



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202237844 A

(43) 公開日：中華民國 111 (2022) 年 10 月 01 日

(21) 申請案號：110145636 (22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 07 日

(51) Int. Cl. : *C12N15/113 (2010.01)* *C12N15/10 (2006.01)*
A61K31/7115(2006.01) *C12P19/34 (2006.01)*

(30) 優先權：2020/12/09 美國 63/123,465
 2020/12/30 美國 63/132,473

(71) 申請人：德商拜恩技術股份公司 (德國) BIONTECH SE (DE)
 德國

(72) 發明人：齊根哈爾斯 湯瑪士 ZIEGENHALS, THOMAS (DE)；庫恩 安德烈斯 KUHN,
 ANDREAS (DE)；費塞爾 史蒂芬妮 FESSER, STEPHANIE (DE)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：4 共 159 頁

(54) 名稱

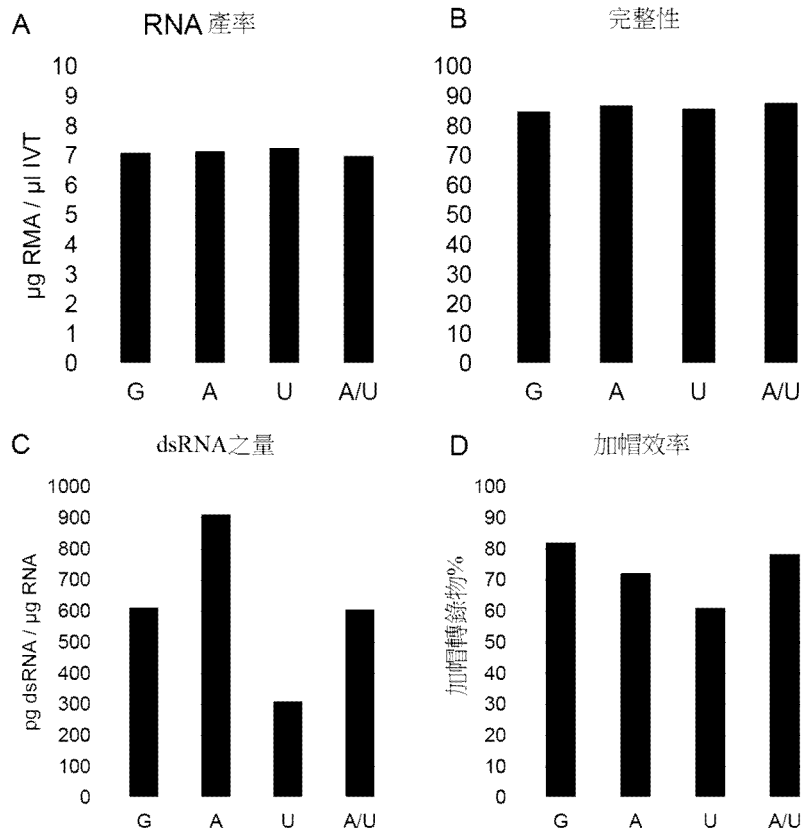
RNA 製造

(57) 摘要

本發明提供用於進行活體外轉錄之技術，該等技術可產生某些污染物(例如異常產物)且特定而言雙股 RNA (dsRNA) 水準降低之產物 RNA 製劑。

The present disclosure provides technologies for performing in vitro transcription that can generate product RNA preparations with reduced levels of certain contaminants (e.g., aberrant products), and particularly of double-stranded RNA (dsRNA).

指定代表圖：



【圖 1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

RNA製造

【英文發明名稱】

RNA MANUFACTURING

【中文】

本發明提供用於進行活體外轉錄之技術，該等技術可產生某些污染物(例如異常產物)且特定而言雙股RNA (dsRNA)水準降低之產物RNA製劑。

【英文】

The present disclosure provides technologies for performing *in vitro* transcription that can generate product RNA preparations with reduced levels of certain contaminants (e.g., aberrant products), and particularly of double-stranded RNA (dsRNA).

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

RNA 製造

【英文發明名稱】

RNA MANUFACTURING

【技術領域】

【0001】 本發明係關於在活體外轉錄期間通過逐步添加核苷酸來減少dsRNA之方法。本發明進一步係關於藉由本發明之方法產生之核酸及此類核酸在治療有需要之個體之方法中的用途。

【先前技術】

【0002】 在生物技術及醫藥行業中，活體外產生RNA已變得日益重要。製造方法(特定而言彼等可大規模產生高品質RNA (例如mRNA)，包括尤其治療級RNA (例如mRNA)之製造方法)之改良為重要的且有價值的。

【發明內容】

【0003】 活體外轉錄(例如藉由T7 RNA聚合酶(RNAP))之RNA可含有異常產物，包括顯著水準之異常產物。不希望受理論限制，認為一些或所有此類產物可藉由所利用之RNAP之非習知活性產生。一種此類異常產物為dsRNA，dsRNA可證實特別有問題，例如考慮到其傾向於誘導炎性細胞介素及/或活化免疫效應蛋白，此尤其可導致蛋白質合成之抑制。dsRNA典型地為活體外RNA轉錄反應之主要污染物。

【0004】 通常，藉由純化將異常產物且尤其dsRNA自活體外轉錄之RNA製劑中移除；多種純化技術為可獲得的(例如經由基於LiCl及/或醇之沈澱、粒徑篩析及/或離子交換層析、二氧化矽基質純化、離子對逆相高

效液相層析[HPLC]、基於纖維素之分離等)。然而，尤其對於商業規模及/或醫藥級製備來說，大多數或所有此類純化策略可能為不切實際的及/或以其他方式不理想，除其他因素外此係因為其常常將所需RNA產物與異常產物(及/或其他污染物)一起移除，從而導致不合期望地過高的RNA產物損失。

【0005】 本發明尤其提供以下深刻見解：令人驚訝地，當藉由轉錄反應合成RNA時限制UTP或其功能類似物之量且在轉錄反應過程中為反應混合物補充UTP或其功能類似物產生純度增加、免疫原性降低且穩定性有利之RNA。

【0006】 此外，本發明提供以下深刻見解：藉由起初減少異常產物(及/或其他污染物)之產生可獲得益處。本發明提供用於進行活體外轉錄之技術，該等技術可產生某些污染物(例如異常產物)且特定而言dsRNA水準降低之產物RNA製劑。所提供之技術的優點包括但不限於製造更高效，包括產物RNA之產率更高(例如在加工期間產物損失更小)、加工步驟更少(此可促使產物損失減小)、生產成本更低、生產時間線更短等。此外，本發明教示所提供之改良之製備技術(例如改良之轉錄反應條件)甚至相對於改良之純化技術亦具有各種優點(包括前述內容)。

【0007】 在一個態樣中，本發明係關於一種產生RNA之方法，該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為反應混合物補充包含UTP或其功能類似物且實質上不含CTP或ATP或其功能類似物

之組合物。

【0008】 在一個態樣中，本發明係關於一種產生RNA之方法，該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中CTP或其功能類似物之起始濃度等於ATP或其功能類似物之起始濃度，且其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為反應混合物補充UTP或其功能類似物。

【0009】 在一個態樣中，本發明係關於一種產生包含具有降低之雙股(ds) RNA含量之RNA的組合物之方法，其中該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為反應混合物補充包含UTP或其功能類似物且實質上不含CTP或ATP或其功能類似物之組合物。

【0010】 在一個態樣中，本發明係關於一種產生包含具有降低之雙股(ds) RNA含量之RNA的組合物之方法，其中該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中CTP或其功能類似物之起始濃度等於ATP或其功能類似物之起始濃度，且其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為反應混合物補充UTP或其功能類似物。

【0011】 在一些實施例中，與包含使用等莫耳量之腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物自相同DNA模板轉錄之RNA的組合物之dsRNA含量相比，該包含RNA之組合物的雙股(ds) RNA含量降低。

【0012】 在一些實施例中，與包含使用等莫耳量之腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物自相同DNA模板轉錄之RNA的組合物之免疫原性相比，該包含RNA之組合物的免疫原性降低。

【0013】 在一些實施例中，尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物以限制轉錄速率之起始濃度存在。

【0014】 在一些實施例中，尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物之起始濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約1:1.5與約1:15之間。

【0015】 在一些實施例中，當UTP或其功能類似物之濃度接近耗竭時，為反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【0016】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，為反應混合物補充至少一次尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【0017】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，為反應混合物連續補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【0018】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，為反應混合物週期性補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【0019】 在一些實施例中，為反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物維持或恢復UTP或其功能類似物之濃度與胞苷三磷酸(CTP)

或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之濃度的初始比率。

【0020】 在一些實施例中，為反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，直至轉錄反應結束。

【0021】 在一些實施例中，鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度低於胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度。在一些實施例中，鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物較佳以限制轉錄速率之起始濃度存在。

【0022】 在一些實施例中，鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約1:1.5與約1:15之間。

【0023】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，為反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【0024】 在一些實施例中，當GTP或其功能類似物之濃度接近耗竭時，為反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【0025】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，為反應混合物補充至少一次鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【0026】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，為反應混合物連續補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【0027】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，為反應混合物週期性補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【0028】 在一些實施例中，為反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物維持或恢復GTP或其功能類似物之濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之濃度的初始比率。

【0029】 在一些實施例中，為反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物，直至轉錄反應結束。

【0030】 在一些實施例中，所提供之方法不包括在轉錄反應過程中為轉錄混合物補充胞苷三磷酸(CTP)及/或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物。

【0031】 在一些實施例中，反應混合物包含對應於RNA分子中之第一核苷酸的起始核苷酸。

【0032】 在一些實施例中，起始核苷酸為核苷單磷酸、核苷二磷酸、核苷三磷酸或二核苷三磷酸。

【0033】 在一些實施例中，起始核苷酸為5'帽或5'帽類似物。

【0034】 在一些實施例中，5'帽或5'帽類似物選自由以下組成之群： $G[5']ppp[5']G$ 、 $m_7G[5']ppp[5']G$ 、 $m_3^{2,2,7}G[5']ppp[5']G$ 、 $m_2^{7,3'}-^OG[5']ppp[5']G$ (3'-ARCA)、 $m_2^{7,2'}-^OGpppG$ (2'-ARCA)、 $m_2^{7,2'}-^OGppspG$ D1 (β -S-ARCA D1)、 $m_2^{7,2'}-^OGppspG$ D2 (β -S-ARCA D2)及 $m_2^{7,3'}-^OGppp(m_2'-O)ApG$ (CC413)。

【0035】 在一些實施例中，反應混合物中之5'帽或5'帽類似物與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物相比以過量存在。

【0036】 在一些實施例中，5'帽或5'帽類似物之起始濃度與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約2:1與約20:1之間。

【0037】 在一些實施例中，5'帽或5'帽類似物之起始濃度與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度的比率為約4:1。

【0038】 在一些實施例中，反應混合物進一步包含RNA聚合酶、緩衝劑及至少一種單價或二價陽離子。

【0039】 在一些實施例中，陽離子為 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、三(羥甲基)胺基甲烷陽離子、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Mn^{2+} 。

【0040】 在一些實施例中，RNA聚合酶選自由以下組成之群：T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶及SP6 RNA聚合酶。

【0041】 在一些實施例中，尿苷三磷酸(UTP)之功能類似物選自由以下組成之群：假UTP、N1-甲基假UTP、2-硫代-UTP及4-硫代-UTP。

【0042】 在一些實施例中，鳥苷三磷酸(GTP)之功能類似物選自由以下組成之群：7-去氫-GTP、N1-甲基-GTP及O6-甲基-GTP。

【0043】 在一些實施例中，DNA模板編碼以下中之一或多者：5'非轉譯區(UTR)、3' UTR、開放閱讀框及聚(A)尾。

【0044】 在一些實施例中，RNA包含以下中之一或多者：5'非轉譯區(UTR)、3' UTR、開放閱讀框及聚(A)尾。

【0045】 在一些實施例中，RNA編碼至少一種肽或蛋白質。

【0046】 在一些實施例中，RNA為mRNA。

【0047】 在一些實施例中，RNA為自我複製RNA。

【0048】 在一些實施例中，藉由本發明之方法產生之RNA具有200至20000個核苷酸之間、200至12000個核苷酸之間、200至8000個核苷酸之間、500至5000個核苷酸之間、500至2500個核苷酸之間，特定而言600至2500個核苷酸之間或800至2000個核苷酸之間的長度。

【0049】 在一些實施例中，在轉錄反應過程中，反應混合物之pH值保持實質上恆定。

【0050】 在一些實施例中，實時監測轉錄反應之進展。

【0051】 在一些實施例中，使用生物反應器進行該方法。

【0052】 在一個態樣中，本發明係關於一種藉由本發明之方法產生之RNA。

【0053】 在一個態樣中，本發明係關於一種包含藉由本發明之方法產生之RNA的組合物。

【0054】 在一個態樣中，本發明係關於一種治療個體之方法，該方法包括以下步驟：(i)獲得藉由本發明之方法產生之RNA，或獲得包含藉由本發明之方法產生之RNA的組合物，及(ii)向個體投與RNA或包含RNA之組合物。

【0055】 在一個態樣中，本發明係關於一種藉由活體外轉錄產生RNA之方法，其中該方法包括在活體外轉錄反應期間限制UTP或其功能類似物之濃度。

【0056】 在一個態樣中，本發明係關於一種活體外轉錄反應，該活體外轉錄反應包括：RNA模板，該RNA模板包含引導模板轉錄以產生視情況具有聚A序列元件之轉錄物的啟動子；RNA聚合酶，該RNA聚合酶作用於啟動子；及腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之濃度。

【0057】 在一個態樣中，本發明係關於一種藉由向個體投與藉由本發明之方法產生之RNA或包含藉由本發明之方法產生之RNA的組合物來治療個體之方法。

【0058】 在一個態樣中，本發明係關於一種用於減少由RNA之活體外轉錄產生之雙股RNA之量的方法，該方法包括在轉錄條件下自模板活體外轉錄RNA，在該等轉錄條件中與ATP、CTP及/或GTP或其相應類似

物中之一或多者之量或濃度相比，UTP或其功能類似物之量或濃度為限制RNA轉錄之量或濃度。

【0059】 在一個態樣中，本發明係關於一種用於減少包含由RNA之活體外轉錄產生之RNA之組合物中的雙股RNA之量的方法，該方法包括在轉錄條件下自模板活體外轉錄RNA，在該等轉錄條件中與ATP、CTP及/或GTP或其相應類似物中之一或多者之量或濃度相比，UTP或其功能類似物之量或濃度為限制RNA轉錄之量或濃度。

【0060】 在一個態樣中，本發明係關於一種用於降低包含由RNA之活體外轉錄產生之RNA之組合物之免疫原性的方法，該方法包括在轉錄條件下自模板活體外轉錄RNA，在該等轉錄條件中與ATP、CTP及/或GTP或其相應類似物中之一或多者之量或濃度相比，UTP或其功能類似物之量或濃度為限制RNA轉錄之量或濃度。

【0061】 在一實施例中，雙股RNA為至少兩個獨特RNA分子彼此退火之結果，亦即，分子間鍵結之結果。在一實施例中，雙股RNA為分子內鍵結之結果，亦即，RNA分子之一部分退火至自身，例如在轉錄物摺疊回自身之情況中。

【圖式簡單說明】

【0062】

圖1展示由在逐步添加NTP之情況下轉錄未經修飾之RNA的IVT反應產生之dsRNA含量的示例性結果。使用起始濃度降低(限制)之所指示之NTP活體外轉錄RNA。G-GTP、A-ATP、U-UTP、A/U-ATP+UTP。向IVT反應中逐步饋送限制之NTP，直至所有NTP均達至最終濃度NTP。使用CC413帽類似物為所有RNA共轉錄加帽。作為對照，使用限制GTP。

A. 與對照相比，RNA產率未受反應過程中所饋送之NTP類型的影響。**B.** 與對照相比，RNA完整性未受反應過程中所饋送之NTP類型的影響。**C.** 與對照相比，當饋送ATP時，dsRNA含量增加，而當饋送UTP時降低。饋送ATP與UTP兩者消除彼此之影響，從而使得dsRNA含量類似於對照(饋送GTP)。**D.** 與對照相比，當不饋送GTP時加帽效率降低。

圖2展示在逐步添加UTP或GTP及UTP之情況下由未經修飾之RNA的IVT反應產生之dsRNA含量的示例性結果，逐步添加UTP或GTP及UTP拯救加帽效率。使用起始濃度降低(限制)之所指示NTP之活體外轉錄RNA。G-GTP、U-UTP、G/U-GTP+UTP。向IVT反應中逐步饋送限制之NTP，直至所有NTP均達至最終濃度NTP。作為對照，使用限制GTP。使用D1-β-S1 ARCA帽類似物為所有RNA共轉錄加帽。**A.** 當在此等反應條件下饋送UTP或UTP與GTP的組合時，與對照相比RNA產率增加。**B.** 當饋送UTP或GTP及UTP時，經純化之RNA的完整性降低。當GTP與UTP組合饋送時將RNA完整性拯救至為IVT反應饋送GTP(對照)時之水準。**C.** 與饋送GTP之對照相比，dsRNA含量因饋送UTP而降低。饋送GTP與UTP兩者同樣使dsRNA含量降低，但程度低於單獨饋送之UTP。**D.** 當單獨饋送UTP時與對照相比加帽效率降低，但藉由饋送GTP與UTP的組合得到拯救。

圖3展示由在逐步添加m1ΨTP或m1ψTP及GTP之情況下轉錄含N1-甲基假尿苷(m1ΨTP)之RNA的IVT反應產生之dsRNA含量的示例性結果。使用起始濃度降低(限制)之所指示之NTP活體外轉錄RNA。G - GTP、m1Ψ - m1ΨTP、G/m1Ψ -GTP+ m1ΨTP。向IVT反應中逐步饋送限制之NTP，直至所有NTP均達至最終濃度NTP。作為對照，使用限制GTP。使用CC413 GAG帽類似物為所有RNA共轉錄加帽。**A.** 與對照相比，RNA產率

未受反應過程中所饋送之NTP類型的影響。**B.** 當饋送m1ΨTP時，與對照相比RNA完整性降低。當將GTP及m1YTP組合饋送時，將RNA完整性拯救至饋送GTP之對照的水準。**C.** 與標準饋送GTP之對照相比，dsRNA含量因饋送m1ΨTP而降低。饋送GTP與m1ΨTP兩者與僅饋送m1ΨTP之反應類似地降低dsRNA含量。**D.** 當饋送m1ΨTP時，與對照相比加帽效率降低，但藉由饋送GTP與m1ΨTP兩者得到拯救。

圖4展示使用圓二色性得到之RNA產物之更高級結構的示例性結果。

【實施方式】

某些定義

【0063】 本文所用之某些術語可理解為如「A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)」, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel及H. Kölbl編, Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995)中所描述來定義。

【0064】 另外，以通用術語表徵之組分的相對量典型地意指由該通用術語涵蓋之所有特定變異體或成員的總量。若由通用術語定義之某一組分指定為以某一相對量存在，且若此組分進一步表徵為由通用術語涵蓋之特定變異體或成員，則意謂不額外存在由通用術語涵蓋之其他變異體或成員以致於由通用術語涵蓋之組分的總相對量超過指定之相對量；更佳根本不存在由通用術語涵蓋之其他變異體或成員。

【0065】 **一個(或種)**：除非本文另外指出或上下文明顯矛盾，否則描述本發明之上下文中(尤其申請專利範圍之上下文中)所用之術語「一個」及「一種」及「該」及類似參考物應理解為涵蓋單數與複數兩者。本文中敘述值範圍僅僅旨在充當個別提及屬於該範圍內之各單獨值之簡寫方

法。除非本文中另外指出，否則各個別值併入本說明書中，如同其在本文中被個別敘述一般。除非本文另外指出或以其他方式上下文明顯矛盾，否則本文所描述之所有方法均可以任何適合之順序進行。使用本文所提供之任何及所有實例或示例性措辭(例如「諸如」)僅指在更好地說明本發明且不對另外主張之本發明範圍構成限制。本說明書中之措辭不應被視為指示任何未主張之元素為實踐本發明所必需的。

【0066】 約或大致：術語「約」或「大致」當在本文中關於一值使用時，係指背景類似於所陳述之參考值的值。一般而言，熟悉背景之熟習此項技術者將瞭解在該背景下由「約」或「大致」涵蓋之相關程度之偏差。熟習此項技術者將瞭解，在許多實施例中(如由上下文將理解)，術語「約」意指大致或接近，且在本文所闡述之數值或範圍之上下文中較佳意指數值或範圍 $\pm 10\%$ 。舉例而言，在一些實施例中，術語「約」或「大致」可涵蓋在所提及之值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小範圍內的值範圍。

【0067】 投與：如本文所用，術語「投與」典型地係指向個體或系統投與組合物。一般熟習此項技術者將知道在適當情況下可用於向個體(例如人類)投與之多種途徑。舉例而言，在一些實施例中，投與可為經眼、經口、非經腸、經表面等。在一些特定實施例中，投與可為經支氣管(例如藉由支氣管滴注)、經頰、經皮膚(其可為或包含例如表面至真皮、真皮內、真皮內、經真皮等中之一或多者)、經腸、動脈內、真皮內、胃內、髓內、肌肉內、鼻內、腹膜內、鞘內、靜脈內、心室內、特定器官內(例如肝內)、經黏膜、經鼻、經口、經直腸、皮下、舌下、經表面、經氣

管(例如藉由氣管內滴注)、經陰道、經玻璃體等。在一些實施例中，投與可為肌肉內的。在一些實施例中，投與可涉及為間歇性(例如時間隔開之複數個劑量)及/或週期性(例如相隔常見時間段之個別劑量)給藥之給藥。在一些實施例中，投與可涉及連續給藥(例如灌注)持續至少所選時間段。

【0068】 劑：一般而言，如本文所用，術語「劑」用於指實體(例如脂質、金屬、核酸、多肽、多醣、小分子等，或其複合物、組合、混合物或系統[例如細胞、組織、有機體])，或現象(例如熱量、電流或電場、磁力或磁場等)。在適當情況下，如由上下文熟習此項技術者將清楚，該術語可用於指為或包含細胞或有機體或其部分、萃取物或組分的實體。替代地或另外，如上下文將講明，該術語可用於指天然產物，因為其在自然界中發現及/或從自然界獲得。在一些情況下，再次如由上下文將清楚，該術語可用於指一或多種人造實體，因為其通過人手之作用設計、工程改造及/或製備及/或未在自然界中發現。在一些實施例中，劑可以分離或純形式使用；在一些實施例中，劑可以粗物質形式使用。在一些實施例中，潛在之劑可作為集合或庫提供，例如該等集合或庫可經篩選以鑑定或表徵其中之活性劑。在一些情況下，術語「劑」可指為或包含聚合物之化合物或實體；在一些情況下，該術語可指包含一或多個聚合部分之化合物或實體。在一些實施例中，術語「劑」可指不為聚合物及/或實質上不含任何聚合物及/或一或多個特定聚合部分之化合物或實體。在一些實施例中，該術語可指缺乏或實質上不含任何聚合部分之化合物或實體。

【0069】 類似物：如本文所用，術語「類似物」係指與參考物質共享一或多個特定結構特徵、元件、組分或部分之物質。典型地，「類似物」顯示與參考物質之顯著結構相似性，例如共享核心或共同結構，但亦

在某些各別方面不同。在一些實施例中，類似物為可例如藉由對參考物質之化學操縱自參考物質產生之物質。在一些實施例中，類似物為可通過執行與產生參考物質之合成製程實質上類似(例如共享複數個步驟)之合成製程產生的物質。在一些實施例中，類似物係通過執行不同於為產生參考物質所用之合成製程的合成製程產生或可通過執行不同於為產生參考物質所用之合成製程的合成製程產生。

【0070】 抗體劑：如本文所用，術語「抗體劑」係指特異性結合於特定抗原之劑。在一些實施例中，該術語涵蓋包括足以賦予特異性結合之免疫球蛋白結構元件之任何多肽或多肽複合物。示例性抗體劑包括但不限於單株抗體或多株抗體。在一些實施例中，抗體劑可包括作為小鼠、兔、靈長類動物或人類抗體之特徵的一或多個恆定區序列。在一些實施例中，如此項技術中已知的，抗體劑可包括經人類化、靈長類化、嵌合等之一或多個序列元件。在許多實施例中，術語「抗體劑」用於指此項技術中已知或開發之在替代陳述中用於利用抗體結構及功能特徵的構築體或模式中之一或多者。舉例而言，在實施例中，根據本發明使用之抗體劑呈選自但不限於以下之模式：完整IgA、IgG、IgE或IgM抗體；雙特異性或多特異性抗體(例如Zybodies®等)；抗體片段，諸如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd'片段、Fd片段及經分離之互補決定區(CDR)或其集合；單鏈Fv；多肽-Fc融合物；單域抗體(例如鯊魚單域抗體，諸如IgNAR或其片段)；駱駝抗體；掩蔽抗體(例如Probodies®)；小模組免疫藥物(「SMIPs™」)；單鏈或串聯雙抗體(TandAb®)；VHHs；Anticalins®；Nanobodies®微型抗體；BiTE®；錨蛋白重複蛋白或DARPINs®；Avimers®；DARTs；TCR樣抗體；Adnectins®；Affilins®；Trans-

bodies®；Affibodies®；TrimerX®；微量蛋白；Fynomers®、Centyrins®；及KALBITOR®。在一些實施例中，抗體可缺乏其若天然產生將會有之共價修飾(例如連接聚醣)。在一些實施例中，抗體可含有共價修飾(例如連接聚醣、有效負荷[例如可偵測部分、治療部分、催化部分等]或其他側基[例如聚乙二醇等])。在許多實施例中，抗體劑為或包含多肽，其胺基酸序列包括由熟習此項技術者識別為互補決定區(CDR)之一或多個結構元件；在一些實施例中，抗體劑為或包含多肽，其胺基酸序列包括與參考抗體中所發現之CDR實質上一致之至少一個CDR(例如至少一個重鏈CDR及/或至少一個輕鏈CDR)。在一些實施例中，所包括之CDR與參考CDR實質上一致，因為其與參考CDR相比在序列上一致或含有1-5個胺基酸取代。在一些實施例中，所包括之CDR與參考CDR實質上一致，因為其顯示與參考CDR之至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一些實施例中，所包括之CDR與參考CDR實質上一致，因為其顯示與參考CDR之至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一些實施例中，所包括之CDR與參考CDR實質上一致，因為與參考CDR相比，所包括之CDR內至少一個胺基酸為缺失、添加或取代的，但所包括之CDR之胺基酸序列以其他方式與參考CDR一致。在一些實施例中，所包括之CDR與參考CDR實質上一致，因為與參考CDR相比所包括之CDR內1-5個胺基酸為缺失、添加或取代的，但所包括之CDR之胺基酸序列以其他方式與參考CDR一致。在一些實施例中，所包括之CDR與參考CDR實質上一致，因為與參考CDR相比，所包括之CDR內至少一個胺基酸為取代的，但所包括之CDR之胺基酸序列以其他方式與參考CDR

一致。在一些實施例中，所包括之CDR與參考CDR實質上一致，因為與參考CDR相比，所包括之CDR內1-5個胺基酸為缺失、添加或取代的，但所包括之CDR之胺基酸序列以其他方式與參考CDR一致。在一些實施例中，抗體劑為或包含多肽，其胺基酸序列包括由熟習此項技術者識別為免疫球蛋白可變結構域之結構元件。在一些實施例中，抗體劑為具有結合結構域之多肽蛋白質，該結合結構域與免疫球蛋白結合結構域同源或大部分同源。

【0071】 抗體劑可由熟練人員使用此項技術中已知之方法及市售服務及套組來製備。舉例而言，單株抗體之製備方法為此項技術中熟知的且包括雜交瘤技術及噬菌體展示技術。適合用於本發明中之其他抗體描述於例如以下出版物中：Antibodies A Laboratory Manual, 第二版. Edward A. Greenfield. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2013年9月30日)；Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, 第二版. Gary C. Howard及Matthew R. Kaser.編 CRC Press (2013年7月29日)；Antibody Engineering: Methods and Protocols, 第二版(Methods in Molecular Biology). Patrick Chames. Humana Press (2012年8月21日)；Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). Vincent Ossipow及Nicolas Fischer.編 Humana Press (2014年2月12日)；及Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). Michael Steinitz. Humana Press (2013年9月30日)。

【0072】 抗體可藉由標準技術產生，例如藉由用適當多肽或其部分免疫，或藉由使用噬菌體展示文庫。若需要多株抗體，則將所選哺乳動物(例如小鼠、兔、山羊、馬等)用帶有所需抗原決定基之免疫原性多肽免

疫，該免疫原性多肽視情況半抗原化至另一多肽。視宿主物種而定，可使用各種佐劑來增加免疫反應。此類佐劑包括但不限於弗氏佐劑 (Freund's)；礦物凝膠，諸如氫氧化鋁；及表面活性物質，諸如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇(pluronic polyol)、聚陰離子、肽、油乳液、鑰孔戚血藍素及二硝基酚。收集經免疫動物之血清且根據已知程序進行處理。若含有針對所需抗原決定基之多株抗體的血清含有針對其他抗原之抗體，則可藉由免疫親和層析或此項技術中已知之任何其他方法來純化多株抗體。用於產生及加工多株抗血清之技術為此項技術中熟知的。

【0073】 抗原：如本文所用，術語「抗原」係指引發免疫反應之劑；及/或(ii)結合至T細胞受體(例如當由MHC分子呈遞時)或結合至抗體之劑。在一些實施例中，抗原引發體液反應(例如包括產生抗原特異性抗體)；在一些實施例中，抗原引發細胞反應(例如涉及受體特異性地與抗原相互作用之T細胞)。在一些實施例中，抗原結合至抗體且可能誘導或可能不誘導有機體中之特定生理反應。一般而言，抗原可為或包括任何化學實體，諸如小分子、核酸、多肽、碳水化合物、脂質、聚合物(在一些實施例中，除了生物聚合物[例如除了核酸或胺基酸聚合物)等。在一些實施例中，抗原為或包含多肽。在一些實施例中，抗原為或包含聚醣。一般熟習此項技術者將瞭解，一般而言，抗原可以分離或純形式提供，或者可以粗物質形式提供(例如與其他材料一起，例如在諸如細胞萃取物之萃取物或其他相對粗之含抗原來源之製劑中)。在一些實施例中，根據本發明使用之抗原以粗物質形式提供。在一些實施例中，抗原為重組抗原。

【0074】 自體：術語「自體」用於描述源自於相同個體之任何東西。舉例而言，「自體細胞」係指源自於相同個體之細胞。將自體細胞引

入個體中為有利的，因為此等細胞會克服以其他方式產生排斥之免疫障壁。

【0075】 **同種異體**：術語「同種異體」用於描述源自於相同物種之不同個體的任何東西。兩個或更多個個體當在一或多個基因座處之基因不一致時被認為彼此同種異體。

【0076】 **鹼基對**：如此項技術中所瞭解，「鹼基對」為二級結構之結構基元，其中兩個核苷酸鹼基通過鹼基上供給位點與接受位點之間的氫鍵彼此締合。互補鹼基A:U及G:C應理解為能夠通過鹼基上供給位點與接受位點之間的氫鍵形成穩定鹼基對；A:U及G:C鹼基對稱為沃森-克裡克鹼基對(Watson-Crick base pair)。較弱鹼基對(稱為搖擺鹼基對)由鹼基G及U形成(G:U)。鹼基對A:U及G:C可稱為「規範」鹼基對。其他鹼基對，諸如G:U (其在RNA中極常出現)及其他相對不常見之鹼基對(例如A:C；U:U)可稱為非規範鹼基對。

【0077】 **批次**：如本文所用，術語「批次」或「批次反應」或類似術語係指至少一種組分之至少一次各別補充事件(例如在一些實施例中)，特定而言UTP或其類似物至少一次，視情況其他組分至少一次，視情況在同一各別補充事件中補充多種組分。

【0078】 **結合**：應瞭解，如本文所用，術語「結合」典型地係指兩個實體之間或更多個實體間之非共價締合。「直接」結合涉及實體或部分之間的物理接觸；間接結合涉及通過與一或多個中間實體物理接觸進行之物理相互作用。兩個或更多個實體之間的結合可典型地在多種背景中之任一者中進行評估，包括其中單獨地或在更複雜之系統背景下(例如在與載劑實體共價或以其他方式締合之同時及/或於生物系統或細胞中)研究相互

