(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112390871 A
(43)申请公布日 2021.02.23

(21)申请号 202010645626.3

(22)申请日 2013.03.15

(30)优先权数据
61/618,961 2012.04.02 US
61/618,953 2012.04.02 US
61/618,862 2012.04.02 US
61/618,866 2012.04.02 US
61/618,868 2012.04.02 US
61/618,870 2012.04.02 US
61/618,873 2012.04.02 US
61/618,878 2012.04.02 US
61/618,885 2012.04.02 US
61/618,896 2012.04.02 US
61/618,911 2012.04.02 US
61/618,922 2012.04.02 US
61/618,935 2012.04.02 US
61/618,945 2012.04.02 US
61/618,957 2012.04.02 US
61/648,286 2012.05.17 US
61/648,244 2012.05.17 US
61/668,157 2012.07.05 US
61/681,687 2012.08.10 US
61/681,647 2012.08.10 US
61/681,654 2012.08.10 US
61/681,675 2012.08.10 US
61/681,648 2012.08.10 US
61/681,667 2012.08.10 US
61/681,696 2012.08.10 US
61/681,658 2012.08.10 US
61/681,704 2012.08.10 US
61/681,720 2012.08.10 US
61/681,712 2012.08.10 US
61/681,650 2012.08.10 US
61/681,661 2012.08.10 US
61/681,645 2012.08.10 US
61/681,649 2012.08.10 US
61/681,742 2012.08.10 US
61/696,381 2012.09.04 US
61/709,303 2012.10.03 US
61/712,490 2012.10.11 US (续)

(62)分案原申请数据
201380028186.5 2013.03.15

(71)申请人 现代泰克斯公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 斯蒂芬·邦塞尔
提尔塔·柴可拉博提 (续)

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
代理人 吴小瑛 付文川

(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01) (续)

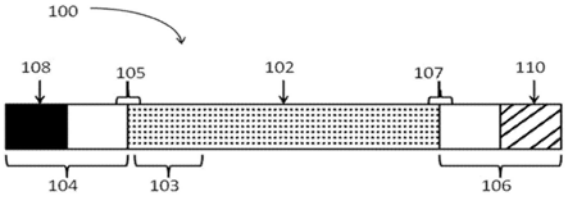
权利要求书2页 说明书473页
序列表123页 附图46页

(54)发明名称

蛋白质的体内产生

(57)摘要

本发明涉及用于蛋白质的体内产生的多核苷酸、初级转录物和mmRNA分子的制备、制造和治疗用途的组合物和方法。这些多核苷酸、初级转录物和mmRNA分子优选地进行修饰以改进以下中的一项或多项,在组织中的稳定性和/或清除率、受体摄取和/或动力学、组合物的细胞通路、与翻译机器的接合、mRNA半衰期、翻译效率、免疫逃避、蛋白质产生能力、分泌效率(适用时)、循环的可及性、蛋白质半衰期和/或细胞状态、功能和/或活性的调节。



CN 112390871 A

[转续页]

[接上页]

(30)优先权数据

61/737,152 2012.12.14 US
61/737,184 2012.12.14 US
61/737,160 2012.12.14 US
61/737,135 2012.12.14 US
61/737,191 2012.12.14 US
61/737,130 2012.12.14 US
61/737,139 2012.12.14 US
61/737,174 2012.12.14 US
61/737,134 2012.12.14 US
61/737,147 2012.12.14 US
61/737,155 2012.12.14 US
61/737,203 2012.12.14 US
61/737,168 2012.12.14 US
61/737,213 2012.12.14 US
PCT/US2013/030068 2013.03.09 US
PCT/US2013/030060 2013.03.09 US
PCT/US2013/030070 2013.03.09 US
PCT/US2013/030061 2013.03.09 US
PCT/US2013/030062 2013.03.09 US
PCT/US2013/030063 2013.03.09 US
PCT/US2013/030064 2013.03.09 US
PCT/US2013/030059 2013.03.09 US
PCT/US2013/030066 2013.03.09 US
PCT/US2013/030067 2013.03.09 US

(72)发明人 安东宁·德富热罗勒
S·M·伊巴希尔 马蒂亚斯·约翰
阿坦恩·洛依 苏珊·沃利斯基
K·M·伍德 保罗·哈塔拉
杰森·P·斯洛姆
凯内齐·伊杰贝
杰夫·L·埃尔斯沃思
贾斯汀·基尔德

(51)Int.Cl.

C12N 9/88(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 31/7115(2006.01)

1.一种体内产生目标多肽的方法,其包括使哺乳动物细胞、组织或生物体与编码所述目标多肽的至少一种分离的mRNA接触,其中所述目标多肽选自由以下组成的组:果糖二磷酸醛缩酶A(ALDOA)、α-甲基酰基-辅酶A消旋酶(AMACR)、血清淀粉样蛋白P成分(APCS)、血管生成素1(ANGPT1)、载脂蛋白A-I(APOA1)Milano、载脂蛋白A-I(APOA1)Paris、载脂蛋白A-I(APOA1)、精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)、artemin(ARTN)、芳基硫酸酯酶B(ARSB)、杀菌/通透性增加蛋白(rBPI-21)、骨形态发生蛋白2(BMP2)、骨形态发生蛋白7(BMP7)、支链酮酸脱氢酶E1α多肽(BCKDHA)、集落刺激因子2(粒细胞-巨噬细胞)(GM-CSF)、集落刺激因子3(粒细胞)(GCSF)、脱氧核糖核酸酶I(DNA酶1)、促红细胞生成素(EPO)、IX因子、VII因子、XI因子、纤维蛋白原A(FGA)、成纤维细胞生长因子18(FGF18)、成纤维细胞生长因子23(FGF23)、成纤维细胞生长因子7(FGF7或KGF)、卵泡抑素(FST)、延胡索酰乙酰乙酸水解酶(延胡索酰乙酰乙酸酶)(FAH)、半乳糖激酶1(GALK1)、半乳糖苷酶α(GLA)、葡聚糖(1,4-α-)分支酶1(GBE1)、糖蛋白激素α多肽(CGA或FSH-α)、血红蛋白β(HBB)、肝细胞生长因子(HGF)、人生长激素(hGH)、门冬胰岛素、甘精胰岛素、谷赖胰岛素、赖脯胰岛素、干扰素β(IFNB)、干扰素α2(IFNA2)、白细胞介素10(IL-10)、白细胞介素15(IL-15)、白细胞介素7(IL-7)、klotho(KL)、卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)、溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶(LIPA)、脂蛋白脂肪酶(LPL)、低密度脂蛋白受体(LDLR)、甘露糖苷酶α2B类成员1(MAN2B1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(MTTP)、N-乙酰谷氨酸合成酶(NAGS)、神经调节蛋白1(NRG1)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)、磷酸化酶激酶α2(肝脏)(PHKA2)、纤溶酶原(PLAT)、胞裂蛋白4(ARTS或SEPT4)、serpin肽酶抑制剂分化体C(抗凝血酶)成员1(SERPINC1)、serpin肽酶抑制剂分化体F(α-2抗纤维蛋白溶酶色素上皮衍生因子)成员2(SERPINF2)、sirtuin 1(SIRT1)、sirtuin 6(SIRT6)、溶质载体家族16成员3(单羧酸转运蛋白4)(SLC16A3)、溶质载体家族2(易化葡萄糖转运蛋白)成员1(SLC2A1或GLUT1)、分拣蛋白1(SORT1)、血小板生成素(THPO)、转化生长因子β(TGFB1)、釉丛蛋白1(TUFT1)、肿瘤蛋白p53(TP53)、酪氨酸酶(TYR)、UDP葡萄糖苷酰转移酶1家族多肽A1(UGT1A1)、血管内皮生长因子(VEGF)和X连锁细胞凋亡抑制剂(XIAP)。

2.根据权利要求1所述的方法,其中编码所述目标多肽的所述分离的mRNA具有选自由SEQ ID NO:168-234、263-272和312-319组成的组的序列。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的mRNA包含具有大约140个核苷酸的连接核苷的3'加尾序列。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的mRNA包含具有大约160个核苷酸的连接核苷的3'加尾序列。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的mRNA包含Cap1的5'末端帽。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的mRNA包含至少一种化学修饰核苷。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一种化学修饰核苷选自由以下组成的组: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、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-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、泽布拉恩、5-氮杂-泽布拉恩、5-甲基-泽布拉恩、5-氮杂-2-硫代-泽布拉恩、2-硫代-泽布拉恩、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、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酰基氨甲酰基腺苷、N6-苏氨酰基氨甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酰基氨甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、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、Y核苷、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、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷。

8.根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的mRNA是经过配制的。

9.根据权利要求8所述的方法,其中所述制剂是脂质复合物制剂。

10.根据权利要求8所述的方法,其中所述制剂包含脂质,并且其中所述脂质选自DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DODMA、DSDMA、DLenDMA、reLNP、PLGA和PEG化脂质以及其混合物。

11.根据权利要求8所述的方法,其中所述分离的mRNA以在1ug与150ug之间的总每日剂量施用。

12.根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的mRNA以两次或更多次相等或不相等的分剂量施用。

蛋白质的体内产生

[0001] 本申请为申请号为201380028186.5,申请日为2013年3月15日,发明名称为“蛋白质的体内产生”的分案申请。

[0002] 序列表参考

[0003] 本申请连同序列表以电子格式一同提交。名称为M313SQLST.txt的序列表文件在2013年3月15日创建并且大小为240,793字节。所述序列表的电子格式中的信息以引用的方式整体并入本文。

[0004] 相关申请的交叉引用

[0005] 本申请涉及以下各项:2012年12月14日提交的名称为Modified Nucleoside, Nucleotide,and Nucleic Acid Compositions的国际申请号PCT/US2012/069610、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics的美国临时专利申请号61/618,862、2012年8月10提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics的美国临时专利申请号61/681,645、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics的美国临时专利申请号61/737,130、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/618,866、2012年8月10提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/681,647、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/737,134、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/618,868、2012年8月10提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/681,648、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/737,135、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides 的美国临时专利申请号61/618,870、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/681,649、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/737,139、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/618,873、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/681,650、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/737,147、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/618,878、2012年8月10提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/681,654、2012年12

月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/737,152、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/618,885、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/681,658、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/737,155、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/618,896、2012年7月5日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/668,157、2012年8月10提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/681,661、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/737,160、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/618,911、2012年8月10提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/681,667、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/737,168、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/618,922、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/681,675、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/737,174、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,935、2012年8月10提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/681,687、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,184、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,945、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/681,696、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,191、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,953、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease

的美国临时专利申请号61/681,704、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,203、美国临时专利申请号61/753,661、2012年4月2日提交的名称为Dosing Methods for Modified mRNA的美国临时专利申请号61/618,961、2012年5月17日提交的名称为Dosing Methods for Modified mRNA的美国临时专利申请号61/648,286、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics and Proteins Associated with Human Disease的国际申请号PCT/US2013/030062、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucloetides的国际申请号PCT/US2013/030063、名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的国际申请号PCT/US2013/030064、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Membrane Proteins的国际申请号PCT/US2013/030059、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的国际申请号PCT/US2013/030066、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的国际申请号PCT/US2013/030067、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的国际申请号PCT/US2013/030060、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的国际申请号PCT/US2013/030061、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030068和2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030070,所述申请各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0006] 本申请还涉及2012年10月3日提交的名称为Modified Nucleosides, Nucleotides,and Nucleic Acids,and Uses Thereof的国际公布号PCT/US2012/58519和2012年12月14日提交的名称为Modified Nucleoside,Nucleotide,and Nucleic Acid Compositions的国际公布号PCT/US2012/69610,所述申请各自的内容以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0007] 本发明涉及用于设计、制备、制造和/或配制多核苷酸、初级构建体以及修饰mRNA分子(mmRNA)的组合物、方法、过程、试剂盒以及装置。

[0008] 发明背景

[0009] 影响蛋白质表达的现有方法论存在多种问题。例如,引入的DNA可在一些频率下整合到宿主细胞基因组DNA中,从而导致宿主细胞基因组DNA的改变和/或损伤。或者,引入到细胞中的异源脱氧核糖核酸(DNA)可由子代细胞(无论异源DNA是否整合到染色体中)或由后代继承。此外,假设适当递送并且无损伤或整合到宿主基因组中,那么在制成编码的蛋白质之前必须发生多个步骤。一旦在细胞内部,DNA必须被转运到细胞核中,在细胞核中它被转录成RNA。从DNA转录的RNA然后必须进入细胞质,在细胞质中它被翻译成蛋白质。从施用

的DNA至蛋白质的多个加工步骤不仅在产生功能性蛋白质之前形成延迟时间，而且每个步骤还意味着误差和对细胞造成损伤的机会。此外，已知难以在细胞中获得DNA表达，因为DNA频繁进入细胞但不表达或不以合理的速率或浓度表达。当将DNA引入到原代细胞或修饰细胞系中时，这尤其成问题。

[0010] 在二十世纪90年代初期，Bloom和同事通过将体外转录的加压素(vasopressin)mRNA注射至下丘脑中成功地拯救了加压素缺陷的大鼠(Science 255:996-998;1992)。然而，低翻译水平和分子的免疫原性阻碍mRNA作为治疗剂的发展，并且自其之后的工作一直集中于可相反采用这些缺陷的替代应用，即用编码癌症抗原的mRNA进行免疫。

[0011] 其他人研究了使用mRNA来递送目标多肽并且显示mRNA分子的某些化学修饰、特别是假尿苷和5-甲基-胞嘧啶降低了免疫刺激作用。

[0012] 这些研究在以下中公开：例如Ribostem Limited于2003年7月9日提交(现已放弃)的英国专利申请序号0316089.2、2004年7月9日提交的公布为WO2005005622的PCT申请号PCT/GB2004/002981、2006年6月8日提交的公布为US20060247195(现已放弃)的美国专利申请国家阶段进入序号10/563,897、以及2004年7月9日提交的公布为EP1646714(现已撤回)的欧洲专利申请国家阶段进入序号EP2004743322中；Novozymes,Inc.于2007年12月19日提交的公布为WO2008140615的PCT申请号PCT/US2007/88060、2009年7月2日提交的公布为US20100028943的美国专利申请国家阶段进入序号12/520,072、以及2009年7月7日提交的公布为EP2104739的欧洲专利申请国家阶段进入序号EP2007874376中；罗彻斯特大学(University of Rochester)于2006年12月4日提交的公布为WO2007064952的PCT申请号PCT/US2006/46120和2006年12月1日提交的公布为US20070141030的美国专利申请序号11/606,995中；BioNTech AG在2007年12月14日提交(现已放弃)的欧洲专利申请序号EP2007024312、2008年12月12日提交的公布为WO2009077134的PCT申请号PCT/EP2008/01059、2010年6月2日提交的公布为EP2240572的欧洲专利申请国家阶段进入序号EP2008861423、2010年11月24日提交的公布为US20110065103的美国专利申请国家阶段进入序号12/,735,060、2005年9月28日提交的德国专利申请序号DE 10 2005 046 490、2006年9月28日提交的公布为WO2007036366的PCT申请PCT/EP2006/0448、2012年3月21日公布的国家阶段欧洲专利EP1934345和2009年8月14日提交的公布为20100129877的国家阶段美国专利申请序号11/992,638；免疫疾病研究所有限公司(Immune Disease Institute Inc.)于2011年4月15日提交的公布为US20120046346的美国专利申请序号13/088,009和2011年4月15日提交的公布为WO20110130624的PCT申请PCT/US2011/32679；Shire Human Genetic Therapeutics于2010年11月20日提交的公布为US20110244026的美国专利申请序号12/957,340中；Sequitur Inc.于1998年9月18日提交的公布为WO1999014346的PCT申请PCT/US1998/019492中；The Scripps Research Institute于2010年2月24日提交的公布为WO2010098861的PCT申请号PCT/US2010/00567和2011年11月3日提交的公布为US20120053333的美国专利申请国家阶段进入序号13/203,229中；Ludwig-Maximillians University于2010年7月30日提交的公布为WO2011012316的PCT申请号PCT/EP2010/004681中；Cellscript Inc.于2008年6月30日提交并且2011年10月18日授权的美国专利号8,039,214、美国专利申请序号2010年12月7日提交的公布为US20110143436的12/962,498、2010年12月7日提交的公布为US20110143397的12/962,468、2011年9月20日提交的公布为

US20120009649的13/237,451以及PCT申请2010年12月7日提交的公布为WO2011071931的PCT/US2010/59305和2010年12月7日提交的公布为WO2011071936的PCT/US2010/59317中；The Trustees of the University of Pennsylvania于2006年8月21日提交的公布为WO2007024708的PCT申请号PCT/US2006/32372和2009年3月27日提交的公布为US20090286852的美国专利申请国家阶段进入序号11/990,646中；Curevac GMBH于德国专利申请序号2001年6月5日提交的DE10 2001 027 283.9、2001年12月19日提交的DE10 2001 062 480.8以及2006年10月31日提交的DE 20 2006 051 516(都已放弃)、欧洲专利号2005年3月30日授权的EP1392341和2008年1月2日授权的EP1458410、PCT申请号2002年6月5日提交的公布为WO2002098443的PCT/EP2002/06180、2002年12月19日提交的公布为WO2003051401的PCT/EP2002/14577、2007年12月31日提交的公布为WO2008052770的PCT/EP2007/09469、2008年4月16日提交的公布为WO2009127230的PCT/EP2008/03033、2005年5月19日提交的公布为WO2006122828的PCT/EP2006/004784、2007年1月9日提交的公布为WO2008083949的PCT/EP2008/00081、以及美国专利申请序号2003年12月5日提交的公布为US20050032730的10/729,830、2004年6月18日提交的公布为US20050059624的10/870,110、2008年7月7日提交的公布为US20080267873的11/914,945、2009年10月27日提交的公布为US2010047261(现已放弃)的12/446,912、2010年1月4日提交的公布为US20100189729的12/522,214、2010年5月26日提交的公布为US20110077287的12/787,566、2010年5月26日提交的公布为US20100239608的12/787,755、2011年7月18日提交的公布为US20110269950的13/185,119以及2011年5月12日提交的公布为US20110311472的13/106,548中，所述专利都以引用的方式整体并入本文。

[0013] 尽管存在被限制于包括假尿苷和5-甲基-胞嘧啶的化学修饰的选择的这些报道，但本领域中仍然需要用于解决围绕细胞内翻译的有效调节和编码多肽或其片段的核酸的加工的大量障碍的治疗方式。

[0014] 为此，本发明人已证实某些修饰mRNA序列具有作为益处超过仅逃避、避免或减弱免疫应答的治疗剂的潜力。这类研究详细描述于公布的共同未决申请国际申请2011年8月5日提交的PCT/US2011/046861和2011年10月3日提交的PCT/US2011/054636、2011年10月3日提交的国际申请号PCT/US2011/054617中，所述申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0015] 本发明通过提供基于核酸的化合物或多核苷酸来解决这种需要，所述多核苷酸编码目标多肽(例如，修饰mRNA或mmRNA)并且具有避免本领域中的一个或多个问题的结构和/或化学特征，例如适用于优化基于核酸的治疗剂的配制和递送且同时保持结构和功能完整性、克服表达的阈值、改进表达速率、半衰期和/或蛋白质浓度、优化蛋白质定位并且避免有害生物应答如免疫应答和/或降解途径的特征。

[0016] 发明概述

[0017] 本文描述用于设计、制备、制造和/或配制修饰mRNA(mmRNA)分子的组合物、方法、过程、试剂盒以及装置。

[0018] 本发明的各种实施方案的细节在以下描述中阐述。本发明的其他特征、目的和优点将是从本发明的描述和附图以及权利要求清楚的。

[0019] 附图简述

[0020] 前述和其它目的、特征以及优点将是从如在附图中示出的本发明的具体实施方案

的以下描述清楚的，在附图中相同参考符号贯穿不同视图指代相同部分。附图未必按比例绘制，而是将重点放在示出本发明的各种实施方案的原理上。

[0021] 图1是本发明的初级构建体的示意图。

[0022] 图2示出现有技术中适用于本发明的脂质结构。示出98N12-5(TETA5-LAP)、DLin-DMA、DLin-K-DMA(2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷)、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA以及C12-200的结构。

[0023] 图3是适用于本文教导的IVT反应中的代表性脂质体。脂质体包含由本发明人设计的插入物64818。

[0024] 图4是封装于PLGA微球中的修饰mRNA的凝胶概况。

[0025] 图5是IX因子蛋白质产生PLGA制剂IX因子修饰mRNA的直方图。

[0026] 图6是示出在一系列剂量的修饰mRNA转染之后人角质形成细胞中的VEGF蛋白质产量的直方图。图6A示出在包含天然核苷三磷酸(NTP)的修饰mRNA转染之后的蛋白质产量。图6B示出在用假尿苷(假-U)和5-甲基胞嘧啶(5mC)完全修饰的修饰mRNA转染之后的蛋白质产量。图6C示出在用N1-甲基-假尿苷(N1-甲基-假-U)和5-甲基胞嘧啶(5mC)完全修饰的修饰mRNA转染之后的蛋白质产量。

[0027] 图7是HEK293细胞中的VEGF蛋白质产量的直方图。

[0028] 图8是哺乳动物中GLA蛋白质产量的凝胶概况。图8A示出GLA的预期大小。图8B示出GLA的预期大小。

[0029] 图9是哺乳动物中ARSB蛋白质产量的凝胶概况。图9A示出ARSB的预期大小。图9B示出ARSB的预期大小。

[0030] 图10是哺乳动物中IFNB1蛋白质产量的凝胶概况。图10A示出IFNB1的预期大小。图10B示出IFNB1的预期大小。

[0031] 图11是哺乳动物中XI因子蛋白质产量的凝胶概况。图11A示出XI因子的预期大小。图11B示出XI因子的预期大小。

[0032] 图12是哺乳动物中TP53蛋白质产量的凝胶概况。图12A示出TP53的预期大小。图12B示出TP53的预期大小。

[0033] 图13是哺乳动物中TGFβ蛋白质产量的凝胶概况。图13A示出TGFβ的预期大小。图13B示出TGFβ的预期大小。

[0034] 图14是哺乳动物中SIRT6蛋白质产量的凝胶概况。图14A示出SIRT6的预期大小。图14B示出SIRT6的预期大小。

[0035] 图15是哺乳动物中NAGS蛋白质产量的凝胶概况。图15A示出NAGS的预期大小。图15B示出NAGS的预期大小。

[0036] 图16是哺乳动物中SORT1蛋白质产量的凝胶概况。图16A示出SORT1的预期大小。图16B示出SORT1的预期大小。

[0037] 图17是哺乳动物中GM-CSF蛋白质产量的凝胶概况。图17A示出GM-CSF的预期大小。图17B示出GM-CSF的预期大小。

[0038] 图18是哺乳动物中Klotho蛋白质产量的凝胶概况。图18A示出Klotho的预期大小。图18B示出Klotho的预期大小。

[0039] 图19是哺乳动物中GALK1蛋白质产量的凝胶概况。图19A示出GALK1的预期大小。图

19B示出GALK1的预期大小。

[0040] 图20是哺乳动物中SERPINF2蛋白质产量的凝胶概况。图20A示出SERPINF2的预期大小。图20B示出SERPINF2的预期大小。

[0041] 图21是哺乳动物中ALDOA蛋白质产量的凝胶概况。

[0042] 图22是哺乳动物中TYR蛋白质产量的凝胶概况。图22A示出TYR的预期大小。图22B示出TYR的预期大小。

[0043] 图23是哺乳动物中BMP7蛋白质产量的凝胶概况。图23A示出BMP7的预期大小。图23B示出BMP7的预期大小。

[0044] 图24是哺乳动物中NRG1蛋白质产量的凝胶概况。图24A示出NRG1的预期大小。图24B示出NRG1的预期大小。

[0045] 图25是哺乳动物中APCS蛋白质产量的凝胶概况。图25A示出APCS的预期大小。图25B示出APCS的预期大小。

[0046] 图26是哺乳动物中LCAT蛋白质产量的凝胶概况。图26A示出LCAT的预期大小。图26B示出LCAT的预期大小。

[0047] 图27是哺乳动物中ARTN蛋白质产量的凝胶概况。图27A示出ARTN的预期大小。图27B示出ARTN的预期大小。

[0048] 图28是哺乳动物中HGF蛋白质产量的凝胶概况。图28A示出HGF的预期大小。图28B示出HGF的预期大小。

[0049] 图29是哺乳动物中EPO蛋白质产量的凝胶概况。图29A示出EPO的预期大小。图29B示出EPO的预期大小。

[0050] 图30是哺乳动物中IL-7蛋白质产量的凝胶概况。图30A示出IL-7的预期大小。图30B示出IL-7的预期大小。

[0051] 图31是哺乳动物中LIPA蛋白质产量的凝胶概况。图31A示出LIPA的预期大小。图31B示出LIPA的预期大小。

[0052] 图32是哺乳动物中DNAse1蛋白质产量的凝胶概况。图32A示出DNAse1的预期大小。图32B示出DNAse1的预期大小。

[0053] 图33是哺乳动物中APOA1Milano蛋白质产量的凝胶概况。图33A示出APOA1Milano的预期大小。图33B示出APOA1Milano的预期大小。

[0054] 图34是哺乳动物中TUFT1蛋白质产量的凝胶概况。图34A示出TUFT1的预期大小。图34B示出TUFT1的预期大小。

[0055] 图35是哺乳动物中APOA1Paris蛋白质产量的凝胶概况。图35A示出APOA1Paris的预期大小。图35B示出APOA1Paris的预期大小。

[0056] 图36是哺乳动物中APOA1蛋白质产量的凝胶概况。图36A示出APOA1的预期大小。图36B示出APOA1的预期大小。

[0057] 图37是哺乳动物中UGT1A1蛋白质产量的凝胶概况。图37A示出UGT1A1的预期大小。图37B示出UGT1A1的预期大小。

[0058] 图38是哺乳动物中THPO蛋白质产量的凝胶概况。图38A示出THPO的预期大小。图38B示出THPO的预期大小。

[0059] 图39是哺乳动物中ASL蛋白质产量的凝胶概况。图39A示出ASL的预期大小。图39B

示出ASL的预期大小。

[0060] 图40是哺乳动物中FSHα蛋白质产量的凝胶概况。

[0061] 图41是哺乳动物中BMP2蛋白质产量的凝胶概况。图41A示出BMP2的预期大小。图41B示出BMP2的预期大小。

[0062] 图42是哺乳动物中PLG蛋白质产量的凝胶概况。图42A示出PLG的预期大小。图42B示出PLG的预期大小。

[0063] 图43是哺乳动物中FGA蛋白质产量的凝胶概况。图43A示出FGA的预期大小。图43B示出FGA的预期大小。

[0064] 图44是哺乳动物中SERPINC1蛋白质产量的凝胶概况。图44A示出SERPINC1的预期大小。图44B示出SERPINC1的预期大小。

[0065] 图45是哺乳动物中MTTP蛋白质产量的凝胶概况。图45A示出MTTP的预期大小。图45B示出MTTP的预期大小。

[0066] 图46是哺乳动物中SEPT4蛋白质产量的凝胶概况。图46A示出SEPT4的预期大小。图46B示出SEPT4的预期大小。

[0067] 图47是哺乳动物中XIAP蛋白质产量的凝胶概况。图47A示出XIAP的预期大小。图47B示出XIAP的预期大小。

[0068] 图48是哺乳动物中SLC16A3蛋白质产量的凝胶概况。图48A示出SLC16A3的预期大小。图48B示出SLC16A3的预期大小。

[0069] 图49是哺乳动物中ANGPT1蛋白质产量的凝胶概况。图49A示出ANGPT1的预期大小。图49B示出ANGPT1的预期大小。

[0070] 图50是哺乳动物中IL-10蛋白质产量的凝胶概况。图50A示出IL-10的预期大小。图50B示出IL-10的预期大小。

[0071] 图51是示出哺乳动物中的胰岛素蛋白质产量的直方图。

[0072] 图52是示出HEK293细胞中的XI因子蛋白质产量的直方图。

[0073] 图53是示出HeLa细胞中的XI因子蛋白质产量的直方图。

[0074] 图54是示出HeLa细胞中的XI因子蛋白质产量的直方图。

[0075] 图55是示出HeLa上清液中的XI因子蛋白质产量的直方图。

[0076] 图56是示出HeLa中的HGH蛋白质产量的直方图。

[0077] 发明详述

[0078] 在治疗学、诊断学、试剂领域并且对于生物测定来说，能够将核酸(例如，核糖核酸(RNA))递送至细胞内部(无论体外、体内、原位或离体)例如以便引起核酸的细胞内翻译和所编码的目标多肽的产生具有重要意义。特别重要的是非整合多核苷酸的递送和功能。

[0079] 本文描述用于设计、制备、制造和/或配制编码一种或多种目标多肽的多核苷酸的组合物(包括药物组合物)和方法。还提供用于选择、设计和/或使用编码本文所描述的目标多肽的多核苷酸的系统、过程、装置和试剂盒。

[0080] 根据本发明，这些多核苷酸优选地进行修饰以便避免本领域的其它多肽编码分子的缺陷。因此，这些多核苷酸被称为修饰mRNA或mmRNA。

[0081] 本发明人已经探索了修饰多核苷酸在抗体、病毒、兽医学应用领域以及多种体内环境中的用途并且这些研究公开于，例如共同未决的和共同拥有的美国临时专利申请序号

2011年3月31日提交的61/470,451,其教导mmRNA的体内应用;2011年4月26日提交的61/517,784,其教导用于产生抗体多肽的工程化的核酸;2011年5月17日提交的61/519,158,其教导mmRNA技术的兽医学应用;2011年9月12日提交的61/533,537,其教导mmRNA技术的抗微生物应用;2011年9月12日提交的61/533,554,其教导mmRNA技术的病毒应用;2011年10月3日提交的61/542,533,其教导用于在mmRNA技术中使用的各种化学修饰;2011年12月14日提交的61/570,690,其教导用于在制作或使用mmRNA技术中使用的可移动装置;2011年12月14日提交的61/570,708,其教导mmRNA在急症护理状况中的用途;2011年12月16日提交的61/576,651,其教导mmRNA的末端修饰构造;2011年12月16日提交的61/576,705,其教导使用mmRNA的脂质体的递送方法;2011年12月21日提交的61/578,271,其教导使用mmRNA来增加器官或组织的存活力的方法;2011年12月29日提交的61/581,322,其教导编码细胞穿透肽的mmRNA;2011年12月29日提交的61/581,352,其教导中细胞毒性核苷的并入以及2012年1月10日提交的61/631,729,其教导使用mmRNA用于穿过血脑屏障的方法;所述专利申请都以引用的方式整体并入本文。

[0082] 本文部分地提供编码目标多肽的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA,所述多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA已经被设计成改进以下中的一项或多项:在组织中的稳定性和/或清除率、受体摄取和/或动力学、组合物的细胞通路、与翻译机器的接合、mRNA半衰期、翻译效率、免疫逃避、蛋白质产生能力、分泌效率(适用时)、循环的可及性、蛋白质半衰期和/或细胞状态、功能和/或活性的调节。

[0083] I.本发明的组合物(mmRNA)

[0084] 本发明提供编码一种或多种目标多肽的核酸分子,具体地说多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。术语“核酸”在其广义上包括包含核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。这些聚合物经常被称为多核苷酸。本发明的示例性核酸或多核苷酸包括但不限于,核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA,包括具有β-D-核糖构型的LNA、具有α-L-核糖构型的α-LNA(LNA的非对映体)、具有2′-氨基官能化的2′-氨基-LNA以及具有2′-氨基官能化的2′-氨基-α-LNA)或其杂合体。

[0085] 在优选实施方案中,核酸分子是信使RNA(mRNA)。如本文所用,术语“信使RNA”(mRNA)是指编码目标多肽并且能够被翻译以在体外、体内、原位或离体产生编码的目标多肽的任何多核苷酸。

[0086] 传统上,mRNA分子的基本组分至少包括编码区、5′UTR、3′UTR、5′帽以及poly-A尾。基于这种野生型模块结构,本发明通过提供多核苷酸或初级RNA构建体扩展了传统mRNA分子的功能性的范围,所述多核苷酸或初级RNA构建体维持模块组织但包含一种或多种结构和/或化学修饰或改变,所述修饰或改变赋予所述多核苷酸有用的特性,在一些实施方案中所述特性包括被引入多核苷酸的细胞的先天性免疫应答的实质性诱导的缺乏。如此,本发明的修饰mRNA分子被称为“mmRNA”。如本文所用,“结构”特征或修饰是其中两个或更多个连接核苷酸在多核苷酸、初级构建体或mmRNA中插入、缺失、复制、反转或随机化而无对所述核苷酸本身的显著化学修饰的特征或修饰。因为要实现结构修饰就必须使化学键断裂并重新形成,所以结构修饰具有化学性质并因此是化学修饰。然而,结构修饰将产生不同的核苷酸序列。例如,多核苷酸“ATCG”可化学修饰成“AT-5meC-G”。同一多核苷酸可从“ATCG”结构修饰成“ATCCCG”。在此,已插入二核苷酸“CC”,从而产生对多核苷酸的结构修饰。

[0087] mmRNA构造

[0088] 本发明的mmRNA在其功能和/或结构设计特征上不同于野生型mRNA，所述功能和/或结构特征如本文所证明用于克服使用基于核酸的治疗剂的有效多肽产生的现有问题。

[0089] 图1示出本发明的代表性多核苷酸初级构建体100。如本文所用，术语“初级构建体”或“初级mRNA构建体”是指编码一种或多种目标多肽并且保留足够结构和/或化学特征以允许翻译其中编码的目标多肽的多核苷酸转录物。初级构建体可以是本发明的多核苷酸。当结构上或化学上修饰时，初级构建体可被称为mmRNA。

[0090] 参见图1，初级构建体100在此包含连接核苷酸的第一区102，所述第一区102由第一侧翼区104和第二侧翼区106侧接。如本文所用，“第一区”可被称为“编码区”或“编码……的区”或简单地“第一区”。这个第一区可包括但不限于编码的目标多肽。目标多肽可在其5’末端包含由信号序列区103编码的一个或多个信号序列。侧翼区104可包含连接核苷酸的包含一个或多个完整或不完整5′UTR序列的区。侧翼区104还可包含5′末端帽108。第二侧翼区106可包含连接核苷酸的包含一个或多个完整或不完整3′UTR的区。侧翼区106还可包含3′加尾序列110。

[0091] 第一操作区105使第一区102的5′端与第一侧翼区104桥接。传统上这个操作区包含起始密码子。操作区或者可包含含有起始密码子的任何翻译起始序列或信号。

[0092] 第二操作区107使第一区102的3′端与第二侧翼区106桥接。传统上这个操作区包含终止密码子。操作区或者可包含含有终止密码子的任何翻译起始序列或信号。根据本发明，还可使用多个连续终止密码子。

[0093] 一般来说，本发明的初级构建体的第一区的最短长度可以是足以编码二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽或十肽的核酸序列的长度。在另一个实施方案中，所述长度可足以编码2至30个氨基酸，例如5至30、10至30、2至25、5至25、10至25或10至20个氨基酸的肽。所述长度可足以编码至少11、12、13、14、15、17、20、25或30个氨基酸的肽，或不超过40个氨基酸，例如不超过35、30、25、20、17、15、14、13、12、11或10个氨基酸的肽。多核苷酸序列可编码的二肽的实例包括但不限于肌肽和鹅肌肽(anserine)。

[0094] 通常，编码本发明的目标多肽的第一区的长度大于约30个核苷酸(例如，至少或大于约35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、和3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000或多达并包括100,000个核苷酸)。如本文所用，“第一区”可被称为“编码区”或“编码……的区”或简单地“第一区”。

[0095] 在一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括约30至约100,000个核苷酸(例如，30至50、30至100、30至250、30至500、30至1,000、30至1,500、30至3,000、30至5,000、30至7,000、30至10,000、30至25,000、30至50,000、30至70,000、100至250、100至500、100至1,000、100至1,500、100至3,000、100至5,000、100至7,000、100至10,000、100至25,000、100至50,000、100至70,000、100至100,000、500至1,000、500至1,500、500至2,000、500至3,000、500至5,000、500至7,000、500至10,000、500至25,000、500至50,000、500至70,000、500至100,000、1,000至1,500、1,000至2,000、1,000至3,000、1,000至5,000、1,000至7,000、1,000至10,000、1,000至25,000、1,000至50,000、1,000至70,000、1,000至100,000、

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

[0096] 根据本发明,第一侧翼区和第二侧翼区的长度可独立地在15至1,000个核苷酸范围内(例如,大于30、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800和900个核苷酸,或至少30、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900和1,000个核苷酸)。

[0097] 根据本发明,加尾序列的长度可在不存在至500个核苷酸范围内(例如,至少60、70、80、90、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450或500个核苷酸)。在加尾区是polyA尾的情况下,所述长度可以polyA结合蛋白结合的单位或作为polyA结合蛋白结合的函数来确定。在这个实施方案中,polyA尾足够长以结合polyA结合蛋白的至少4个单体。polyA结合蛋白单体结合大约38个核苷酸的段。如此,已观察到约80个核苷酸和160个核苷酸的polyA尾是功能性的。

[0098] 根据本发明,加帽区可包含单个帽或形成帽的一系列核苷酸。在这个实施方案中,加帽区的长度可以是1至10,例如2至9、3至8、4至7、1至5、5至10或至少2或10或更少个核苷酸。在一些实施方案中,帽不存在。

[0099] 根据本发明,第一操作区和第二操作区可在3至40,例如5至30、10至20、15或至少4或30或更少个核苷酸的长度范围内,并且可另外包含起始和/或终止密码子、一个或多个信号序列和/或限制序列。

[0100] 环状mmRNA

[0101] 根据本发明,可使初级构建体或mmRNA环化或连环化(concatemerized),以产生有翻译能力的分子来帮助聚-A结合蛋白与5′端结合蛋白之间的相互作用。环化或连环化的机制可通过至少3种不同的途径发生:1)化学,2)酶,以及3)核酶催化。新形成的5′-/3′-键联可以是分子内或分子间的。

[0102] 在第一途径中,核酸的5′端和3′端包含当靠近时在分子的5′端与3′端之间形成新的共价键联的化学反应性基团。5′端可包含NHS-酯反应性基团并且3′端可包含3′-氨基封端的核苷酸,以使得在有机溶剂中合成mRNA分子的3′端上的3′-氨基封端的核苷酸将经历5′-NHS-酯部分上的亲核攻击,从而形成新的5′-/3′-酰胺键。

[0103] 在第二途径中,T4RNA连接酶可用于将5′-磷酸化的核酸分子酶连接至核酸的3′-羟基端,从而形成新的磷酸二酯键联。在示例反应中,根据制造商的方案将1μg核酸分子与1至10单位的T4RNA连接酶(New England Biolabs,Ipswich,MA)在37℃下孵育1小时。连接反应可在存在能够与并列的5′-和3′-区两者碱基配对以帮助酶连接反应的分离寡核苷酸的情况下发生。

[0104] 在第三途径中,cDNA模板的5′-或3′-端编码连接酶核酶序列,以使得在体外转录过程中,所得核酸分子可包含能够将核酸分子的5′端连接至核酸分子的3′端的活性核酶序列。连接酶核酶可源自I组内含子、I组内含子、丁型肝炎病毒、发夹状核酶或可通过SELEX(指数富集的配体系统进化技术)选择。核酶连接酶反应可在0℃与37℃之间的温度下进行1至24小时。

[0105] mmRNA多聚体

[0106] 根据本发明，多种不同的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可使用在3′端修饰的核苷酸通过3′端连接在一起。化学缀合可用于控制递送至细胞中的化学计量学。例如，可将乙醛酸循环酶，即异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶以1:1比例供应至HepG2细胞中以改变细胞脂肪酸代谢。这一比例可通过使用一个多核苷酸、初级构建体或mmRNA物种上的3′-叠氮基封端的核苷酸和相对的多核苷酸、初级构建体或mmRNA物种上的含有C5-乙炔基或炔基的核苷酸化学连接多核苷酸、初级构建体或mmRNA进行控制。根据制造商的方案使用末端转移酶(New England Biolabs,Ipswich,MA)在转录后添加修饰核苷酸。在添加3′-修饰核苷酸之后，两个多核苷酸、初级构建体或mmRNA物种可在存在或不存在铜的情况下组合在水溶液中，以便经由如文献中所描述的点击化学机制形成新的共价键联。

[0107] 在另一个实例中，可使用官能化的接头分子将多于两个多核苷酸连接在一起。例如，官能化的糖分子可被化学修饰成包含多个化学反应性基团(SH-、NH_2-、N_3等)以便与3′-官能化的mRNA分子上的同源部分(即3′-马来酰亚胺酯、3′-NHS-酯、炔基)反应。所修饰的糖上的反应性基团的数目可以化学计量方式进行控制，以便直接控制缀合的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的化学计量比例。

[0108] mmRNA缀合物和组合

[0109] 为了进一步增强蛋白质产生，本发明的初级构建体或mmRNA可被设计成与以下各项缀合：其它多核苷酸、染料、嵌入剂(intercalatingagent)(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素(psoralene)、丝裂霉素C)、卟啉类(TPPC4、德克萨卟啉(texaphyrin)、噻啉(Sapphyrin))、多环芳香烃(例如吩嗪、二氢吩嗪)、人工内切核酸酶(例如EDTA)、烷化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的标志物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶、蛋白质(例如糖蛋白)或肽(例如具有针对共配体的特异性亲和力的分子)或抗体(例如结合指定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞的抗体)、激素和激素受体，非肽物种如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅助因子或药物。

[0110] 缀合可产生增加的稳定性和/或半衰期并且可特别适用于使多核苷酸、初级构建体或mmRNA靶向细胞、组织或器官中的特定位点。

[0111] 根据本发明，mmRNA或初级构建体可与以下中的一种或多种一起施用或进一步编码以下中的一种或多个：RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、miRNA结合位点、反义RNA、核酶、催化性DNA、tRNA、诱导三螺旋形成的RNA、适体或载体等。

[0112] 双功能mmRNA

[0113] 在本发明的一个实施方案中，是双功能多核苷酸(例如，双功能初级构建体或双功能mmRNA)。顾名思义，双功能多核苷酸是具有或能够有至少两种功能的那些多核苷酸。这些分子还可根据惯例被称为多功能的。

[0114] 双功能多核苷酸的多重功能性可由RNA编码(所述功能可能直到编码的产物被翻译才显现)或可以是多核苷酸本身的特性。它可以是结构的或化学的。双功能修饰多核苷酸可包含与多核苷酸共价或静电缔合的功能。此外，两种功能可在mmRNA与另一种分子的复合物的背景下提供。

[0115] 双功能多核苷酸可编码抗增殖性的肽。这些肽可以是线性的、环状的、约束的或无规卷曲的。它们可充当适体、信号传导分子、配体或其模拟物或拟态物。抗增殖肽在翻译时

长度可以是3至50个氨基酸。它们可以是5至40、10至30或大约15个氨基酸长。它们可以是单链、多链或支链的并且一旦被翻译可形成复合物、聚集体或任何多单位结构。

[0116] 非编码多核苷酸和初级构建体

[0117] 如本文所描述，提供具有为部分可翻译或大体上不可翻译的序列，例如具有非编码区的多核苷酸和初级构建体。这种非编码区可以是初级构建体的“第一区”。或者，非编码区可以是不同于所述第一区的区。这类分子通常不被翻译，但能够通过结合和螯合一种或多种翻译机器组分(如核糖体蛋白或转移RNA(tRNA))中的一种或多种对蛋白质产生发挥作用，从而有效地减少细胞中的蛋白质表达或调节细胞中的一种或多种途径或级联，这进而改变蛋白质水平。多核苷酸或初级构建体可包含或编码一种或多种长的非编码RNA(lncRNA或lincRNA)或其部分、小核仁RNA(sno-RNA)、微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)或Piwi-相互作用RNA(piRNA)。

[0118] 目标多肽

[0119] 根据本发明，初级构建体被设计成编码一种或多种目标多肽或其片段。目标多肽可包括但不限于全多肽、多种多肽或多肽的片段，其独立地可由一种或多种核酸、多种核酸、核酸的片段或任何上述的变体编码。如本文所用，术语“目标多肽”是指被选择来在本发明的初级构建体中编码的任何多肽。如本文所用，“多肽”意指最经常通过肽键连接在一起的氨基酸残基(天然或不天然的)的聚合物。如本文所用，所述术语是指具有任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。在一些情况下，编码的多肽小于约50个氨基酸并且所述多肽然后被称为肽。如果多肽是肽，那么它将是至少约2、3、4、或至少5个氨基酸残基长。因此，多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直向同源物、横向同源物、前述的片段和其它等效物、变体和类似物。多肽可以是单个分子或可以是多分子复合物如二聚物、三聚物或四聚物。它们还可包含单链或多链多肽如抗体或胰岛素并且可以是缔合的或连接的。最常见地，在多链多肽中发现二硫键。术语多肽还可应用于氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在氨基酸的人工化学类似物。

[0120] 术语“多肽变体”是指在其氨基酸序列方面与天然或参考序列不同的分子。与天然或参考序列相比，氨基酸序列变体可具有在氨基酸序列内的某些位置处的取代、缺失和/或插入。通常，变体将与天然或参考序列具有至少约50％同一性(同源性)，并且优选地它们将与天然或参考序列至少约80％、更优选至少约90％相同(同源)。

[0121] 在一些实施方案中，提供“变体模拟物”。如本文所用，术语“变体模拟物”是包含将模拟所激活的序列的一个或多个氨基酸的一种变体模拟物。例如，谷氨酸可用作磷-苏氨酸和/或磷-丝氨酸的模拟物。或者，变体模拟物可引起去活或含有模拟物的灭活产物，例如，苯丙氨酸可充当酪氨酸的灭活取代;或丙氨酸可充当丝氨酸的灭活取代。

[0122] “同源性”在其应用于氨基酸序列时被定义为在比对序列并在必要时引入空位以实现最大百分比同源性之后，候选氨基酸序列中与第二序列的氨基酸序列中的残基相同的残基百分比。用于比对的方法和计算机程序是本领域熟知的。应理解同源性取决于百分比同一性的计算，但由于引入计算中的空位和罚分可能得到不同的值。

[0123] “同源物”在其应用于多肽序列时意指与第二物种的第二序列具有实质同一性的其它物种的对应序列。

[0124] “类似物”意欲包括因一个或多个氨基酸改变(例如，氨基酸残基的取代、添加或缺

失)而不同但仍维持亲本或起始多肽的一种或多种特性的多肽变体。

[0125] 本发明考虑为基于多肽的几种类型的组合物,包括变体和衍生物。这些包括取代、插入、缺失和共价变体和衍生物。术语“衍生物”与术语“变体”同义地使用,但通常是指已经相对于参考分子或起始分子以任何方式修饰和/或改变的分子。

[0126] 如此,编码相对于参考序列,具体地说本文所公开的多肽序列含有取代、插入和/或添加、缺失和共价修饰的多肽的mmRNA包括在本发明的范围内。例如,序列标签或氨基酸(如一个或多个赖氨酸)可添加至本发明的肽序列(例如,在N末端或C末端处)。序列标签可用于肽纯化或定位。赖氨酸可用于增加肽溶解度或允许生物素化。或者,位于肽或蛋白质的氨基酸序列的羧基和氨基末端区处的氨基酸残基可任选地被缺失,从而提供截短序列。某些氨基酸(例如,C末端或N末端残基)可替代地被缺失,这取决于序列的使用,例如作为可溶或连接至固相支持物的较大序列的一部分的序列的表达。

[0127] 当提及多肽时“取代变体”是天然或起始序列中的至少一个氨基酸残基被去除并且在其同一位置处的位置中插入不同的氨基酸的多肽。取代可以是单一的,其中分子中的仅一个氨基酸已被取代;或取代可以是多重的,其中同一分子中的两个或更多个氨基酸已被取代。

[0128] 如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是指通常存在于序列中的氨基酸被具有类似大小、电荷或极性的不同氨基酸取代。保守取代的实例包括非极性(疏水性)残基如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸取代另一种非极性残基。同样,保守取代的实例包括一种极性(亲水性)残基取代另一种,如精氨酸与赖氨酸之间、谷氨酰胺与天冬酰胺之间和甘氨酸与丝氨酸之间。另外,碱性残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代另一种碱性残基、或一种酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸取代另一种酸性残基是保守取代的另外实例。非保守取代的实例包括非极性(疏水性)氨基酸残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸取代极性(亲水性)残基如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸,和/或极性残基取代非极性残基。

[0129] 当提及多肽时“插入变体”是具有紧邻天然或起始序列中的特定位置处的氨基酸插入的一个或多个氨基酸的那些变体。“紧邻”氨基酸意指连接至所述氨基酸的α-羧基或α-氨基官能团。

[0130] 当提及多肽时“缺失变体”是天然或起始氨基酸序列中的一个或多个氨基酸被去除的那些变体。通常,缺失变体将使一个或多个氨基酸在分子的特定区中缺失。

[0131] 当提及多肽时“共价衍生物”包括用有机蛋白质或非蛋白质衍生化试剂修饰天然或起始蛋白质,和/或翻译后修饰。传统上通过使蛋白质的靶标氨基酸残基与能够与选定侧链或末端残基反应的有机衍生化试剂反应,或通过利用在选定重组宿主细胞中起作用的翻译后修饰的机制来引入共价修饰。所得共价衍生物适用于旨在鉴别对于生物活性、对于免疫测定或对于制备用于重组糖蛋白的免疫亲和纯化的抗蛋白质抗体来说重要的残基的程序中。这类修饰在本领域普通技术的范围内并且在无过度实验的情况下进行。

[0132] 某些翻译后修饰是重组宿主细胞对所表达多肽的作用的结果。谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基经常在翻译后脱去酰氨基成对应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基。或者,这些残基在温和酸性条件下脱去酰氨基。这些残基的任一形式可存在于根据本发明产生的多肽中。

[0133] 其它翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基

的磷酸化，赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的α-氨基的甲基化(T.E.Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties,W.H.Freeman&Co.,San Francisco,第79-86页(1983))。

[0134] 当提及多肽时“特征”被定义为分子的基于氨基酸序列的不同组分。由本发明的mmRNA编码的多肽的特征包括表面表观、局部构象形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。

[0135] 如本文所用当提及多肽时，术语“表面表观”是指蛋白质的出现在最外表面上的基于多肽的组分。

[0136] 如本文所用，当提及多肽时术语“局部构象形状”是指蛋白质的位于其可限定空间内的基于多肽的结构表观。

[0137] 如本文所用当提及多肽时，术语“折叠”是指在能量最低化时氨基酸序列的所得构象。折叠可在折叠过程的二级或三级水平下发生。二级水平折叠的实例包括β折叠和α螺旋。三级折叠的实例包括由于高能力的聚集或分离形成的结构域和区。以这种方式形成的区包括疏水袋和亲水袋等。

[0138] 如本文所用，术语“转角”在其涉及蛋白质构象时意指使肽或多肽的主链方向改变的弯曲并且可涉及一个、两个、三个或更多个氨基酸残基。

[0139] 如本文所用，当提及多肽时，术语“环”是指可用于使肽或多肽的主链方向反向的多肽的结构特征。当环在多肽中存在并且仅改变主链的方向时，它可包含四个或更多个氨基酸残基。Oliva等人已经鉴别了至少5类蛋白质环(J.Mol Biol 266(4):814-830;1997)。环可以是开放的或闭合的。闭合的环或“环状”环可在桥接部分之间包含2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸。这类桥接部分可包含在具有二硫桥的多肽中典型的半胱氨酸-半胱氨酸桥(Cys-Cys)，或可替代地桥接部分可以是基于非蛋白质的，如本文所使用的dibromozylyl试剂。

[0140] 如本文所用，当提及多肽时术语“半环”是指所鉴别的环的一部分，所述部分具有其所衍生自的环的至少一半数目的氨基酸残基。应理解，环可能不总是包含偶数数目的氨基酸残基。因此，在环包含或被鉴别为包含奇数数目的氨基酸的那些情况下，奇数数目的环的半环将包含所述环的整数部分或下一个整数部分(所述环的氨基酸的数目/2+/-0.5个氨基酸)。例如，被鉴别为7个氨基酸环的环可产生3个氨基酸或4个氨基酸的半环(7/2＝3.5+/-0.5为3或4)。

[0141] 如本文所用，当提及多肽时术语“结构域”是指具有一种或多种可鉴别的结构或功能特征或特性(例如，结合能力，用作蛋白质-蛋白质相互作用的位点)的多肽的基序。

[0142] 如本文所用，当提及多肽时术语“半结构域”意指鉴别的结构域的一部分，所述部分具有其所衍生自的结构域的至少一半数目的氨基酸残基。应理解结构域可能不总是包含偶数数目的氨基酸残基。因此，在结构域包含或被鉴别为包含奇数数目的氨基酸的那些情况下，奇数数目的结构域的半结构域将包含所述结构域的整数部分或下一个整数部分(所述结构域的氨基酸的数目/2+/-0.5个氨基酸)。例如，被鉴别为7个氨基酸结构域的结构域可产生3个氨基酸或4个氨基酸的半结构域(7/2＝3.5+/-0.5为3或4)。还应理解，可在结构域或半结构域内鉴别亚结构域，这些亚结构域拥有少于其所衍生自的结构域或半结构域中鉴别出的所有结构或功能特性。还应理解，包含本文的任何结构域类型的氨基酸不必是沿

多肽的主链连续的(即,不相邻的氨基酸可在结构上折叠以产生结构域、半结构域或亚结构域)。

[0143] 如本文所用,当提及多肽时术语“位点”在其涉及基于氨基酸的实施方案时与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义地使用。位点表示肽或多肽内的可在本发明的基于多肽的分子内修饰、操纵、改变、衍生化或变化的位置。

[0144] 如本文所用,术语“末端(termini)”或“末端(terminus)”当提及多肽时是指肽或多肽的末尾。这种末尾不仅仅限于肽或多肽的第一或最后位点,而且可包括末端区中的另外氨基酸。本发明的基于多肽的分子可被表征为具有N末端(由具有自由氨基(NH2)的氨基酸封端)和C末端(由具有自由羧基(COOH)的氨基酸封端)两者。本发明的蛋白质在一些情况下由通过二硫键或通过非共价力(多聚体、低聚物)集合在一起的多个多肽链组成。这些种类的蛋白质将具有多个N末端和C末端。或者,多肽的末端可进行修饰以使得它们根据情况以基于非多肽的部分(如有机缀合物)开始或结束。

[0145] 一旦任何特征已被鉴别或定义为待由本发明的初级构建体或mmRNA编码的多肽的所需组分,便可通过移动、交换、反转、缺失、随机化或复制来进行这些特征的若干操纵和/或修饰中的任何一种。此外,应理解特征的操纵可产生与对本发明分子的修饰相同的结果。例如,涉及使结构域缺失的操纵将产生正如修饰核酸以编码小于全长分子将产生的那样的分子长度的改变。

[0146] 修饰和操纵可通过本领域已知的方法来实现,例如但不限于定点诱变。然后可使用体外或体内测定(如本文所描述的那些)或本领域已知的任何其它合适的筛选测定来测试所得到的修饰分子的活性。

[0147] 根据本发明,多肽可包含通过多轮实验发现的共有序列。如本文所用,“共有”序列是表示允许一个或多个位点处的变异性的序列集合群体的单个序列。

[0148] 如本领域技术人员所认识到,蛋白质片段、功能性蛋白质结构域和同源蛋白质也被认为在本发明的目标多肽的范围内。例如,本文提供长度为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或大于100个氨基酸的参考蛋白质的任何蛋白质片段(意指比参考多肽序列短至少一个氨基酸残基但在其它方面相同的多肽序列)。在另一个实例中,可根据本发明使用包含与本文所描述的任何序列为约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或约100%相同的具有约20、约30、约40、约50或约100个氨基酸的段的任何蛋白质。在某些实施方案中,待根据本发明使用的多肽包含2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个突变,如本文所提供或提及的任何序列中所示。

[0149] 编码的多肽

[0150] 本发明的初级构建体或mmRNA可被设计成编码选自若干靶标类别中的任何一种的目标多肽,所述靶标类别包括但不限于生物制剂、抗体、疫苗、治疗性蛋白质或肽、细胞穿透肽、分泌性蛋白、质膜蛋白、细胞质或细胞骨架蛋白、细胞内膜结合蛋白、核蛋白、与人类疾病相关的蛋白质、靶向部分或由人基因组编码的那些蛋白质,针对所述蛋白质还未鉴别出治疗适应症但所述蛋白质仍然在研究和发现领域中具有效用。

[0151] 在一个实施方案中,初级构建体或mmRNA可编码与参考多肽序列具有一定同一性的变体多肽。如本文所用,“参考多肽序列”是指起始多肽序列。参考序列可以是野生型序列或在设计另一序列中所参考的任何序列。“参考多肽序列”可以是例如任一蛋白质序列,所

述任一蛋白质序列列于共同待决的以下各案的表6中:2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics的美国临时专利申请号61/618,862、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics的美国临时专利申请号61/681,645、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics美国临时专利申请号61/737,130、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/618,866、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/681,647、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/737,134、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/618,868、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/681,648、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/737,135、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/618,873、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/681,650、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/737,147、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/618,878、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/681,654、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/737,152、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/618,885、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/681,658、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/737,155、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/618,896、2012年7月5日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/668,157、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/681,661、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/737,160、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/618,911、2012年8

月10日提交的,名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/681,667、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/737,168、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/618,922、2012年8月10日提交的,名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/681,675、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/737,174、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,935、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/681,687、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,184、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,945、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/681,696、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,191、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,953、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease美国临时专利申请号61/681,704、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,203、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics and Proteins Associated with Human Disease的国际申请号PCT/US2013/030062、名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的国际申请号PCT/US2013/030064、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Membrane Proteins的国际申请号PCT/US2013/030059、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的国际申请号PCT/US2013/030066、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的国际申请号PCT/US2013/030067、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的国际申请号PCT/US2013/030060、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的国际申请号PCT/US2013/030061;共同待决的以下各案的表6和7中:2012年8月10日提交的,名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的美国临

时专利申请号61/681,720、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/737,213、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/681,742、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030070;共同待决的以下案的表6、178和179中:2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030068;共同待决的以下案的表6、28和29中:2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/618,870;共同待决的以下案的表6、56和57中:2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/681,649;共同待决的以下案的表6、186和187中:2012年12月14日提交的Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/737,139;以及共同待决的以下案的表6、185和186中:2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides的国际申请号PCT/US2013/030063;所述申请各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0152] 如本领域已知的术语“同一性”是指如通过比较序列确定的两个或更多个肽的序列之间的关系。在本领域中,同一性还意指如通过具有两个或更多个氨基酸残基的串之间的匹配数目确定的肽之间的序列相关性程度。同一性测度通过特定数学模型或计算机程序(即“算法”)解决的具有空位比对(如果存在)的两个或更多个序列之间较小者的相同匹配的百分比。相关肽的同一性可通过已知方法容易地计算。这类方法包括但不限于以下中描述的那些:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编辑,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编辑,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,第1部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,M.Stockton Press,New York,1991;和Carillo等人,SIAM J.Applied Math.48,1073(1988)。

[0153] 在一些实施方案中,多肽变体可具有与参考多肽相同或类似的活性。或者,变体可相对于参考多肽具有改变的活性(例如,增加的或减少的)。通常,本发明的特定多核苷酸或多肽的变体将与所述特定参考多核苷酸或多肽具有至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%的序列同一性,如通过本文所描述的和本领域技术人员已知的序列比对程序和参数确定的。用于比对的这类工具包括BLAST套件的那些(Stephen F.Altschul,Thomas L.Madden,Alejandro A.Schäffer,Jinghui Zhang,Zheng Zhang,Webb Miller,和David J.Lipman(1997),"Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs",Nucleic Acids Res.25:3389-3402.)。其它工具在本文、具体地在“同一性”的定义中进行描述。

[0154] BLAST算法中的缺省参数包括例如，预期阈值10、字长28、匹配/错配得分1、-2，空位损失线性。可应用任何滤波器以及选择物种特异性重复序列，例如智人。

[0155] 生物制剂

[0156] 本文所公开的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码一种或多种生物制剂。如本文所用，“生物制剂”是通过本文所提供的方法产生的并且可用于治疗、治愈、减轻、预防或诊断严重的或威胁生命的疾病或医学病状的基因多肽的分子。根据本发明生物制剂包括但不限于，过敏原提取物(例如用于过敏疫苗注射(allergy shot)和测试)、血液组分、基因疗法产物、移植中使用的人组织或细胞产物、疫苗、单克隆抗体、细胞因子、生长因子、酶、溶血栓剂和免疫调节剂等。

[0157] 根据本发明，当前市售或处于研发中的一种或多种生物制剂可由本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码。虽然不希望受理论束缚，但据信将已知生物制剂的编码多肽并入到本发明的初级构建体或mmRNA中将产生改善的治疗功效，这种改善的治疗功效至少部分地归因于构建体设计的特异性、纯度和/或选择性。

[0158] 抗体

[0159] 本文所公开的初级构建体或mmRNA可编码一种或多种抗体或其片段。术语“抗体”包括单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如，双特异性抗体、双抗体和单链分子)以及抗体片段。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文可与“抗体”互换使用。如本文所用，术语“单克隆抗体”是指从大体上同质抗体的群体获得的抗体，即构成所述群体的单独抗体是相同的，除了可能以微量存在的可能的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如，异构化，酰胺化)。单克隆抗体是高度特异性的，从而针对单一抗原位点。

[0160] 本文的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)，其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源，而所述链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这类抗体的片段中的对应序列相同或同源，只要它们表现出所需的生物活性。本文的目标嵌合抗体包括但不限于包含源自非人灵长类动物(例如，旧世界猴、猿等)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0161] “抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选地所述完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab’、$F(ab')_2$和Fv片段；双抗体；线性抗体；纳米抗体(nanobodies)；从抗体片段形成的单链抗体分子和多特异性抗体。

[0162] 五类免疫球蛋白IgA、IgD、IgE、IgG和IgM中的任何一种可由本发明的mmRNA编码，包括分别指定为α、δ、ε、λ和μ的重链。还包括编码亚类γ和μ的多核苷酸序列。因此抗体亚类中的任何一种可被部分或整体地编码并且包括以下亚类：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0163] 根据本发明，当前市售或处于研发中的一种或多种抗体或片段可由本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码。虽然不希望受理论束缚，但据信并入到本发明的初级构建体中将产生改善的治疗功效，这种改善的治疗功效至少部分地归因于mmRNA设计的特异性、纯度和选择性。

[0164] 在本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA中编码的抗体可用于治疗许多治疗领

域中的病状或疾病，所述治疗领域例如但不限于血液、心血管、CNS、中毒(包括抗蛇毒素)、皮肤病学、内分泌学、胃肠、医学成像、肌肉骨骼、肿瘤学、免疫学、呼吸系统、感觉系统以及抗感染的治疗领域。

[0165] 在一个实施方案中，本文所公开的初级构建体或mmRNA可编码单克隆抗体和/或其变体。抗体的变体还可包括但不限于，取代变体、保守氨基酸取代、插入变体、缺失变体和/或共价变体。在一个实施方案中，本文所公开的初级构建体和/或mmRNA可编码免疫球蛋白Fc区。在另一个实施方案中，初级构建体和/或mmRNA可编码变体免疫球蛋白Fc区。作为非限制性实例，初级构建体和/或mmRNA可编码具有变体免疫球蛋白Fc区的抗体，如描述于以引用的方式整体并入本文的美国专利号8,217,147中。

[0166] 疫苗

[0167] 本文所公开的初级构建体或mmRNA可编码一种或多种疫苗。如本文所用，“疫苗”是改善对特定疾病或传染原的免疫性的生物制剂。根据本发明，当前市售或处于研发中的一种或多种疫苗可由本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码。虽然不希望受理论束缚，但据信并入到本发明的初级构建体或mmRNA中将产生改善的治疗功效，这种改善的治疗功效至少部分地归因于构建体设计的特异性、纯度和选择性。

[0168] 在本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA中编码的疫苗可用于治疗许多治疗领域中的病状或疾病，所述治疗领域例如但不限于心血管、CNS、皮肤病学、内分泌学、肿瘤学、免疫学、呼吸系统以及抗感染的治疗领域。

[0169] 治疗性蛋白质或肽

[0170] 本文所公开的初级构建体或mmRNA可编码一种或多种经验证的或“处于测试中的”治疗性蛋白质或肽。

[0171] 根据本发明，当前市售或处于研发中的一种或多种治疗性蛋白质或肽可由本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码。虽然不希望受理论束缚，但据信并入到本发明的初级构建体或mmRNA中将产生改善的治疗功效，这种改善的治疗功效至少部分地归因于构建体设计的特异性、纯度和选择性。

[0172] 在本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA中编码的治疗性蛋白质和肽可用于治疗许多治疗领域中的病状或疾病，所述治疗领域例如但不限于血液、心血管、CNS、中毒(包括抗蛇毒素)、皮肤病学、内分泌学、遗传学、泌尿生殖、胃肠、肌肉骨骼、肿瘤学和免疫学、呼吸系统、感觉系统以及抗感染的治疗领域。

[0173] 细胞穿透多肽

[0174] 本文所公开的初级构建体或mmRNA可编码一种或多种细胞穿透多肽。如本文所用，“细胞穿透多肽”或CPP是指可有助于分子的细胞摄取的多肽。本发明的细胞穿透多肽可包含一种或多种可检测标记。所述多肽可被部分地标记或全部完全地标记。所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA可完全、部分编码或完全不编码可检测标记。细胞穿透肽还可包括信号序列。如本文所用，“信号序列”是指在蛋白质翻译过程中结合在新生蛋白质的氨基末端处的氨基酸残基的序列。信号序列可用于信号传导细胞穿透肽的分泌。

[0175] 在一个实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA还可编码融合蛋白。融合蛋白可通过将带电荷的蛋白质可操作地连接至治疗性蛋白质来形成。如本文所用，“可操作地连接”是指当引入至细胞中时治疗性蛋白质和带电荷的蛋白质以允许表达复合物的这样

一种方式连接。如本文所用，“带电荷的蛋白质”是指携带正、负或总体中性的电荷的蛋白质。优选地，在融合蛋白的形成中治疗性蛋白质可共价地连接至带电荷的蛋白质。表面电荷与总或表面氨基酸的比可以是大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9。

[0176] 由多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码的细胞穿透多肽可在被翻译之后形成复合物。所述复合物可包含连接(例如共价连接)至细胞穿透多肽的带电荷的蛋白质。“治疗性蛋白质”是指当施用至细胞时具有治疗、诊断和/或预防性作用和/或引出所需的生物和/或药理学作用的蛋白质。

[0177] 在一个实施方案中，细胞穿透多肽可包含第一结构域和第二结构域。第一结构域可包含超电荷的多肽。第二结构域可包含蛋白质结合配偶体。如本文所用，“蛋白质结合配偶体”包括但不限于抗体及其功能性片段、支架蛋白或肽。细胞穿透多肽可进一步包含蛋白质结合配偶体的细胞内结合配偶体。细胞穿透多肽可能够从可引入多核苷酸、初级构建体或mmRNA的细胞分泌。细胞穿透多肽还可能够穿透第一细胞。

[0178] 在另一实施方案中，细胞穿透多肽能够穿透第二细胞。第二细胞可来自与第一细胞相同的区域，或它可来自不同的区域。所述区域可包括但不限于组织和器官。第二细胞还可位于第一细胞的近端或远端。

[0179] 在一个实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码可包含蛋白质结合配偶体的细胞穿透多肽。蛋白质结合配偶体可包括但不限于抗体、超电荷的抗体或功能性片段。所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA可引入至被引入了包含蛋白质结合配偶体的细胞穿透多肽的细胞中。

[0180] 分泌性蛋白

[0181] 人和其它真核细胞被膜再分成许多功能不同的隔室。每个膜界定的隔室或细胞器包含对于细胞器的功能来说必要的不同蛋白质。细胞使用“分选信号”(所述分选信号是位于蛋白质内的氨基酸基序)来使蛋白质靶向特定细胞器。

[0182] 被称为信号序列、信号肽或前导序列的一种类型的分选信号将一类蛋白质引导至被称为内质网(ER)的细胞器。

[0183] 通过信号序列靶向ER的蛋白质可作为分泌性蛋白被释放至细胞外空间中。类似地，停留在细胞膜上的蛋白质也可通过将蛋白质固持至膜的“接头”的蛋白水解裂解而分泌至细胞外空间中。虽然不希望受理论束缚，但本发明的分子可用于采用以上所描述的细胞运输。如此，在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达分泌性蛋白。分泌性蛋白可从本文所描述的那些或美国专利公布20100255574中的那些分泌，所述专利公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0184] 在一个实施方案中，这些可用于制造大量有价值的人基因产物。

[0185] 质膜蛋白

[0186] 在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达质膜的蛋白质。

[0187] 细胞质或细胞骨架蛋白

[0188] 在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达细胞质或细胞骨架蛋白。

[0189] 细胞内膜结合蛋白

[0190] 在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达细胞内膜结合蛋白。

[0191] 核蛋白

[0192] 在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达核蛋白。

[0193] 与人类疾病相关的蛋白质

[0194] 在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达与人类疾病相关的蛋白质。

[0195] 其它蛋白质

[0196] 在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达具有目前未知的治疗功能的蛋白质。

[0197] 靶向部分

[0198] 在本发明的一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA被提供来表达靶向部分。这些包括蛋白质结合配偶体或细胞表面上的受体，其用于使细胞在体内或体外靶向特定组织空间或与特定部分相互作用。合适的蛋白质结合配偶体包括但不限于抗体及其功能性片段、支架蛋白或肽。另外，多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用于指导脂质、碳水化合物或其它生物部分或生物分子的合成和细胞外定位。

[0199] 多肽文库

[0200] 在一个实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用于产生多肽文库。这些文库可由多核苷酸、初级构建体或mmRNA的群体的产生而产生，各自含有不同的结构或化学修饰设计。在这个实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA的群体可包含多种编码的多肽，包括但不限于抗体或抗体片段、蛋白质结合配偶体、支架蛋白以及本文所教导或本领域已知的其它多肽。在优选实施方案中，多核苷酸是本发明的初级构建体，包括可适用于直接引入至靶细胞或培养物中的mmRNA，所述靶细胞或培养物进而可合成编码的多肽。

[0201] 在某些实施方案中，可产生各自具有不同的氨基酸修饰的蛋白质的多种变体，并且对其进行测试以便确定就药物代谢动力学、稳定性、生物相容性和/或生物活性或生物物理学特性如表达水平而言最佳的变体。这种文库可包含10、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9或超过10^9个可能的变体(包括但不限于，一个或多个残基的取代、缺失和一个或多个残基的插入)。

[0202] 抗微生物多肽和抗病毒多肽

[0203] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可设计成编码一种或多种抗微生物肽(AMP)或抗病毒肽(AVP)。已经从广泛范围的动物例如但不限于微生物、无脊椎动物、植物、两栖动物、鸟、鱼以及哺乳动物分离并且描述了AMP和AVP(Wang等人，Nucleic Acids Res.2009;37(Database issue):D933-7)。例如，抗微生物多肽描述于以下各项中：抗微生物肽数据库(http://aps.unmc.edu/AP/main.php;Wang等人，Nucleic Acids Res.2009;37(Database issue):D933-7)、CAMP:Collection of Anti-Microbial Peptides(http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/);Thomas等人，Nucleic Acids Res.2010;38(Database issue):D774-80)、US 5221732、US 5447914、US 5519115、US 5607914、US 5714577、US 5734015、US 5798336、US 5821224、US 5849490、US 5856127、US 5905187、US

5994308、US 5998374、US 6107460、US 6191254、US 6211148、US 6300489、US 6329504、US 6399370、US 6476189、US 6478825、US 6492328、US 6514701、US 6573361、US 6573361、US 6576755、US 6605698、US 6624140、US 6638531、US 6642203、US 6653280、US 6696238、US 6727066、US 6730659、US 6743598、US 6743769、US 6747007、US 6790833、US 6794490、US 6818407、US 6835536、US 6835713、US 6838435、US 6872705、US 6875907、US 6884776、US 6887847、US 6906035、US 6911524、US 6936432、US 7001924、US 7071293、US 7078380、US 7091185、US 7094759、US 7166769、US 7244710、US 7314858以及US 7582301，所述文献的内容以引用的方式整体并入本文。

[0204] 本文所描述的抗微生物多肽可通过一种或多种包膜病毒(例如HIV，HCV)来阻断细胞融合和/或病毒进入。例如，抗微生物多肽可包含合成肽或由其组成，所述合成肽对应于病毒包膜蛋白(例如HIV-1gp120或gp41)的跨膜亚基的一个区，例如为至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个氨基酸的连续序列。HIV-1 gp120或gp41的氨基酸和核苷酸序列描述于例如Kuiken等人，(2008)."HIV Sequence Compendium,"Los Alamos National Laboratory中。

[0205] 在一些实施方案中，抗微生物多肽可与对应病毒蛋白质序列具有至少约75％、80％、85％、90％、95％、100％的序列同源性。在一些实施方案中，抗微生物多肽可与对应病毒蛋白质序列具有至少约75％、80％、85％、90％、95％或100％的序列同源性。

[0206] 在其它实施方案中，抗微生物多肽可包含合成肽或由其组成，所述合成肽对应于衣壳结合蛋白的结合结构域的一个区，例如为至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个氨基酸的连续序列。在一些实施方案中，抗微生物多肽可与衣壳结合蛋白的对应序列具有至少约75％、80％、85％、90％、95％或100％的序列同源性。

[0207] 本文所描述的抗微生物多肽可阻断蛋白酶二聚作用并且抑制病毒前蛋白(例如，HIV Gag-pol加工)裂解成功能性蛋白质，从而防止一种或多种包膜病毒(例如，HIV，HCV)的释放。在一些实施方案中，抗微生物多肽可与对应病毒蛋白质序列具有至少约75％、80％、85％、90％、95％、100％的序列同源性。

[0208] 在其它实施方案中，抗微生物多肽可包含合成肽或由其组成，所述合成肽对应于蛋白酶结合蛋白的结合结构域的一个区，例如为至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个氨基酸的连续序列。在一些实施方案中，抗微生物多肽可与蛋白酶结合蛋白的对应序列具有至少约75％、80％、85％、90％、95％或100％的序列同源性。

[0209] 本文所描述的抗微生物多肽可包括针对病毒病原体的体外进化的多肽。

[0210] 抗微生物多肽

[0211] 抗微生物多肽(AMP)是具有可变长度、序列和结构的小肽，所述小肽具有针对包括但不限于细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒和肿瘤/癌细胞的广泛范围微生物的广谱活性。(参见，例如Zaiou,J Mol Med,2007;85:317;以引用的方式整体并入本文)。已显示AMP具有广谱的快速起效的杀伤活性，连同潜在低水平的诱导抗性和伴随的广泛抗炎作用。

[0212] 在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如，抗细菌多肽)可少于10kDa，例如少于8kDa、6kDa、4kDa、2kDa或1kDa。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)由约6至约100个氨基酸，例如约6至约75个氨基酸、约6至约50个氨基酸、约6至约25个氨基酸、约

25至约100个氨基酸、约50至约100个氨基酸、或约75至约100个氨基酸组成。在某些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可由约15至约45个氨基酸组成。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)是大体上阳离子性的。

[0213] 在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是大体上两亲性的。在某些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是大体上阳离子性的和两亲性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是针对革兰氏阳性细菌为细胞生长抑制性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是针对革兰氏阳性细菌为细胞毒性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是针对革兰氏阳性细菌为细胞生长抑制性的和细胞毒性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是针对革兰氏阴性细菌为细胞生长抑制性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是针对革兰氏阴性细菌为细胞毒性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是针对革兰氏阳性细菌为细胞生长抑制性的和细胞毒性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽可以是针对病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合为细胞生长抑制性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽可以是针对病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合为细胞毒性的。在某些实施方案中，抗微生物多肽可以是针对病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合为细胞生长抑制性的和细胞毒性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽可以是针对肿瘤或癌细胞(例如人肿瘤和/或癌细胞)为细胞毒性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽可以是针对肿瘤或癌细胞(例如人肿瘤和/或癌细胞)为细胞生长抑制性的。在某些实施方案中，抗微生物多肽可以是针对肿瘤或癌细胞(例如人肿瘤或癌细胞)为细胞毒性的和细胞生长抑制性的。在一些实施方案中，抗微生物多肽(例如抗细菌多肽)可以是分泌性多肽。

[0214] 在一些实施方案中，抗微生物多肽包含防御素或由其组成。示例性防御素包括但不限于α-防御素(例如，中性粒细胞防御素1、防御素α1、中性粒细胞防御素3、中性粒细胞防御素4、防御素5、防御素6)、β-防御素(例如，β-防御素1、β-防御素2、β-防御素103、β-防御素107、β-防御素110、β-防御素136)和θ-防御素。在其它实施方案中，抗微生物多肽包含凯萨林菌素(cathelicidin)(例如，hCAP18)或由其组成。

[0215] 抗病毒多肽

[0216] 抗病毒多肽(AVP)是具有可变长度、序列和结构的小肽，所述小肽具有针对广泛范围的病毒的广谱活性。参见，例如Zaiou,J Mol Med,2007;85:317。已显示AVP具有广谱的快速起效的杀伤活性，连同潜在低水平的诱导抗性和伴随的广泛抗炎作用。在一些实施方案中，抗病毒多肽少于10kDa，例如少于8kDa、6kDa、4kDa、2kDa或1kDa。在一些实施方案中，抗病毒多肽包含约6至约100个氨基酸，例如约6至约75个氨基酸、约6至约50个氨基酸、约6至约25个氨基酸、约25至约100个氨基酸、约50至约100个氨基酸、或约75至约100个氨基酸或由其组成。在某些实施方案中，抗病毒多肽包含约15至约45个氨基酸或由其组成。在一些实施方案中，抗病毒多肽是大体上阳离子性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是大体上两亲性的。在某些实施方案中，抗病毒多肽是大体上阳离子性的和两亲性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是针对病毒为细胞生长抑制性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是针对病毒为细胞毒性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是针对病毒为细胞生长抑制性的和细胞毒性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是针对细菌、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其

组合为细胞生长抑制性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是针对细菌、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合为细胞毒性的。在某些实施方案中，抗病毒多肽是针对细菌、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合为细胞生长抑制性的和细胞毒性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是针对肿瘤或癌细胞(例如人癌细胞)为细胞毒性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是针对肿瘤或癌细胞(例如人癌细胞)为细胞生长抑制性的。在某些实施方案中，抗病毒多肽是针对肿瘤或癌细胞(例如人癌细胞)为细胞毒性的和细胞生长抑制性的。在一些实施方案中，抗病毒多肽是分泌性多肽。

[0217] 细胞毒性核苷

[0218] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可结合一种或多种细胞毒性核苷。例如，细胞毒性核苷可并入至多核苷酸、初级构建体或mmRNA如双功能修饰的RNA或mRNA中。细胞毒性核苷抗癌剂包括但不限于阿糖腺苷、阿糖胞苷(cytarabine)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、5-氟尿嘧啶、氟达拉滨、氟尿苷、FTORAFUR®(替加氟(tegafur)与尿嘧啶的组合)、替加氟((RS)-5-氟-1-(四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮)以及6-巯基嘌呤。

[0219] 大量细胞毒性核苷类似物作为抗癌剂处于临床使用中或一直是临床试验的主题。这类类似物的实例包括但不限于，阿糖胞苷、吉西他滨、曲沙他滨、地西他滨、替扎他滨、2′-脱氧-2′-亚甲基胞苷(DMDC)、克拉屈滨、氯法拉滨、5-氮杂胞苷、4'-硫代-阿糖胞苷(4'-thio-aracytidine)、环戊烯基胞嘧啶和1-(2-C-氰基-2-脱氧-β-D-阿拉伯-呋喃戊糖基)-胞嘧啶。这种化合物的另一个实例是磷酸氟达拉滨。这些化合物可系统地施用并且可具有细胞毒性剂的典型副作用，例如但不限于相对于增殖性正常细胞对肿瘤细胞很少或没有特异性。

[0220] 本领域还报道了细胞毒性核苷类似物的许多前药。实例包括但不限于N4-山嵛酰氧基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶、N4-十八烷基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶、N4-棕榈酰基-1-(2-C-氰基-2-脱氧-β-D-阿拉伯-呋喃戊糖基)胞嘧啶以及P-4055(阿糖胞苷5'-反油酸酯)。一般来说，这些前药可主要在肝和系统循环中转化成活性药物并且展示很少或不展示活性药物在肿瘤组织中的选择性释放。例如，5'-脱氧-5-氟胞苷(并且最终是5-氟尿嘧啶)的一种前药，卡培他滨，在肝和肿瘤组织两者中代谢。一系列含有“在生理条件下容易水解的基团”的卡培他滨类似物已由Fujiu等人(美国专利号4,966,891)要求保护并且以引用的方式并入本文。由Fujiu描述的系列包括5'-脱氧-5-氟胞苷的N4氨基甲酸烷基酯和氨基甲酸芳烷基酯和以下暗示：这些化合物将在正常生理条件下通过水解而激活以提供5'-脱氧-5-氟胞苷。

[0221] 一系列阿糖胞苷N4-氨基甲酸酯已由Fadl等人(Pharmazie.1995,50,382-7，以引用的方式并入本文)报道，其中化合物被设计成在肝和血浆中转化成阿糖胞苷。以引用的方式并入本文的WO 2004/041203公开了吉西他滨的前药，其中一些前药是N4-氨基甲酸酯。这些化合物被设计成克服吉西他滨的胃肠毒性并且意图在从胃肠道吸收完整前药之后通过在肝和血浆中水解释放来提供吉西他滨。Nomura等人(Bioorg Med.Chem.2003,11,2453-61，以引用的方式并入本文)描述了1-(3-C-乙炔基-β-D-核糖-呋喃戊糖基)胞嘧啶的缩醛衍生物，所述缩醛衍生物在生物还原时产生需要在酸性条件下进一步水解以产生细胞毒性核苷化合物的中间体。

[0222] 可作为化学治疗剂的细胞毒性核苷还包括但不限于,吡唑并[3,4-D]-嘧啶、别嘌呤醇、硫唑嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿昔洛韦、阿糖腺苷(ara-adenosine)、病毒唑、7-脱氮-腺苷、7-脱氮-鸟苷、6-氮杂-尿嘧啶、6-氮杂-胞苷、胸苷核糖核苷酸、5-溴脱氧尿苷、2-氯-嘌呤以及肌苷或其组合。

[0223] 侧翼区:非翻译区(UTR)

[0224] 基因的非翻译区(UTR)被转录但不被翻译。5′UTR开始于转录起始位点并且继续至起始密码子但不包括起始密码子;而3′UTR紧随终止密码子开始并且继续直到转录终止信号。关于就核酸分子和翻译的稳定性而言UTR所起的调控作用存在越来越多的证据。UTR的调控特征可并入本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA中以增强分子的稳定性。在转录物被错误引导至所不希望的器官部位的情况下还可并入所述特定特征以确保转录物的受控下调。

[0225] 5′UTR和翻译起始

[0226] 天然5′UTR携带在翻译起始中起作用的特征。它们拥有像Kozak序列的签名序列,所述Kozak序列通常已知在核糖体起始许多基因的翻译的过程中有所涉及。Kozak序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG,其中R是在起始密码子(AUG)的上游三个碱基处的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),其之后是另一个“G”。还已知5′UTR形成在延伸因子结合中所涉及的二级结构。

[0227] 通过工程化通常在特定靶器官的丰富表达的基因中发现的特征,可增强本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的稳定性和蛋白质产生。例如,引入肝表达的mRNA(如白蛋白、血清淀粉样蛋白A、载脂蛋白A/B/E、转铁蛋白、甲胎蛋白、促红细胞生成素或因子VIII)的5′UTR可用于增强核酸分子(如mmRNA)在肝细胞系或肝中的表达。同样,使用来自其它组织特异性mRNA的5′UTR来改进所述组织中的表达对于以下各项来说是可能的:肌肉(MyoD、肌球蛋白、肌红蛋白、肌细胞生成素(Myogenin)、力蛋白(Herculin))、内皮细胞(Tie-1、CD36)、骨髓细胞(C/EBP、AML1、G-CSF、GM-CSF、CD11b、MSR、Fr-1、i-NOS)、白细胞(CD45、CD18)、脂肪组织(CD36、GLUT4、ACRP30、脂联素)以及肺上皮细胞(SP-A/B/C/D)。

[0228] 其它非UTR序列可并入5′(或3′UTR)UTR中。例如,内含子或内含子序列的部分可并入本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的侧翼区中。并入内含子序列可增加蛋白质产生以及mRNA水平。

[0229] 3′UTR和富含AU的元件

[0230] 已知3′UTR具有嵌入它们之中的腺苷(Adenosine)和尿苷(Uridine)段。这些富含AU的签名序列在具有高更新率的基因中是特别普遍的。基于其序列特征和功能特性,富含AU的元件(ARE)可分成三类(Chen等人,1995):I类ARE在富含U的区内包含AUUUA基序的几个分散的拷贝。C-Myc和MyoD包含I类ARE。II类ARE具有两个或更多个重叠的UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚物。含有这种类型的ARE的分子包括GM-CSF和TNF-a。III类ARE的定义不太明确。这些富含U的区不包含AUUUA基序。c-Jun和肌细胞生成素是这种类别的两个被充分研究的实例。已知大多数结合ARE的蛋白质使信使不稳定,而ELAV家族的成员(最显著的是HuR)已被证明增加mRNA的稳定性。HuR结合所有三类的ARE。将HuR特异性结合位点工程化至核酸分子的3′UTR中将导致HuR结合,并因此导致体内信使的稳定化。

[0231] 3′UTR富含AU的元件的引入、去除或修饰可用于调节本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的稳定性。当工程化特定多核苷酸、初级构建体或mmRNA时,可引入ARE的一个或

多个拷贝来使本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA不那么稳定并由此缩减翻译和减少所得蛋白质的产生。同样,ARE可被鉴别和去除或突变以便增加细胞内稳定性并因此增加翻译和所得蛋白质的产生。可使用本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA在相关细胞系中进行转染实验,并且可在转染后的不同时间点测定蛋白质产生。例如,可用不同的ARE工程化分子转染细胞,并且使用针对相关蛋白质的ELISA试剂盒测定转染后第6小时、第12小时、第24小时、第48小时、第72小时以及7天产生的蛋白质。

[0232] 并入微小RNA结合位点

[0233] 微小RNA(或miRNA)是19至25个核苷酸长的非编码RNA,所述非编码RNA结合核酸分子的3′UTR并且通过降低核酸分子稳定性或通过抑制翻译来下调基因表达。本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包含一个或多个微小RNA靶序列、微小RNA序列或微小RNA种子。这类序列可对应于任何已知的微小RNA如美国公布US2005/0261218和美国公布US2005/0059005中所教导的那些,所述公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0234] 微小RNA序列包含“种子”区,即成熟微小RNA的位置2至8的区中的序列,所述序列与miRNA靶序列具有完美的沃森-克里克(Watson-Crick)互补性。微小RNA种子可包含成熟微小RNA的位置2至8或2至7。在一些实施方案中,微小RNA种子可包含7个核苷酸(例如成熟微小RNA的核苷酸2至8),其中对应miRNA靶标中的种子互补位点由与微小RNA位置1相反的腺嘌呤(A)侧接。在一些实施方案中,微小RNA种子可包含6个核苷酸(例如成熟微小RNA的核苷酸2至7),其中对应miRNA靶标中的种子互补位点由与微小RNA位置1相反的腺嘌呤(A)侧接。参见例如,Grimson A、Farh KK、Johnston WK、Garrett-Engele P、Lim LP、Bartel DP;Mol Cell.2007 7月6日;27(1):91-105;所述文献各自以引用的方式整体并入本文。微小RNA种子的碱基与靶序列具有完全互补性。通过将微小RNA靶序列工程化至本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的3′UTR中,可靶向用于降解或减少翻译的分子,条件是所讨论的微小RNA是可获得的。这种方法将减少核酸分子递送时的脱靶效应的危害。已报道了微小RNA、微小RNA靶区及其表达模式和在生物学中的作用的鉴别(Bonauer等人,Curr Drug Targets 2010 11:943-949;Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176;Contreras和Rao Leukemia 2012 26:404-413(2011年12月20日.doi:10.1038/leu.2011.356);Bartel Cell 2009 136:215-233;Landgraf等人,Cell,2007 129:1401-1414;所述文献各自以引用的方式整体并入本文)。

[0235] 例如,如果核酸分子是mRNA并且不意图被递送至肝但最终被递送至肝,那么在miR-122(在肝中丰富的一种微小RNA)的一个或多个靶位点被工程化至多核苷酸、初级构建体或mmRNA的3′UTR中的情况下,miR-122可抑制目标基因的表达。可工程化不同微小RNA的一个或多个结合位点的引入以便进一步减少多核苷酸、初级构建体或mmRNA的寿命、稳定性和蛋白质翻译。

[0236] 如本文所用,术语“微小RNA位点”是指微小RNA靶位点或微小RNA识别位点或微小RNA所结合或缔合的任何核苷酸序列。应理解“结合”可遵循传统沃森-克里克杂交规则或可反映微小RNA与靶序列在或邻近微小RNA位点处的任何稳定的缔合。

[0237] 相反地,出于本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的目的,可将微小RNA结合位点从它们天然存在的序列中工程化出来(即,去除)以便增加特定组织中的蛋白质表达。例如,可将miR-122结合位点去除以便改进肝中的蛋白质表达。多种组织中的表达的调控可通

过引入或去除一个或若干微小RNA结合位点来实现。

[0238] 已知微小RNA在其中调控mRNA并因此调控蛋白质表达的组织的实例包括但不限于,肝(miR-122)、肌肉(miR-133、miR-206、miR-208)、内皮细胞(miR-17-92、miR-126)、骨髓细胞(miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27)、脂肪组织(let-7、miR-30c)、心脏(miR-1d、miR-149)、肾(miR-192、miR-194、miR-204)以及肺上皮细胞(let-7、miR-133、miR-126)。微小RNA还可调控复杂生物过程如血管生成(miR-132)(Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176;以引用的方式整体并入本文)。在本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA中,可去除或引入在这类过程中所涉及的微小RNA结合位点,以便针对生物上相关的细胞类型或针对相关生物过程的背景定制多核苷酸、初级构建体或mmRNA表达。微小RNA、miR序列和miR结合位点的列表在以下各项中列出:2013年1月17日提交的美国临时申请号61/753,661的表9、2013年1月18日提交的美国临时申请号61/754,159的表9以及2013年1月31日提交的美国临时申请号61/758,921的表7,所述申请各自以引用的方式整体并入本文。

[0239] 最后,通过理解微小RNA在不同细胞类型中的表达模式,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可针对特定细胞类型中或仅在特定生物条件下更强靶向性的表达进行工程化。通过引入组织特异性微小RNA结合位点,可设计将对于组织中或生物条件的背景中的蛋白质表达来说最优的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。列出了微小RNA用于驱动组织或疾病特异性基因表达的用途的实例(Getner和Naldini,Tissue Antigens.2012,80:393-403;以引用的方式整体并入本文)。此外,微小RNA种子位点可并入至mRNA中以减少某些细胞中的表达,这引起生物改进。这种的实例是将miR-142位点并入至表达UGT1A1的慢病毒载体中。miR-142种子位点的存在减少造血细胞中的表达,并因此减少抗原呈递细胞中的表达,从而导致不存在针对病毒表达的UGT1A1的免疫应答(Schmitt等人,Gastroenterology 2010;139:999-1007;Gonzalez-Asequinolaza等人Gastroenterology 2010,139:726-729;两者均以引用的方式整体并入本文)。将miR-142位点并入修饰mRNA中不仅可降低造血细胞中编码的蛋白质的表达,而且可减少或消除对mRNA编码的蛋白质的免疫应答。将miR-142种子位点(一个或多个)并入至mRNA中在治疗具有完全蛋白质缺陷(UGT1A1I型、LDLR-缺陷的患者、CRIM-阴性庞佩氏(Pompe)患者等)的患者的情况下将是重要的。

[0240] 可使用工程化的多核苷酸、初级构建体或mmRNA在相关细胞系中进行转染实验,并且可在转染后的不同时间点测定蛋白质产生。例如,可用不同的微小RNA结合位点工程化的多核苷酸、初级构建体或mmRNA转染细胞,并且使用针对相关蛋白质的ELISA试剂盒测定转染后第6小时、第12小时、第24小时、第48小时以及7天产生的蛋白质。还可使用微小RNA结合位点工程化的分子进行体内实验,以便检测所配制的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的组织特异性表达的变化。

[0241] 5′加帽

[0242] mRNA的5′帽结构涉及核输出,从而增加mRNA稳定性,并且结合mRNA帽结合蛋白(CBP),所述mRNA帽结合蛋白通过CBP与聚(A)结合蛋白缔合以形成成熟的环状mRNA物种来负责细胞中的mRNA稳定性和翻译能力。所述帽在mRNA剪接过程中进一步帮助去除5′近端内含子。

[0243] 内源性mRNA分子可以是5′端加帽的,从而在末端鸟苷帽残基与mRNA分子的5′末端

转录的有义核苷酸之间产生5′-ppp-5′-三磷酸酯键联。这种5′-鸟苷酸帽然后可被甲基化以便产生N7-甲基-鸟苷酸残基。mRNA的5′端的末端和/或前末端(anteterminal)转录的核苷酸的核糖还可任选地是2′-O-甲基化的。通过鸟苷酸帽结构的水解和裂解的5′-脱帽可靶向用于降解的核酸分子,如mRNA分子。

[0244] 对本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA的修饰可产生不可水解的帽结构,从而防止脱帽并因此增加mRNA半衰期。因为帽结构水解要求5′-ppp-5′磷酸二酯键联的裂解,所以可在加帽反应过程中使用修饰核苷酸。例如,来自New England Biolabs(Ipswich,MA)的牛痘加帽酶可根据制造商的说明书与α-硫代-鸟苷核苷酸一起使用以便在5′-ppp-5′帽中形成硫代磷酸酯键联。可使用另外修饰的鸟苷核苷酸,如α-甲基-膦酸酯和硒代-磷酸酯核苷酸。

[0245] 另外的修饰包括但不限于mRNA(如上述)在糖环的2′-羟基上的5′-末端和/或5′-前末端核苷酸的核糖的2′-O-甲基化。多种不同的5′帽结构可用于产生核酸分子如mRNA分子的5′帽。

[0246] 帽类似物,在本文还被称为合成帽类似物、化学帽、化学帽类似物或结构或功能帽类似物,在其化学结构上与天然(即内源性、野生型或生理的)5′帽不同,同时保留帽功能。帽类似物可以是化学(即非酶)或酶合成的和/或连接至核酸分子。

[0247] 例如,抗-反向帽类似物(ARCA)帽包含通过5′-5′-三磷酸酯基团连接的两个鸟嘌呤,其中一个鸟嘌呤包含N7甲基以及3′-O-甲基(即N7,3′-O-二甲基-鸟苷-5′-三磷酸酯-5′-鸟苷(m^7G-3′mppp-G;其可等效地指定为3′O-Me-m7G(5′)ppp(5′)G)。另一未修饰的鸟嘌呤的3′-O原子变成连接至加帽的核酸分子(例如mRNA或mmRNA)的5′末端核苷酸。N7-和3′-O-甲基化的鸟嘌呤提供加帽的核酸分子(例如mRNA或mmRNA)的末端部分。

[0248] 另一种示例性帽是mCAP,其与ARCA类似但在鸟苷上具有2′-O-甲基(即N7,2′-O-二甲基-鸟苷-5′-三磷酸酯-5′-鸟苷,m^7Gm-ppp-G)。

[0249] 虽然帽类似物允许核酸分子在体外转录反应中的伴随加帽,但高达20%的转录物可仍保持未加帽。这种情况以及帽类似物与通过内源性细胞转录机器产生的核酸的内源性5′帽结构的结构差异可导致降低的翻译能力和降低的细胞稳定性。

[0250] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA还可在转录后使用酶加帽,以产生更真实的5′帽结构。如本文所用,短语“更真实的”是指在结构或功能上接近地反映或模拟内源性或野生型特征的特征。也就是说,“更真实的”特征是与现有技术的合成特征或类似物等相比,内源性、野生型、天然或生理细胞功能和/或结构的更好表示,或在一个或多个方面胜过对应的内源性、野生型、天然或生理特征的特征。本发明的更真实的5′帽结构的非限制性实例是与本领域已知的合成5′帽结构(或与野生型、天然或生理5′帽结构)相比,除其他事项之外具有帽结合蛋白的增强的结合、增加的半衰期、对5′内切核酸酶减少的敏感性和/或减少的5′脱帽的那些实例。例如,重组牛痘病毒加帽酶和重组2′-O-甲基转移酶可在mRNA的5′末端核苷酸与鸟嘌呤帽核苷酸之间形成规范的5′-5′-三磷酸酯键联,其中所述帽鸟嘌呤包含N7甲基化并且mRNA的5′末端核苷酸包含2′-O-甲基。这种结构被称为帽1结构。这种帽导致与例如本领域已知的其它5′帽类似物结构相比更高的翻译能力和细胞稳定性以及减少的细胞促炎细胞因子的激活。帽结构包括但不限于,7mG(5′)ppp(5′)N,pN2p(帽0)、7mG(5′)ppp(5′)NlmpNp(帽1)以及7mG(5′)-ppp(5′)NlmpN2mp(帽2)。

[0251] 因为多核苷酸、初级构建体或mmRNA可在转录后加帽，并且因为这种方法是更有效的，所以接近100％的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可被加帽。这与在体外转录反应过程中帽类似物被连接至mRNA时的约80％形成对比。

[0252] 根据本发明，5′末端帽可包括内源性帽或帽类似物。根据本发明，5′末端帽可包含鸟嘌呤类似物。有用的鸟嘌呤类似物包括但不限于，肌苷、N1-甲基-鸟苷、2′氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷以及2-叠氮基-鸟苷。

[0253] 病毒序列

[0254] 另外的病毒序列，例如但不限于大麦黄矮病毒(BYDV-PAV)、绵羊肺腺瘤病反转录病毒(JSRV)和/或地方性鼻内肿瘤病毒的翻译增强子序列(参见例如，国际公布号WO2012129648;以引用的方式整体并入本文)，可被工程化并且插入本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的3′UTR中，并且可在体外和体内刺激构建体的翻译。可在相关细胞系中进行转染实验并且可在转染后第12小时、第24小时、第48小时、第72小时和第7天通过ELISA测定蛋白质产生。

[0255] IRES序列

[0256] 此外，提供可包含内部核糖体进入位点(IRES)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。首先被鉴别为特征细小核糖核酸病毒RNA，IRES在不存在5′帽结构的情况下在蛋白质合成的起始中起重要作用。IRES可用作唯一核糖体结合位点或可用作mRNA的多个核糖体结合位点之一。含有多于一个功能性核糖体结合位点的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码独立地通过核糖体翻译的几种肽或多肽(“多顺反子核酸分子”)。当多核苷酸、初级构建体或mmRNA具有IRES时，进一步任选地提供第二可翻译区。可根据本发明使用的IRES序列的实例包括但不限于来自以下病毒的那些:细小核糖核酸病毒(例如FMDV)、昆虫病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)、丙型肝炎病毒(HCV)、典型猪瘟病毒(CSFV)、鼠白血病病毒(MLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)。

[0257] poly-A尾

[0258] 在RNA加工过程中，可将长链腺嘌呤核苷酸(poly-A尾)添加至多核苷酸如mRNA分子以便增加稳定性。紧随转录之后，转录物的3’端可被裂解以释放3’羟基。然后聚-A聚合酶将腺嘌呤核苷酸链添加至RNA。被称为聚腺苷酸化的过程添加可在例如大约100与250个之间残基长的poly-A尾。

[0259] 已发现独特的poly-A尾长度对本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA提供某些优点。

[0260] 一般来说，本发明的poly-A尾的长度大于30个核苷酸长。在另一个实施方案中，poly-A尾在长度上大于35个核苷酸(例如，至少或大于约35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500以及3,000个核苷酸)。在一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括约30至约3,000个核苷酸(例如，30至50、30至100、30至250、30至500、30至750、30至1,000、30至1,500、30至2,000、30至2,500、50至100、50至250、50至500、50至750、50至1,000、50至1,500、50至2,000、50至2,500、50至3,000、100至500、100至750、100至1,000、100至1,500、100至2,000、100至2,500、100至3,000、500至750、500至1,000、500至1,500、500至2,000、500至2,500、500至3,000、1,

000至1,500、1,000至2,000、1,000至2,500、1,000至3,000、1,500至2,000、1,500至2,500、1,500至3,000、2,000至3,000、2,000至2,500以及2,500至3,000)。

[0261] 在一个实施方案中,相对于总体多核苷酸、初级构建体或mmRNA的长度来设计poly-A尾。这种设计可以是基于编码区的长度、特定特征或区(如第一区或侧翼区)的长度或基于从多核苷酸、初级构建体或mmRNA表达的最终产物的长度。

[0262] 在这种背景下,poly-A尾可在长度上大于多核苷酸、初级构建体或mmRNA或其特征的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。poly-A尾还可被设计为它所属的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一部分。在这种背景下,poly-A尾可以是构建体的总长度或构建体减去poly-A尾的总长度的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%或更多。此外,多核苷酸、初级构建体或mmRNA针对聚-A结合蛋白质的工程化的结合位点和缀合可增强表达。

[0263] 另外,多个不同的核苷酸、初级构建体或mmRNA可使用poly-A尾的3′末端处的修饰核苷酸通过3′末端一起连接至PABP(聚-A结合蛋白)。可在相关细胞系中进行转染实验并且可在转染后第12小时、第24小时、第48小时、第72小时和第7天通过ELISA测定蛋白质产生。

[0264] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸初级构建体被设计成包括polyA-G四联体。G四联体是可通过DNA和RNA两者中的富含G的序列形成的四个鸟嘌呤核苷酸的环状氢键合阵列。在这个实施方案中,G四联体并入在poly-A尾的末端。在不同时间点针对稳定性、蛋白质产生和包括半衰期的其它参数来对所得mmRNA构建体进行测定。已发现polyA-G四联体使得蛋白质产生等效于单独使用120个核苷酸的poly-A尾所观察到的蛋白质产生的至少75%。

[0265] 量化

[0266] 在一个实施方案中,可在源自一种或多种体液的外来体中量化本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。如本文所用,“体液”包括外周血、血清、血浆、腹水、尿液、脑脊髓液(CSF)、痰、唾液、骨髓、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、支气管肺泡灌洗液、精液、前列腺液、考珀液(cowper's fluid)或预射精液、汗液、粪便物、毛发、泪液、囊液、胸膜和腹膜液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、间质液、经血、脓液、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、水样粪便、胰液、来自鼻窦腔的洗出液、支气管肺吸出物、胚泡腔液以及脐带血。或者,可从选自由以下组成的组的器官撷取外来体:肺、心脏、胰脏、胃、肠、膀胱、肾、卵巢、精巢、皮肤、结肠、乳房、前列腺、脑、食道、肝以及胎盘。

[0267] 在量化方法中,从受试者获得不超过2mL的样品并且通过尺寸排阻色谱法、密度梯度离心、差速离心、纳米膜超滤、免疫吸附剂捕获、亲和纯化、微流体分离或其组合来分离外来体。在分析中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA的水平或浓度可以是所施用的构建体的表达水平、存在、不存在、截短或改变。有利的是,使所述水平与一种或多种临床表型或与用于人类疾病生物标志物的测定相关。所述测定可使用构建体特异性探针、细胞计数、qRT-PCR、实时PCR、PCR、流式细胞术、电泳、质谱法或其组合进行,同时可使用免疫组织化学方法如酶联免疫吸附测定(ELISA)方法分离外来体。还可通过尺寸排阻色谱法、密度梯度离心、差速离心、纳米膜超滤、免疫吸附剂捕获、亲和纯化、微流体分离或其组合来分离外来体。

[0268] 这些方法给予研究者实时监测剩余的或所递送的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的水平的能力。这是可能的,因为本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA由于结构修饰或

化学修饰而不同于内源形式。

[0269] II.mmRNA的设计和合成

[0270] 用于根据本发明使用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可根据任何可供使用的技术进行制备，所述技术包括但不限于化学合成、酶合成，其通常被称为较长前体的体外转录(IVT)或酶或化学裂解。合成RNA的方法是本领域已知的(参见例如，Gait,M.J.(编辑)Oligonucleotide synthesis:a practical approach,Oxford[Oxfordshire],Washington,DC:IRL Press,1984;和Herdewijn,P.(编辑)Oligonucleotide synthesis:methods and applications,Methods in Molecular Biology,第288卷(Clifton,N.J.)Totowa,N.J.:Humana Press,2005;两者均以引用的方式并入本文)。

[0271] 设计和合成本发明的初级构建体的方法包括基因构建、mRNA产生(有或无修饰)和纯化的步骤。在酶合成方法中，首先选择编码目标多肽的靶多核苷酸序列以用于并入载体中，所述载体将进行扩增以产生cDNA模板。任选地，靶多核苷酸序列和/或任何侧翼序列可进行密码子优化。然后使用cDNA模板通过体外转录(IVT)产生mRNA。产生之后，mRNA可经历纯化和净化过程。所述步骤在下文更详细地提供。

[0272] 基因构建

[0273] 基因构建的步骤可包括但不限于基因合成、载体扩增、质粒纯化、质粒线性化和净化以及cDNA模板合成和净化。

[0274] 基因合成

[0275] 一旦目标多肽或靶标被选择用于产生，就设计初级构建体。在初级构建体内，编码目标多肽的连接核苷的第一区可使用选定核酸(DNA或RNA)转录物的开放阅读框(ORF)进行构建。ORF可包含野生型ORF、其同工型、变体或片段。如本文所用，“开放阅读框”或“ORF”意思是指能够编码目标多肽的核酸序列(DNA或RNA)。ORF经常开始于起始密码子ATG并且结束于无义或终止密码子或信号。

[0276] 此外，第一区的核苷酸序列可进行密码子优化。密码子优化方法是本领域已知的并且可适用于实现几个目标中的一个或多个的工作中。这些目标包括匹配靶标和宿主生物体中的密码子频率以确保正确折叠；偏置GC含量以增加mRNA稳定性或减少二级结构；最小化可能损害基因构建或表达的串联重复密码子或碱基运行，定制转录和翻译控制区域，插入或去除蛋白质运输序列，在编码的蛋白质中去除/添加翻译后修饰位点(例如糖基化位点)，添加、去除或改组蛋白质结构域，插入或缺失限制性位点，修饰核糖体结合位点和mRNA降解位点，以便调整翻译速率从而允许蛋白质的不同结构域正确地折叠，或以便减少或消除mRNA内的问题二级结构。密码子优化工具、算法和服务是本领域已知的，非限制性实例包括来自GeneArt(Life Technologies)的服务、DNA2.0(Menlo Park CA)和/或专有方法。在一个实施方案中，使用优化算法优化ORF序列。用于每种氨基酸的密码子选择在表1中给出。

[0277] 表1.密码子选择

[0278]

氨基酸	单字母代码	密码子选择
异亮氨酸	I	ATT、ATC、ATA
亮氨酸	L	CTT、CTC、CTA、CTG、TTA、TTG
缬氨酸	V	GTT、GTC、GTA、GTG
苯丙氨酸	F	TTT、TTC
蛋氨酸	M	ATG
半胱氨酸	C	TGT、TGC
丙氨酸	A	GCT、GCC、GCA、GCG
甘氨酸	G	GGT、GGC、GGA、GGG
脯氨酸	P	CCT、CCC、CCA、CCG
苏氨酸	T	ACT、ACC、ACA、ACG
丝氨酸	S	TCT、TCC、TCA、TCG、AGT、AGC
酪氨酸	Y	TAT、TAC
色氨酸	W	TGG
谷氨酰胺	Q	CAA、CAG
天冬酰胺	N	AAT、AAC
组氨酸	H	CAT、CAC
谷氨酸	E	GAA、GAG
天冬氨酸	D	GAT、GAC
赖氨酸	K	AAA、AAG
精氨酸	R	CGT、CGC、CGA、CGG、AGA、AGG
硒代胱氨酸	Sec	在存在硒代胱氨酸插入元件(SECIS)的情况下 mRNA 中的 UGA
终止密码子	终止	TAA、TAG、TGA

[0279] 在本发明的一些实施方案中可被认为是有益的特征可由初级构建体编码并且可位于ORF侧面作为第一或第二侧翼区。所述侧翼区可在ORF的优化之前和/或之后并入初级构建体中。不要求初级构建体包含5′和3′侧翼区两者。这类特征的实例包括但不限于非翻译区(UTR)、Kozak序列、oligo(dT)序列以及可检测标签并且可包括可具有XbaI识别的多克隆位点。

[0280] 在一些实施方案中,5′UTR和/或3′UTR可被提供为侧翼区。多个5′或3′UTR可包括于侧翼区中并且可以具有相同或不同的序列。侧翼区的任何部分(包括没有任何部分)可进行密码子优化并且任何部分可在密码子优化之前和/或之后独立地包含一个或多个不同的结构修饰或化学修饰。特征的组合可包括于第一侧翼区和第二侧翼区中并且可包含于其它特征内。例如,ORF可由可包含强Kozak翻译起始信号的5'UTR和/或可包括用于模板化添加poly-A尾的oligo(dT)序列的3'UTR侧接。5'UTR可包含来自相同和/或不同基因的第一多核苷酸片段和第二多核苷酸片段,如美国专利申请公布号20100293625中所描述的5'UTR,所述专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0281] 表2和表3提供可作为侧翼区用于本发明的初级构建体中的示例性UTR的列表。表2中示出本发明的5′非翻译区的列表。可使用5'UTR的变体,其中一个或多个核苷酸被添加至末端或去除,包括A、T、C或G。

[0282] 表2. 5′非翻译区

[0283]

5′ UTR 标识符	名称/描述	序列	SEQ ID NO.
5UTR-001	上游 UTR	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC	1
5UTR-002	上游 UTR	GGGAGATCAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC	2
5UTR-003	上游 UTR	GGAATAAAAGTCTCAACACAACATATACAAAACAAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTCTATTGCAGCAATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCAAAAGCAATTTTCTGAAAATTTTCACCATTTACGAACGATAGCAAC	3
5UTR-004	上游 UTR	GGGAGACAAGCUUGGCAUUCCGGUACUGUUGGUAAAGCCACC	4

[0284] 表3中示出本发明的3′非翻译区的代表性列表。可使用3’UTR的变体，其中一个或多个核苷酸被添加至末端或去除，包括A、T、C或G。

[0285] 表3．3′非翻译区

[0286]

3′ UTR 标识符	名称/描述	序列	SEQ ID NO.
3UTR-001	肌酸激酶	GCGCCTGCCCACCTGCCACCGACTG CTGGAACCCAGCCAGTGGGAGGGC CTGGCCCACCAGAGTCCTGCTCCCT CACTCCTCGCCCCGCCCCCTGTCCC AGAGTCCCACCTGGGGGCTCTCTCC ACCCTTCTCAGAGTTCCAGTTTCAA CCAGAGTTCCAACCAATGGGCTCCA TCCTCTGGATTCTGGCCAATGAAAT ATCTCCCTGGCAGGGTCCTCTTCTTT TCCCAGAGCTCCACCCCAACCAGGA GCTCTAGTTAATGGAGAGCTCCCAG CACACTCGGAGCTTGTGCTTTGTCT CCACGCAAAGCGATAAATAAAAGC ATTGGTGGCCTTTGGTCTTTGAATA AAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGA	5
3UTR-002	肌红蛋白	GCCCCTGCCGCTCCCACCCCCACCC ATCTGGGCCCCGGGTTCAAGAGAG AGCGGGGTCTGATCTCGTGTAGCCA TATAGAGTTTGCTTCTGAGTGTCTG CTTTGTTTAGTAGAGGTGGGCAGGA GGAGCTGAGGGGCTGGGGCTGGGG TGTTGAAGTTGGCTTTGCATGCCCA GCGATGCGCCTCCCTGTGGGATGTC ATCACCCTGGGAACCGGGAGTGGC CCTTGGCTCACTGTGTTCTGCATGG TTTGGATCTGAATTAATTGTCCTTTC TTCTAAATCCCAACCGAACTTCTTC CAACCTCCAAACTGGCTGTAACCCC AAATCCAAGCCATTAACTACACCTG ACAGTAGCAATTGTCTGATTAATCA CTGGCCCCTTGAAGACAGCAGAAT GTCCCTTTGCAATGAGGAGGAGATC TGGGCTGGGCGGGCCAGCTGGGGA AGCATTTGACTATCTGGAACTTGTG TGTGCCTCCTCAGGTATGGCAGTGA CTCACCTGGTTTTAATAAAACAACC TGCAACATCTCATGGTCTTTGAATA AAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGA	6

[0287]

3UTR-003	α-肌动蛋白	ACACACTCCACCTCCAGCACGCGAC TTCTCAGGACGACGAATCTTCTCAA TGGGGGGGCGGCTGAGCTCCAGCC ACCCCGCAGTCACTTTCTTTGTAAC AACTTCCGTTGCTGCCATCGTAAAC TGACACAGTGTTTATAACGTGTACA TACATTAACTTATTACCTCATTTTGT TATTTTTCGAAACAAAGCCCTGTGG AAGAAAATGGAAAACTTGAAGAAG CATTAAAGTCATTCTGTTAAGCTGC GTAAATGGTCTTTGAATAAAGCCTG AGTAGGAAGTCTAGA	7
3UTR-004	白蛋白	CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCC TACCATGAGAATAAGAGAAAGAAA ATGAAGATCAAAAGCTTATTCATCT GTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGC CAACACCCTGTCTAAAAAACATAA ATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTT CTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT GGAAAGAATCTAATAGAGTGGTAC AGCACTGTTATTTTTCAAAGATGTG TTGCTATCCTGAAAATTCTGTAGGT TCTGTGGAAGTTCCAGTGTTCTCTC TTATTCCACTTCGGTAGAGGATTTC TAGTTTCTTGTGGGCTAATTAAATA AATCATTAATACTCTTCTAATGGTC TTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGT CTAGA	8
3UTR-005	α-珠蛋白	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTC TGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTG CACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAAT AAAGCCTGAGTAGGAAGGCGGCCG CTCGAGCATGCATCTAGA	9
3UTR-006	G-CSF	GCCAAGCCCTCCCCATCCCATGTAT TTATCTCTATTTAATATTTATGTCTA TTTAAGCCTCATATTTAAAGACAGG GAAGAGCAGAACGGAGCCCCAGGC CTCTGTGTCCTTCCCTGCATTTCTGA GTTTCATTCTCCTGCCTGTAGCAGT GAGAAAAAGCTCCTGTCCTCCCATC CCCTGGACTGGGAGGTAGATAGGT AAATACCAAGTATTTATTACTATGA CTGCTCCCCAGCCCTGGCTCTGCAA TGGGCACTGGGATGAGCCGCTGTG AGCCCCTGGTCCTGAGGGTCCCCAC CTGGGACCCTTGAGAGTATCAGGTC TCCCACGTGGGAGACAAGAAATCC CTGTTTAATATTTAAACAGCAGTGT TCCCCATCTGGGTCCTTGCACCCCT CACTCTGGCCTCAGCCGACTGCACA	10

[0288]

		GCGGCCCCTGCATCCCCTTGGCTGT GAGGCCCCTGGACAAGCAGAGGTG GCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCT GGGGTCCCACGAATTTGCTGGGGA ATCTCGTTTTTCTTCTTAAGACTTTT GGGACATGGTTTGACTCCCGAACAT CACCGACGCGTCTCCTGTTTTTCTG GGTGGCCTCGGGACACCTGCCCTGC CCCCACGAGGGTCAGGACTGTGACT CTTTTTAGGGCCAGGCAGGTGCCTG GACATTTGCCTTGCTGGACGGGGAC TGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACA GGAGGAATCATGTCAGGCCTGTGTG TGAAAGGAAGCTCCACTGTCACCCT CCACCTCTTCACCCCCCACTCACCA GTGTCCCCTCCACTGTCACATTGTA ACTGAACTTCAGGATAATAAAGTGT TTGCCTCCATGGTCTTTGAATAAAG CCTGAGTAGGAAGGCGGCCGCTCG AGCATGCATCTAGA	
3UTR-007	Col1a2；胶原，I型，α2	ACTCAATCTAAATTAAAAAAGAAA GAAATTTGAAAAAACTTTCTCTTTG CCATTTCTTCTTCTTCTTTTTTAACT GAAAGCTGAATCCTTCCATTTCTTC TGCACATCTACTTGCTTAAATTGTG GGCAAAAGAGAAAAAGAAGGATTG ATCAGAGCATTGTGCAATACAGTTT CATTAACTCCTTCCCCCGCTCCCCC AAAAATTTGAATTTTTTTTTCAACA CTCTTACACCTGTTATGGAAAATGT CAACCTTTGTAAGAAAACCAAAAT AAAAATTGAAAAATAAAAACCATA AACATTTGCACCACTTGTGGCTTTT GAATATCTTCCACAGAGGGAAGTTT AAAACCCAAACTTCCAAAGGTTTAA ACTACCTCAAAACACTTTCCCATGA GTGTGATCCACATTGTTAGGTGCTG ACCTAGACAGAGATGAACTGAGGT CCTTGTTTTGTTTTGTTCATAATACA AAGGTGCTAATTAATAGTATTTCAG ATACTTGAAGAATGTTGATGGTGCT AGAAGAATTTGAGAAGAAATACTC CTGTATTGAGTTGTATCGTGTGGTG TATTTTTTAAAAAATTTGATTTAGC ATTCATATTTTCCATCTTATTCCCAA TTAAAAGTATGCAGATTATTTGCCC AAATCTTCTTCAGATTCAGCATTTG TTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCTT CTTCCATGGTTCCACAGAAGCTTTG TTTCTTGGGCAAGCAGAAAAATTAA	11

[0289]

		ATTGTACCTATTTTGTATATGTGAG ATGTTTAAATAAATTGTGAAAAAAA TGAAATAAAGCATGTTTGGTTTTCC AAAAGAACATAT	
3UTR-008	Col6a2；胶原，VI 型，α 2	CGCCGCCGCCCGGGCCCCGCAGTCG AGGGTCGTGAGCCCACCCCGTCCAT GGTGCTAAGCGGGCCCGGGTCCCA CACGGCCAGCACCGCTGCTCACTCG GACGACGCCCTGGGCCTGCACCTCT CCAGCTCCTCCCACGGGGTCCCCGT AGCCCCGGCCCCCGCCCAGCCCCAG GTCTCCCCAGGCCCTCCGCAGGCTG CCCGGCCTCCCTCCCCCTGCAGCCA TCCCAAGGCTCCTGACCTACCTGGC CCCTGAGCTCTGGAGCAAGCCCTGA CCCAATAAAGGCTTTGAACCCAT	12
3UTR-009	RPN1；核糖体结合糖蛋白 I	GGGGCTAGAGCCCTCTCCGCACAGC GTGGAGACGGGGCAAGGAGGGGGG TTATTAGGATTGGTGGTTTTGTTTTG CTTTGTTTAAAGCCGTGGGAAAATG GCACAACTTTACCTCTGTGGGAGAT GCAACACTGAGAGCCAAGGGGTGG GAGTTGGGATAATTTTTATATAAAA GAAGTTTTTCCACTTTGAATTGCTA AAAGTGGCATTTTTCCTATGTGCAG TCACTCCTCTCATTTCTAAAATAGG GACGTGGCCAGGCACGGTGGCTCA TGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA GGCCGAGGCAGGCGGCTCACGAGG TCAGGAGATCGAGACTATCCTGGCT AACACGGTAAAACCCTGTCTCTACT AAAAGTACAAAAAATTAGCTGGGC GTGGTGGTGGGCACCTGTAGTCCCA GCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGA GAAAGGCATGAATCCAAGAGGCAG AGCTTGCAGTGAGCTGAGATCACGC CATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAG TGTTAAGACTCTGTCTCAAATATAA ATAAATAAATAAATAAATAAATAA ATAAATAAAAATAAAGCGAGATGT TGCCCTCAAA	13
3UTR-010	LRP1；低密度脂蛋白受体相关蛋白质 1	GGCCCTGCCCCGTCGGACTGCCCCC AGAAAGCCTCCTGCCCCCTGCCAGT GAAGTCCTTCAGTGAGCCCCTCCCC AGCCAGCCCTTCCCTGGCCCCGCCG GATGTATAAATGTAAAAATGAAGG AATTACATTTTATATGTGAGCGAGC AAGCCGGCAAGCGAGCACAGTATT ATTTCTCCATCCCCTCCCTGCCTGCT CCTTGGCACCCCCATGCTGCCTTCA	14

		GGGAGACAGGCAGGGAGGGCTTGG GGCTGCACCTCCTACCCTCCCACCA GAACGCACCCCACTGGGAGAGCTG GTGGTGCAGCCTTCCCCTCCCTGTA TAAGACACTTTGCCAAGGCTCTCCC CTCTCGCCCCATCCCTGCTTGCCCG CTCCCACAGCTTCCTGAGGGCTAAT TCTGGGAAGGGAGAGTTCTTTGCTG CCCCTGTCTGGAAGACGTGGCTCTG GGTGAGGTAGGCGGGAAAGGATGG AGTGTTTTAGTTCTTGGGGGAGGCC ACCCCAAACCCCAGCCCCAACTCCA GGGGCACCTATGAGATGGCCATGCT CAACCCCCCTCCCAGACAGGCCCTC CCTGTCTCCAGGGCCCCCACCGAGG TTCCCAGGGCTGGAGACTTCCTCTG GTAAACATTCCTCCAGCCTCCCCTC CCCTGGGGACGCCAAGGAGGTGGG CCACACCCAGGAAGGGAAAGCGGG CAGCCCCGTTTTGGGGACGTGAACG TTTTAATAATTTTTGCTGAATTCCTT TACAACTAAATAACACAGATATTGT TATAAATAAAATTGT	
[0290]	3UTR-011	Nnt1；心肌营养素样细胞因子 1	ATATTAAGGATCAAGCTGTTAGCTA ATAATGCCACCTCTGCAGTTTTGGG AACAGGCAAATAAAGTATCAGTAT ACATGGTGATGTACATCTGTAGCAA AGCTCTTGGAGAAAATGAAGACTG AAGAAAGCAAAGCAAAAACTGTAT AGAGAGATTTTTCAAAAGCAGTAAT CCCTCAATTTTAAAAAAGGATTGAA AATTCTAAATGTCTTTCTGTGCATA TTTTTTGTGTTAGGAATCAAAAGTA TTTTATAAAAGGAGAAAGAACAGC CTCATTTTAGATGTAGTCCTGTTGG ATTTTTTATGCCTCCTCAGTAACCA GAAATGTTTTAAAAAACTAAGTGTT TAGGATTTCAAGACAACATTATACA TGGCTCTGAAATATCTGACACAATG TAAACATTGCAGGCACCTGCATTTT ATGTTTTTTTTTTCAACAAATGTGAC TAATTTGAAACTTTTATGAACTTCT GAGCTGTCCCCTTGCAATTCAACCG CAGTTTGAATTAATCATATCAAATC AGTTTTAATTTTTTAAATTGTACTTC AGAGTCTATATTTCAAGGGCACATT TTCTCACTACTATTTTAATACATTAA AGGACTAAATAATCTTTCAGAGATG CTGGAAACAAATCATTTGCTTTATA TGTTTCATTAGAATACCAATGAAAC	15

[0291]

		ATACAACTTGAAAATTAGTAATAGT ATTTTTGAAGATCCCATTTCTAATT GGAGATCTCTTTAATTTCGATCAAC TTATAATGTGTAGTACTATATTAAG TGCACTTGAGTGGAATTCAACATTT GACTAATAAAATGAGTTCATCATGT TGGCAAGTGATGTGGCAATTATCTC TGGTGACAAAAGAGTAAAATCAAA TATTTCTGCCTGTTACAAATATCAA GGAAGACCTGCTACTATGAAATAG ATGACATTAATCTGTCTTCACTGTTT ATAATACGGATGGATTTTTTTTCAA ATCAGTGTGTGTTTTGAGGTCTTAT GTAATTGATGACATTTGAGAGAAAT GGTGGCTTTTTTTAGCTACCTCTTTG TTCATTTAAGCACCAGTAAAGATCA TGTCTTTTTATAGAAGTGTAGATTTT CTTTGTGACTTTGCTATCGTGCCTA AAGCTCTAAATATAGGTGAATGTGT GATGAATACTCAGATTATTTGTCTC TCTATATAATTAGTTTGGTACTAAG TTTCTCAAAAAATTATTAACACATG AAAGACAATCTCTAAACCAGAAAA AGAAGTAGTACAAATTTTGTTACTG TAATGCTCGCGTTTAGTGAGTTTAA AACACACAGTATCTTTTGGTTTTAT AATCAGTTTCTATTTTGCTGTGCCTG AGATTAAGATCTGTGTATGTGTGTG TGTGTGTGTGTGCGTTTGTGTGTTA AAGCAGAAAAGACTTTTTTAAAAGT TTTAAGTGATAAATGCAATTTGTTA ATTGATCTTAGATCACTAGTAAACT CAGGGCTGAATTATACCATGTATAT TCTATTAGAAGAAAGTAAACACCAT CTTTATTCCTGCCCTTTTTCTTCTCT CAAAGTAGTTGTAGTTATATCTAGA AAGAAGCAATTTTGATTTCTTGAAA AGGTAGTTCCTGCACTCAGTTTAAA CTAAAAATAATCATACTTGGATTTT ATTTATTTTTGTCATAGTAAAAATTT TAATTTATATATATTTTTATTTAGTA TTATCTTATTCTTTGCTATTTGCCAA TCCTTTGTCATCAATTGTGTTAAAT GAATTGAAAATTCATGCCCTGTTCA TTTTATTTTACTTTATTGGTTAGGAT ATTTAAAGGATTTTTGTATATATAA TTTCTTAAATTAATATTCCAAAAGG TTAGTGGACTTAGATTATAAATTAT GGCAAAAATCTAAAAACAACAAAA ATGATTTTTATACATTCTATTTCATT	

[0292]

		ATTCCTCTTTTTCCAATAAGTCATAC AATTGGTAGATATGACTTATTTTAT TTTTGTATTATTCACTATATCTTTAT GATATTTAAGTATAAATAATTAAAA AAATTTATTGTACCTTATAGTCTGT CACCAAAAAAAAAAAATTATCTGT AGGTAGTGAAATGCTAATGTTGATT TGTCTTTAAGGGCTTGTTAACTATC CTTTATTTTCTCATTTGTCTTAAATT AGGAGTTTGTGTTTAAATTACTCAT CTAAGCAAAAAATGTATATAAATCC CATTACTGGGTATATACCCAAAGGA TTATAAATCATGCTGCTATAAAGAC ACATGCACACGTATGTTTATTGCAG CACTATTCACAATAGCAAAGACTTG GAACCAACCCAAATGTCCATCAATG ATAGACTTGATTAAGAAAATGTGCA CATATACACCATGGAATACTATGCA GCCATAAAAAAGGATGAGTTCATG TCCTTTGTAGGGACATGGATAAAGC TGGAAACCATCATTCTGAGCAAACT ATTGCAAGGACAGAAAACCAAACA CTGCATGTTCTCACTCATAGGTGGG AATTGAACAATGAGAACACTTGGA CACAAGGTGGGGAACACCACACAC CAGGGCCTGTCATGGGGTGGGGGG AGTGGGGAGGGATAGCATTAGGAG ATATACCTAATGTAAATGATGAGTT AATGGGTGCAGCACACCAACATGG CACATGTATACATATGTAGCAAACC TGCACGTTGTGCACATGTACCCTAG AACTTAAAGTATAATTAAAAAAAA AAAGAAAACAGAAGCTATTTATAA AGAAGTTATTTGCTGAAATAAATGT GATCTTTCCCATTAAAAAAATAAAG AAATTTTGGGGTAAAAAAACACAA TATATTGTATTCTTGAAAAATTCTA AGAGAGTGGATGTGAAGTGTTCTCA CCACAAAAGTGATAACTAATTGAG GTAATGCACATATTAATTAGAAAGA TTTTGTCATTCCACAATGTATATAT ACTTAAAAATATGTTATACACAATA AATACATACATTAAAAAATAAGTA AATGTA	
3UTR-012	Col6a1；胶原，VI 型，α 1	CCCACCCTGCACGCCGGCACCAAAC CCTGTCCTCCCACCCCTCCCCACTC ATCACTAAACAGAGTAAAATGTGA TGCGAATTTTCCCGACCAACCTGAT TCGCTAGATTTTTTTTAAGGAAAAG CTTGGAAAGCCAGGACACAACGCT	16

[0293]

		GCTGCCTGCTTTGTGCAGGGTCCTC CGGGGCTCAGCCCTGAGTTGGCATC ACCTGCGCAGGGCCCTCTGGGGCTC AGCCCTGAGCTAGTGTCACCTGCAC AGGGCCCTCTGAGGCTCAGCCCTGA GCTGGCGTCACCTGTGCAGGGCCCT CTGGGGCTCAGCCCTGAGCTGGCCT CACCTGGGTTCCCCACCCCGGGCTC TCCTGCCCTGCCCTCCTGCCCGCCC TCCCTCCTGCCTGCGCAGCTCCTTC CCTAGGCACCTCTGTGCTGCATCCC ACCAGCCTGAGCAAGACGCCCTCTC GGGGCCTGTGCCGCACTAGCCTCCC TCTCCTCTGTCCCCATAGCTGGTTTT TCCCACCAATCCTCACCTAACAGTT ACTTTACAATTAAACTCAAAGCAAG CTCTTCTCCTCAGCTTGGGGCAGCC ATTGGCCTCTGTCTCGTTTTGGGAA ACCAAGGTCAGGAGGCCGTTGCAG ACATAAATCTCGGCGACTCGGCCCC GTCTCCTGAGGGTCCTGCTGGTGAC CGGCCTGGACCTTGGCCCTACAGCC CTGGAGGCCGCTGCTGACCAGCACT GACCCCGACCTCAGAGAGTACTCGC AGGGGCGCTGGCTGCACTCAAGAC CCTCGAGATTAACGGTGCTAACCCC GTCTGCTCCTCCCTCCCGCAGAGAC TGGGGCCTGGACTGGACATGAGAG CCCCTTGGTGCCACAGAGGGCTGTG TCTTACTAGAAACAACGCAAACCTC TCCTTCCTCAGAATAGTGATGTGTT CGACGTTTTATCAAAGGCCCCCTTT CTATGTTCATGTTAGTTTTGCTCCTT CTGTGTTTTTTTCTGAACCATATCCA TGTTGCTGACTTTTCCAAATAAAGG TTTTCACTCCTCTC	
3UTR-013	Calr；钙网蛋白	AGAGGCCTGCCTCCAGGGCTGGACT GAGGCCTGAGCGCTCCTGCCGCAG AGCTGGCCGCGCCAAATAATGTCTC TGTGAGACTCGAGAACTTTCATTTT TTTCCAGGCTGGTTCGGATTTGGGG TGGATTTTGGTTTTGTTCCCCTCCTC CACTCTCCCCCACCCCCTCCCCGCC CTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACTGGT ATTTTATCTTTGATTCTCCTTCAGCC CTCACCCCTGGTTCTCATCTTTCTTG ATCAACATCTTTTCTTGCCTCTGTCC CCTTCTCTCATCTCTTAGCTCCCCTC CAACCTGGGGGGCAGTGGTGTGGA GAAGCCACAGGCCTGAGATTTCATC	17

[0294]

		TGCTCTCCTTCCTGGAGCCCAGAGG AGGGCAGCAGAAGGGGGTGGTGTC TCCAACCCCCCAGCACTGAGGAAG AACGGGGCTCTTCTCATTTCACCCC TCCCTTTCTCCCCTGCCCCCAGGAC TGGGCCACTTCTGGGTGGGGCAGTG GGTCCCAGATTGGCTCACACTGAGA ATGTAAGAACTACAAACAAAATTTC TATTAAATTAAATTTTGTGTCTCC	
3UTR-014	Col1a1；胶原，I型，α1	CTCCCTCCATCCCAACCTGGCTCCC TCCCACCCAACCAACTTTCCCCCCA ACCCGGAAACAGACAAGCAACCCA AACTGAACCCCCTCAAAAGCCAAA AAATGGGAGACAATTTCACATGGA CTTTGGAAAATATTTTTTTCCTTTGC ATTCATCTCTCAAACTTAGTTTTTAT CTTTGACCAACCGAACATGACCAAA AACCAAAAGTGCATTCAACCTTACC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAT AAATAAATAACTTTTTAAAAAAGG AAGCTTGGTCCACTTGCTTGAAGAC CCATGCGGGGGTAAGTCCCTTTCTG CCCGTTGGGCTTATGAAACCCCAAT GCTGCCCTTTCTGCTCCTTTCTCCAC ACCCCCCTTGGGGCCTCCCCTCCAC TCCTTCCCAAATCTGTCTCCCCAGA AGACACAGGAAACAATGTATTGTCT GCCCAGCAATCAAAGGCAATGCTC AAACACCCAAGTGGCCCCCACCCTC AGCCCGCTCCTGCCCGCCCAGCACC CCCAGGCCCTGGGGGACCTGGGGTT CTCAGACTGCCAAAGAAGCCTTGCC ATCTGGCGCTCCCATGGCTCTTGCA ACATCTCCCCTTCGTTTTTGAGGGG GTCATGCCGGGGGAGCCACCAGCC CCTCACTGGGTTCGGAGGAGAGTCA GGAAGGGCCACGACAAAGCAGAAA CATCGGATTTGGGGAACGCGTGTCA ATCCCTTGTGCCGCAGGGCTGGGCG GGAGAGACTGTTCTGTTCCTTGTGT AACTGTGTTGCTGAAAGACTACCTC GTTCTTGTCTTGATGTGTCACCGGG GCAACTGCCTGGGGGCGGGGATGG GGGCAGGGTGGAAGCGGCTCCCCA TTTTATACCAAAGGTGCTACATCTA TGTGATGGGTGGGGTGGGGAGGGA ATCACTGGTGCTATAGAAATTGAGA TGCCCCCCCAGGCCAGCAAATGTTC CTTTTTGTTCAAAGTCTATTTTTATT CCTTGATATTTTTCTTTTTTTTTTTT	18

[0295]

		TTTTTTGTGGATGGGGACTTGTGAA TTTTTCTAAAGGTGCTATTTAACAT GGGAGGAGAGCGTGTGCGGCTCCA GCCCAGCCCGCTGCTCACTTTCCAC CCTCTCTCCACCTGCCTCTGGCTTCT CAGGCCTCTGCTCTCCGACCTCTCT CCTCTGAAACCCTCCTCCACAGCTG CAGCCCATCCTCCCGGCTCCCTCCT AGTCTGTCCTGCGTCCTCTGTCCCC GGGTTTCAGAGACAACTTCCCAAAG CACAAAGCAGTTTTTCCCCCTAGGG GTGGGAGGAAGCAAAAGACTCTGT ACCTATTTTGTATGTGTATAATAAT TTGAGATGTTTTTAATTATTTTGATT GCTGGAATAAAGCATGTGGAAATG ACCCAAACATAATCCGCAGTGGCCT CCTAATTTCCTTCTTTGGAGTTGGG GGAGGGGTAGACATGGGGAAGGGG CTTTGGGGTGATGGGCTTGCCTTCC ATTCCTGCCCTTTCCCTCCCCACTAT TCTCTTCTAGATCCCTCCATAACCC CACTCCCCTTTCTCTCACCCTTCTTA TACCGCAAACCTTTCTACTTCCTCTT TCATTTTCTATTCTTGCAATTTCCTT GCACCTTTTCCAAATCCTCTTCTCCC CTGCAATACCATACAGGCAATCCAC GTGCACAACACACACACACACTCTT CACATCTGGGGTTGTCCAAACCTCA TACCCACTCCCCTTCAAGCCCATCC ACTCTCCACCCCCTGGATGCCCTGC ACTTGGTGGCGGTGGGATGCTCATG GATACTGGGAGGGTGAGGGGAGTG GAACCCGTGAGGAGGACCTGGGGG CCTCTCCTTGAACTGACATGAAGGG TCATCTGGCCTCTGCTCCCTTCTCAC CCACGCTGACCTCCTGCCGAAGGAG CAACGCAACAGGAGAGGGGTCTGC TGAGCCTGGCGAGGGTCTGGGAGG GACCAGGAGGAAGGCGTGCTCCCT GCTCGCTGTCCTGGCCCTGGGGGAG TGAGGGAGACAGACACCTGGGAGA GCTGTGGGGAAGGCACTCGCACCG TGCTCTTGGGAAGGAAGGAGACCT GGCCCTGCTCACCACGGACTGGGTG CCTCGACCTCCTGAATCCCCAGAAC ACAACCCCCCTGGGCTGGGGTGGTC TGGGGAACCATCGTGCCCCCGCCTC CCGCCTACTCCTTTTTAAGCTT	
3UTR-015	Plod1；前胶原-赖氨	TTGGCCAGGCCTGACCCTCTTGGAC CTTTCTTCTTTGCCGACAACCACTG	19

[0296]

	酸，2-酮戊二酸 5-双加氧酶 1	CCCAGCAGCCTCTGGGACCTCGGGG TCCCAGGGAACCCAGTCCAGCCTCC TGGCTGTTGACTTCCCATTGCTCTTG GAGCCACCAATCAAAGAGATTCAA AGAGATTCCTGCAGGCCAGAGGCG GAACACACCTTTATGGCTGGGGCTC TCCGTGGTGTTCTGGACCCAGCCCC TGGAGACACCATTCACTTTTACTGC TTTGTAGTGACTCGTGCTCTCCAAC CTGTCTTCCTGAAAAACCAAGGCCC CCTTCCCCCACCTCTTCCATGGGGT GAGACTTGAGCAGAACAGGGGCTT CCCCAAGTTGCCCAGAAAGACTGTC TGGGTGAGAAGCCATGGCCAGAGC TTCTCCCAGGCACAGGTGTTGCACC AGGGACTTCTGCTTCAAGTTTTGGG GTAAAGACACCTGGATCAGACTCC AAGGGCTGCCCTGAGTCTGGGACTT CTGCCTCCATGGCTGGTCATGAGAG CAAACCGTAGTCCCCTGGAGACAG CGACTCCAGAGAACCTCTTGGGAG ACAGAAGAGGCATCTGTGCACAGC TCGATCTTCTACTTGCCTGTGGGGA GGGGAGTGACAGGTCCACACACCA CACTGGGTCACCCTGTCCTGGATGC CTCTGAAGAGAGGGACAGACCGTC AGAAACTGGAGAGTTTCTATTAAAG GTCATTTAAACCA	
	3UTR-016	Nucb1；核连蛋白 1	TCCTCCGGGACCCCAGCCCTCAGGA TTCCTGATGCTCCAAGGCGACTGAT GGGCGCTGGATGAAGTGGCACAGT CAGCTTCCCTGGGGGCTGGTGTCAT GTTGGGCTCCTGGGGCGGGGGCAC GGCCTGGCATTTCACGCATTGCTGC CACCCCAGGTCCACCTGTCTCCACT TTCACAGCCTCCAAGTCTGTGGCTC TTCCCTTCTGTCCTCCGAGGGGCTT GCCTTCTCTCGTGTCCAGTGAGGTG CTCAGTGATCGGCTTAACTTAGAGA AGCCCGCCCCCTCCCCTTCTCCGTC TGTCCCAAGAGGGTCTGCTCTGAGC CTGCGTTCCTAGGTGGCTCGGCCTC AGCTGCCTGGGTTGTGGCCGCCCTA GCATCCTGTATGCCCACAGCTACTG GAATCCCCGCTGCTGCTCCGGGCCA AGCTTCTGGTTGATTAATGAGGGCA TGGGGTGGTCCCTCAAGACCTTCCC CTACCTTTTGTGGAACCAGTGATGC CTCAAAGACAGTGTCCCCTCCACAG CTGGGTGCCAGGGGCAGGGGATCC	20

[0297]

		TCAGTATAGCCGGTGAACCCTGATA CCAGGAGCCTGGGCCTCCCTGAACC CCTGGCTTCCAGCCATCTCATCGCC AGCCTCCTCCTGGACCTCTTGGCCC CCAGCCCCTTCCCCACACAGCCCCA GAAGGGTCCCAGAGCTGACCCCAC TCCAGGACCTAGGCCCAGCCCCTCA GCCTCATCTGGAGCCCCTGAAGACC AGTCCCACCCACCTTTCTGGCCTCA TCTGACACTGCTCCGCATCCTGCTG TGTGTCCTGTTCCATGTTCCGGTTCC ATCCAAATACACTTTCTGGAACAAA	
3UTR-017	α-珠蛋白	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCCTTGGGCCTCCCCCCAGCC CCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTAC CCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTG AGTGGGCGGC	21

[0298] 应理解上述表中所列举的那些是实例并且来自任何基因的任何UTR都可并入初级构建体的相应第一或第二侧翼区中。此外，可使用任何已知基因的多个野生型UTR。提供不为野生型基因的变体的人工UTR也在本发明的范围内。这些UTR或其部分可置于与它们所选自的转录物中相同的取向或可在取向或位置上有所改变。因此，5′或3′UTR可反转、缩短、延长、与一个或多个其它5′UTR或3′UTR嵌合。如本文所用，术语“改变的”在其涉及UTR序列时意指所述UTR已相对于参考序列在某些方面改变。例如，3′或5′UTR可通过如上所教导的取向或位置的变化而相对于野生型或天然UTR改变或可通过另外核苷酸的包含、核苷酸的缺失、核苷酸的交换或转位来改变。产生“改变的”UTR(无论是3′还是5′)的任何这些变化包含变体UTR。

[0299] 在一个实施方案中，可使用双重、三重或四重UTR如5′或3′UTR。如本文所用，“双重”UTR是其中同一UTR的两个拷贝串联或大体上串联编码的一种UTR。例如，可如美国专利公布20100129877中所描述使用双重β-珠蛋白3′UTR，所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0300] 具有图案化的UTR也在本发明的范围内。如本文所用，“图案化的UTR”是反映重复或交替图案如重复一次、两次或多于3次的ABABAB或AABBAABBAABB或ABCABCABC或其变体的那些UTR。在这些图案中，每个字母A、B或C表示在核苷酸层次上的不同UTR。

[0301] 在一个实施方案中，侧翼区选自其蛋白质共享共同功能、结构、特性特征的转录物的家族。例如，目标多肽可属于在特定细胞、组织中或在发育过程中的某一时间表达的蛋白质的家族。来自任何这些基因的UTR可交换相同或不同蛋白质家族的任何其它UTR以便形成新的嵌合初级转录物。如本文所用，“蛋白质家族”在广义上用于指共享至少一种功能、结构、特征、定位、起源或表达模式的两个或更多个目标多肽的群。

[0302] 在优化(如果需要)之后，初级构建体组分进行重构并且转化到载体如但不限于质粒、病毒、粘粒和人工染色体中。例如，优化的构建体可进行重构并且转化到化学感受态大肠杆菌、酵母、脉孢菌属、玉蜀黍、果蝇属等中，其中高拷贝质粒样或染色体结构通过本文所描述的方法发生。

[0303] 非翻译区还可包括翻译增强子元件(TEE)。作为非限制性实例，TEE可包括美国申

请号20090226470中所描述的那些和本领域已知的那些,所述申请以引用的方式整体并入本文。

[0304] 终止密码子

[0305] 在一个实施方案中,本发明的初级构建体可在3'非翻译区(UTR)之前包含至少两个终止密码子。终止密码子可选自TGA、TAA和TAG。在一个实施方案中,本发明的初级构建体包含终止密码子TGA和一个另外的终止密码子。在另一实施方案中,另外的终止密码子可以是TAA。在另一个实施方案中,本发明的初级构建体包含三个终止密码子。

[0306] 载体扩增

[0307] 然后扩增含有初级构建体的载体并且使用本领域已知的方法例如但不限于使用Invitrogen PURELINK™ HiPure Maxiprep试剂盒(Carlsbad,CA)的大量制备(maxi prep)来分离和纯化质粒。

[0308] 质粒线性化

[0309] 然后可使用本领域已知的方法例如但不限于使用限制性内切酶和缓冲液将质粒线性化。可使用包括例如以下各项的方法来纯化线性化反应:Invitrogen's PURELINK™ PCR微小试剂盒(Carlsbad,CA)和基于HPLC的纯化方法,如但不限于强阴离子交换HPLC、弱阴离子交换HPLC、反相HPLC(RP-HPLC)以及疏水相互作用HPLC(HIC-HPLC)和Invitrogen的标准PURELINK™ PCR试剂盒(Carlsbad,CA)。纯化方法可取决于所进行的线性化反应的大小进行修改。然后使用线性化的质粒产生用于体外转录(IVT)反应的cDNA。

[0310] cDNA模板合成

[0311] 可通过使线性化的质粒经历聚合酶链式反应(PCR)来合成cDNA模板。表4是可适用于本发明的PCR反应中的引物和探针的列表。应理解所述列表不是详尽的并且用于任何扩增的引物-探针设计在本领域技术人员的范围内。探针还可包含化学修饰的碱基以便增加对靶分子的碱基配对保真度和碱基配对强度。这类修饰可包括5-甲基-胞苷、2,6-二-氨基-嘌呤、2′-氟、硫代磷酸酯或锁核酸。

[0312] 表4.引物和探针

[0313]

引物/探针标识符	序列(5'-3')	杂交靶标	SEQ ID NO.
UFP	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG	cDNA 模板	22
URP	T_{x160}CTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA	cDNA 模板	23
GBA1	CCTTGACCTTCTGGAACTTC	酸性葡糖脑苷脂酶	24
GBA2	CCAAGCACTGAAACGGATAT	酸性葡糖脑苷脂	25

[0314]

		酶	
LUC1	GATGAAAAGTGCTCCAAGGA	荧光素酶	26
LUC2	AACCGTGATGAAAAGGTACC	荧光素酶	27
LUC3	TCATGCAGATTGGAAAGGTC	荧光素酶	28
GCSF1	CTTCTTGGACTGTCCAGAGG	G-CSF	29
GCSF2	GCAGTCCCTGATACAAGAAC	G-CSF	30
GCSF3	GATTGAAGGTGGCTCGCTAC	G-CSF	31

[0315] *UFP是通用正向引物;URP是通用反向引物。

[0316] 在一个实施方案中,cDNA可在经历转录之前被提交用于测序分析。

[0317] mRNA产生

[0318] mRNA或mmRNA的方法可包括但不限于,体外转录、cDNA模板去除和RNA净化以及mRNA加帽和/或加尾反应。

[0319] 体外转录

[0320] 在之前步骤中产生的cDNA可使用体外转录(IVT)系统进行转录。所述系统通常包括转录缓冲液、核苷酸三磷酸(NTP)、RNA酶抑制剂和聚合酶。NTP可以自制制造、可选自供应商或可如本文所描述的合成。NTP可选自但不限于本文所描述的那些,包括天然和非天然(修饰的)NTP。聚合酶可选自但不限于T7RNA聚合酶、T3RNA聚合酶和突变体聚合酶如但不限于能够并入修饰核酸的聚合酶。

[0321] RNA聚合酶

[0322] 任何数量的RNA聚合酶或变体可用于本发明的初级构建体的设计中。

[0323] RNA聚合酶可通过插入或缺失RNA聚合酶序列的氨基酸来进行修饰。作为非限制性实例,RNA聚合酶可进行修饰以便与未修饰的RNA聚合酶相比表现出增加的并入2'修饰核苷酸三磷酸的能力(参见国际公布WO2008078180和美国专利8,101,385;以引用的方式整体并入本文)。

[0324] 可通过进化RNA聚合酶、优化RNA聚合酶氨基酸和/或核酸序列和/或通过使用本领域已知的其它方法来获得变体。作为非限制性实例,T7RNA聚合酶变体可使用由Esvelt等人(Nature(2011)472(7344):499-503;以引用的方式整体并入本文)提出的连续定向进化系统进行进化,其中T7RNA聚合酶的克隆可编码至少一个突变,如但不限于,位置93处的赖氨酸取代为苏氨酸(K93T)、I4M、A7T、E63V、V64D、A65E、D66Y、T76N、C125R、S128R、A136T、N165S、G175R、H176L、Y178H、F182L、L196F、G198V、D208Y、E222K、S228A、Q239R、T243N、G259D、M267I、G280C、H300R、D351A、A354S、E356D、L360P、A383V、Y385C、D388Y、S397R、M401T、N410S、K450R、P451T、G452V、E484A、H523L、H524N、G542V、E565K、K577E、K577M、N601S、S684Y、L699I、K713E、N748D、Q754R、E775K、A827V、D851N或L864F。作为另一个非限制性实例,T7RNA聚合酶变体可编码如美国公布号20100120024和20070117112中所描述的至少一个突变;所述公布以引用的方式整体并入本文。RNA聚合酶的变体还可包括但不限于,取代变体、保守氨基酸取代、插入变体、缺失变体和/或共价变体。

[0325] 在一个实施方案中,初级构建体可设计成由野生型或变体RNA聚合酶识别。这样做时,初级构建体可修饰成包含来自野生型或亲本初级构建体的序列变化的位点或区。

[0326] 在一个实施方案中,初级构建体可被设计成在RNA聚合酶结合或识别位点的上游、

RNA聚合酶结合或识别位点的下游、TATA盒序列的上游、初级构建体的TATA盒序列的下游但初级构建体的编码区的上游、5'UTR内、5'UTR之前和/或5'UTR之后包含至少一个取代和/或插入。

[0327] 在一个实施方案中，初级构建体的5'UTR可通过同一碱基的核苷酸的至少一个区和/或串的插入而被置换。核苷酸的区和/或串可包括但不限于至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个核苷酸并且所述核苷酸可以是天然的和/或非天然的。作为非限制性实例，核苷酸的群可包含5至8个腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、本文所公开的任何其它核苷酸的串和/或其组合。

[0328] 在一个实施方案中，初级构建体的5'UTR可通过两个不同碱基的核苷酸的至少两个区和/或串的插入而被置换，所述碱基例如但不限于腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、本文所公开的任何其它核苷酸和/或其组合。例如，5'UTR可通过插入5至8个腺嘌呤碱基、接着插入5至8个胞嘧啶碱基来置换。在另一个实例中，5'UTR可通过插入5至8个胞嘧啶碱基、接着插入5至8个腺嘌呤碱基来置换。

[0329] 在一个实施方案中，初级构建体可包括在可由RNA聚合酶识别的转录起始位点下游的至少一个取代和/或插入。作为非限制性实例，至少一个取代和/或插入可通过取代紧靠转录起始位点下游(如但不限于+1至+6)的区中的至少一个核酸来在转录起始位点的下游发生。紧靠转录起始位点下游的核酸酸的区的变化可影响起始速率、增加表观核苷酸三磷酸(NTP)反应恒定值并且增加短转录物与转录复合物的的解离从而消除(curing)初始转录(Brieba等人,Biochemistry(2002)41:5144-5149;以引用的方式整体并入本文)。至少一个核酸的修饰、取代和/或插入可引起核酸序列的沉默突变或可引起氨基酸序列中的突变。

[0330] 在一个实施方案中，初级构建体可包括在转录起始位点下游的至少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个或至少13个鸟嘌呤碱基的取代。

[0331] 在一个实施方案中，初级构建体可包括紧靠转录起始位点下游的区中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或至少6个鸟嘌呤碱基的取代。作为非限制性实例，如果所述区中的核苷酸是GGGAGA，那么鸟嘌呤碱基可被至少1个、至少2个、至少3个或至少4个腺嘌呤核苷酸取代。在另一个非限制性实例中，如果所述区中的核苷酸是GGGAGA，那么鸟嘌呤碱基可被至少1个、至少2个、至少3个或至少4个胞嘧啶碱基取代。在另一个非限制性实例中，如果所述区中的核苷酸是GGGAGA，那么鸟嘌呤碱基可被至少1个、至少2个、至少3个或至少4个胸腺嘧啶和/或本文所描述的任何核苷酸取代。

[0332] 在一个实施方案中，初级构建体可包括起始密码子上游的至少一个取代和/或插入。为清楚起见，本领域技术人员将理解起始密码子是蛋白质编码区的第一个密码子，而转录起始位点是转录开始的位点。初级构建体可包括但不限于核苷酸碱基的至少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个或至少8个取代和/或插入。核苷酸碱基可在起始密码子上游的1个、至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个位置处插入或取代。所插入和/或取代的核苷酸可以是相同碱基(例如，全部是A或全部是C或全部是T或全部是G)、两种不同的碱基(例如，A和C、A和T或C和T)、三种不同的碱基(例如，A、C和T或A、C和T)或至少四种不同的碱基。作为非限制性实例，初级构建体中的编码区上游的鸟嘌呤碱基可被腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或本文所描述的任何核苷酸取代。在另一个非限制性实例中，

初级构建体中的鸟嘌呤碱基的取代可进行设计以便保留在转录起始位点下游的区中并且在起始密码子之前的一个鸟嘌呤碱基(参见Esvelt等人.Nature(2011)472(7344):499-503;以引用的方式整体并入本文)。作为非限制性实例,至少5个核苷酸可插入转录起始位点下游但起始密码子上游的1个位置处并且所述至少5个核苷酸可以是同一碱基类型。

[0333] cDNA模板去除和净化

[0334] 可使用本领域已知的方法如但不限于用脱氧核糖核酸酶I(DNA酶I)处理来去除cDNA模板。RNA净化还可包括纯化方法,如但不限于来自Beckman Coulter(Danvers,MA)的AGENCOURT® CLEANSEQ®系统,基于HPLC的纯化方法,如但不限于强阴离子交换HPLC、弱阴离子交换HPLC、反相HPLC(RP-HPLC)以及疏水相互作用HPLC(HIC-HPLC)。

[0335] 加帽和/加尾反应

[0336] 初级构建体或mmRNA还可经历加帽和/或加尾反应。加帽反应可通过本领域已知的方法来进行以便将5′帽添加至初级构建体的5′端。用于加帽的方法包括但不限于使用牛痘加帽酶(New England Biolabs,Ipswich,MA)。

[0337] 聚-A加尾反应可通过本领域已知的方法如但不限于2′O-甲基转移酶和如本文所描述的方法来进行。如果从cDNA产生的初级构建体不包括聚-T,那么可有益的是在净化初级构建体之前进行聚-A加尾反应。

[0338] mRNA纯化

[0339] 初级构建体或mmRNA纯化可包括但不限于mRNA或mmRNA净化、质量保证和质量控制。mRNA或mmRNA净化可通过本领域已知的方法如但不限于AGENCOURT®珠粒(Beckman Coulter Genomics,Danvers,MA)、聚-T珠粒、LNA™ oligo-T捕获探针(EXIQON® Inc,Vedbaek,Denmark),或基于HPLC的纯化方法如但不限于强阴离子交换HPLC、弱阴离子交换HPLC、反相HPLC(RP-HPLC)以及疏水相互作用HPLC(HIC-HPLC)来进行。术语“纯化的”当关于多核苷酸使用时如“纯化的mRNA或mmRNA”是指与至少一种污染物分离的多核苷酸。如本文所用,“污染物”是使另一种物质不适当、不纯或低品质的任何物质。因此,纯化的多核苷酸(例如DNA和RNA)以不同于在自然中发现它的形式或布置的形式或布置、或不同于在使它经受处理或纯化方法之前存在的形式或布置的形式或布置存在。

[0340] 质量保证和/或质量控制检查可使用诸如但不限于凝胶电泳、UV吸光度或分析型HPLC的方法来进行。

[0341] 在另一个实施方案中,mRNA或mmRNA可通过包括但不限于逆转录酶PCR的方法来测序。

[0342] 在一个实施方案中,mRNA或mmRNA可使用诸如但不限于紫外可见光谱(UV/Vis)的方法来量化。UV/Vis光谱仪的非限制性实例是NANODROP®光谱仪(ThermoFisher,Waltham,MA)。量化的mRNA或mmRNA可进行分析以便确定所述mRNA或mmRNA是否可具有适当大小、检查没有发生所述mRNA或mmRNA的降解。mRNA或mmRNA的降解可通过以下方法来检查,例如但不限于琼脂糖凝胶电泳,基于HPLC的纯化方法如但不限于强阴离子交换HPLC、弱阴离子交换HPLC、反相HPLC(RP-HPLC)以及疏水相互作用HPLC(HIC-HPLC),液相层析-质谱法(LCMS),毛细管电泳(CE)以及毛细管凝胶电泳(CGE)。

[0343] 信号序列

[0344] 初级构建体或mmRNA还可编码有助于将多肽运输到治疗相关位点的另外特征。帮助蛋白质运输的这样一种特征是信号序列。如本文所用,“信号序列”或“信号肽”分别是长度为约9至200个核苷酸(3至60个核酸)的多核苷酸或多肽,所述多核苷酸或多肽分别并入编码区或所编码的多肽的5′(或N-末端)。添加这些序列使得所编码的多肽通过一种或多种分泌途径运输至内质网。一些信号序列在蛋白质被转运之后通过信号肽酶从蛋白质裂解。

[0345] 表5是可被并入以用于由本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码的蛋白质信号序列的代表性列表。

[0346] 表5.信号序列

[0347]

ID	描述	核苷酸序列 (5′-3′)	SEQ ID NO.	编码的肽	SEQ ID NO.
SS-001	α-1-抗胰蛋白酶	ATGATGCCATCCTCAGTCTCATGGGGTATTTTGCTCTTGGCGGGTCTGTGCTGTCTCGTGCCGGTGTCGCTCGCA	32	MMPSSVSWGILLAGLCCLVPVSLA	94
SS-002	G-CSF	ATGGCCGGACCGGCGACTCAGTCGCCCATGAAACTCATGGCCCTGCAGTTGTTGCTTTGGCACTCAGCCCTCTGGACCGTCCAAGAGGCG	33	MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEA	95
SS-003	IX 因子	ATGCAGAGAGTGAACATGATTATGGCCGAGTCCCCATCGCTCATCACAATCTGCCTGCTTGGTACCTGCTTTCCGCCGAATGCACTGTCTTTCTGGATCACGAGAATGCGAATAAGATCTTGAACCGACCCAAACGG	34	MQRVNMIMAESPSLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR	96
SS-004	催乳素	ATGAAAGGATCATTGCTGTTGCTCCTCGTGTCGAACCTTCTGCTTTGCCAGTCCGTAGCCCCC	35	MKGSLLLLLVSNLLLCQSVAP	97
SS-005	白蛋白	ATGAAATGGGTGACGTTCATCTCACTGTTGTTTTTGTTCTCGTCCGCCTACTCCAGGGGAGTATTCCGCCGA	36	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR	98
SS-006	HMMSP38	ATGTGGTGGCGGCTCTGGTGGCTGCTCCTGTTGCTCCTCTTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCA	37	MWWRLWWLLLLLLLLPMWA	99
MLS-001	鸟氨酸氨甲酰基转移酶	TGCTCTTTAACCTCCGCATCCTGTTGAATAACGCTGCGTTCCGAAATGGGCATAACTTCATGGTACGCAACTTCAGATGCGGCCAGCCACTCCAG	38	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQ	100
MLS-002	细胞色素C氧化酶亚基8A	ATGTCCGTCTTGACACCCCTGCTCTTGAGAGGGCTGACGGGGTCCGCTAGACGCCTGCCGGTACCGCGAGCGAAGATCCACTCCCTG	39	MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSL	101
MLS-0	细胞	ATGAGCGTGCTCACTCC	40	MSVLTPLLLR	10

[0348]

03	色素C氧化酶亚基8A	GTTGCTTCTTCGAGGGCTTACGGGATCGGCTCGGAGGTTGCCCGTCCCGAGAGCGAAGATCCATTCGTTG		GLTGSARRLPVPRAKIHSL	2
SS-007	III型，细菌性	TGACAAAAATAACTTTATCTCCCCAGAATTTTAGAATCCAAAAACAGGAAACCACACTACTAAAAGAAAAATCAACCGAGAAAAATTCTTTAGCAAAAAGTATTCTCGCAGTAAAAATCACTTCATCGAATTAAGGTCAAAATTATCGGAACGTTTTATTTCGCATAAGAACACT	41	MVTKITLSPQNFRIQKQETTLLKEKSTEKNSLAKSILAVKNHFIELRSKLSERFISHKNT	103
SS-008	病毒	ATGCTGAGCTTTGTGGATACCCGCACCCTGCTGCTGCTGGCGGTGACCAGCTGCCTGGCGACCTGCCAG	42	MLSFVDTRTLLLLAVTSCLATCQ	104
SS-009	病毒	ATGGGCAGCAGCCAGGCGCCGCGCATGGGCAGCGTGGGCGGCCATGGCCTGATGGCGCTGCTGATGGCGGGCCTGATTCTGCCGGGCATTCTGGCG	43	MGSSQAPRMGSVGGHGLMALLMAGLILPGILA	105
SS-010	病毒	ATGGCGGGCATTTTTTATTTTCTGTTTAGCTTTCTGTTTGGCATTTGCGAT	44	MAGIFYFLFSFLFGICD	106
SS-011	病毒	ATGGAAAACCGCCTGCTGCGCGTGTTTCTGGTGTGGGGCGGCGCTGACCATGGATGGCGCGAGCGCG	45	MENRLLRVFLVWAALTMDGASA	107
SS-012	病毒	ATGGCGCGCCAGGGCTGCTTTGGCAGCTATCAGGTGATTAGCCTGTTTACCTTTGCGATTGGCGTGAACCTGTGCCTGGGC	46	MARQGCFGSYQVISLFTFAIGVNLCLG	108
SS-013	*芽胞杆菌*	ATGAGCCGCCTGCCGGTGCTGCTGCTGCTGCAGCTGCTGGTGCGCCCGGGCCTGCAG	47	MSRLPVLLLLQLLVRPGLQ	109
SS-014	*芽胞杆菌*	ATGAAACAGCAGAAACGCCTGTATGCGCGCCTGCTGACCCTGCTGTTTGCGCTGATTTTTCTGCTGCCGCATAGCAGCGCGAGCGCG	48	MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSSASA	110
SS-015	分泌信号	ATGGCGACGCCGCTGCCTCCGCCCTCCCCGCGGCACCTGCGGCTGCTGCGG	49	MATPLPPPSPRHLRLLRLLLSG	111

[0349]

		CTGCTGCTCTCCGCCCTCGTCCTCGGC			
SS-016	分泌信号	ATGAAGGCTCCGGGTCGGCTCGTGCTCATCATCCTGTGCTCCGTGGTCTTCTCT	50	MKAPGRLVLIILCSVVFS	112
SS-017	分泌信号	ATGCTTCAGCTTTGGAAACTTGTTCTCCTGTGCGGCGTGCTCACT	51	MLQLWKLLCGVLT	113
SS-018	分泌信号	ATGCTTTATCTCCAGGGTTGGAGCATGCCTGCTGTGGCA	52	MLYLQGWSMPAVA	114
SS-019	分泌信号	ATGGATAACGTGCAGCCGAAAATAAAACATCGCCCCTTCTGCTTCAGTGTGAAAGGCCACGTGAAGATGCTGCGGCTGGATATTATCAACTCACTGGTAACAACAGTATTCATGCTCATCGTATCTGTGTTGGCACTGATACCA	53	MDNVQPKIKHRPFCFSVKGHVKMLRLDIINSLVTTVFMLIVSVLALIP	115
SS-020	分泌信号	ATGCCCTGCCTAGACCAACAGCTCACTGTTCATGCCCTACCCTGCCCTGCCCAGCCCTCCTCTCTGGCCTTCTGCCAAGTGGGGTTCTTAACAGCA	54	MPCLDQQLTVHALPCPAQPSSLAFCQVGFLTA	116
SS-021	分泌信号	ATGAAAACCTTGTTCAATCCAGCCCCTGCCATTGCTGACCTGGATCCCCAGTTCTACACCCTCTCAGATGTGTTCTGCTGCAATGAAAGTGAGGCTGAGATTTTAACTGGCCTCACGGTGGGCAGCGCTGCAGATGCT	55	MKTLFNPAPAIADLDPQFYTLSDVFCCNESEAEILTGLTVGSAADA	117
SS-022	分泌信号	ATGAAGCCTCTCCTTGTTGTGTTTGTCTTTCTTTTCCTTTGGGATCCAGTGCTGGCA	56	MKPLLVVFVFLFLWDPVLA	118
SS-023	分泌信号	ATGTCCTGTTCCCTAAAGTTTACTTTGATTGTAATTTTTTTTTACTGTTGGCTTTCATCCAGC	57	MSCSLKFTLIVIFFTCTLSSS	119
SS-024	分泌信号	ATGGTTCTTACTAAACCTCTTCAAAGAAATGGCAGCATGATGAGCTTTGAAAATGTGAAAGAAAAGAGCAGAGAAGGAGGGCCCCATGCACACACACCCGAAGAAGAATTGTGTTTCGTG	58	MVLTKPLQRNGSMMSFENVKEKSREGGPHAHTPEEELCFVVTHTPQVQTTLNLFFHIFKVLTQPLS	120

[0350]

		GTAACACACTACCCTCAGGTTCAGACCACACTCAACCTGTTTTTCCATATATTCAAGGTTCTTACTCAACCACTTTCCCTTCTGTGGGGT		LLWG	
SS-025	分 泌信号	ATGGCCACCCCGCCATTCCGGCTGATAAGGAAGATGTTTTCCTTCAAGGTGAGCAGATGGATGGGGCTTGCCTGCTTCCGGTCCCTGGCGGCATCC	59	MATPPFRLIRKMFSFKVSRWMGLACFRSLAAS	121
SS-026	分 泌信号	ATGAGCTTTTTCCAACTCCTGATGAAAAGGAAGGAACTCATTCCCTTGGTGGTGTTCATGACTGTGGCGGCGGGTGGAGCCTCATCT	60	MSFFQLLMKRKELIPLVVFMTVAAGGASS	122
SS-027	分 泌信号	ATGGTCTCAGCTCTGCGGGGAGCACCCCTGATCAGGGTGCACTCAAGCCCTGTTTCTTCTCCTTCTGTGAGTGGACCACGGAGGCTGGTGAGCTGCCTGTCATCCCAAAGCTCAGCTCTGAGC	61	MVSALRGAPLIRVHSSPVSSPSVSGPAALVSCLSSQSSALS	123
SS-028	分 泌信号	ATGATGGGGTCCCCAGTGAGTCATCTGCTGGCCGGCTTCTGTGTGTGGGTCGTCTTGGGC	62	MMGSPVSHLLAGFCVWVVLG	124
SS-029	分 泌信号	ATGGCAAGCATGGCTGCCGTGCTCACCTGGGCTCTGGCTCTTCTTTCAGCGTTTTCGGCCACCCAGGCA	63	MASMAAVLTWALALLSAFSATQA	125
SS-030	分 泌信号	ATGGTGCTCATGTGGACCAGTGGTGACGCCTTCAAGACGGCCTACTTCCTGCTGAAGGGTGCCCCTCTGCAGTTCTCCGTGTGCGGCCTGCTGCAGGTGCTGGTGGACCTGGCCATCCTGGGGCAGGCCTACGCC	64	MVLMWTSGDAFKTAYFLLKGAPLQFSVCGLLQVLVDLAILGQATA	126
SS-031	分 泌信号	ATGGATTTTGTCGCTGGAGCCATCGGAGGCGTCTGCGGTGTTGCTGTGGGCTACCCCCTGGACACGGTGAAGGTCAGGATCCAGACGGAGCCAAAGTACACAGGCATCTGGCACTGCGTCCGGGATACGTATCACCGAGAGCGCGTGTGGG	65	MDFVAGAIGGVCGVAVGYPLDTVKVRIQTEPLYTGIWHCVRDTYHRERVWGFYRGLSLPVCTVSLVSS	127

[0351]

		GCTTCTACCGGGGCCTCT CGCTGCCCGTGTGCACG GTGTCCCTGGTATCTTCC			
SS-032	分 泌 信号	ATGGAGAAGCCCCTCTT CCCATTAGTGCCTTTGCA TTGGTTTGGCTTTGGCTA CACAGCACTGGTTGTTTC TGGTGGGATCGTTGGCT ATGTAAAAACAGGCAGC GTGCCGTCCCTGGCTGC AGGGCTGCTCTTCGGCA GTCTAGCC	66	MEKPLFPLVP LHWFGFGYT ALVVSGGIVG YVKTGSVPSL AAGLLFGSLA	128
SS-033	分 泌 信号	ATGGGTCTGCTCCTTCCC CTGGCACTCTGCATCCTA GTCCTGTGC	67	MGLLLPLAL CILVLC	129
SS-034	分 泌 信号	ATGGGGATCCAGACGAG CCCCGTCCTGCTGGCCTC CCTGGGGGTGGGGCTGG TCACTCTGCTCGGCCTGG CTGTGGGC	68	MGIQTSPVLL ASLGVGLVT LLGLAVG	130
SS-035	分 泌 信号	ATGTCGGACCTGCTACT ACTGGGCCTGATTGGGG GCCTGACTCTCTTACTGC TGCTGACGCTGCTAGCCT TTGCC	69	MSDLLLLGLI GGLTLLLLLT LLAFA	131
SS-036	分 泌 信号	ATGGAGACTGTGGTGAT TGTTGCCATAGGTGTGCT GGCCACCATGTTTCTGGC TTCGTTTGCAGCCTTGGT GCTGGTTTGCAGGCAG	70	METVVIVAIG VLATIFLASF AALVLVCRQ	132
SS-037	分 泌 信号	ATGCGCGGCTCTGTGGA GTGCACCTGGGGTTGGG GGCACTGTGCCCCCAGC CCCCTGCTCCTTTGGACT CTACTTCTGTTTGCAGCC CCATTTGGCCTGCTGGG G	71	MAGSVECTW GWGHCAPSP LLLWTLLLFA APFGLLG	133
SS-038	分 泌 信号	ATGATGCCGTCCCGTAC CAACCTGGCTACTGGAA TCCCCAGTAGTAAAGTG AAATATTCAAGGCTCTC CAGCACAGACGATGGCT ACATTGACCTTCAGTTTA AGAAAACCCCTCCTAAG ATCCCTTATAAGGCCATC GCACTTGCCACTGTGCTG TTTTTGATTGGCGCC	72	MMPSRTNLA TGIPSSKVKY SRLSSTDDGY IDLQFKKTPP KIPYKAIALA TVLFLIGA	134
SS-039	分 泌 信号	ATGGCCCTGCCCCAGAT GTGTGACGGGAGCCACT TGGCCTCCACCCTCCGCT	73	MALPQMCDG SHLASTLRYC MTVSGTVVL	135

		ATTGCATGACAGTCAGCGGCACAGTGGTTCTGGTGGCCGGGACGCTCTGCTTCGCT		VAGTLCFA	
SS-041	Vrg-6	TGAAAAAGTGGTTCGTTGCTGCCGGCATCGGCGCTGCCGGACTCATGCTCTCCAGCGCCGCCA	74	MKKWFVAAGIGAGLLMLSSAA	136
SS-042	PhoA	ATGAAACAGAGCACCATTGCGCTGGCGCTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCCGGTGACCAAAGCG	75	MKQSTIALALLPLLFTPVTKA	137
SS-043	OmpA	ATGAAAAAAACCGCGATTGCGATTGCGGTGGCGCTGGCGGGCTTTGCGACCGTGGCGCAGGCG	76	MKKTAIAIAVALAGFATVAQA	138
SS-044	STI	ATGAAAAAACTGATGCTGGCGATTTTTTTTAGCGTGCTGAGCTTTCCGAGCTTTAGCCAGAGC	77	MKKLMLAIFFSVLSFPSFSQS	139
SS-045	STII	ATGAAAAAAAACATTGCGTTTCTGCTGGCGAGCATGTTTGTGTTTAGCATTGCGACCAACGCGTATGCG	78	MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYA	140
SS-046	淀粉酶	ATGTTTGCGAAACGCTTTAAAACCAGCCTGCTGCCGCTGTTTGCGGGCTTTCTGCTGCTGTTTCATCTGGTGCTGGCGGGCCCGGCGGCGGCGAGC	79	MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAAS	141
SS-047	α 因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCGCGGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	80	MRFPSIFTAVLFAASSALA	142
SS-048	α 因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCACCGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	81	MRFPSIFTTVLFAASSALA	143
SS-049	α 因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCAGCGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	82	MRFPSIFTSVLFAASSALA	144
SS-050	α 因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCCATGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	83	MRFPSIFTHVLFAASSALA	145
SS-051	α 因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCATTGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	84	MRFPSIFTIVLFAASSALA	146

[0352]

	SS-052	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCTTTGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	85	MRFPSIFTFVLFAASSALA	147
	SS-053	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCGAAGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	86	MRFPSIFTEVLFAASSALA	148
	SS-054	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCGGCGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	87	MRFPSIFTGVLFAASSALA	149
	SS-055	内切葡聚糖酶V	ATGCGTTCCTCCCCCCTCCTCCGCTCCGCCGTTGTGGCCGCCCTGCCGGTGTTGGCCCTTGCC	88	MRSSPLLRSAVVAALPVLALA	150
	SS-056	分泌信号	ATGGGCGCGGCGGCCGTGCGCTGGCACTTGTGCGTGCTGCTGGCCCTGGGCACACGCGGGCGGCTG	89	MGAAAVRWHLCVLLALGTRGRL	151
[0353]	SS-057	真菌	ATGAGGAGCTCCCTTGTGCTGTTCTTTGTCTCTGCGTGGACGGCCTTGGCCAG	90	MRSSLVLFFVSAWTALA	152
	SS-058	纤连蛋白	ATGCTCAGGGGTCCGGGACCCGGGCGGCTGCTGCTGCTAGCAGTCCTGTGCCTGGGGACATCGGTGCGCTGCACCGAAACCGGGAAGAGCAAGAGG	91	MLRGPGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKR	153
	SS-059	纤连蛋白	ATGCTTAGGGGTCCGGGGCCCGGGCTGCTGCTGCTGGCCGTCCAGCTGGGGACAGCGGTGCCCTCCACG	92	MLRGPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGA	154
	SS-060	纤连蛋白	ATGCGCCGGGGGGCCCTGACCGGGCTGCTCCTGGTCCTGTGCCTGAGTGTTGTGCTACGTGCAGCCCCCTCTGCAACAAGCAAGAAGCGCAGG	93	MRRGALTGLLLVLCLSVVLRAAPSATSKKRR	155

[0354] 在所述表中,SS是分泌信号并且MLS是线粒体前导信号。本发明的初级构建体或mmRNA可设计成编码SEQ ID NO 94至155的任何信号序列或其片段或变体。这些序列可包括在多肽编码区的开头、中间或末端处或可替代地至侧翼区中。此外,本发明的任何多核苷酸初级构建体还可包含由SEQ ID NO 32-93定义的一个或多个序列。这些可在第一区或任一侧翼区中。

[0355] 可在本发明中使用的另外信号序列包括例如在数据库如http://www.signalpeptide.de/或http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/所找到的那些中教导的那些。描述于美国专利8,124,379、7,413,875和7,385,034中的那些也在本发明的范围

内,并且所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0356] 靶标选择

[0357] 根据本发明,初级构建体包含编码至少一个目标多肽的连接核苷的至少第一区。本发明的目标多肽或“靶标”或蛋白质和肽列于:共同待决的以下各案的表6中:2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics的美国临时专利申请号61/618,862、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics的美国临时专利申请号61/681,645、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics美国临时专利申请号61/737,130、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/618,866、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/681,647、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies的美国临时专利申请号61/737,134、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/618,868、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/681,648、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines的美国临时专利申请号61/737,135、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/618,873、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/681,650、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的美国临时专利申请号61/737,147、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/618,878、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/681,654、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins的美国临时专利申请号61/737,152、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/618,885、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/681,658、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的美国临时专利申请号61/737,155、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/618,896、2012年7月5日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/668,157、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/681,661、2012年12月14日提交的名称为Modified

Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins的美国临时专利申请号61/737,160、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/618,911、2012年8月10日提交的,名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/681,667、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的美国临时专利申请号61/737,168、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/618,922、2012年8月10日提交的,名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/681,675、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的美国临时专利申请号61/737,174、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,935、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/681,687、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,184、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,945、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/681,696、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,191、2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/618,953、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease美国临时专利申请号61/681,704、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的美国临时专利申请号61/737,203、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics and Proteins Associated with Human Disease的国际申请号PCT/US2013/030062、名称为Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins的国际申请号PCT/US2013/030064、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Membrane Proteins的国际申请号PCT/US2013/030059、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins的国际申请号PCT/US2013/030066、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins的国际申请号PCT/US2013/030067、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins的国际申请号PCT/US2013/030060、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for

the Production of Proteins Associated with Human Disease的国际申请号PCT/US2013/030061;共同待决的以下各案的表6和7中:2012年8月10日提交的,名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/681,720、2012年12月14日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/737,213、2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/681,742、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030070;共同待决的以下案的表6、178和179中:2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030068;共同待决的以下案的表6、28和29中:2012年4月2日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/618,870;共同待决的以下案的表6、56和57中:2012年8月10日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/681,649;共同待决的以下案的表6、186和187中:2012年12月14日提交的Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides的美国临时专利申请号61/737,139;以及共同待决的以下案的表6、185和186中:2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides的国际申请号PCT/US2013/030063;所述申请各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0358] 作为非限制性实例,本发明的靶标在表6中示出,除了编码目标多肽的基因的名称和描述,还有ENSEMBL转录物ID(ENST)、参考申请的序列号以及参考申请中提及靶标描述的靶标编号。涉及列于共同待决的2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Biologics and Proteins Associated with Human Disease 的国际申请号PCT/US2013/030062、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease的国际申请号PCT/US2013/030061、2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030068和2013年3月9日提交的名称为Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides的国际申请号PCT/US2013/030070的表6中的靶标的序列以引用的方式整体并入本文。对于任何特定基因,可存在一种或多种变体或同种型。当这些存在时,它们也在表中示出。本领域的技术人员将理解所述表中公开的是潜在侧翼区。这些在ORF或编码区的5′(上游)或3′(下游)的每个ENST转录物中编码。通过教导ENSP序列明确地且具体地公开编码区。因此,所教导的在编码蛋白质的序列的侧面的序列被认为是侧翼区。还有可能通过使用一个或多个可供使用的数据库或算法来进一步表征5′和3′侧翼区。数据库注释了包含于ENST转录物的侧翼区中的特征并且这些是本领域中可获得的。

[0359] 表6.靶标

[0360]

靶标描述	ENST	参考申请序列号	参考申请中的靶标编号
果糖二磷酸醛缩酶 A	563060	PCT/US2013/030062	21
果糖二磷酸醛缩酶 A	564546	PCT/US2013/030062	22
果糖二磷酸醛缩酶 A	564595	PCT/US2013/030062	23
醛缩酶 A，果糖二磷酸酯	338110	PCT/US2013/030062	24
醛缩酶 A，果糖二磷酸酯	395240	PCT/US2013/030062	25
醛缩酶 A，果糖二磷酸酯	395248	PCT/US2013/030062	26
醛缩酶 A，果糖二磷酸酯	412304	PCT/US2013/030062	27
α-甲基酰基辅酶 A 消旋酶	335606	PCT/US2013/030061	1556
α-甲基酰基辅酶 A 消旋酶	382072	PCT/US2013/030061	1557
α-甲基酰基辅酶 A 消旋酶	441713	PCT/US2013/030061	1558
α-甲基酰基辅酶 A 消旋酶	382085	PCT/US2013/030061	1559
血清淀粉样蛋白 P 成分	255040	PCT/US2013/030062	44
血管生成素 1	297450	PCT/US2013/030070	136
血管生成素 1	395820	PCT/US2013/030070	137
血管生成素 1	517746	PCT/US2013/030070	138
血管生成素 1	520052	PCT/US2013/030070	139
血管生成素 1	520734	PCT/US2013/030070	140
APOA1 Milano; apo A-I(R173C)Milano , ETC-216		PCT/US2013/030062	48
APOA1 Paris; apo A-I(R151C)Paris		PCT/US2013/030062	49
ApoA-a 优化 mRNA		PCT/US2013/030062	50
载脂蛋白 A-I	236850	PCT/US2013/030062	51
载脂蛋白 A-I	359492	PCT/US2013/030062	52
载脂蛋白 A-I	375320	PCT/US2013/030062	53
载脂蛋白 A-I	375323	PCT/US2013/030062	54
精氨基琥珀酸裂解酶	304874	PCT/US2013/030062	61
精氨基琥珀酸裂解酶	380839	PCT/US2013/030062	62
精氨基琥珀酸裂解酶	395331	PCT/US2013/030062	63
精氨基琥珀酸裂解酶	395332	PCT/US2013/030062	64
精氨基琥珀酸裂解酶	502022	PCT/US2013/030062	65
artemin	372354	PCT/US2013/030062	73
artemin	372359	PCT/US2013/030062	74
artemin	414809	PCT/US2013/030062	75
artemin	471394	PCT/US2013/030062	76
artemin	474592	PCT/US2013/030062	77
artemin	477048	PCT/US2013/030062	78
artemin	491846	PCT/US2013/030062	79
artemin	498139	PCT/US2013/030062	80
芳基硫酸酯酶 B	264914	PCT/US2013/030062	81

[0361]

芳基硫酸酯酶 B	264914	PCT/US2013/030062	82
芳基硫酸酯酶 B	396151	PCT/US2013/030062	83
芳基硫酸酯酶 B	521117	PCT/US2013/030062	84
骨形态发生蛋白 2	378827	PCT/US2013/030062	111
骨形态发生蛋白 7	395863	PCT/US2013/030062	112
骨形态发生蛋白 7	395864	PCT/US2013/030062	113
支链酮酸脱氢酶 E1 α 多肽	269980	PCT/US2013/030061	3520
支链酮酸脱氢酶 E1, α 多肽	378196	PCT/US2013/030061	3521
凝血因子 II (凝血酶)	311907	PCT/US2013/030062	131
凝血因子 II (凝血酶)	446804	PCT/US2013/030062	132
凝血因子 II (凝血酶)	530231	PCT/US2013/030062	133
凝血因子 III (促凝血酶原激酶，组织因子)	334047	PCT/US2013/030062	134
凝血因子 III (促凝血酶原激酶，组织因子)	370207	PCT/US2013/030062	135
凝血因子 IX	218099	PCT/US2013/030062	136
凝血因子 IX	394090	PCT/US2013/030062	137
凝血因子 VIII，促凝血成分	330287	PCT/US2013/030062	144
凝血因子 VIII，促凝血成分	360256	PCT/US2013/030062	145
凝血因子 XI	264692	PCT/US2013/030062	149
凝血因子 XI	403665	PCT/US2013/030062	150
凝血因子 XI	452239	PCT/US2013/030062	151
集落刺激因子 2 (粒细胞-巨噬细胞)	296871	PCT/US2013/030062	157
脱氧核糖核酸酶 I	246949	PCT/US2013/030062	186
脱氧核糖核酸酶 I	407479	PCT/US2013/030062	187
脱氧核糖核酸酶 I	414110	PCT/US2013/030062	188
促红细胞生成素	252723	PCT/US2013/030062	207
纤维蛋白原 α 链	302053	PCT/US2013/030062	211
纤维蛋白原 α 链	403106	PCT/US2013/030062	212
纤维蛋白原 α 链	457487	PCT/US2013/030062	213
成纤维细胞生长因子 23	237837	PCT/US2013/030068	404
成纤维细胞生长因子 7	267843	PCT/US2013/030070	1529
成纤维细胞生长因子 7	560765	PCT/US2013/030070	1530
卵泡抑素	256759	PCT/US2013/030061	10903
卵泡抑素	396947	PCT/US2013/030061	10904
卵泡抑素	511025	PCT/US2013/030061	10905
延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (延胡索酰乙酰乙酸酶)	261755	PCT/US2013/030062	225
延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (延胡索酰乙酰乙酸酶)	407106	PCT/US2013/030062	226

[0362]

延胡索酰乙酰乙酸水解酶(延胡索酰乙酰乙酸酶)	561421	PCT/US2013/030062	227
半乳糖激酶 1	225614	PCT/US2013/030062	228
半乳糖激酶 1	375188	PCT/US2013/030062	229
半乳糖激酶 1	437911	PCT/US2013/030062	230
半乳糖激酶 1	588479	PCT/US2013/030062	231
半乳糖苷酶 α	218516	PCT/US2013/030062	238
葡聚糖(1,4-α-)分支酶 1	264326	PCT/US2013/030062	251
葡聚糖(1,4-α-)分支酶 1	429644	PCT/US2013/030062	252
葡聚糖(1,4-α-)分支酶 1	536832	PCT/US2013/030062	253
糖蛋白激素 α 多肽	369582	PCT/US2013/030062	265
GTP 环化水解酶 1	395514	PCT/US2013/030062	277
GTP 环化水解酶 1	395524	PCT/US2013/030062	278
GTP 环化水解酶 1	491895	PCT/US2013/030062	279
GTP 环化水解酶 1	536224	PCT/US2013/030062	280
GTP 环化水解酶 1	543643	PCT/US2013/030062	281
2 型血色素沉着症(青少年)	336751	PCT/US2013/030062	295
2 型血色素沉着症(青少年)	357836	PCT/US2013/030062	296
2 型血色素沉着症(青少年)	421822	PCT/US2013/030062	297
2 型血色素沉着症(青少年)	475797	PCT/US2013/030062	298
2 型血色素沉着症(青少年)	497365	PCT/US2013/030062	299
2 型血色素沉着症(青少年)	577520	PCT/US2013/030062	300
2 型血色素沉着症(青少年)	580693	PCT/US2013/030062	301
血红蛋白 β	335295	PCT/US2013/030061	13279
血红蛋白 β	380315	PCT/US2013/030061	13280
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	222390	PCT/US2013/030062	302
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	354224	PCT/US2013/030062	303
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	394769	PCT/US2013/030062	304
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	412881	PCT/US2013/030062	305
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	421558	PCT/US2013/030062	306
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	423064	PCT/US2013/030062	307
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	444829	PCT/US2013/030062	308
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	453411	PCT/US2013/030062	309
肝细胞生长因子(肝细胞生成素 A；扩散因子)	457544	PCT/US2013/030062	310

[0363]

海帕西啶抗微生物肽	222304	PCT/US2013/030062	311
海帕西啶抗微生物肽	598398	PCT/US2013/030062	312
门冬胰岛素		PCT/US2013/030062	334
甘精胰岛素		PCT/US2013/030062	335
谷赖胰岛素		PCT/US2013/030062	336
赖脯胰岛素		PCT/US2013/030062	337
干扰素α2	380206	PCT/US2013/030062	343
干扰素β1，成纤维细胞	380232	PCT/US2013/030062	350
白细胞介素 10	423557	PCT/US2013/030062	351
白细胞介素 15	296545	PCT/US2013/030070	1986
白细胞介素 15	320650	PCT/US2013/030070	1987
白细胞介素 15	394159	PCT/US2013/030070	1988
白细胞介素 15	477265	PCT/US2013/030070	1989
白细胞介素 15	514653	PCT/US2013/030070	1990
白细胞介素 15	529613	PCT/US2013/030070	1991
白细胞介素 15	296545	PCT/US2013/030070	1986
白细胞介素 15	320650	PCT/US2013/030070	1987
白细胞介素 15	394159	PCT/US2013/030070	1988
白细胞介素 15	477265	PCT/US2013/030070	1989
白细胞介素 15	514653	PCT/US2013/030070	1990
白细胞介素 15	529613	PCT/US2013/030070	1991
白细胞介素 21	264497	PCT/US2013/030062	352
白细胞介素 7	263851	PCT/US2013/030062	353
白细胞介素 7	379113	PCT/US2013/030062	354
白细胞介素 7	379114	PCT/US2013/030062	355
白细胞介素 7	518982	PCT/US2013/030062	356
白细胞介素 7	520215	PCT/US2013/030062	357
白细胞介素 7	520269	PCT/US2013/030062	358
白细胞介素 7	520317	PCT/US2013/030062	359
白细胞介素 7	541183	PCT/US2013/030062	360
klotho	380099	PCT/US2013/030062	364
klotho	426690	PCT/US2013/030062	365
卵磷脂-胆固醇酰基转移酶	264005	PCT/US2013/030062	370
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	282673	PCT/US2013/030062	374
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	336233	PCT/US2013/030062	375
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	354621	PCT/US2013/030062	376
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	371829	PCT/US2013/030062	377
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	371837	PCT/US2013/030062	378

[0364]

溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	425287	PCT/US2013/030062	379
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	428800	PCT/US2013/030062	380
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	456827	PCT/US2013/030062	381
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	540050	PCT/US2013/030062	382
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	541980	PCT/US2013/030062	383
溶酶体酸性脂肪酶A胆固醇酯酶	542307	PCT/US2013/030062	384
脂蛋白脂肪酶	311322	PCT/US2013/030062	385
脂蛋白脂肪酶	520959	PCT/US2013/030062	386
脂蛋白脂肪酶	522701	PCT/US2013/030062	387
脂蛋白脂肪酶	524029	PCT/US2013/030062	388
脂蛋白脂肪酶	535763	PCT/US2013/030062	389
脂蛋白脂肪酶	538071	PCT/US2013/030062	390
低密度脂蛋白受体	455727	PCT/US2013/030062	396
低密度脂蛋白受体	535915	PCT/US2013/030062	397
低密度脂蛋白受体	545707	PCT/US2013/030062	398
低密度脂蛋白受体	558013	PCT/US2013/030062	399
低密度脂蛋白受体	558518	PCT/US2013/030062	400
低密度脂蛋白受体	561343	PCT/US2013/030062	401
低密度脂蛋白受体	252444	PCT/US2013/030062	402
甘露糖苷酶α2B类成员1	221363	PCT/US2013/030062	408
甘露糖苷酶α2B类成员1	433513	PCT/US2013/030062	409
甘露糖苷酶α2B类成员1	456935	PCT/US2013/030062	410
甘露糖苷酶α2B类成员1	536796	PCT/US2013/030062	411
微粒体甘油三酯转移蛋白	265517	PCT/US2013/030062	416
微粒体甘油三酯转移蛋白	457717	PCT/US2013/030062	417
微粒体甘油三酯转移蛋白	506883	PCT/US2013/030062	418
微粒体甘油三酯转移蛋白	538053	PCT/US2013/030062	419
N-乙酰谷氨酸合成酶	293404	PCT/US2013/030062	422
N-乙酰谷氨酸合成酶	541745	PCT/US2013/030062	423
神经调节蛋白1	287840	PCT/US2013/030062	431

[0365]

神经调节蛋白 1	287842	PCT/US2013/030062	432
神经调节蛋白 1	287845	PCT/US2013/030062	433
神经调节蛋白 1	338921	PCT/US2013/030062	434
神经调节蛋白 1	341377	PCT/US2013/030062	435
神经调节蛋白 1	356819	PCT/US2013/030062	436
神经调节蛋白 1	405005	PCT/US2013/030062	437
神经调节蛋白 1	519301	PCT/US2013/030062	438
神经调节蛋白 1	520407	PCT/US2013/030062	439
神经调节蛋白 1	520502	PCT/US2013/030062	440
神经调节蛋白 1	521670	PCT/US2013/030062	441
神经调节蛋白 1	539990	PCT/US2013/030062	442
神经调节蛋白 1	523079	PCT/US2013/030062	443
鸟氨酸氨甲酰基转移酶	39007	PCT/US2013/030062	447
磷酸化酶激酶 α 2(肝脏)	379942	PCT/US2013/030062	456
纤溶酶原	308192	PCT/US2013/030062	464
纤溶酶原	316325	PCT/US2013/030062	465
纤溶酶原	366924	PCT/US2013/030062	466
纤溶酶原活化蛋白，组织	220809	PCT/US2013/030062	467
纤溶酶原活化蛋白，组织	270189	PCT/US2013/030062	468
纤溶酶原活化蛋白，组织	352041	PCT/US2013/030062	469
纤溶酶原活化蛋白，组织	429089	PCT/US2013/030062	470
纤溶酶原活化蛋白，组织	429710	PCT/US2013/030062	471
纤溶酶原活化蛋白，组织	519510	PCT/US2013/030062	472
纤溶酶原活化蛋白，组织	520523	PCT/US2013/030062	473
纤溶酶原活化蛋白，组织	521694	PCT/US2013/030062	474
纤溶酶原活化蛋白，组织	524009	PCT/US2013/030062	475
septin 4	317256	PCT/US2013/030070	3635
septin 4	317268	PCT/US2013/030070	3636
septin 4	393086	PCT/US2013/030070	3637
septin 4	412945	PCT/US2013/030070	3638
septin 4	426861	PCT/US2013/030070	3639
septin 4	457347	PCT/US2013/030070	3640
septin 4	583114	PCT/US2013/030070	3641
serpin 肽酶抑制剂分化体 C (抗凝血酶)成员 1	351522	PCT/US2013/030062	528
serpin 肽酶抑制剂分化体 C (抗凝血酶)成员 1	367698	PCT/US2013/030062	529
serpin 肽酶抑制剂分化体 F (α-2 抗纤维蛋白溶酶色素上皮衍生因子)成员 2	324015	PCT/US2013/030062	530

[0366]

serpin 肽酶抑制剂分化体 F (α-2 抗纤维蛋白溶酶色素上皮衍生因子)成员 2	382061	PCT/US2013/030062	531
serpin 肽酶抑制剂分化体 F (α-2 抗纤维蛋白溶酶色素上皮衍生因子)成员 2	450523	PCT/US2013/030062	532
serpin 肽酶抑制剂分化体 F (α-2 抗纤维蛋白溶酶色素上皮衍生因子)成员 2	453066	PCT/US2013/030062	533
sirtuin 1	212015	PCT/US2013/030062	539
sirtuin 1	403579	PCT/US2013/030062	540
sirtuin 1	406900	PCT/US2013/030062	541
sirtuin 1	432464	PCT/US2013/030062	542
sirtuin 6	305232	PCT/US2013/030062	543
sirtuin 6	337491	PCT/US2013/030062	544
sirtuin 6	381935	PCT/US2013/030062	545
溶质载体家族 16 成员 3 (单羧酸转运蛋白 4)	581287	PCT/US2013/030070	3791
溶质载体家族 16 成员 3 (单羧酸转运蛋白 4)	582743	PCT/US2013/030070	3792
溶质载体家族 16 成员 3 (单羧酸转运蛋白 4)	392339	PCT/US2013/030070	3793
溶质载体家族 16 成员 3 (单羧酸转运蛋白 4)	392341	PCT/US2013/030070	3794
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 1	372500	PCT/US2013/030070	3803
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 1	372501	PCT/US2013/030070	3804
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 1	397019	PCT/US2013/030070	3805
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 1	415851	PCT/US2013/030070	3806
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 1	426263	PCT/US2013/030070	3807
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 1	439722	PCT/US2013/030070	3808
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 2	314251	PCT/US2013/030062	546
溶质载体家族 2 (易化葡萄糖转运蛋白)成员 2	382808	PCT/US2013/030062	547

[0367]

分拣蛋白 1	256637	PCT/US2013/030062	557
分拣蛋白 1	538502	PCT/US2013/030062	558
血小板生成素	204615	PCT/US2013/030062	581
血小板生成素	353488	PCT/US2013/030062	582
血小板生成素	421442	PCT/US2013/030062	583
血小板生成素	445696	PCT/US2013/030062	584
转化生长因子 β1	221930	PCT/US2013/030062	590
釉丛蛋白 1	353024	PCT/US2013/030062	598
釉丛蛋白 1	368848	PCT/US2013/030062	599
釉丛蛋白 1	368849	PCT/US2013/030062	600
釉丛蛋白 1	507671	PCT/US2013/030062	601
釉丛蛋白 1	538902	PCT/US2013/030062	602
釉丛蛋白 1	544350	PCT/US2013/030062	603
肿瘤蛋白 p53	269305	PCT/US2013/030062	604
肿瘤蛋白 p53	359597	PCT/US2013/030062	605
肿瘤蛋白 p53	396473	PCT/US2013/030062	606
肿瘤蛋白 p53	413465	PCT/US2013/030062	607
肿瘤蛋白 p53	414315	PCT/US2013/030062	608
肿瘤蛋白 p53	419024	PCT/US2013/030062	609
肿瘤蛋白 p53	420246	PCT/US2013/030062	610
肿瘤蛋白 p53	445888	PCT/US2013/030062	611
肿瘤蛋白 p53	455263	PCT/US2013/030062	612
肿瘤蛋白 p53	503591	PCT/US2013/030062	613
肿瘤蛋白 p53	508793	PCT/US2013/030062	614
肿瘤蛋白 p53	509690	PCT/US2013/030062	615
肿瘤蛋白 p53	514944	PCT/US2013/030062	616
肿瘤蛋白 p53	545858	PCT/US2013/030062	617
酪氨酸酶(眼皮肤白化病 IA)	263321	PCT/US2013/030062	618
UDP 葡萄糖苷酰转移酶 1 家族多肽 A1	305208	PCT/US2013/030062	620
UDP 葡萄糖苷酰转移酶 1 家族多肽 A1	360418	PCT/US2013/030062	621
UDP 葡萄糖苷酰转移酶 1 家族多肽 A10	344644	PCT/US2013/030062	622
UDP 葡萄糖苷酰转移酶 1 家族多肽 A3	482026	PCT/US2013/030062	623
X 连锁细胞凋亡抑制剂	355640	PCT/US2013/030070	4424
X 连锁细胞凋亡抑制剂	371199	PCT/US2013/030070	4425
X 连锁细胞凋亡抑制剂	422098	PCT/US2013/030070	4426
X 连锁细胞凋亡抑制剂	430625	PCT/US2013/030070	4427
X 连锁细胞凋亡抑制剂	434753	PCT/US2013/030070	4428

[0368] 蛋白质裂解信号和位点

[0369] 在一个实施方案中，本发明的多肽可包括含有至少一个蛋白质裂解位点的至少一个蛋白质裂解信号。蛋白质裂解位点可位于N-末端，C-末端，在N-末端与C-末端之间的任何

空间处如但不限于,在N-末端与C-末端之间的中间、在N-末端与中间点之间、在中间点与C-末端之间,以及其组合。

[0370] 本发明的多肽可包括但不限于前蛋白转化酶(或激素原转化酶)、凝血酶或Xa因子蛋白质裂解信号。前蛋白转化酶是九种蛋白酶的家族,所述蛋白酶包含与酵母kexin有关的七种碱性氨基酸特异性枯草杆菌蛋白样丝氨酸蛋白酶,其被称为激素原转化酶1/3(PC1/3)、PC2、弗林蛋白酶、PC4、PC5/6、成对的碱性氨基酸裂解酶4(PACE4)和PC7;和在非碱性残基处裂解的两种其它枯草杆菌酶,其被称为枯草杆菌蛋白酶kexin同工酶1(SKI-1)和前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin 9(PCSK9)。蛋白质裂解信号氨基酸序列的非限制性实例在表7中列出。在表7中,"X"是指任何氨基酸,"n"可以是0、2、4或6个氨基酸并且"*"是指蛋白质裂解位点。在表7中,SEQ ID NO:158是指当n=4时并且SEQ ID NO:159是指当n=6时。

[0371] 表7.蛋白质裂解位点序列

[0372]

蛋白质裂解信号	氨基酸裂解序列	SEQ ID NO
前蛋白转化酶	R-X-X-R*	156
	R-X-K/R-R*	157
	K/R-Xn-K/R*	158 或 159
凝血酶	L-V-P-R*-G-S	160
	L-V-P-R*	161
	A/F/G/I/L/T/V/M-A/F/G/I/L/T/V/W-P-R*	162
Xa 因子	I-E-G-R*	163
	I-D-G-R*	164
	A-E-G-R*	165
	A/F/G/I/L/T/V/M-D/E-G-R*	166

[0373] 在一个实施方案中,本发明的初级构建体和mmRNA可被工程化以使得所述初级构建体或mmRNA包含至少一个编码的蛋白质裂解信号。所述编码的蛋白质裂解信号可位于起始密码子之前,起始密码子之后,编码区之前,编码区内例如但不限于编码区中间、起始密码子与中间点之间、中间点与终止密码子之间,编码区之后,终止密码子之前,两个终止密码子之间,终止密码子之后及其组合。

[0374] 在一个实施方案中,本发明的初级构建体或mmRNA可包括含有至少一个蛋白质裂解位点的至少一个编码的蛋白质裂解信号。所述编码的蛋白质裂解信号可包括但不限于前蛋白转化酶(或激素原转化酶)、凝血酶和/或Xa因子蛋白质裂解信号。本领域技术人员可使用以上表1或其它已知的方法来确定适当的编码的蛋白质裂解信号以便包括于本发明的初级构建体或mmRNA中。例如,以表7中的信号开始并且考虑表1的密码子,可设计用于可在所得多肽中产生蛋白质信号的初级构建体的信号。

[0375] 在一个实施方案中,本发明的多肽包括至少一个蛋白质裂解信号和/或位点。

[0376] 作为非限制性实例,美国专利号7,374,930和美国公布号20090227660(以引用的方式整体并入本文)使用弗林蛋白酶裂解位点来裂解来自细胞的高尔基体的表达产物中的GLP-1的N末端蛋氨酸。在一个实施方案中,本发明的多肽包括至少一个蛋白质裂解信号和/或位点,其条件是所述多肽不是GLP-1。

[0377] 在一个实施方案中,本发明的初级构建体或mmRNA包括至少一个编码的蛋白质裂解信号和/或位点。

[0378] 在一个实施方案中，本发明的初级构建体或mmRNA包括至少一个编码的蛋白质裂解信号和/或位点，其条件是所述初级构建体或mmRNA不编码GLP-1。

[0379] 在一个实施方案中，本发明的初级构建体或mmRNA可包括多于一个编码区。在多个编码区存在于本发明的初级构建体或mmRNA中的情况下，所述多个编码区可由编码的蛋白质裂解位点分开。作为非限制性实例，初级构建体或mmRNA可以有序图案的形式表示。这样一种图案遵循AXBY形式，其中A和B是可为相同或不同编码区和/或可编码相同或不同多肽的编码区，并且X和Y是可编码相同或不同蛋白质裂解信号的编码的蛋白质裂解信号。第二这种图案遵循形式AXYBZ，其中A和B是可为相同或不同编码区和/或可编码相同或不同多肽的编码区，并且X、Y和Z是可编码相同或不同蛋白质裂解信号的编码的蛋白质裂解信号。第三图案遵循形式ABXCY，其中A、B和C是可为相同或不同编码区和/或可编码相同或不同多肽的编码区，并且X和Y是可编码相同或不同蛋白质裂解信号的编码的蛋白质裂解信号。

