



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I752036 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 11 日

(21)申請案號：106118838

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 07 日

(51)Int. Cl.：

*A61K38/18 (2006.01)**A61K31/7088(2006.01)**A61K47/10 (2006.01)**A61K47/12 (2006.01)**A61K47/16 (2006.01)**A61K47/24 (2006.01)**C12N15/11 (2006.01)**A61P9/00 (2006.01)**A61P17/02 (2006.01)*

(30)優先權：2016/06/07 美國

62/346,979

2016/10/21 美國

62/411,091

2016/12/09 美國

62/432,005

(71)申請人：美商瑪德那特克斯股份有限公司 (美國) MODERNATX, INC. (US)

美國

(72)發明人：帕林德 萊夫 K. PARINDER, LEIF KARLSSON (SE)；弗里切丹尼爾森 蕾吉娜 D. FRITSCHÉ DANIELSON, REGINA DESIREE (SE)；漢森 肯尼 M. HANSSON, KENNY MIKAEL (SE)；甘 黎明 GAN, LIMING (SE)；克拉克 強納森 CLARKE, JONATHAN (US)；艾格尼爾 安夏洛特 E. EGNELL, ANN-CHARLOTTE EVA (SE)；簡 肯尼斯 R. CHIEN, KENNETH RANDALL (US)

(74)代理人：劉法正；尹重君

(56)參考文獻：

WO 2011/069529A1

WO 2012/138453A1

審查人員：唐韶璞

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：52 共 202 頁

(54)名稱

編碼 VEGF-A 多肽的經修飾 RNA、配製物及關於它們之用途

(57)摘要

本揭露涉及編碼 VEGF-A 多肽的經修飾 RNA 分子和包含該經修飾 RNA 之配製物。本揭露的多方面還涉及包含該經修飾 RNA 的配製物的製備和在治療患有對 VEGF-A 療法有反應的疾病的受試者中之用途。

The disclosure relates to modified RNA molecules encoding VEGF-A polypeptides and formulations comprising the modified RNA. Aspects of the disclosure further relate to preparations and uses of formulations comprising the modified RNA in treating subjects suffering from diseases responsive to VEGF-A therapy.

I752036

發明摘要

※ 申請案號：106118838

※ 申請日：106.06.07

※IPC 分類：

A61K 38/18 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/16 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
G12N 15/11 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA、配製物及關於它們之用途

MODIFIED RNA ENCODING VEGF-A POLYPEPTIDES, FORMULATIONS,
AND USES RELATING THERETO

【中文】

本揭露涉及編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA分子和包含該經修飾RNA之配製物。本揭露的多方面還涉及包含該經修飾RNA的配製物的製備和在治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者中之用途。

【英文】

The disclosure relates to modified RNA molecules encoding VEGF-A polypeptides and formulations comprising the modified RNA. Aspects of the disclosure further relate to preparations and uses of formulations comprising the modified RNA in treating subjects suffering from diseases responsive to VEGF-A therapy.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA、配製物及關於它們之用途

MODIFIED RNA ENCODING VEGF-A POLYPEPTIDES, FORMULATIONS,
AND USES RELATING THERETO

【技術領域】

[0001] 本揭露涉及編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA分子和包含該經修飾RNA之配製物。本揭露的方面還涉及包含該經修飾RNA的配製物的製備和在治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者中之用途。

【先前技術】

[0002] 血管內皮生長因子A (VEGF-A) 通路一般在控制心血管生理功能，特別是動脈生成中發揮核心作用。VEGF-A的作用包括一氧化氮(NO) 傳訊的啟動、血管通透性、腫瘤血管生成、動脈生成、內皮細胞複製以及多潛能心血管先驅細胞的細胞命運轉變。雖然藉由小分子和抗體兩者對VEGF-A途徑的抑制已經成為選定形式的癌症和黃斑變性的護理標準，但解鎖擴張VEGF-A途徑以用於潛在治療效果(包括放鬆平滑肌、促進新血管形成、以及潛在地逆轉與糖尿病血管併發症相關的血管反應缺陷)的潛力仍然具有挑戰性。

[0003] 以此，已經嘗試了不同數量的方法以允許用以控制VEGF-A在靶組織中的空間和時間表現的臨床上易於處理的途徑。然而，每種途徑都有顯著的缺點：全身VEGF-A蛋白途徑可導致明顯的低血壓，並且VEGF-A迅速降解；病毒性包封的和裸的VEGF-A DNA質粒對蛋白質表現的時間控制有限，並且體內表現的效率可以是高度可變的和非劑量依賴性的；腺病

毒載體可以啟動免疫系統；並且裸RNA不穩定，轉染水平低，且還可觸發免疫啟動。結果係該等限制約束了VEGF-A作為治療平臺的適用性。

[0004] 在一些先前的研究中，治療性RNA（例如siRNA）的體內使用已依賴於利用脂質-奈米粒子（LNP）來保護mRNA免於降解以及有效轉染。此外，在肝臟以外的器官中達到治療水平的RNAi治療的嘗試已經導致輸注相關的高敏性以及肝毒性，因此限制了其在其他器官系統中的疾病治療的用途（魯丁（Rudin）CM等人，臨床癌症研究（Clin. Cancer Res.），（2004）10，7244-7251）。此外，該等LNP的其他變體已經在選擇的病例中臨床用於治療用途，但可引起劑量依賴性組織損傷（科埃略（Coelho）T.等人，新英格蘭醫學雜誌（N Engl J Med），（2013）369，819-829）。一些基於脂質的核酸藥物配製物的這種劑量依賴性毒性效應的實例包括輸注相關反應，例如呼吸困難、缺氧、僵硬、背痛、低血壓和肝損傷。此外，雖然陽離子脂質通常包括在RNA治療劑例如siRNA的脂質配製物中，以改善RNA包封和穩定性，但是一些這樣的脂質可展現出劑量依賴性毒性，例如破壞膜結構的完整性、細胞裂解和壞死和/或以不希望的方式改變多種基因的表現（薛（Xue）HY，當前藥物設計（Curr Pharm Des.），（2015）21（22）：3140-7）。在臨床前和臨床水平，脂質複合物（lipoplex）的劑量依賴性全身毒性也已得到充分的記錄。肝臟中庫弗細胞捕獲脂質複合物可觸發炎症反應，其可對肝臟造成損害，並導致主要肝功能指標水平升高。白血球減少症和血小板減少症也可發生（張（Zhang）J.，先進藥物遞送評論（Adv Drug Deliv Rev.），（2005）57（5）：689-698）。此外，脂質轉染胺（lipofectamine）導致免疫/炎症反應和細胞死亡。

[0005] 因此，為了避免RNA的潛在免疫原性和與一些LNP相關的劑量依賴性毒性，需要編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA的供選擇的較低毒性

的配製物，以在治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者中以治療上適當的水平遞送經修飾RNA。

【發明內容】

[0006] 本揭露涉及編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA分子和包含該經修飾RNA的配製物。還揭露了該等配製物中的VEGF-A修飾的RNA針對蛋白質表現、產生毒性較小的治療劑、以及提供可用於治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者的工具的所得益處。

[0007] 在以下段落中概述了本揭露的某些實施方式。此列表僅係示例性的，並且不是本揭露提供的所有實施方式的詳盡列舉。

[0008] 實施方式1. 一種包含經修飾RNA和緩衝液的組成物，該經修飾RNA較佳的是編碼SEQ ID NO：2的VEGF-A多肽的具有SEQ ID NO：1的經修飾RNA，該緩衝液較佳的是檸檬酸鹽鹽水緩衝液、磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）緩衝液或胺丁三醇（THAM）緩衝液，其中該緩衝液基本上不含二價陽離子。

[0009] 實施方式2. 一種包含藥學上可接受量的經修飾RNA和緩衝液的配製物，該經修飾RNA較佳的是編碼SEQ ID NO：2的VEGF-A多肽的具有SEQ ID NO：1的經修飾RNA，該緩衝液較佳的是檸檬酸鹽鹽水緩衝液、磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）緩衝液或胺丁三醇（THAM）緩衝液，其中該緩衝液基本上不含二價陽離子。

[0010] 實施方式3. 如實施方式2所述之配製物，其中所述基本上不含二價陽離子的緩衝液係檸檬酸鹽鹽水緩衝液。

[0011] 實施方式4. 如實施方式3所述之配製物，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。

[0012] 實施方式5. 如實施方式3所述之配製物，其中該檸檬酸鹽鹽

水緩衝液不含鈣或鎂。

[0013] 實施方式6. 如實施方式2所述的配製物，進一步包含藥學上可接受的賦形劑。

[0014] 實施方式7. 如實施方式6所述之配製物，其中該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。

[0015] 實施方式8. 一種治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者的方法，該方法包括向該受試者給予根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物。

[0016] 實施方式9. 如實施方式8所述之方法，其中在所述組成物或配製物中基本上不含二價陽離子的緩衝液係檸檬酸鹽鹽水緩衝液。

[0017] 實施方式10. 如實施方式9所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。

[0018] 實施方式11. 如實施方式9所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0019] 實施方式12. 如實施方式8所述之方法，其中該配製物另外包含藥學上可接受的賦形劑。

[0020] 實施方式13. 如實施方式12所述之方法，其中該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。

[0021] 實施方式14. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病選自具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭、腎臟疾病、涉及皮膚移植和組織移

植的疾病、MI後心臟功能障礙、缺血性心臟病、來自創傷或手術的血管損傷、包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍、嚴重肢體缺血、肺性高血壓和外周動脈疾病。

[0022] 實施方式15. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭。

[0023] 實施方式16. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係MI後心臟功能障礙。

[0024] 實施方式17. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係缺血性心臟病。

[0025] 實施方式18. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係來自創傷或手術的血管損傷。

[0026] 實施方式19. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍。

[0027] 實施方式20. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係嚴重肢體缺血。

[0028] 實施方式21. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係肺性高血壓。

[0029] 實施方式22. 如實施方式8所述之方法，其中該疾病係外周動脈疾病。

[0030] 實施方式23. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係經肌內、皮內、皮下、心內或心外膜途徑，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或藉由直接給予到待治療的區域來給予至受試者。

[0031] 實施方式24. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係經肌內給予該受試者。

[0032] 實施方式25. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係經皮內給予該受試者。

[0033] 實施方式26. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係經皮下給予該受試者。

[0034] 實施方式27. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係經心內或心外膜給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0035] 實施方式28. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係通過門靜脈導管給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0036] 實施方式29. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係通過冠狀竇導管給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0037] 實施方式30. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物係藉由直接給予到待治療的區域而給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0038] 實施方式31. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0039] 實施方式32. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0040] 實施方式33. 如實施方式8所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之

間的該經修飾RNA。

[0041] 實施方式34. 如實施方式9所述之方法，其中與基於脂質的組成物或配製物相比，該具有檸檬酸鹽鹽水緩衝液的組成物或配製物對於該受試者的毒性更低。

[0042] 實施方式35. 一種用於調節哺乳動物細胞、組織或受試者中的生理過程的方法，該方法包括使所述哺乳動物細胞、組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0043] 實施方式36. 如實施方式35所述之方法，其中該調節選自誘導血管生成、刺激血管細胞增殖、增加心外膜衍生的先驅細胞的增殖和/或改變心外膜衍生的先驅細胞的命運、上調內皮化、誘導心臟再生、增加組織移植物的血管再生以用於傷口癒合、改善血管功能、增加組織灌注和新血管形成、減少瘢痕組織和改善心臟功能。

[0044] 實施方式37. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括誘導血管生成。

[0045] 實施方式38. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括刺激血管細胞增殖。

[0046] 實施方式39. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括增加心外膜衍生的先驅細胞的增殖和/或改變心外膜衍生的先驅細胞的命運。

[0047] 實施方式40. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括上調內皮化。

[0048] 實施方式41. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括誘導心臟再生。

[0049] 實施方式42. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括增

加組織移植物的血管再生以用於傷口癒合。

[0050] 實施方式43. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括改善血管功能。

[0051] 實施方式44. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括增加組織灌注和新血管形成。

[0052] 實施方式45. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括減少瘢痕組織。

[0053] 實施方式46. 如實施方式35所述之方法，其中該調節包括改善心臟功能。

[0054] 實施方式47. 如實施方式35所述之方法，其中在所述組成物或配製物中基本上不含二價陽離子的緩衝液係檸檬酸鹽鹽水緩衝液。

[0055] 實施方式48. 如實施方式47所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。

[0056] 實施方式49. 如實施方式47所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0057] 實施方式50. 如實施方式35所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0058] 實施方式51. 如實施方式35所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0059] 實施方式52. 如實施方式35所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0060] 實施方式53. 一種在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A之方法，該方法包括使所述哺乳動物細胞或組織與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0061] 實施方式54. 如實施方式53所述之方法，其中在所述組成物或配製物中基本上不含二價陽離子的緩衝液係檸檬酸鹽鹽水緩衝液。

[0062] 實施方式55. 如實施方式54所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。

[0063] 實施方式56. 如實施方式54所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0064] 實施方式57. 如實施方式53所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0065] 實施方式58. 如實施方式53所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0066] 實施方式59. 如實施方式53所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0067] 實施方式60. 一種在受試者中產生VEGF-A之方法，該方法包括向所述受試者給予根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物。

[0068] 實施方式61. 如實施方式60所述之方法，其中在所述組成物或配製物中基本上不含二價陽離子的緩衝液係檸檬酸鹽鹽水緩衝液。

[0069] 實施方式62. 如實施方式61所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽

水緩衝液基本上不含鈣和鎂。

[0070] 實施方式63. 如實施方式61所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0071] 實施方式64. 如實施方式60所述之方法，其中該配製物另外包含藥學上可接受的賦形劑。

[0072] 實施方式65. 如實施方式64所述之方法，其中該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。

[0073] 實施方式66. 如實施方式60所述之方法，其中該受試者患有對VEGF-A療法有反應的疾病。

[0074] 實施方式67. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病選自具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭、腎臟疾病、涉及皮膚移植和組織移植的疾病、MI後心臟功能障礙、缺血性心臟病、來自創傷或手術的血管損傷、包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍、嚴重肢體缺血、肺性高血壓和外周動脈疾病。

[0075] 實施方式68. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭。

[0076] 實施方式69. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係MI後心臟功能障礙。

[0077] 實施方式70. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係缺血性心臟病。

[0078] 實施方式71. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係來自創傷或手術的血管損傷。

[0079] 實施方式72. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍。

[0080] 實施方式73. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係嚴重肢體缺血。

[0081] 實施方式74. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係肺性高血壓。

[0082] 實施方式75. 如實施方式66所述之方法，其中該疾病係外周動脈疾病。

[0083] 實施方式76. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物係經肌內、皮內、皮下、心內或心外膜途徑，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或藉由直接給予到待治療的區域來給予至受試者。

[0084] 實施方式77. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物係經肌內給予該受試者。

[0085] 實施方式78. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物係經皮內給予該受試者。

[0086] 實施方式79. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物係經皮下給予該受試者。

[0087] 實施方式80. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物係經心內或心外膜給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0088] 實施方式81. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物係通過門靜脈導管給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0089] 實施方式82. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配

製物係通過冠狀竇導管給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0090] 實施方式83. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物係藉由直接給予到待治療的區域而給予該受試者，較佳的是以固定劑量以多次給予來給予。

[0091] 實施方式84. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0092] 實施方式85. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0093] 實施方式86. 如實施方式60所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0094] 實施方式87. 一種製備組成物或配製物之方法，該方法包括將經修飾RNA與緩衝液組合到該組成物或配製物中，該經修飾RNA較佳的是編碼SEQ ID NO：2的VEGF-A多肽的具有SEQ ID NO：1的經修飾RNA，該緩衝液較佳的是檸檬酸鹽鹽水緩衝液、磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）緩衝液或胺丁三醇（THAM）緩衝液，其中該緩衝液基本上不含二價陽離子，並且其中該組成物或配製物對於治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者是有效的。

[0095] 實施方式88. 如實施方式87所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。

[0096] 實施方式89. 如實施方式87所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽

水緩衝液不含鈣或鎂。

[0097] 實施方式90. 如實施方式87所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0098] 實施方式91. 如實施方式87所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0099] 實施方式92. 如實施方式87所述之方法，其中該組成物或配製物包含較佳的是配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的該經修飾RNA。

[0100] 實施方式93. 如實施方式87所述之方法，其中與基於脂質的組成物或配製物相比，該具有檸檬酸鹽鹽水緩衝液的組成物或配製物對於該受試者的毒性更低。

[0101] 實施方式94. 一種降低受試者中VEGF-A治療的毒性之方法，該方法包括將經修飾RNA與緩衝液配製成組成物或配製物，該經修飾RNA較佳的是編碼SEQ ID NO：2的VEGF-A多肽的具有SEQ ID NO：1的經修飾RNA，該鹽水較佳的是檸檬酸鹽鹽水緩衝液、磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）緩衝液或胺丁三醇（THAM）緩衝液，其中該緩衝液基本上不含二價陽離子。

[0102] 實施方式95. 如實施方式94所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。

[0103] 實施方式96. 如實施方式94所述之方法，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0104] 實施方式97. 一種包含用於產生經修飾RNA的體外轉錄模

板之核酸序列，該經修飾RNA較佳的是編碼SEQ ID NO：2的VEGF-A多肽的具有SEQ ID NO：1的經修飾RNA。

[0105] 實施方式98. 一種用於增加哺乳動物組織或受試者中傷口癒合之方法，該方法包括使所述哺乳動物組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0106] 實施方式99. 一種用於誘導哺乳動物組織或受試者中新生血管形成之方法，該方法包括使所述哺乳動物組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0107] 實施方式100. 一種用於誘導哺乳動物組織或受試者中血管生成之方法，該方法包括使所述哺乳動物組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0108] 實施方式101. 一種用於誘導哺乳動物組織或受試者中血管舒張之方法，該方法包括使所述哺乳動物組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0109] 實施方式102. 一種用於誘導哺乳動物組織或受試者中血流上調之方法，該方法包括使所述哺乳動物組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0110] 實施方式103. 一種用於增加哺乳動物組織或受試者中毛細血管和/或小動脈密度之方法，該方法包括使所述哺乳動物組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

[0111] 實施方式104. 一種用於減輕哺乳動物組織或受試者中的纖維化之方法，該方法包括使所述哺乳動物組織或受試者與根據實施方式1所述之組成物和/或根據實施方式2-7中任一項所述之配製物接觸。

【圖式簡單說明】

[0112] 熟習該項技術者將理解，下面描述的附圖僅用於說明的目的。附圖並不旨在以任何方式限制本傳授內容的範圍。

[0113] 圖1A和1B：實例中使用的VEGF-A修飾RNA的結構（圖1A）和序列（SEQ ID NO：1，圖1B）。

[0114] 圖2A、2B和2C：更高劑量的經修飾RNA的轉染導致在人主動脈平滑肌細胞中產生更多的VEGF-A蛋白（圖2A）。在人主動脈平滑肌細胞中用經修飾RNA轉染後產生VEGF-A蛋白的時間歷程（圖2B）。在用經修飾RNA轉染後，小鼠心臟成纖維細胞（圖2C，左圖）和豬內皮細胞（圖2C，右圖）中的VEGF-A蛋白質產生。

[0115] 圖3A、3B和3C：由VEGF-A修飾的RNA產生的VEGF-A蛋白誘導人內皮細胞中VEGFR2的磷酸化（圖3A）以及人內皮細胞中的下游傳訊通路eNOS（圖3B）和小鼠心臟成纖維細胞中的Akt（圖3C）的活化。

[0116] 圖4A、4B和4C：由VEGF-A修飾的RNA產生的VEGF-A蛋白影響血管生成過程中的幾個關鍵步驟。由VEGF-A修飾的RNA產生的VEGF-A蛋白增加培養的人內皮細胞的增殖（圖4A）和遷移（圖4B）。由VEGF-A修飾的RNA產生的VEGF-A蛋白增加具有塗覆了內皮細胞的珠粒的3D培養物中的血管生成芽形成（圖4C）。

[0117] 圖5A、5B和5C：來自塗覆有內皮細胞並用對照培養基（圖5A）或具有經修飾RNA產生的VEGF-A的條件培養基（圖5B）處理的珠粒的血管生成芽形成的圖像。來自塗覆有內皮細胞並用經修飾RNA產生的VEGF-A處理的珠粒的血管生成芽形成的放大視圖（圖5C）。

[0118] 圖6A、6B和6C：指示在檸檬酸鹽鹽水（圖6A）、配製在脂質轉染胺（100 μ g，圖6B）或檸檬酸鹽鹽水緩衝液（150 μ g，圖6C）中的

LacZ修飾的RNA的50 μ L心內注射之後小鼠心臟中產生的 β -半乳糖苷酶的X-gal染色的比較。

[0119] 圖7：對在磷酸鹽緩衝鹽水（PBS， $n = 3$ ）、檸檬酸鹽鹽水（C/S， $n = 6$ ）或胺丁三醇AKA 2-胺基-2-(羥甲基)-1,3-丙二醇（THAM， $n = 3$ ）中配製的螢火蟲螢光素酶修飾的RNA的心內注射之後小鼠心臟中產生的螢光素酶蛋白質的評估。PBS、C/S和THAM緩衝液（ $n = 2$ /組）用作陰性對照。

[0120] 圖8A、8B、8C和8D：在初試大鼠中在15 μ g（圓）、150 μ g（正方形）或1800 μ g（三角形）的用檸檬酸鹽鹽水配製的VEGF-A修飾的RNA的心內注射後的不同時間點，VEGF-A蛋白的心臟水平（圖8A）。患有心肌梗塞和心內注射了檸檬酸鹽/鹽水或VEGF-A修飾的RNA（150或1800 μ g，配製在檸檬酸鹽/鹽水中）的大鼠的左心室射血分數和梗塞尺寸（為左心室質量的%）的比較。在誘導梗塞和注射後8天藉由心臟磁共振成像評估射血分數（圖8B）和梗塞尺寸（圖8C）。誘導心肌梗塞並且心內注射檸檬酸鹽/鹽水或配製於檸檬酸鹽/鹽水中的VEGF-A修飾的RNA後一天，從大鼠抽取的靜脈血中的心肌肌鈣蛋白I（TnI）的水平（圖8D）。

[0121] 圖9A和9B：自心外膜注射了LacZ修飾的RNA（在3個單獨的注射部位100 μ g）的哥廷根小型豬的左心室游離壁收穫的代表性樣品。注射後6小時收穫組織，並X-gal染色18小時。對應地，左側樣品顯示了用配製在脂質轉染胺（圖9A）中的LacZ修飾的RNA注射的組織中的染色，以及用配製在檸檬酸鹽/鹽水中的LacZ修飾的RNA注射的右側樣品組織的情況（圖9B）。

[0122] 圖10：在哥廷根小型豬中，心外膜注射不同劑量的VEGF-A修飾的RNA後6小時，豬左心室組織樣品中的人VEGF-A蛋白。

[0123] 圖11A、11B、11C、11D、11E、11F和11G：在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中LacZ和螢光素酶修飾的RNA心臟轉染和翻譯。用檸檬酸鹽鹽水緩衝液將75 μg LacZ修飾的RNA注射到小鼠心臟中。在心臟左心室的大約10%(圖11A、圖11C和圖11D中的代表性圖像)中發現 β -半乳糖苷酶的產生。X-gal染色的放大視圖，其顯示注射LacZ修飾的RNA後心臟中的 β -半乳糖苷酶的產生(圖11B)。將螢光素酶修飾的RNA注射到心臟中。用螢光素酶探針進行的RNA原位雜交揭示在注射部位的心肌中存在螢光素酶修飾的RNA(圖11E)。用螢光素酶探針進行的RNA原位雜交的放大視圖，其顯示螢光素酶修飾的RNA的存在(圖11F)。免疫組織化學揭示注射螢光素酶修飾的RNA後注射部位心肌中的螢光素酶蛋白表現(圖11G)。

[0124] 圖12A、12B和12C：經修飾RNA隨著檸檬酸鹽/鹽水緩衝液注射到心臟後的VEGF-A蛋白表現係可飽和的，並且在多個物種間具有類似的藥物動力學。在小鼠中單次心臟注射配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液(NTB)中的VEGF-A修飾的RNA(對比脂質轉染胺(LNP))後，72小時內的VEGF-A蛋白質藥物動力學(圖12A)。漸增給予檸檬酸鹽鹽水中的VEGF-A修飾的RNA後，VEGF-A蛋白水平的跨物種比較(圖12B)。藉由漸增劑量的VEGF-A修飾的RNA產生的VEGF-A蛋白的大鼠藥物動力學。在72小時產生的VEGF-A蛋白的曲線下面積(AUC)測量(圖12C)。

[0125] 圖13A和13B：在小鼠、大鼠和豬中，心內注射人VEGF-A修飾的RNA後人VEGF-A蛋白產生的評估。在心內注射配製在檸檬酸鹽/鹽水中的100 μg VEGF-A修飾的RNA後，在小鼠(實心正方形)、大鼠(實心星形)和豬(實心圓)心臟中產生的VEGF-A蛋白的多少和時間曲線(圖13A中為0至72小時；而圖13B中為0至192小時)。顯示為幾何均值 $\pm$ SD。

[0126] 圖14：人VEGF-A修飾的RNA和重組人VEGF-A對經受心肌

梗塞的小型豬的左心室射血分數（EF）的影響。在左前降支冠狀動脈的永久性閉塞之前（BF）和之後（AF）進行EF的連續評估。對一個單獨組的豬進行無冠狀動脈閉塞的假手術（空心圓， $n = 5$ ）。然後在閉塞後7天（7D AF）和再次2個月後（2 MO AF）進行研究藥物注射時對EF的隨後評估。在7D AF的情況，將豬分別隨機接受檸檬酸鹽/鹽水（實心正方形， $n = 8$ ）或總劑量為1 mg（實心圓， $n = 8$ ）或10 mg（實心三角形， $n = 8$ ）的VEGF-A修飾的RNA或配製在自組裝奈米纖維（實心菱形， $n = 5$ ）中的重組人VEGF-A蛋白的20次心外膜注射（每次100 μL ）。*： $P < 0.05$ 相對於2 MO AF檸檬酸鹽/鹽水對照組；**： $P < 0.01$ 相對於2 MO AF檸檬酸鹽/鹽水對照組；†： $P < 0.001$ 比較從7 D AF直到2 MO AF的變化；††： $P < 0.0001$ 比較從7 D AF直到2 MO AF的變化。

[0127] 圖15：人VEGF-A修飾的RNA和重組人VEGF-A對經受心肌梗塞的小型豬中隨時間的推移最高左心室壓力發展（ $dP/dt \text{ max}$ ）的影響。使小型豬經受左前降支冠狀動脈的永久性閉塞以誘導心肌梗塞。對一個單獨組的豬進行無冠狀動脈閉塞的假手術（空心圓， $n = 5$ ）。七天后，將梗塞的豬隨機盲法心外膜注射檸檬酸鹽/鹽水運載體（2 mL，實心正方形）、1 mg（實心圓）或10 mg（實心三角形）VEGF-A修飾的RNA或配製在自組裝奈米纖維中的重組人VEGF-A蛋白（200 ng）（實心菱形）。劑量/容積作為在梗塞周圍區域的20次單獨注射（每次100 μL ）給予。注射後2個月侵入式測量左心室功能。顯示了個體數據和均值 $\pm$ SEM。

[0128] 圖16：人VEGF-A修飾的RNA和重組人VEGF-A對經受心肌梗塞的小型豬中隨時間的推移最小左心室壓力發展（ $dP/dt \text{ min}$ ）的影響。使小型豬經受左前降支冠狀動脈的永久性閉塞以誘導心肌梗塞。對一個單獨組的豬進行無冠狀動脈閉塞的假手術（空心圓， $n = 5$ ）。七天后，將梗塞

的豬隨機盲法心外膜注射檸檬酸鹽/鹽水運載體（2 mL，實心正方形）、1 mg（實心圓）或10 mg（實心三角形）VEGF $\square$ A修飾的RNA或配製在自組裝奈米纖維中的重組人VEGF $\square$ A蛋白（200 ng）（實心菱形）。劑量/容積作為在梗塞周圍區域的20次單獨注射（每次100 μ L）給予。注射後2個月侵入式測量左心室功能。顯示了個體數據和均值 $\pm$ SEM。

[0129] 圖17：人VEGF-A修飾的RNA和重組人VEGF-A對經受心肌梗塞的小型豬的收縮功能（收縮力，ESPVR）的影響。使小型豬經受左前降支冠狀動脈的永久性閉塞以誘導心肌梗塞。對一個單獨組的豬進行無冠狀動脈閉塞的假手術（空心圓，n = 5）。七天后，將梗塞的豬隨機盲法心外膜注射檸檬酸鹽/鹽水運載體（2 mL，實心正方形）、1 mg（實心圓）或10 mg（實心三角形）VEGF $\square$ A修飾的RNA或配製在自組裝奈米纖維中的重組人VEGF $\square$ A蛋白（200 ng）（實心菱形）。劑量/容積作為在梗塞周圍區域的20次單獨注射（每次100 μ L）給予。注射後2個月侵入式測量左心室功能。顯示了個體數據和均值 $\pm$ SEM。

[0130] 圖18：人VEGF-A修飾的RNA和重組人VEGF-A對經受心肌梗塞的小型豬的舒張功能（依從性，EDPVR）的影響。使小型豬經受左前降支冠狀動脈的永久性閉塞以誘導心肌梗塞。對一個單獨組的豬進行無冠狀動脈閉塞的假手術（空心圓，n = 5）。七天后，將梗塞的豬隨機盲法心外膜注射檸檬酸鹽/鹽水運載體（2 mL，實心正方形）、1 mg（實心圓）或10 mg（實心三角形）VEGF $\square$ A修飾的RNA或配製在自組裝奈米纖維中的重組人VEGF $\square$ A蛋白（200 ng）（實心菱形）。劑量/容積作為在梗塞周圍區域的20次單獨注射（每次100 μ L）給予。注射後2個月侵入式測量左心室功能。顯示了個體數據和均值 $\pm$ SEM。

[0131] 圖19：人VEGF-A修飾的RNA和重組人VEGF-A對經受心肌梗塞的小型豬的舒張功能（依從性，EDPVR）的影響。使小型豬經受左前降支冠狀動脈的永久性閉塞以誘導心肌梗塞。對一個單獨組的豬進行無冠狀動脈閉塞的假手術（空心圓，n = 5）。七天后，將梗塞的豬隨機盲法心外膜注射檸檬酸鹽/鹽水運載體（2 mL，實心正方形）、1 mg（實心圓）或10 mg（實心三角形）VEGF $\square$ A修飾的RNA或配製在自組裝奈米纖維中的重組人VEGF $\square$ A蛋白（200 ng）（實心菱形）。劑量/容積作為在梗塞周圍區域的20次單獨注射（每次100 μ L）給予。注射後2個月侵入式測量左心室功能。顯示了個體數據和均值 $\pm$ SEM。

梗塞的小型豬的前負荷補充搏功 (PRSW) 的影響。使小型豬經受左前降支冠狀動脈的永久性閉塞以誘導心肌梗塞。對一個單獨組的豬進行無冠狀動脈閉塞的假手術 (空心圓, $n = 5$)。七天后, 將梗塞的豬隨機盲法心外膜注射檸檬酸鹽/鹽水運載體 (2 mL, 實心正方形)、1 mg (實心圓) 或10 mg (實心三角形) VEGF-A修飾的RNA或配製在自組裝奈米纖維中的重組人VEGF-A蛋白 (200 ng) (實心菱形)。劑量/容積作為在梗塞周圍區域的20次單獨注射 (每次100 μ L) 給予。注射後2個月侵入式測量左心室功能。顯示了個體數據和均值 $\pm$ SEM。

[0132] 圖 20A、20B 和 20C：人 VEGF-A 修飾的 RNA 和重組人 VEGF-A 對經受心肌梗塞的小型豬的梗塞尺寸的影響。梗塞尺寸呈現為心外膜注射檸檬酸鹽/鹽水 (實心正方形) 或者 1 mg (實心圓) 或 10 mg (實心三角形) VEGF-A 修飾的 RNA 或配製在自組裝奈米纖維中的重組人 VEGF-A 蛋白 (200 ng) (實心菱形) 的小型豬中的總體左心室梗塞尺寸 (切片 2、3、4 和 5, 圖 20A)、中左心室梗塞尺寸 (切片 3 和 4, 圖 20B) 和正中左心室梗塞尺寸 (切片 4, 圖 20C)。在藉由左前降支冠狀動脈的永久性閉塞誘導心肌梗塞後 7 天給予注射。注射後 2 個月測量梗塞尺寸。顯示為均值 $\pm$ SEM。

[0133] 圖 21：實例 14 的試驗 1 期間小鼠的身體質量。在每個成像時間點記錄每隻小鼠的身體質量。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM, 黑色條：運載體單次注射, 陰影線條：運載體雙次注射, 灰色條：VEGF-A 修飾的 RNA 單次注射, 橫線條：VEGF-A 修飾的 RNA 雙次注射, * : $p < 0.05$ 針對雙次相對於單次注射運載體。

[0134] 圖 22：在實例 14 的試驗 1 中小鼠的禁食和非空腹血糖測量。在第 0 天, 在 4 小時禁食期後測量血糖。在第 18 天, 測量非空腹血糖。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM, 黑色條：運載體單次注射, 陰影線條：運載體雙次注

射，灰色條：VEGF-A修飾的RNA單次注射，橫線條：VEGF-A修飾的RNA雙次注射，*： $p < 0.05$ 針對VEGF-A修飾的RNA單次注射相對於運載體單次注射。

[0135] 圖23：實例14中試驗1的傷口癒合曲線。將來自三名觀察者的中值的平均歸一化開放傷口面積針對手術後天數繪圖。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM，* $p < 0.05$ 針對分別在第6天進行的VEGF-A修飾的RNA雙次注射（空心正方形）相對於運載體單次（實心圓）和雙次（空心圓）注射以及分別在第10天進行的VEGF-A修飾的RNA雙次注射相對於運載體雙次注射。實心正方形：VEGF-A修飾的RNA單次注射。

[0136] 圖24：來自實例14中試驗1的傷口癒合曲線的三次樣條插值。構建三次樣條插值以接近到25%、50%和75%閉合的時間，如水平灰色虛線所證明的。呈現的數據係來自三名觀察員的中值的歸一化開放傷口面積的均值。 ϕ ： $p < 0.05$ 針對VEGF-A修飾的RNA雙次注射（空心正方形）相對於運載體單次注射（實心圓）#： $p < 0.05$ 針對VEGF-A修飾的RNA雙次注射相對於運載體雙次注射（空心圓）。實心正方形：VEGF-A修飾的RNA單次注射。

[0137] 圖25：實例14中試驗1的時間點之間的傷口癒合百分比。使用歸一化傷口面積數據在每個時間點之間計算傷口閉合的平均百分比。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM；* $p < 0.05$ 針對第3天至第6天VEGF-A修飾的RNA雙次注射（橫線條）分別相對於運載體雙次（陰影線條）和單次注射（黑色條）的更高傷口閉合平均百分比，並且針對第10天至第13天VEGF-A修飾的RNA單次注射（灰色條）分別相對於運載體雙次和單次注射的更低傷口閉合平均值。

[0138] 圖26：實例14試驗1中蘇木精和伊紅染色的傷口切片的代表

性圖像。A：運載體單次注射，B：運載體雙次注射，C：VEGF-A修飾的RNA單次注射，D：VEGF-A修飾的RNA雙次注射。

[0139] 圖27：實例14試驗1中CD31染色的傷口切片的代表性圖像。箭頭指示強CD31染色的區域。A) 單次運載體，B) 雙次運載體，C) 單次VEGF-A修飾的RNA，D) 雙次VEGF-A修飾的RNA。

[0140] 圖28：實例14中試驗1中的CD31染色的量化。圖A至D係代表性的獲得圖像，並且圖E至H係CD31陽性染色（棕色通道）的代表性閾值圖像。A和E：單次運載體，B和F：雙次運載體，C和G：單次VEGF-A修飾的RNA，D和H：雙次VEGF-A修飾的RNA，I：CD31染色（黑色像素覆蓋的區域）的面積百分比的定量。黑色條：運載體單次注射，陰影線條：運載體雙次注射，灰色條：VEGF-A修飾的RNA單次注射，橫線條：VEGF-A修飾的RNA雙次注射。

[0141] 圖29：實例14中用西方印漬進行的下游VEGF傳訊分析（試驗1）。上圖：來自在第0天接受單劑量運載體、在第0天和第3天接受雙劑量運載體、第0天接受單劑量的VEGF-A修飾的RNA、以及在第0和第3天接受雙劑量的VEGF-A修飾的RNA的小鼠的第18天樣品的pAKT和AKT印跡。下圖：pAKT/AKT的定量比值在治療組間未顯示統計學差異。左條：運載體單次注射，左中條：運載體雙次注射，右中條：單次VEGF-A修飾的RNA注射，右條：雙次VEGF-A修飾的RNA注射。

[0142] 圖30：來自實例14中試驗1第18天收穫的小鼠傷口中的pVEGFR2、VEGFR2和VEGF-A的西方印漬分析。上圖：來自在第0天接受單劑量運載體、在第0天和第3天接受雙劑量運載體、第0天接受單劑量的VEGF-A修飾的RNA、以及在第0和第3天接受雙劑量的VEGF-A修飾的RNA的小鼠的第18天樣品的pVEGFR2、VEGFR2和VEGFA印跡。下圖：

pVEGFR2/VEGFR2的定量比值在治療組間未顯示統計學差異。左條：運載體單次注射，左中條：運載體雙次注射，右中條：單次VEGF β A修飾的RNA注射，右條：雙次VEGF β A修飾的RNA注射。

[0143] 圖31：實例14的試驗2期間小鼠的身體質量。在每個成像時間點記錄每隻小鼠的身體質量。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM。左條：運載體雙次注射，右條：VEGF β A修飾的RNA雙次注射。

[0144] 圖32：在實例14的試驗2中小鼠的禁食血糖和非空腹血糖。在第0天，在4小時禁食期後測量血糖。在第18天，測量非空腹血糖。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM。左條：運載體雙次注射，右條：VEGF β A修飾的RNA雙次注射。

[0145] 圖33：氧敏感奈米粒子的體內應用示意圖。A) 奈米粒子在全層皮膚傷口中的應用。激發時，奈米粒子發出強的室溫螢光(B)和強的氧依賴性磷光(C)。比率法圖像由螢光和磷光之間的比例構成，以報告傷口床內氧的相對水平(D)。

[0146] 圖34：實例14試驗2中傷口床內相對氧合水平的比率法圖像。每個時間點雙次運載體(上半部分)和雙次VEGF β A修飾的RNA(下半部分)處理的傷口的代表性亮視野和比率法圖像。傷口邊界以黑色勾勒出來。

[0147] 圖35：藉由來自傷口床中的氧敏感性奈米粒子的螢光和磷光的圖像分析來定量氧合。計算傷口床的每個原始螢光到磷光圖像的灰度均值。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM, *p < 0.05針對VEGF β A修飾的RNA雙次注射(右條)相對於運載體雙次注射(左條)的灰度均值。

[0148] 圖36：實例14中試驗2的傷口癒合曲線。將來自三名獨立的觀察者的中值的平均歸一化開放傷口面積針對手術後天數繪圖。呈現的數

據為均值 $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ 針對分別在第6天進行的VEGF-A修飾的RNA雙次注射（空心正方形）相對於運載體雙次注射（空心圓）的更小開放傷口面積。對應地，曲線下面積為運載體雙次注射641.31和VEGF-A修飾的RNA雙次注射604.35。

[0149] 圖37：來自實例14中試驗2的傷口癒合曲線的三次樣條插值。構建三次樣條插值以接近到25%、50%和75%閉合的時間，如灰色虛線所證明的。呈現的數據係來自三名觀察員的中值的歸一化開放傷口面積的均值。#： $p < 0.05$ 針對VEGF-A修飾的RNA雙次注射（空心正方形）相對於雙次運載體注射（空心圓）。

[0150] 圖38：實例14中試驗2的時間點之間的傷口癒合百分比。使用歸一化傷口面積數據在每個時間點之間計算傷口閉合的平均百分比。呈現的數據為均值 $\pm$ SEM; * $p < 0.05$ 針對第3天至第6天VEGF-A修飾的RNA雙次注射（右條）相對於運載體雙次注射（左條）的更高傷口閉合平均百分比。

[0151] 圖39：小鼠耳朵中對高劑量VEGF-A修飾的RNA的血管反應的光聲顯微鏡檢查。第一排：血管結構；第二排： sO_2 (%)；第三排：血流速度 (mm/s)。虛線圓：注射部位。第3排中的箭頭：具有顯著上調的血流的血管。第一排之上的標籤指示皮內注射VEGF-A修飾的RNA (100 μ g) 後的時間。

[0152] 圖40：皮內注射高劑量VEGF-A修飾的RNA的小鼠耳中的新血管形成和血管生成。在皮內注射100 μ g VEGF-A修飾的RNA的小鼠耳中的新血管（由箭頭標記，第二排）和血管生成的放大圖像。放大區域由第一排中的虛線正方形指示。第一排之上的標籤指示皮內注射VEGF-A修飾的RNA (100 μ g) 後的時間。

[0153] 圖41：小鼠耳朵中對低劑量VEGF-A修飾的RNA的血管反應的光聲顯微鏡檢查。第一排：血管結構；第二排： sO_2 (%)；第三排：血流速度 (mm/s)。虛線圓：注射部位。第一排之上的標籤指示皮內注射VEGF-A修飾的RNA (10 μ g) 後的時間。

[0154] 圖42：小鼠耳朵中對人重組VEGF-A蛋白的血管反應的光聲顯微鏡檢查。第一排：血管結構；第二排： sO_2 (%)；第三排：血流速度 (mm/s)。虛線圓：注射部位。第一排之上的標籤指示皮內注射人重組VEGF-A蛋白 (1 μ g) 後的時間。第三排箭頭指示了具有明顯流量上調的血管。

[0155] 圖43：小鼠耳朵中對檸檬酸鹽/鹽水的血管反應的光聲顯微鏡檢查。第一排：血管結構；第二排： sO_2 (%)；第三排：血流速度 (mm/s)。虛線圓：注射部位。第一排之上的標籤指示皮內注射檸檬酸鹽/鹽水 (10 μ L) 後的時間。

[0156] 圖44：VEGF-A修飾的RNA、人重組VEGF-A蛋白和檸檬酸鹽/鹽水對小鼠耳中血管反應的影響。由皮內注射VEGF-A修飾的RNA (100 μ g，實心正方形)、人重組VEGF-A蛋白 (1 μ g，實心三角形) 或檸檬酸鹽/鹽水 (10 μ L，實心圓) 誘導的小鼠耳中的急性和長期血管反應（左圖為血管直徑且右圖為容積血流量）的定量分析。顯示的值為均值 $\pm$ SD，n = 3隻/組。

[0157] 圖45：小鼠耳中注射VEGF-A修飾的RNA後對微血管流量和氧飽和度的影響。將VEGF-A修飾的RNA (100 μ g) 皮內注射入小鼠耳中。在注射前（基線）和7天后評估微血管流量（圖A）和氧飽和度（圖B）。

[0158] 圖46：小鼠耳中注射重組人VEGF-A蛋白後對微血管流量和氧飽和度的影響。將重組人VEGF-A蛋白 (1 μ g) 皮內注射入小鼠耳中。在

注射前（基線）和7天后評估微血管流量（圖A）和氧飽和度（圖B）。

[0159] 圖47：小鼠耳中注射檸檬酸鹽/鹽水運載體後對微血管流量和氧飽和度的影響。將檸檬酸鹽/鹽水運載體（10 μ g）皮內注射入小鼠耳中。在注射前（基線）和7天后評估微血管流量（圖A）和氧飽和度（圖B）。

[0160] 圖48A和圖48B：圖48A中示出了實例16的實驗設計。48B中示出了實例16的VEGF-A修飾的RNA注射的佈局。

[0161] 圖49：來自皮內注射VEGF-A修飾的RNA的兔的微量透析洗提物中的人VEGF-A濃度。來自皮內插入兔後腿的100 kDa微量透析探針的洗提物中的人VEGF-A濃度。呈現的值係均值 $\pm$ SEM。在 $t = 0$ h開始微量透析，並且在 $t = 1$ h時給予4次VEGF-A修飾的RNA注射（每次50 μ g）的id注射。點劃線表示定量下限（LLOQ，33.4 pg/mL）。每隻兔子插入兩隻探針， $n = 4$ 隻兔子。

[0162] 圖50A、圖50B和圖50C：體內向患心肌梗塞的豬心內注射人VEGF-A修飾的RNA後對毛細血管密度（圖50A）、小動脈密度（圖50B）和纖維化（圖50C）的影響。使小型豬經受左前降支冠狀動脈的永久性結紮，並在7天后，心外膜注射VEGF-A修飾的RNA（1 mg，實心灰條（ $n = 8$ ）或10 mg，陰影線條（ $n = 8$ ））或檸檬酸鹽/鹽水（實心黑條， $n = 8$ ）。一個單獨組的動物進行假手術（冠狀動脈未結紮並且未給予心外膜注射（空心條， $n = 5$ ））。結紮兩個月後，終結動物，並收穫心臟組織以評估梗塞周圍（邊界）區域中的毛細血管密度（圖50A）。顯示為均值 $\pm$ SEM。*： $P < 0.05$ 和***： $P < 0.001$ ，相對於檸檬酸鹽/鹽水處理的動物（單向ANOVA和鄧尼特事後檢驗（Dunnett's post test））。在圖50B中，結紮兩個月後，終結動物，並收穫心臟組織以評估梗塞周圍（邊界）區域中的小動脈密度。顯示為均值 $\pm$ SEM。**： $P < 0.0$ ，相對於檸檬酸鹽/鹽水處理的動物（單向ANOVA和鄧尼特事後

檢驗 (Dunnett's post test))。在圖50C中，結紮兩個月後，終結動物，並收穫心臟組織以評估遠離梗塞區域的纖維化 (膠原蛋白沈積)。顯示為均值 $\pm$ SEM。* : $P < 0.05$ 和 ** : $P < 0.01$ ，相對於檸檬酸鹽/鹽水處理的動物 (單向 ANOVA 和鄧尼特事後檢驗 (Dunnett's post test))。

[0163] 圖51：在人主動脈平滑肌細胞 (hAoSMC，空心圓) 和衍生自誘導多能細胞的人心肌細胞 (hiPS-CM，實心三角形) 中，VEGF-A 修飾的 RNA 轉染後人 VEGF-A 蛋白生產的時間曲線。顯示的數據為均值 $\pm$ SEM。

[0164] 圖52A和圖52B：圖52A示出了在正常非梗塞小鼠心臟 (對照) 中和在組織收穫前3、7或14天經歷左前降支冠狀動脈永久閉塞的心臟中，作為心外膜衍生細胞 (EPDC) 的標誌物的威爾姆斯瘤1轉錄因子 (Wt-1) 的免疫組織化學。箭頭指示 Wt-1 表現。圖52B示出了在正常非梗塞小鼠心臟 (對照) 中和在組織收穫前3、7或14天經歷左前降支冠狀動脈永久閉塞的心臟中 Wt-1⁺ 細胞發生的評分。MI：心肌梗塞。* : $P < 0.05$ ，*** : $P < 0.001$ ，相對於每個研究組中對照， $n = 3-5$ 。

【實施方式】

詳細說明

[0165] 將引用的所有參考文獻以其全文藉由引用結合在此。

[0166] 本揭露所屬領域的技術人員可從前文描述和相關附圖中獲益進而想出本文闡述的揭露內容的許多改進形式和其他實施方式。因此，應當理解本揭露不限於揭露的具體實施方式，改進和其他實施方式旨在包括於所附申請專利範圍的範圍內。儘管其中使用特殊術語，它們僅以通用和描述性意義而非限制目的使用。

[0167] 單位、前綴以及符號可以其 SI 公認的形式來表示。除非另有指明，對應地，核酸以 5' 至 3' 方向從左到右書寫；胺基酸序列以胺基到羧

基方向從左到右書寫。數值範圍包括限定該範圍的數值。胺基酸可以在此藉由它們的通常已知的三字母符號或藉由由IUPAC-IUB生物化學命名委員會（IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission）推薦的單字母符號來提及。同樣地，核苷酸可以藉由它們的普遍公認的單字母代碼而被提及。以下定義的術語總體上參照說明書而更完整地定義。

5.1.定義

[0168] 除非另外確切定義，在此所使用的所有技術和科學術語具有與本揭露所屬領域的技術人員通常所理解的相同的意義。除非另有說明，本文採用或考慮的技術係熟習該項技術者熟知的標準方法。除非另外說明，本揭露的實踐將使用本領域技術範圍內的微生物學、組織培養、分子生物學、化學、生物化學以及重組DNA技術的常規技術。該等材料、方法、和實例僅係說明性的並且不是限制性的。以下藉由說明的方式呈現，並非意在限制本揭露的範圍。

[0169] 在一些實施方式中，在說明書中闡述的數字參數（申請專利範圍全部併入其中）係近似值，其可以根據由特定實施方式尋求獲得的期望性質而變化。在一些實施方式中，該等數值參數應該按照報告的有效數字的數量以及藉由應用普通的舍入技術來解釋。雖然闡述本揭露的一些實施方式的廣泛範圍的數值範圍和參數係近似值，但是在具體實例中闡述的數值被盡可能地精確地報導。在本揭露的一些實施方式中呈現的數值可含有由其各自測試測量中發現的標準差必然導致的某些誤差。本文中對數值範圍的描述僅旨在用作逐個提及落入該範圍內的各個獨立值的一種簡化方法。除非在本文中另有說明，否則將各個獨立的值併入說明書中，就如同在本文中對它進行了逐個描述一樣。