作用之實體或部分。

【0079】 生物反應器：如本文所用之術語「生物反應器」係指用於本文所描述之活體外轉錄的容器。生物反應器可具有任何尺寸，只要其適用於活體外轉錄即可。舉例而言，在一些實施例中，生物反應器可為至少0.5公升，包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50公升或更大，或其間任何體積。典型地在活體外轉錄期間控制生物反應器之內部條件，包括但不限於pH值及溫度。生物反應器可由適合於在如本文所描述之條件下進行活體外轉錄之任何材料組成，包括玻璃、塑膠或金屬。一般熟習此項技術者將知道且將能夠選擇適合用於實踐活體外轉錄之生物反應器體積。

【0080】 帽：如本文所用，術語「帽」係指包含典型地連接至未加帽RNA（例如具有5'-二磷酸之未加帽RNA）之5'端的核苷-5'-三磷酸或基本上其組成之結構。在一些實施例中，帽為或包含鳥嘌呤核苷酸。在一些實施例中，帽為或包含天然存在之RNA 5'帽，包括例如但不限於N7-甲基鳥苷帽，其具有指定為「m7G」之結構。在一些實施例中，帽為或包含合成帽類似物，其類似於RNA帽結構且若與RNA連接則具有穩定RNA之能力，包括例如但不限於此項技術中已知之抗反轉帽類似物(ARCA)。熟習此項技術者將瞭解，用於將帽連接至RNA之5'端的方法為此項技術中已知的。舉例而言，在一些實施例中，加帽RNA可藉由用加帽酶系統(包括例如但不限於痘苗加帽酶系統或啤酒酵母加帽酶系統)對具有5'三磷酸基團之RNA或具有5'二磷酸基團之RNA進行活體外加帽來獲得。或者，加帽RNA可藉由DNA模板之活體外轉錄(IVT)來獲得，其中除GTP外，IVT系統亦含有例如如此項技術中已知之帽類似物。帽類似物之非限制性實例包

括m⁷GpppG帽類似物或N⁷-甲基-GpppG ARCA帽類似物、2'-O-甲基-GpppG ARCA帽類似物或N⁷-甲基-GpppG ARCA帽類似物、3'-O-甲基-GpppG ARCA帽類似物或任何市售帽類似物，包括例如CleanCap (Trilink)、EZ帽等。在一些實施例中，帽類似物為或包含三核苷酸帽類似物。各種帽類似物描述於本文中且為此項技術中已知的，例如市售帽類似物。

【0081】 密碼子：如此項技術中所瞭解，術語「密碼子」係指編碼核酸中指定在蛋白質合成期間在核糖體處接下來將添加哪個胺基酸的鹼基三聯體。

【0082】 類似：如本文所用，術語「類似」係指兩種或更多種劑、實體、情況、條件集合等可能彼此不相同但足夠相似從而容許其之間進行比較，使得熟習此項技術者將理解可基於所觀測之差異或相似性合理地得出結論。在一些實施例中，類似條件集合、情況、個體或群體之特徵為複數個實質上相同之特徵及一個或少量改變之特徵。一般熟習此項技術者將瞭解在上下文中在任何給定情況下兩種或更多種此類劑、實體、情況、條件集合等要被視為類似的需要什麼程度之一致性。舉例而言，一般熟習此項技術者將瞭解，情況集合、個體或群體當以充足數目及類型之實質上一致之特徵為特徵時為彼此類似的，從而得出以下合理結論：在不同情況集合、個體或群體下或使用不同情況集合、個體或群體獲得之結果或觀測之現象的差異由發生改變之彼等特徵之變化引起或指示發生改變之彼等特徵之變化。

【0083】 互補：如本文所用，在提及根據鹼基配對規則相關之寡核苷酸雜交時使用術語「互補」。舉例而言，序列「C-A-G-T」與序列「G-

T-C-A」互補。互補可為部分或總體互補。因此，任何程度之部分互補旨在包括在術語「互補」範圍內，前提條件為該部分互補容許寡核苷酸雜交。部分互補為根據鹼基配對規則其中一或多個核酸鹼基不匹配。核酸之間總體或完全互補為根據鹼基配對規則其中每一個核酸鹼基均與另一鹼基相匹配。如此項技術中所瞭解，互補百分比指示核酸分子中可與第二核酸序列形成氫鍵(例如沃森-克里克鹼基配對)之連續殘基的百分比(例如10個中有5、6、7、8、9、10個為50%、60%、70%、80%、90%及100%互補)。「完美互補」或「完全互補」意謂核酸序列之所有連續殘基將與第二核酸序列中相同數目之連續殘基氫鍵結。在許多實施例中，根據本發明之互補程度為至少70%、較佳至少75%、較佳至少80%、更佳至少85%、甚至更佳至少90%或最佳至少95%、96%、97%、98%或99%。在某些實施例中，根據本發明之互補程度為100%。

【0084】 包含：除非另外明確規定，否則術語「包含」在本文檔之上下文中用於表明除藉由「包含」介紹之列表的成員外可視情況存在其他成員。然而，將術語「包含」涵蓋不存在其他成員之可能性考慮為本發明之特定實施例，亦即出於此實施例之目的，「包含」應理解為具有「由.....組成」之含義。

【0085】 降低、減少、抑制：如此項技術中所瞭解，諸如「降低」、「減少」或「抑制」之術語在本文中可用於指引起例如實體、事件、頻率、活性等之總體及/或相對降低的能力。在一些實施例中，降低例如可為5%或更大、10%或更大、20%或更大、25%或更大、30%或更大、35%或更大、40%或更大、45%或更大，在一些實施例中為50%或更大、60%或更大、70%或更大，且在一些實施例中為75%或更大。在一些實施

例中，降低可為2倍或更大、3倍或更大、4倍或更大、5倍或更大、6倍或更大、7倍或更大、8倍或更大、9倍或更大、10倍或更大、15倍或更大、20倍或更大、25倍或更大、30倍或更大、40倍或更大、50倍或更大、100倍或更大等。在一些實施例中，相對於適當參考物來評估降低。在一些實施例中，抑制可為完全或「基本上」完全抑制，例如達至不可偵測之水準，例如達至零或基本上達至零。

【0086】 衍生物：如本文所用，術語「衍生物」係指參考物質之結構類似物。換句話說，「衍生物」為顯示與參考物質之顯著結構相似性(例如共享核心或共同結構)但在某些各別方面亦不同的物質。在一些實施例中，衍生物為可藉由化學操縱由參考物質產生之物質。在一些實施例中，衍生物為可通過執行與產生參考物質之合成製程實質上類似(例如與其共享複數個步驟)之合成製程產生的物質。舉例而言，在一些實施例中，核酸殘基之「衍生物」可為或包含核苷酸鹼基上、糖上或磷酸上之差異。在一些實施例中，核酸之「衍生物」可為含有非天然存在之一或多個核苷酸及/或核苷酸類似物的核酸。在一些實施例中，核酸之衍生物比缺乏相關衍生化之類似核酸更穩定。在一些實施例中，術語「衍生物」用於指為關於特定參考序列之變異體的核酸序列；在一些此類實施例中，此類衍生(亦即變異體)序列例如當其在RNA分子中置換其親本參考序列時相對於此類親本參考序列顯示類似或改良之穩定性及/或轉譯效率。

【0087】 偵測：術語「偵測」在本文中廣義上用於包括測定相關實體存在或不存在之適當手段或樣品中之相關實體的任何量測形式。因此，「偵測」可包括測定、量測、評估或分析相關實體之存在或不存在、水準、量及/或位置。包括定量及定性測定、量測或評估，包括半定量。此

類測定、量測或評估可為相對的，例如當相對於對照參考物對相關實體進行偵測時；或為絕對的。因而，術語「定量」當用於定量相關實體之背景中時可指絕對或相對定量。絕對定量可藉由使相關實體之偵測水準與已知對照標準物相關聯(例如通過產生標準曲線)來實現。或者，相對定量可藉由比較兩種或更多種不同相關實體之間的偵測水準或量以提供兩種或更多種不同相關實體中之每一者的相對定量(亦即相對於彼此)來實現。

【0088】 測定：讀了本說明書，一般熟習此項技術者將瞭解，「測定」步驟可使用熟習此項技術者可獲得之多種技術中之任一者(包括例如本文明確提及之特定技術)或通過使用熟習此項技術者可獲得之多種技術中之任一者(包括例如本文明確提及之特定技術)來實現。在一些實施例中，測定涉及對物理樣品之操縱。在一些實施例中，測定涉及考慮及/或例如使用電腦或適合於進行相關分析之其他處理單元操縱資料或資訊。在一些實施例中，測定涉及自來源接收相關資訊及/或材料。在一些實施例中，測定涉及比較樣品或實體與類似參考物之一或多個特徵。

【0089】 劑型或單位劑型：熟習此項技術者將瞭解，術語「劑型」可用於指用於向個體投與之活性劑(例如治療劑或診斷劑)之物理各別單元。典型地，各此類單元含有預定量之活性劑。在一些實施例中，此類量為適合根據已確定當向相關群體投與(亦即，使用治療性給藥方案)時與所需或有益結果有關之給藥方案投與的單位劑量(或其整個部分)。一般熟習此項技術者瞭解，向特定個體投與之治療組合物或藥劑之總量由一或多個主治醫師確定且可涉及投與多個劑型。

【0090】 囊封：術語「囊封(encapsulate/encapsulation)」在本文中用於指組分之至少一部分由組合物中之另一材料或另一組分封閉或包圍。

在一些實施例中，組分可完全由組合物中之另一材料或另一組分封閉或包圍。

【0091】 賦形劑：如本文所用，術語「賦形劑」係指可包括於醫藥組合物中例如用於提供或促成所需特性或作用(例如所需堅實度、遞送及/或穩定化作用等)之非治療劑。在一些實施例中，術語「賦形劑」旨在表示可存在於醫藥組合物中且不為活性成分之物質，諸如載劑、結合劑、潤滑劑、增稠劑、表面活性劑、防腐劑、乳化劑、緩衝劑、調味劑或著色劑。在一些實施例中，適合添加至LNP組合物中之醫藥賦形劑可包括例如鹽、澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、氯化鈉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇及類似物。

【0092】 編碼：如本文所用，術語「編碼(encode/encoding)」係指第一分子之序列資訊引導產生具有確定核苷酸序列(例如mRNA)或確定胺基酸序列之第二分子。舉例而言，DNA分子可編碼RNA分子(例如藉由包括DNA依賴性RNA聚合酶之轉錄過程)。RNA分子可編碼多肽(例如藉由轉譯過程)。因此，若對應於基因之mRNA的轉錄及轉譯在細胞或其他生物系統中產生多肽，則基因、cDNA或單股RNA (例如mRNA)編碼多肽。在一些實施例中，編碼目標多肽劑之單股RNA之編碼區係指編碼股，其核苷酸序列與此類目標多肽劑之mRNA序列一致。在一些實施例中，編碼目標多肽劑之單股RNA之編碼區係指此類目標多肽劑之非編碼股，其可用作用於轉錄基因或cDNA之模板。如此項技術中所瞭解，片語「編碼肽或蛋白質之核酸」意謂核酸若存在於適當環境中(例如細胞內及/或無細胞轉譯系統中)，則可引導胺基酸之組裝從而經由轉譯過程產生肽或蛋白質。在一些實施例中，編碼能夠與細胞轉譯機制相互作用，從而允許此類

編碼RNA轉譯產生所編碼之肽或蛋白質。

【0093】 **內源性**：如本文所用「內源性」係指材料來自在其中被發現之有機體、細胞、組織或系統或在其內部產生。

【0094】 **外源性**：如本文所用，術語「外源性」係指材料引入其所定位之有機體、細胞、組織或系統中或在其外部產生。

【0095】 **表現**：如此項技術中所瞭解，術語「表現」用於指產生模板核酸(典型地RNA模板)及/或由其編碼之多肽。因此，在一些實施例中，該術語可用於指產生RNA、產生多肽、產生RNA及多肽；替代地或另外，在一些實施例中，其可指包含核酸之部分表現。此外，表現可為瞬時或穩定或連續的。如本文所用，核酸序列之「表現」係指以下事件中之一或多者：(1)自DNA序列產生RNA模板(例如藉由轉錄)；(2)加工RNA轉錄物(例如藉由剪接、編輯、5'帽形成及/或3'端形成)；(3)將RNA轉譯為多肽或蛋白質；及/或(4)多肽或蛋白質之轉譯後修飾。熟習此項技術者將瞭解，術語「表現」或「轉譯」，當應用於RNA時，典型地指使核糖體(例如細胞中)讀取編碼RNA (例如信使RNA)之股且引導胺基酸序列之組裝從而形成所編碼之肽或蛋白質的過程。

【0096】 **表現控制序列**：如熟習此項技術者閱讀本發明後將瞭解，如本文所用，術語「表現對照序列」係指其存在及/或身份影響另一序列之一或多個表現特徵的序列元件。表現控制序列常常為核酸序列元件，且其常常順式地起作用。因此，在一些實施例中，表現控制序列可為例如啟動子、增強子、抑制元件、成環位點、終止位點、核糖體結合序列、轉譯暫停信號及/或另一控制元件，其例如可控制或調控基因之轉錄及/或轉錄RNA之轉譯。在本發明之特定實施例中，表現控制序列可經調控。存在

於特定可表現構築體中及/或以其他方式與特定可表現構築體相關之表現控制序列的精確結構可例如視相關表現機制之種類或細胞類型(例如RNA聚合酶、剪接體、核糖體等)而改變，但在許多實施例中可包括起始轉錄及轉譯時分別涉及之5'-未轉錄及5'-未翻譯及3'-未翻譯序列。更特定而言，在一些實施例中，5'-未轉錄表現控制序列可包括啟動子區，其涵蓋用於功能上鍵聯之基因的轉錄控制之啟動子序列。在一些實施例中，表現控制序列亦可包括增強子序列或上游活化子序列。在許多實施例中，DNA分子之表現控制序列可包括5'-未轉錄及5'-未翻譯及3'-未翻譯序列，諸如TATA盒、加帽序列、CAAT序列及類似序列。

【0097】 分批饋料方法：如本文所用之術語「分批饋料方法」係指在反應開始後之某一時間將一或多種組分引入容器(例如生物反應器)中的方法。在一些實施例中，藉由分批饋料方法引入一或多種組分以維持其在反應期間之低濃度。在一些實施例中，藉由分批饋料方法引入一或多種組分以補充在反應期間耗竭之組分。

【0098】 五端引發非轉譯區：如本文所用，術語「五端引發非轉譯區」或「5' UTR」係指在轉錄起始位點處開始且在RNA編碼區之起始密碼子(通常為AUG)前一個核苷酸(nt)處結束之mRNA分子序列。

【0099】 片段：關於核酸序列之「片段」係關於核酸序列之一部分，例如表示小於衍生出片段之親本序列的序列，例如在5'端及/或3'端縮短及/或藉由移除一或多個內部殘基得到之核酸序列。在一些實施例中，核酸序列之片段包含至少80%，或在一些實施例中為至少90%、95%、96%、97%、98%或99%之來自此類親本核酸序列之對應核苷酸殘基。在許多實施例中，片段保留其親本序列之一或多種特性或特徵。舉例而言，

在一些實施例中，可轉譯RNA之片段之特徵為穩定性及/或轉譯效率至少合理地類似於其親本。在一些實施例中，將核酸序列表示融合在一起之源自於相同親本核酸之兩個或更多個不連續序列的核酸視為該親本核酸之片段。

【0100】 關於胺基酸序列(肽或蛋白質)之「片段」係關於胺基酸序列之一部分，例如表示在N端及/或C端縮短及/或丟失一或多個內部殘基之胺基酸序列的序列。在一些實施例中，在C端縮短之片段(N端片段)可例如藉由缺乏開放閱讀框之3'端的截短開放閱讀框之轉譯來獲得。在一些實施例中，在N端縮短之片段(C端片段)可例如藉由缺乏開放閱讀框之5'端的截短開放閱讀框之轉譯來獲得，只要截短之開放閱讀框包含用以起始轉譯之起始密碼子即可。在許多實施例中，胺基酸序列之片段包含例如至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%之來自胺基酸序列之胺基酸殘基。在許多實施例中，片段包括至少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、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多個胺基酸，在許多實施例中，片段保留其親本序列之一或多種特性或特徵。在一些實施例中，將核酸序列表示融合在一起之源自於相同親本多肽之兩個或更多個不連續序列的多肽視為該親本多肽之片段。

【0101】 功能性：如本文所用，「功能性」生物分子為呈其展現作為其特徵之特性及/或活性之形式的生物分子。在一些實施例中，生物分

子可具有一種功能(亦即，單功能)、兩種功能(亦即，雙功能)或許多功能(亦即，多功能)。

【0102】 功能類似物：在某些實施例中，「類似物」為「功能類似物」。術語「功能類似物」係指包含或與參考物質共享一或多種功能之物質類似物。舉例而言，核苷三磷酸(NTP)之功能類似物與參考NTP共享一或多種功能。舉例而言，GTP之功能類似物與GTP共享一或多種功能。舉例而言，CTP之功能類似物與CTP共享一或多種功能。舉例而言，ATP之功能類似物與ATP共享一或多種功能。舉例而言，UTP之功能類似物與UTP共享一或多種功能。在某些實施例中，NTP之功能類似物為可轉譯的。在某些實施例中，NTP之功能類似物可替代(亦即置換)參考NTP併入產物分子，例如併入RNA。在某些實施例中，NTP之功能類似物當併入RNA分子時允許RNA分子之轉譯，其中在轉譯期間功能類似物如參考NTP一般發揮功能。在一些實施例中，NTP之功能類似物具有不與參考NTP共享之其他特徵；例如已知假UTP及/或N1-甲基假UTP替代(亦即置換)UTP併入可使得RNA與使用非修飾UTP自相同模板轉錄之RNA相比具有降低之免疫原性。在一些實施例中，UTP之功能類似物可替代UTP併入RNA分子及/或例如如UTP一般或替代UTP為可轉譯的。類似地，GTP之功能類似物可替代GTP併入RNA分子及/或例如如GTP一般或替代GTP為可轉譯的。此同樣適用於CTP及ATP。在某些實施例中，可例如藉由諸如自其轉錄RNA之DNA之所用基質在RNA分子之合成期間在預期或預測為相應NTP之任何給定位置併入NTP之功能類似物。

【0103】 功能性鍵聯：如本文所用，「功能性鍵聯」或「功能上鍵聯」係關於功能關係內之連接。若核酸在功能上與另一核酸序列有關，則

其為「功能上鍵聯」的。舉例而言，若啟動子影響編碼序列之轉錄，則其在功能上鍵聯至該編碼序列。功能上鍵聯之核酸典型地彼此靠近，在由其他核酸序列適當分離之情況下且在特定實施例中，由RNA聚合酶轉錄，得到單一RNA分子(常見轉錄物)。在特定實施例中，核酸根據本發明在功能上鍵聯至表現控制序列，該等表現控制序列可關於該核酸為同源或異源的。

【0104】 基因：如本文所用，術語「基因」係指染色體中編碼產物(例如RNA產物及/或多肽產物)之DNA序列。在一些實施例中，基因包括編碼序列(亦即，編碼特定產物之序列)；在一些實施例中，基因包括非編碼序列。在一些特定實施例中，基因可包括編碼(例如外顯子)與非編碼(例如內含子)序列兩者。在一些實施例中，基因可包括一或多個調控元件，該一或多個調控元件例如可控制或影響基因表現之一或多個態樣(例如細胞類型特異性表現、可誘導表現等)。

【0105】 基因產物或表現產物：如本文所用，術語「基因產物」或「表現產物」通常指自基因轉錄之RNA(加工前及/或加工後)或由自基因轉錄之RNA編碼之多肽(修飾前及/或修飾後)。

【0106】 異源：術語「異源」在本文中用於相對於參考物來描述實體，且用於指明相對於相關參考物，實體源自於不同來源及/或與一或多個不同組分相關。作為實例，將一個個體之細胞引入不同個體中構成異源移植。異源基因為源自於除該個體外之來源的基因。

【0107】 同源性：如本文所用，術語「同源性」或「同源物」係指多核苷酸分子(例如DNA分子及/或RNA分子)之間及/或多肽分子之間的總體相關性。在一些實施例中，若多核苷酸分子(例如DNA分子及/或RNA分

子)及/或多肽分子之序列為至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的，則將其視為彼此「同源」的。在一些實施例中，若多核苷酸分子(例如DNA分子及/或RNA分子)及/或多肽分子之序列為至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%類似的(例如在對應位置含有具有相關化學特性之殘基)，則將其視為彼此「同源」的。舉例而言，如一般熟習此項技術者所熟知，某些胺基酸因彼此類似典型地歸類為「疏水性」或「親水性」胺基酸，及/或歸類為具有「極性」或「非極性」側鏈。一個胺基酸取代另一相同類型常常可被視為「同源」取代。

【0108】 宿主細胞：如本文所用，係指已引入外源性材料(例如DNA，諸如重組或以其他方式)之細胞。技術人員在閱讀本發明後將理解此類術語不僅指特定個體細胞，而且指此類細胞之後代。由於在後繼代中可能因突變或環境影響發生某些修飾，故此類後代實際上可能不與親本細胞相同，但仍包括在如本文所用之術語「宿主細胞」範圍內。在一些實施例中，宿主細胞包括選自生命界中任一者之適合於表現外源性DNA (例如重組核酸序列)之原核及真核細胞。示例性細胞包括原核生物及真核生物之彼等細胞(單細胞或多細胞)、細菌細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*)、芽孢桿菌屬(*Bacillus spp.*)、鏈黴菌屬(*Streptomyces spp.*)等之菌株)、分枝桿菌屬細胞、真菌細胞、酵母細胞(例如啤酒酵母(*S. cerevisiae*)、裂殖酵母(*S. pombe*)、巴斯德畢赤酵母(*P. pastoris*)、甲醇畢赤酵母(*P. methanolica*)等)、植物細胞、昆蟲細胞(例如SF-9、SF-21、桿狀病毒感染之昆蟲細胞、粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*)等)、非人類動物細胞、人類細胞或細胞融

合物，諸如雜交瘤或四體瘤。在一些實施例中，宿主細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在一些實施例中，宿主細胞為真核的。舉例而言，真核宿主細胞可為CHO (例如CHO K1、DXB-1 CHO、Veggie-CHO)、COS (例如COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎臟細胞(例如HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60 (例如BHK21)、Jurkat、Daudi、A431 (表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、足細胞、BRL 3 A細胞、HT1080細胞、骨髓瘤細胞、腫瘤細胞或源自於上述細胞之細胞株。

【0109】 雜交：若兩個序列彼此互補，則核酸「能夠與另一核酸雜交」或「與另一核酸雜交」。若兩個序列能夠彼此形成穩定雙鏈體(例如彼此雜交以形成雙股分子)，則核酸與另一核酸「互補」。互補可為總體或部分互補。熟習此項技術者知道兩個序列彼此雜交之能力可視條件(例如溫度、pH值)及/或其他潛在競爭序列之存在而定。在一些實施例中，雜交在嚴格條件下進行，使得僅高度互補之序列形成穩定雜合物。示例性此類嚴格條件描述於例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook等人編, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989或Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等人編, John Wiley & Sons, Inc., New York中。舉例而言，在一些實施例中，嚴格雜交可涉及將雜交核酸與含有互補核酸之膜在65°C下在雜交緩衝液(3.5 x SSC、0.02% Ficoll、0.02%聚乙炔吡咯啉酮、0.02%牛血清白蛋白、2.5 mM NaH₂PO₄ (pH 7)、0.5% SDS、2 mM EDTA)中一起培育。SSC為0.15 M氯化鈉/0.15 M檸檬酸鈉，pH 7；在此類培育之後，將已轉

移DNA之膜例如在 $2\times\text{SSC}$ 中在室溫下且接著在 $0.1-0.5\times\text{SSC}/0.1\times\text{SDS}$ 中在高至 68°C 之溫度下洗滌。

【0110】 一致性：如本文所用，術語「一致性」係指聚合分子之間，例如核酸分子(例如DNA分子及/或RNA分子)之間及/或多肽分子之間的總體相關性。在一些實施例中，若聚合分子之序列為至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的，則將其視為彼此「實質上一致」。兩個核酸或多肽序列之一致性百分比之計算例如可藉由出於最佳比較目的比對兩個序列來進行(例如可在第一及第二序列中之一者或兩者中引入空位以獲得最佳比對，且出於比較目的可忽略非一致序列)。在某些實施例中，為比較目的而比對之序列的長度為參考序列之長度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或實質上100%。接著比較對應位置處之核苷酸。當第一序列中之位置由與第二序列中對應位置相同之殘基(例如核苷酸或胺基酸)佔據時，則在該位置分子為相同的。兩個序列之間的一致性百分比隨序列所共享之一致位置之數目而變化，將為進行兩個序列之最佳比對而需要引入之空位之數目以及各空位之長度考慮在內。序列之比較及兩個序列之間的一致性百分比之測定可使用數學算法來實現。舉例而言，兩個核苷酸序列之間的一致性百分比可使用Meyers及Miller之算法(CABIOS, 1989, 4: 11-17)來測定，該算法已併入ALIGN程式(2.0版)。在一些示例性實施例中，用ALIGN程式進行之核酸序列比較使用PAM120權重殘基表，空位長度罰分為12且空位罰分為4。或者，可使用GCG軟體包中之GAP程式使用NWSgapdna.CMP矩陣測定兩個核苷酸序列之間的一致性百分比。

【0111】 改良、增加或降低：如本文所用，此等術語或語法上類似之比較術語指示相對於類似參考量測之值。舉例而言，在一些實施例中，使用相關劑達成之評估值相對於使用類似參考劑獲得之評估值可為「改良」的。替代地或另外，在一些實施例中，相對於在相同個體或系統中在不同條件下(例如在諸如投與相關劑之事件之前或之後)，或在不同之類似個體中(例如在相關特定疾病、病症或疾患之一或多種指示物之存在方面，或在事先暴露於條件或劑方面等不同於相關個體或系統之類似個體或系統中)獲得之評估值，在相關個體或系統中達成之評估值可為「改良」的。在一些實施例中，比較術語係指統計學相關之差異(例如其具有足以達成統計相關性之發生率及/或量值)。熟習此項技術者將知道或將輕易能夠確定在給定上下文中達成此類統計顯著性所需要或足以達成此類統計顯著性的差異之程度及/或發生率。

【0112】 增加、增強：如此項技術中所瞭解，諸如「增加」或「增強」之術語在本文中可用於指例如實體、事件、頻率、活性等之總體及/或相對增加或增強。在一些實施例中，增加例如可為增加約至少10%，在一些實施例中為至少20%，在一些實施例中為至少30%，在一些實施例中為至少40%，在一些實施例中為至少50%、55%、65%、70%、75%，在一些實施例中為至少80%、85%、90%、95%，且在一些實施例中為至少100%或更多。在一些實施例中，增加或增強可為2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。

【0113】 活體外：如本文所用之術語「活體外」係指事件發生在人工環境中，例如試管或反應容器(例如生物反應器)中，細胞培養物中等，而非在多細胞有機體內。

【0114】 **活體外轉錄、轉錄**：如此項技術中已知，術語「轉錄 (transcription/transcribing)」係關於期間具有特定核酸序列之核酸分子 (「核酸模板」)由RNA聚合酶讀取使得RNA聚合酶合成其互補單股RNA分子的過程。在轉錄期間，核酸模板中之基因資訊發生轉錄。在一些實施例中，核酸模板為或包含DNA；然而，在一些實施例中，例如在自 α 病毒核酸模板轉錄之情況下，核酸模板可為或包含RNA。在一些實施例中，核酸模板可包括一或多個殘基，其既不為DNA亦不為RNA及/或相對於規範DNA或RNA為DNA或RNA類似物(例如其含有一或多個修飾，例如主鏈修飾或鹼基修飾)。在許多實施例中，轉錄之RNA可轉譯成蛋白質。在許多實施例中，如由上下文將清楚的，本文所用之術語「轉錄」係指「活體外轉錄」。如本文所用，術語「活體外轉錄」或「IVT」係指使轉錄在活體外(亦即，在有機體外且典型地在非細胞系統中)發生以產生合成RNA產物之過程；在許多實施例中，本發明描述用於產生用於某些應用(包括例如蛋白質或多肽之製備)之RNA產物的IVT。在一些實施例中，所產生之RNA產物可在活體外轉譯，或可直接引入細胞中，在一些實施例中其可在細胞中轉譯。在某些特定實施例中，所產生之RNA產物之規模及/或品質足以用於向有機體投與，且在一些實施例中為向人類投與(例如作為醫藥學上具活性之RNA)。在一些實施例中，RNA產物可選自例如但不限於mRNA、反義RNA分子、shRNA分子、長非編碼RNA分子、核酶、適配體、嚮導RNA (例如用於CRISPR)、核糖體RNA、小核RNA、小核仁RNA及類似物。IVT反應典型地使用如本文中描述及/或使用之DNA模板(例如線性DNA模板)、核糖核苷酸(例如未經修飾之核糖核苷三磷酸或經修飾之核糖核苷三磷酸)及適當RNA聚合酶。在一些實施例中，應用選殖

載體來產生轉錄物。在一些此類實施例中，將選殖載體命名為「轉錄載體」(其根據本發明由術語「載體」涵蓋)。在一些實施例中，選殖載體可為質體。在一些實施例中，RNA為活體外轉錄之RNA (IVT-RNA)且可藉由適當DNA模板之活體外轉錄獲得。熟習此項技術者知道多種可適當用於控制藉由相關RNA聚合酶進行之轉錄的啟動子序列。在一些實施例中，用於活體外轉錄之DNA模板可藉由對核酸(諸如cDNA)進行選殖且將其引入用於活體外轉錄之適當載體來獲得。在一些實施例中，cDNA可藉由RNA之反轉錄來獲得。

【0115】 活體外轉錄RNA組合物：如本文所用，術語「活體外轉錄RNA組合物」係指包含藉由活體外轉錄合成之RNA的組合物。在一些實施例中，此類組合物可包含過量體外轉錄試劑(包括例如核糖核苷酸及/或加帽劑)、核酸或其片段(諸如DNA模板或其片段)、多肽或其片段(諸如重組酶或宿主細胞蛋白質或其片段)及/或其他雜質。在一些實施例中，活體外轉錄RNA組合物可在純化製程之前已經處理及/或加工，從而最終產生包含含所需濃度之RNA轉錄物的用於調配及/或進一步製造及/或加工之適當緩衝液的RNA轉錄物製劑。舉例而言，在一些實施例中，活體外轉錄RNA組合物可已經處理以移除或消化DNA模板(例如使用DNA酶)。在一些實施例中，活體外轉錄RNA組合物可已經處理以移除或消化存在於活體外轉錄反應(例如使用蛋白酶)中之多肽(例如酶，諸如RNA聚合酶、RNA酶抑制劑等)。因此，在一些實施例中，在RNA轉錄之後，可將DNA模板移除或與包含RNA之組合物分離；熟習此項技術者知道多種可實現此類移除之方法，例如DNA水解。在一些實施例中，可在DNA移除或消化期間添加RNA酶抑制劑以防止RNA發生可能的降解。在一些實施例

中，活體外轉錄RNA組合物可已經處理以移除或消化存在於活體外轉錄反應(例如使用蛋白酶)中之肽(例如酶，諸如RNA聚合酶、RNA酶抑制劑等)。

【0116】 活體內：如本文所用，術語「活體內」係指事件發生在多細胞有機體(諸如人類及非人類動物)內。

【0117】 分離：如本文所用之術語「分離」典型地指分子或其他實體實質上不含其他組分，諸如其他細胞材料；在一些實施例中，「分離」之實體實質上不含先前與其相關(例如當最初產生時)之組分。在某些實施例中，如本文所用之術語「分離之核酸」係指核酸已(i)例如藉由聚合酶鏈反應(PCR)在活體外擴增，(ii)藉由選殖重組產生，(iii)例如藉由裂解及凝膠-電泳分級分離而純化，或(iv)例如藉由化學合成或IVT合成。在一些實施例中，分離之核酸為藉由重組技術操縱可獲得之核酸。

【0118】 鍵聯、融合(*fused/fusion*)：如本文所用，術語「鍵聯」、「融合(*fused/fusion*)」可互換使用。此等術語係指兩個或更多個元件或組分或結構域(例如來自兩個不同蛋白質或核酸分子之結構域)連接在一起(例如藉由共價鍵)。