[0380] 在一个实施方案中，多肽、初级构建体和mmRNA还可包含编码蛋白质裂解位点的序列，以使得所述多核苷酸、初级构建体和mmRNA可通过用针对所述蛋白质裂解位点的特异性蛋白酶处理来从载体区或融合配偶体释放。

[0381] 在一个实施方案中，本发明的多肽、初级构建体和mmRNA可包括编码2A肽的序列。在一个实施方案中，这个序列可用于分开两个或更多个目标多肽的编码区。作为非限制性实例，编码2A肽的序列可在编码区A与编码区B之间(A-2Apep-B)。2A肽的存在将导致一个长蛋白质裂解成蛋白质A、蛋白质B和2A肽。蛋白质A和蛋白质B可以是相同或不同的目标多肽。在另一个实施方案中，2A肽可用于本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA中，以便产生两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个蛋白质。

[0382] 并入转录后控制调节剂

[0383] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包括至少一种转录后控制调节剂。这些转录后控制调节剂可以是但不限于小分子、化合物和调控序列。作为非限制性实例，转录后控制可使用由PTC Therapeutics Inc.(South Plainfield,NJ)鉴别的小分子、使用其GEMS™(来自Small-Moleclues的Gene Expression Modulation)筛选技术来实现。

[0384] 转录后控制调节剂可以是基因表达调节剂，其通过国际公布号WO2006022712中所详述的方法或所描述的基因表达调节剂筛选，所述公布以引用的方式整体并入本文。鉴别翻译控制中所涉及的RNA调控序列的方法描述于国际公布号WO2004067728中，其以引用的方式整体并入本文；鉴别调节基因的非翻译区依赖性表达的化合物的方法描述于国际公布号WO2004065561中，其以引用的方式整体并入本文。

[0385] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包括至少一种转录后控制调节剂，所述转录后控制调节剂位于本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的5’和/或3’非翻译区中。

[0386] 在另一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包括至少一种转录后控制调节剂以便调节过早翻译终止。转录后控制调节剂可以是国际公布号WO2004010106、WO2006044456、WO2006044682、WO2006044503以及WO2006044505中所描述的化合物或通过所述国际公布中概述的方法发现的化合物，所述国际公布各自以引用的方式整体并入本文。作为非限制性实例，所述化合物可结合28S核糖体RNA的区以便调节过早翻

译终止(参见例如WO2004010106,以引用的方式整体并入本文)。

[0387] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包括至少一种转录后控制调节剂以改变蛋白质表达。作为非限制性实例,VEGF的表达可使用国际公布号WO2005118857、WO2006065480、WO2006065479以及WO2006058088中所描述的化合物或通过所述国际公布中描述的方法发现的化合物来调控,所述国际公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0388] 本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包括至少一种转录后控制调节剂以便控制翻译。在一个实施方案中,转录后控制调节剂可以是RNA调控序列。作为非限制性实例,RNA调控序列可通过国际公布号WO2006071903中描述的方法来鉴别,所述国际公布以引用的方式整体并入本文。

[0389] III.修饰

[0390] 在本文中,在多核苷酸(如初级构建体或mRNA分子)中,术语"修饰"或在适当时"修饰的"是指相对于A、G、U或C核糖核苷酸的修饰。一般来说,在本文中,这些术语不意图指天然存在的5′末端mRNA帽部分中的核糖核苷酸修饰。在多肽中,术语"修饰"是指如与20个氨基酸部分的规范组相比的修饰)。

[0391] 所述修饰可以是各种不同的修饰。在一些实施方案中,编码区、侧翼区和/或末端区可以包含一个、两个或更多个(任选地不同的)核苷或核苷酸修饰。在一些实施方案中,引入至细胞的修饰多核苷酸、初级构建体或mmRNA可以表现出与未修饰多核苷酸、初级构建体或mmRNA相比细胞中减少的降解。

[0392] 多核苷酸、初级构建体和mmRNA可以包括任何有用的修饰,如对糖、核碱基或核苷间键联(例如对连接磷酸酯/对磷酸二酯键联/对磷酸二酯主链)的修饰。嘧啶核碱基的一个或多个原子可以被任选取代的氨基、任选取代的硫醇、任选取代的烷基(例如甲基或乙基)或卤代基(例如氯或氟)置换或取代。在某些实施方案中,修饰(例如,一个或多个修饰)可存在于糖和核苷间键联中的每个中。根据本发明的修饰可以是核糖核酸(RNA)修饰成脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)或其杂合体)。另外的修饰在本文进行描述。

[0393] 如本文所描述,本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA大体上不诱导mRNA所引入至其中的细胞的先天性免疫应答。诱导的先天性免疫应答的特征包括1)增加的促炎性细胞因子的表达,2)细胞内PRR(RIG-I、MDA5等)的激活,和/或3)蛋白质翻译的终止或减少。

[0394] 在某些实施方案中,可能令人希望的是细胞内降解被引入至细胞中的修饰核酸分子。例如,如果蛋白质产生的精确定时是所需的,那么修饰核酸分子的降解可能是优选的。因此,在一些实施方案中,本发明提供一种含有降解结构域的修饰核酸分子,所述降解结构域能够在细胞内以定向的方式被作用。另一方面,本公开提供包含核苷或核苷酸的多核苷酸,所述核苷或核苷酸能够破坏大沟作用(例如结合)配偶体与所述多核苷酸的结合(例如,其中与未修饰核苷酸相比,修饰核苷酸具有对大沟作用配偶体的减少的结合亲和力)。

[0395] 多核苷酸、初级构建体和mmRNA可任选地包括其它剂(例如,RNAi-诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核酶、催化性DNA、tRNA、诱导三螺旋形成的RNA、适体、载体等)。在一些实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包括一个或多个信使RNA(mRNA)和一个或多个修饰核苷或核苷酸(例如,mmRNA分子)。这些多核苷酸、初级构建体和mmRNA的

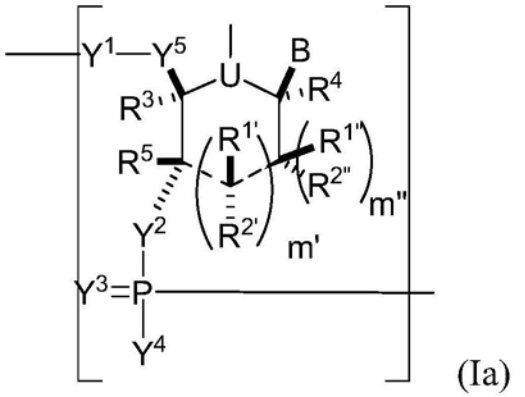
细节随后提供。

[0396] 多核苷酸和初级构建体

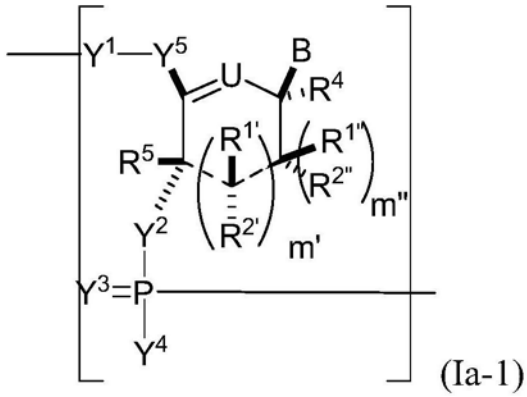
[0397] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA包括编码目标多肽的连接核苷的第一区、位于所述第一区的5'末端处的第一侧翼区以及位于所述第一区的3′末端处的第二侧翼区。

[0398] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(Ia)或式(Ia-1)：

[0399]



(Ia)



(Ia-1)

[0400] 或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0401] 其中

[0402] U为O、S、N$(R^U)_{nu}$或C$(R^U)_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^U独立地为H、卤代或任选取代的烷基；

[0403] 为单键或不存在；

[0404] $R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{1''}$、$R^{2''}$、R^1、R^2、R^3、R^4以及R^5各自独立地为(如果存在)H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在；其中R3与R1'、R1"、R2′、R2"或R5中的一个或多个的组合(例如，R1'与R3的组合、R1"与R3的组合、R2'与R3的组合、R2"与R3的组合或R5与R3的组合)可连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，并且与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如，双环、三环或四环杂环基)；其中R5与R1'、R1"、R2′或R2"中的一个或多个的组合(例如，R1'与R5的组合、R1"与R5的组合、R2′与R5的组合或R2"与R5的组合)可连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，并且与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如，双环、三环或四环杂环基)；并且其中R^4与$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$、$R^{2''}$、R^3或R^5中的一个或多个的组合可连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，并且与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如，双环、三环或四环杂环基)；m'和m"各自独立地为0至3(例如，0至2、0至1、1至3或1至2)的整数；

[0405] Y^1、Y^2和Y^3各自独立地为O、S、Se、$-NR^{N1}-$、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基或不存在；

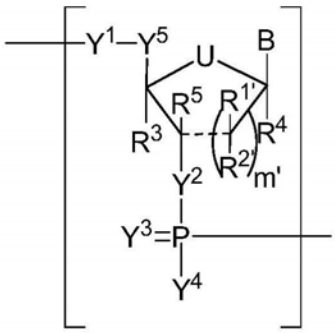
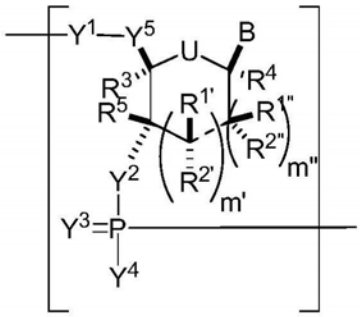
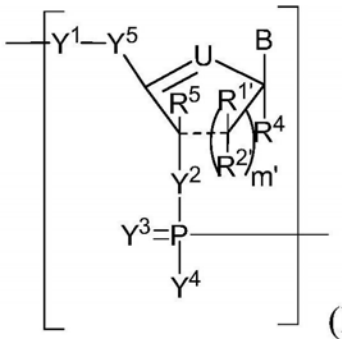
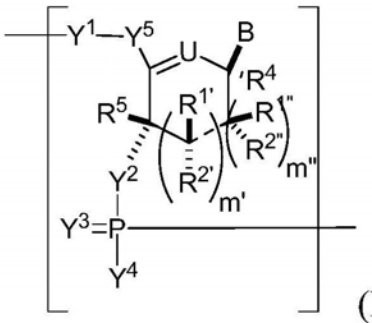
[0406] 每个Y^4独立地为H、羟基、硫醇、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷

氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基；

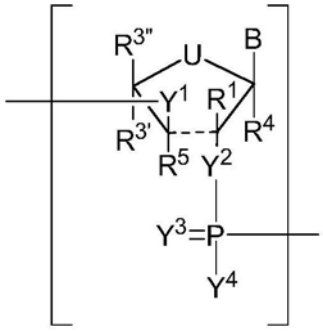
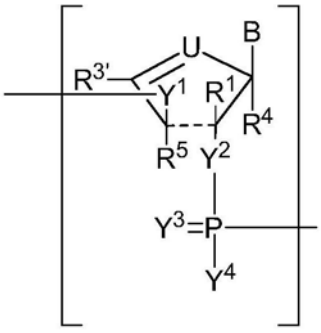
[0407] 每个Y^5独立地为O、S、Se、任选取代的亚烷基(例如，亚甲基)或任选取代的杂亚烷基；

[0408] n为1至100,000的整数；并且

[0409] B为核碱基(例如，嘌呤、嘧啶或其衍生物)，其中B与$R^{1'}$的组合、B与$R^{2'}$的组合、B与$R^{1''}$的组合或B与$R^{2''}$的组合可与它们所连接的碳一起任选地形成双环基团(例如，双环杂环基)或其中B、$R^{1''}$和R^3的组合或B、$R^{2''}$和R^3的组合可任选地形成三环或四环基团(例如，三环或四环杂环基，如在本文的式(IIo)-(IIp)中)。在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括修饰核糖。在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(Ia-2)至(Ia-5)；或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0410] 
(Ia-2)

(Ia-3)

(Ia-4),

(Ia-5)。

[0411] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(Ib)或式(Ib-1)：

[0412] 
(Ib),

(Ib-1)
或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0413] 其中

[0414] U为O、S、$N(R^U)_{nu}$或$C(R^U)_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^U独立地为H、卤代或任选取代的烷基；

[0415] 为单键或不存在；

[0416] R^1、$R^{3'}$、$R^{3''}$以及R^4各自独立地为H、卤代基、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在；并且其中R^1与$R^{3'}$的组合或R^1与$R^{3''}$的组合可合在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基(例如，以产生锁核酸)；

[0417] 每个R^5独立地为H、卤代基、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或不存在；

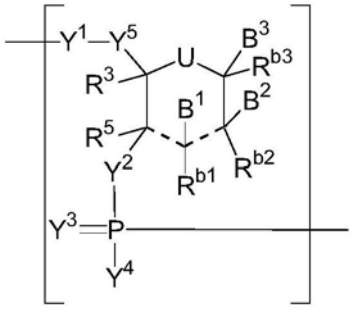
[0418] Y^1、Y^2和Y^3各自独立地为O、S、Se、$-NR^{N1}-$、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基；

[0419] 每个Y^4独立地为H、羟基、硫醇、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基；

[0420] n为1至100,000的整数；并且

[0421] B为核碱基。

[0422] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(Ic)：

[0423]  (Ic)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0424] 其中

[0425] U为O、S、$N(R^U)_{nu}$或$C(R^U)_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^U独立地为H、卤代或任选取代的烷基；

[0426] 为单键或不存在；

[0427] B^1、B^2和B^3各自独立地为核碱基(例如，嘌呤、嘧啶或其衍生物，如本文所描述)、H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基，其中B^1、B^2和B^3中的一个且仅一个为核碱基；

[0428] R^{b1}、R^{b2}、R^{b3}、R^3和R^5各自独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；

[0429] Y^1、Y^2和Y^3各自独立地为O、S、Se、-NR^{N1}-、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基；

[0430] 每个Y^4独立地为H、羟基、硫醇、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基；

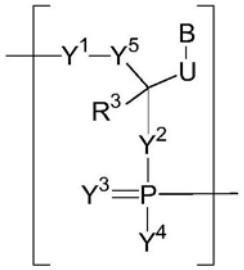
[0431] 每个Y^5独立地为O、S、Se、任选取代的亚烷基(例如，亚甲基)或任选取代的杂亚烷基；

[0432] n为1至100,000的整数；并且

[0433] 其中包括U的环可包括一个或多个双键。

[0434] 在具体实施方案中，包括U的环不具有U-CB^3R^{b3}之间或CB^3R^{b3}-$C^{B2}R^{b2}$之间的双键。

[0435] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(Id)：

[0436]  或其药学上可接受的盐或立体异构体，

(Id)，

[0437] 其中

[0438] U为O、S、N$(R^U)_{nu}$或C$(R^U)_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^U独立地为H、卤代或任选取代的烷基；

[0439] 每个R^3独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；

[0440] Y^1、Y^2和Y^3各自独立地为O、S、Se、-NR^{N1}-、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基；

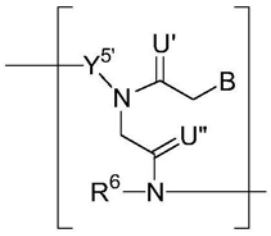
[0441] 每个Y^4独立地为H、羟基、硫醇、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基；

[0442] 每个Y^5独立地为O、S、任选取代的亚烷基(例如，亚甲基)或任选取代的杂亚烷基；

[0443] n为1至100,000的整数；并且

[0444] B为核碱基(例如，嘌呤、嘧啶或其衍生物)。

[0445] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(Ie)：

[0446]  (Ie),或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0447] 其中

[0448] U'和U"各自独立地为O、S、N(R^{U})$_{nu}$或C(R^{U})$_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^{U}独立地为H、卤代或任选取代的烷基；

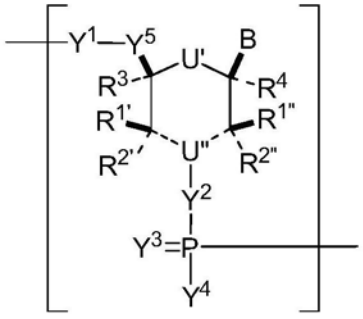
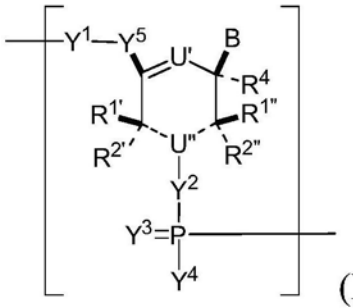
[0449] 每个R^{6}独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；

[0450] 每个Y$^{5'}$独立地为O、S、任选取代的亚烷基(例如，亚甲基或亚乙基)或任选取代的杂亚烷基；

[0451] n为1至100,000的整数；并且

[0452] B为核碱基(例如，嘌呤、嘧啶或其衍生物)。

[0453] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(If)或式(If-1)：

[0454]  (If)、  (If-1)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0455] 其中

[0456] U'和U"各自独立地为O、S、N、N(R^{U})$_{nu}$或C(R^{U})$_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^{U}独立地为H、卤代或任选取代的烷基(例如，U'为O并且U"为N)；

[0457] 为单键或不存在；

[0458] R$^{1'}$、R$^{2'}$、R$^{1"}$、R$^{2"}$、R^{3}以及R^{4}各自独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在；并且其中R$^{1'}$与R^{3}的组合、R$^{1"}$与R^{3}的组合、R$^{2'}$与R^{3}的组合或R$^{2"}$与R^{3}的组合可合在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基(例如，以产生锁核酸)；m'和m"各自独立地为0至3(例如，0至2、0至1、1至3或1至2)的整数；

[0459] Y^{1}、Y^{2}和Y^{3}各自独立地为O、S、Se、-NR^{N1}-、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷

基，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基或不存在；

[0460] 每个Y^4独立地为H、羟基、硫醇、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基；

[0461] 每个Y^5独立地为O、S、Se、任选取代的亚烷基(例如，亚甲基)或任选取代的杂亚烷基；

[0462] n为1至100,000的整数；并且

[0463] B为核碱基(例如，嘌呤、嘧啶或其衍生物)。

[0464] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)、(Ia-1)至(Ia-3)、(Ib)至(If)以及(IIa)至(IIp))中，包括U的环具有一个或两个双键。

[0465] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中，R^1、$R^{1'}$和$R^{1''}$各自(如果存在)为H。在其它实施方案中，R^2、$R^{2'}$和$R^{2''}$各自(如果存在)独立地为H、卤代(例如，氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如，甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在具体实施方案中，烷氧基烷氧基为$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且R'为H或C_{1-20}烷基)。在一些实施方案中，s2为0，s1为1或2，s3为0或1，并且R'为C_{1-6}烷基。

[0466] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中，R^2、$R^{2'}$和$R^{2''}$各自(如果存在)为H。在其它实施方案中，R^1、$R^{1'}$和$R^{1''}$各自(如果存在)独立地为H、卤代(例如，氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如，甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在具体实施方案中，烷氧基烷氧基为$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且R'为H或C_{1-20}烷基)。在一些实施方案中，s2为0，s1为1或2，s3为0或1，并且R'为C_{1-6}烷基。

[0467] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中，R^3、R^4和R^5各自独立地为H、卤代(例如，氟)、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基(例如，甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在具体实施方案中，R^3为H，R^4为H，R^5为H，或R^3、R^4和R^5都为H。在具体实施方案中，R^3为C_{1-6}烷基，R^4为C_{1-6}烷基，R^5为C_{1-6}烷基，或R^3、R^4和R^5都为C_{1-6}烷基。在具体实施方案中，R^3和R^4两者均为H，并且R^5为C_{1-6}烷基。

[0468] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中，R^3和R^5连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，并且与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如，双环、三环或四环杂环基，如反式-3′,4'类似物，其中R^3和R^5连接在一起以形成杂亚烷基(例如，$-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O$

$(CH_2)_{b3}$-，其中b1、b2和b3各自独立地为0至3的整数)。

[0469] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IV1)以及(IXa)至(IXr))中，R^3与$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$、$R^{2''}$或R^5中的一个或多个连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，并且与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如，双环、三环或四环杂环基，R^3与$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$、$R^{2''}$或R^5中的一个或多个连接在一起以形成杂亚烷基(例如，-$(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}$-，其中b1、b2和b3各自独立地为0至3的整数)。

[0470] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IV1)以及(IXa)至(IXr))中，R^5与$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$或$R^{2''}$中的一个或多个连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基，并且与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如，双环、三环或四环杂环基，R^5与$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$或$R^{2''}$中的一个或多个连接在一起以形成杂亚烷基(例如，-$(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}$-，其中b1、b2和b3各自独立地为0至3的整数)。

[0471] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IV1)以及(IXa)至(IXr))中，每个Y^2独立地为O、S或-NR^{N1}-，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基。在具体实施方案中，Y^2为NR^{N1}-，其中R^{N1}为H或任选取代的烷基(例如，C_{1-6}烷基，如甲基、乙基、异丙基或正丙基)。

[0472] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IV1)以及(IXa)至(IXr))中，每个Y^3独立地为O或S。

[0473] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IV1)以及(IXa)至(IXr))中，R^1为H；每个R^2独立地为H、卤代(例如，氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如，甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基(例如，-$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且R'为H或C_{1-20}烷基，如其中s2为0，s1为1或2，s3为0或1，并且R'为C_{1-6}烷基)；每个Y^2独立地为O或-NR^{N1}-，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基(例如，其中R^{N1}为H或任选取代的烷基(例如，C_{1-6}烷基，如甲基、乙基、异丙基或正丙基))；并且每个Y^3独立地为O或S(例如，S)。在其它实施方案中，R^3为H、卤代(例如，氟)、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基(例如，甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在又其它实施方案中，每个Y^1独立地为O或-NR^{N1}-，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基(例如，其中R^{N1}为H或任选取代的烷基(例如，C_{1-6}烷基，如甲基、乙基、异丙基或正丙基))；并且每个Y^4独立地为H、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基。

[0474] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如，式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至

(IVl)以及(IXa)至(IXr))中,每个R^1独立地为H、卤代(例如,氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如,甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基(例如,$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$,其中s1为1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地为0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且R'为H或C_{1-20}烷基,如其中s2为0,s1为1或2,s3为0或1,并且R'为C_{1-6}烷基);R^2为H;每个Y^2独立地为O或$-NR^{N1}-$,其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基(例如,其中R^{N1}为H或任选取代的烷基(例如,C_{1-6}烷基,如甲基、乙基、异丙基或正丙基));并且每个Y^3独立地为O或S(例如,S)。在其它实施方案中,R^3为H、卤代(例如,氟)、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基(例如,甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在又其它实施方案中,每个Y^1独立地为O或$-NR^{N1}-$,其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基(例如,其中R^{N1}为H或任选取代的烷基(例如,C_{1-6}烷基,如甲基、乙基、异丙基或正丙基));并且每个Y^4独立地为H、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基。

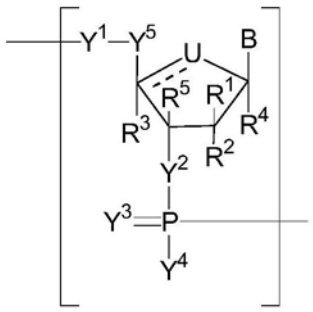
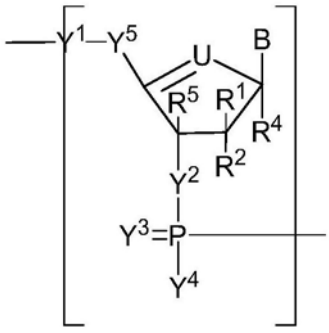
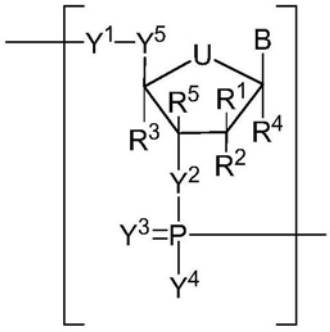
[0475] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如,式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中,包括U的环呈β-D(例如,β-D-核糖)构型。

[0476] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如,式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中,包括U的环呈α-L(例如,α-L-核糖)构型。

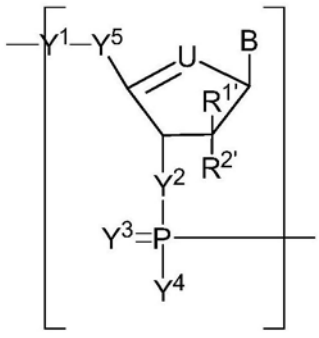
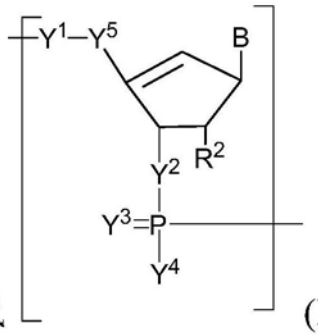
[0477] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如,式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中,一个或多个B不是假尿苷(ψ)或5-甲基-胞苷(m^5C)。在一些实施方案中,约10%至约100%的n数目的B核碱基不是ψ或m^5C(例如,10%至20%、10%至35%、10%至50%、10%至60%、10%至75%、10%至90%、10%至95%、10%至98%、10%至99%、20%至35%、20%至50%、20%至60%、20%至75%、20%至90%、20%至95%、20%至98%、20%至99%、20%至100%、50%至60%、50%至75%、50%至90%、50%至95%、50%至98%、50%至99%、50%至100%、75%至90%、75%至95%、75%至98%、75%至99%、以及75%至100%的n数目的B不是ψ或m^5C)。在一些实施方案中,B不是ψ或m^5C。

[0478] 在多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一些实施方案(例如,式(Ia)至(Ia-5)、(Ib)至(If-1)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)至(IXr))中,当B是选自胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶以及腺嘌呤的未修饰核碱基时,那么Y^1、Y^2或Y^3中的至少一个不是O。

[0479] 在一些实施方案中,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括修饰核糖。在一些实施方案中,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如,所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷,所述核苷具有式(IIa)至(IIc):

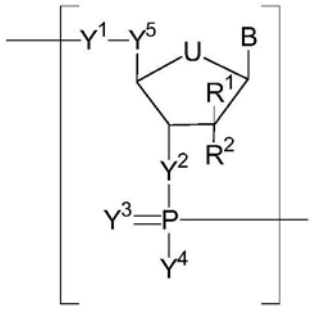
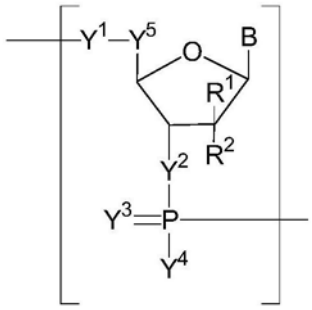
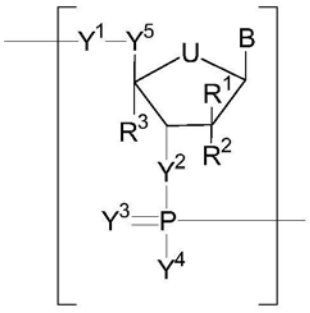
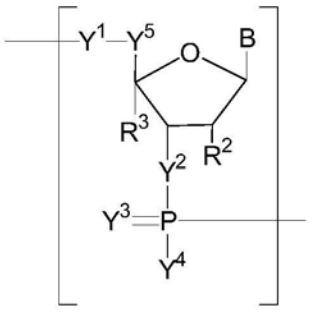
[0480]  (IIa)、  (IIb)、或  (IIc)；或其药学上可接受的盐或立体异构体。在具体实施方案中，U为O或C(R^{U})$_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^{U}独立地为H、卤代或任选取代的烷基(例如，U为-CH$_2$-或-CH-)。在其它实施方案中，R^1、R^2、R^3、R^{4}以及R^{5}各自独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在(例如，每个R^{1}和R^{2}独立地为H、卤代基、羟基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基；每个R^{3}和R^{4}独立地为H或任选取代的烷基；并且R^{5}为H或羟基)，并且---为单键或双键。

[0481] 在具体实施方案中，所述多核苷酸或mmRNA包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(IIb-1)至(IIb-2)：

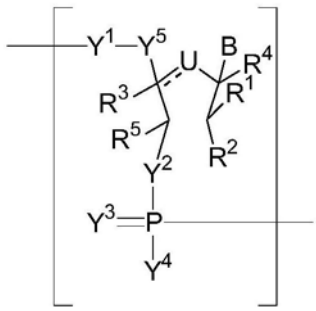
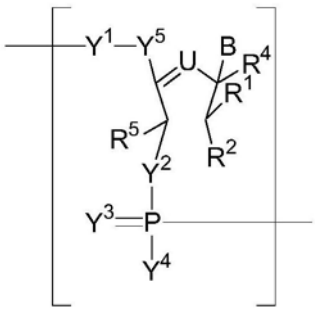
[0482]  (IIb-1)或  (IIb-2)；或其药学上可接受的盐或立体异构体。在一些实施方案中，U为O或C(R^{U})$_{nu}$，其中nu为0至2的整数并且每个R^{U}独立地为H、卤代或任选取代的烷基(例如，U为-CH$_2$-或-CH-)。在其它实施方案中，R^{1}和R^{2}各自独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在(例如，每个R^{1}和R^{2}独立地为H、卤代基、羟基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基，例如，H、卤代基、羟基、烷基或烷氧基)。在具体实施方案中，

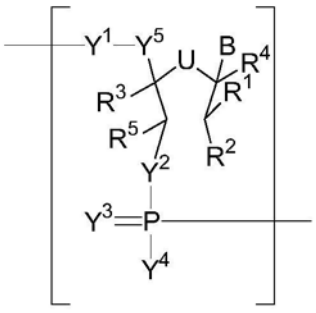
R^2为羟基或任选取代的烷氧基(例如,甲氧基、乙氧基或本文所描述的任何烷氧基)。

[0483] 在具体实施方案中,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括n数目的连接核苷,所述核苷具有式(IIc-1)至(IIc-4):

[0484]  (IIc-1)、  (IIc-2)、  (IIc-3)、或  (IIc-4);或其药学上可接受的盐或立体异构体。在一些实施方案中,U为O或C(R^U)$_{nu}$,其中nu为0至2的整数并且每个R^U独立地为H、卤代或任选取代的烷基(例如,U为-CH_2-或-CH-)。在一些实施方案中,R^1、R^2以及R^3各自独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在(例如,每个R^1和R^2独立地为H、卤代基、羟基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基,例如,H、卤代基、羟基、烷基或烷氧基;并且每个R^3独立地为H或任选取代的烷基))。在具体实施方案中,R^2为任选取代的烷氧基(例如,甲氧基或乙氧基或本文所描述的任何烷氧基)。在具体实施方案中,R^1为任选取代的烷基,并且R^2为羟基。在其它实施方案中,R^1为羟基,并且R^2为任选取代的烷基。在其它实施方案中,R^3为任选取代的烷基。

[0485] 在一些实施方案中,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括非环状的修饰核糖。在一些实施方案中,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如,所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷,所述核苷具有式(IId)至(IIf):

[0486]  (IId)、  (IIe)或

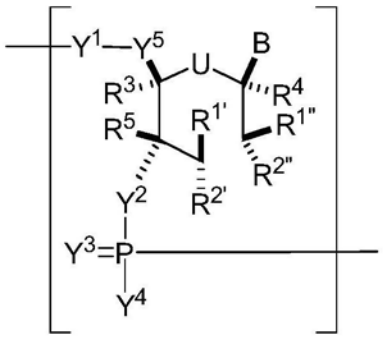


或其药学上可接受的盐或立体异构体。

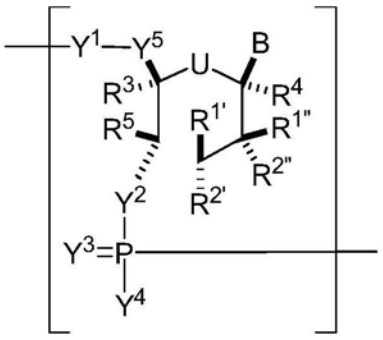
(IIf);

[0487] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括非环状的修饰己糖醇。在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(IIg)至(IIj)：

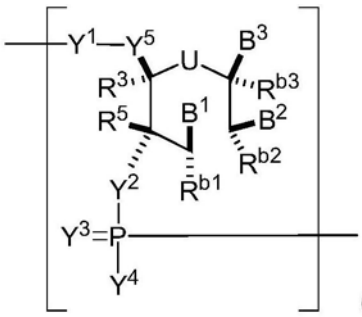
[0488]



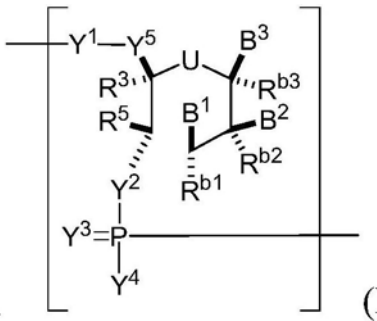
(IIg) 、



(IIh) 、



(IIi)或

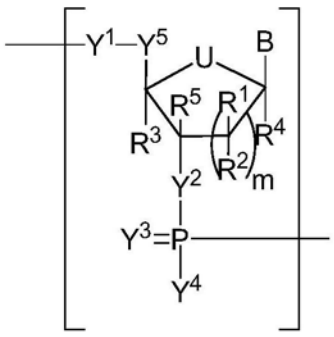


(IIj)；

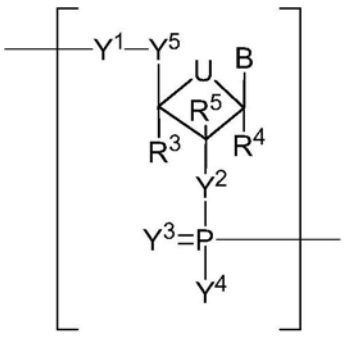
或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0489] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括具有收缩的或展开的核糖环的糖部分。在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(IIk)至(IIm)：

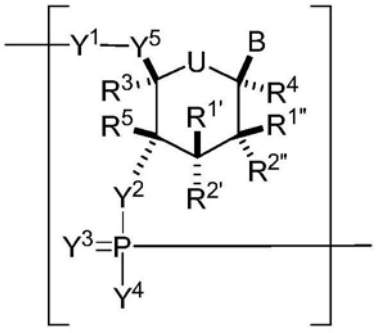
[0490]



(IIk) 、



(III) 或

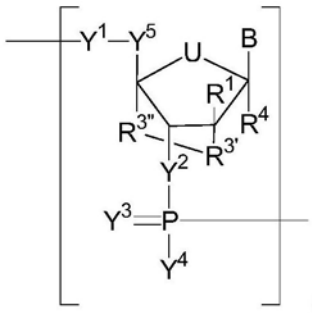


或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$

(IIm)；

以及$R^{2''}$各自独立地为H、卤代基、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或不存在；并且其中$R^{2'}$与R^{3}的组合或$R^{2''}$与R^{3}的组合可合在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基。

[0491] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括锁定的修饰核糖。在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如，所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(IIn)：

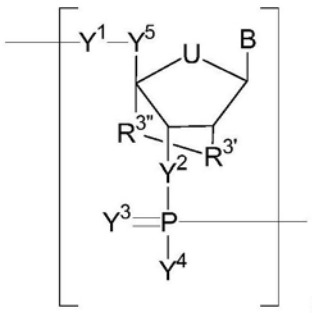
[0492] 

或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中$R^{3'}$为O、S

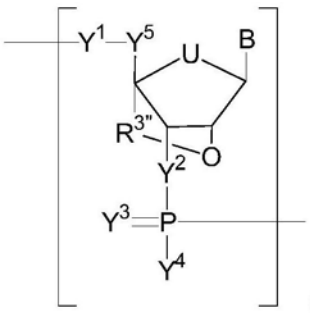
(IIn)；

或$-NR^{N1}-$，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基，并且$R^{3''}$为任选取代的亚烷基(例如，$-CH_2-$、$-CH_2CH_2-$或$-CH_2CH_2CH_2-$)或任选取代的杂亚烷基(例如，$-CH_2NH-$、$-CH_2CH_2NH-$、$-CH_2OCH_2-$或$-CH_2CH_2OCH_2-$)(例如，$R^{3'}$为O并且$R^{3''}$为任选取代的亚烷基(例如，$-CH_2-$、$-CH_2CH_2-$或$-CH_2CH_2CH_2-$))。

[0493] 在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括n数目的连接核苷，所述核苷具有式(IIn-1)至(IIn-2)：

[0494] 

(IIn-1)或



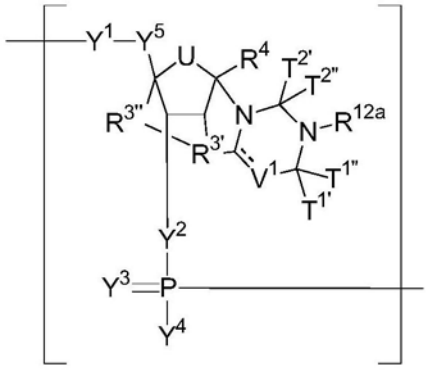
(IIn-2)；

受的盐或立体异构体，其中$R^{3'}$为O、S或$-NR^{N1}-$，其中R^{N1}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基，并且$R^{3''}$为任选取代的亚烷基(例如，$-CH_2-$、$-CH_2CH_2-$或$-CH_2CH_2CH_2-$)或任选取代的杂亚烷基(例如，$-CH_2NH-$、$-CH_2CH_2NH-$、$-CH_2OCH_2-$或$-CH_2CH_2OCH_2-$)(例如，$R^{3'}$为O并且$R^{3''}$为任选取代的亚烷基(例如，$-CH_2-$、$-CH_2CH_2-$或-

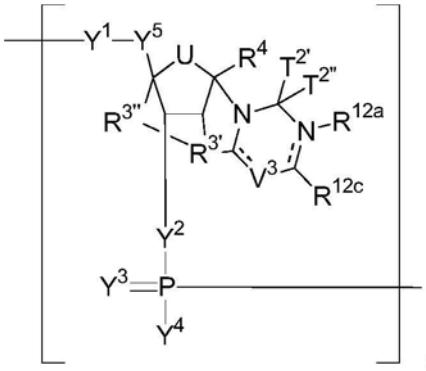
$CH_2CH_2CH_2$-))。

[0495] 在一些实施方案中,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括形成四环杂环基的锁定的修饰核糖。在一些实施方案中,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如,所述第一区、所述第一侧翼区或所述第二侧翼区)包括n数目的连接核苷,所述核苷具有式(IIo):

[0496]



(IIo) 或



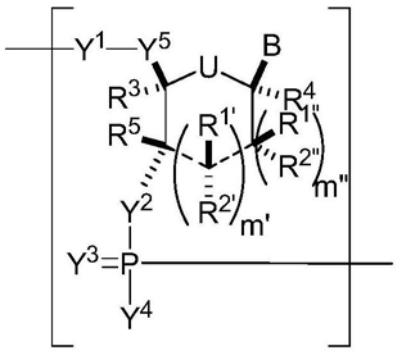
(IIp);

或其药学上可接受的盐,其中R^{12a}、R^{12c}、$T^{1'}$、$T^{1''}$、$T^{2'}$、$T^{2''}$、V^1以及V^3如本文所描述。

[0497] 所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA的任何式可包括一个或多个本文所描述的核碱基(例如,式(b1)至(b43))。

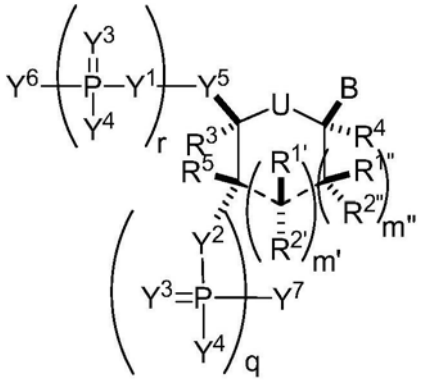
[0498] 在一个实施方案中,本发明提供制备多核苷酸、初级构建体或mmRNA的方法,其中所述多核苷酸包含n数目的如本文所定义的具有式(Ia)的核苷:

[0499]



(Ia),

[0500] 所述方法包括使如本文所定义的式(IIIa)化合物:

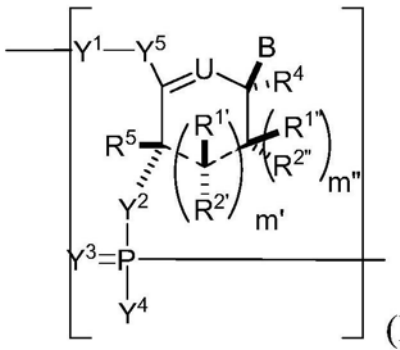
[0501] 

(IIIa),

[0502] 与RNA聚合酶和cDNA模板反应。

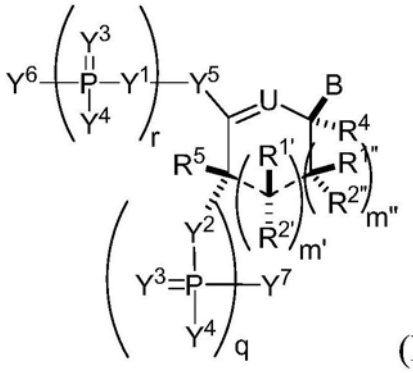
[0503] 在另一个实施方案中，本发明提供扩增包含至少一个核苷酸(例如，mmRNA分子)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的方法，所述方法包括：使如本文所定义的式(IIIa)的化合物与引物、cDNA模板以及RNA聚合酶反应。

[0504] 在一个实施方案中，本发明提供制备包含至少一个核苷酸(例如，mmRNA分子)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的方法，其中所述多核苷酸包含n数目的如本文所定义的具有式(Ia)的核苷：

[0505] 

(Ia-1),

[0506] 所述方法包括使如本文所定义的式(IIIa-1)化合物：

[0507] 

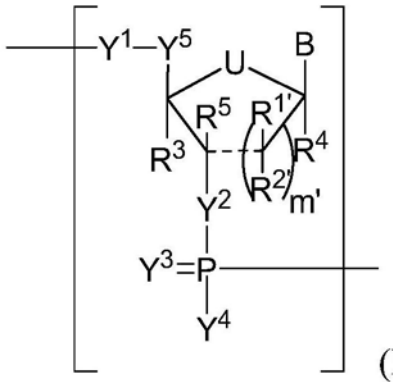
(IIIa-1),

[0508] 与RNA聚合酶和cDNA模板反应。

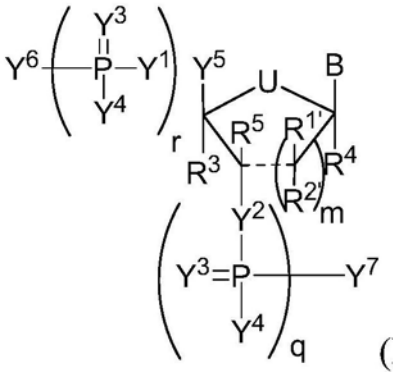
[0509] 在另一个实施方案中，本发明提供扩增包含至少一个核苷酸(例如，mmRNA分子)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的方法，所述方法包括：

[0510] 使如本文所定义的式(IIIa-1)化合物与引物、cDNA模板以及RNA聚合酶反应。

[0511] 在一个实施方案中，本发明提供制备包含至少一个核苷酸(例如，mmRNA分子)的修饰mRNA的方法，其中所述多核苷酸包含n数目的如本文所定义的具有式(Ia-2)的核苷：

[0512] 
(Ia-2),

[0513] 所述方法包括使如本文所定义的式(IIIa-2)化合物：

[0514] 
(IIIa-2),

[0515] 与RNA聚合酶和cDNA模板反应。

[0516] 在另一个实施方案中，本发明提供扩增包含至少一个核苷酸(例如，mmRNA分子)的修饰mRNA的方法，所述方法包括：

[0517] 使如本文所定义的式(IIIa-2)化合物与引物、cDNA模板以及RNA聚合酶反应。

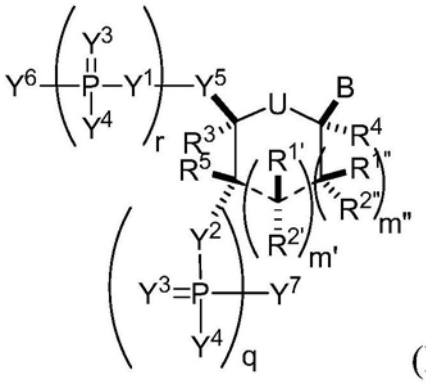
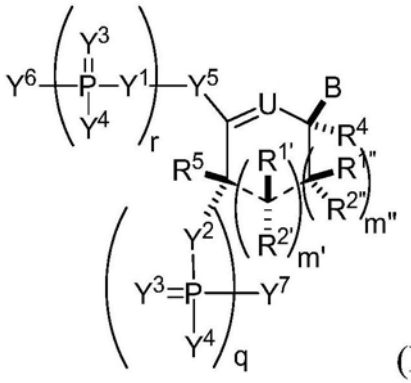
[0518] 在一些实施方案中，所述反应可重复1至约7,000次。在本文的任何实施方案中，B可以是式(b1)至(b43)的核碱基。

[0519] 所述多核苷酸、初级构建体和mmRNA可任选地包括5′和/或3′侧翼区，所述侧翼区在本文进行了描述。

[0520] 修饰RNA(mmRNA)分子

[0521] 本发明还包括修饰RNA(mmRNA)分子的结构单元，例如，修饰核糖核苷、修饰核糖核苷酸。例如，这些结构单元可适用于制备本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。

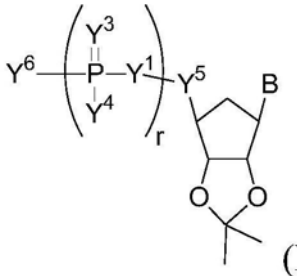
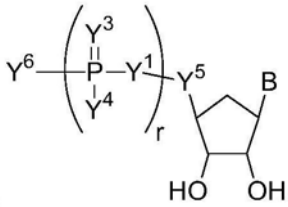
[0522] 在一些实施方案中，所述结构单元分子具有式(IIIa)或(IIIa-1)：

[0523] 
(IIIa)、 
(IIIa-1),

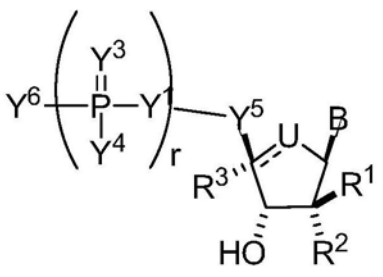
[0524] 或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中取代基如本文所描述(例如，对于式

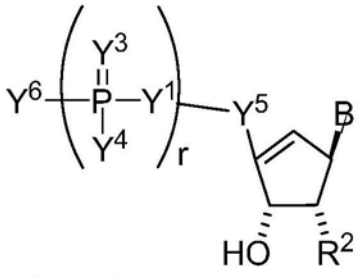
(Ia)和(Ia-1)来说),并且其中当B是选自胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶以及腺嘌呤的未修饰核碱基时,那么Y^1、Y^2或Y^3中的至少一个不是O。

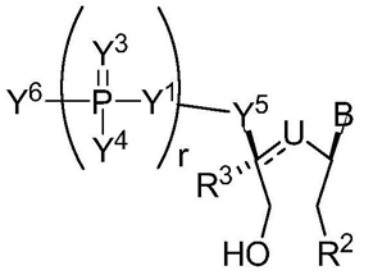
[0525] 在一些实施方案中,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子具有式(IVa)至(IVb):

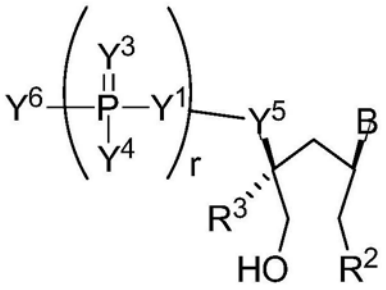
[0526]  (IVa)或  (IVb),或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中B如本文所描述(例如,(b1)至(b43)中的任一个)。在具体实施方案中,将式(IVa)或(IVb)与修饰尿嘧啶(例如,式(b1)至(b9)、(b21)至(b23)以及(b28)至(b31)中的任一个,如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))组合。在具体实施方案中,将式(IVa)或(IVb)与修饰胞嘧啶(例如,式(b10)至(b14)、(b24)、(b25)以及(b32)至(b36)中的任一个,如式(b10)或(b32))组合。在具体实施方案中,将式(IVa)或(IVb)与修饰鸟嘌呤(例如,式(b15)至(b17)和(b37)至(b40)中的任一个)组合。在具体实施方案中,将式(IVa)或(IVb)与修饰腺嘌呤(例如,式(b18)至(b20)和(b41)至(b43)中的任一个)组合。

[0527] 在一些实施方案中,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子具有式(IVc)至(IVk):

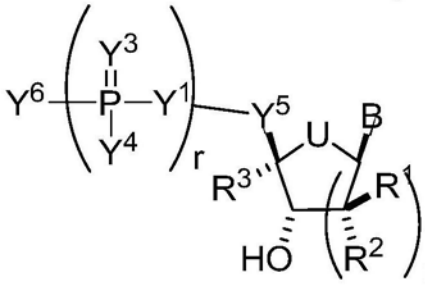

(IVc)、

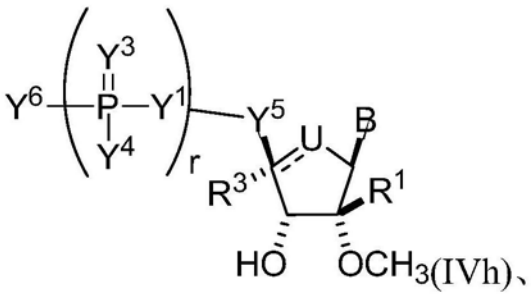

(IVd)、

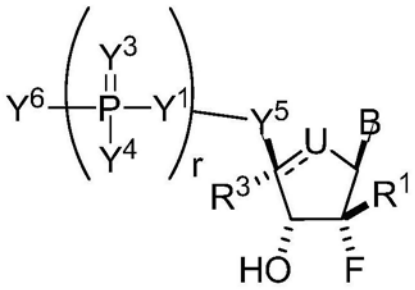

(IVe)、

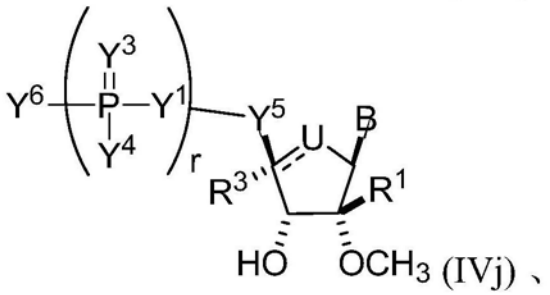

(IVf)、

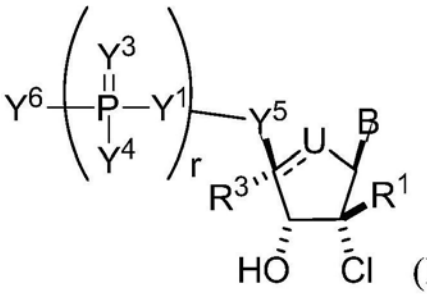
[0528]

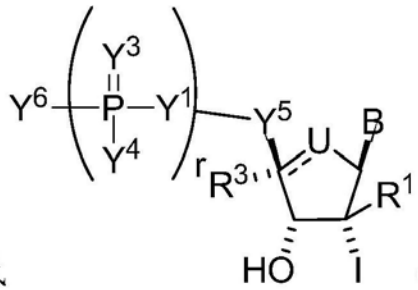

(IVg)、


(IVh)、


(IVi)、

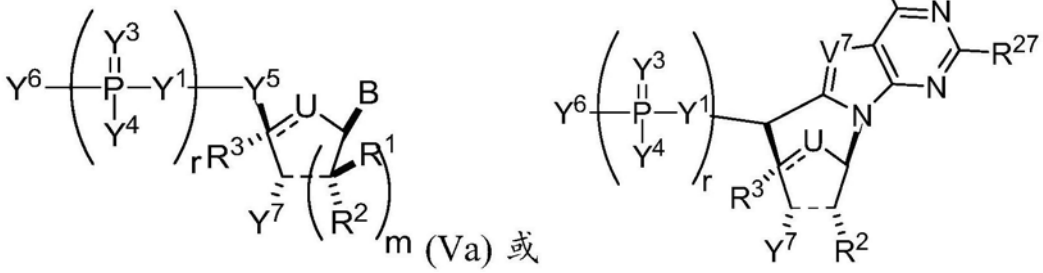

(IVj)、


(IVk)或

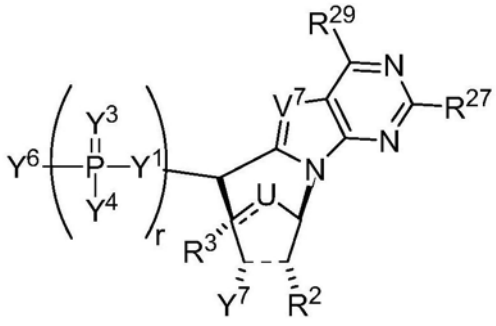

(IVl)，

或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中B如本文所描述(例如，(b1)至(b43)中的任一个)。在具体实施方案中，将式(IVc)至(IVk)中的一个与修饰尿嘧啶(例如，式(b1)至(b9)、(b21)至(b23)以及(b28)至(b31)中的任一个，如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))组合。在具体实施方案中，将式(IVc)至(IVk)中的一个与修饰胞嘧啶(例如，式(b10)至(b14)、(b24)、(b25)以及(b32)至(b36)中的任一个，如式(b10)或(b32))组合。在具体实施方案中，将式(IVc)至(IVk)中的一个与修饰鸟嘌呤(例如，式(b15)至(b17)和(b37)至(b40)中的任一个)组合。在具体实施方案中，将式(IVc)至(IVk)中的一个与修饰腺嘌呤(例如，式(b18)至(b20)和(b41)至(b43)中的任一个)组合。

[0529] 在其它实施方案中，可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子具有式(Va)或(Vb)：

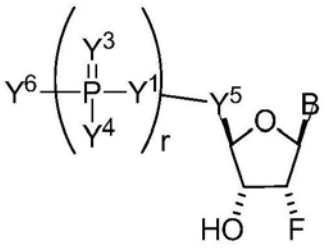
[0530] 

(Va)或

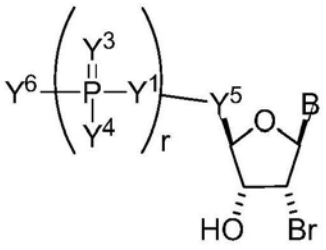


[0531] (Vb)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中B如本文所描述(例如，(b1)至(b43)中的任一个)。

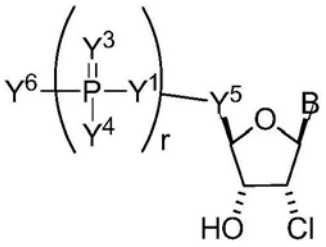
[0532] 在其它实施方案中，可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子具有式(IXa)至(IXd)：

[0533] 

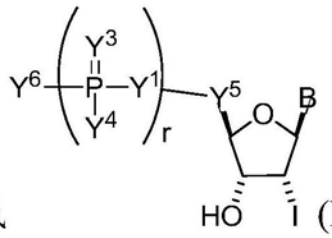
(IXa)、



(IXb)、

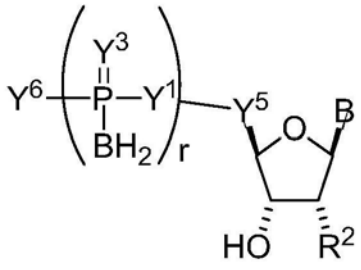
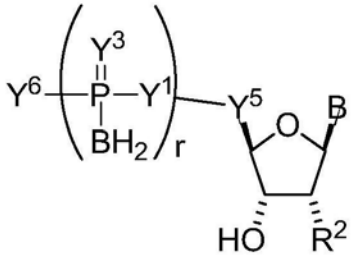
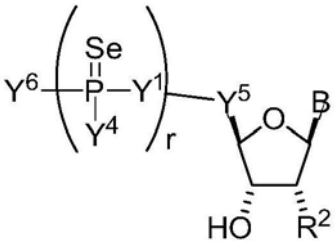


(IXc)或

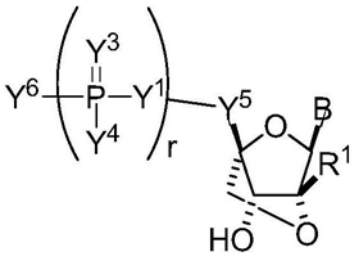
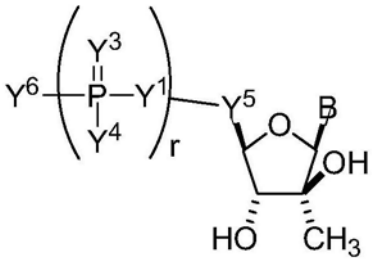
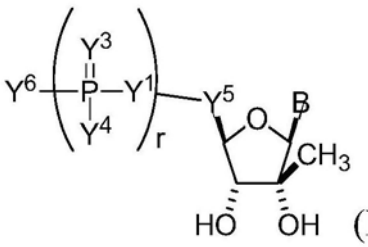
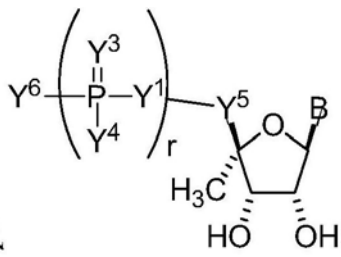


(IXd)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中B如本文所描述(例如，(b1)至(b43)中的任一个)。在具体实施方案中，将式(IXa)至(IXd)中的一个与修饰尿嘧啶(例如，式(b1)至(b9)、(b21)至(b23)以及(b28)至(b31)中的任一个，如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))组合。在具体实施方案中，将式(IXa)至(IXd)中的一个与修饰胞嘧啶(例如，式(b10)至(b14)、(b24)、(b25)以及(b32)至(b36)中的任一个，如式(b10)或(b32))组合。在具体实施方案中，将式(IXa)至(IXd)中的一个与修饰鸟嘌呤(例如，式(b15)至(b17)和(b37)至(b40)中的任一个)组合。在具体实施方案中，将式(IXa)至(IXd)中的一个与修饰腺嘌呤(例如，式(b18)至(b20)和(b41)至(b43)中的任一个)组合。

[0534] 在其它实施方案中，可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子具有式(IXe)至(IXg)：

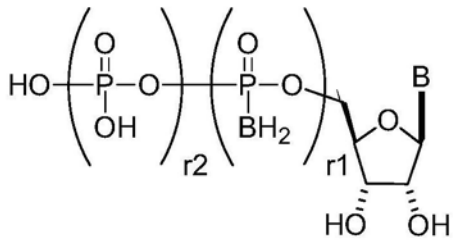
[0535]  (IXe)、  (IXf)或  (IXg)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中B如本文所描述(例如，(b1)至(b43)中的任一个)。在具体实施方案中，将式(IXe)至(IXg)中的一个与修饰尿嘧啶(例如，式(b1)至(b9)、(b21)至(b23)以及(b28)至(b31)中的任一个，如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))组合。在具体实施方案中，将式(IXe)至(IXg)中的一个与修饰胞嘧啶(例如，式(b10)至(b14)、(b24)、(b25)以及(b32)至(b36)中的任一个，如式(b10)或(b32))组合。在具体实施方案中，将式(IXe)至(IXg)中的一个与修饰鸟嘌呤(例如，式(b15)至(b17)和(b37)至(b40)中的任一个)组合。在具体实施方案中，将式(IXe)至(IXg)中的一个与修饰腺嘌呤(例如，式(b18)至(b20)和(b41)至(b43)中的任一个)组合。

[0536] 在其它实施方案中，可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子具有式(IXh)至(IXk)：

[0537]  (IXh)、  (IXi)、  (IXj)或  (IXk)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中B如本文所描述(例如，(b1)至(b43)中的任一个)。在具体实施方案中，将式(IXh)至(IXk)中的一个与修饰尿嘧啶(例如，式(b1)至(b9)、(b21)至(b23)以及(b28)至(b31)中的任一个，如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))组合。在具体实施方案中，将式(IXh)至(IXk)中的一个与修饰胞嘧啶(例如，式(b10)至(b14)、(b24)、(b25)以及(b32)至(b36)中的任一个，如式(b10)或(b32))组合。在具体实施方案中，将式(IXh)至(IXk)中的一个与修饰鸟嘌呤(例如，式(b15)至(b17)和(b37)至(b40)中的任一个)组合。在具体实施方案中，将式(IXh)至(IXk)中的一个与修饰腺嘌呤(例如，式(b18)至(b20)和(b41)至(b43)中

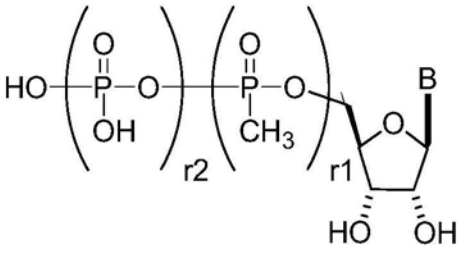
的任一个)组合。

[0538] 在其它实施方案中,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子具有式(IX1)至(IXr):

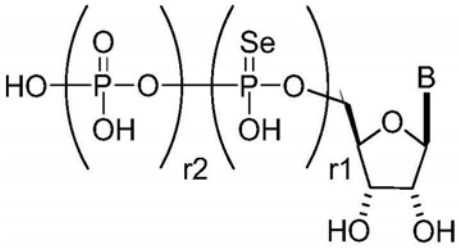


(IXl)、

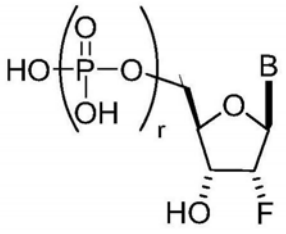
[0539]



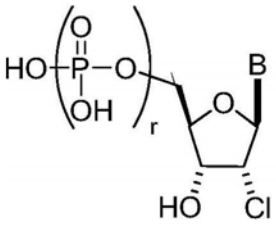
(IXm)、



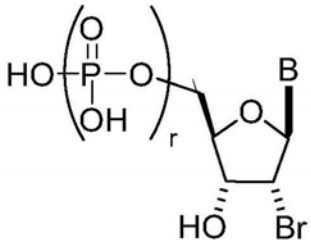
(IXn)、



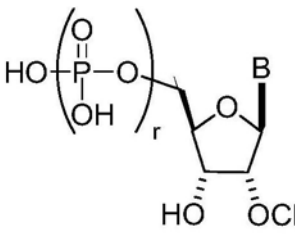
(IXo)、



(IXp)、



(IXq)或

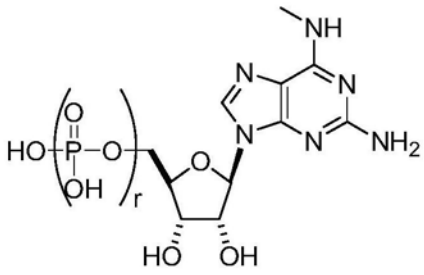


(IXr)

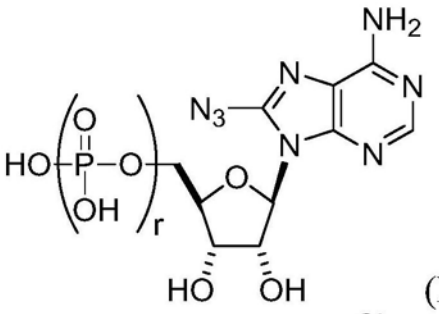
或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r1和r2独立地为0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数并且B如本文所描述(例如,(b1)至(b43)中的任一个)。在具体实施方案中,将式(IX1)至(IXr)中的一个与修饰尿嘧啶(例如,式(b1)至(b9)、(b21)至(b23)以及(b28)至(b31)中的任一个,如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))组合。在具体实施方案中,将式(IX1)至(IXr)中的一个与修饰胞嘧啶(例如,式(b10)至(b14)、(b24)、(b25)以及(b32)至(b36)中的任一个,如式(b10)或(b32))组合。在具体实施方案中,将式(IX1)至(IXr)中的一个与修饰鸟嘌呤(例如,式(b15)至(b17)和(b37)至(b40)中的任一个)组合。在具体实施方案中,将式(IX1)至(IXr)中的一个与修饰腺嘌呤(例如,式(b18)至(b20)和(b41)至(b43)中的任一个)组合。

[0540] 在一些实施方案中,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子可选

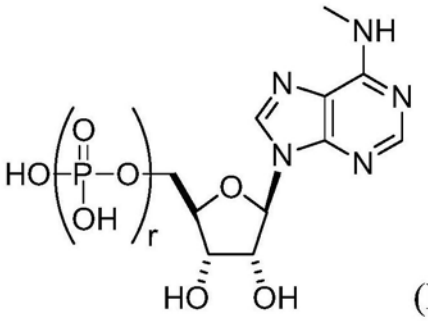
自由以下组成的组：

[0541] 

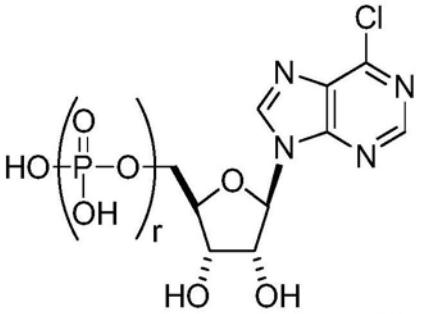
(BB-1) 、



(BB-2)、

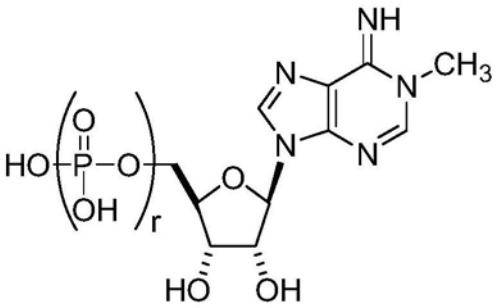


(BB-3)、

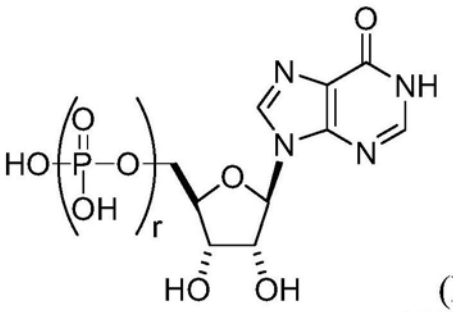


(BB-4)、

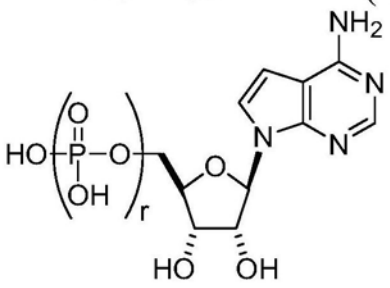
[0542]



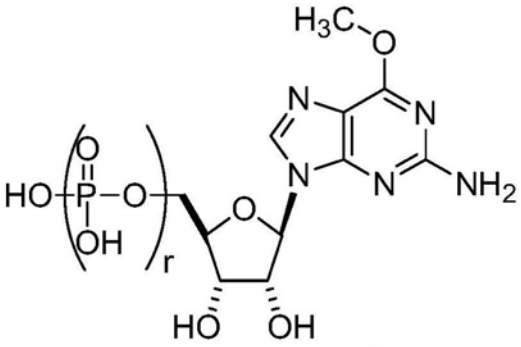
(BB-5)、



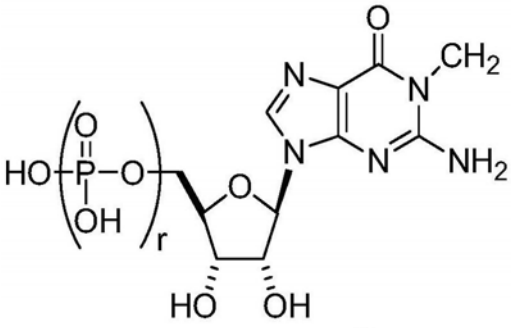
(BB-6)、



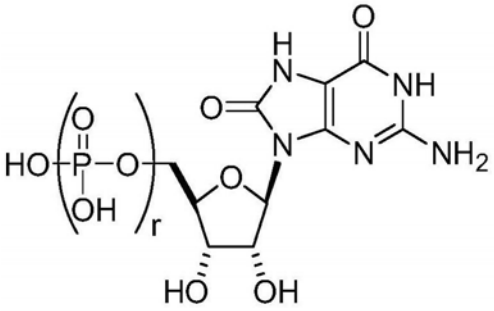
(BB-7)、

[0543] 

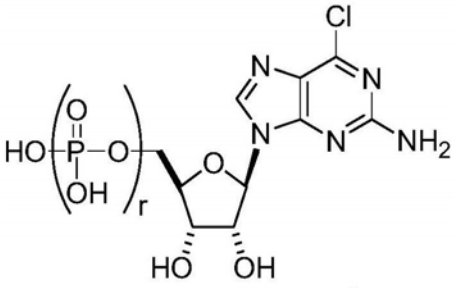
(BB-8)、



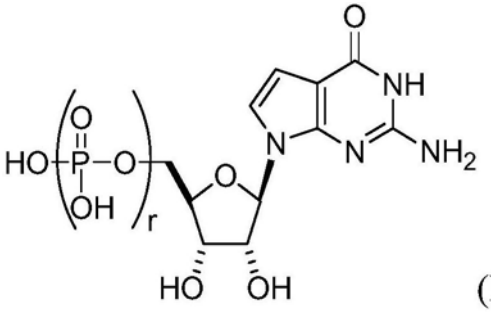
(BB-9)、



(BB-10)、

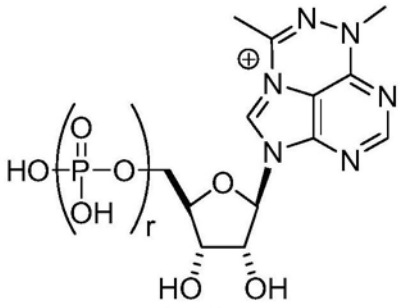


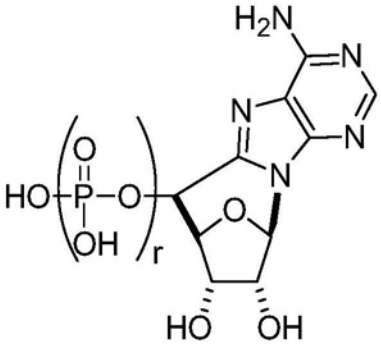
(BB-11)以及

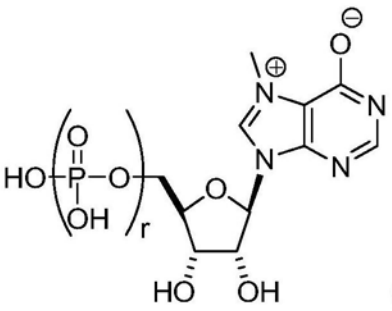


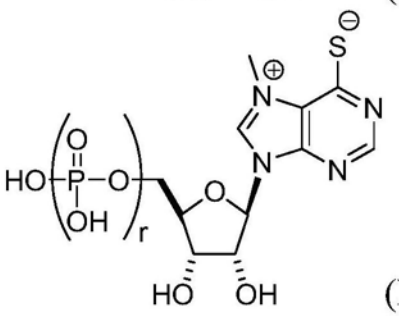
(BB-12),或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地为0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。

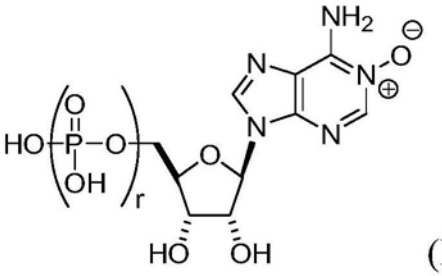
[0544] 在一些实施方案中,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子可选自由以下组成的组:

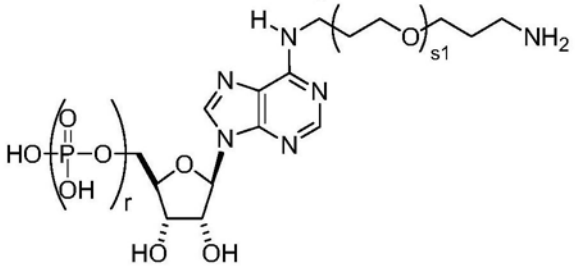
[0545] 

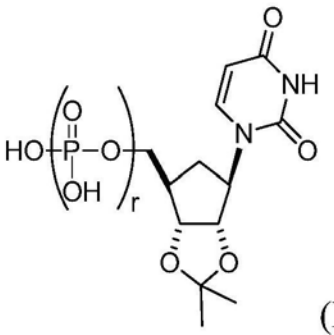
(BB-13)、 

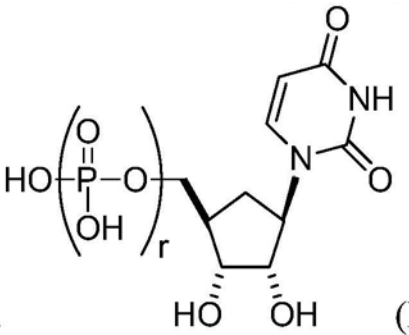
(BB-14)、 

(BB-15)、 

(BB-16)、 

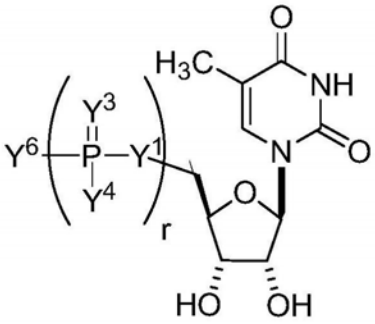
(BB-17)、 

(BB-18)、 

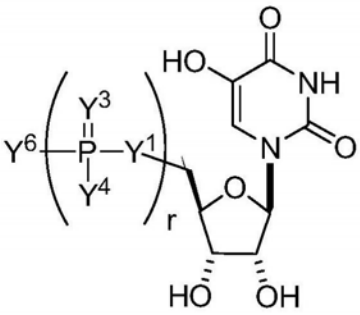
(BB-19)以及 

(BB-20)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中每个r独立地为0至5(例如，0至3、1至3或1至5)的整数并且s1如本文所描述。

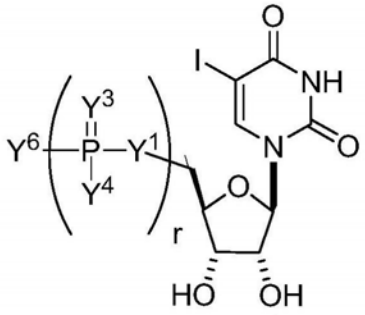
[0546] 在一些实施方案中，可并入核酸(例如，RNA、mRNA、多核苷酸、初级构建体或mmRNA)中的结构单元分子是修饰尿苷(例如，选自由以下组成的组：



(BB- 21)、



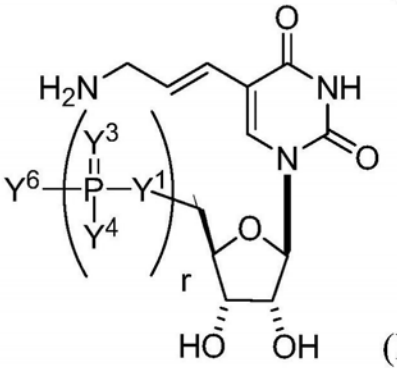
(BB-



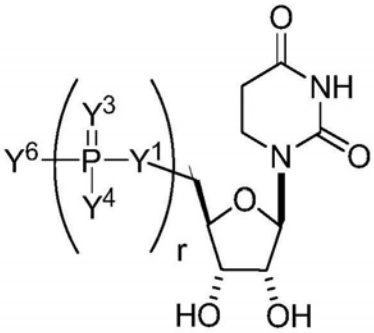
22)、

(BB- 23)、

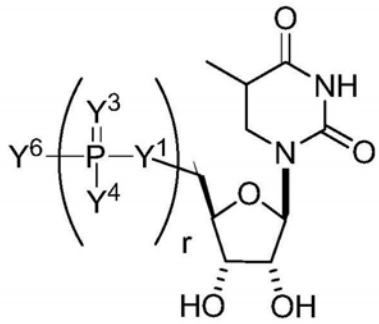
[0547]



(BB- 24)、

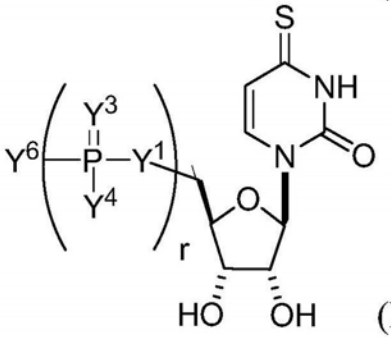


(BB-

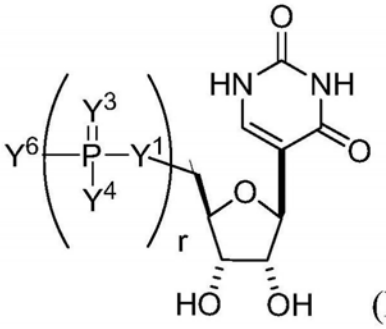


25)、

(BB- 26)、

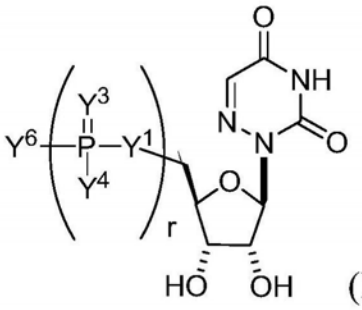


(BB-

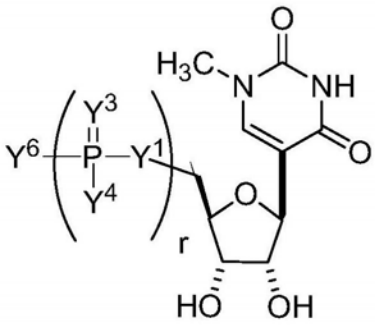


27)、

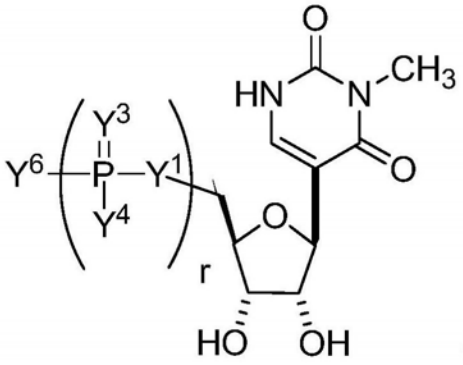
(BB- 28)、



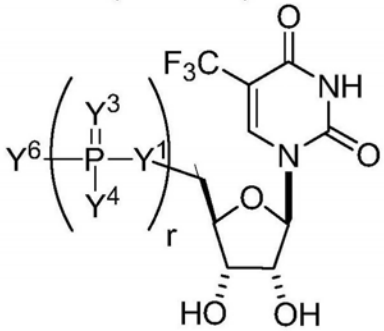
(BB- 29)、



(BB- 30)、

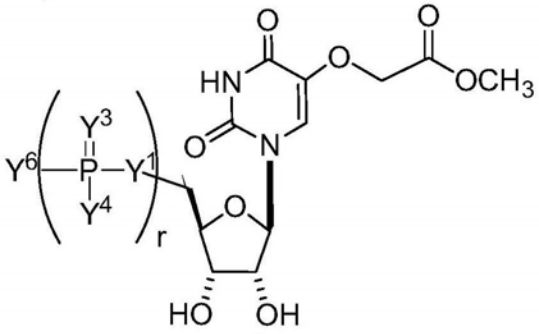


(BB- 31)、

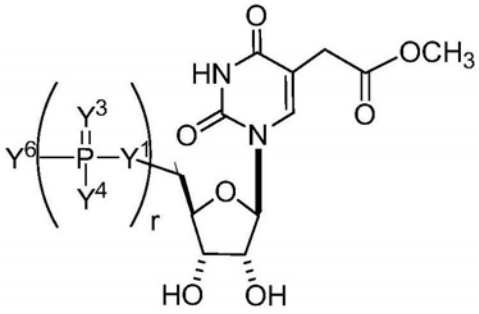


(BB- 32)、

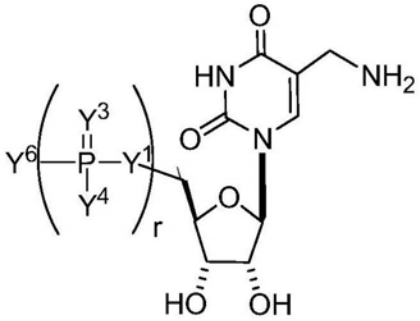
[0548]



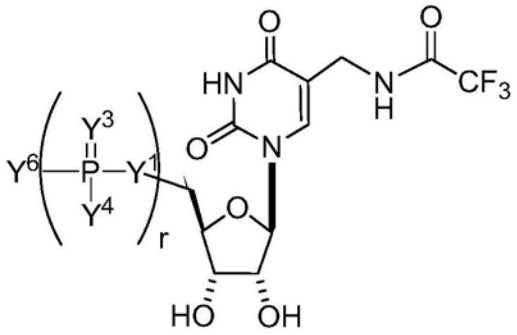
(BB- 33)、



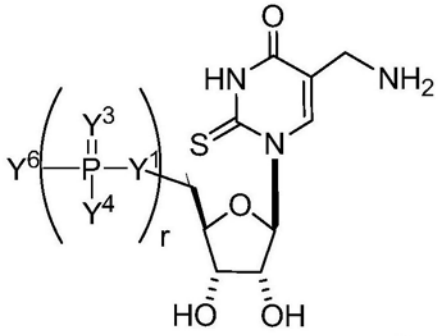
(BB- 34)、



(BB- 35)、

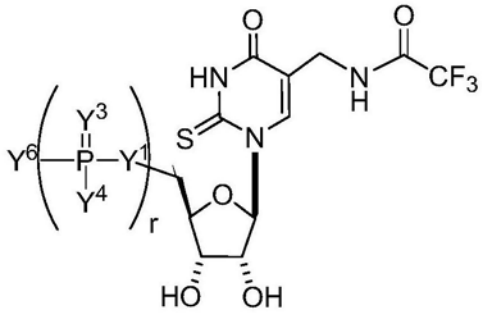


(BB- 36) 、

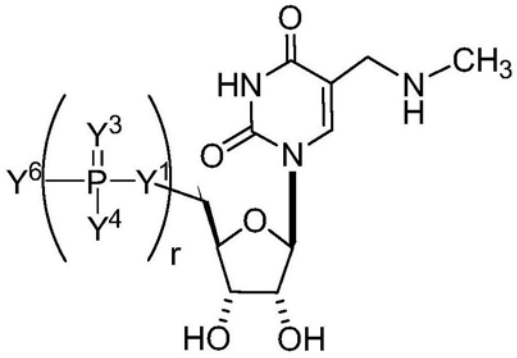


(BB- 37) 、

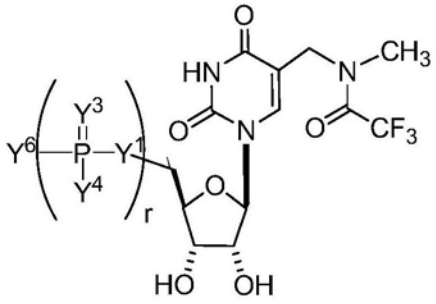
[0549]



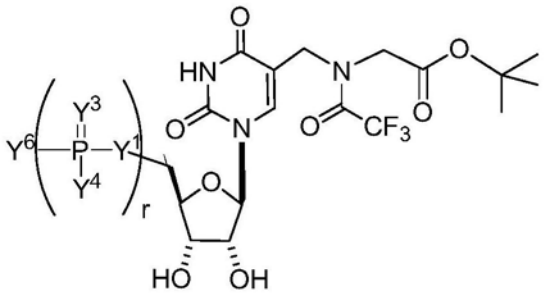
(BB- 38) 、



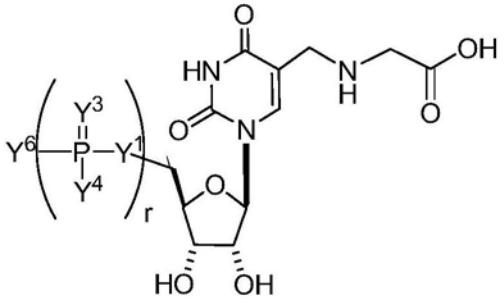
(BB- 39) 、



(BB- 40) 、

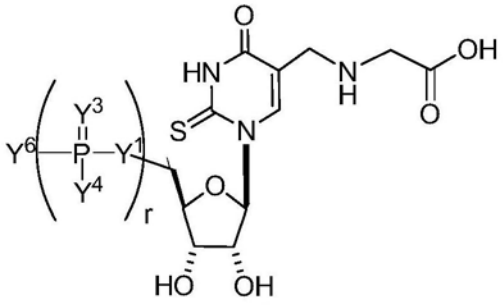


(BB- 41)、

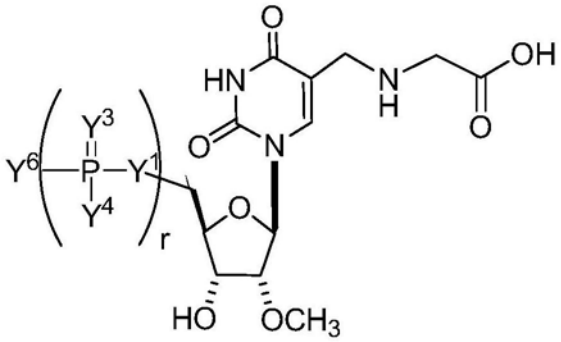


(BB- 42)、

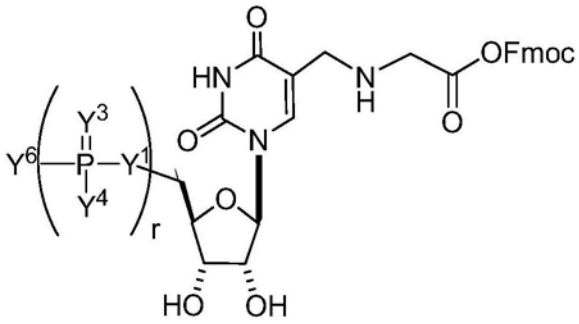
[0550]



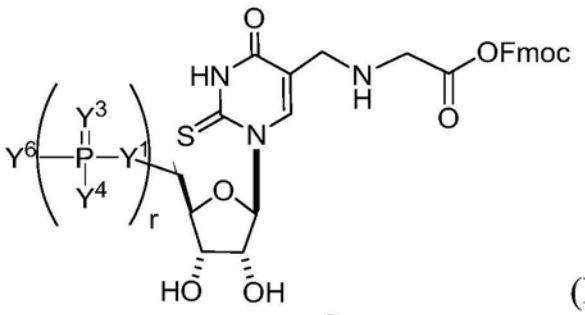
(BB- 43)、



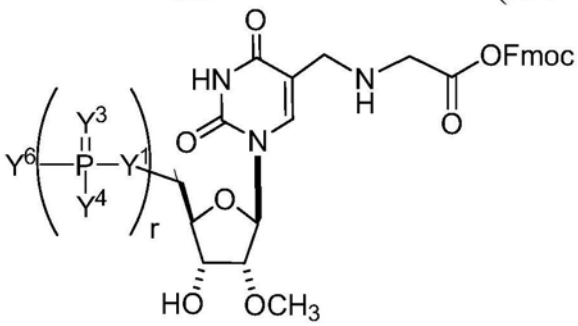
(BB- 44)、



(BB- 45)、

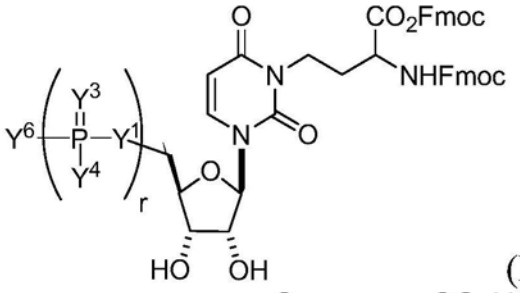


(BB-46)、

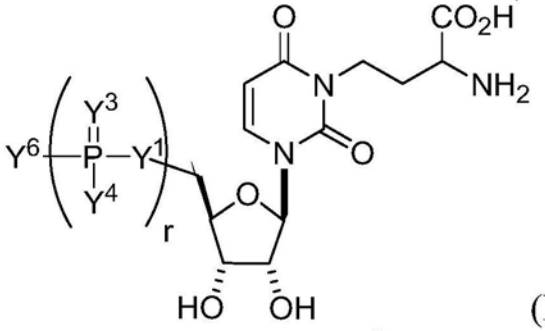


(BB- 47)、

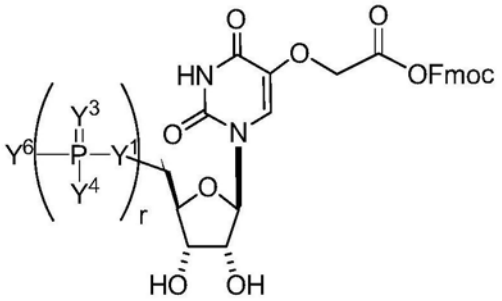
[0551]



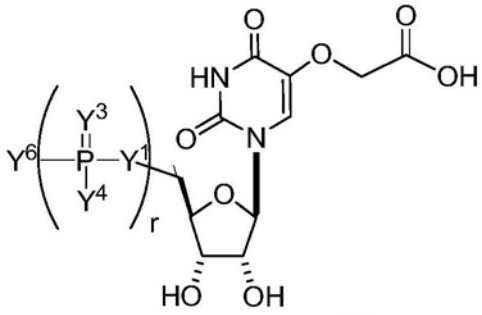
(BB- 48)、



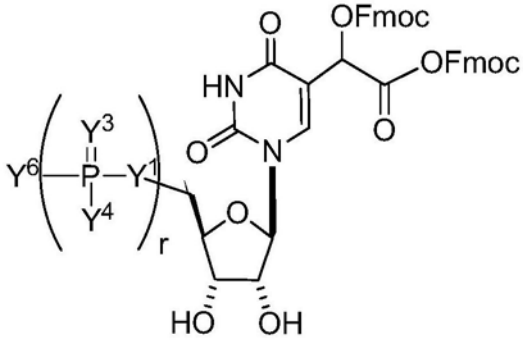
(BB- 49)、



(BB- 50) 、

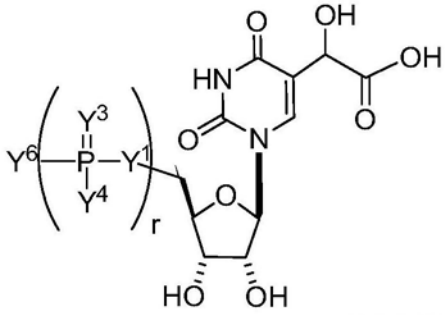


(BB- 51) 、

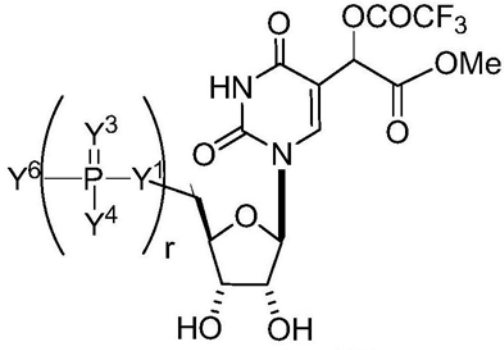


(BB- 52) 、

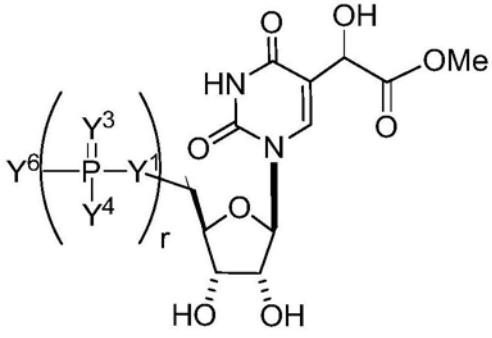
[0552]



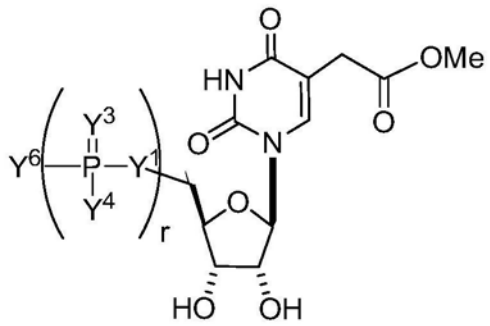
(BB- 53) 、



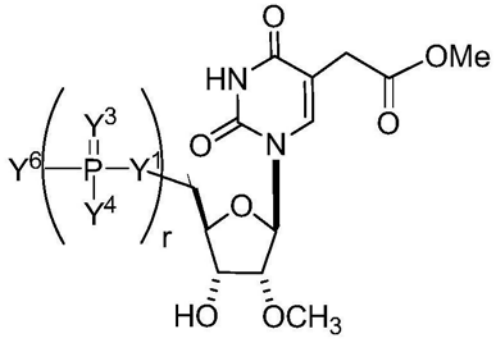
(BB- 54) 、



(BB- 55) 、

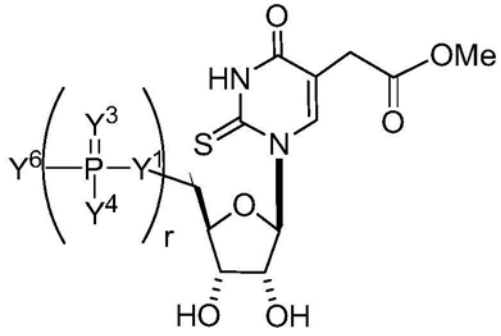


(BB-56)、

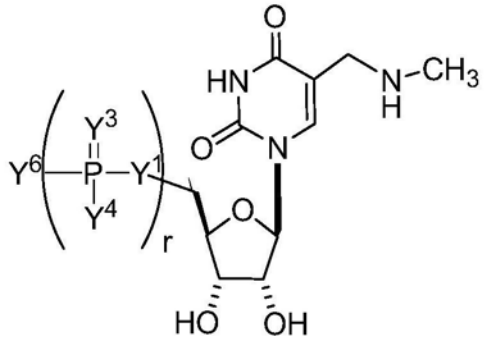


(BB-57)、

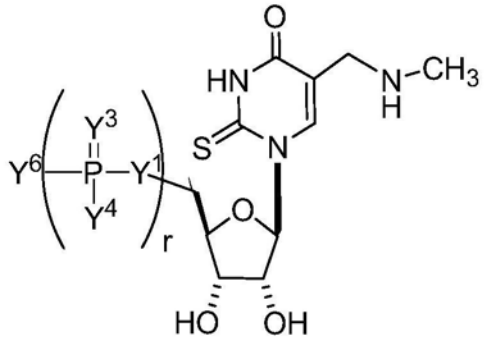
[0553]



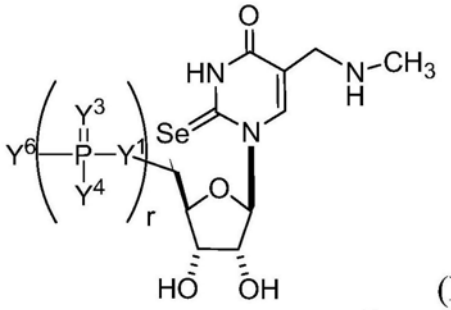
(BB-58)、



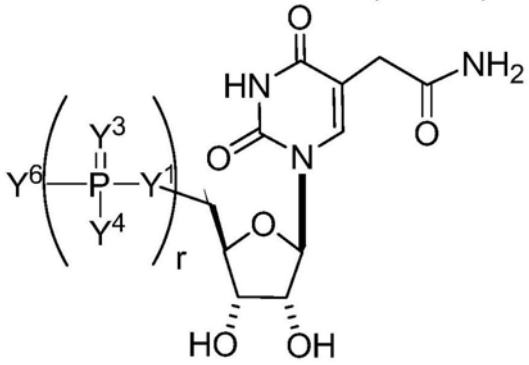
(BB-59)、



(BB-60)、

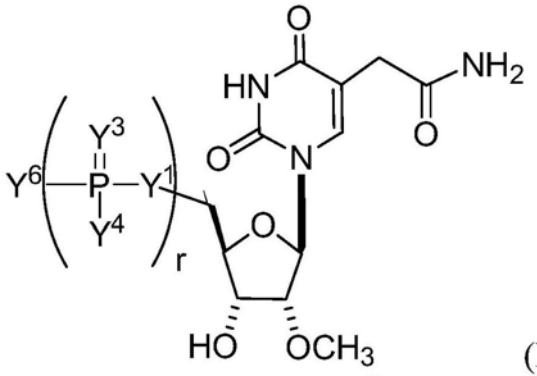


(BB-61)、

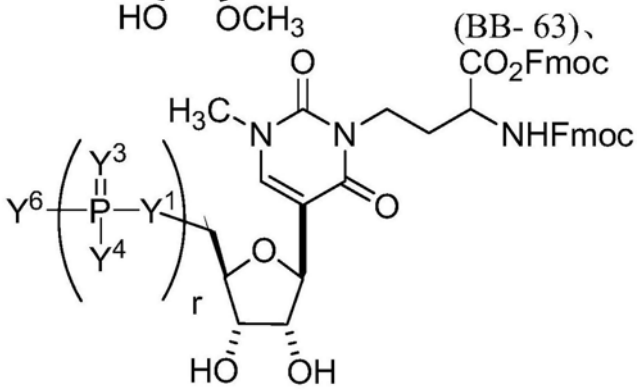


(BB-62)、

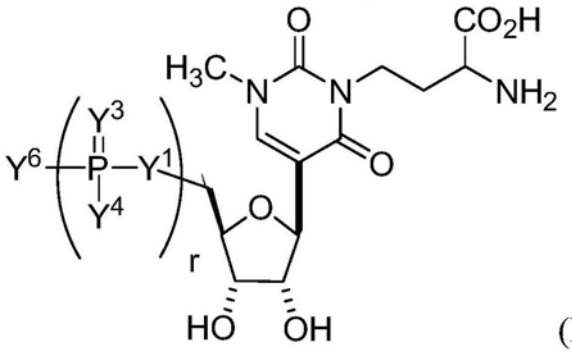
[0554]



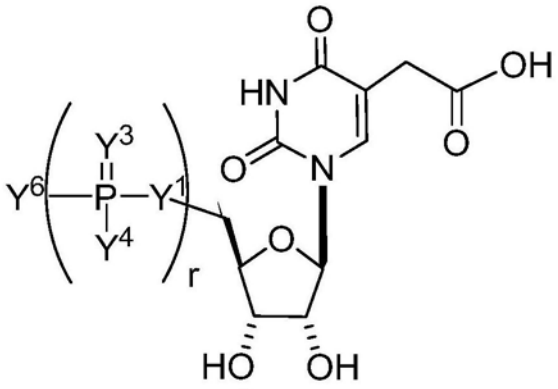
(BB-63)、



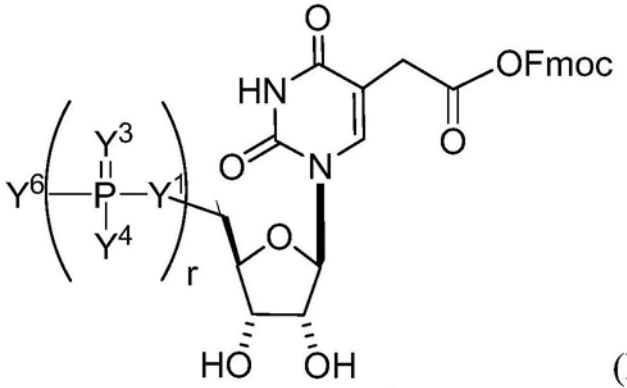
(BB-64)、



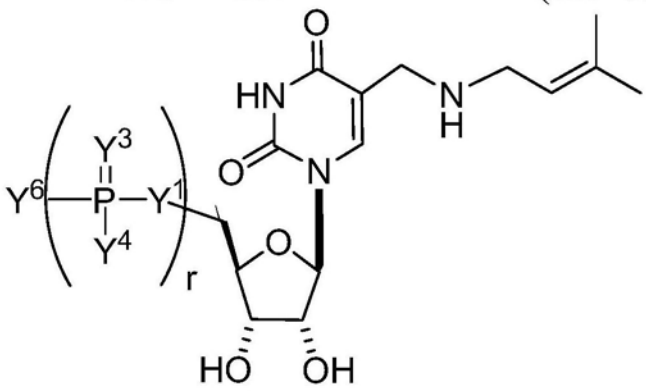
(BB-65)、



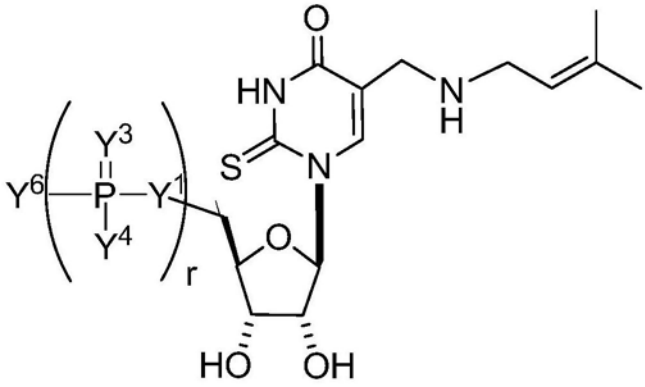
(BB- 66)、



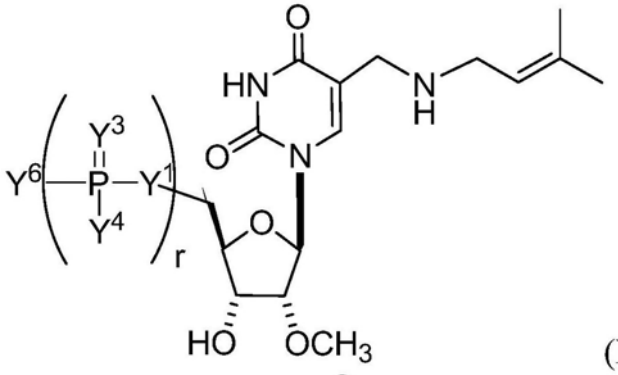
[0555] (BB- 67)、



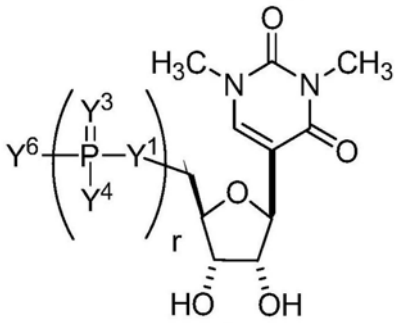
(BB- 68)、



(BB- 69)、

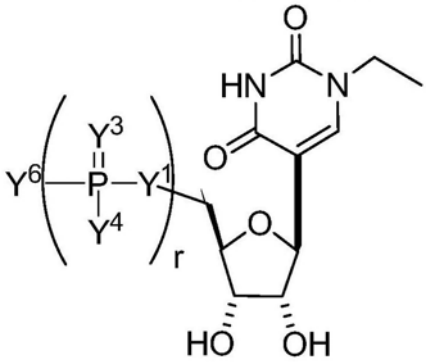


(BB- 70)、

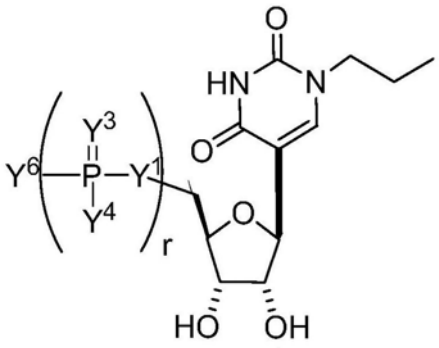


(BB- 71)、

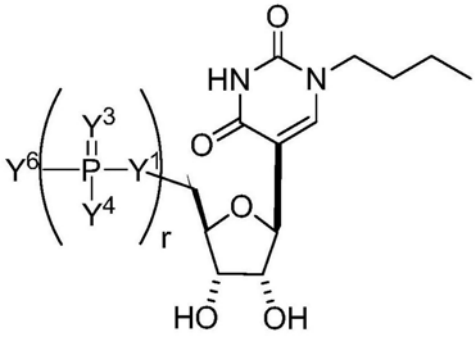
[0556]



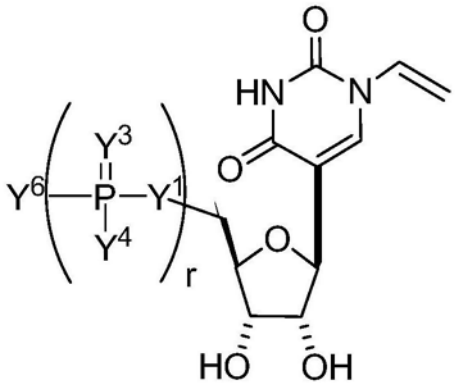
(BB- 72)、



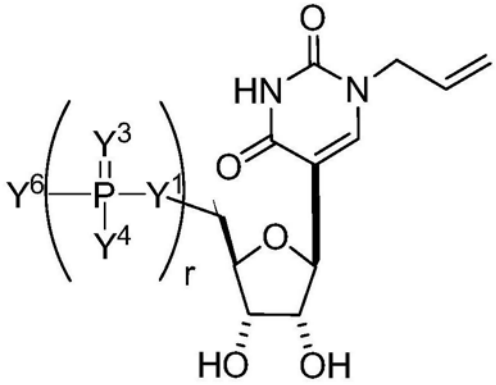
(BB- 73)、



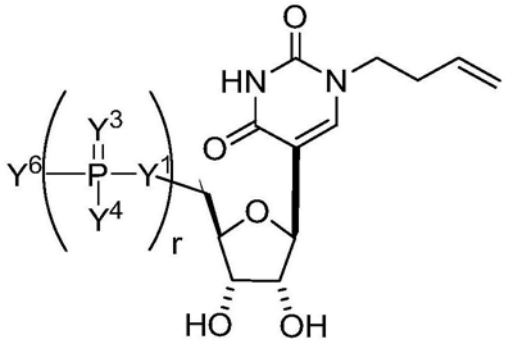
(BB- 74)、



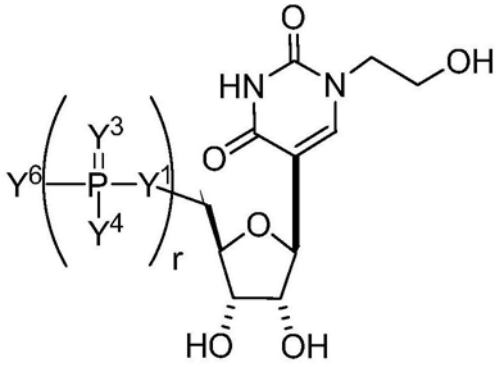
(BB- 75)、



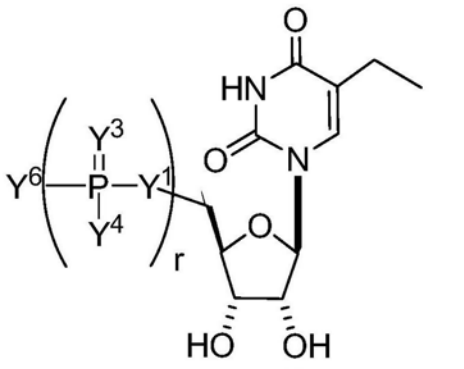
[0557] (BB- 76)、



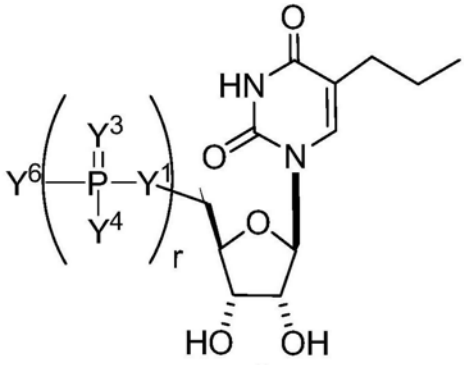
(BB- 77)、



(BB- 78)、

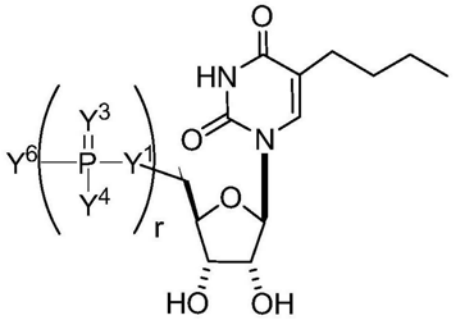


(BB- 79) 、

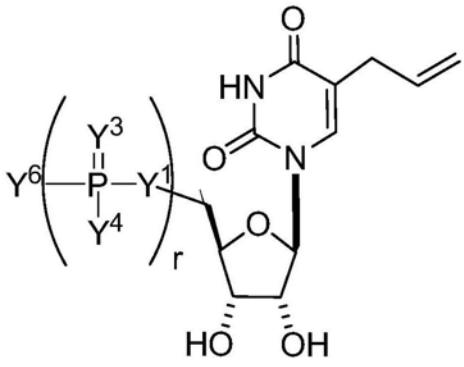


(BB- 80) 、

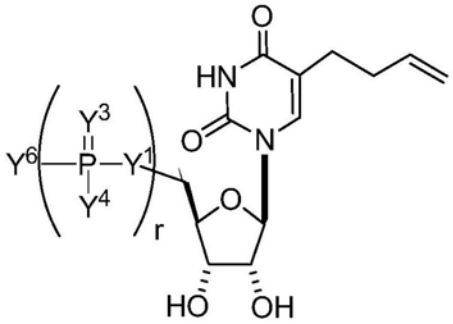
[0558]



(BB- 81) 、

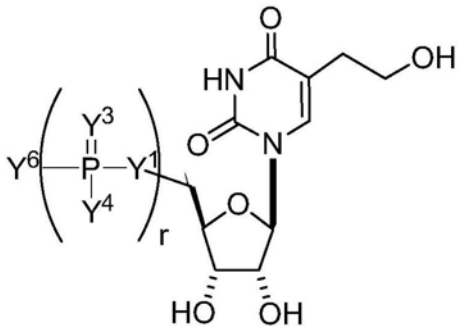


(BB- 82) 、

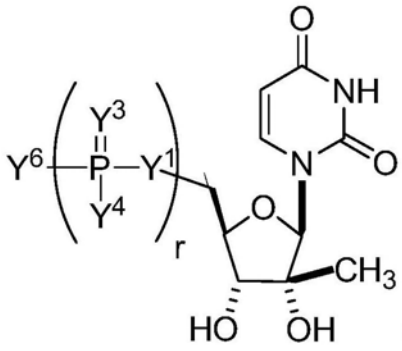


(BB- 83) 、

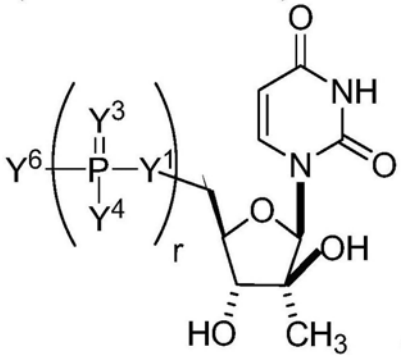
[0559]



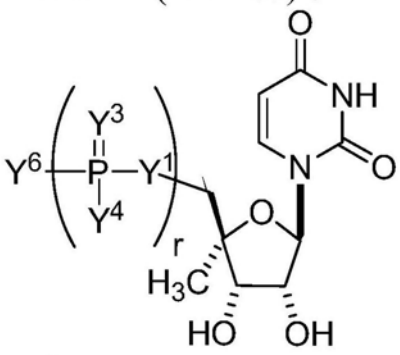
(BB-84)、



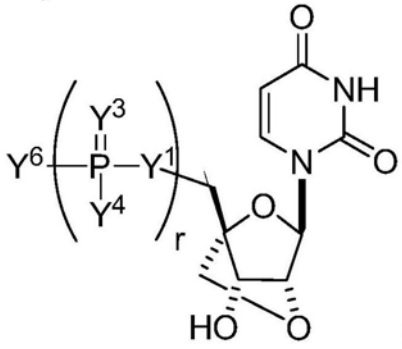
(BB-85)、



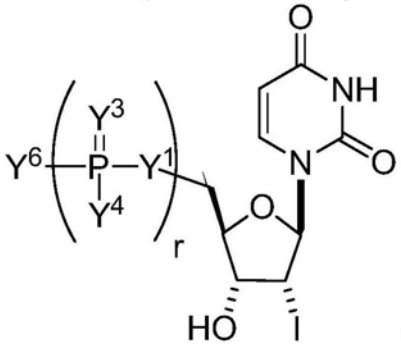
(BB-86)、



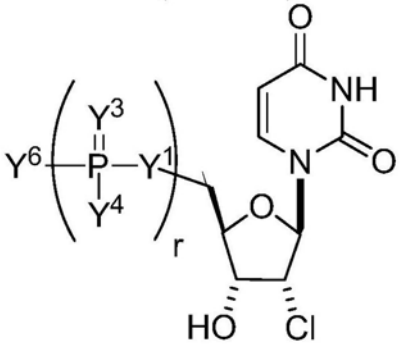
(BB-87)、



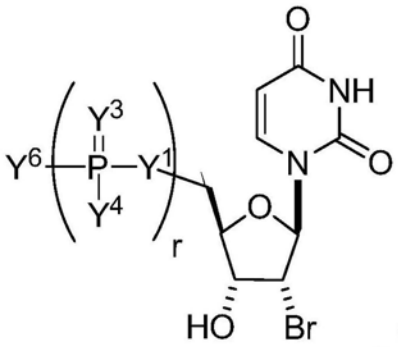
(BB-88)、



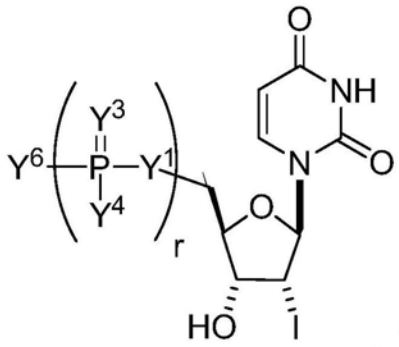
(BB-89)、



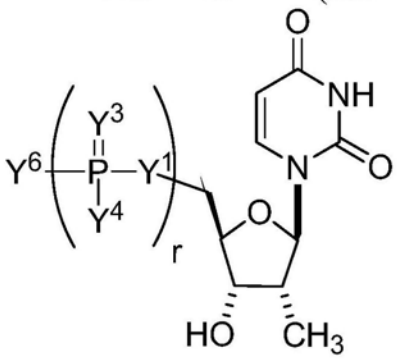
(BB-90)、



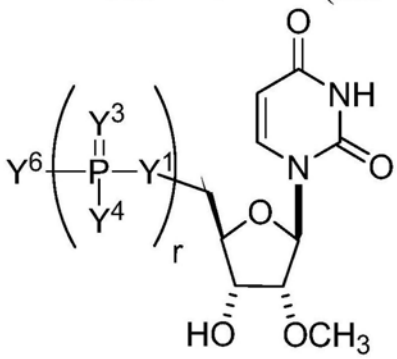
(BB- 91)、



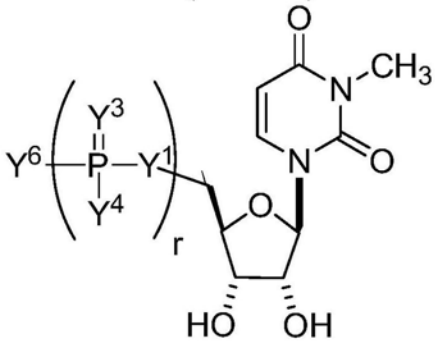
(BB- 92)、



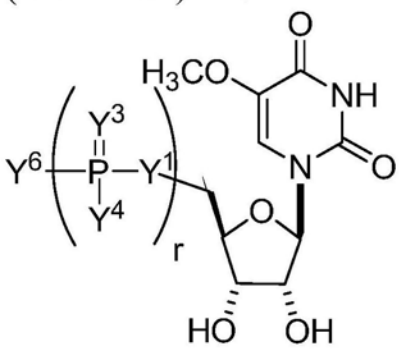
(BB- 93)、



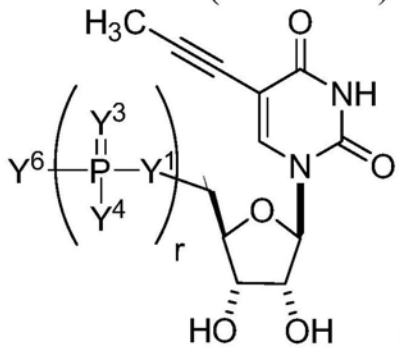
[0560]



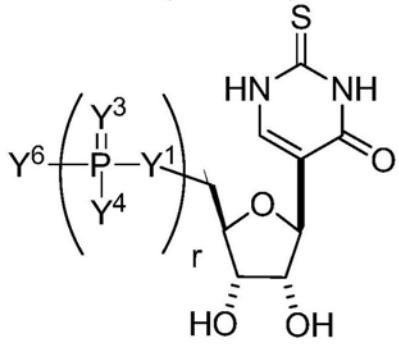
(BB- 94)、



(BB- 95)、

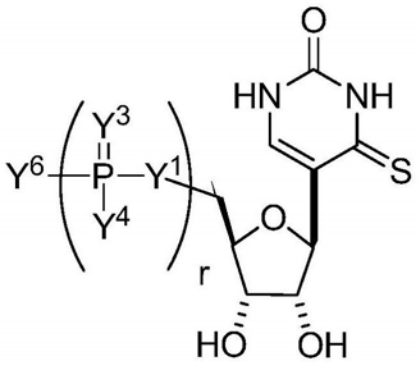


(BB- 96)、

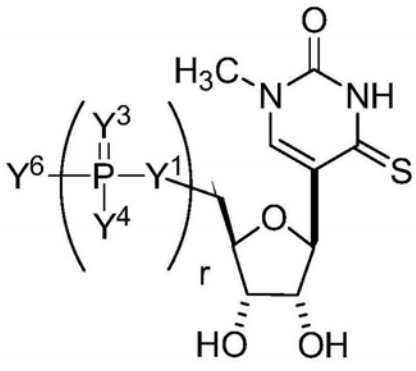


(BB- 97)、

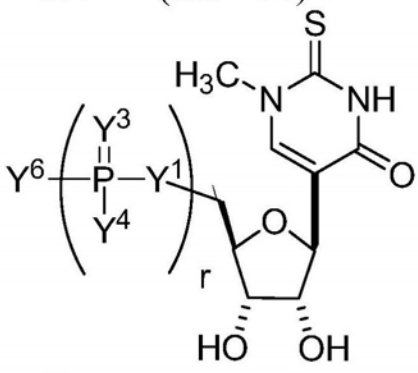
(BB- 98)、



(BB- 99)、

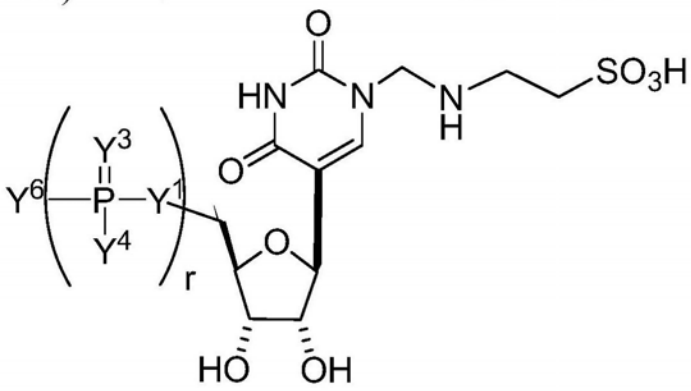


(BB- 100)、

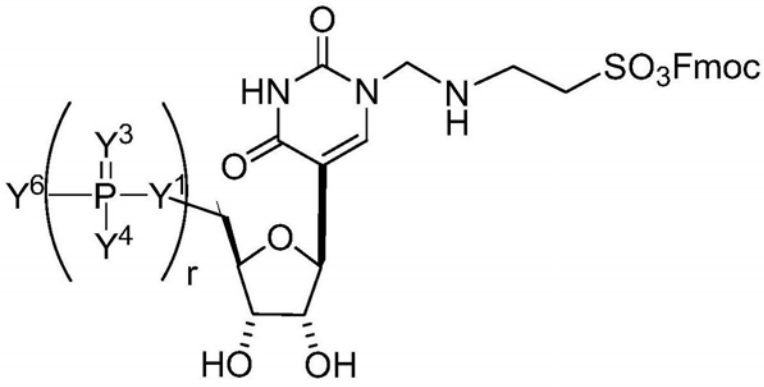


(BB- 101)、

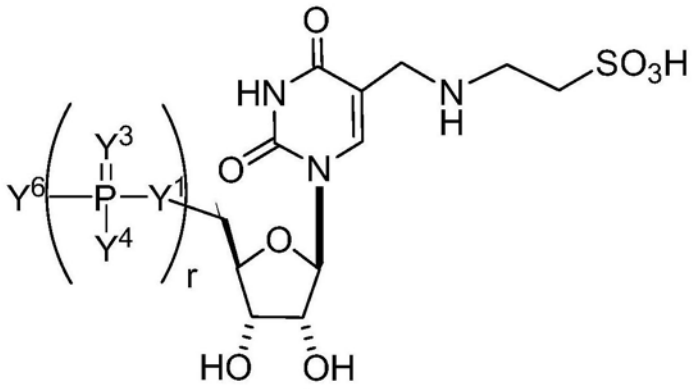
[0561]



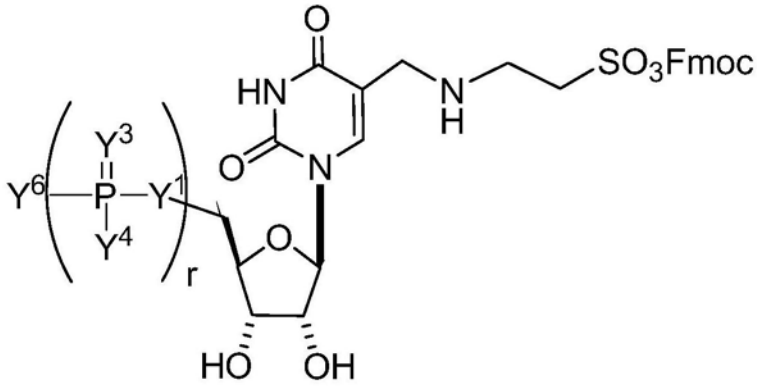
(BB- 102)、



(BB- 103)、

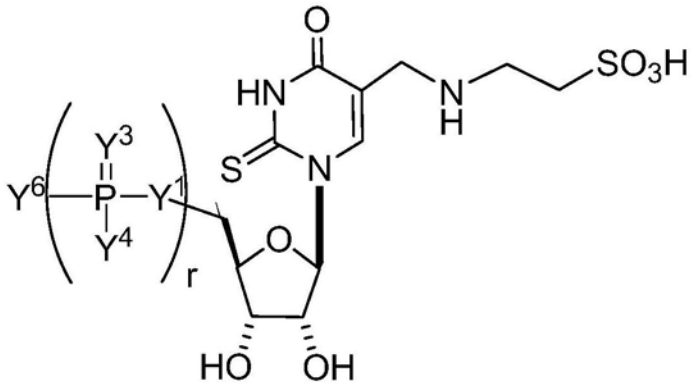


(BB- 104)、

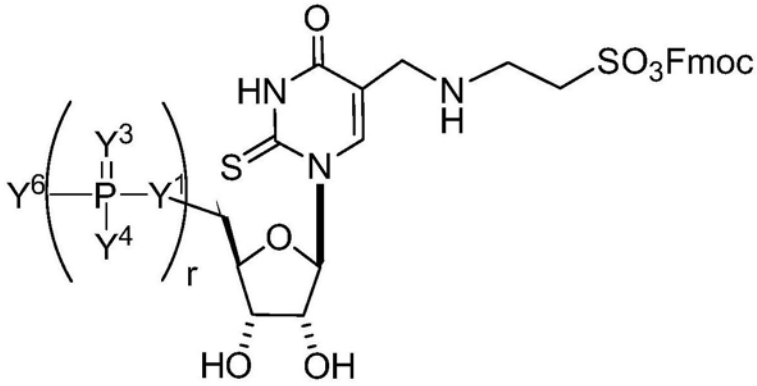


(BB- 105)、

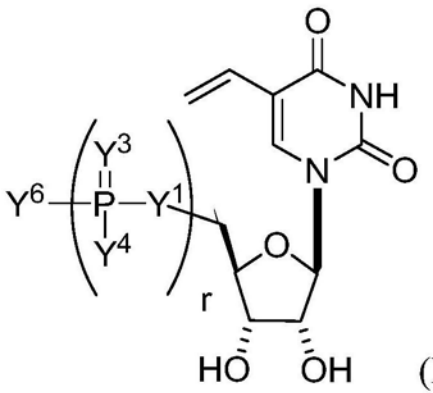
[0562]



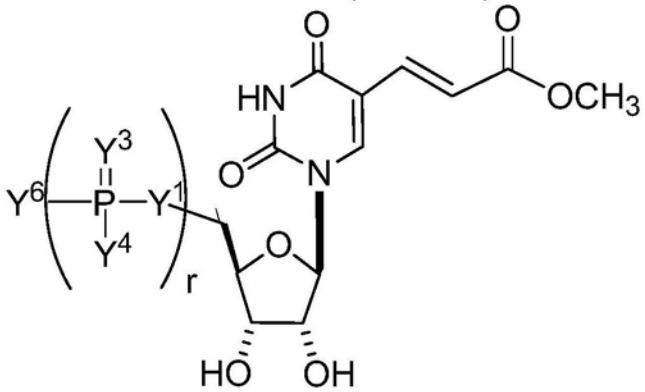
(BB- 106)、



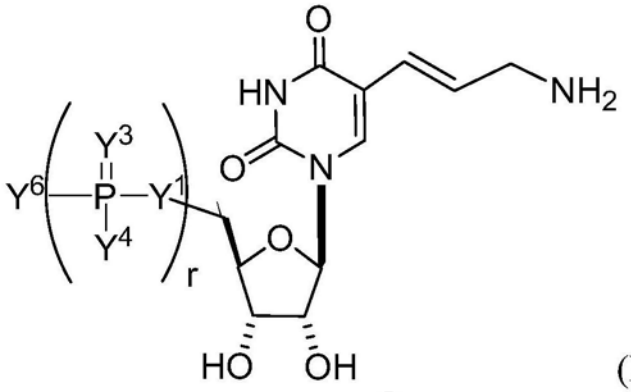
(BB- 107)、



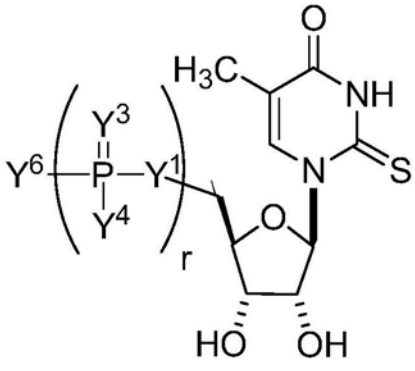
(BB- 108)、



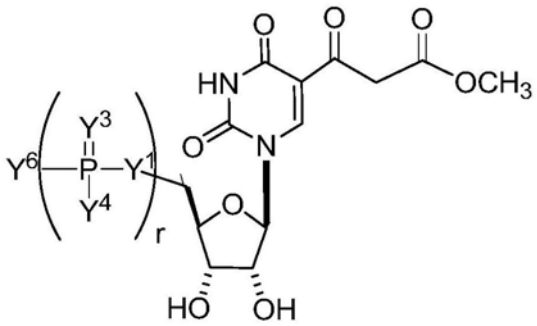
[0563] (BB- 109) 、



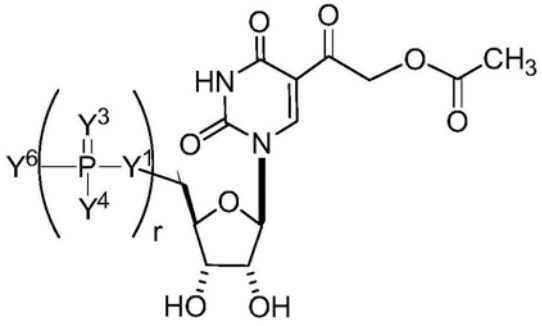
(BB- 110)、



(BB- 111) 、

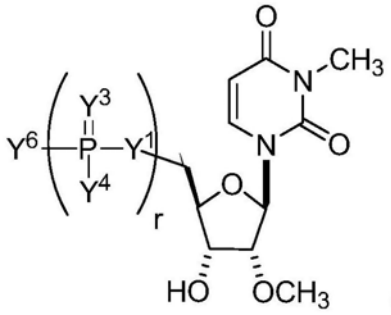


(BB- 112)、

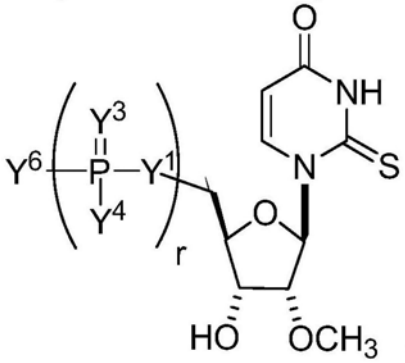


(BB- 113)、

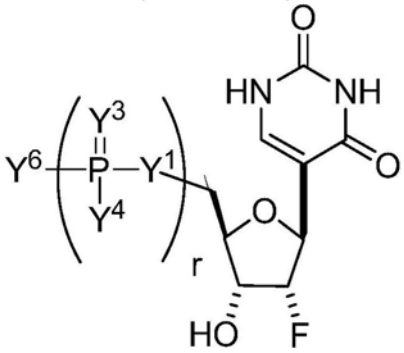
[0564]



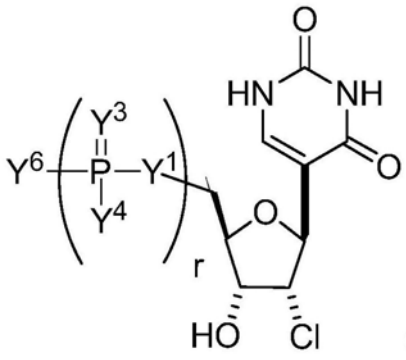
(BB- 114)、



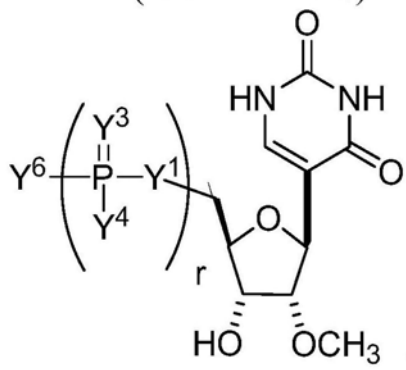
(BB- 115)、



(BB- 116)、

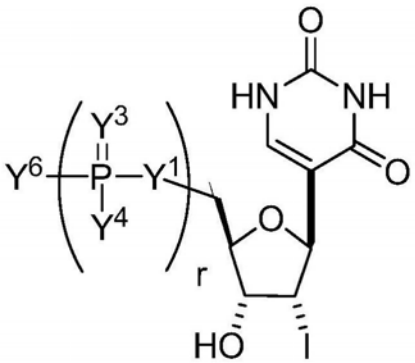


(BB- 117)、

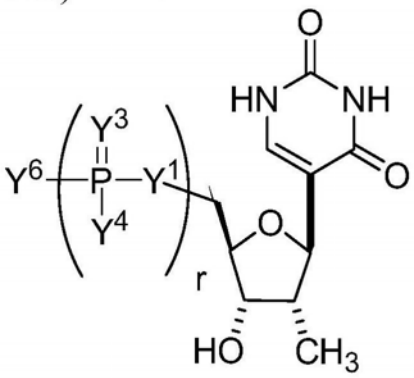


(BB-

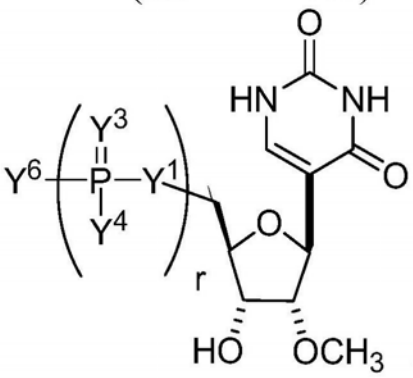
[0565]



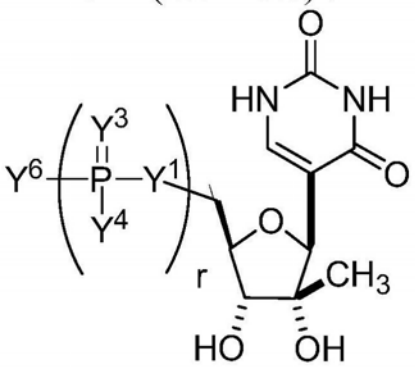
118)、



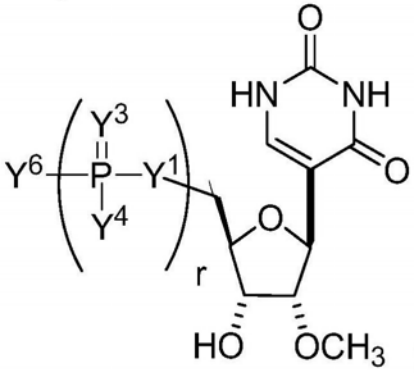
(BB-120)、



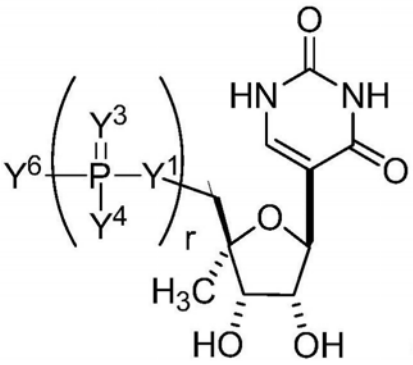
(BB-121)、



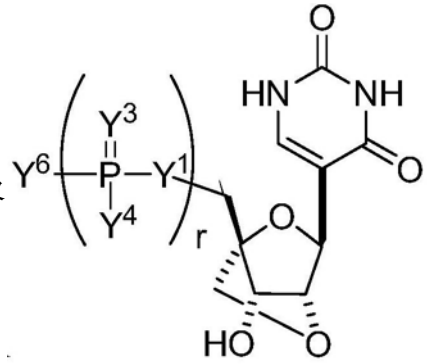
(BB-122)、



(BB-123)、

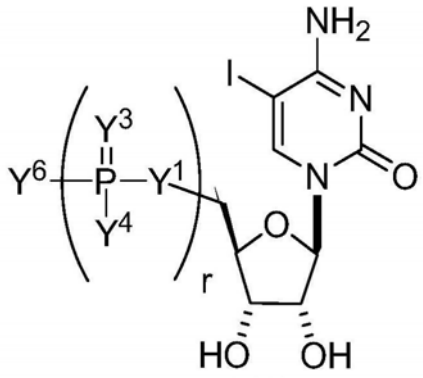


(BB-

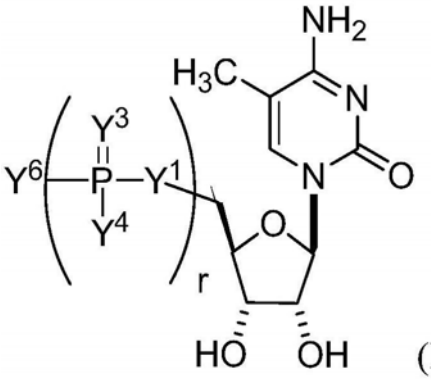
124)以及  (BB-125),

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中Y^1、Y^3、Y^4、Y^6以及r如本文所描述(例如,每个r独立地为0至5,如0至3、1至3或1至5的整数))。

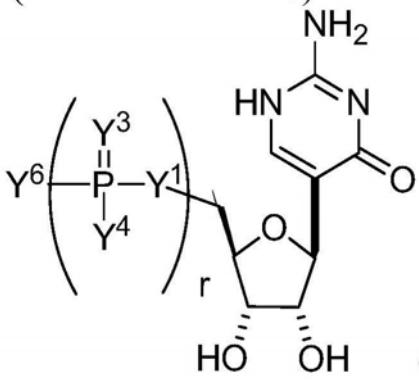
[0566] 在一些实施方案中,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子是修饰胞苷(例如,选自由以下组成的组:



(BB- 126)、

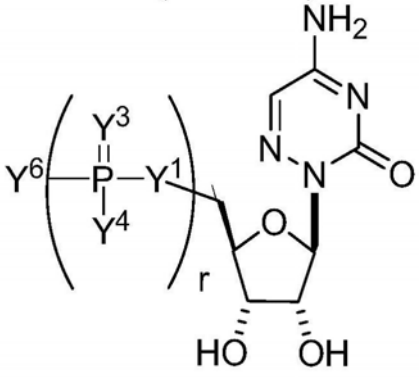


(BB- 127)、

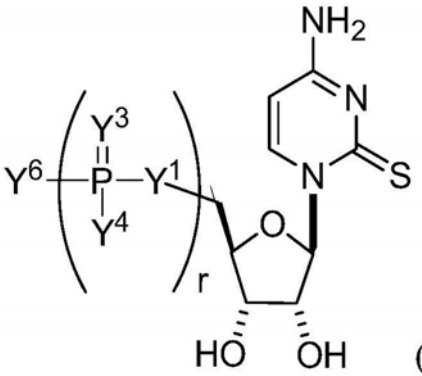


(BB-

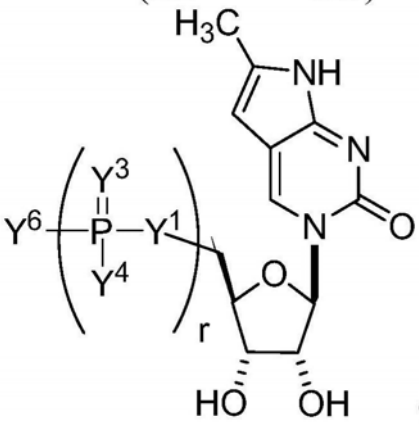
[0567]



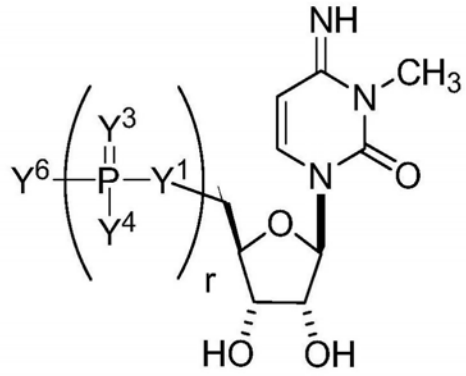
128)、

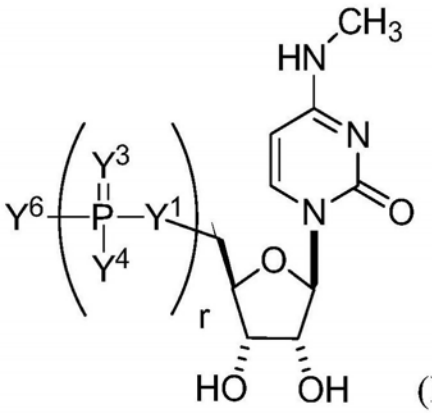
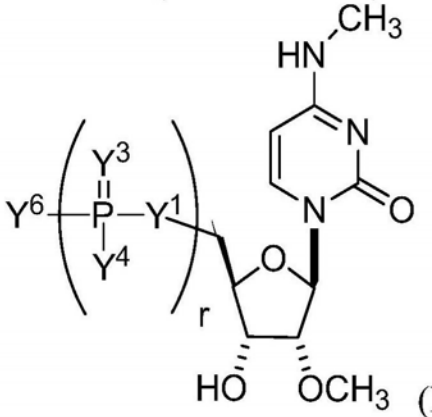


(BB- 130)、

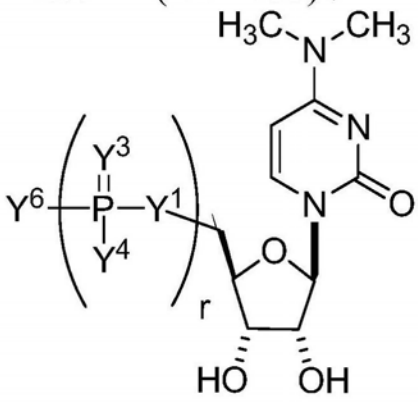


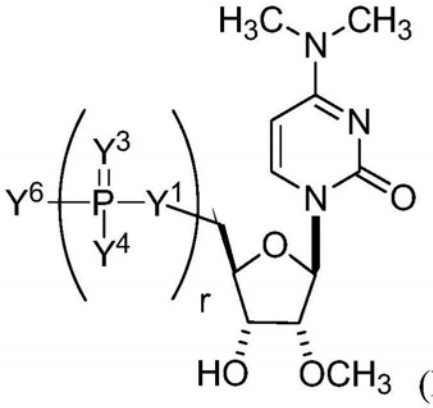
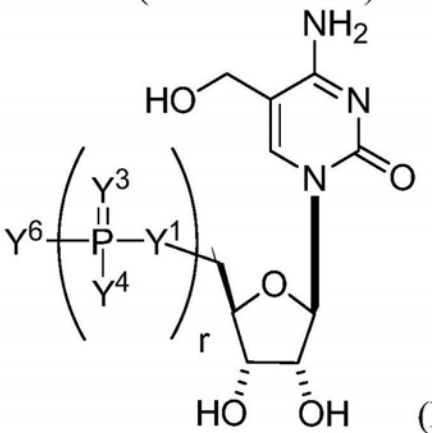
(BB-

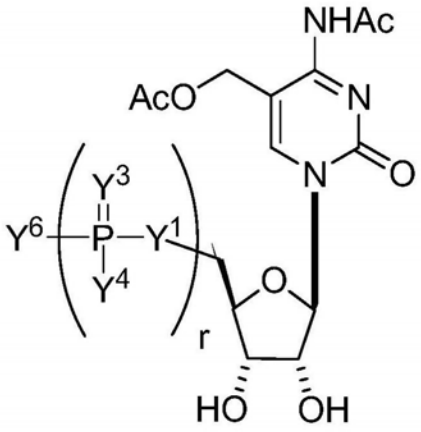


131)、  (BB-132)、  (BB-133)、

[0568]

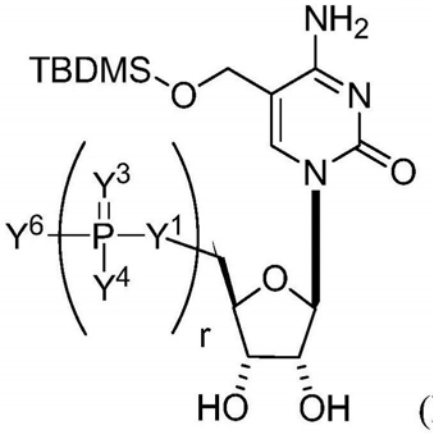


134)、  (BB-135)、  (BB-136)、(BB-137)

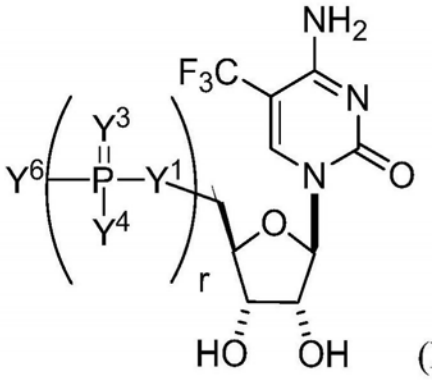


(BB- 138)、

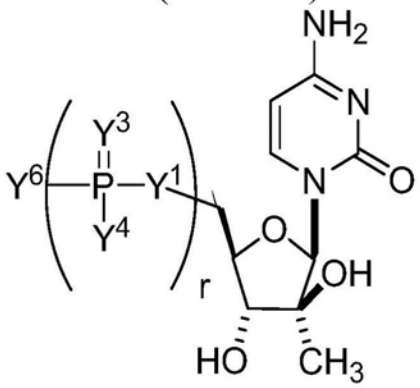
[0569]



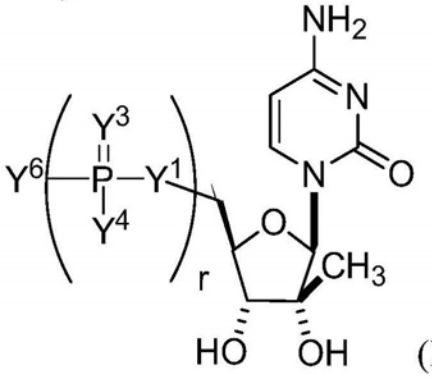
(BB- 139)、



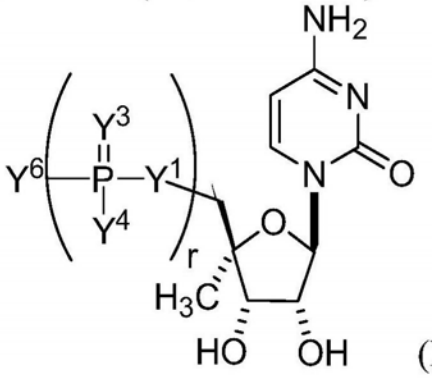
(BB- 140)、



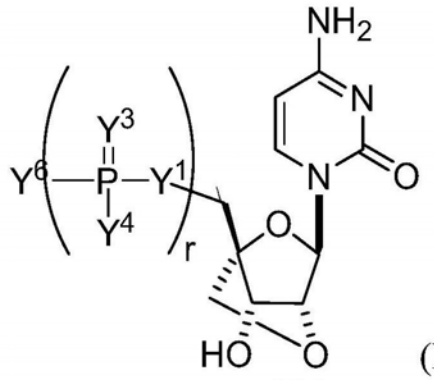
(BB- 141)、



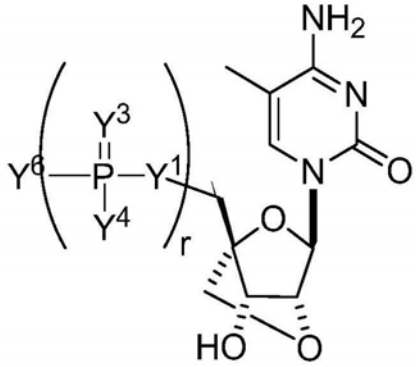
(BB- 142)、



(BB-



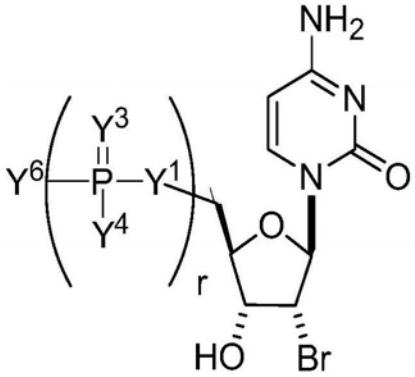
143)、



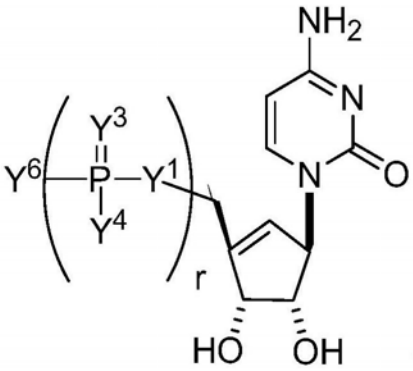
(BB- 144)

[0570]

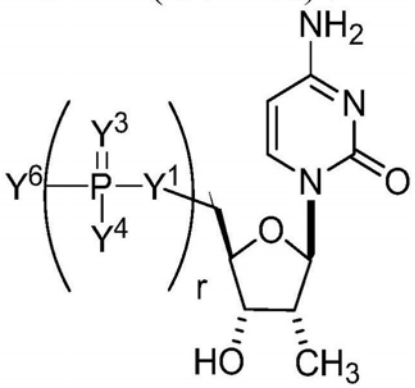
(BB- 145)、



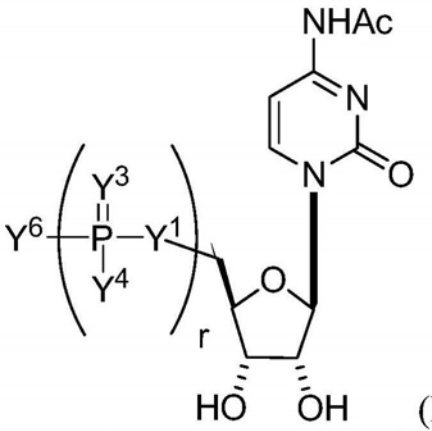
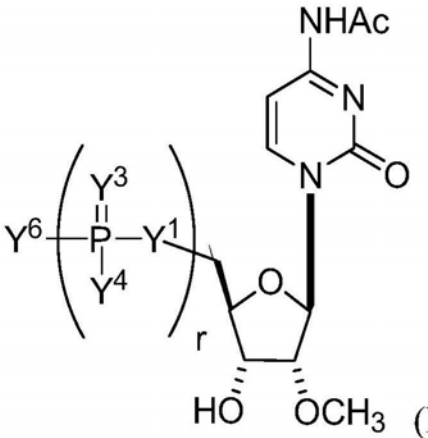
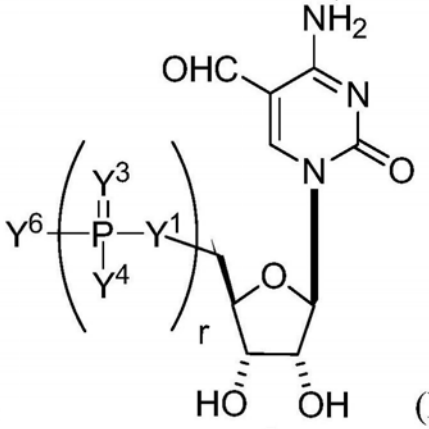
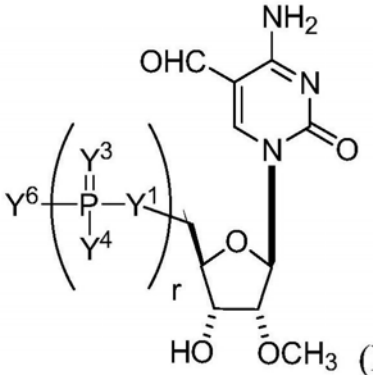
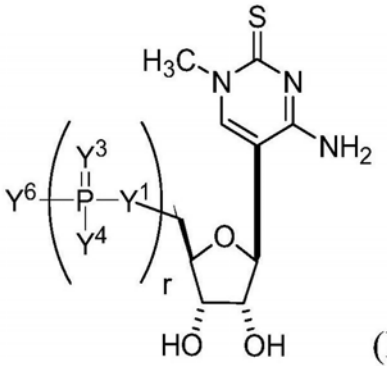
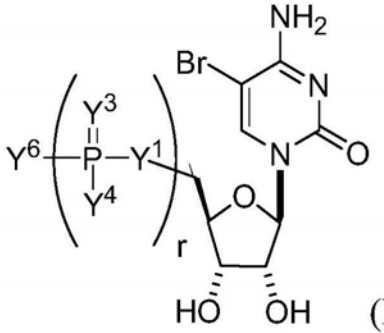
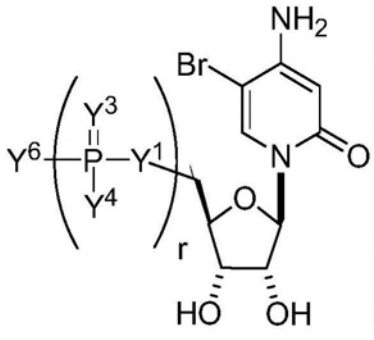
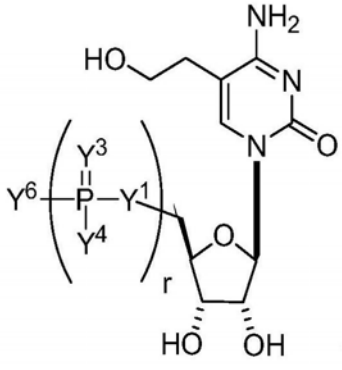
(BB- 146)、

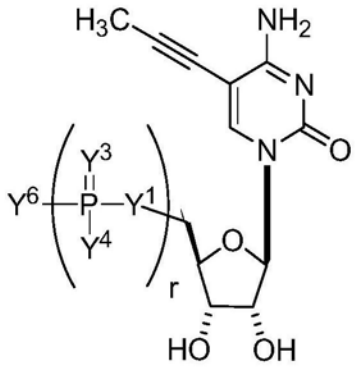


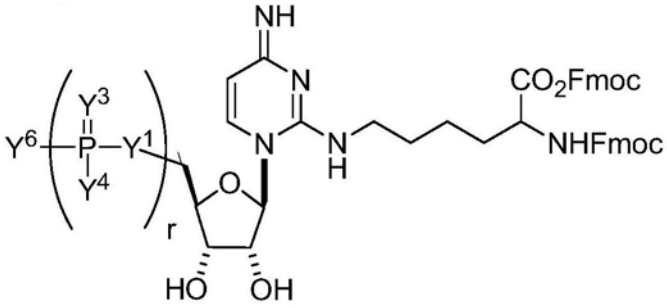
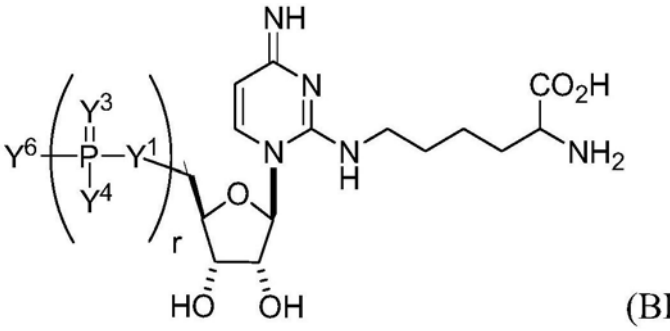
(BB-147)、

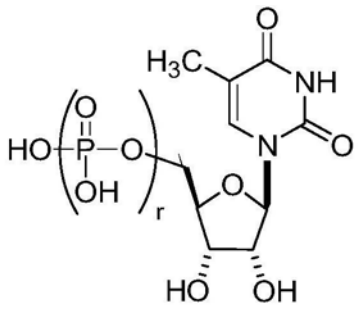
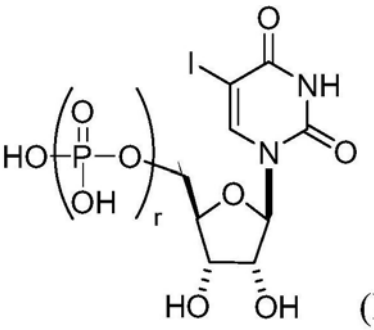


(BB- 148)、

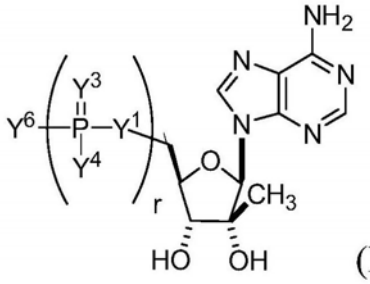
[0571]  (BB- 149)、  (BB-150)、  (BB- 151)、  (BB-152)、  (BB- 153)、  (BB-154)、  (BB- 155)、  (BB-

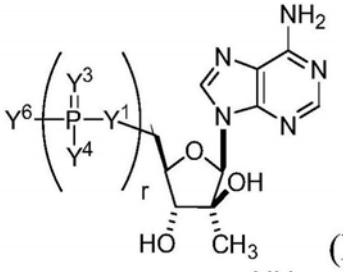


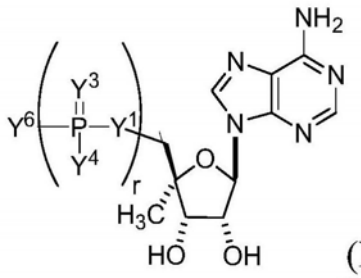
156)、  (BB-157)、  以及(BB-158)或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中Y^1、Y^3、Y^4、Y^6以及r如本文所描述(例如,每个r独立地为0至5,如0至3、1至3或1至5的整数))。例如,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子可以是:

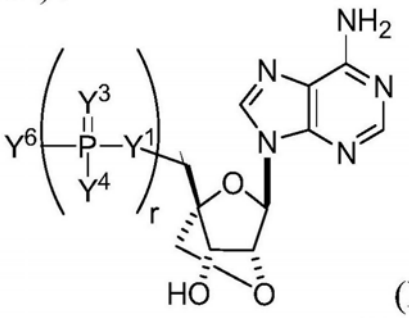
[0572]  (BB-160)或  或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地为0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。(BB-161),

[0573] 在一些实施方案中,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子是修饰腺苷(例如,选自由以下组成的组:

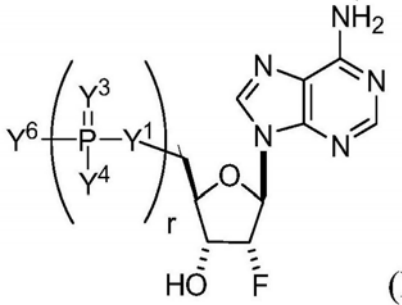

(BB-162)、

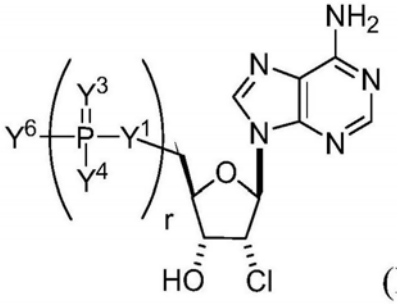

(BB-163)、

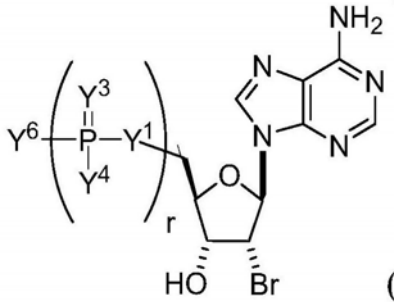

(BB-164)、

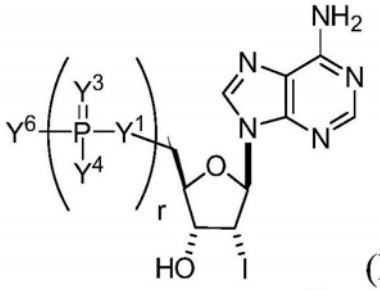

(BB-165)、

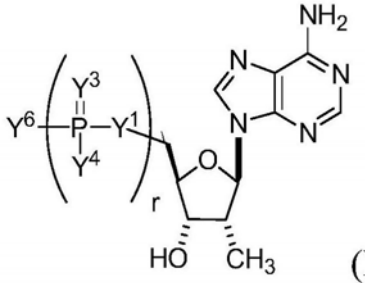
[0574]

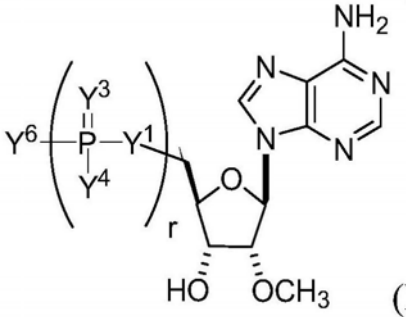

(BB-166)、

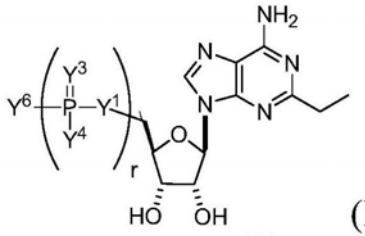

(BB-167)、


(BB-168)、

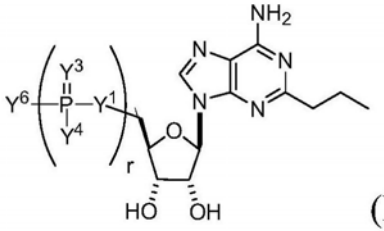

(BB-169)、


(BB-170)、

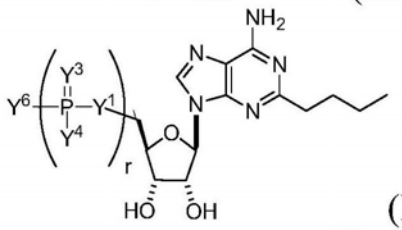

(BB-171)、



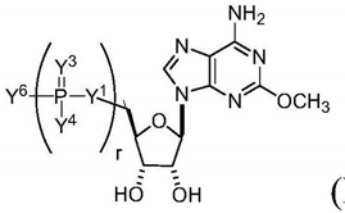
(BB- 172)、



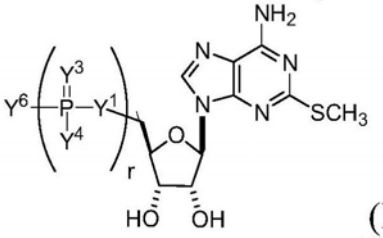
(BB- 173)、



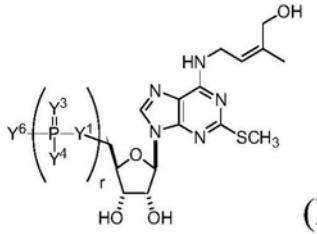
(BB- 174)、



(BB- 175)、

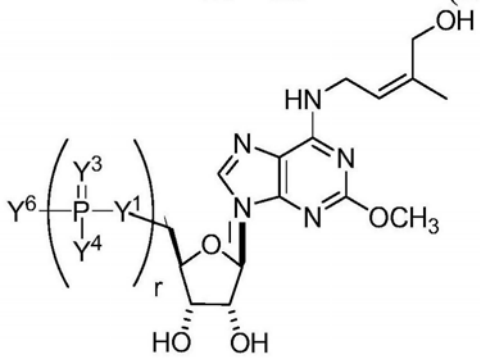


(BB- 176)、

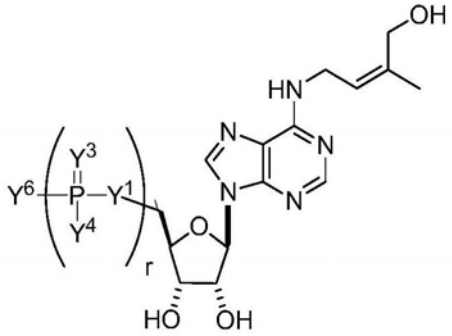


(BB- 177)、

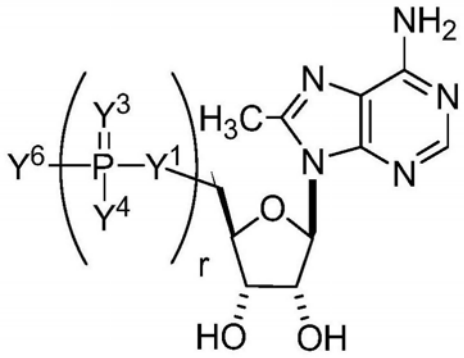
[0575]



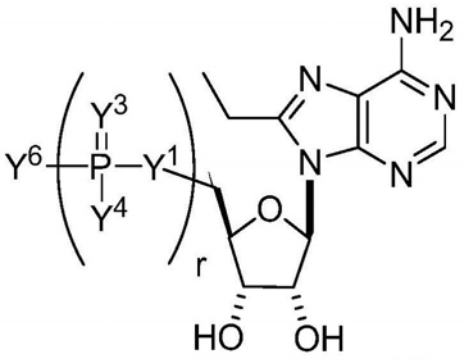
(BB- 178)、



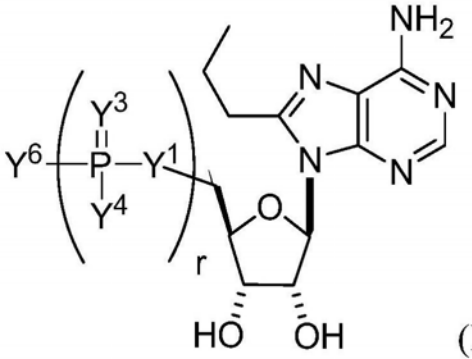
(BB- 179)、



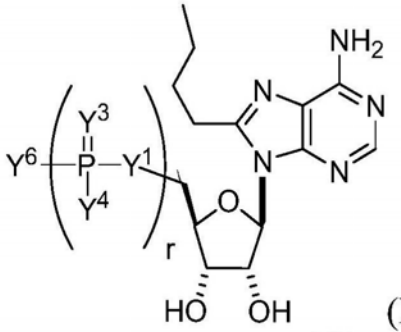
(BB- 180)、



(BB- 181)、

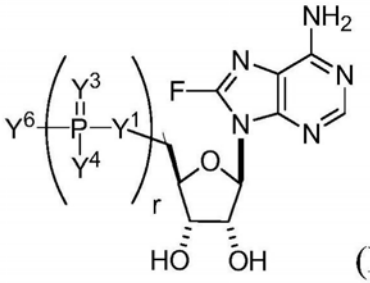


(BB- 182)、



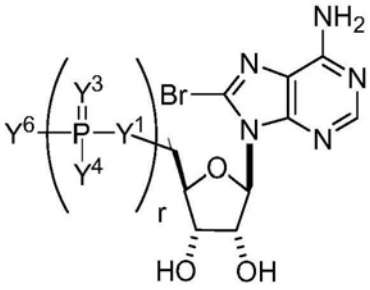
(BB-

[0576]

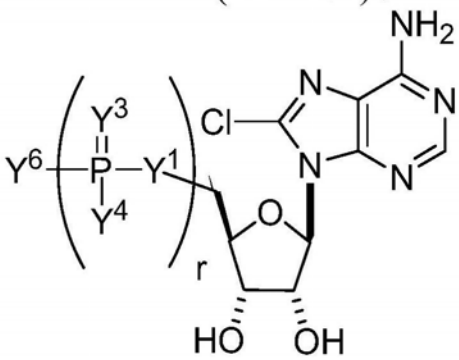


183)、

(BB- 184)、

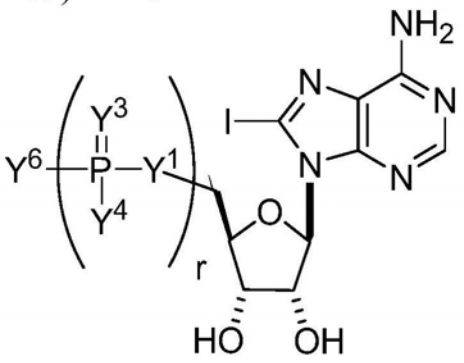


(BB-

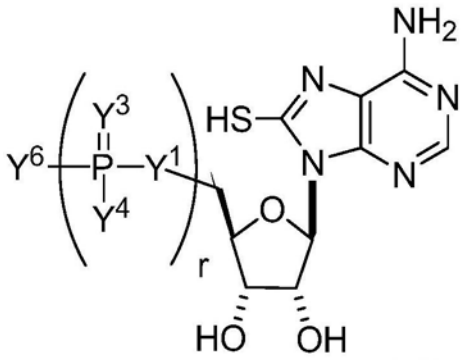


185)、

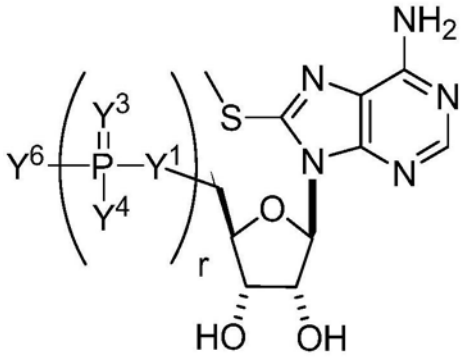
(BB- 186)、



(BB- 187)、

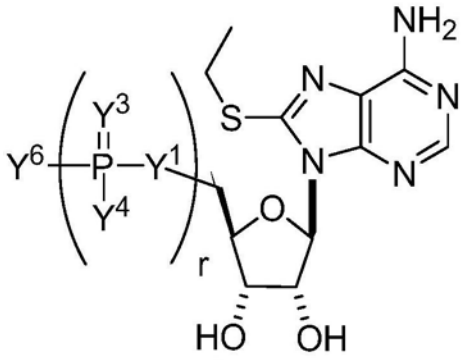


(BB- 188) 、

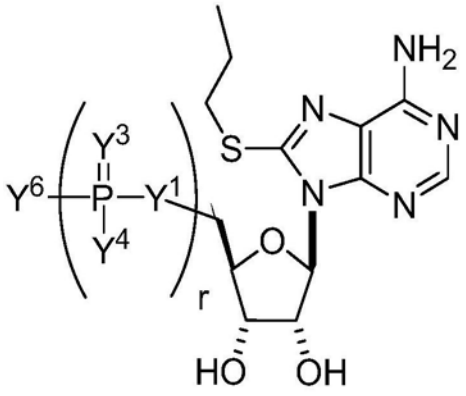


(BB- 189) 、

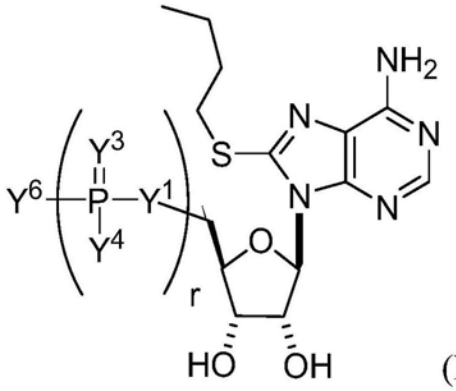
[0577]



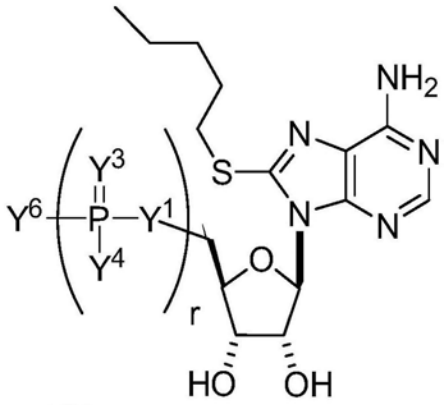
(BB- 190) 、

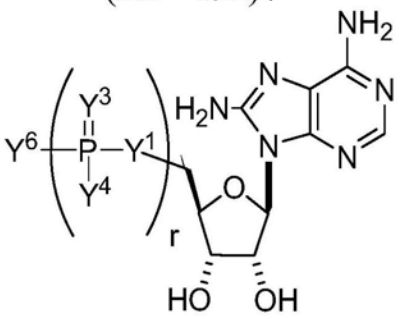


(BB- 191) 、



(BB- 192)、

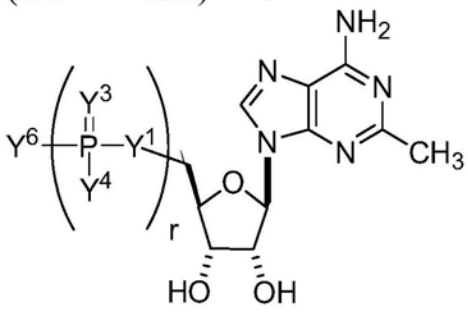




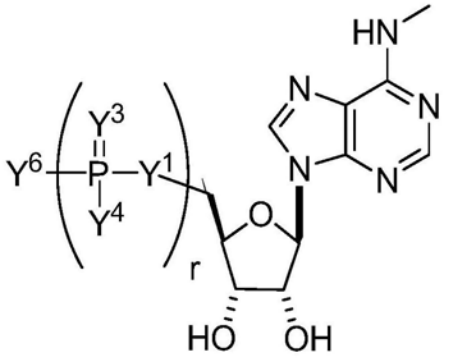
(BB- 193) 、

(BB- 194) 、

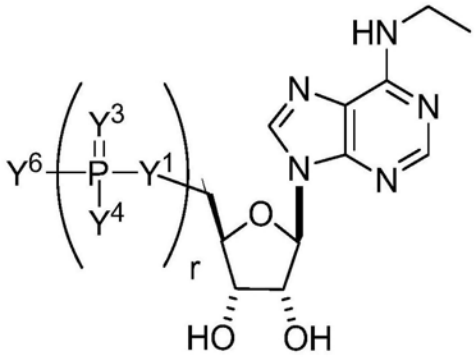
[0578]



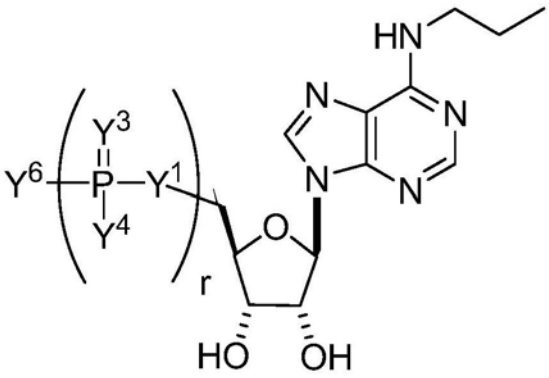
(BB- 195) 、



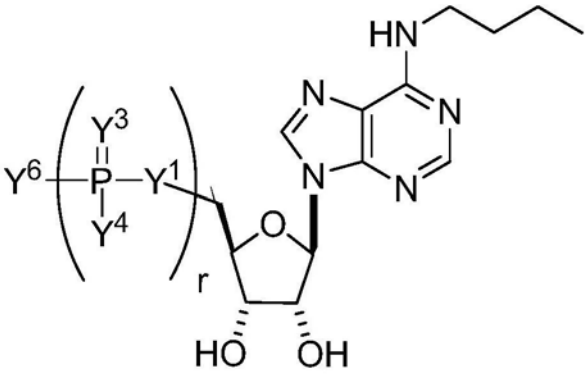
(BB- 196) 、



(BB- 197) 、

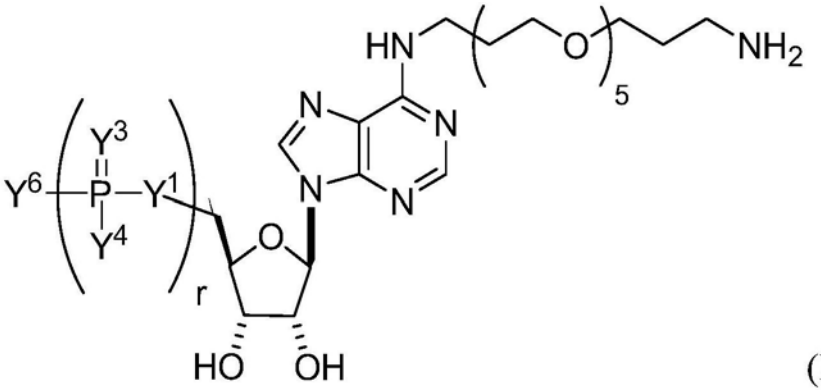


(BB- 198) 、



以及

(BB- 199)

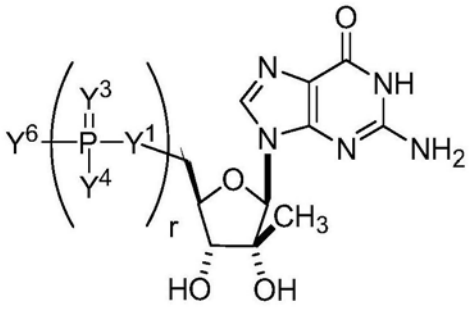


或其药学上可接受的

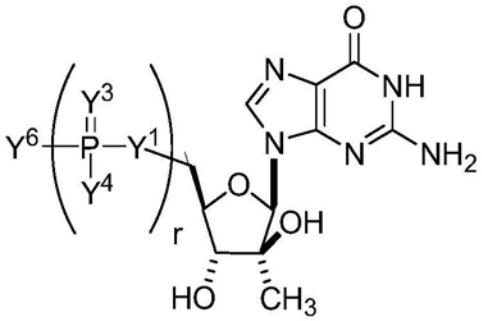
(BB-200)

盐或立体异构体，其中Y^1、Y^3、Y^4、Y^6以及r如本文所描述(例如，每个r独立地为0至5，如0至3、1至3或1至5的整数))。

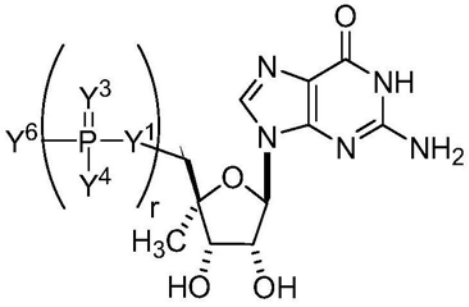
[0579] 在一些实施方案中，可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子是修饰鸟苷(例如，选自由以下组成的组：

[0580] 

(BB- 201) 、

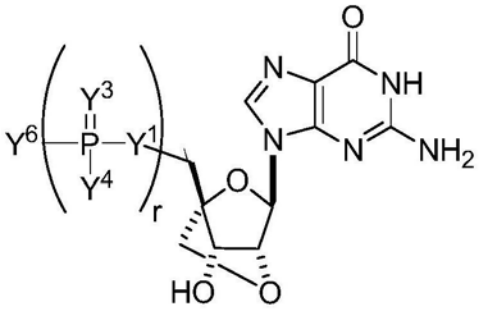


(BB- 202)、

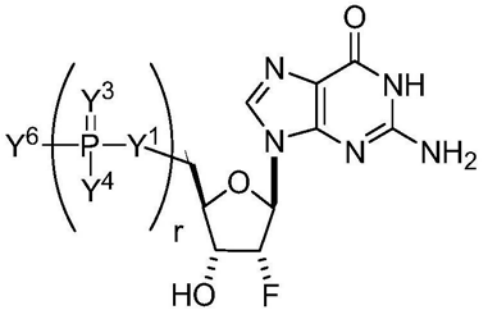


(BB- 203)、

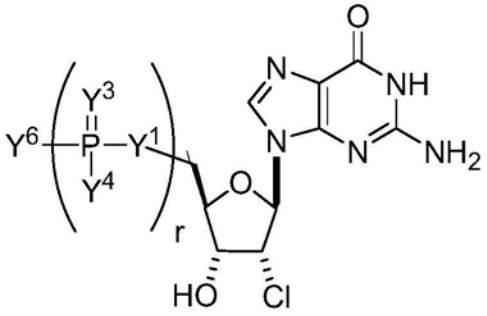
[0581]



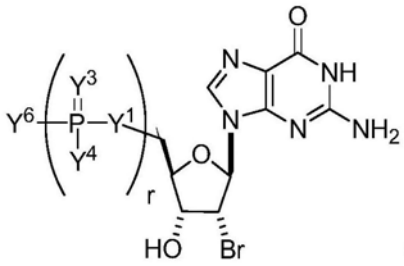
(BB- 204)、



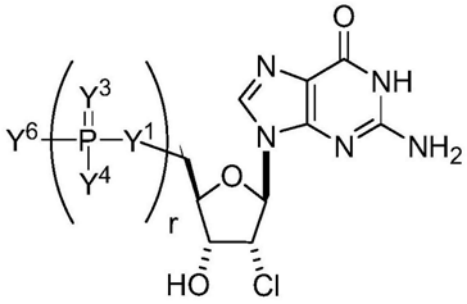
(BB- 205)、



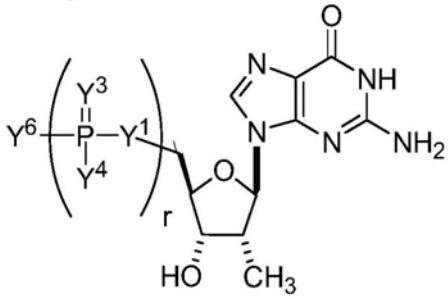
(BB- 206)、



(BB- 207)、

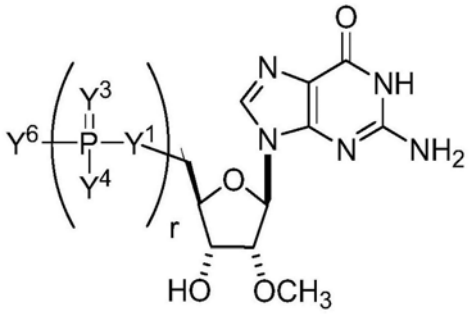


(BB- 208)、

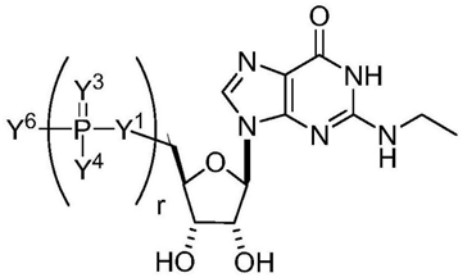


(BB- 209)、

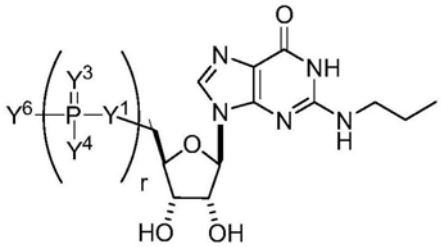
[0582]



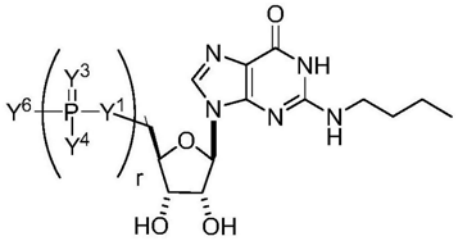
(BB- 210)、



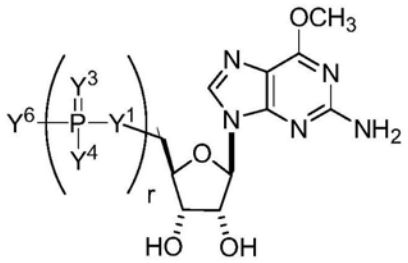
(BB- 211)、



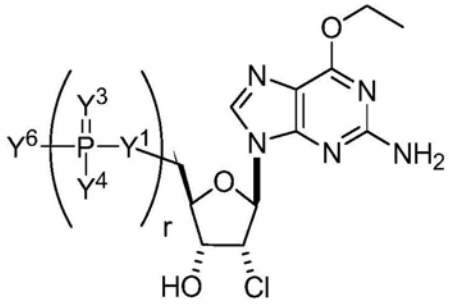
(BB- 212)、



(BB- 213)、

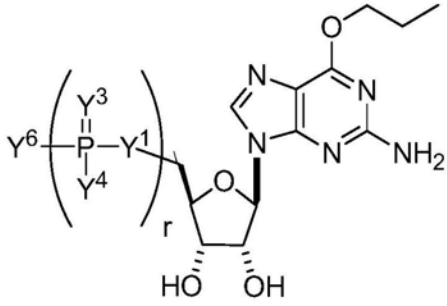


(BB- 214) 、

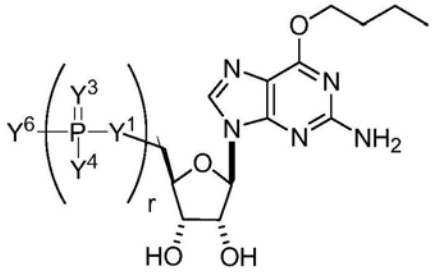


(BB- 215) 、

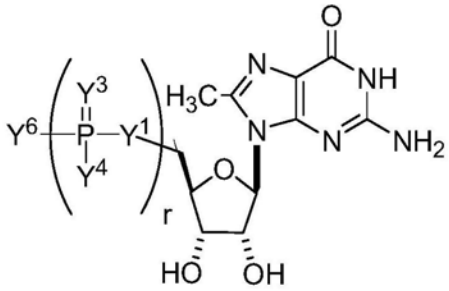
[0583]



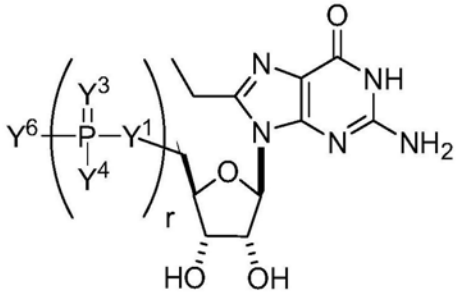
(BB- 216) 、



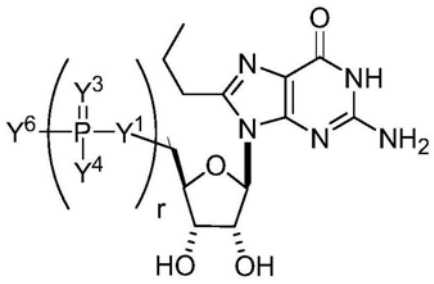
(BB- 217) 、



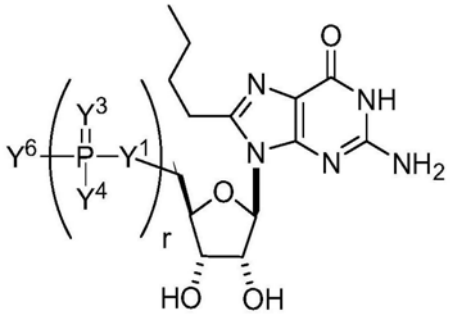
(BB- 218) 、



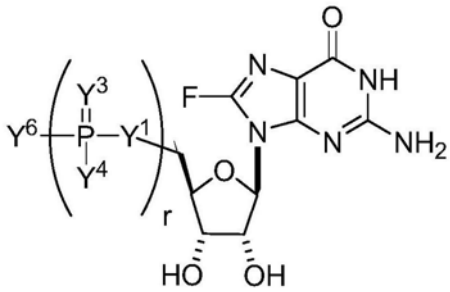
(BB- 219) 、



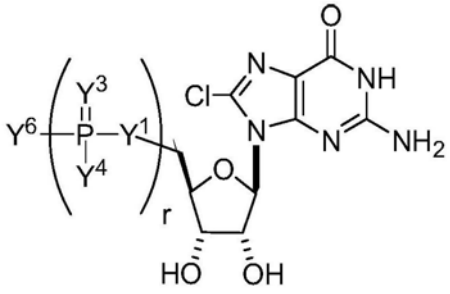
(BB- 220) 、



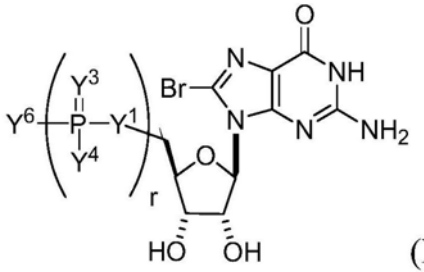
(BB- 221) 、



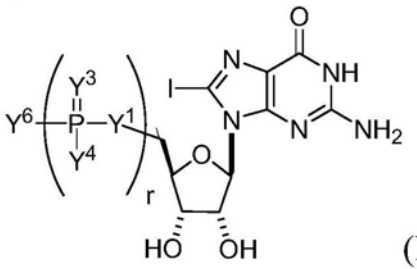
[0584] (BB- 222) 、



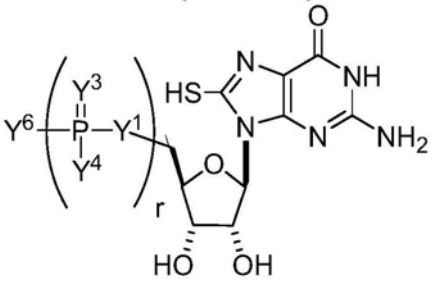
(BB- 223) 、



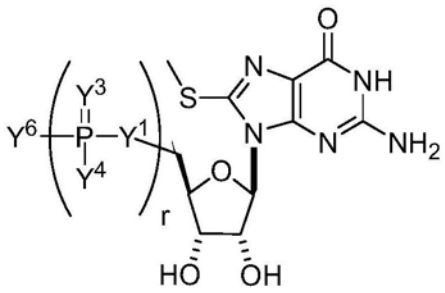
(BB- 224)、



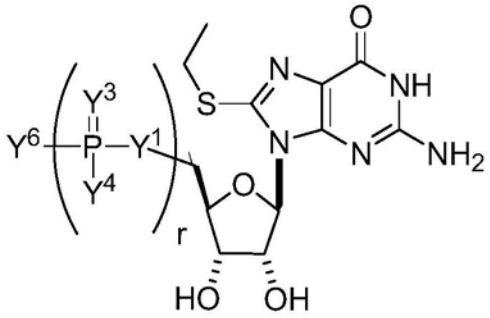
(BB- 225) 、



(BB- 226) 、

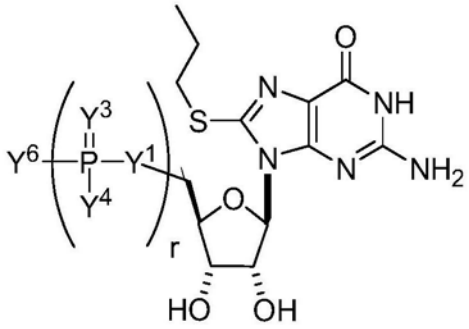


(BB- 227) 、

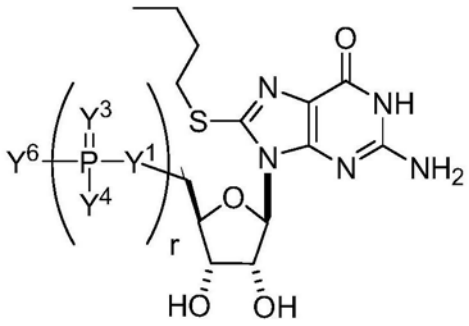


(BB- 228) 、

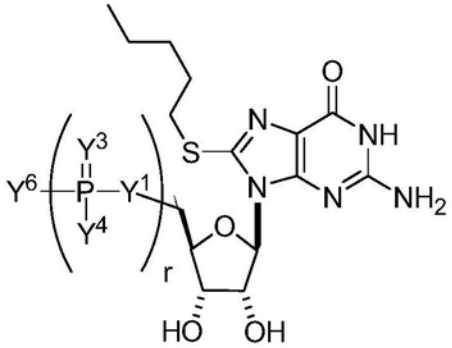
[0585]



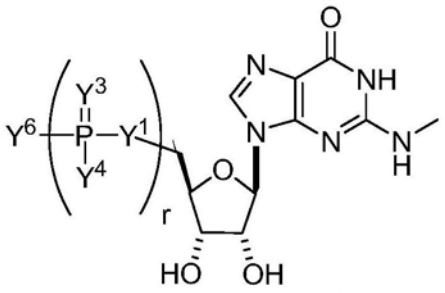
(BB- 229) 、



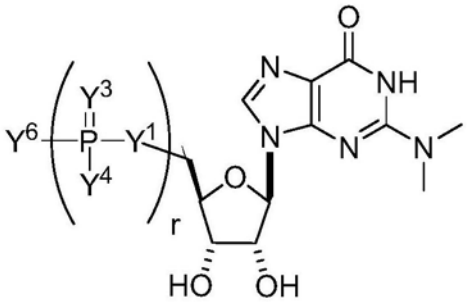
(BB- 230) 、



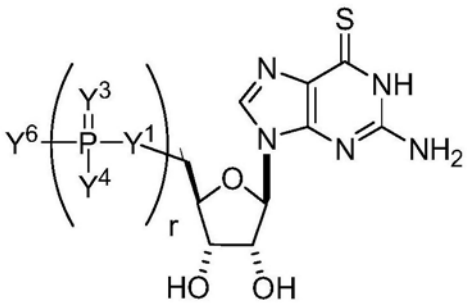
(BB- 231) 、



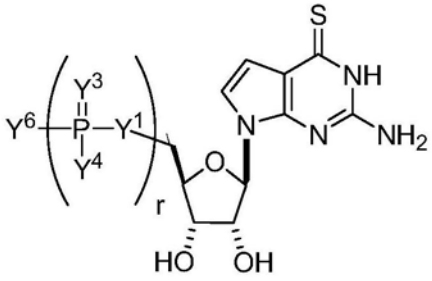
(BB- 232) 、



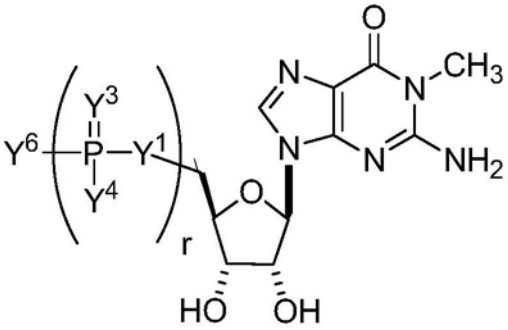
(BB- 233) 、



(BB- 234) 、

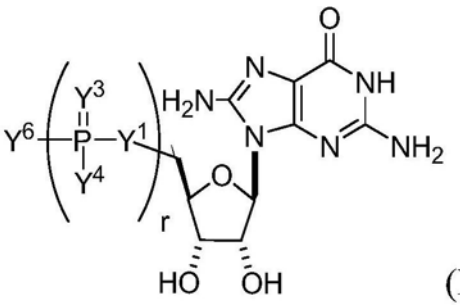


(BB- 235) 、



以及

(BB- 236)

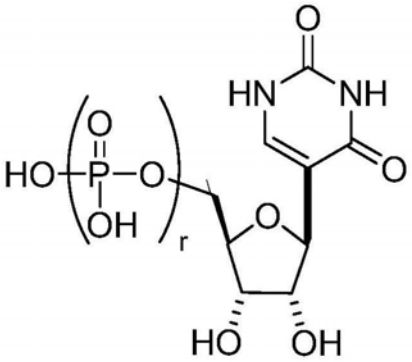


或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中Y^1、

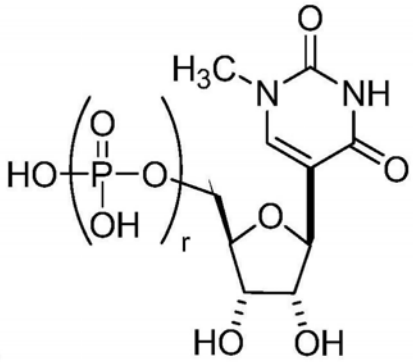
(BB-237),

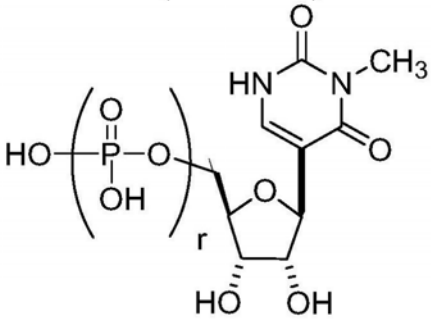
Y^3、Y^4、Y^6以及r如本文所描述(例如,每个r独立地为0至5,如0至3、1至3或1至5的整数))。

[0586] 在一些实施方案中,化学修饰可包括用N置换环的C-5处的C基团(例如,对于嘧啶核苷,如胞嘧啶或尿嘧啶来说)(例如,用>NR^{N1}基团置换C-5处的>CH基团,其中$R^{N}1$为H或任选取代的烷基)。例如,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子可以是:

[0587] 

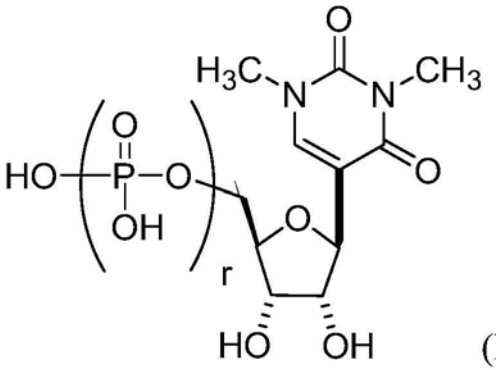
(BB- 238)或





(BB- 239) 或

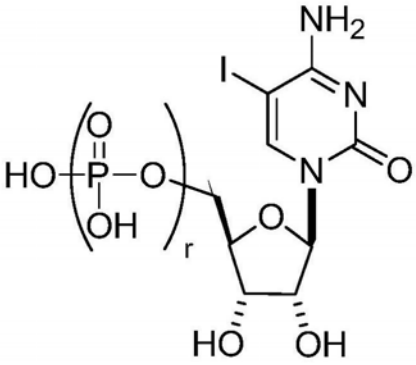
(BB- 240) 或



(BB-241),

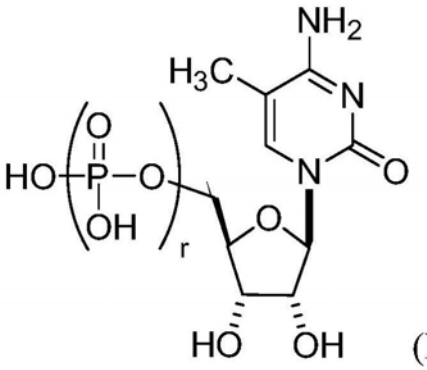
或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地为0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。

[0588] 在另一个实施方案中,化学修饰可包括用卤代(例如,Br、Cl、F或I)或任选取代的烷基(例如,甲基)置换胞嘧啶的C-5处的氢。例如,可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子可以是:

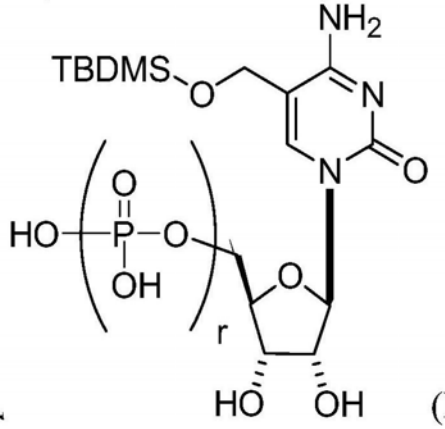


(BB- 242) 或

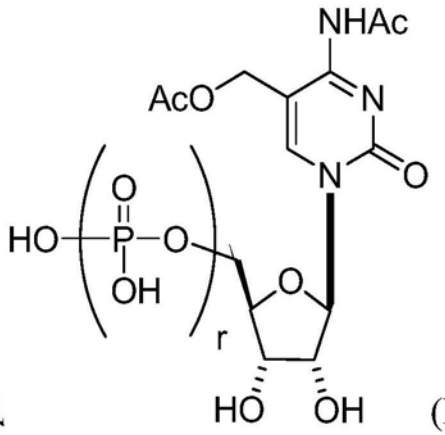
[0589]



(BB- 243)或



(BB-



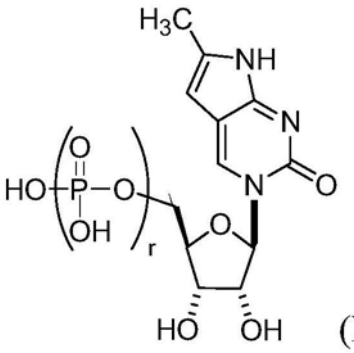
244)或 (BB-245),

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中每个r独立地为0至5(例如，0至3、1至3或1至5)的整数。

[0590] 在又另一个实施方案中，化学修饰可包括由C-4位置处的NH_2和C-5位置处的碳原子形成的稠环。例如，可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的结构单元分子可以是：

[0591]



(BB-246),

或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中

每个r独立地为0至5(例如，0至3、1至3或1至5)的整数。

[0592] 糖上的修饰

[0593] 可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如,RNA或mRNA,如本文所描述)中的修饰核苷和核苷酸(例如,结构单元分子)可以在核糖核酸的糖上被修饰。例如,2′羟基(OH)可以被多个不同的取代基修饰或置换。2′-位置处的示例性取代基包括但不限于H、卤代基、任选取代的C_{1-6}烷基;任选取代的C_{1-6}烷氧基;任选取代的C_{6-10}芳氧基;任选取代的C_{3-8}环烷基;任选取代的C_{3-8}环烷氧基;任选取代的C_{6-10}芳氧基;任选取代的C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷氧基,任选取代的C_{1-12}(杂环基)氧基;糖(例如,核糖、戊糖或本文所描述的任何糖);聚乙二醇(PEG),-O$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$,其中R为H或任选取代的烷基,并且n为0至20(例如,0至4、0至8、0至10、0至16、1至4、1至8、1至10、1至16、1至20、2至4、2至8、2至10、2至16、2至20、4至8、4至10、4至16、以及4至20)的整数;“锁”核酸(LNA),其中2′-羟基通过C_{1-6}亚烷基或C_{1-6}杂亚烷基桥连接至同一核糖的4’-碳,其中示例性桥包括亚甲基、亚丙基、醚或氨基桥;如本文所定义的氨基烷基;如本文所定义的氨基烷氧基;如本文所定义的氨基;以及如本文所定义的氨基酸。

[0594] 一般来说,RNA包括糖基核糖,所述糖基核糖是具有氧的5元环。示例性、非限制性的修饰核苷酸包括核糖中的氧的置换(例如,用S、Se或亚烷基如亚甲基或亚乙基置换);添加双键(例如,以便用环戊烯基或环己烯基置换核糖);核糖的环缩反应(例如,以便形成环丁烷或环氧丙烷的4元环);核糖的扩环反应(例如,以便形成具有额外碳或杂原子的也具有氨基磷酸酯主链的6元或7元环,如对于失水己糖醇、阿卓糖醇、甘露醇、环己烷基、环己烯基以及吗啉代来说);多环形式(例如,三环;以及“非锁定”形式,如乙二醇核酸(GNA)(例如,R-GNA或S-GNA,其中核糖被连接至磷酸二酯键的乙二醇单元置换)、苏糖核酸(TNA,其中核糖被α-L-苏型呋喃糖基-(3′→2′)置换),和肽核酸(PNA,其中2-氨基-乙基-甘氨酸键联置换核糖和磷酸二酯主链)。糖基还可包含具有与核糖中对应碳的立体化学构型相反的立体化学构型的一个或多个碳。因此,多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子可包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。