[0170] 為方便，這裡收集了在整個申請案（包括本說明書、實例

和所附申請專利範圍)中使用的某些術語。除非另外定義，在此所使用的所有技術和科學術語具有與本揭露所屬領域的技術人員通常所理解的相同的意義。

[0171] 如本文使用的，術語“給予”係指藉由使得藥物組成物或藥物配製物至少部分定位在期望的部位或組織位置的方法或途徑，將包含至少一種經修飾RNA的藥物組成物或藥物配製物置入受試者中。在一些實施方式中，包含經修飾RNA的藥物組成物或藥物配製物可以藉由導致受試者有效治療的任何適當途徑給予，即給藥導致遞送至受試者的期望位置或組織，其中至少一部分由經修飾RNA表現的蛋白質位於期望的靶組織或靶細胞位置處。

[0172] 可以肌內、經動脈、腹膜內、靜脈內、動脈內、皮下、心室內、皮內、心內、經心外膜，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或直接給予到待治療的區域中進行給藥。藥物組成物係針對每種給予途徑特別配製的，得到給藥特異性藥物配製物。

[0173] 本文使用的術語“組成物”通常被理解為構成某物的至少兩個部分或元素的組合。例如，本文使用的組成物通常包含根據本揭露的至少一種多核苷酸、主要構建體或經修飾RNA以及合適的載體或賦形劑。

[0174] 術語“包含”、“具有”和“包括”係開放式連接動詞。該等動詞中的一個或多個的任何形式或時態例如“包含 (comprises)”、“包含 (comprising)”、“具有 (has)”、“具有 (having)”、“包括 (includes)”和“包括 (including)”也是開放式的。例如，“包含”、“具有”或“包括”一個或多個步驟的任何方法不限於僅具有那一個或多個步驟，並且還可以涵蓋其他未列出的步驟。類似地，“包含”、“具有”或“包括”一個或多個特徵的任何組成物不限於僅具有那一個或多個特徵

並且可以涵蓋其他未列出的特徵。在此描述的所有方法可以按任何適合的順序進行，除非在此另外指示或明顯地與上下文矛盾。本文關於某些實施方式提供的任何和所有實例或示例性語言（例如“例如”）的應用僅旨在更好地說明本揭露，而不對另外要求保護的本揭露範圍做出限制。說明書中的語言不應當被解釋為指示任何未要求保護的要素為實踐本揭露所必需的。

[0175] 術語“基本上由.....組成”將申請專利範圍的範圍限制於指定的材料或步驟“以及實質上不影響（要求保護的發明的）一個或多個基本和新穎特徵的那些”。關於*Herz*，537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463（CCPA 1976）（原文中的重點）（先前技術的液壓流體需要一分散劑，上訴人認為其被排除在限於“基本上由（某些部件）組成”的功能流體的申請專利範圍之外。

[0176] 術語“由.....組成”係指如在此所述的組成物、方法、及其對應的組分，其排除在該實施方式的這個說明中沒有描述的任何要素。

[0177] 術語“疾病”或“障礙”在本文中可互換使用，並且是指身體或一些器官狀態的任何交替，中斷或干擾功能的表現和/或引起患病的人或與人接觸的那些諸如不適、功能障礙、危難、或甚至死亡的症狀。疾病或障礙也可與瘟熱、病態（ailing）、小病（ailment）、病疾（malady）、患病（sickness）、病（illness）、抱怨、不舒服或感染有關。

[0178] 如本文使用的，術語“對VEGF-A療法有反應的疾病”係指在給予包含VEGF-A蛋白的藥物組成物或藥物配製物或能夠產生VEGF-A蛋白的試劑例如本文揭露的經修飾RNA之後顯示一種或多種症狀或臨床標誌物的改善的障礙。可替代地，如果給予包含VEGF-A蛋白的藥物組成物或藥物配製物或能夠產生VEGF-A蛋白的試劑會減少或停止疾病的進展，則該疾

病對VEGF-A療法係“有反應的”。有益或所希望的臨床結果包括但不限於一個或多個症狀緩解、疾病程度減輕、疾病狀態穩定化（即未惡化）、疾病進展延遲或減緩、疾病狀態改善或緩和、以及減輕（無論是部分減輕還是全部減輕）。

[0179] 如本文使用的，術語“二價陽離子”係指具有正價2的離子物質。例如，鎂離子 Mg^{2+} 和鈣離子 Ca^{2+} 係二價陽離子。

[0180] “劑型”係其中產生和分配藥物（例如，經修飾RNA）的物理形式，例如片劑（包衣、延遲釋放、可分散等）、膠囊、軟膏、或注射劑（粉末、溶液）。

[0181] 短語“藥物產品”係指通常含有活性藥物成分（例如經修飾RNA）但不一定與非活性成分相關聯的成品劑型，例如片劑、膠囊、溶液等。

[0182] 本文使用的術語“有效量”係指足以減少疾病或障礙的至少一種或多種症狀或提供期望的效果的治療劑（例如修飾的RNA）、藥物組成物或藥物配製物的量。例如，當給予具有心血管病症或者其他疾病或障礙的典型受試者時，該量可以是影響與心臟功能障礙或其他障礙相關的症狀或臨床標誌物的治療性或預防性顯著降低的量。

[0183] 如本文使用的，核酸序列的“表現”係指以下事件中的一個或多個：（1）從DNA序列產生RNA模板（例如藉由轉錄）；（2）RNA轉錄物的加工（例如藉由剪接、編輯、5'帽形成和/或3'末端加工）；（3）將RNA翻譯成多肽或蛋白質；和（4）多肽或蛋白質的翻譯後修飾。

[0184] 本文使用的術語“配製物”或“藥物配製物”係指包含含有活性藥物成分（例如經修飾RNA）以及藥學上可接受的載體/稀釋劑/賦形劑的藥物混合物或溶液且適合於經由特定給藥途徑給予哺乳動物（例如，

有需要的人)的組成物類型。例如,本文使用的“配製物”可被特別配製成包括適合的遞送劑和/或其他藥學上可接受的載體,以用於經由多種途徑諸如經由肌內、皮內、皮下或心內途徑中的一種或多種,通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管、和/或藉由直接給予到待治療的區域來給予。“配製物”因此可以被理解為特別配製用於特定給藥途徑的組成物。配製物可以是以特定劑型存在的組成物。

[0185] 如本文使用的,術語“經修飾RNA”係指與腺苷(A)((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-胺基-9*H*-嘌呤-9-基)-5-(羥基甲基)氧雜戊環-3,4-二醇)、鳥苷(G)(2-胺基-9-[3,4-二羥基-5-(羥基甲基)氧雜戊環-2-基]-3*H*-嘌呤-6-酮)、胞苷(C)(4-胺基-1-[3,4-二羥基-5-(羥基甲基)四氫呋喃-2-基]嘧啶-2-酮)和尿苷(U)(1-[(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-二羥基-5-(羥基甲基)氧雜戊環-2-基]嘧啶-2,4-二酮)相比,或與RNA分子中的AMP、GMP、CMP和UMP或其一部分相比,包含一處、兩處或多於兩處核苷修飾的RNA分子。在本說明書的其他地方提供了核苷修飾的非限制性實例。另外,當特定要求保護的RNA的核苷酸序列與天然存在的RNA分子的序列相同時,經修飾RNA被理解為係具有與天然對應物存在的那些不同的至少一處修飾的RNA分子。差異可在於核苷/核苷酸的化學變化或序列內該變化的位置。在一個實施方式中,經修飾RNA係經修飾的信使RNA(或“經修飾的mRNA”)。

[0186] 如本文使用的,術語“調節生理過程”係指活生物及其部分如細胞或組織的不同功能和物理或化學操作的調節。例如,對於其中VEGF-A起著核心作用的生理過程,調節可以包括誘導血管生成、刺激血管細胞增殖、增加心外膜衍生的先驅細胞的增殖和/或改變心外膜衍生的先驅細胞的命運、上調內皮化、誘導心臟再生、增加組織移植物的血管再生以用於傷口癒合、改善血管功能、增加組織灌注和新血管形成、減少瘢痕組

織、增加前負荷補充搏功（PRSW）、增加最高壓發展、增加肌力功能、增加左心室射血分數（LVEF）、減少與心臟功能障礙相關的生物標誌物（例如，NT-proBNP，BNP，hsTnT和hsTnI）水平、減少梗塞尺寸、減少心臟組織的纖維化和/或改善心臟功能。

[0187] 如本文使用的，術語“核酸”在其最廣泛的意義上包括包含藉由磷酸二酯鍵連接的核苷酸聚合物的任何化合物和/或物質。該等聚合物通常稱為寡核苷酸或多核苷酸，這取決於大小。術語“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”在本文中也可互換使用。

[0188] 本文使用的短語“藥學上可接受的”係指在合理的醫學判斷的範圍，適合用於與人類和動物的組織接觸而不產生過度毒性、刺激、過敏反應、或其他問題或併發症，同時具有相稱的合理受益/風險比的那些化合物、材料、組成物、和/或劑型。藥物審批機構（例如EMA，US-FDA）提供指導並審批藥學上可接受的化合物、材料、組成物和/或劑型。實例可列在藥典中。

[0189] 術語“藥學上可接受的賦形劑”在本文中用於指代選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物的藥學上可接受的物質。在一些實施方式中，該溶劑係水性溶劑。

[0190] 如本文使用的，“多肽”意指很多時候由肽鍵連接在一起的胺基酸殘基（天然或非天然的）的聚合物。如本文使用的，該術語係指具有任何大小、結構或功能的蛋白質、多肽以及肽。多肽可以是單分子或者可以是多分子複合物，如二聚體、三聚體或四聚體。它們還可以包含單股或多股多肽例如抗體或胰島素，並且可以締合或連接。最常見的二硫鍵

見於多股多肽中。術語多肽還可以適用於胺基酸聚合物，其中一個或多個胺基酸殘基係相應的天然存在的胺基酸的一種人工化學類似物。

[0191] 如本文使用的，“蛋白質”係基本上由20個胺基酸中的任何胺基酸組成的聚合物。雖然“多肽”通常用於提及相對較大的多肽，而“肽”通常用於提及小多肽，但本領域中該等術語的使用重疊並且是變化的。本文中術語“肽”、“蛋白質”和“多肽”有時可以互換使用。

[0192] 如本文使用的，術語“重組體”係指藉由使用已經藉由引入“異源核酸”或改變天然核酸進行遺傳操作的核酸，蛋白質從原核或真核表現系統衍生。

[0193] 術語“統計學上顯著”或“顯著”係指統計學顯著性。這個術語係指統計學證據表明有差異。當零假設實際為真時，可以將其定義為作出拒絕零假設的決策的概率。通常使用p值進行決策。可以使用本領域眾所周知的具有顯著重要性的任何其他量度。

[0194] 術語“受試者”和“個體”在本文中可互換使用，並且是指用此處所述的方法和組成物向其提供治療（包括預防性治療）的動物，例如人。對於治療對特定的動物如人類受試者係特異性的那些病症或疾病狀態，術語受試者係指該特定的動物。

[0195] 術語“基本上不含”係指其中組成物或配製物不具有顯著量的特定元素的情況。例如，“基本上不含”二價陽離子的組成物或配製物含有很少或沒有二價陽離子。

[0196] 如本文使用的，“患有”疾病、障礙、和/或病症的受試者或個體已經診斷為或顯示出疾病、障礙、和/或病症的一種或多種症狀。在一些實施方式中，受試者可有患疾病、障礙和/或病症的風險。

[0197] 術語“組織”係指一起執行某些特定功能的類似特化細胞

的組或層。術語“組織特異性”係指來自特定組織的細胞的來源或定義特徵。

[0198] 如本文使用的，術語“治療（treat或treatment或treating）”係指治療性治療，其中目的是預防或減緩疾病的發展，例如減緩心臟疾病的發展，或減少血管病症、疾病或障礙（例如以不充分或不期望的心臟功能為特徵的任何障礙）的至少一種不利影響或症狀。

[0199] 應當理解的是，本揭露不限於在此所述的特定方法、方案、以及試劑等等，並且本身可以變化。在此所使用的術語的目的僅在於描述特定的實施方式，並且不意在限制本揭露的範圍，本揭露的範圍僅由申請專利範圍限定。

5.2.編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA

[0200] 它在治療劑、診斷劑、試劑和生物測定能夠在細胞內（無論是體外、體內、原位或離體）遞送核酸例如核糖核酸（RNA）例如以引起核酸的細胞內翻譯和所編碼的感興趣多肽的產生的領域中具有極大意義。

[0201] 天然存在的RNA由四種鹼基核糖核苷酸：ATP、CTP、UTP和GTP合成，但可含有轉錄後修飾的核苷酸。此外，已經在RNA中鑒定了大約一百種不同的核苷修飾（羅森希（Rozenski），J，克雷恩（Crain），P和麥克洛斯基（McCloskey），J，RNA修飾數據庫（The RNA Modification Database）：1999更新，核酸研究（Nucl Acids Res），（1999）27：196-197）。

[0202] 根據本揭露，較佳的是修飾該等RNA以避免本領域其他RNA分子的缺陷（例如，啟動先天免疫應答並在給予時快速降解）。因此，該等多核苷酸被稱為經修飾RNA。在一些實施方式中，經修飾RNA在給予受試者時避免了先天免疫應答。在一些實施方式中，與未經修飾RNA相比，

經修飾RNA的半衰期延長。

[0203] 在較佳的實施方式中，該RNA分子係信使RNA (mRNA)。如本文使用的，術語“信使RNA” (mRNA) 係指編碼感興趣的多肽並且能夠體外、體內、原位或離體翻譯產生所編碼的感興趣多肽的任何多核苷酸。

[0204] 如圖1A所示，傳統上，mRNA分子的基本組分至少包括編碼區、5'非翻譯區 (UTR)、3'非翻譯區 (UTR)、5'帽和聚(A)尾。基於這種野生型模組化結構，本揭露藉由提供保持模組化組織但包含一個或多個賦予多核苷酸有用性質的結構修飾和/或化學修飾或者改變 (在一些實施方式中，包括缺乏對細胞 (其中引入多核苷酸) 的先天免疫應答的實質誘導) 的多核苷酸或初級RNA構建體來擴展傳統mRNA分子的功能範圍。

[0205] 經修飾RNA可以包括相對於標準RNA核苷酸股，對例如糖、核鹼基 (例如，核鹼基的一個或多個修飾，例如藉由用視情況取代的胺基、視情況取代的硫基、視情況取代的烷基 (例如甲基或乙基) 或鹵素 (例如氯或氟) 替換或取代嘧啶核鹼基的原子)) 或核苷間鍵 (例如，對磷酸二酯骨架的一個或多個修飾) 的任何有用的修飾。經修飾RNA可視情況包括其他試劑 (例如RNAi誘導劑、RNAi試劑、siRNA、shRNA、miRNA、反義RNA、核酶、催化DNA、tRNA、誘導三螺旋形成的RNA、適配體、載體等)。

[0206] 美國專利申請公開案號2014/0073687揭露了具有若干有用修飾的示例性的經修飾RNA，該等修飾例如至少一個或多個選自以下項的經修飾的核苷：5-甲基胞苷 (5mC)、N6-甲基腺苷 (m6A)、3,2'-O-二甲基尿苷 (m4U)、2-硫尿苷 (s2U)、2'-氟尿苷、假尿苷、2'-O-甲基尿苷 (Um)、2'去氧尿苷 (2'dU)、4-硫尿苷 (s4U)、5-甲基尿苷 (m5U)、2'-O-甲基腺苷

(m6A)、N6,2'-O-二甲基腺苷(m6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基腺苷(m62Am)、2'-O-甲基胞苷(Cm)、7-甲基鳥苷(m7G)、2'-O-甲基鳥苷(Gm)、N2,7-二甲基鳥苷(m-2,7G)、N2,N2,7-三甲基鳥苷(m-2,2,7G)。在2014年10月7日提交的美國專利申請公開案號2015/0051268和2014年2月3日提交的美國專利案號9,061,059中描述了另外的修飾。因此，該等修飾全部藉由引用以其全部內容結合在此。本文描述了其他修飾。

[0207] 作為非限制性實例，在一些實施方式中，經修飾RNA可包括例如經修飾以形成N1-甲基-假UMP的至少一個一磷酸尿苷(UMP)。在一些實施方式中，N1-甲基-假UMP代替UMP，以0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的UMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有UMP已經被N1-甲基-假UMP替代。

[0208] 在一些實施方式中，經修飾RNA可以(進一步)包括例如經修飾以形成甲基-CMP的至少一個一磷酸胞苷(CMP)。在一些實施方式中，甲基-CMP代替CMP，以選自0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的CMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有CMP已經被5-甲基-CMP替代。

[0209] 在一些實施方式中，經修飾RNA可以(進一步)包括例如經修飾以形成N6-甲基-AMP的至少一個一磷酸腺苷(AMP)。在一些實施方式中，N6-甲基-AMP代替AMP，以選自0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的AMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有AMP已經被N6-甲基-AMP替代。

[0210] 在一些實施方式中，經修飾RNA可以（進一步）包括例如經修飾以形成7-甲基-GMP的至少一個一磷酸鳥苷（GMP）。在一些實施方式中，7-甲基-GMP代替GMP，以選自0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的GMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有GMP已經被7-甲基-GMP替代。

[0211] 在一些實施方式中，經修飾RNA可以（進一步）包括例如選自以下項的至少一個或多個經修飾的核苷：5-甲基胞苷（5mC）、N6-甲基腺苷（m6A）、3,2'-O-二甲基尿苷（m4U）、2-硫尿苷（s2U）、2'-氟尿苷、假尿苷、2'-O-甲基尿苷（Um）、2'去氧尿苷（2'dU）、4-硫尿苷（s4U）、5-甲基尿苷（m5U）、2'-O-甲基腺苷（m6A）、N6,2'-O-二甲基腺苷（m6Am）、N6,N6,2'-O-三甲基腺苷（m62Am）、2'-O-甲基胞苷（Cm）、7-甲基鳥苷（m7G）、2'-O-甲基鳥苷（Gm）、N2,7-二甲基鳥苷（m-2,7G）、N2,N2,7-三甲基鳥苷（m-2,2,7G）以及N1-甲基-假尿苷，或其任何組合。每種可能性和組合代表本揭露獨立的實施方式。

[0212] 在一些實施方式中，經修飾RNA包含對5'帽的修飾，例如5'二鳥苷帽。在一些實施方式中，經修飾RNA包含對編碼區的修飾。在一些實施方式中，經修飾RNA包含對5'UTR的修飾。在一些實施方式中，經修飾RNA包含對3'UTR的修飾。在一些實施方式中，經修飾RNA包含對聚(A)尾的修飾。在一些實施方式中，經修飾RNA包含對編碼區、5'帽、5'UTR、3'UTR或聚(A)尾的修飾的任何組合。在一些實施方式中，經修飾RNA可視情況用鹼性磷酸酶處理。

[0213] 在一些實施方式中，經修飾RNA編碼血管內皮生長因子（VEGF）多肽，即一般在控制心血管生理功能中（並且特別在動脈生成中）

起核心作用的VEGF蛋白的大家族中的任何一個（福爾摩斯（Holmes）DI等人，基因組生物學（Genome Biol.），（2005）6（2）：209）。VEGF的作用還包括一氧化氮（NO）傳訊的啟動、血管通透性、發育性和產後血管生成、腫瘤血管生成、動脈生成、內皮細胞複製以及多潛能心血管先驅細胞的細胞命運轉變。

[0214] 熟習該項技術者將理解，對於任何特定的VEGF基因，可存在一種或多種變體或同功型。根據本揭露的VEGF-A多肽的非限制性實例列於表1中。熟習該項技術者將理解，表1中揭露的序列含有潛在的側翼區。該等在每個核苷酸序列中編碼到開放閱讀框的5'（上游）或3'（下游）。藉由教示核苷酸參考序列明確且具體地揭露了開放閱讀框。還可以藉由利用一個或多個可用數據庫或演算法來進一步表徵5'和3'側翼區。數據庫已經注釋了包含在NCBI序列的側翼區中的該等特徵，並且該等在本領域中係可用的。

表1：智人VEGF-A mRNA同功型。

描述	NM參考	NP參考
智人血管內皮生長因子A（VEGF-A），轉錄變體1，mRNA	NM_001171623.1	NP_001165094.1
智人血管內皮生長因子A（VEGF-A），轉錄變體1，mRNA	NM_001025366.2	NP_001020537.2
智人血管內皮生長因子A（VEGF-A），轉錄變體2，mRNA	NM_001171624.1	NP_001165095.1
智人血管內皮生長因子A（VEGF-A），轉錄變體2，mRNA	NM_003376.5	NP_003367.4
智人血管內皮生長因子A（VEGF-A），轉錄變體3，mRNA	NM_001171625.1	NP_001165096.1
智人血管內皮生長因子A（VEGF-A），轉錄變體3，mRNA	NM_001025367.2	NP_001020538.2

智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體4, mRNA	NM_001171626.1	NP_001165097.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體4, mRNA	NM_001025368.2	NP_001020539.2
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體4, mRNA	NM_001317010.1	NP_001303939.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體5, mRNA	NM_001171627.1	NP_001165098.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體5, mRNA	NM_001025369.2	NP_001020540.2
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體6, mRNA	NM_001171628.1	NP_001165099.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體6, mRNA	NM_001025370.2	NP_001020541.2
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體7, mRNA	NM_001171629.1	NP_001165100.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體7, mRNA	NM_001033756.2	NP_001028928.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體8, mRNA	NM_001171630.1	NP_001165101.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體8, mRNA	NM_001171622.1	NP_001165093.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體9, mRNA	NM_001204385.1	NP_001191314.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體9, mRNA	NM_001204384.1	NP_001191313.1
智人血管內皮生長因子 A (VEGF-A), 轉錄變體10, mRNA	NM_001287044.1	NP_001273973.1

[0215] 熟習該項技術者將理解，可以根據表1中列出的VEGF-A mRNA同功型設計編碼VEGF-A多肽例如人VEGF-A多肽的RNA分子。熟習該項技術者通常熟悉剩餘VEGF家族成員的多種同功型。

[0216] 在一個實施方式中，本揭露提供編碼VEGF-A多肽（例如 SEQ ID NO:2）的經修飾RNA。在一些實施方式中，經修飾RNA編碼VEGF-A多肽，其中經修飾RNA包含SEQ ID NO:1。在一些實施方式中，經修飾RNA還包含5'帽、5'UTR、3'UTR、聚(A)尾或其任何組合。在一些實施方式中，5'帽、5'UTR、3'UTR、聚(A)尾或其任何組合可以包括一個或多個經修飾的核苷酸。

[0217] 在一些實施方式中，編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA可以具有如圖1B所描繪的結構，其為SEQ ID NO:1。

[0218] 在一些實施方式中，經修飾RNA編碼VEGF多肽，其中經修飾RNA包含SEQ ID NO:1的核酸序列內的一個或多個經修飾的UMP核苷酸。在一些實施方式中，編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA可以包括，例如，至少一個UMP被修飾以形成N1-甲基-假UMP。在一些實施方式中，N1-甲基-假UMP代替UMP，以選自0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的UMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有UMP已經被N1-甲基-假UMP替代。

[0219] 在一些實施方式中，經修飾RNA編碼VEGF多肽，其中經修飾RNA（進一步）包含SEQ ID NO:1的核酸序列內的一個或多個CMP修飾的核苷酸。在一些實施方式中，編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA可以包括，例如，至少一個CMP被修飾以形成甲基-CCP。在一些實施方式中，甲基-CMP代替CMP，以選自0.1%、2%、3%、4%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的CMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有CMP已經被5-甲基-CMP替代。

[0220] 在一些實施方式中，經修飾RNA編碼VEGF多肽，其中經修飾RNA（進一步）包含SEQ ID NO：1的核酸序列內的一個或多個AMP修飾的核苷酸。在一些實施方式中，編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA可以包括，例如，至少一個AMP被修飾以形成N6-甲基-AMP。在一些實施方式中，N6-甲基-AMP代替AMP，以選自0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的AMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有AMP已經被N6-甲基-AMP替代。

[0221] 在一些實施方式中，經修飾RNA編碼VEGF多肽，其中經修飾RNA（進一步）包含SEQ ID NO：1的核酸序列內的一個或多個經修飾的GMP核苷酸。在一些實施方式中，經修飾RNA可以包括，例如，至少一個GMP被修飾以形成7-甲基-GMP。在一些實施方式中，7-甲基-GMP代替GMP，以選自0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%和100%的GMP百分比存在於序列中。在一些實施方式中，所有GMP已經被7-甲基-GMP替代。

[0222] 在一些實施方式中，經修飾RNA編碼VEGF多肽，其中經修飾RNA（進一步）包含SEQ ID NO：1的核酸序列內的一個或多個經修飾的核苷酸。在一些實施方式中，編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA可以包括例如選自以下項的至少一個或多個經修飾的核苷：5-甲基胞苷（5mC）、N6-甲基腺苷（m6A）、3,2'-O-二甲基尿苷（m4U）、2-硫尿苷（s2U）、2'-氟尿苷、假尿苷、2'-O-甲基尿苷（Um）、2'去氧尿苷（2'dU）、4-硫尿苷（s4U）、5-甲基尿苷（m5U）、2'-O-甲基腺苷（m6A）、N6,2'-O-二甲基腺苷（m6Am）、N6,N6,2'-O-三甲基腺苷（m62Am）、2'-O-甲基胞苷（Cm）、7-甲基鳥苷（m7G）、

2'-O-甲基鳥苷 (Gm)、N2,7-二甲基鳥苷 (m-2,7G)、N2,N2,7-三甲基鳥苷 (m-2,2,7G) 以及N1-甲基-假尿苷，或其任何組合。每種可能性和組合代表本揭露獨立的實施方式。

5.3.包含經修飾RNA的組成物

[0223] 一些實施方式涉及包含揭露的經修飾RNA的組成物，包括特定配製物。在一些實施方式中，配製物包含藥學上有效量的一種或多種經修飾RNA。

[0224] 在一些實施方式中，藥物組成物可包含基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）中的至少一種或多種經修飾RNA。通常，脂質體、脂質複合物或脂質奈米粒子可用於改善多核苷酸、初級構建體或經修飾RNA定向的蛋白質生產的功效，因為該等配製物可能能夠藉由多核苷酸、初級構建體或經修飾RNA增加細胞轉染；和/或增加編碼蛋白的翻譯。一個這樣的實例涉及使用脂質包封來實現多聚複合物質粒DNA的有效系統遞送（海斯（Heyes）等人，分子療法（Mol Ther.）（2007）15：713-720；藉由引用以其全部內容結合在此）。脂質體、脂質複合物或脂質奈米粒子也可用於增加多核苷酸、初級構建體或經修飾RNA的穩定性。

[0225] 因此，在一些實施方式中，經修飾RNA的藥物組成物包括脂質體。脂質體係人工製備的囊泡，其主要可以由脂質雙層組成，並且可以用作給予營養物和藥物配製物的遞送運載體。脂質體可以具有不同的大小，例如但不限於直徑可以是數百奈米並且可以含有由狹窄水性區室隔開的一系列同心雙層的多層囊泡（MLV）、直徑可以小於50 nm的小單室囊泡（SUV）、以及直徑可以在50和500 nm之間的大單層囊泡（LUV）。脂質體設計可以包括但不限於調理素或配位基，以改善脂質體與不健康組織的連接或以便啟動事件，例如但不限於胞吞。為了改善藥物組成物的遞送，脂

質體可以含有低或高pH。

[0226] 在一些實施方式中，經修飾RNA的藥物組成物包括脂質複合物，例如但不限於來自靜默治療公司（Silence Therapeutics）（倫敦，英國）的ATUPLEX™系統、DACC系統、DBTC系統和其他siRNA-脂質複合物技術，來自STEMGENT®（劍橋，麻薩諸塞州）的STEMFECT™以及聚乙烯亞胺（PEI）或基於魚精蛋白的靶向和非靶向核酸遞送（阿萊庫（Aleku）等人，癌症研究（Cancer Res.），（2008）68：9788-9798；斯特魯姆柏格（Strumberg）等人，國際臨床藥物治療雜誌（Int J Clin Pharmacol Ther），（2012）50：76-78；桑特爾（Santel）等人，基因療法（Gene Ther.），（2006）13：1222-1234；桑特爾（Santel）等人，基因療法（Gene Ther.），（2006）13：1360-1370；格特比爾（Gutbier）等人，肺病藥物治療（Pulm Pharmacol. Ther.），（2010）23：334-344；考夫曼（Kaufmann）等人，微血管研究（Microvasc Res），（2010）80：286-293；魏德（Weide）等人，免疫治療雜誌（J Immuno Ther.），（2009）32：498-507；魏德（Weide）等人，免疫治療雜誌（J. Immunother.），（2008）31：180-188；帕斯科洛（Pascolo），生物療法的專家意見（Expert Opin. Biol. Ther）4：1285-1294；夫廷-莫雷克澤科（Fotin-Mleczek）等人，免疫治療雜誌（J. Immunother），（2011）34：1-15；宋（Song）等人，自然生物技術（Nature Biotechnol.），（2005）23：709-717；皮爾（Peer）等人，美國國家科學院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.），（2007）6；104：4095-4100；德富熱羅萊（deFougerolles），人類基因療法（Hum Gene Ther.），（2008）19：125-132；所有該等藉由引用以其全部內容結合在此）。

[0227] 在一些實施方式中，經修飾RNA的藥物組成物包括固體脂質奈米粒子。固體脂質奈米粒子（SLN）可以是平均直徑在10至1000 nm之

間的球形。SLN具有可溶解親脂性分子並可用表面活性劑和/或乳化劑穩定的固體脂質核心基質。在另一個實施方式中，脂質奈米粒子可以是自組裝脂質-聚合物奈米粒子(參見張(Zhang)等人，ACS奈米(ACS Nano)，2008，2(8)，第1696-1702頁；藉由引用以其全部內容結合在此)。

[0228] 在美國專利申請公開案號2015/0051268中討論了另外的基於脂質的組成物；將其藉由引用以其全部內容結合在此。因此，在一些實施方式中，根據本揭露的經修飾RNA的藥物配製物如在美國專利申請公開案號2015/0051268中所討論的基於脂質的配製物來配製。

[0229] 在本揭露的一些實施方式中，經修飾RNA的藥物配製物不包括任何基於脂質的複合物(例如脂質體、脂質複合物或脂質奈米粒子)，並且在本文中稱為裸RNA配製物。WO 2012/103985已經提出，裸RNA僅在二價陽離子(較佳的是鈣)的存在下配製時，才能滲透細胞。此外，其他研究已經提出並表明需要鈣來將裸RNA分子引入動物組織體內(沃爾夫(Wolff) J.A.等人，科學(Science)，(1999)，247，1465-1468)。類似地，普羅布斯特(Probst)等人顯示在體內注射裸RNA強烈依賴於注射液中鈣的存在(普羅布斯特(Probst) J.等人，基因療法(Gene Ther.)，(2007) 14，1175-1180)。因此，該等關於將裸RNA遞送到細胞和組織中的研究強烈地提出在配製物中需要鈣。

[0230] 然而，在本揭露的一些實施方式中，用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)緩衝液配製裸的經修飾RNA。例如，經修飾RNA可以用基本上不含二價陽離子的pH 7.4 PBS緩衝液配製。在一些實施方式中，經修飾RNA可以用基本上不含鈣或鎂的pH 7.4 PBS緩衝液配製。在一些實施方式中，經修飾RNA可以用不含鈣或鎂的pH 7.4 PBS緩衝液配製。

[0231] 在一些實施方式中，用檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製裸的經修

飾RNA。例如，經修飾RNA可以用基本上不含二價陽離子的pH 7.0檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製。在一些實施方式中，經修飾RNA可以用基本上不含鈣或鎂的pH 7.0檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製。在一些實施方式中，經修飾RNA可以用不含鈣或鎂的pH 7.0檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製。例如，可以用pH 7.0檸檬酸鹽鹽水緩衝液（含有10 mmol/L檸檬酸鹽、130 mmol/L氯化鈉，於Hyclone水中）配製經修飾RNA，其中檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0232] 在一些實施方式中，用胺丁三醇（THAM）緩衝液配製裸的經修飾RNA。例如，經修飾RNA可以用基本上不含二價陽離子的pH 8.0 THAM緩衝液配製。在一些實施方式中，經修飾RNA可以用基本上不含鈣或鎂的THAM緩衝液配製。在一些實施方式中，經修飾RNA可以用不含鈣或鎂的pH 8.0 THAM緩衝液配製。例如，經修飾RNA可以用pH 8.0 THAM緩衝液（胺丁三醇AKA 2-胺基-2-(羥甲基)-1,3-丙二醇，300 mmol/L Tris-HCl）配製，其中THAM緩衝液不含鈣或鎂。

[0233] 在一些實施方式中，當適合於所希望的具體劑型時，裸RNA藥物配製物可以另外包含藥學上可接受的賦形劑，其如本文使用的，包括但不限於任何和所有溶劑、分散介質、稀釋劑或其他液體運載體、分散體或懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑等。賦形劑還可以包括但不限於聚合物、核-殼奈米粒子、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、奈米粒子類比物及其組合。用於配製藥物組成物的各種賦形劑和用於製備組成物的技術係本領域已知的（參見雷明頓：藥學科學與實踐（Remington: The Science and Practice of Pharmacy），第22版，艾倫（Allen），勞埃德（Lloyd）V.，Jr編輯，醫藥出版社（Pharmaceutical Press）；藉由引用以其全部內容結合在此）。可以在本揭露的範圍內考慮使用常規賦形劑介質，除非任何常規的賦形劑介質可能與一種物質或其衍生物不相容，例如

藉由產生任何不期望的生物效應或另外以有害的方式與藥物組成物的一種或多種任何其他組分相互作用。

[0234] 在一些實施方式中，裸RNA配製物包含藥學上有效量的一種或多種經修飾RNA，其中該配製物包含磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液，並且還包含藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。在一些實施方式中，該溶劑係水性溶劑。在一些實施方式中，該溶劑係非水性溶劑。

[0235] 在一些實施方式中，裸RNA配製物包含藥學上有效量的一種或多種經修飾RNA，其中該配製物包含THAM緩衝液，並且還包含藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。在一些實施方式中，該溶劑係水性溶劑。

[0236] 在一些實施方式中，裸RNA配製物包含藥學上有效量的一種或多種經修飾RNA，其中該配製物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液，並且還包含藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。在一些實施方式中，該溶劑係水性溶劑。

[0237] 在某些實施方式中，包含根據本揭露的經修飾RNA的配製物處於基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）、磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中，濃度在0.1

和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間。在一些實施方式中，將包含根據本揭露的經修飾RNA的配製物配製於基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）、磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中，濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間。在一些實施方式中，將包含根據本揭露的經修飾RNA的配製物配製於基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）、磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中，濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間。

[0238] 在較佳的實施方式中，包含根據本揭露的經修飾RNA的裸RNA配製物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。

[0239] 在一些實施方式中，與基於脂質的配製物相比，配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的包含編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA的裸RNA配製物對受試者的毒性更低。

5.4.治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者

[0240] 具有VEGF-A表現不足的受試者可患有許多血管疾病，包括但不限於具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭、腎臟疾病、涉及皮膚移植和組織移植的疾病、MI後心臟功能障礙、缺血性心臟病、來自創傷或手術的血管損傷、包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍、嚴重肢體缺血、肺性高血壓和外周動脈疾病。本揭露的目的是藉由直接給予編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA分子來治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者。在一些實施方式中，裸VEGF-A RNA係在沒有脂質和鈣的檸檬酸鹽鹽

水緩衝液中給予受試者。

[0241] 通常，引入細胞中的外源性核酸誘導先天免疫應答，導致干擾素（IFN）產生和細胞死亡。然而，經修飾RNA已經克服了該等問題中的至少一些，並且對治療劑、診斷劑、試劑和生物測定在細胞內（無論是體內或離體）遞送核酸例如核糖核酸（RNA）例如以引起核酸的細胞內翻譯和所編碼的蛋白質的產生具有極大意義。

[0242] 經修飾RNA和從本文所述的經修飾RNA翻譯的蛋白質可用作治療劑。例如，此處所述的經修飾RNA可以給予受試者，其中經修飾RNA被翻譯以產生受試者中任何VEGF家族成員的治療性蛋白質或其片段。提供了用於治療人和其他哺乳動物中的疾病或病症的方法。此處所述的針對VEGF-A的所有配製物可以與任何其他VEGF家族成員一致地使用。

[0243] 在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的組成物和特定配製物可用於治療以下疾病，諸如具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭、腎臟疾病、涉及皮膚移植和組織移植的疾病、MI後心臟功能障礙、缺血性心臟病、來自創傷或手術的血管損傷、包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍、治癒傷口如撕裂、嚴重肢體缺血、肺性高血壓和外周動脈疾病。

[0244] 在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療MI後心臟功能障礙。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療缺血性心臟病。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療外傷或手術中的血管損傷。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的

一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於傷口治癒，例如治癒撕裂。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於嚴重肢體缺血。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療肺性高血壓。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療外周動脈疾病。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療腎臟疾病。在一些實施方式中，包含編碼VEGF-A多肽的一種或多種經修飾RNA的配製物可用於治療涉及皮膚移植和組織移植的疾病。

[0245] 本揭露的其他方面涉及將包含經修飾RNA的配製物給予有需要的受試者。可以肌內、經動脈、腹膜內、靜脈內、動脈內、皮下、心室內、皮內、心內、經心外膜，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或直接給予到待治療的區域中進行給藥。

[0246] 然而，本揭露還涵蓋藉由考慮到藥物遞送科學中可能進展的任何適當途徑來遞送裸的經修飾RNA分子或經修飾RNA複合物和/或其藥物、預防或診斷配製物。

[0247] 作為非限制性實例，在一些實施方式中，向受試者給予根據本發明的配製物係經肌內、皮內、皮下、心內或心外膜途徑，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或藉由直接給予到待治療的區域。在一些實施方式中，將配製物肌內給予該受試者。在一些實施方式中，將配製物皮內給予該受試者。在一些實施方式中，將配製物皮下給予該受試者。

[0248] 在一些實施方式中，向受試者給予該配製物係經心內進行，較佳的是以固定劑量以多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予來給予。在一些實施方式中，向受試者給予該配製物係通過門靜脈導管進行，較佳的是以固定劑量以多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予來給予。在一些實施方式中，向受試者給予該配製物係通過冠狀竇導管進行，較佳的是以固定劑量以多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予來給予。例如，向受試者給予該配製物係藉由直接給予到待治療的區域進行，較佳的是以固定劑量以多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予來給予。例如，向受試者給予該配製物係藉由在開放性心臟手術期間直接注射到損傷區域進行，較佳的是以固定劑量以多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予來給予。例如，在經歷冠狀動脈旁路移植（CABG）的患者中，向該患者給予該配製物係從心臟的外側進行，較佳的是以固定劑量以多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次) 給予來給予。在本段的每個實施方式中，“多次給予”可以彼此間隔短的(1-5分鐘)、中等(6-30分鐘)或長(超過30分鐘，數小時或甚至數天)的時間間隔。

[0249] 可以使用對治療疾病、障礙和/或病症有效的任何給予量將配製物給予受試者。根據受試者的物種、年齡、和一般狀況、疾病的嚴重性、特定配製物、其給予方式、其活動模式等，所需的確切量將根據受試者的不同而不同。然而，將理解的是，配製物的總每日用量可由主治醫師在合理的醫學判斷範圍內決定。對於任何特定患者的特定藥學有效劑量水平將取決於多種因素，包括正在治療的疾病和疾病的嚴重性；所採用的特定化合物的活性；所採用的特定配製物；患者的年齡、體重、總體健康狀況、性別及飲食；給藥時間、給藥途徑、以及採用的特定化合物的排泄率；治療的持續時間；與所採用的特定化合物組合使用或同時使用的藥物（例如，經修飾RNA）；以及醫療領域公知的類似因素。

[0250] 在某些實施方式中，將根據本揭露的配製物給予受試者，其中該配製物包含基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）。在其他實施方式中，將裸的經修飾RNA在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中進行給予。在其他實施方式中，在不存在二價陽離子（包括鈣）的情況下給予裸的經修飾RNA。在較佳的實施方式中，用於心內或皮內給予的包含經修飾RNA的配製物被配製在不含鈣或鎂的檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸

鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。

[0251] 在某些實施方式中，可以按照足以遞送每天約0.0001 mg/kg至約100 mg/kg、從約0.001 mg/kg至約0.05 mg/kg、從約0.005 mg/kg至約0.05 mg/kg、從約0.001 mg/kg至約0.005 mg/kg、從約0.05 mg/kg至約0.5 mg/kg、從約0.01 mg/kg至約50 mg/kg、從約0.1 mg/kg至約40 mg/kg、從約0.5 mg/kg至約30 mg/kg、從約0.01 mg/kg至約10 mg/kg、從約0.1 mg/kg至約10 mg/kg、或從約1 mg/kg至約25 mg/kg經修飾RNA/受試者體重的劑量水平給予根據本發明的配製物，每天一次或多次，以獲得所期望的治療或預防效果。可以每天三次、每天兩次、每天一次、每隔一天、每三天、每週一次、每兩週一次、每三週一次、每四週一次或作為單一劑量一次，以單次劑量或多次給藥，在24小時時間內按秒、分鐘或小時給予所需劑量。在某些實施方式中，所需劑量可以使用多次給藥進行遞送（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次給藥）。

[0252] 在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按固定劑量水平給予。例如，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量給予約0.1 mg至約1 mg的固定劑量水平。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量給予約1 mg至約10 mg的固定劑量水平。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量給予約10 mg至約25 mg的固定劑量水平。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量給予約25 mg至約50 mg的固定劑量水平。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量給予約50 mg至約100 mg的固定劑量水平。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量給予約0.1至約25 mg的固定劑量

水平。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按固定劑量給予，較佳的是多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予。例如，在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量0.1 mg固定劑量給予，較佳的是多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量1 mg固定劑量給予，較佳的是多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量10 mg固定劑量給予，較佳的是多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量25 mg固定劑量給予，較佳的是多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量50 mg固定劑量給予，較佳的是多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予。在一些實施方式中，根據本揭露的配製物可以按每次給藥或每個總劑量100 mg

固定劑量給予，較佳的是多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予。

[0253] 在一些實施方式中，將根據本揭露的配製物給予受試者，其中與基於脂質的配製物相比，配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的包含編碼 VEGF-A 多肽的裸的經修飾 RNA 的配製物對受試者的毒性更低。根據本揭露的配製物中歸因於 RNA 遞送的毒性的評估可以藉由本領域熟知的方法進行評價。例如，陽離子脂質典型包括在 RNA 治療劑的脂質配製物中以改善 RNA 包封和穩定性。然而，一些陽離子脂質可以以劑量依賴的方式破壞膜結構的完整性，引起細胞裂解和壞死，和/或以不期望的方式改變多種基因的表現（薛（Xue）HY，當前藥物設計（Curr Pharm Des.），（2015）21（22）：3140-7；其全部內容藉由引用結合在此）。因此，可以藉由測量歸因於根據本揭露的配製物中 RNA 遞送的細胞裂解和壞死程度和/或多種基因表現的改變來評估毒性實例。在臨床前和臨床水平上，一些脂質複合物的全身劑量依賴性毒性已得到充分記錄。肝臟中庫弗細胞捕獲一些脂質複合物可觸發炎症反應，其可能對肝臟造成損害，並導致主要肝功能指標水平升高。白血球減少症和血小板減少也可發生（張（Zhang）J，先進藥物遞送評論（Adv Drug Deliv Rev.），（2005）57（5）：689-698；其全部內容藉由引用結合在此）。因此，可以藉由測量歸因於根據本揭露的配製物中 RNA 遞送的炎症反應來評估毒性實例。此外，可以藉由測量輸注相關反應如呼吸困難、缺氧、僵硬、背痛、低血壓和肝損傷來評估毒性實例。

[0254] 如果一種或多種症狀或臨床標誌物被減少，則患有血管疾病的受試者對治療“有反應”。可替代地，如果疾病的進展減慢或停止，則治療係起作用的。例如，心臟衰竭（HF）發生在心臟虛弱並且沒有充滿

血液或不能泵足夠的血液以滿足身體對血液和氧氣的需要時。同樣地，患缺血性心臟病（IHD）的患者具有由心臟動脈狹窄引起的心臟問題。當動脈狹窄時，較少血液和氧氣到達心臟肌肉。作為微血管功能障礙、功能性血管喪失和/或心臟組織損失的結果，患者通常會發展MI後心臟功能障礙。此外，血管結構最常因穿透傷或外科手術受損。糖尿病損害傷口癒合的許多成分，並且具有糖尿病性傷口癒合的患者通常由於血管功能障礙而改變血流量。因此，患有包括糖尿病潰瘍的皮膚潰瘍的患者通常具有減少或延遲的癒合。嚴重肢體缺血（CLI）係動脈的嚴重阻塞，其顯著減少向著四肢（手、腳和腿）的血流，並已進展到嚴重疼痛並且甚至皮膚潰瘍、瘡或壞疽的點。肺性高血壓（PH或PHTN）係肺動脈、肺靜脈或肺毛細血管（共同稱為肺血管結構）中血壓升高，導致氣短、眩暈、昏厥、腿部腫脹和其他症狀。外周動脈疾病（PAD）係腿、胃、手臂和頭部的的外周動脈變窄 - 最常見於腿部動脈。基於各種身體檢查常規臨床診斷該等病症，藉由超音波心動圖、血液檢查、磁共振成像（MRI）心電圖和其他合適的測試證實。例如，顯著的血管損傷的診斷有賴於緊密身體檢查和成像測試。因此，如果患者藉由身體檢查顯示較不嚴重的症狀和/或從超音波心動圖、血液檢查、MRI、心電圖或任何其他合適和/或常規檢查得到測試結果改善，則對該等病症中的任何一種的治療在發揮作用。

[0255] 在一些實施方式中，患有血管疾病的受試者患有心肌梗塞。在一些實施方式中，受試者在用本文揭露的配製物治療之前約一個月內遭受心肌梗塞。

[0256] 在一些實施方式中，隨著時間的推移，心肌梗塞觸發心外膜衍生細胞（EPDC）的啟動。在一些實施方式中，在心心肌梗塞後數天（較佳的是在EPDC活化的峰值時期）用本文揭露的配製物對患有心肌梗塞的受

試者進行治療。在一些實施方式中，在心肌梗塞後約7天用本文揭露的配製物對患有心肌梗塞的受試者進行治療。在一些實施方式中，在心肌梗塞後約10天、心肌梗塞後2週、心肌梗塞後3週、或心肌梗塞後6週用本文揭露的配製物對患有心肌梗塞的受試者進行治療。

[0257] 在一些實施方式中，用此處所述的組成物或配製物進行的治療包括治療具有降低的射血分數的心肌梗塞。在其他實施方式中，治療包括治療具有保留的射血分數的心臟衰竭。在一些實施方式中，該組成物或配製物係在健康和梗塞組織之間的邊界區注射。

[0258] 在一些實施方式中，患有血管疾病的受試者還患有冠狀動脈疾病、高血壓、糖尿病、心房顫動、瓣膜性心臟病、心肌病或感染。

[0259] 在一些實施方式中，患有血管疾病的受試者患有左心室功能障礙。在一些實施方式中，受試者具有小於約40%的左心室射血分數（LVEF）。在一些實施方式中，受試者具有小於約45%的LVEF。

[0260] 在一些實施方式中，受試者患有具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭。在一些實施方式中，具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭的受試者被分類為紐約心臟協會功能分類（NYHAFC）指南的II-IV期。

[0261] 在一些實施方式中，受試者有升高水平的指示具有降低或保留的射血分數的心臟衰竭的一種或多種生物標誌物（例如，NT-proBNP、BNP、hsTnT或hsTnI）。在一些實施方式中，受試者具有升高的BNP（b型利尿鈉肽）水平。在一些實施方式中，受試者具有約100 pg/mL的BNP水平。在一些實施方式中，受試者具有約100-300 pg/mL之間的BNP水平。在一些實施方式中，受試者具有約300-600 pg/mL的BNP水平。在一些實施方式中，受試者具有約600 pg/mL的BNP水平。在一些實施方式中，受試者具有約600-900 pg/mL之間的BNP水平。在一些實施方式中，受試者具有升高的

NT-proBNP (n末端pro b型利尿鈉肽) 水平。在一些實施方式中，受試者具有約450 pg/mL的NT-proBNP水平。在一些實施方式中，受試者小於50歲且具有約450 pg/mL的NT-proBNP水平。在一些實施方式中，受試者具有約900 pg/mL的NT-proBNP水平。在一些實施方式中，受試者在約50和75歲之間且具有約900 pg/mL的NT-proBNP水平。在一些實施方式中，受試者具有至少1800 pg/mL的NT-proBNP水平。在一些實施方式中，受試者約75歲且具有約1800 pg/mL的NT-proBNP水平。在一些實施方式中，受試者具有升高的hsTnT (高靈敏度肌鈣蛋白T) 水平。在一些實施方式中，受試者具有升高的hsTnI (高靈敏度肌鈣蛋白I) 水平。

[0262] 在一些實施方式中，受試者在用本文的配製物治療前約一個月內已經遭受心肌梗塞，LVEF小於約45%。

[0263] 在一些實施方式中，受試者患具有減少或保留的射血分數的慢性缺血性心臟衰竭，LVEF小於約40%，NT-proBNP水平至少約600 pg/mL，並被分類為NYHAFC指南上的II-IV期。

[0264] 另外，血管功能的分子測量可用於評估一般病理生理學的改善。該等測量的實例包括增強的一氧化氮(NO) 可用性，增加的血管生成/動脈生成以及心臟組織中的幹細胞募集。因此，如果患者在該等測量中顯示出改善的分子功能，則患有血管疾病的患者對治療“有反應”。

5.5.調節哺乳動物細胞、組織或受試者中的生理過程

[0265] 本揭露的另一方面涉及給予包含編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA的組成物或特定配製物，用於調節哺乳動物細胞、組織或受試者中的生理過程。在一些實施方式中，用於調節哺乳動物細胞、組織或受試者中的生理過程的方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。作為非限制性實例，生理過程的調節可以

