)OR⁶取代的直链C₁-C₁₂烷基, 其中每个R⁶独立地是直链或支链C₁-C₂₀烷基或C₂-C₂₀烯基。在式 (13*) 和式 (13) 的某些实施方案中, R₁和R₂各自独立地是被-O(CO)R⁶、-C(O)OR⁶或-O(CO)OR⁶取代的直链C₁-C₁₂烷基, 其中每个R⁶独立地是直链或支链C₁-C₂₀烷基或C₂-C₂₀烯基。

[0515] 在某些实施方案中, R₁和R₂中的至少一个被烷氧基羰基取代。在某些实施方案中, 所述烷氧基羰基具有式-C(O)OR⁶, 其中R⁶是未被取代的C₆-C₃₀烷基或C₆-C₃₀烯基。

[0516] 在某些实施方案中, R₁和R₂中的至少一个被烷基羰基氧基取代。在某些实施方案中, 所述烷基羰基氧基具有式-OC(O)R⁶, 其中R⁶是未被取代的C₆-C₃₀烷基或C₆-C₃₀烯基。

[0517] 在某些实施方案中, R₁和R₂中的至少一个被烷基碳酸酯取代。在某些实施方案中, 所述烷基碳酸酯具有式-O(CO)OR⁶, 其中R⁶是未被取代的C₆-C₃₀烷基或C₆-C₃₀烯基。

[0518] 在某些实施方案中, R₁和R₂各自独立地是被-O(CO)R⁶、-C(O)OR⁶或-O(CO)OR⁶取代的C₁-C₁₂烷基, 其中R⁶是未被取代的C₆-C₃₀烷基或C₆-C₃₀烯基。在某些实施方案中, R₁和R₂各自是被-O(CO)R⁶取代的C₁-C₁₂烷基。在某些实施方案中, R₁和R₂各自是被-C(O)OR⁶取代的C₁-C₁₂烷基。在某些实施方案中, R₁和R₂各自是被-O(CO)OR⁶取代的C₁-C₁₂烷基。在某些实施方案中, R₁是-C(O)OR⁶或-O(CO)R⁶且R₂是-O(CO)OR⁶。在某些实施方案中, R₁是-O(CO)OR⁶且R₂是-C(O)OR⁶或-O(CO)R⁶。

[0519] 在某些实施方案中, R₁和R₂中的至少一个选自下式:

[0520] (i) - (CH₂)_qC(O)O(CH₂)_rCH(R⁸)(R⁹),

[0521] (ii) - (CH₂)_qOC(O)(CH₂)_rCH(R⁸)(R⁹), 和

[0522] (iii) - (CH₂)_qOC(O)O(CH₂)_rCH(R⁸)(R⁹),

[0523] 其中:

[0524] q是0至12之间的整数,

[0525] r是0至6之间的整数,

[0526] R⁸是H或R¹⁰, 且

[0527] R⁹和R¹⁰独立地是未被取代的直链C₁-C₁₂烷基或未被取代的直链C₂-C₁₂-烯基。

[0528] 在某些实施方案中, R₁和R₂中的每个独立地选自下式之一:

[0529] (i) - (CH₂)_qC(O)O(CH₂)_rCH(R⁸)(R⁹),

[0530] (ii) - (CH₂)_qOC(O)(CH₂)_rCH(R⁸)(R⁹), 和

[0531] (iii) - (CH₂)_qOC(O)O(CH₂)_rCH(R⁸)(R⁹),

[0532] 其中:

[0533] q是0至12之间的整数,

[0534] r是0至6之间的整数,

[0535] R⁸是H或R¹⁰, 且

[0536] R⁹和R¹⁰独立地是未被取代的直链C₁-C₁₂烷基或未被取代的直链C₂-C₁₂-烯基。

[0537] 在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q是1至6之间的整数。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q是0。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q是1。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q是2。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某

些实施方案中, q 是 3 至 12 之间的整数。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q 是 3 至 6 之间的整数。

[0538] 在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 0。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 1 至 6 之间的整数。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 1。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 2。

[0539] 在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 R^{10} 。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 是不同的。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 是相同的。

[0540] 在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H, 且 R^9 是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_1 - C_{12} -烯基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H, 且 R^9 是未被取代的直链 C_2 - C_{12} 烷基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H, 且 R^9 是未被取代的直链 C_2 - C_8 烷基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H, 且 R^9 是未被取代的直链 C_4 - C_8 烷基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H, 且 R^9 是未被取代的直链 C_5 - C_8 烷基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H, 且 R^9 是未被取代的直链 C_6 - C_8 烷基。

[0541] 在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_1 - C_{12} -烯基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_2 - C_{12} 烷基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_2 - C_8 烷基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_4 - C_8 烷基。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_6 - C_8 烷基。

[0542] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_q OC(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

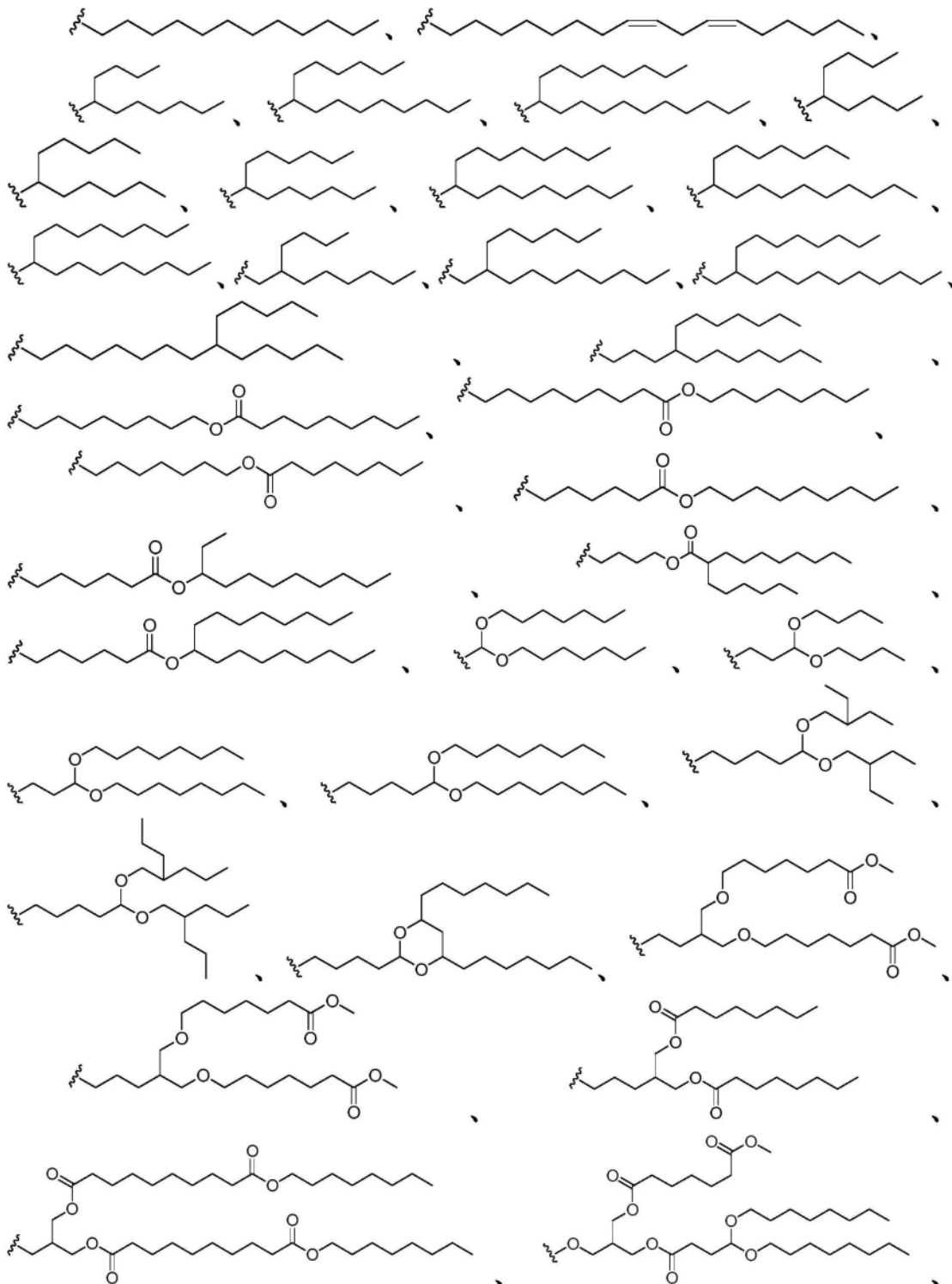
[0543] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$ 或 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在其它实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$ 或 $-(CH_2)_q OC(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$ 或 $-(CH_2)_q OC(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0544] 在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

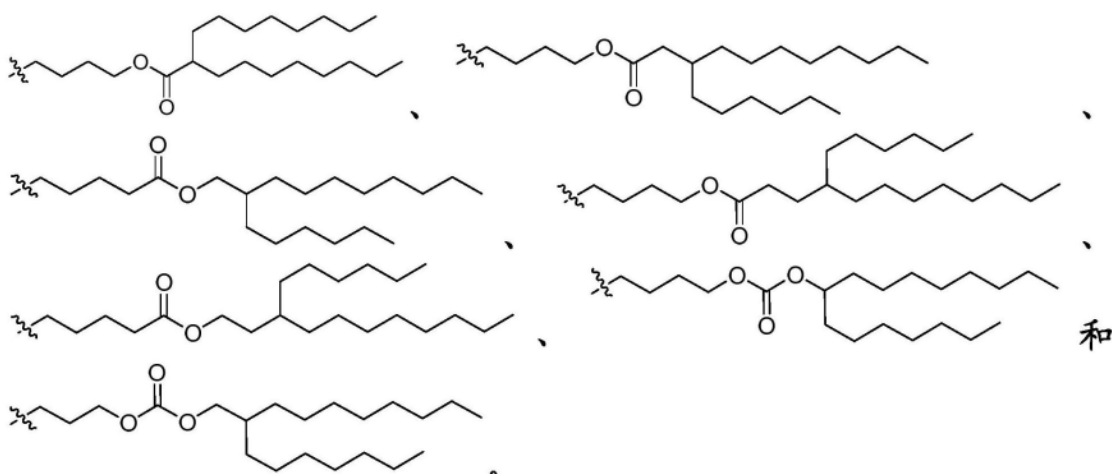
[0545] 在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q C(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O) (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O) O (CH_2)_r CH(R^8) (R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0546] 在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0547] 在某些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地选自:

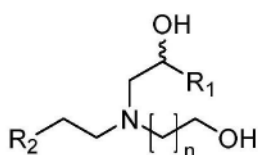


[0549]

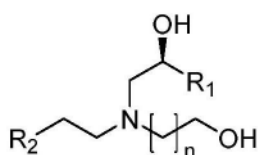


[0550] 在某些实施方案中,式(13)的可电离脂质由式(13a-1)、式(13a-2)或式(13a-3)表示:

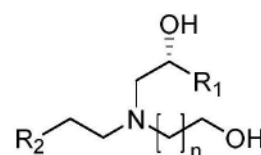
[0551]



式(13a-1)



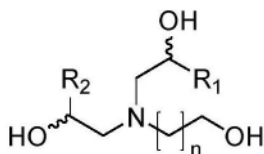
式(13a-2)



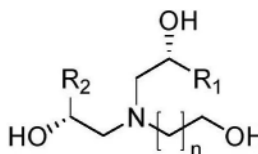
式(13a-3)

[0552] 在某些实施方案中,所述可电离脂质由式(13b-1)、式(13b-2)或式(13b-3)表示:

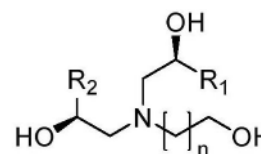
[0553]



式(13b-1)



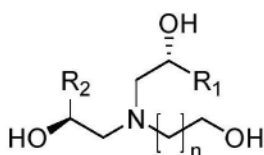
式(13b-2)



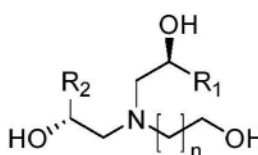
式(13b-3)

[0554] 在某些实施方案中,所述可电离脂质由式(13b-4)、式(13b-5)、式(13b-6)、式(13b-7)、式(13b-8)或式(13b-9)表示:

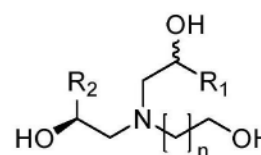
[0555]



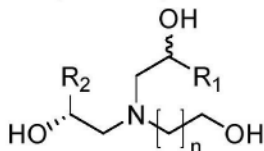
式(13b-4)



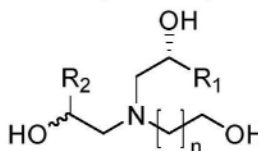
式(13b-5)



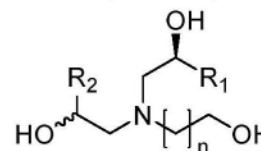
式(13b-6)



式(13b-7)



式(13b-8)



式(13b-9)。

[0556] 在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 独立地是任选地被 $-O(CO)R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 或 $-O(CO)OR^6$ 取代的 C_1-C_{12} 烷基,其中 R^6 是未被取代的直链或支链 C_1-C_{20} 烷基或 C_2-C_{20} 烯基。在某些实施方案中, R^6 是未被取代的直链 C_1-C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^6 是未被取代的支链 C_6-C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^6 是未被取代的直链 C_6-C_{20} 烷基。在某些实施方案

中, R^6 是未被取代的支链 C_6-C_{20} 烷基。

[0557] 在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, R_1 和 R_2 独立地选自直链或支链 C_6-C_{30} 烷基、直链或支链 C_6-C_{30} 烯基、直链或支链 C_6-C_{30} 杂烷基、 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 、 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 和 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 其中 q 是 0 至 12, r 是 0 至 6, R^8 是 H 或 R^{10} , 且 R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1-C_{20} 烷基或未被取代的直链 C_2-C_{20} 烯基。在某些实施方案中, q 是 1 至 8, 诸如 1 至 6, 或 2 至 6。在某些实施方案中, r 是 0。在某些实施方案中, r 是 1 至 6, 诸如 1 至 3。在某些实施方案中, r 是 1。在某些实施方案中, r 是 2。

[0558] 在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, R_1 和 R_2 是不同的基团。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, R_1 和 R_2 是相同的。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的一个为直链基团, 且 R_1 和 R_2 中的另一个包括支链基团。

[0559] 在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个选自下式:

[0560] (i) $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,

[0561] (ii) $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 和

[0562] (iii) $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,

[0563] 其中:

[0564] q 是 0 至 12 之间的整数,

[0565] r 是 0 至 6 之间的整数,

[0566] R^8 是 H 或 R^{10} , 且

[0567] R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1-C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2-C_{12} -烯基。

[0568] 在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的每个独立地选自下式之一:

[0569] (i) $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,

[0570] (ii) $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 和

[0571] (iii) $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,

[0572] 其中:

[0573] q 是 0 至 12 之间的整数,

[0574] r 是 0 至 6 之间的整数,

[0575] R^8 是 H 或 R^{10} , 且

[0576] R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1-C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2-C_{12} -烯基。

[0577] 在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q 是 1 至 6 之间的整数。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q 是 1。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q 是 2。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q 是 3 至 12 之间的整数。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, q 是 3 至 6 之间的整数。

[0578] 在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 0。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 1 至 6 之间的整数。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 1。在式 (i) - (iii) 中的任一个的某些实施方案中, r 是 2。

[0579] 在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 R^{10} 。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 是不同的。在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 是相同的。

[0580] 在式 (i) - (iii) 的某些实施方案中, R^8 是 H, 且 R^9 是未被取代的直链 C_1-C_{12} 烷基或未

被取代的直链 C_1-C_{12} -烯基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_2-C_{12} 烷基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_2-C_8 烷基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_4-C_8 烷基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_6-C_8 烷基。

[0581] 在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_1-C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_1-C_{12} -烯基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_2-C_{12} 烷基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_2-C_8 烷基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_4-C_8 烷基。在式(i)-(iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_6-C_8 烷基。

[0582] 在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0583] 在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0584] 在式(13a-1)至(13b-9)的其它实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0585] 在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,且 R_2 是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,且 R_2 是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,且 R_2 是 $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

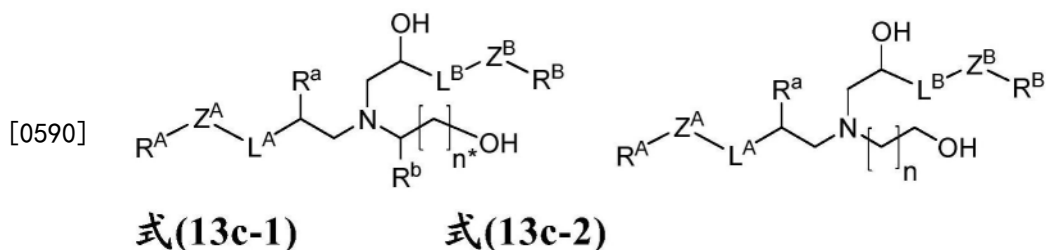
[0586] 在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,且 R_2 是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,且 R_2 是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,且 R_2 是 $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0587] 在式(13a-1)至(13b-9)的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,且 R_2 是 $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(13a-1)至(13b-

9) 的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 且 R_2 是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0588] 在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 1。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 2 至 7 之间的整数。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 2。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 3 至 7 之间的整数。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 3。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 4 至 7 之间的整数。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 4。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 5。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 6。在式 (13a-1) 至 (13b-9) 的某些实施方案中, n 是 7。

[0589] 在式 (13*) 的某些实施方案中, 所述可电离脂质具有式 (13c-1) 或 (13c-2) :



[0591] 其中:

[0592] n^* 和 n 各自是 1 至 7 之间的整数;

[0593] R^a 是氢或羟基,

[0594] R^b 是氢或 C_1 - C_6 烷基,

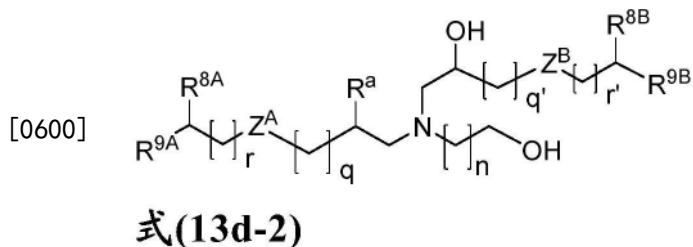
[0595] L^A 和 L^B 各自独立地是直链 C_1 - C_{12} 烷基;

[0596] Z^A 和 Z^B 各自独立地不存在或者选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 和 $-OC(O)O-$; 且

[0597] R^A 和 R^B 独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基或 C_2 - C_{20} 烯基。

[0598] 在式 (13c-1) 和 (13c-2) 的某些实施方案中, Z^A 选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 和 $-OC(O)O-$, 且 Z^B 不存在。在式 (13c-1) 和 (13c-2) 的某些实施方案中, Z^B 选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 和 $-OC(O)O-$, 且 Z^A 不存在。

[0599] 在式 (13c-2) 的某些实施方案中, 所述可电离脂质具有式 (13d-2) :



[0601] 其中:

[0602] q 和 q' 各自独立地是 1 至 12 之间的整数,

[0603] r 和 r' 各自独立地是 0 至 6 之间的整数,

[0604] R^{8A} 是 H 或 R^{10A} ,

[0605] R^{8B} 是 H 或 R^{10B} , 且

[0606] R^{9A} 、 R^{9B} 、 R^{10A} 和 R^{10B} 各自独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2 - C_{12} -烯基。

[0607] 在式 (13d-2) 的某些实施方案中, R^{9A} 、 R^{9B} 、 R^{10A} 和 R^{10B} 各自独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2 - C_{12} -烯基。

[0608] 在式 (13d-2) 的某些实施方案中,q是1至6之间的整数。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,q是0。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,q是1。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,q是2。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,q是3至12。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,q是3至6。

[0609] 在式 (13d-2) 的某些实施方案中,r是0。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,r是1至6之间的整数。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,r是1。在式 (13d-2) 的某些实施方案中,r是2。

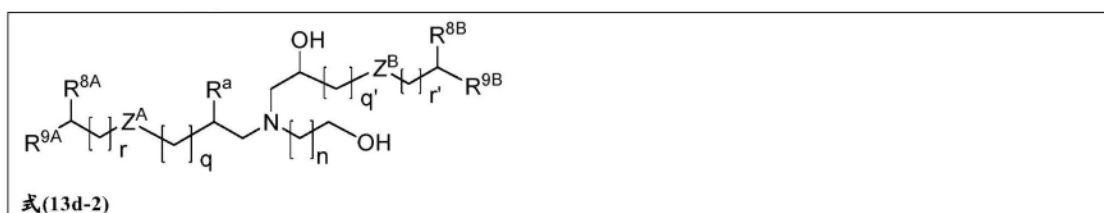
[0610] 在式 (13d-2) 的某些实施方案中, R^a 是氢, Z^A 选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 和 $-OC(O)O-$,且 Z^B 不存在。在式 (13d-2) 的某些实施方案中, R^a 是氢, Z^B 是选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 和 $-OC(O)O-$ 的连接基团,且 Z^A 不存在。

[0611] 在式 (13d-2) 的某些实施方案中, R^a 是羟基, Z^A 选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 和 $-OC(O)O-$,且 Z^B 不存在。在式 (13d-2) 的某些实施方案中, R^a 是羟基, Z^B 选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 和 $-OC(O)O-$,且 Z^A 不存在。

[0612] 在某些实施方案中,本公开内容的可电离脂质具有如下表1的化合物中所述的式 (13d-2),其中任何未定义的变量如上所述。

[0613] 表1:式 (13d-2) 的示例性可电离脂质。在表1的示例性脂质的某些实施方案中,n是1或2。

[0614]



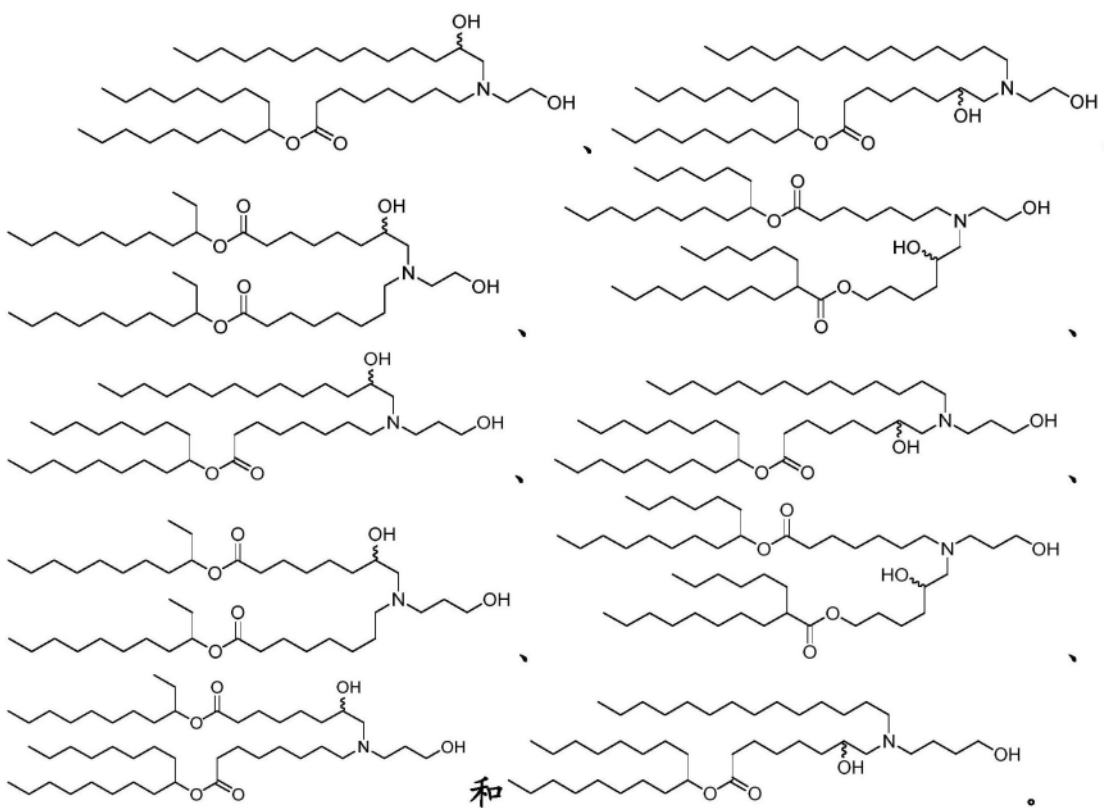
[0615]

化合物 编号	R ^{9A}	R ^{8A}	r	Z ^A	q	R ^a	q'	Z ^B	r'	R ^{8B}	R ^{9B}
1	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-C(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
2	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	1	-C(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)-	1	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
3	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	2	-C(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)-	2	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
4	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
5	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	1	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	1	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
6	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	2	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	2	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
7	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
8	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	1	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	1	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
9	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)-	3-6	H	1-12	不存在	0	H	C ₁ -C ₁₂ 烷基
10	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	H	C ₄ -C ₁₂ 烷基
11	C ₁ -C ₁₂ 烷基	H	0	不存在	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
12	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)-	3-6	OH	1-12	不存在	0	H	C ₁ -C ₁₂ 烷基
13	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)-	3-6	OH	3-6	-C(O)O-	0	H	C ₄ -C ₁₂ 烷基
14	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	H	C ₄ -C ₁₂ 烷基
15	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	H	C ₄ -C ₁₂ 烷基
16	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	H	C ₄ -C ₁₂ 烷基
17	C ₄ -C ₈ 烷基	H	0	-OC(O)-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
18	C ₄ -C ₈ 烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基

[0616]

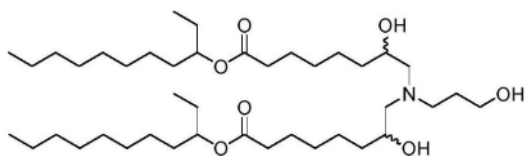
19	C ₄ -C ₈ 烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-OC(O)O-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
20	C ₄ -C ₈ 烷基	H	0	-OC(O)-	3-6	OH	3-6	-OC(O)O-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
21	C ₄ -C ₈ 烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	OH	3-6	-C(O)O	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
22	C ₄ -C ₈ 烷基	H	0	-OC(O)O-	3-6	OH	3-6	-OC(O)O-	0	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基
23	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	C ₁ -C ₄ 烷基	C ₄ -C ₁₂ 烷基
24	C ₄ -C ₈ 烷基	C ₄ -C ₈ 烷基	0	-OC(O)O-	3-6	H	3-6	-C(O)O-	0	C ₁ -C ₅ 烷基	C ₆ -C ₁₂ 烷基

[0617] 在某些实施方案中,本公开内容的可电离脂质选自:



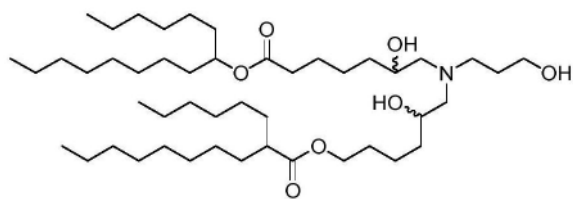
[0619] 在某些实施方案中,所述可电离脂质选自:

[0620]



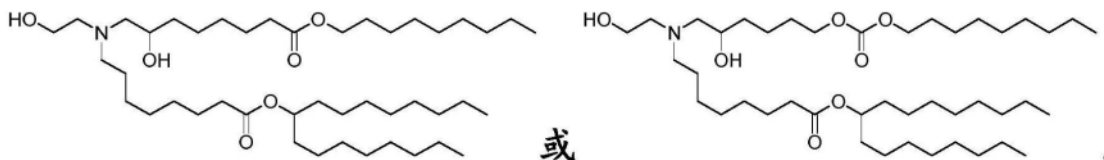
和

[0621]



[0622] 在某些实施方案中,所述可电离脂质不是

[0623]



[0624] 在式 (13c-1) 和/或 (13c-2) 的某些实施方案中,每个 R^b 是氢。

[0625] 在式 (13c-1) 和/或 (13c-2) 的某些实施方案中,一个且仅一个 R^b 是 C_1 - C_6 烷基,且其它 R^b 基团如果存在的话为氢。在式 (13c-1) 和/或 (13c-2) 的某些实施方案中,一个且仅一个 R^b 是甲基或乙基。在某些实施方案中,一个且仅一个作为 C_1 - C_6 烷基的 R^b 连接至与可电离脂质的氮原子相邻的碳原子。在式 (13c-1) 和/或 (13c-2) 的某些实施方案中, n 是2至7,一个且仅一个 R^b 是 C_1 - C_6 烷基,且其它 R^b 基团如果存在的话为氢。

[0626] 在某些实施方案中,本公开内容的可电离脂质是选自表10e-表10h的脂质。

[0627] 在某些实施方案中,本公开内容的可电离脂质具有 β -羟基胺头部基团。在某些实施方案中,所述可电离脂质具有 γ -羟基胺头部基团。

[0628] 在一个实施方案中,所述可电离脂质描述于美国专利公开号US20170210697A1中。

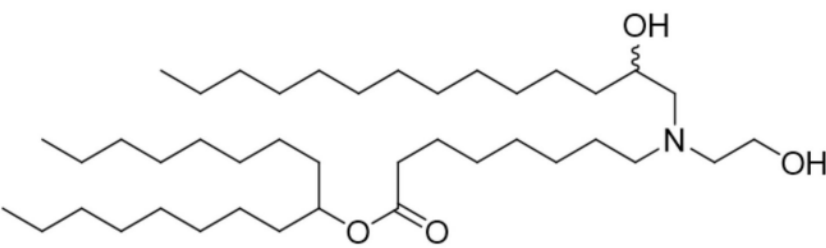
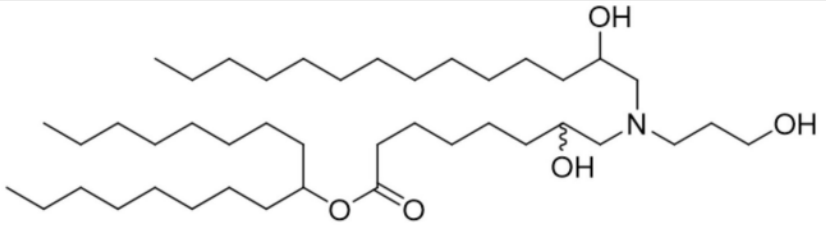
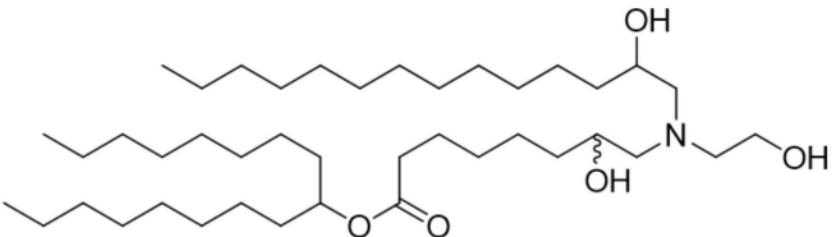
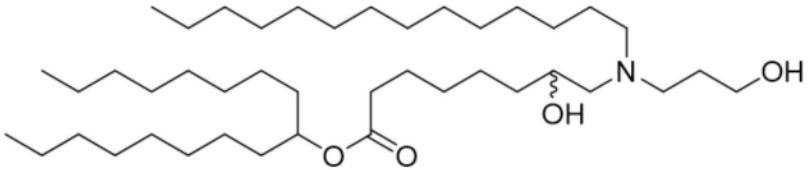
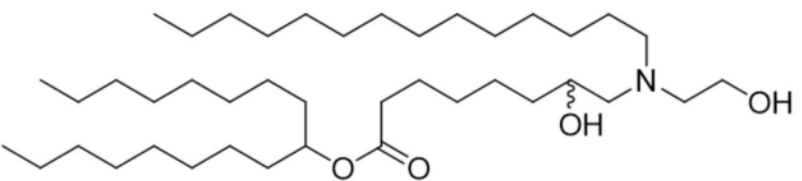
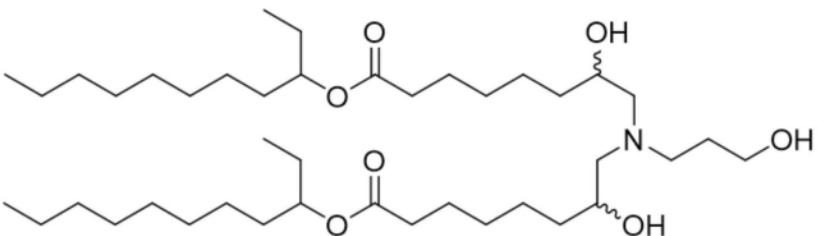
在一个实施方案中,所述可电离脂质描述于美国专利公开号US20170119904A1中。

[0629] 表10e

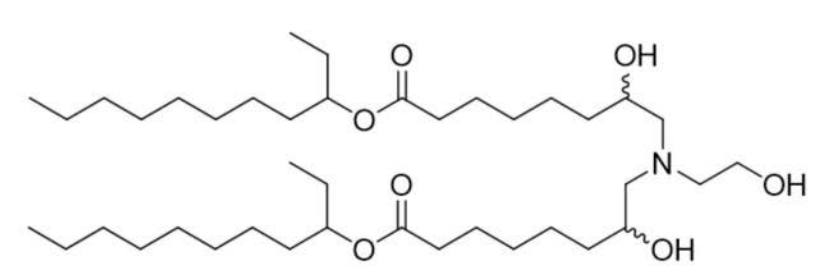
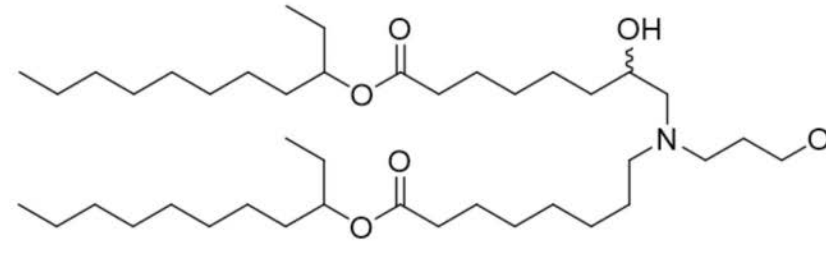
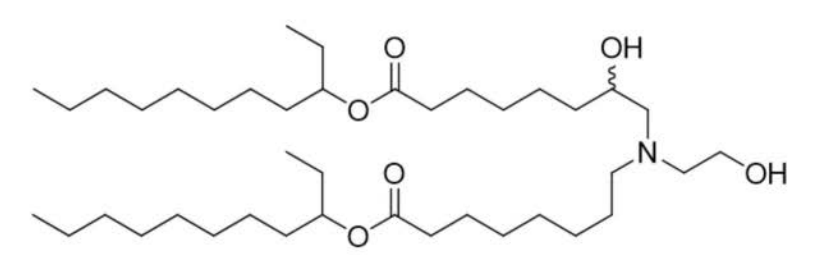
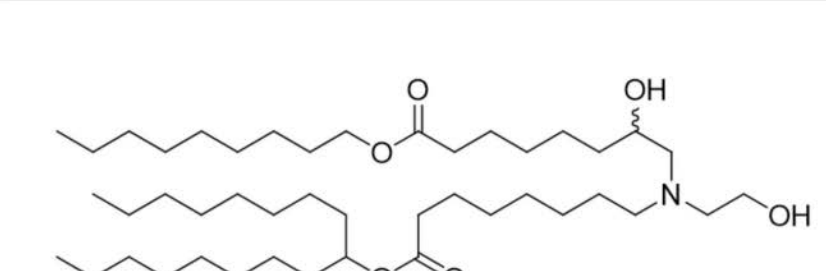
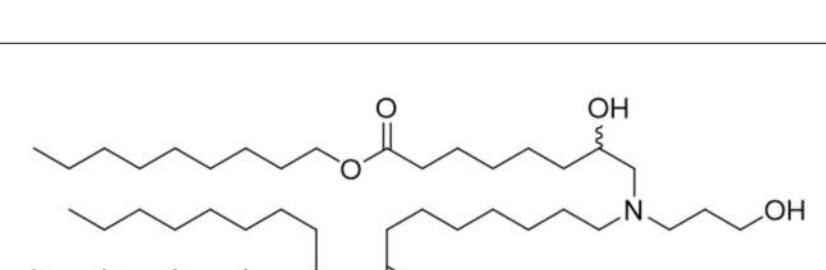
[0630]

可电离脂质编号	结构
1	

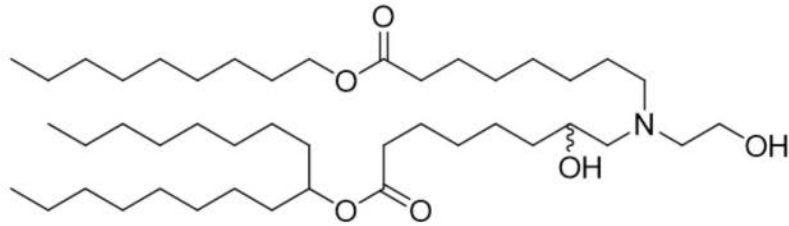
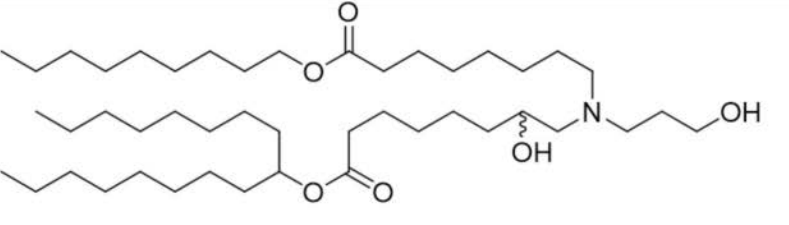
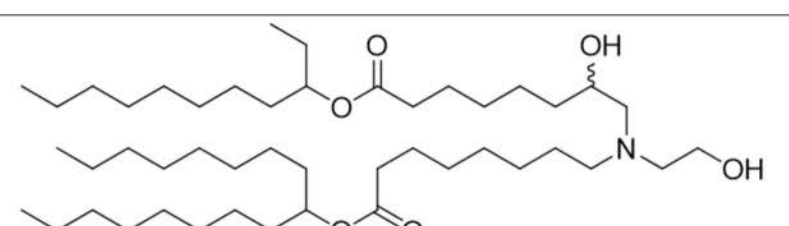
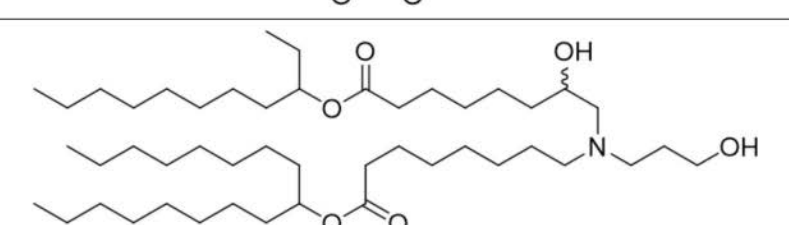
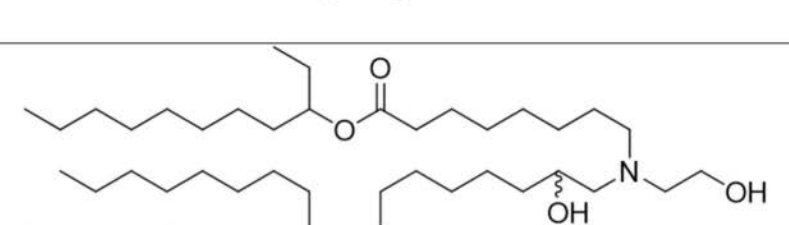
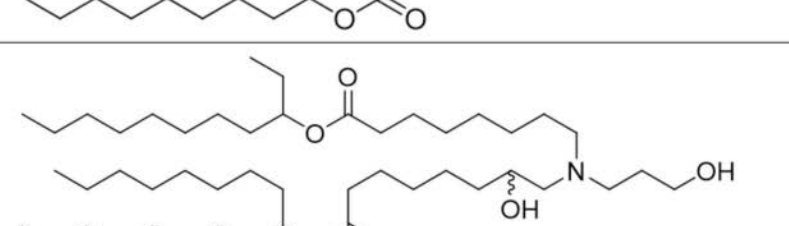
[0631]

2	
3	
4	
5	
6	
7	

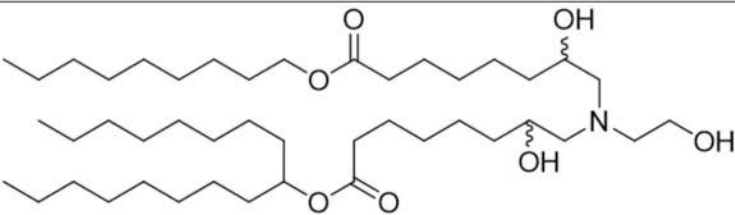
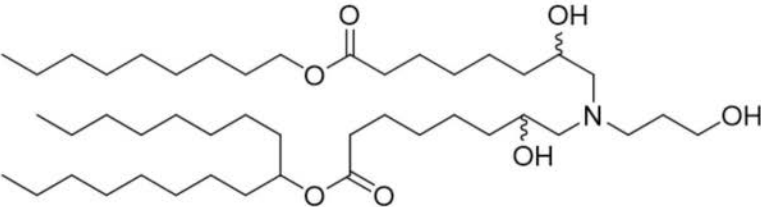
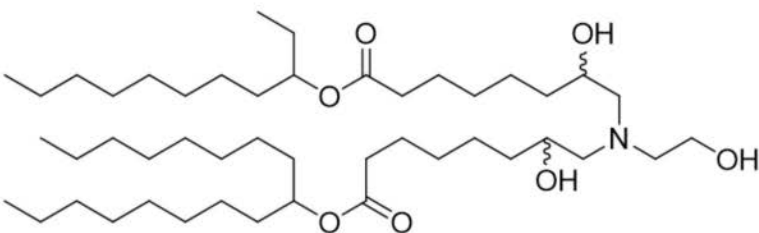
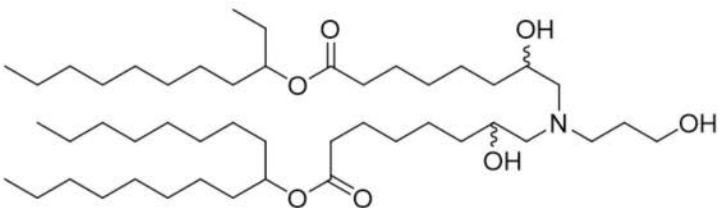
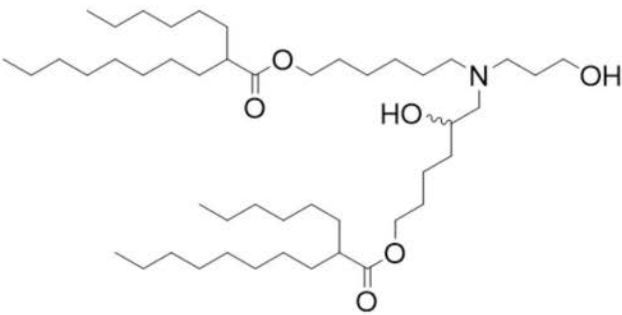
[0632]

8	
9	
10	
11	
12	

[0633]

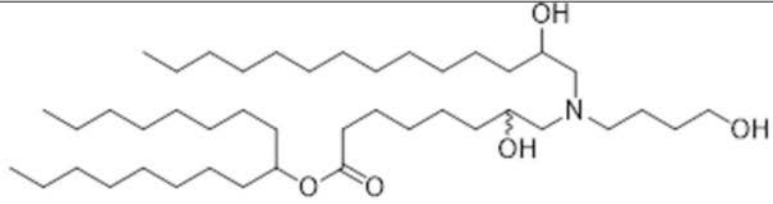
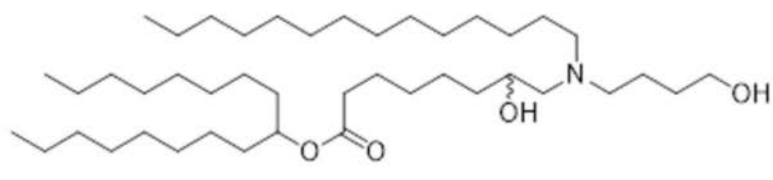
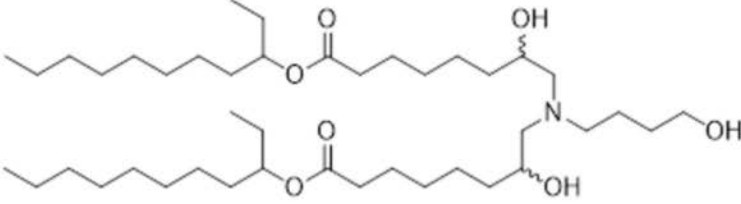
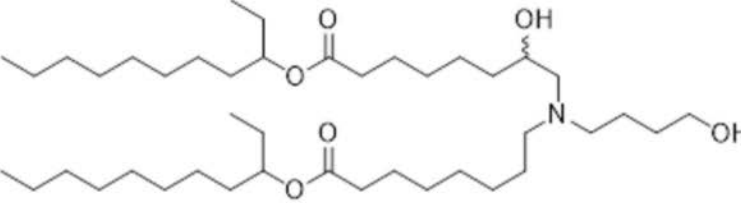
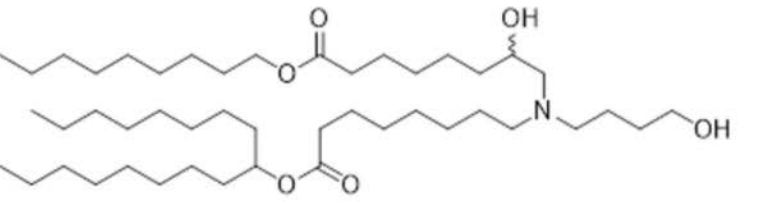
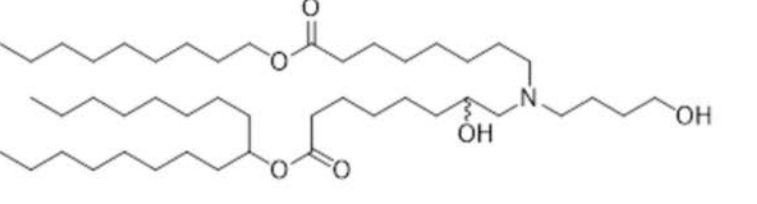
13	
14	
15	
16	
17	
18	

[0634]

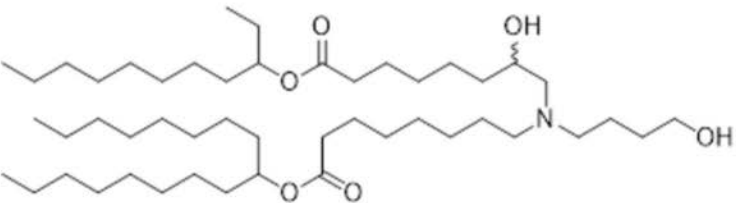
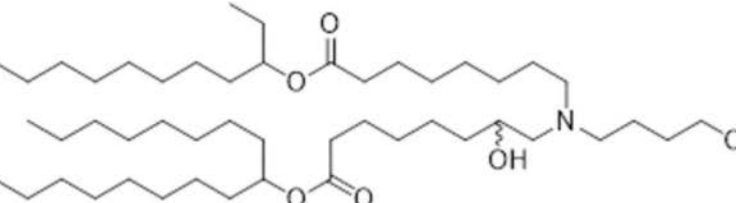
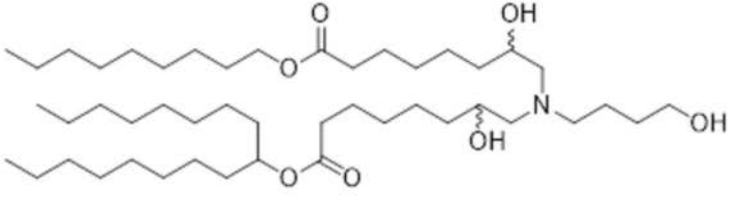
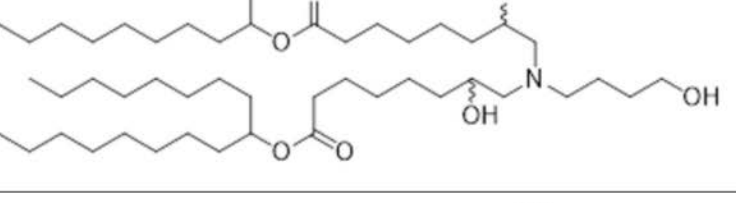
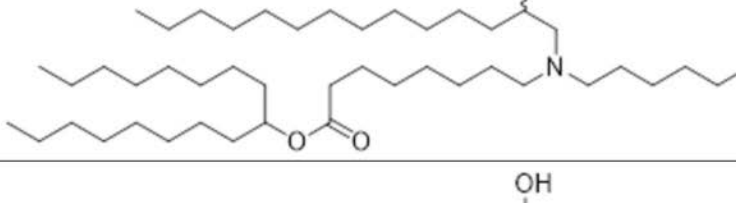
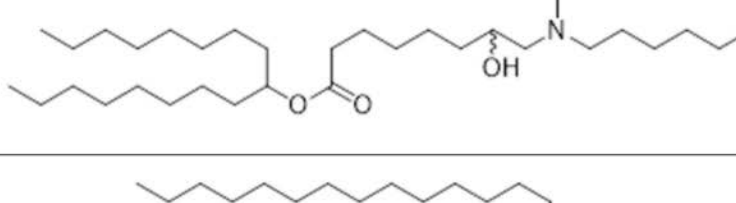
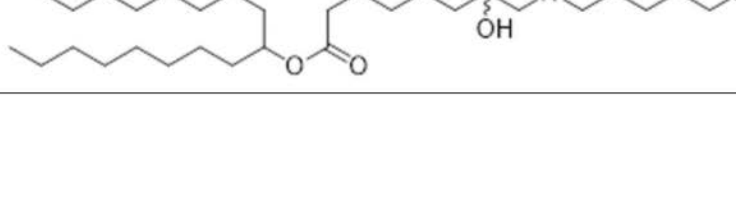
19	
20	
21	
22	
23	

[0635]

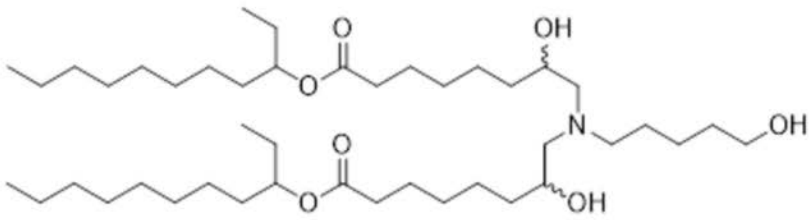
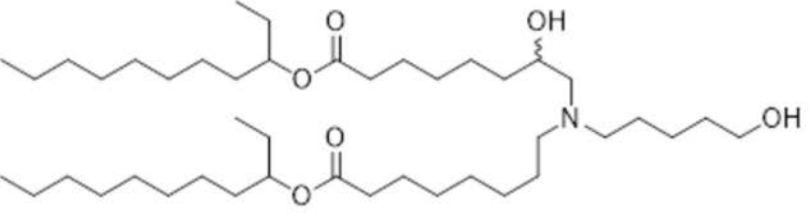
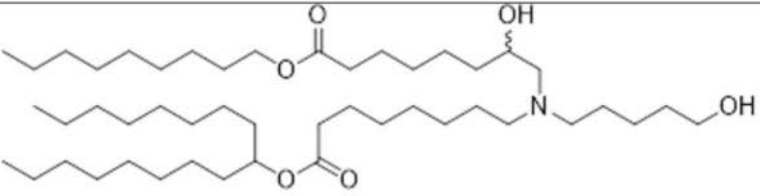
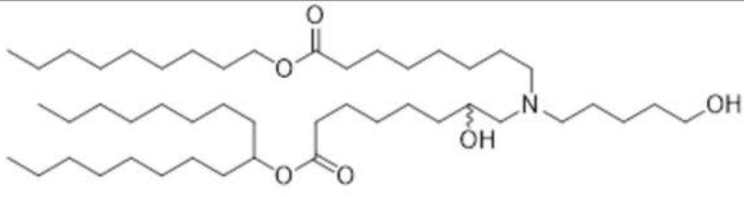
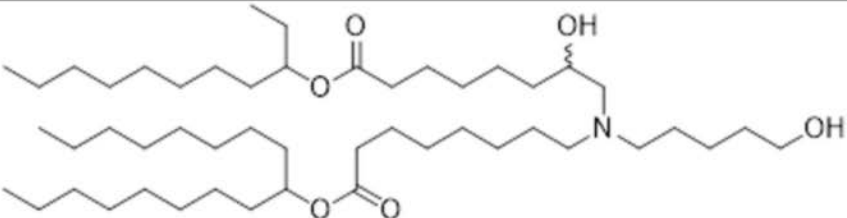
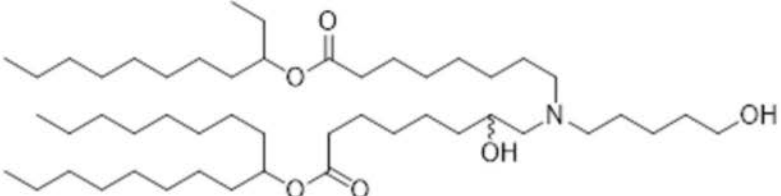
24	
25	
26	
27	

28	
29	
30	
[0636] 31	
32	
33	

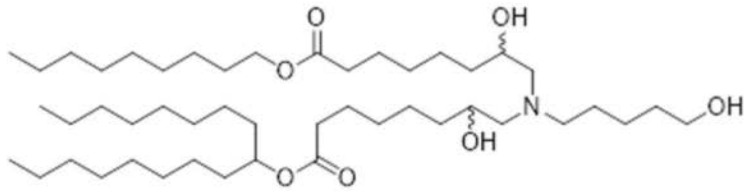
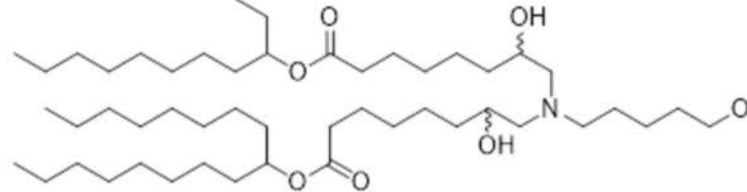
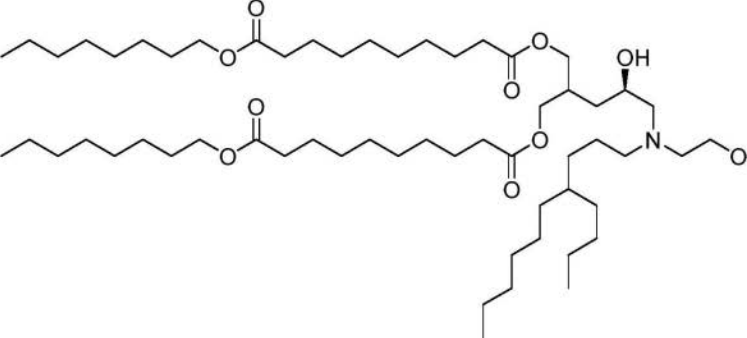
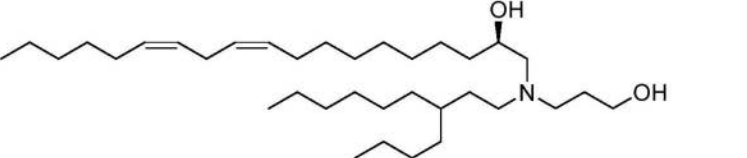
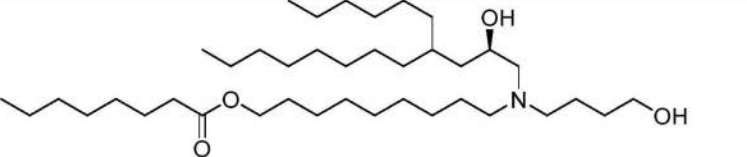
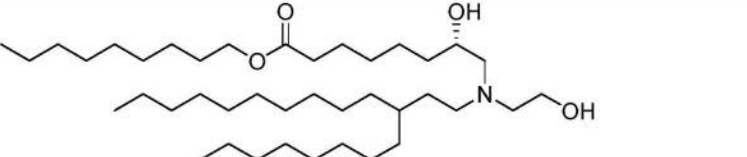
[0637]

34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	

[0638]

41	
42	
43	
44	
45	
46	

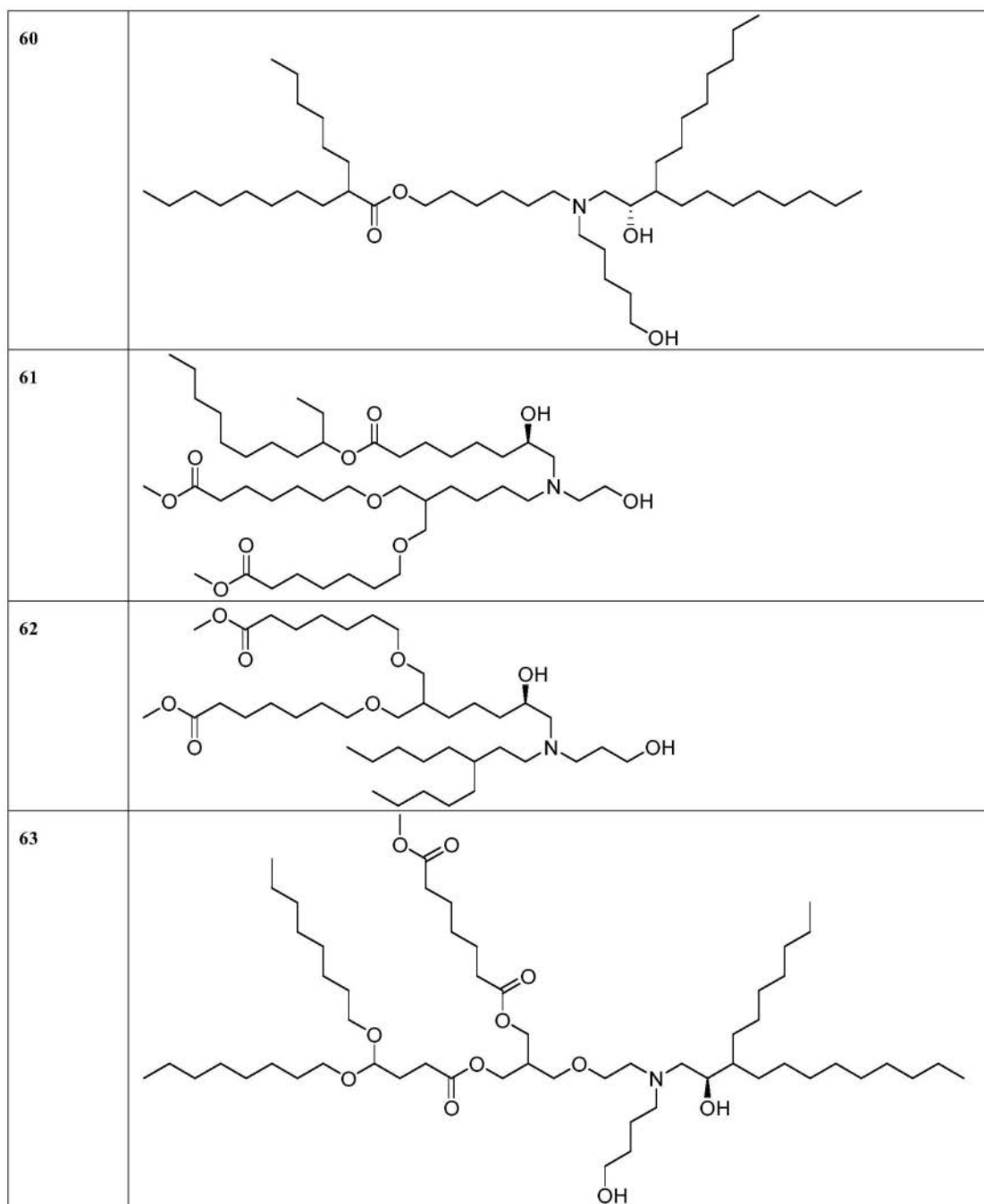
[0639]

47	
48	
49	
50	
51	
52	
53	

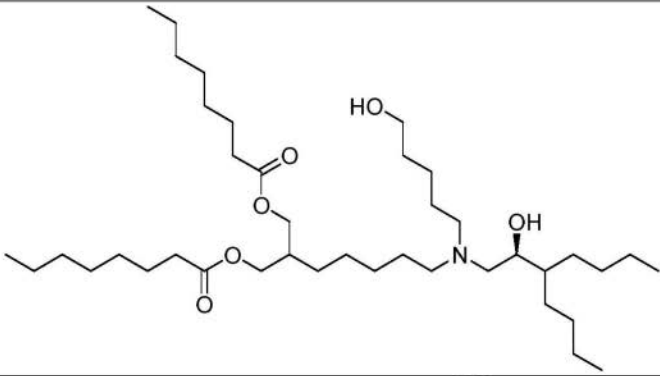
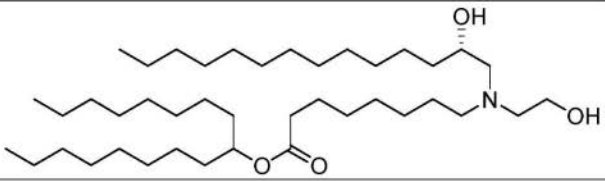
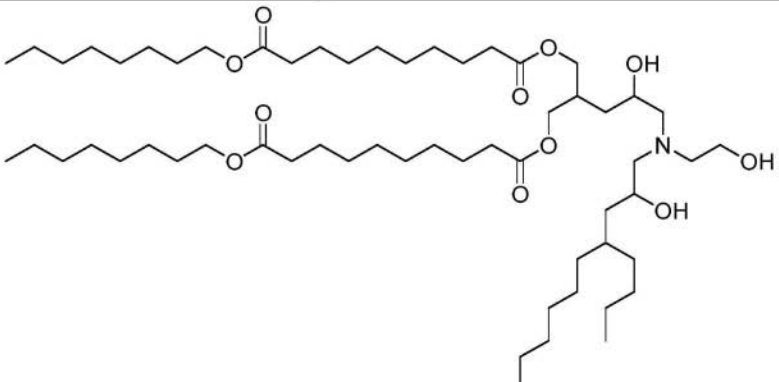
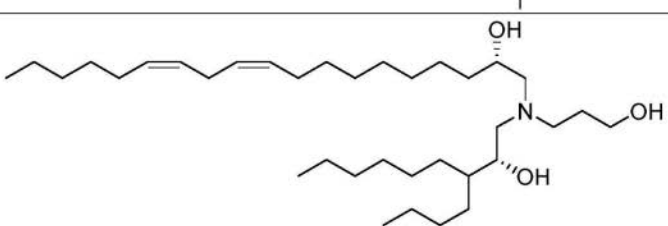
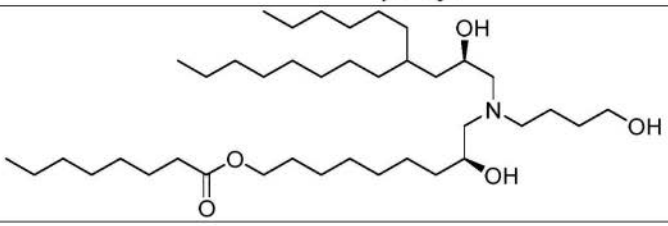
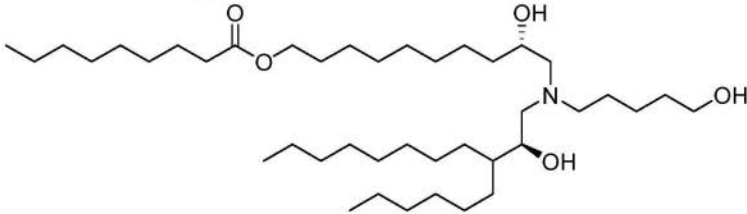
[0640]

54	
55	
56	
57	
58	
59	

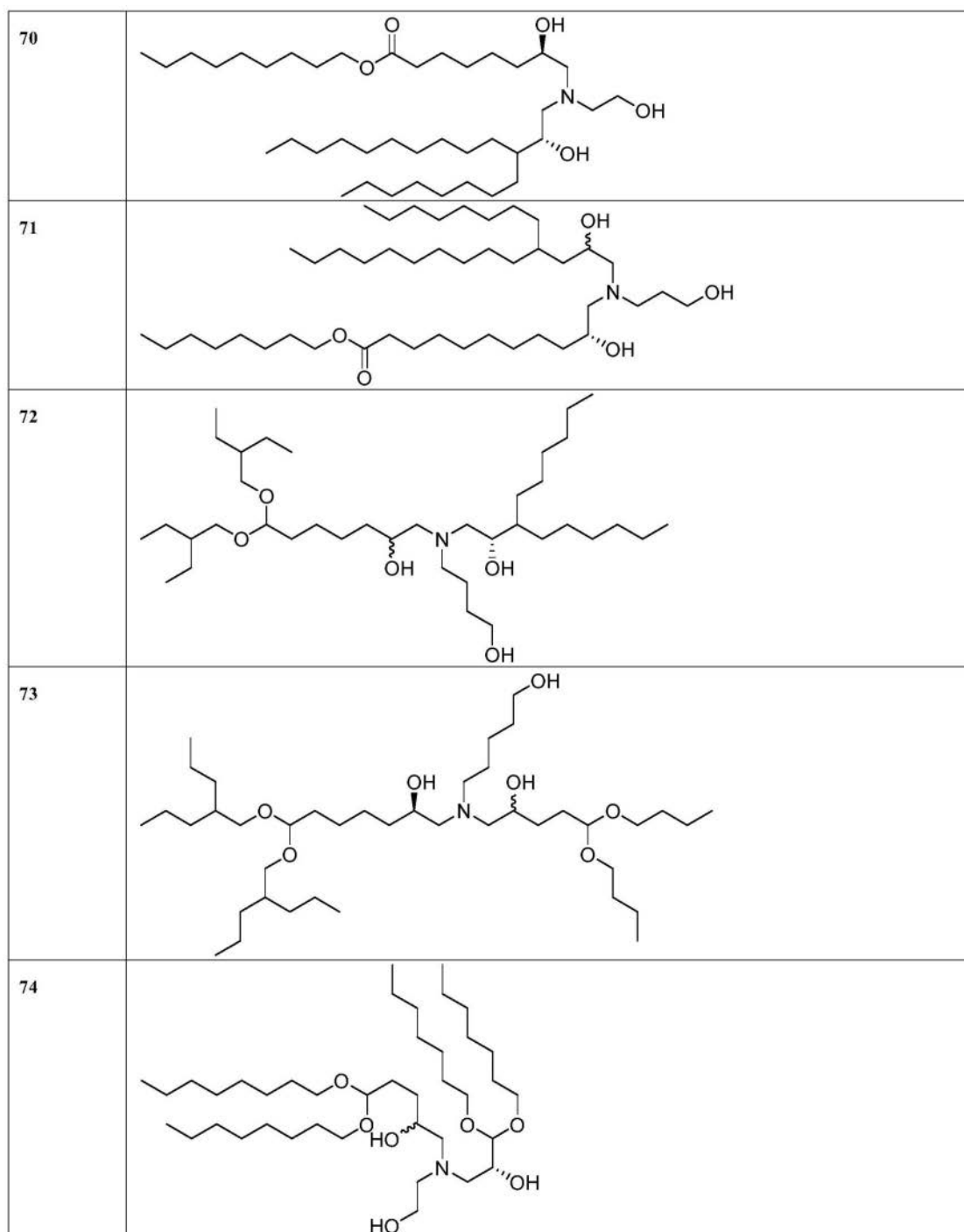
[0641]



[0642]

64	
65	
66	
67	
68	
69	

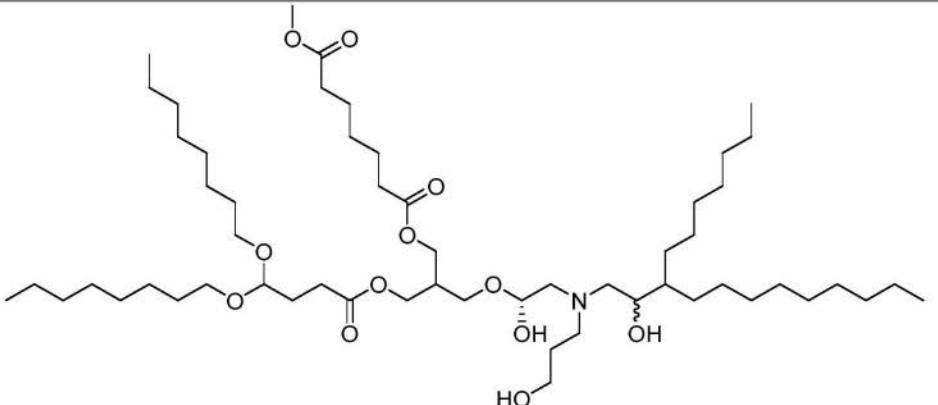
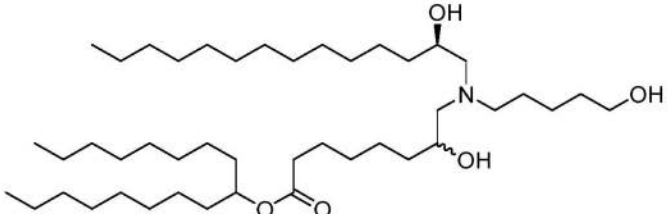
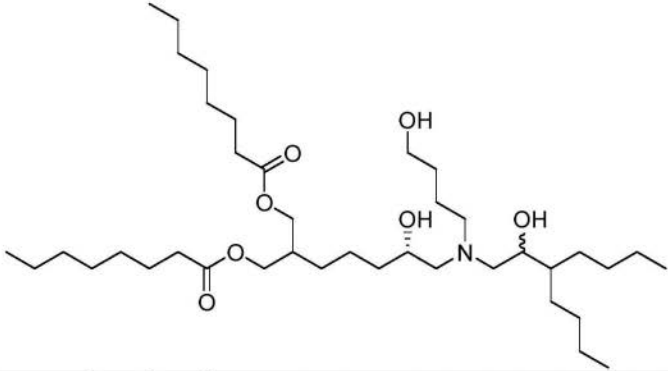
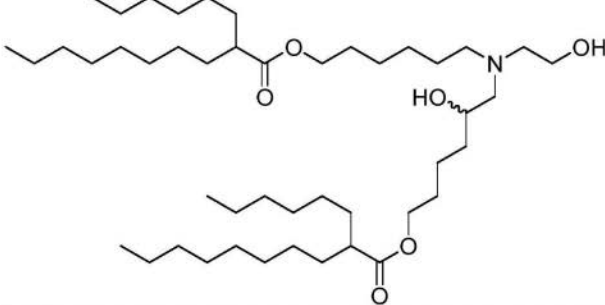
[0643]



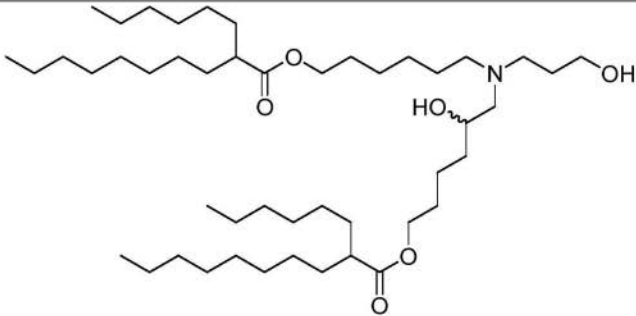
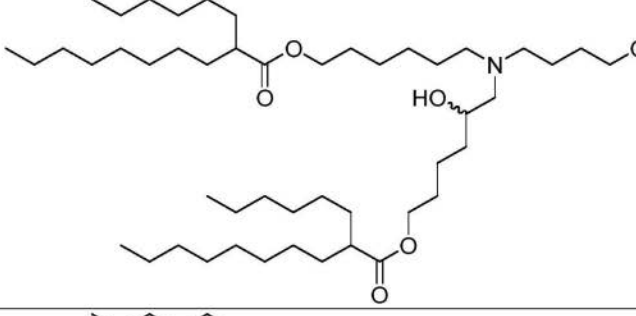
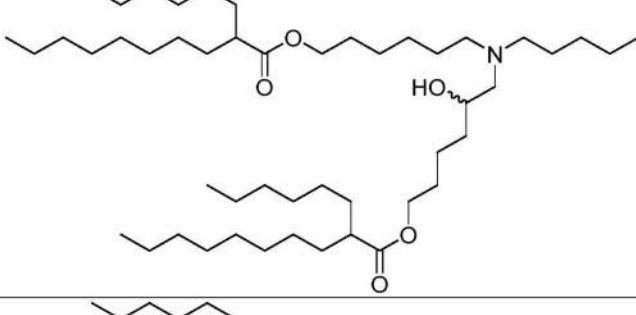
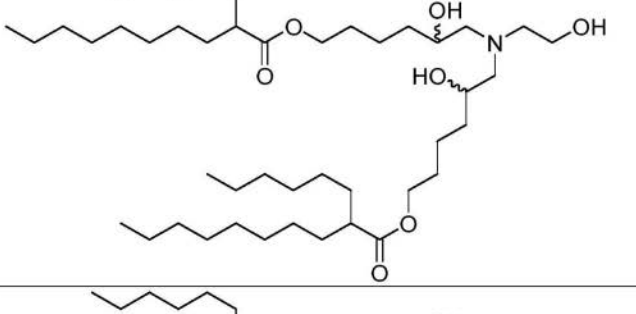
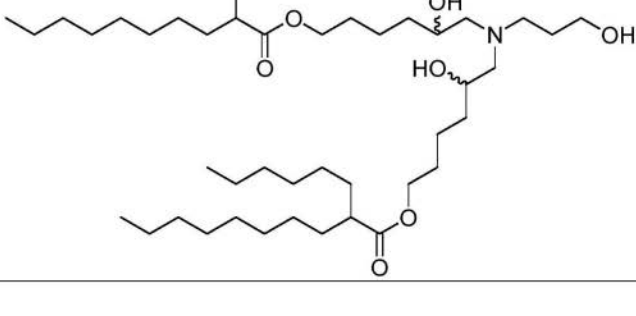
[0644]

75	
76	
77	
78	
79	

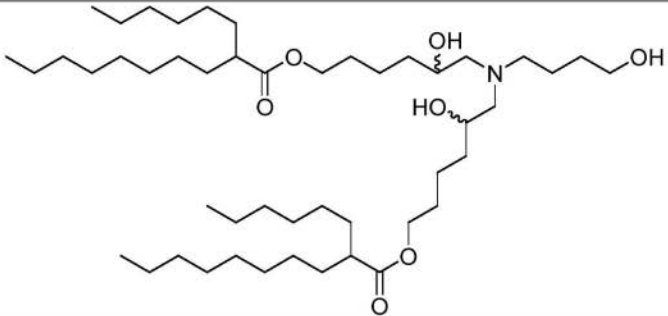
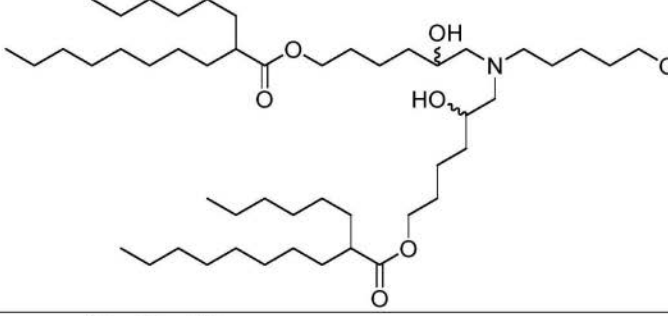
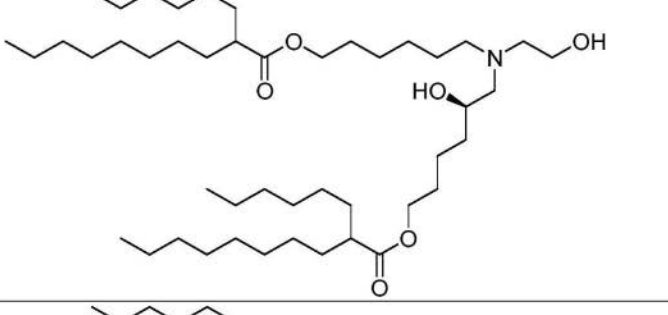
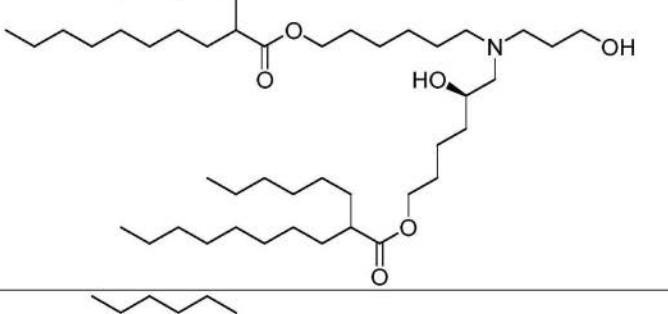
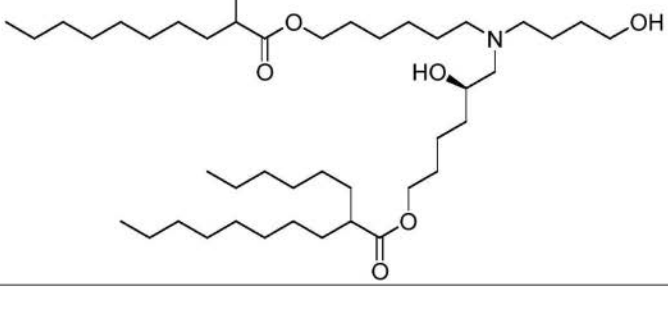
[0645]

80	
81	
82	
83	

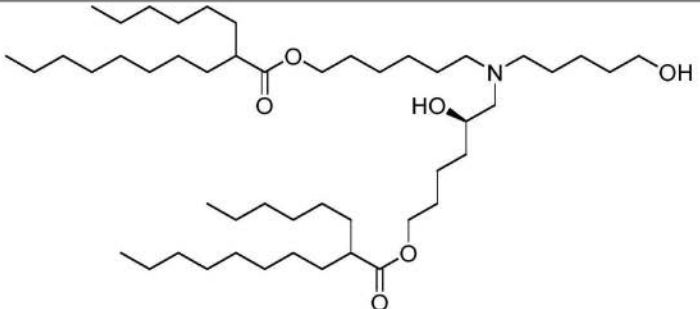
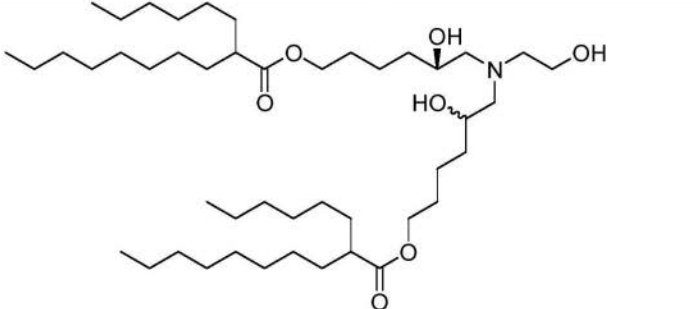
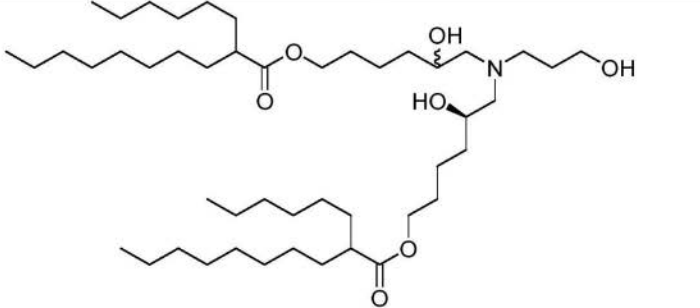
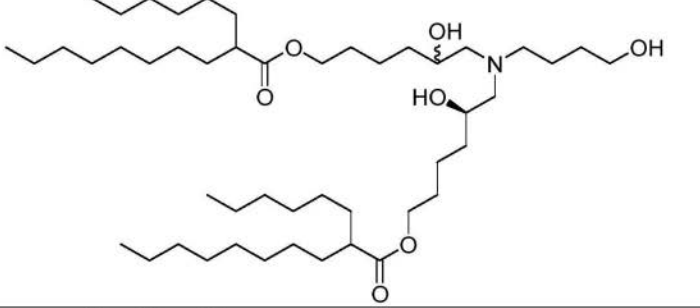
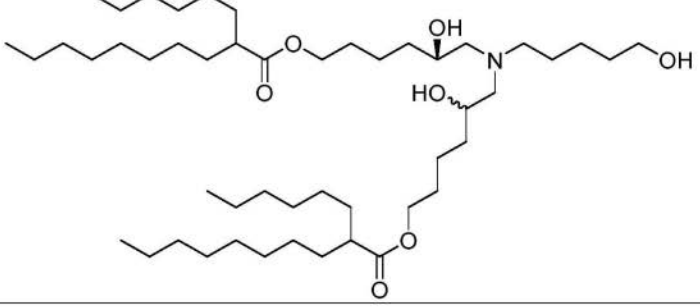
[0646]

84	
85	
86	
87	
88	

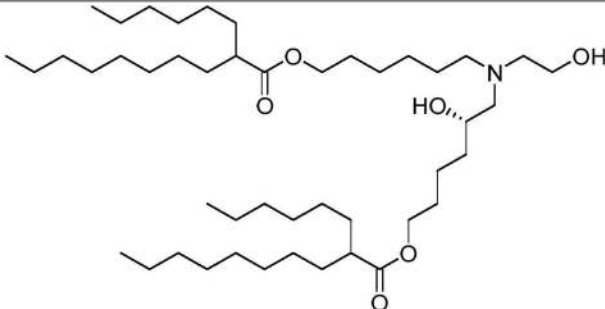
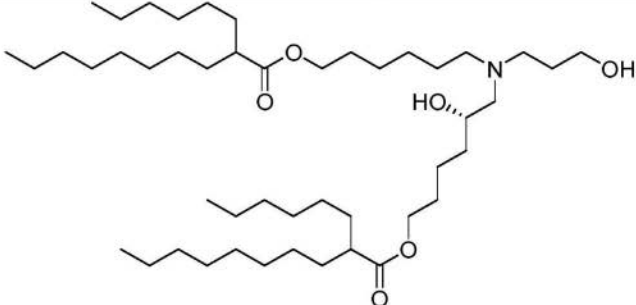
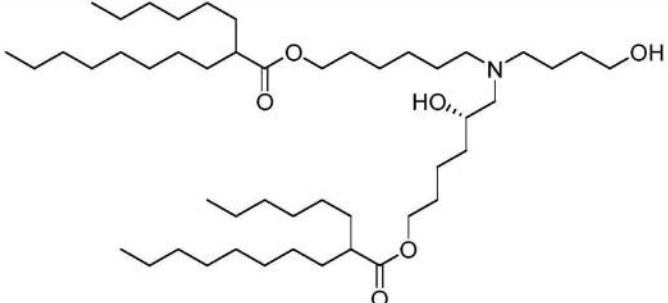
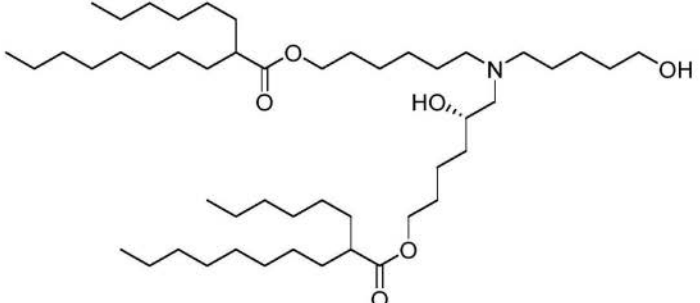
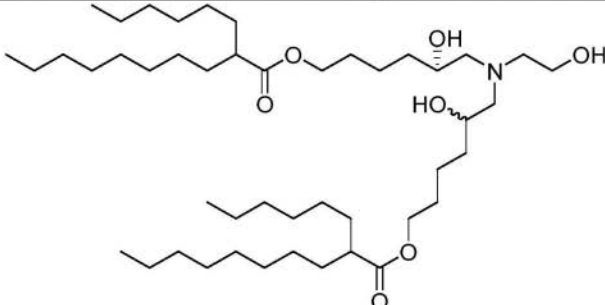
[0647]

89	
90	
91	
92	
93	

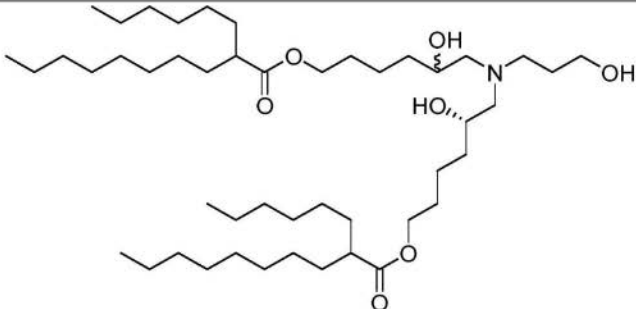
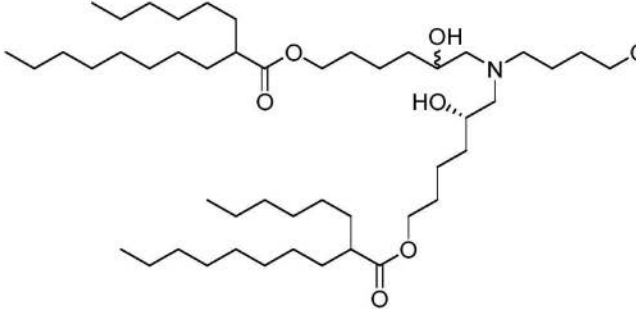
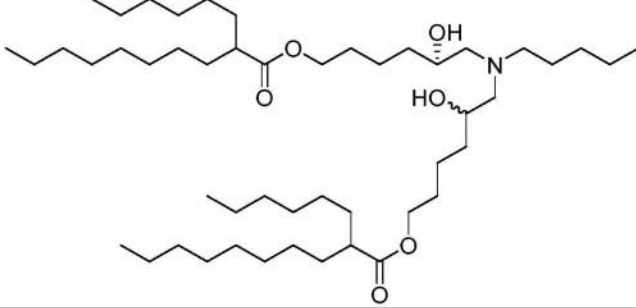
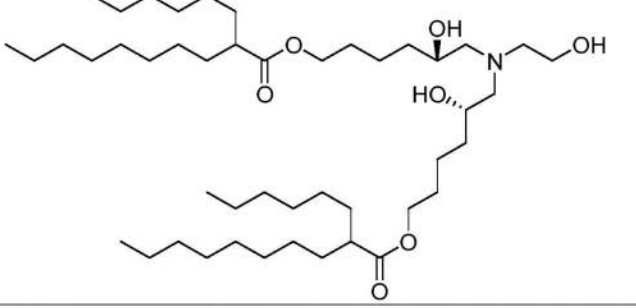
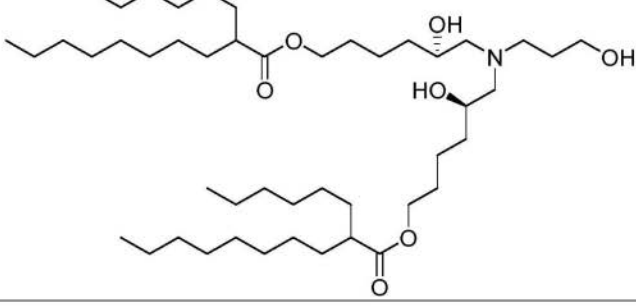
[0648]

94	
95	
96	
97	
98	

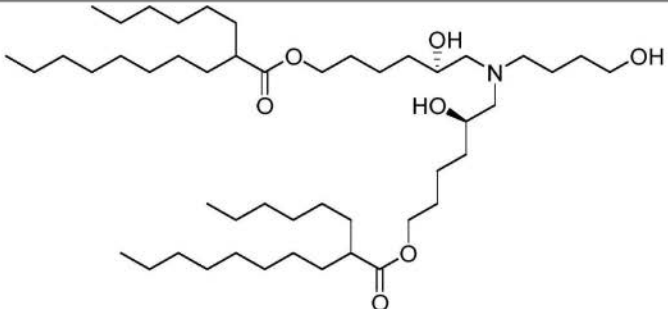
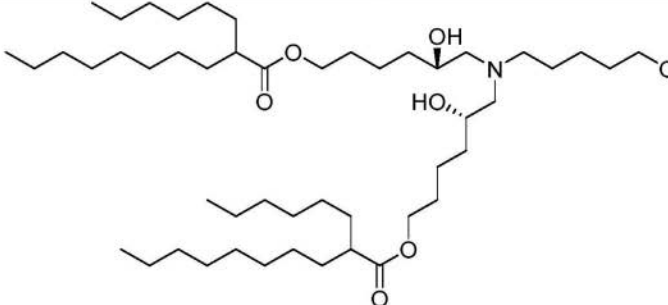
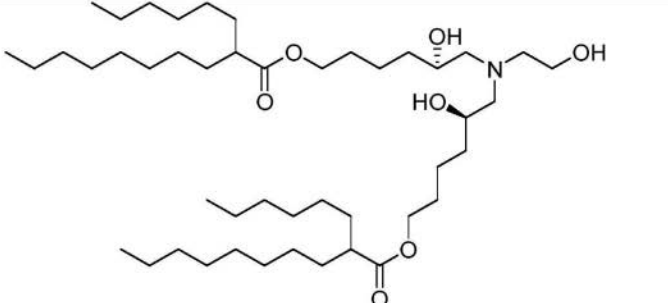
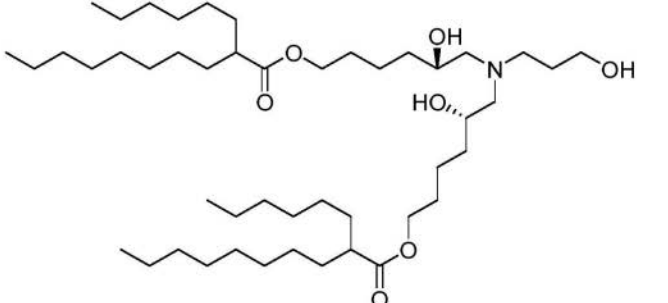
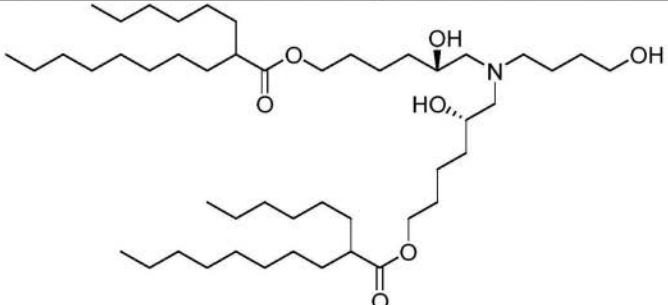
[0649]

99	
100	
101	
102	
103	

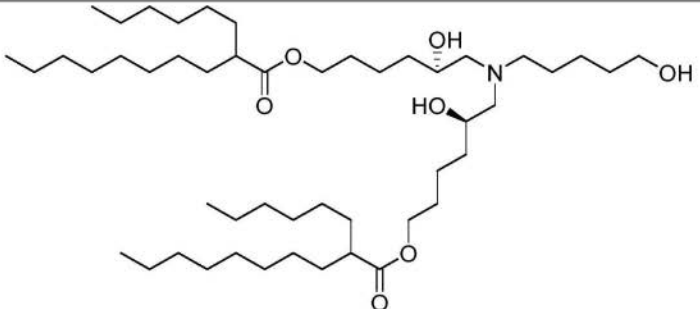
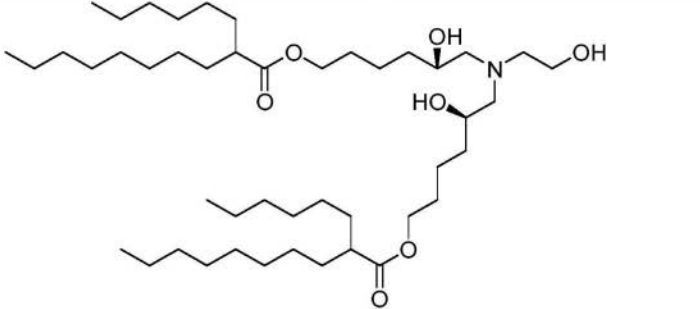
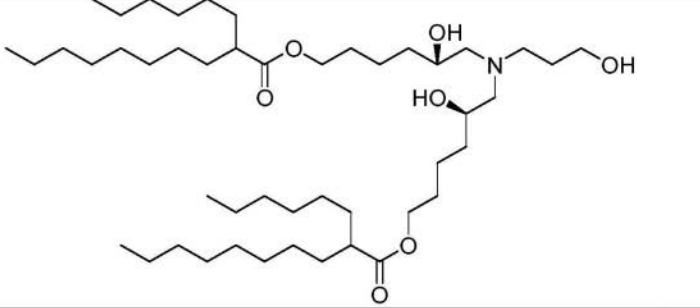
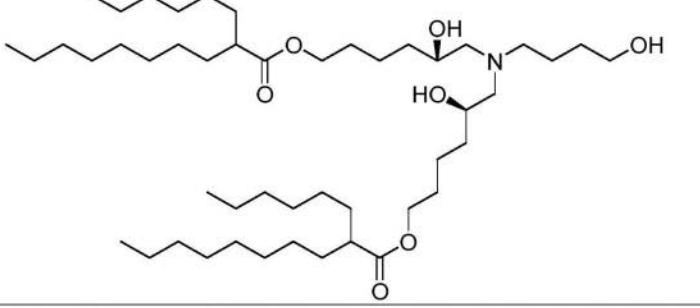
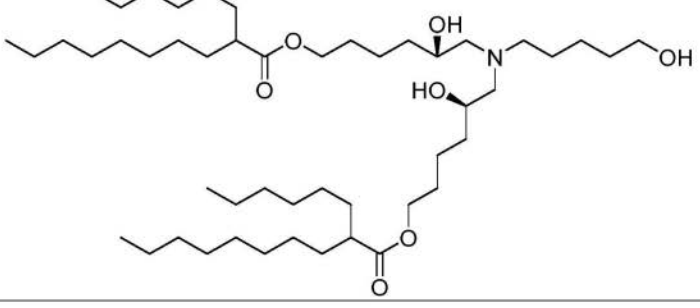
[0650]

104	
105	
106	
107	
108	

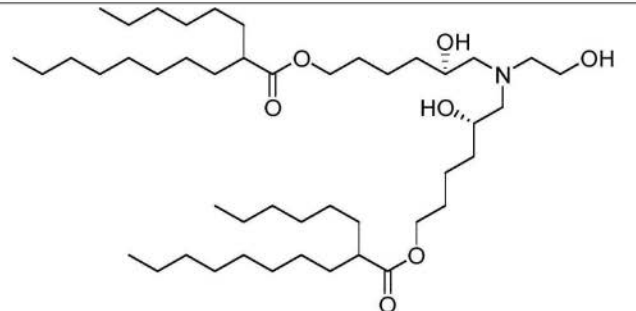
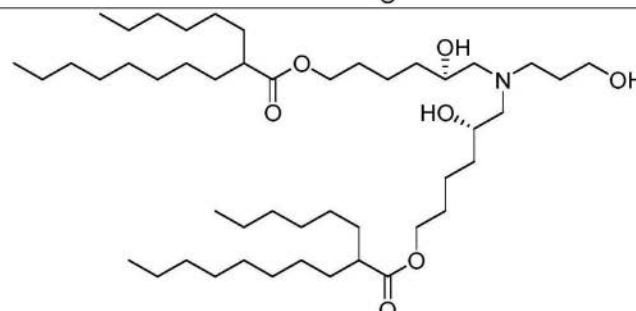
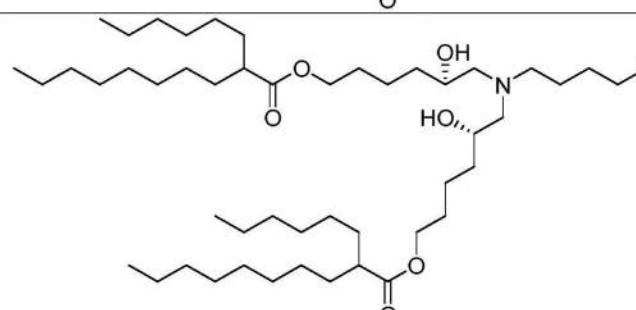
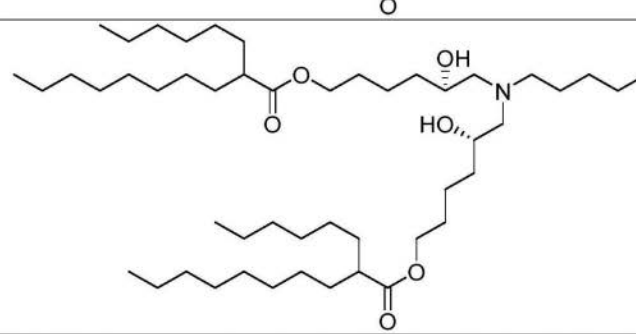
[0651]