[0595] 核碱基上的修饰

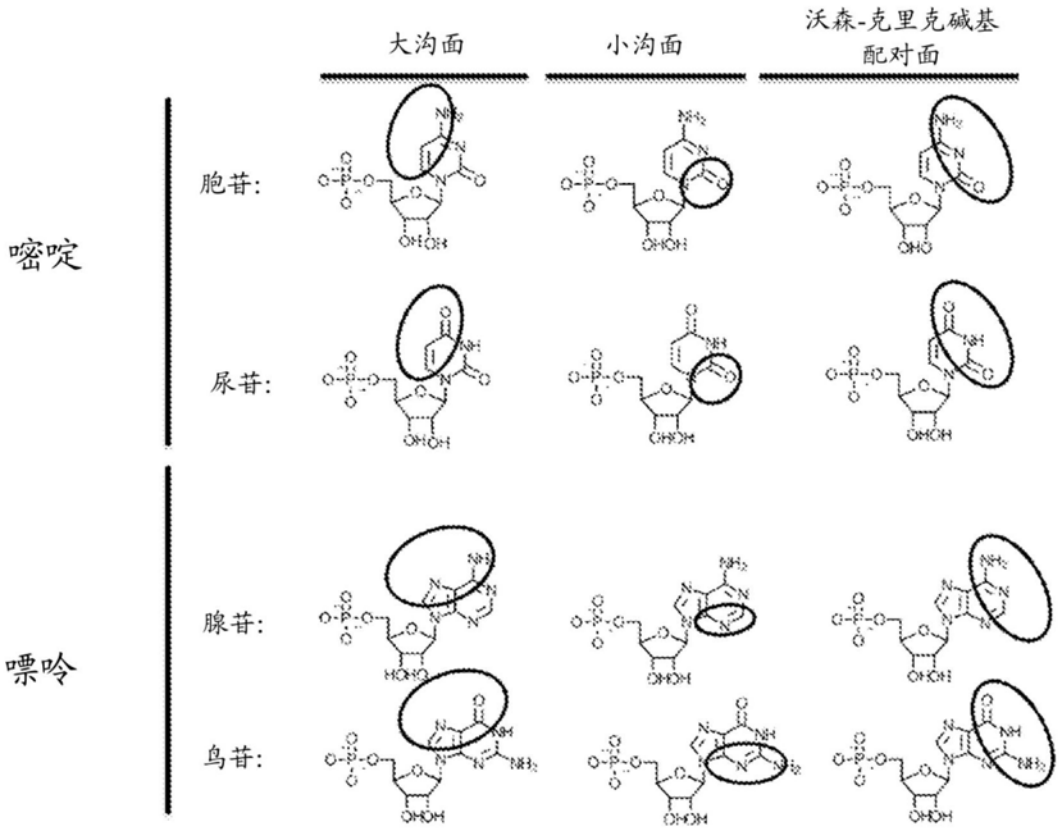
[0596] 本公开提供修饰核苷和核苷酸。如本文所描述,“核苷”被定义为含有糖分子(例如,戊糖或核糖)或其衍生物与有机碱基(例如,嘌呤或嘧啶)或其衍生物(本文还被称为“核碱基”)的组合的化合物。如本文所描述,“核苷酸”被定义为包含磷酸酯基的核苷。修饰核苷酸可通过如本文所描述的任何有用的方法(例如,化学方法、酶方法或重组方法以便包括一个或多个修饰的或非天然的核苷)来合成。

[0597] 修饰核苷酸碱基配对不仅涵盖标准腺苷-胸腺嘧啶、腺苷-尿嘧啶或鸟苷-胞嘧啶碱基对,而且涵盖在核苷酸和/或包含非标准或修饰碱基的修饰核苷酸之间形成的碱基对,其中氢键供体和氢键受体的排列允许非标准碱基与标准碱基之间或两个互补的非标准碱基结构之间的氢键合。这种非标准碱基配对的一个实例是修饰核苷酸肌苷与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。

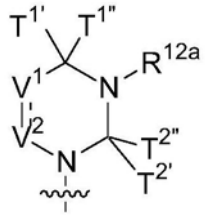
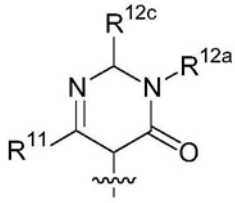
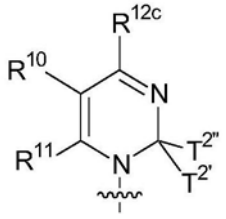
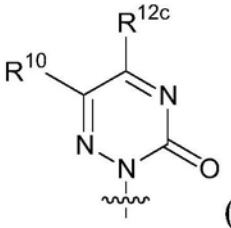
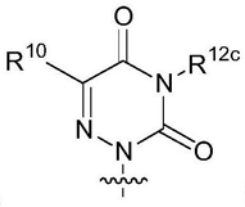
[0598] 修饰核苷和核苷酸可包含修饰核碱基。RNA中发现的核碱基的实例包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶。DNA中发现的核碱基的实例包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。这些核碱基可以是修饰的或完全置换的以便提供具有增强的特性(例如,通过破坏大沟结合配偶体的结合而对核酸酶的抗性增强)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子。以下表8鉴别每种规范核苷酸的化学面。圆圈鉴别包含相应化学区的原子。

[0599] 表8

[0600]



[0601] 在一些实施方案中,B是修饰尿嘧啶。示例性的修饰尿嘧啶包括具有式(b1)至(b5)的那些:

[0602]  (b1)、  (b2)、  (b3)、   (b4)或 (b5),或其药学上可接受的盐或立体异构体,

[0603] 其中

[0604] ≈是单键或双键;

[0605] $T^{1'}$、$T^{1''}$、$T^{2'}$以及$T^{2''}$各自独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基,或$T^{1'}$与$T^{1''}$的组合或$T^{2'}$与$T^{2''}$的组合连接在一起(例如,如T^{2}中)以形成O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基);

[0606] V^1和V^2各自独立地为O、S、N$(R^{Vb})_{nv}$或C$(R^{Vb})_{nv}$,其中nv为0至2的整数并且每个R^{Vb}独立地为H、卤代基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基(例如,被

N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如三氟乙酰基)取代)、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的酰基氨基烷基(例如,被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如三氟乙酰基)取代)、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基或任选取代的炔氧基(例如,任选地被本文所描述的任何取代基(如对于烷基来说选自(1)至(21)的那些)取代);

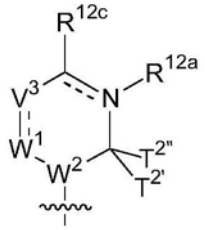
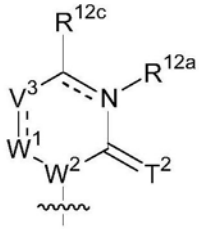
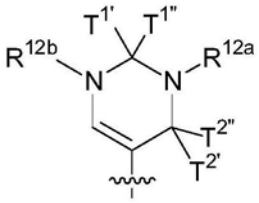
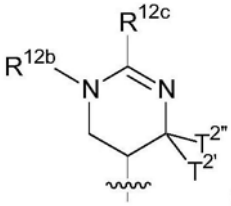
[0607] R^{10}为H、卤代基、任选取代的氨基酸、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基;

[0608] R^{11}为H或任选取代的烷基;

[0609] R^{12a}为H、任选取代的烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、或任选取代的氨基炔基、任选取代的羧基烷基(例如,任选被羟基取代)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基;并且

[0610] R^{12c}为H、卤代基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的氨基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基。

[0611] 其它示例性的修饰尿嘧啶包括具有式(b6)至(b9)的那些:

[0612] 
(b6)、 
(b7)、 
(b8)或 
(b9),

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

[0613] 其中

[0614] ⎓是单键或双键;

[0615] $T^{1'}$、$T^{1''}$、$T^{2'}$以及$T^{2''}$各自独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基,或$T^{1'}$与$T^{1''}$的组合连接在一起(例如,如T^1中)或$T^{2'}$与$T^{2''}$的组合连接在一起(例如,如T^2中)以形成O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基),或每个T^1和T^2独立地为O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基);

[0616] W^1和W^2各自独立地为$N(R^{Wa})_{nw}$或$C(R^{Wa})_{nw}$,其中nw为0至2的整数并且每个R^{Wa}独立地为H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基;

[0617] 每个V^3独立地为O、S、$N(R^{Va})_{nv}$或$C(R^{Va})_{nv}$,其中nv为0至2的整数并且每个R^{Va}独立地

为H、卤代基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基或任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷基(例如,被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如三氟乙酰基或磺基烷基)取代)、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的酰基氨基烷基(例如,被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如三氟乙酰基)取代)、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷基(例如,任选被羟基和/或O-保护基团取代)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基(例如,任选被本文所描述的任何取代基(如对于烷基来说选自(1)至(21)的那些)取代),并且其中R^{Va}和R^{12c}与它们所连接的碳原子一起可形成任选取代的环烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂环基(例如,5元或6元环);

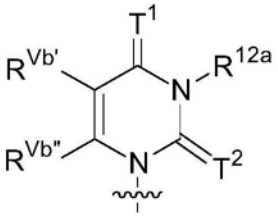
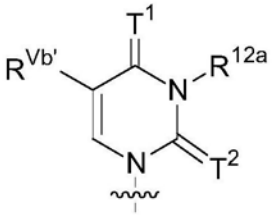
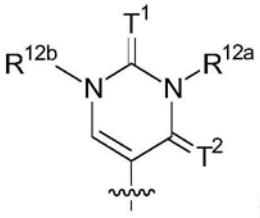
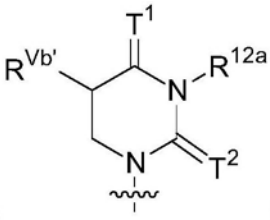
[0618] R^{12a}为H、任选取代的烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的羧基烷基(例如,任选被羟基和/或O-保护基团取代)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基、任选取代的氨甲酰基烷基或不存在;

[0619] R^{12b}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷基(例如,任选被羟基和/或O-保护基团取代)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基,

[0620] 其中R^{12b}与$T^{1'}$的组合或R^{12b}与R^{12c}的组合可连接在一起以形成任选取代的杂环基;并且

[0621] R^{12c}为H、卤代基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的氨基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基。

[0622] 其它示例性的修饰尿嘧啶包括具有式(b28)至(b31)的那些:

[0623] 
(b28)、

(b29)、

(b30)或

(b31),或其药学上可接受的盐或立体异构体,

[0624] 其中

[0625] T^1和T^2各自独立地为O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基)；

[0626] 每个$R^{Vb'}$和$R^{Vb''}$独立地为H、卤代基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷基(例如，被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如，三氟乙酰基或磺基烷基)取代)、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的酰基氨基烷基(例如，被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如，三氟乙酰基)取代)、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷基(例如，任选被羟基和/或O-保护基团取代)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基(例如，任选被本文所描述的任何取代基(如对于烷基来说选自(1)至(21)的那些)取代)(例如，$R^{Vb'}$为任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的氨基烷基，例如，被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如，三氟乙酰基或磺基烷基)取代)；

[0627] R^{12a}为H、任选取代的烷基、任选取代的羧基氨基烷基、任选取代的氨基烷基(例如，被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如，三氟乙酰基或磺基烷基)取代)、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；并且

[0628] R^{12b}为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基(例如，被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如三氟乙酰基或磺基烷基)取代)，

[0629] 任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基。

[0630] 在具体实施方案中，T^1为O(氧代基)，并且T^2为S(硫代基)或Se(硒代基)。在其它实施方案中，T^1为S(硫代基)，并且T^2为O(氧代基)或Se(硒代基)。在一些实施方案中，$R^{Vb'}$为H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基。

[0631] 在其它实施方案中，每个R^{12a}和R^{12b}独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的羟基烷基。在具体实施方案中，R^{12a}为H。在其它实施方案中，R^{12a}和R^{12b}两者均为H。

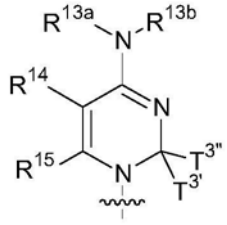
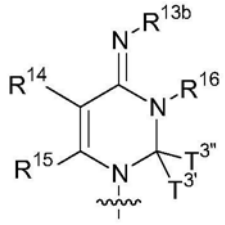
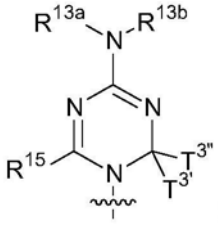
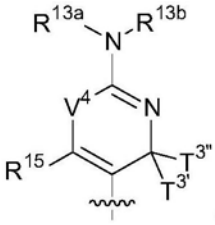
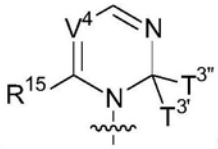
[0632] 在一些实施方案中，R^{12b}的每个$R^{Vb'}$独立地为任选取代的氨基烷基(例如，被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如，三氟乙酰基或磺基烷基)取代)、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或任选取代的酰基氨基烷基(例如，被N-保护基团如本文所描述的任何N-保护基团(例如，三氟乙酰基)取代)。在一些实施方案中，任选取代的氨基烷基的氨基和/或烷基被以下中的一个或多个取代：任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的磺基烷基、任选取代的羧基(例如，被O-保护基团取代)、任选取代的羟基(例如，被O-保护基团取代)、任选取代的羧基烷基(例如，被O-保护基团取代)、任选取代的烷氧基羰基烷基(例如，被O-保护基团取代)或N-保护基团。在一些实施方案中，任选取代的氨基烷基被任选取代的磺基烷基或任选取代的烯基取代。在具体实施方案中，R^{12a}和$R^{Vb''}$两者均为H。在具

体实施方案中，T^1为O(氧代基)，并且T^2为S(硫代基)或Se(硒代基)。

[0633] 在一些实施方案中，$R^{Vb'}$为任选取代的烷氧基羰基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基。

[0634] 在具体实施方案中，R^{12a}、R^{12b}、R^{12c}或R^{Va}的任选取代基为聚乙二醇基团(例如，$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且R'为H或C_{1-20}烷基)；或氨基-聚乙二醇基团(例如，$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且每个R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基)。

[0635] 在一些实施方案中，B是修饰胞嘧啶。示例性的修饰胞嘧啶包括式(b10)至(b14)的化合物：

[0636] 
(b10)、

(b11)、

(b12)、

(b13)或

(b14)，

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0637] 其中

[0638] $T^{3'}$和$T^{3''}$各自独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基，或$T^{3'}$与$T^{3''}$的组合连接在一起(例如，如T^3中)以形成O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基)；

[0639] 每个V^4独立地为O、S、$N(R^{Vc})_{nv}$或$C(R^{Vc})_{nv}$，其中nv为0至2的整数并且每个R^{Vc}独立地为H、卤代基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基或任选取代的炔氧基(例如，任选被本文所描述的任何取代基(如对于烷基来说选自(1)至(21)的那些)取代)，其中R^{13b}与R^{Vc}的组合可合起来以形成任选取代的杂环基；

[0640] 每个V^5独立地为$N(R^{Vd})_{nv}$或$C(R^{Vd})_{nv}$，其中nv为0至2的整数并且每个R^{Vd}独立地为H、卤代基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基或任选取代的炔氧基(例如，任选被本文所描述的任何取代基(如对于烷基来说选自(1)至(21)的那些)取代)(例如，V^5为-CH或N)；

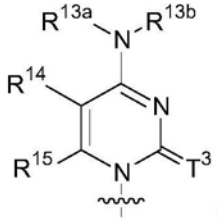
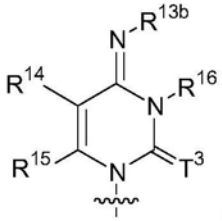
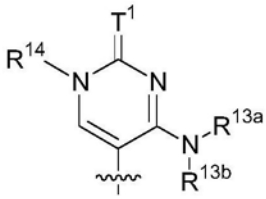
[0641] R^{13a}和R^{13b}各自独立地为H、任选取代的酰基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基，其中R^{13b}与R^{14}的组合可合起来以形成任选取代的杂环基；

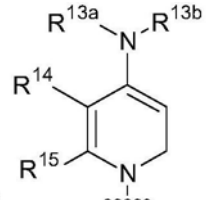
[0642] 每个R^{14}独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选

取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基(例如,被O-保护基团取代)、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的氨基(例如,-NHR,其中R为H、烷基、芳基或磷酰基)、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基烷基;并且

[0643] R^{15}和R^{16}各自独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基。

[0644] 其它示例性的修饰胞嘧啶包括具有式(b32)至(b35)的那些:

[0645]  (b32)、  (b33)、  (b34)

 或其药学上可接受的盐或立体异构体,

或 (b35),

[0646] 其中

[0647] T^1和T^3各自独立地为O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基);

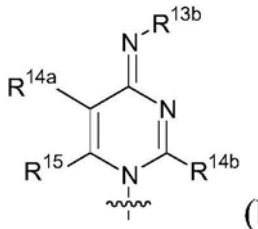
[0648] R^{13a}和R^{13b}各自独立地为H、任选取代的酰基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基,其中R^{13b}与R^{14}的组合可合起来以形成任选取代的杂环基;

[0649] 每个R^{14}独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基(例如,被O-保护基团取代)、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的氨基(例如,-NHR,其中R为H、烷基、芳基或磷酰基)、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基(例如,羟基烷基、烷基、烯基或炔基)、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基;并且

[0650] R^{15}和R^{16}各自独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基(例如,R^{15}为H,并且R^{16}为H或任选取代的烷基)。

[0651] 在一些实施方案中,R^{15}为H,并且R^{16}为H或任选取代的烷基。在具体实施方案中,R^{14}为H、酰基或羟基烷基。在一些实施方案中,R^{14}为卤代。在一些实施方案中,R^{14}和R^{15}两者均为H。在一些实施方案中,R^{15}和R^{16}两者均为H。在一些实施方案中,R^{14}和R^{15}以及R^{16}各自为H。在其它实施方案中,R^{13a}和R^{13b}各自独立地为H或任选取代的烷基。

[0652] 修饰胞嘧啶的其它非限制性实例包括式(b36)的化合物:

[0653]  (b36), 或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0654] 其中

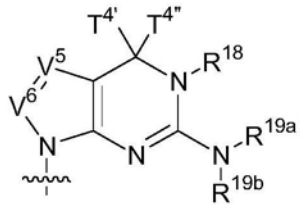
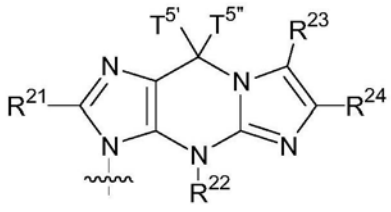
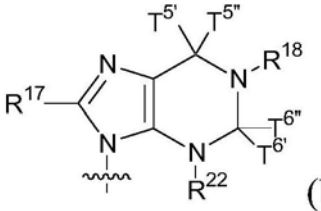
[0655] 每个R^{13b}独立地为H、任选取代的酰基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基，其中R^{13b}与R^{14b}的组合可合起来以形成任选取代的杂环基；

[0656] 每个R^{14a}和R^{14b}独立地为H、卤代基、羟基、硫醇、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基(例如，被O-保护基团取代)、任选取代的羟基烯基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的氨基(例如，-NHR，其中R为H、烷基、芳基、磷酰基、任选取代的氨基烷基或任选取代的羧基氨基烷基)、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；并且

[0657] R^{15}各自独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基。

[0658] 在具体实施方案中，R^{14b}为任选取代的氨基酸(例如，任选取代的赖氨酸)。在一些实施方案中，R^{14a}为H。

[0659] 在一些实施方案中，B是修饰鸟嘌呤。示例性的修饰鸟嘌呤包括式(b15)至(b17)的化合物：

[0660]  (b15)、  (b16)或  (b17)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0661] 其中

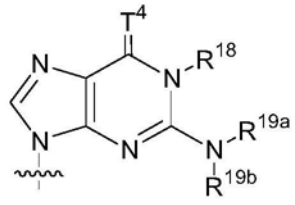
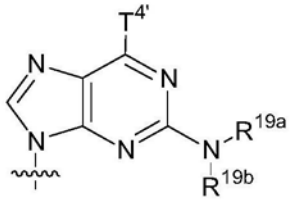
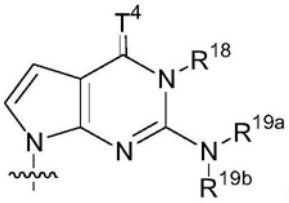
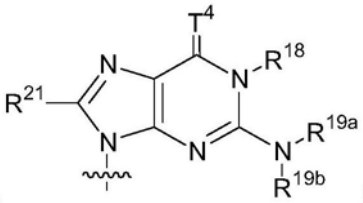
[0662] $T^{4'}$、$T^{4''}$、$T^{5'}$、$T^{5''}$、$T^{6'}$以及$T^{6''}$各自独立地为H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基，并且其中$T^{4'}$与$T^{4''}$的组合(例如，如T^4中)或$T^{5'}$与$T^{5''}$的组合(例如，如T^5中)或$T^{6'}$与$T^{6''}$的组合(例如，如T^6中)连接在一起以形成O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基)；

[0663] V^5和V^6各自独立地为O、S、N$(R^{Vd})_{nv}$或C$(R^{Vd})_{nv}$，其中nv为0至2的整数并且每个R^{Vd}独立地为H、卤代基、硫醇、任选取代的氨基酸、氰基、脒、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基或任选取代的炔氧基(例如，任选被本文所描述的任何取代基(如对于烷基来说选自(1)至(21)的那些)取代)、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨

基;并且

[0664] R^{17}、R^{18}、R^{19a}、R^{19b}、R^{21}、R^{22}、R^{23}以及R^{24}各自独立地为H、卤代基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的氨基或任选取代的氨基酸。

[0665] 示例性的修饰鸟苷包括式(b37)至(b40)的化合物:

[0666]  (b37)、  (b38)、  (b39)或  (b40),或其药学上可接受的盐或立体异构体,

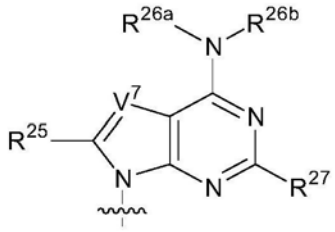
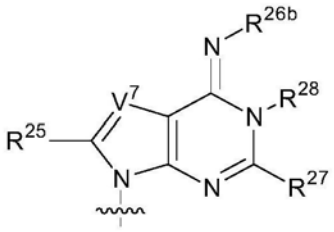
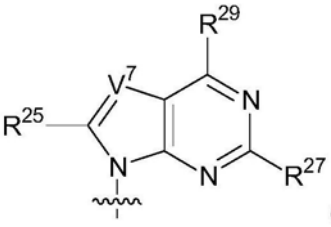
[0667] 其中

[0668] $T^{4'}$各自独立地为H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基,并且每个T^4独立地为O(氧代基)、S(硫代基)或Se(硒代基);

[0669] R^{18}、R^{19a}、R^{19b}以及R^{21}各自独立地为H、卤代基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的氨基或任选取代的氨基酸。

[0670] 在一些实施方案中,R^{18}为H或任选取代的烷基。在其它实施方案中,T^4为氧代。在一些实施方案中,R^{19a}和R^{19b}各自独立地为H或任选取代的烷基。

[0671] 在一些实施方案中,B是修饰腺嘌呤。示例性的修饰腺嘌呤包括式(b18)至(b20)的化合物:

[0672]  (b18)、  (b19)或  (b20),或其药学上可接受的盐或立体异构体,

[0673] 其中

[0674] 每个V^7独立地为O、S、$N(R^{Ve})_{nv}$或$C(R^{Ve})_{nv}$,其中nv为0至2的整数并且每个R^{Ve}独立地为H、卤代基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基或任选取代的炔氧基(例如,任选被本文所描述的任何取

代基(如对于烷基来说选自(1)至(21)的那些)取代)；

[0675] 每个R^{25}独立地为H、卤代基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基；

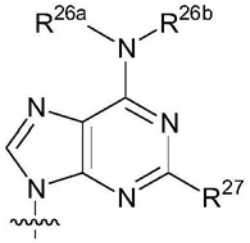
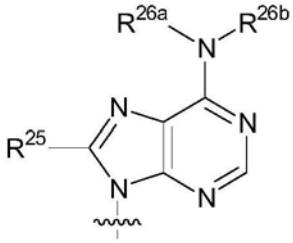
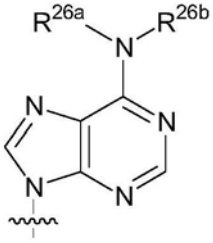
[0676] R^{26a}和R^{26b}各自独立地为H、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的氨甲酰基烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基或聚乙二醇基团(例如，$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且R'为H或C_{1-20}烷基)；或氨基-聚乙二醇基团(例如，$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且每个R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基)；

[0677] 每个R^{27}独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基；

[0678] 每个R^{28}独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基；并且

[0679] 每个R^{29}独立地为H、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的氨甲酰基烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的烷氧基或任选取代的氨基。

[0680] 示例性的修饰腺嘌呤包括式(b41)至(b43)的化合物：

[0681] 
(b41)、 
(b42)或 
(b43)，或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0682] 其中

[0683] 每个R^{25}独立地为H、卤代基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基；

[0684] R^{26a}和R^{26b}各自独立地为H、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的氨甲酰基烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基或聚乙二醇基团(例如，$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且R'为H或C_{1-20}烷基)；或氨基-聚乙二醇基团(例如，$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且每个

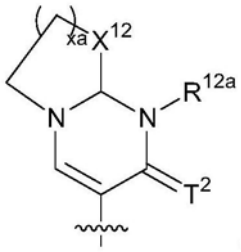
R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基)；并且

[0685] 每个R^{27}独立地为H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基。

[0686] 在一些实施方案中，R^{26a}为H，并且R^{26b}为任选取代的烷基。在一些实施方案中，R^{26a}和R^{26b}各自独立地为任选取代的烷基。在具体实施方案中，R^{27}为任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基。在其它实施方案中，R^{25}为任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基。

[0687] 在具体实施方案中，R^{26a}、R^{26b}或R^{29}的任选取代基为聚乙二醇基团(例如，$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且R'为H或C_{1-20}烷基)；或氨基-聚乙二醇基团(例如，$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$，其中s1为1至10(例如，1至6或1至4)的整数，s2和s3各自独立地为0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，并且每个R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基)。

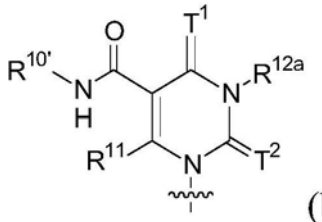
[0688] 在一些实施方案中，B可具有式(b21)：

[0689] 

(b21)，

其中X^{12}独立地为O、S、任选取代的亚烷基(例如，亚甲基)或任选取代的杂亚烷基，xa为0至3的整数，并且R^{12a}和T^2如本文所描述。

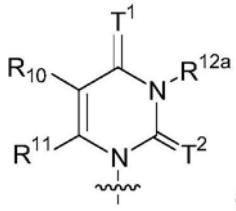
[0690] 在一些实施方案中，B可具有式(b22)：

[0691] 

(b22)，

其中$R^{10'}$独立地为任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基，并且R^{11}、R^{12a}、T^1以及T^2如本文所描述。

[0692] 在一些实施方案中，B可具有式(b23)：

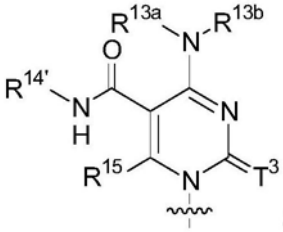
[0693] 

(b23)，

其中R^{10}为任选取代的杂环基(例如，任选取代的呋喃基、任选取代的噻吩基或任选取代的吡咯基)、任选取代的芳基(例如，任选取代的苯基或任选

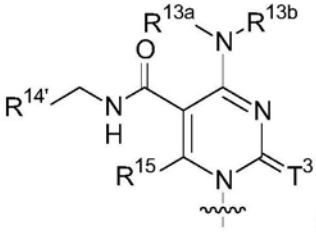
取代的萘基)或本文所描述的任何取代基(例如,对于R^{10}来说);并且其中R^{11}(例如,H或本文所描述的任何取代基)、R^{12a}(例如,H或本文所描述的任何取代基)、T^1(例如,氧代或本文所描述的任何取代基)以及T^2(例如,氧代或本文所描述的任何取代基)如本文所描述。

[0694] 在一些实施方案中,B可具有式(b24):

[0695]  (b24),

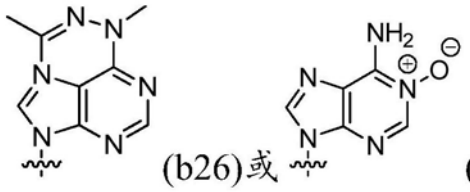
其中$R^{14'}$独立地为任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷芳基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基或任选取代的氨甲酰基烷基,并且R^{13a}、R^{13b}、R^{15}以及T^3如本文所描述。

[0696] 在一些实施方案中,B可具有式(b25):

[0697]  (b25),

其中$R^{14'}$为任选取代的杂环基(例如,任选取代的呋喃基、任选取代的噻吩基或任选取代的吡咯基)、任选取代的芳基(例如,任选取代的苯基或任选取代的萘基)或本文所描述的任何取代基(例如,对于R^{14}或$R^{14'}$来说);并且其中R^{13a}(例如,H或本文所描述的任何取代基)、R^{13b}(例如,H或本文所描述的任何取代基)、R^{15}(例如,H或本文所描述的任何取代基)以及T^3(例如,氧代或本文所描述的任何取代基)如本文所描述。

[0698] 在一些实施方案中,B是选自由胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤以及尿嘧啶组成的组的核碱基。在一些实施方案中,B可以是:

[0699]  (b26)或 (b27)。

[0700] 在一些实施方案中,修饰核碱基是修饰尿嘧啶。具有修饰尿嘧啶的示例性核碱基和核苷包括假尿苷(ψ)、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-尿苷(s^2U)、4-硫代-尿苷(s^4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿苷(ho^5U)、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤代-尿苷(例如,5-碘-尿苷或5-溴-尿苷)、3-甲基-尿苷(m^3U)、5-甲氧基-尿苷(mo^5U)、尿苷5-氧乙酸(cmo^5U)、尿苷5-氧乙酸甲酯($mcmo^5U$)、5-羧甲基-尿苷(cm^5U)、1-羧甲基-假尿苷、5-羧基羟甲基-尿苷(chm^5U)、5-羧基羟甲基-尿苷甲酯($mchm^5U$)、5-甲氧基羰基甲基-尿苷(mcm^5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷(mcm^5s^2U)、5-氨基甲基-2-硫代-尿苷(nm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-尿苷(mnm^5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代-

尿苷(mnm^{5}s^{2}U)、5-甲基氨基甲基-2-硒代-尿苷(mnm^{5}se^{2}U)、5-氨甲酰基甲基-尿苷(ncm^{5}U)、5-羧甲基氨基甲基-尿苷(cmnm^{5}U)、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(cmnm^{5}s^{2}U)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷(τm^{5}U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷(τm^{5}s^{2}U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿苷(m^{5}U,即具有核碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基假尿苷(m^{1}ψ)、5-甲基-2-硫代-尿苷(m^{5}s^{2}U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷(m^{1}s^{4}ψ)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷(m^{3}ψ)、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(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基-二氢尿苷(m^{5}D)、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、N1-甲基-假尿苷(还称为1-甲基假尿苷(m^{1}ψ))、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷(acp^{3}U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷(acp^{3}ψ)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷(inm^{5}U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿苷(inm^{5}s^{2}U)、α-硫代-尿苷、2′-O-甲基-尿苷(Um)、5,2′-O-二甲基-尿苷(m^{5}Um)、2′-O-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2′-O-甲基-尿苷(s^{2}Um)、5-甲氧基羰基甲基-2′-O-甲基-尿苷(mcm^{5}Um)、5-氨甲酰基甲基-2′-O-甲基-尿苷(ncm^{5}Um)、5-羧甲基氨基甲基-2′-O-甲基-尿苷(cmnm^{5}Um)、3,2′-O-二甲基-尿苷(m^{3}Um)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2′-O-甲基-尿苷(inm^{5}Um)、1-硫代-尿苷、脱氧胸苷、2'-F-ara-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-ara-尿苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷以及5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷。

[0701] 在一些实施方案中,修饰核碱基是修饰胞嘧啶。具有修饰胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括5-氮杂-胞苷、6-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷(m^{3}C)、N4-乙酰基-胞苷(ac^{4}C)、5-甲酰基-胞苷(f^{5}C)、N4-甲基-胞苷(m^{4}C)、5-甲基-胞苷(m^{5}C)、5-卤代-胞苷(例如,5-碘-胞苷)、5-羟甲基-胞苷(hm^{5}C)、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷(s^{2}C)、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、泽布拉恩(zebularine)、5-氮杂-泽布拉恩、5-甲基-泽布拉恩、5-氮杂-2-硫代-泽布拉恩、2-硫代-泽布拉恩、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、赖西丁(k$_2$C)、α-硫代-胞苷、2′-O-甲基-胞苷(Cm)、5,2′-O-二甲基-胞苷(m^{5}Cm)、N4-乙酰基-2′-O-甲基-胞苷(ac^{4}Cm)、N4,2′-O-二甲基-胞苷(m^{4}Cm)、5-甲酰基-2′-O-甲基-胞苷(f^{5}Cm)、N4,N4,2′-O-三甲基-胞苷(m$^4{}_2$Cm)、1-硫代-胞苷、2'-F-ara-胞苷、2'-F-胞苷以及2'-OH-ara-胞苷。

[0702] 在一些实施方案中,修饰核碱基是修饰腺嘌呤。具有修饰的腺嘌呤的示例性核碱基和核苷包括2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤代-嘌呤(例如,2-氨基-6-氯-嘌呤)、6-卤代-嘌呤(例如,6-氯-嘌呤)、2-氨基-6-甲基-嘌呤、8-叠氮基-腺苷、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(m^{1}A)、2-甲基-腺嘌呤(m^{2}A)、N6-甲基-腺苷(m^{6}A)、2-甲硫基-N6-甲基-腺苷(ms^{2}m^{6}A)、N6-异戊烯基-腺苷(i^{6}A)、2-甲硫基-N6-异戊烯基-腺苷(ms^{2}i^{6}A)、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷(io^{6}A)、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷(ms^{2}io^{6}A)、N6-甘氨酰基氨甲酰基-腺苷(g^{6}A)、N6-苏氨酰基氨甲酰基-腺苷(t^{6}A)、N6-甲基-N6-苏氨酰基氨甲酰基-腺苷(m^{6}t^{6}A)、2-甲硫基-N6-苏氨酰基氨甲酰基-腺苷(ms^{2}g^{6}A)、N6,N6-二甲基-腺苷(m$^6{}_2$A)、N6-羟基正缬氨酰基氨甲酰基-腺苷

(hn^{6}A)、2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酰基氨甲酰基-腺苷(ms^{2}hn^{6}A)、N6-乙酰基-腺苷(ac^{6}A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、α-硫代-腺苷、2′-O-甲基-腺苷(Am)、N6,2′-O-二甲基-腺苷(m^{6}Am)、N6,N6,2′-O-三甲基-腺苷(m$^6{}_2$Am)、1,2′-O-二甲基-腺苷(m^{1}Am)、2′-O-核糖基腺苷(磷酸酯)(Ar(p))、2-氨基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷、2'-F-ara-腺苷、2'-F-腺苷、2'-OH-ara-腺苷以及N6-(19-氨基-五氧杂十九烷基)-腺苷。

[0703] 在一些实施方案中,修饰核碱基是修饰鸟嘌呤。具有修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m^{1}I)、Y核苷(wyosine)(imG)、甲基Y核苷(mimG)、4-脱甲基-Y核苷(imG-14)、异Y核苷(imG2)、怀丁苷(yW)、过氧怀丁苷(o$_2$yW)、羟基怀丁苷(OHyW)、修饰不足的羟基怀丁苷(OHyW*)、7-脱氮-鸟苷、辫苷(Q)、环氧辫苷(oQ)、半乳糖基-辫苷(galQ)、甘露糖基-辫苷(manQ)、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ$_0$)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ$_1$)、古嘌苷(G$^+$)、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(m^{7}G)、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基-鸟苷(m^{1}G)、N2-甲基-鸟苷(m^{2}G)、N2,N2-二甲基-鸟苷(m$^2{}_2$G)、N2,7-二甲基-鸟苷(m^{2,7}G)、N2,N2,7-二甲基-鸟苷(m^{2,2,7}G)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷、α-硫代-鸟苷、2′-O-甲基-鸟苷(Gm)、N2-甲基-2′-O-甲基-鸟苷(m^{2}Gm)、N2,N2-二甲基-2′-O-甲基-鸟苷(m$^2{}_2$Gm)、1-甲基-2′-O-甲基-鸟苷(m^{1}Gm)、N2,7-二甲基-2′-O-甲基-鸟苷(m^{2,7}Gm)、2′-O-甲基-肌苷(Im)、1,2′-O-二甲基-肌苷(m^{1}Im)以及2′-O-核糖基鸟苷(磷酸酯)(Gr(p))。

[0704] 核苷酸的核碱基可独立地选自嘌呤、嘧啶、嘌呤或嘧啶类似物。例如,核碱基可各自独立地选自腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或次黄嘌呤。在另一实施方案中,核碱基还可包括,例如,碱基的天然存在的和合成的衍生物,包括吡唑并[3,4-d]嘧啶,5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代(例如,8-溴)、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代基、具体地说5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,脱氮鸟嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,3-脱氮鸟嘌呤,脱氮腺嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,3-脱氮腺嘌呤,吡唑并[3,4-d]嘧啶,咪唑并[1,5-a]1,3,5三嗪酮,9-脱氮嘌呤,咪唑并[4,5-d]吡嗪,噻唑并[4,5-d]嘧啶,吡嗪-2-酮,1,2,4-三嗪、哒嗪;以及1,3,5三嗪。当使用简写A、G、C、T或U描绘核苷酸时,每个字母是指其代表性碱基和/或衍生物,例如,A包括腺嘌呤或腺嘌呤类似物,例如,7-脱氮腺嘌呤)。

[0705] 核苷间键联上的修饰

[0706] 可并入多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子中的修饰核苷酸可以在核苷间键联(例如,磷酸酯主链)上被修饰。在本文多核苷酸主链的背景下,短语“磷酸酯”和“磷酸二酯”可互换使用。主链磷酸酯基团可通过用不同的取代基置换一个或多个氧原子来修饰。此外,修饰核苷和核苷酸可包括用如本文所描述的另一种核苷间键联全部置换未修饰的磷酸酯部分。修饰的磷酸酯基团的实例包括但不限于,硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸酯

(boranophosphate)、硼烷磷酸酯(boranophosphate ester)、氢膦酸酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯以及磷酸三酯。二硫代磷酸酯具有的两个非连接的氧均被硫置换。磷酸酯接头还可以通过用氮(桥联氨基磷酸酯)、硫(桥联硫代磷酸酯)和碳(桥联亚甲基-膦酸酯)置换连接的氧来修饰。

[0707] 提供α-硫代取代的磷酸酯部分以便通过非天然的硫代磷酸酯主链键联来对RNA和DNA聚合物赋予稳定性。硫代磷酸酯DNA和RNA具有增加的核酸酶抗性并且因此在细胞环境中具有更长的半衰期。预期硫代磷酸酯连接的多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子还通过细胞先天性免疫分子的较弱结合/激活来减少先天性免疫应答。

[0708] 在具体实施方案中,修饰核苷包括α-硫代-核苷(例如,5′-O-(1-硫代磷酸酯)-腺苷、5′-O-(1-硫代磷酸酯)-胞苷(α-硫代-胞苷)、5′-O-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷、5′-O-(1-硫代磷酸酯)-尿苷或5′-O-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷)。

[0709] 本文在以下描述可根据本发明采用的其它核苷间键联,包括不含磷原子的核苷间键联。

[0710] 修饰的糖、核碱基和核苷间键联的组合

[0711] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可包括对糖、核碱基和/或核苷间键联的修饰的组合。这些组合可包括本文所描述的任何一个或多个修饰。例如,本文式(Ia)、(Ia-1)至(Ia-3)、(Ib)至(If)、(IIa)至(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)至(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)至(IVl)以及(IXa)-(IXr)中所描述的任何核苷酸可与本文所描述的任何核碱基组合(例如,在式(b1)至(b43)或本文所描述的任何其它中)。

[0712] 多肽、初级构建体和mmRNA分子的合成

[0713] 用于根据本发明使用的多肽、初级构建体和mmRNA分子可根据如本文所描述的任何有用的技术来制备。用于本文所公开的多核苷酸、初级构建体和mmRNA分子的合成中的修饰核苷和核苷酸可使用以下一般方法和工序从可容易获得的起始材料来制备。在提供典型的或优选的工艺条件(例如,反应温度、时间、反应物的摩尔比、溶剂、压力等)的情况下,熟练的业内人士将能够优化和开发另外的工艺条件。最佳反应条件可根据所使用的具体反应物或溶剂变化,但这类条件可由本领域的技术人员通过常规优化工序来确定。

[0714] 本文所描述的过程可根据本领域中已知的任何合适的方法进行监测。例如,可通过光谱手段如核磁共振波谱法(例如,^{1}H或^{13}C)、红外光谱法、分光光度测定法(例如,UV-可见)或质谱法或通过色谱法如高效液相色谱法(HPLC)或薄层色谱法来监测产物形成。

[0715] 本发明的多肽、初级构建体和mmRNA分子的制备可涉及各种化学集团的保护和脱保护。保护和脱保护的需要以及适当保护基团的选择可由本领域的技术人员容易地确定。保护基团的化学可在例如Greene等人,Protective Groups in Organic Synthesis,第2版,Wiley&Sons,1991中找到,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0716] 本文所描述的过程的反应可在合适的溶剂中进行,所述溶剂可由有机合成领域中的技术人员容易地选择。合适的溶剂可以是在反应所进行的温度(即,可在溶剂的冷冻温度至溶剂的沸腾温度范围内的温度)下与起始材料(反应物)、中间体或产物大致上不反应的。给定反应可在一种溶剂或多于一种溶剂的混合物中进行。取决于具体反应步骤,可针对具体反应步骤选择合适的溶剂。

[0717] 修饰核苷和核苷酸的外消旋混合物的拆分可通过本领域中已知的多种方法中的

任何一种来进行。示例性方法包括使用“手性拆分酸”的分级重结晶，手性拆分酸是一种光学活性的、成盐有机酸。用于分级重结晶方法的合适的拆分剂是例如光学活性酸，如D和L形式的酒石酸、二乙酰基酒石酸、二苯甲酰基酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸或各种光学活性的樟脑磺酸。外消旋混合物的拆分还可通过在填充有光学活性拆分剂(例如，二硝基苯甲酰基苯基甘氨酸)的柱上洗脱来进行。合适的洗脱溶剂组合物可由本领域的技术人员确定。

[0718] 修饰核苷和核苷酸(例如，结构单元分子)可根据以下中描述的合成方法来制备：Ogata等人，J.Org.Chem.74:2585-2588(2009)；Purmal等人，Nucl.Acids Res.22(1):72-78，(1994)；Fukuhara等人，Biochemistry，1(4):563-568(1962)；以及Xu等人，Tetrahedron，48(9):1729-1740(1992)，所述文献各自以引用的方式整体并入本文。

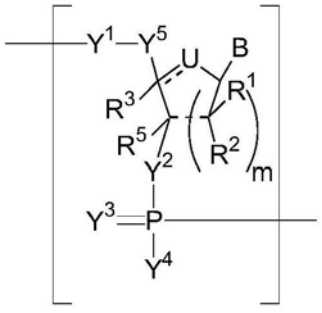
[0719] 本发明的多肽、初级构建体和mmRNA可以是或可以不是沿分子的整个长度均匀修饰的。例如，一个或多个或所有类型的核苷酸(例如，嘌呤或嘧啶，或A、G、U、C中的任何一个或多个或全部)可以是或可以不是在本发明的多核苷酸中或在其给定预先确定的序列区(例如，图1中表示的一个或多个序列区)中均匀修饰的。在一些实施方案中，本发明的多核苷酸中(或其给定序列区中)的所有核苷酸X被修饰，其中X可以是核苷酸A、G、U、C中的任一个或组合A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C或A+G+C中的任一个。

[0720] 不同的糖修饰、核苷酸修饰和/或核苷间键联(例如，主链结构)可存在于多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的不同位置处。本领域的普通技术人员将了解核苷酸类似物或其它修饰可位于多核苷酸、初级构建体或mmRNA的任何位置处，以使得多核苷酸、初级构建体或mmRNA的功能大致上不被减少。修饰还可以是5′或3′末端修饰。多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包含约1％至约100％的修饰核苷酸(相对于总体核苷酸含量或相对于一种或多种类型的核苷酸，即，A、G、U或C中的任何一种或多种)或任何中间百分比(例如，1％至20％、1％至25％、1％至50％、1％至60％、1％至70％、1％至80％、1％至90％、1％至95％、10％至20％、10％至25％、10％至50％、10％至60％、10％至70％、10％至80％、10％至90％、10％至95％、10％至100％、20％至25％、20％至50％、20％至60％、20％至70％、20％至80％、20％至90％、20％至95％、20％至100％、50％至60％、50％至70％、50％至80％、50％至90％、50％至95％、50％至100％、70％至80％、70％至90％、70％至95％、70％至100％、80％至90％、80％至95％、80％至100％、90％至95％、90％至100％以及95％至100％)。

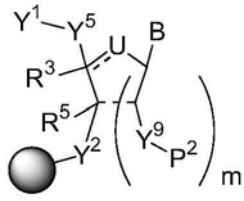
[0721] 在一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括修饰嘧啶(例如，修饰尿嘧啶/尿苷/U或修饰胞嘧啶/胞苷/C)。在一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子中的尿嘧啶或尿苷(通常：U)可用约1％至约100％的修饰尿嘧啶或修饰尿苷(例如，1％至20％、1％至25％、1％至50％、1％至60％、1％至70％、1％至80％、1％至90％、1％至95％、10％至20％、10％至25％、10％至50％、10％至60％、10％至70％、10％至80％、10％至90％、10％至95％、10％至100％、20％至25％、20％至50％、20％至60％、20％至70％、20％至80％、20％至90％、20％至95％、20％至100％、50％至60％、50％至70％、50％至80％、50％至90％、50％至95％、50％至100％、70％至80％、70％至90％、70％至95％、70％至100％、80％至90％、80％至95％、80％至100％、90％至95％、90％至100％以及95％至100％的修饰尿嘧啶或修饰尿苷)置换。修饰尿嘧啶或尿苷可被具有单一独特结构的化合物或被具有不同结构(例如，2、3、4或更多个独特结构，如本文所描述)的多种化合物置换。在一些实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子中的胞嘧啶或胞苷(通常：C)可用约1％至约100％

的修饰胞嘧啶或修饰胞苷(例如,1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%以及95%至100%的修饰胞嘧啶或修饰胞苷)置换。修饰胞嘧啶或胞苷可被具有单一独特结构的化合物或被具有不同结构(例如,2、3、4或更多个独特结构,如本文所描述)的多种化合物置换。

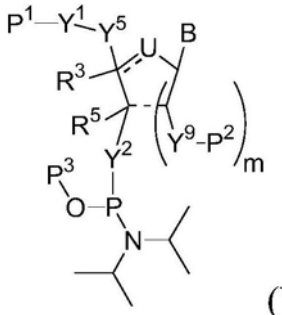
[0722] 在一些实施方案中,本公开提供合成包括n数目的连接核苷的多核苷酸、初级构建体或mmRNA(例如,所述第一区、第一侧翼区或第二侧翼区)的方法,所述核苷具有式(Ia-1):

[0723]  (Ia-1); 所述方法包括

[0724] a)使式(IV-1)的核苷酸:

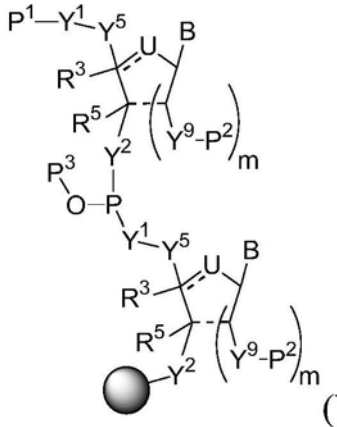
[0725]  (IV-1),

[0726] 与式(V-1)的亚磷酰胺化合物反应:

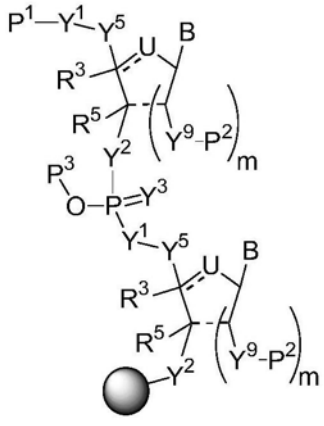
[0727]  (V-1),

[0728] 其中Y^9为H、羟基、磷酰基、焦磷酸酯、硫酸酯、氨基、硫醇、任选取代的氨基酸或肽(例如,包括2至12个氨基酸);并且每个P^1、P^2和P^3独立地为合适的保护基团;并且●指代固相支持物;

[0729] 以便提供式(VI-1)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA:

[0730]  以及

[0731] b)使式(V)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA氧化或硫化以便产生式(VII-1)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA：

[0732]  以及

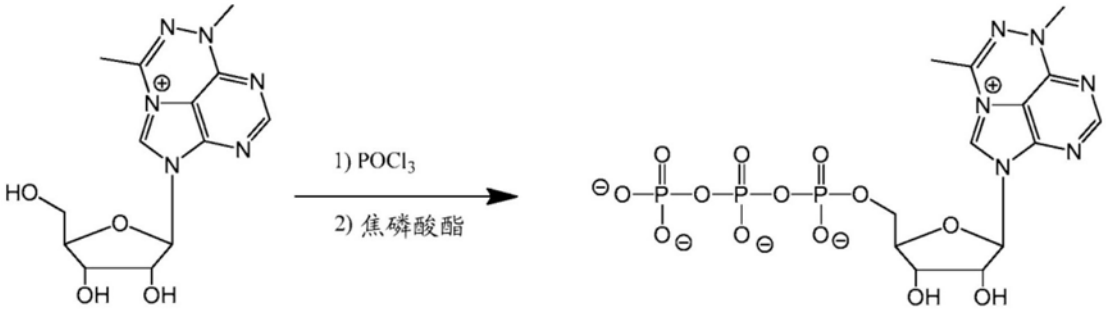
[0733] c)去除保护基团以便产生式(Ia)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。

[0734] 在一些实施方案中，将步骤a)和b)重复1次至约10,000次。在一些实施方案中，所述方法进一步包括选自由A、C、G以及U腺苷、胞嘧啶、鸟苷以及尿嘧啶组成的组的核苷酸(例如，mmRNA分子)。在一些实施方案中，核碱基可以是嘧啶或其衍生物。在一些实施方案中，所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA是可翻译的。

[0735] 多核苷酸、初级构建体和mmRNA的其它组分是任选的，并且在一些实施方案中是有益的。例如，提供5′非翻译区(UTR)和/或3′UTR，其中任一者或两者可独立地包含一种或多种不同的核苷酸修饰。在这类实施方案中，核苷酸修饰还可存在于可翻译区中。还提供含有Kozak序列的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。

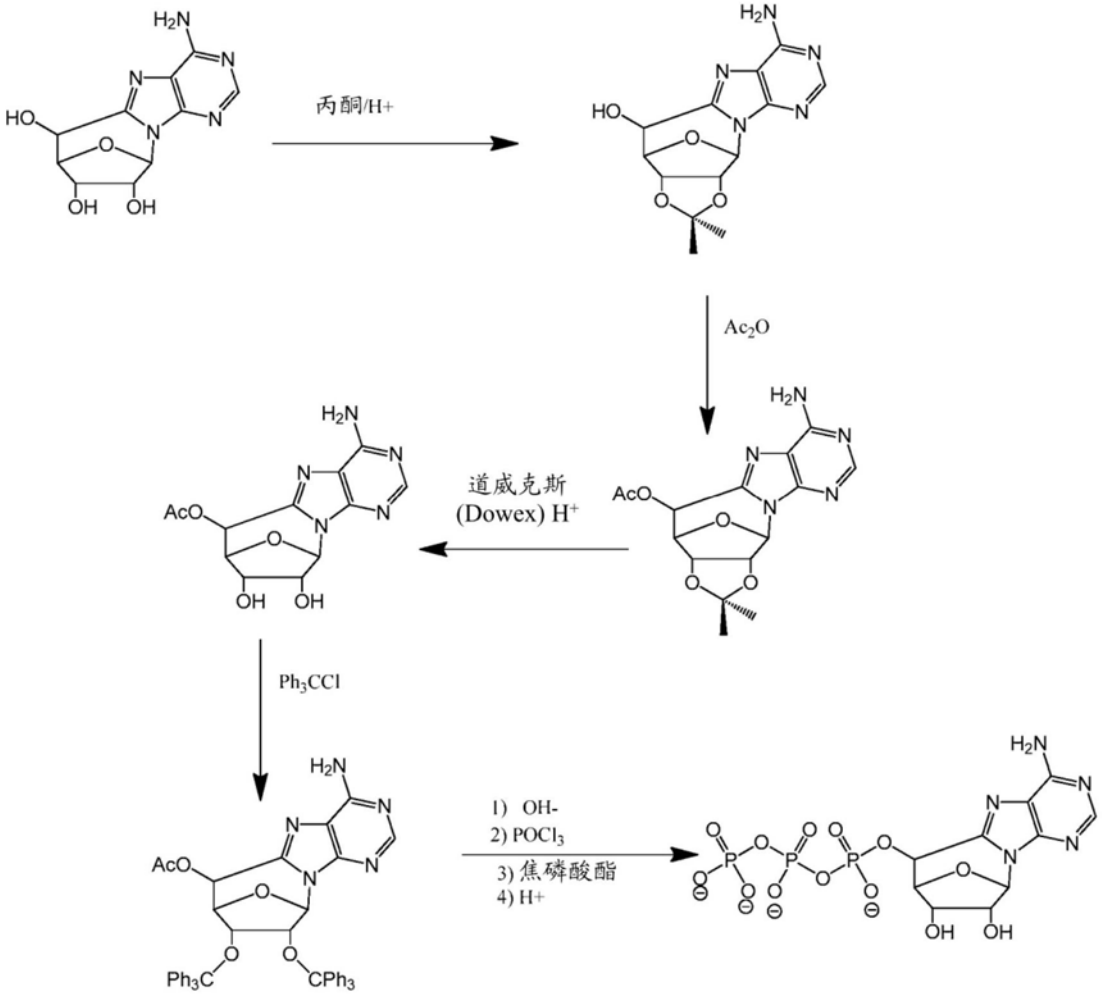
[0736] 并入修饰核酸或mmRNA(例如，RNA或mRNA)中的修饰核苷酸的示例性合成在以下方案1至方案11中提供。方案1提供用于磷酸化核苷酸(包括修饰核苷)的一般方法。

[0737] 方案1

[0738] 

[0739] 可使用各种保护基团来控制反应。例如,方案2提供使用多个保护和脱保护步骤以便促进糖的5′位置处而不是2′和3′羟基的磷酸化。

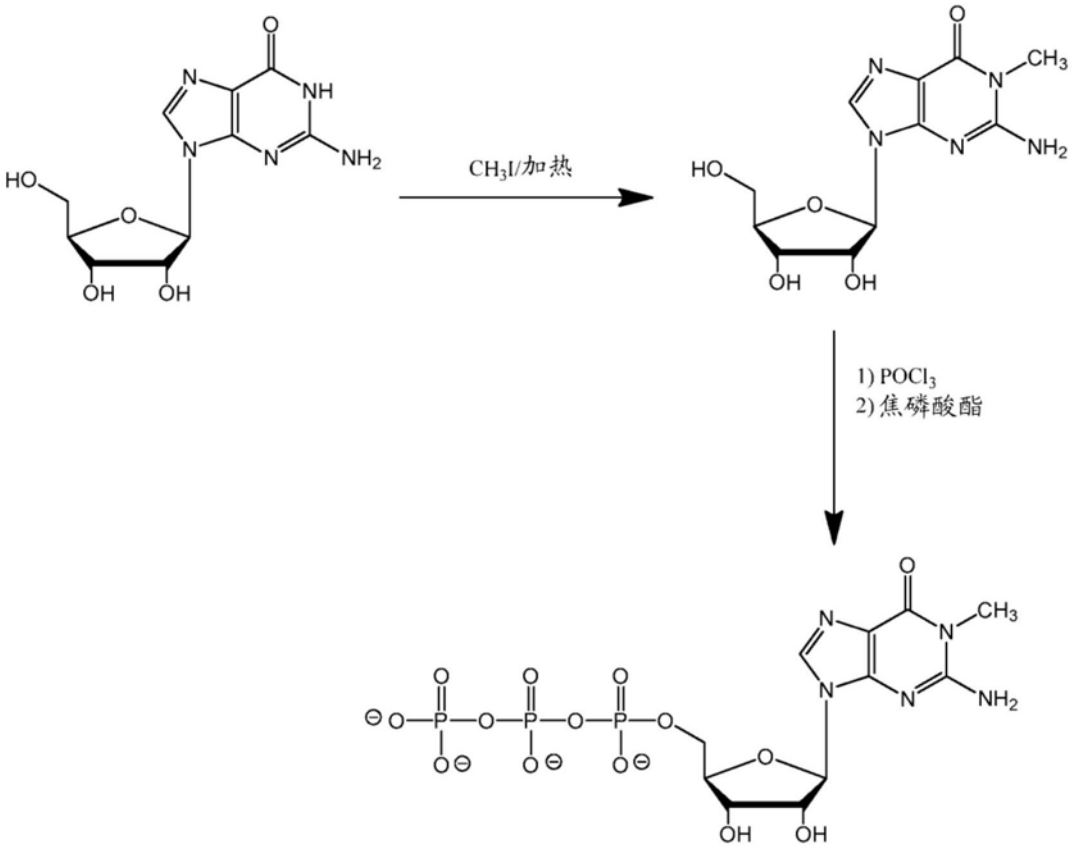
[0740] 方案2

[0741] 

[0742] 修饰核苷酸可以任何有用的方式来合成。方案3、4和7提供用于合成具有修饰嘌呤核碱基的修饰核苷酸的示例性方法;并且方案5和6提供用于合成分别具有修饰假尿苷或假异胞苷的修饰核苷酸的示例性方法。

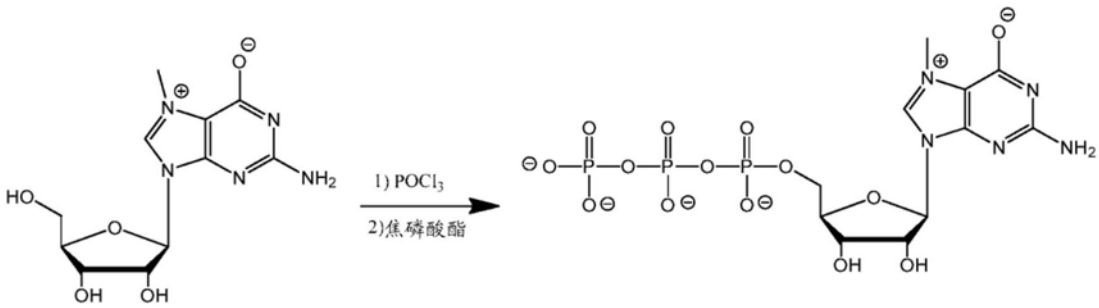
[0743] 方案3

[0744]



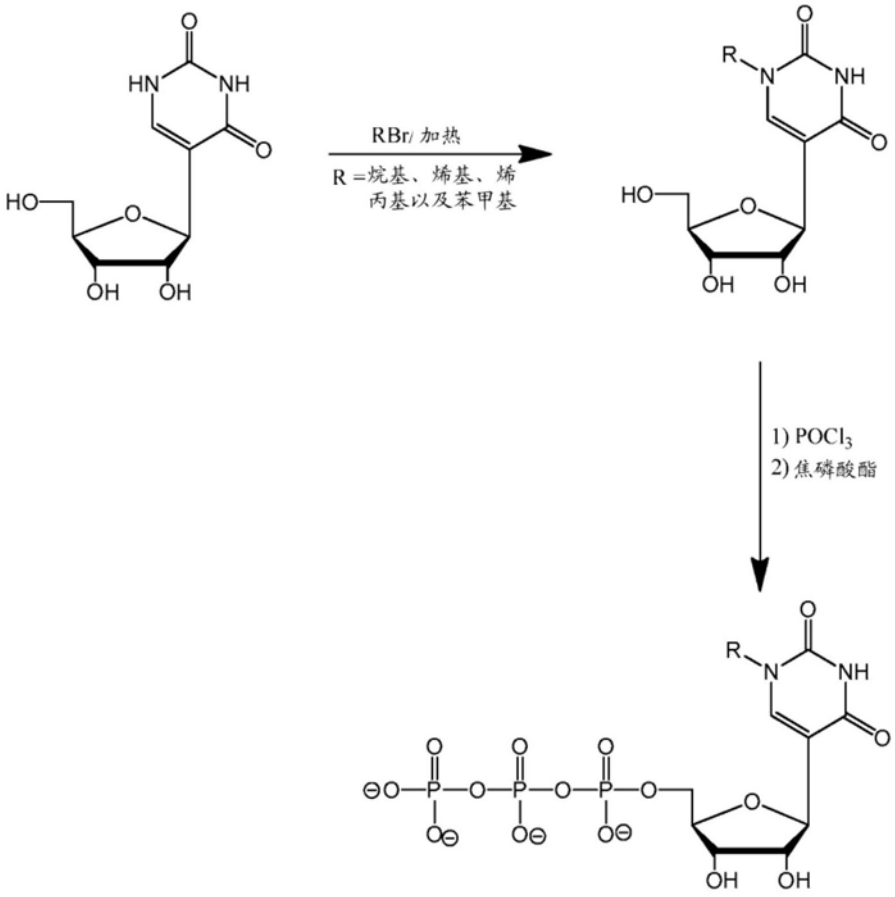
[0745] 方案4

[0746]

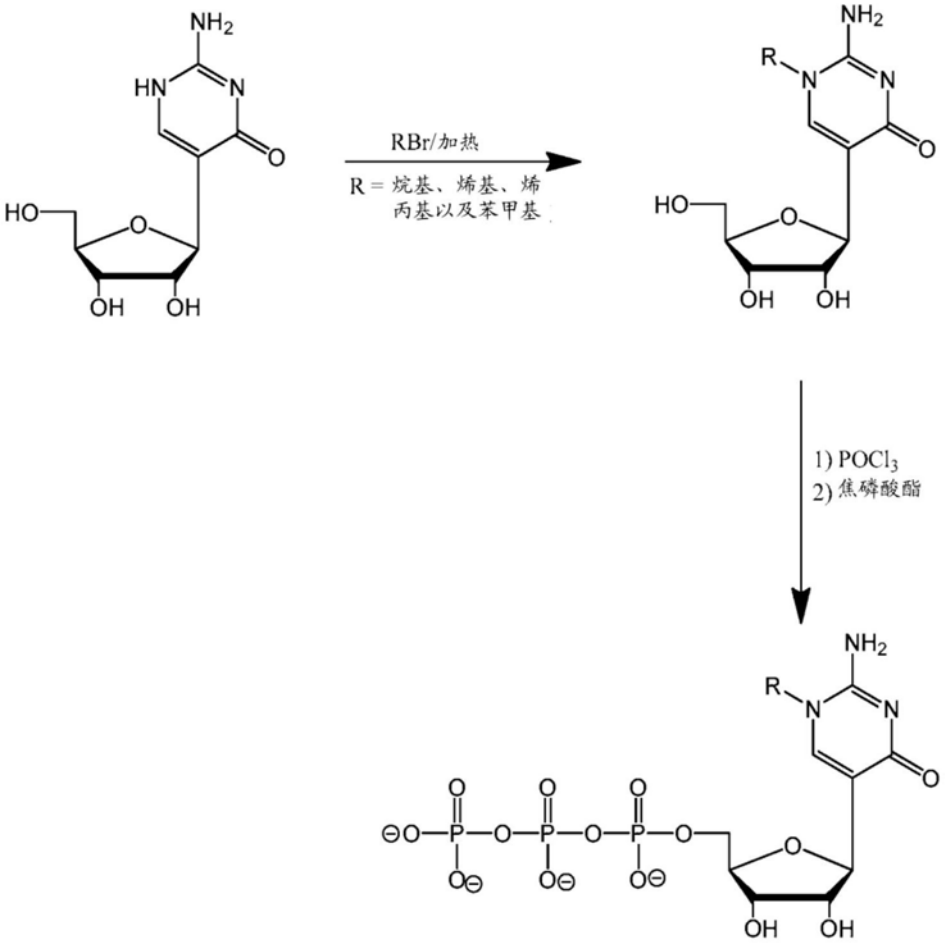


[0747] 方案5

[0748]

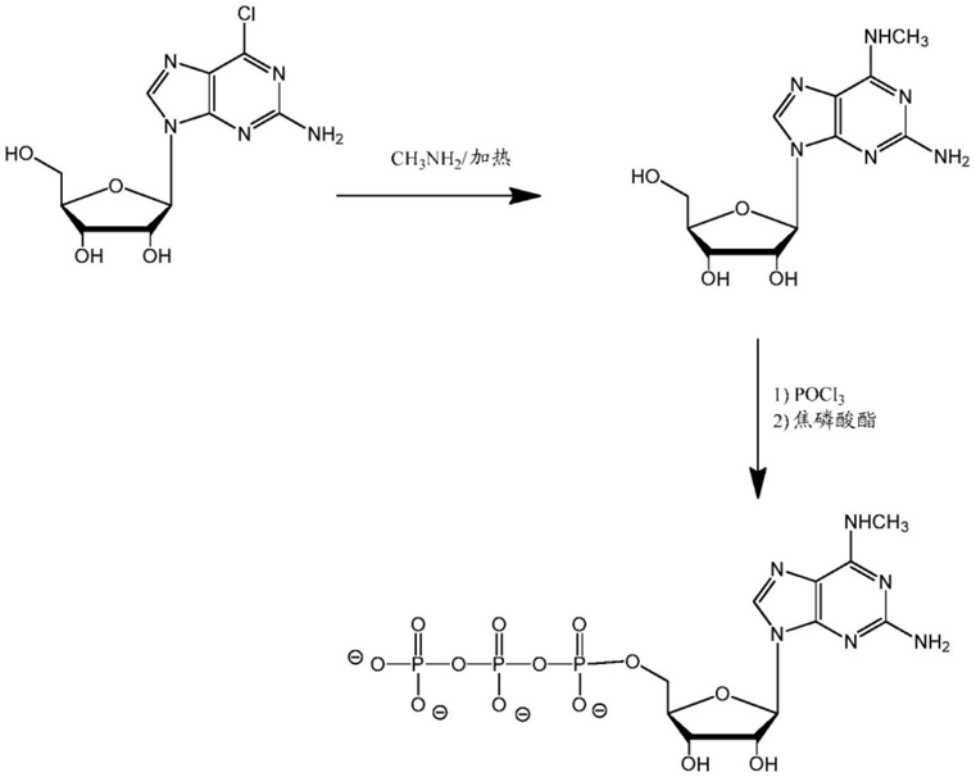


[0749] 方案6



[0750]

[0751] 方案7

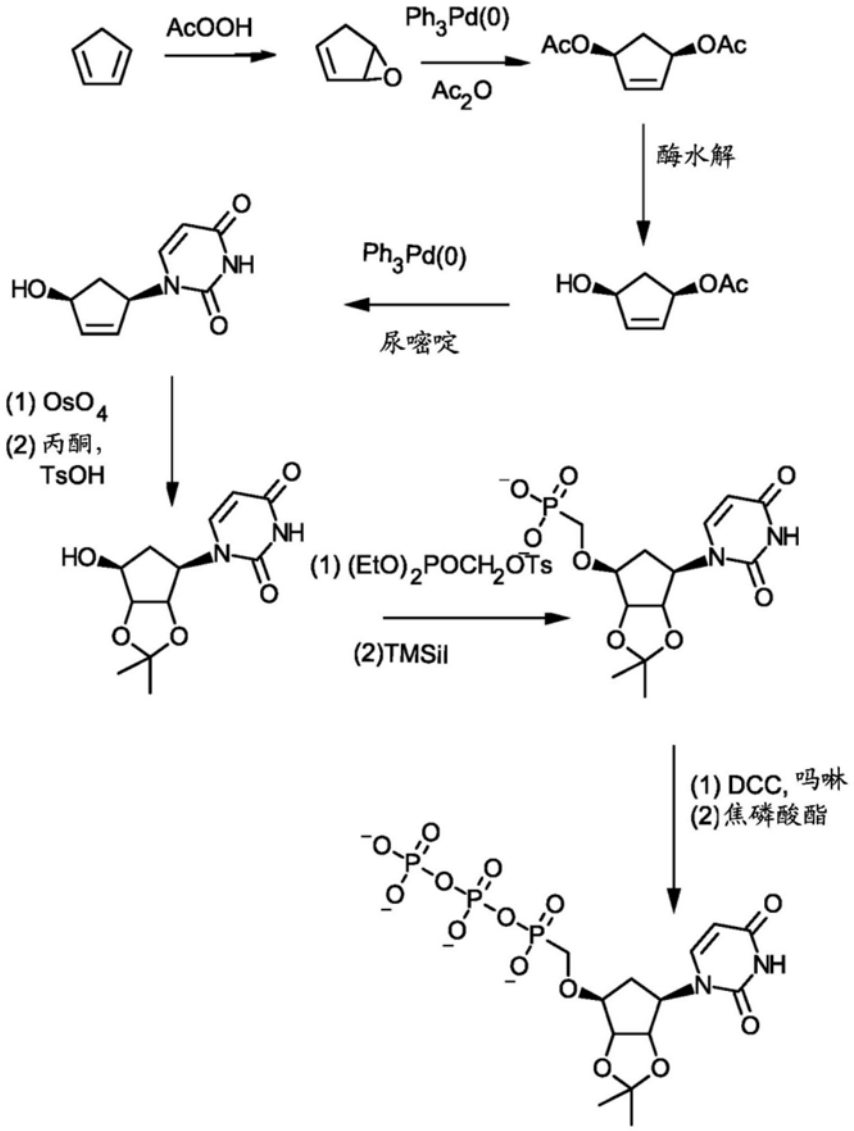


[0752]

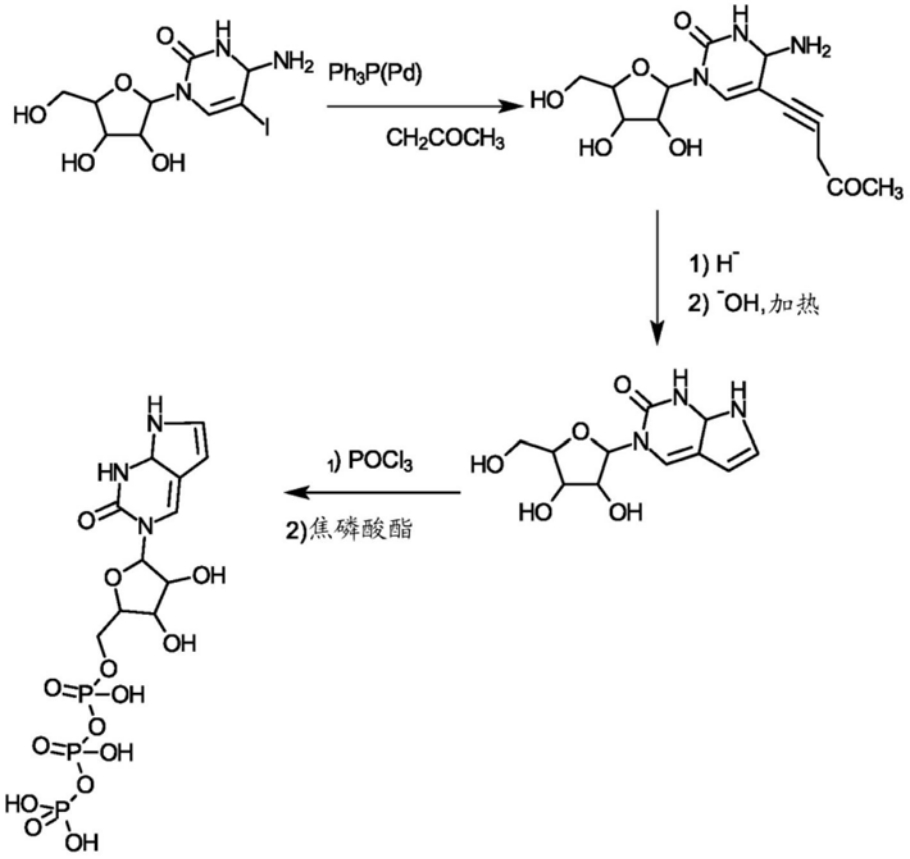
[0753] 方案8和9提供修饰核苷酸的示例性合成。方案10提供用于产生核苷酸的非限制性

生物催化方法。

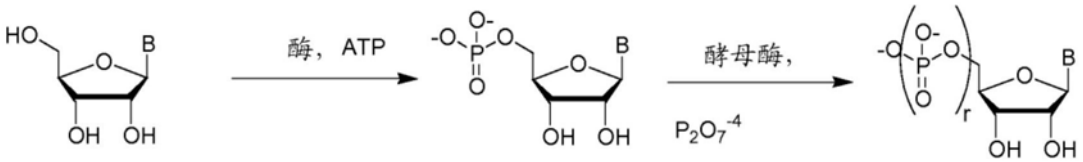
[0754] 方案8

[0755] 

[0756] 方案9

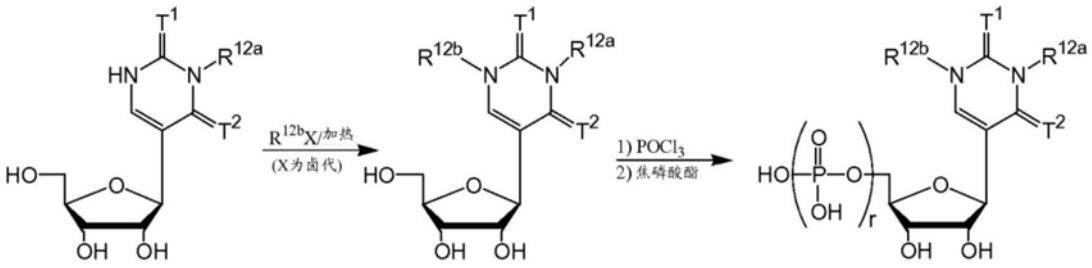
[0757] 

[0758] 方案10

[0759] 

[0760] 方案11提供修饰尿嘧啶的示例性合成，其中N1位置用如别处提供的R^{12b}修饰，并且核糖的5′位置被磷酸化。T^1、T^2、R^{12a}、R^{12b}以及r如本文所提供。这种合成以及其优化的型式可用于修饰其它嘧啶核碱基和嘌呤核碱基(参见，例如式(b1)至(b43))和/或用于设置一个或多个磷酸酯基团(例如，在糖的5′位置处)。这种烷基化反应还可用于在本文所描述的任何核碱基中的任何反应性基团(例如，氨基)(例如，胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤的沃森-克里克碱基配对面中的氨基)处包括一个或多个任选取代的烷基。

[0761] 方案11

[0762] 

[0763] mmRNA中的核苷酸的组合

[0764] 修饰核苷酸和修饰核苷酸组合的其它实例提供在以下表9中。这些修饰核苷酸的组合可用于形成本发明的多肽、初级构建体或mmRNA。除非另外指明，否则修饰核苷酸可以

完全取代本发明的修饰核酸或mmRNA的天然核苷酸。作为非限制性实例，天然核苷酸尿苷可以被本文所描述的修饰核苷取代。在另一个非限制性实例中，天然核苷酸尿苷可以被本文所公开的至少一种修饰核苷部分地取代(例如，约0.1％、1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99.9％)。

[0765] 表9

修饰核苷酸	修饰核苷酸组合
α-硫代-胞苷	α-硫代-胞苷/5-碘-尿苷
	α-硫代-胞苷/N1-甲基-假尿苷
	α-硫代-胞苷/α-硫代-尿苷
	α-硫代-胞苷/5-甲基-尿苷
	α-硫代-胞苷/假尿苷
	约50%的胞嘧啶是α-硫代-胞苷
假异胞苷	假异胞苷/5-碘-尿苷
	假异胞苷/N1-甲基-假尿苷
	假异胞苷/α-硫代-尿苷
	假异胞苷/5-甲基-尿苷
	假异胞苷/假尿苷
	约25%的胞嘧啶是假异胞苷
	假异胞苷/约 50%的尿苷是 N1-甲基-假尿苷并且约50%的尿苷是假尿苷

[0766]

[0767]

	假异胞苷/约 25%的尿苷是 N1-甲基-假尿苷并且约 25%的尿苷是假尿苷
吡咯并-胞苷	吡咯并-胞苷/5-碘-尿苷
	吡咯并-胞苷/N1-甲基-假尿苷
	吡咯并-胞苷/α-硫代-尿苷
	吡咯并-胞苷/5-甲基-尿苷
	吡咯并-胞苷/假尿苷
	约 50%的胞嘧啶是吡咯并-胞苷
5-甲基-胞苷	5-甲基-胞苷/5-碘-尿苷
	5-甲基-胞苷/N1-甲基-假尿苷
	5-甲基-胞苷/α-硫代-尿苷
	5-甲基-胞苷/5-甲基-尿苷
	5-甲基-胞苷/假尿苷
	约 25%的胞嘧啶是 5-甲基-胞苷
	约 50%的胞嘧啶是 5-甲基-胞苷
	5-甲基-胞苷/5-甲氧基-尿苷
	5-甲基-胞苷/5-溴-尿苷
	5-甲基-胞苷/2-硫代-尿苷
	5-甲基-胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
	约 50%的尿苷是 5-甲基-胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
N4-乙酰基-胞苷	N4-乙酰基-胞苷/5-碘-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷/N1-甲基-假尿苷
	N4-乙酰基-胞苷/α-硫代-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷/5-甲基-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷/假尿苷
	约 50%的胞嘧啶是 N4-乙酰基-胞苷
	约 25%的胞嘧啶是 N4-乙酰基-胞苷
	N4-乙酰基-胞苷/5-甲氧基-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷/5-溴-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷/2-硫代-尿苷
	约 50%的胞嘧啶是 N4-乙酰基-胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷

[0768] 修饰核苷酸组合的其它实例提供在以下表10中。这些修饰核苷酸的组合可用于形成本发明的多肽、初级构建体或mmRNA。

[0769] 表10

[0770]

修饰核苷酸	**修饰核苷酸组合**
具有一个或多个式(b10)核碱基的修饰	用(b10)/假尿苷修饰的胞苷
	用(b10)/N1-甲基-假尿苷修饰的胞苷

[0771]

胞苷	用(b10)/5-甲氧基-尿苷修饰的胞苷
	用(b10)/5-甲基-尿苷修饰的胞苷
	用(b10)/5-溴-尿苷修饰的胞苷
	用(b10)/2-硫代-尿苷修饰的胞苷
	约 50%的胞苷被修饰的胞苷(b10)取代/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
具有一个或多个式(b32)核碱基的修饰胞苷	用(b32)/假尿苷修饰的胞苷
	用(b32)/N1-甲基-假尿苷修饰的胞苷
	用(b32)/5-甲氧基-尿苷修饰的胞苷
	用(b32)/5-甲基-尿苷修饰的胞苷
	用(b32)/5-溴-尿苷修饰的胞苷
	用(b32)/2-硫代-尿苷修饰的胞苷
	约 50%的胞苷被修饰的胞苷(b32)取代/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
具有一个或多个式(b1)核碱基的修饰尿苷	用(b1)/N4-乙酰基-胞苷修饰的尿苷
	用(b1)/5-甲基-胞苷修饰的尿苷
具有一个或多个式(b8)核碱基的修饰尿苷	用(b8)/N4-乙酰基-胞苷修饰的尿苷
	用(b8)/5-甲基-胞苷修饰的尿苷
具有一个或多个式(b28)核碱基的修饰尿苷	用(b28)/N4-乙酰基-胞苷修饰的尿苷
	用(b28)/5-甲基-胞苷修饰的尿苷
具有一个或多个式(b29)核碱基的修饰尿苷	用(b29)/N4-乙酰基-胞苷修饰的尿苷
	用(b29)/ 5-甲基-胞苷修饰的尿苷
具有一个或多个式(b30)核碱基的修饰尿苷	用(b30)/N4-乙酰基-胞苷修饰的尿苷
	用(b30)/5-甲基-胞苷修饰的尿苷

[0772] 在一些实施方案中,至少25%的胞嘧啶被式(b10)至(b14)的化合物置换(例如,至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、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%或约100%)。

[0773] 在一些实施方案中,至少25%的尿嘧啶被式(b1)至(b9)的化合物置换(例如,至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、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%或约100%)。

[0774] 在一些实施方案中,至少25%的胞嘧啶被式(b10)-(b14)的化合物置换,并且至少25%的尿嘧啶被式(b1)-(b9)的化合物置换(例如,至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、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%或约100%)。

[0775] IV.药物组合物

[0776] 配制、施用、递送和给药

[0777] 本发明提供与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合的多核苷酸、初级构建体和mmRNA组合物和复合物。药物组合物可任选地包含一种或多种另外活性物质，例如治疗和/或预防活性物质。在配制和/或制造药剂方面的一般考虑因素可见于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(以引用的方式并入本文)中。

[0778] 在一些实施方案中，向人，即人患者或受试者施用组合物。出于本公开的目的，短语“活性成分”通常是指如本文所述递送的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。

[0779] 虽然本文提供的药物组合物的描述主要涉及适用于向人施用的药物组合物，但是熟练的业内人士将理解此类组合物通常适用于向任何其它动物例如向非人动物(例如非人哺乳动物)施用。改变适用于向人施用的药物组合物以便使得组合物适用于向各种动物施用为众所周知的，并且普通兽医药理学家可仅仅通过普通实验(如果需要)来设计和/或进行此种改变。所想到的向其施用药物组合物的受试者包括但不限于人和/或其它灵长类动物;哺乳动物，包括商业上相关的哺乳动物如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或鸟类，包括商业上相关的鸟类如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0780] 本文描述的药物组合物的制剂可通过药理学领域中已知或此后开发的任何方法来制备。通常，此类制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分缔合，并且然后如果必要和/或希望，使产品划分、成形和/或包装为希望的单剂量或多剂量单位。

[0781] 根据本发明的药物组合物可以单一单位剂量和/或以多个单一单位剂量大批量制备、包装和/或销售。如本文所使用，“单位剂量”为包含预先确定的量的活性成分的药物组合物的个别量。活性成分的量通常等于将要向受试者施用的活性成分的剂量和/或这种剂量的合宜分数，例如像这种剂量的一半或三分之一。

[0782] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何另外成分的相对量将取决于所治疗的受试者的身份、尺寸和/或病状并且进一步取决于待施用组合物的途径而改变。作为举例，组合物可包含0.1％与100％之间，例如.5％与50％之间、1％至30％之间、5％与80％之间、至少80％(w/w)的活性成分。

[0783] 制剂

[0784] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可使用一种或多种赋形剂来配制以便:(1)增加稳定性;(2)增加细胞转染;(3)容许持续或延迟释放(例如，从多核苷酸、初级构建体或mmRNA的贮库制剂释放);(4)改变生物分布(例如，使多核苷酸、初级构建体或mmRNA靶向特定组织或细胞类型);(5)增加体内编码的蛋白质的翻译;和/或(6)改变体内编码的蛋白质的释放概况。除了传统赋形剂如任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂之外，本发明的赋形剂可包括但不限于类脂质(lipidoid)、脂质体、脂质纳米颗粒、聚合物、脂质复合物、核-壳纳米颗粒、肽、蛋白质、用多核苷酸、初级构建体或mmRNA转染的细胞(例如，用于移植到受试者中)、透明质酸酶、纳米颗粒模拟物以及其组合。因此，本发明的制剂可包括各自以一定的量存在的一种或多种赋形剂，所述量合起来增加多核苷酸、初级构建体或mmRNA的稳定性、增加由多核苷酸、初级构建体或mmRNA进行的细胞转染、增加多核苷酸、初级构建体或mmRNA编

码的蛋白质的表达和/或改变多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码的蛋白质的释放概况。此外，本发明的初级构建体和mmRNA可使用自组装核酸纳米颗粒来配制。

[0785] 本文描述的药物组合物的制剂可通过药理学领域中已知或此后开发的任何方法来制备。通常，此类制备方法包括使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分缔合的步骤。

[0786] 根据本公开的药物组合物可以单一单位剂量和/或以多个单一单位剂量大批量制备、包装和/或销售。如本文所使用，“单位剂量”是指包含预先确定的量的活性成分的药物组合物的个别量。活性成分的量可通常等于将要向受试者施用的活性成分的剂量和/或这种剂量的合宜分数，包括但不限于这种剂量的一半或三分之一。

[0787] 根据本公开的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何另外成分的相对量可取决于所治疗的受试者的身份、尺寸和/或病状并且进一步取决于待施用组合物的途径而改变。例如，组合物可包含0.1％与99％(w/w)之间的活性成分。

[0788] 在一些实施方案中，本文描述的制剂可含有至少一种mmRNA。作为一个非限制性实例，制剂可含有1、2、3、4或5种mmRNA。在一个实施方案中，制剂可含有编码选自以下分类的蛋白质的修饰mRNA，所述蛋白质分类例如但不限于人蛋白质、兽用蛋白质、细菌蛋白质、生物蛋白质、抗体、免疫原性蛋白、治疗性肽和蛋白质、分泌蛋白、质膜蛋白、胞质蛋白和细胞骨架蛋白、细胞内膜结合蛋白、核蛋白、与人类疾病相关的蛋白质和/或与非人类疾病相关的蛋白质。在一个实施方案中，制剂含有至少三种编码蛋白质的修饰mRNA。在一个实施方案中，制剂含有至少五种编码蛋白质的修饰mRNA。

[0789] 药物制剂可另外包含药学上可接受的赋形剂，如本文所使用的赋形剂包括但不限于适合于所希望的具体剂型的任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂等。用于配制药物组合物的各种赋形剂和用于制备组合物的技术为本领域中已知的(参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro,Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006;以引用的方式整体并入本文)。常规赋形剂介质的使用可涵盖在本公开的范围内，除了如通过产生任何不希望的生物作用或另外以有害的方式与药物组合物的任何其它组分相互作用而可能与物质或其衍生物不相容的任何常规赋形剂介质。

[0790] 在一些实施方案中，可增加和/或减小脂质纳米颗粒的粒度。粒度的变化可能够帮助抵消生物反应例如但不限于炎症或可增加递送至哺乳动物的修饰mRNA的生物作用。

[0791] 在药物组合物的制造中使用的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、表面活性剂和/或乳化剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。此类赋形剂可任选包括在本发明的药物制剂中。

[0792] 类脂质

[0793] 已广泛描述了类脂质的合成并且含有这些化合物的制剂特别适用于递送多核苷酸、初级构建体或mmRNA(参见Mahon等,Bioconjug Chem.2010 21:1448-1454;Schroeder等,J Intern Med.2010 267:9-21;Akinc等,Nat Biotechnol.2008 26:561-569;Love等,Proc Natl Acad Sci U S A.2010 107:1864-1869;Siegwart等,Proc Natl Acad Sci U S A.2011 108:12996-3001;所有所述参考文献均整体并入本文)。

[0794] 虽然这些类脂质已用来在啮齿动物和非人灵长类动物体内有效递送双链小干扰

RNA分子(参见Akinc等,Nat Biotechnol.2008 26:561-569;Frank-Kamenetsky等,Proc Natl Acad Sci U S A.2008 105:11915-11920;Akinc等,Mol Ther.2009 17:872-879;Love等,Proc Natl Acad Sci U S A.2010 107:1864-1869;Leuschner等,Nat Biotechnol.2011 29:1005-1010;所有所述参考文献均整体并入本文),但是本公开描述了其配制和在递送单链多核苷酸、初级构建体或mmRNA中的用途。复合物、胶束、脂质体或颗粒可制备成含有这些类脂质并且因此可产生多核苷酸、初级构建体或mmRNA的有效递送,如通过局部和/或系统施用途径注射类脂质制剂之后产生编码的蛋白质所判断的。多核苷酸、初级构建体或mmRNA的类脂质复合物可通过各种方式施用,包括但不限于静脉内途径、肌内途径或皮下途径。

[0795] 核酸的体内递送可受许多参数包括但不限于制剂组成、颗粒PEG化的性质、负载程度、寡核苷酸与脂质比率以及生物物理参数如但不限于粒度所影响(Akinc等,Mol Ther.2009 17:872-879;其以引用的方式整体并入本文)。作为一个实例,聚(乙二醇)(PEG)脂质的锚链长度的小变化可对体内功效产生显著影响。可测试具有不同类脂质的制剂的体内活性,所述类脂质包括但不限于五[3-(1-月桂基氨基丙酰基)]-三亚乙基四胺盐酸盐(TETA-5LAP;又名98N12-5,参见Murugaiah等,Analytical Biochemistry,401:61(2010);其以引用的方式整体并入本文)、C12-200(包括衍生物和变体)和MD1。

[0796] 本文称为“98N12-5”的类脂质由Akinc等,Mol Ther.200917:872-879公开并且其以引用的方式整体并入。(参见图2)

[0797] 本文称为“C12-200”的类脂质由Love等,Proc Natl Acad Sci U S A.2010 107:1864-1869(参见图2)以及Liu和Huang,Molecular Therapy.2010 669-670(参见图2)公开;所述参考文献均以引用的方式整体并入本文。类脂质制剂可包括除了多核苷酸、初级构建体或mmRNA之外还包含3或4种或更多种组分的颗粒。作为一个实例,具有某些类脂质的制剂包括但不限于98N12-5并且可含有42%类脂质、48%胆固醇和10%PEG(C14烷基链长度)。作为另一个实例,具有某些类脂质的制剂包括但不限于C12-200并且可含有50%类脂质、10%二硬脂酰磷脂酰胆碱、38.5%胆固醇以及1.5%PEG-DMG。

[0798] 在一个实施方案中,用类脂质配制的用于系统静脉内施用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可靶向肝脏。例如,最终优化的静脉内制剂可引起制剂大于90%分布至肝脏,所述最终优化的静脉内制剂使用多核苷酸、初级构建体或mmRNA,并且包含42%98N12-5、48%胆固醇和10%PEG-脂质的脂质摩尔组成,约7.5比1的总脂质比多核苷酸、初级构建体或mmRNA的最终重量比,以及在PEG脂质上的C14烷基链长度,且平均粒度为大约50-60nm。(参见,Akinc等,Mol Ther.2009 17:872-879;其以引用的方式整体并入本文)。在另一个实例中,使用C12-200(参见美国临时申请61/175,770和公布的国际申请WO2010129709,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文)类脂质的静脉内制剂可具有50/10/38.5/1.5的C12-200/二硬脂酰磷脂酰胆碱/胆固醇/PEG-DMG的摩尔比,7比1的总脂质比多核苷酸、初级构建体或mmRNA的重量比,且平均粒度为80nm,其可有效于将多核苷酸、初级构建体或mmRNA递送至肝细胞(参见,Love等,Proc Natl Acad Sci U S A.2010 107:1864-1869,其以引用的方式整体并入本文)。在另一个实施方案中,含MD1类脂质的制剂可用来在体内有效地将多核苷酸、初级构建体或mmRNA递送至肝细胞。用于肌内途径或皮下途径的优化类脂质制剂的特征可取决于靶细胞类型和制剂扩散穿过细胞外基质进入血流的能力而显著变化。虽然由于

内皮窗孔(endothelial fenestrae)的大小,可能希望小于150nm的粒度用于有效肝细胞递送(参见,Akinc等,Mol Ther.2009 17:872-879,其以引用的方式整体并入本文),但是使用类脂质配制的多核苷酸、初级构建体或mmRNA将制剂递送至其它细胞类型(包括但不限于内皮细胞、骨髓细胞和肌细胞)可不受类似大小限制。已报道使用类脂质制剂将siRNA体内递送至其它非肝细胞的细胞如骨髓细胞和内皮(参见Akinc等,Nat Biotechnol.2008 26:561-569;Leuschner等,Nat Biotechnol.2011 29:1005-1010;Cho等Adv.Funct.Mater.2009 19:3112-3118;第8届International Judah Folkman Conference,Cambridge,MA October 8-9,2010;所述参考文献各自均以引用的方式整体并入本文)。有效递送至骨髓细胞如单核细胞的类脂质制剂可具有类似的组分摩尔比。类脂质与其它组分包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-DMG的不同比率可用来优化用于递送至不同细胞类型(包括但不限于肝细胞、骨髓细胞、肌细胞等)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的配制。例如,组分摩尔比可包括但不限于50%C12-200、10%二硬脂酰磷脂酰胆碱、38.5%胆固醇和%1.5PEG-DMG(参见Leuschner等,Nat Biotechnol 2011 29:1005-1010;其以引用的方式整体并入本文)。通过皮下或肌内递送来使用用于将核酸局部递送至细胞(例如但不限于脂肪细胞和肌细胞)的类脂质制剂可不需要系统递送所希望的所有制剂组分,并且因此可仅包含类脂质和多核苷酸、初级构建体或mmRNA。

[0799] 不同类脂质的组合可用来改进多核苷酸、初级构建体或mmRNA引导的蛋白质产生的功效,因为类脂质可能够增加由多核苷酸、初级构建体或mmRNA进行的细胞转染;和/或增加编码的蛋白质的翻译(参见Whitehead等,Mol.Ther.2011,19:1688-1694,其以引用的方式整体并入本文)。

[0800] 脂质体、脂质复合物和脂质纳米颗粒

[0801] 可使用一种或多种脂质体、脂质复合物或脂质纳米颗粒配制本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA的药物组合物包括脂质体。脂质体为人工制备的囊泡,其可主要由脂质双层组成并且可用作用于施用营养物和药物制剂的递送媒介物。脂质体可具有不同大小,例如但不限于直径可为数百纳米并且可含有被狭窄含水区室分开的一系列同心双层的多层囊泡(MLV)、直径可小于50nm的小单细胞囊泡(SUV)以及直径可在50nm与500nm之间的大单细胞囊泡(LUV)。脂质体设计可包括但不限于调理素或配体,以便改进脂质体对不健康组织的附着或启动诸如但不限于胞吞的事件。脂质体可含有低或高pH以便改进药物制剂的递送。

[0802] 脂质体的形成可取决于物理化学特征,例如但不限于包埋的药物制剂和脂质体成分、其中分散脂质囊泡的介质的性质、所包埋物质的有效浓度和其潜在毒性、在囊泡的施加和/或递送过程中涉及的任何另外过程、用于预期应用的囊泡的优化大小、多分散性和保质期,以及大规模生产安全有效的脂质体产品的批与批之间的再现性和可能性。

[0803] 在一个实施方案中,本文描述的药物组合物可包括但不限于脂质体,如从以下物质形成的那些:1,2-二油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)脂质体、来自Marina Biotech(Bothell,WA)的DiLa2脂质体、1,2-二亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)和MC3(US20100324120;其以引用的方式整体并入本文),以及可递送小分子药物的脂质体,如但不限于来自Janssen Biotech,Inc.(Horsham,PA)的DOXIL®。

[0804] 在一个实施方案中，本文描述的药物组合物可包括但不限于脂质体，如从合成先前已描述并且示出适用于体外和体内寡核苷酸递送的稳定质粒-脂质颗粒(SPLP)或稳定核酸脂质颗粒(SNALP)而形成的那些(参见Wheeler等Gene Therapy.1999 6:271-281;Zhang等Gene Therapy.1999 6:1438-1447;Jeffs等Pharm Res.2005 22:362-372;Morrissey等,Nat Biotechnol.2005 2:1002-1007;Zimmermann等,Nature.2006 441:111-114;Heyes等J Contr Rel.2005 107:276-287;Semple等Nature Biotech.2010 28:172-176;Judge等J Clin Invest.2009 119:661-673;deFougerolles Hum Gene Ther.2008 19:125-132;所有所述参考文献均整体并入本文)。Wheeler等的原始制造方法为清洁剂透析方法，其后来被Jeffs等改进并且称为自发囊泡形成方法。除了多核苷酸、初级构建体或mmRNA之外，脂质体制剂主要由3至4种脂质组分组成。作为一个实例，脂质体可含有但不限于如Jeffs等所述的55％胆固醇、20％二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、10％PEG-S-DSG以及15％1,2-二油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)。作为另一个实例，某些脂质体制剂可含有但不限于如Heyes等所述的48％胆固醇、20％DSPC、2％PEG-c-DMA以及30％阳离子脂质，其中阳离子脂质可为1,2-二硬脂氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、DODMA、DLin-DMA或1,2-二亚麻酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)。

[0805] 在一个实施方案中，药物组合物可包括脂质体，其可形成以递送可编码至少一种免疫原的mmRNA。mmRNA可被脂质体包封和/或它可包含在然后可被脂质体包封的含水核中(参见国际公布号WO2012031046、WO2012031043、WO2012030901和WO2012006378;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文)。在另一个实施方案中，可编码免疫原的mmRNA可配制在阳离子性水包油乳剂中，其中乳剂颗粒包含油核和阳离子脂质，阳离子脂质与mmRNA相互作用从而将所述分子锚定至乳剂颗粒(参见国际公布号WO2012006380;其以引用的方式整体并入本文)。在又另一个实施方案中，脂质制剂可包括至少阳离子脂质、可增强转染的脂质以及含有连接至脂质部分的亲水头基的至少一种脂质(国际公布号WO2011076807和美国公布号20110200582;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文)。在另一个实施方案中，编码免疫原的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在脂质囊泡中，脂质囊泡可在官能化的脂质双层之间具有交联(参见美国公布号20120177724，其以引用的方式整体并入本文)。

[0806] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在脂质囊泡中，脂质囊泡可在官能化的脂质双层之间具有交联。

[0807] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在包含阳离子脂质的脂质体中。脂质体的阳离子脂质中的氮原子与RNA中的磷酸酯的摩尔比(N:P比)可在1:1与20:1之间，如在国际公布号WO2013006825中所述，其以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中，脂质体的N:P比可为大于20:1或小于1:1。

[0808] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在脂质-聚阳离子复合物中。脂质-聚阳离子复合物的形成可通过本领域中已知和/或如在美国公布号20120178702中所述的方法来完成，所述专利以引用的方式整体并入本文。作为一个非限制性实例，聚阳离子可包括阳离子肽或多肽例如但不限于聚赖氨酸、聚鸟氨酸和/或聚精氨酸以及在国际公布号WO2012013326中描述的阳离子肽;所述专利以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在脂质-聚阳离子复合

物中,脂质-聚阳离子复合物可进一步包括中性脂质如但不限于胆固醇或二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0809] 脂质体制剂可受(但不限于)以下因素影响:阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和度、PEG化的性质、所有组分比率以及生物物理参数如大小。在Semple等(Semple等Nature Biotech.2010 28:172-176;其以引用的方式整体并入本文)的一个实例中,脂质体制剂主要由57.1%阳离子脂质、7.1%二棕榈酰磷脂酰胆碱、34.3%胆固醇以及1.4%PEG-c-DMA组成。作为另一个实例,改变阳离子脂质的组成可更有效地将siRNA递送至各种抗原呈递细胞(Basha等Mol Ther.201119:2186-2200;其以引用的方式整体并入本文)。

[0810] 在一些实施方案中,可增加或减小脂质纳米颗粒(LNP)制剂中的PEG比率和/或可将PEG脂质的碳链长度从C14修改至C18以改变LNP制剂的药物代谢动力学和/或生物分布。作为一个非限制性实例,与阳离子脂质、DSPC和胆固醇相比,LNP制剂可含有1%-5%的PEG-c-DOMG的脂质摩尔比。在另一个实施方案中,PEG-c-DOMG可被PEG脂质替代,所述PEG脂质例如但不限于PEG-DSG(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油、甲氧基聚乙二醇)或PEG-DPG(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油、甲氧基聚乙二醇)。阳离子脂质可选自本领域中已知的任何脂质,例如但不限于DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200和DLin-KC2-DMA。

[0811] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可配制在脂质纳米颗粒中,如在国际公布号WO2012170930中描述的那些,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0812] 在一个实施方案中,阳离子脂质可选自但不限于在国际公布号WO2012040184、WO2011153120、WO2011149733、WO2011090965、WO2011043913、WO2011022460、WO2012061259、WO2012054365、WO2012044638、WO2010080724、WO201021865和WO2008103276、美国专利号7,893,302、7,404,969和8,283,333以及美国专利公布号US20100036115和US20120202871中描述的阳离子脂质;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中,阳离子脂质可选自但不限于在国际公布号WO2012040184、WO2011153120、WO2011149733、WO2011090965、WO2011043913、WO2011022460、WO2012061259、WO2012054365和WO2012044638中描述的式A;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。在又另一个实施方案中,阳离子脂质可选自但不限于国际公布号WO2008103276的式CLI-CLXXIX、美国专利号7,893,302的式CLI-CLXXIX、美国专利号7,404,969的式CLI-CLXXXXII以及美国专利公布号US20100036115的式I-VI;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。作为一个非限制性实例,阳离子脂质可选自(20Z,23Z)-N,N-二甲基二十九-20,23-二烯-10-胺、(17Z,20Z)-N,N-二甲基二十六-17,20-二烯-9-胺、(1Z,19Z)-N5N-二甲基二十五-16,19-二烯-8-胺、(13Z,16Z)-N,N-二甲基二十二-13,16-二烯-5-胺、(12Z,15Z)-N,N-二甲基二十一-12,15-二烯-4-胺、(14Z,17Z)-N,N-二甲基二十三-14,17-二烯-6-胺、(15Z,18Z)-N,N-二甲基二十四-15,18-二烯-7-胺、(18Z,21Z)-N,N-二甲基二十七-18,21-二烯-10-胺、(15Z,18Z)-N,N-二甲基二十四-15,18-二烯-5-胺、(14Z,17Z)-N,N-二甲基二十三-14,17-二烯-4-胺、(19Z,22Z)-N,N-二甲基二十八-19,22-二烯-9-胺、(18Z,21Z)-N,N-二甲基二十七-18,21-二烯-8-胺、(17Z,20Z)-N,N-二甲基二十六-17,20-二烯-7-胺、(16Z,19Z)-N,N-二甲基二十五-16,19-二烯-6-胺、(22Z,25Z)-N,N-二甲基三十一-22,25-二烯-10-胺、(21Z,24Z)-N,N-二甲基三十-21,24-二烯-9-胺、(18Z)-N,N-二甲基二十七-18-烯-10-胺、(17Z)-N,N-二甲基二十六-17-烯-9-胺、(19Z,22Z)-N,N-二甲

基二十八-19,22-二烯-7-胺、N,N-二甲基二十七-10-胺、(20Z,23Z)-N-乙基-N-甲基二十九-20,23-二烯-10-胺、1-[(11Z,14Z)-1-壬基二十-11,14-二烯-1-基]吡咯烷、(20Z)-N,N-二甲基二十七-20-烯-10-胺、(15Z)-N,N-二甲基二十七-15-烯-10-胺、(14Z)-N,N-二甲基二十九-14-烯-10-胺、(17Z)-N,N-二甲基二十九-17-烯-10-胺、(24Z)-N,N-二甲基三十三-24-烯-10-胺、(20Z)-N,N-二甲基二十九-20-烯-10-胺、(22Z)-N,N-二甲基三十一-22-烯-10-胺、(16Z)-N,N-二甲基二十五-16-烯-8-胺、(12Z,15Z)-N,N-二甲基-2-壬基二十一-12,15-二烯-1-胺、(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二-13,16-二烯-1-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十七-8-胺、1-[(1S,2R)-2-己基环丙基]-N,N-二甲基十九-10-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十九-10-胺、N,N-二甲基-21-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]二十一-10-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-戊基环丙基]甲基}环丙基]十九-10-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十六-8-胺、N,N-二甲基-[(1R,2S)-2-十一烷基环丙基]十四-5-胺、N,N-二甲基-3-{7-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]庚基}十二-1-胺、1-[(1R,2S)-2-庚基环丙基]-N,N-二甲基十八-9-胺、1-[(1S,2R)-2-癸基环丙基]-N,N-二甲基十五-6-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十五-8-胺、R-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺、S-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺、1-{2-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-1-[(辛基氧基)甲基]乙基}吡咯烷、(2S)-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-3-[(5Z)-辛-5-烯-1-基氧基]丙-2-胺、1-{2-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-1-[(辛基氧基)甲基]乙基}氮杂环丁烷、(2S)-1-(己基氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、(2S)-1-(庚基氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-(壬基氧基)-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-[(9Z)-十八-9-烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺;(2S)-N,N-二甲基-1-[(6Z,9Z,12Z)-十八-6,9,12-三烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺、(2S)-1-[(11Z,14Z)-二十-11,14-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(戊基氧基)丙-2-胺、(2S)-1-(己基氧基)-3-[(11Z,14Z)-二十-11,14-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基丙-2-胺、1-[(11Z,14Z)-二十-11,14-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、1-[(13Z,16Z)-二十二-13,16-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、(2S)-1-[(13Z,16Z)-二十二-13,16-二烯-1-基氧基]-3-(己基氧基)-N,N-二甲基丙-2-胺、(2S)-1-[(13Z)-二十二-13-烯-1-基氧基]-3-(己基氧基)-N,N-二甲基丙-2-胺、1-[(13Z)-二十二-13-烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、1-[(9Z)-十六-9-烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、(2R)-N,N-二甲基-H(1-甲酰基辛基)氧基]-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、(2R)-1-[(3,7-二甲基辛基)氧基]-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-(辛基氧基)-3-({8-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-戊基环丙基]甲基}环丙基]辛基}氧基)丙-2-胺、N,N-二甲基-1-{[8-(2-辛基环丙基)辛基]氧基}-3-(辛基氧基)丙-2-胺以及(11E,20Z,23Z)-N,N-二甲基二十九-11,20,2-三烯-10-胺或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0813] 在一个实施方案中,脂质可为可裂解的脂质,如在国际公布号WO2012170889中描述的那些,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0814] 在一个实施方案中，阳离子脂质可通过本领域中已知和/或如在国际公布号WO2012040184、WO2011153120、WO2011149733、WO2011090965、WO2011043913、WO2011022460、WO2012061259、WO2012054365、WO2012044638、WO2010080724和WO201021865中所述的方法合成；所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0815] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的LNP制剂可含有3％脂质摩尔比下的PEG-c-DOMG。在另一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的LNP制剂可含有1.5％脂质摩尔比下的PEG-c-DOMG。

[0816] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的药物组合物可包括在国际公布号2012099755中描述的至少一种PEG化的脂质，所述专利以引用的方式并入本文。

[0817] 在一个实施方案中，LNP制剂可含有PEG-DMG 2000(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000)。在一个实施方案中，LNP制剂可含有PEG-DMG 2000、本领域中已知的阳离子脂质以及至少一种其它组分。在另一个实施方案中，LNP制剂可含有PEG-DMG 2000、本领域中已知的阳离子脂质、DSPC以及胆固醇。作为一个非限制性实例，LNP制剂可含有PEG-DMG 2000、DLin-DMA、DSPC以及胆固醇。作为另一个非限制性实例，LNP制剂可含有摩尔比为2:40:10:48的PEG-DMG 2000、DLin-DMA、DSPC以及胆固醇(参见例如Geall等,Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines,PNAS 2012;PMID:22908294;其以引用的方式整体并入本文)。作为另一个非限制性实例，本文描述的修饰RNA可配制在如美国公布号20120207845中所述的待通过肠胃外途径递送的纳米颗粒中；所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0818] 在一个实施方案中，LNP制剂可通过在国际公布号WO2011127255或WO2008103276中描述的方法配制，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。作为一个非限制性实例，本文描述的修饰RNA可包封在如WO2011127255和/或WO2008103276中所述的LNP制剂中；所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0819] 在一个实施方案中，本文描述的LNP制剂可包含聚阳离子组合物。作为一个非限制性实例，聚阳离子组合物可选自美国专利公布号US20050222064的式1-60；所述专利以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中，包含聚阳离子组合物的LNP制剂可用于在体内和/或在体外递送本文描述的修饰RNA。

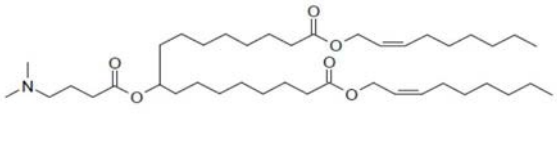
[0820] 在一个实施方案中，本文描述的LNP制剂可另外包含穿透增强剂分子。非限制性的穿透增强剂分子在美国专利公布号US20050222064中描述；所述专利以引用的方式整体并入本文。

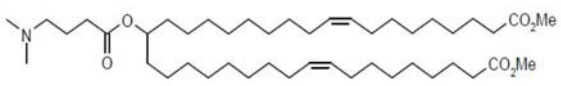
[0821] 在一个实施方案中，药物组合物可配制在脂质体中，例如但不限于DiLa2脂质体(Marina Biotech,Bothell,WA)、SMARTICLES®(Marina Biotech,Bothell,WA)、基于DOPC(1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)的中性脂质体(例如，用于卵巢癌的siRNA递送(Landen等Cancer Biology&Therapy 2006 5(12)1708-1713)；其以引用的方式整体并入本文)以及透明质酸涂覆的脂质体(Quiet Therapeutics,Israel)。

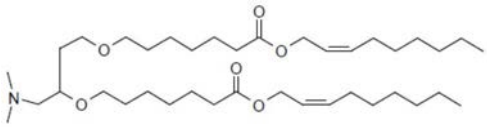
[0822] 纳米颗粒制剂可为包含碳水化合物载体和修饰核酸分子(例如，mmRNA)的碳水化合物纳米颗粒。作为一个非限制性实例，碳水化合物载体可包括但不限于酸酐修饰的植物糖原或糖原型材料、辛烯基琥珀酸植物糖原、植物糖原β-糊精、酸酐修饰的植物糖原β-糊精。(参见例如国际公布号WO2012109121；其以引用的方式整体并入本文)。

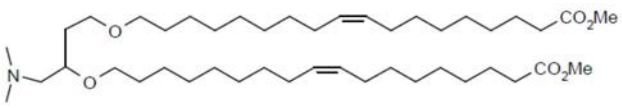
[0823] 可通过用称为快速消除型脂质纳米颗粒(reLNP)的生物可降解阳离子脂质替代所述阳离子脂质来改进脂质纳米颗粒制剂。已显示可电离的阳离子脂质如但不限于DLinDMA、DLin-KC2-DMA和DLin-MC3-DMA随时间推移在血浆和组织中积累并且可为潜在的毒性来源。快速消除型脂质的快速代谢可使脂质纳米颗粒在大鼠中的耐受性和治疗指数提高从1mg/kg剂量至10mg/kg剂量的数量级。包括酶促降解的酯键可改进阳离子组分的降解和代谢概况,同时仍维持reLNP制剂的活性。酯键可位于脂质链的内部或它可位于脂质链的终端上。内酯键可替代脂质链中的任何碳。

[0824] 在一个实施方案中,内酯键可位于饱和碳的任一侧上。reLNP的非限制性实例包括:

[0825] 





以及  。

[0826] 在一个实施方案中,可通过递送可包括纳米种类、聚合物和免疫原的脂质纳米颗粒来引发免疫应答。(美国公布号20120189700和国际公布号WO2012099805;其各自均以引用的方式整体并入本文)。聚合物可包封纳米种类或部分地包封纳米种类。免疫原可为重组蛋白、修饰RNA和/或本文描述的初级构建体。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒可配制用于诸如但不限于抵抗病原体的疫苗中。

[0827] 可对脂质纳米颗粒工程化以改变颗粒的表面性质,使得脂质纳米颗粒可穿透粘膜屏障。粘液位于粘膜组织上,例如但不限于口腔(例如,口腔和食道膜和扁桃体组织)、眼、胃肠(例如,胃、小肠、大肠、结肠、直肠)、鼻、呼吸道(例如,鼻、咽、气管和支气管膜)、生殖器(例如,阴道、宫颈和尿道膜)的粘膜组织。优选用于较高药物包封效率和能够提供广泛药物持续递送的大于10-200nm的纳米颗粒已被认为太大而不能快速扩散穿过粘膜屏障。粘液连续分泌、流出、丢弃或消化和再循环,所以大多数捕获的颗粒可在几秒内或在几小时内从粘膜组织上除去。已密集涂覆有低分子量聚乙二醇(PEG)的大聚合物纳米颗粒(直径为200nm-500nm)仅以低于相同颗粒在水中扩散程度的4至6倍的程度扩散穿过粘液(Lai等PNAS 2007 104(5):1482-487;Lai等Adv Drug Deliv Rev.2009 61(2):158-171;所述参考文献各自均以引用的方式整体并入本文)。可使用穿透速率和/或荧光显微镜技术确定纳米颗粒的转运,所述技术包括但不限于荧光漂白恢复(FRAP)和高分辨率多颗粒追踪(MPT)。作为一个非限制性实例,可穿透粘膜屏障的组合物可根据美国专利号8,241,670中所述制得,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0828] 工程化以穿透粘液的脂质纳米颗粒可包含聚合物材料(即聚合物核)和/或聚合物-维生素缀合物和/或三嵌段共聚物。聚合物材料可包括但不限于聚胺、聚醚、聚酰胺、聚酯、聚氨基甲酸酯、聚脲、聚碳酸酯、聚(苯乙烯)、聚酰亚胺、聚砜、聚氨酯、聚乙炔、聚乙烯、

聚乙烯亚胺、聚异氰酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈以及聚芳酯。聚合物材料可为生物可降解和/或生物相容的。聚合物材料可另外受到辐射。作为一个非限制性实例，聚合物材料可受到γ辐射(参见例如国际申请号WO201282165，其以引用的方式整体并入本文)。具体聚合物的非限制性实例包括聚(己内酯)(PCL)、乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)(PLLGA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLA)、聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PPO-共-D,L-共)、聚氰基丙烯酸烷基酯、聚氨酯、聚-L-赖氨酸(PLL)、甲基丙烯酸羟丙酯(HPMA)、聚乙二醇、聚-L-谷氨酸、聚(羟基酸)、聚酸酐、聚原酸酯、聚(酯酰胺)、聚酰胺、聚(酯醚)、聚碳酸酯、聚烯烃如聚乙烯和聚丙烯、聚亚烷基二醇如聚(乙二醇)(PEG)、聚环氧烷(PEO)、聚对苯二甲酸亚烷基酯如聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醚、聚乙烯酯如聚(乙酸乙烯酯)、聚乙烯卤化物如聚(氯乙烯)(PVC)、聚乙烯吡咯烷酮、聚硅氧烷、聚苯乙烯(PS)、聚氨酯、衍生的纤维素如烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸的聚合物如聚((甲基)丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷基酯)及其共聚物和混合物、聚二氧杂环己酮和其共聚物、聚羟基烷羧酸酯、聚丙二醇富马酸酯、聚甲醛、泊洛沙姆(poloxamer)、聚(原酸)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己内酯)以及三亚甲基碳酸酯、聚乙烯吡咯烷酮。脂质纳米颗粒可涂覆有共聚物或与其缔合，例如但不限于嵌段共聚物(如在国际公布号WO2013012476中描述的支链聚醚-聚酰胺嵌段共聚物，所述专利以引用的方式整体并入本文)和(聚(乙二醇))-(聚(环氧丙烷))-(聚(乙二醇))三嵌段共聚物(参见例如美国公布20120121718和美国公布20100003337以及美国专利号8,263,665;其各自均以引用的方式整体并入本文)。共聚物可为一般认为安全的(GRAS)聚合物并且脂质纳米颗粒的形成可以没有新化学实体产生的方式进行。例如，脂质纳米颗粒可包含涂覆PLGA纳米颗粒而没有形成新化学实体的泊洛沙姆，其仍然能够快速穿透人粘液(Yang等Angew.Chem.Int.Ed.2011 50:2597-2600;其以引用的方式整体并入本文)。

[0829] 聚合物-维生素缀合物的维生素可为维生素E。缀合物的维生素部分可被其它合适的组分取代，例如但不限于维生素A、维生素E、其它维生素、胆固醇、疏水部分或其它表面活性剂的疏水组分(例如，甾醇链、脂肪酸、烃链和环氧烷链)。

[0830] 工程化以穿透粘液的脂质纳米颗粒可包括表面改变剂如但不限于mmRNA、阴离子蛋白质(例如，牛血清白蛋白)、表面活性剂(例如，阳离子表面活性剂例如像二甲基双十八烷基溴化铵)、糖或糖衍生物(例如，环糊精)、核酸、聚合物(例如，肝素、聚乙二醇和泊洛沙姆)、粘液溶解剂(例如，N-乙酰半胱氨酸、艾蒿、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、龙吐珠(clerodendrum)、乙酰半胱氨酸、溴己新(bromhexine)、羧甲司坦(carbocisteine)、依普拉酮(eprazinone)、美司钠(mesna)、氨溴索(ambroxol)、索布瑞醇(sobrerol)、多米奥醇(domiodol)、来托司坦(letosteine)、司替罗宁(stepronin)、硫普罗宁(tiopronin)、凝溶胶蛋白、胸腺素β4阿法链道酶、奈替克新(neltenexine)、厄多司坦(erdosteine))以及各种

DNA酶包括rhDNA酶。表面改变剂可包埋或嵌入在颗粒的表面中或安置(例如,通过涂覆、吸附、共价连接或其它方法)在脂质纳米颗粒的表面上。(参见例如美国公布20100215580和美国公布20080166414;其以引用的方式整体并入本文)。

[0831] 粘液穿透脂质纳米颗粒可包含至少一种本文描述的mmRNA。mmRNA可包封在脂质纳米颗粒中和/或安置在颗粒的表面上。mmRNA可共价偶联至脂质纳米颗粒。粘液穿透脂质纳米颗粒的制剂可包含多个纳米颗粒。此外,制剂可含有可与粘液相互作用并且改变周围粘液的结构和/或粘着性质以减少粘膜粘附的颗粒,从而可增加粘液穿透脂质纳米颗粒向粘膜组织递送。

[0832] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA配制为脂质复合物,例如但不限于ATUPLEX™系统、DACC系统、DBTC系统和来自Silence Therapeutics(London,United Kingdom)的其它siRNA-脂质复合物技术;来自STEMGENT®(Cambridge,MA)的STEMFECT™以及基于聚乙烯亚胺(PEI)或鱼精蛋白的靶向和非靶向核酸递送(Aleku等,Cancer Res.2008 68:9788-9798;Strumberg等,Int J Clin Pharmacol Ther 2012 50:76-78;Santel等,Gene Ther 2006 13:1222-1234;Santel等,Gene Ther 2006 13:1360-1370;Gutbier等,Pulm Pharmacol.Ther.2010 23:334-344;Kaufmann等,Microvasc Res 2010 80:286-293;Weide等,J Immunother.2009 32:498-507;Weide等,J Immunother.2008 31:180-188;Pascolo Expert Opin.Biol.Ther.4:1285-1294;Fotin-Mleczek等,2011J.Immunother.34:1-15;Song等,Nature Biotechnol.2005,23:709-717;Peer等,Proc Natl Acad Sci U S A.2007 6;104:4095-4100;deFougerolles Hum Gene Ther.2008 19:125-132;所有所述参考文献均以引用的方式整体并入本文)。

[0833] 在一个实施方案中,此类制剂还可构建为或组合物可改变为使得其在体内被动或主动指向不同细胞类型,所述细胞类型包括但不限于肝细胞、免疫细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、抗原呈递细胞以及白细胞(Akinc等Mol Ther.2010 18:1357-1364;Song等,Nat Biotechnol.2005 23:709-717;Judge等,J Clin Invest.2009 119:661-673;Kaufmann等,Microvasc Res 2010 80:286-293;Santel等,Gene Ther 2006 13:1222-1234;Santel等,Gene Ther 2006 13:1360-1370;Gutbier等,Pulm Pharmacol.Ther.2010 23:334-344;Basha等,Mol.Ther.201119:2186-2200;Fenske和Cullis,Expert Opin Drug Deliv.2008 5:25-44;Peer等,Science.2008 319:627-630;Peer和Lieberman,Gene Ther.2011 18:1127-1133;所有所述参考文献均以引用的方式整体并入本文)。制剂被动靶向肝脏细胞的一个实例包括基于DLin-DMA、DLin-KC2-DMA和DLin-MC3-DMA的脂质纳米颗粒制剂,其已显示可结合载脂蛋白E并且在体内促进这些制剂结合和吸收到肝细胞中(Akinc等,Mol Ther.2010 18:1357-1364;其以引用的方式整体并入本文)。制剂还可通过其表面上不同配体的表达而选择性靶向,例如但不限于通过叶酸、转铁蛋白、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)以及抗体靶向的方法所举例说明(Kolhatkar等,Curr Drug Discov Technol.2011 8:197-206;Musacchio和Torchilin,Front Biosci.2011 16:1388-1412;Yu等,Mol Membr Biol.2010 27:286-298;Patil等,Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.2008 25:1-61;Benoit等,Biomacromolecules.2011 12:2708-2714;Zhao等,Expert Opin Drug Deliv.2008 5:309-319;Akinc等,Mol Ther.2010 18:1357-1364;Srinivasan等,Methods Mol Biol.2012 820:105-116;Ben-Arie等,Methods Mol Biol.2012 757:497-507;Peer 2010J Control

Release.20:63-68;Peer等,Proc Natl Acad Sci U S A.2007 104:4095-4100;Kim等,Methods Mol Biol.2011 721:339-353;Subramanya等,Mol Ther.2010 18:2028-2037;Song等,Nat Biotechnol.2005 23:709-717;Peer等,Science.2008 319:627-630;Peer和Lieberman,Gene Ther.2011 18:1127-1133;所有所述参考文献均以引用的方式整体并入本文)。

[0834] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA配制为固体脂质纳米颗粒。固体脂质纳米颗粒(SLN)可为球形的,其中平均直径在10nm至1000nm之间。SLN拥有可使亲脂分子溶解并且可用表面活性剂和/或乳化剂稳定的固体脂质核基质。在另外的实施方案中,脂质纳米颗粒可为自组装脂质-聚合物纳米颗粒(参见Zhang等,ACS Nano,2008,2(8),第1696-1702页;其以引用的方式整体并入本文)。

[0835] 脂质体、脂质复合物或脂质纳米颗粒可用来改进多核苷酸、初级构建体或mmRNA引导的蛋白质产生的功效,因为这些制剂可能够增加由多核苷酸、初级构建体或mmRNA进行的细胞转染;和/或增加编码的蛋白质的翻译。这样一个实例涉及使用脂质包封来实现聚合复合物(polyplex)质粒DNA的有效系统递送(Heyes等,Mol Ther.2007 15:713-720;其以引用的方式整体并入本文)。脂质体、脂质复合物或脂质纳米颗粒还可用来增加多核苷酸、初级构建体或mmRNA的稳定性。

[0836] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制用于控制释放和/或靶向递送。如本文所使用,“控制释放”是指遵循用于实现治疗结果的具体释放模式的药物组合物或化合物释放概况。在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包封到本文描述和/或本领域中已知用于控制释放和/或靶向递送的递送剂中。如本文所使用,术语“包封”意指封住、包围或包住。在它涉及本发明化合物的制剂时,包封可为大致上的、完全的或部分的。术语“大致上包封”意指至少大于50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.9%或大于99.999%的本发明的药物组合物或化合物可在递送剂内封住、包围或包住。“部分包封”意指小于10%、10%、20%、30%、40%、50%或更少的本发明的药物组合物或化合物可在递送剂内封住、包围或包住。有利地,可通过使用荧光和/或电子显微照片测量本发明的药物组合物或化合物的逸出或活性来确定包封。例如,至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或大于99.99%的本发明的药物组合物或化合物包封在递送剂中。

[0837] 在一个实施方案中,控制释放制剂可包括但不限于三嵌段共聚物。作为一个非限制性实例,制剂可包括两种不同类型的三嵌段共聚物(国际公布号WO2012131104和WO2012131106;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0838] 在另一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包封到脂质纳米颗粒或快速消除型脂质纳米颗粒中,并且脂质纳米颗粒或快速消除型脂质纳米颗粒然后可包封到本文描述和/或本领域中已知的聚合物、水凝胶和/或外科密封剂中。作为一个非限制性实例,聚合物、水凝胶或外科密封剂可为PLGA、乙烯乙酸乙烯酯(EVAc)、泊洛沙姆、GELSITE®(Nanotherapeutics,Alachua,Inc.FL)、HYLENEX®(Halozyme Therapeutics,San Diego CA),外科密封剂如纤维蛋白原聚合物(Ethicon Inc.Cornelia,GA)、TISSELL®

(BaxterInternational,Deerfield,Inc,IL)、基于PEG的密封剂以及COSEAL®(Baxter International,Deerfield Inc,IL)。

[0839] 在另一个实施方案中,脂质纳米颗粒可包封到本领域中已知的当注射到受试者中时可形成凝胶的任何聚合物中。作为另一个非限制性实例,脂质纳米颗粒可包封到可生物可降解的聚合物基质中。

[0840] 在一个实施方案中,用于控制释放和/或靶向递送的多核苷酸、初级构建体或mmRNA制剂还可包括至少一个控制释放涂层。控制释放涂层包括但不限于OPADRY®、聚乙烯吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、EUDRAGIT RL®、EUDRAGITRS®以及纤维素衍生物如乙基纤维素水性分散体(AQUACOAT®和SURELEASE®)。

[0841] 在一个实施方案中,控制释放和/或靶向递送制剂可包含至少一种可含有聚阳离子侧链的可降解聚酯。可降解聚酯包括但不限于聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)以及其组合。在另一个实施方案中,可降解聚酯可包括PEG缀合以形成PEG化的聚合物。

[0842] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包封在治疗性纳米颗粒中。治疗性纳米颗粒可通过本文描述和本领域中已知的方法来配制,例如但不限于国际公布号WO2010005740、WO2010030763、WO2010005721、WO2010005723、WO2012054923、美国公布号US20110262491、US20100104645、US20100087337、US20100068285、US20110274759、US20100068286和US20120288541以及美国专利号8,206,747、8,293,276、8,318,208和8,318,211,其各自均以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中,治疗性聚合物纳米颗粒可通过在美国公布号US20120140790中描述的方法来鉴别,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0843] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可配制用于持续释放。如本文所使用,“持续释放”是指在特定时间段内遵循释放速率的药物组合物或化合物。时间段可包括但不限于几小时、几天、几周、几个月以及几年。作为一个非限制性实例,持续释放纳米颗粒可包含聚合物和治疗剂如但不限于本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA(参见国际公布号2010075072和美国公布号US20100216804、US20110217377和US20120201859,其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0844] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可配制为靶特异性的。作为一个非限制性实例,治疗性纳米颗粒可包括皮质类固醇(参见国际公布号WO2011084518;其以引用的方式整体并入本文)。在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可配制为癌症特异性的。作为一个非限制性实例,治疗性纳米颗粒可配制在描述于国际公布号WO2008121949、WO2010005726、WO2010005725、WO2011084521和美国公布号US20100069426、US20120004293和US20100104655中的纳米颗粒中,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0845] 在一个实施方案中,本发明的纳米颗粒可包含聚合物基质。作为一个非限制性实例,纳米颗粒可包含两种或更多种聚合物,例如但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酸酐、聚羟基酸、聚富马酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、

聚胺、聚赖氨酸、聚(乙烯亚胺)、聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)或其组合。

[0846] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒包含二嵌段共聚物。在一个实施方案中,二嵌段共聚物可包含PEG与聚合物组合,所述聚合物例如但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酸酐、聚羟基酸、聚富马酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、聚胺、聚赖氨酸、聚(乙烯亚胺)、聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)或其组合。

[0847] 作为一个非限制性实例,治疗性纳米颗粒包含PLGA-PEG嵌段共聚物(参见美国公布号US20120004293和美国专利号8,236,330,其各自均以引用的方式整体并入本文)。在另一个非限制性实例中,治疗性纳米颗粒为包含PEG和PLA或PEG和PLGA的二嵌段共聚物的隐形(stealth)纳米颗粒(参见美国专利号8,246,968和国际公布号WO2012166923,其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0848] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可包含多嵌段共聚物(参见例如,美国专利号8,263,665和8,287,910;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0849] 在一个实施方案中,本文描述的嵌段共聚物可包括在聚离子复合物中,所述聚离子复合物包含非聚合物胶束和嵌段共聚物。(参见例如美国公布号20120076836;其以引用的方式整体并入本文)。

[0850] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可包含至少一种丙烯酸聚合物。丙烯酸聚合物包括但不限于丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰基乙酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、聚氰基丙烯酸酯以及其组合。

[0851] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可包含至少一种本文描述和/或本领域中已知的阳离子聚合物。

[0852] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可包含至少一种含胺聚合物,例如但不限于聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(酰氨基胺)树枝状聚合物、聚(β-氨基酯)(参见例如美国专利号8,287,849;其以引用的方式整体并入本文)以及其组合。

[0853] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可包含至少一种可含有聚阳离子侧链的可降解聚酯。可降解聚酯包括但不限于聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)以及其组合。在另一个实施方案中,可降解聚酯可包括PEG缀合以形成PEG化的聚合物。

[0854] 在另一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可包括至少一个靶向配体的缀合。靶向配体可为本领域中已知的任何配体,例如但不限于单克隆抗体。(Kirpotin等,Cancer Res.2006 66:6732-6740;其以引用的方式整体并入本文)。

[0855] 在一个实施方案中,治疗性纳米颗粒可配制在可用来靶向癌症的水溶液中(参见国际公布号WO2011084513和美国公布号US20110294717,其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0856] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包封在合成纳米载体中、连接至所述合成纳米载体和/或与其缔合。合成纳米载体包括但不限于在国际公布号

WO2010005740、WO2010030763、WO201213501、WO2012149252、WO2012149255、WO2012149259、WO2012149265、WO2012149268、WO2012149282、WO2012149301、WO2012149393、WO2012149405、WO2012149411、WO2012149454和WO2013019669以及美国公布号US20110262491、US20100104645、US20100087337和US20120244222中描述的那些，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。可使用本领域中已知和/或本文描述的方法配制合成纳米载体。作为一个非限制性实例，合成纳米载体可通过描述于国际公布号WO2010005740、WO2010030763和WO201213501以及美国公布号US20110262491、US20100104645、US20100087337和US2012024422中的方法来配制，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中，合成纳米载体制剂可通过描述于国际公布号WO2011072218和美国专利号8,211,473中的方法来冻干；所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0857] 在一个实施方案中，合成纳米载体可含有释放本文描述的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的反应性基团(参见国际公布号WO20120952552和美国公布号US20120171229，其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0858] 在一个实施方案中，合成纳米载体可含有增强来自合成纳米载体递送的免疫应答的免疫刺激剂。作为一个非限制性实例，合成纳米载体可包含可增强免疫系统的基于Th1的应答的Th1免疫刺激剂(参见国际公布号WO2010123569和美国公布号US20110223201，其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0859] 在一个实施方案中，合成纳米载体可配制用于靶向释放。在一个实施方案中，合成纳米载体被配制成在指定的pH下和/或在希望的时间间隔后释放多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。作为一个非限制性实例，合成纳米颗粒可配制成在24小时后和/或在pH为4.5下释放多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA(参见国际公布号WO2010138193和WO2010138194以及美国公布号US20110020388和US20110027217，其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0860] 在一个实施方案中，合成纳米载体可配制用于控制释放和/或持续释放本文描述的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。作为一个非限制性实例，用于持续释放的合成纳米载体可通过本领域中已知、本文描述和/或如在国际公布号WO2010138192和美国公布号20100303850中所述的方法来配制，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0861] 在一个实施方案中，合成纳米载体可配制用作疫苗。在一个实施方案中，合成纳米载体可包封编码至少一种抗原的至少一种多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。作为一个非限制性实例，合成纳米载体可包括至少一种抗原和用于疫苗剂型的赋形剂(参见国际公布号WO2011150264和美国公布号US20110293723，其各自均以引用的方式整体并入本文)。作为另一个非限制性实例，疫苗剂型可包括至少两种合成纳米载体与相同或不同的抗原以及赋形剂(参见国际公布号WO2011150249和美国公布号US20110293701，其各自均以引用的方式整体并入本文)。可通过本文描述、本领域中已知和/或在国际公布号WO2011150258和美国公布号US20120027806中描述的方法来选择疫苗剂型，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0862] 在一个实施方案中，合成纳米载体可包含编码至少一种佐剂的至少一种多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。作为非限制性实例，佐剂可包含二甲基双十八烷基溴化铵、二甲基双十八烷基氯化铵、二甲基双十八烷基磷酸铵或二甲基双十八烷基乙酸铵(DDA)以及分枝杆菌的总脂质提取物的非极性级分或所述非极性级分的部分(参见例如美国专利号8，

241,610;其以引用的方式整体并入本文)。在另一个实施方案中,合成纳米载体可包含至少一种多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA以及佐剂。作为一个非限制性实例,包含佐剂的合成纳米载体可通过描述于国际公布号WO2011150240和美国公布号US20110293700中的方法来配制,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0863] 在一个实施方案中,合成纳米载体可包封至少一种编码来自病毒的肽、片段或区的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。作为一个非限制性实例,合成纳米载体可包括但不限于描述于国际公布号WO2012024621、WO201202629、WO2012024632以及美国公布号US20120064110、US20120058153和US20120058154中的纳米载体,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0864] 在一个实施方案中,合成纳米载体可偶联到可能够触发体液和/或细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答的多核苷酸、初级构建体或mmRNA(参见例如国际公布号WO2013019669,其以引用的方式整体并入本文)。

[0865] 在一个实施方案中,纳米颗粒可优化用于经口施用。纳米颗粒可包含至少一种阳离子生物聚合物,例如但不限于壳聚糖或其衍生物。作为一个非限制性实例,纳米颗粒可通过描述于美国公布号20120282343中的方法来配制;所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0866] 聚合物、生物可降解纳米颗粒和核-壳纳米颗粒

[0867] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可使用天然和/或合成的聚合物来配制。可用于递送的聚合物的非限制性实例包括但不限于来自MIRUS® Bio(Madison,WI)和Roche Madison(Madison,WI)的DYNAMIC POLYCONJUGATE®(Arrowhead Reasearch Corp.,Pasadena,CA)制剂、PHASERX™聚合物制剂如但不限于SMARTT POLYMER TECHNOLOGY™(PHASERX®,Seattle,WA)、DMRI/DOPE、泊洛沙姆、来自Vical(San Diego,CA)的VAXFECTIN®佐剂、壳聚糖、来自Calando Pharmaceuticals(Pasadena,CA)的环糊精、树枝状聚合物以及聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)聚合物。RONDEL™(RNAi/寡核苷酸纳米颗粒递送)聚合物(Arrowhead Research Corporation,Pasadena,CA)和pH响应性共嵌段聚合物如但不限于PHASERX®(Seattle,WA)。

[0868] 壳聚糖制剂的一个非限制性实例包括带正电荷的壳聚糖的核以及带负电荷的底物的外部部分(美国公布号20120258176;其以引用的方式整体并入本文)。壳聚糖包括但不限于N-三甲基壳聚糖、单-N-羧甲基壳聚糖(MCC)、N-棕榈酰基壳聚糖(NPCS)、EDTA-壳聚糖、低分子量壳聚糖、壳聚糖衍生物或其组合。

[0869] 在一个实施方案中,用于本发明中的聚合物已经历加工来减少和/或抑制不想要的物质如但不限于细菌对聚合物表面的附着。可通过本领域中已知和/或描述和/或在国际公布号WO2012150467中描述的方法来加工聚合物,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0870] PLGA制剂的一个非限制性实例包括但不限于PLGA可注射贮库(例如,通过将PLGA溶解于66%N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)中并且剩余物为水性溶剂和亮丙瑞林(leuprolide)而形成的ELIGARD®。一旦注射,PLGA和亮丙瑞林肽沉淀到皮下间隙中)。

[0871] 已证明许多这些聚合物方法在体内递送寡核苷酸到细胞质中的功效(综述于deFougerolles Hum Gene Ther.2008 19:125-132中;所述参考文献以引用的方式整体并入本文)。已产生核酸(在这种情况下利用小干扰RNA(siRNA))的体内稳固递送的两种聚合

物方法为动力学多缀合物(dynamic polyconjugate)和基于环糊精的纳米颗粒。这些递送方法中的第一种使用了动力学多缀合物并且已显示在小鼠中有效递送siRNA和使肝细胞中的内源性靶mRNA沉默(Rozema等,Proc Natl Acad Sci U S A.2007 104:12982-12887;其以引用的方式整体并入本文)。这个具体方法为多组分聚合物系统,其重要特征包括核酸(在这种情况下为siRNA)通过二硫键共价偶联的膜活性聚合物并且其中PEG(用于电荷掩蔽)和N-乙酰半乳糖胺(用于肝细胞靶向)基团都通过pH敏感的键连接(Rozema等,Proc Natl Acad Sci U S A.2007 104:12982-12887;其以引用的方式整体并入本文)。在结合到肝细胞并进入内体时,聚合物复合物在低pH环境下分解,其中聚合物暴露出其正电荷,导致内体逸出并且siRNA从聚合物释放到细胞质。通过用甘露醇基团替代N-乙酰半乳糖胺基团,已显示可将靶向从表达脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞改变为肝窦内皮细胞和Kupffer细胞。另一种聚合物方法涉及使用转铁蛋白靶向的含环糊精的聚阳离子纳米颗粒。这些纳米颗粒已证明使表达转铁蛋白受体的尤因氏肉瘤肿瘤细胞中的EWS-FLI1基因产物靶向沉默(Hu-Lieskovan等,Cancer Res.2005 65:8984-8982;其以引用的方式整体并入本文)并且配制在这些纳米颗粒中的siRNA在非人灵长类动物体内耐受良好(Heidel等,Proc Natl Acad Sci USA 2007 104:5715-21;其以引用的方式整体并入本文)。这些递送策略都结合了使用靶向递送和内体逸出机制的合理方法。

[0872] 聚合物制剂可允许多核苷酸、初级构建体或mmRNA的持续或延迟释放(例如,在肌内注射或皮下注射之后)。多核苷酸、初级构建体或mmRNA的改变的释放概况可导致例如在延长的时间段内翻译编码的蛋白质。聚合物制剂还可用来增加多核苷酸、初级构建体或mmRNA的稳定性。生物可降解的聚合物先前已用来保护除mmRNA以外的核酸不受降解并且已显示在体内引起有效负载的持续释放(Rozema等,Proc Natl Acad Sci U S A.2007 104:12982-12887;Sullivan等,Expert Opin Drug Deliv.2010 7:1433-1446;Convertine等,Biomacromolecules.2010Oct 1;Chu等,Acc Chem Res.2012Jan 13;Manganiello等,Biomaterials.2012 33:2301-2309;Benoit等,Biomacromolecules.2011 12:2708-2714;Singha等,Nucleic Acid Ther.2011 2:133-147;deFougerolles Hum Gene Ther.2008 19:125-132;Schaffert和Wagner,Gene Ther.2008 16:1131-1138;Chaturvedi等,Expert Opin Drug Deliv.2011 8:1455-1468;Davis,Mol Pharm.2009 6:659-668;Davis,Nature 2010 464:1067-1070;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0873] 在一个实施方案中,药物组合物可为持续释放制剂。在另外的实施方案中,持续释放制剂可用于皮下递送。持续释放制剂可包括但不限于PLGA微球、乙烯乙酸乙烯酯(EVAc)、泊洛沙姆、GELSITE®(Nanotherapeutics,Inc.Alachua,FL)、HYLENEX®(Halozyme Therapeutics,San Diego CA),外科密封剂如纤维蛋白原聚合物(Ethicon Inc.Cornelia,GA)、TISSELL®(Baxter International,Inc Deerfield,IL)、基于PEG的密封剂以及COSEAL®(Baxter International,Inc Deerfield,IL)。作为一个非限制性实例,可通过制备具有可调释放速率(例如,几天和几周)的PLGA微球并且将修饰mRNA包封在PLGA微球中同时在包封过程中维持修饰mRNA的完整性,来将修饰mRNA配制在PLGA微球中。EVAc为广泛用于临床前持续释放植入物应用中的非生物可降解、生物相容的聚合物(例如,延长释放产品Ocusert,即一种用于青光眼的匹鲁卡品(pilocarpine)眼插入物,或progestasert,即一种持续释放孕酮子宫内装置;透皮递送系统Testoderm、Duragesic和Selegiline;导管)。

泊洛沙姆F-407NF为在小于5℃温度下具有低粘度的聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯的亲水非离子型表面活性剂三嵌段共聚物，并且在大于15℃温度下形成固体凝胶。基于PEG的外科密封剂包含混合在递送装置中的两种合成PEG组分，其可在一分钟内制备、在3分钟内密封并且在30天内重新吸收。GELSITE®和天然聚合物能够在施用部位处原位凝胶化。已显示它们通过离子相互作用与蛋白质和肽治疗候选物相互作用以提供稳定效应。

[0874] 聚合物制剂还可通过不同配体的表达而选择性靶向，如但不限于通过叶酸、转铁蛋白和N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)所举例说明(Benoit等,Biomacromolecules.2011 12:2708-2714;Rozema等,Proc Natl Acad Sci U S A.2007 104:12982-12887;Davis,Mol Pharm.2009 6:659-668;Davis,Nature 2010 464:1067-1070;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0875] 本发明的修饰核酸和mmRNA可用聚合化合物配制或配制在聚合化合物中。聚合物可包括至少一种聚合物如但不限于聚乙烯、聚乙二醇(PEG)、聚(l-赖氨酸)(PLL)、接枝到PLL的PEG、阳离子脂质聚合物、生物可降解阳离子脂质聚合物、聚乙烯亚胺(PEI)、交联支链聚(亚烷基亚胺)、聚胺衍生物、修饰的泊洛沙姆、生物可降解聚合物、弹性生物可降解聚合物、生物可降解嵌段共聚物、生物可降解无规共聚物、生物可降解聚酯共聚物、生物可降解聚酯嵌段共聚物、生物可降解聚酯嵌段无规共聚物、多嵌段共聚物、线性生物可降解共聚物、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸)(PAGA)、生物可降解交联阳离子多嵌段共聚物、聚碳酸酯、聚酸酐、聚羟基酸、聚富马酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、聚胺、聚赖氨酸、聚(乙烯亚胺)、聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、丙烯酸聚合物、含胺聚合物、葡聚糖聚合物、葡聚糖聚合物衍生物或其组合。

[0876] 作为一个非限制性实例，本发明的修饰核酸或mmRNA可用如美国专利号6,177,274中所述的用PLL接枝的PEG的聚合化合物来配制；所述专利以引用的方式整体并入本文。制剂可用于体外转染细胞或用于体内递送修饰核酸和mmRNA。在另一个实例中，修饰核酸和mmRNA可悬浮在具有阳离子聚合物的溶液或介质中、处在干燥药物组合物中或处在能够如在美国公布号20090042829和20090042825中所述进行干燥的溶液中；所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0877] 作为另一个非限制性实例，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用PLGA-PEG嵌段共聚物(参见美国公布号US20120004293和美国专利号8,236,330，其以引用的方式整体并入本文)或PLGA-PEG-PLGA嵌段共聚物(参见美国专利号6,004,573，其以引用的方式整体并入本文)配制。作为一个非限制性实例，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用PEG和PLA或PEG和PLGA的二嵌段共聚物配制(参见美国专利号8,246,968，其以引用的方式整体并入本文)。

[0878] 聚胺衍生物可用来递送核酸或治疗和/或预防疾病或包括在可植入或可注射装置中(美国公布号20100260817，其以引用的方式整体并入本文)。作为一个非限制性实例，药物组合物可包括修饰核酸和mmRNA以及在美国公布号20100260817中描述的聚胺衍生物(所述专利的内容以引用的方式整体并入本文)。作为一个非限制性实例，本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可使用聚酰胺聚合物来递送，所述聚酰胺(polyaminde)聚合物例如但

不限于包含通过使碳水化合物二叠氮单体与包含低聚胺的二炔单元(dilkyne unite)组合所制备的1,3-偶极加成聚合物的聚合物(美国专利号8,236,280;其以引用的方式整体并入本文)。

[0879] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用描述于国际公布号WO2011115862、WO2012082574和WO2012068187以及美国公布号20120283427中的至少一种聚合物和/或其衍生物配制,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中,本发明的修饰核酸或mmRNA可用WO2011115862中所述的式Z聚合物配制,所述专利以引用的方式整体并入本文。在又另一个实施方案中,修饰核酸或mmRNA可用国际公布号WO2012082574或WO2012068187以及美国公布号2012028342中所述的式Z、Z'或Z"的聚合物配制,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。与本发明的修饰RNA一起配制的聚合物可通过在国际公布号WO2012082574或WO2012068187中描述的方法来合成,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0880] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用至少一种丙烯酸聚合物配制。丙烯酸聚合物包括但不限于丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰基乙酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、聚氰基丙烯酸酯以及其组合。

[0881] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的制剂可包括至少一种含胺聚合物,例如但不限于聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(酰氨基胺)树枝状聚合物或其组合。

[0882] 例如,本发明的修饰核酸或mmRNA可配制在药物化合物中,所述药物化合物包括聚(亚烷基亚胺)、生物可降解阳离子脂质聚合物、生物可降解嵌段共聚物、生物可降解聚合物、或生物可降解无规共聚物、生物可降解聚酯嵌段共聚物、生物可降解聚酯聚合物、生物可降解聚酯无规共聚物、线性生物可降解共聚物、PAGA、生物可降解交联阳离子多嵌段共聚物或其组合。生物可降解阳离子脂质聚合物可通过本领域中已知和/或在美国专利号6,696,038、美国申请号20030073619和20040142474中描述的方法来制得,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。聚(亚烷基亚胺)可使用本领域中已知和/或如在美国公布号20100004315中所述的方法来制得,所述专利以引用的方式整体并入本文。生物可降解聚合物、生物可降解嵌段共聚物、生物可降解无规共聚物、生物可降解聚酯嵌段共聚物、生物可降解聚酯聚合物或生物可降解聚酯无规共聚物可使用本领域中已知和/或如在美国专利号6,517,869和6,267,987中所述的方法来制得,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。线性生物可降解共聚物可使用本领域中已知和/或如在美国专利号6,652,886中所述的方法来制得。PAGA聚合物可使用本领域中已知和/或如在美国专利号6,217,912中所述的方法来制得,所述专利以引用的方式整体并入本文。可将PAGA聚合物共聚以与聚合物如但不限于聚-L-赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、组蛋白、抗生物素蛋白、鱼精蛋白、聚交酯和聚(丙交酯-共-乙交酯)形成共聚物或嵌段共聚物。生物可降解交联阳离子多嵌段共聚物可通过本领域中已知和/或如在美国专利号8,057,821或美国公布号2012009145中所述的方法来制得,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。例如,多嵌段共聚物可使用与支链聚乙烯亚胺相比具有相异形式的线性聚乙烯亚胺(LPEI)嵌段来合成。此外,组合物或药物组合物可通过本领域中已知、本文描述或如在美国公布号20100004315或美国专利号6,267,987和6,217,912中所述的方法来制得,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0883] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可用至少一种可含有聚阳离子侧链的可降解聚酯配制。可降解聚酯包括但不限于聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)以及其组合。在另一个实施方案中,可降解聚酯可包括PEG缀合以形成PEG化的聚合物。

[0884] 本发明的多核苷酸、初级构建体、mmRNA可用至少一种可交联聚酯配制。可交联聚酯包括在本领域中已知和在美国公布号20120269761中描述的那些,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0885] 在一个实施方案中,本文描述的聚合物可缀合至脂质封端的PEG。作为一个非限制性实例,PLGA可缀合至脂质封端的PEG,从而形成PLGA-DSPE-PEG。作为另一个非限制性实例,与本发明一起使用的PEG缀合物描述于国际公布号WO2008103276中,所述专利以引用的方式整体并入本文。聚合物可使用配体缀合物如但不限于在美国专利号8,273,363中描述的缀合物来缀合,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0886] 在一个实施方案中,本文描述的修饰RNA可与另一种化合物缀合。缀合物的非限制性实例描述于美国专利号7,964,578和7,833,992中,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。在另一个实施方案中,本发明的修饰RNA可与如在美国专利号7,964,578和7,833,992中所述的式1-122的缀合物缀合,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。本文描述的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可与金属如但不限于金缀合。(参见例如,Giljohann等,Journ.Amer.Chem.Soc.2009 131(6):2072-2073;其以引用的方式整体并入本文)。在另一个实施方案中,本文描述的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可缀合和/或包封在金纳米颗粒中。(国际公布号WO201216269和美国公布号20120302940;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0887] 如在美国公布号20100004313中所述(所述专利以引用的方式整体并入本文),基因递送组合物可包括核苷酸序列和泊洛沙姆。例如,本发明的修饰核酸和mmRNA可用于具有在美国公布号20100004313中描述的泊洛沙姆的基因递送组合物中。

[0888] 在一个实施方案中,本发明的聚合物制剂可通过使可包括阳离子载体的聚合物制剂与可共价连接至胆固醇和聚乙二醇基团的阳离子脂质聚合物接触来稳定。聚合物制剂可使用描述于美国公布号20090042829中的方法与阳离子脂质聚合物接触,所述专利以引用的方式整体并入本文。阳离子载体可包括但不限于聚乙烯亚胺、聚(三亚甲基亚胺)、聚(四亚甲基亚胺)、聚丙烯亚胺、氨基糖苷-聚胺、二脱氧-二氨基-b-环糊精、精胺、亚精胺、聚甲基丙烯酸(2-二甲基氨基)乙酯、聚(赖氨酸)、聚(组氨酸)、聚(精氨酸)、阳离子化明胶、树枝状聚合物、壳聚糖、1,2-二油酰基-3-三甲铵-丙烷(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羟乙基)咪唑啉氯化物(DOTIM)、2,3-二油酰基氧基-N-[2(精胺羧酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙基三氟乙酸铵(DOSPA)、3B-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基]胆固醇盐酸盐(DC-胆固醇HCl)、二(十七烷基)酰氨基甘氨酰亚精胺(DOGS)、N,N-二硬脂基-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-羟乙基溴化铵(DMRIE)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵DODAC)以及其组合。

[0889] 本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在一种或多种聚合物的聚合复合物中(美国公布号20120237565和20120270927;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

在一个实施方案中，聚合复合物包含两种或更多种阳离子聚合物。阳离子聚合物可包含聚(乙烯亚胺)(PEI)，如线性PEI。

[0890] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA还可使用以下的组合配制为纳米颗粒：聚合物、脂质和/或其它生物可降解剂如但不限于磷酸钙。组分可组合在核-壳、杂交体和/或叠层结构中以允许精细调节纳米颗粒从而可增强多核苷酸、初级构建体和mmRNA的递送(Wang等,Nat Mater.2006 5:791-796;Fuller等,Biomaterials.2008 29:1526-1532;DeKoker等,Adv Drug Deliv Rev.2011 63:748-761;Endres等,Biomaterials.2011 32:7721-7731;Su等,Mol Pharm.2011Jun 6;8(3):774-87;其以引用的方式整体并入本文)。作为一个非限制性实例，纳米颗粒可包含多种聚合物如但不限于亲水-疏水聚合物(例如，PEG-PLGA)、疏水聚合物(例如,PEG)和/或亲水聚合物(国际公布号WO20120225129;其以引用的方式整体并入本文)。

[0891] 已显示与脂质和/或聚合物组合的生物可降解磷酸钙纳米颗粒在体内递送多核苷酸、初级构建体和mmRNA。在一个实施方案中，还可含有靶向配体如茴香酰胺的脂质涂覆的磷酸钙纳米颗粒可用来递送本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。例如，为了在小鼠转移性肺模型中有效递送siRNA，使用了脂质涂覆的磷酸钙纳米颗粒(Li等,J Contr Rel.2010 142:416-421;Li等,J Contr Rel.2012 158:108-114;Yang等,Mol Ther.2012 20:609-615;其以引用的方式整体并入本文)。这个递送系统组合了靶向纳米颗粒与增强内体逸出的组分磷酸钙以便增强siRNA的递送。

[0892] 在一个实施方案中，具有PEG-聚阴离子嵌段共聚物的磷酸钙可用来递送多核苷酸、初级构建体和mmRNA(Kazikawa等,J Contr Rel.2004 97:345-356;Kazikawa等,J Contr Rel.2006 111:368-370;其以引用的方式整体并入本文)。

[0893] 在一个实施方案中，PEG-电荷变换的聚合物(Pitella等,Biomaterials.2011 32:3106-3114)可用来形成递送本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA的纳米颗粒。在PEG-聚阴离子嵌段共聚物通过在酸性pH下裂解为聚阳离子时，PEG-电荷变换聚合物可改进，从而增强内体逸出。

[0894] 使用核-壳纳米颗粒另外集中在合成阳离子交联纳米凝胶核和各种壳的高通量方法上(Siegwart等,Proc Natl Acad Sci U S A.2011 108:12996-13001)。可通过改变纳米颗粒的核和壳组分中的化学组成来精确控制聚合纳米颗粒的复合、递送和内化。例如，核-壳纳米颗粒可在它们将胆固醇共价附着至纳米颗粒之后有效地将siRNA递送至小鼠肝细胞。

[0895] 在一个实施方案中，包含中间PLGA层和含有PEG的外部中性脂质层的空心脂质核可用来递送本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。作为一个非限制性实例，在携带荧光素酶表达肿瘤的小鼠中，已确定与常规脂质复合物相比，脂质-聚合物-脂质杂交纳米颗粒显著压制荧光素酶表达(Shi等,Angew Chem Int Ed.2011 50:7027-7031;其以引用的方式整体并入本文)。

[0896] 在一个实施方案中，脂质纳米颗粒可包含本文公开的修饰核酸分子的核以及聚合物壳。聚合物壳可为本文描述的任何聚合物并且为本领域所已知。在另外的实施方案中，聚合物壳可用来保护核中的修饰核酸。

[0897] 描述了用于与本发明的修饰核酸分子一起使用的核-壳纳米颗粒并且可通过描述

于美国专利号8,313,777中的方法来形成,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0898] 在一个实施方案中,核-壳纳米颗粒可包含本文公开的修饰核酸分子的核以及聚合物壳。聚合物壳可为本文描述的任何聚合物并且为本领域所已知。在另外的实施方案中,聚合物壳可用来保护核中的修饰核酸分子。作为一个非限制性实例,核-壳纳米颗粒可用来治疗眼睛疾病或病症(参见例如美国公布号20120321719,其以引用的方式整体并入本文)。

[0899] 在一个实施方案中,与本文描述的制剂一起使用的聚合物可为如在国际公布号WO2011120053中所述的修饰聚合物(例如但不限于修饰聚缩醛),所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0900] 肽和蛋白质

[0901] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可用肽和/或蛋白质配制以便增加由多核苷酸、初级构建体或mmRNA进行的细胞转染。在一个实施方案中,肽诸如但不限于细胞穿透肽和能实现细胞内递送的蛋白质和肽可用来递送药物制剂。可与本发明的药物制剂一起使用的细胞穿透肽的非限制性实例包括促进递送至细胞内空间的附着至聚阳离子的细胞穿透肽序列,例如HIV-来源的TAT肽、穿膜肽(penetratin)、转运肽(transportan)或hCT来源的细胞穿透肽(参见例如,Caron等,Mol.Ther.3(3):310-8(2001);Langel,Cell-Penetrating Peptides:Processes and Applications(CRC Press,Boca Raton FL,2002);El-Andaloussi等,Curr.Pharm.Des.11(28):3597-611(2003);以及Deshayes等,Cell.Mol.Life Sci.62(16):1839-49(2005),所有所述参考文献均以引用的方式整体并入本文)。组合物还可配制来包括细胞穿透剂例如脂质体,其增强组合物至细胞内空间的递送。本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可复合至肽和/或蛋白质诸如但不限于来自Aileron Therapeutics(Cambridge,MA)和Permeon Biologics(Cambridge,MA)的肽和/或蛋白质以便能实现细胞内递送(Cronican等,ACS Chem.Biol.2010 5:747-752;McNaughton等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2009 106:6111-6116;Sawyer,Chem Biol Drug Des.2009 73:3-6;Verdine和Hilinski,Methods Enzymol.2012;503:3-33;所有所述参考文献均以引用的方式整体并入本文)。

[0902] 在一个实施方案中,细胞穿透多肽可包含第一结构域和第二结构域。第一结构域可包含超电荷的多肽。第二结构域可包含蛋白结合配偶体。如本文所使用,“蛋白结合配偶体”包括但不限于抗体及其功能片段、支架蛋白或肽。细胞穿透多肽可进一步包含用于蛋白结合配偶体的细胞内结合配偶体。细胞穿透多肽可能够从其中可引入多核苷酸、初级构建体或mmRNA的细胞分泌。

[0903] 包括肽或蛋白质的制剂可用来增加由多核苷酸、初级构建体或mmRNA进行的细胞转染,改变多核苷酸、初级构建体或mmRNA的生物分布(例如,通过靶向特定组织或细胞类型)和/或增加编码的蛋白质的翻译。(参见例如国际公布号WO2012110636;其以引用的方式整体并入本文)。

[0904] 细胞

[0905] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可离体转染到细胞中,所述细胞随后移植到受试者中。作为非限制性实例,药物组合物可包括将修饰RNA递送至肝脏和骨髓细胞的红细胞、以病毒样颗粒(VLP)递送修饰RNA的病毒体以及递送修饰RNA的诸如但不限于来自MAXCYTE®(Gaithersburg,MD)和来自ERYTECH®(Lyon,France)的电穿孔细胞。已

记载了使用红细胞、病毒颗粒和电穿孔细胞递送除了mmRNA以外的有效负载的实例(Godfrin等,Expert Opin Biol Ther.2012 12:127-133;Fang等,Expert Opin Biol Ther.2012 12:385-389;Hu等,Proc Natl Acad Sci U S A.2011 108:10980-10985;Lund等,Pharm Res.2010 27:400-420;Huckriede等,J Liposome Res.2007;17:39-47;Cusi,Hum Vaccin.2006 2:1-7;de Jonge等,Gene Ther.2006 13:400-411;所有所述参考文献均以引用的方式整体并入本文)。

[0906] 多核苷酸、初级构建体和mmRNA可以通过描述于国际公布号WO2011085231和美国公布号20110171248中的方法合成的合成VLP递送,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0907] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA的基于细胞的制剂可用来确保细胞转染(例如,在细胞载体中)、改变多核苷酸、初级构建体或mmRNA的生物分布(例如,通过使细胞载体靶向特定组织或细胞类型)和/或增加编码的蛋白质的翻译。

[0908] 各种方法为本领域中已知的并且适用于将核酸引入到细胞中,所述方法包括病毒和非病毒介导的技术。典型的非病毒介导的技术的实例包括但不限于电穿孔、磷酸钙介导的转移、核转染、声致穿孔、热激、磁转染、脂质体介导的转移、微量注射、微弹介导的转移(纳米颗粒)、阳离子聚合物介导的转移(DEAE-葡聚糖、聚乙烯亚胺、聚乙二醇(PEG)等)或细胞融合。

[0909] 声致穿孔或细胞超声的技术是使用声音(例如,超声波频率)来改变细胞质膜的穿透性。声致穿孔方法为本领域技术人员已知的并且用来体内递送核酸(Yoon和Park,Expert Opin Drug Deliv.2010 7:321-330;Postema和Gilja,Curr Pharm Biotechnol.2007 8:355-361;Newman和Bettinger,Gene Ther.2007 14:465-475;所有均以引用的方式整体并入本文)。声致穿孔方法为本领域中已知的并且还例如在它涉及细菌时教导在美国专利公布20100196983中并且在它涉及其它细胞类型时教导在例如美国专利公布20100009424中,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0910] 电穿孔技术也为本领域中熟知的并且用来体内和临床上递送核酸(Andre等,Curr Gene Ther.2010 10:267-280;Chiarella等,Curr Gene Ther.2010 10:281-286;Hojman,Curr Gene Ther.2010 10:128-138;所有均以引用的方式整体并入本文)。在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可通过如在实施例8中所述的电穿孔来递送。

[0911] 透明质酸酶

[0912] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的肌内或皮下局部注射液可包括催化透明质酸水解的透明质酸酶。通过催化间质屏障的组分透明质酸的水解,透明质酸酶降低了透明质酸的粘度,从而增加组织穿透性(Frost,Expert Opin.Drug Deliv.(2007)4:427-440;其以引用的方式整体并入本文)。加速由转染的细胞产生的编码蛋白质的分散和系统分布是有用的。或者,透明质酸酶可用来增加暴露于肌内或皮下施用的本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的细胞数目。

[0913] 纳米颗粒模拟物

[0914] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包封在纳米颗粒模拟物内和/或吸收至纳米颗粒模拟物。纳米颗粒模拟物可模拟生物体或颗粒诸如但不限于病原体、病毒、细菌、真菌、寄生虫、朊病毒以及细胞的递送功能。作为一个非限制性实例,本发明的多核苷酸、初

级构建体或mmRNA可包封在可模拟病毒的递送功能的非病毒体颗粒中(参见国际公布号WO2012006376,其以引用的方式整体并入本文)。

[0915] 纳米管

[0916] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可附着或以另外的方式结合到至少一种纳米管,例如但不限于蔷薇状纳米管、具有双碱基接头的蔷薇状纳米管、碳纳米管和/或单壁碳纳米管。多核苷酸、初级构建体或mmRNA可通过力诸如但不限于空间力、离子力、共价力和/或其它力结合到纳米管。

[0917] 在一个实施方案中,纳米管可将一个或多个多核苷酸、初级构建体或mmRNA释放到细胞中。可改变至少一种纳米管的大小和/或表面结构以便调整身体内的纳米管的相互作用和/或附着或结合到本文公开的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。在一个实施方案中,可改变结构单元和/或附着至少一种纳米管的结构单元的官能团以便调节纳米管的尺寸和/或特性。作为一个非限制性实例,可改变纳米管的长度以阻碍纳米管穿过正常血管壁中的孔但仍足够小以穿过肿瘤组织的血管中的较大的孔。

[0918] 在一个实施方案中,至少一种纳米管还可涂覆有递送增强化合物,其包括聚合物如但不限于聚乙二醇。在另一个实施方案中,至少一种纳米管和/或多核苷酸、初级构建体或mmRNA可与药学上可接受的赋形剂和/或递送媒介物混合。

[0919] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA附着和/或以另外的方式结合到至少一种蔷薇状纳米管。蔷薇状纳米管可通过本领域中已知的方法和/或通过在国际公布号WO2012094304中描述的方法来形成,所述专利以引用的方式整体并入本文。至少一个多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可通过如在国际公布号WO2012094304中所述的方法附着和/或以另外的方式结合到至少一种蔷薇状纳米管,所述专利以引用的方式整体并入本文,其中在可引起至少一个多核苷酸、初级构建体或mmRNA附着或以另外的方式结合到蔷薇状纳米管的条件下,将蔷薇状纳米管或形成蔷薇状纳米管的模块与至少一个多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA混合在水性介质中。

[0920] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可附着和/或以另外的方式结合到至少一种碳纳米管。作为一个非限制性实例,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可结合到连接剂并且连接剂可结合到碳纳米管(参见例如美国专利号8,246,995;其以引用的方式整体并入本文)。碳纳米管可为单壁纳米管(参见例如美国专利号8,246,995;其以引用的方式整体并入本文)。

[0921] 缀合物

[0922] 本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA包括缀合物,如共价连接至载体或靶向基团的多核苷酸、初级构建体或mmRNA,或包括共同产生融合蛋白的两个编码区(例如,带有靶向基团和治疗性蛋白质或肽)。

[0923] 本发明的缀合物包括天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、支链淀粉、壳多糖、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸);或脂质。配体还可为重组或合成分子,如合成聚合物,例如合成聚氨基酸,寡核苷酸(例如,适体)。聚氨基酸的实例包括聚氨基酸为聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇

(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚膦嗪。聚胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、肽模拟物聚胺、树枝状聚合物聚胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐或α螺旋肽。

[0924] 教导多核苷酸缀合物(具体为RNA)的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;其各自均以引用的方式整体并入本文。

[0925] 在一个实施方案中,本发明的缀合物可用作用于本发明的修饰核酸和mmRNA的载体。缀合物可包含阳离子聚合物如但不限于聚胺、聚赖氨酸、聚亚烷基亚胺以及可接枝到聚(乙二醇)的聚乙烯亚胺。作为一个非限制性实例,缀合物可类似于聚合缀合物并且合成聚合缀合物的方法描述于美国专利号6,586,524中,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0926] 缀合物还可包括靶向基团,例如细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如结合到指定细胞类型如肾细胞的抗体。靶向基团可为促甲状腺素、促黑激素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化的聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸盐、聚天冬氨酸盐、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸盐、维生素B12、生物素、RGD肽、RGD肽模拟物或适体。

[0927] 靶向基团可为蛋白质,例如糖蛋白,或肽,例如对共配体具有特异亲和性的分子,或抗体,例如结合到指定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞的抗体。靶向基团还可包括激素和激素受体。它们还可包括非肽种类,如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖或适体。配体可例如为脂多糖或p38MAP激酶的激活剂。

[0928] 靶向基团可为能够靶向特定受体的任何配体。实例包括但不限于叶酸、GalNAc、半乳糖、甘露糖、甘露糖-6P、适体、整联蛋白受体配体、趋化因子受体配体、转铁蛋白、生物素、5-羟色胺受体配体、PSMA、内皮素、GCPII、生长激素抑制素、LDL以及HDL配体。在具体实施方案中,靶向基团为适体。适体可为未修饰的或具有本文公开的修饰的任何组合。

[0929] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物可包括化学修饰如但不限于类似于锁核酸的修饰。

[0930] 教导锁核酸(LNA)如来自Santaris的那些的制备的代表性美国专利包括但不限于以下:美国专利号6,268,490;6,670,461;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,084,125以及7,399,845,其各自均以引用的方式整体并入本文。

[0931] 教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082;5,

714,331和5,719,262,其各自均以引用的方式并入本文。PNA化合物的其它教义可见于例如Nielsen等,Science,1991,254,1497-1500中。

[0932] 在本发明中有特色的一些实施方案包括具有硫代磷酸酯主链的多核苷酸、初级构建体或mmRNA以及具有其它修饰的主链的寡核苷,并且具体为以上引用的美国专利号5,489,677的--CH_2--NH--CH_2--、--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--[称为亚甲基(甲基亚氨基)或MM主链]、--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--、--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--和--N(CH_3)--CH_2--CH_2--[其中天然的磷酸二酯主链表示为--O—P(O)$_2$--O--CH_2--]以及以上引用的美国专利号5,602,240的酰胺主链。在一些实施方案中,在本文中有特色的多核苷酸具有以上引用的美国专利号5,034,506的吗啉代主链结构。

[0933] 2′位置上的修饰也可帮助递送。优选地,2′位置上的修饰不位于编码多肽的序列中,即不在可翻译区中。2′位置上的修饰可位于5′UTR、3′UTR和/或加尾区(tailing region)中。2′位置上的修饰可包括2'位置上的以下之一:H(即,2′-脱氧);F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可为取代或未取代的C_1至C_{10}烷基或C_2至C_{10}烯基和炔基。示例性的合适的修饰包括O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$、O($CH_2$)$_n$$OCH_3$、O($CH_2$)$_n$$NH_2$、O($CH_2$)$_n$$CH_3$、O($CH_2$)$_n$$ONH_2$以及O($CH_2$)$_n$ON[($C_2$)$_n$$CH_3$]$_2$,其中n和m为1至约10。在其它实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA包括2'位置上的以下之一:C_1至C_{10}低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报道基团、嵌入剂、用于改进药物代谢动力学性质的基团、或用于改进药效学性质的基团以及具有类似性质的其它取代基。在一些实施方案中,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$,又称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),即烷氧基-烷氧基。另一个示例性修饰为2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O(CH_2)$_2$ON(CH_3)$_2$基团,又称为2'-DMAOE,如本文以下实施例中所述,和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中又称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即也在本文以下实施例中描述的2'-O--CH_2--O--CH_2--N(CH_2)$_2$。其它修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH_3)、2'-氨基丙氧基(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)以及2'-氟(2'-F)。类似修饰还可在其它位置上进行,具体为3'末端核苷酸上或2'-5'连接的dsRNA中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。本发明的多核苷酸还可具有糖模拟物如环丁基部分以替代呋喃戊糖基糖。教导此类修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633以及5,700,920,并且所述专利各自均以引用的方式并入本文。

[0934] 在其它的实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA共价缀合至细胞穿透多肽。细胞穿透肽还可包括信号序列。本发明的缀合物可设计来具有增加的稳定性;增加的细胞转染;和/或改变的生物分布(例如,靶向特定的组织或细胞类型)。

[0935] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可缀合至试剂以增强递送。作为一个非限制性实例,所述试剂可为单体或聚合物,如靶向单体或具有如在国际公布号WO2011062965中所述的靶向嵌段的聚合物,所述专利以引用的方式整体并入本文。在另一

个非限制性实例中，药剂可为共价偶联至本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的转运剂(参见例如美国专利号6,835.393和7,374,778，其各自均以引用的方式整体并入本文)。在又另一个非限制性实例中，试剂可为膜屏障转运增强剂如在美国专利号7,737,108和8,003,129中描述的那些，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[0936] 在另一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA可缀合至SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PHASERX®,Inc.Seattle,WA)。

[0937] 自组装纳米颗粒

[0938] 核酸自组装纳米颗粒

[0939] 自组装纳米颗粒具有明确定义的大小，其可精确控制为可容易重新编程的核酸链。例如，用于癌症靶向的纳米递送载体的最佳粒度为20-100nm，因为大于20nm的直径避免了肾清除并且通过增强的穿透性和保留效应增强了至某些肿瘤的递送。使用自组装核酸纳米颗粒，可实现大小单一均匀的群体和具有精确控制的空间取向的形状以及用于增强递送的癌症靶向配体的密度。作为一个非限制性实例，使用短DNA片段和治疗性siRNA的可编程自组装来制备寡核苷酸纳米颗粒。这些纳米颗粒在分子上与可控制的粒度和靶向配体位置以及密度相同。DNA片段和siRNA自组装到一步反应中以产生用于体内靶向递送的DNA/siRNA四面体纳米颗粒。(Lee等,Nature Nanotechnology 2012 7:389-393;其以引用的方式整体并入本文)。

[0940] 在一个实施方案中，本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制为自组装纳米颗粒。作为一个非限制性实例，核酸可用来制得可用于本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的递送系统中的纳米颗粒(参见例如国际公布号WO2012125987;其以引用的方式整体并入本文)。

[0941] 在一个实施方案中，核酸自组装纳米颗粒可包含本文公开的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的核以及聚合物壳。聚合物壳可为本文描述的任何聚合物并且为本领域所已知。在另外的实施方案中，聚合物壳可用来保护核中的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。

[0942] 基于聚合物的自组装纳米颗粒

[0943] 聚合物可用来形成自组装到纳米颗粒中的薄片。这些纳米颗粒可用来递送本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。在一个实施方案中，这些自组装纳米颗粒可为由RNA发夹的长聚合物形成的微海绵，所述RNA发夹的长聚合物在自组装到微海绵之前形成结晶的‘打褶’薄片。这些微海绵为密集压积的海绵样微粒，其可用作有效的载体并且可能够将货物递送至细胞。微海绵的直径可为1um至300nm。微海绵可与本领域中已知的其它试剂复合以形成更大的微海绵。作为一个非限制性实例，微海绵可与一种试剂复合以形成促进细胞吸收的外层如聚阳离子聚乙烯亚胺(PEI)。这个复合物可形成在高温(150℃)下能保持稳定的250-nm直径的颗粒(Grabow和Jaegar,Nature Materials 2012,11:269-269;其以引用的方式整体并入本文)。另外，这些微海绵可能够展现出保护不受核糖核酸酶降解的非比寻常的程度。

[0944] 在另一个实施方案中，基于聚合物的自组装纳米颗粒如但不限于微海绵可为完全可编程的纳米颗粒。可精确控制纳米颗粒的几何学、大小和化学计量学以产生用于递送货物如但不限于多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的最佳纳米颗粒。

[0945] 在一个实施方案中，基于聚合物的纳米颗粒可包含本文公开的多核苷酸、初级构

建体和/或mmRNA的核以及聚合物壳。聚合物壳可为本文描述的任何聚合物并且为本领域所已知。在另外的实施方案中，聚合物壳可用来保护核中的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。

[0946] 在又另一个实施方案中，基于聚合物的纳米颗粒可包含非核酸聚合物，其包含多个异种单体如在国际公布号WO2013009736中描述的那些，所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0947] 无机纳米颗粒

[0948] 本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在无机纳米颗粒中(美国专利号8,257,745，其以引用的方式整体并入本文)。无机纳米颗粒可包括但不限于水可溶胀的粘土物质。作为一个非限制性实例，无机纳米颗粒可包括由简单硅酸盐制得的合成蒙脱石粘土(参见例如美国专利号5,585,108和8,257,745，其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0949] 在一个实施方案中，无机纳米颗粒可包含本文公开的修饰核酸的核以及聚合物壳。聚合物壳可为本文描述的任何聚合物并且为本领域所已知。在另外的实施方案中，聚合物壳可用来保护核中的修饰核酸。

[0950] 半导电纳米颗粒和金属纳米颗粒

[0951] 本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在包含半导电材料或金属材料的水可分散纳米颗粒中(美国公布号20120228565；其以引用的方式整体并入本文)或在磁性纳米颗粒中形成(美国公布号20120265001和20120283503；其各自均以引用的方式整体并入本文)。水可分散纳米颗粒可为疏水纳米颗粒或亲水纳米颗粒。

[0952] 在一个实施方案中，半导电纳米颗粒和/或金属纳米颗粒可包含本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的核以及聚合物壳。聚合物壳可为本文描述的任何聚合物并且为本领域所已知。在另外的实施方案中，聚合物壳可用来保护核中的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。

[0953] 凝胶和水凝胶

[0954] 在一个实施方案中，本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包封到本领域中已知的任何水凝胶中，当注射到受试者中时所述水凝胶可形成凝胶。水凝胶为亲水聚合物链的网络，并且有时以其中水为分散介质的胶体凝胶形式存在。水凝胶为高度吸收性(它们可含有超过99％的水)的天然或合成聚合物。水凝胶由于其大量的水含量还拥有非常类似于天然组织的柔软度。本文描述的水凝胶可用来包封生物相容、生物可降解和/或多孔的脂质纳米颗粒。

[0955] 作为一个非限制性实例，水凝胶可为适体功能化的水凝胶。适体功能化的水凝胶可使用核酸杂交来编程以释放一个或多个多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。(Battig等，J.Am.Chem.Society.2012 134:12410-12413；其以引用的方式整体并入本文)。

[0956] 作为另一个非限制性实例，水凝胶可成形为倒置的蛋白石。

[0957] 蛋白石水凝胶展现出较高的溶胀比并且溶胀动力学同样也快了一个数量级。产生蛋白石水凝胶的方法和蛋白石水凝胶的描述在国际公布号WO2012148684中描述，所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0958] 在又另一个非限制性实例中，水凝胶可为抗细菌水凝胶。抗细菌水凝胶可包含药

学上可接受的盐或有机材料，例如但不限于药用级和/或医用级银盐和芦荟凝胶或提取物。(国际公布号WO2012151438，其以引用的方式整体并入本文)。

[0959] 在一个实施方案中，修饰mRNA可包封在脂质纳米颗粒中并且然后脂质纳米颗粒可包封到水凝胶中。

[0960] 在一个实施方案中，本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包封到本领域中已知的任何凝胶中。作为一个非限制性实例，凝胶可为氟尿嘧啶可注射凝胶或含有本领域中已知的化学化合物和/或药物的氟尿嘧啶可注射凝胶。作为另一个实例，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包封在含肾上腺素的氟尿嘧啶凝胶中(参见例如，Smith等，Cancer Chemotherapty and Pharmacology,1999 44(4):267-274;其以引用的方式整体并入本文)。

[0961] 在一个实施方案中，本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可包封到纤维蛋白凝胶、纤维蛋白水凝胶或纤维蛋白胶中。在另一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可在包封到纤维蛋白凝胶、纤维蛋白水凝胶或纤维蛋白胶中之前配制在脂质纳米颗粒或快速消除型脂质纳米颗粒中。在又另一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可在包封到纤维蛋白凝胶、水凝胶或纤维蛋白胶中之前配制为脂质复合物。纤维蛋白凝胶、水凝胶和胶包含两种组分，即纤维蛋白原溶液和富含钙的凝血酶溶液(参见例如，Spicer和Mikos,Journal of Controlled Release 2010.148:49-55;Kidd等Journal of Controlled Release 2012.157:80-85;其各自均以引用的方式整体并入本文)。可改变纤维蛋白凝胶、水凝胶和/或胶的组分的浓度以改变凝胶、水凝胶和/或胶的特征、网络筛孔大小和/或降解特征，例如但不限于改变纤维蛋白凝胶、水凝胶和/或胶的释放概况。(参见例如，Spicer和Mikos,Journal of Controlled Release 2010.148:49-55;Kidd等,Journal of Controlled Release 2012.157:80-85;Catelas等,Tissue Engineering 2008.14:119-128;其各自均以引用的方式整体并入本文)。这个特征可在用来递送本文公开的修饰mRNA时为有利的。(参见例如，Kidd等,Journal of Controlled Release 2012.157:80-85;Catelas等,Tissue Engineering 2008.14:119-128;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0962] 阳离子和阴离子

[0963] 本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的制剂可包括阳离子或阴离子。在一个实施方案中，制剂包括金属阳离子如但不限于Zn2+、Ca2+、Cu2+、Mg+以及其组合。作为一个非限制性实例，制剂可包括聚合物和与金属阳离子复合的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA(参见例如美国专利号6,265,389和6,555,525，其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[0964] 模制的纳米颗粒和微粒

[0965] 本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在纳米颗粒和/或微粒中。这些纳米颗粒和/或微粒可模制成任何大小、形状和化学性质。作为一个实例，可使用LIQUIDA TECHNOLOGIES® (Morrisville,NC)的PRINT®技术制得纳米颗粒和/或微粒(参见例如国际公布号WO2007024323;其以引用的方式整体并入本文)。

[0966] 在一个实施方案中，模制的纳米颗粒可包含本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的核以及聚合物壳。聚合物壳可为本文描述的任何聚合物并且为本领域所已知。在

另外的实施方案中，聚合物壳可用来保护核中的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。

[0967] 纳米夹克(NanoJacket)和纳米脂质体

[0968] 本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制在Keystone Nano(State College,PA)的纳米夹克和纳米脂质体中。纳米夹克由天然存在于身体中的化合物包括钙、磷酸盐制成，并且还可包括少量硅酸盐。纳米夹克的大小可在5nm至50nm范围内，并且可用来递送亲水和疏水化合物如但不限于多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。

[0969] 纳米脂质体由脂质制成，例如但不限于天然存在于身体中的脂质。纳米脂质体的大小可在60nm至80nm范围内，并且可用来递送亲水和疏水化合物如但不限于多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA。在一个方面中，本文公开的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA配制在纳米脂质体如但不限于神经酰胺纳米脂质体中。

[0970] 赋形剂

[0971] 药物制剂可另外包含药学上可接受的赋形剂，如本文所使用的赋形剂包括适合于所希望的具体剂型的任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington的The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro(Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006;其以引用的方式整体并入本文)公开了用于配制药物组合物的各种赋形剂和用于其制备的已知技术。除了如通过产生任何不希望的生物作用或另外以有害的方式与药物组合物的任何其它组分相互作用而与物质或其衍生物不相容的任何常规赋形剂介质以外，所述赋形剂的使用被涵盖在本发明的范围内。

[0972] 在一些实施方案中，药学上可接受的赋形剂为至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％纯净。在一些实施方案中，赋形剂被批准用于人和用于兽医使用。在一些实施方案中，赋形剂由美国食品药品管理局批准。在一些实施方案中，赋形剂为药用级。在一些实施方案中，赋形剂满足美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0973] 在药物组合物的制造中使用的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、分散剂和/或成粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。此类赋形剂可任选包括在药物组合物中。

[0974] 示例性稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉等和/或其组合。

[0975] 示例性成粒剂和/或分散剂包括但不限于土豆淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟乙酸淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘浆、琼脂、膨润土、纤维素和木材产品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚(乙烯吡咯烷酮)(交聚维酮)、羧甲基淀粉钠(羟乙酸淀粉钠)、羟甲基纤维素、交联羟甲基纤维素钠(交联羧甲纤维素)、甲基纤维素、预胶凝淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不可溶淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝(VEEGUM®)、月桂硫酸钠、季铵化合物等和/或其组合。

[0976] 示例性表面活性剂和/或乳化剂包括但不限于天然乳化剂(例如阿拉伯树胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、黄蓍胶、软骨胶、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、

胆固醇、蜡以及卵磷脂)、胶体粘土(例如膨润土[硅酸铝]和VEEGUM®[硅酸镁铝])、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、单硬脂酸三乙酸甘油酯、二硬脂酸乙二醇酯、单硬脂酸甘油酯和单硬脂酸丙二醇酯、聚乙烯醇)、卡波姆(carbomer)(例如羧基聚亚甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物以及羧乙烯基聚合物)、角叉菜胶、纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、脱水山梨糖醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯[TWEEN®20]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇[TWEENn®60]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯[TWEEN®80]、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯[SPAN®40]、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯[SPAN®60]、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯[SPAN®65]、单油酸甘油酯、脱水山梨糖醇单油酸酯[SPAN®80])、聚氧乙烯酯(例如聚氧乙烯单硬脂酸酯[MYRJ®45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚氧乙烯化蓖麻油、聚氧亚甲基硬脂酸酯以及SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚(例如聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ®30])、聚(乙烯吡咯烷酮)、二乙二醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂硫酸钠、PLURONIC®F 68、POLOXAMER®188、十六烷基三甲基溴化铵、氯化十六烷基吡啶、苯扎氯铵、多库酯钠等和/或其组合。

[0977] 示例性粘合剂包括但不限于淀粉(例如玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然和合成的树胶(例如阿拉伯树胶、海藻酸钠、角叉菜提取物、panwar树胶、印度树胶、isapol皮的粘液质、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚(乙烯吡咯烷酮)、硅酸镁铝(Veegum®)以及落叶松阿拉伯半乳聚糖);海藻酸盐;聚环氧乙烷;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇等;以及其组合。

[0978] 示例性防腐剂可包括但不限于抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和/或其它防腐剂。示例性抗氧化剂包括但不限于α生育酚、抗坏血酸、棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚、丁羟甲苯、单硫代甘油、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和/或亚硫酸钠。示例性螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸单水合物、依地酸二钠、依地酸二钾、依地酸、富马酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸和/或依地酸三钠。示例性抗微生物防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、苯索氯铵、苯甲醇、溴硝丙二醇、西曲溴铵、氯化十六烷基吡啶、氯已定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪脲、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇和/或硫柳汞。示例性抗真菌防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和/或山梨酸。示例性醇防腐剂包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚类化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯和/或苯乙醇。示例性酸性防腐剂包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、β-胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸和/或植酸。其它防腐剂包括但不限于生育酚、乙酸生育酚、甲磺酸去铁胺、西曲溴铵、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、乙二胺、月桂基硫酸钠(SLS)、月桂基乙醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钾、焦亚硫

酸钾、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、对羟基苯甲酸甲酯、GERMALL®115、GERMABEN®II、NEOLONE™、KATHON™和/或EUXYL®。

[0979] 示例性缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡糖酸钙、D-葡糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、羟基磷酸钙、乙酸钾、氯化钾、葡糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨基丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏液(Ringer's solution)、乙醇等和/或其组合。

[0980] 示例性润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、山嵛酸甘油酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、月桂基硫酸镁、月桂基硫酸钠等以及其组合。

[0981] 示例性油包括但不限于扁桃、杏仁、鳄梨、巴巴苏椰子、佛手柑、黑加仑籽、琉璃苣、杜松、洋甘菊、芥花、葛缕子、棕榈蜡、蓖麻、肉桂、可可脂、椰子、鱼肝、咖啡、玉米、棉籽、鹌鹑、桉树、月见草、鱼、亚麻籽、香茅醇、葫芦、葡萄籽、榛子、海索草、肉豆蔻酸异丙酯、西蒙德木、夏威夷核果、杂薰衣草、薰衣草、柠檬、山苍子、澳洲坚果、锦葵、芒果籽、白芒花籽、水貂、肉豆蔻、橄榄、柑橘、橙连鳍鲑、棕榈、棕榈仁、桃仁、花生、罂粟籽、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、红花、檀香木、山茶花、塔花、沙棘、芝麻、牛油树脂、硅酮、大豆、向日葵、茶树、蓟、椿、岩兰草、胡桃以及小麦胚芽油。示例性油包括但不限于硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环甲硅油、癸二酸二乙酯、聚二甲基硅氧烷360、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油和/或其组合。

[0982] 根据配制者的判断,赋形剂如可可脂和栓剂蜡、着色剂、涂覆剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂可存在于组合物中。

[0983] 递送

[0984] 本公开涵盖通过考虑可能推进药物递送科学的任何适当途径用于任何治疗剂、药物、诊断剂或成像的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的递送。递送可为裸露的或配制的。

[0985] 裸露的递送

[0986] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可裸露递送至细胞。如本文所使用,"裸露的"是指递送不含促进转染的试剂的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。例如,递送至细胞的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可不含有修饰。可使用本领域中已知和本文描述的施用途径将裸露的多核苷酸、初级构建体或mmRNA递送至细胞。

[0987] 配制的递送

[0988] 可使用本文描述的方法配制本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。制剂可含有可修饰和/或未修饰多核苷酸、初级构建体或mmRNA。制剂可进一步包括但不限于细胞穿透剂、药学上可接受的载体、递送剂、生物可侵蚀或生物相容的聚合物、溶剂以及持续释放递送贮库。可使用本领域中已知和本文描述的施用途径将配制的多核苷酸、初级构建体或mmRNA递送至细胞。

[0989] 组合物还可配制用于以本领域中若干方式中的任何方式直接递送至器官或组织,

所述方式包括但不限于通过使用基质如涂覆或浸渍有组合物等的织物或生物可降解材料，通过凝胶、粉末、软膏、霜剂、凝胶、洗剂和/或滴剂经过导管直接浸泡或沉浸。

[0990] 施用

[0991] 可通过产生治疗有效结果的任何途径施用本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。这些包括但不限于肠内、胃肠、硬膜外、经口、透皮、硬膜外(epidural)(硬膜外(peridural))、脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、皮外(涂敷在皮肤上)、皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤下)、鼻施用(通过鼻子)、静脉内(进入静脉)、动脉内(进入动脉)、肌内(进入肌肉)、心脏内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、鞘内(进入椎管)、腹膜内(输注或注射到腹膜中)、膀胱内输注、玻璃体内(通过眼睛)、海绵体内注射(进入阴茎底部)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、透皮(扩散穿过完好的皮肤用于系统分布)、透粘膜(扩散穿过粘膜)、吹入(嗅吸)、舌下、唇下、灌肠、滴眼液(滴在结膜上)或用滴耳液。在具体的实施方案中，组合物可以允许其穿过血脑屏障、血管屏障或其它上皮屏障的方式施用。用于本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的施用的非限制性途径在以下描述。

[0992] 肠胃外和注射施用

[0993] 用于肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬液、糖浆剂和/或酏剂。除了活性成分以外，液体剂型可包含在本领域中通常使用的惰性稀释剂，例如像水或其它溶剂、溶解剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯以及其混合物。除了惰性稀释剂以外，经口组合物可包括佐剂如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂。在用于肠胃外施用的某些实施方案中，组合物与溶解剂如CREMOPHOR®、醇、油、改性油、二醇类、聚山梨酯、环糊精、聚合物和/或其组合混合。

[0994] 可注射制剂，例如无菌可注射水性或油性混悬液可根据已知技术使用合适的分散剂、润湿剂和/或悬浮剂配制。无菌可注射制剂可为非毒性肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬液和/或乳剂，如在1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的媒介物和溶剂为水、林格氏液(U.S.P.)和等渗氯化钠溶液。无菌不挥发油常规用作溶剂或悬浮介质。出于此目的可采用任何温和的不挥发油，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸如油酸可用于可注射剂的制备中。

[0995] 可注射制剂可例如通过滤过细菌滞留过滤器和/或通过在使用之前可溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中的无菌固体组合物中加入灭菌剂来灭菌。

[0996] 为了延长活性成分的作用，常常希望减缓对来自皮下注射或肌内注射的活性成分的吸收。这可通过使用水溶性差的结晶或非定形材料的液体混悬液来实现。药物的吸收速率则取决于其溶解速率，而溶解速率又可取决于晶体大小和晶形。或者，通过将药物溶解或悬浮于油媒介物中来完成肠胃外施用的药物形式的延迟吸收。可注射贮库形式通过在生物可降解聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成药物的微胶囊基质来制得。取决于药物与聚合物的比率和所采用的具体聚合物的性质，可控制药物释放的速率。其它生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。贮库可注射制剂通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备。

[0997] 直肠和阴道施用

[0998] 用于直肠或阴道施用的组合物通常为栓剂，其可通过将组合物与在环境温度下为固体但在体温下为液体并且因此在直肠或阴道腔中熔化并释放活性成分的合适的非刺激性赋形剂如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合来制备。

[0999] 经口施用

[1000] 用于经口施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬液、糖浆剂和/或酏剂。除了活性成分以外，液体剂型可包含在本领域中通常使用的惰性稀释剂，例如像水或其它溶剂、溶解剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯以及其混合物。除了惰性稀释剂以外，经口组合物可包括佐剂如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂。在用于肠胃外施用的某些实施方案中，组合物与溶解剂如CREMOPHOR®、醇、油、改性油、二醇类、聚山梨酯、环糊精、聚合物和/或其组合混合。

[1001] 用于经口施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉末和颗粒剂。在此类固体剂型中，活性成分与至少一种惰性药学上可接受的赋形剂如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或填充剂或增量剂(例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇以及硅酸)、粘合剂(例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖以及阿拉伯树胶)、保湿剂(例如甘油)、崩解剂(例如琼脂、碳酸钙、土豆或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠)、溶解延缓剂(例如石蜡)、吸收促进剂(例如季铵盐化合物)、润湿剂(例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯)、吸收剂(例如高岭土和膨润土粘土)以及润滑剂(例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠)以及其混合物混合。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，剂型可包含缓冲剂。

[1002] 局部或透皮施用

[1003] 如本文所述，含有本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的组合物可配制用于局部施用。皮肤可为递送的理想靶部位，因为其易于进入。不仅可对皮肤限制基因表达(潜在地避免非特异性毒性)，而且对皮肤内的特定层和细胞类型的基因表达加以限制。

[1004] 所递送组合物的皮肤表达的部位将取决于核酸递送的途径。通常考虑三个途径将多核苷酸、初级构建体或mmRNA递送至皮肤：(i)局部涂敷(例如用于局部/区域治疗和/或化妆品涂敷)；(ii)透皮注射(例如用于局部/区域治疗和/或化妆品涂敷)；以及(iii)系统递送(例如用于治疗影响皮肤和皮肤外区域的皮肤疾病)。可通过本领域中已知的若干不同方法将多核苷酸、初级构建体或mmRNA递送至皮肤。已显示大多数局部递送方法可递送DNA，例如但不限于局部涂敷非阳离子脂质体-DNA复合物、阳离子脂质体-DNA复合物、颗粒介导的(基因枪)、穿刺介导的基因转染以及病毒递送方法。在递送核酸之后，在许多不同皮肤细胞类型中检测到基因产物，包括但不限于基础角质形成细胞、皮脂腺细胞、皮肤成纤维细胞以及皮肤巨噬细胞。

[1005] 在一个实施方案中，本发明提供用于方便和/或有效进行本发明的方法的各种敷料(例如，伤口敷料)或绷带(例如，粘合绷带)。通常敷料或绷带可包含足够量的本文描述的药物组合物和/或多核苷酸、初级构建体或mmRNA以允许使用者进行对受试者的多次治疗。

[1006] 在一个实施方案中，本发明提供待以多于一次注射递送的多核苷酸、初级构建体或mmRNA组合物。

[1007] 在一个实施方案中，在局部和/或透皮施用之前，至少一个组织区域如皮肤可受到

可增加穿透性的装置和/或溶液作用。在一个实施方案中,组织可受到磨损装置作用以增加皮肤的穿透性(参见美国专利公布号20080275468,其以引用的方式整体并入本文)。在另一个实施方案中,组织可受到超声增强装置作用。超声增强装置可包括但不限于在美国公布号20040236268和美国专利号6,491,657和6,234,990中描述的装置;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。增强组织穿透性的方法描述于美国公布号20040171980和20040236268以及美国专利号6,190,315中;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[1008] 在一个实施方案中,装置可用来在递送本文描述的修饰mRNA的制剂之前增加组织的穿透性。皮肤的穿透性可通过本领域中已知和/或在美国专利号6,190,315中描述的方法来测量,所述专利以引用的方式整体并入本文。作为一个非限制性实例,修饰mRNA制剂可通过描述于美国专利号6,190,315中的药物递送方法来递送,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[1009] 在另一个非限制性实例中,可在组织可受到可增加穿透性的装置作用之前、期间和/或之后用局部麻醉剂共溶合质(EMLA)霜剂处理组织。Katz等(Anesth Analg(2004);98:371-76;其以引用的方式整体并入本文)证实与低能量组合使用EMLA霜剂,在用低能量超声预处理之后5分钟很快就见到表面皮肤镇痛开始。

[1010] 在一个实施方案中,可在组织已处理来增加穿透性之前、期间和/或之后将增强剂施加至组织。增强剂包括但不限于转运增强剂、物理增强剂和空化增强剂。增强剂的非限制性实例描述于美国专利号6,190,315中,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[1011] 在一个实施方案中,装置可用来在递送本文描述的修饰mRNA的制剂之前增加组织的穿透性,所述制剂可进一步含有引起免疫应答的物质。在另一个非限制性实例中,含有引起免疫应答的物质的制剂可通过在美国公布号20040171980和20040236268中描述的方法来递送;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[1012] 用于局部和/或透皮施用组合物的剂型可包括软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂和/或贴剂。通常,在无菌条件下将活性成分与药学上可接受的载体和/或任何所需的防腐剂和/或可能需要的缓冲剂混合。

[1013] 另外,本发明涵盖透皮贴剂的使用,所述透皮贴剂常常具有提供将化合物受控制的递送至身体的额外优点。此种剂型可例如通过将化合物溶解和/或分散于适当的介质中来制备。可选地或另外地,可通过提供速率控制膜和/或通过将化合物分散于聚合物基质和/或凝胶中来控制速率。

[1014] 适用于局部施用的制剂包括但不限于液体和/或半液体制剂如擦剂、洗剂、水包油和/或油包水乳剂如霜剂、软膏和/或糊剂、和/或溶液和/或混悬液。

[1015] 可局部施用的制剂可例如包含约0.1%至约10%(w/w)活性成分,虽然活性成分的浓度可如活性成分在溶剂中的溶解度极限那么高。用于局部施用的制剂可进一步包含本文描述的一种或多种另外成分。

[1016] 贮库施用

[1017] 如本文所述,在一些实施方案中,组合物配制在用于延长释放的贮库中。通常,特定器官或组织(“靶组织”)被靶向用于施用。

[1018] 在本发明的一些方面中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA在空间上保留于靶组织内或邻近靶组织。提供了通过在使得组合物(具体为组合物的核酸组分)大致上保留在靶组织

中，意味着至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.9％、99.99％或大于99.99％的组合物保留在靶组织中的条件下使靶组织(其含有一个或多个靶细胞)与组合物接触来向哺乳动物受试者的靶组织提供组合物的方法。有利地，通过测量存在于进入一个或多个靶细胞的组合物中的核酸的量来确定保留。例如，在施用之后的一段时间里，至少1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.9％、99.99％或大于99.99％的施用至受试者的核酸存在于细胞内。例如，使用含核糖核酸和转染试剂的水性组合物进行向哺乳动物受试者肌内注射，并且通过测量存在于肌细胞中的核糖核酸的量来确定组合物的保留。

[1019] 本发明的方面涉及通过在使得组合物大致上保留在靶组织中的条件下使靶组织(含有一个或多个靶细胞)与组合物接触来向哺乳动物受试者的靶组织提供组合物的方法。组合物含有有效量的多核苷酸、初级构建体或mmRNA以使得目标多肽在至少一个靶细胞中产生。组合物通常含有细胞穿透剂，虽然也涵盖“裸露的”核酸(如不具有细胞穿透剂或其它试剂的核酸)，以及药学上可接受的载体。

[1020] 在一些情况下，由组织中的细胞产生的蛋白质的量按希望地增加。优选地，蛋白质产生的这种增加在空间上局限于靶组织内的细胞。因此，提供了增加哺乳动物受试者的组织中目标蛋白质的产生的方法。提供含有多核苷酸、初级构建体或mmRNA的组合物，其特征在于已确定单位量的组合物在包含于预先确定体积的靶组织内的很大百分比的细胞中产生目标多肽。

[1021] 在一些实施方案中，组合物包括多种不同的多核苷酸、初级构建体或mmRNA，其中一种或多于一种多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码目标多肽。任选地，组合物还含有细胞穿透剂以帮助组合物的细胞内递送。对包含在预先确定体积的靶组织内的很大百分比的细胞中产生目标多肽所需要的组合物的剂量进行确定(通常，在接近预先预定的体积或在靶组织远端的组织中不诱导目标多肽的显著产生)。在此确定之后，将确定的剂量直接引入到哺乳动物受试者的组织中。

[1022] 在一个实施方案中，本发明提供待以多于一次注射或通过分次剂量注射递送的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。

[1023] 在一个实施方案中，本发明可使用小的一次性药物储器、贴片泵或渗透泵而保留在靶组织附近。贴片泵的非限制性实例包括由BD® (Franklin Lakes,NJ)、Insulet Corporation(Bedford,MA)、SteadyMed Therapeutics(San Francisco,CA)、Medtronic (Minneapolis,MN) (例如，MiniMed)、UniLife(York,PA)、Valeritas(Bridgewater,NJ)以及SpringLeaf Therapeutics(Boston,MA)制造和/或销售的那些。渗透泵的一个非限制性实例包括由DURECT® (Cupertino,CA) (例如，DUROS®和ALZET ®)制造的那些。

[1024] 肺施用

[1025] 药物组合物可以适用于经过口腔进行肺施用的制剂形式制备、包装和/或销售。这种制剂可包含干颗粒，其包含活性成分并且其具有在约0.5nm至约7nm或约1nm至约6nm范围内的直径。此类组合物适当地以待施用的干粉末形式存在，所述干粉末使用包括可指导推进剂流向其分散粉末的干粉末储器的装置和/或使用自推进溶剂/粉末分散容器如包含溶解和/或悬浮于密封容器中的低沸点推进剂中的活性成分的装置来施用。此类粉末包含颗

粒,其中至少98重量%的颗粒具有大于0.5nm的直径并且至少95%数目的颗粒具有小于7nm的直径。或者,至少95重量%的颗粒具有大于1nm的直径并且至少90%数目的颗粒具有小于6nm的直径。干粉末组合物可包括固体精细粉末稀释剂如糖并且合宜地以单位剂型提供。

[1026] 低沸点推进剂通常包括在大气压力下沸点低于65℉的液体推进剂。通常,推进剂可占组合物的50%至99.9%(w/w),并且活性成分可占组合物的0.1%至20%(w/w)。推进剂可进一步包含另外成分,如液体非离子型和/或固体阴离子表面活性剂和/或固体稀释剂(其粒度可与包含活性成分的颗粒的数量级相同)。

[1027] 作为一个非限制性实例,本文描述的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可配制用于通过在美国专利号8,257,685中描述的方法进行肺部递送;所述专利以引用的方式整体并入本文。

[1028] 配制用于肺部递送的药物组合物可以溶液和/或混悬液的液滴形式提供活性成分。此类制剂可呈任选无菌的、包含活性成分的水性和/或稀释醇溶液和/或混悬液形式制备、包装和/或销售,并且可合宜地使用任何喷雾和/或雾化装置施用。此类制剂可进一步包含一种或多种另外成分,包括但不限于调味剂如糖精钠、挥发油、缓冲剂、表面活性剂和/或防腐剂如羟基苯甲酸甲酯。通过此施用途径提供的液滴可具有在约0.1nm至约200nm范围内的平均直径。

[1029] 鼻内、鼻和口腔施用

[1030] 作为可用于肺部递送的本文描述的制剂可用于药物组合物的鼻内递送。适用于鼻内施用的另一种制剂为包含活性成分并且平均颗粒为约0.2μm至500μm的粗粉末。这种制剂以采用鼻吸的方式施用,即通过从置于鼻子附近的粉末容器快速吸入穿过鼻通道。

[1031] 适用于鼻施用的制剂可例如包含少至0.1%(w/w)并且多至100%(w/w)的活性成分,并且可包含一种或多种本文描述的另外成分。药物组合物可以适用于口腔施用的制剂形式制备、包装和/或销售。此类制剂可例如以使用常规方法制得的片剂和/或锭剂的形式存在,并且可例如包含0.1%至20%(w/w)活性成分,其余包含经口可溶解和/或可降解的组合物和任选地一种或多种本文描述的另外成分。或者,适用于口腔施用的制剂可包含含有活性成分的粉末和/或气雾化和/或雾化的溶液和/或混悬液。此类粉状、气雾化和/或气雾化的制剂在分散时可具有在约0.1nm至约200nm范围内的平均颗粒和/或液滴大小,并且可进一步包含一种或多种本文描述的任何另外成分。

[1032] 眼施用

[1033] 药物组合物可以适用于眼施用的制剂形式制备、包装和/或销售。此类制剂可例如以滴眼液的形式存在,包括例如活性成分在水性或油性液体赋形剂中的0.1%/1.0%(w/w)溶液和/或混悬液。此类滴液可进一步包含缓冲剂、盐和/或一种或多种本文描述的其它任何另外成分。有用的其它眼可施用的制剂包括以微晶形式和/或以脂质体制剂存在的包含活性成分的那些。滴耳液和/或滴眼液涵盖在本发明的范围内。多层薄膜装置可制备为含有用于递送至眼睛和/或周围组织的药物组合物。

[1034] 有效负载施用:可检测剂和治疗剂

[1035] 本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用于许多不同的情景中,其中希望将物质(“有效负载”)递送至生物靶标,例如递送用于检测靶标的可检测物质或递送治疗剂。检测方法可包括但不限于体外成像和体内成像方法,例如免疫组织化学、生物发光成像