【0119】 信使-RNA、mRNA：根據本發明，術語「mRNA」意謂「信使-RNA」且係關於典型地自模板(例如DNA模板)產生之轉錄物且編碼肽或蛋白質。典型地，mRNA包含5' UTR、蛋白質編碼區、3' UTR及聚(A)序列。在一些實施例中，mRNA可如本文所描述自DNA模板藉由活體外轉錄產生。在一些實施例中，可例如藉由穩定化修飾及/或加帽對mRNA進行修飾。在一些實施例中，核酸(諸如RNA，例如mRNA)可編碼肽或蛋白質。因此，在一些實施例中，可轉錄核酸序列或其轉錄物可含有

編碼肽或蛋白質之開放閱讀框(ORF)。

【0120】 奈米粒子：如本文所用，術語「奈米粒子」係指具有小於1000奈米(nm)之直徑的粒子。在一些實施例中，如國家科學基金會(National Science Foundation)所定義，奈米粒子具有小於300 nm之直徑。在一些實施例中，如國立衛生研究院(National Institutes of Health)所定義，奈米粒子具有小於100 nm之直徑。在一些實施例中，如國立衛生研究院所定義，奈米粒子具有小於80 nm之直徑。在一些實施例中，奈米粒子包含一或多個封閉區室，其藉由包圍且封閉一空間或區室之膜與主體溶液分離。

【0121】 核酸/多核苷酸：如本文所用之術語「核酸」係指包含兩個或更多個核苷酸或核苷酸類似物殘基之聚合物。在一些實施例中，核酸可包括一或多個相對於天然存在之DNA或RNA殘基經修飾之殘基或鍵聯。舉例而言，在一些實施例中，核酸可相對於天然存在之DNA或RNA殘基具有對鹼基、糖或主鏈(例如磷酸鹽)之一或多個修飾。在一些實施例中，核酸分子係指為或包含去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)的核酸。在一些實施例中，核酸可為或包含，或可具有在基因體DNA、cDNA、mRNA、病毒RNA、siRNA、miRNA、shRNA、重組製備及化學合成之分子中所發現之序列。在一些實施例中，術語「核酸」係指至少2個殘基或更多個殘基，包括例如至少3個殘基、至少4個殘基、至少5個殘基、至少6個殘基、至少7個殘基、至少8個殘基、至少9個殘基、至少10個殘基或更多個殘基之聚合物。在一些實施例中，核酸為或包含DNA。在一些實施例中，核酸為或包含RNA。在一些實施例中，核酸為或包含肽核酸(PNA)。在一些實施例中，核酸為或包含單股核酸。在一些實施例中，核

酸為或包含雙股核酸。在一些實施例中，核酸包含單股與雙股部分兩者。在一些實施例中，核酸包含含有一或多個磷酸二酯鍵之主鏈。在一些實施例中，核酸包含含有磷酸二酯與非磷酸二酯鍵之主鏈。舉例而言，在一些實施例中，核酸可包含含有一或多個硫代磷酸酯或5'-N-亞磷醯胺鍵及/或一或多個肽鍵(例如如「肽核酸」中)的主鏈。在一些實施例中，核酸包含一或多個或所有天然殘基(例如腺嘌呤、胞嘧啶、去氧腺苷、去氧胞苷、去氧鳥苷、去氧胸苷、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶)。在一些實施例中，核酸包含一或多個或所有非天然殘基。在一些實施例中，非天然殘基包含核苷類似物(例如2-胺基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、1-甲基-假尿苷、C-5丙炔基-尿苷、2-胺基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-胺基腺苷、7-去氫腺苷、7-去氫鳥苷、8-側氧基腺苷、8-側氧基鳥苷、6-O-甲基鳥嘌呤、2-巰基胞苷、甲基化鹼基、嵌插鹼基及其組合)。在一些實施例中，與天然殘基中相比，非天然殘基包含一或多個經修飾之糖(例如2'-氟核糖、核糖、2'-去氧核糖、阿拉伯糖及己糖)。在一些實施例中，核酸具有編碼功能基因產物(諸如RNA或多肽)之核苷酸序列。在一些實施例中，核酸具有包含一或多個內含子之核苷酸序列。在一些實施例中，可藉由自天然來源分離、酶促合成(例如藉由例如活體內或活體外基於互補模板之聚合、在重組細胞或系統中繁殖或化學合成來製備核酸。在一些實施例中，核酸長至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、20、225、250、275、300、325、350、375、

400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、
2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、
7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、
11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、
15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、
19,500或20,000個或更多個殘基或核苷酸。

【0122】 核酸序列：根據本發明，「核酸序列」係指核酸(例如核糖核酸(RNA)或去氧核糖核酸(DNA))中之殘基序列。在一些實施例中，該術語用於指整個核酸分子之序列(達至整個核酸分子之單股之程度)；在一些實施例中，該術語用於指表示其一部分(例如片段)之序列。

【0123】 核苷酸：術語「核苷酸」在本文中如此項技術中通常所理解來使用且可指核苷單磷酸、核苷二磷酸及核苷三磷酸。

【0124】 醫藥級：如本文所用之術語「醫藥級」係指由認可之國家或地區藥典(例如美國藥典及處方集(The United States Pharmacopeia and The Formulary) (USP-NF))建立的用於化學及生物原料藥、藥物產品、劑型、混配製劑、賦形劑、醫學裝置及膳食補充物之標準。

【0125】 多肽：如本文所用，術語「多肽」典型地具有其此項技術認可之至少三個胺基酸或更多胺基酸之聚合物的含義。一般熟習此項技術者將瞭解，術語「多肽」旨在為足夠一般性的以至不僅涵蓋具有本文中敘述之完整序列的多肽，而且涵蓋表示此類完整多肽之功能性、生物活性或特徵片段、部分或結構域(例如保留至少一種活性之片段、部分或結構域)的多肽。在一些實施例中，多肽可含有L-胺基酸、D-胺基酸或兩者及/或可含有此項技術中已知之多種胺基酸修飾或類似物中之任一者。適用修飾

包括例如末端乙醯化、醯胺化、甲基化等。在一些實施例中，多肽可包含天然胺基酸、非天然胺基酸、合成胺基酸及其組合(例如可為或包含擬肽物)。在一些實施例中，多肽可為或包含酶。在一些實施例中，多肽可為或包含多肽抗原。在一些實施例中，多肽可為或包含抗體劑。在一些實施例中，多肽可為或包含細胞介素。

【0126】 一級結構：如本文關於核酸分子所用，術語「一級結構」係指單體殘基之線性序列。

【0127】 啟動子、啟動子區：術語「啟動子」或「啟動子區」係指例如藉由為RNA聚合酶提供識別及結合位點來引導轉錄物(例如包含編碼序列之轉錄物)之合成的核酸序列。在一些實施例中，啟動子區可包括用於參與該基因之調控轉錄之其他因子的其他識別或結合位點。在一些實施例中，啟動子可控制原核或真核基因之轉錄。在一些實施例中，啟動子可為「可誘導」的且響應於誘導劑起始轉錄；在一些實施例中，若轉錄不由誘導劑或細胞類型特異性啟動子控制，則啟動子可為「組成性」的。在一些實施例中，若誘導劑不存在，則可誘導啟動子僅在極小程度上表現或根本不表現；當誘導劑存在時，啟動子「開啟」或轉錄水準增加，其典型地由特異性轉錄因子之結合介導。

【0128】 純的或純化的：如本文所用，若一劑或實體實質上不含其他組分，則其為「純的」或「純化的」。舉例而言，含有超過約90%之特定劑或實體的製劑典型地被視為純製劑。在一些實施例中，在製劑中劑或實體為至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%純的。

【0129】 核糖核苷酸：如本文所用，術語「核糖核苷酸」涵蓋未經

修飾之核糖核苷酸及經修飾之核糖核苷酸。舉例而言，未經修飾之核糖核苷酸包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G)，及嘧啶鹼基胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。經修飾之核糖核苷酸(類似物)可包括包括但不限於例如以下之一或多個修飾：(a)末端修飾，例如5'端修飾(例如磷酸化、去磷酸化、結合、反向鍵聯等)、3'端修飾(例如結合、反向鍵聯等)，(b)鹼基修飾，例如用經修飾之鹼基、穩定化鹼基、去穩定化鹼基或與擴大之配偶體譜鹼基配對的鹼基或結合之鹼基置換，(c)糖修飾(例如在2'位置或4'位置)或糖置換，及(d)核苷間鍵聯修飾，包括磷酸二酯鍵之修飾或置換。在一些實施例中，經修飾之核糖核苷酸維持對應未經修飾之核糖核苷酸之至少一種功能。術語「核糖核苷酸」可涵蓋核糖核苷三磷酸，包括經修飾及未經修飾之核糖核苷三磷酸。

【0130】核糖核酸(RNA)：如本文所用，術語「RNA」係指核糖核苷酸之聚合物；術語「RNA」或「RNA分子」係關於包含核糖核苷酸殘基之分子。在一些實施例中，「RNA」完全或實質上由核糖核苷酸殘基組成。如熟習此項技術者所瞭解，規範「核糖核苷酸」為在 β -D-呋喃核糖基之2'-位置具有羥基之核苷酸。術語「RNA」可包含雙股RNA、單股RNA、經分離之RNA(諸如部分或完全純化之RNA)、基本上純之RNA、合成RNA及重組產生之RNA，諸如經修飾之RNA，其因一或多個核苷酸之添加、缺失、取代及/或改變而不同於天然存在之RNA。在一些實施例中，RNA可相對於參考物(例如天然存在之RNA)例如藉由諸如向RNA之末端或在內部(例如在RNA之一或多個核苷酸處)添加非核苷酸材料而修飾。在一些實施例中，RNA分子中之一或多個殘基或鍵聯可為或包含非標準殘基或鍵聯，諸如非天然存在之核苷酸或化學合成之核苷酸或去氧核

苷酸；在一些實施例中，此類RNA可稱為類似物，例如天然存在之RNA之類似物。在一些實施例中，RNA為單股的。在一些實施例中，RNA為雙股的。在一些實施例中，RNA包含單股與雙股部分兩者。在一些實施例中，RNA可包含如以上「核酸/多核苷酸」之定義中所描述的主鏈結構。RNA可為調控RNA (例如siRNA、微RNA等)或信使RNA (mRNA)。在一些實施例中，其中RNA為mRNA。在其中RNA為mRNA之一些實施例中，RNA典型地在其3'端包含聚(A)區。在其中RNA為mRNA之一些實施例中，RNA典型地在其5'端包含此項技術認可之帽結構，例如用於使mRNA識別且連接至核糖體以起始轉譯。在一些實施例中，RNA為合成RNA。合成RNA包括活體外合成(例如藉由酶促合成方法及/或藉由化學合成方法)之RNA。在一些實施例中，RNA為單股RNA。在一些實施例中，單股RNA可包含自我互補之元件及/或可建立二級及/或三級結構。熟習此項技術者將瞭解，術語「單股RNA」通常指未與互補核酸分子(典型地未與互補RNA分子)相締合之RNA分子。在一些實施例中，單股RNA可含有自我互補序列，從而允許RNA之一部分摺疊回來且形成如此項技術中所已知之二級結構基元，包括但不限於鹼基對、莖、莖環及/或突起。當單股RNA稱為「編碼」時，熟習此項技術者由上下文將理解係指編碼股序列抑或其互補序列。在一些實施例中，單股RNA可為自我擴增RNA (亦稱為自我複製RNA)。

【0131】 重組：如本文所用，術語「重組」當用於指多肽時旨在指藉由重組手段設計、工程改造、製備、表現、形成、製造及/或分離之多肽，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之多肽；自重組組合人類多肽文庫分離之多肽；自對於編碼多肽或其一或多種組分、部分、元

件或結構域及/或引導其之表現的一或多種基因或基因體分為轉基因動物或以其他方式進行操縱以表現該一或多種基因或基因體分的動物(例如小鼠、兔、綿羊、魚等)分離之多肽；及/或藉由涉及剪接所選核酸序列元件或使所選核酸序列元件彼此連結、化學合成所選序列元件及/或以其他方式產生編碼多肽或其一或多種組分、部分、元件或結構域及/或引導其表現之核酸的任何其他手段製備、表現、形成或分離之多肽。在一些實施例中，此類所選序列元件中之一或多者存在於自然界中。在一些實施例中，此類所選序列元件中之一或多者係經由電腦模擬設計。在一些實施例中，一或多個此類所選序列元件由例如來自天然或合成來源諸如在相關來源有機體(例如人類、小鼠等)之生殖系中之已知序列元件的誘變(例如活體內或活體外)產生。在一些實施例中，本文所描述之核酸可為重組及/或經分離之分子。

【0132】 參考：如本文所用，術語「參考」描述相對於其進行比較之標準或對照。舉例而言，在一些實施例中，將相關劑、動物、個體、群體、樣品、序列或值與參考或對照劑、動物、個體、群體、樣品、序列或值相比較。在一些實施例中，與相關測試或測定實質上同時對參考或對照進行測試及/或測定。在一些實施例中，參考或對照為視情況在有形介質中具體化之歷史參考或對照。典型地，如熟習此項技術者將瞭解，在與進行評估之條件或情況類似之條件或情況下對參考或對照進行測定或表徵。熟習此項技術者將瞭解何時呈現充足相似性來證明對特定可能參考或對照之依賴及/或與特定可能參考或對照之比較。

【0133】 RNA聚合酶：如本文所用，術語「RNA聚合酶」係指藉由使用DNA或RNA作為模板將核糖核苷酸單元添加至核苷酸鏈來催化聚核

糖核苷酸合成之酶。如由上下文將清楚，該術語係指如其存在於自然界中一般之完整酶，或其經分離之活性催化或功能結構域或片段。在一些實施例中，RNA聚合酶在引物或核酸股之3'端或在啟動子序列處起始合成，且沿目標核酸在5'方向上進行以合成與目標核酸互補之股直至合成終止。

【0134】 RNA轉錄物製劑：如本文所用之術語「RNA轉錄物製劑」係指包含自本文所描述之活體外轉錄RNA組合物純化之RNA轉錄物的製劑。在一些實施例中，RNA轉錄物製劑為包含醫藥級RNA轉錄物之製劑。在一些實施例中，RNA轉錄物製劑為包含RNA轉錄物之製劑，其一或多種產物品質特徵經表徵及測定滿足釋放及/或接受準則(例如如本文所描述)。此類產物品質特徵之實例包括但不限於外觀、RNA長度、作為RNA之原料藥身份、RNA完整性、RNA序列、RNA濃度、pH值、滲透重量莫耳濃度、殘餘DNA模板、殘餘雙股RNA、細菌內毒素、生物負荷及其組合。

【0135】 室溫：如本文所用，術語「室溫」係指周圍溫度。在一些實施例中，室溫為約15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C，較佳約18°C-30°C，例如約18°C-25°C，或約20°C-25°C，或約20-30°C，或約23-27°C或約25°C。

【0136】 樣品：如本文所用，術語「樣品」典型地係指獲自或源自於例如如本文所描述之相關來源之材料的等分試樣。在一些實施例中，相關來源為生物或環境來源。在一些實施例中，相關來源可為或包含細胞或有機體，諸如微生物、植物或動物(例如小鼠)。在一些實施例中，相關來源為或包含生物組織或流體。在一些實施例中，生物流體可為或包含細胞

內液、細胞外液、血管內液(血漿)、間隙液、淋巴液及/或跨細胞液。在一些實施例中，生物組織或樣品可例如藉由抽吸、活組織切片檢查(例如精細針頭或組織活組織切片檢查)、拭子(例如口、鼻、皮膚或陰道拭子)、刮擦、手術、洗滌或灌洗(例如支氣管肺泡(brocheoalveolar)、導管、鼻、眼、口、子宮、陰道或其他洗滌或灌洗)來獲得。在一些實施例中，樣品為或包含自個體獲得之細胞。在一些實施例中，樣品為藉由任何適當手段直接自相關來源獲得之「初級樣品」。在一些實施例中，如由上下文將清楚，術語「樣品」係指藉由對初級樣品進行加工(例如藉由移除一或多種組分及/或藉由添加一或多種劑)獲得之製劑。舉例而言，「加工之樣品」可包含例如自樣品萃取或藉由使初級樣品經受一或多種技術(諸如核酸之擴增或反轉錄、某些組分之分離及/或純化等)獲得之核酸或蛋白質。

【0137】 二級結構：如此項技術中所瞭解，術語「二級結構」用於指核酸分子中鹼基之間的相互作用。因此，二級結構可描述為核酸分子之反映鹼基配對之二維表示。該術語常常用於指單股分子(例如單股RNA)中之分子內鹼基配對相互作用。實際上，許多單股核酸分子及特定而言單股RNA分子以(分子內)鹼基對之區域為特徵。根據本發明，術語「二級結構」包含包括但不限於鹼基對、莖、莖環、突起、環(諸如內部環及多分支環)之結構基元。核酸分子之二級結構可由顯示鹼基配對之二維圖式(平面圖)表示(關於RNA分子之二級結構之其他細節，參見Auber等人，(2006), *J. Graph Algorithms Appl.*, 10: 329–351)。如本文所描述，在本發明之情形中某些RNA分子之二級結構為相關的。核酸分子(特定而言單股RNA分子)之二級結構可藉由使用用於RNA二級結構預測之網站伺服器(<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predic>

t1.html)預測來確定。

【0138】 穩定：術語「穩定」當應用於核酸及/或包含核酸(例如囊封於脂質奈米粒子中)之組合物時，意謂此類核酸及/或組合物在指定條件集合(例如pH值、溫度、照明、相對濕度等)下維持其特徵(例如物理及/或結構特徵、功能及/或活性)之一或多個態樣超過一段時間。在一些實施例中，此類穩定性維持超過至少約一小時之時間段；在一些實施例中，此類穩定性維持超過約5小時、約10小時、約一(1)天、約一(1)週、約兩(2)週、約一(1)個月、約兩(2)個月、約三(3)個月、約四(4)個月、約五(5)個月、約六(6)個月、約八(8)個月、約十(10)個月、約十二(12)個月、約二十四(24)個月、約三十六(36)個月或更長之時間段。在一些實施例中，此類穩定性維持超過在約一(1)天至約二十四(24)個月、約兩(2)週至約十二(12)個月、約兩(2)個月至約五(5)個月等範圍內之時間段。在一些實施例中，在周圍條件下(例如在室溫及環境壓力下)維持此類穩定性。在一些實施例中，在生理條件下(例如在活體內或在約37°C下，例如在血清中或磷酸鹽緩衝鹽水中)維持此類穩定性。在一些實施例中，在冷藏(例如等於或低於約4°C，包括例如-20°C或-70°C)下維持此類穩定性。在一些實施例中，當核酸及/或包含該等核酸之組合物避光(例如維持在黑暗中)時維持此類穩定性。

【0139】 作為實例，在一些實施例中，術語「穩定」用於指奈米粒子組合物(例如脂質奈米粒子組合物)。在此類實施例中，穩定奈米粒子組合物(例如穩定奈米粒子組合物)及/或其組分在指定條件集合下維持其特徵(例如物理及/或結構特徵、功能及/或活性)之一或多個態樣超過一段時間。舉例而言，在一些實施例中，穩定奈米粒子組合物(例如脂質奈米粒

子組合物)之特徵在於奈米粒子之平均粒度、粒度分佈及/或多分散性在指定條件集合(例如如本文所描述)下實質上維持(例如與初始特徵相比在10%或更小範圍內)超過一段時間(例如如本文所描述)。在一些實施例中，穩定奈米粒子組合物(例如脂質奈米粒子組合物)之特徵在於在其在指定條件集合(例如如本文所描述)下維持超過一段時間之後不存在可偵測量之降解產物(例如與水解及/或酶促消化相關)。

【0140】 RNA之穩定性：術語「RNA之穩定性」在本文中常用於指RNA之「半衰期」。「半衰期」係關於消除一半之活性、量或分子數目所需之時間段。在許多實施例中，RNA之半衰期指示其穩定性。熟習此項技術者將瞭解，RNA之半衰期常常會影響RNA之「表現持續時間」；典型地，相對於具有較短半衰期之RNA，具有長半衰期之RNA將表現延長之時間段。

【0141】 莖環、髮夾：如本文所用，術語「莖環」或「髮夾」或「髮夾環」係指核酸分子(典型地單股核酸分子，諸如單股RNA)之特定二級結構。由莖環表示之特定二級結構由包含莖及環(例如末端環，亦稱為髮夾環)之連續核酸序列組成，其中莖由兩個鄰近之完全或部分互補之序列元件形成；該兩個鄰近之完全或部分互補之序列元件由形成莖-環結構之環的短序列(例如3-10個核苷酸)隔開。兩個鄰近之完全或部分互補之序列可定義為例如莖環元件莖1及莖2。當此兩個鄰近之完全或部分反向之互補序列(例如莖環元件莖1及莖2)彼此形成鹼基對，使得雙股核酸序列在其末端包含由定位於莖環元件莖1與莖2之間的短序列形成之未配對之環時，形成莖環。因此，莖環包含兩個莖(莖1及莖2)，其在核酸分子之二級結構層面彼此形成鹼基對，且其在核酸分子之一級結構層面由不為莖1或莖2之

一部分的短序列隔開。為作說明，莖環之二維表示類似於棒棒糖狀結構。莖-環結構之形成涉及可摺疊回自身之上以形成配對之雙股的序列；配對之雙股由莖1及莖2形成。典型地根據相較於莖1中不能與莖2之核苷酸形成鹼基對(較佳為規範鹼基對，更佳為沃森-克裡克鹼基對)(錯配或突起)之核苷酸的數目莖1中能夠與莖2之核苷酸形成此類鹼基對之核苷酸的長度、數目來測定配對莖環元件之穩定性。若給定核酸序列之特徵為莖環，則相應互補核酸序列典型地亦以莖環為特徵。莖環典型地由單股RNA分子形成。

【0142】 合成：如本文所用，術語「合成」係指實體為人造的或在人為干預情況下製備或由合成產生而非天然存在。舉例而言，在一些實施例中，合成核酸或多核苷酸係指化學合成(例如在一些實施例中藉由固相合成)之核酸分子。在一些實施例中，術語「合成」係指實體在生物細胞外製備。舉例而言，在一些實施例中，合成核酸或多核苷酸係指使用模板藉由活體外轉錄產生之核酸分子(例如RNA)。

【0143】 模板：如本文所用，術語「模板」或「核酸模板」或「模板核酸」統指可複製或轉錄之核酸序列。在一些實施例中，模板為DNA。在一些實施例中，DNA模板為線性DNA分子。在一些實施例中，DNA模板為環狀DNA分子。DNA可使用此項技術中已知之方法獲得或產生，包括例如基因合成、重組DNA技術或其組合。在一些實施例中，DNA模板包含編碼相關轉錄區(例如編碼本文所描述之RNA)之核苷酸序列及由經選擇用於活體外轉錄之RNA聚合酶(諸如本文所描述之RNA聚合酶)識別的啟動子序列。在一些實施例中，DNA模板編碼產物(諸如RNA)之一或多個元件，例如5' UTR、3' UTR、開放閱讀框(例如編碼相關肽或

蛋白質，諸如抗原)、聚(A)尾等。在一些實施例中，DNA模板編碼產物RNA之所有元件。在一些實施例中，DNA模板不編碼產物RNA之所有元件，例如DNA模板可不編碼聚(A)尾，且此類聚(A)尾可在如本文所描述之轉錄之後以酶促方式添加至RNA。

【0144】 三級結構：如本文所用，關於核酸分子之術語「三級結構」係指如原子坐標所定義之核酸分子之三維結構。

【0145】 三端引發非轉譯區：如本文所用，術語「三端引發非轉譯區」或「3' UTR」係指mRNA分子中在開放閱讀框序列之編碼區之終止密碼子之後開始的序列。在一些實施例中，3' UTR在開放閱讀框序列之編碼區之終止密碼子之後即刻開始。在其他實施例中，3' UTR未在開放閱讀框序列之編碼區之終止密碼子之後即刻開始。

【0146】 臨限值水準(例如接受準則)：如本文所用，術語「臨限值水準」係指用作用於獲得關於量測結果(例如分析中所獲得之量測結果)之資訊及/或對量測結果進行歸類之參考的水準。舉例而言，在一些實施例中，臨限值水準意謂在分析中量測之確定群體之兩個子集(例如滿足品質控制準則之批次相較於不滿足品質控制準則之批次)之間的分界線的值。因此，等於或高於臨限值水準之值確定群體之一個子集，且低於臨限值水準之值確定群體之另一子集。臨限值水準可基於一或多個對照樣品或在對照樣品之群體中確定。臨限值水準可在進行相關量測之前、同時或之後確定。在一些實施例中，臨限值水準可為值之範圍。

【0147】 轉錄效率：術語「轉錄效率」係關於在特定時間段內由模板分子產生之轉錄產物的量。

【0148】 轉譯效率：術語「轉譯效率」係關於在特定時間段內由

RNA分子提供之轉譯產物的量。

【0149】 **變異體**：術語「變異體」當關於例如核酸及胺基酸序列使用時包括任何變異體，特定而言為突變體、病毒株變異體、剪接變異體、構象、同種型、對偶變異體、物種變異體及物種同源物，特定而言為天然存在之變異體。對偶變異體係關於基因之正常序列的改變，其顯著性常常不清楚。完整基因測序常常鑑定給定基因之許多對偶變異體。關於核酸分子，術語「變異體」包括簡併核酸序列，其中根據本發明之簡併核酸為密碼子序列因遺傳密碼之簡併而不同於參考核酸之核酸。物種同源物為來源於與給定核酸或胺基酸序列不同之物種的核酸或胺基酸序列。病毒同源物為來源於與給定核酸或胺基酸序列不同之病毒的核酸或胺基酸序列。在一些實施例中，核酸變異體可與參考核酸相比包括單個或多個核苷酸缺失、添加、突變、取代及/或插入。缺失包括自參考核酸移除一或多個核苷酸。添加變異體包含一或多個核苷酸(諸如1、2、3、5、10、20、30、50或更多個核苷酸)之5'-端及/或3'-端融合物。在取代情況下，序列中之至少一個核苷酸移除且至少一個其他核苷酸替代它插入(諸如易位及變換)。突變可包括無鹼基位點、交聯位點及化學改變或修飾之鹼基。插入包括添加至少一個核苷酸至參考核酸中。

【0150】 **載體**：如本文所用，術語「載體」係指能夠轉運與其鍵聯之另一核酸的核酸分子。載體包含質體；黏粒載體；噬粒，諸如 λ 噬菌體；病毒基因體，包括反轉錄病毒、腺病毒或桿狀病毒載體；人工染色體載體，諸如細菌人工染色體(BAC)、酵母人工染色體(YAC)或P1人工染色體(PAC)；及其功能部分。一種類型之載體為「質體」，其指其他DNA區段可連結至其中之環狀雙股DNA。另一類型之載體為病毒載體，其中其

他DNA區段可連結至病毒基因體中。某些載體能夠在其引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及附加型哺乳動物載體)。其他載體(例如非附加型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞後整合至宿主細胞之基因體中，且由此與宿主基因體一起複製。此外，某些載體能夠引導與其可操作地鍵聯之基因的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。表現載體包含質體以及病毒載體且在特定宿主有機體中(例如細菌、酵母、植物、昆蟲或哺乳動物)或在活體外表現系統中通常含有所需編碼序列及可操作地鍵聯之編碼序列之表現所必需的適當非編碼序列。選殖載體通常用於工程改造及擴增某一所需DNA片段，且可缺乏所需DNA片段之表現所需要的功能序列。

某些實施例之具體實施方式

【0151】 雖然以下詳細描述了本發明之某些實施例，但應瞭解本發明不限於本文所描述之特定方法、方案及試劑，因為此等因素均可改變。亦應瞭解，本文所用之術語僅用於描述特定實施例之目的，且不旨在限制本發明之範圍，本發明之範圍將由隨附申請專利範圍界定。除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語具有與一般熟習此項技術者通常所理解的相同之含義。

【0152】 在一些實施例中，除非另外指出，否則本發明之實踐將採用化學、生物化學、細胞生物學、免疫學及重組DNA技術之習知方法，該等習知方法在本領域之文獻中有解釋(參看例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, J. Sambrook等人編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989)。實際上，在許多實施例中，可使用例如用於重組DNA製備及/或操縱、寡核苷酸合成、組織培養及轉

化(例如電穿孔、脂質體轉染)等之標準技術。熟習此項技術者讀了本發明將瞭解何處可根據製造商之技術規範或如此項技術中通常所實現或如本文所描述進行酶促反應及/或純化技術。前述技術及程序可總體上根據此項技術中熟知及/或如本說明書通篇引用及論述之各種一般及更特定參考文獻中所描述之習知方法來進行。參見例如Green及Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)), 該參考文獻出於任何目的以引用之方式併入本文中。

【0153】 在以下描述中，將描述本發明之某些元件。此等元件可在特定實施例情況下論述，然而，應瞭解其可以任何方式且以任何數目組合以形成其他實施例。不同描述之實例及特定實施例不應理解為僅將本發明限制於明確描述之實施例。此描述應理解為揭示及涵蓋將明確描述之實施例與任何數目之所揭示及/或較佳之元件組合之實施例。此外，除非上下文另有指示，否則本申請案中所有所描述元件之任何排列與組合均應視為由此描述揭示。

【0154】 在本說明書之文本通篇中引用若干文件。本文引用之文件中之每一者(包括所有專利、專利申請案、科技出版物、製造商之技術規範、說明書等) (同上或同下)以全文引用之方式併入本文中。本文中之任何內容均不應視為承認本發明無權先於此類揭示內容。

批次，分批饋料

【0155】 本發明提供用於產生RNA分子及特定而言用於使用「批次」反應經由活體外轉錄(IVT)產生RNA分子之某些技術。熟習此項技術者將瞭解，術語「批次」或「批次反應」或類似術語用於指一種反應，諸

如轉錄反應，其中對至少一種組分(例如至少一種NTP，諸如UTP及/或GTP或其功能類似物)且視情況對一或多種其他組分(例如本文論述之反應混合物的組分)進行至少一次各別補充事件，視情況在同一各別補充事件中補充多種組分。在一些實施例中，補充反應混合物包括補充UTP或其功能類似物。在一些實施例中，補充反應混合物包括補充UTP或其功能類似物及GTP或其功能類似物。在一些實施例中，補充反應混合物包括補充其他組分，諸如ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物及/或一或多種鹽及/或一或多種酶(諸如聚合酶)及/或一或多種5'帽核苷酸及/或本文所描述之反應混合物的一或多種其他組分，諸如轉錄緩衝液、RNA酶抑制劑、DNA模板、5'帽及/或5'帽類似物等。在一些實施例中，在轉錄及/或加帽反應過程中補充反應混合物超過一次。

【0156】 在某些實施例中，在產生RNA或包含RNA之組合物的方法中使用分批饋料方法。術語「分批饋料方法」或「分批饋料反應」或類似術語係指其中起始反應混合物中存在部分或所有組分(批次反應)且其中在反應過程中偶而為反應補充一或多種組分之方法或反應。在一些實施例中，補充(例如藉由分批饋料方法引入)一或多種組分(諸如UTP或其功能類似物及/或GTP或其功能類似物)，以維持其在反應期間之低濃度或恢復其初始濃度與CTP及/或ATP或其功能類似物之初始濃度的比率。在一些實施例中，補充(例如藉由分批饋料方法引入)一或多種組分(諸如UTP或其功能類似物及/或GTP或其功能類似物)以補足在反應期間耗竭之組分。「補充反應混合物」係指在反應開始之後以各別量向反應中補充組分。然而，充分批饋料反應不限於補充各別量。在一些實施例中，補充包括藉由連續流補充，亦即，在轉錄及/或加帽反應過程中連續補充反應混合物之一或

多種組分。

【0157】 在一些實施例中，分批饋料方法涉及使用其中存在作為所要合成之RNA的一部分之所有核苷酸三磷酸的起始反應混合物；在其他實施例中，分批饋料方法涉及使用其中不存在作為所要合成之RNA的一部分之所有核苷酸三磷酸的起始反應混合物。

【0158】 在一些實施例中，起始反應混合物含有ATP、GTP、CTP及UTP或其功能類似物。在一些實施例中，所用之起始反應混合物實質上不含ATP或其功能類似物。在一些實施例中，起始反應混合物實質上不含GTP或其功能類似物。在一些實施例中，起始反應混合物實質上不含CTP或其功能類似物。在一些實施例中，起始反應混合物實質上不含UTP或其功能類似物。應瞭解，當所要合成之RNA經預測(例如根據所用之模板)包含不存在於起始反應混合物中之組分時，為了合成該RNA不得不補充此組分。

【0159】 在加帽及轉錄反應中，舉例而言，當RNA聚合酶介導核苷酸與帽類似物之間形成共價鍵時反應開始。應瞭解，加帽及轉錄反應與沒有加帽之轉錄反應之間的一個差異為存在向轉錄物之5'端提供帽結構之組分，諸如本文所描述之5'帽或5'帽類似物。