109	
110	
111	
112	
113	

[0652]

114	
115	
116	
117	
118	

[0653]

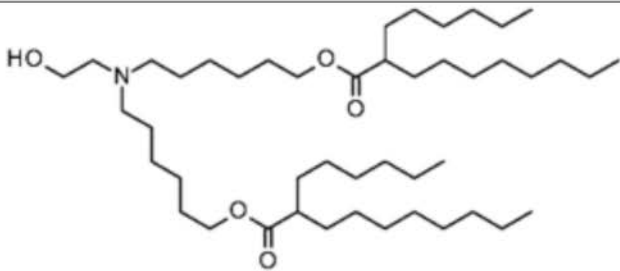
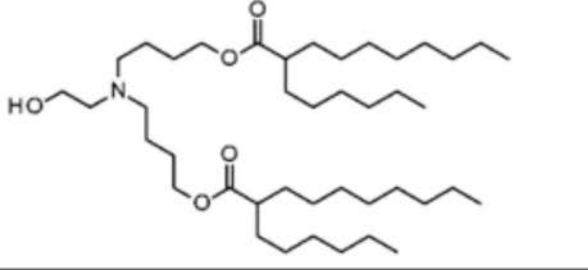
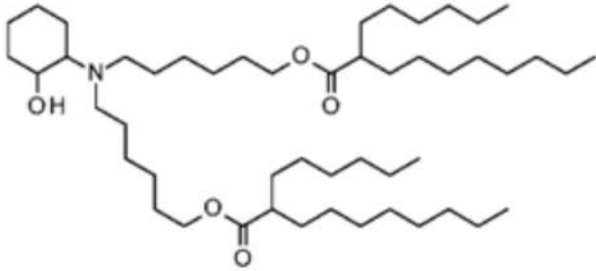
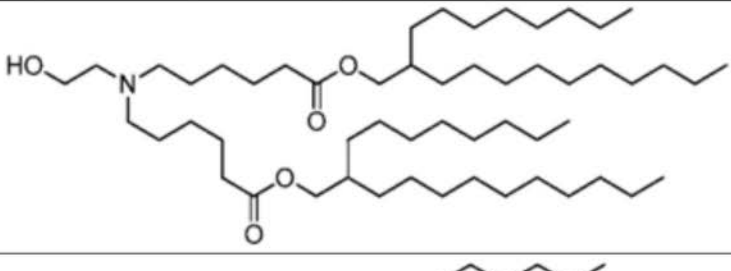
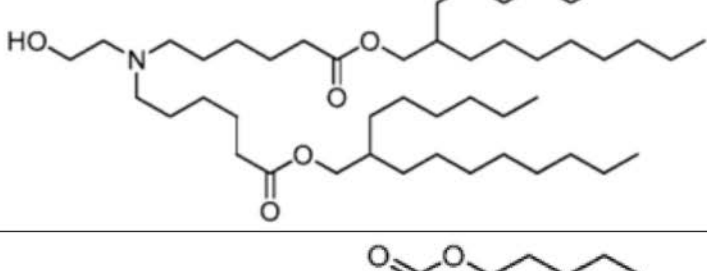
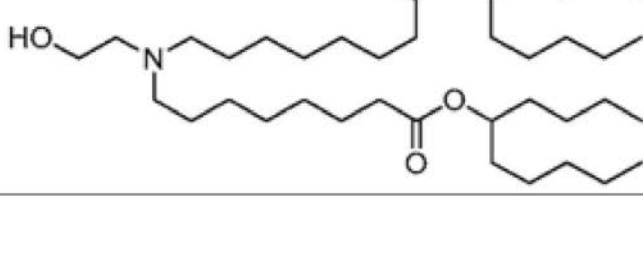
119	
120	
121	
122	

[0654] 表10f

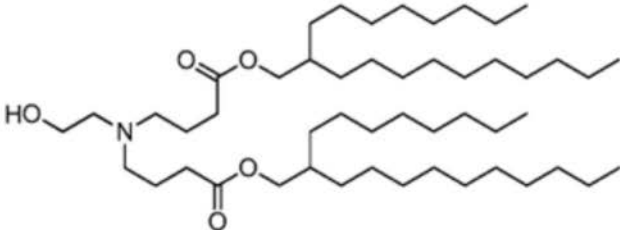
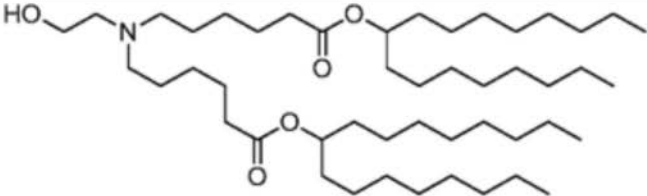
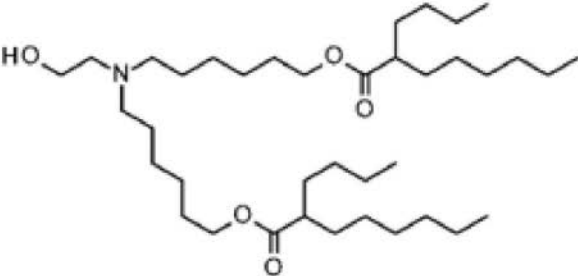
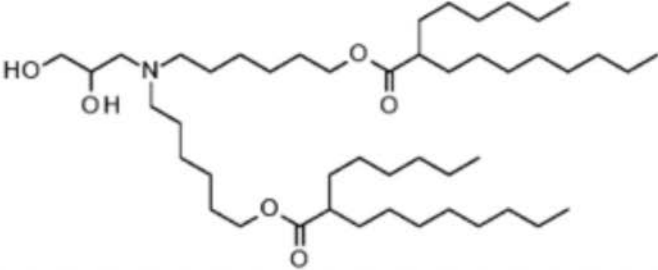
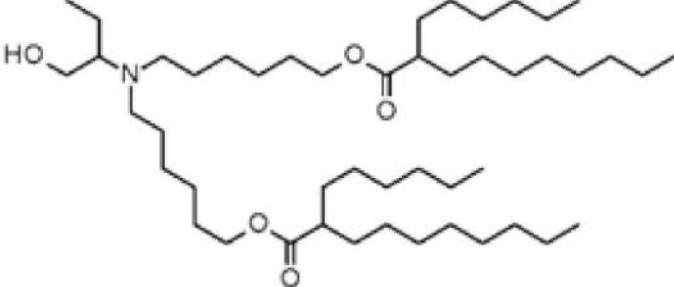
[0655]

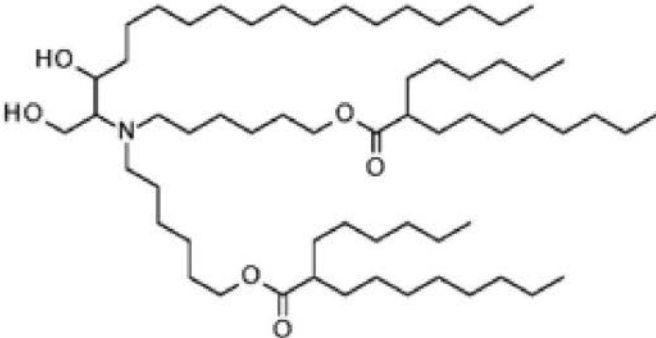
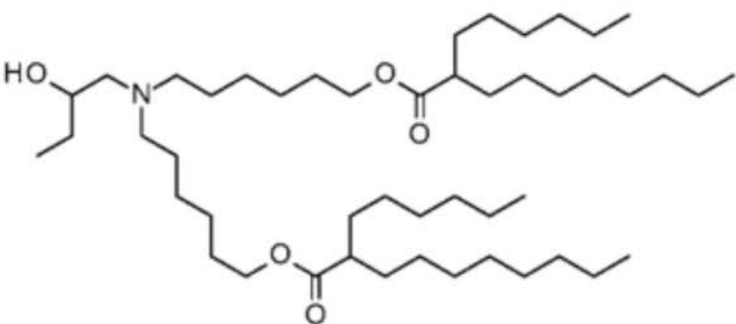
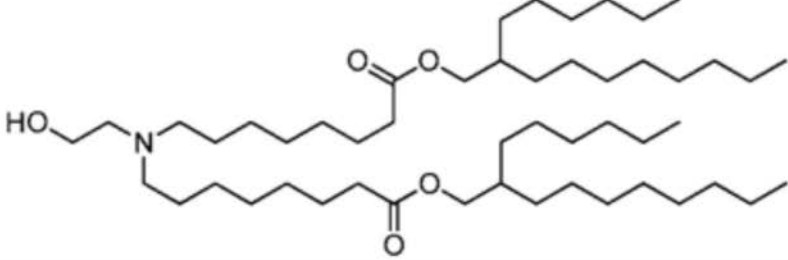
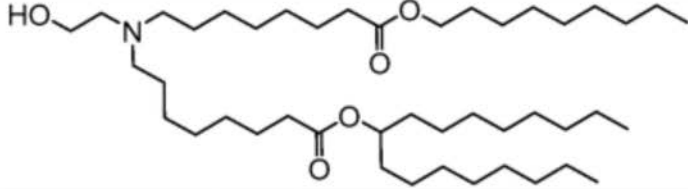
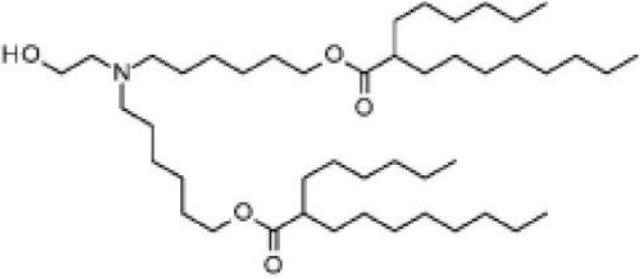
可电离脂 质编号	结构
-------------	----

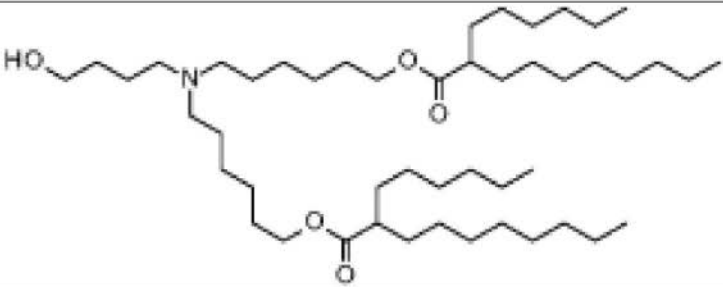
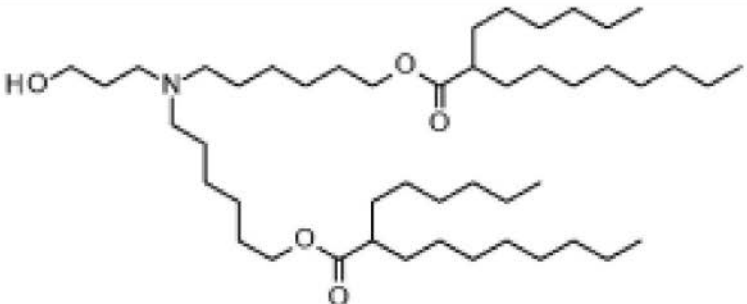
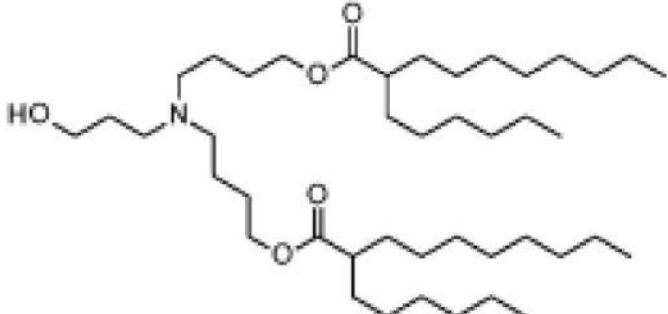
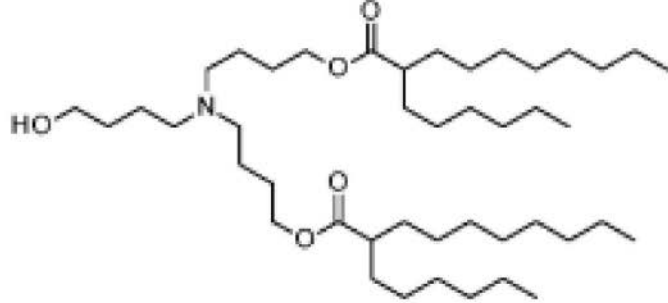
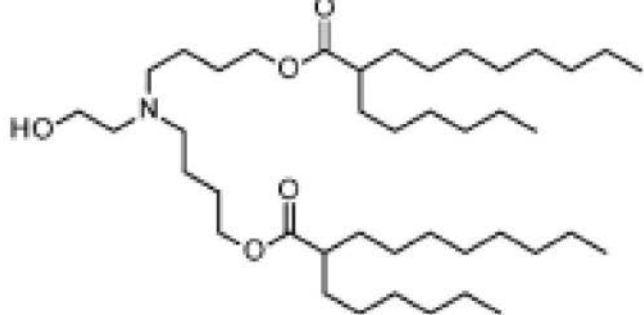
[0656]

1	
2	
3	
4	
5	
6	

[0657]

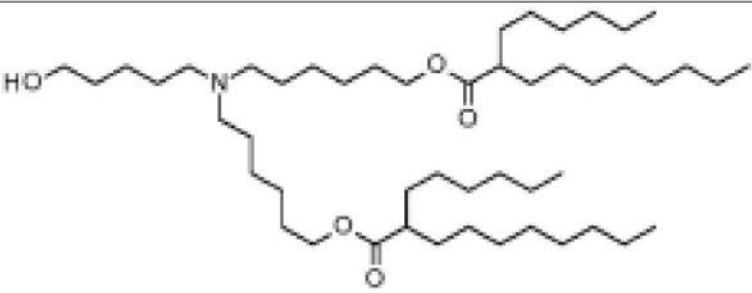
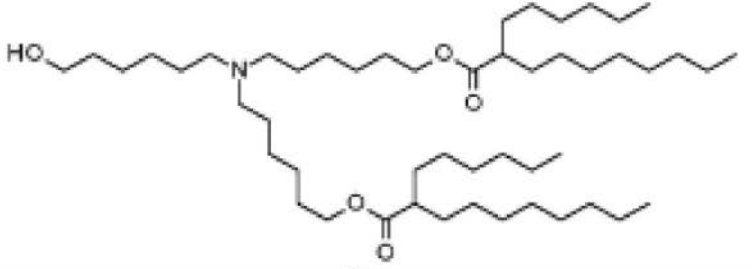
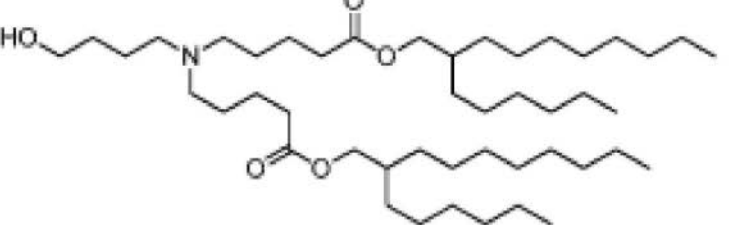
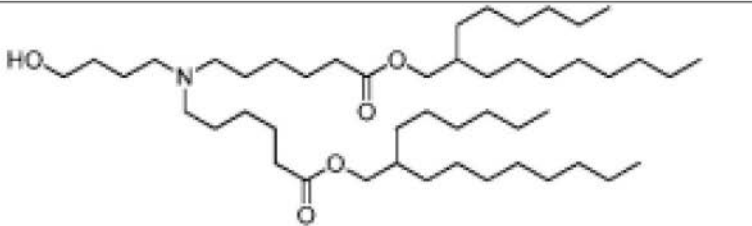
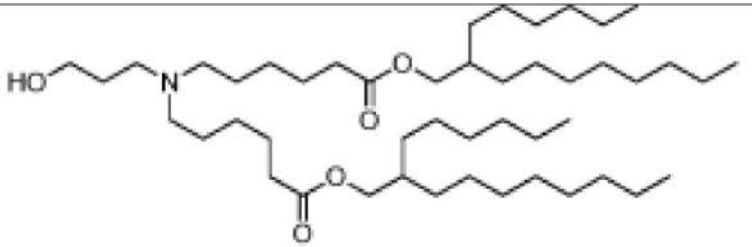
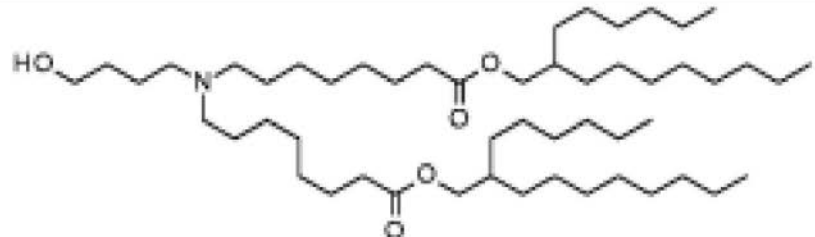
7	
8	
9	
10	
11	

12	
13	
[0658] 14	
15	
16	

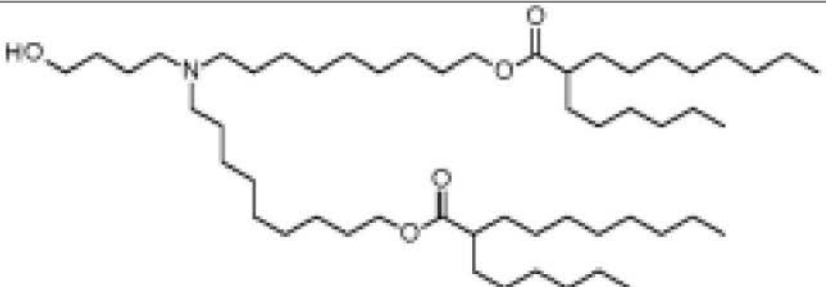
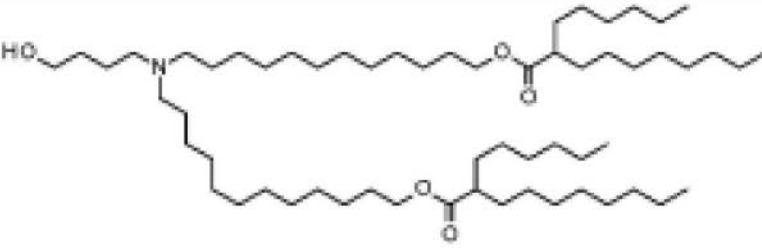
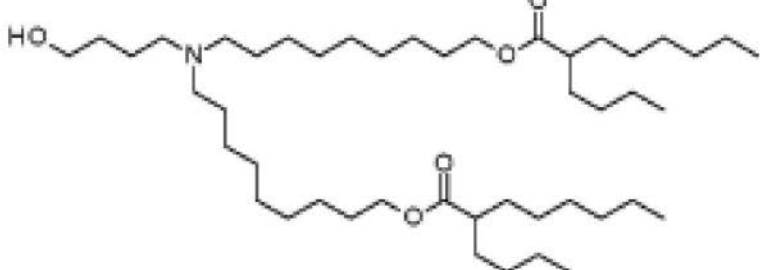
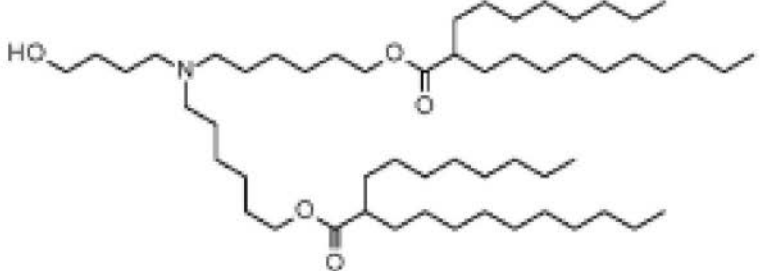
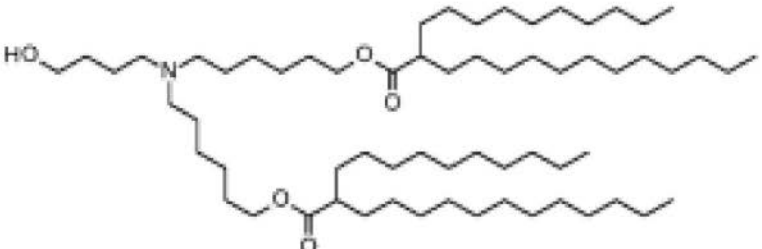
17	
18	
19	
20	
21	

[0659]

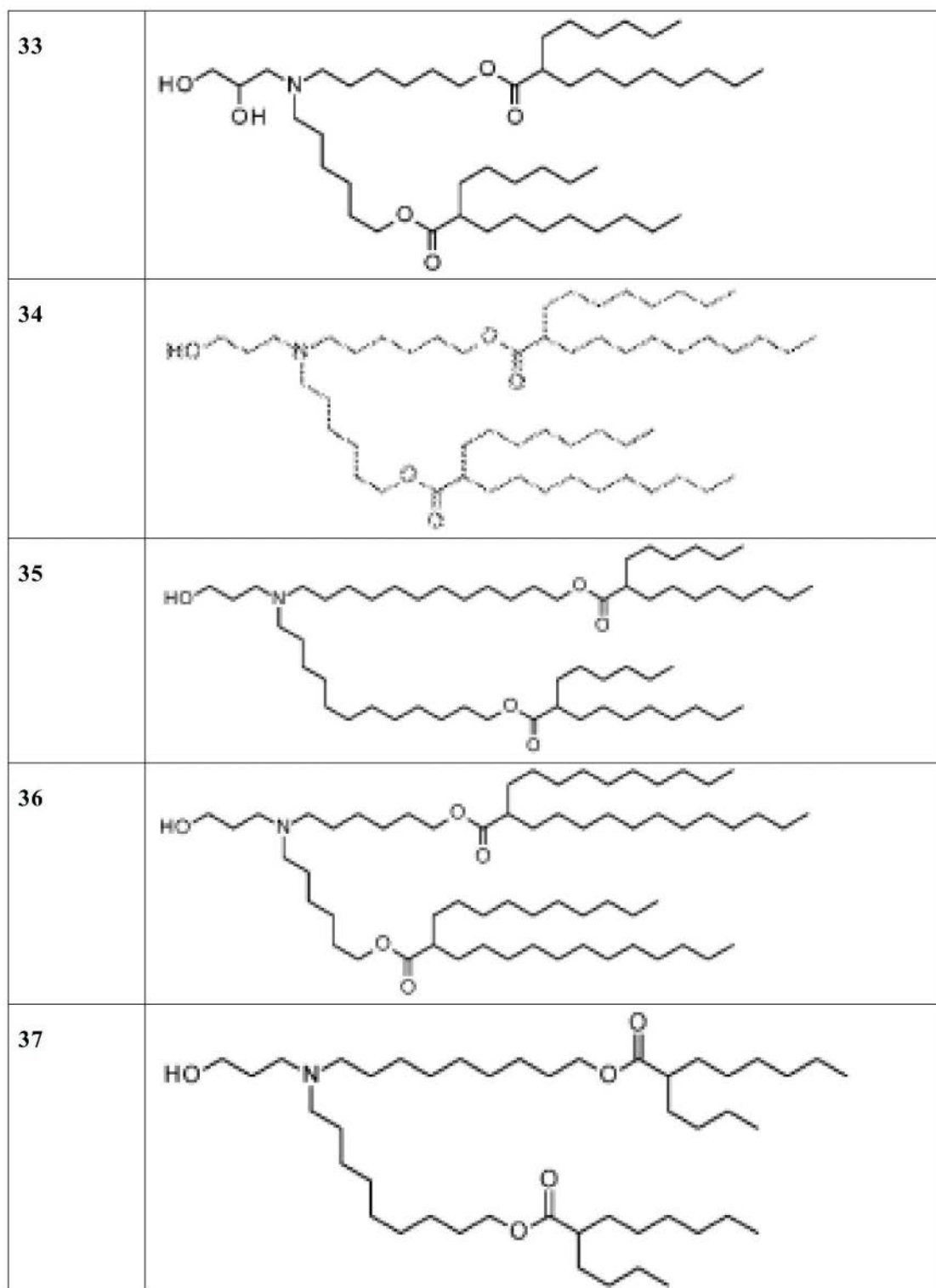
[0660]

22	
23	
24	
25	
26	
27	

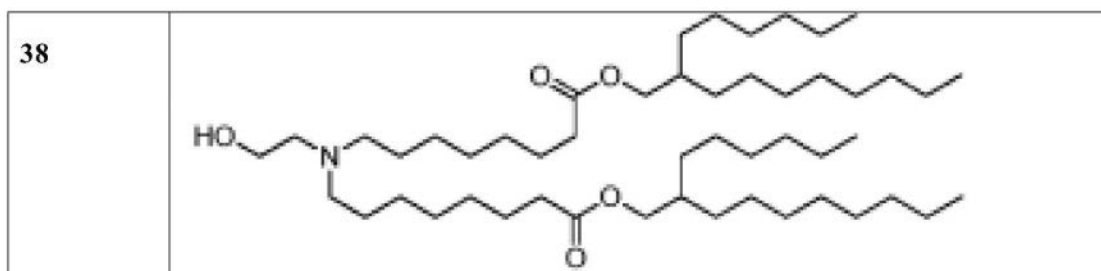
[0661]

28	
29	
30	
31	
32	

[0662]

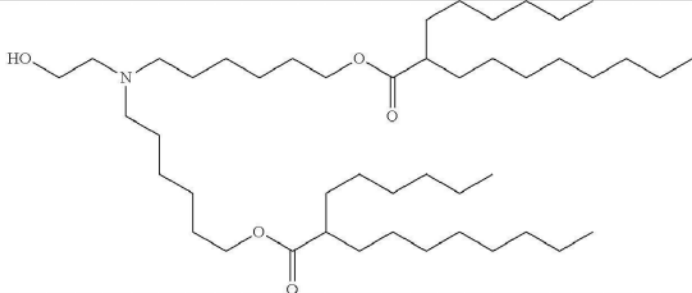
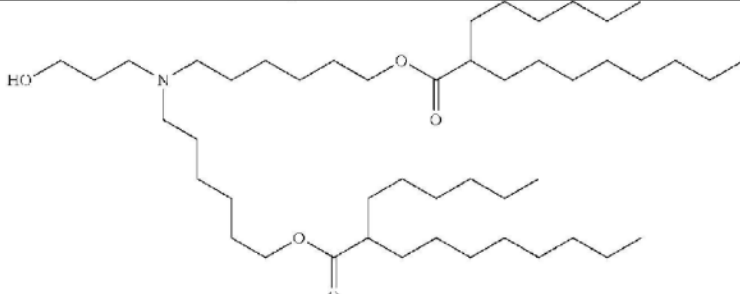
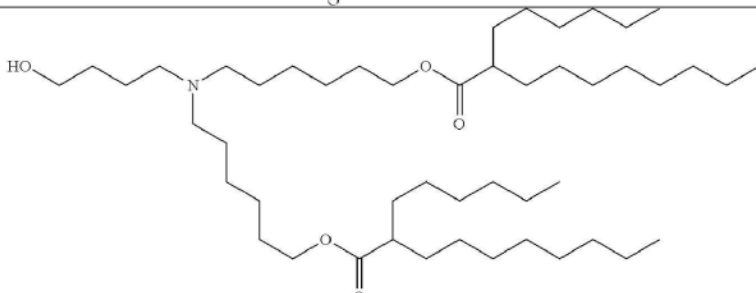
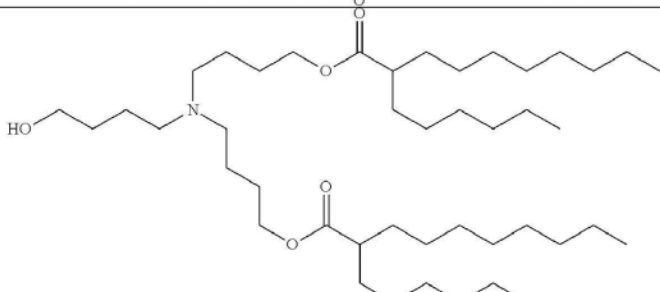


[0663]

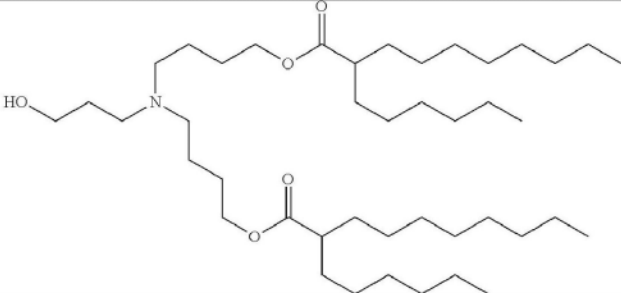
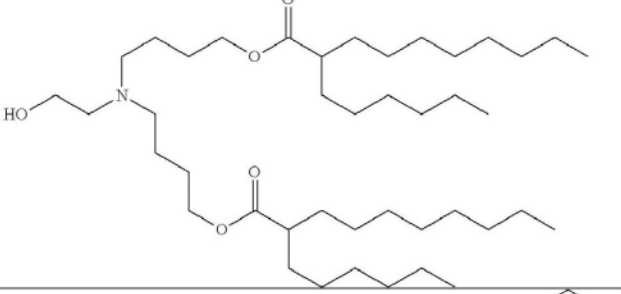
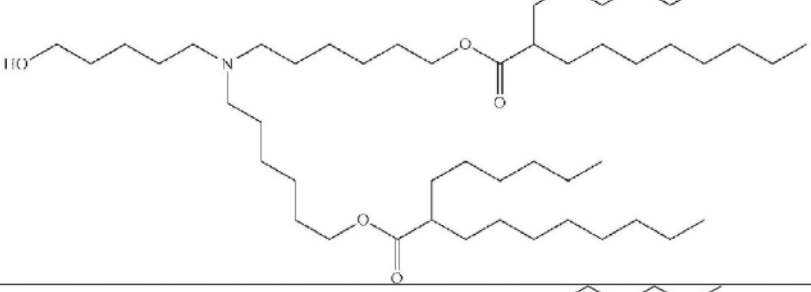
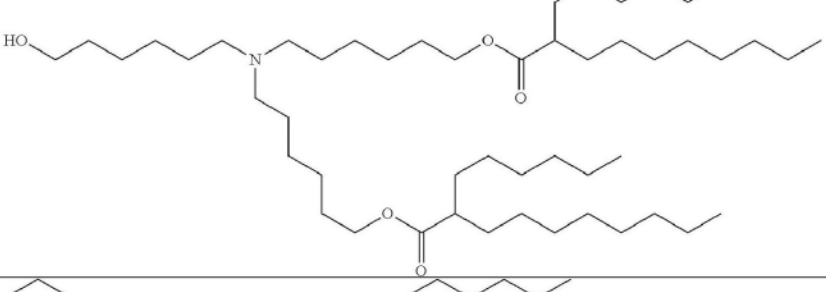
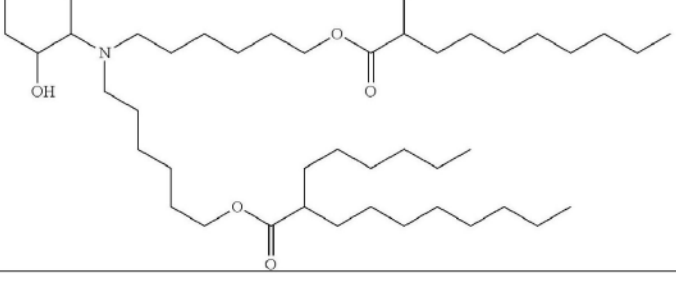


[0664] 在某些实施方案中,可电离脂质具有下表10中所列出的结构之一。

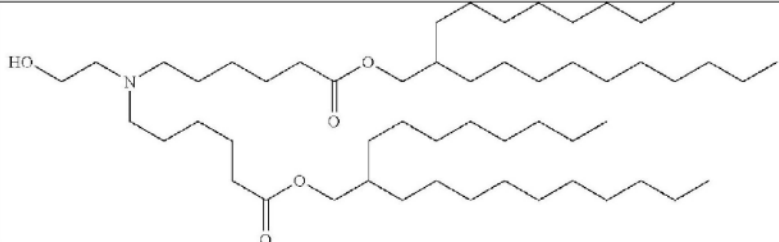
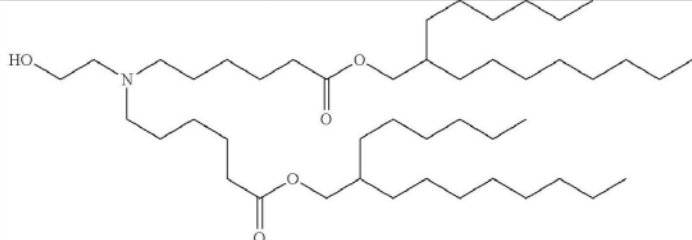
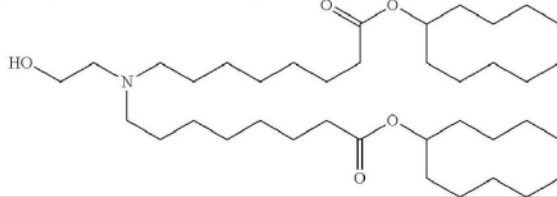
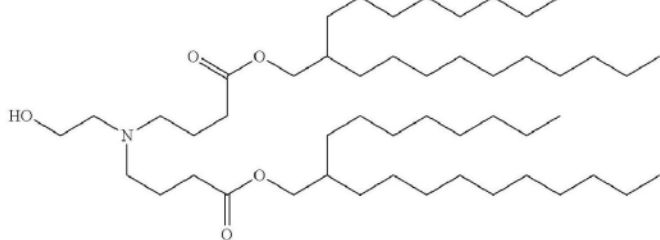
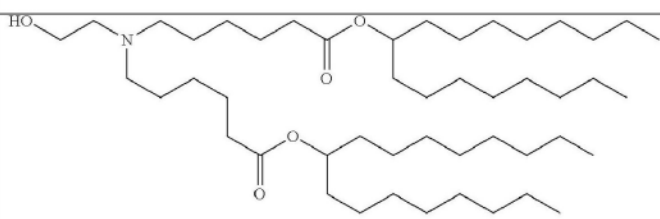
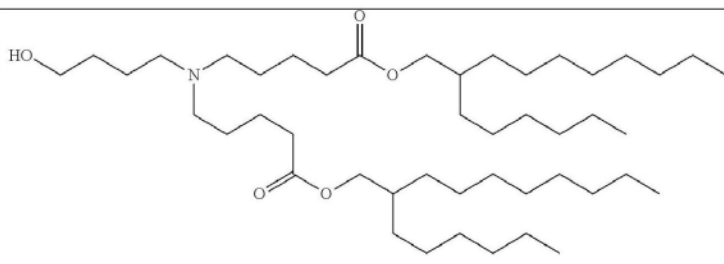
[0665] 表10g

编号	结构
1	
2	
3	
4	

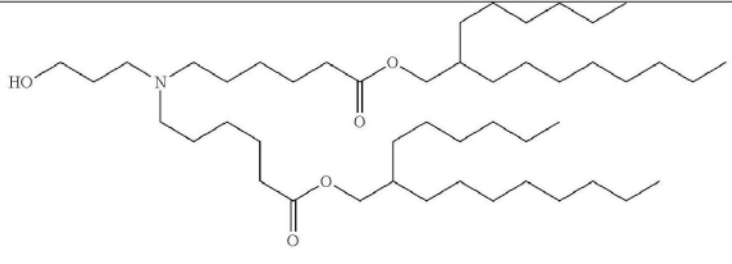
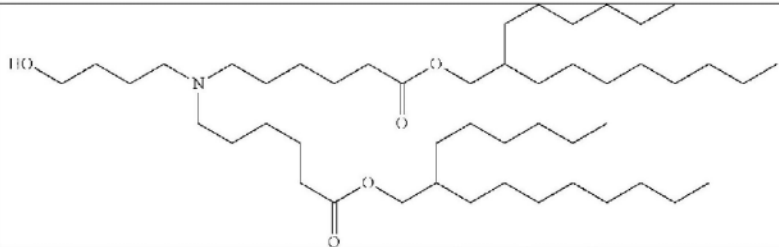
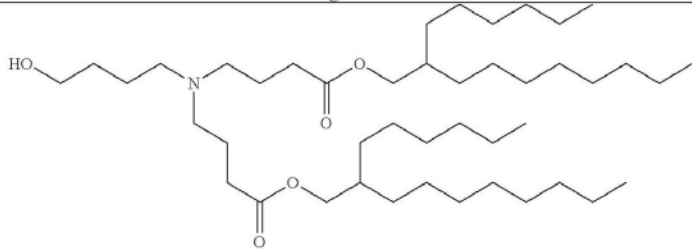
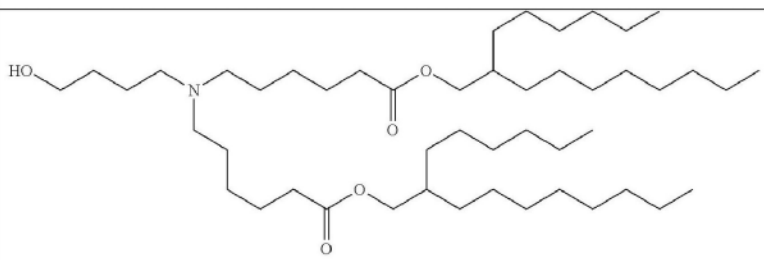
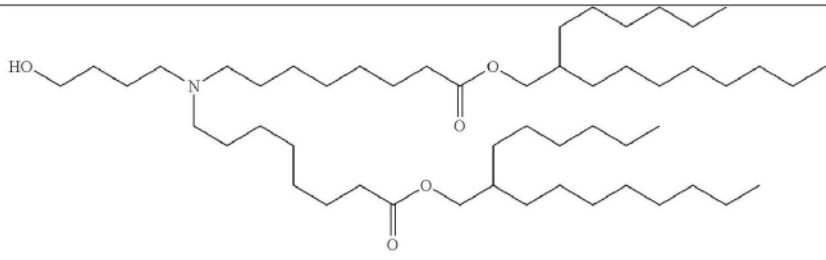
[0667]

5	
6	
7	
8	
9	

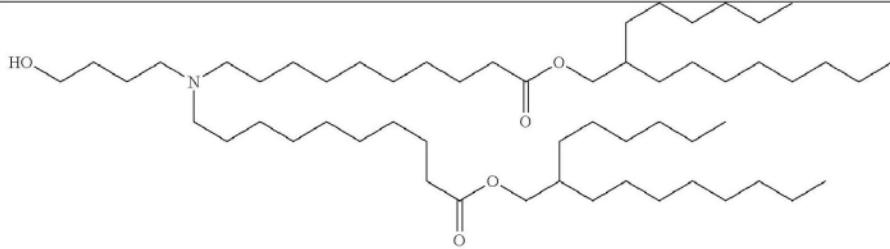
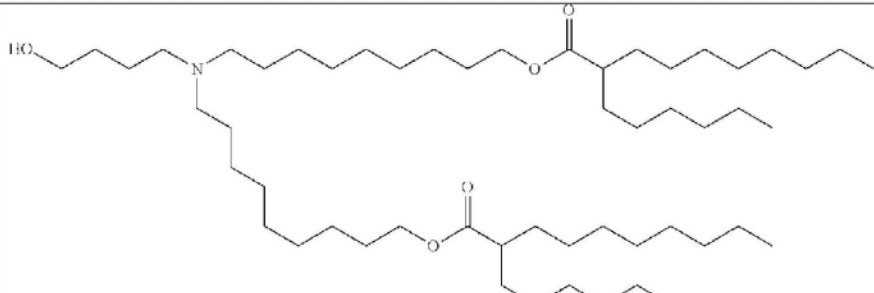
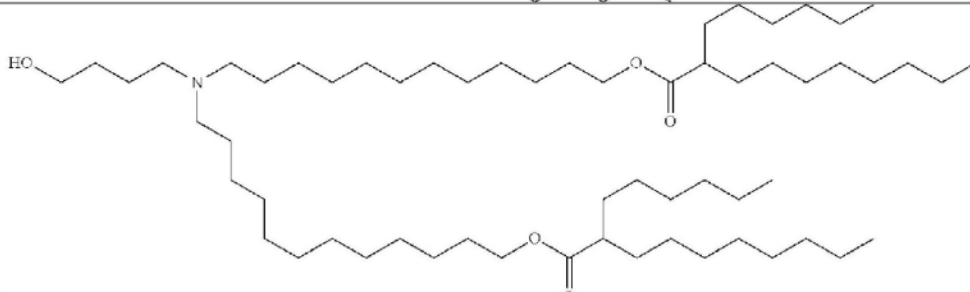
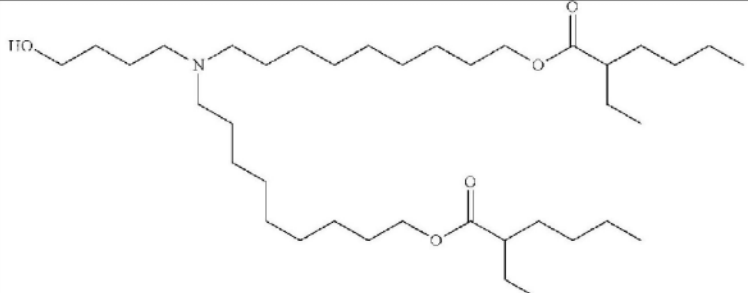
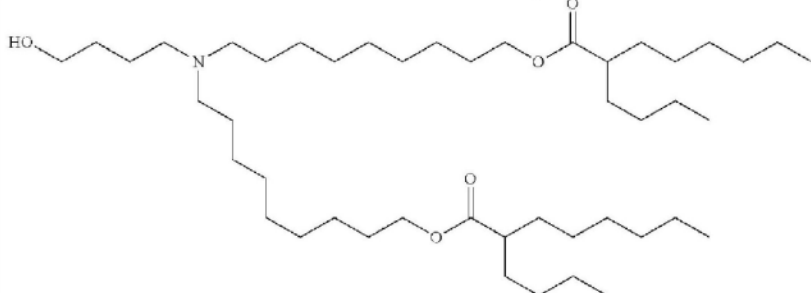
[0668]

10	
11	
12	
13	
14	
15	

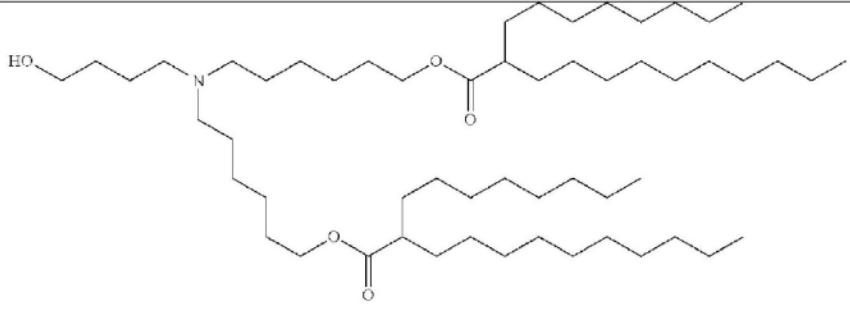
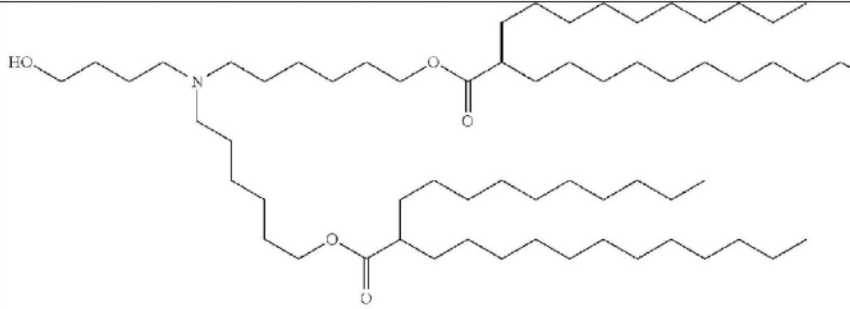
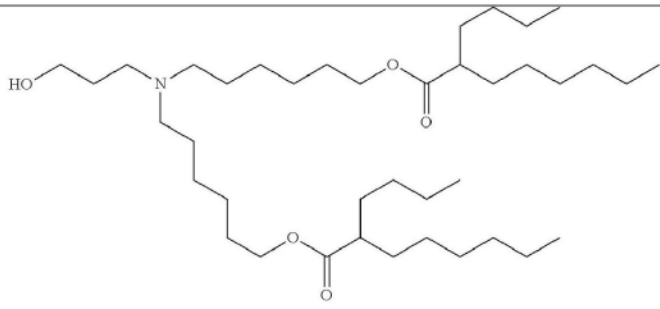
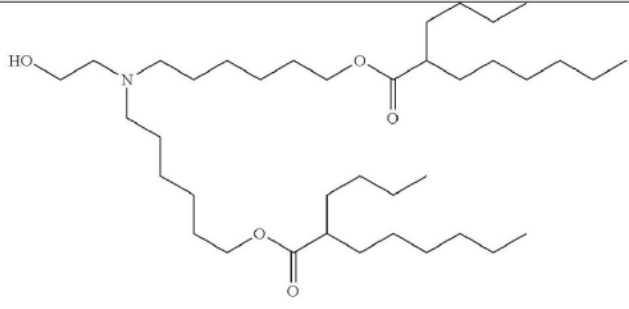
[0669]

16	
17	
18	
19	
20	

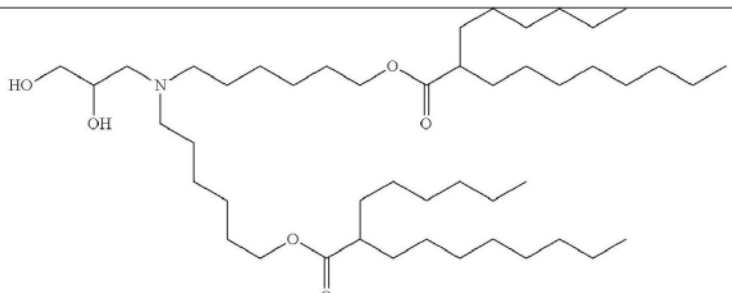
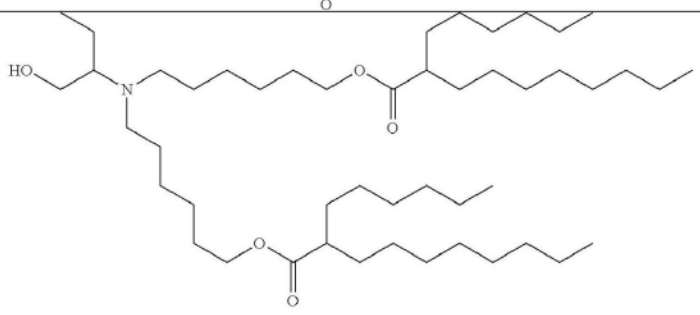
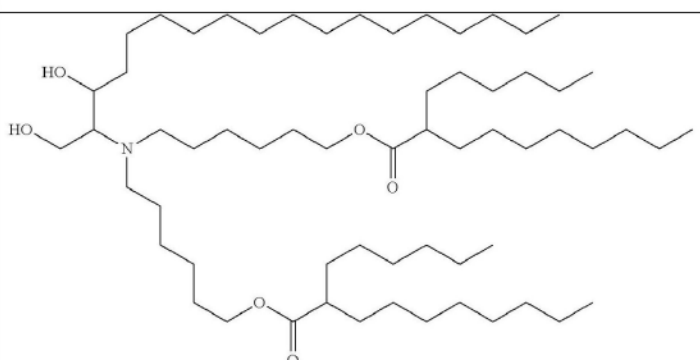
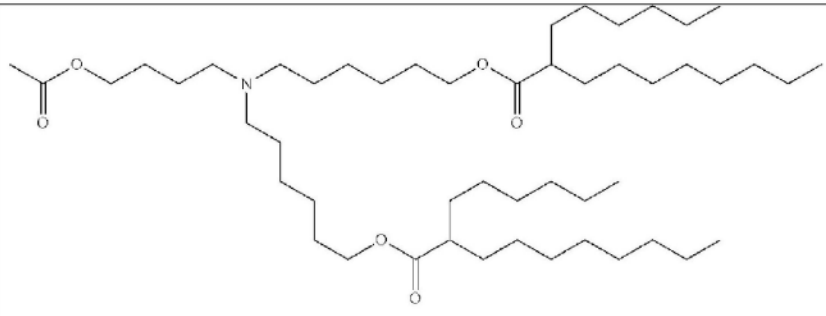
[0670]

21	
22	
23	
24	
25	

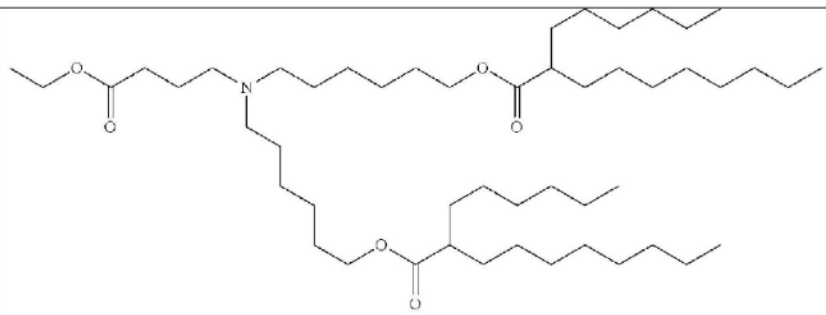
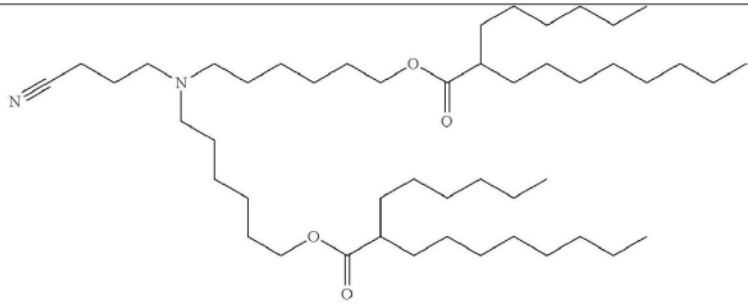
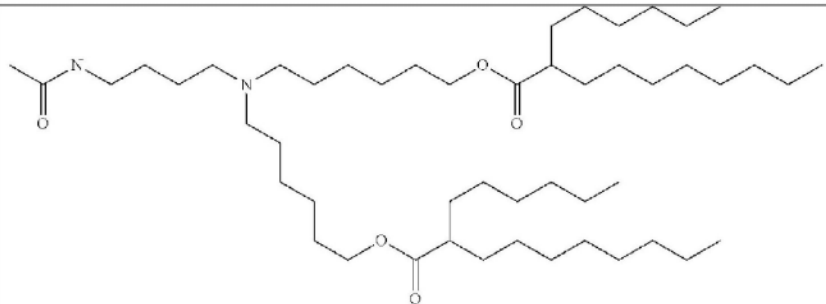
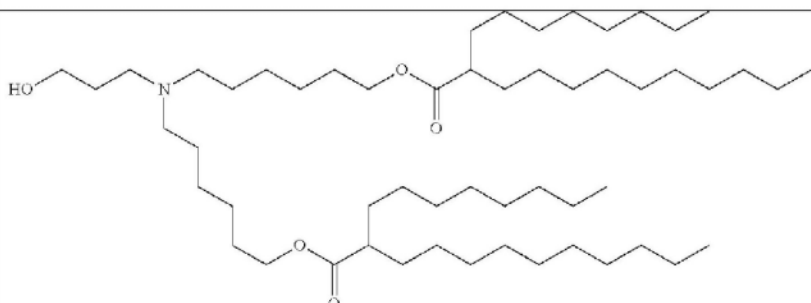
[0671]

26	
27	
28	
29	

[0672]

30	
31	
32	
33	

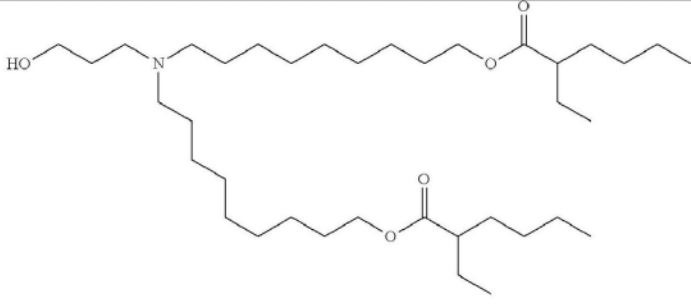
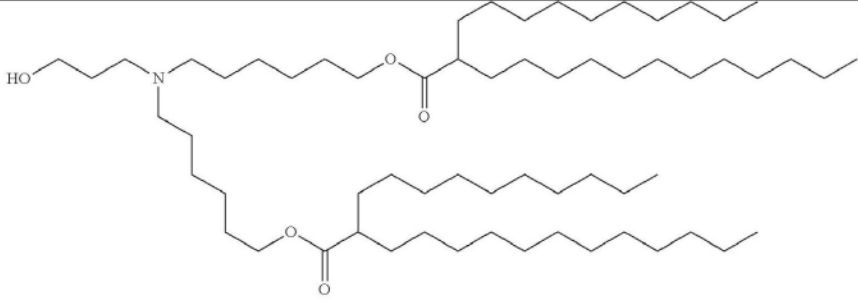
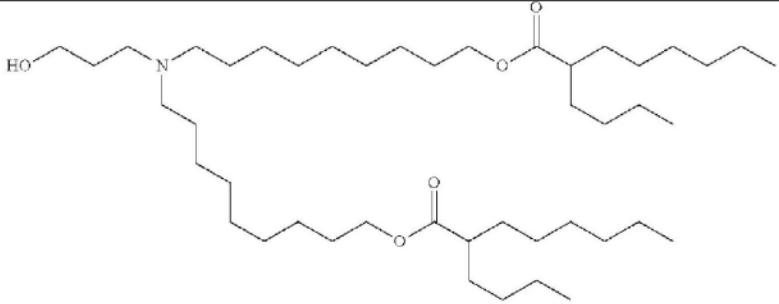
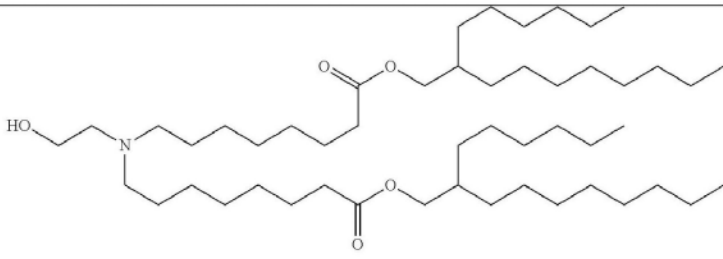
[0673]

34	
35	
36	
37	

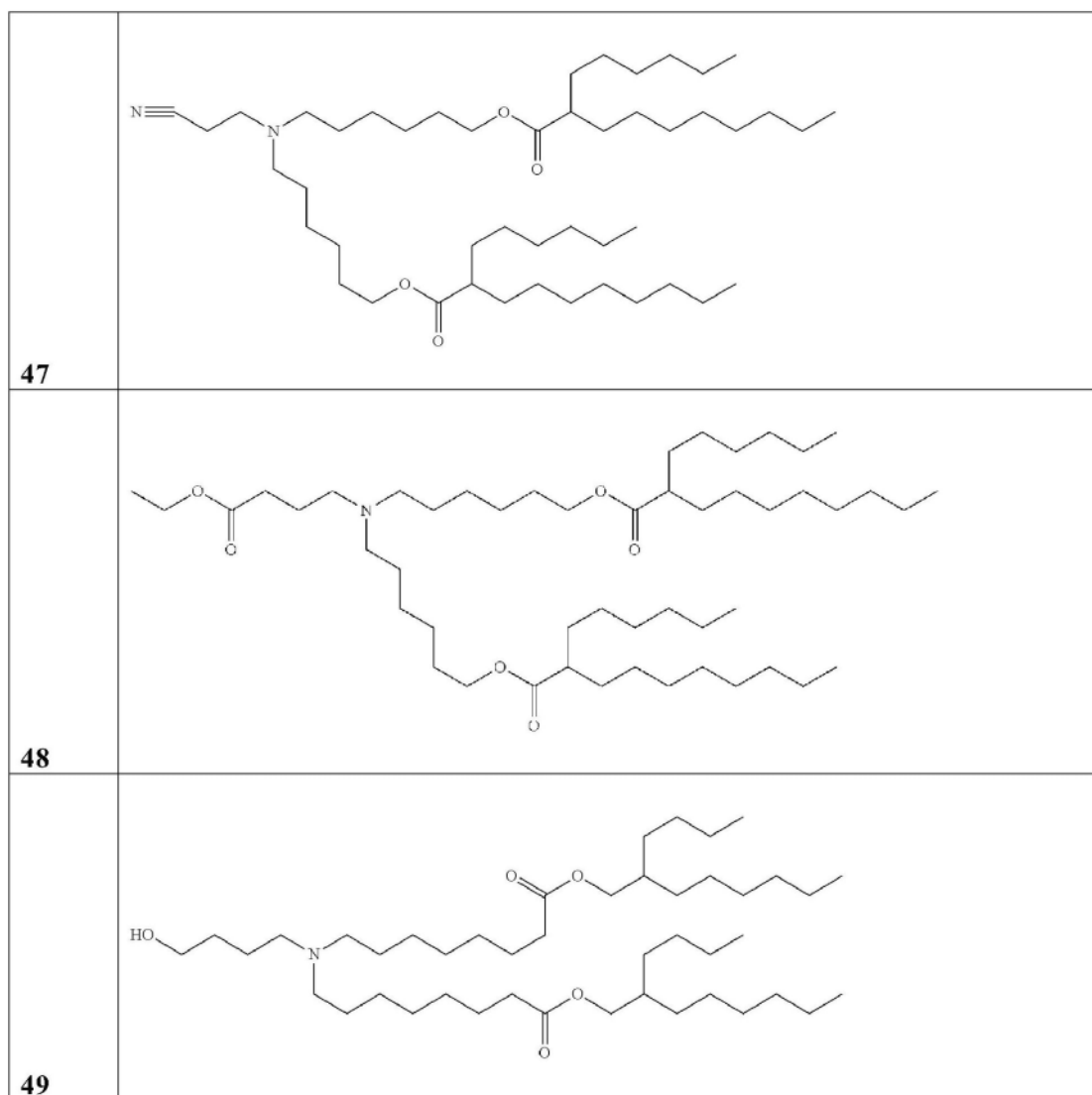
[0674]

38	
39	
40	
41	
42	

[0675]

43	
44	
45	
46	

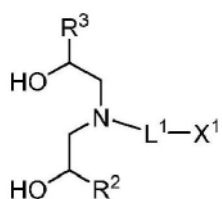
[0676]



[0677] 在某些实施方案中,可电离脂质描述于国际专利申请PCT/US2020/038678中。

[0678] 在某些实施方案中,所述可电离脂质由式(14*)或其药学上可接受的盐表示:

[0679]



式(14*)

[0680] 其中

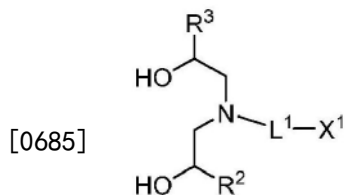
[0681] L^1 是 C_2 - C_{11} 亚烷基、 C_4 - C_{10} -亚烯基或 C_4 - C_{10} -亚炔基;

[0682] X^1 是 OR^1 、 SR^1 或 $N(R^1)_2$,其中 R^1 独立地是H或未被取代的 C_1 - C_6 烷基;且

[0683] R_2 和 R_3 各自独立地是直链或支链 C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基或 C_1 - C_{30} 杂烷基,其任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自氧代、卤素、羟基、氰基、烷基、烯基、醛、杂环基烷基、羟基烷基、二羟基烷基、羟基烷基氨基烷基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、(杂环基)(烷基)氨基烷基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、炔基、烷氧基、氨基、二烷基氨基

基、氨基烷基羰基氨基、氨基羰基烷基氨基、(氨基羰基烷基) (烷基) 氨基、烯基羰基氨基、羟基羰基、烷氧基羰基、烷基羰基氧基、烷基碳酸酯、烯基氧基羰基、烯基羰基氧基、烯基碳酸酯、炔基氧基羰基、炔基羰基氧基、炔基碳酸酯、氨基羰基、氨基烷基氨基羰基、烷基氨基烷基氨基羰基、二烷基氨基烷基氨基羰基、杂环基烷基氨基羰基、(烷基氨基烷基) (烷基) 氨基羰基、烷基氨基烷基羰基、二烷基氨基烷基羰基、杂环基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亚砷、烷基亚砷烷基、烷基磺酰基和烷基砷烷基。

[0684] 在某些实施方案中,所述可电离脂质由式(14)或其药学上可接受的盐表示:



式(14)

[0686] 其中

[0687] L^1 是 C_2 - C_{11} 亚烷基、 C_4 - C_{10} -亚烯基或 C_4 - C_{10} -亚炔基;

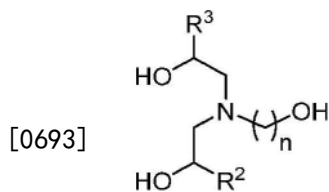
[0688] X^1 是 OR^1 、 SR^1 或 $\text{N}(\text{R}^1)_2$,其中 R^1 独立地是H或未被取代的 C_1 - C_6 烷基;且

[0689] R^2 和 R^3 各自独立地是 C_6 - C_{30} -烷基、 C_6 - C_{30} -烯基或 C_6 - C_{30} -炔基。

[0690] 在某些实施方案中, X^1 是 OR^1 。在某些实施方案中, X^1 是OH。在某些实施方案中, X^1 是 SR^1 。在某些实施方案中, X^1 是SH。在某些实施方案中, X^1 是 $\text{N}(\text{R}^1)_2$ 。在某些实施方案中, X^1 是 NH_2 。

[0691] 在某些实施方案中, L^1 是 C_2 - C_{10} 亚烷基。在某些实施方案中, L^1 是未被取代的 C_2 - C_{10} 亚烷基。在某些实施方案中, L^1 是 C_4 - C_{10} 亚烯基。在某些实施方案中, L^1 是未被取代的 C_4 - C_{10} 亚烯基。在某些实施方案中, L^1 是 C_4 - C_{10} 亚炔基。在某些实施方案中, L^1 是未被取代的 C_4 - C_{10} 亚炔基。

[0692] 在式(14)的某些实施方案中,脂质具有根据式(14-2)的结构,



式(14-2)

[0694] 或其药学上可接受的盐,其中n是2-10的整数。

[0695] 在某些实施方案中,n是2、3、4或5。在某些实施方案中,n是2。在某些实施方案中,n是3。在某些实施方案中,n是4。在某些实施方案中,n是5。在某些实施方案中,n是6。在某些实施方案中,n是7。在某些实施方案中,n是8。在某些实施方案中,n是9。在某些实施方案中,n是10。

[0696] 在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 和 R_3 独立地是直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基或 C_1 - C_{20} 杂烷基,其任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基各自独立地选自直链或支链 C_1 - C_{20} 烷氧基、直链或支链 C_1 - C_{20} 烷氧基羰基、直链或支链 C_1 - C_{20} 烷基羰基氧

基、直链或支链 C_1-C_{20} 烷基碳酸酯、直链或支链 C_2-C_{20} 烯基氧基羰基、直链或支链 C_2-C_{20} 烯基羰基氧基、直链或支链 C_2-C_{20} 烯基碳酸酯、直链或支链 C_2-C_{20} 炔基氧基羰基、直链或支链 C_2-C_{20} 炔基羰基氧基和直链或支链 C_2-C_{20} 炔基碳酸酯。

[0697] 在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是未被取代的 C_6-C_{30} -烷基、未被取代的 C_6-C_{30} -烯基或未被取代的 C_6-C_{30} -炔基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的每个是未被取代的 C_6-C_{30} -烷基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的每个是未被取代的 C_6-C_{30} -烯基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的每个是未被取代的 C_6-C_{30} -炔基。

[0698] 在式(14*)的某些实施方案中,烷氧基羰基取代基具有式 $-C(O)OR^6$,其中 R^6 是未被取代的 C_6-C_{30} 烷基或 C_6-C_{30} 烯基。在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个被烷氧基羰基取代。在某些实施方案中,所述烷氧基羰基具有式 $-OC(O)R^6$,其中 R^6 是未被取代的 C_6-C_{30} 烷基或 C_6-C_{30} 烯基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个被烷基碳酸酯取代。在某些实施方案中,所述烷基碳酸酯具有式 $-O(CO)OR^6$,其中 R^6 是未被取代的 C_6-C_{30} 烷基或 C_6-C_{30} 烯基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 独立地是被 $-O(CO)R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 或 $-O(CO)OR^6$ 取代的 C_1-C_{12} 烷基,其中 R^6 是未被取代的 C_6-C_{30} 烷基或 C_6-C_{30} 烯基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 各自是被 $-O(CO)R^6$ 取代的 C_1-C_{12} 烷基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 各自是被 $-C(O)OR^6$ 取代的 C_1-C_{12} 烷基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 各自是被 $-O(CO)OR^6$ 取代的 C_1-C_{12} 烷基。在某些实施方案中, R_2 是 $-C(O)OR^6$ 或 $-O(CO)R^6$ 且 R_3 是 $-O(CO)OR^6$ 。在某些实施方案中, R_2 是 $-O(CO)OR^6$ 且 R_3 是 $-C(O)OR^6$ 或 $-O(CO)R^6$ 。

[0699] 在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个选自下式:

[0700] (i) $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,

[0701] (ii) $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$, 和

[0702] (iii) $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,

[0703] 其中:

[0704] q 是0至12,

[0705] r 是0至6,

[0706] R^8 是H或 R^{10} , 且

[0707] R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1-C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2-C_{12} -烯基。

[0708] 在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的每个独立地选自下式之一:

[0709] (i) $-(CH_2)_qC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,

[0710] (ii) $-(CH_2)_qOC(O)(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$, 和

[0711] (iii) $-(CH_2)_qOC(O)O(CH_2)_rCH(R^8)(R^9)$,

[0712] 其中:

[0713] q 是0至12,

[0714] r 是0至6,

[0715] R^8 是H或 R^{10} , 且

[0716] R^9 和 R^{10} 独立地是未被取代的直链 C_1-C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_2-C_{12} -烯基。

[0717] 在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中, q 是1至6。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中, q 是0。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中, q 是1。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中, q 是2。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,

q是3至12。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,q是3至6。

[0718] 在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,r是0。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,r是1至6。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,r是1。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,r是2。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,r是3。在式(i) - (iii)中的任一个的某些实施方案中,r是4。

[0719] 在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是H。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是 R^{10} 。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 是不同的。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^9 和 R^{10} 是相同的。

[0720] 在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_1 - C_{12} -烯基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_2 - C_{12} 烷基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_2 - C_8 烷基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_4 - C_8 烷基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_5 - C_8 烷基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 是H,且 R^9 是未被取代的直链 C_6 - C_8 烷基。

[0721] 在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_1 - C_{12} 烷基或未被取代的直链 C_1 - C_{12} -烯基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_2 - C_{12} 烷基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_2 - C_8 烷基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_4 - C_8 烷基。在式(i) - (iii)的某些实施方案中, R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_6 - C_8 烷基。

[0722] 在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q是3至12(例如,6至12)、r是1至6(例如,1、2或3),且 R^8 和 R^9 各自独立地是未被取代的直链 C_4 - C_8 烷基。

[0723] 在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在其它实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0724] 在式(14*)或式(14-2)的其它实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q OC(O)(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$ 或 $-(CH_2)_q OC(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0725] 在式(14*)或式(14-2)的某些实施方案中, R_2 是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,且 R_3 是 $-(CH_2)_q C(O)O(CH_2)_r CH(R^8)(R^9)$,其中q、r、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2

是 $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0726] 在式 (14*) 或式 (14-2) 的某些实施方案中, R_2 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0727] 在式 (14*) 或式 (14-2) 的某些实施方案中, R_2 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。在某些实施方案中, R_2 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 且 R_3 是 $-(\text{CH}_2)_q\text{OC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_r\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, 其中 q 、 r 、 R^8 和 R^9 如上面所定义。

[0728] 在式 (14*) 或式 (14-2) 的某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的一个或每个是未被取代的 C_6 - C_{22} -烷基, 或 R^2 和 R^3 中的一个或每个是未被取代的 C_6 - C_{22} -烯基。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的每个是未被取代的 C_6 - C_{22} -烷基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的每个是未被取代的 C_6 - C_{22} -烯基。

[0729] 在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的一个或每个是 $-\text{C}_6\text{H}_{13}$ 、 $-\text{C}_7\text{H}_{15}$ 、 $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ 、 $-\text{C}_9\text{H}_{19}$ 、 $-\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ 、 $-\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ 、 $-\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ 、 $-\text{C}_{13}\text{H}_{27}$ 、 $-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ 、 $-\text{C}_{15}\text{H}_{31}$ 、 $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ 、 $-\text{C}_{17}\text{H}_{35}$ 、 $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ 、 $-\text{C}_{19}\text{H}_{39}$ 、 $-\text{C}_{20}\text{H}_{41}$ 、 $-\text{C}_{21}\text{H}_{43}$ 、 $-\text{C}_{22}\text{H}_{45}$ 、 $-\text{C}_{23}\text{H}_{47}$ 、 $-\text{C}_{24}\text{H}_{49}$ 、 $-\text{C}_{25}\text{H}_{51}$ 。

[0730] 在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的一个或每个是 $-(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}_2$ 、

[0731] $-(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_8\text{SCH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、

[0732] $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 、

[0733] $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 、

[0734] $-(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ 、

[0735] $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ 、

[0736] $-(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ 、

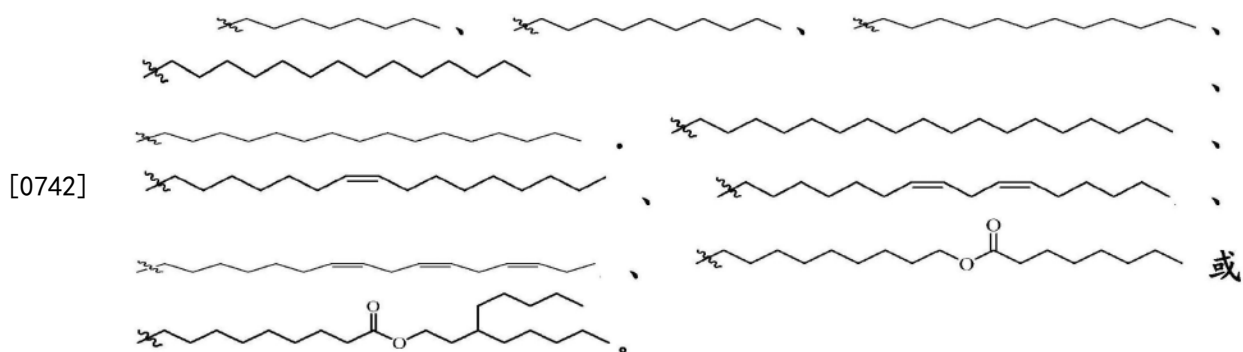
[0737] $-(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ 、

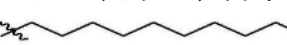
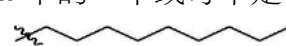
[0738] $-(\text{CH}_2)_{11}\text{ICH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 或

[0739] $-(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0740] 在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的一个或每个是被 $-\text{O}(\text{CO})\text{R}^6$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^6$ 取代的 C_6 - C_{12} 烷基, 其中 R^6 是未被取代的 C_6 - C_{14} 烷基。在某些实施方案中, R^6 是未被取代的直链 C_6 - C_{14} 烷基。在某些实施方案中, R^6 是未被取代的支链 C_6 - C_{14} 烷基。

[0741] 在某些实施方案中, R_2 和 R_3 中的一个或每个是 $(\text{CH}_2)_7\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{C}_5\text{H}_{11})_2$ 或 $(\text{CH}_2)_8\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{C}_5\text{H}_{11})_2$ 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是

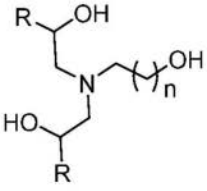
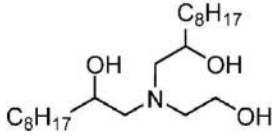
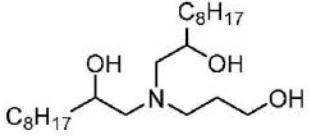
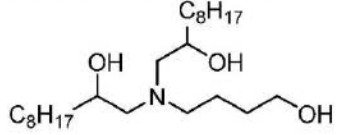
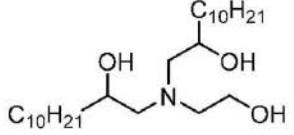
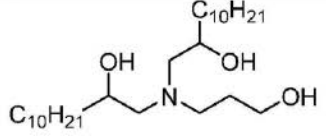
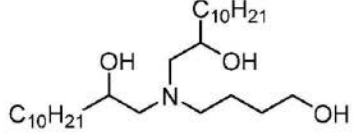
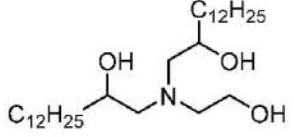


[0743] 在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 中的一个或每个是 。

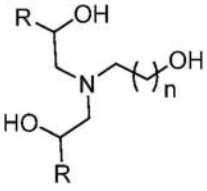
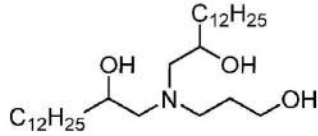
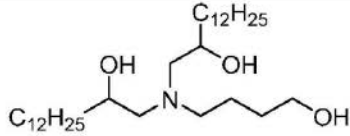
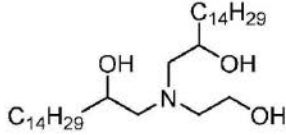
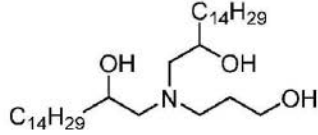
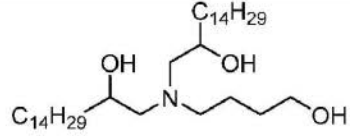
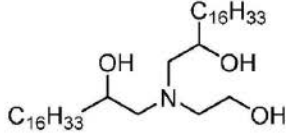
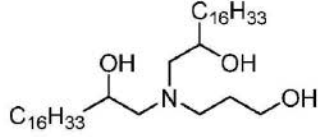
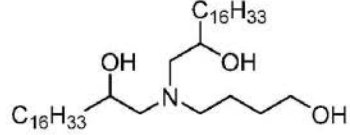
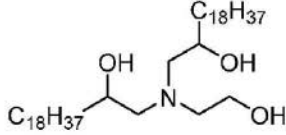
[0744] 在某些实施方案中, 可电离脂质描述于表10h中。

[0745] 表10h

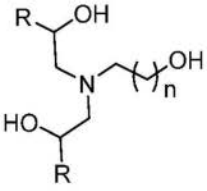
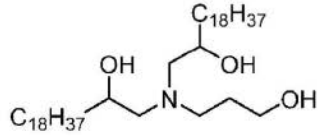
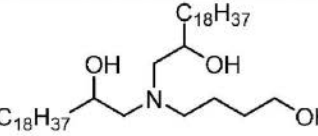
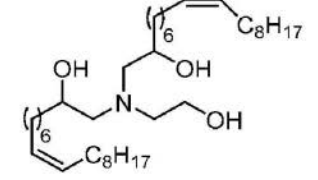
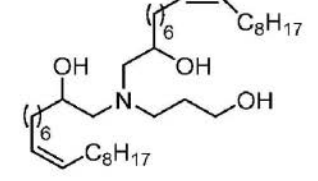
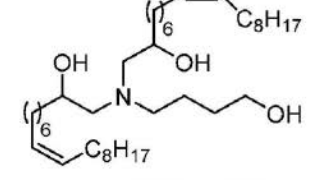
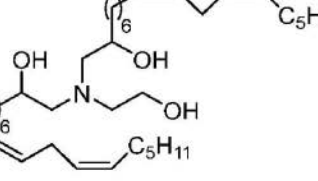
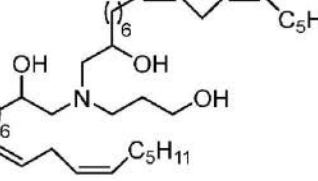
[0746]

			
化合物	n	R	结构
1	1	C ₈ H ₁₇	
2	2	C ₈ H ₁₇	
3	3	C ₈ H ₁₇	
4	1	C ₁₀ H ₂₁	
5	2	C ₁₀ H ₂₁	
6	3	C ₁₀ H ₂₁	
7	1	C ₁₂ H ₂₅	

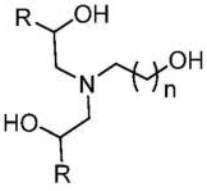
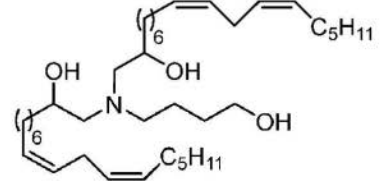
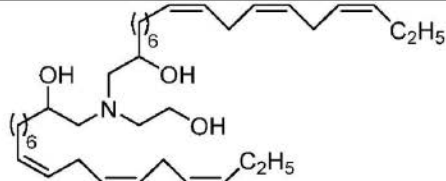
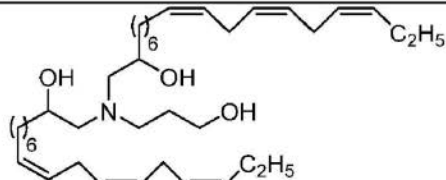
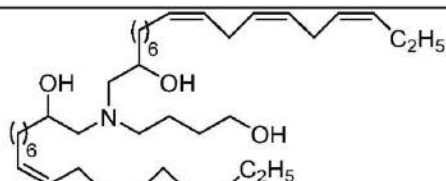
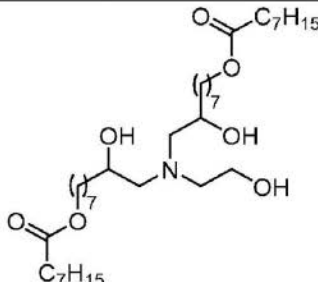
[0747]

			
化合物	n	R	结构
8	2	C ₁₂ H ₂₅	
9	3	C ₁₂ H ₂₅	
10	1	C ₁₄ H ₂₉	
11	2	C ₁₄ H ₂₉	
12	3	C ₁₄ H ₂₉	
13	1	C ₁₆ H ₃₃	
14	2	C ₁₆ H ₃₃	
15	3	C ₁₆ H ₃₃	
16	1	C ₁₈ H ₃₇	

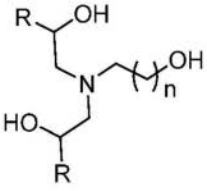
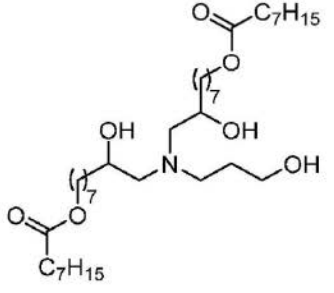
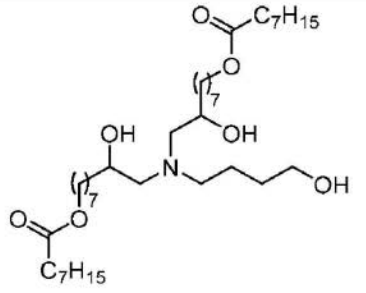
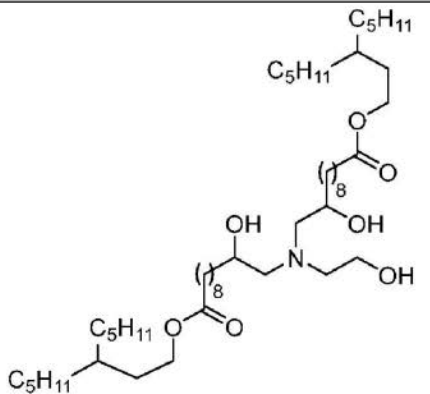
[0748]

			
化合物	n	R	结构
17	2	C ₁₈ H ₃₇	
18	3	C ₁₈ H ₃₇	
19	1	C ₆ H ₁₂ CH=CHC ₈ H ₁₇	
20	2	C ₆ H ₁₂ CH=CHC ₈ H ₁₇	
21	3	C ₆ H ₁₂ CH=CHC ₈ H ₁₇	
22	1	C ₆ H ₁₂ CH=CHCH ₂ CH=CHC ₅ H ₁₁	
23	2	C ₆ H ₁₂ CH=CHCH ₂ CH=CHC ₅ H ₁₁	

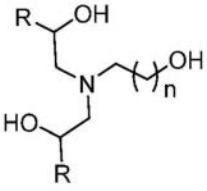
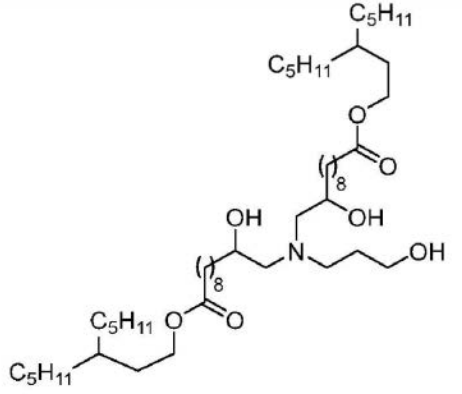
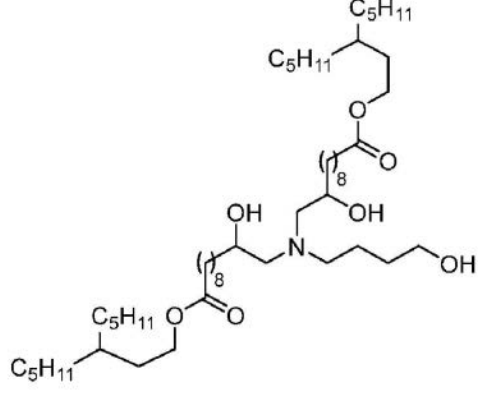
[0749]

			
化合物	n	R	结构
24	3	$C_6H_{12}CH=CHCH_2CH=CHC_5H_{11}$	
25	1	$(CH_2)_6CH=CH(CH_2)CH=CH$ $(CH_2)CH=CHC_2H_5$	
26	2	$(CH_2)_6CH=CH(CH_2)CH=CH$ $(CH_2)CH=CHC_2H_5$	
27	3	$(CH_2)_6CH=CH(CH_2)CH=CH$ $(CH_2)CH=CHC_2H_5$	
28	1	$C_7H_{14}O(CO)C_7H_{15}$	

[0750]

			
化合物	n	R	结构
29	2	$C_7H_{14}O(CO)C_7H_{15}$	
30	3	$C_7H_{14}O(CO)C_7H_{15}$	
31	1	$C_8H_{16}C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$	

[0751]

			
化合物	n	R	结构
32	2	$C_8H_{16}C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$	
33	3	$C_8H_{16}C(O)O(CH_2)_2CH(C_5H_{11})_2$	

[0752] 5.1其它可电离脂质

[0753] 在某些实施方案中,在本公开内容的转移媒介物中利用一种或多种(例如,两种或更多种、或三种或更多种)可电离脂质。在某些实施方案中,所述转移媒介物包括第一种可电离脂质(例如,如本文描述的,诸如式(13*)或(14*)的脂质)和一种或多种另外的可电离脂质。

[0754] 感兴趣的脂质,包括可以与本文描述的第一种可电离脂质组合使用(诸如通过掺入本公开内容的转移媒介物中)的可电离脂质,包括但不限于下述文献中描述的脂质:国际申请PCT/US2018/058555,国际申请PCT/US2020/038678,美国公开US2019/0314524, W02019/152848,国际申请PCT/US2010/061058,国际申请PCT/US2017/028981, W02015/095340, W02014/136086, US2019/0321489, W02010/053572,美国临时专利申请61/617,468,国际专利申请PCT/US2019/025246,美国专利公开2017/0190661和2017/0114010,美国公开20190314284, W02015/095340, W02019/152557, W02019/152848,国际申请PCT/US2019/015913,美国专利9,708,628,美国专利9,765,022;Wang等人,ACS Synthetic Biology,1, 403-07(2012);W0 2008/042973,美国专利8,071,082,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0755] 在某些实施方案中,在脂质中使用的尾部基团可以如在W02015/095340、W02019/152557和W02019/152848中所述,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0756] 可以通过本领域公知的方法制备脂质样化合物。

[0757] 在某些实施方案中,使用可电离脂质N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵或“DOTMA”。(Felgner等人.Proc.Nat'l Acad.Sci.84,7413(1987);美国专利号4,897,355)。DOTMA可以与可电离脂质(例如,如本文描述的)一起配制,和/或可以与中性脂质、二油酰基磷脂酰乙醇胺或“DOPE”或其它阳离子或非阳离子脂质组合成脂质纳米颗粒。

[0758] 其它合适的脂质包括,例如,可电离的阳离子脂质,诸如,例如,(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-15,18-二烯-1-胺(HGT5000)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-4,15,18-三烯-1-胺(HGT5001)和(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-5,15,18-三烯-1-胺(HGT5002)、C12-200(描述于W0 2010/053572中)、2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧杂环戊烷-4-基)-N,N-二甲基乙胺(DLinKC2-DMA))(参见,W0 2010/042877;Semple等人,Nature Biotech.28:172-176(2010))、2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧杂环戊烷-4-基)-N,N-二甲基乙胺(DLin-KC2-DMA)、(3S,10R,13R,17R)-3-(1H-咪唑-4-基)丙酸10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚烷-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基酯(ICE)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-15,18-二烯-1-胺(HGT5000)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-4,15,18-三烯-1-胺(HGT5001)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-5,15,18-三烯-1-胺(HGT5002)、5-羧基精胺基甘氨酸-二十八烷基酰胺(DOGS)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲酰氨基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵(DOSPA)(Behr等人.Proc.Nat'l Acad.Sci.86,6982(1989);美国专利号5,171,678;5,334,761)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷或(DOTAP)。考虑的可电离脂质也包括1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DSDMA)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DODMA)、1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻烯基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLenDMA)、N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂酰基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DMRIE)、3-二甲基氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁烷-4-氧基)-1-(顺式,顺式-9,12-十八碳二烯氧基(enoxy))丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(胆甾-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺式,顺式-9',1'-2'-十八碳二烯氧基(enoxy))丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苄胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(D0carbDAP)、2,3-二亚油酰氧基-N,N-二甲基丙胺(DLinDAP)、1,2-N,N'-二亚油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基(amino)丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亚油酰基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinCDAP)、2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-XTC2-DMA)或GL67或其混合物。(Heyes,J.,等人,J Controlled Release 107:276-287(2005);Morrissey,D V.,等人,Nat.Biotechnol.23(8):1003-1007(2005);PCT公开W02005/121348A1)。本发明还考虑使用基于胆固醇的可电离脂质来配制转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)。这样的基于胆固醇的可电离脂质可以单独使用或与其它脂质组合使用。合适的基于胆固醇的可电离脂质包括例如DC-胆固醇(N,N-

二甲基-N-乙基甲酰氨基胆固醇)和1,4-双(3-N-油烯基氨基-丙基)哌嗪(Gao,等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.179,280(1991);Wolf等人.BioTechniques 23,139(1997);美国专利号5,744,335)。

[0759] 还考虑了阳离子脂质,诸如基于二烷基氨基的、基于咪唑的和基于胍盐的脂质。例如,还考虑使用可电离脂质(3S,10R,13R,17R)-3-(1H-咪唑-4-基)丙酸10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚烷-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基酯(ICE),如国际申请号PCT/US2010/058457中所公开的,该文献通过引用并入本文。

[0760] 还考虑了可电离脂质,诸如基于二烷基氨基的、基于咪唑的和基于胍盐的脂质。例如,某些实施方案涉及包含一种或多种基于咪唑的可电离脂质的组合物,例如,咪唑胆固醇酯或“ICE”脂质,(3S,10R,13R,17R)-3-(1H-咪唑-4-基)丙酸10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚烷-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基酯。

[0761] 不希望受特定理论束缚,据信基于咪唑的阳离子脂质ICE的融合性与咪唑基团促进的内体破坏有关,其相对于传统的可电离脂质具有较低的pKa。内体破坏又促进渗透肿胀和脂质体膜的破裂,随后其中加载的核酸内容物转染或细胞内释放到靶细胞中。

[0762] 与其它可电离脂质相比,基于咪唑的可电离脂质特征还在于其降低的毒性。

[0763] 在某些实施方案中,用于递送环状RNA的转移媒介物组合物包含胺脂质。在某些实施方案中,可电离脂质是胺脂质。在某些实施方案中,胺脂质描述于国际专利申请PCT/US2018/053569中。

[0764] 在某些实施方案中,所述胺脂质是脂质E,其为(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸3-((4,4-双(辛基氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙基氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯。

[0765] 在某些实施方案中,胺脂质是脂质E的类似物。在某些实施方案中,脂质E类似物是脂质E的缩醛类似物。在特定转移媒介物组合物中,所述缩醛类似物是C4-C12缩醛类似物。在某些实施方案中,所述缩醛类似物是C5-C12缩醛类似物。在另外的实施方案中,所述缩醛类似物是C5-C10缩醛类似物。在其它实施方案中,所述缩醛类似物选自C4、C5、C6、C7、C9、C10、C11和C12缩醛类似物。

[0766] 适用于本文描述的转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)的胺脂质和其它可生物降解的脂质在体内是可生物降解的。本文描述的胺脂质具有低毒性(例如,在动物模型中耐受大于或等于10mg/kg的量而没有不良作用)。在某些实施方案中,由胺脂质组成的转移媒介物包括其中至少75%的胺脂质在8、10、12、24或48小时或3、4、5、6、7或10天内从血浆中清除的转移媒介物。

[0767] 可生物降解的脂质包括例如W02017/173054、W02015/095340和W02014/136086的可生物降解的脂质。

[0768] 可以通过本领域的技术人员已知的方法测量脂质清除率。参见,例如,Maier, M.A.,等人.Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics.Mol.Ther.2013,21(8), 1570-78。

[0769] 包含胺脂质的转移媒介物组合物可以导致增加的清除率。在某些实施方案中,所述清除率是脂质清除率,例如从血液、血清或血浆中清除脂质的速率。在某些实施方案中,所述清除率是RNA清除率,例如从血液、血清或血浆中清除circRNA的速率。在某些实施方案中,所述清除率是从血液、血清或血浆中清除转移媒介物的速率。在某些实施方案中,所述清除率是从组织(诸如肝组织或脾组织)中清除转移媒介物的速率。在某些实施方案中,高清除率导致安全性谱,且没有实质性不良影响。胺脂质和可生物降解的脂质可以减少转移媒介物在循环和组织中的积累。在某些实施方案中,转移媒介物在循环和组织中的积累的减少导致安全性谱,且没有实质性不良影响。

[0770] 脂质可以根据其所在介质的pH而电离。例如,在弱酸性介质中,脂质(诸如胺脂质)可能质子化,并因而带正电荷。相反,在弱碱性介质(诸如例如,血液,其中pH是大约7.35)中,脂质(诸如胺脂质)可能不会质子化,并因而不带电荷。

[0771] 脂质带电荷的能力与其固有pKa有关。在某些实施方案中,本公开内容的胺脂质可以各自独立地具有在约5.1至约7.4的范围内的pKa。在某些实施方案中,本公开内容的可生物利用的脂质可以各自独立地具有在约5.1至约7.4的范围内的pKa。例如,本公开内容的胺脂质可以各自独立地具有在约5.8至约6.5的范围内的pKa。具有在约5.1至约7.4的范围内的pKa的脂质可有效在体内递送货物,例如递送到肝脏。此外,已经发现,具有在约5.3至约6.4的范围内的pKa的脂质可有效在体内递送,例如递送至肿瘤中。参见,例如,W02014/136086。

[0772] 本公开内容的脂质可以具有一S—S—(二硫化物)键。

[0773] 通过本领域已知的合成途径使用合适的起始材料可以制备本公开内容的脂质样化合物。所述方法可以包括另外的步骤以添加或除去合适的保护基团,从而最终允许合成脂质样化合物。此外,可以按照交替的顺序或次序执行各种合成步骤以产生期望的材料。可用于合成适用脂质样化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和去保护)是本领域已知的,包括例如R.Larock, *Comprehensive Organic Transformations* (第2版, VCH Publishers 1999); P.G.M. Wuts和T.W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (第4版, John Wiley and Sons 2007); L. Fieser和M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis* (John Wiley and Sons 1994); 和L. Paquette, 编, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (第2版, John Wiley and Sons 2009) 及其后续版本。某些脂质样化合物可以含有非芳族双键和一个或多个不对称中心。因此,它们可以作为外消旋体和外消旋混合物、单一对映异构体、各非对映异构体、非对映异构体混合物、以及顺式-或反式-异构形式存在。考虑所有这样的异构形式。

[0774] 上述化合物和组合物的制备方法在下文中进行描述和/或是本领域已知的。

[0775] 本领域技术人员将理解,在本文所述的方法中,中间体化合物的官能团可能需要用合适的保护基团保护。这样的官能团包括例如羟基、氨基、巯基和羧酸。羟基的合适保护基团包括例如三烷基甲硅烷基或二芳基烷基甲硅烷基(例如,叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基)、四氢吡喃基、苄基等。氨基、脒基和胍基的合适保护基团包括例如叔丁氧基羰基、苄氧基羰基等。巯基的合适保护基团包括例如-C(O)-R”(其中R”是烷基、芳基或芳基烷基)、对甲氧基苄基、三苯甲基等。羧酸的合适保护基团包括例如烷基酯、芳基酯或芳基烷基酯。根据本领域技术人员已知的和如本文所述的标准技术,可以添

加或除去保护基团。保护基团的使用详细描述于例如Green, T.W. 和P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 第3版, Wiley中。本领域技术人员将理解, 保护基团还可以是聚合物树脂, 诸如Wang树脂、Rink树脂或2-氯三苯甲基氯树脂。

[0776] 本领域技术人员还将理解, 尽管本发明的化合物的这样的受保护衍生物本身可能不具有药理学活性, 但它们可以施用给哺乳动物, 并此后在体内代谢以形成药理学上有活性的本发明的化合物。因此, 这样的衍生物可以被描述为前药。本发明的化合物的所有前药被包括在本发明的范围内。

[0777] 此外, 所有以游离碱或酸形式存在的本发明的化合物都可以通过用本领域技术人员已知的方法用适当的无机或有机碱或酸处理转化为其药学上可接受的盐。本发明的化合物的盐也可以通过标准技术转化为其游离碱或酸形式。

