

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年12月12日 (12.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/251232 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/11 (2006.01) *A61K 9/127* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

区苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期C区24号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/097944

(74) 代理人: 北京彩和律师事务所 (BEIJING CAI HE LAW FIRM); 中国北京市海淀区大柳树路17号富海国际港1602室, Beijing 100081 (CN)。

(22) 国际申请日: 2024年6月7日 (07.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2023/099512
2023年6月9日 (09.06.2023) CN
PCT/CN2023/121779
2023年9月26日 (26.09.2023) CN
202410711025.6 2024年6月3日 (03.06.2024) CN

(71) 申请人: 仁景(苏州)生物科技有限公司 (RINUAGENE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期C区24号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。仁景国际香港有限公司 (RINUAGENE INTERNATIONAL HK LIMITED) [CN/CN]; 中国中华人民共和国香港特别行政区九龙城区长沙湾道788号罗氏商业广场6楼603室, Hong Kong 999077 (CN)。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(72) 发明人: 张卫国 (ZHANG, Weiguo); 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期C区24号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。董翊洁 (DONG, Yijie); 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期C区24号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。陈瑞 (CHEN, Rui); 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期C区24号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。祁锐 (QI, Rui); 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: EXPRESSION-ADJUSTABLE ENGINEERED RNA MOLECULE

(54) 发明名称: 表达可调控的工程化RNA分子

(57) Abstract: An engineered RNA molecule, a DNA molecule encoding same and the use thereof. The engineered RNA molecule comprises a poly-A tail sequence containing an mRNA binding site. The poly-A tail can be used to achieve accurate expression of the target gene in organs, tissues and/or cells.

(57) 摘要: 一种工程化RNA分子、编码所述RNA分子的DNA分子及其用途。所述工程化RNA分子包含含有mRNA结合位点的Poly(A)尾序列。所述Poly(A)尾可用于使目的基因实现器官、组织和/或细胞的精准表达。



WO 2024/251232 A1

说明书

发明名称: 表达可调控的工程化RNA分子

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2023年6月9日提交的中国临时申请PCT/CN2023/099512、于2023年9月26日提交的中国临时申请PCT/CN2023/121779、和于2024年6月3日提交的中国临时申请202410711025.6的优先权。在先申请的全部内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及生物技术领域，具体涉及一种包含Poly(A)尾的工程化RNA分子。所述Poly(A)尾使得所述工程化RNA分子在特定器官、组织和/或细胞中精准表达。

背景技术

[0004] 脱氧核糖核酸(DNA)和信使核糖核酸(mRNA)是生物遗传物质的主要组成物质，其主要作用是携带和传递遗传信息。在真核细胞内，完整的mRNA主要包括5'的帽子结构、5'非翻译区(5' untranslated region, 5' UTR)、编码区(ORF)、3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)以及3'多聚腺苷酸尾部结构poly(A)。5'的帽子结构主要调控mRNA的稳定性以及mRNA翻译的启动，帽子结构通过将5'端封闭起来，以避免mRNA被核酸外切酶水解，并且其可以通过被帽子结合蛋白(cap binding protein, eIF-4E)识别并结合，调控mRNA与核糖体结合，进而启动翻译过程。5' UTR是帽子与起始密码子之间的一段较短的序列，过短或过长都不利于mRNA的翻译起始。一般认为3' UTR主要参与转录后调控，包括调节mRNA的体内半衰期，比如，很多miRNA可以与靶基因mRNA的3' UTR结合，通过降解或者结合抑制的形式降低靶基因的表达。在3' UTR之后还有一段多聚A(poly(A))的序列，可以防止外切酶降解，此外，poly(A)尾巴序列还可以与多聚腺苷酸结合蛋白(PABP)结合，并进一步招募eIF4G、eIF4B、Paip-1等多种蛋白形成复合体，参与mRNA稳定性调节及翻译起始过程。真核生物细胞内天然mRNA的poly(A)尾巴是通过多聚腺苷酸聚合酶在

转录后添加的，在包括从真菌、植物到动物的进化过程中该聚合酶具有对腺苷酸的底物特异性。至今未发现明确的证据表明在天然poly(A)尾结构中能形成具有特异调控功能的复杂非腺苷酸motif。

- [0005] mRNA疗法的应用领域广泛，根据mRNA疗法不同应用主要分为以下方向：传染病疫苗方向、肿瘤免疫治疗方向、单抗药物及其他蛋白类药物替代方向、基因编辑方向。mRNA疫苗在新冠流行期间的成功也证实了mRNA平台的巨大价值。mRNA疗法通常通过基于脂质的载体系统(包括脂质体和脂质纳米颗粒)来递送mRNA。这些脂质载体通常封装mRNA并且可以改善mRNA的细胞内递送和有效性。脂质纳米颗粒(LNP)制剂代表了核酸递送领域的一场革命。LNP通常包括一种或多种阳离子脂质和/或氨基(可离子化)脂质、磷脂、结构脂质(如胆固醇)和/或含有聚乙二醇的脂质(PEG脂质)。阳离子和/或可离子化的脂质包括，例如，含有胺的脂质，可以很容易地质子化。
- [0006] 尽管LNP介导的核酸递送相关研究已取得长足进步,但在目前的递送体系中几乎都有很强的嗜肝性。由于LNP递送脂质的构效关系不清晰，难以理性设计器官、组织高度特异的、尤其是同一个器官和组织的不同细胞类型特异的递送载体，导致mRNA-LNP会广泛积聚到多个器官、组织和/或细胞类型中。如何将mRNA递送到特定器官、组织和/或细胞中以实现所递送的mRNA在特定器官、组织和/或细胞中特异性表达以及减少其他器官、组织和/或细胞的副作用也是此类疗法的主要挑战。
- [0007] miRNA(又称microRNA)是在植物、动物和一些病毒中发现的小型单链、19-25个核苷酸长度的非编码RNA分子,其功能主要是mRNA降解或沉默和基因表达的转录后调节。它们通过Watson-Crick碱基配对与目标mRNA分子3'非翻译区(3'UTR)内的特定序列互补进而导致这些mRNA分子被沉默。miRNA的表达在器官、组织、细胞方面具有高度特异性，miRNA在组织特异性表达的例子有肝脏(miRNA-122)、脾脏(miRNA-142)等。miRNA结合序列通常位于mRNA的3' UTR。本领域已经记载了将miRNA结合位点整合到3'UTR中以改善脱靶表达。

[0008] 在mRNA领域，体外制备mRNA药物的第一步，是以含有设计好的产品序列的线性化质粒为模板通过体外转录(IVT)合成，Poly(A)尾则通常以共转录的方式添加在3' UTR下游。为实现共转录添加Poly(A)，需要在模板质粒中包含相对应的poly(dA:dT)序列。然而，质粒中poly(dA:dT)重复序列在大肠杆菌中复制过程中不稳定，经常发生缺失突变导致poly(dA:dT)变短。这种现象不利于通过发酵规模化生产体外转录模板质粒的制备工艺，Poly(A)截短对mRNA的体内稳定性和生物学活性产生显著影响。因此，mRNA的质粒复制稳定性是mRNA药物/疫苗的重要考察因素。

[0009] mRNA领域目前仍亟需开发可递送至特定器官、组织和/或细胞且质量、活性可控，易于工业化生产的mRNA疫苗或药物，以及调节所递送的mRNA在特定器官、组织和/或细胞中的表达的工具及方法。

[0010] 申请概述

[0011] 天然mRNA的polyA中不存在miRNA结合位点，本申请发明人创造性地通过将miRNA结合位点整合入Poly(A)尾，在增强mRNA在特定器官、组织和/或细胞中表达的特异性的同时，兼顾了mRNA的质粒复制稳定性，以使生产出的mRNA质量可控、药效稳定。

[0012] 具体地，本申请提供了：

[0013] 1、一种工程化Poly(A)尾，所述Poly(A)尾包含miRNA结合位点。所述工程化Poly(A)尾包含的miRNA结合位点可以是一个、两个或更多个。

[0014] 在一些实施方案中，所述两个或更多个miRNA结合位点序列彼此毗邻或由一个或多个碱基相分隔。

[0015] 2、根据方案1的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾包含如下的式(I)：

[0016] $nA-miRNA结合处-mA$ 式(I)；

[0017] 其中，miRNA结合处包含一个或多个miRNA结合位点，

[0018] nA表示与所述miRNA结合处5'末端毗邻的连续n个腺苷酸(A)，

[0019] mA表示与所述miRNA结合处3'末端毗邻的连续m个腺苷酸(A)，

[0020] m和n为自然数，且 $m+n \leq 150$ 、 $m+n \leq 120$ 、 $m+n \leq 100$ 、 $m+n \leq 80$ 、 $m+n \leq 60$ 、 $m+n \leq 30$ 、 $m+n \leq 19$ 、或 $m+n \leq 14$ 。在一些实施方案中，所

述m与n之和为：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、或150。

[0021] 在一些实施方案中，miRNA结合处中一个或多个miRNA结合位点直接相连或通过间隔序列相连。所述间隔序列由一个或多个核苷酸组成。在一些实施方案中，所述间隔序列由一个或多个非A核苷酸组成。

[0022] 在一些实施方案中，式(I)中的miRNA结合处由1、2、3、4、5或6个miRNA结合位点组成。在一些实施方案中，式(I)中的miRNA结合处由一个miRNA结合位点组成。在一些实施方案中，式(I)中的miRNA结合处包含两个或更多个相毗邻或通过一个或多个核苷酸相连接的miRNA结合位点。在一些实施方案中，式(I)中的miRNA结合处包含三个或更多个相毗邻或通过一个或多个核苷酸相连接的miRNA结合位点。在一些实施方案中，所述Poly(A)尾中仅有一个式(I)。在一些实施方案中，所述Poly(A)尾为式(I)。

[0023] 3、根据方案2的工程化Poly(A)尾，其中 $n=0$ 或 $n \geq 1$ 。

[0024] 4、根据方案2的工程化Poly(A)尾，其中 $m=0$ 。

[0025] 5、根据方案2的工程化Poly(A)尾，其中 $n \leq 80$ 、 $n \leq 60$ 、 $n \leq 30$ 、 $n \leq 19$ 、 $n \leq 14$ 或 $n \leq 10$ 。在一些实施方案中， $14 \leq n \leq 30$ 、 $14 \leq n \leq 19$ 或 $19 \leq n \leq 30$ 。在一些实施方案中，所述n为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50

、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80。

[0026] 6、根据方案1至5中任一项的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾的长度为80至240nt，例如100至200nt，101至150nt、120至150nt、130至140nt、123nt至135或125至139nt。在一些实施方案中，所述Poly(A)尾的长度为81nt、82nt、83nt、84nt、85nt、86nt、87nt、88nt、89nt、90nt、91nt、92nt、93nt、94nt、95nt、96nt、97nt、98nt、99nt、100nt、101nt、102nt、103nt、104nt、105nt、106nt、107nt、108nt、109nt、110nt、111nt、112nt、113nt、114nt、115nt、116nt、117nt、118nt、119nt、120nt、121nt、122nt、123nt、124nt、125nt、126nt、127nt、128nt、129nt、130nt、131nt、132nt、133nt、134nt、135nt、136nt、137nt、138nt、139nt、140nt、141nt、142nt、143nt、144nt、145nt、146nt、147nt、148nt、149nt、150nt、151nt、152nt、153nt、154nt、155nt、156nt、157nt、158nt、159nt、160nt、161nt、162nt、163nt、164nt、165nt、166nt、167nt、168nt、169nt、170nt、171nt、172nt、173nt、174nt、175nt、176nt、177nt、178nt、179nt、180nt、181nt、182nt、183nt、184nt、185nt、186nt、187nt、188nt、189nt、190nt、191nt、192nt、193nt、194nt、195nt、196nt、197nt、198nt、199nt、200nt、201nt、202nt、203nt、204nt、205nt、206nt、207nt、208nt、209nt、210nt、211nt、212nt、213nt、214nt、215nt、216nt、217nt、218nt、219nt、220nt、221nt、222nt、223nt、224nt、225nt、226nt、227nt、228nt、229nt、230nt、231nt、232nt、233nt、234nt、235nt、236nt、237nt、238nt、或239nt。

[0027] 7、根据方案1至6中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾：

[0028] 在式(I)的3'一侧进一步包含与式(I)结构的3'末端直接相连的尾部片段，优选所述尾部片段5'末端的核苷酸不为A；和/或

- [0029] 在式(I)的5'一侧进一步包含与式(I)结构的5'末端直接相连的头部片段, 优选所述头部片段3'末端的核苷酸不为A。
- [0030] 在一些实施方案中, 所述尾部片段或头部片段由一个或多个非A核苷酸以及多个A组成, 例如包括1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个非A核苷酸。
- [0031] 在一些实施方案中, 所述尾部片段或头部片段的核苷酸数量为 p , 其中 $p \leq 80$ 、 $p \leq 60$ 、 $p \leq 30$ 、 $p \leq 19$ 、或 $p \leq 14$ 。在一些实施方案中, 所述 p 为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79。
- [0032] 在一些实施方案中, 所述尾部片段或头部片段由一个或多个元件 c 和/或一个或多个元件 d 与一个或多个A组成,
- [0033] 所述元件 c 为一个非A的核苷酸; 例如T、U、C或G;
- [0034] 所述元件 d 由任意两个或更多个连续的核苷酸组成, 元件 d 的5'及3'末端的核苷酸不为A核苷酸;
- [0035] 所述元件 d 的长度范围为 $2nt \leq d \leq 30nt$; 优选 $6nt \leq d \leq 20nt$, 更优选 $6nt \leq d \leq 12nt$;
- [0036] 其中所述元件 c 和元件 d 不相邻。
- [0037] 在一些实施方案中, 所述元件 d 的长度为 $2nt$ 、 $3nt$ 、 $4nt$ 、 $5nt$ 、 $6nt$ 、 $7nt$ 、 $8nt$ 、 $9nt$ 、 $10nt$ 、 $11nt$ 、 $12nt$ 、 $13nt$ 、 $14nt$ 、 $15nt$ 、 $16nt$ 、 $17nt$ 、 $18nt$ 、 $19nt$ 、 $20nt$ 、 $21nt$ 、 $22nt$ 、 $23nt$ 、 $24nt$ 、 $25nt$ 、 $26nt$ 、 $27nt$ 、 $28nt$ 、 $29nt$ 或 $30nt$ 。
- [0038] 在一些实施方案中, 所述元件 d 由任意两个或更多个连续的核苷酸组成, 元件 d 不包含三个以上连续的A, 所述核苷酸选自A、U、C、G核苷酸, 其中

元件d的5'及3'末端的核苷酸不为A核苷酸, 优选所述元件d的长度范围为 $2nt \leq d \leq 30nt$, 优选 $6nt \leq d \leq 20nt$, 更优选 $6nt \leq d \leq 12nt$ 。

- [0039] 在一些实施方案中, 其中所述元件c的个数为0个、1个、2至10个、3个至8个、或4至6个或2-5个, 例如7个。在一些实施方案中, 元件c的个数为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个。
- [0040] 在一些实施方案中, 其中所述元件d的个数为0-5, 优选1-3个, 例如2或4个。在一些实施方案中, 元件d的个数为0、1、2、3、4、5个。
- [0041] 在一些实施方案中, 其中当元件c和元件d同时存在时, 所述元件c和元件d的个数总和为2-15个, 优选3-5个, 进一步优选3个。在一些实施方案中, 所述元件c和元件d的个数总和为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个。
- [0042] 在一些实施方案中, 其中在所述Poly(A)尾靠近3'末端的1/2部分, 包含一个或多个非A核苷酸。
- [0043] 在一些实施方案中, 在所述Poly(A)尾靠近3'末端的1/3处包含一个或多个非A核苷酸。
- [0044] 在一些实施方案中, 在所述Poly(A)尾靠近3'末端的1/4处包含一个或多个非A核苷酸。
- [0045] 根据前述任一种方案中所述的工程化Poly(A)尾, 其在所述miRNA结合处的5'一侧包含0至60、0至30、0至20、0至14、或0至10个核苷酸, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个核苷酸。
- [0046] 8.根据方案1至7中任一项的工程化Poly(A)尾,所述工程化Poly(A)尾由所述miRNA结合处插入如下所示的Poly(A)尾结构中形成:
- [0047] 元件a-元件c-元件b-元件c-元件b-元件c-元件b-元件c-元件b;
- [0048] 元件b-元件c-元件b-元件c-元件a-元件d-元件b-元件c-元件b-元件c-元件b;
- [0049] 元件b-元件c-元件b-元件c-元件b-元件d-元件a-元件c;
- [0050] 元件a-元件d-元件b-元件c-元件b-元件c-元件b; 或
- [0051] 元件b-元件c-元件b-元件c-元件b-元件d-元件a;
- [0052] 元件a-元件d-元件b;

- [0053] 元件a-元件d-元件a;
- [0054] 元件b-元件d-元件a;
- [0055] 元件b-元件d-元件b;
- [0056] 元件a-元件d-A
- [0057] 元件a-元件c-A
- [0058] 可选地:
- [0059] 1)由所述miRNA结合处替换任1个、2个、3个、4个、5个或多个元件形成;
- [0060] 2)由所述miRNA结合处插入到任意两个元件之间形成; 或
- [0061] 3)由所述miRNA结合处插入到元件a或元件b中的任一两个A之间形成。
- [0062] 在所述Poly(A)尾结构中, 所述元件a由多个连续的腺嘌呤(A)核苷酸组成, 所述元件a的长度范围为 $100\text{nt} \geq a > 30\text{nt}$, 优选 $80\text{nt} \geq a \geq 60\text{nt}$;
- [0063] 所述元件b由多个连续的A核苷酸组成, 所述元件b的长度范围所述元件b的长度范围为 $10\text{nt} \leq b \leq 30\text{nt}$, 优选 $14\text{nt} \leq b \leq 20\text{nt}$;
- [0064] 所述元件c由一个非A的核苷酸组成;
- [0065] 所述元件d由任意两个或更多个连续的核苷酸组成, 元件d不包含三个以上连续的A, 所述核苷酸选自A、T、C、G核苷酸, 其中元件d的5'及3'末端的核苷酸不为A核苷酸, 优选所述元件d的长度范围为 $2\text{nt} \leq d \leq 30\text{nt}$, 优选 $6\text{nt} \leq d \leq 20\text{nt}$, 更优选 $6\text{nt} \leq d \leq 12\text{nt}$ 。
- [0066] 在一些实施方案中, 所述元件a为31nt、32nt、33nt、34nt、35nt、36nt、37nt、38nt、39nt、40nt、41nt、42nt、43nt、44nt、45nt、46nt、47nt、48nt、49nt、50nt、51nt、52nt、53nt、54nt、55nt、56nt、57nt、58nt、59nt、60nt、61nt、62nt、63nt、64nt、65nt、66nt、67nt、68nt、69nt、70nt、71nt、72nt、73nt、74nt、75nt、76nt、77nt、78nt、79nt、80nt、81nt、82nt、83nt、84nt、85nt、86nt、87nt、88nt、89nt、90nt、91nt、92nt、93nt、94nt、95nt、96nt、97nt、98nt、99nt、100nt。

- [0067] 在一些实施方案中，所述元件b为10nt、11nt、12nt、13nt、14nt、15nt、16nt、17nt、18nt、19nt、20nt、21nt、22nt、23nt、24nt、25nt、26nt、27nt、28nt、29nt或30nt。
- [0068] 在一些实施方案中，所述元件d为2nt、3nt、4nt、5nt、6nt、7nt、8nt、9nt、10nt、11nt、12nt、13nt、14nt、15nt、16nt、17nt、18nt、19nt、20nt、21nt、22nt、23nt、24nt、25nt、26nt、27nt、28nt、29nt或30nt。
- [0069] 9、根据方案1至7中任一项的工程化Poly(A)尾，所述工程化Poly(A)尾由所述miRNA结合处插入到WO2020074642A1、WO2022028559A1、US_10717982中记载的Poly(A)尾结构中形成。
- [0070] 10、根据方案1-9中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述元件c为G。
- [0071] 11、根据方案1-10中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述元件d包含回文序列。
- [0072] 12、根据方案1-11中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述元件d长度为6nt。
- [0073] 13、根据方案1-12中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述元件d选自以下序列中的任一种或多种：GATATC(SEQ ID NO: 60)、GTATAC(SEQ ID NO: 61)、GAATCT(SEQ ID NO: 62)、GCATATGACT(SEQ ID NO: 63)及GATATCGTATAC(SEQ ID NO: 64)。
- [0074] 14、根据方案1-12中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述元件d如GATATC(SEQ ID NO: 60)所示。
- [0075] 15、根据方案1-14中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾在miRNA结合处5'一侧包含的核苷酸个数与所述Poly(A)尾在miRNA结合处3'一侧包含的核苷酸个数的比值小于1/1、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、或1/10。
- [0076] 16、根据方案6-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾，所述尾部片段的结构为：元件d-元件b-元件c-元件b-元件c-元件b或元件c-元件b-元件c-元件b，优选的所述尾部片段的结构为：元件d-19A-元件c-19A-元件c-17A或元件c-19A-元

件c-17A,更优选的所述尾部片段的结构为:GATATC-19A-G-19A-G-17A。在一些实施方案中,所述的工程化Poly(A)尾不包含头部片段。在一些实施方案中,所述工程化Poly(A)尾由尾部片段和式(I)组成。在一些实施方案中,所述工程化Poly(A)尾由头部片段、尾部片段和式(I)组成。