【0160】 本發明提供涉及分批饋料方法之技術，其中反應混合物之至少一種組分以限制量存在。「限制量」意謂限制反應組分以一定量存在，例如以限制直至反應停止之時間、直至反應停止時由方法產生之產物的量及轉錄速率中之一或多者的起始濃度存在。舉例而言，在一些實施例中，限制反應組分(例如UTP或其功能類似物及/或GTP或其功能類似物)之量限制直至轉錄及/或加帽反應停止之時間、直至轉錄及/或加帽反應停止

時產生之產物(例如RNA)的量及/或轉錄及/或加帽反應之速率(例如反應物轉化成產物之速率)中之一或多者。

【0161】 在一些實施例中，向反應中連續添加一或多種反應組分，且諸如藉由分批饋料方法向反應中週期性地添加諸如一或多種限制組分之一或多種組分。在某些實施例中，藉由分批饋料方法週期性地或間歇性地向反應中補充諸如限制組分(例如限制核苷酸)之組分。術語「週期性地」意謂「間隔地進行」，所述間隔可為「規則的」，意謂就諸如反應中之時間及/或濃度水準之特徵而言為「固定」的。術語「間歇性地」意謂「間隔地進行」。「間隔」指規則與不規則間隔兩者。應瞭解，「間歇性的」組分補充亦可為「週期性的」。將進一步瞭解，向反應中間歇性引入或補充組分意謂至少一次，而「週期性」引入或補充組分為至少兩次(以確定「有規則間隔」)。在一些實施例中，在轉錄及/或加帽反應過程中，組分(諸如限制組分，例如UTP及/或GTP或其功能類似物)可補充、至少補充或至多補充1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100或更多次，或其中可得到之任何範圍。在一些實施例中，UTP或其功能類似物補充至少一次。在一些實施例中，UTP或其功能類似物補充至少兩次。在其他實施例中，將UTP或其功能類似物間歇性地或週期性地引入反應中三次至50次。在一些實施例中，此類週期性補充可以一或多次大劑量或批量添加來進行，包括例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多次大劑量或批量添加。在一些實施例中，此類週期性補充可藉由分批饋料方法進行。補充亦可包括補充包含UTP或其功能類似物且包含其他組分(諸如緩衝劑、聚合酶CTP或其功能類似物、GTP或其

功能類似物、ATP或其功能類似物)之組合物，或可存在於如本文所描述之轉錄反應混合物中之其他組分。在一些實施例中，用於補充之組合物基本上不含CTP及/或ATP或其功能類似物。

DS RNA 污染物

【0162】 如此項技術中已知，在例如使用T7 RNA聚合酶或另一RNAP藉由轉錄反應(例如活體外轉錄(IVT))合成mRNA期間，歸因於酶之非習知活性產生了大量異常產物，包括雙股RNA (dsRNA) (例如涉及獨特RNA分子之雜交)。已顯示dsRNA誘導炎性細胞介素且活化導致蛋白質合成抑制之效應子酶。

【0163】 如本文中注意到，活體外轉錄反應之dsRNA污染可造成問題。已描述至少兩種不同類型之dsRNA污染物：(i)短dsRNA，其中反義片段與相關RNA轉錄物(例如mRNA產物)鹼基配對；及(ii)幾乎全長之dsRNA。兩者均可藉由啟動子依賴性或非啟動子依賴性RNAP (例如T7)活性產生；一些可能受模板內終止位點的影響。

【0164】 不希望受理論限制，吾等注意到多種機制已被建議用於在活體外轉錄期間製備dsRNA。舉例而言，在一些情況下，當已起始合成之酶在完成轉錄物之前夭折時可產生短RNA轉錄物(例如約5至約11 nt長)且可接著引發互補股之轉錄。替代地或另外，RNA摺疊回來可能會導致延長之轉錄，甚至產生超長(可能兩倍尺寸，或甚至更長)轉錄物。另外，替代地或另外，在某些開放模板結構處再起始轉錄可能會使得轉錄產生反義股。報道亦已表明模板終止位點可能會影響dsRNA之產生。

【0165】 本發明尤其提供用於減少RNA製劑中之dsRNA的技術。舉例而言，在一些實施例中，存在於根據本發明製備之RNA製劑中的

dsRNA相對於存在於例如使用等莫耳量之ATP、GTP、CTP及UTP製備之RNA製劑中的dsRNA有所減少。

【0166】 dsRNA之水準及因此其降低之水準可使用包括但不限於本文論述之彼等技術的多種技術中之任一者來測定。舉例而言，可將RNA在膜(諸如耐綸膜)上點樣，在適當緩衝液中阻斷且使用基於抗體之分析來進行偵測，使用對dsRNA具特異性之抗體(諸如J2抗體(SCICONS English and Scientific Consulting))，隨後用第二抗體抗小鼠HRP抗體(Jackson ImmunoResearch)染色(參見EP 18 717 580.7)。基於抗體之偵測方法為熟知的。RNA濃度亦可使用UV (例如Nanodrop)評估，UV亦可指示是否存在dsRNA濃度。RNA完整性可使用生物分析儀(Agilent)評估。

【0167】 術語「免疫原性」係指特定物質(特定而言RNA)在動物(諸如人類)體內引起免疫反應(例如先天免疫反應或適應性免疫反應或兩者)之能力。換句話說，免疫原性為誘導體液及/或細胞介導之免疫反應的能力。不想要之免疫原性包括有機體針對治療性物質(諸如藥物)之免疫反應。此反應可使治療之治療效應失活且可誘導有害作用。不希望受任何特定理論限制，咸信許多RNA製劑及特定而言藉由習知活體外轉錄反應產生之彼等RNA製劑之免疫原性係至少部分歸因於其中含有dsRNA。

【0168】 在一些實施例中，與諸如使用等莫耳量之腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物使用先前已知之方法自相同DNA模板轉錄之RNA及包含RNA之組合物相比，本文所描述之RNA製劑(例如藉由本文所提供之方法產生之RNA製劑)之免疫原性顯著更小。在一些實施例中，與使用等莫耳量之ATP、GTP、CTP及UTP或其功能類似物轉錄之RNA或包含RNA之組合物

相比，本發明之RNA或包含RNA之組合物(亦即，所提供之RNA製劑)之免疫原性小至少5%。在一些實施例中，免疫原性降低至少10%。在一些實施例中，免疫原性降低至少20%。在一些實施例中，免疫原性降低至少30%。在一些實施例中，免疫原性降低至少40%。在一些實施例中，免疫原性降低至少50%。在一些實施例中，免疫原性降低至少60%。在一些實施例中，免疫原性降低至少70%。在一些實施例中，免疫原性降低至少80%。在一些實施例中，免疫原性降低至少90%。在一些實施例中，免疫原性去除或基本上去除，亦即降低約100%。

【0169】 在一些實施例中，根據本發明轉錄之RNA或包含RNA之組合物(亦即，所提供之RNA製劑之免疫原性)及使用此項技術中已知之相關對照方法(諸如使用等莫耳量之ATP、GTP、CTP及UTP或其功能類似物)轉錄之RNA或包含RNA之組合物的相對免疫原性可藉由測定所提供之RNA製劑與給定量之使用對照方法(例如使用等莫耳量之ATP、GTP、CTP及UTP或其功能類似物)轉錄之RNA或包含RNA之組合物在相同程度上引發相同結果(例如表現相同量之蛋白質)的量來確定。在一實施例中，所提供之RNA製劑及其使用相關對照方法轉錄之相應對應物的相對免疫原性可藉由測定相對於相同量的使用對照方法轉錄之RNA或包含RNA之組合物，響應於投與根據本發明轉錄之RNA或包含RNA之組合物所分泌的細胞介素(例如IL-12、IFN- α 、TNF- α 、RANTES、MIP-1 α 或 β 、IL-6、IFN- β 或IL-8)之量來確定。舉例而言，若分泌達一半之細胞介素，則根據本發明轉錄之RNA或包含RNA之組合物之免疫原性比使用適當對照方法轉錄之RNA或包含RNA之組合物低50%。

【0170】 「顯著更小之免疫原性」係指免疫原性可偵測地降低。在

一實施例中，該術語係指降低使得可投與或重複投與有效量之RNA或包含RNA之組合物而不會觸發可偵測之免疫反應。在一些實施例中，該術語係指降低使得可重複投與RNA或包含RNA之組合物而不會引發足以可偵測地降低例如如包含RNA之組合物中所包含的RNA編碼之肽或蛋白質之表現的免疫反應。在一些實施例中，降低使得可重複投與RNA或包含RNA之組合物而不會引發足以消除由RNA編碼之肽或蛋白質之表現的免疫反應。

【0171】 如本文所證實，可藉由使用如本文所描述之根據本發明之方法轉錄RNA來降低RNA或包含RNA之組合物(亦即，RNA製劑)之免疫原性。在一些實施例中，在此類方法中，用於自模板轉錄RNA之反應混合物中之UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度。在一些實施例中，包括使用起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度的UTP或其功能類似物轉錄RNA且在轉錄反應過程中為轉錄反應混合物補充包含UTP或其功能類似物之組合物的方法與諸如使用等莫耳量之ATP、GTP、CTP及UTP或其功能類似物執行該方法之適當對照轉錄反應相比使得在轉錄期間dsRNA之形成減少。因此，在一些實施例中，如本文所描述，與使用等莫耳量之ATP、GTP、CTP及UTP或其功能類似物轉錄之RNA相比，根據本發明之方法轉錄RNA所產生之RNA的免疫原性更小。在一些實施例中，如本文所描述，與使用等莫耳量之ATP、GTP、CTP及UTP或其功能類似物轉錄之RNA相比，根據本發明之方法轉錄RNA使得RNA產率增加。

活體外轉錄反應

【0172】 如本文所描述，RNA可在活體外合成。活體外轉錄尤其容

許使用可例如添加至活體外轉錄反應中之帽類似物(例如非天然存在之帽類似物)。熟習此項技術者將瞭解，在許多實施例中，RNA分子之聚(A)尾(若存在)由所轉錄模板上之互補序列(例如由DNA模板中之聚(dT)序列)編碼。替代地或另外，在一些實施例中，如此項技術中已知，加帽及/或聚(A)尾添加可在轉錄之後以酶促方式達成。

【0173】 熟習此項技術者將瞭解，活體外轉錄反應典型地包括：(1) 模板(常常為DNA，典型地為線性的)，其包含引導相關序列轉錄之啟動子；(2)核糖核苷三磷酸(其可為天然化合物或類似物)；(3)緩衝系統(典型地包括鎂離子)；及(4) RNA聚合酶。因此，根據本發明，RNA轉錄反應典型地包括：(1)模板(例如DNA，典型地為線性的)，其可包含引導相關序列轉錄之啟動子；(2)核糖核苷三磷酸(天然或其功能類似物)；(3)緩衝系統，諸如本文所描述之緩衝液，例如根據所利用之RNA聚合酶選擇的緩衝液；及(4) RNA聚合酶。在一些實施例中，轉錄反應混合物可進一步包含RNA酶抑制劑。在一些實施例中，轉錄反應混合物可進一步包含焦磷酸酶(例如無機焦磷酸酶)。在一些實施例中，轉錄反應混合物可進一步包含一或多種鹽(例如單價鹽及/或二價鹽，諸如包含 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、三(羥甲基)胺基甲烷陽離子、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Mn^{2+} 之鹽)、還原劑(例如二硫蘇糖醇、2-巰基乙醇等)、亞精胺或其組合。在一些實施例中，以特定順序添加某些反應組分(例如最後添加焦磷酸酶及聚合酶)。在一些實施例中，在添加特定反應組分(例如焦磷酸酶、聚合酶)之後增加攪拌速率。

【0174】 熟習此項技術者將知道，尤其對於大規模(例如每次反應產生大於約50 ug，或更多通常大於約100 ug RNA的規模，或每微克模板產

生約120 ug至約180 ug之規模)而言，需要降低活體外轉錄反應之變化。舉例而言，在許多實施例中，可能需要控制單價或二價陽離子之濃度及/或反應溫度。在一些實施例中，根據本發明之反應混合物中之陽離子為 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、三(羥甲基)胺基甲烷陽離子、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Mn^{2+} 。舉例而言，在許多實施例中，可能需要控制 Mg^{2+} 之濃度及/或反應溫度。在一些實施例中，減少 Mg^{2+} 及/或增加溫度(參見例如Mu等人, *Nuc Acids Res.*10:5239)。

【0175】 在一些實施例中，本發明尤其提供用於例如以至少10 g RNA (包括例如至少15 g RNA、至少20 g RNA、至少25 g RNA、至少30 g RNA、至少35 g RNA、至少40 g RNA、至少45 g RNA、至少50 g RNA、至少55 g RNA、至少60 g RNA、至少70 g RNA、至少80 g RNA、至少90 g RNA、至少100 g RNA、至少150 g RNA、至少200 g RNA或更多)之質量批量生產量大規模製造醫藥級包含RNA之組合物或製劑的技術。在一些實施例中，本文所描述之此類方法可用於產生約10 g至約300 g RNA、約10 g至約200 g RNA、約10 g至約100 g RNA、約30 g至約60 g RNA或約50 g RNA至300 g RNA之質量批量生產量。在一些實施例中，本文所描述之此類方法適用於大規模製造，該大規模製造產生每小時至少1 g或更多RNA，諸如每小時至少1.5 g RNA (包括例如每小時至少2 g RNA、每小時至少2.5 g RNA、每小時至少3 g RNA、每小時至少3.5 g RNA、每小時至少4 g RNA、每小時至少4.5 g RNA、每小時至少5 g RNA、每小時至少5.5 g RNA、每小時至少6 g RNA、每小時至少6.5 g RNA、每小時至少7 g RNA、每小時至少7.5 g RNA、每小時至少8 g RNA、每小時至少8.5 g RNA、每小時至少9 g RNA、每小時至少10 g

RNA或更高)之質量批量生產量。在一些實施例中，本文所描述之大規模製造方法可達至每小時15 g RNA至每小時20 g RNA (例如每小時約17g)之能力。

【0176】 熟習此項技術者將瞭解，術語「聚合酶」通常指能夠催化自單聚構建組元合成聚合分子之分子實體。「RNA聚合酶」為能夠催化自核糖核苷酸構建組元合成RNA分子之分子實體。「RNA依賴性RNA聚合酶」或「RdRP」為催化自RNA模板轉錄RNA之酶。「DNA聚合酶」為能夠催化自去氧核糖核苷酸構建組元合成DNA分子之分子實體。在DNA聚合酶及RNA聚合酶之情況下，分子實體典型地為蛋白質或多個蛋白質之組裝物或複合物。典型地，DNA聚合酶基於模板核酸合成DNA分子，該模板核酸典型地為DNA分子。典型地，RNA聚合酶基於模板核酸合成RNA分子，該模板核酸為DNA分子(在該情況下RNA聚合酶為DNA依賴性RNA聚合酶，DdRP)，或為RNA分子(在該情況下RNA聚合酶為RNA依賴性RNA聚合酶，RdRP)。

【0177】 適合於轉錄反應之各種RNA聚合酶為此項技術中已知的，包括但不限於DNA依賴性RNA聚合酶(例如T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶、SP6 RNA聚合酶、N4病毒體RNA聚合酶或其變異體或功能結構域)。天然催化之RNA依賴性RNA聚合酶典型地由除反轉錄病毒外之所有RNA病毒編碼。編碼RNA依賴性RNA聚合酶之病毒的典型代表為 α 病毒。熟練人員將瞭解，本文所用之RNA聚合酶可為重組RNA聚合酶及/或經純化之RNA聚合酶，亦即不作為除RNA聚合酶外含有其他組分的細胞萃取物之一部分。在一些實施例中，適用於大規模轉錄之RNA聚合酶為T7 RNA聚合酶。在一些實施例中，可添加無機焦磷酸酶以改良轉錄反應之產率(例

如在由T7 RNA聚合酶催化之一些實施例中)。

【0178】 本發明尤其確定限制核苷酸可減少活體外反應中dsRNA之形成。本發明特定而言證實，限制UTP活體外轉錄反應可減少dsRNA之形成，且可特定而言適用於產生可包括聚A序列(諸如聚A尾)之轉錄物。不希望受理論限制，吾等認為所觀測到之dsRNA產生減少可能可歸因於反向轉錄(例如在與諸如聚A尾之聚A序列雜交後起始)之減少。

【0179】 熟習此項技術者將瞭解，如本文所用之「限制UTP」意謂對在功能上與模板中之A殘基配對使得其用於模板化合成中(亦即，活體外轉錄反應中)且併入所產生之股的核苷酸之水準進行限制；此類核苷酸在本文中稱為「UTP或其功能類似物」)。在一些實施例中，功能類似物亦典型地可轉譯為「U」。

【0180】 因此，本發明尤其提供某些活體外轉錄技術，其中對UTP(及/或其功能類似物)之濃度進行限制，例如使其低於CTP及/或ATP或其功能類似物之濃度。在一些實施例中，在反應起始時限制UTP。在一些實施例中，在整個反應中限制UTP。

【0181】 舉例而言，本發明提供活體外轉錄反應，其中對UTP進行限制(例如UTP及其功能類似物之濃度低於其他核苷酸(亦即，腺苷三磷酸(ATP)及其功能類似物、鳥苷三磷酸(GTP)及其功能類似物及胞苷三磷酸(CTP)及其功能類似物)中之一或多者。

【0182】 此外，本發明尤其提供其中在初始活體外轉錄反應時如本文所描述對UTP進行限制之技術。在一些實施例中，本發明尤其提供其中隨時間推移為進行UTP限制之初始活體外轉錄反應補充UTP或其功能類似物的技術；在一些此類實施例中，此類補充係藉由一或多次各別饋送事件

來進行。在一些實施例中，此類補充可藉由連續方法來進行，例如在一些實施例中，其中UTP補充之速率類似於在轉錄反應期間UTP消耗之速率。在一些實施例中，在補充期間限制UTP (例如以一定濃度補充，使得在此類補充之後，在反應中UTP或其功能類似物以低於ATP或其功能類似物、GTP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之一或多者且在一些實施例中低於全部的濃度存在。

【0183】 在一些實施例中，為活體外轉錄反應補充複數種核苷酸(例如補充UTP或其功能類似物且亦補充一或多種其他核苷酸，例如ATP或其功能類似物、GTP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物)。

【0184】 在一些實施例中，在初始反應中及/或在補充期間對UTP與GTP兩者進行限制。

RNA產物

【0185】 本發明提供適用於產生RNA產物(亦即，用於製造特定RNA產物之製劑)之技術。

【0186】 在本發明之某些實施例中，所產生之RNA為例如與編碼肽或蛋白質之RNA轉錄物有關之信使RNA (mRNA)。如此項技術中已知，在許多情況下，mRNA可含有5'非轉譯區(5' UTR)、肽編碼區及3'非轉譯區(3' UTR)。

【0187】 在一些實施例中，藉由活體外轉錄來產生RNA產物。在一些實施例中，例如使用DNA模板(其中DNA係指含有去氧核糖核苷酸之核酸)藉由活體外轉錄來產生mRNA產物。在一些實施例中，RNA合成亦可在細胞或其他系統內進行。

【0188】 在一些實施例中，RNA產物為活體外轉錄之RNA (IVT-

RNA)且可藉由適當DNA模板之活體外轉錄來獲得。

【0189】 在某些實施例中，DNA模板為線型分子。在某些實施例中，DNA模板為環狀分子。通常，可使用此項技術中已知之方法來獲得或產生DNA，包括例如基因合成、重組DNA技術或其組合。在一些實施例中，DNA模板包含編碼相關轉錄區(例如編碼RNA，諸如本文所描述之RNA)之核苷酸序列及由經選擇用於活體外轉錄之RNA聚合酶識別之啟動子序列。用於控制轉錄之啟動子可為用於任何RNA聚合酶之任何啟動子。各種RNA聚合酶為此項技術中已知的且示例性聚合酶揭示於本文中。熟練技工讀了本發明將容易理解，本文所用之RNA聚合酶可為重組RNA聚合酶及/或經純化之RNA聚合酶，亦即不作為除RNA聚合酶外含有其他組分之細胞萃取物的一部分。熟習此項技術者將識別用於所選RNA聚合酶之適當啟動子序列。在一些實施例中，DNA模板可包含用於T7 RNA聚合酶之啟動子序列。用於活體外轉錄之DNA模板可藉由對核酸(諸如cDNA)進行選殖且將其引入用於活體外轉錄之適當載體中來獲得。用於將核酸序列引入載體中之技術為此項技術中熟知的，例如低溫融合選殖及其他技術。cDNA可藉由RNA之反轉錄來獲得。

【0190】 在一些實施例中，可用於本文所描述之技術的RNA為單股RNA(例如如本文所描述之mRNA)。在一些實施例中，單股RNA為非編碼RNA，因為其核苷酸序列不包括開放閱讀框(或其互補序列)。在一些實施例中，單股RNA具有編碼如本文所描述之多肽之核苷酸序列(或為編碼如本文所描述之多肽之序列的互補序列)。

【0191】 在一些實施例中，本文所描述之技術可特定而言適用於合成長度為至少500個核糖核苷酸(諸如至少600個核糖核苷酸、至少700個

核糖核苷酸、至少800個核糖核苷酸、至少900個核糖核苷酸、至少1000個核糖核苷酸、至少1250個核糖核苷酸、至少1500個核糖核苷酸、至少1750個核糖核苷酸、至少2000個核糖核苷酸、至少2500個核糖核苷酸、至少3000個核糖核苷酸、至少3500個核糖核苷酸、至少4000個核糖核苷酸、至少4500個核糖核苷酸、至少5000個核糖核苷酸、至少6000個核糖核苷酸、至少7000個核糖核苷酸、至少8000個核糖核苷酸、至少9000個核糖核苷酸、至少10000個核糖核苷酸、至少11000個核糖核苷酸、至少12000個核糖核苷酸或更長)之單股RNA。在一些實施例中，本文所描述之技術可特定而言適用於合成長度為約1000個核糖核苷酸至5000個核糖核苷酸之單股RNA。

【0192】 在一些實施例中，相關RNA包括多肽編碼部分。在一些特定實施例中，此類部分可編碼為或包含抗原(或其抗原決定基)、細胞介素、酶等之多肽。在一些實施例中，所編碼之多肽可為或包括與腫瘤相關之一或多個新抗原或新抗原決定基。在一些實施例中，所編碼之多肽可為或包括感染物(例如細菌、真菌、病毒等)之抗原(或其抗原決定基)。在某些實施例中，所編碼之多肽可為野生型多肽之變異體。

【0193】 本發明特定而言例示編碼病毒抗原(及/或其抗原決定基)(例如冠狀病毒抗原及/或抗原決定基)之RNA的製造。舉例而言，在一些實施例中，本發明例示核苷酸序列編碼冠狀病毒多肽或其變異體之單股RNA的產生。在一些實施例中，單股RNA包含編碼例如如WO 2018081318中所描述之融合前(prefusion)冠狀病毒刺突蛋白的核苷酸序列，該專利之全部內容出於本文所描述之目的以引用之方式併入本文中。

【0194】 在一些實施例中，單股RNA包含編碼SARS-CoV-2多肽(包

括例如刺突(S)蛋白、核衣殼(N)蛋白、包膜(E)蛋白及膜(M)蛋白)或其免疫原性片段之核苷酸序列。在一些實施例中，單股RNA包含編碼SARS-CoV-2 S多肽或其免疫原性片段(例如S蛋白之受體結合結構域)之核苷酸序列。在一些實施例中，此類SARS-CoV-2 S多肽或其免疫原性片段可為突變體蛋白質。在一些實施例中，用於根據本發明之用途的RNA編碼具有K986P及V978P突變之SARS-CoV-2刺突蛋白。

【0195】 在一些實施例中，單股RNA (例如如本文所描述之mRNA)可包含分泌信號編碼區(例如允許所編碼之目標實體在轉譯後由細胞分泌之分泌信號編碼區)。在一些實施例中，此類分泌信號編碼區可為或包含非人類分泌信號。在一些實施例中，此類分泌信號編碼區可為或包含人類分泌信號。

【0196】 在一些實施例中，單股RNA (例如如本文所描述之mRNA)可包含至少一個非編碼序列元件(例如用於增強RNA穩定性及/或轉譯效率)。非編碼序列元件之實例包括但不限於3'非轉譯區(UTR)、5' UTR、用於mRNA之共轉錄加帽的帽結構、聚腺嘌呤(聚A)尾及其任何組合。

【0197】 *UTR (5' UTR及/或3'UTR)*：在一些實施例中，單股RNA可包含編碼相關5'UTR及/或相關3' UTR之核苷酸序列。熟習此項技術者將瞭解，mRNA序列之非轉譯區(例如3' UTR及/或5' UTR)可促進mRNA穩定性、mRNA定位及/或轉譯效率。在一些實施例中，非轉譯區(UTR)可存在於開放閱讀框之5' (上游) (5' UTR)及/或開放閱讀框之3' (下游) (3' UTR)。

【0198】 在一些實施例中，單股RNA可包含5' UTR核苷酸序列及/或3' UTR核苷酸序列。在一些實施例中，此類5' UTR序列可操作地鍵聯至

編碼序列(例如涵蓋一或多個編碼區)之3'。另外或或者，在一些實施例中，3' UTR序列可操作地鍵聯至編碼序列(例如涵蓋一或多個編碼區)之5'。在一些實施例中，根據本發明，5'-非轉譯區及/或3'-非轉譯區可在功能上鍵聯至開放閱讀框，使得此等區域與開放閱讀框以使得包含該開放閱讀框之RNA的穩定性及/或轉譯效率增加之方式締合。

【0199】 在一些實施例中，單股RNA中包括之5'及3' UTR序列可由天然存在或對於相關基因之開放閱讀框而言為內源性之5'及3' UTR序列組成或包含天然存在或對於相關基因之開放閱讀框而言為內源性之5'及3' UTR序列。或者，在一些實施例中，單股RNA中之包括5'及/或3' UTR序列對於編碼序列(例如涵蓋一或多個編碼區)而言不為內源性的；在一些此類實施例中，此類5'及/或3' UTR序列可適用於改變所轉錄之RNA序列之穩定性及/或轉譯效率。舉例而言，熟練技工將瞭解，3' UTR序列中之富AU元件可降低mRNA之穩定性。因此，如熟練技工將瞭解，可對3'及/或5' UTR進行選擇或設計以基於此項技術中熟知之UTR特性增加所轉錄之RNA的穩定性。

【0200】 舉例而言，熟習此項技術者將瞭解，在一些實施例中，可選擇由相關基因或核苷酸序列之開放閱讀框序列之Kozak序列組成或包含相關基因或核苷酸序列之開放閱讀框序列之Kozak序列的核苷酸序列且用作編碼5' UTR之核苷酸序列。如熟練技工將瞭解，已知Kozak序列增加一些RNA轉錄物之轉譯效率，但不一定為所有RNA實現高效轉譯所需的。在一些實施例中，單股RNA可包含編碼源自於RNA基因體在細胞中穩定之RNA病毒的5' UTR之核苷酸序列。在一些實施例中，各種經修飾之核糖核苷酸(例如如本文所描述)均可用於3'及/或5' UTR中，例如用於妨礙所

轉錄之RNA序列之外核酸酶降解。

【0201】 如熟習此項技術者所知，Kozak序列為最初由Kozak, (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15: 8125–8148描述之序列。RNA分子(諸如mRNA分子)上之Kozak序列由核糖體識別為轉譯起始位點。典型地，Kozak序列包含AUG起始密碼子，隨後緊接著為高度保守之G核苷酸：AUGG。特定而言，據描述Kozak序列可藉由(gcc)gccRccAUGG如下加以鑑定：(i)小寫字母表示在一位置處之最常見鹼基，然而其中鹼基可改變；(ii)大寫字母指示高度保守之鹼基(例如『AUGG』)；(iii)『R』指示嘌呤(腺嘌呤或鳥嘌呤)；(iv)括號中之序列((gcc))具有不確定之意義；(v)加下劃線之AUG鹼基三聯體表示起始密碼子。

【0202】 在一些實施例中，根據本發明產生之RNA包含

- (1) 5' UTR,
- (2) 開放閱讀框，例如其編碼相關肽或蛋白質，及/或
- (3) 3' UTR。

【0203】 在一些實施例中，此類5' UTR序列可操作地鍵聯至編碼序列(例如涵蓋一或多個編碼區)之3'。另外又或者，在一些實施例中，3' UTR序列可操作地鍵聯至編碼序列(例如涵蓋一或多個編碼區)之5'。

【0204】 在一些實施例中，單股RNA中包括之5' UTR可來源於與Kozak區組合之人類 α -球蛋白mRNA。

【0205】 在一些實施例中，單股RNA可包含一或多個3'UTR。舉例而言，在一些實施例中，單股RNA可包含源自於球蛋白mRNA (諸如 α 2-球蛋白、 α 1-球蛋白、 β -球蛋白(例如人類 β -球蛋白) mRNA)之3'-UTR的兩個拷貝。在一些實施例中，可使用源自於人類 β -球蛋白mRNA之3'UTR的

兩個拷貝，例如在一些實施例中，可將其放置於單股RNA之編碼序列與聚(A)尾之間，以改良mRNA之蛋白質表現水準及/或延長之持久性。在一些實施例中，單股RNA中包括之3' UTR可為或包含一或多個(例如1、2、3或更多)揭示於WO 2017/060314中之3' UTR序列，該專利之全部內容出於本文所描述之目的以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，3'-UTR可為源自於「分裂之胺基端增強子」(AES) mRNA (稱為F)及粒線體編碼之12S核糖體RNA (稱為I)之至少兩個序列元件之組合(FI元件)。對於賦予RNA穩定性且增強總蛋白表現之序列，此等係藉由離體選擇過程來鑑定(參見以引用之方式併入本文中之WO 2017/060314)。

【0206】 人類 β -球蛋白3' UTR (特定而言人類 β -球蛋白3' UTR之兩個連續一致拷貝)促成高轉錄物穩定性及轉譯效率(Holtkamp等人, (2006), Blood,108: 4009-4017)。因此，在一些實施例中，根據本發明之複製酶構築體包含人類 β -球蛋白3' UTR之兩個連續一致拷貝。因此，其在5' \rightarrow 3'方向上包含：(a)視情況存在之5' UTR；(b)開放閱讀框；(c) 3' UTR；該3' UTR包含人類 β -球蛋白3' UTR、其片段或人類 β -球蛋白3' UTR或其片段之變異體之兩個連續一致拷貝。

【0207】 在一些實施例中，根據本發明之RNA包含3' UTR，該3' UTR為活性的以增加轉譯效率及/或穩定性，但其不為人類 β -球蛋白3' UTR、其片段或人類 β -球蛋白3' UTR或其片段之變異體。

【0208】 **聚A尾**：在一些實施例中，單股RNA可包含聚A尾。聚A尾為包含一系列腺苷核苷酸之核苷酸序列，其長度可改變(例如至少5個腺嘌呤核苷酸)且可達至數百個腺苷核苷酸。聚A尾可自模板(例如DNA模板)轉錄，或可在轉錄反應之後以酶促方式添加。在一些實施例中，聚A尾為包

含至少30個或更多個腺苷核苷酸，包括例如至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100個或更多個腺苷核苷酸之核苷酸序列。在一些實施例中，聚A尾為或包含聚A均聚體尾部。在一些實施例中，聚A尾可包含一或多個經修飾之腺苷核苷，包括但不限於蟲草素及8-氮雜腺苷。在一些實施例中，聚A尾可包含一或多個非腺苷核苷酸。在一些實施例中，聚A尾可為或包含如WO 2016/005324中所描述之受到破壞或經修飾之聚A尾，該專利之全部內容出於本文所描述之目的以引用之方式併入本文中。舉例而言，在一些實施例中，本文所描述之單股RNA中包括之聚A尾可為或包含經修飾之聚A序列，其包含：連接子序列；至少20個連續A核苷酸之第一序列，其為連接子序列之5'；及至少20個連續A核苷酸之第二序列，其為連接子序列之3'。在一些實施例中，經修飾之聚A序列可包含：連接子序列，其包含至少十個核苷酸(例如U、G及/或C核苷酸)；至少30個連續A核苷酸之第一序列，其為連接子序列之5'；及至少70個連續A核苷酸之第二序列，其為連接子序列之3'。