[0778] 应当理解, 本领域技术人员能够通过类似方法或通过结合本领域技术人员已知的其它方法来制备这些化合物。还应当理解, 本领域技术人员能够通过使用适当的起始材料和修改合成参数来制备本文未具体说明的式(1)的其它化合物。一般而言, 起始材料可以从诸如Sigma Aldrich、Lancaster Synthesis, Inc.、Maybridge、Matrix Scientific、TCI和Fluorochem USA等来源得到, 或根据本领域技术人员已知的来源合成(参见, 例如, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 第5版(Wiley, 2000年12月)), 或如本发明所述制备。

[0779] 如上所述, 这些脂质样化合物可用于递送药学试剂。可以通过体外测定初步筛选其递送药学试剂的效力, 并然后通过动物实验和临床试验进行确认。本领域普通技术人员还会明白其它方法。

[0780] 不受任何理论的束缚, 本公开内容的脂质样化合物可以通过形成复合物(例如, 纳米复合物和微米颗粒)来促进药剂的递送。这样的脂质样化合物的带正电荷的或带负电荷的亲水头结合带相反电荷的药学试剂的部分, 并且它的疏水部分结合药学试剂的疏水部分。任一种结合可以是共价的或非共价的。

[0781] 可以使用诸如Wang等人, *ACS Synthetic Biology*, 1, 403-07 (2012)等出版物中描述的程序制备上述复合物。通常, 通过在缓冲液(诸如乙酸钠缓冲液或磷酸盐缓冲盐水("PBS"))中温育脂质样化合物和药学试剂而获得它们。

[0782] 5.2亲水基团

[0783] 在某些实施方案中, 选定的亲水官能团或部分可以改变化合物或以这样的化合物为其组分的转移媒介物的性能或以其它方式赋予性能(例如, 通过提高以该化合物为其组分的脂质纳米颗粒的转染效率)。例如, 胍盐作为亲水头部基团在本文公开的化合物中的掺入可以促进这样的化合物(或以这样的化合物作为其组分的转移媒介物)与一个或多个靶细胞的细胞膜的融合性, 从而增强例如这样的化合物的转染效率。据推测, 来自亲水性胍盐部分的氮形成6元环过渡态, 其为相互作用提供稳定性, 并从而使细胞能够摄取包封的材料(Wender, 等人, *Adv. Drug Del. Rev.* (2008) 60:452-472)。类似地, 一个或多个氨基基团或部分向所公开的化合物中的掺入(例如, 作为头部基团)可以通过利用这样的氨基基团的融合性进一步促进靶细胞的内体/溶酶体膜的破裂。这不仅基于组合物的氨基基团的pKa, 还基于氨基基团经历六边形相变并与靶细胞表面(即囊泡膜)融合的能力(Koltover, 等人, *Science* (1998) 281:78-81.)。该结果被认为会促进囊泡膜的破裂和脂质纳米颗粒内容物

向靶细胞中的释放。

[0784] 类似地,在某些实施方案中,例如咪唑作为亲水头部基团在本文公开的化合物中的掺入可以用于促进例如被包封在本发明的转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)中的内容物的内体或溶酶体释放。这样的增强的释放可以通过质子-海绵介导的破坏机制和/或增强的融合机制之一或两者来实现。质子-海绵机制是基于化合物和特别是化合物的官能部分或基团的缓冲内体酸化的能力。这可以通过化合物的pKa或构成这种化合物的一个或多个官能团(例如,咪唑)的pKa来操纵或以其它方式控制。因此,在某些实施方案中,例如本文公开的基于咪唑的化合物(例如,HGT4001和HGT4004)的融合性与内体破坏性能有关,所述性能由这样的咪唑基团促进,其相对于其它传统的可电离脂质具有更低的pKa。这样的内体破坏性能又促进渗透膨胀和脂质体膜的破裂,随后其中装载或包封的多核苷酸材料转染或细胞内释放到靶细胞中。除咪唑部分外,这种现象还可适用于多种具有期望pKa曲线的化合物。这样的实施方案还包括基于多氮的官能团诸如多胺、多肽(组氨酸)和基于氮的树突结构。

[0785] 示例性的可电离的和/或阳离子的脂质描述于国际PCT专利公开W02015/095340、W02015/199952、W02018/011633、W02017/049245、W02015/061467、W02012/040184、W02012/000104、W02015/074085、W02016/081029、W02017/004143、W02017/075531、W02017/117528、W02011/022460、W02013/148541、W02013/116126、W02011/153120、W02012/044638、W02012/054365、W02011/090965、W02013/016058、W02012/162210、W02008/042973、W02010/129709、W02010/144740、W02012/099755、W02013/049328、W02013/086322、W02013/086373、W02011/071860、W02009/132131、W02010/048536、W02010/088537、W02010/054401、W02010/054406、W02010/054405、W02010/054384、W02012/016184、W02009/086558、W02010/042877、W02011/000106、W02011/000107、W02005/120152、W02011/141705、W02013/126803、W02006/007712、W02011/038160、W02005/121348、W02011/066651、W02009/127060、W02011/141704、W02006/069782、W02012/031043、W02013/006825、W02013/033563、W02013/089151、W02017/099823、W02015/095346和W02013/086354、以及美国专利公开US2016/0311759、US2015/0376115、US2016/0151284、US2017/0210697、US2015/0140070、US2013/0178541、US2013/0303587、US2015/0141678、US2015/0239926、US2016/0376224、US2017/0119904、US2012/0149894、US2015/0057373、US2013/0090372、US2013/0274523、US2013/0274504、US2013/0274504、US2009/0023673、US2012/0128760、US2010/0324120、US2014/0200257、US2015/0203446、US2018/0005363、US2014/0308304、US2013/0338210、US2012/0101148、US2012/0027796、US2012/0058144、US2013/0323269、US2011/0117125、US2011/0256175、US2012/0202871、US2011/0076335、US2006/0083780、US2013/0123338、US2015/0064242、US2006/0051405、US2013/0065939、US2006/0008910、US2003/0022649、US2010/0130588、US2013/0116307、US2010/0062967、US2013/0202684、US2014/0141070、US2014/0255472、US2014/0039032、US2018/0028664、US2016/0317458和US2013/0195920中,它们的内容都通过引用整体并入本文。国际专利申请W0 2019/131770也通过引用整体并入本文。

[0786] B. PEG脂质

[0787] 考虑在本文描述的脂质体和药物组合物中使用和包含聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂和衍生化的脂质诸如衍生化的神经酰胺(PEG-CER)(包括N-辛酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)-2000](C8 PEG-2000神经酰胺)),优选地与本文公开的化合物和脂质中的

一种或多种组合。考虑的PEG修饰的脂质包括但不限于长度高达5kDa的聚乙二醇链,其共价地连接至具有C6-C20长度的烷基链的脂质。在某些实施方案中,在本发明的组合物和方法中采用的PEG修饰的脂质是1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油、甲氧基聚乙二醇(2000MW PEG)“DMG-PEG2000”。PEG修饰的脂质向脂质递送媒介物中的添加可以防止复合物聚集,并且还可以提供延长循环寿命和增加脂质-多核苷酸组合物向靶组织的递送的手段(Klibanov等人.(1990)FEBS Letters,268(1):235-237),或者可以选择它们以在体内快速从制剂中交换出来(参见美国专利号5,885,613)。特别有用的可交换脂质是具有较短酰基链(例如,C14或C18)的PEG-神经酰胺。本发明的PEG修饰的磷脂和衍生化的脂质可以占在脂质体脂质纳米颗粒中存在的总脂质的约0%至约20%、约0.5%至约20%、约1%至约15%、约4%至约10%或约2%摩尔比。

[0788] 在一个实施方案中,PEG修饰的脂质描述于国际专利申请号PCT/US2019/015913或PCT/US2020/046407中,它们通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,转移媒介物包含一种或多种PEG修饰的脂质。

[0789] PEG修饰的脂质的非限制性实例包括PEG修饰的磷脂酰乙醇胺和磷脂酸、PEG-神经酰胺缀合物(例如,PEG-CerC14或PEG-CerC20)、PEG修饰的二烷基胺和PEG修饰的1,2-二酰氧基丙烷-3-胺。在某些另外的实施方案中,PEG修饰的脂质可以是例如PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE。

[0790] 在某些再进一步的实施方案中,PEG修饰的脂质包括但不限于1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](PEG-DSPE)、PEG-二硬脂酰甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈油烯基、PEG-二油烯基、PEG-二硬脂酰基、PEG-二酰基咪唑双酰胺(glycamide)(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)、PEG-1,2-二肉豆蔻基氧基(ox1)丙基-3-胺(PEG-c-DMA)。

[0791] 在某些再进一步的实施方案中,PEG修饰的脂质是DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基氨基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DOMG或PEG-1。在某些实施方案中,所述PEG修饰的脂质是DSPE-PEG(2000)。

[0792] 在某些实施方案中,所述PEG修饰的脂质包含PEG部分,该PEG部分包含10-70(例如,30-60)个氧基亚乙基(-O-CH₂-CH₂-)单元或其部分。在某些实施方案中,所述PEG修饰的脂质包含(OCH₂CH₂)_v-OR_w,且v是0至70之间的整数(包括端值)(例如,30至60之间的整数),w是氢或烷基。

[0793] 在各种实施方案中,PEG修饰的脂质也可以被称作“PEG化的脂质”或“PEG-脂质”。

[0794] 在一个实施方案中,所述PEG-脂质选自PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油、及其混合物。

[0795] 在某些实施方案中,PEG-脂质的脂质部分包括具有约C₁₄至约C₂₂(诸如约C₁₄至约C₁₆)的长度的脂质部分。在某些实施方案中,PEG部分(例如mPEG-NH₂)具有约1000、约2000、约5000、约10,000、约15,000或约20,000道尔顿的大小。在一个实施方案中,所述PEG-脂质是PEG2k-DMG。

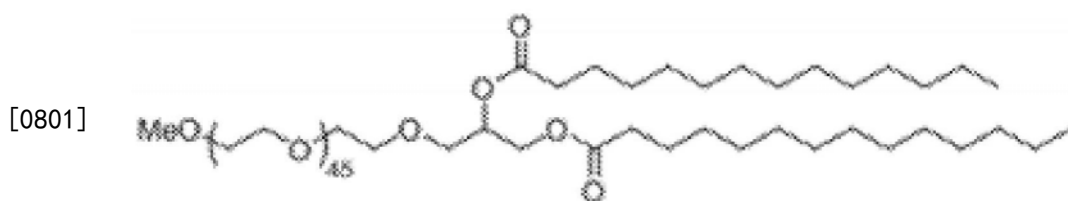
[0796] 在一个实施方案中,本文描述的脂质纳米颗粒可以包含用非扩散性PEG修饰的脂质。非扩散性PEG的非限制性实例包括PEG-DSG和PEG-DSPE。

[0797] PEG-脂质是本领域已知的,诸如在美国专利号8,158,601和国际专利公开号W02015/130584A2中描述的那些,它们通过引用整体并入本文。

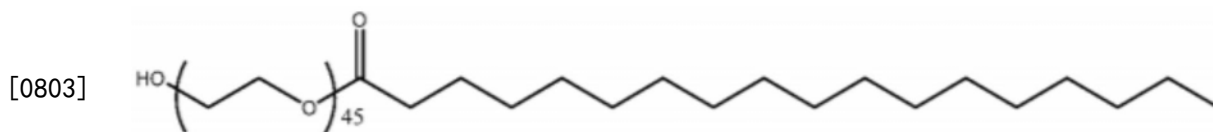
[0798] 在各种实施方案中,本文描述的脂质(例如,PEG-脂质)可以如在国际专利公开号PCT/US2016/000129中所述进行合成,其通过引用整体并入。

[0799] 脂质纳米颗粒组合物的脂质组分可以包括一种或多种包含聚乙二醇的分子,诸如PEG或PEG修饰的脂质。这样的物质可以可替代地被称作PEG化的脂质。PEG脂质是用聚乙二醇修饰的脂质。PEG脂质可以选自包括以下成员的非限制性组:PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油、及其混合物。例如,PEG脂质可以是PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂质。

[0800] 在某些实施方案中,所述PEG修饰的脂质是PEG-DMG的修饰形式。PEG-DMG具有以下结构:

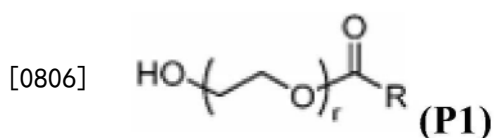


[0802] 在某些实施方案中,所述PEG修饰的脂质是PEG-C18或PEG-1的修饰形式。PEG-1具有以下结构



[0804] 在一个实施方案中,用于本发明的PEG脂质可以是在国际公开号W02012099755中描述的PEG化的脂质,其内容通过引用整体并入本文。可以对本文描述的这些示例性PEG脂质中的任一种进行修饰,以在PEG链上包含羟基基团。在某些实施方案中,所述PEG脂质是PEG-OH脂质。在某些实施方案中,所述PEG-OH脂质在PEG链上包含一个或多个羟基基团。在某些实施方案中,PEG-OH或羟基-PEG化的脂质在PEG链的末端处包含-OH基团。每种可能性代表本发明的一个单独实施方案。

[0805] 在某些实施方案中,所述PEG脂质是式(P1)的化合物:



[0807] 或其盐或异构体,其中:

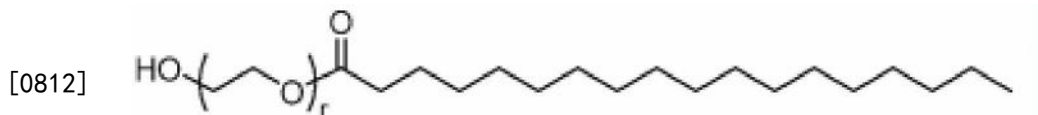
[0808] r是1至100之间的整数;

[0809] R是 C_{10-40} 烷基、 C_{10-40} 烯基或 C_{10-40} 炔基;且任选地R的一个或多个亚甲基基团独立地被 C_{3-10} 亚碳环基、4至10元亚杂环基、 C_{6-10} 亚芳基、4至10元亚杂芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR N C(O)-、-NR N C(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR N C(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR N)-、-C(=NR N)N(R^N)-、-NR N C(=NR N)-、-NR N C

(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)₂-、-N(R^N)S(O)₂-、-S(O)₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)₂N(R^N)-、-OS(O)₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)₂O-替换；且

[0810] R^N的每个实例独立地是氢、C₁₋₆烷基或氮保护基团。

[0811] 例如,R是C17烷基。例如,所述PEG脂质是式(P1-a)的化合物:



[0813] 或其盐或异构体,其中r是1至100之间的整数。

[0814] 例如,所述PEG脂质是下式的化合物:



[0816] C. 辅助脂质

[0817] 在某些实施方案中,本文描述的转移媒介物(例如,LNP)包含一种或多种非阳离子的辅助脂质。在某些实施方案中,所述辅助脂质是磷脂。在某些实施方案中,所述辅助脂质是磷脂替代品或替代物。在某些实施方案中,所述磷脂或磷脂替代品可以是例如一种或多种饱和的或(多)不饱和的磷脂或磷脂替代品或其组合。一般而言,磷脂包含磷脂部分和一个或多个脂肪酸部分。

[0818] 磷脂部分可以选自例如由以下成员组成的非限制性组:磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂。

[0819] 脂肪酸部分可以选自例如由以下成员组成的非限制性组:月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻烯酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、芥酸、植烷酸、花生酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、山嵛酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸。

[0820] 磷脂包括但不限于甘油磷脂诸如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油和磷脂酸。磷脂也包括磷酸鞘脂(phosphosphingolipid),诸如鞘磷脂。

[0821] 在某些实施方案中,所述辅助脂质是1,2-二硬脂酰基-177-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)类似物、DSPC替代品、油酸或油酸类似物。

[0822] 在某些实施方案中,辅助脂质是非磷脂酰胆碱(PC)两性离子脂质、DSPC类似物、油酸、油酸类似物或DSPC替代品。

[0823] 在某些实施方案中,辅助脂质描述于PCT/US2018/053569中。适用于本公开内容的脂质组合物中的辅助脂质包括例如多种中性的、不带电荷的或两性离子的脂质。这样的辅助脂质优选与本文公开的一种或多种化合物和脂质组合使用。辅助脂质的实例包括但不限于5-十七烷基苯-1,3-二醇(间苯二酚)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、磷脂酰胆碱(PLPC)、1,2-二硬脂酰基sn-甘油-3-磷酸胆碱(DAPC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二月桂酰基磷脂酰胆碱(DLPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、1-肉豆蔻酰基-2-

棕榈酰基磷脂酰胆碱 (MPPC)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱 (PMPC)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基磷脂酰胆碱 (SPPC)、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DBPC)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱 (SPPC)、1,2-二(二十碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DEPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱 (POPC)、溶血磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二亚油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺 (POPE)、溶血磷脂酰乙醇胺和其组合。在一个实施方案中,所述辅助脂质可以是二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC) 或二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺 (DMPE)。在另一个实施方案中,所述辅助脂质可以是二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC)。辅助脂质起作用以稳定和改善转移媒介物的加工。这样的辅助脂质优选与其它赋形剂(例如本文公开的一种或多种可电离脂质)组合使用。在某些实施方案中,当与可电离脂质组合使用时,辅助脂质可以占在脂质纳米颗粒中存在的总脂质的5%至约90%、或约10%至约70%摩尔比。

[0824] D. 结构脂质

[0825] 在一个实施方案中,结构脂质描述于国际专利申请PCT/US2019/015913中。

[0826] 本文描述的转移媒介物包含一种或多种结构脂质。结构脂质在脂质纳米颗粒中的掺入可能有助于减轻颗粒中其它脂质的聚集。结构脂质可以包括但不限于胆固醇、粪甾醇、麦角甾醇、菜籽甾醇 (bassicasterol)、番茄碱、番茄素、熊果酸、 α -生育酚、及其混合物。在某些实施方案中,所述结构脂质是胆固醇。在某些实施方案中,所述结构脂质包括胆固醇和皮质类固醇(诸如例如泼尼松龙、地塞米松、泼尼松和氢化可的松)或其组合。

[0827] 在某些实施方案中,所述结构脂质是甾醇。在某些实施方案中,所述结构脂质是类固醇。在某些实施方案中,所述结构脂质是胆固醇。在某些实施方案中,所述结构脂质是胆固醇的类似物。在某些实施方案中,所述结构脂质是 α -生育酚。

[0828] 本文描述的转移媒介物包含一种或多种结构脂质。结构脂质在转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)中的掺入可能有助于减轻颗粒中其它脂质的聚集。在某些实施方案中,所述结构脂质包括胆固醇和皮质类固醇(诸如例如泼尼松龙、地塞米松、泼尼松和氢化可的松)或其组合。

[0829] 在某些实施方案中,所述结构脂质是甾醇。结构脂质可以包括但不限于甾醇(例如,植物甾醇或动物甾醇)。

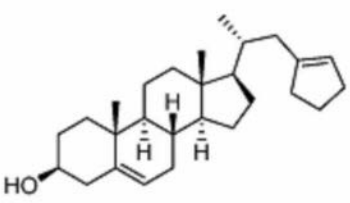
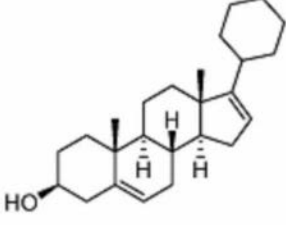
[0830] 在某些实施方案中,所述结构脂质是类固醇。例如,甾醇可以包括但不限于胆固醇、 β -谷甾醇、粪甾醇、麦角甾醇、谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇、麦角甾醇、番茄碱、番茄素、熊果酸或 α -生育酚。

[0831] 在某些实施方案中,转移媒介物包括有效量的免疫细胞递送增强脂质,例如,胆固醇类似物或氨基脂质或其组合,其当存在于转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)中时,相对于缺乏免疫细胞递送增强脂质的转移媒介物,可以通过增强细胞结合和/或摄取、内化、细胞内运输和/或加工和/或内体逃逸来发挥作用,和/或可以增强免疫细胞的识别和/或与免疫细胞的结合。因此,虽然不打算受任何特定机理或理论约束,但在一个实施方案中,本公开内容的结构脂质或其它免疫细胞递送增强脂质结合C1q或促进包含这样的脂质的转移媒介物与C1q的结合。因此,对于本公开内容的转移媒介物将核酸分子递送至免疫细胞的体外使用而言,使用包括C1q的培养条件(例如,使用包括血清的培养基或将外源C1q加入无血清培

培养基中)。对于本公开内容的转移媒介物的体内使用,对C1q的需求由内源性C1q提供。
[0832] 在某些实施方案中,所述结构脂质是胆固醇。在某些实施方案中,所述结构脂质是胆固醇的类似物。在某些实施方案中,所述结构脂质是表16中的脂质:

[0833] 表16

[0834]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
1		22	

[0835]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
2		23	
3		24	
4		25	
5		26	
6		27	
7		28	

[0836]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
8		29	
9		30	
10		31	
11		32	
12		33	
13		34	

[0837]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
14		35	
15		36	
16		37	
17		38	
18		39	
19		40	

[0838]

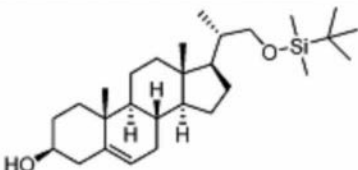
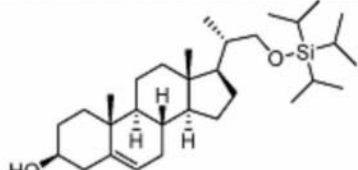
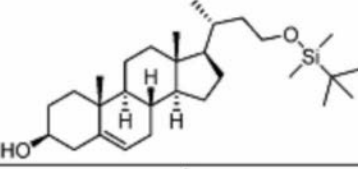
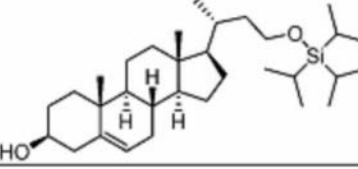
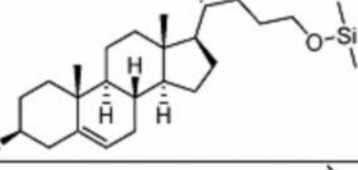
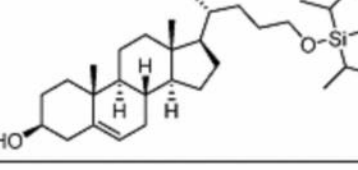
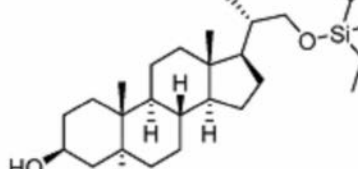
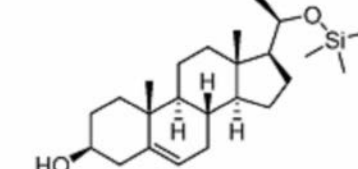
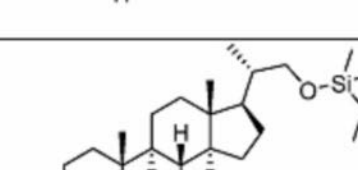
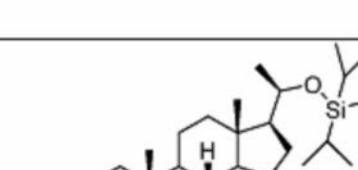
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
20		41	
21		42	
150		165	
154		169	
162		170	

[0839]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
163		171	
164		172	
184			

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
43		47	

[0840]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
44		48	
45		49	
46		50	
175		177	
176		178	

[0841]

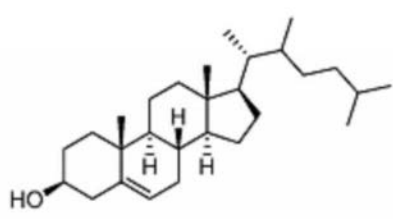
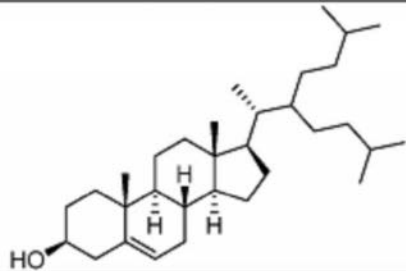
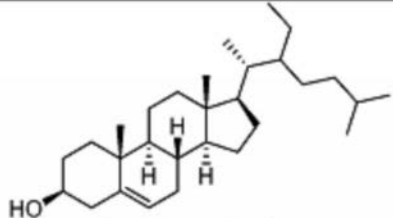
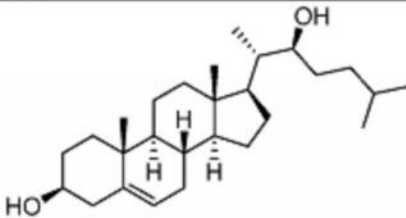
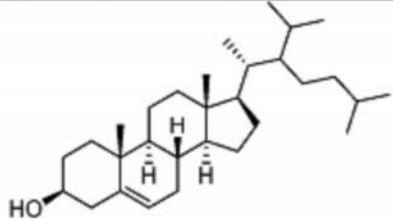
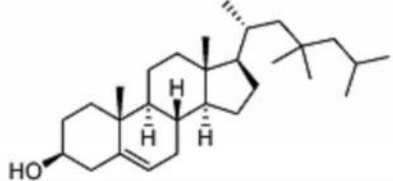
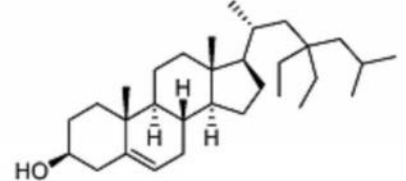
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
51		60	
52		61	
53		62	
54		63	
55		64	
56		65	
57		66	

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
58		67	
59		149	
153			

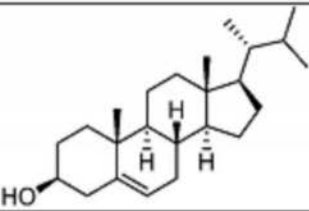
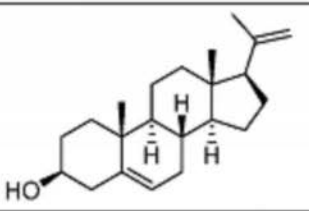
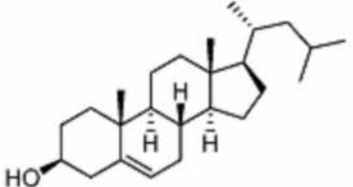
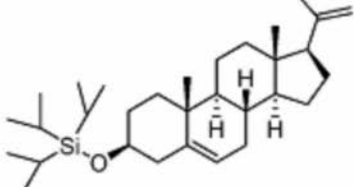
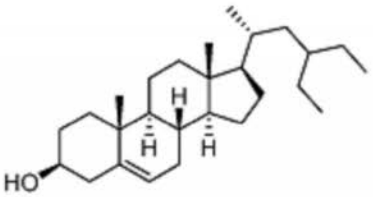
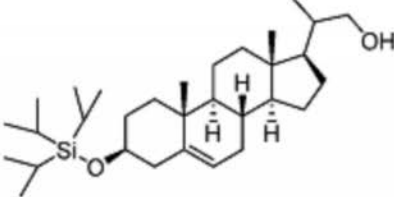
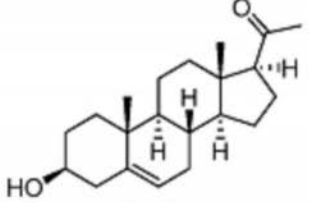
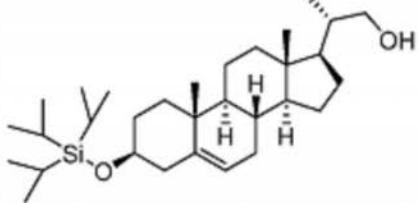
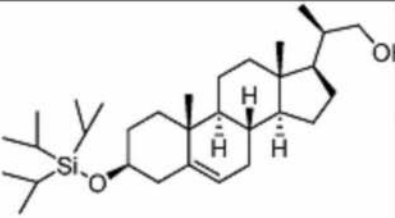
[0842]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
68		71	
69		72	
70		73	

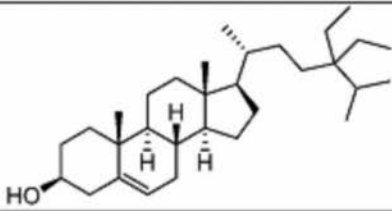
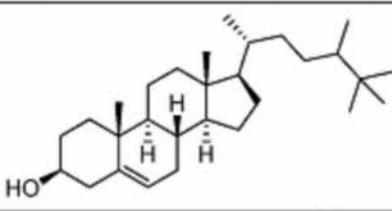
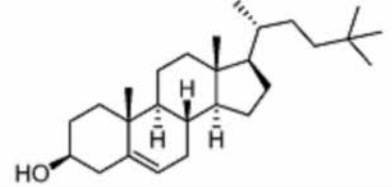
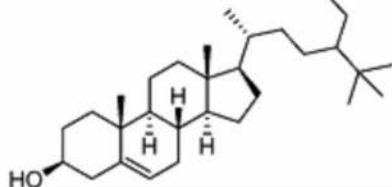
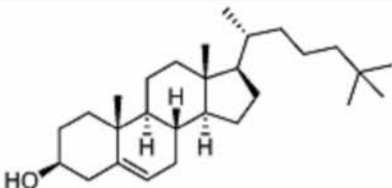
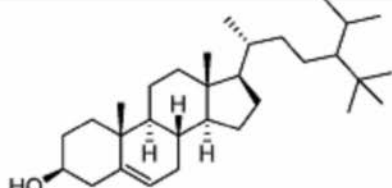
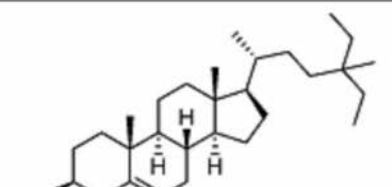
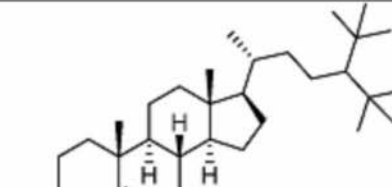
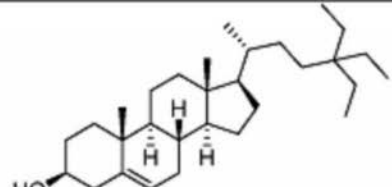
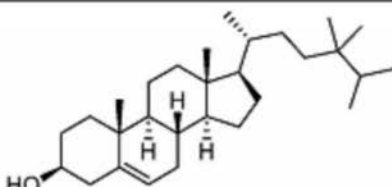
[0843]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
74		77	
75		78	
76			
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
79		80	

[0844]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
81		85	
82		86	
83		87	
84		152	
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
157			

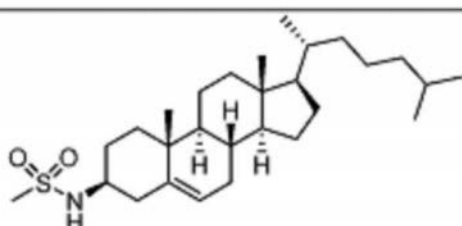
[0845]

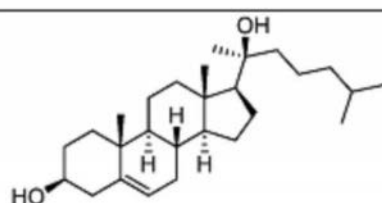
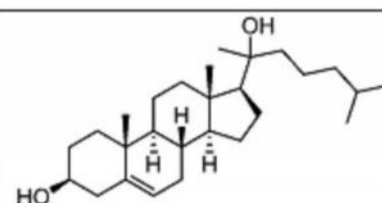
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
88		93	
89		94	
90		95	
91		96	
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
92		97	

[0846]

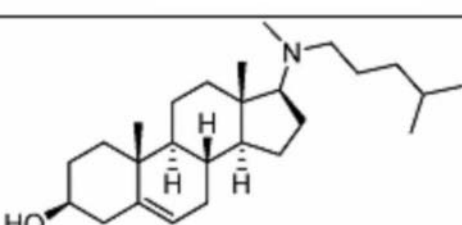
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
98		102	
99		103	
100		104	
101		105	

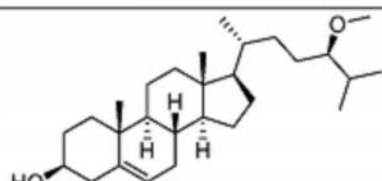
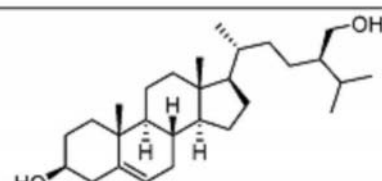
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
180		182	
181			

化合物 编号S-	结构
106	

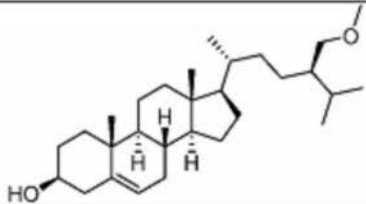
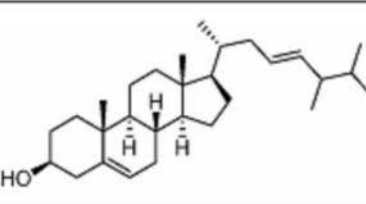
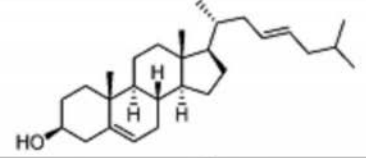
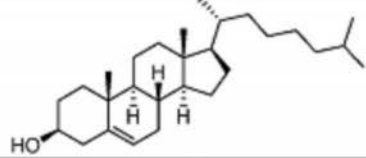
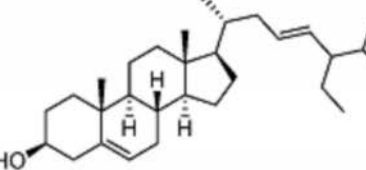
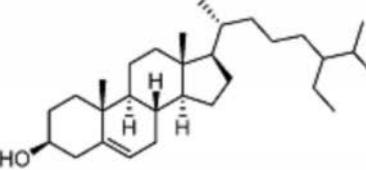
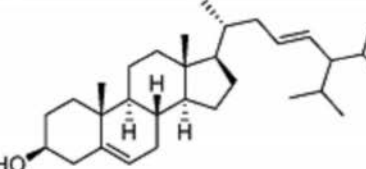
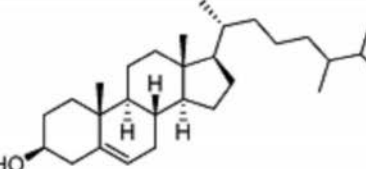
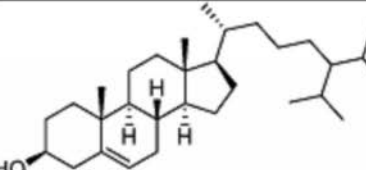
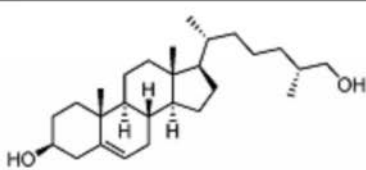
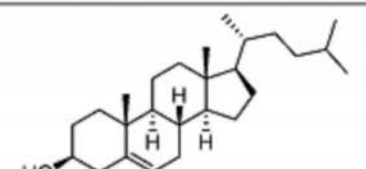
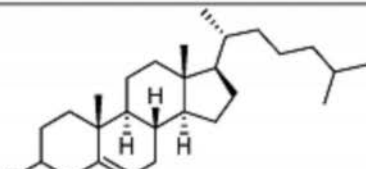
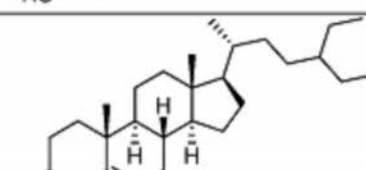
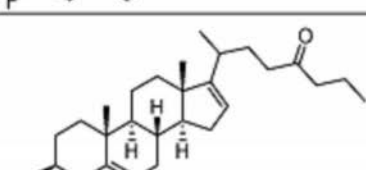
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
107		108	

[0847]

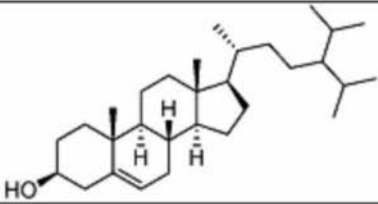
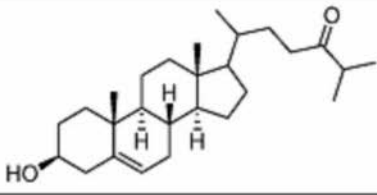
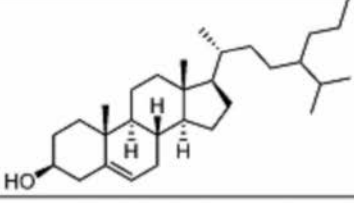
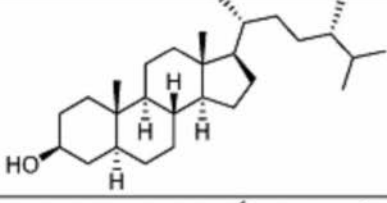
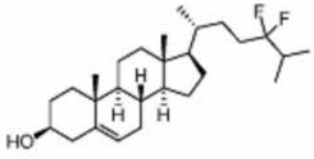
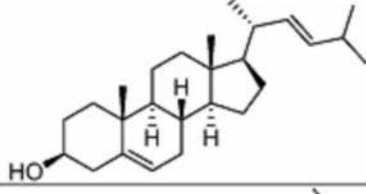
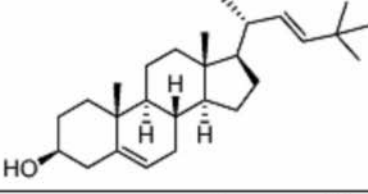
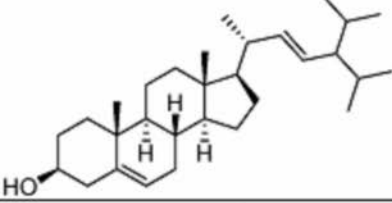
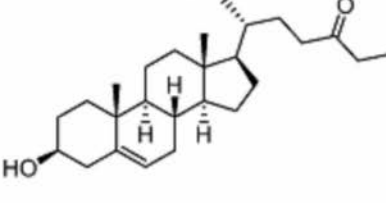
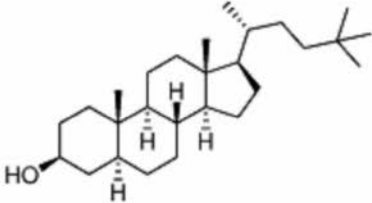
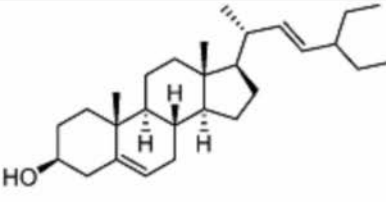
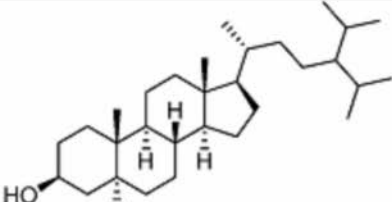
化合物 编号S-	结构
109	

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
110		121	

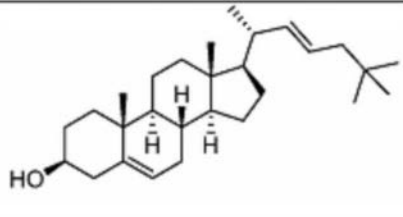
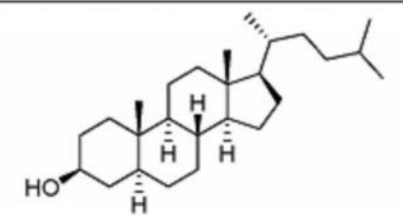
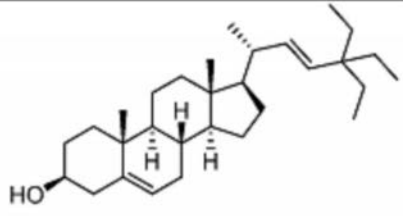
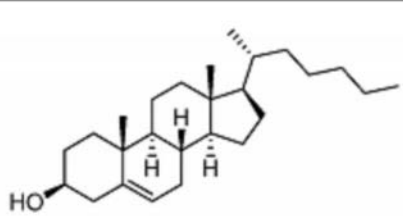
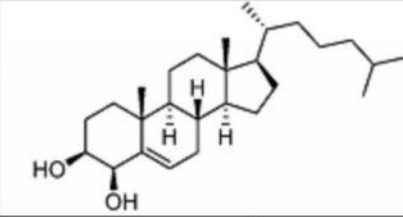
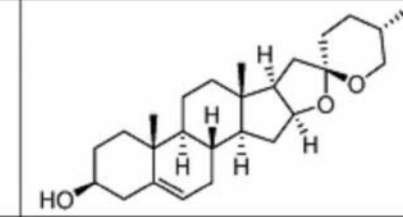
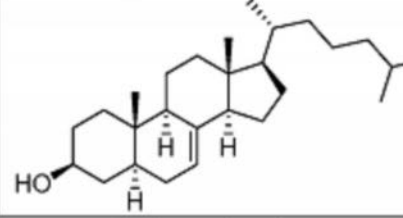
[0848]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
111		122	
112		123	
113		124	
114		125	
115		126	
116		127	
117		128	

[0849]

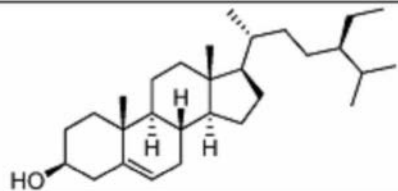
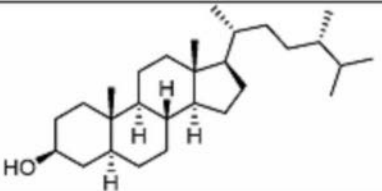
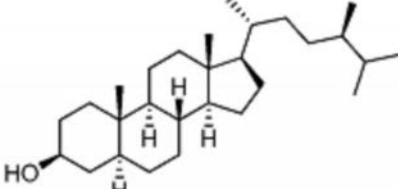
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
118		129	
119		130	
120		155	
156		167	
158		168	
160		173	

[0850]

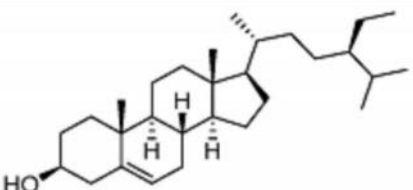
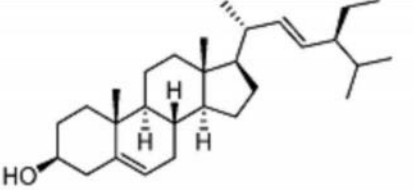
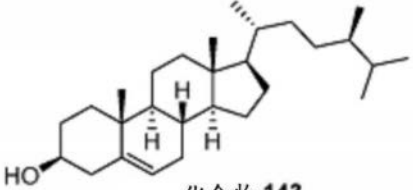
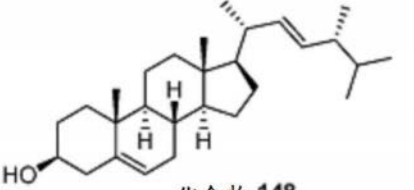
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
161		174	
166		179	
化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
131		133	
132			

[0851]

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
134		142	
135		143	
136		144	
137		145	
138		146	
139		147	
140		148	

化合物 编号S-	结构	化合物 编号S-	结构
141		151	
159			

[0852]

组合物 S-编号	结构
183	 化合物 141  化合物 140  化合物 143  化合物 148

[0853] E. 脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂

[0854] 本文描述的脂质纳米颗粒 (LNP) 的形成可以通过本领域已知的任何方法实现。例如,如在美国专利公开号US2012/0178702A1中所述,其通过引用整体并入本文。例如,在 Semple 等人.(2010) Nat. Biotechnol. 28:172-176、Jayarama 等人.(2012), Angew. Chem. Int. 编, 51:8529-8533 和 Maier 等人.(2013) Molecular Therapy 21,1570-1578 (它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文) 中描述了脂质纳米颗粒组合物及其制备方法的非限制性实例。

[0855] 在一个实施方案中,通过例如在国际专利公开号W0 2011/127255或W0 2008/103276 (它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文) 中描述的方法,可以制备LNP制剂。

[0856] 在一个实施方案中,本文描述的LNP制剂可以包含聚阳离子的组合物。作为一个非限制性实例,聚阳离子的组合物可以是选自美国专利公开号US2005/0222064A1的式1-60的组合物,其内容通过引用整体并入本文。

[0857] 在一个实施方案中,所述脂质纳米颗粒可以通过在美国专利公开号US2013/0156845A1和国际专利公开号W02013/093648A2或W02012/024526A2 (它们中的每一篇通过引用整体并入本文) 中描述的方法配制。

[0858] 在一个实施方案中,本文描述的脂质纳米颗粒可以通过美国专利公开号US2013/0164400A1 (其通过引用整体并入本文) 中描述的系统和/或方法在无菌环境中制备。

[0859] 在一个实施方案中,所述LNP制剂可以配制成纳米颗粒,诸如在美国专利号8,492,359(其通过引用整体并入本文)中描述的核酸-脂质颗粒。

[0860] 纳米颗粒组合物可以任选地包含一个或多个涂层。例如,纳米颗粒组合物可以配制成具有涂层的胶囊剂、薄膜或片剂。包含本文所述组合物的胶囊剂、薄膜或片剂可以具有任何有用的尺寸、拉伸强度、硬度或密度。

[0861] 在某些实施方案中,可以使用包含微流体混合器的方法合成本文描述的脂质纳米颗粒。示例性的微流体混合器可以包括但不限于狭缝叉指式微混合器,包括但不限于由 Precision Nanosystems (Vancouver, BC, 加拿大)、Microinnova (Allerheiligen bei Wildon, 奥地利) 制造的微混合器和/或交错人字形微混合器 (SHM) (Zhigaltsev, I.V. 等人. (2012) *Langmuir*. 28:3633-40; Belliveau, N.M. 等人. *Mol. Ther. Nucleic. Acids*. (2012) 1: e37; Chen, D. 等人. *J. Am. Chem. Soc.* (2012) 134(16):6948-51; 它们中的每一篇通过引用整体并入本文)。

[0862] 在某些实施方案中,包含SHM的LNP生成方法进一步包括混合至少两个输入流,其中混合通过微结构诱导的混乱平流 (MICA) 发生。根据该方法,流体通过呈现人字形图案的通道流动,从而造成旋转流并将流体围绕彼此折叠。该方法还可以包括用于流体混合的表面,其中该表面在流体循环期间改变方向。使用SHM生成LNP的方法包括在美国专利公开号 US2004/0262223A1 和 US2012/0276209A1 (它们中的每一篇通过引用整体并入本文) 中公开的方法。

[0863] 在一个实施方案中,可以使用微混合器配制脂质纳米颗粒,诸如,但不限于来自 Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Mainz (德国) 的狭缝叉指式微结构化混合器 (SIMM-V2) 或标准狭缝叉指式微混合器 (SSIMM) 或 Caterpillar (CPMM) 或撞击-喷射 (IJMM)。在一个实施方案中,使用微流体技术产生脂质纳米颗粒 (参见, Whitesides (2006) *Nature*. 442:368-373; 和 Abraham 等人. (2002) *Science*. 295:647-651; 它们中的每一篇通过引用整体并入本文)。作为一个非限制性实例,受控微流体制剂包括一种用于在低雷诺数下混合微通道中稳定的压力驱动流的被动方法 (参见,例如, Abraham 等人. (2002) *Science*. 295:647651; 其通过引用整体并入本文)。

[0864] 在一个实施方案中,本发明的 circRNA 可以配制在使用微混合器芯片产生的脂质纳米颗粒中,诸如,但不限于来自 Harvard Apparatus (Holliston, MA)、Dolomite Microfluidics (Royston, 英国) 或 Precision Nanosystems (Van Couver, BC, 加拿大) 的微混合器芯片。微混合器芯片可以用于通过分离和重新组合机制快速混合两个或更多个流体流。

[0865] 在某些实施方案中,本公开内容的 LNP 包含摩尔比在约 40% 至约 60% 之间的可电离脂质、摩尔比在约 3.5% 至约 14% 之间的辅助脂质、摩尔比在约 28% 至约 50% 之间的结构脂质、以及摩尔比在约 0.5% 至约 5% 之间的 PEG-脂质,包括所有端点。在某些实施方案中,在 LNP 中的可电离脂质、辅助脂质、结构脂质和 PEG-脂质的总摩尔百分比为 100%。

[0866] 在某些实施方案中,在 LNP 中的可电离脂质的摩尔比是在 LNP 中存在的总脂质的约 40% 至约 60%。在某些实施方案中,在 LNP 中的可电离脂质的摩尔比是在 LNP 中存在的总脂质的约 40%、约 41%、约 42%、约 43%、约 44%、约 45%、约 46%、约 47%、约 48%、约 49%、约 50%、约 51%、约 52%、约 53%、约 54%、约 55%、约 56%、约 57%、约 58%、约 59% 或约 60%。

在某些实施方案中,所述可电离脂质由式(7)表示。在某些实施方案中,所述可电离脂质由式(8)表示。所有值均包含所有端点。

[0867] 在某些实施方案中,在LNP中的辅助脂质的摩尔比是在LNP中存在的总脂质的约3.5%至约14%。在某些实施方案中,在LNP中的辅助脂质的摩尔比是在LNP中存在的总脂质的约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%或约14%。在某些实施方案中,所述辅助脂质是DSPC。在某些实施方案中,所述辅助脂质是DOPE。所有值均包含所有端点。

[0868] 在某些实施方案中,在LNP中的结构脂质的摩尔比是在LNP中存在的总脂质的约28%至约50%。在某些实施方案中,在LNP中的结构脂质的摩尔比是在LNP中存在的总脂质的约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%或约50%。在某些实施方案中,所述结构脂质是胆固醇。所有值均包含所有端点。

[0869] 在某些实施方案中,在LNP中的PEG-脂质的摩尔比是在LNP中存在的总脂质的约0.5%至约5%。在某些实施方案中,在LNP中的PEG-脂质的摩尔比是在LNP中存在的总脂质的约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2.0%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3.0%、约3.1%、约3.2%、约3.3%、约3.4%、约3.5%、约4.0%、约4.5%或约5%。在某些实施方案中,所述PEG-脂质是DSPE-PEG(2000)。在某些实施方案中,所述PEG-脂质是DMG-PEG(2000)。所有值均包含所有端点。

[0870] 在某些实施方案中,在LNP中的可电离脂质:辅助脂质:结构脂质:PEG-脂质的摩尔比是约45:9:44:2。在某些实施方案中,在LNP中的可电离脂质:辅助脂质:结构脂质:PEG-脂质的摩尔比是约50:10:38.5:1.5。在某些实施方案中,在LNP中的可电离脂质:辅助脂质:结构脂质:PEG-脂质的摩尔比是约41:12:45:2。在某些实施方案中,在LNP中的可电离脂质:辅助脂质:结构脂质:PEG-脂质的摩尔比是约62:4:33:1。在某些实施方案中,在LNP中的可电离脂质:辅助脂质:结构脂质:PEG-脂质的摩尔比是约53:5:41:1。在某些实施方案中,可电离脂质、辅助脂质、结构脂质和PEG-脂质中的每一种的摩尔比是在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%或0.01%内。

[0871] 在一个实施方案中,所述脂质纳米颗粒可以具有约10至约100nm的直径,诸如,但不限于约10至约20nm、约10至约30nm、约10至约40nm、约10至约50nm、约10至约60nm、约10至约70nm、约10至约80nm、约10至约90nm、约20至约30nm、约20至约40nm、约20至约50nm、约20至约60nm、约20至约70nm、约20至约80nm、约20至约90nm、约20至约100nm、约30至约40nm、约30至约50nm、约30至约60nm、约30至约70nm、约30至约80nm、约30至约90nm、约30至约100nm、约40至约50nm、约40至约60nm、约40至约70nm、约40至约80nm、约40至约90nm、约40至约100nm、约50至约60nm、约50至约70nm、约50至约80nm、约50至约90nm、约50至约100nm、约60至约70nm、约60至约80nm、约60至约90nm、约60至约100nm、约70至约80nm、约70至约90nm、约70至约100nm、约80至约90nm、约80至约100nm和/或约90至约100nm。在一个实施方案中,所述脂质纳米颗粒可以具有约10至500nm的直径。在一个实施方案中,所述脂质纳米颗粒可以具

有大于100nm、大于150nm、大于200nm、大于250nm、大于300nm、大于350nm、大于400nm、大于450nm、大于500nm、大于550nm、大于600nm、大于650nm、大于700nm、大于750nm、大于800nm、大于850nm、大于900nm、大于950nm或大于1000nm的直径。每种可能性代表本发明的一个单独实施方案。

[0872] 在某些实施方案中,纳米颗粒(例如,脂质纳米颗粒)具有10-500nm、20-400nm、30-300nm或40-200nm的平均直径。在某些实施方案中,纳米颗粒(例如,脂质纳米颗粒)具有50-150nm、50-200nm、80-100nm或80-200nm的平均直径。

[0873] 在某些实施方案中,本文描述的脂质纳米颗粒可以具有从低于0.1 μ m到至多1mm的直径,诸如,但不限于小于0.1 μ m、小于1.0 μ m、小于5 μ m、小于10 μ m、小于15 μ m、小于20 μ m、小于25 μ m、小于30 μ m、小于35 μ m、小于40 μ m、小于50 μ m、小于55 μ m、小于60 μ m、小于65 μ m、小于70 μ m、小于75 μ m、小于80 μ m、小于85 μ m、小于90 μ m、小于95 μ m、小于100 μ m、小于125 μ m、小于150 μ m、小于175 μ m、小于200 μ m、小于225 μ m、小于250 μ m、小于275 μ m、小于300 μ m、小于325 μ m、小于350 μ m、小于375 μ m、小于400 μ m、小于425 μ m、小于450 μ m、小于475 μ m、小于500 μ m、小于525 μ m、小于550 μ m、小于575 μ m、小于600 μ m、小于625 μ m、小于650 μ m、小于675 μ m、小于700 μ m、小于725 μ m、小于750 μ m、小于775 μ m、小于800 μ m、小于825 μ m、小于850 μ m、小于875 μ m、小于900 μ m、小于925 μ m、小于950 μ m、小于975 μ m。

[0874] 在另一个实施方案中,LNP可以具有约1nm至约100nm、约1nm至约10nm、约1nm至约20nm、约1nm至约30nm、约1nm至约40nm、约1nm至约50nm、约1nm至约60nm、约1nm至约70nm、约1nm至约80nm、约1nm至约90nm、约5nm至约100nm、约5nm至约10nm、约5nm至约20nm、约5nm至约30nm、约5nm至约40nm、约5nm至约50nm、约5nm至约60nm、约5nm至约70nm、约5nm至约80nm、约5nm至约90nm、约10至约50nm、约20至约50nm、约30至约50nm、约40至约50nm、约20至约60nm、约30至约60nm、约40至约60nm、约20至约70nm、约30至约70nm、约40至约70nm、约50至约70nm、约60至约70nm、约20至约80nm、约30至约80nm、约40至约80nm、约50至约80nm、约60至约80nm、约20至约90nm、约30至约90nm、约40至约90nm、约50至约90nm、约60至约90nm和/或约70至约90nm的直径。每种可能性代表本发明的一个单独实施方案。

[0875] 纳米颗粒组合物可能是相对均匀的。多分散性指数可以用于指示纳米颗粒组合物的均匀性,例如纳米颗粒组合物的粒度分布。小(例如,小于0.3)多分散性指数通常指示狭窄的粒度分布。纳米颗粒组合物可以具有约0至约0.25的多分散性指数,诸如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在某些实施方案中,纳米颗粒组合物的多分散性指数可以为约0.10至约0.20。每种可能性代表本发明的一个单独实施方案。

[0876] 纳米颗粒组合物的 ζ 电位可以用于指示所述组合物的电动电位。例如, ζ 电位可以描述纳米颗粒组合物的表面电荷。具有相对低的电荷(正电荷或负电荷)的纳米颗粒组合物通常是合乎需要的,因为带更高电荷的物质可能与细胞、组织和体内的其它元件不希望地相互作用。在某些实施方案中,纳米颗粒组合物的 ζ 电位可以为约-20mV至约+20mV、约-20mV至约+15mV、约-20mV至约+10mV、约-20mV至约+5mV、约-20mV至约0mV、约-20mV至约-5mV、约-20mV至约-10mV、约-20mV至约-15mV约-20mV至约+20mV、约-20mV至约+15mV、约-20mV至约+10mV、约-20mV至约+5mV、约-20mV至约0mV、约0mV至约+20mV、约0mV至约+15mV、约0mV至约+10mV、约0mV至约+5mV、约+5mV至约+20mV、约+5mV至约+15mV或约+5mV至约+10mV。每种可能

性代表本发明的一个单独实施方案。

[0877] 治疗剂的包封效率描述了相对于提供的初始量,在制备后被包封或以其它方式与纳米颗粒组合物结合的治疗剂的量。希望包封效率高(例如接近100%)。例如,通过对比在用一种或多种有机溶剂或去污剂分解纳米颗粒组合物之前和之后含有纳米颗粒组合物的溶液中治疗剂的量,可以测量包封效率。荧光可以用于测量在溶液中的游离治疗剂(例如,核酸)的量。对于本文描述的纳米颗粒组合物,治疗剂的包封效率可以为至少50%,例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在某些实施方案中,所述包封效率可以为至少80%。在某些实施方案中,所述包封效率可以为至少90%。每种可能性代表本发明的一个单独实施方案。在某些实施方案中,所述脂质纳米颗粒具有小于0.4的多样性值。在某些实施方案中,所述脂质纳米颗粒在中性pH具有净中性电荷。在某些实施方案中,所述脂质纳米颗粒具有50-200nm的平均直径。

[0878] 脂质纳米颗粒制剂的性质可能受多种因素影响,所述因素包括但不限于阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和度、非阳离子脂质组分的选择、非阳离子脂质饱和度、结构脂质组分的选择、PEG化的性质、所有组分的比例以及生物物理学参数诸如尺寸。如本文描述的,PEG脂质组分的纯度对LNP的性能和表现也是重要的。

[0879] F. 脂质纳米颗粒(LNP)的方法

[0880] 在一个实施方案中,可以通过在国际公开号W02011127255或W02008103276(它们中的每一篇通过引用整体并入本文)中描述的方法来制备脂质纳米颗粒制剂。在某些实施方案中,脂质纳米颗粒制剂可以描述于国际公开号W02019131770(其通过引用整体并入本文)中。

[0881] 在某些实施方案中,根据在美国专利申请15/809,680中描述的方法配制环状RNA。在某些实施方案中,本发明提供了一种将环状RNA包封在转移媒介物中的方法,所述方法包括以下步骤:将脂质形成为预形成的转移媒介物(即在没有RNA存在下形成),并然后将预形成的转移媒介物与RNA结合。在某些实施方案中,与未进行预形成脂质纳米颗粒的步骤(例如,将脂质直接与RNA组合)制备的相同RNA制剂相比,新型配制工艺产生在体外和体内均具有更高效能(肽或蛋白表达)和更高效力(生物相关终点的改善)的RNA制剂,并且耐受性可能更好。

[0882] 对于RNA的某些阳离子脂质纳米颗粒制剂,为了实现RNA的高包封,必须加热在缓冲液(例如,柠檬酸盐缓冲液)中的RNA。在这些工艺或方法中,需要在配制工艺之前进行加热(即加热单独组分),因为配制后加热(纳米颗粒形成后)不会增加在脂质纳米颗粒中的RNA的包封效率。相反,在本发明的新方法的某些实施方案中,RNA的加热顺序似乎不会影响RNA包封百分比。在某些实施方案中,在配制工艺之前或之后不需要对包含预形成的脂质纳米颗粒的溶液、包含RNA的溶液和包含脂质纳米颗粒包封的RNA的混合溶液中的一种或多种进行加热(即维持在环境温度)。

[0883] 可以将RNA提供在要与脂质溶液混合的溶液中,使得RNA可以被包封在脂质纳米颗粒中。合适的RNA溶液可以是含有不同浓度的待包封RNA的任何水溶液。例如,合适的RNA溶液可以含有处于或大于约0.01mg/ml、0.05mg/ml、0.06mg/ml、0.07mg/ml、0.08mg/ml、0.09mg/ml、0.1mg/ml、0.15mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、

0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml或1.0mg/ml的浓度的RNA。在某些实施方案中,合适的RNA溶液可以含有在约0.01-1.0mg/ml、0.01-0.9mg/ml、0.01-0.8mg/ml、0.01-0.7mg/ml、0.01-0.6mg/ml、0.01-0.5mg/ml、0.01-0.4mg/ml、0.01-0.3mg/ml、0.01-0.2mg/ml、0.01-0.1mg/ml、0.05-1.0mg/ml、0.05-0.9mg/ml、0.05-0.8mg/ml、0.05-0.7mg/ml、0.05-0.6mg/ml、0.05-0.5mg/ml、0.05-0.4mg/ml、0.05-0.3mg/ml、0.05-0.2mg/ml、0.05-0.1mg/ml、0.1-1.0mg/ml、0.2-0.9mg/ml、0.3-0.8mg/ml、0.4-0.7mg/ml或0.5-0.6mg/ml的范围内的浓度的RNA。

[0884] 通常,合适的RNA溶液还可以含有缓冲剂和/或盐。通常,缓冲剂可以包括HEPES、Tris、硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾或磷酸钠。在某些实施方案中,合适的缓冲剂浓度可以是在约0.1mM至100mM、0.5mM至90mM、1.0mM至80mM、2mM至70mM、3mM至60mM、4mM至50mM、5mM至40mM、6mM至30mM、7mM至20mM、8mM至15mM或9至12mM的范围内。

[0885] 示例性的盐可以包括氯化钠、氯化镁和氯化钾。在某些实施方案中,在RNA溶液中的合适盐浓度可以是在约1mM至500mM、5mM至400mM、10mM至350mM、15mM至300mM、20mM至250mM、30mM至200mM、40mM至190mM、50mM至180mM、50mM至170mM、50mM至160mM、50mM至150mM或50mM至100mM的范围内。

[0886] 在某些实施方案中,合适的RNA溶液可以具有在约3.5-6.5、3.5-6.0、3.5-5.5、3.5-5.0、3.5-4.5、4.0-5.5、4.0-5.0、4.0-4.9、4.0-4.8、4.0-4.7、4.0-4.6或4.0-4.5的范围内的pH。

[0887] 可以使用各种方法来制备适用于本发明的RNA溶液。在某些实施方案中,可以将RNA直接溶解在本文描述的缓冲溶液中。在某些实施方案中,可以通过将RNA储备溶液与缓冲溶液混合来生成RNA溶液,然后与脂质溶液混合进行包封。在某些实施方案中,可以通过将RNA储备溶液与缓冲溶液混合来生成RNA溶液,然后立即与脂质溶液混合进行包封。

[0888] 根据本发明,脂质溶液含有适合形成用于包封RNA的转移媒介物的脂质的混合物。在某些实施方案中,合适的脂质溶液是基于乙醇的。例如,合适的脂质溶液可以含有溶解在纯乙醇(即100%乙醇)中的期望脂质的混合物。在另一个实施方案中,合适的脂质溶液是基于异丙醇的。在另一个实施方案中,合适的脂质溶液是基于二甲亚砜的。在另一个实施方案中,合适的脂质溶液是合适溶剂的混合物,包括但不限于乙醇、异丙醇和二甲亚砜。

[0889] 合适的脂质溶液可以含有不同浓度的期望脂质的混合物。在某些实施方案中,合适的脂质溶液可以含有期望脂质的混合物,其总浓度在约0.1-100mg/ml、0.5-90mg/ml、1.0-80mg/ml、1.0-70mg/ml、1.0-60mg/ml、1.0-50mg/ml、1.0-40mg/ml、1.0-30mg/ml、1.0-20mg/ml、1.0-15mg/ml、1.0-10mg/ml、1.0-9mg/ml、1.0-8mg/ml、1.0-7mg/ml、1.0-6mg/ml或1.0-5mg/ml的范围内。

[0890] G. 脂质体

[0891] 在某些实施方案中,本文公开了脂质体或其它脂质双层囊泡,并且其可以用作组分或用作整个转移媒介物,以促进或增强环状RNA向一个或多个靶细胞的递送和释放。脂质体通常特征在于具有通过一个或多个双层膜与外部介质隔离的内部空间,从而形成微囊或囊泡。脂质体的双层膜通常由脂质形成,即包含在空间上分离的疏水结构域或亲水结构域的合成或天然来源的两亲性分子(Lasic, D, 和Papahadjopoulos, D., 编. *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier, 阿姆斯特丹, 1998)。

[0892] 在某些实施方案中,所述环状RNA被包封,或者可以使用各种方法制备脂质体,包括但不限于机械分散、溶剂分散和/或去污剂去除。这些方法中的每一种都包括从有机溶剂中干燥脂质、将脂质分散在水性介质中、调整脂质体的大小和纯化脂质体悬浮液的步骤(Gomez等人,ACS Omega.2019.4(6):10866-10876)。在Akbarzadeh等人,Nanoscale Res Lett.2013;8(1):102中可以找到各种其它脂质体制备方法。在某些实施方案中,可以被动地(即环状RNA在脂质体形成期间被包封)或主动地(即在脂质体形成之后)加载所述环状RNA。

[0893] 在某些实施方案中,本文公开的脂质体可以包含一个或多个双层。在某些实施方案中,所述脂质体可以包含多层囊泡或单层囊泡。

[0894] 在某些实施方案中,本文描述的脂质体包含天然地衍生的或经工程改造的磷脂。在某些实施方案中,所述脂质体可以进一步包含有助于整体脂质体结构稳定性的PEG-脂质。可以使用其它改进,包括但不限于皮质类固醇和其它类固醇,以帮助维持脂质体的结构和稳定性。

[0895] H. 树枝状聚合物

[0896] 在某些实施方案中,用于运输环状RNA的转移媒介物包含树枝状聚合物。“树枝状聚合物”的使用描述了转移媒介物的结构基序。在某些实施方案中,所述树枝状聚合物包括但不限于含有内部核心和从内部核心延伸或伸出的一个或多个层(即代)。在某些实施方案中,所述代可以含有一个或多个分支点和附着至最外代的末端基团的外表面。在某些实施方案中,所述分支点可能大部分是单分散的,并且含有围绕内部核心构建的对称分支单元。

[0897] 树枝状聚合物的合成可以包括发散法、收敛生长、超核和分支单体生长、双指数生长、乐高化学、点击化学以及本领域中可用的其它方法(Mendes L.等人,Molecules.2017.22(9):1401进一步描述了这些方法)。

[0898] I. 基于聚合物的递送

[0899] 在某些实施方案中,如本文描述的,环状RNA多核苷酸的转移媒介物包含聚合物纳米颗粒。在某些实施方案中,所述聚合物纳米颗粒包括纳米囊和纳米球。在某些实施方案中,纳米囊由聚合物壳包围的油性核心组成。在某些实施方案中,所述环状RNA被包含在核心内,并且所述聚合物壳控制环状RNA的释放。另一方面,纳米球包含连续的聚合物网络,其中环状RNA被保留或吸收到表面上。在某些实施方案中,使用阳离子聚合物来包封环状RNA,因为阳离子与带负电荷的核酸和细胞膜之间具有有利的静电相互作用。

[0900] 可以通过多种方法制备聚合物纳米颗粒。在某些实施方案中,可以通过纳米沉淀、乳液技术、溶剂蒸发、溶剂扩散、反向盐析或本领域中可用的其它方法来制备聚合物纳米颗粒。

[0901] J. 聚合物-脂质杂合体

[0902] 在某些实施方案中,如本文描述的,环状RNA多核苷酸的转移媒介物包含聚合物-脂质杂合体纳米颗粒(LPHNP)。在某些实施方案中,所述LPHNP包含被包裹在脂质双层内的聚合物核心。在某些实施方案中,所述聚合物核心包封环状RNA多核苷酸。在某些实施方案中,所述LPHNP进一步包含外脂质双层。在某些实施方案中,该外脂质双层包含PEG-脂质、辅助脂质、胆固醇或本领域已知的其它分子,以帮助基于脂质的纳米颗粒中的稳定性。最靠近聚合物核心的脂质双层会减轻在LPHNP形成过程中包裹的环状RNA的损失,并通过阻止水从

转移媒介物外部扩散到聚合物核心中来防止聚合物核心的降解 (Mukherjee 等人, In J.Nanomedicine.2019;14:1937-1952)。

[0903] 有多种开发和配制LPHNP的方法。在某些实施方案中,使用本领域中可用的一步法或两步法开发LPHNP。在某些实施方案中,用于形成LPHNP的一步法是通过纳米沉淀或乳化-溶剂蒸发。在某些实施方案中,所述两步法包括纳米沉淀、乳化-溶剂蒸发、高压匀浆化或本领域中可用的其它方法。

[0904] K. 基于肽的递送

[0905] 在某些实施方案中,可以使用基于肽的递送机制来运输环状RNA。在某些实施方案中,所述基于肽的递送机制包含脂蛋白。基于要递送的药物的大小,脂蛋白可以是低密度脂蛋白 (LDL) 或高密度脂蛋白 (HDL)。如在US8734853B2中所见,高密度脂蛋白能够在体内和在体外运输核酸。

[0906] 在特定实施方案中,所述脂质组分包括胆固醇。在更具体的实施方案中,所述脂质组分包括胆固醇和胆固醇油酸盐的组合。

[0907] HDL-核酸颗粒可以是任意尺寸,但在特定实施方案中,颗粒具有约100埃至约500埃的分子尺寸。在更具体的实施方案中,颗粒具有约100埃至约300埃的分子尺寸。该尺寸可能取决于掺入颗粒中的核酸组分的尺寸。

[0908] HDL-核酸颗粒可以具有宽分子量范围。重量取决于在颗粒中掺入的核酸的尺寸。例如,在某些实施方案中,所述颗粒具有约100,000道尔顿至约1,000,000道尔顿之间的分子量。在更具体的实施方案中,所述颗粒具有约100,000道尔顿至约500,000道尔顿之间的分子量。在具体实施方案中,所述颗粒具有约100,000道尔顿至约300,000道尔顿之间的分子量。

[0909] 本发明的HDL-核酸颗粒可以通过不同的方法制备。例如,可以通过将核酸与由连续的带正电荷的氨基酸组成的肽或多肽组合来中和核酸(例如,siRNA)。例如,如以上所讨论的,氨基酸序列可以包括2个或更多个连续的赖氨酸残基。氨基酸序列的正电荷中和带负电荷的核酸分子。然后可以使用Lacko等人(2002)描述的方法将核酸包封在HDL颗粒中。

[0910] L. 碳水化合物载体

[0911] 在某些实施方案中,可以使用碳水化合物载体或糖-纳米囊来运输环状RNA多核苷酸。在某些实施方案中,所述碳水化合物载体包含糖修饰的纳米颗粒、肽-和糖-缀合的树枝状聚合物、基于多糖的纳米颗粒和本领域中可用的其它基于碳水化合物的载体。如本文描述的,碳水化合物分子的掺入可以通过合成方式进行。

[0912] 在某些实施方案中,所述碳水化合物载体包含多糖。这些多糖可能由靶细胞的微生物细胞壁制成。例如,由甘露聚糖碳水化合物构成的碳水化合物载体已经被证明成功地递送mRNA (Son等人, Nano Lett. 2020.20(3):1499-1509)。

[0913] M. 聚糖修饰的纳米颗粒/糖纳米颗粒

[0914] 在某些实施方案中,如本文所提供的,环状RNA的转移媒介物是糖纳米颗粒 (GlycoNP)。如本领域已知的,糖纳米颗粒包含由金、氧化铁、半导体纳米颗粒或其组合构成的核心。在某些实施方案中,使用碳水化合物对糖纳米颗粒进行官能化。在某些实施方案中,所述糖纳米颗粒包含碳纳米管或石墨烯。在一个实施方案中,所述糖纳米颗粒包含基于多糖的GlycoNP(例如,基于壳聚糖的GlycoNP)。在某些实施方案中,所述糖纳米颗粒是糖树

状聚合物。

[0915] 7. 蛋白和IRES的组合

[0916] 在某些实施方案中,如本文所提供的,可以通过使用在翻译起始元件(TIE)内的特定内核糖体进入位点(IRES)来优化由环状RNA多核苷酸编码的有效负载。在某些实施方案中,在环状RNA内的IRES特异性可以显著增强在编码元件内编码的特定蛋白的表达。

[0917] 8. 靶向

[0918] A. 靶向方法

[0919] 本发明还考虑通过被动和主动靶向手段对靶细胞和组织进行区别性靶向。被动靶向现象利用了体内转移媒介物的自然分布模式,而不依赖于使用另外的赋形剂或方式来增强靶细胞对转移媒介物的识别。例如,受到网状内皮系统细胞吞噬作用的转移媒介物可能在肝脏或脾脏中积聚,并因此可以提供被动引导组合物递送至这样的靶细胞的方法。

[0920] 可替换地,本发明考虑主动靶向,其涉及使用可以与转移媒介物结合(共价地或非共价地)的靶向部分,以促进这样的转移媒介物定位在某些靶细胞或靶组织处。例如,可以通过在转移媒介物内部或表面上包括一个或多个内源性靶向部分来介导靶向,以促进向靶细胞或组织的分布。靶组织对靶向部分的识别主动促进转移媒介物和/或其内容物在靶细胞和组织中的组织分布和细胞摄取(例如,在转移媒介物内部或表面上包含载脂蛋白-E靶向配体会促进转移媒介物与肝细胞表达的内源性低密度脂蛋白受体的识别和结合)。如本文所提供的,所述组合物可以包含能够增强组合物对靶细胞的亲和力的部分。靶向部分可以在配制期间或配制后连接到脂质颗粒的外双层。这些方法是本领域众所周知的。此外,某些脂质颗粒制剂可以采用融合聚合物,诸如PEAA、血凝素、其它脂肽(参见美国专利申请系列号08/835,281,和60/083,294,它们通过引用并入本文)以及可用于体内和/或细胞内递送的其它特征。在其它某些实施方案中,本发明的组合物表现出改善的转染效率,和/或表现出增强的对靶细胞或目标组织的选择性。因此,考虑包含一种或多种部分(例如,肽、适体、寡核苷酸、维生素或其它分子)的组合物,所述部分能够增强组合物及其核酸内容物对靶细胞或组织的亲和力。合适的部分可以任选地结合或连接到转移媒介物的表面。在某些实施方案中,所述靶向部分可以跨越转移媒介物的表面或被包封在转移媒介物内。基于其物理、化学或生物学性能(例如选择性亲和力和/或靶细胞表面标志物或特征的识别)选择合适的部分。细胞特异性的靶位点及其相应的靶向配体可以宽泛地变化。选择合适的靶向部分,以利用靶细胞的独特特征,从而使组合物能够区分靶细胞和非靶细胞。例如,本发明的组合物可以包括表面标志物(例如,载脂蛋白-B或载脂蛋白-E),其选择性地增强对肝细胞的识别或亲和力(例如,通过受体介导的对这样的表面标志物的识别和结合)。作为一个实例,半乳糖作为靶向部分的使用预计会将本发明的组合物引导至实质肝细胞,或者可替换地含甘露糖的糖残基作为靶向配体的使用预计会将本发明的组合物引导至肝内皮细胞(例如,含甘露糖的糖残基,其可以优先结合在肝细胞中存在的无唾液酸糖蛋白受体)。(参见Hillery A M,等人.“Drug Delivery and Targeting:For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists”(2002)Taylor&Francis,Inc.)。因此,已经与在转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)中存在的部分缀合的这样的靶向部分的呈现有利于本发明的组合物在靶细胞和组织中的识别和摄取。合适的靶向部分的实例包括一种或多种肽、蛋白、适体、维生素和寡核苷酸。

[0921] 在特定实施方案中,转移媒介物包含靶向部分。在某些实施方案中,所述靶向部分选择性地介导受体介导的胞吞作用进入特定的细胞群体中。在某些实施方案中,所述靶向部分能够结合T细胞抗原。在某些实施方案中,所述靶向部分能够结合NK、NKT或巨噬细胞抗原。在某些实施方案中,所述靶向部分能够结合选自CD3、CD4、CD8、PD-1、4-1BB和CD2的蛋白。在某些实施方案中,所述靶向部分是单链Fv(scFv)片段、纳米抗体、肽、基于肽的大环、微体(minibody)、重链可变区、轻链可变区或其片段。在某些实施方案中,所述靶向部分选自T细胞受体基序抗体、T细胞 α 链抗体、T细胞 β 链抗体、T细胞 γ 链抗体、T细胞 δ 链抗体、CCR7抗体、CD3抗体、CD4抗体、CD5抗体、CD7抗体、CD8抗体、CD11b抗体、CD11c抗体、CD16抗体、CD19抗体、CD20抗体、CD21抗体、CD22抗体、CD25抗体、CD28抗体、CD34抗体、CD35抗体、CD40抗体、CD45RA抗体、CD45RO抗体、CD52抗体、CD56抗体、CD62L抗体、CD68抗体、CD80抗体、CD95抗体、CD117抗体、CD127抗体、CD133抗体、CD137(4-1BB)抗体、CD163抗体、F4/80抗体、IL-4R α 抗体、Sca-1抗体、CTLA-4抗体、GITR抗体GARP抗体、LAP抗体、粒酶B抗体、LFA-1抗体、转铁蛋白受体抗体、及其片段。在某些实施方案中,所述靶向部分是淋巴细胞上的胞外酶的小分子结合剂。胞外酶的小分子结合剂包括A2A抑制剂CD73抑制剂、CD39或腺苷(adesines)受体A2aR和A2bR。潜在的小分子包括AB928。

[0922] 在某些实施方案中,如在Shobaki N,Sato Y,Harashima H.Mixing lipids to manipulate the ionization status of lipid nanoparticles for specific tissue targeting.Int J Nanomedicine.2018;13:8395-8410(2018年12月10日出版)中所述配制和/或靶向转移媒介物。在某些实施方案中,转移媒介物由3种脂质类型组成。在某些实施方案中,转移媒介物由4种脂质类型组成。在某些实施方案中,转移媒介物由5种脂质类型组成。在某些实施方案中,转移媒介物由6种脂质类型组成。

[0923] B. 靶细胞

[0924] 在需要将核酸递送至免疫细胞的情况下,免疫细胞表示靶细胞。在某些实施方案中,本发明的组合物以有区别的方式转染靶细胞(即,不会转染非靶细胞)。本发明的组合物还可以制备成优先靶向多种靶细胞,包括但不限于T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞。

[0925] 在某些实施方案中,所述靶细胞缺乏感兴趣的蛋白或酶。例如,在需要将核酸递送至肝细胞的情况下,肝细胞表示靶细胞。在某些实施方案中,本发明的组合物以有区别的方式转染靶细胞(即,不会转染非靶细胞)。本发明的组合物还可以制备成优先靶向多种靶细胞,所述靶细胞包括但不限于肝细胞、上皮细胞、造血细胞、上皮细胞、内皮细胞、肺细胞、骨细胞、干细胞、间充质细胞、神经细胞(例如,脑膜、星形胶质细胞、运动神经元、背根神经节细胞和前角运动神经元)、感光细胞(例如,视杆细胞和视锥细胞)、视网膜色素上皮细胞、分泌细胞、心脏细胞、脂肪细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、 β 细胞、垂体细胞、滑膜内衬细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、成纤维细胞、B细胞、T细胞、网织红细胞、白细胞、粒细胞和肿瘤细胞。

[0926] 本发明的组合物可以制备成优先分布至诸如在心脏、肺、肾、肝和脾中的靶细胞。在某些实施方案中,本发明的组合物分布到肝脏或脾脏的细胞中,以促进其中包含的circRNA的递送并随后由肝脏细胞(例如,肝细胞)或脾细胞(例如,免疫细胞)表达。靶向的细胞可以充当生物“储库”或“贮库”,其能够产生并系统地排泄功能性蛋白或酶。因此,在本发明的一个实施方案中,转移媒介物可以靶向肝细胞或免疫细胞和/或在递送后优先分布

到肝脏或脾脏的细胞。在一个实施方案中,在转染目标肝细胞或免疫细胞后,在媒介物中加载的circRNA被翻译并产生、排泄和全身分布的功能性蛋白产物。在其它实施方案中,除肝细胞之外的细胞(例如,肺、脾、心脏、眼或中枢神经系统的细胞)可以充当蛋白产生的储存位置。

[0927] 在一个实施方案中,本发明的组合物促进受试者对一种或多种功能性蛋白和/或酶的内源性产生。在本发明的一个实施方案中,转移媒介物包含编码缺陷蛋白或酶的circRNA。在这样的组合物分布到靶组织并随后转染这样的靶细胞后,加载到转移媒介物(例如,脂质纳米颗粒)中的外源性circRNA可以在体内翻译以产生由外源地施用的circRNA编码的功能性蛋白或酶(例如,受试者缺乏的蛋白或酶)。因此,本发明的组合物利用受试者的翻译外源地或重组地制备的circRNA的能力来产生内源地翻译的蛋白或酶,并从而产生(和在适用时排泄)功能性蛋白或酶。表达的或翻译的蛋白或酶还可以通过体内包含天然翻译后修饰来表征,所述修饰通常在重组制备的蛋白或酶中不存在,从而进一步降低翻译的蛋白或酶的免疫原性。

[0928] 编码缺陷蛋白或酶的circRNA的施用会避免将核酸递送至靶细胞内特定细胞器的需要。相反,在转染靶细胞并将核酸递送至靶细胞的细胞质后,转移媒介物的circRNA内容物可以被翻译并表达功能性蛋白或酶。

[0929] 在某些实施方案中,环状RNA包含一个或多个miRNA结合位点。在某些实施方案中,环状RNA包含一个或多个miRNA结合位点,所述位点被存在于一个或多个非靶细胞或非靶细胞类型(例如,库普弗细胞或肝细胞)中但不存在于一个或多个靶细胞或靶细胞类型(例如,肝细胞或T细胞)中的miRNA识别。在某些实施方案中,环状RNA包含一个或多个miRNA结合位点,与一个或多个靶细胞或靶细胞类型(例如,肝细胞或T细胞)相比,所述位点被在一个或多个非靶细胞或非靶细胞类型(例如,库普弗细胞或肝细胞)中以增加的浓度存在的miRNA识别。miRNA被认为通过与RNA分子内的互补序列配对发挥作用,从而导致基因沉默。

[0930] 在某些实施方案中,本发明的组合物以有区别的方式转染或分布至靶细胞(即,不转染非靶细胞)。本发明的组合物还可以制备成优先靶向多种靶细胞,所述靶细胞包括但不限于肝细胞、上皮细胞、造血细胞、上皮细胞、内皮细胞、肺细胞、骨细胞、干细胞、间充质细胞、神经细胞(例如,脑膜、星形胶质细胞、运动神经元、背根神经节细胞和前角运动神经元)、感光细胞(例如,视杆细胞和视锥细胞)、视网膜色素上皮细胞、分泌细胞、心脏细胞、脂肪细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、 β 细胞、垂体细胞、滑膜内衬细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、成纤维细胞、B细胞、T细胞、网织红细胞、白细胞、粒细胞和肿瘤细胞。

[0931] 9. 药物组合物

[0932] 在某些实施方案中,本文提供了包含本文提供的治疗剂的组合物(例如,药物组合物)。在某些实施方案中,所述治疗剂是本文提供的环状RNA多核苷酸。在某些实施方案中,所述治疗剂是本文提供的载体。在某些实施方案中,所述治疗剂是包含本文提供的环状RNA或载体的细胞(例如,人细胞,诸如人T细胞)。在某些实施方案中,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体。在某些实施方案中,本文提供的组合物包含与其它药学活性剂或药物(诸如抗炎药物或能够靶向B细胞抗原的抗体,例如,抗-CD20抗体,例如,利妥昔单抗)组合的本文提供的治疗剂。

[0933] 关于药物组合物,药学上可接受的载体可以是常规使用的那些中的任一种,并且

仅受限于化学物理考虑因素(诸如溶解度和与活性剂的反应性的缺乏)和施用途径。本文描述的药学上可接受的载体,例如,媒介物、辅助剂、赋形剂和稀释剂,是本领域技术人员众所周知的并且易于被公众获得。优选的是,药学上可接受的载体是对治疗剂化学惰性的载体和在使用条件下没有有害的副作用或毒性的载体。

[0934] 载体的选择部分地取决于特定治疗剂,以及用于施用治疗剂的特定方法。因此,本文提供的药物组合物有多种合适的制剂。

[0935] 在某些实施方案中,所述药物组合物包含防腐剂。在某些实施方案中,合适的防腐剂可以包括,例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。任选地,可以使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物的约0.0001重量%至约2重量%的量存在。

[0936] 在某些实施方案中,所述药物组合物包含缓冲剂。在某些实施方案中,合适的缓冲剂可以包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其它酸和盐。可以任选地使用2种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲剂或其混合物通常以总组合物的约0.001重量%至约4重量%的量存在。

[0937] 在某些实施方案中,所述药物组合物中的治疗剂的浓度可以变化,例如,按重量计小于约1%或至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或约50%或更多,并且可以根据所选的特定施用模式主要通过流体体积和粘度来选择。

[0938] 以下用于口服、气雾剂、胃肠外(例如,皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内和鞘内)和局部施用的制剂仅仅是示例性的,并且绝不是限制性的。可以使用超过一种途径施用本文提供的治疗剂,并且在某些情况下,特定途径可以提供比另一种途径更直接和更有效的应答。

[0939] 适合口服施用的制剂可以包含以下或由以下组成:(a)液体溶液,诸如溶解在稀释剂(诸如水、盐水或橙汁)中的有效量的治疗剂;(b)胶囊剂、药囊、片剂、锭剂和糖锭,各自含有预定量的活性成分,作为固体或颗粒;(c)粉剂;(d)在适当的液体中的混悬液;和(e)合适的乳剂。液体制剂可以包括稀释剂,诸如水和醇,例如,乙醇、苯甲醇和聚乙烯醇,其添加或不添加药学上可接受的表面活性剂。胶囊形式可以是普通的硬壳或软壳明胶类型,其含有例如表面活性剂、润滑剂和惰性填充剂,诸如乳糖、蔗糖、磷酸钙和玉米淀粉。片剂形式可以包括下述的一种或多种:乳糖、蔗糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、瓜尔胶、胶体二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸和其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、润湿剂、防腐剂、矫味剂和其它药理学上相容的赋形剂。锭剂形式可以包含治疗剂与调味剂,所述调味剂通常是蔗糖、阿拉伯胶或黄蓍胶。软锭剂可以包含治疗剂与惰性基质,诸如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶、乳剂、凝胶等,此外其还含有诸如本领域已知的赋形剂。

[0940] 适合用于胃肠外施用的制剂包括:水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。在某些实施方案中,本文提供的治疗剂可以在药物载体中的生理上可接受的稀释剂中施用,诸如无菌液体或液体混合物,包括水、盐水、右旋糖水溶液和有关的糖溶液、醇诸如乙醇或十六烷醇、二醇诸如丙二

醇或聚乙二醇、二甲亚砜、甘油、缩酮类诸如2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、醚类、聚(乙二醇)400、油、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯、或乙酰化的脂肪酸甘油酯,添加或不添加药学上可接受的表面活性剂诸如皂或去污剂、助悬剂诸如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素或乳化剂和其它药物辅助剂。

[0941] 在某些实施方案中,可以用在胃肠外制剂中的油包括石油、动物油、植物油或合成的油。油的具体实例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、矿脂和矿物油。用于胃肠外制剂中的合适脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯是合适的脂肪酸酯的实例。

[0942] 用于胃肠外制剂的某些实施方案的合适皂包括脂肪酸碱金属盐、铵盐和三乙醇胺盐,并且合适的去污剂包括(a)阳离子去污剂诸如例如二甲基二烷基铵卤化物和烷基吡啶鎓卤化物,(b)阴离子去污剂诸如例如烷基、芳基和烯烴磺酸盐、烷基、烯烴、醚和甘油单酯硫酸盐和磺基琥珀酸盐,(c)非离子去污剂诸如例如脂肪胺氧化物、脂肪酸烷醇酰胺和聚氧乙烯聚丙烯共聚物,(d)两性去污剂诸如例如烷基- β -氨基丙酸盐和2-烷基-咪唑啉季铵盐和(e)它们的混合物。

[0943] 在某些实施方案中,所述胃肠外制剂将在溶液中含有例如约0.5重量%至约25重量%的治疗剂。可以使用防腐剂和缓冲液。为了最小化或消除在注射部位处的刺激,这样的组合物可以含有一种或多种非离子表面活性剂,其具有例如约12至约17的亲水亲油平衡值(HLB)。在这样的制剂中的表面活性剂的量通常在例如按重量计约5%至约15%的范围内。合适的表面活性剂包括聚乙二醇、脱水山梨糖醇、脂肪酸酯诸如脱水山梨糖醇单油酸酯、以及由环氧丙烷与丙二醇缩合而形成的具有疏水性碱基的环氧乙烷的高分子量加合物。胃肠外制剂可以存在于单位剂量或多剂量密闭容器(诸如安瓿或管形瓶)中,并且可以储存在冷冻干燥(低压冻干)条件下,只需要在即将使用前添加无菌液体赋形剂,例如,注射用水。可以从前面所述种类的无菌粉剂、颗粒和片剂制备即时注射溶液和混悬液。

[0944] 在某些实施方案中,本文提供了可注射制剂。对于可注射组合物的有效药物载体的要求是本领域普通技术人员众所周知的(参见,例如,Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker和Chalmers, 编, 第238-250页(1982), 以及ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 第4版, 第622-630页(1986))。

[0945] 在某些实施方案中,本文提供了局部制剂。局部制剂(包括可用于透皮释放药物的制剂)在本文提供的某些实施方案的情况下适合应用于皮肤。在某些实施方案中,单独的或与其它合适组分组合的治疗剂可以制成气雾剂制剂以通过吸入施用。这些气雾剂制剂可以置于增压的可接受的推进剂(诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等)中。它们也可以配制为用于非加压制备的药物,诸如在喷雾器或雾化器中。这样的喷雾制剂也可以用于喷洒粘膜。

[0946] 在某些实施方案中,本文提供的治疗剂可以配制为包合络合物,诸如环糊精包合络合物或脂质体。脂质体可以用于将治疗剂靶向至特定组织。脂质体也可以用于增加治疗剂的半衰期。许多方法可用于制备脂质体,例如如在Szoka等人, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980) 和美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中所述。

[0947] 在某些实施方案中,本文提供的治疗剂被配制为限时释放、延迟释放或持续释放

递送系统,使得组合物的递送发生在待治疗部位致敏之前并且具有足够的时间以造成待治疗部位的致敏。这样的系统可以避免治疗剂的重复施用,从而增加受试者和医师的便利性,并且可能特别适合于本文提供的某些组合物实施方案。在一个实施方案中,配制本发明的组合物使得它们适合于其中所含的circRNA的延长释放。这样的延长释放组合物可以方便地以延长的施用间隔施用给受试者。例如,在一个实施方案中,每天两次、每天一次或每隔一天向受试者施用本发明的组合物。在一个实施方案中,每周两次、每周一次、每十天一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每六周一次、每八周一次、每三个月一次、每四个月一次、每六个月一次、每八个月一次、每九个月一次或每年一次向受试者施用本发明的组合物。

[0948] 在某些实施方案中,由本发明的多核苷酸编码的蛋白由靶细胞产生持续一段时间。例如,可以在施用后产生所述蛋白超过一小时、超过四小时、超过六小时、超过12小时、超过24小时、超过48小时或超过72小时。在某些实施方案中,所述多肽在施用后约六小时以峰值水平表达。在某些实施方案中,所述多肽的表达至少维持在治疗水平。在某些实施方案中,所述多肽在施用后至少以治疗水平表达超过1小时、超过4小时、超过6小时、超过12小时、超过24小时、超过48小时或超过72小时。在某些实施方案中,所述多肽在患者组织(例如,肝或肺)中以治疗水平检测到。在某些实施方案中,可检测多肽的水平来自施用后超过一小时、超过四小时、超过六小时、超过12小时、超过24小时、超过48小时或超过72小时的时间段内circRNA组合物的连续表达。

[0949] 在某些实施方案中,由本发明的多核苷酸编码的蛋白的产生水平高于正常生理水平。与对照相比,蛋白水平可能增加。在某些实施方案中,所述对照是正常个体或正常个体群体中多肽的基线生理水平。在其它实施方案中,所述对照是缺乏相关蛋白或多肽的个体中多肽的基线生理水平,或缺乏相关蛋白或多肽的个体群体中多肽的基线生理水平。在某些实施方案中,所述对照可以是向其施用所述组合物的个体中相关蛋白或多肽的正常水平。在其它实施方案中,所述对照是在其它治疗干预后多肽的表达水平,例如,在一个或多个相当的时间点直接注射相应的多肽后。

[0950] 在某些实施方案中,由本发明的多核苷酸编码的蛋白的水平在施用后3天、4天、5天或1周或更长时间可检测到。在组织(例如,肝或肺)中可以观察到增加的蛋白水平。

[0951] 在某些实施方案中,所述方法产生了由本发明的多核苷酸编码的蛋白的持续循环半衰期。例如,检测到蛋白的时间可以比通过皮下注射蛋白或编码蛋白的mRNA观察到的半衰期长数小时或数天。在某些实施方案中,所述蛋白的半衰期为1天、2天、3天、4天、5天或1周或更长。

[0952] 许多类型的释放递送系统是本领域普通技术人员可得到的和已知的。它们包括基于聚合物的系统诸如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羧基丁酸和聚酸酐。含有药物的前述聚合物的微胶囊描述于例如美国专利5,075,109中。递送系统也包括:非聚合物系统,其为脂质,包括甾醇诸如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪诸如甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶(sylastic)系统;基于肽的系统;蜡包衣;使用常规粘合剂和赋形剂的压片;部分融合的植入物;等。具体实例包括但不限于:(a)侵蚀系统,其中活性组合物以基质内的形式包含,诸如在美国专利4,452,775、4,667,014、4,748,034和5,239,660中描述的那些;和(b)扩散系统,其中活性组分以受

控速率从聚合物渗透,诸如在美国专利3,832,253和3,854,480中描述的那些。另外,可以使用基于泵的硬件递送系统,其中的一些适合植入。

[0953] 在某些实施方案中,所述治疗剂可以直接地或通过连接部分间接地缀合至靶向部分。将治疗剂缀合至靶向部分的方法是本领域已知的。参见,例如,Wadwa等人,J,Drug Targeting 3:111(1995)和美国专利5,087,616。

[0954] 在某些实施方案中,本文提供的治疗剂被配制成贮库形式,使得治疗剂释放到其所施用的身体内的方式根据在体内的时间和位置受到控制(参见,例如,美国专利4,450,150)。治疗剂的贮库形式可以是例如包含治疗剂和多孔或无孔材料(诸如聚合物)的可植入组合物,其中治疗剂被材料包封或扩散到整个材料中和/或无孔材料降解。然后将贮库植入体内的期望位置,并以预定的速率从植入物中释放治疗剂。

[0955] 10. 治疗方法

[0956] A. 治疗领域和相关的疾病/障碍

[0957] 在某些方面,本文提供了治疗和/或预防病症(例如,自身免疫障碍或癌症)的方法。

[0958] 在某些实施方案中,本文提供的治疗剂与一种或多种另外的治疗剂共同施用(例如,在相同的药物组合物中或在单独的药物组合物中)。在某些实施方案中,可以首先施用本文提供的治疗剂,并可以然后施用一种或多种另外的治疗剂,或反之亦然。可替换地,可以同时施用本文提供的治疗剂和一种或多种另外的治疗剂。

[0959] 在某些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方案中,本文所指的哺乳动物可以是任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目的哺乳动物,诸如小鼠和仓鼠,或兔形目的哺乳动物,诸如兔。所述哺乳动物可以来自食肉目,包括猫科动物(猫)和犬科动物(狗)。所述哺乳动物可以来自偶蹄目,包括牛和猪,或来自奇蹄目,包括马。所述哺乳动物可以属于灵长类动物、猿类或类人猿(猴)或类人猿(人类和猿类)。优选地,哺乳动物是人。