[0077] 在根据前述1-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾,其结构选自以下的任一种:

[0078] 1)nA-miRNA结合处-mA,其中 $150 \geq m+n \geq 50$,优选的, $m+n=120$ 或 $m+n=60$;

[0079] 2)nA-miRNA结合处-mA-元件d-元件b-元件c-元件b-元件c-元件b,其中 $80 \geq m+n \geq 60$,优选的, $m+n=60$;

[0080] 3)元件a-元件d-nA-miRNA结合处-mA-元件c-元件b-元件c-元件b,其中 $30 \geq m+n \geq 10$,优选的, $m+n=19$;

[0081] 4)nA-miRNA结合处-mA-元件c-元件b-元件c-元件b,其中 $110 \geq m+n \geq 70$,优选的, $m+n=79$;

[0082] 5)nA-miRNA结合处-mA-元件c-元件b-元件c-元件b-元件d-元件a或元件b-元件c-nA-miRNA结合处-mA-元件c-元件b-元件d-元件a,其中 $19 \geq m+n \geq 14$,优选的, $m+n=19$ 。

[0083] 在根据前述1-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾中,其结构选为:

[0084] nA-miRNA结合处-mA-元件d-元件b-元件c-元件b-元件c-元件b,其中 $80 \geq m+n \geq 60$,优选的, $m+n=60$;进一步优选地, $30 \geq n \geq 14$;更优选地, $19 \geq n \geq 14$ 。

[0085] 在根据前述1-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾中,其结构选自以下的任一种:

[0086] 1)nA-miRNA结合处-mA,其中 $m+n=120$ 或 $m+n=100$ 或 $m+n=60$;

[0087] 2)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A, $m+n=60$;

[0088] 3)60A-元件d-nA-miRNA结合处-mA-G-19A-G-17A, $m+n=19$;

[0089] 4)nA-miRNA结合处-mA-G-19A-G-17A, $m+n=79$;

[0090] 5)nA-miRNA结合处-mA-G-19A-G-19A-元件d-60A或19A-G-nA-miRNA结合处-mA-G-19A-元件d-60A,其中 $m+n=19$ 。

[0091] 在根据前述1-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾中,其结构为:

[0092] nA -miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A, $m+n=60$ 且 $30 \geq n \geq 14$; 优选地, $19 \geq n \geq 14$ 。

[0093] 在根据前述1-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾中,其结构选自以下的任一种:

[0094] 1) nA -miRNA结合处-mA, 其中 $m+n=120$ 或 $m+n=100$;

[0095] 2) nA -miRNA结合处-mA-SEQ ID NO: 60-19A-G-19A-G-17A, $m+n=60$;

[0096] 3)60A-SEQ ID NO: 60- nA -miRNA结合处-mA-G-19A-G-17A, $m+n=19$;

[0097] 4) nA -miRNA结合处-mA-G-19A-G-17A, $m+n=79$;

[0098] 5) nA -miRNA结合处-mA-G-19A-G-19A-SEQ ID NO: 60-60A或19A-G- nA -miRNA结合处-mA-G-19A-元件d-60A,其中 $m+n=19$ 。

[0099] 在根据前述1-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾中,其结构为:

[0100] nA -miRNA结合处-mA-SEQ ID NO: 60-19A-G-19A-G-17A, $m+n=60$ 且 $30 \geq n \geq 14$, 优选地, $19 \geq n \geq 14$ 。

[0101] 17、根据方案1-16中任一项所述的工程化Poly(A)尾,其中,所述miRNA结合处所结合的miRNA选自以下的一种或多种:

[0102] miR-142,miR-122,miR-126,miR-148a,miR-133,miR-206,miR-208,miR-17-92,miR-16,miR-21,miR-223,miR-24,miR-27,let-7,miR-30c,miR-1d,miR-149,miR-192,miR-194和miR-204。

[0103] 在一些实施方案中,所述miRNA选自miR-142,miR-122,miR-126,和miR-148a中的一种或多种。

[0104] 在一些实施方案中,所述miRNA选自miR-142-3p,miR-122-5p,miR-126-3p和miR-148a-3p中的一种或多种。

[0105] 在一些实施方案中,所述miRNA包括或由其组成: miR142和miR-122, miR142和miR-126, miR-142和miR-148a, miR-122和miR-126,miR-122和miR-148a,或miR-126和miR-148a。

- [0106] 在一些实施方案中，所述miRNA包括或由其组成：miR-142、miR-122和miR-126，miR-142、miR-122和miR-148a，miR-142、miR-126和miR-148a，或miR-122、miR-126和miR-148a。
- [0107] 在一些实施方案中，所述miRNA包括或由其组成：miR-142、miR-122、miR-126和miR-148a。
- [0108] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR142和miR-122或由miR142和miR-122组成，且所述Poly(A)的miRNA结合处中，miR142结合位点位于miR-122结合位点的5'一侧或所述miR142结合位点位于miR-122结合位点的3'一侧，所述miR142结合位点与miR-122结合位点彼此毗邻。
- [0109] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR142和miR-122，且所述Poly(A)的结合处中，miR142结合位点位于miR-122结合位点的5'一侧或所述miR142位点位于miR-122位点的3'一侧，所述miR142结合位点与miR-122结合位点由一个或多个核苷酸相分隔。
- [0110] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR142和miR-126或由miR142和miR-126组成，且所述Poly(A)的结合处中，miR142结合位点位于miR-126结合位点的5'一侧或所述miR142位点位于miR-126位点的3'一侧，所述miR142结合位点与miR-126结合位点彼此毗邻。
- [0111] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR142和miR-126，且所述Poly(A)的结合处中，miR142结合位点位于miR-126结合位点的5'一侧或所述miR142位点位于miR-126位点的3'一侧，所述miR142结合位点与miR-126结合位点由一个或多个核苷酸相分隔。
- [0112] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-142和miR-148a或由miR-142和miR-148a组成，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-142结合位点位于miR-148a结合位点的5'一侧或miR-142结合位点位于miR-148a结合位点的3'一侧，所述miR-142结合位点与miR-148a结合位点彼此毗邻。
- [0113] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-142和miR-148a，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-142结合位点位于miR-148a结合位点的5'一侧或miR-142结

合位点位于miR-148a结合位点的3'一侧，所述miR-142结合位点与miR-148a结合位点由一个或多个核苷酸相分隔。

[0114] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-122和miR-126或由miR-122和miR-126组成，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-122结合位点位于miR-126结合位点的5'一侧或miR-122结合位点位于miR-126结合位点的3'一侧，所述miR-122结合位点与miR-126结合位点彼此毗邻。

[0115] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-122和miR-126，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-122结合位点位于miR-126结合位点的5'一侧或miR-122结合位点位于miR-126结合位点的3'一侧，所述miR-122结合位点与miR-126结合位点由一个或多个核苷酸相分隔。

[0116] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-122和miR-148a或由miR-122和miR-148a组成，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-122结合位点位于miR-148a结合位点的5'一侧或miR-122结合位点位于miR-148a结合位点的3'一侧，所述miR-122结合位点与miR-148a结合位点彼此毗邻。

[0117] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-122和miR-148a，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-122结合位点位于miR-148a结合位点的5'一侧或miR-122结合位点位于miR-148a结合位点的3'一侧，所述miR-122结合位点与miR-148a结合位点由一个或多个核苷酸相分隔。

[0118] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-126和miR-148a或由miR-126和miR-148a组成，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-126结合位点位于miR-148a结合位点的5'一侧或miR-126结合位点位于miR-148a结合位点的3'一侧，所述miR-126结合位点与miR-148a结合位点彼此毗邻。

[0119] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miR-126和miR-148a，且在所述Poly(A)的结合处中，miR-126结合位点位于miR-148a结合位点的5'一侧或miR-126结合位点位于miR-148a结合位点的3'一侧，所述miR-126结合位点与miR-148a结合位点由一个或多个核苷酸相分隔。

[0120] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miRNA-142、miR-148a和miR-126，并且在所述Poly(A)的miRNA结合处中，各miRNA结合位点从5'至3'的排列顺序为：

[0121] miR-126结合位点、miR-148a结合位点及miR-142结合位点；

[0122] miR-148a结合位点、miR-142结合位点及miR-126结合位点；

[0123] miR-142结合位点、miR-148a结合位点和miR-126结合位点；

[0124] miR-126结合位点、miR-142结合位点及miR-148a结合位点；

[0125] miR-148a结合位点、miR-126结合位点及miR-142结合位点；或

[0126] miR-142结合位点、miR-126结合位点和miR-148a结合位点；

[0127] 其中miR-126结合位点、miR-148a结合位点和miR-142结合位点彼此毗邻。

[0128] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miRNA-142、miR-148a和miR-126，并且在所述Poly(A)的miRNA结合处中，各miRNA结合位点从5'至3'的排列顺序为：

[0129] miR-126结合位点、miR-148a结合位点及miR-142结合位点；

[0130] miR-148a结合位点、miR-142结合位点及miR-126结合位点；

[0131] miR-142结合位点、miR-148a结合位点和miR-126结合位点；

[0132] miR-126结合位点、miR-142结合位点及miR-148a结合位点；

[0133] miR-148a结合位点、miR-126结合位点及miR-142结合位点；或

[0134] miR-142结合位点、miR-126结合位点和miR-148a结合位点；

[0135] 其中miR-126结合位点、miR-148a结合位点和miR-142结合位点彼此之间由一个或多个核苷酸相分隔。

[0136] 在一些实施方案中，所述miRNA包括miRNA-142、miR-148a和miR-126，并且在所述Poly(A)的miRNA结合处中，各miRNA结合位点从5'至3'的排列顺序为：

[0137] miR-126结合位点、miR-148a结合位点及miR-142结合位点；

[0138] miR-148a结合位点、miR-142结合位点及miR-126结合位点；

[0139] miR-142结合位点、miR-148a结合位点和miR-126结合位点；

[0140] miR-126结合位点、miR-142结合位点及miR-148a结合位点；

- [0141] miR-148a结合位点、miR-126结合位点及miR-142结合位点；或
- [0142] miR-142结合位点、miR-126结合位点和miR-148a结合位点；
- [0143] 其中miR-126结合位点、miR-148a结合位点和miR-142结合位点中有两个相邻的miRNA结合位点彼此毗连，另外两个相邻的miRNA结合位点由一个或多个核苷酸相分隔。
- [0144] 在根据前述任一项所述的工程化Poly(A)尾中，其结构选自以下的任一种：
- [0145] 1)nA-miRNA结合处-mA，其中 $n=0$ ， $m=120$ 或 $m=100$ 或 $m=60$ ；
- [0146] 2)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中 $m+n=60$ ， $n \leq 20$ 或 $n \leq 14$ 或 $n \leq 10$ ；
- [0147] 3)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中 $n=0$ ， $m=60$ ；
- [0148] 4)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中 $m+n=60$ ， $14 \leq n \leq 30$ ；优选 $14 \leq n \leq 19$ ；
- [0149] 5)nA-miRNA结合处-mA-G-19A-G-17A，其中 $n=60$ ， $m=19$ ；
- [0150] 其中优选地所述元件d为回文序列，更优选的所述元件d的多核苷酸序列如SEQ ID NO:60至64中任一项所示。
- [0151] 在根据前述任一项所述的工程化Poly(A)尾中，其结构选自以下的任一种：
- [0152] 1)nA-miRNA结合处-mA，其中 $n=0$ ， $m=120$ 或 $m=100$ 或 $m=60$ ，所述miRNA结合处为miR-122、miR-126或miR-142的结合位点；
- [0153] 2)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中 $n=14$ ， $m=46$ ，所述miRNA结合处为miR-122、miR-126或miR-142的结合位点；
- [0154] 3)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中 $n=19$ ， $m=41$ ，所述miRNA结合处为miR-122、miR-126或miR-142的结合位点；
- [0155] 4)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中 $n=30$ ， $m=30$ ，所述miRNA结合处为miR-122、miR-126或miR-142的结合位点；
- [0156] 5)nA-miRNA结合处-mA-G-19A-G-17A，其中 $n=60$ ， $m=19$ ，所述miRNA结合处为miR-122、miR-126或miR-142的结合位点；
- [0157] 6)nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中 $n=0$ ， $m=60$ ，miRNA结合处为miR-142、miR-122、miR-126、miR-148a、miR-142-

miR122、miR142-miR126-miR148a、miR142-miR148a-miR126；miR126-miR142-miR148a；miR126-miR148a-miR142、miR148a-miR142-miR126、或miR148a-miR126-miR142的结合位点；或

[0158] 7)nA-miR-122结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中n=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，且n+m=60，

[0159] 8)nA-miR-142结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中n=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，且n+m=60，

[0160] 9)nA-miR-126结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中n=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，且n+m=60，

[0161] 10)nA-miR-148a结合处-mA-元件d-19A-G-19A-G-17A，其中n=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，且n+m=60，

[0162] 其中优选地所述元件d为回文序列，更优选的所述元件d的多核苷酸序列如SEQ ID NO:60至64中任一项所示，优选SEQ ID NO:60。

[0163] 在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾的miRNA结合处由选自以下一个、两个、三个、四个或更多个miRNA结合位点序列组成：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 53。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾的miRNA结合处由选自以下一个、两个、三个、四个或更多个miRNA结合位点序列：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 53以及所述miRNA结合位点之间的0个、1个或多个核苷酸组成。

[0164] 18、根据方案1-17中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾的序列包含选自以下的多核苷酸序列或为下述多核苷酸序列中的任一种：SEQ ID NO: 6-16、SEQ ID NO: 19-31、SEQ ID NO: 33-52、SEQ ID NO: 54-59、SEQ ID NO: 65-71。

[0165] 19、工程化RNA分子，其为mRNA或非编码RNA，其包含根据方案1-18中任一项所述Poly(A)尾以及位于所述Poly(A)尾5'一侧的目的基因序列。在一些实施方案中，所述Poly(A)尾中的式(I)中的nA与3' UTR直接相连。

- [0166] 20、工程化DNA分子，其编码包含根据方案1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾，或根据方案19所述的工程化RNA序列。 细则 91,
07.06.202
- [0167] 21、根据方案20所述的工程化DNA分子，所述DNA分子为质粒或病毒载体。
- [0168] 22、DNA与RNA的杂合分子，其携带与根据方案1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾，根据方案19所述的工程化RNA分子或根据方案20或21所述的工程化DNA分子相同的遗传信息。
- [0169] 23、工程化细胞，其包含根据方案1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾，根据方案19所述的工程化RNA分子，根据方案20或21所述的工程化DNA分子，或根据方案22所述的杂合分子，其中所述细胞为的真核或原核细胞。 细则 91,
07.06.202
- [0170] 24、根据方案23所述的工程化细胞，其中所述原核细胞为大肠杆菌。
- [0171] 25、将根据方案1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾用于使目的基因在特定器官、组织和/或细胞中低表达的用途，所述特定器官、组织和/或细胞高表达所述miRNA或
- [0172] 将根据方案1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾用于使目的基因在特定器官、组织和/或细胞中特异性表达的用途，优选地，所述器官或组织优选肝或脾器官组织；更优选地，所述细胞为肝实质细胞。
- [0173] 26、将根据方案20或21所述的工程化DNA分子，或根据方案22所述的杂合分子用于使编码所述Poly(A)尾的DNA编码序列在宿主细胞中的复制更加保守的用途。
- [0174] 27、根据方案26的用途，所述宿主细胞为原核细胞，优选大肠杆菌。
- [0175] 28、脂质纳米颗粒，其包含根据方案1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾，根据方案19所述的工程化RNA分子，根据20或21所述的工程化DNA分子，或根据方案22所述的杂合分子。
- [0176] 29、病毒颗粒，其包含根据方案1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾，根据方案19所述的工程化RNA分子，根据20或21所述的工程化DNA分子，或根据方案22所述的杂合分子。

[0177] 本领域技术人员应当知晓，在所述miRNA结合处5'末端核苷酸的5'一侧还可以进一步包含0个、1个或更多个非A核苷酸，该技术方案，也应属于本申请涵盖的范畴，或作为本申请方案的等同方案。

[0178] 应当理解，本文描述的本申请的方面和实施方案包括“包含”，“组成”和“基本上由……组成”的方面和实施方案。以上详细描述了本申请的优选实施方案，但是，本申请并不限于此。在本申请的技术构思范围内，可以对本申请的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本申请所公开的内容，均属于本申请的保护范围。

附图说明

[0179] 图1A-1B示出了本发明自主设计的含有miR-142/miR-122结合位点的5种Poly(A)的组成示意图；

[0180] 图2A-2B示出了带有本发明自主设计的含有miR-142结合位点的5种poly(A)的荧光素酶mRNA在小鼠中表达后，解剖得到小鼠脾脏/肝脏进行的荧光成像的绝对数值结果。

[0181] 图3A-3B示出了带有本发明自主设计的含有miR-122结合位点的5种poly(A)的荧光素酶mRNA在小鼠中表达后，解剖得到小鼠肝脏/脾脏进行的荧光成像的绝对数值结果。

[0182] 图4示出了带有本发明自主设计的含有miRNA结合位点miR-142/miR-122的不同poly(A)的荧光素酶DNA质粒在大肠杆菌DH5 α 中的碱基缺失统计。

[0183] 图5示出了带有本发明自主设计的含有miR-142结合位点的8种poly(A)的荧光素酶mRNA在哺乳动物细胞系Raw 264.7中的酶活性检测的绝对数值结果。

[0184] 图6示出了带有miR-142结合位点和miR-122结合位点poly(A)的荧光素酶mRNA在哺乳动物细胞系Raw 264.7中的酶活性检测的绝对数值结果。

[0185] 图7A-7D示出了带有本发明自主设计poly(A)变体的荧光素酶mRNA在哺乳动物细胞系Raw 264.7/LSEC/HSC/AML中的酶活性检测的绝对数值结果。

[0186] 图8A-8C示出了带有本发明自主设计poly(A)变体的荧光素酶mRNA在Raw 264.7/LSEC/HSC的表达相对于肝实质细胞AML表达降低的比例。

[0187] 发明详述

[0188] 本申请首先提供了一种实现特定器官、组织和/或细胞特异性表达的工具，即通过将miRNA结合位点整合入Poly(A)尾，特异性地关闭不希望mRNA表达的器官、组织和/或细胞中的mRNA表达，以减少mRNA全身表达的脱靶毒副作用。

[0189] 本申请还提供了在体外稳定扩增Poly(A)尾转录模板DNA的方法，以减少所述DNA在细胞中大量复制时，其中Poly(A)尾转录模板序列的突变频率。从而，基于所述DNA获得大量包含序列确定的Poly(A)尾的RNA。在此基础上，使得经过工程化设计而具有某种特定功能的Poly(A)尾的RNA，例如mRNA，得以通过体外发酵，实现规模化生产。

[0190] 术语

[0191] 在本申请中，Poly(A)尾中的“元件c”、“元件d”、nA、mA、尾部片段、头部片段、miRNA结合位点及miRNA结合处均可以术语“元件”指代。其中，“miRNA结合处”、“nA”、“mA”、“元件c”及“元件d”互不重合也互不包含，确定“miRNA结合处”、“nA”、“mA”、“元件c”及“元件d”的方式可以是：

[0192] 首先通过序列比对的方式，在Poly(A)尾中确定miRNA结合位点，然后以所有miRNA结合位点中最靠近所述Poly(A)尾5'末端的miRNA结合位点的5'一侧最邻近的A为nA的3'末端，从而确定所述连续n个A为nA；并以所有miRNA结合位点中最靠近所述Poly(A)尾3'末端的miRNA结合位点的3'一侧最邻近的A为mA的5'末端，从而确定所述连续m个A为mA；nA和mA之间的部分即为miRNA结合处。所述Poly(A)尾如果在nA的5'一侧具有多核苷酸或多核苷酸序列，则所述多核苷酸或多核苷酸序列为头部片段；所述Poly(A)尾如果在mA的3'一侧具有多核苷酸或多核苷酸序列，则所述多核苷酸或多核苷酸序列为尾部片段。确定“元件d”和“元件c”的方式是首先从目标序列中确定元件d，所述元件d为目标序列中一段包含非A碱基的片段，由任意两个或更多个连续的核苷酸组成，元件d的5'及3'末端的核苷酸不为A核苷酸，元件d不包含三个以上连续的A，且元件d的5'及3'末端均与至少2个A毗邻，在元件d确定后，再从所述目标序列中元件d以外的部分中确定所有非A碱基分别为“元件c”。在一些实施方案中，

所述Poly(A)尾包含多个miRNA结合处，且每个结合处中的各miRNA结合位点之间直接相连或通过非A碱基相连。在一些实施方案中，所述Poly(A)尾包含多个miRNA结合处，且每个结合处中的各miRNA结合位点之间直接相连或通过核酸序列相连，所述核酸序列中不包含三个以上连续的A。

[0193] 如本文所用，“miRNA”，即微RNA或microRNA，是一类短非编码RNA，长度通常小于22bp。其通过与mRNA上的靶序列(即miRNA结合位点)结合，发挥转录后调控作用。如本文所用，优选的，“miRNA结合位点”即与miRNA结合后，下调mRNA表达的miRNA结合位点。