【0209】 在一些實施例中，聚(A)尾包含至少20個、在一些實施例中至少26個、在一些實施例中至少40個、在一些實施例中至少80個、在一些實施例中至少100個且在一些實施例中至多500個、在一些實施例中至多400個、在一些實施例中至多300個、在一些實施例中至多200個、在一些實施例中至多150個且特定而言約120個A核苷酸或基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，聚(A)尾為包含至少30個或更多個腺苷核苷酸，包括例如至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100個

或更多個腺苷核苷酸之核苷酸序列。在此背景下，「基本上由……組成」意謂聚(A)尾中之大多數核苷酸(典型地以「聚(A)尾」中核苷酸之數目計至少50%且在一些實施例中至少75%)為A核苷酸(腺嘌呤核苷酸)，但容許其餘核苷酸為除A核苷酸外之核苷酸，諸如U核苷酸(尿嘧啶核苷酸)、G核苷酸(鳥嘌呤核苷酸)、C核苷酸(胞嘧啶核苷酸)。在此背景下，「由……組成」意謂聚(A)尾中之所有核苷酸(亦即按聚(A)尾中核苷酸之數目計100%)為核苷酸。術語「A核苷酸」或「A」係指腺嘌呤核苷酸。

【0210】實際上，已證實約120個A核苷酸之3'聚(A)尾對所轉染真核細胞中之RNA水準以及自存在於3'聚(A)尾之上游(5')的開放閱讀框轉譯之蛋白質水準具有有益影響(Holtkamp等人, (2006), Blood,108: 4009-4017)。

【0211】根據本發明，在一些實施例中，在RNA轉錄期間，亦即在基於在與編碼股互補之股中包含重複dT核苷酸(去氧胸苷酸)之DNA模板製備活體外轉錄之RNA期間連接3'聚(A)尾。編碼聚(A)尾之DNA序列(編碼股)稱為聚(A)盒。

【0212】**5'帽**：在一些實施例中，如本文所描述製備之RNA產物(例如單股RNA)可包含5'帽，其可在轉錄期間併入此類單股RNA，或在轉錄後與此類RNA連接。在一些實施例中，RNA可包含用於mRNA之共轉錄加帽之5'帽結構。用於共轉錄加帽之帽結構之實例為此項技術中已知的，包括例如如WO 2017/053297中所描述，該專利之全部內容出於本文所描述之目的以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所描述之RNA產物中包括之5'帽為或包含帽1結構。舉例而言，在一些實施例中，帽1結構可為或包含m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG，亦稱為m₂^{7,3'}

$^{\circ}\text{Gppp}(\text{m}_1^{2'}\text{-}^{\circ})\text{ApG}$ 。

【0213】 在一些實施例中，如本文所描述產生之RNA產物(例如單股RNA)可包含至少一個經修飾之核糖核苷酸，例如在一些實施例中，用於增加此類RNA產物之穩定性及/或用於降低此類RNA產物之細胞毒性。舉例而言，在一些實施例中，單股RNA之A、U、C及G核糖核苷酸中之至少一者可由經修飾之核糖核苷酸置換。舉例而言，在一些實施例中，存在於單股RNA中之一些或所有胞苷殘基可由經修飾之胞苷置換，該經修飾之胞苷在一些實施例中可為例如5-甲基胞苷。替代地或另外，在一些實施例中，存在於單股RNA中之一些或所有尿苷殘基可由經修飾之尿苷置換，該經修飾之尿苷在一些實施例中可為例如假尿苷，諸如1-甲基假尿苷。在一些實施例中，存在於單股RNA中之所有尿苷殘基由假尿苷(例如1-甲基假尿苷)置換。

DNA模板

【0214】 一般熟習此項技術者將瞭解，DNA模板典型地用於直接合成RNA (例如單股RNA)。在一些實施例中，DNA模板為線性DNA分子。在一些實施例中，DNA模板為環狀DNA分子。DNA可使用此項技術中已知之方法獲得或產生，包括例如基因合成、重組DNA技術或其組合。在一些實施例中，DNA模板包含編碼相關轉錄區(例如編碼本文所描述之RNA)之核苷酸序列及由經選擇用於活體外轉錄之RNA聚合酶識別之啟動子序列。各種RNA聚合酶為此項技術中已知的，包括例如DNA依賴性RNA聚合酶(例如T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶、SP6 RNA聚合酶、N4病毒體RNA聚合酶或其變異體或功能結構域)。熟練技工將容易理解，本文所用之RNA聚合酶可為重組RNA聚合酶及/或經純化之RNA聚合酶，亦

即不作為除RNA聚合酶外含有其他組分之細胞萃取物的一部分。熟習此項技術者將識別用於所選RNA聚合酶之適當啟動子序列。在一些實施例中，DNA模板可包含用於T7 RNA聚合酶之啟動子序列。

【0215】 在一些實施例中，DNA模板包含編碼本文所描述之RNA的核苷酸序列(例如包含編碼相關抗原的核苷酸序列且視情況包含編碼本文所描述之RNA之特徵元件的一或多個核苷酸序列，本文所描述之RNA之特徵元件包括例如聚A尾、3' UTR及/或5' UTR等)。在一些實施例中，可藉由基因合成產生此類編碼序列。在一些實施例中，可藉由低溫融合選殖將此類編碼序列插入載體中。

【0216】 在一些實施例中，DNA模板可進一步包含用於適當限制內核酸酶(例如用於線性化)、適當抗性基因及/或適當複製起點之識別序列中之一或多者。在一些實施例中，DNA模板可進一步包含用於適當限制內核酸酶(例如用於線性化，諸如但不限於II類限制內核酸酶)、適當抗性基因(例如但不限於卡那黴素(kanamycin)抗性基因)及適當複製起點之識別序列。

【0217】 在一些實施例中，DNA模板可例如經由聚合酶鏈反應(PCR)自質體DNA擴增或已例如經由聚合酶鏈反應(PCR)自質體DNA擴增。在一些實施例中，可例如自細菌細胞(例如大腸桿菌(*Escherichia coli*/*E. coli*))獲得質體DNA，隨後進行不含內毒素及動物產品之質體分離程序。

核糖核苷酸

【0218】 用於活體外轉錄之核糖核苷酸可包括至少兩種或更多種(例如至少三種或更多種、至少四種或更多種、至少五種或更多種、至少六種

或更多種)不同類型之核糖核苷酸，各種類型具有不同之核苷。用於活體外轉錄之核糖核苷酸可包括未經修飾及/或經修飾之核糖核苷酸。未經修飾之核糖核苷酸包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G)，及嘧啶鹼基胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。在一些實施例中，所有四種類型之未經修飾之核糖核苷酸均可用於活體外轉錄。

【0219】 在一些實施例中，活體外轉錄中包括之至少一種類型之核糖核苷酸為經修飾之核糖核苷酸。經修飾之核糖核苷酸可包括一或多種修飾，包括但不限於例如(a)末端修飾，例如5'端修飾(例如磷酸化、去磷酸化、結合、反向鍵聯等)、3'端修飾(例如結合、反向鍵聯等)，(b)鹼基修飾，例如用經修飾之鹼基、穩定化鹼基、去穩定化鹼基或與擴大之配偶體譜鹼基配對之鹼基或結合之鹼基置換，(c)糖修飾(例如在2'位置或4'位置)或糖置換，及(d)核苷間鍵聯修飾，包括磷酸二酯鍵之修飾或置換。在此類修飾妨礙轉譯(例如相對於不存在該修飾使得轉譯減少50%或更多，例如如使用兔網狀紅血球活體外轉譯分析所表徵)之情況下，在一些實施例中不希望此類經修飾之核糖核苷酸用於本文所描述之技術中。

【0220】 在一些實施例中，可利用一或多種經修飾之核苷，諸如腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)中之一或多者之一或多種功能類似物。當ATP、GTP、CTP或UTP中之任一者之功能類似物用於根據本發明之方法中時，所得RNA分子將包含此等功能類似物分別代替ATP、GTP、CTP或UTP。

【0221】 在一些實施例中，經修飾之核糖核苷酸可具有至少一種核苷(「鹼基」)修飾或取代。各種核苷修飾或取代為此項技術中已知的；熟習此項技術者將瞭解，經修飾之核苷包括例如但不限於合成及天然核鹼

基，諸如肌苷、黃嘌呤、次黃嘌呤、水粉蕈素(nubularine)、異鳥苷、殺結核菌素(tubercidine)、2-(鹵代)腺嘌呤、2-(烷基)腺嘌呤、2-(丙基)腺嘌呤、2-(胺基)腺嘌呤、2-(胺基烷基)腺嘌呤、2-(胺基丙基)腺嘌呤、2-(甲硫基)-N6-(異戊烯基)腺嘌呤、6-(烷基)腺嘌呤、6-(甲基)腺嘌呤、7-(去氫)腺嘌呤、8-(烯基)腺嘌呤、8-(烷基)腺嘌呤、8-(炔基)腺嘌呤、8-(胺基)腺嘌呤、8-(鹵代)腺嘌呤、8-(羥基)腺嘌呤、8-(硫烷基)腺嘌呤、8-(硫醇)腺嘌呤、N6-(異戊基)腺嘌呤、N6-(甲基)腺嘌呤、N6,N6-(二甲基)腺嘌呤、2-(烷基)鳥嘌呤、2-(丙基)鳥嘌呤、6-(烷基)鳥嘌呤、6-(甲基)鳥嘌呤、7-(烷基)鳥嘌呤、7-(甲基)鳥嘌呤、7-(去氫)鳥嘌呤、8-(烷基)鳥嘌呤、8-(烯基)鳥嘌呤、8-(炔基)鳥嘌呤、8-(胺基)鳥嘌呤、8-(鹵代)鳥嘌呤、8-(羥基)鳥嘌呤、8-(硫烷基)鳥嘌呤、8-(硫醇)鳥嘌呤、N-(甲基)鳥嘌呤、2-(硫代)胞嘧啶、3-(去氫)-5-(氮雜)胞嘧啶、3-(烷基)胞嘧啶、3-(甲基)胞嘧啶、5-(烷基)胞嘧啶、5-(炔基)胞嘧啶、5-(鹵代)胞嘧啶、5-(甲基)胞嘧啶、5-(丙炔基)胞嘧啶、5-(丙炔基)胞嘧啶、5-(三氟甲基)胞嘧啶、6-(偶氮基)胞嘧啶、N4-(乙醯基)胞嘧啶、3-(3胺基-3羧基丙基)尿嘧啶、2-(硫代)尿嘧啶、5-(甲基)-2-(硫代)尿嘧啶、5-(甲基胺基甲基)-2(硫代)尿嘧啶、4-(硫代)尿嘧啶、5-(甲基)-4(硫代)尿嘧啶、5-(甲基胺基甲基)-4(硫代)尿嘧啶、5-(甲基)-2,4-(二硫代)尿嘧啶、5-(甲基胺基甲基)-2,4(二硫代)尿嘧啶、5-(2-胺基丙基)尿嘧啶、5-(烷基)尿嘧啶、5-(炔基)尿嘧啶、5-(烯丙基胺基)尿嘧啶、5-(胺基烯丙基)尿嘧啶、5-(胺基烷基)尿嘧啶、5-(胍烷基)尿嘧啶、5-(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶、5-(氰基烷基)尿嘧啶、5-(二烷基胺基烷基)尿嘧啶、5-(二甲基胺基烷基)尿嘧啶、5-(鹵代)尿嘧啶、5-(甲氧基)尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、5-(甲氧基羰基甲基)-2-(硫

代)尿嘧啶、5-(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶、5-(丙炔基)尿嘧啶、5-(丙炔基)尿嘧啶、5-(三氟甲基)尿嘧啶、6-(偶氮基)尿嘧啶、二氫尿嘧啶、N3-(甲基)尿嘧啶、5-尿嘧啶(亦即，假尿嘧啶)、2-(硫代)假尿嘧啶、4-(硫代)假尿嘧啶、2,4-(二硫代)假尿嘧啶、5-(烷基)假尿嘧啶、5-(甲基)假尿嘧啶、5-(烷基)-2-(硫代)假尿嘧啶、5-(甲基)-2-(硫代)假尿嘧啶、5-(烷基)-4(硫代)假尿嘧啶、5-(甲基)-4(硫代)假尿嘧啶、5-(烷基)-2,4(二硫代)假尿嘧啶、5-(甲基)-2,4(二硫代)假尿嘧啶、1-取代之假尿嘧啶(例如1-甲基-假尿苷)、C-5丙炔基-尿苷、2-胺基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、1-取代-2(硫代)-假尿嘧啶、1-取代之4(硫代)假尿嘧啶、1-取代之2,4-(二硫代)假尿嘧啶、1-(胺基羰基乙烯基)-假尿嘧啶、1-(胺基羰基乙烯基)-2(硫代)-假尿嘧啶、1(胺基羰基乙烯基)-4(硫代)假尿嘧啶、1-(胺基羰基乙烯基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶、1-(胺基烷基胺基羰基乙烯基)-假尿嘧啶、1(胺基烷基胺基-羰基乙烯基)-2(硫代)-假尿嘧啶、1-(胺基烷基胺基羰基乙烯基)-4(硫代)假尿嘧啶、1-(胺基烷基胺基羰基乙烯基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶、1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、7-取代之1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、7-取代之1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、7-取代之1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、7-取代之1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、7-(胺基烷基羰基)-1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、-(胺基烷基羰基)-1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、7-(胺基烷基羰基)-1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、7-(胺基烷基羰基)-1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、7-(胍烷基羰基)-1,3-

(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、7-(胍烷基羥基)-1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、7-(胍烷基-羥基)-1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁嗪-1-基、7-(胍烷基羥基)-1-(氮雜)-2-(硫代)-3-(氮雜)-吩噁嗪-1-基、1,3,5-(三氮雜)-2,6-(二氧雜)-蔡、肌苷、黃嘌呤、次黃嘌呤、水粉蕈素、殺結核菌素、異鳥苷、肌苷基、2-氮雜-肌苷基、7-去氮-肌苷基、硝基咪唑基、硝基吡唑基、硝基苯并咪唑基、硝基吡啶基、胺基吡啶基、吡咯并嘧啶基、3-(甲基)異喹啉酮基(isocarbostrylyl)、5-(甲基)異喹啉酮基、3-(甲基)-7-(丙炔基)異喹啉酮基、7-(氮雜)吡啶基、6-(甲基)-7-(氮雜)吡啶基、咪唑并吡啶基、9-(甲基)-咪唑并吡啶基、吡咯并吡嗪基、異喹啉酮基、7-(丙炔基)異喹啉酮基、丙炔基-7-(氮雜)吡啶基、2,4,5-(三甲基)苯基、4-(甲基)吡啶基、4,6-(二甲基)吡啶基、苯基、蔡基、蔥基、菲基、茈基、芪基、并四苯基(tetracenylyl)、并五苯基、二氟甲苯基、4-(氟)-6-(甲基)苯并咪唑、4-(甲基)苯并咪唑、6-(偶氮基)胸腺嘧啶、2-吡啶酮、5硝基吡啶、3硝基吡咯、6-(氮雜)嘧啶、2(胺基)嘌呤、2,6-(二胺基)嘌呤、5取代之嘧啶、N2-取代之嘌呤、N6-取代之嘌呤、O6-取代之嘌呤、經取代之1,2,4-三唑、吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、對位取代-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、鄰位取代-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、雙鄰位取代-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、對(胺基烷基羥基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、鄰(胺基烷基羥基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、雙鄰(胺基烷基羥基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、吡啶并嘧啶-3-基、2-側氧基-7-胺基-吡啶并嘧啶-3-基、2-側氧基-吡啶并嘧啶-3-基或其任何O-烷基化或N-烷基化衍生物。

【0222】 在一些實施例中，本文所描述之IVT系統及/或方法中所用

之經修飾之核苷酸可破壞RNA與包括例如但不限於以下之一或多個哺乳動物(例如人類)內源性RNA感測器(例如先天免疫RNA感測器)之結合：鐘樣受體(TLR)3、TLR7、TLR8、視黃酸可誘導基因I (RIG-I)、黑素瘤分化相關基因5 (MDA5)、蛋白激酶R (PKR)、2'-5'寡腺苷酸合成酶(OAS)及遺傳學及生理學實驗室蛋白2 (LGP2)及其組合。在一些實施例中，此類經修飾之核糖核苷酸可包括如US 9,334,328中所描述之修飾，該專利之內容出於本文所描述之目的以全文引用之方式併入本文中。經修飾之核苷典型地為在宿主細胞中可轉譯所需的(例如經修飾之核苷之存在不阻止RNA序列轉譯至相應蛋白質序列中)。可由一般熟習此項技術者使用例如兔網狀紅血球溶解產物轉譯分析對經修飾之核苷酸對轉譯的影響進行分析。

【0223】 在一些實施例中，經修飾之核糖核苷酸可包括經修飾之核苷間鍵聯。各種此類經修飾之核苷間鍵聯為此項技術中已知的；熟習此項技術者將瞭解，可用於本文所提供之技術中的經修飾之核苷間鍵聯之非限制性實例包括具有正常3'-5'鍵聯之硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、甲基及其他烷基磷酸酯(包括3'-伸烷基磷酸酯)及對掌性磷酸酯、亞磷酸酯、胺基磷酸酯(包括3'-胺基胺基磷酸酯及胺基烷基胺基磷酸酯)、硫羰基胺基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯及硼代磷酸酯、此等物質之2'-5'鍵聯類似物以及其中相鄰核苷單元對3'-5'鍵聯至5'-3'或2'-5'鍵聯至5'-2'之具有反向極性之彼等物質。亦包括各種鹽、混合鹽及游離酸形式。其中不包括磷原子之經修飾之核苷間鍵聯可具有由短鏈烷基或環烷基核苷間鍵聯、混合雜原子及烷基或環烷基核苷間鍵聯或一或多個短鏈雜原子或雜環核苷間鍵聯形成之核苷間鍵聯。此等核苷間鍵聯包括具有以下之彼等核苷間鍵聯：嗎啉基鍵

聯(部分由核苷之糖部分形成)；矽氧烷主鏈；硫化物、亞碲及碲主鏈；甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；亞甲基甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；含鏈烯之主鏈；胺基磺酸酯主鏈；亞甲基亞胺基及亞甲基胍基主鏈；磺酸酯及磺醯胺主鏈；醯胺主鏈；及其他具有混合N、O、S及CH₂組成部分之物質。

【0224】 在一些實施例中，經修飾之核糖核苷酸可包括一或多個經取代之糖部分。各種此類經修飾之糖部分為此項技術中已知的；熟習此項技術者將瞭解，在一些實施例中，核糖核苷酸之糖部分可在2'位置包括以下中之一者：H (去氧核糖)；OH (核糖)；F；O-烷基、S-烷基或N-烷基；O-烯基、S-烯基或N-烯基；O-炔基、S-炔基或N-炔基；或O-烷基-O-烷基，其中烷基、烯基及炔基可經取代或未經取代。在一些實施例中，核糖核苷酸之糖部分可包括2'甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃，亦稱為2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)、2'-二甲基胺基氧基乙氧基(亦即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基團，亦稱為2'-DMAOE)及2'-二甲基胺基乙氧基乙氧基(此項技術中亦稱為2'O-二甲基胺基乙氧基乙基或2'-DMAEOE)，亦即2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂；2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-胺基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)及2'-氟(2'-F)。類似修飾亦可在其他位置進行，例如在3'端核苷酸上之糖的3'位置或2'-5'鍵聯之核苷酸中及5'端核苷酸之5'位置。

【0225】 在一些實施例中，適用於活體外轉錄反應之核糖核苷酸之混合物可包含UTP或其功能類似物與ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及GTP或其功能類似物中之至少一者或全部的組合。在一些實施例中，UTP之功能類似物為或包含N¹-甲基假尿苷-5'三磷酸(m¹ΨTP)。如本文所描述，本發明尤其提供其中在初始活體外轉錄反應時如本文所描述對

UTP進行限制的技術(例如濃度低於ATP或其功能類似物、GTP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之一或多者且在一些實施例中低於全部。在一些實施例中，本發明尤其提供其中隨時間推移為進行UTP限制之初始活體外轉錄反應補充UTP或其功能類似物的技術；在一些此類實施例中，此類補充係藉由一或多次各別饋送事件來進行。在一些實施例中，此類補充可藉由連續方法來進行，例如在一些實施例中，其中UTP補充之速率類似於在轉錄反應期間UTP消耗之速率。在一些實施例中，在補充期間限制UTP (例如以一定濃度補充，使得在此類補充之後，在反應中UTP或其功能類似物以低於ATP或其功能類似物、GTP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之一或多者且在一些實施例中低於全部的濃度存在。

【0226】 在一些實施例中，核苷三磷酸(NTP)之功能類似物包含經修飾之核苷。在一些實施例中，經修飾之核苷為經修飾之尿苷。在某些實施例中，用經修飾之核苷置換尿苷係藉由將UTP用其功能類似物置換來進行。在一些實施例中，UTP之功能類似物為經修飾之尿苷核苷之三磷酸酯。

【0227】 在一些實施例中，經修飾之尿苷核苷獨立地選自假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)及5-甲基-尿苷(m5U)。在一些實施例中，經修飾之核苷包含假尿苷(ψ)。在一些實施例中，經修飾之核苷包含N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)。在一些實施例中，經修飾之核苷包含5-甲基-尿苷(m5U)。

【0228】 在一些實施例中，RNA可包含超過一種類型之經修飾之尿苷核苷。在一些實施例中，RNA包含超過一種類型之獨立地選自假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)及5-甲基-尿苷(m5U)的經修飾之尿苷核苷。

在一些實施例中，經修飾之核苷包含假尿苷(ψ)及N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)。在一些實施例中，經修飾之核苷包含假尿苷(ψ)及5-甲基-尿苷(m5U)。在一些實施例中，經修飾之核苷包含N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)及5-甲基-尿苷(m5U)。在一些實施例中，經修飾之核苷包含假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)及5-甲基-尿苷(m5U)。

【0229】 在一些實施例中，經修飾之核苷為選自由以下組成之群的任何一或多者：3-甲基-尿苷(m3U)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-氮雜-尿苷、6-氮雜-尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代-尿苷(s2U)、4-硫代-尿苷(s4U)、3-甲基尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羥基-尿苷(ho5U)、5-胺基烯丙基-尿苷、5-鹵代-尿苷(例如5-碘-尿苷或5-溴-尿苷)、尿苷5-氧基乙酸(cmo5U)、尿苷5-氧基乙酸甲酯(mcmo5U)、5-羧基甲基-尿苷(cm5U)、1-羧基甲基-假尿苷、5-羧基羥基甲基-尿苷(chm5U)、5-羧基羥基甲基-尿苷甲酯(mchm5U)、5-甲氧基羧基甲基-尿苷(mcm5U)、5-甲氧基羧基甲基-2-硫代-尿苷(mcm5s2U)、5-胺基甲基-2-硫代-尿苷(nm5s2U)、5-甲基胺基甲基-尿苷(mnm5U)、1-乙基-假尿苷、5-甲基胺基甲基-2-硫代-尿苷(mnm5s2U)、5-甲基胺基甲基-2-硒基-尿苷(mnm5se2U)、5-胺基甲醯基甲基-尿苷(ncm5U)、5-羧基甲基胺基甲基-尿苷(cnm5U)、5-羧基甲基胺基甲基-2-硫代-尿苷(cnm5s2U)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷(τ m5U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷(τ m5s2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷)、5-甲基-2-硫代-尿苷(m5s2U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷(m1s4 ψ)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷(m3 ψ)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮-假尿苷、二氫尿苷(D)、二氫假

尿苷、5,6-二氫尿苷、5-甲基-二氫尿苷(m5D)、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-胺基-3-羧基丙基)尿苷(acp3U)、1-甲基-3-(3-胺基-3-羧基丙基)假尿苷(acp3ψ)、5-(異戊烯基胺基甲基)尿苷(inm5U)、5-(異戊烯基胺基甲基)-2-硫代-尿苷(inm5s2U)、α-硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基-尿苷(m5Um)、2'-O-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s2Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm5Um)、5-胺基甲醯基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm5Um)、5-羧基甲基胺基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmm5Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m3Um)、5-(異戊烯基胺基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm5Um)、1-硫代-尿苷、去氧胸苷、2'-F-ara-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-ara-尿苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷、5-[3-(1-E-丙烯基胺基)尿苷或此項技術中已知之任何其他經修飾之尿苷。

【0230】 在一些實施例中，NTP之功能類似物包含經修飾之核苷。在一些實施例中，經修飾之核苷為經修飾之腺苷。在某些實施例中，用經修飾之核苷置換腺苷係藉由將ATP用其功能類似物置換來進行。在一些實施例中，ATP之功能類似物為經修飾之腺苷核苷之三磷酸酯。

【0231】 在一些實施例中，經修飾之核苷為選自由以下組成之群的任何一或多者：2-胺基嘌呤、2,6-二胺基嘌呤、7-去氫-腺嘌呤、7-去氫-8-氮雜-腺嘌呤、7-去氫-2-胺基嘌呤、7-去氫-8-氮雜-2-胺基嘌呤、7-去氫-2,6-二胺基嘌呤、7-去氫-8-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、1-甲基腺苷、N1-甲基-腺苷、N6-甲基腺苷、N6-異戊烯基腺苷、N6-(順-羥基異戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(順-羥基異戊烯基)腺苷、N6-甘胺醯胺基甲醯基腺苷、N6-

蘇胺醯胺基甲醯基腺苷、2-甲硫基-N6-蘇胺醯胺基甲醯基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、 α -硫代-腺苷、8-疊氮基-腺苷、7-去氮-腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤及2-甲氧基-腺嘌呤。

【0232】 在一些實施例中，NTP之功能類似物包含經修飾之核苷。在一些實施例中，經修飾之核苷為經修飾之鳥苷。在某些實施例中，用經修飾之核苷置換鳥苷係藉由將GTP用其功能類似物置換來進行。在一些實施例中，GTP之功能類似物為經修飾之鳥苷核苷之三磷酸酯。

【0233】 在一些實施例中，經修飾之核苷為選自由以下組成之群的任何一或多者：1-甲基-肌苷、懷俄苷(wyosine)、懷丁苷(wybutosine)、 α -硫代-鳥苷、6-甲基-鳥苷、7-去氮鳥苷、7-去氮-8-氮雜-鳥苷、6-硫代-鳥苷、6-硫代-7-去氮-鳥苷、6-硫代-7-去氮-8-氮雜-鳥苷、7-甲基-鳥苷、6-硫代-7-甲基-鳥苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鳥苷、O6-甲基-鳥苷、N1-甲基鳥苷、N2-甲基鳥苷、N2,N2-二甲基鳥苷、8-側氧基-鳥苷、7-甲基-8-側氧基-鳥苷、1-甲基-6-硫代-鳥苷、N2-甲基-6-硫代-鳥苷及N2,N2-二甲基-6-硫代-鳥苷。

【0234】 在一些實施例中，NTP之功能類似物包含經修飾之核苷。在一些實施例中，經修飾之核苷為經修飾之胞苷。在某些實施例中，用經修飾之核苷置換胞苷係藉由將CTP用其功能類似物置換來進行。在一些實施例中，CTP之功能類似物為經修飾之胞苷核苷之三磷酸酯。

【0235】 在一些實施例中，經修飾之核苷為選自由以下組成之群的任何一或多者：5-氮雜-胞苷、6-氮雜胞苷、 α -硫代-胞苷、假異胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙醯胞苷、5-甲醯胞苷、N4-甲基胞苷、5-羥基甲基胞苷、1-甲基-假異胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假異胞苷、2-硫代-胞苷、

2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假異胞苷、4-硫代-1-甲基假異胞苷、4-硫代-1-甲基-1-去氮-假異胞苷、1-甲基-1-去氮-假異胞苷、澤布拉林(zebularine)、5-氮雜澤布拉林、5-甲基-澤布拉林、5-氮雜-2-硫代-澤布拉林、2-硫代-澤布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基胞苷、4-甲氧基-假異胞苷及4-甲氧基-1-甲基-假異胞苷。

5'帽

【0236】 在一些實施例中，藉由本文所描述之技術產生之RNA可在其5'端包含帽。

【0237】 術語「非延伸核苷酸」或「起始核苷酸」或類似術語意謂核苷酸不具有5'三磷酸或具有已經修飾使得核苷酸可僅在轉錄物之5'端併入之5'三磷酸，且具有3'羥基，因此其可在3'位置延伸。起始核苷酸為對應於RNA之第一核苷酸之核苷酸。在一些實施例中，添加起始核苷酸增加RNA聚合酶之起始速率。在某些實施例中，起始核苷酸為或包含核苷單磷酸、核苷二磷酸、核苷三磷酸或二核苷三磷酸。在RNA之第一核苷酸為G的情況下，起始核苷酸可為如本文所描述之GTP或GMP或其功能類似物。在一些實施例中，起始核苷酸為二核苷酸或三核苷酸。在一些實施例中，起始核苷酸為核苷-5'-三磷酸。在一些實施例中，RNA之第一核苷酸為G，起始核苷酸為G之帽類似物且對應核糖核苷三磷酸為GTP。在一些實施例中，起始核苷酸為天然存在之5'帽或5'帽類似物，諸如本文所描述之帽類似物。在一些實施例中，帽為或包含鳥嘌呤核苷酸。此等核苷酸可具有或可不具有帽官能基。起始核苷酸包括5'帽及5'帽類似物，諸如本文所描述之彼等。

【0238】 在一些實施例中，根據本文所提供之技術產生之RNA (亦

即，根據本發明之RNA)具有不為GTP之初始核苷酸(起始核苷酸)。在一些實施例中，根據本發明之RNA具有與GTP或其功能類似物競爭併入RNA中之起始核苷酸。在一些實施例中，起始核苷酸與任何其他核苷酸一樣容易併入RNA中。在一些實施例中，起始核苷酸比任何其他核苷酸更高效地併入RNA中，特定而言比GTP或其功能類似物更高效。在一些實施例中，起始核苷酸與任何其他核苷酸相比不太高效地併入RNA中，特定而言與GTP或其功能類似物相比不太高效。在一些實施例中，在轉錄過程中補充起始核苷酸。在一些實施例中，在轉錄反應開始之前將起始核苷酸添加至反應混合物中。

【0239】 在一些實施例中，在根據本發明使用之反應混合物中，與預測要存在於或存在於要產生之RNA分子之第一位置之核苷酸部分相比，過量添加對應於該RNA分子之第一核苷酸的起始核苷酸。在一些實施例中，在反應混合物中，與競爭併入所要產生之RNA分子之核苷酸部分相比，過量添加對應於該RNA分子之第一核苷酸之起始核苷酸。舉例而言，在一些實施例中，第一核苷酸為G且在初始反應混合物中5'帽或5'帽類似物相較於GTP以過量存在。在一些實施例中，以在約1至20 mM、1至17.5 mM、1至15 mM、1至12.5 mM、1至10 mM、1至7.5 mM、1至5 mM或1至2.5 mM範圍內之初始濃度添加起始核苷酸。在一些實施例中，與競爭併入RNA之核苷酸相比，以至少約2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1或甚至更多之過量添加起始核苷酸。舉例而言，在一些實施例中，5'帽或5'帽類似物之起始濃度比GTP之起始濃度介於約2:1與約20:1之間，諸如約2:1、3:1，在一些實施例中為4:1，在一些實施例中為

5:1，在一些實施例中為6:1，另外在一些實施例中為7:1、8:1、9:1、10:1或甚至更高。

【0240】 術語「5'帽」、「帽」、「5'帽結構」、「帽結構」、「帽核苷酸」及「5'帽核苷酸」同義地用於指存在於核酸(諸如mRNA)之5'端的二核苷酸。5'帽為其中(視情況經修飾之)鳥苷經由5'至5'三磷酸酯鍵聯(或在某些帽類似物之情況下為經修飾之三磷酸酯鍵聯)鍵結至mRNA分子之第一核苷酸的結構。在一些實施例中，此鳥苷在7-位置為甲基化的(例如天然存在之m7G帽)。術語「習知5'帽」係指天然存在之RNA 5'帽，在一些實施例中指7-甲基鳥苷帽(m7G)。為RNA提供5'帽或5'帽類似物可藉由活體外轉錄達成，其中5'帽共轉錄併入RNA股(轉錄及加帽反應)，或可使用加帽酶(諸如來自牛痘病毒或啤酒酵母加帽酶系統之加帽酶)在轉錄後(例如在活體外轉錄RNA之後)連接至RNA。或者，加帽RNA可藉由DNA模板之活體外轉錄(IVT)來獲得，其中除GTP外，IVT系統亦含有例如如此項技術中已知及本文所描述之5'帽或5'帽類似物。用於為RNA提供5'帽之方法為此項技術中熟知的。在加帽RNA中，(加帽) RNA分子之第一鹼基之3'位置經由磷酸二酯鍵鍵聯至RNA分子之後續鹼基(「第二鹼基」)之5'位置。