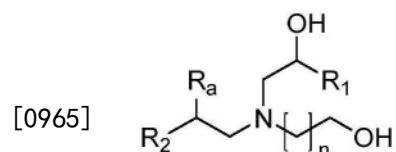
[0960] 11. 另外的实施方案

[0961] 通过下述非限制性的示例性实施方案进一步描述本发明:

[0962] 实施方案1. 一种药物组合物,其包含:

[0963] a. RNA多核苷酸,和

[0964] b. 转移媒介物,其包含由式(13)表示的可电离脂质:



式(13)

[0966] 其中:

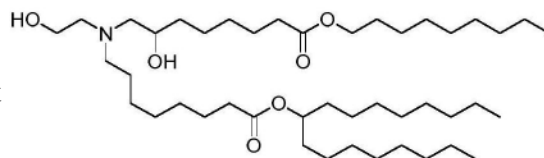
[0967] n 是1至4之间的整数;

[0968] R_a 是氢或羟基;

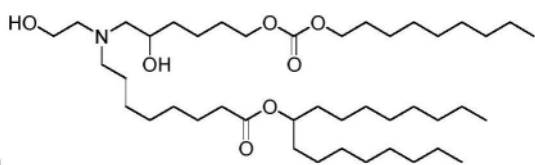
[0969] R_1 和 R_2 各自独立地是直链或支链 C_6 - C_{30} 烷基、 C_6 - C_{30} 烯基或 C_6 - C_{30} 杂烷基,其任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自氧代、卤素、羟基、氰基、烷基、烯基、醛、杂环烷基、羟基烷基、二羟基烷基、羟基烷基氨基烷基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷

基、(杂环基)(烷基)氨基烷基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、炔基、烷氧基、氨基、二烷基氨基、氨基烷基羰基氨基、氨基羰基烷基氨基、(氨基羰基烷基)(烷基)氨基、烯基羰基氨基、羟基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、氨基烷基氨基羰基、烷基氨基烷基氨基羰基、二烷基氨基烷基氨基羰基、杂环基烷基氨基羰基、(烷基氨基烷基)(烷基)氨基羰基、烷基氨基烷基羰基、二烷基氨基烷基羰基、杂环基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亚砷、烷基亚砷烷基、烷基磺酰基和烷基砷烷基；

[0970] 前提条件是,所述可电离脂质不是

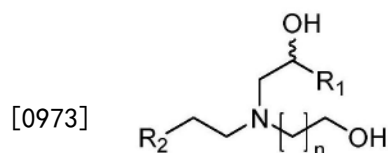


或

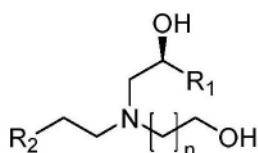


[0971] 实施方案2.实施方案1的药物组合物,其中 R_a 是氢。

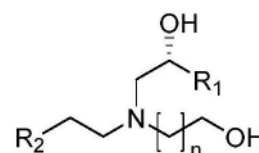
[0972] 实施方案3.实施方案2的药物组合物,其中所述可电离脂质由式(13a-1)、式(13a-2)或式(13a-3)表示:



式(13a-1)



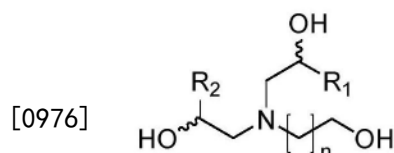
式(13a-2)



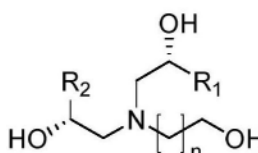
式(13a-3)

[0974] 实施方案4.实施方案1的药物组合物,其中 R_a 是羟基。

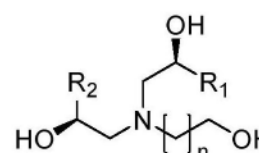
[0975] 实施方案5.实施方案4的药物组合物,其中所述可电离脂质由式(13b-1)、式(13b-2)或式(13b-3)表示:



式(13b-1)

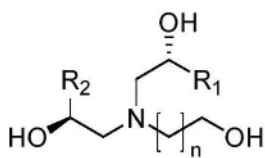


式(13b-2)

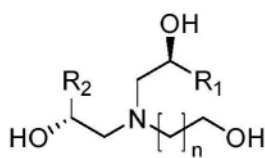


式(13b-3)

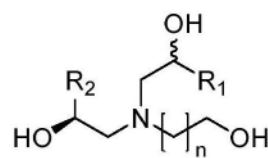
[0977] 实施方案6.实施方案4的药物组合物,其中所述可电离脂质由式(13b-4)、式(13b-5)、式(13b-6)、式(13b-7)、式(13b-8)或式(13b-9)表示:



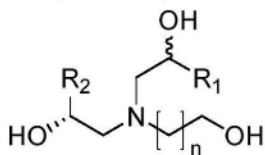
式(13b-4)



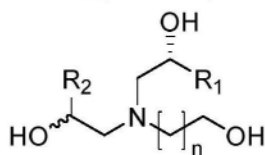
式(13b-5)



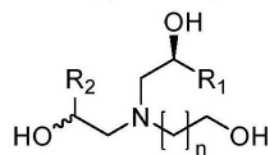
式(13b-6)



式(13b-7)

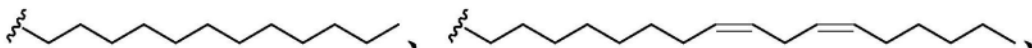


式(13b-8)

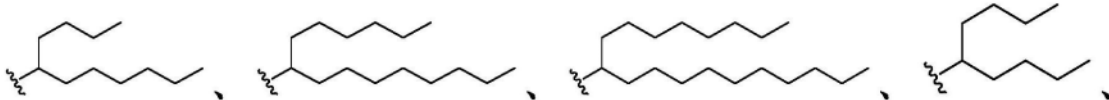


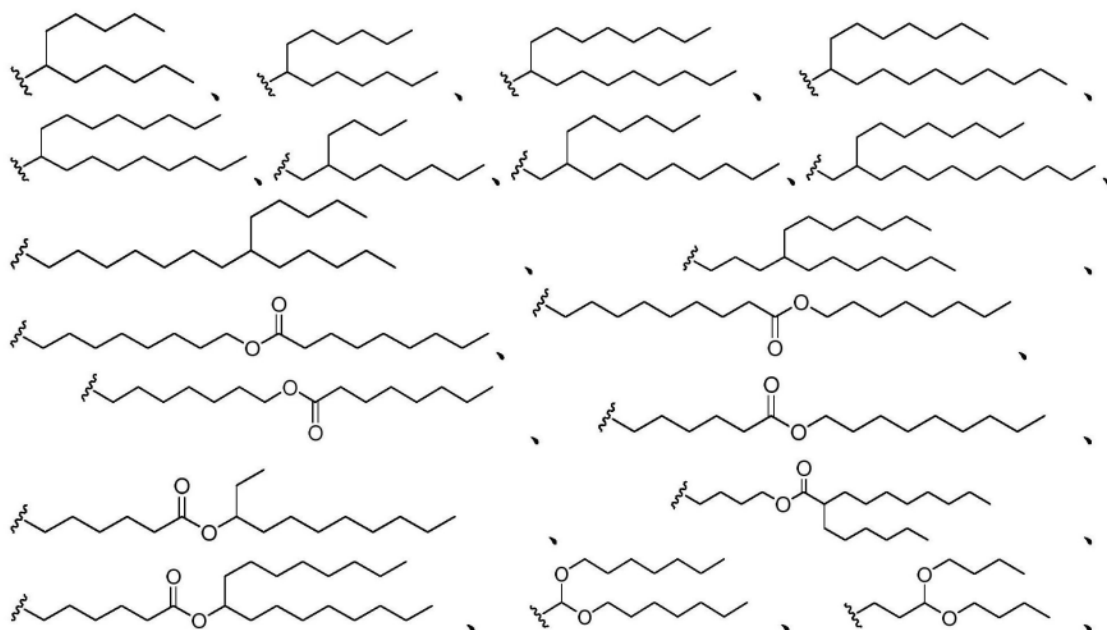
式(13b-9)

[0978]

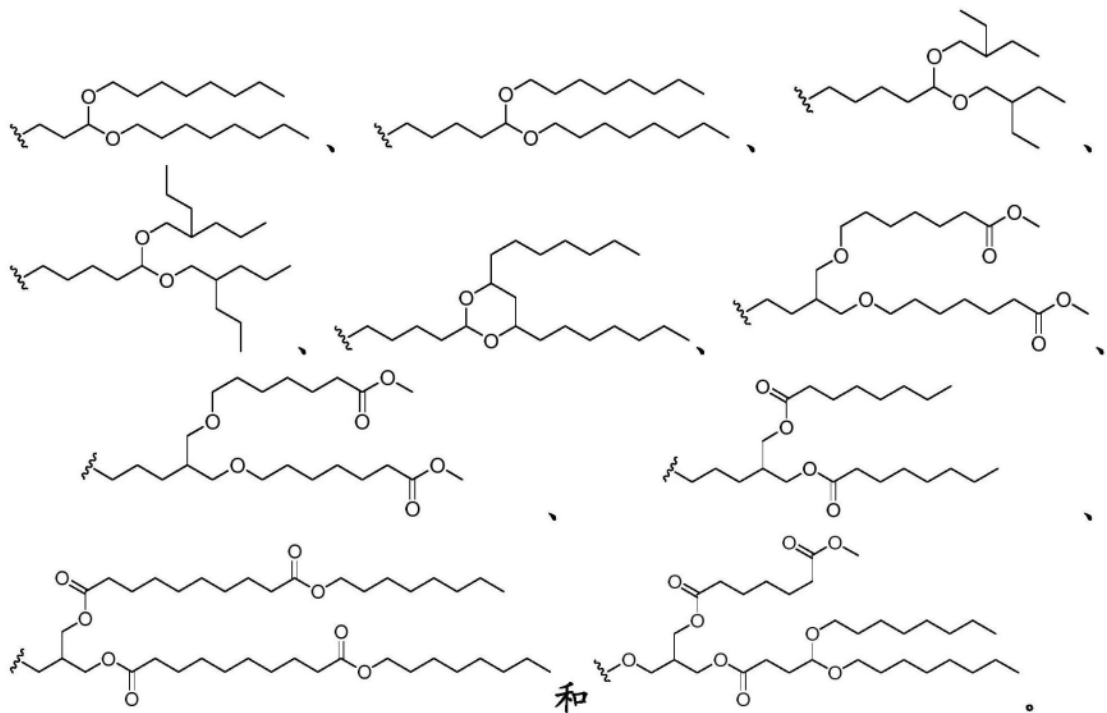
[0979] 实施方案7. 实施方案1-6中的任一个的药物组合物, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地选自:

[0980]

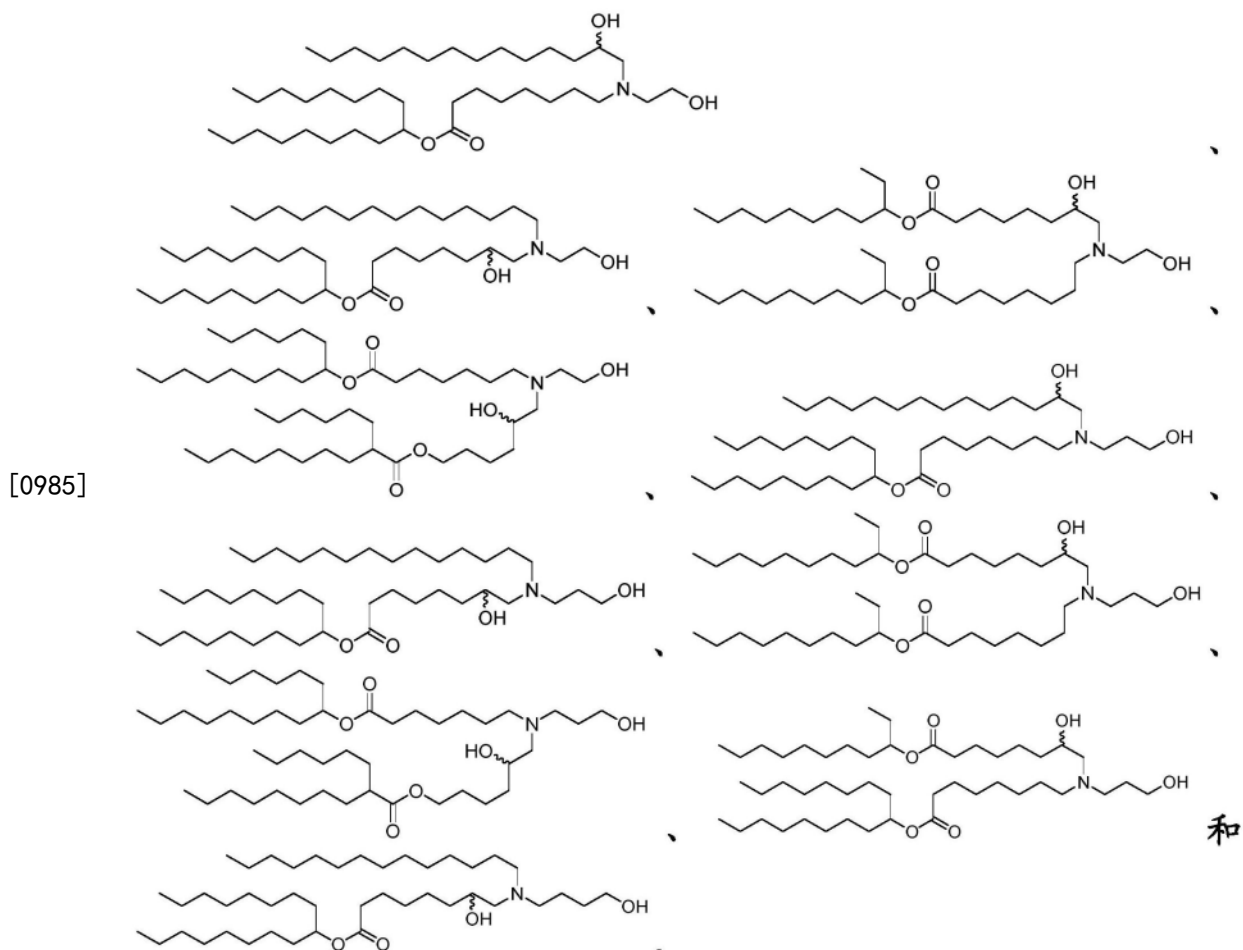




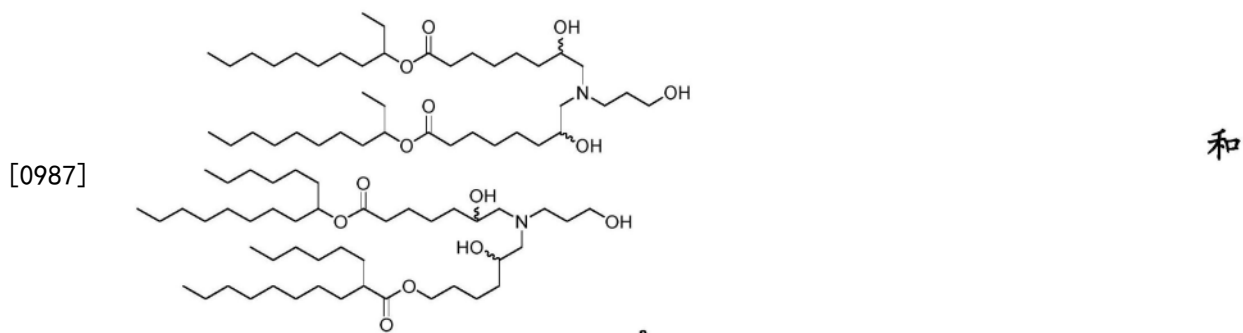
[0981]

[0982] 实施方案8.实施方案1-7中的任一个的药物组合物,其中 R_1 和 R_2 是相同的。[0983] 实施方案9.实施方案1-7中的任一个的药物组合物,其中 R_1 和 R_2 是不同的。

[0984] 实施方案10.实施方案1-9中的任一个的药物组合物,其中所述可电离脂质选自:



[0986] 实施方案11. 实施方案1-9中的任一个的药物组合物, 其中所述可电离脂质选自:



[0988] 实施方案12. 实施方案1-9中的任一个的药物组合物, 其中所述可电离脂质选自表10e。

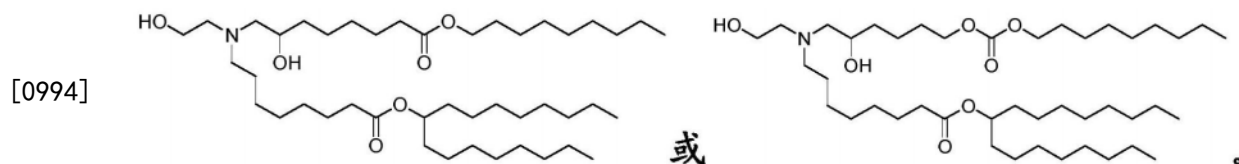
[0989] 实施方案13. 实施方案1-12中的任一个的药物组合物, 其中所述RNA多核苷酸是直链或环状RNA多核苷酸。

[0990] 实施方案14. 实施方案1-13中的任一个的药物组合物, 其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸。

[0991] 实施方案15. 一种药物组合物, 其包含:

[0992] a. RNA多核苷酸, 其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸, 和

[0993] b. 转移媒介物, 其包含选自以下的可电离脂质:



[0995] 实施方案16.实施方案1-15中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸被包封在所述转移媒介物中。

[0996] 实施方案17.实施方案1-16中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸以至少80%的包封效率被包封在所述转移媒介物中。

[0997] 实施方案18.实施方案1-14中的任一个的药物组合物,其中所述RNA包含第一表达序列。

[0998] 实施方案19.实施方案18的药物组合物,其中所述第一表达序列编码治疗性蛋白。

[0999] 实施方案20.实施方案19的药物组合物,其中所述第一表达序列编码细胞因子或其功能片段。

[1000] 实施方案21.实施方案19的药物组合物,其中所述第一表达序列编码转录因子。

[1001] 实施方案22.实施方案19的药物组合物,其中所述第一表达序列编码免疫检查点抑制剂。

[1002] 实施方案23.实施方案19的药物组合物,其中所述第一表达序列编码嵌合抗原受体(CAR)。

[1003] 实施方案24.实施方案1-23中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸进一步包含第二表达序列。

[1004] 实施方案25.实施方案24的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸进一步包含内核糖体进入位点(IRES)。

[1005] 实施方案26.实施方案25的药物组合物,其中所述第一和第二表达序列被核糖体跳跃元件或编码蛋白酶切割位点的核苷酸序列隔开。

[1006] 实施方案27.实施方案24或26中的任一个的药物组合物,其中所述第一表达序列编码第一T细胞受体(TCR)链,且所述第二表达序列编码第二TCR链。

[1007] 实施方案28.实施方案1-27中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸包含一个或多个微RNA结合位点。

[1008] 实施方案29.实施方案28的药物组合物,其中所述微RNA结合位点被肝脏中表达的微RNA识别。

[1009] 实施方案30.实施方案28或29的药物组合物,其中所述微RNA结合位点被miR-122识别。

[1010] 实施方案31.实施方案1-30中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸包含第一IRES,所述第一IRES与人免疫细胞中的蛋白表达高于参考人细胞中的蛋白表达相关。

[1011] 实施方案32.实施方案31的药物组合物,其中所述人免疫细胞是T细胞、NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。

[1012] 实施方案33.实施方案31或32的药物组合物,其中所述参考人细胞是肝细胞。

[1013] 实施方案34.实施方案1-33中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸按以下顺序包含:

- [1014] a.5' 增强的外显子元件,
- [1015] b.核心功能元件,和
- [1016] c.3' 增强的外显子元件。
- [1017] 实施方案35.实施方案1-34中的任一个的药物组合物,所述药物组合物进一步包含剪接后内含子片段。
- [1018] 实施方案36.实施方案34或35的药物组合物,其中所述5' 增强的外显子元件包含3' 外显子片段。
- [1019] 实施方案37.实施方案34-36中的任一个的药物组合物,其中所述5' 增强的外显子元件包含位于3' 外显子片段下游的5' 内部双链体区域。
- [1020] 实施方案38.实施方案34-37中的任一个的药物组合物,其中所述5' 增强的外显子元件包含位于3' 外显子片段下游的5' 内部间隔区。
- [1021] 实施方案39.实施方案38的药物组合物,其中所述5' 内部间隔区具有约10至约60个核苷酸的长度。
- [1022] 实施方案40.实施方案38或39的药物组合物,其中所述5' 内部间隔区包含聚腺苷酸或聚腺苷酸-胞苷酸(聚A-C)序列。
- [1023] 实施方案41.实施方案40的药物组合物,其中所述聚腺苷酸或聚腺苷酸-胞苷酸序列包含约10-50个核苷酸的长度。
- [1024] 实施方案42.实施方案34-41中的任一个的药物组合物,其中所述核心功能元件包含翻译起始元件(TIE)。
- [1025] 实施方案43.实施方案42中的任一个的药物组合物,其中所述翻译起始元件(TIE)包含非翻译区(UTR)或其片段。
- [1026] 实施方案44.实施方案43的药物组合物,其中所述UTR或其片段包含病毒内核糖体进入位点(IRES)或真核IRES。
- [1027] 实施方案45.实施方案44的药物组合物,其中所述IRES选自表17,或者是其功能片段或变体。
- [1028] 实施方案46.实施方案44或45的药物组合物,其中所述IRES具有完全地或部分地来自以下的序列:桃拉综合征病毒、吸血猎蝽病毒、泰勒氏脑脊髓炎病毒、猿猴病毒40、红火蚁病毒1、禾谷缢管蚜病毒、网状内皮组织增殖病病毒、人脊髓灰质炎病毒1、斯氏珀蝽肠病毒、克什米尔蜜蜂病毒、人鼻病毒2、假桃病毒叶蝉病毒-1、人免疫缺陷病毒1型、假桃病毒叶蝉病毒-1、Himetobi P病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、肝炎GB病毒、口蹄疫病毒、人肠道病毒71、马鼻炎病毒、茶尺蠖小核糖核酸样病毒、脑心肌炎病毒、果蝇C病毒、人柯萨奇病毒B3、十字花科烟草花叶病毒、蟋蟀麻痹病毒、牛病毒性腹泻病毒1、黑蜂王台病毒、蚜虫致死性麻痹病毒、禽脑脊髓炎病毒、急性蜜蜂麻痹病毒、木槿褪绿环斑病毒、古典猪瘟病毒、人FGF2、人SFTPA1、人AML1/RUNX1、果蝇触角足突变、人AQP4、人AT1R、人BAG-1、人BCL2、人BiP、人c-IAP1、人c-myc、人eIF4G、小鼠NDST4L、人LEF1、小鼠HIF1 α 、人n.myc、小鼠Gtx、人p27kip1、人PDGF2/c-sis、人p53、人Pim-1、小鼠Rbm3、果蝇reaper、犬Scamper、果蝇Ubx、人UNR、小鼠UtrA、人VEGF-A、人XIAP、无毛果蝇、酿酒酵母TFIID、酿酒酵母YAP1、烟草蚀纹病毒、芜菁皱缩病毒、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV pEC9、细小双RNA病毒、HCV QC64、人Cosavirus E/D、人Cosavirus F、人Cosavirus JMY、鼻病毒NAT001、HRV14、HRV89、

HRVC-02、HRV-A21、Salivirus ASH1、Salivirus FHB、Salivirus NG-J1、人副肠孤病毒1、克
罗希病毒B、Yc-3、Rosavirus M-7、Shanbavirus A、Pasivirus A、Pasivirus A 2、埃可病毒
E14、人副肠孤病毒5、爱知病毒、甲型肝炎病毒HA16、Phopivirus、CVA10、肠道病毒C、肠道病
毒D、肠道病毒J、人Pegivirus 2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、Pegivirus A
1220、Pasivirus A 3、萨佩罗病毒、Rosavirus B、Bakunsa病毒、震颤病毒A、猪Pasivirus
1、PLV-CHN、Pasivirus A、Sicinivirus、丙型肝炎病毒K、丙型肝炎病毒A、BVDV1、边缘病病
毒、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573双顺反子病毒、湖北小核糖核酸样病毒、CRPV、黑线姬鼠小核
糖核酸病毒、山羊嶺病毒、副牛病毒、Salivirus A BN5、Salivirus A BN2、Salivirus A
02394、Salivirus A GUT、Salivirus A CH、Salivirus A SZ1、Salivirus FHB、CVB3、CVB1、
埃可病毒7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24或eIF4G的适体。

[1029] 实施方案47. 实施方案42-46中的任一个的药物组合物, 其中所述翻译起始元件
(TIE) 包含适体复合物。

[1030] 实施方案48. 实施方案42的药物组合物, 其中所述适体复合物包含至少两种适体。

[1031] 实施方案49. 实施方案34-48中的任一个的药物组合物, 其中所述核心功能元件包
含编码区。

[1032] 实施方案50. 实施方案49的药物组合物, 其中所述编码区编码治疗性蛋白。

[1033] 实施方案51. 实施方案50的药物组合物, 其中所述治疗性蛋白是嵌合抗原受体
(CAR)、细胞因子、转录因子、T细胞受体 (TCR)、B-细胞受体 (BCR)、配体、免疫细胞活化或抑
制性受体、重组融合蛋白、嵌合突变蛋白或其融合蛋白或功能片段。

[1034] 实施方案52. 实施方案51的药物组合物, 其中所述治疗性蛋白是抗原。

[1035] 实施方案53. 实施方案52的药物组合物, 其中所述抗原是来自以下的病毒多肽: 腺
病毒; 1型单纯疱疹病毒; 2型单纯疱疹病毒; 脑炎病毒, 乳头瘤病毒, 水痘带状疱疹病毒; 爱
泼斯坦-巴尔病毒; 人巨细胞病毒; 8型人疱疹病毒; 人乳头瘤病毒; BK病毒; JC病毒; 天花; 脊
髓灰质炎病毒; 乙型肝炎病毒; 人博卡病毒; 细小病毒B19; 人星状病毒; 诺沃克病毒; 柯萨奇
病毒; 甲型肝炎病毒; 脊髓灰质炎病毒; 鼻病毒; 严重急性呼吸综合征病毒; 丙型肝炎病毒;
黄热病病毒; 登革热病毒; 西尼罗河病毒; 风疹病毒; 戊型肝炎病毒; 人免疫缺陷病毒 (HIV);
流感病毒; 瓜纳瑞托病毒; 胡宁病毒; 拉沙病毒; 马丘波病毒; 沙比亚病毒; 克里米亚-刚果出
血热病毒; 埃博拉病毒; 马尔堡病毒; 麻疹病毒; 腮腺炎病毒; 副流感病毒; 呼吸道合胞体病
毒; 人偏肺病毒; 亨德拉病毒; 尼帕病毒; 狂犬病病毒; 丁型肝炎病毒; 轮状病毒; 环状病毒;
Coltivirus; 版纳病毒; 人肠道病毒; 汉坦病毒; 西尼罗河病毒; 中东呼吸综合征冠状病毒;
日本脑炎病毒; 水泡性皮炎病毒 (Vesicular exanthernavirus); SARS-CoV-2; 东方马脑炎
病毒, 或上述两种或更多种的组合。

[1036] 实施方案54. 实施方案34-53中的任一个的药物组合物, 其中所述核心功能元件包
含终止密码子或终止盒。

[1037] 实施方案55. 实施方案34-53中的任一个的药物组合物, 其中所述核心功能元件包
含非编码区。

[1038] 实施方案56. 实施方案34-53中的任一个的药物组合物, 其中所述核心功能元件包
含辅助元件或调节元件。

[1039] 实施方案57. 实施方案56的药物组合物, 其中所述辅助元件或调节元件包含miRNA

结合位点或其片段、限制位点或其片段、RNA编辑基序或其片段、邮政编码(zip code)元件或其片段、RNA运输元件或其片段或其组合。

[1040] 实施方案58. 实施方案56的药物组合物, 其中所述辅助元件或调节元件包含与IRES反式作用因子(ITAF)的结合结构域。

[1041] 实施方案59. 实施方案34-58中的任一个的药物组合物, 其中所述3' 增强的外显子元件包含5' 外显子片段。

[1042] 实施方案60. 实施方案59的药物组合物, 其中所述3' 增强的外显子元件包含位于5' 外显子片段上游的3' 内部间隔区。

[1043] 实施方案61. 实施方案60的药物组合物, 其中所述3' 内部间隔区是聚腺苷酸或聚腺苷酸-胞苷酸序列。

[1044] 实施方案62. 实施方案60或61的药物组合物, 其中所述3' 内部间隔区具有约10至约60个核苷酸的长度。

[1045] 实施方案63. 实施方案59-62中的任一个的药物组合物, 其中所述3' 增强的外显子元件包含位于5' 外显子片段上游的3' 内部双链体元件。

[1046] 实施方案64. 实施方案1-63中的任一个的药物组合物, 其中所述RNA多核苷酸通过RNA多核苷酸的环化制成, 所述RNA多核苷酸按以下顺序包含:

[1047] a. 5' 增强的内含子元件,

[1048] b. 5' 增强的外显子元件,

[1049] c. 核心功能元件,

[1050] d. 3' 增强的外显子元件, 和

[1051] e. 3' 增强的内含子元件。

[1052] 实施方案65. 实施方案64的药物组合物, 其中所述5' 增强的内含子元件包含3' 内含子片段。

[1053] 实施方案66. 实施方案65的药物组合物, 其中所述3' 内含子片段包含3' I组内含子剪接位点二核苷酸的第一核苷酸或第一和第二核苷酸。

[1054] 实施方案67. 实施方案64或65的药物组合物, 其中所述5' 增强的内含子元件包含位于3' 内含子片段上游的5' 亲和标签。

[1055] 实施方案68. 实施方案65-67中的任一个的药物组合物, 其中所述5' 增强的内含子元件包含位于3' 内含子片段上游的5' 外部间隔区。

[1056] 实施方案69. 实施方案64-68中的任一个的药物组合物, 其中所述5' 增强的内含子元件包含位于所述5' 增强的内含子元件的5' 末端处的先导非翻译序列。

[1057] 实施方案70. 实施方案64-69中的任一个的药物组合物, 其中所述3' 增强的内含子元件包含5' 内含子片段。

[1058] 实施方案71. 实施方案64-70中的任一个的药物组合物, 其中所述3' 增强的内含子元件包含位于5' 内含子片段下游的3' 外部间隔区。

[1059] 实施方案72. 实施方案64-71中的任一个的药物组合物, 其中所述3' 增强的内含子元件包含位于5' 内含子片段下游的3' 亲和标签。

[1060] 实施方案73. 实施方案64-72中的任一个的药物组合物, 其中所述3' 增强的内含子元件包含在所述5' 增强的内含子元件的3' 末端处的3' 末端非翻译序列。

[1061] 实施方案74.实施方案64-73中的任一个的药物组合物,其中所述5' 增强的内含子元件包含位于3'内含子片段上游的5' 外部双链体区域,并且所述3' 增强的内含子元件包含位于5'内含子片段下游的3' 外部双链体区域。

[1062] 实施方案75.实施方案74的药物组合物,其中所述5' 外部双链体区域和所述3' 外部双链体区域是相同的。

[1063] 实施方案76.实施方案74的药物组合物,其中所述5' 外部双链体区域和所述3' 外部双链体区域是不同的。

[1064] 实施方案77.实施方案66-76中的任一个的药物组合物,其中所述I组内含子部分地或完全地来自细菌噬菌体、病毒载体、细胞器基因组或细胞核rDNA基因。

[1065] 实施方案78.实施方案77的药物组合物,其中所述细胞核rDNA基因包含源自真菌、植物或藻类的细胞核rDNA基因、或其片段。

[1066] 实施方案79.实施方案1-78中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸含有至少约80%、至少约90%、至少约95%或至少约99%天然存在的核苷酸。

[1067] 实施方案80.实施方案1-79中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸由天然存在的核苷酸组成。

[1068] 实施方案81.实施方案34-80中的任一个的药物组合物,其中所述表达序列是密码子优化的。

[1069] 实施方案82.实施方案1-81中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸被优化为缺乏在等同预优化的多核苷酸中存在的至少一个微RNA结合位点。

[1070] 实施方案83.实施方案1-82中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸被优化为缺乏至少一个微RNA结合位点,该位点能够结合在表达RNA多核苷酸的细胞中存在的微RNA。

[1071] 实施方案84.实施方案1-83中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸被优化为缺乏在等同预优化的多核苷酸中存在的至少一个内切核酸酶敏感位点。

[1072] 实施方案85.实施方案1-84中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸被优化为缺乏至少一个内切核酸酶敏感位点,该位点能够被表达内切核酸酶的细胞中存在的内切核酸酶切割。

[1073] 实施方案86.实施方案1-85中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸被优化为缺乏在等同预优化的多核苷酸中存在的至少一个RNA编辑敏感位点。

[1074] 实施方案87.实施方案1-86中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸是约100个核苷酸至约10,000个核苷酸的长度。

[1075] 实施方案88.实施方案1-87中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸是约100个核苷酸至约15,000个核苷酸的长度。

[1076] 实施方案89.实施方案1-88中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸,且其中所述环状RNA多核苷酸比具有与所述环状RNA多核苷酸相同的表达序列的参考线性RNA多核苷酸更紧凑。

[1077] 实施方案90.实施方案1-89中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸,且其中所述组合物在人细胞中的治疗效果持续时间大于或等于包含具有与环状RNA多核苷酸相同的表达序列的参考线性RNA多核苷酸的组合物的治疗效果持续时

间。

[1078] 实施方案91.实施方案90的药物组合物,其中所述参考线性RNA多核苷酸是线性的、未修饰的或核苷修饰的、完全加工的mRNA,其包含帽子1结构和至少80个核苷酸长度的聚腺苷酸尾巴。

[1079] 实施方案92.实施方案1-91中的任一个的药物组合物,其中所述RNA多核苷酸是环状RNA多核苷酸,且其中所述组合物在人体内的治疗效果持续时间大于包含具有与环状RNA多核苷酸相同的表达序列的参考线性RNA多核苷酸的组合物的治疗效果持续时间。

[1080] 实施方案93.实施方案1-92中的任一个的药物组合物,其中所述组合物具有至少约10、至少约20、至少约30、至少约40、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约90或至少约100小时的在人体内的治疗效果持续时间。

[1081] 实施方案94.实施方案1-93中的任一个的药物组合物,其中所述组合物在人细胞中的功能半衰期大于或等于预定阈值的功能半衰期。

[1082] 实施方案95.实施方案1-94中的任一个的药物组合物,其中所述组合物在人体内的功能半衰期大于预定阈值的功能半衰期。

[1083] 实施方案96.实施方案94或95的药物组合物,其中通过功能蛋白测定来确定所述功能半衰期。

[1084] 实施方案97.实施方案96的药物组合物,其中所述功能蛋白测定是体外萤光素酶测定。

[1085] 实施方案98.实施方案96的药物组合物,其中所述功能蛋白测定包括测量患者血清或组织样品中由RNA多核苷酸的表达序列编码的蛋白的水平。

[1086] 实施方案99.实施方案94-98中的任一个的药物组合物,其中所述预定阈值是包含与RNA多核苷酸相同的表达序列的参考线性RNA多核苷酸的功能半衰期。

[1087] 实施方案100.实施方案1-99中的任一个的药物组合物,其中所述组合物具有至少约20小时的功能半衰期。

[1088] 实施方案101.实施方案1-100中的任一个的药物组合物,所述药物组合物进一步包含结构脂质和PEG修饰的脂质。

[1089] 实施方案102.实施方案101中的任一个的药物组合物,其中所述结构脂质结合C1q和/或与缺乏所述结构脂质的对照转移媒介物相比促进包含所述脂质的转移媒介物与C1q的结合和/或与缺乏所述结构脂质的对照转移媒介物相比增加C1q-结合的转移媒介物向免疫细胞中的摄取。

[1090] 实施方案103.实施方案97-102中的任一个的药物组合物,其中所述免疫细胞是T细胞、NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。

[1091] 实施方案104.实施方案101-103中的任一个的药物组合物,其中所述结构脂质是胆固醇。

[1092] 实施方案105.实施方案102的药物组合物,其中所述结构脂质是 β -谷甾醇。

[1093] 实施方案106.实施方案102的药物组合物,其中所述结构脂质不是 β -谷甾醇。

[1094] 实施方案107.实施方案101-106中的任一个的药物组合物,其中所述PEG修饰的脂质是DSPE-PEG、DMG-PEG、PEG-DAG、PEG-S-DAG、PEG-PE、PEG-S-DMG、PEG-cer、PEG-二烷氧基丙基氨基甲酸酯、PEG-OR、PEG-OH、PEG-c-DMG或PEG-1。

[1095] 实施方案108.实施方案107的药物组合物,其中所述PEG修饰的脂质是DSPE-PEG (2000)。

[1096] 实施方案109.实施方案1-108中的任一个的药物组合物,所述药物组合物进一步包含辅助脂质。

[1097] 实施方案110.实施方案109的药物组合物,其中所述辅助脂质是DSPC或DOPE。

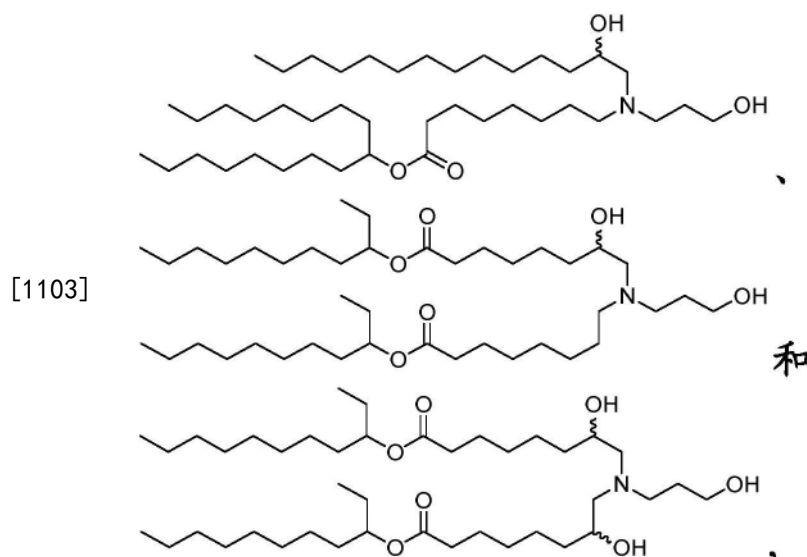
[1098] 实施方案111.实施方案1-110中的任一个的药物组合物,所述药物组合物进一步包含DSPC、胆固醇和DMG-PEG (2000)。

[1099] 实施方案112.实施方案102-111中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物包含按摩尔比计约0.5%至约4%PEG修饰的脂质。

[1100] 实施方案113.实施方案102-112中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物包含按摩尔比计约1%至约2%PEG修饰的脂质。

[1101] 实施方案114.实施方案1-113中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物包含:

[1102] a.可电离脂质,其选自:



[1104] 或其混合物,

[1105] b.选自DOPE或DSPC的辅助脂质,

[1106] c.胆固醇,和

[1107] d.选自DSPE-PEG (2000) 或DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质。

[1108] 实施方案115.实施方案114的药物组合物,其中可电离脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质的摩尔比是45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

[1109] 实施方案116.实施方案114的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

[1110] 实施方案117.实施方案117的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DSPE-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DSPE-PEG (2000) 的摩尔比是45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

[1111] 实施方案118.实施方案117的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助

脂质和DSPE-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DSPE-PEG (2000) 的摩尔比是62:4:33:1。

[1112] 实施方案119.实施方案114的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DSPE-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DSPE-PEG (2000) 的摩尔比是53:5:41:1。

[1113] 实施方案120.实施方案114的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

[1114] 实施方案121.实施方案120的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是50:10:38.5:1.5。

[1115] 实施方案122.实施方案120的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是41:12:45:2。

[1116] 实施方案123.实施方案120的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是45:9:44:2。

[1117] 实施方案124.实施方案114的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DSPC的辅助脂质和DSPE-PEG (2000) 的PEG-脂质,且其中可电离脂质:DSPC:胆固醇:DSPE-PEG (2000) 的摩尔比是45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

[1118] 实施方案125.实施方案114的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质且所述PEG-脂质是C14-PEG (2000),且其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:C14-PEG (2000) 的摩尔比是45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

[1119] 实施方案126.实施方案114的药物组合物,其中所述转移媒介物包含DOPE的辅助脂质和DMG-PEG (2000) 的PEG-脂质,其中可电离脂质:DOPE:胆固醇:DMG-PEG (2000) 的摩尔比是45:9:44:2、50:10:38.5:1.5、41:12:45:2、62:4:33:1或53:5:41:1。

[1120] 实施方案127.实施方案1-126中的任一个的药物组合物,所述药物组合物具有约3至约9的脂质:磷酸酯(IL:P) 摩尔比。

[1121] 实施方案128.实施方案1-127中的任一个的药物组合物,所述药物组合物具有约3、约4、约4.5、约5、约5.5、约5.7、约6、约6.2、约6.5或约7的脂质:磷酸酯(IL:P) 摩尔比。

[1122] 实施方案129.实施方案1-128中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物被配制用于所述RNA多核苷酸的内体释放。

[1123] 实施方案130.实施方案1-129中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物能够结合APOE。

[1124] 实施方案131.实施方案1-130中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物与载脂蛋白E (APOE) 的相互作用小于加载了具有与RNA多核苷酸相同的表达序列的参考线性RNA的等同转移媒介物。

[1125] 实施方案132.实施方案1-131中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物的外表面基本上不具有APOE结合位点。

[1126] 实施方案133.实施方案1-132中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物具有小于约120nm的直径。

[1127] 实施方案134.实施方案1-133中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物不会形成具有超过300nm的直径的聚集体。

[1128] 实施方案135.实施方案1-134中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物具有小于约30小时的体内半衰期。

[1129] 实施方案136.实施方案1-135中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物能够实现向细胞中的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 依赖性摄取。

[1130] 实施方案137.实施方案1-136中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物能够实现向细胞中的LDLR非依赖性摄取。

[1131] 实施方案138.实施方案1-137中的任一个的药物组合物,其中所述药物组合物基本上不具有线性RNA。

[1132] 实施方案139.实施方案1-138中的任一个的药物组合物,所述药物组合物进一步包含可操作地连接至所述转移媒介物的靶向部分。

[1133] 实施方案140.实施方案139的药物组合物,其中所述靶向部分特异性地或间接地结合免疫细胞抗原。

[1134] 实施方案141.实施方案140的药物组合物,其中所述免疫细胞抗原是T细胞抗原。

[1135] 实施方案142.实施方案141的药物组合物,其中所述T细胞抗原选自CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、 β 7整联蛋白、 β 2整联蛋白和C1qR。

[1136] 实施方案143.实施方案142的药物组合物,所述药物组合物进一步包含含有转移媒介物结合部分和细胞结合部分的衔接分子,其中所述靶向部分特异性地结合所述转移媒介物结合部分且所述细胞结合部分特异性地结合靶细胞抗原。

[1137] 实施方案144.实施方案143的药物组合物,其中所述靶细胞抗原是免疫细胞抗原。

[1138] 实施方案145.实施方案144的药物组合物,其中所述免疫细胞抗原是T细胞抗原、NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。

[1139] 实施方案146.实施方案145的药物组合物,其中所述T细胞抗原选自CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD4、 β 7整联蛋白、 β 2整联蛋白、CD25、CD39、CD73、A2a受体、A2b受体和C1qR。

[1140] 实施方案147.实施方案140或143的药物组合物,其中所述免疫细胞抗原是巨噬细胞抗原。

[1141] 实施方案148.实施方案147的药物组合物,其中所述巨噬细胞抗原选自甘露糖受体、CD206和C1q。

[1142] 实施方案149.实施方案139-148中的任一个的药物组合物,其中所述靶向部分是小分子。

[1143] 实施方案150.实施方案149的药物组合物,其中所述小分子是甘露糖、凝集素、阿西维辛、生物素或地高辛配基。

[1144] 实施方案151.实施方案149的药物组合物,其中所述小分子结合免疫细胞上的胞外酶,其中所述胞外酶选自CD38、CD73、腺苷2a受体和腺苷2b受体。

[1145] 实施方案152.实施方案139-148中的任一个的药物组合物,其中所述靶向部分是单链Fv (scFv) 片段、纳米抗体、肽、基于肽的大环、微体 (minibody)、小分子配体诸如叶酸

盐、精氨酸基甘氨酸天冬氨酸 (RGD) 或酚溶性调控蛋白 α 1肽 (PSMA1)、重链可变区、轻链可变区或其片段。

[1146] 实施方案153.实施方案1-152中的任一个的药物组合物,其中所述可电离脂质具有在细胞膜中小于约2周的半衰期。

[1147] 实施方案154.实施方案1-153中的任一个的药物组合物,其中所述可电离脂质具有在细胞膜中小于约1周的半衰期。

[1148] 实施方案155.实施方案1-154中的任一个的药物组合物,其中所述可电离脂质具有在细胞膜中小于约30小时的半衰期。

[1149] 实施方案156.实施方案1-155中的任一个的药物组合物,其中所述可电离脂质在细胞膜中的半衰期小于所述RNA多核苷酸的功能半衰期。

[1150] 实施方案157.一种治疗或预防疾病、障碍或病症的方法,所述方法包括施用有效量的实施方案1-156中的任一个的药物组合物。

[1151] 实施方案158.实施方案157的方法,其中所述疾病、障碍或病症与选自ASCII表L和M的多肽的异常表达、活性或定位相关。

[1152] 实施方案159.实施方案157或158的方法,其中所述RNA多核苷酸编码治疗性蛋白。

[1153] 实施方案160.实施方案159的方法,其中在脾中的治疗性蛋白表达高于在肝中的治疗性蛋白表达。

[1154] 实施方案161.实施方案160的方法,其中在脾中的治疗性蛋白表达是在肝中的治疗性蛋白表达的至少约2.9倍。

[1155] 实施方案162.实施方案160的方法,其中所述治疗性蛋白不在肝脏中以功能水平表达。

[1156] 实施方案163.实施方案160的方法,其中所述治疗性蛋白不在肝脏中以可检测的水平表达。

[1157] 实施方案164.实施方案160的方法,其中在脾中的治疗性蛋白表达是总治疗性蛋白表达的至少约50%。

[1158] 实施方案165.实施方案160的方法,其中在脾中的治疗性蛋白表达是总治疗性蛋白表达的至少约63%。

[1159] 实施方案166.实施方案1-156中的任一个的药物组合物,其中所述转移媒介物包含纳米颗粒和任选的可操作地连接至所述纳米颗粒的靶向部分。

[1160] 实施方案167.实施方案166的药物组合物,其中所述纳米颗粒是脂质纳米颗粒、芯-壳纳米颗粒、可生物降解的纳米颗粒、可生物降解的脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒或可生物降解的聚合物纳米颗粒。

[1161] 实施方案168.实施方案166或167的药物组合物,所述药物组合物包含靶向部分,其中所述靶向部分在没有细胞分离或纯化的情况下介导受体介导的胞吞作用或直接选择性地融合到选定的细胞群体或组织的细胞中。

[1162] 实施方案169.实施方案166-168中的任一个的药物组合物,其中所述靶向部分是scfv、纳米抗体、肽、微体(minibody)、多核苷酸适体、重链可变区、轻链可变区或其片段。

[1163] 实施方案170.实施方案166-169中的任一个的药物组合物,其中所述组合物中小于1重量%的多核苷酸是双链RNA、DNA夹板或三磷酸化的RNA。

[1164] 实施方案171.实施方案166-170中的任一个的药物组合物,其中所述药物组合物中小于1重量%的多核苷酸和蛋白是双链RNA、DNA夹板、三磷酸化的RNA、磷酸酶蛋白、蛋白连接酶和加帽酶。

[1165] 实施方案172.一种治疗有此需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效量的实施方案166-171中的任一个的药物组合物。

[1166] 实施方案173.实施方案172的方法,其中所述靶向部分是scfv、纳米抗体、肽、微体(minibody)、重链可变区、轻链可变区、TCR的细胞外结构域或其片段。

[1167] 实施方案174.实施方案172或173的方法,其中所述纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、可电离脂质或聚 β -氨基酯。

[1168] 实施方案175.实施方案172-174中的任一个的方法,其中所述纳米颗粒包含一种或多种非阳离子脂质。

[1169] 实施方案176.实施方案172-175中的任一个的方法,其中所述纳米颗粒包含一种或多种PEG修饰的脂质、聚谷氨酸脂质或透明质酸脂质。

[1170] 实施方案177.实施方案172-176中的任一个的方法,其中所述纳米颗粒包含胆固醇。

[1171] 实施方案178.实施方案172-177中的任一个的方法,其中所述纳米颗粒包含花生四烯酸或油酸。

[1172] 实施方案179.实施方案172-178中的任一个的方法,其中所述药物组合物包含靶向部分,其中所述靶向部分在没有细胞选择或纯化的情况下介导受体介导的胞吞作用以选择性地进入选定细胞群体的细胞中。

[1173] 实施方案180.实施方案172-179中的任一个的方法,其中所述纳米颗粒包含超过一种环状RNA多核苷酸。

[1174] 实施方案181.编码实施方案64-78中的任一个的RNA多核苷酸的DNA载体。

[1175] 实施方案182.实施方案181的DNA载体,所述DNA载体进一步包含转录调节序列。

[1176] 实施方案183.实施方案182的DNA载体,其中所述转录调节序列包含启动子和/或增强子。

[1177] 实施方案184.实施方案183的DNA载体,其中所述启动子包含T7启动子。

[1178] 实施方案185.实施方案181-184中的任一个的DNA载体,其中所述DNA载体包含环状DNA。

[1179] 实施方案186.实施方案181-185中的任一个的DNA载体,其中所述DNA载体包含线性DNA。

[1180] 实施方案187.包含根据实施方案181-186中的任一个的DNA载体的原核细胞。

[1181] 实施方案188.包含根据实施方案1-187中的任一个的RNA多核苷酸的真核细胞。

[1182] 实施方案189.实施方案189的真核细胞,其中所述真核细胞是人细胞。

[1183] 实施方案190.一种产生环状RNA多核苷酸的方法,所述方法包括在合适的环化条件下温育实施方案64-78中的任一个的RNA多核苷酸。

[1184] 实施方案191.一种产生环状RNA多核苷酸的方法,所述方法包括在合适的转录条件下温育实施方案181-186中的任一个的DNA。

[1185] 实施方案192.实施方案191的方法,其中所述DNA在体外被转录。

[1186] 实施方案193.实施方案191的方法,其中所述合适的条件包含三磷酸腺苷(ATP)、三磷酸鸟嘌呤(GTP)、三磷酸胞嘧啶(CTP)、三磷酸尿苷(UTP)和RNA聚合酶。

[1187] 实施方案194.实施方案191的方法,其中所述合适的条件进一步包含单磷酸鸟嘌呤(GMP)。

[1188] 实施方案195.实施方案194的方法,其中GMP浓度与GTP浓度的比率是在约3:1至约15:1的范围内,任选地是约4:1、5:1或6:1。

[1189] 实施方案196.一种产生环状RNA多核苷酸的方法,所述方法包括在适合于在细胞中转录DNA的条件下培养实施方案187的原核细胞。

[1190] 实施方案197.实施方案190-196中的任一个的方法,所述方法进一步包括纯化环状RNA多核苷酸。

[1191] 实施方案198.实施方案197的方法,其中使用与缀合到固体表面的第一或第二间隔区杂交的亲核寡核苷酸,通过负选择来纯化环状RNA多核苷酸。

[1192] 实施方案199.实施方案198的方法,其中所述第一或第二间隔区包含聚腺苷酸序列,且其中所述亲核寡核苷酸是脱氧胸腺嘧啶寡核苷酸。

实施例

[1193] Wesselhoeft等人,(2019)RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In vivo.Molecular Cell.74(3),508-520和Wesselhoeft等人,(2018)Engineering circular RNA for Potent and Stable Translation in Eukaryotic Cells.Nature Communications.9,2629通过引用整体并入。

[1194] 通过参考以下实施例进一步详细描述本发明,但并不旨在限于以下实施例。这些实施例涵盖图示的任何和所有变型,目的是向本领域普通技术人员提供如何制造和使用主题发明的完整公开和描述,而不旨在限制被视为本发明的范围。

[1195] 实施例1

[1196] 实施例1A:使用置换内含子外显子(PIE)环化策略,外部双链体区域允许长前体RNA环化。

[1197] 将含有全长脑心肌炎病毒(EMCV)IRES、高斯萤光素酶(GLuc)表达序列和置换内含子-外显子(PIE)构建体的两个短外显子片段的1.1kb序列插入到T4噬菌体的胸苷酸合成酶(Td)基因中置换I组催化内含子的3'和5'内含子之间。通过失控转录而合成前体RNA。尝试通过在有镁离子和GTP存在下加热前体RNA进行环化,但未获得剪接产物。

[1198] 设计了完全互补的9个核苷酸和19个核苷酸长的双链体区域,并添加在前体RNA的5'和3'末端处。通过前体RNA带的消失评估出,这些同源性臂的添加将9个核苷酸双链体区域的剪接效率从0提高到16%,并将19个核苷酸双链体区域的剪接效率提高到48%。

[1199] 用RNA酶R处理剪接产物。对RNA酶R处理过的剪接反应物的假定剪接连接点的测序揭示了连接的外显子,并且用寡核苷酸靶向的RNA酶H对RNA酶R处理过的剪接反应物的消化产生了单一条带,与此相比,用RNA酶H消化的线性前体产生了两条带。这表明,环状RNA是含有9或19个核苷酸长的外部双链体区域的前体RNA的剪接反应的主要产物。

[1200] 实施例1B:保留IRES和PIE剪接位点的二级结构的间隔区增加了环化效率。

[1201] 设计了一系列间隔区并将其插入在3' PIE剪接位点和IRES之间。这些间隔区旨在

保留或破坏在IRES中的内含子序列内的二级结构、3' PIE剪接位点和/或5' 剪接位点。旨在保留二级结构的间隔区序列的添加产生了87%剪接效率,而破坏性间隔区序列的添加没有产生可检测的剪接。

[1202] 实施例2

[1203] 实施例2A:除外部双链体区域外,内部双链体区域还产生剪接泡并允许翻译若干表达序列。

[1204] 间隔区被设计为非结构化的、与内含子和IRES序列不同源的,并且含有间隔区-间隔区双链体区域。这些被插入到构建体的5' 外显子和IRES之间以及3' 外显子和表达序列之间,所述构建体含有外部双链体区域、高斯萤光素酶的EMCV IRES和表达序列(总长度:1289个核苷酸)、萤火虫萤光素酶(2384个核苷酸)、eGFP(1451个核苷酸)、人促红细胞生成素(1313个核苷酸)和Cas9内切核酸酶(4934个核苷酸)。实现了所有5种构建体的环化。利用T4噬菌体和鱼腥蓝细菌(*Anabaena*)内含子的构建体的环化大致相等。较短序列的环化效率更高。为了测量翻译,将每个构建体转染到HEK293细胞中。高斯和萤火虫萤光素酶转染的细胞产生了稳健应答(通过发光测量),在用促红细胞生成素circRNA转染的细胞的培养基中可检测到促红细胞生成素,并且在用EGFP circRNA转染的细胞中观察到了EGFP荧光。与仅使用sgRNA的对照相比,将Cas9 circRNA与针对GFP的sgRNA共转染到组成性地表达GFP的细胞中导致高达97%的细胞的荧光消失。

[1205] 实施例2B:使用CVB3 IRES增加蛋白产量。

[1206] 制备了具有内部和外部双链体区域以及含有高斯萤光素酶或萤火虫萤光素酶表达序列的不同IRES的构建体。在转染后24小时,通过HEK293细胞上清液中的发光来测量蛋白产量。柯萨奇病毒B3(CVB3) IRES构建体在两种情况下产生了最多的蛋白。

[1207] 实施例2C:使用聚腺苷酸或聚AC间隔区增加蛋白产量。

[1208] 在构建体中在IRES和剪接连接点之间添加了30个核苷酸长的聚腺苷酸或聚AC间隔区,每个IRES在实施例2B中产生蛋白。在转染后24小时,通过HEK293细胞上清液中的发光来测量高斯萤光素酶活性。与没有间隔区的对照构建体相比,两种间隔区提高了每个构建体中的表达。

[1209] 实施例3

[1210] 用环状RNA转染的HEK293或HeLa细胞比用相当的未修饰的或修饰的线性的RNA转染的那些产生更多的蛋白。

[1211] 将HPLC纯化的编码高斯萤光素酶的circRNA(CVB3-GLuc-pAC)与规范的未修饰的5' 甲基鸟苷加帽的和3' 聚腺苷酸尾巴线性GLuc mRNA、以及商购可得的核苷修饰的(假尿苷,5-甲基胞嘧啶)线性GLuc mRNA(来自Trilink)进行了对比。在转染后24小时测量发光,揭示circRNA在HEK293细胞中产生的蛋白比未修饰的线性mRNA多811.2%,并且比修饰的mRNA多54.5%的蛋白。在HeLa细胞中获得了类似的结果,并将优化的编码人促红细胞生成素的circRNA与用5-甲氧基尿苷修饰的线性mRNA进行了对比。

[1212] 收集了6天的发光数据。在HEK293细胞中,circRNA转染导致80小时的蛋白产生半衰期,与此相比,未修饰的线性mRNA为43小时,修饰的线性的mRNA为45小时。在HeLa细胞中,circRNA转染导致116小时的蛋白产生半衰期,与此相比,未修饰的线性mRNA为44小时,修饰的线性的mRNA为49小时。在两种细胞类型的整个生命周期中,circRNA产生的蛋白比未修饰

的和修饰的线性的mRNA多得多。

[1213] 实施例4

[1214] 实施例4A:通过RNA酶消化、HPLC纯化和磷酸酶处理对circRNA的纯化降低了免疫原性。完全纯化的环状RNA的免疫原性显著低于未纯化的或部分纯化的环状RNA。蛋白表达稳定性和细胞生存力取决于细胞类型和环状RNA纯度。

[1215] 用下列物质转染人胚胎肾293 (HEK293) 和人肺癌A549细胞:

[1216] a. 未纯化的GLuc环状RNA剪接反应的产物,

[1217] b. 剪接反应的RNA酶R消化产物,

[1218] c. 剪接反应的RNA酶R消化和HPLC纯化的产物,或

[1219] d. 剪接反应的RNA酶消化、HPLC纯化和磷酸酶处理的产物。

[1220] 与未转染的对照相比,剪接反应的RNA酶R消化不足以阻止A549细胞中的细胞因子释放。

[1221] HPLC纯化的添加也不足以阻止细胞因子释放,尽管与未纯化的剪接反应物相比,白介素-6 (IL-6) 显著减少且干扰素- α 1 (IFN α 1) 显著增加。

[1222] 在HPLC纯化之后和RNA酶R消化之前磷酸酶处理的添加显著降低在A549细胞中评估的所有上调细胞因子的表达。分泌的单核细胞趋化蛋白1 (MCP1)、IL-6、IFN α 1、肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和IFN γ 可诱导的蛋白-10 (IP-10) 降至不可检测的或未转染的基线水平。

[1223] 在HEK293细胞中没有大量细胞因子释放。当用较高纯度环状RNA转染时,A549细胞具有增加的GLuc表达稳定性和细胞生存力。完全纯化的环状RNA具有与转染的293细胞相似的稳定性表型。

[1224] 实施例4B:环状RNA没有造成显著的免疫原性并且不是RIG-I配体。

[1225] 用下列物质转染A549细胞:

[1226] a. 未纯化的环状RNA,

[1227] b. 高分子量 (线性和环状连接) RNA,

[1228] c. 环状 (带切口的) RNA,

[1229] d. 纯化的环状RNA的早期级分 (与带切口的RNA峰重叠较多),

[1230] e. 纯化的环状RNA的晚期级分 (与带切口的RNA峰重叠较少),

[1231] f. 在环化过程中切除的内含子,或

[1232] g. 媒介物 (即未转染的对照)。

[1233] 由于难以从剪接反应物中获得足够纯的线性前体RNA,因此以剪接位点缺失突变体 (DS) 的形式单独合成和纯化前体RNA。在每种情况下测量细胞因子释放和细胞生存力。

[1234] 响应于在剪接反应物中存在的大多数物质以及前体RNA,观察到稳健的IL-6、RANTES和IP-10释放。早期circRNA级分引发的细胞因子应答与其它非circRNA级分相当,这表明即使相对少量的线性RNA污染物也能够在A549细胞中诱导显著的细胞免疫应答。晚期circRNA级分不会引发超过未转染对照的细胞因子应答。晚期circRNA级分在转染后36小时的A549细胞生存力与所有其它级分相比明显更大。

[1235] 分析了在用晚期circRNA HPLC级分、前体RNA或未纯化的剪接反应物转染A549细胞后的RIG-I和IFN- β 1转录物诱导。晚期circRNA级分对RIG-I和IFN- β 1转录物的诱导比前体RNA和未纯化的剪接反应物弱。RNA酶R对剪接反应物的单独处理不足以消除这种影响。极

少量的RIG-I配体3p-hpRNA向环状RNA中的添加会诱导大量RIG-I转录。在HeLa细胞中,RNA酶R消化的剪接反应物的转染会诱导RIG-I和IFN- β 1,但纯化的circRNA不会。总体而言,HeLa细胞对污染性RNA物质的敏感性低于A549细胞。

[1236] 在用剪接反应物或完全纯化的circRNA转染A549细胞后前8小时内,监测RIG-I、IFN- β 1、IL-6和RANTES转录物诱导的时程实验未揭示对circRNA的瞬时应答。纯化的circRNA同样没有在RAW264.7鼠巨噬细胞中诱导促炎转录物。

[1237] 用含有EMCV IRES和EGFP表达序列的纯化circRNA转染A549细胞。这未能产生促炎转录物的大量诱导。这些数据表明,剪接反应物的非环状组分导致在先前研究中观察到的免疫原性,并且circRNA不是RIG-I的天然配体。

[1238] 实施例5

[1239] 环状RNA避免通过TLR检测到。

[1240] 用多个直链或环状RNA构建体转染TLR 3、7和8报告细胞系,并测量分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)。

[1241] 通过删除内含子和同源性臂序列来构建线性化的RNA。然后将线性RNA构建体用磷酸酶处理(对于加帽的RNA,在加帽后)并通过HPLC纯化。

[1242] 所有尝试的转染均未在TLR7报告细胞中产生应答。TLR3和TLR8报告细胞被加帽的线性化的RNA、聚腺苷酸的线性化的RNA、带切口的circRNA HPLC级分和早期circRNA级分活化。晚期circRNA级分和m1 ψ -mRNA未在任何细胞系中引发TLR介导的应答。

[1243] 在第二个实验中,使用两种方法将circRNA线性化:在有镁离子存在下热处理circRNA和DNA寡核苷酸引导的RNA酶H消化。两种方法均产生大部分全长线性RNA,以及少量完整的circRNA。用环状RNA、热降解的环状RNA或RNA酶H降解的环状RNA转染TLR3、7和8报告细胞,并在转染后36小时测量SEAP分泌。TLR8报告细胞响应于降解的环状RNA的两种形式而分泌SEAP,但没有产生比模拟转染更大的对环状RNA转染的应答。尽管体外转录的线性化RNA活化了TLR3,但在降解或完整条件下在TLR3和TLR7报告细胞中未观察到活化。

[1244] 实施例6

[1245] 未修饰的环状RNA产生比线性RNA增加的持续体内蛋白表达。

[1246] 注射小鼠并用未修饰的和m1 ψ -修饰的人促红细胞生成素(hEpo)线性mRNA和circRNA转染HEK293细胞。m1 ψ -mRNA和未修饰的circRNA的等摩尔转染导致在HEK293细胞中稳健的蛋白表达。与GLuc线性mRNA和circRNA相比,在HEK293和A549细胞的等重量转染后,hEpo线性mRNA和circRNA显示出相似的相对蛋白表达谱和细胞生存力。

[1247] 在小鼠中,将hEpo circRNA或线性mRNA注射到内脏脂肪中以后,在血清中检测到hEpo。在注射未修饰的circRNA后检测到的hEpo衰减速度比未修饰的或m1 ψ -mRNA更缓慢,并且在注射后42小时仍然存在。在注射未纯化的circRNA剪接反应物或未修饰的线性mRNA后,血清hEpo迅速下降。未纯化的剪接反应物的注射产生了可在血清中检测到的细胞因子应答,而对其它RNA(包括纯化的circRNA)未观察到这种应答。

[1248] 实施例7

[1249] 环状RNA可以通过脂质纳米颗粒在体内或在体外有效递送。

[1250] 将纯化的环状RNA与可电离类脂质cKK-E12一起配制成脂质纳米颗粒(LNP)(Dong等人,2014;Kauffman等人,2015)。所述颗粒形成均匀的多层结构,其平均尺寸、多分散性指

数和包封效率与含有用5moU修饰的市售对照线性mRNA的颗粒相似。

[1251] 当被包封在LNP中并加入HEK293细胞中时,纯化的hEpo circRNA表现出比5moU-mRNA更大的表达。LNP-RNA在HEK293细胞中的表达稳定性与通过转染试剂递送的RNA的表达稳定性相似,但5moU-mRNA和circRNA的衰减略有延迟。未修饰的circRNA和5moU-mRNA没有在体外活化RIG-I/IFN- β 1。

[1252] 在小鼠中,将LNP-RNA通过局部注射到内脏脂肪组织中或静脉内递送而输送到肝脏。在两种情况下,来自circRNA的血清hEpo表达较低,但与递送后6小时5moU-mRNA的血清hEpo表达相当。在脂肪注射未修饰的LNP-circRNA后检测到的血清hEpo衰减速度比LNP-5moU-mRNA更慢,在血清中存在的表达衰减的延迟与在体外观察到的相似,但在静脉内注射LNP-circRNA或LNP-5moU-mRNA后血清hEpo以大约相同的速率衰减。在这些情况中的任一种下,血清细胞因子或局部RIG-I、TNF α 或IL-6转录物诱导没有增加。

[1253] 实施例8

[1254] IRES在HEK293、HepG2和1C1C7细胞中的表达和功能稳定性。

[1255] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和不同IRES的构建体环化。使用Lipofectamine MessengerMax,将100ng每个环化反应物分别转染到20,000个HEK293细胞、HepG2细胞和1C1C7细胞中。在24小时后评估每份上清液的发光,作为蛋白表达的量度。在HEK293细胞中,包括克罗希病毒B、Salivirus FHB、爱知病毒、Salivirus HG-J1和肠道病毒J IRES的构建体在24小时产生了最多的发光(图1A)。在HepG2细胞中,包括爱知病毒、Salivirus FHB、EMCV-Cf和CVA3 IRES的构建体在24小时产生高发光(图1B)。在1C1C7细胞中,包括Salivirus FHB、爱知病毒、Salivirus NG-J1和Salivirus A SZ-1IRES的构建体在24小时产生高发光(图1C)。

[1256] 观察到在24小时更大的IRES产生更大发光的趋势。较短的总序列长度倾向于增加环化效率,因此选择高表达和相对短的IRES可以产生改进的构建体。在HEK293细胞中,使用克罗希病毒B IRES的构建体产生了最高的发光,尤其是与类似长度的其它IRES相比(图2A)。在图2B和2C中显示了HepG2和1C1C7细胞中IRES构建体的表达与IRES大小的关系。

[1257] 在3天内测量了HepG2和1C1C7细胞中所选IRES构建体的功能稳定性。在用100ng的每个环化反应物转染20,000个细胞并更换完全培养基后,每24小时测量一次上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。Salivirus A GUT和Salivirus FHB在HepG2细胞中表现出最高的功能稳定性,并且Salivirus N-J1和Salivirus FHB在1C1C7细胞中产生最稳定的表达(图3A和3B)。

[1258] 实施例9

[1259] IRES在Jurkat细胞中的表达和功能稳定性。

[1260] 将2组包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和一组先前试验的IRES的构建体环化。将60,000个Jurkat细胞用1 μ g每个环化反应物电穿孔。在电穿孔后24小时测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。在两组中包含CVB3 IRES构建体,以便于组间对比以及与先前定义的IRES效力进行对比。CVB1和Salivirus ASZ1 IRES构建体在24小时产生最多表达。数据可以参见图4A和4B。

[1261] 在3天内测量了每轮电穿孔的Jurkat细胞中IRES构建体的功能稳定性。在将60,000个细胞用1 μ g每种环化反应物电穿孔并随后更换完全培养基后,每24小时测量一次上清

液中分泌的高斯萤光素酶的发光(图5A和5B)。

[1262] 与其它构建体相比,Salivirus A SZ1和Salivirus A BN2 IRES构建体具有高功能稳定性。

[1263] 实施例10

[1264] 环状和线性RNA在Jurkat细胞中的表达、功能稳定性和细胞因子释放。

[1265] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和Salivirus FHB IRES的构建体环化。包括高斯萤光素酶表达序列和约150个核苷酸聚腺苷酸尾巴并且被修饰以用5-甲氧基尿苷(5moU)替换100%的尿苷的mRNA是商购可得的并购自Trilink。5moU核苷酸修饰已经被证实会改善mRNA稳定性和表达(Bioconjug Chem. 2016年3月16日;27(3):849-53)。测量并对比了Jurkat细胞中修饰的mRNA、环化反应(不纯的)和通过尺寸排阻HPLC纯化的circRNA(纯的)的表达(图6A)。在用1 μ g每种RNA物质对60,000个细胞进行电穿孔后24小时,测量了上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。

[1266] 在将60,000个细胞用1 μ g每种RNA物质电穿孔并随后更换完全培养基后,每24小时测量一次上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。图6B对比了Jurkat细胞中修饰的mRNA和circRNA在3天内的功能稳定性数据。

[1267] 用1 μ g上述每个RNA物质和3p-hpRNA(5'三磷酸发夹RNA,其为已知的RIG-I激动剂)对60,000个Jurkat细胞进行电穿孔后18小时,测量了IFN γ (图7A)、IL-6(图7B)、IL-2(图7C)、RIG-I(图7D)、IFN- β 1(图7E)和TNF α (图7F)转录物诱导。

[1268] 实施例11

[1269] 环状和线性RNA在单核细胞和巨噬细胞中的表达。

[1270] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和Salivirus FHB IRES的构建体环化。包括高斯萤光素酶表达序列和约150个核苷酸聚腺苷酸尾巴并且被修饰以用5-甲氧基尿苷(5moU)替换100%的尿苷的mRNA购自Trilink。在人原代单核细胞(图8A)和人原代巨噬细胞(图8B)中测量了环状和修饰的mRNA的表达。在用1 μ g每种RNA物质对60,000个细胞进行电穿孔后24小时,测量了上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。还在人原代巨噬细胞电穿孔后4天测量发光,每24小时更换一次培养基(图8C)。发光差异在每种情况下是统计上显著的($p < 0.05$)。

[1271] 实施例12

[1272] IRES在原代T细胞中的表达和功能稳定性。

[1273] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和一组先前试验的IRES的构建体环化,并通过尺寸排阻HPLC纯化反应产物。将150,000个原代人CD3+T细胞用1 μ g每种circRNA电穿孔。在电穿孔后24小时测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光(图9A)。爱知病毒和CVB3 IRES构建体在24小时具有最多的表达。

[1274] 在电穿孔后还每24小时测量一次发光,持续3天,以对比每个构建体的功能稳定性(图9B)。含有Salivirus A SZ1 IRES的构建体是最稳定的。

[1275] 实施例13

[1276] 环状和线性RNA在原代T细胞和PBMC中的表达和功能稳定性。

[1277] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和Salivirus A SZ1 IRES或Salivirus FHB IRES的构建体环化。包括高斯萤光素酶表达序列和约150个核

苷酸聚腺苷酸尾巴并且被修饰以用5-甲氧基尿苷(5moU)替换100%的尿苷的mRNA购自Trilink。在人原代CD3+T细胞中测量了Salivirus A SZ1 IRES HPLC纯化的环状和修饰的mRNA的表达。在人PBMC中测量了Salivirus FHB HPLC纯化的环状、未纯化的环状和修饰的mRNA的表达。在用1 μ g每个RNA物质对150,000个细胞进行电穿孔后24小时,测量了上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。图10A和10B为原代人T细胞的数据,且图10C为PBMC的数据。纯化的环状RNA和未纯化的环状RNA或线性RNA之间的表达差异在每种情况下都是显著的($p < 0.05$)。

[1278] 在电穿孔后的3天内每24小时测量一次原代T细胞上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光,以对比构建体功能稳定性。数据如图10B所示。对于原代T细胞而言,纯化的环状RNA和线性RNA之间的第1天测量的相对发光差异在第2天和第3天都是显著的。

[1279] 实施例14

[1280] 鱼腥蓝细菌内含子中置换位点的环化效率。

[1281] 产生了包括CVB3 IRES、高斯萤光素酶表达序列、鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、间隔区、内部双链体区域和同源性臂的RNA构建体。通过HPLC测量了使用传统的鱼腥蓝细菌内含子置换位点和P9中5个连续置换位点的构建体的环化效率。图11A显示了P9中5个连续置换位点的HPLC色谱图。

[1282] 在各种置换位点处测量了环化效率。环化效率被定义为circRNA/(circRNA+前体RNA)各自的HPLC色谱曲线下面积。图11B显示了在每个置换位点处的环化效率的排序量化。选择了3个置换位点(图11B中所示)进行进一步研究。

[1283] 使本实施例中的环状RNA通过体外转录(IVT)发生环化,然后通过旋转柱纯化。如果包括与Mg²⁺和鸟苷核苷酸一起温育的另外步骤,所有构建体的环化效率可能更高;但是,删除此步骤可以对环状RNA构建体进行对比和优化。这种水平的优化对于维持大RNA构建体(诸如编码嵌合抗原受体的那些)的高环化效率特别有用。

[1284] 实施例15

[1285] 替代内含子的环化效率。

[1286] 创建了含有可变物种来源的置换1组内含子或置换位点和几个恒定元件的前体RNA,所述恒定元件包括:CVB3 IRES、高斯萤光素酶表达序列、间隔区、内部双链体区域和同源性臂。环化数据可以参见图12。图12A显示了分辨前体、CircRNA和内含子的色谱图。图12B提供了基于图12A所示的色谱图的环化效率的分级量化,作为内含子构建体的函数。

[1287] 在本实施例中的环状RNA通过体外转录(IVT)而环化,然后通过旋转柱纯化。如果包括与Mg²⁺和鸟苷核苷酸一起温育的另外步骤,所有构建体的环化效率可能更高;但是,去除此步骤可以对环状RNA构建体进行对比和优化。这种水平的优化对于维持大RNA构建体(诸如编码嵌合抗原受体的那些)的高环化效率特别有用。

[1288] 实施例16

[1289] 通过同源性臂存在或长度确定环化效率。

[1290] 产生了包括CVB3 IRES、高斯萤光素酶表达序列、鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、间隔区和内部双链体区域的RNA构建体。用30个核苷酸、25%GC同源性臂或无同源性臂(“NA”)试验了代表3个鱼腥蓝细菌内含子置换位点的构建体。在没有与Mg²⁺一起温育的步骤下使这些构建体环化。测量并对比了环化效率。数据可以参见图13。对于每个缺乏同源性臂

的构建体来说,环化效率更高。图13A提供了环化效率的排序量化;图13B提供了解析前体、circRNA和内含子的色谱图。

[1291] 对于3个置换位点中的每一个,构建了具有10个核苷酸、20个核苷酸和30个核苷酸臂长度和25%、50%和75%GC的构建体。测量了这些构建体的剪接效率,并与没有同源性臂的构建体进行了对比(图14)。剪接效率被定义为在剪接反应中游离内含子相对于总RNA的比例。

[1292] 图15A(左)含有HPLC色谱图,其显示了强同源性臂对提高剪接效率的贡献。左上:75%GC含量,10个核苷酸同源性臂。左中:75%GC含量,20个核苷酸同源性臂。左下:75%GC含量,30个核苷酸同源性臂。

[1293] 图15A(右)显示了HPLC色谱图,其指示增加的剪接效率与增加的切口相伴,在circRNA峰上呈现为肩部。右上:75%GC含量,10个核苷酸同源性臂。右中:75%GC含量,20个核苷酸同源性臂。右下:75%GC含量,30个核苷酸同源性臂。

[1294] 图15B(左)显示了置换位点和同源性臂的选定组合,据推测表现出提高的环化效率。

[1295] 图15B(右)显示了置换位点和同源性臂的选定组合,据推测,经大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶处理后,表现出提高的环化效率。

[1296] 在本实施例中的环状RNA通过体外转录(IVT)环化,然后通过旋转柱纯化。如果包括与 Mg^{2+} 和鸟苷核苷酸一起温育的另外步骤,所有构建体的环化效率可能更高;但是,去除此步骤可以对环状RNA构建体进行对比和优化。这种水平的优化对于维持大RNA构建体(诸如编码嵌合抗原受体的那些)的高环化效率特别有用。

[1297] 实施例17

[1298] 编码嵌合抗原受体的环状RNA。

[1299] 使包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、Kymriah嵌合抗原受体(CAR)表达序列和CVB3 IRES的构建体环化。将100,000个人原代CD3+T细胞用500ng的circRNA电穿孔,并与稳定表达GFP和萤火虫萤光素酶的Raji细胞共培养24小时。效应物与靶标之比(E:T之比)为0.75:1。将100,000个人原代CD3+T细胞进行模拟电穿孔并共培养作为对照(图16)。

[1300] 将100,000个人原代CD3+T细胞的组进行模拟电穿孔或用1 μ g的circRNA电穿孔,然后与稳定表达GFP和萤火虫萤光素酶的Raji细胞共培养48小时。E:T比率为10:1(图17)。

[1301] 通过检测萤火虫发光来确定Raji靶细胞的特异性裂解的量化(图18)。将模拟电穿孔的或用编码不同CAR序列的circRNA电穿孔的100,000个人原代CD3+T细胞与稳定表达GFP和萤火虫萤光素酶的Raji细胞共培养48小时。%特异性裂解被定义为 $1 - [\text{CAR条件发光}] / [\text{模拟条件发光}]$ 。E:T比率为10:1。

[1302] 实施例18

[1303] 环状和线性RNA在Jurkat细胞和静止人T细胞中的表达和功能稳定性。

[1304] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和一组先前试验的IRES的构建体环化,并通过尺寸排阻HPLC纯化反应产物。将150,000个Jurkat细胞用1 μ g环状RNA或5moU-mRNA电穿孔。在电穿孔后24小时测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光(图19A左)。将150,000个静息原代人CD3+T细胞(刺激后10天)用1 μ g环状RNA或5moU-mRNA电穿孔。在电穿孔后24小时测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光(图19A右)。

[1305] 在电穿孔后每24小时测量一次上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光,并随后更换完全培养基。功能稳定性数据如图19B所示。在每种情况下,环状RNA都具有比线性RNA更高的功能稳定性,在Jurkat细胞中差异更为明显。

[1306] 实施例19

[1307] 用线性RNA或不同的环状RNA构建体电穿孔的细胞的IFN- β 1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN γ 和TNF α 转录物诱导。

[1308] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、高斯萤光素酶表达序列和一组先前试验的IRES的构建体环化,并通过尺寸排阻HPLC纯化反应产物。将150,000个CD3+人T细胞用1 μ g环状RNA、5moU-mRNA或免疫刺激性的阳性对照聚肌苷:胞嘧啶电穿孔。在电穿孔后18小时测量IFN- β 1 (图20A)、RIG-I (图20B)、IL-2 (图20C)、IL-6 (图20D)、IFN- γ (图20E)和TNF- α (图20F)转录物诱导。

[1309] 实施例20

[1310] 用不同量的环状或线性RNA电穿孔的CAR表达细胞对靶细胞的特异性裂解和IFN γ 转录物诱导;在不同E:T比率下CAR表达细胞对靶细胞和非靶细胞的特异性裂解。

[1311] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、抗-CD19 CAR表达序列和CVB3 IRES的构建体环化,并通过尺寸排阻HPLC纯化反应产物。将模拟电穿孔的或用不同量的编码抗-CD19 CAR序列的circRNA电穿孔的150,000个人原代CD3+T细胞与稳定表达GFP和萤火虫萤光素酶的Raji细胞以2:1的E:T比率共培养12小时。通过检测萤火虫发光来确定Raji靶细胞的特异性裂解(图21A)。特异性裂解%被定义为1-[CAR条件发光]/[模拟条件发光]。在电穿孔后24小时测量IFN γ 转录物诱导(图21B)。

[1312] 将150,000个人原代CD3+T细胞模拟电穿孔或用500ng编码抗-CD19 CAR序列的circRNA或m1 ψ -mRNA电穿孔,然后以不同E:T比率与稳定表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞共培养24小时。通过检测萤火虫发光来确定Raji靶细胞的特异性裂解(图22A)。特异性裂解被定义为1-[CAR条件发光]/[模拟条件发光]。

[1313] 还将表达CAR的T细胞以不同E:T比率与稳定表达萤火虫萤光素酶的Raji或K562细胞共培养24小时。通过检测萤火虫发光来确定Raji靶细胞或K562非靶细胞的特异性裂解(图22B)。特异性裂解%被定义为1-[CAR条件发光]/[模拟条件发光]。

[1314] 实施例21

[1315] 用编码CAR的环状RNA或线性RNA电穿孔的T细胞对靶细胞的特异性裂解。

[1316] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、抗-CD19 CAR表达序列和CVB3 IRES的构建体环化,并通过尺寸排阻HPLC纯化反应产物。将人原代CD3+T细胞用500ng环状RNA或等摩尔量的m1 ψ -mRNA电穿孔,各自编码靶向CD19的CAR。将Raji细胞以10:1的E:T比率在7天内加入CAR-T细胞培养物中。在第1、3、5和7天测量了两种构建体的特异性裂解%(图23)。

[1317] 实施例22

[1318] 表达抗-CD19 CAR或抗-BCMACAR的T细胞对Raji细胞的特异性裂解。

[1319] 将包括鱼腥蓝细菌内含子/外显子区域、抗-CD19或抗-BCMA CAR表达序列和CVB3 IRES的构建体环化,并通过尺寸排阻HPLC纯化反应产物。将150,000个原代人CD3+T细胞用500ng的circRNA电穿孔,然后以2:1的E:T比率与Raji细胞共培养。在电穿孔后12小时测量特异性裂解%(图24)。

[1320] 实施例23

[1321] 表达抗原的环状和线性RNA的表达、功能稳定性和细胞因子转录物诱导。

[1322] 将包含一个或多个抗原表达序列的构建体环化,并通过尺寸排阻HPLC纯化反应产物。将抗原呈递细胞用环状RNA或mRNA电穿孔。

[1323] 通过ELISA测量体外抗原产生。任选地,在电穿孔后每24小时测量一次抗原产生。在用编码抗原的环状或线性RNA电穿孔抗原呈递细胞后18小时,测量细胞因子转录物诱导或释放。试验的细胞因子可以包括IFN- β 1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN γ 、RANTES和TNF α 。

[1324] 使用纯化的circRNA、纯化的circRNA+反义circRNA和未纯化的circRNA测量体外抗原产生和细胞因子诱导,以找到最佳保留表达和免疫刺激的比率。

[1325] 实施例24

[1326] 在动物模型中的体内抗原和抗体表达。

[1327] 为了评估编码抗原的circRNA的促进体内抗原表达和抗体产生的能力,通过肌肉内注射将递增剂量的编码一种或多种抗原的RNA引入小鼠中。

[1328] 给小鼠注射一次,在28天后收集血液,然后再次注射,在14天后收集血液。通过ELISA测量针对目标抗原的中和抗体。

[1329] 实施例25

[1330] 针对感染的保护。

[1331] 为了评估编码抗原的circRNA的预防或治愈感染的能力,通过肌肉内注射将编码一种或多种病毒(如流感)抗原的RNA引入小鼠中。

[1332] 小鼠接受编码一种或多种抗原的circRNA的初次注射和加强注射。按两周内的体重减轻和死亡率确定针对流感等病毒的保护。

[1333] 实施例26

[1334] 实施例26A:化合物的合成

[1335] 本发明的代表性可电离脂质的合成描述于PCT申请PCT/US2016/052352、PCT/US2016/068300、PCT/US2010/061058、PCT/US2018/058555、PCT/US2018/053569、PCT/US2017/028981、PCT/US2019/025246、PCT/US2018/035419、PCT/US2019/015913、PCT/US2020/063494、以及具有公开号20190314524、20190321489和20190314284的美国申请中,它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

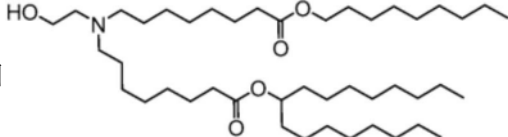
[1336] 实施例26B:化合物的合成

[1337] 本发明的代表性可电离脂质的合成描述于美国专利公开号US20170210697A1中,其内容通过引用整体并入本文。

[1338] 实施例27

[1339] 器官的蛋白表达

[1340] 生成编码FLuc的环状或线性RNA,并将其加载到具有以下配方的转移媒介物中:

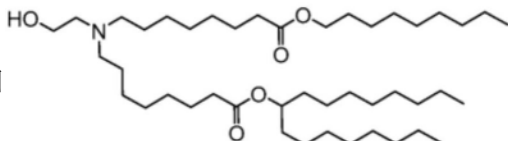
50%由  表示的可电离脂质,10%DSPC,1.5%PEG-DMG,

38.5%胆固醇。给CD-1小鼠施用0.2mg/kg,并在6小时(活体IVIS)和24小时(活体IVIS和离体IVIS)测量发光。测量了肝、脾、肾、肺和心脏的总通量(感兴趣区域的光子/秒)。

[1341] 实施例28

[1342] 在脾脏中的表达分布

[1343] 生成编码GFP的环状或线性RNA,并将其加载到具有以下配方的转移媒介物中:

50%由  表示的可电离脂质,10%DSPC,1.5%PEG-DMG,

38.5%胆固醇。将所述制剂施用给CD-1小鼠。对脾细胞进行流式细胞计量术以确定在不同细胞类型中的表达分布。

[1344] 实施例29

[1345] 实施例29A:纳米颗粒组合物的产生

[1346] 为了研究用于将环状RNA递送至细胞的安全且有效的纳米颗粒组合物,制备并试验了一系列制剂。具体而言,优化了纳米颗粒组合物的脂质组分中的特定元件及其比例。

[1347] 纳米颗粒可以在单一流体流中制备,或通过混合过程制备,诸如微流体学和两个流体流的T型接头混合,其中一个流体流含有环状RNA且另一个流体流具有脂质组分。

[1348] 如下制备脂质组合物:将可电离脂质、任选的辅助脂质(诸如DOPE、DSPC或油酸,可得自Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL)、PEG脂质(诸如1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇,也被称作PEG-DMG,可得自Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL)和结构脂质诸如胆固醇以例如约40或50mM的浓度在溶剂(例如,乙醇)中混合。溶液应冷藏储存,例如,在-20℃下储存。将脂质组合以产生期望的摩尔比(参见,例如,下面表17a和17b),并用水和乙醇稀释至最终的脂质浓度,例如,在约5.5mM至约25mM之间。

[1349] 表17a

[1350]

制剂编号	描述
1	将 C12-200、DOPE、Chol 和 DMG-PEG2K (40:30:25:5)的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合,并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地,从 1 mg/mL 储备液制备 circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬酸盐 /150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性 circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤,用 1×PBS (pH 7.4)渗滤,浓缩并在 2-8℃储存。
2	将 DODAP、DOPE、胆固醇和 DMG-PEG2K (18:56:20:6)的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合,并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地,从 1 mg/mL 储备液制备 EPO circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬

[1351]

	酸盐/150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性 circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤, 用 1×PBS (pH 7.4) 渗滤, 浓缩并在 2-8°C 储存。终浓度=1.35 mg/mL EPO circRNA (包封)。Zave=75.9 nm (Dv(50)=57.3 nm; Dv(90)=92.1 nm)。
3	将 HGT4003、DOPE、胆固醇和 DMG-PEG2K (50:25:20:5) 的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合, 并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地, 从 1 mg/mL 储备液制备 circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬酸盐/150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性 circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤, 用 1×PBS (pH 7.4) 渗滤, 浓缩并在 2-8°C 储存。
4	将 ICE、DOPE 和 DMG-PEG2K (70:25:5) 的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合, 并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地, 由 1 mg/mL 储备液制备 circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬酸盐/150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性 circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤, 用 1×PBS (pH 7.4) 渗滤, 浓缩并在 2-8°C 储存。
5	将 HGT5000、DOPE、胆固醇和 DMG-PEG2K (40:20:35:5) 的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合, 并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地, 由 1 mg/mL 储备液制备 EPO circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬酸盐/150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性 circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤, 用 1×PBS (pH 7.4) 渗滤, 浓缩并在 2-8°C 储存。终浓度=1.82 mg/mL EPO mRNA (包封)。Zave=105.6 nm (Dv(50)=53.7 nm; Dv(90)=157 nm)。
6	将 HGT5001、DOPE、胆固醇和 DMG-PEG2K (40:20:35:5) 的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合, 并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地, 由 1 mg/mL 储备液制备 EPO circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬酸盐/150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性

[1352]

	circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤，用 1×PBS (pH 7.4) 渗滤，浓缩并在 2-8°C 储存。
7	将 HGT5001、DOPE、胆固醇和 DMG-PEG2K (35:16:46.5:2.5) 的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合，并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地，由 1 mg/mL 储备液制备 EPO circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬酸盐/150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性 circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤，用 1×PBS (pH 7.4) 渗滤，浓缩并在 2-8°C 储存。
8	将 HGT5001、DOPE、胆固醇和 DMG-PEG2K (40:10:40:10) 的 50 mg/mL 乙醇溶液的等分试样混合，并用乙醇稀释至 3 mL 终体积。单独地，由 1 mg/mL 储备液制备 EPO circRNA 的水性缓冲溶液(10 mM 柠檬酸盐/150 mM NaCl, pH 4.5)。将脂质溶液快速注射进水性 circRNA 溶液中并摇动以产生在 20%乙醇中的最终悬浮液。将得到的纳米颗粒悬浮液过滤，用 1×PBS (pH 7.4) 渗滤，浓缩并在 2-8°C 储存。

[1353] 在某些实施方案中，转移媒介物具有在表17a中描述的配方。

[1354] 表17b

[1355]

组合物 (mol %)	组分
40:20:38.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
45:15:38.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
50:10:38.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
55:5:38.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG

[1356]

组合物 (mol %)	组分
60:5:33.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
45:20:33.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
50:20:28.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
55:20:23.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
60:20:18.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
40:15:43.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
50:15:33.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
55:15:28.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
60:15:23.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
40:10:48.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
45:10:43.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
55:10:33.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
60:10:28.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
40:5:53.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
45:5:48.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
50:5:43.5:1.5	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
40:20:40:0	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
45:20:35:0	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
50:20:30:0	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
55:20:25:0	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
60:20:20:0	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG
40:15:45:0	化合物: 磷脂: 植物甾醇*:PEG-DMG

[1357] 在某些实施方案中,转移媒介物具有在表17b中描述的配方。

[1358] 对于包含circRNA的纳米颗粒组合物,将在去离子水中的0.1mg/ml浓度的circRNA

溶液稀释在缓冲液(例如,pH在3至4之间的50mM柠檬酸钠缓冲液)中,以形成储备溶液。可替换地,将在去离子水中的0.15mg/ml浓度的circRNA溶液稀释在缓冲液(例如,pH在3至4.5之间的6.25mM乙酸钠缓冲液)中,以形成储备溶液。

[1359] 通过将脂质溶液与包含环状RNA的溶液以约5:1至约50:1的脂质组分与circRNA重量比混合,制备包含环状RNA和脂质组分的纳米颗粒组合物。使用例如基于NanoAssemblr微流体的系统将脂质溶液以约10ml/min至约18ml/min之间或约5ml/min至约18ml/min之间的流速快速注入circRNA溶液中,以产生水与乙醇比率在约1:1至约4:1之间的悬浮液。

[1360] 可以通过透析处理纳米颗粒组合物以除去乙醇并实现缓冲液交换。将制剂使用具有10kDa或20kDa的分子量截止值的Slide-A-Lyzer盒(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL)在pH7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中透析两次,体积为主要产物的200倍。然后将制剂在4°C透析过夜。将得到的纳米颗粒悬浮液通过0.2 μ m无菌过滤器(Sarstedt, Nümbrecht, 德国)过滤到玻璃瓶中,并用卷边压接闭合密封。通常得到0.01mg/ml至0.15mg/ml的纳米颗粒组合物溶液。

[1361] 上述方法诱导纳米沉淀和颗粒形成。

[1362] 可以使用包括但不限于T型接头和直接注射等替代工艺来实现相同的纳米沉淀。

[1363] B. 纳米颗粒组合物的表征

[1364] Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)可以用于测定纳米颗粒组合物的粒度、多分散性指数(PDI)和 ζ 电位,在1 $\times$ PBS中测定粒度,并在15mM PBS中测定 ζ 电位。

[1365] 紫外-可见光谱法可以用于测定纳米颗粒组合物中circRNA的浓度。将100 μ L在1 $\times$ PBS中稀释的制剂加入到900 μ L甲醇和氯仿的4:1(v/v)混合物中。在混合后,记录溶液的吸光度光谱,例如,在DU 800分光光度计(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)上在230nm至330nm之间记录。基于在组合物中使用的circRNA的消光系数以及在例如260nm波长处的吸光度与在例如330nm波长处的基线值之间的差异,可以计算纳米颗粒组合物中的circRNA浓度。

[1366] QUANT-ITTM **RIBOGREEN®** RNA测定(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)可以用于评价纳米颗粒组合物对circRNA的包封。将样品在TE缓冲溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)中稀释至大约5 μ g/mL或1 μ g/mL的浓度。将50 μ L稀释的样品转移至聚苯乙烯96孔平板,并向孔中加入50 μ L的TE缓冲液或50 μ L的2-4% Triton X-100溶液。将平板在37°C的温度温育15分钟。将**RIBOGREEN®**试剂在TE缓冲液中以1:100或1:200稀释,并向每个孔中加入100 μ L该溶液。可以使用荧光平板读数器(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA)在例如约480nm的激发波长和例如约520nm的发射波长测量荧光强度。从每个样品的荧光值减去试剂空白的荧光值,并通过将完整样品(未添加Triton X-100)的荧光强度除以被破坏的样品(由于添加Triton X-100而造成)的荧光值,确定游离circRNA的百分比。

[1367] 实施例29B: 体内制剂研究

[1368] 为了监测各种纳米颗粒组合物将circRNA递送至靶细胞的有效性,制备了包括circRNA的不同纳米颗粒组合物并将其施用给啮齿动物群体。给小鼠静脉内地、肌肉内地、动脉内地或肿瘤内地施用单次剂量,其包括具有脂质纳米颗粒制剂的纳米颗粒组合物。在

某些情况下,可能使小鼠吸入剂量。剂量大小可以在0.001mg/kg至10mg/kg的范围内,其中10mg/kg描述的剂量包括每1kg小鼠体重10mg在纳米颗粒组合物中的circRNA。还可以采用包括PBS在内的对照组合物。

[1369] 在将纳米颗粒组合物施用给小鼠后,可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、生物发光成像或其它方法测量特定制剂及其剂量的剂量递送曲线、剂量应答和毒性。还可以评价蛋白表达的时程。从啮齿动物收集的用于评价的样品可以包括血液和组织(例如,来自肌肉内注射部位的肌肉组织和内部组织);样品收集可能涉及动物的处死。

[1370] 通过施用包含circRNA的组合物诱导的更高蛋白表达水平将指示更高的circRNA翻译和/或纳米颗粒组合物circRNA递送效率。由于非RNA组分被认为不会影响翻译机制本身,因此更高的蛋白表达水平可能指示,与其它纳米颗粒组合物或其不存在相比,给定的纳米颗粒组合物递送circRNA的更高效率。