包括誘導血管生成、刺激血管細胞增殖、增加心外膜衍生的先驅細胞的增殖和/或改變心外膜衍生的先驅細胞的命運、上調內皮化、誘導心臟再生、增加組織移植物的血管再生以用於傷口癒合、改善血管功能、增加組織灌注和新血管形成、減少瘢痕組織、增加前負荷補充搏功、增加最高壓發展、增加肌力功能、增加左心室射血分數（例如，約5%至10%）、減少與心臟功能障礙相關的生物標誌物（例如，NT-proBNP，BNP，hsTnT和hsTnI）水平、減少梗塞尺寸、減少心臟組織的纖維化和/或改善心臟功能。

[0266] 在與將本文所揭露的經修飾RNA與細胞、組織或受試者接觸相聯繫時，本文所使用的術語“接觸（contacting或contact）”包括使得經修飾RNA與細胞、組織或受試者碰觸或非常緊密接近。因此，在一些實施方式中，短語“接觸”係指暴露方法，其可以是直接或間接的。在一種方法中，這種接觸包括藉由本領域熟知的任何方法將組成物直接注射到細胞、組織或受試者中。在另一個實施方式中，接觸還涵蓋間接接觸，例如藉由圍繞組織的局部介質，或經由本領域已知的任何途徑。每種可能性代表本揭露獨立的實施方式。

[0267] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中誘導血管生成之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對誘導血管生成的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見例如洛佩斯（Lopez）JJ等人，心血管研究（Cardiovasc. Res），（1998）40，272-281；

加利亞諾 (Galiano) R.D.等人，美國病理學雜誌 (Am J Pathol.) (2004) 164，1935-1947；林 (Lin) Y.D.等人，科學轉化醫學期刊 (Sci Transl Med.)，(2012) 4 (146)：146ra109；桑吉 (Zangi) L.等人，自然生物技術 (Nat Biotechnol.)，(2013) 10，898-907；該等所有都藉由引用結合在此)。

[0268] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中刺激血管細胞增殖之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對刺激血管細胞增殖的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見，例如，加利亞諾 (Galiano) R.D.等人，美國病理學雜誌 (Am J Pathol) (2004) 164，1935-1947；其全部內容藉由引用結合在此)。

[0269] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中增加心外膜衍生的先驅細胞的增殖和/或改變心外膜衍生的先驅細胞的命運之方法包括使哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對增加心外膜衍生的先驅細胞的增殖和/或改變心外膜衍生的先驅細胞的命運的影響可以藉由本領域公知的方法來評價（參見，例如，桑吉 (Zangi) L.等人，自然生物

技術 (Nat Biotechnol.), (2013) 10, 898-907; 其全部內容藉由引用結合在此)。

[0270] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中上調內皮化 (endothelialization) 之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對上調內皮化的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價 (參見，例如，加利亞諾 (Galiano) R.D.等人，美國病理學雜誌 (Am J Pathol) (2004) 164, 1935-1947; 其全部內容藉由引用結合在此)。

[0271] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中誘導心臟再生之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對誘導心臟再生的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價 (參見，例如，桑吉 (Zangi) L.等人，自然生物技術 (Nat Biotechnol.), (2013) 10, 898-907; 林 (Lin) Y.D.等人，科學轉化醫學期刊 (Sci Transl Med.), (2012) 4 (146): 146ra109; 這二者都藉由引用結合在此)。

[0272] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者

中增加組織移植物的血管再生以用於傷口癒合之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對增加組織移植物的血管再生以用於傷口癒合的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見，例如，遠山（Tohyama）H.等人，長庚醫學雜誌（Chang Gung Med J），（2009）32，133-139；陳（Chen）J.等人，實驗治療醫學（Exp Ther Med），（2012）4，430-434；這二者都藉由引用結合在此）。

[0273] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中改善血管功能之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對改善血管功能的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見，例如，洛佩斯（Lopez）JJ等人，心血管研究（Cardiovasc. Res），（1998）40，272-281；蒂奧（Tio）R.A.等人，人類基因療法（Hum Gene Ther.），（1999）10，2953-2960；薩托（Sato）K.等人，美國心臟病學會雜誌（J Am Coll Cardiol.），（2001）37，616-23；該等所有都藉由引用結合在此）。

[0274] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者

中增加組織灌注和新血管形成之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對增加組織灌注和新血管形成的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見例如，芝阿皮尼（Chiappini）C.等人，自然材料（Nat Mater），（2015）14，532-539；林（Lin）Y.D.等人，科學轉化醫學期刊（Sci Transl Med.），（2012）4（146）：146ra109；桑吉（Zangi）L.等人，自然生物技術（Nat Biotechnol.），（2013）10，898-907；該等所有都藉由引用結合在此）。

[0275] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中減少癥痕組織之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對減少癥痕組織的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見，例如，羅薩諾（Rosano）JM等人，心血管工程和技術（Cardiovasc Eng Technol.），（2012）3，237-247；加利亞諾（Galiano）R.D.等人，美國病理學雜誌（Am J Pathol）（2004）164，1935-1947；林（Lin）Y.D.等人，科學轉化醫學期刊（Sci Transl Med.），（2012）4（146）：146ra109；桑吉（Zangi）L.等人，自然生物技術（Nat Biotechnol.）（2013）10，898-907；該等所有都藉由引用結合在此）。

[0276] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中改善心臟功能之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對改善心臟功能的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見，例如，羅薩諾（Rosano）JM等人，心血管工程和技術（*Cardiovasc Eng Technol.*），（2012）3，237-247；林（Lin）Y.D.等人，科學轉化醫學期刊（*Sci Transl Med.*），（2012）4（146）：146ra109；桑吉（Zangi）L.等人，自然生物技術（*Nat Biotechnol.*），（2013）10，898-907；該等所有都藉由引用結合在此）。

[0277] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中增加前負荷補充搏功（PRSW）之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對增加前負荷補充搏功的影響可以藉由本領域熟知的方法進行評價（參見，例如，費內麗（Fenely）等人，*JACC*，（1992），19（7）：1522-30）。

[0278] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中增加最高壓發展之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在

磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對增加最高壓發展的影響可以藉由本領域熟知的方法例如左心室造影、冠狀動脈造影、超音波心動圖、MRI掃描、CT掃描、門控心肌SPEC掃描或閘控心肌PET掃描進行評價。

[0279] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中增加肌力功能之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。經修飾RNA對增加肌力功能的影響可以藉由本領域熟知的方法例如左心室造影、冠狀動脈造影、超音波心動圖、MRI掃描、CT掃描、門控心肌SPEC掃描或閘控心肌PET掃描進行評價。

[0280] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物心臟細胞或組織或受試者中增加左心室射血分數（LVEF）之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣

或鎂。經修飾RNA對增加左心室射血分數的影響可以藉由本領域熟知的方法例如左心室造影、冠狀動脈造影、超音波心動圖、MRI掃描、CT掃描、門控心肌SPEC掃描或閘控心肌PET掃描進行評價。在一些實施方式中，LVEF增加約4%和10%之間。在一些實施方式中，LVEF增加約5%和8%之間。

[0281] 在一些實施方式中，在哺乳動物細胞、組織或受試者中減少與心臟功能障礙相關的一種或多種生物標誌物（例如，NT-proBNP，BNP，hsTnT和hsTnI）之方法包括使哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0282] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者中減少梗塞尺寸之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。在一些實施方式中，梗塞尺寸被減少。在一些實施方式中，梗塞被消除。經修飾RNA對梗塞尺寸的影響可以藉由本領域熟知的方法例如左心室造影、冠狀動脈造影、超音波心動圖、MRI掃描、CT掃描、門控心肌SPEC掃描或閘控心肌PET掃描進行評價。

[0283] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞、組織或受試者

中減少纖維化之方法包括將哺乳動物細胞、組織或受試者與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。在一些實施方式中，將組成物配製在磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。在一些實施方式中，纖維化減少。在一些實施方式中，纖維化被消除。經修飾RNA對纖維化的影響可以藉由本領域熟知的方法例如左心室造影、冠狀動脈造影、超音波心動圖、MRI掃描、CT掃描、門控心肌SPEC掃描或閘控心肌PET掃描進行評價。

5.6.在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A

[0284] 本揭露的另一方面涉及給予包含編碼VEGF-A多肽的經修飾RNA的組成物或特定配製物，用於哺乳動物細胞或組織中的體內、體外、原位或離體蛋白質表現。

[0285] 一些實施方式涉及用於在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A之方法，該方法包括將哺乳動物細胞或組織在體內、體外或離體與包含經修飾RNA的組成物接觸。

[0286] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A之方法包括將哺乳動物細胞或組織與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸。

[0287] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A之方法包括將哺乳動物細胞或組織與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸，其中該組成物配製於磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA

的組成物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在一些實施方式中，該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0288] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A之方法包括將哺乳動物細胞或組織與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸，其中該組成物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該組成物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該組成物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。

[0289] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A之方法包括使哺乳動物細胞或組織與包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物接觸，其中該組成物配製在基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）中。

[0290] 在一些實施方式中，用於在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A之方法包括將哺乳動物細胞或組織與配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的包含經修飾RNA的組成物接觸，其中與基於脂質的配製物相比，該組成物對於受試者的毒性更低。

5.7.在受試者中產生VEGF-A之方法

[0291] 一些實施方式涉及在受試者中產生VEGF-A之方法，該方法包括向受試者給予包含根據本揭露的經修飾RNA的組成物或特定配製物。

[0292] 作為非限制性實例，在一些實施方式中，在受試者中產生VEGF-A之方法包括向受試者給予根據本揭露的包含經修飾RNA的配製物。在一些實施方式中，配製物配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在一些實

施方式中，該配製物進一步包含藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，該配製物進一步包含藥學上可接受的賦形劑，其選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。在一些實施方式中，該溶劑係水性溶劑。

[0293] 在一些實施方式中，該配製物還包含藥學上可接受的賦形劑，其選自脂質、類脂質 (lipidoid)、脂質體、脂質奈米粒子、脂質複合物及其混合物。

[0294] 在一些實施方式中，在受試者中產生VEGF-A之方法包括向受試者給予根據本揭露的包含經修飾RNA的配製物，其中該受試者患有對VEGF-A療法有反應的疾病。在一些實施方式中，受試者患有選自以下項的疾病：具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭、腎臟疾病、涉及皮膚移植和組織移植的疾病、MI後心臟功能障礙、缺血性心臟病、來自創傷或手術的血管損傷、包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍、嚴重肢體缺血、肺性高血壓和外周動脈疾病。在一些實施方式中，該疾病係具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭。在一些實施方式中，該疾病係MI後心臟功能障礙。在一些實施方式中，該疾病係缺血性心臟病。在一些實施方式中，該疾病係來自創傷或手術的血管損傷。在一些實施方式中，該疾病係包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍。在一些實施方式中，該疾病係嚴重肢體缺血。在一些實施方式中，該疾病係肺性高血壓。在一些實施方式中，該疾病係外周動脈疾病。在一些實施方式中，該疾病係腎臟疾病。在一些實施方式中，該疾病係涉及皮膚移植和組織移植的疾病。

[0295] 在一些實施方式中，在受試者中產生VEGF-A之方法包括向受試者給予根據本揭露的包含經修飾RNA的配製物，其中向受試者給予該

配製物係經肌內、皮內、皮下或心內途徑，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或藉由直接給予到待治療的區域。在一些實施方式中，將配製物肌內給予該受試者。在一些實施方式中，將配製物皮內給予該受試者。在一些實施方式中，將配製物皮下給予該受試者。在一些實施方式中，向受試者給予該配製物係經心內進行，較佳的是以固定劑量以多次（例如，兩次、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、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次）給予來給予。在一些實施方式中，向受試者給予該配製物係通過門靜脈導管進行。在一些實施方式中，向受試者給予該配製物係通過冠狀竇導管進行。在一些實施方式中，藉由直接給予到待治療的區域中將該配製物給予該受試者。

[0296] 在一些實施方式中，在受試者中產生VEGF-A之方法包括向受試者給予根據本揭露的包含經修飾RNA的配製物，其中該配製物包含基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）、磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液。在較佳的實施方式中，包含經修飾RNA的配製物配製在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0297] 在一些實施方式中，在受試者中產生VEGF-A之方法包括向受試者給予根據本揭露的包含經修飾RNA的配製物，其中該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。

[0298] 在一些實施方式中，在受試者中產生VEGF-A之方法包括向受試者給予根據本揭露的包含經修飾RNA的配製物，其中該配製物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液，並且與基於脂質的配製物相比對於受試者的毒性更低。

5.8.用於製備配製物之方法

[0299] 一些實施方式涉及用於製備配製物之方法，該方法包括將根據本揭露的經修飾RNA與基於脂質的複合物（例如脂質體、脂質複合物和脂質奈米粒子）、磷酸鹽緩衝鹽水緩衝液、THAM緩衝液或檸檬酸鹽鹽水緩衝液組合。

[0300] 一些實施方式涉及製備配製物之方法，該方法包括將經修飾RNA與檸檬酸鹽鹽水緩衝液組合，其中該配製物對於治療患有對VEGF-A療法有反應的疾病的受試者是有效的；調節哺乳動物細胞、組織或受試者的生理過程；在哺乳動物細胞或組織中表現VEGF-A；和/或在受試者中產生VEGF-A。

[0301] 在一些實施方式中，用於製備配製物之方法包括將根據本揭露的經修飾RNA與檸檬酸鹽鹽水緩衝液組合，其中該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在0.1和1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在1和10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。在一些實施方式中，該配製物包含配製於檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的濃度在10和50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間的經修飾RNA。

[0302] 在一些實施方式中，用於製備配製物之方法包括將根據本揭露將經修飾RNA與檸檬酸鹽鹽水緩衝液組合，其中該配製物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液，並且與基於脂質的配製物相比對於受試者的毒性更低。

[0303] 在一些實施方式中，用於製備配製物之方法包括將根據本揭露將經修飾RNA與檸檬酸鹽鹽水緩衝液組合，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝

液基本上不含二價陽離子，包括鈣和鎂。在一些實施方式中，檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。

[0304] 在一些實施方式中，用於製備配製物之方法包括將根據本揭露將經修飾RNA與檸檬酸鹽鹽水緩衝液組合，其中該配製物包含檸檬酸鹽鹽水緩衝液，並且進一步包含藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。在一些實施方式中，該溶劑係水性溶劑。

[0305] 根據本揭露，可以經由許多途徑向受試者給予配製物。適於皮內、心內、皮下和肌內注射的特定配製物係本領域已知的。例如，為了延長活性成分的效果，通常希望的是減緩肌內注射的活性成分的吸收。藉由將藥物（例如，經修飾RNA）溶解或懸浮於油性運運載體中完成肌內給予的藥物的延遲吸收。藉由在生物可降解的聚合物（諸如聚乳酸交酯-聚乙交酯）中形成藥物（例如修飾的RNA）的微膠囊基質來製得可注射的貯庫形式。取決於藥物對聚合物的比率以及所使用的特定聚合物的性質，可以對藥物釋放的速率進行控制。其他可生物降解的聚合物的實例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。對於皮內和皮下注射，較佳的是配製該配製物以使得當遞送到皮內隔室時不誘導免疫應答。添加劑可用於皮內注射的配製物中，包括例如潤濕劑、乳化劑或pH緩衝劑。用於皮內注射的配製物還可以含有一種或多種其他賦形劑，例如糖和多元醇。對於心內注射，較佳的是配製該配製物以使得在使用注射針後它們不會對心臟肌肉和冠狀動脈造成額外的損傷。本文提供了用於心內注射的合適配製物。

5.9.降低經修飾RNA組成物的毒性之方法

[0306] 一些實施方式涉及減少受試者中經修飾RNA治療的毒性的方法，該方法包括用檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製經修飾RNA。在一些實施方式中，與基於脂質的配製物相比，用檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製經修飾RNA對受試者的毒性更低。在一些實施方式中，基於脂質的配製物的毒性係劑量依賴性毒性。在一些實施方式中，基於脂質的配製物的毒性係劑量限制性毒性。

[0307] 在一些實施方式中，減少受試者中的治療毒性的方法包括根據本揭露用檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製經修飾RNA，並且進一步包含藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。在一些實施方式中，該溶劑係水性溶劑。在一些實施方式中，該溶劑係非水性溶劑。

[0308] 在一些實施方式中，降低受試者中的治療毒性的方法包括根據本揭露用檸檬酸鹽鹽水緩衝液配製經修飾RNA，其中該受試者患有對VEGF-A療法有反應的疾病。在一些實施方式中，受試者患有選自以下項的疾病：具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭、腎臟疾病、涉及皮膚移植和組織移植的疾病、MI後心臟功能障礙、缺血性心臟病、來自創傷或手術的血管損傷、包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍、嚴重肢體缺血、肺性高血壓和外周動脈疾病。在一些實施方式中，該疾病係具有減少或保留的射血分數的心臟衰竭。在一些實施方式中，該疾病係MI後心臟功能障礙。在一些實施方式中，該疾病係缺血性心臟病。在一些實施方式中，該疾病係來自創傷或手術的血管損傷。在一些實施方式中，該疾病係包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍。在一些實施方式中，該疾病係嚴重肢體缺血。在一些實施方

式中，該疾病係肺性高血壓。在一些實施方式中，該疾病係外周動脈疾病。在一些實施方式中，該疾病係外周動脈疾病。在一些實施方式中，該疾病係腎臟疾病。在一些實施方式中，該疾病係涉及皮膚移植和組織移植的疾病。

5.10.核酸序列

[0309] 一些實施方式涉及包含用於產生經修飾RNA的體外轉錄模板的核酸序列。在一些實施方式中，根據本揭露，核酸序列包含用於產生經修飾RNA的體外轉錄模板。

[0310] 一旦用於產生經修飾RNA的轉錄模板可用，根據本揭露的經修飾RNA可以根據本領域熟知的任何可用的技術，使用可商購的起始材料製備（參見，例如，美國專利申請公開案號2015/0051268；美國專利案號8,710,200；美國專利申請公開案號2013/0259923；該等所有都藉由引用結合）。

[0311] 申請專利範圍列表中的所有申請專利範圍在此藉由引用以其全部內容作為附加實施方式併入本說明書中。

6. 實例

6.1.實例1

VEGF-A修飾的RNA的轉染和VEGF-A蛋白的產生

[0312] 為了研究VEGF-A修飾的RNA的轉染潛力，將10,000個細胞接種到常規培養基中的96孔板中。為了製備含有經修飾RNA產生的VEGF-A的條件培養基，將250,000個人臍靜脈內皮細胞（HUVEC）（龍沙公司（Lonza），瑞士巴塞爾）接種在內皮生長培養基（EGM）培養基（龍沙公司）中的6孔板中。第二天，在無血清內皮基礎培養基（EBM）培養基（龍沙公司）中進行轉染。根據製造商的說明書，將VEGF A修飾的RNA（指示

量)與脂質轉染胺2000(英傑公司(Invitrogen),卡爾斯巴德,加利福尼亞州,美國)混合並加入細胞中。作為轉染對照,使用與水混合的脂質轉染胺2000。4小時後,將轉染培養基去除並更換為新鮮的無血清EBM培養基,並在指定的時間點收集培養基。24小時後收集條件培養基並保持在-80°C。如下所述用ELISA測量人VEGF A濃度。

[0313] 根據製造商的說明書,用人VEGF-A ELISA試劑盒(Novex,英傑公司)測量轉染後細胞培養基中人VEGF-A的量。在SpectraMax讀數器中在450 nm處讀取吸光度,並計算樣品中的VEGF A濃度。

[0314] 對於在體外將VEGF-A修飾的RNA全部轉染到細胞中,需要脂質轉染胺2000。VEGF-A修飾的RNA可被轉染到多種人心臟細胞類型中。更高劑量的經修飾RNA導致產生更多的VEGF-A蛋白(圖2A)。來自經修飾RNA的蛋白質生產在轉染後大約8小時達到峰值,並且然後下降(圖2B)。此外,經修飾RNA轉染和蛋白質生產跨物種進行,並且可以轉染小鼠心臟成纖維細胞和豬內皮細胞,導致VEGF-A蛋白的翻譯(圖2C)。

6.2.實例2

藉由重組和經修飾RNA產生的VEGF-A啟動VEGF受體2傳訊

[0315] 將十萬個HUVEC接種在EGM培養基中的12孔板中。第二天,將細胞在EBM中饑餓24小時,並且然後暴露於100 ng/mL VEGF-A,無論是重組的(R&D系統公司,明尼阿波里斯市,明尼蘇達州,美國)或經修飾RNA產生的(作為條件培養基添加),或者暴露於不具有VEGF-A的培養基。2、10和20分鐘後終止刺激,並除去培養基。從用含有蛋白酶和磷酸酶抑制劑(中尺度發現公司(Mesoscale Discovery),羅克維爾,馬里蘭州,美國)的裂解緩衝液培養的細胞製備總蛋白。使用BCA蛋白測定試劑盒(皮爾斯公司(Pierce),羅克福德,伊利諾州,美國)根據製造商的方案測量

蛋白質濃度。

[0316] 將15微克蛋白質載入在4%至12% Bis-Tris梯度凝膠上，並使用MES SDS運行緩衝液（英傑公司）進行電泳。將分級蛋白質電印漬到聚二氟乙烯（PVDF）膜（英傑公司）上。將膜在TBS吐溫（0.1%）中的5% BSA中封閉，並且隨後在4°C下用一級抗體孵育過夜。使用的一級抗體係針對VEGF受體2（VEGFR2）、磷酸化VEGFR2（p-VEGFR2）、Akt、磷酸化Akt（p-Akt）、eNOS（均來自細胞傳訊公司（CellSignaling），丹佛斯，麻塞諸塞州，美國）和磷酸化eNOS（p-eNOS，BD生物科學公司（BD Biosciences），佛蘭克林湖，新澤西州，美國）。將膜用辣根過氧化物酶標記的二級抗體（達科公司（Dako），格洛斯楚普，丹麥）進行孵育，並使用ECL西方印漬底物（皮爾斯公司）檢測免疫反應。化學發光信號係使用ChemiDoc觸摸成像系統（伯樂公司（BioRad），赫拉克勒斯，加利福尼亞州，美國）來視覺化。

[0317] 為了驗證由經修飾RNA產生的VEGF-A蛋白係有活性的，將來自用VEGF-A修飾的RNA轉染的細胞的條件培養基加入到培養的細胞中。這導致人內皮細胞中主要VEGF-A受體（VEGF受體2）的磷酸化（圖3A）。此外，條件培養基還分別誘導人內皮細胞中的下游傳訊通路eNOS（圖3B）和小鼠心臟成纖維細胞中的Akt（圖3C）的磷酸化。

6.3.實例3

經修飾RNA產生的VEGF-A蛋白係在血管生成過程中刺激了幾個關鍵步驟的活性蛋白

[0318] 將HUVEC以每孔3000個細胞的密度在EGM培養基（龍沙公司）中接種在96孔板中。第二天，將培養基更換為補充有2%胎牛血清（FBS）和重組VEGF-A（R&D系統公司）的基礎EBM培養基或更換為補充有2%FBS的含有經修飾RNA產生的VEGF-A的條件培養基。VEGF-A濃度分別為10

ng/mL、50 ng/mL和100 ng/mL。將不含VEGF-A的培養基用作對照。將板在37°C保持於5% CO₂中，並且兩天後在4%緩衝甲醛（Histolab，瑞典哥德堡）中固定，並用Hoechst（英傑公司）核染色10 min。在圖片表達高含量分析系統（Image Express High Content Analysis System）中確定核計數。

[0319] 根據製造商的說明，將HUVEC用Cell Tracker Red（分子探針公司（Molecular Probes），尤金，俄勒岡，美國）染色，並接種在24孔板（康寧公司（Corning），紐約，美國）中具有8 μm孔徑的FloroBlok膜的穿孔插入物（transwell insert）中的補充有2%血清的EBM培養基中。將具有人重組VEGF-A（R&D系統公司）和2%血清的EBM或者含有經修飾RNA產生的VEGF-A和2%血清的條件培養基加入到下室中。分別以10 ng/mL和100 ng/mL的濃度研究作為趨化因子的VEGF-A。將不含VEGF-A的培養基用作對照。24小時後，用圖片表達高含量分析系統（Image Express High Content Analysis System）對遷移到膜下側的細胞進行計數。

[0320] 在EBM中將HUVEC與Cytodex 3微載體珠粒（GE醫療集團（GE Healthcare），小查爾方特（Little Chalfont），英國）混合，並將管保持在37°C下並經常輕彈以允許均勻塗覆。4小時後，將塗覆有內皮細胞的珠粒接種在燒瓶中，並保持在37°C和5% CO₂下過夜。將珠粒以500個珠粒/mL懸浮於含有抑肽酶（0.15單位/mL，西格瑪奧德里奇（Sigma Aldrich））的纖維蛋白原溶液（2 mg/mL西格瑪奧德里奇，聖路易斯市，密蘇里州，美國）中，並且然後加入96孔板中含有凝血酶（0.625單位/mL，西格瑪奧德里奇）的孔中。15分鐘後，纖維蛋白凝膠已形成凝塊，並且加入具有重組VEGF-A的EGM培養基或含有經修飾RNA產生的VEGF-A的條件培養基。作為對照，使用不具有VEGF-A的培養基。當評價血管生成芽形成時，將板保持在37°C和5% CO₂下2天。將細胞用鈣黃綠素染色30 分鐘，並在圖片表達高含量分

析系統中讀取各板，並確定芽形成。

[0321] 如所描繪的，血管生成過程中的幾個關鍵步驟受到經修飾RNA產生的VEGF-A蛋白的影響。VEGF-A增加培養的人內皮細胞的增殖（圖4A）和遷移（圖4B）。此外，藉由經修飾RNA產生的VEGF-A增加具有塗覆有內皮細胞的珠粒的3D培養物中的血管生成芽形成（圖4C和圖5）。重要的是，在內皮細胞中，與重組VEGF-A蛋白相比，經修飾RNA產生的VEGF-A蛋白誘導相似的應答，這表明經修飾RNA產生的VEGF-A保留了其影響血管生成的性質和能力。

6.4.實例4

在小鼠中單次心內注射LacZ修飾的RNA後評估β-半乳糖苷酶蛋白

[0322] 將雄性C57B1/6小鼠（10至12週齡）用異氟烷麻醉。將左胸部剃毛並滅菌，並且在插管後，藉由左胸廓切開術將心臟暴露。將配製在檸檬酸鹽/鹽水（10 mmol/L檸檬酸鹽，130 mmol/L氯化鈉，在Hyclone水中，用氫氧化鈉將pH調節至大約7.5）或脂質轉染胺[®]（RNAiMAX轉染試劑，賽默飛世爾公司（Thermo Fisher Scientific Inc.），紐約，美國）中的LacZ修飾的RNA從心臟的頂點向基部注射（50 μL）在左心室游離壁中。注射後，藉由縫合將胸和皮膚閉合，並藉由溫和的胸部按壓從胸腔中除去多餘的空氣。隨後，當正常呼吸建立時，將小鼠與呼吸機斷開連接並使其返回到它的居住籠中。在心臟注射後的預定義時間點，將小鼠麻醉並將胸部第二次打開。切除心臟，並藉由5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷（X-gal）染色檢測轉染效率和報告物β-半乳糖苷酶的存在。X-gal被酶水解，產生指示存在活性β-半乳糖苷酶的強烈藍色不溶性產物。簡言之，將器官或組織在磷酸鹽緩衝液中漂洗並固定在4%多聚甲醛中15分鐘，並用含有2 mmol/L MgCl₂、0.01%去氧膽酸鈉和0.02% Nonidet P40的0.1 mmol/L磷酸鹽（pH 7.3）

洗滌緩衝液洗滌3次（20至30分鐘）。隨後，將新鮮製備的X-gal溶液（含有5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$ 、5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 和1 mg/mL X-gal的磷酸鹽洗滌緩衝液）加入到樣本中，然後將其包裹在箔中並在37°C下孵育過夜。然後將樣品用磷酸鹽洗滌緩衝液洗滌3次並拍照。

[0323] 在左胸廓切開術之後，給麻醉的小鼠單次心內注射檸檬酸鹽/鹽水或LacZ修飾的RNA。大約24小時後，處死小鼠，並切除心臟。然後將心臟進行X-gal染色過夜。圖6B和6C說明了用配製在脂質轉染胺（圖6B）或檸檬酸鹽/鹽水緩衝液（圖6C）中的經修飾RNA注射的頂端區域中有效的和定性相似的轉染以及 β 半乳糖苷酶的產生。在僅注射了檸檬酸鹽/鹽水的心臟中未觀察到染色（圖6A）。

6.5.實例5

在初試小鼠中，心內注射螢光素酶修飾的RNA後評估螢光素酶蛋白表現

[0324] 將雄性C57B1/6小鼠（10至12週齡）用藉由腹膜內注射給予的氯胺酮（10 mg/kg）和甲苯噻吡（3.5至4 mg/kg）的混合物進行麻醉。將左胸部剃毛並滅菌，並且在插管後，藉由左胸廓切開術將心臟暴露。

[0325] 用以下緩衝液配製螢火蟲螢光素酶修飾的RNA：

1. PBS緩衝液（1xPBS，無鈣，無鎂，pH 7.4）
2. 檸檬酸鹽鹽水緩衝液（C/S，10 mmol/L檸檬酸鹽，130 mmol/L氯化鈉，於Hyclone水中，pH 7.0）
3. THAM緩衝液（胺丁三醇AKA 2-胺基-2-(羥甲基)-1,3-丙二醇），300 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0）

[0326] 將總共25 μ g的螢光素酶修飾的RNA從心臟的頂點向著基部注射（50 μ L）在左心室游離壁中。注射後，藉由縫合將胸和皮膚閉合，

並藉由溫和的胸部按壓從胸腔中除去多餘的空氣。手術後，小鼠接受腹膜內注射阿替美唑（atipamezole）鹽酸鹽（1 mg/kg）和皮下注射丁丙諾啡（buprenorphine）鹽酸鹽（0.02 mg/kg）。隨後，當正常呼吸建立時，將小鼠與呼吸機斷開連接並使其返回到它的居住籠中。

[0327] 在左胸廓切開術之後，給予麻醉的小鼠單次心內注射僅緩衝液（PBS，C/S或THAM對照）或配製在PBS、C/S或THAM緩衝液中的螢火蟲螢光素酶修飾的RNA。切除心臟以用於藉由生物發光IVIS成像進行螢光素酶蛋白表現評估。下面呈現的結果係兩個交錯的小鼠研究的組合。表2報告了個體原始IVIS生物發光通量值，並且圖7分別示出了所有治療組的圖示平均值。

表2.僅注射了對照緩衝液或在緩衝液的任一種中配製的螢光素酶修飾的RNA的小鼠心臟中的原始IVIS生物發光數據。

	平均通量	n	#1	#2	#3	#4
C/S	6.24E+03	2	5.05E+03	7.42E+03		
C/S+Luc	6.43E+06	3	2.26E+06	1.41E+05	1.69E+07	
THAM	5.32E+03	2	4.03E+03	6.61E+03		
THAM+Luc	3.62E+06	3	1.82E+06	2.93E+06	6.10E+06	
PBS	1.02E+04	2	2.39E+03	1.79E+04		
PBS+Luc	1.01E+07	3	7.84E+06	3.14E+06	1.94E+07	
C/S+Luc	4.91E+06	3	2.49E+06	1.93E+06	1.03E+07	

[0328] 如在圖7中所描繪的，在用螢光素酶修飾的RNA注射的所有心臟中檢測到螢光素酶蛋白表現，而陰性對照（PBS，C/S和THAM）顯示很少信號乃至沒有信號。該等對照中的基線IVIS生物發光信號從約4波動到 $7.5 + E03$ 單位生物發光通量，表示為光子/秒。在用螢光素酶修飾的RNA注射的所有心臟中檢測到螢光素酶信號的3至4個數量級。在各種緩衝液之間沒有檢測到統計學差異。

6.6.實例6

在大鼠中，心內注射人VEGF-A修飾的RNA後評估人VEGF-A蛋白產生

[0329] 將雄性史一道二氏大鼠（體重250至300 g）用異氟烷麻醉，並皮下注射了麻卡因（marcaine）（25 mg/kg）和丁丙諾啡（0.05 mg/kg）用於鎮痛。將左胸部剃毛並滅菌，並且在插管後，藉由在第五肋間隙的左胸廓切開術將心臟暴露。沿著左心室游離壁的一條線，將配製在檸檬酸鹽鹽水（10 mmol/L檸檬酸鹽，130 mmol/L氯化鈉，於Hyclone水中，用氫氧化鈉將pH調節至大約7.5）中的人VEGF-A修飾的RNA（1800、150或15 μ g）作為六次分開的注射（每次15 μ L，總容積90 μ L）進行注射。注射後，藉由縫合將胸和皮膚閉合，並藉由溫和的胸部按壓從胸腔中除去多餘的空氣。隨後，當正常呼吸建立時，將大鼠與呼吸機斷開連接並使其返回到它的居住籠中。在心臟注射後的預定義時間點，將大鼠麻醉並將胸部第二次打開進行心臟組織取樣。切除心臟，並且切掉右心室及左心房和右心房。將包括注射部位的橫向切片切除，分成兩部分，將其在液氮中快速冷凍並在-80°C下儲存，直至分析VEGF-A蛋白。作為陰性對照，從遠離注射部位的頂端取出單獨的組織樣品。

[0330] 對麻醉的大鼠心內注射配製在檸檬酸鹽/鹽水中的3種不同劑量（15、150或1800 μ g）的VEGF-A修飾的RNA。在一個單時間點作為六

次分開的注射跨左心室游離壁給予每個劑量。在注射後的不同時間點處死動物，切除心臟，並收穫心室組織用於VEGF-A蛋白質含量分析。圖8A總結了注射的三個劑量中的每個產生的VEGF-A蛋白的時間曲線和多少。如可以看出的，蛋白質產生不是劑量線性的，並且15至150 μg 的10倍劑量增加導致僅在曲線下面積（AUC）上增加1.6倍，並且150和1800 μg 劑量組觀察到相似的AUC（1.1倍差異）。

6.7.實例7

向經受心肌梗塞的大鼠中心內注射人VEGF-A修飾的RNA後對左心室功能和梗塞尺寸的影響

[0331] 如上所述，將雄性史一道二氏大鼠（體重250至300 g）進行麻醉、預處理並切開胸廓。隨後使動物經受左前降支冠狀動脈的永久性結紮以誘導心肌梗塞。結紮之後係心內注射90 μL 檸檬酸鹽/鹽水（10 mmol/L檸檬酸鹽，130 mmol/L氯化鈉，於Hyclone水中，用氫氧化鈉將pH調節至大約7.5）或150或1800 μg 在檸檬酸鹽/鹽水中配製的人VEGF-A修飾的RNA。整個容積係按六次分開的心外膜注射沿著梗塞邊界區域遞送的。注射後，藉由縫合將胸和皮膚閉合，並藉由溫和的胸部按壓從胸腔中除去多餘的空氣。隨後，當正常呼吸建立時，將大鼠與呼吸機斷開連接並使其返回到它的居住籠中。

[0332] 在手術後1和8天，將動物帶到成像設備以藉由磁共振成像（MRI）評估左心室功能和梗塞尺寸。此外，在手術之後的第二天，從尾靜脈抽取血液樣品以便分析作為心臟損傷的生物標誌物的心肌肌鈣蛋白I（i-STAT[®]心肌肌鈣蛋白I診斷測試，雅培定點照護公司（Abbott Point of Care Inc.），雅培科技園（Abbott Park），伊利諾州60064，美國）。使用專用的小型動物MRI系統進行MRI掃描，場強為4.7T。以短軸方向採集圖像，並且採

集覆蓋左心室的圖像堆疊。使用心電描記法在心動週期的特定階段觸發成像。從證明一個心跳期間左心室壁的移動的一個圖像系列評價心臟功能。在採集該圖像系列時使用的成像序列係梯度回波序列，橫向重複時間為10 ms，而翻轉角為25°。經驗豐富的讀取者使用專用圖像分析軟體在不同時間點藉由手動描繪來評估左心室的容積。收縮末期(ESV)和舒張末期(EDV)容積被鑒定為最小和最大的左心室容積。反映心臟功能的射血分數(EF)係藉由公式 $EF = (EDV - ESV) / EDV$ 來評估。在給予釷雙胺(含有釷的造影劑)後採集證明心肌梗塞程度的圖像。圖像採集前十分鐘，藉由尾靜脈導管注射0.3 mmol/kg釷雙胺(Gadodiamide)。使用梯度回波序列進行成像，其中造影準備包括使用反轉脈衝。重複時間為最小的900 ms，並且翻轉角為90°。有經驗的讀取者使用專用圖像分析軟體藉由手動描繪來評估左心室壁容積(LVV)和梗塞容積(IV)。藉由公式 $IS = IV / LVV$ 確定梗塞尺寸(IS)，表示為左心室壁的梗塞分數。

[0333] 將二十七隻大鼠經受左前降支冠狀動脈的永久性結紮，以及心內注射檸檬酸鹽/鹽水(n = 8)或者低(150 µg, n = 9)或高(1800 µg, n = 10)劑量的配製在檸檬酸鹽/鹽水中的VEGF-A修飾的RNA。對動物隨訪8天，並且在誘導梗塞後第1天和第8天藉由MRI評估對左心室射血分數和梗塞尺寸的影響。在第1天在靜脈血中測量作為心肌細胞損傷的生物標誌物的心肌TnI。由於兩種劑量的VEGF-A修飾的RNA導致產生相似量的VEGF-A，在功效分析中彙集來自兩組的數據。與檸檬酸鹽/鹽水處理的大鼠相比，給予VEGF-A修飾的RNA的動物具有顯著較高的第8天左心室射血分數(圖8B)和較低水平的第1天心機TnI(圖8D)。此外，相對於運載體處理的大鼠，積極處理的大鼠傾向於具有減小的梗塞尺寸(圖8C)。

6.8. 實例8

在哥廷根小型豬中，心內注射LacZ修飾的RNA或人VEGF-A修飾的RNA後評估β-半乳糖苷酶和人VEGF-A蛋白

[0334] 禁食過夜的雌性哥廷根小型豬（體重約25 kg）藉由肌內注射咪達唑侖（midazolam）和氯胺酮（ketamine）鎮靜。鎮靜後，將靜脈管線置於耳邊緣靜脈中，以藉由丙泊酚（propofol）誘導麻醉，並將豬經氣管內插管。然後將豬轉移到實驗室並連接到呼吸機。全身麻醉係由通過精密汽化器輸送的異氟烷和具有定期動脈血氣監測的循環吸氣呼吸系統維持。在整個實驗過程中連續監測生命體征（心率、血壓、呼吸率、O₂脈搏血氧計、ECG和體溫）。在整個手術過程中給予靜脈流體治療，調整速率以取代失血或在全身血壓低的情況下進行。進行左胸廓切開術以暴露心臟，並將LacZ修飾的RNA或VEGF-A修飾的RNA（以不同的容積和劑量）以距離心外膜表面大約5 mm的深度注射到左心室游離壁中。注射部位用小縫合線標記，並且6小時後切除心臟。在注射部位收穫透壁組織厚板，並且如上所述針對β-半乳糖苷酶進行X-gal染色。對於VEGF-A蛋白分析，從心外膜到心內膜，將每個組織厚板分成6個單獨的樣本。將該等樣品在液氮中快速冷凍並在-80°C下儲存，直到如下所述的VEGF-A分析。

[0335] 將LacZ或VEGF-A修飾的RNA經心外膜注射到左心室游離壁中，並且6小時後採集組織以用於X-gal染色或VEGF-A蛋白分析。在給予了LacZ修飾的RNA的豬中，當使用脂質轉染胺作為轉染培養基時（圖9A），與當使用檸檬酸鹽/鹽水時相比，β-半乳糖苷酶的產生係定性相似的（圖9B）。

6.9.實例9

心臟組織中人VEGF-A蛋白的定量

[0336] 將含有磷酸酶抑制劑I和II及蛋白酶抑制劑和蛋白酶抑制劑（中尺度發現公司（Meso Scale Discovery（MSD）），羅克維爾，馬里蘭州，

美國)的Tris裂解緩衝液加入到冷凍的組織活組織檢查物中，並在均質化之前在約-20°C下冷凍。然後添加陶瓷珠粒(3毫米)，並使用Precellys均化器將樣品均質化。將勻漿物離心，並將上清液儲存在-80°C，之後分析。

[0337] 使用具有電化學發光檢測的夾心免疫測定法測定VEGF-A濃度。MSD V-PLEX細胞介素組1(人)VEGF-A試劑盒(kit)被用於測量組織勻漿物中的VEGF-A濃度。按照試劑盒說明進行該測定。使用試劑盒稀釋液將標準品1:2連續稀釋，並在每批中包括額外的對照以監測測定性能。在分析前用試劑盒稀釋液將樣品最少1:10稀釋，並在MSD Sector 600儀器上讀取各板。

[0338] 圖10總結了在檸檬酸鹽/鹽水中配製的不同劑量(每次注射50至2000 µg)的VEGF-A修飾的RNA的心外膜注射後6小時VEGF-A的劑量依賴性產生。在低劑量注射VEGF-A修飾的RNA的情況下產生的蛋白的水平指示飽和，這與大鼠中的發現一致(圖8A)。

6.10.實例10

在檸檬酸鹽鹽水緩衝液中LacZ和螢光素酶修飾的RNA心臟轉染和翻譯

[0339] 如所描繪的，將75 µg具有心臟注射液的編碼經修飾RNA的LacZ進行轉染並在大約10%的左心室中翻譯(圖11A、11B、11C和11D)。螢光素酶修飾的RNA的RNA原位雜交揭示在注射部位的心肌中的染色表現(圖11E和11F)，並且藉由連續切片中的免疫組織化學分析顯示相關螢光素酶蛋白表現(圖11G)。

6.11.實例11

經修飾RNA隨檸檬酸鹽鹽水緩衝液注射到心臟後，VEGF-A蛋白表現係可飽和的，並且在多個物種間具有類似的藥物動力學

[0340] 為了比較VEGF-A蛋白產生，將檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的150 µg VEGF-A修飾的RNA和使用RNAiMax（基於脂質的配製物）作為遞送載體的100 µg VEGF-A修飾的RNA注射到大鼠心臟中。24小時後，大鼠中檸檬酸鹽鹽水緩衝液（NTB）的情況下的VEGF-A蛋白水平具有與注射了RNAiMax的大鼠中相當的水平，並且藥物動力學曲線相似（圖12A）。在物種間可見蛋白質表現係劑量限制性的和可飽和的（圖12B）。隨著劑量的十倍增加，曲線下面積僅增加1.6倍（圖12C）。

6.12.實例12

在小鼠、大鼠和豬中，心內注射人VEGF-A修飾的RNA後評估人VEGF-A蛋白產生

[0341] 為了比較VEGF-A蛋白產生，將檸檬酸鹽鹽水緩衝液中的150 µg VEGF-A修飾的RNA和使用RNAiMax（基於脂質的配製物）作為遞送載體的100 µg VEGF-A修飾的RNA注射到大鼠心臟中。24小時後，大鼠中的VEGF-A蛋白水平將雄性C57B1/6小鼠（10至12週齡）用異氟烷麻醉。將左胸部剃毛並滅菌，並且在插管後，藉由左胸廓切開術將心臟暴露。將配製在檸檬酸鹽鹽水（10 mmol/L檸檬酸鹽，130 mmol/L氯化鈉，於Hyclone水中，用氫氧化鈉將pH調節至約7.5）中的100 µg VEGF-A修飾的RNA（編碼人VEGF-A蛋白（VEGF-A））從心臟的頂點向基部注射（50 µL）在左心室游離壁中。注射後，藉由縫合將胸和皮膚閉合，並藉由溫和的胸部按壓從胸腔中除去多餘的空氣。隨後，當正常呼吸建立時，將小鼠移離呼吸機並使其返回到它的居住籠中。在心臟注射後的預定義時間點，將小鼠麻醉並將胸部第二次打開進行心臟組織取樣。切除心臟，並且切掉右心室及左心房和右心房。將剩餘的心臟組織（即，左心室游離壁和心室內隔膜）在液氮中快速冷凍並在-80°C下儲存，直至如下所述分析VEGF-A蛋白。

[0342] 將雄性史一道二氏大鼠（體重250至300 g）用異氟烷麻醉，並皮下注射了麻卡因（25 mg/kg）和丁丙諾啡（0.05 mg/kg）用於鎮痛。將左胸部剃毛並滅菌，並且在插管後，藉由在第五肋間隙的左胸廓切開術將心臟暴露。沿著左心室游離壁的一條線，將配製在檸檬酸鹽鹽水（10 mmol/L 檸檬酸鹽，130 mmol/L 氯化鈉，於Hyclone水中，用氫氧化鈉將pH調節至大約7.5）中的人VEGF-A修飾的RNA（100 µg）作為三次分開的注射（每次20 µL，總容積60 µL）進行注射。注射後，藉由縫合將胸和皮膚閉合，並藉由溫和的胸部按壓從胸腔中除去多餘的空氣。隨後，當正常呼吸建立時，將大鼠與呼吸機斷開連接並使其返回到它的居住籠中。在心臟注射後的預定義時間點，將大鼠麻醉並將胸部第二次打開進行心臟組織取樣。切除心臟，並且切掉右心室及左心房和右心房。將包括注射部位的橫向切片切除，分成兩部分，將其在液氮中快速冷凍並在-80°C下儲存，直至如下所述分析VEGF-A蛋白。

[0343] 禁食過夜的雌性哥廷根小型豬（體重約25 kg）藉由肌內注射咪達唑侖和氯胺酮鎮靜。鎮靜後，將靜脈管線置於耳邊緣靜脈中，以藉由丙泊酚誘導麻醉，並將豬經氣管內插管。然後將豬轉移到實驗室並連接到呼吸機。全身麻醉係由通過精密汽化器輸送的異氟烷和具有定期動脈血氣監測的循環吸氣呼吸系統維持。在整個實驗過程中連續監測生命體征（心率、血壓、呼吸率、O₂脈搏血氧計、ECG和體溫）。在整個手術過程中給予靜脈流體治療，調整速率以取代失血或在全身血壓低的情況下進行。進行左胸廓切開術以暴露心臟，並將VEGF-A修飾的RNA（配製在檸檬酸鹽鹽水（10 mmol/L 檸檬酸鹽，130 mmol/L 氯化鈉，於Hyclone水中，用氫氧化鈉將pH調節至約7.5）中的100 µg）以距離心外膜表面大約5 mm的深度注射到左心室游離壁中。注射部位用小縫合線標記，並且6小時後切除心臟。收穫透

壁組織厚板。對於VEGF-A蛋白分析，從心外膜到心內膜，將每個組織厚板分成6個單獨的樣本。將該等樣品在液氮中快速冷凍並在-80°C下儲存，直到如下所述的VEGF-A分析。

[0344] 如在圖13A和13B中所示，產生的蛋白質的量在注射後大約6至12小時達到峰值，並且所產生的VEGF A蛋白的多少和時間曲線在物種間係相似的。在大鼠中注射後192小時，在心臟組織中仍觀察到人VEGF-A蛋白（圖13B）。

6.13.實例13

向經受心肌梗塞的豬心內注射人VEGF-A修飾的RNA後對左心室功能和梗塞尺寸的影響

[0345] 將三十四隻任一性別的性成熟的蘭嶼小型豬（約5月齡）禁食過夜並麻醉，氣管內插管並通過呼吸器用氧氣、空氣和異氟烷的混合物人工通氣。在整個實驗過程中連續監測生命體征（心率、血壓、呼吸率、O₂脈搏血氧計、ECG和體溫）。在整個手術過程中給予靜脈流體治療，調整速率以取代失血或在全身血壓低的情況下進行。進行左胸廓切開術以暴露心臟，並且除了其中動脈未閉塞的5例（假手術組）外，所有豬均進行中左前降支冠狀動脈的永久閉塞。隨後，閉合胸部，並在將豬帶回到圍欄後，轉入特護室持續大約2小時。在手術前後，給予鎮痛劑和抗生素以緩解疼痛並預防感染。

[0346] 在初次手術後7天，如上所述準備豬用於第二次手術，並將其帶回手術室。準備後，將梗塞的豬隨機用檸檬酸鹽/鹽水（n = 8）、VEGF-A修飾的RNA低劑量（1 mg，n = 8）、VEGF-A修飾的RNA高劑量（10 mg，n = 8）或配製在自組裝奈米纖維中的重組人VEGF-A蛋白（n = 5）進行盲法處理。儘管未被批准用於臨床使用，包括了奈米纖維構建體作為陽性對照

療法(林(Lin) Y.D.等人, 科學轉化醫學期刊(Science Transl Med), (2012) 4: 146ra109; 其全部內容藉由引用結合在此)。在左胸廓切開術後, 研究藥物以分佈於梗塞周圍/梗塞區域中的20個心外膜注射來給予, 每次注射容積為100 μ L。該程序之後, 如上所述對豬進行處理, 並在進行終點實驗之前使其恢復2個月。

[0347] 在整個研究中, 藉由超音波心動圖評估左心室功能的連續測量。因此, 就在心肌梗塞誘導之前和之後, 就在心內注射研究藥物之前和處死當天, 在閉合胸部的豬中在麻醉下進行測量。使用Vivid Q與3.5 MHz探針(GE醫療集團, 霍頓(Horten), 挪威)藉由2D超音波心動圖評估心臟功能。將豬置於左側臥位。藉由M模式獲得胸骨旁長軸視圖以測量左心室容積, 以得出左心室射血分數。在研究結束時(即在給予研究藥物後2個月), 如上所述將豬麻醉, 並用裝備儀器以便藉由定位在左心室腔內的壓力-容積循環記錄導管(米拉儀器公司(Millar Instruments), 休士頓, 德克薩斯州, 美國)藉由右頸動脈插管術進行侵入式血流動力學評估。用商務軟體(AD儀器公司(AD Instruments))分析血液動力學數據。血液動力學評估後, 處死豬, 並收穫心臟。將心臟洗滌三次, 並從頂端到乳頭肌層處理成五個切片。拍攝每個切片的圖像, 並使用商務軟體(ImageJ)估計梗塞尺寸。梗塞尺寸計算為整個心室面積減去內部空間面積的百分比。