[0194] 在本文中，“编码”是指i)DNA序列中包含可被转录成RNA分子的遗传信息，和/或ii)RNA分子中包含可被翻译成氨基酸序列的遗传信息。因此，如本文所用，“编码序列”可用以指代mRNA前体或成熟mRNA中可以被翻译为蛋白质的核糖核苷酸(RNA)序列或其片段，亦可指代作为模板用以转录所述mRNA前体或成熟mRNA的脱氧核糖核苷酸(DNA)序列的互补序列或其片段。此外，本申请的“编码序列”还可以进一步包含编码蛋白、功能性核酸、或其片段，例如miRNA、shRNA、dsRNA、向导RNA、Poly(A)尾、5' UTR、3' UTR等的多核苷酸序列。其中，包含可被转录成RNA分子的遗传信息的DNA分子称为所述RNA分子的“编码核酸”；包含可被翻译成氨基酸序列的遗传信息的RNA分子称为所述氨基酸序列的“编码核酸”。

[0195] 在本申请中，所有多核苷酸序列中的核苷酸由5'末端向3'末端编号，即5'末端的核苷酸为第一个核苷酸，3'末端的核苷酸为最后一个核苷酸。如无特别指明，“5'端”与“5'末端”可互换使用，“3'端”与“3'末端”可互换使用。特别的，“5'末端”与“3'末端”可分别用于描述一条核酸序列或一条核酸序列的某一个区段的第一个及最后一个核苷酸所在的位置。此外，“5'”与“3'”尤其用于描述同一条核酸序列中，核苷酸之间，核苷酸序列区段之间，或核苷酸与核苷酸序列区段之间的相对位置关系；例如“5'一侧”用以描述同一条多核苷酸序列中两段相互之间无重叠部分的序列的相对位置关系，当描述一段序列位于另一段序列的5'一侧，则是指所述一段序列相对于另一段序列更加靠近所述多核苷酸序列的“5'末端”。同理，当描述一段序

列位于另一段序列的3'一侧，则是指一段序列相对于所述另一段序列更加靠近所述多核苷酸序列的“3'末端”，且所述一段序列与所述另一段序列彼此不包含重叠部分。此外，如本文所用，“5'部分”是指以所述多核苷酸序列“中心位置”为界，靠近所述多核苷酸序列5'末端的一半。“3'部分”则指以所述多核苷酸序列中心位置为界，靠近所述多核苷酸序列3'末端的一半。本申请所述“中心位置”至所述5'末端和至所述3'末端的核苷酸数量相等。

[0196] 如本文所用，“毗邻”是指核酸分子(例如Poly(A)尾)的两个元件之间无任何核苷酸或碱基插入(如非特别指明，本申请中术语“核苷酸”与术语“碱基”可互换使用)，即：所述两个元件的一个元件的多核苷酸序列的3'末端的3'一侧的第一个核苷酸是另一个元件的5'末端核苷酸。例如“与所述miRNA结合位点5'末端毗邻的连续n个A”是指所述连续的n个A位于所述miRNA结合位点5'一侧，且所述miRNA结合位点5'末端核苷酸与所述n个A之间无其他核苷酸或碱基插入。例如“与所述miRNA结合位点3'末端毗邻”是指所述连续的n个A位于所述miRNA结合位点3'一侧，且所述miRNA结合位点3'末端核苷酸与所述n个A之间无其他核苷酸或碱基插入。此外，“毗邻”还可用于描述多个元件之间的位置关系，以表示所述多个元件中的每一个元件与所述多个元件中的任一个其他元件相毗邻，且所述多个元件的任意两个元件之间不包含所述多个元件以外的其他元件或核苷酸。

[0197] 在本申请中，当描述两个或多个元件的位置关系为“不相邻”，则是指两个或多个元件两两之间不毗邻。换句话讲，即所述两个或多个元件两两之间至少包含所述两个元件的核苷酸以外的一个或多个其他核苷酸或碱基。

[0198] 如本文所用，将术语“保守”用于描述核酸分子的复制时，是指所述复制过程中出现突变的概率低。在此语境中，“保守”是个相对的概念。例如当描述“Poly(A)尾的DNA编码序列用于使编码RNA的DNA分子在宿主细胞中的复制更加保守”时，是指编码RNA的亲代DNA分子复制为子代DNA分子后，如果所述RNA分子包含该Poly(A)尾，则相对于不包含所述Poly(A)尾(例如包含某种其他Poly(A)尾的RNA分子)的RNA分子的编码DNA，所述子代DNA分子与所述亲代

DNA分子具有100%序列同一性的概率更高；或由所述亲代DNA分子复制获得的多条所述子代DNA分子与所述亲代DNA分子之间的平均序列同一性更高。

[0199] 在本申请中，当描述“调控”RNA分子表达时，所述“调控”是指：在相同的时长内使所述RNA分子表达的蛋白或功能RNA的总量提高或降低；或使所述RNA可以在更长或更短的时间范围内表达蛋白或功能RNA，所述提高、降低、或更长或更短的时间范围是相较于另一表达相同蛋白或功能RNA的RNA分子而言的。当描述“调控”蛋白表达时，则指调控包含所述蛋白编码序列的RNA分子表达。这里描述的调控作用可以通过将本申请的Poly(A)尾连接在不包含Poly(A)尾的RNA分子的3'末端实现，也可以通过将RNA原有的Poly(A)尾替换为本申请的Poly(A)尾实现。

[0200] 如本文所用，“同一性”的百分比，例如85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%同一性，是指氨基酸序列之间或核苷酸序列之间，通过序列比对确定的相似程度，是85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%。例如，通过引入空位等方式可以使两条序列在尽可能多的位置上具有相同残基后，确定的具有相同碱基或氨基酸残基的位置数量占位置总数的比例。“同一性”的百分比可以用本领域已知的软件程序来确定。优选的是使用默认参数进行比对。一个优选的比对程序是BLAST。优选的程序是BLASTN和BLASTP。这些程序的细节可以在以下互联网地址找到：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0201] 如本文所用，核酸的“互补”是指一条核酸通过传统的Watson-Crick碱基配对与另一条核酸形成氢键的能力。百分比互补性表示核酸分子中可与另一核酸分子形成氢键(即，Watson-Crick碱基配对)的残基的百分比(例如，10个中的约5、6、7、8、9、10个分别为约50%，60%，70%，80%，90%和100%互补)。“完全互补”是指核酸序列的所有连续残基与第二核酸序列中相同数量的连续残基形成氢键。如本文所用，“基本上互补”是指在约40、50、60、70、80、100、150、200、250或更多个核苷酸的区域内，至少约70%，75%，80%，85%，90%，95%，96%，97%，98%，99%或100%中的

任何一个的互补程度，或指在严格条件下杂交的两条核酸。对于单个碱基或单个核苷酸，按照Watson-Crick碱基配对原则，A与T或U、C与G或I配对时，被称为互补或匹配，反之亦然；而除此以外的碱基配对都称为不互补。本申请中某多核苷酸序列的“互补多核苷酸序列”则是指与该某多核苷酸序列完全互补的多核苷酸序列。

[0202] 如本文所用，某个蛋白、多肽或氨基酸序列的“保守取代变体”是指其中一个或多个氨基酸残基经过氨基酸取代而不改变蛋白质或酶的整体构象和功能，这包括但不限于以前述“保守取代”描述的方式取代亲本蛋白质中氨基酸序列中的氨基酸。因此，相似功能的两个蛋白或氨基酸序列的相似性可能会不同。例如，基于MEGALIGN算法的70%至99%的相似度(同一性)。“保守取代变体”还包括通过BLAST或FASTA算法确定具有60%以上的氨基酸同一性的多肽或酶，若能达75%以上更好，最好能达85%以上，甚至达90%以上为最佳，并且与天然或亲本蛋白质或酶相比具有相同或基本相似的性质或功能。

[0203] 在本申请的上下文中，术语“DNA”和“RNA”是指单链或双链DNA或RNA分子。除非另有说明，否则术语“DNA”和“DNA分子”是指由A、C、G和/或T核苷酸构成的双链DNA分子，而术语“RNA”和“RNA分子”是指由A、C、G和/或U核苷酸构成的单链RNA分子。在本文中，所述A、C、G、T和U核苷酸是指包含腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶作为各自的含氮碱基的核苷酸。

[0204] RNA分子包括编码RNA(coding RNA)或非编码RNA(non-coding RNA,ncRNA)，例如Pre-mRNA、成熟mRNA或长链非编码RNA(long noncoding RNA,lncRNA)。

[0205] 如本文所用，所述“DNA与RNA的杂合分子”是一个包含由脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸组成的多核苷酸序列的分子。所述DNA与RNA的杂合分子可以通过以下方式获得：

[0206] 将DNA中的一个或多个脱氧核糖核苷酸替换为核糖核苷酸；

[0207] 将RNA中的一个或多个核糖核苷酸替换为脱氧核糖核苷酸；或

[0208] 通过生物或化学合成的方式，以脱氧核糖核苷酸以及核糖核苷酸为原料从头合成。需注意，获得DNA与RNA的杂合分子的方式不限于以上方式，由任何方式获取的DNA与RNA的杂合分子均属于本申请定义的“DNA与RNA的杂合分子”的范畴。

[0209] 如本文所用，如果描述两个核酸分子具有“相同的遗传信息”，则是指所述两个核酸分子互补，或包含完全相同的碱基序列，或其中一个核酸分子相对于另一个核酸分子，其区别仅在于其碱基序列中一个或多个碱基由与其具有相同生物功能的另一个碱基替代。所述相同生物功能是指所述碱基与所述另一个碱基可与同一种碱基发生传统的Watson-Crick碱基配对，例如胸腺嘧啶(T)与尿嘧啶(U)均可与腺嘌呤发生Watson-Crick碱基配对，次黄嘌呤(I)与胞嘧啶(C)均可与鸟嘌呤(G)发生Watson-Crick碱基配对等。因此，DNA、RNA以及DNA与RNA的杂合分子中的任意两种均可具有相同的遗传信息。其中，术语“碱基序列”指多核苷酸分子中碱基的排列顺序。本领域技术人员应当知晓，除非另有说明，否则本申请中所述的碱基序列或多核苷酸序列可在用于描述DNA序列时，以“T”代指胸腺嘧啶，但在所述碱基序列或多核苷酸序列用于描述RNA(例如mRNA)时，“T”将由“U”(尿嘧啶)取代。因此，由本文中的特定序列号(SEQ ID NO)公开的任何DNA也公开与所述DNA互补或对应的RNA(例如mRNA或Poly(A)尾)序列，其中所述DNA序列的每个“T”被“U”取代。

[0210] 如本文所用“DNA与RNA的杂合分子”是指既包含脱氧核糖核苷酸又包含核糖核苷酸的核酸分子。所述“DNA与RNA的杂合分子”可以是一条DNA分子中的一个或多个脱氧核糖核苷酸被核糖核苷酸替代，也可以是一条RNA分子中的一个或多个核糖核苷酸被脱氧核糖核苷酸替代。

[0211] Poly(A)尾及其用途

[0212] 本文提供了一种工程化Poly(A)尾，其包含一个、两个、三个或更多个miRNA结合位点。优选的，本发明工程化Poly(A)尾包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个miRNA结合位点。所述一个、两个或更多个miRNA结合位点可以与相同或不同的miRNA相结合。在一些实施方案中，本申请提供的Poly(A)尾通过将一个、两个、三个或更多个miRNA结合位点插入

任何不含miRNA结合位点的Poly(A)尾获得。在一些实施方案中，本申请提供的Poly(A)尾通过将一个或多个所述miRNA结合处插入任何不含miRNA结合位点的Poly(A)尾获得。在一些实施方案中，本申请提供的Poly(A)尾为通过将任何不含miRNA结合位点的Poly(A)尾中的一个或多个非A碱基或一个或多个在结构上等同于元件d的元件替换为一个或多个miRNA结合位点获得。在一些实施方案中，本申请提供的Poly(A)尾通过将任何不含miRNA结合位点的Poly(A)尾中的一个或多个非A碱基或一个或多个在结构上等同于元件d的元件替换为miRNA结合处获得。所述“在结构上等同于元件d的元件”即不包含miRNA结合位点的Poly(A)尾中，由任意两个或更多个连续的核苷酸组成，5'及3'末端的核苷酸不为A，且不包含连续三个以上A的多核苷酸片段，例如PCT申请PCT/CN2023/079037中的元件d。所述“不含miRNA结合位点的Poly(A)尾”可选自描述于PCT/CN2023/079037、WO2022028559A1、WO2020/074642、US10717982B2中的任一种Poly(A)尾，及任何仅含有A的Poly(A)尾。

[0213] 如本文所用，术语“PolyA尾”或“PolyA序列”是指通常位于RNA分子3'-末端的不间断或不中断的腺苷酸残基序列。在RNA中，在有3'-UTR存在的情况下，Poly-A序列与3'-UTR的3'端相连。不间断的poly-A尾的特点是有连续的腺苷酸残基。Poly-A尾可以是任何长度的。在一些实施方案中，Poly-A尾包含，或由至少20、至少30、至少40、至少80或至少100和至多500、至多400、至多300、至多200或至多150个腺苷酸(A)组成，特别是约120个A。通常，PolyA尾中的绝大多数核苷酸都是腺苷，所述绝大多数是指至少75%，至少80%，至少85%，至少90%的核苷酸等，但允许剩余的核苷酸是A以外的核苷酸(非A核苷酸)，例如U(尿苷酸)、G(鸟苷酸)或C(胞苷酸)。

[0214] 在一些实施方案中，所述RNA的体外制备过程是原核发酵过程，即将包含所述Poly(A)尾的RNA分子的编码核酸导入原核细胞中，通过扩增所述原核细胞，达到扩增所述编码核酸的目的，随后，将扩增后的所述编码核酸转录为所述RNA。在一些实施方案中，所述RNA的体外制备过程是将包含蛋白质编码序列的RNA片段与Poly(A)尾通过同源重组、酶切连接、或其他非同源重组等方式连接，且所述Poly(A)尾通过原核发酵过程制备，所述原核发酵过程时将包含所述

Poly(A)尾的编码核酸导入原核细胞中，通过扩增所述原核细胞，达到扩增所述编码核酸的目的，随后，将扩增后的所述编码核酸转录为包含所述Poly(A)尾的RNA。在一些实施方案中，前述编码核酸是线性的。在一些实施方案中，前述编码核酸是环状的。在一些实施方案中，前述编码核酸是质粒。在一些实施方案中，前述编码核酸是单链或双链。在一些实施方案中，前述编码核酸在导入原核细胞前经过了化学修饰。在一些实施方案中，导入原核细胞前的前述编码核酸通过化学合成。在一些实施方案中，所述编码核酸插入所述原核细胞的类核/拟核基因组DNA中。在一些实施方案中，所述编码核酸游离存在于所述原核细胞的细胞质中或类核/拟核以外。在一些实施方案中，所述原核细胞是大肠杆菌。

[0215] 基于此，本申请提供了一系列的工程化Poly(A)尾，所述工程化Poly(A)尾包含miRNA结合位点序列。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾除miRNA结合位点以外的碱基均为A。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾还进一步在RNA的体外制备过程中具有较高的保守性。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾可提升mRNA稳定性。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾是由所述miRNA结合位点插入保守Poly(A)尾的任一两个核苷酸之间形成的。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾是由所述miRNA结合位点在保守Poly(A)尾的5'一侧与保守Poly(A)尾的5'末端核苷酸直接相连(毗邻)形成的。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾是由所述miRNA结合位点在保守Poly(A)尾的3'一侧与保守Poly(A)尾的3'末端核苷酸直接相连(毗邻)形成的。在一些实施方案中，所述工程化Poly(A)尾是由一个或多个miRNA结合位点替换保守Poly(A)尾的任一个或多个元件形成的。

[0216] 如本文所用，术语“保守Poly(A)尾”是一类包含至少一个非A碱基的Poly(A)尾，其在RNA的体外制备过程中具有较高的保守和/或相较于所有碱基均为A的Poly(A)尾可使mRNA的稳定性得到提升。保守Poly(A)可以是天然Poly(A)尾或人工合成的Poly(A)尾，包括但不限于PCT申请PCT/CN2023/079037、中国专利申请CN112805386A、美国专利US10717982B2中所描述的各种Poly(A)尾。上述申请或专利文本在此全部并入本文。

[0217] 如本文所用，本文中“-”连接的两个元件之间直接相连，所述“直接相连”是指所述两个元件之间不包含任何核苷酸，因此所述“直接相连”可以通过任何核苷酸间允许的连接方式相连。在一些实施方案中，所述“直接相连”是指通过化学键相连。在一些实施方案中，所述“直接相连”是指通过磷酸酯键相连。

[0218] 此外，本申请也提供了将上述Poly(A)尾用于使目的基因在特定器官、组织和/或细胞中低表达的用途，所述特定器官、组织和/或细胞高表达所述miRNA。

[0219] 工程化DNA分子

[0220] 本申请还提供了一种可在细胞中复制的工程化DNA分子，其包含前述工程化Poly(A)尾的编码序列或其互补序列。在一些实施方案中，所述工程化DNA分子可在细胞中复制。在一些实施方案中，所述工程化DNA分子可表达前述工程化Poly(A)尾。在一些实施方案中，所述工程化DNA分子可表达前述工程化Poly(A)尾且可在细胞中复制。在一些实施方案中，所述细胞是原核细胞或真核细胞。在一些实施方案中，所述原核细胞是大肠杆菌。本领域技术人员应当知晓，除所述工程化Poly(A)尾的编码序列以外，所述工程化DNA分子还应包含可使所述DNA分子在细胞中复制，或高效复制所必须的结构元件。使所述工程化DNA分子在细胞中复制或高效复制所述必须的结构元件是本领域已知的，包括例如复制起点(ORI)。在一些实施方案中，所述工程化DNA分子还进一步包含标记基因或其片段和/或报道基因或其片段、和允许插入DNA元件的独特的限制性内切酶位点，优选多克隆位点(MCS)形式的限制性内切酶位点。所述标记基因有利于鉴定含有包含所述标记基因的质粒的细胞，可选自，例如抗生素抗性基因。所述MCS中的每一个限制性内切酶位点均可被不同的限制性内切酶特异性识别。

[0221] 在一些实施方案中，所述DNA分子是DNA质粒。如本文所用，术语“DNA质粒”是指由双链DNA分子组成的质粒。在一些实施方案中，所述“质粒”是环状DNA分子。在一些实施方案中，所述“质粒”还可以涵盖线性DNA分子。具体的，术语“质粒”还涵盖通过例如用限制性内切酶切割环状质粒，进而使该环状质粒分子转变成线性分子而使该环状质粒线性化所得到的分子，以及可在

原核生物中复制的线性分子。质粒可以复制，即在细胞中独立于原核细胞拟核或类核存储的基因组遗传信息而扩增，并且可以用于克隆，即用于在细菌细胞中扩增遗传信息。优选地，根据本发明的DNA质粒是中拷贝或高拷贝质粒，更优选地是高拷贝质粒。此类高拷贝质粒的实例是这样的载体：其基于pUC、pTZ质粒或包含支持质粒高拷贝的ORI的任意其它质粒(例如pMB1、pColE1)等。

[0222] 在一些实施方案中，所述DNA分子是构成原核生物拟核或类核的DNA分子或其片段，即所述包含前述工程化Poly(A)尾的编码序列或其互补序列可随原核生物基因组进行复制。

[0223] 在一些实施方案中所述DNA分子是基因组DNA，例如病毒基因组DNA或真核生物基因组DNA。在一些实施方案中，所述DNA为线粒体DNA。在一些实施方案中，所述DNA当导入真核细胞中后，为游离DNA。在一些实施方案中，所述DNA为病毒载体。

[0224] 在一些实施方案中，所述DNA分子在所述工程化Poly(A)尾编码序列的5' 一侧进一步连接目的基因片段，所述目的基因片段与所述工程化Poly(A)尾编码序列共同编码RNA。在一些实施方案中，所述目的基因片段与所述工程化Poly(A)尾编码序列共同编码mRNA。所述目的基因片段包含蛋白、多肽或其片段的编码序列。所述蛋白、多肽或其片段的编码序列可被最终翻译为一个或多个蛋白、或一条或多条多肽，例如短肽、寡肽、多肽、融合蛋白、蛋白质及其片段，如已知蛋白质的部分，例如功能性部分。所述功能性部分可以是例如，蛋白质的生物活性部分或可以有效地产生抗体的抗原部分，例如抗原表位。所述蛋白、多肽或其片段的编码序列的两端分别包含起始密码子(5' 端)和终止密码子(3' 端)，其分别是所述mRNA分子的可被翻译的前三个核苷酸和后三个核苷酸。

[0225] 在一些实施方案中，本发明mRNA还包括5' UTR、3' UTR等。在一些实施方案中，本发明mRNA从5' 至3' 至少依次包含5'UTR的序列，目的基因序列、3'UTR的序列、本发明的Poly(A)尾序列。

[0226] 5'UTR通常包含至少一个核糖体结合位点(RBS)，如原核生物中的Shine-Dalgarno序列，或至少一个翻译起始位点，如真核生物中的Kozak序列。RBS通过在翻译起始时募集核糖体来促进mRNA分子的有效且准确的翻译。可以通过