[1371] 实施例30

[1372] 纳米颗粒组合物的表征

[1373] Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd,Malvern,Worcestershire,英国)可以用于测定转移媒介物组合物的粒度、多分散性指数(PDI)和 ζ 电位,在1×PBS中测定粒度,并在15mM PBS中测定 ζ 电位。

[1374] 紫外-可见光谱法可以用于测定转移媒介物组合物中治疗性和/或预防性(例如, RNA)的浓度。将100 μ L在1×PBS中稀释的制剂加入到900 μ L甲醇和氯仿的4:1(v/v)混合物中。在混合后,记录溶液的吸光度光谱,例如,在DU 800分光光度计(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)上在230nm至330nm之间记录。基于在组合物中使用的治疗剂和/或预防剂的消光系数以及在例如260nm波长处的吸光度与在例如330nm波长处的基线值之间的差异,可以计算转移媒介物组合物中的治疗剂和/或预防剂浓度。

[1375] 对于包含RNA的转移媒介物组合物,QUANT-IT™ **RIBOGREEN®** RNA测定(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)可以用于评价转移媒介物组合物对RNA的包封。将样品在TE缓冲溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)中稀释至大约5 μ g/mL或1 μ g/mL的浓度。将50 μ L稀释的样品转移至聚苯乙烯96孔平板,并向孔中加入50 μ L的TE缓冲液或50 μ L的2-4% Triton X-100溶液。将平板在37°C的温度温育15分钟。将**RIBOGREEN®**试剂在TE缓冲液中以1:100或1:200稀释,并向每个孔中加入100 μ L该溶液。可以使用荧光平板读数器(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA)在例如约480nm的激发波长和例如约520nm的发射波长测量荧光强度。从每个样品的荧光值减去试剂空白的荧光值,并通过将完整样品(未添加Triton X-100)的荧光强度除以被破坏的样品(由于添加Triton X-100而造成)的荧光值,确定游离RNA的百分比。

[1376] 实施例31

[1377] T细胞靶向

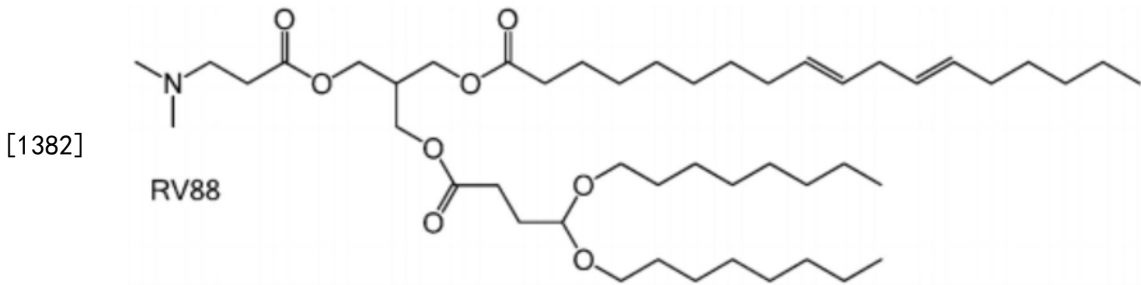
[1378] 为了将转移媒介物靶向T细胞,将T细胞抗原结合剂(例如,抗-CD8抗体)偶联到转移媒介物的表面。在PBS中的EDTA存在下,抗-T细胞抗原抗体被过量的DTT轻微还原,以暴露游离铰链区硫醇。为了除去DTT,使抗体穿过脱盐柱。使用异双功能交联剂SM(PEG) 24将抗体锚定到加载有circRNA的转移媒介物的表面(在PEG脂质的头部基团中存在胺基,在抗体上的游离硫醇基由DTT产生,SM(PEG) 24在胺基和硫醇基之间进行交联)。首先将转移媒介物与

过量的SM(PEG) 24温育,并离心以除去未反应的交联剂。然后将活化的转移媒介物与过量的还原的抗-T细胞抗原抗体一起温育。使用离心过滤装置除去未结合的抗体。

[1379] 实施例32

[1380] 使用RV88的含有RNA的转移媒介物。

[1381] 在本实施例中,使用2-D涡旋微流体芯片合成含有RNA的转移媒介物,所述芯片带有阳离子脂质RV88以递送circRNA。



[1383] 表18a

[1384]

材料和仪器	供应商	目录号
1M Tris-HCl, pH 8.0, 无菌	Teknova	T1080
5M 氯化钠溶液	Teknova	S0250
QB 柠檬酸盐缓冲液, pH 6.0 (100 mM)	Teknova	Q2446
不含核酸酶的水	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV88	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
胆固醇	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
乙醇	Acros Organic	615090010
5 ml 硼硅玻璃瓶	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25 脱盐柱	GE Healthcare	VWR Cat. #95055-984
Quant-iT RiboGreen RNA 测定试剂盒	Molecular Probes/Life Technologies	R11490
黑色 96-孔微板	Greiner	655900

[1385] RV88、DSPC和胆固醇都在硼硅瓶中以10mg/ml的浓度在乙醇中制备。脂质14:0-PEG2K PE也在硼硅玻璃瓶中以4mg/ml的浓度制备。通过将脂质在乙醇中声处理2分钟,将脂质以储备浓度溶解。然后将溶液在设定为170rpm的轨道倾斜振荡器上在37℃加热10分钟。然后将小瓶在26℃平衡至少45分钟。然后通过添加在表18b中所示的体积的储备脂质来混

合脂质。然后用乙醇调节溶液,使得最终脂质浓度为7.92mg/ml。

[1386] 表18b

组合物	MW	%	nmol	mg	储备物(mg/ml)	ul	乙醇 (ul)
RV88	794.2	40%	7200	5.72	10	571.8	155.3
DSPC	790.15	10%	1800	1.42	10	142.2	
胆固醇	386.67	48%	8640	3.34	10	334.1	
PEG2K	2693.3	2%	360	0.97	4	242.4	

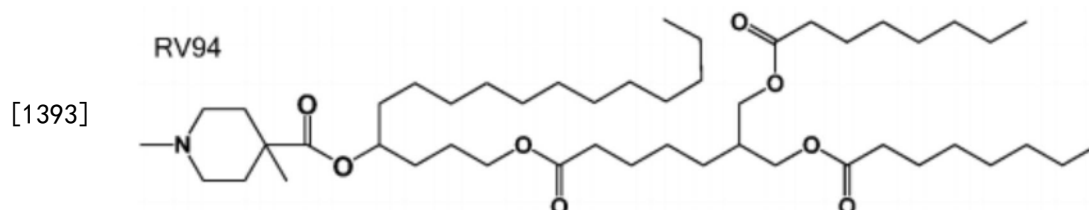
[1388] 将RNA使用75mM柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)制备为储备溶液,并且RNA浓度为1.250mg/ml。然后用75mM柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)将RNA浓度调整为0.1037mg/ml,平衡至26°C。然后将溶液在26°C温育至少25分钟。

[1389] 用乙醇清洁微流体室,并通过在一个注射器中装入RNA溶液和在另一个注射器中装入乙醇脂质来准备neMYSIS注射泵。两个注射器都被装载并受neMESYS软件控制。然后将溶液施加到混合芯片,水相与有机相比率为2,且总流速为22ml/min(RNA为14.67ml/min,且脂质溶液为7.33ml/min)。两台泵同步启动。将从微流体芯片流出的混合器溶液收集成4x1 ml级分,其中第一个级分作为废物被丢弃。使用G-25微型脱盐柱将含有RNA-脂质体的剩余溶液交换为10mM Tris-HCl、1mM EDTA, pH 7.5。在缓冲液交换后,分别通过DLS分析和Ribogreen测定来表征材料的尺寸和RNA捕获。

[1390] 实施例33

[1391] 使用RV94的含有RNA的转移媒介物。

[1392] 在本实施例中,使用2-D涡旋微流体芯片合成含有RNA的脂质体,所述芯片带有阳离子脂质RV94以递送circRNA。



[1394] 表19

[1395]

材料和仪器	供应商	目录号
1M Tris-HCl, pH 8.0, 无菌	Teknova	T1080
5M 氯化钠溶液	Teknova	S0250
QB 柠檬酸盐缓冲液, pH 6.0 (100 mM)	Teknova	Q2446
不含核酸酶的水	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV94	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
胆固醇	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
乙醇	Acros Organic	615090010
5 ml 硼硅玻璃瓶	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25 脱盐柱	GE Healthcare	VWR Cat. #95055-984
Quant-iT RiboGreen RNA 测定试剂盒	Molecular Probes/Life Technologies	R11490
黑色 96-孔微板	Greiner	655900

[1396] 按照实施例29的方法使用表20中列出的材料量制备脂质,直至最终脂质浓度为7.92mg/ml。

[1397] 表20

[1398]

组合物	MW	%	nmol	mg	储备物 (mg/ml)	ul	乙醇 (ul)
RV94	808.22	40%	2880	2.33	10	232.8	155.3
DSPC	790.15	10%	720	0.57	10	56.9	
胆固醇	386.67	48%	3456	1.34	10	133.6	
PEG2K	2693.3	2%	144	0.39	4	97.0	

[1399] 将circRNA的水溶液用75mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 制备为储备溶液,circRNA浓度为1.250mg/ml。然后用75mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 将RNA浓度调整为0.1037mg/ml,平衡至26°C。然后将溶液在26°C温育至少25分钟。

[1400] 用乙醇清洁微流体室,并通过在一个注射器中装入RNA溶液和在另一个注射器中装入乙醇脂质来准备neMYSIS注射泵。两个注射器都被装载并受neMESYS软件控制。然后将溶液施加到混合芯片,水相与有机相比率为2,且总流速为22ml/min (RNA为14.67ml/min,且脂质溶液为7.33ml/min)。两台泵同步启动。将从微流体芯片流出的混合器溶液收集成4x1 ml级分,其中第一个级分作为废物被丢弃。如上所述使用G-25微型脱盐柱将含有circRNA-转移媒介物的剩余溶液交换为10mM Tris-HCl、1mM EDTA, pH 7.5。在缓冲液交换后,分别通过DLS分析和Ribogreen测定来表征材料的尺寸和RNA捕获。脂质体的生物物理学分析如表21所示。

[1401] 表21

样品 名称	N:P 比率	TFR	比率	RNA包封量	RNA包封 收率	大小	
						d.nm	PDI
[1402] SAM-RV94	8	22	(水相/有机相) 2	($\mu\text{g/ml}$) 31,46	% 86,9	113,1	0,12

[1403] 实施例34

[1404] 在线混合的一般方案

[1405] 制备单个和分开的储备溶液——一种含有脂质,且另一种含有circRNA。通过溶解在90%乙醇中来制备含有期望脂质或脂质混合物、DSPC、胆固醇和PEG脂质的脂质储备物。剩余的10%是低pH柠檬酸盐缓冲液。脂质储备物的浓度为4mg/mL。该柠檬酸盐缓冲液的pH可以在pH 3至pH 5的范围内,取决于所用脂质的类型。还将circRNA以4mg/mL的浓度溶解在柠檬酸盐缓冲液中。制备5mL每种储备溶液。

[1406] 储备溶液完全澄清,并确保脂质在与circRNA结合之前完全溶解。可以加热储备溶液以完全溶解脂质。在该过程中使用的circRNA可以是未修饰的或修饰的寡核苷酸,并且可以与亲脂部分(诸如胆固醇)缀合。

[1407] 通过将各溶液泵送到T型接头来合并各个储备物。使用双头Watson-Marlow泵同时控制两个流的启动和停止。为了增加线性流速,将1.6mm聚丙烯管进一步缩小至0.8mm管。将聚丙烯管线(ID=0.8mm)连接至T型接头的任一侧。聚丙烯T具有1.6mm的线性边缘,因此体积为4.1mm³。将聚丙烯管线的每个大端(1.6mm)放入装有溶解的脂质储备物或溶解的circRNA的试管中。在T型接头后,将单个管道放在合并流出口处。然后将管道延伸到含有2倍体积PBS的容器中,并快速搅拌。将该泵的流速设置为300rpm或110mL/min。通过透析除去乙醇并将其替换为PBS。然后使用离心或渗滤将脂质制剂浓缩至适当的工作浓度。

[1408] C57BL/6小鼠(Charles River Labs,MA)通过尾静脉注射接受盐水或配制的circRNA。在施用后的不同时间点,通过眶后放血收集血清样品。使用产色测定法(Biophen FVTI, Aniara Corporation, OH)测定样品中因子VII蛋白的血清水平。为了确定因子VII的肝脏RNA水平,将动物处死,并收获肝脏并在液氮中快速冷冻。从冷冻的组织制备组织裂解物,并使用分支DNA测定(QuantiGene Assay, Panomics, CA)定量分析因子VII的肝脏RNA水平。

[1409] 在C57BL/6小鼠静脉内(推注)注射后48小时,在FVTI siRNA处理过的动物中评价FVII活性。按照制造商的说明书在微量培养板规模,使用商购可得的试剂盒测量FVII以确定血清或组织中的蛋白水平。针对未经处理的对照小鼠测定FVII减少,并将结果以残留FVII%表示。在每种新型脂质体组合物的筛选中使用两种剂量水平(0.05和0.005mg/kg FVII siRNA)。

[1410] 实施例36

[1411] 使用预成型囊泡的circRNA制剂。

[1412] 使用预成型囊泡方法制备含有阳离子脂质的转移媒介物。将阳离子脂质、DSPC、胆

固醇和PEG-脂质分别以40/10/40/10的摩尔比溶解在乙醇中。将脂质混合物加入水性缓冲液(50mM柠檬酸盐,pH 4)中,并混合至最终乙醇和脂质浓度分别为30%(体积/体积)和6.1mg/mL,并在室温平衡2分钟后挤出。使用Lipex挤出机(Northern Lipids,Vancouver,BC)将水合的脂质在22°C通过两个堆叠的80nm孔尺寸过滤器(Nuclepore)挤出,直到获得通过Nicom分析确定的70-90nm的囊泡直径。对于不形成小囊泡的阳离子脂质混合物,用较低pH缓冲液(50mM柠檬酸盐,pH 3)水合脂质混合物以质子化DSPC头部基团上的磷酸酯基团会有助于形成稳定的70-90nm囊泡。

[1413] 将FVII circRNA(溶解于含有30%乙醇的50mM柠檬酸盐pH 4水溶液中)在混合下以约5mL/min的速度加入预平衡至35°C的囊泡中。在达到0.06(重量/重量)的最终目标circRNA/脂质比率之后,将混合物在35°C进一步温育30分钟,以使囊泡重组并包封FVII RNA。然后通过透析或切向流渗滤除去乙醇并将外部缓冲液替换为PBS(155mM NaCl,3mM Na₂HPO₄,1mM KH₂PO₄,pH 7.5)。使用尺寸排阻旋转柱或离子交换旋转柱除去未包封的RNA后,确定最终包封的circRNA与脂质之比。

[1414] 实施例37

[1415] 实施例37A:从工程改造的环状RNA表达三特异性抗原结合蛋白

[1416] 环状RNA被设计为包括:(1)3'剪接后I组内含子片段;(2)内核糖体进入位点(IRES);(3)三特异性抗原结合蛋白编码区;和(4)3'双链体区域。构建三特异性抗原结合蛋白区域以产生将与靶抗原(例如,GPC3)结合的示例性的三特异性抗原结合蛋白。

[1417] 实施例37B:scFv CD3结合结构域的产生

[1418] 人CD3 ϵ 链规范序列为Uniprot登记号P07766。人CD3 γ 链规范序列为Uniprot登记号P09693。人CD3 δ 链规范序列为Uniprot登记号P043234。通过亲和力成熟等已知技术产生针对CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 的抗体。当使用鼠抗-CD3抗体作为起始材料时,临床环境需要鼠抗-CD3抗体的人源化,其中小鼠特异性的残基可能在接受本文描述的三特异性抗原结合蛋白治疗的受试者中诱导人抗小鼠抗原(HAMA)应答。通过将鼠抗-CD3抗体的CDR区域移植到适当的人种系受体框架上来实现人源化,任选地包括对CDR和/或框架区的其它修饰。

[1419] 因此,将人或人源化的抗-CD3抗体用于生成三特异性抗原结合蛋白的CD3结合结构域的scFv序列。获得编码人或人源化的VL和VH结构域的DNA序列,并任选地优化构建体的密码子以在来自智人的细胞中表达。VL和VH结构域在scFv中出现的顺序是多种多样的(即VL-VH或VH-VL方向),并且“G₄S”或“G₄S”亚基的三个拷贝(G₄S)₃连接可变结构域以创建scFv结构域。抗-CD3 scFv质粒构建体可以具有任选的Flag、His或其它亲和标签,并且电穿孔到HEK293或其它合适的人或哺乳动物细胞系中并进行纯化。验证测定包括通过FACS的结合分析、使用Proteon的动力学分析和CD3表达细胞的染色。

[1420] 实施例37C:scFv磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)结合结构域的产生

[1421] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)是存在于肝细胞癌上、但不存在于健康正常肝组织上的细胞表面蛋白之一。在肝细胞癌中经常观察到其升高,并且与HCC患者的不良预后有关。已知它会活化Wnt信号传递。已经生成GPC3抗体,包括MDX-1414、HN3、GC33和YP7。

[1422] 以与上述产生针对CD3的scFv结合结构域的方法类似的方法产生与GPC-3或另一种靶抗原结合的scFv。

[1423] 实施例37D:三特异性抗原结合蛋白在体外的表达

[1424] 使用CHO细胞表达系统(**Flp-In®**, Life Technologies), 即CHO-K1中国仓鼠卵巢细胞(ATCC, CCL-61)的衍生物(Kao和Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968; 60 (4): 1275-81)。根据Life Technologies提供的标准细胞培养方案对粘附细胞进行传代培养。

[1425] 为了适应悬浮生长, 将细胞从组织培养瓶中分离出来并置于无血清培养基中。将悬浮适应细胞冷冻保存在含有10% DMSO的培养基中。

[1426] 通过转染悬浮适应细胞来产生稳定表达分泌型三特异性抗原结合蛋白的重组CHO细胞系。在使用抗生素潮霉素B进行选择的过程中, 每周测量两次活细胞密度, 并将细胞离心并重新悬浮在新鲜选择培养基中, 最大密度为 0.1×10^6 个活细胞/mL。在2-3周的选择后, 回收稳定表达三特异性抗原结合蛋白的细胞池, 此时将细胞转移到摇瓶中的标准培养基中。通过进行蛋白凝胶电泳或流式细胞计量术确认重组分泌蛋白的表达。将稳定的细胞池在含有DMSO的培养基中冷冻保存。

[1427] 在稳定转染的CHO细胞系的10天补料分批培养物中通过分泌到细胞培养物上清液中产生三特异性抗原结合蛋白。10天后收获细胞培养物上清液, 培养物生存力通常>75%。每隔一天从生产培养物中收集样品并评估细胞密度和生存力。在收获当天, 将细胞培养物上清液通过离心和真空过滤进行澄清, 然后进一步使用。

[1428] 通过SDS-PAGE分析细胞培养物上清液中的蛋白表达滴度和产物完整性。

[1429] 实施例37E: 三特异性抗原结合蛋白的纯化

[1430] 在两步程序中从CHO细胞培养物上清液纯化三特异性抗原结合蛋白。在第一步中对构建体进行亲和色谱法, 随后在第二步中在Superdex 200上进行制备型尺寸排阻色谱法(SEC)。对样品进行缓冲液交换并通过超滤浓缩至>1mg/mL的典型浓度, 通过在还原和非还原条件下的SDS PAGE评估最终样品的纯度和均匀性(通常>90%), 随后分别使用抗- (半衰期延长结构域) 或抗独特型抗体以及通过分析型SEC进行免疫印迹法。将纯化的蛋白以等份试样在-80°C储存直至使用。

[1431] 实施例38

[1432] 具有半衰期延长结构域的经工程改造的环状RNA的表达具有比不具有半衰期延长结构域的环状RNA改善的药代动力学参数

[1433] 将在实施例37的circRNA分子上编码的三特异性抗原结合蛋白作为0.5mg/kg快速推注肌肉内地施用给食蟹猴。另一组食蟹猴接受在大小相当的circRNA分子上编码的蛋白, 其具有与CD3和GPC-3的结合结构域, 但缺乏半衰期延长结构域。第三组和第四组分别接受具有CD3和半衰期延长结构域结合结构域的circRNA分子上编码的蛋白以及具有GPC-3和半衰期延长结构域的蛋白。由circRNA编码的两种蛋白在大小上与三特异性抗原结合蛋白相当。每个试验组由5只猴子组成。在指定的时间点收集血清样品, 进行连续稀释, 并使用对CD3和/或GPC-3的结合ELISA测定蛋白的浓度。

[1434] 使用试验物质血浆浓度进行药代动力学分析。当相对于定量施用后时间绘制时, 每种试验物质的组平均血浆数据符合多指数曲线。对数据通过标准的双室模型进行拟合, 该模型具有推注输入以及分布和消除阶段的一阶速率常数。静脉内施用数据的最佳拟合的一般方程式为: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, 其中 $c(t)$ 是在时间 t 时的血浆浓度, A 和 B 是在 Y 轴上的截距, 且 α 和 β 分别是分布和消除阶段的表观一阶速率常数。 α -阶段是清除的初始阶段, 并反映蛋白在动物的所有细胞外流体中的分布, 而衰减曲线的第二或 β -阶段部分代表真正的血浆

清除率。用于拟合这样的方程式的方法是本领域众所周知的。例如, $A = D/V(a - k_{21}) / (a - p)$, $B = D/V(p - k_{21}) / (a - p)$, 并且 α 和 β (对于 $\alpha > \beta$) 是二次方程式 $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ 的根, 使用以下估计参数: V = 分布容积, k_{10} = 清除率, k_{12} = 从隔室1到隔室2的传递速率, 且 k_{21} = 从隔室2到隔室1的传递速率, 以及 D = 施用的剂量。

[1435] 数据分析: 使用KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V.3.09 Copyright 1986-1997.Synergy Software.Reading, Pa.) 绘制浓度相对于时间的曲线图。报告为低于可报告值 (LTR) 的值未被包含在PK分析中, 并且也不以图形方式表示。使用WinNonlin软件 (WinNonlin® Professional V.3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999.Pharsight Corporation.Mountain View, Calif) 通过隔室分析来确定药代动力学参数。按照Ritschel W A和Kearns G L, 1999, EST: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 第5版, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D C 中所述计算药代动力学参数。

[1436] 预见到, 实施例37的circRNA分子上编码的三特异性抗原结合蛋白具有改善的药代动力学参数, 诸如与缺乏半衰期延长结构域的蛋白相比, 消除半衰期增加。

[1437] 实施例39

[1438] 三特异性抗原结合蛋白的细胞毒性

[1439] 在体外评价实施例37的circRNA分子上编码的三特异性抗原结合蛋白介导的对GPC-3+靶细胞的T细胞依赖性细胞毒性。

[1440] 将荧光标记的GPC3靶细胞与随机供体的分离的PBMC或作为效应细胞的T细胞在实施例37的三特异性抗原结合蛋白存在下温育。在37°C在保湿培养箱中温育4小时后, 在荧光分光计中测定荧光染料从靶细胞向上清液中的释放。未与实施例37的三特异性抗原结合蛋白一起温育的靶细胞和在温育结束时通过添加皂苷而完全裂解的靶细胞分别充当阴性对照和阳性对照。

[1441] 基于测量的剩余活靶细胞, 根据下式计算特异性细胞裂解的百分比: $[1 - (\text{活靶标数目 (样品)} / \text{活靶标数目 (自发)})] \times 100\%$ 。使用GraphPad软件通过非线性回归/4-参数逻辑拟合计算S形剂量应答曲线和EC50值。使用Prism软件的4参数逻辑拟合分析, 利用给定抗体浓度获得的裂解值来计算S形剂量-应答曲线。

[1442] 实施例40

[1443] 具有环状RNA的脂质纳米颗粒制剂

[1444] 使用带有‘NextGen’混合室的Precision Nanosystems Ignite仪器形成脂质纳米颗粒 (LNP)。乙醇相以16:1:4:1重量比或62:4:33:1摩尔比含有可电离脂质10c-7、DSPC、胆固醇和DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.), 与含有环状RNA和25mM乙酸钠缓冲液 (pH 5.2) 的水相组合。使用3:1的水相与乙醇相的混合比。然后将配制的LNP在1L水中透析, 并在18小时内交换2次。将透析的LNP使用0.2μm过滤器过滤。在体内定量施用前, 将LNP在PBS中稀释。通过动态光散射确定LNP大小。使用Malvern Panalytical Zetasizer Pro测量含有1mL的20μg/mL的LNP的PBS溶液 (pH 7.4) 的比色皿的Z平均值。记录了Z平均值和多分散性指数。

[1445] 40.1脂质10c-7和10c-8的制剂

[1446] 使用带有‘NextGen’混合室的Precision Nanosystems Ignite仪器形成脂质纳米

颗粒(LNP)。乙醇相以16:1:4:1重量比或62:4:33:1摩尔比含有可电离脂质10c-7或脂质10c-28、DOPE、胆固醇和DSPE-PEG 2000(Avanti Polar Lipids Inc.),与含有环状RNA和25mM乙酸钠缓冲液(pH 5.2)的水相组合。使用3:1的水相与乙醇相的混合比。然后将配制的LNP在1L水中透析,并在18小时内交换2次。将透析的LNP使用0.2 μ m过滤器过滤。在体内定量施用前,将LNP在PBS中稀释。通过动态光散射确定LNP大小。使用Malvern Panalytical Zetasizer Pro测量含有1mL的20 μ g/mL的LNP的PBS溶液(pH 7.4)的比色皿的Z平均值。记录了Z平均值和多分散性指数。

[1447] 实施例41

[1448] 绿色荧光蛋白(GFP)或嵌合抗原受体(CAR)的体外递送

[1449] 用包封GFP的LNP转染人PBMC(Stemcell Technologies)并通过流式细胞计量术检查。将来自五个不同供体的PBMC(PBMC A-E)与一种LNP组合物一起在37 $^{\circ}$ C在RPMI、2%人血清、IL-2(10ng/mL)和50uM BME中在体外温育,所述LNP组合物含有编码GFP或CD19-CAR的环状RNA(200ng)。未与LNP温育的PBMC用作阴性对照。在LNP温育后24、48或72小时,对细胞分析CD3、CD19、CD56、CD14、CD11b、CD45、可固定的活死细胞和有效负载(GFP或CD19-CAR)。

[1450] 代表性数据如图27A和27B所示,表明试验的LNP能够将环状RNA递送到原代人免疫细胞中,从而产生蛋白表达。

[1451] 实施例42

[1452] 多种IRES变体可以介导鼠CD19 CAR的体外表达

[1453] 编码抗-鼠CD19 CAR的多种环状RNA构建体含有独特的IRES序列,并被脂转染到1C1C7细胞系中。在脂转染之前,将1C1C7细胞在完全RPMI中扩增数天。一旦将细胞扩增到适当数目,就用四种不同的环状RNA构建体对1C1C7细胞进行脂转染(Invitrogen RNAiMAX)。24小时以后,将1C1C7细胞与His-标记的重组鼠CD19(Sino Biological)蛋白一起温育,然后用二级抗-His抗体染色。随后,通过流式细胞计量术分析细胞。

[1454] 代表性数据如图26所示,显示来自所示病毒(黑线姬鼠小核糖核酸病毒、山羊嶂病毒、副牛病毒和Salivirus)的IRES能够驱动抗-小鼠CD19 CAR在鼠T细胞中的表达。

[1455] 实施例43

[1456] 鼠CD19 CAR在体外介导肿瘤细胞杀死

[1457] 将编码抗-小鼠CD19 CAR的环状RNA电穿孔到鼠T细胞中以评价CAR介导的细胞毒性。对于电穿孔,将T细胞使用ThermoFisher的Neon转染系统用编码抗-小鼠CD19 CAR的环状RNA电穿孔,然后静置过夜。对于细胞毒性测定,将电穿孔的T细胞与Fluc+靶细胞和非靶细胞一起以1:1比例在含有10%FBS、IL-2(10ng/mL)和50uM BME的完全RPMI中共培养,并在37 $^{\circ}$ C温育过夜。在共培养后24小时使用萤光素酶测定系统(Promega Brightglo Luciferase System)测量细胞毒性,以检测Fluc+靶细胞和非靶细胞的裂解。相对于未转染的模拟信号计算所显示的值。

[1458] 代表性数据如图27所示,显示由环状RNA表达的抗-小鼠CD19CAR在体外鼠T细胞中具有功能。

[1459] 实施例44

[1460] 与由mRNA表达相比,由环状RNA表达的CD19 CAR具有更高的收率和更大的细胞毒性效应

[1461] 将编码抗-CD19嵌合抗原受体环状RNA电穿孔到人外周T细胞中以评价表面表达和CAR介导的细胞毒性,所述抗原受体从N端到C端包括FMC63衍生的scFv、CD8跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内结构域。为了对比,在本实验中将环状RNA电穿孔的T细胞与mRNA电穿孔的T细胞进行了对比。为了电穿孔,使用来自供体人PBMC的商购可得的T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)从人PBMC分离CD3⁺T细胞。在分离后,用抗-CD3/抗-CD28(Stemcell Technologies)刺激T细胞,并在37°C在含有10%FBS、IL-2 (10ng/mL) 和50uM BME的完全RPMI中扩增5天。在刺激后五天,将T细胞使用ThermoFisher的Neon转染系统用编码抗-人CD19 CAR的环状RNA电穿孔,并随后静置过夜。对于细胞毒性测定,将电穿孔的T细胞与Fluc⁺靶细胞和非靶细胞以1:1的比例在含有10%FBS、IL-2 (10ng/mL) 和50uM BME的完全RPMI中共培养,并在37°C温育过夜。在共培养后24小时,使用萤光素酶测定系统(Promega Brightglo Luciferase System)测量细胞毒性以检测Fluc⁺靶细胞和非靶细胞的裂解。此外,在分析当天,取电穿孔的T细胞的等分试样并关于活死可固定染色、CD3、CD45和嵌合抗原受体(FMC63)染色。

[1462] 代表性数据如图28和29所示。图28A和28B显示,与由线性mRNA表达的抗-人CD19 CAR相比,由环状RNA表达的抗-人CD19 CAR以更高的水平表达并且维持时间更长。图29A和29B显示,与由线性mRNA表达的抗-人CD19 CAR相比,由环状RNA表达的抗-人CD19 CAR发挥更大的细胞毒性作用。

[1463] 实施例45

[1464] 来自单一环状RNA的两个CAR的功能表达

[1465] 将编码嵌合抗原受体环状RNA电穿孔到人外周T细胞中以评价表面表达和CAR介导的细胞毒性。本研究的目的是评价编码两个CAR的环状RNA是否可以用2A (P2A) 或IRES序列随机表达。为了电穿孔,从市场上购买CD3⁺T细胞(Cellero),并用抗-CD3/抗-CD28(Stemcell Technologies)刺激,并在37°C在含有10%FBS、IL-2 (10ng/mL) 和50uM BME的完全RPMI中扩增5天。在刺激后四天,将T细胞使用ThermoFisher的Neon转染系统用编码抗-人CD19 CAR、抗-人CD19 CAR-2A-抗人BCMACAR和抗-人CD19 CAR-IRES-抗-人BCMACAR的环状RNA电穿孔,然后静置过夜。对于细胞毒性测定,将电穿孔的T细胞与表达人CD19或BCMA抗原的Fluc⁺K562细胞以1:1比例在含有10%FBS、IL-2 (10ng/mL) 和50uM BME的完全RPMI中共培养,并在37°C温育过夜。在共培养后24小时使用萤光素酶测定系统(Promega BrightGlo Luciferase System)测量细胞毒性以检测Fluc⁺靶细胞的裂解。

[1466] 代表性数据如图30所示,显示两个CAR可以从相同的环状RNA构建体在功能上表达并发挥细胞毒性效应或功能。

[1467] 实施例46

[1468] 实施例46A:嵌入聚腺苷酸序列和亲和纯化以产生免疫沉默的环状RNA

[1469] 将聚腺苷酸序列(20-30个核苷酸)插入到RNA构建体(在内含子中具有嵌入聚腺苷酸序列的前体RNA)的5' 和3' 末端。可替换地,可以使用例如大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶或酵母聚腺苷酸聚合酶在转录后对前体RNA和内含子进行聚腺苷酸化,这需要使用另外的酶。

[1470] 将在本实施例中的环状RNA通过体外转录(IVT)环化,并通过在商购可得的寡-dT树脂上洗涤进行亲和纯化,以从剪接反应物中选择性地除去聚腺苷酸标记的序列(包括游离内含子和前体RNA)。所述IVT采用市售IVT试剂盒(New England Biolabs)或定制的IVT混

合物(Orna Therapeutics)进行,所述IVT混合物含有不同比例(GMP:GTP=8、12.5或13.75)的单磷酸鸟苷(GMP)和三磷酸鸟苷(GTP)。在某些实施方案中,在高GMP:GTP比率的GMP可能优先作为第一个核苷酸被包含,从而产生大多数单磷酸加帽的前体RNA。作为对比,可替换地通过用Xrn1、RNA酶R和DNA酶I处理来纯化环状RNA产物(酶纯化)。

[1471] 然后评估使用亲和纯化或酶纯化工艺制备的环状RNA的免疫原性。简而言之,将制备的环状RNA转染到A549细胞中。在24小时以后,将细胞裂解并通过qPCR测量相对于模拟样品的干扰素 β -1诱导。3p-hpRNA(一种三磷酸化的RNA)用作阳性对照。

[1472] 图31B和31C表明,当聚腺苷酸序列被包含于在剪接过程中被除去且存在于未剪接的前体分子中的元件上时,负选择亲和纯化会从剪接反应物中除去非环状产物。图31D显示用试验的IVT条件和纯化方法制备的环状RNA都是免疫静止的。这些结果表明,对于环状RNA纯化来说,负选择亲和纯化等效于或优于酶纯化,并且定制环状RNA合成条件(IVT条件)可以减少对GMP过量的依赖以实现最大免疫静止。

[1473] 实施例46B:用于环状RNA产生的专用结合位点和亲和纯化

[1474] 可以包括特别设计的序列(DBS、专用结合位点)来代替聚腺苷酸标签。

[1475] 可以使用专用结合位点(DBS)(诸如可以与树脂结合的专门设计的互补寡核苷酸)来代替聚腺苷酸标签,以选择性地耗竭前体RNA和游离内含子。在本实施例中,将DBS序列(30个核苷酸)插入到前体RNA的5'和3'末端。RNA被转录,并且转录的产物在与树脂连接的定制互补寡核苷酸上洗涤。

[1476] 图32B和32C证实,通过负亲和纯化,在剪接过程中除去的元件中包含设计的DBS序列能够除去剪接反应物中未剪接的前体RNA和游离内含子组分。

[1477] 实施例46C:编码肌养蛋白的环状RNA的产生

[1478] 通过RNA前体的体外转录产生编码肌养蛋白的12kb 12,000个核苷酸环状RNA,然后使用Xrn1、DNA酶I和RNA酶R的混合物进行酶纯化以降解剩余的线性组分。图33显示成功生成编码肌养蛋白的环状RNA。

[1479] 实施例47

[1480] 3'内含子片段和IRES之间的5'间隔区改善环状RNA表达

[1481] 对比了在3'内含子片段和IRES之间具有不同5'间隔区的纯化circRNA在Jurkat细胞中的表达水平。简而言之,在用250ng的每种RNA对60,000个细胞进行电穿孔后24小时测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。

[1482] 此外,对比了在3'内含子片段和IRES之间具有不同5'间隔区的纯化circRNA在Jurkat细胞中的稳定性。简而言之,在用250ng的每种RNA对60,000个细胞进行电穿孔后,在2天内测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光,并将其归一化为第1天的表达。

[1483] 结果如图34A和34B所示,表明添加间隔区可以增强IRES功能以及添加的间隔区的序列同一性和长度的重要性。一种可能的解释是,间隔区刚好被添加在IRES之前,其可能通过使IRES独立于其它结构化元件(诸如内含子片段)折叠来起作用。

[1484] 实施例48

[1485] 本实施例描述了从山羊嶺病毒IRES的5'或3'末端进行删除扫描。IRES边界通常很难表征并且需要经验分析,并且本实施例可以用于定位驱动翻译期望的核心功能序列。简而言之,由可操作地连接至高斯萤光素酶编码序列的截短的IRES元件生成环状RNA构建体。

截短的IRES元件具有从5' 或3' 末端除去的指示长度的核苷酸序列。在将原代人T细胞用RNA电穿孔后24和48小时,测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。将表达的稳定性计算为在48小时时间点的表达水平与在24小时时间点的表达水平之比。

[1486] 如图35所示,从IRES的5' 末端删除超过40个核苷酸会降低表达并破坏IRES功能。IRES元件的截短对表达稳定性相对没有影响,但从IRES的3' 末端删除141个核苷酸会显著降低表达水平,而从3' 末端删除57或122个核苷酸对表达水平具有积极影响。

[1487] 还观察到,删除6个核苷酸前起始序列会降低萤光素酶报告物的表达水平。用经典的kozak序列(GCCACC)替换6核苷酸序列不会产生显著影响,但至少维持表达。

[1488] 实施例49

[1489] 本实施例描述了所选IRES序列的修饰(例如,截短),包括山羊嶙病毒(CKV) IRES、副牛病毒IRES、姬鼠小核糖核酸病毒(AP) IRES、嶙病毒SZAL6 IRES、克罗希病毒B(CrVB) IRES、CVB3 IRES和SAFV IRES。在SEQ ID NO:348-389中提供了IRES元件的序列。简而言之,由可操作地连接至高斯萤光素酶编码序列的截短的IRES元件生成环状RNA构建体。用环状RNA转染HepG2细胞。在转染后24和48小时评估上清液中的发光。将表达稳定性计算为在48小时时间点的表达水平与在24小时时间点的表达水平之比。

[1490] 如在图36中所示,截断具有不同的效果,取决于IRES的身份,后者可能取决于用于翻译的起始机制和蛋白因子,其在IRES之间通常存在差异。5' 和3' 缺失可以有效组合,例如在CKV IRES的背景下。在某些情况下,规范Kozak序列的添加会显著改善表达(如在SAFV中,全长相对于全长+K)或减少表达(如在CKV中,5d40/3d122相对于5d40/3d122+K)。

[1491] 实施例50

[1492] 本实施例描述了CK-739、AP-748和PV-743 IRES序列的修饰,包括在翻译起始元件处的突变。简而言之,用可操作地连接至高斯萤光素酶编码序列的修饰的IRES元件生成环状RNA构建体。在用RNA转染1C1C7细胞后24和48小时测量上清液中分泌的高斯萤光素酶的发光。

[1493] CUG是最常见的替代起始位点,但也表征了许多其它位点。这些三联体可以存在于起始密码子之前的IRES扫描道中,并可以影响正确多肽的翻译。创建了四个替代起始位点突变,在SEQ ID NO:378-380中提供了IRES序列。如在图37中所示,在CK-739 IRES中替代翻译起始位点的突变会影响正确多肽的翻译,在某些情况下产生积极影响,并在其它情况下产生消极影响。所有替代翻译起始位点的突变都会降低翻译水平。

[1494] 位于起始密码子前6个核苷酸的替代Kozak序列也可以影响表达水平。在CK-739 IRES和“6nt Pre-Start”组中1-5号样品中,在起始密码子上游的6个核苷酸序列分别为gTcacG、aaagtc、gTcacG、gtcatg、gcaaac和acaacc。如在图37中所示,在起始密码子前的某些6个核苷酸序列的置换会影响翻译。

[1495] 还观察到,在AP-748和PV-743 IRES序列中的5' 和3' 末端缺失会降低表达。但是,在具有长扫描道的CK-739 IRES中,翻译相对不受扫描道中的缺失影响。

[1496] 实施例51

[1497] 本实施例描述了通过插入5' 和/或3' 非翻译区(UTR)并产生IRES杂交体来修饰选定的IRES序列。简而言之,用可操作地连接至高斯萤光素酶编码序列的修饰的IRES元件生成环状RNA构建体。在用RNA转染HepG2细胞后24和48小时,测量上清液中分泌的高斯萤光素

酶的发光。

[1498] 在SEQ ID NO:390-401中提供了插入了UTR的IRES序列。如在图53中所示,5' UTR刚好在IRES的3'末端之后和起始密码子之前的插入会略微增加从山羊嶺病毒(CK) IRES的翻译,但在某些情况下会消除从Salivirus SZ1 IRES的翻译。3' UTR刚好在终止盒之后的插入对两个IRES序列没有影响。

[1499] 在SEQ ID NO:390-401中提供了杂合CK IRES序列。CK IRES被用作基础,并且CK IRES的特定区域被来自其它IRES序列的看起来相似的结构替换,例如,SZ1和AV(爱知病毒)。如在图38中所示,某些杂合的合成IRES序列具有功能性,表明杂合IRES可以使用表现出相似预测结构的不同IRES序列的部分构建,而删除这些结构会完全消除IRES功能。

[1500] 实施例52

[1501] 本实施例描述了通过引入终止密码子或盒变体对环状RNA的修饰。简而言之,生成环状RNA构建体,其中IRES元件可操作地连接至高斯萤光素酶编码序列,随后是可变终止密码子盒,其包括在每个框架中的终止密码子和在高斯萤光素酶编码序列的读码框中的两个终止密码子。用环状RNA转染1C1C7细胞。在转染后24和48小时评估上清液中的发光。

[1502] 终止密码子盒的序列如SEQ ID NO:406-412所示。如在图39中所示,某些终止密码子盒提高了表达水平,尽管它们对表达稳定性影响不大。具体地,具有两个框架1(高斯萤光素酶编码序列的读码框)终止密码子(第一个是TAA,随后是框架2终止密码子和框架3终止密码子)的终止盒有效地促进功能性翻译。

[1503] 实施例53

[1504] 本实施例描述了通过插入5' UTR变体对环状RNA的修饰。简而言之,用IRES元件生成环状RNA构建体,其中5' UTR变体插入在IRES的3'末端和起始密码子之间,所述IRES可操作地连接至高斯萤光素酶编码序列。用环状RNA转染1C1C7细胞。在转染后24和48小时评估上清液中的发光。

[1505] 5' UTR变体的序列如SEQ ID NO:402-405所示。如在图40中所示,当添加36-核苷酸非结构化/低GC间隔区序列(UTR2)时,具有规范Kozak序列的CK IRES(UTR4)更有效,从而提示,富含GC的Kozak序列可能干扰核心IRES折叠。使用具有kozak序列的更高GC/结构化间隔区并未显示出相同的好处(UTR3),可能是因为间隔区本身干扰了IRES折叠。将kozak序列突变为gTcacG(UTR1)会将翻译增强到与Kozak+间隔区替代方案相同的水平,而无需间隔区。

[1506] 实施例54

[1507] 本实施例描述了在环状RNA中的miRNA靶位点对表达水平的影响。简而言之,用可操作地连接至人促红细胞生成素(hEPO)编码序列的IRES元件生成环状RNA构建体,其中2个串联的miR-122靶位点插入构建体中。用环状RNA转染表达miR-122的Huh7细胞。通过夹心ELISA在转染后24和48小时评估上清液中的hEPO表达。

[1508] 如在图41中所示,当miR-122靶位点插入环状RNA时,hEPO表达水平被消除。该结果表明,环状RNA的表达可以由miRNA调节。因此,通过掺入在不希望表达重组蛋白的细胞类型中表达的miRNA的靶位点,可以实现细胞类型或组织特异性的表达。

[1509] 实施例55

[1510] 含有抗-CD19 CAR的LNP和环状RNA构建体减少体内血液和脾脏中的B细胞。

[1511] 如上所述将编码抗-CD19 CAR表达的环状RNA构建体包封在脂质纳米颗粒中。为了

对比,将编码萤光素酶表达的环状RNA包封在单独的脂质纳米颗粒内。

[1512] 给6至8周龄的C57BL/6小鼠每隔一天注射一次LNP溶液,每只小鼠共注射4次LNP。在最后一次LNP注射后24小时,收获小鼠的脾脏和血液,进行染色并通过流式细胞计量术进行分析。如在图42A和图42B中所示,与用编码萤光素酶的LNP-环状RNA处理的小鼠相比,含有编码抗-CD19 CAR的LNP-环状RNA构建体的小鼠导致外周血和脾脏中的CD19+B细胞的统计上显著的减少。

[1513] 实施例56

[1514] 编码CAR的环状RNA内所含的IRES序列会改善CAR表达和T细胞的细胞毒性。

[1515] 将活化的鼠T细胞用200ng环状RNA构建体电穿孔,所述构建体含有独特的IRES和鼠抗-CD19 1D3 ζ CAR表达序列。在这些构建体中所含的IRES完全地或部分地源自山羊嶺病毒、姬鼠小核糖核酸病毒、副牛病毒或Salivirus。对山羊嶺病毒来源的IRES另外进行密码子优化。作为对照,使用含有野生型 ζ 小鼠CAR (不含IRES) 的环状RNA进行对比。在电穿孔后24小时针对CD-19CAR将T细胞染色以评价表面表达,并然后与A20 Fluc靶细胞共培养。然后在T细胞与靶细胞共培养后24小时,关于Fluc+A20细胞的细胞毒性杀死评价所述测定。

[1516] 如在图43A、43B、43C和44中所见,独特的IRES能够增加T细胞表达CAR蛋白的频率和在细胞表面上的CAR表达水平。CAR蛋白表达频率的增加和在细胞表面上的CAR表达水平的提高会导致提高的抗肿瘤应答。

[1517] 实施例57

[1518] 在原代人T细胞中由环状RNA构建体表达的细胞溶质蛋白和表面蛋白。

[1519] 环状RNA构建体含有编码荧光细胞溶质报告物或表面抗原报告物的序列。荧光报告物包括绿色荧光蛋白、mCitrine、mWasabi、Tsapphire。表面报告物包括CD52和Thy1.1^{bio}。将原代人T细胞用抗-CD3/抗-CD28抗体活化,并在含有报告序列的环状RNA活化后6天进行电穿孔。在电穿孔后24小时收获T细胞并通过流式细胞计量术进行分析。将表面抗原用商购可得的抗体(例如,Biolegend、Miltenyi和BD)染色。

[1520] 如在图45A和图45B中所见,细胞溶质蛋白和表面蛋白可以由编码所述蛋白的环状RNA在原代人T细胞中表达。

[1521] 实施例58

[1522] 含有独特IRES序列的环状RNA具有比线性mRNA改善的翻译表达。

[1523] 环状RNA构建体含有独特IRES以及萤火虫萤光素酶 (FLuc) 的表达序列。

[1524] 来自2个供体的人T细胞被富集并用抗-CD3/抗-CD28抗体刺激。在几天的增殖以后,收获活化的T细胞,并用等摩尔的表达FLuc有效负载的mRNA或环状RNA进行电穿孔。研究了各种IRES序列,包括源自山羊嶺病毒、姬鼠小核糖核酸病毒和副牛病毒的那些,以评价有效负载表达在7天内的表达水平和耐久性。在7天内,将T细胞用Promega Brightglo裂解以评价生物发光。

[1525] 如在图46C、46D、46E、46F和46G中所示, IRES在环状RNA中的存在可以使细胞溶质蛋白的翻译和表达增加几个数量级,并且与线性mRNA相比可以改善表达。发现这在多个人T细胞供体中是一致的。

[1526] 实施例59

[1527] 实施例59A:编码抗-CD19的LNP-环状RNA介导人T细胞对K562细胞的杀死。

[1528] 环状RNA构建体含有编码抗-CD19抗体的序列。然后将环状RNA构建体包封在脂质纳米颗粒(LNP)中。

[1529] 用抗-CD3/抗-CD28刺激人T细胞并使其增殖长达6天。在第6天,将LNP-环状RNA和ApoE3(1 μ g/mL)与T细胞共培养以介导转染。在24小时后,将Fluc+K562细胞用200ng编码抗-CD19抗体的环状RNA电穿孔,并在以后在第7天进行共培养。在共培养后48小时,通过Fluc表达关于CAR表达和K562细胞的细胞毒性杀死来评估所述测定。

[1530] 如在图47A和图47B中所示,LNP介导的CAR在体外向T细胞的递送导致抗-CD19 CAR的T细胞表达,且其能够在经工程改造的K562细胞中以特异性的抗原依赖性方式裂解肿瘤细胞。

[1531] 实施例59B:编码抗-BCMA抗体的LNP-环状RNA介导人T细胞对K562细胞的杀死。

[1532] 环状RNA构建体含有编码抗-BCMA抗体的序列。然后将环状RNA构建体包封在脂质纳米颗粒(LNP)中。

[1533] 用抗-CD3/抗-CD28刺激人T细胞并使其增殖长达6天。在第6天,将LNP-环状RNA和ApoE3(1 μ g/mL)与T细胞共培养以介导转染。在24小时后,将Fluc+K562细胞用200ng编码抗-BCMA抗体的环状RNA电穿孔,并在以后在第7天进行共培养。在共培养后48小时,通过Fluc表达关于CAR表达和K562细胞的细胞毒性杀死来评估所述测定。

[1534] 如在图47B中所示,LNP介导的CAR在体外向T细胞的递送导致BCMACAR的T细胞表达,且其能够在经工程改造的K562细胞中以特异性的抗原依赖性方式裂解肿瘤细胞。

[1535] 实施例60

[1536] 抗-CD19 CAR T细胞在体外表现出抗肿瘤活性。

[1537] 将人T细胞用抗-CD3/抗-CD28活化,并用200ng表达抗-CD19CAR的环状RNA电穿孔一次。将电穿孔的T细胞与FLuc+Na1m6靶细胞和非靶Fluc+K562细胞共培养,以评价CAR介导的杀死。在共培养后24小时以后,将T细胞裂解并检查靶细胞和非靶细胞的剩余FLuc表达以评价在总共8天内的表达和表达稳定性。

[1538] 如在图48A和48B中所示,T细胞以特异性的抗原依赖性方式表达环状RNA CAR构建体。结果还表明,与编码CAR的线性mRNA和功能性表面受体的递送相比,编码CAR的环状RNA具有改善的细胞毒性。

[1539] 实施例61

[1540] ApoE3介导的环状RNA的有效LNP转染

[1541] 用抗-CD3/抗-CD28刺激人T细胞并使其增殖长达6天。在第6天,将脂质纳米颗粒(LNP)和表达绿色荧光蛋白的环状RNA溶液(含有或不含有ApoE3(1 μ g/mL))与T细胞共培养。24小时后,关于活/死T细胞对T细胞进行染色,并在流式细胞计上分析活T细胞的GFP表达。

[1542] 如图49A、49B、49C、49D和49E所示,有效的LNP转染可以由活化的T细胞上的ApoE3介导,随后进行显著的有效负载表达。这些结果在多个供体中得到展现。

[1543] 实施例62

[1544] 本实施例说明了SARS-CoV2刺突蛋白的体外表达。使用MessengerMax转染试剂将编码SARS-CoV2稳定化的刺突蛋白的环状RNA转染到293细胞中。在转染后24小时,用CR3022抗-刺突一级抗体和APC-标记的二级抗体对293细胞进行染色。

[1545] 图50A显示了由体外转录反应产生的大致4.5kb编码SARS-Cov2稳定化的刺突蛋白

的RNA的环化效率。图50B和图73C显示了与模拟转染的细胞相比,使用MessengerMax转染试剂进行环状RNA转染后在293细胞上的SARS-CoV2稳定化的刺突蛋白表达。

[1546] 图54A和图54B显示了使用MessengerMax转染试剂,在转染一组环状RNA(含有可变IRES序列、密码子优化的编码区和稳定化的SARS-CoV2刺突蛋白)后,在293细胞上SARS-CoV2稳定化的刺突蛋白表达(以细胞百分比和gMFI表示)。图54C显示了MFI和百分比之间的关系。

[1547] 实施例63

[1548] 本实施例说明了在静脉内注射0.2mg/kg的被包封在脂质纳米颗粒制剂中的circRNA制剂以后的体内细胞因子应答。由于三磷酸化的5'末端在剪接反应中的存在,用GTP作为前体RNA引发剂和剪接核苷酸合成的circRNA剪接反应激发比纯化的circRNA和线性m1ψ-mRNA更大的细胞因子应答。在静脉内注射LNP配制的circRNA制剂后6小时,从抽取的血液中测量IL-1β、IL-6、IL-10、IL-12p70、RANTES、TNFα的水平。注射PBS的小鼠被用作对照。

[1549] 如在图51中所见,由于三磷酸化的5'末端在剪接反应中的存在,以GTP作为前体RNA引发剂和剪接核苷酸合成的circRNA剪接反应激发比纯化的circRNA和线性m1ψ-mRNA更大的细胞因子应答。

[1550] 实施例64

[1551] 本实施例说明了不同剂量的含有环状RNA的脂质纳米颗粒的肌肉内递送。给小鼠施用0.1μg、1μg或10μg的在脂质纳米颗粒中配制的circRNA。在注射萤光素6小时后进行全身IVIS成像(图52A和图52B)。在24小时进行离体IVIS成像。图52C显示了肝脏、四头肌和小腿的通量值。图53B和图53C显示环状RNA的表达存在于小鼠的肌肉组织中。

[1552] 实施例65

[1553] 本实施例说明了LNP制剂中多个环状RNA的表达。将编码hEPO或fLuc的环状RNA构建体在单一LNP和混合LNP组中施用。测定血清中的hEPO浓度(图53A)和通过IVIS成像确定总通量(图53B)。结果表明,单独配制的或共配制的环状RNA hEPO或fLuc构建体有效地表达蛋白。

[1554] 实施例66

[1555] 实施例66A:肝细胞铺板和培养

[1556] 将原代人肝细胞(PHH)、原代小鼠肝细胞(PMH)、原代食蟹猴肝细胞(PCH)解冻并重新悬浮在肝细胞解冻培养基(Xenotech,目录号K8600/K8650)中,然后离心。弃去上清液,并将沉淀的细胞重新悬浮在肝细胞铺板培养基(Xenotech,目录号K8200)中。通过血球计数器对细胞计数,并在100uL铺板培养基中铺板在Bio-coat胶原-I包被的96-孔平板上,PHH的密度为25,000个细胞/孔,PMH的密度为25,000个细胞/孔,PCH的密度为50,000个细胞/孔。将铺板的细胞在组织培养箱中在37°C和5%CO₂气氛下静置并粘附6小时。在温育后,检查细胞是否形成单层,然后抽吸铺板培养基并替换为100uL培养基(Xenotech,目录号K8300)。在实验期间每24小时更换一次培养基。

[1557] 实施例66B:在原代人、小鼠和食蟹猴肝细胞中在体外筛选编码萤火虫萤光素酶的LNP配制的环状RNA

[1558] 产生包含TIE和编码萤火虫萤光素酶的编码元件的环状RNA构建体并将其转染到

LNP中。将用环化RNA (oRNA) 配制的不同浓度的LNP稀释在补充了3%胎牛血清 (FBS) (ThermoFisher, 目录号A3160401) 的肝细胞培养基中。在将100uL的LNP/FBS/培养基混合物加入细胞之前,从细胞中吸出培养基。

[1559] 在原代人(图67A)、小鼠(图67B)和食蟹猴(图67C)肝细胞中检测到萤光素酶活性。在转染后24小时将平板从培养箱中取出,并允许其平衡至室温15分钟。向每个孔中加入100 μ L体积的萤火虫萤光素酶一步法发光测定工作溶液(Pierce, 目录号16196)。将平板放在微量培养板振荡器(ThermoFisher, 目录号S72050)上并以300rpm混合3分钟。在混合后,将平板在室温温育10分钟。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5仪器读取发光。

[1560] 如在图67A、图67B和图67C中所见,含有TIE的环状RNA当在体外用LNP转染时能够以剂量依赖性方式驱动来自多个物种的原代肝细胞中的萤火虫萤光素酶蛋白表达。

[1561] 实施例66C:在多个原代人肝细胞供体中在体外筛选编码萤火虫萤光素酶的LNP配制的环状RNA

[1562] 生成包含TIE和编码萤火虫萤光素酶的编码元件的环状RNA构建体并将其转染到LNP中。将用环化RNA (oRNA) 配制的不同浓度的LNP在补充了3%胎牛血清 (FBS) (ThermoFisher, 目录号A3160401) 的肝细胞培养基中稀释。在将100uL的LNP/FBS/培养基混合物加入细胞之前,从细胞中吸出培养基。

[1563] 在原代人(图68A)、小鼠(图68B)和食蟹猴(图68C)肝细胞中检测到萤光素酶活性。在转染后24小时将平板从培养箱中取出,并允许其平衡至室温15分钟。向每个孔中加入100 μ L体积的萤火虫萤光素酶一步法发光测定工作溶液(Pierce, 目录号16196)。将平板放在微量培养板振荡器(ThermoFisher, 目录号S72050)上并以300rpm混合3分钟。在混合后,将平板在室温温育10分钟。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5仪器读取发光。

[1564] 如在图68A、图68B和图68C中所见,含有TIE的环状RNA当在体外用LNP转染时能够以剂量依赖性方式驱动来自多个人供体的原代肝细胞中的萤火虫萤光素酶蛋白表达。

[1565] 实施例67

[1566] 在多个人细胞模型中在体外表达用编码GFP的环状RNA配制的LNP。

[1567] 产生了环状RNA构建体,其包含TIE和编码GFP蛋白的编码元件。用环状RNA构建体配制LNP。然后将含有环状RNA构建体的不同浓度的LNP稀释在添加了3%胎牛血清 (FBS) (ThermoFisher, 目录号A3160401) 的肝细胞培养基中。在将100uL的LNP/FBS/培养基混合物加入细胞之前,从细胞中吸出培养基。

[1568] 将HeLa(人宫颈腺癌;ATCC, 目录号CCL-2)、HEK293(人胚胎肾;ATCC, 目录号CRL-1573)和HUH7(人肝肝细胞癌;JCRB, 目录号JCRB0403)按照之前描述的方式用LNP配制的oRNA进行转染。在转染后24小时,移除培养基并对细胞进行胰蛋白酶消化。将胰蛋白酶消化的细胞用添加了10%FBS的PBS中和,收获,并转移到试管中。将试管离心以使细胞沉淀,并吸出上清液。在裂解之前将沉淀物在-80°C储存。为了裂解,将细胞在冰上解冻,并用100 μ L/孔RIPA缓冲液(Boston Bio Products, 目录BP-115)加新鲜添加的1mM DTT和250U/mL Benzonase(EMD Millipore, 目录号71206-3)和由完整蛋白酶抑制剂混合液(Sigma, 目录号11697498001)组成的蛋白酶抑制剂混合物裂解。将细胞在冰上保持30分钟,在此时添加NaCl(1M终浓度)。将细胞裂解物彻底混合并在冰上保留30分钟。将全细胞提取物(WCE)离心以沉淀碎片。使用Bradford测定(Bio-Rad, 目录号500-0001)评估裂解物的蛋白含量。根据

生产商的方案完成Bradford测定程序。将提取物在使用前在-20℃储存。进行蛋白质印迹来评估GFP蛋白水平。将全细胞提取裂解物与Laemmli缓冲液混合,并在95℃变性10分钟。根据生产商的方案,使用NuPage系统在4-12%Bis-Tris凝胶(ThermoFisher,目录号NP0335BOX)上运行蛋白质印迹,然后湿转移到0.45μm硝酸纤维素膜(ThermoFisher,目录号LC2001)上。在转移后,用水彻底冲洗膜,并用丽春红S溶液(Boston Bio Products,目录号ST-180)染色以确认完全且均匀的转移。在室温在实验室摇床上使用在TBS中的5%奶粉封闭印迹30分钟。将印迹用1XTBST(Boston BioProducts,目录号IBB-180)冲洗,并用1X TBST中1:1,000的小鼠dylight 680-标记的抗-GFP单克隆抗体(ThermoFisher,目录号MA515256D680)探测。将抗-β-肌动蛋白或GAPDH在1X TBST中以1:4,000用作负载对照(ThermoFisher,目录号AM4302/AM4300),并与GFP一级抗体同时温育。将印迹密封在袋子中并在实验室摇床上在4℃保存过夜。在温育后,将印迹在1XTBST中冲洗3次各5分钟,并在室温用小鼠二级抗体(ThermoFisher,目录号PI35519)各以1:25,000在1X TBST中探测30分钟。在温育后,将印迹在1X TBST中冲洗3次各5分钟。使用Licor Odyssey系统对印迹进行显影和分析。

[1569] 如在图69中所示,含有TIE的环状RNA当在体外用LNP转染时能够以剂量依赖性方式在不同人细胞系(例如,HeLa、HEK293和HUH7细胞)中表达GFP蛋白。

[1570] 实施例68

[1571] 在原代人肝细胞中体外表达用编码GFP的环状RNA配制的LNP。

[1572] 产生了环状RNA构建体,其包含TIE和编码GFP蛋白的编码元件。将含有环化RNA(oRNA)的不同浓度的LNP稀释在补充了3%胎牛血清(FBS)(ThermoFisher,目录号A3160401)的肝细胞培养基中。在向细胞添加100μL的LNP/FBS/培养基混合物之前,从细胞中吸出培养基。

[1573] 将原代人肝细胞(PHH)解冻并重新悬浮在肝细胞解冻培养基(Xenotech,目录号K8600/K8650)中,然后离心。弃去上清液,并将沉淀的细胞重新悬浮在肝细胞铺板培养基(Xenotech,目录号K8200)中。通过血球计数器对细胞计数,并将其在100uL铺板培养基中铺板到Bio-coat胶原-I包被的96-孔平板上,PHH的密度为25,000个细胞/孔,PMH的密度为25,000个细胞/孔,PCH的密度为50,000个细胞/孔。使铺板的细胞在组织培养箱中在37℃和5%CO₂气氛下沉淀并粘附6小时。在温育后检查细胞是否形成单层,然后吸出铺板培养基并替换为100ul的培养基(Xenotech,目录号K8300)。在实验期间每24小时更换一次培养基。

[1574] 将原代人肝细胞按照之前描述的方式用LNP配制的oRNA进行转染。在转染后24小时,移除培养基并对细胞进行胰蛋白酶消化。将胰蛋白酶消化的细胞用补充了10%FBS的PBS中和,收获并转移到试管中。将试管离心以使细胞沉淀,并吸出上清液。在裂解前将沉淀物在-80℃储存。为了裂解,将细胞在冰上解冻,并用100μL/孔RIPA缓冲液(Boston Bio Products,目录BP-115)加新鲜添加的1mM DTT和250U/ml Benzonase(EMD Millipore,目录号71206-3)和以及由完整蛋白酶抑制剂混合液(Sigma,目录号11697498001)组成的蛋白酶抑制剂混合物裂解。将细胞在冰上保持30分钟,在此时添加NaCl(1M终浓度)。将细胞裂解物彻底混合并在冰上保留30分钟。将全细胞提取物(WCE)离心以沉淀碎片。使用Bradford测定(Bio-Rad,目录号500-0001)评估裂解物的蛋白含量。根据生产商的方案完成Bradford测定程序。将提取物在使用前在-20℃储存。进行蛋白质印迹来评估GFP蛋白水平。将全细胞提取裂解物与Laemmli缓冲液混合,并在95℃变性10分钟。根据生产商的方案,使用NuPage系统

在4-12%Bis-Tris凝胶(ThermoFisher,目录号NP0335BOX)上运行蛋白质印迹,然后湿转移到0.45 μ m硝酸纤维素膜(ThermoFisher,目录号LC2001)上。在转移后,用水彻底冲洗膜,并用丽春红S溶液(Boston Bio Products,目录号ST-180)染色以确认完全且均匀的转移。在室温在实验室摇床上使用在TBS中的5%奶粉封闭印迹30分钟。将印迹用1XTBST(Boston BioProducts,目录号IBB-180)冲洗,并用在1X TBST中1:1,000的小鼠dylight 680-标记的抗-GFP单克隆抗体(ThermoFisher,目录号MA515256D680)探测。将抗- β -肌动蛋白或GAPDH在1X TBST中以1:4,000用作负载对照(ThermoFisher,目录号AM4302/AM4300),并与GFP一级抗体同时温育。将印迹密封在袋子中并在实验室摇床上在4 $^{\circ}$ C保存过夜。在温育后,将印迹在1XTBST中冲洗3次各5分钟,并在室温用小鼠二级抗体(ThermoFisher,目录号PI35519)各以1:25,000在1X TBST中探测30分钟。在温育后,将印迹在1X TBST中冲洗3次各5分钟。使用Licor Odyssey系统对印迹进行显影和分析。

[1575] 如在图70的蛋白质印迹中所示,含有TIE的环状RNA当在体内用LNP转染时能够在原代人肝细胞中成功编码GFP蛋白。

[1576] 实施例69

[1577] 使用lipofectamine在小鼠成肌细胞和原代人骨骼肌成肌细胞中在编码萤火虫萤光素酶的环状RNA中体外表达萤火虫萤光素酶。

[1578] 包含TIE和编码萤火虫萤光素酶蛋白的编码元件的环状RNA构建体。

[1579] 将原代人骨骼肌(HSkM)细胞(Lonza,目录号20TL356514)在37 $^{\circ}$ C水浴中解冻,并以推荐的接种密度(3,000至5,000/cm²)铺板在SkGM-2BulletKit生长培养基(Lonza,目录号CC-3245)中,并让其生长过夜。使用ReagentPack传代培养试剂(Lonza,目录号CC-5034)分离细胞,并以推荐的接种密度铺板在组织培养级96-孔平板上,并在组织培养箱中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂气氛下生长过夜,或培养至70-80%汇合,每2天更换一次生长培养基。

[1580] 对于一个96-孔平板反应,将0.3 μ L的Lipofectamine-3000转染试剂(Lipo3K)(ThermoFisher,目录号L3000015)与5 μ L Opti-MEM减血清培养基(ThermoFisher,目录号51985091)混合。在每个反应中,在一个单独的试管中,将萤火虫萤光素酶(f.luc) oRNA(在10-200ng)与5 μ L Opti-MEM和0.2 μ L P3000TM增强剂试剂(ThermoFisher,目录号L3000015)组合。将等体积的Lipo3K/Opti-MEM混合物与oRNA/Opti-MEM混合物组合,并在室温温育15分钟。将Lipo3K/oRNA混合物加入到每个要转染的孔中,并放入组织培养箱中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂气氛下培养24小时。

[1581] 24小时以后,将转染板从培养箱中取出,并允许平衡至室温15分钟。将100 μ L体积的萤火虫萤光素酶一步法发光测定工作溶液(Pierce,目录号16196)加入每个孔中。将平板放在微量培养板振荡器(ThermoFisher,目录号S72050)上并以300rpm混合3分钟。在混合后,将平板在室温温育10分钟。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5仪器读取发光。

[1582] 如在图71A和图71B中所示,包含TIE的环状RNA在用lipofectamine体外转染时能够以剂量依赖性方式驱动来自不同物种的成肌细胞中的萤火虫萤光素酶蛋白表达。

[1583] 实施例70

[1584] 在分化的原代人骨骼肌肌管中,编码萤火虫萤光素酶的环状RNA中的萤火虫萤光素酶的体外表达

[1585] 包含TIE和编码萤火虫萤光素酶蛋白的编码元件的环状RNA构建体。

[1586] 将原代人骨骼肌 (HskM) 细胞 (Lonza, 目录号20TL356514) 在37°C水浴中解冻, 并以推荐的接种密度 (3,000至5,000/cm²) 铺板在SkGM-2BulletKit生长培养基 (Lonza, 目录号CC-3245) 中, 并让其生长过夜。使用ReagentPack传代培养试剂 (Lonza, 目录号CC-5034) 分离细胞, 并以推荐的接种密度铺板在组织培养级96-孔平板上, 并在组织培养箱中在37°C和5%CO₂气氛下生长过夜, 或培养至70-80%汇合, 每2天更换一次生长培养基。一旦细胞达到70-80%汇合, 就除去生长培养基, 将细胞用1X PBS (Gibco, 目录号10010023) 洗涤2次, 并更换成由补充了2%马血清 (Gibco, 目录号26050088) 和1%Pen-Strep (Gibco, 目录号15140-122) 的F-10 (1X) (Gibco, 目录号11550-043) 组成的分化培养基。每天更换培养基, 持续5至6天, 直到几乎所有成肌细胞已经融合以形成肌管。

[1587] 对于一个96-孔平板反应, 将0.3μL的Lipofectamine-3000转染试剂 (Lipo3K) (ThermoFisher, 目录号L3000015) 与5μL Opti-MEM减血清培养基 (ThermoFisher, 目录号51985091) 混合。在每个反应中, 在一个单独的试管中, 将萤火虫萤光素酶 (f.luc) oRNA (在10-200ng) 与5μL Opti-MEM和0.2μL P3000TM增强剂试剂 (ThermoFisher, 目录号L3000015) 组合。将等体积的Lipo3K/Opti-MEM混合物与oRNA/Opti-MEM混合物组合, 并在室温温育15分钟。将Lipo3K/oRNA混合物加入到每个要转染的孔中, 并放入组织培养箱中在37°C和5%CO₂气氛下培养24小时。

[1588] 24小时以后, 将转染板从培养箱中取出, 并允许平衡至室温15分钟。将100μL体积的萤火虫萤光素酶一步法发光测定工作溶液 (Pierce, 目录号16196) 加入每个孔中。将平板放在微量培养板振荡器 (ThermoFisher, 目录号S72050) 上并以300rpm混合3分钟。在混合后, 将平板在室温温育10分钟。使用Varioskan或Bio-Tek Cytation5仪器读取发光。

[1589] 如在图72A和图72B中所示, 当用lipofectamine在体外转染时, 包含TIE的环状RNA能够以剂量依赖性方式在多个人供体的分化状态 (例如, 成肌细胞和分化的肌管中) 中驱动萤火虫萤光素酶蛋白在原代肌细胞中的表达。

[1590] 实施例71

[1591] 含有TIE的环状RNA的无细胞体外翻译

[1592] 完成了无细胞兔网织红细胞体外翻译测定 (Promega, 目录号L4540), 以表征来自各种RNA模板的蛋白产物。在该测定中使用了线性mRNA和环状oRNA模板, 并根据生产商的方案组装反应组分。在测定前, 将RNA模板在65°C变性3分钟, 并立即在冰上冷却。在冰上组装所有反应组分。将Flexi兔网织红细胞试剂盒组分、完全氨基酸混合物 (Promega, 目录号L5061)、RNAin TIEuclease抑制剂 (Promega, 目录号N2111) 和transcend tRNA (Promega, 目录号L5061) 加入变性的RNA模板中。将反应物涡旋混合, 并在30°C温育60分钟, 并然后置于冰上。

[1593] 将反应混合物加入1x样品缓冲液 (ThermoFisher, 目录号NP0007) 中, 并在70°C加热15分钟。将变性蛋白样品加载至4-12%Bis-Tris凝胶 (ThermoFisher, 目录号NP0335BOX) 上。完成凝胶电泳, 并将凝胶湿转移到0.45μm硝酸纤维素膜 (ThermoFisher, 目录号LC2001) 上。在转移后, 将膜放入新鲜制备的含有0.5%吐温-20 (Boston Bioproducts Inc目录号IBB-180) 的TBS中摇动封闭1小时。将膜与1:2,500稀释的链霉亲和素-AP (Promega, 目录号V5591) 一起摇动温育45分钟。对膜进行四个冲洗周期: 用TBST冲洗两次, 并用去离子水冲洗两次, 每次冲洗1分钟。将膜与Western Blue底物 (Promega, 目录号S3841) 一起温育45分钟,

并将膜用水冲洗并在LICOR Odyssey CLx成像系统上扫描。

[1594] 如在图73A和图73B中所示,包含TIE的环状RNA能够驱动无细胞裂解物中的蛋白表达,与任何细胞类型无关。图73A显示了萤火虫萤光素酶从直链或环状RNA输入的表达式。图73B显示了与野生型天然序列(WT)相比,使用不同的密码子优化(co)方案的人和小鼠ATP7B蛋白的表达式。表达ATP7B蛋白的密码子优化的环状RNA和表达萤火虫萤光素酶的环状RNA实现了蛋白全长蛋白表达。

[1595] 实施例72

[1596] TIE选择方法学

[1597] 从GenBank中的序列中确定出推定的TIE以进行活性评估。简而言之,确定了核糖病毒域和大于1kb长度的未分类病毒序列。基于推定的CDS起始和终止位点提取5'和基因间UTR,最小长度截止值为250个核苷酸。还收集了反向序列以用于负义CDS注释。对于预计不含有TIE序列的属,每个属随机选择几个非编码区域。剔除重复序列、含有>10个核苷酸重复的序列、具有XbaI和BamHI位点的序列以及低质量序列(非acgt),然后通过CDHit对序列进行分簇,以80%序列相似性截止值进行分簇;从每个簇中选择代表性序列进行进一步研究。对于未分类的序列或预计包含TIE的序列,选择所有5'和基因间UTR;剔除重复序列、含有>10个核苷酸重复的序列、具有XbaI和BamHI位点的序列以及低质量序列(非acgt),然后通过CDHit对序列进行分簇,以95%(低风险,已知的IRES)序列相似性截止值进行分簇;从每个簇中选择代表性序列进行进一步研究。对于两种策略,短于300个核苷酸的序列或由于序列复杂性而无法合成的序列都被淘汰。

[1598] 实施例73

[1599] 实施例73A:在原代人T细胞中的TIE活性

[1600] 将含有推定TIE的核酸序列插入环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的起始密码子之前。合成并纯化含有TIE的oRNA。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染到体外T细胞中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定性。

[1601] 实施例73B:在原代人肝细胞中的TIE活性

[1602] 将含有推定TIE的核酸序列插入环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的起始密码子之前。合成并纯化含有TIE的oRNA。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染到体外肝细胞中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定性。

[1603] 实施例73C:在原代人肌管中的TIE活性

[1604] 将含有推定TIE的核酸序列插入环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的起始密码子之前。合成并纯化含有TIE的oRNA。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染到体外人肌管中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定

性。

[1605] 实施例74

[1606] TIE组织向性

[1607] 选择含有TIE的oRNA配制成LNP。将LNP-oRNA转染到T细胞、肝细胞和肌管中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定性。在细胞类型之间对比了TIE活性,并注意到由于TIE组织偏好而导致的差异。差异可以是表现出组织特异性表达并促进增强的翻译起始、降解或稳定性的TIE衔接蛋白的结果。

[1608] 实施例75

[1609] 实施例75A:TIE缺失扫描

[1610] 将从TIE的5'末端或3'末端逐渐缺失的选定TIE序列插入到环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的起始密码子之前。合成并纯化含有TIE变体的oRNA。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染到人原代T细胞中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光可能指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定性。由于逐渐缺失而导致的表达或稳定性受损确定出TIE的核心功能单元。

[1611] 实施例75B:TIE变体产生和确定

[1612] 对选定的含有TIE的oRNA合成质粒进行易错PCR,以将随机突变引入PCR产物中。将PCR产物用作oRNA合成的模板。将纯化的oRNA配制成LNP,并转染到原代人T细胞中。在转染后6、24、48和72小时通过HPLC从T细胞收获多核糖体级分。从多核糖体级分中提取与每个多核糖体级分相关的RNA,并通过NGS测序。分析在每个时间点每个多核糖体级分中的TIE突变富集,以确定1)维持或改善TIE的翻译活性和/或2)改善oRNA的稳定性的突变。

[1613] 实施例75C:TIE单一和多变体验证

[1614] 将单独地或组合地含有实施例6中的推定有益TIE突变的核酸序列插入环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的起始密码子之前。合成并纯化含有TIE变体的oRNA。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染到人原代T细胞中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定性。

[1615] 实施例76

[1616] 实施例76A:真核TIE的选择

[1617] 真核TIE的选择。使用几个数据库来确定推定的真核TIE。所选的TIE包括40-1578个核苷酸长度的序列,并且可以含有或不含有确定的修饰(m6A)位点。

[1618] 实施例76B:含有修饰的核苷酸(m6A)的TIE

[1619] 将含有推定TIE的核酸序列插入到环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的编码区之前。通过滴定修饰的核苷酸来合成oRNA。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染进T细胞、肝细胞和肌管中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,

并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。含有TIE的修饰的核苷酸在24小时的更高发光指示需要修饰以增强功能。与24小时相比,在48小时更高的发光指示含有TIE的修饰的核苷酸会增强oRNA的稳定性。

[1620] 实施例77

[1621] 经历氧化应激和/或缺氧应激的细胞中TIE的表达

[1622] 将含有推定TIE的核酸序列插入到环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的编码区之前。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。用过氧化氢处理肝细胞以诱导氧化性应激,或用CoCl₂处理肝细胞以诱导缺氧应激。将LNP-oRNA在体外转染到肝细胞中(在缺氧应激、氧化应激或未处理下)。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光可能指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定性。

[1623] 实施例78

[1624] 作为TIE的适体

[1625] 将含有针对翻译起始因子(即eIF4E、eIF4G、eIF4a)的适体的核酸序列插入到环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的编码区之前。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染进肝细胞中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示更高的TIE功能。与24小时相比,在48小时更高的发光可能指示由TIE功能引起的更高的oRNA稳定性。

[1626] 实施例79

[1627] 串联的TIE

[1628] 将病毒、真核和/或适体TIE的选定组合插入到环状RNA(oRNA)构建体中,位于高斯萤光素酶报告序列的编码区之前。通过滴定修饰的核苷酸来合成oRNA。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染进T细胞、肝细胞和肌管中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时含有多个TIE的构建体的更高发光指示TIE的协同作用。与24小时相比,在48小时更高的发光可能指示在一个构建体中具有多个TIE会增强oRNA的稳定性。

[1629] 实施例80

[1630] 实施例80A:编码适体以增强不依赖帽子的翻译

[1631] 已知某些结合eIF4E、eIF4a和其它翻译引发剂的适体会通过迫使蛋白采用非功能性构象来抑制翻译。将含有针对翻译起始因子(即eIF4E、eIF4a)的适体的核酸序列插入到环状RNA(oRNA)构建体中,在功能性TIE和高斯萤光素酶报告序列的编码区之前。将纯化的oRNA配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染进肝细胞中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示不依赖帽子的翻译的偏好。与24小时相比,在48小时更高的发光指示由帽子依赖性翻译的抑制引起的更高oRNA稳定性。

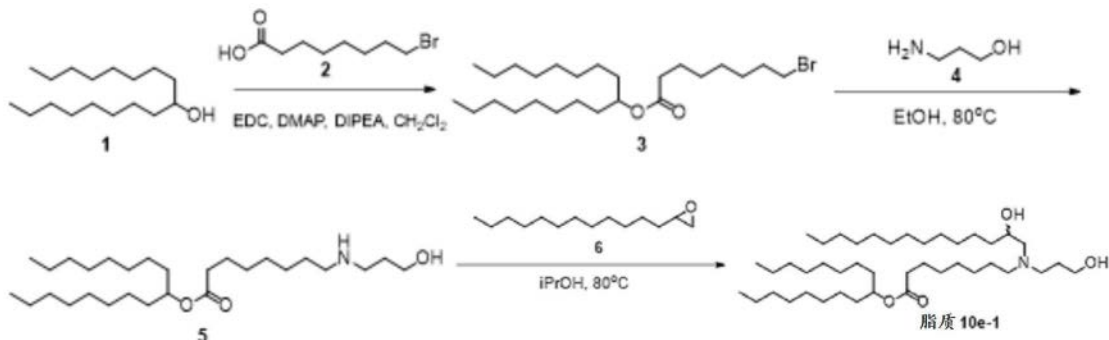
[1632] 实施例80B:编码适体以增强不依赖帽子的翻译

[1633] oRNA和适体的共转染。已知某些结合eIF4E、eIF4a和其它翻译引发剂的适体会通

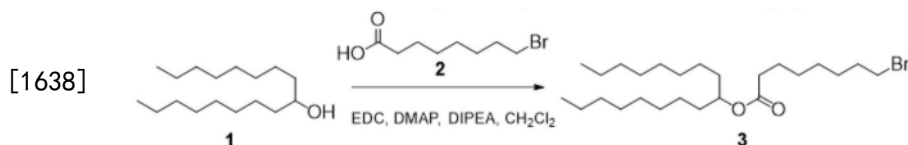
过迫使蛋白采用非功能性构象来抑制翻译。将含有针对翻译起始因子(即eIF4E、eIF4a)的适体的核酸序列与含有TIE和高斯萤光素酶报告物的编码区的环状RNA(oRNA)共转染。将纯化的适体和oRNA一起配制成脂质纳米颗粒。将LNP-oRNA转染进肝细胞中。在转染后24和48小时收获并更换上清液,并使用含有腔肠素的检测试剂和光度计测定来自oRNA的高斯萤光素酶表达。在24小时更高的发光指示不依赖帽子的翻译的偏好。与24小时相比,在48小时更高的发光可能指示由帽子依赖性翻译的抑制引起的更高oRNA稳定性。

[1634] 实施例81

[1635] 实施例81.1 8-((3-羟基丙基)(2-羟基十四烷基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(脂质10e-1)的合成



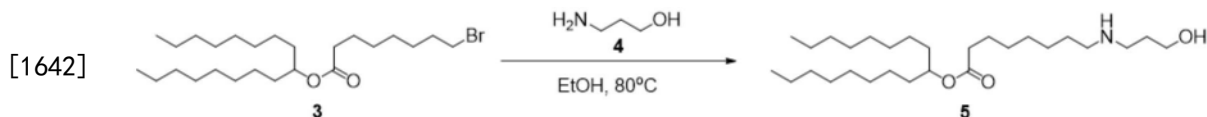
[1637] 实施例81.1.1 8-溴辛酸十七烷-9-基酯(3)的合成



[1639] 向8-溴辛酸2(10g, 44.82mmol)和十七烷-9-醇1(9.6g, 37.35mmol)在CH₂Cl₂(300mL)中的混合物中加入DMAP(900mg, 7.48mmol)、DIPEA(26mL, 149.7mmol)和EDC(10.7g, 56.03mmol)。将反应物在室温搅拌过夜。浓缩反应混合物以后,将粗残余物溶解在乙酸乙酯(300mL)中,用1N HCl、饱和NaHCO₃、水和盐水洗涤。将有机层经无水Na₂SO₄干燥。将溶剂蒸发,并将粗残余物通过快速色谱法(SiO₂:己烷=100%至30%的EtOAc在己烷中的溶液)纯化并得到无色油产物3(5g, 29%)。

[1640] ¹H NMR(300MHz, CDCl₃): δppm 4.86(m, 1H), 3.39(t, J=7.0Hz, 2H), 2.27(t, J=7.6Hz, 2H), 1.84(m, 2H), 1.62(m, 2H), 1.5-1.4(m, 8H), 1.35-1.2(m, 26H), 0.87(t, J=6.7Hz, 6H)。

[1641] 实施例81.1.2 8-((3-羟基丙基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(5)的合成

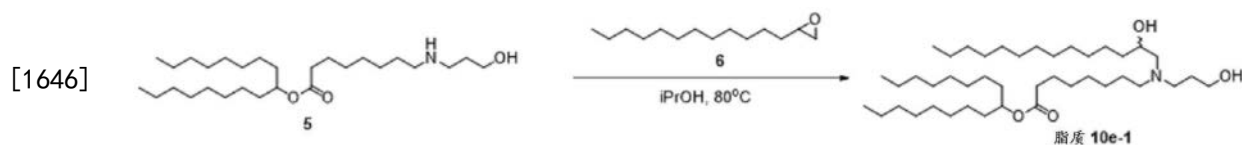


[1643] 将8-溴辛酸1-辛基壬酯3(7.4g, 16.03mmol)在EtOH(200mL)中的溶液加入3-氨基-1-丙醇4(24.4mL, 320mmol)中,并将反应溶液在70°C加热过夜。MS显示预期的产物:[APCI]: [MH]⁺456.4。浓缩反应混合物以后,将粗残余物溶解在甲基叔丁基醚(500mL)中,用饱和NaHCO₃、水和盐水洗涤。将有机层经无水Na₂SO₄干燥。将溶剂蒸发,并将粗残余物通过快速色谱法(SiO₂:CH₂Cl₂=100%至10%的MeOH在含有1%NH₄OH的CH₂Cl₂中的溶液)纯化,并得到无

色油产物5 (6.6g, 88%)。

[1644] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ ppm 4.84 (m, 1H), 3.80 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 2H), 2.87 (t, $J=5.76\text{Hz}$, 2H), 2.59 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.27 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.5-1.4 (m, 5H), 1.35-1.2 (m, 32H), 0.87 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 6H)。MS (APCI+): 456.4 (M+1)。

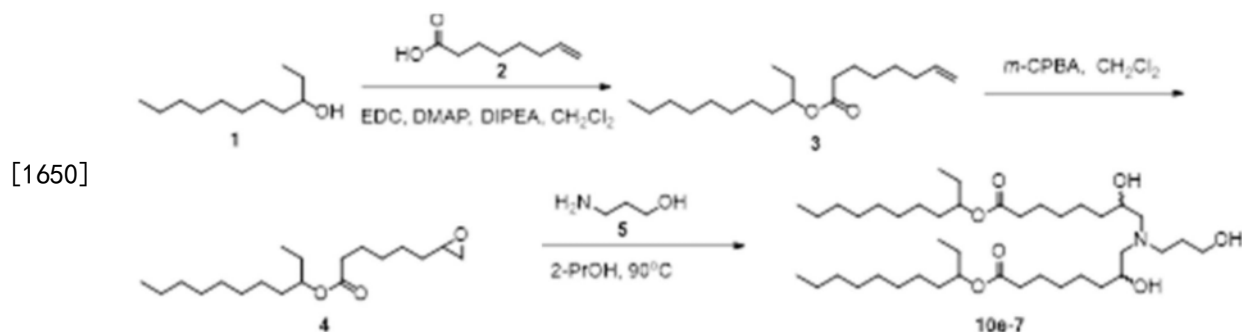
[1645] 实施例81.1.3 8'-((3-羟基丙基)(2-羟基十四烷基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(7)的合成



[1647] 将化合物5 (6.6g, 14.5mmol) 和1,2-环氧十四烷 (3.68g, 17.4mmol) 在异丙醇 (150mL) 中的混合物加热至回流保持过夜。MS显示预期的产物:[APCI]:[MH]⁺668.6。将反应混合物浓缩,并将粗产物通过快速色谱法(SiO_2 : CH_2Cl_2 =100%至10%的MeOH在含有1% NH_4OH 的 CH_2Cl_2 中的溶液)纯化以得到作为无色油的脂质10e-1 (6.34g, 65%)。

[1648] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ ppm 4.85 (m, 1H), 3.76 (t, $J=5.49\text{Hz}$, 2H), 3.68 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.59 (m, 2H), 2.38 (m, 3H), 2.27 (m, 2H), 1.58-1.68 (m, 2H), 1.48 (m, 6H), 1.24 (m, 56H), 0.87 (m, 9H)。MS (APCI+): 668.6 (M+1)。

[1649] 实施例81.2 8,8'-((3-羟基丙基)氮烷二基)双(7-羟基辛酸)二(十一烷-3-基)酯(10e-7)的合成



[1651] 实施例81.2.1辛-7-烯酸十一烷-3-基酯(3)的合成

[1652] 向辛-7-烯酸2 (10g, 70.3mmol) 和十一烷-3-醇1 (10g, 58.6mmol) 在 CH_2Cl_2 (300mL) 中的混合物中加入DMAP (1.4g, 11.6mmol)、DIPEA (40mL, 232mmol) 和EDC (16.9g, 87.9mmol)。将反应物在室温搅拌过夜。浓缩反应混合物以后,将粗残余物溶解在叔丁基甲基醚 (500mL) 中,用1N HCl、饱和 NaHCO_3 、水和盐水洗涤。将有机层经无水 Na_2SO_4 干燥。将溶剂蒸发,并将粗残余物通过快速色谱法(SiO_2 :己烷=100%至20%的EtOAc在己烷中的溶液)纯化,并得到无色油产物3 (17.2g, 98%)。

[1653] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ ppm 5.88-5.72 (m, 1H), 5.02-4.91 (m, 1H), 4.80 (m, 1H), 2.28 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.05-2.03 (m, 2H), 1.62-1.49 (m, 6H), 1.37-1.25 (m, 16H), 0.87 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 6H)。

[1654] 实施例81.2.2 6-(氧杂环丙烷-2-基)己酸十一烷-3-基酯(4)的合成

[1655] 在0°C冰水浴中向辛-7-烯酸十一烷-3-基酯3 (17.2g, 58.1mmol) 在 CH_2Cl_2 (300mL) 中的混合物中一次性加入间氯过氧苯甲酸 (mCPBA, <77%) (19.5g, 87mmol)。将反应物在室

温搅拌过夜。将白色沉淀物(间-苯甲酸)过滤并将滤液用 CH_2Cl_2 (200mL) 稀释,用10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、饱和 NaHCO_3 、水和盐水洗涤。将有机层经无水 Na_2SO_4 干燥。将溶剂蒸发并将粗残余物通过快速色谱法(SiO_2 :己烷=100%至30%的EtOAc在己烷中的溶液)纯化,并得到无色油产物3(17.1g,97%)。

[1656] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ ppm 4.80(m, 1H), 2.89-2.86(m, 1H), 3.39(t, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 2.74(t, $J=4.7\text{Hz}$, 1H), 2.47(dd, $J=4.9, 2.2\text{Hz}$, 1H), 2.28(t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 1.74-1.46(m, 10H), 1.35-1.2(m, 13H) 0.87(m, 6H)。

[1657] 实施例81.2.3 8,8'-((3-羟基丙基)氮烷二基)双(7-羟基辛酸)二(十一烷-3-基)酯(10e-7)的合成

[1658] 将6-(氧杂环丙烷-2-基)己酸十一烷-3-基酯4(8g, 25.6mmol)在异丙醇(50mL)中的溶液加入3-氨基-1-丙醇(769.1mg, 10.2mmol)中,并将反应溶液在90°C加热过夜。MS显示预期的产物:[APCI]:[MH]⁺700.6。浓缩反应混合物以后,将粗残余物通过快速色谱法(SiO_2 : CH_2Cl_2 =100%至10%的MeOH在 CH_2Cl_2 中的溶液)纯化并得到无色油产物(5.1g, 71%)。

[1659] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ ppm 4.81(m, 2H), 3.80(m, 2H), 3.73(m, 2H), 2.78(m, 2H), 2.52-2.43(m, 4H), 2.28(t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 1.68-1.48(m, 15H), 1.35-1.17(m, 37H), 0.88-0.83(m, 12H)。MS (APCI⁺): 700.6 (M+1)。

[1660] 实施例82

[1661] 脂质纳米颗粒制剂程序

[1662] 使用Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, 英国)测定纳米颗粒组合物的粒度、多分散性指数(PDI)和 ζ 电位,在1×PBS中测定粒度,并在15mM PBS中测定 ζ 电位。使用Malvern Panalytical Zetasizer Pro测量含有1mL的20 μg /mL的在PBS (pH 7.4)中的LNP的比色皿的Z平均值。记录Z平均值和多分散性指数。通过动态光散射确定LNP尺寸。

[1663] 紫外-可见光谱法可以用于测定纳米颗粒组合物中circRNA的浓度。将100 μL 在1×PBS中稀释的制剂加入900 μL 的甲醇和氯仿的4:1 (v/v)混合物中。在混合后,记录溶液的吸光度光谱,例如,在DU 800分光光度计(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)上在230nm至330nm之间。基于在组合物中使用的circRNA的消光系数以及在例如260nm波长处的吸光度与在例如330nm波长处的基线值之间的差异,可以计算纳米颗粒组合物中circRNA的浓度。

[1664] 对于转移媒介物的 pK_a ,进行了TNS测定。将5 μL 的60 μg /mL 2-(对甲苯氨基)萘-6-磺酸(TNS)和5 μL 的30 μg 的RNA/mL脂质纳米颗粒加入到在pH 2-12范围内的HEPES缓冲液的孔中。然后将混合物在室温摇动5分钟,并使用平板读数器读取荧光(激发322nm,发射431nm)。计算荧光信号的拐点以确定颗粒的 pK_a 。

[1665] 对于包含RNA的转移媒介物组合物,可以使用QUANT-ITTM **RIBOGREEN**[®] RNA测定(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)来评价转移媒介物组合物对RNA的包封。将纳米颗粒溶液在三乙胺四乙酸(TE)缓冲液中稀释,理论oRNA浓度为2 μg /mL。制备在2 μg /mL至0.125 μg /mL范围内的在TE缓冲液中稀释的标准oRNA溶液。将颗粒和标准品分别铺板在含有TE缓冲液和4% Triton-X的黑色96-孔平板中(Triton-X用作表面活性剂以裂解纳米颗粒)。温育(37°C, 350rpm, 15分钟)以后,将Quant-itTM RibogreenTM RNA试剂加入所有孔中,并

进行第二次温育 (37°C, 350rpm, 3分钟)。使用 **SPECTRAmax®GEMINI XS** 微量培养板荧光分光光度计 (Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA) 测量荧光。使用标准曲线计算每个颗粒溶液中的 oRNA 浓度。通过在裂解的和未裂解的颗粒之间检测到的 oRNA 的比例来计算包封效率。

[1666] 实施例83

[1667] mOX40L 在脾免疫细胞中的表达。

[1668] 将包含表10e的脂质1和表10f的脂质15的脂质纳米颗粒与编码mOX40L的环状RNA以5.7的可电离脂质与磷酸酯比率 (IL:P) 配制。这些LNP的可电离脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质摩尔比是50:10:38.5:1.5。使用PBS进行LNP的透析。向C57BL/6雌性小鼠 (6-8周, n=4) 静脉内地施用1mg/kg的包含表10e的脂质1或表10f的脂质15的LNP。在24小时, 收集小鼠脾脏用于流式细胞计量术分析。在T细胞、髓样细胞、B细胞和NK细胞中对比了表10e的脂质1和表10f的脂质15的mOX40L转染。

[1669] 如在图74中所示, 与包含表10f的脂质15的那些相比, 表10e的脂质1导致脾脏免疫细胞中相当或更高的mOX40L转染水平。

制剂	可电离脂质	辅助脂质	PEG-脂质	透析	Z-平均值(nm)	PD	RNA 包封效率(%)
[1670] 10e-1 (5.7A)	表 10e, 脂质 1	DSP C	DMG-PEG(2000)	1X PBS	79	0.03	95
10f-15 (5.7A)	表 10f, 脂质 15	DSP C	DMG-PEG(2000)	1X PBS	69	0.09	98

[1671] 实施例84

[1672] 与在LNP制剂中包含的线性RNA相比, 在LNP制剂中包含的环状RNA的荧光表达。

[1673] 将LNP制成含有编码萤火虫萤光素酶的环状RNA或编码萤火虫萤光素酶的线性RNA (mRNA)。将含有线性RNA的LNP也用5-甲氧基尿苷 (5-moU) 修饰。将这些LNP配制成含有表10e的脂质1或脂质7, 其中这些LNP的可电离脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质摩尔比是50:10:38.5:1.5。使用1X PBS进行LNP的透析。确定了LNP构建体的大小、多分散性指数 (PDI) 和RNA捕获。

[1674] 如下表中所见, 每种LNP制剂中环状RNA的包封效率大于相同制剂中线性RNA的包封效率。

[1675]	制剂	可电离脂质	辅助脂质	PEG-脂质	RNA	Z-平均值(nm)	PDI	RNA 包封效率(%)
	10e-1 (5.7A)	表 10e, 脂质 1	DSPC	DMG-PEG(2000)	FLuc oRNA	82	0.05	95
					FLuc mRNA 5M oU	89	0.05	90
	10e-7 (5.7A)	表 10e, 脂质 7	DSPC	DMG-PEG(2000)	oRNA	86	0.02	97
					FLuc mRNA 5M oU	86	0.04	94

[1676] 实施例85

[1677] 使用PBS或TSS配制的进行透析的LNP。

[1678] 以5.7的可电离脂质与磷酸酯比率(IL:P)和50:10:38.5:1.5的可电离的脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质比率,用环状RNA配制LNP。然后使用1X PBS或1X TSS对这些LNP进行透析。两种配制的LNP具有大于90%的环状RNA的包封效率比率。