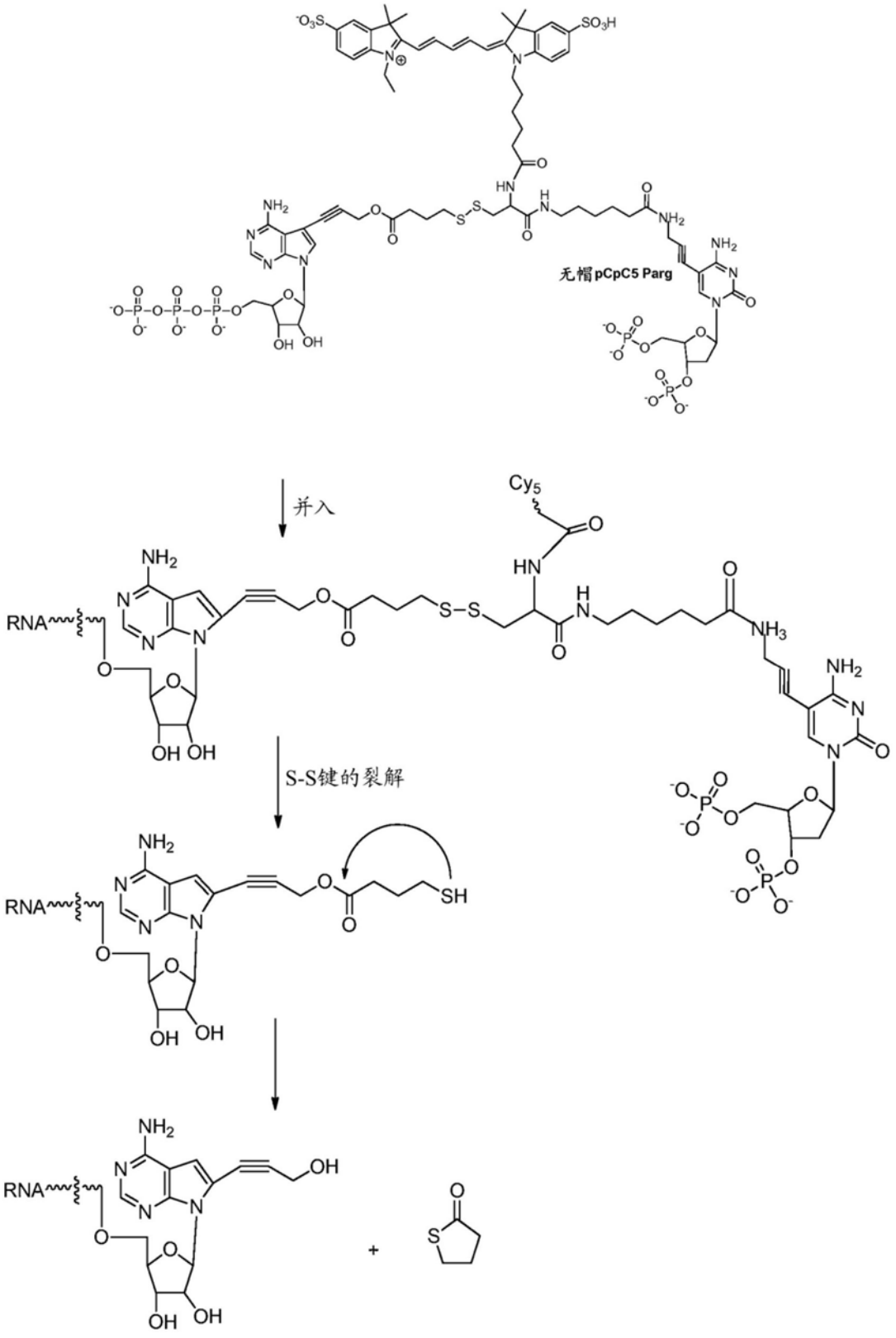
(BLI)、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层摄影术(PET)、电子显微术、X-射线计算断层摄影、拉曼成像、光学相干断层成像、吸收成像、热成像、荧光反射成像、荧光显微术、荧光分子断层成像、核磁共振成像、X-射线成像、超声成像、光声成像、实验室测定或在需要标记/染色/成像的任何情况下。

[1036] 多核苷酸、初级构建体或mmRNA可设计包括呈任何有用取向的接头和有效负载。例如,具有两个端的接头可用来将一端附着至有效负载并且将另一端附着至核碱基,如在脱氮腺苷或脱氮鸟苷的C-7或C-8位置上或至胞嘧啶或尿嘧啶的N-3或C-5位置。本发明的多核苷酸可包括多于一种有效负载(例如,标记物和转录抑制剂)以及一种可裂解接头。在一个实施方案中,修饰核苷酸为修饰的三磷酸7-脱氮-腺苷,其中可裂解接头的一端附着至7-脱氮-腺苷的C7位置,接头的另一端附着至抑制剂(例如,附着至胞苷上的核碱基的C5位置),并且标记物(例如,Cy5)附着至接头的中心(参见例如美国专利号7,994,304的图5和第9和10列中的无冒A*pCp C5Parg的化合物1,所述专利以引用的方式并入本文)。在将修饰的三磷酸7-脱氮-腺苷并入至编码区时,所得到的具有可裂解接头的多核苷酸附着至标记物和抑制剂(例如,聚合酶抑制剂)。在接头裂解时(例如,在还原条件下还原具有可裂解的二硫键部分的接头),释放标记物和抑制剂。本文描述了另外的接头和有效负载(例如,治疗剂、可检测的标记物以及细胞穿透有效负载)。

[1037] 以下的方案12描绘了示例性的修饰核苷酸,其中核碱基腺嘌呤在7-脱氮腺嘌呤的C-7碳上附着至接头。另外,方案12描绘了具有并入到mRNA的3'端上的接头和有效负载(例如可检测剂)的修饰核苷酸。二硫键裂解和炔丙酯上的硫醇基的1,2-加成释放了可检测剂。剩余结构(在方案12中例如描绘为pApC5Parg)为抑制剂。用于修饰核苷酸的结构的原则为栓系的抑制剂空间上干扰聚合酶并入第二碱基的能力。因此,关键的是系链为足以影响这种功能的长度并且抑制剂处于抑制或阻止第二和后续核苷酸进入成长的多核苷酸链中的立体化学取向中。

[1038] 方案12

[1039]



[1040] 例如，本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用于重新编程所诱导的多能干细胞(iPS细胞)中，与成簇的总细胞相比其可直接追踪转染的细胞。在另一个实例中，可经过接头附着至多核苷酸、初级构建体或mmRNA并且可荧光标记的药物可用来体内例如在细胞内追踪药物。其它实例包括但不限于在可逆药物递送到细胞中使用多核苷酸、初级构建体或mmRNA。

[1041] 本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用于有效负载例如可检测剂或治疗剂对特定细胞器的细胞内靶向中。示例性的细胞内靶标可包括但不限于用于高级mRNA加工的核定位或连接至含有抑制剂的mRNA的核定位序列(NLS)。

[1042] 另外,本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用来将治疗剂递送至例如活动物体内的细胞或组织。例如,本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用来递送高度极性的化学治疗剂以杀死癌细胞。通过接头附着至治疗剂的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可促进允许治疗剂行进到细胞中到达细胞内靶标的膜穿透。

[1043] 在一个实例中,接头附着在核糖环的2'-位置上和/或多核苷酸、初级构建体或mmRNA的3'和/或5'位置上(参见例如国际公布号WO2012030683,其以引用的方式整体并入本文)。接头可为本文公开、本领域中已知和/或在国际公布号WO2012030683中公开的任何接头,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[1044] 在另一个实例中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可通过可裂解接头附着至多核苷酸、初级构建体或mmRNA病毒抑制肽(VIP)。可裂解接头可使VIP和染料释放到细胞中。在另一个实例中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可通过接头附着至ADP-核糖基化物(ADP-ribosylate),其负责一些细菌毒素如霍乱毒素、白喉毒素和百日咳毒素的作用。这些毒素蛋白是改变人细胞中的靶蛋白的ADP-核糖基转移酶。例如,霍乱毒素ADP-核糖基化物G蛋白通过从小肠内层引起导致威胁生命的腹泻的大量流体分泌来改变人细胞。

[1045] 在一些实施方案中,有效负载可以是治疗剂如细胞毒素、放射性离子、化学治疗剂或其它治疗剂。细胞毒素或细胞毒性剂包括可对细胞有害的任何药剂。实例包括但不限于紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxyanthracinedione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素、美登木素生物碱(maytansinoid)例如美登木醇(maytansinol)(参见美国专利号5,208,020,其整体并入本文)、拉奇霉素(rachelmycin)(CC-1065,参见美国专利号5,475,092、5,585,499和5,846,545,所有所述专利均以引用的方式并入本文)以及其类似物或同系物。放射性离子包括但不限于碘(例如,碘125或碘131)、锶89、磷、钯、铯、铱、磷酸盐、钴、钇90、钐153以及镥。其它治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺)、烷基化剂(例如,氮芥、塞替派、苯丁酸氮芥、拉奇霉素(CC-1065)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BCNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C以及顺-二氯二胺铂(II)(DDP)、顺铂)、蒽环霉素(anthracyclines)(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如,更生霉素(dactinomycin)(以前称为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(anthramycin)(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱、长春碱、紫杉醇和美登木素生物碱)。

[1046] 在一些实施方案中,有效负载可以是可检测剂,如各种有机小分子、无机化合物、纳米颗粒、酶或酶底物、荧光材料、发光材料(例如,鲁米诺(luminal))、生物发光材料(例如,荧光素酶、荧光素和水母蛋白)、化学发光材料、放射性材料(例如,^{18}F、^{67}Ga、^{81m}Kr、^{82}Rb、^{111}In、^{123}I、^{133}Xe、^{201}Tl、^{125}I、^{35}S、^{14}C、^{3}H或^{99m}Tc(例如,如高锝酸盐(高锝酸根(VII),TcO_4^-))

以及造影剂(例如,金(例如,金纳米颗粒)、钆(例如,螯合的Gd)、氧化铁(例如,超顺磁性氧化铁(SPIO)、单晶氧化铁纳米颗粒(MION)和超小超顺磁性氧化铁(USPIO))、镁螯合物(例如,Mn-DPDP)、硫酸钡、碘化造影介质(碘海醇)、微泡或全氟化碳)。此类光学可检测的标记物包括例如不限于:4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸根合二苯乙烯-2,2′二磺酸;吖啶和衍生物(例如,吖啶和吖啶异氰酸酯);5-(2′-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS);4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基)苯基]萘酰亚胺-3,5二磺酸酯;N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺;邻氨基苯甲酰胺;BODIPY;亮黄;香豆素和衍生物(例如,香豆素、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC,香豆素120)和7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆素151));花青染料;焰红染料;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI);5′5″-二溴连苯三酚-磺酞(溴邻苯三酚红);7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸根合苯基)-4-甲基香豆素;二亚乙基三胺五乙酸酯;4,4'-二异硫氰酸根合二氢-二苯乙烯-2,2′-二磺酸;4,4'-二异硫氰酸根合二苯乙烯-2,2′-二磺酸;5-[二甲基氨基]-萘-1-磺酰氯(DNS,丹酰氯);4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯(DABITC);曙红和衍生物(例如,曙红和曙红异硫氰酸酯);藻红和衍生物(例如,藻红B和藻红异硫氰酸酯);乙锭;荧光素和衍生物(例如,5-羧基荧光素(FAM)、5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素(DTAF)、2',7'-二甲氧基-4'5′-二氯-6-羧基荧光素、荧光素、异硫氰酸荧光素、X-罗丹明-5-(和-6)-异硫氰酸酯(QFITC或XRITC)以及荧光胺);2-[2-[3-[[1,3-二氢-1,1-二甲基-3-(3-磺丙基)-2H-苯并[e]吲哚-2-亚基]亚乙基]-2-[4-(乙氧基羰基)-1-哌嗪基]-1-环戊烯-1-基]乙烯基]-1,1-二甲基-3-(3-磺丙基)-1H-苯并[e]吲哚氢氧化物,内盐,与n,n-二乙基乙胺复合(1:1)(IR144);5-氯-2-[2-[3-[(5-氯-3-乙基-2(3H)-苯并噻唑-亚基)亚乙基]-2-(二苯基氨基)-1-环戊-1-基]乙烯基]-3-乙基苯并噻唑高氯酸盐(IR140);孔雀石绿异硫氰酸酯;4-甲基伞形酮邻甲酚酞;硝基酪氨酸;碱性副品红;酚红;B-藻红蛋白;邻苯二醛;芘和衍生物(例如,芘、芘丁酸酯以及琥珀酰亚胺基1-芘);丁酸酯量子点;活性红4(CIBACRON™亮红3B-A);罗丹明和衍生物(例如,6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基罗丹明(R6G)、丽丝胺罗丹明B、磺酰氯罗丹明(Rhod)、罗丹明B、罗丹明123、罗丹明X异硫氰酸酯、磺基罗丹明B、磺基罗丹明101、磺基罗丹明101的磺酰氯衍生物(德克萨斯红)、N,N,N',N'四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)四甲基罗丹明以及四甲基罗丹明异硫氰酸酯(TRITC));核黄素;玫红酸;铽螯合物衍生物;花青-3(Cy3);花青-5(Cy5);花青-5.5(Cy5.5)、花青-7(Cy7);IRD 700;IRD 800;Alexa 647;La Jolta Blue;酞菁以及萘酞菁。

[1047] 在一些实施方案中,可检测剂可以是在激活时变为可检测的非可检测前体(例如,发荧光的四嗪荧光团构建体(例如,四嗪-BODIPY FL、四嗪-奥勒冈绿488或四嗪-BODIPY TMR-X)或酶可激活发荧光剂(例如,PROSENSE® (VisEn Medical)))。可使用酶标记的组合物的体外测定包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀测定、免疫荧光法、酶免疫测定(EIA)、放射性免疫测定(RIA)以及蛋白质印迹分析。

[1048] 组合

[1049] 多核苷酸、初级构建体或mmRNA可与一种或多种其它治疗剂、预防剂、诊断剂或成像剂组合使用。"组合"并非旨在暗示药剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,虽然这些递送方法在本公开的范围内。组合物可在一种或多种其它希望的治疗剂或医学程序同时、之前或之后施用。通常,每种药剂将在一定剂量下和/或根据针对所述药剂确定的时间表施用。在一些实施方案中,本公开涵盖与可改进其生物利用率、减少和/或改变其代谢、抑制其

排泄和/或改变其在身体内分布的药剂组合递送药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物。作为一个非限制性实例，核酸或mmRNA可与用于治疗癌症或控制过度增殖细胞的药物剂组合使用。在美国专利号7,964,571(其以引用的方式整体并入本文)中，描述了用于治疗原发性或转移性实体瘤的组合疗法，其使用包括编码白细胞介素-12的DNA质粒和脂质聚合物的药物组合物并且还递送至少一种抗癌剂或化学治疗剂。此外，编码抗增殖分子的本发明的核酸和mmRNA可与脂质聚合物一起存在于药物组合物中(参见例如美国公布号20110218231，其以引用的方式整体并入本文，要求了包含编码抗增殖分子的DNA质粒和脂质聚合物的药物组合物)，所述药物组合物可与至少一种化学治疗剂或抗癌剂一起施用。

[1050] 将进一步了解的是，组合使用的治疗活性剂、预防活性剂、诊断活性剂或成像活性剂可以单一组合物一起施用或以不同组合物分开施用。通常，预期组合使用的药剂在不超过它们单独使用的水平下使用。在一些实施方案中，组合使用的水平将低于单独使用的那些水平。在一个实施方案中，可根据本文描述的分次给药方案施用所述组合，各自施用或一起施用。

[1051] 给药

[1052] 本发明提供了包括向有需要的受试者施用根据本发明的修饰mRNA和其编码的蛋白质或复合物的方法。可使用有效用于预防、治疗、诊断或成像疾病、病症和/或病状(例如，与工作记忆缺失相关的疾病、病症和/或病状)的任何量和任何施用途径向受试者施用核酸、蛋白质或复合物或其药物组合物、成像组合物、诊断组合物或预防组合物。所需要的精确量可取决于受试者的种类、年龄和一般状况、疾病的严重性、具体组合物、其施用方式、其作用方式等在受试者与受试者之间不同。根据本发明的组合物通常配制成便于施用和剂量均匀的剂量单位形式。然而，将理解的是，本发明的组合物的总每日用量可由主治医师在合理医学判断范围内决定。任何具体患者的具体治疗有效、预防有效或适当成像的剂量水平将取决于各种因素，所述因素包括所治疗的病症和病症的严重性；所采用的具体化合物的活性；所采用的具体组合物；患者年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；所采用的具体化合物的施用时间、施用途径和排泄速率；治疗持续时间；与所采用的具体化合物组合或同时使用的药物；以及医学领域中熟知的类似因素。

[1053] 在某些实施方案中，根据本发明的组合物可以足够每天递送约0.0001mg/kg至约100mg/kg、约0.001mg/kg至约0.05mg/kg、约0.005mg/kg至约0.05mg/kg、约0.001mg/kg至约0.005mg/kg、约0.05mg/kg至约0.5mg/kg、约0.01mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg或约1mg/kg至约25mg/kg受试者体重的剂量水平下一天一次或多次施用，以获得所希望的治疗、诊断、预防或成像效果。可一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周递送所希望的剂量。在某些实施方案中，可使用多次施用(例如，两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)递送所希望的剂量。当采用多次施用时，可使用分次给药方案，如本文描述的那些。

[1054] 根据本发明，已发现以分剂量方案施用mmRNA在哺乳动物受试者体内产生更高水平的蛋白质。如本文所使用，“分剂量”为将单个单位剂量或总每日剂量分成两次或更多次剂量，例如单个单位剂量的两次或更多次施用。如本文所使用，“单个单位剂量”为以一次剂量/一次/单个途径/单个接触点施用的任何治疗剂的剂量，即，单次施用事件。如本文所使

用,“总每日剂量”为24小时时期内给予或规定的量。所述总每日剂量可作为单个单位剂量施用。在一个实施方案中,以分剂量向受试者施用本发明的mmRNA。mmRNA可仅配制在缓冲液中或配制在本文描述的制剂中。

[1055] 剂型

[1056] 本文描述的药物组合物可配制成本文描述的剂型,如局部的、鼻内的、气管内的或可注射的(例如,静脉内、眼内、玻璃体内、肌内、心脏内、腹膜内、皮下)。

[1057] 液体剂型

[1058] 用于肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬液、糖浆剂以及酏剂。除了活性成分以外,液体剂型可包含在本领域中通常使用的惰性稀释剂,包括但不限于水或其它溶剂、溶解剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯以及其混合物。在用于肠胃外施用的某些实施方案中,组合物可与溶解剂如CREMOPHOR®、醇、油、改性油、二醇类、聚山梨酯、环糊精、聚合物和/或其组合混合。

[1059] 可注射剂

[1060] 可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性混悬液可根据已知技术配制并且可包括合适的分散剂、润湿剂和/或悬浮剂。无菌可注射制剂可为非毒性肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬液和/或乳剂,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的媒介物和溶剂包括但不限于水、林格氏液(U.S.P.)以及等渗氯化钠溶液。无菌不挥发油常规用作溶剂或悬浮介质。出于此目的可采用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸如油酸可用于可注射剂的制备中。

[1061] 可注射制剂可例如通过滤过细菌滞留过滤器和/或通过在使用之前可溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中的无菌固体组合物中加入灭菌剂来灭菌。

[1062] 为了延长活性成分的作用,可希望减缓对来自皮下注射或肌内注射的活性成分的吸收。这可通过使用水溶性差的结晶或非定形材料的液体混悬液来实现。多核苷酸、初级构建体或mmRNA的吸收速率则取决于其溶解速率,而溶解速率又可取决于晶体大小和晶形。或者,肠胃外施用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的延迟吸收可通过将多核苷酸、初级构建体或mmRNA溶解或悬浮于油性媒介物中来完成。可注射贮库形式通过在如聚丙交酯-聚乙交酯的生物可降解聚合物中形成多核苷酸、初级构建体或mmRNA的微胶囊基质来制得。取决于多核苷酸、初级构建体或mmRNA与聚合物的比率和所采用的具体聚合物的性质,可控制多核苷酸、初级构建体或mmRNA释放的速率。其它生物可降解聚合物的实例包括但不限于聚(原酸酯)和聚(酸酐)。贮库可注射制剂可通过将多核苷酸、初级构建体或mmRNA包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备。肺

[1063] 作为可用于肺部递送的本文描述的制剂还可用于药物组合物的鼻内递送。适用于鼻内施用的另一种制剂可为包含活性成分并且平均颗粒为约0.2μm至500μm的粗粉末。这种制剂可以采用鼻吸的方式施用,即通过从置于鼻子附近的粉末容器快速吸入穿过鼻通道。

[1064] 适用于鼻施用的制剂可例如包含少至0.1%(w/w)并且多至100%(w/w)的活性成分,并且可包含一种或多种本文描述的另外成分。药物组合物可以适用于口腔施用的制剂形式制备、包装和/或销售。此类制剂可例如以使用常规方法制得的片剂和/或锭剂的形式

存在,并且可例如含有约0.1%至20%(w/w)活性成分,其中其余可包含经口可溶解和/或可降解的组合物和任选地一种或多种本文描述的另外成分。或者,适用于口腔施用的制剂可包含含有活性成分的粉末和/或气雾化和/或雾化的溶液和/或混悬液。此类粉状、气雾化和/或气雾化的制剂在分散时可具有在约0.1nm至约200nm范围内的平均颗粒和/或液滴大小,并且可进一步包含一种或多种本文描述的任何另外成分。

[1065] 在配制和/或制造药剂方面的一般考虑因素可见于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(其以引用的方式整体并入本文)中。

[1066] 包衣或壳

[1067] 可用包衣和壳如药物配制领域中熟知的肠包衣和其它包衣制备片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型。它们可任选包含遮光剂并且可具有它们仅仅或优选地在肠道的某一部分中任选地以延迟的方式释放活性成分的组成。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。类似类型的固体组合物可使用如乳糖或奶糖的赋形剂以及高分子量聚乙二醇等来用作软质和硬质填充明胶胶囊中的填充剂。

[1068] 药物组合物的特性

[1069] 本文描述的药物组合物可由生物利用率、治疗窗和/或分布体积中的一个或多个来表征。

[1070] 生物利用率

[1071] 当与本文所述的递送剂配制成组合物时,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可展现出与缺乏本文所述的递送剂的组合物相比生物利用率的增加。如本文所使用,术语“生物利用率”是指向哺乳动物施用的给定量的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的系统利用率。可通过测量将化合物施用至哺乳动物之后未改变形式的化合物的曲线下面积(AUC)或最大血清或血浆浓度(C_{max})来评定生物利用率。AUC为沿着纵坐标(Y轴)的化合物的血清或血浆浓度对沿着横坐标(X轴)的时间作图的曲线下面积的确定。通常,可使用本领域普通技术人员已知并且如G.S.Banker,Modern Pharmaceutics,Drugs and the Pharmaceutical Sciences,第72卷,Marcel Dekker,New York,Inc.,1996中所述的方法来计算具体化合物的AUC,所述参考文献以引用的方式整体并入本文。

[1072] C_{max}值为在将化合物施用至哺乳动物之后在哺乳动物的血清或血浆中达到的化合物的最大浓度。可使用本领域普通技术人员已知的方法来测量具体化合物的C_{max}值。如本文所使用的短语“增加生物利用率”或“改进药物代谢动力学”意指在与本文所述的递送剂共同施用时在哺乳动物中作为AUC、C_{max}或C_{min}测量的第一多核苷酸、初级构建体或mmRNA的系统利用率比在没有发生这种共同施用时更大。在一些实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA的生物利用率可增加至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、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%或约100%。

[1073] 治疗窗

[1074] 当与本文所述的递送剂配制成组合物时,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可展现出所施用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA组合物的治疗窗与缺乏本文所述的递送剂的所施

用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA组合物的治疗窗相比有所增加。如本文所使用的“治疗窗”是指血浆浓度的范围或作用部位处的治疗活性物质的水平范围，具有高的引发治疗作用的可能性。在一些实施方案中，在与本文所述的递送剂共同施用时多核苷酸、初级构建体或mmRNA的治疗窗可增加至少约2％、至少约5％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、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％或约100％。

[1075] 分布体积

[1076] 当与本文所述的递送剂配制成组合物时，多核苷酸、初级构建体或mmRNA可展现出相对于缺乏本文所述的递送剂的组合物分布体积(V_{dist})有所改进，例如减小或靶向。分布体积(Vdist)使身体内的药物的量与血液或血浆中的药物的浓度联系起来。如本文所使用，术语“分布体积”是指在与血液或血浆中的相同浓度下在身体内容纳药物总量所需要的流体体积：Vdist等于身体内的药物量/血液或血浆中的药物浓度。例如，针对10mg剂量和10mg/L的血浆浓度，分布体积将为1升。分布体积反映出药物存在于血管外组织中的程度。大的分布体积反映出与血浆蛋白结合相比化合物结合组织组分的倾向。在临床环境中，Vdist可用来确定实现稳态浓度的负载剂量。在一些实施方案中，在与本文所述的递送剂共同施用时多核苷酸、初级构建体或mmRNA的分布体积可减少至少约2％、至少约5％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％。

[1077] 生物效应

[1078] 在一个实施方案中，递送至动物的修饰mRNA的生物效应可通过分析动物中的蛋白质表达来分类。蛋白质表达可通过分析从施用本发明的修饰mRNA的哺乳动物中收集的生物样品来确定。在一个实施方案中，至少50pg/ml的由施用给哺乳动物的修饰mRNA编码的表达蛋白质可为优选的。例如，由递送给哺乳动物的修饰mRNA编码的蛋白质的50-200pg/ml的蛋白质表达可看作哺乳动物体内治疗有效量的蛋白质。

[1079] 通过质谱法检测修饰核酸

[1080] 质谱法(MS)是可在分子转化为离子之后提供关于分子的结构和分子质量/浓度信息的分析技术。首先电离分子以获得正电荷或负电荷并且然后它们行进穿过质量分析器以根据其质/荷(m/z)比到达检测器的不同区域。

[1081] 使用质谱仪进行质谱法，所述质谱仪包括用于电离分级分离的样品和产生用于进一步分析的带电荷分子的离子源。例如样品的电离可通过电喷雾电离(ESI)、大气压化学电离(APCI)、光致电离、电子电离、快速原子轰击(FAB)/液相次级电离(LSIMS)、基质辅助激光解吸/电离(MALDI)、场致电离、场解吸、热喷射/等离子体喷射电离以及粒子束电离来进行。熟练技术人员将理解可基于待测量的分析物、样品类型、检测器类型、正负模式的选择等确定电离方法的选择。

[1082] 在样品被电离之后，可分析由此产生的带正电荷或带负电荷的离子以确定质荷比(即，m/z)。用于确定质荷比的合适的分析器包括四极分析器、离子阱分析器和飞行时间分析器。可使用若干检测模式检测离子。例如，可检测(即，使用选择性离子监测模式(SIM))检测选择的离子，或可选地，可使用扫描模式例如多重反应监测(MRM)或选择反应监测(SRM)

来检测离子。

[1083] 已显示与稳定的同位素标记的肽标准物稀释物偶联的液相色谱法-多重反应监测(LC-MS/MRM)是用于蛋白质验证的有效方法(例如,Keshishian等,Mol Cell Proteomics 2009 8:2339-2349;Kuhn等,Clin Chem 2009 55:1108-1117;Lopez等,Clin Chem 2010 56:281-290;其各自均以引用的方式整体并入本文)。不像频繁用于生物标志物发现研究中的未靶向的质谱法,靶向的MS方法是集中仪器的全部分析能力在复杂混合物中的数十至数百种选择的肽上的基于肽序列的MS模式。通过将检测和分级分离仅局限于来源于目标蛋白质的那些肽,灵敏度和可再现性与发现模式MS方法相比显著改进。基于质谱法的多重反应监测(MRM)定量蛋白质的这种方法可通过临床样品的快速、靶向的、倍增蛋白质表达谱绘制显著地影响生物标志物的发现和定量。

[1084] 在一个实施方案中,可通过MRM-MS的方法来分析可含有由本发明的至少一种修饰mRNA编码的至少一种蛋白质的生物样品。生物样品的定量可进一步包括但不限于作为内标物的同位素标记的肽或蛋白质。

[1085] 根据本发明,生物样品一旦从受试者中获得便可受到酶消化。如本文所使用,术语“消化”意指碎裂成更短的肽。如本文所使用,短语“处理样品以消化蛋白质”意指以为了破坏样品中的蛋白质的方式操纵样品。这些酶包括但不限于胰蛋白酶、内切蛋白酶Glu-C和胰凝乳蛋白酶。在一个实施方案中,可使用酶来消化可含有由本发明的至少一种修饰mRNA编码的至少一种蛋白质的生物样品。

[1086] 在一个实施方案中,可使用电喷雾电离分析可含有由本发明的修饰mRNA编码的蛋白质的生物样品中的蛋白质。电喷雾电离(ESI)质谱法(ESIMS)使用电能来帮助离子在通过质谱法进行分析之前从溶液转移至气相。可使用本领域中已知的方法分析样品(例如,Ho等,Clin Biochem Rev.2003 24(1):3-12;其以引用的方式整体并入本文)。可通过分散电荷液滴的细小喷雾、蒸发溶剂以及使离子从带电荷液滴射出以产生高度带电荷液滴的薄雾,来将包含在溶液中的离子种类转移到气相中。可使用至少1个、至少2个、至少3个或至少4个质量分析器如但不限于四极质量分析器来分析高度带电荷液滴的薄雾。此外,质谱方法可包括纯化步骤。作为一个非限制性实例,可设置第一四极以选择单一m/z比,这样它可滤掉具有不同m/z比的其它分子离子,这可在MS分析之前消除复杂耗时的样品纯化工序。

[1087] 在一个实施方案中,可在串联ESIMS系统(例如,MS/MS)中分析可含有由本发明的修饰mRNA编码的蛋白质的生物样品中的蛋白质。作为非限制性实例,可使用产物扫描(或子离子扫描)、前体扫描(母离子扫描)、中性丢失或多重反应监测来分析液滴。

[1088] 在一个实施方案中,可使用基质辅助激光解吸/电离(MALDI)质谱法(MALDIMS)分析可含有由本发明的修饰mRNA编码的蛋白质的生物样品。MALDI提供大分子和小分子如蛋白质的非破坏性汽化和电离。在MALDI分析中,首先使分析物与大量摩尔过量的基质化合物共同结晶,所述基质化合物还可包括但不限于吸收紫外线的弱有机酸。用于MALDI中的基质的非限制性实例为α-氰基-4-羟基肉桂酸、3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸和2,5-二羟基苯甲酸。分析物-基质混合物的激光辐射可引起基质和分析物的汽化。激光诱导的解吸提供完整分析物的高离子产率并且允许高精度地测量化合物。可使用本领域中已知的方法分析样品(例如,Lewis,Wei和Siuzdak,Encyclopedia of Analytical Chemistry 2000:5880-5894;其以引用的方式整体并入本文)。作为非限制性实例,用于MALDI分析中的质量分析器可包

括线性飞行时间(TOF)、TOF反射器或傅里叶变换质量分析器。

[1089] 在一个实施方案中,可使用干燥液滴方法形成分析物-基质混合物。将生物样品与基质混合以产生基质与样品比率为大约5000:1的饱和基质溶液。然后允许饱和基质溶液的等分试样(大约0.5-2.0uL)干燥以形成分析物-基质混合物。

[1090] 在一个实施方案中,可使用薄层方法形成分析物-基质混合物。首先形成基质匀膜并且然后涂敷样品,并且可被基质吸收以形成分析物-基质混合物。

[1091] 在一个实施方案中,可使用厚层方法形成分析物-基质混合物。用硝基纤维素基质添加剂形成基质匀膜。一旦获得均匀的硝基纤维素基质层,便涂敷样品并且吸收到基质中以形成分析物-基质混合物。

[1092] 在一个实施方案中,可使用夹层方法形成分析物-基质混合物。如在薄层方法中那样基质晶体的薄层,接着添加水性三氟乙酸、样品和基质的液滴。然后使样品吸收到基质中以形成分析物-基质混合物。

[1093] V.本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA的用途

[1094] 在优选实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA被设计用于避免或回避有害的生物应答如免疫应答和/或降解途径、克服表达阈值和/或改进蛋白质产生能力、提供改进的表达速率或翻译效率、改进的药物或蛋白质半衰期和/或蛋白质浓度、优化的蛋白质定位、改进以下中的一种或多种:组织中的稳定性和/或清除、受体吸收和/或动力学、组合物的细胞进入、与翻译机器的衔接、分泌效率(适用时)、循环的可及性,和/或细胞的状态、功能和/或活性的调节。

[1095] 治疗剂

[1096] 治疗剂

[1097] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA如修饰核酸和修饰RNA以及从本文描述的所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA翻译的蛋白质可用作治疗剂或预防剂。它们可用于医学中。例如,本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可施用给受试者,其中多核苷酸、初级构建体或mmRNA在体内翻译以在受试者体内产生治疗性或预防性多肽。提供了用于诊断、治疗或预防人和其它哺乳动物体内的疾病或病状的组合物、方法、试剂盒和试剂。本发明的活性治疗剂包括多核苷酸、初级构建体或mmRNA、含有多核苷酸、初级构建体或mmRNA的细胞或从多核苷酸、初级构建体或mmRNA翻译的多肽。

[1098] 在某些实施方案中,本文提供了含有一种或多种多核苷酸、初级构建体或mmRNA的组合治疗剂,所述多核苷酸、初级构建体或mmRNA含有编码提升哺乳动物受试者的免疫性的一种或多种蛋白质、连同诱导抗体依赖细胞毒性的蛋白质的可翻译区。例如,本文提供了含有编码曲妥珠单抗(trastuzumab)和粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)的一种或多种核酸的治疗剂。具体地说,此类组合治疗剂有用于对曲妥珠单抗发展诱导抗性的Her2+乳癌患者。(参见,例如Albrecht,Immunotherapy.2(6):795-8(2010))。

[1099] 本文提供了使用本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA在细胞群中诱导重组多肽的翻译的方法。此种翻译可为体内、离体、在培养物中或体外。使细胞群与有效量的含有核酸的组合物接触,所述核酸具有至少一个核苷修饰和编码重组多肽的可翻译区。在使得核酸定位到细胞群的一个或多个细胞中并且在细胞中从核酸翻译重组多肽的条件下接触群。

[1100] 至少部分地基于靶组织、靶细胞类型、施用方式、核酸的物理特征(例如,大小和修饰核苷的程度)以及其它决定因素提供“有效量”的组合物。通常,有效量的组合物在细胞中提供有效的蛋白质产生,优选地比含有对应未修饰核酸的组合物更有效。可通过细胞转染(即,用核酸转染的细胞的百分比)增加、从核酸的蛋白质翻译增加、核酸降解减少(例如通过从修饰核酸的蛋白质翻译的持续时间增加所证实)或宿主细胞的先天性免疫应答减少来证实效率增加。

[1101] 本发明的方面涉及在有需要的哺乳动物受试者中诱导体内重组多肽的翻译的方法。其中,使用本文描述的递送方法向受试者施用有效量的含有核酸的组合物,所述核酸具有至少一个结构或化学修饰和编码重组多肽的可翻译区。以使得核酸定位到受试者的细胞中并且在细胞内从核酸翻译重组多肽的量下和其它条件下提供核酸。可用一轮或多于一轮的核酸施用来靶向核酸所定位的细胞或存在细胞的组织。

[1102] 在某些实施方案中,施用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA引导一种或多种重组多肽产生,所述重组多肽提供翻译重组多肽的细胞、组织或生物体中大致上不存在的功能活性。例如,缺失的功能活性本质上可为酶促的、结构的或基因调控的。在相关实施方案中,施用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA引导一种或多种重组多肽产生,所述重组多肽增加(例如,协同地)翻译重组多肽的细胞中存在但大致上不足的功能活性。

[1103] 在其它实施方案中,施用的多核苷酸、初级构建体或mmRNA引导一种或多种重组多肽产生,所述重组多肽替代翻译重组多肽的细胞中大致上不存在的一种多肽(或多种多肽)。此种不存在可由编码基因或其调控途径的基因突变造成。在一些实施方案中,重组多肽使细胞中的内源性蛋白质的水平增加至希望的水平;这种增加可使内源性蛋白质的水平从低于正常水平达到正常水平或从正常水平达到超正常水平。

[1104] 或者,重组多肽起拮抗存在于细胞中、在细胞的表面上或从细胞分泌的内源性蛋白质的活性的作用。通常,所述内源性蛋白质的活性对受试者有害;例如由于内源性蛋白质的突变导致活性或定位改变。另外,重组多肽直接或间接地拮抗存在于细胞中、在细胞的表面上或从细胞分泌的生物部分的活性。被拮抗的生物部分的实例包括脂质(例如,胆固醇)、脂蛋白(例如,低密度脂蛋白)、核酸、碳水化合物、蛋白毒素如志贺毒素和破伤风毒素,或小分子毒素如肉毒杆菌毒素、霍乱毒素和白喉毒素。另外,被拮抗的生物分子可为展现出不希望的活性如细胞毒性或细胞抑制活性的内源性蛋白质。

[1105] 本文描述的重组蛋白可工程化用于在细胞内定位,潜在地在特定区室如细胞核内,或工程化用于从细胞分泌或易位至细胞的质膜。

[1106] 在一些实施方案中,根据本发明的修饰mRNA及其编码的多肽可用于治疗任何各种疾病、病症和/或病状,包括但不限于以下的一种或多种:自身免疫病症(例如糖尿病、狼疮、多发性硬化、牛皮癣、类风湿关节炎);炎症性病症(例如关节炎、盆腔炎症性疾病);感染性疾病(例如病毒感染(例如,HIV、HCV、RSV)、细菌感染、真菌感染、脓毒症);神经性病症(例如阿耳茨海默氏病、亨廷顿氏疾病;孤独症;假肥大型肌营养不良);心血管疾病(例如动脉粥样硬化、高胆固醇血症、血栓形成、凝血病症、血管生成病症如黄斑变性);增殖性病症(例如癌症、良性肿瘤);呼吸系统病症(例如慢性阻塞性肺病);消化病症(例如炎症性肠病、溃疡);肌肉骨骼病症(例如纤维肌瘤、关节炎);内分泌、代谢和营养病症(例如糖尿病、骨质疏松症);泌尿系统疾病(例如肾病);心理病症(例如抑郁症、精神分裂症);皮肤病症(例如伤

口、湿疹);血液和淋巴病症(例如贫血、血友病)等。

[1107] 特征在于功能障碍或异常蛋白质活性的疾病包括囊性纤维化、镰状细胞贫血、大疱性表皮松解、肌萎缩性侧索硬化以及6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏。本发明提供了用于通过引入含有本文提供的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的核酸或基于细胞的治疗剂治疗受试者体内的此类病状或疾病的方法,其中多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码拮抗或以另外的方式克服存在于受试者细胞中的异常蛋白质活性的蛋白质。功能障碍性蛋白质的具体实例为囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)基因的错义突变变体,其产生引起囊性纤维化的CFTR蛋白的功能障碍性蛋白质变体。

[1108] 特征在于缺失(或大致上减少以使得合适(或正常)生理蛋白质功能不发生)蛋白质活性的疾病包括囊性纤维化、C型尼曼-皮克二氏病、β重型地中海贫血、假肥大型肌营养不良、胡尔勒综合征、亨特综合征以及A型血友病。此类蛋白质可不存在或基本上没有功能。本发明提供了用于通过引入含有本文提供的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的核酸或基于细胞的治疗剂治疗受试者体内的此类病状或疾病的方法,其中多核苷酸、初级构建体或mmRNA编码替代受试者靶细胞所缺失的蛋白质活性的蛋白质。功能障碍性蛋白质的具体实例为囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)基因的无义突变变体,其产生引起囊性纤维化的CFTR蛋白的无功能性蛋白质变体。

[1109] 因此,提供了通过在使得有效量的CTFR多肽存在于细胞中的条件下使受试者的细胞与具有编码功能性CFTR多肽的可翻译区的多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触来治疗哺乳动物受试者的囊性纤维化的方法。优选的靶细胞为上皮细胞、内皮细胞和间皮细胞,如肺,并且鉴于靶组织确定施用方法;即针对肺部递送,RNA分子配制用于通过吸入施用。

[1110] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于通过将编码Sortilin(目前通过基因组研究表征的蛋白质)的修饰mRNA分子引入到受试者的细胞群中从而改善受试者的高脂血症来治疗受试者的高脂血症的方法。SORT1基因编码称为Sortilin的高尔基体外侧网络(TGN)跨膜蛋白。遗传研究已显示五分之一的个体在SORT1基因的1p13基因座中具有单一核苷酸多态性rs12740374,其使他们倾向于具有低水平的低密度脂蛋白(LDL)和极低密度脂蛋白(VLDL)。存在于约30%人群中的小等位基因的每个拷贝使LDL胆固醇改变8mg/dL,而存在于约5%群体中的小等位基因的两个拷贝使LDL胆固醇降低16mg/dL。还已显示小等位基因的载体具有40%减小的心肌梗塞风险。小鼠中的体内功能研究描述了小鼠肝脏组织中的SORT1过度表达导致显著降低LDL-胆固醇水平,如降低80%之多,并且沉默SORT1使LDL胆固醇增加大约200%(Musunuru K等,From noncoding variant to phenotype via SORT1at the 1p13cholesterol locus.Nature 2010;466:714-721)。

[1111] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于治疗造血病症、心血管疾病、肿瘤学、糖尿病、囊性纤维化、神经性疾病、先天性代谢错误、皮肤和系统性病症以及失明的方法。已描述了治疗这些具体疾病的分子靶的身份(Templeton编著,Gene and Cell Therapy:Therapeutic Mechanisms and Strategies,第3版,Bota Raton,FL:CRC Press;其以引用的方式整体并入本文)。

[1112] 本文提供了在处于发展感染和/或脓毒症风险的受试者中预防感染和/或脓毒症的方法,方法包括向有此种预防需要的受试者施用足够预防感染和/或脓毒症的量的组合物,所述组合物包含编码抗微生物多肽(例如,抗细菌多肽)或其部分或完全加工形式的多

核苷酸、初级构建体或mmRNA前体。在某些实施方案中，处于发展感染和/或脓毒症风险的受试者可为癌症患者。在某些实施方案中，癌症患者可经历预处理方案(conditioning regimen)。在一些实施方案中，预处理方案可包括但不限于化学疗法、放射疗法或这两者。作为一个非限制性实例，多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码蛋白C、其酶原或前原蛋白、蛋白C的激活形式(APC)或本领域中已知的蛋白C的变体。多核苷酸、初级构建体或mmRNA可被化学修饰并且递送至细胞。可在本发明的化学修饰mRNA内编码的多肽的非限制性实例包括在美国专利7,226,999、7,498,305、6,630,138中教导的那些，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。这些专利教导了蛋白C样分子、变体和衍生物，所述任何蛋白C样分子、变体和衍生物可在本发明的化学修饰的分子内编码。

[1113] 本文进一步提供了治疗受试者的感染和/或脓毒症的方法，方法包括向有此种治疗需要的受试者施用足够治疗感染和/或脓毒症的量的组合物，所述组合物包含编码抗微生物多肽(例如，抗细菌多肽)、例如本文描述的抗微生物多肽或其部分或完全加工形式的多核苷酸、初级构建体或mmRNA前体。在某些实施方案中，有治疗需要的受试者为癌症患者。在某些实施方案中，癌症患者经历预处理方案。在一些实施方案中，预处理方案可包括但不限于化学疗法、放射疗法或这两者。

[1114] 在某些实施方案中，受试者可展现出急性或慢性微生物感染(例如，细菌感染)。在某些实施方案中，受试者可已经接受或可正在接受一种疗法。在某些实施方案中，所述疗法可包括但不限于放射疗法、化学疗法、类固醇、紫外辐射或其组合。在某些实施方案中，患者可遭受微血管病症。在一些实施方案中，微血管病症可为糖尿病。在某些实施方案中，患者可具有伤口。在一些实施方案中，伤口可为溃疡。在一个具体实施方案中，伤口可为糖尿病性足部溃疡。在某些实施方案中，受试者可具有一个或多个烧伤伤口。在某些实施方案中，施用可为局部或系统的。在某些实施方案中，施用可为皮下的。在某些实施方案中，施用可为静脉内的。在某些实施方案中，施用可为经口的。在某些实施方案中，施用可为局部的。在某些实施方案中，施用可为通过吸入。在某些实施方案中，施用可为直肠的。在某些实施方案中，施用可为阴道的。

[1115] 本公开的其它方面涉及将含有多核苷酸、初级构建体或mmRNA的细胞移植至哺乳动物受试者。向哺乳动物受试者施用细胞为本领域普通技术人员已知的，并且包括但不限于局部植入(例如，局部或皮下施用)、器官递送或系统注射(例如，静脉内注射或吸入)以及在药学上可接受的载体中的细胞制剂。含有多核苷酸、初级构建体或mmRNA的此类组合物可配制用于肌内、经动脉、腹膜内、静脉内、鼻内、皮下、内窥镜、透皮或鞘内施用。在一些实施方案中，组合物可配制用于延长释放。

[1116] 可向其施用治疗剂的受试者遭受了疾病、病症或有害病状或可处于发展疾病、病症或有害病状的风险中。提供了基于这些基础来鉴别、诊断和分类受试者的方法，所述方法可包括临床诊断、生物标志物水平、全基因组关联研究(GWAS)以及本领域中已知的其它方法。

[1117] 伤口处理

[1118] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用于伤口治疗，例如对于展现出延迟愈合的伤口。本文提供了包括施用多核苷酸、初级构建体或mmRNA以便管理伤口治疗的方法。本文的方法可进一步包括在施用多核苷酸、初级构建体或mmRNA之前、同时或之后进行的步

骤。例如,可需要清洁和准备伤口床以便促进伤口愈合并且希望获得伤口闭合。可使用若干策略以便促进伤口愈合并实现伤口闭合,包括但不限于:(i)清创术,任选重复、快速的清创术(从伤口中手术去除死去或感染的组织),任选包括化学清创剂如酶来去除坏死组织;(ii)伤口敷料,用于为伤口提供潮湿温暖的环境并促进组织修复和愈合。

[1119] 用于配制伤口敷料的材料的实例包括但不限于:水凝胶(例如,AQUASORB®; DUODERM®)、水胶体(例如,AQUACEL®;COMFEEL®)、泡沫(例如,LYOFOAM®; SPYROSORB®)和海藻酸盐(例如,ALGISITE®; CURASORB®);(iii)另外的生长因子,用于刺激细胞分化和增殖并促进伤口愈合,例如贝卡普勒明(becaplermin)(REGRANEX GEL®),即一种由FDA批准用于治疗神经性足部溃疡的人重组血小板源性生长因子;(iv)软组织伤口覆盖物,一种为获得干净的未愈合伤口所需要的皮肤移植物。可用于软组织覆盖物的皮肤移植物的实例包括但不限于:自体皮肤移植物、尸体皮肤移植物、生物工程化的皮肤替代品(例如,APLIGRAF®; DERMAGRAFT®)。

[1120] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可进一步包括水凝胶(例如,AQUASORB®; DUODERM®)、水胶体(例如,AQUACEL®; COMFEEL®)、泡沫(例如,LYOFOAM®;SPYROSORB®)和/或海藻酸盐(例如,ALGISITE®; CURASORB®)。在某些实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可与皮肤移植物一起使用,所述皮肤移植物包括但不限于自体皮肤移植物、尸体皮肤移植物或生物工程化的皮肤替代品(例如,APLIGRAF®;DERMAGRAFT®)。在一些实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可与伤口敷料制剂和/或皮肤移植物一起涂敷或它们可分开涂敷,但方法如但不限于浸泡或喷涂。

[1121] 在一些实施方案中,用于伤口处理的组合物可包含编码抗微生物多肽(例如,抗细菌多肽)和/或抗病毒多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。可编码抗微生物多肽的前体或部分或完全加工形式。组合物可配制用于使用绷带(例如,粘性绷带)来施用。抗微生物多肽和/或抗病毒多肽可与敷料组合物相互混合或可例如通过浸泡或喷涂分开涂敷。

[1122] 抗体的产生

[1123] 在本发明的一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码抗体和此类抗体的片段。这些可通过本文描述的任一方法来产生。抗体可具有任何不同亚类或同种型的免疫球蛋白,如但不限于IgA、IgG或IgM或任何其它亚类。可根据本发明制备的示例性抗体分子和片段包括但不限于免疫球蛋白分子、大致上完整的免疫球蛋白分子和可含有互补位的免疫球蛋白分子的那些部分。含有互补位的抗体的此种部分包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')$_2$、F(v)以及本领域中已知的那些部分。

[1124] 本发明的多核苷酸可编码变体抗体多肽,其可与参比多肽序列具有一定同一性或与参比多肽序列具有相似或不相似的结合特征。

[1125] 通过本发明的方法获得的抗体可为嵌合抗体,其包含来源于免疫动物的非人抗体来源可变区序列和人抗体来源恒定区序列。另外,它们还可为人源化抗体,其包含来源于免

疫动物的非人抗体的互补决定区(CDR)以及来源于人抗体的构架区(FR)和恒定区。在另一个实施方案中,本文提供的方法可有用于增强细胞培养过程中的抗体蛋白质产物产率。

[1126] 感染管理

[1127] 在一个实施方案中,提供了用于通过施用编码抗微生物多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA在受试者中治疗或预防微生物感染(例如,细菌感染)和/或与微生物或病毒感染相关的疾病、病症或病状或其症状的方法。所述施用可与抗微生物剂(例如,抗细菌剂)、例如抗微生物多肽或本文描述的小分子抗微生物化合物组合。抗微生物剂包括但不限于抗细菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗原生动物剂、抗寄生虫剂以及抗朊病毒剂。

[1128] 可例如以组合的单位剂量同时施用所述药剂(例如,提供两种药剂的同时递送)。还可在指定的时间间隔下施用药剂,例如但不限于数分钟、数小时、数天或数周的间隔。通常,药剂在受试者体内可为同时生物利用的,例如可检测的。在一些实施方案中,可基本上同时施用药剂,例如在相同时间下施用两个单位剂量或两种药剂的组合单位剂量。在其它实施方案中,可以分开的单位剂量递送药剂。可以任何顺序或作为包括两种或更多种药剂的一个或多个制剂施用药剂。在优选的实施方案中,可在另一种药剂(例如,第二药剂)的数分钟、一小时、两小时、三小时或四小时内或甚至一天或两天内进行所述药剂中的一种(例如,第一药剂)的至少一次施用。在一些实施方案中,组合可实现协同结果,例如大于加合结果,例如比加合结果大至少25%、50%、75%、100%、200%、300%、400%或500%。

[1129] 与细菌感染相关的病状

[1130] 可与细菌感染相关的疾病、病症或病状包括但不限于以下的一种或多种:脓肿、放线菌病、急性前列腺炎、嗜水气单胞菌、一年生黑麦草毒性、炭疽、杆菌性紫癜、菌血症、细菌性肠胃炎、细菌性脑膜炎、细菌性肺炎、细菌性阴道炎、细菌相关的皮肤病状、巴尔通氏体病(bartonellosis)、BCG-oma、葡萄球菌病、肉毒中毒、巴西紫癜热、布罗迪囊肿、布鲁氏菌病、布鲁利溃疡、弯杆菌病、龋齿、卡里翁氏病、猫抓病、蜂窝织炎、衣原体感染、霍乱、慢性细菌性前列腺炎、慢性复发性多灶骨髓炎、梭菌坏死性肠炎、牙髓牙周联合病变、牛传染性胸膜肺炎、白喉、白喉性口炎、埃里希体病(ehrlichiosis)、丹毒、会厌炎(piglottitis)、丹毒、菲-休-柯三氏综合征(Fitz-Hugh-Curtis syndrome)、跳蚤传播性斑疹热、脚腐病(传染性足部皮炎)、加雷氏硬化性骨髓炎、淋病、腹股沟肉芽肿、人粒细胞边虫病、人嗜单核细胞埃里希体病、百日咳、脓疱病、晚期先天性梅毒眼病、军团杆菌病、勒米埃综合征(Lemierre's syndrome)、麻风病(汉森氏病)、钩端螺旋体病、李氏杆菌病、莱姆病、淋巴结炎、类鼻疽、脑膜炎球菌病、脑膜炎球菌败血病、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染、鸟胞内分枝杆菌(MAI)、支原体肺炎、坏死性筋膜炎、诺卡氏菌病、坏疽性口炎(走马疽或坏疽性口腔炎)、脐炎、眼眶蜂窝织炎、骨髓炎、无法抵抗的脾切除后感染(OPSI)、羊布鲁氏杆菌、巴氏杆菌病、眼眶周围蜂窝织炎、百日咳(pertussis)(百日咳(whooping cough))、鼠疫、肺炎球菌性肺炎、波特氏疾病、直肠炎、假单胞菌感染、鹦鹉热、脓毒症、脓性肌炎、Q热、回归热(relapsing fever)(回归热(typhinia))、风湿热、落基山斑疹热(RMSF)、立克次氏体病、沙门氏菌病、猩红热、脓毒病、沙雷氏菌感染、志贺氏菌病、南方蜱相关疹病、葡萄球菌烫伤皮肤综合征、链球菌咽炎、游泳池肉芽肿、猪布鲁氏菌病、梅毒、梅毒性主动脉炎、破伤风、中毒性休克综合征(TSS)、沙眼、战壕热、热带溃疡、结核病、土拉菌病、伤寒、斑疹伤寒、泌尿生殖器结核、尿道感染、耐万古霉素金黄色葡萄球菌感染、沃-氟二氏综合征(Waterhouse-Friderichsen

syndrome)、假结核病(耶尔森氏菌)病以及耶尔森菌病。与细菌感染相关的其它疾病、病症和/或病状可包括例如阿尔茨海默氏病、神经性厌食症、哮喘、动脉粥样硬化、注意缺乏多动症、孤独症、自身免疫疾病、两极性精神病、癌症(例如,结肠直肠癌、胆囊癌、肺癌、胰腺癌以及胃癌)、慢性疲劳综合征、慢性阻塞性肺病、克罗恩氏病、冠心病、痴呆、抑郁症、吉-巴综合征(Guillain-Barrésyndrome)、代谢综合征、多发性硬化、心肌梗塞、肥胖症、强迫性神经症、惊恐症、牛皮癣、类风湿关节炎、类肉瘤病、精神分裂症、中风、血栓闭塞性血管炎(伯格氏病)以及图雷特综合征。

[1131] 细菌病原体

[1132] 本文描述的细菌可为革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。细菌病原体包括但不限于波美不动杆菌(Acinetobacter baumannii)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)、包氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、流产布鲁氏菌(Brucella abortus)、犬布鲁氏菌(Brucella canis)、马尔他布鲁氏菌(Brucella melitensis)、猪布鲁氏菌(Brucella suis)、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)、鹦鹉热嗜衣原体(Chlamydophila psittaci)、肉毒梭状芽胞杆菌(Clostridium botulinum)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、产气荚膜梭状芽胞杆菌(Clostridium perfringens)、破伤风杆菌(Clostridium tetani)、凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase Negative Staphylococcus)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheria)、粪肠球菌(Enterococcus faecalis)、屎肠球菌(Enterococcus faecium)、大肠杆菌(Escherichia coli)、肠产毒性大肠杆菌(enterotoxigenic Escherichia coli)(ETEC)、肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic E.coli)、大肠杆菌O157:H7(E.coli O157:H7)、肠杆菌属(Enterobacter sp.)、土拉热弗朗西斯杆菌(Francisella tularensis)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori)、肺炎克氏杆菌(Klebsiella pneumoniae)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、肾脏钩端螺旋体(Leptospira interrogans)、单核细胞增生李斯特氏菌(Listeria monocytogenes)、卡他莫拉氏菌(Moraxellacatarralis)、麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)、淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrhoeae)、奈瑟氏脑膜炎菌(Neisseria meningitides)、奇异变形杆菌(Preteus mirabilis)、变形杆菌属(Proteus sps.)、绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、立氏立克次氏体(Rickettsia rickettsii)、伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、粘质沙雷氏菌(Serratia marcesens)、氟氏志贺氏菌(Shigella flexneri)、松内志贺氏菌(Shigella sonnei)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)、腐生葡萄球菌(Staphylococcus saprophyticus)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、变异链球菌(Streptococcus mutans)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)、梅毒密螺旋体(Treponema pallidum)、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)以及鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis)。细菌病原体还可包括引起耐药性细菌感染的细菌,例如耐克林霉素艰难梭菌、耐氟喹诺酮艰难梭菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐多药物粪肠球菌、耐多药物屎肠球菌、耐多药物

绿脓假单胞菌、耐多药物波美不动杆菌以及耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)。

[1133] 抗生素组合

[1134] 在一个实施方案中,本发明的修饰mRNA可连同一种或多种抗生素一起施用。这些包括但不限于Aknilox、两性霉素B脂质体注射剂(Ambisome)、阿莫西林(Amoxycillin)、氨必西林(Ampicillin)、奥格门汀(Augmentin)、莫西沙星(Avelox)、阿奇霉素(Azithromycin)、莫匹罗星(Bactroban)、聚维酮碘(Betadine)、戊酸倍他米松(Betnovate)、磺胺醋酰泼尼松龙眼液(Blephamide)、头孢克洛(Cefaclor)、头孢羟氨苄(Cefadroxil)、头孢地尼(Cefdinir)、头孢吡肟(Cefepime)、头孢克肟(Cefix)、头孢克肟(Cefixime)、头孢西丁(Cefoxitin)、头孢泊肟(Cefpodoxime)、头孢丙烯(Cefprozil)、头孢呋辛(Cefuroxime)、头孢齐尔(Cefzil)、头孢氨苄(Cephalexin)、头孢唑啉(Cephazolin)、头孢他啶(Ceptaz)、氯胺苯醇(Chloramphenicol)、氯己定(Chlorhexidine)、氯霉素(Chloromycetin)、Chlorsig、环丙沙星(Ciprofloxacin)、克拉霉素(Clarithromycin)、氯林可霉素磷酸酯(Clindagel)、克林霉素(Clindamycin)、Clindatech、邻氯青霉素(Cloxacillin)、粘菌素(Colistin)、复方新诺明(Co-trimoxazole)、地美环素(Demeclocycline)、双氯青霉素(Diclocil)、双氯西林(Dicloxacillin)、强力霉素(Doxycycline)、头孢羟氨苄(Duricef)、红霉素(Erythromycin)、磺胺嘧啶银(Flamazine)、Floxin、新霉素B(Framycetin)、梭链孢素(Fucidin)、呋喃丹啶(Furadantin)、梭链孢酸(Fusidic)、加替沙星(Gatifloxacin)、吉米沙星(Gemifloxacin)、吉米沙星(Gemifloxacin)、依托红霉素(Ilosone)、碘、左氧氟沙星制剂(Levaquin)、左氧氟沙星(Levofloxacin)、洛美沙星(Lomefloxacin)、美西肯(Maxaquin)、甲氧噻吩头孢菌素(Mefoxin)、美罗培南(Meronem)、米诺环素(Minocycline)、莫西沙星(Moxifloxacin)、乙胺丁醇(Myambutol)、制霉菌素(Mycostatin)、新孢霉素(Neosporin)、奈替米星(Netromycin)、呋喃妥因(Nitrofurantoin)、诺氟沙星(Norfloxacin)、Norilet、氧氟沙星(Ofloxacin)、头孢地尼片(Omnicef)、阿莫西林三水酸(Ospamox)、氧四环素(Oxytetracycline)、氯霉素(Paraxin)、青霉素(Penicillin)、肺炎球菌疫苗(Pneumovax)、多粘菌素B(Polyfax)、聚维酮(Povidone)、利福定(Rifadin)、利福平(Rifampin)、利福昔明(Rifaximin)、卫非宁(Rifinah)、利福平制剂(Rimactane)、罗氏芬(Rocephin)、罗红霉素(Roxithromycin)、环丝氨酸(Seromycin)、新霉素(Soframycin)、司帕沙星(Sparfloxacin)、氟氯西林钠胶囊(Staphlex)、他格适(Targocid)、四环素(Tetracycline)、多西环素(Tetradox)、赖氨四环素(Tetralysal)、妥布霉素(tobramycin)、妥布霉素(Tobramycin)、乙硫异烟胺(Trecator)、替加环素(Tygacil)、万古霉素、头孢拉定(Velosef)、强力霉素(Vibramycin)、利福昔明片(Xifaxan)、撒共姆(Zagam)、Zitrotek、Zoderm、Zymar以及斯沃(Zyvox)。

[1135] 抗细菌剂

[1136] 示例性抗细菌剂包括但不限于氨基糖苷(例如,阿米卡星(amikacin)(AMIKIN®)、庆大霉素(gentamicin)(GARAMYCIN®)、卡那霉素(kanamycin)(KANTREX®)、新霉素(neomycin)(MYCIFRADIN®)、奈替米星(netilmicin)(NETROMYCIN®)、妥布霉素(NEBCIN®)、巴龙霉素(Paromomycin)

(HUMATIN®))、安莎霉素(ansamycin)(例如,格尔德霉素(geldanamycin)、除莠霉素(herbimycin))、碳头孢烯(carbacephem)(例如,氯碳头孢(loracarbef)(LORABID®)、碳青霉烯(Carbapenem)(例如,厄他培南(ertapenem)(INVANZ®)、多利培南(doripenem)(DORIBAX®)、亚胺培南(imipenem)/西司他丁(cilastatin)(PRIMAXIN®)、美罗培南(meropenem)(MERREM®)、头孢菌素(cephalosporin)(第一代)(例如,头孢羟氨苄(DURICEF®)、头孢唑啉(cefazolin)(ANCEF®)、头孢噻吩(cefalotin)或头孢噻吩(cefalothin)(KEFLIN®)、头孢氨苄(cefalexin)(KEFLEX®)、头孢菌素(第二代)(例如,头孢克洛(CECLOR®)、头孢孟多(cefamandole)(MANDOL®)、头孢西丁(MEFOXIN®)、头孢丙烯(CEFZIL®)、头孢呋辛(CEFTIN®、ZINNAT®))、头孢菌素(第三代)(例如,头孢克肟(SUPRAX®)、头孢地尼(OMNICEF®、CEFDIEL®)、头孢托仑(cefditoren)(SPECTRACEF®)、头孢哌酮(cefoperazone)(CEFOBID®)、头孢噻肟(cefotaxime)(CLAFORAN®)、头孢泊肟(VANTIN®)、头孢他啶(FORTAZ®)、头孢布烯(ceftibuten)(CEDAX®)、头孢唑肟(ceftizoxime)(CEFIZOX®)、头孢曲松(ceftriaxone)(ROCEPHIN®))、头孢菌素(第四代)(例如,头孢吡肟(MAXIPIME®))、头孢菌素(第五代)(例如,头孢吡普(ceftobiprole)(ZEFTERA®))、糖肽(例如,替考拉宁(teicoplanin)(TARGOCID®)、万古霉素(VANCOCIN®)、特拉万星(telavancin)(VIBATIV®))、林可酰胺(lincosamide)(例如,克林霉素(CLEOCIN®)、林可霉素(LINCOCIN®))、脂肽(例如,达托霉素(daptomycin)(CUBICIN®))、大环内酯(例如,阿奇霉素(ZITHROMAX®、SUMAMED®、ZITROCIN®)、克拉霉素(BIAXIN®)、地红霉素(dirithromycin)(DYNABAC®)、红霉素(ERYTHOCIN®、ERYTHROPED®)、罗红霉素、醋竹桃霉素(troleandomycin)(TAO®)、泰利霉素(telithromycin)(KETEK®)、壮观霉素(spectinomycin)(TROBICIN®))、单环内酰胺(例如,氨曲南(aztreonam)(AZACTAM®))、硝基呋喃(例如,呋喃唑酮(FUROXONE®)、呋喃妥因(MACRODANTIN®、MACRODID®))、青霉素(例如,阿莫西林(NOVAMOX®、AMOXIL®)、氨必西林(PRINCIPEN®)、阿洛西林(azlocillin)、羧苄西林(carbenicillin)(GEOCILLIN®)、氯唑西林(cloxacillin)(TEGOPEN®)、双氯西林(DYNAPEN®)、氟氯西林(flucloxacillin)(FLOXAPEN®)、美洛西林(mezlocillin)(MEZLIN®)、甲氧西林(STAPHCILLIN®)、萘夫西林(nafcillin)

(UNIPEN®)、苯唑西林(oxacillin)(PROSTAPHLIN®)、青霉素G(PENTIDS®)、青霉素V(PEN-VEE-K®)、哌拉西林(piperacillin)(PIPRACIL®)、替莫西林(temocillin)(NEGABAN®)、替莫西林(ticarcillin)(TICAR®))、青霉素组合(例如,阿莫西林/克拉维酸盐(AUGMENTIN®)、氨必西林/舒巴坦(sulbactam)(UNASYN®)、哌拉西林/三唑巴坦(tazobactam)(ZOSYN®)、替卡西林/克拉维酸盐(TIMENTIN®))、多肽(例如,杆菌肽、粘菌素(COLY-MYCIN-S®)、多粘菌素B、喹诺酮(例如,环丙沙星(CIPRO®、CIPROXIN®、CIPROBAY®)、依诺沙星(enoxacin)(PENETREX®)、加替沙星(TEQUIN®)、左氧氟沙星(LEVAQUIN®)、洛美沙星(MAXAQUIN®)、莫西沙星(AVELOX®)、萘啶酸(NEGGRAM®)、诺氟沙星(NOROXIN®)、氧氟沙星(FLOXIN®、OCUFLOX®)、曲伐沙星(trovafloxacin)(TROVAN®)、格帕沙星(grepafloxacin)(RAXAR®)、司帕沙星(ZAGAM®)、替马沙星(temafloxacin)(OMNIFLOX®))、磺胺(例如,磺胺米隆(mafenide)(SULFAMYLON®)、磺胺柯衣汀(sulfonamidochrysoidine)(PRONTOSIL®)、磺胺醋酰(sulfacetamide)(SULAMYD®、BLEPH-10®)、磺胺嘧啶(sulfadiazine)(MICRO-SULFON®)、磺胺嘧啶银(SILVADENE®)、磺胺甲二唑(sulfamethizole)(THIOSULFIL FORTE®)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)(GANTANOL®)、磺胺二甲异噁唑(sulfanilamide)、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)(AZULFIDINE®)、磺胺异噁唑(sulfisoxazole)(GANTRISIN®)、甲氧苄啶(trimethoprim)(PROLOPRIM®)、TRIMPEX®)、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(复方新诺明)(TMP-SMX)(BACTRIM®、SEPTRA®))、四环素(例如,地美环素(DECLOMYCIN®)、多西环素(VIBRAMYCIN®)、米诺环素(MINOCIN®)、氧四环素(TERRAMYCIN®)、四环素(SUMYCIN®、ACHROMYCIN®V、STECLIN®))、抵抗分枝杆菌的药物(例如,氯法齐明(clofazimine)(LAMPRENE®)、氨苯砜(dapsone)(AVLOSULFON®)、卷曲霉素(capreomycin)(CAPASTAT®)、环丝氨酸(SEROMYCIN®)、乙胺丁醇(MYAMBUTOL®)、乙硫异烟胺(TRECATOR®)、异烟肼(isoniazid)(I.N.H.®)、吡嗪酰胺(ALDINAMIDE®)、利福平(RIFADIN®、RIMACTANE®)、利福布丁(rifabutin)(MYCOBUTIN®)、利福喷汀(rifapentine)(PRIFTIN®)、链霉素)以及其它抗细菌剂(例如,胂凡纳明(arsphenamine)(SALVARSAN®)、氯胺苯醇(CHLOROMYCETIN®)、磷霉素

(fosfomycin)(MONUROL®)、梭链孢酸(FUCIDIN®)、利奈唑胺(linezolid)(ZYVOX®)、甲硝哒唑(metronidazole)(FLAGYL®)、莫匹罗星(BACTROBAN®)、平板霉素(platensimycin)、奎奴普丁(quinupristin)/达福普汀(dalfopristin)(SYNERCID®)、利福昔明(XIFAXAN®)、甲砜霉素(thiamphenicol)、替加环素(TIGACYL®)、替硝唑(TINDAMAX®、FASIGYN®)。

[1137] 与病毒感染相关的病状

[1138] 在另一个实施方案中,提供了用于通过与抗病毒剂(例如,本文描述的抗病毒多肽或小分子抗病毒剂)组合施用编码抗病毒多肽(例如本文描述的抗病毒多肽)的多核苷酸、初级构建体或mmRNA来在受试者中治疗或预防病毒感染和/或与病毒感染相关的疾病、病症或病状或其症状的方法。

[1139] 与病毒感染相关的疾病、病症或病状包括但不限于急性热性咽炎、咽结膜热、流行性角结膜炎、幼儿胃肠炎、柯萨奇病毒感染(Coxsackie infection)、传染性单核细胞增多症、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、肝细胞癌、原发性HSV-1感染(例如,儿童龈口炎、成人扁桃体炎和咽炎、角膜结膜炎)、潜伏性HSV-1感染(例如,唇疱疹和感冒疮)、原发性HSV-2感染、潜伏性HSV-2感染、无菌性脑膜炎、传染性单核细胞增多症、巨细胞包涵体病、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、多中心型卡斯曼病(multicentric Castleman disease)、原发性渗出性淋巴瘤、AIDS、流感、雷依氏综合征(Reye syndrome)、麻疹、感染后脑脊髓炎、腮腺炎、上皮增生性病变(例如,寻常疣、扁平疣、足底疣和肛门生殖器疣、喉乳头状瘤、疣状表皮发育不良)、宫颈癌、鳞状细胞癌、哮吼(croup)、肺炎、毛细支气管炎、普通感冒、脊髓灰质炎、狂犬病、毛细支气管炎、肺炎、流感样综合征、重度毛细支气管炎伴肺炎、德国麻疹(German measle)、先天性风疹、水痘以及带状疱疹。

[1140] 病毒病原体

[1141] 病毒病原体包括但不限于腺病毒、柯萨基病毒、登革热病毒、脑炎病毒、埃-巴二氏病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、巨细胞病毒、人疱疹病毒8型、人免疫缺陷病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头状瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、西尼罗病毒以及黄热病病毒。病毒病原体还可包括引起耐药性病毒感染的病毒。

[1142] 抗病毒剂

[1143] 示例性抗病毒剂包括但不限于阿巴卡韦(abacavir)(ZIAGEN®)、阿巴卡韦/拉米夫定(lamivudine)/齐多夫定(zidovudine)(trizivir®)、阿昔洛韦(aciclovir)或无环鸟苷(acyclovir)(CYCLOVIR®、HERPEX®、ACIVIR®、ACIVIRAX®、ZOVIRAX®、ZOVIR®)、阿德福韦(adefovir)(Preveon®、Hepsera®)、金刚胺(SYMMETREL®)、安泼那韦(amprenavir)(AGENERASE®)、安普利近(ampligen)、阿比多尔(arbidol)、阿扎那韦(atazanavir)

(REYATAZ®)、波普瑞韦(boceprevir)、西多福韦(cidofovir)、达芦那韦(darunavir)(PREZISTA®)、地拉韦啶(delavirdine)(RESCRIPTOR®)、去羟肌苷(VIDEX®)、二十二烷醇(ABREVA®)、依度尿苷(edoxudine)、依法韦仑(efavirenz)(SUSTIVA®、STOCRIN®)、恩曲他滨(emtricitabine)(EMTRIVA®)、恩曲他滨/替诺福韦(tenofovir)/依法韦仑(ATRIPLA®)、恩夫韦(enfuvirtide)(FUZEON®)、恩替卡韦(entecavir)(BARACLUDE®、ENTAVIR®)、泛昔洛韦(famciclovir)(FAMVIR®)、福米韦生(fomivirsen)(VITRAVENE®)、福沙那韦(fosamprenavir)(LEXIVA®、TELZIR®)、磷卡萘替(foscarnet)(FOSCAVIR®)、磷乙酸盐(fosfonet)、更昔洛韦(ganciclovir)(CYTOVENE®、CYMEVENE®、VITRASERT®)、GS 9137(ELVITEGRAVIR®)、咪喹莫特(imiquimod)(ALDARA®、ZYCLARA®、BESELNA®)、茚地那韦(indinavir)(CRIXIVAN®)、肌苷、异丙肌苷(inosine pranobex)(IMUNOVIR®)、I型干扰素、II型干扰素、III型干扰素、kutapressin(NEXAVIR®)、拉米夫定(ZEFFIX®、HEPTOVIR®、EPIVIR®)、拉米夫定/齐多夫定(COMBIVIR®)、洛匹那韦(lopinavir)、洛韦胺(loviride)、马拉维洛克(maraviroc)(SELZENTRY®、CELSENTRI®)、美替沙腙(methisazone)、MK-2048、吗啉胍、那非那韦(nelfinavir)(VIRACEPT®)、奈韦拉平(nevirapine)(VIRAMUNE®)、奥塞米韦(oseltamivir)(TAMIFLU®)、聚乙二醇干扰素α-2a(PEGASYS®)、喷昔洛韦(penciclovir)(DENAVIR®)、帕拉米韦(peramivir)、普来可那立(pleconaril)、鬼臼毒素(CONDYLOX®)、拉替拉韦(raltegravir)(ISENTRESS®)、利巴韦林(ribavirin)(COPEGUs®、REBETOL®、RIBASPHERE®、VILONA®和VIRAZOLE®)、金刚乙胺(FLUMADINE®)、利托那韦(ritonavir)(NORVIR®)、嘧啶、沙奎那韦(saquinavir)(INVIRASE®、FORTOVASE®)、司他夫定(stavudine)、茶树油(千层油(melaleuca oil))、替诺福韦(VIREAD®)、替诺福韦/恩曲他滨(TRUVADA®)、替拉那韦(tipranavir)(APTIVUS®)、曲氟尿苷(VIROPTIC®)、曲金刚胺(VIRU-MERZ®)、伐昔洛韦(valaciclovir)(VALTREX®)、缬更昔洛韦(valganciclovir)(VALCYTE®)、维立韦罗(vicriviroc)、阿糖腺苷(vidarabine)、韦拉咪定(viramidine)、扎西他滨(zalcitabine)、扎那米韦(zanamivir)(RELENZA®)以及齐多夫定(叠氮胸苷(AZT)、RETROVIR®、RETROVIS®)。

[1144] 与真菌感染相关的病状

[1145] 与真菌感染相关的疾病、病症或病状包括但不限于曲霉病、芽生菌病、假丝酵母病、球孢子菌病、隐球酵母病、组织胞浆菌病、足菌肿、副球孢子菌病以及皮癣菌病。此外，具有免疫缺陷的人特别易于感染由真菌属如曲霉属(Aspergillus)、念珠菌属(Candida)、隐球菌属(Cryptoccocus)、组织胞浆菌属(Histoplasma)和肺孢子虫属(Pneumocystis)引起的疾病。其它真菌可侵害眼部、指甲、头发，并且尤其皮肤(所谓的皮肤真菌和嗜角蛋白真菌)，并引起各种病状，其中以癣菌病如香港脚(athlete's foot)较为常见。真菌孢子也为过敏症的主要原因，并且来自不同分类组的广范围真菌可激发一些人的过敏反应。

[1146] 真菌病原体

[1147] 真菌病原体包括但不限于子囊菌门(Ascomycota)(例如，尖胞镰刀菌(Fusarium oxysporum)、卡氏肺囊虫(Pneumocystis jirovecii)、曲霉菌属(Aspergillus spp.)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)/球孢子菌(posadasii)、白色念珠菌(Candida albicans))、担子菌门(Basidiomycota)(例如，新型线黑粉菌(Filobasidiella neoformans)、毛孢子菌(Trichosporon))、微孢子目(Microsporidia)(例如，家兔脑胞内原虫(Encephalitozoon cuniculi)、腹泻原虫(Enterocytozoon bieneusi))以及毛霉菌亚门(Mucoromycotina)(例如，卷枝毛霉(Mucor circinelloides)、米根霉(Rhizopus oryzae)、伞枝犁头霉(Lichtheimia corymbifera))。

[1148] 抗真菌剂

[1149] 示例性抗真菌剂包括但不限于多烯抗真菌剂(例如，游霉素(natamycin)、龟裂杀菌素(rimocidin)、菲律宾菌素(filipin)、制霉菌素、两性霉素B、坎底辛(candicin)、哈霉素(hamycin))、咪唑抗真菌剂(例如，咪康唑(miconazole)(MICATIN®、DAKTARIN®)、酮康唑(ketoconazole)(NIZORAL®、FUNGORAL®、SEBIZOLE®)、克霉唑(clotrimazole)(LOTRIMIN®、LOTRIMIN® AF、CANESTEN®)、益康唑(econazole)、奥莫康唑(omoconazole)、联苯苄唑(bifonazole)、布康唑(butoconazole)、芬替康唑(fenticonazole)、异康唑(isoconazole)、奥昔康唑(oxiconazole)、舍他康唑(sertaconazole)(ERTACZO®)、硫康唑(sulconazole)、噻康唑(tioconazole))、三唑抗真菌剂(例如，阿泊康唑(albaconazole)、氟康唑(fluconazole)、伊曲康唑(itraconazole)、艾沙康唑(isavuconazole)、雷夫康唑(ravuconazole)、泊沙康唑(posaconazole)、伏立康唑(voriconazole)、特康唑(terconazole))、噻唑抗真菌剂(例如，阿巴芬净(abafungin))、烯丙胺(例如，特比萘芬(terbinafine)(LAMISIL®)、萘替芬(naftifine)(NAFTIN®)、布替萘芬(butenafine)(LOTRIMIN® Ultra))、棘白霉素(echinocandin)(例如，阿尼芬净(anidulafungin)、卡泊芬净(caspofungin)、米卡芬净(micafungin))以及其它抗真菌剂(例如，水蓼二醛(polygodial)、苯甲酸、环吡酮、托萘酯(TINACTIN®、DESENEX®、AFTATE®)、十一碳烯酸、氟胞嘧啶或5-氟胞嘧啶、灰黄霉素(griseofulvin)、卤普罗近(haloprogin)、碳酸氢钠、蒜素)。

[1150] 与原生动物感染相关的病状

[1151] 与原生动物感染相关的疾病、病症或病状包括但不限于阿米巴病、贾第虫病、毛滴

虫病、非洲昏睡病、美国昏睡病、利什曼病(黑热病(Kala-Azar))、小袋虫病、弓形体病、疟疾、棘阿米巴角膜炎以及焦虫病。

[1152] 原生动物病原体

[1153] 原生动物病原体包括但不限于痢疾内变形虫(Entamoeba histolytica)、贾第鞭毛虫属(Giardia lambila)、阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis)、布氏锥虫冈比亚(Trypanosoma brucei)、克氏锥虫(T.cruzi)、杜氏利什曼虫(Leishmania donovani)、肠袋虫属(Balantidium coli)、鼠弓形体(Toxoplasma gondii)、疟原虫属(Plasmodium spp.)以及田鼠巴贝虫(Babesia microti)。

[1154] 抗原生动物剂

[1155] 示例性抗原生动物剂包括但不限于依氟鸟氨酸(eflornithine)、呋喃唑酮(FUROXONE®、DEPENDAL-M®)、美拉胂醇(melarsoprol)、甲硝唑(FLAGYL®)、奥硝唑(ornidazole)、硫酸巴龙霉素(paromomycinsulfate)(HUMATIN®)、喷他脒(pentamidine)、乙胺嘧啶(pyrimethamine)(DARAPRIM®)以及替硝唑(tinidazole)(TINDAMAX®、FASIGYN®)。

[1156] 与寄生虫感染相关的病状

[1157] 与寄生虫感染相关的疾病、病症或病状包括但不限于棘阿米巴角膜炎、阿米巴病、蛔虫病、焦虫病、小袋虫病、贝蛔虫病(baylisascariasis)、查加斯病、华支睾吸虫病、锥蝇病(cochliomyia)、隐孢子虫病、裂头绦虫病、麦地那龙线虫病、包虫病、象皮病、蛲虫病、片吸虫病、姜片吸虫病、丝虫病、贾第鞭毛虫病、颚口线虫病、膜壳绦虫病、等孢子球虫病、钉螺热、利什曼病、莱姆病、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、疥疮、血吸虫病、昏睡病、类圆线虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形体病、旋毛虫病以及鞭虫病。

[1158] 寄生虫病原体

[1159] 寄生虫病原体包括但不限于棘阿米巴属(Acanthamoeba)、异尖线虫(Anisakis)、人蛔虫(Ascaris lumbricoides)、马蝇(botfly)、肠袋虫属、臭虫、多节绦虫亚纲(Cestoda)、恙螨、螺旋蝇(Cochliomyia hominivorax)、痢疾内变形虫、肝片吸虫(Fasciola hepatica)、兰伯贾第虫(Giardia lamblia)、钩虫、利什曼虫属(Leishmania)、锯齿状舌形虫(Linguatula serrata)、肝吸虫、罗阿丝虫(Loa loa)、并殖吸虫属(Paragonimus)、蛲虫、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、血吸虫属(Schistosoma)、肠类圆线虫(Strongyloides stercoralis)、螨、绦虫、鼠弓形体(Toxoplasma gondii)、锥虫属(Trypanosoma)、鞭虫、班氏线虫(Wuchereria bancrofti)。

[1160] 抗寄生虫剂

[1161] 示例性抗寄生虫剂包括但不限于抗线虫剂(例如,甲苯咪唑、双羟萘酸噻嘧啶、噻苯达唑、乙胺嗪、伊维菌素(ivermectin))、抗绦虫剂(例如,氯硝柳胺(niclosamide)、吡喹酮(praziquantel)、阿苯达唑(albendazole))、抗吸虫剂(例如,吡喹酮)、抗变形虫剂(例如,利福平、两性霉素B)以及抗原生动物剂(例如,美拉胂醇、依氟鸟氨酸、甲硝唑、替硝唑)。

[1162] 与朊病毒感染相关的病状

[1163] 与朊病毒感染相关的疾病、病症或病状包括但不限于克罗伊茨费尔特-雅各布病(CJD)、医原性克罗伊茨费尔特-雅各布病(iCJD)、变体克罗伊茨费尔特-雅各布病(vCJD)、

家族性克罗伊茨费尔特-雅各布病(fCJD)、散发性克罗伊茨费尔特-雅各布病(sCJD)、格-施-沙综合征(GSS)、致命性家族性失眠症(FFI)、库鲁病、羊搔痒症、牛海绵状脑病(BSE)、疯牛病、传染性水貂脑病(TME)、慢性消耗性疾病(CWD)、猫海绵状脑病(FSE)、外来有蹄类脑病(EUE)以及海绵状脑病。

[1164] 抗朊病毒剂

[1165] 示例性抗朊病毒剂包括但不限于氟吡汀(flupirtine)、戊聚糖多硫酸盐(pentosan polysuphate)、奎纳克林(quinacrine)以及四环化合物。

[1166] 免疫应答的调节

[1167] 免疫应答的避免

[1168] 如本文所述,本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的有用特征是能够减小、逃避或避免细胞的先天性免疫应答。一方面,本文提供了编码目标多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA,当其递送至细胞时引起来自宿主的免疫应答与由参比化合物触发的应答相比有所减小,所述参比化合物例如为对应于本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的未修饰多核苷酸或本发明的不同多核苷酸、初级构建体或mmRNA。如本文所使用,“参比化合物”为当向哺乳动物施用时引起具有已知程度、水平或量的免疫刺激的先天性免疫应答的任何分子或物质。参比化合物不必为核酸分子并且它不必为本发明的任何多核苷酸、初级构建体或mmRNA。因此,可相对于已知触发这样一种应答的任何化合物或物质来表示多核苷酸、初级构建体或mmRNA避免、逃避或不能触发免疫应答的量度。

[1169] 术语“先天性免疫应答”包括对外源单链核酸(通常来源于病毒或细菌)的细胞应答,其涉及诱导细胞因子表达和释放(具体为干扰素)以及细胞死亡。如本文所使用,先天性免疫应答或干扰素应答在引起细胞因子表达、细胞因子释放、蛋白质合成全抑制、细胞RNA全破坏、主要组织相容性分子上调和/或凋亡性死亡诱导、涉及凋亡的基因的基因转录诱导、抗生长以及先天性和适应性免疫细胞激活的单细胞水平下运作。由I型IFN诱导的一些基因包括PKR、ADAR(作用于RNA的腺苷脱氨酶)、OAS(2',5'-寡腺苷酸合成酶)、RNA酶L以及Mx蛋白。PKR和ADAR分别导致抑制翻译起始和RNA编辑。OAS为激活核糖核酸内切酶RNA酶L降解ssRNA的dsRNA-依赖性合成酶。

[1170] 在一些实施方案中,先天性免疫应答包括I型或II型干扰素表达,并且I型或II型干扰素表达与来自尚未与本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触的细胞的参比相比没有增加多于两倍。

[1171] 在一些实施方案中,先天性免疫应答包括一个或多个IFN签名基因的表达,并且其中一个或多个IFN签名基因的表达与来自尚未与本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触的细胞的参比相比没有增加多于三倍。

[1172] 而在一些情况下,消除细胞中的先天性免疫应答可为有利的,本发明提供了在施用时引起免疫应答(包括干扰素信号传导)大致上减小(显著更小)但没有完全消除这种应答的多核苷酸、初级构建体和mmRNA。

[1173] 在一些实施方案中,与由参比化合物诱导的免疫应答相比,免疫应答降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%或大于99.9%。免疫应答自身可通过确定1型干扰素的表达或活性水平或干扰素调节基因如toll样受体(例如,TLR7和TLR8)的表达来测量。还可通过在一次或多次向细胞群施用之后测量细胞死亡减少的水

平来测量先天性免疫应答的减小;例如细胞死亡相比针对参比化合物所观察到的细胞死亡频率少10%、25%、50%、75%、85%、90%、95%或超过95%。此外,细胞死亡可影响少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%或少于0.01%的与多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触的细胞。

[1174] 在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的免疫原性显著小于具有相同序列的未修饰的体外合成RNA分子多核苷酸或初级构建体或参比化合物。如本文所使用,"免疫原性显著小于"是指免疫原性可检测的减小。在另一个实施方案中,术语是指免疫原性的倍数减小。在另一个实施方案中,术语是指使得可施用有效量的多核苷酸、初级构建体或mmRNA但没有触发可检测的免疫应答的减小。在另一个实施方案中,术语是指使得可重复施用多核苷酸、初级构建体或mmRNA但没有引起足以可检测地减少重组蛋白表达的免疫应答的减小。在另一个实施方案中,减小是使得可重复施用多核苷酸、初级构建体或mmRNA但没有引起足以消除可检测的重组蛋白表达的免疫应答。

[1175] 在另一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA的免疫原性比其未修饰的对应物或参比化合物小2倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小3倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小5倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小7倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小10倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小15倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小一定倍数。在另一个实施方案中,免疫原性减小50倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小100倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小200倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小500倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小1000倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小2000倍。在另一个实施方案中,免疫原性减小另一个倍数差。

[1176] 确定免疫原性的方法为本领域中熟知的,并且包括例如测量细胞因子(例如IL-12、IFNα、TNF-α、RANTES、MIP-1α或MIP-1β、IL-6、IFN-β或IL-8)的分泌、测量DC激活标志物(例如CD83、HLA-DR、CD80和CD86)的表达或测量充当用于适应性免疫应答的佐剂的能力。

[1177] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA(包括本文教导的修饰组合)可具有使其更适合作为治疗方式的优越特性。

[1178] 已确定本领域中的"全或无"模型非常不足以描述与修饰mRNA的治疗用途相关的生物现象。发明人已确定为了改进蛋白质产生,人们可考虑修饰或修饰组合的性质、修饰百分比并且调查多于一种细胞因子或度量以确定具体修饰mRNA的功效和风险概况。

[1179] 在本发明的一个方面中,与未修饰相比确定修饰mRNA的有效性的方法涉及测量和分析一种或多种细胞因子,所述细胞因子的表达通过施用本发明的外源核酸来触发。将这些值与未修饰核酸的施用或标准度量如细胞因子应答、PolyIC、R-848或本领域中已知的其它标准物相比较。

[1180] 本文开发的标准度量的一个实例为测量在细胞、组织或生物体中产生的编码多肽(蛋白质)的水平或量与由于施用或接触修饰核酸而在细胞、组织或生物体中触发其表达的一种或多种(或一组)细胞因子的水平或量的比率。此类比率在本文中称为蛋白质:细胞因子比或"PC"比。PC比越高,修饰核酸(编码所测量的蛋白质的多核苷酸)功效越大。本发明的以细胞因子计的优选PC比可为大于1、大于10、大于100、大于1000、大于10,000或更多。具有比不同或未修饰构建体的修饰核酸更高的PC比的修饰核酸为优选的。

[1181] 可进一步通过存在于多核苷酸中的修饰百分比来限定PC比。例如,归一化为100%

的修饰核酸,可确定作为细胞因子(或风险)或细胞因子概况的函数的蛋白质产生。

[1182] 在一个实施方案中,本发明提供了用于通过比较修饰核酸(多核苷酸、初级构建体或mmRNA)的PC比而通过化学性质、细胞因子或修饰百分比来确定任何具体的修饰多核苷酸、初级构建体或mmRNA的相对功效的方法。

[1183] 可产生含有不同核碱基取代水平的mmRNA,其维持蛋白质产生增加和免疫刺激潜力减小。任何修饰核苷酸与其天然存在的核苷酸对应物的相对百分比可在IVT反应过程中改变(例如,使用100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.1%、0.01%5甲基胞苷与胞苷;使用100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.1%、0.01%假尿苷或N1-甲基-假尿苷与尿苷)。还可对相同碱基使用2个或更多个不同的核苷酸制得使用不同比率的mmRNA(例如,不同比率的假尿苷和N1-甲基-假尿苷)。还可制得在多于1个"碱基"位置上同时具有混合比率的mmRNA,如5甲基胞苷/胞苷和假尿苷/N1-甲基-假尿苷/尿苷的比率。使用具有改变的修饰核苷酸比率的修饰mRNA可有益于减少对化学修饰核苷酸的潜在暴露。最后,调节蛋白质产生或免疫刺激潜力或这两者的修饰核苷酸进入mmRNA的位置引入也是可能的。可体外(使用如本文描述的PBMC测定法的测定)评价所述mmRNA展示这些改进特性的能力,并且还可体内通过测量mmRNA编码的蛋白质产生和先天性免疫识别的介导物如细胞因子来评价。

[1184] 在另一个实施方案中,通过确定引起与给定量的未修饰核苷酸或参比化合物程度相同的以上应答之一所需要的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的量来确定多核苷酸、初级构建体或mmRNA以及其未修饰的对应物的相对免疫原性。例如,如果引起相同应答需要两倍的多核苷酸、初级构建体或mmRNA,则多核苷酸、初级构建体或mmRNA的免疫原性比未修饰核苷酸或参比化合物小两倍。

[1185] 在另一个实施方案中,通过确定相对于相同量的未修饰核苷酸或参比化合物响应于多核苷酸、初级构建体或mmRNA的施用所分泌的细胞因子(例如IL-12、IFNα、TNF-α、RANTES、MIP-1α或MIP-1β、IL-6、IFN-β或IL-8)的量来确定多核苷酸、初级构建体或mmRNA以及其未修饰的对应物的相对免疫原性。例如,如果分泌一半细胞因子,则多核苷酸、初级构建体或mmRNA的免疫原性比未修饰核苷酸小两倍。在另一个实施方案中,在计算以上方法中的免疫原性之前扣除刺激的背景水平。

[1186] 本文还提供了用于进行一种细胞或一群细胞中的免疫应答的滴定、减少或消除的方法。在一些实施方案中,使细胞与变化剂量的相同多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触并且评价剂量反应。在一些实施方案中,使细胞与相同或不同剂量下的许多不同多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触以确定用于产生希望效果的最优组成。关于免疫应答,希望的效果可为避免、逃避或减少细胞的免疫应答。希望的效果还可为改变蛋白质产生的效率。

[1187] 本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可使用在国际公布号WO2013003475中描述的方法用来减少免疫应答,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[1188] 免疫应答的激活:疫苗

[1189] 另外,当引入到本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA中时某些修饰核苷或其组合将激活先天性免疫应答。在与多肽和/或其它疫苗组合时,此类激活分子可用作佐剂。在某些实施方案中,激活分子含有编码用作疫苗的多肽序列的可翻译区,从而提供作为自佐剂的能力。

[1190] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可编码免疫原。编

码免疫原的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA的递送可激活免疫应答。作为一个非限制性实例，编码免疫原的多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可递送至细胞以触发多个先天性应答途径(参见国际公布号WO2012006377;其以引用的方式整体并入本文)。作为另一个非限制性实例，编码免疫原的本发明的多核苷酸、初级构建体和mmRNA可以足够大以对脊椎动物具免疫原性的剂量递送至脊椎动物(参见国际公布号WO2012006372和WO2012006369;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[1191] 本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码疫苗的多肽序列并且可进一步包含抑制剂。抑制剂可损害抗原递呈和/或抑制本领域中已知的各种途径。作为一个非限制性实例，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可与可损害抗原递呈的抑制剂组合用于疫苗(参见国际公布号WO2012089225和WO2012089338;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[1192] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可为自我复制的RNA。自我复制的RNA分子可增强RNA递送的效率和包封的基因产物的表达。在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA可包含本文描述和/或本领域中已知的至少一种修饰。在一个实施方案中，自我复制的RNA可设计成使得自我复制的RNA不会诱导传染性病毒颗粒的产生。作为一个非限制性实例，可通过在美国公布号US20110300205和国际公布号WO2011005799中描述的方法设计自我复制的RNA，所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[1193] 在一个实施方案中，本发明的自我复制的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码可引起免疫应答的蛋白质。作为一个非限制性实例，多核苷酸、初级构建体或mmRNA可为可编码至少一种抗原的自我复制的mRNA(参见美国公布号US20110300205和国际公布号WO2011005799、WO2013006838和WO2013006842;其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[1194] 在一个实施方案中，本发明的自我复制的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可使用本文描述或本领域中已知的方法配制。作为一个非限制性实例，自我复制的RNA可通过Geall等描述的方法(Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines,PNAS 2012;PMID:22908294)配制用于递送。

[1195] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码两亲性肽和/或免疫原性两亲性肽。

[1196] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的制剂可进一步包含两亲性肽和/或免疫原性两亲性肽。作为一个非限制性实例，包含两亲性肽和/或免疫原性两亲性肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可如美国公布号US20110250237和国际公布号WO2010009277和WO2010009065中所述配制;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[1197] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可为免疫刺激性的。作为一个非限制性实例，多核苷酸、初级构建体或mmRNA可编码正义链或负义链RNA病毒基因组的所有或部分(参见国际公布号WO2012092569和美国公布号US20120177701，其各自均以引用的方式整体并入本文)。在另一个非限制性实例中，本发明的免疫刺激性多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用如本文所述和/或本领域中已知的用于施用的赋形剂配制(参见国际公布号WO2012068295和美国公布号US20120213812，其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[1198] 在一个实施方案中，可通过添加各种化合物以诱导治疗作用来增强通过本文描述

的方法配制的疫苗的应答。作为一个非限制性实例，疫苗制剂可包括MHC II结合肽或具有与MHC II结合肽类似的序列的肽(参见国际公布号WO2012027365、WO2011031298和美国公布号US20120070493、US20110110965，其各自均以引用的方式整体并入本文)。作为另一个实例，疫苗制剂可包含可对受试者体内的烟碱残留物产生抗体应答的修饰的烟碱化合物(参见国际公布号WO2012061717和美国公布号US20120114677，其各自均以引用的方式整体并入本文)。

[1199] 天然存在的突变体

[1200] 在另一个实施方案中，可使用多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA来表达天然存在的蛋白质的变体，所述变体具有改进的疾病改善活性，包括增强的生物活性、改进的患者转归或保护功能等。已在哺乳动物中描述了许多此类修饰基因(Nadeau,Current Opinion in Genetics&Development 2003 13:290-295;Hamilton和Yu,PLoS Genet.2012;8:e1002644;Corder等,Nature Genetics 1994 7:180-184;所有参考文献均以引用的方式整体并入本文)。对于人类的实例包括Apo E2蛋白、Apo A-I变体蛋白(Apo A-I Milano、Apo A-I Paris)、高活性IX因子蛋白(IX因子Padua Arg338Lys)、甲状腺素运载蛋白突变体(TTR Thr119Met)。已显示ApoE2(cys112、cys158)的表达通过减少对阿尔茨海默氏病和可能地其它病状如心血管疾病的易受性来相对于其它ApoE同工型(ApoE3(cys112、arg158)和ApoE4(arg112、arg158))给予保护(Corder等,Nature Genetics 1994 7:180-184;Seripa等,Rejuvenation Res.2011 14:491-500;Liu等,Nat Rev Neurol.20139:106-118;所有参考文献均以引用的方式整体并入本文)。Apo A-I变体的表达与胆固醇降低有关(deGoma和Rader,2011Nature RevCardiol 8:266-271;Nissen等,2003JAMA 290:2292-2300;所有参考文献均以引用的方式整体并入本文)。在某些群体中ApoA-I的氨基酸序列改变为Apo A-I Milano中的半胱氨酸(Arg 173改变为Cys)和Apo A-I Paris中的半胱氨酸(Arg 151改变为Cys)。位置R338L上的IX因子突变(FIX Padua)产生活性增加大约10倍的IX因子蛋白(Simioni等,N Engl J Med.2009 361:1671-1675;Finn等,Blood.2012120:4521-4523;Cantore等,Blood.2012 120:4517-20;所有参考文献均以引用的方式整体并入本文)。已显示位置104或119上的甲状腺素运载蛋白的突变(Arg104His、Thr119Met)为还携带引起Val30Met突变的疾病的患者提供保护(Saraiva,Hum Mutat.2001 17:493-503;DATA BASE ON TRANSTHYRETIN MUTATIONS http://www.ibmc.up.pt/mjsaraiva/ttrmut.html;所有参考文献均以引用的方式整体并入本文)。观察到分别携带Met 119和His104突变的葡萄牙和日本Met 30患者之间的临床表现和症状严重性的差异，具有由非病原性突变体产生的明显保护作用(Coelho等,1996Neuromuscular Disorders(Suppl)6:S20;Terazaki等,1999.Biochem Biophys Res Commun 264:365-370;所有参考文献均以引用的方式整体并入本文)，所述非病原性突变体给予分子更多稳定性。编码这些保护性TTR等位基因的修饰mRNA可在TTR淀粉样变性的患者中表达，从而减小病原性突变TTR蛋白的作用。

[1201] 大沟作用配偶体

[1202] 如本文所述，短语“大沟作用配偶体”是指通过与核苷酸或核酸的大沟面的相互作用(例如结合)来检测并且应答于RNA配体的RNA识别受体。同样，包含修饰核苷酸或核酸如本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的RNA配体降低了与大沟结合配偶体的相互作用并因此减小先天性免疫应答。

[1203] 示例性大沟作用(如结合)配偶体包括但不限于以下核酸酶和解旋酶。在膜内,TLR(Toll-样受体)3、7和8可应答于单链和双链RNA。在细胞质内,DEX(D/H)解旋酶和ATP酶的超家族2类的成员可感测到RNA以起始抗病毒应答。这些解旋酶包括RIG-I(视黄酸-诱导基因I)和MDA5(黑素瘤分化-相关基因5)。其它实例包括遗传学和生理学实验室蛋白2(LGP2)、含有HIN-200结构域的蛋白质或含有解旋酶结构域的蛋白质。

[1204] 病原生物体或患病细胞的靶向

[1205] 本文提供了用于使用编码细胞抑制多肽或细胞毒性多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA来靶向病原微生物如细菌、酵母、原生动物、蠕虫等或患病细胞如癌细胞的方法。优选地,所引入的mRNA含有专门或优选地在靶病原生物体中翻译以减小治疗剂可能的脱靶效应的修饰核苷或其它核酸序列修饰。此类方法有用于去除病原生物体或杀死存在于任何生物材料包括血液、精液、卵和移植材料包括胚胎、组织和器官中的患病细胞。

[1206] 生物处理

[1207] 本文提供的方法可有用于增强细胞培养过程中的蛋白质产物产率。在含有多个宿主细胞的细胞培养物中,引入本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA引起相对于对应未修饰核酸的蛋白质产生效率增加。可例如通过显示细胞转染增加、从多核苷酸、初级构建体或mmRNA的蛋白质翻译增加、核酸降解减少和/或宿主细胞的先天性免疫应答减少来证明所述蛋白质产生效率增加。可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量蛋白质产生,并且可通过本领域中已知的各种功能测定来测量蛋白质活性。可在连续或分批投料的哺乳动物过程中发生蛋白质产生。

[1208] 另外,优化潜在目标细胞系或一系列细胞系中的特定多肽的表达是有用的,所述多肽具体为目标多肽如具有已知活性的参比蛋白质的蛋白质变体。在一个实施方案中,提供了通过提供多个靶细胞类型并且独立地使多个靶细胞类型中的每一种与编码目标多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触来优化靶细胞中的目标多肽的表达的方法。细胞可同时或依次用两种或更多种多核苷酸、初级构建体或mmRNA转染。

[1209] 在某些实施方案中,可使用多轮本文描述的方法来获得具有增加的一种或多种目标核酸或蛋白质的表达的细胞。例如,可用编码目标核酸或蛋白质的一种或多种多核苷酸、初级构建体或mmRNA转染细胞。在再次分离之前,在受到另外几轮用一种或多种编码目标核酸或蛋白质的其它核酸转染之前,可根据本文描述的方法分离细胞。此方法可有用于产生具有增加的以下物质的表达的细胞:蛋白质的复合物、在相同或相关的生物途径中的核酸或蛋白质、在彼此上游或下游作用的核酸或蛋白质、彼此具有调节、激活或压制功能的核酸或蛋白质、取决于彼此功能或活性的核酸或蛋白质或共有同源性的核酸或蛋白质。

[1210] 另外,可改变培养条件以增加蛋白质产生效率。随后,检测和/或定量多个靶细胞类型中的目标多肽的存在和/或水平,从而允许通过选择有效的靶细胞和与其相关的细胞培养条件来优化多肽的表达。此类方法在多肽含有一种或多种翻译后修饰或具有大量的三级结构而常常使有效蛋白质产生复杂化的情况时特别有用。

[1211] 在一个实施方案中,可培养用于本发明的方法中的细胞。可以悬浮培养或贴壁培养的形式培养细胞。可在各种容器中培养细胞,包括但不限于生物反应器、细胞培养袋(cell bag)、摇袋(wave bag)、培养板、培养瓶和本领域普通技术人员熟知的其它容器。细胞可在IMDM(Invitrogen,目录号12440-53)或任何其它合适的培养基包括但不限于化学定

义的培养基制剂中培养。可适用于细胞培养的环境条件如温度和大气组成为本领域技术人员熟知的。可结合适用于蛋白质产生的任何细胞使用本发明的方法。

[1212] 本发明提供了例如在体外、离体、原位或在体内将修饰核酸重复引入(例如,转染)到靶细胞群中。例如,接触相同细胞群可重复一次或多次(如两次、三次、四次、五次或多于五次)。在一些实施方案中,以足够使得在细胞群中达到预先确定的蛋白质翻译效率的次数来重复细胞群与多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触的步骤。鉴于由核酸修饰提供的靶细胞群的细胞毒性常常减小,可在一系列不同的细胞类型中和在如本文所提供的各种组织内实现重复转染。

[1213] 在一个实施方案中,本发明的生物处理方法可用来产生抗体或其功能片段。功能片段可包含Fab、Fab'、F(ab')$_2$、Fv结构域、scFv或双抗体。它们可在任何区包括互补决定区(CDR)中是可变的。在一个实施方案中,在CDR3区中存在完全多样性。在另一个实施方案中,除了在CDR3区中,抗体大致上为保守的。

[1214] 可制得与任何生物分子结合或缔合的抗体,所述生物分子无论是人来源、病原性或非人来源。病原体可存在于非人哺乳动物、临床样本中或来自商业产品如化妆品或药物材料。它们还可结合任何样本或样品,包括来自任何生物体的临床样本或组织样品。

[1215] 在一些实施方案中,在选自由6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、72小时、84小时、96小时和108小时组成的组的频率下和在小于20nM、小于50nM、小于80nM或小于100nM的浓度下使接触步骤重复多次。还可在小于1mM、小于5mM、小于10mM、小于100mM或小于500mM下施用组合物。

[1216] 在一些实施方案中,以50个分子/细胞、100个分子/细胞、200个分子/细胞、300个分子/细胞、400个分子/细胞、500个分子/细胞、600个分子/细胞、700个分子/细胞、800个分子/细胞、900个分子/细胞、1000个分子/细胞、2000个分子/细胞或5000个分子/细胞的量添加多核苷酸、初级构建体或mmRNA。

[1217] 在其它实施方案中,以选自由以下组成的组的浓度下添加多核苷酸、初级构建体或mmRNA:0.01fmol/106个细胞、0.1fmol/106个细胞、0.5fmol/106个细胞、0.75fmol/106个细胞、1fmol/106个细胞、2fmol/106个细胞、5fmol/106个细胞、10fmol/106个细胞、20fmol/106个细胞、30fmol/106个细胞、40fmol/106个细胞、50fmol/106个细胞、60fmol/106个细胞、100fmol/106个细胞、200fmol/106个细胞、300fmol/106个细胞、400fmol/106个细胞、500fmol/106个细胞、700fmol/106个细胞、800fmol/106个细胞、900fmol/106个细胞以及1pmol/106个细胞。

[1218] 在一些实施方案中,通过监测一个或多个可测量生物过程参数来检测生物产物的产生,所述可测量生物过程参数例如为选自由以下组成的组的参数:细胞密度、pH、氧气水平、葡萄糖水平、乳酸水平、温度和蛋白质产生。蛋白质产生可测量为比生产率(SP)(溶液中的产物如异源表达的多肽的浓度)并且可表达为mg/L或g/L;在替代实施方案中,比生产率可表达为pg/细胞/天。SP增加可指在两组定义的条件下产生的产物浓度的绝对或相对增加(例如,在与没有用修饰mRNA处理的对照相比时)。

[1219] 细胞

[1220] 在一个实施方案中,细胞选自由以下组成的组:哺乳动物细胞、细菌细胞、植物细胞、微生物细胞、藻类细胞和真菌细胞。在一些实施方案中,细胞为哺乳动物细胞,例如但不

限于人、小鼠、大鼠、山羊、马、兔、仓鼠或奶牛细胞。在另外的实施方案中，细胞可来自已建立的细胞系，包括但不限于HeLa、NS0、SP2/0、KEK 293T、Vero、Caco、Caco-2、MDCK、COS-1、COS-7、K562、Jurkat、CHO-K1、DG44、CHOK1SV、CHO-S、Huvec、CV-1、Huh-7、NIH3T3、HEK293、293、A549、HepG2、IMR-90、MCF-7、U-20S、Per.C6、SF9、SF21或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[1221] 在某些实施方案中，细胞为真菌细胞，例如但不限于金孢子菌属(Chrysosporium)细胞、曲霉属(Aspergillus)细胞、木霉属(Trichoderma)细胞、盘基网柄菌属(Dictyostelium)细胞、念珠菌属(Candida)细胞、酵母属(Saccharomyces)细胞、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)细胞以及青霉属(Penicillium)细胞。

[1222] 在某些实施方案中，细胞为细菌细胞，例如但不限于大肠杆菌细胞、枯草芽孢杆菌(B.subtilis)细胞或BL21细胞。待通过本发明的方法转染的原代细胞和传代(secondary)细胞可从各种组织中获得，并且包括但不限于可维持在培养物中的所有细胞类型。例如，可通过本发明的方法转染的原代细胞和传代细胞包括但不限于成纤维细胞、角质形成细胞、上皮细胞(例如，乳腺上皮细胞、肠上皮细胞)、内皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、血液形成成分(例如，淋巴细胞、骨髓细胞)、肌细胞以及这些体细胞类型的前体。原代细胞还可从相同种类的供体或从另一种种类(例如，小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、奶牛、鸟、绵羊、山羊、马)获得。

[1223] 纯化和分离

[1224] 本领域普通技术人员应该能够确定方法用来从培养的细胞中纯化或分离目标蛋白质。通常，这通过使用亲和性结合或非亲和性纯化的捕获方法来完成。如果培养的细胞不分泌目标蛋白质，则应该在纯化或分离之前进行培养细胞的裂解。可在本发明中使用含有目标蛋白质、连同细胞培养基组分以及细胞培养添加剂如消泡化合物以及其它营养物和补充剂、细胞、细胞碎片、宿主细胞蛋白质、DNA、病毒等的未澄清的细胞培养流体。可在生物反应器本身中进行所述方法。可将流体预处理至希望的刺激如pH、温度或其它刺激特征或可在添加聚合物时处理流体或可将聚合物添加至载体液体中，所述载体液体被适当处理至聚合物溶解于流体中所需要的刺激条件的所需参数。可允许聚合物随流体充分循环并且然后可施加刺激(pH、温度、盐浓度变化等)并且可使所希望的蛋白质和聚合物从溶液中沉淀出来。可从剩余的流体中分离出聚合物和所希望的蛋白质并且任选地洗涤一次或多次以去除任何补集或松散结合的污染物。然后可通过例如洗脱等从聚合物中回收所希望的蛋白质。优选地，可在使得聚合物保持其沉淀形式并且保留其在所希望的蛋白质的选择洗脱过程中的任何杂质的一系列条件下进行洗脱。聚合物和蛋白质以及任何杂质可溶解在新流体如水或缓冲溶液中，并且可通过如亲和性、离子交换、疏水性或对蛋白质比对聚合物或杂质具有优选性和选择性的一些其它类型的色谱法的手段回收蛋白质。然后可回收洗脱的蛋白质并且如果合适的话，可对其进行另外的加工步骤，如分批样步骤或连续流过步骤。

[1225] 在另一个实施方案中，优化潜在目标细胞系或一系列细胞系中的特定多肽的表达可为有用的，所述多肽具体为目标多肽如具有已知活性的参比蛋白质的蛋白质变体。在一个实施方案中，提供了通过提供多个靶细胞类型并且独立地使多个靶细胞类型中的每一种与编码多肽的修饰mRNA接触来优化靶细胞中的目标多肽的表达的方法。另外，可改变培养条件以增加蛋白质产生效率。随后，检测和/或定量多个靶细胞类型中的目标多肽的存在和/或水平，从而允许通过选择有效的靶细胞和与其相关的细胞培养条件来优化目标多肽

的表达。此类方法可在目标多肽含有一种或多种翻译后修饰或具有大量的三级结构而常常使有效蛋白质产生复杂化时是有用的。

[1226] 蛋白质回收

[1227] 目标蛋白质可优选地作为分泌多肽从培养基中回收，或如果表达没有分泌信号，它可从宿主细胞裂解物中回收。以获得大致上均质的目标蛋白质的制剂的方式从其它重组蛋白和宿主细胞蛋白质中纯化目标蛋白质可为必需的。可从培养基或裂解物中去除细胞和/或颗粒细胞碎片。然后可例如通过免疫亲和性或离子交换柱的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC(RP-HPLC)、SEPHADEX®色谱法、二氧化硅或阳离子交换树脂如DEAE的色谱法来从污染的可溶性蛋白、多肽和核酸中纯化目标产物。纯化由宿主细胞异源表达的蛋白质的方法为本领域中熟知的。

[1228] 本文描述的方法和组合物可用来产生能够消减或阻断内源性激动剂生物应答和/或拮抗哺乳动物受试者体内的受体或信号传导分子的蛋白质。例如，IL-12和IL-23受体信号传导可在慢性自身免疫病症如多发性硬化和炎症性疾病如类风湿关节炎、牛皮癣、红斑狼疮、强直性脊柱炎和克罗恩氏病中有所增强(Kikly K,Liu L,Na S,Sedgwich JD(2006)Cur.Opin.Immunol.18(6):670-5)。在另一个实施方案中，核酸编码趋化因子受体的拮抗剂。趋化因子受体CXCR-4和CCR-5为HIV进入宿主细胞所需要的(Arenzana-Seisdedos F等,(1996)Nature.Oct 3;383(6599):400)。

[1229] 基因沉默

[1230] 本文描述的多核苷酸、初级构建体和mmRNA有用于使细胞群中的一种或多种靶基因的表达沉默(即，阻止或大致上减少)。将编码能够引导序列特异性组蛋白H3甲基化的目标多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA在所述多肽被翻译并且通过组蛋白H3甲基化和后续的异染色质形成来减少靶基因的基因转录的条件下，引入到细胞群的细胞中。在一些实施方案中，对存在于哺乳动物受试者中的细胞群进行沉默机制。通过非限制性实例，有用的靶基因为突变的Janus激酶-2家族成员，其中哺乳动物受试者表达突变靶基因，遭受由异常激酶活性引起的骨髓增生性疾病。

[1231] 本文还提供了多核苷酸、初级构建体以及mmRNA和RNAi剂的共同施用。

[1232] 生物途径的调节

[1233] 引入到细胞中的快速翻译多核苷酸、初级构建体和mmRNA提供了调节靶生物途径的希望机制。此种调节包括给定途径的拮抗作用或激动作用。在一个实施方案中，提供了用于通过在使得多核苷酸、初级构建体和mmRNA定位到细胞中并且目标多肽能够在细胞中从多核苷酸、初级构建体和mmRNA翻译的条件下使细胞与有效量的包含编码目标多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的组合物接触来拮抗细胞中的生物途径的方法，其中所述多肽抑制了在生物途径中起作用的多肽的活性。示例性生物途径为自身免疫或炎症性病症如多发性硬化、类风湿关节炎、牛皮癣、红斑狼疮、强直性脊柱炎或克罗恩氏病中有缺陷的那些；具体来说，IL-12和IL-23信号传导途径的拮抗作用具有特别用途。(参见Kikly K,Liu L,Na S,Sedgwick JD(2006)Curr.Opin.Immunol.18(6):670-5)。

[1234] 此外，提供了编码趋化因子受体的拮抗剂的多核苷酸、初级构建体或mmRNA；趋化因子受体CXCR-4和CCR-5为例如HIV进入宿主细胞中所需要的(Arenzana-Seisdedos F等,(1996)Nature.Oct 3;383(6599):400)。

[1235] 替代地，提供了通过在使得核酸定位到细胞中并且重组多肽能够在细胞中从核酸翻译的条件下使细胞与有效量的编码重组多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA接触来激动细胞中的生物途径的方法，并且重组多肽诱导了在生物途径中起作用的多肽的活性。示例性激动的生物途径包括调节细胞命运决定的途径。此种激动为可逆的或者不可逆的。

[1236] 细胞表面上配体或受体的表达

[1237] 在一些方面和本文描述的方面的实施方案中，本文描述的多核苷酸、初级构建体或mmRNA可用来表达细胞表面上的配体或配体受体(例如，归巢部分)。附着至细胞表面的配体或配体受体可容许细胞在体内与组织或药剂具有希望的生物相互作用。配体可为抗体、抗体片段、适体、肽、维生素、碳水化合物、蛋白质或多肽、受体例如细胞表面受体、粘附分子、糖蛋白、糖残基、治疗剂、药物、糖胺聚糖或其任何组合。例如，配体可为识别癌细胞特异性抗原的抗体，从而呈现能够优选地与肿瘤细胞相互作用以容许修饰细胞的肿瘤特异性定位的细胞。配体可给予细胞组合物在待治疗的组织中积累的能力，因为优选的配体可能够与待治疗的组织的外表面上的靶分子相互作用。与其它组织具有限制的交叉反应性的配体通常为优选的。

[1238] 在一些情况下，配体可充当归巢部分，其容许细胞靶向特定组织或与特定配体相互作用。此类归巢部分可包括但不限于特异性结合对、抗体、单克隆抗体或其衍生物或类似物的任何成员，其包括但不限于：Fv片段、单链Fv(scFv)片段、Fab'片段、F(ab')2片段、单结构域抗体、骆驼化抗体和抗体片段、人源化抗体和抗体片段以及上述的多价形式；多价结合试剂，包括但不限于：单特异性抗体或双特异性抗体，如二硫键稳定的Fv片段、scFv串联((SCFV)2片段)、双抗体、三抗体或四抗体，其通常共价连接或以另外的方式稳定的(即，亮氨酸拉链或螺旋稳定的)scFv片段；以及其它归巢部分，包括例如适体、受体和融合蛋白。

[1239] 在一些实施方案中，归巢部分可为表面结合抗体，其可容许调整细胞靶向特异性。这尤其有用，因为高度特异性的抗体可针对用于希望的靶向部位的目标表位而产生。在一个实施方案中，多种抗体在细胞的表面上表达，并且每种抗体均可对希望的靶标具有不同的特异性。此类方法可增加归巢相互作用的亲合力和特异性。

[1240] 熟练技术人员可基于细胞的希望的定位或功能选择任何归巢部分，例如雌激素受体配体，如他莫昔芬(tamoxifen)可将细胞靶向雌激素依赖性乳癌细胞，其在细胞表面上具有增加数目的雌激素受体。配体/受体相互作用的其它非限制性实例包括CCRI(例如，用于治疗类风湿关节炎和/或多发性硬化中的发炎关节组织或脑)、CCR7、CCR8(例如，靶向淋巴结组织)、CCR6、CCR9、CCR10(例如，靶向肠组织)、CCR4、CCR10(例如用于靶向皮肤)、CXCR4(例如，用于一般的增强的移行)、HCELL(例如用于治疗炎症和炎性病症、骨髓)、α4β7(例如用于肠粘膜靶向)、VLA-4/VCAM-1(例如靶向内皮)。通常，涉及靶向(例如，癌症转移)的任何受体可用于本文描述的方法和组合物中。

[1241] 细胞谱系的调节

[1242] 提供了在靶哺乳动物细胞中诱导细胞命运改变的方法。靶哺乳动物细胞可为前体细胞并且改变可涉及驱使分化成一种谱系或阻断此种分化。或者，靶哺乳动物细胞可为分化的细胞，并且细胞命运改变包括驱使去分化为多能性前体细胞或阻断此种去分化，如使癌细胞去分化为癌干细胞。在希望细胞命运变化的情况下，在使得诱导细胞命运改变的条件下将有效量的编码细胞命运诱导多肽的mRNA引入到靶细胞中。在一些实施方案中，修饰

mRNA有用于将细胞亚群从第一表型重新编程为第二表型。这种重新编程可为暂时的或永久的。

[1243] 任选地，重新编程诱导靶细胞采用中间表型。

[1244] 另外，本发明的方法由于高转染效率、重新转染细胞的能力和在靶细胞中产生的重组多肽的量的可保持性(tenability)而特别有用于产生诱导的多能性干细胞(iPS细胞)。此外，预期使用本文描述的方法产生的iPS细胞的使用具有减小的畸胎瘤形成的发生率。

[1245] 还提供了减少靶细胞群中的细胞分化的方法。例如，在使得多肽被翻译并减少前体细胞分化的条件下，使含有一个或多个前体细胞类型的靶细胞群与具有有效量的编码多肽的多核苷酸、初级构建体和mmRNA的组合物接触。在非限制性实施方案中，靶细胞群在受手术过程影响的哺乳动物受试者或组织中含有损伤的组织。前体细胞为例如基质前体细胞、神经前体细胞或间充质前体细胞。

[1246] 在具体实施方案中，提供了编码一个或多个分化因子Gata4、Mef2c和Tbx4的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。将这些mRNA产生的因子引入到成纤维细胞中并且驱使重新编程为心肌细胞。这种重新编程可在体内通过使含有mRNA的贴片或其它材料接触受损的心脏组织以促进心脏再生来进行。这种方法促进了与纤维变性相反的心肌细胞生成。

[1247] 细胞死亡的介导

[1248] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA组合物可用来通过使死亡受体、死亡受体配体或其组合的表达增加来诱导细胞(例如，癌细胞)凋亡。这个方法可用来诱导任何希望的细胞的细胞死亡并且对治疗细胞逃脱自然凋亡信号的癌症特别有用。

[1249] 可通过多个独立信号传导途径来诱导凋亡，所述独立信号传导途径集中于由属于肿瘤坏死因子(TNF)受体/配体超家族的若干“死亡受体”与其配体之间的多种相互作用组成的最终效应子机制。最充分表征的死亡受体为CD95(“Fas”)、TNFRI(p55)、死亡受体3(DR3或Apo3/TRAMO)、DR4和DR5(apo2-TRAIL-R2)。凋亡的最终效应子机制可为称作半胱天冬酶(caspase)的一系列蛋白酶的激活。这些半胱天冬酶的激活导致一系列活细胞蛋白的裂解和细胞死亡。死亡受体/配体诱导的凋亡的分子机制为本领域中熟知的。例如，通过以下方式来诱导Fas/FasL-介导的凋亡：通过C-末端死亡结构域(DD)来结合诱导Fas受体三聚的三个FasL分子，其转而招募衔接蛋白FADD(具有死亡结构域的Fas相关蛋白)和半胱天冬酶-8。这个三分子复合物Fas/FAIDD/半胱天冬酶-8的低聚导致酶原半胱天冬酶-8蛋白水解裂解为活性半胱天冬酶-8，其转而通过蛋白水解激活其它下游半胱天冬酶(包括半胱天冬酶-3)来启动凋亡过程。通常，死亡配体在成为三聚体或更高级结构时为凋亡的。作为单体，它们可通过与用于结合死亡受体的三聚体竞争充当抗凋亡剂。

[1250] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体或mmRNA组合物编码死亡受体(例如，Fas、TRAIL、TRAMO、TNFR、TLR等)。通过多核苷酸、初级构建体和mmRNA的转染来表达死亡受体的细胞变得容易经受由激活所述受体的配体诱导的死亡。类似地，例如在其表面上表达死亡配体的细胞将在转染的细胞接触靶细胞时用受体诱导细胞的死亡。在另一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和mmRNA组合物编码死亡受体配体(例如，FasL、TNF等)。在另一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和mmRNA组合物编码半胱天冬酶(例如，半胱天冬酶3、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9等)。在癌细胞经常展现出不能适当地分化成非增殖性或控制的增

殖形式的情况下，在另一个实施方案中，合成的多核苷酸、初级构建体和mmRNA组合物编码死亡受体和其适当的激活配体。在另一个实施方案中，合成的多核苷酸、初级构建体和mmRNA组合物编码在癌细胞如癌干细胞中表达时将诱导细胞分化成非病原性或非自更新表型(例如，细胞生长速率减小、细胞分裂减少等)或诱导细胞进入细胞休眠期(例如，G_0休止期)的分化因子。

[1251] 本领域技术人员将了解，使用凋亡诱导技术可要求多核苷酸、初级构建体或mmRNA适当地靶向例如肿瘤细胞以防止不希望的广泛细胞死亡。因此，可使用识别癌症抗原的递送机制(例如，附着的配体或抗体、靶向的脂质体等)，以使得多核苷酸、初级构建体或mmRNA仅在癌细胞中表达。

[1252] 美容应用

[1253] 在一个实施方案中，多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA可用于美容学病状的治疗、改善或预防。此类病状包括痤疮、红斑痤疮、斑痕形成、皱纹、湿疹、带状疱疹、牛皮癣、老年斑、胎记、皮肤干燥、老茧、皮疹(例如，尿布、热)、疥疮、荨麻疹、疣、昆虫叮咬、白癜风、头皮屑、雀斑以及老化迹象。

[1254] VI.试剂盒和装置

[1255] 试剂盒

[1256] 本发明提供各种用于方便和/或有效进行本发明的方法的试剂盒。通常试剂盒将包括足够量和/或数目的组分以允许使用者进行受试者的多次治疗和/或进行多个实验。

[1257] 一方面，本发明提供包含本发明的分子(多核苷酸、初级构建体或mmRNA)的试剂盒。在一个实施方案中，试剂盒包含一种或多种功能性抗体或其功能片段。

[1258] 所述试剂盒可用于蛋白质产生，其包含包括可翻译区的第一多核苷酸、初级构建体或mmRNA。试剂盒可进一步包含包装和说明书和/或形成制剂组合物的递送剂。递送剂可包含盐水、缓冲溶液、类脂质或本文公开的任何递送剂。

[1259] 在一个实施方案中，缓冲溶液可包括氯化钠、氯化钙、磷酸盐和/或EDTA。在另一个实施方案中，缓冲溶液可包括但不限于盐水、具有2mM钙的盐水、5％蔗糖、具有2mM钙的5％蔗糖、5％甘露醇、具有2mM钙的5％甘露醇、林格氏乳酸盐、氯化钠、具有2mM钙的氯化钠以及甘露糖(参见例如美国公布号20120258046;其以引用的方式整体并入本文)。在另外的实施方案中，缓冲溶液可为沉淀的或它可为冻干的。可改变每种组分的量以实现一致的、可再现的更高浓度的盐水或样品缓冲制剂。还可改变组分以便增加经过一段时间和/或在各种条件下修饰RNA在缓冲溶液中的稳定性。一方面，本发明提供用于蛋白质生产的试剂盒，其包含:包括可翻译区的多核苷酸、初级构建体或mmRNA，其以有效于在引入到靶细胞中时产生希望的量的由可翻译区编码的蛋白质的量提供;包含抑制性核酸的第二多核苷酸，其以有效于大致上抑制细胞的先天性免疫应答的量提供;以及包装和说明书。

[1260] 一方面，本发明提供用于蛋白质产生的试剂盒，其包含:包括可翻译区的多核苷酸、初级构建体或mmRNA，其中多核苷酸展现出由细胞核酸酶引起的降解减少;以及包装和说明书。

[1261] 一方面，本发明提供用于蛋白质产生的试剂盒，其包含:包括可翻译区的多核苷酸、初级构建体或mmRNA，其中多核苷酸展现出由细胞核酸酶引起的降解减少;以及适用于翻译第一核酸的可翻译区的哺乳动物细胞。

[1262] 在一个实施方案中，可通过免疫测定测量蛋白C的水平。测定可购自和从任何数目的供应商获得，包括BioMerieux Inc.(Durham,NC)、Abbott Laboratories(Abbott Park,IL)、Siemens Medical Solutions USA,Inc.(Malvern,PA)、BIOPORTO®Diagnostics A/S(Gentofte,Denmark)、USCN®Life Science Inc.(Houston,TX)或Roche Diagnostic Corporation(Indianapolis,IN)。在此实施方案中，测定可用来评价随着修饰mRNA分子施用或响应于修饰mRNA分子施用的蛋白C或其激活形式或变体的水平。

[1263] 装置

[1264] 本发明提供可并入编码目标多肽的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的装置。这些装置包含处于稳定制剂中的试剂，所述试剂用于合成可供立即递送至有需要的受试者如人患者的制剂形式的多核苷酸。这种目标多肽的非限制性实例包括用于伤口愈合的生长因子和/或血管生成刺激物、促进感染控制的肽抗生素以及快速刺激对新鉴别的病毒的免疫应答的抗原。

[1265] 还可与本发明结合使用装置。在一个实施方案中，装置用来评定以修饰mRNA的形式施用的蛋白质的水平。装置可包括血液、尿或其它生物流体测试。它可大到足以包括自动中心实验室平台或小型分散台式装置。它可为现场护理或手持设备。在此实施方案中，例如，蛋白C或APC可在用编码蛋白C(其酶原)、APC或其任何变体的修饰mRNA治疗之前、之中或之后定量。蛋白C，又称为自凝血酶原IIA和凝血因子XIV，是对凝血调节和体内纤维蛋白溶解活性的产生起重要作用的丝氨酸蛋白酶的酶原或前体。它呈单链多肽的形式在肝脏中合成，但经历翻译后加工而产生二链中间体。经12-残基肽从重链的氨基-末端至分子的氨基-末端的凝血酶介导的裂解使蛋白C的中间体形式转化为称为“激活蛋白C”(APC)的活性形式。装置可在药物发现研究中用作与蛋白C相关的成对诊断测试或如用于脓毒症或严重脓毒症的APC治疗。在早期研究中，已表明APC具有减少严重脓毒症中的死亡率的能力。在这项工作之后，临床研究导致FDA批准一种化合物，激活的屈曲可净α(drotrecogin alfa)(重组蛋白C)。然而，在2011年下半年，根据PROWESS-SHOCK研究的结果使药物在所有销售市场撤回，所述研究显示它不能满足脓毒性休克患者中的28天全因死亡率统计学显著减小的主要端点。本发明提供可用于诊断和治疗脓毒症、严重脓毒症和败血病的修饰mRNA分子，其克服与哺乳动物体内蛋白质表达效率增加相关的现有课题或问题。

[1266] 在一些实施方案中，装置为自含式的并且任选地能够无线远程访问以获得用于合成和/或分析产生的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的说明书。装置能够机动地合成至少一种多核苷酸、初级构建体或mmRNA，并且优选地为不受限制数目的不同多核苷酸、初级构建体或mmRNA。在某些实施方案中，装置能够由一个或几个个体运输。在其它实施方案中，缩放装置以安装在工作台或桌上。在其它实施方案中，缩放装置以安装到手提箱、背包或类似大小的物体中。在另一个实施方案中，装置可为现场护理或手持装置。在另外的实施方案中，缩放装置以安装到车辆如小汽车、卡车或救护车或军用车辆如坦克或人员输送车中。产生编码目标多肽的修饰mRNA所必要的信息存在于装置中包括的计算机可读介质内。

[1267] 在一个实施方案中，装置可用来评定以多核苷酸、初级构建体或mmRNA的形式施用的蛋白质的水平。装置可包括血液、尿或其它生物流体测试。

[1268] 在一些实施方案中，装置能够与核酸和多肽序列的数据库通信(例如，无线通信)。装置含有用于插入一个或多个样品容器的至少一个样品块(sample block)。此类样品容器

能够接受呈液体或其它形式的任何数目的材料如模板DNA、核苷酸、酶、缓冲液和其它试剂。样品容器还能够通过与样品块接触来被加热和冷却。样品块通常与具有用于至少一个样品块的一个或多个电子控制单元的装置底座连通。样品块优选地含有加热模块，这种加热模块能够将样品容器及其内容物加热和/或冷却至约-20C与+100C之间的温度。装置底座与电压供应如电池或外部电压供应连通。装置还含有用于储存和分配用于RNA合成的材料的工具(means)。

[1269] 任选地，样品块含有用于分离合成的核酸的模块。或者，装置含有任选连接至样品块的分离模块。优选地，装置含有用于分析合成的核酸的工具。此种分析包括序列同一性(如通过杂交证明)、不存在不希望的序列、测量合成的mRNA的完整性(如通过与分光光度法组合的微流体粘度测定法)以及修饰RNA的浓度和/或效力(如通过分光光度法)。

[1270] 在某些实施方案中，装置与用于检测存在于从受试者获得的生物材料中的病原体的工具组合，所述工具例如为用于微生物鉴别的IBISPLEX-ID系统(Abbott,Abbott Park,IL)。

[1271] 用于递送本文描述的皮内药物组合物的合适的装置包括短针装置，如在美国专利4,886,499;5,190,521;5,328,483;5,527,288;4,270,537;5,015,235;5,141,496和5,417,662中描述的那些;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。皮内组合物可通过限制针进入皮肤的有效穿透长度的装置来施用，如在PCT公布WO 99/34850中描述的那些(所述专利以引用的方式整体并入本文)及其功能等效物。通过液体喷射注射器和/或通过穿刺角质层并产生到达真皮的喷流的针将液体组合物递送至真皮的喷射注射装置为合适的。喷射注射装置例如描述于美国专利5,480,381;5,599,302;5,334,144;5,993,412;5,649,912;5,569,189;5,704,911;5,383,851;5,893,397;5,466,220;5,339,163;5,312,335;5,503,627;5,064,413;5,520,639;4,596,556;4,790,824;4,941,880;4,940,460;以及PCT公布WO 97/37705和WO 97/13537中;所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。使用压缩气体来加速以粉末形式存在的疫苗穿过皮肤的外层到达真皮的弹道粉末/颗粒递送装置为合适的。可选地或另外地，常规注射器可用于皮内施用的经典芒图氏(mantoux)方法中。

[1272] 在一些实施方案中，装置可为泵或包括用于跨过血脑屏障施用本发明的化合物或组合物的导管。此类装置包括但不限于加压嗅觉递送装置、离子电渗装置、多层微流体装置等。此类装置可为便携式的或固定式的。它们可植入或外部栓系至身体或其组合。

[1273] 可使用用于施用的装置以根据本文教导的单次给药方案、多次给药方案或分次给药方案递送本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA。以下描述了此类装置。

[1274] 设想到本领域中已知的用于向细胞、器官和组织多次施用的方法和装置与本文公开的方法和组合物结合使用作为本发明的实施方案。这些包括例如具有多个针的那些方法和装置、采用例如管腔或导管的混合型装置以及使用热、电流或辐射驱动机制的装置。

[1275] 根据本发明，可使用这些多次施用装置来递送本文想到的单次剂量、多次剂量或分剂量。

[1276] 用于将治疗剂递送至固体组织的方法已由Bahrami等描述并且例如在美国专利公布20110230839中教导，所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Bahrami，将针阵列并入到沿着每个针的长度在所述固体组织中的任何位置上递送大致上等量的流体的装置中。

[1277] 用于穿过生物组织递送生物材料的装置已由Kodgule等描述并且例如在美国专利公布20110172610中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Kodgule,将由一种或多种金属制成并且具有约200微米至约350微米的外径和至少100微米长度的多个空心微型针并入到递送肽、蛋白质、碳水化合物、核酸分子、脂质和其它药学上活性成分或其组合的装置中。

[1278] 用于将治疗剂递送至组织的递送探针已由Gunday等描述并且例如在美国专利公布20110270184中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Gunday,将多个针并入到在启动位置与未启动位置之间移动附着的胶囊以迫使药剂穿过针从胶囊中出来的装置中。

[1279] 多注射医疗设备已由Assaf描述并且例如在美国专利公布20110218497中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Assaf,将多个针并入到具有连接至一个或多个所述针的腔室和用于在每次注射之后用医学流体连续重新填充腔室的工具的装置中。

[1280] 在一个实施方案中,多核苷酸、初级构建体或mmRNA经至少3个针同时或在60分钟时间段内皮下或肌内施用至三个不同的、任选相邻的部位(例如,同时或在60分钟时间段内施用至4、5、6、7、8、9或10个部位)。可使用描述于美国专利公布号20110230839和20110218497中的装置同时向相邻组织施用分剂量,所述专利各自均以引用的方式整体并入本文。

[1281] 用于将物质注射到患者身体内的至少部分可植入系统(具体为阴茎勃起刺激系统)已由Forsell描述并且例如在美国专利公布20110196198中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Forsell,将多个针并入到连同一个或多个壳体邻近于患者的左右海绵体植入的装置中。还植入储器和泵以通过针供应药物。

[1282] 用于透皮递送治疗有效量的铁的方法已由Berenson描述并且例如在美国专利公布20100130910中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Berenson,可使用多个针来在角质层中形成多个微通道以增强在离子电渗贴片上的离子铁的透皮递送。

[1283] 用于穿过生物组织递送生物材料的方法已由Kodgule等描述并且例如在美国专利公布20110196308中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Kodgule,将含有治疗活性成分的多个生物可降解的微型针并入递送蛋白质、碳水化合物、核酸分子、脂质和其它药学上活性成分或其组合的装置中。

[1284] 包含肉毒杆菌毒素组合物的透皮贴片已由Donovan描述并且例如在美国专利公布20080220020中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Donovan,将多个针并入到通过所述针将肉毒杆菌毒素递送到角质层下方的贴片中,所述针突出穿过皮肤的角质层而没有使血管破裂。

[1285] 可容纳大约0.2mL至15mL液体制剂的小型一次性药物储器或贴片泵可放置在皮肤上并且使用所需要的小孔(例如,26至34号)连续皮下递送制剂。作为非限制性实例,贴片泵可为具有30至34号针的50mm乘76mm乘20mm弹簧加载的(BD™ Microinfuser,Franklin Lakes NJ)、具有用于药物递送如胰岛素的2mL储器的41mm乘62mm乘17mm(OMNIPOD®,Insulet Corporation Bedford,MA)或具有0.5mL至10mL储器的43-60mm直径、10mm厚(PATCHPUMP®,SteadyMed Therapeutics,San Francisco,CA)。此外,贴片泵可为电池供电的和/或可再充电的。

[1286] 用于向低温处理的位置施用活性剂的低温探针已由Toubia描述并且例如在美国专利公布20080140061中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Toubia,多个针并入到将活性剂接收到腔室中并将药剂施用到组织的探针中。

[1287] 用于治疗或预防炎症或促进健康关节的方法已由Stock等描述并且例如在美国专利公布20090155186中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Stock,将多个针并入到施用含有信号转导调节剂化合物的组合物的装置中。

[1288] 多部位注射系统已由Kimmell等描述并且例如在美国专利公布20100256594中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Kimmell,将多个针并入到通过针将药剂递送到角质层中的装置中。

[1289] 用于将干扰素递送至皮内区室的方法已由Dekker等描述并且例如在美国专利公布20050181033中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Dekker,将具有0mm与1mm之间暴露高度的出口的多个针并入到通过在0.3mm与2mm之间深度递送物质来改进药物代谢动力学和生物利用率的装置中。

[1290] 用于将基因、酶和生物剂递送至组织细胞的方法已由Desai描述并且例如在美国专利公布20030073908中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Desai,将多个针并入到插入身体中并通过所述针递送药剂流体的装置中。

[1291] 用于使用成纤维细胞治疗心律失常的方法已由Lee等描述并且例如在美国专利公布20040005295中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Lee,将多个针并入到将成纤维细胞递送到组织的局部区域中的装置中。

[1292] 使用磁控制的泵用于治疗脑肿瘤的方法已由Shachar等描述并且例如在美国专利7799012(方法)和7799016(装置)中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Shachar,将多个针并入到以控制的速率推动药剂穿过针的泵中。

[1293] 治疗哺乳动物雌性体内的膀胱功能性病症的方法已由Versi等描述并且例如在美国专利8,029,496中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Versi,将微型针阵列并入到通过针将治疗剂直接递送到膀胱三角中的装置中。

[1294] 微型针透皮输送装置已由Angel等描述并且例如在美国专利7,364,568中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Angel,将多个针并入到通过从不同方向插入到表面中的针将物质输送到身体表面中的装置中。微型针透皮输送装置可为实心微型针系统或空心微型针系统。作为一个非限制性实例,实心微型针系统可具有高达至0.5mg容量,其中约150-700μm高的每平方厘米300-1500个实心微型针被药物涂覆。微型针穿透角质层并且在皮肤中保持较短的持续时间(例如,20秒至15分钟)。在另一个实例中,空心微型针系统具有高达至3mL容量以使用大约950μm高的每平方厘米15-20个微型针递送液体制剂。微型针穿透皮肤以允许液体制剂从装置流入到皮肤中。空心微型针系统可取决于制剂体积和粘度而持久1至30分钟。

[1295] 用于皮下输注的装置已由Dalton等描述并且例如在美国专利7,150,726中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Dalton,将多个针并入到通过针将流体递送到皮下组织中的装置中。

[1296] 用于通过微插管皮内递送疫苗和基因治疗剂的装置和方法已由Mikszta等描述并且例如在美国专利7,473,247中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据

Mitszta,将至少一个空心微型针并入到将疫苗递送至受试者皮肤的0.025mm与2mm之间的深度的装置中。

[1297] 递送胰岛素的方法已由Pettis等描述并且例如在美国专利7,722,595中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Pettis,将两个针并入到装置中,其中这两个针基本上同时插入到皮肤中,第一个针处于小于2.5mm的深度将胰岛素递送至皮内区室并且第二个针处于大于2.5mm且小于5.0mm的深度将胰岛素递送至皮下区室。

[1298] 抽吸下的经皮注射递送已由Kochamba等描述并且例如在美国专利6,896,666中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Kochamba,将彼此相对邻近的多个针并入到将流体注射到皮层下方的装置中。

[1299] 用于通过皮肤抽取或递送物质的装置已由Down等描述并且例如在美国专利6,607,513中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Down,并入到装置中的多个皮肤穿透构件具有约100微米至约2000微米的长度并且为约30至50号。

[1300] 用于将物质递送至皮肤的装置已由Palmer等描述并且例如在美国专利6,537,242中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Palmer,将微型针阵列并入到使用拉伸组件以增强针与皮肤的接触并且提供物质的更均匀递送的装置中。

[1301] 用于局部药物递送的灌注装置已由Zamoyski描述并且例如在美国专利6,468,247中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Zamoyski,将多个皮下注射针并入到在缩回所述皮下注射针时将皮下注射针的内容物注射到组织中的装置中。

[1302] 用于通过改进微型针与人皮肤之间的相互作用增强药物和生物分子穿过组织的输送的方法已由Prausnitz等描述并且例如在美国专利6,743,211中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Prausnitz,将多个微型针并入到能够提供施加微型针的更硬且不易变形表面的装置中。

[1303] 用于器官内施用药剂的装置已由Ting等描述并且例如在美国专利6,077,251中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Ting,将具有用于增强施用的侧面开口的多个针并入到通过将所述针从针腔室伸出和将所述针缩回到腔室来迫使药剂从储器进入所述针并将所述药剂注射到靶器官中的装置中。

[1304] 多针保持器和皮下多通道输注口已由Brown描述并且例如在美国专利4,695,273中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Brown,将针保持器上的多个针插入穿过输注口的隔膜并且与所述输注口中的分开的腔室连通。

[1305] 双皮下注射器已由Horn描述并且例如在美国专利3,552,394中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Horn,并入到装置中的两个针间隔小于68mm并且可具有不同样式和长度,因此实现进行不同深度的注射。

[1306] 具有多个针和多个流体区室的注射器已由Hershberg描述并且例如在美国专利3,572,336中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Hershberg,将多个针并入到具有多个流体区室并且能够同时施用不能混合用于一次注射的不相容药物的注射器中。

[1307] 用于皮内注射流体的手术器具已由Eliscu等描述并且例如在美国专利2,588,623中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Eliscu,将多个针并入到以更广泛的分散皮内注射流体的器具中。

[1308] 用于向多个母乳管同时递送物质的设备已由Hung描述并且例如在EP 1818017中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Hung,将多个管腔并入到插入穿过导管网络的孔口并将流体递送至导管网络的装置中。

[1309] 用于将药剂引入至心脏或其它器官的组织的导管由Tkebuchava描述并且例如在WO2006138109中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Tkebuchava,并入以扁平轨迹进入器官壁的两个弯针。

[1310] 用于递送药剂的装置已由Mckay等描述并且例如在WO2006118804中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Mckay,将每个针上具有多个孔口的多个针并入到装置中以促进向组织如椎间盘的内部盘间隙的区域递送。

[1311] 用于将免疫调节物质直接递送到哺乳动物皮肤内的皮内空间中的方法已由Pettis描述并且例如在WO2004020014中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Pettis,将多个针并入到通过针将物质递送至0.3mm与2mm之间深度的装置中。

[1312] 用于将物质施用到皮肤中的至少两个区室中以用于系统吸收和改进的药物代谢动力学的方法和装置已由Pettis等描述并且例如在WO2003094995中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Pettis,将具有约300μm与约5mm之间长度的多个针并入到向皮内组织区室和皮下组织区室同时递送的装置中。

[1313] 具有针和辊的药物递送装置已由Zimmerman等描述并且例如在WO2012006259中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Zimmerman,将定位于辊中的多个空心针并入到在辊旋转时通过针递送储器中的内容物的装置中。

[1314] 药物递送装置如支架为本领域中已知的并且例如在美国专利号8,333,799、美国公布号US20060020329、US20040172127和US20100161032中教导;所述专利各自的内容均以引用的方式整体并入本文。可使用支架递送本文描述的多核苷酸、初级构建体、mmRNA的制剂。另外,本文使用的支架可能够以相同或变化的递送速率递送多种多核苷酸、初级构建体和/或mmRNA和/或制剂。支架制造商的非限制性实例包括CORDIS® (Miami,FL) (CYPHER®)、Boston Scientific Corporation(Natick,MA) (TAXUS®) 、Medtronic (Minneapolis,MN) (ENDEAVOUR®)以及Abbott(Abbott Park,IL) (XIENCEV®)。

[1315] 使用导管和/或管腔的方法和装置

[1316] 可采用使用导管和管腔的方法和装置按照单次、多次或分次给药方案施用本发明的mmRNA。以下描述了此类方法和装置。

[1317] 骨骼成肌细胞向受损心脏的心肌的基于导管的递送已由Jacoby等描述并且例如在美国专利公布20060263338中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Jacoby,将多个针并入到装置中,所述装置的至少部分插入到血管中并且通过针将细胞组合物递送到受试者心脏的局部区域中。

[1318] 用于使用神经毒素治疗哮喘的设备已由Deem等描述并且例如在美国专利公布20060225742中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Deem,将多个针并入到通过针将神经毒素递送到支气管组织中的装置中。

[1319] 用于施用多组分疗法的方法已由Nayak描述并且例如在美国专利7,699,803中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Nayak,可将多个注射套管并入到装

置中,其中可包括用于控制在组织内递送治疗物质的深度的深度狭槽。

[1320] 用于烧蚀通道并将至少一种治疗剂递送到组织的希望区域中的手术装置已由McIntyre等描述并且例如在美国专利8,012,096中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据McIntyre,将多个针并入到将治疗剂分配到包围通道的组织区域中并特别适用于透心肌的血管再造操作的装置中。

[1321] 治疗哺乳动物雌性体内的膀胱功能性病症的方法已由Versi等描述并且例如在美国专利8,029,496中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Versi,将微型针阵列并入到通过针将治疗剂直接递送到膀胱三角中的装置中。

[1322] 用于将流体递送到柔性生物屏障中的装置和方法已由Yeshurun等描述并且例如在美国专利7,998,119(装置)和8,007,466(方法)中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Yeshurun,装置上的微型针穿透并延伸到柔性生物屏障中并且通过空心微型针的孔注射流体。

[1323] 用于将物质从心外膜注射到具有心外膜表面并置于躯干内的心脏的组织区域中的方法已由Bonner等描述并且例如在美国专利7,628,780中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Bonner,装置具有用于驱使针进入组织并通过针将药剂注射到组织中的细长轴和远端注射头。

[1324] 用于密封穿刺孔的装置已由Nielsen等描述并且例如在美国专利7,972,358中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Nielsen,将多个针并入到将封闭剂递送到包围穿刺道的组织中的装置中。

[1325] 用于肌生成和血管生成的方法已由Chiu等描述并且例如在美国专利6,551,338中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Chiu,将最大直径为至少1.25mm并具有有效于提供6mm至20mm穿刺深度的长度的5至15个针并入到装置中,所述装置插入到心肌附近并且通过位于至少一些所述针中的管道向所述心肌供应外源性血管生成因子或生肌因子。

[1326] 用于治疗前列腺组织的方法已由Bolmsj等描述并且例如在美国专利6,524,270中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Bolmsj,包括通过尿道插入的导管的装置具有至少一个可伸出到周围前列腺组织中的空心尖端。通过所述尖端将收敛剂和止痛药递送到所述前列腺组织中。

[1327] 用于将流体输注至骨内部位的方法已由Findlay等描述并且例如在美国专利6,761,726中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Findlay,将多个针并入到能够穿透被一层软材料覆盖的硬壳材料并将流体递送到所述硬壳材料下方预先确定的距离处的装置中。

[1328] 用于将药剂注射到血管壁中的装置已由Vigil等描述并且例如在美国专利5,713,863中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Vigil,将多个注射器安装在装置中的每个柔性管上,所述装置通过多管腔导管将药剂流体引入到所述柔性管中并从所述注射器出来用于输注到血管壁中。

[1329] 用于将治疗剂和/或诊断剂递送至包围身体通道的组织的导管已由Faxon等描述并且例如在美国专利5,464,395中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Faxon,将至少一个针套管并入到通过突出到导管外侧的所述针将希望的药剂递送至组织

的导管中。

[1330] 用于递送治疗剂的球囊导管已由Orr等描述并且例如在WO2010024871中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Orr,将多个针并入到将治疗剂递送至组织内的不同深度的装置中。另一方面,药物洗脱球囊可用来递送本文描述的制剂。药物洗脱球囊可用于靶损伤应用中,例如但不限于支架内再狭窄、治疗曲折脉管中的损伤、分叉损伤、股骨/腘肌损伤以及膝下损伤。

[1331] 用于将治疗剂(例如,多核苷酸、初级构建体或mmRNA)递送至置于管腔周围的组织的装置已由Perry等描述并且例如在美国专利公布US20100125239中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Perry,导管具有可通过本领域中已知和在Perry中描述的方法涂覆有治疗剂的球囊。当球囊膨胀时,治疗剂将接触周围组织。装置可另外具有热源以改变球囊上涂层的温度,以便使治疗剂释放至组织。

[1332] 使用电流的方法和装置

[1333] 可采用使用电流的方法和装置根据本文教导的单次给药方案、多次给药方案或分次给药方案递送本发明的mmRNA。以下描述了此类方法和装置。

[1334] 电胶原诱导疗法装置已由Marquez描述并且例如在美国专利公布20090137945中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Marquez,将多个针并入到重复穿刺皮肤并在皮肤中取出第一次向皮肤施加的一部分物质的装置中。

[1335] 电动系统已由Etheredge等描述并且例如在美国专利公布20070185432中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Etheredge,将微型针并入到由电流驱使药剂穿过针进入到所靶向的治疗部位中的装置中。

[1336] 离子电渗装置已由Matsumura等描述并且例如在美国专利7,437,189中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Matsumura,将多个针并入到能够以较高的速度或以较高的效率将可电离的药物递送到活体中的装置中。

[1337] 通过无针注射和电穿孔皮内递送生物活性剂已由Hoffmann等描述并且例如在美国专利7,171,264中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Hoffmann,将一个或多个无针注射器并入到电穿孔装置中并且无针注射和电穿孔的组合足以将药剂引入到皮肤、肌肉或粘膜中的细胞中。

[1338] 用于电通透介导的细胞内递送的方法已由Lundkvist等描述并且例如在美国专利6,625,486中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Lundkvist,将一对针电极并入到导管中。将所述导管置于体腔中,随后使所述针电极伸出以穿入包围所述管腔的组织中。然后装置通过至少一个所述针电极引入药剂并且通过所述针电极对施加电场以允许所述药剂穿过细胞膜进入治疗部位处的细胞中。

[1339] 用于透皮免疫的递送系统已由Levin等描述并且例如在WO2006003659中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Levin,将多个电极并入到在电极之间施加电能以在皮肤中产生微通道从而促进透皮递送的装置中。

[1340] 用于将RF能递送到皮肤中的方法已由Schomacker描述并且例如在WO2011163264中教导,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。根据Schomacker,将多个针并入到施加真空以吸住皮肤与板接触从而使得针通过板上的孔洞插入皮肤中并递送RF能的装置中。

[1341] VII.定义

[1342] 在本说明书中的各个地方，本公开的化合物的取代基以基团或以范围公开。确切意图为本公开包括此类基团和范围的成员的每种和每个单独子组合。例如，术语“C_{1-6}烷基”确切意图为单独公开甲基、乙基、C_3烷基、C_4烷基、C_5烷基和C_6烷基。

[1343] 约：如本文所使用，术语“约”意指所列举的值的+/-10％。

[1344] 组合施用：如本文所使用，术语“组合施用”或“组合的施用”意指同时或在使得对患者存在每种药剂的作用重叠的时间段内向受试者施用两种或更多种试剂。在一些实施方案中，在彼此约60、30、15、10、5或1分钟内施用它们。在一些实施方案中，使药剂的施用足够靠近地间隔以使得实现组合(例如，协同)作用。

[1345] 动物：如本文所使用，术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中，“动物”是指在任何发育阶段下的人。在一些实施方案中，“动物”是指在任何发育阶段下的非人动物。在某些实施方案中，非人动物为哺乳动物(例如，啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物或猪)。在一些实施方案中，动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼以及蠕虫。在一些实施方案中，动物为转基因动物、基因工程化的动物或克隆。

[1346] 目标抗原或希望的抗原：如本文所使用，术语“目标抗原”或“希望的抗原”包括本文提供的那些蛋白质和其它生物分子，其被本文描述的抗体及其片段、突变体、变体和改变免疫特异性结合。目标抗原的实例包括但不限于胰岛素、胰岛素样生长因子、hGH、tPA、细胞因子如白细胞介素(IL)，例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、干扰素(IFN)α、IFNβ、IFNγ、IFNω或IFNτ、肿瘤坏死因子(TNF)如TNFα和TNFβ、TNFγ、TRAIL；G-CSF、GM-CSF、M-CSF、MCP-1和VEGF。

[1347] 大约：如本文所使用，在应用于一个或多个目标值时，术语“大约”或“约”是指类似于所说明的参考值的值。在某些实施方案中，术语“大约”或“约”是指在所说明的参考值的任一方向上的(大于或小于)25％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％或更小范围内的值范围，除非另外说明或以另外的方式从上下文显而易见(除了这样的数字将超过可能值的100％)。

[1348] 缔合：如本文所使用，在关于两个或更多个部分使用时，术语“缔合”、“缀合”、“连接”、“附着”和“栓系”意味着所述部分直接或经充当连接剂的一个或多个另外的部分彼此物理缔合或连接以形成足够稳定的结构，从而使得在使用所述结构的条件例如生理条件下所述部分保持物理缔合。“缔合”不需要是严格地通过直接共价化学结合。还可表明离子键合或氢键合或基于杂交的连接足够稳定以使得“缔合的”实体保持物理缔合。

[1349] 双功能的：如本文所使用，术语“双功能的”是指能够或维持至少两个功能的任何物质、分子或部分。所述功能可实现相同结果或不同结果。产生功能的结构可为相同的或不同的。例如，本发明的双功能性的修饰RNA可编码细胞毒性肽(第一功能)，同时包含编码RNA的那些核苷在它们本身中和它们制得的产品中为细胞毒性的(第二功能)。在此实例中，双功能性的修饰RNA向癌细胞的递送将不仅产生可改善或治疗癌症的肽或蛋白质分子，而且如果发生降解而不是修饰RNA的翻译，还将细胞毒性有效负载的核苷递送至细胞。

[1350] 生物相容：如本文所使用，术语“生物相容”意指与活细胞、组织、器官或系统相容，造成很少或没有损伤、毒性或被免疫系统排斥的风险。

[1351] 生物可降解:如本文所使用,术语“生物可降解”意指能够通过活物的作用分解成无害产物。

[1352] 生物活性的:如本文所使用,短语“生物活性的”是指在生物系统和/或生物体中具有活性的任何物质的特征。例如,在向生物体施用时对所述生物体具有生物效应的物质被认为生物活性的。在具体实施方案中,如果甚至本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA的一部分为生物活性或模拟认为生物相关的活性,则可认为多核苷酸、初级构建体或mmRNA是生物活性的。

[1353] 化学术语:以下提供了“酰基”至“硫醇基”的各种化学术语的定义。

[1354] 如本文所使用的术语“酰基”代表通过如本文所定义的羰基连接至母体分子基团的氢或如本文所定义的烷基(例如,卤代烷基)并且由甲酰基(即羧基醛基团)、乙酰基、丙酰基、丁酰基等举例说明。示例性未取代的酰基包括1至7、1至11或1至21个碳。在一些实施方案中,烷基进一步用本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1355] 如本文所使用的术语“酰氨基”代表通过如本文所定义的氨基连接至母体分子基团的如本文所定义的酰基(即,-N(R^{N1})-C(O)-R,其中R为H或任选取代的C_{1-6}、C_{1-10}或C_{1-20}烷基并且R^{N1}如本文所定义)。示例性未取代的酰氨基包括1至41个碳(例如,1至7、1至13、1至21、2至7、2至13、2至21或2至41个碳)。在一些实施方案中,烷基进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代,和/或氨基为$-NH_2$或$-NHR^{N1}$,其中R^{N1}独立地为OH、NO_2、NH_2、NR^{N2}_2、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、烷基或芳基,并且每个R^{N2}均可为H、烷基或芳基。

[1356] 如本文所使用的术语“酰氧基”代表通过氧原子连接至母体分子基团的如本文所定义的酰基(即,-O-C(O)-R,其中R为H或任选取代的C_{1-6}、C_{1-10}或C_{1-20}烷基)。示例性未取代的酰氧基包括1至21个碳(例如,1至7或1至11个碳)。在一些实施方案中,烷基进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代,和/或氨基为$-NH_2$或$-NHR^{N1}$,其中R^{N1}独立地为OH、NO_2、NH_2、NR^{N2}_2、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、烷基或芳基,并且每个R^{N2}均可为H、烷基或芳基。

[1357] 如本文所使用的术语“烷芳基”代表通过如本文所定义的亚烷基连接至母体分子基团的如本文所定义的芳基。示例性未取代的烷芳基为7至30个碳(例如,7至16或7至20个碳,如C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、C_{1-10}烷基-C_{6-10}芳基或C_{1-20}烷基-C_{6-10}芳基)。在一些实施方案中,亚烷基和芳基各自均可进一步用针对相应基团如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。以相同方式定义加上前缀“烷-(alk-)”的其它基团,其中“烷”是指C_{1-6}亚烷基,除非另外指出,并且连接的化学结构如本文所定义。

[1358] 术语“烷基环烷基”代表通过如本文所定义的亚烷基(例如,具有1至4、1至6、1至10或1至20个碳的亚烷基)连接至母体分子基团的如本文所定义的环烷基。在一些实施方案中,亚烷基和环烷基各自均可进一步用针对相应基团如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1359] 如本文所使用的术语“烯基”代表除非另外指明否则具有2至20个碳(例如,2至6或2至10个碳)的含有一个或多个碳-碳双键的单价直链或支链基团,并且由乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基等举例说明。烯基包括顺式异构体和反式异构体。烯基可任选地用如本文所定义的1、2、3或4个独立地选自氨基、芳基、环烷基或杂环基(例如,杂芳基)的取代基或本文描述的任何示例性烷基取代基取代。

[1360] 术语“烯氧基”代表式-OR的化学取代基,其中R为C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}或C_{2-10}烯基),

除非另外指明。示例性烯氧基包括乙烯氧基、丙烯氧基等。在一些实施方案中，烯基可进一步用如本文所定义的1、2、3或4个取代基(例如，羟基)取代。

[1361] 术语“烷基杂芳基”是指通过如本文所定义的亚烷基连接至母体分子基团的如本文所定义的杂芳基。示例性未取代的烷基杂芳基为2至32个碳(例如，2至22、2至18、2至17、2至16、3至15、2至14、2至13或2至12个碳，如C_{1-6}烷基-C_{1-12}杂芳基、C_{1-10}烷基-C_{1-12}杂芳基或C_{1-20}烷基-C_{1-12}杂芳基)。在一些实施方案中，亚烷基和杂芳基各自均可进一步用针对相应基团如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。烷基杂芳基为烷基杂环基的子集。

[1362] 术语“烷基杂环基”代表通过如本文所定义的亚烷基连接至母体分子基团的如本文所定义的杂环基。示例性未取代的烷基杂环基为2至32个碳(例如，2至22、2至18、2至17、2至16、3至15、2至14、2至13或2至12个碳，如C_{1-6}烷基-C_{1-12}杂环基、C_{1-10}烷基-C_{1-12}杂环基或C_{1-20}烷基-C_{1-12}杂环基)。在一些实施方案中，亚烷基和杂环基各自均可进一步用针对相应基团如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1363] 术语“烷氧基”代表式-OR的化学取代基，其中R为C_{1-20}烷基(例如，C_{1-6}或C_{1-10}烷基)，除非另外指明。示例性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如，正丙氧基和异丙氧基)、叔丁氧基等。在一些实施方案中，烷基可进一步用如本文所定义的1、2、3或4个取代基(例如，羟基或烷氧基)取代。

[1364] 术语“烷氧基烷氧基”代表用烷氧基取代的烷氧基。示例性未取代的烷氧基烷氧基包括2至40个之间的碳(例如，2至12或2至20个碳，如C_{1-6}烷氧基-C_{1-6}烷氧基、C_{1-10}烷氧基-C_{1-10}烷氧基或C_{1-20}烷氧基-C_{1-20}烷氧基)。在一些实施方案中，每个烷氧基均可进一步用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1365] 术语“烷氧基烷基”代表用烷氧基取代的烷基。示例性未取代的烷氧基烷基包括2至40个之间的碳(例如，2至12或2至20个碳，如C_{1-6}烷氧基-C_{1-6}烷基、C_{1-10}烷氧基-C_{1-10}烷基或C_{1-20}烷氧基-C_{1-20}烷基)。在一些实施方案中，烷基和烷氧基各自均可进一步用针对相应基团如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1366] 如本文所使用的术语“烷氧基羰基”代表通过羰基原子连接至母体分子基团的如本文所定义的烷氧基(例如，-C(O)-OR，其中R为H或任选取代的C_{1-6}、C_{1-10}或C_{1-20}烷基)。示例性未取代的烷氧基羰基包括1至21个碳(例如，1至11或1至7个碳)。在一些实施方案中，烷氧基进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1367] 如本文所使用的术语“烷氧基羰基烷氧基”代表用如本文所定义的烷氧基羰基取代的如本文所定义的烷氧基(例如，-O-烷基-C(O)-OR，其中R为任选取代的C_{1-6}、C_{1-10}或C_{1-20}烷基)。示例性未取代的烷氧基羰基烷氧基包括3至41个碳(例如，3至10、3至13、3至17、3至21或3至31个碳，如C_{1-6}烷氧基羰基-C_{1-6}烷氧基、C_{1-10}烷氧基羰基-C_{1-10}烷氧基或C_{1-20}烷氧基羰基-C_{1-20}烷氧基)。在一些实施方案中，每个烷氧基均进一步独立地用如本文所述的1、2、3或4个取代基(例如，羟基)取代。

[1368] 如本文所使用的术语“烷氧基羰基烷基”代表用如本文所定义的烷氧基羰基取代的如本文所定义的烷基(例如，-烷基-C(O)-OR，其中R为任选取代的C_{1-20}、C_{1-10}或C_{1-6}烷基)。示例性未取代的烷氧基羰基烷基包括3至41个碳(例如，3至10、3至13、3至17、3至21或3至31个碳，如C_{1-6}烷氧基羰基-C_{1-6}烷基、C_{1-10}烷氧基羰基-C_{1-10}烷基或C_{1-20}烷氧基羰基-C_{1-20}烷基)。在一些实施方案中，每个烷基和烷氧基均进一步独立地用如本文所述的1、2、3或4个取

代基(例如,羟基)取代。

[1369] 如本文所使用的术语“烷基”包括1至20个碳(例如,1至10或1至6)的直链和支链饱和基团,除非另外指明。烷基由甲基、乙基、正丙基和异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基、新戊基等举例说明,并且可任选地用一个、两个、三个或(在具有两个或更多个碳的烷基的情况下)四个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下组成的组:(1)C_{1-6}烷氧基;(2)C_{1-6}烷基亚磺酰基;(3)如本文所定义的氨基(例如,未取代的氨基(即,$-NH_2$)或取代的氨基(即,$-N(R^{N1})_2$,其中R^{N1}如针对氨基所定义);(4)C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷氧基;(5)叠氮基;(6)卤代基;(7)(C_{2-9}杂环基)氧基;(8)羟基;(9)硝基;(10)氧代基(例如,羧基醛或酰基);(11)C_{1-7}螺环基;(12)硫代烷氧基;(13)硫醇基;(14)$-CO_2R^{A'}$,其中$R^{A'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c)C_{6-10}芳基、(d)氢、(e)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f)氨基-C_{1-20}芳基、(g)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基,以及(h)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;(15)$-C(O)NR^{B'}R^{C'}$,其中$R^{B'}$和$R^{C'}$各自均独立地选自由以下组成的组:(a)氢、(b)C_{1-6}烷基、(c)C_{6-10}芳基以及(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(16)$-SO_2R^{D'}$,其中$R^{D'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基、(c)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基以及(d)羟基;(17)$-SO_2NR^{E'}R^{F'}$,其中$R^{E'}$和$R^{F'}$各自均独立地选自由以下组成的组:(a)氢、(b)C_{1-6}烷基、(c)C_{6-10}芳基以及(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(18)$-C(O)R^{G'}$,其中$R^{G'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c)C_{6-10}芳基、(d)氢、(e)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f)氨基-C_{1-20}烷基、(g)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基以及(h)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;(19)$-NR^{H'}C(O)R^{I'}$,其中$R^{H'}$选自由以下组成的组:(a1)氢和(b1)C_{1-6}烷基,并且$R^{I'}$选自由以下组成的组:(a2)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b2)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c2)C_{6-10}芳基、(d2)氢、(e2)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f2)氨基-C_{1-20}烷基、(g2)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基,以及(h2)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;(20)$-NR^{J'}C(O)OR^{K'}$,其中$R^{J'}$选自由以下组成的组:(a1)氢和(b1)C_{1-6}烷基,并且$R^{K'}$选自由以下组成的组:(a2)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b2)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c2)C_{6-10}芳基、(d2)氢、(e2)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f2)氨基-C_{1-20}烷基、(g2)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基,以及(h2)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10

的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;以及(21)脒。在一些实施方案中,这些基团各自均可如本文所述进一步被取代。例如,C_1-烷芳基的亚烷基可进一步用氧代基取代得到相应的芳酰基取代基。

[1370] 如本文所使用的术语"亚烷基"和前缀"烷基-"代表通过去除两个氢原子衍生自直链或支链饱和烃的饱和二价烃基,并且由亚甲基、亚乙基、亚异丙基等举例说明。术语"C_{x-y}亚烷基"和前缀"C_{x-y}烷基-"代表具有x与y个之间的碳的亚烷基。对于x的示例性值为1、2、3、4、5和6,并且对于y的示例性值为2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18或20(例如,C_{1-6}、C_{1-10}、C_{2-20}、C_{2-6}、C_{2-10}或C_{2-20}亚烷基)。在一些实施方案中,亚烷基可进一步用针对烷基如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1371] 如本文所使用的术语"烷基亚磺酰基"代表通过-S(O)-基团连接至母体分子基团的烷基。示例性未取代的烷基亚磺酰基为1至6、1至10或1至20个碳。在一些实施方案中,烷基可进一步用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1372] 如本文所使用的术语"烷基亚磺酰基烷基"代表被烷基亚磺酰基取代的如本文所定义的烷基。示例性未取代的烷基亚磺酰基烷基为2至12、2至20或2至40个碳。在一些实施方案中,各烷基可进一步用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1373] 如本文所使用的术语"炔基"代表含有碳-碳三键的2至20个碳原子(例如,2至4、2至6或2至10个碳)的单价直链或支链基团并且由乙炔基、1-丙炔基等举例说明。炔基可任选地用如本文所定义的1、2、3或4个独立地选自芳基、环烷基或杂环基(例如,杂芳基)的取代基或本文描述的任何示例性烷基取代基取代。

[1374] 术语"炔氧基"代表式-OR的化学取代基,其中R为C_{2-20}炔基(例如,C_{2-6}或C_{2-10}炔基),除非另外指明。示例性炔氧基包括乙炔氧基、丙炔氧基等。在一些实施方案中,炔基可进一步用如本文所定义的1、2、3或4个取代基(例如,羟基)取代。

[1375] 如本文所使用的术语"脒"代表-C(=NH)NH_2基团。

[1376] 如本文所使用的术语"氨基"代表-N(R^{N1})$_2$,其中各R^{N1}独立地为H、OH、NO_2、N(R^{N2})$_2$、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、N-保护基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、环烷基、烷基环烷基、羧基烷基、磺烷基、杂环基(例如,杂芳基)或烷基杂环基(例如,烷基杂芳基),其中这些列举的R^{N1}基团各自均可针对每个基团如本文所定义任选地取代;或两个R^{N1}组合形成杂环基或N-保护基并且其中各R^{N2}独立地为H、烷基或芳基。本发明的氨基可为未取代的氨基(即,-NH_2)或取代的氨基(即,-N(R^{N1})$_2$)。在优选实施方案中,氨基为-NH_2或-NHR^{N1},其中R^{N1}独立地为OH、NO_2、NH_2、NR^{N2}_2、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、烷基、羧基烷基、磺烷基或芳基,并且各R^{N2}可为H、C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)或C_{6-10}芳基。

[1377] 如本文所述的术语"氨基酸"是指具有侧链、氨基和酸基团(例如,-CO_2H的羧基或-SO_3H的磺基)的分子,其中氨基酸通过侧链、氨基或酸基团(例如,侧链)连接至母体分子基团。在一些实施方案中,氨基酸通过羰基连接至母体分子基团,其中侧链或氨基连接至羰基。示例性侧链包括任选取代的烷基、芳基、杂环基、烷芳基、烷基杂环基、氨基烷基、氨基甲酰基烷基以及羧基烷基。示例性氨基酸包括丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、羟基正缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、吡咯赖氨酸、硒代半胱氨酸、丝氨酸、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸以及缬氨酸。氨基酸基团可任选地用一个、两个、三个或(在具有两个或

更多个碳的氨基酸基团的情况下)四个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下组成的组:(1)C_{1-6}烷氧基;(2)C_{1-6}烷基亚磺酰基;(3)如本文所定义的氨基(例如,未取代的氨基(即,$-NH_2$)或取代的氨基(即,$-N(R^{N1})_2$,其中R^{N1}如针对氨基所定义);(4)C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷氧基;(5)叠氮基;(6)卤代基;(7)(C_{2-9}杂环基)氧基;(8)羟基;(9)硝基;(10)氧代基(例如,羧基醛或酰基);(11)C_{1-7}螺环基;(12)硫代烷氧基;(13)硫醇基;(14)$-CO_2R^{A'}$,其中$R^{A'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c)C_{6-10}芳基、(d)氢、(e)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f)氨基-C_{1-20}芳基、(g)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基,以及(h)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;(15)$-C(O)NR^{B'}R^{C'}$,其中$R^{B'}$和$R^{C'}$各自均独立地选自由以下组成的组:(a)氢、(b)C_{1-6}烷基、(c)C_{6-10}芳基以及(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(16)$-SO_2R^{D'}$,其中$R^{D'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基、(c)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基以及(d)羟基;(17)$-SO_2NR^{E'}R^{F'}$,其中$R^{E'}$和$R^{F'}$各自均独立地选自由以下组成的组:(a)氢、(b)C_{1-6}烷基、(c)C_{6-10}芳基以及(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(18)$-C(O)R^{G'}$,其中$R^{G'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c)C_{6-10}芳基、(d)氢、(e)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f)氨基-C_{1-20}烷基、(g)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基以及(h)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;(19)$-NR^{H'}C(O)R^{I'}$,其中$R^{H'}$选自由以下组成的组:(a1)氢和(b1)C_{1-6}烷基,并且$R^{I'}$选自由以下组成的组:(a2)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b2)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c2)C_{6-10}芳基、(d2)氢、(e2)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f2)氨基-C_{1-20}烷基、(g2)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基,以及(h2)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;(20)$-NR^{J'}C(O)OR^{K'}$,其中$R^{J'}$选自由以下组成的组:(a1)氢和(b1)C_{1-6}烷基,并且$R^{K'}$选自由以下组成的组:(a2)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基)、(b2)C_{2-20}烯基(例如,C_{2-6}烯基)、(c2)C_{6-10}芳基、(d2)氢、(e2)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基、(f2)氨基-C_{1-20}烷基、(g2)$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$的聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且R'为H或C_{1-20}烷基,以及(h2)$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$的氨基-聚乙二醇,其中s1为1至10的整数(例如,1至6或1至4),s2和s3各自均独立地为0至10的整数(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10),并且各R^{N1}独立地为氢或任选取代的C_{1-6}烷基;以及(21)脒。在一些实施方案中,这些基团各自均可如本文所述进一步被取代。

[1378] 如本文所使用的术语“氨基烷氧基”代表被如本文所定义的氨基取代的如本文所

定义的烷氧基。烷基和氨基各自均可进一步用针对相应基团如本文所述的1、2、3或4个取代基取代(例如，$CO_2R^{A'}$，其中$R^{A'}$选自由以下组成的组：(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基、(c)氢和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基，例如羧基)。

[1379] 如本文所使用的术语“氨基烷基”代表被如本文所定义的氨基取代的如本文所定义的烷基。烷基和氨基各自均可进一步用针对相应基团如本文所述的1、2、3或4个取代基取代(例如，$CO_2R^{A'}$，其中$R^{A'}$选自由以下组成的组：(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基、(c)氢和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基，例如羧基)。

[1380] 如本文所使用的术语“芳基”代表具有一个或两个芳环的单环、双环或多环碳环系统并且由苯基、萘基、1,2-二氢萘基、1,2,3,4-四氢萘基、蒽基、菲基、芴基、茚满基、茚基等举例说明，并且可任选地用独立地选自由以下组成的组的1、2、3、4或5个取代基取代：(1)C_{1-7}酰基(例如，羧基醛)；(2)C_{1-20}烷基(例如，C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基-C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷基亚磺酰基-C_{1-6}烷基、氨基-C_{1-6}烷基、叠氮基-C_{1-6}烷基、(羧基醛)-C_{1-6}烷基、卤代-C_{1-6}烷基(例如，全氟烷基)、羟基-C_{1-6}烷基、硝基-C_{1-6}烷基或C_{1-6}硫代烷氧基-C_{1-6}烷基)；(3)C_{1-20}烷氧基(例如，C_{1-6}烷氧基，如全氟烷氧基)；(4)C_{1-6}烷基亚磺酰基；(5)C_{6-10}芳基；(6)氨基；(7)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基；(8)叠氮基；(9)C_{3-8}环烷基；(10)C_{1-6}烷基-C_{3-8}环烷基；(11)卤代基；(12)C_{1-12}杂环基(例如，C_{1-12}杂芳基)；(13)(C_{1-12}杂环基)氧基；(14)羟基；(15)硝基；(16)C_{1-20}硫代烷氧基(例如，C_{1-6}硫代烷氧基)；(17)-$(CH_2)_qCO_2R^{A'}$，其中q为0至4的整数，并且$R^{A'}$选自由以下组成的组：(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基、(c)氢和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基；(18)-$(CH_2)_qCONR^{B'}R^{C'}$，其中q为0至4的整数并且其中$R^{B'}$和$R^{C'}$独立地选自由以下组成的组：(a)氢、(b)C_{1-6}烷基、(c)C_{6-10}芳基和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基；(19)-$(CH_2)_qSO_2R^{D'}$，其中q为0至4的整数并且其中$R^{D'}$选自由以下组成的组：(a)烷基、(b)C_{6-10}芳基和(c)烷基-C_{6-10}芳基；(20)-$(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$，其中q为0至4的整数并且其中$R^{E'}$和$R^{F'}$各自均独立地选自由以下组成的组：(a)氢、(b)$C_{1-6}$烷基、(c)$C_{6-10}$芳基和(d)$C_{1-6}$烷基-$C_{6-10}$芳基；(21)硫醇基；(22)$C_{6-10}$芳氧基；(23)$C_{3-8}$环烷氧基；(24)$C_{6-10}$芳基-$C_{1-6}$烷氧基；(25)$C_{1-6}$烷基-$C_{1-12}$杂环基(例如$C_{1-6}$烷基-$C_{1-12}$杂芳基)；(26)$C_{2-20}$烯基；以及(27)$C_{2-20}$炔基。在一些实施方案中，这些基团各自均可如本文所述进一步被取代。例如，C_1-烷芳基或C_1-烷基杂环基的亚烷基可进一步用氧代基取代得到相应的芳酰基和(杂环基)酰基取代基。

[1381] 如本文所使用的术语“芳基烷氧基”代表通过氧原子连接至母体分子基团的如本文所定义的烷芳基。示例性未取代的烷氧基烷基包括7至30个碳(例如，7至16或7至20个碳，如C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷氧基、C_{6-10}芳基-C_{1-10}烷氧基或C_{6-10}芳基-C_{1-20}烷氧基)。在一些实施方案中，芳基烷氧基可用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1382] 术语“芳氧基”代表式-OR′的化学取代基，其中R′为6至18个碳的芳基，除非另外指明。在一些实施方案中，芳基可用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1383] 如本文所使用的术语“芳酰基”代表通过羰基连接至母体分子基团的如本文所定义的芳基。示例性未取代的芳酰基具有7至11个碳。在一些实施方案中，芳基可用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1384] 术语“叠氮基”代表-N_3基团，其还可表示为-N=N=N。

[1385] 如本文所使用的术语“双环”是指具有两个环的结构，其可为芳香族的或非芳香族的。双环结构包括如本文所定义的螺环基和共有一个或多个桥联的两个环，其中所述桥联

可包括一个原子或包括两个、三个或更多个原子的链。示例性双环基团包括双环碳环基，其中第一环和第二环为如本文所定义的碳环基；双环芳基，其中第一环和第二环为如本文所定义的芳基；双环杂环基，其中第一环为杂环基并且第二环为碳环基(例如，芳基)或杂环基(例如，杂芳基)；以及双环杂芳基，其中第一环为杂芳基并且第二环为碳环基(例如，芳基)或杂环基(例如，杂芳基)。在一些实施方案中，双环基团可用针对环烷基、杂环基和芳基如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1386] 如本文所使用的术语“碳环”和“碳环基”是指其中可为芳香族的或非芳香族的环由碳原子形成的任选取代的C_{3-12}单环、双环或三环结构。碳环结构包括环烷基、环烯基和芳基。

[1387] 如本文所使用的术语“氨基甲酰基”代表$-C(O)-N(R^{N1})_2$，其中各R^{N1}的意思见于本文提供的“氨基”定义中。

[1388] 如本文所使用的术语“氨基甲酰基烷基”代表被如本文所定义的氨基甲酰基取代的如本文所定义的烷基。烷基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1389] 如本文所使用的术语“氨基甲酰基”是指具有结构$-NR^{N1}C(=O)OR$或$-OC(=O)N(R^{N1})_2$的氨基甲酸酯基团，其中各R^{N1}的意思见于本文提供的“氨基”定义中，并且R为如本文所定义的烷基、环烷基、烷基环烷基、芳基、烷芳基、杂环基(例如，杂芳基)或烷杂环基(例如，烷杂芳基)。

[1390] 如本文所使用的术语“羰基”代表C(O)基团，其还可表示为C=O。

[1391] 术语“羧基醛”代表具有结构-CHO的酰基。

[1392] 如本文所使用的术语“羧基”意指$-CO_2H$。

[1393] 如本文所使用的术语“羧基烷氧基”代表被如本文所定义的羧基取代的如本文所定义的烷氧基。烷氧基可进一步用针对烷基如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1394] 如本文所使用的术语“羧基烷基”代表被如本文所定义的羧基取代的如本文所定义的烷基。烷基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1395] 如本文所使用的术语“氰基”代表-CN基团。

[1396] 术语“环烷氧基”代表式-OR的化学取代基，其中R为如本文所定义的C_{3-8}环烷基，除非另外指明。环烷基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。示例性未取代的环烷氧基为3至8个碳。在一些实施方案中，环烷基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1397] 如本文所使用的术语“环烷基”代表三至八个碳的单价饱和或不饱和非芳香族环烃基，除非另外指明，并且由环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、双环[2.2.1.]庚基等举例说明。当环烷基包括一个碳-碳双键时，环烷基可称为“环烯基”。示例性环烯基包括环戊烯基、环己烯基等。本发明的环烷基可任选用以下取代：(1)C_{1-7}酰基(例如，羧基醛)；(2)C_{1-20}烷基(例如，C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基-C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷基亚磺酰基-C_{1-6}烷基、氨基-C_{1-6}烷基、叠氮基-C_{1-6}烷基、(羧基醛)-C_{1-6}烷基、卤代-C_{1-6}烷基(例如，全氟烷基)、羟基-C_{1-6}烷基、硝基-C_{1-6}烷基或C_{1-6}硫代烷氧基-C_{1-6}烷基)；(3)C_{1-20}烷氧基(例如，C_{1-6}烷氧基，如全氟烷氧基)；(4)C_{1-6}烷基亚磺酰基；(5)C_{6-10}芳基；(6)氨基；(7)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基；(8)叠氮基；(9)C_{3-8}环烷基；(10)C_{1-6}烷基-C_{3-8}环烷基；(11)卤代基；(12)C_{1-12}杂环基(例如，C_{1-12}杂芳基)；(13)(C_{1-12}杂环基)氧基；(14)羟基；(15)硝基；(16)C_{1-20}硫代烷氧基(例如，C_{1-6}硫代烷氧基)；

(17)-$(CH_2)_qCO_2R^{A'}$，其中q为0至4的整数，并且$R^{A'}$选自由以下组成的组：(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基、(c)氢和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基；(18)-$(CH_2)_qCONR^{B'}R^{C'}$，其中q为0至4的整数并且其中$R^{B'}$和$R^{C'}$独立地选自由以下组成的组：(a)氢、(b)C_{1-6}烷基、(c)C_{6-10}芳基和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基；(19)-$(CH_2)_qSO_2R^{D'}$，其中q为0至4的整数并且其中$R^{D'}$选自由以下组成的组：(a)C_{6-10}烷基、(b)C_{6-10}芳基和(c)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基；(20)-$(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$，其中q为0至4的整数并且其中$R^{E'}$和$R^{F'}$各自均独立地选自由以下组成的组：(a)氢、(b)$C_{6-10}$烷基、(c)$C_{6-10}$芳基和(d)$C_{1-6}$烷基-$C_{6-10}$芳基；(21)硫醇基；(22)$C_{6-10}$芳氧基；(23)$C_{3-8}$环烷氧基；(24)$C_{6-10}$芳基-$C_{1-6}$烷氧基；(25)$C_{1-6}$烷基-$C_{1-12}$杂环基(例如$C_{1-6}$烷基-$C_{1-12}$杂芳基)；(26)氧代基；(27)$C_{2-20}$烯基；以及(28)$C_{2-20}$炔基。在一些实施方案中，这些基团各自均可如本文所述进一步被取代。例如，C_1-烷芳基或C_1-烷基杂环基的亚烷基可进一步用氧代基取代得到对应的芳酰基和(杂环基)酰基取代基。

[1398] 如本文所使用的术语“非对映异构体”意指彼此不为镜像并且彼此不可重叠的立体异构体。

[1399] 如本文所使用的术语“有效量”的药剂为足以实现有益或希望的结果，例如临床结果的量，并且因此“有效量”取决于施加其的背景。例如，在施用治疗癌症的药剂的背景下，有效量的药剂为例如足以与没有施用药剂所获得的应答相比实现癌症的如本文所定义的治疗的量。

[1400] 如本文使用的术语“对映异构体”意指具有至少80％(即，至少90％的一种对映异构体和至多10％的另一种对映异构体)、优选至少90％并且更优选至少98％的光学纯度或对映异构体过量(如由本领域中标准的方法所确定)的本发明化合物的每种单独光学活性形式。

[1401] 如本文所使用的术语“卤代基”代表选自溴、氯、碘或氟的卤素。

[1402] 如本文所使用的术语“卤代烷氧基”代表被卤素基团(即，F、Cl、Br或I)取代的如本文所定义的烷氧基。卤代烷氧基可用一个、两个、三个或(在具有两个或更多个碳的烷基情况下)四个卤素取代。卤代烷氧基包括全氟烷氧基(例如，$-OCF_3$)、$-OCHF_2$、$-OCH_2F$、$-OCCl_3$、$-OCH_2CH_2Br$、$-OCH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$以及$-OCHICH_3$。在一些实施方案中，卤代烷氧基可进一步用针对烷基如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

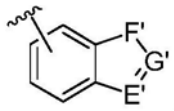
[1403] 如本文所使用的术语“卤代烷基”代表被卤素基团(即，F、Cl、Br或I)取代的如本文所定义的烷基。卤代烷基可用一个、两个、三个或(在具有两个或更多个碳的烷基情况下)四个卤素取代。卤代烷基包括全氟烷基(例如，$-CF_3$)、$-CHF_2$、$-CH_2F$、$-CCl_3$、$-CH_2CH_2Br$、$-CH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$以及$-CHICH_3$。在一些实施方案中，卤代烷基可进一步用针对烷基如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1404] 如本文所使用的术语“杂亚烷基”是指其中一个或两个组成碳原子已各自被氮、氧或硫替代的如本文所定义的亚烷基。在一些实施方案中，杂亚烷基可进一步用针对亚烷基如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1405] 如本文所使用的术语“杂芳基”代表芳香族的如本文所定义的杂环基的子集：即，它们在单环或多环的环系统内含有4n+2个π电子。示例性未取代的杂芳基具有1至12(例如，1至11、1至10、1至9、2至12、2至11、2至10或2至9)个碳。在一些实施方案中，杂芳基用针对杂环基所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1406] 如本文所使用的术语“杂环基”代表含有一个、两个、三个或四个杂原子的5元环、6元环或7元环(除非另外指明),所述杂原子独立地选自由氮、氧和硫组成的组。5元环具有0至2个双键,并且6元环和7元环具有0至3个双键。示例性未取代的杂环基具有1至12(例如,1至11、1至10、1至9、2至12、2至11、2至10或2至9)个碳。术语“杂环基”还代表具有桥联的多环结构的杂环化合物,其中一个或多个碳和/或杂原子桥联单环的两个非相邻成员,例如奎宁环基。术语“杂环基”包括双环基团、三环基团和四环基团,其中任何以上杂环稠合至一个、两个或三个碳环,例如芳环、环己烷环、环己烯环、环戊烷环、环戊烯环或另一个单环杂环,如吲哚基、喹啉基、异喹啉基、四氢喹啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基等。稠合杂环的实例包括葸萘烷和1,2,3,5,8,8a-六氢吲嗪。杂环包括吡咯基、吡咯啉基、吡咯烷基、吡唑基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、吡啶基、哌啶基、高哌啶基、吡嗪基、哌嗪基、嘧啶基、哒嗪基、噁唑基、噁唑烷基、异噁唑基、异噁唑烷基、吗啉基、硫代吗啉基、噻唑基、噻唑烷基、异噻唑基、异噻唑烷基、吲哚基、吲唑基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、二氢喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、酞嗪基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并噻二唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑烷基、异噻唑基、三唑基、四唑基、噁二唑基(例如,1,2,3-噁二唑基)、嘌呤基、噻二唑基(例如,1,2,3-噻二唑基)、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、二氢噻吩基、二氢吲哚基、二氢喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、二氢异喹啉基、吡喃基、二氢吡喃基、二噻唑基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基等,包括其二氢形式和四氢形式,其中一个或多个双键被还原并且用氢替代。其它示例性杂环基包括:2,3,4,5-四氢-2-氧代-噁唑基;2,3-二氢-2-氧代-1H-咪唑基;2,3,4,5-四氢-5-氧代-1H-吡唑基(例如,2,3,4,5-四氢-2-苯基-5-氧代-1H-吡唑基);2,3,4,5-四氢-2,4-二氧代-1H-咪唑基(例如,2,3,4,5-四氢-2,4-二氧代-5-甲基-5-苯基-1H-咪唑基);2,3-二氢-2-硫代-1,3,4-噁二唑基(例如,2,3-二氢-2-硫代-5-苯基-1,3,4-噁二唑基);4,5-二氢-5-氧代-1H-三唑基(例如,4,5-二氢-3-甲基-4-氨基5-氧代-1H-三唑基);1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代吡啶基(例如,1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3,3-二乙基吡啶基);2,6-二氧代-哌啶基(例如,2,6-二氧代-3-乙基-3-苯基哌啶基);1,6-二氢-6-氧代嘧啶基;1,6-二氢-4-氧代嘧啶基(例如,2-(甲硫基)-1,6-二氢-4-氧代-5-甲基嘧啶-1-基);1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代嘧啶基(例如,1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3-乙基嘧啶基);1,6-二氢-6-氧代-哒嗪基(例如,1,6-二氢-6-氧代-3-乙基哒嗪基);1,6-二氢-6-氧代-1,2,4-三嗪基(例如,1,6-二氢-5-异丙基-6-氧代-1,2,4-三嗪基);2,3-二氢-2-氧代-1H-吲哚基(例如,3,3-二甲基-2,3-二氢-2-氧代-1H-吲哚基和2,3-二氢-2-氧代-3,3′-螺环丙烷-1H-吲哚-1-基);1,3-二氢-1-氧代-2H-异吲哚基;1,3-二氢-1,3-二氧代-2H-异吲哚基;1H-苯并吡唑基(例如,1-(乙氧基羰基)-1H-苯并吡唑基);2,3-二氢-2-氧代-1H-苯并咪唑基(例如,3-乙基-2,3-二氢-2-氧代-1H-苯并咪唑基);2,3-二氢-2-氧代-苯并噁唑基(例如,5-氯-2,3-二氢-2-氧代-苯并噁唑基);2,3-二氢-2-氧代-苯并噁唑基;2-氧代-2H-苯并吡喃基;1,4-苯并二氧杂环己烷基;1,3-苯并二氧杂环己烷基;2,3-二氢-3-氧代,4H-1,3-苯并噻嗪基;3,4-二氢-4-氧代-3H-喹唑啉基(例如,2-甲基-3,4-二氢-4-氧代-3H-喹唑啉基);1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3H-喹唑啉基(例如,1-乙基-1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3H-喹唑啉基);1,2,3,6-四氢-2,6-二氧代-7H-嘌呤基(例如,1,2,3,6-四氢-1,3-二甲基-2,6-二氧代-7H-嘌呤基);1,2,3,6-四氢-2,6-二氧代-1H-嘌呤基(例如,1,2,3,6-四氢-3,7-二甲基-2,6-二氧代-1H-嘌呤基);2-氧代苯并[c,d]吲哚基;1,

1-二氧代-2H-萘并[1,8-c,d]异噻唑基;以及1,8-亚萘基二甲酰氨基。另外的杂环包括3,3a,4,5,6,6a-六氢-吡咯并[3,4-b]吡咯-(2H)-基和2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚-2-基、高哌嗪基(或二氮杂环庚烷基)、四氢吡喃基、二噻唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氮杂环辛烷基、氧杂环辛烷基(oxecanyl)以及硫杂环辛烷基。杂环基团还包括下式的基团

[1407] 

，其中

[1408] E′选自由-N-和-CH-组成的组;F′选自由-N=CH-、-NH-CH_2-、-NH-C(O)-、-NH-、-CH=N-、-CH_2-NH-、-C(O)-NH-、-CH=CH-、-CH_2-、-CH_2CH_2-、-CH_2O-、-OCH_2-、-O-和-S-组成的组;并且G′选自由-CH-和-N-组成的组。本文提到的任何杂环基可任选用一个、两个、三个、四个或五个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下组成的组:(1)C_{1-7}酰基(例如,羧基醛);(2)C_{1-20}烷基(例如,C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基-C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷基亚磺酰基-C_{1-6}烷基、氨基-C_{1-6}烷基、叠氮基-C_{1-6}烷基、(羧基醛)-C_{1-6}烷基、卤代-C_{1-6}烷基(例如,全氟烷基)、羟基-C_{1-6}烷基、硝基-C_{1-6}烷基或C_{1-6}硫代烷氧基-C_{1-6}烷基);(3)C_{1-20}烷氧基(例如,C_{1-6}烷氧基,如全氟烷氧基);(4)C_{1-6}烷基亚磺酰基;(5)C_{6-10}芳基;(6)氨基;(7)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(8)叠氮基;(9)C_{3-8}环烷基;(10)C_{1-6}烷基-C_{3-8}环烷基;(11)卤代基;(12)C_{1-12}杂环基(例如,C_{2-12}杂芳基);(13)(C_{1-12}杂环基)氧基;(14)羟基;(15)硝基;(16)C_{1-20}硫代烷氧基(例如,C_{1-6}硫代烷氧基);(17)-$(CH_2)_qCO_2R^{A'}$,其中q为0至4的整数,并且$R^{A'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基、(c)氢和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(18)-$(CH_2)_qCONR^{B'}R^{C'}$,其中q为0至4的整数并且其中$R^{B'}$和$R^{C'}$独立地选自由以下组成的组:(a)氢、(b)C_{1-6}烷基、(c)C_{6-10}芳基和(d)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(19)-$(CH_2)_qSO_2R^{D'}$,其中q为0至4的整数并且其中$R^{D'}$选自由以下组成的组:(a)C_{1-6}烷基、(b)C_{6-10}芳基和(c)C_{1-6}烷基-C_{6-10}芳基;(20)-$(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$,其中q为0至4的整数并且其中$R^{E'}$和$R^{F'}$各自均独立地选自由以下组成的组:(a)氢、(b)$C_{1-6}$烷基、(c)$C_{6-10}$芳基和(d)$C_{1-6}$烷基-$C_{6-10}$芳基;(21)硫醇基;(22)$C_{6-10}$芳氧基;(23)$C_{3-8}$环烷氧基;(24)芳基烷氧基;(25)$C_{1-6}$烷基-$C_{1-12}$杂环基(例如$C_{1-6}$烷基-$C_{1-12}$杂芳基);(26)氧代基;(27)($C_{1-12}$杂环基)亚氨基;(28)$C_{2-20}$烯基;以及(29)$C_{2-20}$炔基。在一些实施方案中,这些基团各自均可如本文所述进一步被取代。例如,C_1-烷芳基或C_1-烷基杂环基的亚烷基可进一步用氧代基取代得到相应的芳酰基和(杂环基)酰基取代基。

[1409] 如本文所使用的术语“(杂环基)亚氨基”代表通过亚氨基连接至母体分子基团的如本文所定义的杂环基。在一些实施方案中,杂环基可用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1410] 如本文所使用的术语“(杂环基)氧基”代表通过氧原子连接至母体分子基团的如本文所定义的杂环基。在一些实施方案中,杂环基可用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1411] 如本文所使用的术语“(杂环基)酰基”代表通过羰基连接至母体分子基团的如本文所定义的杂环基。在一些实施方案中,杂环基可用如本文所定义的1、2、3或4个取代基取代。

[1412] 如本文所使用的术语“烃”代表仅由碳原子和氢原子组成的基团。

[1413] 如本文所使用的术语“羟基”代表-OH基团。

[1414] 如本文所使用的术语“羟基烯基”代表被一个至三个羟基取代的如本文所定义的烯基，其条件为不多于一个羟基可连接至烷基的单个碳原子，并且由二羟基丙烯基、羟基异戊烯基等举例说明。

[1415] 如本文所使用的术语“羟基烷基”代表被一个至三个羟基取代的如本文所定义的烷基，其条件为不多于一个羟基可连接至烷基的单个碳原子，并且由羟基甲基、二羟基丙基等举例说明。

[1416] 如本文所使用的术语“异构体”意指本发明的任何化合物的任何互变异构体、立体异构体、对映异构体或非对映异构体。可认识到本发明的化合物可具有一个或多个手性中心和/或双键，并且因此呈立体异构体如双键异构体(即，几何E/Z异构体)或非对映异构体(例如，对映异构体(即，(+)或(-))或顺式/反式异构体)存在。根据本发明，本文描绘的化学结构并且因此本发明的化合物涵盖所有对应的立体异构体，即立体异构纯形式(例如，几何纯、对映异构纯或非对映异构纯)和对映异构和立体异构混合物，例如消旋体。本发明的化合物的对映异构和立体异构混合物通常可通过熟知的方法，如手性相气相色谱法、手性相高效液相色谱法、使化合物结晶为手性盐复合物或在手性溶剂中结晶化合物来拆分成其组分对映异构体或立体异构体。还可通过熟知的不对称合成方法从立体异构或对映异构纯中间体、试剂和催化剂中获得对映异构体和立体异构体。

[1417] 如本文所使用的术语“N-保护的氨基”是指其上连接如本文所定义的一个或两个N-保护基的如本文所定义的氨基。

[1418] 如本文所使用的术语“N-保护基”代表在合成过程中用于保护氨基抵抗不希望的反应的那些基团。经常使用的N-保护基公开在Greene，“Protective Groups in Organic Synthesis，”第3版(John Wiley&Sons，New York，1999)中，其以引用的方式并入本文。N-保护基包括酰基、芳酰基或氨甲酰基如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻硝基苯氧基乙酰基、α-氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基和手性助剂如保护的或未保护的D、L或D，L-氨基酸如丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等；含磺酰基的基团如苯磺酰基、对甲苯磺酰基等；氨基甲酸酯形成基团如苄氧羰基、对氯苄氧羰基、对甲氧基苄氧羰基、对硝基苄氧羰基、2-硝基苄氧羰基、对溴苄氧羰基、3，4-二甲氧基苄氧羰基、3，5-二甲氧基苄氧羰基、2，4-二甲氧基苄氧羰基、4-甲氧基苄氧羰基、2-硝基-4，5-二甲氧基苄氧羰基、3，4，5-三甲氧基苄氧羰基、1-(对联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、α，α-二甲基-3，5-二甲氧基苄氧羰基、二苯甲基氧基羰基、叔丁氧羰基、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧羰基、乙氧基羰基、甲氧基羰基、烯丙氧基羰基、2，2，2，-三氯乙氧基羰基、苯氧基羰基、4-硝基苯氧基羰基、芴基-9-甲氧基羰基、环戊氧羰基、金刚烷基氧基羰基、环己氧羰基、苯硫基羰基等；烷芳基如苯甲基、三苯基甲基、苯甲氧基甲基等，以及甲硅烷基如三甲基甲硅烷基等。优选的N-保护基为甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、丙氨酰基、苯磺酰基、苯甲基、叔丁氧羰基(Boc)以及苄氧羰基(Cbz)。

[1419] 如本文所使用的术语“硝基”代表-NO_2基团。

[1420] 如本文所使用的术语“氧代基”代表=O。

[1421] 如本文所使用的术语“全氟烷基”代表其中结合烷基的每个氢基被氟基替代的如

本文所定义的烷基。全氟烷基由三氟甲基、五氟乙基等举例说明。

[1422] 如本文所使用的术语“全氟烷氧基”代表其中结合烷氧基的每个氢基被氟基替代的如本文所定义的烷氧基。全氟烷氧基由三氟甲氧基、五氟乙氧基等举例说明。

[1423] 如本文所使用的术语“螺环基”代表其两端均结合母体基团的相同碳原子以形成螺环基团的C_{2-7}亚烷基二基，并且还代表其两端均结合相同原子的C_{1-6}杂亚烷基二基。形成螺环基的杂亚烷基可含有一个、两个、三个或四个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的杂原子。在一些实施方案中，螺环基包括一至七个碳，不包括其上连接二基的碳原子。本发明的螺环基可任选用本文提供的1、2、3或4个取代基如用于环烷基和/或杂环基的任选取代基取代。

[1424] 如本文所使用的术语“立体异构体”是指化合物可拥有的所有可能的不同异构体形式以及构象形式(例如，本文描述的任何式的化合物)，具体为基本分子结构的所有可能的立体化学和构象异构体形式、所有非对映异构体、对映异构体和/或构象异构体。本发明的一些化合物可以不同互变异构形式存在，所有互变异构形式都包括在本发明的范围内。

[1425] 如本文所使用的术语“磺基烷基”代表被$-SO_3H$的磺基取代的如本文所定义的烷基。在一些实施方案中，烷基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1426] 如本文所使用的术语“磺酰基”代表$-S(O)_2-$基团。

[1427] 如本文所使用的术语“硫代烷芳基”代表式-SR的化学取代基，其中R为烷芳基。在一些实施方案中，烷芳基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1428] 如本文所使用的术语“硫代烷基杂环基”代表式-SR的化学取代基，其中R为烷基杂环基。在一些实施方案中，烷基杂环基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1429] 如本文所使用的术语“硫代烷氧基”代表式-SR的化学取代基，其中R为如本文所定义的烷基。在一些实施方案中，烷基可进一步用如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[1430] 术语“硫醇基”代表-SH基团。

[1431] 化合物：如本文所使用，术语“化合物”意指包括描绘的结构的所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。

[1432] 本文描述的化合物可为不对称的(例如，具有一个或多个立体中心)。除非另外指出，否则意图是所有立体异构体，如对映异构体和非对映异构体。可以光学活性形式或消旋形式分离含有不对称取代的碳原子的本公开化合物。关于如何从光学活性起始材料制备光学活性形式的方法为本领域中已知的，如通过消旋混合物的拆分或通过立体选择性合成。烯烃的许多几何异构体、C＝N双键等也可存在于本文描述的化合物中，并且所有此类稳定的异构体均涵盖于本公开中。描述了本公开化合物的顺式几何异构体和反式几何异构体，并且可以异构体混合物或分开的异构形式分离。

[1433] 本公开的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式由单键与相邻双键交换并且同时伴随质子迁移而产生。互变异构形式包括质子异变互变异构体，其为具有相同经验式和总电荷的异构质子化状态。实例质子异变互变异构体包括酮-烯醇对、酰胺-酰亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、酰胺-酰亚胺酸对、烯胺-亚胺对，以及环状形式，其中质子可占据杂环系统中的两个或更多个位置，如1H-咪唑和3H-咪唑；1H-1,2,4-三唑、2H-1,2,4-三唑和4H-1,2,4-三唑；1H-异吲哚和2H-异吲哚；以及1H-吡唑和2H-吡唑。互变异构形式可处于平衡状态或通过适当的取代在空间上锁定为一种形式。

[1434] 本公开的化合物还包括出现于中间体或最终化合物中的原子的所有同位素。“同位素”是指具有相同原子数但具有由原子核中的中子数不同而产生的不同质量数的原子。例如,氢的同位素包括氚和氘。

[1435] 本公开的化合物和盐可通过常规方法与溶剂或水分子组合以形成溶剂化物和水合物来制备。

[1436] 保守的:如本文所使用,术语“保守的”是指分别在比较的两个或更多个序列的相同位置上未发生改变的多核苷酸序列或多肽序列的核苷酸或氨基酸残基。相对保守的核苷酸或氨基酸为在较为相关的序列之间比出现于序列的其它地方的核苷酸或氨基酸保守的那些核苷酸或氨基酸。

[1437] 在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此100%相同,将它们称为“完全保守的”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同或至少95%相同,将它们被称为“高度保守的”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此约70%相同、约80%相同、约90%相同、约95%、约98%或约99%相同,将它们称为“高度保守的”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此至少30%相同、至少40%相同、至少50%相同、至少60%相同、至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同或至少95%相同,将它们被称为“保守的”。在一些实施方案中,如果两个或更多个序列彼此约30%相同、约40%相同、约50%相同、约60%相同、约70%相同、约80%相同、约90%相同、约95%相同、约98%相同或约99%相同,将它们称为“保守的”。序列的保守可适用于寡核苷酸或多肽的整个长度或可适用于其部分、区或特征。

[1438] 控制释放:如本文所使用,术语“控制释放”是指遵循用于实现治疗结果的特定释放模式的药物组合物或化合物释放概况。

[1439] 环状或环化:如本文所使用,术语“环状”是指存在连续环路。环状分子不需要为环形的,仅连接形成不断开链的亚单位。环状分子如本发明的工程化的RNA或mRNA可为单一单元或多聚体或包含复合物或高级结构的一种或多种组分。

[1440] 细胞抑制性:如本文所使用,“细胞抑制性”是指抑制、减少、压制细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合的生长、分裂或繁殖。

[1441] 细胞毒性:如本文所使用,“细胞毒性”是指杀死细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合或对其造成有害的、毒性的或致死的作用。