改变给定的RBS或翻译启示位点的长度和序列以及距起始密码子的距离来优化其活性。可选地或任选地，5'UTR包括内部核糖体进入位点或IRES。3'UTR可包含一个或多个调控序列，如增强mRNA分子稳定性的氨基酸序列的结合位点、调控RNA分子(如miRNA分子)的结合位点、和/或参与mRNA分子的胞内运输的信号序列。

[0227] 所述蛋白、多肽或其片段的编码序列包含可以翻译成氨基酸序列的密码子。所述编码序列包含的全部密码子中，可以全部是天然存在的编码氨基酸的密码子，也可以有部分或全部由人工合成的密码子组成。在一些实施方案中，所述部分或全部密码子经过了密码子优化。在一些实施方案中，所述部分或全部密码子编码非天然氨基酸。

[0228] 在一些实施方案中，所述DNA分子在述目的基因片段的5'端一侧还进一步包含可启动或调控所述RNA转录所必须的结构元件，所述结构元件是本领域已知的。在一些实施方案中，所述结构元件至少包含启动子。启动子及其序列是本领域已知的，包括弱启动子、中等强度启动子、强启动子、mini启动子或核心启动子等。在一些特定的实施方案中，所述启动子为强启动子。在一些实施方案中，所述启动子可在原核细胞中启动所述目的基因片段和/或工程化Poly(A)尾转录。在一些实施方案中，所述启动子可以在真核细胞中启动所述目的基因片段和/或工程化Poly(A)尾转录。所述“启动子”包含至少一个转录识别位点及其后的转录因子结合位点。所述识别和结合位点可以与介导或调节转录的氨基酸序列相互作用。与识别位点相比，结合位点更靠近前述目的基因片段。结合位点可以是，例如原核生物中的Pribnow框或真核生物中的TATA框。例如，在一些实施方案中，当使用Pribnow框时，所述转录识别位点可以位于转录起始位点上游约35bp处，而转录因子结合位点可以位于转录起始位点上游约10bp处。在一些实施方案中，所述启动子包含至少一个另外的调控元件，如位于转录起始位点之前约40和/或60个核苷酸处富含AT的上游元件，和/或位于识别位点和结合位点之间的增强启动子活性的另外的调控元件。在一些实施方式中，所述启动子是强启动子，即所述启动子包含促进前述RNA编码序列转录的序列。强启动子是本领域技术人员已知的，例如来自大肠杆菌的JRecA启动子衍生的OXB

18、OXB19和OXB20启动子，或者可以通过常规实验室程序鉴定或合成。在一些实施方案中，所述启动子为T7启动子。在一些实施方案中，所述启动子前还包含另外的调控元件，如包含在DNA质粒中可促进前述RNA编码序列转录的增强子。

[0229] 此外，本申请还提供了上述工程化DNA分子在稳定扩增工程化Poly(A)尾编码序列或带有工程化Poly(A)尾的RNA的编码序列中的用途。

[0230] 工程化RNA

[0231] 本申请提供了一种工程化RNA或工程化RNA分子，其包含前述工程化Poly(A)尾，以及Poly(A)尾编码序列5'端一侧的目的基因片段。在一些实施方案中，所述RNA为mRNA。

[0232] 在一些实施方式中，本申请的mRNA分子还包含5' UTR和/或3' UTR。

[0233] 在一些实施方式中，本申请的mRNA分子还包含5' 帽子。在优选的实施方式中，所述5' 帽子 $m^7G(5')ppp(5')(2' -OMeA)pG$ 。

[0234] 在一些实施方式中，本申请的mRNA分子还包含化学修饰，例如将所述多核苷酸序列中的全部或部分尿苷酸修饰为N1-甲基假尿苷。

[0235] 如本文所用“mRNA”(信使RNA)是编码至少一种蛋白质、多肽或其片段的，天然存在、非天然存在或经修饰的任何RNA，所述mRNA具备经翻译以在体外、体内、原位或离体产生所编码的蛋白质、多肽或其片段的能力。因此，所述mRNA可以是成熟的mRNA或成熟前的mRNA，其必须包含或选择性包含的元件或结构是本领域已知的。在一些实施方案中，所述mRNA包含多个必要的功能组件的编码序列，以表达、调节、或增强所述蛋白、多肽或其片段的表达水平。所述功能组件包括但不限于5' 帽子、5' UTR、3' UTR等。5'UTR和3'UTR两者通常都从基因组DNA转录，并且是成熟前的mRNA就具有的元件。

[0236] 作为成熟mRNA，通常术语“5' 帽子”位于mRNA的5'最末端，包含甲基化鸟苷酸，所述甲基化鸟苷酸经焦磷酸连接于mRNA的5'末端，与其相邻的核苷酸形成5',5'-三磷酸连接。5' 帽子结构通常有三种类型($m^7G5'ppp5'Np$ 、 $m^7G5'ppp5'NmpNp$ 、 $m^7G5'ppp5'NmpNmpNp$)，分别称为O型、I型和II型。O型指末端核苷酸的核糖未甲基化，I型指末端一个核苷酸的

核糖甲基化，II型指末端两个核苷酸的核糖均甲基化。在一些实施方案中，所述5'帽子可根据制造商的方案，使用以下化学RNA帽类似物在体外转录反应期间同时完成对多核苷酸的5'加帽以产生5'-鸟苷帽结构：3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G[ARCA帽]、G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')G、m⁷G(5')ppp(5')A、m⁷G(5')ppp(5')G(NewEnglandBioLabs、Ipswich、MA)、或m⁷G(5')ppp(5')(2'-OMeA)pG(CleanCapAG)。例如在一些实施方案中，可使用牛痘病毒加帽酶在转录后完成对经修饰RNA的5'加帽，以产生O型帽子结构：m⁷G(5')ppp(5')G(New England BioLabs,Ipswich,MA)。可使用牛痘病毒加帽酶和2'-O甲基-转移酶两者来产生I型帽子结构，以产生m⁷G(5')ppp(5')(2'-OMeA)pG。可从I型帽子结构接着使用2'-O甲基-转移酶对5'-倒数第三核苷酸进行2'-O-甲基化来产生II型帽子结构。可从II型帽子结构接着使用2'-O甲基-转移酶对5'-倒数第四核苷酸进行2'-O-甲基化来产生III型帽子结构。

[0237] 在一些实施方案中，所述mRNA还包含稳定化元件。稳定化元件可包括例如组蛋白茎环。在一些实施方案中，所述mRNA包含编码区、至少一个组蛋白茎环和任选地poly(A)序列或多聚腺苷酸化信号。所述poly(A)序列或多聚腺苷酸化信号通常应增强所编码蛋白质的表达水平。在一些实施方案中，所述mRNA包含poly(A)序列或多聚腺苷酸化信号与至少一个组蛋白茎环的组合，尽管两者在自然界中具有替代机制，但其协同作用可使蛋白质表达增加至超过任一单个元件所观察到的水平。poly(A)与至少一个组蛋白茎环的组合的协同效应不依赖于元件的次序或poly(A)序列的长度。在一些实施方案中，所述组蛋白茎环通常源自组蛋白基因，并且包括由间隔区(由短序列组成)分隔的两个相邻部分或完全反向互补序列的分子内碱基配对形成环。未配对的环区通常无法与茎环元件中的任一者进行碱基配对。茎环结构的稳定性通常取决于长度、错配或膨出部的数目以及配对区的碱基组成。在一些实施方案中，可产生摆动碱基配对(非Watson-Crick碱基配对)。在一些实施方案中，所述至少一个组蛋白茎环序列包含15至45个核苷酸长度。

[0238] 在一些实施方案中，可将所述mRNA的一个或多个富含AU的序列去除。这些序列有时称为AURES，其是在3'UTR中发现的去稳定化序列。可将AURES从mRNA中去除。或者，可使AURES保留在mRNA中。

[0239] 细胞

[0240] 本申请还提供了包含前述工程化DNA分子的细胞，所述DNA分子可在所述细胞中储存和/或扩增。在一些实施方案中，所述细胞为原核细胞，所述DNA分子可在所述原核细胞中复制。在一些实施方案中，所述细胞为原核细胞，所述DNA分子可在所述原核细胞中复制和/或转录。在一些实施方案中，所述DNA分子为真核细胞，所述DNA分子可在所述细胞中复制。在一些实施方案中，所述DNA分子可在所述DNA细胞中转录和/或复制。

[0241] 在一些实施方案中，所述细胞为原核细胞。在一些实施方案中，所述细胞为细菌、放线菌、蓝细菌、支原体、立克次氏体和衣原体。在一些实施方案中，所述细胞选自：枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌、醋酸杆菌、棒状杆菌、短杆菌、节杆菌、假单胞菌、及小球菌。在一些实施方案中，所述细胞为recA⁻的细菌。在一些实施方案中，所述细胞为大肠杆菌。在一些实施方案中，所述细胞为大肠杆菌，所述大肠杆菌选自：K-12及其衍生菌株，以及B菌株及其衍生菌株。在一些实施方案中，所述大肠杆菌选自：MG1655、DH5或DH5 α 、DH10B、BL21、DB3.1、HB101、JM109、JM110、MC1061、MG1655、Pir1、Stbl2、Stbl3、Top10、XL1Blue、XL10 Gold、BLR、HMS174、Tuner、Rostetta2、Lemo21、T7Express、Origami2等。在一些实施方案中，所述细胞选自链霉菌属、小单孢菌属和诺卡氏菌属。在一些实施方案中，所述细胞为真菌。在一些实施方案中，所述细胞选自酵母菌或霉菌。

[0242] 脂质纳米颗粒

[0243] 本申请还提供了包含本申请的工程化Poly(A)尾、工程化RNA分子、和/或工程化DNA分子的脂质纳米颗粒。

[0244] 在一些实施方案中，脂质与所述工程化RNA混合形成脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，将本申请的工程化Poly(A)尾、工程化RNA分子、和/或工程化DNA分子配制在脂质纳米颗粒中。在一些实施方案中，所述脂质纳米颗粒首先

形成为空的脂质纳米颗粒，并且在即将施用之前(例如在几分钟至一小时内)与所述工程化Poly(A)尾、工程化RNA分子、和/或工程化DNA分子组合或包裹。

[0245] 所述脂质纳米颗粒通常包含可电离的脂质、非阳离子脂质、固醇和PEG脂质组分以及目标核酸，例如本申请的工程化Poly(A)尾、工程化RNA分子、和/或工程化DNA分子。

[0246] 本发明所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、结构脂质和PEG脂质；优选地，所述可电离脂、磷脂、结构脂质和PEG脂质的摩尔比为：(20~60)：(5~25)：(25~55)：(0.5~15)，更优选地(40~55)：(5~15)：(30~50)：(1~3)；

[0247] 其中所述磷脂优选选自下述化合物中的一种或两种以上：

[0248] 二月桂酰基卵磷脂(DLPC)、

[0249] 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、

[0250] 二油酰基卵磷脂(DOPC)、

[0251] 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、

[0252] 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、

[0253] 二油酰基磷脂酰胆碱(DUPC)、

[0254] 棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、

[0255] 1,2-二-O-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0Diether PC)、

[0256] 1-油酰基-2-胆甾醇二甲基琥珀酸-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、

[0257] 1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、

[0258] 1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

[0259] 1,2-二芳基酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

[0260] 1,2-二油酰-SN-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、

[0261] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

[0262] 1,2-二乙醇基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

[0263] 1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

[0264] 1,2-二芳基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

[0265] 1,2-二硫代六烯酸-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

[0266] 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1-甘油)钠盐(DOPG)或鞘磷脂，

- [0267] 例如，所述磷脂为DOPE或DSPC；
- [0268] 所述结构脂质优选选自胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、豆甾醇中的一种或两种以上；例如，所述结构脂质是胆固醇；和/或
- [0269] 所述PEG脂质优选选自PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油或PEG修饰的二烷基甘油中的一种或两种以上，例如，所述PEG脂质为DMG-PEG2000。
- [0270] 可使用如本领域中通常已知的组分、组合物和方法来产生本公开的脂质纳米颗粒，参见例如PCT/US2016/052352、PCT/US2016/068300、PCT/US2017/037551、PCT/US2015/027400、PCT/US2016/047406、PCT/US2016000129、PCT/US2016/014280、PCT/US2016/014280、PCT/US2017/038426、PCT/US2014/027077、PCT/US2014/055394、PCT/US2016/52117、PCT/US2012/069610、PCT/US2017/027492、PCT/US2016/059575和PCT/US2016/069491，其全部通过引用整体并入本文。
- [0271] 应当理解，本申请包含本文所描述的各种方面、实施方案以及所述方面和/或实施方案的组合。以上描述以及随后的实施例旨在说明而不是限制本申请的范围。在本申请范围内的其他方面、改进和修改对于本申请所属领域的技术人员将是显而易见的。因此，本领域的普通技术人员应该认识到，本申请的范围还包括对所述方面和实施方案的所述改进和修改。

实施例

- [0272] 实施例1：包含本发明polyA变体的荧光素酶mRNA的构建
- [0273] 1)构建包含荧光素酶蛋白编码区的载体
- [0274] 该载体以大肠杆菌克隆载体pUC57作为载体骨架，在其多克隆位点的Xba I酶切位点和SapI酶切位点之间按顺序排列T7启动子序列(SEQ ID NO: 2)、5'UTR、Kozak序列(GCCACC)、荧光素酶蛋白编码序列、3'UTR以及编号为RG008的poly(dA:dT)，作为本发明中设计的poly(A)变体的对照。
- [0275] 2)将通用载体中的多聚腺苷酸串poly(dA:dT)进行替换合成构建不同poly(A)变体所需的全部序列(如文末序列列表所示)，用2个限制性内切酶进行双酶切以便从1)中构建的通用载体中切除编号为RG008的变体poly(dA:dT)，之后用T4 DNA连接酶

细则 91,
07.06.202

1将本发明不同poly(A)变体与切除poly(dA:dT)的载体连接，完成了对通用载体中poly(dA:dT)的替换。

[0276] 示意图如图1A和图1B所示。

[0277] 实施例2：本发明mRNA-LNP的制备

[0278] 向荧光素酶mRNA原液中，加入醋酸溶液至醋酸终浓度为20mmol/L、mRNA终浓度为200 μg/ml，搅拌混匀，作为mRNA工作液。将mRNA工作液与混脂溶液(根据表1配制)经T混流装置按流量比为2:1 ~ 4:1混合，制备成LNP。然后，用2mmol/L醋酸溶液将LNP稀释2 ~ 5倍，再用2mmol/L醋酸溶液置换不低于3倍，将料液浓缩至目标浓度。加入蔗糖溶液调节渗透压，并用Tris溶液调节pH至7.0 ~ 8.0，获得本发明的mRNA-脂质纳米颗粒(LNP)。

[0279] 表1：混脂溶液配方

混脂组分	mol%
可电离脂	40-55
胆固醇	30-50
磷脂	5-15
DMG-PEG2000	1-3

[0280] 实施例3含有miR-142结合位点的5种poly(A)的荧光素酶mRNA在小鼠中的表达测试

[0281] 以荧光素酶为蛋白编码区，考察5种Poly(A)变体(Poly(A)-60A insert miR-142; Poly(A)-30A insert miR-142; Poly(A)-19A insert miR-142; Poly(A)-14A insert miR-142; Poly(A)-0A insert miR-142)在miR-142低表达的小鼠肝脏以及miR-142高表达的小鼠脾脏中的表达水平，以检测miR-142结合位点的插入是否能够在miR-142高表达的器官中下调mRNA的表达水平。

[0282] C57BL/6小鼠按照体重随机分组，每组6只，适应性饲养2-3天。小鼠采取尾静脉注射方式给药，每只注射0.05mg/kg的mRNA-LNPs(1 μg)，注射体积为100 μL，空白对照注射等体积PBS。给药后6h，按照150mg/kg的计量在腹腔注射Luciferin(200 μL)，10min后麻醉小鼠，采用小动物成像仪进行成像，解剖小鼠的

肝脏和脾脏，再次成像，实验共做1次，取每只小鼠的测定值做柱状图，结果如图2A-2B所示。

- [0283] 结论：miR-142结合位点插入在RG008的0A(SEQ ID NO: 16)、14A(SEQ ID NO:9)、19A(SEQ ID NO: 8)、30A(SEQ ID NO: 7)、60A(SEQ ID NO: 6)之后的位置构成不同的Poly(A)变体，当带有这类变体的mRNA通过LNPs包裹，并通过尾静脉注射进小鼠体内时，在巨噬细胞(高表达miR-142)富集的脾脏中，mRNA会被摄取并降解，表达受到抑制。在脾脏表达水平方面，miR-142结合位点插入3' UTR、0A、14A、19A、30A位置处时下降水平相当，显著优于插入位置为60A处。
- [0284] 在肝脏表达水平方面，当miR-142结合位点插入至14A、19A、30A、60A位置处时，对肝脏的表达水平基本无影响，插入位置为14A、30A时甚至优于无miR-142结合位点的对照组，而插入至0A位置处肝脏表达水平下降明显。
- [0285] 综合肝脏表达水平和脾脏表达水平，本发明筛选出插入位置14A-30A处为较优的miR-142结合位点插入位置，其可在不影响肝脏表达水平的前提下显著下调脾脏表达水平，适用于mRNA肝部表达蛋白治疗疾病的应用场景。
- [0286] 实施例4含有miR-122结合位点的5种poly(A)的荧光素酶mRNA在小鼠中的表达测试
- [0287] 考察5种Poly(A)变体(Poly(A)-60A insert miR-122; Poly(A)-30A insert miR-122; Poly(A)-19A insert miR-122; Poly(A)-14A insert miR-122; Poly(A)-0A insert miR-122)在miR-122低表达的小鼠脾脏以及miR-122高表达的小鼠肝脏中的表达水平。
- [0288] C57BL/6小鼠按照体重随机分组，每组6只，适应性饲养2-3天。小鼠采取尾静脉注射方式给药，每只注射0.05mg/kg的mRNA-LNPs(1 μ g)，注射体积为100 μ L，空白对照注射等体积PBS。给药后6h，按照150mg/kg的计量在腹腔注射Luciferin(200 μ L)，10min后麻醉小鼠，采用小动物成像仪进行成像。解剖小鼠的肝脏和脾脏，再次成像。实验共做1次，取每只小鼠的测定值做柱状图，其中肝脏及脾脏的荧光成像绝对值分别如图3A-3B所示。

[0289] 结论：miR-122结合位点插入在RG008的0A、14A、19A、30A、60A之后的位置构成不同的Poly(A)变体，当带有这类变体的mRNA通过LNPs包裹，并通过尾静脉注射进小鼠体内时，在肝脏中，mRNA均会被摄取并明显降解，表达受到抑制。miR-122结合位点插入在RG008的0A、14A、19A的肝脏表达降低水平显著优于插入至30A、60A处。脾脏表达水平各组均有所降低。综合肝脏表达水平和脾脏表达水平，本发明筛选出插入位置0A、14A、19A处为较优的miR-122结合位点插入位置，其可在显著下调肝脏表达水平的基础上保持脾脏表达水平，适用于mRNA脾脏蛋白治疗疾病的应用场景。

[0290] 实施例5含有不同poly(A)变体的质粒在大肠杆菌中复制的稳定性实验

[0291] 考察两组共10种Poly(A)变体(Poly(A)-60A insert miR-142; Poly(A)-30A insert miR-142; Poly(A)-19A insert miR-142; Poly(A)-14A insert miR-142; Poly(A)-0A insert miR-142; Poly(A)-60A insert miR-122; Poly(A)-30A insert miR-122; Poly(A)-19A insert miR-122; Poly(A)-14A insert miR-122; Poly(A)-0A insert miR-122)在大肠杆菌中的稳定性的影响。

[0292] 根据实施例1中的方法构建的载体质粒经测序确认无误后，转入大肠杆菌DH5 α ，转化后的平板在30℃生长，次日将平板寄送至测序服务公司随机挑选50个克隆，完成测序工作。测序完成后根据测序结果分析和计算不同Poly(A)变体的情况。

[0293] 结果如图4所示，两种不同的miRNA结合位点插入到Poly(A)变体14A-30A的位置处发生碱基缺失的比例均低于插入至0A或60A位置处以及插入至3' UTR中。结果表明，miRNA结合位点插入到RG008 Poly(A)变体14A-30A位置处的质粒稳定性更好。

[0294] 实施例6含有不同插入位置的miR-142结合位点的Poly(A)变体的mRNA在细胞中的表达测试

[0295] 考察8种Poly(A)变体(Poly(A)-0A insert miR-142; Poly(A)-1A insert miR-142; Poly(A)-2A insert miR-142; Poly(A)-3A insert miR-142; Poly(A)-4A insert miR-142; Poly(A)-5A insert miR-142; Poly(A)-10A insert miR-142;

Poly(A)-14A insert miR-142)在miR-142高表达的小鼠单核巨噬细胞白血病 RAW 264.7细胞中的表达水平。

[0296] RAW 246.7细胞培养使用24孔细胞培养板，细胞的密度为 1×10^5 cells/孔，每孔采用Lipofectamine 3000(购自赛默飞)转染500ng体外合成的mRNA。转染24h后吸掉细胞培养基，每孔加入200 μ L细胞裂解液，10min后将细胞裂解液转移至1.5mL EP管中，12000rpm，4 $^{\circ}$ C离心5min，随后将20 μ L裂解液上清转移至黑色不透光的96孔板中，采用荧光检测仪加入200 μ L荧光素底物并读值。结果如图5所示。