[1679]	制剂	可电离脂质	辅助脂质	PEG-脂质	透析	Z-平均值(nm)	PDI	RNA 包封效率(%)
	10e-1 (5.7A)	表 10e, 脂质 1	DSPC	DMG-PEG(2000)	1X PBS	87	0.06	94
					1X TSS	68	0.04	92

[1680] 实施例86

[1681] 用可电离脂质中编码具有不同B-羟基基团的萤火虫萤光素酶的LNP-环状RNA处理后的小鼠脾蛋白表达

[1682] 给C57BL/6小鼠(雌性,6-8周,每组n=4)静脉内注射0.5mg/kg的被包封在LNP或PBS对照中的编码萤火虫萤光素酶的环状RNA。LNP由不同的可电离脂质(表10e、脂质85、86、89或90或表10f脂质22)配制,并按下表所述配制。在6小时以后,给小鼠腹膜内注射D-萤光素(200 μ L,15mg/mL)。在15分钟以后,对小鼠实施安乐死并收集其脾脏。使用IVIS Spectrum体内成像系统(PerkinElmer)离体测量整个组织发光,并使用Living Image®软件(PerkinElmer)量化总通量。

[1683] 如在图75中所示,脾脏中增加的萤光素酶表达与在LNP的可电离脂质组分中存在的增加的B-羟基基团数目相关。

[1684]	制剂	可电离脂质	辅助脂质	PEG-脂质	可电离脂质: 辅助脂质: 胆固醇: PEG-脂质(摩尔%)	Z-平均值(nm)	PDI	RNA 包封效率(%)
	10e-85 (5.7A)	表 10e, 脂质 85	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	81	0.08	91
	10e-89 (5.7A)	表 10e, 脂质 89	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	82	0.04	92
	10f-22 (5.7A)	表 10f, 脂质 22	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	78	0.08	93
	10e-86 (5.7A)	表 10e, 脂质 86	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	79	0.1	92
	10e-90 (5.7A)	表 10e, 脂质 90	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	86	0.04	92

[1685] 实施例87

[1686] 用编码萤火虫萤光素酶并包含来自表10e的可电离脂质的LNP-环状RNA处理后小鼠整个脾蛋白表达

[1687] 给C57BL/6小鼠(雌性, 6-8周, 每组n=4)静脉内注射0.5mg/kg的被包封在LNP或PBS对照中的编码萤火虫萤光素酶的环状RNA。LNP由表10e中的不同可电离脂质(脂质1、脂质85、脂质38、脂质34、脂质45、脂质86、脂质88、脂质89、脂质90)配制。以5.7的可电离脂质与磷酸酯比率(IL:P)和50:10:38.5:1.5的可电离的脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质比率,用环状RNA配制LNP。在6小时后,给小鼠腹膜内注射D-萤光素(200 μ L, 15mg/mL)。在15分钟后,对小鼠实施安乐死并收集其脾脏。使用IVIS Spectrum体内成像系统(PerkinElmer)离体测量整个组织发光,并使用Living **Image**®软件(PerkinElmer)量化总通量。

[1688] 如在图76中所见,在静脉内施用构建体后,LNP-环状RNA能够在小鼠脾脏中表达萤火虫萤光素酶。

[1689] 实施例88

[1690] mOX40L在脾T细胞中的表达。

[1691] 以5.7的可电离脂质与磷酸酯比率(IL:P),用编码mOX40L的环状RNA配制包含来自表10e的可电离脂质(脂质1、16、85、34、45、86、88、89、90)或PBS(阴性对照)的脂质纳米颗粒。这些LNP的可电离脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质摩尔比是50:10:38.5:1.5。以1mg/kg静脉内施用给C57BL/6雌性小鼠(6-8周, n=4)。在24小时,收集小鼠脾脏用于流式细胞计量术分析,试验体重减轻,并在血液收集后测量血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)。测量脾T细胞中的mOX40L表达。

[1692] 如在图77中所示,表10e的脂质1导致脾T细胞中mOX40L的表达。没有测量到与体重减轻或ALT有关的显著不良影响。

[1693]

制剂	可电离脂质	辅助脂质	PEG-脂质	可电离脂质: 辅助脂质: 胆固醇: PEG-脂质(摩尔%)	Z-平均值(nm)	PDI	RNA 包封效率(%)
10e-1 (5.7A)	表 10e, 脂质 1	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	73	0.05	94
10e-16 (5.7A)	表 10e, 脂质 16	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	76	0.10	95

[1694]

10e-85 (5.7A)	表 10e, 脂质 85	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	74	0.04	95
10e-34 (5.7A)	表 10e, 脂质 34	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	72	0.03	97
10e-45 (5.7A)	表 10e, 脂质 45	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	75	0.04	98
10e-86 (5.7A)	表 10e, 脂质 86	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	79	0.05	94
10e-88 (5.7A)	表 10e, 脂质 88	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	67	0.01	95
10e-89 (5.7A)	表 10e, 脂质 89	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	73	0.01	95
10e-90 (5.7A)	表 10e, 脂质 90	DSPC	DMG-PEG(2000)	50: 10: 38.5: 1.5	87	0.02	94

[1695] 实施例89

[1696] 编码aCD19-CAR的LNP-环状RNA治疗后的B细胞耗竭水平

[1697] 在第0、2、5和7天,向C57BL/6小鼠(雌性,6-8周,每组n=4)静脉内注射1mg/kg的被包封在LNP中的编码aCD19-CAR的环状RNA或被包封在LNP中的编码mWasabi的对照环状RNA。LNP由不同的可电离脂质(表10e,脂质1、16、85、45、86或90)形成。LNP由环状RNA制成,其中可电离脂质与磷酸酯比率(IL:P)为5.7,且可电离脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质比率为50:10:38.5:1.5。在第8天,进行心脏穿刺以收集血液,并根据生产商的方案对血液进行染色、固定和用BD FACS裂解溶液裂解。为了评估血液中B细胞的频率,对单细胞悬液进行死细胞染色(LiveDead Near IR, Invitrogen),并以1:200用抗-小鼠抗体(CD45、30-F11或BUV563[血液], BD; CD3、17A2、APC, Biolegend; B220、RA3-6B2、PE, Biolegend; CD11b、M1/70、BV421, Biolegend)染色。使用BD FACSSymphony流式细胞计进行流式细胞计量术。通过活的CD45+免疫细胞的B220+B细胞的百分比来定义B细胞耗竭。

[1698] 在图78中显示了由此产生的血液B细胞发育不良。如在图78中所示, LNP-环状RNA构建体能够表达aCD19-CAR。

[1699] 实施例90

[1700] 在Na1m6模型中施用LNP-oRNA构建体后的肿瘤生长动力学

[1701] 给NSG小鼠移植Na1m6-萤光素酶肿瘤细胞,并在3天后移植人PBMC。从第二天开始,每隔一天用媒介物(PBS)或2mg/kg剂量的抗-CD19 LNP-oCAR化合物治疗小鼠4次。LNP由环状RNA配制,其中可电离脂质与磷酸酯比率(IL:P)为5.7,且可电离的脂质:辅助脂质:胆固醇:PEG-脂质比率为50:10:38.5:1.5。然后通过IVIS对动物进行全身成像以监测Na1m6细胞的萤光素酶表达。将Na1m6肿瘤负荷绘制为在每个成像时间点的萤光素酶表达的总通量。

[1702] 如在图79中所示,所有三种抗-CD19 oCAR LNP(每种包含不同的可电离脂质)能够减缓在该Na1m6模型中的肿瘤生长。

[1703] 通过引用并入

[1704] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,达到如同每篇单独的出版物、专利或专利申请被明确地且单独地指出通过引用并入本文的相同程度。