[0348] 在研究過程中進行左心室射血分數(EF)的連續評估。如可以在圖14中看到的, 左前降支冠狀動脈的永久閉塞與EF立即從大約65%減少到低於45%相關, 即在注射研究藥物閉塞後7天保持的下降。在經受假手術的豬中沒有觀察到這種減少。在注射後兩個月, 觀察到給予了配製在自組裝奈米纖維中的VEGF-A修飾的RNA或重組VEGF-A蛋白的豬與檸檬酸鹽/鹽水注射的豬相比具有改善的EF。當比較注射當天直到研究結束時EF

的變化，對於VEGF-A修飾的RNA組和VEGF-A蛋白組而言觀察到統計學上顯著的改善，而對於檸檬酸鹽/鹽水組未觀察到。在研究終止時進行的左心室功能的侵入式血液動力學評估顯示出類似的改善，分別由隨時間的最高左心室壓力發展上的差異（ $dP/dt \max$ ，圖15）、隨時間的最小壓力發展（ $dP/dt \min$ ，圖16）、收縮末期壓力容積關係（ESPVR，圖17）、舒張末期壓力容積關係（EDPVR，圖18）和前負荷補充搏功（PRSW，圖19）證明。

[0349] 在研究結束時在組織收穫後測量梗塞尺寸，並將其定量為總體左心室梗塞尺寸（切片2、3、4和5，圖20A）、中左心室梗塞尺寸（切片3和4，圖20B）和正中左心室梗塞尺寸（切片4，圖20C）。如可以在圖20A、20B和20C中看到的，VEGF-A修飾的RNA以及VEGF-A蛋白/奈米纖維處理與梗塞尺寸的劑量依賴性降低（對比檸檬酸鹽/鹽水處理的豬）相關。

6.14.實例14

在糖尿病小鼠的傷口癒合模型中人VEGF-A修飾的RNA的體內作用

[0350] 該實驗的目的是確定人VEGF-A修飾的RNA是否在延遲皮膚傷口癒合的糖尿病小鼠模型中展示出生物活性。使用db/db小鼠進行兩次試驗，該小鼠由於點突變而在瘦蛋白受體表現上有缺陷，並且相對於健康對照小鼠經歷延遲的皮膚傷口癒合。db/db小鼠已被廣泛用於已發表的文獻中，以測試旨在加速傷口癒合的各種治療的治療功效。第一個試驗，試驗1，包括32隻雄性db/db小鼠，並被設計為：1）評價人VEGF-A修飾的RNA對傷口癒合率的影響，2）確定治療是否導致肉芽組織形成異常，以及3）確定人VEGF-A修飾的RNA對肉芽組織中血管分佈的影響。第二個試驗，試驗2，包括7隻雄性db/db小鼠，並被設計為使用新型硼基氧傳感奈米粒子的比率法成像來評價傷口隨時間的癒合。簡言之，在試驗的第一天（第0天），在每

隻小鼠的背部經手術製造1 cm直徑的全層皮膚傷口，並且將人VEGF-A修飾的RNA或運載體對照（每組n = 8隻小鼠）立即皮內注射在傷口周圍。在小鼠的亞組（每組n = 8隻小鼠）中，在第3天還遞送人VEGF-A修飾的RNA或運載體對照。使用Tegaderm將傷口包紮，並將小鼠單獨地關在籠中。在隨後的時間點採集傷口的連續照片，並在終點（第18天），收穫傷口組織並處理用於免疫組織化學（針對內皮細胞CD31+染色及蘇木精和伊紅（H&E）染色）。在試驗2中，除了僅在第0天和第3天進行給藥，在類似於試驗1的實驗程序之後，將氧傳感奈米粒子局部遞送到傷口床後採集螢光和磷光的連續圖像。試驗1的結果顯示，相對於運載體對照的連續給藥，人VEGF-A修飾的RNA（第0天為100 µg，第3天為100 µg）的連續給藥在第6天和第10天顯著（p <0.05）減少了開放傷口面積，而單次給予人VEGF-A修飾的RNA或運載體對照組沒有如此。早期時間點（第3至6天）之間傷口閉合的平均百分比與運載體對照相比顯著增加。在接受人VEGF-A修飾的RNA連續給藥的小鼠中，肉芽組織中的CD31+染色也增加。在試驗2中，相對於雙次注射運載體組，接受2次連續劑量的100 µg人VEGF-A修飾的RNA的小鼠在第6天傷口中的氧水平也顯著增加（p < 0.05）。此實驗支持在早期（更臨床相關的傷口癒合期）期間藉由連續給予人VEGF-A修飾的RNA來處理糖尿病小鼠背部的皮膚傷口顯著加速傷口癒合。加速的癒合併隨在早期時間點肉芽組織的血管化增加和傷口床的氧合增加。

[0351] 測試化合物和配製物	
測試化合物	人VEGF-A修飾的RNA（圖1B）（如實例14附圖所示的VEGF-A修飾的RNA）
配製物	檸檬酸鹽/鹽水（10 mmol/L/130 mmol/L，pH 7.5）

[0352] 測試系統

選擇測試系統的理由	使用的db/db小鼠係II型糖尿病的確立模型，並且與野生型小鼠相比，大量報導描述了傷口難愈。db/db小鼠的傷口難愈允許更長的癒合窗來測試藥物生物活性。
品系	B6.BKS (D) - <i>Lepr</i> ^{db} /J (db/db小鼠)
性別	雄性
動物總數	39隻 (試驗1：32隻小鼠，試驗2：7隻小鼠)

[0353] 研究設計

劑量	試驗1：每個注射部位25 µg VEGF-A修飾的RNA (每個注射時間點共4個部位，總共100 µg/動物)。VEGF-A修飾的RNA濃度為2.5 µg/µL。 試驗1：10 µL運載體注射劑 (10 mmol/L 檸檬酸鹽，NaCl 130 mmol/L) 試驗2：每個成像時間點為50 µL的1 mg/mL奈米粒子溶液
給藥容積	在傷口周圍四個位置皮內注射10 µL的VEGF-A修飾的RNA或運載體 (總共40 µL) 對於試驗2，每個成像時間點添加大約50 µL的奈米粒子溶液。
給藥途徑和頻率	在第0天和第3天皮內注射VEGF-A修飾的RNA或運載體。第0天：在0、90、180和270度位置處注射。第3天：在45、135、225和315度位置處注射。第3天后沒有注射。 在每個成像時間點 (0、3、6、10、13和18天)，將奈米粒子溶液局部施用於傷口。
治療持續時間	18天
數量/組	試驗1：每組8隻小鼠 試驗2：每組3隻和4隻小鼠 (見下文)

組數	試驗1 4組 第1組：單次運載體注射（第0天，n = 8，1隻小鼠在研究結束前死亡） 第2組：雙次運載體注射（第0天和第3天，n = 8） 第3組：單次人VEGF-A修飾的RNA注射（第0天，n = 8） 第4組：雙次人VEGF-A修飾的RNA注射（第0天和第3天，n = 8，1小鼠在研究結束前死亡） 試驗2（用奈米粒子） 2組 第1組：雙次運載體注射（第0天和第3天，n = 4） 第2組：雙次人VEGF-A修飾的RNA注射（第0天和第3天，n = 3）
----	---

[0354] 實驗程序

[0355] 實驗分為兩個試驗，試驗1和試驗2。試驗1專注於在糖尿病傷口癒合的背景下評價人VEGF-A修飾的RNA的生物活性。試驗2再次測試人VEGF-A修飾的RNA在相同傷口癒合模型中的生物活性，而且還採用氧敏感性奈米粒子的使用來確定傷口床內的氧合作用。除非另有說明，以下列出的程序為兩次試驗共有。

[0356] 全層皮膚傷口（第0天）：用2%可吸入的異氟烷/氧氣混合物麻醉小鼠，並且然後在手術前脫毛並滅菌。使用模版在小鼠的背部上標記1 cm直徑的圓。從輪廓區域仔細切除皮膚（包括真皮和表皮），以形成全層皮膚傷口。皮內注射人VEGF-A修飾的RNA或運載體。在手術後給予鎮痛劑（丁丙諾啡，0.1 mg/kg），並用Tegaderm敷料和自黏包裹物覆蓋傷口。

[0357] 皮內注射（第0天和第3天）：切除皮膚後立即注射10 μ L x 4 的人VEGF-A修飾的RNA或運載體（如上概述）。在第0天（創傷日），將人

VEGF-A修飾的RNA或運載體在傷口周圍以0、90、180和270度位置注射到皮膚真皮層中。在第3天，將人VEGF-A修飾的RNA或運載體圍繞傷口周圍以45、135、225和315度位置進行皮內注射，以避免在相同位置注射兩次。

[0358] 成像程序（第0、3、6、10、13和18天）：在傷口成像之前去除自黏包裹物和Tegaderm敷料。在成像前每天記錄身體質量（第0、3、6、10、13和18天）。用1200萬像素攝像機在傷口上方固定距離處採集圖像，同時用2%可吸入的異氟烷/氧氣混合物麻醉小鼠。成像後，用新的Tegaderm敷料覆蓋傷口，並用現有的自黏包裹物包裹（除非要進行奈米粒子成像）。

[0359] 用氧敏感性奈米粒子進行的成像程序（第0、3、6、10、13和18天）：對氧氣水平的成像僅在試驗2中進行。在如上所述成像之後，將小鼠保持麻醉並置於具有定製設計的成像平臺的溫度控制顯微鏡台。在UV照射下，對每個傷口採集M-JPEG，1）由以下組成：在施加硼基奈米粒子（BNP）之前，10幀（以3幀/秒採集）傷口，和2）在傷口床內50 μ L奈米粒子溶液超灌後60幀（以3幀/秒採集）。成像後，用新的Tegaderm敷料覆蓋傷口，並用現有的自黏包裹物包裹。

[0360] 傷口氧合圖像分析：僅在試驗2中進行氧水平的成像。使用專門編寫的MATLAB程序分析UV照射的傷口圖像（如上所述採集）。為了考慮背景信號，在添加奈米粒子之前針對紅色和藍色通道強度分析傷口床內的選定點。從添加奈米粒子後採集的紅色和藍色強度值減去該等背景強度值。計算每個像素的藍色通道強度與紅色通道強度的比率，以表示螢光（在BNP存在下恒定）與磷光（在氧存在下淬滅）的比例。然後使用256值色彩地圖定性展示比率法圖像，該地圖被縮放到比例範圍以在時空上解析螢光與磷光比。為了量化傷口床內的氧氣量，使用原始藍色和紅色通道強度值來構建灰度圖像（低氧：黑色像素，高氧：白色像素）。選擇傷口床作

為感興趣區域，並使用ImageJ軟體量化灰度像素均值。

[0361] 組織的收穫、組織學切片和染色（第18天）：藉由CO₂窒息將小鼠安樂死，並採集傷口的最終圖像。將傷口中心周圍1.5 cm x 1.5 cm的區域切除，並針對三次單獨的分析縱向三分。將三分之一的組織在液氮中快速冷凍並發送用於下游VEGF傳訊蛋白的評估。將組織的中間三分之一固定在10%福馬林中1週，並處理用於石蠟包埋。切割5 µm切片並用蘇木精和伊紅（H & E）且針對CD31（聖克魯茲生物技術公司（Santa Cruz Biotechnology），sc-1506，PECAM-1（M-20））染色。

[0362] 血糖測量（第0天和第18天）：在第0天初始創傷之前，所有小鼠在沒有食物的鋪墊紙的籠中禁食4小時。創傷前進行初始禁食血糖測量。在第18天收穫血液時，進行未禁食血糖測量，並對血液小樣品取樣。

[0363] 數據分析

[0364] 傷口面積定量：試驗1和2的時間點。使用ImageJ，觀察者追蹤周邊傷口，並且ImageJ計算開放傷口的面積。為了將觀察者判斷的差異考慮在內，每個傷口報告三個傷口面積的中值。將每個時間點的傷口面積針對初始傷口面積（第0天）歸一化，以考慮初始傷口尺寸的微小差異。使用重複測量雙向ANOVA統計分析數據，顯著性假定 $p < 0.05$ 。進行該等數據的三次樣條插值，以分別計算到傷口閉合25%、50%和75%的估計時間。時間點之間的平均癒合百分比藉由從先前剩餘傷口面積的百分比減去剩餘傷口面積的百分比來計算。使用重複測量雙向ANOVA分析數據，顯著性假定 $p < 0.05$ 。

[0365] CD31染色分析（試驗1）：傷口組織的組織學橫截面針對CD31免疫染色，並使用具有40x物鏡的透射光學顯微鏡成像。棕色通道（陽性CD31標記）被界限為白色和黑色以去除背景和非特異性標記。對於 $n = 3$

的每個處理組，計算CD31陽性染色的面積閾值百分比。

[0366] 蘇木精和伊紅染色分析（試驗1）：將來自每個傷口的石蠟切片用H&E染色，並使用透射光學顯微鏡使用4x物鏡成像。目視檢查肉芽組織，以定性評估表皮的厚度和連續性、肉芽組織的橫截面面積（寬度和厚度）以及任何異常組織結構如血管瘤的存在或不存在。

[0367] 下游VEGF傳訊分析（西方印漬）（試驗1）：將皮膚組織樣品用RIPA裂解緩衝液（sc-24948，聖克魯茲生物技術公司（Santa Cruz Biotechnology），聖克魯茲，加利福尼亞州）均質化，並離心，由布拉德福德（Bradford）蛋白測定法（# 5000112，Bio-Red，加利福尼亞州赫拉克勒斯）確定上清液的蛋白質濃度。將總蛋白30 µg載入在聚丙烯醯胺凝膠（# 3450124，Bio-Red，加利福尼亞州赫拉克勒斯）上並轉移到膜（# 1620232，Bio-Red，赫拉克勒斯，加利福尼亞州）上。用以下抗體探測膜：抗pAKT抗體（S473，# 4060，細胞傳訊公司（Cell Signaling），丹佛斯，麻塞諸塞州）和抗AKT抗體（# 4691，細胞傳訊技術公司（Cell Signaling Technology），丹佛斯，麻塞諸塞州），抗兔IgG二級抗體（IRDye 800CW，LI-COR生物科學公司（LI-COR biosciences），林肯，內布拉斯加州）。使用ImageJ程序29進行pAKT和AKT條帶的定量。

[0368] 身體質量和血糖分析：使用重複測量雙向ANOVA統計分析身體質量和血糖水平，顯著性假定 $p < 0.05$ 。

[0369] 氧定量分析（試驗2）：使用重複測量雙向ANOVA統計分析原始奈米粒子圖像的灰度均值，顯著性假定 $p < 0.05$ 。

[0370] 結果

傷口面積測量結果（試驗1）

[0371] 在試驗1中包括的所有組中db/db小鼠的身體質量示於圖21

中。在所有時間點所有組的身體質量都相似，除了單次注射的運載體組和單次注射的VEGF-A修飾的RNA組在第13天有顯著差異 ($p < 0.05$)。此差異不應認為對研究成果具有影響。

[0372] 在第0天和第18天，所有組的db/db小鼠中禁食血糖和非空腹血糖水平示於圖22。所有組都是相似的，除了單次注射的運載體組和單次注射的VEGF-A修飾的RNA組在第0天有85 mg/dL的顯著 ($p < 0.05$) 差異。此差異不應認為對研究成果具有影響。

[0373] 在18天觀察時間期間傷口面積的測量結果示於圖23-25中。關於開放性傷口區域的閉合，在第18天觀察時間期間，在第0天單次注射VEGF-A修飾的RNA組劑量與其單次注射的運載體當量相比並沒有顯示任何顯著的效果。另一方面，在第0天和第3天雙次注射VEGF-A修飾的RNA的組顯示顯著 ($p < 0.05$) 較快的閉合，在第6天為55%開放傷口面積並在第10天為27%開放傷口面積，相比之下對應地雙次注射運載體組的第6天為71%開放傷口面積和第10天為49%開放傷口面積（圖23）。曲線下面積分別為運載體單次注射962.83，運載體雙次注射998.21，VEGF-A修飾RNA單次注射895.12，VEGF-A修飾的RNA雙次注射792.79。到25%閉合的時間分別為單次注射運載體6.2天，雙次注射運載體5.4天，單次注射VEGF-A修飾的RNA 5.1天，以及雙次注射VEGF-A修飾的RNA 4.2天（圖24）。到50%閉合的時間分別為單次注射運載體8.9天，雙次注射運載體9.8天，單次注射VEGF-A修飾的RNA 7.8天，以及雙次注射VEGF-A修飾的RNA 6.3天（圖24）到75%閉合的時間分別為單次注射運載體12.3天，雙次注射運載體13.7天，單次注射VEGF-A修飾的RNA 12.5天，以及雙次注射VEGF-A修飾的RNA 10.4天（圖24）當比較時間點之間傷口閉合的平均百分比時，相比於雙次注射運載體組的20%變化，雙次注射的VEGF-A修飾的RNA組顯示顯著 (p

<0.05) 差異，在第3天至第6天之間有40%變化，而單次注射的VEGF-A修飾的RNA組與單次注射運載體組相比未顯示顯著性（圖25）。

組織學評價結果（試驗1）

[0374] 圖26顯示了第18天傷口區域的H&E染色切片的代表性結果。此染色顯示正常的肉芽組織，沒有任何異常組織結構的跡象。在圖27中，在單次和雙次注射運載體和VEGF-A修飾的RNA之後，對於傷口區域切片分別顯示代表性的CD31陽性染色。在圖28所示的傷口區域中基於內皮細胞的血管的定量得到增加的面積閾值百分比，單次（ 4.3 ± 4.0 ，均值 $\pm$ SD）和雙次（ 8.4 ± 4.4 ）注射VEGF-A修飾的RNA均為CD31陽性染色，分別相比於單次（ 3.2 ± 0.6 ）和雙次（ 3.2 ± 0.6 ）注射運載體。

用西方印漬進行的下游VEGF傳訊分析（試驗1）

[0375] 在第18天，包括AKT和VEGFR2的下游VEGF傳訊的分析結果示於圖29和圖30中。該等結果在第18天（研究結束）沒有顯示任何持續的下游傳訊。

氧傳感奈米粒子測量結果（試驗2）

[0376] 在圖31中，包括在兩個組即試驗2中的雙次注射運載體和VEGF-A修飾的RNA中的db/db小鼠的身體質量顯示為時間的函數。在所有時間點所有組的身體質量都是相似的。在試驗2中，對應地，在db/db小鼠中雙次注射運載體和VEGF-A修飾的RNA在第0天和第18天的禁食血糖和非空腹血糖水平示於圖32中。兩組中禁食血糖和非空腹血糖水平相似。

[0377] 在試驗2中，將氧敏感性奈米粒子置於傷口中以估計氧合。在圖33中，顯示了奈米粒子氧定量背後技術的示意圖。在室溫和在激發後，奈米粒子發出由藍色通道信號捕獲的螢光和由紅色信號通道捕獲的氧依賴性磷光。當該等信號放在一起時，結果係傷口中相對氧合的圖像。在圖34

中，顯示了雙次注射運載體的小鼠和雙次注射VEGF-A修飾的RNA的小鼠的代表性圖像，作為時間的函數。與雙次注射運載體的小鼠相比，在第3天雙次注射VEGF-A修飾的RNA的小鼠的傷口區域中的黃色和紅色已經更突出。在第6天，雙次注射VEGF-A修飾的RNA的組與雙次注射運載體的組相比，氧合顯著 ($p < 0.05$) 增加 (圖35)。

[0378] 在18天觀察時間期間傷口面積的測量結果示於圖36-38中。在第0天和第3天雙次注射VEGF-A修飾的RNA的組在第6天顯示顯著 ($p < 0.05$) 更快的閉合，開放傷口面積為45%，相比之下對應地雙次注射運載體的組開放傷口面積為62%。到25%閉合的時間分別為雙次注射運載體3.4天和雙次注射VEGF-A修飾的RNA 3.8天。到50%閉合的時間分別為雙次注射運載體7.1天和雙次注射VEGF-A修飾的RNA 5.6天。到75%閉合的時間分別為雙次注射運載體8.9天和雙次注射VEGF-A修飾的RNA 7.8天。當比較時間點之間傷口閉合的平均百分比時，對應地相比於雙次注射運載體組的14%變化，雙次注射的VEGF-A修飾的RNA組顯示顯著 ($p < 0.05$) 差異，在第3天至第6天之間有40%變化。

[0379] 結論

[0380] 在損傷後第0天和第3天分到傷口周圍附近4個注射部位的100 μg VEGF-A修飾的RNA的表皮內給予相對於運載體對照顯著減少在第6天和第10天db/db小鼠中的開放傷口面積。

[0381] 在損傷後第0天和第3天分到傷口周圍附近4個注射部位的100 μg VEGF-A修飾的RNA的表皮內給予相對於運載體對照顯著增加在早期時間點之間 (第3至6天) 傷口閉合的平均百分比。

[0382] 在損傷後第0天和第3天分到傷口周圍附近4個注射部位的100 μg VEGF-A修飾的RNA的表皮內給予相對於運載體對照且相對於僅在

初始時間點（第0天）給予VEGF-A修飾的RNA，增加了第18天肉芽組織的組織學橫截面中的CD31+免疫染色的面積。

[0383] 在損傷後第0天和第3天分到傷口周圍附近4個注射部位的100 µg VEGF-A修飾的RNA的表皮內給予相對於運載體對照顯著增加了在第6天傷口中的氧量。

6.15.實例15

在體內，人VEGF-A修飾的RNA對小鼠耳朵血液動力學和新生血管形成的影響的光聲顯微鏡檢查

[0384] 在此實驗中，在體內在健康的小鼠耳朵中監測對人VEGF-A修飾的RNA（VEGF-A修飾的RNA）的急性和慢性血管反應。應用多參數光聲顯微鏡檢查（PAM）技術來動態表徵VEGF-A修飾的RNA對血管直徑、血色素氧飽和度（sO₂）、血流量和新生血管形成的影響。進行對VEGF-A修飾的RNA、重組人VEGF-A蛋白和檸檬酸鹽/鹽水/運載體的反應的並行和定量比較。此外，藉由比較高劑量（100 µg/耳）和低劑量（10 µg/耳）VEGF-A修飾的RNA誘導的結果，探討了反應的劑量依賴性。研究表明，VEGF-A修飾的RNA在注射後不久（30分鐘至6小時）誘導注射部位附近局部血流量的明顯上調。另外，注意到注射高劑量VEGF-A修飾的RNA後7至14天不顯著的毛細血管生成和新生血管形成，但注射低劑量VEGF-A修飾的RNA、VEGF-A蛋白或檸檬酸鹽/鹽水的耳朵中不是這樣。此外，在注射部位下游的微血管血流中VEGF-A修飾的RNA誘導醒目的和空間限制的上調，這與對人重組VEGF-A蛋白的高度集中的應答有明顯差異。

[0385] 本研究的目的是藉由多參數光聲顯微鏡檢查（PAM）技術來在健康的小鼠耳朵體內動態表徵VEGF-A修飾的RNA對血管直徑、血色素氧飽和度（sO₂）、血流量和新生血管形成的影響。

[0386] 化合物和配製物

測試化合物	人VEGF-A修飾的RNA（圖1B）（如實例15附圖所示的VEGF-A修飾的RNA）
配製物	檸檬酸鹽/鹽水（10 mmol/L/130 mmol/L，pH 6.5）

對照/參考化合物係來自R & D系統公司（614麥金利普萊斯NE（McKinley Place NE），明尼阿波里斯市，明尼蘇達州55413，美國）的重組人VEGF-A₁₆₅蛋白。

[0387] 測試系統

選擇測試系統的理由	使用多參數PAM進行所有動物實驗（寧（Ning）等人，2015）。它係迄今為止唯一能夠動態且全面地表徵體內血流量、灌注、氧飽和度和新生血管形成的可用顯微鏡檢查平臺，因此非常適合於本研究。
品系	C57BL/6
性別	雌性
動物總數	12

[0388] 研究設計

劑量	檸檬酸鹽/鹽水；NA 高劑量VEGF-A修飾的RNA；100 µg 中劑量VEGF-A修飾的RNA；30 µg 低劑量VEGF-A修飾的RNA；10 µg VEGF-A蛋白；1 µg
給藥容積	10 µL
給藥途徑和頻率	皮內，單次注射
治療持續時間	急性（少於5分鐘）

數量/組	1到3
組數	5
個體動物鑒定 編號/參考號	第1組，注射高劑量（HD）VEGF-A修飾的RNA，3隻小鼠：HD 1號，HD 2號，HD 3號 第2組，注射低劑量（LD）VEGF-A修飾的RNA，2隻小鼠：LD 1號，LD 2號 第3組，注射中劑量（MD）VEGF-A修飾的RNA，1隻小鼠：MD 1號 第4組，注射VEGF-A蛋白（P），3隻小鼠：P 1號，P 2號，P 3號 第5組，注射檸檬酸鹽/鹽水，3隻小鼠：C/S 1號，C/S 2號，C/S 3號

[0389] 實驗程序

[0390] 對於完全非侵入式的小鼠耳朵成像，可以反復對相同的小鼠成像以對不同藥物對血管直徑、sO₂、血流量、血管生成和新生血管形成的影響進行延時監測。在皮內注射研究藥物之前採集小鼠耳朵的基線圖像。然後，將藥物處理的耳朵監測6小時以捕獲急性血管反應並在第7天再次成像以記錄慢性血液動力學反應和可能的新生血管形成。為了檢查VEGF-A修飾的RNA誘導的血管重塑的持續性，將用高劑量VEGF-A修飾的RNA處理的小鼠分別在第14、21和28天進一步成像。

[0391] 詳細的PAM成像方案如下：將小鼠在充滿3%異氟烷吸入氣體的小室中麻醉（典型流速為1至1.5 L/min，取決於體重）。整個實驗中以1.5%異氟烷維持麻醉。使用醫用級空氣作為吸入氣體來將小鼠維持在正常生理狀態。純氧不適合，因為它將靜脈血氧合提高到高於正常生理水平並偏向PAM測量。隨後，將小鼠從麻醉室轉移到附近的立體定位階段。使用

加熱墊將小鼠的體溫保持在37°C。在立體定位階段定位之後，將一層超音波凝膠施加在要成像的耳朵的表面上。注意避免在凝膠內捕獲氣泡。然後將耳朵放置在填充有去離子水的箱下面，並緩慢升高直到超音波凝膠與被聚乙烯薄膜覆蓋的箱底緩慢接觸。將軟膏施加至眼睛以防止乾燥和意外的雷射損傷。然後將成像頭降低直到聲透鏡浸入水箱中。去除在透鏡下麵捕獲的任何氣泡。因此，從上到下豎直設置包括聲透鏡、水箱、超音波凝膠和小鼠耳朵。然後檢查雷射能量密度，以確保其在美國國家標準協會的雷射安全標準（即20 mJ/cm²）內運行。圖像採集後，用去離子水清潔小鼠耳朵，並將其運回居住籠中。

[0392] 藉由多參數PAM同時獲得三個血管參數（寧（Ning）等人，微血管解剖學、氧飽和度和血流量的同時光聲顯微鏡檢查（Simultaneous photoacoustic microscopy of microvascular anatomy, oxygen saturation, and blood flow），光學通訊（Opt Lett），2015，40：910-913）。在每個取樣位置，血管解剖學藉由PAM採集的原始光聲信號的希爾伯特變換（Hilbert-transformation）直接產生。以雙波長激發獲得血管sO₂，藉由其光吸收光譜來區分氧-和去氧-血紅蛋白。藉由關聯在532 nm處獲得的100個連續A線來定量血流速度。相關分析的時間窗設置為10 ms。計算的相關係數的時間過程遵循二階指數衰減，並且與血流速度成線性比例的衰減常數被提取用於流量定量。此外，借助於記錄的血管分割演算法提取了各個血管的平均直徑、sO₂和血流量（瑟蒂克諾（Soetikno）等人，光聲顯微鏡檢查獲得的缺血性中風圖像的血管分割分析（Vessel segmentation analysis of ischemic stroke images acquired with photoacoustic microscopy）國際光學工程學會學報（Proc.SSPE），2012，8223：822345）。將各組內不同動物的測量組合以用於統計分析。

[0393] 數據分析

[0394] 顯示的結果係均值 $\pm$ SD。為了研究檸檬酸鹽/鹽水、VEGF-A修飾的RNA和人重組VEGF-A蛋白處理的小鼠之間的定量差異，使用重複測量的混合模型進行統計分析。將具有協方差矩陣自回歸結構的個體截距模型擬合到血管直徑或容積流量自基線的差異。另外，使用基線血管直徑或容積流量作為協變數來校正任何差異。

[0395] 結果

[0396] 將高劑量的VEGF-A修飾的RNA皮內注射在三隻健康小鼠的耳朵中。血管結構、sO₂和血流量的代表性延時PAM圖像顯示在圖39中。注射後不久（即長達6小時），在所有三隻小鼠的注射部位周圍觀察到血管sO₂和血流量的顯著上調。在第7、14、21和28天重複採集的PAM圖像顯示，先前上調的sO₂逐漸回退，而血流量保持在基線之上。除了持續的血流上調外，在三隻高劑量的VEGF-A修飾的RNA注射的耳朵中的兩個中觀察到醒目的血管生成和新生血管形成（圖40）。在PAM圖像中的該等新血管的強烈對比意味著它們被紅細胞高度灌注。確切地，如在圖40中看到的，新血管在注射後14天出現，在第21天回退，並在第28天“消失”。類似地，在第二高劑量小鼠中，新血管在第7天出現，並在注射後14天“消失”。新血管的“回退/消失”可能是由於血液灌注的喪失。

[0397] 為了探索減少的VEGF-A修飾的RNA劑量是否可以誘導血流上調和新生血管形成，評估了對較低劑量的VEGF-A修飾的RNA（30 μ g和10 μ g）的血管反應。在注射了30 μ g VEGF-A修飾的RNA的一隻小鼠中，誘導sO₂和血流中較不持續的上調，其在第14天回退到基線。儘管能夠在注射部位周圍產生毛細血管生成，但未觀察到明顯的新生血管形成。在兩隻小鼠中降低VEGF-A修飾的RNA劑量甚至更低（至10 μ g）導致進一步的血

管反應受損（圖41）。確切地，血管 sO_2 和血流量的急性上調略微更弱並且較不持續（在第7天回退到基線），並且沒有觀察到明顯的新生血管形成或血管生成。該等結果進一步證實了對VEGF-A修飾的RNA的血管反應的劑量依賴性。

[0398] 為了比較，在三隻小鼠中研究了對人重組VEGF-A蛋白的血管反應（圖42）。與高劑量和中劑量VEGF-A修飾的RNA類似，在整個7天的監測期內VEGF-A蛋白誘導局部 sO_2 和血流的持續上調。然而，在第7天，在三隻小鼠中的兩隻中僅觀察到非常適度的毛細血管生成，並且在所有情況下均未觀察到新血管。

[0399] 最後，進行三個對照實驗以檢查對檸檬酸鹽/鹽水的血管反應。如在圖43中顯示的，局部 sO_2 和血流量在注射後不久稍微上調，可能是由於組織間隙液壓增加，並在第7天恢復到基線水平。沒有觀察到血管生成、新生血管形成或炎症反應。

[0400] 使用血管分割，進一步定量比較對高劑量VEGF-A修飾的RNA、人重組VEGF-A蛋白和檸檬酸鹽/鹽水的血管反應，並在圖44中示出。在注射VEGF-A修飾的RNA和VEGF-A蛋白後不久觀察到急性和明顯的血管舒張和流量上調。回應於檸檬酸鹽/鹽水注射還觀察到血管直徑和血流上的適度反應，可能是組織間隙液壓增加的結果。作為反應，對於處理和被視作對照的檸檬酸鹽/鹽水，隨著時間的推移比較血管直徑（4個血管的均值）自基線（注射前）的變化。治療與時間的相互作用係統計學上顯著的（ $p < 0.0001$ ）。在7天時，所有處理與彼此統計學上有差異（ $p = 0.0009$ ），並且在6小時處，VEGF-A修飾的RNA和人重組VEGF-A蛋白與鹽水不同（ $p = 0.004$ ）。對容積流量自基線的變化進行類似的分析（4個血管的均值）。對於處理和被視為對照的檸檬酸鹽/鹽水，隨著時間的推移比較容積流量的變

化。治療與時間的相互作用係統計學上顯著的($p = 0.02$)。在第7天, VEGF-A修飾的RNA和人重組VEGF-A蛋白與檸檬酸鹽/鹽水不同($p = 0.0015$)。注射後7天, 檸檬酸鹽/鹽水組的血管直徑和血流量返回到基線, 這與VEGF-A修飾的RNA和人重組VEGF-A蛋白組中的持續血管舒張和流量上調形成醒目對比。

[0401] 進一步探索對局部注射的微血管反應的空間依賴性。為此, 使用血管分割除去直徑大於 $50\ \mu\text{m}$ 的所有主要血管, 並且隨後將剩餘的微血管分成微節段。然後, 藉由疊加個體微節段的值將微血管 sO_2 和血流量延伸到組織水平。疊加中的加權因子被定義為微節段的質心與感興趣組織的位置之間的距離的倒數。將在注射VEGF-A修飾的RNA(即基線)之前採集的組織水平流量和 sO_2 地圖從第7天採集的減去, 顯示在注射部位的微血管血流下游中醒目的(即約4倍)和空間上限制的上調(圖45), 而微血管 sO_2 的變化係適度的(圖45)。相比之下, VEGF-A蛋白誘導的微血管流量上調在注射部位周圍不太明顯且更集中(圖46), 但微血管 sO_2 的增加更為顯著。如所預期的, 在第7天對鹽水注射的微血管反應去除(圖47)。

[0402] 結論

[0403] 使用多參數光聲顯微鏡檢查和血管分割, 監測並比較了對皮內注射VEGF-A修飾的RNA、人重組VEGF-A蛋白和檸檬酸鹽/鹽水的時空血管反應。證明VEGF-A修飾的RNA可以在體內誘導劑量依賴性的顯著和持續的血管生成、血流上調、毛細血管生成和新生血管形成。此外, 在注射部位下游的微血管血流中VEGF-A修飾的RNA誘導醒目的和空間限制的上調, 這與對人重組VEGF-A蛋白的高度集中的應答有明顯差異。

6.16.實例16

在體內, 兔皮內注射VEGF-A修飾的RNA後人VEGF-A蛋白的表現和檢

測

[0404] 在此實驗中，用微量透析技術研究了在檸檬酸鹽/鹽水中配製的人VEGF-A修飾的RNA（VEGF-A修飾的RNA）的皮內（id）注射後兔皮膚中VEGF-A蛋白的產生。

[0405] 在4隻經麻醉的兔子的每一隻中，在左後腿上皮內插入兩個微量透析探針。在t = 0小時（h）時，開始兩個微量透析探針的回收時間。1小時後，接近每個微量透析探針給出VEGF-A修飾的RNA的4次注射（每次50 μL和50 μg）。每小時在冰上收集含蛋白質的洗提物，在t = 2 h開始，直至t = 6 h。最後一次洗提物收集後，注射部位周圍的區域被切除。

[0406] 在注射VEGF-A修飾的RNA後3小時，在8個探針中的3個的洗提物中發現人VEGF-A的可檢測水平（218±155，均值±SEM）。相應地，在注射後4和5小時，分別在8個探針中的5個和8個探針中的5個的洗提物中檢測到VEGF-A蛋白。儘管觀察到的濃度變化很大；但蛋白質水平在該等時間點趨於穩定（分別為369±217和360±203 pg/mL）。

[0407] 可以得出結論，在皮內注射VEGF-A修飾的RNA後3至5小時，可以在兔皮膚中用微量透析技術檢測人VEGF-A蛋白。

[0408] 化合物和配製物

測試化合物	人VEGF-A修飾的RNA（圖1B）（如實例16附圖所示的VEGF-A修飾的RNA）
配製物	檸檬酸鹽/鹽水（10 mmol/L/130 mmol/L，pH 6.5）

[0409] 測試系統

物種	兔
性別	雄性
動物總數	4

[0410] 研究設計

劑量	在每個探針位置分4次注射總共200 µg的 VEGF-A修飾的RNA 每隻動物微量透析探針數：2
給藥容積	每個探針位置4乘以50 µL
給藥途徑和頻率	皮內
治療持續時間	急性
數量/組	4
組數	1

[0411] 實驗程序

[0412] 麻醉和維持體內平衡：將紐西蘭白色（NZW）雄性兔分別用作為靜脈內推注給予的氯胺酮（5 mg/kg，Ketalar®，輝瑞（Pfizer）AB，索倫蒂納市，瑞典）和美托咪定（medetomidine）（0.15 mg/kg，Domitor®，奧利昂藥物公司（Orion Pharma），埃斯波，芬蘭）進行麻醉，隨後維持輸注（11和0.33 mg/kg * h）。將兔子插管並使用伺服呼吸機（900D，西門子埃萊馬（Siemens Elema），索爾納，瑞典）用室內空氣和10% O₂的混合物進行人工通氣。呼吸速率在30週期/min保持恒定。在實驗前和實驗過程中，藉由血液氣體分析儀（ABL800 Flex，輻射計（Radiometer），哥本哈根，丹麥）測量動脈血中的血液氣體和pH值，並且如果需要，將其藉由調節潮氣量調整為落入正常生理範圍內。藉由覆蓋動物並藉由外部加熱將直腸溫度保持在38°C和39.5°C之間。

[0413] 動物製劑：將用於給予麻醉劑的經皮聚乙烯導管（Venflon 0.8 mm，比戈（Viggo），赫爾辛堡，瑞典）插入左耳的邊緣靜脈。將聚乙烯導管（Intramedic PE-90 Clay Adams，貝迪公司（Becton Dickinson），斯帕克斯，馬里蘭州，美國）插入右頸動脈分別用於動脈血壓記錄（藉由壓力感測器，彼得·馮·伯格·梅蒂井特赫尼克（Peter von Berg Medizintechnik）GmbH，基爾希塞翁/恩格爾哈廷（Kirchseeon/Englharting），德國）和血液採樣。藉由使用電腦和軟體（PharmLab V6.6，阿斯利康（AstraZeneca）R&D Mölndal，瑞典）記錄血壓測量信號並採樣。左後腿的皮毛用電動剃鬚刀去除。

[0414] 微量透析：根據供應商提供的說明，在每個實驗中將兩個 100 kDa 線性微量透析探針（命名為A和B）（66線性導管 & 66高截斷線性導管，M透析AB，哈馬比（Hammarby），瑞典斯德哥爾摩）皮內插入到兔子左後腿的上部。將微量透析探針用 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 鹽水（9 mg/mL，費森尤斯卡比公司（Fresenius Kabi AG），巴特洪堡（Bad Homburg），德國）灌注，並將洗提物樣品收集在預先稱重的 0.5 mL 管（蛋白LoBind，埃普多夫公司（Eppendorf AG），漢堡，德國）中的冰上。透析膜和收集管出口之間的死區約為 1.5 μL 。測定每種洗提物的容積，並以 1:1 的條件添加磷酸鹽緩衝鹽水（PBS pH 7.4，生命技術公司（Life Technologies）TM 的 gibco®，派斯利，英國）中的 2% 牛血清白蛋白（BSA，A7979，西格瑪奧德里奇，聖路易斯市，密蘇里州，美國）。將該等樣品在 -80°C 下保存直到分析。

[0415] 實驗方案：圖48A中示出了實驗設計。在 $t = 0$ h 時，開始兩個微量透析探針的回收時間。1小時後（即 $t = 1$ h），收集回收洗提物，並隨後在微量透析-探針部位進行4次注射，如圖48B所描繪的。從 $t = 2$ h 至 $t = 6$ h，每小時收集含蛋白質的洗提物，並如上所述進行處理。在研究結束時，

藉由致死的靜脈內劑量的戊巴比妥鈉（pentobarbital sodium）（Allfatal vet，Omnia AB，斯德哥爾摩，瑞典）終結動物。

[0416] 微量透析洗提物中人VEGF-A蛋白的評估：使用Gyrolab平臺測定微量透析洗提物樣品中表現的人VEGF-A濃度。Gyrolab使用具有微結構孔的親和力流通版式（Gyros，烏普薩拉，瑞典）。使用由含有具有鏈黴親和素塗覆材料（Gyros）的親和捕獲柱的96個微結構孔組成的Gyrolab bioafy 1000CD。首先，將針對人VEGF A（AF-293-NA，R&D系統公司，阿賓頓，英國）的生物素化捕獲多株抗體固定在鏈黴親和素柱上，其中樣品藉由旋轉重力流過，並且分析物被捕獲在抗體上。然後使針對人VEGF-A（R&D系統公司）的Alexa標記的檢測抗體流過柱，並使用螢光強度來定量配位基。使用五參數線性擬合產生標準曲線，並根據其吸光度從標準曲線計算樣品濃度。用MSD稀釋液9（中尺度發現公司（Meso Scale Discovery），羅克維爾，馬里蘭州，美國）中的人VEGF-A165（293-VE-010，R&D系統公司）製備範圍為16.7 pg/mL至12170 pg/mL的標準曲線。質量控制品係從MSD稀釋液9中的人VEGF-A165的WHO標準品（國家生物標準與控制研究所（National Institute for Biological Standards and Control），赫特福德郡，英國）準備的。將所有標準品、QC和樣品與Rexxip HN-max（Gyros）在分析前1:1混合。

[0417] 數據分析：結果呈現為均值±SEM。

[0418] 結果

[0419] 來自四隻兔子（兩個各自插入探針，A和B）的個體人VEGF-A蛋白水平在圖49中呈現為均值±SEM。在注射VEGF-A修飾的RNA後3小時，在8個探針中的3個的洗提物中發現人VEGF-A的可檢測水平（218±155，均值±SEM）。相應地，在注射後4和5小時，分別在8個探針中

的5個和8個探針中的5個的洗提物中檢測到VEGF-A蛋白。儘管觀察到濃度變化很大，但蛋白質水平在該等時間點趨於穩定（分別為 369 ± 217 和 360 ± 203 pg/mL）。

[0420] 結論

[0421] 在皮內注射VEGF-A修飾的RNA後3至5小時，用微量透析技術檢測到人VEGF-A蛋白在兔皮膚中表現。

6.17.實例17

體內向經受心肌梗塞的豬心內注射人VEGF-A修飾的RNA後對毛細血管和小動脈密度以及纖維化的影響

[0422] 在蘭嶼小型豬中進行VEGF-A修飾的RNA（1或10 mg）、檸檬酸鹽/鹽水（2 mL）或假手術對毛細血管和小動脈密度以及纖維化的影響的評估。

[0423] 毛細管和小動脈密度測定：在研究終止後，在4°C將來自梗塞周圍區域的組織樣品在4%多聚甲醛中固定至少24小時，並且然後石蠟包埋。切片後，脫石蠟並再水合，藉由在10 mmol/L檸檬酸鈉緩衝液（pH 6）中煮沸10分鐘進行抗原修復。然後將切片用抗心肌肌鈣蛋白I（1：200，DSHB，愛荷華，愛荷華州，美國）、抗-同工凝集素（1：100，英傑公司，卡爾斯巴德，加利福尼亞州，美國）和SM-22 α （1：200，艾碧康（Abcam），劍橋，英國）孵育過夜。洗滌三次後，將切片用相關的Alexa Fluor 488或568抗體（英傑公司）進行孵育。將細胞核用4',6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI，西格瑪奧德里奇，聖路易斯市，密蘇里州，美國）染色。安裝後，藉由從沿著梗塞周圍區域的三個隨機選擇的區域拍攝的圖像（200倍放大）手動計數和求平均值計算毛細血管和小動脈密度。

[0424] 纖維化測量：將遠離梗塞/梗塞周圍區域的樣品如上所述針

對梗塞周圍區域樣品進行處理。使用梅森氏三色染色 (Masson's trichrome staining) 測定根據膠原沈積的纖維化。使用亮視野顯微鏡 (200倍放大) 從三個隨機選擇的區域針對每個切片拍攝圖像，並且然後定量 (Axio Vision，蔡司，慕尼黑，德國) 並求平均值。

[0425] 結果

[0426] 圖50A和圖50B說明了誘導心肌梗塞後兩個月評估的假手術或注射VEGF-A修飾的RNA (1或10 mg) 或檸檬酸鹽/鹽水 (2 mL) 對梗塞周圍 (邊界) 區域中的毛細血管和小動脈密度的影響。如所見的，VEGF-A修飾的RNA的注射與毛細血管和小動脈密度的劑量依賴性和統計學顯著性增加相關 (相比檸檬酸鹽/鹽水的注射)。

[0427] 證明VEGF-A修飾的RNA對比檸檬酸鹽/鹽水的注射統計學上顯著減小遠離梗塞區域收穫的組織樣品中的膠原含量 (即纖維化) (圖50C)。

6.18.實例18

體外人VEGF-A修飾的RNA轉染之後VEGF-A蛋白產生的時間歷程

[0428] 為了研究VEGF-A修飾的RNA轉染之後人VEGF-A蛋白產生的時間曲線，將10,000個人主動脈平滑肌細胞 (hAoSMC，龍沙公司，巴塞爾，瑞士) 或20,000個衍生自誘導多能細胞的人心肌細胞 (hiPS-CM，細胞動力公司 (Cellular Dynamics)，麥迪森，威斯康辛州，美國) 分別接種在96-孔板中補充有生長因子的平滑肌細胞基礎培養基 (SmGM-2，龍沙公司) 或充分補充的心肌細胞維持培養基 (細胞動力公司) 中。第二天，在無血清培養基中進行轉染，並根據製造商的說明書將250 ng VEGF-A修飾的RNA與脂質轉染胺2000 (英傑公司，卡爾斯巴德，加利福尼亞州，美國) 混合並加入到細胞中。使用與水混合的脂質轉染胺2000作為轉染對照。每8

個小時用新鮮培養基代替培養基，並在不同時間點用ELISA測量上清液中的人VEGF-A蛋白。

[0429] 在人主動脈平滑肌細胞和人心肌細胞中由VEGF-A修飾的RNA產生的人VEGF-A蛋白的多少在轉染後大約8小時達到峰值，並且然後下降到低水平（圖51）。轉染後32小時，沒有檢測到或檢測到非常低水平的蛋白質。

6.19.實例19

小鼠中心肌梗塞後心外膜衍生細胞擴張的時間歷程

[0430] 將雄性C57BL/6小鼠用異氟烷麻醉，插管並連接到呼吸機，並用補充有空氣和氧氣（80%/20%）的2.5%至3%異氟烷人工通氣。藉由加熱的操作臺和加熱燈將直腸溫度保持在37.5°C。隨後，將胸部剃光，並將ECG針電極插入爪中，以評估心率和ECG。在皮膚上進行切口，仔細分離胸部肌肉，並將第四肋間隙打開以便胸部牽引器插入。輕輕地解剖心包，並將7-0結紮絲線置於左心房略下方的左前降支冠狀動脈周圍，用於永久性閉塞。藉由視覺檢查（遠離縫合線的左心室變暗淡）和ECG的ST升高證實了缺血。對照動物未經受動脈閉塞。然後用6-0可吸收縫合線閉合肋骨和皮膚。皮下給予鎮痛劑（丁丙諾啡，0.05 mg/kg，10 mL/kg），並使小鼠在其籠中在電加熱墊上恢復。在心肌梗塞（MI）後第3天、第7天和第14天處死小鼠。切下心臟，並且然後在鹽水中沖洗，之後進行福馬林固定。藉由免疫組織化學法，藉由威爾姆斯瘤蛋白1（Wt-1）表現來評估心包膜衍生的細胞（EPDC）活化。

[0431] 將福馬林固定的心臟從頂部到基部橫向切成1 mm切片。將心臟切片在乙醇和二甲苯中脫水，包埋在石蠟中，並且最後切成4 μm切片。使用針對Wt-1（稀釋1：200，Calbiochem，聖地牙哥，加利福尼亞州，美國）

的兔多株抗體在溫塔娜發現（Ventana Discovery）XT自動染色機中進行作為EPDC標記的Wt-1的免疫組織化學檢查。所有試劑均為溫塔娜（Ventana）產品（羅氏公司（Roche），巴塞爾，瑞士）。對Wt-1陽性（Wt-1⁺）細胞進行盲法評價，並藉由手動評分系統進行評價。得分定義為：0：無Wt-1⁺細胞，1：稀有數量的Wt-1⁺陽性細胞，2：在心臟中位於特定水平的單層中很少的Wt-1⁺陽性細胞，3：位於心臟中若干水平的中等數量的Wt-1⁺陽性細胞，以及4：在心臟中位於若干水平的厚層中大量Wt-1⁺陽性細胞。

[0432] 在對照非梗塞心臟的心外膜中發現很少的Wt-1⁺ EPDC（圖52A）。誘導MI後，啟動Wt-1⁺ EPDC，並擴增數量在MI後7天達到峰值（圖52B）。

7.序列表

7.1.SEQ ID NO：1：實例中使用的編碼VEGF-A的經修飾RNA

5',^{7Me}G_{ppp}G_{2'}OMeGGAAAUAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAU
AAGAGCCACCAUGAACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCU
UGCCUUGCUGCUCUACCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCA
CCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAG
UUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACCC
UGGUGGACAUCUUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGAGUACAUCU
UCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCA
AUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAACAUCA
CCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAG
GAGAGAUGAGCUUCCUACAGCACAAACAAUGUGAAUGCAGACCAA
AGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAAUCCCUGUGGGCCUUGCUCAG
AGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCGCGAGACGUGUAAAU
GUUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUUG
AGUUAACGAACGUACUUGCAGAUUGACAAGCCGAGGCGGUGAU
AAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUC
CCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUU
UGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AAAUCUAG_{OH}3'

（ SEQ ID NO：1）

其中：

對應地，A，C，G&U = AMP，CMP，GMP & N1-甲基-假UMP
Me = 甲基
p = 無機磷酸鹽

7.1.SEQ ID NO：2：人VEGF-A同功型VEGF-165的胺基酸序列
MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDV
YQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPT
EESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPC
SERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR (**SEQ ID NO：2**)