[1442] 递送:如本文所使用,“递送”是指递送化合物、物质、实体、部分、货物或有效负载的动作或方式。

[1443] 递送剂:如本文所使用,“递送剂”是指至少部分地促进多核苷酸、初级构建体或mmRNA体内递送至靶细胞的任何物质。

[1444] 去稳定:如本文所使用,术语“不稳定的”、“去稳定化”或“去稳定区”意指比相同区或分子的起始野生型或天然形式的稳定性差的区或分子。

[1445] 可检测标记:如本文所使用,“可检测标记”是指附接、并入或缔合另一个通过本领域中已知的方法容易检测的实体的一种或多种标志物、信号或部分,所述方法包括射线照相术、荧光、化学发光、酶活性、吸光度等。可检测标记包括放射性同位素、荧光团、发色团、

酶、染料、金属离子、配体如生物素、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白链菌素和半抗原、量子点等。可检测标记可位于本文公开的肽或蛋白质中的任何位置上。它们可在氨基酸、肽或蛋白质内，或位于N-末端或C-末端上。

[1446] 消化：如本文所使用，术语“消化”意指裂开成更小的片或组分。在指多肽或蛋白质时，消化引起肽的产生。

[1447] 远端：如本文所使用，术语“远端”意指位置远离中心或远离目标点或区。

[1448] 给药方案：如本文所使用，术语“给药方案”为施用时间表或治疗、预防或缓和护理的医师确定方案。

[1449] 剂量分割因子(DSF)-剂量分开治疗的PUD除以总每日剂量或单次单位剂量的PUD的比率。该值来源于给药方案组的比较。

[1450] 包封：如本文所使用，术语“包封”意指封住、包围或包住。

[1451] 编码的蛋白质裂解信号：如本文所使用，“编码的蛋白质裂解信号”是指编码蛋白质裂解信号的核苷酸序列。

[1452] 工程化的：如本文所使用，本发明的实施方案在它们被设计来具有不同于起始点野生型或天然分子的无论结构或化学上的特征或特性时为“工程化的”。

[1453] 外来体：如本文所使用，“外来体”为哺乳动物细胞分泌的囊泡或涉及RNA降解的复合物。

[1454] 表达：如本文所使用，核酸序列的“表达”是指以下事件中的一个或多个：(1)从DNA序列产生RNA模板(例如，通过转录)；(2)加工RNA转录物(例如，通过剪接、编辑、5′帽形成和/或3′端加工)；(3)RNA翻译成多肽或蛋白质；以及(4)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[1455] 特征：如本文所使用，“特征”是指特点、特性或独特要素。

[1456] 制剂：如本文所使用，“制剂”至少包括多核苷酸、初级构建体或mmRNA和递送剂。

[1457] 片段：如本文所使用的“片段”是指部分。例如，蛋白质的片段可包含通过消化从培养的细胞中分离的全长蛋白质获得的多肽。

[1458] 功能性：如本文使用，“功能性”生物分子为呈展现出可借以对其进行表征的特性和/或活性的形式的生物分子。

[1459] 同源性：如本文所使用，术语“同源性”是指聚合物分子之间例如核酸分子(例如，DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。在一些实施方案中，如果聚合物分子的序列为至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％相同或相似，则认为它们是彼此“同源的”。术语“同源的”必定是指至少两个序列(多核苷酸序列或多肽序列)之间的比较。根据本发明，如果两个多核苷酸序列编码的多肽是具有至少约20个氨基酸的至少一段的至少约50％、60％、70％、80％、90％、95％或甚至99％，则认为两个多核苷酸序列是同源的。在一些实施方案中，同源多核苷酸序列的特征在于编码一段至少4-5个独特指定的氨基酸的能力。对于长度小于60个核苷酸的多核苷酸序列，通过编码一段至少4-5个独特指定的氨基酸的能力来确定同源性。根据本发明，如果两种蛋白质对于具有至少约20个氨基酸的至少一段为至少约50％、60％、70％、80％或90％相同，则认为两个蛋白质序列是同源的。

[1460] 同一性：如本文所使用，术语“同一性”是指聚合物分子之间例如寡核苷酸分子(例如，DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。两个多核苷酸序列的同

一性百分比的计算例如可通过出于最佳比较目的比对两个序列来进行(例如,为了最佳比对可将空位引入第一核酸序列和第二核酸序列之一或两者中并且出于比较目的可忽视不相同的序列)。在某些实施方案中,出于比较目的比对的序列的长度为参比序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较对应核苷酸位置上的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的核苷酸占据时,则分子在所述位置上相同。两个序列之间的同一性百分比为将空位数和每个空位的长度考虑在内的序列共有的相同位置数的函数,所述空位需要引入用于两个序列的最佳比对。可使用数学算法来完成序列比较和确定两个序列之间的同一性百分比。例如,可使用如描述于以下中的那些方法确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编著,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编著,Academic Press,New York,1993;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.编著,Humana Press,New Jersey,1994;以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.编著,M Stockton Press,New York,1991;所述参考文献各自均以引用的方式并入本文。例如,可使用Meyers和Miller(CABIOS,1989,4:11-17)的算法确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比,所述算法已结合到ALIGN程序(2.0版本)中,使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。或者可使用GCG软件包中的GAP程序、使用NWSgapdna.CMP矩阵确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。确定序列之间的同一性百分比的经常采用的方法包括但不限于在Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988)中公开的那些;所述参考文献以引用的方式并入本文。用于确定同一性的技术编写在公众可获得的计算机程序中。确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包括但不限于GCG程序包,Devereux,J.等,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984))、BLASTP、BLASTN和FASTA Altschul,S.F.等,J.Molec.Biol.,215,403(1990))。

[1461] 抑制基因的表达:如本文所使用,短语“抑制基因的表达”意指引起基因的表达产物的量减少。表达产物可为从基因转录的RNA(例如,mRNA)或从基因转录的mRNA翻译的多肽。通常,mRNA的水平减少导致从其翻译的多肽的水平减少。可使用用于测量mRNA或蛋白质的标准技术确定表达的水平。

[1462] 体外:如本文所使用,术语“体外”是指发生在人工环境中,例如试管或反应容器中、细胞培养物中、皮氏培养皿中等,而不是在生物体(例如,动物、植物或微生物)内的事件。

[1463] 体内:如本文所使用,术语“体内”是指发生在生物体(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内的事件。

[1464] 分离的:如本文所使用,术语“分离的”是指已从其缔合(无论在自然中或在实验设置中)的至少一些组分中分离的物质或实体。分离的物质可相对于它们缔合的物质具有不同水平的纯度。分离的物质和/或实体可从至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或更多的它们最初与其缔合的其它组分中分离。在一些实施方案中,分离的药剂为大于约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约

95％、约96％、约97％、约98％、约99％或多于约99％纯。如本文所使用，如果物质大致上不含其它组分，则它为“纯的”。大致上分离的：“大致上分离的”意指化合物从其形成或检测的环境中大致上分离。部分分离可包括例如富集本公开化合物的组合物。大致上分离可包括含有至少约50重量％、至少约60重量％、至少约70重量％、至少约80重量％、至少约90重量％、至少约95重量％、至少约97重量％或至少约99重量％的本公开化合物或其盐的组合物。用于分离化合物和它们的盐的方法在本领域中为常规的。

[1465] 接头：如本文所使用，接头是指一组原子，例如10-1,000个原子，并且可包含原子或基团如但不限于碳、氨基、烷基氨基、氧、硫、亚砜、磺酰基、羰基和亚胺。接头可在第一端处附着至核碱基或糖部分上的修饰核苷或核苷酸，并且在第二端处附着至有效负载例如可检测剂或治疗剂。接头可具有足够的长度以便不干扰并入到核酸序列中。可出于任何有用目的使用接头，如为了形成mmRNA多聚体(例如，通过连接两个或更多个多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子)或mmRNA缀合物以及为了施用如本文所述的有效负载。可并入到接头中的化学基团的实例包括但不限于烷基、烯基、炔基、酰氨基、氨基、醚、硫醚、酯、亚烷基、杂亚烷基、芳基或杂环基，其各自均可如本文所述任选取代的。接头的实例包括但不限于不饱和烷烃、聚乙二醇(例如，乙二醇或丙二醇单体单元，例如二乙二醇、二丙二醇、三乙二醇、三丙二醇、四乙二醇或四乙二醇)以及葡聚糖聚合物和其衍生物。其它实例包括但不限于接头内的可裂解部分，例如像二硫键(-S-S-)或偶氮键(-N＝N-)，其可使用还原剂或光分解进行裂解。选择性可裂解的键的非限制性实例包括可例如通过使用三(2-羧乙基)膦(TCEP)或其它还原剂和/或光分解裂解的酰胺键，以及可例如通过酸性或碱性水解裂解的酯键。

[1466] 微小RNA(miRNA)结合位点：如本文所使用，微小RNA(miRNA)结合位点代表miRNA的至少“种子”区结合的核酸转录物的核苷酸位置或区。

[1467] 修饰的：如本文所使用“修饰的”是指本发明的分子的变化的状态或结构。可以许多方式包括化学上、结构上和功能上的方式修饰分子。在一个实施方案中，本发明的mRNA分子通过引入非天然的核苷和/或核苷酸来修饰，例如在它涉及天然核糖核苷酸A、U、G和C时。诸如帽结构的非规范核苷酸虽然它们不同于A、C、G、U核糖核苷酸的化学结构，但不认为“修饰的”。

[1468] 粘液：如本文所使用，“粘液”是指粘稠的天然物质并且包含粘蛋白糖蛋白。

[1469] 天然存在的：如本文所使用，“天然存在的”意指不需要人工辅助在自然中存在。

[1470] 非人脊椎动物：如本文所使用，“非人脊椎动物”包括除了智人(Homo sapiens)以外的所有脊椎动物，包括野生种类和驯养种类。非人脊椎动物的实例包括但不限于哺乳动物，如羊驼、白臀野牛、野牛、骆驼、猫、牛、鹿、狗、驴、大额牛、山羊、豚鼠、马、美洲驼、骡、猪、兔、驯鹿、绵羊、水牛以及牦牛。

[1471] 脱靶：如本文所使用，“脱靶”是指对任何一个或多个靶标、基因或细胞转录物的任何非预期作用。

[1472] 开放阅读框：如本文所使用，“开放阅读框”或“ORF”是指在给定阅读框中不含有终止密码子的序列。

[1473] 可操作地连接：如本文所使用，短语“可操作地连接”是指两个或更多个分子、构建体、转录物、实体、部分等之间的功能连接。

[1474] 任选取代的：在本文中形式“任选取代的X”(例如，任选取代的烷基)的短语旨在等

于“X，其中X为任选取代的”(例如，“烷基，其中所述烷基为任选取代的”)。并不用以意指特征“X”(例如，烷基)本身为任选的。

[1475] 肽：如本文所使用，“肽”为小于或等于50个氨基酸长，例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[1476] 互补位：如本文所使用，“互补位”是指抗体的抗原结合位点。

[1477] 患者：如本文所使用，“患者”是指可寻求或有治疗需要、要求治疗、正接受治疗、将接受治疗的受试者，或针对特定疾病或病状在受过训练的专业人员的护理下的受试者。

[1478] 药学上可接受的：本文采用短语“药学上可接受的”指在合理医学判断范围内、适用于与人类和动物接触而没有过量毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症、与合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[1479] 药学上可接受的赋形剂：如本文所使用的短语“药学上可接受的赋形剂”是指除了本文描述的化合物以外的任何成分(例如，能够悬浮或溶解活性化合物的媒介物)并且在患者中具有大致上无毒和非炎症性的特性。赋形剂可包括例如：抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(颜料)、软化剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、香料、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂以及水合作用的水。示例性赋形剂包括但不限于：丁羟甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二碱的)、硬脂酸钙、交联羧甲纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶凝淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、淀粉羟基乙酸钠、山梨醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C以及木糖醇。

[1480] 药学上可接受的盐：本公开还包括本文描述的化合物的药学上可接受的盐。如本文所使用，“药学上可接受的盐”是指公开的化合物的衍生物，其中母体化合物通过将现有酸或碱部分转化为其盐形式(例如，通过使自由碱基团与合适的有机酸反应)来修饰。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基如胺的无机酸盐或有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱盐或有机盐等。代表性酸加成盐包括乙酸盐、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、葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、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、双羟萘酸盐、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、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属盐或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等以及无毒的铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开的药学上可接受的盐包括例如从无毒无机酸或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐。可通过常规化学方法从含有碱性部分或酸性部分的母体化合物合成本公开的药学上可接受的盐。通常，可通过使游离酸或游离碱形式的这些化合物与化学计量的量的适当碱或酸在水或在有机溶剂中或者在水与有机溶剂的混合物中反应来制备此类盐；通

常，像乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈的非水性介质为优选的。合适的盐的列表见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985,第1418页,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编著),Wiley-VCH,2008和Berge等,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977),所述参考文献各自均以引用的方式整体并入本文。

[1481] 药学上可接受的溶剂化物:如本文所使用的术语“药学上可接受的溶剂化物”意指其中合适溶剂的分子并入晶格中的本发明的化合物。合适的溶剂在所施用的剂量下为生理上可耐受的。例如,可通过从包括有机溶剂、水或其混合物的溶液中结晶、重结晶或沉淀来制备溶剂化物。合适溶剂的实例为乙醇、水(例如,一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水为溶剂时,溶剂化物称为“水合物”。

[1482] 药物代谢动力学:如本文所使用,“药物代谢动力学”是指当涉及确定施用给活生物体的物质的命运时,分子或化合物的任何一种或多种特性。药物代谢动力学分成若干区域,包括吸收、分布、代谢和排泄的程度和速率。这通常称为ADME,其中:(A)吸收为物质进入血液循环的过程;(D)分布为物质在整个身体的体液和组织中的分散或散布;(M)代谢(或生物转化)为母体化合物不可逆转化成子代谢物;并且(E)排泄(或消除)是指物质从身体消除。在极少数情况下,一些药物不可逆地在身体组织中积累。

[1483] 物理化学:如本文所使用,“物理化学”意指或关于物理和/或化学特性。

[1484] 多肽/单位药物(PUD):如本文所使用,PUD或产物/单位药物定义为总每日剂量的细分部分,通常如在体液或组织中所测量的1mg、pg、kg等的产物(如多肽),通常以除以体液中的量值的浓度定义如pmol/mL、mmol/mL等。

[1485] 预防:如本文所使用,术语“预防”是指部分或完全延迟感染、疾病、病症和/或病状的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病状的一个或多个症状、特征或临床表现的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病状的一个或多个症状、特征或表现的发作;部分或完全延迟特定疾病、病症和/或病状从感染的进展;和/或减少发展与感染、疾病、病症和/或病状相关的病理的风险。

[1486] 前药:本公开还包括本文描述的化合物的前药。如本文所使用,“前药”是指呈在化学或物理改变时充当治疗剂的物质、分子或实体的形式的任何物质、分子或实体。前药可以一定方式共价键合或螯合并且在向哺乳动物受试者施用之前、之时或之后释放或转化为活性药物部分。可通过以在常规操纵或体内使修饰裂解为母体化合物的方式修饰存在于化合物中的官能团来制备前药。前药包括其中羟基、氨基、硫氢基或羧基结合至在向哺乳动物受试者施用时分别裂解以形成游离羟基、氨基、硫氢基或羧基的任何基团的化合物。前药的制备和用途讨论于T.Higuchi和V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems,”A.C.S.学术讨论会丛刊第14期和Bioreversible Carriers in Drug Design,编著Edward B.Roche,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987中,所述参考文献均特此以引用的方式整体并入。

[1487] 增殖:如本文所使用,术语“增殖”意指生长、扩增或增加或引起快速生长、扩增或

增加。“增殖性的”意指具有增殖的能力。“抗增殖性的”意指具有抵消或与增殖特性相反的特性。

[1488] 蛋白质裂解位点:如本文所使用,“蛋白质裂解位点”是指其中可通过化学方式、酶促方式或光化学方法完成氨基酸链的控制裂解的位点。

[1489] 蛋白质裂解信号:如本文所使用,“蛋白质裂解信号”是指标志或标记用于裂解的多肽的至少一个氨基酸。

[1490] 目标蛋白质:如本文所使用,术语“目标蛋白质”或“希望的蛋白质”包括本文提供的那些和其片段、突变体、变体和改变。

[1491] 近端:如本文所使用,术语“近端”意指位置比较靠近中心或目标点或区。

[1492] 假尿苷:如本文所使用,假尿苷是指核苷尿苷的C-糖苷异构体。“假尿苷类似物”为假尿苷的任何修饰、变体、同工型或衍生物。例如,假尿苷类似物包括但不限于1-羧甲基-假尿苷、1-丙炔基-假尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、1-甲基假尿苷($m^1\psi$)、1-甲基-4-硫代-假尿苷($m^1s^4\psi$)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷($m^3\psi$)、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、二氢假尿苷、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、N1-甲基-假尿苷、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷($acp^3\psi$)以及2′-O-甲基-假尿苷(ψm)。

[1493] 纯化的:如本文所使用,“纯化”、“纯化的”、“纯化作用”意指使之为大致上纯的或没有不想要的组分、材料污物、混合物或瑕疵。

[1494] 样品:如本文所使用,术语“样品”或“生物样品”是指其组织、细胞或组成部分的子集(例如体液,包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊髓液、唾液、羊水、羊膜脐带血、尿、阴道液和精液)。样品进一步可包括从整个生物体或其组织、细胞或组成部分的子集或其馏分或部分制备的匀浆、裂解物或萃取物,包括但不限于例如血浆、血清、脊髓液、淋巴液,皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外切片,眼泪、唾液、乳、血细胞、肿瘤、器官。样品进一步是指可含有细胞组分如蛋白质或核酸分子的培养基如营养肉汤或凝胶。

[1495] 信号序列:如本文所使用,短语“信号序列”是指可指导蛋白质转运或定位的序列。

[1496] 单个单位剂量:如本文所使用,“单个单位剂量”为以一次剂量/一次/单个途径/单个接触点施用的任何治疗剂的剂量,即,单次施用事件。

[1497] 相似性:如本文所使用,术语“相似性”是指聚合物分子之间例如多核苷酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。可以与同一性百分比计算相同的方式进行聚合物分子彼此的相似性百分比的计算,除了相似性百分比计算考虑到如本领域中所理解的保守取代。

[1498] 分剂量:如本文所使用,“分剂量”为单个单位剂量或总每日剂量分成两次或更多次剂量。

[1499] 稳定的:如本文所使用“稳定的”是指足够稳固以经受从反应混合物中分离成有用的纯度并且优选能够配制成有效治疗剂的化合物。

[1500] 稳定:如本文所使用,术语“使…..稳定”、“稳定了的”、“稳定区”意指使之稳定或变为稳定的。

[1501] 受试者:如本文所使用,术语“受试者”或“患者”是指例如出于实验、诊断、预防和/

或治疗目的可向其施用根据本发明的组合物的任何生物体。典型受试者包括动物(例如,哺乳动物如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人)和/或植物。

[1502] 大致上:如本文所使用,术语“大致上”是指展现目标特征或特性的总范围或程度或接近总范围或程度的定性条件。生物领域普通技术人员将理解,生物现象和化学现象很少(如果有的话)会完成和/或进行到底或达到或避免绝对结果。因此,本文使用术语“大致上”来获得在许多生物现象和化学现象中固有的潜在完全性缺乏。

[1503] 大致上相等:如本文所使用,在它涉及剂量之间的时间差时,术语意指正/负2%。

[1504] 大致上同时:如本文所使用并且在它涉及多个剂量时,术语意指在2秒内。

[1505] 遭受:“遭受”疾病、病症和/或病状的个体已诊断具有或表现疾病、病症和/或病状的一个或多个症状。

[1506] 易感:“易感”疾病、病症和/或病状的个体尚未诊断具有和/或可不展现疾病、病症和/或病状的症状但怀疑有发展疾病或其症状的倾向。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状(例如,癌症)的个体可具有以下的一个或多个特征:(1)与发展疾病、病症和/或病状相关的基因突变;(2)与发展疾病、病症和/或病状相关的遗传多态性;(3)与疾病、病症和/或病状相关的蛋白质和/或核酸的表达和/或活性增加和/或减少;(4)与发展疾病、病症和/或病状相关的习惯和/或生活方式;(5)疾病、病症和/或病状的家族史;以及(6)暴露于和/或感染与发展疾病、病症和/或病状相关的微生物。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状的个体将发展疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状的个体将不会发展疾病、病症和/或病状。

[1507] 持续释放:如本文所使用,术语“持续释放”是指在特定时间段内遵循释放速率的药物组合物或化合物释放概况。

[1508] 合成的:术语“合成的”意指通过人为产生、制备和/或制造的。本发明的多核苷酸或多肽或其它分子的合成可为化学或酶促的。

[1509] 靶细胞:如本文所使用,“靶细胞”是指任何一种或多种目标细胞。细胞可存在于体外、体内、原位或在生物体的组织或器官中。生物体可为动物,优选地哺乳动物,更优选地人并且最优选地患者。

[1510] 治疗剂:术语“治疗剂”是指当向受试者施用时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引出希望的生物和/或药理学作用的任何药剂。

[1511] 治疗有效量:如本文所使用,术语“治疗有效量”意指在向遭受或易感感染、疾病、病症和/或病状的受试者施用时足以实现感染、疾病、病症和/或病状的治疗、症状改善、诊断、预防和/或发作延迟的待递送药剂(例如,核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量。

[1512] 治疗有效结果:如本文所使用,术语“治疗有效结果”意指在遭受或易感感染、疾病、病症和/或病状的受试者中足以实现感染、疾病、病症和/或病状的治疗、症状改善、诊断、预防和/或发作延迟的结果。

[1513] 总每日剂量:如本文所使用,“总每日剂量”为24小时时期内给予或规定的量。所述总每日剂量可作为单个单位剂量施用。

[1514] 转录因子:如本文所使用,术语“转录因子”是指例如通过激活或抑制转录来调节DNA向RNA的转录的DNA结合蛋白。一些转录因子单独实现转录的调节,而其它转录因子与其它蛋白质协力作用。一些转录因子在某些条件下可激活和抑制转录。通常,转录因子结合特

定靶序列或与靶基因的调节区中的特定共有序列高度相似的序列。转录因子可单独或与其它分子复合来调节靶基因的转录。

[1515] 治疗:如本文所使用,术语“治疗”是指部分或完全地实现特定感染、疾病、病症和/或病状的一个或多个症状或特征的减轻、改善、改进、缓解、发作延迟、进展抑制、严重性降低和/或发生率降低。例如,“治疗”癌症可指抑制肿瘤的存活、生长和/或扩散。可出于减少发展与疾病、病症和/或病状相关的病理的风险的目的,向没有展现疾病、病症和/或病状的征兆的受试者和/或仅展现疾病、病症和/或病状的早期征兆的受试者施用治疗。

[1516] 未修饰的:如本文所使用,“未修饰的”是指在以任何方式变化之前的任何物质、化合物或分子。未修饰的可但并非总是指野生型或天然形式的生物分子。分子可经历一系列修饰,从而每个修饰分子均可充当后续修饰的“未修饰的”起始分子。

[1517] 等效物和范围

[1518] 本领域的技术人员将认识到,或仅使用常规实验就能够确定本文描述的根据本发明的具体实施方案的许多等效物。本发明的范围并不打算限于以上描述,而是如所附权利要求书所阐述。

[1519] 在权利要求中,除非相反指出或另外从上下文明显看出,否则冠词如“一个(a)”、“一种(an)”以及“所述(the)”可意指一个或多于一个。除非相反指出或另外从上下文明显看出,否则如果一个、多于一个或所有组成员出现于、被用于或以其它方式关联于给定的产品或过程,那么认为包括在组的一个或多个成员之间的“或”的权利要求或描述得到了满足。本发明包括其中恰有组中的一个成员出现于、被用于或以其它方式关联于给定的产品或过程的实施方案。本发明包括多于一个或所有的组成员存在于、被用于或以其它方式关联于给定的产品或过程的实施方案。

[1520] 还应该注意术语“包含”旨在为开放的并且容许但并非要求包括另外的要素或步骤。当本文中使用术语“包含”时,因此还涵盖并且公开术语“由……组成”。

[1521] 在给出范围时,端点被包括在内。此外,应该理解,除非另外指出或另外从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见,否则在本发明的不同实施方案中,表述为范围的值可假定为任何特定值或所述范围内的子范围,到所述范围的下限的单位的十分之一,除非在上下文中另有明确规定。

[1522] 另外,应该理解,在现有技术内的本发明的任何具体实施方案可从任何一个或多个权利要求中明确排除。因为认为此类实施方案为本领域普通技术人员所已知的,即使本文没有明确阐述排除,也可排除它们。本发明的组合物的任何具体实施方案(例如,因此编码的任何核酸或蛋白质;任何生产方法;任何使用方法等)可出于无论是否与现有技术存在相关的任何原因而从任何一个或多个权利要求中排除。

[1523] 所有引用的来源例如参考文献、出版物、数据库、数据库条目和本文引用的技术均以引用的方式并入本申请,即使在引用中没有明确陈述。在引用的来源和本申请的陈述冲突的情况下,应当以本申请中的陈述为准。

[1524] 小节标题和表格标题并不旨在限制性的。

实施例

[1525] 实施例1.修饰mRNA的产生

[1526] 可使用标准实验室方法和材料制备根据本发明的修饰mRNA(mmRNA)。目标基因的开放阅读框(ORF)可由可含有强Kozak翻译起始信号的5'非翻译区(UTR)和/或可包括用于poly-A尾的模板添加的oligo(dT)序列的α-珠蛋白3'UTR侧接。修饰mRNA可修饰来减少细胞先天性免疫应答。用以减少细胞应答的修饰可包括假尿苷(ψ)和5-甲基-胞苷(5meC、5mc或m^5C)。(参见,Kariko K等,Immunity 23:165-75(2005),Kariko K等,Mol Ther 16:1833-40(2008),Anderson BR等,NAR(2010);所述文献各自通过引用整体并入本文)。

[1527] ORF还可包括多种上游或下游添加物(例如但不限于β-珠蛋白、标签等),所述添加物可从优化服务(例如但不限于DNA2.0(Menlo Park,CA))订购,并且可含有可具有XbaI识别的多克隆位点。在接收构建体时,可将所述构建体重构并转化到化学感受态大肠杆菌(E.coli)中。

[1528] 对于本发明,使用了NEB DH5-α感受态大肠杆菌。使用100ng质粒,根据NEB说明来执行转化。方案如下:

[1529] 1将一管NEB 5-α感受态大肠杆菌细胞在冰上解冻10分钟。

[1530] 2向细胞混合物中添加含有1pg-100ng质粒DNA的1-5μl。小心轻弹管4-5次,以将细胞与DNA混合。不涡旋。

[1531] 3将混合物在冰上放置30分钟。不混合。

[1532] 4在42℃下热休克刚好30秒。不混合。

[1533] 5在冰上放置5分钟。不混合。

[1534] 6用移液管向混合物中移入950μl的室温SOC。

[1535] 7在37℃下放置60分钟。剧烈振荡(250rpm)或转动。

[1536] 8将选择性平板温热至37℃。

[1537] 9通过轻弹管并翻转将细胞充分混合。

[1538] 将50-100μl的每种稀释液涂布在选择性平板上,并且在37℃下孵育过夜。或者,在30℃下孵育24-36小时或在25℃下孵育48小时。

[1539] 然后使用单菌落来接种5ml的使用了适当抗生素的LB生长培养基,并且然后允许其生长(250RPM,37℃)5小时。然后将这用于接种200ml培养基并允许其在相同条件下生长过夜。

[1540] 为了分离质粒(至850μg),使用Invitrogen PURELINK™ HiPure Maxiprep试剂盒(Carlsbad,CA)按照制造商的说明执行大量制备。

[1541] 为了生成用于体外转录(IVT)的cDNA,首先使用如XbaI的限制性内切酶将质粒(其实例在图3中示出)线性化。使用XbaI的典型限制性消化将包括以下:质粒1.0μg;10x缓冲液1.0μl;XbaI 1.5μl;dH_20,至10μl;在37℃下孵育1小时。如果以实验室规模(<5μg)执行,那么使用Invitrogen的PURELINK™ PCR Micro试剂盒(Carlsbad,CA)按照制造商的说明清洗反应物。更大规模的纯化可需要使用具有更大负载容量的产品(如Invitrogen的标准PURELINK™ PCR试剂盒(Carlsbad,CA))来进行。在清洗之后,将线性化的载体使用NanoDrop纯化,并使用琼脂糖凝胶电泳进行分析以确认线性化。

[1542] 本文所述用以制备修饰mRNA的方法可用于产生包括长分子的所有大小的分子。已针对不同大小的分子制备了使用所述方法的修饰mRNA,包括酸性葡糖苷酶α(GAA)(3.2kb)、囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)(4.7kb)、VII因子(7.3kb)、溶酶体酸性脂肪酶

(45.4kDa)、葡糖脑苷脂酶(59.7kDa)以及艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(76kDa)。

[1543] 作为非限制性实例,G-CSF可代表目标多肽。实施例1-5所概述的步骤中使用的序列在表11中示出。应注意,在表11的每个序列中起始密码子(ATG)加有下划线。

[1544] 表11.G-CSF序列

[1545]

SEQ ID NO	描述
167	cDNA 序列: ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCC CTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAG GAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGC TTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGC GATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAG CTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTG GGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCC CTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTT TTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCC CCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTC GCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTG GGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCG GCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTG GTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCG TTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTGA
168	具有 T7 聚合酶位点、AfeI 和 Xba 限制性位点的 cDNA: TAATACGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG AGCCACC ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCC CTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAG GAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGC

[1546]

	TTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGC GATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAG CTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTG GGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCC CTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTT TTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCC CCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTC GCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTG GGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCG GCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTG GTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCG TTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTGA AGCGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCT TCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCT GAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
169	优化序列：含有 T7 聚合酶位点、AfeI 和 Xba 限制性位点 TAATACGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG AGCCACC ATGGCCGGTCCCGCGACCCAAAGCCCCATGAAACTTATGGCC CTGCAGTTGCTGCTTTGGCACTCGGCCCTCTGGACAGTCCAAG AAGCGACTCCTCTCGGACCTGCCTCATCGTTGCCGCAGTCATT CCTTTTGAAGTGTCTGGAGCAGGTGCGAAAGATTCAGGGCGA TGGAGCCGCACTCCAAGAGAAGCTCTGCGCGACATACAAACT TTGCCATCCCGAGGAGCTCGTACTGCTCGGGCACAGCTTGGG GATTCCCTGGGCTCCTCTCTCGTCCTGTCCGTCGCAGGCTTTG CAGTTGGCAGGGTGCCTTTCCCAGCTCCACTCCGGTTTGTTCT TGTATCAGGGACTGCTGCAAGCCCTTGAGGGAATCTCGCCAG AATTGGGCCCGACGCTGGACACGTTGCAGCTCGACGTGGCGG ATTTCGCAACAACCATCTGGCAGCAGATGGAGGAACTGGGGA TGGCACCCGCGCTGCAGCCCACGCAGGGGGCAATGCCGGCCT TTGCGTCCGCGTTTCAGCGCAGGGCGGGTGGAGTCCTCGTAG CGAGCCACCTTCAATCATTTTTGGAAGTCTCGTACCGGGTGCT GAGACATCTTGCGCAGCCGTGA AGCGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCT TCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCT GAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
170	mRNA 序列(经转录的) GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAG AGCCACC AUGGCCGGUCCCGCGACCCAAAGCCCCAUGAAACUUAUGGC CCUGCAGUUGCUGCUUUGGCACUCGGCCCUCUGGACAGUCC AAGAAGCGACUCCUCUCGGACCUGCCUCAUCGUUGCCGCAG UCAUUCCUUUUGAAGUGUCUGGAGCAGGUGCGAAAGAUUC AGGGCGAUGGAGCCGCACUCCAAGAGAAGCUCUGCGCGACA UACAAACUUUGCCAUCCCGAGGAGCUCGUACUGCUCGGGCA CAGCUUGGGGAUUCCCUGGGCUCCUCUCUCGUCCUGUCCGU CGCAGGCUUUGCAGUUGGCAGGGUGCCUUUCCCAGCUCCAC UCCGGUUUGUUCUUGUAUCAGGGACUGCUGCAAGCCCUUGA GGGAAUCUCGCCAGAAUUGGGCCCGACGCUGGACACGUUGC

[1547]

	AGCUCGACGUGGCGGAUUUCGCAACAACCAUCUGGCAGCAG AUGGAGGAACUGGGGAUGGCACCCGCGCUGCAGCCCACGCA GGGGGCAAUGCCGGCCUUUGCGUCCGCGUUUCAGCGCAGGG CGGGUGGAGUCCUCGUAGCGAGCCACCUUCAAUCAUUUUUG GAAGUCUCGUACCGGGUGCUGAGACAUCUUGCGCAGCCGUG A AGCGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAA GCCUGAGUAGGAAG

[1548] 实施例2:用于cDNA产生的PCR

[1549] 使用Kapa Biosystems(Woburn,MA)的2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix来执行用于制备cDNA的PCR程序。此体系包括2x KAPA ReadyMix 12.5μl;正向引物(10uM)0.75μl;反向引物(10uM)0.75μl;模板cDNA 100ng;以及dH_20,稀释至25.0μl。反应条件为:在95℃下持续5min;和25个循环:在98℃下持续20sec,接着在58℃下持续15sec,接着在72℃下持续45sec,接着在72℃下持续5min,接着在4℃下至终止。

[1550] 本发明的反向引物为mRNA中的poly-A_{120}并入了poly-T_{120}。具有更长或更短poly(T)序列段的其它反向引物可用于调整mRNA中poly(A)尾的长度。

[1551] 使用Invitrogen的PURELINK™ PCR Micro试剂盒(Carlsbad,CA)根据制造商的说明清洗反应物(至5μg)。更大的反应物将需要使用具有更大容量的产品来清洗。清洗后,使用NANODROP™将cDNA定量,并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,以确认cDNA为期望大小。然后使cDNA进行测序分析,之后进行体外转录反应。

[1552] 实施例3.体外转录(IVT)

[1553] 体外转录反应生成含有修饰核苷酸的mRNA或修饰RNA。使用天然或非天然NTP内部制备输入核苷酸三磷酸(NTP)混合物。

[1554] 典型的体外转录反应液包括以下:

[1555]

1 模板 cDNA	1.0 μg
2 10x 转录缓冲液(400 mM Tris-HCl pH 8.0, 190 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 10 mM 亚精胺)	2.0 μl
3 定制 NTP (各 25 mM)	7.2 μl
4 RNA 酶抑制剂	20 U
5 T7 RNA 聚合酶	3000 U
6 dH_20	至 20.0 μl。并且

[1556] 7在37℃下孵育3小时至5小时。

[1557] 粗制IVT混合物可在4℃下储存过夜,用于第二天清洗。然后使用1U不含RNA酶的DNA酶来消化原始模板。在37℃下孵育15分钟后,使用Ambion的MEGACLEAR™试剂盒(Austin,

TX)按照制造商的说明纯化mRNA。此试剂盒可纯化达500μg的RNA。清洗后,使用NanoDrop将RNA定量,并且通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,以确认RNA为适当大小并且RNA未发生降解。

[1558] 实施例4.mRNA的酶促加帽

[1559] 如下执行mRNA的加帽,其中混合物包括:IVT RNA 60μg-180μg和dH_20,至72μl。将混合物在65℃下孵育5分钟,以使RNA变性,然后立即转移到冰上。

[1560] 方案然后涉及10x加帽缓冲液(0.5M Tris-HCl(pH 8.0)、60mM KCl、12.5mM $MgCl_2$)(10.0μl)、20mM GTP(5.0μl)、20mM S-腺苷甲硫氨酸(2.5μl)、RNA酶抑制剂(100U)、2′-O-甲基转移酶(400U)、牛痘加帽酶(鸟苷酸转移酶)(40U)、dH_20(至28μl)的混合;以及在37℃下孵育30分钟(对于60μg RNA)或长至2小时(对于180μg RNA)。

[1561] 然后使用Ambion的MEGACLEAR™试剂盒(Austin,TX)按照制造商的说明对mRNA进行纯化。清洗后,使用NANODROP™(ThermoFisher,Waltham,MA)将RNA定量,并且通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,以确认RNA为适当大小并且RNA未发生降解。还可通过运行反转录PCR以生成用于测序的cDNA来对RNA产物进行测序。

[1562] 实施例5.PolyA加尾反应

[1563] 在cDNA中没有poly-T的情况下,必须在清洗最终产物之前执行poly-A加尾反应。这通过以下来进行:将加帽的IVT RNA(100μl)、RNA酶抑制剂(20U)、10x加尾缓冲液(0.5M Tris-HCl(pH 8.0)、2.5M NaCl、100mM $MgCl_2$)(12.0μl)、20mM ATP(6.0μl)、Poly-A聚合酶(20U)、dH_20(至123.5μl)混合并在37℃下孵育30min。如果转录物中已经存在poly-A尾,那么可跳过加尾反应,并且使用Ambion的MEGACLEAR™试剂盒(Austin,TX)直接进行清洗(最多500μg)。Poly-A聚合酶优选为在酵母中表达的重组酶。

[1564] 对于本文执行和描述的研究,poly-A尾在IVT模板中编码成包括160个核苷酸长度。然而,应了解,polyA加尾反应的可加工性或完整性可能不总是导致刚好160个核苷酸。因此,具有大约160个核苷酸,例如,约150-165、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164或165个核苷酸的polyA尾在本发明的范围之内。

[1565] 实施例6.天然5′帽和5′帽类似物

[1566] 使用以下用以生成5′-鸟苷帽结构的化学RNA帽类似物,根据制造商的方案,在体外转录反应期间伴随地完成修饰RNA的5′加帽:3′-O-Me-m7G(5')ppp(5')G[ARCA帽]、G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')A、m7G(5')ppp(5')G(New England BioLabs,Ipswich,MA)。可使用用以生成“Cap0”结构:m7G(5')ppp(5')G的牛痘病毒加帽酶(New England BioLabs,Ipswich,MA)在转录后完成修饰RNA的5′加帽。可使用牛痘病毒加帽酶和用以生成m7G(5')ppp(5')G-2′-O-甲基的2′-O甲基转移酶来生成Cap1结构。可由Cap1结构,之后使用2′-O甲基转移酶将5′倒数第三个核苷酸2′-O甲基化来生成Cap2结构。可由Cap2结构,之后使用2′-O甲基转移酶将5′倒数第四个核苷酸2′-O甲基化来生成Cap3结构。酶优选源自重组来源。

[1567] 当转染到哺乳动物细胞中时,修饰mRNA具有在12小时至18小时之间或大于18小时,例如24小时、36小时、48小时、60小时、72小时或大于72小时的稳定性。

[1568] 实施例7.加帽

[1569] A.蛋白质表达测定

[1570] 可将编码含有ARCA(3′O-Me-m7G(5')ppp(5')G)帽类似物或Cap1结构的人G-CSF

(SEQ ID NO:167中示出的cDNA;SEQ ID NO:170中示出的在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰的mRNA序列,其中在序列中未示出长度大约为160个核苷酸的polyA尾)的合成mRNA在相等浓度下转染到人原代角质形成细胞中。在转染后6小时、12小时、24小时和36小时,可通过ELISA测定分泌到培养基中的G-CSF的量。向培养基中分泌较高水平G-CSF的合成mRNA将对应于具有较高翻译能力Cap结构的合成mRNA。

[1571] B.纯度分析合成

[1572] 可使用变性琼脂糖-尿素凝胶电泳或HPLC分析针对纯度对编码含有ARCA帽类似物或Cap1结构粗制合成产物的人G-CSF(SEQ ID NO:167中示出的cDNA;SEQ ID NO:170中示出的在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰的mRNA序列,其中在序列中未示出长度大约为160个核苷酸的polyA尾)的合成mRNA进行比较。与具有多个条带或拖尾条带的合成mRNA相比,通过电泳具有单个统一条带的合成mRNA对应于较高纯度产物。具有单个HPLC峰的合成mRNA也将对应于较高纯度产物。具有较高效率的加帽反应将提供更纯的mRNA群。

[1573] C.细胞因子分析

[1574] 可将编码含有ARCA帽类似物或Cap1结构的人G-CSF(SEQ ID NO:167中示出的cDNA;SEQ ID NO:170中示出的在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰的mRNA序列,其中在序列中未示出长度大约为160个核苷酸的polyA尾)的合成mRNA在多个浓度下转染到人原代角质形成细胞中。在转染后6小时、12小时、24小时和36小时,可通过ELISA测定分泌到培养基中的促炎性细胞因子(如TNF-α和IFN-β)的量。向培养基中分泌较高水平的促炎性细胞因子的合成mRNA将对应于含有免疫激活帽结构的合成mRNA。

[1575] D.加帽反应效率

[1576] 可在加帽mRNA核酸酶处理之后,通过LC-MS针对加帽反应效率对编码含有ARCA帽类似物或Cap1结构的人G-CSF(SEQ ID NO:167中示出的cDNA;SEQ ID NO:170中示出的在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰的mRNA序列,其中在序列中未示出长度大约为160个核苷酸的polyA尾)的合成mRNA进行分析。加帽mRNA的核酸酶处理将产生可通过LC-MS检测的游离核苷酸和加帽的5′-5-三磷酸帽结构的混合物。LC-MS图谱上加帽产物的量可表示为来自反应的总mRNA的百分比并且将对应于加帽反应效率。具有较高加帽反应效率的帽结构通过LC-MS将具有较高量的加帽产物。

[1577] 实施例8.修饰RNA或RT PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

[1578] 将每个修饰RNA(200-400ng,20μl体积)或反转录的PCR产物(200-400ng)加样到非变性的1.2%琼脂糖E-Gel(Invitrogen,Carlsbad,CA)上的孔中,并且根据制造商的方案跑胶12-15分钟。

[1579] 实施例9.Nanodrop修饰RNA定量和UV光谱数据

[1580] TE缓冲液中的修饰RNA(1μl)用于Nanodrop UV吸光度读数,以对来自体外转录反应的每个修饰RNA的产率进行定量。

[1581] 实施例10.使用类脂质的修饰mRNA的配制

[1582] 通过在添加至细胞之前,将mmRNA与类脂质以设定比率混合来配制修饰mRNA(mmRNA)用于体外实验。体内配制可需要添加额外成分,以有利于在整个身体中循环。为了

测试这些类脂质形成适用于体内工作的颗粒的能力，使用用于siRNA-类脂质制剂的标准配制方法作为起始点。初始mmRNA-类脂质制剂可由包括42％类脂质、48％胆固醇和10％PEG(比率可能进一步优化)的颗粒组成。颗粒配制之后，添加mmRNA并允许其与复合物整合。使用标准染料排除测定法对包封效率进行测定。

[1583] 实施例11-15的材料和方法

[1584] A.脂质合成

[1585] 通过本领域中概述的方法合成六种脂质DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、98N12-5、C12-200和DLin-MC3-DMA，以便与修饰RNA一起配制。DLin-DMA和前体如Heyes等，J.Control Release,2005,107,276-287中所述进行合成。DLin-K-DMA和DLin-KC2-DMA以及前体如Semple等,Nature Biotechnology,2010,28,172-176中所述进行合成。98N12-5和前体如Akinc等,Nature Biotechnology,2008,26,561-569中所述进行合成。

[1586] C12-200和前体根据Love等,PNAS,2010,107,1864-1869中概述的方法进行合成。向含有胺200(0.723g,3.36mmol,1当量)和搅拌棒的小瓶中添加2-环氧十二烷(5.10g,27.7mmol,8.2当量)。将小瓶密封并温热至80℃。将反应液在80℃下搅拌4天。然后通过硅胶色谱使用从纯二氯甲烷(DCM)至DCM:MeOH 98:2的梯度对混合物进行纯化。通过RP-HPLC对靶标化合物进行进一步纯化，以得到所希望的化合物。

[1587] DLin-MC3-DMA和前体根据通过引用整体并入本文的WO2010054401中所描述的程序进行合成。将二亚油基甲醇(1.5g,2.8mmol,1当量)、N,N-二甲基氨基丁酸(1.5g,2.8mmol,1当量)、DIPEA(0.73mL,4.2mmol,1.5当量)和TBTU(1.35g,4.2mmol,1.5当量)在10mL DMF中的混合物在室温下搅拌10h。然后将反应混合物在醚中稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥、过滤并在减压下浓缩。通过硅胶色谱使用DCM至DCM:MeOH 98:2的梯度对粗产物进行纯化。随后使靶标化合物经受另外的RP-HPLC纯化，所述RP-HPLC纯化使用YMC-Pack C4柱来进行，以得到靶标化合物。

[1588] B.修饰RNA纳米颗粒的配制

[1589] 在50mM的浓度下在乙醇中制备合成脂质、1,2-二硬脂酰基-3-磷脂酰胆碱(DSPC)(Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL)、胆固醇(Sigma-Aldrich,Taufkirchen,Germany)以及α-[3'-(1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙氧基)-甲酰胺-丙基]-ω-甲氧基-聚氧乙烯(PEG-c-DOMG)(NOF,Bouwelven,Belgium)的溶液，并且在-20℃下储存。将脂质合并，以得到50:10:38.5:1.5(脂质:DSPC:胆固醇:PEG-c-DOMG)的摩尔比，并且用乙醇稀释至25mM的最终脂质浓度。将在1-2mg/mL的浓度下的修饰mRNA的水溶液在pH 3的50mM柠檬酸钠缓冲液中稀释，以形成修饰mRNA贮液。通过将合成脂质溶液与修饰mRNA溶液以10:1、15:1、20:1和30:1的总脂质与修饰mRNA的重量比合并，来制备脂质和修饰mRNA的制剂。将脂质乙醇溶液快速注射到修饰mRNA的水溶液中，以得到含有33％乙醇的混悬液。手动(MI)注射或借助于注射泵(SP)(Harvard Pump 33Dual Syringe Pump Harvard Apparatus Holliston,MA)来注射溶液。

[1590] 为了去除乙醇并实现缓冲液交换，使用Slide-A-Lyzer盒(Thermo Fisher Scientific Inc.Rockford,IL)将制剂对pH 7.4体积为初产物200倍的磷酸盐缓冲盐水透析两次，其中分子量截断(MWCO)为10kD。第一次透析在室温下执行3小时，然后将制剂在4℃下透析过夜。将所得的纳米颗粒混悬液通过0.2μm无菌过滤器(Sarstedt,Nümbrecht,

Germany)过滤到玻璃小瓶中并且用卷曲封口密封。

[1591] C.制剂的表征

[1592] 使用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd,Malvern,Worcestershire,UK)测定修饰mRNA纳米颗粒的粒度、多分散指数(PDI)和ζ电势,在1X PBS中测定粒度并且在15mM PBS中测定ζ电势。

[1593] 使用紫外可见光谱测定修饰mRNA纳米颗粒制剂的浓度。将100μL的在1X PBS中稀释的制剂添加到900μL的甲醇和氯仿的4:1(v/v)混合物中。混合之后,在DU 800分光光度计(Beckman Coulter,Beckman Coulter,Inc.,Brea,CA)上在230nm与330nm之间记录溶液的吸收光谱。纳米颗粒制剂中修饰RNA的浓度基于制剂中使用的修饰RNA的消光系数以及在260nm波长处的吸光度与在330nm波长处的基线值之间的差来计算。

[1594] 使用QUANT-IT™RIBOGREEN®RNA测定(Invitrogen Corporation Carlsbad,CA)来评价通过纳米颗粒对修饰RNA的包封。将样品在TE缓冲液(10mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH 7.5)中稀释至大约5μg/mL的浓度。将50μL的稀释样品转移到聚苯乙烯96孔平板中,然后添加50μL的TE缓冲液或50μL的2%Triton X-100溶液。将平板在37℃的温度下孵育15分钟。将RIBOGREEN®试剂在TE缓冲液中1:100稀释,将100μL的此溶液添加到每个孔中。使用荧光平板读取器(Wallac Victor 1420Multilablel Counter;Perkin Elmer,Waltham,MA)在～480nm的激发波长和～520nm的发射波长下测量荧光强度。将每个样品的荧光值减去试剂空白的荧光值,并且通过用完整样品(没有添加Triton X-100)的荧光强度除以破碎样品(通过添加Triton X-100造成)的荧光值来测定游离的修饰RNA的百分比。

[1595] D.体外孵育

[1596] 将人胚胎肾上皮(HEK293)细胞和肝细胞癌上皮(HepG2)细胞(LGC standards GmbH,Wesel,Germany)接种到96孔平板(Greiner Bio-one GmbH,Frickenhausen,Germany)上,并且用于HEK293细胞的平板预先涂布有1型胶原。将HEK293以30,000细胞/孔的密度接种,HepG2以35,000细胞/孔的密度接种在100μl的细胞培养基中。对于HEK293,细胞培养基为DMEM,10%FCS,添加2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和1x非必需氨基酸(Biochrom AG,Berlin,Germany)以及1.2mg/ml碳酸氢钠(Sigma-Aldrich,Munich,Germany),并且对于HepG2,培养基为MEM(Gibco Life Technologies,Darmstadt,Germany),10%FCS,添加2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和1x非必需氨基酸(Biochrom AG,Berlin,Germany。在接种细胞并且孵育之后,一式四份直接添加含有mCherry mRNA(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)的制剂。具有用于体外转录(IVT)的T7启动子、5'非翻译区(UTR)和3′UTR的mCherry cDNA在SEQ ID NO:172中给出。mCherry mRNA在每个胞嘧啶处用5meC,并且在每个尿苷位点用假尿苷替代进行修饰。

[1597] 通过将培养基上清液转移至96孔Pro-Bind U底平板(Beckton Dickinson GmbH,Heidelberg,Germany)来收获细胞。将细胞用1/2体积的胰蛋白酶/EDTA(Biochrom AG,Berlin,Germany)胰蛋白酶消化,与相应的上清液合并,并且通过添加一个体积的PBS/2%FCS(均为Biochrom AG,Berlin,Germany)/0.5%甲醛(Merck,Darmstadt,Germany)进行固定。然后在LSRII细胞仪(Beckton Dickinson GmbH,Heidelberg,Germany)中用532nm激发激光和PE-Texas Red的610/20滤波器使样品经受流式细胞仪测量。给出了所分析样品的全部事件的平均荧光强度(MFI)和四个独立孔的标准偏差。

[1598] 实施例11.纳米颗粒制剂的纯化

[1599] 对HEK293和HepG2中DLin-KC2-DMA和98N12-5的纳米颗粒制剂进行测试，以确定平均荧光强度(MFI)是否取决于脂质与修饰RNA的比率和/或纯化。使用注射泵产生达到表12所述规格的DLin-KC2-DMA的三种制剂和98N12-5的两种制剂。通过SEPHADEX™ G-25DNA级(GE Healthcare,Sweden)对纯化的样品进行纯化。纯化之前和之后(aP)的每种制剂在250ng修饰RNA/孔的浓度下在24孔平板中进行测试。对于每种制剂和背景样品，当通过流式细胞仪分析时，对于FL4通道的标志物为阳性的细胞的百分比(%FL4-阳性)，以及每种制剂和背景样品的FL4通道的标志物的MFI在表13中示出。经过纯化的制剂比在纯化之前测试的那些制剂具有稍高的MFI。

[1600] 表12.制剂

[1601]

制剂编号	脂质	脂质/RNA wt/wt	平均尺寸(nm)
NPA-001-1	DLin-KC2-DMA	10	155 nm PDI：0.08
NPA-001-1 aP	DLin-KC2-DMA	10	141 nm PDI：0.14
NPA-002-1	DLin-KC2-DMA	15	140 nm PDI：0.11
NPA-002-1 aP	DLin-KC2-DMA	15	125 nm PDI：0.12
NPA-003-1	DLin-KC2-DMA	20	114 nm PDI：0.08
NPA-003-1 aP	DLin-KC2-DMA	20	104 nm PDI：0.06
NPA-005-1	98N12-5	15	127 nm PDI：0.12
NPA-005-1 aP	98N12-5	15	134 nm PDI：0.17

[1602]

NPA-006-1	98N12	20	126 nm PDI：0.08
NPA-006-1 aP	98N12	20	118 nm PDI：0.13

[1603] 表13.HEK293和HepG2,24孔,250ng修饰RNA/孔

[1604]

制剂	%FL4-阳性		FL4 MFI	
	HEK293	HepG2	HEK293	HepG2
未处理的	0.33	0.40	0.25	0.30
NPA-001-1	62.42	5.68	1.49	0.41
NPA-001-ap	87.32	9.02	3.23	0.53
NPA-002-1	91.28	9.90	4.43	0.59
NPA-002-ap	92.68	14.02	5.07	0.90
NPA-003-1	87.70	11.76	6.83	0.88
NPA-003-ap	88.88	15.46	8.73	1.06
NPA-005-1	50.60	4.75	1.83	0.46
NPA-005-ap	38.64	5.16	1.32	0.46
NPA-006-1	54.19	13.16	1.30	0.60
NPA-006-ap	49.97	13.74	1.27	0.61

[1605] 实施例12.浓度反应曲线

[1606] 在不同的浓度下对98N12-5(NPA-005)和DLin-KC2-DMA(NPA-003)的纳米颗粒制剂进行测试,以测定FL4或mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)在剂量范围内的MFI。所测试的制剂概述于表14。为了测定98N12-5的纳米颗粒制剂的最佳浓度,在HEK293的24孔平板中对不同浓度的配制的修饰RNA(100ng、10ng、1.0ng、0.1ng和0.01ng每孔)进行测试,并且各剂量的FL4MFI的结果在表15中示出。类似地,为了测定DLin-KC2-DMA的纳米颗粒制剂的最佳浓度,在HEK293的24孔平板中对不同浓度的配制的修饰RNA(250ng、100ng、10ng、1.0ng、0.1ng和0.01ng每孔)进行测试,并且各剂量的FL4MFI的结果在表16中示出。还在HEK293的24孔平板中以不同浓度的配制的修饰RNA(250ng、100ng和30ng每孔)对DLin-KC2-DMA的纳米颗粒制剂进行测试,并且各剂量的FL4MFI的结果在表17中示出。发现98N12-5的1ng/孔的剂量以及DLin-KC2-DMA的10ng/孔的剂量与背景的FL4MFI类似。

[1607] 为了测定浓度与背景相似的密切程度,我们利用了具有用于检测mCherry表达的优化过滤装置的流式细胞仪,并且能够以相对于背景水平增加的灵敏度获得结果。针对98N12-5(NPA-005)和DLin-KC2-DMA(NPA-003),分析了25ng/孔、0.25ng/孔、0.025ng/孔和0.0025ng/孔的剂量,以测定mCherry的MFI。如表18中所示,0.025ng/孔的浓度或更小浓度类似于约为386.125的mCherry的背景MFI水平。

[1608] 表14.制剂

[1609]

制剂编号	NPA-003	NPA-005
脂质	DLin-KC2-DMA	98N12-5
脂质/RNA wt/wt	20	15
平均尺寸	114 nm PDI: 0.08	106 nm PDI: 0.12

[1610] 表15.HEK293,NPA-005,24-孔,n=4

[1611]

制剂	FL4MFI
未处理的对照	0.246

NPA-005 100ng	2.2175
NPA-005 10ng	0.651
NPA-005 1.0ng	0.28425
NPA-005 0.1ng	0.27675
NPA-005 0.01ng	0.2865

[1612] 表16.HEK293,NPA-003,24-孔,n＝4

[1613]

制剂	FL4MFI
未处理的对照	0.3225
NPA-003 250ng	2.9575
NPA-003 100ng	1.255
NPA-003 10ng	0.40025
NPA-003 1ng	0.33025
NPA-003 0.1ng	0.34625
NPA-003 0.01ng	0.3475

[1614] 表17.HEK293,NPA-003,24-孔,n＝4

[1615]

制剂	FL4MFI
未处理的对照	0.27425
NPA-003 250ng	5.6075
NPA-003 100ng	3.7825
NPA-003 30ng	1.5525

[1616] 表18.浓度和MFI

[1617]

	MFI mCherry	
制剂	NPA-003	NPA-005
25 ng/孔	11963.25	12256.75
0.25 ng/孔	1349.75	2572.75
0.025 ng/孔	459.50	534.75
0.0025 ng/孔	310.75	471.75

[1618] 实施例13.手动注射和注射泵制剂

[1619] 通过手动注射(MI)和注射泵注射(SP)制备DLin-KC2-DMA和98N12-5的两种制剂，并且与背景样品一起进行分析以对不同制剂的mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)的MFI进行比较。表19示出,与具有相同脂质和脂质/RNA比的手动注射制剂相比，注射泵制剂具有较高的MFI。

[1620] 表19.制剂和MFI

[1621]

制剂编号	脂质	脂质/RNA wt/wt	平均尺寸 (nm)	配制方法	MFI
未处理的对照	N/A	N/A	N/A	N/A	674.67
NPA-002	DLin-KC2-DMA	15	140 nm PDI：0.11	MI	10318.25
NPA-002-2	DLin-KC2-DMA	15	105 nm PDI：0.04	SP	37054.75
NPA-003	DLin-KC2-DMA	20	114 nm PDI：0.08	MI	22037.5
NPA-003-2	DLin-KC2-DMA	20	95 nm PDI：0.02	SP	37868.75

[1622]

NPA-005	98N12-5	15	127 nm PDI：0.12	MI	11504.75
NPA-005-2	98N12-5	15	106 nm PDI：0.07	SP	9343.75
NPA-006	98N12-5	20	126 nm PDI：0.08	MI	11182.25
NPA-006-2	98N12-5	20	93 nm PDI：0.08	SP	5167

[1623] 实施例14.脂质纳米颗粒制剂

[1624] 将DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、98N12-5、C12-200以及DLin-MC3-DMA的制剂在60ng/孔或62.5ng/孔的浓度下在HEK293平板中并且在62.5ng/孔的浓度下在HepG2细胞的平板中孵育24小时，以测定每种制剂的mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5'帽，Cap1；用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)的MFI。所测试的制剂概述于下表20。如针对60ng/孔的表21以及针对62.5ng/孔的表22、23、24和25所示，NPA-003和NPA-018的制剂具有最高mCherry MFI，并且NPA-008、NPA-010和NPA-013的制剂与背景样品mCherry MFI值最为相似。

[1625] 表20.制剂

[1626]

制剂编号	脂质	脂质/RNA wt/wt	平均尺寸(nm)
NPA-001	DLin-KC2-DMA	10	155 nm PDI：0.08
NPA-002	DLin-KC2-DMA	15	140 nm PDI：0.11
NPA-002-2	DLin-KC2-DMA	15	105 nm PDI：0.04
NPA-003	DLin-KC2-DMA	20	114 nm PDI：0.08
NPA-003-2	DLin-KC2-DMA	20	95 nm PDI：0.02
NPA-005	98N12-5	15	127 nm PDI：0.12
NPA-006	98N12-5	20	126 nm PDI：0.08

[1627]

NPA-007	DLin-DMA	15	148 nm PDI：0.09
NPA-008	DLin-K-DMA	15	121 nm PDI：0.08
NPA-009	C12-200	15	138 nm PDI：0.15
NPA-010	DLin-MC3-DMA	15	126 nm PDI：0.09
NPA-012	DLin-DMA	20	86 nm PDI：0.08
NPA-013	DLin-K-DMA	20	104 nm PDI：0.03
NPA-014	C12-200	20	101 nm PDI：0.06
NPA-015	DLin-MC3-DMA	20	109 nm PDI：0.07

[1628] 表21.HEK293,96孔,60ng修饰RNA/孔

[1629]

制剂	MFI mCherry
未处理的	871.81
NPA-001	6407.25
NPA-002	14995
NPA-003	29499.5
NPA-005	3762
NPA-006	2676
NPA-007	9905.5
NPA-008	1648.75
NPA-009	2348.25

NPA-010	4426.75
NPA-012	11466
NPA-013	2098.25
NPA-014	3194.25
NPA-015	14524

[1630] 表22.HEK293,62.5ng/孔

[1631]

制剂	MFI mCherry
未处理的	871.81
NPA-001	6407.25
NPA-002	14995
NPA-003	29499.5
NPA-005	3762
NPA-006	2676
NPA-007	9905.5
NPA-008	1648.75
NPA-009	2348.25
NPA-010	4426.75
NPA-012	11466
NPA-013	2098.25
NPA-014	3194.25
NPA-015	14524

[1632] 表23.HEK293,62.5ng/孔

[1633]

制剂	MFI mCherry
未处理的	295
NPA-007	3504
NPA-012	8286
NPA-017	6128
NPA-003-2	17528
NPA-018	34142
NPA-010	1095
NPA-015	5859
NPA-019	3229

[1634] 表24.HepG2,62.5ng/孔

[1635]

制剂	MFI mCherry
未处理的	649.94
NPA-001	6006.25
NPA-002	8705
NPA-002-2	15860.25
NPA-003	15059.25
NPA-003-2	28881
NPA-005	1676
NPA-006	1473
NPA-007	15678
NPA-008	2976.25
NPA-009	961.75
NPA-010	3301.75
NPA-012	18333.25
NPA-013	5853

[1636]

NPA-014	2257
NPA-015	16225.75

[1637] 表25.HepG2,62.5ng/孔

[1638]

制剂	MFI mCherry
未处理的对照	656
NPA-007	16798
NPA-012	21993
NPA-017	20377
NPA-003-2	35651
NPA-018	40154
NPA-010	2496
NPA-015	19741
NPA-019	16373

[1639] 实施例15.体内制剂研究

[1640] 给啮齿动物(n＝5)静脉内、皮下或肌内施用单次剂量的含有修饰mRNA和脂质的制剂。施用至啮齿动物的修饰mRNA选自:G-CSF(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、促红细胞生成素(EPO)(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、IX因子(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,帽1)或mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。具有用于体外转录(IVT)的T7启动子、5'非翻译区(UTR)和3′UTR的促红细胞生成素cDNA在SEQ ID NO:175和SEQ ID NO:176中给出。

[1641] 每种制剂还含有选自DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、reLNP、ATUPLEX®、DACC以及DBTC中的一个的脂质。给啮齿动物注射100ug、10ug或1ug的配制的修饰mRNA,并且在特定的时间间隔收集样品。

[1642] 通过特异性G-CSF ELISA测量来自施用含有人G-CSF修饰mRNA的制剂的啮齿动物

的血清，并且通过特异性IX因子ELISA或显色测定对来自施用人IX因子修饰RNA的小鼠的血清进行分析。通过免疫组织化学(IHC)或荧光激活细胞分选(FACS)对来自施用了mCherry修饰mRNA的小鼠的肝和脾进行分析。作为对照，一组小鼠不注射任何制剂，并且收集其血清和组织，通过ELISA、FACS和/或IHC进行分析。

[1643] A.时间过程

[1644] 给啮齿动物施用含有至少一种修饰mRNA的制剂，以对所施用制剂的蛋白质表达的时间过程进行研究。在施用修饰mRNA制剂之前和之后的特定时间间隔将啮齿动物放血，以测定蛋白质表达和全血细胞计数。还从皮下和肌内施用修饰mRNA制剂的啮齿动物的施用部位收集样品，以测定组织中的蛋白质表达。

[1645] B.剂量反应

[1646] 给啮齿动物施用含有至少一种修饰mRNA的制剂，以测定每种制剂的剂量反应。在施用修饰mRNA制剂之前和之后的特定时间间隔将啮齿动物放血，以测定蛋白质表达和全血细胞计数。还将啮齿动物处死，以分析修饰mRNA制剂对内部组织的作用。还从皮下和肌内施用修饰mRNA制剂的啮齿动物的施用部位收集样品，以测定组织中的蛋白质表达。

[1647] C.毒性

[1648] 给啮齿动物施用含有至少一种修饰mRNA的制剂，以研究每种制剂的毒性。在施用修饰mRNA制剂之前和之后的特定时间间隔将啮齿动物放血，以测定蛋白质表达和全血细胞计数。还将啮齿动物处死，以分析修饰mRNA制剂对内部组织的作用。还从皮下和肌内施用修饰mRNA制剂的啮齿动物的施用部位收集样品，以测定组织中的蛋白质表达。

[1649] 实施例16.PLGA微球制剂

[1650] 用于配制PLGA微球的参数的优化可在维持包封在微球中的修饰RNA的完整性的同时，允许可调释放速率和高包封效率。例如但不限于粒度、回收率以及包封效率的参数可优化，以实现最佳配制。

[1651] A.PLGA微球的合成

[1652] 使用本领域中已知的水/油/水二次乳化方法，使用PLGA(Lactel，目录号B6010-2，固有粘度0.55-0.75，50:50LA:GA)、聚乙烯醇(PVA)(Sigma，目录号348406-25G，MW 13-23k)二氯甲烷和水合成聚乳酸乙醇酸(PLGA)微球。简单地说，将0.1ml的水(W1)添加到2ml的以范围在50-200mg/ml的PLGA的浓度下溶解于二氯甲烷(DCM)(O1)的PLGA中。将W1/O1乳液在速度4(～15,000rpm)下均化(IKA Ultra-Turrax Homogenizer，T18)30秒。然后将W1/O1乳液添加到100ml至200ml的0.3％至1％的PVA(W2)中，并且变速均化1分钟。使制剂搅拌3小时，然后通过离心(20-25min，4,000rpm，4℃)进行洗涤。弃去上清液，并且将PLGA沉淀重悬于5-10ml的水中，重复2次。在洗涤之后，通过显微镜检查测定每种制剂的平均粒度(表示20-30个颗粒)。表26示出PLGA浓度的增加导致较大尺寸的微球。200mg/mL的PLGA浓度得到14.8μm的平均粒度，100mg/mL得到8.7μm，并且50mg/mL的PLGA得到4.0μm的平均粒度。

[1653] 表26.变化的PLGA浓度

[1654]

样品ID	O1体积(mL)	PLGA浓度(mg/mL)	W2体积(mL)	PVA浓度(%)	速度	平均尺寸(μm)
1	2	200	100	0.3	5	14.8
2	2	100	100	0.3	5	8.7
3	2	50	100	0.3	5	4.0

[1655] 表27示出将均化速度从5(～20,000rpm)降至速度4(～15,000rpm)导致粒度从14.8μm增加至29.7μm。

[1656] 表27.变化的均化速度

[1657]

样品ID	O1体积(mL)	PLGA浓度(mg/mL)	W2体积(mL)	PVA浓度(%)	速度	平均尺寸(μm)
1	2	200	100	0.3	5	14.8
4	2	200	100	0.3	4	29.7

[1658] 表28示出,增加W2体积(即,将W2:O1的比从50:1增加至100:1)略微降低平均粒度。将PVA浓度从0.3wt%改变为1wt%对PLGA微球尺寸具有极小影响。

[1659] 表28.变化的W2体积和浓度

[1660]

样品ID	O1体积(mL)	PLGA浓度(mg/mL)	W2体积(mL)	PVA浓度(%)	速度	平均尺寸(μm)
1	2	200	100	0.3	5	14.8
5	2	200	200	0.3	5	11.7
6	2	200	190	0.3	5	11.4
7	2	200	190	1.0	5	12.3

[1661] B.修饰mRNA的包封

[1662] 将修饰的G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)以2mg/ml的浓度溶解于水中(W3)。以以下参数如上所述制备三批PLGA微球制剂:0.1ml的2mg/ml的W3、1.6ml的200mg/ml的O1、160ml的1%的W2,并且对于第一乳液(W3/O1),在4的速度下均化,对于第二乳液(W3/O1/W2),在5的速度下均化。通过离心洗涤之后,将制剂冰冻于液氮中,然后冻干3天。为了测试制剂的包封效率,将冻干的材料在DCM中解聚6小时,之后在水中提取过夜。然后通过OD260测定样品中修饰RNA的浓度。通过获取修饰RNA的实际量,并除以修饰RNA的起始量来计算包封效率。在所测试的三个批次中,包封效率为59.2、49.8和61.3。

[1663] C.包封在PLGA微球中的修饰mRNA的完整性

[1664] 将修饰的IX因子mRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)以不同的浓度溶解于水中(W4),以改变负载在制剂中的重量百分比(mg修饰RNA/mg PLGA*100)并且测定包封效率。使用表29中的参数来制备四个不同批次的PLGA微球制剂,其中第一乳液(W4/O1)的均化速度为4并且第二乳液(W4/O1/W2)的均化速度为5。

[1665] 表29.IX因子PLGA微球制剂参数

[1666]

ID	W4体积(uL)	IX因子浓度(mg/ml)	IX因子量(ug)	O1体积(ml)	PLGA浓度(mg/ml)	W2体积(ml)	PVA浓度(%)	重量%(wt%)负载
A	100	2.0	200.0	2.0	200	200	1.0	0.05
B	100	4.0	400.0	2.0	200	200	1.0	0.10
C	400	2.0	800.0	2.0	200	200	1.0	0.20
D	400	4.0	1600.0	2.0	200	200	1.0	0.40

[1667] 冻干之后,在2ml eppendorf管中称出对应于～10ug修饰RNA的PLGA微球。发现冻干未破坏PLGA微球的总体结构。为了增加PLGA微球的重量百分比负载(wt%),向样品中添加增大的量的修饰RNA。通过向每个管中添加1.0ml的DCM并且然后将样品振荡6小时来使PLGA微球解聚。对于修饰RNA提取,将0.5ml的水添加到每个样品中,将样品振荡过夜,之后通过OD260测定样品中修饰RNA的浓度。为了测定提取过程的回收,将未配制的IX因子修饰RNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)(解聚对照)加入DCM中,并经受解聚过程。表30示出样品的负载和包封效率。将所有包封效率样品根据解聚对照归一化。

[1668] 表30.重量百分比负载和包封效率

[1669]

ID	理论修饰RNA负载(wt%)	实际修饰RNA负载(wt%)	包封效率(%)
A	0.05	0.06	97.1
B	0.10	0.10	85.7
C	0.20	0.18	77.6
D	0.40	0.31	68.1
对照	-	-	100.0

[1670] D.包封在PLGA微球中的修饰mRNA的释放研究

[1671] 将用IX因子修饰RNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制的PLGA微球如上所述解聚,并通过自动电泳(Bio-Rad Experion)测定所提取的修饰RNA的完整性。将所提取的修饰mRNA与未配制的修饰mRNA以及解聚对照进行比较,以便测试包封的修饰mRNA的完整性。如图4中所示,对于批次ID A、B、C和D,对于解聚对照(脱成型对照)以及未配制对照(未成型对照)来说,大多数modRNA是完整的。

[1672] E.包封在PLGA微球中的修饰mRNA的蛋白质表达

[1673] 将用IX因子修饰RNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制的PLGA微球如上所述解聚,并通过体外转染测定对所提取的修饰RNA的蛋白质表达进行测定。用250ng的与RNAiMAX(Invitrogen)复合的IX因子修饰RNA一式三份逆向转染HEK293细胞。

[1674] 将IX因子修饰RNA在不含核酸酶的水中稀释至25ng/μl的浓度,并且将RNAiMAX在不含血清的EMEM中稀释13.3x。将等体积的稀释的修饰RNA和稀释的RNAiMAX混合在一起,并且允许其在室温下静置20至30分钟。随后,将20μl的含有250ng IX因子修饰RNA的转染混合

物添加到80μl的含有30,000个细胞的细胞混悬液中。然后将细胞在加湿的37℃/5%CO2细胞培养箱中孵育16h,之后收获细胞培养物上清液。通过对IX因子特异性的ELISA试剂盒(Molecular Innovations,目录号HFIXKT-TOT)对细胞上清液中的IX因子蛋白质表达进行分析,蛋白质表达在表31和图5中示出。在所测试的所有PLGA微球批次中,IX因子修饰RNA在配制于PLGA微球并随后解聚之后保持活性并且表达IX因子。

[1675] 表31.蛋白质表达

[1676]

样品	IX 因子蛋白质表达 (ng/ml)
批次 A	0.83
批次 B	1.83
批次 C	1.54
批次 D	2.52
解聚对照	4.34
未配制对照	3.35

[1677] F.包封在PLGA微球中的修饰mRNA的释放研究

[1678] 将用IX因子修饰RNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制的PLGA微球重悬于水中,至24mg/ml的PLGA微球浓度。重悬之后,将150ul的PLGA微球混悬液等分到eppendorf管中。在研究过程期间,将样品保持在37℃下孵育并振荡。在第0.2、1、2、8、14和21天,一式三份地抽取样品。为了测定从PLGA微球中释放的修饰RNA的量,将样品离心,去除上清液,并通过OD 260测定上清液中修饰RNA的浓度。表32中所示的释放百分比基于每个样品中修饰RNA的总量进行计算。31天之后,从PLGA微球制剂中释放出96%的IX因子修饰RNA。

[1679] 表32.释放百分比

[1680]

时间(天)	%释放
0	0.0
0.2	27.0

[1681]

1	37.7
2	45.3
4	50.9
8	57.0
14	61.8
21	75.5
31	96.4

[1682] G.PLGA微球的粒度重现性

[1683] 使用表29中所示针对批次D所描述的相同条件(0.4ml的4mg/ml的W4、2.0ml的200mg/ml的O1、200ml的1%的W2,并且对于W4/O1/W2乳液,在5的速度下均化)制备了三个批次的IX因子修饰RNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)PLGA微球。为了改善PLGA微球混悬液的均匀性,在离心之前并入过滤。在搅拌3小时之后并且在离心之前,使所有配制

的材料通过100μm尼龙网过滤器(Fisherbrand Cell Strainer,目录号22-363-549),以去除较大的聚集物。在洗涤并用水重悬之后,使用100-200μl的PLGA微球样品,通过激光衍射(Malvern Mastersizer2000)测量制剂的粒度。样品的粒度在表33中示出。

[1684] 表33.粒度汇总

[1685]

ID	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)	体积加权平均值(um)	过滤
对照	19.2	62.5	722.4	223.1	否
A	9.8	31.6	65.5	35.2	是
B	10.5	32.3	66.9	36.1	是
C	10.8	35.7	79.8	41.4	是

[1686] 将使用过滤的3个PLGA微球批次的结果与在相同条件下不进行过滤所制备的PLGA微球批次相比较。在洗涤之前包括过滤步骤减小了平均粒度并且表明了3个PLGA微球批次之间一致的粒度分布。

[1687] H.IX因子PLGA微球的血清稳定性

[1688] 将在缓冲液(TE)或90%血清(Se)中的IX因子mRNA RNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰),或在缓冲液、90%血清或1%血清中的PLGA中的IX因子mRNA在总体积为70ul的缓冲液、90%血清或1%血清中在50ng/ul的mRNA浓度下孵育。在0分钟、30分钟、60分钟或120分钟时移除样品。通过添加25ul的4x蛋白酶K缓冲液(0.4ml 1M TRIS-HCl(pH 7.5)、0.1ml 0.5M EDTA、0.12ml 5M NaCl和0.4ml 10%SDS)和8ul的20mg/ml的蛋白酶K,用蛋白酶K在55℃下消化20分钟使RNA酶失活。使IX因子mRNA沉淀(添加250ul 95%乙醇,持续1小时,在13k rpm下离心10min并去除上清液,向沉淀添加200ul 70%乙醇,再次在13k rpm下离心5min并去除上清液并将沉淀重悬于70ul水中)或从PLGA微球中提取(在13k rpm下离心5min并去除上清液,用1ml水洗涤沉淀,在13k rpm下离心5min并去除上清液,向沉淀添加280ul二氯甲烷并振荡15分钟,添加70ul水,然后振荡2小时,并且去除水相),之后通过生物分析仪进行分析。PLGA微球保护IX因子修饰mRNA在90%和1%血清中历经2小时不降解。IX因子修饰mRNA在90%血清中在初始时间点完全降解。

[1689] 实施例17.脂质纳米颗粒体内研究

[1690] 使用注射泵法将G-CSF(具有用于体外转录的T7启动子、5'非翻译区(UTR)和3'UTR的cDNA在SEQ ID NO:169中给出。SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)和IX因子(具有用于体外转录的T7启动子、5'UTR和3'UTR的cDNA在SEQ ID NO:177中给出。在SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap 1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)修饰mRNA配制为脂质纳米颗粒(LNP)。以20:1的总脂质与修饰mRNA的重量比配制LNP,并且最终脂质摩尔比为50:10:38.5:1.5(DLin-KC2-DMA:DSPC:胆固醇:PEG-c-DOMG)。通过粒度、ζ电势以及包封对表34中列出的制剂进行表征。

[1691] 表34.制剂

[1692]

制剂编号	NPA-029-1	NPA-030-1
修饰 mRNA	IX 因子	G-CSF
平均尺寸	91 nm PDI：0.04	106 nm PDI：0.06
在 pH 7.4 下的 ζ	1.8 mV	0.9 mV
包封 (RiboGr)	92%	100%

[1693] 以100ug、10ug或1ug的修饰mRNA剂量向小鼠(n＝5)静脉内施用LNP制剂。在给药8小时之后将小鼠处死。通过心脏穿刺从施用了G-CSF或IX因子修饰mRNA制剂的小鼠中收集血清。通过ELISA测定蛋白质表达。

[1694] G-CSF或IX因子剂量组中没有显著的体重损失(<5%)。通过ELISA,由标准曲线测定G-CSF或IX因子剂量组的蛋白质表达。将血清样品稀释(对于G-CSF,约20-2500x,并且对于IX因子,约10-250x),以确保样品在标准曲线的线性范围内。如表35所示,通过ELISA测定的G-CSF蛋白表达对于1ug、10ug和100ug剂量组分别为大约17ng/ml、1200ng/ml和4700ng/ml。如表36中所示,通过ELISA测定的IX因子蛋白质表达对于1ug、10ug和100ug剂量组分别为大约36ng/ml、380ng/ml和3000-11000ng/ml。

[1695] 表35.G-CSF蛋白表达

[1696]

剂量(ug)	浓度(ng/ml)	稀释因子	样品体积
1	17.73	20x	5ul
10	1204.82	2500x	0.04ul
100	4722.20	2500x	0.04ul

[1697] 表36.IX因子蛋白质表达

[1698]

剂量(ug)	浓度(ng/ml)	稀释因子	样品体积
1	36.05	10x	5ul
10	383.04	10x	5ul
100*	3247.75	50x	1ul
100*	11177.20	250x	0.2ul

[1699] 如表37所示,与施用相同剂量的修饰mRNA的静脉内(IV)-脂质复合物制剂以及肌内(IM)或皮下(SC)施用相同剂量的在盐水中的修饰mRNA相比,上述LNP制剂的蛋白质产量增加了约10,000-100,000倍。如表37中所使用,符号“～”是指约。

[1700] 表37.蛋白质产量

[1701]

G-CSF	剂量(ug)	施用后8-12小时的血清浓度(pg/ml)
IM	100	～20-80
SC	100	～10-40
IV(脂复合物)	100	～30
IV(LNP)	100	～5,000,000
IV(LNP)	10	～1,000,000
IV(LNP)	1	～20,000

IX因子	剂量(ug)	施用后8-12小时的血清浓度(ng/ml)
IM	2x 100	～1.6ng/ml
IV(LNP)	100	～3,000-10,000ng/ml
IV(LNP)	10	～400ng/ml
IV(LNP)	1	～40ng/ml

[1702] 实施例18-23的材料和方法

[1703] 使用注射泵法将G-CSF(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)和EPO(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)修饰mRNA配制为脂质纳米颗粒(LNP)。以20:1的总脂质与修饰mRNA的重量比配制LNP,并且最终脂质摩尔比为50:10:38.5:1.5(DLin-KC2-DMA:DSPC:胆固醇:PEG-c-DOMG)。通过粒度、ζ电势以及包封对表38中列出的制剂进行表征。

[1704] 表38.制剂

[1705]

制剂编号	**NPA-030-2**	**NPA-060-1**
修饰 mRNA	G-CSF	EPO
平均尺寸	84 nm PDI: 0.04	85 nm PDI: 0.03
在 pH 7.4 下的 ζ	0.8 mV	1.5 mV
包封(RiboGreen)	95%	98%

[1706] 实施例18.使用修饰mRNA进行脂质纳米颗粒的体内研究

[1707] 以0.05mg/kg的单次修饰mRNA剂量向大鼠(n＝5)静脉内(IV)、肌内(IM)或皮下(SC)施用表38(上文)所示的LNP制剂。大鼠对照组(n＝4)未处理。在2小时、8小时、24小时、48小时和96小时并且在大鼠施用了G-CSF或EPO修饰mRNA制剂之后将大鼠放血,以使用ELISA测定蛋白质表达。静脉内施用EPO修饰mRNA的大鼠还在第7天放血。

[1708] 如表39所示,静脉内施用修饰的EPO mRNA的大鼠中的EPO蛋白表达至第5天是可检测出的。静脉内施用修饰的G-CSF mRNA的大鼠中的G-CSF至第7天是可检测的。EPO修饰mRNA的皮下和肌内施用至至少24小时是可检测的,并且G-CSF修饰mRNA至至少8小时是可检测的。在表39中,"OSC"是指标准曲线外部的值,"NT"是指未测试的。

[1709] 表39.G-CSF和EPO蛋白表达

[1710]

途径	**时间**	**EPO 血清浓度(pg/ml)**	**G-CSF 血清浓度(pg/ml)**
IV	2 小时	36,981.0	31,331.9
IV	8 小时	62,053.3	70,532.4
IV	24 小时	42,077.0	5,738.6
IV	48 小时	5,561.5	233.8

[1711]

IV	5 天	0.0	60.4
IV	7 天	0.0	NT
IM	2 小时	1395.4	1620.4
IM	8 小时	8974.6	7910.4
IM	24 小时	4678.3	893.3
IM	48 小时	NT	OSC
IM	5 天	NT	OSC
SC	2 小时	386.2	80.3
SC	8 小时	985.6	164.2
SC	24 小时	544.2	OSC
SC	48 小时	NT	OSC
SC	5 天	NT	OSC
未处理的	全血	0	0

[1712] 实施例19.时间过程体内研究

[1713] 以0.5mg/kg、0.05mg/kg或0.005mg/kg的单次修饰mRNA剂量向小鼠(n=5)静脉内(IV)施用表38(上文)所示的LNP制剂。在给小鼠施用了G-CSF或EPO修饰mRNA制剂之后8小时、24小时、72小时和6天将小鼠放血,以使用ELISA测定蛋白质表达。

[1714] 如表40所示,静脉内施用修饰mRNA的小鼠中的EPO和G-CSF蛋白表达对于以0.005mg/kg和0.05mg/kg的修饰mRNA给药的小鼠来说至72小时是可检测出的,并且对于施用EPO修饰mRNA的小鼠来说至第6天是可检测出的。在表40中,“>”是指大于,并且“ND”是指未检测的。

[1715] 表40.蛋白质表达

[1716]

剂量(mg/kg)	时间	EPO 血清浓度(pg/ml)	G-CSF 血清浓度(pg/ml)
0.005	8 小时	12,508.3	11,550.6
0.005	24 小时	6,803.0	5,068.9
0.005	72 小时	ND	ND
0.005	6 天	ND	ND
0.05	8 小时	92,139.9	462,312.5
0.05	24 小时	54,389.4	80,903.8
0.05	72 小时	ND	ND
0.05	6 天	ND	ND
0.5	8 小时	498,515.3	>1,250,000
0.5	24 小时	160,566.3	495,812.5
0.5	72 小时	3,492.5	1,325.6
0.5	6 天	21.2	ND

[1717]

[1718] 实施例20.啮齿动物中的LNP制剂体内研究

[1719] A.小鼠中的LNP制剂

[1720] 以0.05mg/kg或0.005mg/kg的单次修饰mRNA剂量向小鼠(n=4)静脉内(IV)施用表38(上文)所示的LNP制剂。还存在3个未处理的小鼠对照组(n=4)。在施用了G-CSF或EPO修饰mRNA制剂之后2小时、8小时、24小时、48小时和72小时将小鼠放血,以测定蛋白质表达。G-CSF和EPO的蛋白质表达使用ELISA来测定。

[1721] 如表41所示,小鼠中的EPO和G-CSF蛋白表达对于接受0.005mg/kg修饰RNA剂量的小鼠来说至少至48小时是可检测出的,并且对于接受0.05mg/kg修饰RNA剂量的小鼠来说至少至72小时是可检测出的。在表41中,"OSC"是指标准曲线外部的值,"NT是指未测试的。"

[1722] 表41.小鼠中的蛋白质表达

[1723]

剂量(mg/kg)	时间	EPO 血清浓度(pg/ml)	G-CSF 血清浓度(pg/ml)
0.005	2 小时	OSC	3,447.8
0.005	8 小时	1,632.8	11,454.0
0.005	24 小时	1,141.0	4,960.2
0.005	48 小时	137.4	686.4
0.005	72 小时	0	NT
0.05	2 小时	10,027.3	20,951.4
0.05	8 小时	56,547.2	70,012.8

[1724]

0.05	24 小时	25,027.3	19,356.2
0.05	48 小时	1,432.3	1,963.0
0.05	72 小时	82.2	47.3

[1725] B.啮齿动物中的LNP制剂

[1726] 以0.05mg/kg的单次修饰mRNA剂量向大鼠(n=4)静脉内(IV)施用表38(上文)所示的LNP制剂。还存在1个未处理的大鼠对照组(n=4)。在施用G-CSF或EPO修饰mRNA制剂后2小时、8小时、24小时、48小时、72小时、7天和14天将大鼠放血,以测定蛋白质表达。G-CSF和EPO的蛋白质表达使用ELISA来测定。

[1727] 实施例21.LNP的早期时间过程研究

[1728] 以0.5mg/kg、0.05mg/kg或0.005mg/kg的单次修饰mRNA剂量向哺乳动物静脉内(IV)、肌内(IM)或皮下(SC)施用表38(上文)所示的LNP制剂。哺乳动物对照组未处理。在施用修饰mRNA LNP制剂后5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、1小时、1.5小时和/或2小时将哺乳动物放血,以使用ELISA测定蛋白质表达。还将哺乳动物放血,以测定全血细胞计数如粒细胞水平和红血细胞计数。

[1729] 实施例22.非人灵长类动物体内研究

[1730] 使用皮下针头将表38(上文)所示的LNP制剂作为弹丸式静脉内注射(IV)历经大约

30秒施用至非人灵长类动物(NHP)(食蟹猴)(n=2),所述皮下针头可根据需要附接至注射器/套管针(abbocath)或蝶形阀。以0.5mL/kg的剂量体积向NHP施用0.05mg/kg的单次修饰mRNA IV剂量的EPO或G-CSF或0.005mg/kg的EPO。在给予修饰mRNA LNP制剂之前5-6天将NHP放血,以测定血清中的蛋白质表达和基线全血细胞计数。在施用修饰mRNA制剂之后,在第8小时、第24小时、第48小时和第72小时将NHP放血,以测定蛋白质表达。在施用后24小时和72小时,还测定NHP的全血细胞计数。G-CSF和EPO的蛋白质表达通过ELISA来测定。在整个实验过程中收集来自NHP的尿液并且进行分析以评价临床安全性。在施用G-CSF或EPO修饰mRNA制剂之后,从NHP收集样品,以使用ELISA测定蛋白质表达。还对非人灵长类动物的临床化学、血液学、尿分析以及细胞因子进行分析。

[1731] 如表42所示,施用0.05mg/kg的NHP中的EPO蛋白表达至72小时是可检测出的,并且EPO制剂的0.005mg/kg给予至48小时是可检测出的。在表42中,"<"是指小于给定值。在施用修饰mRNA制剂后24小时观察到G-CSF蛋白表达。初步地,在施用修饰mRNA制剂之后的NHP中观察到粒细胞和网织红细胞水平的增加。

[1732] 表42.非人灵长类动物中的蛋白质表达

[1733]

修饰mRNA	剂量(mg/kg)	时间	雌性 NHP 血清浓度(pg/ml)	雄性 NHP 血清浓度(pg/ml)	平均血清浓度(pg/ml)
G-CSF	0.05	前血	0	0	0
		8 小时	3289	1722	2,506
		24 小时	722	307	515
		48 小时	0	0	0
		72 小时	0	0	0
EPO	0.05	前血	0	0	0
		8 小时	19,858	7,072	13,465
		24 小时	18,178	4,913	11,546
		48 小时	5,291	498	2,895
		72 小时	744	60	402
EPO	0.005	前血	0	0	0
		8 小时	523	250	387
		24 小时	302	113	208
		48 小时	<7.8	<7.8	<7.8
		72 小时	0	0	0

[1734] 实施例23.G-CSF和EPO的非人灵长类动物体内研究

[1735] 将表38(上文)所示的LNP制剂作为静脉内注射(IV)施用至非人灵长类动物(NHP)(食蟹猴)(n=2)。以0.5mL/kg的剂量体积向NHP施用0.5mg/kg、0.05mg/kg或0.005mg/kg的单次修饰mRNA IV剂量的G-CSF或EPO。在给予修饰mRNA LNP制剂之前将NHP放血,以测定血清中的蛋白质表达和基线全血细胞计数。在施用G-CSF修饰mRNA制剂之后,在第8小时、第24小时、第48小时和第72小时将NHP放血,以测定蛋白质表达。在施用EPO修饰mRNA制剂之后,在第8小时、第24小时、第48小时、第72小时以及第7天将NHP放血,以测定蛋白质表达。

[1736] 通过ELISA对从施用G-CSF或EPO修饰mRNA制剂后的NHP中收集的样品进行分析,以

测定蛋白质表达。在给药前、施用修饰的G-CSF或EPO制剂后24小时、3天、7天、14天和18天，还对中性粒细胞和网织红细胞计数进行测定。

[1737] 如表43所示，超过72小时后未检测到G-CSF蛋白表达。在表43中，“<39”是指低于39pg/ml的检测下限的值。

[1738] 表43.G-CSF蛋白表达

[1739]

修饰 mRNA	剂量 (mg/kg)	时间	雌性 NHP 血清 G-CSF 浓度(pg/ml)	雄性 NHP 血清 G-CSF 浓度 (pg/ml)
G-CSF	0.5	前血	<39	<39
		8 小时	43,525	43,594
		24 小时	11,374	3,628
		48 小时	1,100	833
		72 小时	<39	306
G-CSF	0.05	前血	<39	<39
		8 小时	3,289	1,722
		24 小时	722	307
		48 小时	<39	<39
		72 小时	<39	<39
G-CSF	0.005	前血	<39	<39
		8 小时	559	700
		24 小时	155	<39
		48 小时	<39	<39
		72 小时	<39	<39

[1740] 如表44所示，超过7天后未检测到EPO蛋白表达。在表44中，“<7.8”是指低于7.8pg/ml的检测下限的值。

[1741] 表44.EPO蛋白表达

[1742]

修饰 mRNA	剂量(mg/kg)	时间	雌性 NHP 血清 EPO 浓度(pg/ml)	雄性 NHP 血清 EPO 浓度(pg/ml)
EPO	0.5	前血	<7.8	<7.8
		8 小时	158,771	119,086
		24 小时	133,978	85,825
		48 小时	45,250	64,793
		72 小时	15,097	20,407
		7 天	<7.8	<7.8
EPO	0.05	前血	<7.8	<7.8
		8 小时	19,858	7,072
		24 小时	18,187	4,913
		48 小时	5,291	498
		72 小时	744	60
		7 天	<7.8	<7.8
EPO	0.005	前血	<7.8	<7.8
		8 小时	523	250
		24 小时	302	113
		48 小时	11	29
		72 小时	<7.8	<7.8
		7 天	<7.8	<7.8

[1743] 如表45所示,所有G-CSF组的中性粒细胞相对于给药前水平有所增加。

[1744] 表45.G-CSF mRNA在NHP中的药理学作用

[1745]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF)中性粒细胞(10^9/L)	雌性 NHP (G-CSF)中性粒细胞(10^9/L)	雄性 NHP (EPO)中性粒细胞(10^9/L)	雌性 NHP (EPO)中性粒细胞(10^9/L)
0.5	给药前	1.53	1.27	9.72	1.82
	24 小时	14.92	13.96	7.5	11.85
	3 天	9.76	13.7	11.07	5.22
	7 天	2.74	3.81	11.8	2.85
	14/18 天	2.58	1.98	7.16	2.36

[1746]

0.05	给药前	13.74	3.05	0.97	2.15
	24 小时	19.92	29.91	2.51	2.63
	3 天	7.49	10.77	1.73	4.08
	7 天	4.13	3.8	1.23	2.77
	14/18 天	3.59	1.82	1.53	1.27
0.005	给药前	1.52	2.54	5.46	5.96
	24 小时	16.44	8.6	5.37	2.59
	3 天	3.74	1.78	6.08	2.83
	7 天	7.28	2.27	3.51	2.23
	14/18 天	4.31	2.28	1.52	2.54

[1747] 如表46所示，在给药后3天至14/18天，所有EPO组的网织红细胞相对于给药后24小时的网织红细胞水平有所增加。

[1748] 表46.EPO mRNA对中性粒细胞计数的药理学作用

[1749]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF)中性粒细胞 (10^{12}/L)	雌性 NHP (G-CSF)中性粒细胞(10^{12}/L)	雄性 NHP (EPO)中性粒细胞(10^{12}/L)	雌性 NHP (EPO)中性粒细胞(10^{12}/L)
0.5	给药前	0.067	0.055	0.107	0.06
	24 小时	0.032	0.046	0.049	0.045
	3 天	0.041	0.017	0.09	0.064
	7 天	0.009	0.021	0.35	0.367
	14/18 天	0.029	0.071	0.066	0.071
0.05	给药前	0.055	0.049	0.054	0.032
	24 小时	0.048	0.046	0.071	0.04
	3 天	0.101	0.061	0.102	0.105
	7 天	0.157	0.094	0.15	0.241
	14/18 天	0.107	0.06	0.067	0.055
0.005	给药前	0.037	0.06	0.036	0.052
	24 小时	0.037	0.07	0.034	0.061
	3 天	0.037	0.054	0.079	0.118
	7 天	0.046	0.066	0.049	0.087
	14/18 天	0.069	0.057	0.037	0.06

[1750] 如表47-49所示，EPO修饰RNA的施用对包括血红蛋白(HGB)、血细胞比容(HCT)和红血细胞(RBC)计数的其它促红细胞生成素参数有影响。

[1751] 表47.EPO mRNA对血红蛋白的药理学作用

[1752]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF) HGB (g/L)	雌性 NHP (G-CSF) HGB (g/L)	雄性 NHP (EPO) HGB (g/L)	雌性 NHP (EPO) HGB (g/L)
0.5	给药前	133	129	134	123
	24 小时	113	112	127	108
	3 天	118	114	126	120
	7 天	115	116	140	134
	14/18 天	98	113	146	133
0.05	给药前	137	129	133	133
	24 小时	122	117	123	116
	3 天	126	115	116	120
	7 天	126	116	126	121
	14/18 天	134	123	133	129
0.005	给药前	128	129	132	136
	24 小时	117	127	122	128
	3 天	116	127	125	130
	7 天	116	129	119	127
	14/18 天	118	129	128	129

[1753] 表48.EPO mRNA对血细胞比容的药理学作用

[1754]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF) HCT (L/L)	雌性 NHP (G-CSF) HCT (L/L)	雄性 NHP (EPO) HCT (L/L)	雌性 NHP (EPO) HCT (L/L)
0.5	给药前	0.46	0.43	0.44	0.4
	24 小时	0.37	0.38	0.4	0.36
	3 天	0.39	0.38	0.41	0.39
	7 天	0.39	0.38	0.45	0.45
	14/18 天	0.34	0.37	0.48	0.46
0.05	给药前	0.44	0.44	0.45	0.43
	24 小时	0.39	0.4	0.43	0.39
	3 天	0.41	0.39	0.38	0.4
	7 天	0.42	0.4	0.45	0.41
	14/18 天	0.44	0.4	0.46	0.43
0.005	给药前	0.42	0.42	0.48	0.45
	24 小时	0.4	0.42	0.42	0.43
	3 天	0.4	0.41	0.44	0.42
	7 天	0.39	0.42	0.41	0.42
	14/18 天	0.41	0.42	0.42	0.42

[1755] 表49.EPO mRNA对红血细胞的药理学作用

[1756]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF) RBC (10^{12}/L)	雌性 NHP (G-CSF) RBC (10^{12}/L)	雄性 NHP (EPO) RBC (10^{12}/L)	雌性 NHP (EPO) RBC (10^{12}/L)
0.5	给药前	5.57	5.57	5.43	5.26
	24 小时	4.66	4.96	5.12	4.69
	3 天	4.91	4.97	5.13	5.15
	7 天	4.8	5.04	5.55	5.68
	14/18 天	4.21	4.92	5.83	5.72
0.05	给药前	5.68	5.64	5.57	5.84
	24 小时	4.96	5.08	5.25	5.18
	3 天	5.13	5.04	4.81	5.16
	7 天	5.17	5.05	5.37	5.31
	14/18 天	5.43	5.26	5.57	5.57
0.005	给药前	5.67	5.36	6.15	5.72
	24 小时	5.34	5.35	5.63	5.35
	3 天	5.32	5.24	5.77	5.42
	7 天	5.25	5.34	5.49	5.35
	14/18 天	5.37	5.34	5.67	5.36

[1757] 如表50和51所示，修饰RNA的施用对包括丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的血清化学参数有影响。

[1758] 表50.EPO mRNA对丙氨酸转氨酶的药理学作用

[1759]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF) ALT (U/L)	雌性 NHP (G-CSF) ALT (U/L)	雄性 NHP (EPO) ALT (U/L)	雌性 NHP (EPO) ALT (U/L)
0.5	给药前	29	216	50	31
	2 天	63	209	98	77
	4 天	70	98	94	87
	7 天	41	149	60	59
	14 天	43	145	88	44
0.05	给药前	58	53	56	160
	2 天	82	39	95	254
	4 天	88	56	70	200
	7 天	73	73	64	187
	14 天	50	31	29	216
0.005	给药前	43	51	45	45

[1760]

	2 天	39	32	62	48
	4 天	48	58	48	50
	7 天	29	55	21	48
	14 天	44	46	43	51

[1761] 表51.EPO mRNA对天冬氨酸转氨酶的药理学作用

[1762]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF) AST (U/L)	雌性 NHP (G-CSF) AST (U/L)	雄性 NHP (EPO) AST (U/L)	雌性 NHP (EPO) AST (U/L)
0.5	给药前	32	47	59	20
	2 天	196	294	125	141
	4 天	67	63	71	60
	7 天	53	68	56	47
	14 天	47	67	82	44
0.05	给药前	99	33	74	58
	2 天	95	34	61	80
	4 天	69	42	48	94
	7 天	62	52	53	78
	14 天	59	20	32	47
0.005	给药前	35	54	39	40
	2 天	70	34	29	25
	4 天	39	36	43	55
	7 天	28	31	55	31
	14 天	39	20	35	54

[1763] 如表52所示,脂质纳米颗粒-配制的修饰RNA在高剂量(0.5mg/kg)下的施用造成修饰mRNA施用之后细胞因子、干扰素-α(IFN-α)的增加。

[1764] 表52.EPO mRNA对丙氨酸转氨酶的药理学作用

[1765]

剂量 (mg/kg)	时间	雄性 NHP (G-CSF) IFN-α (pg/mL)	雌性 NHP (G-CSF) IFN-α (pg/mL)	雄性 NHP (EPO) IFN-α (pg/mL)	雌性 NHP (EPO) IFN-α (pg/mL)
0.5	给药前	0	0	0	0
	1 天+8 小时	503.8	529.2	16.79	217.5
	4 天	0	0	0	0
0.05	给药前	0	0	0	0
	1 天+8 小时	0	0	0	0

[1766]

	4 天	0	0	0	0
0.005	给药前	0	0	0	0
	1 天+8 小时	0	0	0	0
	4 天	0	0	0	0

[1767] 实施例24.在非人灵长类动物中肌内和/或皮下施用的研究

[1768] 将在盐水中的含有修饰的EPO mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)或G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)的制剂肌内(IM)或皮下(SC)施用

至非人灵长类动物(食蟹猴)(NHP)。0.05mg/kg或0.005mg/kg的单次修饰mRNA剂量处于0.5mL/kg的剂量体积中。在给药之前5-6天将非人灵长类动物放血,以测定血清蛋白浓度和基线全血细胞计数。在施用修饰mRNA制剂之后,在第8小时、第24小时、第48小时、第72小时、第7天以及第14天将NHP放血,以测定蛋白质表达。G-CSF和EPO的蛋白质表达通过ELISA来测定。在施用后24小时、72小时、7天和14天还对NHP的全血细胞计数进行测定。在整个实验过程中收集来自NHP的尿液并且进行分析以评价临床安全性。还收集注射部位附近的组织并进行分析,以测定蛋白质表达。

[1769] 实施例25.修饰mRNA的运输

[1770] 为了测定修饰mRNA的定位和/或运输,可如下执行研究。

[1771] 根据本领域已知和/或本文所述的方法配制siRNA和修饰mRNA的LNP制剂。LNP制剂可包括至少一种修饰mRNA,其可编码蛋白质,如G-CSF、EPO、VII因子和/或本文所述的任何蛋白质。可使用肌内或皮下注射将制剂局部地施用至哺乳动物的肌肉中。修饰mRNA的剂量和LNP的尺寸可变化,以测定对在哺乳动物体内运输的作用和/或评估对生物反应(例如但不限于炎症)的影响。可在不同的时间点将哺乳动物放血,以测定存在于血清中的由所施用的修饰mRNA编码的蛋白质的表达和/或测定哺乳动物中的全血细胞计数。

[1772] 例如,可肌内和/或皮下施用编码在肝中表达并分泌到血清中的VII因子的修饰mRNA。在修饰mRNA施用的同时或之前,施用siRNA以敲除内源VII因子。由肌内和/或皮下注射所施用的修饰mRNA产生的VII因子在血液中进行测量。并且,VII因子的水平在注射部位附近的组织中进行测量。如果VII因子在血液中表达,那么存在修饰mRNA的运输。如果VII因子在组织中表达而不在血液中表达,那么仅存在VII因子的局部表达。

[1773] 实施例26.具有多种修饰mRNA的制剂

[1774] 根据本领域已知和/或本文所述的或本领域已知的方法配制修饰mRNA的LNP制剂。LNP制剂可包括至少一种修饰mRNA,其可编码蛋白质,如G-CSF、EPO、血小板生成素和/或本文所述的任何蛋白质。至少一种修饰mRNA可包括1、2、3、4或5种修饰mRNA分子。含有至少一种修饰mRNA的制剂可以单次或多次给药方案静脉内、肌内或皮下施用。可在施用至少一种修饰mRNA制剂之前和/或之后,在不同的时间点收集例如但不限于血液和/或血清的生物样品并进行分析。在哺乳动物施用过含有编码蛋白质的至少一种修饰mRNA的制剂之后,所述蛋白质在生物样品中50-200pg/ml的表达视为生物有效的。

[1775] 实施例27.聚乙二醇比率研究

[1776] A.PEG LNP的配制和表征

[1777] 使用注射泵法配制脂质纳米颗粒(LNP)。以20:1的总脂质与修饰的G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)的重量比来配制LNP。制剂的摩尔比范围在表53中示出。

[1778] 表53.摩尔比

[1779]

	DLin-KC2-DMA	DSPC	胆固醇	PEG-c-DOMG
摩尔百分比(mol%)	50.0	10.0	37-38.5	1.5-3

[1780] 在1.5mol％或3.0mol％下对两种类型的PEG脂质1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG,NOF目录号SUNBRIGHT®GM-020)和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DSG,NOF目录号SUNBRIGHT®GS-020)进行测试。在LNP的配制和修饰的G-CSF mRNA的包封之后,通过粒度、ζ电势以及包封百分比对LNP制剂进行表征,结果在表54中示出。

[1781] 表54.LNP制剂的表征

[1782]

制剂编号	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1
脂质	PEG-DMG 1.5%	PEG-DMG 3%	PEG-DSA 1.5%	PEG-DSA 3%
平均尺寸	95 nm PDI：0.01	85 nm PDI：0.06	95 nm PDI：0.08	75 nm PDI：0.08
在 pH 7.4 下的 ζ	-1.1 mV	-2.6 mV	1.7 mV	0.7 mV
包封 (RiboGreen)	88%	89%	98%	95%

[1783] B.PEG LNP的体内筛选

[1784] 以0.5mg/kg的剂量向小鼠(n＝5)静脉内施用表55所述的PEG LNP的制剂。在施用制剂后2小时、8小时、24小时、48小时、72小时和8天从小鼠中收集血清。通过ELISA对血清进行分析,以测定G-CSF的蛋白质表达,表达水平在表55中示出。使用PEG-DMG的LNP制剂比用PEG-DSA的LNP制剂给出显著较高的蛋白质表达水平。

[1785] 表55.蛋白质表达

[1786]

脂质	制剂编号	时间	蛋白质表达(pg/ml)
PEG-DMG, 1.5%	NPA-071-1	2 小时	114,102
		8 小时	357,944
		24 小时	104,832
		48 小时	6,697
		72 小时	980
		8 天	0
PEG-DMG, 3%	NPA-072-1	2 小时	154,079
		8 小时	354,994
		24 小时	164,311
		48 小时	13,048
		72 小时	1,182
		8 天	13
PEG-DSA, 1.5%	NPA-073-1	2 小时	3,193
		8 小时	6,162
		24 小时	446
		48 小时	197
		72 小时	124
		8 天	5
PEG-DSA, 3%	NPA-074-1	2 小时	259
		8 小时	567
		24 小时	258
		48 小时	160
		72 小时	328
		8 天	33

[1787] 实施例28.阳离子脂质制剂研究

[1788] A.阳离子脂质纳米颗粒的配制和表征

[1789] 使用注射泵法配制脂质纳米颗粒(LNP)。以20:1的总脂质与修饰mRNA的重量比配制LNP。阳离子脂质、DSPC、胆固醇和PEG-c-DOMG的最终脂质摩尔比范围在表56中概述。

[1790] 表56.摩尔比

[1791]

	阳离子脂质	DSPC	胆固醇	PEG-c-DOMG
摩尔百分比 (mol%)	50.0	10.0	38.5	1.5

[1792] 将25mM脂质的乙醇溶液和在50mM pH 3的柠檬酸盐中的修饰RNA混合,以产生自发囊泡形成。使囊泡在乙醇中稳定,之后去除乙醇,并且通过透析进行缓冲液交换。然后通过粒度、ζ电势和包封百分比对LNP进行表征。表57描述了使用DLin-MC3-DMA、DLin-DMA或C12-200作为阳离子脂质包封EPO修饰mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个

核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)或G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)的LNP的表征。

[1793] 表57.阳离子脂质制剂的表征

[1794]

制剂编号	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1	NPA-075-1	NPA-076-1
脂质	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-DMA	DLin-DMA	C12-200	C12-200
修饰RNA	EPO	G-CSF	EPO	G-CSF	EPO	G-CSF
平均尺寸	89 nm PDI: 0.07	96 nm PDI: 0.08	70 nm PDI: 0.04	73 nm PDI: 0.06	97 nm PDI: 0.05	103 nm PDI: 0.09
在pH 7.4下的ζ	-1.1 mV	-1.4 mV	-1.6 mV	-0.4 mV	1.4 mV	0.9 mV
包封(RiboGreen)	100%	100%	99%	100%	88%	98%

[1795] B.阳离子LNP制剂的体内筛选

[1796] 以0.5mg/kg的剂量向小鼠(n=5)静脉内施用表57所述的阳离子脂质制剂的制剂。在施用制剂后2小时、24小时、72小时和/或7天从小鼠中收集血清。通过ELISA对血清进行分析,以测定EPO或G-CSF的蛋白质表达,表达水平在表58中示出。

[1797] 表58.蛋白质表达

[1798]

修饰mRNA	制剂编号	时间	蛋白质表达(pg/ml)
EPO	NPA-071-1	2小时	304,190.0
		24小时	166,811.5
		72小时	1,356.1
		7天	20.3
EPO	NPA-073-1	2小时	73,852.0
		24小时	75,559.7
		72小时	130.8
EPO	NPA-075-1	2小时	413,010.2
		24小时	56,463.8
G-CSF	NPA-072-1	2小时	62,113.1
		24小时	53,206.6
G-CSF	NPA-074-1	24小时	25,059.3
G-CSF	NPA-076-1	2小时	219,198.1
		24小时	8,470.0

[1799] 在施用具有阳离子脂质C12-200(NPA-075-1和NPA-076-1)的LNP制剂的小鼠中观察到毒性并且在第24小时将所述小鼠处死,因为小鼠表现出如皮毛短小、抖缩行为以及体

重损失大于10％的症状。预期C12-200更具毒性，但是在短的时间段中也具有高表达水平。阳离子脂质DLin-DMA(NPA-073-1和NPA-074-1)在所测试的三种阳离子脂质中具有最低表达。对于EPO制剂，DLin-MC3-DMA(NPA-071-1和NPA-072-1)至第三天显示出良好表达并且至第7天高于背景样品。

[1800] 实施例29.蛋白质表达的筛选方法

[1801] A.电喷雾电离

[1802] 制备了可包含由施用至受试者的修饰RNA编码的蛋白质的生物样品并且根据电喷雾电离(ESI)的制造商方案使用1、2、3或4个质量分析仪对其进行分析。还使用串联ESI质谱系统对生物样品进行分析。

[1803] 将蛋白质片段或整个蛋白质的模式与给定蛋白质的已知对照进行比较，并且通过比较确定身份。

[1804] B.基质辅助激光解吸/电离

[1805] 制备可包含由施用至受试者的修饰RNA编码的蛋白质的生物样品，并根据基质辅助激光解吸/电离(MALDI)的制造商方案对其进行分析。

[1806] 将蛋白质片段或整个蛋白质的模式与给定蛋白质的已知对照进行比较，并且通过比较确定身份。

[1807] C.液相色谱-质谱-质谱

[1808] 可将可包含由修饰RNA编码的蛋白质的生物样品用胰蛋白酶处理，以消化其中包含的蛋白质。通过液相色谱-质谱-质谱(LC/MS/MS)对所得的肽进行分析。将肽在质谱仪中片段化，以产生诊断模式，其可经由计算机算法与蛋白质序列数据库进行匹配。可将所消化的样品稀释，以实现1ng或更少的给定蛋白质的起始材料。含有简单缓冲液背景(例如，水或挥发性盐)的生物样品适合于直接在溶液中消化；更复杂的背景(例如，去污剂、非挥发性盐、甘油)需要另外的清洗步骤以便于样品分析。

[1809] 将蛋白质片段或整个蛋白质的模式与给定蛋白质的已知对照进行比较，并且通过比较确定身份。

[1810] 实施例30.脂质纳米颗粒体内研究

[1811] 使用注射泵法将mCherry mRNA(SEQ ID NO:178中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5’帽，Cap1；用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制为脂质纳米颗粒(LNP)。以20:1的总脂质与修饰mRNA的重量比配制LNP，并且最终脂质摩尔比为50:10:38.5:1.5(DLin-KC2-DMA:DSPC:胆固醇:PEG-c-DOMG)。通过粒度、ζ电势以及包封对表59中列出的mCherry制剂进行表征。

[1812] 表59.mCherry制剂

[1813]

制剂编号	NPA-003-5
修饰 mRNA	mCherry
平均尺寸	105 nm
	PDI：0.09
在 pH 7.4 下的 ζ	1.8 mV
包封 (RiboGr)	100%

[1814] 以100ug的修饰mRNA剂量向小鼠(n=5)静脉内施用LNP制剂。在给药后24小时将小鼠处死。通过免疫组织化学(IHC)、蛋白质印迹或荧光激活细胞分选(FACS)对来自施用了mCherry修饰mRNA制剂的小鼠的肝和脾进行分析。

[1815] 肝的组织学在整个切片中显示出一致的mCherry表达,而未处理的动物不表达mCherry。还使用蛋白质印迹来证实mCherry在所处理动物中的表达,而在未处理动物中未检测到mCherry。使用微管蛋白作为对照标志物,并且在处理的和未处理的小鼠中均检测到微管蛋白,表明肝细胞中的正常蛋白质表达未受影响。

[1816] 还在mCherry和未处理小鼠的脾上执行FACS和IHC。通过FACS分析,所有白细胞细胞群对于mCherry表达均为阴性的。通过IHC,在mCherry处理的小鼠与未处理小鼠的脾之间也没有可观测差异。

[1817] 实施例31.注射泵体内研究

[1818] 使用注射泵法将mCherry修饰mRNA(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)配制为脂质纳米颗粒(LNP)。以20:1的总脂质与修饰mRNA的重量比配制LNP,并且最终脂质摩尔比为50:10:38.5:1.5(DLin-KC2-DMA:DSPC:胆固醇:PEG-c-DOMG)。通过粒度、ζ电势和包封对mCherry制剂进行表征。

[1819] 以10ug或100ug的修饰mRNA剂量向小鼠(n=5)静脉内施用LNP制剂。在给药后24小时将小鼠处死。通过免疫组织化学(IHC)、蛋白质印迹和/或荧光激活细胞分选(FACS)对来自施用了mCherry修饰mRNA制剂的小鼠的肝和脾进行分析。

[1820] 实施例32.体外和体内表达

[1821] A.使用类脂质制剂在人细胞中的体外表达

[1822] 在不同的类脂质:mmRNA比率下,对用于体外转染的测试的mmRNA与lipidoid的比率进行经验性地测试。使用siRNA和类脂质的先前工作利用了2.5:1、5:1、10:1和15:1的类脂质:siRNA wt:wt比。在相对于siRNA,mmRNA的长度更长的情况下,更低的类脂质与mmRNA的wt:wt比可为有效的。此外,为了比较,还使用RNAIMAX™(Invitrogen,Carlsbad,CA)或TRANSIT-mRNA(Mirus Bio,Madison,WI)阳离子脂质递送媒介物来配制mmRNA。

[1823] 类脂质-配制的荧光素酶(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)、绿色荧光蛋白(GFP)(SEQ ID NO:181中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:182中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)、G-CSF mRNA(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)以及EPO mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)表达期望蛋白质产物的能力可通过以下来确认:对于荧光素酶表达,通过发光;对于GFP表达,通过流式细胞术;并且对于G-CSF和促红细胞生成素(EPO)分泌,通过ELISA。

[1824] B.静脉内注射后的体内表达

[1825] 使用多种不同的类脂质,包括但不限于98N12-5、C12-200和MD1实现制剂的系统性静脉内施用。

[1826] 将含有mmRNA的类脂质制剂静脉内注射到动物体内。修饰mRNA(mmRNA)编码的蛋白

质的表达在从动物中收集的血液和/或其它器官样品(例如但不限于肝和脾)中进行评估。进行单次剂量静脉内研究还将允许评估期望产物的量值、剂量反应度和表达的持久性。

[1827] 在一个实施方案中,使用98N12-5、C12-200、MD1和其它类脂质的基于类脂质的制剂来将荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、mCherry荧光蛋白、分泌的碱性磷酸酶(sAP)、人G-CSF、人IX因子或人促红细胞生成素(EPO)mmRNA递送到动物中。在如先前所述用脂质配制mmRNA之后,将动物分组,以接受含有选自荧光素酶、GFP、mCherry、sAP、人G-CSF、人IX因子以及人EPO的不同mmRNA中的一个的盐水制剂或类脂质制剂。在注射到动物中之前,将含有mmRNA的类脂质制剂在PBS中稀释。然后向动物施用单次剂量的配制的mmRNA,所述剂量在10mg/kg的剂量至低至1ng/kg的剂量范围内变化,其中优选范围为10mg/kg至100ng/kg,其中mmRNA的剂量取决于动物体重,如20克小鼠最大接受0.2ml的制剂(给药是基于mmRNA/kg体重)。在施用mmRNA-类脂质制剂之后,获得血清、组织和/或组织裂解物,并且mmRNA编码的产物的水平在单个时间间隔或一个范围的时间间隔进行测定。类脂质配制的荧光素酶、GFP、mCherry、sAP、G-CSF、IX因子和EPO mmRNA表达期望蛋白质产物的能力通过以下来确认:对于荧光素酶的表达,通过发光;对于GFP和mCherry的表达,通过流式细胞术;对于sAP,通过酶活性;或对于G-CSF、IX因子和/或EPO的切片,通过ELISA。

[1828] 还执行了多次剂量方案的进一步研究,以测定mmRNA的最大表达,评价mmRNA驱动的表达的饱和性(通过并行或顺序给予对照和活性mmRNA制剂),以及测定重复药物施用的可行性(通过以由周或月分开的剂量给予mmRNA,然后测定表达水平是否受到如免疫原性的因素的影响)。如G-CSF和EPO的蛋白质的生理学功能的评估还通过分析来自测试动物的样品并分别检测粒细胞和红血细胞计数的增加来确定。所表达的蛋白质产物如IX因子在动物中的活性还可通过IX因子酶活性(如激活的部分促凝血酶原激酶时间测定)的分析和凝血时间的影响进行评估。

[1829] C.肌内和/或皮下注射后的体外表达

[1830] 需要对类脂质制剂经由肌内注射途径或皮下注射途径递送包括mRNA的寡核苷酸的用途进行评价,因为先前未对其有过报道。对mmRNA的肌内和/或皮下注射进行评价,以确定含有mmRNA的类脂质制剂是否能够产生期望蛋白质的局部和系统性表达。

[1831] 将含有mmRNA的98N12-5、C12-200和MD1的类脂质制剂肌内和/或皮下注射到动物中,所述mmRNA选自荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、mCherry荧光蛋白、分泌的碱性磷酸酶(sAP)、人G-CSF、人IX因子或人促红细胞生成素(EPO)mmRNA。在肌肉或皮下组织内,并且在血液和其它器官(如肝和脾)中系统性地评估mmRNA编码的蛋白质的表达。单次剂量研究允许评估期望产物的量值、剂量反应度和表达的持久性。

[1832] 将动物分组以接受盐水制剂或含有修饰mRNA的制剂。在注射之前,将含有mmRNA的类脂质制剂在PBS中稀释。向动物施用单次静脉内剂量的配制的mmRNA,所述剂量在50mg/kg至低至1ng/kg的剂量范围内变化,其中优选范围为10mg/kg至100ng/kg。对于小鼠,肌内施用的最大剂量为大约1mg mmRNA,或对于肌内注射到小鼠后下肢,最大剂量低至0.02ng mmRNA。对于皮下施用,向动物施用单次皮下剂量的配制的mmRNA,所述剂量在400mg/kg至低至1ng/kg的剂量范围内变化,其中优选范围为80mg/kg至100ng/kg。对于小鼠,皮下施用的最大剂量为大约8mg mmRNA或低至0.02ng mmRNA。

[1833] 对于20克的小鼠,单次肌内注射的体积最大为0.025ml,并且单次皮下注射最大为

0.2ml。由动物的体重计算所施用mmRNA的最佳剂量。在施用mmRNA-类脂质之后的时间点的不同点，获得血清、组织和组织裂解物，并且测定mmRNA编码产物的水平。类脂质配制的荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、mCherry荧光蛋白、分泌的碱性磷酸酶(sAP)、人G-CSF、人IX因子或人促红细胞生成素(EPO)mmRNA表达期望蛋白质产物的能力通过以下进行证实：对于荧光素酶表达，通过发光；对于GFP和mCherry表达，通过流式细胞术，对于sAP，通过酶活性，并且对于G-CSF、IX因子和促红细胞生成素(EPO)分泌，通过ELISA。

[1834] 还执行了多次剂量方案的另外研究，以测定使用mmRNA的最大表达，评价mmRNA驱动的表达的饱和性(通过并行或顺序给予对照和活性mmRNA制剂实现)，以及测定重复药物施用的可行性(通过以由周或月分开的剂量给予mmRNA，并且然后测定表达水平是否受到如免疫原性的因素的影响)。还利用了在一个时间点利用多个皮下或肌内注射部位的研究，以进一步增加mmRNA药物暴露并改善蛋白质产生。如GFP、mCherry、sAP、人G-CSF、人IX因子以及人EPO的蛋白质的生理学功能的评估通过分析来自测试动物的样品并检测粒细胞和/或红血细胞计数的改变进行测定。所表达的蛋白质产物如IX因子在动物中的活性还可通过IX因子酶活性(如激活的部分促凝血酶原激酶时间测定)的分析和凝血时间的影响进行评估。

[1835] 实施例33.双功能mmRNA

[1836] 使用本文所述的教导和合成方法，将修饰RNA设计并合成为双功能的，从而编码一种或多种细胞毒性蛋白质分子并且使用细胞毒性核苷进行合成。

[1837] 使用盐水或脂质载体实现双功能修饰mRNA的施用。一旦施用，就翻译双功能修饰mRNA以产生编码的细胞毒性肽。在递送的修饰mRNA降解时，细胞毒性核苷被释放，这也影响对受试者的治疗益处。

[1838] 实施例34.修饰mRNA的转染

[1839] A.反向转染

[1840] 对于在24孔胶原涂布的组织培养平板中执行的实验，以1x 10^5的细胞密度接种角质形成细胞。对于在96孔胶原涂布的组织培养平板中执行的实验，以0.5x 10^5的细胞密度接种角质形成细胞。对于待转染的每种修饰mRNA(mmRNA)，如所描述制备修饰mRNA:RNAIMAX™并且在细胞粘附至组织培养平板之前，将其与细胞在多孔平板中在细胞接种时间段(例如6小时)内混合。

[1841] B.正向转染

[1842] 在24孔胶原涂布的组织培养平板中，以0.7x 10^5的细胞密度接种角质形成细胞。对于在96孔胶原涂布的组织培养平板中执行的实验，以0.3x 10^5的细胞密度接种角质形成细胞。角质形成细胞经24小时生长至>70％汇合。对于待转染的每种修饰mRNA(mmRNA)，如所描述制备修饰mRNA:RNAIMAX™并且在细胞接种并粘附至组织培养平板之后，经24小时将其转染到多孔平板中的细胞上。

[1843] C.修饰mRNA翻译筛选:G-CSF ELISA

[1844] 角质形成细胞在来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的具有补充剂S7的EPILIFE培养基中在>70％汇合下生长。将一组角质形成细胞用300ng的与来自Invitrogen的RNAIMAX™复合的化学修饰的mRNA(mmRNA)反向转染。将另一组角质形成细胞用300ng的与来自Invitrogen的RNAIMAX™复合的修饰mRNA正向转染。通过首先将RNA与不含补充剂的EPILIFE®培养基在5X体积稀释物中在室温下孵育10分钟来形成修饰mRNA:RNAIMAX™复

合物。

[1845] 在第二个小瓶中，将RNAIMAX™试剂与不含补充剂的EPILIFE®培养基在10X体积稀释物中在室温下孵育10分钟。然后将RNA小瓶与RNAIMAX™小瓶混合，并且在室温下孵育20-30分钟，之后以逐滴方式添加到细胞中。在一式三份的每种化学修饰mRNA转染后18小时对培养基中分泌的人粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)浓度进行测量。

[1846] 人G-CSF从转染的人角质形成细胞的分泌使用来自Invitrogen的ELISA试剂盒或R&D系统(Minneapolis,MN)按照制造商推荐的说明进行定量。

[1847] D.修饰mRNA剂量和持续时间:G-CSF ELISA

[1848] 角质形成细胞在来自Invitrogen的具有补充剂S7的EPILIFE®培养基中在>70％汇合下生长。用0ng、46.875ng、93.75ng、187.5ng、375ng、750ng或1500ng与来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的RNAIMAX™复合的修饰mRNA反向转染角质形成细胞。形成了修饰mRNA:RNAIMAX™复合物，如所描述的。在一式三份的每个浓度的每种修饰mRNA的转染后0、6、12、24和48小时对培养基中分泌的人G-CSF浓度进行测量。人G-CSF从转染的人角质形成细胞的分泌使用来自Invitrogen的ELISA试剂盒或R&D系统按照制造商推荐的说明进行定量。

[1849] 实施例35.分剂量研究

[1850] 设计并执行在一个时间点利用多个皮下或肌内注射部位的研究，以研究增加mmRNA药物暴露并改善蛋白质产生的方法。除了所表达的蛋白质产物的检测之外，还通过对来自测试动物的样品进行分析来对蛋白质的生理学功能的评估进行测定。

[1851] 令人惊讶的是，经过测定，mmRNA的分次给药产生的蛋白质产量和表型反应大于通过单次单位给药或多次给药方案产生的那些。

[1852] 单次单位剂量、多次剂量和分剂量实验的设计涉及使用仅在缓冲液中施用的人促红细胞生成素(EPO)mmRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)。给药媒介物(F.缓冲液)由以下组成:150mM NaCl、2mM $CaCl_2$、2mM Na^+-磷酸盐(1.4mM磷酸二氢钠;0.6mM磷酸氢二钠)以及0.5mM EDTA，pH 6.5。使用氢氧化钠调节pH并且将最终溶液无菌过滤。在每个胞嘧啶处用5meC，并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代对mmRNA进行修饰。

[1853] 对于100ug的单次单位剂量，将动物(n＝5)IM(肌内)注射。对于多次给药，使用两个时间表，3次100ug的剂量和6次100ug的剂量。对于分次给药方案，使用两个时间表，3次33.3ug mmRNA的剂量和6次16.5ug mmRNA的剂量。对照给药涉及在6次剂量下仅使用缓冲液。对照mmRNA涉及在100ug下6次给药的荧光素酶mmRNA(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列，具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出)，5'帽，Cap1，在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)的使用。在注射后13小时对血液和肌肉组织进行评价。

[1854] 在缓冲液中的EPO mmRNA的I.M.单次、多次或分次给药后13h，在小鼠血清中测量人EPO蛋白。对七组小鼠(n＝5小鼠/组)进行处理和评价。结果在表60中示出。

[1855] 表60.分剂量研究

[1856]

组	处理	mmRNA的剂量	总剂量	平均pmol/mL人EPO	多肽/单位药物(pmol/ug)	剂量分割因子
1	人EPO mmRNA	1 x 100 ug	100 ug	14.3	.14	1

[1857]

2	人EPO mmRNA	3 x 100 ug	300 ug	82.5	.28	2
3	人EPO mmRNA	6 x 100 ug	600 ug	273.0	.46	3.3
4	人EPO mmRNA	3 x 33.3 ug	100 ug	104.7	1.1	7.9
5	人EPO mmRNA	6 x 16.5 ug	100 ug	127.9	1.3	9.3
6	荧光素酶mmRNA	6 x 100 ug	600 ug	0	--	--
7	仅缓冲液	--	--	0	--	--

[1858] 分割因子定义为每单位药物的产物除以每单位药物(PUD)的单次剂量产物。例如，对于处理组2，将值28或每单位药物(mmRNA)的产物(EPO)除以每单位药物的单次剂量产物0.14。结果为2。类似地，对于处理组4，将值1.1或每单位药物(mmRNA)的产物(EPO)除以每单位药物的单次剂量产物0.14。结果为7.9。因此，剂量分割因子(DSF)可用作分次给药方案的效率的指示物。对于总每日剂量的任何单次施用，DSF应等于1。因此，在分次给药方案中大于此值的任何DSF为效率增大的指示。

[1859] 为了确定剂量反应趋势、注射部位的影响和注射定时的影响，执行了研究。在这些研究中，使用1ug、5ug、10ug、25ug、50ug以及介于其间的值的不同剂量来测定剂量反应结果。100ug总剂量的分次给药包括三次或六次1.6ug、4.2ug、8.3ug、16.6ug或或等于施用所选总剂量的值和总剂量的剂量。

[1860] 注射部位选自肢体或呈现出适用于注射的足够面积的任何身体表面。这还可包括注射深度的选择，以靶向真皮(皮内)、表皮(表皮)、皮下组织(SC)或肌肉(IM)。注射角度将基于靶标递送部位而变化，其中靶向皮内部位的注射与皮肤表面的平面成10-15度角，对于皮下注射，与皮肤表面的平面成20度至45度之间的角，并且对于大量注射到肌肉中，成60度至90度之间的角。

[1861] 实施例36.在外来体中的定量

[1862] 本发明的mmRNA的量和定位可通过测量在所分离的外来体中的量(初始，时间过程或剩余基准)进行确定。在本研究中，由于mmRNA通常为密码子优化的并且在序列上与内源mRNA不同，所以通过使用Gibbings，PCT/IB2009/005878(其内容通过引用整体并入本文)的方法，与天然或野生型mRNA的内源水平相比较，对mmRNA的水平进行定量。

[1863] 在这些研究中，通过以下执行所述方法：首先优选地从先前用本发明的多核苷酸、初级构建体或mmRNA处理的患者体液中分离外来体或囊泡，然后通过mRNA微阵列、qRT-PCR，或本领域中用于测量RNA的其它手段(包括合适的抗体或免疫组织化学方法)中的一个在所述外来体中测量多核苷酸、初级构建体或mmRNA水平。

[1864] 实施例37.修饰mRNA对细胞存活力、细胞毒性和细胞凋亡的作用

[1865] 此实验表明不同的修饰mRNA体外转染的人角质形成细胞的细胞存活力、细胞毒性和细胞凋亡。角质形成细胞在来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的具有人角质形成细胞生长补充剂、不存在氢化可的松的EPILIFE®培养基中在>70％汇合下生长。用0ng、46.875ng、93.75ng、187.5ng、375ng、750ng、1500ng、3000ng或6000ng的与来自Invitrogen的RNAIMAX™复合的修饰mRNA反向转染角质形成细胞。形成修饰mRNA:RNAIMAX™复合物。在一式三份的每个浓度的每种修饰mRNA的转染后0、6、12、24和48小时对培养基中分泌的人G-CSF浓度进行测量。人G-CSF从转染的人角质形成细胞的分泌使用来自Invitrogen的ELISA试剂盒或R&D系统按照制造商推荐的说明进行定量。

[1866] 使用来自Promega(Madison,WI)的APOTOX-GLO™试剂盒,根据制造商的说明,在转染后0、12、48、96和192小时对细胞存活力、细胞毒性和细胞凋亡进行测量。

[1867] 实施例38.使用ELISA测定检测对修饰mRNA的细胞先天性免疫应答

[1868] 对用于从体外转染的人角质形成细胞中分泌的人肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、人干扰素-β(IFN-β)和人粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)的酶联免疫吸附测定(ELISA)进行测试,用于检测细胞先天性免疫应答。角质形成细胞在来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的具有人角质形成细胞生长补充剂、不存在氢化可的松的EPILIFE®培养基中在>70％汇合下生长。如所描述的一式三份用0ng、93.75ng、187.5ng、375ng、750ng、1500ng或3000ng的与来自Invitrogen的RNAIMAX™复合的化学修饰mRNA(mmRNA)反向转染所分泌的TNF-α角质形成细胞。使用来自Invitrogen的ELISA试剂盒,根据制造商的方案,在每种化学修饰mRNA转染后24小时,对培养基中的分泌的TNF-α进行测量。

[1869] 使用来自Invitrogen的ELISA试剂盒,根据制造商的方案,在每种化学修饰mRNA转染后24小时,对相同培养基中分泌的TNF-β进行测量。在每种化学修饰mRNA转染后24小时,对相同培养基中分泌的人G-CSF浓度进行测量。使用来自Invitrogen的ELISA试剂盒或R&D系统(Minneapolis,MN),按照制造商推荐的说明,对人G-CSF从转染的人角质形成细胞的分泌进行定量。通过测量示例性1型细胞因子TNF-α和IFN-β,这些数据表明了与天然或其它化学修饰多核苷酸或参考化合物相比,哪种修饰mRNA(mmRNA)能够引起减小的细胞先天性免疫应答。

[1870] 实施例39.人粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)修饰的mRNA-诱导的细胞增殖测定

[1871] 将人角质形成细胞在来自Invitrogen的具有补充剂S7的EPILIFE®培养基中,在>70％的汇合下,在24孔胶原涂布的TRANSWELL®(Coming,Lowell,MA)共培养组织培养平板中生长。如所描述的一式三份用750ng与来自Invitrogen的RNAIMAX复合的所指示的化学修饰mRNA(mmRNA)反向转染角质形成细胞。形成修饰mRNA:RNAIMAX复合物,如所描述的。在转染后6-8小时更换角质形成细胞培养基。转染后42小时,将插有0.4μm-孔半可渗透聚酯膜的24孔TRANSWELL®平板放置在含有人G-CSF修饰mRNA转染的角质形成细胞的培养平板中。

[1872] 将人成髓细胞、Kasumi-1细胞或KG-1(0.2x 10^5细胞)接种到插入孔中,并且在共培养开始后42小时,使用CyQuant Direct Cell Proliferation Assay(Invitrogen,Carlsbad,CA)在100-120μl体积中在96孔平板中对细胞增殖进行定量。将编码人G-CSF的修

饰mRNA-诱导的成髓细胞增殖表示为根据未转染的角质形成细胞/成髓细胞共培养对照孔归一化的细胞增殖百分比。在一式三份的每种修饰mRNA的共培养开始后42小时，对角质形成细胞和成髓细胞插入共培养孔中的分泌的人G-CSF浓度进行测量。使用来自Invitrogen的ELISA试剂盒，按照制造商推荐的说明对人G-CSF的分泌进行定量。

[1873] 通过RT-PCR检测人角质形成细胞饲养细胞(keratinocyte feeder cell)和未转染的人成髓细胞中的转染的人G-CSF修饰mRNA。使用RNEASY®试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)根据制造商的说明提取和裂解来自样品细胞的总RNA。将提取的总RNA进行RT-PCR，用于使用PROTOSCRIPT® M-MuLV Taq RT-PCR试剂盒(New England BioLabs,Ipswich,MA)根据制造商的说明，使用人G-CSF特异性引物进行修饰mRNA-G-CSF的特异性扩增。通过1.2％琼脂糖凝胶电泳显现RT-PCR产物。

[1874] 实施例40:共培养测定

[1875] 包括编码人粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)的化学上不同的修饰核苷酸的修饰mRNA可在共培养环境中刺激转染非感受态细胞的细胞增殖。共培养包括高度可转染的细胞类型(如人角质形成细胞)和转染非感受态细胞类型(如全血细胞(WBC))。将编码G-CSF的修饰mRNA转染到高度可转染细胞中，从而允许产生G-CSF蛋白并将其分泌到胞外环境中，其中G-CSF以类似旁分泌的方式起作用，以刺激表达G-CSF受体的全血细胞增殖。所扩增的WBC群体可用于治疗免疫功能受损患者或部分重构免疫抑制性患者的WBC群体，并且从而降低机会性感染的风险。

[1876] 在另一个实例中，用某些生长因子转染高度可转染细胞如成纤维细胞，以支持并刺激可转染性差的胚胎干细胞或诱导的多能干细胞的生长、维持或分化。

[1877] 实施例41:人IgG抗体的检测测定

[1878] A.人IgG抗体的ELISA检测

[1879] 此实例描述了用于人IgG的ELISA，所述人IgG来自用人IgG修饰mRNA(mmRNA)转染的中国仓鼠卵巢(CHO)和人胚胎肾(HEK,HER-2阴性)293细胞。使人胚胎肾(HEK)293在来自Invitrogen的具有L-谷氨酰胺补充剂的CD 293培养基中生长，直到其达到80％-90％的汇合。使CHO细胞在具有L-谷氨酰胺、次黄嘌呤和胸苷补充剂的CD CHO培养基中生长。在一方面，在7ml培养基中在来自Corning的75cm2培养烧瓶中用24μg的与来自Invitrogen的RNAIMAXTM复合的修饰mRNA转染2x 106个细胞。在另一方面，在24孔平板中用1μg的与来自Invitrogen的RNAIMAXTM复合的修饰mRNA转染80,000个细胞。通过将mmRNA在小瓶中以5X体积稀释度用CD 293或CD CHO培养基在室温下孵育10分钟来形成修饰mRNA:RNAIMAXTM复合物。在第二个小瓶中，将RNAIMAXTM试剂以10X体积稀释度用CD 293培养基或CD CHO培养基在室温下孵育10分钟。然后将mmRNA小瓶与RNAIMAXTM小瓶混合，并且在室温下孵育20-30分钟，之后以逐滴方式添加到CHO或HEK细胞中。将培养物上清液储存在4摄氏度。24μg mmRNA转染物中培养基中的分泌的人IgG的浓度在转染后12、24、36小时进行测量，并且1μg mmRNA转染物在36小时进行测量。使用来自Abcam(Cambridge,MA)的ELISA试剂盒按照制造商推荐的说明对曲妥珠单抗从转染的HEK 293细胞的分泌进行定量。数据显示人源化的IgG抗体(如曲妥珠单抗)mmRNA在HEK细胞中能够被翻译，并且曲妥珠单抗被分泌出细胞并释放到胞外环境中。另外，数据表明，用编码曲妥珠单抗的mmRNA转染细胞来产生分泌的蛋白质可按比例扩大至生物反应器或大的细胞培养条件。

[1880] B.修饰mRNA产生的人IgG抗体的Western检测

[1881] CHO-K1细胞的蛋白质印迹用1μg的曲妥珠单抗修饰mRNA(mmRNA)的重链和轻链各自共转染。使用标准方案使CHO细胞在24孔平板中生长。将细胞上清液或细胞裂解液在转染后24小时收集、在12％SDS-Page凝胶上分离并且使用Invitrogen(Carlsbad,CA)的IBOT®转移到硝酸纤维素膜上。将细胞与缀合至DYLIGHT594(ab96904,abcam,Cambridge,MA)的抗人IgG的兔多克隆抗体的第一缀合物和缀合至碱性磷酸酶的抗Rb IgG的山羊多克隆抗体的第二缀合物一起孵育。在孵育之后,使用Invitrogen(Carlsbad,CA)的Novex®碱性磷酸酶显色底物检测抗体。

[1882] C.修饰mRNA产生的曲妥珠单抗和利妥昔单抗的细胞免疫染色

[1883] 将CHO-K1细胞用500ng的曲妥珠单抗或利妥昔单抗中的任一个的重链和轻链各自共转染。使细胞在来自GIBCO® (Grand Island,NY)的F-12K培养基和10％FBS中生长。将细胞在PBS中用4％低聚甲醛固定、用在PBS中的0.1％Triton X-100在室温下透化处理5-10分钟,并且将细胞用室温PBS洗涤3次。使用缀合至DYLIGHT®594(ab96904,abcam,Cambridge,MA)的抗人IgG的兔多克隆抗体,根据制造商推荐的稀释度执行曲妥珠单抗和利妥昔单抗染色。用来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的DAPI染料执行核DNA染色。在修饰mRNA转染时,曲妥珠单抗和利妥昔单抗的蛋白质被翻译并定位至细胞质。在转染后13小时获取图。

[1884] D.修饰mRNA产生的曲妥珠单抗和利妥昔单抗的结合免疫印迹测定

[1885] 使用结合免疫印迹检测测定来检测曲妥珠单抗和利妥昔单抗。将不同浓度(100ng/ul至0ng/ul)的ErB2肽(ab40048,abeam,Cambridge,MA)、曲妥珠单抗的抗原和CD20肽(ab97360,abeam,Cambridge,MA)、利妥昔单抗的抗原在12％SDS-Page凝胶上跑胶,并且使用来自Invitrogen的iBlot转移到膜上。将膜用来自CHO-K1细胞的其各自的细胞上清液孵育1小时,所述CHO-K1细胞用500ng的曲妥珠单抗或利妥昔单抗的重链和轻链各自共转染。将膜用1％BSA封闭,并且添加缀合至碱性磷酸酶(abcam,Cambridge,MA)的二级抗人IgG抗体。使用Invitrogen(Carlsbad,CA)的NOVEX碱性磷酸酶显色底物进行抗体检测。数据显示由修饰mRNA生成的人源化IgG抗体能够识别并结合至其对应的抗原。

[1886] E.细胞增殖测定

[1887] 过表达HER2/neu受体的衍生自人乳腺腺癌的粘附细胞系SK-BR-3细胞系可用于比较产生曲妥珠单抗的修饰mRNA(mmRNA)的抗增殖特性。将不同浓度的由修饰mRNA产生的纯化曲妥珠单抗和曲妥珠单抗添加到细胞培养基中,并且其对细胞生长的作用通过一式三份的细胞毒性和存活力测定来评估。

[1888] 实施例42:将修饰mRNA大量转染到细胞培养物中

[1889] A.阳离子脂质递送媒介物

[1890] 使用RNAIMAX™(Invitrogen,Carlsbad,CA)或TRANSIT-mRNA(Mirus Bio,Madison,WI)阳离子脂质递送媒介物进行RNA转染。首先将RNA和试剂在Opti-MEM基础培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA)中稀释。将100ng/uL RNA稀释5x,并且将5μL的RNAIMax/μg RNA稀释10x。将稀释的组分合并,并且在室温下孵育15分钟,之后将其分散于培养基中。对于TRANSIT-mRNA转染,将100ng/uL RNA在Opti-MEM中稀释10x,并且添加BOOST试剂(在2μL/μg

RNA的浓度下),添加TRANSIT-mRNA(在2μL/μg RNA的浓度下),然后在室温下孵育2分钟之后,将RNA-脂质的复合物递送至培养基。对于RiPS衍生物,在Nutristem xenofree hES培养基(Stemgent,Cambridge,MA)中执行RNA转染,对于角质形成细胞实验,在Dermal Cell Basal Medium外加Keratinocyte Growth Kit(ATCC)中执行RNA转染,并且对于所有其它实验,在Opti-MEM外加2%FBS中执行RNA转染。向宿主细胞中成功引入修饰mRNA(mmRNA)可使用多种已知方法,如荧光标志物(如绿色荧光蛋白(GFP))进行监测。修饰mRNA的成功转染也可通过经由例如蛋白质印迹或免疫细胞化学测量靶标多肽的蛋白质表达水平进行确定。可按照类似方法用于按照类似的RNA-脂质复合物比率将大体积规模扩大到多升(5-10,000L)培养基形式。

[1891] B.外源性合成mRNA转录物的电穿孔递送

[1892] 通过用体外合成的修饰mRNA(mmRNA)转录物转染MRC-5成纤维细胞并且通过使用设计来特异性地检测外源转录物的引物的定量RT-PCR测量转染效率来对电穿孔参数进行优化。将充电至F的150uF电容器放电到悬浮于标准电穿孔杯(2mm间隙)中的50μl的Opti-MEM(Invitrogen,Carlsbad,CA)的2.5x10^6个细胞中对于重复递送超过10,000拷贝的修饰mRNA转录物/孔是充足的(如使用标准曲线方法所测定),同时维持了高的存活力(>70%)。另外的实验可揭示,用mmRNA转录物有效转染细胞所需的电压可取决于电穿孔期间的细胞密度。细胞密度可从1x10^6细胞/50μl变化至2.5x10^6细胞/50μl的密度,并且需要110V至145V来以在每孔的转录拷贝中所测量的类似效率来转染细胞。可与大体积流动电穿孔策略类似地执行大的多升(5-10,000L)电穿孔,所述策略与关于上述菌株所描述的方法类似(Li等,2002;Geng等,2010)。

[1893] 实施例43:使用脂质复合物体内递送

[1894] A.人EPO修饰RNA脂质复合物

[1895] 将含有100μg修饰的人促红细胞生成素mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)(EPO;完全修饰的5-甲基胞嘧啶;N1-甲基-假尿苷)的制剂与30体积%的RNAIMAX™(Lipoplex-h-Epo-46;第2代或Gen2)脂质复合,以50-70uL肌内递送至四只C57/BL6小鼠。其它组由接受脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA(脂质复合-luc)(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶位点处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)的注射的小鼠或在65ul剂量体积下接受作为阴性对照的配制缓冲液的注射的小鼠组成,所述脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA充当对照,其含有100μg的与30体积%的RNAiMAX™脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA。肌内注射后13小时,从每只小鼠中收集血清,以通过人EPO ELISA测量小鼠血清中人EPO蛋白的量,结果在表61中示出。

[1896] 表61.人EPO产量(IM注射途径)

[1897]

制剂	平均值
脂质复合-h-Epo-46	251.95
脂质复合-Luc	0
配制缓冲液	0

[1898] B.人G-CSF修饰RNA脂质复合物

[1899] 将含有100μg的与30体积％的RNAIMAX™脂质复合的两种型式的修饰的人G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)(用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF(G-CSF)或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的G-CSF(G-CSF-N1))中的一个的制剂以150uL肌内(I.M)递送、以150uL皮下(S.C)递送并且以225uL静脉内(I.V)递送至C57/BL6小鼠。

[1900] 三个对照组肌内施用100μg的修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)(Luc-unsp I.M.),或静脉内施用150μg的修饰的荧光素酶mRNA(Luc-unsp I.V.),或肌内施用150uL的配制缓冲液(缓冲液I.M.)。施用制剂后6小时,从每只小鼠中收集血清,以通过人G-CSF ELISA测量小鼠血清中人G-CSF蛋白的量,结果在表62中示出。

[1901] 这些结果表明,当在脂质复合物制剂中通过I.V.或I.M.施用途径递送时,5-甲基胞嘧啶/假尿苷和5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷修饰的人G-CSF mRNA均可导致人G-CSF蛋白在血清中的特异性表达。

[1902] 表62.血清中的人G-CSF(I.M.、I.V.、S.C.注射途径)

[1903]

制剂	途径	G-CSF(pg/ml)
G-CSF	I.M.	85.6
G-CSF N1	I.M.	40.1
G-CSF	S.C.	3.9
G-CSF N1	S.C.	0.0
G-CSF	I.V.	31.0
G-CSF N1	I.V.	6.1
Luc-unsp	I.M.	0.0
Luc-unsp	I.V.	0.0
缓冲液	I.M.	0.0

[1904] C.人G-CSF修饰RNA脂质复合物的比较

[1905] 将含有100μg的与30体积％的RNAIMAX™脂质复合的具有5-甲基胞嘧啶(5mc)和假尿苷(ψ)修饰的修饰的人G-CSF mRNA(G-CSF-Gen1-脂质复合物)、在盐水中的具有5mc和ψ修饰的修饰的人G-CSF mRNA(G-CSF-Gen1-盐水)、具有N1-5-甲基胞嘧啶(N1-5mc)和ψ修饰的与30体积％的RNAIMAX™脂质复合的修饰的人G-CSF mRNA(G-CSF-Gen2-脂质复合物)、在盐水中的具有N1-5mc和ψ修饰的修饰的人G-CSF mRNA(G-CSF-Gen2-盐水)、具有5mc和ψ修饰的与30体积％的RNAIMAX™脂质复合的修饰的荧光素酶(Luc-脂质复合物),或在盐水中的具有5mc和ψ修饰的修饰的荧光素酶mRNA(Luc-盐水)的制剂肌内(I.M.)或皮下(S.C.)递送至C57/BL6小鼠,并且每种施用方法的对照组向C57/BL6小鼠给予80uL剂量的配制缓冲液(F.缓冲液)。注射后13小时,从每只小鼠中收集来自注射部位的血清和组织,并且通过G-CSF ELISA进行分析,以对人G-CSF蛋白水平进行比较。肌内施用的小鼠血清中人G-CSF蛋白的结果以及皮下施用结果在表63中示出。

[1906] 这些结果表明,当无论以盐水制剂还是以脂质复合物制剂通过I.M.或S.C.施用途

径递送时，5-甲基胞嘧啶/假尿苷和5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷修饰的人G-CSF mRNA均可导致人G-CSF蛋白在血清中的特异性表达。如表63所示，5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷修饰的人G-CSF mRNA大体表明相对于5-甲基胞嘧啶/假尿苷修饰的人G-CSF mRNA，人G-CSF蛋白产生增加。

[1907] 表63.小鼠血清中的人G-CSF蛋白

[1908]

制剂	G-CSF (pg/ml)	
	I.M.注射途径	S.C.注射途径
G-CSF-Gen1-脂质复合物	13.988	42.855
G-CSF-Gen1-盐水	9.375	4.614
G-CSF-Gen2-脂质复合物	75.572	32.107
G-CSF-Gen2-盐水	20.190	45.024
Luc 脂质复合物	0	3.754
Luc 盐水	0.0748	0
F.缓冲液	4.977	2.156

[1909] D.mCherry修饰的RNA脂质复合物的比较

[1910] 肌内和皮下施用

[1911] 将含有100μg的与30体积％的RNAIMAX™脂质复合的修饰mCherry mRNA(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)或在盐水中的修饰mCherry mRNA的制剂肌内和皮下递送至小鼠。还将配制缓冲液肌内或皮下施用至对照组小鼠。可在注射后17小时收集小鼠的注射部位，用于切片以确定负责产生蛋白质的一种或多种细胞类型。

[1912] 玻璃体内施用

[1913] 可将含有10μg的与RNAIMAX™脂质复合的修饰mCherry mRNA、在配制缓冲液中的修饰mCherry mRNA、与RNAIMAX™脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA、在配制缓冲液中的修饰的荧光素酶mRNA的制剂以5μl/眼的剂量体积通过玻璃体内注射(IVT)在大鼠中施用。还通过IVT以5μl/眼的剂量体积向对照组大鼠施用配制缓冲液。可在注射后18小时，收集所处理大鼠的眼睛，用于切片并裂解，以测定mmRNA是否可在体内有效地递送至眼睛以及蛋白质产生的结果，并且还确定负责在体内产生蛋白质的一种或多种细胞类型。

[1914] 鼻内施用

[1915] 鼻内递送含有100μg的与30体积％的RNAIMAX™脂质复合的修饰mCherry mRNA、在盐水中的修饰mCherry mRNA、与30体积％的RNAIMAX™脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA或在盐水中的修饰的荧光素酶mRNA的制剂。还向对照组鼻内施用配制缓冲液。可在滴注后约13小时收集肺部，用于切片(对于接受mCherry mRNA的那些)或匀浆(对于接受荧光素酶mRNA的那些)。这些样品将用于测定mmRNA是否可在体内有效地递送至肺部以及蛋白质产生的结果，并且还确定负责在体内产生蛋白质的一种或多种细胞类型。

[1916] 实施例44:使用不同脂质比的体内递送

[1917] 将修饰mRNA递送至C57/BL6小鼠，以评价不同的脂质比和所得的蛋白质表达。将具有100μg与10％、30％或50％RNAIMAX™脂质复合的修饰的人EPO mRNA(SEQ ID NO:173中示

出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)、100μg与10%、30%或50%RNAIMAX™脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)的制剂或配制缓冲液以单次70μl剂量肌内施用至小鼠。注射后13小时收集血清,以进行人EPO ELISA,以测定每只小鼠中的人EPO蛋白水平。表64所示的人EPO ELISA的结果显示,对于不同百分比的RNAIMAX™各自,在肌肉中表达的修饰的人EPO分泌到血清中。

[1918] 表64.小鼠血清中的人EPO蛋白(IM注射途径)

[1919]

制剂	EPO(pg/ml)
Epo+10%RNAiMAX	11.4
Luc+10%RNAiMAX	0
Epo+30%RNAiMAX	27.1
Luc+30%RNAiMAX	0
Epo+50%RNAiMAX	19.7
Luc+50%RNAiMAX	0
F.缓冲液	0

[1920] 实施例45:哺乳动物中的肌内和皮下体内递送

[1921] 将在配制缓冲液中配制的修饰的人EPO mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)递送至C57/BL6小鼠或Sprague-Dawley大鼠,以评价对人EPO产生的剂量依赖性。给大鼠肌内注射50μl的修饰的人EPO mRNA(h-EPO)、修饰的荧光素酶mRNA(Luc)(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)或配制缓冲液(F.缓冲液),如给药图表表65中所述。

[1922] 给小鼠肌内或皮下注射50μl的修饰的人EPO mRNA(h-EPO)、修饰的荧光素酶mRNA(Luc)或配制缓冲液(F.缓冲液),如给药图表表66中所述。注射后13小时,收集血液,并对血清进行分析,以测定每只小鼠或大鼠中人EPO的量。大鼠研究的平均值和几何平均值(pg/ml)也在表65中示出。

[1923] 表65.大鼠研究

[1924]

	组	剂量(ug)	平均值 pg/ml	几何平均值 pg/ml
h-EPO	G#1	150	67.7	67.1
h-EPO	G#2	100	79.4	66.9
h-EPO	G#3	50	101.5	85.4
h-EPO	G#4	10	46.3	31.2
h-EPO	G#5	1	28.7	25.4
Luc	G#6	100	24.5	22.4
F.缓冲液	G#7	-	18.7	18.5

[1925] 表66.小鼠研究

[1926]

途径	处理	组	剂量	血清中的平均水平 pg/ml
IM	h-EPO	1	100 μg	96.2
IM	h-EPO	2	50 μg	63.5
IM	h-EPO	3	25 μg	18.7
IM	h-EPO	4	10 μg	25.9
IM	h-EPO	5	1 μg	2.6
IM	Luc	6	100 μg	0
IM	F.缓冲液	7	-	1.0
SC	h-EPO	1	100 μg	72.0
SC	Luc	2	100 μg	26.7
SC	F.缓冲液	3	--	17.4

[1927] 实施例46:肌内体内递送后活性的持续时间

[1928] 将在配制缓冲液中配制的修饰的人EPO mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)递送至Sprague-Dawley大鼠,以测定剂量反应的持续时间。给大鼠肌内注射50μl的修饰的人EPO mRNA(h-EPO)、修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)(Luc)或配制缓冲液(F.缓冲液),如给药图表表67中所述。在肌内注射后2、6、12、24、48和72小时,将大鼠放血,以测定给定时间处血清中人EPO的浓度。此研究的平均值和几何平均值(pg/ml)也在表67中示出。

[1929] 表67.给药图表

[1930]

	组	剂量 (ug)	平均值 pg/ml	几何平均值 (pg/ml)
h-EPO	2 小时	100	59.6	58.2
h-EPO	6 小时	100	68.6	55.8
h-EPO	12 小时	100	87.4	84.5
h-EPO	24 小时	100	108.6	95.3
h-EPO	48 小时	100	77.9	77.0
h-EPO	72 小时	100	80.1	75.8
Luc	24、48 和 72 小时	100	37.2	29.2
F.缓冲液	24、48 和 72 小时	-	48.9	10.4

[1931] 实施例47:施用途径

[1932] 执行进一步研究以调查使用不同施用途径的给药。按照实施例35中概述的方案,通过表68中概述的给药图表,向每组4只小鼠肌内(I.M.)、静脉内(IV)或皮下(S.C.)给药。注射后13小时从所有小鼠中收集血清,从肌内和皮下组的注射部位收集组织,并且从静脉内组收集脾、肝和肾。肌内组和皮下组的结果在表69中示出。

[1933] 表68.给药图表

[1934]

组	处理	途径	mmRNA 的剂量	总 剂量	给药媒介物
1	脂质复合-人 EPO mmRNA	I.M.	4 x 100 ug + 30%脂质复合物	4x70 ul	脂质复合物
2	脂质复合-人 EPO mmRNA	I.M.	4 x 100 ug	4x70 ul	缓冲液
3	脂质复合-人 EPO mmRNA	S.C.	4 x 100 ug + 30%脂质复合物	4x70 ul	脂质复合物
4	脂质复合-人 EPO mmRNA	S.C.	4 x 100 ug	4x70 ul	缓冲液
5	脂质复合-人 EPO mmRNA	I.V.	200 ug + 30% 脂质复合物	140 ul	脂质复合物
6	脂质复合的荧光素酶 mmRNA	I.M.	100 ug + 30% 脂质复合物	4x70 ul	脂质复合物
7	脂质复合的荧光素酶 mmRNA	I.M.	100 ug	4x70 ul	缓冲液
8	脂质复合的荧光素酶 mmRNA	S.C.	100 ug + 30% 脂质复合物	4x70 ul	脂质复合物
9	脂质复合的荧光素酶 mmRNA	S.C.	100 ug	4x70 ul	缓冲液
10	脂质复合的人 EPO mmRNA	I.V.	200 ug + 30% 脂质复合物	140 ul	脂质复合物
11	配制缓冲液	I.M.	4x 多次给药	4x70 ul	缓冲液

[1935] 表69.小鼠血清中的人EPO蛋白(IM注射途径)

[1936]

制剂	EPO (pg/ml)	
	I.M.注射途径	S.C.注射途径
Epo-脂质复合物	67.115	2.154
Luc-脂质复合物	0	0
Epo-盐水	100.891	11.37
Luc-盐水	0	0
配制缓冲液	0	0

[1937] 实施例48.快速消除型脂质纳米颗粒(reLNP)研究

[1938] A.修饰RNA reLNP的配制

[1939] 制备了合成脂质、1,2-二硬脂酰基-3-磷脂酰胆碱(DSPC)(Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL)、胆固醇(Sigma-Aldrich,Taufkirchen,Germany)以及α-[3'-(1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙氧基)-甲酰胺-丙基]-ω-甲氧基-聚氧乙烯(PEG-c-DOMG)(NOF,Bouwelven,Belgium)的溶液,并且储存在-20℃。合成脂质选自具有内酯的DLin-DMA、具有末端酯的DLin-DMA、DLin-MC3-DMA-内酯以及具有末端酯的DLin-MC3-DMA。将reLNP合并,以得到50:

10:38.5:1.5(reLNP:DSPC:胆固醇:PEG-c-DOMG)的摩尔比。通过将脂质溶液与修饰mRNA溶液以10:1、15:1、20:1和30:1的总脂质与修饰mRNA的重量比合并,来制备reLNP和修饰mRNA的制剂。

[1940] B.制剂的表征

[1941] 使用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments有限责任公司,Malvern,Worcestershire,UK)测定修饰mRNA纳米颗粒的粒度、多分散指数(PDI)和ζ电势,在1X PBS中测定粒度并且在15mM PBS中测定ζ电势。

[1942] 使用紫外可见光谱测定修饰mRNA纳米颗粒制剂的浓度。混合之后,在DU 800分光光度计(Beckman Coulter,Beckman Coulter有限公司,Brea,CA)上在230nm与330nm之间记录溶液的吸收光谱。纳米颗粒制剂中的修饰RNA浓度基于制剂中使用的修饰RNA的消光系数以及在260nm波长处的吸光度与在330nm波长处的基线值之间的差来计算。

[1943] 使用QUANT-IT™RIBOGREEN®RNA测定(Invitrogen Corporation Carlsbad,CA)来评价纳米颗粒对修饰RNA的包封。将样品稀释、转移至聚苯乙烯96孔平板,然后添加TE缓冲液或2%Triton X-100溶液。孵育平板并且将RIBOGREEN®试剂在TE缓冲液中稀释,并将此溶液添加到每个孔中。使用荧光平板读取器(Wallac Victor 1420Multilabel Counter;Perkin Elmer,Waltham,MA)测量荧光强度。从每个样品中减去试剂空白的荧光值,并且通过用完整样品的荧光强度除以破碎样品的荧光值来测定游离的修饰RNA的百分比。

[1944] C.体外孵育

[1945] 将人胚胎肾上皮(HEK293)细胞和肝细胞癌上皮(HepG2)细胞(LGC standards GmbH,Wesel,Germany)接种到96孔平板(Greiner Bio-one GmbH,Frickenhausen,Germany)上,并且用于HEK293细胞的平板预先涂布有1型胶原。将HEK293以约30,000细胞/孔的密度接种,HepG2以约35,000细胞/孔的密度接种在100μl细胞培养基中。在接种细胞并且孵育之后,直接添加含有mCherry mRNA(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)的制剂。具有用于体外转录(IVT)的T7启动子、5'非翻译区(UTR)和3′UTR的mCherry cDNA在SEQ ID NO:172中给出。

[1946] 通过将培养基上清液转移至96孔Pro-Bind U底平板(Beckton Dickinson GmbH,Heidelberg,Germany)来收获细胞。将细胞用1/2体积的胰蛋白酶/EDTA(Biochrom AG,Berlin,Germany)胰蛋白酶消化,与对应的上清液合并,并且通过添加一个体积的PBS/2%FCS(均为Biochrom AG,Berlin,Germany)/0.5%甲醛(Merck,Darmstadt,Germany)进行固定。然后在LSRII细胞仪(Beckton Dickinson GmbH,Heidelberg,Germany)中用激发激光和PE-Texas Red的610/20滤波器使样品经受流式细胞仪测量。给出了所分析样品的全部事件的平均荧光强度(MFI)和四个独立孔的标准偏差。

[1947] D.体内制剂研究

[1948] 向小鼠静脉内施用单次剂量的含有修饰mRNA和reLNP的制剂。施用至小鼠的修饰mRNA选自:G-CSF(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、IX因子(SEQ ID NO:174中示出的mRNA;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)或mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。

[1949] 给小鼠注射100ug、10ug或1ug的配制的修饰mRNA，并且在施用制剂后8小时将小鼠处死。通过特异性G-CSF ELISA对来自施用含有人G-CSF修饰mRNA的制剂的小鼠的血清进行测量，并且通过特异性IX因子ELISA或显色测定对来自施用人IX因子修饰RNA的小鼠的血清进行分析。通过免疫组织化学(IHC)或荧光激活细胞分选(FACS)对来自施用了mCherry修饰mRNA的小鼠的肝和脾进行分析。作为对照，一组小鼠不注射任何制剂，并且收集其血清和组织，通过ELISA、FACS和/或IHC进行分析。

[1950] 实施例49.VEGF-A的体外转染

[1951] 通过反向转染将人血管内皮生长因子同工型A(VEGF-A)修饰的mRNA(SEQ ID NO:183中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)在24多孔平板中转染到人角质形成细胞中。使人角质形成细胞在来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的具有补充剂S7的EPILIFE®培养基中生长，直到其达到50％-70％的汇合。用0ng、46.875ng、93.75ng、187.5ng、375ng、750ng和1500ng的已经与来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的RNAIMAX™复合的编码VEGF-A的修饰mRNA(mmRNA)转染细胞。通过首先将RNA以5X体积稀释度用不含补充剂的EPILIFE®培养基在室温下孵育10分钟来形成RNA:RNAIMAX™复合物。在第二个小瓶中，以10X体积稀释度将RNAIMAX™试剂与不含补充剂的EPILIFE®培养基一起在室温下孵育10分钟。然后将RNA小瓶与RNAIMAX™小瓶混合，并且在室温下孵育20-30分钟，之后以逐滴方式添加到细胞中。

[1952] 转染到人角质形成细胞中的编码VEGF-A(SEQ ID NO:183中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)的完全优化的mRNA包括翻译期间的修饰，如天然核苷三磷酸(NTP)、在每个尿苷位点处的假尿苷和在每个胞嘧啶位点处的5-甲基胞嘧啶(假-U/5mC)，以及在每个尿苷位点处的N1-甲基-假尿苷和在每个胞嘧啶位点处的5-甲基胞嘧啶(N1-甲基-假-U/5mC)。用编码VEGF-A的mmRNA转染细胞，对于每个浓度，在转染后6、12、24和48小时，使用来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的ELISA试剂盒按照制造商推荐的说明对培养基中分泌的VEGF-A浓度(ρg/ml)进行测量。表70和图6A、6B和6C中示出的这些数据显示，编码VEGF-A的修饰mRNA能够在人角质形成细胞中被翻译，并且VEGF-A被运输出细胞并释放到胞外环境中。

[1953] 表70.VEGF-A给药和蛋白质分泌

[1954]

含有天然 NTP 的 VEGF-A 给药				
剂量(ug)	6 小时(pg/ml)	12 小时(pg/ml)	24 小时(pg/ml)	48 小时(pg/ml)
46.875	10.37	18.07	33.90	67.02
93.75	9.79	20.54	41.95	65.75
187.5	14.07	24.56	45.25	64.39
375	19.16	37.53	53.61	88.28
750	21.51	38.90	51.44	61.79
1500	36.11	61.90	76.70	86.54
含有假-U/5mC 的 VEGF-A 给药				
剂量(ug)	6 小时(pg/ml)	12 小时(pg/ml)	24 小时(pg/ml)	48 小时(pg/ml)
46.875	10.13	16.67	33.99	72.88
93.75	11.00	20.00	46.47	145.61
187.5	16.04	34.07	83.00	120.77
375	69.15	188.10	448.50	392.44
750	133.95	304.30	524.02	526.58
1500	198.96	345.65	426.97	505.41
含有 N1-甲基-假-U/5mC 的 VEGF-A 给药				
剂量(ug)	6 小时(pg/ml)	12 小时(pg/ml)	24 小时(pg/ml)	48 小时(pg/ml)
46.875	0.03	6.02	27.65	100.42
93.75	12.37	46.38	121.23	167.56
187.5	104.55	365.71	1025.41	1056.91
375	605.89	1201.23	1653.63	1889.23

[1955]

750	445.41	1036.45	1522.86	1954.81
1500	261.61	714.68	1053.12	1513.39

[1956] 实施例50.IX因子的体内研究

[1957] 将配制在配制缓冲液中的人IX因子mmRNA(Gen1;完全修饰的5-甲基胞嘧啶和假尿苷)通过肌内注射递送至小鼠。结果表明,血清中的IX因子蛋白升高,如施用后13小时所测量的。

[1958] 在此研究中,以2x 100ug/小鼠向小鼠(对于IX因子N=5,对于荧光素酶或缓冲液对照N=3)肌内注射50μl的IX因子mmRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、荧光素酶(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)或配制缓冲液(F.缓冲液)。在肌内注射后13小时将小鼠放血,以测定血清中人多肽的浓度(pg/mL)。结果揭示,IX因子mmRNA的施用导致在13小时时的1600pg/mL的水平,与荧光素酶或缓冲液对照施用的小于100pg/mL的IX因子形成对比。

[1959] 实施例51.多部位施用:肌内和皮下

[1960] 将修饰为Gen1或Gen2(5-甲基胞嘧啶(5mc)和假尿苷(ψ)修饰,G-CSF-Gen1;或N1-5-甲基胞嘧啶(N1-5mc)和ψ修饰,G-CSF-Gen2)并且在配制缓冲液中配制的人G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'

帽,Cap1)通过肌内(IM)或皮下(SC)注射递送至小鼠。每天执行四次剂量或2x 50ug(两个部位)的注射,持续三天(24小时间隔)。在血液收集和CBS分析之前6小时施用第四剂量。对照包括荧光素酶(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)或配制缓冲液(F.缓冲液)。在第一mRNA注射(最后一次修饰mRNA剂量后6小时)后72小时将小鼠放血,以测定mRNA编码的人G-CSF对中性粒细胞计数的作用。给药方案在表71中示出,所得的中性粒细胞计数(千/uL)同样如此。在表71中,星号(*)指示p<0.05的统计显著性。

[1961] 对于肌内施用,数据揭示,对于Gen1G-CSF mRNA,在第3天中性粒细胞计数比对照高4倍,对于Gen2G-CSF mmRNA,高2倍。对于皮下施用,数据揭示,对于Gen2G-CSF mRNA,在第3天,中性粒细胞计数比对照高2倍。

[1962] 这些数据表明,5-甲基胞嘧啶/假尿苷和5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷-修饰mRNA均可为生物活性的,如血液中性粒细胞计数的特异性增加所证明。

[1963] 表71.给药方案

[1964]

组	处理	途径	N=	剂量(μg/小鼠)	剂量体积(μl/小鼠)	给药媒介物	中性粒细胞 千/uL
1	G-CSF (Gen1)	I.M	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	840*
2	G-CSF (Gen1)	S.C	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	430
3	G-CSF (Gen2)	I.M	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	746*
4	G-CSF (Gen2)	S.C	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	683
5	Luc (Gen1)	I.M.	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	201
6	Luc (Gen1)	S.C.	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	307
7	Luc (Gen2)	I.M	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	336
8	Luc (Gen2)	S.C	5	2x50 ug (四次剂量)	50	F.缓冲液	357
9	F.缓冲液	I.M	4	0 (四次剂量)	50	F.缓冲液	245
10	F.缓冲液	S.C.	4	0 (四次剂量)	50	F.缓冲液	509
11	未处理的	-	4			-	312

[1965]

[1966] 实施例52.静脉内施用

[1967] 将用5-甲基胞嘧啶(5mc)和假尿苷(ψ)修饰(Gen 1)进行修饰或不具有修饰,并且配制于10%脂质复合物(RNAiMax)中的人G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)以50ug RNA的剂量并且以100ul的体积通过静脉内(IV)注射在第0天、第2天、和第4天递送至小鼠。在第1天、第5天和第8天测量中性粒细胞。对照包括非特异性哺乳动物RNA或仅包括配制缓冲液(F.缓冲液)。在第1天、第5天和第8天将小鼠放血,以测定修饰mRNA编码的人G-CSF对增加中性粒细胞计数的作用。给药方案在表72中示出,所得的中性粒细胞计数(千/uL;K/uL)同样如此。

[1968] 对于静脉内施用,数据揭示,在G-CSF修饰mRNA的情况下,在第5天中性粒细胞计数比对照高四至五倍,而在未修饰的G-CSFmRNA或非特异性对照的情况下没有。在最终注射之后四天,血细胞计数回到基线。没有观察到白细胞群的其它改变。

[1969] 在表72中,星号(*)指示与缓冲液相比,$p<0.001$的统计显著性。

[1970] 这些数据表明,当通过I.V.施用途径递送时,脂质复合-配制的5-甲基胞嘧啶/假尿苷-修饰mRNA可为生物活性的,如通过血液中性粒细胞计数的特异性增加所证明。其它细胞亚群没有显著变化。类似地施用的未修饰的G-CSF mRNA显示对中性粒细胞计数没有药理学作用。

[1971] 表72.给药方案

[1972]

组	天数	处理	N=	剂量体积 (μl/小鼠)	给药媒介物	中性粒细胞 K/uL
1	1	G-CSF (Gen1)	5	100	10%脂质复合物	2.91
2	5	G-CSF (Gen1)	5	100	10%脂质复合物	5.32*
3	8	G-CSF (Gen1)	5	100	10%脂质复合物	2.06
4	1	G-CSF (无修饰)	5	100	10%脂质复合物	1.88
5	5	G-CSF (无修饰)	5	100	10%脂质复合物	1.95
6	8	G-CSF (无修饰)	5	100	10%脂质复合物	2.09
7	1	RNA 对照	5	100	10%脂质复合物	2.90
8	5	RNA 对照	5	100	10%脂质复合物	1.68
9	8	RNA 对照	4	100	10%脂质复合物	1.72
10	1	F.缓冲液	4	100	10%脂质复合物	2.51
11	5	F.缓冲液	4	100	10%脂质复合物	1.31
12	8	F.缓冲液	4	100	10%脂质复合物	1.92

[1973] 实施例53.盐水制剂:肌内施用

[1974] A.蛋白质表达

[1975] 将人G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)和人EPO mmRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、G-CSF修饰mRNA(用5-甲基胞嘧啶(5mc)和假尿苷(ψ)修饰)以及EPO修饰mRNA(用N1-5-甲基胞嘧啶(N1-5mc)和ψ修饰进行修饰)配制于配制缓冲液(150mM氯化钠、2mM氯化钙、2mM磷酸盐、0.5mM EDTA(pH 6.5))中,并且通过肌内(IM)注射以100ug的剂量递送至小鼠。

[1976] 对照包括荧光素酶(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)或配制缓冲液(F.缓冲液)。在注射后13小时将小鼠放血,以测定血清中人多肽的浓度(pg/mL)。(G-CSF组在小鼠血清中测量人G-CSF并且EPO组在小鼠血清中测量人EPO)。数据在表73中示出。

[1977] 表73.给药方案

[1978]

组	处理	N=	剂量体积(μl/小鼠)	给药媒介物	平均蛋白质产量pg/mL，血清
G-CSF	G-CSF	5	50	盐水	19.8
G-CSF	荧光素酶	5	50	盐水	0.5
G-CSF	F.缓冲液	5	50	F.缓冲液	0.5
EPO	EPO	5	50	盐水	191.5
EPO	荧光素酶	5	50	盐水	15.0
EPO	F.缓冲液			F.缓冲液	4.8

[1979] B.剂量反应

[1980] 将人EPO修饰mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制于配制缓冲液中并通过肌内(IM)注射递送至小鼠。

[1981] 对照包括荧光素酶(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)或配制缓冲液(F.缓冲液)。在注射后13小时将小鼠放血,以测定血清中人多肽的浓度(pg/mL)。剂量和表达在表74中示出。

[1982] 表74.给药方案和表达

[1983]

处理	剂量体积(μl/小鼠)	平均蛋白质产量pg/mL，血清
EPO	100	96.2
EPO	50	63.5
EPO	25	18.7
EPO	10	25.9
EPO	1	2.6
荧光素酶	100	0.0
F.缓冲液	100	1.0

[1984] 实施例54.EPO多次给药/多次施用

[1985] 设计并执行在一个时间点利用多个肌内注射部位的研究。

[1986] 单个多次给药实验的设计涉及使用在配制缓冲液中施用的人促红细胞生成素(EPO)mmRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)或G-CSF mmRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。给药媒介物(F.缓冲液)用作对照。在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代对EPO和G-CSF修饰mRNA进行修饰。

[1987] 对于100ug的单次单位剂量,向动物(n=5)Sprague-Dawley大鼠IM(肌内)注射(递送至一个大腿)。对于多次给药,EPO和G-CSF mmRNA均使用6次100ug的剂量(递送至两个大腿)。对照给药涉及以单次剂量使用缓冲液。在注射后13小时对人EPO血液水平进行评价。

[1988] 肌内注射后13小时,在大鼠血清中测量人EPO蛋白质。对五组大鼠进行处理和评价。结果在表75中示出。

[1989] 表75.多次给药研究

[1990]

组	处理	mmRNA 的剂量	总 剂量	平 均 Pg/mL 人 EPO,血清
1	人 EPO mmRNA	1 x 100 ug	100 ug	143
2	人 EPO mmRNA	6 x 100 ug	600 ug	256
3	G-CSF mmRNA	1 x 100 ug	100 ug	43
4	G-CSF mmRNA	6 x 100 ug	600 ug	58
5	仅缓冲液	--	--	20

[1991] 实施例55.信号序列交换研究

[1992] 使用修饰核苷酸假尿苷和5-甲基胞嘧啶(假-U/5mC)合成编码人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)的mmRNA的若干变体。这些变体包括编码野生型N末端分泌信号肽序列(MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEA;SEQ ID NO:95)、非分泌信号肽序列或取自其它mRNA的分泌信号肽序列的G-CSF构建体。这些包括其中野生型G-CSF信号肽序列被以下中的任一信号肽序列替代的序列:人α-1-抗胰蛋白酶(AAT)(MMPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLA;SEQ ID NO:94)、人IX因子(FIX)(MQRVNMIMAESPSLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR;SEQ ID NO:96)、人催乳素(Prolac)(MKGSLLLLLVSNLLLCQSVAP;SEQ ID NO:97)或人白蛋白(Alb)(MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR;SEQ ID NO:98)。

[1993] 使用1ul的Lipofectamine 2000(Life Technologies),在24孔平板中,将250ng的编码各G-CSF变体的修饰mRNA转染到HEK293A(表中的293A)、小鼠成肌细胞(表中的MM)(C2C12,CRL-1772,ATCC)和大鼠成肌细胞(表中的RM)(L6系,CRL-1458,ATCC)细胞系中,每个孔含有300,000个细胞。在24小时之后收获上清液,并且使用人G-CSF ELISA试剂盒(Life Technologies)通过ELISA对分泌的G-CSF蛋白进行分析。表76所示的数据揭示,用编码白蛋白信号肽的G-CSF mmRNA转染的细胞分泌的G-CSF蛋白比其野生型对应物多至少12倍。

[1994] 表76.信号肽交换

[1995]

信号肽	293A (pg/ml)	MM (pg/ml)	RM (pg/ml)
天然 G-CSF	9650	3450	6050
α-1-抗胰蛋白酶	9950	5000	8475
IX 因子	11675	6175	11675
催乳素	7875	1525	9800
白蛋白	122050	81050	173300
无信号肽	0	0	0

[1996] 实施例56.细胞因子研究:PBMC

[1997] A.PBMC分离和培养

[1998] 从肝素钠管中的研究血液组分(Research Blood Components)(批号KP30928和KP30931)中接收50mL来自两个供体的人类血液。对于每个供体,将血液合并,用DPBS(SAFC Bioscience 59331C,批号071M8408)稀释至70mL并且在两个50mL锥形管之间均匀地分配。将10mL的Ficoll Paque(GE Healthcare 17-5442-03,批号10074400)轻柔地分散在血液层下方。在低加速和制动的情况下,将管子在2000rpm下离心30分钟。移除管子并且将血沉棕黄PBMC层轻柔地转移至新鲜的50mL锥形管并用DPBS洗涤。将管子在1450rpm下离心10分钟。

[1999] 吸出上清液并且将PBMC沉淀重悬并在50mL的DPBS中洗涤。将管子在1250rpm下离心10分钟。重复此洗涤步骤,并且将PBMC沉淀重悬于19mL的Optimem I(Gibco 11058,批号1072088)中并计数。将细胞混悬液调节至3.0x 10^6细胞/mL活细胞的浓度。

[2000] 然后将这些细胞以50uL/孔涂布在五个(每个供体)96孔组织培养基处理的圆底平板(Costar 3799)上。在30分钟内,将转染混合物以50uL/孔的体积添加到每个孔中。在转染之后4小时,用10uL的胎牛血清(Gibco 10082,批号1012368)补充培养基。

[2001] B.转染物制备

[2002] 将编码人G-CSF的mmRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)(含有(1)天然NTP,(2)具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的100%取代,或(3)具有5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷的100%取代);编码荧光素酶的mmRNA(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)(含有(1)天然NTP或(2)具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的100%取代)以及TLR激动剂R848(Invivogen tlrl-r848)在最终体积2500uL的Optimem I中稀释至38.4ng/uL。

[2003] 单独地,用13.1mL Optimem I稀释432uL的Lipofectamine 2000(Invitrogen 11668-027,批号1070962)。在96孔平板中,将九等份的135uL的各mmRNA、阳性对照(R-848)或阴性对照(Optimem I)添加至135uL的稀释的Lipofectamine 2000。将含有待转染材料的平板孵育20分钟。然后将转染混合物以50uL/孔转移至每个人PBMC平板。然后在37℃下孵育平板。在第2小时、第4小时、第8小时、第20小时和第44小时,将每个平板从培养箱中移除,并且冷冻上清液。

[2004] 在移除最后一个平板之后,使用人G-CSF ELISA试剂盒(Invitrogen KHC2032)和人IFN-αELISA试剂盒(Thermo Scientific 41105-2)对上清液进行测定。每个条件重复进

行两次。

[2005] C.结果

[2006] 随着时间的推移对未修饰和修饰mRNA(mmRNA)产生所编码蛋白质的能力进行评估,同样对mRNA触发先天性免疫识别的能力进行评估,如通过干扰素-α产生所测量的。体外PBMC培养物的使用是用以测量寡核苷酸的免疫刺激潜力的已接受方式(Robbins等,Oligonucleotides 2009 19:89-102;通过引用整体并入本文)。

[2007] 将结果对照使用四个参数逻辑曲线拟合的每个ELISA平板的标准曲线进行内插。表77和78所示的是如通过特异性ELISA所测量的随着时间推移G-CSF和IFN-α产量的来自2个单独PBMC供体的平均值。

[2008] 在G-CSF ELISA中,在每个时间点,减去来自Lipofectamine 2000未处理条件的背景信号。数据表明,在含有天然NTP、具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的100%取代或具有5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷的100%取代的G-CSF mRNA的情况下,观察到通过人外周血单核细胞特异性地产生人G-CSF蛋白。相对于未修饰的mRNA,通过使用修饰mRNA,显著增加了G-CSF的产生,其中含有5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷的G-CSF mmRNA显示出最高水平的G-CSF产生。就先天性免疫识别来说,未修饰的mRNA导致显著的IFN-α产生,而修饰mRNA大大阻止了干扰素-α产生。用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA不显著增加细胞因子,而用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA诱导IFN-α、TNF-α和IP10。许多其它细胞因子不受任一修饰的影响。

[2009] 表77.G-CSF信号

[2010]

G-CSF 信号-2 个供体平均值					
pg / mL	**2 小时**	**4 小时**	**8 小时**	**20 小时**	**44 小时**
G-CSF (5mC/假尿苷)	120.3	136.8	421.0	346.1	431.8
G-CSF (5mC/N1-甲基-假尿苷)	256.3	273.7	919.3	1603.3	1843.3
G-CSF(天然-无修饰)	63.5	92.6	129.6	258.3	242.4
荧光素酶(5mC/假尿苷)	4.5	153.7	33.0	186.5	58.0

[2011] 表78.IFN-α信号

[2012]

IFN-α 信号-2 个供体平均值					
pg / mL	**2 小时**	**4 小时**	**8 小时**	**20 小时**	**44 小时**
G-CSF (5mC/假尿苷)	21.1	2.9	3.7	22.7	4.3
G-CSF (5mC/N1-甲基-假尿苷)	0.5	0.4	3.0	2.3	2.1
G-CSF(天然)	0.0	2.1	23.3	74.9	119.7
荧光素酶(5mC/假尿苷)	0.4	0.4	4.7	1.0	2.4
R-848	39.1	151.3	278.4	362.2	208.1
Lpf. 2000 对照	0.8	17.2	16.5	0.7	3.1

[2013] 实施例57.修饰mRNA的化学修饰范围

[2014] 例如但不限于化学修饰5-甲基胞嘧啶和假尿苷的修饰核苷酸已显示出在哺乳动

物细胞中降低先天性免疫应答并增加RNA的表达。令人惊讶并且先前未知的是，当化学修饰的量少于100％时，化学修饰所表现的作用可滴定。先前据信完全修饰对于引发化学修饰的有益作用是必需并且足够的，并且mRNA的少于100％修饰具有极小作用。然而，现在已经显示，可使用少于完全修饰得到化学修饰的益处并且作用是靶标、浓度和修饰依赖性的。

[2015] A.在PBMC中转染的修饰RNA

[2016] 将960ng的用5-甲基胞嘧啶(5mC)和假尿苷(假U)修饰的G-CSF mRNA或未修饰的G-CSF mRNA与0.8uL的Lipofectamine 2000一起转染到来自三个正常血液供体(D1、D2、D3)的外周血单核细胞(PBMC)中。G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5’帽，Cap1)用5mC和假U完全修饰(100％修饰)、不用5mC和假U修饰(0％修饰)或用5mC和假U部分修饰，以使mRNA将含有50％修饰、25％修饰、10％修饰、5％修饰、1％修饰或0.1％修饰。对于G-CSF表达，还对荧光素酶(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5’帽，Cap1；完全修饰的5meC和假U)的对照样品进行分析。对于TNF-α和IFN-α，还对Lipofectamine2000、LPS、R-848、荧光素酶(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5’帽，Cap1；完全修饰的5mC和假)以及P(I)P(C)的对照样品进行分析。在转染之后22小时，收获上清液并通过ELISA分析，以测定蛋白质表达。G-CSF的表达在表79中示出，并且IFN-α和TNF-α的表达在表80中示出。IFN-α和TNF-α的表达可为G-CSF mRNA的转染的次级效应。表79和80显示，当mRNA不是完全修饰的时，G-CSF、IFN-α和TNF-α的化学修饰的量为可滴定的，并且每个靶标的可滴定趋势不相同。

[2017] 表79.G-CSF表达

[2018]

	G-CSF 表达(pg/ml)		
	D1	D2	D3
100%修饰	270.3	151.6	162.2
50%修饰	45.6	19.8	26.3
25%修饰	23.6	10.8	8.9
10%修饰	39.4	12.9	12.9
5%修饰	70.9	26.8	26.3
1%修饰	70.3	26.9	66.9
0.1%修饰	67.5	25.2	28.7
荧光素酶	14.5	3.1	10.0

[2019] 表80.IFN-α和TNF-α表达

[2020]

	IFN-α 表达(pg/ml)			TNF-α 表达(pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100% 修饰	76.8	6.8	15.1	5.6	1.4	21.4
50%修饰	22.0	5.5	257.3	4.7	1.7	12.1
25%修饰	64.1	14.9	549.7	3.9	0.7	10.1
10%修饰	150.2	18.8	787.8	6.6	0.9	13.4
5%修饰	143.9	41.3	1009.6	2.5	1.8	12.0
1%修饰	189.1	40.5	375.2	9.1	1.2	25.7
0.1%修饰	261.2	37.8	392.8	9.0	2.	13.7
0%修饰	230.3	45.1	558.3	10.9	1.4	10.9
LF 200	0	0	1.5	45.8	2.8	53.6
LPS	0	0	1.0	114.5	70.0	227.0

[2021]

R-848	39.5	11.9	183.5	389.3	256.6	410.6
荧光素酶	9.1	0	3.9	4.5	2.7	13.6
P(I)P(C)	1498.1	216.8	238.8	61.2	4.4	69.1

[2022] B.在HEK293中转染的修饰RNA

[2023] 将人胚胎肾上皮(HEK293)细胞在100ul细胞培养基中以30,000细胞/孔的密度接种在96孔平板上。向孔中添加与RNAiMAX ™(Invitrogen,Carlsbad,CA)一起配制的250ng的修饰的G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。G-CSF用5mC和假U完全修饰(100%修饰)、不用5mC和假U修饰(0%修饰),或用5mC和假U部分修饰,以使mRNA将含有75%修饰、50%修饰或25%修饰。还对对照样品(AK 5/2、mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;完全修饰的5mC和假U)以及未处理的)进行分析。用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA的半衰期为大约8-10小时。在16小时之后收获上清液并且通过ELISA对分泌的G-CSF蛋白质进行分析。表81显示当mRNA不是完全修饰的时,G-CSF的化学修饰的量是可滴定的。

[2024] 表81.G-CSF表达

[2025]

	G-CSF表达(ng/ml)
100%修饰	118.4
75%修饰	101.9
50%修饰	105.7
25%修饰	231.1
0%修饰	270.9
AK 5/2	166.8
mCherry	0
未处理的	0

[2026] 实施例58:修饰mRNA(mmRNA)的体内递送

[2027] 将修饰RNA肌内、皮下或静脉内递送至C57/BL6小鼠,以使用荧光素酶评价修饰RNA的生物分布。使用氢氧化钠对与所有递送方法一起使用的含有150mM氯化钠、2mM氯化钙、

2mM Na+-磷酸盐(包括1.4mM磷酸二氢钠和0.6mM磷酸氢二钠)以及0.5mM乙二胺四乙酸(EDTA)的配制缓冲液进行调节,以达到6.5的最终pH,之后进行过滤和灭菌。使用1X浓度作为递送缓冲液。为了形成递送至小鼠的脂质复合的溶液,在一个小瓶中,将50μg的RNA在室温下在递送缓冲液中平衡10分钟,并且在第二小瓶中,将10μlRNAiMAX™在室温下在递送缓冲液中平衡10分钟。平衡之后,将小瓶合并,并且添加递送缓冲液以达到100μl的最终体积,然后将其在室温下孵育20分钟。在介于15分钟与30分钟之间的荧光素暴露曲线的平台期期间,在成像之前,通过腹膜内注射(IP)以150mg/kg向每只小鼠施用荧光素。为了产生荧光素,将1g的D-荧光素钾或钠盐溶解于66.6ml蒸馏的磷酸盐缓冲溶液(DPBS)(不含Mg2+或Ca2+)中,以制备15mg/ml溶液。将溶液轻轻混合并使其通过0.2μm注射过滤器,之后用氮气吹扫,等分并冷冻于-80℃,同时尽可能避光。在给药的当天,使用水浴(如果荧光素不溶解)将溶液解冻,轻轻混合并保持在冰上。

[2028] 在给药后2、8和24小时获取每只小鼠的全身图像。在给药后24小时从每只小鼠收集组织图像和血清。将静脉内施用剂量的小鼠的肝、脾、肾、肺、心、肾周围脂肪组织和胸腺成像。将静脉内或皮下施用剂量的小鼠的肝、脾、肾、肺、肾周围脂肪组织和注射部位的肌肉成像。对于每个施用途径和给药方案,由全身图像对生物发光进行测量,以光子/秒计。

[2029] A.肌内施用

[2030] 对于每种制剂,以在50μl注射体积中的50μg修饰RNA的单次剂量在右后肢中,并且以在50μl注射体积中的5μg修饰RNA的单次剂量在左后肢中向小鼠肌内(I.M.)施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的修饰荧光素酶mRNA(裸-Luc)、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的脂质复合的修饰荧光素酶mRNA(脂质复合-luc)(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)、脂质复合的修饰的粒细胞集落刺激因子(G-CSF)mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)(脂质复合-细胞因子)或配制缓冲液。在给药后2、8和24小时,每组的荧光素酶表达信号的生物发光平均值在表82中示出。在5μg和50μg含有和不含脂质复合物的修饰RNA制剂的注射部位,生物发光显示阳性信号。

[2031] 表82.体内生物光子成像(I.M.注射途径)

[2032]

制剂	剂量(ug)	生物发光(光子/秒)		
		2 小时	8 小时	24 小时
裸-Luc	5	224,000	683,000	927,000
脂质复合-Luc	5	579,000	639,000	186,000
脂质复合-G-CSF	5	64,600	85,600	75,100
配制缓冲液	5	102,000	86,000	90,700
裸-Luc	50	446,000	766,000	509,000
脂质复合-Luc	50	374,000	501,000	332,000
脂质复合-G-CSF	50	49,400	74,800	74,200
配制缓冲液	50	59,300	69,200	63,600

[2033] B.皮下施用

[2034] 对于每种制剂,以在100μl注射体积中的50μg修饰mRNA的单次剂量,向小鼠皮下(S.C.)施用修饰的荧光素酶mRNA(裸-Luc)、脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA(脂质复合-luc),脂质复合的修饰的G-CSF mRNA(脂质复合-G-CSF)或配制缓冲液。在给药后2、8和24小时,每组的荧光素酶表达信号的生物发光平均值在表83中示出。在50μg含有和不含脂质复合物的修饰mRNA制剂的注射部位,生物发光显示阳性信号。

[2035] 表83.体内生物光子成像(S.C.注射途径)

[2036]

制剂	生物发光(光子/秒)		
	2 小时	8 小时	24 小时
裸-Luc	3,700,000	8,060,000	2,080,000
脂质复合-Luc	3,960,000	1,700,000	1,290,000
脂质复合-G-CSF	123,000	121,000	117,000
配制缓冲液	116,000	127,000	123,000

[2037] C.静脉内施用

[2038] 对于每种制剂,以在100μl注射体积中的50μg修饰mRNA的单次剂量,向小鼠静脉内(I.V.)施用修饰的荧光素酶mRNA(裸-Luc)、脂质复合的修饰的荧光素酶mRNA(脂质复合-luc),脂质复合的修饰的G-CSF mRNA(脂质复合-G-CSF)或配制缓冲液。在给药后2小时,来自每组的脾中的荧光素酶表达信号的生物发光平均值在表84中示出。在50μg含有脂质复合物的修饰mRNA制剂的脾中,生物发光显示阳性信号。

[2039] 表84.体内生物光子成像(I.V.注射途径)

[2040]

制剂	脾的生物发光(光子/秒)
裸-Luc	58,400
脂质复合-Luc	65,000
脂质复合-G-CSF	57,100
配制缓冲液	58,300

[2041] 实施例59.缓冲液制剂研究

[2042] 以50μl的注射体积以如表85中所述的200ug/大鼠的修饰mRNA剂量向大鼠(n=5)肌内施用在缓冲溶液中的G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用N1-假尿苷和5-甲基胞嘧啶完全修饰)或IX因子修饰mRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用N1-假尿苷和5-甲基胞嘧啶完全修饰)。将修饰mRNA在水中冻干,持续1-2天。然后将其在以下列出的缓冲液中重构至6mg/ml的目标浓度。通过OD 260测定浓度。在给药之前将样品在适当的缓冲液中稀释至4mg/ml。

[2043] 为了使修饰mRNA沉淀,分别以修饰mRNA总体积的1/10和总体积的4倍添加pH 5.5的3M乙酸钠和纯乙醇。将材料放置于-80C,持续最少1小时。然后将材料在4000rpm、4C下离心30分钟。去除上清液并且将沉淀离心并用75%乙醇洗涤3x。最后,将沉淀用缓冲液重构至6mg/ml的目标浓度。通过OD 260测定浓度。在给药之前将样品在适当的缓冲液中稀释至4mg/ml。除非下文说明,否则所有样品均通过冻干法制备。

[2044] 表85.缓冲液给药组

[2045]

组	处理	缓冲液	剂量(ug/大鼠)
1	G-CSF	0.9%盐水	200
	IX 因子	0.9%盐水	200
2	G-CSF	0.9%盐水+2 mM 钙	200
	IX 因子	0.9%盐水+2 mM 钙	200
3	G-CSF	乳酸化林格氏液	200
	IX 因子	乳酸化林格氏液	200
4	G-CSF	5%蔗糖	200
	IX 因子	5%蔗糖	200
5	G-CSF	5%蔗糖+2 mM 钙	200
	IX 因子	5%蔗糖+2 mM 钙	200
6	G-CSF	5%甘露醇	200
	IX 因子	5%甘露醇	200
7	G-CSF	5%甘露醇+2 mM 钙	200
	IX 因子	5%甘露醇+2 mM 钙	200
8	G-CSF	0.9%盐水(沉淀)	200
	IX 因子	0.9%盐水(沉淀)	200

[2046] 在不同时间间隔从大鼠中收集血清样品,并且使用G-CSF或IX因子ELISA针对G-CSF或IX因子蛋白质表达对所述血清样品进行分析。

[2047] 实施例60.多次给药研究

[2048] 经28天向Sprague-Dawley大鼠(n=8)静脉内注射8次(一周两次)。给大鼠注射0.5mg/kg、0.05mg/kg、0.005mg/kg或0.0005mg/kg的配制于脂质纳米颗粒中的人G-CSF修饰mRNA或荧光素酶修饰mRNA、0.5mg/kg的在盐水中的人G-CSF修饰mRNA、0.2mg/kg的配制于脂质纳米颗粒中的人G-CSF蛋白质Neupogen或不可翻译的人G-CSF修饰mRNA。在预定的时间间隔期间收集血清,以评价G-CSF蛋白表达(在该周第一次给药后8、24和72小时),全血细胞计数和白血细胞计数(在该周第一次给药后24和72小时)和临床化学(在该周第一次给药后24和72小时)。在第29天(末次给药后4天)将大鼠处死,以测定全血细胞计数、白血细胞计数、临床化学、蛋白质表达并且通过组织病理学和尸体剖检评价对主要器官的作用。另外,在第29天在大鼠上进行抗体测定。

[2049] 实施例61.LNP体内研究

[2050] 使用注射泵法将荧光素酶修饰mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制为脂质纳米颗粒(LNP)。以20:1的总脂质与修饰mRNA的重量比配制LNP,并且最终脂质摩尔比为50:10:38.5:1.5(DLin-KC2-DMA:DSPC:胆固醇:PEG-c-DMG)。如表86中所示,通过粒度、ζ电位以及包封对荧光素酶LNP制剂进行表征。

[2051] 表86.荧光素酶制剂

[2052]

制剂	NPA-098-1
修饰 mRNA	荧光素酶
平均尺寸	135 nm
	PDI：0.08
在 pH 7.4 下的 ζ	-0.6 mV
包封 (RiboGr)	91 %

[2053] 如表87所概述，向Balb-C小鼠(n＝3)肌内、静脉内和皮下施用荧光素酶LNP制剂并且向小鼠静脉内施用配制于PBS中的荧光素酶修饰RNA。

[2054] 表87.荧光素酶制剂

[2055]

制剂	媒介物	途径	浓度 (mg/ml)	注射体积 (ul)	修饰 RNA 的量(ug)	剂量 (mg/kg)
Luc-LNP	PBS	IV	0.20	50	10	0.50
Luc-LNP	PBS	IM	0.20	50	10	0.50
Luc-LNP	PBS	SC	0.20	50	10	0.50
Luc-PBS	PBS	IV	0.20	50	10	0.50

[2056] 将静脉内和肌内施用荧光素酶LNP制剂的小鼠在2、8、24、48、120和192小时成像，并且将皮下施用荧光素酶LNP制剂的小鼠在2、8、24、48和120小时成像，以测定荧光素酶表达，如表88所示。在表88中，“NT”意思是未测试的。在成像之前20分钟，以150mg/kg给小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。

[2057] 表88.荧光素酶表达

[2058]

制剂	施用途径	平均表达(光子/秒)					
		2 小时	8 小时	24 小时	48 小时	120 小时	192 小时
Luc-LNP	IV	1.62E+08	3.00E+09	7.77E+08	4.98E+08	1.89E+08	6.08E+07
Luc-LNP	IM	4.85E+07	4.92E+08	9.02E+07	3.17E+07	1.22E+07	2.38E+06
Luc-LNP	SC	1.85E+07	9.79E+08	3.09E+08	4.94E+07	1.98E+06	NT
Luc-PBS	IV	3.61E+05	5.64E+05	3.19E+05	NT	NT	NT

[2059] 将静脉内施用LNP制剂的一只小鼠在第8小时处死，以测定肝和脾中的荧光素酶表达。同样，将肌内施用LNP制剂的一只小鼠在第8小时处死，以测定注射部位周围的肌肉以及肝和脾中的荧光素酶表达。如表89所示，在静脉内和肌内施用之后的肝和脾中以及肌内注射部位周围的肌肉中均观察到表达。

[2060] 表89.组织中的荧光素酶表达

[2061]

荧光素酶 LNP：IV 施用	表达(光子/秒)
肝	7.984E+08
脾	3.951E+08
荧光素酶 LNP:IM 施用	表达(光子/秒)
注射部位周围的肌肉	3.688E+07
肝	1.507E+08
脾	1.096E+07

[2062] 实施例62.细胞因子研究:PBMC

[2063] A.PBMC分离和培养

[2064] 从肝素钠管中的研究血液组分(批号KP30928和KP30931)中接收50mL来自两个供体的人类血液。对于每个供体,将血液合并,用DPBS(SAFC Bioscience 59331C,批号071M8408)稀释至70mL并且在两个50mL锥形管之间均匀地分配。将10mL的Ficoll Paque(GE Healthcare 17-5442-03,批号10074400)轻柔地分散在血液层下方。在低加速和制动的情况下,将管子在2000rpm下离心30分钟。移除管子并且将血沉棕黄PBMC层轻柔地转移至新鲜的50mL锥形管并用DPBS洗涤。将管子在1450rpm下离心10分钟。

[2065] 吸出上清液并且将PBMC沉淀重悬并在50mL的DPBS中洗涤。将管子在1250rpm下离心10分钟。重复此洗涤步骤,并且将PBMC沉淀重悬于19mL的Optimem I(Gibco 11058,批号1072088)中并计数。将细胞混悬液调节至3.0x 10^6细胞/mL活细胞的浓度。

[2066] 然后将这些细胞以50uL/孔接种在五个(每个供体)96孔组织培养基处理的圆底平板(Costar 3799)上。在30分钟内,将转染混合物以50uL/孔的体积添加到每个孔中。在转染后4小时,用10uL的胎牛血清(Gibco 10082,批号1012368)补充培养基。

[2067] B.转染物制备

[2068] 将编码人G-CSF的修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)(含有(1)天然NTP,(2)具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的100%取代,或(3)具有5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷的100%取代);编码荧光素酶的mRNA(SEQ ID NO:179中示出的IVT cDNA序列;SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列,具有大约160个核苷酸的polyA尾(序列中未示出),5'帽,Cap1,在每个胞嘧啶处用5-甲基胞嘧啶并且在每个尿苷位点处用假尿苷替代完全修饰)(含有(1)天然NTP或(2)具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的100%取代)以及TLR激动剂R848(Invivogen tlrl-r848)在最终体积2500uL的Optimem I中稀释至38.4ng/uL。

[2069] 单独地,用6.76mL Optimem I稀释110uL的Lipofectamine 2000(Invitrogen 11668-027,批号1070962)。在96孔平板中,将九等份的135uL的各mRNA、阳性对照(R-848)或阴性对照(Optimem I)添加至135uL的稀释的Lipofectamine 2000。将含有待转染材料的平板孵育20分钟。然后将转染混合物以50uL/孔转移至每个人PBMC平板。然后在37℃下孵育平板。在第2小时、第4小时、第8小时、第20小时和第44小时,将每个平板从培养箱中移除,并且冷冻上清液。

[2070] 在移除最后一个平板之后,使用人G-CSF ELISA试剂盒(Invitrogen KHC2032)和人IFN-αELISA试剂盒(Thermo Scientific 41105-2)对上清液进行测定。每个条件重复进行两次。

[2071] C.蛋白质和先天性免疫应答分析

[2072] 随着时间的推移对未修饰和修饰mRNA产生所编码蛋白质的能力进行评估,同样对mRNA触发先天性免疫识别的能力进行评估,如通过干扰素-α产生所测量的。体外PBMC培养物的使用是用以测量寡核苷酸的免疫刺激潜力的已接受方式(Robbins等,Oligonucleotides 2009 19:89-102)。

[2073] 将结果对照使用四个参数逻辑曲线拟合的每个ELISA平板的标准曲线进行内插。表90和91所示的是如通过特异性ELISA所测量的随着时间推移G-CSF、干扰素-α(IFN-α)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)产量的来自3个单独的PBMC供体的平均值。

[2074] 在G-CSF ELISA中,在每个时间点,减去来自Lipofectamine 2000(LF2000)未处理条件的背景信号。数据表明,在含有天然NTP、具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的100%取代或具有5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷的100%取代的G-CSF mRNA的情况下,观察到通过人外周血单核细胞特异性地产生人G-CSF蛋白。相对于5-甲基胞嘧啶和假尿苷修饰的mRNA,通过使用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷修饰的mRNA,显著增加了G-CSF的产生。

[2075] 就先天性免疫识别来说,虽然两种修饰mRNA化学物质均相对于阳性对照(R848、p(I)p(C))大大阻止了IFN-α和TNF-α产生,但是在化学物质之间的确存在着显著差异。5-甲基胞嘧啶和假尿苷修饰的mRNA导致低的但是可检测水平的IFN-α和TNF-α产生,而5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷修饰的mRNA导致不可检测的IFN-α和TNF-α产生。

[2076] 因此,已确定,除了需要审视先天性免疫应答的激活的不止一种细胞因子标志物之外,还令人惊讶地发现修饰的组合提供不同水平的细胞应答(蛋白质产生和免疫激活)。此研究中的修饰N1-甲基-假尿苷已显示出赋予了超出其他人所研究的5-甲基胞嘧啶/假尿苷的标准组合之外的额外保护,从而导致两倍的蛋白质以及免疫激活(TNF-α)的将近150倍的减少。

[2077] 假设PBMC含有大的先天性免疫RNA识别传感器阵列,并且还能够进行蛋白质翻译,那么它提供了适用于测试这两个途径的相互依赖性的系统。已知mRNA翻译可受到所述先天性免疫途径的激活的负面影响(Kariko等Immunity(2005)23:165-175;Warren等Cell Stem Cell(2010)7:618-630)。使用PBMC作为体外测定系统,可能建立翻译(在此情况下为G-CSF蛋白产生)与细胞因子产生(在此情况下例示为IFN-α和TNF-α蛋白质产生)之间的相关性。更好的蛋白质产生与更低的先天性免疫激活途径的诱导相关,并且可基于此比率有利地判断新的化学物质(表92)。