【0241】 熟習此項技術者將瞭解，在一些實施例中，添加5'帽至RNA (例如mRNA)可有助於RNA識別且連接至核糖體以起始轉譯且增強轉譯效率。熟習此項技術者將亦瞭解，5'帽亦可防止RNA產物發生5'外核酸酶介導之降解且因此增加半衰期。

【0242】 如上文所提及，在一些實施例中，藉由本文所描述之技術產生之RNA可在其5'端包含帽。在一些實施例中，RNA不具有未加帽之

5'-三磷酸。在一些實施例中，RNA可由5'帽類似物修飾。在一些實施例中，5'帽為或包含類似於RNA 5'帽結構且若與RNA連接則具有穩定RNA之能力的合成5'帽類似物，包括例如但不限於此項技術中已知且本文所描述之抗反向帽類似物(ARCA)。熟習此項技術者將瞭解，添加5'帽至RNA(例如mRNA)可有助於RNA識別且連接至核糖體以起始轉譯且增強轉譯效率。熟習此項技術者將亦瞭解，5'帽亦可防止RNA產物發生5'外核酸酶介導之降解且因此增加半衰期。用於加帽之方法為此項技術中已知的；一般熟習此項技術者將瞭解，在一些實施例中，加帽可在存在加帽系統(例如基於酶之加帽系統，諸如牛痘病毒之加帽酶)之情況下在活體外轉錄之後進行。在一些實施例中，可藉由在存在加帽酶系統(包括例如但不限於牛痘加帽酶系統或啤酒酵母加帽酶系統)之情況下對具有5'三磷酸基團之RNA或具有5'二磷酸基團之RNA進行活體外加帽來獲得加帽RNA。在一些實施例中，可將加帽劑與複數種核糖核苷酸一起引入活體外轉錄反應混合物(例如如本文所描述之活體外轉錄反應混合物)中，使得帽在轉錄期間併入RNA(亦稱為共轉錄加帽)。雖然在一些實施例中，可能希望在RNA中包括5'帽，但在一些實施例中，RNA可不具有5'帽。

【0243】 最常使用之用於在活體外製備加帽RNA之方法為藉由在存在四種核糖核苷三磷酸及5'帽或5'帽類似物(諸如m⁷G(5')ppp(5')G(亦稱為m⁷GpppG))之情況下使用RNAP(諸如細菌或噬菌體RNA聚合酶)轉錄DNA模板。RNA聚合酶以由m⁷GpppG之鳥苷部分之3'-OH對下一模板化核苷三磷酸(pppN)之 α -磷酸酯進行親核攻擊產生中間物m⁷GpppGpN(其中N為RNA分子之第二鹼基)來起始轉錄。競爭性GTP-起始產物pppGpN之形成因如本文所描述相較於GTP過量添加5'帽或5'帽類似物而受到抑

制。

【0244】 在一些實施例中，可添加5'加帽劑至活體外轉錄反應混合物中。在一些實施例中，5'加帽劑可包含經修飾之核苷酸，例如經修飾之鳥嘌呤核苷酸。在一些實施例中，5'加帽劑可包含例如一個或多個甲基、甘油基、反向去氧無鹼基部分、4'5'亞甲基核苷酸、1-(β-D-赤式呋喃糖基)核苷酸、4'硫代核苷酸、碳環核苷酸、1,5-無水己糖醇核苷酸、L-核苷酸、α-核苷酸、經修飾之鹼基核苷酸、蘇-戊呋喃糖基核苷酸、非環狀3',4'-開環(seco)核苷酸、非環狀3,4-二羥基丁基核苷酸、非環狀3,5二羥基戊基核苷酸、3'-3'-反向核苷酸部分、3'-3'-反向無鹼基部分、3'-2'-反向核苷酸部分、3'-2'-反向無鹼基部分、1,4-丁二醇磷酸酯、3'-胺基磷酸酯、己基磷酸酯、胺基己基磷酸酯、3'-磷酸酯、3'硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或橋接或非橋接甲基磷酸酯部分、肌苷、N1-甲基-鳥苷、2'-氟-鳥苷、7'去氫-鳥苷、8-側氧基-鳥苷、2-胺基-鳥苷、LNA-鳥苷、2-疊氮基-鳥苷。在一些實施例中，5'加帽劑可為或包含二核苷酸帽類似物(包括例如m7GpppG帽類似物或N7-甲基-GpppG抗反向帽類似物(ARCA)帽類似物、2'-O-甲基-GpppG抗反向帽類似物(ARCA)帽類似物或N7-甲基-GpppG ARCA帽類似物、3'-O-甲基-GpppG ARCA帽類似物)。在一些實施例中，5'加帽劑包含5' N7-甲基-3'-O-甲基鳥苷結構，例如CleanCap®試劑(Trilink BioTechnologies)。在一些實施例中，5'帽可為或包含二核苷酸帽類似物，諸如G[5']ppp[5']G、m7G[5']ppp[5']G、m₃^{2,2,7}G[5']ppp[5']G、m₂^{7,3'}-O₂G[5']ppp[5']G (3'-ARCA)、m₂^{7,2'}-O₂GpppG (2'-ARCA)、m₂^{7,2'}-O₂GppSpG (D1) (β-S-ARCA (D1))及m₂^{7,2'}-O₂GppSpG (D2) (β-S-ARCA (D2))及m₂^{7,3'}-O₂Gppp(m2'-O)ApG (CC413)。在一些實施

例中，將5'-加帽劑過量添加至一種或多種特定核糖核苷酸或核糖核苷酸(例如GTP、ATP、UTP、CTP或其修飾型式)中以使5'-帽能夠在對RNA轉錄物首次添加時併入。在一些實施例中，本發明中所用之5'帽為 $m_2^{7,3'}\text{-}^0\text{Gppp}(m^{2'}\text{-}^0)\text{ApG}$ 5'帽。

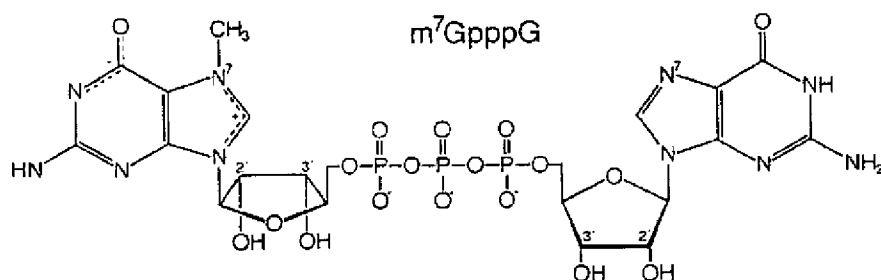
【0245】 在本發明背景下，術語「5'帽類似物」係指類似於習知5'帽，但經修飾若與RNA連接則在一些實施例中在活體內及/或在細胞中具有穩定RNA之能力的分子結構。帽類似物不為習知5'帽。

【0246】 已總體上描述5'帽參與mRNA之高效轉譯：一般而言，在真核生物中，除非存在內部核糖體進入位點(IRES)，否則僅在信使RNA(mRNA)分子之5'端起始轉譯。真核細胞能夠在核中轉錄期間為RNA提供5'帽：例如當轉錄物達至20至30個核苷酸之長度時，新合成之mRNA通常經修飾具有5'帽結構。首先，5'端核苷酸pppN (ppp表示三磷酸；N表示任何核苷)藉由具有RNA 5'-三磷酸酶及鳥苷醯基轉移酶活性之加帽酶在細胞中轉化為5' GpppN。GpppN可隨後藉由具有(鳥嘌呤-7)-甲基轉移酶活性之第二酶在細胞中甲基化以形成單甲基化 $m^7\text{GpppN}$ 帽。在一些實施例中，本發明中所用之5'帽為天然5'帽。

【0247】 若需要在將相應RNA引入宿主細胞中或宿主有機體中之後對編碼蛋白質之核酸序列進行轉譯，尤其若在引入RNA之後在頭1個小時內或在頭兩個小時內或在頭三個小時內需要轉譯，則RNA分子上存在帽為明顯較佳的。

【0248】 在本發明中，天然5'帽二核苷酸典型地選自由以下組成之群：非甲基化帽二核苷酸(G(5')ppp(5')N；亦稱為GpppN)及甲基化帽二核苷酸($(m^7\text{G}(5'))\text{ppp}(5')\text{N}$ ；亦稱為 $m^7\text{GpppN}$)。 $m^7\text{GpppN}$ (其中N為G)由

下式表示：



【0249】 在本發明之某些實施例中，5'帽為5'帽類似物。最初描述5'帽類似物有助於藉助於活體外轉錄大規模合成RNA轉錄物。

【0250】 對於諸如mRNA之RNA，迄今為止已總體上描述一些5'帽類似物(合成帽)，且其全部可在本發明之背景下使用。理想地，選擇與轉譯效率較高及/或對活體內降解之抗性增加及/或對活體外降解之抗性增加有關之5'帽類似物。

【0251】 在一些實施例中，使用僅可沿一個取向併入RNA鏈之5'帽類似物。Pasquinelli等人, (1995), RNA J. 1: 957-967證實在活體外轉錄期間，噬菌體RNA聚合酶使用7-甲基鳥苷單元來起始轉錄，藉此約40-50%之具有帽之轉錄物具有相反取向之帽二核苷酸(亦即，當使用 m^7G 時初始反應產物為 $Gpppm^7GpN$)。與具有恰當5'帽之RNA相比，具有反向5'帽之RNA就核酸序列轉譯至蛋白質中而言不為功能性的。因此，需要沿恰當取向併入5'帽，亦即產生結構基本上對應於 $m^7GpppGpN$ 等之RNA。已證實，帽-二核苷酸之反向整合因甲基化鳥苷單元之2'-OH或3'-OH基團的取代而受到抑制(Stepinski等人, (2001), RNA J., 7: 1486-1495；Peng等人, (2002), Org. Lett., 24: 161-164)。在存在此類「抗反向帽類似物」或「ARCA」之情況下合成之RNA比在存在習知5'帽 m^7GpppG 之情況下活體外轉錄之RNA更高效地轉譯。為此，例如Holtkamp等人, (2006), Blood,

R^2 及 R^3 獨立地選自由以下組成之群：H、鹵基、OH及視情況經取代之烷氧基，或 R^2 及 R^3 一起形成O-X-O，其中X選自由以下組成之群：視情況經取代之 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)$ ，且

$C(CH_3)_2$ ，或 R^2 與在與 R^2 連接之環的位置4'之氫原子組合形成-O- CH_2 -或- CH_2 -O-，

R^5 選自由以下組成之群：S、Se及 BH_3 ，

R^4 及 R^6 獨立地選自由以下組成之群：O、S、Se及 BH_3 。

【0253】 n為1、2或3。

【0254】 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 之某些實施例揭示於WO 2011/015347 A1中且在本發明中可相應地進行選擇。

【0255】 舉例而言，在本發明之一些實施例中，5'帽為或包含硫代磷酸酯-帽-類似物。硫代磷酸酯-帽-類似物為特定帽類似物，其中三磷酸酯鏈中之三個非橋接O原子中之一者用S原子置換，亦即式(I)中之 R^4 、 R^5 或 R^6 中之一者為S。硫代磷酸酯-帽-類似物已由Kowalska等人, (2008), RNA,14: 1119-1131描述為針對不希望之去帽過程之解決方案，且因此增加在活體內RNA之穩定性。特定而言，在5'-帽之 β -磷酸酯基處氧原子取代硫原子產生針對Dcp2之穩定化。在本發明中較佳之彼實施例中，式(I)中之 R^5 為S；且 R^4 及 R^6 為O。

【0256】 在本發明之一些實施例中，本發明之RNA包含硫代磷酸酯-帽-類似物，其中RNA 5'-帽之硫代磷酸酯修飾與「抗反向帽類似物」(ARAC)修飾組合。相應ARCA-硫代磷酸酯-帽-類似物描述於WO 2008/157688 A2中，且其全部可用於本發明之RNA中。在彼實施例中，式(I)中之 R^2 或 R^3 中之至少一者不為OH，在一些實施例中， R^2 及 R^3 之中的

【0259】 在本發明之某些實施例中，本發明之RNA經修飾具有 β -S-ARCA (D2)非對映異構體。 β -S-ARCA之兩個非對映異構體針對核酸酶之敏感度不同。已證實，帶有 β -S-ARCA之D2非對映異構體之RNA幾乎完全抵抗Dcp2裂解(與在存在未經修飾之ARCA 5'-帽之情況下合成之RNA相比僅6%裂解)，而具有 β -S-ARCA (D1) 5'-帽之RNA對Dcp2裂解展現中間敏感度(71%裂解)。進一步表明針對Dcp2裂解之穩定性增加與哺乳動物細胞中之蛋白質表現增加有關。特定而言，已證實與帶有 β -S-ARCA (D1)帽之RNA相比，帶有 β -S-ARCA (D2)帽之RNA在哺乳動物細胞中更高效地轉譯。因此，在本發明之一些實施例中，本發明中所用之5'帽為根據式(I)之5'帽類似物，其特徵為式(I)中在P原子處包含取代基 R^5 之立體化學組態對應於在 β -S-ARCA之D2非對映異構體之 P_β 原子處的立體化學組態。在彼實施例中，式(I)中之 R^5 為S；且 R^4 及 R^6 為O。另外，在一些實施例中，式(I)中之 R^2 或 R^3 中之至少一者不為OH，及/或 R^2 及 R^3 之中的一者為甲氧基(OCH₃)，及/或 R^2 及 R^3 之中的另一者為OH；在一些實施例中，式(I)中之 R^2 或 R^3 中之每一者不為OH；在一些此類實施例中， R^2 及 R^3 之中的一者為甲氧基(OCH₃)，且 R^2 及 R^3 之中的另一者為OH。

【0260】 在某些其他實施例中，本發明中所用之5'帽為 β -S-ARCA (D1)非對映異構體。此實施例特定而言適合於諸如出於疫苗接種目的將加帽RNA轉移至不成熟抗原呈遞細胞中。已證實 β -S-ARCA (D1)非對映異構體在分別加帽之RNA轉移至不成熟抗原呈遞細胞中後特別適合於增加RNA之穩定性，增加RNA之轉譯效率，延長RNA之轉譯，增加RNA之總蛋白表現，及/或增加針對抗原或由該RNA編碼之抗原肽的免疫反應(Kuhn等人, (2010), Gene Ther., 17: 961-971)。因此，在本發明之一些實

施例中，本發明之RNA經修飾具有根據式(I)之帽類似物，其特徵為式(I)中在P原子處包含取代基R⁵之立體化學組態對應於在β-S-ARCA之D1非對映異構體之P_β原子處的立體化學組態。相應帽類似物及其實施例描述於WO 2011/015347 A1及Kuhn等人, (2010), Gene Ther., 17: 961-971中。WO 2011/015347 A1中所描述之其中在P原子處包含取代基R⁵之立體化學組態對應於在β-S-ARCA之D1非對映異構體之P_β原子處的立體化學組態之任何帽類似物均可用於本發明中。在一些實施例中，式(I)中之R⁵為S；且R⁴及R⁶為O。另外，在一些實施例中，式(I)中之R²或R³中之至少一者不為OH，及/或R²及R³之中的一者為甲氧基(OCH₃)，及/或R²及R³之中的另一者為OH；在一些實施例中，式(I)中之R²或R³中之每一者不為OH；在一些此類實施例中，R²及R³之中的一者為甲氧基(OCH₃)，且R²及R³之中的另一者為OH。在一些實施例中，本發明中所用之5'帽為m₂^{7,3'}-⁰Gppp(m₁^{2'-0})ApG (有時亦稱為m₂^{7,3'}⁰G(5')ppp(5')m^{2'-0}ApG、m₂^{7,3'}-⁰Gppp(m^{2'-0})ApG、CC413或CleanCap)。在一尤其較佳實施例中，本發明之RNA經修飾具有CleanCap。

【0261】適用於本發明中之5'帽進一步包括但不限於m₃^{2,2,7}G[5']ppp[5']G、m₂^{7,2'}-⁰GpppG (2'-ARCA)、m⁷Gp₃m^{2'-0}G、m⁷Gp₃m⁷G、m₂^{7,2'}-⁰Gp₃G、m₂^{7,2'}-⁰GpppSG (D1)、m₂^{7,2'}-⁰GpppSG (D2)、m₂^{7,2'}-⁰GppspG (D1)、m₂^{7,2'}-⁰GppspG (D2)、m₂^{7,2'}-⁰GpsppG (D1)、m₂^{7,2'}-⁰GpsppG (D2)。適用於本發明中之5'帽亦可為三磷酸酯5'帽類似物之四磷酸酯衍生物，諸如m⁷Gp₄G，其為m⁷Gp₃G之衍生物；b⁷Gp₄G，其為m₂^{7,3'}-⁰Gp₃G之衍生物；b⁷m^{3'}-⁰Gp₄G，其為b⁷Gp₃G之衍生物；m₂^{2,7}Gp₄G，其為e⁷Gp₃G之衍生物；m₃^{2,2,7}Gp₄G，其為m₂^{2,7}Gp₃G之

衍生物； $b^7m^2Gp_4G$ ，其為 $m_3^{2,2,7}Gp_3G$ 之衍生物； $m^7Gp_4m^7G$ ，其為 $m^7Gp_32'dG$ 之衍生物。其他適用之5'帽類似物已描述於US7074596、WO2008/016473、WO2008/157688、WO2009/149253、WO2011/015347及WO2013/059475中。

【0262】 在一些實施例中，本發明中所用之5'帽為根據式(I)之5'帽結構，其中任一磷酸酯基由硼代磷酸酯基或硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)基置換。此類5'帽在活體外與活體內具有增加之穩定性。視情況，相應化合物具有2'-O-或3'-O-烷基(其中在一些實施例中烷基為甲基)；相應帽類似物稱為 BH_3 -ARCA或Se-ARCA。如WO2009/149253中所描述，特定而言適合於對mRNA進行加帽之化合物包括 β - BH_3 -ARCA及 β -Se-ARCA。對於此等化合物，式(I)中在P原子處包含取代基 R^5 之立體化學組態對應於在 β -S-ARCA之D1非對映異構體之 P_β 原子處之立體化學組態為較佳的。

示例性活體外轉錄反應

【0263】 一般熟習此項技術者將瞭解用於典型活體外轉錄之材料及試劑。在一些實施例中，在添加至活體外轉錄反應混合物中之前將一種或多種個體反應組分解凍。舉例而言，活體外轉錄反應混合物典型地包括DNA模板(例如如本文所描述)、核糖核苷酸(例如如本文所描述)、RNA聚合酶(例如DNA依賴性RNA聚合酶)及用於所選RNA聚合酶之適當反應緩衝液。在一些實施例中，活體外轉錄反應混合物可進一步包含RNA酶抑制劑。在一些實施例中，活體外轉錄反應混合物可進一步包含焦磷酸酶(例如無機焦磷酸酶)。在一些實施例中，活體外轉錄反應混合物可進一步包含一或多種鹽(例如單價鹽及/或二價鹽，諸如 Mg^{2+})、還原劑(例如二硫

蘇糖醇、2-巰基乙醇等)、亞精胺或其組合。在一些實施例中，以特定順序添加某些反應組分(例如最後添加焦磷酸酶及聚合酶)。在一些實施例中，在添加特定反應組分(例如焦磷酸酶、聚合酶)之後增加攪拌速率。

【0264】 適合於活體外轉錄之各種RNA聚合酶為此項技術中已知的，包括例如但不限於DNA依賴性RNA聚合酶(例如T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶、SP6 RNA聚合酶、N4病毒體RNA聚合酶或其變異體或功能結構域)。熟練技工將瞭解本文中所用之RNA聚合酶可為重組RNA聚合酶及/或經純化之RNA聚合酶，亦即不作為除RNA聚合酶外含有其他組分之細胞萃取物的一部分。在一些實施例中，適用於大規模活體外轉錄之RNA聚合酶為T7 RNA聚合酶。在一些實施例中，可添加無機焦磷酸酶以改良活體外轉錄反應之產率(例如在由T7 RNA聚合酶催化之一些實施例中)。

【0265】 在一些實施例中，針對所選RNA聚合酶對轉錄反應中所用之緩衝液(轉錄緩衝液)進行優化。典型地針對所選RNA聚合酶對轉錄緩衝液進行優化。舉例而言，在一些實施例中，轉錄緩衝液可包含Tris-HCl、HEPES或其他適當之緩衝液。在一些實施例中，轉錄緩衝液可包含20-60 mM HEPES、20-60 mM二價鹽(例如鎂鹽，諸如氯化鎂、乙酸鎂、Li⁺、Na⁺、K⁺、NH⁴⁺、三(羥甲基)胺基甲烷陽離子、Mg²⁺、Ba²⁺或Mn²⁺等)、5-15 mM還原劑(例如二硫蘇糖醇、2-巰基乙醇等)及0.5-3 mM亞精胺。

【0266】 在一些實施例中，轉錄反應在約6、6.5、7、7.5、8或9之pH值下進行。在一些實施例中，轉錄緩衝液具有7-9 (例如約7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0)之pH值。在一些實施例中，轉錄緩衝液具有6-9

之pH值。在一些實施例中，pH值為約6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0。在一些實施例中，轉錄緩衝液具有約6-8.5之pH值。在一些實施例中，緩衝液具有約6至8.5、約6.5至8.0、約7.0至7.5之pH值，在一些實施例中為約7.5。在一些實施例中，適合於轉錄反應之pH值可為約7.5-8.5。在一些實施例中，pH值為約6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0。在一些實施例中，pH值為約6-8.5。在一些實施例中，pH值為6至8.5、6.5至8.0、7.0至7.5；在一些實施例中，pH值為7.5。

【0267】 在一些實施例中，例如藉由使用適合之緩衝液使反應混合物之pH值在轉錄反應過程中保持基本上恆定。適合於調節pH值之緩衝液為此項技術中已知及本文所描述的，且包括但不限於NaOH緩衝液、KOH緩衝液或HCl緩衝液。

【0268】 在一些實施例中，例如藉由補充pH值類似於或等於起始反應混合物之pH值的緩衝液及/或藉由補充pH值不同於起始反應混合物之pH值的緩衝液(若需要)使反應混合物之pH值在轉錄反應過程中保持實質上恆定。

【0269】 在一些實施例中，緩衝液選自由以下組成之群：80 mM HEPES/KOH，pH 7.5及40 mM Tris/HCl，pH 7.5。

示例性活體外轉錄反應條件

【0270】 在一些實施例中，活體外轉錄反應例如在本文所描述之生

物反應器中(經選擇用於某一活體外轉錄反應體積，例如如本文所描述)進行一段時間。在一些實施例中，時間段為至少20分鐘，包括例如至少25分鐘、至少30分鐘、至少40分鐘、至少55分鐘、至少60分鐘、至少75分鐘、至少90分鐘、至少105分鐘、至少120分鐘、至少135分鐘、至少150分鐘、至少165分鐘或至少180分鐘。在一些實施例中，時間段為20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175或180分鐘。在一些實施例中，時間段為約1.5-3小時。在一些實施例中，時間段為約25-35分鐘。

【0271】 在一些實施例中，活體外轉錄反應例如在本文所描述之生物反應器中在使所選RNA聚合酶在功能上具活性之溫度下進行一段時間(例如如本文所描述)。雖然執行活體外轉錄反應之典型噬菌體RNA聚合酶(例如T7聚合酶)在高溫(例如45°C以上)下通常不具活性，但熱穩定性RNA聚合酶(例如T7 RNA聚合酶之熱穩定性變異體，諸如如US10519431中所描述之熱穩定性變異體，該專利之內容出於本文所描述之目的以引用之方式併入)在高溫下可顯示增加之穩定性。在一些實施例中，活體外轉錄在約25°C或更高，包括例如26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C或45°C之溫度下進行。在一些實施例中，活體外轉錄在約45°C或更高，包括例如46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C或更高之溫度下進行。

【0272】 在一些實施例中，活體外轉錄例如在本文所描述之生物反應器中在約6、6.5、7、7.5、8或9之pH值下進行。在一些實施例中，適

合於活體外轉錄之pH值可為約7.5-8.5。

【0273】 在一些實施例中，根據本發明(例如在如本文所描述之生物反應器中)進行之活體外轉錄反應可作為連續饋料反應進行；在一些實施例中，其可作為分批饋料反應進行。在一些實施例中，可逐步將一或多種核苷酸添加至活體外轉錄反應中(例如至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多次大劑量饋送)。在一些實施例中，攪拌速率經選擇使得特定摻混時間使大劑量添加物能夠快速混合以確保在RNA合成期間達成經修飾之核苷酸溶液及一或多種其他核苷酸溶液之最佳可獲得性。

【0274】 *反應組分之限制*：在某些實施例中，限制組分以低於非限制組分之起始濃度的起始濃度存在。在一些實施例中，限制組分為核苷酸，諸如ATP、GTP、CTP、UTP或其功能類似物。在一些實施例中，非限制組分為核苷酸，諸如ATP、GTP、CTP、UTP或其功能類似物。限制或非限制組分亦可為5'帽或5'帽類似物。在一些實施例中，限制組分與非限制組分之比率(諸如UTP或其功能類似物與ATP及/或CTP或其功能類似物之比率，或GTP或其功能類似物與ATP及/或CTP或其功能類似物之比率)介於約1:1與約1:100之間，諸如1:1.1與約1:80之間、1:1.2與約1:60之間、1:1.3與約1:40之間，在一些實施例中介於1:1.4與約1:30之間，在一些實施例中介於1:1.5與約1:20之間，在一些實施例中介於1:1.5與約1:15之間、1:1.6與約1:10之間、1:1.7與約1:9之間、1:1.8與約1:8之間、1:1.9與約1:7之間、1:2與約1:6之間。在一些實施例中，當與一或多個非限制組分(諸如ATP及/或CTP或其功能類似物)之起始濃度相比時，一或多種限制組分(諸如UTP或其功能類似物或GTP或其功能類似物)之起始濃度為1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、

1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19、1/20、1/21、1/22、1/23、1/24、
1/25、1/26、1/27、1/28、1/29、1/30、1/31、1/32、1/33、1/34、1/35、
1/36、1/37、1/38、1/39、1/40、1/50、1/60、1/70、1/80、1/90或1/100。

【0275】 UTP限制及/或補充：在一些實施例中，活體外轉錄反應包含限制濃度之UTP或其功能類似物與ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物中之至少一者或全部的組合。在一些實施例中，UTP之功能類似物為或包含N1-甲基假尿苷-5'三磷酸(m1ΨTP)。在一些實施例中，UTP或其功能類似物在活體外轉錄反應中以限制轉錄速率之起始濃度存在。在一些實施例中，UTP或其功能類似物在活體外轉錄反應中以低於ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度的起始濃度存在。在一些實施例中，與ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度相比，UTP或其功能類似物之起始濃度低至少30%(包括例如低至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%)。在一些實施例中，UTP或其功能類似物之起始濃度與ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度的比率為約1:1.3或更低，包括例如1:1.4；1:1.5；1:2，1:2.5；1:3；1:3.5；1:4；1:4.5；1:5；1:6；1:7；1:8，1:9；1:10；1:11；1:12；1:13；1:14；1:15；1:16；1:17；1:18；1:19；1:20或更低。在一些實施例中，UTP或其功能類似物之起始濃度與ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度的比率為約1:1.3至約1:20，或約1:1.5至約1:15，或約1:5至約

1:15，或約1:8至約1:12。在一些此類實施例中，ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物之起始濃度可為相同的。

【0276】 在一些實施例中，在反應過程中為活體外轉錄反應補充至少一次UTP或其功能類似物。在一些實施例中，在轉錄反應過程中為活體外轉錄反應補充多次(例如至少2次或更多次，包括例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15次或更多次) UTP或其功能類似物。在一些實施例中，UTP或其功能類似物之補充係在反應混合物中其濃度接近耗竭時進行。在一些實施例中，UTP或其功能類似物之補充係在反應混合物中其濃度小於100 uM、90 uM、80 uM、70 uM、60 uM、50 uM、40 uM、30 uM、20 uM、10 uM、5 uM、3 uM、2 uM、1 uM、500 nM、250 nM、200 nM、100 nM、50 nM、25 nM或更低時進行。在一些實施例中，補充UTP或其功能類似物可包括例如以如本文所描述視情況包含其他反應組分之組合物的形式補充UTP或其功能類似物及補充物GTP或其功能類似物。在其他實施例中，補充UTP不指補充其他反應組分。同樣地，在一些實施例中，補充GTP不指補充其他反應組分。

【0277】 在一些實施例中，UTP (或其功能類似物)補充可在轉錄反應過程中連續地進行。舉例而言，在一些實施例中，UTP (或其功能類似物)補充可以與其消耗速率類似(例如在10%或更低範圍內)之速率以連續方式進行。在一些實施例中，UTP (或其功能類似物)補充可以一定速率進行，使得在此類補充之後，UTP或其功能類似物在反應中以低於ATP或其功能類似物、GTP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之一或多者且在一些實施例中低於全部之濃度存在。

【0278】 在一些實施例中，UTP (或其功能類似物)補充可在轉錄反應過程中週期性地進行。在一些實施例中，UTP (或其功能類似物)補充可以週期性方式進行，使得每次添加之後，UTP或其功能類似物在反應中以低於ATP或其功能類似物、GTP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之一或多者且在一些實施例中低於全部之濃度存在。在一些實施例中，此類週期性補充可以一或多次大劑量或批量添加來進行，包括例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多次大劑量或批量添加。在一些實施例中，此類週期性補充可藉由分批饋料方法進行。在一些實施例中，補充可包括補充包含UTP或其功能類似物且包含其他組分(諸如緩衝劑、聚合酶、CTP或其功能類似物、GTP或其功能類似物、ATP或其功能類似物)之組合物，或可存在於如本文所描述之轉錄反應混合物中之其他組分。在一些實施例中，補充UTP或其功能類似物不包括補充CTP或ATP或其功能類似物。

【0279】 在一些實施例中，在補充期間所添加之UTP或其功能類似物之濃度與UTP或其功能類似物之起始濃度相同。在一些實施例中，在補充期間所添加之UTP或其功能類似物之濃度低於UTP或其功能類似物之起始濃度，例如比UTP或其功能類似物之起始濃度低至少10%(包括例如低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%)。

【0280】 在一些實施例中，UTP (或其功能類似物)補充以一定濃度及/或以一定速率或方式進行，使得UTP或其功能類似物之濃度與ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物中之至少一者或全部之濃度的比率(在反應過程中)維持與UTP或其功能類

似物之濃度同ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物及視情況存在之GTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度的初始比率(在反應開始時)實質上相同(例如在10%或更小範圍內)。

【0281】 在一些實施例中，補充UTP或其功能類似物直至轉錄反應結束。

【0282】 在一些實施例中，UTP或其功能類似物在初始轉錄反應中以0.1至2 mM或0.1至1.5 mM或0.1至1 mM或0.5至2 mM或1至2 mM之起始濃度存在。在一些實施例中，在活體外轉錄反應過程中使UTP或其功能類似物維持在0.1至2 mM或0.1至1.5 mM或0.1至1 mM或0.5至2 mM或1至2 mM之濃度下。

【0283】 *視情況存在之其他非UTP限制及/或補充*：在一些實施例中，在初始活體外轉錄反應(例如活體外轉錄反應開始)時以限制濃度提供非UTP (或其功能類似物)中之至少一者(除限制之UTP或其功能類似物之外)。舉例而言，在一些實施例中，在初始活體外轉錄反應(例如活體外轉錄反應開始)時以限制濃度提供ATP或其功能類似物、CTP或其功能類似物或GTP或其功能類似物中之至少一者(除限制之UTP或其功能類似物之外)。在一些實施例中，在初始活體外轉錄(例如活體外轉錄反應開始)時以限制濃度提供GTP或其功能類似物(除限制之UTP或其功能類似物之外)。

【0284】 在本發明之某些實施例中，方法涉及為轉錄及加帽反應補充GTP或其功能類似物，因為其在某些反應中與帽類似物競爭，諸如當T7、SP6或T3聚合酶用於催化反應時。然而，應瞭解，本發明不限於GTP或其功能類似物。實際上，可關於涉及與帽類似物競爭之核苷酸或可在轉