7.3.螢光素酶mRNA構建體

螢光素酶mRNA構建體 (實例5和10)	
研究目標名稱	螢光素酶
研究多肽名稱	螢火蟲螢光素酶
注意：在以下mRNA序列中，對應地，A，C，G & U = AMP，CMP，GMP & N1-甲基-假UMP	
帽	帽，牛痘加帽酶
5'UTR	GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAG UAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC (SEQ ID NO：3)
mRNA構建體的ORF (不包括終止密碼子)	AUGGAAGAUGCGAAGAACAUCAAG AAGGGACCUGCCCCGUUUUACCCUU UGGAGGACGGUACAGCAGGAGAAC AGCUCCACAAGGCGAUGAAACGCU ACGCCCUGGUCCCCGGAACGAUUGC GUUUACCGAUGCACAUAUUGAGGU AGACAUCACAUACGCAGAAUACUU CGAAAUGUCGGUGAGGCUGGCGGA AGCGAUGAAGAGAUUAUGGUCUUA CACUAAUCACCGCAUCGUGGUGUG UUCGGAGAACUCAUUGCAGUUUUU CAUGCCGGUCCUUGGAGCACUUUU CAUCGGGGUCGCAGUCGCGCCAGCG AACGACAUCUACAAUGAGCGGGAA CUCUUGAAUAGCAUGGGGAUCUCC CAGCCGACGGUCGUGUUUGUCUCC AAAAAGGGGCUGCAGAAAAUCCUC AACGUGCAGAAGAAGCUCCCCAUU AUUCAAAAGAUCAUCAUUAUGGAU AGCAAGACAGAUUACCAAGGGUUC CAGUCGAUGUAUACCUUUGUGACA

	UCGCAUUUGCCGCCAGGGUUUAAC GAGUAUGACUUCGUCCCCGAGUCA UUUGACAGAGAUAAAACCAUCGCG CUGAUUAUGAAUCCUCGGGUAGC ACCGGUUUGCCAAAGGGGGUGGCG UUGCCCCACCGCACUGCUUGUGUGC GGUUCUCGCACGCUAGGGAUCCUA UCUUUGGUAAUCAGAUCAUUCCCG ACACAGCAAUCCUGUCCGUGGUACC UUUUCAUCACGGUUUUGGCAUGUU CACGACUCUCGGCUAUUUGAUUUG CGGUUUCAGGGUCGUACUUAUGUA UCGGUUCGAGGAAGAACUGUUUUU GAGAUCCUUGCAAGAUUACAAGAU CCAGUCGGCCCUCCUUGUGCCAACG CUUUUCUCAUUCUUUGCGAAAUCG ACACUUAUUGAUAAGUAUGACCUU UCCAAUCUGCAUGAGAUUGCCUCA GGGGGAGCGCCGCUUAGCAAGGAA GUCGGGGAGGCAGUGGCCAAGCGC UCCACCUUCCCGGAUUUCGGCAGG GAUACGGGCUCACGGAGACAACAU CCGCGAUCCUUAUCACGCCCGAGGG UGACGAUAAGCCGGGAGCCGUCGG AAAAGUGGUCCCCUUCUUUGAAGC CAAGGUCGUAGACCUCGACACGGG AAAAACCCUCGGAGUGAACCAGAG GGGCGAGCUCUGCGUGAGAGGGCC GAUGAUCAUGUCAGGUUACGUGAA UAACCCUGAAGCGACGAAUGCGCU GAUCGACAAGGAUGGGUGGUUGCA UUCGGGAGACAUUGCCUAUUGGGA UGAGGAUGAGCACUUCUUUAUCGU AGAUCGACUUAAGAGCUUGAUCAA AUACAAAGGCUAUCAGGUAGCGCC UGCCGAGCUCGAGUCAAUCCUGCUC CAGCACCCCAACAUUUUCGACGCCG GAGUGGCCGGGUUGCCCGAUGACG ACGCGGGUGAGCUGCCAGCGGCCG UGGUAGUCCUCGAACAUGGGAAAA CAAUGACCGAAAAGGAGAUUCGUGG ACUACGUAGCAUCACAAGUGACGA CUGCGAAGAAACUGAGGGGGAGGGG UAGUCUUUGUGGACGAGGUCCCGA AAGGCUUGACUGGGAAGCUUGACG
--	--

	CUCGCAAAAUCCGGGAAAUCCUGA UUAAGGCAAAGAAAGGCGGGAAAA UCGCUGUC (SEQ ID NO : 4)
3'UTR	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUG GCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCU GCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGA AUAAGUCUGAGUGGGCGGC (SEQ ID NO : 5)
相應的胺基酸序列	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQL HKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVDITY AEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIV VCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPAN DIYNERELNSMGISQPTVVVFVSKKGL QKILNVQKKLPPIQKIIIMDSKTDYQGF QSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDR DKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTA CVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPF HHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFE EELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAK STLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVG EAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILIT PEGDDKPGAVGKVVPFFEAKVVDLDT GKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVN NPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDED EHFFIVDRLKSLIKYKGYQVAPAELESI LLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAV VVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAK KLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIR EILIKAKKGGKIAV (SEQ ID NO : 6)
聚(A)尾	100 nt

7.4.LacZ mRNA構建體

LacZ mRNA構建體 (實例4、8和10)	
注意：在以下mRNA序列中，對應地，A，C，G & U = AMP，CMP，GMP & N1-甲基-假UMP	
核苷酸序列 (5'UTR，ORF，3'UTR)	UCAAGCUUUUGGACCCUCGUACAG AAGCUAAUACGACUCACUAUAGGG AAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAA GAAGAAAUUAAGAGCCACCAUGG CCUUGGCUGUCGUCCUGCAAAGAA GAGAUUGGGAAAAUCCUGGAGUUA

	CGCAACUGAAUAGACUCGCCGCACA UCCACCGUUCGCGUCCUGGCGAAAU AGCGAAGAAGCGCGGACCGACAGA CCUUCGCAGCAGCUGCGCUCUCUCA ACGGGGGAAUGGCGGUUCGCAUGGU UUCCGGCUCUUGAGGCAGUCCCGGA AAGCUGGCUCGAGUGCGACCUCCCG GAAGCCGAUACGGUGGUGGUGCCG UCAAAUUGGCAAAUGCAUGGAUAC GACGCCCCCAUCUACACCAACGUCA CUUACCCUAUCACCGUGAAUCCCCC AUUCGUCCCCGACUGAGAACCCGACU GGAUGCUACAGCCUGACCUUUAAC GUGGACGAGUCGUGGCUGCAAGAA GGGCAGACUCGCAUCAUUUUCGAC GGAGUCAACUCCGCGUCCAUCUU UGGUGUAACGGACGGUGGGUGGGA UACGGGCAGGACUCCAGGCUGCCG AGCGAAUUCGACUUGUCAGCCUUC CUGCGCGCCGGCGAAAACCGCCUGG CUGUCAUGGUCCUAGAUGGUCGG AUGGCUCGUACCUGGAGGAUCAGG ACAUGUGGAGGAUGUCAGGGAUCU UCCGGGAUGUCUCGCUGCUCCACAA GCCAACUACCCAGAUUCUCCGACUUU CAUGUGGCCACCCGCUUCAAACGAUG ACUUCAGCAGGGCGGUUCUGGAAG CCGAGGUGCAAAUGUGCGGAGAAC UGAGGGACUACCUCGCGUGACUG UCUCGCUCUGGCAGGGUGAAACCC AAGUGGCUUCAGGCACUGCACCGU UCGGAGGAGAAAUCAUCGACGAAC GGGGAGGAUACGCCGAUCGCGUCA CCCUGCGCCUCAUGUGGAAAAUCC GAAACUGUGGUUCGGCAGAAAUCCC UAAUUUGUACCGGGCCGUGGUGGA GCUGCACACCGCCGACGGAACUCUG AUCGAGGCCGAGGCAUGCGAUGUG GGAUUCGCGAGGUCCGCAUCGAA AAUGGACUGCUUCUGCUUAAUGGC AAACCGCUGCUCAUCCGCGGAGUG AACAGACACGAGCAUACCCGCGUC ACGGUCAGGUCAUGGAUGAACAGA CUAUGGUGCAAGACAUCUCCUGCUGA UGAAACAAAACAACUUAACGCCG
--	---

	UUCGGUGCUCCCAUUACCCUAAUCA CCCGUUGUGGUUAUACCCUUGCGA UCGGUACGGCCUCUACGUGGUGGA CGAAGCGAACAUUCGAGACUCACGG AAUGGUCCCUAUGAACCGCCUCACU GACGACCCGAGGUGGCUCCCGGCAA UGUCGGAACGAGUGACUCGGAUGG UGCAGAGGGACCGCAACCAUCCGUC GGUGAUAAUCUGGUCGCUGGGGAA CGAAUCUGGCCACGGAGCUAACCAC GAUGCGCUGUACCGCUGGAUUAAG UCCGUGGACCCAAGCCGGCCCGUCC AGUACGAAGGAGGUGGUGCUGAUA CCACUGCAACCGACAUCaucugccc AAUGUAUGCGCGGGUGGAUGAGGA CCAACCUUUCGCGGGUGCCAAAG UGGUCCAUCAAGAAAUGGCUCUCG CUGCCCGGAGAAACGCGCCCGCUGA UCCUGUGCGAAUAUGCGCACGCUA UGGGAAAUUCACUGGGGGGAUUUG CGAAGUACUGGCAGGCUUUUCGAC AGUACCCGAGACUCCAGGGUGGCU UCGUGUGGGACUGGGUUGACCAGA GCCUCAUCAAUACGAUGAAAACG GCAACCCAUGGUCCGCGUACGGCGG AGACUUUGGAGACACCCCUAACGA UCGCCAGUUCUGCAUGAACGGCCU GGUGUUCGCCGACAGAACUCCGCA UCCAGCCCUUACUGAGGCUAAGCAC CAACAACAGUUCUUCAGUUCAGA CUGUCGGGGCAAACGAUCGAAGUG ACUUCCGAAUACCUCUCCGGCAUU CGGACAACGAGUUGCUGCACUGGA UGGUCGCCCUGGAUGGAAAGCCCC UCGCCUCCGGAGAAGUGCCGCUCGA CGUGGCGCCGACAGGGAAGCAGUU GAUCGAGUUGCCGGAACUGCCACA GCCCCGAGUCAGCAGGACAGCUCUG GCUUACCGUCAGAGUCGUGCAGCC AAAUGCCACCGCCUGGUCGGAGGC AGGACAUAUUUCAGCCUGGCAGCA GUGGCGCCUCGCCGAGAAUCUGAG CGUGACCUUGCCAGCAGCCUCACAC GCCAUUCCGCAUCUGACCACGUCCG AAAUGGACUUUUGUAUCGAACUGG
--	---

	GGAAUAAGCGCUGGCAGUUCAAUC GGCAAUCAGGCUUCCUGUCCCAGA UGUGGAUUGGUGACAAGAAGCAGC UCCUGACCCCGCUGCGCGAUCAGUU CACUCGCGCCCCACUUGACAACGAC AUUGGCGUGAGCGAGGCCACGCGU AUCGAUCCAAACGCUUUGGGUGGAG CGCUGGAAGGCGGCUGGCCACUAU CAGGCGGAGGCCGCGCUCCUGCAGU GUACCGCGGAUACCCUCGCAGACGC CGUUCUGAUUACCACGGCGCAUGCC UGGCAACACCAGGGAAAGACCCUG UUUAUCAGCCGCAAACUUACCGG AUCGAUGGCAGCGGCCAAAUGGCG AUCACUGUGGACGUCGAGGUGGCA UCAGACACUCCACACCCAGCACGGA UCGGACUCAAUUGCCAACUGGCUC AAGUGGCUGAGAGAGUCAAUUGGC UGGGCCUCGGCCCCCAAGAGAACUA CCCUGAUCGGCUUACUGCCGCAUGC UUUGACCGGUGGGAUCUGCCUCUG UCGGAUAUGUACACCCCCUACGUG UUCCCAUCCGAGAACGGUCUGAGA UGCGGUACUAGGGAGUUGAACUAC GGACCGCACCAAUGGAGGGGGGAC UUUCAGUUCAACAUCUCAAGAUAC AGCCAGCAGCAAUUGAUGGAAACC UCGCACCGGCAUCUCUUGCAUGCAG AGGAAGGGACCUGGCUGAACAU CG AUGGAUUCCACAUGGGAAUUGGUG GGGAUGACUCCUGGUCCCCUAGCG UGUCCGCGGAACUUCAGCUGUCCGC CGGCCGGUACCACUACCAGCUCGUG UGGUGUCAAAAGUGAUAAUAGGCU GGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCC UCCUCCCCUUCUGCACCCGUACCC CCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA GUGGGCGGCUCUAGA (SEQ ID NO : 7)
ORF氨基酸序列	MALAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAA HPPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNG EWRFAWFPAPEAVPESWLECDLPEAD TVVVPSNWQM HGYDAPIYTNVTYPIT

	VNPPFVPTENPTGCYSLTFNVDESWLQ EGQTRIIFDGVNSAFHLWCNGRWVGY GQDSRLPSEFDLSAFLRAGENRLAVM VLRWSDGSYLEDDQDMWRMSGIFRDV SLLHKPTTQISDFHVATRFDNDDFSRAVL EAEVQMCGELRDYLRVTVSLWQGET QVASGTAPFGGEIIDERGGYADRVTLR LNVENPKLWSAEIPNLYRAVVELHTAD GTLIEAEACDVGFREVRIENGLLLLNG KPLLIRGVNRHEHHPLHGVMDDEQT MVQDILLMKQNNFNAVRCSHYPNHPL WYTLCDRYGLYVVDEANIETHGMVP MNRLTDDPRWLPAMSERVTRMVQRD RNHPSVIIWSLGNESGHGANHDALYR WIKSVDPSPVQYEGGGADTTATDIIC PMYARVDEDQPFPAVPKWSIKKWLSL PGETRPLILCEYAHAMGNSLGGFAKY WQAFRQYPRLQGGFVWDWVDQSLIK YDENGNPWSAYGGDFGDTPNDRQFC MNGLVFADRTPHPALTEAKHQQQFFQ FRLSGQTIEVTSEYLFHSDNELHWM VALDGKPLASGEVPLDVAPQGKQLIEL PELPQPESAGQLWLTVRVVQPNATAW SEAGHISAWQQWRLAENLSVTLPAA HAIPHLLTSEMDFCIELGNKRWQFN SGFLSQMWIGDKKQLLTPLRDQFTRA PLDNDIGVSEATRDPNAWVERWCAA GHYQAEAALLQCTADTLADAVLITTA HAWQHQGKTLFISRKTYRIDGSGQMA ITVDVEVASDTPHPARIGLNCQLAQVA ERVNWLGLGPQENYPDRLTAACFDRW DLPLSDMYTPYVFPSENGLRCTREL NYGPHQWRGDFQFNISRYSSQQQLMET SHRHLLHAEETWLNIDGFHMGIGGD DSWSPSVSAELQLSAGRYHYQLVWCQ K (SEQ ID NO : 8)
ORF核苷酸序列	AUGGCCUUGGCUGUCGUCCUGCAA AGAAGAGAUUGGGAAAAUCCUGGA GUUACGCAACUGAAUAGACUCGCC GCACAUCCACCGUUCGCGUCCUGGC GAAAUAGCGAAGAAGCGCGGACCG ACAGACCUUCGCAGCAGCUGCGCUC UCUCAACGGGGAAUGGCGGUUCGC AUGGUUCCGGCUCCUGAGGCAGU CCCGGAAAGCUGGCUCGAGUGCGA

	CCUCCCCGGAAGCCGAUACGGUGGU GGUGCCGUCAAUUGGCAAUUGCA UGGAUACGACGCCCCCAUCUACACC AACGUCACUUACCCUAUCACCGUGA AUCCCCCAUUCGUCCCGACUGAGAA CCCGACUGGAUGCUACAGCCUGACC UUUAACGUGGACGAGUCGUGGCUG CAAGAAGGGCAGACUCGCAUCAUU UUCGACGGAGUCAAUCCGCGUUC AUCUUUGGUGUAAACGGACGGUGGG UGGGAUACGGGCAGGACUCCAGGC UGCCGAGCGAAUUCGACUUGUCAG CCUUCCUGCGCGCCGGCGAAAACCG CCUGGCUGUCAUGGUCCUUAAGAUG GUCGGAUGGCUCGUACCUGGAGGA UCAGGACAUGUGGAGGAUGUCAGG GAUCUUCCGGGAUGUCUCGCUGCU CCACAAGCCAACUACCCAGAUCUCC GACUUUCAUGUGGCCACCCGCUUCA ACGAUGACUUCAGCAGGGCGGUUC UGGAAGCCGAGGUGCAAUUGUGCG GAGAACUGAGGGACUACCUCGCG UGACUGUCUCGCUCUGGCAGGGUG AAACCCAAGUGGCUUCAGGCACUG CACCGUUCGGAGGAGAAAUCAUCG ACGAACGGGGAGGAUACGCCGAUC GCGUCACCCUGCGCCUCAUGUGGA AAAUCCGAAACUGUGGUCGGCAGA AAUCCCUAAUUUGUACCGGGCCGU GGUGGAGCUGCACACCGCCGACGG AACUCUGAUCGAGGCCGAGGCAUG CGAUGUGGGAUUCGCGAGGUCCG CAUCGAAAUGGACUGCUUCUGCU UAAUGGCAAACCGCUGCUCAUCCGC GGAGUGAACAGACACGAGCAUCAC CCGCUGCACGGUCAGGUCAUGGAU GAACAGACUAUGGUGCAAGACAUC CUGCUGAUGAAACAAAACAACUUC AACGCCGUUCGGUGCUCCCAUUACC CUAAUCACCCGUUGUGGUUAUACCC UUUGCGAUCGGUACGGCCUCUACG UGGUGGACGAAGCGAACAUCGAGA CUCACGGAAUGGUCCCUAUGAACC GCCUCACUGACGACCCGAGGUGGCU CCCGGCAAUGUCGGAACGAGUGAC
--	---

	UCGGAUGGUGCAGAGGGACCGCAA CCAUCCGUCGGUGAUAAUCUGGUC GCUGGGGAACGAAUCUGGCCACGG AGCUAACCACGAUGCGCUGUACCGC UGGAUUAAGUCCGUGGACCCAAGC CGGCCCUGCCAGUACGAAGGAGGU GGUGCUGAUACCACUGCAACCGAC AUCAUCUGCCCAAUGUAUGCGCGG GUGGAUGAGGACCAACCUUUCCCG GCGGUGCCAAAGUGGUCCAUCAAG AAAUGGCUCUCGCUGCCCGGAGAA ACGCGCCCGCUGAUCCUGUGCGAAU AUGCGCACGCUAUGGGAAAUUCAC UGGGGGGGAUUUGCGAAGUACUGGC AGGCUUUUCGACAGUACCCGAGAC UCCAGGGUGGCUUCGUGUGGGACU GGGUUGACCAGAGCCUCAUCAAU ACGAUGAAAACGGCAACCCAUGGU CCGCGUACGGCGGAGACUUUGGAG ACACCCCUAACGAUCGCCAGUUCUG CAUGAACGGCCUGGUGUUCGCCGA CAGAACUCCGCAUCCAGCCCUUACU GAGGCUAAGCACCAACAACAGUUC UCCAGUUCAGACUGUCGGGGCAA ACGAUCGAAGUGACUUCCGAAUAC CUCUCCGGCAUUCGGACAACGAG UUGCUGCACUGGAUGGUCGCCUG GAUGGAAAGCCCCUCGCCUCCGGAG AAGUGCCGCUCGACGUGGCGCCGCA GGGAAAGCAGUUGAUCGAGUUGCC GGAACUGCCACAGCCCGAGUCAGCA GGACAGCUCUGGCUUACCGUCAGA GUCGUGCAGCCAAAUGCCACCGCCU GGUCGGAGGCAGGACAUAUUUCAG CCUGGCAGCAGUGGCGCCUCGCCGA GAAUCUGAGCGUGACCUUGCCAGC AGCCUCACACGCCAUUCCGCAUCUG ACCACGUCCGAAAUGGACUUUUGU AUCGAACUGGGGAAUAAGCGCUGG CAGUUCAAUCCGGCAAUCAGGCUUC CUGUCCCAGAUGUGGAUUGGUGAC AAGAAGCAGCUCCUGACCCCGCUGC GCGAUCAGUUCACUCGCGCCCCACU UGACAACGACAUUGGCGUGAGCGA GGCCACGCGUAUCGAUCCAAACGCU
--	--

	UGGGUGGAGCGCUGGAAGGCGGCU GGCCACUAUCAGGCGGAGGCCGCGC UCCUGCAGUGUACCGCGGAUACCCU CGCAGACGCCGUUCUGAUUACCACG GCGCAUGCCUGGCAACACCAGGGA AAGACCCUGUUUAUCAGCCGCAA ACUUACCGGAUCGAUGGCAGCGGC CAAUUGGCGAUCACUGUGGACGUC GAGGUGGCAUCAGACACUCCACACC CAGCACGGAUCGGACUCAAUUGCC AACUGGCUCAAGUGGCUGAGAGAG UCAAUUGGCUGGGCCUCGGCCCCCA AGAGAACUACCCUGAUCGGCUUAC UGCCGCAUGCUUUGACCGGUGGGA UCUGCCUCUGUCGGAUAUGUACAC CCCUACGUGUUCUCAUCCGAGAAC GGUCUGAGAUGCGGUACUAGGGAG UUGAACUACGGACCGCACCAAUGG AGGGGGGACUUUCAGUUCAACAUC UCAAGAUACAGCCAGCAGCAAUUG AUGGAAACCUCGCACCGGCAUCUCU UGCAUGCAGAGGAAGGGACCUGGC UGAACAU CGAUGGAU UCCACAUGG GAAUUGGUGGGGAUGACUCCUGGU CCCUAGCGUGUCCGCGGAACUUCA GCUGUCCGCCGGCCGGUACCACUAC CAGCUCGUGUGGUGUCAAAAG(SEQ ID NO : 9)
--	---

【序列表】

- <110> 美商瑪德那特克斯股份有限公司(MODERNATX, INC.)
- <120> 編碼 VEGF-A 多肽的經修飾 RNA、配製物及關於它們之用途
- <140> TW 106118838
- <141> 2017-06-07
- <150> US 62/346,979
- <151> 2016-06-07
- <150> US 62/411,091
- <151> 2016-10-21
- <150> US 62/432,005
- <151> 2016-12-09
- <160> 9
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
- <211> 845
- <212> RNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 編碼 VEGF-A 的經修飾的 RNA
- <220>
- <221> 經修飾的鹼基
- <222> (1)..(1)
- <223> 5' 7MeGppp, 其中 Me = 甲基並且 p = 無機磷酸鹽
- <220>
- <221> 尚未歸類的特徵
- <222> (1)..(845)
- <223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-甲基-假 UMP
- <220>
- <221> 經修飾的鹼基
- <222> (2)..(2)
- <223> G2'OMe, 其中 Me 是甲基

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (845)..(845)
<223> GOH 3'

<400> 1
ggggaaaauaa gagagaaaag aagaguaaga agaaaauauaa gagccaccau gaacuuucug 60
cugucuuggg ugcauuggag ccuugccuug cugcucuacc uccaccaugc caaguggucc 120
caggcugcac ccauggcaga aggaggaggg cagaaucauc acgaaguggu gaaguucaug 180
gaugucuaua agcgcagcua cugccaucca aucgagaccc ugguggacau cuuccaggag 240
uaccucugaug agaucgagua caucuuaag ccauccugug ugccccugau gcgaugcggg 300
ggcugcugca augacgaggg ccuggagugu gugcccacug aggaguccaa caucaccaug 360
cagauuaugc ggaucaaacc ucaccaaggc cagcacauag gagagaugag cuuccuacag 420
cacaacaaau gugaaugcag accaaagaaa gauagagcaa gacaagaaaa ucccuguggg 480
ccuugcucag agcggagaaa gcauuuguuu guacaagauc cgcagacgug uaaauguucc 540
ugcaaaaaca cagacucgcg uugcaaggcg aggcagcuug aguuaaacga acguacuugc 600
agaugugaca agccgaggcg gugauaaauag gcuggagccu cgguggccau gcuucugcc 660
ccuugggccu cccccagcc ccuccucucc uuccugcacc cguacccccg uggucuuga 720
auaaagucug agugggcggc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840
ucuag 845

<210> 2
<211> 191
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185 190

<210> 3
<211> 47
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 螢火蟲螢光素酶 5' UTR

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<222> (1)..(47)
<223> A = AMP，C = CMP，G = GMP，U = N1-甲基-假UMP

<400> 3
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccacc 47

<210> 4
<211> 1650
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mRNA 構建體的螢火蟲螢光素酶 ORF（不包括終止密碼子）

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<222> (1)..(1650)
<223> A = AMP，C = CMP，G = GMP，U = N1-甲基-假UMP

<400> 4
auggaagaug cgaagaacau caagaaggga ccugccccgu uuuacccuuu ggaggacggu 60
acagcaggag aacagcucca caaggcgaug aaacgcuacg ccugguccc cggaacgauu 120
gcguuuaccg augcacauau ugagguagac aucacauacg cagaauacuu cgaaaugucg 180
gugaggcugg cggaagcgau gaagagauau ggucuuaaca cuaaucaccg caucguggug 240
uguucggaga acucauugca guuuuucaug ccgguccuug gagcacuuuu caucgggguc 300
gcagucgcgc cagcgaacga caucuacaau gagcgggaac ucuugaauag caugggaauc 360
ucccagccga cggucguguu ugucuccaaa aaggggcugc agaaaauccu caacgugcag 420

aagaagcucc ccauuauuca aaagaucauc auuauggaua gcaagacaga uuaccaaggg	480
uuccagucga uguauaccuu ugugacaucg cauuugccgc caggguuuuaa cgaguaugac	540
uucguccccc agucauuuga cagagauaaa accaucgcgc ugauuaugaa uuccucgggu	600
agcaccgguu ugccaaaggg gguggcguug cccaccgcga cugcuugugu gcgguucucg	660
cacgcuaggg auccuauuu ugguaaucag aucauucccg acacagcaau ccuguccgug	720
guaccuuuuc aucacgguuu uggauguuc acgacucucg gcuauuugau uugcgguuuc	780
aggguuguac uuauguaucg guucgaggaa gaacuguuuu ugagaucuu gcaagauuac	840
aagauccagu cggcccuccu ugugccaacg cuuuucucan ucuuugcgaa aucgacacuu	900
auugauaagu augaccuuuc caaucugcau gagauugccu cagggggagc gccgcuuagc	960
aaggaagucg gggaggcagu ggccaagcgc uuccaccuuc ccggaauucg gcagggauac	1020
gggcucacgg agacaacauc cgcgauccuu aucacgcccg agggugacga uaagccggga	1080
gccgucggaa aagugguccc cuucuugaa gccaaagucg uagaccucga cacgggaaaa	1140
accucggag ugaaccagag gggcgagcuc ugcgugagag ggccgaugau caugucaggu	1200
uacgugaaua acccugaagc gacgaaucg cugaucgaca aggaugggug guugcauucg	1260
ggagacauug ccuauuggga ugaggaugag cacuucuua ucguagaucg acuaagagc	1320
uugaucaau acaaaggcua ucagguagcg ccugccgagc ucgagucaau ccugcuccag	1380
cacccaaca uuuucgacgc cggaguggcc gguugcccg augacgacgc gggugagcug	1440
ccagcggccg ugguaguuccu cgaacauggg aaaacauga ccgaaaagga gaucguggac	1500
uacguagcau cacaagugac gacugcgaag aaacugaggg gagggguagu cuuuguggac	1560
gaggucccga aaggcuugac uggaagcuu gacgcucgca aaauccggga aaucugauu	1620
aaggcaaaga aaggcgggaa aaucgcuguc	1650

<210> 5

<211> 119

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 螢火蟲螢光素酶 3' UTR

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<222> (1)..(119)
<223> A = AMP , C = CMP , G = GMP , U = N1-甲基-假 UMP

<400> 5
ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc 60

cuccucuccu uccugcaccc guacccccgu ggucuugaa uaaagucuga gugggcggc 119

<210> 6
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 螢火蟲螢光素酶

<400> 6

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
20 25 30

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu
35 40 45

Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala
50 55 60

Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val
65 70 75 80

Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu
85 90 95

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg
100 105 110

Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val
115 120 125

Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro
130 135 140

Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly
145 150 155 160

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
165 170 175

Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile
180 185 190

Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
195 200 205

Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp
210 215 220

Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val
225 230 235 240

Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
245 250 255

Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu
 260 265 270

Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
 275 280 285

Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
 290 295 300

Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
 305 310 315 320

Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
 325 330 335

Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
 340 345 350

Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
 355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 370 375 380

Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
 385 390 395 400

Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415

Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
 420 425 430

Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445

Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu
465 470 475 480

Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
500 505 510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
530 535 540

Gly Gly Lys Ile Ala Val
545 550

<210> 7
<211> 3274
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LacZ 核苷酸序列 (5' UTR, ORF, 3' UTR)

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<222> (1)..(3274)
<223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-甲基-假UMP

<400> 7
ucaagcuuuu ggaccucgu acagaagcua auacgacuca cuauaggga auaagagaga 60

aaagaagagu aagaagaaau auaagagcca ccauggccuu ggcugucguc cugcaaagaa	120
gagauuggga aaauccugga guuacgcaac ugaauagacu cgccgcacau ccaccguucg	180
cguccuggcg aaauagcgaa gaagcgcgga cgcacagacc uucgcagcag cugcgcucuc	240
ucaacgggga auggcgguuc gcaugguuuc cggcuccuga ggcagucccg gaaagcuggc	300
ucgagugcga ccucccgga gccgauacgg ugguggugcc gucaaaugg caaangcaug	360
gauacgacgc ccccaucua accaacguca cuuaccuau caccgugaau ccccauucg	420
ucccgacuga gaacccgacu ggaugcuaca gccugaccuu uaacguggac gagucguggc	480
ugcaagaagg gcagacucgc aucauuuucg acggagucua cuccgcguuc caucuuggu	540
guaacggacg guggguggga uacgggcagg acuccaggcu gccgagcgaa uucgacuugu	600
cagccuuccu gcgcgccggc gaaaaccgcc uggcugucau gguccuaga uggucggaug	660
gcucguaccu ggaggauacg gacaugugga ggaugucagg gaucuccgg gaugucucgc	720
ugcuccacaa gccaacuacc cagaucuccg acuuucaugu ggccaccgc uucaacgaug	780
acuucagcag ggcggguucg gaagccgagg ugcaaaugug cggagaacug agggacuacc	840
uccgcgugac ugucucgcuc uggcagggug aaaccaagu ggcuucaggc acugcaccgu	900
ucggaggaga aaucaucgac gaacggggag gauacgccga ucgcgucacc cugcgccuca	960
auguggaaaa uccgaaacug uggucggcag aaauccuaa uuuguaccgg gccguggugg	1020
agcugcacac cgccgacgga acucugaucg aggccgaggc augcgaugug ggauuccgcg	1080
agguccgcau cgaaaaugga cugcuucugc uuaauggcaa accgcugcuc auccgcggag	1140
ugaacagaca cgagcaucac ccgcugcacg gucaggucan ggaugaacag acuauggugc	1200
aagacauccu gcugaugaaa caaaacaacu ucaacgccgu ucggugcucc cauuaccua	1260
aucacccguu gugguauacc cuuugcgauc gguacggccu cuacguggug gacgaagcga	1320
acaucgagac ucacggaaug gucccuanga accgccucac ugacgaccgc agguggcucc	1380
cggcaauguc ggaacgagug acucggaugg ugcagaggga ccgcaaccan ccgucgguga	1440

uaaucugguc gcuggggaac gaaucuggcc acggagcuaa ccacgaugcg cuguaccgcu	1500
ggauuaaguc cguggaccca agccggccccg uccaguacga aggagguggu gcugauacca	1560
cugcaaccga caucaucugc ccaauguaug cgcgggugga ugaggaccaa ccuuucccg	1620
cggugccaaa gugguccauc aagaaauggc ucucgcugcc cggagaaacg cccccgcuga	1680
uccugugcga auaugcgcac gcuaugggaa auucacuggg gggauuugcg aaguacuggc	1740
aggcuuuucg acaguacccg agacuccagg guggcuucgu gugggacugg guugaccaga	1800
gccucaucaa auacgaugaa aacggcaacc caugguccgc guacggcgga gacuuuggag	1860
acaccccuaa cgaucgccag uucugcauga acggccuggu guucgccgac agaacuccgc	1920
auccagcccu uacugaggcu aagcaccaac aacaguucuu ccaguucaga cugucggggc	1980
aaacgaucga agugacuucc gaauaccucu uccggcauuc ggacaacgag uugcugcacu	2040
ggauggugcg ccuggaugga aagccccucg ccuccggaga agugccgcuc gacguggcgc	2100
cgcagggaaa gcaguugauc gaguugccgg aacugccaca gcccagauca gcaggacagc	2160
ucuggcuuac cgucagaguc gugcagccaa augccaccgc cuggucggag gcaggacaua	2220
uuucagccug gcagcagugg cgccucgccg agaaucugag cgugaccuug ccagcagccu	2280
cacacgccau uccgcaucug accacguccg aaauaggacuu uuguaucgaa cugggggaaua	2340
agcgcuggca guucaaucgg caaucaggcu uccugucca gauguggauu ggugacaaga	2400
agcagcuccu gaccccgcu cgcgaucagu ucacucgcgc cccacuugac aacgacauug	2460
gcgugagcga ggccacgcgu aucgauccaa acgcuugggu ggagcgcugg aaggcggcug	2520
gccacuauc ggcggaggcc ggcucuccgc aguguaccgc ggauaccuc gcagacgccg	2580
uucugauuac cacggcgcau gccuggcaac accagggaau gaccuguuu aucagccgca	2640
aaacuaccg gaucgauggc agcggccaaa uggcgauac uguggacguc gagguggcau	2700
cagacacucc acaccagca cggauccgac ucaauugcca acuggcucaa guggcugaga	2760
gagucaauug gcugggccuc ggcccccaag agaacuacc ugaucggcuu acugccgcau	2820

gcuuugaccg gugggaucug ccucugucgg auauguacac ccccuacgug uucccauccg 2880
agaacggucu gagaugcggu acuagggagu ugaacuacgg accgcaccaa uggagggggg 2940
acuuucaguu caacaucuca agauacagcc agcagcaauu gauggaaacc ucgcaccggc 3000
aucucuugca ugcagaggaa gggaccuggc ugaacaucga uggauuccac augggaauug 3060
guggggauga cuccuggucc ccuagcgugu ccgcggaacu ucagcugucc gccggccggu 3120
accacuacca gcucgugugg ugucaaaagu gauaaauaggc uggagccucg guggccaugc 3180
uucuugcccc uugggccucc cccagcccc uccuccccuu ccugcaccgc uacccccgug 3240
gucuungaau aaagucugag ugggcggcuc uaga 3274

<210> 8
<211> 1019
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LacZ

<400> 8

Met Ala Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly
1 5 10 15

Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp
20 25 30

Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg
35 40 45

Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala
50 55 60

Val Pro Glu Ser Trp Leu Glu Cys Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val
65 70 75 80

Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr
85 90 95

Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr
100 105 110

Glu Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn Val Asp Glu Ser
115 120 125

Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp Gly Val Asn Ser
130 135 140

Ala Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly Tyr Gly Gln Asp
145 150 155 160

Ser Arg Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe Leu Arg Ala Gly
165 170 175

Glu Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser Asp Gly Ser Tyr
180 185 190

Leu Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile Phe Arg Asp Val
195 200 205

Ser Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp Phe His Val Ala
210 215 220

Thr Arg Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu Glu Ala Glu Val
225 230 235 240

Gln Met Cys Gly Glu Leu Arg Asp Tyr Leu Arg Val Thr Val Ser Leu
245 250 255

Trp Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala Pro Phe Gly Gly
260 265 270

Glu Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg Val Thr Leu Arg
275 280 285

Leu Asn Val Glu Asn Pro Lys Leu Trp Ser Ala Glu Ile Pro Asn Leu
290 295 300

Tyr Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly Thr Leu Ile Glu
305 310 315 320

Ala Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg Ile Glu Asn Gly
325 330 335

Leu Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg Gly Val Asn Arg
340 345 350

His Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp Glu Gln Thr Met
355 360 365

Val Gln Asp Ile Leu Leu Met Lys Gln Asn Asn Phe Asn Ala Val Arg
370 375 380

Cys Ser His Tyr Pro Asn His Pro Leu Trp Tyr Thr Leu Cys Asp Arg
385 390 395 400

Tyr Gly Leu Tyr Val Val Asp Glu Ala Asn Ile Glu Thr His Gly Met
405 410 415

Val Pro Met Asn Arg Leu Thr Asp Asp Pro Arg Trp Leu Pro Ala Met
420 425 430

Ser Glu Arg Val Thr Arg Met Val Gln Arg Asp Arg Asn His Pro Ser
435 440 445

Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Gly His Gly Ala Asn His
450 455 460

Asp Ala Leu Tyr Arg Trp Ile Lys Ser Val Asp Pro Ser Arg Pro Val
465 470 475 480

Gln Tyr Glu Gly Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr Asp Ile Ile Cys
485 490 495

Pro Met Tyr Ala Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe Pro Ala Val Pro
500 505 510

Lys Trp Ser Ile Lys Lys Trp Leu Ser Leu Pro Gly Glu Thr Arg Pro
515 520 525

Leu Ile Leu Cys Glu Tyr Ala His Ala Met Gly Asn Ser Leu Gly Gly
530 535 540

Phe Ala Lys Tyr Trp Gln Ala Phe Arg Gln Tyr Pro Arg Leu Gln Gly
545 550 555 560

Gly Phe Val Trp Asp Trp Val Asp Gln Ser Leu Ile Lys Tyr Asp Glu
565 570 575

Asn Gly Asn Pro Trp Ser Ala Tyr Gly Gly Asp Phe Gly Asp Thr Pro
580 585 590

Asn Asp Arg Gln Phe Cys Met Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp Arg Thr
595 600 605

Pro His Pro Ala Leu Thr Glu Ala Lys His Gln Gln Gln Phe Phe Gln
610 615 620

Phe Arg Leu Ser Gly Gln Thr Ile Glu Val Thr Ser Glu Tyr Leu Phe
625 630 635 640

Arg His Ser Asp Asn Glu Leu Leu His Trp Met Val Ala Leu Asp Gly
645 650 655

Lys Pro Leu Ala Ser Gly Glu Val Pro Leu Asp Val Ala Pro Gln Gly
660 665 670

Lys Gln Leu Ile Glu Leu Pro Glu Leu Pro Gln Pro Glu Ser Ala Gly
675 680 685

Gln Leu Trp Leu Thr Val Arg Val Val Gln Pro Asn Ala Thr Ala Trp
690 695 700

Ser Glu Ala Gly His Ile Ser Ala Trp Gln Gln Trp Arg Leu Ala Glu
705 710 715 720

Asn Leu Ser Val Thr Leu Pro Ala Ala Ser His Ala Ile Pro His Leu
725 730 735

Thr Thr Ser Glu Met Asp Phe Cys Ile Glu Leu Gly Asn Lys Arg Trp
740 745 750

Gln Phe Asn Arg Gln Ser Gly Phe Leu Ser Gln Met Trp Ile Gly Asp
755 760 765

Lys Lys Gln Leu Leu Thr Pro Leu Arg Asp Gln Phe Thr Arg Ala Pro
770 775 780

Leu Asp Asn Asp Ile Gly Val Ser Glu Ala Thr Arg Ile Asp Pro Asn
785 790 795 800

Ala Trp Val Glu Arg Trp Lys Ala Ala Gly His Tyr Gln Ala Glu Ala
805 810 815

Ala Leu Leu Gln Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ala Asp Ala Val Leu Ile
820 825 830

Thr Thr Ala His Ala Trp Gln His Gln Gly Lys Thr Leu Phe Ile Ser
835 840 845

Arg Lys Thr Tyr Arg Ile Asp Gly Ser Gly Gln Met Ala Ile Thr Val
850 855 860

Asp Val Glu Val Ala Ser Asp Thr Pro His Pro Ala Arg Ile Gly Leu
865 870 875 880

Asn Cys Gln Leu Ala Gln Val Ala Glu Arg Val Asn Trp Leu Gly Leu
885 890 895

Gly Pro Gln Glu Asn Tyr Pro Asp Arg Leu Thr Ala Ala Cys Phe Asp
900 905 910

Arg Trp Asp Leu Pro Leu Ser Asp Met Tyr Thr Pro Tyr Val Phe Pro
915 920 925

Ser Glu Asn Gly Leu Arg Cys Gly Thr Arg Glu Leu Asn Tyr Gly Pro
930 935 940

His Gln Trp Arg Gly Asp Phe Gln Phe Asn Ile Ser Arg Tyr Ser Gln
945 950 955 960

Gln Gln Leu Met Glu Thr Ser His Arg His Leu Leu His Ala Glu Glu
965 970 975

Gly Thr Trp Leu Asn Ile Asp Gly Phe His Met Gly Ile Gly Gly Asp
980 985 990

Asp Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu Leu Gln Leu Ser Ala Gly
995 1000 1005

Arg Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys Gln Lys
1010 1015

<210> 9
<211> 3057
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LacZ ORF 核苷酸序列

<220>
<221> 尚未歸類的特徵
<222> (1)..(3057)
<223> A = AMP , C = CMP , G = GMP , U = N1-甲基-假UMP

<400> 9
auggccuugg cugucguccu gcaaagaaga gauugggaaa auccuggagu uacgcaacug 60
aauagacucg ccgcacaucc accguucgcg uccuggcgaa auagcgaaga agcgcgggacc 120
gacagaccuu cgcagcagcu ggcgcucucuc aacgggggaau ggcgguucgc augguuuccg 180
gcuccugagg cagucccgga aagcuggcuc gagugcgacc ucccggaagc cgauacggug 240
guggugccgu caaanuggca aaugcaugga uacgacgccc ccaucuacac caacgucacu 300
uaccuauca ccgugaaucc cccauucguc ccgacugaga acccgacugg augcuacagc 360
cugaccuuua acguggacga gucguggcug caagaagggc agacucgcau cauuuucgac 420
ggagucaacu ccgcguucca ucuuuggugu aacggacggu ggguggggaau cgggcaggac 480
uccaggcugc cgagcgaauu cgacuuguca gccuuccugc gcgccggcga aaaccgccug 540
gcugucaugg uccuuagaug gucggauggc ucguaccugg aggaucagga cauguggagg 600
augucaggga ucuuccggga ugucucgcug cuccacaagc caacuacca gaucuccgac 660
uuucaugugg ccacccgcuu caacgaugac uucagcaggg cgguucugga agccgaggug 720

caaaugugcg gagaacugag ggacuaccuc cgcgugacug ucucgcucug gcagggugaa	780
acccaagugg cuucaggcac ugcaccguuc ggaggagaaa ucaucgacga acggggagga	840
uacgccgauc gcgucacccu gcgccucaau guggaaaauc cgaaacugug gucggcagaa	900
aucccuauuu uguaccgggc cgugguggag cugcacaccg ccgacggaac ucugaucgag	960
gccgaggcau gcgauguggg auuccgagag guccgcaucg aaaauggacu gcuucugcuu	1020
aauggcaaac cgcugcucan ccgcggagug aacagacacg agcaucaccc gcugcacggu	1080
caggucaugg augaacagac uauggugcaa gacauccugc ugaugaaaca aaacaacuuc	1140
aacgccguuc ggugcuccca uuaccuauu caccguugu gguauaccu uugcgauccg	1200
uacggccucu acguggugga cgaagcgaac aucgagacuc acggauggu ccuaugaac	1260
cgccucacug acgacccgag guggcucccg gcaaugucgg aacgagugac ucggauggug	1320
cagagggacc gcaaccaucc gucggugaua aucuggucgc uggggaacga aucuggccac	1380
ggagcuaucc acgaugcgcu guaccgcugg auuaaguccg uggaccaag ccggcccguc	1440
caguacgaag gagguggugc ugauaccacu gcaaccgaca ucaucugccc aauguaugcg	1500
cggguggaug aggaccaacc uuuccggcg gugccaaagu gguccauca gaauggcuc	1560
ucgugccccg gagaaacgcg cccgcugauc cugugcgaau augcgacgc uauugggaaau	1620
ucacuggggg gauuugcgaa guacuggcag gcuuucgac aguacccgag acuccaggu	1680
ggcuucgugu gggacugggu ugaccagagc cucaucaau acgaugaaaa cggcaaccac	1740
ugguccgcgu acggcgagga cuuuggagac acccuuacg aucgccagu cugcaugaac	1800
ggcuggugu ucgccgacag aacuccgau ccagcccuu cugaggcuu gcaccaaca	1860
caguucucc aguucagacu gucggggcaa acgaucgaag ugacuuccga auaccucuuc	1920
cggcauucgg acaacgagu gcugcacugg auggucgcc uggauugaaa gcccucgcc	1980
uccggagaag ugccgcucga cguggcgccg cagggaagc aguugaucga guugccggaa	2040
cugccacagc ccgagucagc aggacagcuc uggcuuaccg ucagagucgu gcagccaaau	2100

gccaccgccu ggucggaggc aggacauuu ucagccuggc agcaguggcg ccucgccgag	2160
aaucugagcg ugaccuugcc agcagccuca cacgccauuc cgcaucugac cacguccgaa	2220
auggacuuuu guaucgaacu ggggaauaag cgcuggcagu ucaaucggca aucaggcuuc	2280
cugucccaga uguggauugg ugacaagaag cagcuccuga ccccgucg cgaucaguuc	2340
acucgcgccc cacuugacaa cgacauuggc gugagcgagg ccacgcguau cgauccaaac	2400
gcuuggggugg agcgcuaggaa ggcggcuggc cacuauagg cgaggccgc gcuccugcag	2460
uguaccgcgg auaccucgc agacgccguu cugauuacca cggcgcaugc cuggcaacac	2520
cagggaaga cccuguuuau cagccgcaa acuuaccgga ucgauggcag cggccaaug	2580
gcgaucacug uggacgucga gguggcauca gacacuccac acccagcacg gaucggacuc	2640
aaugccaac uggcucaagu ggcuagaga gucaauuggc ugggccucgg ccccaagag	2700
aacuaccug aucggcuuac ugccgcaugc uuugaccggu gggauugcc ucugucggau	2760
anguacacc ccuacguguu cccaucgag aacggucuga gaugcgguac uagggaguug	2820
aacuacggac cgcaccaaug gaggggggac uuucaguuca acaucucaag auacagccag	2880
cagcaauuga uggaaaccuc gcaccggcau cucuugcaug cagaggaagg gaccuggcug	2940
aaucaugaug gauuccacau gggaauuggu ggggaugacu ccuggucucc uagcgugucc	3000
gcggaacuuc agcuguccgc cggccgguac cacuaccagc ucguguggug ucaaaag	3057

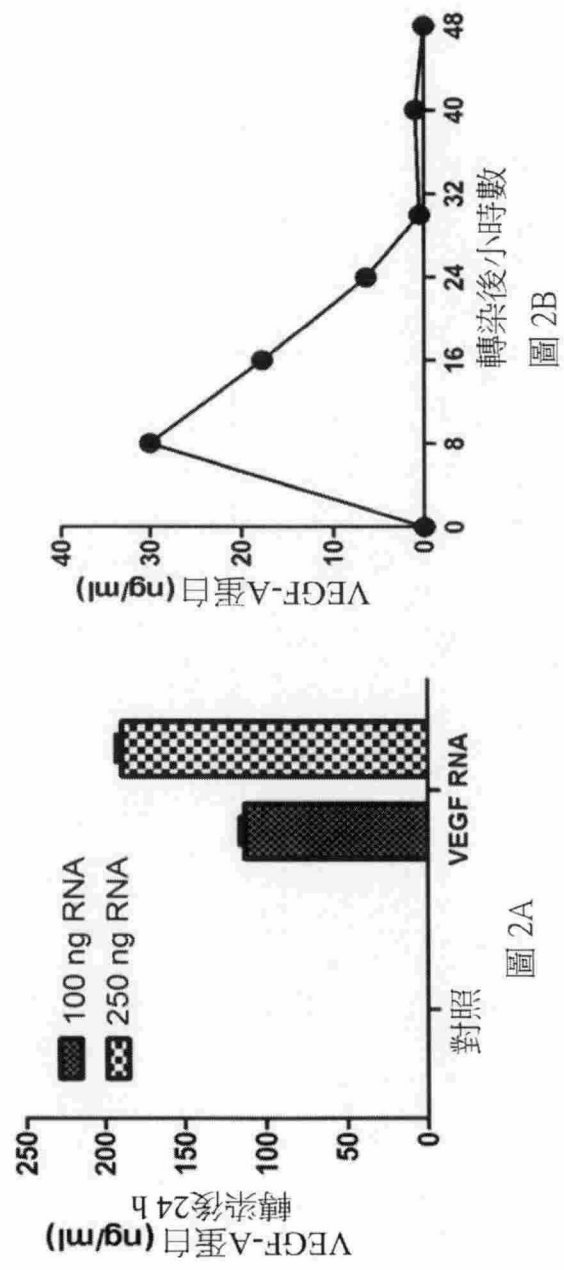
申請專利範圍

1. 一種包含經修飾 mRNA 和檸檬酸鹽鹽水緩衝液之組成物，該經修飾 mRNA 編碼 SEQ ID NO：2 的 VEGF-A 多肽，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子。
2. 一種包含藥學上可接受量的經修飾 mRNA 和檸檬酸鹽鹽水緩衝液之配製物，該經修飾 mRNA 編碼 SEQ ID NO：2 的 VEGF-A 多肽，其中該緩衝液基本上不含二價陽離子。
3. 如請求項 2 所述之配製物，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含鈣和鎂。
4. 如請求項 2 所述之配製物，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液不含鈣或鎂。
5. 如請求項 2 所述之配製物，進一步包含藥學上可接受的賦形劑。
6. 如請求項 5 所述之配製物，其中該藥學上可接受的賦形劑選自溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、核-殼奈米粒子、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶及其混合物。
7. 一種製備組成物或配製物之方法，該方法包括將經修飾 mRNA 與檸檬酸鹽鹽水緩衝液組合，該經修飾 mRNA 編碼 SEQ ID NO：2 的 VEGF-A 多肽，其中該檸檬酸鹽鹽水緩衝液基本上不含二價陽離子，並且其中該組成物或配製物對於治療患有對 VEGF-A 療法有反應的疾病的受試者係有效的。