[2078] 在此研究中,与细胞因子IFN-α的9944/1=9944相比,均具有5-甲基胞嘧啶的两种化学修饰假尿苷和N1-甲基-假尿苷的PC比为4742/141=34。对于细胞因子TNF-α,两种化学物质具有分别为153和1243的PC比,表明对于任一细胞因子,N1-甲基-假尿苷为优异修饰。在表90和91中,“NT”意思是未测试的。

[2079] 表90.G-CSF

[2080]

G-CSF：3 个供体平均值(pg/ml)	
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/假尿苷	4742
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	9944
荧光素酶	18
LF2000	16

[2081] 表91.IFN-α和TNF-α

[2082]

	IFN-α：3 个供体平均值(pg/ml)	TNF-α：3 个供体平均值(pg/ml)
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/假尿苷	141	31
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	1	8
P(I)P(C)	1104	NT
R-848	NT	1477
LF2000	17	25

[2083] 表92.G-CSF与细胞因子的比

[2084]

	G-CSF/IFN-α(比)		G-CSF/TNF-α(比)	
	5-甲基胞嘧啶/假尿苷	5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	5-甲基胞嘧啶/假尿苷	5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷
PC 比	34	9944	153	1243

[2085] 实施例63.体外PBMC研究:修饰百分比

[2086] 将480ng的用5-甲基胞嘧啶(5mC)和假尿苷(假U)修饰的G-CSF mRNA或未修饰的G-CSF mRNA与0.4uL的Lipofectamine 2000一起转染到来自三个正常血液供体(D1、D2和D3)的外周血单核细胞(PBMC)中。G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1)用5mC和假U完全修饰(100％修饰)、不用5mC和假U修饰(0％修饰)或用5mC和假U部分修饰,以使mRNA将含有75％修饰、50％修饰或25％修饰。还针对G-CSF表达,对荧光素酶(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1;完全修饰的5meC和假U)的对照样品进行分析。对于TNF-α和IFN-α,还对Lipofectamine 2000、LPS、R-848、荧光素酶(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1;完全修饰的5mC和假U)以及P(I)P(C)的对照样品进行分析。在转染之后22小时,收获上清液并通过ELISA分析,以测定蛋白质表达。G-CSF的表达在表93中示出,并且IFN-α和TNF-α的表达在表94中示出。IFN-α和TNF-α的表达可为G-CSF mRNA的转染的次级效应。表93和94显示,当mRNA不是完全修饰的时,G-CSF、干扰素α(IFN-α)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的化学修饰的量为可滴定的,并且每个靶标的可滴定趋势不相同。

[2087] 通过使用PBMC作为体外测定系统,可能建立翻译(在此情况下为G-CSF蛋白产生)与细胞因子产生(在此情况下例示为IFN-α蛋白质产生)之间的相关性。更好的蛋白质产生与更低的先天性免疫激活途径的诱导相关,并且可基于此比率有利地判断化学物质的修饰

百分比(表95)。如由表93和94中计算以及表95中所示,具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的完全修饰显示出比没有任何修饰(天然G-CSF mRNA)好得多的蛋白质/细胞因子产生比(对于IFN-α为100倍,对于TNF-α为27倍)。部分修饰显示出与逐渐减少的修饰的线性关系,从而导致较低的蛋白质/细胞因子比。

[2088] 表93.G-CSF表达

[2089]

	G-CSF 表达(pg/ml)		
	D1	D2	D3
100%修饰	1968.9	2595.6	2835.7
75%修饰	566.7	631.4	659.5
50%修饰	188.9	187.2	191.9
25%修饰	139.3	126.9	102.0
0%修饰	194.8	182.0	183.3
荧光素酶	90.2	0.0	22.1

[2090] 表94.IFN-α和TNF-α表达

[2091]

	IFN-α 表达(pg/ml)			TNF-α 表达(pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100%修饰	336.5	78.0	46.4	115.0	15.0	11.1
75%修饰	339.6	107.6	160.9	107.4	21.7	11.8
50%修饰	478.9	261.1	389.7	49.6	24.1	10.4
25%修饰	564.3	400.4	670.7	85.6	26.6	19.8
0%修饰	1421.6	810.5	1260.5	154.6	96.8	45.9
LPS	0.0	0.6	0.0	0.0	12.6	4.3
R-848	0.5	3.0	14.1	655.2	989.9	420.4
P(I)P(C)	130.8	297.1	585.2	765.8	2362.7	1874.4
仅脂质	1952.2	866.6	855.8	248.5	82.0	60.7

[2092] 表95.PC比和修饰百分比的影响

[2093]

%修饰	平均 G-CSF (pg/ml)	平均 IFN-α (pg/ml)	平均 TNF-α (pg/ml)	G-CSF/IFN-α (PC 比)	G-CSF/TNF-α (PC 比)
100	2466	153	47	16	52
75	619	202	47	3.1	13

[2094]

50	189	376	28	0.5	6.8
25	122	545	44	0.2	2.8
0	186	1164	99	0.16	1.9

[2095] 实施例64.在PBMC中转染的修饰RNA

[2096] 将500ng的用5-甲基胞嘧啶(5mC)和假尿苷(假U)修饰的G-CSF mRNA或未修饰的G-CSF mRNA与0.4uL的Lipofectamine 2000一起转染到来自三个正常血液供体(D1、D2和D3)的外周血单核细胞(PBMC)中。G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)用5mC和假U完全修饰(100%修饰)、不用5mC和假U修饰(0%修饰)或用5mC和假U部分修饰,以使mRNA将含有50%修饰、25%修饰、

10％修饰、5％修饰、1％修饰或0.1％修饰。还针对G-CSF、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和干扰素-α(IFN-α)的表达，对mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5'帽，Cap1；完全修饰的5meC和假尿苷)的对照样品、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF(对照G-CSF)以及未处理的对照进行分析。在转染之后6小时和18小时，收获上清液并通过ELISA分析，以测定蛋白质表达。供体1的G-CSF、IFN-α和TNF-α的表达在表96中示出，供体2在表97中示出，并且供体3在表98中示出。

[2097] 具有5-甲基胞嘧啶和假尿苷的完全100％修饰导致在全部三个人PBMC供体中产生大部分蛋白质翻译(G-CSF)以及最少量的细胞因子。减小修饰的量导致更多的细胞因子产生(IFN-α和TNF-α)，因此进一步突出了完全修饰对减少细胞因子和改善蛋白质翻译的重要性(如此处G-CSF产生所证明)。

[2098] 表96.供体1

[2099]

	G-CSF (pg/ml)		IFN-α (pg/ml)		TNF-α (pg/ml)	
	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时
100%修饰	1815	2224	1	13	0	0

[2100]

75%修饰	591	614	0	89	0	0
50%修饰	172	147	0	193	0	0
25%修饰	111	92	2	219	0	0
10%修饰	138	138	7	536	18	0
1%修饰	199	214	9	660	18	3
0.1%修饰	222	208	10	597	0	6
0%修饰	273	299	10	501	10	0
对照 G-CSF	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
未处理的	N/A	不适用	0	0	1	1

[2101] 表97.供体2

[2102]

	G-CSF (pg/ml)		IFN-α (pg/ml)		TNF-α (pg/ml)	
	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时
100%修饰	2184	2432	0	7	0	11
75%修饰	935	958	3	130	0	0
50%修饰	192	253	2	625	7	23
25%修饰	153	158	7	464	6	6
10%修饰	203	223	25	700	22	39
1%修饰	288	275	27	962	51	66
0.1%修饰	318	288	33	635	28	5
0%修饰	389	413	26	748	1	253
对照 G-CSF	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
未处理的	不适用	不适用	1	0	0	0

[2103] 表98.供体3

[2104]

	G-CSF (pg/mL)		IFN-α (pg/ml)		TNF-α (pg/ml)	
	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时
100%修饰	6086	7549	7	658	11	11
75%修饰	2479	2378	23	752	4	35
50%修饰	667	774	24	896	22	18
25%修饰	480	541	57	1557	43	115
10%修饰	838	956	159	2755	144	123
1%修饰	1108	1197	235	3415	88	270
0.1%修饰	1338	1177	191	2873	37	363
0%修饰	1463	1666	215	3793	74	429
对照 G-CSF	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
未处理的	不适用	不适用	1	1	0	8

[2105] 实施例65.BJ成纤维细胞中的先天性免疫应答研究

[2106] A.单次转染

[2107] 从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)(目录号CRL-2522)获得人包皮原代成纤维细胞(BJ成纤维细胞)并使其在补充有10%胎牛血清的Eagle's极限必需培养基(ATCC,目录号30-2003)中在37℃、5%CO_2下生长。将BJ成纤维细胞在0.5ml的培养基中以300,000细胞/孔的密度接种在24孔平板上。使用Lipofectamine 2000(Invitrogen,目录号11668-019)按照制造商的方案,转染250ng的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰(Gen1)的或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰(Gen2)的具有Cap0、Cap1或不具有帽的修饰G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。还转染poly I:C(PIC)、Lipofectamine 2000(Lipo)、天然荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)和天然G-CSF mRNA的对照样品。在18小时之后收获细胞,分离总RNA并使用RNeasy微量试剂盒(目录号74004)按照制造商的方案将所述总RNA进行DNASE®处理。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(目录号4368814)按照制造商的方案,使用100ng的总RNA进行cDNA分析。然后使用SybrGreen在Biorad CFX 384仪器中按照制造商的方案,通过定量实时PCR,针对先天性免疫应答基因的表达对cDNA进行分析。表99示出先天性免疫应答转录物相对于管家基因HPRT(次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶)的表达水平,并且表示为相对于HPRT的诱导倍数。在所述表中,标准量度的面板包括:RIG-I为视黄酸诱导型基因1,IL-6为白细胞介素-6、OAS-1为寡腺苷酸合成酶1,IFNb为干扰素-β,AIM2在黑色素瘤-2中不存在,IFIT1-1为具有三十四肽重复序列1的干扰素诱导的蛋白质,PKR为蛋白激酶R,TNFα为肿瘤坏死因子α并且IFNα为干扰素α。

[2108] 表99.先天性免疫应答转录水平

[2109]

制剂	RIG-I	IL6	OAS-1	IFNb	AIM2	IFIT-1	PKR	TNFα	IFNα
天然荧光素酶	71.5	20.6	20.778	11.404	0.251	151.218	16.001	0.526	0.067
天然G-CSF	73.3	47.1	19.359	13.615	0.264	142.011	11.667	1.185	0.153
PIC	30.0	2.8	8.628	1.523	0.100	71.914	10.326	0.264	0.063
G-CSF Gen1-UC	0.81	0.22	0.080	0.009	0.008	2.220	1.592	0.090	0.027
G-CSF Gen1-Cap0	0.54	0.26	0.042	0.005	0.008	1.314	1.568	0.088	0.038
G-CSF Gen1-Cap1	0.58	0.30	0.035	0.007	0.006	1.510	1.371	0.090	0.040
G-CSF Gen2-UC	0.21	0.20	0.002	0.007	0.007	0.603	0.969	0.129	0.005
G-CSF Gen2-Cap0	0.23	0.21	0.002	0.0014	0.007	0.648	1.547	0.121	0.035
G-CSF Gen2-Cap1	0.27	0.26	0.011	0.004	0.005	0.678	1.557	0.099	0.037
Lipo	0.27	0.53	0.001	0	0.007	0.954	1.536	0.158	0.064

[2110] B.重复转染

[2111] 从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)(目录号CRL-2522)获得人包皮原代成纤维细胞(BJ成纤维细胞)并使其在补充有10%胎牛血清的Eagle's极限必需培养基(ATCC,目录号30-2003)中在37℃、5%CO_2下生长。将BJ成纤维细胞在0.5ml的培养基中以300,000细胞/孔的密度接种在24孔平板上。按照制造商的方案,每天转染250ng的未修饰的、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰(Gen1)的或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰(Gen2)的修饰G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具

有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1),持续5天。还将Lipofectamine 2000(L2000)和mCherry mRNA(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞苷和假尿苷完全修饰)的对照样品每天转染,持续5天。结果在表100中示出。

[2112] 一天后,未修饰mRNA显示出干扰素-β(IFN-β)以及白细胞介素-6(IL-6)的细胞因子应答。至少用假尿苷修饰的mRNA在2-3天后显示出细胞因子应答,而用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷修饰的mRNA在3-5天后显示出减少的应答。

[2113] 表100.细胞因子应答

[2114]

制剂	转染	IFN-β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
未修饰的 G-CSF	6 小时	0	3596
	第 1 天	1363	15207
	第 2 天	238	12415
	第 3 天	225	5017
	第 4 天	363	4267
	第 5 天	225	3094
G-CSF Gen 1	6 小时	0	3396
	第 1 天	38	3870
	第 2 天	1125	16341
	第 3 天	100	25983
	第 4 天	75	18922
	第 5 天	213	15928
G-CSF Gen 2	6 小时	0	3337
	第 1 天	0	3733
	第 2 天	150	974

[2115]

	第 3 天	213	4972
	第 4 天	1400	4122
	第 5 天	350	2906
mCherry	6 小时	0	3278
	第 1 天	238	3893
	第 2 天	113	1833
	第 3 天	413	25539
	第 4 天	413	29233
	第 5 天	213	20178
L2000	6 小时	0	3270
	第 1 天	13	3933
	第 2 天	388	567
	第 3 天	338	1517
	第 4 天	475	1594
	第 5 天	263	1561

[2116] 实施例66.先天性免疫应答的体内检测

[2117] 为了区分mRNA的不同化学修饰对体内蛋白质产生和体内细胞因子应答的重要性,

给雌性BALB/C小鼠(n＝5)肌内注射具有5'帽,Cap1的G-CSF mRNA(未修饰的G-CSF mRNA)(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;)、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA(G-CSF mRNA 5mc/pU)、具有(G-CSF mRNA 5mc/N1pU)或不具有5'帽(G-CSF mRNA5mc/N1pU无帽)的用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA或者R848或5％蔗糖的对照,如表101中所述。

[2118] 表101.给药图表

[2119]

制剂	途径	剂量(ug/小鼠)	剂量(ul)
未修饰的 G-CSF mRNA	I.M.	200	50
G-CSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50
G-CSF mRNA 5mc/N1pU	I.M.	200	50
G-CSF mRNA 5mc/N1pU 无帽	I.M.	200	50
R848	I.M.	75	50
5%蔗糖	I.M.	-	50

[2120]

未处理的	I.M.	-	-

[2121] 在给药后8小时收集血液。使用ELISA,通过ELISA测定G-CSF、TNF-α和IFN-α的蛋白质水平。在给药后8小时,从注射部位收集肌肉并且使用定量实时聚合酶链式反应(QPCR)测定肌肉中RIG-1、PKR、AIM-2、IFIT-1、OAS-2、MDA-5、IFN-β、TNF-α、IL-6、G-CSF、CD45的mRNA水平。

[2122] 实施例67.先天性免疫应答的体内检测研究

[2123] 给雌性BALB/C小鼠(n＝5)肌内注射具有5'帽,Cap1的G-CSF mRNA(未修饰的G-CSF mRNA)(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;)、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA(G-CSF mRNA 5mc/pU)、具有(G-CSF mRNA 5mc/N1pU)或不具有5'帽(G-CSF mRNA 5mc/N1pU无帽)的用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA或者R848或5％蔗糖的对照,如表102中所述。在给药后8小时收集血液,并使用ELISA,通过ELISA测定G-CSF和干扰素-α(IFN-α)的蛋白质水平,并在表102中示出。

[2124] 如表102所示,未修饰的、5mc/pU和5mc/N1pU修饰的G-CSF mRNA导致小鼠血清中的人G-CSF表达。未加帽的5mC/N1pU修饰的G-CSF mRNA没有显示出血清中的人G-CSF表达,突出了具有5'帽结构对于蛋白质翻译的重要性。

[2125] 如所预期的,在R848、仅5％蔗糖和未处理的组中没有表达人G-CSF蛋白。重要地,如通过血清中的小鼠IFN-α所测量的,观察到细胞因子产生的显著差异。如所预期的,未修饰的G-CSF mRNA表明了稳健的体内细胞因子应答(大于R848阳性对照)。5mc/pU修饰的G-CSF mRNA的确显示出低的但可检测的体内细胞因子应答,而5mc/N1pU修饰的mRNA在血清中没有显示出可检测的IFN-α(媒介物或未处理的动物同样如此)。

[2126] 此外,5mc/N1pU修饰的mRNA的应答是相同的,不管其是否加帽。这些体内结果加强这样的结论:1)未修饰mRNA产生稳健的先天性免疫应答,2)通过5mc/pU修饰的100％并入减

少所述应答,但不消失,以及3)5mc/N1pU修饰的并入不导致可检测的细胞因子应答。

[2127] 最后,由于这些注射在5%蔗糖(本身无影响)中进行,这些结果应准确反映这些修饰的免疫刺激潜力。

[2128] 由该数据,明显的是,N1pU修饰的分子产生更多蛋白质,而伴随地对IFN-α表达具有极小或没有影响。还明显的是,对于此化学修饰,加帽是蛋白质产生所需的。与未修饰mRNA的PC(PC=9)比相比,748的蛋白质:细胞因子比意思是此化学修饰就与IFN-α相关的作用或生物学意义来说是非常优异的。

[2129] 表102.血清中的人G-CSF和小鼠IFN-α

[2130]

制剂	途径	剂量(ug/小鼠)	剂量(ul)	G-CSF蛋白(pg/ml)	IFN-α表达(pg/ml)	PC比
未修饰的G-CSF mRNA	I.M.	200	50	605.6	67.01	9
G-CSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50	356.5	8.87	40
G-CSF mRNA5mc/N1pU	I.M.	200	50	748.1	0	748
G-CSF mRNA5mc/N1pU 无帽	I.M.	200	50	6.5	0	6.5
R848	I.M.	75	50	3.4	40.97	.08
5%蔗糖	I.M.	-	50	0	1.49	0
未处理的	I.M.	-	-	0	0	0

[2131] 实施例68:修饰RNA的体内递送

[2132] 通过向雌性Sprague Dawley大鼠(n=6)递送修饰的G-CSF mRNA或修饰的IX因子mRNA,来评价修饰mRNA的蛋白质产生。向大鼠注射400ug在100ul中的由冻干形式在5%蔗糖中重构的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)(G-CSF Gen1)、用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA(G-CSF Gen2)或用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的IX因子mRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)(IX因子Gen1)。在注射后8小时收集血液,并且通过ELISA测量血清中的G-CSF蛋白水平。表103示出8小时后血清中的G-CSF蛋白水平。

[2133] 这些结果表明,在单次肌内注射之后,G-CSF Gen1和G-CSF Gen2修饰的mRNA均可在大鼠中产生人G-CSF蛋白,并且与Gen1化学物质相比,在使用Gen2化学物质时,人G-CSF蛋白产生得到改善。

[2134] 表103.大鼠血清中的G-CSF蛋白(IM注射途径)

[2135]

制剂	G-CSF蛋白(pg/ml)
G-CSF Gen1	19.37
G-CSF Gen2	64.72
IX因子Gen 1	2.25

[2136] 实施例69.化学修饰:体外研究

[2137] A.PBMC的体外筛选

[2138] 将500ng的用表104和105中概述的化学修饰完全修饰的G-CSF(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)mRNA与0.4uL Lipofectamine 2000一起转染到来自三个正常血液供体的外周血单核细胞(PBMC)中。还对LPS、R848、P(I)P(C)和mCherry(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)的对照样品进行分析。收获上清液并且冷冻储存,直到通过ELISA分析,以测定G-CSF蛋白表达,以及细胞因子干扰素-α(IFN-α)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)的诱导。G-CSF的蛋白质表达在表104中示出,并且IFN-α和TNF-α的表达在表105中示出。

[2139] 表104中的数据表明,许多但并非所有化学修饰可用于在PBMC中有成效地产生人G-CSF。值得注意的是,100%N1-甲基-假尿苷取代表现出最高水平的人G-CSF产生(比假尿苷本身几乎高出10倍)。当N1-甲基-假尿苷与5-甲基胞苷结合使用时,也产生高水平的人G-CSF蛋白(这也比假尿苷与5甲基胞苷结合使用时要高)。

[2140] 鉴于PBMC中蛋白质产生与细胞因子产生之间的相反关系,表105中也可见类似趋势,其中具有N1-甲基-假尿苷的100%取代不造成细胞因子诱导(类似于仅转染对照)并且假尿苷显示出高于背景的可检测的细胞因子诱导。

[2141] 其它修饰(如N6-甲基腺苷和α-硫代胞苷)似乎增加了细胞因子刺激。

[2142] 表104.化学修饰和G-CSF蛋白表达

[2143]

化学修饰	G-CSF 蛋白表达(pg/ml)		
	供体 1	供体 2	供体 3
假尿苷	2477	1,909	1,498
5-甲基尿苷	318	359	345
N1-甲基-假尿苷	21,495	16,550	12,441
2-硫代尿苷	932	1,000	600
4-硫代尿苷	5	391	218
5-甲氧基尿苷	2,964	1,832	1,800
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第 1 组)	2,632	1,955	1,373
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基-假尿苷(第 1 组)	10,232	7,245	6,214
2'氟鸟苷	59	186	177
2'氟尿苷	118	209	191
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第 2 组)	1,682	1,382	1,036
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基-假尿苷(第 2 组)	9,564	8,509	7,141
5-溴尿苷	314	482	291
5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷	77	286	177
5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷	541	491	550
α-硫代胞苷	105	264	245
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第 3 组)	1,595	1,432	955
N1-甲基腺苷	182	177	191
N6-甲基腺苷	100	168	200
5-甲基胞苷	291	277	359

[2144]

N4-乙酰基胞苷	50	136	36
5-甲酰基胞苷	18	205	23
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第 4 组)	264	350	182
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基-假尿苷(第 4 组)	9,505	6,927	5,405
LPS	1,209	786	636
mCherry	5	168	164
R848	709	732	636
P(I)P(C)	5	186	182

[2145] 表105.化学修饰和细胞因子表达

[2146]

化学修饰	IFN-α 表达(pg/ml)			TNF-α 表达(pg/ml)		
	供体 1	供体 2	供体 3	供体 1	供体 2	供体 3
假尿苷	120	77	171	36	81	126
5-甲基尿苷	245	135	334	94	100	157
N1-甲基-假尿苷	26	75	138	101	106	134
2-硫代尿苷	100	108	154	133	133	141
4-硫代尿苷	463	258	659	169	126	254
5-甲氧基尿苷	0	64	133	39	74	111
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第 1 组)	88	94	148	64	89	121
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基-假尿苷(第 1 组)	0	60	136	54	79	126
2'氟鸟苷	107	97	194	91	94	141
2'氟尿苷	158	103	178	164	121	156
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第 2 组)	133	92	167	99	111	150
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基-假尿苷(第 2 组)	0	66	140	54	97	149
5-溴尿苷	95	86	181	87	106	157
5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷	0	61	130	40	81	116
5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷	0	58	132	71	90	119
α-硫代胞苷	1,138	565	695	300	273	277
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第 3 组)	88	75	150	84	89	130
N1-甲基腺苷	322	255	377	256	157	294
N6-甲基腺苷	1,935	1,065	1,492	1,080	630	857
5-甲基胞苷	643	359	529	176	136	193
N4-乙酰基胞苷	789	593	431	263	67	207

[2147]

5-甲酰基胞苷	180	93	88	136	30	40
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(第4组)	131	28	18	53	24	29
5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷(第4组)	0	0	0	36	14	13
LPS	0	67	146	7,004	3,974	4,020
mCherry	100	75	143	67	100	133
R848	674	619	562	11,179	8,546	9,907
P(I)P(C)	470	117	362	249	177	197

[2148] B.在HeLa细胞中的体外筛选

[2149] 在转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10%FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37oG下在5%CO_2气氛中生长过夜。第二天,将83ng的具有表106中所述的化学修饰的荧光素酶修饰RNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。

[2150] 使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。

[2151] 在孵育18至22小时之后,用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA),并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。调节或稀释裂解物体积,直到对于产生最强信号的样品检测到不超过2mio相对光单位(RLU)/孔,所测试的每种化学物质的RLU在表106中示出。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。

[2152] 这些结果表明,许多但并非所有化学修饰可用于在HeLa细胞中有成效地产生人G-CSF。值得注意的是,100%N1-甲基-假尿苷取代表现出最高水平的人G-CSF产生。

[2153] 表106.荧光素酶的相对光单位

[2154]

化学修饰	RLU
N6-甲基腺苷(m6a)	534
5-甲基胞苷(m5c)	138,428
N4-乙酰基胞苷(ac4c)	235,412
5-甲酰基胞苷(f5c)	436
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A1	48,659
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷,测试A1	190,924
假尿苷	655,632

1-甲基假尿苷(m1u)	1,517,998
2-硫代尿苷(s2u)	3387
5-甲氧基尿苷(mo5u)	253,719
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试B1	317,744
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷,测试B1	265,871
5-溴-尿苷	43,276
5(2羰乙烯基)尿苷	531
5(3-1E丙烯基氨基)尿苷	446
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A2	295,824
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷,测试A2	233,921
5-甲基尿苷	50,932
α-硫代-胞苷	26,358
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试B2	481,477
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷,测试B2	271,989
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A3	438,831
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷,测试A3	277,499
未修饰的荧光素酶	234,802

[2155] C.在兔网织红细胞裂解物中的体外筛选

[2156] 用表107中列出的化学修饰对荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)进行修饰,并将其在不含核酸酶的无菌水中稀释至在10ul中的250ng的最终量。将稀释的荧光素酶添加到40ul新鲜制备的兔网织红细胞裂解物中,并在标准的1.5mL聚丙烯反应管(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中在30℃下在干燥加热块中进行体外翻译反应。用Rabbit Reticulocyte Lysate(核酸酶处理过的)试剂盒(Promega,Madison,WI)根据制造商的说明进行翻译测定。反应缓冲液补充有缺乏亮氨酸或甲硫氨酸中的任一个的所提供氨基酸原液的一比一共混物,从而产生含有足量的两种氨基酸的反应混合物,以允许有效的体外翻译。

[2157] 在孵育60分钟之后,通过将反应管放置在冰上停止反应。将含有荧光素酶修饰RNA的体外翻译反应液的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA),并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。调节或稀释体外翻译反应液的体积,直到对于产生最强信号的样品检测到不超过2mio相对光单位(RLU)/孔,所测试的每种化学物质的RLU在表107中示出。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。

[2158] 这些不含细胞的翻译结果与HeLa中的蛋白质产生结果十分相关,与通常在两种系统中起作用或不起作用的相同修饰十分相关。一个值得注意的例外是5-甲酰基胞苷修饰的荧光素酶mRNA,其在不含细胞的翻译系统中起作用,而在基于HeLa细胞的转染系统中不起作用。在5-甲酰基胞苷修饰的G-CSF mRNA的情况下还观察到两种测定之间的类似差异。

[2159] 表107.荧光素酶的相对光单位

[2160]

化学修饰	RLU
N6-甲基腺苷(m6a)	398
5-甲基胞苷(m5c)	152,989

[2161]

N4-乙酰基胞苷(ac4c)	60,879
5-甲酰基胞苷(f5c)	55,208
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 A1	349,398
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试 A1	205,465
假尿苷	587,795
1-甲基假尿苷(m1u)	589,758
2-硫代尿苷(s2u)	708
5-甲氧基尿苷(mo5u)	288,647
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 B1	454,662
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试 B1	223,732
5-溴-尿苷	221,879
5 (2 羰乙烯基)尿苷	225
5 (3-1E 丙烯基氨基)尿苷	211
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 A2	558,779
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试 A2	333,082
5-甲基尿苷	214,680
α-硫代-胞苷	123,878
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 B2	487,805
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试 B2	154,096
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 A3	413,535
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试 A3	292,954
未修饰的荧光素酶	225,986

[2162] 实施例70.化学修饰:体内研究

[2163] A.G-CSF修饰mRNA的体内筛选

[2164] 在每只腿中向Balb-C小鼠(n＝4)肌内注射配制于1x PBS中的用表108中概述的化学修饰完全修饰的修饰G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。还对荧光素酶修饰mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用假尿苷和5-甲基胞嘧啶完全修饰)的对照和PBS的对照进行测试。在8小时后收集血清,以通过ELISA测定G-CSF蛋白水平和细胞因子水平。

[2165] 表108.G-CSF

[2166]

mRNA	化学修饰
G-CSF	假尿苷
G-CSF	5-甲基尿苷
G-CSF	2-硫代尿苷
G-CSF	4-硫代尿苷

G-CSF	5-甲氧基尿苷
G-CSF	2'-氟尿苷
G-CSF	5-溴尿苷
G-CSF	5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷)
G-CSF	α-硫代-胞苷
G-CSF	5-甲基胞苷
G-CSF	N4-乙酰基胞苷
G-CSF	假尿苷和5-甲基胞嘧啶
G-CSF	N1-甲基-假尿苷和5-甲基胞嘧啶
荧光素酶	假尿苷和5-甲基胞嘧啶
PBS	无

[2167] B.荧光素酶修饰mRNA的体内筛选

[2168] 向Balb-C小鼠(n=4)皮下注射200ul的含有配制于1x PBS中的42ug至103ug的用表109中概述的化学修饰完全修饰的修饰荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。还对PBS的对照进行测试。修饰的荧光素酶mRNA的剂量也概述于表109。给药8小时后,对小鼠成像以测定荧光素酶表达。在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。

[2169] 如表109中所表明,所有荧光素酶mRNA修饰的化学物质均表现出体内活性,2'氟尿苷除外。此外,1-甲基假尿苷修饰的mRNA表现出非常高的荧光素酶表达(比含有假尿苷的mRNA高5倍的表达)。

[2170] 表109.荧光素酶筛选

[2171]

mRNA	化学修饰	mRNA 的剂量(ug)	剂量体积(ml)	荧光素酶表达(光子/秒)
荧光素酶	5-甲基胞苷	83	0.72	1.94E+07
荧光素酶	N4-乙酰基胞苷	76	0.72	1.11E07
荧光素酶	假尿苷	95	1.20	1.36E+07
荧光素酶	1-甲基假尿苷	103	0.72	7.40E+07
荧光素酶	5-甲氧基尿苷	95	1.22	3.32+07
荧光素酶	5-甲基尿苷	94	0.86	7.42E+06
荧光素酶	5-溴尿苷	89	1.49	3.75E+07
荧光素酶	2'氟鸟苷	42	0.72	5.88E+05
荧光素酶	2'-氟胞苷	47	0.72	4.21E+05
荧光素酶	2'-氟尿苷	59	0.72	3.47E+05
PBS	无	-	0.72	3.16E+05

[2172]

[2173] 实施例71.组合荧光素酶修饰mRNA的体内筛选

[2174] 向Balb-C小鼠(n=4)皮下注射200ul的配制于1xPBS中的100ug的用表110中概述的化学修饰完全修饰的修饰荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约

160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。还对PBS的对照进行测试。给药8小时后,对小鼠成像以测定荧光素酶表达。在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。

[2175] 如表110中所表明,所有荧光素酶mRNA修饰的化学物质(组合)表现出体内活性。此外,修饰mRNA(具有N4-乙酰基胞苷或5-甲基胞苷)中N1-甲基-假尿苷的存在比在与假尿苷一起使用进行测试时的相同组合表现出更高的表达。总的来说,这些数据表明,含有N1-甲基-假尿苷的荧光素酶mRNA无论单独使用(表109)还是在与其它修饰核苷酸组合使用(表110)时,均导致改善的体内蛋白质表达。

[2176] 表110.荧光素酶筛选组合

[2177]

mRNA	化学修饰	荧光素酶表达(光子/秒)
荧光素酶	N4-乙酰基胞苷/假尿苷	4.18E+06
荧光素酶	N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	2.88E+07
荧光素酶	5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	3.48E+07

[2178]

荧光素酶	5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	1.44E+07
荧光素酶	5-甲基胞苷/其中 50%的尿苷被 2-硫代尿苷替代	2.39E+06
荧光素酶	5-甲基胞苷/假尿苷	2.36E+07
荧光素酶	5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	4.15E+07
PBS	无	3.59E+05

[2179] 实施例72.BJ成纤维细胞的先天性免疫应答

[2180] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC)(目录号CRL-2522)获得人包皮原代成纤维细胞(BJ成纤维细胞)并使其在补充有10%胎牛血清的Eagle's极限必需培养基(ATCC,目录号30-2003)中在37℃、5%CO2下生长。将BJ成纤维细胞在0.5ml的培养基中以130,000细胞/孔的密度接种在24孔平板上。使用Lipofectamine 2000(Invitrogen,目录号11668-019)按照制造商的方案,转染250ng的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰(Gen1)的或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰(Gen2)的修饰G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。还转染Lipofectamine 2000和未修饰的G-CSF mRNA(天然G-CSF)的对照样品。转染细胞,持续五个连续日。在每轮转染之后4小时移除转染复合物。

[2181] 在转染之后,按照制造商的方案,每天通过ELISA针对分泌的G-CSF(R&D系统,目录号DCS50)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和干扰素α(IFN-α)对培养物上清液进行测定。在第一轮转染之后6小时和18小时以及随后的每隔一天,使用CELL TITER GLO® (Promega,目录号G7570)针对存活力对细胞进行分析。同时从所收获的细胞中分离总RNA并使用RNAEASY微量试剂盒(目录号74004)按照制造商的方案用DNASE®对所述总RNA进行处理。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems,目录号4368814)按照制造商的方案,使用100ng的总RNA进行cDNA分析。然后使用SybrGreen在Biorad CFX 384仪器中按照制造商的方案,通过定量实时PCR,针对先天性免疫应答基因的表达,对cDNA进

行分析。

[2182] 实施例73.使用野生型T7聚合酶的体外转录

[2183] 如先前所述,使用野生型T7聚合酶,用表111-114中列出的不同的化学物质和化学物质组合对荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)和G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)进行完全修饰。

[2184] 通过分光光度测量(OD260)对翻译反应的产量进行测定,荧光素酶的产量在表111中示出,并且G-CSF的产量在表113中示出。

[2185] 荧光素酶和G-CSF修饰的mRNA还经受酶促加盖反应,并且通过分光光度测量(OD260)对每个修饰mRNA加盖反应的产量进行评价并使用生物分析仪评估正确的大小。荧光素酶的加盖反应的产量在表112中示出,并且G-CSF的加盖反应的产量在表113中示出。

[2186] 表111.荧光素酶的体外转录化学

[2187]

化学修饰	产 量 (mg)
N6-甲基腺苷	0.99
5-甲基胞苷	1.29
N4-乙酰基胞苷	1.0
5-甲酰基胞苷	0.55
假尿苷	2.0
N1-甲基-假尿苷	1.43
2-硫代尿苷	1.56
5-甲氧基尿苷	2.35
5-甲基尿苷	1.01
α-硫代-胞苷	0.83
5-溴-尿苷(5Bru)	1.96
5 (2 甲氧羰基乙烯基)尿苷	0.89
5 (3-1E 丙烯基氨基)尿苷	2.01
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	1.34

[2188]

N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1.26
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	1.38
5-甲基胞苷/5-溴尿苷	0.12
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	2.97
5-甲基胞苷/一半的尿苷被 2-硫代尿苷修饰	1.59
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	0.90
5-甲基胞苷/假尿苷	1.83
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1.33

[2189] 表112.荧光素酶修饰mRNA的加帽化学和产量

[2190]

化学修饰	产量 (mg)
5-甲基胞苷	1.02
N4-乙酰基胞苷	0.93
5-甲酰基胞苷	0.55
假尿苷	2.07
N1-甲基-假尿苷	1.27
2-硫代尿苷	1.44
5-甲氧基尿苷	2
5-甲基尿苷	0.8
α-硫代-胞苷	0.74
5-溴-尿苷(5Bru)	1.29
5 (2 甲氧羰基乙烯基)尿苷	0.54
5 (3-1E 丙烯基氨基)尿苷	1.39
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	0.99
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1.08
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	1.13
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	1.08
5-甲基胞苷/一半的尿苷被 2-硫代尿苷修饰	1.2
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	1.27
5-甲基胞苷/假尿苷	1.19
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1.04

[2191] 表113.G-CSF修饰mRNA的体外转录化学和产量

[2192]

化学修饰	产量 (mg)
N6-甲基腺苷	1.57
5-甲基胞苷	2.05
N4-乙酰基胞苷	3.13
5-甲酰基胞苷	1.41
假尿苷	4.1

N1-甲基-假尿苷	3.24
2-硫代尿苷	3.46
5-甲氧基尿苷	2.57
5-甲基尿苷	4.27
4-硫代尿苷	1.45
2'-F-尿苷	0.96
α-硫代-胞苷	2.29
2'-F-鸟苷	0.6
N-1-甲基腺苷	0.63
5-溴-尿苷(5Bru)	1.08
5 (2 甲氧羰基乙烯基)尿苷	1.8
5 (3-1E 丙烯基氨基)尿苷	2.09
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	1.72
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1.37
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	1.85
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	1.56
5-甲基胞苷/一半的尿苷被 2-硫代尿苷修饰	1.84
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	2.53
5-甲基胞苷/假尿苷	0.63
N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	1.3
N4-乙酰基胞苷/5-溴尿苷	1.37
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1.25
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	2.24

[2193]

[2194] 表114.G-CSF修饰mRNA的加帽化学和产量

化学修饰	**产量(mg)**
N6-甲基腺苷	1.04
5-甲基胞苷	1.08
N4-乙酰基胞苷	2.73
5-甲酰基胞苷	0.95
假尿苷	3.88
N1-甲基-假尿苷	2.58
2-硫代尿苷	2.57
5-甲氧基尿苷	2.05
5-甲基尿苷	3.56
4-硫代尿苷	0.91
2'-F-尿苷	0.54
α-硫代-胞苷	1.79
2'-F-鸟苷	0.14
5-溴-尿苷(5Bru)	0.79
5 (2 甲氧羰基乙烯基)尿苷	1.28
5 (3-1E 丙烯基氨基)尿苷	1.78

[2195]

[2196]

N4-乙酰基胞苷/假尿苷	0.29
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	0.33
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	0.91
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	0.61
5-甲基胞苷/一半的尿苷被2-硫代尿苷修饰	1.24
5-甲基胞苷/假尿苷	1.08
N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	1.34
N4-乙酰基胞苷/5-溴尿苷	1.22
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1.56

[2197] 实施例74.使用突变T7聚合酶的体外转录

[2198] 使用突变T7聚合酶(Durascribe®T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI),用表115-118中列出的不同的化学物质和化学物质组合对荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)和G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)进行完全修饰。

[2199] 通过分光光度测量(OD260)对翻译反应的产量进行测定,荧光素酶的产量在表115中示出,并且G-CSF的产量在表117中示出。

[2200] 荧光素酶和G-CSF修饰mRNA还经受酶促加盖反应,并且通过分光光度测量(OD260)对每个修饰mRNA加盖反应的产量进行评价并使用生物分析仪评估正确的大小。荧光素酶的加盖反应的产量在表116中示出,并且G-CSF的加盖反应的产量在表118中示出。

[2201] 表115.荧光素酶修饰mRNA的体外转录化学和产量

[2202]

化学修饰	产量(ug)
2'氟胞嘧啶	71.4
2'氟尿苷	57.5
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试A	26.4
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试A	73.3
N1-乙酰基胞苷/2-氟尿苷	202.2
5-甲基胞苷/2-氟尿苷	131.9

2-氟胞嘧啶/假尿苷	119.3
2-氟胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	107.0
2-氟胞嘧啶/2-硫代尿苷	34.7
2-氟胞嘧啶/5-溴尿苷	81.0
2-氟胞嘧啶/2-氟尿苷	80.4
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	61.2
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	65.0
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	41.2
2-氟鸟嘌呤/假尿苷	79.1
2-氟鸟嘌呤/N1-甲基-假尿苷	74.6
5-甲基胞苷/假尿苷，测试B	91.8
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷，测试B	72.4
2'氟腺苷	190.98

[2203]

[2204] 表116.荧光素酶修饰mRNA的加帽化学和产量

[2205]

化学修饰	产量(ug)
2'氟胞嘧啶	19.2
2'氟尿苷	16.7
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A	7.0
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷,测试A	21.5
N1-乙酰基胞苷/2-氟尿苷	47.5
5-甲基胞苷/2-氟尿苷	53.2
2-氟胞嘧啶/假尿苷	58.4
2-氟胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	26.2
2-氟胞嘧啶/2-硫代尿苷	12.9
2-氟胞嘧啶/5-溴尿苷	26.5
2-氟胞嘧啶/2-氟尿苷	35.7
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	24.7
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	32.3
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	31.3
2-氟鸟嘌呤/假尿苷	20.9
2-氟鸟嘌呤/N1-甲基-假尿苷	29.8
5-甲基胞苷/假尿苷,测试B	58.2
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷,测试B	44.4

[2206] 表117.G-CSF修饰mRNA的体外转录化学和产量

[2207]

化学修饰	产量(ug)
2'氟胞嘧啶	56.5
2'氟尿苷	79.4
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试A	21.2
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试A	77.1

[2208]

N1-乙酰基胞苷/2-氟尿苷	168.6
5-甲基胞苷/2-氟尿苷	134.7
2-氟胞嘧啶/假尿苷	97.8
2-氟胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	103.1
2-氟胞嘧啶/2-硫代尿苷	58.8
2-氟胞嘧啶/5-溴尿苷	88.8
2-氟胞嘧啶/2-氟尿苷	93.9
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	97.3
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	96.0
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	82.0
2-氟鸟嘌呤/假尿苷	68.0
2-氟鸟嘌呤/N1-甲基-假尿苷	59.3
5-甲基胞苷/假尿苷，测试B	58,7
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷，测试B	78.0

[2209] 表118.G-CSF修饰mRNA的加帽化学和产量

[2210]

化学修饰	产量(ug)
2’氟胞嘧啶	16.9
2’氟尿苷	17.0
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A	10.6
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷,测试A	22.7
N1-乙酰基胞苷/2-氟尿苷	19.9
5-甲基胞苷/2-氟尿苷	21.3
2-氟胞嘧啶/假尿苷	65.2
2-氟胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	58.9
2-氟胞嘧啶/2-硫代尿苷	41.2
2-氟胞嘧啶/5-溴尿苷	35.8
2-氟胞嘧啶/2-氟尿苷	36.7
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	36.6
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	37.3
2-氟鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	30.7
2-氟鸟嘌呤/假尿苷	29.0
2-氟鸟嘌呤/N1-甲基-假尿苷	22.7
5-甲基胞苷/假尿苷,测试B	60.4
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷,测试B	33.0

[2211] 实施例75. 2’O-甲基和2’氟代基化合物

[2212] 将荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1)制备为具有表119中的化学物质的完全修饰的型式,并使用突变T7聚合酶(Durascribe® T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)进行转录。使用Durascribe T7制备含有2’氟代基的mRNA,然而,

含有2'O甲基的mRNA不可使用Durascribe T7进行转录。

[2213] 可能可使用其它突变T7聚合酶(Nat Biotechnol.(2004)22:1155-1160;Nucleic Acids Res.(2002)30:e138或美国专利7,309,570,其中每一个的内容通过引用整体并入本文)来实现2'O甲基修饰的mRNA的并入。或者,可使用酶促手段在转录后引入2'OMe修饰。

[2214] 在糖的2'基团上引入修饰具有许多潜在优点。已知2'OMe取代(如2'氟代基取代)抗核酸酶,并且还已经显示出,当并入到其它核酸(如siRNA和反义)中时,其消除先天性免疫识别(整体并入,Crooke编辑,Antisense Drug Technology,第2版;Boca Raton:CRC出版社)。

[2215] 然后可将2'氟代基-修饰的mRNA转染到HeLa细胞中,以评估在细胞背景中的蛋白质产生,并且还在不含细胞的兔网织红细胞系统中对相同的mRNA进行评估。使用未修饰的荧光素酶的对照(天然荧光素酶)进行两种转录实验,还针对HeLa转染对未处理的和模拟未转染的(仅Lipofectamine 2000)对照进行分析,并且针对兔网织红细胞对没有RNA的对照进行分析。

[2216] 对于HeLa转染实验,在转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10%FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37oG下在5%CO_2气氛中生长过夜。第二天,将83ng的具有表119中所述的化学修饰的含有2'氟代基的荧光素酶修饰RNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。在孵育18至22小时之后,用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA),并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。调节或稀释裂解物体积,直到对于产生最强信号的样品检测到不超过2mio相对光单位(RLU)/孔,所测试的每种化学物质的RLU在表119中示出。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。

[2217] 对于兔网织红细胞裂解物测定,将含有2'-氟代基的荧光素酶mRNA在不含核酸酶的无菌水中稀释至在10ul中的250ng的最终量,并且添加到40ul的新鲜制备的兔网织红细胞裂解物中,在标准的1.5mL聚丙烯反应管(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中在30℃下在干燥的加热块中进行体外翻译反应。用Rabbit Reticulocyte Lysate(核酸酶处理过的)试剂盒(Promega,Madison,WI)根据制造商的说明进行翻译测定。反应缓冲液补充有缺乏亮氨酸或甲硫氨酸中的任一个的所提供氨基酸原液的一比一共混物,从而产生含有足量的两种氨基酸的反应混合物,以允许有效的体外翻译。在孵育60分钟之后,通过将反应管放置在冰上停止反应。

[2218] 将含有荧光素酶修饰RNA的体外翻译反应液的等分试样转移至白色不透明的聚苯

乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA)，并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。调节或稀释体外翻译反应液的体积，直到对于产生最强信号的样品检测到不超过2mio相对光单位(RLU)/孔，所测试的每种化学物质的RLU在表120中示出。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。没有试剂的平板的背景信号为约160相对光单位/孔。

[2219] 如表119和120可见，多种含有2'氟代基的化合物在体外为活性的并且产生荧光素酶蛋白。

[2220] 表119.HeLa细胞

[2221]

化学修饰	浓度(ug/ml)	体积(ul)	产量(ug)	RLU
2'氟腺苷	381.96	500	190.98	388.5
2'氟胞嘧啶	654.56	500	327.28	2420
2'氟鸟嘌呤	541,795	500	270.90	11,705.5
2'-氟尿苷	944.005	500	472.00	6767.5
天然荧光素酶	不适用	不适用	不适用	133,853.5
模拟的	不适用	不适用	不适用	340
未处理的	不适用	不适用	不适用	238

[2222] 表120.兔网织红细胞

[2223]

化学修饰	RLU
2'氟腺苷	162
2'氟胞嘧啶	208
2'氟鸟嘌呤	371,509
2'-氟尿苷	258
天然荧光素酶	2,159,968
无RNA	156

[2224] 实施例76.使用修饰的组合的HeLa细胞中的荧光素酶

[2225] 为了评价2'氟代基-修饰的mRNA与其它修饰的结合使用，如实施例75中所述使用野生型T7聚合酶(不含有氟代基的化合物)或使用突变T7聚合酶(含有氟代基的化合物)将一系列mRNA转录。通过体外转染在HeLa细胞中对所有修饰mRNA进行测试。

[2226] 在转染前一天，通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10％FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5％CO_2气氛中生长过夜。第二天，将83ng的具有表121中所述的化学修饰的荧光素酶修饰RNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂，并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后，将两种溶液合并，并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。

[2227] 在孵育18至22小时之后，用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,

WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA),并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。调节或稀释裂解物体积,直到对于产生最强信号的样品检测到不超过2mio相对光单位(RLU)/孔,所测试的每种化学物质的RLU在表121中示出。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。

[2228] 如表121中所证明,修饰的大多数组合得到产生功能性荧光素酶蛋白的mRNA,包括所有不含氟代基的化合物以及含有2'氟代基修饰的许多组合。

[2229] 表121.荧光素酶

[2230]

化学修饰	RLU
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	113,796
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	316,326
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	24,948
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	43,675
5-甲基胞苷/一半的尿苷被 50% 2-硫代尿苷修饰	41,601
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	1,102
5-甲基胞苷/假尿苷	51,035
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	152,151
N4-乙酰基胞苷/2'氟尿苷三磷酸	288
5-甲基胞苷/2'氟尿苷三磷酸	269
2'氟胞嘧啶三磷酸/假尿苷	260
2'氟胞嘧啶三磷酸/N1-甲基-假尿苷	412
2'氟胞嘧啶三磷酸/2-硫代尿苷	427
2'氟胞嘧啶三磷酸/5-溴尿苷	253
2'氟胞嘧啶三磷酸/2'氟尿苷三磷酸	184
2'氟鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷	321
2'氟鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷/假尿苷	207
2'氟鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	235
2'氟鸟嘌呤/假尿苷	218
2'氟鸟嘌呤/N1-甲基-假尿苷	247
5-甲基胞苷/假尿苷, 测试 A	13,833
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷, 测试 A	598
2'氟胞嘧啶三磷酸	201
2'氟尿苷三磷酸	305
5-甲基胞苷/假尿苷, 测试 B	115,401
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷, 测试 B	21,034
天然荧光素酶	30,801
未处理的	344
模拟的	262

[2231]

[2232] 实施例77.G-CSF体外转录

[2233] 为了评估我们的所有不同的化学修饰在第二开放阅读框背景下的活性,我们用人

G-CSF mRNA重复了先前使用荧光素酶mRNA进行的实验。使用野生型T7聚合酶(对于所有不含氟代基的化合物)或突变T7聚合酶(对于所有含有氟代基的化合物),用表122和123中的化学物质对G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)进行完全修饰。商业获得突变T7聚合酶(Durascribe® T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)。

[2234] 将表122和123中的修饰RNA体外转染到HeLa细胞中或添加到兔网织红细胞(250ng的修饰mRNA)中,如所指示的。还对未处理的、模拟转染的(仅转染试剂)用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的G-CSF的对照或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶对照(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)进行分析。通过ELISA测定G-CSF蛋白的表达,值在表122和123中示出。在表122中,"NT"意思是未测试的。

[2235] 如表123所示,许多但并非全部化学修饰导致人G-CSF蛋白产生。来自基于细胞和不含细胞的翻译系统的这些结果与通常在两种系统中起作用或不起作用的相同修饰十分相关。一个值得注意的例外是5-甲酰基胞苷修饰的G-CSF mRNA,其在不含细胞的翻译系统中起作用,而在基于HeLa细胞的转染系统中不起作用。还在5-甲酰基胞苷修饰的荧光素酶mRNA的情况下观察到两种测定之间的类似差异。

[2236] 如表123中所表明,许多但并非全部G-CSF mRNA修饰的化学物质(当组合使用时)表现出体内活性。此外,修饰mRNA(具有N4-乙酰基胞苷或5-甲基胞苷)中N1-甲基-假尿苷的存在比在与假尿苷一起使用进行测试时的相同组合表现出更高的表达。总的来说,这些数据表明,含有N1-甲基-假尿苷的G-CSF mRNA导致改善的体外蛋白质表达。

[2237] 表122.G-CSF表达

[2238]

化学修饰	G-CSF 蛋白(pg/ml) HeLa 细胞	G-CSF 蛋白(pg/ml) 兔网织红细胞
假尿苷	1,150,909	147,875
5-甲基尿苷	347,045	147,250
2-硫代尿苷	417,273	18,375
N1-甲基-假尿苷	NT	230,000
4-硫代尿苷	107,273	52,375
5-甲氧基尿苷	1,715,909	201,750
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试 A	609,545	119,750
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷, 测试 A	1,534,318	110,500

[2239]

2'-氟-鸟苷	11,818	0
2'-氟-尿苷	60,455	0
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 B	358,182	57,875
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试 B	1,568,636	76,750
5-溴-尿苷	186,591	72,000
5-(2 甲氧羰基乙烯基)尿苷	1,364	0
5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷	27,955	32,625
α-硫代-胞苷	120,455	42,625
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 C	882,500	49,250
N1-甲基-腺苷	4,773	0
N6-甲基-腺苷	1,591	0
5-甲基-胞苷	646,591	79,375
N4-乙酰基胞苷	39,545	8,000
5-甲酰基-胞苷	0	24,000
5-甲基胞嘧啶/假尿苷，测试 D	87,045	47,750
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，测试 D	1,168,864	97,125
模拟的	909	682
未处理的	0	0
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，对照	1,106,591	NT
荧光素酶对照	NT	0

[2240] 表123.HeLa细胞中的组合化学物质

[2241]

化学修饰	**G-CSF 蛋白 (pg/ml) HeLa 细胞**
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	537,273
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	1,091,818
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	516,136
5-甲基胞苷/5-溴尿苷	48,864
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	207,500
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	33,409
N4-乙酰基胞苷/5-溴尿苷	211,591
N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	46,136
5-甲基胞嘧啶/假尿苷	301,364
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	1,017,727
N4-乙酰基胞苷/2'氟尿苷三磷酸	62,273
5-甲基胞苷/2'氟尿苷三磷酸	49,318
2-氟胞嘧啶三磷酸/假尿苷	7,955
2'氟胞嘧啶三磷酸/N1-甲基-假尿苷	1,364
2'氟胞嘧啶三磷酸/2-硫代尿苷	0
2'氟胞嘧啶三磷酸/5-溴尿苷	1,818
2'氟胞嘧啶三磷酸/2'氟尿苷三磷酸	909

[2242]

2'氟鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷	0
2'氟鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷/假尿苷	0
2'氟鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷/N1 甲基假尿苷	1,818
2'氟鸟嘌呤三磷酸/假尿苷	1,136
2'氟鸟嘌呤三磷酸/2'氟胞嘧啶三磷酸/N1-甲基-假尿苷	0
5-甲基胞苷/假尿苷	617,727
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	747,045
5-甲基胞苷/假尿苷	475,455
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	689,091
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，对照 1	848,409
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷，对照 2	581,818
模拟的	682
未处理的	0
荧光素酶 2'氟胞嘧啶三磷酸	0
荧光素酶 2'氟尿苷三磷酸	0

[2243] 实施例78.化学物质的筛选

[2244] 以下列出的表(表124-126)汇总了使用先前实施例中呈现的不同化合物的大部分体外和体外筛选数据。基于细胞和不含细胞的翻译测定之间存在良好的相关性。无论是在荧光素酶mRNA的背景还是在G-CSF mRNA的背景下测试，相同的化学取代通常显示出良好的一致性。最后，含有N1-甲基-假尿苷的mRNA在体外和体内显示出非常高的蛋白质表达水平，以及极少至没有可检测的细胞因子刺激，并且在体外和体内均优于含有假尿苷的mRNA。

[2245] 用表124和125中所述的天然或非天然存在的化学物质或表126中所述的组合化学物质对荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5'帽，Cap1)和G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列；具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5'帽，Cap1)进行修饰，并使用本文所述的方法对其进行测试。

[2246] 在表125和126中，“*”是指使用突变T7聚合酶(Durascribe®T7 Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)的体外转录反应；“**”是指使用突变T7聚合酶(Durascribe®T7 Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)的第二结果体外转录反应；“***”是指在不含细胞的翻译物(兔网织红细胞裂解物)中观察到的产生；HeLa的蛋白质产生通过“+”、“+/-”和“-”进行判断，当提到G-CSF PBMC时，“++++”，是指大于6,000pg/ml G-CSF，“+++”是指大于3,000pg/ml G-CSF，“++”是指大于1,500pg/ml G-CSF，“+”是指大于300pg/ml G-CSF，“+/-”是指150-300pg/ml G-CSF，并且背景为约110pg/ml；当提到细胞因子PBMC时，“++++”是指大于1,000pg/ml干扰素-α(IFN-α)，“+++”是指大于600pg/ml IFN-α，“++”是指大于300pg/ml IFN-α，“+”是指大于100pg/ml IFN-α，“-”是指小于100pg/ml并且背景为约70pg/ml；并且“NT”是指未测试的。在表125中，使用突变T7聚合酶(Durascribe®T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)评价蛋白质产生。

[2247] 表124.天然存在的

[2248]

常用名称(符号)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	蛋白质 (Luc; HeLa)	蛋白质 (G-CSF ; HeLa)	蛋白质 (G-CSF ; PBMC)	细胞因子 (G-CSF ; PBMC)	体内蛋白质 (Luc)	体内蛋白质 (G-CSF)
1-甲基腺苷(m^1A)	未通过	通过	NT	-	+/-	++	NT	NT
N^6-甲基腺苷(m^6A)	通过	通过	-	-	+/-	++++	NT	NT
2'-O-甲基腺苷(Am)	未通过*	未进行	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-甲基胞苷(m^5C)	通过	通过	+	+	+	++	+	NT
2'-O-甲基胞苷(Cm)	未通过*	未进行	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[2249]

2-硫代胞苷(s^2C)	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
N^4-乙酰基胞苷(ac^4C)	通过	通过	+	+	+/-	+++	+	NT
5-甲酰基胞苷(f^5C)	通过	通过	-***	-***	-	+	NT	NT
2'-O-甲基鸟苷(Gm)	未通过*	未进行	NT	NT	NT	NT	NT	NT
肌苷(I)	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
假尿苷(Y)	通过	通过	+	+	++	+	+	NT
5-甲基尿苷(m^5U)	通过	通过	+	+	+/-	+	NT	NT
2'-O-甲基尿苷(Um)	未通过*	未进行	NT	NT	NT	NT	NT	NT
1-甲基假尿苷(m^1Y)	通过	通过	+	未进行	++++	-	+	NT
2-硫代尿苷(s^2U)	通过	通过	-	+	+	+	NT	NT
4-硫代尿苷(s^4U)	未通过	通过		+	+/-	++	NT	NT
5-甲氧基尿苷(mo^5U)	通过	通过	+	+	++	-	+	NT
3-甲基尿苷(m^3U)	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[2250] 表125.非天然存在的

[2251]

常用名称	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	蛋白质 (Luc; HeLa)	蛋白质 (G-CSF ; HeLa)	蛋白质 (G-CSF ; PBMC)	细胞因子 (G-CSF ; PBMC)	体内蛋白质 (Luc)	体内蛋白质 (G-CSF)
2'-F-ara-鸟苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-腺苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-胞苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-尿苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-鸟苷	未通过/通过**	通过/未通过**	+**	+/-	-	+	+	NT
2'-F-腺苷	未通过/通过**	未通过/未通过**	-**	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-胞苷	未通过/通过**	未通过/通过**	+**	NT	NT	NT	+	NT
2'-F-尿苷	未通过/通过**	通过/通过**	+**	+	+/-	+	-	NT
2'-OH-ara-鸟苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-腺苷	未进行	未进行	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-胞苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-尿苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-Br-尿苷	通过	通过	+	+	+	+	+	

[2252]

5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷	通过	通过	-	-	+/-	-		
5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷 (aka Chem 5)	通过	通过	-	+	+	-		
N6-(19-氨基-五氧杂十九烷基) A	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-二甲基氨基鸟苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-氮杂-胞苷	未通过	未通过	NT	NT	NT	NT	NT	NT
α-硫代-胞苷	通过	通过	+	+	+/-	+++	NT	NT
假-异胞苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-碘-尿苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
α-硫代-尿苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-氮杂-尿苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
脱氧-胸甘	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
α-硫代-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8-氧代-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
O6-甲基-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-脱氮-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-氯-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[2253]

嘌呤								
α-硫代-腺苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-脱氮-腺苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-碘-胞苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[2254] 在表126中,HeLa的蛋白质产生通过“+”、“+/-”和“-”进行判断,当提到G-CSF PBMC时,“++++”是指大于6,000pg/ml G-CSF,“+++”是指大于3,000pg/ml G-CSF,“++”是指大于1,500pg/ml G-CSF,“+”是指大于300pg/ml G-CSF,“+/-”是指150-300pg/ml G-CSF,并且背景为约110pg/ml;当提到细胞因子PBMC时,“++++”是指大于1,000pg/ml干扰素-α(IFN-α),“+++”是指大于600pg/ml IFN-α,“++”是指大于300pg/ml IFN-α,“+”是指大于100pg/ml IFN-α,“-”是指小于100pg/ml并且背景为约70pg/ml;“WT”是指野生型T7聚合酶,“MT”是指突变T7聚合酶(Durascribe®T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI),并且“NT”是指未测试的。

[2255] 表126.组合化学物质

[2256]

胞苷类似物	**尿苷类似物**	**嘌呤**	**IVT Luc**	**IVT (G-CSF)**	**蛋白质 (Luc; HeLa)**	**蛋白质 (G-CSF; HeLa)**	**蛋白质 (G-CSF; PBMC)**	**细胞因子 (G-CSF; PBMC)**	**体内蛋白质 (Luc)**
N4-乙酰基胞苷	假尿苷	A、G	通过WT	通过WT	+	+	NT	NT	+
N4-乙酰基胞苷	N1-甲基-假尿苷	A、G	通过WT	通过WT	+	+	NT	NT	+
5-甲	5-甲	A、	通	通过	+	+	NT	NT	+

[2257]

基胞苷	氧基尿苷	G	过 WT	WT					
5-甲基胞苷	5-溴尿苷	A、G	通过 WT	通过 WT	未进行	+	NT	NT	
5-甲基胞苷	5-甲基尿苷	A、G	通过 WT	通过 WT	+	+	NT	NT	+
5-甲基胞苷	50% 2-硫代尿苷；50% 尿苷	A、G	通过 WT	通过 WT	+	NT	NT	NT	+
5-甲基胞苷	100% 2-硫代尿苷	A、G	通过 WT	通过 WT	-	+	NT	NT	
5-甲基胞苷	假尿苷	A、G	通过 WT	通过 WT	+	+	++	+	+
5-甲基胞苷	N1-甲基-假尿苷	A、G	通过 WT	通过 WT	+	+	++++	-	+
N4-乙酰基胞苷	2-硫代尿苷	A、G	未进行	通过 WT	未进行	+	NT	NT	NT
N4-乙酰基胞苷	5-溴尿苷	A、G	未进行	通过 WT	未进行	+	NT	NT	NT
N4-乙酰基	2 氟尿苷三磷	A、G	通过	通过	-	+	NT	NT	NT

[2258]

胞苷	酸								
5-甲基胞苷	2 氟尿苷三磷酸	A、G	通过	通过	-	+	NT	NT	NT
2 氟胞嘧啶三磷酸	假尿苷	A、G	通过	通过	-	+	NT	NT	NT
2 氟胞嘧啶三磷酸	N1-甲基-假尿苷	A、G	通过	通过	-	+/-	NT	NT	NT
2 氟胞嘧啶三磷酸	2-硫代尿苷	A、G	通过	通过	-	-	NT	NT	NT
2 氟胞嘧啶三磷酸	5-溴尿苷	A、G	通过	通过	-	+/-	NT	NT	NT
2 氟胞嘧啶三磷酸	2 氟尿苷三磷酸	A、G	通过	通过	-	+/-	NT	NT	NT
5-甲基胞	尿苷	A、2 氟代	通过	通过	-	-	NT	NT	NT

[2259]

苷		GTP							
5-甲基胞苷	假尿苷	A、2氟代GTP	通过	通过	-	-	NT	NT	NT
5-甲基胞苷	N1-甲基-假尿苷	A、2氟代GTP	通过	通过	-	+/-	NT	NT	NT
2氟胞嘧啶三磷酸	假尿苷	A、2氟代GTP	通过	通过	-	+/-	NT	NT	NT
2氟胞嘧啶三磷酸	N1-甲基-假尿苷	A、2氟代GTP	通过	通过	-	-	NT	NT	NT

[2260] 实施例79.PBMC中的2'氟代基化学物质

[2261] 通过测量干扰素-α(IFN-α)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)产量来测定G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)触发先天性免疫应答的能力。体外PBMC培养物的使用是用以测量寡核苷酸的免疫刺激潜力的已接受方式(Robbins等,Oligonucleotides 2009 19:89-102),并且转染方法在本文有所描述。表127所示的是随着时间推移干扰素-α(IFN-α)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)产量的来自2个或3个单独PBMC供体的平均值,如通过特异性ELISA所测量的。还对R848、P(I)P(C)、LPS和Lipofectamine 2000(L2000)的对照进行了分析。

[2262] 就先天性免疫识别来说,虽然相对于阳性对照(R848、P(I)P(C)),两种修饰mRNA化学物质均大大阻止IFN-α和TNF-α产生,但是2'氟代基化合物将IFN-α和TNF-α产生降低得甚至比其它组合更低,并且N4-乙酰基胞苷组合使细胞因子特征谱上升。

[2263] 表127.IFN-α和TNF-α

[2264]

	IFN-α：3 个供体的平均值(pg/ml)	TNF-α：2 个供体的平均值(pg/ml)
L2000	1	361
P(I)P(C)	482	544
R848	45	8,235
LPS	0	6,889
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	694	528
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	307	283
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	0	411
5-甲基胞苷/5-溴尿苷	0	270
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	456	428
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	274	277
N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	0	285
N4-乙酰基胞苷/5-溴尿苷	44	403
5-甲基胞苷/假尿苷	73	332
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	31	280
N4-乙酰基胞苷/2'氟尿苷三磷酸	35	32
5-甲基胞苷/2'氟尿苷三磷酸	24	0
2'氟胞苷三磷酸/N1-甲基-假尿苷	0	11
2'氟胞苷三磷酸/2-硫代尿苷	0	0
2'氟胞苷/三磷酸 5-溴尿苷	12	2
2'氟胞苷三磷酸/2'氟尿苷三磷酸	11	0
2'氟胞苷三磷酸/5-甲基胞苷	14	23
2'氟胞苷三磷酸/5-甲基胞苷/假尿苷	6	21
2'氟胞苷三磷酸/5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	3	15
2'氟胞苷三磷酸/假尿苷	0	4
2'氟胞苷三磷酸/N1-甲基-假尿苷	6	20
5-甲基胞苷/假尿苷	82	18
5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	35	3

[2265] 实施例80.具有烟草蚀纹病毒5'UTR的修饰mRNA

[2266] 可作为侧翼区提供5'非翻译区(UTR)。侧翼区中可包括多个5′UTR并且所述多个5′UTR可为相同的或具有不同序列。侧翼区的任何部分(包括没有)可为密码子优化的,并且任何一个可在密码子优化之前和/或之后独立地含有一个或多个不同的结构或化学修饰。

[2267] 5'UTR可包括来自烟草蚀纹病毒(TEV)的5'UTR。可利用5'UTR的变体,其中一个或多个核苷酸被添加或移除至末端,包括A、T、C或G。

[2268] 实施例81.PLGA配制的mRNA的表达

[2269] A.荧光素酶PLGA微球的合成和表征

[2270] 将用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰、用以2-硫代尿苷代替25%尿苷并用5-甲基胞嘧啶代替25%胞嘧啶进行修饰的、用N1-甲基-假尿苷完全修饰的,或用假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的

polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)在1x TE缓冲液中重构并且然后配制于PLGA微球中。使用本领域中已知的水/油/水二次乳化方法,使用PLGA-酯帽(Lactel,目录号B6010-2,固有粘度0.55-0.75,50:50LA:GA)、聚乙烯醇(PVA)(Sigma,目录号348406-25G,MW 13-23k)二氯甲烷和水合成PLGA微球。简单地说,将4mg/ml的0.4ml在TE缓冲液中的mRNA(W1)添加到2ml在200mg/ml的PLGA浓度下溶解于二氯甲烷(DCM)的PLGA(O1)中。将W1/O1乳液在速度5(~19,000rpm)下均化(IKA Ultra-Turrax Homogenizer,T18)30秒。然后将W1/O1乳液添加到250ml 1%PVA(W2)中,并且在速度5(~19,000rpm)下均化1分钟。使制剂搅拌3小时,然后使其通过100μm尼龙网过滤器(Fisherbrand Cell Strainer,目录号22-363-549)以去除较大的聚集物,并且最终通过离心(10min,9,250rpm,4℃)对其进行洗涤。弃去上清液,并且将PLGA沉淀重悬于5-10ml的水中,重复2次。在洗涤和用水重悬之后,使用100-200μl的PLGA微球样品来通过激光衍射(Malvern Mastersizer2000)测量制剂的粒度。将经过洗涤的制剂在液氮中冰冻,然后冻干2-3天。

[2271] 在冻干之后,在2ml eppendorf管中称出~10mg的PLGA MS,并且通过添加1ml的DCM并将样品振荡2-6小时来使其解聚。通过添加0.5ml水并将样品振荡过夜来从脱配制的PLGA微球中提取mRNA。将在TE缓冲液中的未配制的荧光素酶mRNA(未配制的对照)加入DCM中,并经受解聚过程(解聚对照),以在转染测定中用作对照。包封效率,重量百分比负载和粒度在表128中示出。包封效率计算为来自PLGA微球的脱配制的mRNA的mg除以添加到制剂中的mRNA的初始量。制剂中的重量百分比负载计算为来自PLGA微球的脱配制的mRNA的mg除以添加到制剂中的PLGA的初始量。

[2272] 表128.PLGA特征

[2273]

化学修饰	样品 ID	包封效率(%)	理论 mRNA 负载(wt %)	实际 mRNA 负载(wt %)	粒度 (D50, um)
用 5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基-假尿苷完全修饰	43-66A	45.8	0.4	0.18	33.4
	43-66B	29.6		0.12	27.7
	43-66C	25.5		0.10	27.1
用 2-硫代尿苷代替 25%的尿苷并用 5-甲基胞嘧啶代替 25%的胞嘧啶	43-67A	34.6	0.4	0.14	29.9
	43-67B	22.8		0.09	30.2
	43-67C	23.9		0.10	25.1
用 N1-甲基-假尿苷完全修饰	43-69A	55.8	0.4	0.22	40.5
	43-69B	31.2		0.12	41.1
	43-69C	24.9		0.10	46.1
用假尿苷完全修饰	43-68-1	49.3	0.4	0.20	34.8
	43-68-2	37.4		0.15	35.9
	43-68-3	45.0		0.18	36.5

[2274] B.包封在PLGA微球中的修饰mRNA的蛋白质表达

[2275] 在转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,

NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul EMEM培养基(补充有10%FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5%CO2气氛中生长过夜。第二天,将83ng的脱配制的荧光素酶mRNA PLGA微球样品、脱配制的荧光素酶mRNA对照(脱成型对照)或未配制的荧光素酶mRNA对照(未成型对照)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5min后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15min。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中。然后如之前所述孵育平板。

[2276] 在孵育18至22小时之后,用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA),并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。

[2277] 收获细胞并且每个样品的生物发光(以相对光单位RLU计)在表129中示出。这些样品的转染确认了荧光素酶mRNA的不同化学物质在PLGA微球配制之后仍然能够表达荧光素酶蛋白。

[2278] 表129.化学修饰

[2279]

化学修饰	样品ID	Biolum.(RLU)
用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰	脱成型对照	164266.5
	未配制对照	113714
	43-66A	25174
	43-66B	25359
	43-66C	20060
用2-硫代尿苷代替25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶代替25%的胞嘧啶	脱成型对照	90816.5
	未配制对照	129806
	43-67A	38329.5
	43-67B	8471.5
	43-67C	10991.5

[2280]

用N1-甲基-假尿苷完全修饰	脱成型对照	928093.5
	未配制对照	1512273.5
	43-69A	1240299.5
	43-69B	748667.5
	43-69C	1193314
用假尿苷完全修饰	脱成型对照	154168
	未配制对照	151581
	43-68-1	120974.5
	43-68-2	107669
	43-68-3	97226

[2281] 实施例82.IX因子的体外研究

[2282] A.不含血清的培养基

[2283] 在不含血清的培养基中转染人IX因子mRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)。收集细胞培养物上清液并使其进行胰蛋白酶消化,之后进行肽的2维HPLC分离。使用基质辅助激光解吸/电离来检测肽。检测到8种肽并且所检测的肽中的7种为IX因子所特有的。这些结果表明在不含血清的培养基中转染的mRNA能够表达全长IX因子蛋白。

[2284] B.人胚胎肾(HEK)293A细胞

[2285] 使用Lipofectamine 2000在DMEM中,在10%FBS的存在下,将250ng的密码子优化的人IX因子mRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)转染到HEK 293A细胞(150,000细胞/孔)中。转染后3小时移除转染复合物。在转染后3、6、9、12、24、48和72小时收获细胞。分离总RNA并用于cDNA分析。使用密码子优化的IX因子特异性引物组,通过定量实时PCR对cDNA进行分析。人次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶1(HPRT)的水平用于归一化。将数据作为可检测mRNA的百分比进行绘图,在3小时时间点处的mRNA水平视为100%。用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的IX因子修饰mRNA在人胚胎肾293(HEK293)细胞中的半衰期为约8-10小时。

[2286] 实施例83.盐水制剂:皮下施用

[2287] 将人G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)和人EPO修饰mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制于盐水中并以100ug的剂量通过肌内(IM)注射递送至小鼠。

[2288] 对照包括荧光素酶(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)或配制缓冲液(F.缓冲液)。在注射后13小时将小鼠放血,以测定血清中人多肽的浓度(pg/mL)。(G-CSF组在小鼠血清中测量人G-CSF并且EPO组在小鼠血清中测量人EPO)。数据在表130中示出。

[2289] 在不存在制剂的情况下,mRNA在血清中快速降解,表明递送mRNA以在系统中持续较长时间的最好方法是通过配制mRNA。如表130所示,可仅使用配制缓冲液皮下递送mRNA。

[2290] 表130.给药方案

[2291]

组	处理	剂量体积(μl/小鼠)	给药媒介物	平均蛋白质产量 pg/ml, 血清
G-CSF	G-CSF	100	F.缓冲液	45

[2292]

G-CSF	荧光素酶	100	F.缓冲液	0
G-CSF	F.缓冲液	100	F.缓冲液	2.2
EPO	EPO	100	F.缓冲液	72.03
EPO	荧光素酶	100	F.缓冲液	26.7
EPO	F.缓冲液	100	F.缓冲液	13.05

[2293] 实施例84.玻璃体内递送

[2294] 将配制于盐水中的mCherry修饰mRNA(SEQ ID NO:171中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)和荧光素酶修饰mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)玻璃体内递送于大鼠,如表131所述。将样品与玻璃体内递送的仅具有盐水的对照进行比较。

[2295] 表131.给药图表

[2296]

组号	剂量水平(μg 修饰RNA/眼睛)	剂量体积(μL/眼睛)	处理	
			右眼(OD)	左眼(OS)
对照	0	5	仅递送缓冲液	仅递送缓冲液
在递送缓冲液中的修饰 RNA	10	5	mCherry	荧光素酶

[2297] 在第1天,在使动物麻醉的同时,将制剂施用至每只动物的左眼或右眼。在施用的前一天,向两只眼睛给予两次庆大霉素眼用软膏或溶液。还在注射之后立即给予并且在注射的第二天给予庆大霉素眼用软膏或溶液。在给药之前,向每只眼睛给予扩瞳滴剂(1%托吡卡胺和/或2.5%苯福林)。

[2298] 在给药后18小时,将接受mCherry和递送缓冲液的剂量的眼睛摘出,并且将每只眼睛单独放置在含有处于室温的10mL 4%低聚甲醛的管中用于过夜组织固定。第二天,将眼睛单独地转移到含有10mL的30%蔗糖的管中并且储存在21℃直到将它们加工和切片。在F-显微镜下评价由不同切片制备的载玻片。在用施用mCherry修饰mRNA的眼睛制备的载玻片中观察到阳性表达,而对照未显示表达。

[2299] 实施例85.体内细胞因子表达研究

[2300] 向小鼠肌内注射200ug的没有用5'帽,Cap1修饰的(未修饰的)、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷以及5'帽,Cap1完全修饰(Gen1)的或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷以及5'帽,Cap1(Gen2帽)或没有帽(未加帽的Gen2)完全修饰的G-CSF修饰mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出)。还对R-848、5%蔗糖以及未处理的小鼠的对照进行分析。8小时后,从小鼠中收集血清并针对干扰素-α(IFN-α)表达进行分析。结果在表132中示出。

[2301] 表132.IFN-α表达

[2302]

制剂	IFN-α(pg/ml)
未修饰的G-CSF	67.012
G-CSF Gen1	8.867
G-CSF Gen2帽	0
未加帽的G-CSF Gen2	0
R-848	40.971
5%蔗糖	1.493
未处理的	0

[2303] 实施例86.VEGF修饰mRNA的体外表达

[2304] 以表133所示的浓度，用已经与来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的Lipofectamine2000复合的修饰mRNA(mmRNA)VEGF-A(SEQ ID NO:183中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)转染HEK293细胞。通过ELISA检测蛋白质表达，并且蛋白质(pg/ml)在表133和图7中示出。

[2305] 表133.蛋白质表达

[2306]

转染的量	10 ng	2.5 ng	625 pg	156 pg	39 pg	10 pg	2 pg	610 fg
蛋白质(pg/ml)	10495	10038	2321.23	189.6	0	0	0	0

[2307] 实施例87.GFP在HeLa细胞中的体外筛选

[2308] 在转染前一天，通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul EMEM培养基(补充有10％FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5％CO_2气氛中生长过夜。第二天，将37.5ng或75ng的具有表134中所述的化学修饰的绿色荧光蛋白(GFP)修饰RNA(SEQ ID NO:182中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂，并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后，将两种溶液合并，并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。

[2309] 在孵育18至22小时之后，用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA)，并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。测定每种化学物质的荧光介质强度(MFI)并在表134中示出。

[2310] 这些结果表明，与其它化学物质相比，用N1-甲基-假尿苷和5-甲基胞嘧啶完全修饰的GFP在HeLa细胞中产生更多蛋白质。另外，施用至细胞的更高剂量的GFP导致最高的MFI值。

[2311] 表134.平均荧光强度

[2312]

化学物质	**37.5 ng**	**75 ng**
	MFI	**MFI**
无修饰	97400	89500
5-甲基胞嘧啶/假尿苷	324000	715000
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基-假尿苷	643000	1990000

[2313] 实施例88.均化

[2314] 对不同的荧光素酶mRNA溶液(如表135中所述，其中"X"是指包含所述组分的溶液)(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)进行评价，以测试不同溶液的产率百分比、通过生物分析仪测试mRNA的完整性并通过体外转染测试mRNA的蛋白质表达。如表135中所指

出，在水、1x TE缓冲液中以4mg/ml制备mRNA溶液，并且将其添加到二氯甲烷(DCM)或含有200mg/ml的聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)(Lactel，目录号B6010-2，固有粘度0.55-0.75，50:50LA:GA)的DCM中，以实现0.8mg/ml的最终mRNA浓度。将需要均化的溶液在速度5(大约19,000rpm)(IKA Ultra-Turrax Homogenizer，T18)下均化30秒。在水、二氯甲烷和聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)中的mRNA样品是不可回收的(NR)。除了NR样品之外的所有样品保持mRNA的完整性，如通过生物分析仪(Bio-rad Experion)所测定。

[2315] 在转染前一天，通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies，Grand Island，NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号；Manassas，VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10％FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning，Manassas，VA)中。使细胞在37℃下在5％CO2气氛中生长过夜。第二天，将来自可回收样品的250ng的荧光素酶mRNA稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies，Grand Island，NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies，Grand Island，NY)作为转染试剂，并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后，将两种溶液合并，并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中。然后如之前所述孵育平板。还对对照荧光素酶mRNA(在盐水中配制的荧光素酶mRNA)(Control)和未处理细胞(Untreat.)进行评价。收获细胞并且每个信号的生物发光平均值(以光子/秒计)(biolum.(p/s))也在表135中示出。在分析时，可回收样品均显示出荧光素酶mRNA的活性。

[2316] 在孵育18至22小时之后，用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega，Madison，WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning，Manassas，VA)，并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega，Madison，WI)合并。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek，Winooski，VT)。

[2317] 收获细胞并且每个信号的生物发光平均值(以相对光单位RLU计)(biolum.(RLU))也在表135中示出。在分析时，可回收样品均显示出荧光素酶mRNA的活性。

[2318] 表135.溶液

[2319]

溶液编号	水	1 x TE缓冲液	DCM	DCM/PLGA	均化器	产率(%)	Biolum.(RLU)
1	X					96	5423780
2		X			X	95	4911950
3	X				X	92	2367230
4		X			X	90	4349410
5	X		X		X	66	4145340
6		X	X		X	71	3834440
7	X			X	X	NR	n/a
8		X		X	X	24	3182080
9	X			X		NR	n/a
10		X		X		79	3276800
11	X		X			79	5563550
12		X	X			79	4919100

[2320]

对照							2158060
未处理的							3530

[2321] 实施例89.TE缓冲液和水评价

[2322] 如表136中所概述将荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)在水或TE缓冲液中重构并然后配制于PLGA微球中。使用本领域中已知的水/油/水二次乳化方法,使用PLGA(Lactel,目录号B6010-2,固有粘度0.55-0.75,50:50LA:GA)、聚乙烯醇(PVA)(Sigma,目录号348406-25G,MW 13-23k)二氯甲烷和水合成PLGA微球。简单地说,将2mg/ml至6mg/ml的0.2ml至0.6ml在水或TE缓冲液中的mRNA(W1)添加到2ml在100mg/ml PLGA浓度下溶解于二氯甲烷(DCM)的PLGA(O1)中。将W1/O1乳液在速度5(～19,000rpm)下均化(IKA Ultra-Turrax Homogenizer,T18)30秒。然后将W1/O1乳液添加到250ml 1%PVA(W2)中,并且在速度5(～19,000rpm)下均化1分钟。

[2323] 使制剂搅拌3小时,然后使其通过100μm尼龙网过滤器(Fisherbrand Cell Strainer,目录号22-363-549)以去除较大的聚集物,并且最终通过离心(10min,9,250rpm,4℃)对其进行洗涤。弃去上清液,并且将PLGA沉淀重悬于5-10ml的水中,重复2次。将经过洗涤的制剂在液氮中冰冻,然后冻干2-3天。在冻干之后,在2ml eppendorf管中称出～10mg的PLGA MS,并且通过添加1ml的DCM并使样品振荡2-6小时来使其解聚。通过添加0.5ml水并使样品振荡过夜来从脱配制的PLGA微球中提取mRNA。将在水或TE缓冲液中未配制的荧光素酶mRNA(脱配制的对照)加入DCM中,并经受解聚过程,以在转染测定中用作对照。

[2324] 在转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10%FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5%CO2气氛中生长过夜。第二天,将100ng的脱配制的荧光素酶mRNA样品稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中。然后如之前所述孵育平板。

[2325] 在孵育18至22小时之后,用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA),并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。为了测定来自每种制剂的荧光素酶mRNA的活性,将每种制剂的相对光单位(RLU)除以适当的mRNA脱制剂对照的RLU(在水或TE缓冲液中的mRNA)。表136示出荧光素酶mRNA的活性。通过配制于TE缓冲液(相对于水)中,显著改善了PLGA微球制剂(Form.)中荧光素酶mRNA的活性。

[2326] 表136.制剂

[2327]

Form.	mRNA 浓度 (mg/ml)	W1 溶剂体积 (ul)	总 mRNA (ug)	理论 mRNA 负载(wt%)	实际 mRNA 负载 (wt%)	W1 溶剂	活性 (deform.对照的%)
PLGA A	4	400	1600	0.80	0.14	水	12.5%
PLGA B	4	200	800	0.40	0.13	水	1.3%
PLGA C	4	600	2400	1.20	0.13	水	12.1%
PLGA D	2	400	800	0.40	0.07	水	1.3%

[2328]

PLGA E	6	400	2400	1.20	0.18	TE 缓冲液	38.9%
PLGA F	4	400	1600	0.80	0.16	TE 缓冲液	39.7%
PLGA G	4	400	1600	0.80	0.10	TE 缓冲液	26.6%

[2329] 实施例90.mRNA上的化学修饰

[2330] 在转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(Life Technologies,Grand Island,NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10%FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5%CO_2气氛中生长过夜。第二天,将83ng的具有表137中所述的化学修饰的荧光素酶修饰RNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。

[2331] 在孵育18至22小时之后,用100ul的Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,WI)按照制造商的说明将表达荧光素酶的细胞裂解。将裂解物的等分试样转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔平板(Corning,Manassas,VA),并且与100ul的完全荧光素酶测定溶液(Promega,Madison,WI)合并。调节或稀释裂解物体积,直到对于产生最强信号的样品检测到不超过2mio相对光单位(RLU)/孔,所测试的每种化学物质的RLU在表137中示出。平板读取器为BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。没有试剂的平板的背景信号为约200相对光单位/孔。

[2332] 表137.化学修饰

[2333]

样品	RLU

[2334]

未处理的	336
未修饰的荧光素酶	33980
5-甲基胞嘧啶和假尿苷	1601234
5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷	421189
用5-甲基胞嘧啶代替25%的胞嘧啶并用2-硫代尿苷代替25%的尿苷	222114
N1-甲基-假尿苷	3068261
假尿苷	140234
N4-乙酰基胞苷	1073251
5-甲氧基尿苷	219657
5-溴尿苷	6787
N4-乙酰基胞苷和N1-甲基-假尿苷	976219
5-甲基胞嘧啶和5-甲氧基尿苷	66621
5-甲基胞嘧啶和2'氟尿苷	11333

[2335] 实施例91.修饰mRNA的肌内和皮下施用

[2336] 将配制于PBS(pH 7.4)中的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷(5mC/N1mpU)完全修饰的、用假尿苷(pU)完全修饰的、用N1-甲基-假尿苷(N1mpU)完全修饰的或其中用5-甲基胞嘧啶代替25%的胞嘧啶并用2-硫代尿苷代替25%的尿苷(5mC/s2U)进行修饰的荧光素酶修饰mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)以2.5mg/kg的剂量肌内或皮下施用至Balb-C小鼠。对于肌内递送,在第2小时、第8小时、第24小时、第48小时、第72小时、第96小时、第120小时和第144小时,并且对于皮下递送,在第2小时、第8小时、第24小时、第48小时、第72小时、第96小时和第120小时对小鼠成像。在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。肌内施用的平均总流量(光子/秒)在表138中示出,并且皮下施用的平均总流量(光子/秒)在表139中示出。背景信号为3.79E+05(p/s)。对于所有化学物质,在第24小时与第48小时之间观察到肌内施用的峰值表达,并且在第144小时仍检测到表达。对于皮下递送,在第2小时至第8小时观察到峰值表达,并且在第72小时检测到表达。

[2337] 表138.肌内施用

[2338]

	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U	pU	N1mpU
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
2 小时	1.98E+07	4.65E+06	4.68E+06	2.33E+06	3.66E+07
8 小时	1.42E+07	3.64E+06	3.78E+06	8.07E+06	7.21E+07
24 小时	2.92E+07	1.22E+07	3.35E+07	1.01E+07	1.75E+08
48 小时	2.64E+07	1.01E+07	5.06E+07	7.46E+06	3.42E+08
72 小时	2.18E+07	8.59E+06	3.42E+07	4.08E+06	5.83E+07
96 小时	2.75E+07	2.70E+06	2.38E+07	4.35E+06	7.15E+07
120 小时	2.19E+07	1.60E+06	1.54E+07	1.25E+06	3.87E+07
144 小时	9.17E+06	2.19E+06	1.14E+07	1.86E+06	5.04E+07

[2339] 表139.皮下施用

[2340]

	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U	pU	N1mpU
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
2 小时	5.26E+06	4.54E+06	9.34E+06	2.43E+06	2.80E+07
8 小时	2.32E+06	8.75E+05	8.15E+06	2.12E+06	3.09E+07
24 小时	2.67E+06	5.49E+06	3.80E+06	2.24E+06	1.48E+07
48 小时	1.22E+06	1.77E+06	3.07E+06	1.58E+06	1.24E+07
72 小时	1.12E+06	8.00E+05	8.53E+05	4.80E+05	2.29E+06
96 小时	5.16E+05	5.33E+05	4.30E+05	4.30E+05	6.62E+05
120 小时	3.80E+05	4.09E+05	3.21E+05	6.82E+05	5.05E+05

[2341] 实施例92.渗透泵研究

[2342] 在植入之前，向渗透泵(ALZET® Osmotic Pump 2001D,DURECT Corp.Cupertino,CA)负载0.2ml的1X PBS(pH 7.4)(PBS负载泵)或0.2ml的在1x PBS(pH 7.4)中的1mg/ml的荧光素酶修饰mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)(荧光素酶负载泵)并且在1x PBS(pH 7.4)中在37℃下孵育过夜。

[2343] 给Balb-C小鼠(n＝3)皮下植入PBS负载泵或荧光素酶负载泵,并且在第2小时、第8小时和第24小时成像。作为对照,将PBS负载泵皮下植入,并且给小鼠皮下注射在1x PBS中的荧光素酶修饰mRNA(PBS负载泵;SC荧光素酶)或不植入渗透泵并且给小鼠皮下注射在1x PBS中的荧光素酶修饰mRNA(SC荧光素酶)。荧光素酶制剂概述在表140中。

[2344] 表140.荧光素酶制剂

[2345]

组	媒介物	浓度(mg/ml)	注射体积(ul)	量(ug)	剂量(mg/kg)
PBS 负载泵; SC 荧光素酶	PBS	1.00	50	50	2.5
荧光素酶负载泵	PBS	1.00	-	200	10.0
PBS 负载泵	PBS	-	-	-	-
SC 荧光素酶	PBS	1.00	50	50	2.5

[2346] 实施例93.外置渗透泵研究

[2347] 向外置渗透泵(ALZET®Osmotic Pump 2001D,DURECT Corp.Cupertino,CA)负载0.2ml的1X PBS(pH 7.4)(PBS负载泵)或0.2ml的在1x PBS(pH 7.4)中的1mg/ml的荧光素酶修饰mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)(荧光素酶负载泵)并且在1x PBS(pH 7.4)中在37℃下孵育过夜。

[2348] 使用连接到外置PBS负载泵或荧光素酶负载泵的导管,向Balb-C小鼠(n=3)施用制剂。在第2小时、第8小时和第24小时对小鼠成像。作为对照,使用外置PBS负载泵,并且给小鼠皮下注射在1x PBS中的荧光素酶修饰mRNA(PBS负载泵;SC荧光素酶)或不使用外置泵并且仅给小鼠皮下注射在1x PBS中的荧光素酶修饰mRNA(SC荧光素酶)。在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。荧光素酶制剂在表141中概述,并且平均总流量(光子/秒)。

[2349] 表141.荧光素酶制剂

[2350]

组	媒介物	浓度(mg/ml)	注射体积(ul)	量(ug)	剂量(mg/kg)
PBS 负载泵; SC 荧光素酶	PBS	1.00	50	50	2.5
荧光素酶负载泵	PBS	1.00	-	200	10.0
PBS 负载泵	PBS	-	-	-	-
SC 荧光素酶	PBS	1.00	50	50	2.5

[2351] 实施例94.纤维蛋白密封剂研究

[2352] 由纤维蛋白原和凝血酶在双筒注射器中组成纤维蛋白密封剂,如Tisseel(Baxter Healthcare Corp.,Deerfield,IL)。在混合时,纤维蛋白原在约10秒至30秒中转化成纤维蛋白以形成纤维蛋白凝块。此凝块可模拟身体的天然凝血机制。另外,纤维蛋白水凝胶为可潜在地用于持续释放递送的三维结构。当前,纤维蛋白密封剂被批准用于止血和密封的应用以代替常规外科技术(如缝合、结扎以及烧灼)。

[2353] 将凝血酶和纤维蛋白原组分单独加载到双筒注射器中。向Balb-C小鼠(n=3)皮下注射50ul的纤维蛋白原、50ul的凝血酶,并且还在相同部位向所述小鼠注射修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)(Tisseel+荧光素酶)、50ul的纤维蛋白原和50ul凝血酶(Tisseel)或修饰的荧光素酶mRNA(荧光素酶)。使用双筒注射器同时进行纤维蛋白原和凝血酶的注射。在纤维蛋白原/凝血酶注射后15分钟进行荧光素酶的SC注射,以允许纤维蛋白水凝胶聚合(Tisseel+荧光素酶组)。还对未处理小鼠的对照组进行评价。在第5小时和第24小时对小鼠成像。在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。荧光素酶制剂在表142中概述,并且平均总流量(光子/秒)在表143中示出。发现纤维蛋白密封剂不干扰成像并且荧光素酶和Tisseel的注射显示出荧光素酶的表达。

[2354] 表142.荧光素酶制剂

[2355]

组	媒介物	浓 度 (mg/ml)	注射体积(ul)	量 (ug)	剂 量 (mg/kg)
Tisseel+荧光素酶	PBS	1.00	50	50	2.5
Tisseel	-	-	-	-	-
荧光素酶	PBS	1.00	50	50	2.5
未处理的	-	-	-	-	-

[2356] 表143.总流量

[2357]

组	5 小时	24 小时
	流量(p/s)	流量(p/s)
Tisseel+荧光素酶	4.59E+05	3.39E+05
Tisseel	1.99E+06	1.06E+06
荧光素酶	9.94E+05	7.44E+05
未处理的	3.90E+05	3.79E+05

[2358] 实施例95.含有mRNA的纤维蛋白密封剂研究

[2359] A.修饰mRNA和氯化钙

[2360] 在重构之前,将用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰或用N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)添加到氯化钙中。然后使用氯化钙重构凝血酶。用纤维蛋白溶解抑制剂溶液按照制造商的说明重构纤维蛋白原。将所重构的含有修饰mRNA的凝血酶和纤维蛋白原加载到双筒注射器中。向小鼠皮下注射50ul纤维蛋白原和50ul的含有修饰mRNA的凝血酶或者向所述小鼠注射50ul的含有等效剂量的修饰荧光素酶mRNA的PBS。还对未处理小鼠的对照组进行评价。在预定间隔对小鼠成像以测定平均总流量(光子/秒)。

[2361] B.脂质纳米颗粒配制的修饰mRNA和氯化钙

[2362] 在重构之前,将配制于脂质纳米颗粒中的用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰或用N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)添加到氯化钙中。然后使用氯化钙重构凝血酶。用纤维蛋白溶解抑制剂溶液按照制造商的说明重构纤维蛋白原。将所重构的含有修饰mRNA的凝血酶和纤维蛋白原加载到双筒注射器中。向小鼠皮下注射50ul纤维蛋白原和50ul的含有修饰mRNA的凝血酶或者向所述小鼠注射50ul的含有等效剂量的修饰荧光素酶mRNA的PBS。还对未处理小鼠的对照组进行评价。在预定间隔对小鼠成像以测定平均总流量(光子/秒)。

[2363] C.修饰mRNA和纤维蛋白原

[2364] 在重构之前,将用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰或用N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)添加到纤维蛋白溶解抑制剂溶液中。然后使用纤维蛋白溶解抑制剂溶液重构纤维蛋白原。用氯化钙溶液按照制造商的说明重构凝血酶。将所重构的含有修饰mRNA的纤维蛋白原和凝血酶加载到双筒注射器中。向小鼠皮下注射50ul凝血酶和50ul的含有修饰mRNA的纤维蛋白原或者向所述小鼠注射50ul的含有等效剂量的修饰荧光素酶mRNA的PBS。还对未处理小鼠的对照组进行评价。在预定间隔对小鼠成像以测定平

均总流量(光子/秒)。

[2365] D.脂质纳米颗粒配制的修饰mRNA和纤维蛋白原

[2366] 在重构之前,将配制于脂质纳米颗粒中的用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰或用N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)添加到纤维蛋白溶解抑制剂溶液中。然后使用纤维蛋白溶解抑制剂溶液重构纤维蛋白原。用氯化钙溶液按照制造商的说明重构凝血酶。将所重构的含有修饰mRNA的纤维蛋白原和凝血酶加载到双筒注射器中。向小鼠皮下注射50ul凝血酶和50ul的含有修饰mRNA的纤维蛋白原或者向所述小鼠注射50ul的含有等效剂量的修饰荧光素酶mRNA的PBS。还对未处理小鼠的对照组进行评价。在预定间隔对小鼠成像以测定平均总流量(光子/秒)。

[2367] E.修饰mRNA和凝血酶

[2368] 在重构之前,将用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰或用N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)添加到所重构的凝血酶(在用氯化钙按照制造商的说明重构所述凝血酶之后)中。然后使用纤维蛋白溶解抑制剂溶液按照制造商的说明重构纤维蛋白原。将所重构的纤维蛋白原和含有修饰mRNA的凝血酶加载到双筒注射器中。向小鼠皮下注射50ul含有修饰mRNA的凝血酶和50ul纤维蛋白原或者向所述小鼠注射50ul的含有等效剂量的修饰荧光素酶mRNA的PBS。还对未处理小鼠的对照组进行评价。在预定间隔对小鼠成像以测定平均总流量(光子/秒)。

[2369] F.脂质纳米颗粒配制的修饰mRNA和凝血酶

[2370] 在重构之前,将配制于脂质纳米颗粒中的用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰或用N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)添加到所重构的凝血酶(在用氯化钙按照制造商的说明重构所述凝血酶之后)中。然后使用纤维蛋白溶解抑制剂溶液按照制造商的说明重构纤维蛋白原。将所重构的纤维蛋白原和含有修饰mRNA的凝血酶加载到双筒注射器中。向小鼠皮下注射50ul含有修饰mRNA的凝血酶和50ul纤维蛋白原或者向所述小鼠注射50ul的含有等效剂量的修饰荧光素酶mRNA的PBS。还对未处理小鼠的对照组进行评价。在预定间隔对小鼠成像以测定平均总流量(光子/秒)。

[2371] 实施例96. 5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷修饰的mRNA的阳离子脂质制剂

[2372] 将用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)配制于表144中所述的阳离子脂质中。以0.05mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V.)、肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。

[2373] 表144.阳离子脂质制剂

[2374]

制剂	NPA-126-1	NPA-127-1	NPA-128-1	NPA-129-1	111612-B
脂质	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
脂质/mRNA比(wt/wt)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
平均尺寸	122 nm PDI：0.13	114 nm PDI：0.10	153 nm PDI：0.17	137 nm PDI：0.09	223.2 nm PDI：0.142
在pH 7.4下的ζ	-1.4 mV	-0.5 mV	-1.4 mV	2.0 mV	-3.09 mV
包封(RiboGr)	95%	77%	69%	80%	64%

[2375] 在成像之前20分钟，以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在给药后2小时、8小时和24小时对小鼠成像，并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景流量为约4.17E+05p/s。成像的结果在表145中示出。在表145中，“T”是指未测试的。

[2376] 表145.流量

[2377]

途径	时间点	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
		流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
I.V.	第2小时	1.92E+08	2.91E+08	1.08E+08	2.53E+07	8.40E+06
I.V.	第8小时	1.47E+08	2.13E+08	3.72E+07	3.82E+07	5.62E+06
I.V.	第24小时	1.32E+07	2.41E+07	5.35E+06	4.20E+06	8.97E+05
I.M.	第2小时	8.29E+06	2.37E+07	1.80E+07	1.51E+06	NT
I.M.	第8小时	5.83E+07	2.12E+08	2.60E+07	1.99E+07	NT
I.M.	第24小时	4.30E+06	2.64E+07	3.01E+06	9.46E+05	NT
S.C.	第2小时	1.90E+07	5.16E+07	8.91E+07	4.66E+06	9.61E+06
S.C.	第8小时	7.74E+07	2.00E+08	4.58E+07	9.67E+07	1.90E+07
S.C.	第24小时	7.49E+07	2.47E+07	6.96E+06	6.50E+06	1.28E+06

[2378] 实施例97.脂质纳米颗粒静脉内研究

[2379] 将荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制于含有50%的如表146中所述的DLin-MC3-DMA或DLin-KC2-DMA、38.5%胆固醇、10%DSPC和1.5%PEG的脂质纳米颗粒中。以0.5mg/kg、0.05mg/kg、0.005mg/kg或0.0005mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V.)施用制剂。在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。

[2380] 表146.制剂

[2381]

制剂	NPA-098-1	NPA-100-1
脂质	DLin-KC2-DMA	DLin-MC3-DMA
脂质/mRNA 比(wt/wt)	20:1	20:1
平均尺寸	135 nm PDI: 0.08	152 nm PDI: 0.08
在 pH 7.4 下的ζ	-0.6 mV	-1.2 mV
包封 (RiboGr)	91%	94%

[2382] 对于DLin-KC2-DMA,在给药后2小时、8小时、24小时、72小时、96小时和168小时对小鼠成像,并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景流量为约3.66E+05p/s。成像的结果在表147中示出。在第8小时对器官成像,并且测量肝、脾、肺和肾的平均总流量(光子/秒)。还对每种器官的对照进行分析。结果在表148中示出。所有剂量水平的峰值信号处于施用后8小时。另外,通过增加或减小LNP剂量可能够控制至

不同器官(肝、脾、肺和肾)的分布。

[2383] 表147.流量

[2384]

时间点	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.005 mg/kg	0.0005 mg/kg
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
第 2 小时	3.54E+08	1.75E+07	2.30E+06	4.09E+05
第 8 小时	1.67E+09	1.71E+08	9.81E+06	7.84E+05
第 24 小时	2.05E+08	2.67E+07	2.49E+06	5.51E+05
第 72 小时	8.17E+07	1.43E+07	1.01E+06	3.75E+05
第 96 小时	4.10E+07	9.15E+06	9.58E+05	4.29E+05
第 168 小时	3.42E+07	9.15E+06	1.47E+06	5.29E+05

[2385] 表148.器官流量

[2386]

	肝	脾	肺	肾
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
0.5 mg/kg	1.42E+08	4.86E+07	1.90E+05	3.20E+05
0.05 mg/kg	7.45E+06	4.62E+05	6.86E+04	9.11E+04
0.005 mg/kg	3.32E+05	2.97E+04	1.42E+04	1.15E+04
0.0005 mg/kg	2.34E+04	1.08E+04	1.87E+04	9.78E+03
未处理的	1.88E+04	1.02E+04	1.41E+04	9.20E+03

[2387] 对于DLin-MC3-DMA,在给药后2小时、8小时、24小时、48小时、72小时和144小时对小鼠成像,并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景流量为约4.51E+05p/s。成像的结果在表149中示出。在第8小时对器官成像,并且测量肝、脾、肺和肾的平均总流量(光子/秒)。还对每种器官的对照进行分析。结果在表150中示出。所有剂量水平的峰值信号处于施用后8小时。另外,通过增加或减小LNP剂量可能够控制至不同器官(肝、脾、肺和肾)的分布。

[2388] 表149.流量

[2389]

时间点	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.005 mg/kg	0.0005 mg/kg
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
第 2 小时	1.23E+08	7.76E+06	7.66E+05	4.88E+05
第 8 小时	1.05E+09	6.79E+07	2.75E+06	5.61E+05
第 24 小时	4.44E+07	1.00E+07	1.06E+06	5.71E+05
第 48 小时	2.12E+07	4.27E+06	7.42E+05	4.84E+05
第 72 小时	1.34E+07	5.84E+06	6.90E+05	4.38E+05
第 144 小时	4.26E+06	2.25E+06	4.58E+05	3.99E+05

[2390] 表150.器官流量

[2391]

	肝	脾	肺	肾
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
0.5 mg/kg	1.19E+08	9.66E+07	1.19E+06	1.85E+05
0.05 mg/kg	1.10E+07	1.79E+06	7.23E+04	5.82E+04
0.005 mg/kg	3.58E+05	6.04E+04	1.33E+04	1.33E+04
0.0005 mg/kg	2.25E+04	1.88E+04	2.05E+04	1.65E+04
未处理的	1.91E+04	1.66E+04	2.63E+04	2.14E+04

[2392] 实施例98.脂质纳米颗粒皮下研究

[2393] 将荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制于含有50%的如表151中所述的DLin-KC2-DMA、385%胆固醇、10%DSPC和1.5%PEG的脂质纳米颗粒中。以0.5mg/kg、0.05mg/kg或0.005mg/kg的剂量向Balb-C小鼠皮下(S.C.)施用制剂。

[2394] 表151.DLin-KC2-DMA制剂

[2395]

制剂	NPA-098-1
脂质	DLin-KC2-DMA
脂质/mRNA 比(wt/wt)	20:1
平均尺寸	135 nm PDI: 0.08
在 pH 7.4 下的 ζ	-0.6 mV
包封 (RiboGr)	91%

[2396] 在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在给药后2小时、8小时、24小时、48小时、72小时和144小时对小鼠成像,并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。检测的下限为约3E+05p/s。成像的结果在表152中示出。在第8小时对器官成像,并且测量肝、脾、肺和肾的平均总流量(光子/秒)。还对每种器官的对照进行分析。结果在表153中示出。所有剂量水平的峰值信号处于施用后8小时。另外,通过增加或减小LNP剂量可能够控制至不同器官(肝、脾、肺和肾)的分布。在高剂量下,LNP制剂迁移到皮下注射部位的外部,因为在肝、脾、肺和肾中检测到高水平的荧光素酶表达。

[2397] 表152.流量

[2398]

时间点	0.5 mg/kg	0.05 mg/kg	0.005 mg/kg
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
第 2 小时	3.18E+07	7.46E+06	8.94E+05
第 8 小时	5.15E+08	2.18E+08	1.34E+07
第 24 小时	1.56E+08	5.30E+07	7.16E+06
第 48 小时	5.22E+07	8.75E+06	9.06E+05
第 72 小时	8.87E+06	1.50E+06	2.98E+05
第 144 小时	4.55E+05	3.51E+05	2.87E+05

[2399] 表153.器官流量

[2400]

	肝	脾	肺	肾
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
0.5 mg/kg	1.01E+07	7.43E+05	9.75E+04	1.75E+05
0.05 mg/kg	1.61E+05	3.94E+04	4.04E+04	3.29E+04
0.005 mg/kg	2.84E+04	2.94E+04	2.42E+04	9.79E+04
未处理的	1.88E+04	1.02E+04	1.41E+04	9.20E+03

[2401] 实施例99.阳离子脂质纳米颗粒皮下研究

[2402] 将荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)配制于含有50%DLin-MC3-DMA、38.5%胆固醇、10%DSPC和1.5%PEG的脂质纳米颗粒中。以0.5mg/kg、0.05mg/kg或0.005mg/kg的剂量向Balb-C小鼠皮下(S.C.)施用制剂。

[2403] 在给药后2小时、8小时、24小时、48小时、72小时和144小时对小鼠成像,并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。在第8小时对器官成像,并且测量肝、脾、肺和肾的平均总流量(光子/秒)。还对每种器官的对照进行分析。

[2404] 实施例100.荧光素酶脂质复合物研究

[2405] 用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰、用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷(5mC/N1mpU)完全修饰或其中用5-甲基胞嘧啶代替25%的胞嘧啶并用2-硫代尿苷代替25%的尿苷(5mC/s2U)进行修饰的脂质复合的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。以0.10mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V.)、肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。

[2406] 在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在给药后8小时、24小时和48小时对小鼠成像,并且对每种施用途径和化学修饰的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景信号为约3.91E+05p/s。成像的结果在表154中示出。在第6小时对器官成像,并且测量肝、脾、肺和肾的平均总流量(光子/秒)。还对每种器官的对照进行分析。结果在表155中示出。

[2407] 表154.流量

[2408]

途径	时间点	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U
		流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
I.V.	第 8 小时	5.76E+06	1.78E+06	1.88E+06
I.V.	第 24 小时	1.02E+06	7.13E+05	5.28E+05
I.V.	第 48 小时	4.53E+05	3.76E+05	4.14E+05
I.M.	第 8 小时	1.90E+06	2.53E+06	1.29E+06
I.M.	第 24 小时	9.33E+05	7.84E+05	6.48E+05
I.M.	第 48 小时	8.51E+05	6.59E+05	5.49E+05
S.C.	第 8 小时	2.85E+06	6.48E+06	1.14E+06
S.C.	第 24 小时	6.66E+05	7.15E+06	3.93E+05
S.C.	第 48 小时	3.24E+05	3.20E+06	5.45E+05

[2409] 表155.器官流量

[2410]

途径	化学物质	肝	脾	肺	肾	注射部位
		流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
I.V.	5mC/pU	5.26E+05	2.04E+07	4.28E+06	1.77E+04	不适用
I.V.	5mC/N1mpU	1.48E+05	5.00E+06	1.93E+06	1.77E+04	不适用
I.V.	5mC/s2U	2.14E+04	3.29E+06	5.48E+05	2.16E+04	不适用
I.M.	5mC/pU	2.46E+04	1.38E+04	1.50E+04	1.44E+04	1.15E+06
I.M.	5mC/N1mpU	1.72E+04	1.76E+04	1.99E+04	1.56E+04	1.20E+06
I.M.	5mC/s2U	1.28E+04	1.36E+04	1.33E+04	1.07E+04	7.60E+05
S.C.	5mC/pU	1.55E+04	1.67E+04	1.45E+04	1.69E+04	4.46E+04
S.C.	5mC/N1mpU	1.20E+04	1.46E+04	1.38E+04	1.14E+04	8.29E+04
S.C.	5mC/s2U	1.22E+04	1.31E+04	1.45E+04	1.08E+04	5.62E+04
	未处理的	2.59E+04	1.34E+04	1.26E+04	1.22E+04	不适用

[2411] 实施例101.修饰mRNA的阳离子脂质制剂

[2412] 将其中用5-甲基胞嘧啶代替25%的胞嘧啶并用2-硫代尿苷代替25%的尿苷(5mC/s2U)进行修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)配制于表156中所述的阳离子脂质中。以0.05mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V.)、肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。

[2413] 表156.阳离子脂质制剂

[2414]

制剂	NPA-130-1	NPA-131-1	NPA-132-1	NPA-133-1	111612-C
脂质	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
脂质/mRNA比(wt/wt)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
平均尺寸	120 nm PDI: 0.10	105 nm PDI: 0.11	122 nm PDI: 0.13	105 nm PDI: 0.14	221.3 nm PDI: 0.063
在pH 7.4下的ζ	0.2 mV	-0.6 mV	-0.5 mV	-0.3 mV	-3.10 mV
包封(RiboGr)	100%	100%	93%	93%	60%

[2415] 在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在给药后2小时、8小时和24小时对小鼠成像,并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景流量为约3.31E+05p/s。成像的结果在表157中示出。在表157中,"NT"是指未测试的。未处理的小鼠显示出的平均流量在第2小时为3.14E+05、在第8小时为3.33E+05并且在第24小时为3.46E+05。对于所测试的全部三种途径,在第8小时观察到峰值表达。DLin-KC2-DMA具有比DLin-MC3-DMA更好的表达,并且对于所评价的所有途径,DODMA均显示出表达。

[2416] 表157.流量

[2417]

途径	时间点	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
		流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
I.V.	第2小时	9.88E+06	6.98E+07	9.18E+06	3.98E+06	5.79E+06
I.V.	第8小时	1.21E+07	1.23E+08	1.02E+07	5.98E+06	6.14E+06
I.V.	第24小时	2.02E+06	1.05E+07	1.25E+06	1.35E+06	5.72E+05
I.M.	第2小时	6.72E+05	3.66E+06	3.25E+06	7.34E+05	4.42E+05
I.M.	第8小时	7.78E+06	2.85E+07	4.29E+06	2.22E+06	1.38E+05
I.M.	第24小时	4.22E+05	8.79E+05	5.95E+05	8.48E+05	4.80E+05
S.C.	第2小时	2.37E+06	4.77E+06	4.44E+06	1.07E+06	1.05E+06
S.C.	第8小时	3.65E+07	1.17E+08	3.71E+06	9.33E+06	2.57E+06
S.C.	第24小时	4.47E+06	1.28E+07	6.39E+05	8.89E+05	4.27E+05

[2418] 实施例102. 5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷修饰的mRNA的制剂

[2419] 将用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)配制于PBS(pH 7.4)中。以2.5mg/kg的剂量向Balb-C小鼠肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。

[2420] 在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在给药后5分钟、30分钟、60分钟和120分钟对小鼠成像,并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景流量为约3.78E+05p/s。成像的结果在表158中示出。在两种递送途径下,在第30分钟时均已观察到荧光素酶的表达。皮下施用的峰值表达出现在第30分钟至第60分钟之间。肌内表达在第120分钟时仍然在增大。

[2421] 表158.流量

[2422]

途径	时间点	PBS (pH 7.4)
		流量(p/s)
I.M.	第 5 分钟	4.38E+05
I.M.	第 30 分钟	1.09E+06
I.M.	第 60 分钟	1.18E+06
I.M.	第 120 分钟	2.86E+06
S.C.	第 5 分钟	4.19E+05
S.C.	第 30 分钟	6.38E+06
S.C.	第 60 分钟	5.61E+06
S.C.	第 120 分钟	2.66E+06

[2423] 实施例103.化学修饰mRNA的肌内和皮下施用

[2424] 以2.5mg/kg的剂量向Balb-C小鼠肌内或皮下施用配制于PBS(pH 7.4)中的用N4-乙酰基胞苷完全修饰、用5-甲氧基尿苷完全修饰、用N4-乙酰基胞苷和N1-甲基-假尿苷完全修饰或用5-甲基胞嘧啶和5-甲氧基尿苷完全修饰的荧光素酶修饰mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。在成像之前20分钟,以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在第2小时、第8小时和第24小时对小鼠成像。肌内施用的平均总流量(光子/秒)在表159中示出,并且皮下施用的平均总流量(光子/秒)在表160中示出。背景信号为3.84E+05(p/s)。对于所有化学物质,在第24小时与第48小时之间观察到肌内施用的峰值表达,并且在第120小时仍检测到表达。对于皮下递送,在第2小时至第8小时观察到峰值表达,并且在第72小时检测的到表达。

[2425] 表159.肌内施用

[2426]

	2 小时	8 小时	24 小时
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)

[2427]

N4-乙酰基胞苷	1.32E+07	2.15E+07	4.01E+07
5-甲氧基尿苷	4.93E+06	1.80E+07	4.53E+07
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	2.02E+07	1.93E+07	1.63E+08
5-甲基胞嘧啶/5-甲氧基尿苷	6.79E+06	4.55E+07	3.44E+07

[2428] 表160.皮下施用

[2429]

	2 小时	8 小时	24 小时
	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
N4-乙酰基胞苷	3.07E+07	1.23E+07	1.28E+07
5-甲氧基尿苷	7.10E+06	9.38E+06	1.32E+07
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基-假尿苷	7.12E+06	3.07E+06	1.03E+07
5-甲基胞嘧啶/5-甲氧基尿苷	7.15E+06	1.25E+07	1.11E+07

[2430] 实施例104.体内研究

[2431] 使用注射泵法将含有至少一种化学修饰的荧光素酶修饰mRNA配制为脂质纳米颗粒(LNP),并且通过粒度、ζ电势和包封对其进行表征。

[2432] 如表161中所概述,向Balb-C小鼠肌内(I.M.)、静脉内(I.V.)和皮下(S.C.)施用荧光素酶LNP制剂。作为对照,向小鼠静脉内施用配制于PBS中的荧光素酶修饰RNA。

[2433] 表161.荧光素酶制剂

[2434]

制剂	媒介物	途径	浓度(mg/ml)	注射体积(ul)	修饰 RNA 的量(ug)	剂量(mg/kg)
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.2000	50	10	0.5000
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.0200	50	1	0.0500
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.0020	50	0.1	0.0050
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.0002	50	0.01	0.0005
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.2000	50	10	0.5000
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.0200	50	1	0.0500
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.0020	50	0.1	0.0050
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.0002	50	0.01	0.0005
Luc-LNP	PBS	I.M.	0.2000	50	10	0.5000
Luc-LNP	PBS	I.M.	0.0200	50	1	0.0500
Luc-LNP	PBS	I.M.	0.0020	50	0.1	0.0050

[2435]

Luc-LNP	PBS	I.M.	0.0002	50	0.01	0.0005
Luc-PBS	PBS	I.V.	0.20	50	10	0.50

[2436] 在第2、8、24、48、120和192小时对小鼠成像,以测定生物发光(测量为整个小鼠的总流量(光子/秒))。在第8小时和第192小时,对肝、脾、肾以及皮下施用和肌内施用的注射部位成像,以测定生物发光。

[2437] 实施例105.化学修饰mRNA的阳离子脂质制剂研究

[2438] 将用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)、假尿苷(pU)或N1-甲基-假尿苷(N1mpU)完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)配制于表162中所述的阳离子脂质中。以0.05mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V.)、肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。

[2439] 表162.阳离子脂质制剂

[2440]

制剂	NPA-137-1	NPA-134-1	NPA-135-1	NPA-136-1	111612-A
脂质	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DODMA
脂质/mRNA比(wt/wt)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
平均尺寸	111 nm PDI：0.15	104 nm PDI：0.13	95 nm PDI：0.11	143 nm PDI：0.12	223.2 nm PDI：0.142
在pH 7.4下的ζ	-4.1 mV	-1.9 mV	-1.0 mV	0.2 mV	-3.09 mV
包封(RiboGr)	97%	100%	100%	78%	64%
化学物质	pU	N1mpU	N1mpU	N1mpU	5mC/pU

[2441] 在成像之前20分钟，以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在给药后2小时、8小时和24小时对小鼠成像，并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景流量为约4.11E+05p/s。成像的结果在表163中示出。对于所测试的全部三种途径，在第8小时观察到峰值表达。

[2442] 表163.流量

[2443]

途径	时间点	DLin-MC3-DMA (pU)	DLin-MC3-DMA (N1mpU)	DLin-KC2-DMA (N1mpU)	C12-200 (N1mpU)	DODMA (5mC/pU)
		流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
I.V.	第2小时	3.21E+08	1.24E+09	1.01E+09	9.00E+08	3.90E+07
I.V.	第8小时	1.60E+09	3.22E+09	2.38E+09	1.11E+09	1.17E+07
I.V.	第24小时	1.41E+08	3.68E+08	3.93E+08	8.06E+07	1.11E+07
I.M.	第2小时	2.09E+07	3.29E+07	8.32E+07	9.43E+07	4.66E+06
I.M.	第8小时	2.16E+08	6.14E+08	1.00E+09	8.77E+07	7.05E+06
I.M.	第24小时	1.23E+07	1.40E+08	5.09E+08	1.36E+07	1.14E+06
S.C.	第2小时	2.32E+07	3.60E+07	2.14E+08	1.01E+08	3.11E+07
S.C.	第8小时	5.55E+08	9.80E+08	4.93E+09	1.01E+09	8.04E+07
S.C.	第24小时	1.81E+08	2.74E+08	2.12E+09	4.74E+07	1.34E+07

[2444] 实施例106.化学修饰的mRNA的研究

[2445] 将用N4-乙酰基胞苷(N4-乙酰基)完全修饰、用5-甲氧基尿苷(5meth)完全修饰、用N4-乙酰基胞苷和N1-甲基-假尿苷(N4-乙酰基/N1mpU)完全修饰或用5-甲基胞嘧啶和5-甲氧基尿苷(5mC/5-meth)完全修饰的荧光素酶mRNA(SEQ ID NO:180中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)配制于DLin-MC3-DMA中,如表164中所述。

[2446] 以0.05mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V.)、肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。

[2447] 表164.阳离子脂质制剂

[2448]

制剂	NPA-141-1	NPA-142-1	NPA-143-1	NPA-144-1
脂质	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA
脂质/mRNA比(wt/wt)	20:1	20:1	20:1	20:1
平均尺寸	138 nm PDI：0.16	116 nm PDI：0.15	144 nm PDI：0.15	131 nm PDI：0.15
在pH 7.4下的ζ	-2.8 mV	-2.8 mV	-4.3 mV	-5.0 mV
包封(RiboGr)	97%	100%	75%	72%
化学物质	N4-乙酰基	5meth	N4-乙酰基/N1mpU	5mC/5-meth

[2449] 在成像之前20分钟，以150mg/kg向小鼠腹膜内注射D-荧光素溶液。然后将动物麻醉并使用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)采集图像。生物发光测量为整只小鼠的总流量(光子/秒)。在给药后2小时、6小时和24小时对小鼠成像，并且对每种施用途径和阳离子脂质制剂的平均总流量(光子/秒)进行测量。背景流量为约2.70E+05p/s。成像的结果在表165中示出。

[2450] 表165.流量

[2451]

途径	时间点	N4-乙酰基	5meth	N4-乙酰基/N1mpU	5mC/5-meth
		流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)	流量(p/s)
I.V.	第2小时	9.17E+07	3.19E+06	4.21E+07	1.88E+06
I.V.	第6小时	7.70E+08	9.28E+06	2.34E+08	7.75E+06
I.V.	第24小时	6.84E+07	1.04E+06	3.55E+07	3.21E+06
I.M.	第2小时	8.59E+06	7.86E+05	5.30E+06	5.11E+05

[2452]

I.M.	第6小时	1.27E+08	8.88E+06	3.82E+07	3.17E+06
I.M.	第24小时	4.46E+07	1.38E+06	2.00E+07	1.39E+06
S.C.	第2小时	1.83E+07	9.67E+05	4.45E+06	1.01E+06
S.C.	第6小时	2.89E+08	1.78E+07	8.91E+07	1.29E+07
S.C.	第24小时	6.09E+07	6.40E+06	2.08E+08	6.63E+06

[2453] 实施例107.含有多种修饰mRNA的脂质纳米颗粒

[2454] 将EPO mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)、G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)以及IX因子mRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)配制于DLin-MC3-DMA中，如表166中所述。以0.05mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V.)、肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。还以等效剂量施用

仅含有一种mRNA的对照LNP制剂。

[2455] 表166.DLin-MC3-DMA制剂

[2456]

制剂	NPA-157-1
脂质	DLin-MC3- DMA
脂质/mRNA比(wt/wt)	20:1
平均尺寸	89 nm PDI：0.08
在pH 7.4下的ζ	1.1 mV
包封(RiboGr)	97%

[2457] 在施用制剂后8小时、24小时、72小时和/或7天从小鼠中收集血清。通过ELISA分析血清以测定EPO、G-CSF和IX因子的蛋白质表达。

[2458] 实施例108. 5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷修饰的mRNA的阳离子脂质制剂研究

[2459] 将EPO mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)或G-CSF mRNA(SEQ ID NO:170中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰)配制于DLin-MC3-DMA和DLin-KC2-DMA中,如表167中所述。以0.05mg/kg的剂量向Balb-C小鼠静脉内(I.V)、肌内(I.M.)或皮下(S.C.)施用制剂。

[2460] 表167.DLin-MC3-DMA和DLin-KC2-DMA制剂

[2461]

制剂	NPA-147-1	NPA-148-1	NPA-150-1	NPA-151-1
mRNA	EPO	EPO	G-CSF	G-CSF
脂质	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA
脂质/mRNA比(wt/wt)	20:1	20:1	20:1	20:1
平均尺寸	117 nm PDI：0.14	82 nm PDI：0.08	119 nm PDI：0.13	88 nm PDI：0.08
在pH 7.4下的ζ	-1.7 mV	0.6 mV	3.6 mV	2.2 mV
包封(RiboGr)	100%	96%	100%	100%

[2462] 在施用制剂后8小时、24小时、72小时和/或7天从小鼠中收集血清。通过ELISA分析血清,以测定EPO和G-CSF的蛋白质表达。

[2463] 实施例109.体外VEGF PBMC研究

[2464] 将500ng的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰(VEGF 5mC/pU)、用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰(VEGF 5mC/N1mpU)或未修饰(VEGF unmod)的VEGF mRNA(SEQ ID

NO:183中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)与0.4uL的Lipofectamine 2000一起转染到来自三个正常血液供体(D1、D2和D3)的外周血单核细胞(PBMC)中。对于每个供体,还对细胞不进行处理作为对照。在转染之后22小时,收获上清液并通过ELISA分析,以测定蛋白质表达和细胞因子诱导。VEGF的表达和IFN-α诱导在表168以及图8A和8B中示出。

[2465] 表168.蛋白质和细胞因子水平

[2466]

	VEGF 表达(pg/ml)			IFN-α 诱导(pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
VEGF unmod	2	0	0	5400	3537	4946
VEGF 5mC/pU	424	871	429	145	294	106
VEGF 5mC/N1mpU	5088	10331	6183	205	165	6

[2467] 实施例110.修饰mRNA的体外表达

[2468] 以表169、170和171所示的浓度,使用本文所述的程序,用EPO修饰mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)转染HEK293细胞;用转化生长因子β(TGF-β)修饰的mRNA(SEQ ID NO:184中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的poly A尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)正向转染HeLa细胞;并且用已经与来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的Lipofectamine2000复合的杀菌/通透性增加蛋白(rBPI-21)修饰的mRNA(SEQ ID NO:185;具有大约160个核苷酸的poly A尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)转染HepG2细胞。通过ELISA检测蛋白质表达,并且蛋白质(pg/ml)也在表169、170和171中示出。在表169中,">"意思是大于。对于TGF-β,还对未处理细胞的对照和Lipofectamine2000的模拟转染进行测试。

[2469] 表169.EPO蛋白表达

[2470]

转染的量	5 ng	1 ng	200 pg	40 pg	8 pg	1.6 pg	320 fg	64 fg
蛋白质(pg/ml)	>2000	609.486	114.676	0	0	0	0	0

[2471] 表170.TGF-β蛋白表达

[2472]

转染的量	750 ng	250 ng	83 ng	模拟的	未处理的
蛋白质(pg/ml)	5058	4325	3210	2	0

[2473] 表171.rBPI-21蛋白表达

[2474]

转染的量	2 ug	400 ng	80 ng	16 ng	3.2 ng	640 pg	128 pg	26 pg
蛋白质(pg/ml)	20.683	9.269	4.768	0	0	0	0	0

[2475] 实施例111.双顺反子修饰mRNA

[2476] 将人胚胎肾上皮细胞(HEK293)接种在96孔平板(Greiner Bio-one GmbH,Frickenhausen,Germany)上,以30,000的密度将HEK293接种于100μl细胞培养基(DMEM,10%FCS,添加2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和1x非必需氨基酸(Biochrom AG,Berlin,Germany)以及1.2mg/ml碳酸氢钠(Sigma-Aldrich,Munich,Germany))中,在接种细胞之后,添加75ng的双顺反子修饰mRNA(mCherry-2A-GFP)(SEQ ID NO:186;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)、mCherry修饰mRNA(mRNA SEQ ID NO:171;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)或绿色荧光蛋白(GFP)修饰的mRNA(SEQ ID NO:182中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)并且进行孵育。还对未处理细胞的对照进行评价。mCherry-2A-GFP是指包含mCherry的编码区、2A肽以及GFP的编码区的修饰的mRNA序列。

[2477] 通过将培养基上清液转移至96孔Pro-Bind U底平板(Beckton Dickinson GmbH,Heidelberg,Germany)来收获细胞。将细胞用1/2体积的胰蛋白酶/EDTA(Biochrom AG,Berlin,Germany)胰蛋白酶消化,与对应的上清液合并,并且通过添加一个体积的PBS/2%FCS(均为Biochrom AG,Berlin,Germany)/0.5%甲醛(Merck,Darmstadt,Germany)进行固定。然后在LSRII细胞仪(Beckton Dickinson GmbH,Heidelberg,Germany)中用532nm激发激光和PE-Texas Red的610/20滤波器使样品经受流动细胞仪测量。所有事件的平均荧光强度(MFI)在表172中示出。用双顺反子修饰的mRNA转染的细胞能够表达mCherry和GFP。

[2478] 表172.修饰mRNA的MFI

[2479]

修饰mRNA	mCherry MFI	GFP MFI
mCherry	17746	427
GFP	427	20019
mCherry-2A-GFP	5742	6783
未处理的	427	219

[2480] 实施例112.假尿苷和N1-甲基-假尿苷的定向SAR

[2481] 随着近来对嘧啶核苷假尿苷的关注,设计了一系列结构-活性研究对含有假尿苷或N1-甲基-假尿苷的修饰的mRNA进行研究。

[2482] 对该研究进行设计以探讨当在N1位、C6位、2-位、4-位以及在磷酸主链上进行修饰时,链长、增大的亲油性、环结构的存在以及疏水或亲水相互作用的改变的影响。还对稳定性进行研究。

[2483] 为此,对涉及烷基化、环烷基化、烷基-环烷基化、芳基化、烷基-芳基化、具有氨基的烷基化部分、具有羧酸基团的烷基化部分以及含有氨基酸带电荷部分的烷基化部分的修饰进行研究。烷基化的程度通常为C_1-C_6。化学修饰的例子包括在表173和表174中列出的那些。

[2484] 表173.假尿苷和N1-甲基假尿苷SAR

[2485]

化学修饰	化合物编号	天然存在的
N1-修饰		
N1-乙基-假-UTP	1	N
N1-丙基-假-UTP	2	N

N1-异丙基-假-UTP	3	N
N1-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP	4	N
N1-环丙基-假-UTP	5	N
N1-环丙基甲基-假-UTP	6	N
N1-苯基-假-UTP	7	N
N1-苄基-假-UTP	8	N
N1-氨基甲基-假-UTP	9	N
假-UTP-N1-2-乙酸	10	N
N1-(3-氨基-3-羧丙基)假-UTP	11	N
N1-甲基3-(3-氨基-3-羧丙基)假-UTP	12	Y
C-6修饰		
6-甲基-假-UTP	13	N
6-三氟甲基-假-UTP	14	N
6-甲氧基-假-UTP	15	N
6-苯基-假-UTP	16	N
6-碘-假-UTP	17	N
6-溴-假-UTP	18	N
6-氯-假-UTP	19	N
6-氟-假-UTP	20	N
2-位或4-位修饰		
4-硫代-假-UTP	21	N
2-硫代-假-UTP	22	N
磷酸主链修饰		
α-硫代-假-UTP	23	N
N1-Me-α-硫代-假-UTP	24	N

[2486] 表174.假尿苷和N1-甲基-假尿苷SAR

[2487]

化学修饰	化合物编号	天然存在的
N1-甲基-假-UTP	1	Y
N1-丁基-假-UTP	2	N
N1-叔丁基-假-UTP	3	N

	N1-戊基-假-UTP	4	N
	N1-己基-假-UTP	5	N
	N1-三氟甲基-假-UTP	6	Y
	N1-环丁基-假-UTP	7	N
	N1-环戊基-假-UTP	8	N
	N1-环己基-假-UTP	9	N
	N1-环庚基-假-UTP	10	N
	N1-环辛基-假-UTP	11	N
	N1-环丁基甲基-假-UTP	12	N
	N1-环戊基甲基-假-UTP	13	N
	N1-环己基甲基-假-UTP	14	N
	N1-环庚基甲基-假-UTP	15	N
	N1-环辛基甲基-假-UTP	16	N
	N1-对甲苯基-假-UTP	17	N
	N1-(2,4,6-三甲基-苯基)假-UTP	18	N
	N1-(4-甲氧基-苯基)假-UTP	19	N
	N1-(4-氨基-苯基)假-UTP	20	N
	N1-(4-硝基-苯基)假-UTP	21	N
	假-UTP-N1-对苯甲酸	22	N
	N1-(4-甲基-苄基)假-UTP	24	N
[2488]	N1-(2,4,6-三甲基-苄基)假-UTP	23	N
	N1-(4-甲氧基-苄基)假-UTP	25	N
	N1-(4-氨基-苄基)假-UTP	26	N
	N1-(4-硝基-苄基)假-UTP	27	N
	假-UTP-N1-甲基-对苯甲酸	28	N
	N1-(2-氨基-乙基)假-UTP	29	N
	N1-(3-氨基-丙基)假-UTP	30	N
	N1-(4-氨基-丁基)假-UTP	31	N
	N1-(5-氨基-戊基)假-UTP	32	N
	N1-(6-氨基-己基)假-UTP	33	N
	假-UTP-N1-3-丙酸	34	N
	假-UTP-N1-4-丁酸	35	N
	假-UTP-N1-5-戊酸	36	N
	假-UTP-N1-6-己酸	37	N
	假-UTP-N1-7-庚酸	38	N
	N1-(2-氨基-2-羧乙基)假-UTP	39	N
	N1-(4-氨基-4-羧丁基)假-UTP	40	N
	N3-烷基-假-UTP	41	N
	6-乙基-假-UTP	42	N
	6-丙基-假-UTP	43	N
	6-异丙基-假-UTP	44	N

	6-丁基-假-UTP	45	N
	6-叔丁基-假-UTP	46	N
	6-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP	47	N
	6-乙氧基-假-UTP	48	N
	6-三氟甲氧基-假-UTP	49	N
	6-苯基-假-UTP	50	N
	6-(取代的苯基)-假-UTP	51	N
	6-氟基-假-UTP	52	N
	6-叠氮基-假-UTP	53	N
	6-氨基-假-UTP	54	N
	6-羧酸乙酯-假-UTP	54b	N
	6-羟基-假-UTP	55	N
	6-甲基氨基-假-UTP	55b	N
	6-二甲基氨基-假-UTP	57	N
	6-羟氨基-假-UTP	59	N
	6-甲酰基-假-UTP	60	N
	6-(4-吗啉基)-假-UTP	61	N
	6-(4-硫代吗啉基)-假-UTP	62	N
	N1-Me-4-硫代-假-UTP	63	N
	N1-Me-2-硫代-假-UTP	64	N
[2489]	1,6-二甲基-假-UTP	65	N
	1-甲基-6-三氟甲基-假-UTP	66	N
	1-甲基-6-乙基-假-UTP	67	N
	1-甲基-6-丙基-假-UTP	68	N
	1-甲基-6-异丙基-假-UTP	69	N
	1-甲基-6-丁基-假-UTP	70	N
	1-甲基-6-叔丁基-假-UTP	71	N
	1-甲基-6-(2,2,2-三氟乙基)假-UTP	72	N
	1-甲基-6-碘-假-UTP	73	N
	1-甲基-6-溴-假-UTP	74	N
	1-甲基-6-氯-假-UTP	75	N
	1-甲基-6-氟-假-UTP	76	N
	1-甲基-6-甲氧基-假-UTP	77	N
	1-甲基-6-乙氧基-假-UTP	78	N
	1-甲基-6-三氟甲氧基-假-UTP	79	N
	1-甲基-6-苯基-假-UTP	80	N
	1-甲基-6-(取代的苯基)假-UTP	81	N
	1-甲基-6-氟基-假-UTP	82	N
	1-甲基-6-叠氮基-假-UTP	83	N
	1-甲基-6-氨基-假-UTP	84	N
	1-甲基-6-羧酸乙酯-假-UTP	85	N

[2490]

1-甲基-6-羟基-假-UTP	86	N
1-甲基-6-甲基氨基-假-UTP	87	N
1-甲基-6-二甲基氨基-假-UTP	88	N
1-甲基-6-羟氨基-假-UTP	89	N
1-甲基-6-甲酰基-假-UTP	90	N
1-甲基-6-(4-吗啉基)-假-UTP	91	N
1-甲基-6-(4-硫代吗啉基)-假-UTP	92	N
1-烷基-6-乙烯基-假-UTP	93	N
1-烷基-6-烯丙基-假-UTP	94	N
1-烷基-6-高烯丙基-假-UTP	95	N
1-烷基-6-乙炔基-假-UTP	96	N
1-烷基-6-(2-丙炔基)-假-UTP	97	N
1-烷基-6-(1-丙炔基)-假-UTP	98	N

[2491] 实施例113.天然和非天然存在的核苷的并入

[2492] 将天然和非天然存在的核苷并入到编码目标多肽的mRNA中。这些的实例在表175和176中给出。某些可商购获得的核苷三磷酸(NTP)在本发明的多核苷酸中进行研究。这些的选择在表175中给出。然后针对所得mRNA产生蛋白质、诱导细胞因子和/或产生治疗成果的能力对其进行检测。

[2493] 表175.天然和非天然存在的核苷

[2494]

化学修饰	化合物编号	天然存在的
N4-甲基-胞嘧啶	1	Y
N4,N4-二甲基-2'-OMe-胞嘧啶	2	Y
5-氧基乙酸-甲酯-尿苷	3	Y
N3-甲基-假-尿苷	4	Y
5-羟甲基-胞嘧啶	5	Y
5-三氟甲基-胞嘧啶	6	N
5-三氟甲基-尿苷	7	N
5-甲基-氨基-甲基-尿苷	8	Y
5-羧基-甲基-氨基-甲基-尿苷	9	Y
5-羧基甲基氨基甲基-2'-OMe-尿苷	10	Y
5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷	11	Y
5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷	12	Y
5-甲氧基-羰基-甲基-尿苷	13	Y
5-甲氧基-羰基-甲基-2'-OMe-尿苷	14	Y

[2495]

5-氧基乙酸-尿苷	15	Y
3-(3-氨基-3-羧丙基)-尿苷	16	Y
5-(羧基羟甲基)尿苷甲酯	17	Y
5-(羧基羟甲基)尿苷	18	Y

[2496] 表176.非天然存在的核苷三磷酸

[2497]

化学修饰	化合物编号	天然存在的
N1-Me-GTP	1	N
2'-OMe-2-氨基-ATP	2	N
2'-OMe-假-UTP	3	Y
2'-OMe-6-Me-UTP	4	N
2'-叠氮基-2'-脱氧-ATP	5	N
2'-叠氮基-2'-脱氧-GTP	6	N
2'-叠氮基-2'-脱氧-UTP	7	N
2'-叠氮基-2'-脱氧-CTP	8	N
2'-氨基-2'-脱氧-ATP	9	N
2'-氨基-2'-脱氧-GTP	10	N
2'-氨基-2'-脱氧-UTP	11	N
2'-氨基-2'-脱氧-CTP	12	N
2-氨基-ATP	13	N
8-氮杂-ATP	14	N
黄苷-5'-TP	15	N
5-溴-CTP	16	N
2'-F-5-甲基-2'-脱氧-UTP	17	N
5-氨基烯丙基-CTP	18	N
2-氨基-核糖核苷-TP	19	N

[2498] 实施例114.向核碱基和碳水化合物(糖)并入修饰

[2499] 将天然和非天然存在的核苷并入到编码目标多肽的mRNA中。针对其并入到mRNA中并产生蛋白质、诱导细胞因子和/或产生治疗成果的能力,对具有核碱基和碳水化合物(糖)的修饰的可商购获得的核苷和NTP进行检测。这些核苷的实例在表177和178中给出。

[2500] 表177.组合修饰

[2501]

化学修饰	化合物编号

[2502]

5-碘-2'-氟-脱氧尿苷	1
5-碘-胞苷	6
2'-溴-脱氧尿苷	7
8-溴-腺苷	8
8-溴-鸟苷	9
2,2'-脱水-胞苷盐酸盐	10
2,2'-脱水-尿苷	11
2'-叠氮基-脱氧尿苷	12
2-氨基-腺苷	13
N4-苯甲酰基-胞苷	14
N4-氨基-胞苷	15
2'-O-甲基-N4-乙酰基-胞苷	16
2'氟-N4-乙酰基-胞苷	17
2'氟-N4-Bz-胞苷	18
2'O-甲基-N4-Bz-胞苷	19
2'O-甲基-N6-Bz-脱氧腺苷	20
2'氟-N6-Bz-脱氧腺苷	21
N2-异丁基-鸟苷	22
2'氟-N2-异丁基-鸟苷	23
2'O-甲基-N2-异丁基-鸟苷	24

[2503] 表178.天然存在的组合

[2504]

名称	化合物编号	天然存在的
5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷 TP	1	Y
5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷 TP	2	Y
5-氨基甲酰基甲基尿苷 TP	3	Y
5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷 TP	4	Y
1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷 TP	5	Y
5-甲基氨基甲基-2-硒代尿苷 TP	6	Y
5-羧基甲基尿苷 TP	7	Y
5-甲基二氢尿苷 TP	8	Y
赖西丁 TP	9	Y
5-牛磺酸甲基尿苷 TP	10	Y
5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷 TP	11	Y
5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷 TP	12	Y
5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代尿苷 TP	13	Y
5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基尿苷 TP	14	Y
N4-乙酰基-2'-O-甲基胞苷 TP	15	Y
N4,2'-O-二甲基胞苷 TP	16	Y

[2505]

5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷 TP	17	Y
2'-O-甲基假尿苷 TP	18	Y
2-硫代-2'-O-甲基尿苷 TP	19	Y
3,2'-O-二甲基尿苷 TP	20	Y

[2506] 在该表中，“UTP”代表尿苷三磷酸，“GTP”代表鸟苷三磷酸，“ATP”代表腺苷三磷酸，“CTP”代表胞嘧啶三磷酸，“TP”代表三磷酸并且“Bz”代表苄基。

[2507] 实施例115.半乳糖苷酶α蛋白质的检测:蛋白质印迹

[2508] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的半乳糖苷酶α(GLA) mRNA mRNA(SEQ ID NO:187中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA或小鼠未处理。

[2509] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2510] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2511] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2512] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2513] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2514] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素

膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2515] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗GLA蛋白的一抗(GLA兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2516] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2517] 如图8A和8B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在49kd的预期大小附近的蛋白质。

[2518] 实施例116.芳基硫酸酯酶B蛋白的检测:蛋白质印迹

[2519] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的芳基硫酸酯酶B(ARSB)mRNA(SEQ ID NO:188中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2520] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2521] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2522] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2523] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2524] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺

梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2525] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2526] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗ARSB蛋白的一抗(ARSB兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2527] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2528] 如图9A和9B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在37kd的预期大小附近的蛋白质。

[2529] 实施例117.干扰素β1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2530] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的干扰素β1(IFNB1)mRNA(SEQ ID NO:189中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2531] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2532] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并

如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2533] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2534] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2535] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2536] 在电泳终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2537] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗IFNB1蛋白的一抗(干扰素β兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2538] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2539] 如图10A和10B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在22kd的预期大小附近的蛋白质。针对IFNB1(22kd、33/37kd和110kd)描述SDS-PAGE中具有可变大小的条带。

[2540] 实施例118.XI因子蛋白的检测:蛋白质印迹

[2541] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的XI因子mRNA(SEQ ID NO:190中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2542] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2543] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2544] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2545] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2546] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2547] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2548] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗XI因子蛋白的一抗(XI因子兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2549] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2550] 如图11A和11B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在70kd的预期大小附近的蛋白质。

[2551] 实施例119.肿瘤蛋白53蛋白的检测:蛋白质印迹

[2552] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的肿瘤蛋白53(TP53或p53)mRNA(SEQ ID NO:191中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2553] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2554] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2555] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2556] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2557] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2558] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2559] 转移之后,将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗TP53蛋白的一抗(肿瘤蛋白53小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物

酶并结合至一抗。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2560] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2561] 如图12A和12B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在53kd的预期大小附近的蛋白质。

[2562] 实施例120.转化生长因子β1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2563] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的转化生长因子β1(TGFB1)mRNA(SEQ ID NO:184中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂，LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2564] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2565] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2566] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2567] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2568] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2569] 在电泳终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2570] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗TGFB1蛋白的一抗(TGFB1兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2571] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2572] 如图13A和13B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在44kd的预期大小附近的蛋白质。

[2573] 实施例121.Sirtuin 6蛋白的检测:蛋白质印迹

[2574] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的sirtuin 6(SIRT6)mRNA(SEQ ID NO:192中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2575] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2576] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2577] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2578] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如

上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2579] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2580] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2581] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗SIRT6蛋白的一抗(SIRT6兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2582] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2583] 如图14A和14B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在39kd的预期大小附近的蛋白质。

[2584] 实施例122.N-乙酰谷氨酸合成酶蛋白的检测:蛋白质印迹

[2585] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的N-乙酰谷氨酸合成酶(NAGS)mRNA(SEQ ID NO:193中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2586] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2587] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞

重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2588] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2589] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2590] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2591] 在电泳终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2592] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗NAGS蛋白的一抗(NAGS兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2593] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2594] 如图15A和15B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在58kd附近的蛋白质。

[2595] 实施例123.Sortilin 1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2596] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的Sortilin 1(SORT1)mRNA(SEQ ID NO:194中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,

NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2597] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2598] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2599] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2600] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2601] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2602] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2603] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗SORT1蛋白的一抗(SORT1兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2604] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2605] 如图16A和16B中的框所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在37kd的预期大小附近的蛋白质。

[2606] 实施例124.集落刺激因子2(粒细胞-巨噬细胞)蛋白的检测:蛋白质印迹

[2607] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的集落刺激因子2(粒细胞-巨噬细胞)(GM-CSF)mRNA(SEQ ID NO:195中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2608] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2609] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2610] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2611] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2612] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2613] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2614] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗GM-CSF蛋白的一抗(GM-CSF兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3

次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2615] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2616] 如图17A和17B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在15kd的预期大小附近的蛋白质。如图17A和17B中所示,有3个条带彼此非常靠近并且针对未处理动物仅观察到一个条带。

[2617] 实施例125.Klotho蛋白的检测:蛋白质印迹

[2618] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的klotho(KL)mRNA(SEQ ID NO:196中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2619] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2620] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2621] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2622] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2623] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95

℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2624] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2625] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗KL蛋白的一抗(Klotho兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2626] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2627] 如图18A和18B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到蛋白质。如图18A和18B中所示,取决于动物经处理或未处理,可见不同大小的条带。

[2628] 实施例126.半乳糖激酶1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2629] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的肿瘤蛋白53(TP53或p53)mRNA(SEQ ID NO:197中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2630] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2631] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2632] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2633] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测

定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2634] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2635] 在电泳终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2636] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗GALK1蛋白的一抗(GALK1小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2637] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2638] 如图19A和19B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在42kd的预期大小附近的蛋白质。

[2639] 实施例127.Serpin肽酶抑制剂分化体F成员2蛋白的检测:蛋白质印迹

[2640] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的Serpin肽酶抑制剂分化体F成员2(SERPINF2)(SORT1)mRNA(SEQ ID NO:198中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2641] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2642] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养

盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2643] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2644] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2645] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2646] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2647] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗SERPINF2蛋白的一抗(SERPINF2兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2648] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2649] 如图20A和20B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在55kd的预期大小附近的蛋白质。

[2650] 实施例128.果糖二磷酸醛缩酶A蛋白的检测:蛋白质印迹

[2651] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的果糖二磷酸醛缩酶A(ALDOA)mRNA(SEQ ID NO:199中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中

未示出;5’帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2652] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2653] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS将细胞重悬并如所描述地进行旋转。

[2654] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中并接着在2000rpm下旋转2分钟。

[2655] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2656] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2657] 在电泳终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2658] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗ALDOA蛋白的一抗(ALDOA山羊多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗山羊HRP缀合物;Abcam,Cambrdige,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2659] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2660] 如图21中所示，对于针对来自用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的ALDOA mRNA的ALDOA蛋白所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在37kd的预期大小附近的蛋白质。

[2661] 实施例129.酪氨酸酶蛋白的检测:蛋白质印迹

[2662] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的酪氨酸酶(TYR)mRNA(SEQ ID NO:200中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂，LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2663] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2664] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2665] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2666] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2667] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2668] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2669] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+

0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗TYR蛋白的一抗(TYR兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2670] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2671] 如图22A和22B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在65kd的预期大小附近的蛋白质。

[2672] 实施例130.骨形态发生蛋白7蛋白的检测:蛋白质印迹

[2673] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的骨形态发生蛋白7(BMP7)mRNA(SEQ ID NO:201中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2674] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2675] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2676] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2677] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2678] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂

以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2679] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2680] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗BMP7蛋白的一抗(BMP7小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2681] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2682] 如图23A和23B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在50kd的预期大小附近的蛋白质。

[2683] 实施例131.神经调节蛋白1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2684] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的神经调节蛋白1(NRG1)mRNA(SEQ ID NO:202中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2685] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2686] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2687] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2688] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的

500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2689] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2690] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2691] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗NRG1蛋白的一抗(NRG1兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2692] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2693] 如图24A和24B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在50kd的预期大小附近的蛋白质。

[2694] 实施例132.血清淀粉样蛋白P成分蛋白的检测:蛋白质印迹

[2695] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的血清淀粉样蛋白P成分(APCS)mRNA(SEQ ID NO:203中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2696] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2697] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,

San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2698] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2699] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2700] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2701] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2702] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗APCS蛋白的一抗(APCS小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2703] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2704] 如图25A和25B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在27kd的预期大小附近的蛋白质。

[2705] 实施例133.卵磷脂-胆固醇酰基转移酶蛋白的检测:蛋白质印迹

[2706] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的卵磷脂-胆固醇酰基转

移酶(LCAT)mRNA(SEQ ID NO:204中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2707] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2708] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2709] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2710] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2711] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2712] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2713] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗LCAT蛋白的一抗(LCAT兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2714] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo

Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2715] 如图26A和26B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在50kd的预期大小附近的蛋白质。

[2716] 实施例134.Artemin蛋白的检测:蛋白质印迹

[2717] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的artemin(ARTN)mRNA(SEQ ID NO:205中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2718] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2719] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2720] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2721] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and DSystems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2722] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2723] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2724] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+

0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗ARTN蛋白的一抗(ARTN山羊多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗山羊HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2725] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2726] 如图27A和27B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在23kd的预期大小附近的蛋白质。

[2727] 实施例135.赫赛汀生长因子蛋白的检测:蛋白质印迹

[2728] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的赫赛汀生长因子(HGF)mRNA(SEQ ID NO:206中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2729] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2730] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2731] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2732] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2733] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含

有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2734] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2735] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗HGF蛋白的一抗(HGF兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2736] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2737] 如图28A和28B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在83kd的预期大小附近的蛋白质。

[2738] 实施例136.促红细胞生成素蛋白的检测:蛋白质印迹

[2739] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的促红细胞生成素(EPO)mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2740] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2741] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2742] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2743] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的

500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and DSystems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2744] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2745] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2746] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗EPO蛋白的一抗(EPO兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1XTBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2747] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2748] 如图29A和29B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在28kd的预期大小附近的蛋白质。

[2749] 实施例137.白细胞介素7蛋白的检测:蛋白质印迹

[2750] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的白细胞介素7(IL-7)mRNA(SEQ ID NO:207中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2751] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2752] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养

盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2753] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2754] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2755] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2756] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2757] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗IL-7蛋白的一抗(IL-7兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2758] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2759] 如图30A和30B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在20kd的预期大小附近的蛋白质。

[2760] 实施例138.溶酶体酸性脂肪酶A蛋白的检测:蛋白质印迹

[2761] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的溶酶体酸性脂肪酶A(LIPA)mRNA(SEQ ID NO:208中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中

未示出;5’帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2762] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2763] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2764] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2765] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2766] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2767] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2768] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗LIPA蛋白的一抗(LIPA小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2769] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPicoChemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2770] 如图31A和31B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在46kd的预期大小附近的蛋白质。

[2771] 实施例139.DNA酶1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2772] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的脱氧核糖核酸酶I(DNA酶1)mRNA(SEQ ID NO:209中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5'帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂，LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2773] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2774] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2775] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2776] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2777] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2778] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2779] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X

TBS溶液中的抗DNA酶1蛋白的一抗(DNA酶1兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2780] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2781] 如图32A和32B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在31kd的预期大小附近的蛋白质。在图32B中,针对1mpU修饰mRNA检测到低分子量条带。

[2782] 实施例140.载脂蛋白A1Milano蛋白的检测:蛋白质印迹

[2783] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的载脂蛋白A1(APOA1)Milano mRNA(SEQ ID NO:210中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2784] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2785] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2786] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2787] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2788] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含

有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2789] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2790] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗APOA1Milano蛋白的一抗(APOA1Milano兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2791] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2792] 如图33A和33B中所示,对于针对每种化学物质所评价的3个样品各自,蛋白质印迹检测到在31kd的预期大小附近的蛋白质。

[2793] 实施例141.釉丛蛋白1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2794] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的釉丛蛋白1(TUFT1)mRNA(SEQ ID NO:211中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2795] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2796] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2797] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2798] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2799] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2800] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2801] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗TUFT1蛋白的一抗(TUFT1小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2802] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2803] 如图34A和34B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在44kd的预期大小附近的蛋白质。

[2804] 实施例142.载脂蛋白A1Paris蛋白的检测:蛋白质印迹

[2805] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的载脂蛋白A1(APOA1)Paris mRNA(SEQ ID NO:212中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂，LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2806] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2807] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2808] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2809] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2810] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2811] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2812] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗APOA1Paris蛋白的一抗(APOA1Paris兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2813] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2814] 如图35A和35B中所示,对于针对每种化学物质所评价的3个样品各自,蛋白质印迹检测到在31kd的预期大小附近的蛋白质。

[2815] 实施例143.载脂蛋白A1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2816] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假

尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的载脂蛋白A1(APOA1)mRNA(SEQ ID NO:213中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2817] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2818] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2819] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2820] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2821] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2822] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2823] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗APOA1蛋白的一抗(APOA1兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2824] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5

分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2825] 如图36A和36B中所示,对于针对每种化学物质所评价的3个样品各自,蛋白质印迹检测到在31kd的预期大小附近的蛋白质。

[2826] 实施例144.UDP葡萄糖醛酸基转移酶1家族多肽A1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2827] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的UDP葡萄糖醛酸基转移酶1家族多肽A1(UGT1A1)mRNA(SEQ ID NO:214中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2828] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2829] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2830] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2831] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2832] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2833] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2834] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗UGT1A1蛋白的一抗(UGT1A1兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2835] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2836] 如图37A和37B中所示，对于针对除5-甲基胞嘧啶和假尿苷外(5mC/pU)的所有化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在60kd的预期大小附近的蛋白质。

[2837] 实施例145.血小板生成素蛋白的检测:蛋白质印迹

[2838] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的血小板生成素(THPO)mRNA(SEQ ID NO:215中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2839] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2840] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2841] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2842] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2843] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自

Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2844] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2845] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗THPO蛋白的一抗(THPO兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2846] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2847] 如图38A和38B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在38kd的预期大小附近的蛋白质。

[2848] 实施例146.精氨基琥珀酸裂解酶蛋白的检测:蛋白质印迹

[2849] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)mRNA(SEQ ID NO:216中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2850] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2851] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2852] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2853] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2854] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2855] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2856] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗ASL蛋白的一抗(ASL兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1XTBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2857] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2858] 如图39A和39B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在55kd的预期大小附近的蛋白质。

[2859] 实施例147.糖蛋白激素α多肽蛋白的检测:蛋白质印迹

[2860] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的糖蛋白激素α多肽(FSHα或CGA)mRNA(SEQ ID NO:217中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2861] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2862] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2863] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2864] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2865] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2866] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2867] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗FSHα蛋白的一抗(FSHα兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2868] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2869] 如图40中所示,对于针对假尿苷(pU)和1-甲基假尿苷(1mpU)化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在21kd的预期大小附近的蛋白质。

[2870] 实施例148.骨形态发生蛋白2蛋白的检测:蛋白质印迹

[2871] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假

尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的骨形态发生蛋白2(BMP2)mRNA(SEQ ID NO:218中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2872] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2873] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2874] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2875] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2876] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2877] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2878] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗BMP2蛋白的一抗(BMP2兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2879] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5

分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2880] 如图41A和41B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在45kd的预期大小附近的蛋白质。

[2881] 实施例149.纤溶酶原蛋白的检测:蛋白质印迹

[2882] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的纤溶酶原(PLG)mRNA(SEQ ID NO:219中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2883] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2884] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2885] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2886] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2887] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2888] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2889] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗PLG蛋白的一抗(PLG山羊多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗山羊HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2890] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2891] 如图42A和42B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在95kd的预期大小附近的蛋白质。

[2892] 实施例150.纤维蛋白原A蛋白的检测:蛋白质印迹

[2893] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的纤维蛋白原A(FGA)mRNA(SEQ ID NO:220中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2894] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2895] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2896] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2897] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2898] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自

Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2899] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2900] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗FGA蛋白的一抗(FGA山羊多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗山羊HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2901] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2902] 如图43A和43B中所示,对于针对除5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)以及5-甲基胞苷(5-methylcyostine)和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)外的每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在95kd的预期大小附近的蛋白质。

[2903] 实施例151.Serpin肽酶抑制剂分化体C成员1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2904] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的serpin肽酶抑制剂分化体C(抗凝血酶)成员1(SERPINC1)mRNA(SEQ ID NO:221中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2905] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2906] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并

如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2907] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2908] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2909] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2910] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2911] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗SERPINC1蛋白的一抗(SERPINC1小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2912] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2913] 如图44A和44B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在52kd的预期大小附近的蛋白质。

[2914] 实施例153.微粒体甘油三酯转移蛋白(MTTP)蛋白的检测:蛋白质印迹

[2915] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的微粒体甘油三酯转移蛋白(MTTP)mRNA(SEQ ID NO:222中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂，LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2916] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存

在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2917] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2918] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2919] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2920] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2921] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2922] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗MTTP蛋白的一抗(MTTP兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2923] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2924] 如图45A和45B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在99kd的预期大小附近的蛋白质。

[2925] 实施例153.胞裂蛋白(Septin)4蛋白的检测:蛋白质印迹

[2926] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧

啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的胞裂蛋白4(SEPT4)mRNA(SEQ ID NO:223中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2927] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2928] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2929] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2930] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2931] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2932] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2933] 转移之后,将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗SEPT4蛋白的一抗(SEPT4小鼠单克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(驴抗小鼠HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育

3小时。

[2934] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2935] 如图46A和46B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在55kd的预期大小附近的蛋白质。

[2936] 实施例154.X连锁细胞凋亡抑制剂蛋白的检测:蛋白质印迹

[2937] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的X连锁细胞凋亡抑制剂蛋白(XIAP)mRNA(SEQ ID NO:224中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂，LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2938] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2939] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2940] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2941] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2942] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2943] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素

膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2944] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗XIAP蛋白的一抗(XIAP兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2945] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2946] 如图47A和47B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在57kd的预期大小附近的蛋白质。

[2947] 实施例155.溶质载体家族16成员3蛋白的检测:蛋白质印迹

[2948] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的溶质载体家族16成员3(SLC16A3)mRNA(SEQ ID NO:225中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5’帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2949] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2950] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2951] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2952] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2953] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4%-12%丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2954] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2955] 转移之后,将膜在5%BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5%BSA的1X TBS+0.1%Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5%BSA的1X TBS溶液中的抗SLC16A3蛋白的一抗(SLC16A3兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA),在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5%BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2956] 在孵育时间结束时,伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1%Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2957] 如图48A和48B中所示,对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自,蛋白质印迹检测到在49kd的预期大小附近的蛋白质。

[2958] 实施例156.血管生成素1蛋白的检测:蛋白质印迹

[2959] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的血管生成素1(ANGPT1)mRNA(SEQ ID NO:226中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2960] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2961] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细

胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2962] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2963] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2964] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2965] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2966] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗ANGPT1蛋白的一抗(ANGPT1兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2967] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2968] 如图49A和49B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在58kd的预期大小附近的蛋白质。

[2969] 实施例157.白细胞介素10蛋白的检测:蛋白质印迹

[2970] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的白细胞介素10(IL-10)mRNA(SEQ ID NO:227中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2971] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2972] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences, San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2973] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2974] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2975] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上，其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min，但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2976] 在跑胶终止后，使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置，通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2977] 转移之后，将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟，然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗IL-10蛋白的一抗(IL-10兔多克隆抗体;Abcam,Cambridge,MA)，在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。二抗(山羊抗兔HRP缀合物;Abcam,Cambridge,MA)缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3小时。

[2978] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2979] 如图50A和50B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在20kd的预期大小附近的蛋白质。

[2980] 实施例153.肿瘤蛋白53蛋白的检测:蛋白质印迹

[2981] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、用2-硫代尿苷修饰25％的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的肿瘤蛋白53(TP53或p53)mRNA(SEQ ID NO:191中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[2982] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[2983] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[2984] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[2985] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[2986] 将蛋白质裂解物加样到具有1.5mm随时可用的Bis-Tris凝胶和4％-12％丙烯酰胺梯度的NuPage SDS-PAGE系统(腔室和电源)上,其中MOPS-缓冲液作为电泳助剂(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将各裂解物样品制备至40ul最终体积。此样品含有处于不同体积的25ug蛋白质裂解物、RIPA缓冲液以补充到26ul的体积、4ul的10x还原剂以及10ul 4x SDS加样缓冲液(均来自Life Technologies,Grand Island,NY)。将样品在95℃下加热5分钟并加样到凝胶上。由制造商选择标准设置200V、120mA以及最大值25W。电泳时间为60min,但是不超过使电泳染料到达凝胶下端的时间。

[2987] 在跑胶终止后,使塑料盒产生裂缝并将封装的凝胶转移至随时可用的硝基纤维素膜试剂盒和电源(iBLOT;LifeTechnologies,Grand Island,NY)。使用默认设置,通过高安培电将蛋白质裂解物从凝胶转移到膜上。

[2988] 转移之后,将膜在5％BSA的1X TBS溶液中孵育15分钟,然后在5％BSA的1X TBS+0.1％Tween溶液中再孵育15分钟。施加在1:500至1:2000的稀释度下在3ml 5％BSA的1X TBS溶液中的抗靶标蛋白的一抗,在室温下保持3小时并在轨道摇床上轻轻搅拌。伴随轻轻的搅拌,用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次,每次5分钟。二抗缀合至辣根过氧化物酶并结合至一抗抗体。将二抗在5％BSA的1X TBS溶液中稀释1:1000至1:5000并且在室温下孵育3

小时。

[2989] 在孵育时间结束时，伴随轻轻的搅拌，用1X TBS/0.1％Tween将膜洗涤3次，每次5分钟。按照指导将膜在5ml Pierce WestPico Chemiluminescent Subtrate(Thermo Fisher,Rockford,IL)中显影。

[2990] 如图43A和43B中所示，对于针对每种化学物质所评价的2个样品各自，蛋白质印迹检测到在53kd的预期大小附近的蛋白质。

[2991] 实施例158.肽身份的验证

[2992] 可使用具有定量LC-多反应监测(MRM)的与质谱串联的液相色谱-质谱(LC-MS/MS)来评价蛋白质，以便验证肽的身份。

[2993] 可使用具有定量LC-多反应监测(MRM)测定(Biognosys AG,Schlieren Switzerland)的与质谱串联的液相色谱-质谱(LC-MS/MS)来评价本文所述的任何蛋白质靶标的身份。使用具有定量LC-MRM测定(Biognosys,Schlieren Switzerland)的LC-MS/MS评价含有由修饰mRNA表达的蛋白质的HeLa细胞裂解物，以便验证细胞裂解物中肽的身份。使用已知和/或本领域中所述的方法，将所鉴定的肽片段与包括同工型的已知蛋白质进行比较。

[2994] A.样品制备

[2995] 通过用5mM tris(2-羧乙基)膦(TCEP)在37℃下孵育1小时来还原裂解缓冲液中每个样品中的蛋白质。在黑暗中在室温下，使用10mM碘乙酰胺进行烷基化作用，持续30分钟。使用胰蛋白酶(序列级,PromegaCorporation,Madison,WI)在1:50的蛋白酶:蛋白质比率下将蛋白质消化成肽。消化在37℃下过夜进行(总消化时间为12小时)。将肽清洗，用于使用C18旋转柱(The Nest Group,Southborough,MA)根据制造商的说明进行质谱分析。将肽干燥至完全干燥并重悬于LC溶剂A(1％乙腈、0.1％甲酸(FA))中。所有溶剂为来自SIGMA-ALDRICH®(St.Louis,MO)的HPLC-级，并且除非另外陈述，否则所有化学品均获自SIGMA-ALDRICH®(St.Louis,MO)。

[2996] B.LC-MS/MS和LC-MRM

[2997] 对于所有质谱分析，将肽注射到Proxeon Easy nLC纳米液相色谱系统上的填充的C18柱(Magic AQ,3um粒度，200 Å孔径,Michrom Bioresources,Inc(Auburn,CA)；11cm柱长，75um内径,New Objective(Woburn,MA))中。LC溶剂为A:在具有0.1％FA的水中的1％乙腈;B:在具有0.1％FA的乙腈中的3％水。用于鸟枪分析的LC梯度为在120分钟内的5％-35％溶剂B，之后是在2分钟内的35％-100％溶剂B以及持续8分钟的100％溶剂B(总梯度长度为130分钟)。用于肽发现的LC-MS/MS鸟枪试验在配备有标准纳米电喷射源的Thermo Scientific(Thermo Fisher Scientific)(Billerica,MA)Q Exactive质谱仪上进行。用于LC-MRM的LC梯度为在30分钟内的5％-35％溶剂B，之后是在2分钟内的35％-100％溶剂B以及持续8分钟的100％溶剂B(总梯度长度为40分钟)。Thermo Scientific(Thermo Fisher Scientific)(Billerica,MA)TSQ Vantage三重四极质谱仪配备有标准纳米电喷射源。在用于重新校准的非预定MRM模式中，在20ms停留时间/转变下进行操作。对于整个样品中肽的相对定量，以预定的MRM模式操作TSQ Vantage，其中采集窗口长度为4分钟。将LC洗脱液在1.9kV下电喷射并使用0.7Da的Q1峰宽执行MRM分析。通过线性回归，根据供应商的规格来计算TSQ Vantage的碰撞能量。

[2998] C.测定设计、数据处理和分析

[2999] 对于LC-MRM测定的产生,以预定的LC-MRM模式测量来自LC-MS/MS分析的12个最强的片段离子,并且使用mProphet的评分部分MQUEST® (Cluetec,Karlsruhe,Germany)来处理数据(Reiter等,mProphet:Automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments,Nature Methods,2011(8),430-435;所述文献的内容通过引用并入本文)。对测定进行人工验证,测定精确的片段强度,并且相对于Biognosys的iRT-肽指定iRT(指数化保留时间)(Escher等Using iRT,a normalized retention time for more targeted measurement of peptides,Proteomics,2012(12),1111-1121;所述文献的内容通过引用并入本文)。

[3000] 对于整个样品系列的肽的相对定量,在整个样品系列对每个测定的8个最强转变进行测量。使用SpectroDive™(Biognosys,Schlieren Switzerland)进行数据分析。对于选定肽,比较总峰面积,并且应用0.05的假发现率。具有低于0.05的Q值的肽不包括在内并且视为在对应的样品中没有检测到。

[3001] 实施例159.来自化学修饰mRNA的肽身份的验证

[3002] 如实施例158中所述,使用具有定量LC-MRM的LC-MS/MS评价含有由用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC和pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC和1mpU)完全修饰的、其中用2-硫代尿苷修饰25%的尿苷并用5-甲基胞嘧啶修饰25%的胞嘧啶(s2U和5mC)进行修饰的、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的α-半乳糖苷酶(GLA)修饰mRNA(SEQ ID NO:187中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、芳基硫酸酯酶B(ARSB)修饰mRNA(SEQ ID NO:188中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、白细胞介素-7(IL-7)修饰mRNA(SEQ ID NO:207中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、成纤维细胞生长因子7(FGF7)修饰mRNA(SEQ ID NO:228中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、溶酶体α-甘露糖苷酶(MAN2B1)修饰mRNA(SEQ ID NO:229中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、α-甲基酰基-辅酶A消旋酶(AMACR)修饰mRNA(SEQ ID NO:230中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、白细胞介素-10(IL-10)修饰mRNA(SEQ ID NO:227中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、低密度脂蛋白受体(LDLR)修饰mRNA(SEQ ID NO:231中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、1,4-α-葡聚糖-分支酶(GBE1)修饰mRNA(SEQ ID NO:232中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、溶质载体家族2成员1(GLUT1或SLC2A1)修饰mRNA(SEQ ID NO:233中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、脂蛋白脂肪酶(LPL)修饰mRNA(SEQ ID NO:234中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)产生的蛋白质的细胞裂解物。所评价蛋白质的所鉴定的肽片段在表179中示出。

[3003] 表179.蛋白质和肽片段序列

[3004]

	肽片段 SEQ ID NO	5mC 和 pU	5mC 和 1mpU	s2U 和 5mC	pU	1mpU
ARSB						
ELIHISDWLPTLVK	235	-	是	是	是	是
GVGFVASPLLK	236	-	是	是	是	-
HSVPVYFPAQDPR	237	-	是	是	是	是
GLA						
FDGCYCDSLENLADGYK	238	是	是	是	是	是
NFADIDDSWK	239	是	是	是	是	是
SILDWTSFNQER	240	是	是	是	是	是
IL-7						
EGMFLFR	241	-	-	-	是	是
EIGSNCLNNEFNNFFK	242	是	是	是	是	是
VSEGTTILLNCTGQVK	243	是	是	-	是	是
FGF7						
GVESEFYLAMNK	244	-	-	-	是	是
SYSYMEGGDIR	245	是	是	是	是	是
TVAVGIVAIK	246	是	是	-	是	是
MAN2B1						
FQVIVYNPLGR	247	是	是	是	是	是
HLVLLDTAQAAAAGHR	248	是	是	是	是	是
AMACR						
FADVFAEK	249	是	是	是	是	是
LQLGPEILQR	250	是	是	是	是	是
IL-10						

[3005]

AHVNSLGENLK	251	是	是	是	-	是
DQLDNLLLK	252	是	是	-	-	是
FLPCENK	253	是	是	是	是	是
LDLR						
AVGSIAYLFFTNR	254	是	是	-	是	是
SEYTSLIPPLR	255	-	是	-	-	是
GBE1						
LLEIDPYLKPYAVDFQR	256	是	是	是	是	是
SVLVPHGSK	257	是	是	是	是	是
YGWLAAPQAYVSEK	258	是	是	是	是	是
SLC2A1 (GLUT1)						
TFDEIASGFR	259	是	是	-	是	是
VTILELFR	260	是	是	-	是	是
LPL						
LSPDDADFVDVLHTFTR	261	是	是	是	是	是
SIHLFIDSLLNEENPSK	262	是	是	是	是	是

[3006] 实施例160.来自1-甲基假尿苷修饰mRNA的肽身份的确认

[3007] 如实施例158中所述,使用具有定量LC-MRM的LC-MS/MS评价含有由用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的纤溶酶原活化蛋白(组织)(PLAT)修饰mRNA(SEQ ID NO:263中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、sirtuin 1(SIRT1)修饰mRNA(SEQ ID NO:264中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、延胡索酰乙酰乙酸水解酶(FAH)修饰mRNA(SEQ ID NO:265中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、溶酶体α-甘露糖苷酶(MAN2B1)修饰mRNA(SEQ ID NO:229中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)(双倍于正常转染量/孔)、纤维蛋白原A(FGA)修饰mRNA(SEQ ID NO:220中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、磷酸化酶激酶α2(肝脏)(PHKA2)修饰mRNA(SEQ ID NO:266中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(MTTP)修饰mRNA(SEQ ID NO:222中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、溶质载体家族2成员1(GLUT1或SLC2A1)修饰mRNA(SEQ ID NO:233中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、血红蛋白β(HBB)修饰mRNA(SEQ ID NO:267中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、白细胞介素15(IL-15)修饰mRNA(SEQ ID NO:268中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、成纤维细胞生长因子23(FGF23)修饰mRNA (SEQ ID NO:269中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、成纤维细胞生长因子18(FGF18)修饰mRNA(SEQ ID NO:270中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、卵泡抑

素(FST)修饰mRNA(SEQ ID NO:30070中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、血管生成素1(ANGPT1)修饰mRNA(SEQ ID NO:226中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、支链酮酸脱氢酶E1α多肽(BCKDHA)修饰mRNA(SEQ ID NO:272中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)产生的蛋白质的细胞裂解物。所评价蛋白质的所鉴定的肽片段在表180中示出。在表180中,"Uniprot ID"是指当针对数据库中的所有评审蛋白质对肽片段序列进行比对时来自UniProt数据库的蛋白质标识符。

[3008] 表180.蛋白质和肽片段序列

[3009]

	肽片段 SEQ ID NO	Uniprot ID
PLAT		
VYTAQNPSAQALGLGK	273	P00750
YIVHKEFDDDTYDNDIALLQLK	274	P00750
IKGGLFADIASHPWQAAIFAK	275	P00750
SIRT1		
TSPPDSSVIVTLLDQAAK	276	Q96EB6

[3010]

GDIFNQVVPR	277	Q96EB6
FAH		
VFLQNLLSVSQAR	278	P16930
HLFTGPVLSK	279	P16930
HQDVFNQPTLNSFMGLGQAAWK	280	P16930
FLLDGDEVIITGYCQGDGYR	281	P16930
MAN2B1		
GSSVHVLYSTPACYLWELNK	282	O00754
HLVLLDTAQAAAAGHR	283	O00754
FQVIVYNPLGR	284	O00754
FGA		
GLIDEVNQDFTNR	285	P02671
NSLFEYQK	286	P02671
RLEVDIDIK	287	P02671
PHKA2		
AYELEQNVVK	288	P46019
MTTP		
LTYSTEVLLDR	289	P55157
FLYACGFASHPNEELLR	290	P55157
NFLAFIQHLR	291	P55157
SLC2A2 (GLUT1)		
SFEEIAAEFQK	292	P11168
HVLGVPLDDRK	293	P11168
HBB		
LLGNVLVCVLAHHFGK	294	P68871
VLGAFSDGLAHLDNLK	295	P68871
IL-15		
TEANWVNVISDLKK	296	P40933
FGF23		
VNTHAGGTGPEGCRPFAK	297	Q9GZV9
RNEIPLIHFNTPIPR	298	Q9GZV9
VNTHAGGTGPEGCRPFAK	299	Q9GZV9
FGF18		
GEDGDKYAQLLVETDTFGSQVR	300	O76093
ENQQDVHFMK	301	O76093
VLENNYTALMSAK	302	O76093
FST		
LSTSWTEEDVNDNTLFK	303	P19883
SCEDIQCTGGKK	304	P19883
GPVCGLDGK	305	P19883
ANGPT1		
ESTTDQYNTNALQR	306	Q15389
DAPHVEPDFSSQK	307	Q15389
AHLRDEEK	308	Q15389
BCKDHA		
HLQTYGEHYPLDHFDK	309	P12694
SVDEVNYWDKQDHPISR	310	P12694
HLQTYGEHYPLDHFDK	311	P12694

[3011] 实施例161.胰岛素蛋白的检测:ELISA

[3012] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用假尿苷(pU)

完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的、含有用2-硫代尿苷修饰的25％的尿苷和用5-甲基胞嘧啶修饰的25％的胞嘧啶(s2U和5mC)的脂质复合的谷赖胰岛素(INS GLU)修饰mRNA(SEQ ID NO:312中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的赖脯胰岛素(INS LIS)修饰mRNA(SEQ ID NO:313中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)、用假尿苷(pU)完全修饰的门冬胰岛素(INS ASP)修饰mRNA(SEQ ID NO:314中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1),或用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC和pU)完全修饰的、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的甘精胰岛素(INS GLA)修饰mRNA(SEQID NO:315中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[3013] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[3014] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[3015] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[3016] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[3017] 使用胰岛素ELISA试剂盒(Mercodia,Winston salem,NC),按照制造商推荐的说明,测定细胞裂解物中的胰岛素表达。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。所产生的蛋白质的量在表181和图51中示出。

[3018] 表181.蛋白质产量

[3019]

样品	胰岛素(pg/ml)
谷赖胰岛素(s2U和5mC)	1272
谷赖胰岛素(pU)	283
谷赖胰岛素(1mpU)	43
赖脯胰岛素(1mpU)	148
门冬胰岛素(pU)	59
甘精胰岛素(5mC和pU)	110

甘精胰岛素(pU)	39
甘精胰岛素(1mpU)	866
未处理的	0

[3020] 实施例162.化学修饰的XI因子在HEK293细胞中的产量

[3021] 将人胚胎肾上皮细胞(HEK293)(LGC standards GmbH,Wesel,Germany)接种于预先涂布有1型胶原的24孔平板(Greiner Bio-one GmbH,Frickenhausen,Germany)上。将HEK293以约100,000细胞/孔的密度接种在100μl细胞培养基中。在将细胞接种并且孵育之后,直接添加含有350ng或750的XI因子mRNA(modRNA FXI)(SEQ ID NO:190中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)的制剂。还对未处理细胞的对照进行评价。

[3022] 通过将培养基上清液转移至96孔Pro-Bind U底平板(Beckton Dickinson GmbH,Heidelberg,Germany)来收获细胞。将细胞用1/2体积的胰蛋白酶/EDTA(Biochrom AG,Berlin,Germany)胰蛋白酶消化,与对应的上清液合并,并且通过添加一个体积的PBS/2%FCS(均为Biochrom AG,Berlin,Germany)/0.5%甲醛(Merck,Darmstadt,Germany)进行固定。

[3023] 在孵育12小时之后,收集表达XI因子的细胞的细胞培养物上清液并在10.000rcf下离心2分钟。然后用XI因子-特异性ELISA试剂盒(Innovative Research,Novi,MI),根据制造商的说明对澄清的上清液进行分析。所产生的蛋白质的量在图52中示出。

[3024] 实施例163.化学修饰的XI因子在HeLa细胞中的蛋白质产量

[3025] 在转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获15,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10%FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5%CO_2气氛中生长过夜。第二天,将250ng的具有表182中所述的化学修饰的XI因子修饰RNA(SEQ ID NO:190中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul的lipofectamine 2000稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。还对未处理细胞的对照进行分析。

[3026] 在孵育18至22小时之后,收集表达XI因子的细胞的细胞培养物上清液并在10.000rcf下离心2分钟。然后用XI因子-特异性ELISA试剂盒(Innovative Research,Novi,MI),根据制造商的说明对澄清的上清液进行分析。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。与未处理的样品相比较的所产生的蛋白质的量在表182和图53中示出。在表182中,">"意思是大于。

[3027] 表182.蛋白质产量

[3028]

样品	XI 因子蛋白 (ng/ml)
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC 和 pU)	> 500
5-甲基胞嘧啶和 1-甲基假尿苷(5mC 和 1mpU)	> 500
用 2-硫代尿苷修饰 25%的尿苷并用 5-甲基胞嘧啶修饰 25%的胞嘧啶(s2U 和 5mC)	42
假尿苷(pU)	> 500
1-甲基假尿苷(1mpU)	> 500
未处理的	9

[3029] 实施例164.XI因子在HeLa细胞上清液中的蛋白质产量

[3030] 在转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获20,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10％FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5％CO_2气氛中生长过夜。第二天,将250ng用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷完全修饰的XI因子修饰RNA(SEQ ID NO:190中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul的lipofectamine 2000稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。还对促红细胞生成素(EPO)修饰mRNA(SEQ ID NO:173中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;帽,Cap1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)和未处理细胞的对照进行分析。

[3031] 在孵育18至22小时之后,收集表达纤溶酶原的细胞的细胞培养物上清液并在10.000rcf下离心2分钟。然后用XI因子-特异性ELISA试剂盒(Innovative Research,Novi,MI),根据制造商的说明对澄清的上清液进行分析。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。所产生的蛋白质的量在表183和图54中示出。

[3032] 表183.蛋白质产量

[3033]

样品	XI 因子蛋白 (ng/ml)
XI 因子	105
EPO	0.3
未处理的	1.2

[3034] 实施例165.化学修饰的IX因子在HeLa细胞上清液中的蛋白质产量

[3035] 在转染前一天,通过用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获15,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的Eagle's极限必需培养基(EMEM)(补充有10％胎牛血清(FCS)和1x Glutamax)/孔的24孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5％CO_2气氛中生长过夜。第二天,将250ng的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰、其中用5-甲基胞嘧啶代替25％的胞嘧啶并

用2-硫代尿苷代替25％的尿苷(s2U/5mC)进行修饰、用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰或用假尿苷(pU)完全修饰的IX因子修饰RNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM®(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul的lipofectamine 2000稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM®中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。还对未处理的对照进行分析。

[3036] 在孵育18小时之后,通过用来自Pierce Biotechnology(Thermo Scientific,Rockford,IL)的免疫沉淀(IP)缓冲液裂解细胞来收集表达IX因子的细胞的细胞培养物上清液并将其在10.000rcf下离心2分钟。将澄清上清液1:2(1ml裂解物/2孔/24孔平板)或1:5(1ml裂解物/5孔/24孔平板)稀释,然后用IX因子特异性ELISA试剂盒根据制造商的说明对其进行分析。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。两个研究中所产生的蛋白质的量均在表184和图55中示出。

[3037] 表184.蛋白质产量

[3038]

样品	IX 因子 (ng/ml)
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)	45.8
5-甲基胞嘧啶和 1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)	147.1
用 5-甲基胞嘧啶代替 25%的胞嘧啶并用 2-硫代尿苷代替 25%的尿苷(s2U/5mC)	7.4
假尿苷(pU)	17.0
1-甲基假尿苷(1mpU)	32.0

[3039]

未处理的	0

[3040] 实施例166.IX因子蛋白的检测:ELISA

[3041] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC和pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC和1mpU)完全修饰的、用假尿苷(pU)完全修饰或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的IX因子(FIX)修饰mRNA(SEQ ID NO:174中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[3042] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[3043] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞

重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[3044] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中，然后在2000rpm下旋转2分钟。

[3045] 在一个管中，将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中，将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4％甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN)，然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[3046] 使用IX因子ELISA试剂盒(Innovative Research;Burlington,ON,Canada)，按照制造商推荐的说明，测定细胞裂解物中的IX因子表达。对所有样品进行稀释，直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。所产生的蛋白质的平均量在表185中示出。

[3047] 表185.蛋白质产量

[3048]

样品	小鼠数目	平均 FIX (pg/ml)
IX 因子(5mC 和 pU)	3	643
IX 因子(5mC 和 1mpU)	2	210
IX 因子(pU)	1	70
IX 因子(1mpU)	2	192.5
未处理的	-	0

[3049] 实施例167.鸟氨酸氨甲酰基转移酶蛋白的检测:ELISA

[3050] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC和pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC和1mpU)完全修饰的、含有用2-硫代尿苷修饰的25％的尿苷和用5-甲基胞嘧啶修饰的25％的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰的或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)修饰mRNA(SEQ ID NO:316中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出;5’帽，Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂，LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[3051] 6小时后，将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板，并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割，并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[3052] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA)，而留下纤维组分。通过重力，细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS，并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟，然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[3053] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[3054] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[3055] 使用OTC ELISA试剂盒(BlueGene;中国上海),按照制造商推荐的说明,测定细胞裂解物中的OTC表达。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。所产生的蛋白质的平均量在表186中示出。

[3056] 表186.蛋白质产量

[3057]

样品	小鼠数目	平均 OTC (ug/ml)
OTC (5mC 和 pU)	2	15.7
OTC (5mC 和 1mpU)	2	10.2
OTC (s2U 和 5mC)	2	6.3
OTC (pU)	2	6.8
OTC (1mpU)	2	8.2
未处理的	2	0.6

[3058] 实施例168.干扰素α2蛋白的检测:ELISA

[3059] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC和pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC和1mpU)完全修饰的、含有用2-硫代尿苷修饰的25%的尿苷和用5-甲基胞嘧啶修饰的25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰的或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的干扰素α2(IFNA2)修饰mRNA(SEQ ID NO:317中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[3060] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[3061] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[3062] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[3063] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的

500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[3064] 使用IFNA2ELISA试剂盒(PBL InterferonSource;Piscataway,NJ),按照制造商推荐的说明,测定细胞裂解物中的IFNA2表达。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。所产生的蛋白质的平均量在表187中示出。

[3065] 表187.蛋白质产量

[3066]

样品	小鼠数目	平均 IFNA2 (ug/ml)
IFNA2 (5mC 和 pU)	3	52
IFNA2 (5mC 和 1mpU)	3	47.7
IFNA2 (s2U 和 5mC)	3	50
IFNA2 (pU)	3	30.7
IFNA2 (1mpU)	3	30
未处理的	-	0

[3067] 实施例169.VII因子蛋白的检测:ELISA

[3068] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC和pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC和1mpU)完全修饰的、含有用2-硫代尿苷修饰的25%的尿苷和用5-甲基胞嘧啶修饰的25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰的或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的VII因子修饰mRNA(SEQ ID NO:318中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[3069] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[3070] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[3071] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[3072] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次

并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[3073] 使用VII因子ELISA试剂盒(Innovative Research;Burlington,ON),按照制造商推荐的说明,测定细胞裂解物中的VII因子表达。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。所产生的蛋白质的平均量在表188中示出。

[3074] 表188.蛋白质产量

[3075]

样品	小鼠数目	平均 VII 因子(pg/ml)
VII 因子(5mC 和 pU)	1	606
VII 因子(5mC 和 1mpU)	2	155
VII 因子(s2U 和 5mC)	1	1043
VII 因子(pU)	2	289.5
VII 因子(1mpU)	1	1805
未处理的	-	0

[3076] 实施例170.人生长激素2蛋白的检测:ELISA

[3077] 向CD1小鼠(Harlan Laboratories,South Easton,MA)静脉内施用用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC和pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC和1mpU)完全修饰的、含有用2-硫代尿苷修饰的25%的尿苷和用5-甲基胞嘧啶修饰的25%的胞嘧啶(s2U和5mC)、用假尿苷(pU)完全修饰的或用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰的脂质复合的人生长激素(HGH)修饰mRNA(SEQ ID NO:319中示出的mRNA序列;具有大约140个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)。向小鼠施用在100ul无菌基础DMEM培养基(不含添加剂,LifeTechnologies,Grand Island,NY)中的与2ul Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)复合的2ug剂量的mRNA。

[3078] 6小时后,将动物处死并获取血清和脾。将脾转移至6孔平板,并且在1ml PBS的存在下保持在冰上。将一个脾多次用解剖刀并用橡胶细胞刮棒切割,并且挤出脾细胞直到PBS因细胞释放而变得浑浊。

[3079] 将细胞转移至置于12孔细胞培养平板上的100um细胞过滤器(BD Biosciences,San Jose,CA),而留下纤维组分。通过重力,细胞通过细胞过滤器并收集在下方的12孔培养盘中。将1ml的PBS与自由漂浮的脾细胞一起转移至Eppendorf管并在2000rpm下旋转5min。弃去PBS,并且将细胞沉淀与500ul新鲜PBS合并。通过在2000rpm下短暂涡旋5分钟将脾细胞重悬。弃去PBS并且将1ml BD Pharmlyse缓冲液添加到细胞沉淀中。通过短暂涡旋重悬脾细胞。将细胞在室温下孵育3分钟,然后在2000rpm下旋转5分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。用500ul的PBS如所描述地将细胞再次重悬。

[3080] 将250ul这些脾细胞转移到新鲜的管中,然后在2000rpm下旋转2分钟。

[3081] 在一个管中,将细胞沉淀重悬于具有哺乳动物细胞的蛋白酶抑制剂混合物的500ul RIPA缓冲液(BostonBioproducts,Ashland,MA)中并且将裂解物冰冻储存或立即用BCA测定进行分析。在第二管中,将细胞重悬于250ul FACS染色试剂盒固定溶液(4%甲醛;R and D Systems,Minneapolis,MN),然后在室温下孵育10分钟。用500ul PBS洗涤细胞两次并如上所述进行旋转。将细胞沉淀再次重悬于500PBS中并储存于4℃。

[3082] 使用HGH ELISA试剂盒(R&D systems;Minneapolis,MN),按照制造商推荐的说明,

测定细胞裂解物中的HGH表达。对所有样品进行稀释，直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。所产生的蛋白质的平均量在表189中示出。

[3083] 表189.蛋白质产量

[3084]

样品	小鼠数目	平均 HGH (pg/ml)

[3085]

HGH (5mC 和 pU)	3	133.7
HGH (5mC 和 1mpU)	3	197.3
HGH (s2U 和 5mC)	3	182
HGH (pU)	3	159.7
HGH (1mpU)	3	180
未处理的	-	0

[3086] 实施例171.蛋白质表达的验证

[3087] 通过荧光和/或蛋白质印迹对编码表190中所述蛋白质的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC/pU)完全修饰的、用5-甲基胞嘧啶和1-甲基假尿苷(5mC/1mpU)完全修饰的、其中用5-甲基胞嘧啶代替25％的胞嘧啶并用2-硫代尿苷代替25％的尿苷(s2U/5mC)进行修饰的、用1-甲基假尿苷(1mpU)完全修饰或用假尿苷(pU)完全修饰的修饰mRNA进行分析，以便验证蛋白质的表达以及所表达蛋白质的长度。表190描述了修饰mRNA(具有大约140个核苷酸的polyA尾，序列中未示出；5’帽，Cap1)或cDNA(用于体外转录(IVT)的T7启动子、5′非翻译区(UTR)和3′UTR，在序列中示出)的序列、所评价的化学修饰以及长度(以碱基对计)，如果已知的话。

[3088] 表190.蛋白质和表达

[3089]

蛋白质	修饰 mRNA SEQ ID NO	5mC/ pU	5mC /1mpU	s2U/5mC	pU	1mpU
芳基硫酸酯酶B	188	-	是 1888 bp	是 1888 bp	是 1888 bp	-
半乳糖苷酶α (GLA)	187	-	是 1576 bp	是 1576 bp	是 1576 bp	-
IX因子(F9)	174	是 1672 bp	是 1672 bp	是 1672 bp	-	是 1672 bp
人生长激素 (hGH)	319	是 940 bp	是 940 bp	是 940 bp	是 940 bp	是 940 bp

[3090] 实施例172.人生长激素在HeLa细胞中的蛋白质产量

[3091] 在转染前一天，通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获15,000HeLa细胞(ATCC第CCL-2号;Manassas,VA)并将其接种于总体积100ul的EMEM培养基(补充有10％FCS和1x Glutamax)/孔的96孔细胞培养平板(Corning,Manassas,VA)中。使细胞在37℃下在5％CO_2气氛中生长过夜。第二天，将250ng的具有表192

中所述的化学修饰的人生长激素(hGH)修饰RNA(SEQ ID NO:319中示出的mRNA序列;具有大约160个核苷酸的polyA尾,序列中未示出;5'帽,Cap1)稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine 2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,并且将0.2ul的lipofectamine 2000稀释于10ul最终体积的OPTI-MEM中。在室温下孵育5分钟后,将两种溶液合并,并在室温下再孵育15分钟。然后将20ul所合并的溶液添加到100ul含有HeLa细胞的细胞培养基中并在室温下孵育。还对未处理细胞的对照进行分析。

[3092] 在孵育18至22小时之后,收集表达人生长激素的细胞的细胞培养物上清液并在10.000rcf下离心2分钟。然后用人生长激素ELISA试剂盒(目录号DGH00;R&DSYSTEMS®,Minneapolis,MN),根据制造商的说明对澄清的上清液进行分析。对所有样品进行稀释,直到所测定的值在ELISA标准曲线的线性范围内。与未处理的样品相比较的所产生的蛋白质的量在表192和图56中示出。在表192中,">"意思是大于。

[3093] 表193.蛋白质产量

[3094]

样品	hGH (pg/ml)
5-甲基胞嘧啶和假尿苷(5mC 和 pU)	> 8,000
5-甲基胞嘧啶和 1-甲基假尿苷(5mC 和 1mpU)	> 8,000
用 2-硫代尿苷修饰 25%的尿苷并用 5-甲基胞嘧啶修饰 25%的胞嘧啶(s2U 和 5mC)	> 8,000
假尿苷(pU)	> 8,000
1-甲基假尿苷(1mpU)	> 8,000

[3095]

未处理的	0

[3096] 其它实施方案

[3097] 应理解,已使用的措辞为描述性措辞,而不是限制性措辞,并且可在随附权利要求的范围内做出改变,而不脱离在本发明的更宽的方面内的本发明的真实范围和精神。

[3098] 虽然已关于若干所描述的实施方案相当详细并相当具体地描述了本发明,但是并不预期本发明应限于任何所述细节或实施方案或任何具体实施方案,而是参考随附权利要求进行说明,以便考虑到现有技术提供所述权利要求的最广泛的可能解释,并且因此有效地涵盖本发明的预期范围。

[3099] 本文提到的所有公布、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入。如有矛盾,以包括定义在内的本说明书为准。另外,章节标题、材料、方法和实施例仅为示例性的并且不旨在具有限制性。

序列表

<110> 现代泰克斯公司

<120> 蛋白质的体内产生

<130> M313.20/2030.1313PCT

<150> 61/737,213

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,203

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,191

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,184

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,174

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,168

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,160

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,155

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,152

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,147

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,139

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,135

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,134

<151> 2012-12-14

<150> 61/737,130

<151> 2012-12-14

<150> 61/712,490

<151> 2012-10-11

<150> 61/709,303

<151> 2012-10-03

<150> 61/696,381

<151> 2012-09-04

<150> 61/681,742
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,720
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,712
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,704
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,696
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,687
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,675
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,667
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,661
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,658
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,654
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,650
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,649
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,648
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,647
<151> 2012-08-10
<150> 61/681,645
<151> 2012-08-10
<150> 61/668,157
<151> 2012-07-05
<150> 61/648,286
<151> 2012-05-17
<150> 61/648,244
<151> 2012-05-17
<150> 61/618,961

<151> 2012-04-02
<150> 61/618,957
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,953
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,945
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,935
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,922
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,911
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,896
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,885
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,878
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,873
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,870
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,868
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,866
<151> 2012-04-02
<150> 61/618,862
<151> 2012-04-02
<150> PCT/US13/30062
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30063
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30064
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30059
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30066
<151> 2013-03-09

<150> PCT/US13/30067
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30060
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30061
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30068
<151> 2013-03-09
<150> PCT/US13/30070
<151> 2013-03-09
<160> 319
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 47
<212> DNA
<213> 智人
<400> 1
gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc 47
<210> 2
<211> 47
<212> DNA
<213> 智人
<400> 2
gggagatcag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc 47
<210> 3
<211> 145
<212> DNA
<213> 智人
<400> 3
ggaataaaag tctcaacaca acatatacaa aacaaacgaa tctcaagcaa tcaagcattc 60
tacttctatt gcagcaattt aaatcatttc ttttaaagca aaagcaattt tctgaaaatt 120
ttcaccattt acgaacgata gcaac 145
<210> 4
<211> 42
<212> RNA
<213> 智人
<400> 4
gggagacaag cuuggcauuc cgguacuguu gguaaagcca cc 42
<210> 5

<211> 371
<212> DNA
<213> 智人
<400> 5
gcgcctgccc acctgccacc gactgctgga acccagccag tgggagggcc tggcccacca 60
gagtcctgct ccctcactcc tcgccccgcc ccctgtccca gagtcccacc tgggggctct 120
ctccaccctt ctcagagttc cagtttcaac cagagttcca accaatgggc tccatcctct 180
ggattctggc caatgaaata tctccctggc agggtcctct tcttttccca gagctccacc 240
ccaaccagga gctctagtta atggagagct cccagcacac tcggagcttg tgctttgtct 300
ccacgcaaag cgataaataa aagcattggt ggcctttggt ctttgaataa agcctgagta 360
ggaagtctag a 371
<210> 6
<211> 568
<212> DNA
<213> 智人
<400> 6
gcccctgccg ctcccacccc cacccatctg ggccccgggt tcaagagaga gcggggtctg 60
atctcgtgta gccatataga gtttgcttct gagtgtctgc tttgtttagt agaggtgggc 120
aggaggagct gaggggctgg ggctggggtg ttgaagttgg ctttgcatgc ccagcgatgc 180
gcctccctgt gggatgtcat caccctggga accgggagtg gcccttggct cactgtgttc 240
tgcatggttt ggatctgaat taattgtcct ttcttctaaa tcccaaccga acttcttcca 300
acctccaaac tggctgtaac cccaaatcca agccattaac tacacctgac agtagcaatt 360
gtctgattaa tcactggccc cttgaagaca gcagaatgtc cctttgcaat gaggaggaga 420
tctgggctgg gcgggccagc tggggaagca tttgactatc tggaacttgt gtgtgcctcc 480
tcaggtatgg cagtgactca cctggtttta ataaaacaac ctgcaacatc tcatggtctt 540
tgaataaagc ctgagtagga agtctaga 568
<210> 7
<211> 289
<212> DNA
<213> 智人
<400> 7
acacactcca cctccagcac gcgacttctc aggacgacga atcttctcaa tgggggggcg 60
gctgagctcc agccaccccg cagtcacttt ctttgtaaca acttccgttg ctgccatcgt 120
aaactgacac agtgtttata acgtgtacat acattaactt attacctcat tttgttattt 180
ttcgaaacaa agccctgtgg aagaaaatgg aaaacttgaa gaagcattaa agtcattctg 240
ttaagctgcg taaatggtct ttgaataaag cctgagtagg aagtctaga 289
<210> 8
<211> 379
<212> DNA

<213> 智人

<400> 8

catcacattt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 60
aagcttattc atctgttttt ctttttcgtt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 120
ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 180
gaatctaata gagtggtaca gcactgttat ttttcaaaga tgtgttgcta tcctgaaaat 240
tctgtaggtt ctgtggaagt tccagtgttc tctcttattc cacttcggta gaggatttct 300
agtttcttgt gggctaatta aataaatcat taatactctt ctaatggtct ttgaataaag 360
cctgagtagg aagtctaga 379

<210> 9

<211> 118

<212> DNA

<213> 小鼠属(Mus sp.)