[0297] 结论：miR-142结合位点插入在RG008的0A(SEQ ID NO: 16)、1A(SEQ ID NO: 15)、2A(SEQ ID NO: 14)、3A(SEQ ID NO: 13)、4A(SEQ ID NO: 12)、5A(SEQ ID NO: 11)、10A(SEQ ID NO: 10)、14A(SEQ ID NO: 9)之后的位置构成不同的Poly(A)变体，当带有这类变体的mRNA被递送至miR-142过表达的细胞系，如Raw 264.7细胞中时，mRNA均会被miR-142降解，表达受到抑制。

[0298] 实施例7 Poly(A)尾中不同microRNA结合位点串联后相互影响研究

[0299] 考察2种Poly(A)变体(Poly(A)-0A insert miR-142+miR-122; Poly(A)-0A insert miR-122+miR-142)在miR-142高表达的小鼠单核巨噬细胞白血病 RAW 264.7细胞中的表达水平，以考察miR-122和miR-142串联合位点的插入是否影响miR-142结合位点下调mRNA的表达水平。

[0300] RAW 246.7细胞培养使用24孔细胞培养板，细胞的密度为 1×10^5 cells/孔，每孔采用Lipofectamine 3000(购自赛默飞)转染500ng体外合成的mRNA。转染24h后吸掉细胞培养基，每孔加入200 μ L细胞裂解液，10min后将细胞裂解液转移至1.5mL EP管中，12000rpm，4 $^{\circ}$ C离心5min，随后将20 μ L裂解液上清转移至黑色不透光的96孔板中，采用荧光检测仪加入200 μ L荧光素底物并读值。结果如图6所示。

[0301] 结论：miR-142+miR-122或miR-122+miR-142结合位点插入在RG008的0A之后的位置构成不同的Poly(A)变体，当带有这类变体的mRNA通过LNPs递送至miR-142过表达的细胞系，如Raw 264.7细胞中时，mRNA会被miR-142降解，

表达受到抑制，且miR-142和miR-122结合位点不同顺序串联后不影响表达抑制效果。

[0302] 实施例8含有多个microRNA结合位点Poly(A)变体的mRNA的细胞精准表达研究

[0303] 考察6种Poly(A)变体(Poly(A)-0A insert miR-142+miR-126+miR-148a;

Poly(A)-0A insert miR-142+miR-148a+miR-126; Poly(A)-0A insert miR-

126+miR-142+miR-148a; Poly(A)-0A insert miR-126+miR-148a+miR-142;

Poly(A)-0A insert miR-148a+miR-142+miR-126; Poly(A)-0A insert miR-148a

+miR-126+miR-142)在miR-142高表达的小鼠单核巨噬细胞白血病RAW 264.7

细胞，miR-126高表达的小鼠肝窦内皮细胞LSEC，miR-148a高表达的小鼠肝星

状细胞HSC以及肝实质细胞AML中的表达水平，

[0304] RAW264.7, LSEC, HSC, AML12细胞的培养使用24孔细胞培养板，细胞的密度为 1×10^5 cells/孔，每孔采用Lipofectamine 3000(购自赛默飞)转染500ng体外合成的mRNA。转染24h后吸掉细胞培养基，每孔加入200 μ L细胞裂解液，10min后将细胞裂解液转移至1.5mLEP管中，12000rpm，4 $^{\circ}$ C离心5min，随后将20 μ L裂解液上清转移至黑色不透光的96孔板中，采用荧光检测仪加入200 μ L荧光素底物并读值。相对于肝实质表达的降低比例计算：将without miRNA ts组的数据定义为1，计算不同细胞系实验中不同组相对于without miRNA ts的相对表达量，以桥接不同细胞系直接的表达数据，以此为基础计算每个设计在目标细胞(RAW 264.7细胞、肝窦内皮细胞LSEC、肝星状细胞HSC)相对于肝实质细胞AML12表达降低的比例，计算方式为： $(1 - \text{目标细胞相对表达量} / \text{肝实质细胞相对表达量}) \times 100\%$ 。

[0305] 结论：miR-148a, miR-142, miR-126串联时，当mRNA转染至RAW 264.7细胞时，Poly(A)变体中含有miR-142结合位点，mRNA在该细胞系中的表达就会降低。当mRNA转染至LSEC细胞时，Poly(A)变体中含有miR-126结合位点，mRNA在该细胞系中的表达就会降低。当mRNA转染至HSC细胞时，Poly(A)变体中含有miR-148a结合位点，mRNA在该细胞系中的表达就会降低。此外，miR-126+miR-148a+miR-142和miR-148a+miR-142+miR-126的组合在三个细胞中的表现优于其他顺序。参见图7A-7D，图8A-8C。

- [0306] 肝脏主要由肝实质细胞、肝巨噬细胞、肝窦内皮细胞、肝星状细胞组成，本实施例筛选出了表现优异的肝实质细胞特异性表达的microRNA结合位点组合，为肝实质细胞的靶向治疗提供了可靠的工具。
- [0307] 本发明结果表明，在Poly(A)变体中插入miRNA结合位点可以使mRNA在不同细胞系中以及小鼠的不同脏器中表现出不同的表达差异，因此，通过在同一个序列中插入一个或多个miRNA结合位点，可以实现高度特异的表达调控。
- [0308] 本申请以上实施例中使用的序列示于如下序列表中。应当理解，以下序列仅为本申请实施方案的示例性序列，而非对本申请方案的任何限制。以下序列表中的核酸序列可表示DNA序列或RNA序列，当其表示RNA序列时，其中的“T”代表尿苷。并且，本申请中单独的T在RNA的语境下，也指代尿嘧啶或尿苷。
- [0309] 序列表：

SEQ ID NO.	名称	序列
核酸序列		
1	RG008	AAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA GATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA G AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2	T7启动子	TAATACGACTCACTATAAGG
3	3'UTR	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCA GCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAA AGTCTGAGTGGGCGGC
4	miR-142结合位点	<u>TCCATAAAGTAGGAAACACTACA</u>
5	插入miR-142结合位点的3'UTR	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCA GCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCTCCATAAAGTAGGAA ACACTACAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC
6	Poly(A)-60A insert miR-142	AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA <u>TCCATAAAGTAGGAAACACTACA</u> AAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAA AAAAA
7	Poly(A)-30A insert miR-142	AATCCATAAAGTAGGA <u>AACTACTAC</u> AAAGATAT CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAA AAAAAAAAAAAAA
8	Poly(A)-19A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCATAAAGTAGGAAACACTACA AAAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAA AAAAAAAAAAAAA
9	Poly(A)-14A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAATCCATAAAGTAGGAAACACTACA AAAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAA AAAAAAAAAAAAA
10	Poly(A)-10A insert miR-142	AAAAAAAAAAATCCATAAAGTAGGAAACACTACA AAAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAA

		AAAAAAAAAAAAA
11	Poly(A)-5A insert miR-142	AAAAATCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
12	Poly(A)-4A insert miR-142	AAAAATCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
13	Poly(A)-3A insert miR-142	AAATCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
14	Poly(A)-2A insert miR-142	AATCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
15	Poly(A)-1A insert miR-142	ATCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
16	Poly(A)-0A insert miR-142	TCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
17	miR-122 结合位点	CAAACACCATTGTCACACTCCA
18	插入miR-122 结合位点的 3'UTR	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCA GCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCCCAAACACCATTGTC ACACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC
19	Poly(A)-60A insert miR-122	AAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAA AAAAA
20	Poly(A)-30A insert miR-122	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTC ACACTCCA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
21	Poly(A)-19A insert miR-122	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
22	Poly(A)-14A insert miR-122	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
23	Poly(A)-10A insert miR-122	AAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
24	Poly(A)-5A insert miR-122	AAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
25	Poly(A)-4A insert miR-122	AAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGATATC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAAA
26	Poly(A)-3A	AAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

	insert miR-122	AAAGATATC AAAGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA
27	Poly(A)-2A insert miR-122	AACAAACACCATTGTCACACTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGATATC AAAGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA
28	Poly(A)-1A insert miR-122	ACAAACACCATTGTCACACTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGATATC AAAGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA
29	Poly(A)-0A insert miR-122	CAAAACACCATTGTCACACTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGATATC AAAGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA
30	Poly(A)-0A insert miR-122+mi R-142	CAAAACACCATTGTCACACTCCATCCATAAAGTAGGAAACACTACA AA AAAGATATC AAAGAA AA
31	Poly(A)-0A insert miR-142+mi R-122	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA CAAAACACCATTGTCACACTCCA AA AAAGATATC AAAGAA AA
32	miR-126结合 位点	CGCATTATTACTCACGGTACGA
33	Poly(A)-60A insert miR-126	AA AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
34	Poly(A)-30A insert miR-126	AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
35	Poly(A)-19A insert miR-126	AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
36	Poly(A)-14A insert miR-126	AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
37	Poly(A)-0A insert miR-126	CGCATTATTACTCACGGTACGA AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
38	Poly(A)-120)- 0A insert miR-142	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA AA AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
39	Poly(A)-120)- 0A insert miR-122	CAAAACACCATTGTCACACTCCA AA AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
40	Poly(A)-120)- 0A insert miR-126	CGCATTATTACTCACGGTACGA AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA
41	Poly(A)-120)- 14A insert	AAAGATATCAA AAAGAAAA AAAAA

	miR-142	AA AAAAAAAAA
42	Poly(A-120)-14A insert miR-122	AAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAAAAAAA AA AA AAAAAAAAA
43	Poly(A-120)-14A insert miR-126	AAAAAAAAAAAAAAAA CGCATTATTACTCACGGTACG AAAAAAAA AA AA AAAAAAAAA
44	Poly(A-120)-19A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAA TCCATAAAGTAGGAAACACTACA AAA AA AA AAAAAAAAA
45	Poly(A-120)-19A insert miR-122	AAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAA AA AA AAAAAAAAA
46	Poly(A-120)-19A insert miR-126	AAAAAAAAAAAAAAAAAA CGCATTATTACTCACGGTACG AAAAA AA AA AAAAAAAAA
47	Poly(A-120)-30A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAA TCCATAAAGTAGGAAACTACA AAA AACTACA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA AAAAAAAAA
48	Poly(A-120)-30A insert miR-122	AAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAA AACTCCA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA AAAAAAAAA
49	Poly(A-120)-30A insert miR-126	AAAAAAAAAAAAAAAAAA CGCATTATTACTCACG GTACG AA AA AAAAAAAAA
50	Poly(A-120)-60A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAA TCCATAAAGTAGGAAACTACA AAA AA AA AAAAAAAAA
51	Poly(A-120)-60A insert miR-122	AAAAAAAAAAAAAAAAAA CAAACACCATTGTCACACTCCA AAA AA AA AAAAAAAAA
52	Poly(A-120)-60A insert miR-126	AAAAAAAAAAAAAAAAAA CGCATTATTACTCACGGTACG AAAAA AA AA AAAAAAAAA
53	miR-148a 结合位点	ACAAAGTTCTGTAGTGCCTGA
54	Poly(A)-0A insert miR-142+miR-126+miR-148a	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA CGCATTATTACTCACGGTACGAAC AAAGTTCTGTAGTGCCTGA AA AAGATATCAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAA
55	Poly(A)-0A insert miR-142+miR-148a+miR-126	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA CAAAGTTCTGTAGTGCCTGC GCATTATTACTCACGGTACG AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATATCAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAA

56	Poly(A)-0A insert miR-126+miR-142+miR-148a	CGCATTATTACTCACGGTACGATCCATAAAGTAGGAAACACTACAAC AAAGTTCTGTAGTGCCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGATATCAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
57	Poly(A)-0A insert miR-126+miR-148a+miR-142	CGCATTATTACTCACGGTACGAAACAAAGTTCTGTAGTGCCTGATCCA TAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGATATCAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
58	Poly(A)-0A insert miR-148a+miR-142+miR-126	ACAAAGTTCTGTAGTGCCTGATCCATAAAGTAGGAAACACTACAC GCATTATTACTCACGGTACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGATATCAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
59	Poly(A)-0A insert miR-148a+miR-126+miR-142	ACAAAGTTCTGTAGTGCCTGACGCATTATTACTCACGGTACGATCCA TAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGATATCAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
60	元件d	GATATC
61	元件d	GTATAC
62	元件d	GAATCT
63	元件d	GCATATGACT
64	元件d	GATATCGTATAC
65	Poly(A-60)-0A insert miR-142	TCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA
66	Poly(A-60)-30A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCATAAAGTAGGA AACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
67	A30LA70 (US10717982 B2)	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAA AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
68	Poly(A30LA70)-0A insert miR-142	TCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA
69	Poly(A30LA70)-30A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCATAAAGTAGGA AACACTACAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA
70	Poly(A30LA70)-60A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCATAAAGTAGGAAACACTACA AA
71	Poly(A30LA70)-90A insert miR-142	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAA AA AATCCATAAAGTAGGAAACACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
72	5' UTR	ACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC
73	荧光素酶蛋白 Luciferase	ATGGAAGACGCCAAAAACATTAAGAAGGGGCCAGCGCCATTCTACC CACTCGAAGACGGGACCCGCCGGCGAGCAGCTGCACAAAGCCATGA

	编码区	AGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTACCGACGCACA TATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTT CGGCTGGCAGAAAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATACAAACCATC GGATCGTGGTGTGCAGCGAGAATAGCTTGCAGTTCTTCATGCCCGT GTTGGGTGCCCTGTTTCATCGGTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACGCAC ATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGC CCACCGTCGTATTTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAAAGATCCTCAA CGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACAAAAGATCATCATCATGGAT AGCAAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAAGCATGTACACCTTCGTGA CTTCCCATTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCGAG AGCTTCGACCCGGGACAAAACCATCGCCCTGATCATGAACAGTAGTG GCAGTACCGGATTGCCCAAGGGCGTAGCCCTACCGCACCCGCACCCG TTGTGTCCGATTCAGTCATGCCCGCGACCCCATCTTCGGCAACCAGA TCATCCCCGACACCGCTATCCTCAGCGTGGTGCCATTCACCACGGC TTCGGCATGTTACACCGCTGGGCTACTTGATCTGCGGCTTCGGGT CGTGCTCATGTACCGCTTCGAGGAGGAGCTATTCTTGCGCAGCTTGC AAGACTATAAGATTCAATCTGCCCTGCTGGTGCCACACTATTTAGC TTCTTCGCTAAGAGCACTTCATCGACAAGTACGACCTAAGCAACTT GCACGAGATCGCCAGCGGGCGGGCGCCGTCAGCAAGGAGGTAGG TGAGGCCGTGGCCAAACGCTTCCACCTACCAGGCATCCGCCAGGGC TACGGCCTGACAGAAACAACCAGCGCCATTCTGATCACCCCGAAG GGGACGACAAGCCTGGCGCAGTAGGCAAGGTGGTGCCCTTCTTCGA GGCTAAGGTGGTGGACTTGGACACCGGTAAGACACTGGGTGTGAAC CAGCGCGGCAGCTGTGCGTCCGTGGCCCCATGATCATGAGCGGCT ACGTTAACAACCCGAGGCTACAAACGCTCTCATCGACAAGGACGG CTGGCTGCACAGCGCGACATCGCCTACTGGGACGAGGACGAGCAC TTCTTCATCGTGGACCGGCTCAAAAGCCTGATCAAAATAAAGGGCT ACCAGGTAGCCCCAGCCGAACCTGGAGAGCATCCTGCTGCLACCCC CAACATCTTCGACGCCGGGGTCGCCGGCCTGCCCGACGAGATGCC GGCGAGCTGCCCGCCGAGTCGTCTGTGTTGGAACACGGTAAAACCA TGACCGAGAAGGAGATCGTGGACTATGTGGCCAGCCAGGTTACAAC CGCCAAGAAGCTGCGCGGTGGTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT AAAGGACTGACCGGCAAGTTGGACGCCCCGCAAGATCCGCGAGATTC TCATTAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTA
--	-----	--

权利要求书

- [权利要求 1] 一种工程化Poly(A)尾，所述Poly(A)尾包含miRNA结合位点。
- [权利要求 2] 根据权利要求1的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾包含或为如下的式(I)：nA-miRNA结合处-mA 式(I)；
其中，miRNA结合处由一个或多个miRNA结合位点通过一个或多个核苷酸连接而成或直接连接而成；
nA表示与所述miRNA结合处5'末端毗邻的连续n个腺苷酸(A)，
mA表示与所述miRNA结合处3'末端毗邻的连续m个腺苷酸(A)，
m和n为自然数，且 $m+n \leq 150$ 、 $m+n \leq 120$ 、 $m+n \leq 100$ 、 $m+n \leq 80$ 、 $m+n \leq 60$ 、 $m+n \leq 30$ 、 $m+n \leq 19$ 、或 $m+n \leq 14$ ；优选地， $m+n=60$ ；
miRNA结合处的3'及5'末端不包含除miRNA结合位点本身包含的A以外的其他A。
- [权利要求 3] 根据权利要求2的工程化Poly(A)尾，其中 $n=0$ 或 $n \geq 1$ 。
- [权利要求 4] 根据权利要求2的工程化Poly(A)尾，其中 $n \leq 60$ 、 $n \leq 30$ 、 $n \leq 19$ 、 $n \leq 14$ 或 $n \leq 10$ 。
- [权利要求 5] 根据权利要求2的工程化Poly(A)尾，其中 $14 \leq n \leq 30$ ，优选 $19 \leq n \leq 30$ 或 $14 \leq n \leq 19$ 。
- [权利要求 6] 根据权利要求1至5中任一项的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾的长度为80至240nt，例如100至200nt，101至150nt、120至150nt、130至140nt、123nt至135或125至139nt。
- [权利要求 7] 根据权利要求2至6中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述Poly(A)尾：
在式(I)的3'一侧进一步包含与式(I)结构的3'末端直接相连的尾部片段，所述尾部片段5'末端的核苷酸不为A；和/或
在式(I)的5'一侧进一步包含与式(I)结构的5'末端直接相连的头部片段，所述头部片段3'末端的核苷酸不为A。

- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的工程化Poly(A)尾，其中，所述尾部片段或头部片段由一个或多个元件c和/或一个或多个元件d与一个或多个A组成，
所述元件c为一个非A的核苷酸；
所述元件d由任意两个或更多个连续的核苷酸组成，元件d的5'及3'末端的核苷酸不为A，且元件d不包含三个以上连续的A；
所述元件d的长度范围为 $2nt \leq d \leq 20nt$ ；
其中所述元件c和元件d不相邻。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的工程化Poly(A)尾，其包含的所述元件c的个数为2至10个、3个至8个、或4至6个或2-5个，优选2个；和/或元件c为G。
- [权利要求 10] 根据权利要求8-9中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中所述元件d选自如SEQ ID NO: 60至64所示序列中的任一种或多种，优选地，所述元件d如SEQ ID NO: 60所示。
- [权利要求 11] 根据权利要求8-10中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其包含的所述元件d的个数为0-5，优选1-3个，进一步优选1个。
- [权利要求 12] 根据权利要求1-11中任一项所述的工程化Poly(A)尾，不包含头部片段，且所述尾部片段的结构为：元件d-19A-元件c-19A-元件c-17A或元件c-19A-元件c-17A。
- [权利要求 13] 根据权利要求1-12中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其结构为nA-miRNA结合处-mA-元件d-19A-元件c-19A-元件c-17A。
- [权利要求 14] 根据权利要求1-13中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其结构为nA-miRNA结合处-mA-SEQ ID NO: 60-19A-G-19A-G-17A。
- [权利要求 15] 根据权利要求1-14中任一项所述的工程化Poly(A)尾，其中，所述miRNA选自以下的一种或多种：
miR-142,miR-122,miR-126,miR-148a,miR-133,miR-206,miR-208,miR-17-92,miR-16,miR-21,miR-223,miR-24,miR-27,let-

7,miR-30c,miR-1d,miR-149,miR-192,miR-194,miR-101和miR-204;

优选地,所述miRNA选自以下的一种或多种miR-142,miR-122,miR-126,miR-148a;

优选地,所述miRNA选自以下的一种或多种:miR-142和miR-122的组合,miR-126和miR-148a的组合,miR-142,miR-148a和miR-126的组合。

[权利要求 16] 根据权利要求1-15中任一项所述的工程化Poly(A)尾,其中,所述miRNA包括miRNA-142、miR-148a和miR-126,并且在所述Poly(A)的miRNA结合处中,各miRNA结合位点从5'至3'的排列顺序为:
miR-126结合位点、miR-148a结合位点及miR-142结合位点;
miR-148a结合位点、miR-142结合位点及miR-126结合位点;
miR-142结合位点、miR-148a结合位点和miR-126结合位点;
miR-126结合位点、miR-142结合位点及miR-148a结合位点;
miR-148a结合位点、miR-126结合位点及miR-142结合位点;或
miR-142结合位点、miR-126结合位点和miR-148a结合位点;
其中miR-126结合位点、miR-148a结合位点和miR-142结合位点彼此毗邻。

[权利要求 17] 根据权利要求1-16中任一项所述的工程化Poly(A)尾,其中, $n=0$, $m=60$,且mA与所述尾部片段组成如SEQ ID NO: 1所示的多核苷酸序列。