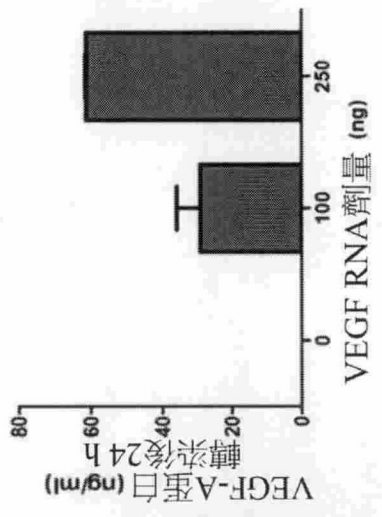
8. 一種如請求項 1 所述之組成物或如請求項 2-6 中任一項所述之配製物在製備一藥物的用途，該藥物係供用於在療法中使用。
9. 一種如請求項 1 所述之組成物或如請求項 2-6 中任一項所述之配製物在製備一藥物的用途，該藥物係供用於在治療對 VEGF-A 療法有反應的疾病之方法中使用。
10. 如請求項 9 所述之用途，其中該疾病選自具有減少或保留的射血分數(ejection fraction)的心臟衰竭、腎臟疾病、涉及皮膚移植和組織移植的疾病、心肌梗塞(MI)後心臟功能障礙、缺血性心臟病、來自創傷或手術的血管損傷、包括糖尿病性潰瘍的皮膚潰瘍、嚴重肢體缺血、肺性高血壓和外周動脈疾病。
11. 如請求項 9 所述之用途，其中該組成物或配製物係經肌內、皮內、皮下、心內或心外膜途徑，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或藉由直接給予到待治療的區域來給予至一有其需要的受試者。
12. 如請求項 10 所述之用途，其中該組成物或配製物係經肌內、皮內、皮下、心內或心外膜途徑，通過門靜脈導管、通過冠狀竇導管和/或藉由直接給予到待治療的區域來給予至一有其需要的受試者。
13. 如請求項 8 所述之用途，其中該組成物或配製物係在心肌梗塞(MI)後在心肌中在心外膜衍生細胞活化的峰值時期給予。
14. 如請求項 8 所述之用途，其中該組成物或配製物係在 MI 後 7 天、MI 後 10 天、MI 後 2 週、MI 後 3 週、或 MI 後 6 週給予。

15. 如請求項 13 所述之用途，其中該組成物或配製物係在 MI 後 7 天、MI 後 10 天、MI 後 2 週、MI 後 3 週、或 MI 後 6 週給予。
16. 如請求項 8-15 中任一項所述之用途，其中療法包括治療具有降低的射血分數的心肌梗塞或治療具有保留的射血分數的心臟衰竭。
17. 如請求項 16 所述之用途，其中該組成物或配製物係在健康和梗塞組織之間的邊界區處注射。

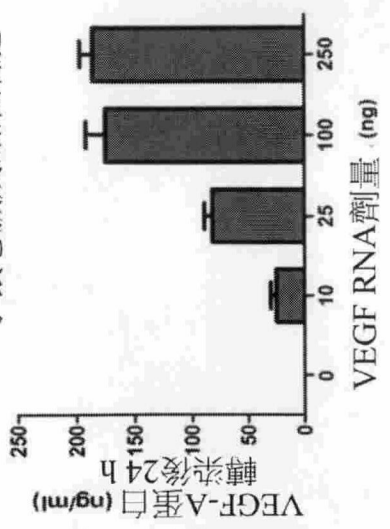
人主動脈平滑肌細胞



豬內皮細胞



小鼠心臟成纖維細胞



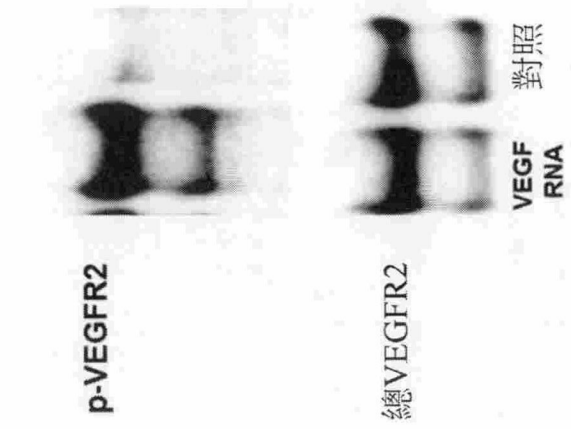


圖 3A

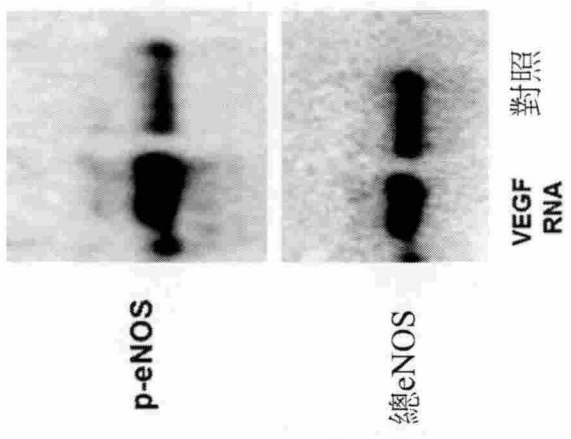


圖 3B

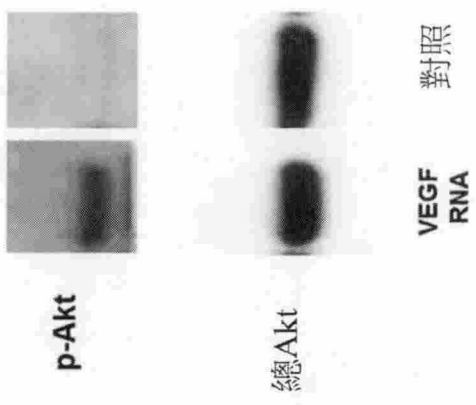


圖 3C

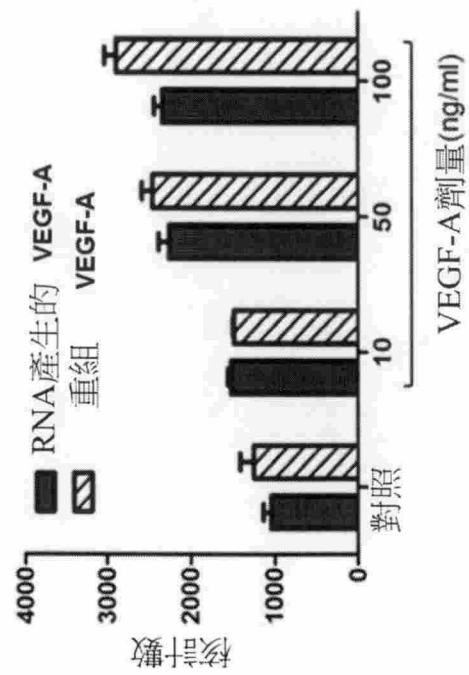


圖 4A

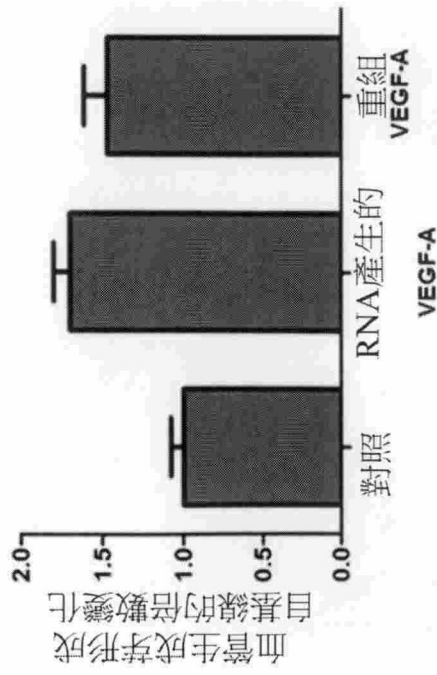


圖 4C

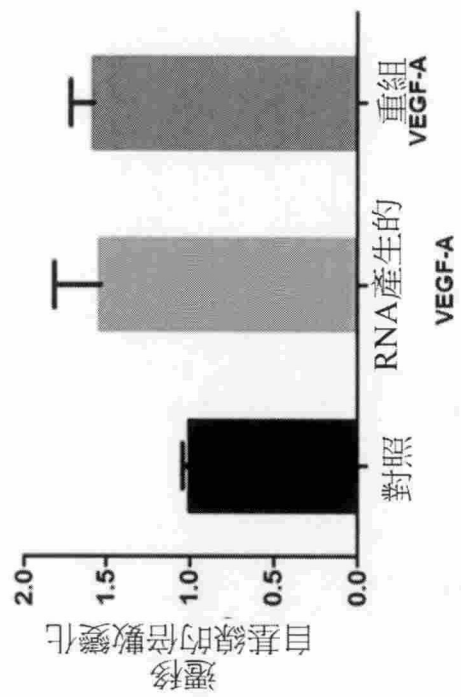
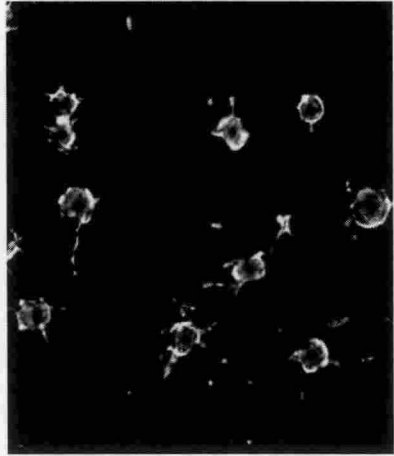
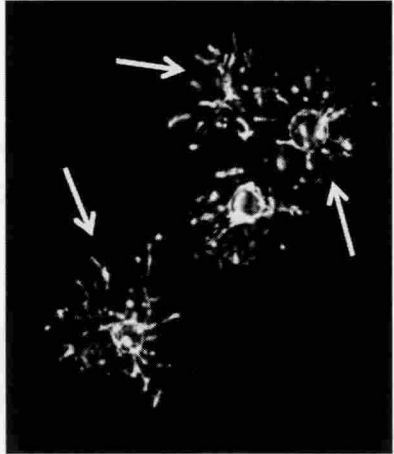