<400> 9

gctgccttct gcggggcttg ccttctggcc atgcccttct tctctccctt gcacctgtac 60
ctcttggtct ttgaataaag cctgagtagg aaggcggccg ctcgagcatg catctaga 118

<210> 10

<211> 908

<212> DNA

<213> 智人

<400> 10

gccaagccct ccccatccca tgtatttatc tctatttaat atttatgtct atttaagcct 60
catatttaaa gacagggaag agcagaacgg agccccaggc ctctgtgtcc ttccctgcat 120
ttctgagttt cattctcctg cctgtagcag tgagaaaaag ctcctgtcct cccatccccct 180
ggactgggag gtagataggt aaataccaag tatttattac tatgactgct ccccagccct 240
ggctctgcaa tgggcactgg gatgagccgc tgtgagcccc tggtcctgag ggtccccacc 300
tgggaccctt gagagtatca ggtctcccac gtgggagaca agaaatccct gtttaatatt 360
taaacagcag tgttccccat ctgggtcctt gcacccctca ctctggcctc agccgactgc 420
acagcggccc ctgcatcccc ttggctgtga ggcccctgga caagcagagg tggccagagc 480
tgggaggcat ggccctgggg tcccacgaat ttgctgggga atctcgtttt tcttcttaag 540
acttttggga catggtttga ctcccgaaca tcaccgacgc gtctcctgtt tttctgggtg 600
gcctcgggac acctgccctg cccccacgag ggtcaggact gtgactcttt ttagggccag 660
gcaggtgcct ggacatttgc cttgctggac ggggactggg gatgtgggag ggagcagaca 720
ggaggaatca tgtcaggcct gtgtgtgaaa ggaagctcca ctgtcaccct ccacctcttc 780
acccccccact caccagtgtc ccctccactg tcacattgta actgaacttc aggataataa 840
agtgtttgcc tccatggtct ttgaataaag cctgagtagg aaggcggccg ctcgagcatg 900
catctaga 908

<210> 11

<211> 835

<212> DNA
<213> 智人
<400> 11
actcaatcta aattaaaaaa gaaagaaatt tgaaaaaact ttctctttgc catttcttct 60
tcttcttttt taactgaaag ctgaatcctt ccatttcttc tgcacatcta cttgcttaaa 120
ttgtgggcaa aagagaaaaa gaaggattga tcagagcatt gtgcaataca gtttcattaa 180
ctccttcccc cgctcccccа aaaatttgaa ttttttttтc aacactctta cacctgttat 240
ggaaaatgtc aacctttgta agaaaaccaa aataaaaatt gaaaaataaa aaccataaac 300
atttgcacca cttgtggctt ttgaatatct tccacagagg gaagtttaaa acccaaactt 360
ccaaaggttt aaactacctc aaaacacttt cccatgagtg tgatccacat tgttaggtgc 420
tgacctagac agagatgaac tgaggtcctt gttttgtttt gttcataata caaaggtgct 480
aattaatagt atttcagata cttgaagaat gttgatggtg ctagaagaat ttgagaagaa 540
atactcctgt attgagttgt atcgtgtggt gtattttta aaaaatttga tttagcattc 600
atattttcca tcttattccc aattaaaagt atgcagatta tttgcccaaa tcttcttcag 660
attcagcatt tgttctttgc cagtctcatt ttcatcttct tccatggttc cacagaagct 720
ttgtttcttg ggcaagcaga aaaattaaat tgtacctatt ttgtatatgt gagatgttta 780
aataaattgt gaaaaaaatg aaataaagca tgtttggttt tccaaaagaa catat 835
<210> 12
<211> 297
<212> DNA
<213> 智人
<400> 12
cgccgccgcc cgggccccgc agtcgagggt cgtgagccca ccccgtccat ggtgctaagc 60
gggcccgggt cccacacggc cagcaccgct gctcactcgg acgacgccct gggcctgcac 120
ctctccagct cctcccacgg ggtccccgta gccccggccc ccgcccagcc ccaggtctcc 180
ccaggccctc cgcaggctgc ccggcctccc tccccctgca gccatcccaa ggctcctgac 240
ctacctggcc cctgagctct ggagcaagcc ctgacccaat aaaggctttg aacccat 297
<210> 13
<211> 602
<212> DNA
<213> 智人
<400> 13
ggggctagag ccctctccgc acagcgtgga gacggggcaa ggaggggggt tattaggatt 60
ggtggttttg ttttgctttg tttaaagccg tgggaaaatg gcacaacttt acctctgtgg 120
gagatgcaac actgagagcc aaggggtggg agttgggata atttttatat aaaagaagtt 180
tttccacttt gaattgctaa aagtggcatt tttcctatgt gcagtcactc ctctcatttc 240
taaaataggg acgtggccag gcacggtggc tcatgcctgt aatcccagca ctttgggagg 300
ccgaggcagg cggctcacga ggtcaggaga tcgagactat cctggctaac acggtaaaac 360
cctgtctcta ctaaaagtac aaaaaattag ctgggcgtgg tggtgggcac ctgtagtccc 420

agctactcgg gaggctgagg caggagaaag gcatgaatcc aagaggcaga gcttgcagtg 480
agctgagatc acgccattgc actccagcct gggcaacagt gttaagactc tgtctcaaat 540
ataaataaat aaataaataa ataaataaat aaataaaaat aaagcgagat gttgccctca 600
aa 602

<210> 14
<211> 785
<212> DNA
<213> 智人
<400> 14

ggccctgccc cgtcggactg cccccagaaa gcctcctgcc ccctgccagt gaagtccttc 60
agtgagcccc tccccagcca gcccttccct ggccccgccg gatgtataaa tgtaaaaatg 120
aaggaattac attttatatg tgagcgagca agccggcaag cgagcacagt attatttctc 180
catcccctcc ctgcctgctc cttggcaccc ccatgctgcc ttcagggaga caggcaggga 240
gggcttgggg ctgcacctcc taccctccca ccagaacgca ccccactggg agagctggtg 300
gtgcagcctt cccctccctg tataagacac tttgccaagg ctctcccctc tcgccccatc 360
cctgcttgcc cgctcccaca gcttcctgag ggctaattct gggaagggag agttctttgc 420
tgcccctgtc tggaagacgt ggctctgggt gaggtaggcg ggaaaggatg gagtgtttta 480
gttcttgggg gaggccaccc caaaccccag ccccaactcc aggggcacct atgagatggc 540
catgctcaac ccccctccca gacaggccct ccctgtctcc agggccccca ccgaggttcc 600
cagggctgga gacttcctct ggtaaacatt cctccagcct cccctccccct ggggacgcca 660
aggaggtggg ccacacccag gaagggaaag cgggcagccc cgttttgggg acgtgaacgt 720
tttaataatt tttgctgaat tcctttacaa ctaaataaca cagatattgt tataaataaa 780
attgt 785

<210> 15
<211> 3001
<212> DNA
<213> 智人
<400> 15

atattaagga tcaagctgtt agctaataat gccacctctg cagttttggg aacaggcaaa 60
taaagtatca gtatacatgg tgatgtacat ctgtagcaaa gctcttggag aaaatgaaga 120
ctgaagaaag caaagcaaaa actgtataga gagatttttc aaaagcagta atccctcaat 180
tttaaaaaag gattgaaaat tctaaatgtc tttctgtgca tatttttgt gttaggaatc 240
aaaagtattt tataaaagga gaaagaacag cctcatttta gatgtagtcc tgttggattt 300
tttatgcctc ctcagtaacc agaaatgttt taaaaaacta agtgtttagg atttcaagac 360
aacattatac atggctctga aatatctgac acaatgtaaa cattgcaggc acctgcattt 420
tatgtttttt ttttcaacaa atgtgactaa tttgaaactt ttatgaactt ctgagctgtc 480
cccttgcaat tcaaccgcag tttgaattaa tcatatcaaa tcagttttaa ttttttaaat 540
tgtacttcag agtctatatt tcaagggcac attttctcac tactatttta atacattaaa 600
ggactaaata atctttcaga gatgctggaa acaaatcatt tgctttatat gtttcattag 660

aataccaatg aaacatacaa cttgaaaatt agtaatagta tttttgaaga tcccatttct 720
aattggagat ctctttaatt tcgatcaact tataatgtgt agtactatat taagtgcact 780
tgagtggaat tcaacatttg actaataaaa tgagttcatc atgttggcaa gtgatgtggc 840
aattatctct ggtgacaaaa gagtaaaatc aaatatttct gcctgttaca aatatcaagg 900
aagacctgct actatgaaat agatgacatt aatctgtctt cactgtttat aatacggatg 960
gatttttttt caaatcagtg tgtgttttga ggtcttatgt aattgatgac atttgagaga 1020
aatggtggct ttttttagct acctctttgt tcatttaagc accagtaaag atcatgtctt 1080
tttatagaag tgtagatttt ctttgtgact ttgctatcgt gcctaaagct ctaaatatag 1140
gtgaatgtgt gatgaatact cagattattt gtctctctat ataattagtt tggtactaag 1200
tttctcaaaa aattattaac acatgaaaga caatctctaa accagaaaaa gaagtagtac 1260
aaattttgtt actgtaatgc tcgcgtttag tgagtttaaa acacacagta tcttttggtt 1320
ttataatcag tttctatttt gctgtgcctg agattaagat ctgtgtatgt gtgtgtgtgt 1380
gtgtgtgcgt ttgtgtgtta aagcagaaaa gacttttta aaagttttaa gtgataaatg 1440
caatttgtta attgatctta gatcactagt aaactcaggg ctgaattata ccatgtatat 1500
tctattagaa gaaagtaaac accatcttta ttcctgccct ttttcttctc tcaaagtagt 1560
tgtagttata tctagaaaga agcaattttg atttcttgaa aaggtagttc ctgcactcag 1620
tttaaactaa aaataatcat acttggattt tatttatttt tgtcatagta aaaatttaa 1680
tttatatata tttttattta gtattatctt attctttgct atttgccaat cctttgtcat 1740
caattgtgtt aaatgaattg aaaattcatg ccctgttcat tttattttac tttattggtt 1800
aggatattta aaggattttt gtatatataa tttcttaaat taatattcca aaaggttagt 1860
ggacttagat tataaattat ggcaaaaatc taaaaacaac aaaaatgatt tttatacatt 1920
ctatttcatt attcctcttt ttccaataag tcatacaatt ggtagatatg acttatttta 1980
tttttgtatt attcactata tctttatgat atttaagtat aaataattaa aaaaatttat 2040
tgtaccttat agtctgtcac caaaaaaaaa aaattatctg taggtagtga aatgctaatg 2100
ttgatttgtc tttaagggct tgttaactat cctttatttt ctcatttgtc ttaaattagg 2160
agtttgtgtt taaattactc atctaagcaa aaaatgtata taaatcccat tactgggtat 2220
atacccaaag gattataaat catgctgcta taaagacaca tgcacacgta tgtttattgc 2280
agcactattc acaatagcaa agacttggaa ccaacccaaa tgtccatcaa tgatagactt 2340
gattaagaaa atgtgcacat atacaccatg gaatactatg cagccataaa aaaggatgag 2400
ttcatgtcct ttgtagggac atggataaag ctggaaacca tcattctgag caaactattg 2460
caaggacaga aaaccaaaca ctgcatgttc tcactcatag gtgggaattg aacaatgaga 2520
acacttggac acaaggtggg gaacaccaca caccagggcc tgtcatgggg tgggggggagt 2580
ggggagggat agcattagga gatataccta atgtaaatga tgagttaatg ggtgcagcac 2640
accaacatgg cacatgtata catatgtagc aaacctgcac gttgtgcaca tgtaccctag 2700
aacttaaagt ataattaaaa aaaaaaagaa aacagaagct atttataaag aagttatttg 2760
ctgaaataaa tgtgatcttt cccattaaaa aaataaagaa attttggggt aaaaaaacac 2820
aatatattgt attcttgaaa aattctaaga gagtggatgt gaagtgttct caccacaaaa 2880
gtgataacta attgaggtaa tgcacatatt aattagaaag attttgtcat tccacaatgt 2940
atatatactt aaaaatatgt tatacacaat aaatacatac attaaaaaat aagtaaatgt 3000

a 3001

<210> 16

<211> 1037

<212> DNA

<213> 智人

<400> 16

cccaccctgc acgccggcac caaaccctgt cctcccaccc ctccccactc atcactaaac 60
agagtaaaat gtgatgcgaa ttttcccgac caacctgatt cgctagattt tttttaagga 120
aaagcttgga aagccaggac acaacgctgc tgcctgcttt gtgcagggtc ctccggggct 180
cagccctgag ttggcatcac ctgcgcaggg ccctctgggg ctcagccctg agctagtgtc 240
acctgcacag ggccctctga ggctcagccc tgagctggcg tcacctgtgc agggccctct 300
ggggctcagc cctgagctgg cctcacctgg gttccccacc ccgggctctc ctgccctgcc 360
ctcctgcccg ccctccctcc tgcctgcgca gctccttccc taggcacctc tgtgctgcat 420
cccaccagcc tgagcaagac gccctctcgg ggcctgtgcc gcactagcct ccctctcctc 480
tgtccccata gctggttttt cccaccaatc ctcacctaac agttacttta caattaaact 540
caaagcaagc tcttctcctc agcttggggc agccattggc ctctgtctcg ttttgggaaa 600
ccaaggtcag gaggccgttg cagacataaa tctcggcgac tcggccccgt ctcctgaggg 660
tcctgctggt gaccggcctg gaccttggcc ctacagccct ggaggccgct gctgaccagc 720
actgaccccg acctcagaga gtactcgcag gggcgctggc tgcactcaag accctcgaga 780
ttaacggtgc taaccccgtc tgctcctccc tcccgcagag actggggcct ggactggaca 840
tgagagcccc ttggtgccac agagggctgt gtcttactag aaacaacgca aacctctcct 900
tcctcagaat agtgatgtgt tcgacgtttt atcaaaggcc ccctttctat gttcatgtta 960
gttttgctcc ttctgtgttt ttttctgaac catatccatg ttgctgactt ttccaaataa 1020
aggttttcac tcctctc 1037

<210> 17

<211> 577

<212> DNA

<213> 智人

<400> 17

agaggcctgc ctccagggct ggactgaggc ctgagcgctc ctgccgcaga gctggccgcg 60
ccaaataatg tctctgtgag actcgagaac tttcattttt ttccaggctg gttcggattt 120
ggggtggatt ttggttttgt tcccctcctc cactctcccc cacccccctcc ccgccctttt 180
ttttttttt ttttaaactg gtattttatc tttgattctc cttcagccct cacccctggt 240
tctcatcttt cttgatcaac atcttttctt gcctctgtcc ccttctctca tctcttagct 300
cccctccaac ctgggggggca gtggtgtgga gaagccacag gcctgagatt tcatctgctc 360
tccttcctgg agcccagagg agggcagcag aaggggggtgg tgtctccaac cccccagcac 420
tgaggaagaa cggggctctt ctcatttcac ccctcccttt ctcccctgcc cccaggactg 480
ggccacttct gggtggggca gtgggtccca gattggctca cactgagaat gtaagaacta 540
caaacaaaat ttctattaaa ttaaattttg tgtctcc 577

<210> 18
<211> 2212
<212> DNA
<213> 智人
<400> 18

ctccctccat cccaacctgg ctccctccca cccaaccaac tttccccca acccggaaac 60
agacaagcaa cccaaactga acccccctcaa aagccaaaaa atgggagaca atttcacatg 120
gactttggaa aatatttttt tcctttgcat tcatctctca aacttagttt ttatctttga 180
ccaaccgaac atgaccaaaa accaaaagtg cattcaacct taccaaaaaa aaaaaaaaaa 240
aaagaataaa taaataactt tttaaaaaag gaagcttggt ccacttgctt gaagacccat 300
gcgggggtaa gtccctttct gcccgttggg cttatgaaac cccaatgctg ccctttctgc 360
tcctttctcc acacccccct tggggcctcc cctccactcc ttcccaaatc tgtctcccca 420
gaagacacag gaaacaatgt attgtctgcc cagcaatcaa aggcaatgct caaacaccca 480
agtggccccc accctcagcc cgctcctgcc cgcccagcac ccccaggccc tgggggacct 540
ggggttctca gactgccaaa gaagccttgc catctggcgc tcccatggct cttgcaacat 600
ctccccttcg tttttgaggg ggtcatgccg ggggagccac cagcccctca ctgggttcgg 660
aggagagtca ggaagggcca cgacaaagca gaaacatcgg atttggggaa cgcgtgtcaa 720
tcccttgtgc cgcagggctg ggcgggagag actgttctgt tccttgtgta actgtgttgc 780
tgaaagacta cctcgttctt gtcttgatgt gtcaccgggg caactgcctg ggggcgggga 840
tgggggcagg gtggaagcgg ctccccattt tataccaaag gtgctacatc tatgtgatgg 900
gtggggtggg gagggaatca ctggtgctat agaaattgag atgccccccc aggccagcaa 960
atgttccttt ttgttcaaag tctatttttа ttccttgata tttttctttt ttttttttt 1020
tttttgtgga tggggacttg tgaatttttc taaaggtgct atttaacatg ggaggagagc 1080
gtgtgcggct ccagcccagc ccgctgctca ctttccaccc tctctccacc tgcctctggc 1140
ttctcaggcc tctgctctcc gacctctctc ctctgaaacc ctcctccaca gctgcagccc 1200
atcctcccgg ctccctccta gtctgtcctg cgtcctctgt ccccgggttt cagagacaac 1260
ttcccaaagc acaaagcagt ttttcccccт aggggtggga ggaagcaaaa gactctgtac 1320
ctattttgta tgtgtataat aatttgagat gtttttaatt attttgattg ctggaataaa 1380
gcatgtggaa atgacccaaa cataatccgc agtggcctcc taatttcctt ctttggagtt 1440
gggggagggg tagacatggg gaaggggctt tggggtgatg ggcttgcctt ccattcctgc 1500
cctttccctc cccactattc tcttctagat ccctccataa ccccactccc ctttctctca 1560
cccttcttat accgcaaacc tttctacttc ctctttcatt ttctattctt gcaatttcct 1620
tgcacctttt ccaaatcctc ttctcccctg caataccata caggcaatcc acgtgcacaa 1680
cacacacaca cactcttcac atctggggtt gtccaaacct catacccact ccccttcaag 1740
cccatccact ctccaccccc tggatgccct gcacttggtg gcggtgggat gctcatggat 1800
actgggaggg tgaggggagt ggaacccgtg aggaggacct gggggcctct ccttgaactg 1860
acatgaaggg tcatctggcc tctgctccct tctcacccac gctgacctcc tgccgaagga 1920
gcaacgcaac aggagagggg tctgctgagc ctggcgaggg tctgggaggg accaggagga 1980
aggcgtgctc cctgctcgct gtcctggccc tgggggagtg agggagacag acacctggga 2040

gagctgtggg gaaggcactc gcaccgtgct cttgggaagg aaggagacct ggccctgctc 2100
accacggact gggtgcctcg acctcctgaa tccccagaac acaacccccc tgggctgggg 2160
tggtctgggg aaccatcgtg cccccgcctc ccgcctactc ctttttaagc tt 2212

<210> 19
<211> 729
<212> DNA
<213> 智人
<400> 19

ttggccaggc ctgaccctct tggacctttc ttctttgccg acaaccactg cccagcagcc 60
tctgggacct cggggtccca gggaacccag tccagcctcc tggctgttga cttcccattg 120
ctcttggagc caccaatcaa agagattcaa agagattcct gcaggccaga ggcggaacac 180
acctttatgg ctggggctct ccgtggtgtt ctggacccag cccctggaga caccattcac 240
ttttactgct ttgtagtgac tcgtgctctc caacctgtct tcctgaaaaa ccaaggcccc 300
cttcccccac ctcttccatg gggtgagact tgagcagaac aggggcttcc ccaagttgcc 360
cagaaagact gtctgggtga gaagccatgg ccagagcttc tcccaggcac aggtgttgca 420
ccagggactt ctgcttcaag ttttggggta aagacacctg gatcagactc caagggctgc 480
cctgagtctg ggacttctgc ctccatggct ggtcatgaga gcaaaccgta gtcccctgga 540
gacagcgact ccagagaacc tcttgggaga cagaagaggc atctgtgcac agctcgatct 600
tctacttgcc tgtggggagg ggagtgacag gtccacacac cacactgggt caccctgtcc 660
tggatgcctc tgaagagagg gacagaccgt cagaaactgg agagtttcta ttaaaggtca 720
tttaaacca 729

<210> 20
<211> 847
<212> DNA
<213> 智人
<400> 20

tcctccggga ccccagccct caggattcct gatgctccaa ggcgactgat gggcgctgga 60
tgaagtggca cagtcagctt ccctgggggc tggtgtcatg ttgggctcct ggggcggggg 120
cacggcctgg catttcacgc attgctgcca ccccaggtcc acctgtctcc actttcacag 180
cctccaagtc tgtggctctt cccttctgtc ctccgagggg cttgccttct ctcgtgtcca 240
gtgaggtgct cagtgatcgg cttaacttag agaagcccgc cccctcccct tctccgtctg 300
tcccaagagg gtctgctctg agcctgcgtt cctaggtggc tcggcctcag ctgcctgggt 360
tgtggccgcc ctagcatcct gtatgcccac agctactgga atccccgctg ctgctccggg 420
ccaagcttct ggttgattaa tgagggcatg gggtggtccc tcaagacctt cccctacctt 480
ttgtggaacc agtgatgcct caaagacagt gtcccctcca cagctgggtg ccaggggcag 540
gggatcctca gtatagccgg tgaaccctga taccaggagc ctgggcctcc ctgaacccct 600
ggcttccagc catctcatcg ccagcctcct cctggacctc ttggccccca gccccttccc 660
cacacagccc cagaagggtc ccagagctga ccccactcca ggacctaggc ccagcccctc 720
agcctcatct ggagcccctg aagaccagtc ccacccacct ttctggcctc atctgacact 780

gctccgcatc ctgctgtgtg tcctgttcca tgttccggtt ccatccaaat acactttctg 840
gaacaaa 847
<210> 21
<211> 110
<212> DNA
<213> 智人
<400> 21
gctggagcct cggtggccat gcttcttgcc ccttgggcct ccccccagcc cctcctcccc 60
ttcctgcacc cgtacccccg tggtctttga ataaagtctg agtgggcggc 110
<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人
<400> 22
ttggaccctc gtacagaagc taatacg 27
<210> 23
<211> 189
<212> DNA
<213> 智人
<400> 23
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120
tttttttttt tttttttttt tttttttttt cttcctactc aggctttatt 180
caaagacca 189
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 24
ccttgacctt ctggaacttc 20
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 25
ccaagcactg aaacggatat 20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA

<213> 智人
<400> 26
gatgaaaagt gctccaagga 20
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 27
aaccgtgatg aaaaggtacc 20
<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 28
tcatgcagat tggaaaggtc 20
<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 29
cttcttggac tgtccagagg 20
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 30
gcagtccctg atacaagaac 20
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人
<400> 31
gattgaaggt ggctcgctac 20
<210> 32
<211> 75
<212> DNA
<213> 智人
<400> 32
atgatgccat cctcagtctc atggggtatt ttgctcttgg cgggtctgtg ctgtctcgtg 60

ccggtgtcgc tcgca 75

<210> 33

<211> 90

<212> DNA

<213> 智人

<400> 33

atggccggac cggcgactca gtcgcccatg aaactcatgg ccctgcagtt gttgctttgg 60

cactcagccc tctggaccgt ccaagaggcg 90

<210> 34

<211> 137

<212> DNA

<213> 智人

<400> 34

atgcagagag tgaacatgat tatggccgag tccccatcgc tcatcacaat ctgcctgctt 60

ggtacctgct ttccgccgaa tgcactgtct ttctggatca cgagaatgcg aataagatct 120

tgaaccgacc caaacgg 137

<210> 35

<211> 63

<212> DNA

<213> 智人

<400> 35

atgaaaggat cattgctgtt gctcctcgtg tcgaaccttc tgctttgcca gtccgtagcc 60

ccc 63

<210> 36

<211> 72

<212> DNA

<213> 智人

<400> 36

atgaaatggg tgacgttcat ctcactgttg tttttgttct cgtccgccta ctccagggga 60

gtattccgcc ga 72

<210> 37

<211> 63

<212> DNA

<213> 智人

<400> 37

atgtggtggc ggctctggtg gctgctcctg ttgctcctct tgctgtggcc catggtgtgg 60

gca 63

<210> 38

<211> 95

<212> DNA
<213> 智人
<400> 38
tgctctttaa cctccgcatc ctgttgaata acgctgcgtt ccgaaatggg cataacttca 60
tggtacgcaa cttcagatgc ggccagccac tccag 95
<210> 39
<211> 87
<212> DNA
<213> 智人
<400> 39
atgtccgtct tgacacccct gctcttgaga gggctgacgg ggtccgctag acgcctgccg 60
gtaccgcgag cgaagatcca ctccctg 87
<210> 40
<211> 87
<212> DNA
<213> 智人
<400> 40
atgagcgtgc tcactccgtt gcttcttcga gggcttacgg gatcggctcg gaggttgccc 60
gtcccgagag cgaagatcca ttcgttg 87
<210> 41
<211> 175
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 41
tgacaaaaat aactttatct ccccagaatt ttagaatcca aaaacaggaa accacactac 60
taaaagaaaa atcaaccgag aaaaattctt tagcaaaaag tattctcgca gtaaaaatca 120
cttcatcgaa ttaaggtcaa aattatcgga acgttttatt tcgcataaga acact 175
<210> 42
<211> 69
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 42
atgctgagct ttgtggatac ccgcaccctg ctgctgctgg cggtgaccag ctgcctggcg 60
acctgccag 69
<210> 43

<211> 96
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 43
atgggcagca gccaggcgcc gcgcatgggc agcgtgggcg gccatggcct gatggcgctg 60
ctgatggcgg gcctgattct gccgggcatt ctggcg 96
<210> 44
<211> 51
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 44
atggcgggca ttttttattt tctgtttagc tttctgtttg gcatttgcga t 51
<210> 45
<211> 66
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 45
atggaaaacc gcctgctgcg cgtgtttctg gtgtgggcgg cgctgaccat ggatggcgcg 60
agcgcg 66
<210> 46
<211> 81
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 46
atggcgcgcc agggctgctt tggcagctat caggtgatta gcctgtttac ctttgcgatt 60
ggcgtgaacc tgtgcctggg c 81
<210> 47
<211> 57
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>

<223> 未知序列的描述:细菌信号序列

<400> 47

atgagccgcc tgccggtgct gctgctgctg cagctgctgg tgcgcccggg cctgcag 57

<210> 48

<211> 87

<212> DNA

<213> 未知序列

<220>

<223> 未知序列的描述:细菌信号序列

<400> 48

atgaaacagc agaaacgcct gtatgcgcgc ctgctgaccc tgctgtttgc gctgattttt 60

ctgctgccgc atagcagcgc gagcgcg 87

<210> 49

<211> 78

<212> DNA

<213> 智人

<400> 49

atggcgacgc cgctgcctcc gccctccccg cggcacctgc ggctgctgcg gctgctgctc 60

tccgccctcg tcctcggc 78

<210> 50

<211> 54

<212> DNA

<213> 智人

<400> 50

atgaaggctc cgggtcggct cgtgctcatc atcctgtgct ccgtggtctt ctct 54

<210> 51

<211> 45

<212> DNA

<213> 智人

<400> 51

atgcttcagc tttggaaact tgttctcctg tgcggcgtgc tcact 45

<210> 52

<211> 39

<212> DNA

<213> 智人

<400> 52

atgctttatc tccagggttg gagcatgcct gctgtggca 39

<210> 53

<211> 144

<212> DNA
<213> 智人
<400> 53
atggataacg tgcagccgaa aataaaacat cgccccttct gcttcagtgt gaaaggccac 60
gtgaagatgc tgcggctgga tattatcaac tcactggtaa caacagtatt catgctcatc 120
gtatctgtgt tggcactgat acca 144
<210> 54
<211> 96
<212> DNA
<213> 智人
<400> 54
atgccctgcc tagaccaaca gctcactgtt catgccctac cctgccctgc ccagccctcc 60
tctctggcct tctgccaagt ggggttctta acagca 96
<210> 55
<211> 138
<212> DNA
<213> 智人
<400> 55
atgaaaacct tgttcaatcc agcccctgcc attgctgacc tggatcccca gttctacacc 60
ctctcagatg tgttctgctg caatgaaagt gaggctgaga ttttaactgg cctcacggtg 120
ggcagcgctg cagatgct 138
<210> 56
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 56
atgaagcctc tccttgttgt gtttgtcttt cttttccttt gggatccagt gctggca 57
<210> 57
<211> 63
<212> DNA
<213> 智人
<400> 57
atgtcctgtt ccctaaagtt tactttgatt gtaatttttt tttactgttg gctttcatcc 60
agc 63
<210> 58
<211> 210
<212> DNA
<213> 智人
<400> 58

atggttctta ctaaacctct tcaaagaaat ggcagcatga tgagctttga aaatgtgaaa 60
gaaaagagca gagaaggagg gccccatgca cacacacccg aagaagaatt gtgtttcgtg 120
gtaacacact accctcaggt tcagaccaca ctcaacctgt ttttccatat attcaaggtt 180
cttactcaac cactttccct tctgtggggt 210

<210> 59
<211> 96
<212> DNA
<213> 智人
<400> 59
atggccaccc cgccattccg gctgataagg aagatgtttt ccttcaaggt gagcagatgg 60
atggggcttg cctgcttccg gtccctggcg gcatcc 96

<210> 60
<211> 87
<212> DNA
<213> 智人
<400> 60
atgagctttt tccaactcct gatgaaaagg aaggaactca ttcccttggt ggtgttcatg 60
actgtggcgg cgggtggagc ctcatct 87

<210> 61
<211> 123
<212> DNA
<213> 智人
<400> 61
atggtctcag ctctgcgggg agcacccctg atcagggtgc actcaagccc tgtttcttct 60
ccttctgtga gtggaccacg gaggctggtg agctgcctgt catcccaaag ctcagctctg 120
agc 123

<210> 62
<211> 60
<212> DNA
<213> 智人
<400> 62
atgatggggt ccccagtgag tcatctgctg gccggcttct gtgtgtgggt cgtcttgggc 60

<210> 63
<211> 69
<212> DNA
<213> 智人
<400> 63
atggcaagca tggctgccgt gctcacctgg gctctggctc ttctttcagc gttttcggcc 60
acccaggca 69

<210> 64
<211> 135
<212> DNA
<213> 智人
<400> 64
atggtgctca tgtggaccag tggtgacgcc ttcaagacgg cctacttcct gctgaagggt 60
gcccctctgc agttctccgt gtgcggcctg ctgcaggtgc tggtggacct ggccatcctg 120
gggcaggcct acgcc 135
<210> 65
<211> 204
<212> DNA
<213> 智人
<400> 65
atggattttg tcgctggagc catcggaggc gtctgcggtg ttgctgtggg ctacccccctg 60
gacacggtga aggtcaggat ccagacggag ccaaagtaca caggcatctg gcactgcgtc 120
cgggatacgt atcaccgaga gcgcgtgtgg ggcttctacc ggggcctctc gctgcccgtg 180
tgcacggtgt ccctggtatc ttcc 204
<210> 66
<211> 147
<212> DNA
<213> 智人
<400> 66
atggagaagc ccctcttccc attagtgcct ttgcattggt ttggctttgg ctacacagca 60
ctggttgttt ctggtgggat cgttggctat gtaaaaacag gcagcgtgcc gtccctggct 120
gcagggctgc tcttcggcag tctagcc 147
<210> 67
<211> 45
<212> DNA
<213> 智人
<400> 67
atgggtctgc tccttccccct ggcactctgc atcctagtcc tgtgc 45
<210> 68
<211> 78
<212> DNA
<213> 智人
<400> 68
atggggatcc agacgagccc cgtcctgctg gcctccctgg gggtggggct ggtcactctg 60
ctcggcctgg ctgtgggc 78
<210> 69

<211> 75
<212> DNA
<213> 智人
<400> 69
atgtcggacc tgctactact gggcctgatt gggggcctga ctctcttact gctgctgacg 60
ctgctagcct ttgcc 75
<210> 70
<211> 87
<212> DNA
<213> 智人
<400> 70
atggagactg tggtgattgt tgccataggt gtgctggcca ccatgtttct ggcttcgttt 60
gcagccttgg tgctggtttg caggcag 87
<210> 71
<211> 105
<212> DNA
<213> 智人
<400> 71
atgcgcggct ctgtggagtg cacctggggt tgggggcact gtgcccccag ccccctgctc 60
ctttggactc tacttctgtt tgcagcccca tttggcctgc tgggg 105
<210> 72
<211> 171
<212> DNA
<213> 智人
<400> 72
atgatgccgt cccgtaccaa cctggctact ggaatcccca gtagtaaagt gaaatattca 60
aggctctcca gcacagacga tggctacatt gaccttcagt ttaagaaaac ccctcctaag 120
atcccttata aggccatcgc acttgccact gtgctgtttt tgattggcgc c 171
<210> 73
<211> 108
<212> DNA
<213> 智人
<400> 73
atggccctgc cccagatgtg tgacgggagc cacttggcct ccaccctccg ctattgcatg 60
acagtcagcg gcacagtggt tctggtggcc gggacgctct gcttcgct 108
<210> 74
<211> 63
<212> DNA
<213> 未知序列

<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 74
tgaaaaagtg gttcgttgct gccggcatcg gcgctgccgg actcatgctc tccagcgccg 60
cca 63
<210> 75
<211> 63
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 75
atgaaacaga gcaccattgc gctggcgctg ctgccgctgc tgtttacccc ggtgaccaaa 60
gcg 63
<210> 76
<211> 63
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 76
atgaaaaaaa ccgcgattgc gattgcggtg gcgctggcgg gctttgcgac cgtggcgcag 60
gcg 63
<210> 77
<211> 63
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 77
atgaaaaaac tgatgctggc gatttttttt agcgtgctga gctttccgag ctttagccag 60
agc 63
<210> 78
<211> 69
<212> DNA
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 78

atgaaaaaaa acattgcgtt tctgctggcg agcatgtttg tgtttagcat tgcgaccaac 60
gcgtatgcg 69
<210> 79
<211> 96
<212> DNA
<213> 智人
<400> 79
atgtttgcga aacgctttaa aaccagcctg ctgccgctgt ttgcgggctt tctgctgctg 60
tttcatctgg tgctggcggg cccggcggcg gcgagc 96
<210> 80
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 80
atgcgctttc cgagcatttt taccgcggtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57
<210> 81
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 81
atgcgctttc cgagcatttt taccaccgtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57
<210> 82
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 82
atgcgctttc cgagcatttt taccagcgtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57
<210> 83
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 83
atgcgctttc cgagcatttt tacccatgtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57
<210> 84
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 84
atgcgctttc cgagcatttt taccattgtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57

<210> 85
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 85
atgcgctttc cgagcatttt tacctttgtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57
<210> 86
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 86
atgcgctttc cgagcatttt taccgaagtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57
<210> 87
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人
<400> 87
atgcgctttc cgagcatttt taccggcgtg ctgtttgcgg cgagcagcgc gctggcg 57
<210> 88
<211> 63
<212> DNA
<213> 智人
<400> 88
atgcgttcct ccccccctcct ccgctccgcc gttgtggccg ccctgccggt gttggccctt 60
gcc 63
<210> 89
<211> 66
<212> DNA
<213> 智人
<400> 89
atgggcgcgg cggccgtgcg ctggcacttg tgcgtgctgc tggccctggg cacacgcggg 60
cggctg 66
<210> 90
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成信号序列
<400> 90

atgaggagct cccttgtgct gttctttgtc tctgcgtgga cggccttggc cag 53

<210> 91

<211> 96

<212> DNA

<213> 智人

<400> 91

atgctcaggg gtccgggacc cgggcggctg ctgctgctag cagtcctgtg cctggggaca 60

tcggtgcgct gcaccgaaac cgggaagagc aagagg 96

<210> 92

<211> 69

<212> DNA

<213> 智人

<400> 92

atgcttaggg gtccggggcc cgggctgctg ctgctggccg tccagctggg gacagcggtg 60

ccctccacg 69

<210> 93

<211> 93

<212> DNA

<213> 智人

<400> 93

atgcgccggg gggccctgac cgggctgctc ctggtcctgt gcctgagtgt tgtgctacgt 60

gcagcccccc ctgcaacaag caagaagcgc agg 93

<210> 94

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人

<400> 94

Met Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Ala Gly Leu Cys

1 5 10 15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala

20

<210> 95

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 95

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln

1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala

20 25 30

<210> 96
<211> 46
<212> PRT
<213> 智人
<400> 96

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr
1 5 10 15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg
35 40 45

<210> 97
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人
<400> 97

Met Lys Gly Ser Leu Leu Leu Leu Leu Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15
Gln Ser Val Ala Pro
20

<210> 98
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人
<400> 98

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
20

<210> 99
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 99

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
1 5 10 15
Met Trp Ala

<210> 100

<211> 32
<212> PRT
<213> 智人
<400> 100
Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn
1 5 10 15
Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln
20 25 30
<210> 101
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人
<400> 101
Met Ser Val Leu Thr Pro Leu Leu Leu Arg Gly Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15
Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys Ile His Ser Leu
20 25
<210> 102
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人
<400> 102
Met Ser Val Leu Thr Pro Leu Leu Leu Arg Gly Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15
Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys Ile His Ser Leu
20 25
<210> 103
<211> 59
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 103
Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln
1 5 10 15
Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala
20 25 30
Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr
50 55

<210> 104
<211> 23
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 104
Met Leu Ser Phe Val Asp Thr Arg Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Thr
1 5 10 15
Ser Cys Leu Ala Thr Cys Gln
20

<210> 105
<211> 32
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 105
Met Gly Ser Ser Gln Ala Pro Arg Met Gly Ser Val Gly Gly His Gly
1 5 10 15
Leu Met Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Leu Ala
20 25 30

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:病毒信号序列
<400> 106
Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Leu Phe Ser Phe Leu Phe Gly Ile Cys
1 5 10 15
Asp

<210> 107
<211> 22
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>

<223> 未知序列的描述:病毒信号序列

<400> 107

Met Glu Asn Arg Leu Leu Arg Val Phe Leu Val Trp Ala Ala Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Gly Ala Ser Ala
20

<210> 108

<211> 27

<212> PRT

<213> 未知序列

<220>

<223> 未知序列的描述:病毒信号序列

<400> 108

Met Ala Arg Gln Gly Cys Phe Gly Ser Tyr Gln Val Ile Ser Leu Phe
1 5 10 15

Thr Phe Ala Ile Gly Val Asn Leu Cys Leu Gly
20 25

<210> 109

<211> 19

<212> PRT

<213> 未知序列

<220>

<223> 未知序列的描述:细菌信号序列

<400> 109

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro
1 5 10 15

Gly Leu Gln

<210> 110

<211> 29

<212> PRT

<213> 未知序列

<220>

<223> 未知序列的描述:细菌信号序列

<400> 110

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ser Ala Ser Ala
20 25

<210> 111

<211> 22
<212> PRT
<213> 智人
<400> 111
Met Ala Thr Pro Leu Pro Pro Pro Ser Pro Arg His Leu Arg Leu Leu
1 5 10 15
Arg Leu Leu Leu Ser Gly
20
<210> 112
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人
<400> 112
Met Lys Ala Pro Gly Arg Leu Val Leu Ile Ile Leu Cys Ser Val Val
1 5 10 15
Phe Ser
<210> 113
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人
<400> 113
Met Leu Gln Leu Trp Lys Leu Leu Cys Gly Val Leu Thr
1 5 10
<210> 114
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人
<400> 114
Met Leu Tyr Leu Gln Gly Trp Ser Met Pro Ala Val Ala
1 5 10
<210> 115
<211> 48
<212> PRT
<213> 智人
<400> 115
Met Asp Asn Val Gln Pro Lys Ile Lys His Arg Pro Phe Cys Phe Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly His Val Lys Met Leu Arg Leu Asp Ile Ile Asn Ser Leu
20 25 30

Val Thr Thr Val Phe Met Leu Ile Val Ser Val Leu Ala Leu Ile Pro
35 40 45

<210> 116
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人
<400> 116

Met Pro Cys Leu Asp Gln Gln Leu Thr Val His Ala Leu Pro Cys Pro
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ser Ser Leu Ala Phe Cys Gln Val Gly Phe Leu Thr Ala
20 25 30

<210> 117
<211> 46
<212> PRT
<213> 智人
<400> 117

Met Lys Thr Leu Phe Asn Pro Ala Pro Ala Ile Ala Asp Leu Asp Pro
1 5 10 15
Gln Phe Tyr Thr Leu Ser Asp Val Phe Cys Cys Asn Glu Ser Glu Ala
20 25 30
Glu Ile Leu Thr Gly Leu Thr Val Gly Ser Ala Ala Asp Ala
35 40 45

<210> 118
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 118

Met Lys Pro Leu Leu Val Val Phe Val Phe Leu Phe Leu Trp Asp Pro
1 5 10 15
Val Leu Ala

<210> 119
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人
<400> 119

Met Ser Cys Ser Leu Lys Phe Thr Leu Ile Val Ile Phe Phe Thr Cys
1 5 10 15
Thr Leu Ser Ser Ser
20

<210> 120
<211> 70
<212> PRT
<213> 智人
<400> 120
Met Val Leu Thr Lys Pro Leu Gln Arg Asn Gly Ser Met Met Ser Phe
1 5 10 15
Glu Asn Val Lys Glu Lys Ser Arg Glu Gly Gly Pro His Ala His Thr
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Leu Cys Phe Val Val Thr His Thr Pro Gln Val Gln
35 40 45
Thr Thr Leu Asn Leu Phe Phe His Ile Phe Lys Val Leu Thr Gln Pro
50 55 60
Leu Ser Leu Leu Trp Gly
65 70
<210> 121
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人
<400> 121
Met Ala Thr Pro Pro Phe Arg Leu Ile Arg Lys Met Phe Ser Phe Lys
1 5 10 15
Val Ser Arg Trp Met Gly Leu Ala Cys Phe Arg Ser Leu Ala Ala Ser
20 25 30
<210> 122
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人
<400> 122
Met Ser Phe Phe Gln Leu Leu Met Lys Arg Lys Glu Leu Ile Pro Leu
1 5 10 15
Val Val Phe Met Thr Val Ala Ala Gly Gly Ala Ser Ser
20 25
<210> 123
<211> 41
<212> PRT
<213> 智人
<400> 123
Met Val Ser Ala Leu Arg Gly Ala Pro Leu Ile Arg Val His Ser Ser

1 5 10 15
Pro Val Ser Ser Pro Ser Val Ser Gly Pro Ala Ala Leu Val Ser Cys
20 25 30
Leu Ser Ser Gln Ser Ser Ala Leu Ser
35 40
<210> 124
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人
<400> 124
Met Met Gly Ser Pro Val Ser His Leu Leu Ala Gly Phe Cys Val Trp
1 5 10 15
Val Val Leu Gly
20
<210> 125
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人
<400> 125
Met Ala Ser Met Ala Ala Val Leu Thr Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15
Ala Phe Ser Ala Thr Gln Ala
20
<210> 126
<211> 45
<212> PRT
<213> 智人
<400> 126
Met Val Leu Met Trp Thr Ser Gly Asp Ala Phe Lys Thr Ala Tyr Phe
1 5 10 15
Leu Leu Lys Gly Ala Pro Leu Gln Phe Ser Val Cys Gly Leu Leu Gln
20 25 30
Val Leu Val Asp Leu Ala Ile Leu Gly Gln Ala Thr Ala
35 40 45
<210> 127
<211> 68
<212> PRT
<213> 智人
<400> 127

Met Asp Phe Val Ala Gly Ala Ile Gly Gly Val Cys Gly Val Ala Val
1 5 10 15
Gly Tyr Pro Leu Asp Thr Val Lys Val Arg Ile Gln Thr Glu Pro Leu
20 25 30
Tyr Thr Gly Ile Trp His Cys Val Arg Asp Thr Tyr His Arg Glu Arg
35 40 45
Val Trp Gly Phe Tyr Arg Gly Leu Ser Leu Pro Val Cys Thr Val Ser
50 55 60
Leu Val Ser Ser
65

<210> 128
<211> 49
<212> PRT
<213> 智人
<400> 128

Met Glu Lys Pro Leu Phe Pro Leu Val Pro Leu His Trp Phe Gly Phe
1 5 10 15
Gly Tyr Thr Ala Leu Val Val Ser Gly Gly Ile Val Gly Tyr Val Lys
20 25 30
Thr Gly Ser Val Pro Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu Phe Gly Ser Leu
35 40 45
Ala

<210> 129
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人
<400> 129

Met Gly Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Cys Ile Leu Val Leu Cys
1 5 10 15

<210> 130
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人
<400> 130

Met Gly Ile Gln Thr Ser Pro Val Leu Leu Ala Ser Leu Gly Val Gly
1 5 10 15
Leu Val Thr Leu Leu Gly Leu Ala Val Gly
20 25

<210> 131

<211> 25
<212> PRT
<213> 智人
<400> 131
Met Ser Asp Leu Leu Leu Leu Gly Leu Ile Gly Gly Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Phe Ala
20 25
<210> 132
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人
<400> 132
Met Glu Thr Val Val Ile Val Ala Ile Gly Val Leu Ala Thr Ile Phe
1 5 10 15
Leu Ala Ser Phe Ala Ala Leu Val Leu Val Cys Arg Gln
20 25
<210> 133
<211> 35
<212> PRT
<213> 智人
<400> 133
Met Ala Gly Ser Val Glu Cys Thr Trp Gly Trp Gly His Cys Ala Pro
1 5 10 15
Ser Pro Leu Leu Leu Trp Thr Leu Leu Leu Phe Ala Ala Pro Phe Gly
20 25 30
Leu Leu Gly
35
<210> 134
<211> 57
<212> PRT
<213> 智人
<400> 134
Met Met Pro Ser Arg Thr Asn Leu Ala Thr Gly Ile Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Val Lys Tyr Ser Arg Leu Ser Ser Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Asp Leu
20 25 30
Gln Phe Lys Lys Thr Pro Pro Lys Ile Pro Tyr Lys Ala Ile Ala Leu
35 40 45

Ala Thr Val Leu Phe Leu Ile Gly Ala
50 55

<210> 135
<211> 36
<212> PRT
<213> 智人
<400> 135

Met Ala Leu Pro Gln Met Cys Asp Gly Ser His Leu Ala Ser Thr Leu
1 5 10 15
Arg Tyr Cys Met Thr Val Ser Gly Thr Val Val Leu Val Ala Gly Thr
20 25 30
Leu Cys Phe Ala
35

<210> 136
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人
<400> 136

Met Lys Lys Trp Phe Val Ala Ala Gly Ile Gly Ala Gly Leu Leu Met
1 5 10 15
Leu Ser Ser Ala Ala
20

<210> 137
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人
<400> 137

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15
Pro Val Thr Lys Ala
20

<210> 138
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人
<400> 138

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala

20

<210> 139
<211> 21
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 139

Met Lys Lys Leu Met Leu Ala Ile Phe Phe Ser Val Leu Ser Phe Pro
1 5 10 15
Ser Phe Ser Gln Ser
20

<210> 140
<211> 23
<212> PRT
<213> 未知序列
<220>
<223> 未知序列的描述:细菌信号序列
<400> 140

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15
Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala
20

<210> 141
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人
<400> 141

Met Phe Ala Lys Arg Phe Lys Thr Ser Leu Leu Pro Leu Phe Ala Gly
1 5 10 15
Phe Leu Leu Leu Phe His Leu Val Leu Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ser
20 25 30

<210> 142
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 142

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala
<210> 143
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 143
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Thr Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala
<210> 144
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 144
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ser Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala
<210> 145
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 145
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr His Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala
<210> 146
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 146
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ile Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala
<210> 147
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 147
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Phe Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15
Ala Leu Ala
<210> 148
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 148
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Glu Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala
<210> 149
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人
<400> 149
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Gly Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala
<210> 150
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人
<400> 150
Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
1 5 10 15
Val Leu Ala Leu Ala
20
<210> 151
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人
<400> 151
Met Gly Ala Ala Ala Val Arg Trp His Leu Cys Val Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15
Gly Thr Arg Gly Arg Leu
20
<210> 152
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成信号序列
<400> 152
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
1 5 10 15
Ala
<210> 153
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人
<400> 153
Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu
1 5 10 15
Cys Leu Gly Thr Ser Val Arg Cys Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg
20 25 30
<210> 154
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人
<400> 154
Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Gln Cys
1 5 10 15
Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala
20 25
<210> 155
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人
<400> 155
Met Arg Arg Gly Ala Leu Thr Gly Leu Leu Leu Val Leu Cys Leu Ser
1 5 10 15
Val Val Leu Arg Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Lys Lys Arg Arg
20 25 30
<210> 156
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人
<220>

<221> MOD_RES
<222> (2)..(3)
<223> 任何氨基酸
<400> 156
Arg Xaa Xaa Arg
1
<210> 157
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Lys或ARg
<400> 157
Arg Xaa Xaa Arg
1
<210> 158
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Lys或Arg
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(5)
<223> 任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Lys或Arg
<400> 158
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 159

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Lys或Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(7)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys或Arg

<400> 159

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 160

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 160

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 161

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 161

Leu Val Pro Arg

1

<210> 162

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Ala, Phe, Gly, Ile, Leu, Thr, Val或Met
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ala, Phe, Gly, Ile, Leu, Thr, Val或Trp
<400> 162
Xaa Xaa Pro Arg
1
<210> 163
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人
<400> 163
Ile Glu Gly Arg
1
<210> 164
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人
<400> 164
Ile Asp Gly Arg
1
<210> 165
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人
<400> 165
Ala Glu Gly Arg
1
<210> 166
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Ala, Phe, Gly, Ile, Leu, Thr, Val或Met

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Asp或Glu
<400> 166
Xaa Xaa Gly Arg
1
<210> 167
<211> 615
<212> DNA
<213> 智人
<400> 167
atggctggac ctgccaccca gagccccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg 60
cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc acccccctgg gccctgccag ctccctgccc 120
cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg 180
ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc 240
ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag 300
ctggcaggct gcttgagcca actccatagc ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag 360
gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt cccaccttgg acacactgca gctggacgtc 420
gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg 480
cagcccaccc agggtgccat gccggccttc gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg 540
gtcctggttg cctcccatct gcagagcttc ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac 600
cttgcccagc cctga 615
<210> 168
<211> 800
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 168
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggct ggacctgcca cccagagccc catgaagctg atggccctgc agctgctgct 120
gtggcacagt gcactctgga cagtgcagga agccaccccc ctgggccctg ccagctccct 180
gccccagagc ttcctgctca agtgcttaga gcaagtgagg aagatccagg gcgatggcgc 240
agcgctccag gagaagctgt gtgccaccta caagctgtgc caccccgagg agctggtgct 300
gctcggacac tctctgggca tcccctgggc tcccctgagc agctgcccca gccaggccct 360
gcagctggca ggctgcttga gccaactcca tagcggcctt ttcctctacc aggggctcct 420
gcaggccctg gaagggatct cccccgagtt gggtcccacc ttggacacac tgcagctgga 480
cgtcgccgac tttgccacca ccatctggca gcagatggaa gaactgggaa tggcccctgc 540

cctgcagccc acccagggtg ccatgccggc cttcgcctct gctttccagc gccgggcagg 600
aggggtcctg gttgcctccc atctgcagag cttcctggag gtgtcgtacc gcgttctacg 660
ccaccttgcc cagccctgaa gcgctgcctt ctgcggggct tgccttctgg ccatgccctt 720
cttctctccc ttgcacctgt acctcttggt ctttgaataa agcctgagta ggaaggcggc 780
cgctcgagca tgcatctaga 800

<210> 169
<211> 800
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 169

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggcc ggtcccgcga cccaaagccc catgaaactt atggccctgc agttgctgct 120
ttggcactcg gccctctgga cagtccaaga agcgactcct ctcggacctg cctcatcgtt 180
gccgcagtca ttccttttga agtgtctgga gcaggtgcga aagattcagg gcgatggagc 240
cgcactccaa gagaagctct gcgcgacata caaactttgc catcccgagg agctcgtact 300
gctcgggcac agcttgggga ttccctgggc tcctctctcg tcctgtccgt cgcaggcttt 360
gcagttggca gggtgccttt cccagctcca ctccggtttg ttcttgtatc agggactgct 420
gcaagccctt gagggaatct cgccagaatt gggcccgacg ctggacacgt tgcagctcga 480
cgtggcggat ttcgcaacaa ccatctggca gcagatggag gaactgggga tggcacccgc 540
gctgcagccc acgcaggggg caatgccggc ctttgcgtcc gcgtttcagc gcagggcggg 600
tggagtcctc gtagcgagcc accttcaatc atttttggaa gtctcgtacc gggtgctgag 660
acatcttgcg cagccgtgaa gcgctgcctt ctgcggggct tgccttctgg ccatgccctt 720
cttctctccc ttgcacctgt acctcttggt ctttgaataa agcctgagta ggaaggcggc 780
cgctcgagca tgcatctaga 800

<210> 170
<211> 758
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 170

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gccggucccg 60
cgacccaaag ccccaugaaa cuuauggccc ugcaguugcu gcuuuggcac ucggcccucu 120
ggacagucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugccgcag ucauuccuuu 180
ugaaagugucu ggagcaggug cgaaagauuc agggcgaugg agccgcacuc caagagaagc 240
ucugcgcgac auacaaacuu ugccaucccg aggagcucgu acugcucggg cacagcuugg 300
ggauucccug ggcuccucuc ucguccuguc cgucgcaggc uuugcaguug gcagggugcc 360

uuucccagcu ccacuccggu uuguucuugu aucagggacu gcugcaagcc cuugagggaa 420
ucucgccaga auugggcccg acgcuggaca cguugcagcu cgacguggcg gauuucgcaa 480
caaccaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgcgcugcag cccacgcagg 540
gggcaaugcc ggccuuugcg uccgcguuuc agcgcagggc ggguggaguc cucguagcga 600
gccaccuuca aucauuuuug gaagucucgu accgggugcu gagacaucuu gcgcagccgu 660
gaagcgcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 720
uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 758

<210> 171
<211> 854
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 171

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug guauccaagg 60
gggaggagga caacauggcg aucaucaagg aguucaugcg auucaaggug cacauggaag 120
guucggucaa cggacacgaa uuugaaaucg aaggagaggg ugaaggaagg cccuaugaag 180
ggacacagac cgcgaaacuc aaggucacga aaggggacc acuuccuuuc gccugggaca 240
uucuuucgcc ccaguuuaug uacgggucca aagcauaugu gaagcauccc gccgauauuc 300
cugacuaucu gaaacucagc uuuccgagg gauucaagug ggagcggguc augaacuuug 360
aggacggggg uguagucacc guaacccaag acucaagccu ccaagacggc gaguucaucu 420
acaaggucaa acugcggggg acuaacuuuc cgucggaugg gccggugaug cagaagaaaa 480
cgaugggaug ggaagcguca ucggagagga uguacccaga agauggugca uugaaggggg 540
agaucaagca gagacugaag uugaaagaug ggggacauua ugaugccgag gugaaaacga 600
cauacaaagc gaaaaagccg gugcagcuuc ccggagcgua uaaugugaau aucaaguugg 660
auauuacuuc acacaaugag gacuacacaa uugucgaaca guacgaacgc gcugagggua 720
gacacucgac gggaggcaug gacgaguugu acaaaugaua agcugccuuc ugcggggcuu 780
gccuucuggc caugcccuuc uucucucccu ugcaccugua ccucuugguc uuugaauaaa 840
gccugaguag gaag 854

<210> 172
<211> 896
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 172

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggta tccaaggggg aggaggacaa catggcgatc atcaaggagt tcatgcgatt 120
caaggtgcac atggaaggtt cggtcaacgg acacgaattt gaaatcgaag gagagggtga 180

aggaaggccc tatgaaggga cacagaccgc gaaactcaag gtcacgaaag ggggaccact 240
tcctttcgcc tgggacattc tttcgcccca gtttatgtac gggtccaaag catatgtgaa 300
gcatcccgcc gatattcctg actatctgaa actcagcttt cccgagggat tcaagtggga 360
gcgggtcatg aactttgagg acgggggtgt agtcaccgta acccaagact caagcctcca 420
agacggcgag ttcatctaca aggtcaaact gcgggggact aactttccgt cggatgggcc 480
ggtgatgcag aagaaaacga tgggatggga agcgtcatcg gagaggatgt acccagaaga 540
tggtgcattg aagggggaga tcaagcagag actgaagttg aaagatgggg gacattatga 600
tgccgaggtg aaaacgacat acaaagcgaa aaagccggtg cagcttcccg gagcgtataa 660
tgtgaatatc aagttggata ttacttcaca caatgaggac tacacaattg tcgaacagta 720
cgaacgcgct gagggtagac actcgacggg aggcatggac gagttgtaca aatgataagc 780
tgccttctgc ggggcttgcc ttctggccat gcccttcttc tctcccttgc acctgtacct 840
cttggtcttt gaataaagcc tgagtaggaa ggcggccgct cgagcatgca tctaga 896

<210> 173
<211> 725
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 173

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug ggagugcacg 60
agugucccgc gugguugugg uugcugcugu cgcucuugag ccucccacug ggacugccug 120
ugcuguggggc accacccaga uugaucugcg acucacgggu acuugagagg uaccuucuug 180
aagccaaaga agccgaaaac aucacaaccg gaugcgccga gcacugcucc cucaaugaga 240
acauuacugu accggauaca aaggucaauu ucuaugcaug gaagagaaug gaaguaggac 300
agcaggccgu cgaagugugg caggggcucg cgcuuuuguc ggaggcggug uugcgggguc 360
aggcccuccu cgucaacuca ucacagccgu gggagccccu ccaacuucau gucgauaaag 420
cggugucggg gcuccgcagc uugacgacgu ugcuucgggc ucugggcgca caaaaggagg 480
cuauuucgcc gccugacgcg gccuccgcgg caccccuccg aacgaucacc gcggacacgu 540
uuaggaagcu uuuuagagug uacagcaauu uccuccgcgg aaagcugaaa uuguauacug 600
gugaagcgug uaggacaggg gaucgcugau aagcugccuu cugcggggcu ugccuucugg 660
ccaugcccuu cuucucuccc uugcaccugu accucuuggu cuuugaauaa agccugagua 720
ggaag 725

<210> 174
<211> 1536
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 174

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaau gcagcgcguc 60
aacaugauua uggccgaauc gccgggacuc aucacaaucu gccucuuggg uuaucucuug 120
ucggcagaau guaccguguu cuuggaucac gaaaacgcga acaaaauucu uaaucgcccg 180
aagcgguaua acuccgggaa acuugaggag uuugugcagg gcaaucuuga acgagagugc 240
auggaggaga aaugcuccuu ugaggaggcg agggaagugu uugaaaacac agagcgaaca 300
acggaguuuu ggaagcaaua cguagauggg gaccagugug agucgaaucc gugccucaau 360
gggggaucau guaaagauga caucaauagc uaugaaugcu ggugcccguu uggguuugaa 420
gggaagaacu gugagcugga ugugacgugc aacaucaaaa acggacgcug ugagcaguuu 480
uguaagaacu cggcugacaa uaagguagua ugcucgugca cagagggaua ccggcuggcg 540
gagaaccaaa aaucgugcga gcccgcaguc ccguucccuu gugggagggu gagcguguca 600
cagacuagca aguugacgag agcggagacu guauuccccg acguggacua cgucaacagc 660
accgaagccg aaacaauccu cgauaacauc acgcagagca cucaguccuu caaugacuuu 720
acgagggucg uaggugguga ggacgcgaaa cccggucagu uccccuggca gguggguauug 780
aacggaaaag ucgaugccuu uuguggaggu uccauuguca acgagaagug gauugucaca 840
gcggcacacu gcguagaaac aggagugaaa aucacgguag uggcgggaga gcauaacauu 900
gaagagacag agcacacgga acaaaagcga aaugucauca gaaucauucc acaccauaac 960
uauaacgcgg caaucaauaa guacaaucac gacaucgcac uuuuggagcu ugacgaaccu 1020
uuggugcuua auucguacgu caccccuauu uguauugccg acaaagagua uacaaacauc 1080
uucuugaaau ucggcuccgg guacguaucg ggcuggggca gaguguucca uaaggguaga 1140
uccgcacugg uguugcaaua ccucagggug ccccucgugg aucgagccac uugucugcgg 1200
uccaccaaau ucacaaucua caacaauaug uucugugcgg gauuccauga aggugggaga 1260
gauagcugcc agggagacuc aggggguccc cacgugacgg aagucgaggg gacgucauuu 1320
cugacgggaa uuaucucaug gggagaggaa ugugcgauga aggggaaaua uggcaucuac 1380
acuaaagugu cacgguaugu caauuggauc aaggaaaaga cgaaacucac gugaucagcc 1440
agcgcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu ucuucucucc cuugcaccug 1500
uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1536

<210> 175
<211> 767
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 175

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggga gtgcacgagt gtcccgcgtg gttgtggttg ctgctgtcgc tcttgagcct 120
cccactggga ctgcctgtgc tgggggcacc acccagattg atctgcgact cacgggtact 180
tgagaggtac cttcttgaag ccaaagaagc cgaaaacatc acaaccggat gcgccgagca 240
ctgctccctc aatgagaaca ttactgtacc ggatacaaag gtcaatttct atgcatggaa 300
gagaatggaa gtaggacagc aggccgtcga agtgtggcag gggctcgcgc ttttgtcgga 360

ggcggtgttg cggggtcagg ccctcctcgt caactcatca cagccgtggg agcccctcca 420
acttcatgtc gataaagcgg tgtcggggct ccgcagcttg acgacgttgc ttcgggctct 480
gggcgcacaa aaggaggcta tttcgccgcc tgacgcggcc tccgcggcac ccctccgaac 540
gatcaccgcg gacacgttta ggaagctttt tagagtgtac agcaatttcc tccgcggaaa 600
gctgaaattg tatactggtg aagcgtgtag gacaggggat cgctgataag ctgccttctg 660
cggggcttgc cttctggcca tgcccttctt ctctcccttg cacctgtacc tcttggtctt 720
tgaataaagc ctgagtagga aggcggccgc tcgagcatgc atctaga 767

<210> 176
<211> 750
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 176

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggga gtgcacgagt gtcccgcgtg gttgtggttg ctgctgtcgc tcttgagcct 120
cccactggga ctgcctgtgc tgggggcacc acccagattg atctgcgact cacgggtact 180
tgagaggtac cttcttgaag ccaaagaagc cgaaaacatc acaaccggat gcgccgagca 240
ctgctccctc aatgagaaca ttactgtacc ggatacaaag gtcaatttct atgcatggaa 300
gagaatggaa gtaggacagc aggccgtcga agtgtggcag gggctcgcgc ttttgtcgga 360
ggcggtgttg cggggtcagg ccctcctcgt caactcatca cagccgtggg agcccctcca 420
acttcatgtc gataaagcgg tgtcggggct ccgcagcttg acgacgttgc ttcgggctct 480
gggcgcacaa aaggaggcta tttcgccgcc tgacgcggcc tccgcggcac ccctccgaac 540
gatcaccgcg gacacgttta ggaagctttt tagagtgtac agcaatttcc tccgcggaaa 600
gctgaaattg tatactggtg aagcgtgtag gacaggggat cgctgataag ctgccttctg 660
cggggcttgc cttctggcca tgcccttctt ctctcccttg cacctgtacc tcttggtctt 720
tgaataaagc ctgagtagga aggcggccgc 750

<210> 177
<211> 1578
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 177

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccaatgca gcgcgtcaac atgattatgg ccgaatcgcc gggactcatc acaatctgcc 120
tcttgggtta tctcttgtcg gcagaatgta ccgtgttctt ggatcacgaa aacgcgaaca 180
aaattcttaa tcgcccgaag cggtataact ccgggaaact tgaggagttt gtgcagggca 240
atcttgaacg agagtgcatg gaggagaaat gctcctttga ggaggcgagg gaagtgtttg 300

aaaacacaga gcgaacaacg gagttttgga agcaatacgt agatggggac cagtgtgagt 360
cgaatccgtg cctcaatggg ggatcatgta aagatgacat caatagctat gaatgctggt 420
gcccgtttgg gtttgaaggg aagaactgtg agctggatgt gacgtgcaac atcaaaaacg 480
gacgctgtga gcagttttgt aagaactcgg ctgacaataa ggtagtatgc tcgtgcacag 540
agggataccg gctggcggag aaccaaaaat cgtgcgagcc cgcagtcccg ttcccttgtg 600
ggagggtgag cgtgtcacag actagcaagt tgacgagagc ggagactgta ttccccgacg 660
tggactacgt caacagcacc gaagccgaaa caatcctcga taacatcacg cagagcactc 720
agtccttcaa tgactttacg agggtcgtag gtggtgagga cgcgaaaccc ggtcagttcc 780
cctggcaggt ggtattgaac ggaaaagtcg atgccttttg tggaggttcc attgtcaacg 840
agaagtggat tgtcacagcg gcacactgcg tagaaacagg agtgaaaatc acggtagtgg 900
cgggagagca taacattgaa gagacagagc acacggaaca aaagcgaaat gtcatcagaa 960
tcattccaca ccataactat aacgcggcaa tcaataagta caatcacgac atcgcacttt 1020
tggagcttga cgaacctttg gtgcttaatt cgtacgtcac ccctatttgt attgccgaca 1080
aagagtatac aaacatcttc ttgaaattcg gctccgggta cgtatcgggc tggggcagag 1140
tgttccataa gggtagatcc gcactggtgt tgcaatacct cagggtgccc ctcgtggatc 1200
gagccacttg tctgcggtcc accaaattca caatctacaa caatatgttc tgtgcgggat 1260
tccatgaagg tgggagagat agctgccagg gagactcagg gggtccccac gtgacggaag 1320
tcgaggggac gtcatttctg acgggaatta tctcatgggg agaggaatgt gcgatgaagg 1380
ggaaatatgg catctacact aaagtgtcac ggtatgtcaa ttggatcaag gaaaagacga 1440
aactcacgtg atcagccagc gctgccttct gcggggcttg ccttctggcc atgcccttct 1500
tctctccctt gcacctgtac ctcttggtct ttgaataaag cctgagtagg aaggcggccg 1560
ctcgagcatg catctaga 1578

<210> 178
<211> 851
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 178

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gugagcaagg 60
gcgaggagga uaacauggcc aucaucaagg aguucaugcg cuucaaggug cacauggagg 120
gcuccgugaa cggccacgag uucgagaucg agggcgaggg cgagggccgc cccuacgagg 180
gcacccagac cgccaagcug aaggugacca aggguggccc ccugcccuuc gccugggaca 240
uccugucccc ucaguucaug uacggcucca aggccuacgu gaagcacccc gccgacaucc 300
ccgacuacuu gaagcugucc uucccgagg gcuucaagug ggagcgcgug augaacuucg 360
aggacggcgg cguggugacc gugacccagg acuccucccu gcaggacggc gaguucaucu 420
acaaggugaa gcugcgcggc accaacuucc ccuccgacgg ccccguaaug cagaagaaga 480
ccaugggcug ggaggccucc uccgagcgga uguaccccga ggacggcgcc cugaagggcg 540
agaucaagca gaggcugaag cugaaggacg gcggccacua cgacgcugag gucaagacca 600

ccuacaaggc caagaagccc gugcagcugc ccggcgccua caacgucaac aucaaguugg 660
acaucaccuc ccacaacgag gacuacacca ucguggaaca guacgaacgc gccgagggcc 720
gccacuccac cggcggcaug gacgagcugu acaagugagc ugccuucugc ggggcuugcc 780
uucuggccau gcccuucuuc ucucccuugc accuguaccu cuuggucuuu gaauaaagcc 840
ugaguaggaa g 851

<210> 179
<211> 1838
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 179

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggaa gatgcgaaga acatcaagaa gggacctgcc ccgttttacc ctttggagga 120
cggtacagca ggagaacagc tccacaaggc gatgaaacgc tacgccctgg tccccggaac 180
gattgcgttt accgatgcac atattgaggt agacatcaca tacgcagaat acttcgaaat 240
gtcggtgagg ctggcggaag cgatgaagag atatggtctt aacactaatc accgcatcgt 300
ggtgtgttcg gagaactcat tgcagttttt catgccggtc cttggagcac ttttcatcgg 360
ggtcgcagtc gcgccagcga acgacatcta caatgagcgg gaactcttga atagcatggg 420
aatctcccag ccgacggtcg tgtttgtctc caaaaagggg ctgcagaaaa tcctcaacgt 480
gcagaagaag ctccccatta ttcaaaagat catcattatg gatagcaaga cagattacca 540
agggttccag tcgatgtata cctttgtgac atcgcatttg ccgccagggt ttaacgagta 600
tgacttcgtc cccgagtcat ttgacagaga taaaaccatc gcgctgatta tgaattcctc 660
gggtagcacc ggtttgccaa agggggtggc gttgccccac cgcactgctt gtgtgcggtt 720
ctcgcacgct agggatccta tctttggtaa tcagatcatt cccgacacag caatcctgtc 780
cgtggtacct tttcatcacg gttttggcat gttcacgact ctcggctatt tgatttgcgg 840
tttcagggtc gtacttatgt atcggttcga ggaagaactg tttttgagat ccttgcaaga 900
ttacaagatc cagtcggccc tccttgtgcc aacgctttc tcattctttg cgaaatcgac 960
acttattgat aagtatgacc tttccaatct gcatgagatt gcctcagggg gagcgccgct 1020
tagcaaggaa gtcggggagg cagtggccaa gcgcttccac cttcccggaa ttcggcaggg 1080
atacgggctc acggagacaa catccgcgat ccttatcacg cccgagggtg acgataagcc 1140
gggagccgtc ggaaaagtgg tccccttctt tgaagccaag gtcgtagacc tcgacacggg 1200
aaaaaccctc ggagtgaacc agaggggcga gctctgcgtg agagggccga tgatcatgtc 1260
aggttacgtg aataaccctg aagcgacgaa tgcgctgatc gacaaggatg ggtggttgca 1320
ttcgggagac attgcctatt gggatgagga tgagcacttc tttatcgtag atcgacttaa 1380
gagcttgatc aaatacaaag gctatcaggt agcgcctgcc gagctcgagt caatcctgct 1440
ccagcacccc aacattttcg acgccggagt ggccgggttg cccgatgacg acgcgggtga 1500
gctgccagcg gccgtggtag tcctcgaaca tgggaaaaca atgaccgaaa aggagatcgt 1560
ggactacgta gcatcacaag tgacgactgc gaagaaactg aggggagggg tagtctttgt 1620

ggacgaggtc ccgaaaggct tgactgggaa gcttgacgct cgcaaaatcc gggaaatcct 1680
gattaaggca aagaaaggcg ggaaaatcgc tgtctgataa gctgccttct gcggggcttg 1740
ccttctggcc atgcccttct tctctccctt gcacctgtac ctcttggtct ttgaataaag 1800
cctgagtagg aaggcggccg ctcgagcatg catctaga 1838

<210> 180
<211> 1796
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 180

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gaagaugcga 60
agaacaucaa gaagggaccu gccccguuuu acccuuugga ggacgguaca gcaggagaac 120
agcuccacaa ggcgaugaaa cgcuacgccc ugguccccgg aacgauugcg uuuaccgaug 180
cacauauuga gguagacauc acauacgcag aauacuucga aaugucggug aggcuggcgg 240
aagcgaugaa gagauauggu cuuaacacua aucaccgcau cgugguugu ucggagaacu 300
cauugcaguu uuucaugccg guccuuggag cacuuuucau cggggucgca gucgcgccag 360
cgaacgacau cuacaaugag cgggaacucu ugaauagcau gggaaucucc cagccgacgg 420
ucguguuugu cuccaaaaag gggcugcaga aaauccucaa cgugcagaag aagcucccca 480
uuauucaaaa gaucaucauu auggauagca agacagauua ccaaggguuc cagucgaugu 540
auaccuuugu gacaucgcau uugccgccag gguuuaacga guaugacuuc gucccgagu 600
cauuugacag agauaaaacc aucgcgcuga uuaugaauuc cucggguagc accgguuugc 660
caaaaggggu ggcguugccc caccgcacug cuugugugcg guucucgcac gcuagggauc 720
cuaucuuugg uaaucagauc auucccgaca cagcaauccu guccguggua ccuuuucauc 780
acgguuuugg cauguucacg acucucggcu auuugauuug cgguuucagg gucguacuua 840
uguaucgguu cgaggaagaa cuguuuuuga gauccuugca agauuacaag auccagucgg 900
cccuccuugu gccaacgcuu uucucauucu uugcgaaauc gacacuuauu gauaaguaug 960
accuuuccaa ucugcaugag auugccucag ggggagcgcc gcuuagcaag gaagucgggg 1020
aggcaguggc caagcgcuuc caccuucccg gaauucggca gggauacggg cucacggaga 1080
caacauccgc gauccuuauc acgcccgagg gugacgauaa gccgggagcc gucggaaaag 1140
uggucccuu cuuugaagcc aaggucguag accucgacac gggaaaaacc cucggaguga 1200
accagagggg cgagcucugc gugagagggc cgaugaucau gucagguuac gugaauaacc 1260
cugaagcgac gaaugcgcug aucgacaagg auggguggguu gcauucggga gacauugccu 1320
auugggauga ggaugagcac uucuuuaucg uagaucgacu uaagagcuug aucaaauaca 1380
aaggcuauca gguagcgccu gccgagcucg agucaauccu gcuccagcac cccaacauuu 1440
ucgacgccgg aguggccggg uugcccgaug acgacgcggg ugagcugcca gcggccgugg 1500
uaguccucga acaugggaaa acaaugaccg aaaaggagau cguggacuac guagcaucac 1560
aagugacgac ugcgaagaaa cugaggggag ggguagucuu uguggacgag gucccgaaag 1620
gcuugacugg gaagcuugac gcucgcaaaa uccgggaaau ccugauuaag gcaaagaaag 1680

gcgggaaaau cgcugucuga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu 1740
ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1796
<210> 181
<211> 905
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 181
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggtg tccaagggtg aggaattgtt taccggggtg gtgcctattc tcgtcgaact 120
tgacggggat gtgaatggac acaagttttc ggtatccgga gaaggagagg gtgacgccac 180
atacggaaag cttacactca aattcatctg tacgacgggg aaactgcccg taccctggcc 240
tacgctcgta accacgctga cttatggagt gcagtgcttt agcagatacc ccgaccatat 300
gaagcagcac gacttcttca agtcggcgat gcccgagggg tacgtgcaag agaggaccat 360
tttcttcaaa gacgatggca attacaaaac acgcgcagaa gtcaagtttg agggcgatac 420
tctggtcaat cggatcgaat tgaagggaat cgatttcaaa gaagatggaa acatccttgg 480
ccataagctc gagtacaact ataactcgca taatgtctat atcatggctg acaagcagaa 540
aaacggtatc aaagtcaact ttaagatccg acacaatatt gaggacggtt cggtgcagct 600
tgcggaccac tatcaacaga atacgccgat tggggatggt ccggtccttt tgccggataa 660
ccattatctc tcaacccagt cagccctgag caaagatcca aacgagaaga gggaccacat 720
ggtcttgctc gaattcgtga cagcggcagg gatcactctg ggaatggacg agttgtacaa 780
gtgataagct gccttctgcg gggcttgcct tctggccatg cccttcttct ctcccttgca 840
cctgtacctc ttggtctttg aataaagcct gagtaggaag gcggccgctc gagcatgcat 900
ctaga 905
<210> 182
<211> 863
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 182
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug guguccaagg 60
gugaggaauu guuuaccggg guggugccua uucucgucga acuugacggg gaugugaaug 120
gacacaaguu uucgguaucc ggagaaggag agggugacgc cacauacgga aagcuuacac 180
ucaaauucau cuguacgacg gggaaacugc ccguacccug gccuacgcuc guaaccacgc 240
ugacuuaugg agugcagugc uuuagcagau accccgacca uaugaagcag cacgacuucu 300
ucaagucggc gaugcccgag ggguacgugc aagagaggac cauuuucuuc aaagacgaug 360
gcaauuacaa aacacgcgca gaagucaagu uugagggcga uacucugguc aaucggaucg 420

aauugaaggg aaucgauuuc aaagaagaug gaaacauccu uggccauaag cucgaguaca 480
acuauaacuc gcauaauguc uauaucaugg cugacaagca gaaaaacggu aucaaaguca 540
acuuuaagau ccgacacaau auugaggacg guucggugca gcuugcggac cacuaucaac 600
agaauacgcc gauuggggau gguccggucc uuuugccgga uaaccauuau cucucaaccc 660
agucagcccu gagcaaagau ccaaacgaga agagggacca cauggucuug cucgaauucg 720
ugacagcggc agggaucacu cugggaaugg acgaguugua caagugauaa gcugccuucu 780
gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu ucucucccuu gcaccuguac cucuuggucu 840
uugaauaaag ccugaguagg aag 863

<210> 183
<211> 716
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 183

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aacuuucucu 60
ugucaugggu gcacuggagc cuugcgcugc ugcuguaucu ucaucacgcu aaguggagcc 120
aggccgcacc cauggcggag gguggcggac agaaucacca cgaaguaguc aaauucaugg 180
acguguacca gaggucguau ugccauccga uugaaacucu uguggauauc uuucaagaau 240
accccgauga aaucgaguac auuuucaaac cgucgugugu cccucucaug aggugcgggg 300
gaugcugcaa ugaugaaggg uuggagugug uccccacgga ggagucgaau aucacaaugc 360
aaaucaugcg caucaaacca caucaggguc agcauauugg agagaugucc uuucuccagc 420
acaacaaaug ugaguguaga ccgaagaagg accgagcccg acaggaaaac ccaugcggac 480
cgugcuccga gcggcgcaaa cacuuguucg uacaagaccc ccagacaugc aagugcucau 540
guaagaauac cgauucgcgg uguaaggcga gacagcugga auugaacgag cgcacgugua 600
ggugcgacaa gccuagacgg ugagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu 660
ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 716

<210> 184
<211> 1316
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 184

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cccccaucgg 60
gauugagauu guugccccuu cugcuuccgc ugcuuugguu gcucguccug accccuggca 120
ggcccgcagc gggguugucg acguguaaga cgauugacau ggagcucgug aaacgcaaga 180
gaauugaagc aaucaggggu caaauucuga gcaaacucag acucgcaucc ccaccguccc 240
agggugaggu cccaccggga ccucugcccg aggcgguccu ggccuuguac aacucgacac 300

gcgaccgagu cgcaggggag ucagcggaac ccgagcccga acccgaggcc gacuacuacg 360
ccaaagaggu cacucggguc uugauggugg aaacucacaa cgaaaucuac gacaaguuua 420
agcagucgac ccauucgauc uacauguucu ucaauaccag cgagcuuaga gaagcggucc 480
ccgagccggu acuuuugucc agagcggagc ugcgguugcu caggcucaag cugaaagugg 540
aacagcacgu agagcuuuau cagaaguaca gcaacaauuc auggcgguau cucucgaacc 600
ggcuguuggc gccgucggau ucacccgaau ggcucagcuu ugaugucacg gggguggugc 660
gccagugguu guccaggggc ggagagaucg aaggauuucg gcucucagcc cacuguucgu 720
gugauagcag ggacaacacg cuccaaguag auaucaacgg auucacuacu ggucgcagag 780
gggaucuugc gacaauccac gguaugaauc gcccuuuucu ccugcugaug gccacacccc 840
uugaacgggc gcaacaucuu cagucauccc gccauaggag agcacuggac acgaacuacu 900
guuuuucguc gacagagaag aauugcugcg ugcggcagcu uuacaucgac uuccgaaaag 960
aucucgggug gaaauggauu caugaaccga agggguauca cgccaacuuc ugccuggguc 1020
cguguccuua uaucuggucg uuggauacac aguauucaaa gguguuggcu cuuuacaauc 1080
agcacaaccc gggagccucg gcugcgccuu guugcguacc ccaggcauug gagccauugc 1140
cgauugugua uuauguggga agaaagccga aaguggagca guugucgaau augaucguac 1200
ggagcugcaa augcuccuga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu 1260
ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1316

<210> 185
<211> 806
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 185

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gguguaaggc 60
acccgcccug cucccacaga cuccuggcgg ugugugccuu gguaucgcuu gcgaccgccg 120
cacugcuugu caauccgggg guagucgugc gcaucagcca gaagggacug gauuacgccu 180
cgcagcaggg uaccgcggca cuucagaaag agcuuaagcg gaucaagauu ccagacuauu 240
cagauagcuu uaagaucaag cauuugggaa aaggucacua uucguuuuac ucgauggaca 300
uuagagaauu ccagcucccu ucgucccaaa uuuccauggu cccgaaugug gggcugaaau 360
ucagcauuuc gaacgcgaac aucaagaucu cagggaaaug gaaggcacag aagcgauuuc 420
ucaaaauguc aggaaacuuu gaucucucca ucgaggggau gucaaucucg gcggacuuga 480
aacucggcuc caauccuaca ucgggaaagc ccacuauuac ggccucgucg uguucgagcc 540
auaucaacuc ggugcacguc cauaucucaa aguccaaagu aggauggcuu auccagcucu 600
uccacaaaaa gauugagucg gcuuugcgca acaagaugaa uagccaagug ugcgagaaag 660
ucacaaauuc cgugucauca gaauugcagc ccuacuucca aacgcuguaa ugagcugccu 720
ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg 780
ucuuugaaua aagccugagu aggaag 806

<210> 186

<211> 1573
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 186
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug guauccaagg 60
gggaggagga caacauggcg aucaucaagg aguucaugcg auucaaggug cacauggaag 120
guucggucaa cggacacgaa uuugaaaucg aaggagaggg ugaaggaagg cccuaugaag 180
ggacacagac cgcgaaacuc aaggucacga aaggggacc acuuccuuuc gccugggaca 240
uucuuucgcc ccaguuuaug uacgggucca aagcauaugu gaagcauccc gccgauauuc 300
cugacuaucu gaaacucagc uuucccgagg gauucaagug ggagcggguc augaacuuug 360
aggacggggg uguagucacc guaacccaag acucaagccu ccaagacggc gaguucaucu 420
acaaggucaa acugcggggg acuaacuuuc cgucggaugg gccggugaug cagaagaaaa 480
cgaugggaug ggaagcguca ucggagagga uguacccaga agauggugca uugaaggggg 540
agaucaagca gagacugaag uugaaagaug ggggacauua ugaugccgag gugaaaacga 600
cauacaaagc gaaaaagccg gugcagcuuc ccggagcgua uaaugugaau aucaaguugg 660
auauuacuuc acacaaugag gacuacacaa uugucgaaca guacgaacgc gcugagggua 720
gacacucgac gggaggcaug gacgaguugu acaaaggaag cggagcuacu aacuucagcc 780
ugcugaagca ggcuggagac guggaggaga acccuggacc uaugugucc aagggugagg 840
aauuguuuac cgggguggug ccuauucucg ucgaacuuga cggggaugug aauggacaca 900
aguuuucggu auccggagaa ggagagggug acgccacaua cggaaagcuu acacucaaau 960
ucaucuguac gacggggaaa cugcccguac ccuggccuac gcucguaacc acgcugacuu 1020
auggagugca gugcuuuagc agauaccccg accauaugaa gcagcacgac uucuucaagu 1080
cggcgaugcc cgagggguac gugcaagaga ggaccauuuu cuucaaagac gauggcaauu 1140
acaaaacacg cgcagaaguc aaguuugagg gcgauacucu ggucaaucgg aucgaauuga 1200
agggaaucga uuucaaagaa gauggaaaca uccuuggcca uaagcucgag uacaacuaua 1260
acucgcauaa ugucuauauc auggcugaca agcagaaaaa cgguaucaaa gucaacuuua 1320
agauccgaca caauauugag gacgguucgg ugcagcuugc ggaccacuau caacagaaua 1380
cgccgauugg ggaugguccg guccuuuugc cggauaacca uuaucucuca acccagucag 1440
cccugagcaa agauccaaac gagaagaggg accacauggu cuugcucgaa uucgugacag 1500
cggcagggau cacucuggga auggacgagu uguacaagug auaauggucu uugaauaaag 1560
ccugaguagg aag 1573
<210> 187
<211> 1433
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 187

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cagcuucgga 60
auccagaacu ccauuugggg ugcgcgcucg cacugcgguu ucucgcgcug gugucauggg 120
acauuccggg agcgcgagcc cuggacaacg gguuggcgag aacuccgaca auggguuggc 180
uccauuggga gcgguuuaug ugcaaccuug auugucagga ggagcccgau ucguguaucu 240
ccgaaaaacu cuucauggaa auggcggagc uuauggugag cgaggguugg aaggacgcag 300
gguacgagua uuugugcauc gacgauugcu ggauggcccc acagagggac uccgaaggac 360
gccuccaagc ggacccgcag cgguuucccgc acgguauccg gcagcucgcu aacuacguac 420
acagcaaagg gcuuaagcug gguaucuacg cggacguagg gaacaagacg ugugcagggu 480
uccccggcuc auucggauau uacgauauug acgcccagac guuugcggac uggggcgucg 540
aucuucugaa guuugacgga ugcuacugcg acagccucga aaaucuugcu gauggauaca 600
aacacauguc ccuggcacug aacaggacgg gucgcuccau cguguauucg ugugaauggc 660
ccuuguauau guggccauuu cagaagccca acuacacgga aaucagacag uauuguaacc 720
acuggaggaa uuucgcggac auugaugaua gcuggaaguc gaucaaauca auuuuggauu 780
ggacaucguu caaccaggag cgcaucgugg acgucgcggg ucccggaggg uggaaugacc 840
cggauauguu gguaauugga aacuuuggcc uuucguggaa ucagcaagug acccagaugg 900
ccuugugggc gauuauggca gcgcccuugu ucaugucgaa ugauuugaga cauauuucgc 960
cgcaggccaa ggcguugcuu caagauaagg acgugaucgc caucaaucag gaccccuugg 1020
gaaaacaggg auaccaacuc cgccaaggag auaacuucga ggucugggaa aggccccuuu 1080
cgggacuugc uugggccgug gcgaugauca acagacaaga gauugggggu ccucgguccu 1140
auacuaucgc cguggcauca cuugguaaag gagucgcaug uaaucccgcg ugcuucauca 1200
cucagcuccu uccugucaag cgaaaauugg gguuuuauga guggaccagc cgccugcggu 1260
cgcacaucaa uccaacaggg acugugcucu ugcagcucga aaacacaaug cagauguccc 1320
ucaaagauuu gcuguaauga gcugccuucu gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu 1380
ucucucccuu gcaccuguac cucuuggucu uugaauaaag ccugaguagg aag 1433

<210> 188
<211> 1745
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 188

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gggccaagag 60
gagcggcuuc acucccgcga ggaccaggac cuaggcgauu gcuucucccc gugguccuuc 120
cucugcugcu ucuuuugcuu cucgcgccac cugguucggg ugcgggagcc ucaagaccgc 180
cccaccucgu auuucugcuc gccgaugacc ucggguggaa ugacguaggg uuccacggau 240
cgcgaauccg aacgccgcau cuugaugcau uggcagcagg uggaguacuu uuggauaacu 300
acuacacgca gccauugugu acacccucga ggagccaguu gcugacuggc cgcuaccaga 360
uccggaccgg acuucagcac cagaucaucu ggcccuguca gccgucaugu gucccccuug 420

augagaagcu uuugccucag cugcuuaaag aagcggggua uacgacacau augguggga 480
aguggcaccu cggaauguac agaaaagaau gccuucccac cagaagggga uucgauaccu 540
acuucgguua ucugcugggg ucagaggacu acuacuccca cgaacgcugc acgcuuaucg 600
augcauugaa cguaacccgc ugcgcccucg acuuucggga uggagaggaa gucgccacag 660
gguauaagaa cauguauucg acaaacaucu ucacgaaaag ggccauugcg cugauuacga 720
aucaucccc ggaaaagccc cucuuucucu acuuggcgcu gcagagcgug caugagccuc 780
ugcaagugcc cgaggaguau cuuaaacccu acgauuucau ccaagacaag aaccggcacc 840
acuacgcggg aaugugucg uugauggaug aggcggucgg aaaugugaca gcggcuuuga 900
agucgagcgg acucuggaac aauacggugu ucaucuuuuc aacugauaau gggggacaga 960
cguuggcggg ugguaauaac uggccccuua ggggaagaaa auggucgcug ugggaaggug 1020
gagugagggg ugucggguuu gucgcgagcc ccuugcugaa acaaaagggg gucaagaacc 1080
gagaauugau ucauaucagc gacuggcugc cgacccucgu caagcuggca cgcgggcaca 1140
caaacgguac gaagccauug gacggguuug acguguggaa aacaaucucc gagggcucgc 1200
cuucgccgag gauugaguug cuccacaaca ucgaccccaa cuuuguagac agcucaccgu 1260
gcccccgaaa uucgauggcg ccugcuaaag augauagcag ccugccagag uacuccgcgu 1320
ucaacacuuc agugcaugca gcaauucgcc acggaaauug gaagcuucug acuggguauc 1380
cugguugugg cuauugguuc ccaccgccgu cgcaguauaa uguaucggag auuccguccu 1440
cggauccgcc gacuaaaaca uugugguugu ucgacaucga ccgcgacccc gaagagcggc 1500
acgaccuuuc gagggaauau ccccauauug ugacgaaguu gcuuagccgg uugcaguucu 1560
accauaaaca cagcguaccg guguauuuuc cugcccaaga uccucgcugc gaccccaagg 1620
ccacgggagu cugggguccc uggaugugau aagcugccuu cugcggggcu ugccuucugg 1680
ccaugcccuu cuucucuccc uugcaccugu accucuuggu cuuugaauaa agccugagua 1740
ggaag 1745

<210> 189
<211> 707
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 189

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug accaacaagu 60
gucugcucca gaucgcacuc uuguugugcu ucucgacgac ugcccuuucg augucauaca 120
aucugcuggg auuccuucag aggagcucga auuuucagug ucagaaguug uuguggcaac 180
ucaaugggcg acucgaguac ugcuugaaag aucggaugaa cuuugacauu cccgaagaaa 240
ucaagcaacu gcagcaauuc cagaaagagg acgcggcucu gacaaucuac gagaugcuuc 300
agaacauuuu cgcgaucuuc agacaggaca gcucauccac gggcuggaac gagacaaucg 360
uagaaaaccu gcucgcaaac gucuaucacc agauuaauca ccucaagaca gugcuugagg 420
agaagcuuga aaaagaagau uucacucgcg ggaaacugau guccucgcuc cauuugaaaa 480
gguacuaugg aaggauuuug cacuaucuca aggccaagga guauucccau ugcgcgugga 540

ccaucgugcg cgucgagauc cuucggaacu uuuacuuuau caaucgguug acggguuacc 600
ucagaaauug auaagcugcc uucugcgggg cuugccuucu ggccaugccc uucuucucuc 660
ccuugcaccu guaccucuug gucuuugaau aaagccugag uaggaag 707

<210> 190
<211> 2021
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 190

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aucuuccucu 60
aucaggucgu ccauuucauc uuguucacgu cgguguccgg cgaaugcguc acgcaguugu 120
ugaaggacac gugcuuugaa ggaggagaca uuacaacggu guuuacgcca uccgcgaaau 180
acugucaggu ggucuguacc uaccaucccc ggugucugcu guuuacauuc acugccgaau 240
ccccuagcga ggaccccacu cggugguuca cgugugugcu uaaggauucc gucaccgaaa 300
cacuuccucg ggucaaucgg acagcggcga ucucggggua cucguucaag caaugcucac 360
accagauuuc cgccugcaac aaagacaucu acgucgaucu cgauaugaaa ggcaucaacu 420
acaacuccuc gguggcaaag agcgcacaag agugucaaga gcgaugcaca gacgacgugc 480
acugccacuu cuucacauac gcgaccaggc aguucccauc gcuggaacac agaaacaucu 540
gccuccucaa gcauacucag acgggaacuc ccaccaggau uacgaagcug gauaaggugg 600
uaucgggauu uucccuuaag ucaugcgccc uuagcaaccu ggcguguauc agggacaucu 660
uucccaauac aguauuugcc gauuccaaua uugacucagu gauggccccu gacgccuucg 720
uguguggccg caucugcaca caucaccccg gaugucucuu cuucaccuuc uuuagccagg 780
aguggcccaa ggagagccag aggaaccucu gccuucucaa aacgucggag ucaggauugc 840
ccucgacgcg gaucaagaaa ucaaaggcgc uuucgggguu cucguugcag agcugucgcc 900
auagcauucc agucuuuugu cacucaucgu uuuaucacga cacugauuuu cucggggaag 960
aguuggacau cguggcagca aagucgcaug aagcgugcca gaaguugugu accaacgccg 1020
uccgcugcca guuuuucaca uacacuccgg cccaggcuuc gugcaacgag gggaagggaa 1080
agugcuauuu gaagcucagc uccaauggcu cgccuaccaa aauucuucac ggacgaggcg 1140
gaaucucagg guacaccuug agauugugua agauggacaa cgaauguacu acaaagauca 1200
aaccgcgaau uguaggcgga acggcgucgg uccggggaga auggccgugg cagguaacau 1260
ugcauacgac cucccccacc cagagacacu ugugcggugg gucaauuauc gggaaucagu 1320
ggaucuugac cgcagcccac ugcuuuuaug gaguggaguc cccgaaaauc uugagggugu 1380
acucagggau cuugaaccag ucggaaauca aggaggacac aucauucuuc gggguccaag 1440
agaucaucau ucacgaucag uacaagaugg cggagucggg guacgauauu gcgcuucuga 1500
aauuggaaac caccgucaac uacacugauu cgcagcggcc gaucugccug ccuagcaaag 1560
gggaccggaa ugucaucuac acagauuguu ggguaacggg uuggggguau cgcaagcugc 1620
gagacaaaau ccagaauaca cugcaaaaag cgaaaauucc guuggugacu aacgaggagu 1680
gucagaagag auauagaggu cacaaaauca cccacaagau gaucugcgcc ggauaccggg 1740

aaggggguaa agacgcaugu aaaggagaua gcgguggccc guugagcugc aagcauaacg 1800
agguauggca ccucgugggu auuacuucau ggggagaagg cugugcgcag cgcgagaggc 1860
cgggugucua uacuaaugua guagaguaug uggacuggau cuuggagaaa acucaagcag 1920
ucugaagcgc ugccuucugc ggggcuugcc uucuggccau gcccuucuuc ucucccuugc 1980
accuguaccu cuuggucuuu gaauaaagcc ugaguaggaa g 2021

<210> 191
<211> 1325
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 191

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gaagagccac 60
agucagaccc gagcguggag ccgccauuga gccaggagac uuucagcgac uuguggaaac 120
uucucccgga aaacaaugug cugucaccgu ugccgagcca ggcgauggau gaccugaugc 180
uuucgccgga cgacaucgag caguggguca cugaagaucc cggaccggac gaggcaccga 240
gaaugcccga agcggcuccg ccuguggcgc cugccccagc agcgcccacg cccgcagcgc 300
ccgccccggc accaagcugg ccgcugucgu caucagugcc cucgcaaaag accuaucagg 360
gaucguacgg guuccgccug ggcuuucuuc acucgggaac ggccaagucg gucacaugca 420
cguacucccc agcgcucaac aaaauguucu gccaguuggc aaaaacgugu cccguccaac 480
ucugggugga uuccacaccc ccacccggua caaggguacg agccauggca aucuacaagc 540
agucccaaca caugacggaa gucgugcggc ggugccccca ccaugagcgg ugcucagauu 600
cagauggucu ugcuccgccc cagcacuuga uuagggugga agguaaccuc agagucgagu 660
aucuugauga cagaaauacc uuucggcacu ccgugguagu ccccuaugaa ccccccggaag 720
uggggucgga cuguacuacc auccauuaca acuauaugug caauucgagc uguaugggcg 780
ggaugaaucg acggccuauc cucaccauca uuacguugga agauagcucg ggaaaccugc 840
ucggucgcaa cagcuuugag guccgaguau gugccugccc gggacgcgac cgacgcacag 900
aggaagagaa cuugaggaaa aagggagagc cccaucacga guugcccccu ggaucgacga 960
aacgcgcgcu cccuaacaau acaucaucau caccucagcc gaagaagaaa ccgcuugaug 1020
gggaauacuu uacgcuucag auuaggggua gagagagauu cgaaauguuu agagaguuga 1080
augaggcccu cgagcuuaaa gacgcgcaag cgggaaagga gcccgguggc uccagggcuc 1140
auuccucgca ccuuaagagc aagaaagggc agucgacguc gcggcauaag aaacucaugu 1200
ucaagacaga agggcccgac agcgauugau aagcugccuu cugcggggcu ugccuucugg 1260
ccaugcccuu cuucucuccc uugcaccugu accucuuggu cuuugaauaa agccugagua 1320
ggaag 1325

<210> 192
<211> 1211
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 192
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug uccgugaauu 60
augccgcugg ucuuuccccg uacgccgaua aaggaaagug uggccucccu gagauuuuug 120
acccgccaga ggaguuggaa cgcaaagucu gggaguuggc cagguuggua uggcagucgu 180
caucgguggu auuucauacg ggagcuggaa uuucaacggc aucgggaauc ccggauuuuc 240
ggggucccca cggagucugg accauggagg aaaggggggcu cgccccuaag uucgauacga 300
cauuugagag cgcacgccca acucaaaccc auauggcccu ggugcagcug gaaagggucg 360
gacuucuccg cuuccucgug ucgcagaaug uagacggauu gcacgugaga uccggauucc 420
caagggauaa gcuggcggag cugcacggua acauguucgu cgaggaaugc gcgaagugua 480
aaacucagua cgugcgggau acaguagucg gaacaauggg acugaaggcg accgggcgac 540
uuuguaccgu agcaaaggcg agaggauuga gagcgugccg gggugaauug cgggacacaa 600
ucuuggacug ggaggacucg cuuccggauc gagaucuggc ccucgcggac gaagcgucgc 660
gaaacgcgga ccugucgauu acucugggca caucacugca aauccgcccc agcgggaacc 720
ucccucuugc aacaaaacgg cgaggcggua gacuggucau ugucaaccuc cagccgacca 780
aacacgaccg gcacgccgac uugagaaucc auggguaugu agaugaggug augacgcgcu 840
ugaugaaaca ucucggguug gagaucccgg cuugggacgg gccaaggguc cuugagaggg 900
cgcucccgcc uuugccaaga cccccgacgc ccaagcugga accaaaggaa gaaucccccga 960
cgagaaucaa uggcucaauc cccgcugggc cuaaacagga accgugcgcg cagcauaaug 1020
gguccgagcc cgcaucaccc aaacgagaaa ggcccacauc gccugcaccg cacagacccc 1080
caaagagggu aaaagcgaaa gccgugcccu cguaaugagc ugccuucugc ggggcuugcc 1140
uucuggccau gcccuucuuc ucucccuugc accuguaccu cuuggucuuu gaauaaagcc 1200
ugaguaggaa g 1211
<210> 193
<211> 1748
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 193
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcgacggcgc 60
uuauggccgu cguccuucga gcggcagcgg uggcgcccag acucaggggu agaggaggga 120
cgggaggagc uagacggcug ucguguggag ccagacggcg agcggcgaga ggaacgucac 180
ccggacgccg ccuuucgacg gcgugguccc agccucagcc gccuccagag gaauaugcug 240
gggccgauga cguaucccag agcccgguag ccgaggagcc gucgugggguc cccagcccga 300
ggccucccggu gccccacgag ucaccggaac cacccagcgg ucgcucgcuc guccaacggg 360
auauucaggc guuucugaac cagugcggag caucgccggg agaagcgagg cacuggcuga 420
cccaguucca aaccugucau cacuccgcug acaaacccuu ugcagucauu gaaguagacg 480

aggaagugcu caagugccag caaggggugu cguccuuggc guucgcgcuc gcguuccuuc 540
agaggaugga caugaaaccc cuuguggugc uuggccuccc ugccccuacu gccccuucgg 600
gaugucuguc cuuuugggaa gcgaaagcgc aacuggccaa aucguguaag gucuuggucg 660
acgcauugag acauaaugcc gcagcagccg ugccguucuu uggaggcggu uccguccuua 720
gagcugcgga gccagcgccc cacgccucgu auggcggaau ugucuccgug gagacagauu 780
ugcuucagug gugccucgag ucagguagca uccccauucu uugccccauc ggagaaacug 840
cagcaaggcg cagcguguug cuugacagcc ucgagguaac agccucccuc gcaaaagcuu 900
ugaggcccac caagaucauc uuucuuaaca acacgggagg auugcgagau ucgagccaua 960
agguacuuuc aaaugugaau uugccggcag aucuggaccu cguaugcaau gccgaguggg 1020
uguccacaaa ggaacgccag cagaugaggc ugauugugga ugugcuuucg agacucccgc 1080
accacucauc agcgguaauc acugcagcga gcacucugcu gacggagcug uucagcaaua 1140
agggcucagg gacgcucuuc aagaacgcgg aaagaaugcu ucggguccgg agccuggaca 1200
aauuggauca ggggcgacuu gucgaucucg ucaacgcguc auuugggaaa aagcugcggg 1260
acgacuaucu ggcgucguug cgaccacgcc uccacucgau cuacgugucg gaggguuaca 1320
acgcagccgc aaucuugaca auggaaccag ucuugggagg gacaccguac cucgauaagu 1380
ucgugguguc gucgucacgg cagggccagg guagcgguca aaugcucugg gagugucuga 1440
ggcgggacuu gcagacccuc uuuuggcgcu cccgcgugac aaaucccauc aauccuuggu 1500
acuuuaagca uucggauggg ucguucucga acaaacagug gauuuucuuu ugguucggac 1560
uugcggacau ccgagacuca uacgaguugg uaaaccaugc gaaggguug cccgauucgu 1620
uccacaagcc cgcaucagac cccgggucau gauaagcugc cuucugcggg gcuugccuuc 1680
uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga 1740
guaggaag 1748

<210> 194
<211> 2228
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 194

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug acguuugggc 60
aaucgaaacu guauaggucc gaagauuacg ggaagaauuu caaagauauu acggauuuga 120
ucaauaacac cuucaucaga acugaguucg guauggccau cgguccagaa aauucgggaa 180
aagugguccu cacagcagag gugucaggag gcucgcgcgg agggcggauu uuucgcucau 240
cggacuuugc caagaacuuc gugcagacug accucccauu ucacccgcuc acacaaauga 300
uguauucacc gcagaacuca gacuaccucc uggcguuguc aacggagaau ggccuuuggg 360
uauccaagaa uuuuggaggg aagugggagg aaauucauaa agccgugugc cuugcgaagu 420
gggguagcga caauaccauc uucuuuacaa cguaugcuaa cggcucaugu acggaucuug 480
gugcgcuuga auuguggaga acuucggauc ucggaaaguc guucaaaacg auugguguga 540
aaaucuacag cuuugggcug ggaggaaggu uccucuuugc uuccgugaug gcagacaaag 600

acacgacuag gaggauucac gugucaaccg accagggaga cacgugguca auggcacaac 660
ugccgagcgu aggccaggag caguucuauu caauccuugc ggcgaacgau gauauggucu 720
uuaugcacgu cgaugagcca ggugauacag gguuuggaac uaucuuuaca ucagaugauc 780
gagggaucgu guauucaaaa ucgcucgacc gacaucucua caccacaacu gguggugaga 840
cugauuucac gaacgucacc ucacugcgcg gaguguauau cacauccgug cuuagcgagg 900
acaauuccau ccagaccaug aucacguuug accaaggagg aagauggaca cauuugagaa 960
aacccgagaa cagcgaaugc gacgccacug cuaagaacaa aaacgagugc ucguugcaca 1020
uccacgcuuc cuauucgauu ucacaaaagc ugaauguacc uauggcaccu cucucggagc 1080
cuaacgcagu agggaucgua aucgcucaug guucgguggg agaugccauc ucaguaaugg 1140
uccccgaugu cuauaucucg gaugacgggg gauacucaug gacaaaaaug cuugagggac 1200
cccauuacua uacuauuuug gacucagggg gcaucauugu agccaucgaa cacucaucga 1260
ggcccauuaa cguaaucaag uucucaacag acgaaggaca augcuggcaa acguauacuu 1320
uuacgcgaga uccaaucuac uucacggggc uggccuccga gccaggagcc cggucgauga 1380
auaucucaau cuggggcuuc accgagucgu uccuuacguc ccagugggug ucauauacaa 1440
ucgacuucaa agacauccuu gaacgcaauu gugaggaaaa ggacuacaca auuuggcugg 1500
cacauucgac cgaccccgag gacuacgagg acggcuguau ucugggguac aaagagcagu 1560
uccuucgcuu gcggaaguca agcguauguc agaacgggcg agauuacguc guaacgaagc 1620
agccuucaau cugucugugu ucgcuugagg acuuucuuug cgacuucggu uacuacagac 1680
ccgaaaauga cucgaagugu gucgagcagc cugaacucaa ggggcaugac uuggaauuuu 1740
gcuuguacgg gagagaggaa caccuuacua caaaugggua cagaaagauc cccggagaca 1800
agugccaggg ugggguaaac cccgugaggg aggucaagga ccucaaaaag aaaugcaccu 1860
caaacuuucu cucgccggaa aagcagaaua gcaaguccaa uagcgucccu aucauccucg 1920
ccauugucgg ucuuauguug gugacuguag uggcaggugu gcugauuguc aaaaaguaug 1980
ugugcggagg gagguucuug gugcaucggu auagcguguu gcagcaacac gcggaagcua 2040
acggagucga ugguguggau gcccuggaua cagcgucgca cacaaacaag agcggcuacc 2100
acgacgacag cgacgaggau cuccuugagu gaagcgcugc cuucugcggg gcuugccuuc 2160
uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga 2220
guaggaag 2228

<210> 195
<211> 578
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 195

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug uggcuccagu 60
cacuuuuguu gcuuggaacg gucgcaugcu ccaucucggc accagcgcgg ucccccucgc 120
cgagcacgca gccuugggaa caugugaacg cuauccaaga agcgaggaga cuucugaauc 180
ugucacgaga uacagcggcc gagaugaacg aaacuguaga ggucaucuca gagauguuug 240

accuucaaga gcccacaugu cuccagaccc gccuggaacu guauaagcag ggguugcggg 300
gaucccucac caaauugaaa ggucccuuga ccaugauggc cucgcacuac aaacagcacu 360
guccgccgac gccugagaca ucgugcgcga cgcagauuau cacuuuugaa agcuucaagg 420
aaaaucucaa ggacuuccug cucgugauuc cauucgauug cugggagccc gugcaagagu 480
gauaagcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 540
uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 578

<210> 196
<211> 1793
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 196

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cccgcgucgg 60
caccgccgag aaggccccga ccuccuccac cuucacuuag ccugcugcug gugcuccucg 120
gacugggagg acggaggcug agggccgaac ccggagaugg ggcucaaacg ugggccaggu 180
ucucacggcc accggcuccc gaggcugccg gcuuguucca aggaacguuu ccggacgggu 240
uccuuugggc gguaggaucg gcggcauacc agacggaggg aggguggcag cagcacggua 300
aaggggcauc aauuugggac acguucacuc aucacccgcu cgcuccaccg ggugacucca 360
gaaaugcuuc gcuuccgcuu ggagcacccu caccccuuca accggccacu ggggaugucg 420
cgucagauuc guacaauaau guguuucgcg auaccgaagc ccuuagagaa cuuggcguca 480
cacauuaccg auuuucaauu ucaugggcua ggguguugcc uaaugggucg gcggguguac 540
cgaauagaga aggucugagg uauuaucgcc gccuucucga acgccuuagg gagcuugggg 600
uccaaccggu gguaacacuu uaucacuggg accucccaca gcggcuccaa gaugcguaug 660
gaggggugggc caaucgggcg uuggccgacc acuuuagaga cuacgcggaa cuuugcuuuc 720
gccacuucgg aggacagguc aaguauugga uuaccaucga caauccuuac gugguagccu 780
ggcacgguua cgccacgggg aggcucgcgc cugguauccg cggguccccg cgacucgguu 840
aucuugucgc ccacaaccuc uuguuggccc acgccaaagu guggcauuug uauaacacaa 900
gcuucaggcc gacgcagggc ggacaggugu caaucgcauu gucgucgcac uggaucaauc 960
ccaggcggau gaccgaucau ucgauuaagg agugccagaa gucgcuggac uuuguacugg 1020
guugguuugc gaagccagug uuuaucgacg gugacuaccc ugaauccaug aagaacaauc 1080
uuagcucgau uuugcccgac uuuacggagu cagagaaaaa guuuaucaag ggcacggcgg 1140
acuucuucgc acuuuguuuu gggcccacuc uuuccuucca gcucuuggac ccgcauauga 1200
aauuccgcca gcuugagucg cccaaucuca gacagcuccu gucguggauc gauuuggagu 1260
uuaaccaccc acaaaucuuu aucguggaaa auggaugguu cgugucgggu acgacaaagc 1320
gggaugaugc gaaguauaug uacuacuuga agaaauucau cauggagaca cugaaagcca 1380
ucaaacuuga cggcguagau gucaucggau auacagcgug gucacucaug gauggguuug 1440
aauggcauag gggcuacucg auuagacgcg ggcuguuuua cgucgacuuu uugagccagg 1500
acaaaaugcu gcucccccaaa agcuccgccu uguucuacca gaaacuuauu gagaaaaacg 1560

gguucccgcc acuuccggaa aaucagcccu uggaagggac auuuccgugc gauuucgcgu 1620
gggguguagu agacaauuac auucagguaa gccagcugac aaaaccgauu uccucauuga 1680
caaagcccua ccacugauaa gcugccuucu gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu 1740
ucucucccuu gcaccuguac cucuuggucu uugaauaaag ccugaguagg aag 1793

<210> 197
<211> 1322
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 197

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcggccuugc 60
gacagccgca agucgcggaa cugcuggcug aagcccggag agcguuccgc gaggaguucg 120
gagccgaacc cgagcucgcg guaucagcac caggacgggu gaaccuuauu ggggaacaua 180
cugauuacaa ccaggggcuc guauugccca uggcccugga acuuaugacc guacuugucg 240
ggucaccccg caaggacggc uuggugagcu ugcuuacgac auccgagggu gcugaugaac 300
cgcagcgacu ucaguucccu cucccuacgg cgcaacgguc auuggagcca gggacgccca 360
gaugggccaa uuaugugaaa ggagugauuc aguauuaucc cgcagcgccg cucccuggau 420
uuucagcagu aguggugucg agcguaccuc uugguggagg acugucgucg uccgcauccc 480
ucgaggucgc aaccuacacg uuuuugcagc agcucugucc ggacucgggg accaucgcgg 540
cgagagccca agugugccaa caggcggagc acagcuuugc cggcaugcca uguggaauca 600
uggaccaguu caucucgcug augggucaga aaggacaugc ucuccugauc gauugccgcu 660
cgcuggaaac aucgcuggug cccuuguccg acccgaagcu ggcugugcug aucacgaauu 720
ccaacguccg ccauagcuug gccucaagcg aguacccggu gaggaggcga cagugcgagg 780
aggucgcccg agcgcuugga aaagaaucgu ugagggaggu gcagcuugaa gagcuugaag 840
cggcgaggga ucuugucuca aaggaggggu uucgacgcgc gaggcacguc gucggggaga 900
uucggagaac agcccaggcg gcugccgcac ucagacgcgg ggauuauagg gcguuuggac 960
gguugauggu cgagucgcac agaagcuuga gggacgacua cgaagugucg ugcccggagc 1020
uggaccagcu cguagaagcg gcucuugcgg uccccggugu guacgggucc agaaugacgg 1080
gcgguggcuu cggagggugu acagucacuc ucuuggaagc gucggccgca ccccacgcga 1140
ugcggcauau ccaagaacac uacggaggua cugcaaccuu cuaucuuagc caggcggcag 1200
auggugcgaa gguauugugu cucugauaag cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca 1260
ugcccuucuu cucucccuug caccuguacc ucuuggucuu ugaauaaagc cugaguagga 1320
ag 1322

<210> 198
<211> 1619
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 198

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcgcuccucu 60
ggggacugcu cgugcugucc uggucgugcc uccaaggacc cuguucggua uuuucgcccg 120
ugucagcgau ggagccccuc ggacgccagc uuacgucggg gccuaaucag gaacaaguaa 180
gccccuugac acugcugaaa cuggggaacc aggaacccgg agggcagacg gcgcuuaagu 240
caccgccagg agugugcucg agggacccaa cuccggaaca gacgcauagg cuugcacgag 300
ccaugauggc cuuuaccgcc gaucuguucu cccucguggc ccagacaucg acguguccua 360
accucauccu cuccccgcuc ucaguagcuc ucgcccucag ccacuuggcg cuuggcgccc 420
agaaccacac uuugcagagg uugcagcaag uccuucaugc ggggucagga ccauguuugc 480
cucacuugcu gucgcgccuc ugccaggauc ugggaccugg ugcauuccgg cuugcggcca 540
gaauguaucu ccaaaaaggu uuccccauca aggaagauuu ucuugagcag uccgagcagc 600
uuuucggcgc aaaaccggug ucgcugaccg ggaaacaaga ggacgaccug gcgaauauca 660
aucagugggu gaaggaagcu acagagggua aaauccaaga guuucuuucg ggacugccgg 720
aagauacagu ccuucuucug uugaacgcga uucacuucca aggguuuugg cgcaacaaau 780
uugacccauc ccucacgcag agagacagcu uucaccucga cgagcaguuu acggucccgg 840
uggaaaugau gcaggcgcgg acuuaucccu ugcgcugguu ccuucucgag cagcccgaaa 900
uucaaguggc acauuucccc uucaagaaca auaugucguu ugucguacug gugccaacac 960
acuucgagug gaaugugagc caagugcucg ccaaucugag cugggauacg uugcauccgc 1020
cgcucguaug ggaacggccc accaaagugc ggcugccuaa gcucuaccuu aaacaucaga 1080
uggaccuugu cgcgacucuc agccaguugg ggcuucaaga guuguuucag gcaccggacu 1140
ugcgggguau uagcgaacag agccucgugg uguccggggu ccagcaccag ucaaccuugg 1200
agcucucaga ggucgguguc gaagcggcug ccgcgaccuc aauugcgaug uccagaaugu 1260
cgcuuucguc guuuucaguc aauaggcccu uccuguucuu uaucuuugaa gauacgacag 1320
ggcuuccgcu cuuuguaggc ucaguaagaa accccaaccc aucggcaccg cgcgagcuca 1380
aggagcaaca ggacucgccc gguaacaagg auuucuugca gucccucaag ggauucccuc 1440
gaggagacaa guuguucgga ccugacuuga aguugguccc acccauggag gaggauuacc 1500
cgcaguucgg gagcccgaag ugauaagcug ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc 1560
ccuucuucuc ucccuugcac cuguaccucu uggucuuuga auaaagccug aguaggaag 1619

<210> 199

<211> 1238

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 199

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug ccauaccagu 60
aucccgcgcu uacgccugag cagaagaagg agcugucgga caucgcucau cggaucgucg 120
cacccgggaa gggcauucuc gcagcugaug aaucgacggg uucaauugcg aagcgacucc 180

agucgaucgg gacagaaaau accgaagaaa acagacgguu cuaucgccag cuguugcuca 240
cagcggauga ucgagugaac ccuugcauug gaggggucau ucuguuucac gagacacuuu 300
aucagaaagc cgacgaugga cgcccguucc cucaagugau caagagcaaa ggcggagugg 360
ucgggaucaa aguggacaag ggagugguac cccuugcugg aacuaauggu gagacaacga 420
cgcaggguuu ggacgggcuc agcgaacggu gcgcccagua caaaaaggau ggagccgauu 480
ucgccaaaug gaggugugua cucaagaucg gugagcacac cccguccgca cuugcgauua 540
uggaaaaugc aaaugucuug gcgagguacg cgucaauuug ucagcaaaac ggcauuguac 600
cgaucgucga acccgagauc cucccggacg gggaucauga cuugaaaagg ugucaguaug 660
uaacggagaa ggugcucgca gcgguguaua aggcgcuguc agaccaccac aucuacuugg 720
aggguacucu ucugaaacca aacaugguaa cucccggaca ugcaugcaca caaaaguuuu 780
cgcacgaaga gaucgccaug gcuacuguca ccgccuugcg cagaaccgug ccgccugcag 840
ugacggguau cacguuuuug uccggagggc agucggagga agaggccucg aucaaucuga 900
acgcaaucaa caaguguccc cugcugaagc ccugggcgcu uacguucagc uacggacggg 960
cguugcaggc gagcgcccuc aaagcguggg gagggaagaa agagaacuug aaagcggcgc 1020
aagaggagua cgucaagaga gcucuugcga acucccucgc cugccagggg aaauacacac 1080
cgucaggaca ggccggugcc gcagcgucgg aaucacuuuu uguguccaau caugcguauu 1140
gauaagcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 1200
uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 1238

<210> 200
<211> 1736
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 200

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cuucuggccg 60
uccuuuacug ucucuugugg uccuuccaga caucggcggg acauuuucca agggcgugcg 120
uaucgucaaa gaaucugaug gaaaaggaau guuguccacc cuggucagga gauagguccc 180
cuugcggcca guugucaggu agaggaagcu gucagaacau ucuucuuucg aacgcuccgu 240
ugggaccgca guucccccuuu acgggugucg augaucgcga aucauggccc agcguguuuu 300
acaacagaac gugccaaugc agcgggaauu ucaugggauu caacugcggg aacugcaagu 360
uuggcuuuug gggacccaac ugcacggagc ggcgacuccu cguacggcga aacaucuuug 420
aucugucagc gcccgagaaa gacaaguucu ucgcguaucu uacucuggca aaacauacca 480
ucucgagcga uuacgugauc ccaaucggua cguacggaca gaugaagaau ggaucgacuc 540
cuauguucaa cgauaucaac aucuacgauc uuuucgugug gaugcauuac uaugucucca 600
uggaugcccu cuugggagga ucggagauuu ggagagacau ugacuuugcg cacgaggcgc 660
cugcguuucu gccuuggcac cgccuguuuc uuuugcgcug ggagcaggag auccagaagc 720
ugacugggga cgagaauuuc accaucccgu acugggauug gagggacgcg gaaaaaugug 780
auauuugcac cgaugaauac auggguggcc aacaccccac aaaucccaau cuccuuucac 840

ccgcauccuu cuuuucgucc uggcagauug ucuguuccag gcuggaagag uauaacucac 900
accaguccuu gugcaauggu accccggagg ggccucuccg ccgcaauccc ggaaaucacg 960
acaaaagcag gacaccgcgg cucccguccu cggcagacgu ggaauucugu cucagcuuga 1020
cgcaguauga gucggggucg auggacaagg cagccaacuu uucguuccgg aauacgcucg 1080
aaggguucgc aagccccuug acagggaucg cggacgcaag ccagucgucg augcauaacg 1140
cgcugcauau cuacaugaau gggacaauga gccaggugca ggggucggcu aacgacccga 1200
uuuuccugcu ccaccacgcc uucguagaca gcauuuuuga acaaugguug cgacggcacc 1260
ggccguugca agaggucuau ccggaggcca acgccccgau cggucacaac agggaaucau 1320
auaugguacc guuuaucccu cuguauagaa auggugacuu cuucaucagc ucgaaagacc 1380
uuggcuauga uuacuccuau cuccaagauu cggauccgga cucauuccaa gacuacauua 1440
agucauaucu cgagcaagcg ucgcgaaucu ggucgugguu gcugggagcg gccauggucg 1500
gggcagugcu gacggcgcug cucgccgguc uugugucgcu guugugucgg cacaagagaa 1560
aacagcuccc cgaggagaag cagcccuugc ucauggaaaa agaggauuau cauucacuuu 1620
accagucgca ucugugauaa uaggcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu 1680
ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1736

<210> 201
<211> 1442
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 201

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug caugucagau 60
cgcucagagc agccgcuccc cacuccuucg uggcacucug ggcgccucug uuucucuugc 120
ggucggcauu ggcagauuuc ucguuggaca augaggucca uucaucguuc auccaccgca 180
ggcugaggag ccaggagcgc cgagagaugc agcgcgaaau ccugucgauc cuuggacuuc 240
cccaccggcc ucggccacac uugcaaggaa aacauaacag cgccccuaug uucaugcugg 300
aucucuauaa cgcgauggcc guagaggagg gaggaggacc gggagggcag ggguuuuccu 360
acccauauaa ggccgucuuu ucgacacagg guccgcccuu ggcgucauug caagauuccc 420
auuuccuuac ggacgcggau augguaauga gcuuugucaa ccuggucgaa cacgacaagg 480
aguuuuucca uccccgcuac caccaccgcg aguucagauu cgaccuguca aagauuccgg 540
aaggggaggc ugugacggca gcggaauuuc ggaucuacaa agacuauauc cgggagcggu 600
uugacaauga gacauuccga auuuccgucu aucagguacu ccaagagcac cuugguaggg 660
aaucggaccu uuuccugcuu gacucgagaa cuuugugggc gucggaggaa ggguggcugg 720
uguuugacau cacggccacu agcaaucacu ggguagucaa ccccaggcau aaucuuggac 780
ugcagcucuc aguagagaca uuggaugguc agucaaucaa cccuaagcuu gcuggccuua 840
ucggacgaca ugggccgcaa aacaagcagc cguuuauggu ggcguucuuc aaagccacgg 900
agguacauuu uagaucgauu aggucaaccg gcagcaagca gagaucccag aacagaucca 960
agacgccgaa aaaucaggaa gcgcuccgga uggccaacgu ggcggagaau ucguccucgg 1020

aucagcgaca ggcgugcaaa aagcaugaau uguauguguc cuuucgcgau cuugguuggc 1080
aggauuggau caucgcaccc gagggguaug cggcguacua cugugaaggc gagugcgcgu 1140
uccccuugaa uucauacaug aacgcgacca accacgccau ugugcaaacu cucguccacu 1200
ucaucaaucc cgaaaccguc ccuaaacccu guugugcccc uacacagcug aaugccauuu 1260
cagugcucua cuucgacgac ucaagcaaug ugauuuugaa aaaguacaga aacauggugg 1320
ugagggcgug cgggugccac ugauaauagg cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca 1380
ugcccuucuu cucucccuug caccuguacc ucuuggucuu ugaauaaagc cugaguagga 1440
ag 1442

<210> 202
<211> 2102
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 202

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatgtca gagcggaaag aaggaagggg aaagggtaaa gggaagaaaa aggaacgcgg 120
atcggggaag aaaccggaat cagccgctgg ctcacagtcg ccggcactgc caccccggct 180
caaggagatg aagagccagg aatccgcggc tgggtcgaag cttgtgttga gatgcgaaac 240
gtccagcgag tactcatcac ttcggtttaa gtggtttaag aatggaaacg agctcaatag 300
gaagaacaag ccccagaata tcaagatcca gaagaaaccc gggaaatccg aacttcggat 360
caacaaagcg tccctggcgg actccgggga gtacatgtgt aaagtcatca gcaaactcgg 420
taacgattca gcctccgcta atatcacgat cgtcgagtcg aatgagatca ttaccggtat 480
gccggcgtcc acggagggag catatgtgtc gtcggaaagc cccatcagga tttccgtgtc 540
gactgaagga gcaaatacaa gctcgtccac cagcacgagc acgacgggga cgtcacatct 600
cgtgaaatgc gccgaaaagg agaaaacttt ctgcgtcaat ggtggagaat gcttcatggt 660
gaaggatctt tcaaacccct cccggtacct ctgcaaatgt ccgaacgagt ttaccgggga 720
ccggtgtcag aactatgtaa tggccagctt ctataaagcc gaagagctgt accagaagcg 780
agtgttgacg atcacaggca tctgcattgc actccttgtc gtaggaatca tgtgtgtggt 840
ggcgtattgc aaaacaaaga agcagcgcaa aaagttgcac gaccgactgc gccagtcgtt 900
gaggagcgag cgaaacaata tgatgaatat tgcaaatggg ccccatcacc cgaacccgcc 960
acccgagaac gtacaactgg tgaaccagta tgtctcgaaa aacgtcatct cgtcggaaca 1020
tatcgtggaa cgggaggcgg aaacaagctt cagcacatcg cactacacga gcactgccca 1080
ccactccacg accgtgacac agacgcccag ccactcatgg tcgaacggtc atacagagtc 1140
gatcctgtca gagtcccatt cagtaattgt aatgtcgtcc gtcgaaaatt caaggcactc 1200
aagccccacg ggagggccta gaggccgcct caacgggact ggcggtcctc gagaatgtaa 1260
ttccttcttg agacacgcga gggaaacgcc cgattcgtac agagattcac cccactcgga 1320
gcgctatgtc agcgcgatga ccactcccgc cagaatgtcg ccggtggatt ttcatacacc 1380
ttcgtcccct aagtcaccgc ctagcgagat gtcgccgcct gtatcatcca tgacagtgag 1440

catgccctcg atggccgtgt caccgtttat ggaggaggaa aggcccctgt tgttggtcac 1500
accaccaaga cttcgggaga aaaagttcga ccaccatccg cagcagttct cgtcgttcca 1560
ccataatccg gcgcacgata gcaactccct cccggcatcg cctctccgga ttgtcgaaga 1620
tgaggagtac gaaacgaccc aagaatacga acccgcgcaa gagccggtaa agaagctcgc 1680
aaatagcaga agggcgaaac gcaccaaacc aaacggacac attgcgaaca ggcttgaggt 1740
cgacagcaat acctcgtccc agtcgtcaaa ctccgagagc gagacagagg acgagcgagt 1800
cggggaggac acacctttтc tcggaatcca aaacccgctt gcagcgtcgt tggaagccac 1860
gccagcgttt agacttgcgg actcacggac taaccctgcc ggaaggttct cgacgcaaga 1920
ggagattcag gctaggttgt cctcggtgat tgctaatcag gaccccatcg ccgtgtgata 1980
ataggctgcc ttctgcgggg cttgccttct ggccatgccc ttcttctctc ccttgcacct 2040
gtacctcttg gtctttgaat aaagcctgag taggaaggcg gccgctcgag catgcatcta 2100
ga 2102

<210> 203
<211> 818
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 203

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aauaagccuc 60
ucuuguggau cucggucuug acgucccuuu uggaggcauu cgcccacacg gacuugucgg 120
gaaagguauu cguguuuccc cgggaaagcg ucacugauca ugucaaucuc aucacgccuc 180
uggagaaacc acugcagaac uuuacacucu gcuuucgagc cuauucggau cugucaagag 240
ccuacucgcu cuucuccuau aacacacagg gacgggacaa cgagcuucuu guguacaagg 300
aaaggguagg agaguacuca cucuacaucg gucgccauaa agugaccucc aaaguaaucg 360
aaaaguuccc ggcucccguc cacauuugug uaucauggga guccucguca gggaucgcgg 420
aguucuggau uaaugggaca ccccuuguga agaagggacu gagacagggg uauuucguag 480
aagcgcagcc gaaaaucgug uugggucagg aacaagacag cuacggaggg aaguuugaca 540
ggagccaauc guuuguggga gagaucggug aucuuuacau gugggacucg guccugccac 600
ccgaaaacau cuugagcgca uaccagggga ccccguugcc cgcgaauauu cucgauuggc 660
aggcgcucaa cuaugagauu cgcggcuaug ucauuaucaa accgcuggug ugggugugau 720
aauaggcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 780
uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 818

<210> 204
<211> 1469
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 204

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gggccucccg 60
ggucgccgug gcaguggguc accuugcugc uuggguugcu guugccuccu gcugcgcccu 120
uuugguugcu gaaugugcuc uuuccaccuc acacgacacc aaaggccgag cucucgaauc 180
acaccaggcc ggugauuuug gugcccgggu gccuugggaa ccaacuggaa gccaaauugg 240
acaagcccga uguggugaac uggauguguu aucgaaagac agaggacuuc uucacuauuu 300
ggcuugaccu caauauguuu cucccgcugg gaguggacug cuggaucgau aauacccgcg 360
ucguauacaa cagauccagc ggucuuguau caaacgcucc cggaguccag auuagagucc 420
ccgguuuugg aaaaacuuac agcguagaau accuugauuc aucaaaacuu gcgggauauc 480
ugcauacgcu ggugcagaac cucgugaaua acggguacgu cagagaugaa acaguccgag 540
ccgcaccgua cgacuggcgc uuggaaccgg gccaacagga ggaguauuac cgcaaacucg 600
ccggacuugu cgaggagaug cacgcagccu acggaaagcc aguguuucug auuggucauu 660
cacuggggug ucuccacuug cucuauuuuc ucuugagaca gccucaagcg uggaaagacc 720
gguucaucga cggcuuuauc ucccucggug cgccaugggg aggcuccauc aagccuaugc 780
ucgucuuggc aucgggcgau aaccagggca ucccgauuau gagcagcauc aaacuuaagg 840
aggagcagag gauuacuacg acaucgcccu ggauguuccc guccagaaug gccuggcccg 900
aagaucaugu auucaucagc acgcccucgu ucaauuacac agggcgagac uuccagaggu 960
uuuucgcgga ucuccacuuc gaggaagggu gguacaugug gcuucaaucg cgggacuugc 1020
uggcgggacu cccugcgccu gggguggaag uauauuguuu guacggaguc ggccuuccca 1080
cgccacggac uuauaucuac gaccacgggu uccccuauac ggauccggua ggaguacuuu 1140
augaggacgg ggaugauaca guggcgacgc ggagcacgga guugugcgga uuguggcagg 1200
gucggcagcc acagccggug caccuguugc cgcugcacgg aauucagcau cugaauaugg 1260
uguuuucgaa ccucacccuu gaacauauca acgcaauccu gcucggugcg uaucgccagg 1320
gaccgccagc uucacccaca gcaucgccgg agccgccacc gccugaauga uaauaggcug 1380
ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc ccuucuucuc ucccuugcac cuguaccucu 1440
uggucuuuga auaaagccug aguaggaag 1469

<210> 205
<211> 809
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 205

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gagcucgggc 60
ucggaggccu uucgacacug agccauuguc ccuggcccag gcagcagccc gcguuguggc 120
ccacguuggc ggcguuggcg cugcuuucau cagucgccga ggcgucccuu gggagcgccc 180
cucgcucccc ggcacccaga gaaggcccuc cgcccguccu cgcaucgccg gcugggcacc 240
uuccgggugg uagaaccgcg agaugguguu cgggaagagc cagacggccu ccaccucaac 300
ccucaaggcc cgcaccgccu ccuccggcac cgccgucagc gcugccccga ggagggcgag 360

cagcgagggc gggagggccu gguucaaggg cgagagcagc cggagccagg ggaugucggc 420
ugcggagcca gcuugugccg gugagggcuc ugggacuugg gcaucgcagc gacgaguugg 480
ugcgcuuccg guucuguagc ggaucgugcc gcagagccag gucgccacac gaucucuccc 540
uggccuccuu gcucggagcu ggcgcguugc gcccaccacc ugguucacgg cccgugucac 600
agcccugcug cagacccacg agguacgaag cgguaucguu uauggaugua aacucgacau 660
ggcgcacugu cgaccgcuug ucggcaaccg cgugcgggug ccucgguuga uaauaggcug 720
ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc ccuucuucuc ucccuugcac cuguaccucu 780
uggucuuuga auaaagccug aguaggaag 809

<210> 206
<211> 2333
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 206

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug ugggugacga 60
aauugcuccc ugcucuucug cuccagcaug ucuugcucca uuugcuucuc cugccgaucg 120
ccaucccuua cgcggaaggg cagcggaagc ggcgcaacac uauccaugag uucaagaagu 180
cggccaagac gacccucauc aaaauugacc ccgcauugaa gaucaagaca aagaaaguga 240
acacagcaga ucagugcgcc aacagaugca cgcggaacaa agggcuuccu uucacaugua 300
aagcguuugu guucgauaag gcgcgcaagc aauguuugug guuccccuuu aacucaauga 360
gcuccggagu gaagaaggag uuuggacaug aguucgaucu uuacgagaac aaagauuaca 420
uccggaauug uaucaucgga aaaggcagau cauacaaagg aacagugucg auuacaaaau 480
cagggaucaa gugucaaccg uggucaucaa ugauuccgca cgagcauucg uuccuucccu 540
ccuccuaucg ggguaaagac cuucaagaaa acuacugccg gaauccccga ggagaggaag 600
gugggcccug gugcuuuaca ucaaauccag agguacgcua cgaagucugu gacaucccgc 660
agugcucgga aguggagugu augacaugca auggggaaag cuacagagga uugauggauc 720
acaccgaguc cgggaaaauc ugccagaggu gggaucacca aacaccacac aggcauaagu 780
uccucccccga aagguacccg gacaaagguu ucgaugauaa cuacuguagg aauccggacg 840
ggcagccgag gccauggugc uacacucuug auccucauac uaggugggag uauugcgcga 900
uuaagacgug cgcggacaau accaugaaug acacggaugu gccacuggaa acaacugagu 960
gcauccaggg gcagggagag ggcuaucgcg guacagucaa uacgaucugg aacggcaucc 1020
cgugccagag augggacucc caguacccgc augaacacga caugacuccc gagaauuuca 1080
agugcaagga uuugcgcgag aauuacuguc gaaaccccga uggaucggag ucacccuggu 1140
guuuuacgac ugaucccaau auccgaguag gcuauugcuc gcaaauccca aauugcgaca 1200
ugucacacgg ucaagacugc uaccggggaa acggaaagaa cuauaugggu aaccugucgc 1260
agacgagguc gggucugacg ugcuccaugu gggacaaaaa cauggaggau cuucaccgac 1320
acaucuuuug ggaaccggac gccuccaaac ucaacgagaa cuauuguaga aaucccgacg 1380
acgacgcgca ugggccgugg uguuauaccg gaaaucccuu gaucccccugg gauuacugcc 1440

cgaucucgcg gugugaagga gacacgacac cuaccauugu gaacuuggau cauccgguga 1500
uuucaugcgc gaaaacgaag cagcugcggg ugguaaacgg uauucccacc agaacuaaca 1560
uuggguggau ggugagccuc agauauagaa acaaacauau cugcgguggc ucgcuuauca 1620
aggaaucgug ggucuugacu gcaaggcagu guuuucccag ccgggaucuu aaggacuacg 1680
aggcguggcu cgguauccau gacguccacg gacgcggaga ugaaaagugc aaacaggugc 1740
ucaaugucag ccagcucgug uaugggcccg agggaagcga ucuuguacuu augaaguugg 1800
cgcgaccggc gguacuggac gacuuuguau cgacaauuga uuugccgaau uaugguugca 1860
ccauuccgga gaaaacgucc ugcucagucu acgggugggg uuacacgggg cugaucaacu 1920
augaugggcu ccuuagggug gcacacuugu auaucauggg gaacgagaaa uguucgcagc 1980
accaccgcgg uaaagugacg cugaacgaaa gcgaaaucug ugcgggagcu gagaagauug 2040
ggucaggccc uugugaggga gauuacggug ggccccuggu cugugaacag cacaagaugc 2100
gcauggucuu gggagugauu guaccaggac gcgguugugc caucccuaau aggccuggaa 2160
ucuucgugcg cgucgccuau uacgccaaau ggauucacaa gaucauccuu acauacaagg 2220
ugccccaguc gugauaauag gcugccuucu gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu 2280
ucucucccuu gcaccuguac cucuuggucu uugaauaaag ccugaguagg aag 2333

<210> 207
<211> 677
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 207

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug uuucacgugu 60
cauuucggua uaucuuuggg cugccuccgc uuauccucgu acuccucccc guggccuccu 120
cagacugcga cauugagggg aaagacggga agcaguacga aucgguacuu auggucagca 180
ucgaccagcu cuuggacucg augaaggaaa ucgggucgaa uugucugaac aaugaguuca 240
acuucuucaa gcgacauauc ugugaugcua acaaagaggg aauguuccug uuuagagcgg 300
cgagaaaacu gcgccaguuu uugaagauga auucaaccgg ugauuucgau cuucaccugc 360
uuaaaguguc cgaggguaca acuauccucc uuaacugcac gggacagguc aagggacgga 420
aaccggcagc gcucggagaa gcccaaccca caaagucgcu ggaggaaaac aagagcuuga 480
aggaacagaa gaaauugaau gaucucugcu ucuugaaaag guugcuucaa gagauuaaga 540
cguguuggaa uaagauuuug augggcacga aagagcauug auaagcugcc uucugcgggg 600
cuugccuucu ggccaugccc uucuucucuc ccuugcaccu guaccucuug gucuuugaau 660
aaagccugag uaggaag 677

<210> 208
<211> 1343
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 208

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aagaugcgcu 60
uucucgggcu cguaguaugc cugguccucu ggacgcugca cucggaggga uccaggggaa 120
agcugacggc cguagacccc gaaacgaaua ugaaugucuc ggagauuauc uccuauuggg 180
gcuuuccguc agaggaguau cugguagaga cagaggaugg uuacaucuug ugucucaacc 240
ggaucccccа cggacggaaa aaccacucgg auaaaggacc gaagccgguc guguuucuuc 300
agcacggacu ucuggccgac uccucgaauu gggugacgaa uuuggcgaac uccucguugg 360
gguuuauccu cgcggacgcc ggauuugaug uguggauggg caacucgcga gguaacacgu 420
ggucaaggaa acauaaaacc cugucagucu cgcaagacga guucugggca uucucguacg 480
augaaauggc gaaguaugac cugcccgcgu caauuaacuu cauccucaau aagaccggac 540
aagaacaggu auacuaugug ggccauagcc agggaacaac gaucggguuu aucgcuuuca 600
gccagauccc ggagcucgcu aagcgcauca agauguucuu cgcgcucggg ccuguggcgu 660
caguggcguu cugcacgucg cccauggcaa aauuggguag auugcccgac caucuuauca 720
aagaucuguu uggggauaag gaauuucugc cgcagucggc cuuccucaaa ugguugggga 780
cacacgucug uacucacgug auuuugaaag aacuuugcgg gaacuugugc uucuugcuuu 840
guggauucaa ugagcggaau uugaauaugu caagagucga ugucuacacc acccauucac 900
cagcaggaac aucaguccag aauaugcugc auuggуccca agcggucaaa uuccagaagu 960
uccaagcauu ugacuggggc ucgagcgcca aaaacuauuu ccacuauaac cagucguacc 1020
cgccuacuua caauguaaag gacaugcuug uccccacugc gguguggagc ggugggcacg 1080
auuggcuugc ggacguguau gaugugaaca uucuucucac acagaucaca aaccuggugu 1140
uucaugaguc cauucccgaa ugggaacacc ucgacuucau cuggggуuug gacgccccuu 1200
ggaggcucua caacaagauu aucaacuuga ugcgaaagua ccagugauaa gcugccuucu 1260
gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu ucucucccuu gcaccuguac cucuuggucu 1320
uugaauaaag ccugaguagg aag 1343

<210> 209

<211> 992

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 209

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cgagggauga 60
agcuucucgg ugcguuguug gcgcucgcag ccuugcugca gggagcggug agccucaaaa 120
uugccgcuuu caacauccag acauuuggcg agacuaaaau gagcaaugcg acacuuguau 180
cguacaucgu acagauucug ucgagauacg acauugcgcu cgugcaagaa gugagagaca 240
gccaccugac ggcaguggga aaauugcucg auaaucucaa ccaggacgcu cccgacaccu 300
accacuacgu cguaagcgaa cccuuggggc gaaacucgua uaaggagcgc uaccuguucg 360
uauacaggcc ggaucaaguc uccgcggugg acucauauua cuaugacgau gggugugagc 420

cgugcgggaa cgacaccuuu aaccgggaac cugcuaucgu cagguucuuc ucgcgcuuua 480
cggaaguccg cgaguuugcc aucguacccu ugcacgccgc accaggagau gcgguggccg 540
agaucgaugc ccucuaugac gucuaucucg auguccaaga gaaguggggu cuugaagaug 600
ugaugcuuau gggagacuuc aaugccggau guucauaugu ccggcccuca cagugguccu 660
cgaucaggcu guggacguca cccacauuuc aguggcugau uccggacucc gcagacacua 720
cggcgacgcc cacccauugc gcguacgauc ggaucguagu ggcagggaug cuccuuagag 780
gcgcgguggu cccggauucc gcucuuccuu ucaauuucca agcggcauac ggucuuucag 840
accaguuggc ccaggcgauc ucggaucauu auccugucga ggugauguug aagugauaag 900
cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca ugcccuucuu cucucccuug caccuguacc 960
ucuuggucuu ugaauaaagc cugaguagga ag 992

<210> 210
<211> 947
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 210

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aaagcagcgg 60
ugcuuacgcu cgcuguguug uuccugacag gcucgcaagc gcggcauuuu uggcagcagg 120
acgaaccgcc ucagucgcca ugggaccgcg ugaaagacuu ggcgaccguc uacguggacg 180
ucuugaagga uucgggucgg gauuacguau cacaguucga agggucggca cugggaaagc 240
aguugaaucu caaacuguug gauaacuggg acagcgugac cucgacuuuu ucaaaacuga 300
gggagcaguu gggacccguc acccaagagu uuugggacaa ccucgagaag gagacagagg 360
gguugcgaca ggagaugagc aaggauuugg aagaaguaaa ggcgaaggua cagccuuauc 420
uugaugacuu ccaaaagaaa uggcaggaag aaauggaacu cuaucgccag aagguagagc 480
cccuucgggc ggaacuucaa gagggagcga ggcaaaaacu ccacgaacuc caagagaaac 540
uuuccccgcu uggggaagag augcgcgaua gagccagggc gcaugucgac gccuugcgaa 600
cgcaccuggc gcccuacucc gaugaguuga gacagugccu ggccgccagg cucgaagcgc 660
ugaaagaaaa ugguggugcc cggcuggcag aguaucacgc caaggcgaca gagcaccuca 720
gcacgcuuuc cgagaaggcu aaaccggcac uugaggaccu uagacaggga cugcuucccg 780
ucuuggaauc guucaaggug ucauuucugu cagcccucga ggaauacacg aagaagcuca 840
acacucagug auaagcugcc uucugcgggg cuugccuucu ggccaugccc uucuucucuc 900
ccuugcaccu guaccucuug gucuuugaau aaagccugag uaggaag 947

<210> 211
<211> 1316
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 211

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aaugguacgc 60
gcaacuggug cacucucgug gaugugcacc cggaagauca ggcagcuggg uccgucgaca 120
uucuccggcu gacacuucag ggggaacuga ccggggacga gcuggagcac aucgcgcaga 180
aagcgggucg aaaaacauac gcgaugguga gcucgcacuc ggcugggcac ucccucgccu 240
cagaacuggu ggaaucacac gauggacaug aagagaucau caaaguauau cucaagggac 300
gcuccggaga caagaugauu caugagaaga auaucaacca auugaaguca gaaguccagu 360
auauccaaga ggcgcggaac uguuugcaaa agcugagaga ggacauuucg ucaaagcucg 420
auaggaacuu gggcgauagc uugcaccgac aggagauuca aguaguacuc gaaaagccca 480
auggcuuuuc ccagucgcca accgccuugu auucgucacc cccugagguc gacacaugca 540
ucaaugagga cgucgaauca cuuagaaaga cagugcaaga ccuuuuggcg aaacuccaag 600
aagcgaagcg ccagcaucag ucggauugug uagccuucga aguaacguug ucaagguacc 660
agagagaggc ggagcagucg aacguggcgc uucaacgcga agaggaucgc guagagcaaa 720
aagaggcuga ggucggugag cuucagagaa gguugcucgg gauggaaacg gagcaccagg 780
cacucuuggc caaagucaga gagggagagg uggcauugga agaacuuagg uccaacaaug 840
cggauugcca ggccgaacgg gaaaaggcgg ccacucucga gaaagagguc gcgggauugc 900
gagagaagau ccaucauuug gacgacaugc uuaagucgca gcagcggaaa gugaggcaga 960
ugaucgagca gcugcagaac ucgaaagccg ugauccaguc caaagaugca acgauucaag 1020
agcucaaaga gaaaauugcg uacuuggaag ccgagaaucu cgaaaugcau gaccgcaugg 1080
aacaccuuau cgaaaagcag auuucacacg gaaauuucag cacgcaggcg agagcaaaga 1140
ccgaaaaccc ggggucgauu cggaucagca aaccgccuuc gccgaagccc augcccguca 1200
ucagagucgu ggaaacguaa ugagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu 1260
ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1316

<210> 212
<211> 947
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 212

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aaggcggcag 60
ucuugacgcu cgcgguacuc uuucugacag ggucacaggc caggcacuuc uggcagcagg 120
acgaaccgcc ucagucgccc ugggaccgag ugaaagauuu ggcgacggua uacgucgaug 180
uguugaagga uuccgguaga gauuaugugu cacaguuuga gggaucagcc cuugggaaac 240
aacucaaucu caaacuccuc gacaacuggg acagcgucac auccacguuc ucgaagcugc 300
gcgagcaacu uggacccgua acccaagagu ucugggauaa ucuugaaaaa gagacagagg 360
gguugcgcca ggaaaugagc aaggaccucg aggaagugaa ggcgaaagug cagccuuauc 420
uugacgacuu ccaaaagaag uggcaggaag aaauggaauu guacagacag aaggucgagc 480
cacucagggc ggagcuucaa gaaggcgcuc gacagaaguu gcacgagcug caagagaagc 540

ucagcccguu gggagaggaa augcgggacu gcgcacgcgc ccacgucgac gcguugcgga 600
cucaucuggc cccauacucg gaugaacuca ggcagcggcu ugcugcaaga cuugaggcac 660
ugaaggaaaa cgguggggcu cgguuggcgg aguaucaugc gaaagccacg gagcaccuuu 720
ccacccuuuc ggagaaagca aaacccgccc uugaagaucu gcgccaggga uugcugccgg 780
uacuugaguc guuuaaggug ucguuuuugu ccgcgcugga agaguacacu aagaaacuga 840
acacacagug auaagcugcc uucugcgggg cuugccuucu ggccaugccc uucuucucuc 900
ccuugcaccu guaccucuug gucuuugaau aaagccugag uaggaag 947

<210> 213
<211> 947
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 213

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug aaagcggcgg 60
uccugacgcu cgccguccug uuuuugacgg gaagccaagc gcggcacuuu uggcaacagg 120
acgaaccccc ucaguccccc ugggauagag ugaaggaucu cgcgacugug uaugucgaug 180
ugcuuaagga uucgggaaga gacuaugugu cacaguucga aggcucggca cuggggaaac 240
agcuuaaucu gaaguuguug gacaauuggg auucggucac guccacguuc ucaaaacucc 300
gcgaacagcu ugguccggua acccaagagu ucugggacaa cuuggagaag gagacagaag 360
ggcugcgaca ggagaugagc aaagaccuug aggaagucaa agccaaggua cagccguacu 420
uggacgacuu ccaaaagaag uggcaggaag aaauggaacu cuaccggcag aaaguggagc 480
cgcucagagc ggagcugcaa gaaggggcac ggcagaagcu ccacgaacuu caagagaaau 540
uguccccacu gggagaagag augcgggacc gcgcacgagc ccacguggau gcguugagga 600
cccaucuugc accuuacucc gacgagcuga ggcagcgauu ggcagccagg cuugaagcgc 660
uuaaggagaa cgguggagcc cgccuggcug aauaccaugc aaaggcgacu gaacaccucu 720
cgacauuguc ggagaaggcc aaacccgcac uugaggauuu gagacagggg cuccugcccg 780
ugcuggaaag cuuuaaggua ucauuucuuu cggcgcucga ggaguacacc aaaaagcuca 840
acacacagug auaagcugcc uucugcgggg cuugccuucu ggccaugccc uucuucucuc 900
ccuugcaccu guaccucuug gucuuugaau aaagccugag uaggaag 947

<210> 214
<211> 1805
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 214

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcggucgagu 60
cgcaaggugg acggccucuu gugcuugguu ugcuccuuug uguacucggc ccugucgugu 120

cacacgccgg gaagauuuug uugauccccg uggacggauc acauuggcuu ucgaugcucg 180
gagccaucca gcaguugcag caaaaggggc augagauugu gguccuggcu ccggacgcgu 240
cgcucuacau ucgcgauggu gcauucuaua cucuuaagac auauccagug cccuuccagc 300
gcgaagaugu caaagaguca uuugucucac ugggacacaa cguauucgag aacgacuccu 360
ucuugcagag agucaucaag acguacaaga aaaucaaaaa ggauagcgcc augcuguugu 420
cagggugcuc gcacuugcuu cacaacaagg agcugauggc gucacuggcg gagucgagcu 480
uugaugucau guugacggac ccguuuuugc cguguagccc gaucguggcg caauacuugu 540
cccuucccac cguauucuuc cuccacgcgc uucccuguag ccuggaguuu gaggcgaccc 600
agugucccaa ucccuuuuca uacgugccuc gaccguuguc aucacauucg gaccacauga 660
cguuccucca gcgggugaag aauaugcuca ucgccuuuuc ccaaaacuuc cucugcgacg 720
ucgucuacuc cccuuacgcc acgcuggcau ccgaguuucu gcagcgagag gugacugugc 780
aagaccuucu cucgucggca ucaguauggu uguuccgauc agauuucgua aaggacuacc 840
caagacccau caugcccaac augguguucg uagggggaau caauugccuc caccagaauc 900
cgcugagcca ggaguuugaa gcguauauca acgcgucggg ggaacacgga auugucgugu 960
uuagccuggg gucgauggua ucggagauuc ccgaaaagaa ggcgauggca aucgcagacg 1020
cacucggaaa gauccccccag acaguccuuu ggcgguauac agggacgagg ccgagcaauu 1080
uggcaaacaa uacgauccuu gugaaauggu ugccgcagaa ugaucuucuc ggucauccca 1140
ugacaagagc cuucaucacg cacgccgguu cgcauggggu auaugaaucg auuugcaaug 1200
gcgugccuau ggugaugaug ccgcucuuug gugaccagau ggacaaugcg aaaaggaugg 1260
aaaccaaggg agcaggaguc acccugaaug ugcuggaaau gacauccgag gaucucgaaa 1320
acgcgcuuaa agcggucauu aacgacaaau cguauaagga aaacaucaug agguugagcu 1380
cccuucacaa agauagaccu gucgagccau uggaccuggc cguguuuugg gucgaguucg 1440
ugaugcggca caagggagcg ccacacuuga ggccagcugc gcaugaucug acgugguauc 1500
aguaccacuc ccucgaugug auuggcuucc ugcuggcagu cguguugacu guggcguuua 1560
ucacauucaa auguugcgcu uacggcuacc ggaagugcuu gggaaagaaa ggacgcguga 1620
aaaaggccca uaagucgaaa acacauugau aagcugccuu cugcggggcu ugccuucugg 1680
ccaugcccuu cuucucuccc uugcaccugu accucucaaa caccauuguc acaaacacca 1740
uugucacaaa caccauuguc acaaacacca uugucauggu cuuugaauaa agccugagua 1800
ggaag 1805

<210> 215
<211> 1205
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 215

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gagcuuacgg 60
agcugcuccu ugucgucaug uugcugcuga cggcgcgauu gacacucuca uccccugcac 120
cucccgcgug cgacuugcgg guccugucga aguuguugcg agacucgcau gugcuccacu 180

cacgguuguc gcagugucca gaggugcacc cauugcccac cccgguguug cucccggcug 240
uggauuucuc gcuuggagag uggaaaacgc aaauggaaga aacuaaggcc caagacaucu 300
ugggagcggu gacacuucuc cucgaagggg ugauggcugc aaggggucaa uuggguccca 360
caugccucuc cagccucuug gggcagcuuu ccggucaggu gcggcuucug cuuggugcgc 420
ugcagagccu gcuuggaacu caguugccac cgcaggggcg cacuaccgcg cacaaagacc 480
ccaacgccau cuuucuuucc uuucagcacu uguugcgcgg uaaaguacga uuucucaugc 540
ucgucggugg cucgacacuu ugugucagaa gagcaccucc cacaaccgca gugcccuccc 600
ggacaagccu uguacugacg cucaacgagc uuccgaauag gacaagcggg cuccucgaaa 660
cuaacuuuac ggcgucggcc aggacgacgg gaucaggccu ucucaagugg cagcagggau 720
uccgcgccaa gaucccuggu uuguugaacc agacaucgag gucauuggau cagauucccg 780
gguaucuuaa uaggauucac gagcuucuga auggaacgag agggcuguuc ccgggaccau 840
ccagacggac gcucggagcc cccgauaucu cgucggggac gagcgacaca gggucacugc 900
cucccaaucu gcagccaggu uacucgccuu cccccacgca ucccccgacg ggacaauaca 960
cgcucuuccc ccuuccgccu acacugccua ccccgguagu acagcuccau ccguugcugc 1020
ccgauccauc agcgccgacc cccacaccca ccagcccgcu ucucaacacu ucauauacgc 1080
auagccagaa ccucucgcaa gaaggauaau gagcugccuu cugcggggcu ugccuucugg 1140
ccaugcccuu cuucucuccc uugcaccugu accucuuggu cuuugaauaa agccugagua 1200
ggaag 1205

<210> 216
<211> 1538
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 216

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcgucggaga 60
gcgguaaacu uuggggugga cgauucgucg gggcaguaga ccccaucaug gagaaguuua 120
acgcgucgau ugccuaugac agacaucucu gggaaguaga cgugcaagga uccaaagccu 180
auucacgcgg gcuggaaaag gccggacugu ugacgaaggc agagauggac cagauccuuc 240
auggguugga uaaagucgcu gaagaguggg cccagggaac cuucaagcuc aauucgaaug 300
acgaagauau ccacaccgcc aacgagcgca gacuuaaaga acugauugga gcgacagccg 360
guaaacugca caccggaagg ucacggaacg accagguggu cacugaucuu aggcugugga 420
ugaggcagac gugcagcacg cugucggggu ugcuuuggga guugauccgg acgauggucg 480
aucgagcuga ggcagagaga gauguacuuu uccccgggua uacacauuug caacgcgccc 540
agcccauccg guggucccac uggaucuugu cccacgcggu ggcucugaca cgcgauagcg 600
aacggcuccu ugaaguccgc aagagaauca auguccuccc uuugggaucc ggugcgauug 660
ccggaaaucc acugggagug gaccgggaac ucuugagggc agagcucaac uuuggcgcaa 720
uuaccuugaa cucaauggac gcaaccucgg agagggacuu cguagcggag uuucucuuuu 780
gggcgucccu uugcaugacu cauuugucac gcauggcgga ggaucugauc uuguacugua 840

caaaagaguu uuccuucguc cagcucucag acgcguacuc gacgggaucg agccugaugc 900
cgcagaagaa aaacccagac ucauuggagc ucauccgguc gaaggccggg aggguguucg 960
ggagaugcgc agggcuccuu augacgcuua agggacuucc gucaacuuac aauaaggauc 1020
uccaagaaga uaaagaagcc guguuugaag ucagcgacac uaugagcgca guguugcaag 1080
uagccacggg cgugaucucg acgcugcaga uccaucagga gaauauggga caggcgcugu 1140
ccccggauau gcucgcgaca gauuuggcuu auuaccucgu ccggaagggg augcccuuca 1200
gacaggcgca cgaggcgucg ggaaaggcgg uauucauggc cgaaacaaaa ggcguggcgu 1260
ugaaccagcu gucgcugcaa gaauugcaga cgaucucgcc ucucuuuucc ggugauguga 1320
uuuguguaug ggacuauggg cacucggugg agcaguacgg ggcauugggc gguacagcga 1380
ggucaucagu ggacuggcag auuagacagg ugcgcgcucu ccuucaagcg caacaggccu 1440
gauaagcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 1500
uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 1538

<210> 217
<211> 494
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 217

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gacuacuaua 60
ggaaguacgc ugcaaucuuu cucguaacac uuucagucuu ucuccaugug cugcauucgg 120
ccccugaugu gcaagacugu ccagaaugca cgcugcaaga gaacccguuc uucagccagc 180
ccggagcgcc cauuuugcag uguauggggu guugcuuuuc acgggccuau ccgacgcccc 240
uuagaucgaa gaaaaccaug uuggugcaga agaacguaac cucggagucc acuuguugcg 300
uggcgaaauc guacaaucgc guaacaguca ugggcgguuu caaggucgaa aaucacacag 360
cgugccacug cagcacgugu uacuaucaca aauccugaua agcugccuuc ugcggggcuu 420
gccuucuggc caugcccuuc uucucucccu ugcaccugua ccucuugguc uuugaauaaa 480
gccugaguag gaag 494

<210> 218
<211> 1354
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 218

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug guggccggua 60
cccgcugccu ccucgcgcug cuuuugcccc aaguguugcu ggguggcgca gccggacucg 120
ucccagagcu uggacgaagg aaguuugcag cagccucguc agguagaccc ucuucgcaac 180
cuucggauga ggugcugagc gaauuugaau ugcggcugcu cuccauguuu ggacugaagc 240

agcguccgac uccaucgcgc gacgcggugg ugccaccuua caugcuugac cucuaccgca 300
gacacagcgg acaaccuggc agcccugcac ccgaucaccg gcuggagaga gcagcaagca 360
gggcaaauac uguccggucg uuucaucaug aagagagccu ugaagaacug ccagaaaccu 420
ccggaaagac cacgagacgg uuuuucuuca aucuuucuuc gauuccaacc gaagaauuca 480
uaacuagcgc agaacuucaa guuuuucgcg agcagaugca agaugcacuu ggaaacaacu 540
ccucauucca ucaucgaauc aacauauacg aaaucaucaa gccggcaacc gccaacucaa 600
aguucccggu gacucgucug cuugauacgc gccuggucaa ccaaaacgcu ucccgcuggg 660
aaucauucga ugucacccca gccguuauga gauggacugc ucaaggacac gcaaaccaug 720
gguuuguggu ggaaguggcc caucuugaag aaaagcaggg ggugagcaag cgucacguga 780
gaauuucgag aucccugcau caggaugaac auucaugguc gcaaauucgg ccacuccugg 840
ucacuuuugg ccacgauggu aaaggacacc cucugcauaa gagggagaaa agacaggcga 900
agcauaaaca gaggaagaga cugaagucca gcugcaagcg acaucccuu uacguggacu 960
ucucggacgu gggguggaau gacuggauug uggcaccucc uggcuaccac gccuuuuacu 1020
gucauggaga augucccuuu ccacuggcgg aucaccucaa uuccaccaau caugcaauug 1080
ugcaaacccu ugugaacuca gucaauucca aaaucccuaa ggcuuguugu gucccuacug 1140
agcucuccgc aauuucgaug cucuaccuug augagaacga gaaagucgug cugaaaaacu 1200
aucaggacau ggucguggag gguugugguu gccggugaua auaggcugga gccucggugg 1260
ccaugcuucu ugccccuugg gccucccccc agccccuccu ccccuuccug cacccguacc 1320
cccguggucu uugaauaaag ucugaguggg cggc 1354

<210> 219
<211> 2576
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 219

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gaacacaaag 60
aggucguccu cuugcugcuc cuguuucuca aaucgggcca gggagagccc uuggacgauu 120
acgugaacac acagggcgcg agccuguucu cgguaacgaa aaagcaguug ggagcuggcu 180
caauugaaga augugcggcg aaaugcgaag aagaugaaga guucacgugu cgggcauuuc 240
aguaucacuc gaaagagcaa cagugcguga ucauggcaga gaaccgaaaa ucgucgauca 300
ucaucagaau gcgggacguc gugcuguucg aaaagaaagu guaccuguca gaguguaaga 360
cggguaaugg gaaaaacuau aggggcacaa ugucaaagac uaagaauggg auuacauguc 420
agaaaugguc guccacgucc ccucacagac caagauucuc gccugcuacg cauccguccg 480
agggcuugga ggagaacuau ugucgcaacc cagauaacga uccccaaggg ccuuggugcu 540
acaccacaga ccccgagaag cgguaugauu acugcgauau ucuugaaugc gaggaggagu 600
guaugcacug cuccggagag aacuacgaug gaaagaucuc caagacaaug uccggacugg 660
aaugucaggc cugggacuca cagucgcccc augcacacgg uuacauuccu agcaaauucc 720
cgaauaagaa ccuuaagaag aauuacugcc ggaacccgga ccgagagcuu cgcccuuggu 780

guuucacaac cgaccccaac aagagauggg agcuguguga cauuccgaga uguacaacac 840
caccgccguc aucgggucca accuaucaau gucugaaggg aacgggugag aacuaucggg 900
gaaacgucgc ggucacagug agcgggcaca cgugccagca cuggucggcg cagacacccc 960
acacacauaa ucggacgcca gaaaacuucc cuuguaagaa ucuggaugag aacuacugca 1020
gaaacccaga cgguaaaaga gccccguggu gccauacuac gaacagccaa gugcgauggg 1080
aauauuguaa gaucccgucg ugcgacucau cgccaguaag cacugaacaa cuugcaccga 1140
cggcuccucc cgaguugacg ccuguggugc aagauuguua ccauggcgau gggcagucau 1200
acaggggaac uagcagcacc accacgacgg gcaaaaagug ucagucgugg uccuccauga 1260
caccacaccg gcaccaaaag acuccggaga auuacccaaa ugcgggucug accaugaauu 1320
acuguaggaa cccugacgcg gacaaagguc cauggugcuu uaccaccgau cccuccguac 1380
gcugggaaua cuguaacuug aagaaaugcu cggggacaga agccuccgug guagccccuc 1440
cgccagucgu gcugcuuccc gacguggaga caccguccga agaggacugu auguuuggua 1500
acggaaaggg auauagaggg aaaagggcga cgacggugac ugggacgccc ugucaggacu 1560
gggcagcgca agagccgcac cgccacagca ucuuuacucc cgaaaccaau ccaagggccg 1620
gacuugaaaa gaacuauugc cggaauccgg auggggacgu cggagguccg ugguguuaua 1680
cuacaaaccc uagaaaacuc uacgauuauu gcgauguacc gcaaugugcc gcucccuccu 1740
ucgacugcgg aaagccucaa gucgagccua agaaagucc cgggagagug gugggcgggu 1800
gcguagccca cccgcauucg uggcccuggc agguaucguu gagaacgaga uuugggaugc 1860
acuuuugugg cgguacgcuu aucucccccug agugggucuu gacagcugcg cauugcuugg 1920
agaagucccc ucggccgucc ucauacaagg ucaucuuggg agcccaucag gaggugaauc 1980
uggagcccca uguccaagaa auugagguau cgagguuguu ucucgaaccg acacgcaagg 2040
acaucgcacu gcugaaacuu agcucccccug ccgucaucac agacaaaguc aucccagcgu 2100
gccucccccag ccccaauuac guaguggcgg auagaaccga gugcuucauc acgggauggg 2160
gcgagacaca ggggacguuc ggagcuggcc uccuuaaaga ggcccagcuu cccguaaucg 2220
aaaacaaagu augcaaccgc uaugaguuuc ucaauggacg cgugcagagc acagagcuuu 2280
gcgccggaca ccucgcggga gggaccgaua gcugccaggg ugacagcgga gggccguugg 2340
uguguuucga aaaagacaag uauaucuugc aaggugugac cagcugggga cuuggggugcg 2400
cgaggcccaa uaagccggga gucuauguga gagucucacg cuucgucaca uggauugagg 2460
gagugaugag gaacaacuga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu 2520
ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 2576

<210> 220
<211> 2745
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 220

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug uuuucgauga 60
gaauugugug ucucgucuug ucagucguag gaaccgcgug gaccgccgac agcggggaag 120

gugauuucuu ggcugagggu gguggagucc gcggucccag agugguagaa aggcaucaau 180
ccgcauguaa agacagcgau uggccguucu gcucggauga ggacuggaac uauaagugcc 240
cuuccgggug ucggaugaag gggcucaucg acgaggucaa ucaggauuuc acuaaccgca 300
ucaauaagcu caaaaacucg cuguucgagu accagaagaa caacaaggau agccacucgc 360
ugacuacaaa uaucauggaa aucuugcggg gagacuucuc aagcgcgaau aaucgcgaua 420
auacguacaa ccgaguauca gaggacuuga ggucgaggau ugaaguccuu aagcggaagg 480
ucauugagaa aguccaacac auccaguugc ugcagaagaa cguacgggcg caguuggugg 540
auaugaagag gcuggaagug gacaucgaca ucaagauccg auccugucgg ggaucaugcu 600
cacgagccuu ggcgagggag guagacuuga aggacuauga ggaccagcag aagcaguugg 660
aacaggugau ugccaaggac uugcuuccgu cacgggaucg gcagcaccuc ccuuugauca 720
agaugaaacc cgugccggac cucgugcccg gaaacuucaa gucccagcuu cagaagguac 780
caccggagug gaaagcgcuu acagacaugc cgcagaugcg gauggaguug gagaggccgg 840
gaggaaacga aauuacgaga ggcggcucaa caucguacgg gacagguucg gaaacagaau 900
cgcccagaaa uccaucguca gcaggaucau ggaacagcgg uagcuccgga ccggguucga 960
cgggaaauag aaacccggga ucaucaggua ccggugggac ugcgacuugg aagcccgguu 1020
cgucgggacc gggaucgacu ggaucgugga auagcggcuc cuccgguacu ggaucgaccg 1080
gaaaucagaa uccugguucg ccucggccug gcuccaccgg aacauggaac ccgggcagca 1140
gcgaaagggg aucggcugga cacuggacgu cagagucguc cgugucaggg ucgacggggc 1200
aguggcacuc cgaaucggga ucguuccggc cugauucacc uggcuccgga aacgcaagac 1260
ccaauaaccc ggauuggggu acguuugaag aggucagcgg aaacguauca ccggggacac 1320
ggagggagua ucauacugag aaauugguga caucgaaggg agauaaagag cucagaacgg 1380
ggaaggagaa ggugacgagc ggaucaacga cgacuacuag gagguccugc ucgaaaacug 1440
uaaccaagac cgugauuggg cccgacggcc auaaagaggu cacuaaagaa gucgugaccu 1500
ccgaggaugg guccgacugc cccgaagcca uggaccucgg gacgcuuucc ggaauuggga 1560
cguuggacgg guuuagacac aggcaccccg acgaagcagc guuuuucgau acggccagca 1620
ccggcaaaac guuccccggg uucuucucgc ccaugcucgg agaguuuguc ucagaaacgg 1680
agucgcgcgg uucggagagc gguaucuuua caaauacgaa agagucgucg ucgcaccauc 1740
ccggaauugc agaauuuccc agcaggggca aaagcagcuc auacuccaaa caguucacau 1800
cguccaccuc guacaauaga ggugacagca cauucgaaag caagagcuac aaaauggccg 1860
acgaggcggg uagcgaggcu gaucaugaag guacacauuc aacaaaacgc ggacacgcua 1920
agucgcgacc ggugcgggau ugcgacgaug uccuccagac ccaccccucg gggacacaau 1980
cggguauuuu caauaucaaa cuucccgggu ccucgaagau cuuuucggua uauugugauc 2040
aagaaacguc cuugggaggg uggcuccuua uccaacaacg cauggacggg ucacugaacu 2100
uuaaucgaac guggcaggau uacaaacggg gauucggguc guugaaugac gagggagaag 2160
gggaguuuug gcucggaaac gacuaccucc aucugcucac acagagaggu agcguguuga 2220
ggguggaacu ugaagauugg gcgggaaaug aggcguaugc ggaguaucac uuucgcgucg 2280
ggucagaagc agagggauac gcacuucagg ugucgucgua ugaaggaacg gcuggggacg 2340
cccugauuga ggggagcgua gaggaagggg cagaguauac gucgcacaac aacaugcaau 2400
uuuccacauu cgacagagau gccgaucagu gggaggaaaa cugugcggag guguacggcg 2460

guggguggug guauaacaau ugccaggcgg ccaacuugaa ugggaucuac uaucccggag 2520
gcucguacga uccacgcaau aacucgccau augaaauuga aaauggagug gucugggugu 2580
cguuccgagg agcagauuac ucguugagag cggucaggau gaagaucaga cccuugguaa 2640
cccaaugaua agcugccuuc ugcggggcuu gccuucuggc caugcccuuc uucucucccu 2700
ugcaccugua ccucuugguc uuugaauaaa gccugaguag gaagg 2745

<210> 221
<211> 1619
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 221

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcgcuccucu 60
ggggacugcu cgugcugucc uggucgugcc uccaaggacc cuguucggua uuuucgcccg 120
ugucagcgau ggagccccuc ggacgccagc uuacgucggg gccuaaucag gaacaaguaa 180
gccccuugac acugcugaaa cuggggaacc aggaacccgg agggcagacg gcgcuuaagu 240
caccgccagg agugugcucg agggacccaa cuccggaaca gacgcauagg cuugcacgag 300
ccaugauggc cuuuaccgcc gaucuguucu cccucguggc ccagacaucg acguguccua 360
accucauccu cuccccgcuc ucaguagcuc ucgcccucag ccacuuggcg cuuggcgccc 420
agaaccacac uuugcagagg uugcagcaag uccuucaugc ggggucagga ccauguuugc 480
cucacuugcu gucgcgccuc ugccaggauc ugggaccugg ugcauuccgg cuugcggcca 540
gaauguaucu ccaaaaaggu uuccccauca aggaagauuu ucuugagcag uccgagcagc 600
uuuucggcgc aaaaccggug ucgcugaccg ggaaacaaga ggacgaccug gcgaauauca 660
aucaguggguu gaaggaagcu acagagggua aaauccaaga guuucuuucg ggacugccgg 720
aagauacagu ccuucuucug uugaacgcga uucacuucca aggguuuugg cgcaacaaau 780
uugacccauc ccucacgcag agagacagcu uucaccucga cgagcaguuu acggucccgg 840
uggaaaugau gcaggcgcgg acuuaucccu ugcgcugguu ccuucucgag cagcccgaaa 900
uucaaguggc acauuucccc uucaagaaca auaugucguu ugucguacug gugccaacac 960
acuucgagug gaaugugagc caagugcucg ccaaucugag cugggauacg uugcauccgc 1020
cgcucguaug ggaacggccc accaaagugc ggcugccuaa gcucuaccuu aaacaucaga 1080
uggaccuugu cgcgacucuc agccaguugg ggcuucaaga guuguuucag gcaccggacu 1140
ugcgggguau uagcgaacag agccucgugg uguccggggu ccagcaccag ucaaccuugg 1200
agcucucaga ggucgguguc gaagcggcug ccgcgaccuc aauugcgaug uccagaaugu 1260
cgcuuucguc guuuucaguc aauaggcccu uccuguucuu uaucuuugaa gauacgacag 1320
ggcuuccgcu cuuuguaggc ucaguaagaa accccaaccc aucggcaccg cgcgagcuca 1380
aggagcaaca ggacucgccc gguaacaagg auuucuugca gucccucaag ggauucccuc 1440
gaggagacaa guuguucgga ccugacuuga aguugguccc acccauggag gaggauuacc 1500
cgcaguucgg gagcccgaag ugauaagcug ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc 1560
ccuucuucuc ucccuugcac cuguaccucu uggucuuuga auaaagccug aguaggaag 1619

<210> 222
<211> 2828
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 222

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug auccuucucg 60
cagugcuuuu ucugugcuuc aucuccucgu acucggccuc gguaaagggu cauacgacag 120
ggcuuucgcu caacaacgac cggcuguaca aacuuacgua cuccaccgag guguugcugg 180
aucgcggaaa gggaaagcuc caagauucag ugggcuaucg gaucucgucg aauguggaug 240
uggcguuguu guggagaaac ccugaugggg augacgauca gcucauucag aucaccauga 300
aagacgugaa cguggaaaac gugaaccaac agcgaggaga gaaguccauu uucaaaggaa 360
aaucacccuc aaaaaucaug ggcaaagaga auuuggaggc ucuucagcgg cccacgcuuu 420
ugcaccuuau ucacggaaaa gucaaggagu ucuacucgua ucagaaugag gcgguggcua 480
ucgagaauau caagcgggga cucgcgucgc ucuuccagac ucagcucagc agcgggacua 540
caaacgaggu agauaucucg gguaauugca aggucacgua ucaggcgcac caggacaaag 600
ugauuaagau caaagcacuu gacagcugua aaaucgcgcg gagcgguuuc acuacgccga 660
accagguguu gggaguaucg agcaaagcaa cgagcguaac uacguacaaa auugaggacu 720
cguuugugau cgcgguccuu gcggaagaga cucacaauuu ugggcucaau uuucuccaaa 780
cuauuaaggg aaagaucguc agcaagcaaa agcuggagcu caagacaacg gaggcgggac 840
cacggcugau gucgggcaaa caggcggcug ccaucaucaa agcaguggau ucgaaguaca 900
cagcaauucc uauugucggu cagguguuuc agucccacug caagggaugc ccgucccugu 960
cggaacucug gcgcagcacg aggaaguacc uucagccgga caaccugucg aaggcagaag 1020
ccguccgaaa cuuuuuggcc uuuauccagc aucuccgaac cgcgaaaaag gaagagauuc 1080
uccaaauucu caagauggaa aacaaggagg uacugccaca gcugguggac gcggugacgu 1140
cggcgcagac gagcgacucg cuugaagcga uuuuggacuu ccucgauuuc aagucggauu 1200
cgucgauuau ucuucaagaa agauuucucu augcaugcgg auuugccuca cauccaaacg 1260
aggaacuccu uagggcguug auuucgaagu uuaaaggauc gauuggcagc agcgacaucc 1320
gggagacagu caugaucauu acggggacuu uggugcgaaa guugugucaa aaugaggguu 1380
guaagcugaa ggccgugguc gaggcgaaga aacucauuuu gggcggacuc gagaaagcug 1440
agaagaaaga ggacacgaga auguauuugu uggcauugaa gaaugcguug cuucccgaag 1500
ggaucccguc guugcucaaa uacgccgagg cgggugaggg gccuauuagc caccucgcca 1560
ccacagcguu gcaaagauac gaucucccuu ucaucacuga cgaagucaag aaaacacuua 1620
aucgaaucua ccaccagaac agaaaaguac augaaaagac gguacgcacu gcugccgcag 1680
cgaucauccu caacaacaau cccagcuaca uggaugucaa gaauaucuug cuguccaucg 1740
gagagcuucc ccaagagaug aacaaguaca ugcucgccau cguacaagac auucugagau 1800
uugagaugcc ggcgagcaaa aucguccgac gcgugcugaa ggaaaugguc gcacacaacu 1860
augaucgcuu uucaagaucg gguucgucca gcgccuauac gggauacauc gaacggucac 1920

cgagaucagc gagcacguac ucguuggaca uccucuacuc aggguccggg auuuugcgcc 1980
ggagcaaccu caacaucuuu caguacaucg ggaaagcggg gcuccacggc ucacaagugg 2040
uaaucgaggc ccaagguuug gaagcauuga uugcggcgac ucccgaugag ggagaagaga 2100
aucucgauuc guaugccggg auguccgcaa uucucuucga cgugcagcuu cggcccguaa 2160
cguucuuuaa uggguauucg gauuugaugu cgaagaugcu gagcgcguca ggugacccaa 2220
uuucagucgu gaaaggauug auccugcuca ucgaucauuc gcaagaacuu caguugcagu 2280
cagggcucaa ggccaacauc gaggugcagg gcggucuugc gaucgauauc uccggagcca 2340
uggaguucuc acugugguac agggagucca agacuagagu caagaaucga gugacagucg 2400
ugaucacaac agauaucaca guagacucau cguucgugaa ggcgggauug gagacaagca 2460
cggaaaccga agccgggcuu gaauucaucu cgacggucca guucucccag uauccguucc 2520
ugguguguau gcagauggac aaagaugagg cuccguucag gcaguucgaa aagaaguaug 2580
aacggcucuc gacuggaagg ggauauguau cccagaaacg caaggaaagc guccuggcug 2640
guugugaguu ccccuugcac caggagaacu ccgagaugug caagguggug uuugccccuc 2700
aaccggacuc aacgucgucg gguugguuuu gauaagcugc cuucugcggg gcuugccuuc 2760
uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga 2820
guaggaag 2828

<210> 223
<211> 1595
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 223

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gaccguucac 60
ugggauggca agggaauucu gucccugagg acaggacuga agcugggauc aagcguuucc 120
uggaggacac cacggaugau ggagaacuga gcaaguucgu gaaggauuuc ucaggaaaug 180
cgagcugcca cccaccagag gcuaagaccu gggcauccag gccccaaguc ccggagccaa 240
ggccccaggc cccggaccuc uaugaugaug accuggaguu cagacccccc ucgcggcccc 300
aguccucuga caaccagcag uacuucugug ccccagcccc ucucagccca ucugccaggc 360
cccgcagccc auggggcaag cuugaucccu augauuccuc ugaggaugac aaggaguaug 420
ugggcuuugc aacccucccc aaccaagucc accgaaaguc cgugaagaaa ggcuuugacu 480
uuacccucau gguggcagga gagucuggcc ugggcaaauc cacacuuguc aauagccucu 540
uccucacuga ucuguaccgg gaccggaaac uucuuggugc ugaagagagg aucaugcaaa 600
cuguggagau cacuaagcau gcaguggaca uagaagagaa gggugugagg cugcggcuca 660
ccauugugga cacaccaggu uuuggggaug cagucaacaa cacagagugc uggaagccug 720
uggcagaaua cauugaucag caguuugagc aguauuuccg agacgagagu ggccugaacc 780
gaaagaacau ccaagacaac agggugcacu gcugccugua cuucaucuca cccuucggcc 840
augggcuccg gccauuggau guugaauuca ugaaggcccu gcaucagcgg gucaacaucg 900
ugccuauccu ggcuaaggca gacacacuga caccucccga aguggaccac aagaaacgca 960

aaauccggga ggagauugag cauuuuggaa ucaagaucua ucaauuccca gacugugacu 1020
cugaugagga ugaggacuuc aaauugcagg accaagcccu aaaggaaagc aucccauuug 1080
caguaauugg cagcaacacu guaguagagg ccagagggcg gcgaguucgg ggucgacucu 1140
accccugggg caucguggaa guggaaaacc cagggcacug cgacuuugug aagcugagga 1200
caaugcuggu acguacccac augcaggacc ugaaggaugu gacacgggag acacauuaug 1260
agaacuaccg ggcacagugc auccagagca ugacccgccu gguggugaag gaacggaauc 1320
gcaacaaacu gacucgggaa agugguaccg acuuccccau cccugcuguc ccaccaggga 1380
cagauccaga aacugagaag cuuauccgag agaaagauga ggagcugcgg cggaugcagg 1440
agaugcuaca caaaauacaa aaacagauga aggagaacua uugauaauag gcuggagccu 1500
cgguggccau gcuucuugcc ccuugggccu ccccccagcc ccuccucccc uuccugcacc 1560
cguacccccg uggucuuuga auaaagucug agugg 1595

<210> 224
<211> 1652
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 224

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug acuuuuaaca 60
guuuugaagg aucuaaaacu uguguaccug cagacaucaa uaaggaagaa gaauuuguag 120
aagaguuuaa uagauuaaaa acuuuugcua auuuuccaag ugguaguccu guuucagcau 180
caacacuggc acgagcaggg uuucuuuaua cuggugaagg agauaccgug cggugcuuua 240
guugucaugc agcuguagau agauggcaau auggagacuc agcaguugga agacacagga 300
aaguaucccc aaauugcaga uuuaucaacg gcuuuuaucu ugaaaauagu gccacgcagu 360
cuacaaauuc ugguauccag aauggucagu acaaaguuga aaacuaucug ggaagcagag 420
aucauuuugc cuuagacagg ccaucugaga cacaugcaga cuaucuuuug agaacugggc 480
agguuguaga uauaucagac accauauacc cgaggaaccc ugccauguau agugaagaag 540
cuagauuaaa guccuuucag aacuggccag acuaugcuca ccuaacccca agagaguuag 600
caagugcugg acucuacuac acagguauug gugaccaagu gcagugcuuu uguuguggug 660
gaaaacugaa aaauugggaa ccuugugauc gugccugguc agaacacagg cgacacuuuc 720
cuaauugcuu cuuuguuuug ggccggaauc uuaauauucg aagugaaucu gaugcuguga 780
guucugauag gaauuuccca aauucaacaa aucuuccaag aaauccaucc auggcagauu 840
augaagcacg gaucuuuacu uuugggacau ggauauacuc aguuaacaag gagcagcuug 900
caagagcugg auuuuaugcu uuaggugaag gugauaaagu aaagugcuuu cacuguggag 960
gagggcuaac ugauuggaag cccagugaag acccuuggga acaacaugcu aaaugguauc 1020
cagggugcaa auaucuguua gaacagaagg gacaagaaua uauaaacaau auucauuuaa 1080
cucauucacu ugaggagugu cugguaagaa cuacugagaa aacaccauca cuaacuagaa 1140
gaauugauga uaccaucuuc caaaauccua ugguacaaga agcuauacga auggguuca 1200
guuucaagga cauuaagaaa auaauggagg aaaaaauuca gauaucuggg agcaacuaua 1260

aaucacuuga gguucugguu gcagaucuag ugaaugcuca gaaagacagu augcaagaug 1320
agucaaguca gacuucauua cagaaagaga uuaguacuga agagcagcua aggcgccugc 1380
aagaggagaa gcuuugcaaa aucuguaugg auagaaauau ugcuaucguu uuuguuccuu 1440
guggacaucu agucacuugu aaacaaugug cugaagcagu ugacaagugu cccaugugcu 1500
acacagucau uacuuucaag caaaaaauuu uuaugucuug auaauaggcu ggagccucgg 1560
uggccaugcu ucuugccccu ugggccuccc cccagccccu ccuccccuuc cugcacccgu 1620
acccccgugg ucuuugaaua aagucugagu gg 1652

<210> 225
<211> 1556
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 225

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug ggcggagcug 60
ugguggacga ggggccuacc ggugugaagg cgccugaugg uggcuggggc ugggcagucc 120
uguuugggug uuucgugauu accggcuuuu ccuacgccuu cccuaaagca gugucagugu 180
ucuucaagga acucauucaa gaauucggca uuggcuacuc ggacacugca uggaucucca 240
gcauucugcu ugcgaugcuc uacggaaccg gaccacuuug uuccgucugu gugaaccgcu 300
ucggaugucg gccuguuaug cuugucggug gucuuuuugc cucacuuggu auggucgcag 360
caucguuuug ucgcuccauc auucaagugu aucugaccac uggugucauu accggucugg 420
gucuugcacu uaacuuucag ccgucucuga uaaugcuuaa ucgauacuuu ucaaagagac 480
ggccuauggc gaacgggcug gcagcagcgg gaucgccugu guuucucugu gcacuuucgc 540
cgcugggaca gcuucuccaa gaccgauacg gguggagagg cggauuccuu auucuuggug 600
gauuguugcu caauugcugu gugugcgcag cccugaugcg uccgcugguc gugacugcac 660
agccaggguc gggaccacca agaccuucga ggaggcugcu ggaucucagc guguuccgug 720
auagaggauu ugugcuguac gccguggcag caagcgugau ggugcuugga cuuuuugugc 780
cacccgucuu uguggugucg uacgccaagg aucugggugu gccugauacu aaggccgcau 840
uccuccugac cauucugggc uuuaucgaca ucuucgccag accagcagcu ggcuuugugg 900
ccggacuugg aaagguccgc ccauacagcg uguacuuguu uuccuucuca auguuuuuca 960
augggcuggc ugaucuggca gguagcacug cuggagauua cggcggucug guggucuuuu 1020
gcaucuucuu uggcaucucg uacggaaugg ugggugccuu gcaauuugaa guucugaugg 1080
ccauaguggg aacccacaag uuuagcucgg caauuggacu ggucuugcug auggaagcag 1140
ucgcugugcu ugucggaccu ccuuccggug ggaaacuucu ugaugcaacc cauguguaca 1200
uguauguguu uauccuggcg ggagcggaag ugcucacuuc cucacucauu cuccuccuug 1260
ggaacuuuuu cugcauacgg aaaaagccca aagaaccuca gcccgaggug gcagcagccg 1320
aagaggaaaa gcugcauaag ccccccagcag acagcggagu ugaucucagg gaggucgaac 1380
acuuucucaa agcggaaccc gaaaagaacg gagagguggu ccauacgcca gagacguccg 1440
ucugauaaua ggcuggagcc ucgguggcca ugcuucuugc cccuugggcc ucccccccagc 1500

cccuccuccc cuuccugcac ccguaccccc guggucuuug aauaaagucu gagugg 1556

<210> 226

<211> 1655

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 226

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug acaguuuucc 60
uuuccuuugc uuuccucgcu gccauucuga cucacauagg gugcagcaau cagcgccgaa 120
guccagaaaa cagugggaga agauauaacc ggauucaaca ugggcaaugu gccuacacuu 180
ucauucuucc agaacacgau ggcaacuguc gugagaguac gacagaccag uacaacacaa 240
acgcucugca gagagaugcu ccacacgugg aaccggauuu cucuucccag aaacuucaac 300
aucuggaaca ugugauggaa aauuauacuc aguggcugca aaaacuugag aauuacauug 360
uggaaaacau gaagucggag auggcccaga uacagcagaa ugcaguucag aaccacacgg 420
cuaccaugcu ggagauagga accagccucc ucucucagac ugcagagcag accagaaagc 480
ugacagaugu ugagacccag guacuaaauc aaacuucucg acuugagaua cagcugcugg 540
agaauucauu auccaccuac aagcuagaga agcaacuucu ucaacagaca aaugaaaucu 600
ugaagaucca ugaaaaaaac aguuuauuag aacauaaaau cuuagaaaug gaaggaaaac 660
acaaggaaga guuggacacc uuaaaggaag agaaagagaa ccuucaaggc uugguuacuc 720
gucaaacaua uauaauccag gagcuggaaa agcaauuaaa cagagcuacc accaacaaca 780
guguccuuca gaagcagcaa cuggagcuga uggacacagu ccacaaccuu gucaaucuuu 840
gcacuaaaga agguguuuua cuaaagggag gaaaaagaga ggaagagaaa ccauuuagag 900
acugugcaga uguauaucaa gcugguuuua auaaaagugg aaucuacacu auuuauauua 960
auaauaugcc agaacccaaa aagguguuuu gcaauaugga ugucaauggg ggagguugga 1020
cuguaauaca acaucgugaa gauggaaguu uagauuucca aagaggcugg aaggaauaua 1080
aaauggguuu uggaaauccc uccggugaau auuggcuggg gaaugaguuu auuuuugcca 1140
uuaccaguca gaggcaguac augcuaagaa uugaguuaau ggacugggaa gggaaccgag 1200
ccuauucaca guaugacaga uuccacauag gaaaugaaaa gcaaaacuau agguuguauu 1260
uaaaagguca cacugggaca gcaggaaaac agagcagccu gaucuuacac ggugcugauu 1320
ucagcacuaa agaugcugau aaugacaacu guaugugcaa augugcccuc auguuaacag 1380
gaggauggug guuugaugcu uguggccccu ccaaucuaaa uggaauguuc uauacugcgg 1440
gacaaaacca uggaaaacug aaugggauaa aguggcacua cuucaaaggg cccaguuacu 1500
ccuuacguuc cacaacuaug augauucgac cuuuagauuu uugauaauag gcuggagccu 1560
cgguggccau gcuucuugcc ccuugggccu ccccccagcc ccuccucccc uuccugcacc 1620
cguacccccg uggucuuuga auaaagucug agugg 1655

<210> 227

<211> 695

<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 227
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cauagcucag 60
cccucuugug uugccugguu cuucuuacgg gagugcgggc uucgccaggc caagggacuc 120
aguccgaaaa cucguguacc cacuuucccg gaaaccugcc uaacaugcuu cgggaucuca 180
gagaugcguu cucgcgcguc aagaccuucu uccaaaugaa ggaccaacuc gauaaccugc 240
uucucaaaga aucacugcuu gaggacuuua aggguuaucu ugguugucag gcauuguccg 300
agaugaucca guuuuaccuu gaggaaguga ugccgcaagc ggaaaaccag gauccagaca 360
uuaaggcaca ugugaauagc cuuggagaaa aucucaaaac ccugaggcug cgucugcgaa 420
gaugccacag auuucugccu ugugagaaua agucuaaggc aguggagcag gucaagaacg 480
cauucaacaa gcugcaagaa aaaggcauau acaaagccau guccgaauuu gauaucuuua 540
ucaacuacau ugaagcauac augacuauga agauucgcaa uugauaauag gcuggagccu 600
cgguggccau gcuucuugcc ccuugggccu ccccccagcc ccuccucccc uuccugcacc 660
cguacccccg uggucuuuga auaaagucug agugg 695
<210> 228
<211> 743
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 228
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cacaaaugga 60
uacugacaug gauccugcca acuuugcucu acagaucaug cuuucacauu aucugucuag 120
uggguacuau aucuuuagcu ugcaaugaca ugacuccaga gcaaauggcu acaaauguga 180
acuguuccag cccugagcga cacacaagaa guuaugauua cauggaagga ggggauauaa 240
gagugagaag acucuucugu cgaacacagu gguaccugag gaucgauaaa agaggcaaag 300
uaaaagggac ccaagagaug aagaauaauu acaauaucau ggaaaucagg acaguggcag 360
uuggaauugu ggcaaucaaa gggguggaaa gugaauucua ucuugcaaug aacaaggaag 420
gaaaacucua ugcaaagaaa gaaugcaaug aagauuguaa cuucaaagaa cuaauucugg 480
aaaaccauua caacacauau gcaucagcua aauggacaca caacggaggg gaaauguuug 540
uugccuuaaa ucaaaagggg auuccuguaa gaggaaaaaa aacgaagaaa gaacaaaaaa 600
cagcccacuu ucuuccuaug gcaauaacuu gauaauaggc uggagccucg guggccaugc 660
uucuugcccc uugggccucc ccccagcccc uccucccccuu ccugcacccg uacccccgug 720
gucuuugaau aaagucugag ugg 743
<210> 229
<211> 3182
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 229

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug ggagcauacg 60
cccgagcgag cggggucugc gcacgagggu gccucgauuc cgcugguccc uggacaauga 120
gccgggcucu gcgcccaccc cugccgccgu uguguuucuu ucuccugcug cuugcugcag 180
ccggagcgag ggcggguggu uacgaaacgu gcccuacagu acagcccaac augcuuaacg 240
uacaucugcu gccgcacacc cacgaugacg uggguuggcu uaaaacaguc gaccaguauu 300
ucuacggaau caaaaaugac auucaacaug cggggguaca guacauuuug gauuccguca 360
uuuccgcgcu uuuggcggac ccaacucggc gcuucaucua cguggagauc gcguucuuca 420
gccgguggug gcaccaacag acgaacgcga cacaagaggu agugcgcgau cuuguaagac 480
aggggcgguu ggaauucgcg aauggagguu gggugaugaa cgacgaggcc gcgacacauu 540
auggggcaau uguggaccaa augacgcuug gccuucgguu ccuugaggac acuuucggaa 600
acgauggucg gcccagggua gcguggcaca ucgauccguu uggacacuca agagagcagg 660
ccucauuguu ugcgcagaug gguuucgacg gguuuuucuu uggccggcuu gauuaucaag 720
acaaggugggu caggaugcag aaacuggaaa uggagcaggu guggcgggcu ucgacgucgu 780
ugaaaccccc gacugcagau cuguuuacgg gggugcugcc gaacggguac aauccacccc 840
gaaaucuuug uugggaugug cugugcgucg accagccuuu gguagaagau ccgagaucgc 900
cugaauauaa cgcgaaggaa cucguggacu acuuccucaa cguggcgacg gcgcagggac 960
gauacuauag aacgaaucac acugucauga caaugggaag cgacuuucaa uacgagaacg 1020
ccaacaugug guuuaagaac cuugacaagc uuauccgacu cgugaaugca caacaggcga 1080
agggaagcuc cgugcacgug uuguacucga cacccgcgug cuaccuuugg gaacugaaca 1140
aggcgaauuu gaccuggucg gugaaacaug acgacuucuu cccuuacgca gauggaccuc 1200
accaguuuug gacaggcuac uuuucguccc gcccagcgcu caagcgauau gaacgccugu 1260
cauacaacuu ucuucaagua ugcaaucaac uugaggcguu ggucgggcug gcugcgaacg 1320
uaggaccgua cggaagcggc gauucggccc cucucaacga agcgauggcu gucuugcagc 1380
aucacgacgc cgugucggga acgucccggc agcauguggc caacgacuau gcgaggcagu 1440
uggcagcggg auggggacca ugugaggugc ucuugucaaa cgcucucgcg agauugcgcg 1500
gcuuuaaaga ucacuuuaca uuuugccaac agcugaacau cucaaucugu ccuuugagcc 1560
aaacggcggc acgguuccaa gugauugucu auaacccccu ugguagaaaa gucaacugga 1620
ugguacgccu uccgguguca gaagggguau ucguggugaa agaccccaac gggcggaccg 1680
ugccaucgga cguggugauc uuuccgucau cggauucaca agcgcaucca cccgaacuuc 1740
uguucucagc gucguugcca gccuuggguu ucagcacgua uucaguggcg caggugcccc 1800
gcuggaaacc ccaggccaga gccccucagc ccaucccgag gcgguccugg ucgcccgcac 1860
ucacaauuga gaacgagcac auccgcgcga cguucgaccc ugauacaggg uugcuuaugg 1920
agaucaugaa uaugaaccaa caacugcugc uuccggugag acagacuuuc uuuugguaua 1980
acgcuucgau uggagauaau gaguccgacc aagcuucagg ggcguacauu uuccggccaa 2040
aucagcagaa gccguugccc gugucaaggu gggcccagau ucaccuggua aagacaccgu 2100

ugguacaaga ggugcaccag aauuucucgg cgugguguag ccaaguggug cggcucuacc 2160
cuggacagag acauuuggaa uuggaaugga gcguaggccc cauucccgug ggagacacuu 2220
gggguaaaga agugaucuca agauucgaca caccccucga gacaaaggga cgguucuaua 2280
cugacucaaa uggucgagag auccucgaga ggcggcgaga uuaccggccc acguggaagc 2340
uuaaccagac ggaaccaguc gcggggaacu auuauccggu gaauaccaga aucuacauua 2400
ccgacgggaa caugcaguug acagugcuua cggaccggag ccagggugga ucgucgcuua 2460
gggacggguc auuggagcuc augguccaua ggcggcuucu caaggacgac ggacgcggag 2520
ucucggaacc gcuuauggaa aauggaagcg gagcaugggu acgcggacga caucuugugc 2580
ucuuggacac ggcucaagcc gcugcagcag gacauagacu ccucgccgaa caagaagugc 2640
uggcaccaca aguggucuug gcgccaggcg ggggagcggc cuauaaccuu ggagcgccac 2700
cgagaacuca guuuagcgga uugcgcagag aucucccgcc uucgguacac uugcugacau 2760
uggcgucgug gggaccggag augucuugu ugagacugga gcaccaguuu gcagugggcg 2820
aggacagcgg aaggaaucug uccgcgccug uaacauugaa ucuucgcgau cuuuucucga 2880
ccuuuacaau cacacgcuug caagaaacaa cacuugucgc aaaccaguug agagaggcag 2940
cguccagauu gaaguggacg accaacacgg gaccuacacc ccaucagacg ccguaucaac 3000
ucgauccagc gaacaucaca cuugagccga uggaaauccg cacauuuuug gccucgguac 3060
aauggaaaga aguagauggc ugauaauagg cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca 3120
ugcccuucuu cucucccuug caccuguacc ucuuggucuu ugaauaaagc cugaguagga 3180
ag 3182

<210> 230
<211> 1307
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 230

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcgcugcagg 60
gaauuagcgu ggucgagcug ucgggacucg ccccuggccc auuuugcgca augguguugg 120
cagacuuugg agcacggguc guccgggugg aucgucccgg uagcagauac gacgugucCC 180
gauuggguag aggaaagagg ucccucgugc uugaucugaa acaaccccgu ggagccgcag 240
uccuuagacg ccuuuguaag aggucagacg uccugcuuga accuuuuaga aggggcguga 300
uggaaaaacu ucaacucggu ccggaaauuc uucagcgcga aaacccacgg cugauauacg 360
cuagacuguc cggauucggc cagucaggau ccuuuuguag acuggccgga cacgauauca 420
auuaccuugc auugucgggg gugcugucaa agauuggacg gagcggagaa aacccguacg 480
caccauugaa ccuucucgca gacuuugcgg guggcggucu uaugugugca cuggggauua 540
ucauggcacu guuugaucga acucgcaccg gaaagggcca agugauugac gccaauaugg 600
uggaagggac ugcauaccuc agcucguuuc uuuggaaaac gcaaaaacuu ucacucuggg 660
aagcuccucg gggucagaac augcucgaug guggugcccc auucuacacc accuaccgaa 720
ccgccgaugg cgaguuuaug gcagugggag caauugaacc ccaauucuau gagcuccuga 780

ucaagggacu ggggcuuaag agcgacgaac uuccuaacca aaugucgaug gaugacuggc 840
cagagaugaa aaagaaguuc gcggaugugu uugccgaaaa gaccaaagcu gaaugguguc 900
agauuuucga ugggacugau gcaugcguca ccccuguccu cacuuuugag gaaguggugc 960
aucaugauca caacaaggag aggggaucgu uuaucacgag cgaggaacaa gauguguccc 1020
cuagaccagc accucugcug cugaauaccc cugcgauucc aucguucaag cgcgaucccu 1080
ucaucgguga gcauacugaa gaaauacugg aggaauuugg cuucucgcgc gaggaaaucu 1140
accagcugaa uuccgacaag aucauugaau ccaacaaggu uaaggcaucu cuuugauaau 1200
aggcuggagc cucgguggcc augcuucuug ccccuugggc cucccccag ccccuccucc 1260
ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu gaauaaaguc ugagugg 1307

<210> 231
<211> 2726
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 231

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gguccguggg 60
gcuggaagcu uagauggaca gucgcgcucc uccuugcagc agcaggaacu gcggucggag 120
aucgaugcga gcgcaacgag uuccaaugcc aagaugggaa guguauuucg uacaaguggg 180
ucugcgaugg aucagcggaa ugucaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu 240
cagugacaug caagucggga gacuucucgu gcggaggacg cguaaacaga uguauuccac 300
aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauguc 360
cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuuc gcugccauga uggaaagugc auuucgcggc 420
aguucguaug ugauucggau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg 480
uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacgugcauu ccccagcugu 540
gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua 600
gggguuugua cguauuccaa ggagacucaa gccccuguuc cgccuuugag uuucacugcc 660
ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg ugggcccgac ugcaaagaua 720
agagcgacga ggagaauugc gcggucgcga cgugcagacc cgaugaguuc cagugcuccg 780
auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgcga guacgauugu aaagacaugu 840
cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugugcgaggg uccgaacaag uuuaagugcc 900
auucgggcga auguauuacg cucgauaaag ucugcaacau ggcgcgagau uguagggauu 960
ggucagacga acccaucaag gagugcggca cuaacgagug uuuggacaau aacggcgggu 1020
guucgcacgu cugcaaugau cucaaaauug gguaugagug ucucuguccu gacggauucc 1080
agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu 1140
cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggu acaagugcca gugcgaggag ggauuucagc 1200
uugacccgca cacgaaagca uguaaagcgg ugggguccau ugcguauuug uuuuucacaa 1260
acagacauga agugcggaag augacccuug aucgcagcga auauacguca cugaucccua 1320
aucuuaggaa ugucguggcc cuugacacgg agguagcauc aaauagaauc uacugguccg 1380

accucucaca gagaaugauc uguucaacac aguuggaucg ggcgcacggg gugucgucgu 1440
acgauacggu aauuagccgc gacauccagg cgccagacgg acucgcgguc gacuggaucc 1500
auagcaacau cuacuggaca gacuccgugu ugggaaccgu auccguagcu gacacaaagg 1560
gagugaagcg gaaaacucuu uuuagagaga acggcagcaa accgagagca aucguggucg 1620
auccggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa aucaagaaag 1680
gcgguuugaa uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauauucag uggccaaacg 1740
ggaucaccuu ggacuuguug ucggggaggu uguauuuggu ggacucaaag cuccacucga 1800
ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaaua ggaaaacuau ucucgaagau gagaaaagac 1860
uggcccaccc cuucucgcuc gcgguguucg aggacaaagu auuuuggaca gacaucauca 1920
acgaagcgau cuuuucagcc aaccgccuga cagggucgga ugucaaucuc uuggccgaaa 1980
accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaauuu gacccaaccc agagguguga 2040
auuggugcga acggacgaca uugucgaacg gagguugcca guaucucugu cucccugcac 2100
cccagauuaa uccccauuca cccaaguuca cgugugcgug cccagacgga augcuucuug 2160
cgagggacau gagauccugu cucaccgaag cggaagcggc aguggccaca caagagacuu 2220
cgacuguccg ccuuaaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac 2280
ccgugcccga uaccucgcgg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaaucg 2340
uaaccaugag ccaccaggca cuuggagaug ucgcaggcag aggcaaugag aagaaaccca 2400
gcucggucag agcccucagc aucgugcugc cuauugugcu gcuuguguuu cucuguuugg 2460
guguguucuu guuguggaag aacuggcgcc uuaagaauau caacucgauu aacuucgaua 2520
auccgguaua ccagaaaacc acagaggaug aagugcauau uugucacaac caagauggcu 2580
auucguaccc guccaggcaa augguaucac uugaggacga cguggccuga uaagcugccu 2640
ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg 2700
ucuuugaaua aagccugagu aggaag 2726

<210> 232
<211> 2252
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 232

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcugcgccca 60
ugacucccgc agcaagaccg gaggacuacg aggcagcauu gaaugccgcc cucgcagacg 120
ugcccgagcu ugcaagguug cuggaaauug aucccuaucu caagcccuac gccgucgauu 180
uucagcgccg guacaagcag uucucccaaa uucucaagaa cauuggcgag aacgaaggag 240
guaucgacaa guuuucacgg gguuaugagu cguucggggu ccaccggugc gccgacggag 300
ggcuguauug uaaggagugg gcgccugggg cggaaggggu guuucuuacg ggagauuuca 360
auggauggaa ucccuucuca uacccguaca agaaauugga cuacggaaag ugggaguugu 420
auauuccacc gaagcagaac aaaucagugc uugugccuca uggauccaaa cuuaaagucg 480
ugauuacauc gaaaagcggg gagauccucu accgcaucuc accgugggcg aaauauguag 540

ucagggaagg ggauaacguc aacuacgauu ggauccacug ggaccccgag cauucauacg 600
aauucaaaca cucaaggccg aagaagcccc gaucgcuccg gaucuacgaa agccacgugg 660
gaauuuccuc acaugaagga aagguggccu cguacaaaca cuuuacgugc aauguccuuc 720
cucgaaucaa aggucuggga uacaauugca uccagcuuau ggcgauuaug gagcaugccu 780
auuaugcguc cuuuggcuac cagaucaccu cguucuucgc ggcgagcuca cgauauggaa 840
cuccagagga guugcaagaa uugguagaca ccgcccacuc aauggguauc auuguccuuc 900
uugacguggu gcacagccau gccagcaaga acucggcgga uggccucaac auguucgacg 960
ggacagacuc augcuacuuc cacagcgggc cuaggguac ucaugaucuc ugggacucgc 1020
gccuuuuugc guacucgagc ugggaaaucc uccgcuuucu gcugucgaau aucagguggu 1080
ggcuggagga guaucgguuc gaugguuucc gcuuugaugg agucacgagc augcuuuacc 1140
aucaucacgg ggugggccag ggauucucgg gcgacuauuc ggaauacuuc gggcuucaag 1200
uagacgagga ugcguugacc uaccucaugc ucgccaauca cuugguccac acguuguguc 1260
cugauucgau cacaaucgcc gaggacgugu cggggaugcc agcgcucugu uccccgaucu 1320
cgcaaggugg aggcggguuc gauuaucgcc uggcgauggc aauucccgac aaguggauuc 1380
aacuucucaa agaguuuaag gaugaggauu ggaauauggg agacauugug uacacgcuga 1440
cgaaucgccg guaucuugag aaaugcaucg cguaugcuga gucgcacgac caggcguugg 1500
ucggggauaa gucccucgca uuuuggcuca uggacgcaga aauguauaca aauaugucgg 1560
uauugacucc cuucacaccc gugaucgauc gagggauuca gcuccacaaa augaucagau 1620
ugauuacgca cgguuugggc ggagaggggu auuugaacuu caugggaaac gaauuugguc 1680
auccagagug gcucgacuuc ccgcgcaaag gaaauaacga guccuaccac uacgcaagga 1740
ggcaguuuca ucuuacggau gaugaccuuc ugagauauaa guuucuuaac aacuuugaca 1800
gggacaugaa ccgccucgaa gagagauacg guugguuggc ugcuccucaa gcauacguau 1860
ccgaaaagca cgaagggaau aagaucaucg cauucgaacg ggcaggacuc cuguuuaucu 1920
ucaacuuuca cccgucgaaa ucauauacgg acuaucgagu cggaacagcg cugccgggca 1980
aauucaagau uguacuggau ucagaugcgg cugaguacgg aggccaucag agacuugacc 2040
acuccaccga cuucuucucg gaagcguucg agcacaacgg aaggccguac ucacuucugg 2100
ucuauauccc cucgcgggua gcacucaucu ugcaaaaugu agaucucccg aauugauaag 2160
cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca ugcccuucuu cucucccuug caccuguacc 2220
ucuuggucuu ugaauaaagc cugaguagga ag 2252

<210> 233
<211> 1637
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 233

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gagcccagca 60
gcaagaagcu gacgggucgc cucaugcugg ccgugggagg agcagugcuu ggcucccugc 120
aguuuggcua caacacugga gucaucaaug ccccccagaa ggugaucgag gaguucuaca 180

accagacaug gguccaccgc uauggggaga gcauccugcc caccacgcuc accacgcucu 240
ggucccucuc aguggccauc uuuucuguug ggggcaugau uggcuccuuc ucuguggggcc 300
uuuucguuaa ccgcuuuggc cggcggaauu caaugcugau gaugaaccug cuggccuucg 360
uguccgccgu gcucaugggc uucucgaaac ugggcaaguc cuuugagaug cugauccugg 420
gccgcuucau caucggugug uacugcggcc ugaccacagg cuucgugccc auguaugugg 480
gugaaguguc acccacagcc cuucgugggg cccugggcac ccugcaccag cugggcaucg 540
ucgucggcau ccucaucgcc cagguguucg gccuggacuc caucaugggc aacaaggacc 600
uguggccccu gcugcugagc aucaucuuca ucccggcccu gcugcagugc aucgugcugc 660
ccuucugccc cgagaguccc cgcuuccugc ucaucaaccg caacgaggag aaccgggcca 720
agagugugcu aaagaagcug cgcgggacag cugacgugac ccaugaccug caggagauga 780
aggaagagag ucggcagaug augcgggaga agaaggucac cauccuggag cuguuccgcu 840
cccccgccua ccgccagccc auccucaucg cuguggugcu gcagcugucc cagcagcugu 900
cuggcaucaa cgcugucuuc uauuacucca cgagcaucuu cgagaaggcg ggggugcagc 960
agccugugua ugccaccauu ggcuccggua ucgucaacac ggccuucacu gucgugucgc 1020
uguuuguggu ggagcgagca ggccggcgga cccugcaccu cauaggccuc gcuggcaugg 1080
cggguugugc cauacucaug accaucgcgc uagcacugcu ggagcagcua cccuggaugu 1140
ccuaucugag caucguggcc aucuuuggcu uuguggccuu cuuugaagug gguccuggcc 1200
ccaucccaug guucaucgug gcugaacucu ucagccaggg uccacgucca gcugccauug 1260
ccguugcagg cuucuccaac uggaccucaa auuucauugu gggcaugugc uuccaguaug 1320
uggagcaacu gugugguccc uacgucuuca ucaucuucac ugugcuccug guucuguucu 1380
ucaucuucac cuacuucaaa guuccugaga cuaaaggccg gaccuucgau gagaucgcuu 1440
ccggcuuccg gcaggggcga gccagccaaa gugacaagac acccgaggag cuguuccauc 1500
cccuggggc ugauucccaa gugugauaau aggcuggagc cucgguggcc augcuucuug 1560
ccccuugggc cucccccag ccccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 1620
gaauaaaguc ugagugg 1637