[权利要求 18] 根据权利要求1-16中任一项所述的工程化Poly(A)尾,其中所述Poly(A)尾包含选自以下的任一条多核苷酸序列:
SEQ ID NO: 6-16、SEQ ID NO: 19-31、SEQ ID NO: 33-52、SEQ ID NO: 54-59及SEQ ID NO: 65-71。

[权利要求 19] 工程化RNA分子,其为mRNA或非编码RNA,其包含根据权利要求1-18中任一项所述Poly(A)尾以及位于所述Poly(A)尾5'一侧的

目的基因序列,所述RNA序列从5'至3'端至少依次包含5'UTR序列,目的基因序列、3'UTR序列以及权利要求1-18中任一项所述Poly(A)尾,所述Poly(A)尾的式(I)中的nA与3'UTR直接相连;优选地所述RNA分子具有5'帽子和/或全部或部分尿苷酸被修饰为N1-甲基假尿苷。

[权利要求 20] 工程化DNA分子,其编码包含根据权利要求1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾,或根据权利要求19所述的工程化RNA序列;优选地,所述DNA分子为质粒或病毒载体。

[权利要求 21] 工程化细胞,其包含根据权利要求1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾,根据权利要求19所述的工程化RNA分子,根据权利要求20所述的工程化DNA分子,其中所述细胞为真核或原核细胞;优选地所述原核细胞为大肠杆菌。

[权利要求 22] 根据权利要求1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾用于调控目的基因在特定器官、组织和/或细胞中表达的用途,所述特定器官、组织和/或细胞高表达所述miRNA,优选的所述调控为使目的基因在特定器官、组织和/或细胞中低表达;更优选的,所述特定器官、组织和/或细胞为肝或脾器官、组织和/或细胞。

[权利要求 23] 将根据权利要求1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾用于使目的基因在特定器官、组织和/或细胞中特异性表达的用途,优选地,所述器官或组织优选肝或脾器官或组织;更优选地,所述细胞为肝实质细胞。

[权利要求 24] 根据权利要求1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾用于使编码所述Poly(A)尾的DNA编码序列在宿主细胞中的复制更加保守的用途,优选地,所述宿主细胞为原核细胞,更优选大肠杆菌。

[权利要求 25] 脂质纳米颗粒,其包含根据权利要求1-18中任一项所述的工程化Poly(A)尾,根据权利要求19所述的工程化RNA分子,根据20所述的工程化DNA分子。

细则 91,
07.06.202

[权利要求 26] 根据权利要求25所述的脂质纳米颗粒，其中所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、结构脂质和PEG脂质；优选地，所述可电离脂、磷脂、结构脂质和PEG脂质的摩尔比为： $(20 \sim 60) : (5 \sim 25) : (25 \sim 55) : (0.5 \sim 15)$ ，更优选地 $(40 \sim 55) : (5 \sim 15) : (30 \sim 50) : (1 \sim 3)$ ；其中所述磷脂优选选自下述化合物中的一种或两种以上：

二月桂酰基卵磷脂(DLPC)、

二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、

二油酰基卵磷脂(DOPC)、

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、

二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、

二油酰基磷脂酰胆碱(DUPC)、

棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、

1,2-二-O-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0Diether PC)、

1-油酰基-2-胆甾醇二甲基琥珀酸-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、

1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、

1,2-二乙炔基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二芳基酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二油酰-SN-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、

1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙炔醇基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙炔基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二芳基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

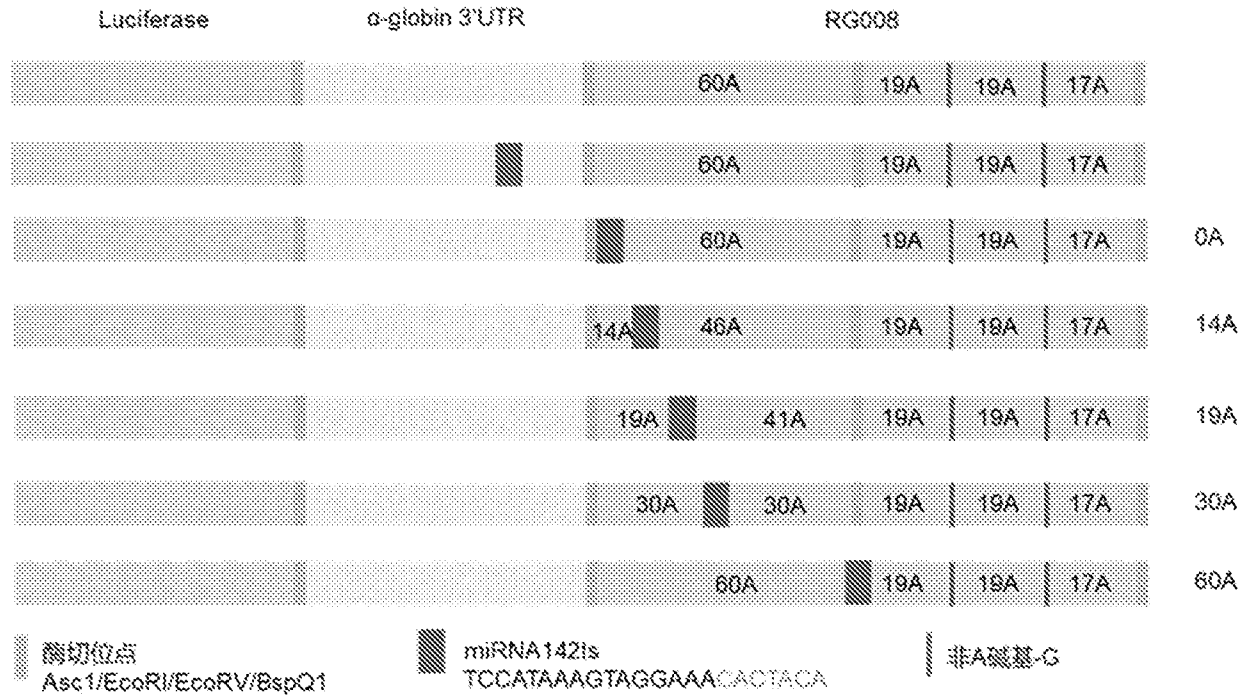
1,2-二硫代六烯酸-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1-甘油)钠盐(DOPG)或鞘磷脂，例如，所述磷脂为DOPE或DSPC；

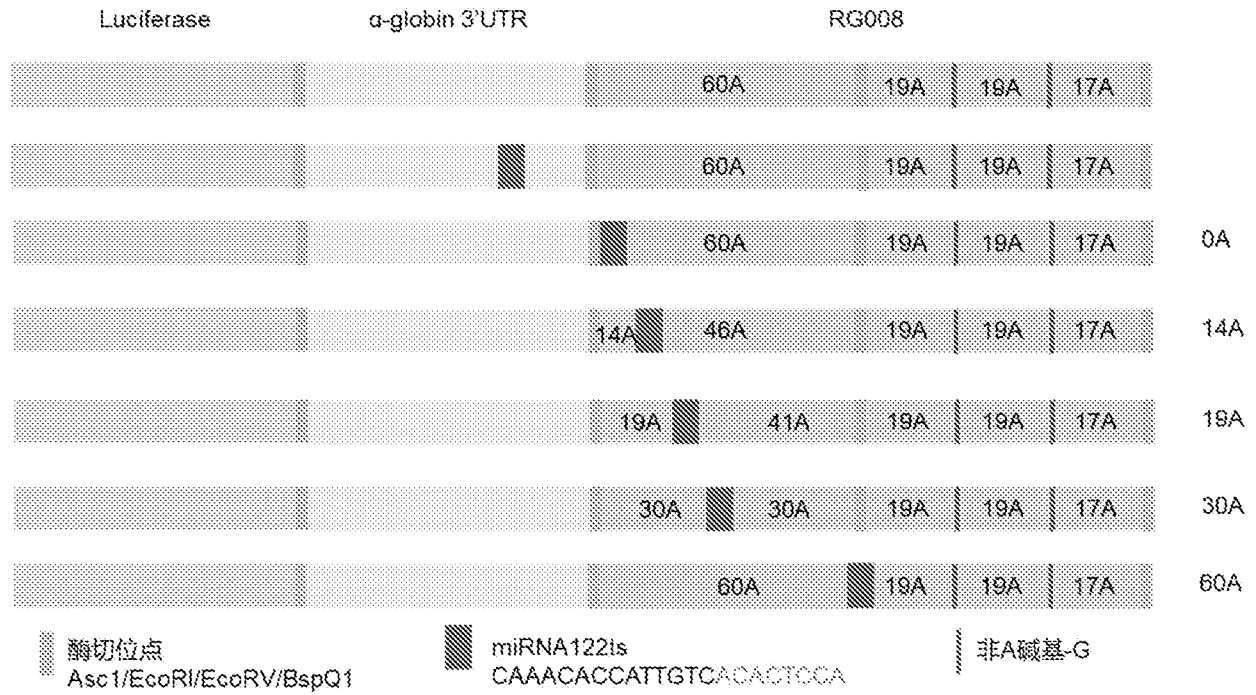
所述结构脂质优选选自胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、豆甾醇中的一种或两种以上；例如，所述结构脂质是胆固醇；和/或

所述PEG脂质优选选自PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油或PEG修饰的二烷基甘油中的一种或两种以上，例如，所述PEG脂质为DMG-PEG2000。

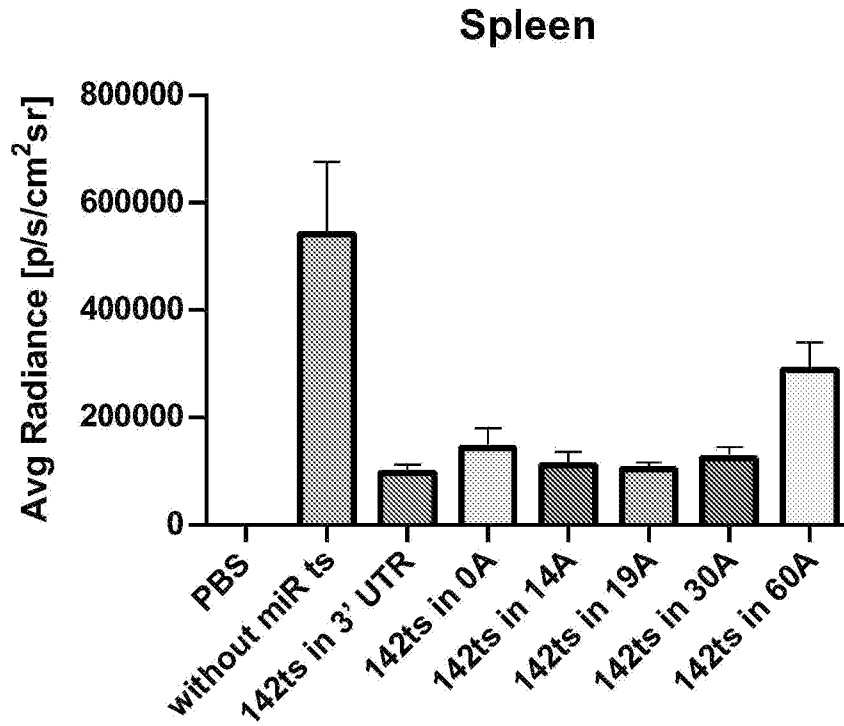
[图 1A]



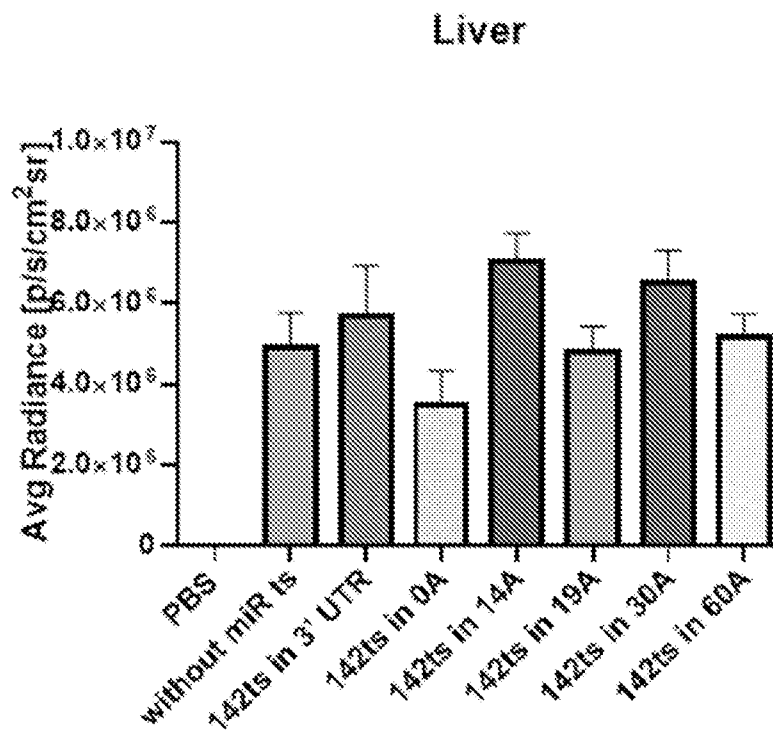
[图 1B]



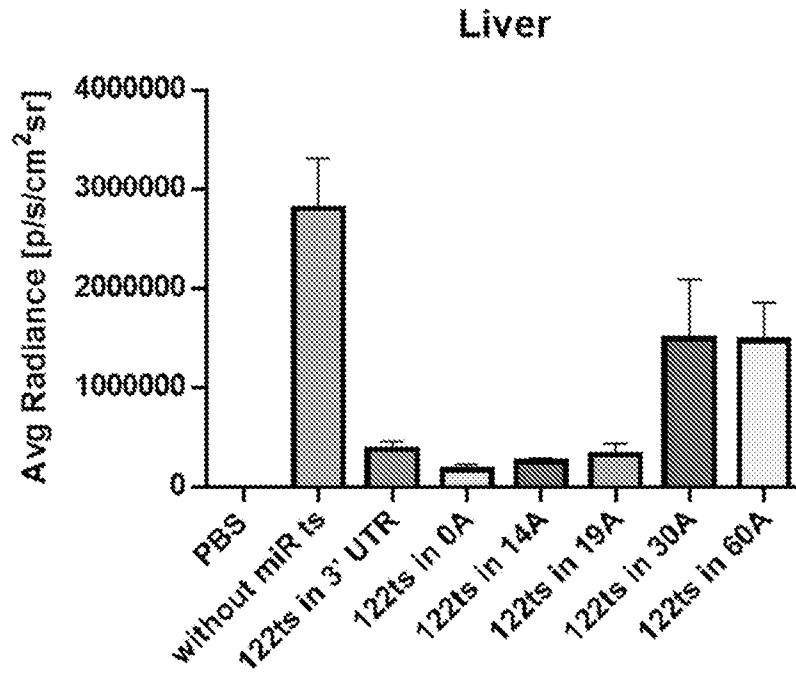
[图 2A]



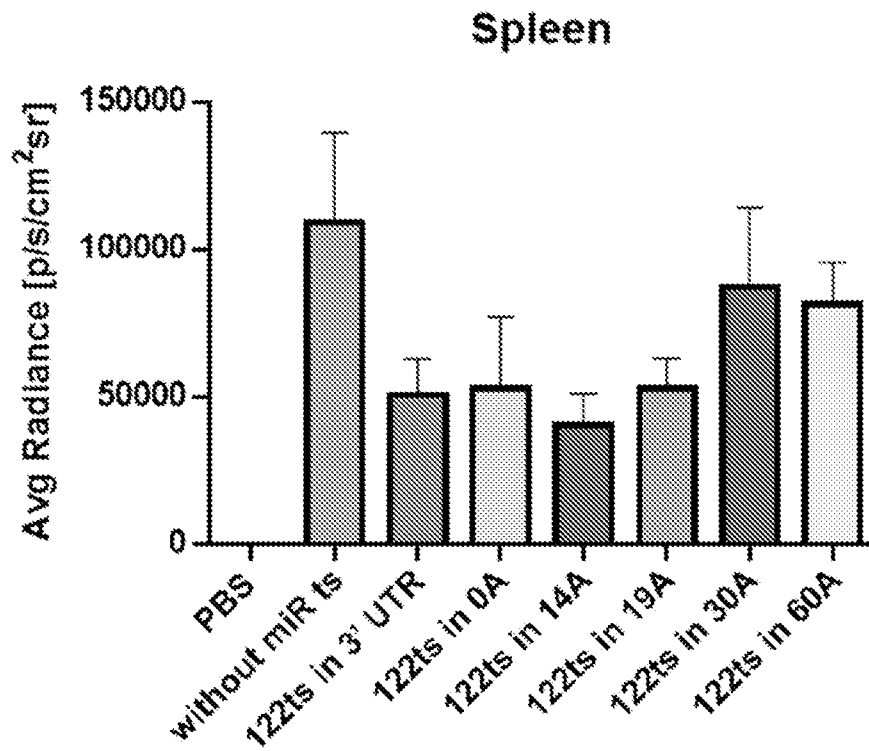
[图 2B]



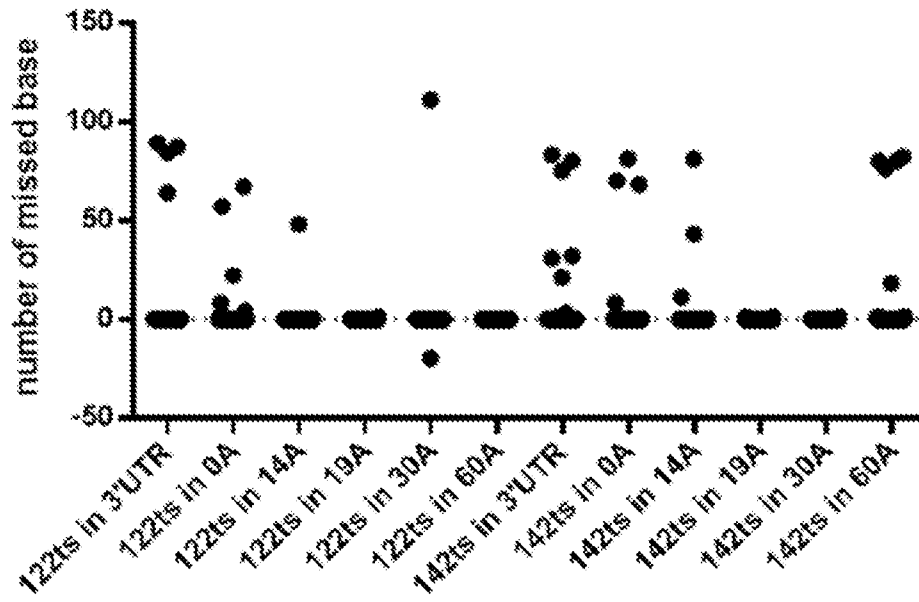
[图 3A]



[图 3B]

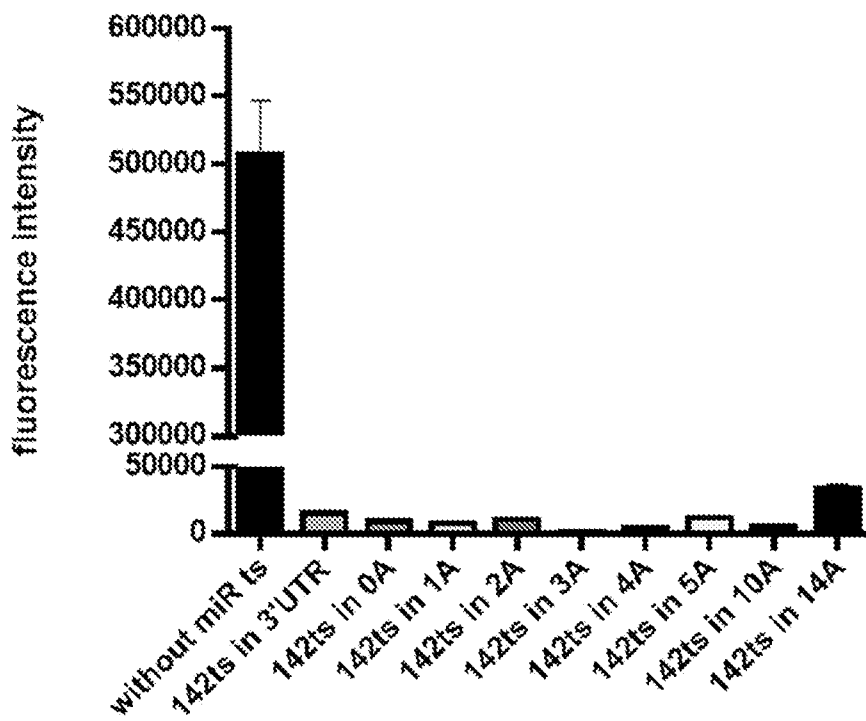


[图 4]