圖 4B



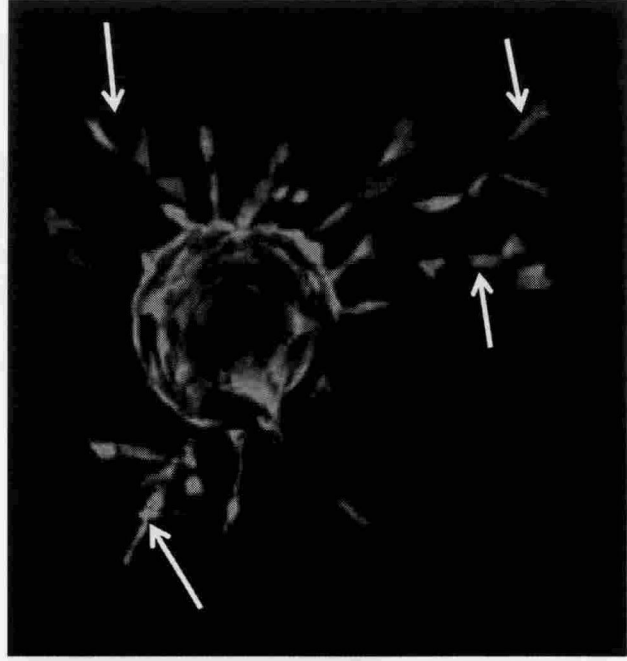
對照

圖 5A



RNA 產生的
VEGF-A

圖 5B



RNA 產生的 VEGF-A

圖 5C

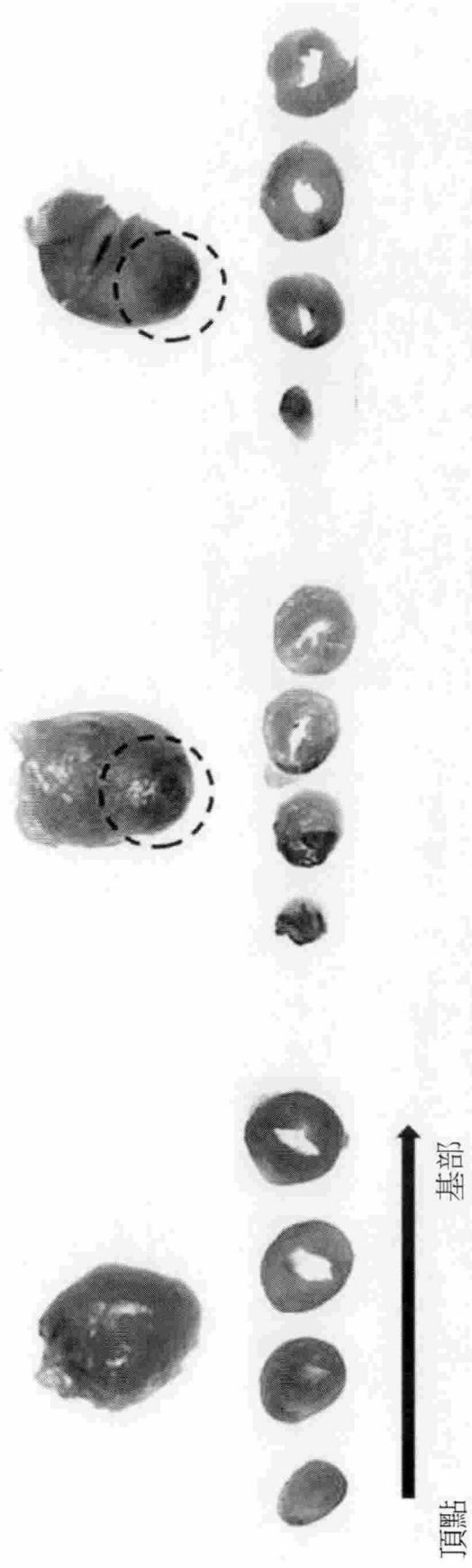


圖 6A

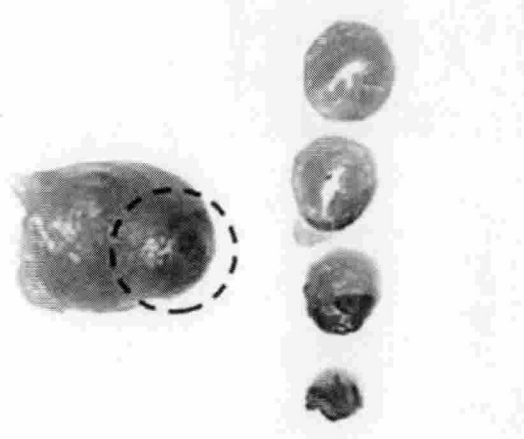


圖 6B

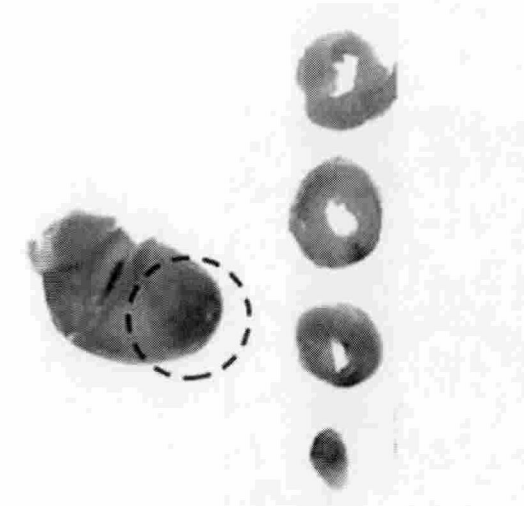


圖 6C

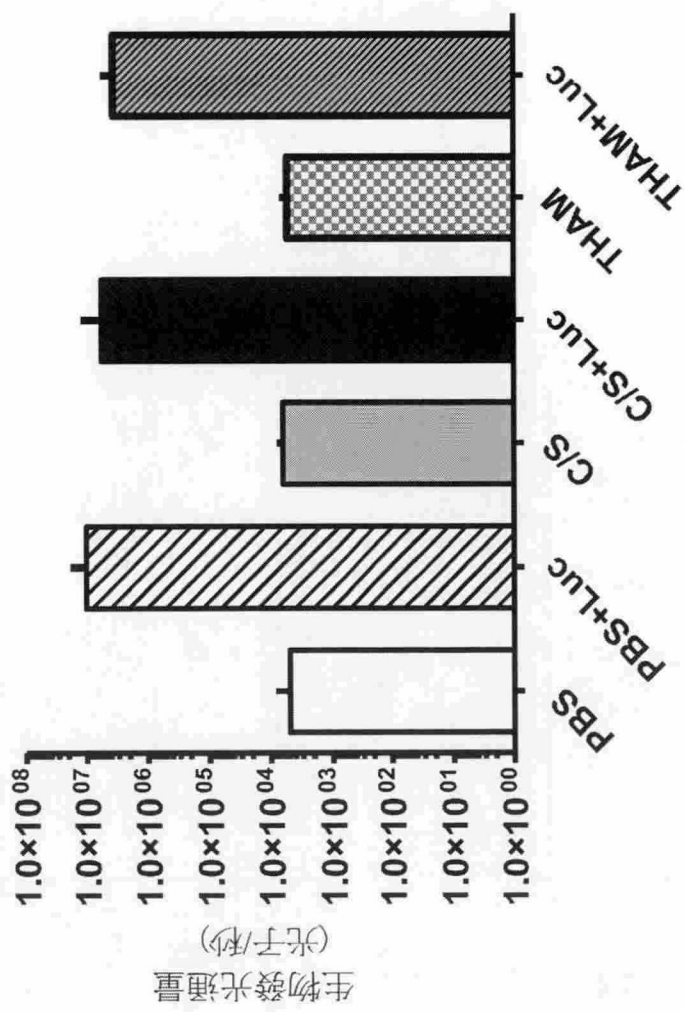


圖 7

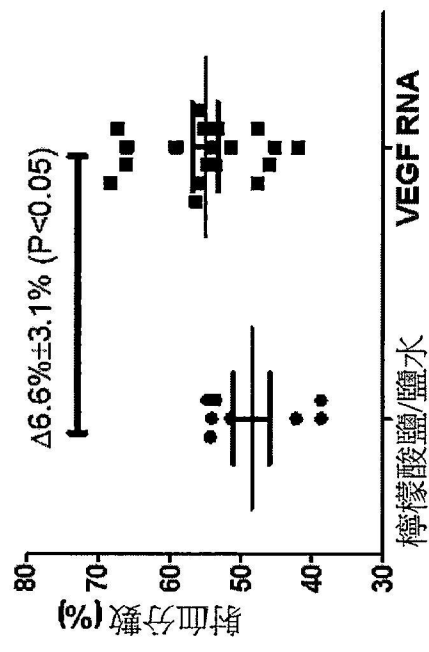


圖 8B

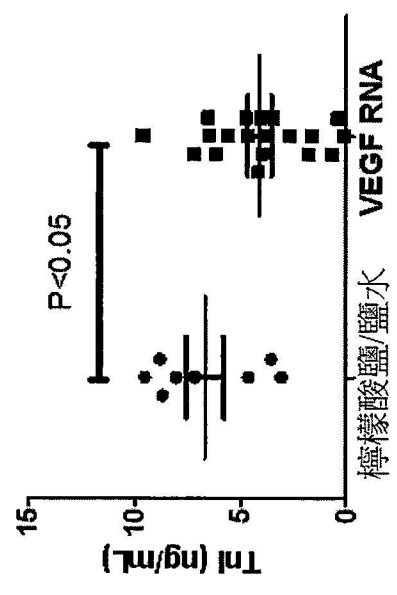


圖 8D

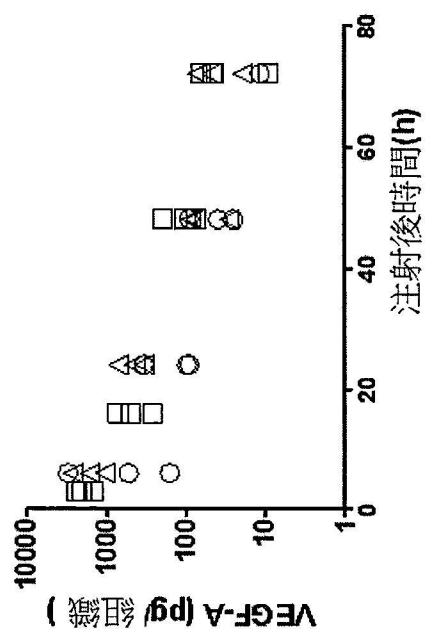


圖 8A

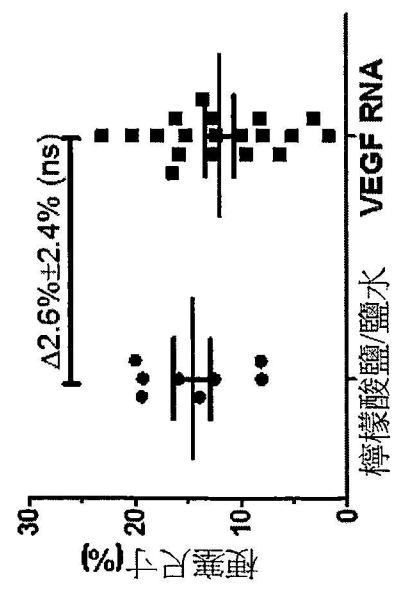


圖 8C

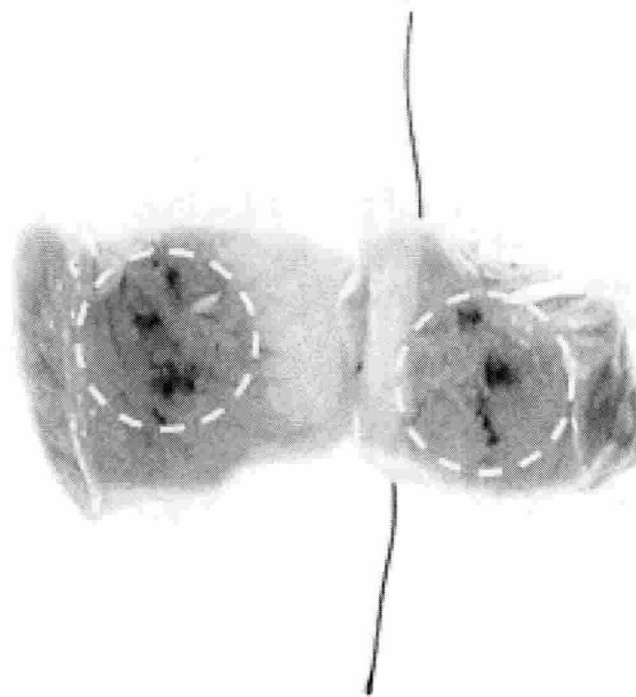


圖 9B



圖 9A

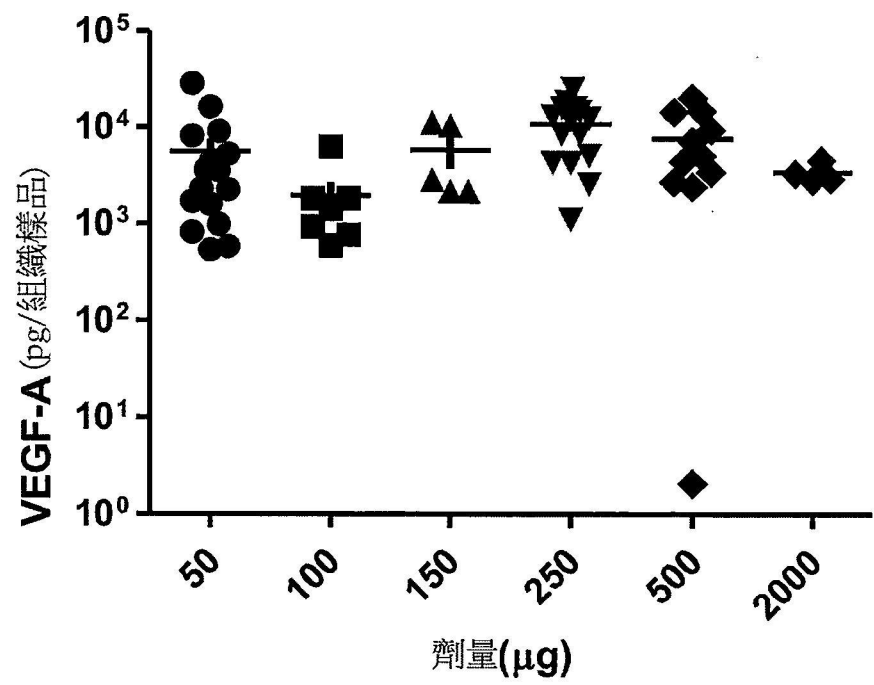


圖 10



圖 11A

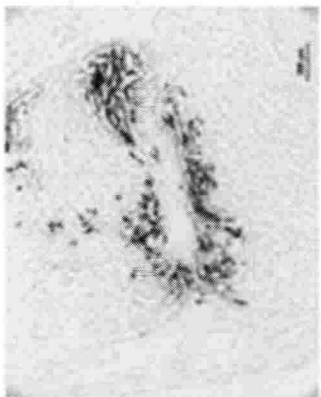


圖 11B

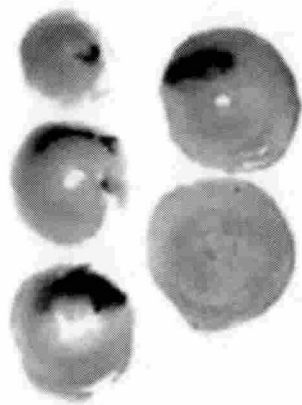


圖 11C

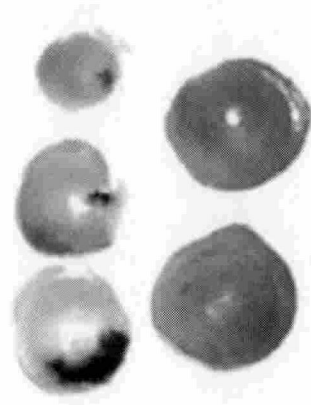


圖 11D

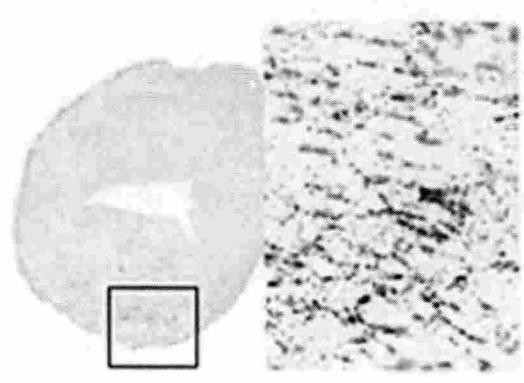


圖 11E

螢光素酶 **ISH-mRNA** 表現

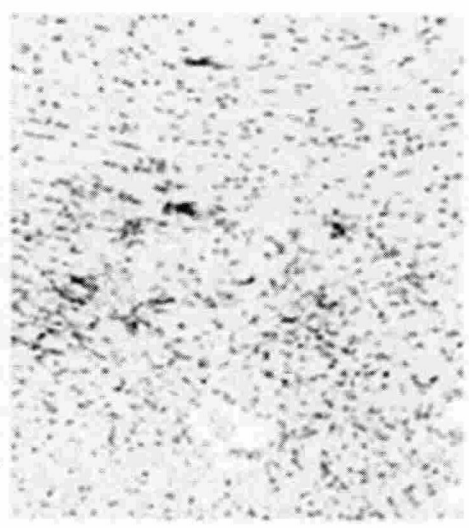


圖 11F

螢光素酶 **IHC**-蛋白質表現



圖 11G

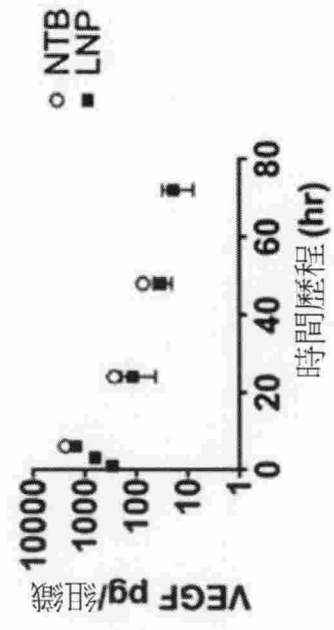


圖 12A

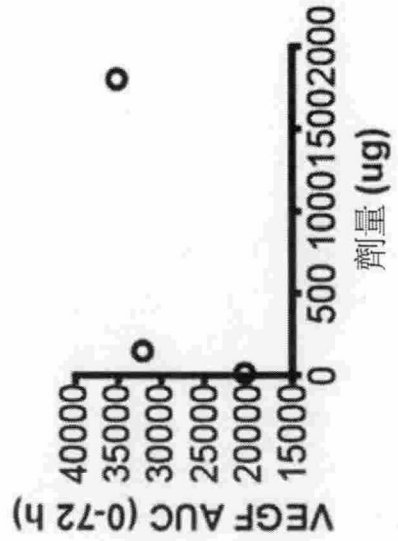


圖 12C

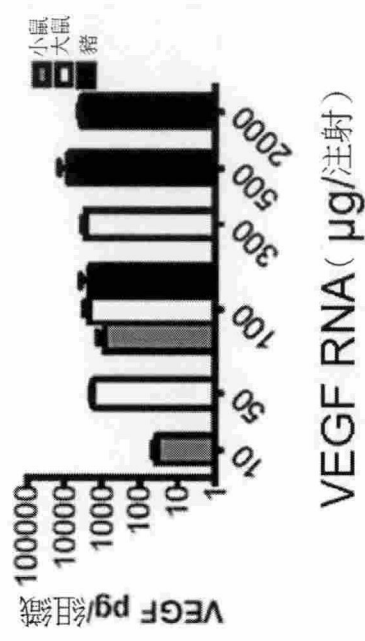


圖 12B

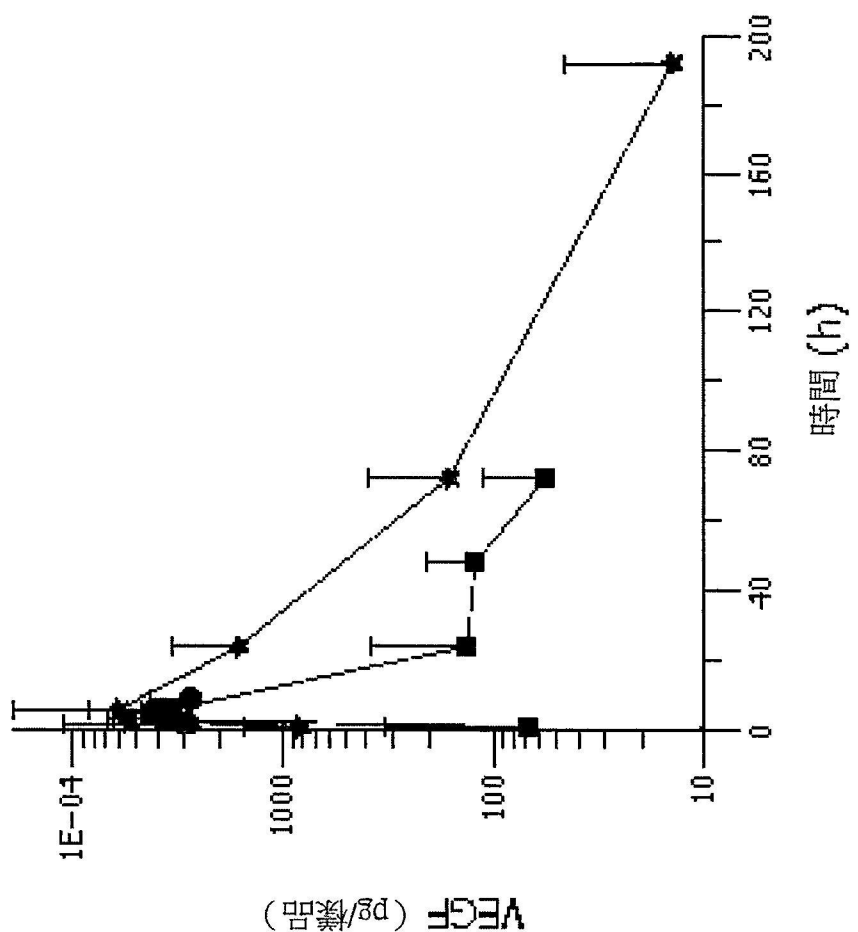


圖 13A

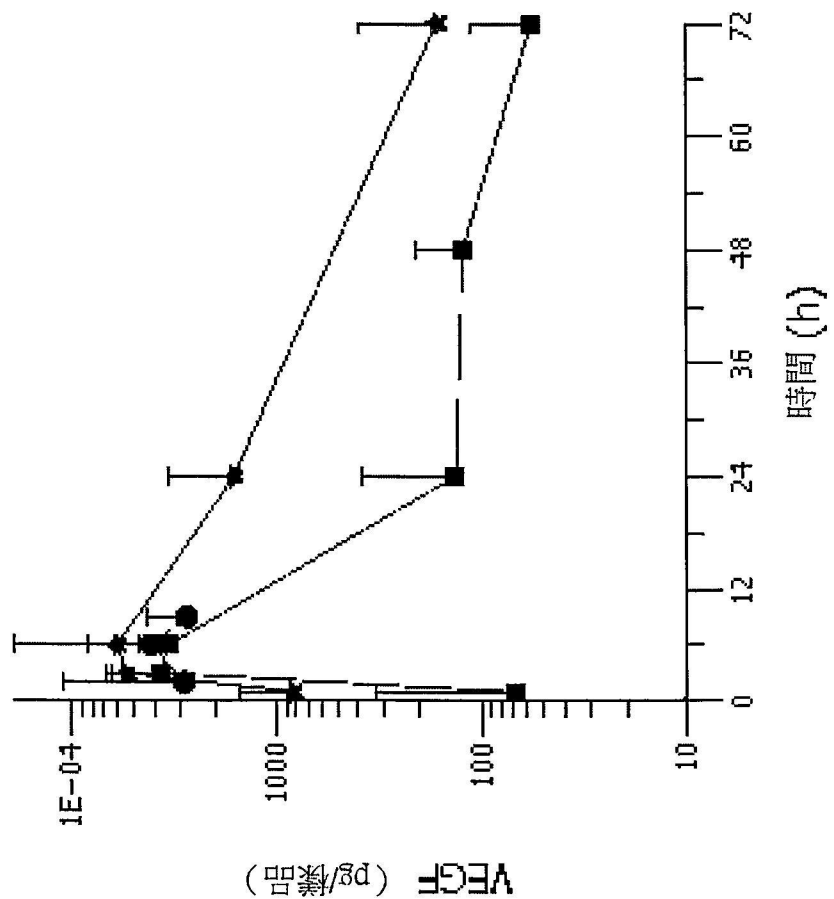


圖 13B

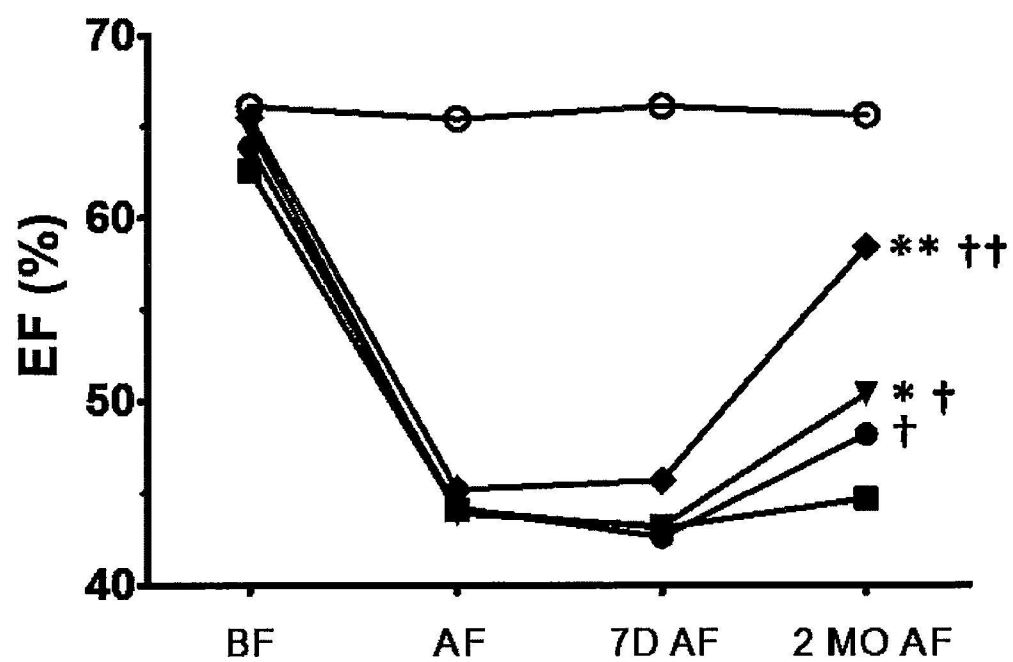


圖 14

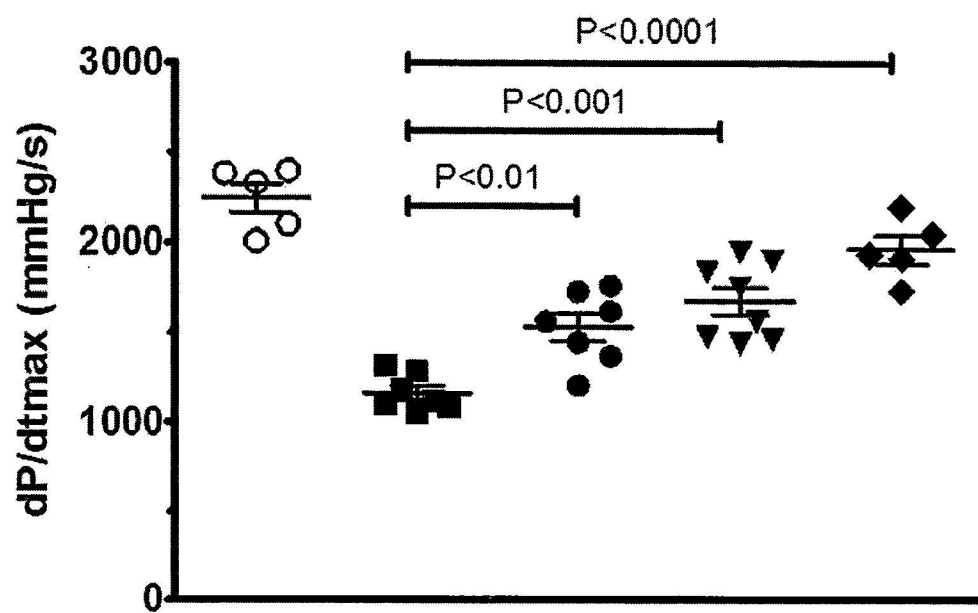


圖 15

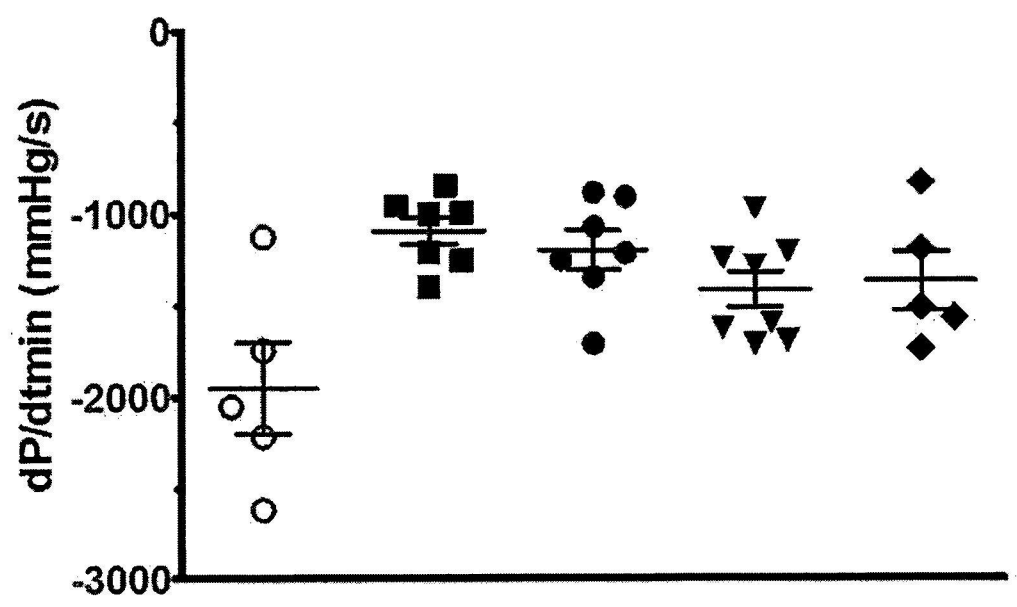


圖 16

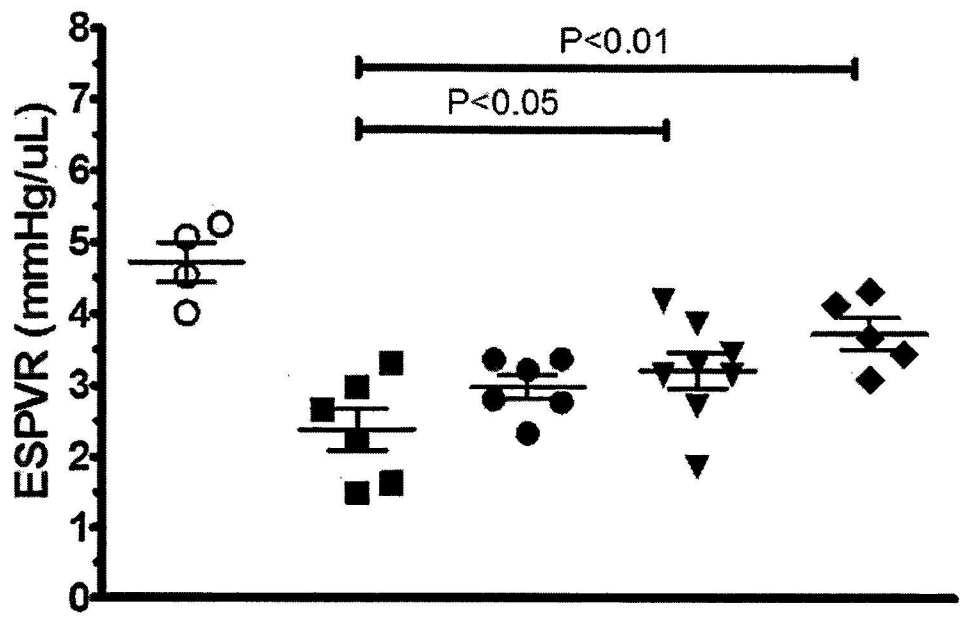


圖 17

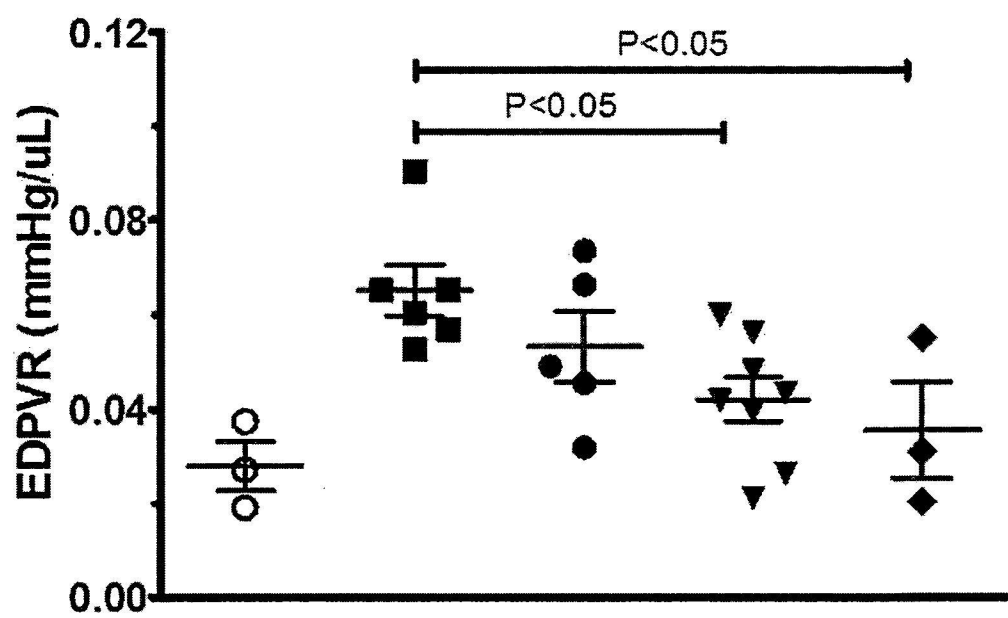


圖 18

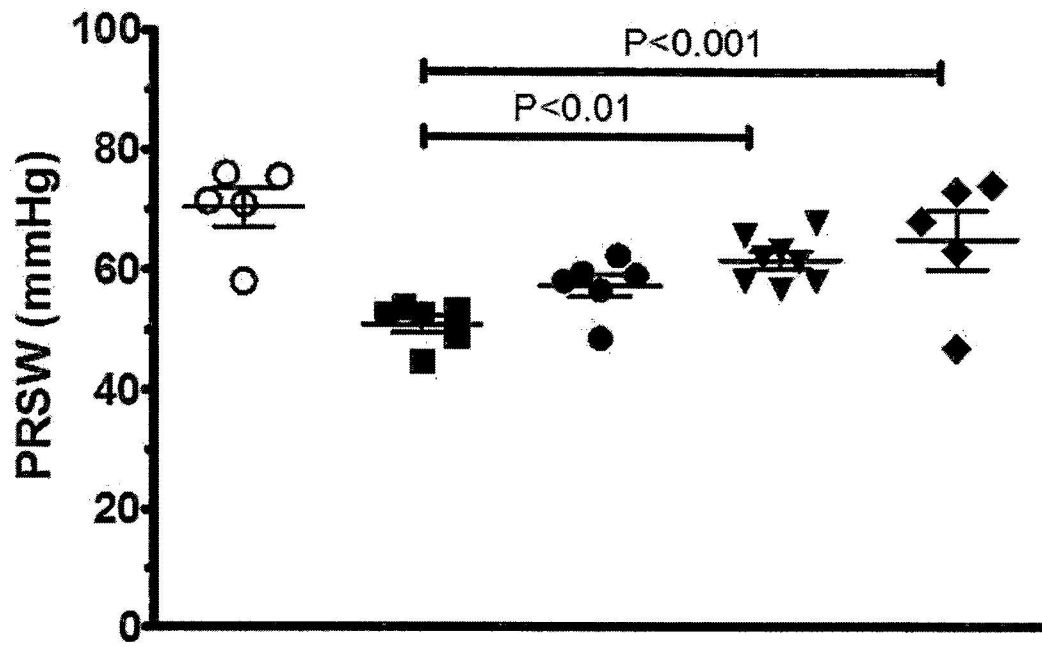


圖 19

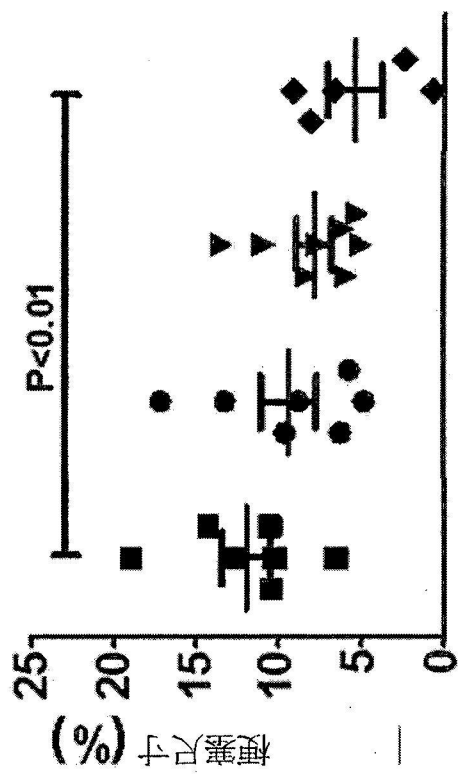


圖 20B

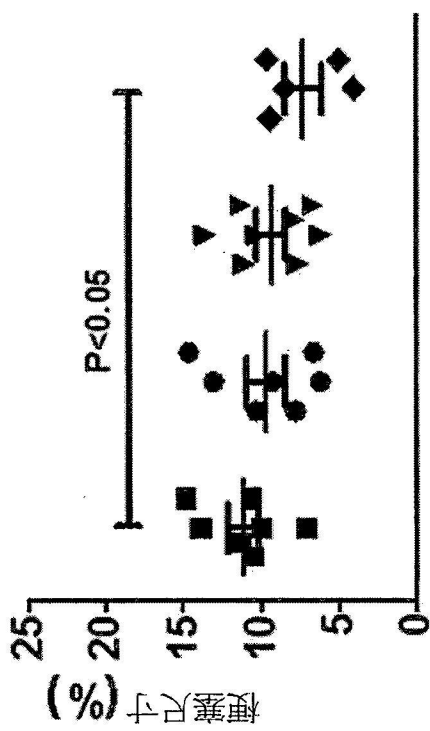


圖 20A

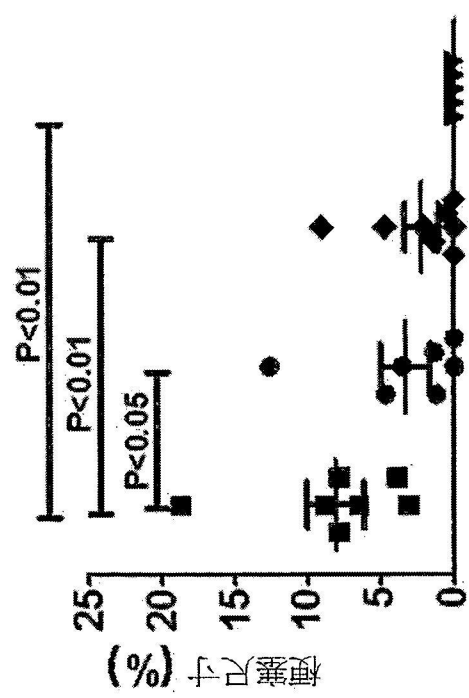


圖 20C

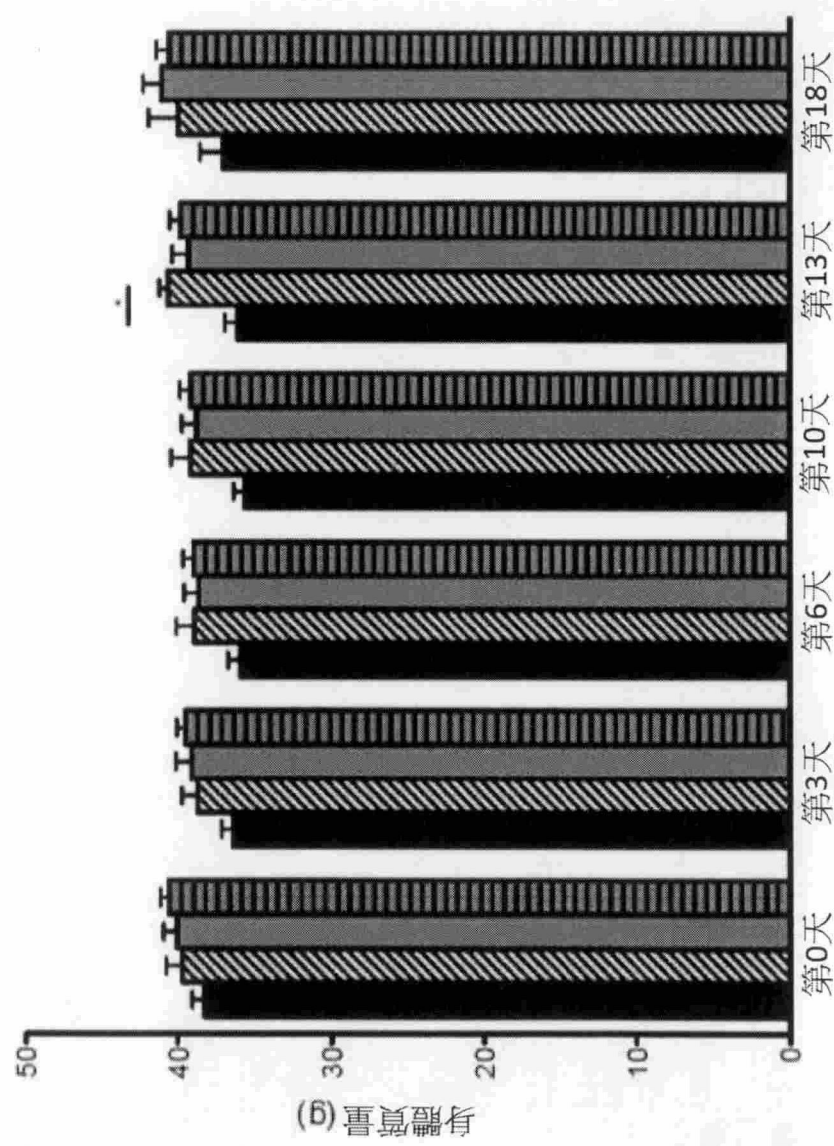


圖 21

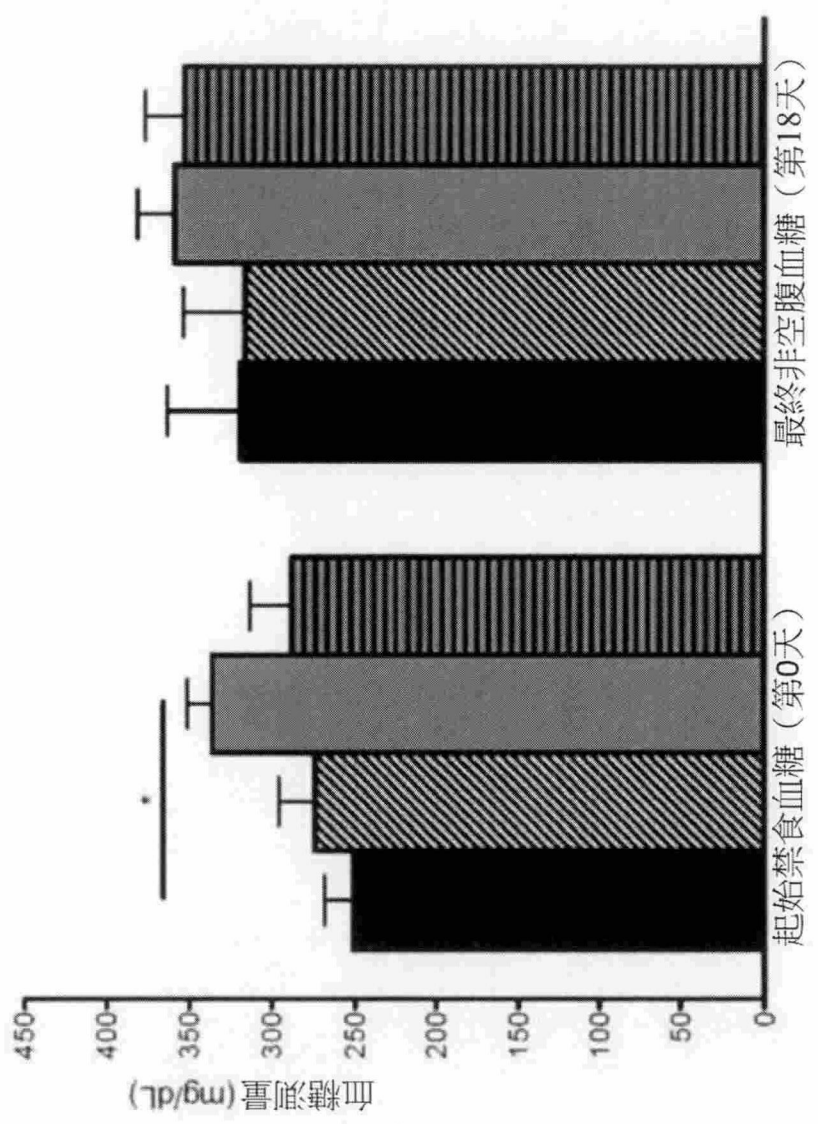


圖 22