<210> 234
<211> 1586
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 234

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gaaagcaaag 60
cgcuccuggu gcugacccug gcagucuggc uucaaucauu aacagccuca agaggagggg 120
uggccgcugc cgaccaaaga agggacuuca ucgauauaga gagcaaguuu gcguugagaa 180
cuccagaaga uacugcugaa gauaccuguc accugauucc uggugguggcc gaauccgugg 240
caacuuguca uuucaaucau uccucuaaga cguucauggu gauccaugga uggacgguga 300
ccgguaugua cgagucgugg guuccuaagc uuguggccgc acuguacaag agagaaccug 360
acucgaaugu cauuguggug gauugguugu cgcgagcaca agaacauuac ccugugucgg 420

cagguuacac caagcucguc ggacaagaug ucgcacguuu uaucaacugg auggaagagg 480
aguuuaacua cccacucgac aacguccauc uucuuggaua cagccucgga gcucaugcag 540
cggguauugc ggguucgcuc accaacaaga aagugaacag aauuaccgga cuugauccgg 600
cagguccaaa cuucgaauac gcagaggcac ccucucgccu cuccccugau gaugcagauu 660
uuguggacgu guuacauacu uuuacucggg gaucacccgg aagaaguaua ggcauucaga 720
agccaguugg gcaugucgau auauauccua acggcggaac uuuucagcca ggcuguaaca 780
uuggagaagc aauuaggguc auugcagaac gcggcuuggg agauguggau cagcugguga 840
agugcagcca cgagagaucg auccaccugu uuaucgauuc acugcuuaau gaggaaaauc 900
ccucgaaagc auaucgcugu uccagcaagg aagcauuuga aaaaggucuu ugucugagcu 960
gccgcaagaa ucggugcaac aaccucggau augaaaucaa caaggugcga gcaaagcguu 1020
cgucaaagau guaccuuaag accagaucac agaugccuua caagguguuu cacuaccaag 1080
ugaagauaca cuuuuccggc acggagagcg agacucauac caaccaagcu uucgaaaucu 1140
cccuuuacgg uacugucgcc gaauccgaga acauuccguu cacucugccu gaggugucaa 1200
ccaauaagac cuacagcuuc cugauauaca ccgaagugga uaucggggaa cuucugaugc 1260
uuaaacucaa auggaagucc gauuccuacu uuucguggag cgacuggugg ucgucgccag 1320
gguuugccau ucagaagauu cgggucaaag caggugaaac ucagaaaaag gucauuuucu 1380
gcucaaggga aaaagucucc caucuucaaa agggaaaagc acccgcagug uuugugaaau 1440
gucaugacaa gucccugaau aagaagucgg gaugauaaua ggcuggagcc ucgguggcca 1500
ugcuucuugc cccuugggcc ucccccccagc cccuccuccc cuuccugcac ccguaccccc 1560
guggucuuug aauaaagucu gagugg 1586

<210> 235
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人
<400> 235
Glu Leu Ile His Ile Ser Asp Trp Leu Pro Thr Leu Val Lys
1 5 10

<210> 236
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 236
Gly Val Gly Phe Val Ala Ser Pro Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 237
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人
<400> 237

His Ser Val Pro Val Tyr Phe Pro Ala Gln Asp Pro Arg
1 5 10
<210> 238
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 238
Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr
1 5 10 15
Lys
<210> 239
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 239
Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys
1 5 10
<210> 240
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 240
Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg
1 5 10
<210> 241
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人
<400> 241
Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg
1 5
<210> 242
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 242
Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Asn Phe Phe Lys
1 5 10 15
<210> 243

<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 243
Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys
1 5 10 15
<210> 244
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 244
Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys
1 5 10
<210> 245
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 245
Ser Tyr Ser Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg
1 5 10
<210> 246
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 246
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys
1 5 10
<210> 247
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 247
Phe Gln Val Ile Val Tyr Asn Pro Leu Gly Arg
1 5 10
<210> 248
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 248

His Leu Val Leu Leu Asp Thr Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gly His Arg
1 5 10 15

<210> 249
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人
<400> 249
Phe Ala Asp Val Phe Ala Glu Lys
1 5

<210> 250
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 250
Leu Gln Leu Gly Pro Glu Ile Leu Gln Arg
1 5 10

<210> 251
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 251
Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys
1 5 10

<210> 252
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 252
Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys
1 5

<210> 253
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人
<400> 253
Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys
1 5

<210> 254
<211> 13

<212> PRT
<213> 智人
<400> 254
Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Asn Arg
1 5 10
<210> 255
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 255
Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Pro Leu Arg
1 5 10
<210> 256
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 256
Leu Leu Glu Ile Asp Pro Tyr Leu Lys Pro Tyr Ala Val Asp Phe Gln
1 5 10 15
Arg
<210> 257
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 257
Ser Val Leu Val Pro His Gly Ser Lys
1 5
<210> 258
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人
<400> 258
Tyr Gly Trp Leu Ala Ala Pro Gln Ala Tyr Val Ser Glu Lys
1 5 10
<210> 259
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 259

Thr Phe Asp Glu Ile Ala Ser Gly Phe Arg
1 5 10
<210> 260
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人
<400> 260
Val Thr Ile Leu Glu Leu Phe Arg
1 5
<210> 261
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 261
Leu Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Phe Thr
1 5 10 15
Arg
<210> 262
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 262
Ser Ile His Leu Phe Ile Asp Ser Leu Leu Asn Glu Glu Asn Pro Ser
1 5 10 15
Lys
<210> 263
<211> 1832
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 263
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gaugccauga 60
aacgggguu guguugcgua cuucuuuugu gcggagcggu guucgugucc ccgucgcaag 120
agauccacgc gcgauucaga aggggugcgc ggagcuacca ggucaucugc cgagaugaga 180
aaacucagau gaucuaccaa cagcaucagu ccuggcugcg gccuguacug cgcuccaacc 240
gaguggaaua cugcuggugu aauagcggca gggcccagug ccauucagua ccgguaaagu 300
cgugcucgga accgcgcugc uuuaauggcg ggacauguca gcaggcgcuu uacuucuccg 360
auuucgugug ucagugccca gaaggguucg cgggcaaaug cugcgaaauc gacacacggg 420

cgacguguua ugaagaucag ggaauuagcu accgggguac guggucgacg gccgagucgg 480
gggcagagug uaccaacugg aacagcucgg cgcuggcgca gaagcccuau ucgggacgaa 540
ggccggacgc caucagauug ggacuuggaa aucacaacua cugucgcaac ccugacagag 600
acucaaaacc cugguguuau gucuuuaagg cggggaaaua cucaucggag uucugcucga 660
cccccgcaug cucagagggu aacucggauu gcuauuuugg aaaugguucc gccuaccgcg 720
gaacgcacuc cuugacugaa ucgggugcca gcugucugcc cuggaacuca augauccuga 780
ucggaaaagu guacaccgcg cagaacccaa gcgcacaggc acuuggacuc gguaaacaca 840
auuacugccg caaucccgac ggggaugcga agcccuggug ucacgucuug aagaauagaa 900
ggcucacgug ggaguauugu gacgucccca gcugcucaac gugugggcuc aggcaguauu 960
cacagccgca guuccggauc aaggguggac uuuuugcaga caucgcaucg caccccuggc 1020
aggcugccau cuuugcgaag caucgacgga gcccgggaga gcgcuucuug uguggcggga 1080
uucucauuuc aucaugcugg auucucucgg cggcucacug cuuucaagaa cgauuucccc 1140
cgcaccauuu gacggucauu cucgggagaa cguaccgcgu agugccggga gaggaagaac 1200
aaaaguucga gguggagaag uauaucgugc auaaagaguu cgacgacgac acguaugaca 1260
acgauaucgc ucugcuccag uugaagagcg auucaucgcg gugugcacaa gagucauccg 1320
uagucagaac gguaugccug cccccugcug acuugcagcu gccagauugg acagaaugcg 1380
agcuuucggg auauggaaag caugaagccu ugagcccguu cuauucggag cgguugaaag 1440
aggcccaugu gcgccuguac ccaucgucac gcuguacauc ccagcaccuu cucaaccgga 1500
ccgugaccga caacaugcuu ugugcagggg auacaaggag cgggggaccc caggcgaauu 1560
ugcacgaugc cugucaaggu gauucgggug gcccgcuugu cugccugaac gaugggagaa 1620
ugacacuggu gggaaucauu ucgugggggu uggggugugg gcaaaaggau gucccgggug 1680
ucuacacuaa agugacaaau uaccuugacu ggauuagaga caauaugagg ccaugauaag 1740
cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca ugcccuucuu cucucccuug caccuguacc 1800
ucuuggucuu ugaauaaagc cugaguagga ag 1832

<210> 264
<211> 1502
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 264

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug uuugacauug 60
aguauuuucg gaaagacccu aggccguucu uuaaguuugc caaagaaauc uacccugggc 120
aguuccagcc cagccuuugc cacaaguuua ucgccuuguc ggauaaagag ggaaaauugc 180
uuaggaacua cacccagaac aucgauacgu uggaacaggu cgcagggauc cagaggauca 240
uccagugcca cgggucauuu gcuacugcau ccugucucau uuguaaguac aaaguggauu 300
gugaggcggu gcggggagau aucuuuaauc aagucguacc ccgaugcccu cgcugcccag 360
cggacgaacc auuggcgauc augaagcccg aaaucgucuu uuucggcgaa aaucucccag 420
agcaguucca ucgcgccaug aaguaugaca aggaugaagu ggacuugcug aucgucaucg 480

gcucgucacu gaaaguaaga cccguagcgu ugauucccuc gucaauuccc caugaggugc 540
cucaaauucu gauuaacagg gagccccuuc cccaucucca cuucgauguc gagcuuuugg 600
gggacuguga cgucaucauu aacgaacugu gucaccgacu uggaggggaa uaugcgaaau 660
ugugcugcaa cccggugaaa uugucggaga uuacagaaaa accgcccaga acgcagaaag 720
agcuggcgua ccucuccgag cugcccccga ccccucugca ugugucggag gacagcuccu 780
cgcccgaacg gaccucccca ccggacucau cggucauugu gacgcuccuu gaccaggcag 840
cgaagucgaa ugaugaucug gauguaagcg agucaaaggg cuguauggaa gagaagcccc 900
aagaagugca aacgucgcgc aauguggagu caaucgccga acaaauggag aacccugacc 960
ucaaaaacgu aggaucguca acaggggaaa agaacgaacg gacgucggug gccggaacag 1020
ucagaaagug cuggccuaau agaguagcca aggagcagau cucgcggcga cuggauggga 1080
aucaauaccu uuuccuuccc ccaaacaggu auaucuucca cggagcggag guauauucag 1140
auucggagga cgauguauug ucaucaucga gcuguggauc aaacucggau ucggguacau 1200
gccagagccc cucgcucgag gagccuaugg aggacgaaag cgagaucgag gaguucuaca 1260
auggacucga ggacgagccu gacgucccag aaagggcggg uggagcgggg uucgguacug 1320
auggagauga ccaagaagca auuaacgaag ccaucuccgu gaagcaggaa gugacggaua 1380
ugaacuaucc guccaauaag uccugauaag cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca 1440
ugcccuucuu cucucccuug caccuguacc ucuuggucuu ugaauaaagc cugaguagga 1500
ag 1502

<210> 265
<211> 1403
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 265

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug uccuuuaucc 60
cuguggccga agauucggac uucccccauuc acaaccuccc guacggugua uucuccacac 120
gcggugaccc cagaccgaga aucgggguag ccauuggaga ucagaucuug gacuugucga 180
ucaucaaaca ucucuucacc ggcccagucc ucucgaaaca ucaggacgug uuuaaucagc 240
ccacccuuaa cuccuucaug ggacugggac aggccgcaug gaaggaagcg cgggucuuuc 300
uucaaaaccu uuugagcgug ucacaggcga ggcugaggga cgauacugag cugcggaagu 360
gugcguuuau cucacaagcg uccgcgacaa ugcaucuucc agcuacuauc ggggacuaua 420
cagauuucua cagcucccgc cagcacgcga cgaaugucgg aaucauguuc cgagacaaag 480
agaaugcguu gaugccuaac ugguugcacc ucccgguggg cuaucacggu cgagccagcu 540
cggucguggu gucaggaacg ccgauuagaa ggccuauggg ucagaugaaa cccgacgacu 600
cgaaaccgcc gguauauggc gcgugcaagu ugcuggauau ggagcuugaa auggcguucu 660
ucgucggucc cgguaaccgg uugggugaac ccauucccau cagcaaggcc caugaacaua 720
ucuucggcau ggugcucaug aacgacuggu cagcuagaga uauucagaag ugggaguaug 780
ugcccuuggg gcccuuucuc gggaagucgu uugggacgac cgucagcccc ugggucguac 840

cgauggacgc ucuuaugccg uuugccguac caaaucccaa acaggacccu aggccucucc 900
cguacuugug ucacgaugag cccuacacgu ucgauaucaa ccucucgguc aaucucaaag 960
gagagggaau gucgcaggcg gcaacgauuu gcaagucaaa uuucaaguau auguacugga 1020
ccaugcuuca acaacucaca caccacagcg ugaaugggug uaacuugcgc ccaggggacc 1080
uccucgcauc cggaacuauu uccggucccg agccagagaa cuuuggauca augcuugaac 1140
ugucguggaa ggggacaaag ccuauugacc uuggaaaugg acaaacgcgg aaauuucugc 1200
uggauggaga ugaggugauc auuacggggu acugccaggg agaugguuac cgcaucgggu 1260
uuggacagug cgcagggaag gugcucccug cgcuucugcc cucgugauaa gcugccuucu 1320
gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu ucucucccuu gcaccuguac cucuuggucu 1380
uugaauaaag ccugaguagg aag 1403

<210> 266
<211> 3851
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 266

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cgaucgaggu 60
ccaauucggg ugugcgccug gacgguuaug ccagacucgu gcagcagaca auucucugcu 120
aucaaaaucc ggugacgggg cuccucagcg cgucacacga gcagaaagac gccugggugc 180
gcgacaauau cuacagcauu cucgcgguau ggggucuugg aauggcguau aggaagaacg 240
ccgauaggga cgaggauaaa gccaaagcgu acgagcucga acagaacguc guaaagcuga 300
ugcggggcuu gcugcaaugc augaugcgcc aagucgcuaa ggucgagaag uucaaacaua 360
cgcagagcac uaaggacucc cugcacgcga aauacaauac agcuacgugc gggacagugg 420
ugggcgauga ccaguggggа caucuccaag ucgacgcaac cucgcuuuuc uuguuguucc 480
uggcucagau gacggcaucg gguuugcgaa ucaucuuuac uuuggaugaa gucgcguuca 540
uccagaaucu cguauucuac auugaagccg cguauaaggu agcggauuau ggcaugуggg 600
agaggggуga caagacuaac caagguaucc cggaacucaa cgccucguca gucggcaugg 660
ccaaagcggc guuggaagcg aucgacgagu uggaucuuuu uggagcucac ggugggagga 720
aaagcgucau ucacguauug cccgaugaag uggagcacug ucaaucgauc uuguucucga 780
ugcucccuag ggcaucgaca uccaaggaaa ucgaugcggg guugcugucg aucauuagcu 840
ucccggcguu cgcagucgag gaugucaacc ucgucaacgu gacaaagaac gagauuauca 900
gcaaacuuca agggagguau gggugcugcc gguuccuuag ggaugguuac aagaccccga 960
gagaagaucc gaauagacuu cacuaugacc cggcagagcu caaacuuuuu gagaacaucg 1020
aaugcgagug gcccguguuu uggacuuacu uuaucaucga ugggguauuu ucgggugaug 1080
cgguccaagu gcaagaguau cgggaggcuc uggaagguau ucucauccgc gggaaaaaug 1140
ggauucgacu cgugcccgag cucuaugcgg uaccucccuaa caaggуggac gaggaguaca 1200
agaauccuca cacaguggau aggguccccua ugggaaaggu accccauuug uggggccagu 1260
cgcucuacau ucugucaucg cuucucgcgg aaggguuccu ggcggcugga gaaaucgauc 1320

ccuugaauag gagguuuuca acgagcguca agccugaugu ggucguccaa gugacggugc 1380
ucgccgaaaa caaucauauc aaagaccuuc uccggaagca cggcgugaau guccagucga 1440
uugcggauau ucacccaauu caagugcagc ccggaagaau ccugucgcau aucuacgcga 1500
aguuggggcg gaauaagaac augaaccugu cgggucgacc guaucggcau auuggagucc 1560
ucgguacguc aaaacuuuau gucauccgaa accagaucuu cacguucacu ccacaguuua 1620
cggaccagca ucacuucuau cuugcgcugg acaacgagau gaucguggaa augcuuagga 1680
uugaacuggc guauuugugc acuuguugga ggaugaccgg acgacccacc cucacauucc 1740
caaucucccg gacgauguug acaaacgacg gaucagacau ccauuccgcc gugcucucaa 1800
cuaucaggaa acuggaggac ggguacuuug gaggugcuag gguaaaacuc ggaaaucugu 1860
ccgaguuucu gacgacuucg uuuuacacuu aucuuacguu ccucgacccu gacugcgacg 1920
aaaagcuguu ugauaacgcu ucagaaggga cuuucucgcc ugauucagac uccgaucucg 1980
ucggauacuu ggaggacaca ugcaaucagg aaagccagga ugaacuggac cacuacauca 2040
accacuugcu ucagucgacc ucauugcgcu cguaucuucc uccccugugc aagaauacgg 2100
aggaccgcca cgucuuuucg gcaauucaua gcacgcgaga cauccugucg gugauggcga 2160
aagcgaaggg ccuugagguc ccauuuguac ccaugacccu gccgacaaaa guguugucag 2220
cccaccggaa gucacuuaac uugguggacu ccccgcagcc auugcucgaa aaaguccccug 2280
agucagacuu ccaguggccc agggacgauc acggugacgu cgacugugaa aagcuggugg 2340
aacagcugaa ggacugcucg aaucuccaag aucaggcaga cauccuuuac auucucuaug 2400
uaaucaaagg uccuucaugg gauacgaauu ugucggguca gcacggggug accguacaga 2460
acuugcuugg ggagcucuac gggaaagccg gucuuaauca agaaaugggc cugauccggu 2520
acauuuccgg acucuugcgg aagaaggucg aaguguuggc ugaagcaugu accgaucucc 2580
ucucgcauca gaagcaguug acugugggac ucccucccga gcccagagaa aagauuaucu 2640
cggccccauu gccgccagaa gaacuuacaa aacuuaucua ugaagccagc gggcaggaua 2700
uuucgaucgc cguauugacg caagagauug uggucuauuu ggcgauguac gugagggcgc 2760
agcccuccuu guuugucgag augcuccgcu ugagaaucgg acucauuauc caaguaaugg 2820
caacugaacu cgcucgcucc cucaauugca gcggggagga ggcuuccgaa ucccuuauga 2880
acuugagccc guucgauaug aagaaccuuc uccaucauau cuugucaggg aaggaguuug 2940
gggucgagcg cucagugagg ccgauccaca gcucgaccuc cagcccuacg aucucgaucc 3000
augagguagg gcacaccgga gucacaaaga ccgagagguc cgggaucaau agacugcgau 3060
cggagaugaa gcagaugaca agacgguuca gcgccgauga gcaauucuuc ucaguaggac 3120
aggcggcauc gucgucagca cauucgucaa agucagcaag guccucgacu ccgucaucgc 3180
cuacgggcac aagcucaucg gauucgggag ggcaucacau cggcuggggc gagcgccagg 3240
ggcaaugguu gaggagaagg agacucgaug gagccauuaa ccgggucccc gucgguuucu 3300
accagagagu cuggaagauc cuucaaaaau gucacgggcu uucgauugac gguuacgucc 3360
uucccucauc caccacccgc gagaugacuc cccacgaaau caaauucgcg gugcaugucg 3420
aguccgugcu uaauagaguc ccgcagcccg aguauaggca gcuuuugguc gaagccauua 3480
uggugcuuac guuguugagc gauacggaga ugacgagcau cggcgggauu auucacgugg 3540
aucagaucgu gcagauggcg ucccagcucu uucuccaaga ccaagucagc aucggugcga 3600
uggauacgcu ggaaaaggac caagccacgg gcauuuguca cuuuuucuac gauucggcac 3660

cgucgggagc cuauggaaca augacauacc ucacgagagc aguagccucc uacuugcaag 3720
agcugcugcc caacagcggc ugucagaugc aaugauaagc ugccuucugc ggggcuugcc 3780
uucuggccau gcccuucuuc ucucccuugc accuguaccu cuuggucuuu gaauaaagcc 3840
ugaguaggaa g 3851

<210> 267
<211> 602
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 267

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gugcaucuga 60
ccccagaaga gaagagcgcg gugacugccc uuuggggaaa ggucaacgug gaugaagugg 120
gaggagaagc ucucggcaga cuccuugugg uguacccgug gacgcaacgc uucuuugagu 180
cauuuggcga ccugucgacc ccugaugccg ucauggguaa uccuaagguu aaggcacaug 240
gaaagaaggu gcugggcgca uuuucggaug ggcuugcaca ucuugauaau cuuaaaggua 300
cuuuugcaac ucucuccgaa cugcacugug acaagcugca uguggacccc gagaacuucc 360
ggcuccuugg uaacguccug gucugcgugu uggcucauca cuuugggaaa gaauucaccc 420
caccugucca ggcggcauac caaaaggugg ucgccggagu ggcaaacgca cuggcccaca 480
aauaccauug auaauaggcu ggagccucgg uggccaugcu ucuugccccu ugggccuccc 540
cccagccccu ccucccccuuc cugcacccgu acccccgugg ucuuugaaua aagucugagu 600
gg 602

<210> 268
<211> 647
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 268

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug agaauuucga 60
aaccacauuu gagaaguauu uccauccagu gcuacuugug uuuacuucua aacagucauu 120
uucuaacuga agcuggcauu caugucuuca uuuugggcug uuucagugca gggcuuccua 180
aaacagaagc caacugggug aauguaauaa gugauuugaa aaaaauugaa gaucuuauuc 240
aaucuaugca uauugaugcu acuuuauaua cggaaaguga uguucacccc aguugcaaag 300
uaacagcaau gaagugcuuu cucuuggagu uacaaguuau uucacuugag uccggagaug 360
caaguauuca ugauacagua gaaaaucuga ucauccuagc aaacaacagu uugucuucua 420
augggaaugu aacagaaucu ggaugcaaag aaugugagga acuggaggaa aaaaauauua 480
aagaauuuuu gcagaguuuu guacauauug uccaaauguu caucaacacu ucuugauaau 540
aggcuggagc cucgguggcc augcuucuug ccccuugggc cucccccccag ccccuccucc 600

ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu gaauaaaguc ugagugg 647

<210> 269

<211> 914

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 269

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cugggugcaa 60
gacuucgccu uugggugugc gcacuuugca gcguguguuc aaugagcgug cugagagcau 120
acccuaacgc cucccccccuu cugggcucgu cgugggggagg ccugauucac cuuuacacug 180
caaccgcaag gaauucauau cauuugcaaa uccauaagaa ugggcauguc gauggagccc 240
cucaucagac caucuacuca gcacucauga uucggucgga agaugcuggg uuugucguca 300
uuacuggagu gaugucucgg cgguaccucu guauggauuu ucgcggaaac auauucggca 360
gccauuacuu ugacccagag aacuguagau uucaacauca aacccuugaa aauggauacg 420
augucuacca cagcccacag uaccacuucc uuugucgcu gggacgagca aaacgcgccu 480
uucucccggg uaugaaccca ccacccuacu cccaguuucu cagcagacgc aacgaaaucc 540
cacugauuca cuucaauacc ccuauuccaa ggagacauac ucgguccgcc gaggacgacu 600
ccgaacguga ccccuugaac gugcugaagc cuagggcuag aaugacgcca gccccugcgu 660
caugcucgca agaacucccg ucggcggagg auaacucccc uauggcaucc gauccucugg 720
gaguggugcg agguggucgu guuaacaccc acgcgggugg cacuggaccc gaagggugua 780
gaccuuucgc aaaguuuauc ugauaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc 840
cuugggccuc cccccagccc cuccucccccu uccugcaccc guacccccgu ggucuuugaa 900
uaaagucuga gugg 914

<210> 270

<211> 782

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 270

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug uacuccgcac 60
caucagcuug caccugucuc ugccugcacu uucugcuucu guguuuucaa guucaagucc 120
uuguggcaga agagaaugug gacuuccgca uucaugugga gaaccagacu cgugccagag 180
augacguguc ccgcaaacaa cuccggcugu accagcugua cagccgaacc ucugguaaac 240
acauucaagu gcuggggagg agaaucucgg cacguggcga agauggagau aaguacgcgc 300
agcuguuggu cgaaacggac acuuuuggau cccaagugcg cauaaaggga aaggaaaccg 360
aguuuuaccu uuguaugaac aggaaaggaa agcucguggg aaaaccagau ggcacuucga 420
aggaaugugu cuuuaucgaa aaggugcuug aaaacaauua cacugcacuc augucagcaa 480

aguauagcgg uugguacgug gguuuuacca aaaagggcag accccgcaag gggccuaaga 540
ccagagagaa ccaacaggau guccauuuca ugaagcggua ccccaagggu cagccugaac 600
uucagaaacc uuucaaguac acgacuguca ccaagagguc gagacgaauu cggccaaccc 660
auccggccug auaauaggcu ggagccucgg uggccaugcu ucuugccccu ugggccuccc 720
cccagccccu ccucccccuuc cugcacccgu acccccgugg ucuuugaaua aagucugagu 780
gg 782

<210> 271
<211> 1193
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 271

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gugagagcac 60
ggcaucagcc agguggccuu ugccugcucc uucuucuuuu gugucaauuc auggaagauc 120
guucggcaca ggcgggaaac uguuggcugc gacaggcgaa gaacgguaga ugccaagugc 180
uguacaaaac ugagcugagc aaagaagaau guuguucaac cggucgacuu ucaaccucau 240
ggaccgaaga ggaugugaau gauaacacuu uguuuaagug gaugauuuuc aacgggggag 300
ccccuaauug uauuccuugu aaagaaacuu gcgaaaacgu cgauugugga ccgggaaaga 360
aaugucgcau gaacaaaaag aauaagccaa ggugugugug cgcaccugac uguucaaaca 420
uuacuuggaa gggaccuguc uguggccuug acgggaaaac cuaucgcaac gaaugugcac 480
ugcugaaggc gagaugcaag gaacaaccgg aacucgaagu gcaguaccag gguagaugca 540
agaaaacgug ucgugaugug uuuugucccg gcucuucgac uuguguggguc gaucaaacca 600
acaacgcaua cugcgucacu uguaaccgga uaugccccga gcccgcaucc ucggagcagu 660
accucugugg aaaugacggg guuacuuaca gcucggccug ucaucuccgg aaggcaaccu 720
gucugcuggg aagaucgauc ggacuggccu acgaaggcaa augcauuaag gcaaagucgu 780
gugaggacau ccaaugcacc gguggaaaga agugucucug ggacuuuaag gugggucgcg 840
gcaggugcuc ccuuugcgau gaacuuugcc cagauuccaa gagcgaugaa ccagucugug 900
caucagauaa ugcaacguac gccuccgagu gcgcuaugaa ggaagccgcu uguuccuccg 960
gggugcugcu ugaggugaag cacucgggau cguguaauag caucagcgag gacaccgagg 1020
aagaagaaga ggaugaagau caagacuaca gcuuuccuau uuccuccauc cucgaguggu 1080
gauaauaggc uggagccucg guggccaugc uucuugcccc uuggggccucc ccccagcccc 1140
uccuccccuu ccugcacccg uacccccgug gucuuugaau aaagucugag ugg 1193

<210> 272
<211> 1496
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 272

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcaguggcaa 60
uugcagccgc cagggucugg cggcugaaca gagggcuguc acaggcggca cuccugcugc 120
uccgccagcc uggggcacga ggccuggcca gaucgcaucc cccucgucag caacaacaau 180
ucagcucccu ugaugauaaa ccucaguucc cgggugcgag cgccgaguuu aucgauaagc 240
ucgaguucau ccaaccuaau gugauuagcg gaauuccgau cuaccgggug auggacagac 300
aaggacaaau cauuaaccca ucggaggauc cacaucugcc uaaggagaaa gucuugaagc 360
ucuacaaguc caugacucuu cuuaacacua uggaccgaau acuuuacgaa ucacagcgcc 420
agggaaggau cucguuuuac augaccaauu acggugaaga gggaacccau gugggaucgg 480
cagcagcacu ggacaauacc gaccucguuu ucggucagua ccgggaggca ggagugcuca 540
uguauaggga cuacccacug gagcuguuua uggcccaaug cuauggcaac auuagcgauc 600
uggguaaagg uagacagaug ccagugcacu acggguguaa ggaacggcac uuugucacua 660
uuucgagccc ucuugcaacu caaauacccc aagcugucgg agcagcauac gcagcaaagc 720
gggcaaaugc aaacagagug gugaucuguu acuucggaga aggugcagca ucggaaggag 780
acgcgcacgc aggcuucaac uuugcugcga cucuugaaug ccccauuauc uucuuuuguc 840
ggaacaacgg cuaugcaaua agcacgccua ccucagaaca guaccgcgga gaugguaucg 900
ccgcuagggg uccaggguac gggauuaugu ccauuagagu ggauggaaac gauguuuuug 960
cgguguacaa ugcgacgaag gaagcacguc gcagggccgu cgcagaaaac cagccuuuuc 1020
ugauugaggc caugaccuac cgcaucggac aucauuccac cucagaugau ucuucggccu 1080
accgauccgu ggacgaaguc aauuacuggg auaaacagga ucaucccauu uccagacuuc 1140
gucauuaccu ucugucgcag ggcugguggg augaagaaca ggaaaaagcc uggcgaaagc 1200
aaucaagacg caaagugaug gaagccuuug aacaagcuga gagaaagcca aagccuaauc 1260
caaaccuucu guuuuccgac guguaccaag aaaugccagc gcaacuccgc aagcaacaag 1320
aguccuuggc uagacacuug caaaccuacg gcgaacauua cccccuugau cacuuugaca 1380
agugauaaua ggcuggagcc ucgguggcca ugcuucuugc cccuugggcc ucccccccagc 1440
cccuccuccc cuuccugcac ccguaccccc guggucuuug aauaaagucu gagugg 1496

<210> 273
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 273

Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys
1 5 10 15

<210> 274
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人
<400> 274

Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile

1 5 10 15
Ala Leu Leu Gln Leu Lys
20
<210> 275
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人
<400> 275
Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15
Ala Ile Phe Ala Lys
20
<210> 276
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人
<400> 276
Thr Ser Pro Pro Asp Ser Ser Val Ile Val Thr Leu Leu Asp Gln Ala
1 5 10 15
Ala Lys
<210> 277
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 277
Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val Pro Arg
1 5 10
<210> 278
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人
<400> 278
Val Phe Leu Gln Asn Leu Leu Ser Val Ser Gln Ala Arg
1 5 10
<210> 279
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 279

His Leu Phe Thr Gly Pro Val Leu Ser Lys
1 5 10
<210> 280
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人
<400> 280
His Gln Asp Val Phe Asn Gln Pro Thr Leu Asn Ser Phe Met Gly Leu
1 5 10 15
Gly Gln Ala Ala Trp Lys
20
<210> 281
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人
<400> 281
Phe Leu Leu Asp Gly Asp Glu Val Ile Ile Thr Gly Tyr Cys Gln Gly
1 5 10 15
Asp Gly Tyr Arg
20
<210> 282
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人
<400> 282
Gly Ser Ser Val His Val Leu Tyr Ser Thr Pro Ala Cys Tyr Leu Trp
1 5 10 15
Glu Leu Asn Lys
20
<210> 283
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 283
His Leu Val Leu Leu Asp Thr Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gly His Arg
1 5 10 15
<210> 284
<211> 11
<212> PRT

<213> 智人
<400> 284
Phe Gln Val Ile Val Tyr Asn Pro Leu Gly Arg
1 5 10
<210> 285
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人
<400> 285
Gly Leu Ile Asp Glu Val Asn Gln Asp Phe Thr Asn Arg
1 5 10
<210> 286
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人
<400> 286
Asn Ser Leu Phe Glu Tyr Gln Lys
1 5
<210> 287
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 287
Arg Leu Glu Val Asp Ile Asp Ile Lys
1 5
<210> 288
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 288
Ala Tyr Glu Leu Glu Gln Asn Val Val Lys
1 5 10
<210> 289
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 289
Leu Thr Tyr Ser Thr Glu Val Leu Leu Asp Arg
1 5 10

<210> 290
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 290
Phe Leu Tyr Ala Cys Gly Phe Ala Ser His Pro Asn Glu Glu Leu Leu
1 5 10 15
Arg
<210> 291
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 291
Asn Phe Leu Ala Phe Ile Gln His Leu Arg
1 5 10
<210> 292
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 292
Ser Phe Glu Glu Ile Ala Ala Glu Phe Gln Lys
1 5 10
<210> 293
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 293
His Val Leu Gly Val Pro Leu Asp Asp Arg Lys
1 5 10
<210> 294
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
<400> 294
Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys
1 5 10 15
<210> 295
<211> 16
<212> PRT

<213> 智人
<400> 295
Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15
<210> 296
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人
<400> 296
Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys
1 5 10
<210> 297
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人
<400> 297
Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe
1 5 10 15
Ala Lys
<210> 298
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人
<400> 298
Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg
1 5 10 15
<210> 299
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人
<400> 299
Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe
1 5 10 15
Ala Lys
<210> 300
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人
<400> 300

Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr
1 5 10 15
Phe Gly Ser Gln Val Arg
20
<210> 301
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人
<400> 301
Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
1 5 10
<210> 302
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人
<400> 302
Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys
1 5 10
<210> 303
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 303
Leu Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe
1 5 10 15
Lys
<210> 304
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 304
Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys
1 5 10
<210> 305
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 305
Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys

1 5

<210> 306

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 306

Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr Asn Ala Leu Gln Arg

1 5 10

<210> 307

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 307

Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser Gln Lys

1 5 10

<210> 308

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 308

Ala His Leu Arg Asp Glu Glu Lys

1 5

<210> 309

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 309

His Leu Gln Thr Tyr Gly Glu His Tyr Pro Leu Asp His Phe Asp Lys

1 5 10 15

<210> 310

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 310

Ser Val Asp Glu Val Asn Tyr Trp Asp Lys Gln Asp His Pro Ile Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 311

<211> 16

<212> PRT
<213> 智人
<400> 311
His Leu Gln Thr Tyr Gly Glu His Tyr Pro Leu Asp His Phe Asp Lys
1 5 10 15
<210> 312
<211> 470
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 312
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcgcugugga 60
ugcggcuucu cccucuucuc gcguuguugg cacuuugggg acccgaccca gcugccgccu 120
uugucaaaca gcaccucugu gggucgcauc ugguagaggc ccuguauuug gugugcgggg 180
aaagggguuu cuucuacaca ccggaaaccg aggcggaaga uuugcaaguc ggacaggugg 240
agcuuggugg cggaccggga gcggggagcc ugcagccccu ugcauuggaa gggucgcugc 300
agaagcgcgg aauuguggag cagugcugua cgucaaucug cucccucuac caacucgaga 360
acuauuguaa uugauaagcu gccuucugcg gggcuugccu ucuggccaug cccuucuucu 420
cucccuugca ccuguaccuc uuggucuuug aauaaagccu gaguaggaag 470
<210> 313
<211> 470
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 313
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcccucugga 60
ugagacuguu gccgcuccug gcacuucuug cgcucugggg gccugacccc gcagcggccu 120
ucgugaauca gcauuugugu ggaucgcacc ugguagaagc gcuuuacuug gucugcggug 180
agcggggguu uuucuauacc aagccgacag aggccgaaga uuugcaagug ggccaggucg 240
agcucggugg gggucccgga gcuggaucgc uccagccacu ggcgcuugag ggaucacugc 300
agaaaagggg gauuguggag caguguugca cgagcaucug cucccuuuau caauuggaaa 360
acuacuguaa cugauaagcu gccuucugcg gggcuugccu ucuggccaug cccuucuucu 420
cucccuugca ccuguaccuc uuggucuuug aauaaagccu gaguaggaag 470
<210> 314
<211> 470
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 314
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcccuuugga 60
ugagauugcu uccucuucuc gcgcuccucg cgcugugggg uccagacccc gcagcugccu 120
uugugaauca gcaucugugc ggaagccacu uggucgaagc ccuguacuug guaugcgggg 180
agcggggguu cuucuacacc gacaaaacag aagcggaaga uuugcaaguc ggacaggugg 240
aguugggugg gggucccgga gcaggcucgc uucaaccgcu ggcgcucgag ggaucacuuc 300
agaagagggg gaucguggag caguguugca cguccauuug uucgcuguau cagcucgaga 360
acuauuguaa cugauaagcu gccuucugcg gggcuugccu ucuggccaug cccuucuucu 420
cucccuugca ccuguaccuc uuggucuuug aauaaagccu gaguaggaag 470
<210> 315
<211> 476
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 315
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gcgcucugga 60
ugcgauugcu uccucuccug gcuuugcuug cacugugggg uccagacccg gcagccgcgu 120
ucgugaauca gcauuugugc ggaagccacc uugucgaagc guuguaucug gucugcgggg 180
agaggggguu cuuuuacaca cccaagaccc gcagagaggc cgaggauuug caaguaggcc 240
agguggaacu cggugggggа cccggagccg gaucgcucca accgcucgcg cuggaagggu 300
cacugcagaa acggggaauc guggagcagu guuguacguc cauuugcucg cuuuaccagc 360
uugagaacua uuguggcuga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu 420
ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 476
<210> 316
<211> 1208
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 316
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug cucuuuaacc 60
uccgcauccu guugaauaac gcugcguucc gaaaugggca uaacuucaug guacgcaacu 120
ucagaugcgg ccagccacuc cagaacaagg ugcagcuuaa aggucgggac cuccuuacuc 180
ugaagaacuu uaccggagaa gagaucaagu acaugcugug gcuuucagcg gauuugaagu 240
uucgcauuaa acagaaggga gaguaucuuc cccucuugca agggaagucg cucgggauga 300
ucuucgagaa gcgcucgaca aggacccggc ucagcaccga aaccggauuu gcgcuguugg 360

gagggcaccc guguuuucuc acgacgcaag acauucacuu gggagugaau gagucguuga 420
cagacacugc cagaguccuu ucaucgaugg ccgaugcggu gcuugcgagg gucuacaaac 480
agucggaucu ugacacacug gccaaggaag ccucgauccc gaucauuaac gggcucucgg 540
auuuguacca cccaauccag aucuuggcgg auuaucuuac auugcaagag cauuauuccu 600
cccucaaggg gcugacucuc agcuggauug gugacggaaa uaacauccuc cauucaauca 660
ugaugagcgc agcgaaauuc ggaaugcacc uccaagcggc cacgcccaaa gguuaugaac 720
cugaugcgag cguaacuaaa cucgcggagc aguaugcaaa ggaaaauggc acgaaacucu 780
ugcucacaaa ugaccccuug gaggcagcac acggugguaa uguccugauu acagacacau 840
ggaucuccau ggggcaggag gaggagaaaa agaaaagacu ucaggcauuu cagggauacc 900
agguaacgau gaaaacggcg aaggucgccg ccucagacug gacuuuccuc cauugccugc 960
cgaggaagcc ggaagaaguc gaugaugagg uguuuuacag cccccgaucc cugguguucc 1020
cugaagccga aaaucggaag uggacaauua uggcagugau ggugucccuu cuuacggacu 1080
acucgcccca gcugcaaaaa ccgaaauucu aaugagcugc cuucugcggg gcuugccuuc 1140
uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga 1200
guaggaag 1208

<210> 317
<211> 710
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成转录物序列
<400> 317

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gccuugacgu 60
ucgcccuucu cguagcccug uuggugcucu caugcaaauc guccuguucc gucggaugcg 120
aucuucccca gacgcauucg cuggggucgc gcagaacucu cauguuguug gcgcagauga 180
ggcgaauuag ccuuuucucg ugucuuaagg accggcacga uuuugguuuc ccucaagagg 240
aguuuggcaa ccaguuccag aaggcggaaa caaucccccgu acuccacgag augauccagc 300
agaucuucaa ccuguuuucc acgaaggacu ccucagcggc uugggacgaa acccugcugg 360
auaaguuuua cacggagcuc uaucagcagc ugaaugaccu cgaagcaugu gugauucaag 420
gagugggggu caccgagaca ccgcuuauga aggaagauuc aauccuugca gugcggaaau 480
acuuucagag gaucacuuug uaucuuaaag agaaaaagua cagcccgugc gcgugggaag 540
ucgugagagc ggagauuaug cgaagcuucu cgcugagcac aaauuugcaa gagucgcucc 600
gcucaaaaga augauaagcu gccuucugcg gggcuugccu ucuggccaug cccuucuucu 660
cucccuugca ccuguaccuc uuggucuuug aauaaagccu gaguaggaag 710

<210> 318
<211> 1544
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 318

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gucagccagg 60
cacucagacu gcucugccug uugcuugggc ugcaggguug cuuggccgcu gggggagucg 120
cgaaagcguc ggguggagaa acgcgggaca ugccauggaa gccuggaccc caucgcguau 180
ucgugacaca agaagaagcc cacggagugu ugcauagacg gcgcagagca aacgccuuuc 240
ucgaagagcu cagaccgggg ucgcucgaga gggaguguaa ggaagagcag uguuccuuug 300
aagaagcacg cgaaaucuuc aaagacgccg aacgaaccaa gcuguuuugg aucucguauu 360
cagauggaga ucagugugcc ucaucgccgu gucaaaaugg gggaagcugc aaagaucagc 420
uucagagcua cauuugcuuu uguuugcccg cguucgaggg gcggaacugu gagacucaca 480
aagaugacca acugaucugc gucaacgaga augguggggug cgagcaguau ugcuccgacc 540
acaccggcac aaaaagauca ugccgcuguc acgagggaua uucgcugcuc gcggacggag 600
ucagcuguac gccgacaguc gaguauccau gcggaaagau uccgauucuu gagaaacgca 660
augccucgaa gccccagggg cggaucgucg guggaaaagu gugcccgaag ggggagugcc 720
ccuggcaggu gcuccucuug gugaauggag cccaguugug uggcggcacg uugaucaaua 780
caaucugggu aguaucggcu gcccauugcu ucgacaaaau caaaaacugg cgaaaccuga 840
uugcggugcu gggugaacac gacuuguccg agcacgaugg ggacgagcag ucgaggcggg 900
uagcgcaagu caucauccca uccaccuacg ucccuggaac aacuaaccac gauauugcac 960
ugcucaggcu gcaccaaccc gucguguuga cggaucaugu ggugccccuu ugucuccccg 1020
agagaaccuu cagcgagaga acguuggccu ucgugcgguu cucgcuugug ucgggguggg 1080
ggcagcuucu cgauagggga gcgacagcuu uggaacugau gguacugaac guaccgaggc 1140
uuaugaccca agacuguuug caacagucgc gcaagguggg agauucgccg aauaucacug 1200
aguacauguu cugugcgggu uacuccgacg gaucaaagga cucaugcaag ggugauagcg 1260
guggucccca ugcgacgcau uaccgaggga cgugguaccu uacgggaauc guaucauggg 1320
ggcagggaug cgcgacggug gggcacuuug gugucuacac ucgcgucagc caguauauug 1380
agugguugca gaaguugaug aggagcgaac cucggccugg agugcugcuc agggcaccgu 1440
uuccuugaua agcugccuuc ugcggggcuu gccuucuggc caugcccuuc uucucucccu 1500
ugcaccugua ccucuugguc uuugaauaaa gccugaguag gaag 1544

<210> 319

<211> 797

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成转录物序列

<400> 319

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gccacugggu 60
cgaggaccag ccuguuguug gccuuugggc ugcuuugucu gccauggcuc caagagggau 120
ccgcauuccc gacaauuccc cucucaagac uguuugauaa cgcuaugcuc cgagcccacc 180
ggcugcacca gcuggcguuc gauacauacc aagaauucga ggaagcauac aucccccaaag 240

agcagaagua uucguuccuu caaaauccuc agacaucgcu uuguuucucg gagucaauuc 300
cgacgcccag caauagggaa gaaacgcagc agaagucgaa ccuugaguug uugcggauua 360
gcuugcuccu gauccaguca uggcucgaac cggugcaguu cuugcgcucg guguuugcga 420
acucccuggu auauggugcg uccgauucaa augucuacga cuugcucaag gaucuugaag 480
aggggaucca aacucucaug gguaggcuug aggacggcuc gccucgcacg ggacagaucu 540
uuaagcagac guauucgaaa uuugacacca auucacauaa cgacgacgcg uugcucaaaa 600
acuauggauu gcucuacugc uuucggaagg acauggauaa aguggagaca uucuugagaa 660
ucguccagug cagauccgua gagggaucau gcgguuuuug auaagcugcc uucugcgggg 720
cuugccuucu ggccaugccc uucuucucuc ccuugcaccu guaccucuug gucuuugaau 780
aaagccugag uaggaag 797

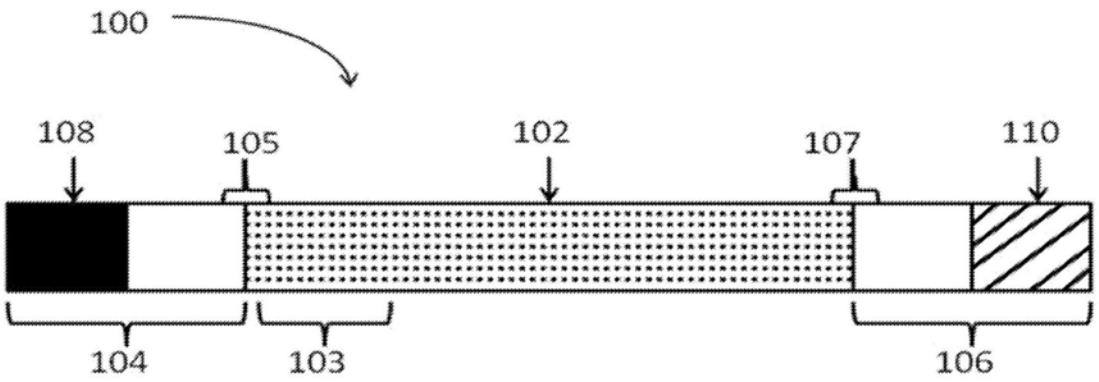
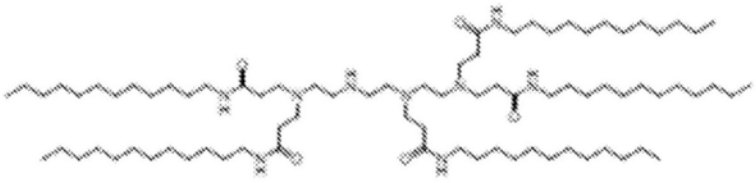
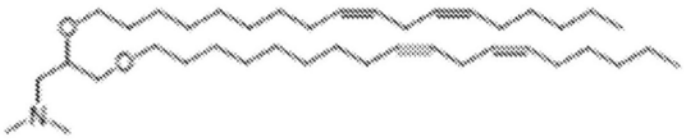


图1

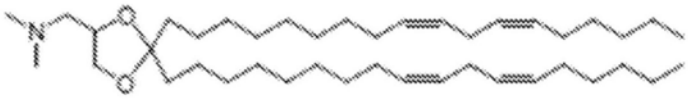
98N12-5 (TETA5-LAP)



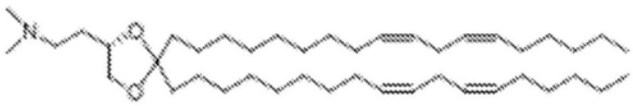
DLIN-DMA



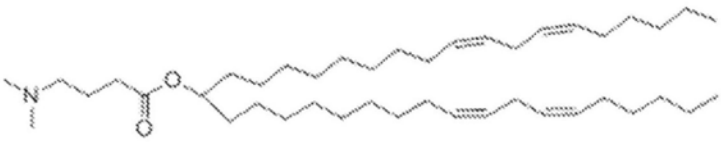
DLIN-K-DMA (2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷)



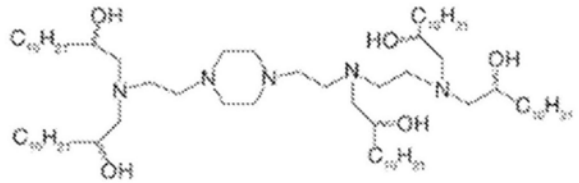
DLIN-KC2-DMA



DLIN-MC3-DMA



C12-200



现有技术

图2

在图中仅示出单切点酶。

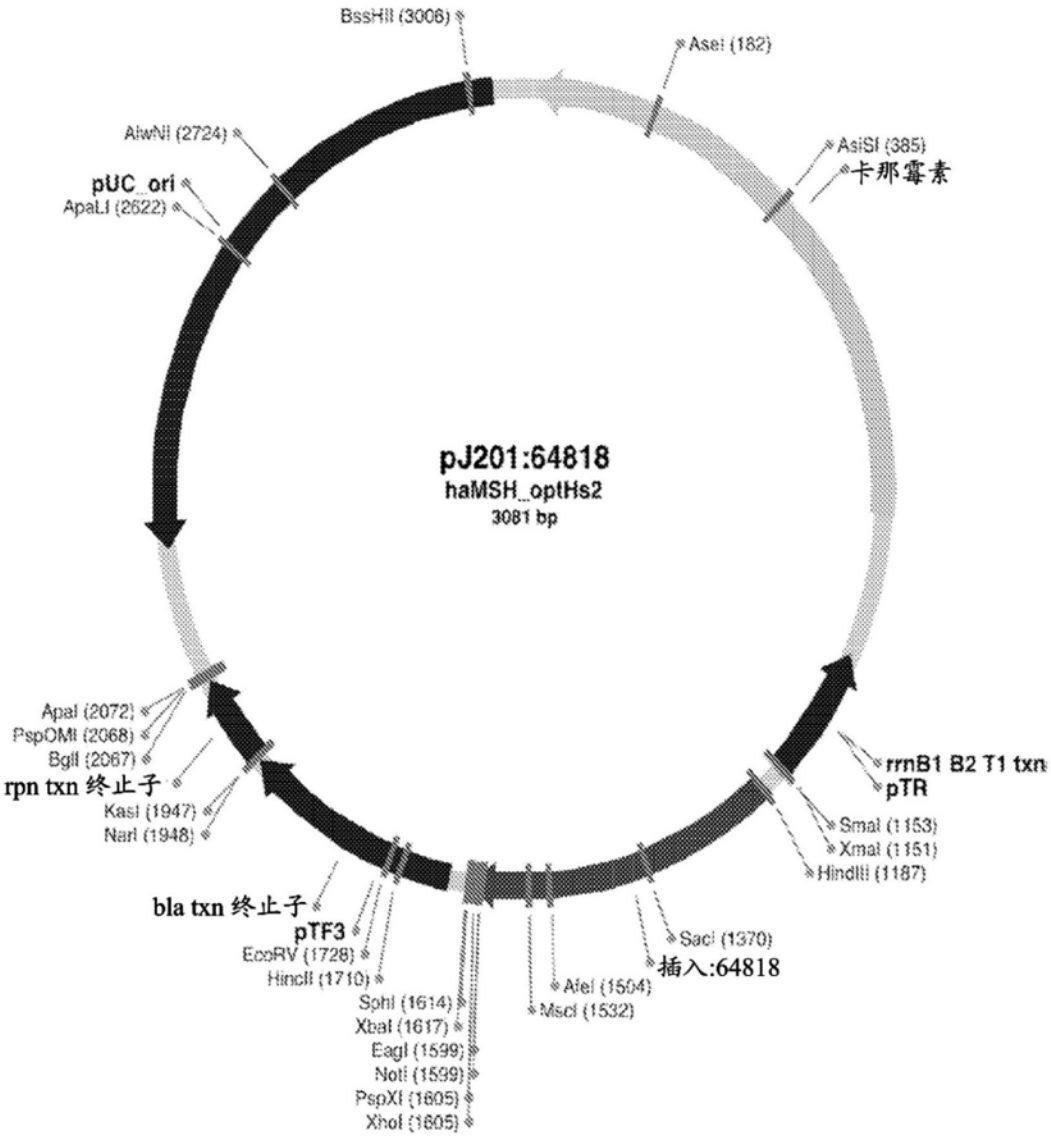


图3

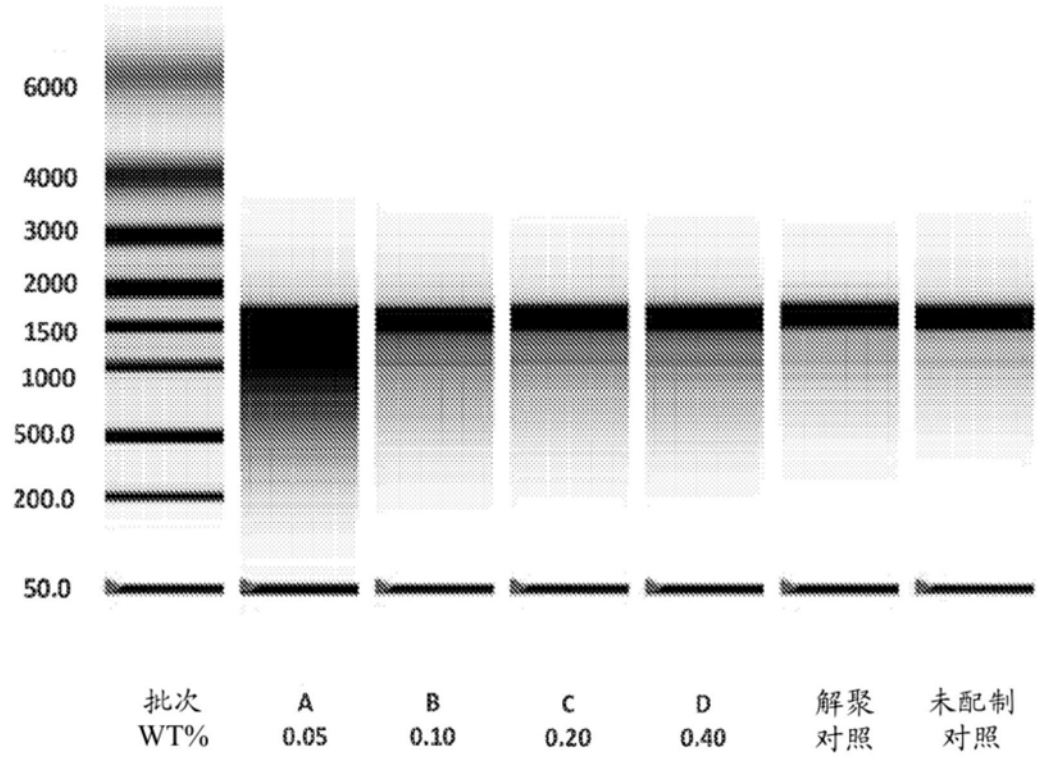

6000
4000
3000
2000
1500
1000
500.0
200.0
50.0
批次 A B C D 解聚 未配制
WT% 0.05 0.10 0.20 0.40 对照 对照

图4

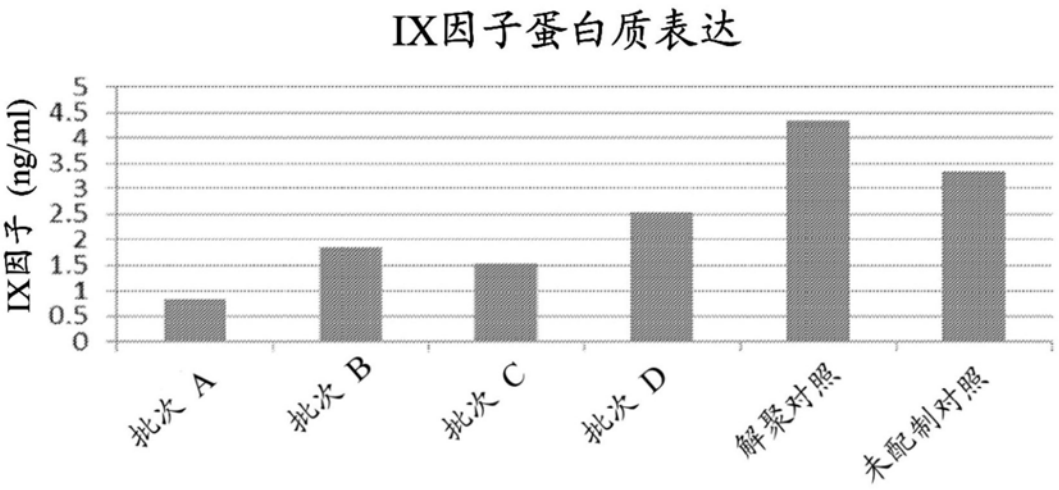
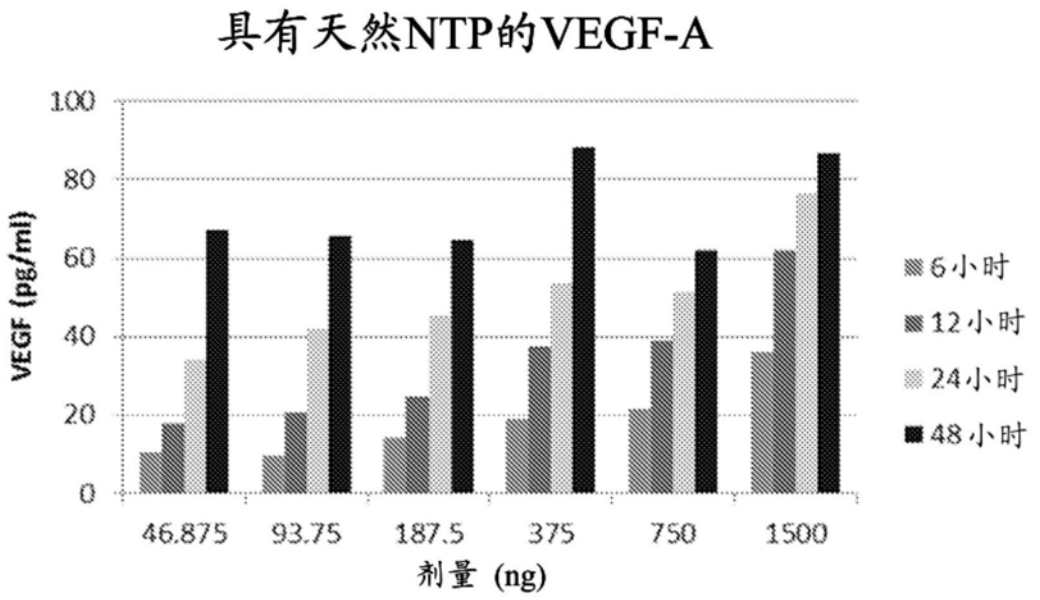

IX因子蛋白质表达
IX因子 (ng/ml)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
批次 A
批次 B
批次 C
批次 D
解聚对照
未配制对照

图5

A.


具有天然NTP的VEGF-A
VEGF (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
46.875
93.75
187.5
375
750
1500
剂量 (ng)
6小时
12小时
24小时
48小时

B.

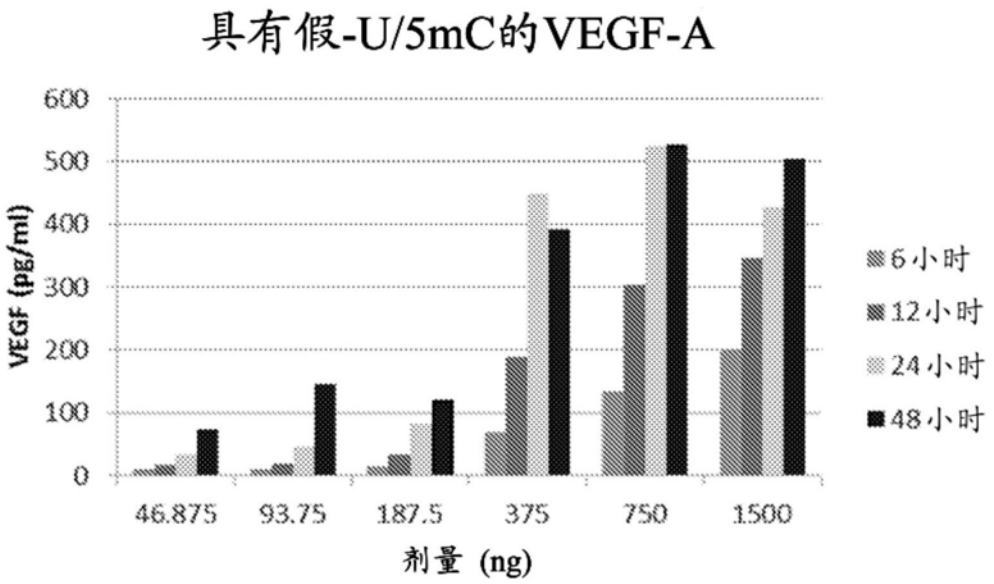

具有假-U/5mC的VEGF-A
VEGF (pg/ml)
600
500
400
300
200
100
0
46.875
93.75
187.5
375
750
1500
剂量 (ng)
6小时
12小时
24小时
48小时

图6

C.

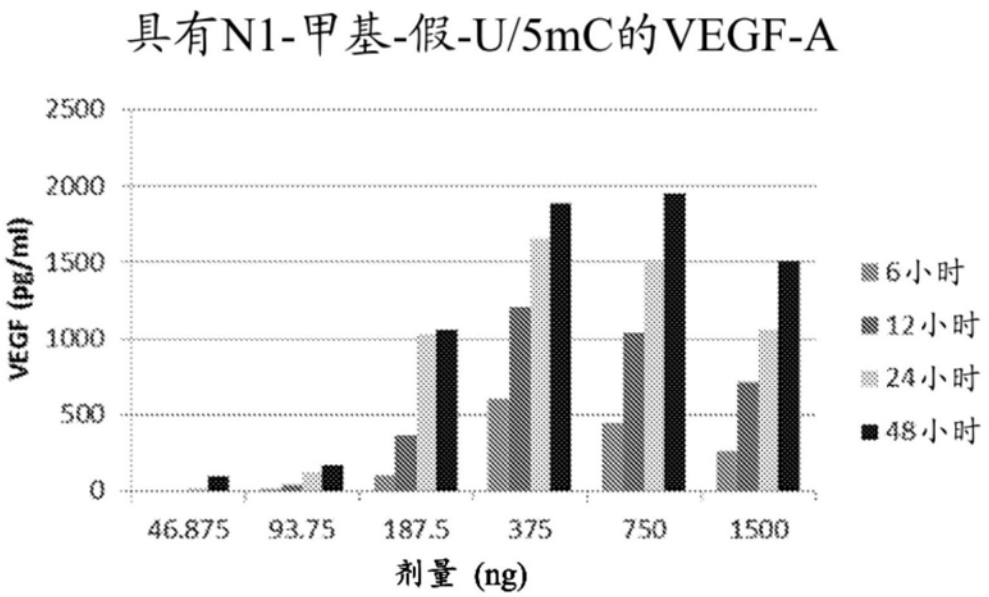

具有N1-甲基-假-U/5mC的VEGF-A
2500
2000
1500
1000
500
0
VEGF (pg/ml)
46.875
93.75
187.5
375
750
1500
剂量 (ng)
6小时
12小时
24小时
48小时

图6续

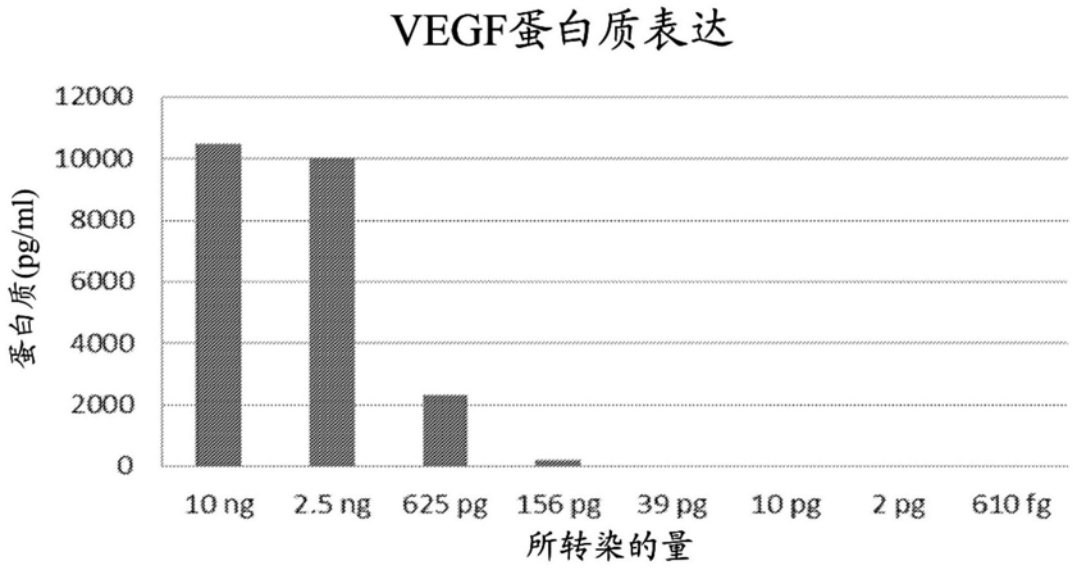

VEGF蛋白质表达
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
蛋白质(pg/ml)
10 ng
2.5 ng
625 pg
156 pg
39 pg
10 pg
2 pg
610 fg
所转染的量

图7

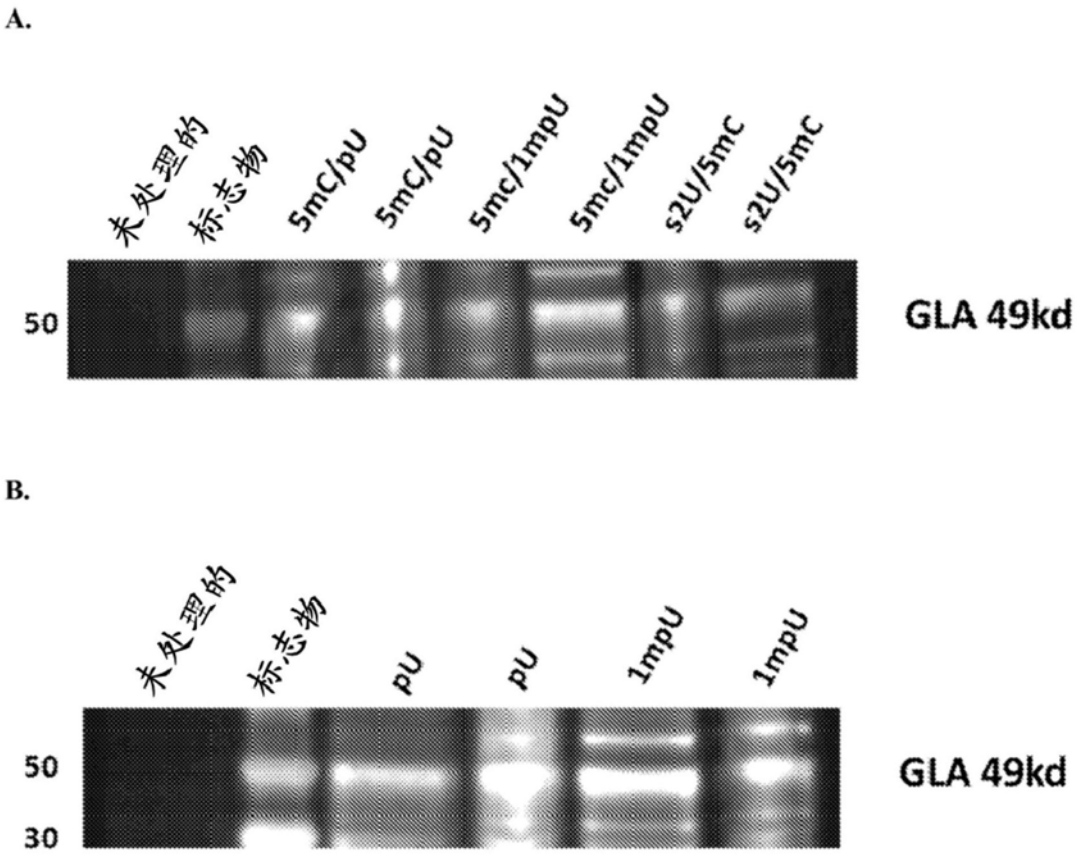

A.
未处理的
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
50
GLA 49kd
B.
未处理的
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
50
30
GLA 49kd

图8

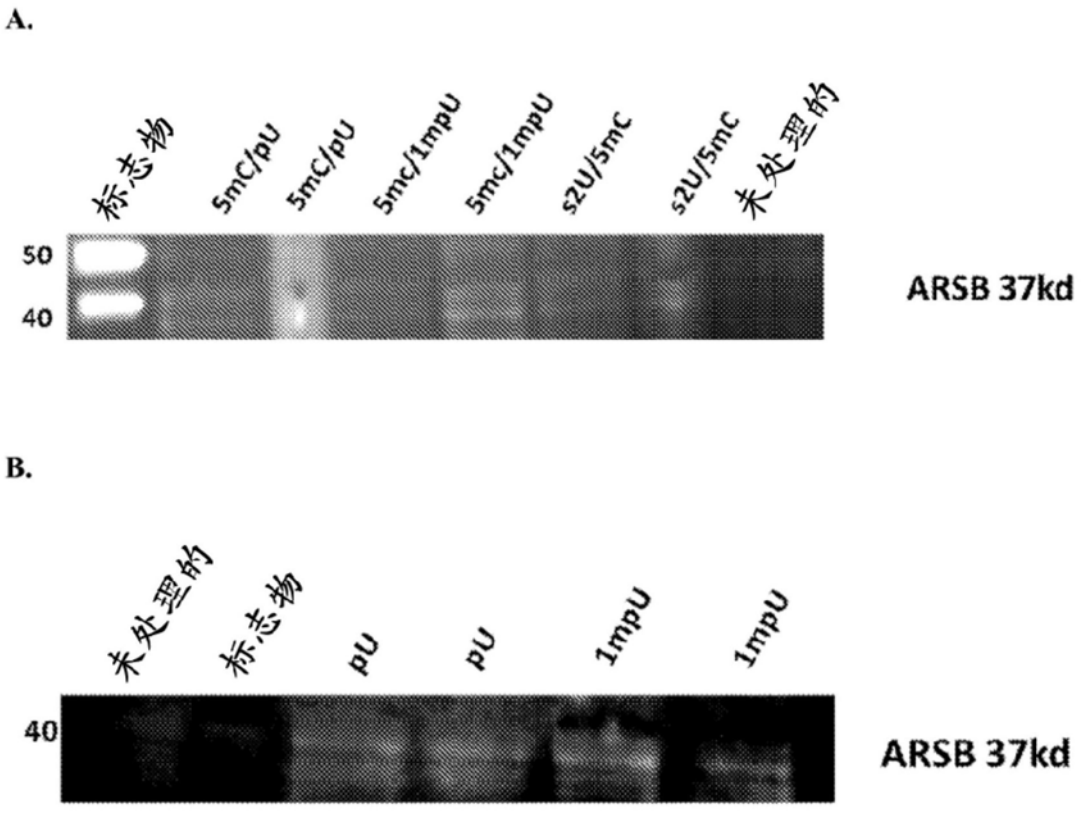
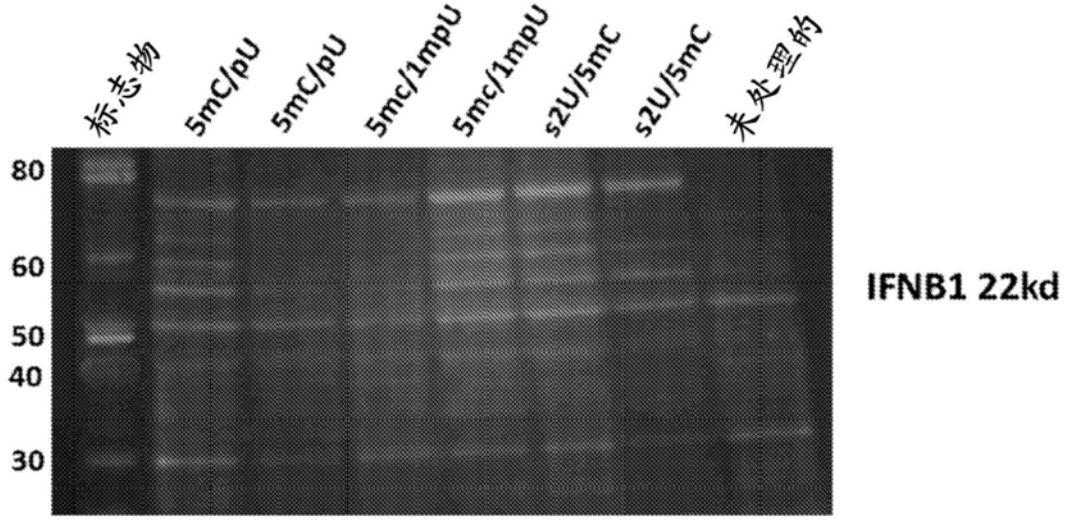

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
40
ARSB 37kd
B.
未处理的
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
40
ARSB 37kd

图9

A.


标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
80
60
50
40
30
IFNB1 22kd

B.

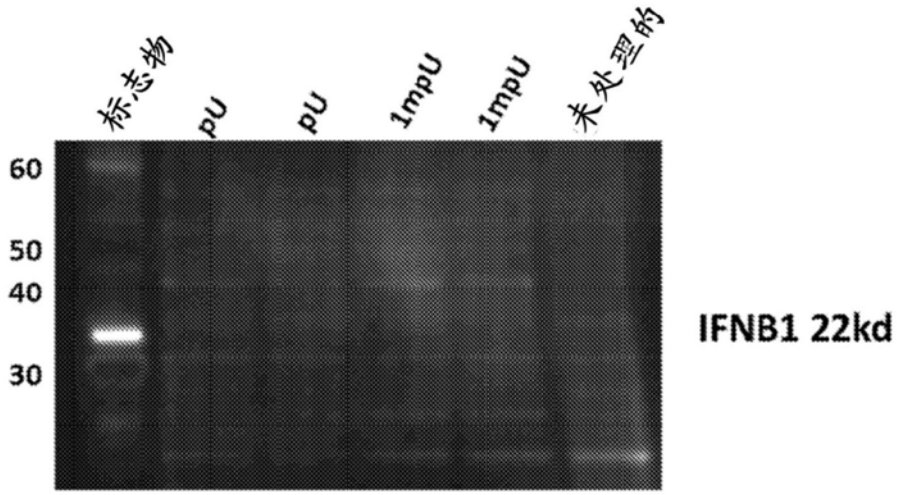

标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
50
40
30
IFNB1 22kd

图10

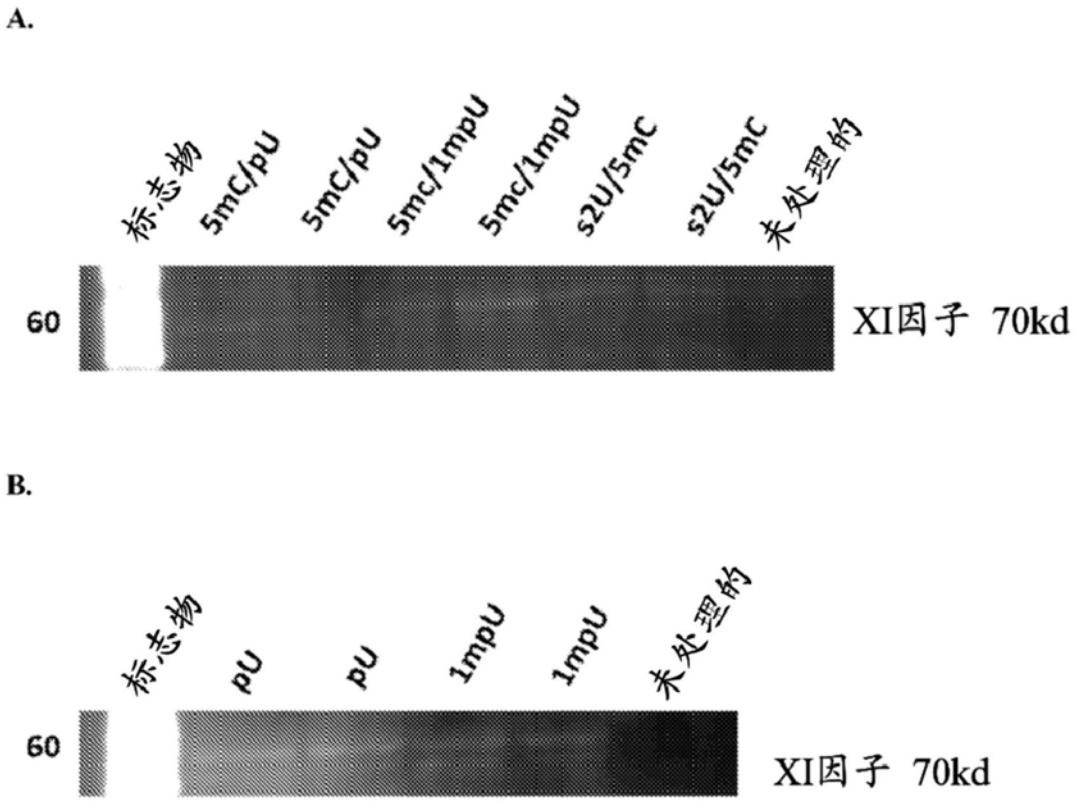

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
XI因子 70kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
XI因子 70kd

图11

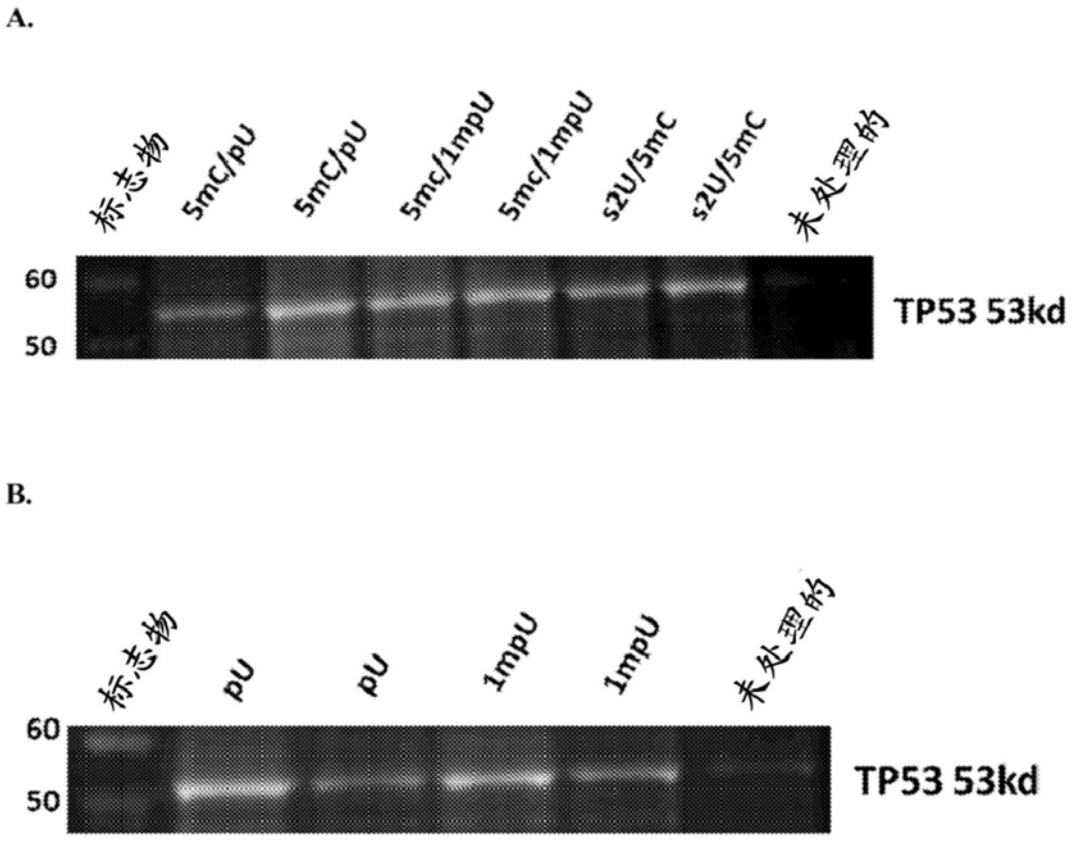

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
50
TP53 53kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
50
TP53 53kd

图12

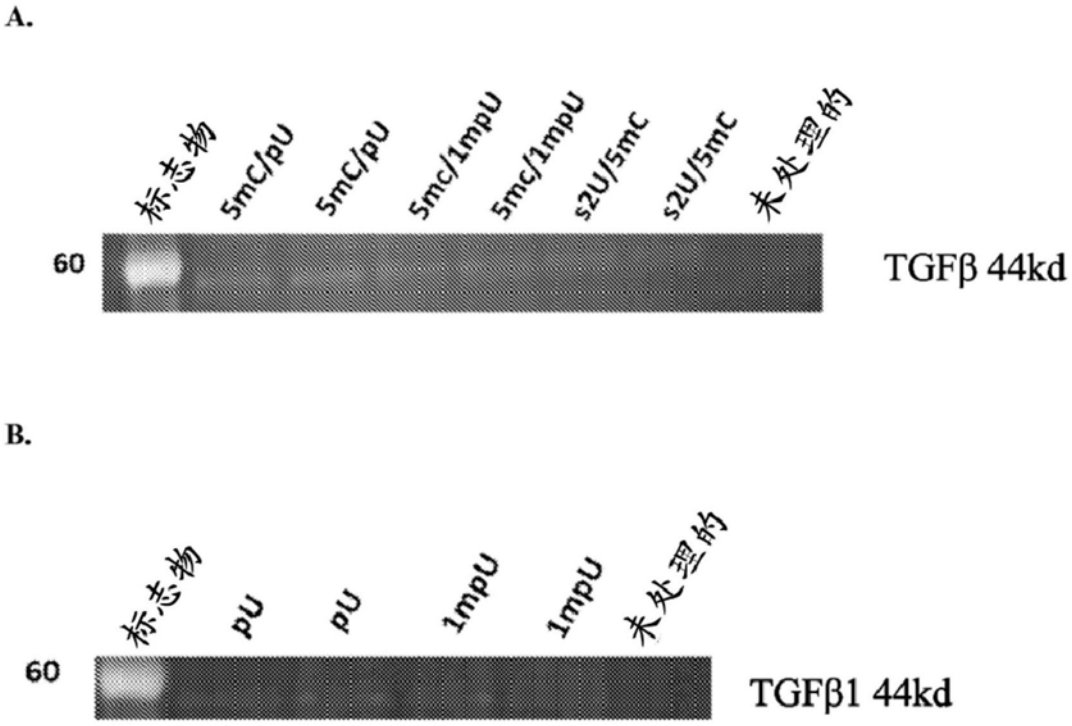
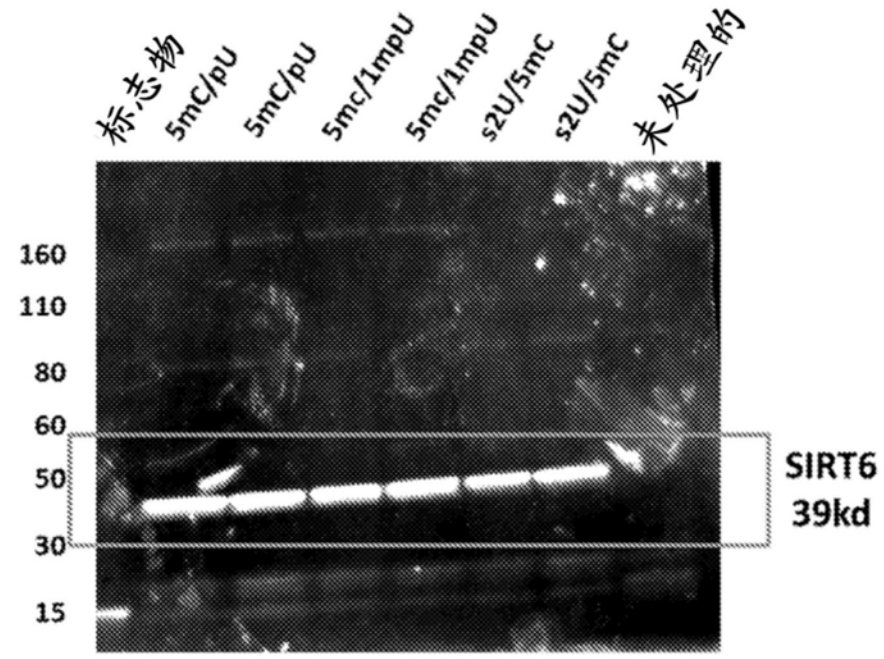

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
TGFβ 44kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
TGFβ1 44kd

图13

A.


标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
160
110
80
60
50
30
15
SIRT6
39kd

B.

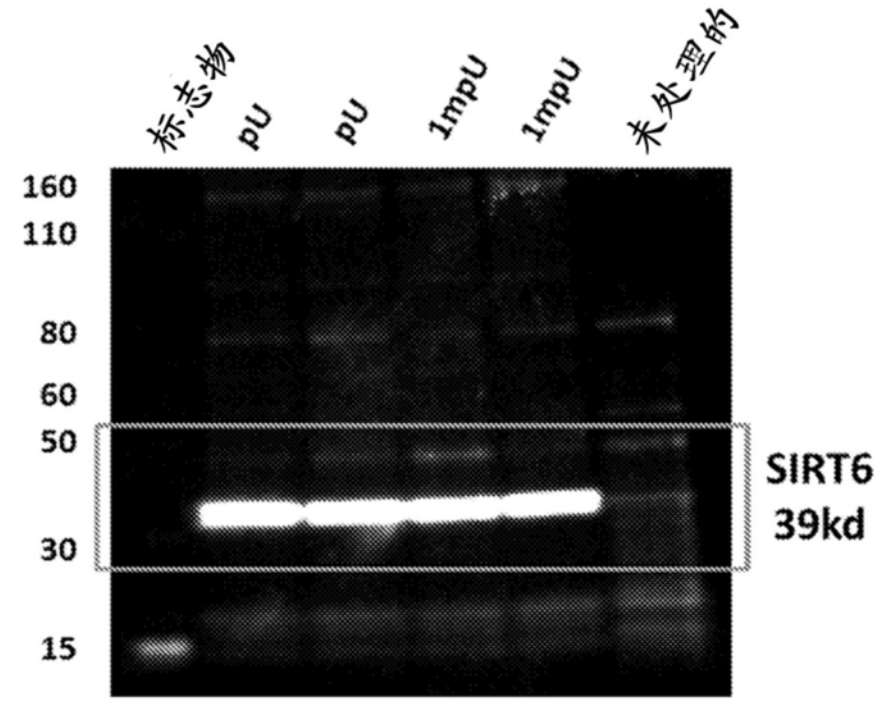

标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
160
110
80
60
50
30
15
SIRT6
39kd

图14

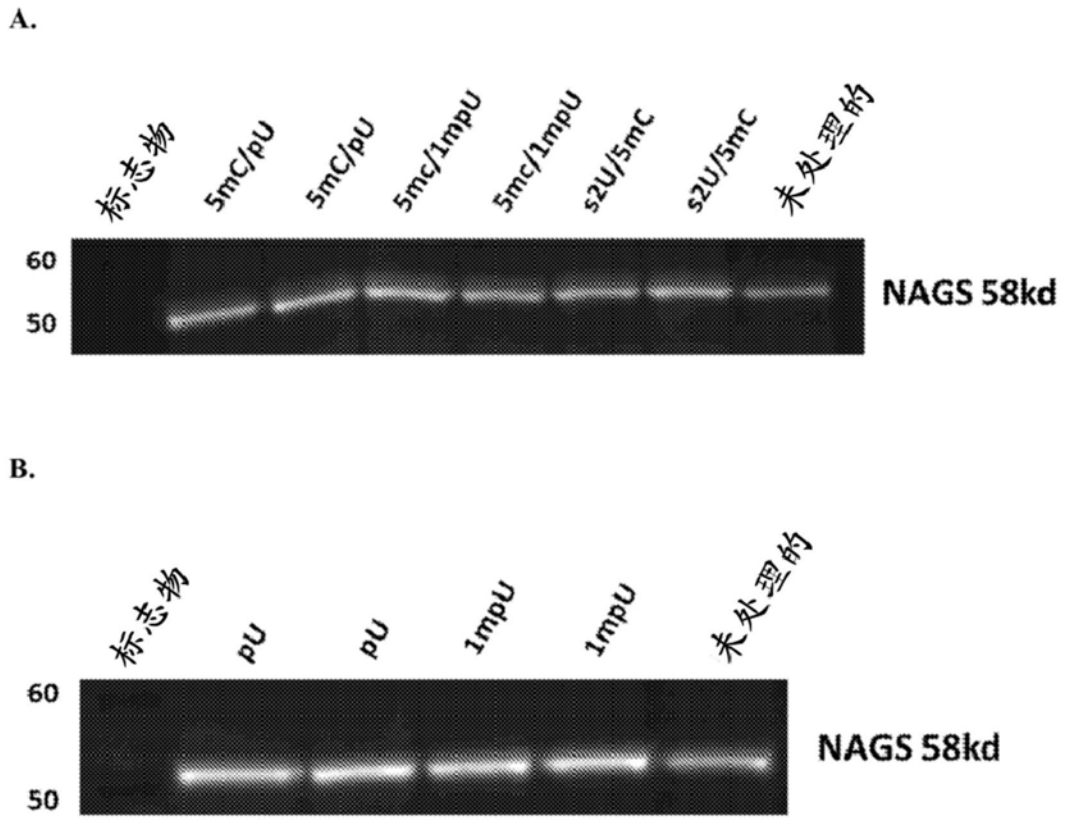

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
50
NAGS 58kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
50
NAGS 58kd

图15

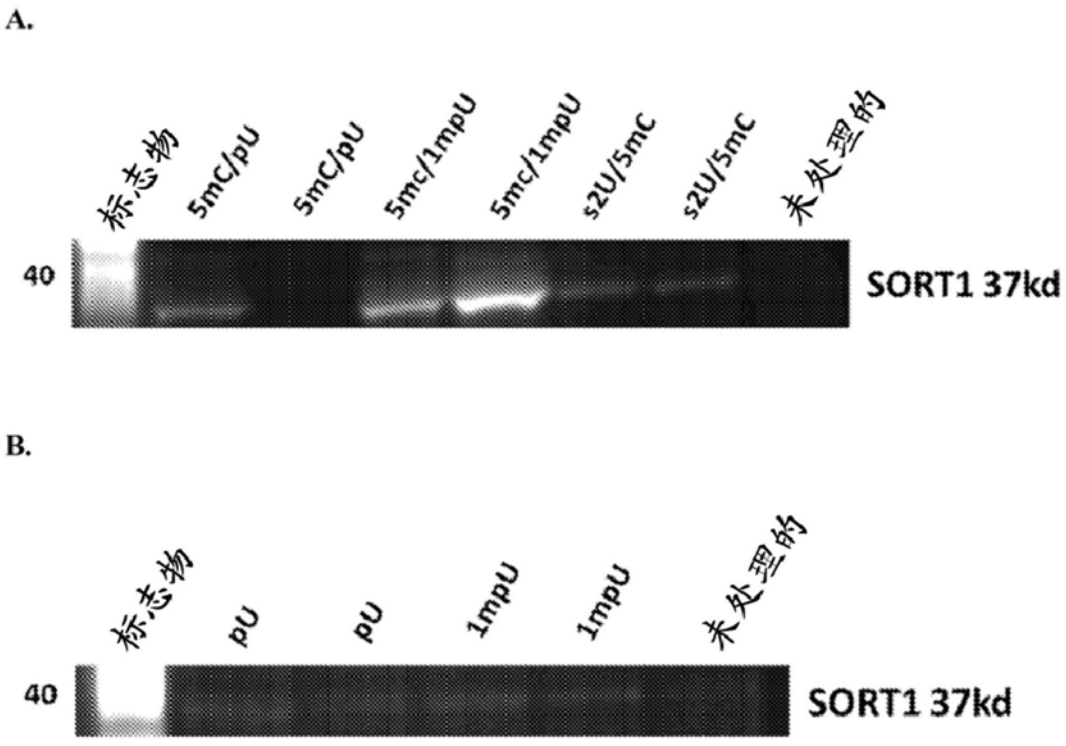

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
40
SORT1 37kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
40
SORT1 37kd

图16

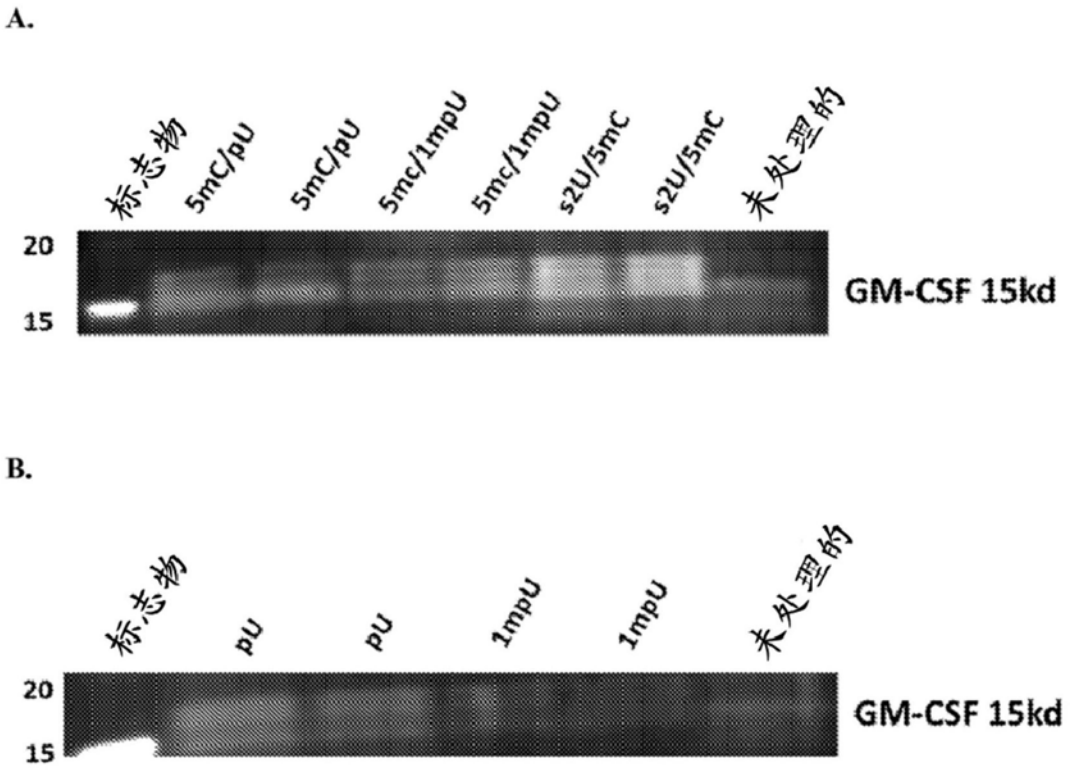

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
20
15
GM-CSF 15kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
20
15
GM-CSF 15kd

图17

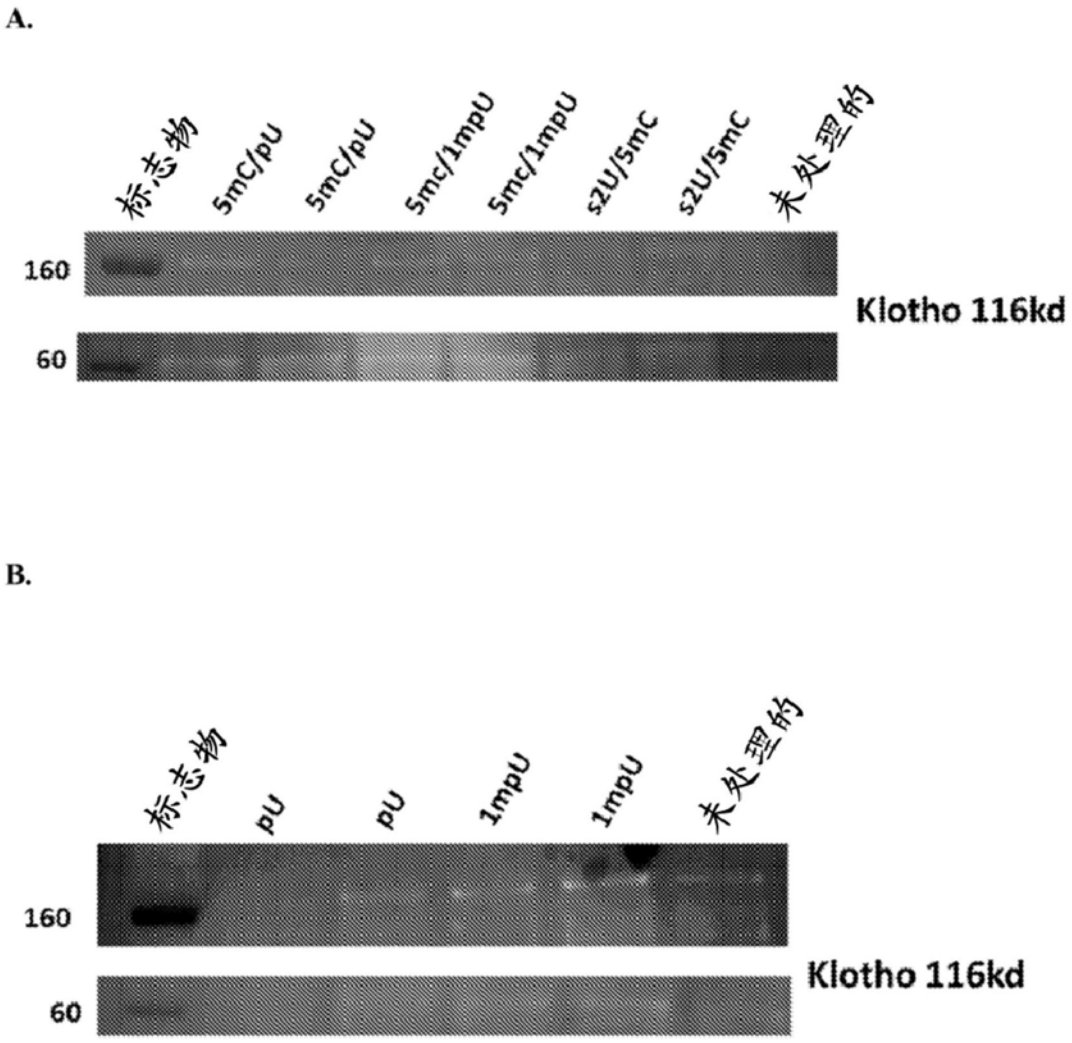

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
160
60
Klotho 116kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
160
60
Klotho 116kd

图18

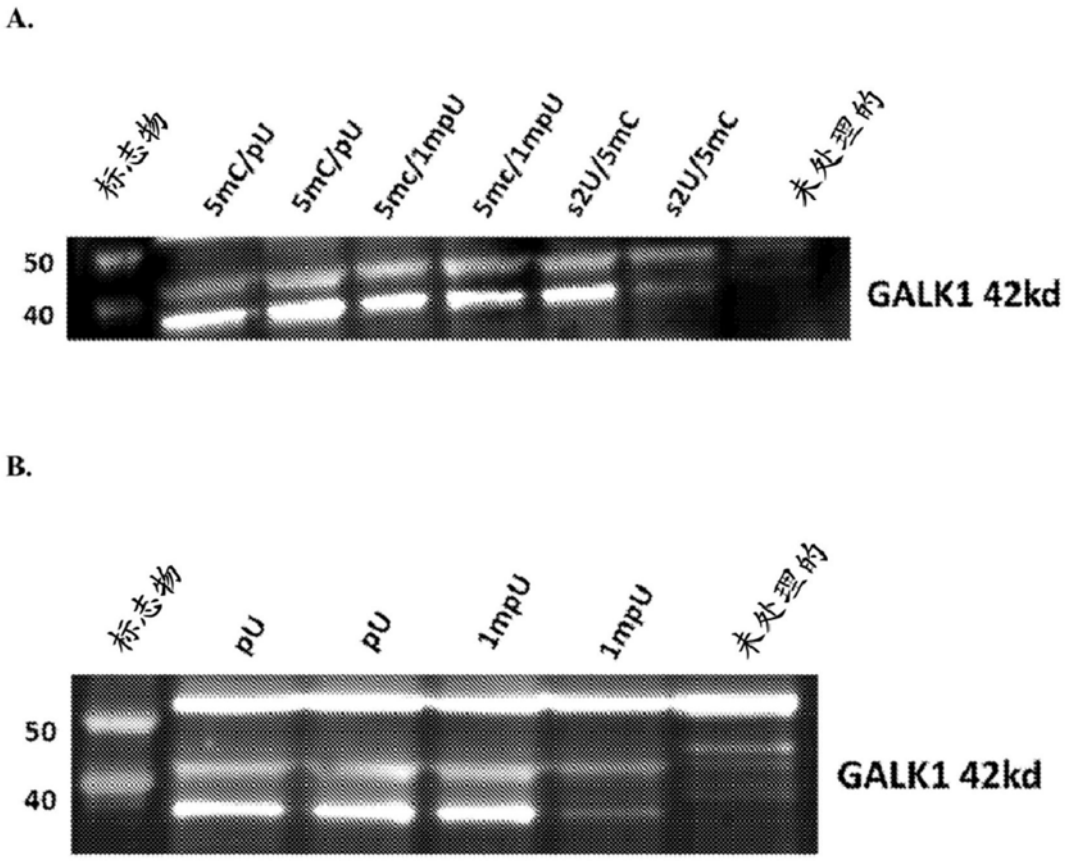

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
40
GALK1 42kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
50
40
GALK1 42kd

图19

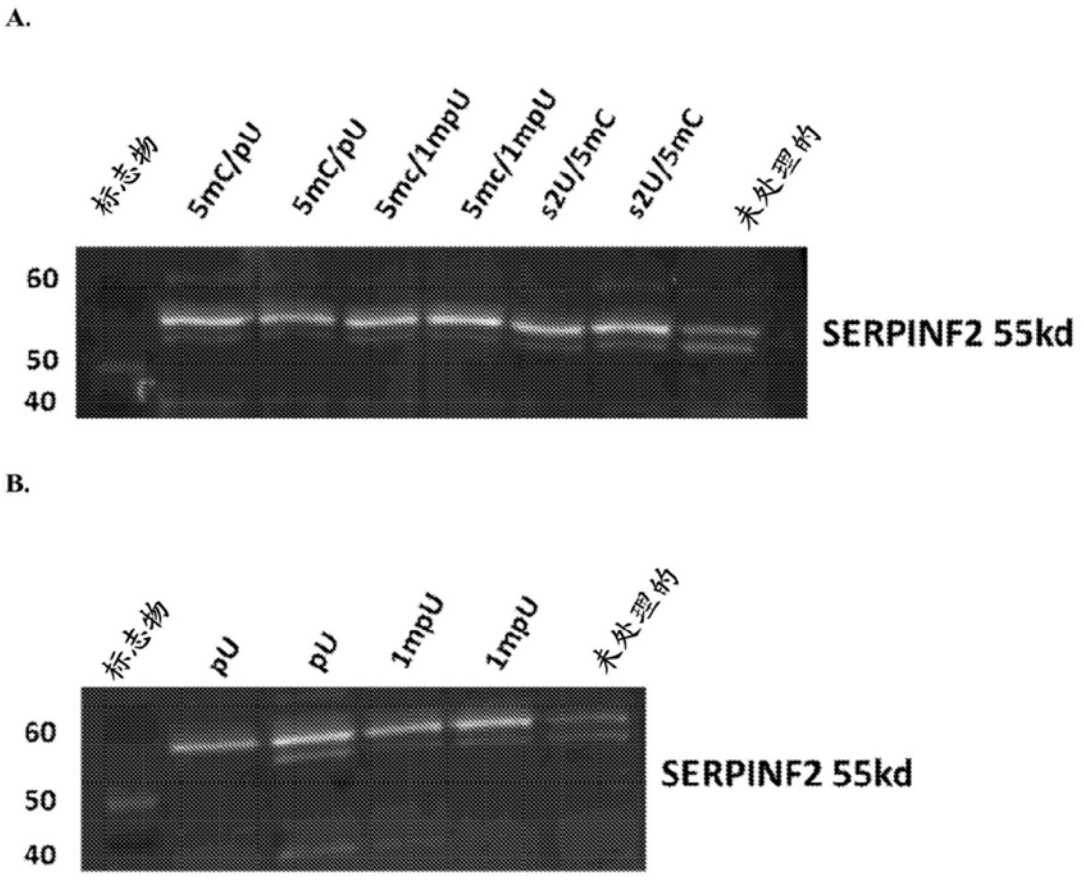

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
50
40
SERPINF2 55kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
50
40
SERPINF2 55kd

图20

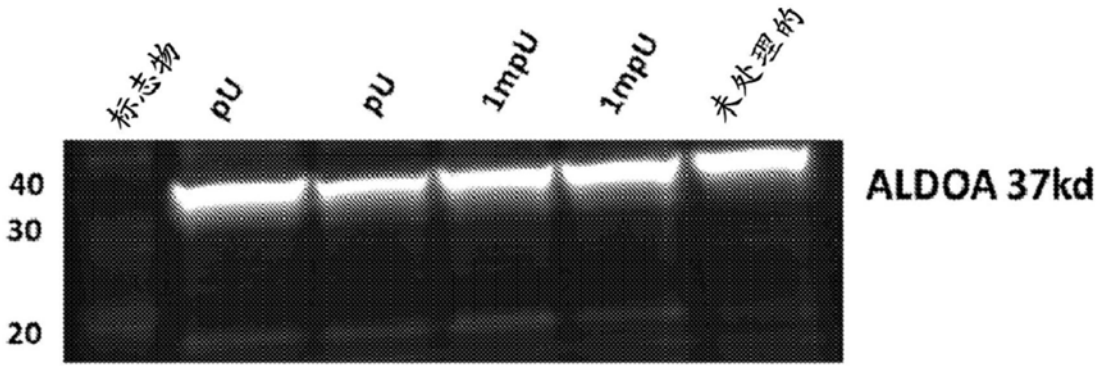

标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
40
30
20
ALDOA 37kd

图21

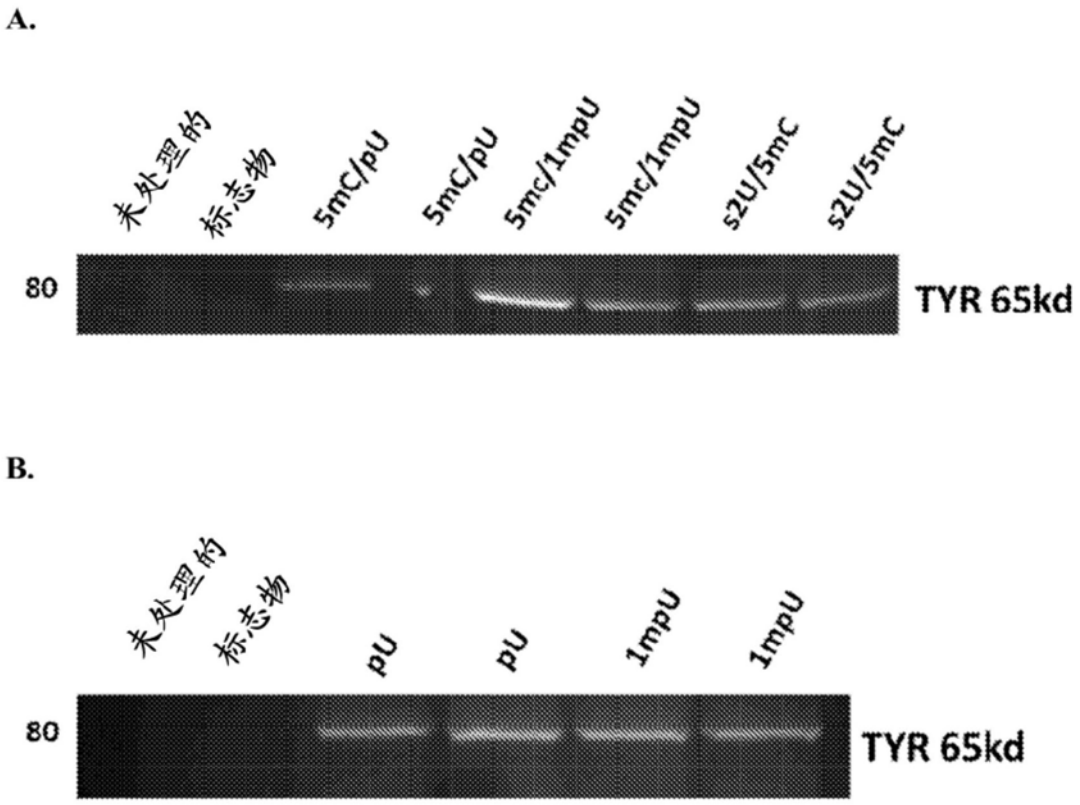

A.
未处理的
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
80
TYR 65kd
B.
未处理的
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
80
TYR 65kd

图22

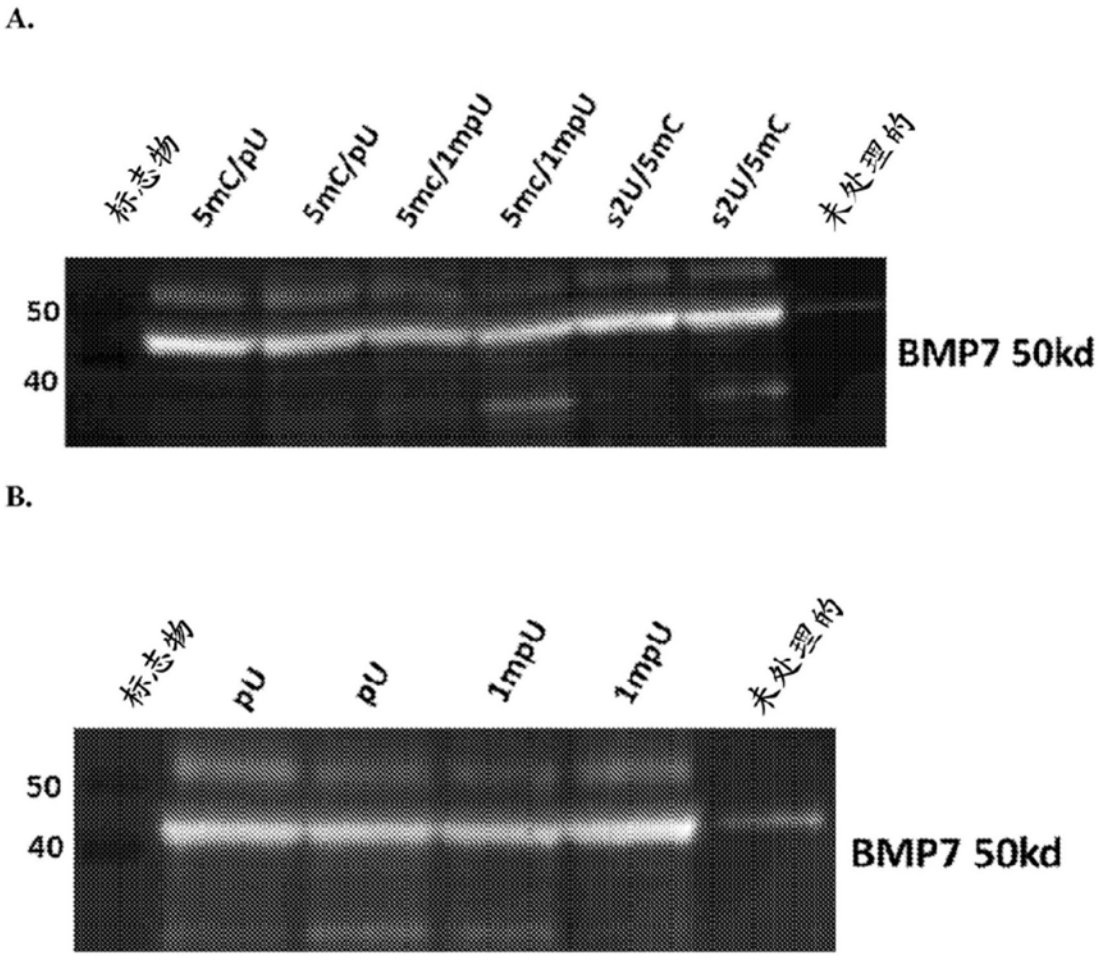
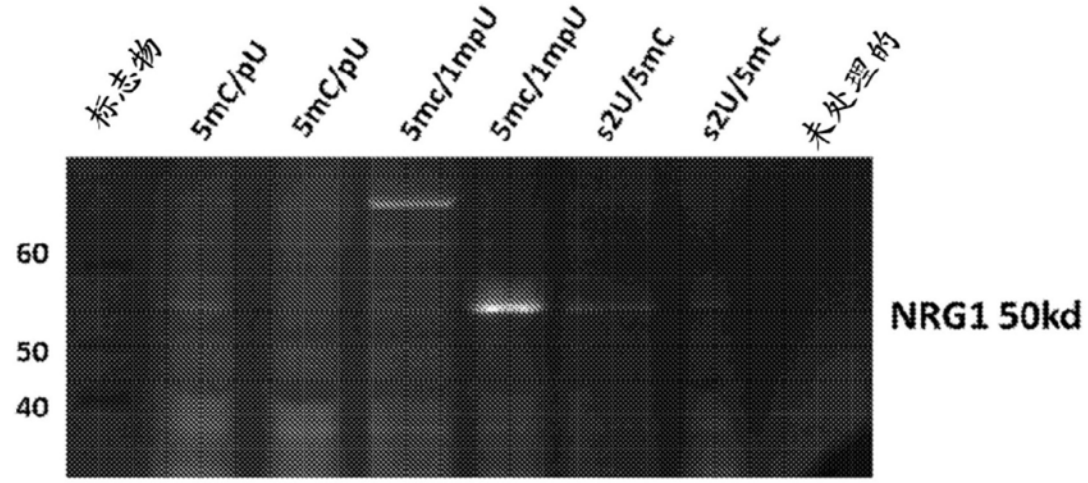

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
40
BMP7 50kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
50
40
BMP7 50kd

图23

A.


标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
50
40
NRG1 50kd

B.

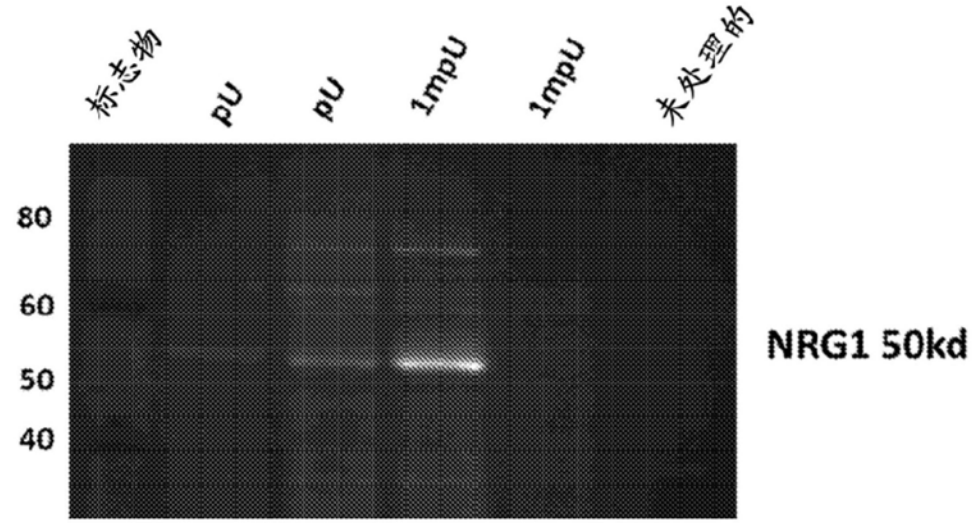

标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
80
60
50
40
NRG1 50kd

图24

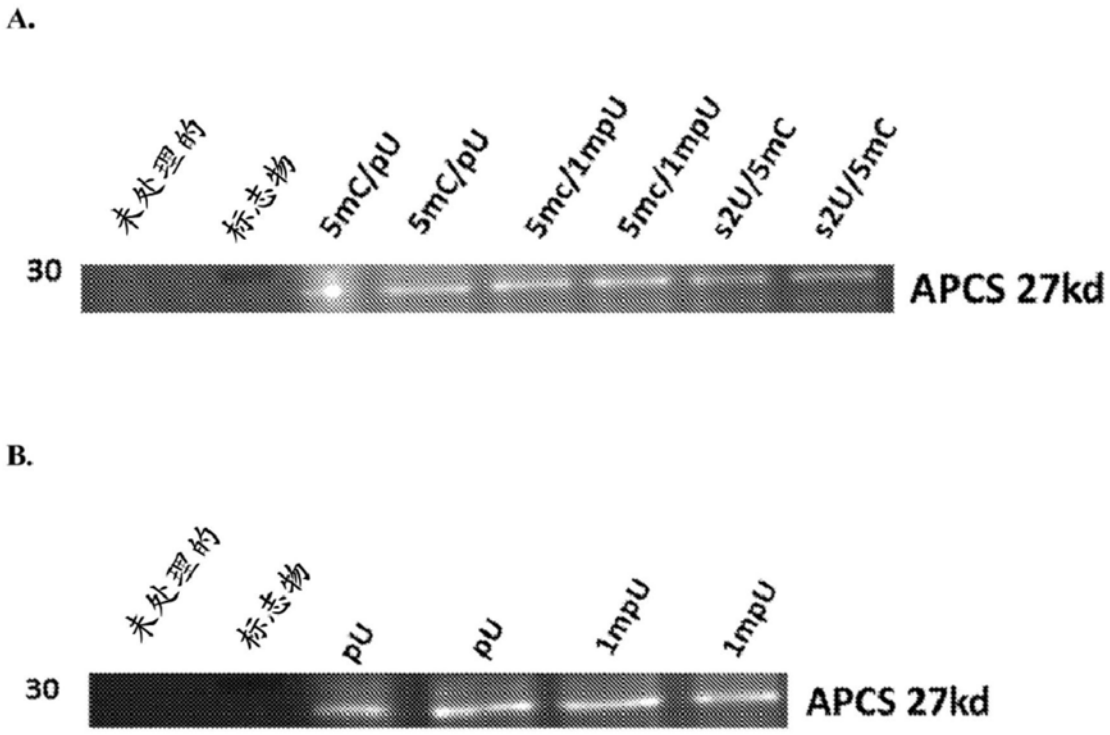

A.
未处理的
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
30
APCS 27kd
B.
未处理的
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
30
APCS 27kd

图25

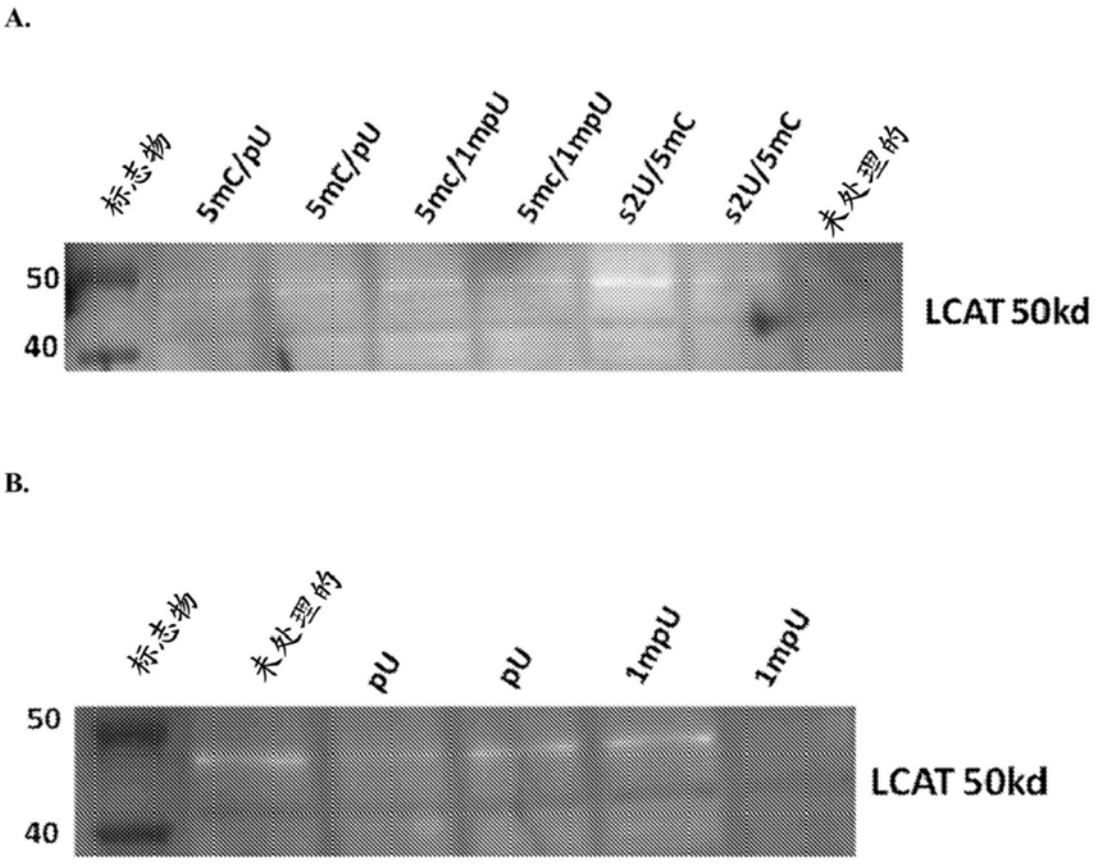

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
40
LCAT 50kd
B.
标志物
未处理的
pU
pU
1mpU
1mpU
50
40
LCAT 50kd

图26

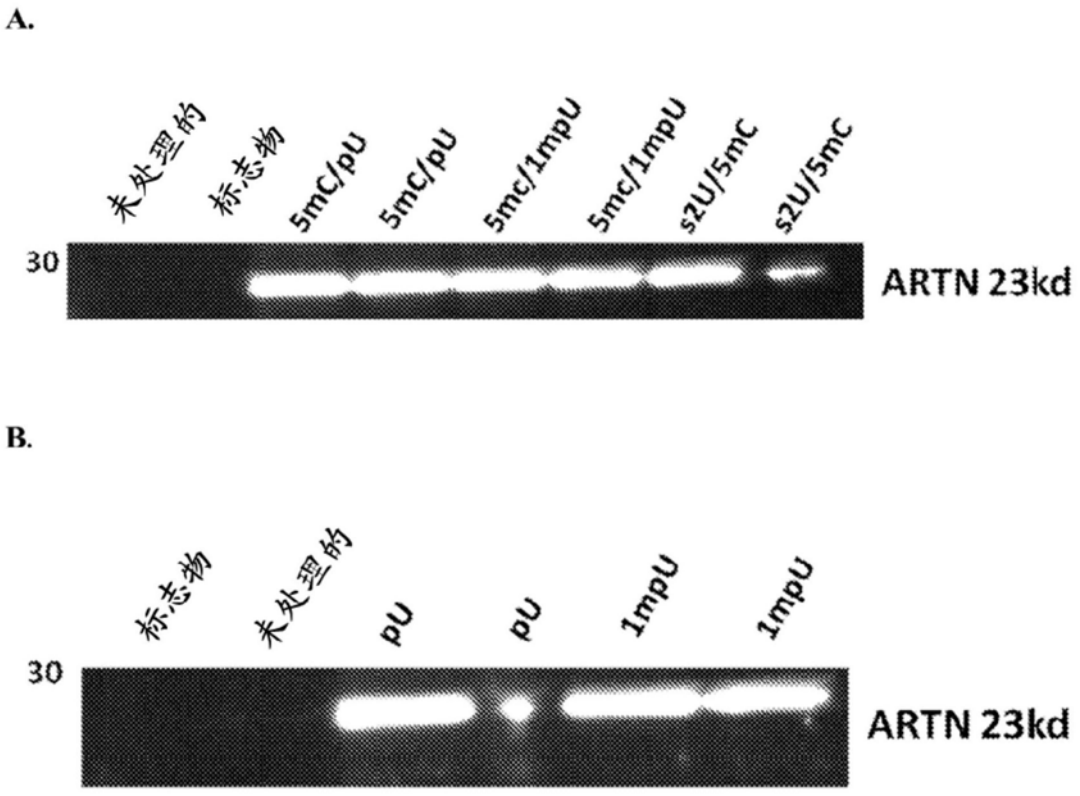

A.
未处理的
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
30
ARTN 23kd
B.
标志物
未处理的
pU
pU
1mpU
1mpU
30
ARTN 23kd

图27

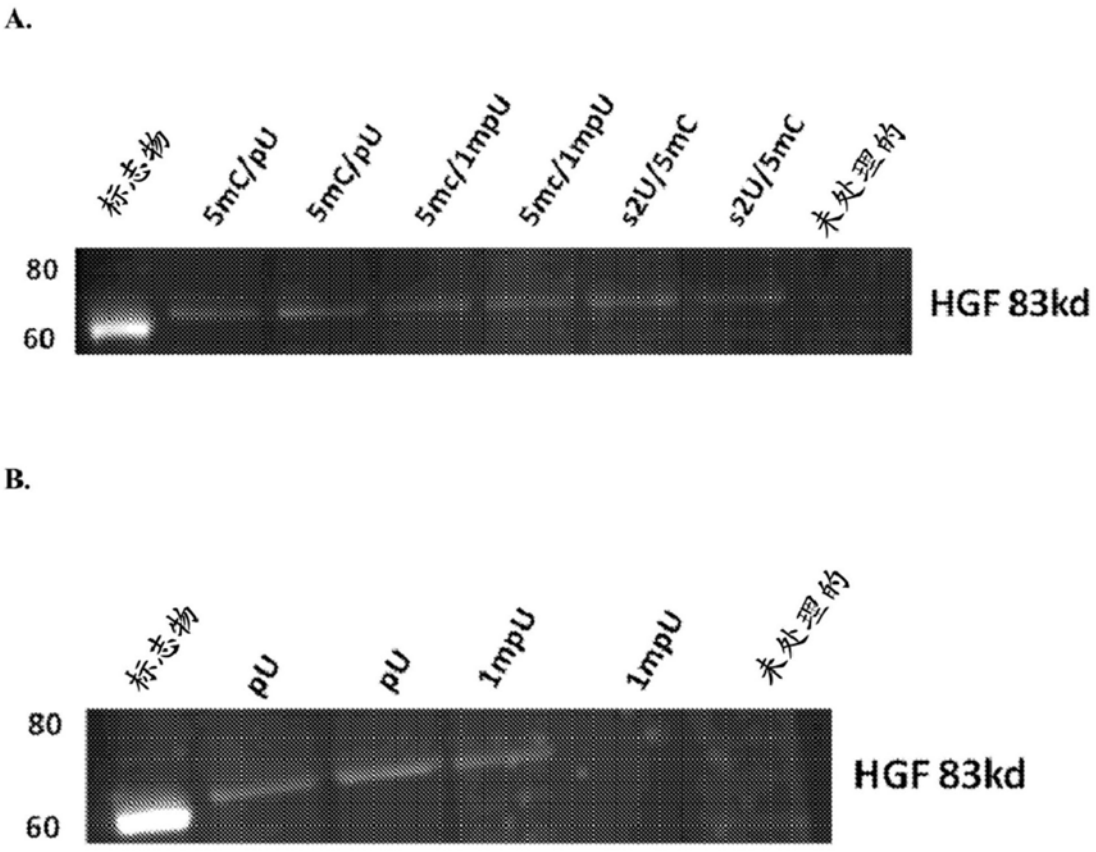
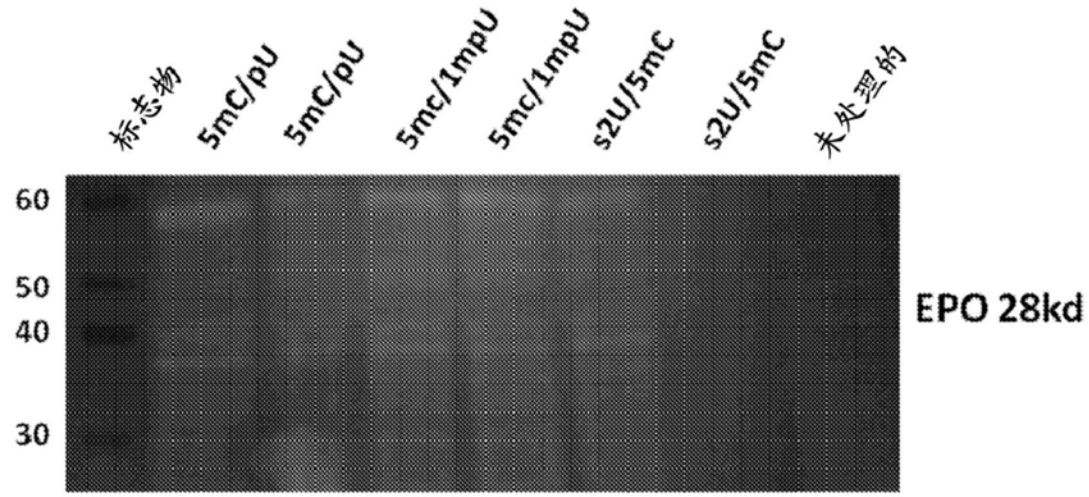

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
80
60
HGF 83kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
80
60
HGF 83kd

图28

A.


标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
50
40
30
EPO 28kd

B.

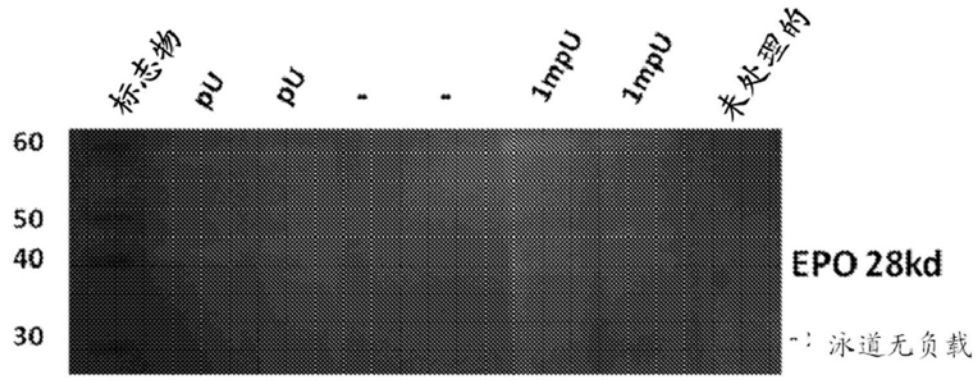

标志物
pU
pU
-
-
1mpU
1mpU
未处理的
60
50
40
30
EPO 28kd
-：泳道无负载

图29

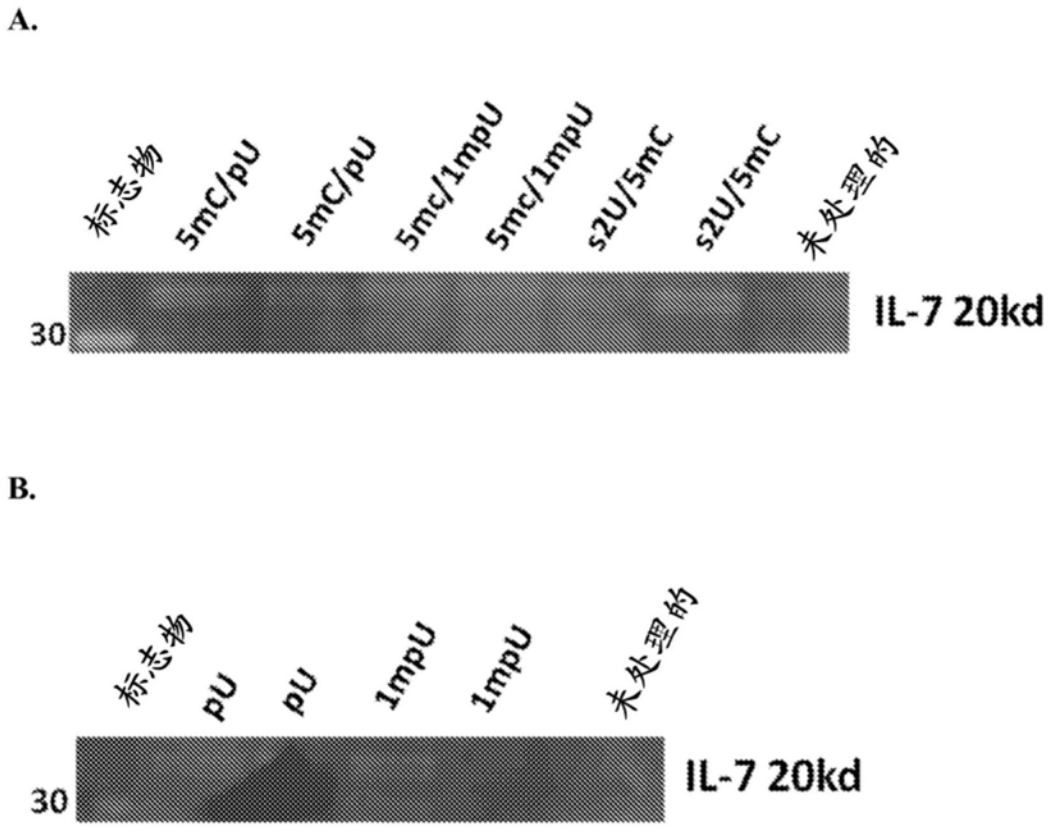

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
30
IL-7 20kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
30
IL-7 20kd

图30

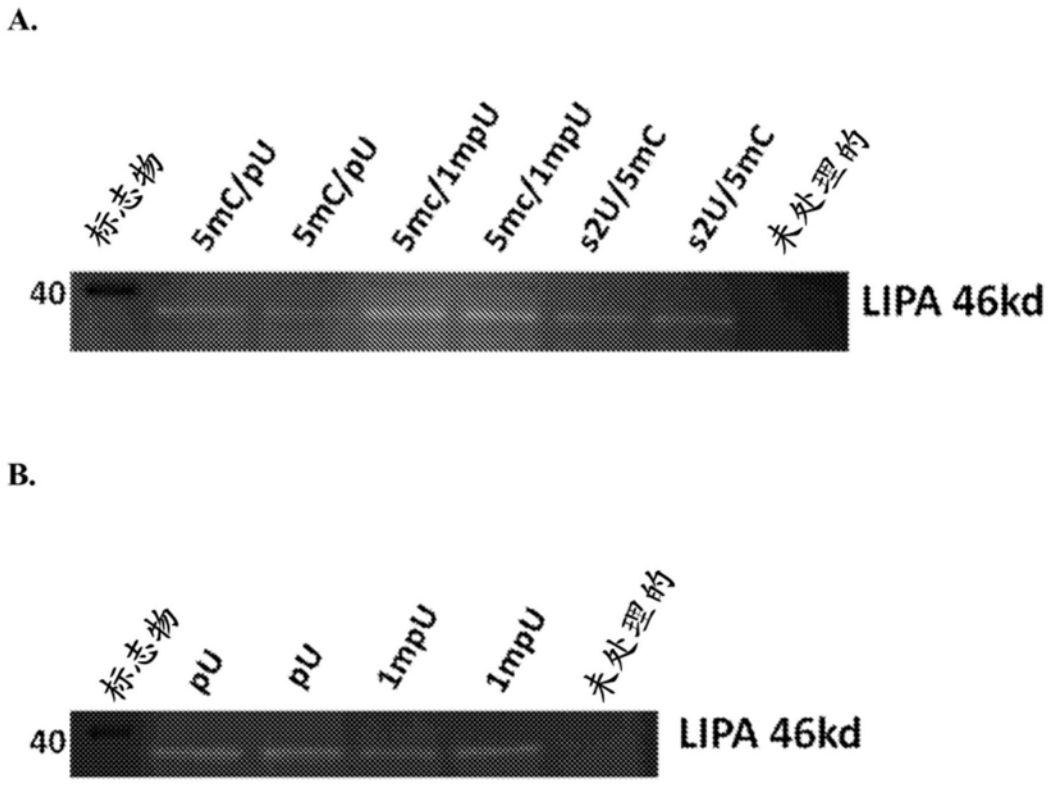

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
40
LIPA 46kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
40
LIPA 46kd

图31

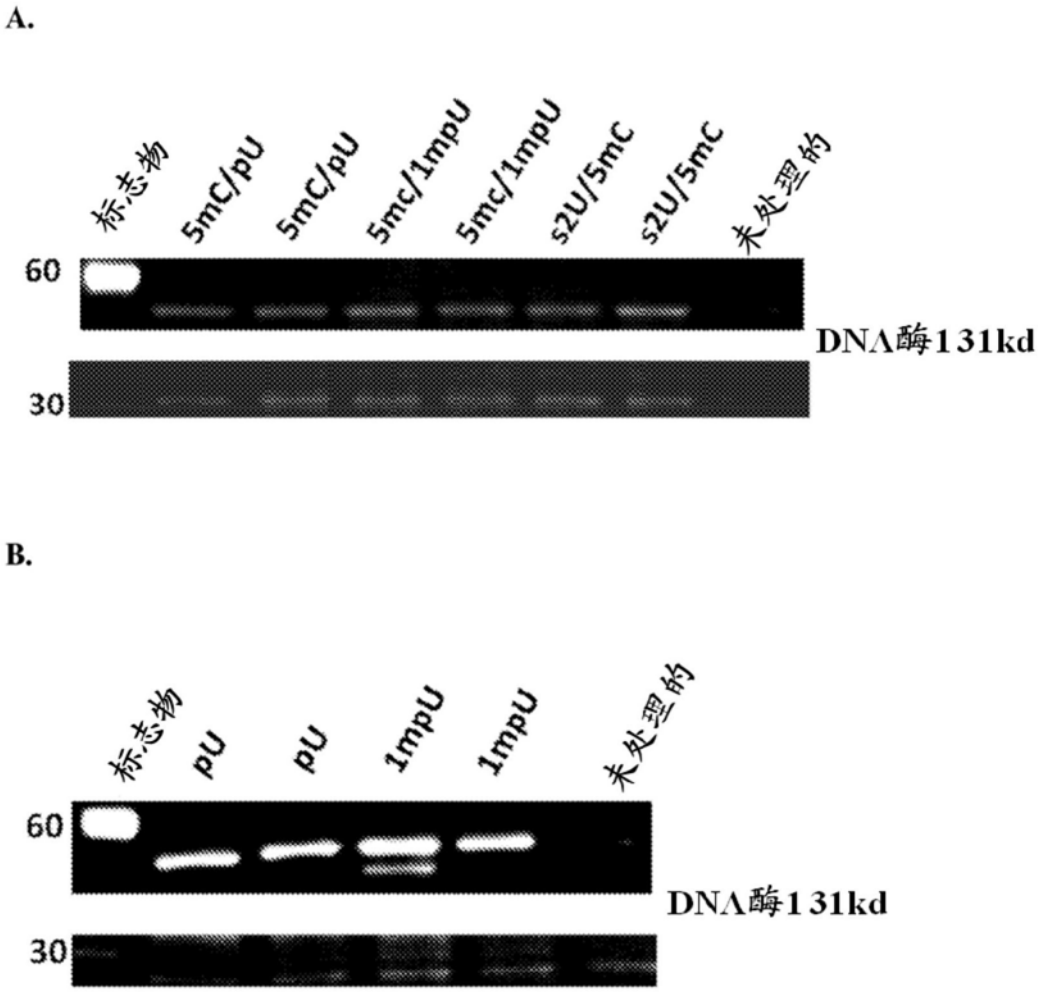

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
30
DNA酶131kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
30
DNA酶131kd

图32

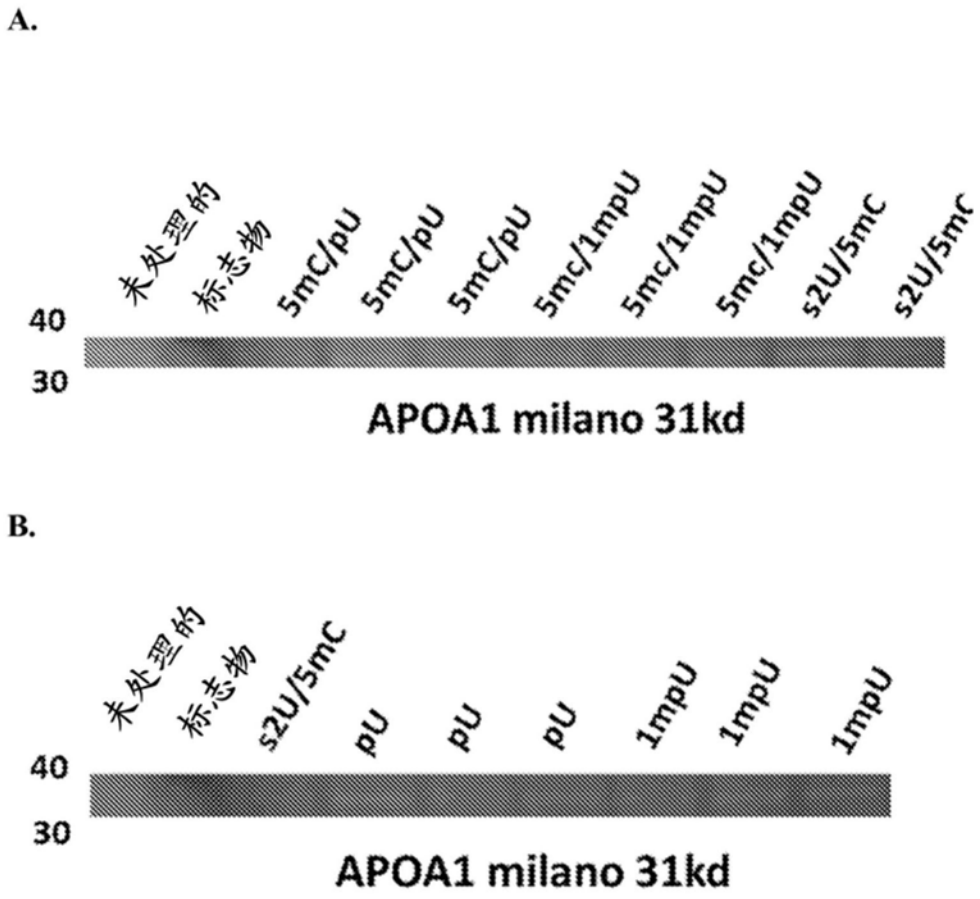

A.
未处理的
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
40
30
APOA1 milano 31kd
B.
未处理的
标志物
s2U/5mC
pU
pU
pU
1mpU
1mpU
1mpU
40
30
APOA1 milano 31kd

图33

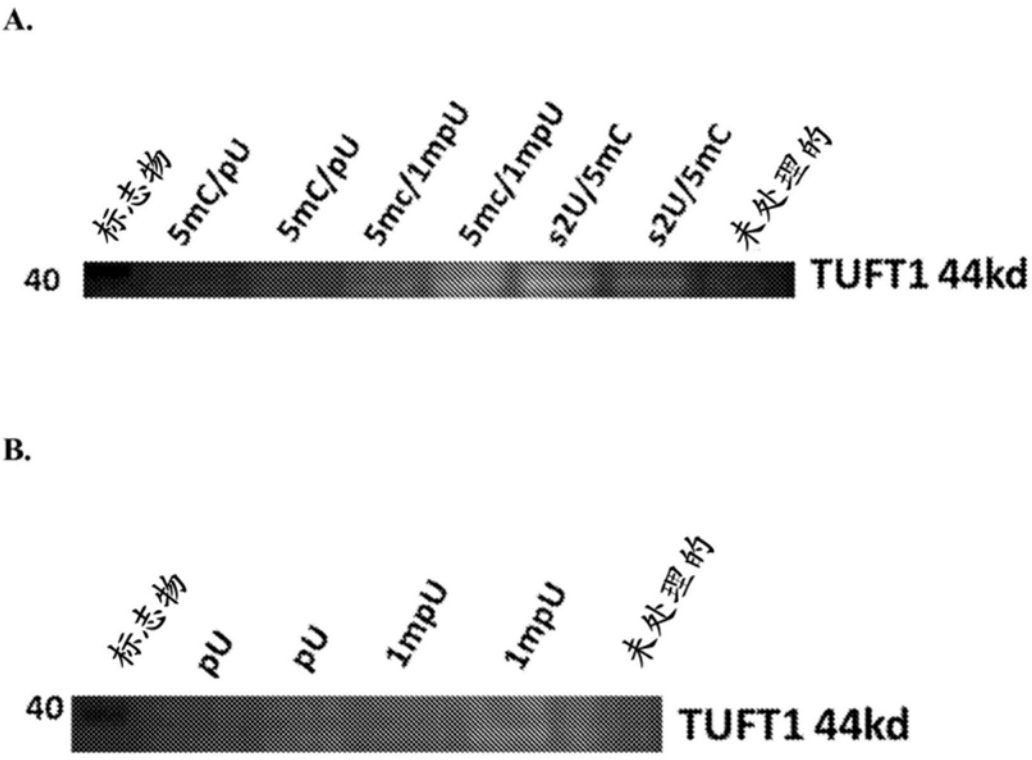

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
40
TUFT1 44kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
40
TUFT1 44kd

图34

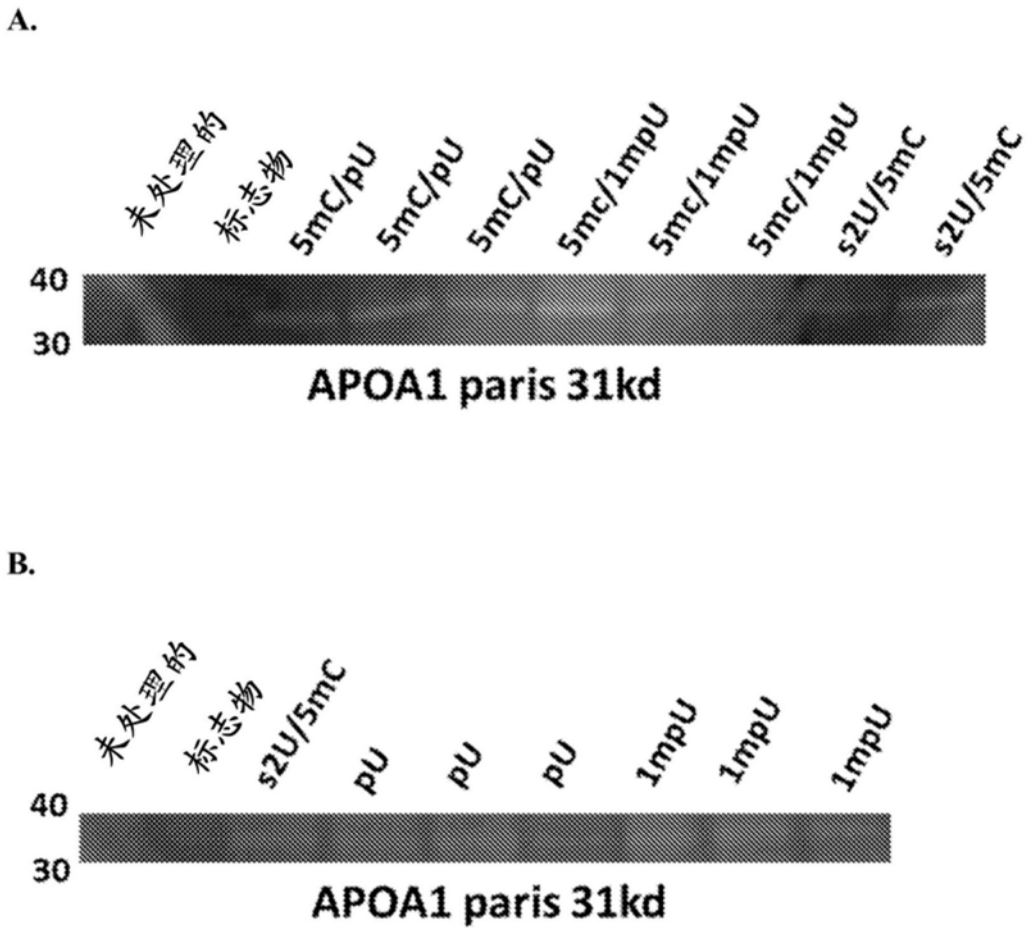

A.
未处理的
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
40
30
APOA1 paris 31kd
B.
未处理的
标志物
s2U/5mC
pU
pU
pU
1mpU
1mpU
1mpU
40
30
APOA1 paris 31kd

图35

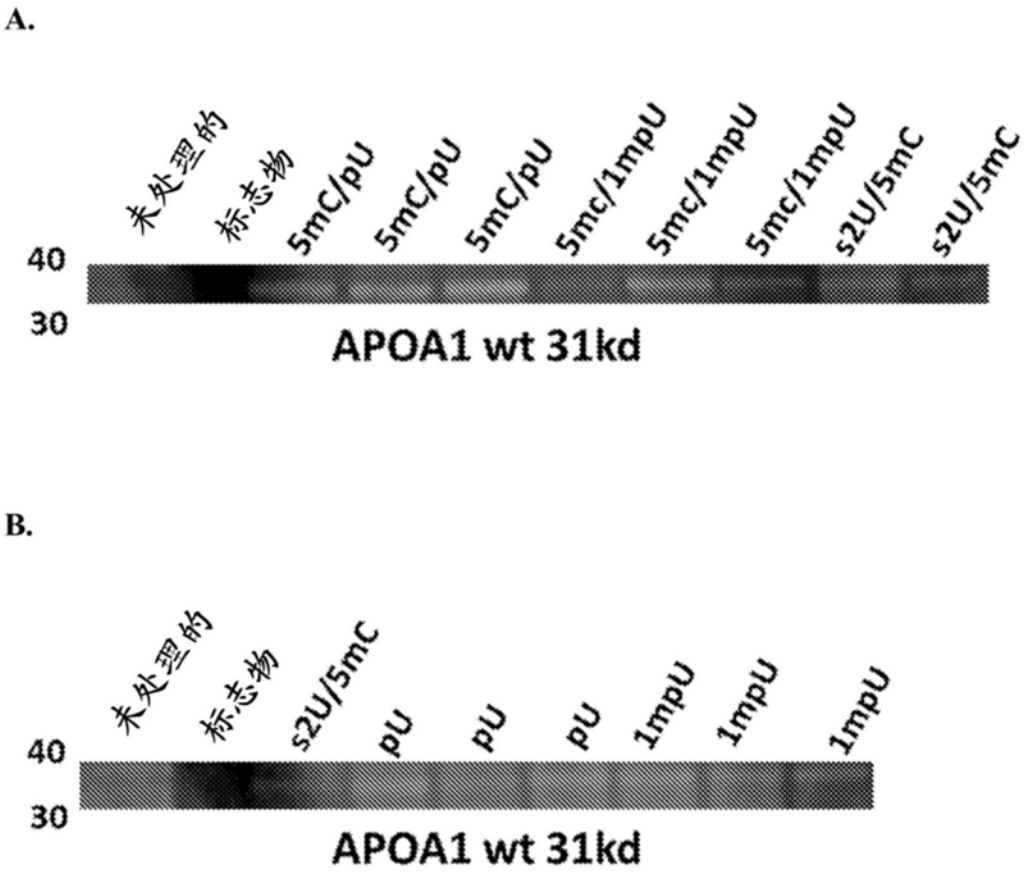

A.
未处理的
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
40
30
APOA1 wt 31kd
B.
未处理的
标志物
s2U/5mC
pU
pU
pU
1mpU
1mpU
1mpU
40
30
APOA1 wt 31kd

图36

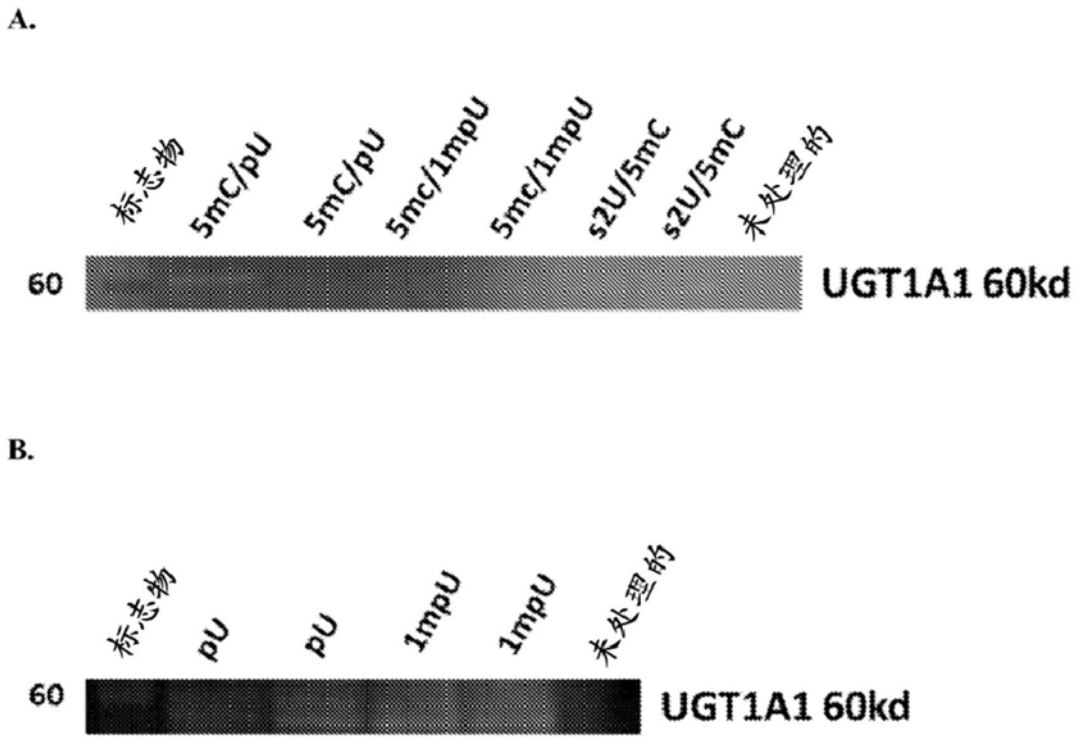

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
UGT1A1 60kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
60
UGT1A1 60kd

图37

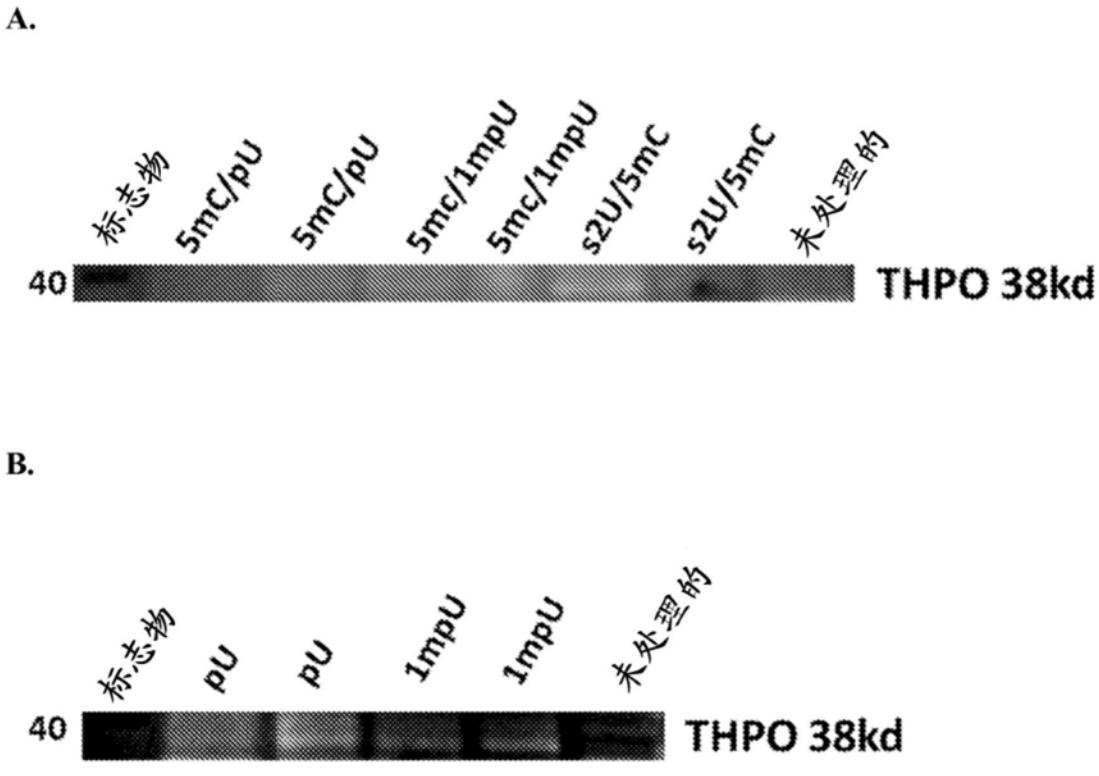

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
40
THPO 38kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
40
THPO 38kd

图38

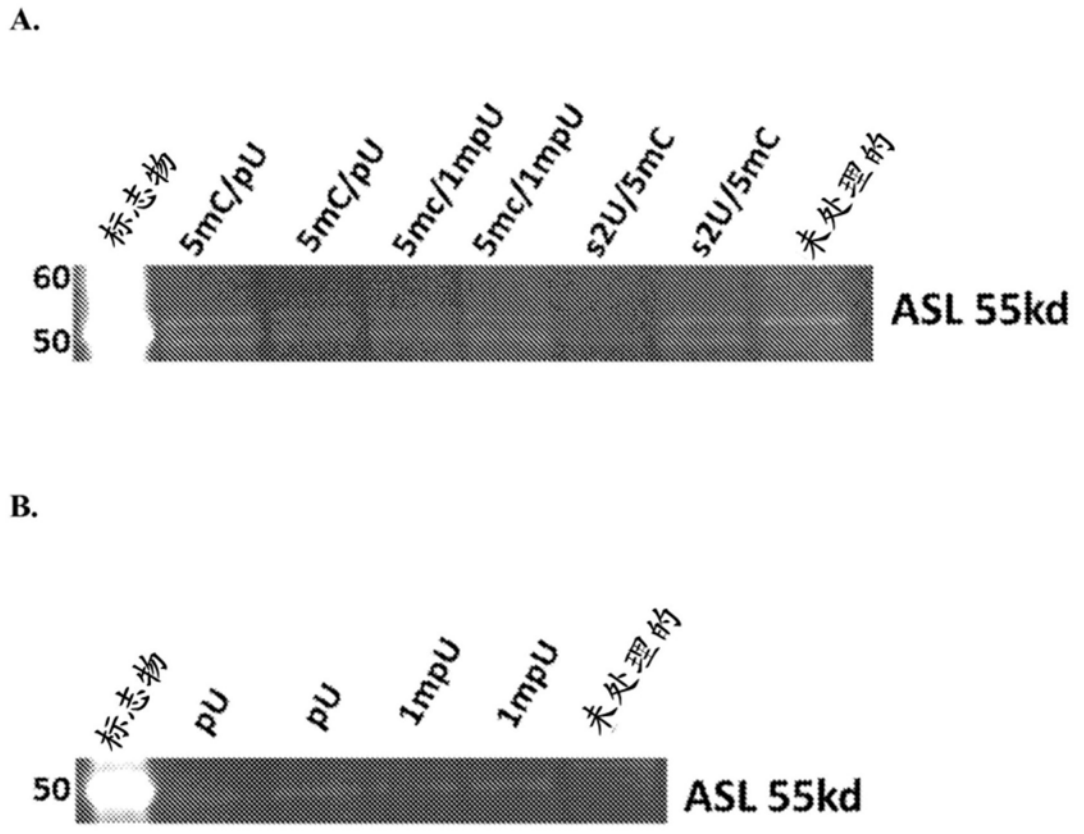

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
60
50
ASL 55kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
50
ASL 55kd

图39

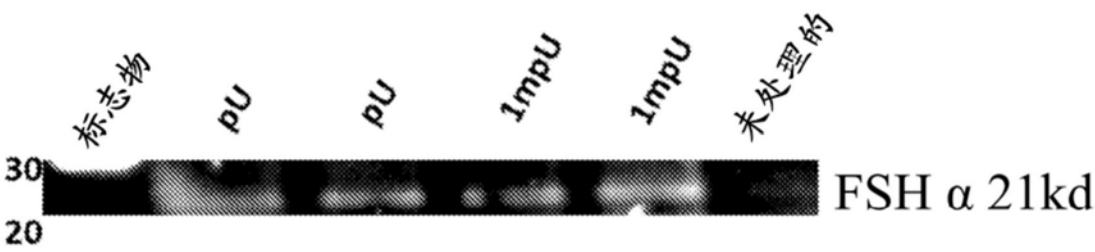

标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
30
20
FSH α 21kd

图40

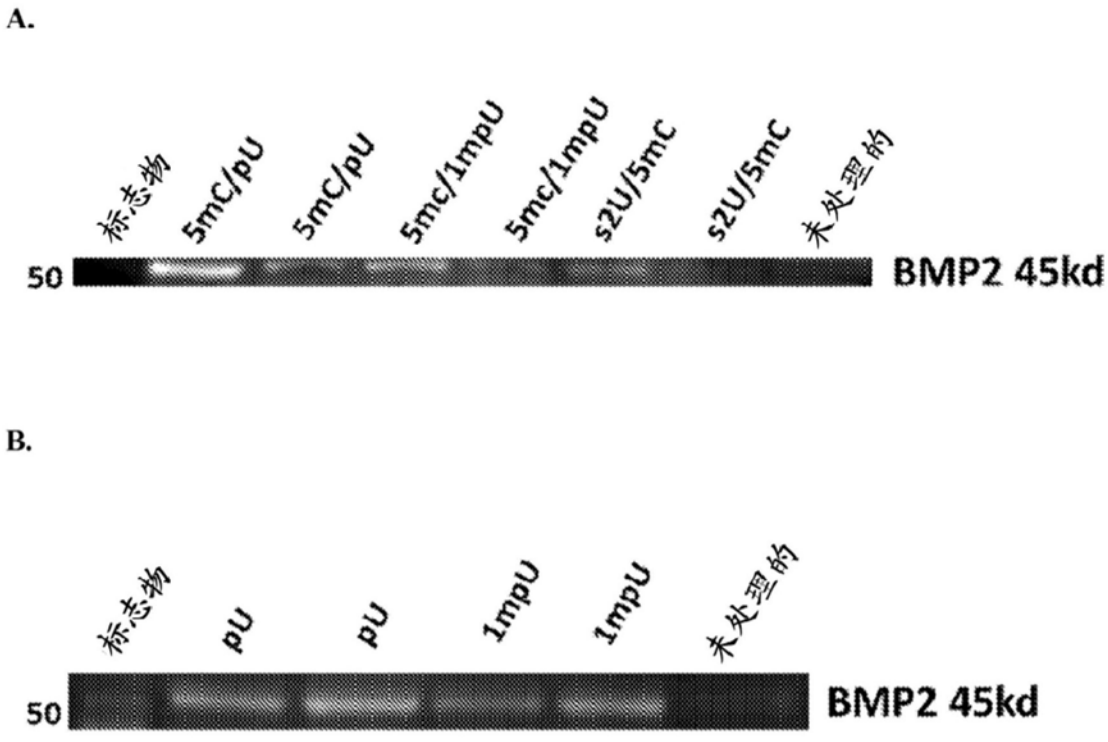

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
BMP2 45kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
50
BMP2 45kd

图41

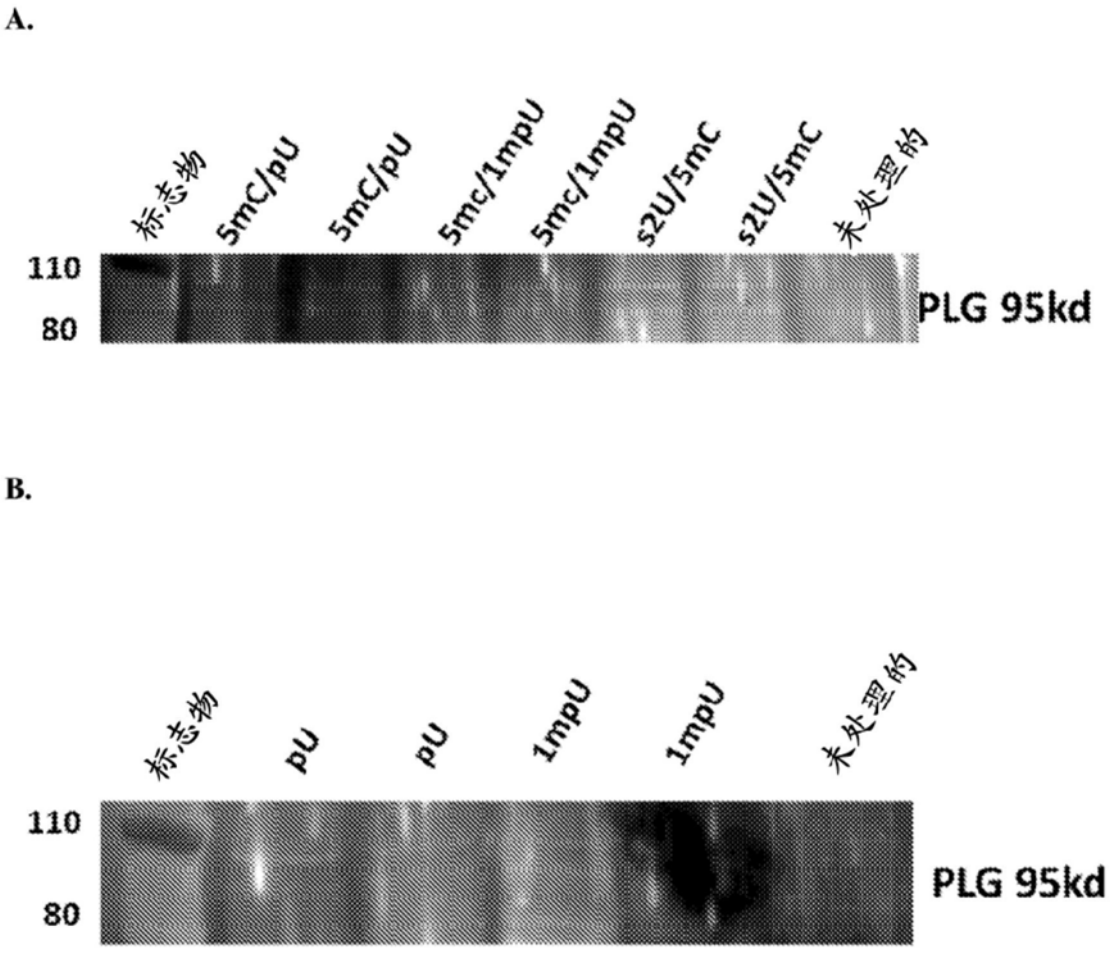

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
110
80
PLG 95kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
110
80
PLG 95kd

图42

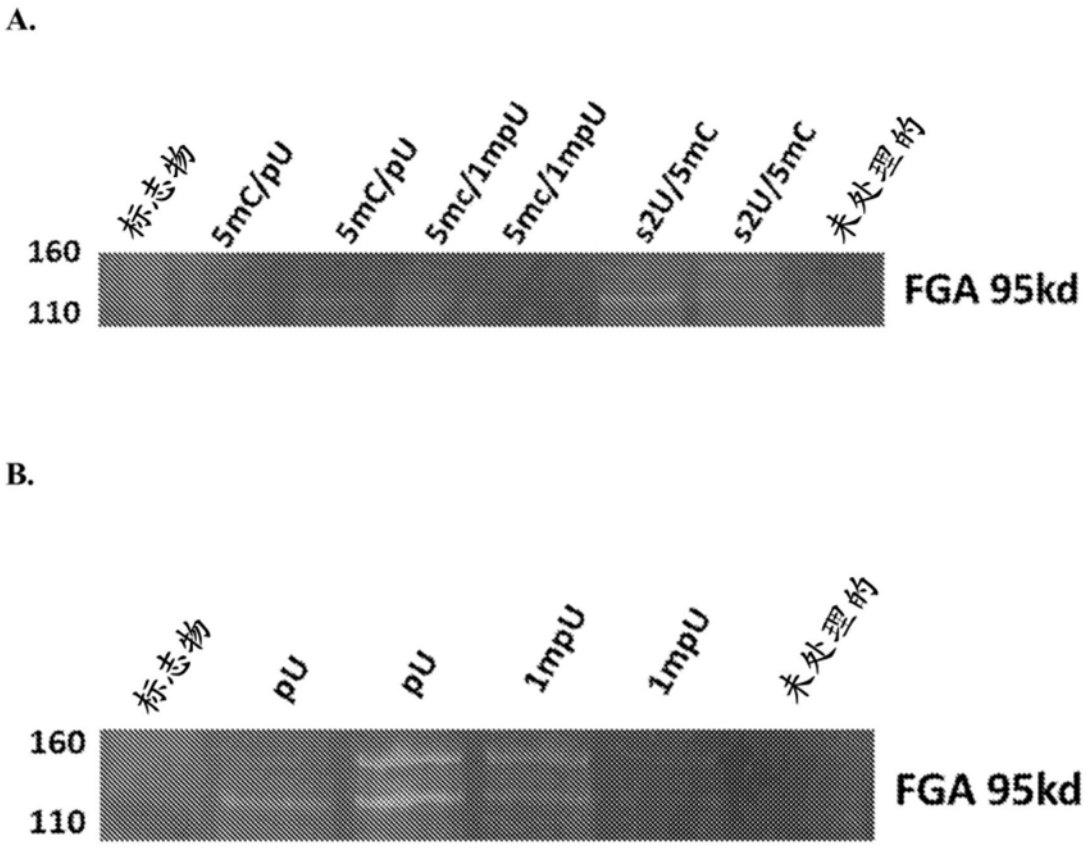

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
160
110
FGA 95kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
160
110
FGA 95kd

图43

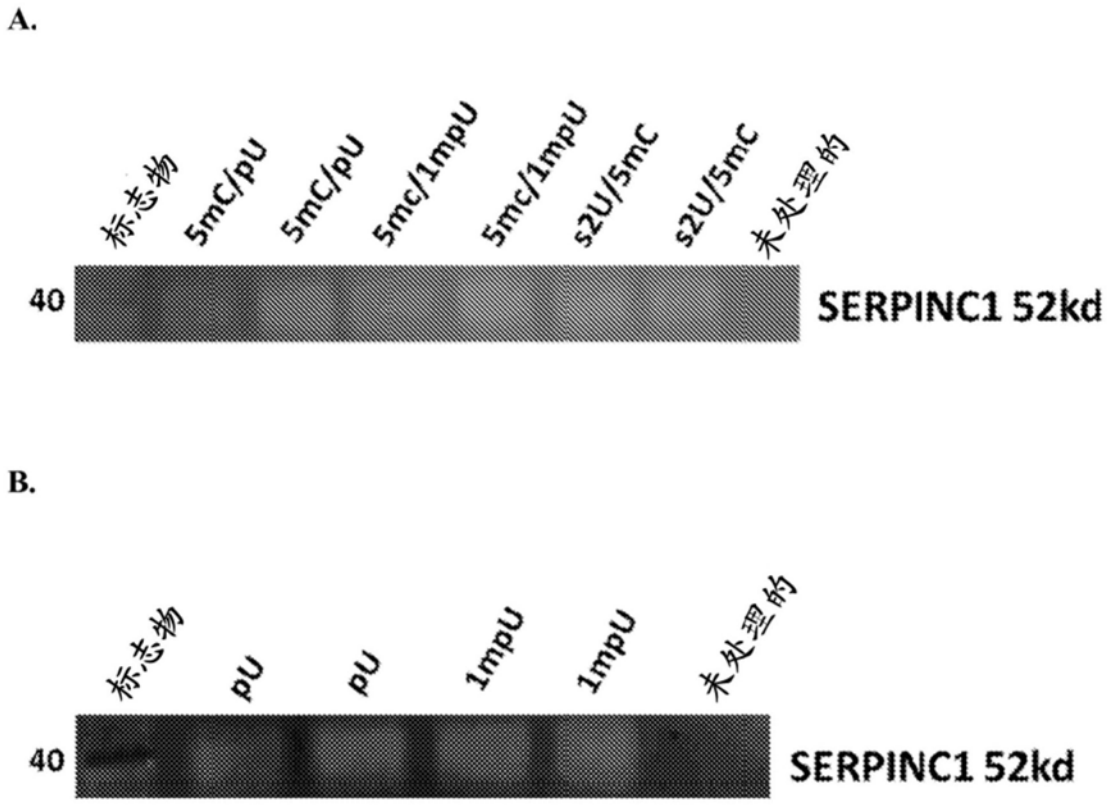

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mc/1mpU
5mc/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
40
SERPINC1 52kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
40
SERPINC1 52kd

图44

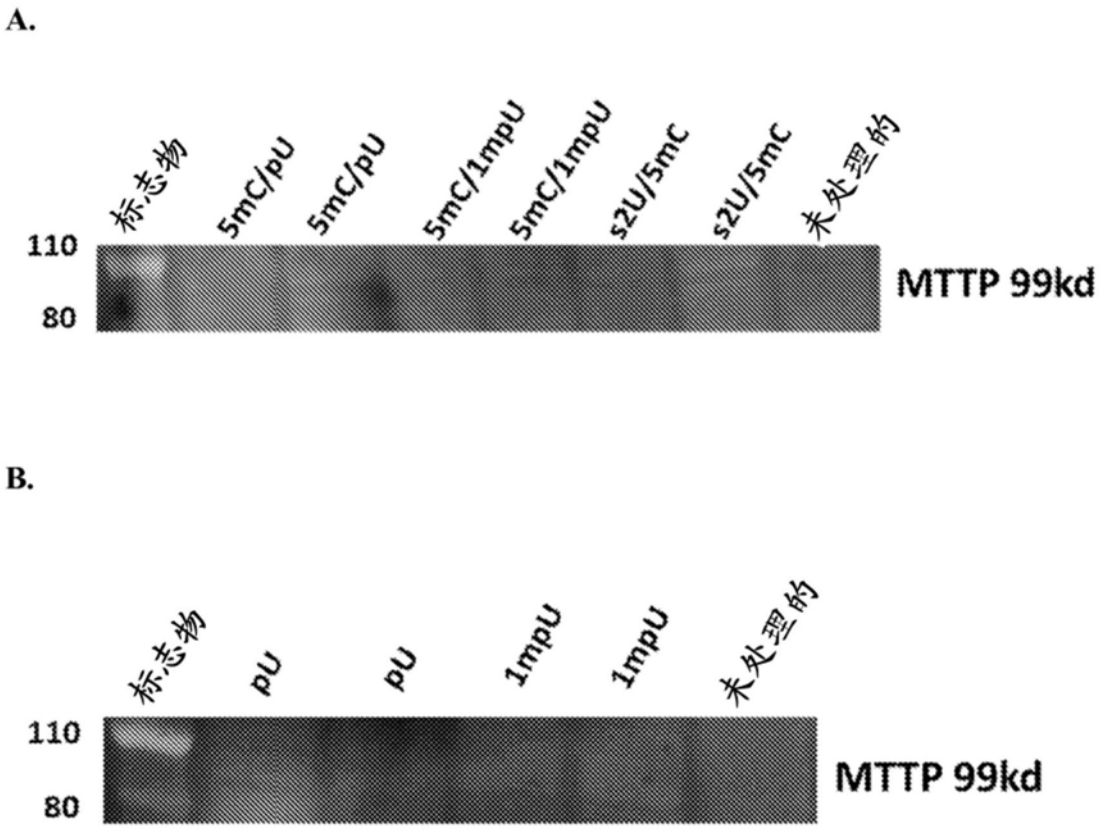

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
110
80
MTTP 99kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
110
80
MTTP 99kd

图45

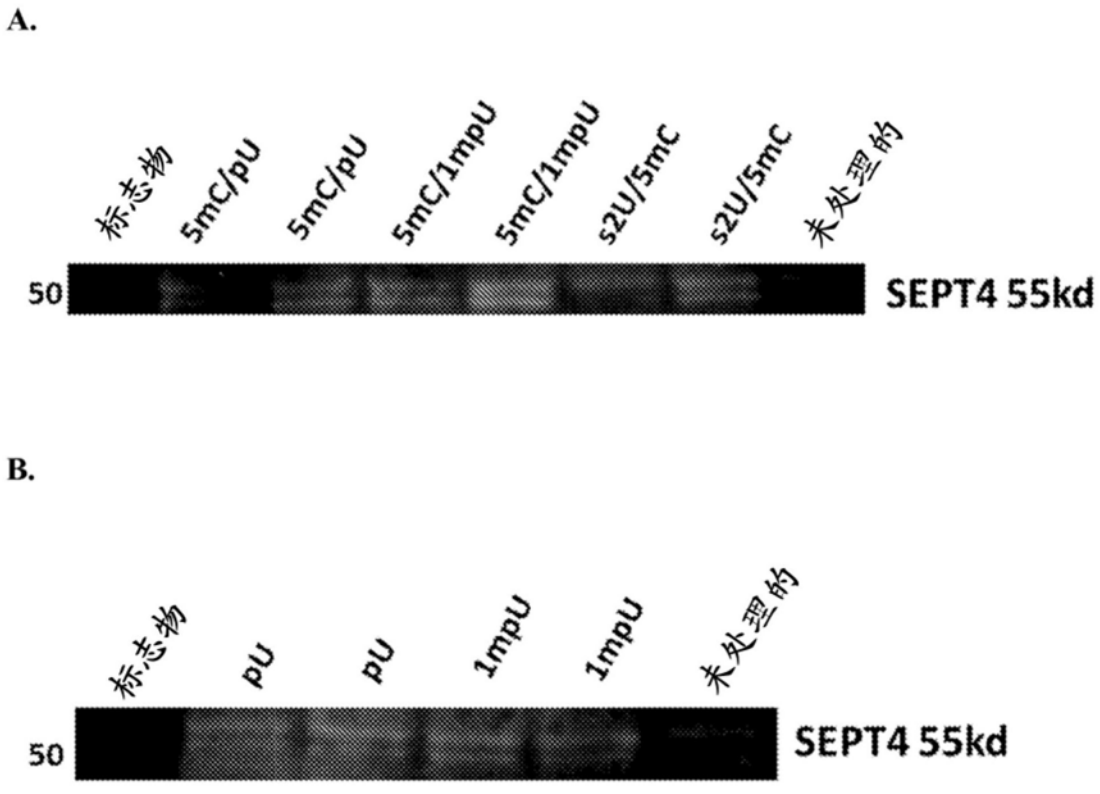

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
SEPT4 55kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
50
SEPT4 55kd

图46

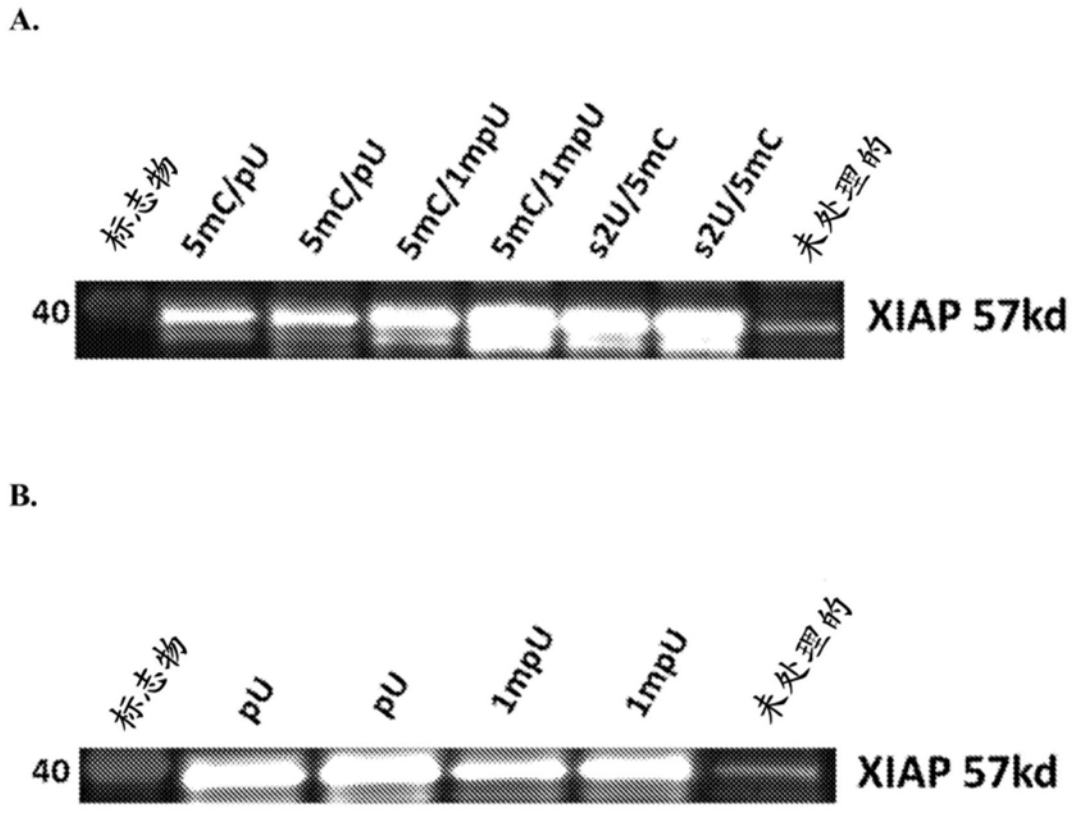

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
40
XIAP 57kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
40
XIAP 57kd

图47

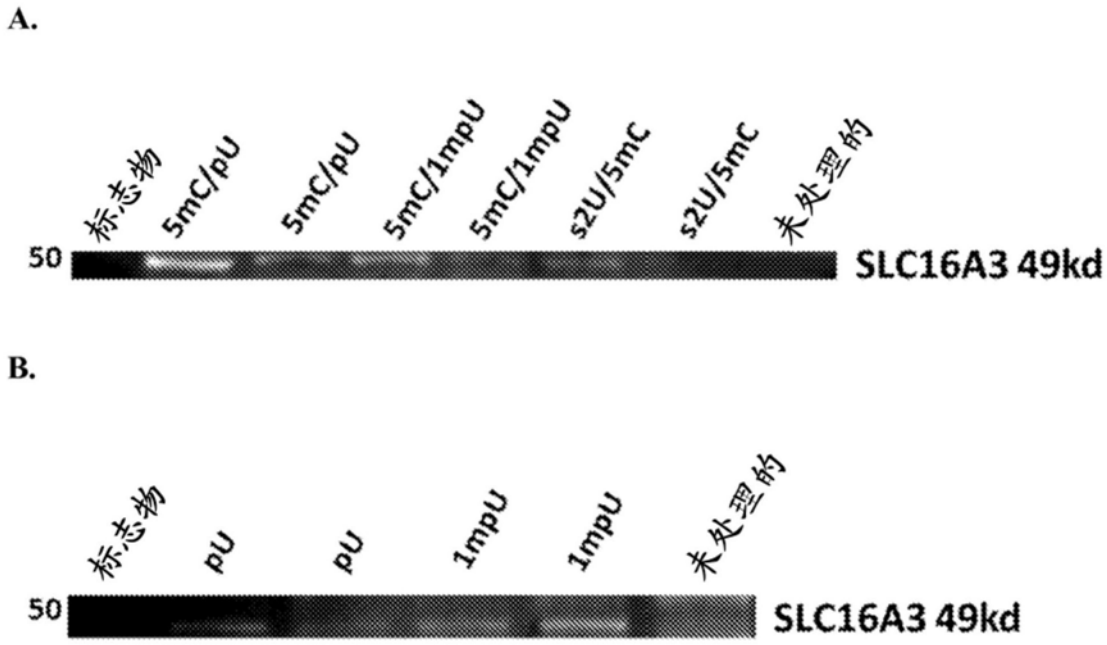

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
SLC16A3 49kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
50
SLC16A3 49kd

图48

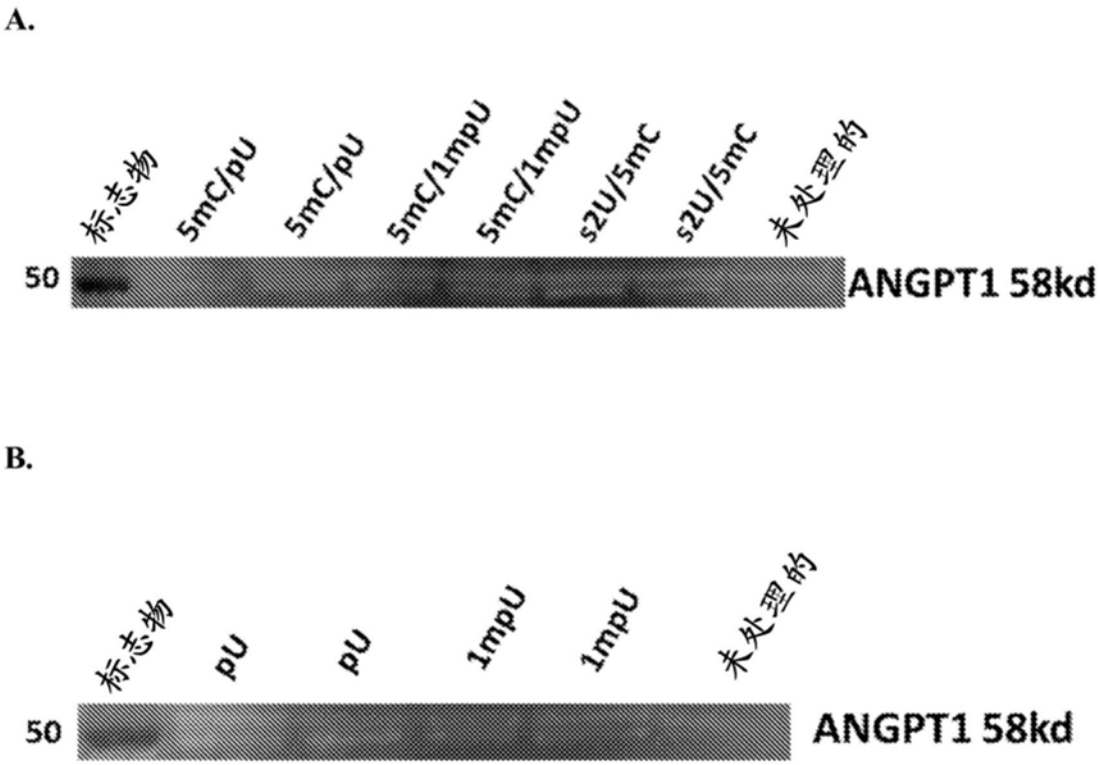

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
50
ANGPT1 58kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
50
ANGPT1 58kd

图49

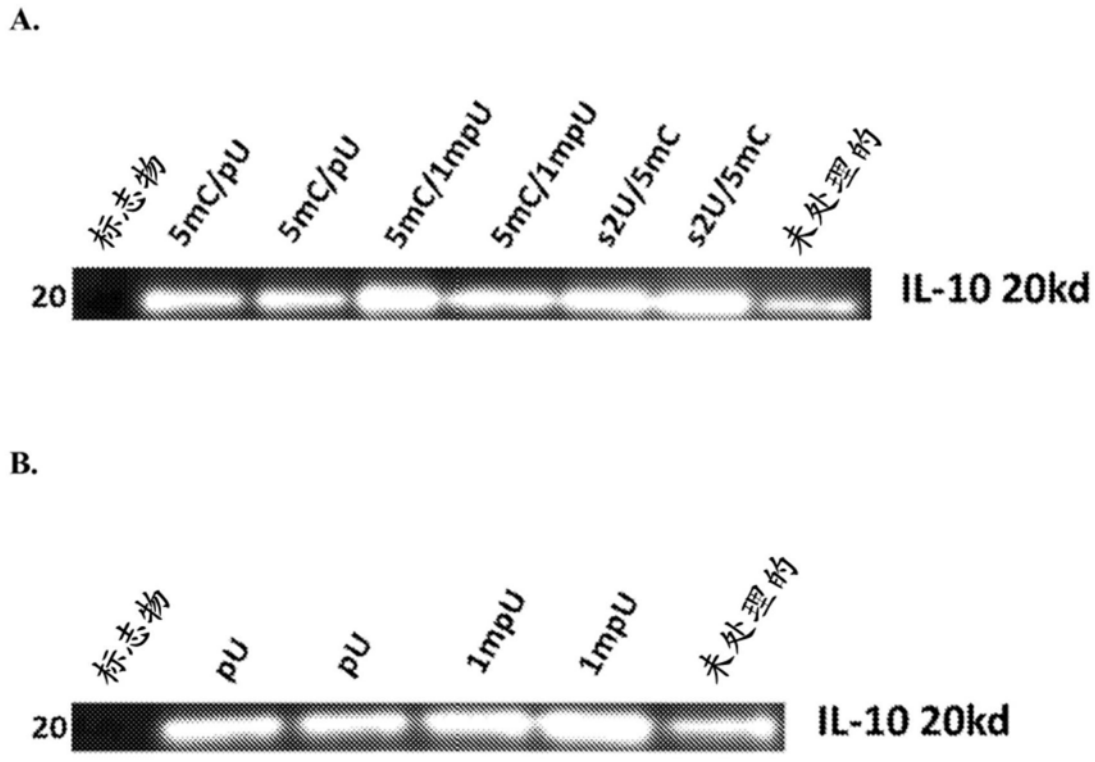

A.
标志物
5mC/pU
5mC/pU
5mC/1mpU
5mC/1mpU
s2U/5mC
s2U/5mC
未处理的
20
IL-10 20kd
B.
标志物
pU
pU
1mpU
1mpU
未处理的
20
IL-10 20kd

图50

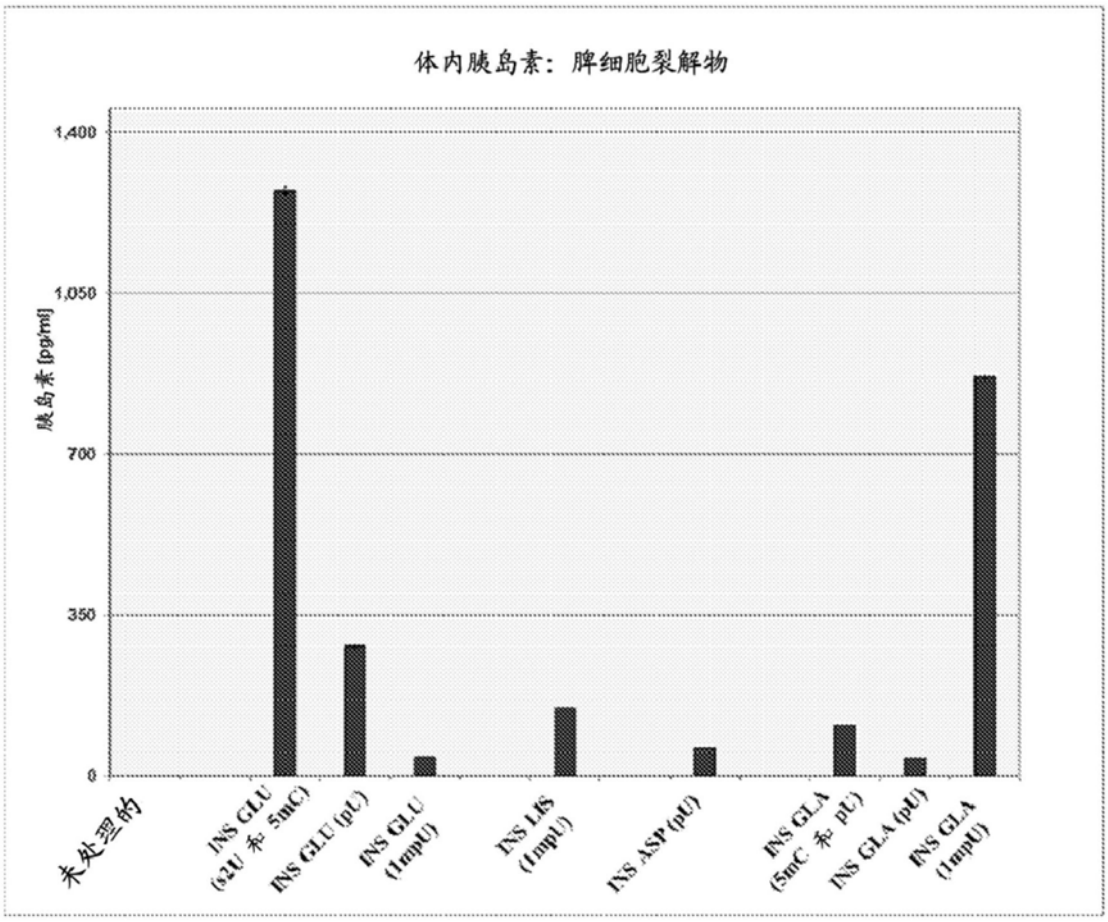

体内胰岛素：脾细胞裂解物
胰岛素 [pg/ml]
1,400
1,050
700
350
0
未处理的
INS GLU (62U 和 5mC)
INS GLU (pU)
INS GLU (1mpU)
INS LIS (1mpU)
INS ASP (pU)
INS GLA (5mC 和 pU)
INS GLA (pU)
INS GLA (1mpU)

图51

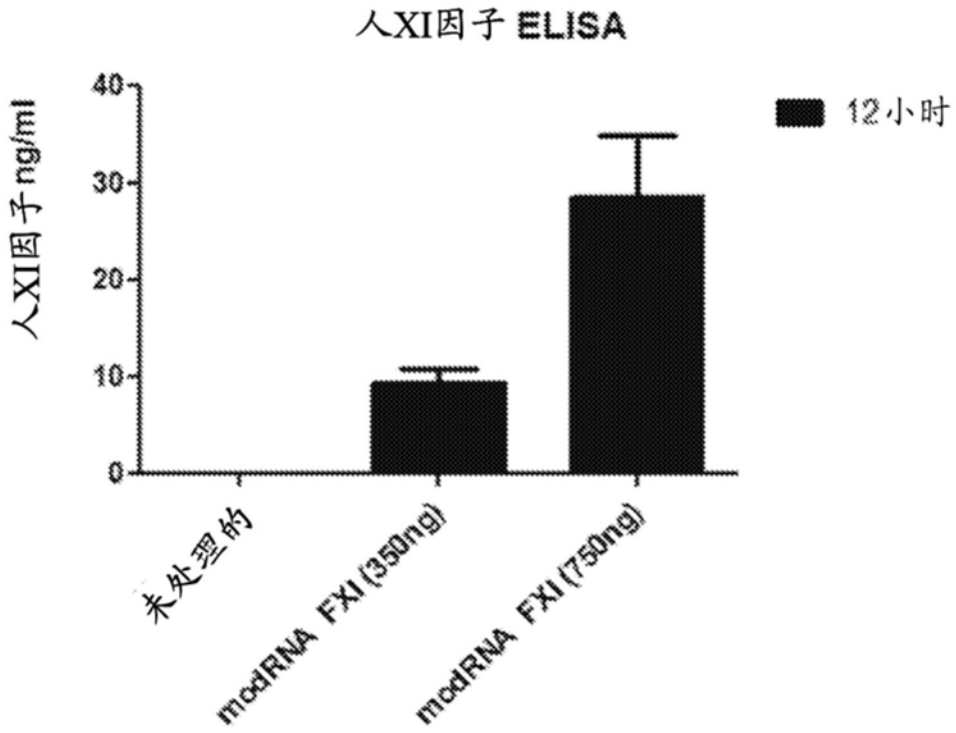

人XI因子 ELISA
人XI因子 ng/ml
40
30
20
10
0
12小时
未处理的
modRNA FXI (350ng)
modRNA FXI (750ng)

图52

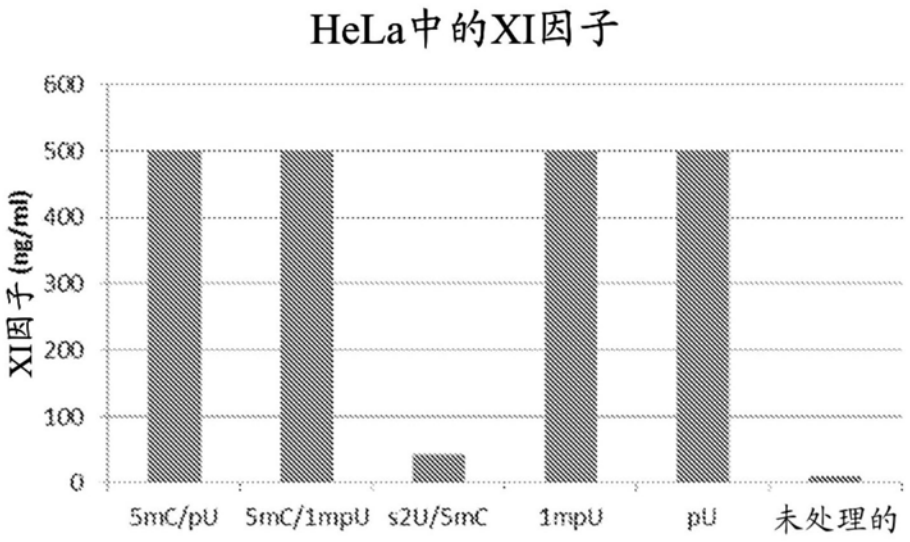

HeLa中的XI因子
XI因子 (ng/ml)
600
500
400
300
200
100
0
5mC/pU
5mC/1mpU
s2U/5mC
1mpU
pU
未处理的

图53

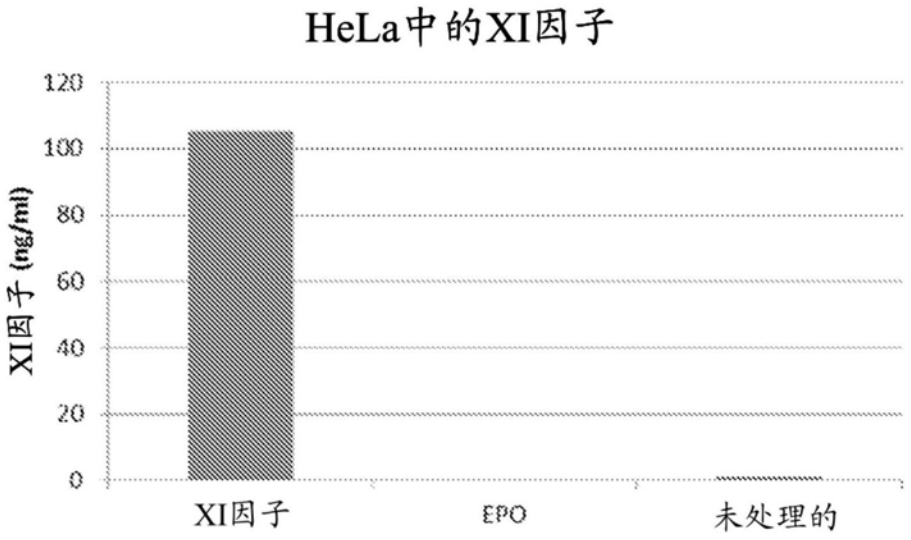

HeLa中的XI因子
XI因子 (ng/ml)
120
100
80
60
40
20
0
XI因子
EPO
未处理的

图54

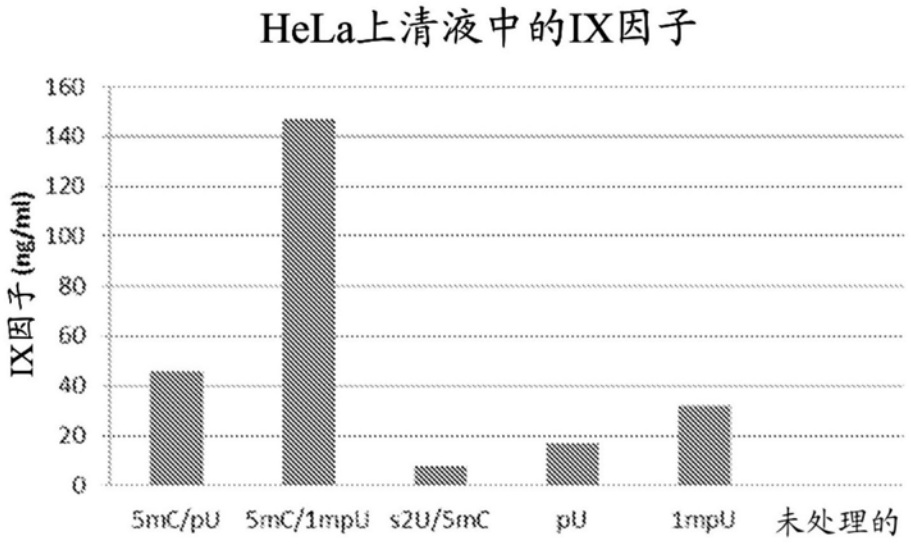

HeLa上清液中的IX因子
IX因子 (ng/ml)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
5mC/pU
5mC/1mpU
s2U/5mC
pU
1mpU
未处理的

图55

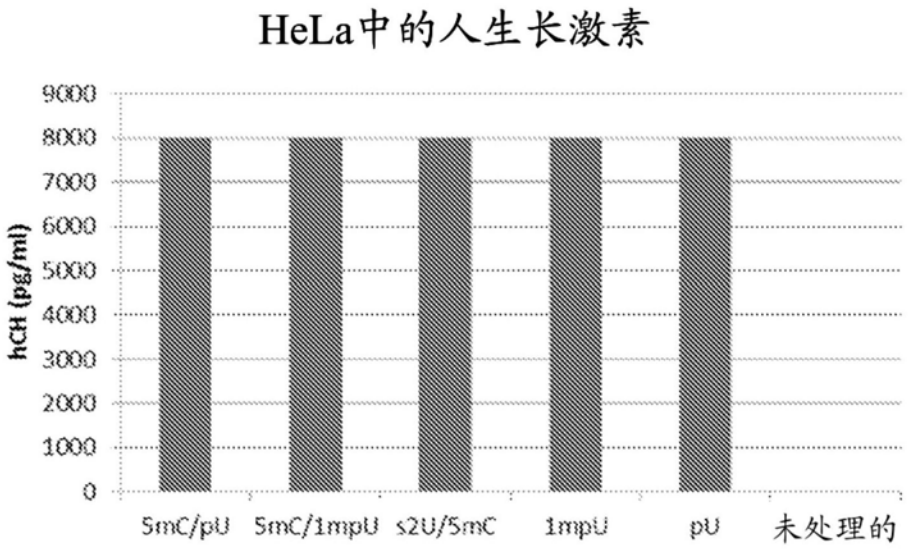

HeLa中的人生长激素
hCH (pg/ml)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5mC/pU
5mC/1mpU
s2U/5mC
1mpU
pU
未处理的

图56