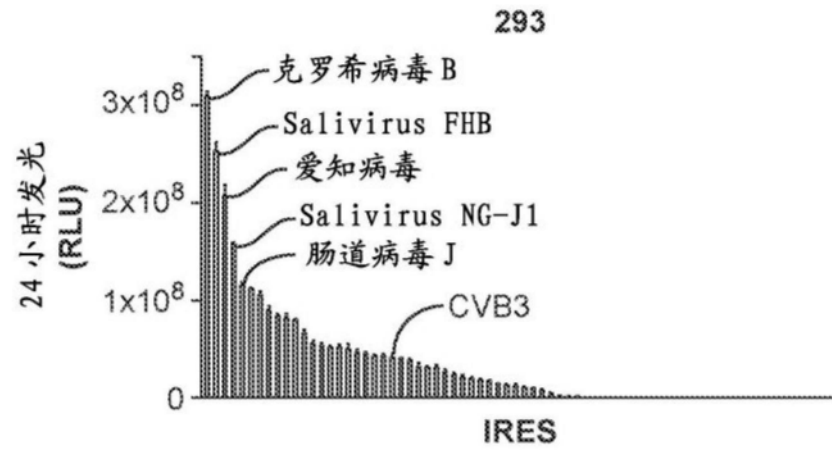


图1A

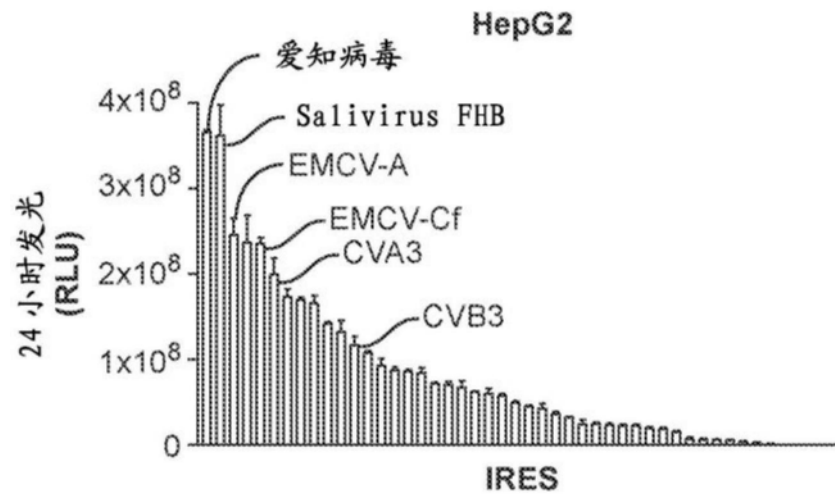


图1B

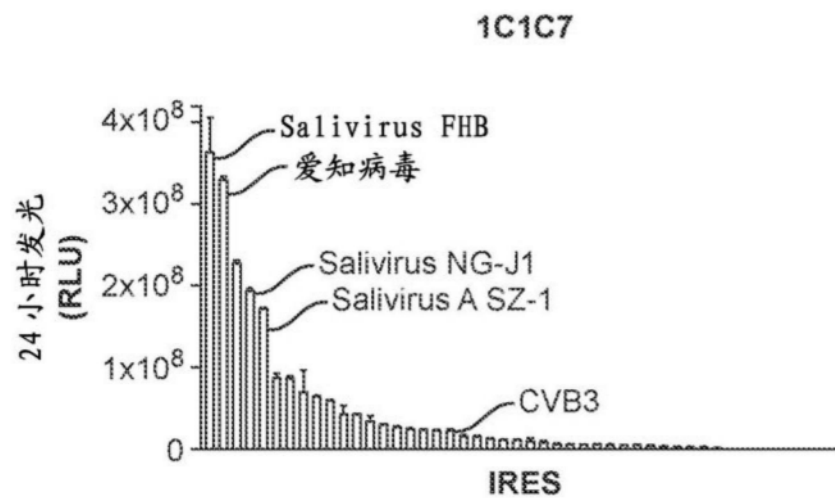


图1C

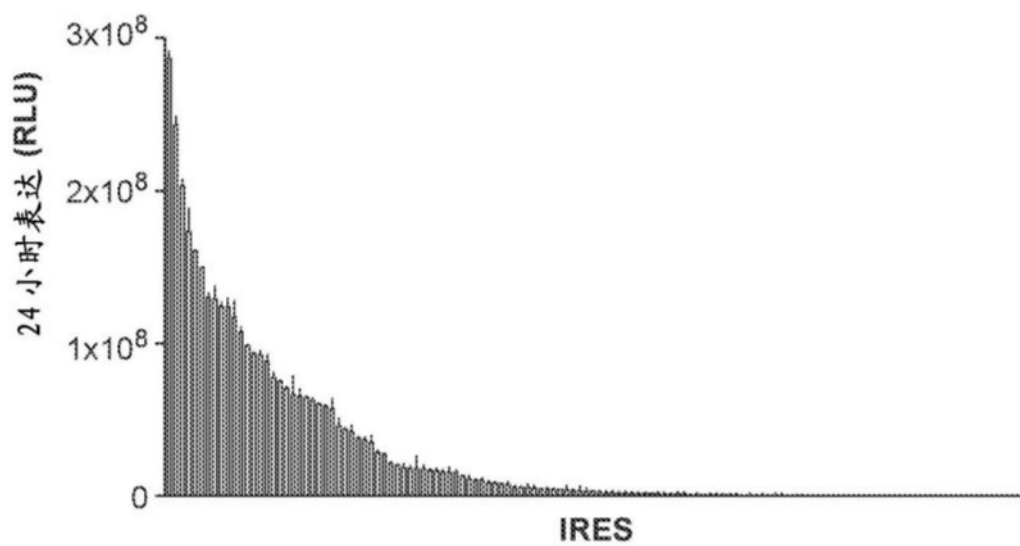


图1D

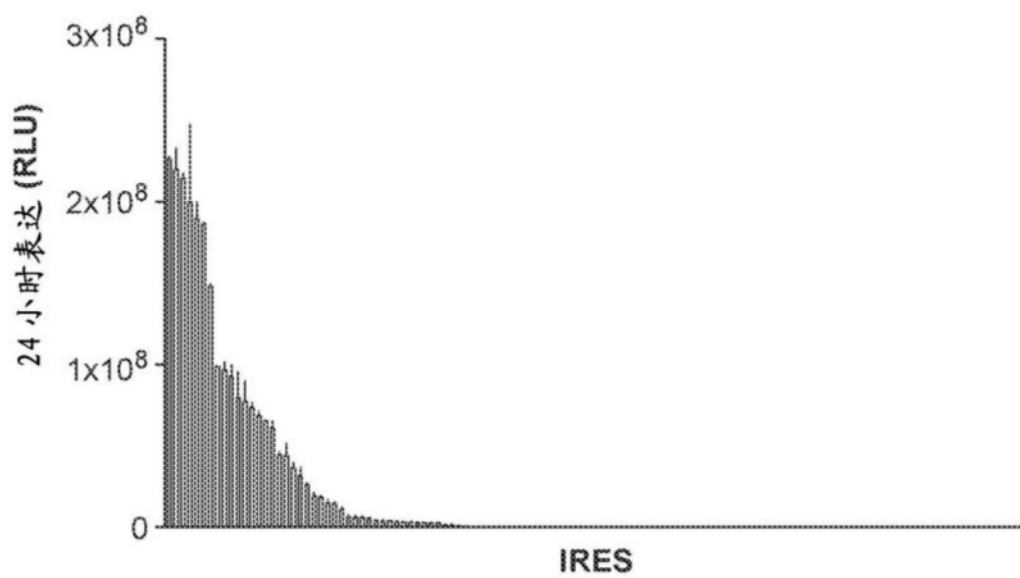


图1E

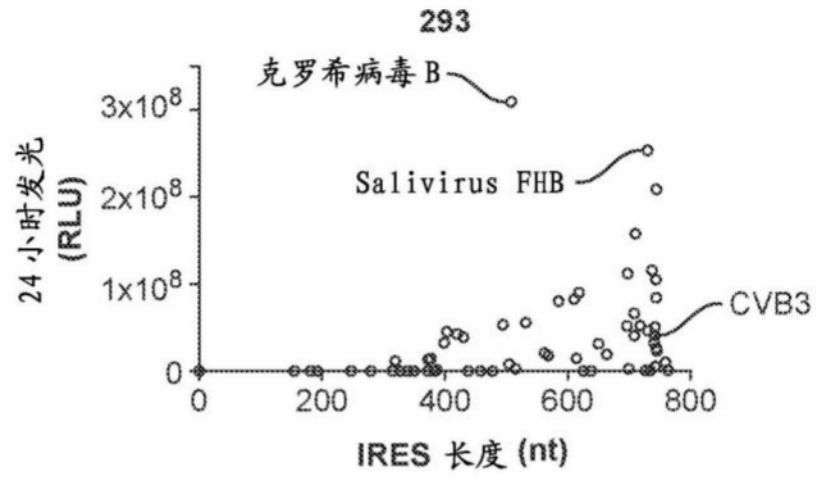


图2A

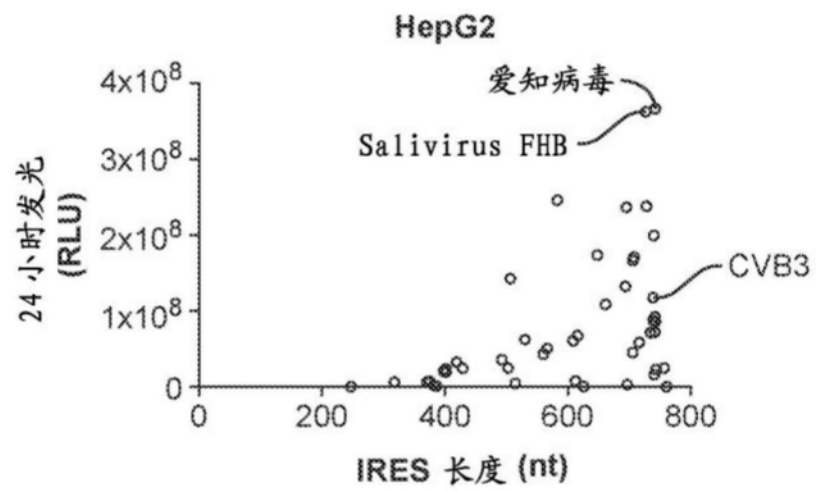


图2B

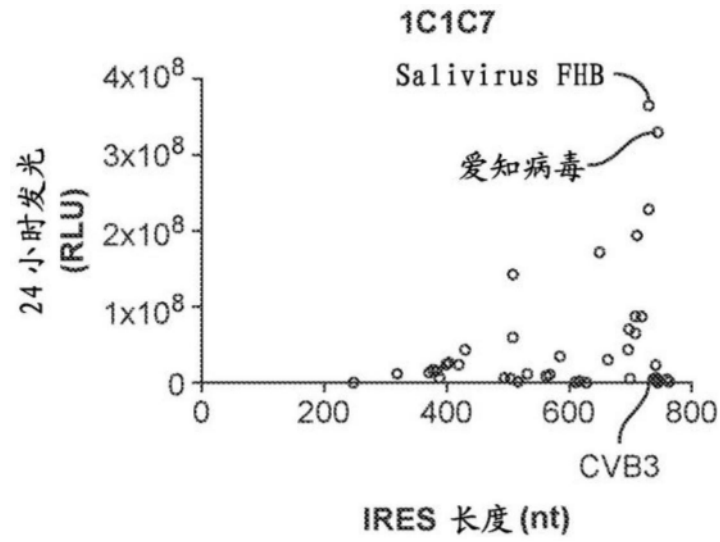


图2C

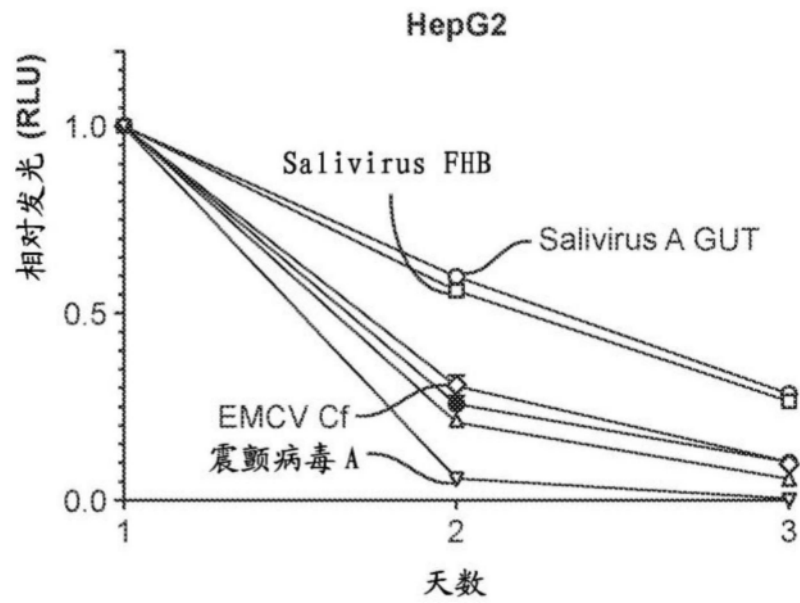


图3A

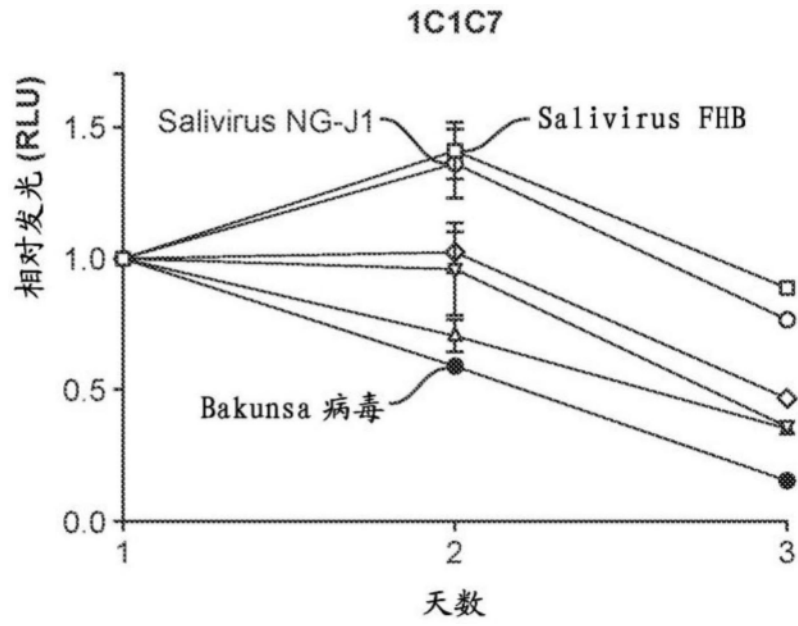


图3B

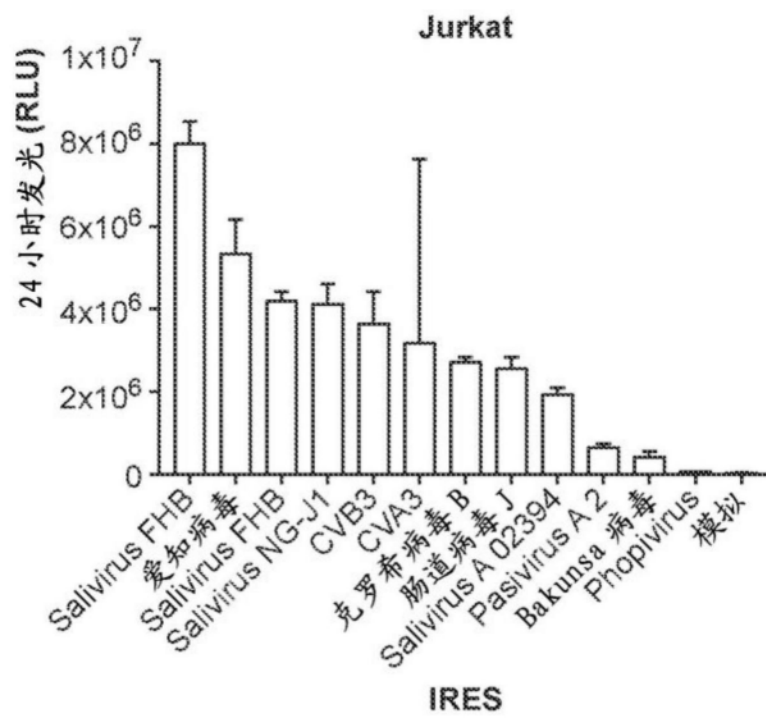


图4A

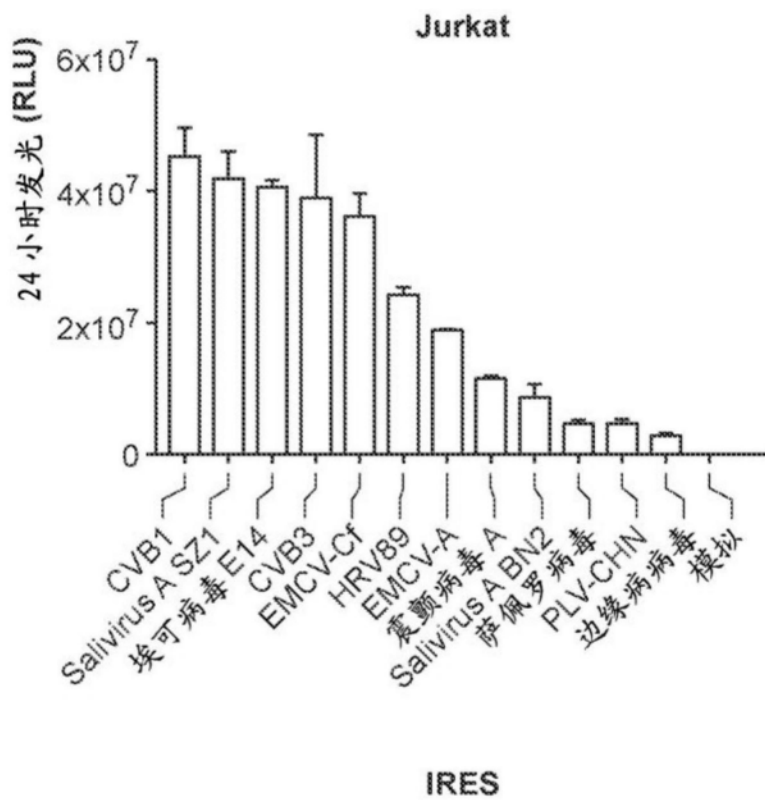


图4B

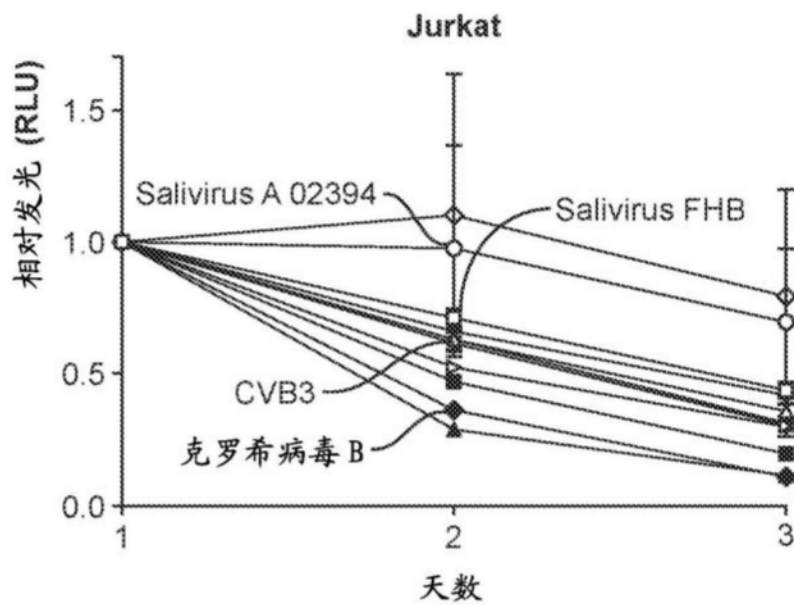


图5A

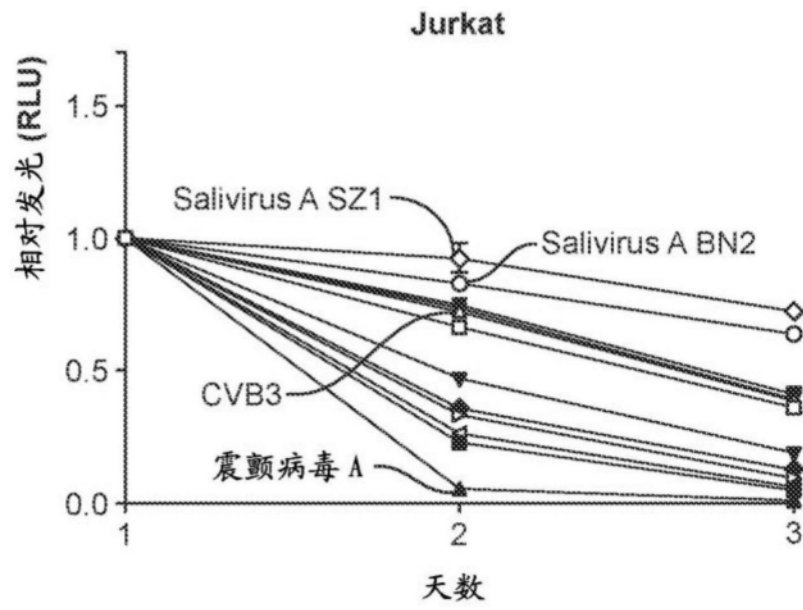


图5B

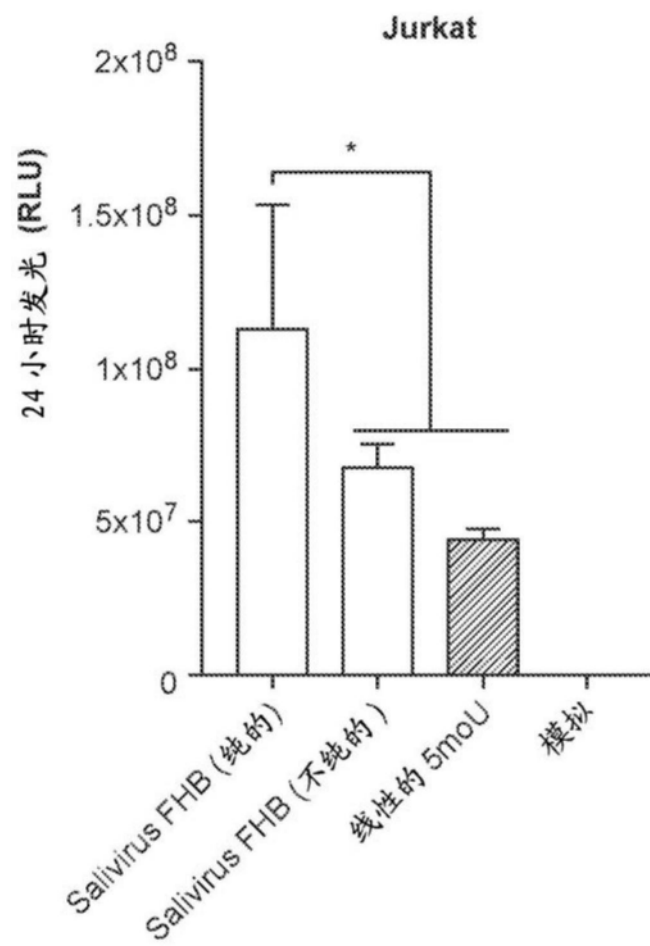


图6A

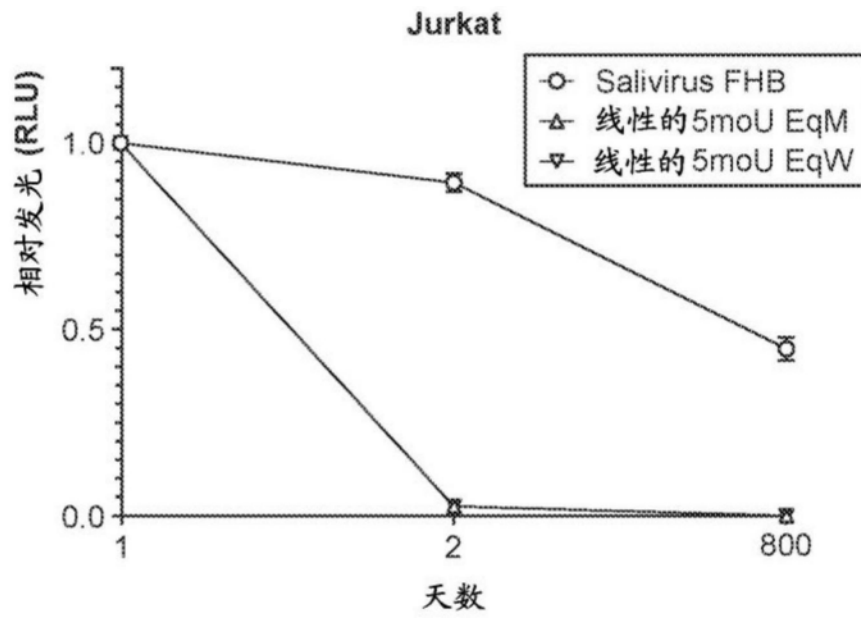


图6B

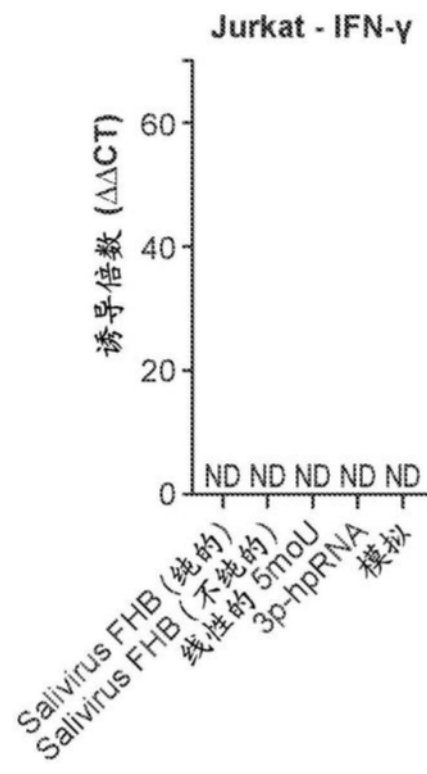


图7A

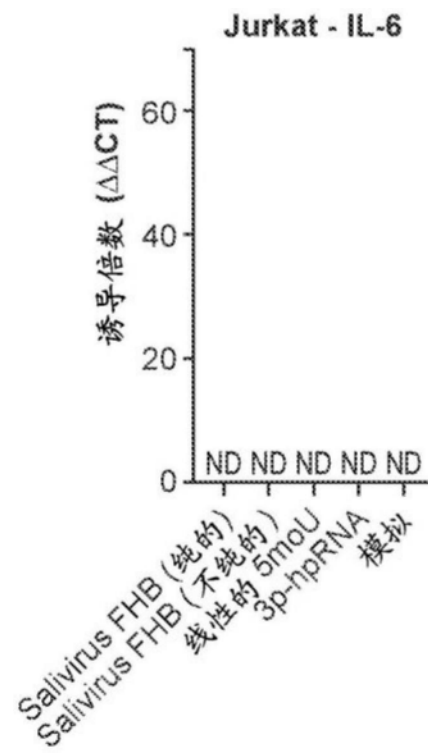


图7B

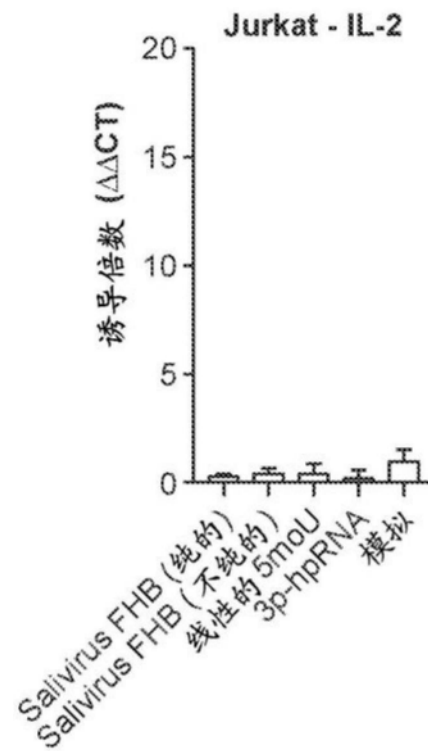


图7C

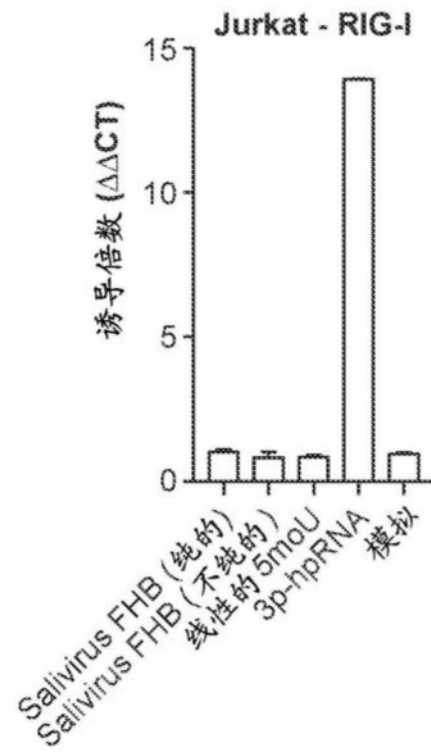


图7D

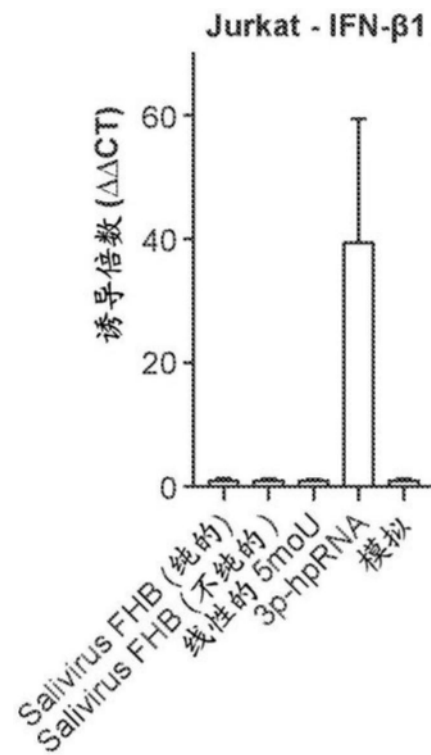


图7E

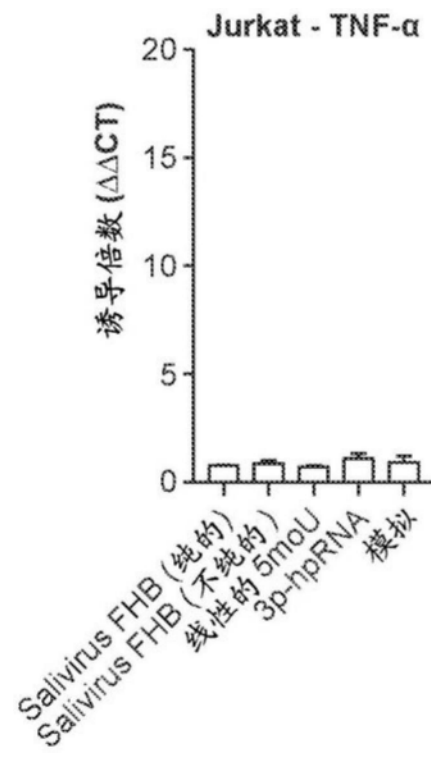


图7F

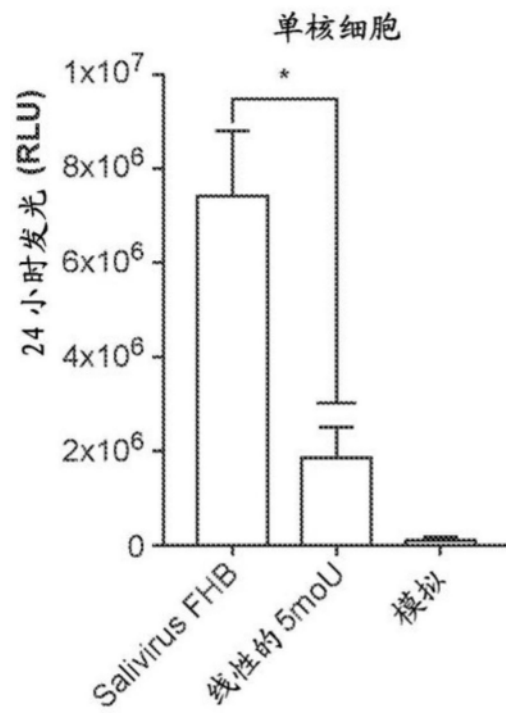


图8A

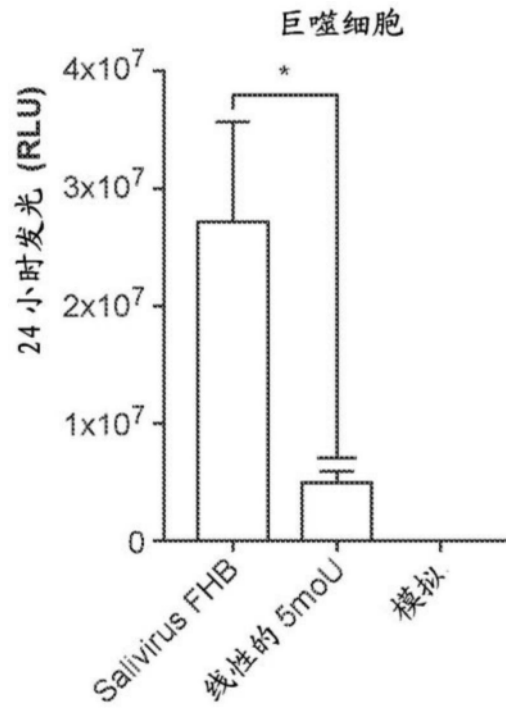


图8B

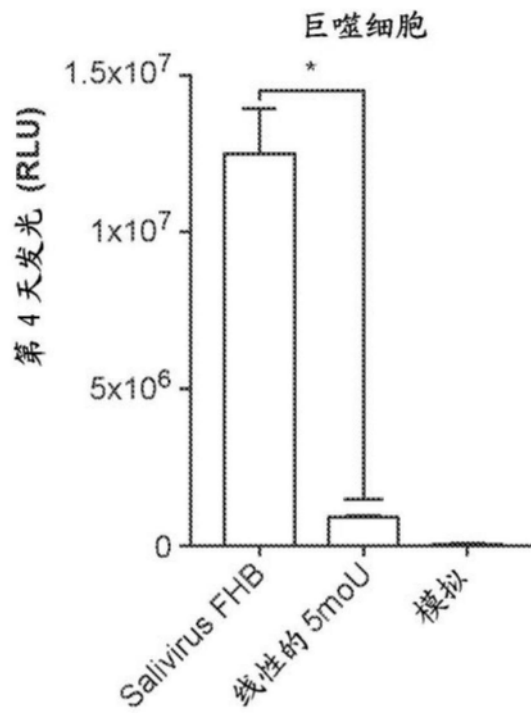


图8C

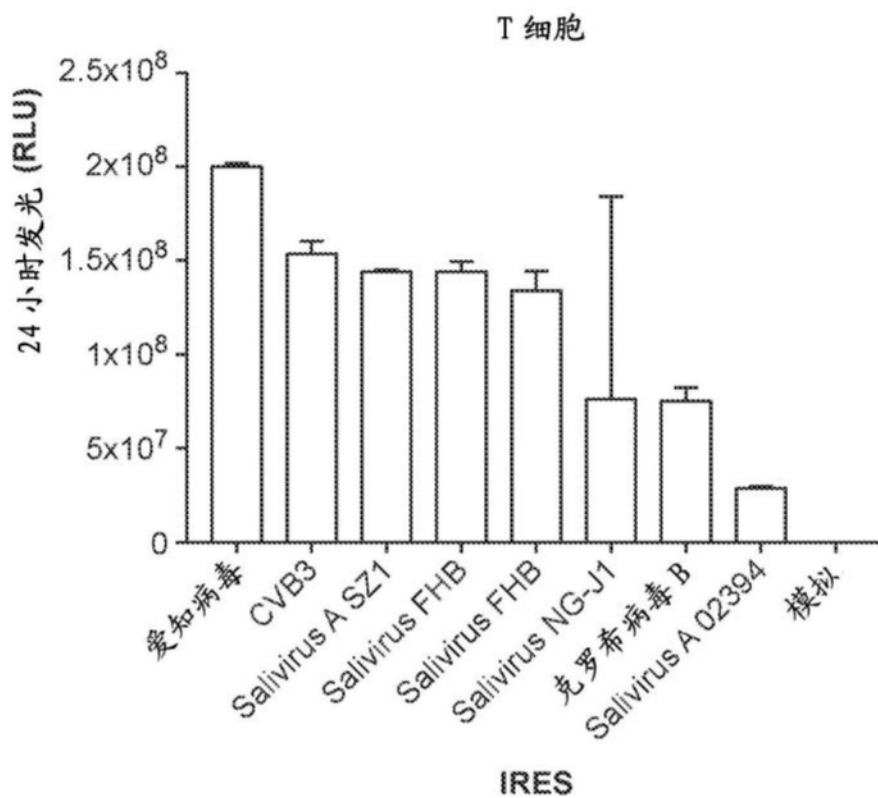


图9A

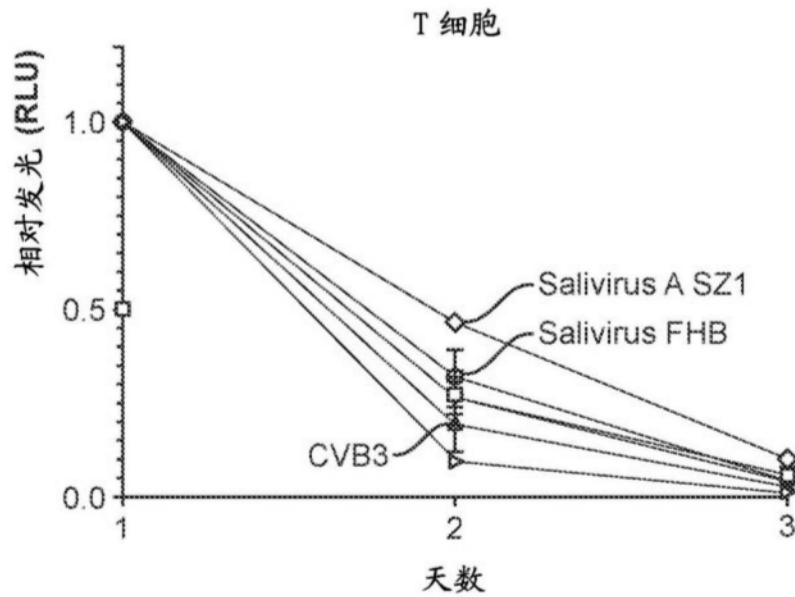


图9B

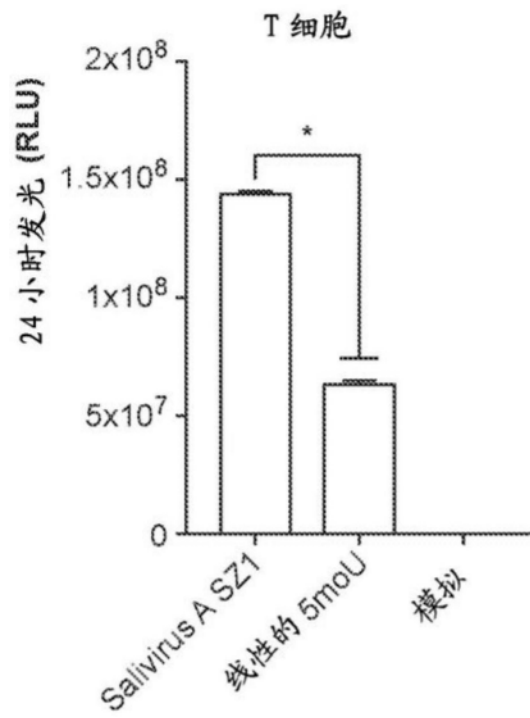


图10A

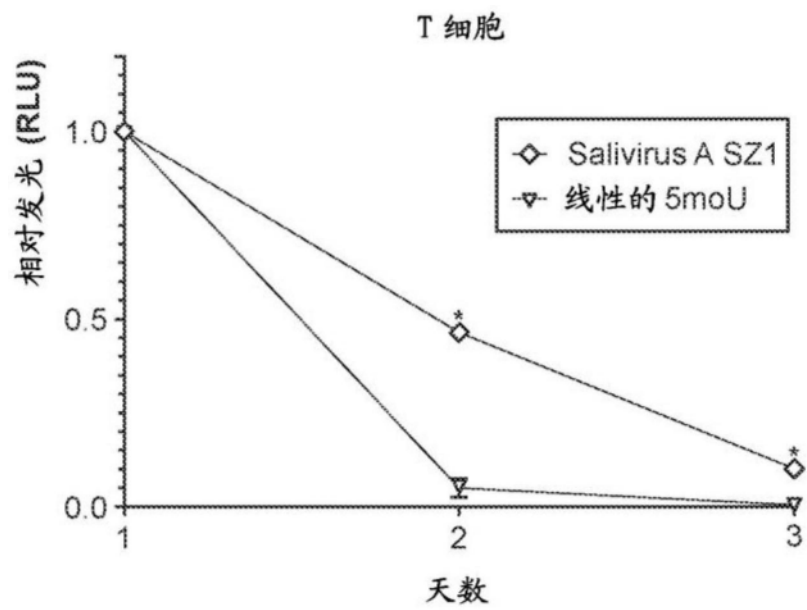


图10B

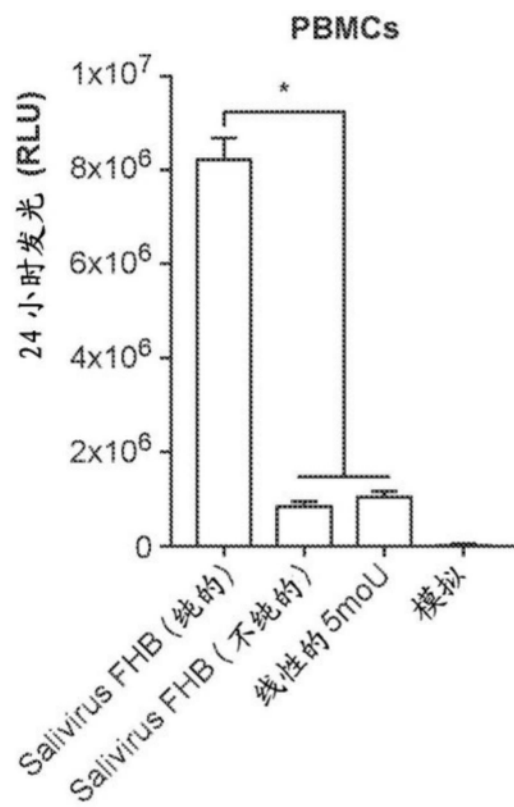


图10C

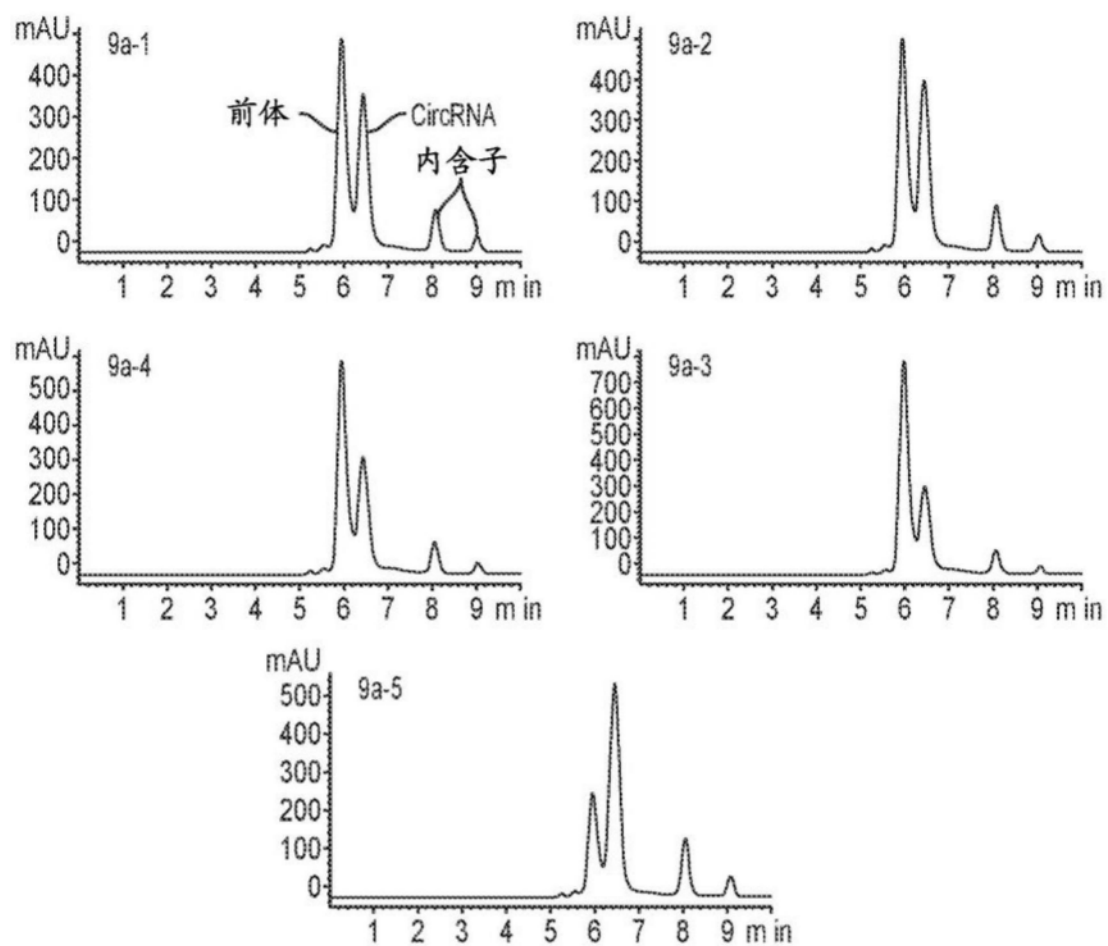


图11A

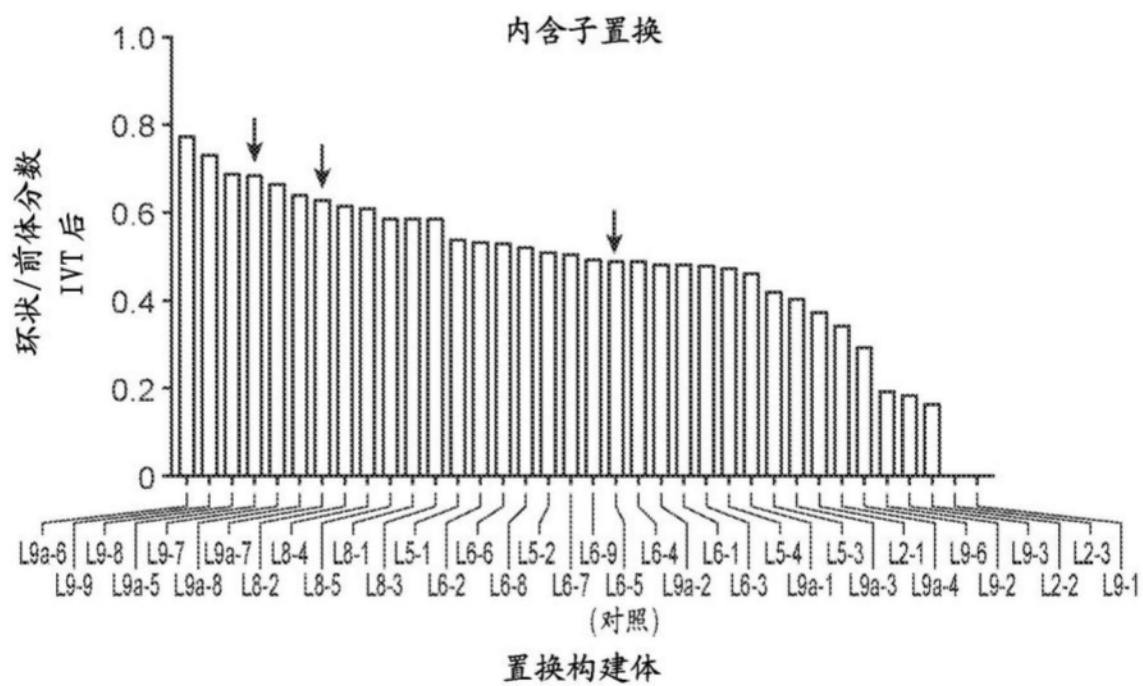


图11B

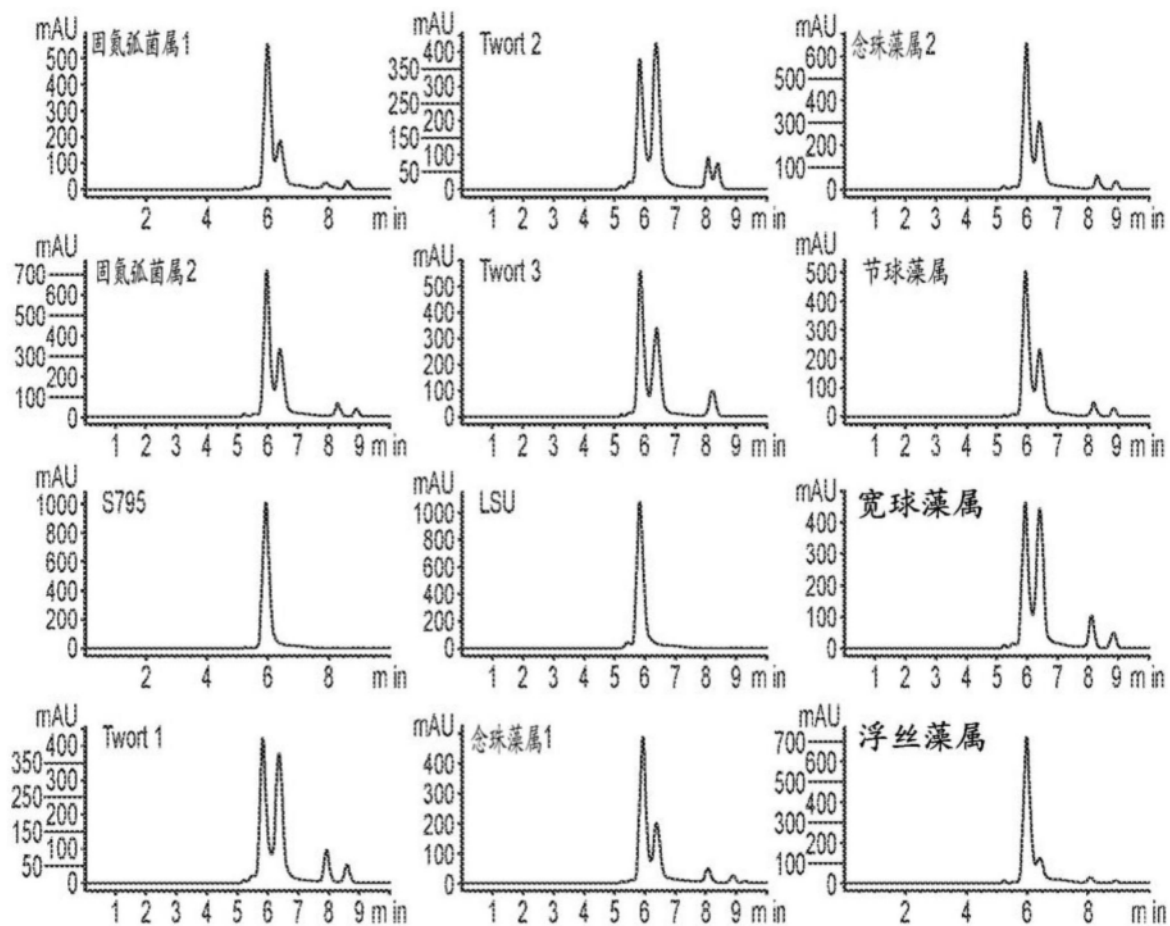


图12A

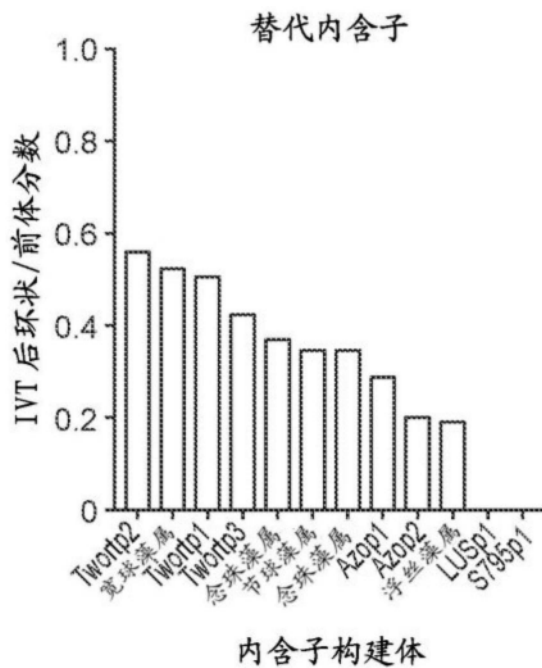


图12B

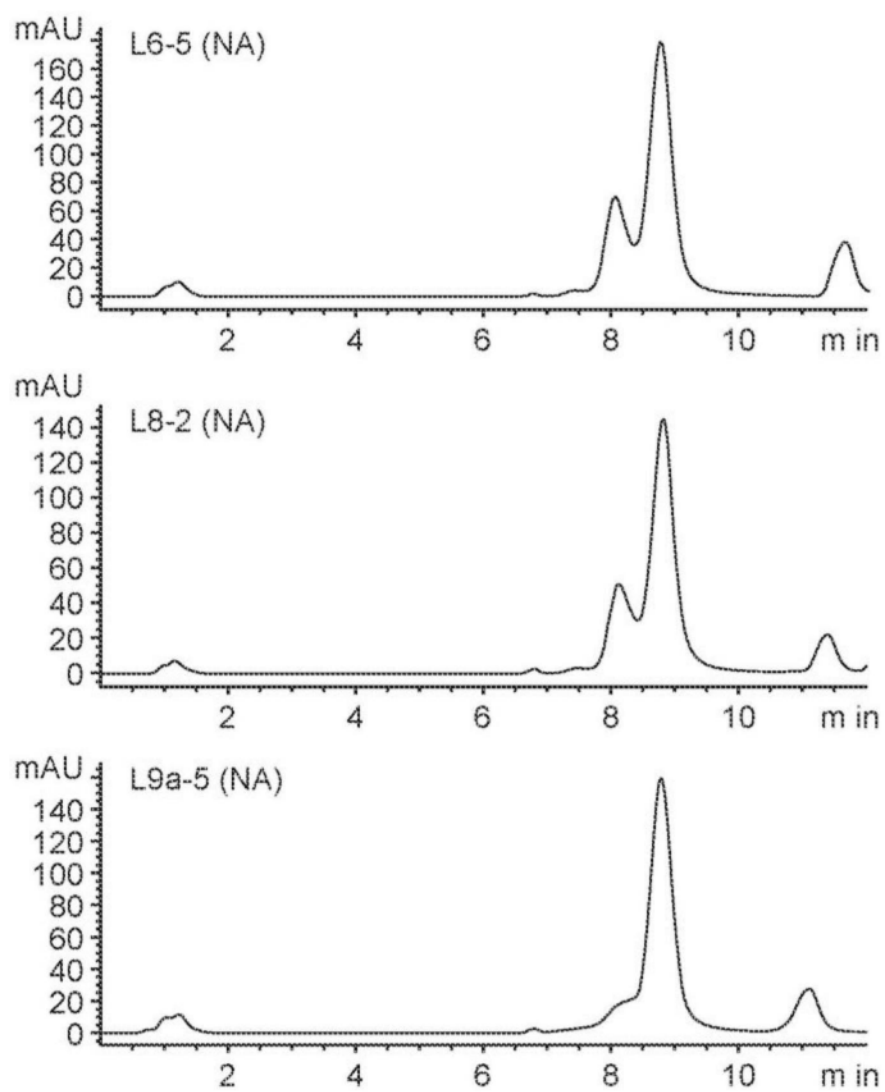


图13A

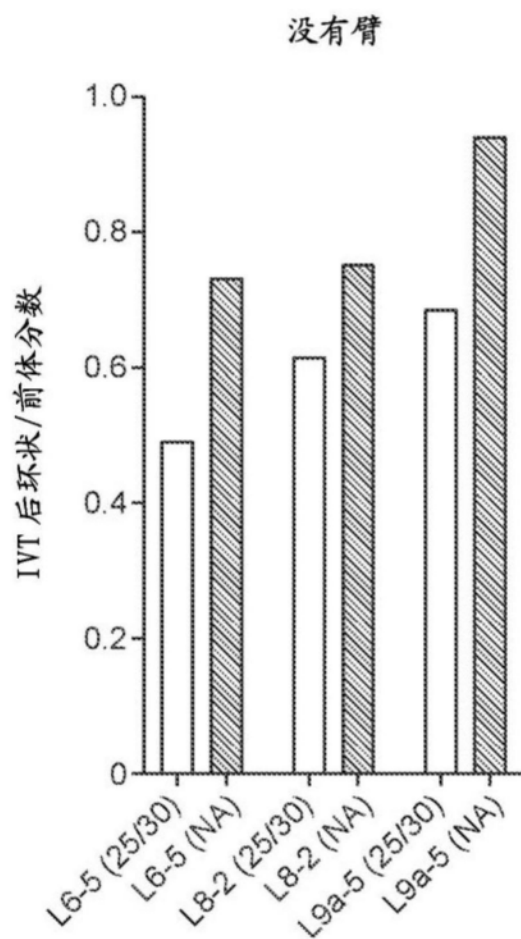


图13B

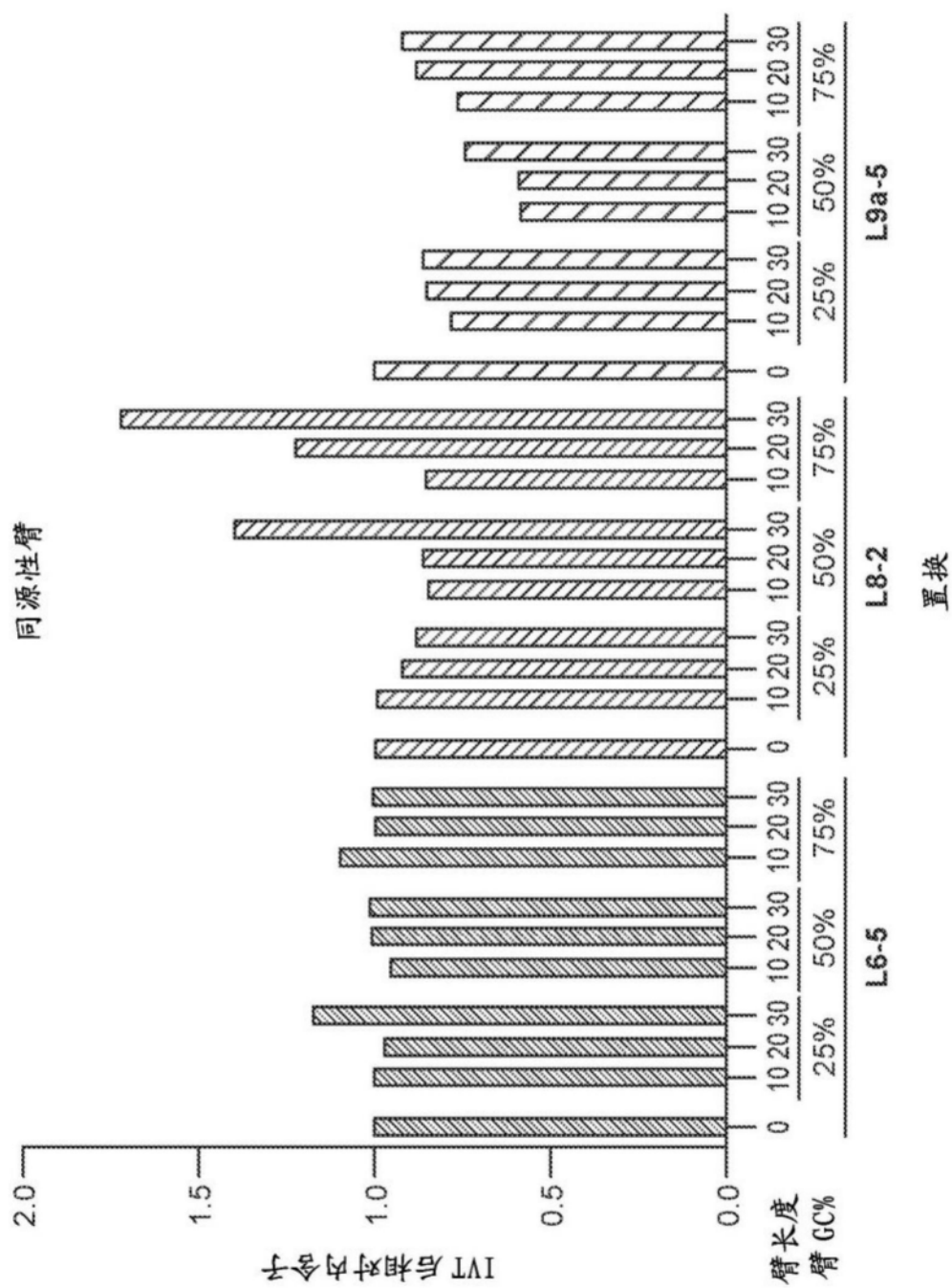


图14

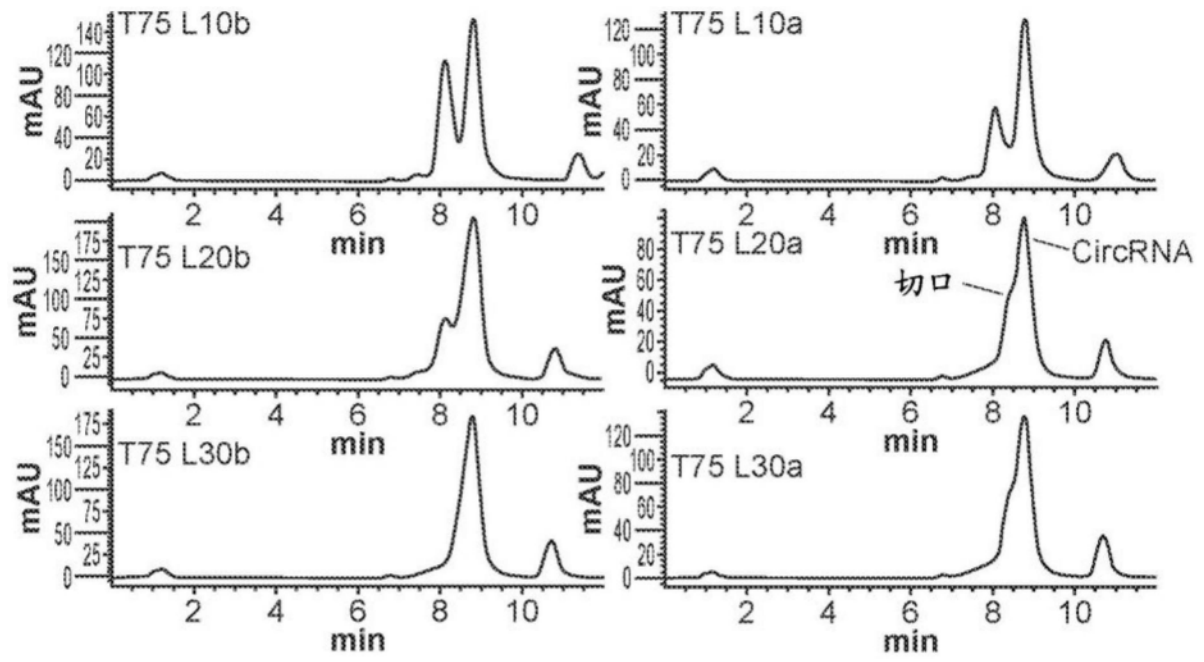


图15A

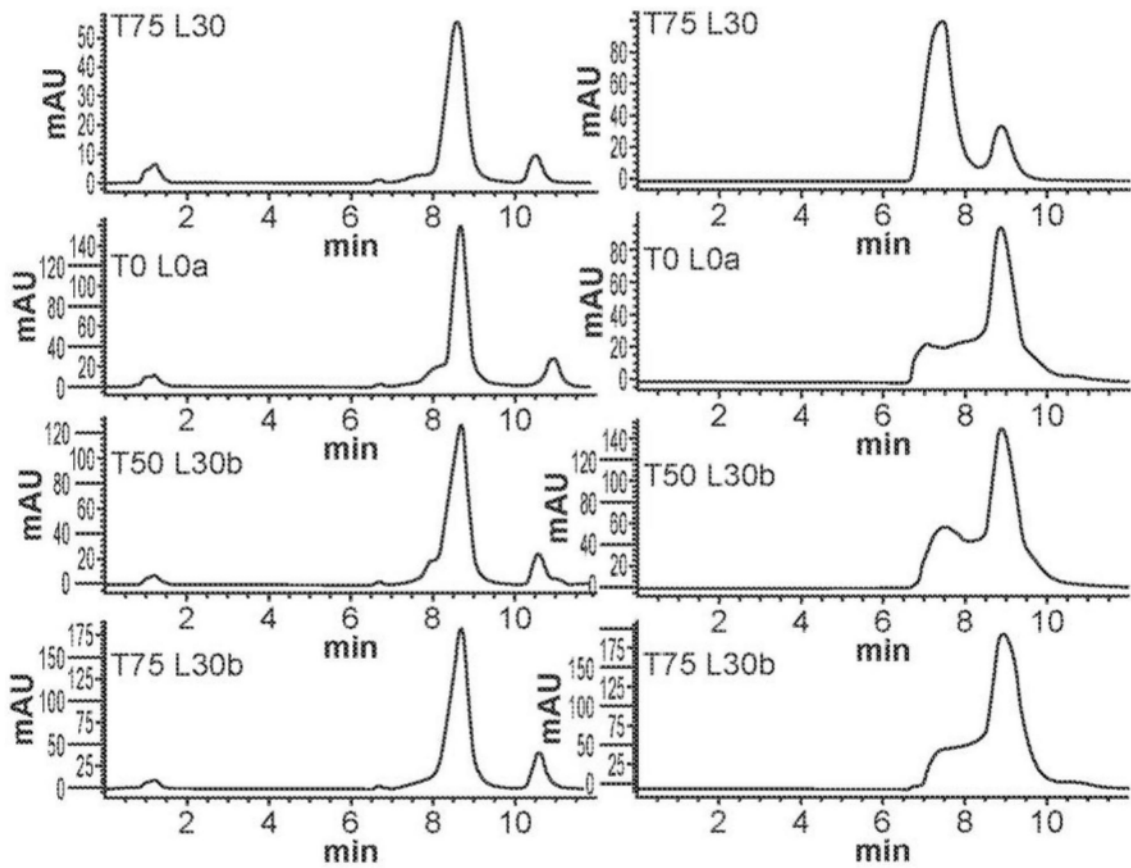


图15B

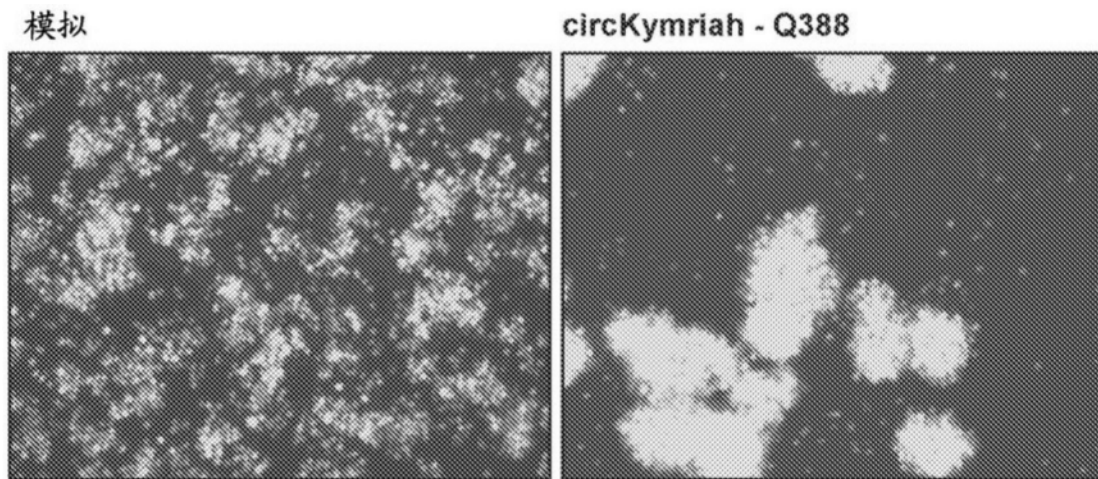


图16

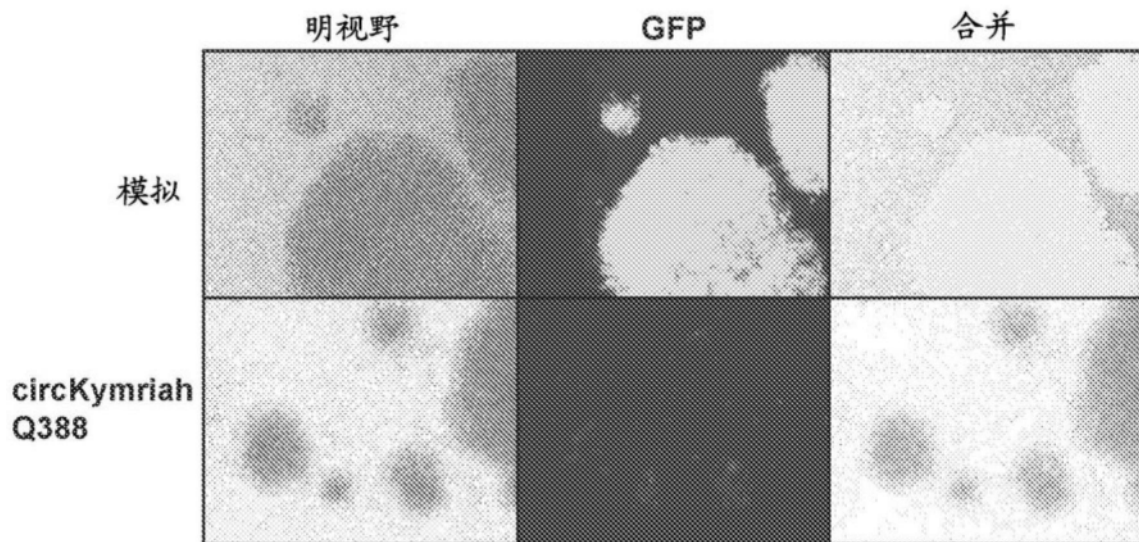


图17

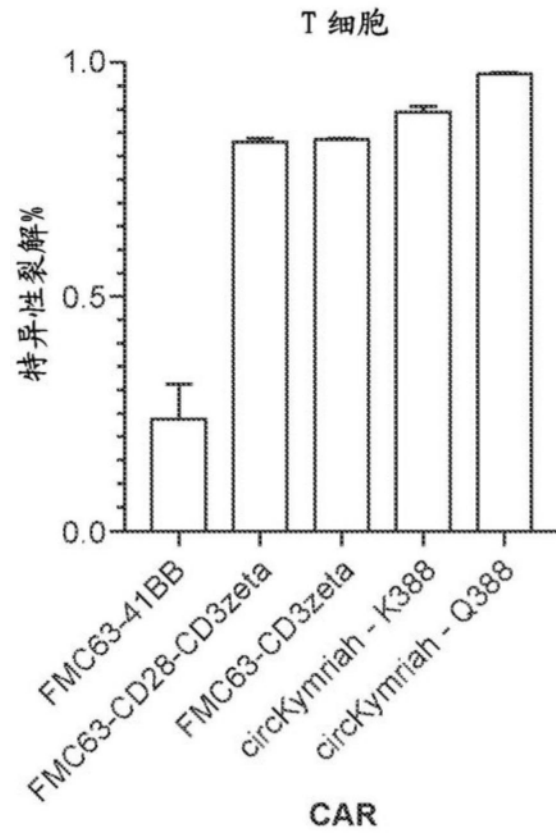


图18

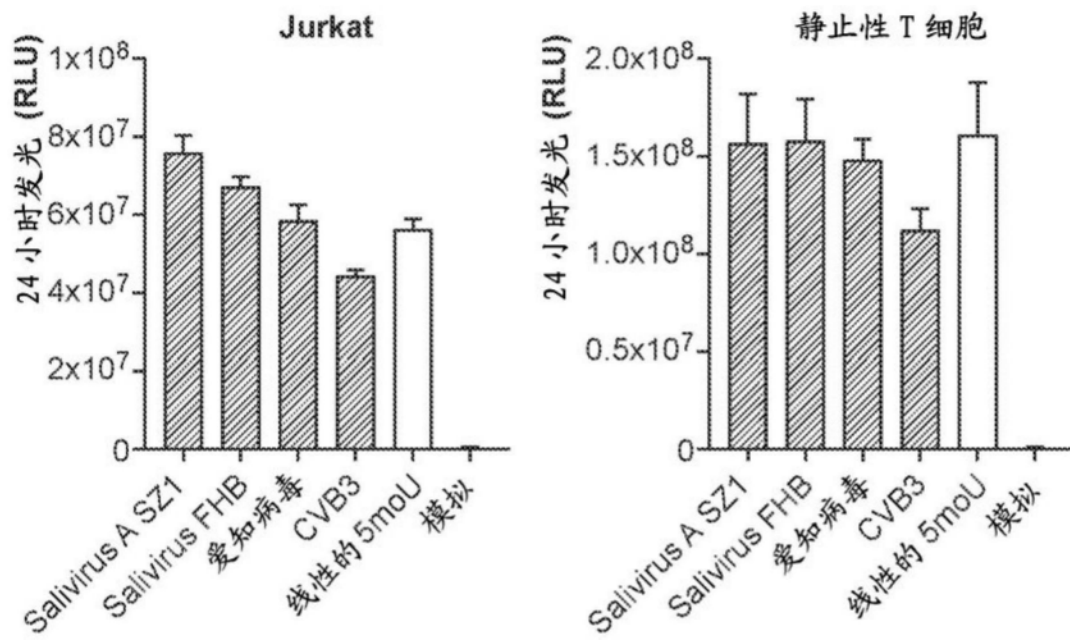


图19A

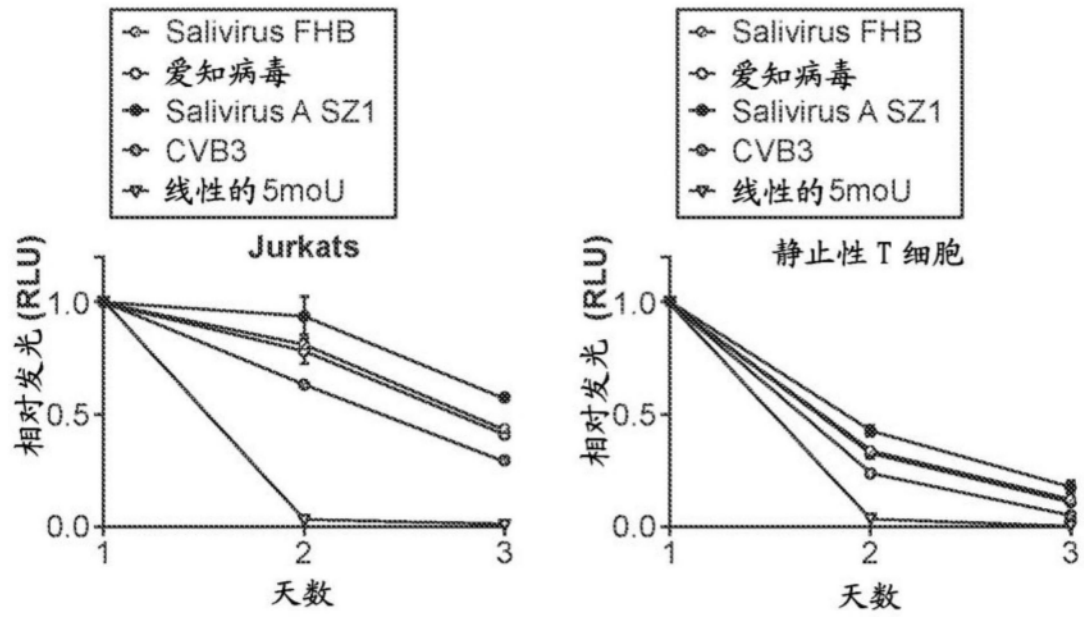


图19B

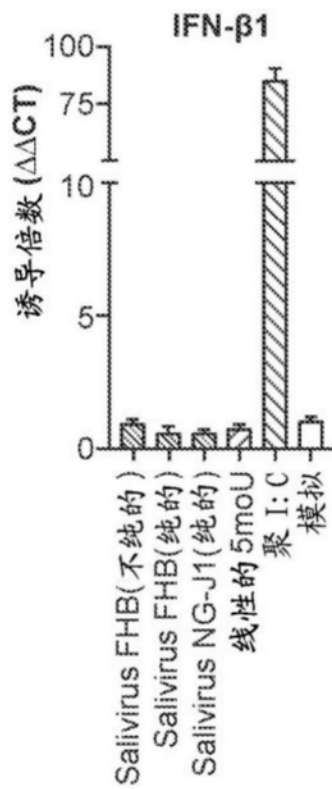


图20A

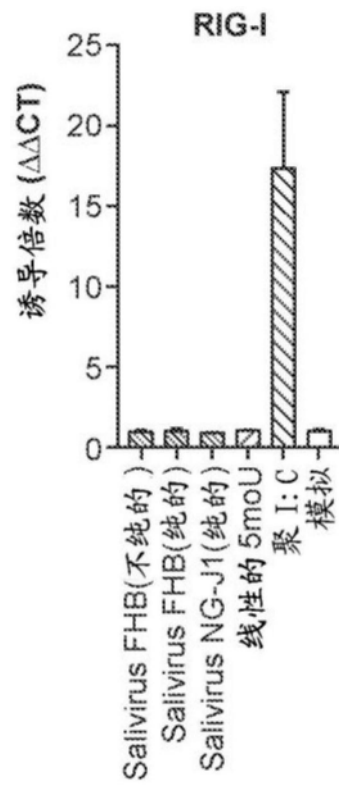


图20B

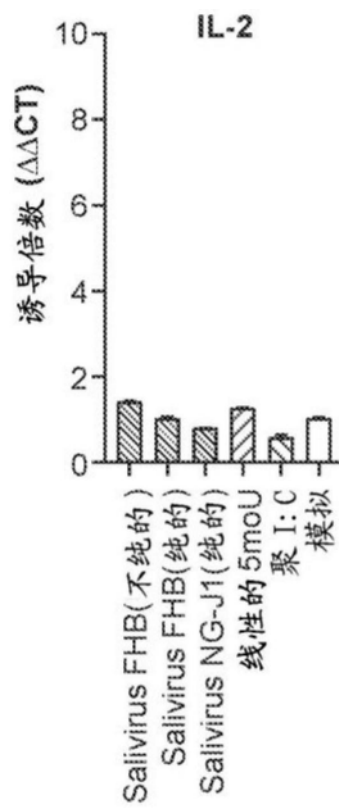


图20C

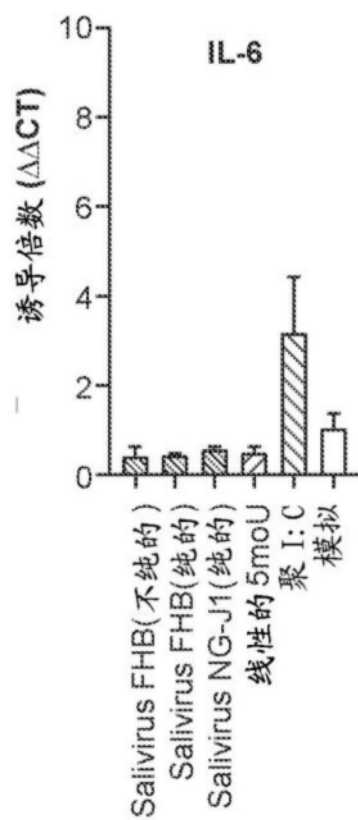


图20D

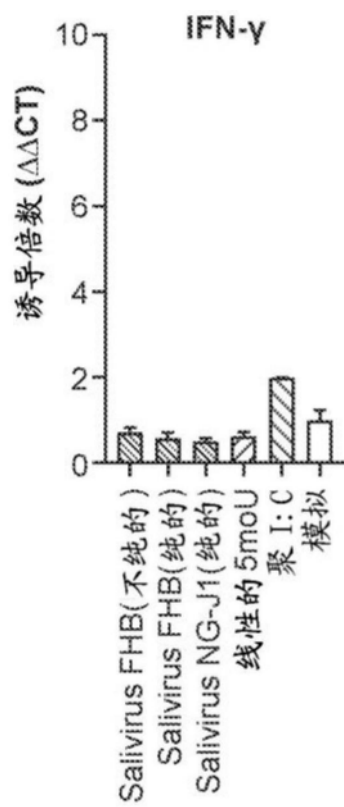


图20E

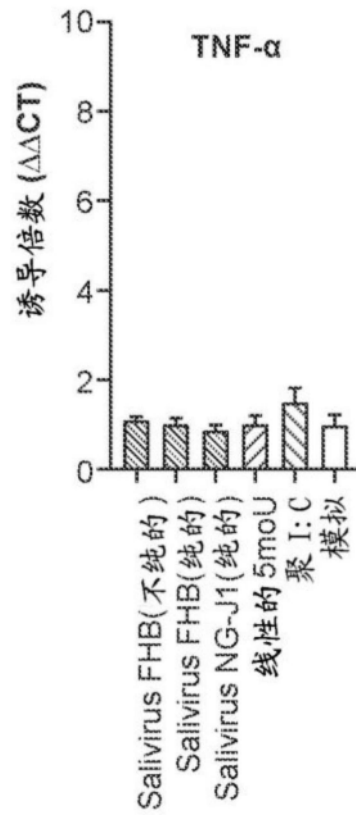


图20F

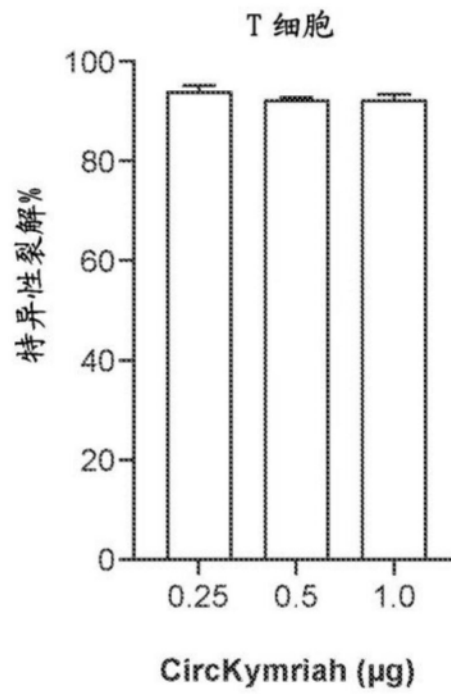


图21A

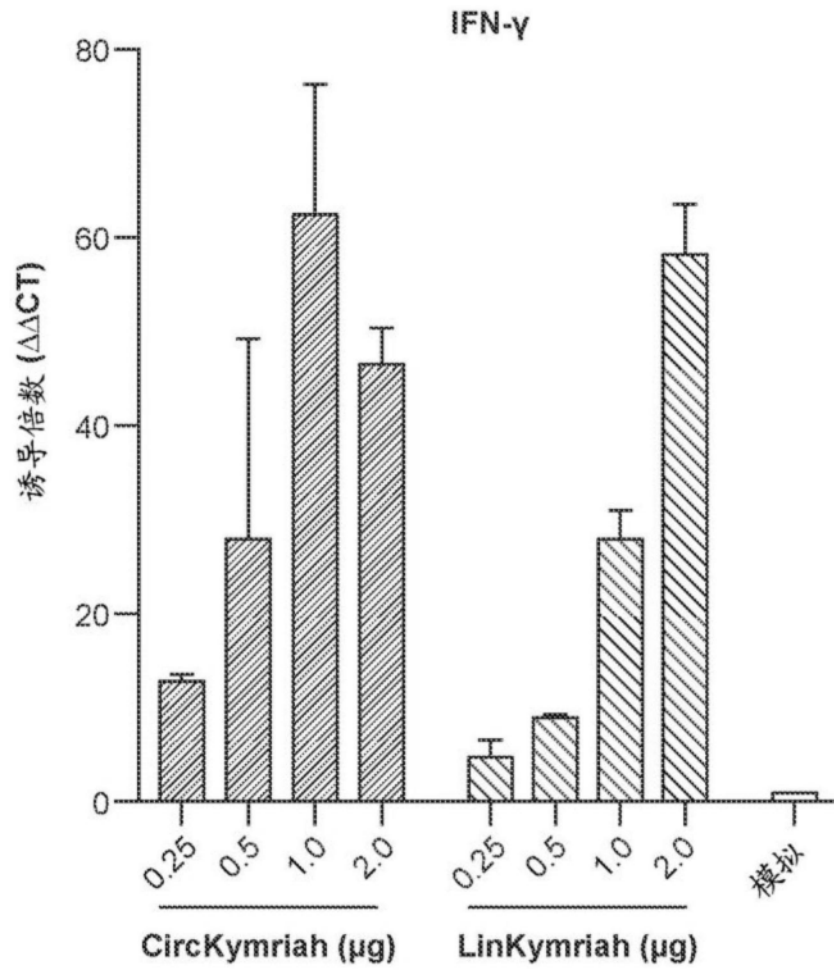


图21B

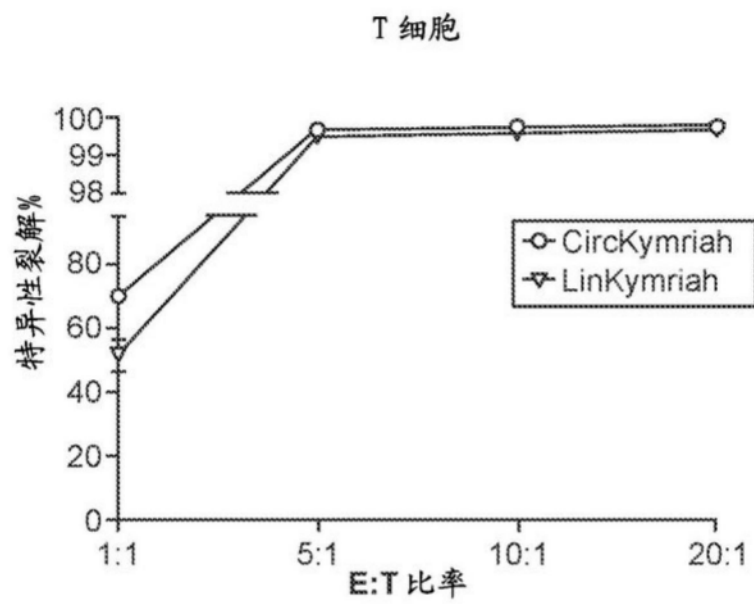


图22A

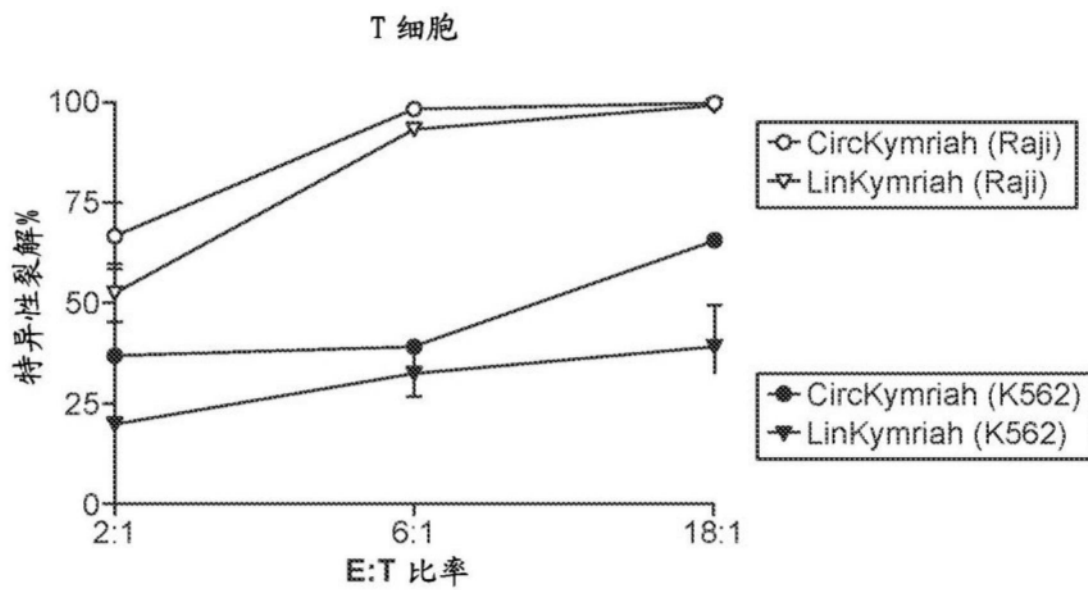


图22B

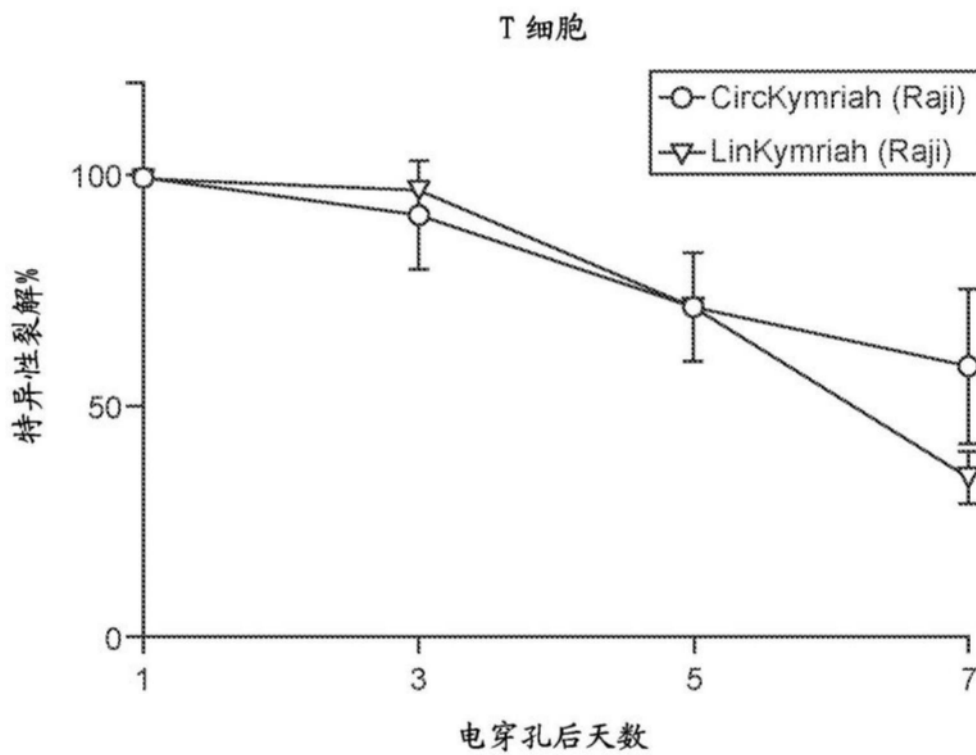


图23

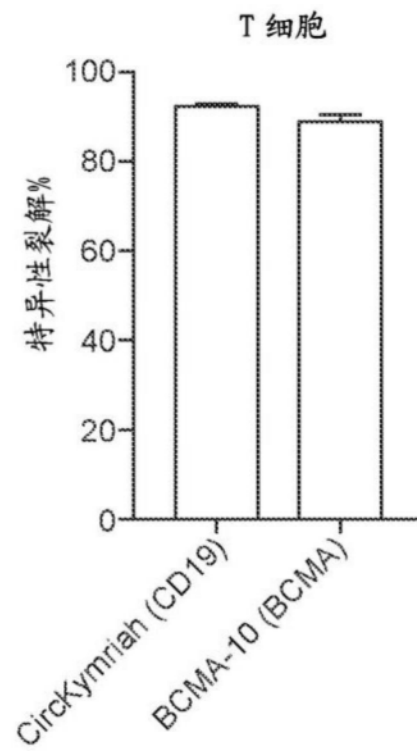


图24

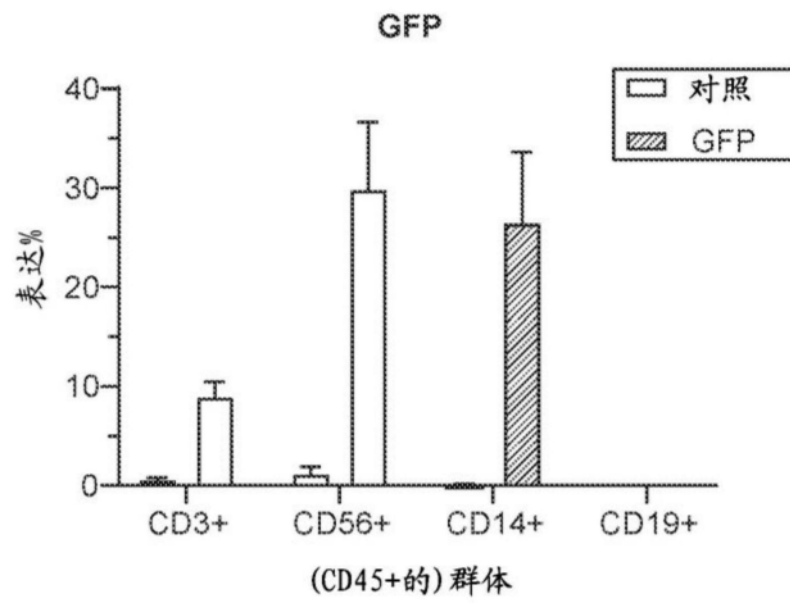


图25A

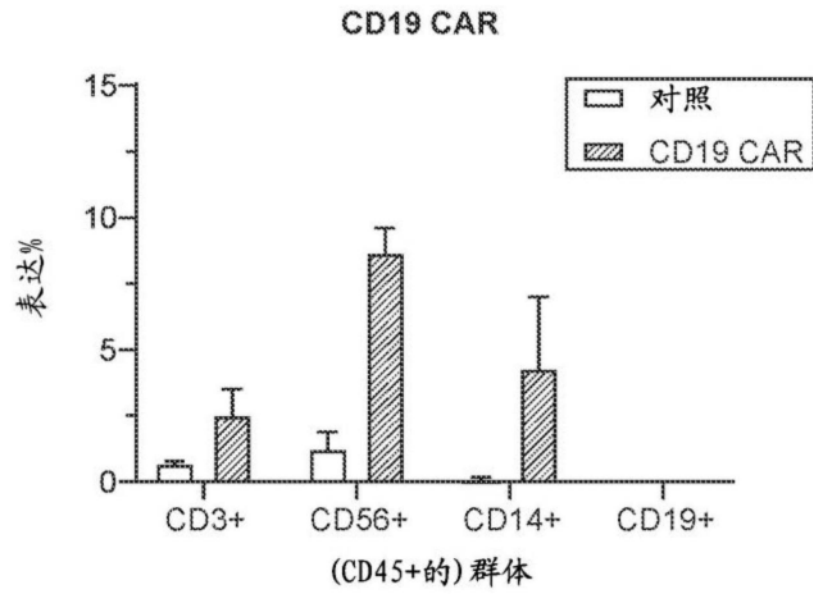


图25B

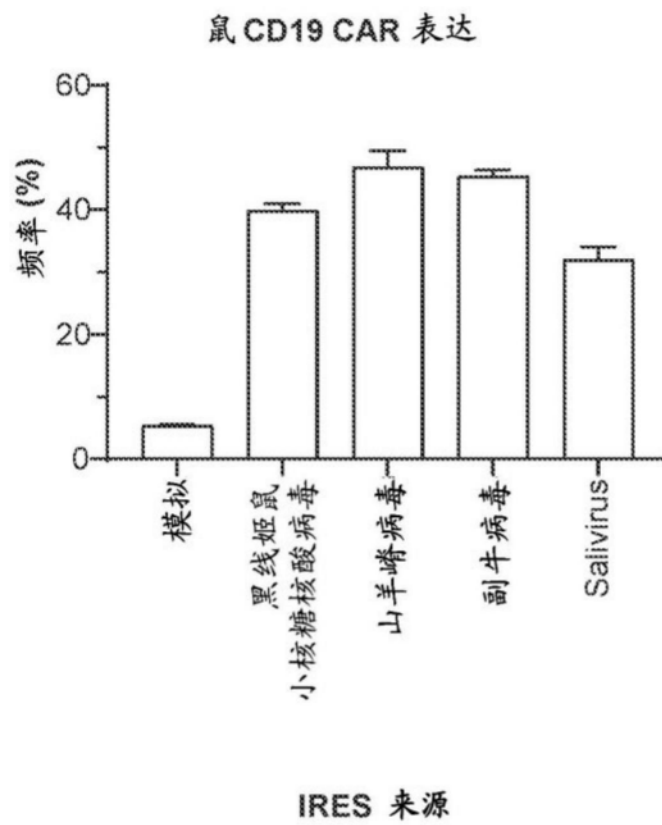


图26

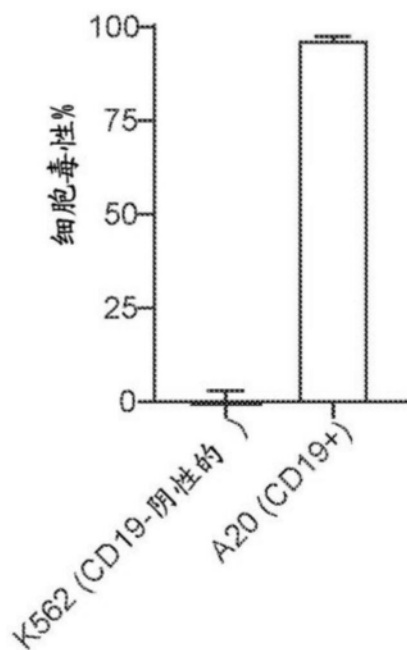


图27

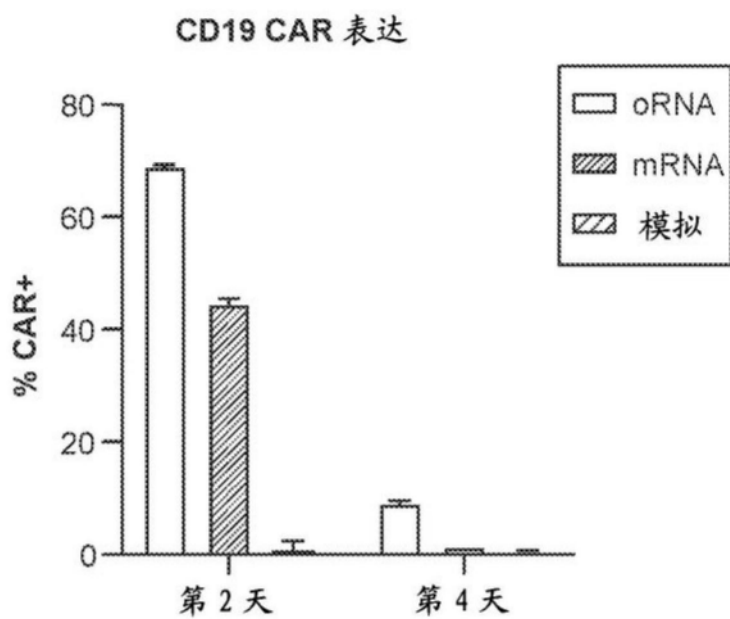


图28A

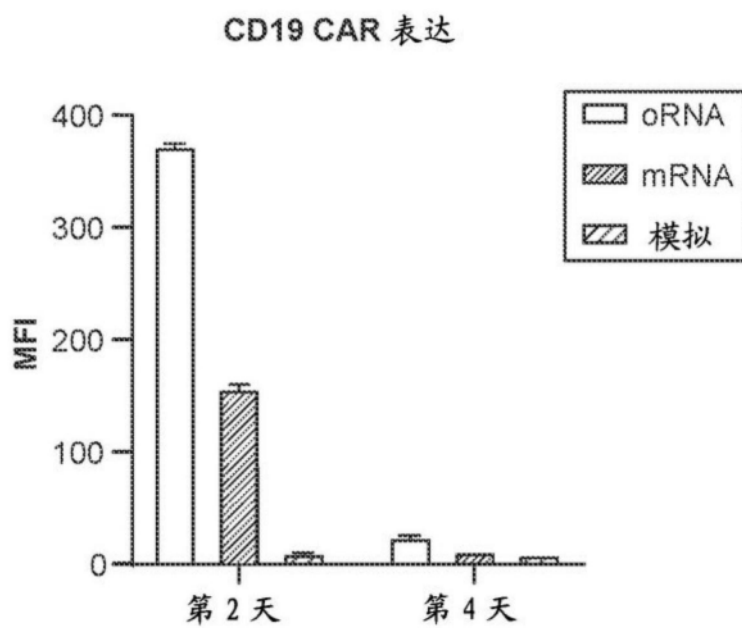


图28B

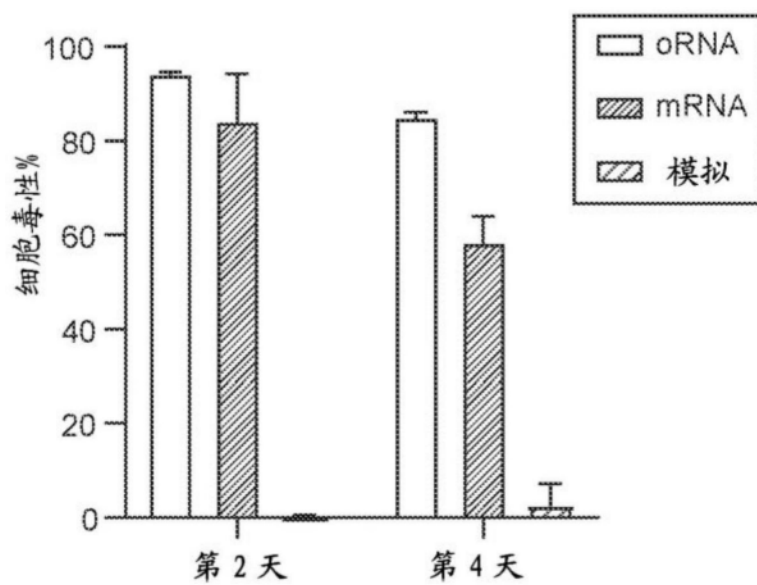


图29A

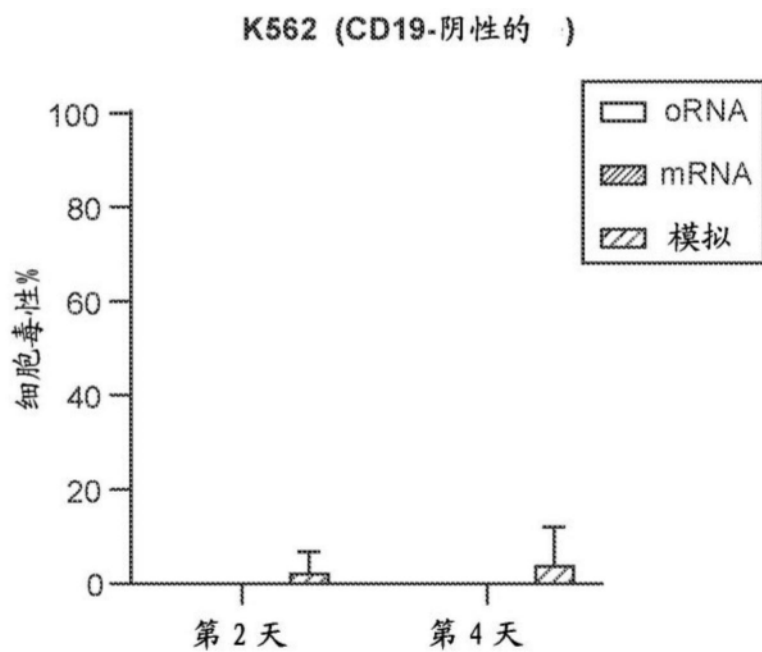


图29B

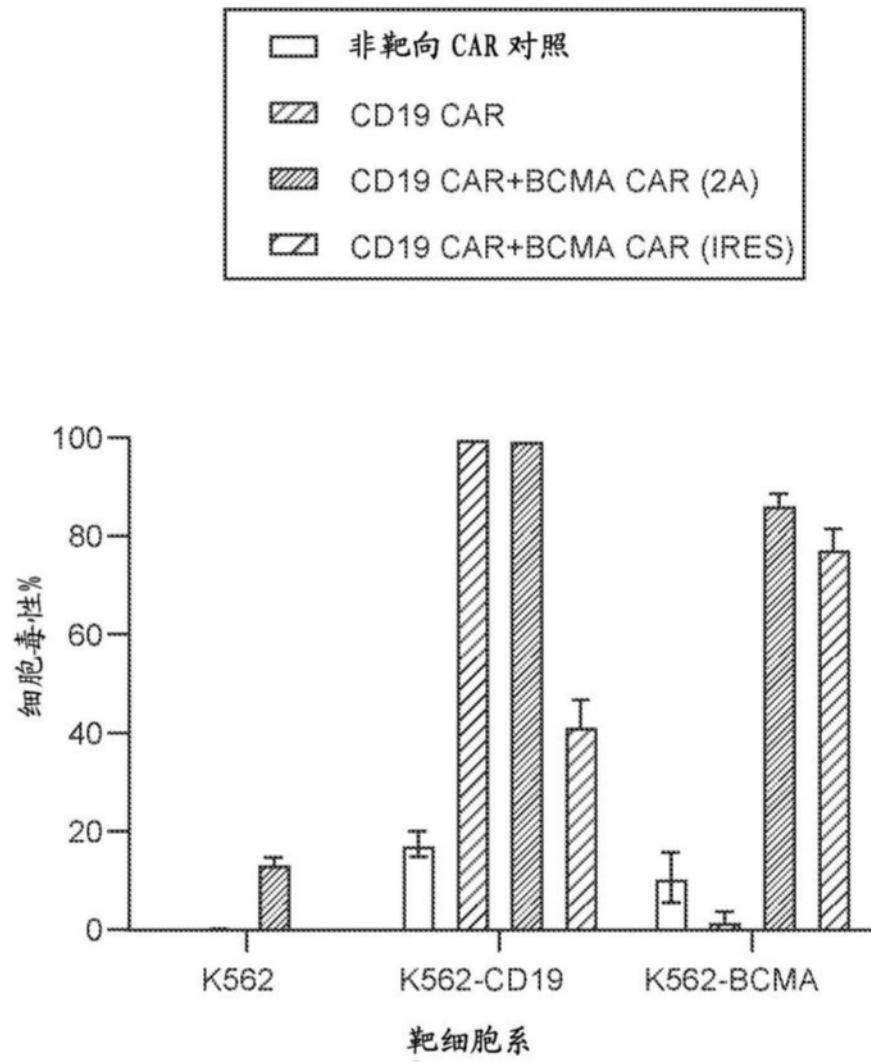


图30

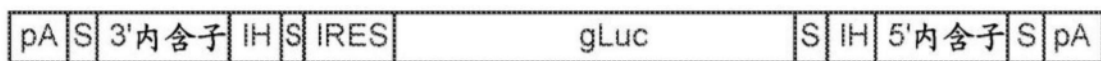


图31A

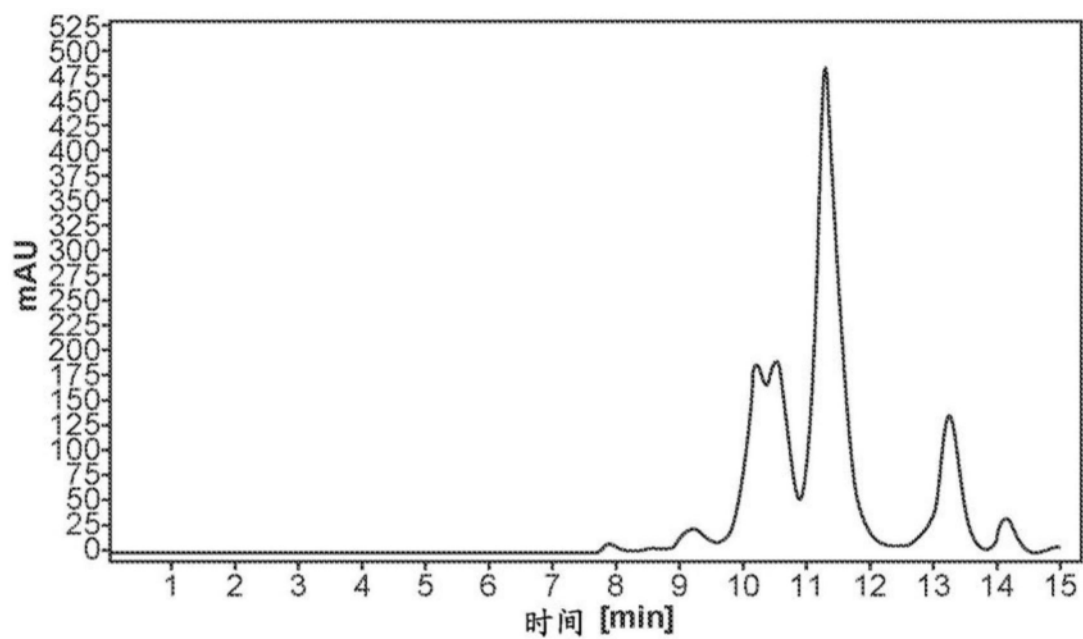


图31B

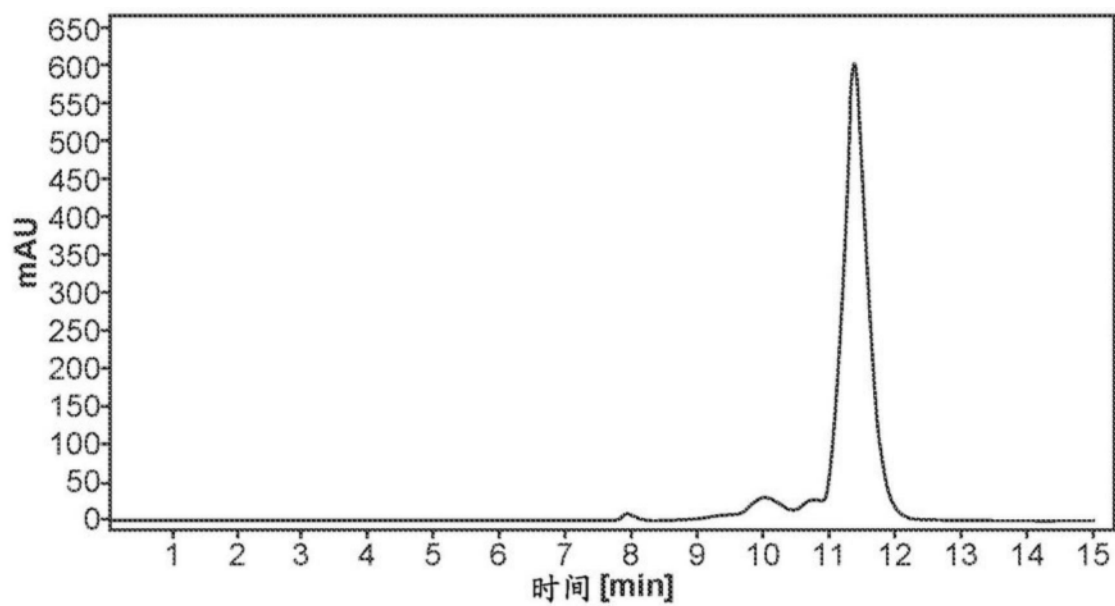


图31C

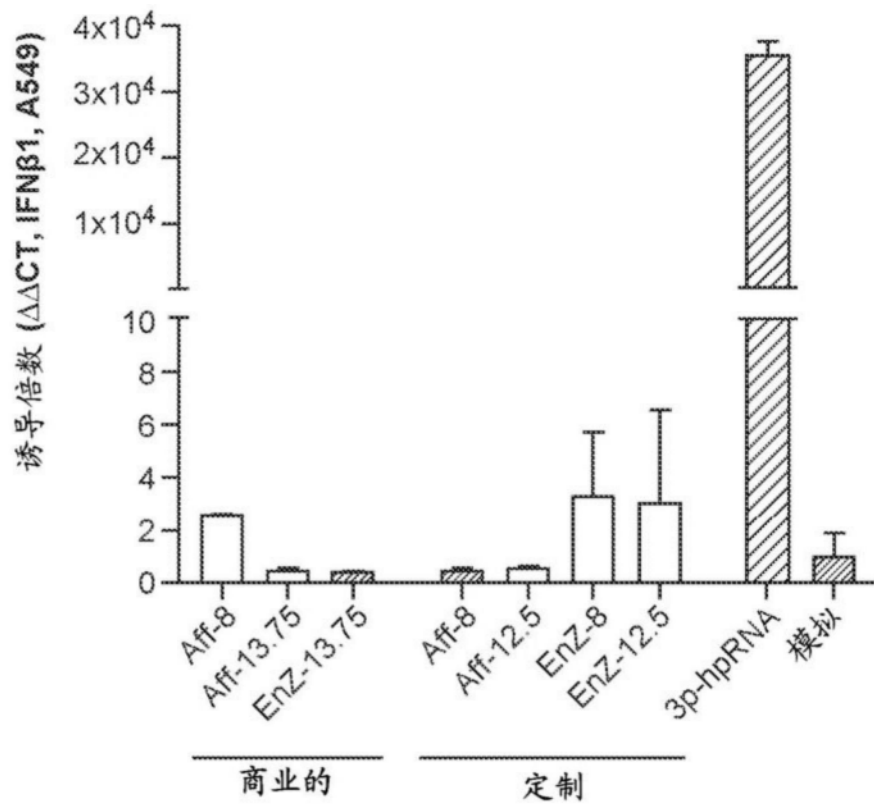


图31D

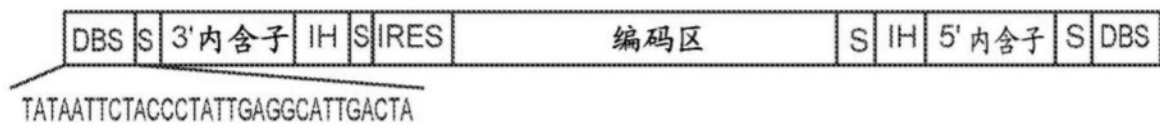


图32A

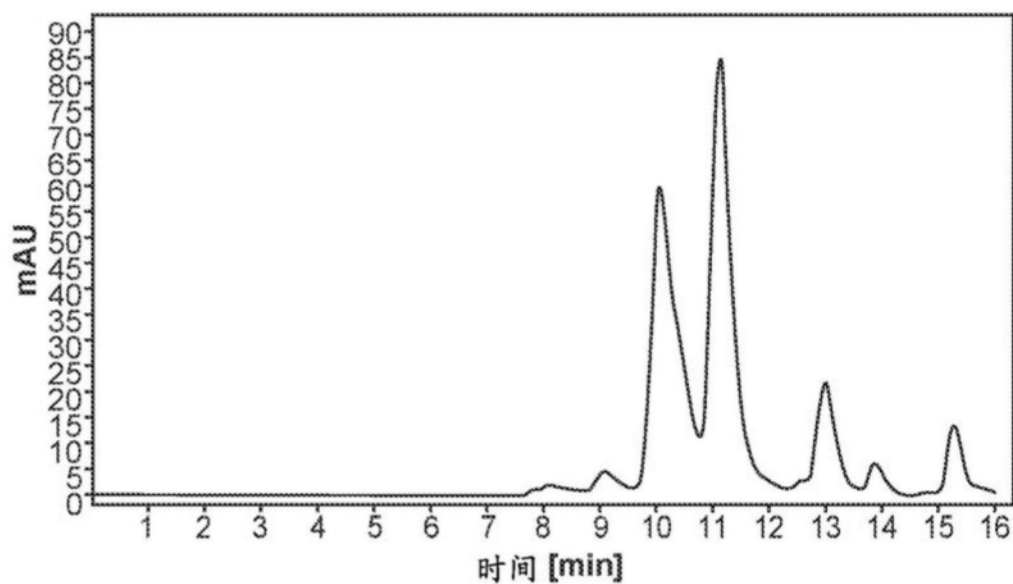


图32B

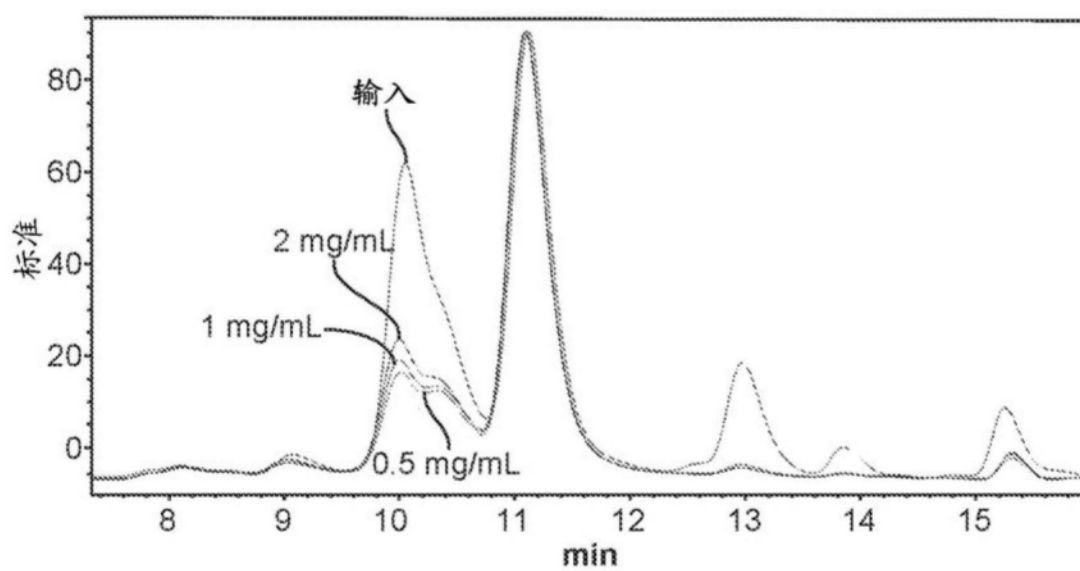


图32C

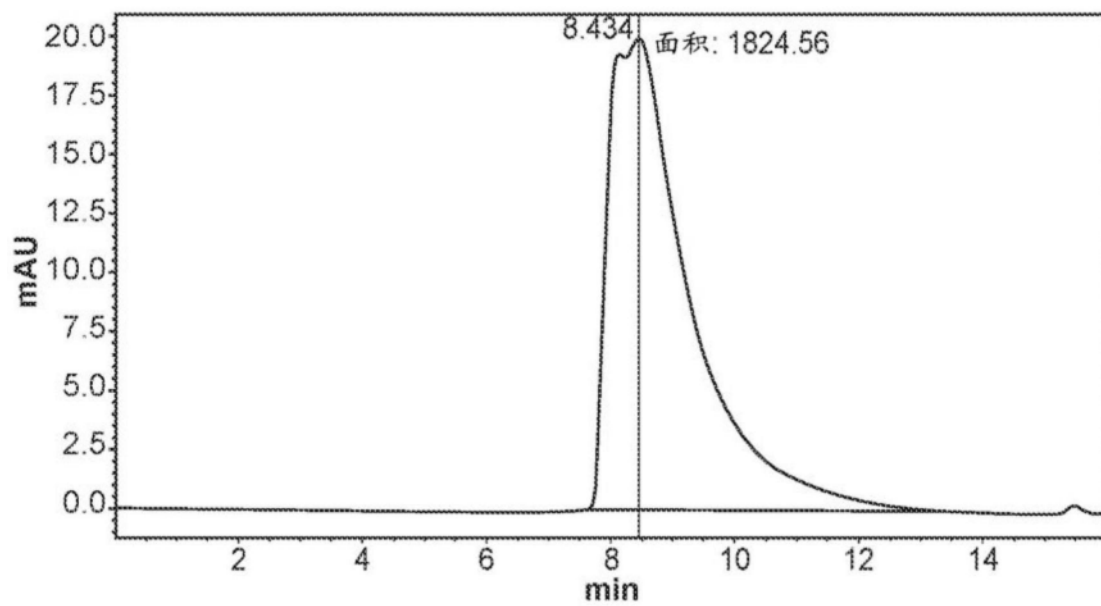


图33A

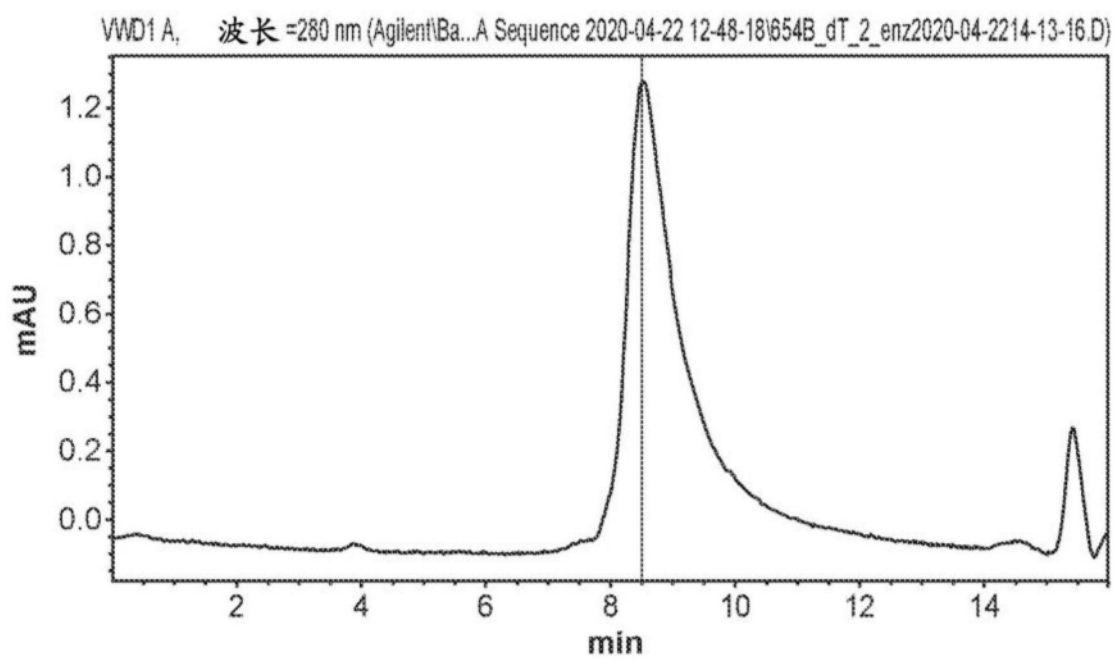


图33B

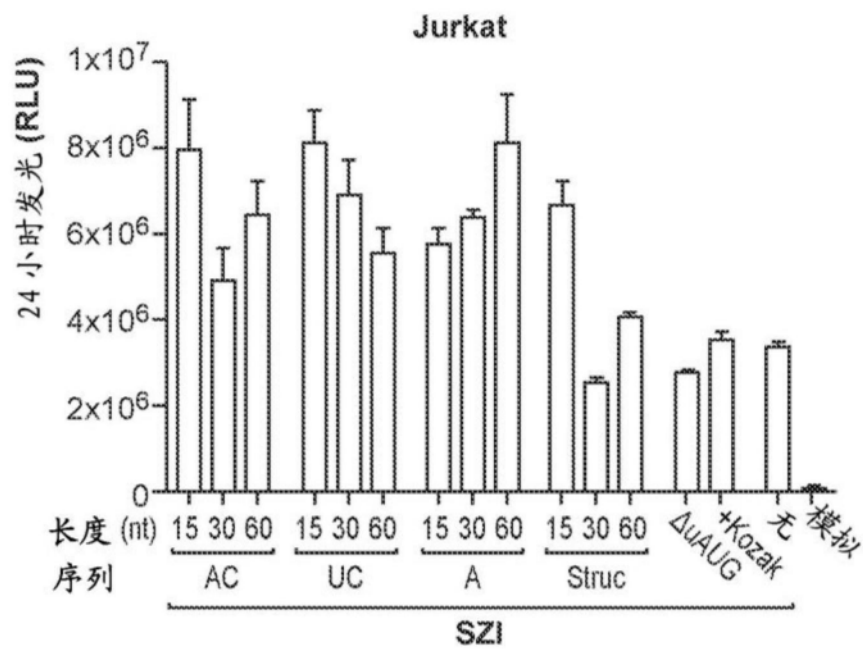


图34A

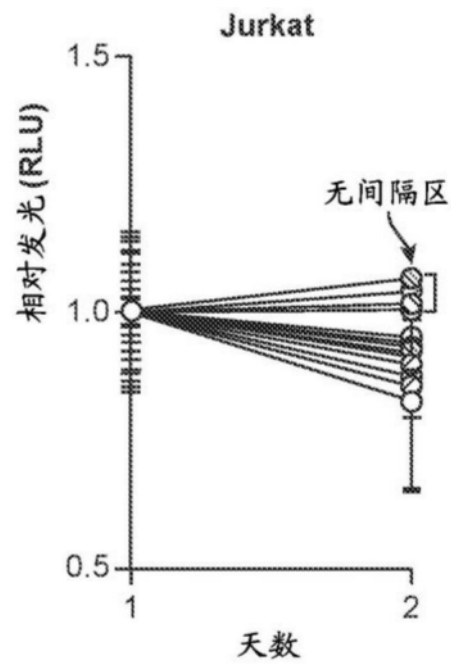


图34B

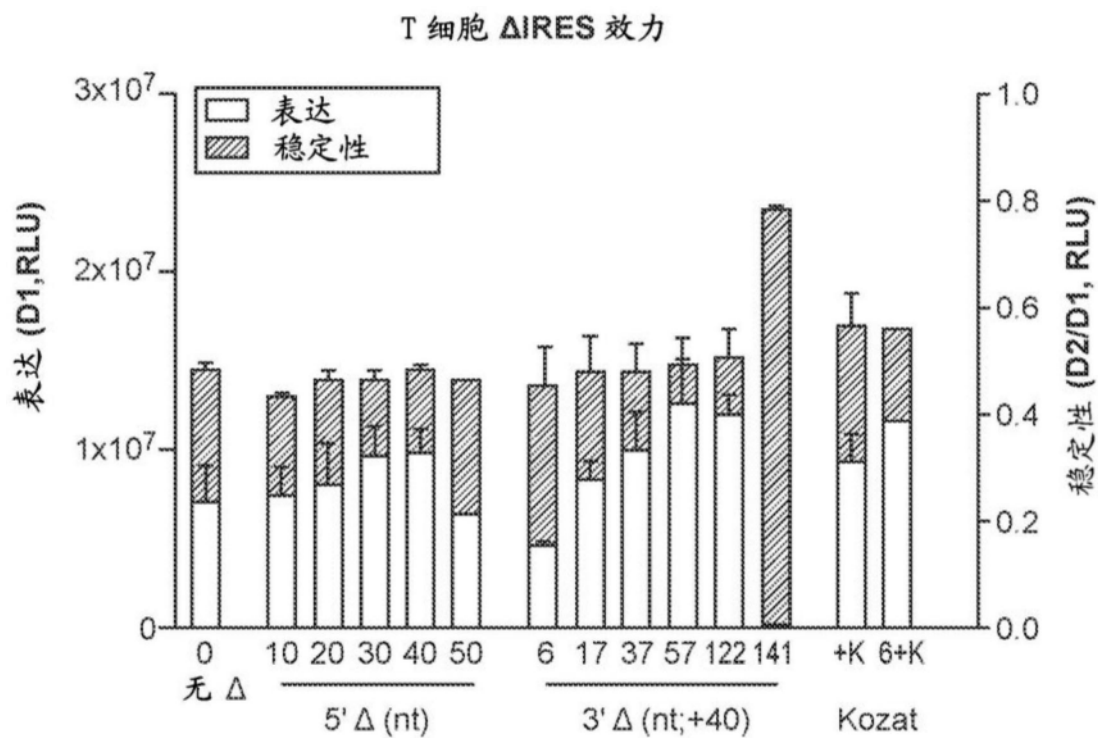


图35

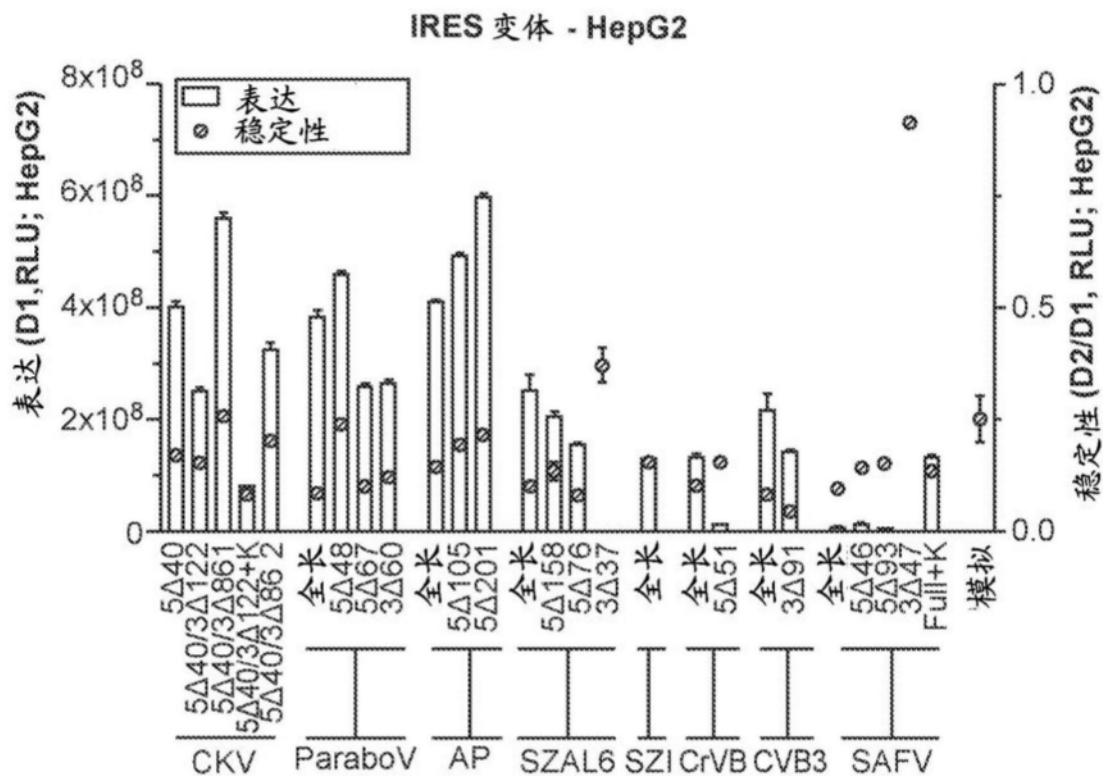


图36

在 1C1C7 中的 oRNA 表达

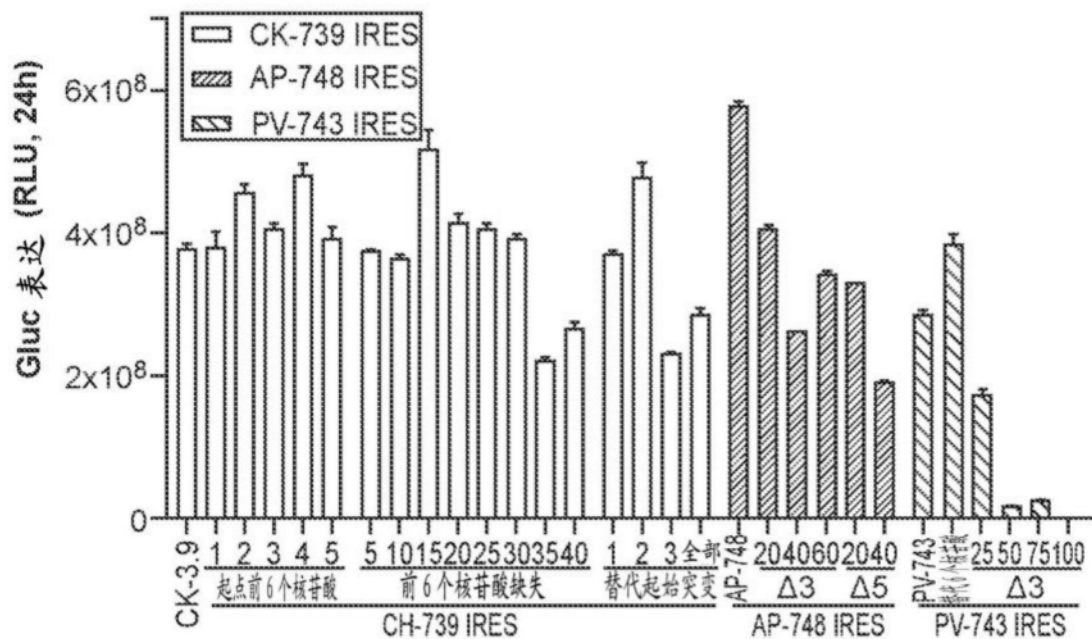


图37

IRES 变体

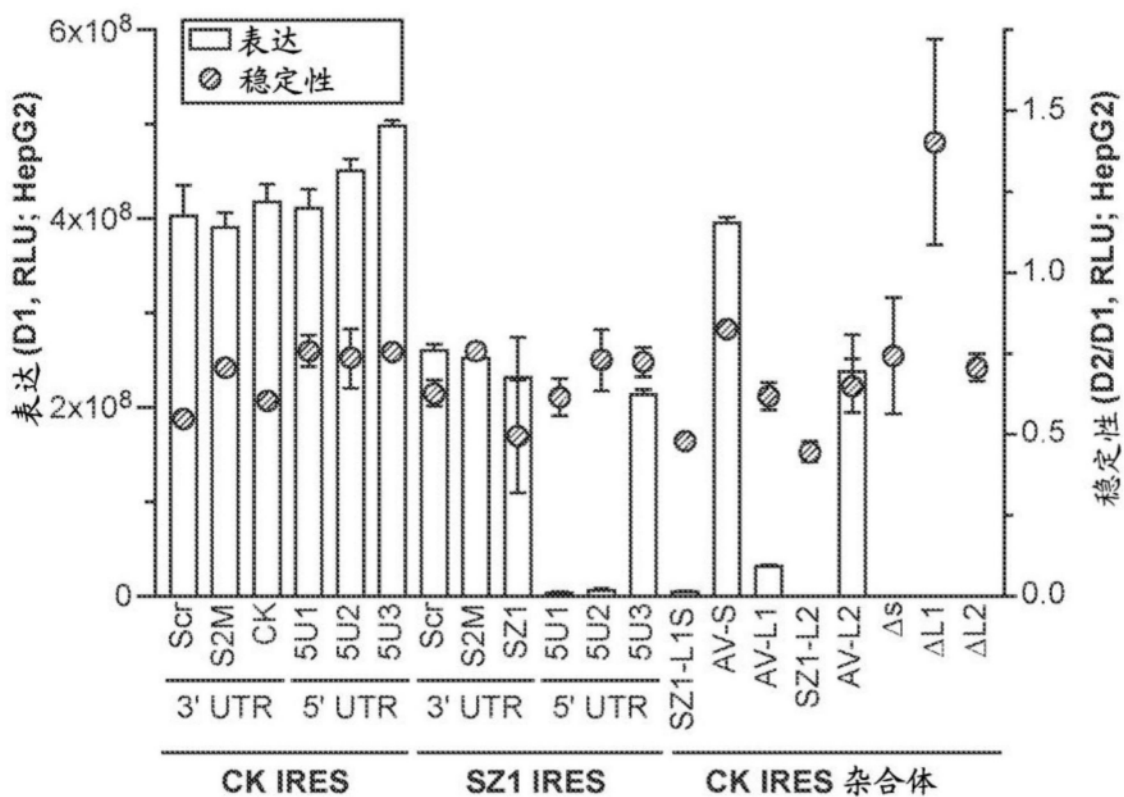


图38