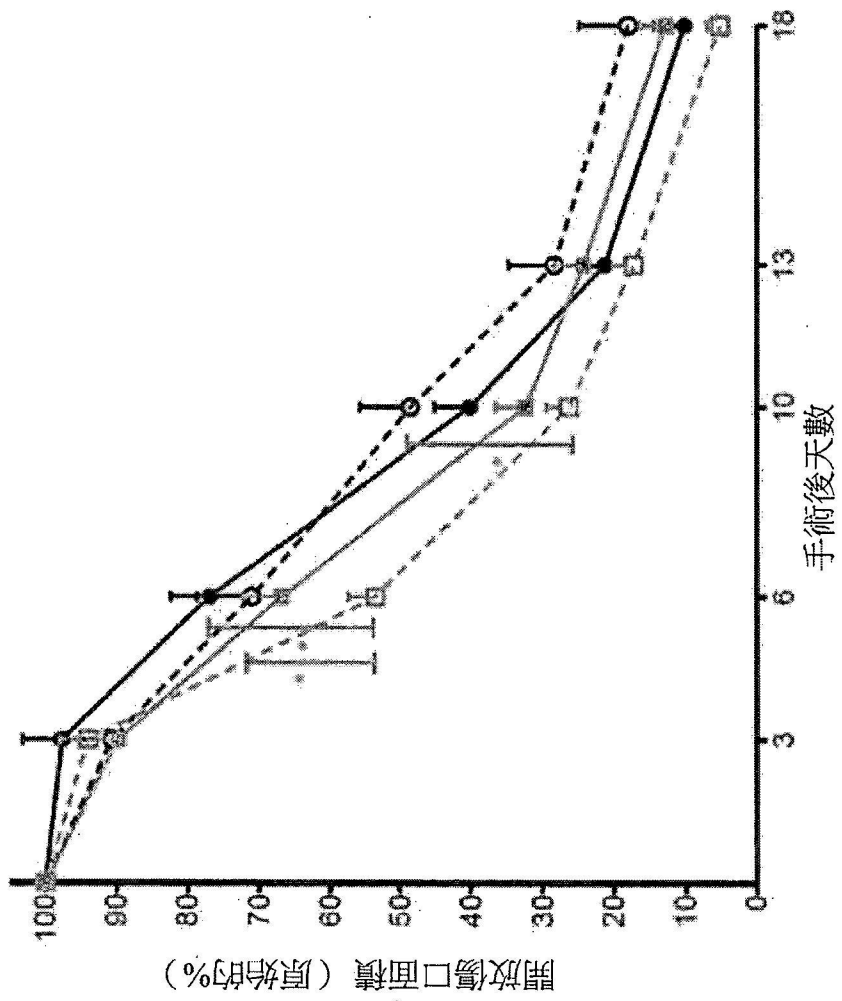


圖 23

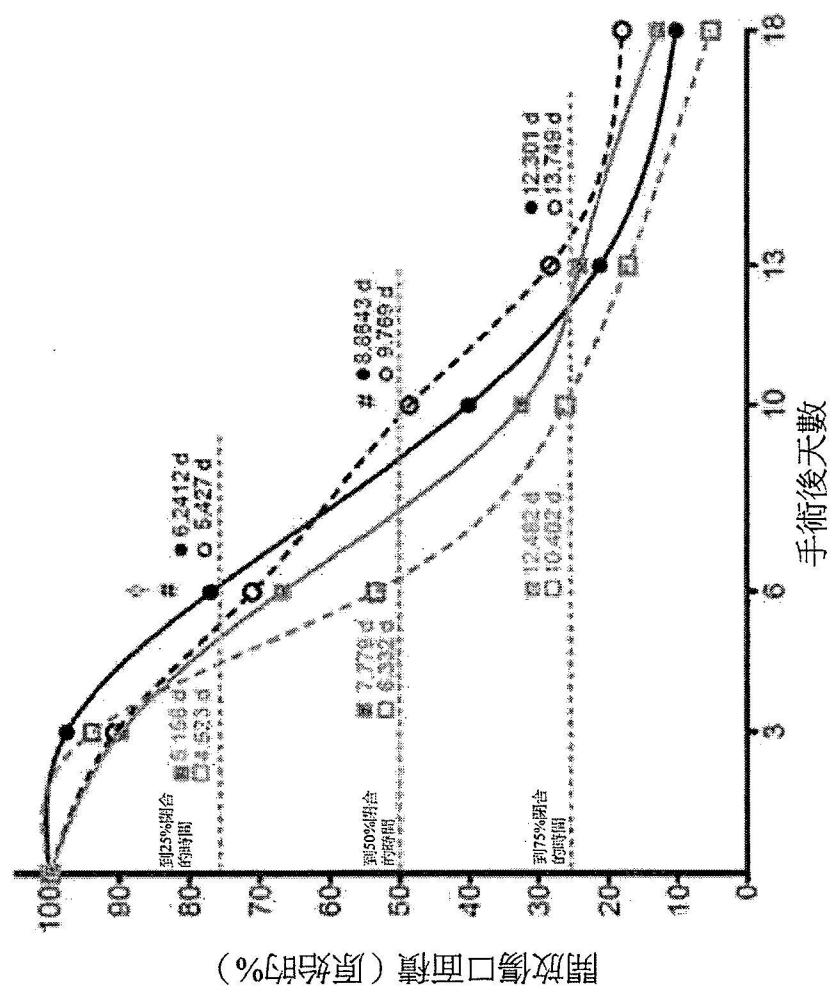


圖 24

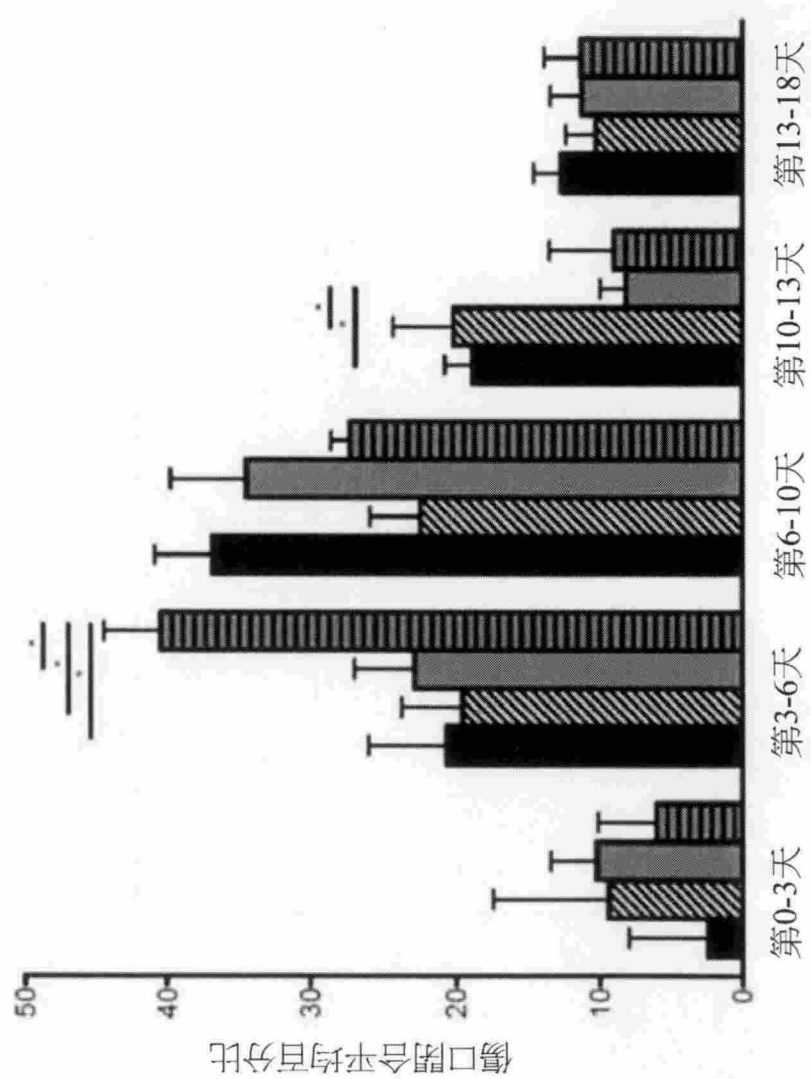


圖 25

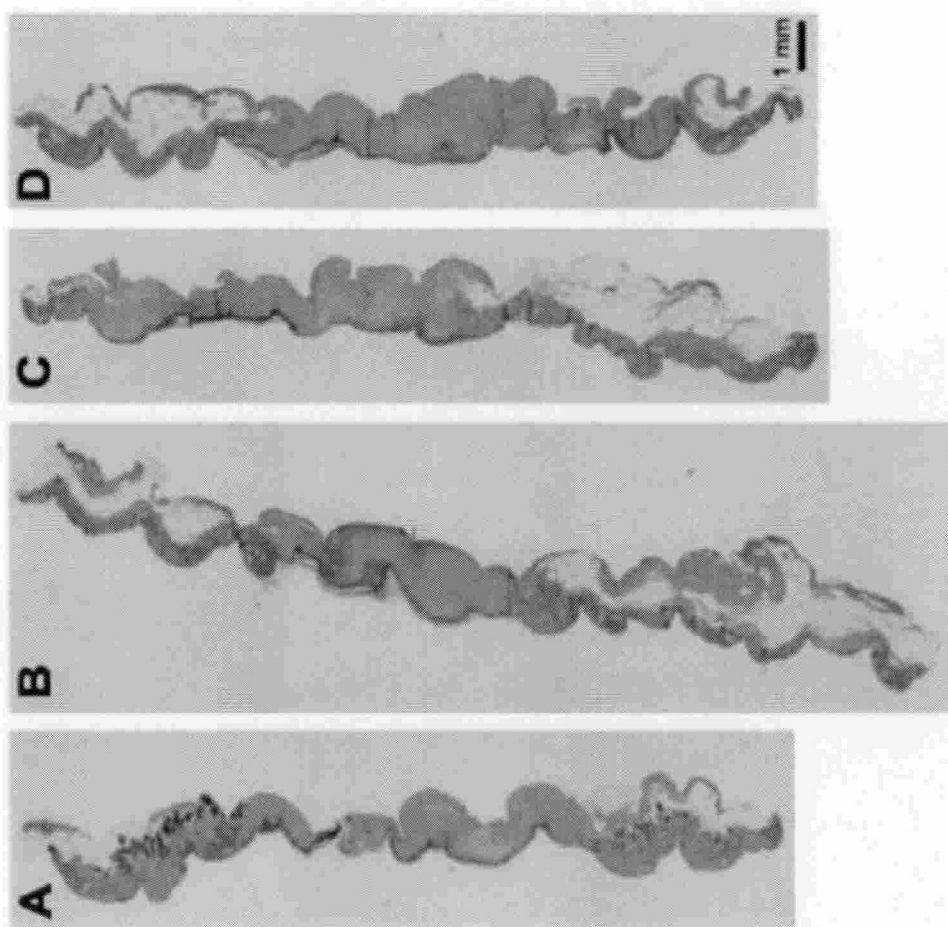


圖 26

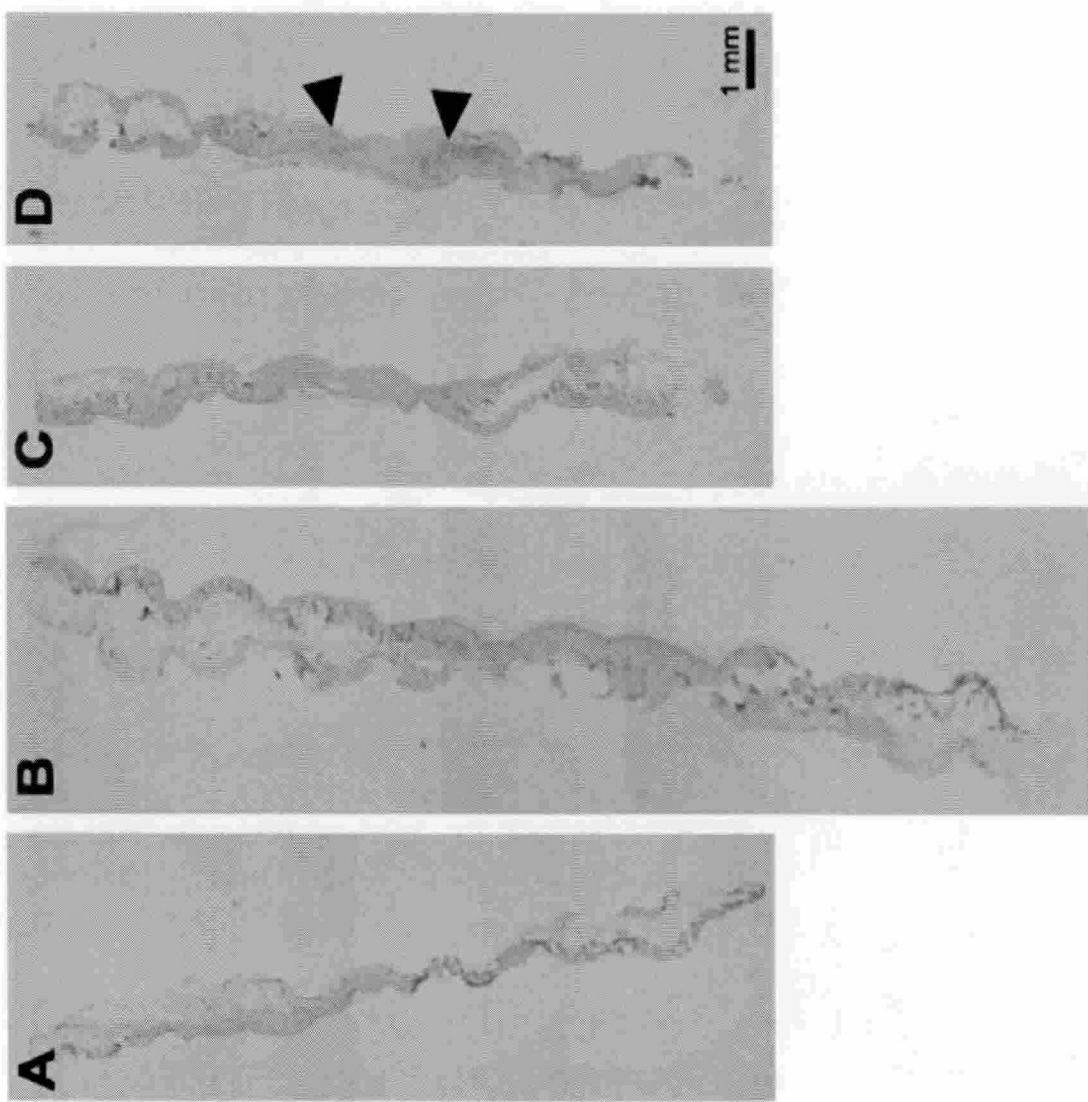


圖 27

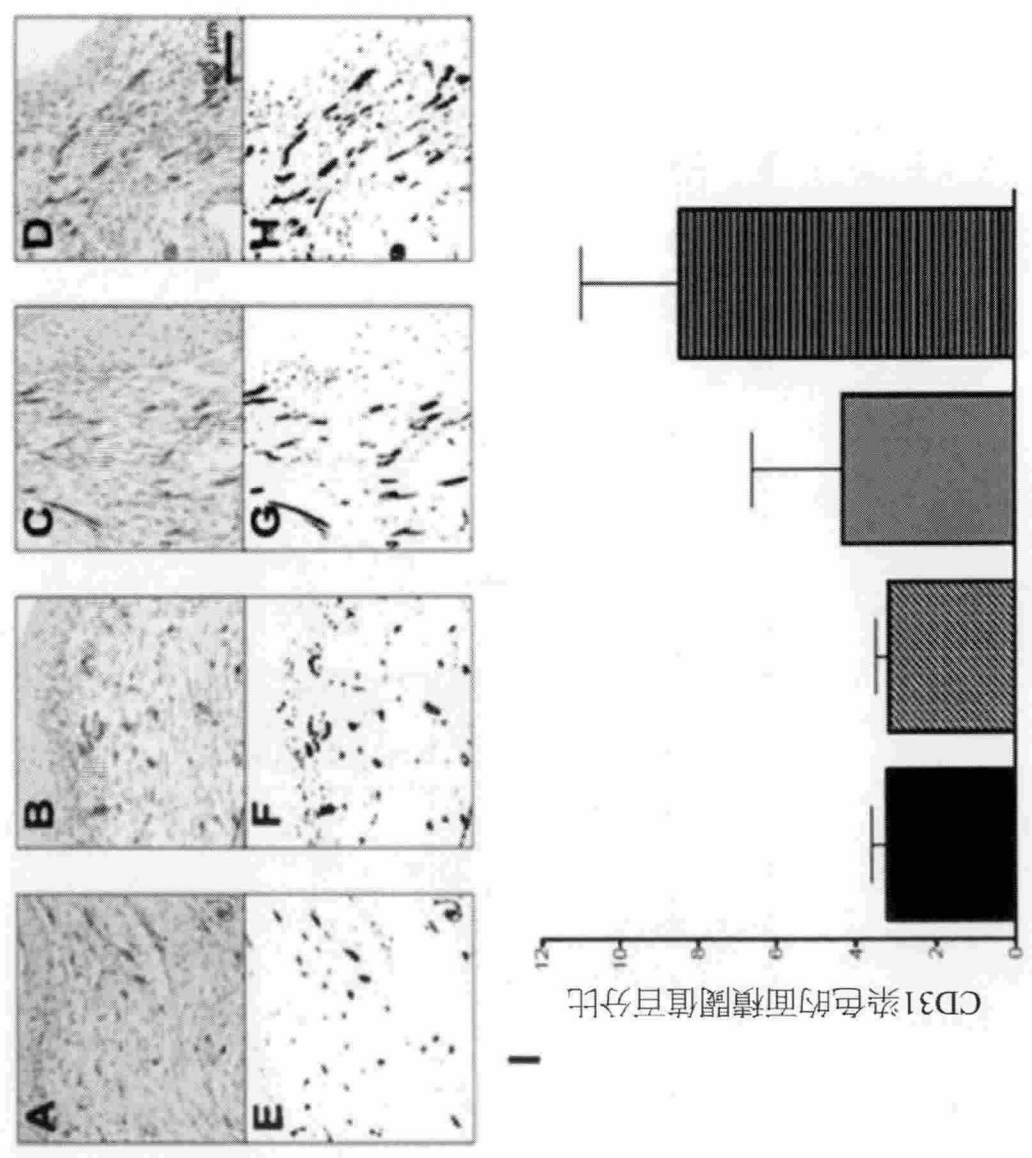


圖 28

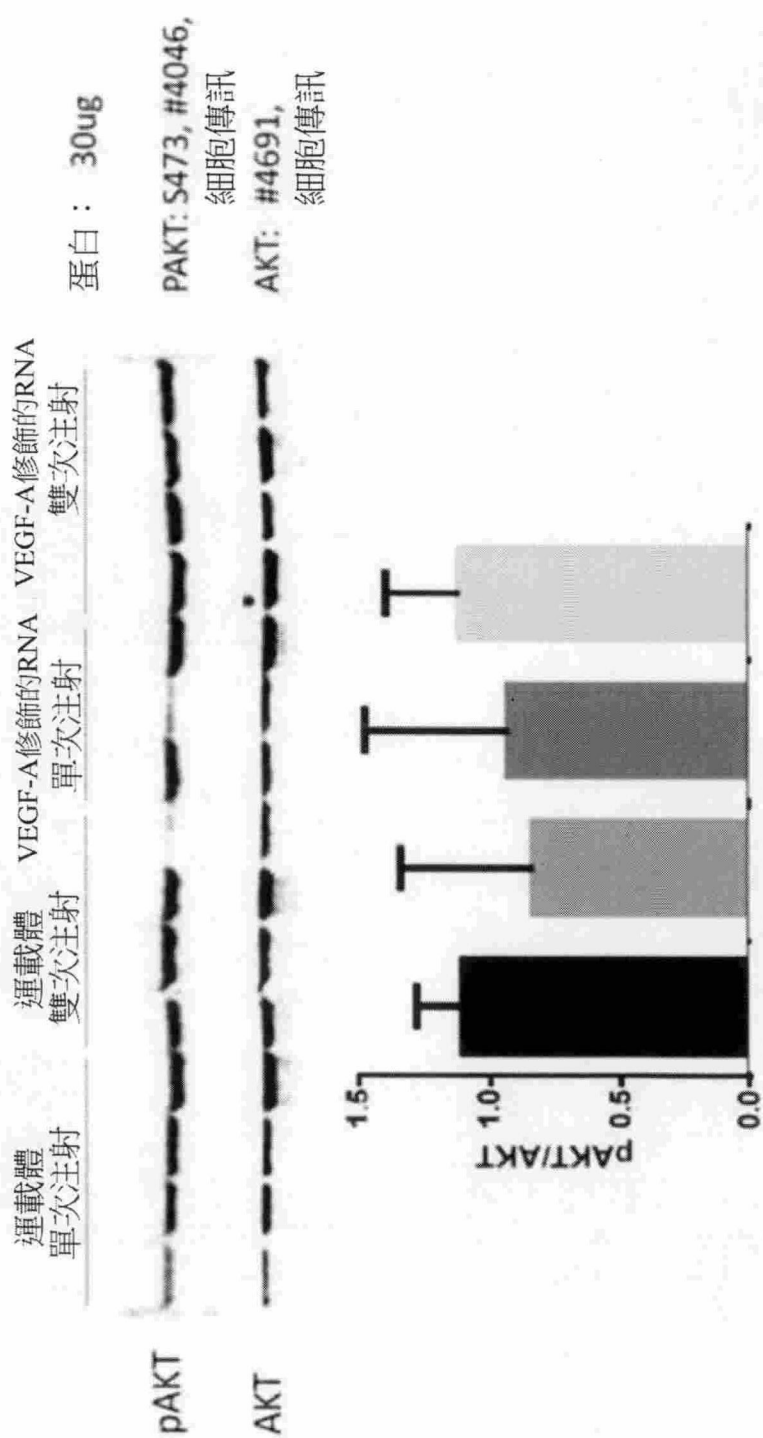


圖 29

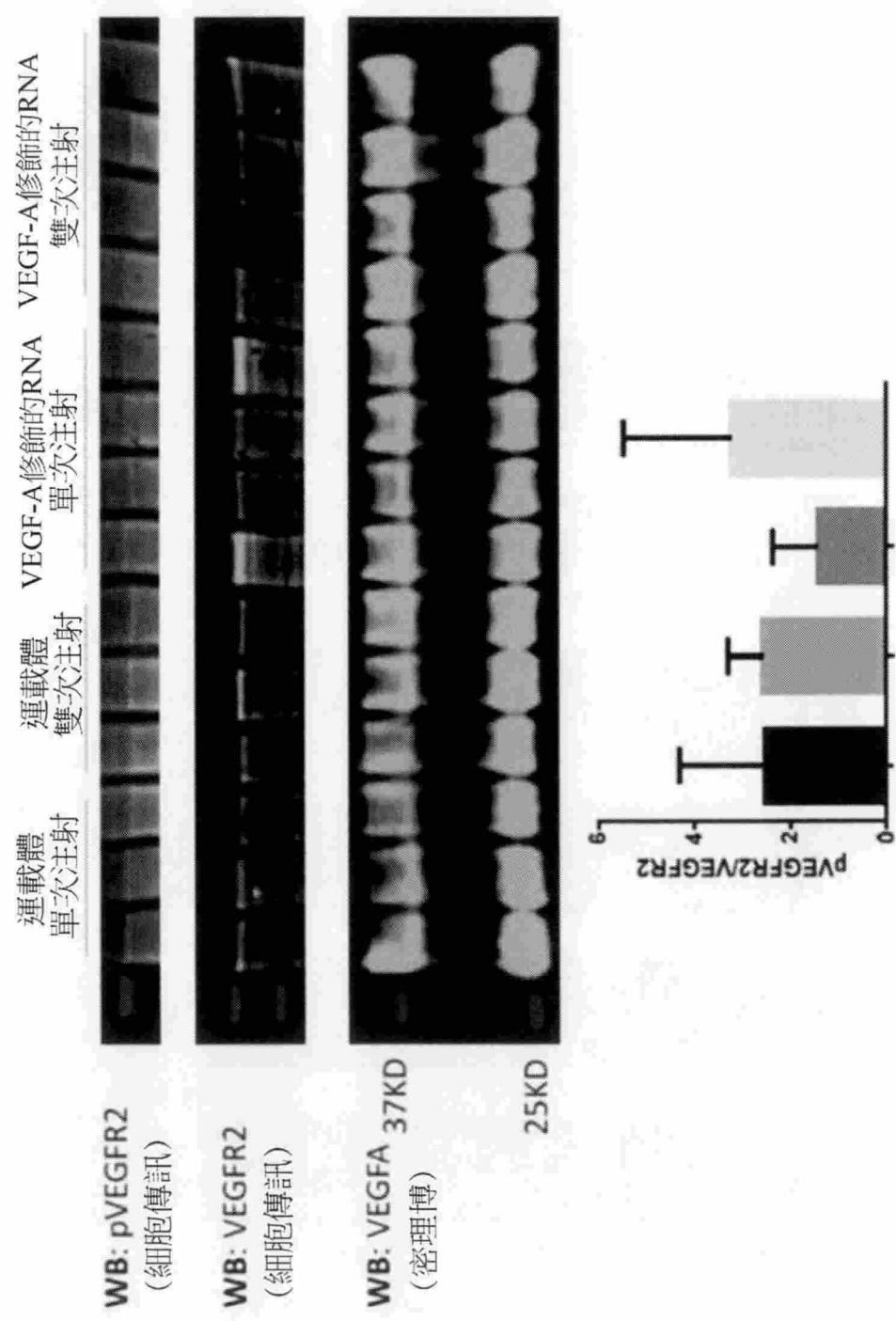


圖 30

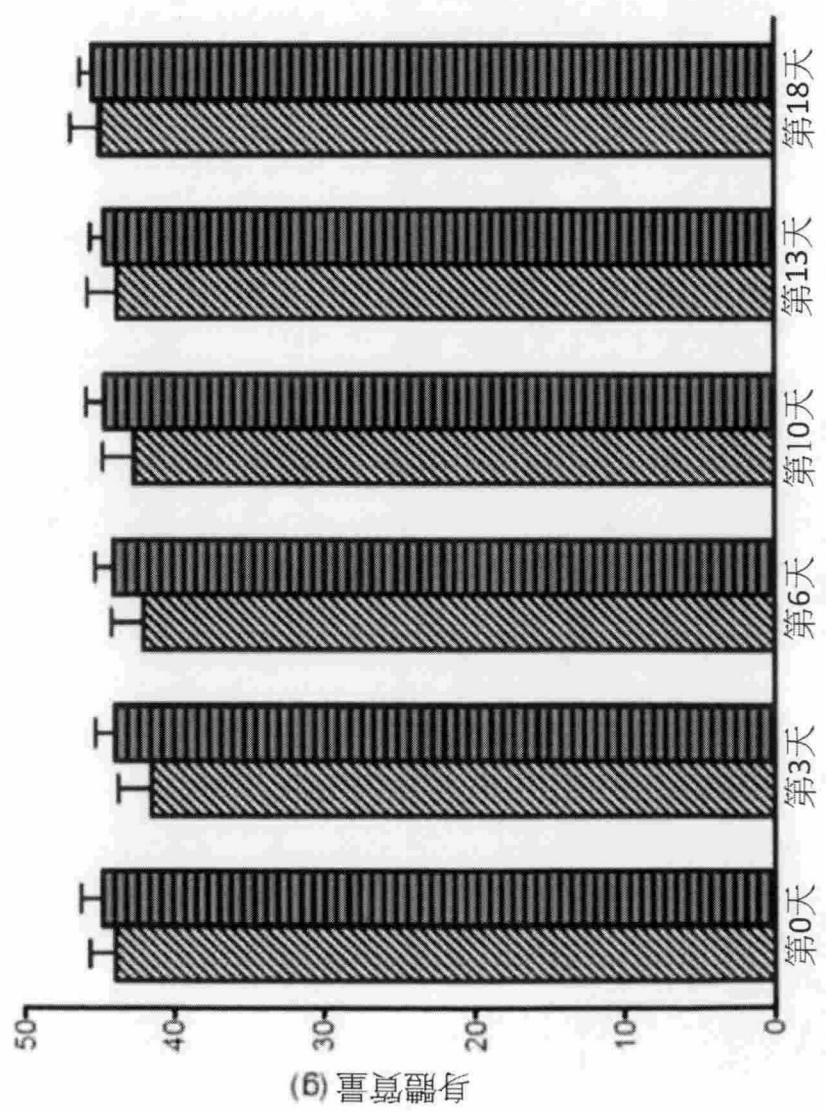


圖 31

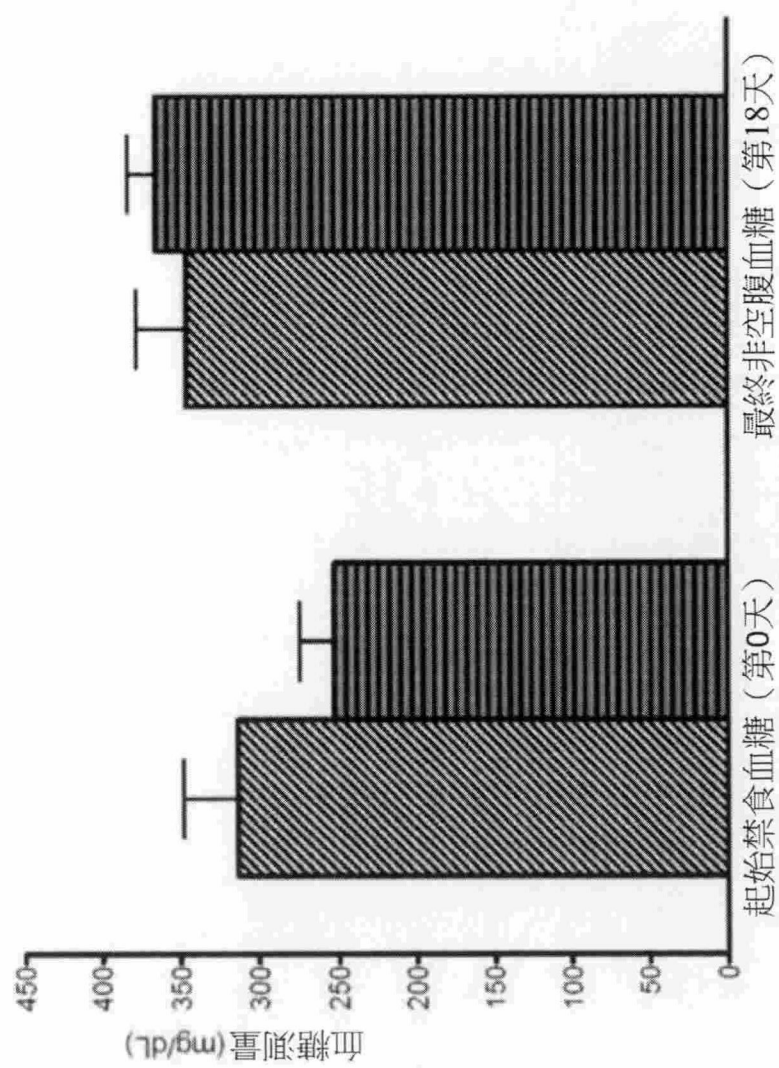


圖 32

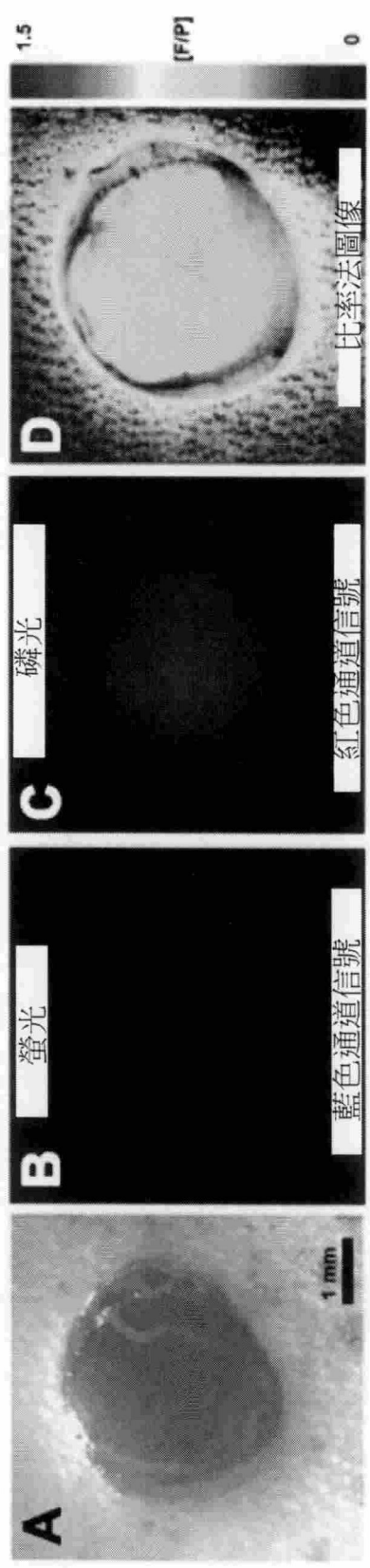


圖 33

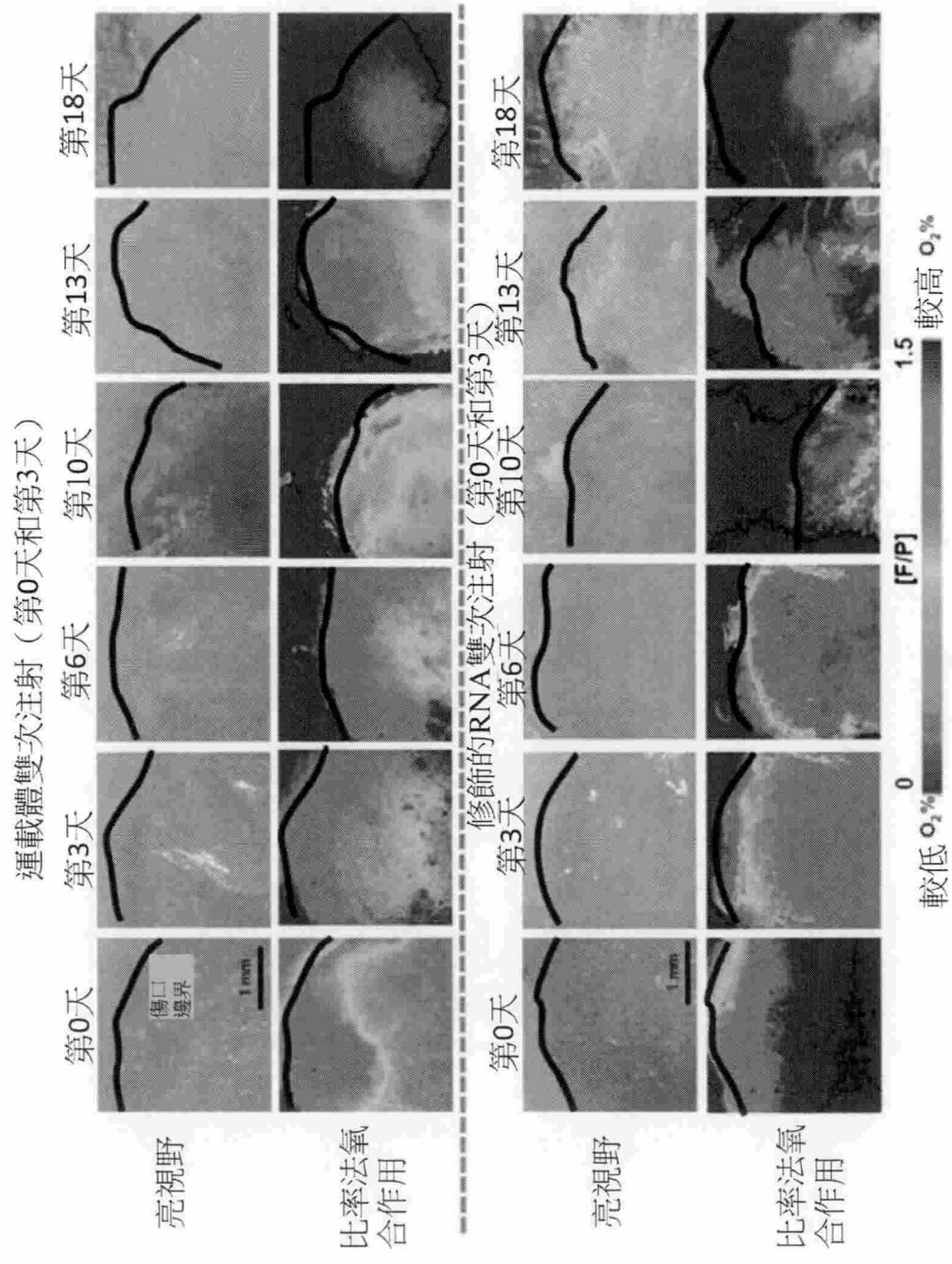


圖 34

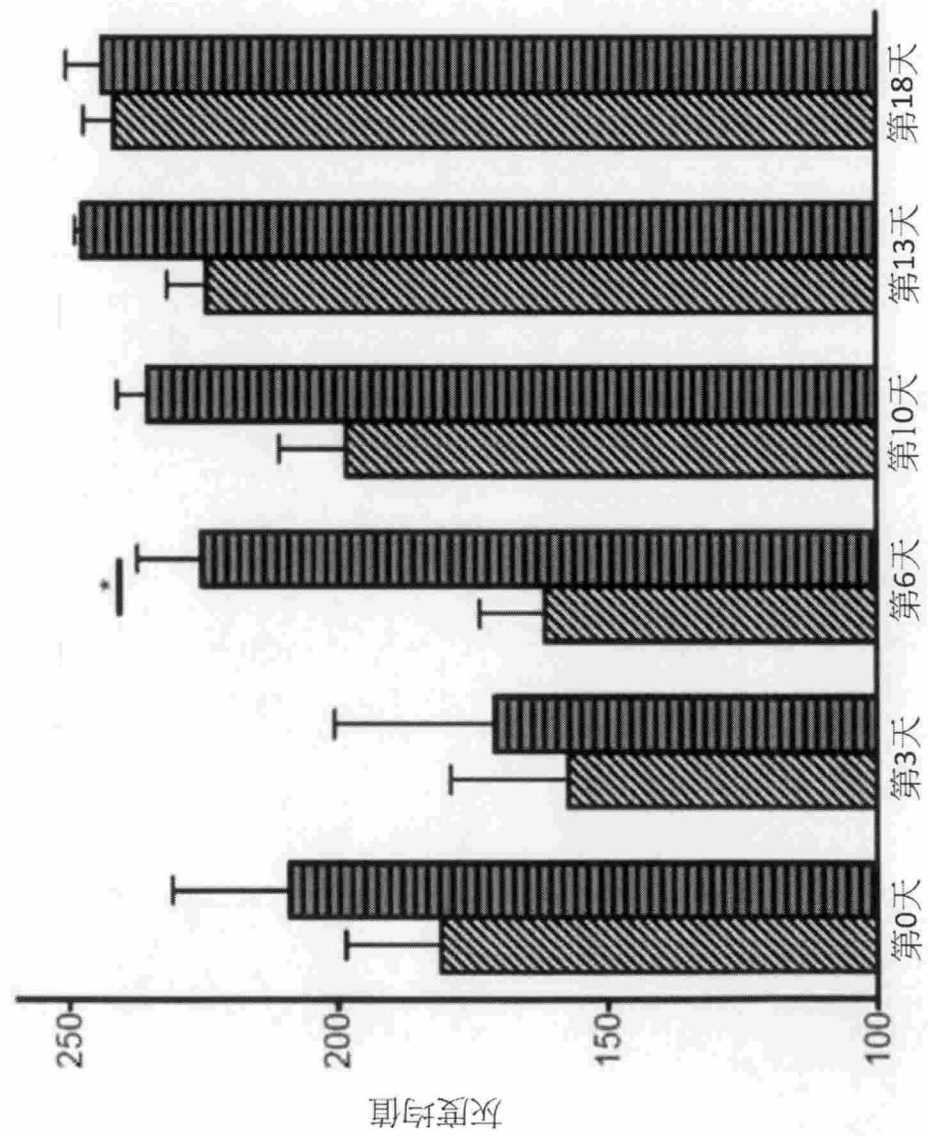


圖 35

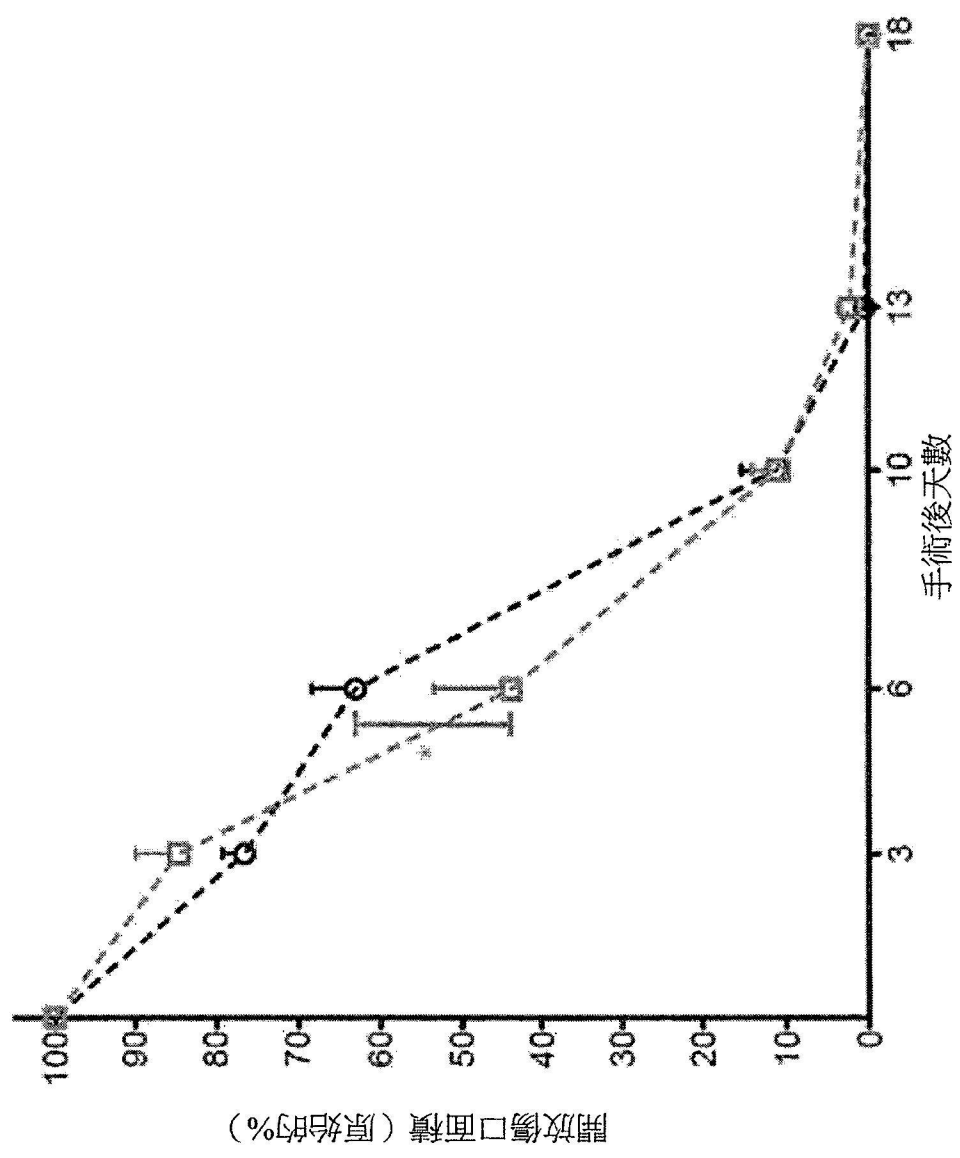


圖 36

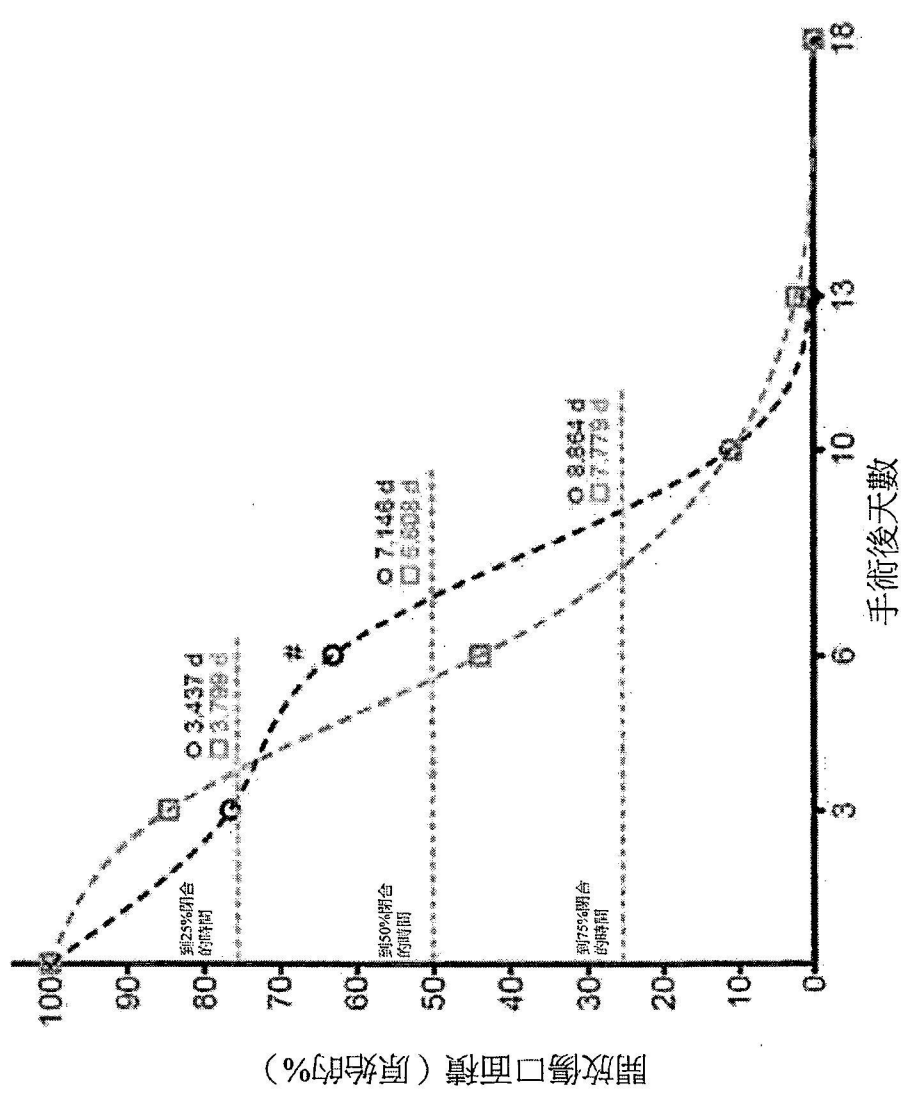


圖 37

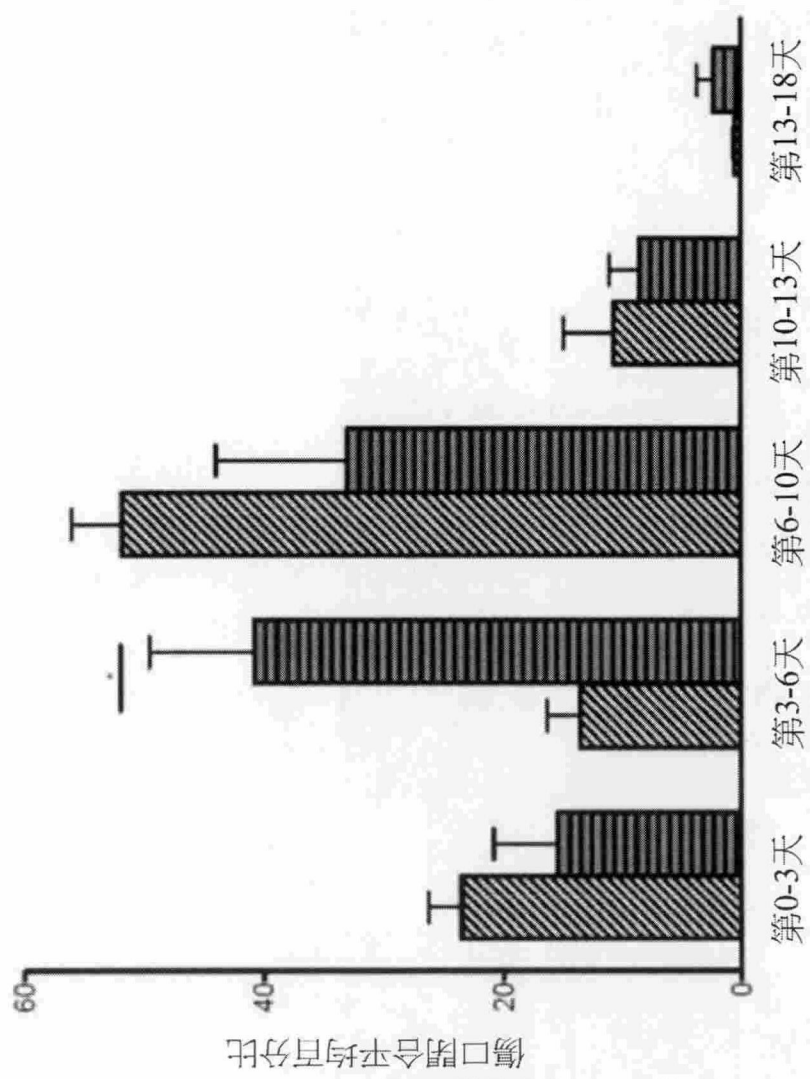


圖 38

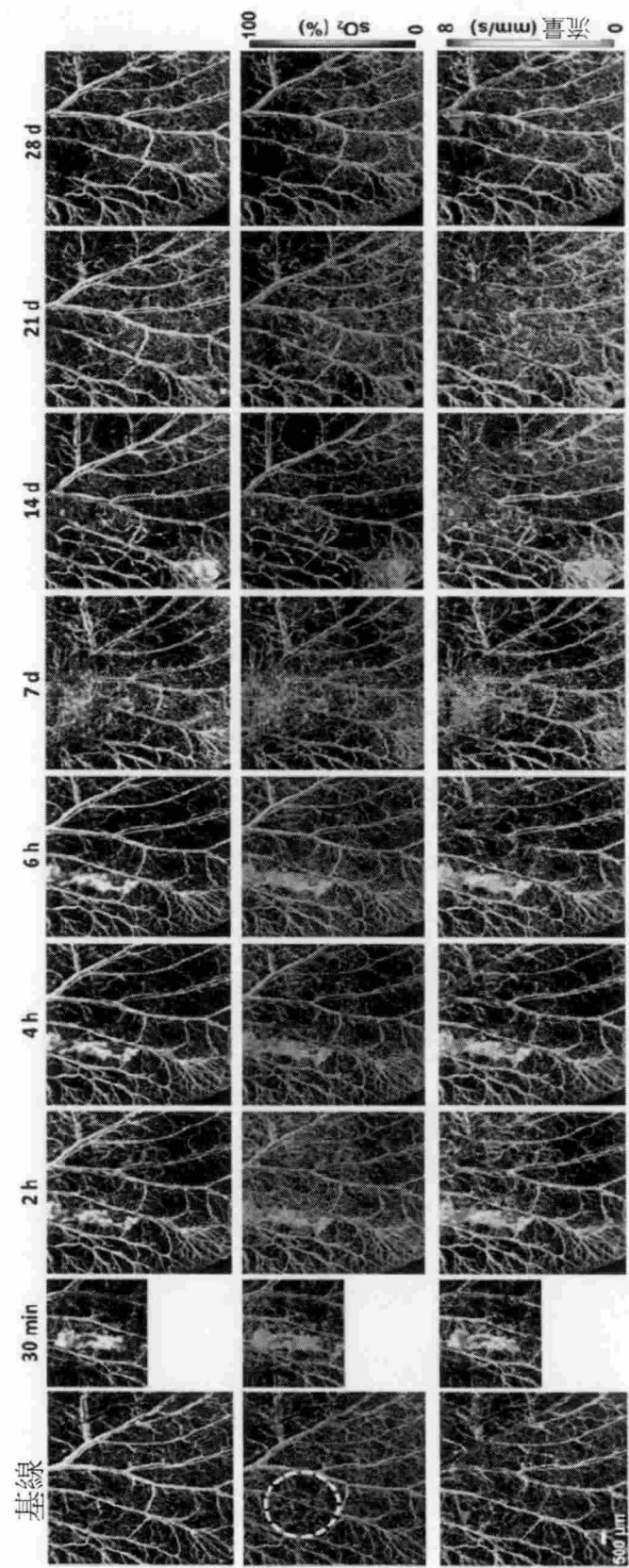


圖 39

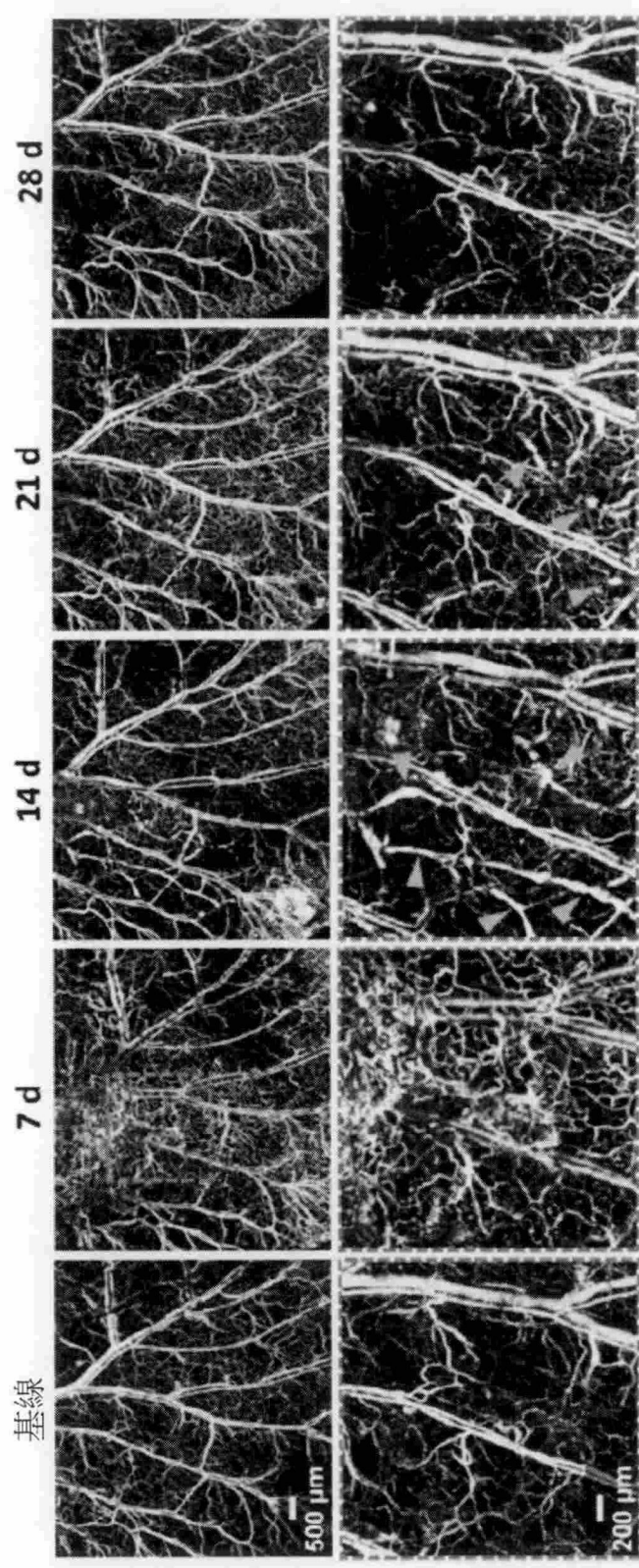


圖 40

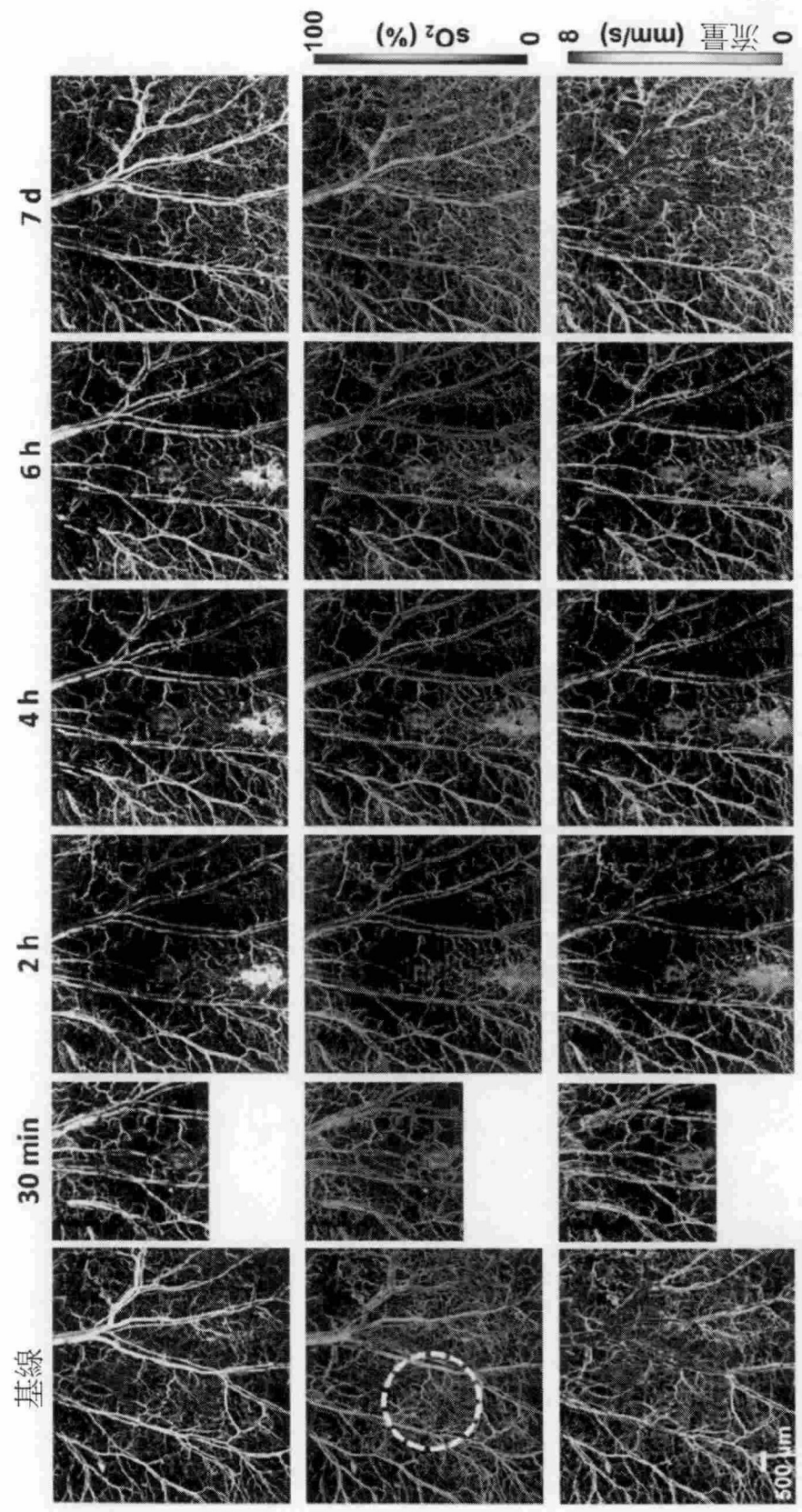


圖 41

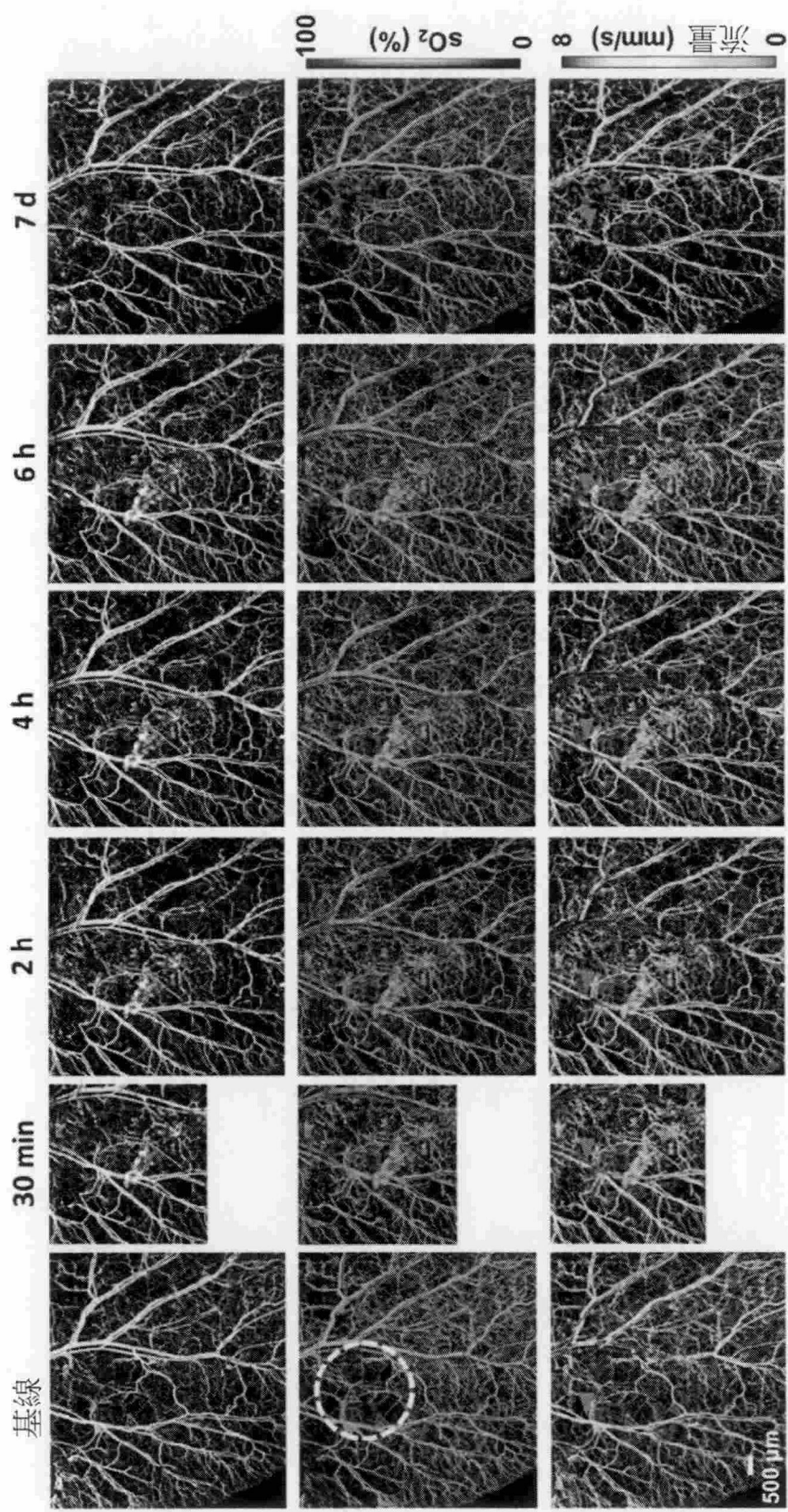


圖 42

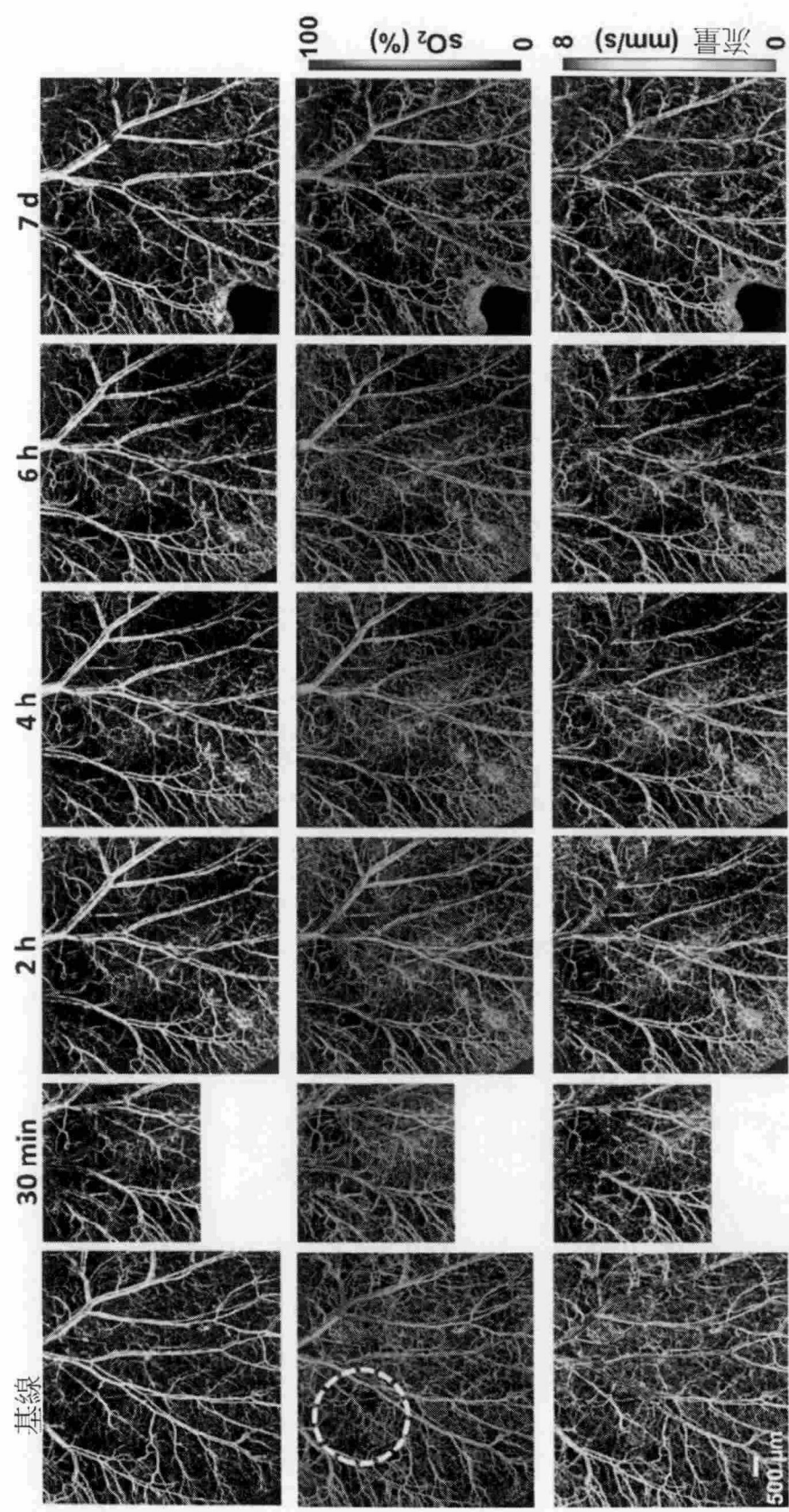


圖 43

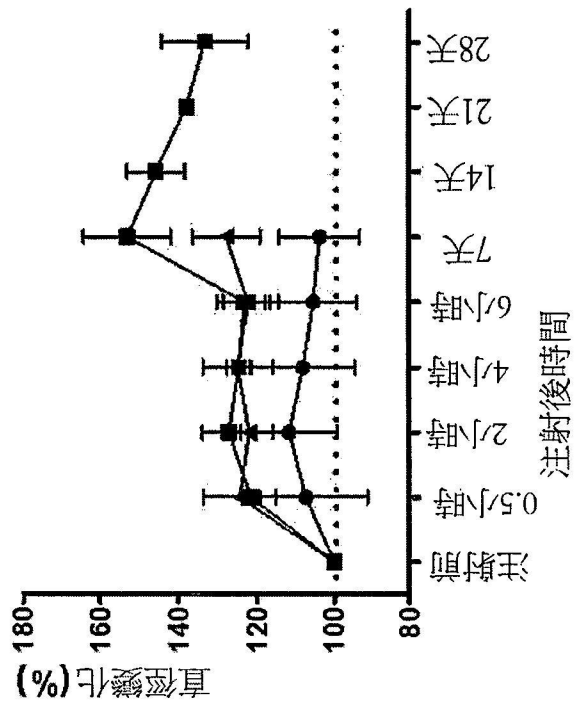
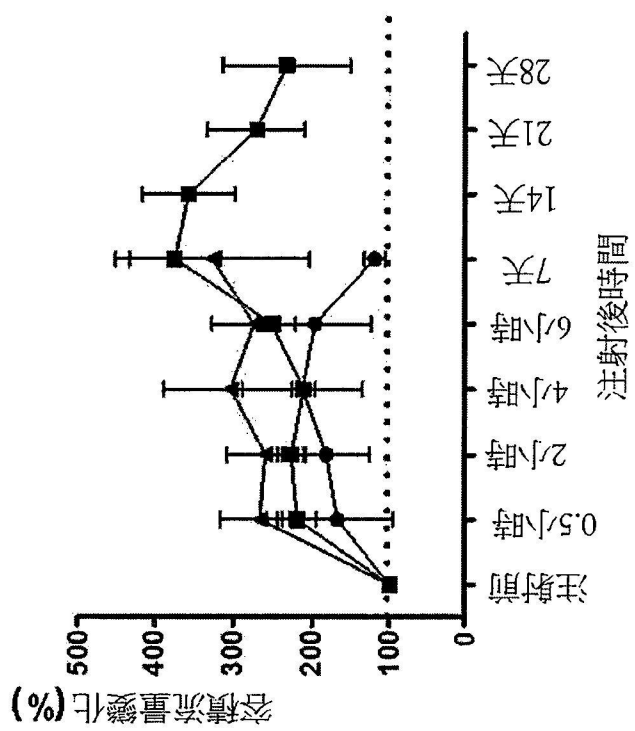


圖 44

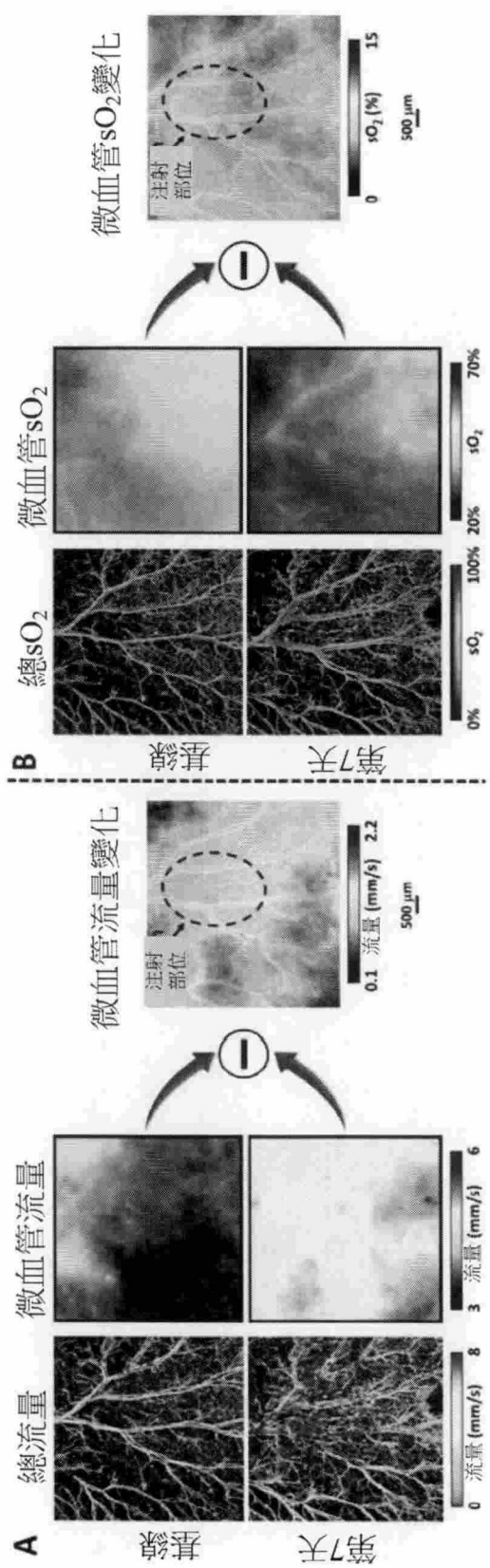


圖 45

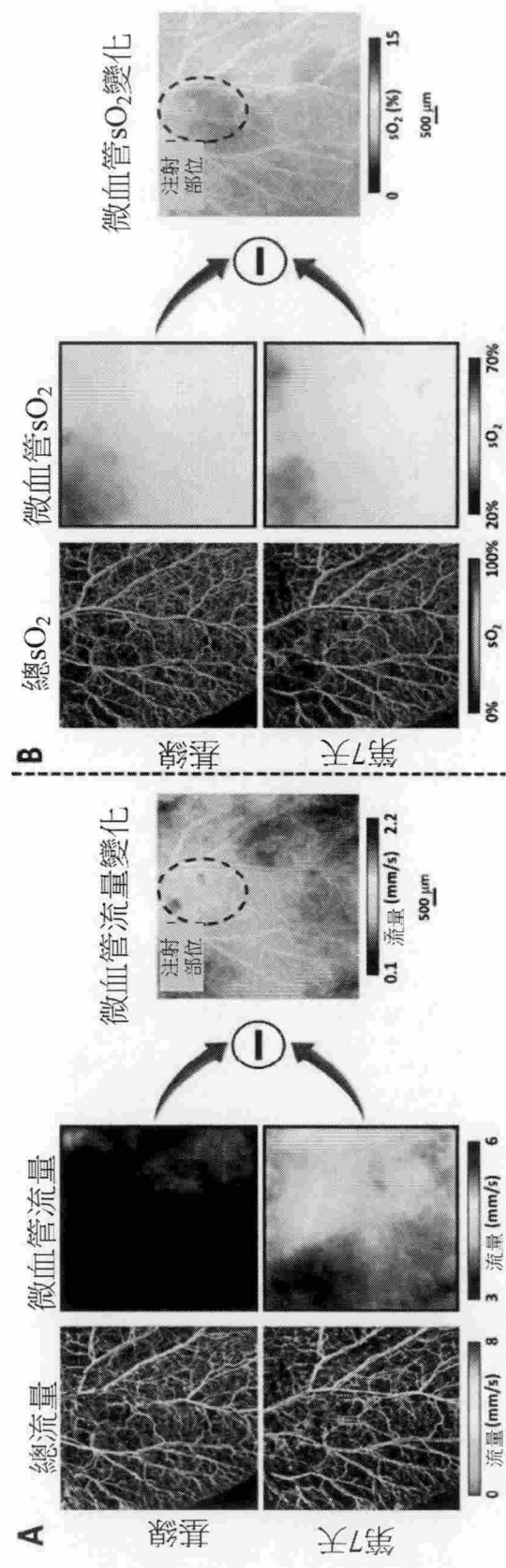


圖 46

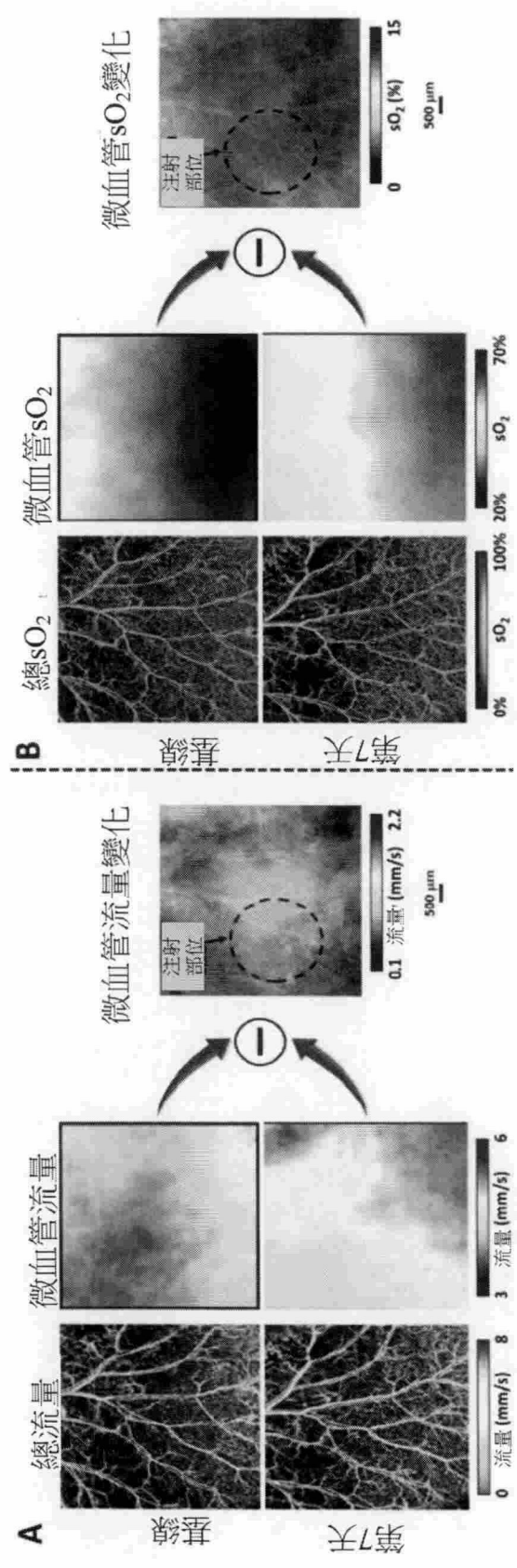


圖 47

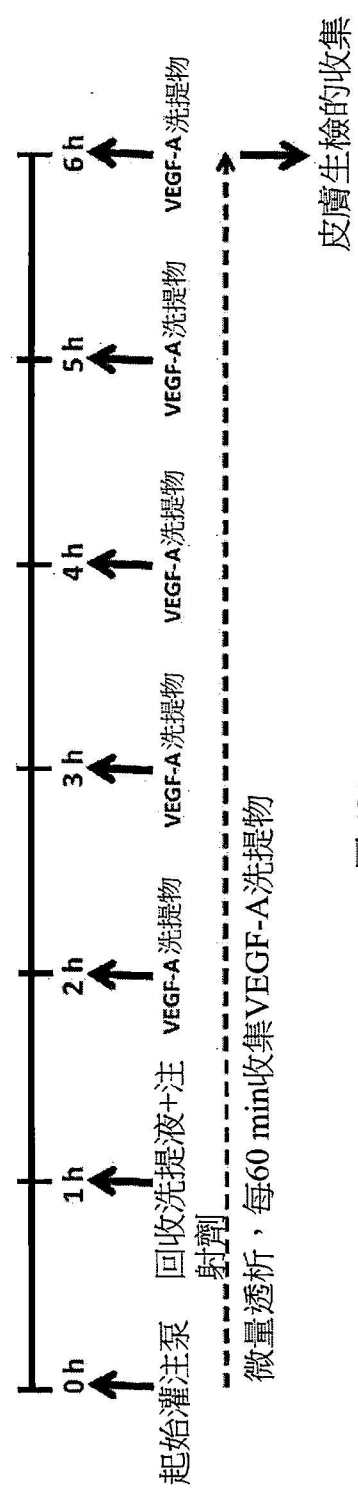


圖 48A

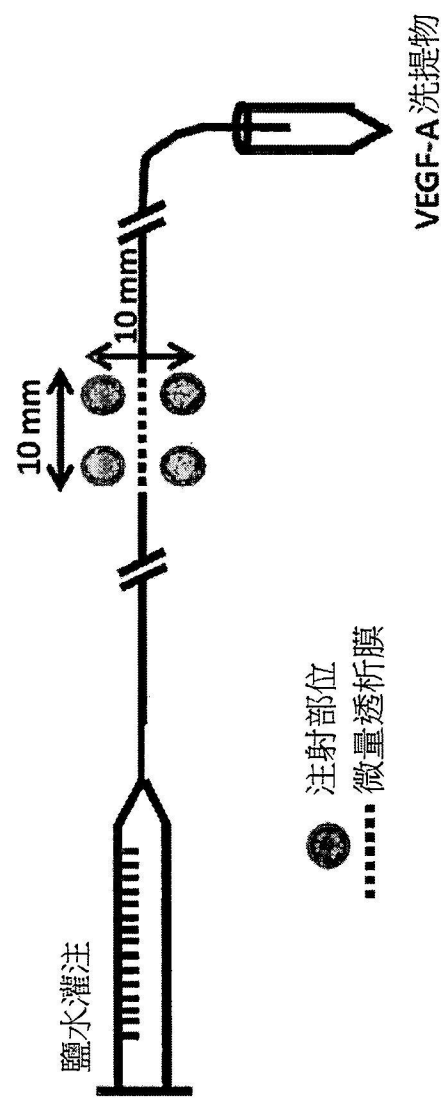


圖 48B

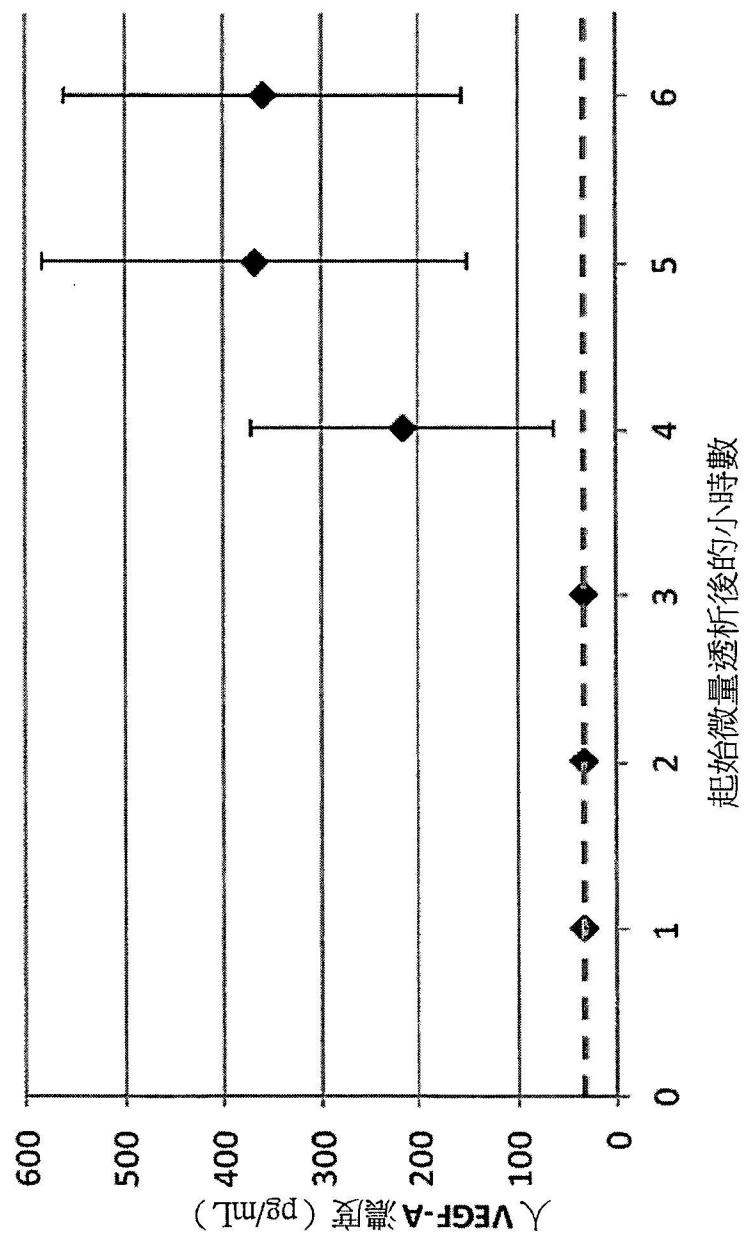


圖 49

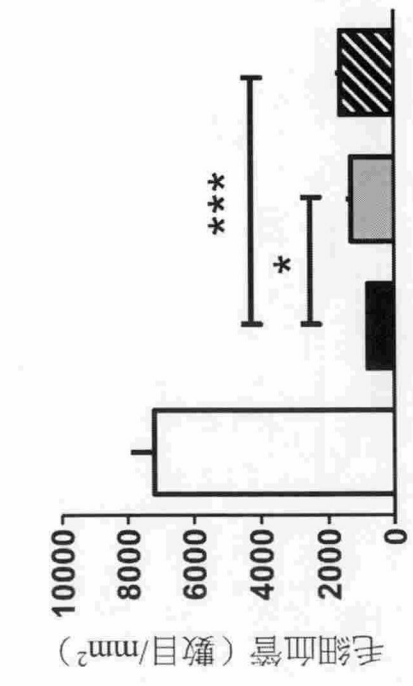


圖 50A

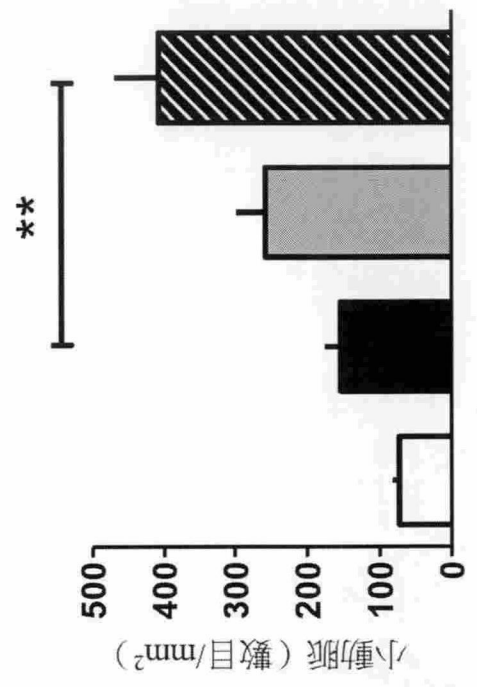


圖 50B

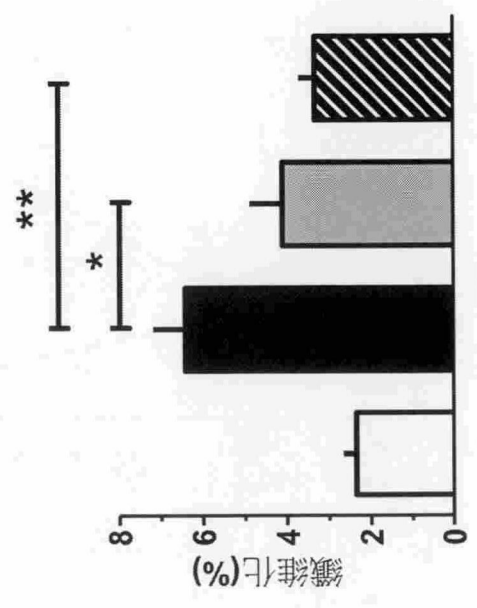


圖 50C

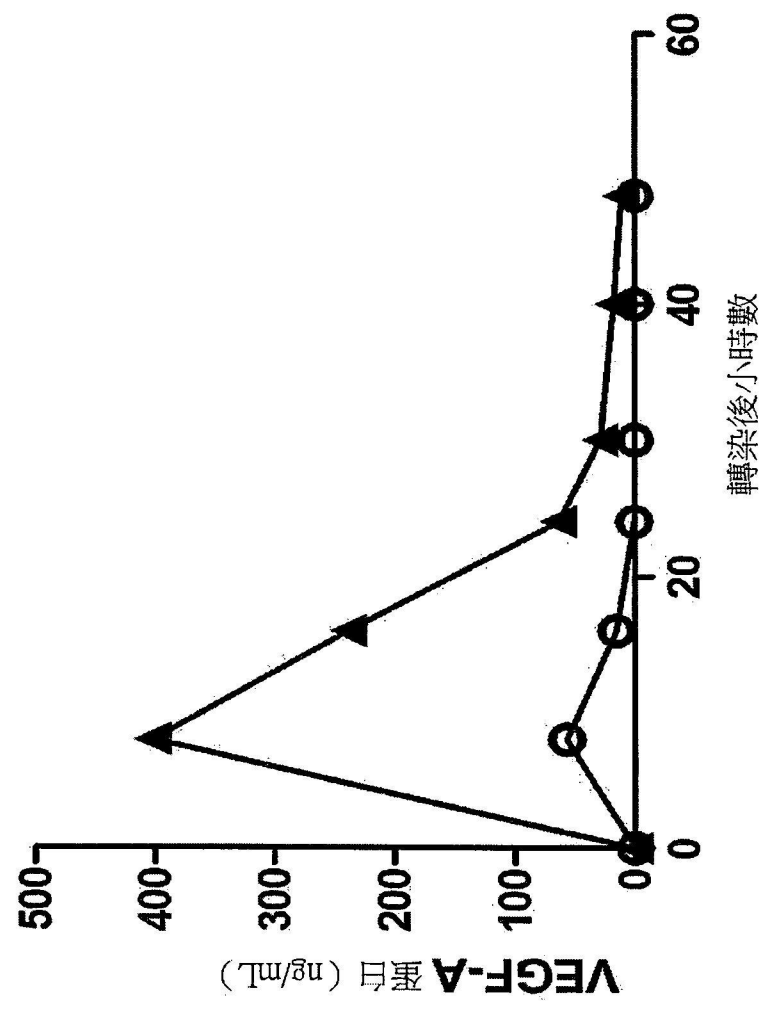


圖 51

5 3 3

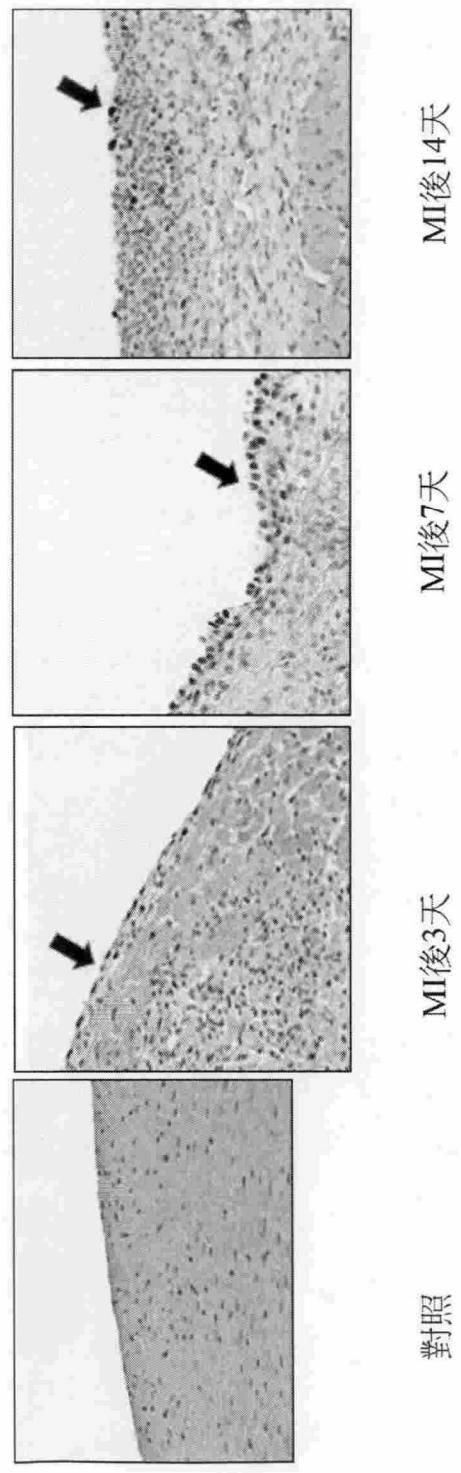


圖 52A

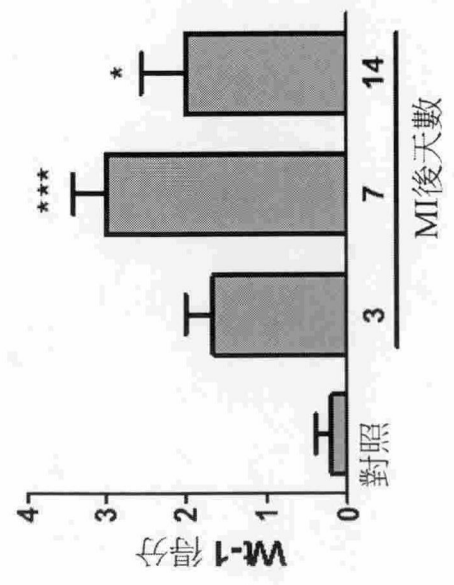


圖 52B