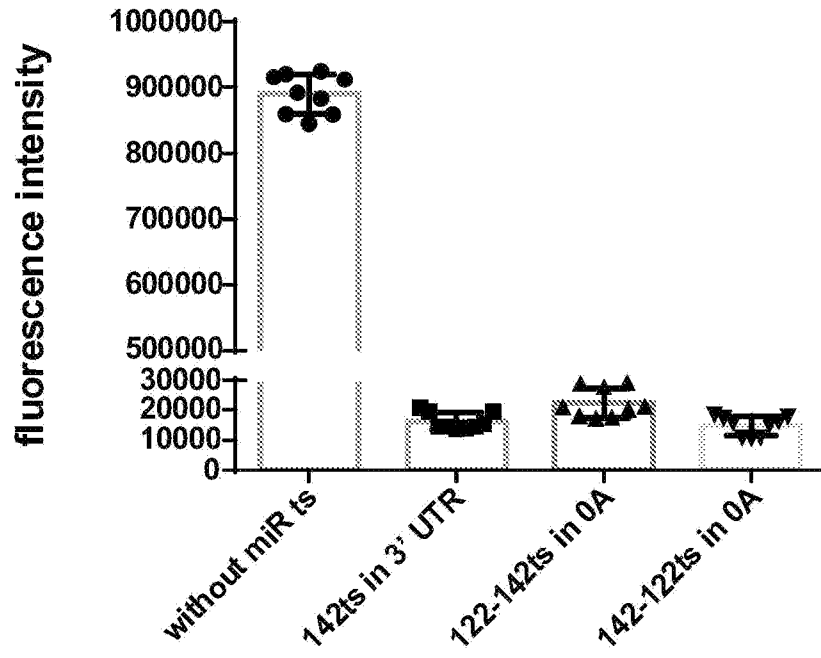


[图 5]

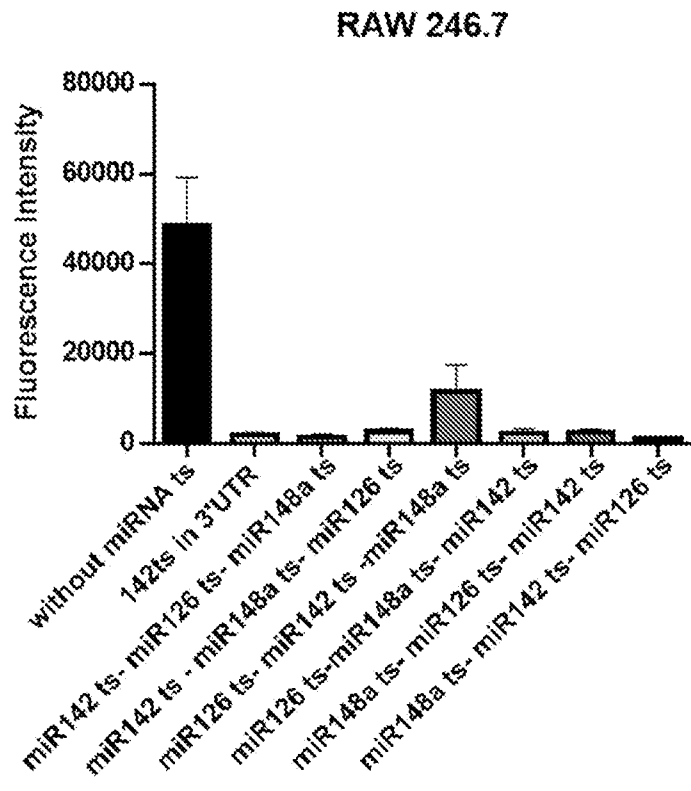
RAW 264.7



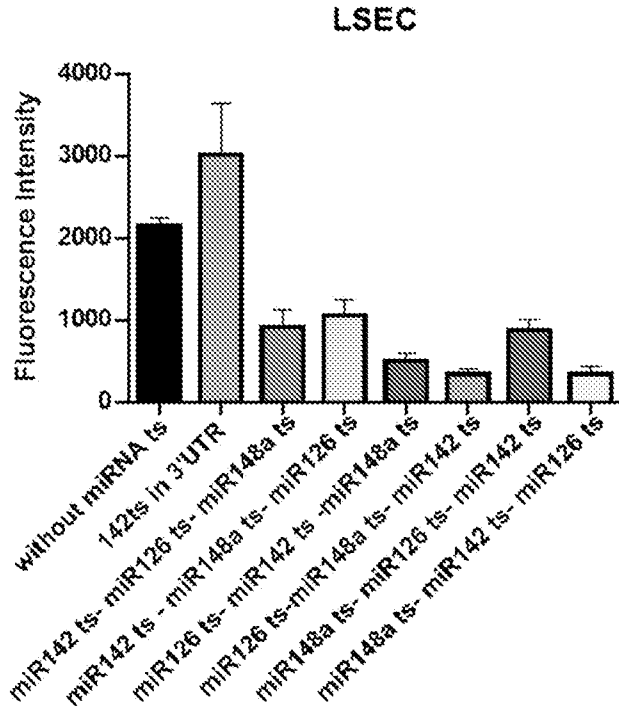
[图 6]



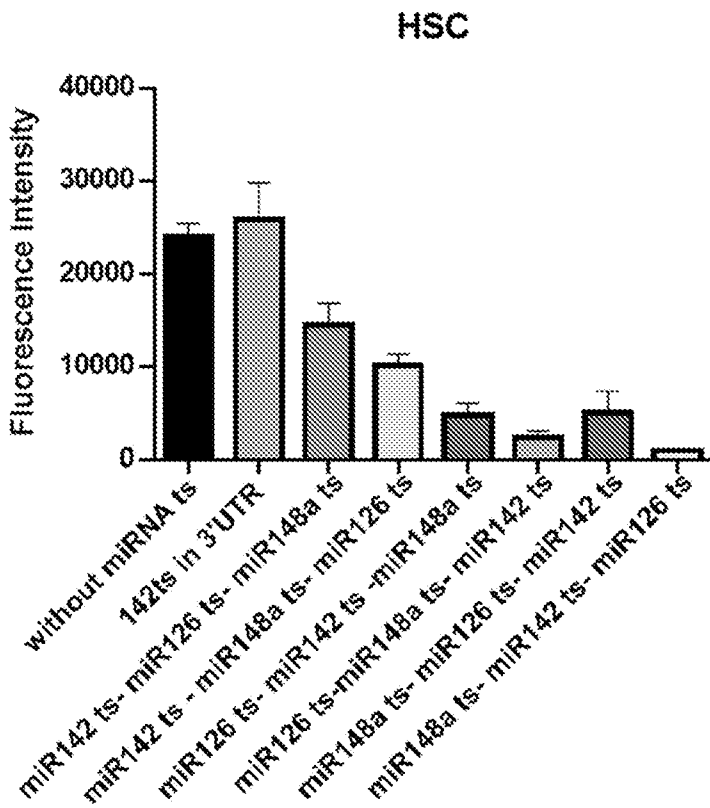
[图 7A]



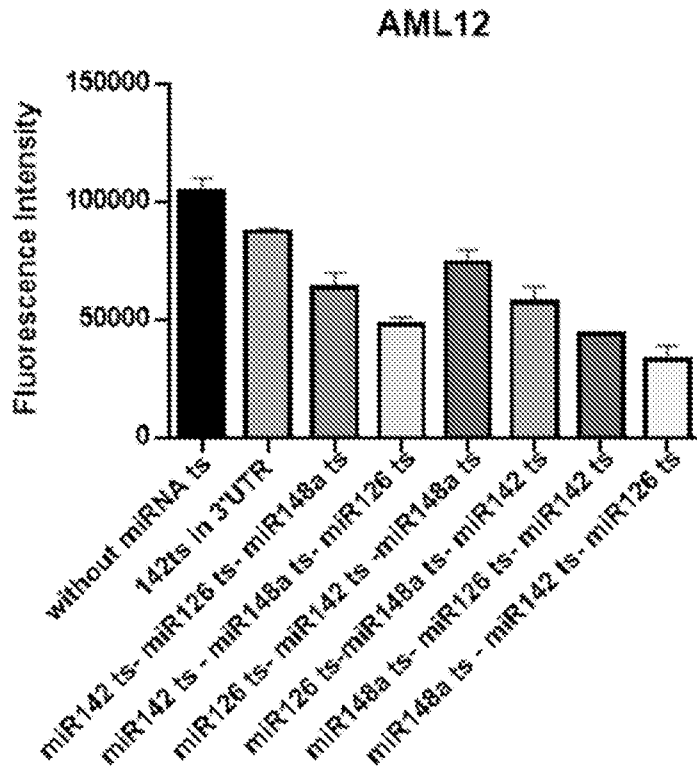
[图 7B]



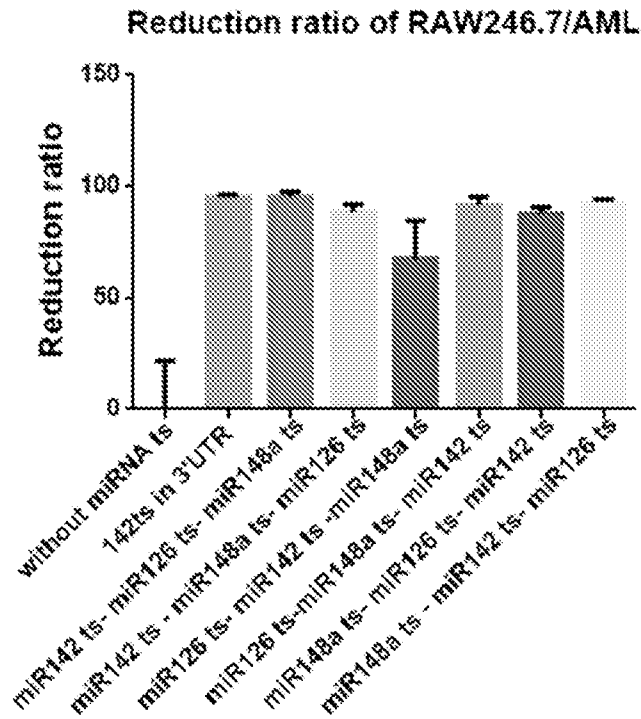
[图 7C]



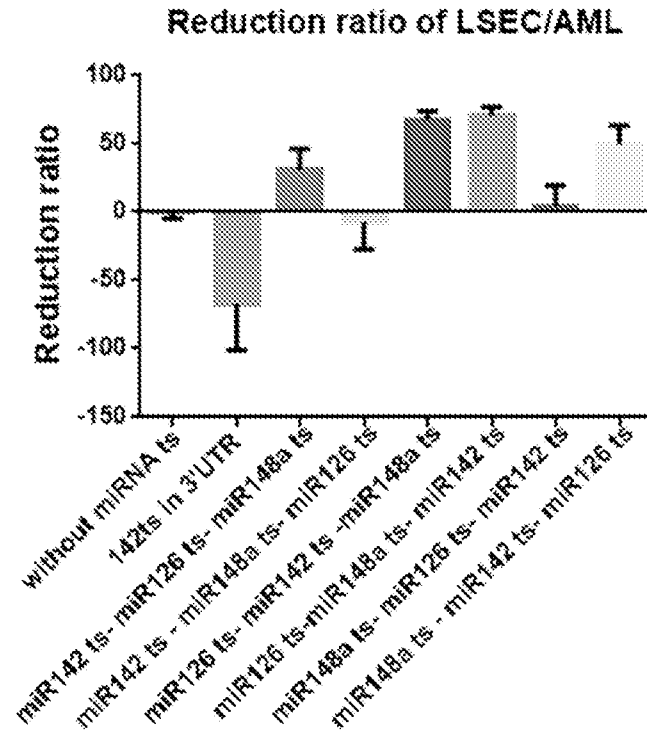
[图 7D]



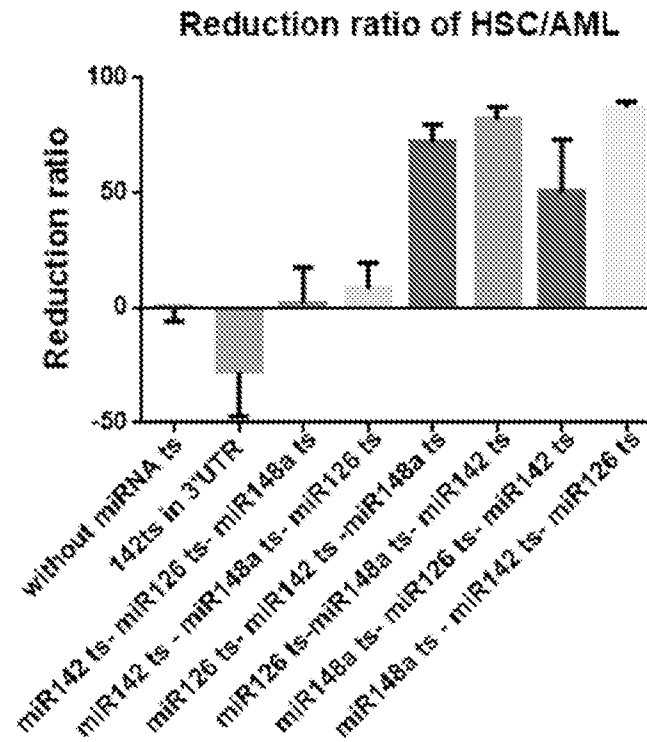
[图 8A]



[图 8B]



[图 8C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097944

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N15/11(2006.01)i; C12N15/113(2010.01)i; A61K9/127(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC:C12N,A61K.		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, ISI of Web Science, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, Patents, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System, NCBI Genbank, EBI, STNext: 申请人, 发明人, miRNA结合位点整合入Poly(A)尾, "Poly(A)"尾, "聚(A)尾", "聚-A尾", miRNA结合位点, miRNA结合位点, or微小RNA结合位点, mRNA结合位点, 包含, 多聚腺苷酸+, 工程化结合位点, 多核苷酸, Poly-A结合蛋白, 缀合, 增强表达, 结合位点, 聚A尾, 聚腺苷酸, 微小RNA结合位点, 整合, 10GCATATGACT, 10GCAUAUGACU, 30A, 70A, A30, binding, PolyA, site, Stabilisierung, poly+, Connect+, Compris+, mRNA binding site, RNA constructs, engineered binding sites, "A30L70", Segmented poly+, Conjugat+, "Poly-A", +RNA, Poly-A, miRNA binding site.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016005004 A1 (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH et al.) 14 January 2016 (2016-01-14) title, abstract, and description, pages 56-58, embodiment 2	1, 6, 12, 15-16, 19-26
A	WO 2022233880 A1 (CUREVAC AG) 10 November 2022 (2022-11-10) abstract, claims 1-32, and description, paragraphs 122-124	1-26
A	WO 2020056239 A1 (MODERNATX, INC.) 19 March 2020 (2020-03-19) description, paragraphs 335 and 349	1-26
A	CN 111065742 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 24 April 2020 (2020-04-24) claims 1-49	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 September 2024		24 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097944

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 115820740 A (BEIJING JINLAN GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 21 March 2023 (2023-03-21) claims 1-15	1-26
A	WO 2023031392 A2 (CUREVAC SE) 09 March 2023 (2023-03-09) claims 1-46	1-26
A	WO 2022101469 A1 (BIONTECH SE) 19 May 2022 (2022-05-19) claims 1-178	1-26
A	US 2018318229 A1 (MODERNATX, INC.) 08 November 2018 (2018-11-08) claims 147-166	1-26
A	WO 2022118226 A1 (SEQIRUS, INC.) 09 June 2022 (2022-06-09) claims 1-48	1-26
A	WO 2022266083 A2 (MODERNATX, INC.) 22 December 2022 (2022-12-22) claims 1-34	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097944

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/097944

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016005004	A1	14 January 2016	PT	3167059	T	29 July 2019
				TR	201910424	T4	21 August 2019
				CA	2954706	A1	14 January 2016
				CA	2954706	C	24 January 2023
				JP	2017522050	A	10 August 2017
				JP	6759196	B2	23 September 2020
				SI	3167059	T1	30 October 2019
				AU	2021277776	A1	23 December 2021
				AU	2021277776	B2	08 August 2024
				ES	2735728	T3	20 December 2019
				DE	202015010039	U1	08 July 2024
				DE	202015010020	U1	05 June 2023
				US	2020392518	A1	17 December 2020
				US	12054723	B2	06 August 2024
				EP	3594337	A1	15 January 2020
				PL	3167059	T3	31 December 2019
				AU	2015286820	A1	23 February 2017
				AU	2015286820	A8	30 March 2017
				AU	2015286820	B2	09 September 2021
				DK	3167059	T3	05 August 2019
				EP	3167059	A1	17 May 2017
				EP	3167059	B1	26 June 2019
				US	2017166905	A1	15 June 2017
				US	10717982	B2	21 July 2020
				HUE	046120	T2	28 February 2020
				DE	202015010019	U1	02 June 2023
				WO	2016005324	A1	14 January 2016
				JP	2020188758	A	26 November 2020
				JP	7144481	B2	29 September 2022
				PT	3167059	T	29 July 2019
				TR	201910424	T4	21 August 2019
				CA	2954706	A1	14 January 2016
				CA	2954706	C	24 January 2023
				JP	2017522050	A	10 August 2017
				JP	6759196	B2	23 September 2020
				SI	3167059	T1	30 October 2019
				AU	2021277776	A1	23 December 2021
				AU	2021277776	B2	08 August 2024
				ES	2735728	T3	20 December 2019
				DE	202015010039	U1	08 July 2024
				DE	202015010020	U1	05 June 2023
				US	2020392518	A1	17 December 2020
				US	12054723	B2	06 August 2024
				EP	3594337	A1	15 January 2020
				PL	3167059	T3	31 December 2019
				AU	2015286820	A1	23 February 2017
				AU	2015286820	A8	30 March 2017
				AU	2015286820	B2	09 September 2021
				DK	3167059	T3	05 August 2019
				EP	3167059	A1	17 May 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/097944

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				EP 3167059 B1	26 June 2019
				US 2017166905 A1	15 June 2017
				US 10717982 B2	21 July 2020
				HUE 046120 T2	28 February 2020
				DE 202015010019 U1	02 June 2023
				WO 2016005324 A1	14 January 2016
				JP 2020188758 A	26 November 2020
				JP 7144481 B2	29 September 2022
WO	2022233880	A1	10 November 2022	CA 3171589 A1	03 November 2022
				US 2024229075 A1	11 July 2024
				EP 4334446 A1	13 March 2024
				CA 3171589 A1	03 November 2022
				US 2024229075 A1	11 July 2024
				EP 4334446 A1	13 March 2024
WO	2020056239	A1	19 March 2020	EP 3850102 A1	21 July 2021
				JP 2022500444 A	04 January 2022
				CA 3112398 A1	19 March 2020
				US 2022401584 A1	22 December 2022
				AU 2019339430 A1	29 April 2021
				MA 53615 A	21 July 2021
				EP 3850102 A1	21 July 2021
				JP 2022500444 A	04 January 2022
				CA 3112398 A1	19 March 2020
				US 2022401584 A1	22 December 2022
				AU 2019339430 A1	29 April 2021
				MA 53615 A	21 July 2021
CN	111065742	A	24 April 2020	WO 2018226785 A1	13 December 2018
				CO 2019014840 A2	17 January 2020
				AU 2018281145 A1	02 January 2020
				EA 201992882 A1	25 May 2020
				BR 112019025732 A2	30 June 2020
				EP 3635122 A1	15 April 2020
				EP 3635122 A4	31 March 2021
				KR 20200015701 A	12 February 2020
				JP 2023164447 A	10 November 2023
				JP 2020522269 A	30 July 2020
				US 2023416779 A1	28 December 2023
				MX 2019014760 A	03 August 2020
				CL 2019003582 A1	25 September 2020
				US 2020181646 A1	11 June 2020
				US 11680275 B2	20 June 2023
				IL 271170 A	30 January 2020
				SG 11201911737 PA	30 January 2020
				CA 3066623 A1	13 December 2019
				WO 2018226785 A1	13 December 2018
				CO 2019014840 A2	17 January 2020
				AU 2018281145 A1	02 January 2020
				EA 201992882 A1	25 May 2020
				BR 112019025732 A2	30 June 2020
				EP 3635122 A1	15 April 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/097944

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				EP 3635122 A4	31 March 2021
				KR 20200015701 A	12 February 2020
				JP 2023164447 A	10 November 2023
				JP 2020522269 A	30 July 2020
				US 2023416779 A1	28 December 2023
				MX 2019014760 A	03 August 2020
				CL 2019003582 A1	25 September 2020
				US 2020181646 A1	11 June 2020
				US 11680275 B2	20 June 2023
				IL 271170 A	30 January 2020
				SG 11201911737 PA	30 January 2020
				CA 3066623 A1	13 December 2019
<hr/>					
CN	115820740	A	21 March 2023	None	
<hr/>					
WO	2023031392	A2	09 March 2023	WO 2023031392 A3	13 April 2023
				EP 4395820 A2	10 July 2024
				CA 3230056 A1	09 March 2023
				MX 2024002725 A	15 March 2024
				IL 309502 A	01 February 2024
				AU 2022336664 A1	18 January 2024
				WO 2023031392 A3	13 April 2023
				EP 4395820 A2	10 July 2024
				CA 3230056 A1	09 March 2023
				MX 2024002725 A	15 March 2024
				IL 309502 A	01 February 2024
				AU 2022336664 A1	18 January 2024
<hr/>					
WO	2022101469	A1	19 May 2022	CA 3198311 A1	19 May 2022
				MX 2023005697 A	03 August 2023
				IL 302770 A	01 July 2023
				KR 20230109689 A	20 July 2023
				AU 2021380033 A1	15 June 2023
				US 2024041785 A1	08 February 2024
				JP 2023549265 A	22 November 2023
				EP 4243789 A1	20 September 2023
				CA 3198311 A1	19 May 2022
				MX 2023005697 A	03 August 2023
				IL 302770 A	01 July 2023
				KR 20230109689 A	20 July 2023
				AU 2021380033 A1	15 June 2023
				US 2024041785 A1	08 February 2024
				JP 2023549265 A	22 November 2023
				EP 4243789 A1	20 September 2023
<hr/>					
US	2018318229	A1	08 November 2018	LT 3458474 T	10 October 2022
				PL 3458474 T3	14 November 2022
				DK 3458474 T3	26 September 2022
				HRP 20221135 T1	25 November 2022
				HRP 20221135 T8	03 February 2023
				AU 2017266929 A1	17 January 2019
				AU 2017266929 A8	14 March 2019
				AU 2017266929 B2	11 May 2023
				US 2019060246 A1	28 February 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/097944