錄物之5'端併入之非延伸單核苷酸或二核苷酸的任何反應來實施本發明。因此，特定而言預期可關於不同核苷酸或核苷酸類似物實施涉及GTP或其功能類似物作為競爭核苷酸之任何實施例。該方法不依賴於是否使用GTP及/或其功能類似物，只要該類似物以類似於GTP之速率藉由聚合酶併入伸長之轉錄物中即可。如本文所用，術語「GTP之功能類似物」係指延伸之核苷酸，且因此排除如下文所定義之任何帽類似物。

【0285】 在一些實施例中，GTP或其功能類似物之起始濃度限制轉錄速率。使用限制轉錄及/或加帽反應之轉錄速率之起始濃度之GTP或其功能類似物且為反應補充GTP或其功能類似物為較佳的，因為在某些反應(諸如使用T7、SP6或T3聚合酶之反應)中GTP與5'帽或5'帽類似物競爭。然而，應瞭解，本發明不限於GTP或GTP類似物。在某些實施例中，UTP或其功能類似物以對反應具限制性之起始量存在，且根據本發明之方法包括為反應混合物補充UTP或其功能類似物。在某些實施例中，UTP或其功能類似物及GTP或其功能類似物以對反應具限制性之起始量存在，且根據本發明之方法包括為反應混合物補充UTP或其功能類似物及GTP或其功能類似物。

【0286】 在一些實施例中，GTP或其功能類似物在活體外轉錄反應中以限制轉錄速率之起始濃度存在。在一些實施例中，GTP或其功能類似物在活體外轉錄反應中以低於ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度的起始濃度存在。在一些實施例中，與ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度相比，GTP或其功能類似物之起始濃度低至少30%(包括例如低至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%)。在一些實

施例中，GTP或其功能類似物之起始濃度與ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度的比率為約1:1.3或更低，包括例如1:1.4；1:1.5；1:2，1:2.5；1:3；1:3.5；1:4；1:4.5；1:5；1:6；1:7；1:8，1:9；1:10；1:11；1:12；1:13；1:14；1:15；1:16；1:17；1:18；1:19；1:20或更低。在一些實施例中，GTP或其功能類似物之起始濃度與ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之至少一者或全部之起始濃度的比率為約1:1.3至約1:20，或約1:1.5至約1:15，或約1:5至約1:15，或約1:8至約1:12。在一些此類實施例中，ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物之起始濃度。

【0287】 在一些實施例中，在反應過程中為活體外轉錄反應補充至少一次GTP或其功能類似物。在一些實施例中，在轉錄反應過程中為活體外轉錄反應補充多次(例如至少2次或更多次，包括例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15次或更多次) GTP或其功能類似物。在一些實施例中，GTP或其功能類似物之補充係在反應混合物中其濃度接近耗竭時進行。在一些實施例中，GTP或其功能類似物之補充係在反應混合物中其濃度小於100 uM、90 uM、80 uM、70 uM、60 uM、50 uM、40 uM、30 uM、20 uM、10 uM、5 uM、3 uM、2、uM、1 uM、500 nM、250 nM、200 nM、100 nM、50 nM、25 nM或更低時進行。

【0288】 在一些實施例中，GTP (或其功能類似物)補充可在轉錄反應過程中連續地進行。舉例而言，在一些實施例中，GTP (或其功能類似物)補充可以與其消耗速率類似(例如在10%或更低範圍內)之速率以連續方式進行。在一些實施例中，GTP (或其功能類似物)補充可以一定速率進行，使得此類補充之後，GTP或其功能類似物在反應中以低於ATP或其功

能類似物及/或CTP或其功能類似物之濃度存在。

【0289】 在一些實施例中，GTP (或其功能類似物)補充可在轉錄反應過程中週期性地進行。在一些實施例中，GTP (或其功能類似物)補充可以週期性方式進行，使得在每次添加之後，GTP或其功能類似物在反應中以低於ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物中之一或多者且在一些實施例中低於全部之濃度存在。在一些實施例中，此類週期性補充可以一或多次大劑量或批量添加來進行，包括例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多次大劑量或批量添加。在一些實施例中，此類週期性補充可藉由分批饋料方法進行。在一些實施例中，補充可包括補充包含GTP或其功能類似物且包含其他組分(諸如緩衝劑、聚合酶、CTP或其功能類似物、UTP或其功能類似物、ATP或其功能類似物)之組合物，或可存在於如本文所描述之轉錄反應混合物中之其他組分。在一些實施例中，補充GTP或其功能類似物不包括補充ATP或CTP或其功能類似物。

【0290】 在一些實施例中，在補充期間所添加之GTP或其功能類似物之濃度與GTP或其功能類似物之起始濃度相同。在一些實施例中，在補充期間所添加之GTP或其功能類似物之濃度低於GTP或其功能類似物之起始濃度，例如比GTP或其功能類似物之起始濃度低至少10%(包括例如低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%)。

【0291】 在一些實施例中，GTP (或其功能類似物)補充以一定濃度及/或以一定速率或方式進行，使得GTP或其功能類似物之濃度與ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物之濃度的比率(在反應過程中)維持

與GTP或其功能類似物之濃度同ATP或其功能類似物及/或CTP或其功能類似物之起始濃度的初始比率(在反應開始時)實質上相同(例如在10%或更小範圍內)。

【0292】 在一些實施例中，補充GTP或其功能類似物直至轉錄反應結束。

【0293】 在一些實施例中，GTP或其功能類似物在初始轉錄反應中以0.1至2 mM或0.1至1.5 mM或0.1至1 mM或0.5至2 mM或1至2 mM之起始濃度存在。在一些實施例中，在活體外轉錄反應過程中GTP或其功能類似物維持在0.1至2 mM或0.1至1.5 mM或0.1至1 mM或0.5至2 mM或1至2 mM之濃度下。

【0294】 在一些實施例中，非UTP補充不包括補充CTP或其功能類似物或ATP或其功能類似物。

【0295】 在其中進行非UTP補充之一些實施例中，此類非UTP補充可在反應過程中與UTP補充同時進行。在一些實施例中，非UTP或其功能類似物及UTP或其功能類似物可以單一組合物形式添加至反應混合物中。在一些實施例中，非UTP或其功能類似物及UTP或其功能類似物可以單獨組合物形式添加至反應混合物中，例如各自處於相同或不同濃度及/或各自以相同或不同流速引至反應混合物)。在一些實施例中，此類非UTP補充及UTP補充可藉由不同方法進行，例如一者連續地進行(例如如本文所描述)而另一者週期性地進行(例如如本文所描述)。

【0296】 在一些實施例中，補充核苷酸(諸如UTP及/或GTP或其功能類似物)包括補充超過一種類型之核苷酸，例如補充超過一種UTP及/或GTP之功能類似物。舉例而言，在一些實施例中，在轉錄反應期間補充反

應混合物包括補充UTP及假UTP。在一些實施例中，在轉錄反應期間補充反應混合物包括補充UTP、假UTP及GTP。在一些實施例中，在轉錄反應期間補充反應混合物包括補充假UTP及/或1-甲基假UTP及GTP。在一些實施例中，補充超過一種類型之核苷酸使得補充量之UTP及/或GTP或其功能類似物在反應混合物中產生過量之UTP及/或GTP或其功能類似物。在一些實施例中，補充超過一種UTP及/或GTP之功能類似物不使得補充量之UTP及/或GTP或其功能類似物將在反應混合物中產生過量之UTP及/或GTP或其功能類似物。

【0297】 在一些實施例中，用於增加加帽RNA轉錄物之產率及/或用於減少dsRNA之方法包括：將用於轉錄及加帽反應之組分在用於促進轉錄物聚合之條件下培育，其中藉由多次投與競爭性核苷酸組分使5'帽類似物在反應中之濃度相對於競爭性核苷酸組分之濃度維持在介於約1:1與約50:1之間的比率下。在特定實施例中，競爭性核苷酸為GTP或其功能類似物。在涉及T7、T3或SP6 RNA聚合酶之反應中，競爭性核苷酸典型地為GTP或其功能類似物。特定而言預期當使用在+ 1位置採用另一特定核苷酸之RNA聚合酶時，涉及使用GTP或其功能類似物之任何實施例均可用另一核苷酸三磷酸或其功能類似物取代。本發明亦係關於用於增加加帽轉錄物之產率及/或用於減少活體外轉錄及加帽反應中之dsRNA的方法，該等方法包括：將反應組分在實現轉錄之條件下培育，其中GTP或其功能類似物在反應中之濃度維持在介於約0.2 mM與約2.0 mM之間的濃度下，且在反應期間其他核苷酸之濃度為至少約0.2 mM持續至少30分鐘。

【0298】 此外，本發明係關於產生在5'端具有非延伸核苷酸之RNA之方法，該等方法包括藉由分批饋料方法向包括RNA聚合酶及非延伸核

苷酸之轉錄反應中引入與非延伸核苷酸競爭之核苷酸。在特定實施例中，非延伸核苷酸不為功能性帽類似物。特定而言預期關於GTP或GTP類似物論述之任何實施例均可關於另一核苷酸來實施，只要彼核苷酸與在5'端之非延伸核苷酸競爭即可，且反之亦然。此外，亦應瞭解，關於5'帽或5'帽類似物論述之任何實施例均可關於能夠僅添加至轉錄物5'端之非延伸核苷酸來實施，且反之亦然。

【0299】 在某些實施例中，可在轉錄及/或加帽反應過程中為反應補充5'帽或5'帽類似物。在某些實施例中，在轉錄及/或加帽反應過程中不為反應補充5'帽或5'帽類似物。

【0300】 在一些實施例中，例如藉由分批饋料方法向反應中補充之組分之一者為核苷酸。在一些情況下，藉由分批饋料方法引入超過一種核苷酸。舉例而言，可藉由分批饋料方法補充UTP與GTP核苷酸或其功能類似物兩者，或可藉由分批饋料方法補充UTP及其功能類似物，及/或可藉由分批饋料方法補充GTP及其功能類似物。在其他實施例中，藉由分批饋料方法補充所有核苷酸。反應中之核苷酸中之一或多者可為經修飾之核苷酸，諸如本文所描述之核苷三磷酸之功能類似物。非帽核苷酸可經修飾但仍為功能性的，因為其可在3'端併至聚合轉錄物上；換句話說，此等非帽經修飾核苷酸為可延伸的，因為其具有5'三磷酸。

【0301】 在一些實施例中，可使用可程式化幫浦來進行補充。在一些實施例中，可使用可程式化注射幫浦，例如以自動進行一或多種反應組分之逐步添加。替代地或另外，在一些實施例中，可利用監測器(例如感測器)來偵測一或多種組分之水準；在一些此類實施例中，監測器可與幫浦自動連通，例如使得可在偵測到降低量之此類組分後釋放額外之饋料。

【0302】 在一些實施例中，在RNA轉錄之後，可例如使用此項技術中已知之方法(例如DNA水解)將DNA模板移除或與活體外轉錄RNA組合物分離。

【0303】 在一些實施例中，可在DNA移除或消化期間添加RNA酶抑制劑以防止RNA發生可能的降解。在一些實施例中，可將螯合劑添加至DNA酶處理之轉錄混合物中以與活體外轉錄反應期間可能添加之二價離子複合。示例性螯合劑可為或包含乙二胺四乙酸(EDTA)。在一些實施例中，在添加螯合劑後，溫度可改變至少1°C(包括例如至少2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C或更多)。

生物反應器

【0304】 在一些實施例中，轉錄反應在本文所描述之生物反應器中(亦即使用生物反應器)進行。

【0305】 如本文中所提到，在一些實施例中，轉錄反應在約6、6.5、7、7.5、8或9之pH值下進行。在一些實施例中，適合於轉錄反應之pH值可為約7.5-8.5。在一些實施例中，pH值為約6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0。在一些實施例中，pH值為約6-8.5。在一些實施例中，pH值為6至8.5、6.5至8.0、7.0至7.5；在一些實施例中，pH值為7.5。在一些實施例中，例如藉由使用適合之緩衝液使反應混合物之pH值在轉錄反應過程中保持基本上恆定。適合於調節pH值之緩衝液為此項技術中已知及本文所描述的，且包括但不限於NaOH緩衝液、KOH緩衝液或HCl緩衝液。在一些實施例中，緩衝液具有如本文所描述之pH值，例如6至8.5、6.5至8.0、

7.0至7.5或7.5。在一些實施例中，緩衝液選自由以下組成之群：80 mM HEPES/KOH，pH 7.5及40 mM Tris/HCl，pH 7.5。在一些實施例中，在轉錄反應過程保持pH值恆定及/或監測pH值係在生物反應器中(亦即使用生物反應器)進行。

【0306】 在一些實施例中，實時監測轉錄反應之進展。在一些實施例中，監測轉錄反應之進展係使用生物反應器(諸如包括感測器(例如用於UV 260/280 nm量測之UV流動池)之生物反應器)來實現。

【0307】 如本文所用之術語「生物反應器」或「轉錄反應器」係指諸如腔室或試管或管柱之容器，在該容器中在諸如本文所描述之特定條件下進行轉錄反應。用於轉錄之生物反應器為此項技術中已知的(參見WO 1995/08626及EP 3 155 129)。生物反應器典型地經配置使得反應組分由饋送管線遞送至反應器核心且RNA產物藉由穿過超濾膜而移去(參見EP 3 155 129及van de Merbel, (1999), J. Chromatogr. A 856(1-2): 55-82)到達排出物流。適用於本發明之方法中之生物反應器可包括用於執行轉錄反應之反應模組、用於暫時捕獲所轉錄之RNA分子的捕獲模組及用於控制反應混合物之組分饋入反應模組中之控制模組，其中反應模組可包括用於自反應混合物分離核苷酸之過濾膜，且藉由控制模組控制反應混合物之組分饋入可基於所量測之經分離核苷酸的濃度來進行。生物反應器可經熱調控以準確維持特定溫度，諸如如本文所描述之轉錄反應的溫度，例如通常介於4°C與40°C之間。生物反應器可包括流入饋料孔及出口孔。生物反應器可允許在轉錄反應期間例如以可變攪拌速率攪拌反應混合物。攪拌可為連續或不連續的，諸如以諸多種間隔進行。

【0308】 用於根據本發明之用途的生物反應器可具有任何尺寸，只

要其適用於轉錄即可。舉例而言，在一些實施例中，生物反應器可為至少0.2公升或更大，諸如0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50公升或更大或其間之任何體積。典型地在如本文所描述之轉錄反應期間控制生物反應器之內部條件，包括但不限於pH值及溫度。生物反應器可由適合於在如本文所描述之條件下進行活體外轉錄之任何材料組成，包括玻璃、塑膠或金屬。

【0309】 在一些實施例中，生物反應器可裝備有用於補充反應混合物之幫浦。在一些實施例中，可使用可程式化幫浦來進行補充。在一些實施例中，可使用可程式化注射幫浦，例如以自動進行一或多種反應組分之逐步添加。替代地或另外，在一些實施例中，可利用監測器(例如感測器)來偵測一或多種組分之水準；在一些此類實施例中，監測器可與幫浦自動連通，例如使得可在偵測到降低量之此類組分後釋放額外之饋料。

用途

【0310】 在許多實施例中，與藉由其中在活體外轉錄過程期間UTP具限制性之方法產生之RNA產物相比，藉由本文所描述之方法產生之RNA產物具有降低量之dsRNA污染物。在一些實施例中，此類RNA產物具有低水準之dsRNA污染物，從而不需要純化製程來移除dsRNA污染物。在一些實施例中，此類RNA(例如mRNA)為治療性的。在一些實施例中，此類RNA(例如mRNA)為醫藥級產物。

【0311】 在一些實施例中，一或多個RNA(例如單股RNA)可與脂質奈米粒子一起調配或與脂質體複合以產生包含RNA-LNP或RNA-脂質複合物之醫藥級組合物或製劑。在一些實施例中，脂質奈米粒子為包含例如如

此項技術中已知之一或多種陽離子或可離子化脂質的脂質奈米粒子。在一些實施例中，脂質奈米粒子可包含至少一種陽離子或可離子化脂質、至少一種聚合物結合脂質及至少一種輔助脂質(例如至少一種中性脂質，諸如磷脂及/或固醇)。

【0312】 在一些實施例中，本文所描述之此類RNA產物可向有需要之個體(例如將受益於所編碼之多肽的表現之個體，例如作為置換或刺激或增強免疫反應)投與，典型地在一些實施例中經由併入LNP中來進行。

【0313】 疾患之治療及疫苗接種：在許多實施例中，將所提供之RNA產物(例如通過使用如本文所描述之方法製造之製劑)用於治療疾患及/或用於接種。

【0314】 術語「免疫」或「疫苗接種」通常指出於治療或預防原因對個體進行處理之過程。治療(特定而言預防性治療)較佳為或包含以誘導或增強個體例如針對一或多種抗原之免疫反應為目標的治療。若根據本發明，需要藉由使用如本文所描述之RNA來誘導或增強免疫反應，則可藉由RNA來觸發或增強免疫反應。在一些實施例中，本發明提供一種預防性治療，其較佳為或包含對個體之疫苗接種。本發明之其中本發明之RNA編碼作為相關蛋白質之為免疫活性化合物或抗原之醫藥學活性肽或蛋白質的實施例特定而言適用於疫苗接種。當以治療疾患為目標時，本發明之RNA較佳編碼能夠或足以治療該疾患之肽或蛋白質，或核酸(例如治療性核酸，包括但不限於siRNA、shRNA、miRNA等)。

【0315】 術語「個體(subject)」及「個體(individual)」可互換使用且係關於哺乳動物。舉例而言，在本發明之情形中哺乳動物為人類、非人類靈長類動物、馴養動物(諸如狗、貓、綿羊、牛、山羊、豬、馬等)、實

驗室動物(諸如小鼠、大鼠、兔、豚鼠等)以及圈養動物(諸如動物園之動物)。如本文所用之術語「動物」亦包括人類。術語「個體」亦可包括患者，亦即動物，較佳為患有疾病之人類。

【0316】 本文所描述之劑(例如RNA產物)及組合物較佳以有效量投與。「有效量」係指單獨或與其他劑量一起達成所需反應或所需效應之量。在治療特定疾病或特定疾患之情況下，所需反應較佳係關於抑制疾病過程。此包括減慢疾病進展及特定而言中斷或逆轉疾病進展。治療疾病或疾患中之所需反應亦可為延遲該疾病或該疾患之發作或預防其發作。

【0317】 本文所描述之劑或組合物之有效量將視所要治療之疾患、疾病之嚴重程度、患者之個體參數(包括年齡、生理狀況、體形及體重)、治療持續時間、伴隨療法(若存在)之類型、特定投藥途徑及類似因素而定。因此，本文所描述之劑的投與劑量可視若干此等參數而定。在使用初始劑量患者中之反應不足之情況下，可使用更高之劑量(或藉由不同的更局部化之投藥途徑達成有效性更高之劑量)。

套組

【0318】 本發明尤其提供包含適用於產生根據本發明之RNA之一或多種組分的套組，及/或包含諸如藉由本發明之方法產生之RNA的套組。在一些實施例中，套組可包含例如醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑、載劑等。在一些實施例中，套組包含如本文所描述產生之RNA產物的製劑，及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑、載劑等。在一些實施例中，所提供之套組包括一或多個用於投與之器具(例如注射器或小瓶或IV袋)，或其組件。在一些實施例中，所提供的包括一或多個用於稀釋之器具。

【0319】 在一些實施例中，套組之各個組成部分以單獨實體形式存在。舉例而言，包含兩種或更多種核酸分子(例如兩種或更多種如本文所描述之RNA產物)之套組可包括於單獨容器中之該兩種或更多種核酸分子。替代地或另外，套組可包括於一或多個容器中之一或多種核酸分子，及於與包括核酸之任何容器分離之一或多個容器中之一或多種其他組分(例如緩衝劑、載劑、稀釋劑、賦形劑等)。

【0320】 在一些實施例中，單獨容器可為開放容器或封閉容器。在一些實施例中，一些或所有容器為封閉容器。

【0321】 在一些實施例中，包括RNA或要與RNA組合之組分(例如緩衝劑、載劑、稀釋劑、賦形劑等)的任何容器為不含RNA酶或基本上不含RNA酶的。

【0322】 在一些實施例中，本發明之套組包含用於與細胞一起接種及/或用於向人類或動物個體投與之RNA。在一些實施例中，RNA製劑為冷凍的。在一些實施例中，RNA製劑為乾燥的。在一些實施例中，RNA製劑包含脂質(例如LNP)。

【0323】 根據本發明之套組視情況包含標籤或其他形式之資訊元件，例如電子資料載體。標籤或資訊元件較佳包括說明書，例如印刷之書面說明書或視情況可印刷之呈電子形式之說明書。說明書可指套組之至少一種適合之可能用途。

RNA製劑及組合物

【0324】 如本文所描述，本發明提供RNA產物之各種製劑及/或包含RNA(例如如本文所描述產生之RNA)之其他組合物。

【0325】 因此，本發明提供藉由本發明之方法可獲得之組合物，例

如與不可藉由本發明之方法獲得之組合物相比含有更少雙股RNA之比較組合物。

【0326】 在一些實施例中，所提供之組合物為純化的；在一些實施例中，其可不為純化的。若未進一步純化，包含RNA之組合物可進一步包含其他化學品及分子，例如轉錄混合物中用於轉錄RNA之組分、DNA模板分子、酶、鹽、NTP等。

【0327】 在一些實施例中，包含根據本發明之RNA之組合物之純度足以用於後續製程中而不需要進一步純化。在一些實施例中，包含根據本發明之RNA之組合物之純度足以用於向細胞及/或向有需要之個體投與。在一些實施例中，在轉錄反應後在用於其他製程前包含根據本發明之RNA之組合物需要純化。在一些實施例中，在轉錄反應後在用於向細胞或向有需要之個體投與前包含根據本發明之RNA之組合物需要純化。

【0328】 在一些實施例中，與藉由使用等莫耳量之ATP、CTP、GTP、UTP或其功能類似物之方法產生之dsRNA的量相比，藉由本發明之方法產生之dsRNA的量有所降低。在一些實施例中，與藉由使用等莫耳量之ATP、CTP、GTP、UTP或其功能類似物之方法產生之dsRNA的量相比，藉由本發明之方法產生之dsRNA的量降低至少10%，諸如至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%，較佳至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。較佳地，與藉由使用等莫耳量之ATP、CTP、GTP、UTP或其功能類似物之方法產生之dsRNA的量相比，藉由本發明之方法產生之dsRNA的量降低至少至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少

57%、至少48%、至少49%、至少60%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%，較佳至少57%、至少58%、至少59%、至少60%或更多。

【0329】 在一些實施例中，與藉由使用等莫耳量之ATP、CTP、GTP、UTP或其功能類似物之方法產生之RNA的產率相比，藉由本發明之方法產生之RNA的產率有所增加。在一些實施例中，與藉由使用等莫耳量之ATP、CTP、GTP、UTP或其功能類似物之方法產生之RNA的產率相比，藉由本發明之方法產生之RNA的產率增加至少10%，諸如至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%，較佳至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。較佳地，與藉由使用等莫耳量之ATP、CTP、GTP、UTP或其功能類似物之方法產生之RNA的產率相比，藉由本發明之方法產生之RNA的產率增加至少至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少57%、至少48%、至少49%、至少60%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%，較佳至少57%、至少58%、至少59%、至少60%或更多。

【0330】 在一些實施例中，一或多種RNA (例如單股RNA)可與脂質奈米粒子一起調配或與脂質體複合以產生包含RNA-LNP或RNA-脂質複合物之醫藥級組合物或製劑。在一些實施例中，脂質奈米粒子為包含例如如此項技術中已知之一或多種陽離子或可離子化脂質的脂質奈米粒子。在一些實施例中，脂質奈米粒子可包含至少一種陽離子或可離子化脂質、至少一種聚合物結合脂質及至少一種輔助脂質(例如至少一種中性脂質，諸如

磷脂及/或固醇)。

醫藥組合物

【0331】 在一些實施例中，本發明之RNA (諸如藉由本發明之方法產生之RNA)可以醫藥組合物之形式存在。根據本發明之醫藥組合物可包含至少一種根據本發明之RNA分子。根據本發明之醫藥組合物可進一步包含醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑、載劑及/或媒劑中之任何一或多者。醫藥學上可接受之載劑、媒劑、賦形劑或稀釋劑之選擇未特別限制。此項技術中已知之任何適合之醫藥學上可接受之載劑、媒劑、賦形劑或稀釋劑均可使用。

【0332】 術語「載劑」係指天然或非天然(合成)性質之有機或無機組分，其與活性組分組合以有助於、增強或實現應用。根據本發明，術語「載劑」亦包括適合於向患者投與之一或多種相容固體或液體填料、稀釋劑或囊封物質。

【0333】 可能用於非經腸投與之載劑物質為例如無菌水、葡萄糖溶液、林格氏溶液(Ringer)、林格氏乳酸鹽、無菌氯化鈉溶液、聚二醇、氫化萘及特定而言，生物相容之丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物。

【0334】 本文所描述之醫藥組合物可經由任何習知途徑投與，諸如藉由非經腸投與，包括藉由注射或輸注。投與較佳為非經腸的，例如靜脈內、動脈內、皮下、淋巴結內、皮內或肌肉內。

【0335】 在本發明之一些實施例中，醫藥組合物可進一步包含溶劑，諸如水性溶劑或使得有可能保留RNA完整性之任何溶劑。在一些實施例中，醫藥組合物為包含RNA之水溶液。水溶液可視情況包含溶質，

例如鹽。

【0336】 在本發明之一些實施例中，醫藥組合物呈冷凍乾燥組合物形式。冷凍乾燥組合物為藉由冷凍乾燥相應水性組合物可獲得的。

【0337】 適合於非經腸投與之組合物通常包含活性化合物之無菌水性或非水性製劑，其較佳與接受者之血液等張。相容載劑及溶劑之實例為林格氏溶液及等張氯化鈉溶液。此外，通常將無菌固定油用作溶液或懸浮液介質。

【0338】 在一些實施例中，醫藥組合物包含至少一種陽離子實體。一般而言，陽離子脂質、陽離子聚合物及具有正電荷之其他物質可與帶負電荷之核酸形成複合物。可藉由與陽離子化合物，較佳聚陽離子化合物(諸如陽離子或聚陽離子肽或蛋白質)複合來穩定根據本發明之RNA。在一些實施例中，根據本發明之醫藥組合物包含選自由以下組成之群的至少一種陽離子分子：魚精蛋白、聚乙烯亞胺、聚L-離胺酸、聚L-精胺酸、組蛋白或陽離子脂質。

【0339】 在一些實施例中，根據本發明適用之陽離子脂質為陽離子兩親分子，例如包含至少一種親水性及親脂性部分之分子。在一些實施例中，陽離子脂質可為單陽離子或聚陽離子的。陽離子脂質典型地具有親脂性部分，諸如固醇、醯基或二醯基鏈，且具有總淨正電荷。脂質之頭部基團典型地帶有正電荷。陽離子脂質較佳具有1至10價之正電荷，更佳1至3價之正電荷，且更佳1價之正電荷。陽離子脂質之實例包括但不限於1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基銨丙烷(DOTMA)；二甲基二(十八烷基)銨(DDAB)；1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷(DOTAP)；1,2-二油醯基-3-二甲基銨-丙烷(DODAP)；1,2-二醯氧基-3-二甲基銨丙烷；1,2-二烷基氧基-

3-二甲基銨丙烷；雙十八基二甲基氯化銨(DODAC)、1,2-肉豆蔻醯氧基丙基-1,3-二甲基羥基乙基銨(DMRIE)及2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺甲醯胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙銨三氟乙酸鹽(DOSPA)。陽離子脂質亦包括具有三級胺基團之脂質，包括1,2-二亞油烯基氧基-N,N-二甲基-3-胺基丙烷(DLinDMA)。陽離子脂質適合於在如本文所描述之脂質調配物中調配RNA，諸如脂質體、乳液及脂質複合物。典型地，正電荷由至少一種陽離子脂質貢獻且負電荷由RNA貢獻。在一些實施例中，除陽離子脂質外，醫藥組合物亦包含至少一種輔助脂質。輔助脂質可為中性或陰離子脂質。輔助脂質可為天然脂質(諸如磷脂)，或天然脂質之類似物，或與天然脂質沒有相似性之完全合成脂質或脂質樣分子。在其中醫藥組合物包括陽離子脂質與輔助脂質兩者之情況下，陽離子脂質與中性脂質的莫耳比可考慮調配物之穩定性及類似因素適當地確定。

【0340】 在一些實施例中，根據本發明之醫藥組合物包含魚精蛋白。在一些實施例中，魚精蛋白可適合作為帶陽離子之劑。術語「魚精蛋白」係指富含精胺酸之相對低分子量之各種強鹼性蛋白質中之任一者，且代替動物(諸如魚類)之精細胞中之體細胞組蛋白尤其與DNA相關聯存在。特定而言，術語「魚精蛋白」係指在魚類精子中發現之蛋白質，其為強鹼性，可溶於水，不因熱量而凝結，且包含多個精胺酸單體。根據本發明，如本文所用之術語「魚精蛋白」意謂包含獲自或源自於天然或生物來源之任何魚精蛋白胺基酸序列，包括其片段及該胺基酸序列或其片段之多聚形式。此外，該術語涵蓋人造的且特定而言經設計用於特定目的且不能自天然或生物來源分離之(合成)多肽。

【0341】 在一些實施例中，由本發明提供之組合物可包含一或多種

佐劑。佐劑可添加至疫苗中以刺激免疫系統之反應；佐劑本身不典型地提供免疫性。示例性佐劑包括但不限於以下各項：無機化合物(例如明礬、氫氧化鋁、磷酸鋁、磷酸鈣氫氧化物)；礦物油(例如石蠟油)、細胞介素(例如IL-1、IL-2、IL-12)；免疫刺激多核苷酸(諸如RNA或DNA；例如含CpG之寡核苷酸)；皂苷(例如來自皂樹、大豆、美遠志(*Polygala senega*)之植物皂苷)；油乳液或脂質體；聚氧乙烯醚及聚氧乙烯酯調配物；聚磷腈(PCPP)；胞壁醯肽；咪唑并喹啉酮化合物；硫半卡脞化合物；Flt3配位體(WO 2010/066418 A1)；或熟習此項技術者所知之任何其他佐劑。用於投與根據本發明之RNA的較佳佐劑為Flt3配位體(WO 2010/066418 A1)。當Flt3配位體與編碼抗原之RNA一起投與時，可觀測到抗原特異性CD8⁺T細胞的強增加。

【0342】 在一些實施例中，由本發明提供之醫藥組合物可為緩衝的(例如使用乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、丁二酸鹽緩衝液、Tris緩衝液、磷酸鹽緩衝液)。

宿主細胞

【0343】 在一些實施例中，醫藥(或其他)組合物經適當調配用於引入細胞中；其中可接種(亦即投與)一個或更多個RNA分子之細胞可稱為「宿主細胞」。如本文所用，術語「宿主細胞」係指可用外源性RNA分子轉化或轉染之任何細胞。術語「細胞」在許多實施例中為完整細胞，亦即尚未釋放其正常細胞內組分(諸如酶、細胞器或遺傳物質)之具有完整膜之細胞。完整細胞在許多實施例中為活細胞，亦即能夠執行其正常代謝功能之活細胞。根據本發明，術語「宿主細胞」包含原核(例如大腸桿菌)或真核細胞(例如人類及動物細胞、植物細胞、酵母細胞及昆蟲細胞)。示例性

細胞包括原核生物及真核生物之彼等細胞(單細胞或多細胞)、細菌細胞(例如大腸桿菌、芽孢桿菌屬、鏈黴菌屬等之菌株)、分枝桿菌屬細胞、真菌細胞、酵母細胞(例如啤酒酵母、裂殖酵母、巴斯德畢赤酵母、甲醇畢赤酵母等)、植物細胞、昆蟲細胞(例如SF-9、SF-21、桿狀病毒感染之昆蟲細胞、粉紋夜蛾等)、非人類動物細胞、人類細胞或細胞融合物(諸如雜交瘤或四體瘤)。在一些實施例中，宿主細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在一些實施例中，宿主細胞為真核的。舉例而言，真核宿主細胞可為CHO (例如CHO K1、DXB-1 CHO、Veggie-CHO)、COS (例如COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎臟細胞(例如HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60 (例如BHK21)、Jurkat、Daudi、A431 (表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、足細胞、BRL 3 A細胞、HT1080細胞、骨髓瘤細胞、腫瘤細胞或源自於上述細胞之細胞株。特定令人關注的為哺乳動物細胞，諸如來自人類、小鼠、倉鼠、豬、馴養動物(包括馬、牛、綿羊及山羊)以及靈長類動物的細胞。細胞可源自於許多組織類型且包含原代細胞及細胞株。特定實例包括角質細胞、外周血白血球、骨髓幹細胞及胚胎幹細胞。在一些實施例中，宿主細胞為抗原呈遞細胞，特定而言為樹突細胞、單核細胞或巨噬細胞。在一些實施例中，本文所提供之組合物(例如醫藥組合物)可將核酸(例如RNA)遞送至宿主細胞，使得其變得以單個拷貝或以若干拷貝存在於宿主細胞中，且在一些實施例中在宿主細胞中表現。