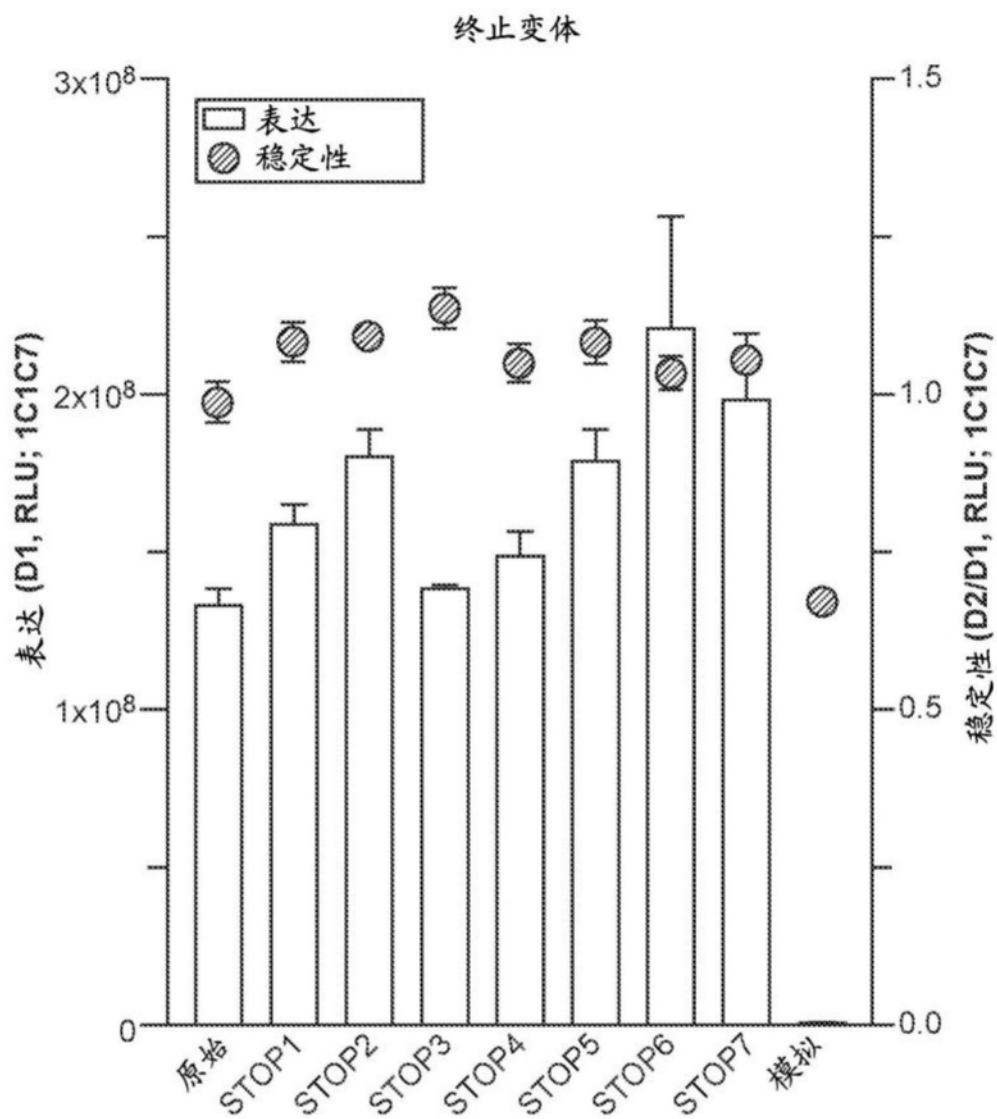


图39

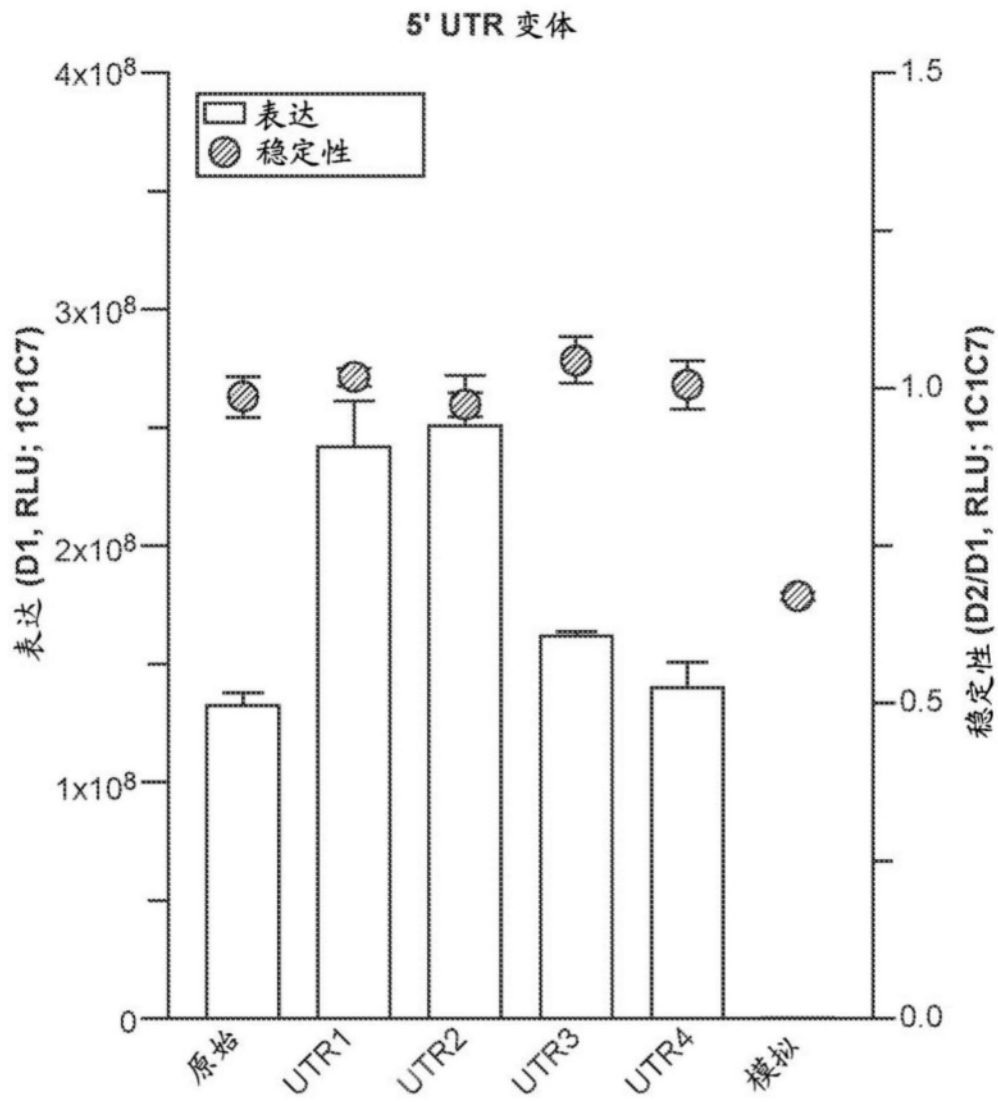


图40

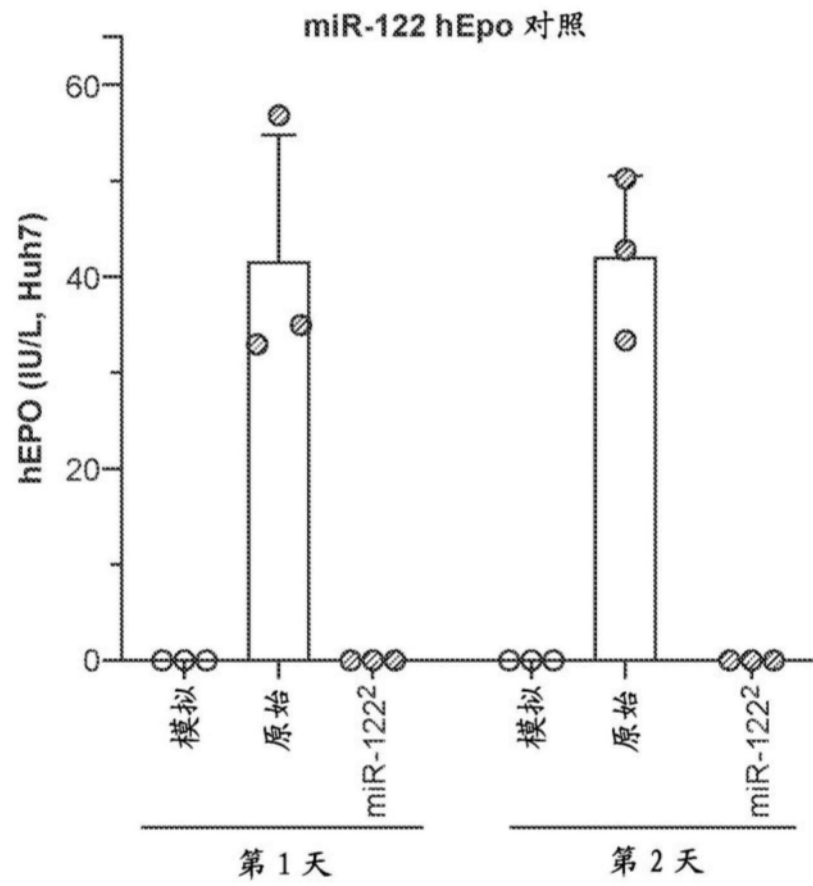


图41

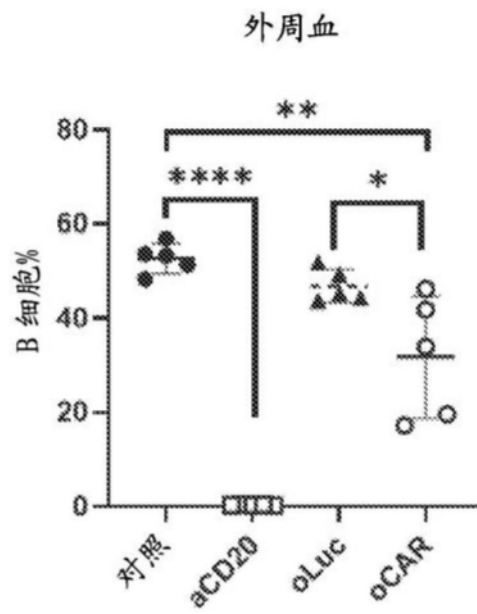


图42A

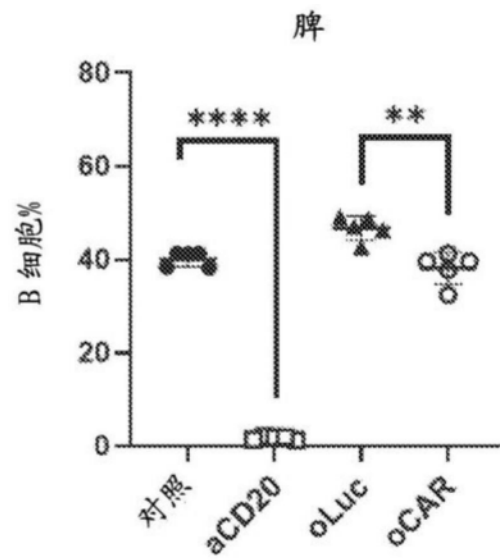


图42B

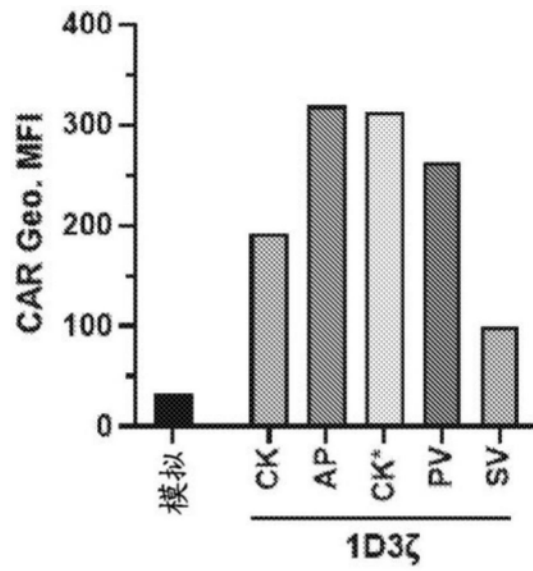


图43A

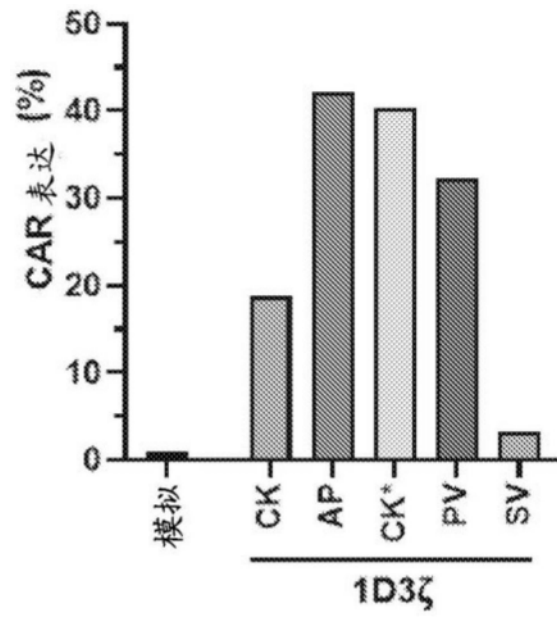


图43B

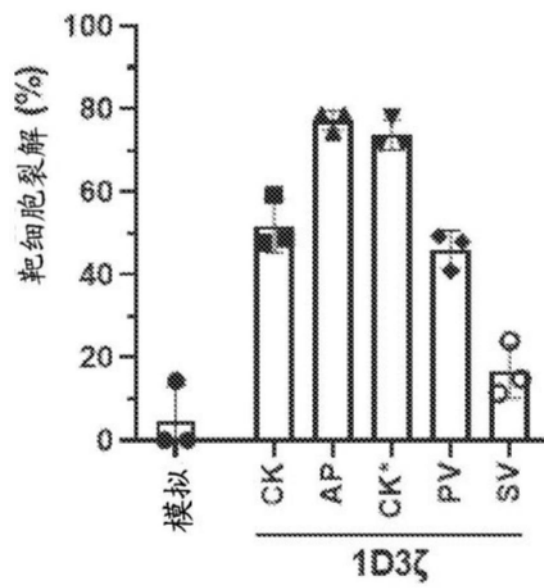


图43C

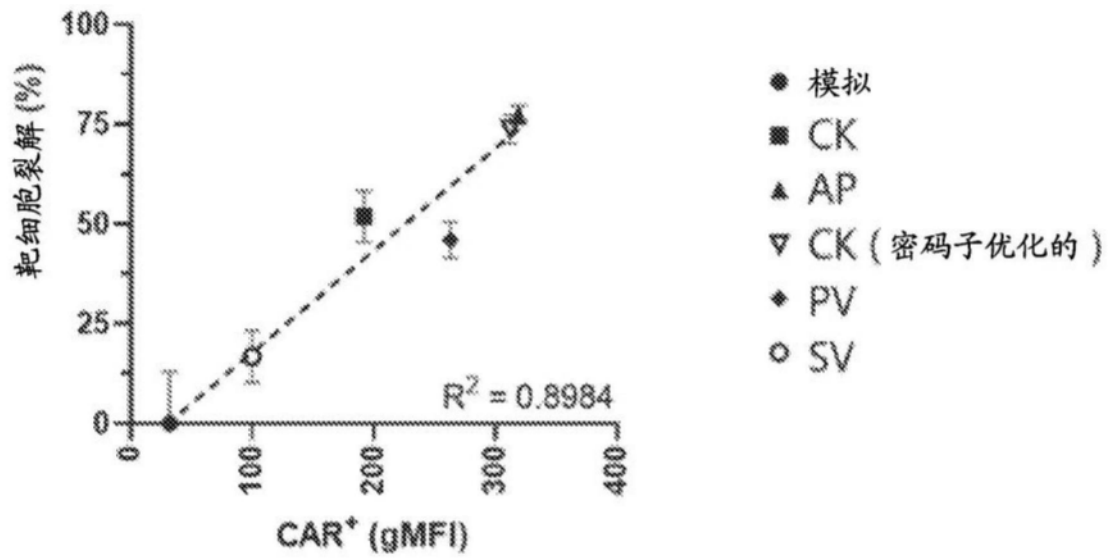


图44

荧光报告物

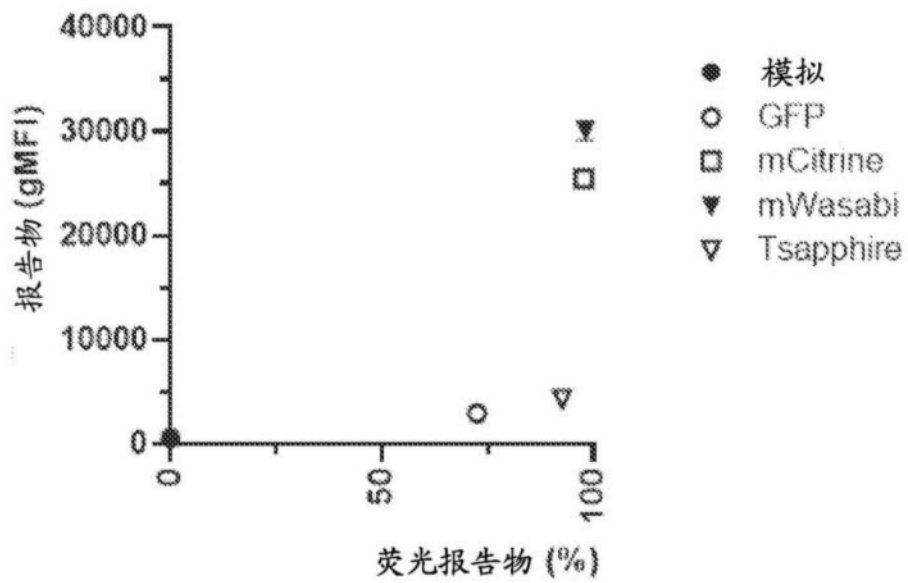


图45A

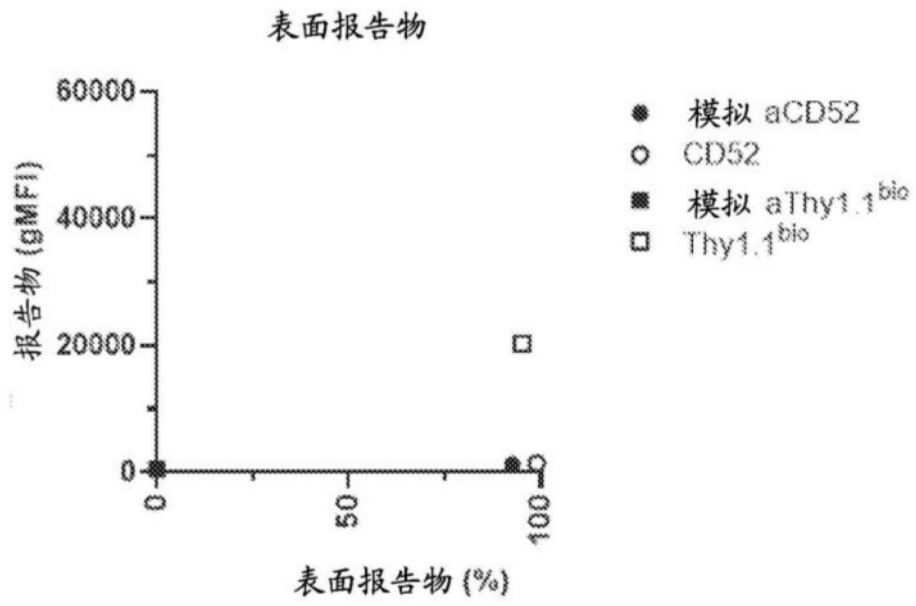


图45B

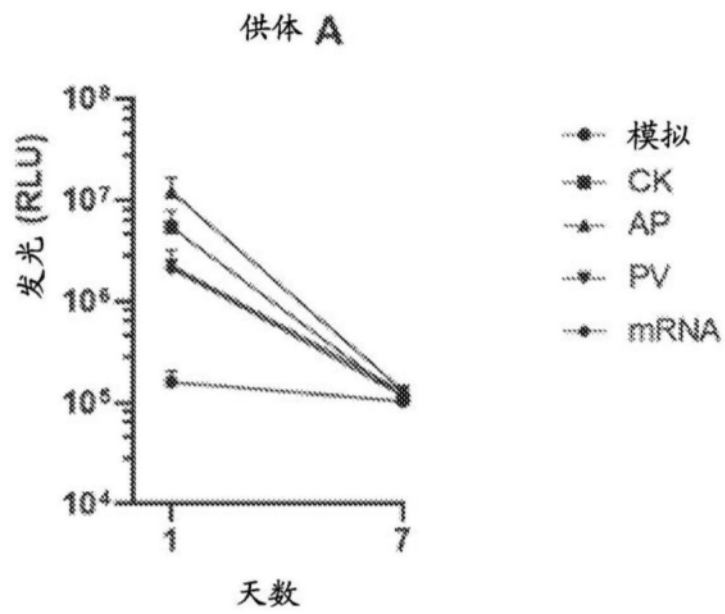


图46A

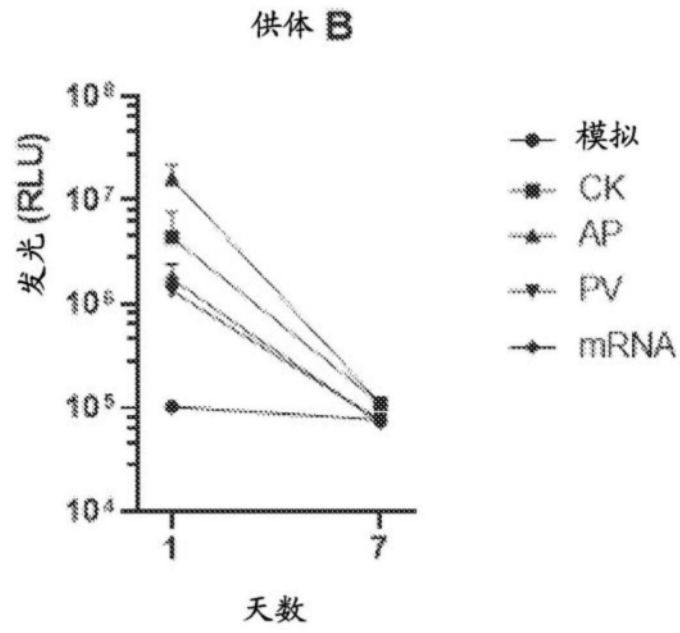


图46B

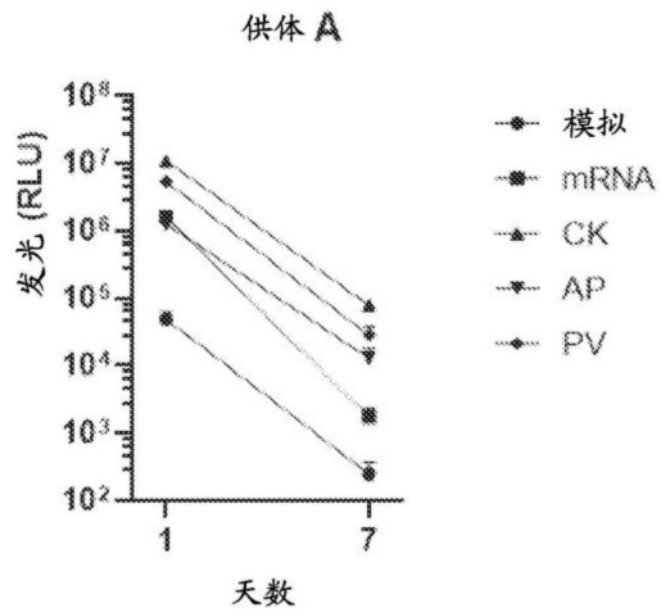


图46C

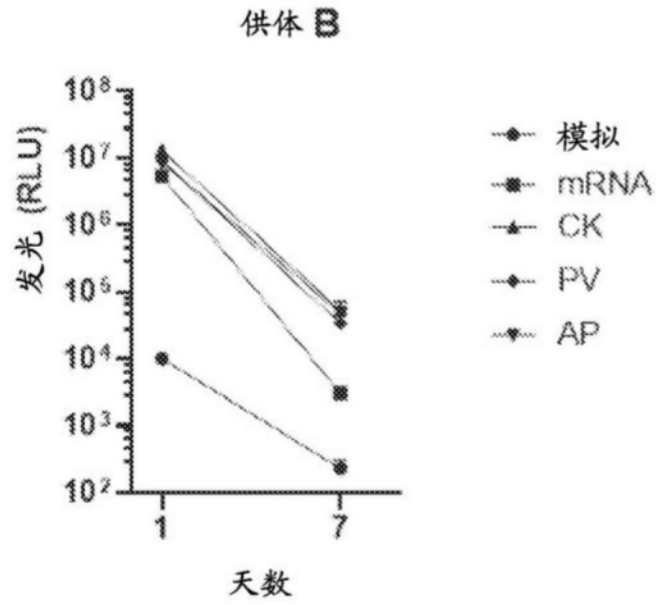


图46D

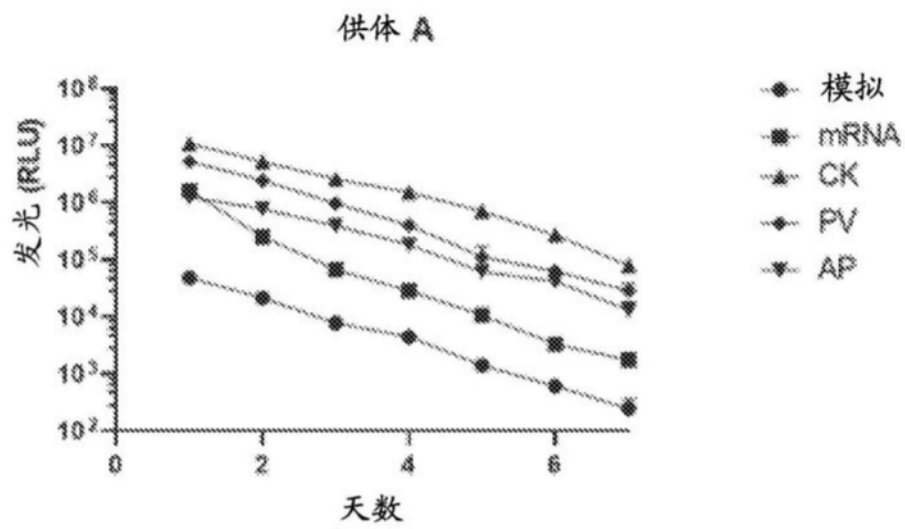


图46E

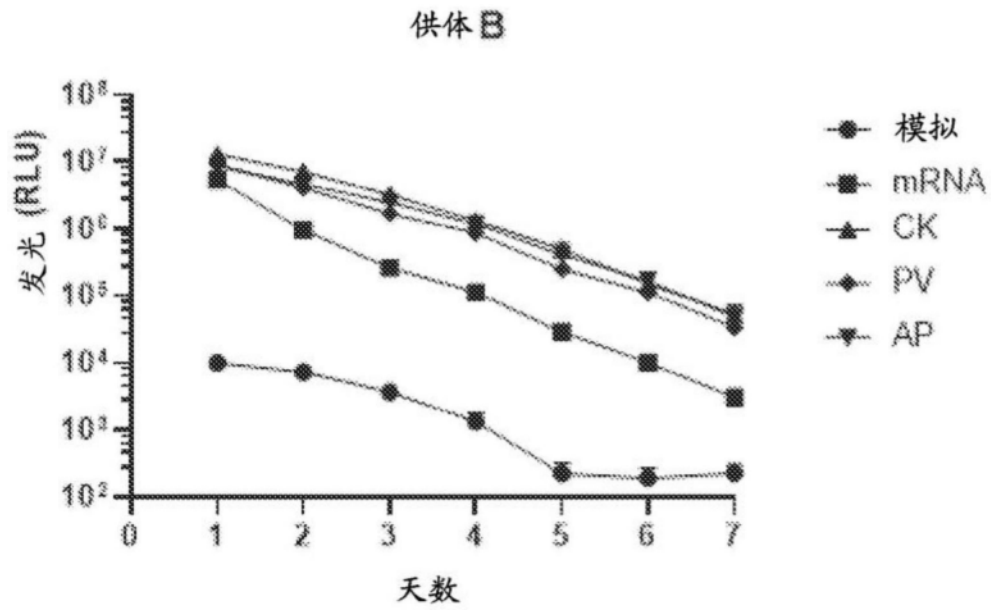


FIG. 46F

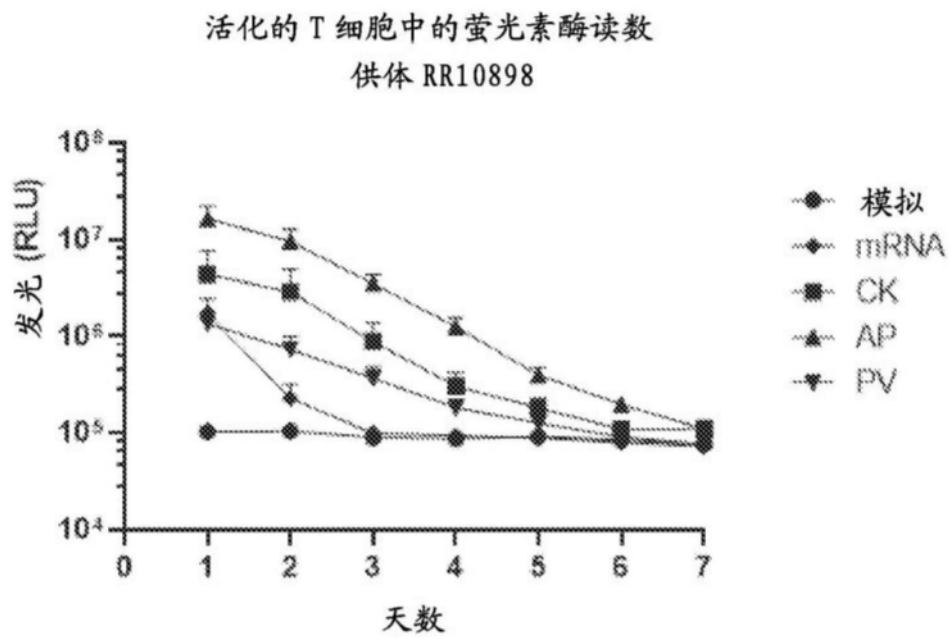


图46G

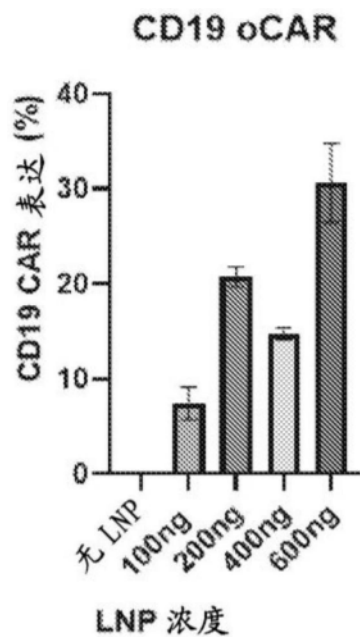


图47A

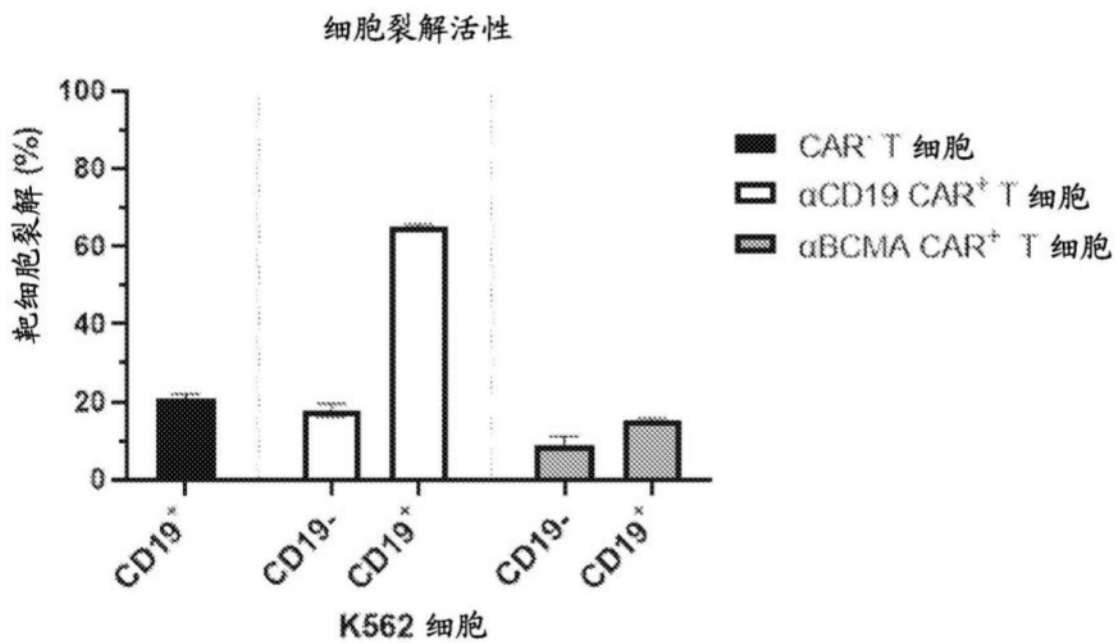


图47B

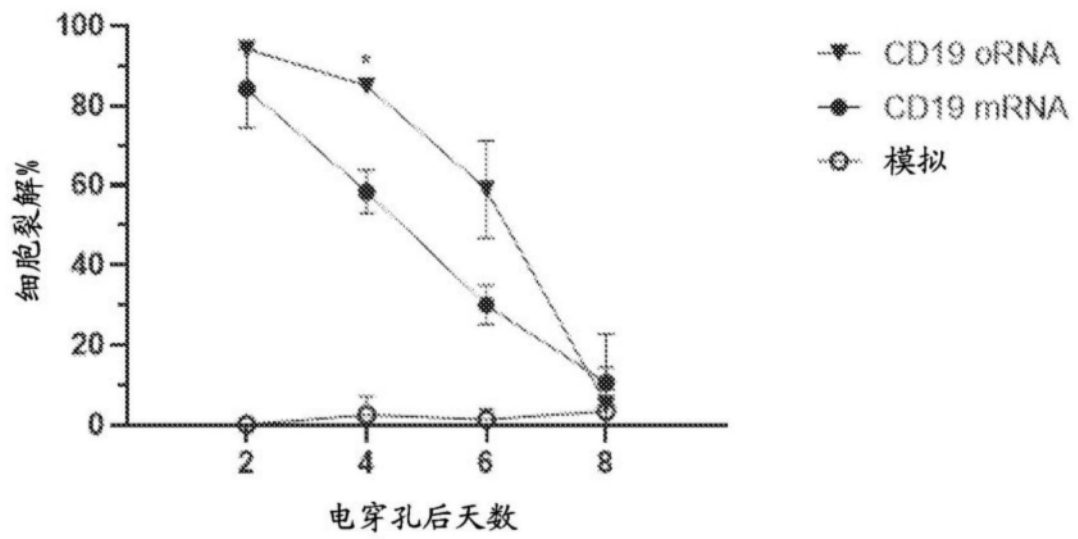
使用 α CD19 CAR 的 Na1m6 裂解

图48A

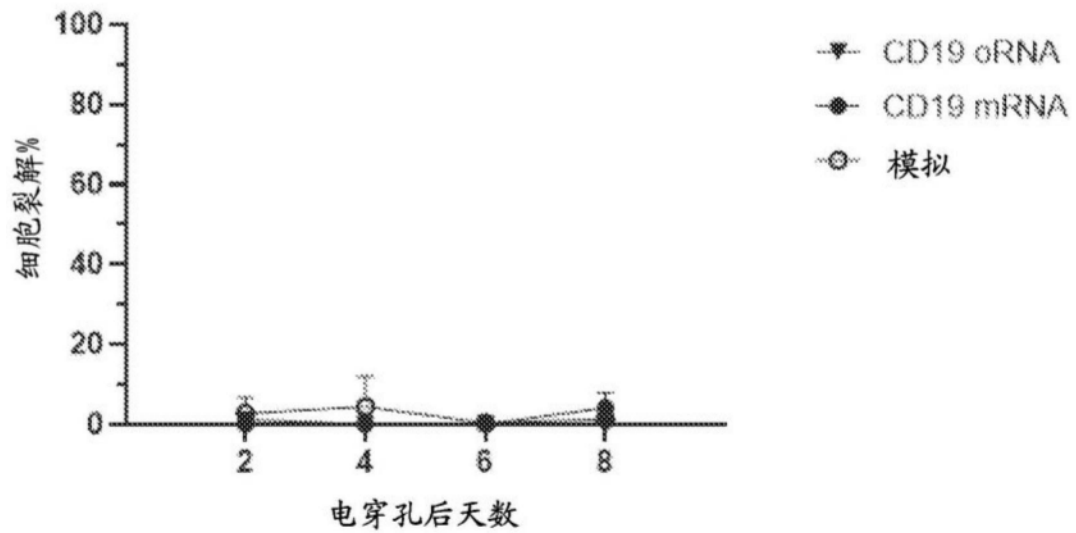
使用 α CD19 CAR 的 K562 裂解

图48B

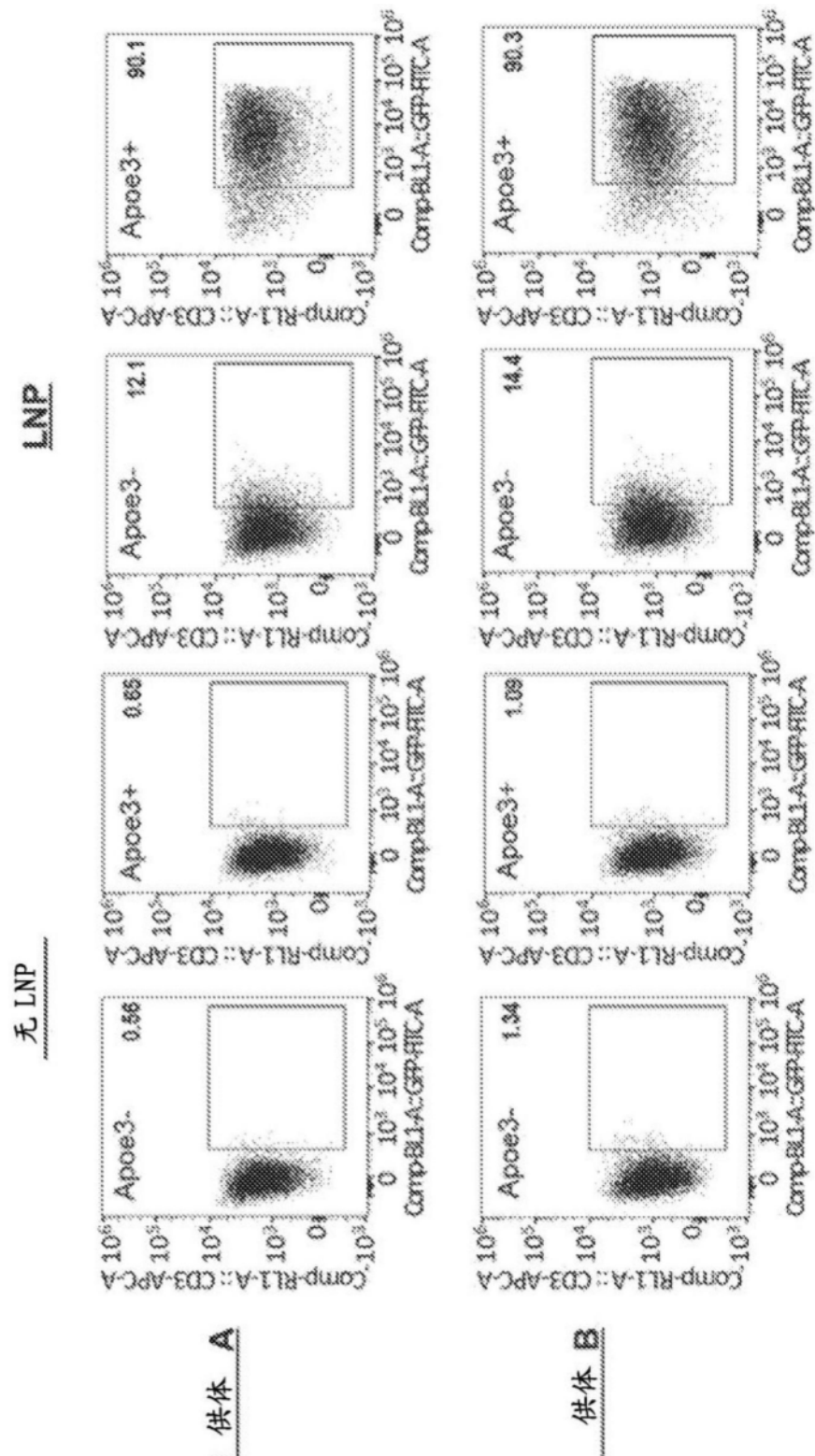


图49A

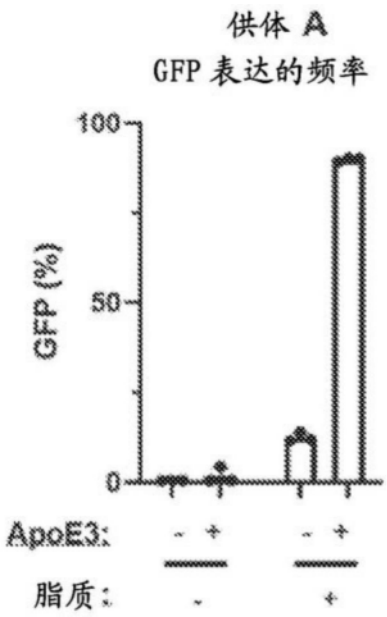


图49B

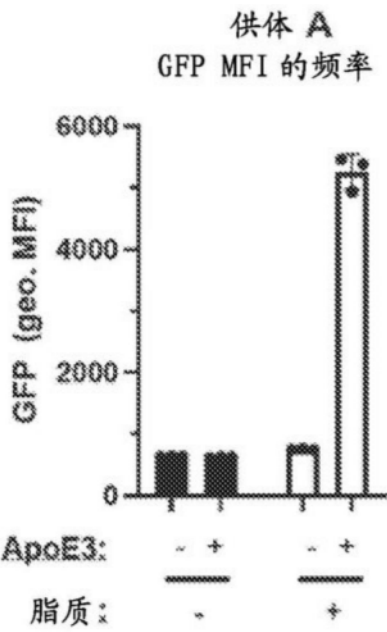


图49C

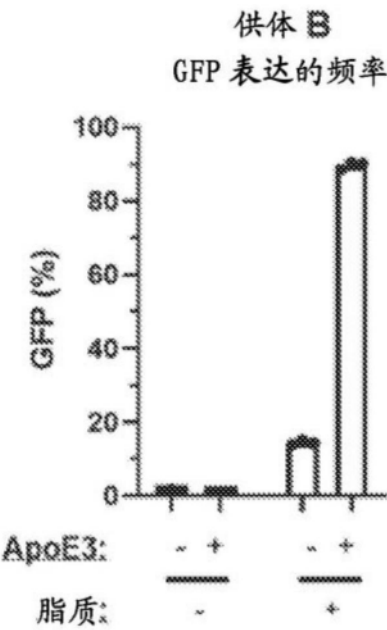


图49D

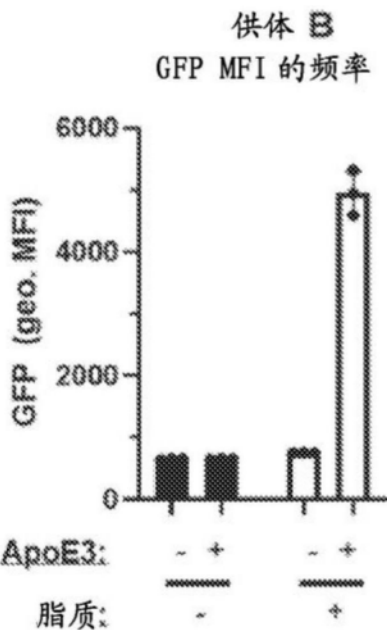


图49E

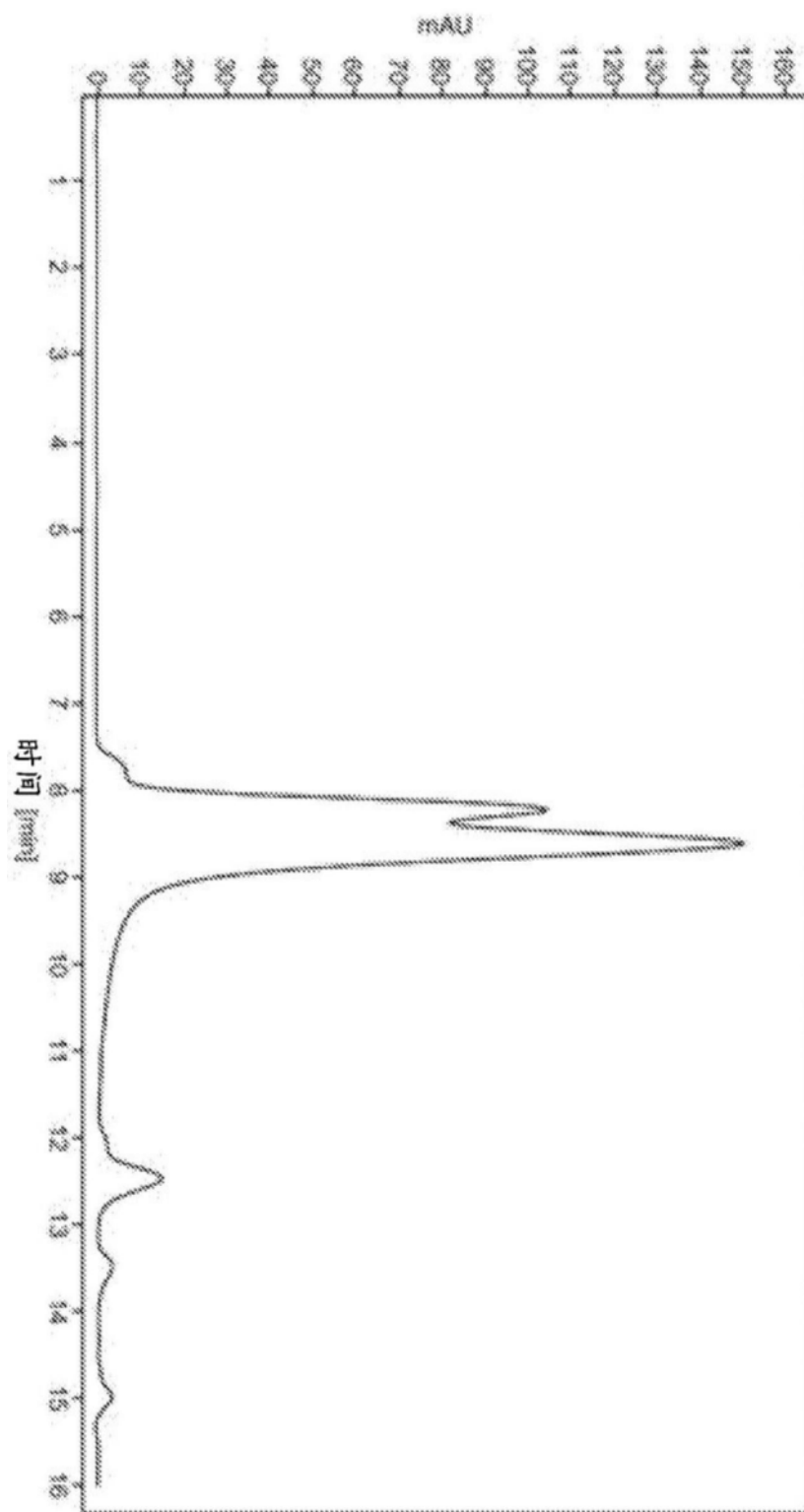


图50A

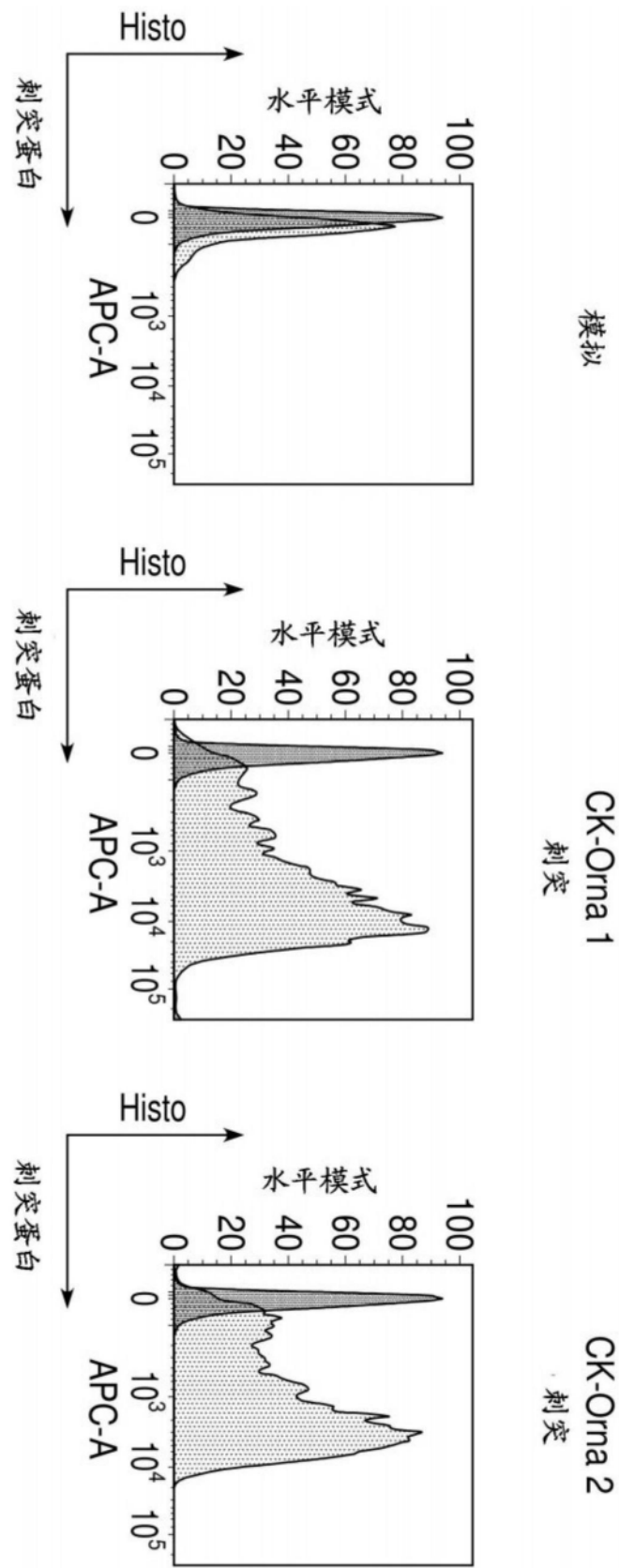


图50B

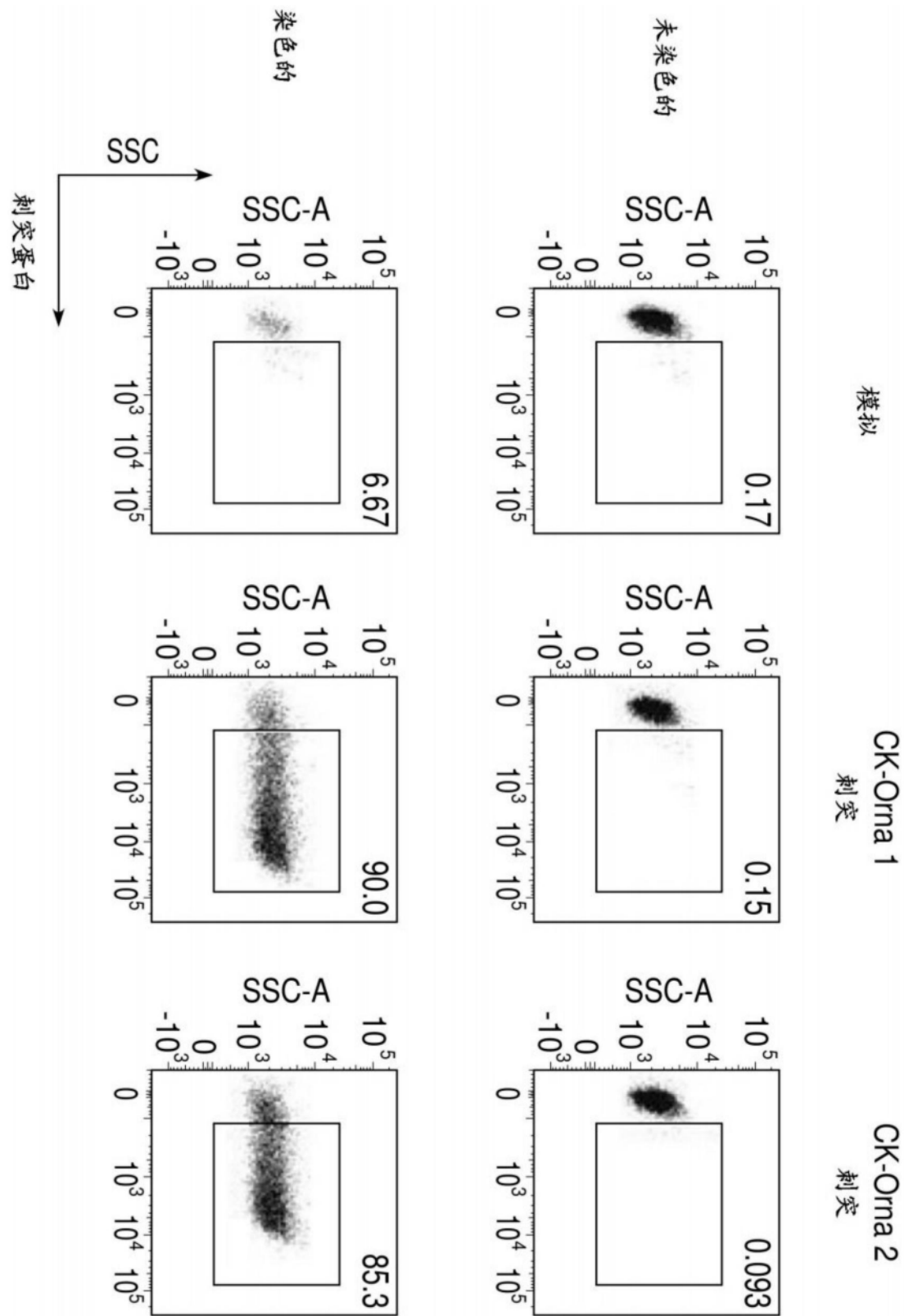


图50C

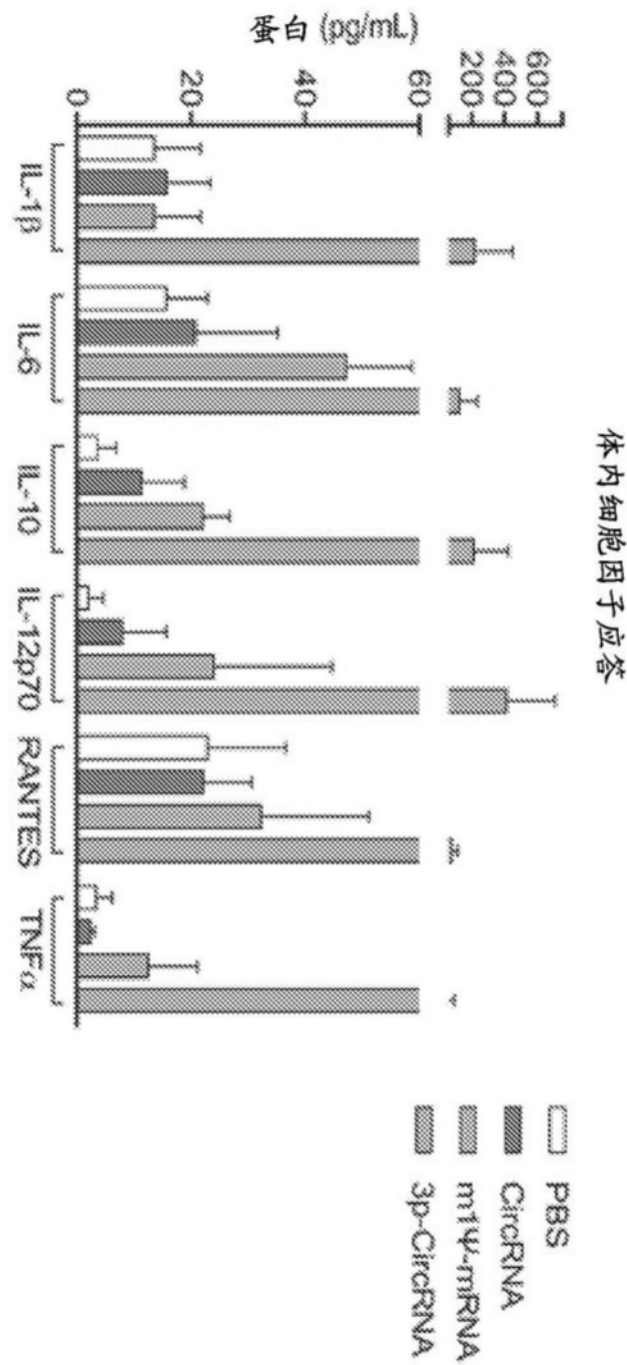


图51

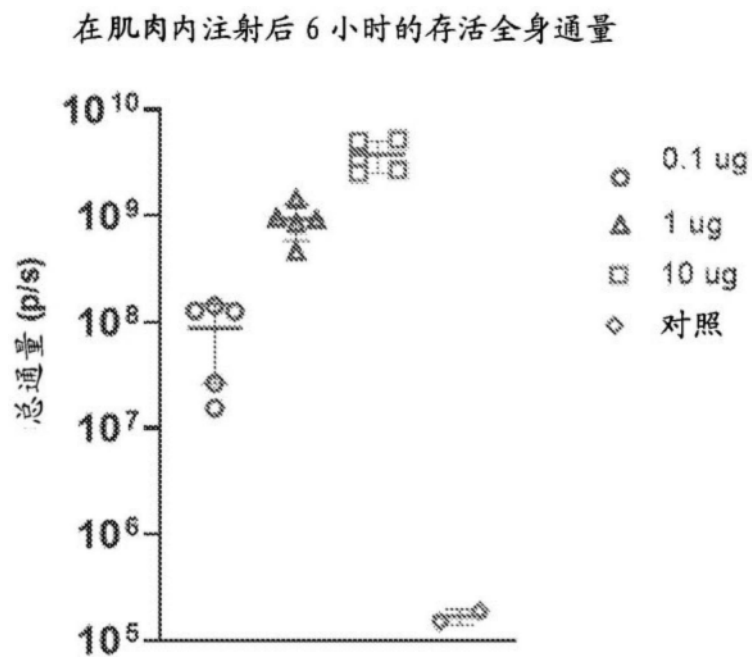


图52A

全身 IVIS:
在 6 小时肌肉内 1 ug 剂量

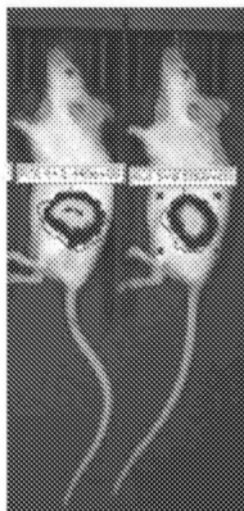


图52B

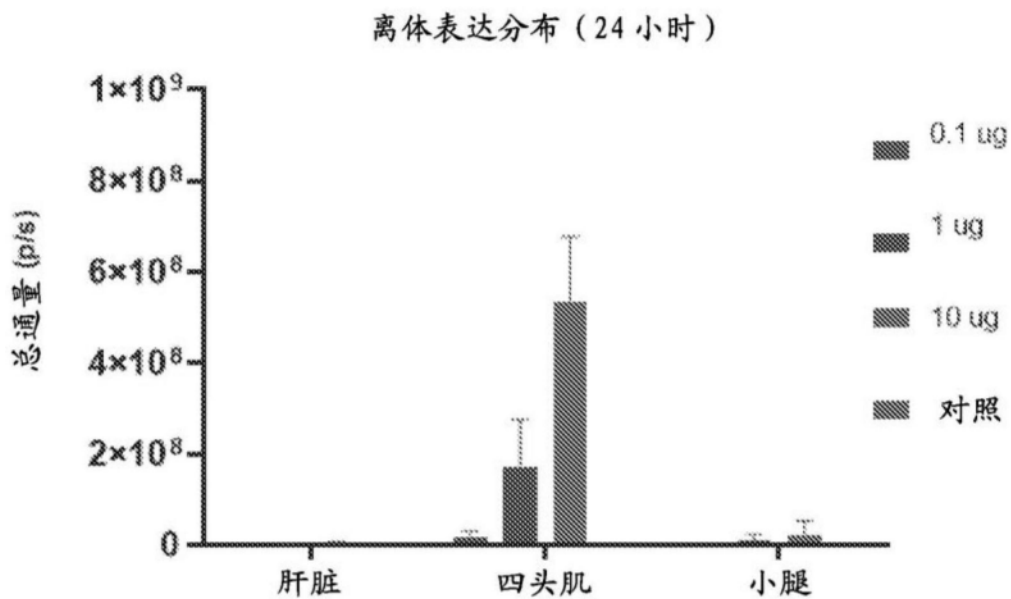


图52C

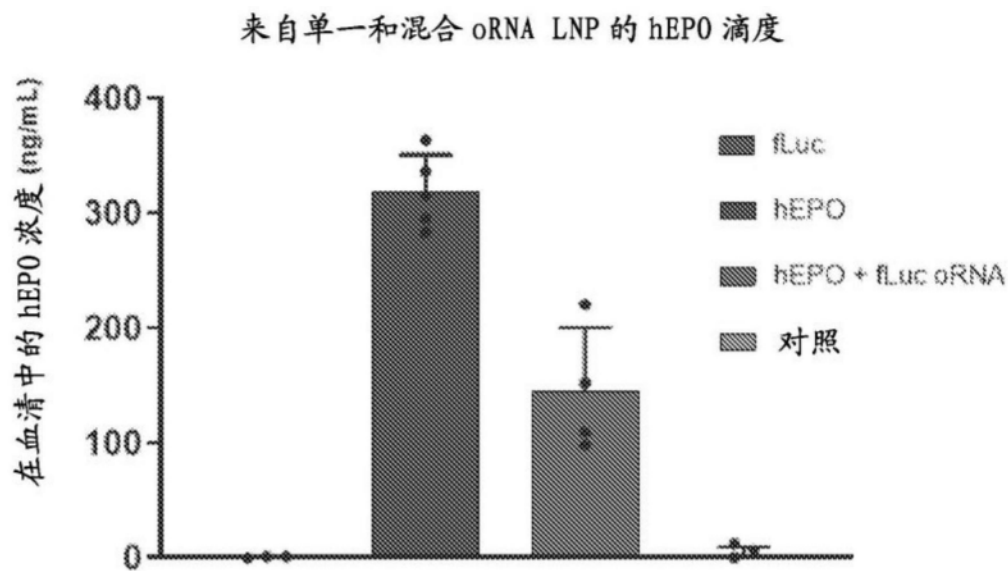


图53A

来自单一和混合 oRNA LNP 的生物发光

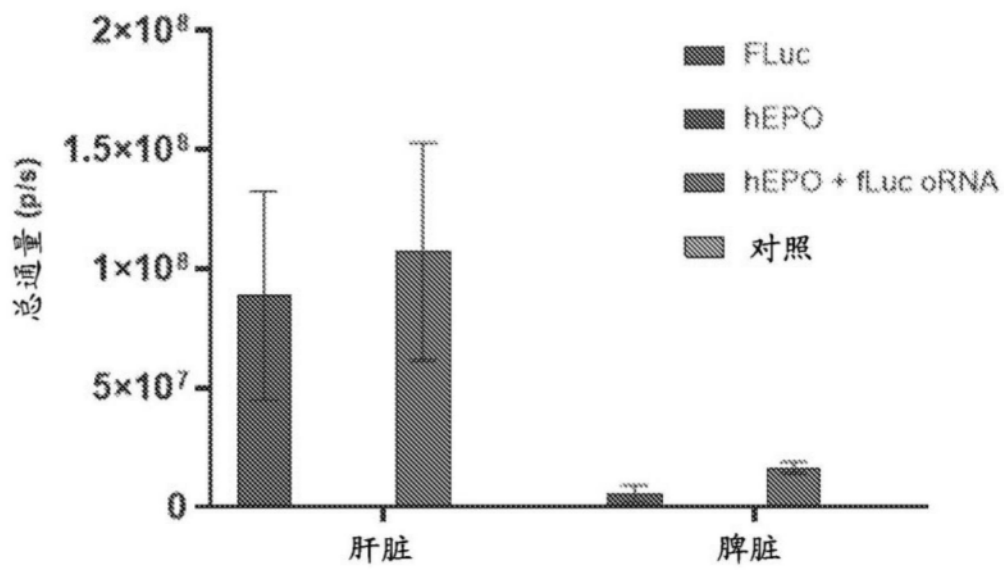


图53B

刺突 Covid 2 表达的频率

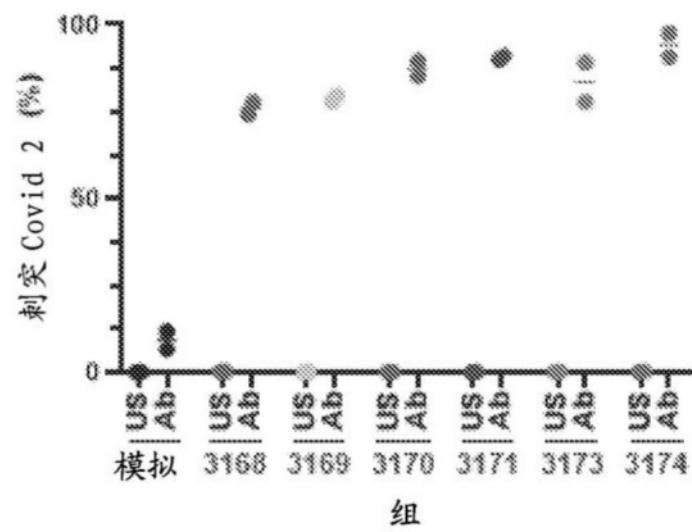


图54A

刺突 Covid 2 表达的 gMFI

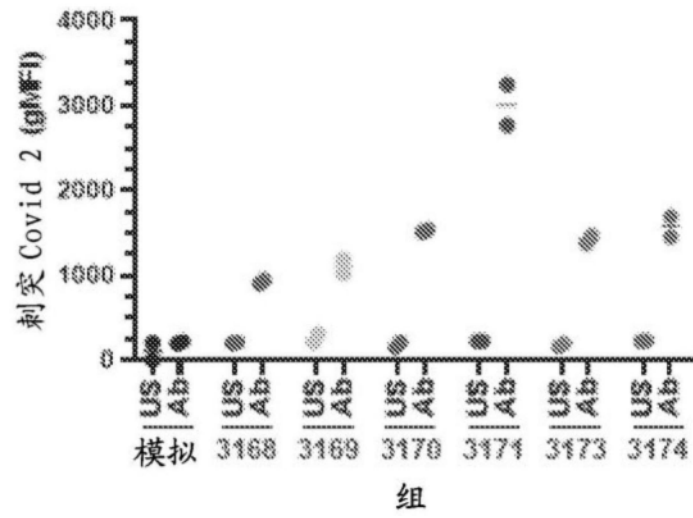


图54B

gMFI 相对于频率

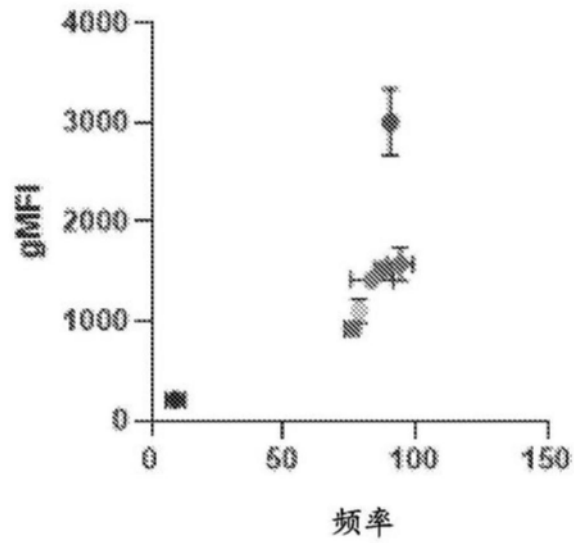


图54C

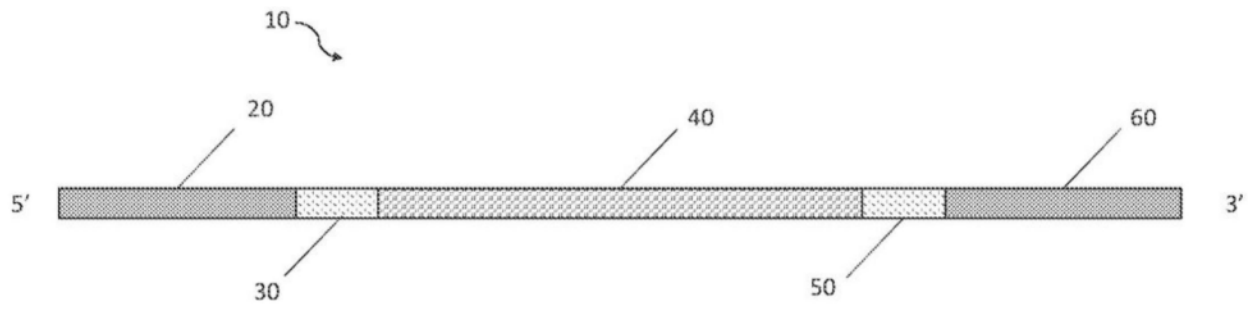


图55

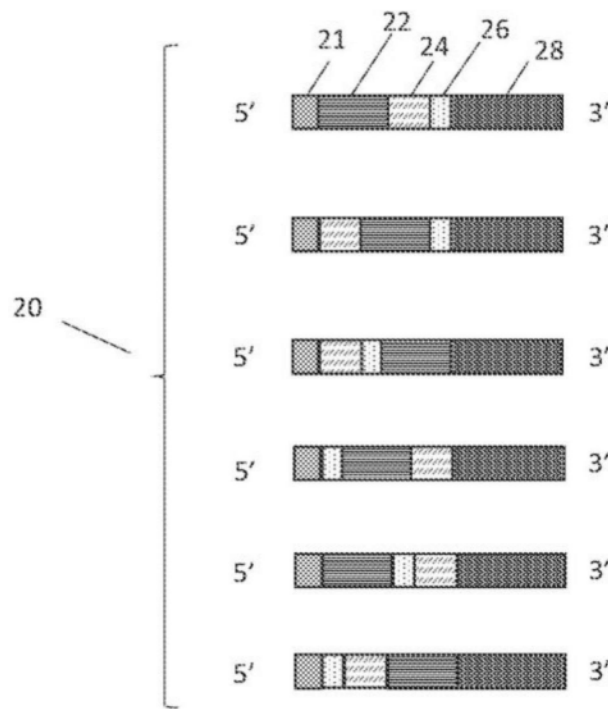


图56

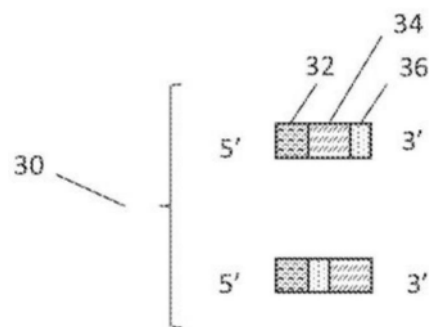


图57

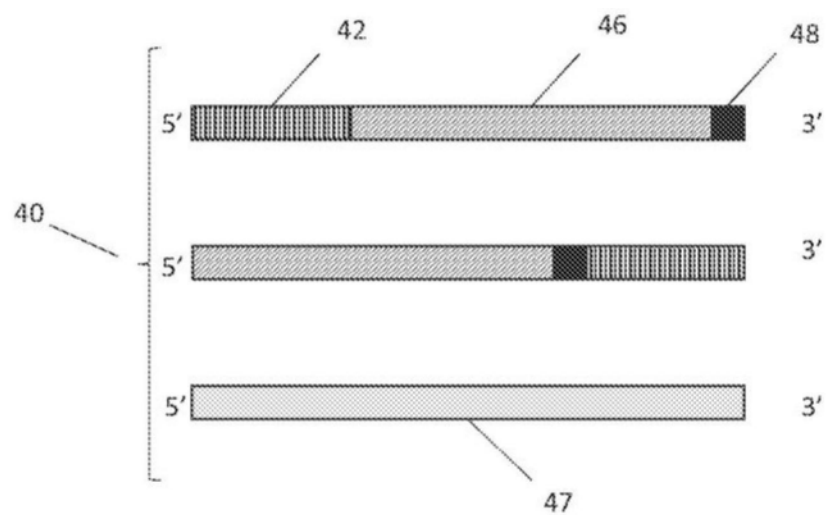


图58

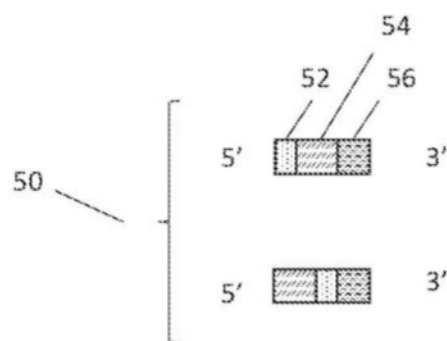


图59

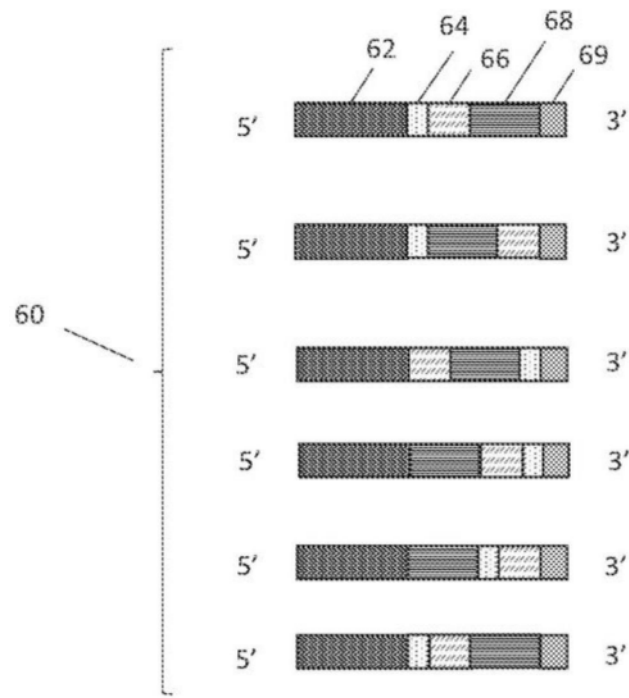


图60

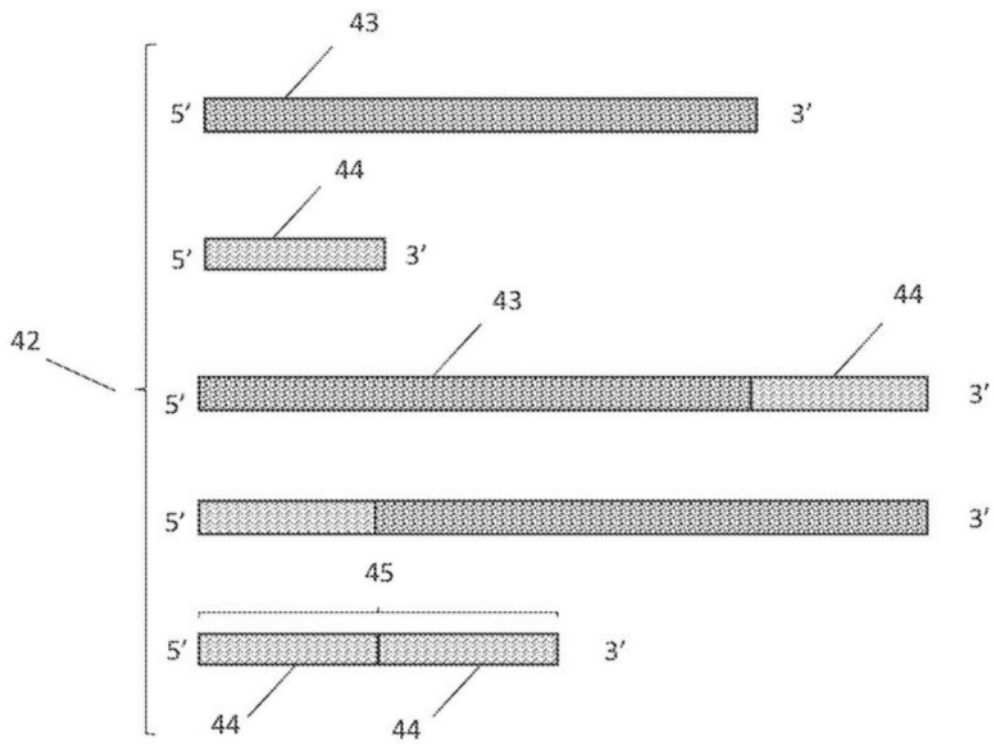


图61

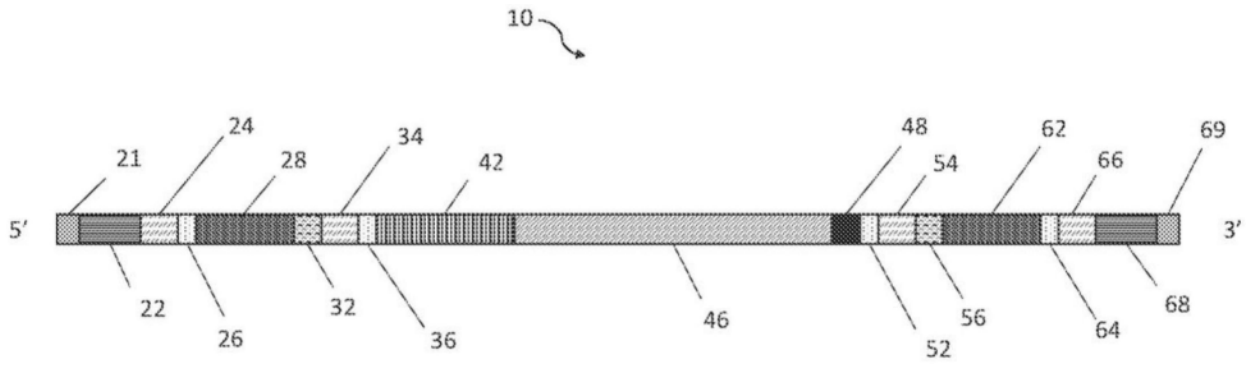


图62

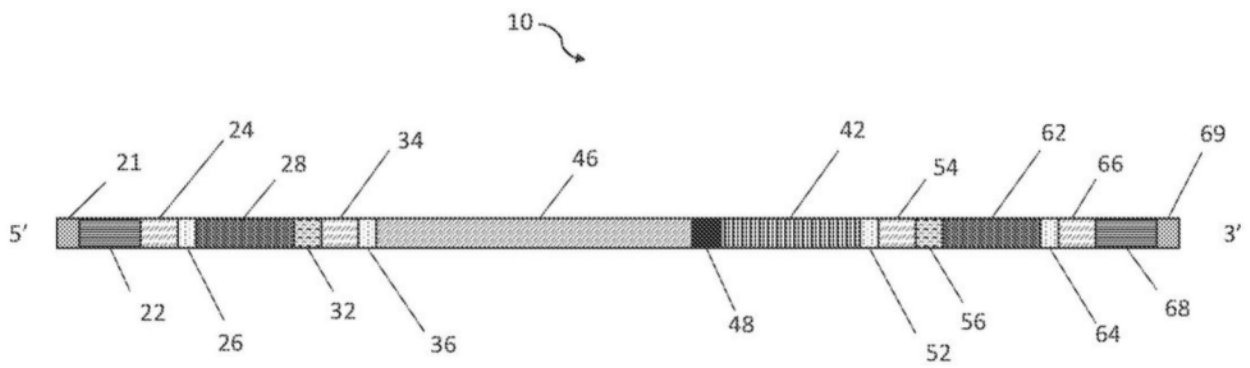


图63

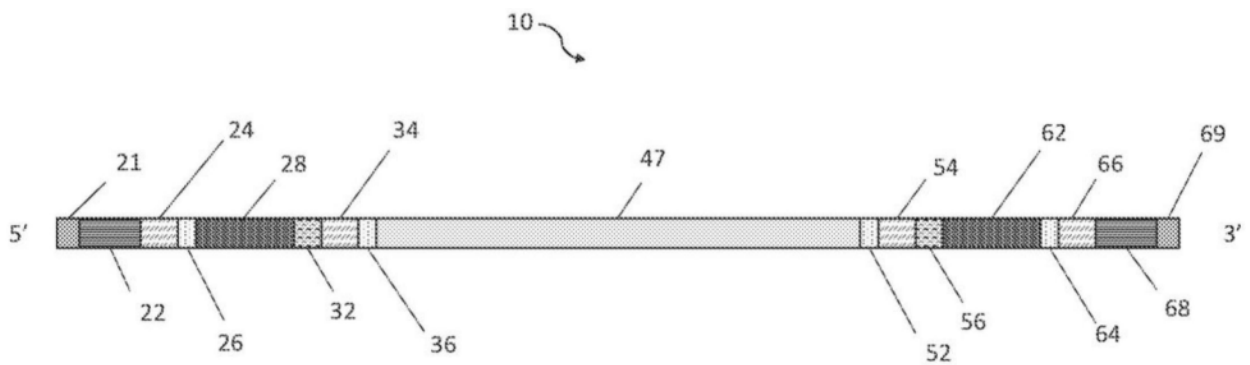


图64

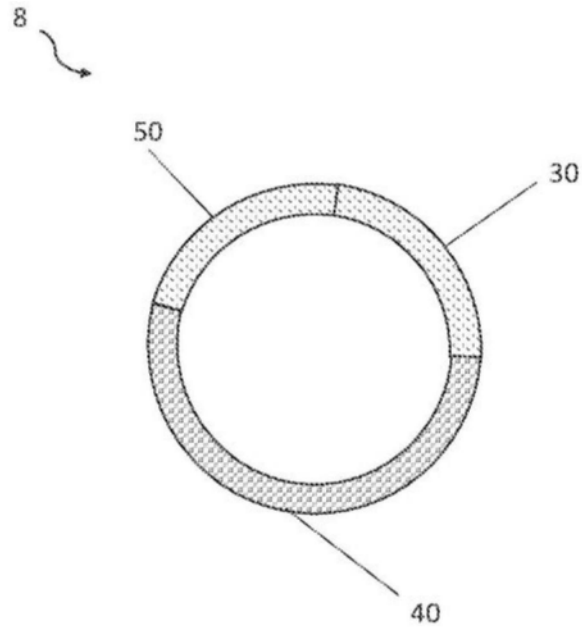


图65

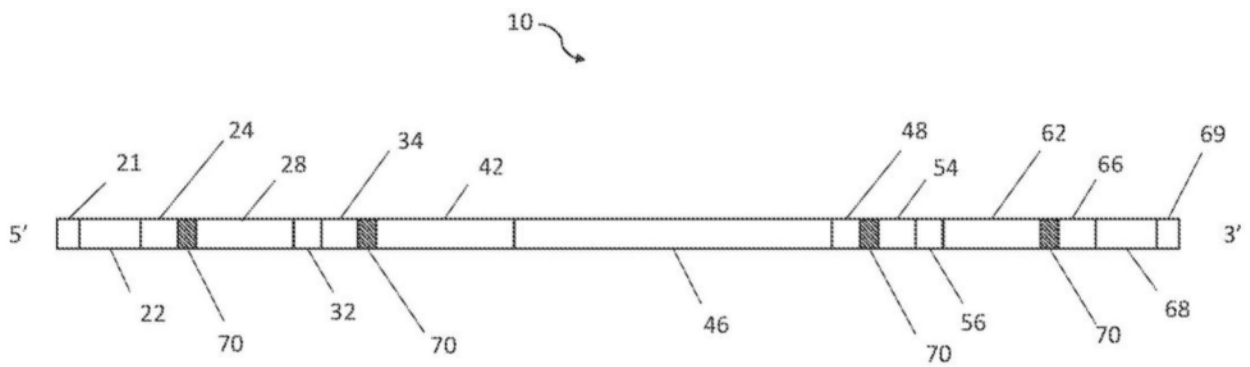


图66A

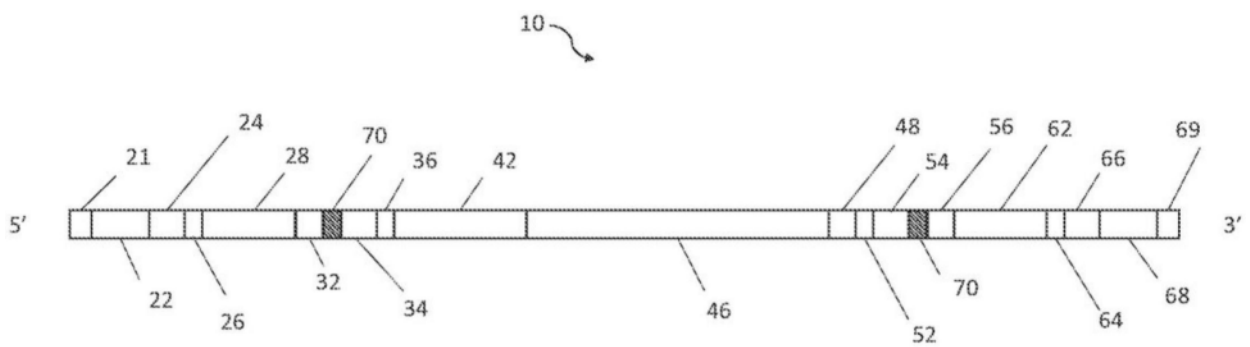


图66B

26, 36, 52, 64

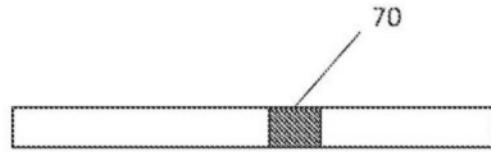


图66C

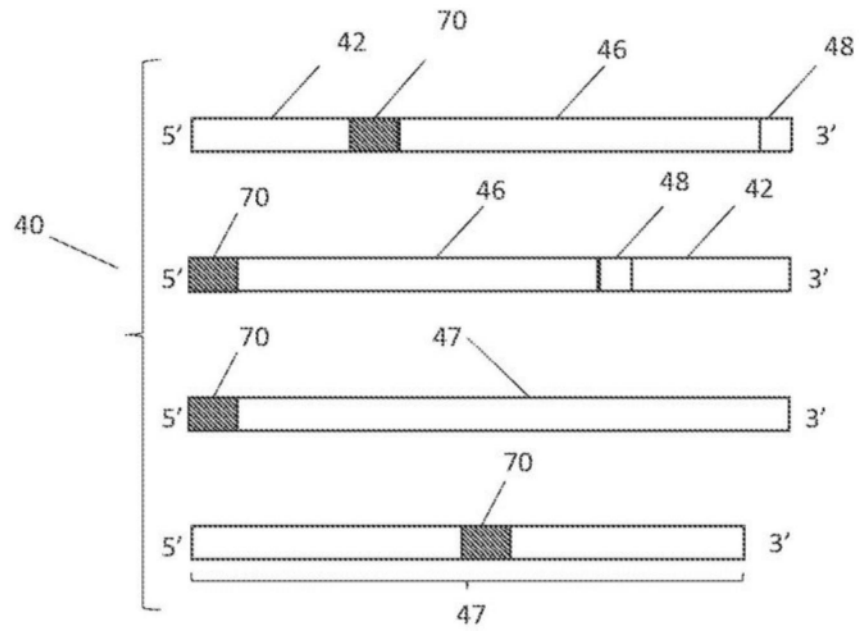
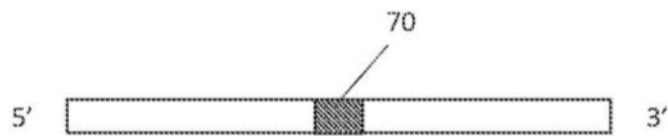


图66D

43



47

图66E

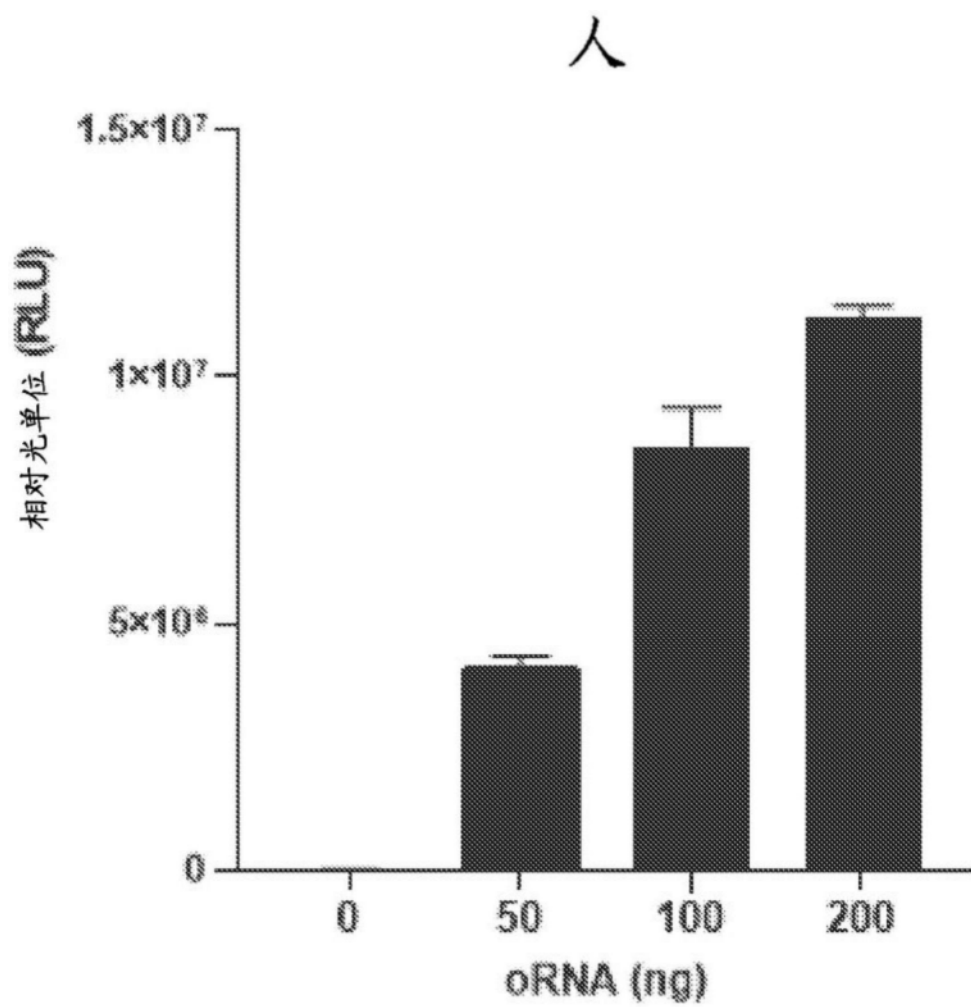


图67A

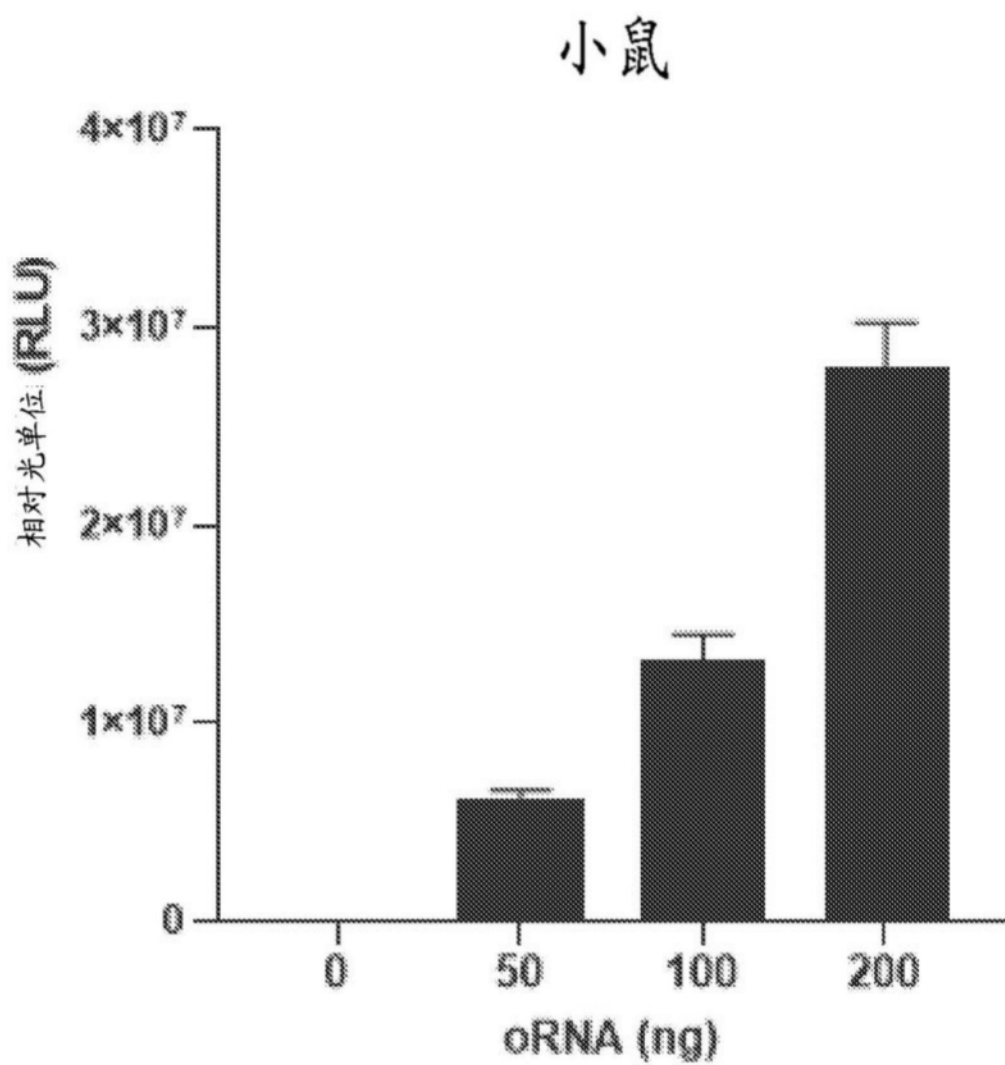


图67B

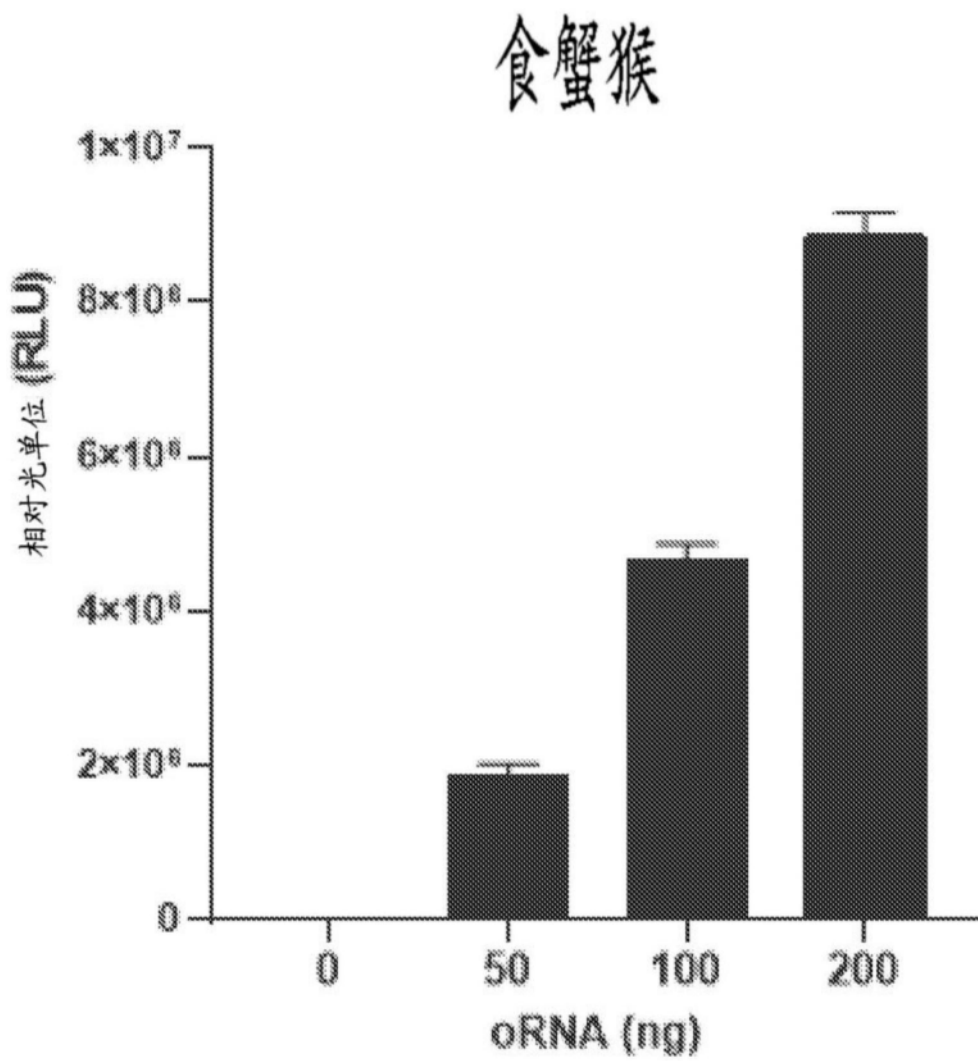


图67C

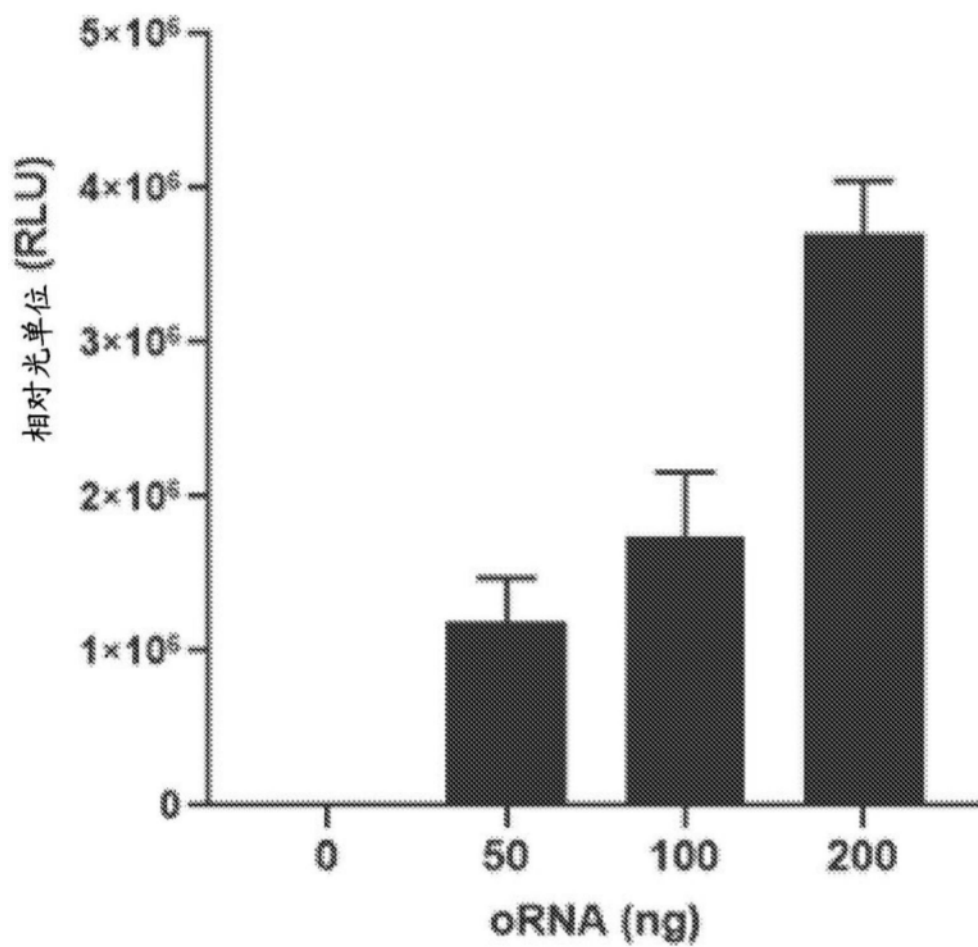
供体 **1**

图68A

供体 2

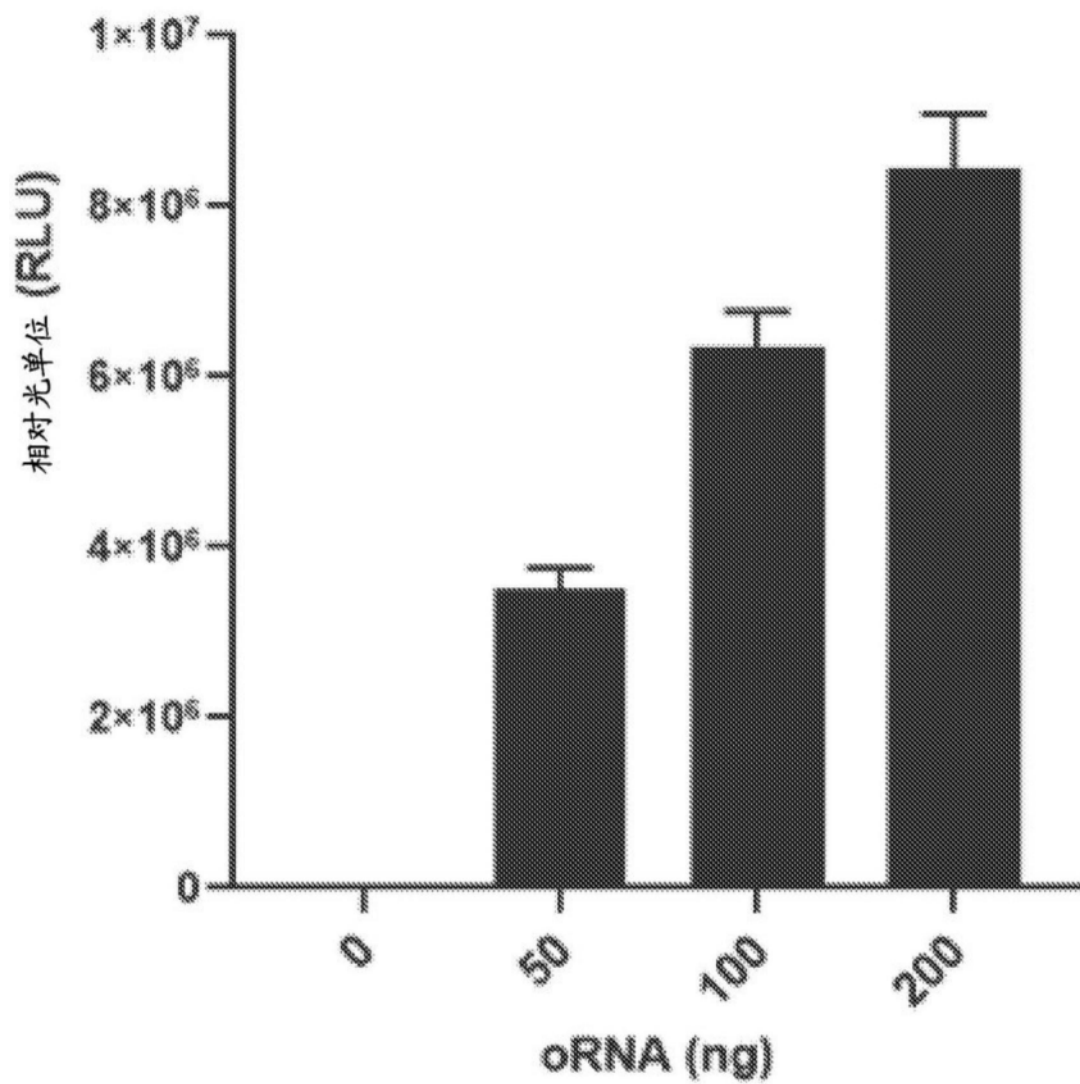


图68B

供体 3

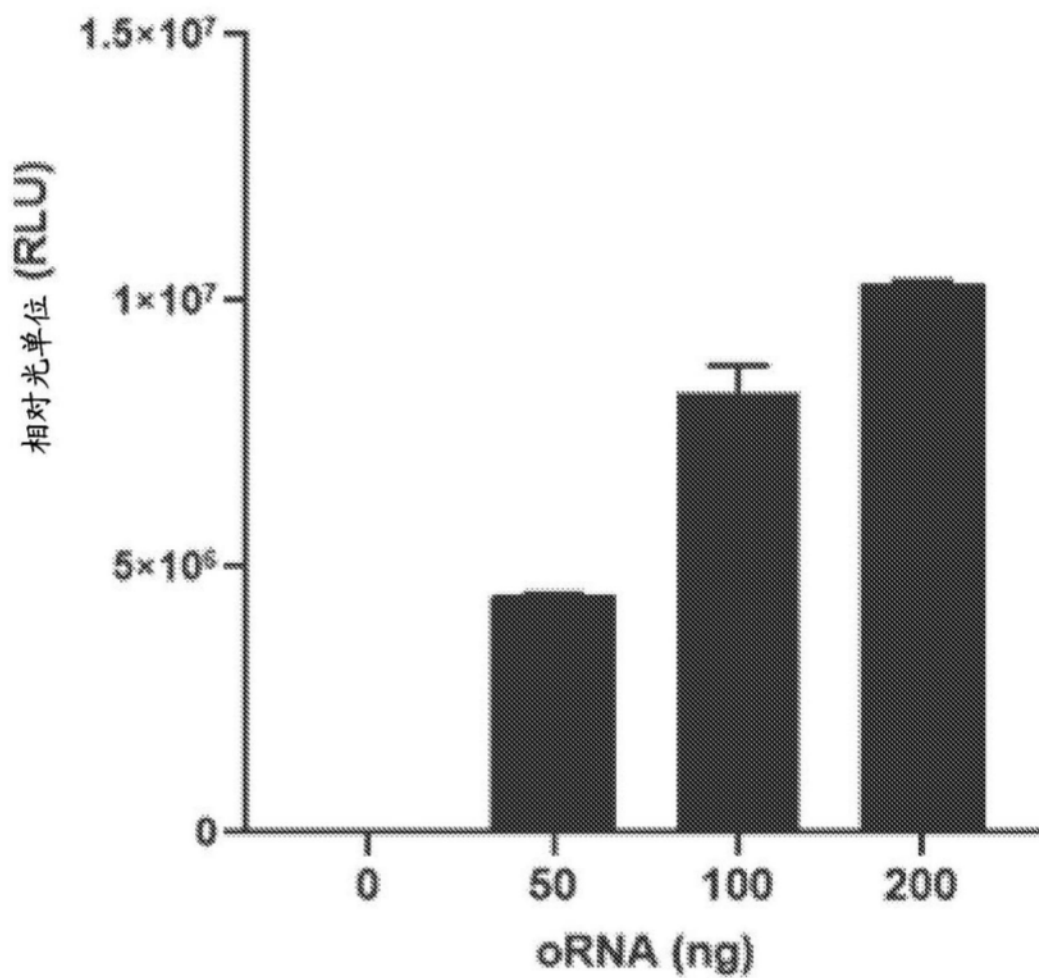


图68C

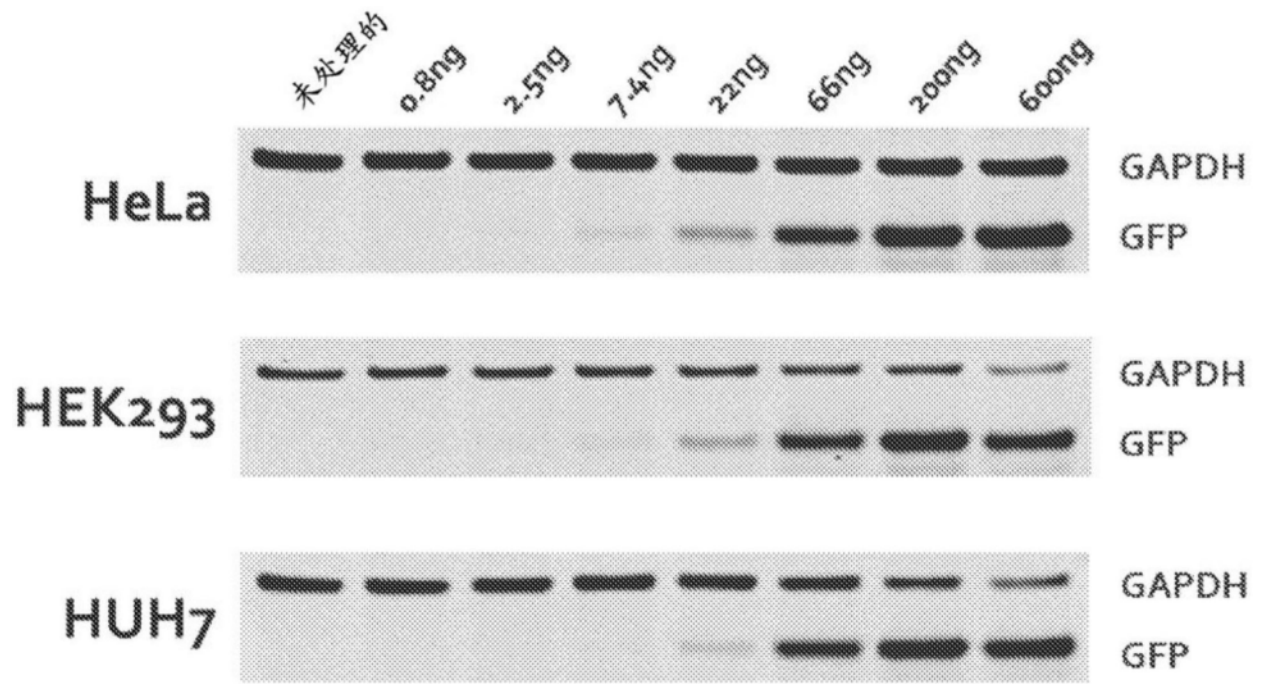


图69

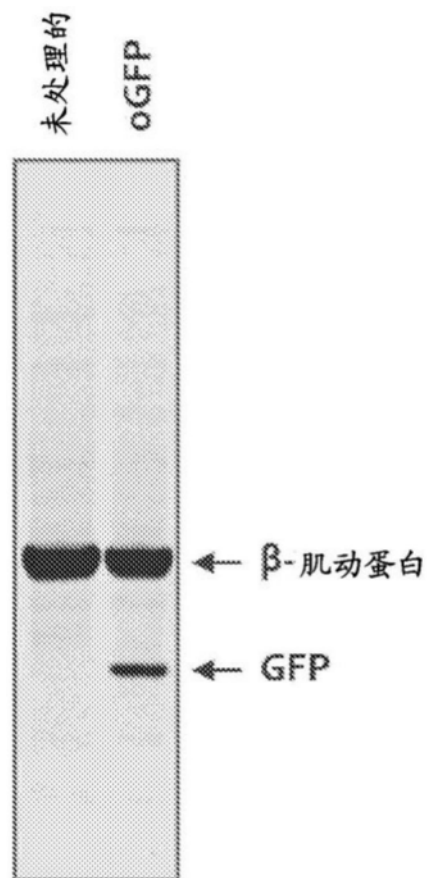


图70

小鼠
C2C12 细胞

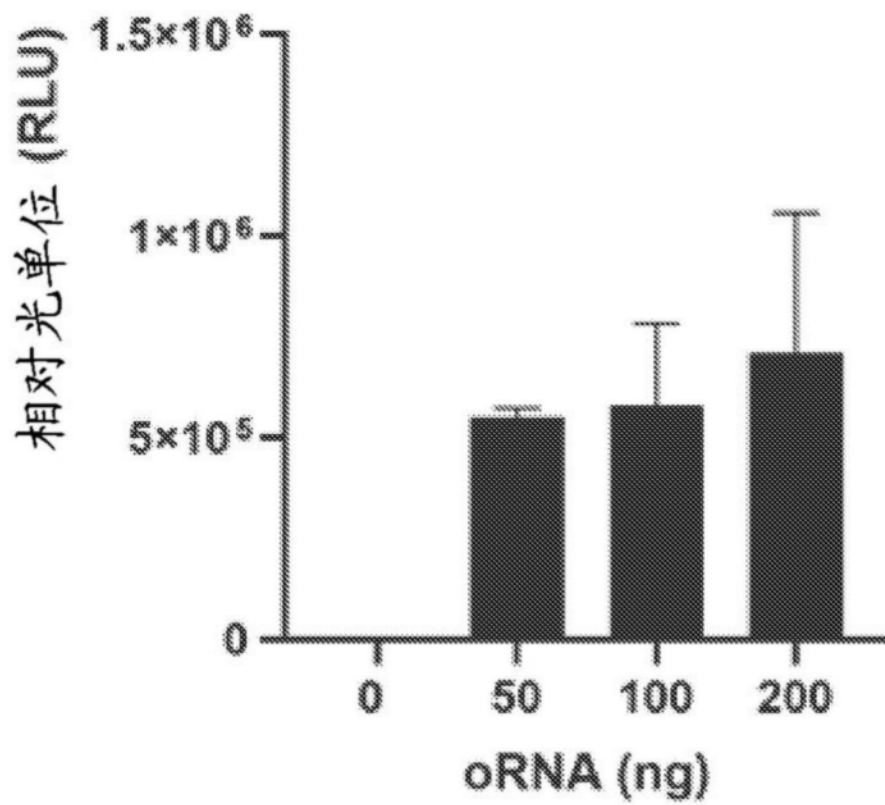


图71A

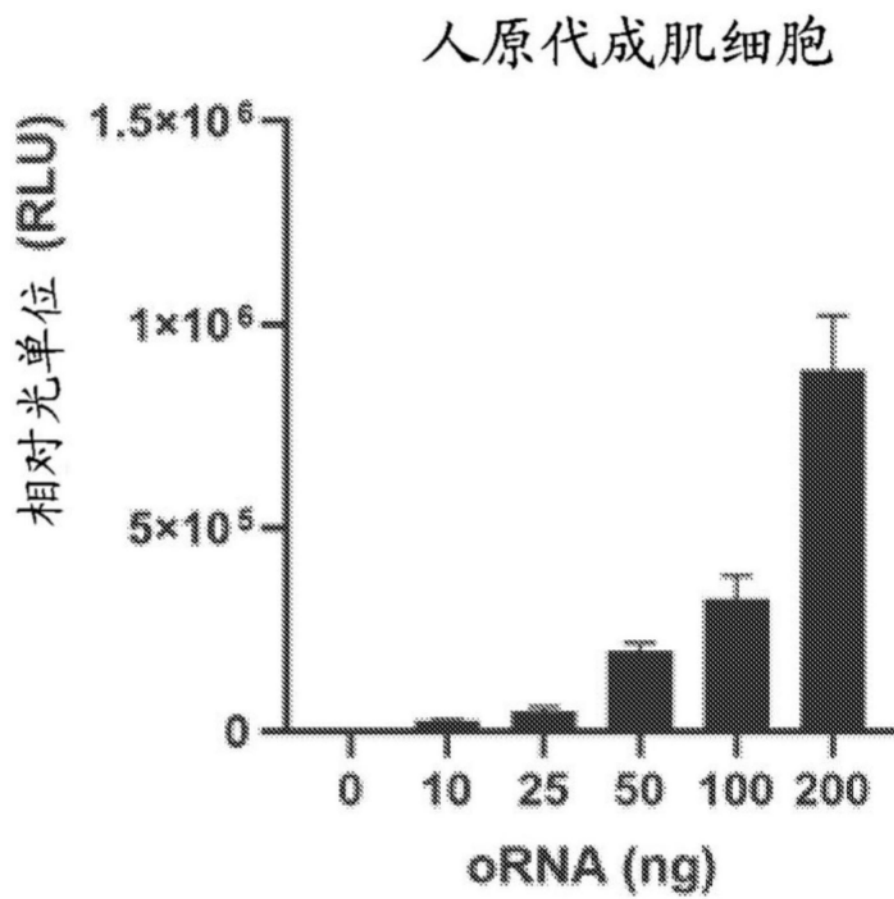


图71B

人供体 1

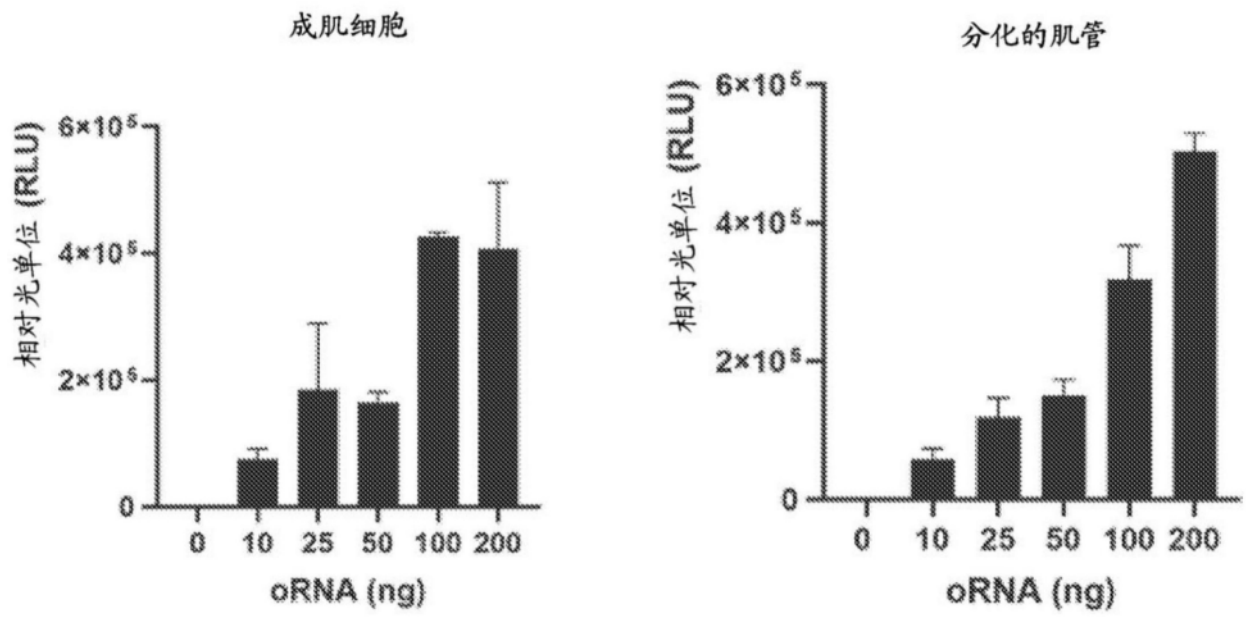


图72A

人供体 2

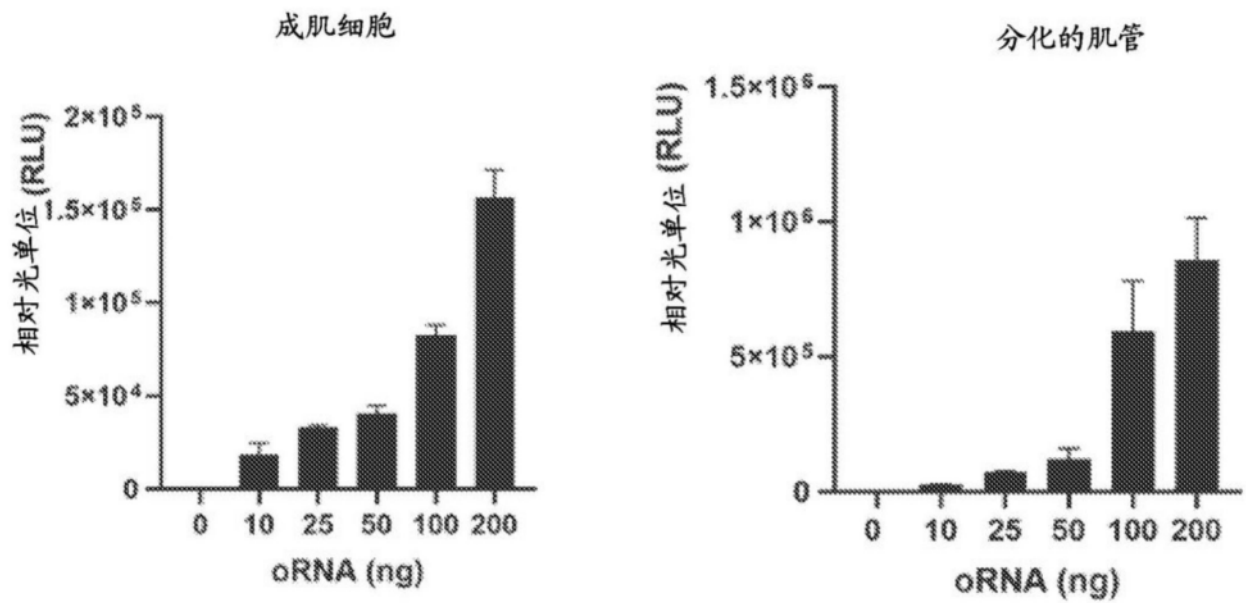


图72B

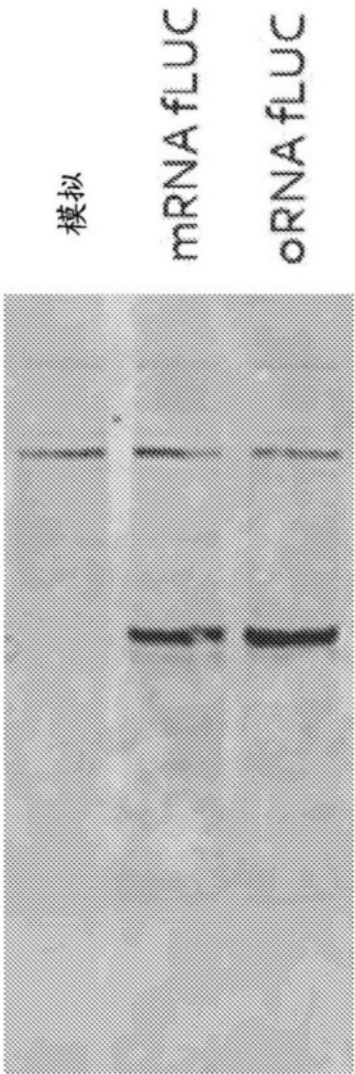


图73A

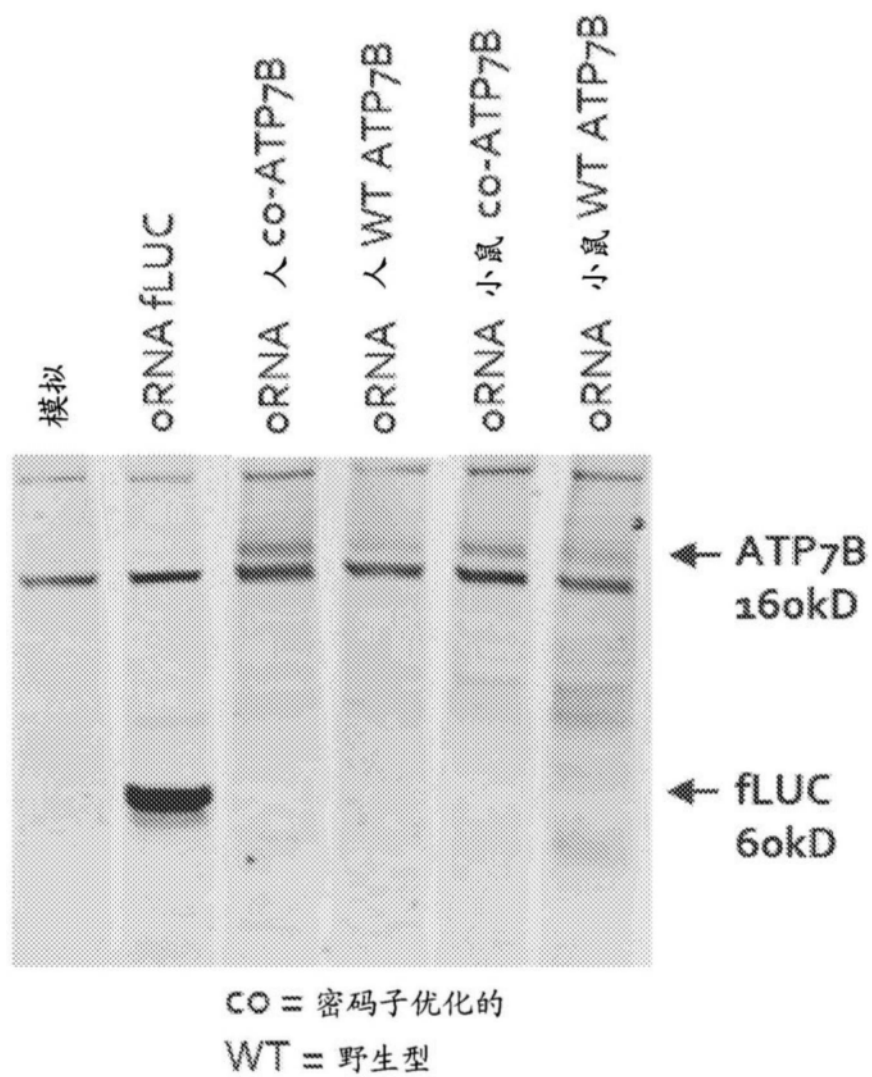


图73B

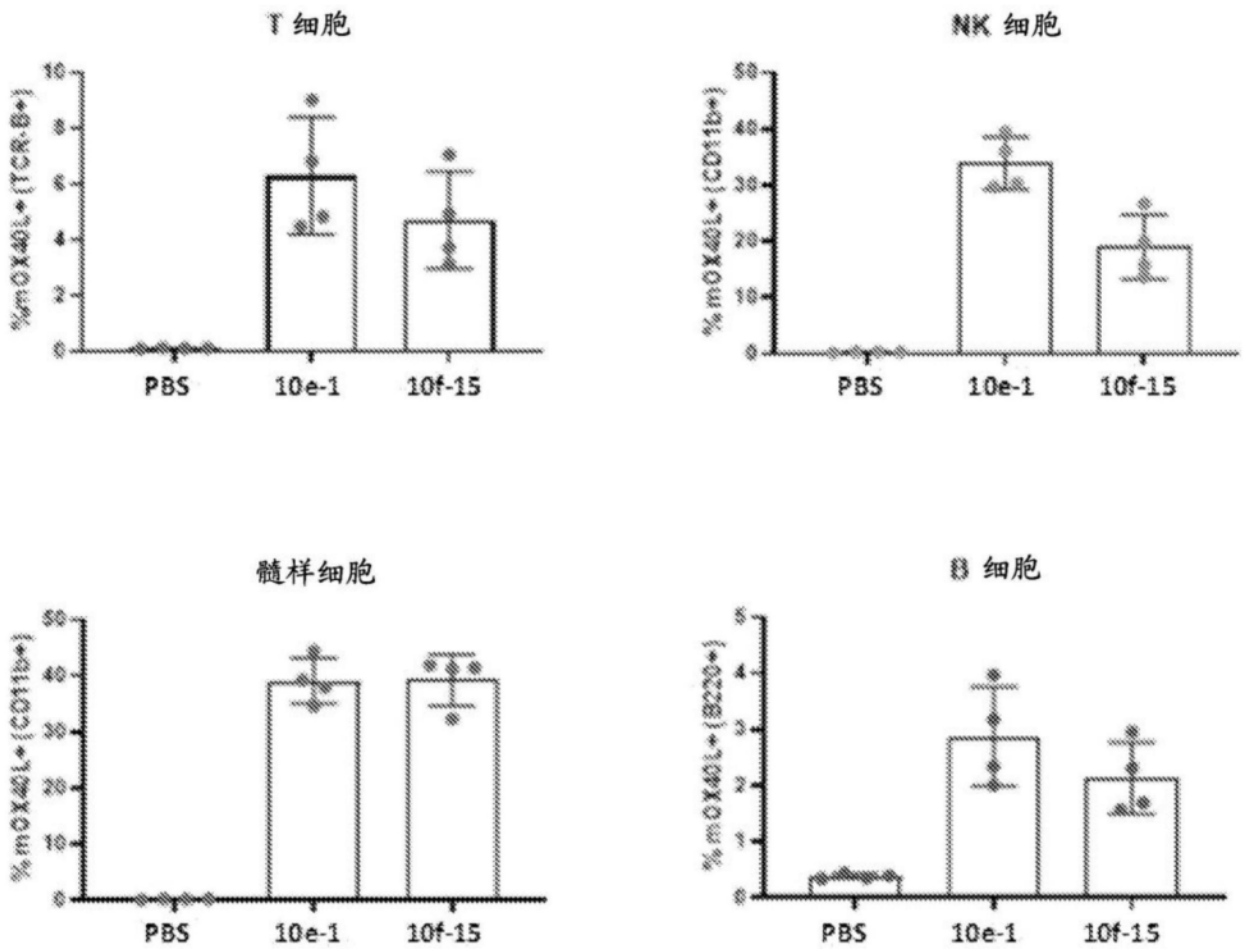


图74

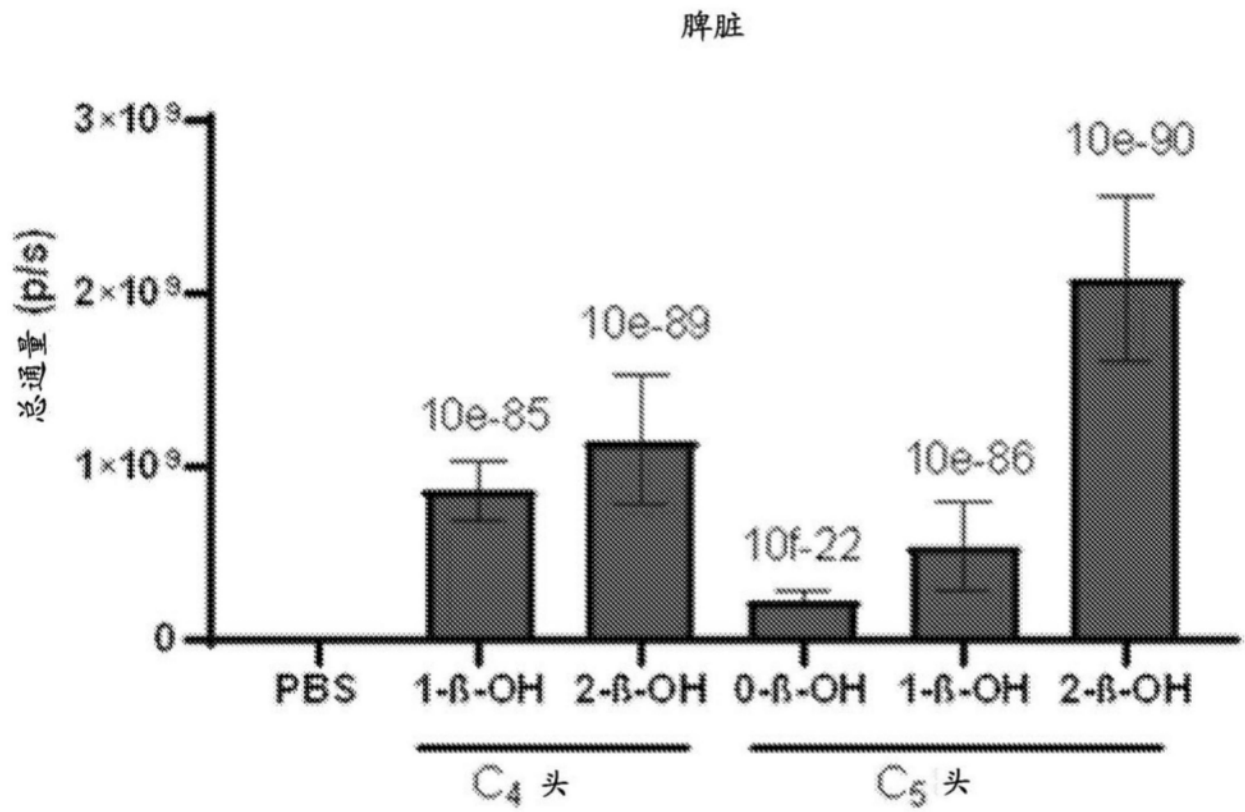


图75

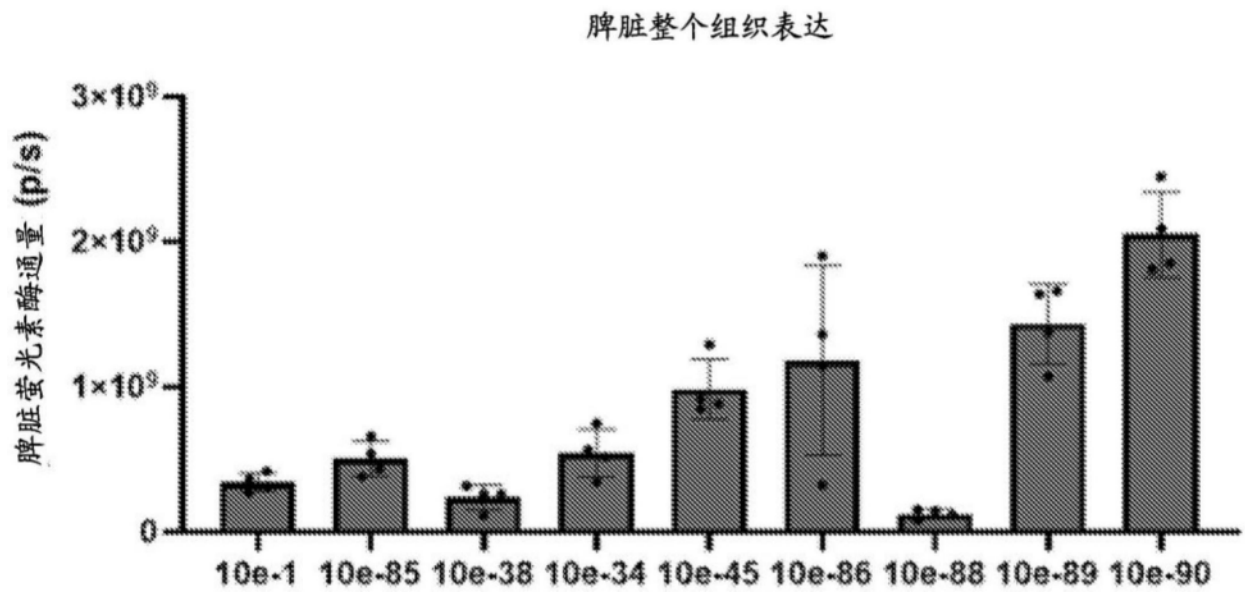


图76

脾脏 T 细胞表达

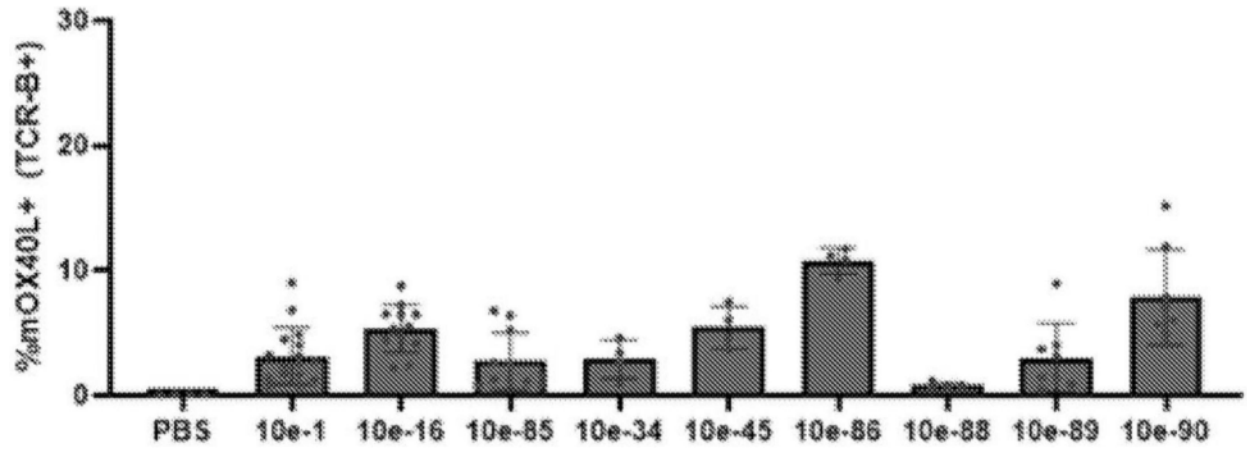


图77

合并的血液 B 细胞发育不良数据

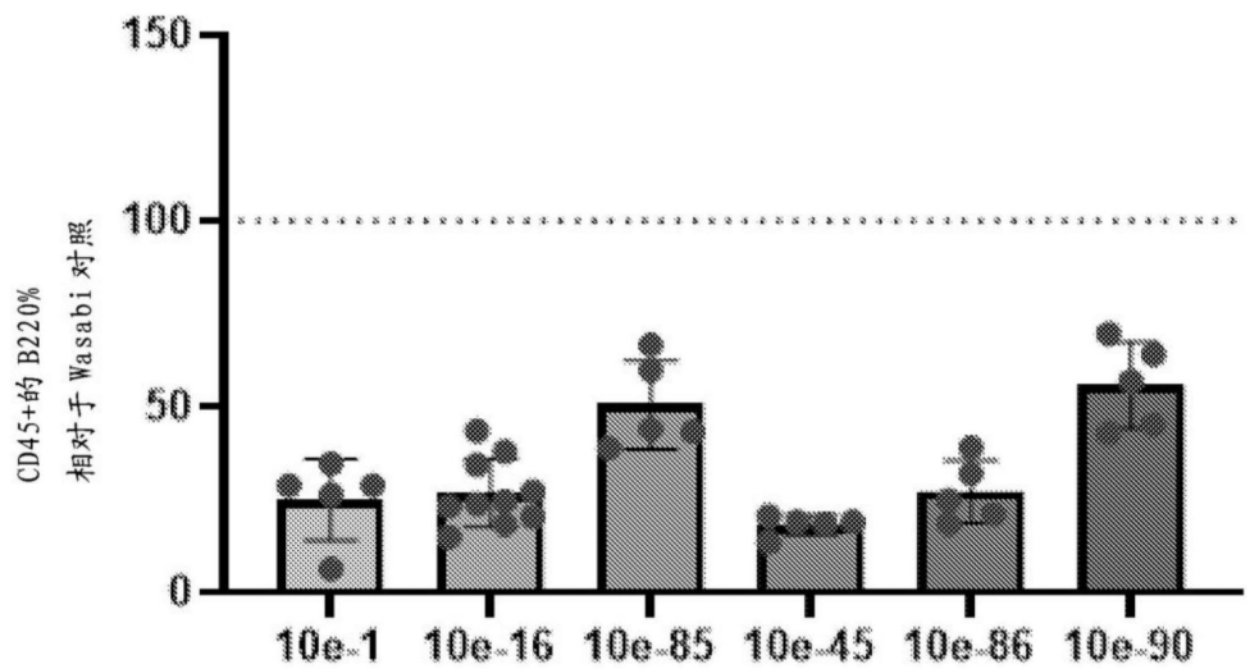


图78

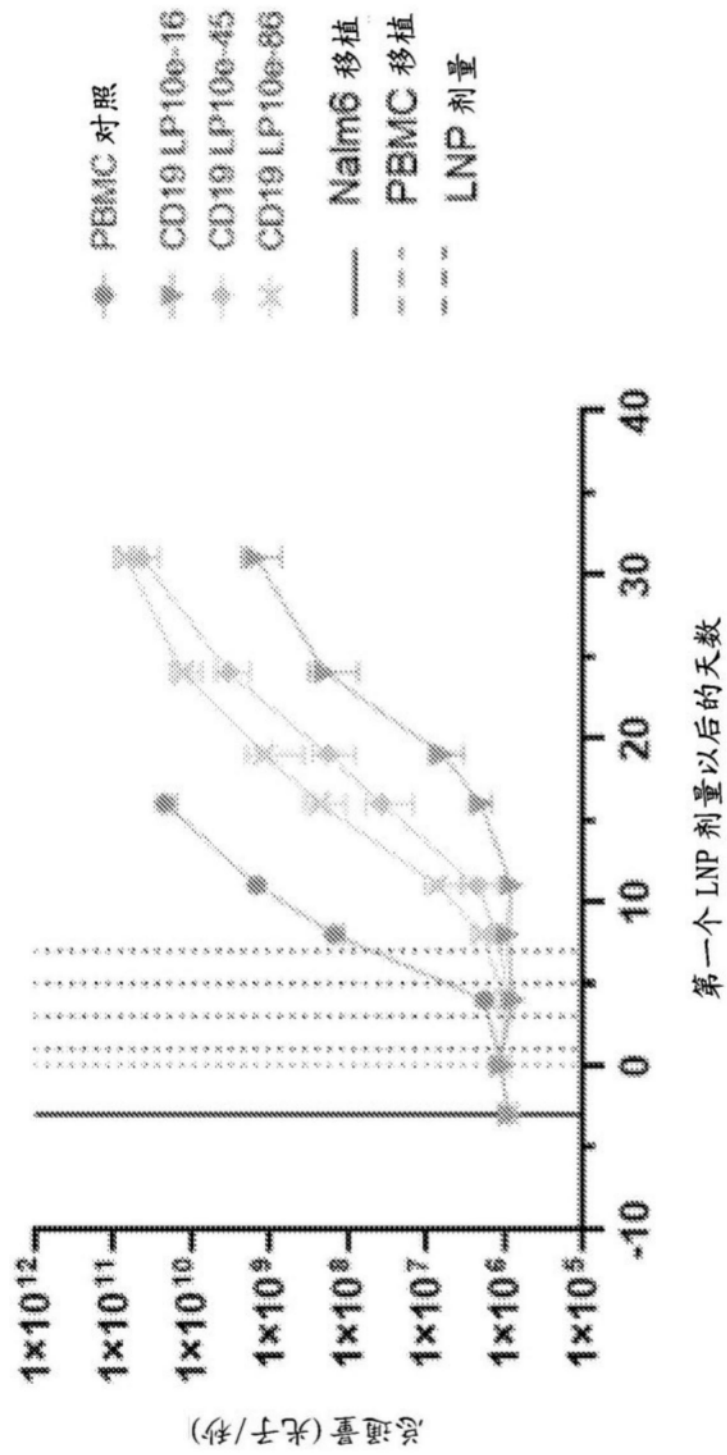


图79