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 10322090 B2	18 June 2019
		US 2021038529 A1	11 February 2021
		US 11071716 B2	27 July 2021
		RS 63625 B1	31 October 2022
		MA 45035 A	27 March 2019
		WO 2017201325 A1	23 November 2017
		WO 2017201325 A8	30 August 2018
		JP 2019519517 A	11 July 2019
		JP 7194594 B2	22 December 2022
		US 2023026381 A1	26 January 2023
		US 11596609 B2	07 March 2023
		PT 3458474 T	08 November 2022
		EP 4137509 A1	22 February 2023
		US 2019105281 A1	11 April 2019
		US 10406113 B2	10 September 2019
		US 11344504 B1	31 May 2022
		KR 20190020299 A	28 February 2019
		KR 102482867 B1	02 January 2023
		US 2019111003 A1	18 April 2019
		US 10285950 B2	14 May 2019
		AU 2023210606 A1	24 August 2023
		KR 20230008243 A	13 January 2023
		US 2023041964 A1	09 February 2023
		US 2020113844 A1	16 April 2020
		US 11185510 B2	30 November 2021
		HUE 059955 T2	28 January 2023
		US 2019105280 A1	11 April 2019
		US 10322091 B2	18 June 2019
		JP 2023022326 A	14 February 2023
		US 10172808 B2	08 January 2019
		SI 3458474 T1	28 October 2022
		ES 2932516 T3	20 January 2023
		CA 3024917 A1	23 November 2017
		EP 3458474 A1	27 March 2019
		EP 3458474 B1	06 July 2022
		LT 3458474 T	10 October 2022
		PL 3458474 T3	14 November 2022
		DK 3458474 T3	26 September 2022
		HRP 20221135 T1	25 November 2022
		HRP 20221135 T8	03 February 2023
		AU 2017266929 A1	17 January 2019
		AU 2017266929 A8	14 March 2019
		AU 2017266929 B2	11 May 2023
		US 2019060246 A1	28 February 2019
		US 10322090 B2	18 June 2019
		US 2021038529 A1	11 February 2021
		US 11071716 B2	27 July 2021
		RS 63625 B1	31 October 2022
		MA 45035 A	27 March 2019
		WO 2017201325 A1	23 November 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/097944

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2017201325 A8	30 August 2018
		JP 2019519517 A	11 July 2019
		JP 7194594 B2	22 December 2022
		US 2023026381 A1	26 January 2023
		US 11596609 B2	07 March 2023
		PT 3458474 T	08 November 2022
		EP 4137509 A1	22 February 2023
		US 2019105281 A1	11 April 2019
		US 10406113 B2	10 September 2019
		US 11344504 B1	31 May 2022
		KR 20190020299 A	28 February 2019
		KR 102482867 B1	02 January 2023
		US 2019111003 A1	18 April 2019
		US 10285950 B2	14 May 2019
		AU 2023210606 A1	24 August 2023
		KR 20230008243 A	13 January 2023
		US 2023041964 A1	09 February 2023
		US 2020113844 A1	16 April 2020
		US 11185510 B2	30 November 2021
		HUE 059955 T2	28 January 2023
		US 2019105280 A1	11 April 2019
		US 10322091 B2	18 June 2019
		JP 2023022326 A	14 February 2023
		US 10172808 B2	08 January 2019
		SI 3458474 T1	28 October 2022
		ES 2932516 T3	20 January 2023
		CA 3024917 A1	23 November 2017
		EP 3458474 A1	27 March 2019
		EP 3458474 B1	06 July 2022
-----	-----	-----	-----
WO 2022118226 A1	09 June 2022	CA 3199996 A1	09 June 2022
		IL 303315 A	01 July 2023
		US 2024024455 A1	25 January 2024
		AU 2021392077 A1	13 July 2023
		AU 2021392077 A9	23 May 2024
		JP 2023551982 A	13 December 2023
		KR 20230120646 A	17 August 2023
		EP 4255446 A1	11 October 2023
		CA 3199996 A1	09 June 2022
		IL 303315 A	01 July 2023
		US 2024024455 A1	25 January 2024
		AU 2021392077 A1	13 July 2023
		AU 2021392077 A9	23 May 2024
		JP 2023551982 A	13 December 2023
		KR 20230120646 A	17 August 2023
		EP 4255446 A1	11 October 2023
-----	-----	-----	-----
WO 2022266083 A2	22 December 2022	EP 4355882 A2	24 April 2024
		WO 2022266083 A3	02 February 2023
		EP 4355882 A2	24 April 2024
		WO 2022266083 A3	02 February 2023
-----	-----	-----	-----

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N15/11(2006.01)i; C12N15/113(2010.01)i; A61K9/127(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:C12N,A61K.</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>VEN,CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, ISI of Web Science, 百度学术, Patents, 中国生物序列检索系统, NCBI Genbank, EBI, STNext; 申请人, 发明人, miRNA结合位点整合入Poly(A)尾,"Poly(A)"尾,"聚(A)尾","聚-A尾",miRNA结合位点,miRNA结合位点 or微小RNA结合位点,mRNA结合位点,包含,多聚腺苷酸+,工程化结合位点,多核苷酸,Poly-A结合蛋白,缀合,增强表达,结合位点,聚A尾,聚腺苷酸,微小RNA结合位点,整合,10GCATATGACT,10GCAUAUGACU,30A, 70A,A30,binding, PolyA,site,Stabilisierung, poly+,Connect+,Compris+,mRNA binding site,RNA constructs,engineered binding sites,"A30L70", Segmented poly+,Conjugat+, "Poly-A",+RNA,Poly-A,miRNA binding site.</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016005004 A1 (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH等) 2016年1月14日 (2016 - 01 - 14) 标题、摘要及说明书第56-58页实施例2</td> <td>1, 6, 12, 15-16,19-26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2022233880 A1 (CUREVAC AG) 2022年11月10日 (2022 - 11 - 10) 摘要, 权利要求1-32, 说明书第122-124段</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020056239 A1 (MODERNATX, INC.) 2020年3月19日 (2020 - 03 - 19) 说明书第335,349段</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111065742 A (马萨诸塞大学) 2020年4月24日 (2020 - 04 - 24) 权利要求1-49</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 115820740 A (北京锦篮基因科技有限公司) 2023年3月21日 (2023 - 03 - 21) 权利要求1-15</td> <td>1-26</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2016005004 A1 (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH等) 2016年1月14日 (2016 - 01 - 14) 标题、摘要及说明书第56-58页实施例2	1, 6, 12, 15-16,19-26	A	WO 2022233880 A1 (CUREVAC AG) 2022年11月10日 (2022 - 11 - 10) 摘要, 权利要求1-32, 说明书第122-124段	1-26	A	WO 2020056239 A1 (MODERNATX, INC.) 2020年3月19日 (2020 - 03 - 19) 说明书第335,349段	1-26	A	CN 111065742 A (马萨诸塞大学) 2020年4月24日 (2020 - 04 - 24) 权利要求1-49	1-26	A	CN 115820740 A (北京锦篮基因科技有限公司) 2023年3月21日 (2023 - 03 - 21) 权利要求1-15	1-26
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	WO 2016005004 A1 (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH等) 2016年1月14日 (2016 - 01 - 14) 标题、摘要及说明书第56-58页实施例2	1, 6, 12, 15-16,19-26																		
A	WO 2022233880 A1 (CUREVAC AG) 2022年11月10日 (2022 - 11 - 10) 摘要, 权利要求1-32, 说明书第122-124段	1-26																		
A	WO 2020056239 A1 (MODERNATX, INC.) 2020年3月19日 (2020 - 03 - 19) 说明书第335,349段	1-26																		
A	CN 111065742 A (马萨诸塞大学) 2020年4月24日 (2020 - 04 - 24) 权利要求1-49	1-26																		
A	CN 115820740 A (北京锦篮基因科技有限公司) 2023年3月21日 (2023 - 03 - 21) 权利要求1-15	1-26																		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2024年9月18日	2024年9月24日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																			
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李煦颖																			
	号码 (+86) 010-53961960																			

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2023031392 A2 (CUREVAC SE) 2023年3月9日 (2023 - 03 - 09) 权利要求1-46	1-26
A	WO 2022101469 A1 (BIONTECH SE) 2022年5月19日 (2022 - 05 - 19) 权利要求1-178	1-26
A	US 2018318229 A1 (MODERNATX,INC.) 2018年11月8日 (2018 - 11 - 08) 权利要求147-166	1-26
A	WO 2022118226 A1 (SEQIRUS, INC.) 2022年6月9日 (2022 - 06 - 09) 权利要求1-48	1-26
A	WO 2022266083 A2 (MODERNATX,INC.) 2022年12月22日 (2022 - 12 - 22) 权利要求1-34	1-26

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/097944

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016005004	A1	2016年1月14日	PT	3167059	T	2019年7月29日
				TR	201910424	T4	2019年8月21日
				CA	2954706	A1	2016年1月14日
				CA	2954706	C	2023年1月24日
				JP	2017522050	A	2017年8月10日
				JP	6759196	B2	2020年9月23日
				SI	3167059	T1	2019年10月30日
				AU	2021277776	A1	2021年12月23日
				AU	2021277776	B2	2024年8月8日
				ES	2735728	T3	2019年12月20日
				DE	202015010039	U1	2024年7月8日
				DE	202015010020	U1	2023年6月5日
				US	2020392518	A1	2020年12月17日
				US	12054723	B2	2024年8月6日
				EP	3594337	A1	2020年1月15日
				PL	3167059	T3	2019年12月31日
				AU	2015286820	A1	2017年2月23日
				AU	2015286820	A8	2017年3月30日
				AU	2015286820	B2	2021年9月9日
				DK	3167059	T3	2019年8月5日
				EP	3167059	A1	2017年5月17日
				EP	3167059	B1	2019年6月26日
				US	2017166905	A1	2017年6月15日
				US	10717982	B2	2020年7月21日
				HUE	046120	T2	2020年2月28日
				DE	202015010019	U1	2023年6月2日
				WO	2016005324	A1	2016年1月14日
				JP	2020188758	A	2020年11月26日
				JP	7144481	B2	2022年9月29日
				PT	3167059	T	2019年7月29日
				TR	201910424	T4	2019年8月21日
				CA	2954706	A1	2016年1月14日
				CA	2954706	C	2023年1月24日
				JP	2017522050	A	2017年8月10日
				JP	6759196	B2	2020年9月23日
				SI	3167059	T1	2019年10月30日
				AU	2021277776	A1	2021年12月23日
				AU	2021277776	B2	2024年8月8日
				ES	2735728	T3	2019年12月20日
				DE	202015010039	U1	2024年7月8日
				DE	202015010020	U1	2023年6月5日
				US	2020392518	A1	2020年12月17日
				US	12054723	B2	2024年8月6日
				EP	3594337	A1	2020年1月15日
				PL	3167059	T3	2019年12月31日
				AU	2015286820	A1	2017年2月23日
				AU	2015286820	A8	2017年3月30日
					2015286820	B2	2021年9月9日
					3167059	T3	2019年8月5日
					3167059	A1	2017年5月17日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/097944

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		EP 3167059 B1	2019年6月26日
		US 2017166905 A1	2017年6月15日
		US 10717982 B2	2020年7月21日
		HUE 046120 T2	2020年2月28日
		DE 202015010019 U1	2023年6月2日
		WO 2016005324 A1	2016年1月14日
		JP 2020188758 A	2020年11月26日
		JP 7144481 B2	2022年9月29日
WO 2022233880 A1	2022年11月10日	CA 3171589 A1	2022年11月3日
		US 2024229075 A1	2024年7月11日
		EP 4334446 A1	2024年3月13日
		CA 3171589 A1	2022年11月3日
		US 2024229075 A1	2024年7月11日
		EP 4334446 A1	2024年3月13日
WO 2020056239 A1	2020年3月19日	EP 3850102 A1	2021年7月21日
		JP 2022500444 A	2022年1月4日
		CA 3112398 A1	2020年3月19日
		US 2022401584 A1	2022年12月22日
		AU 2019339430 A1	2021年4月29日
		MA 53615 A	2021年7月21日
		EP 3850102 A1	2021年7月21日
		JP 2022500444 A	2022年1月4日
		CA 3112398 A1	2020年3月19日
		US 2022401584 A1	2022年12月22日
		AU 2019339430 A1	2021年4月29日
		MA 53615 A	2021年7月21日
CN 111065742 A	2020年4月24日	WO 2018226785 A1	2018年12月13日
		CO 2019014840 A2	2020年1月17日
		AU 2018281145 A1	2020年1月2日
		EA 201992882 A1	2020年5月25日
		BR 112019025732 A2	2020年6月30日
		EP 3635122 A1	2020年4月15日
		EP 3635122 A4	2021年3月31日
		KR 20200015701 A	2020年2月12日
		JP 2023164447 A	2023年11月10日
		JP 2020522269 A	2020年7月30日
		US 2023416779 A1	2023年12月28日
		MX 2019014760 A	2020年8月3日
		CL 2019003582 A1	2020年9月25日
		US 2020181646 A1	2020年6月11日
		US 11680275 B2	2023年6月20日
		IL 271170 A	2020年1月30日
		SG 11201911737 PA	2020年1月30日
		CA 3066623 A1	2019年12月13日
		WO 2018226785 A1	2018年12月13日
		CO 2019014840 A2	2020年1月17日
		AU 2018281145 A1	2020年1月2日
		201992882 A1	2020年5月25日
		112019025732 A2	2020年6月30日
		3635122 A1	2020年4月15日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/097944

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		EP 3635122 A4	2021年3月31日
		KR 20200015701 A	2020年2月12日
		JP 2023164447 A	2023年11月10日
		JP 2020522269 A	2020年7月30日
		US 2023416779 A1	2023年12月28日
		MX 2019014760 A	2020年8月3日
		CL 2019003582 A1	2020年9月25日
		US 2020181646 A1	2020年6月11日
		US 11680275 B2	2023年6月20日
		IL 271170 A	2020年1月30日
		SG 11201911737 PA	2020年1月30日
		CA 3066623 A1	2019年12月13日

CN 115820740 A	2023年3月21日	无	

WO 2023031392 A2	2023年3月9日	WO 2023031392 A3	2023年4月13日
		EP 4395820 A2	2024年7月10日
		CA 3230056 A1	2023年3月9日
		MX 2024002725 A	2024年3月15日
		IL 309502 A	2024年2月1日
		AU 2022336664 A1	2024年1月18日
		WO 2023031392 A3	2023年4月13日
		EP 4395820 A2	2024年7月10日
		CA 3230056 A1	2023年3月9日
		MX 2024002725 A	2024年3月15日
		IL 309502 A	2024年2月1日
		AU 2022336664 A1	2024年1月18日

WO 2022101469 A1	2022年5月19日	CA 3198311 A1	2022年5月19日
		MX 2023005697 A	2023年8月3日
		IL 302770 A	2023年7月1日
		KR 20230109689 A	2023年7月20日
		AU 2021380033 A1	2023年6月15日
		US 2024041785 A1	2024年2月8日
		JP 2023549265 A	2023年11月22日
		EP 4243789 A1	2023年9月20日
		CA 3198311 A1	2022年5月19日
		MX 2023005697 A	2023年8月3日
		IL 302770 A	2023年7月1日
		KR 20230109689 A	2023年7月20日
		AU 2021380033 A1	2023年6月15日
		US 2024041785 A1	2024年2月8日
		JP 2023549265 A	2023年11月22日
		EP 4243789 A1	2023年9月20日

US 2018318229 A1	2018年11月8日	LT 3458474 T	2022年10月10日
		PL 3458474 T3	2022年11月14日
		DK 3458474 T3	2022年9月26日
		HRP 20221135 T1	2022年11月25日
		HRP 20221135 T8	2023年2月3日
		AT 2017266929 A1	2019年1月17日
		2017266929 A8	2019年3月14日
		2017266929 B2	2023年5月11日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/097944

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		US 2019060246 A1	2019年2月28日
		US 10322090 B2	2019年6月18日
		US 2021038529 A1	2021年2月11日
		US 11071716 B2	2021年7月27日
		RS 63625 B1	2022年10月31日
		MA 45035 A	2019年3月27日
		WO 2017201325 A1	2017年11月23日
		WO 2017201325 A8	2018年8月30日
		JP 2019519517 A	2019年7月11日
		JP 7194594 B2	2022年12月22日
		US 2023026381 A1	2023年1月26日
		US 11596609 B2	2023年3月7日
		PT 3458474 T	2022年11月8日
		EP 4137509 A1	2023年2月22日
		US 2019105281 A1	2019年4月11日
		US 10406113 B2	2019年9月10日
		US 11344504 B1	2022年5月31日
		KR 20190020299 A	2019年2月28日
		KR 102482867 B1	2023年1月2日
		US 2019111003 A1	2019年4月18日
		US 10285950 B2	2019年5月14日
		AU 2023210606 A1	2023年8月24日
		KR 20230008243 A	2023年1月13日
		US 2023041964 A1	2023年2月9日
		US 2020113844 A1	2020年4月16日
		US 11185510 B2	2021年11月30日
		HUE 059955 T2	2023年1月28日
		US 2019105280 A1	2019年4月11日
		US 10322091 B2	2019年6月18日
		JP 2023022326 A	2023年2月14日
		US 10172808 B2	2019年1月8日
		SI 3458474 T1	2022年10月28日
		ES 2932516 T3	2023年1月20日
		CA 3024917 A1	2017年11月23日
		EP 3458474 A1	2019年3月27日
		EP 3458474 B1	2022年7月6日
		LT 3458474 T	2022年10月10日
		PL 3458474 T3	2022年11月14日
		DK 3458474 T3	2022年9月26日
		HRP 20221135 T1	2022年11月25日
		HRP 20221135 T8	2023年2月3日
		AU 2017266929 A1	2019年1月17日
		AU 2017266929 A8	2019年3月14日
		AU 2017266929 B2	2023年5月11日
		US 2019060246 A1	2019年2月28日
		US 10322090 B2	2019年6月18日
		US 2021038529 A1	2021年2月11日
		11071716 B2	2021年7月27日
		63625 B1	2022年10月31日
		45035 A	2019年3月27日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/097944

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		WO 2017201325 A1	2017年11月23日
		WO 2017201325 A8	2018年8月30日
		JP 2019519517 A	2019年7月11日
		JP 7194594 B2	2022年12月22日
		US 2023026381 A1	2023年1月26日
		US 11596609 B2	2023年3月7日
		PT 3458474 T	2022年11月8日
		EP 4137509 A1	2023年2月22日
		US 2019105281 A1	2019年4月11日
		US 10406113 B2	2019年9月10日
		US 11344504 B1	2022年5月31日
		KR 20190020299 A	2019年2月28日
		KR 102482867 B1	2023年1月2日
		US 2019111003 A1	2019年4月18日
		US 10285950 B2	2019年5月14日
		AU 2023210606 A1	2023年8月24日
		KR 20230008243 A	2023年1月13日
		US 2023041964 A1	2023年2月9日
		US 2020113844 A1	2020年4月16日
		US 11185510 B2	2021年11月30日
		HUE 059955 T2	2023年1月28日
		US 2019105280 A1	2019年4月11日
		US 10322091 B2	2019年6月18日
		JP 2023022326 A	2023年2月14日
		US 10172808 B2	2019年1月8日
		SI 3458474 T1	2022年10月28日
		ES 2932516 T3	2023年1月20日
		CA 3024917 A1	2017年11月23日
		EP 3458474 A1	2019年3月27日
		EP 3458474 B1	2022年7月6日
WO 2022118226 A1	2022年6月9日	CA 3199996 A1	2022年6月9日
		IL 303315 A	2023年7月1日
		US 2024024455 A1	2024年1月25日
		AU 2021392077 A1	2023年7月13日
		AU 2021392077 A9	2024年5月23日
		JP 2023551982 A	2023年12月13日
		KR 20230120646 A	2023年8月17日
		EP 4255446 A1	2023年10月11日
		CA 3199996 A1	2022年6月9日
		IL 303315 A	2023年7月1日
		US 2024024455 A1	2024年1月25日
		AU 2021392077 A1	2023年7月13日
		AU 2021392077 A9	2024年5月23日
		JP 2023551982 A	2023年12月13日
		KR 20230120646 A	2023年8月17日
		EP 4255446 A1	2023年10月11日
WO 2022266083 A2	2022年12月22日	EP 4355882 A2	2024年4月24日
		2022266083 A3	2023年2月2日
		4355882 A2	2024年4月24日
		2022266083 A3	2023年2月2日