【0344】 在一些實施例中，宿主細胞可為原核細胞；在一些實施例中，宿主細胞可為真核細胞。

【0345】 在一些實施例中，原核細胞在本文中用於例如進行根據本發明之DNA的增殖，且真核細胞在本文中適合例如用於表現複製子之開放閱讀框。

某些實施例

【0346】 以下描述由本發明提供之某些實施例：

1. 一種產生RNA之方法，該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充包含UTP或其功能類似物且實質上不含CTP或ATP或其功能類似物之組合物。

2. 一種產生RNA之方法，該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中CTP或其功能類似物之起始濃度等於ATP或其功能類似物之起始濃度，且其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充UTP或其功能類似物。

3. 一種產生包含具有降低之雙股(ds) RNA含量之RNA的組合物之方法，其中該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充包含UTP或其功能類似物且實質上不含CTP或

ATP或其功能類似物之組合物。

4. 一種產生包含具有降低之雙股(ds) RNA含量之RNA的組合物之方法，其中該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中CTP或其功能類似物之起始濃度等於ATP或其功能類似物之起始濃度，且其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充UTP或其功能類似物。

5. 如實施例3或4之方法，其中與包含使用等莫耳量之腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物自相同DNA模板轉錄之RNA的組合物之dsRNA含量相比，該包含RNA之組合物之雙股(ds) RNA含量降低。

6. 如實施例3至5中任一項之方法，其中與包含使用等莫耳量之腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物自相同DNA模板轉錄之RNA的組合物之免疫原性相比，該包含RNA之組合物的免疫原性降低。

7. 如實施例1至6中任一項之方法，其中尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物以限制轉錄速率之起始濃度存在。

8. 如實施例1至7中任一項之方法，其中尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物之起始濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約1:1.5與約1:15之間。

9. 如實施例1至8中任一項之方法，其中當UTP或其功能類似物之濃度接近耗竭時，為該反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

10. 如實施例1至9中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物補充至少一次尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

11. 如實施例1至10中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物連續補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

12. 如實施例1至10中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物週期性補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

13. 如實施例1至12中任一項之方法，其中為該反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物維持或恢復UTP或其功能類似物之濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之濃度的初始比率。

14. 如實施例1至13中任一項之方法，其中為該反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，直至該轉錄反應結束。

15. 如實施例1至14中任一項之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度低於胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度。

16. 如實施例15之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物以限制轉錄速率之起始濃度存在。

17. 如實施例15或16之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約1:1.5與約1:15之間。

18. 如實施例15至17中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

19. 如實施例18之方法，其中當GTP或其功能類似物之濃度接近耗

竭時，為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

20. 如實施例15至19中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物補充至少一次鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

21. 如實施例15至20中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物連續補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

22. 如實施例15至20中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物週期性補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

23. 如實施例15至22中任一項之方法，其中為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物維持或恢復GTP或其功能類似物之濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之濃度的初始比率。

24. 如實施例15至23中任一項之方法，其中為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物，直至該轉錄反應結束。

25. 如實施例1至24中任一項之方法，其中該方法不包括在該轉錄反應過程中為該轉錄混合物補充胞苷三磷酸(CTP)及/或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物。

26. 如實施例1至25中任一項之方法，其中該反應混合物包含對應於RNA分子中之第一核苷酸的起始核苷酸。

27. 如實施例26之方法，其中該起始核苷酸為核苷單磷酸、核苷二磷酸、核苷三磷酸或二核苷三磷酸。

28. 如實施例26或27之方法，其中該起始核苷酸為5'帽或5'帽類似物。

29. 如實施例28之方法，其中該5'帽類似物選自由以下組成之群：

G[5']ppp[5']G、 m^7 G[5']ppp[5']G、 $m^{3^{2,2},7}$ G[5']ppp[5']G、 $m_2^{7,3'}$ -OG[5']ppp[5']G (3'-ARCA)、 $m_2^{7,2'}$ - 0 GpppG (2'-ARCA)、 $m_2^{7,2'}$ - 0 GppspG D1 (β -S-ARCA D1)、 $m_2^{7,2'}$ - 0 GppspG D2 (β -S-ARCA D2)及 $m_2^{7,3'}$ - 0 Gppp($m^{2'}$ - 0)ApG (CC413)。

30. 如實施例28或29之方法，其中該反應混合物中之該5'帽或5'帽類似物與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物相比以過量存在。

31. 如實施例30之方法，其中5'帽或5'帽類似物之起始濃度與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約2:1與約20:1之間。

32. 如實施例31之方法，其中5'帽或5'帽類似物之起始濃度與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度的比率為約4:1。

33. 如實施例1至32中任一項之方法，其中該反應混合物進一步包含RNA聚合酶、緩衝劑及至少一種單價或二價陽離子。

34. 如實施例33之方法，其中該陽離子為 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、三(羥甲基)胺基甲烷陽離子、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Mn^{2+} 。

35. 如實施例33或34之方法，其中該RNA聚合酶選自由以下組成之群：T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶及SP6 RNA聚合酶。

36. 如實施例1至35中任一項之方法，其中尿苷三磷酸(UTP)之功能類似物選自由以下組成之群：假UTP、N1-甲基假UTP、2-硫代-UTP及4-硫代-UTP。

37. 如實施例1至36中任一項之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)之功能類似物選自由以下組成之群：7-去氫-GTP、N1-甲基-GTP及O6-甲基-GTP。

38. 如實施例1至37中任一項之方法，其中該DNA模板編碼以下中

之一或多者：5'非轉譯區(UTR)、3' UTR、開放閱讀框及聚(A)尾。

39. 如實施例1至38中任一項之方法，其中該RNA包含以下中之一或多者：5'非轉譯區(UTR)、3' UTR、開放閱讀框及聚(A)尾。

40. 如實施例39之方法，其中該RNA編碼至少一種肽或蛋白質。

41. 如實施例1至40中任一項之方法，其中該RNA為mRNA。

42. 如實施例1至41中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中該反應混合物之pH值保持實質上恆定。

43. 如實施例1至42中任一項之方法，其中實時監測該轉錄反應之進展。

44. 如實施例1至43中任一項之方法，其中使用生物反應器進行該方法。

45. 一種RNA，其係藉由如實施例1至44中任一項之方法產生。

46. 一種包含RNA之組合物，其係藉由如實施例3至44中任一項之方法產生。

47. 一種治療個體之方法，該方法包括以下步驟：

(i) 獲得藉由如實施例1至44中任一項之方法產生之RNA，或獲得藉由如實施例3至44中任一項之方法產生之包含RNA之組合物，及

(ii) 向該個體投與該RNA或該包含RNA之組合物。

48. 一種治療個體之方法，該方法藉由向該個體投與如實施例45之RNA或如實施例46之包含RNA之組合物來進行。

49. 在一種藉由活體外轉錄產生RNA之方法中，改良包括：在活體外轉錄反應期間限制UTP或其功能類似物之濃度。

50. 一種活體外轉錄反應，其包括：

在活體外轉錄反應期間限制UTP或其功能類似物之濃度。一種活體外轉錄反應，其包括：

RNA模板，該RNA模板包含引導模板轉錄以產生具有聚A序列元件之轉錄物的啟動子；

RNA聚合酶，該RNA聚合酶作用於該啟動子；及

腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之濃度。

例示

【0347】 本發明藉由圖及實例來詳細描述及說明，該等圖及實例僅用於說明目且不意在具限制性。由於該描述及該等實例，熟練技工可獲得同樣包括在本發明中之其他實施例。

實例1：在轉錄反應中限制UTP或UTP及ATP之示例性IVT反應可減少dsRNA內容物之產生

【0348】 本實例展示用於增強加帽效率及/或操縱在活體外轉錄(IVT)反應期間產生之雙股RNA (dsRNA)含量之量的示例性分批饋料程序。在一些實施例中，藉由反向轉錄(例如3'至5'方向)產生dsRNA。在一些實施例中，自3'端起始之轉錄所需之限制NTP使此效應最小化。本實例特定而言證實，活體外轉錄反應中限制UTP可減少dsRNA之形成，且可特定而言適用於產生可包括聚A序列(諸如聚A尾)之轉錄物。不希望受理論限制，吾等認為所觀測到之dsRNA產生減少可能可歸因於反向轉錄(例如在與諸如聚A尾之聚A序列雜交後起始)之減少。

【0349】 為測試NTP限制在IVT期間之效應，以某種時間間隔將

ATP (A)、UTP (U)及ATP與UTP之組合(A/U)饋送至反應中。將標準GTP (G)饋料用作對照。

【0350】 在一些實施例中，將G、U、A或A/U之起始濃度降至其相應起始濃度(例如IVT之典型起始濃度)之20%，且在轉錄反應過程中以4次添加進行饋送直至達至最終濃度。

【0351】 在存在DNA模板、用於共轉錄加帽之 $m_2^{7,3'}\text{-}^{\circ}\text{Gppp}(m^{2'}\text{-}^{\circ})\text{ApG}$ (CC413)帽類似物及核苷三磷酸(GTP、ATP、UTP、CTP)之情況下進行示例性IVT。在存在T7 RNA聚合酶、RNA酶抑制劑(Ribolock)及無機焦磷酸酶之情況下使用含有二硫蘇糖醇及亞精胺之乙酸鎂緩衝液進行IVT反應持續150分鐘。

【0352】 在一些實施例中，在IVT之後，移除DNA模板(例如經由DNA酶消化)且將RNA純化(例如使用磁珠進行固定(Berensmeier, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Appl.Microbiol.Biotechnol. 73, 495–504; 10.1007/s00253-006-0675-0 (2006))。在一些實施例中，將RNA例如在H₂O中溶離。

【0353】 除評估dsRNA含量之外，亦測定IVT之產率、RNA完整性及加帽效率以表徵源自於不同轉錄條件之RNA。

【0354】 在一些實施例中，測定dsRNA之量。在一些實施例中，將1 μg之RNA以5 μl等分試樣點樣至耐綸墨點分析膜(Nytran SuPerCharge (SPC)耐綸墨點分析膜)上。接著將膜在含有脫脂奶粉(例如5% (w/v))之緩衝液(例如TBST-20 mM TRIS pH 7.4、137 mM NaCl、0.1% (v/v)吐溫-20(TWEEN-20))中阻斷1h。為偵測dsRNA，將膜與在緩衝液(例如含有1% (w/v)脫脂奶粉之TBS-T緩衝液)中1:10,000稀釋之dsRNA-特異性抗體

(例如小鼠單株抗體)一起培育1h。在用緩衝液洗滌之後，將膜與在緩衝液(例如含有1% (w/v)脫脂奶粉之TBS-T)中1:10,000稀釋之第二抗體(例如HRP結合之驢抗小鼠IgG)一起培育1h，用緩衝液(例如TBS-T)洗滌且使用西方墨點偵測試劑及成像系統顯影。在一些實施例中，必要時，例如藉由密度測定法定量雜交信號強度。

【0355】 在一些實施例中，例如藉由UV (例如Nanodrop)量測RNA濃度且計算IVT產率(例如每單位IVT反應體積(μl)產生之RNA(μg))。

【0356】 在一些實施例中，使用生物分析儀(例如Agilent)分析RNA完整性。為製備用於RNA完整性分析之示例性樣品，使含250 ng之RNA的50%甲醯胺在70°C下變性10分鐘且進一步用Agilent RNA 6000奈米套組(5067-1511, Agilent)加工。在一些實施例中，隨後藉由主要峰積分對完整電泳圖之積分的關係來計算完整性。

【0357】 在一些實施例中，測定RNA加帽效率。在一些實施例中，用RNA核酶處理RNA以在5' UTR中裂解RNA且將片段純化，在變性凝膠(例如21%聚丙烯醯胺)上運行，從而解析加帽及未加帽片段之間的1nt差異。在一些實施例中，接著藉由密度測定法測定加帽與未加帽片段之間的比率。

【0358】 在一些實施例中，不同核苷酸(G、A、U或A/U)之饋送對RNA完整性及RNA產率具有輕微/可忽略之影響(圖1A及B)。

【0359】 在一些實施例中，觀測到與對照(饋送GTP)相比，當對UTP進行限制時dsRNA含量意外降低(圖1C)。此外，當限制ATP時觀測到相反效應(例如增加) (圖1C)。不希望受任一理論約束，當限制ATP時所觀測到之dsRNA含量增加可能係歸因於T7聚合酶在轉錄物末端停止，因為

可能尚未存在不足以按典型速度合成聚A尾之ATP (例如其中ATP未受限制)。此停止可有利於反向轉錄，因為在轉錄物末端聚合酶之停留更久。藉由同時饋送ATP與UTP兩者，當限制ATP時所觀測之dsRNA含量增加得到拯救(例如dsRNA含量降低至對照水準) (圖1C)。

【0360】 在一些實施例中，使用限制GTP來增加加帽效率。在一些實施例中，限制其他NTP可對加帽RNA寡核苷酸之比率具有不同影響。儘管示例性帽類似物CC413經設計以獲得高加帽效率，但與限制其他NTP相比，限制GTP顯示最高加帽效率(圖1D)。在一些實施例中，與對照相比，限制UTP或ATP導致降低之加帽效率。在一些實施例中，與對照相比，ATP及UTP之雙重限制僅展示關於加帽效率之僅輕度降低(圖1D)。

實例2：UTP及/或GTP之示例性分批饋料添加可拯救加帽效率

【0361】 本實例證實藉由限制UTP之起始濃度或藉由限制UTP與GTP (G/U)之起始濃度，可在減少dsRNA內容物之產生的同時恢復加帽效率。

【0362】 在一些實施例中，在RNA之5'端帽類似物之併入與GTP之併入競爭。在一些實施例中，當IVT反應中帽類似物相較於GTP過量時，加帽效率為最高的。在一些實施例中，此可藉由在IVT反應之持續時間內保持低GTP濃度來達成，但可降低產率及RNA完整性。不受任一理論約束，降低之產率及RNA完整性可能歸因於低GTP濃度，此限制反應速率且導致失敗之轉錄物。在一些實施例中，藉由向反應中逐步添加GTP以保持低總GTP濃度同時總是提供足夠之GTP以維持轉錄反應效率來改良產率及RNA完整性。在一些實施例中，對於使用非三核苷酸帽類似物(諸如ARCA或 β -S ARCA-D1帽類似物)而言此可甚至更重要。在此實例中，使

用 β -S ARCA-D1。為拯救饋送UTP之反應中之加帽效率，除UTP外亦饋送GTP。使用標準GTP饋送作為對照。

【0363】舉例而言，將GTP、UTP及GTP/UTP之起始濃度降至起始濃度之1/18且在轉錄反應過程中以17次添加進行饋送直至達至最終濃度。

【0364】在存在DNA模板、用於共轉錄加帽之 β -S ARCA (D1)帽類似物及核苷三磷酸(GTP、ATP、UTP、CTP)之情況下進行示例性IVT。

【0365】在存在T7 RNA聚合酶、RNA酶抑制劑(Ribolock)及無機焦磷酸酶之情況下使用含有二硫蘇糖醇及亞精胺之乙酸鎂緩衝液進行示例性反應持續180分鐘。將RNA純化且如實例1中所描述測定RNA濃度、完整性、dsRNA含量及加帽效率。

【0366】在一些實施例中，與對照相比，UTP之限制及GTP及UTP之雙重限制產生增加之產率(圖2A)。在一些實施例中，完整性因限制UTP而降低，但當將GTP與UTP一起限制時恢復至對照水準(圖2B)。與實例1中所觀測類似地，與僅限制GTP或將GTP與UTP兩者一起限制相比，dsRNA含量因在IVT期間限制UTP而降低。雙重GTP及UTP限制條件使得dsRNA含量降低，但所達到之程度比僅限制UTP之條件低(圖2C)。在一些實施例中，雙重限制之目標為拯救加帽效率。雖然UTP之限制降低加帽效率，但GTP及UTP之雙重限制使加帽效率恢復至類似於對照反應之水準(圖2D)。

實例3：m1 Ψ TP及/或GTP之示例性分批饋料添加可拯救加帽效率

【0367】本實例證實限制1-甲基-假尿苷(m1 Ψ TP)或m1 Ψ TP與GTP兩者(G/ Ψ)之起始濃度可減少IVT期間之dsRNA產生，同時與僅限制GTP之起始濃度(對照)相比，限制m1 Ψ TP與GTP兩者之起始濃度可維持

dsRNA減少且維持加帽效率。

【0368】 在一些實施例中，使用m1ΨTP替代UTP降低活體外轉錄之RNA之免疫原性及IVT反應中產生之dsRNA的量。為確定dsRNA水準是否會進一步降低，如實例1及2中之UTP一般對m1ΨTP進行限制。使用標準GTP饋送作為對照。

【0369】 在一些實施例中，將GTP、m1ΨTP及GTP/m1ΨTP之起始濃度降至起始濃度之1/11且在轉錄反應過程中以10次添加進行饋送直至達至最終濃度。

【0370】 在存在DNA模板、用於共轉錄加帽之 $m_2^{7,3'}\text{-}^0\text{Gppp}(m^{2'}\text{-}^0)\text{ApG}$ (CC413)帽類似物及核苷三磷酸(GTP、ATP、m1ΨTP、CTP)之情況下使用T7聚合酶進行示例性IVT。

【0371】 在存在T7 RNA聚合酶、RNA酶抑制劑(Ribolock)及無機焦磷酸酶之情況下使用含有二硫蘇糖醇及亞精胺之乙酸鎂緩衝液進行示例性反應持續180分鐘。

【0372】 將RNA純化且如實例1中所描述測定RNA產率、完整性及dsRNA含量。藉由用3'外核酸酶消化RNA且使剩餘之核苷酸經受藉由質譜法進行之量測來測定加帽效率。根據ATP及GTP針對帽類似物的比率來計算加帽效率。

【0373】 在一些實施例中，饋送不同核苷酸對RNA產率僅具有適度影響(圖3A)。在一些實施例中，RNA完整性因限制m1ΨTP而降低，但當將GTP與m1ΨTP一起限制時與對照相比未改變(圖3B)。與在實例1中所觀測類似，在一些實施例中，dsRNA污染因限制m1ΨTP (實例1中為UTP)之起始濃度而減少。在一些實施例中，與在僅限制m1ΨTP之條件下所觀測

的相比，限制GTP與m1ΨTP兩者之起始濃度維持類似之所產生之dsRNA污染的減少(圖3C)。與在UTP分批饋料程序(實例1)中所觀測類似，當限制m1ΨTP時，與對照相比加帽效率降低，但藉由m1ΨTP與GTP兩者之雙重限制恢復至對照水準(圖3D)。

實例4：示例性活體外轉錄RNA製造方案

【0374】 初始活體外轉錄反應：在攪拌下，將組分在反應容器中組合，該等組分包括ATP溶液(100 mM腺苷5'-三磷酸)、CTP溶液(100 mM胞苷5'-三磷酸)、N1-甲基假UTP溶液(100 mM N1-甲基假尿苷5'-三磷酸)、GTP溶液(100 mM鳥苷5'-三磷酸)、5'-帽溶液(100 mM 5'-帽)、RNA酶抑制劑、轉錄緩衝液(10x為400 mM HEPES、400 mM乙酸鎂、100 mM DTT、20 mM亞精胺，pH 8.3)及線性DNA模板(注射用水(WFI))。

【0375】 接著添加焦磷酸酶及T7聚合酶(T7 RNA聚合酶)且增加攪拌。初始反應之總體積典型地為約30 L，例如35 L以上，例如介於約30 L與約50 L之間，或介於約35 L與約45 L之間。

【0376】 在添加酶之後，培育期開始，在此期間進行GTP/N1-甲基假UTP大劑量饋送。

【0377】 *首次培育及分批饋送*：在培育期期間，以大劑量饋送形式遞送N1-甲基假UTP與GTP之等量混合物。多次大劑量饋送可在培育期期間添加。舉例而言，饋送可以例如每4-7分鐘或每5-10分鐘約1次之平均速率或按需要添加。在一些實施例中，首個培育期可持續超過約30分鐘、35分鐘、40分鐘、45分鐘、50分鐘、55分鐘、60分鐘、65分鐘、70分鐘、75分鐘、80分鐘、85分鐘、90分鐘、95分鐘等。在一些實施例中，首個培育期為約60至約80分鐘，或約65至約75分鐘，或約65至約70分

鐘。在一些實施例中，在首個培育期期間進行1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多次饋送。

【0378】 所有其他饋送之後的總體積將增加(相對於初始反應)例如約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約5.5倍、約6倍、約6.5倍、約7倍、約7.5倍、約8倍、約8.5倍、約9倍、約9.5倍、約10倍或更多倍。在一些實施例中，總體積將增加約2至約8倍，或約3至約7倍，或約4至約6倍，或約4至約5倍。

【0379】 *最終培育*。所有饋送完成之後，開始最終IVT培育時間。在最終IVT培育時間完成後，方法進行(例如即刻)至DNA酶I消化操作。在一些實施例中，最終IVT培育可持續約10至約60分鐘、約15至約50分鐘、約20至約45分鐘、約20至約40分鐘、約20至約35分鐘、約25至約305分鐘、約25至約35分鐘等。

【0380】 *DNA酶消化*：可向最終IVT培育中添加DNA酶I及氯化鈣溶液(50 mM氯化鈣)；可攪拌混合物。可藉由添加EDTA (例如500 mN)來停止反應。

【0381】 *蛋白酶K消化*：與DNA酶消化相比，蛋白酶K消化典型地在適度更低之溫度下進行。可直接向停止反應之DNA酶消化混合物中添加蛋白酶K溶液。可維持(且視情況監測)溫度及攪拌速率。

【0382】 在蛋白酶K消化之後，可進行一或多個純化(例如超濾/滲濾及/或過濾)步驟。

實例5：RNA產物之示例性方法參數及中間控制

【0383】 此實例描述可利用之方法參數及中間控制的示例性集合。在一些實施例中，利用方法參數來評估及/或監測如本文所描述之RNA製

造方法的一致性。在一些實施例中，利用中間控制來評估及/或監測如本文所描述製造之RNA產物的品質及/或將其與適當參考相比較。

【0384】 在一些實施例中，可評估及/或監測IVT反應之方法參數。在一些實施例中，可評估及/或監測溫度、酶後攪拌速率、初始NTP溶液體積、大劑量饋送期間之培育時間、總NTP大劑量體積及/或最終IVT培育時間中之一或多者。在一些實施例中，評估以下中之一或多者或全部：

表5-1：用於IVT反應之示例性方法對照。

參數	可接受範圍		
	方法A	方法B	方法C
溫度1 [°C]	34 – 40 (培育器)	34.0 – 40.0	
酶後攪拌速率[rpm]	200 – 250 (視體積而定)	60 – 110	90 – 110
初始GTP溶液體積(mL/L)	5	4.75 – 5.25	
初始N1-甲基假UTP溶液體積(mL/L)	5	4.75 – 5.25	
初始CTP溶液體積(mL/L)	90	85.4 – 143.8	
初始ATP溶液體積(mL/L)	90	85.4 – 135.1	
GTP/N1-甲基假UTP大劑量饋送期間之培育時間[min]	75	67 – 70	
總GTP/N1-甲基假UTP大劑量體積(mL/L)	170	153.2 – 187.3	
最終IVT培育時間[min]	30	25 – 35	

【0385】 在一些實施例中，可評估及/或監測DNA酶(例如DNA酶I)消化之方法參數。在一些實施例中，可評估及/或監測溫度、DNA酶(例如DNA酶I)體積及/或DNA酶(例如DNA酶I)培育時間中之一或多者。在一些實施例中，評估以下中之一或多者或全部：

表5-2：用於DNA酶(例如DNA酶I)消化之示例性方法對照。

參數	可接受範圍		
	方法A	方法B	方法C
溫度1 [°C]	34 – 40 (培育器)	34.0 – 40.0	
溫度2 [°C]	不適用	32.0 – 38.0	
DNA酶I體積[每公升起始IVT體積之毫升數]	3.43 – 11.66	7.20 – 8.81	
DNA酶I培育時間[min]	30 – 40	29 – 35	

【0386】 在一些實施例中，可評估及/或監測如本文所描述之蛋白質消化及/或片段化之方法參數及/或中間控制。在一些實施例中，可評估及/或監測溫度、蛋白酶K體積、蛋白酶K培育時間、RNA濃度、生物負荷及/或內毒素中之一或多者。在一些實施例中，評估以下中之一或多者或全部：

表5-3：用於蛋白質消化及/或片段化(例如蛋白酶K消化)之示例性方法參數及中間控制。

參數	可接受範圍		
	方法A	方法B	方法C
溫度2 [°C]	不適用	32.0 – 38.0	
蛋白酶K體積[每公升起始IVT體積之毫升數]	不適用	1.00 – 1.22	
蛋白酶K培育時間[min]	不適用	10 – 15	
RNA濃度[mg/mL]	不適用	不適用	
生物負荷[CFU/mL]	不適用	≤100 / 10	
內毒素[EU/mL]	不適用	≤ 12.5	

【0387】 在一些實施例中，可評估及/或監測如本文所描述之純化(例如藉由UF/DF)及調配之方法參數及/或中間控制。在一些實施例中，可評估及/或監測滲濾體積、調配緩衝液pH值、生物負荷、內毒素及/或RNA濃度(例如在各種UFDF回收操作期間¹及/或方法結束時)中之一或多者。在一些實施例中，評估以下中之一或多者或全部：

表5-4：用於示例性純化及調配之示例性方法參數及中間控制。

參數	可接受範圍		
	方法A	方法B	方法C
滲濾1體積[DV]	不適用	≥ 5.0	
滲濾2體積[DV]	不適用	≥ 10.0	
調配緩衝液pH值	不適用	6.90 – 7.10	
生物負荷[CFU/mL]	不適用	≤100 / 10	
內毒素[EU/mL]	不適用	≤ 12.5	
RNA濃度 ¹ [mg/mL]	不適用	不適用	
RNA濃度[mg/mL]	不適用	≥ 2.00	

【0388】 在一些實施例中，評估及/或監測方法產率。在一些實施例中，針對以下步驟中之一或多者評估及/或監測方法產率：IVT、純化(例如UF/DF)、最終過濾及分配。在一些實施例中，以下提供示例性評估：

表5-5：示例性方法產率評估及/或監測。

方法步驟	可接受範圍		
	方法A	方法B	方法C
IVT [每公升IVT起始體積之mRNA克數]	5.36 – 11.11	≥ 3.38	
UFDF [%]	不適用	≥ 68	
最終過濾及分配[%]	不適用	≥ 80	

【0389】 在一些實施例中，本文所描述之製造方法中所用之設備包括以下各項：

表5-6：本文所描述之製造方法中所用之示例性設備。

方法步驟	方法A:	方法B:	方法C
步驟1: 活體外轉錄	<ul style="list-style-type: none"> • 培育器(Thermo BBD 6220) • 磁攪拌器(2mag MIX 1 XL) • 注射幫浦(KD Scientific Legato 210 P) • 離心機 天平(Sartorius Lab Instruments)	50L夾套一次性混合器(SUM)	Biostat STR 50L反應器(SUM)
步驟2: DNA酶I消化	培育器(Thermo BBD 6220) 磁攪拌器(2mag MIX 1 XL) 天平(Sartorius Lab Instruments)	50L夾套一次性混合器(SUM)	Biostat STR 50L反應器(SUM)
步驟3: 蛋白酶K消化	-	50L夾套一次性混合器(SUM)	Biostat STR 50L反應器(SUM)
步驟4: UFDF	-	200L夾套一次性混合器(SUM) • 具有7m ² 300kD膜之SS超濾系統 200L SS留存槽。	200L夾套一次性混合器(SUM) • 具有7m ² 300kD膜之SS超濾系統
步驟5: 最終過濾	0.2um過濾過濾器完整性測試儀(Pall palltronic Flowstar IV)	200L夾套一次性混合器(SUM), 0.2um過濾。	200L夾套一次性混合器(SUM), 0.2um過濾。

DNA/mg RNA、約50-950 ng DNA/mg RNA、約50-900 ng DNA/mg RNA、約50-850 ng DNA/mg RNA內，或在一些實施例中低於或等於約500 ng DNA/mg RNA、約480 ng DNA/mg RNA、約450 ng DNA/mg RNA、約420 ng DNA/mg RNA、約390 ng DNA/mg RNA、約360 ng DNA/mg RNA、約330 ng DNA/mg RNA、約300 ng DNA/mg RNA、約270 ng DNA/mg RNA、約240 ng DNA/mg RNA、約210 ng DNA/mg RNA或更低。

實例7：更高級結構之示例性評估

【0392】 本實例展示RNA產物之更高級結構之評估。在一些實施例中，如本文所提供之RNA組合物具有以類似於標準參考物之圓二色性(CD)光譜為特徵的更高級結構。在一些實施例中，一式三份記錄CD光譜。在一些實施例中，由1X磷酸鹽緩衝鹽水溶液並行分析樣品。在一些實施例中，CD光譜展現交替之峰及槽且在200 nm至330 nm之所有波長上所有樣品之光譜類似。圖4中展示示例性CD評估。

實例8：RNA產物之示例性表徵

【0393】 此實例描述可用於表徵如本文所描述製造之RNA產物及/或用於將其與適當參考物比較之示例性參數集合：RNA完整性、5'-帽、聚(A)尾、殘餘DNA模板及雙股RNA (dsRNA)。在一些實施例中，將此等參數中之每一者視為關鍵品質特徵(CQA)。在一些實施例中，對於聚(A)尾，將聚(A)陽性mRNA分子之百分比以及聚(A)尾之長度均視為CQA。

【0394】 在一些實施例中，亦可評估截短RNA物質之水準(及/或身份)。

【0395】 在一些實施例中，亦可評估RNA聚合酶及/或蛋白酶K之水

準。

〔0396〕 在一些實施例中，可例如藉由LC/MS/MS寡核苷酸作圖來評估RNA產物之一級序列。

〔0397〕 在一些實施例中，可例如藉由圓二色性光譜學來評估RNA產物之更高級結構。

〔0398〕 在一些實施例中，可藉由測定例如所編碼蛋白質例如在藉由活體外轉譯表現時之尺寸(例如藉由西方墨點法)來評估功能性。

〔0399〕 在一些實施例中，評估以下中之一或多者或全部：

特性	分析方法	方法
• 鹼基序	確切寡核苷酸序列之預期RNA序列	藉由RNA降解作圖作之核糖核酸片段的深層DIP-C-UV及串聯質譜法(LC/MS/MS)
	確切寡核苷酸序列之預期RNA序列	Illumina MiSeq次世代定序技術
5'帽結構	確切5'帽結構及5'端序列	RNA降解作圖之核糖核酸之5'端作圖和DIP-C-UV及質譜(DIP-C-UVMS)分析
聚(A)尾	確切聚(A)尾之存在且 確切聚(A)尾之長度	核糖核酸降解作圖之核糖核酸之聚(A)尾的深層DIP-C-UV及質譜(DIP-C-UVMS)分析
更序高級結構(DOS)	光譜分析，以確切DOS 之存在及折光譜	圓二色性(CD)光譜學

實例9：RNA原料藥之示例性規格

【0400】本實例描述藉由如本文所描述處理之活體外轉錄製造之RNA原料藥之示例性規格。

表9-1：RNA原料藥之示例性規格

品質特徵	分析程序	接受準則
組成及強度		
透明度	外觀(透明度)a	≤ 6 NTU
著色	外觀(著色)a	與第7水準之棕色(B)著色標準相比未更強著色
pH	電位測定法a	7.0 ± 0.5
含量(RNA濃度)	UV光譜學	2.25 ± 0.25 mg/mL
身份		
所編碼RNA序列之身份	RT-PCRb	身份確認
純度		
RNA完整性	毛細管凝膠電泳	≥50%完整之RNA
5'-帽	RP-HPLC	≥ 50%
聚(A)尾	ddPCR	≥ 70%
方法相關雜質		
殘餘DNA模板	qPCRb	≤ 1000 ng DNA/mg RNA
產物相關雜質		
dsRNA	免疫墨點法b	≤ 2000 pg dsRNA/μg RNA
安全性		
細菌內毒素	內毒素(LAL) (藥典)	≤ 12.5 EU/mL
生物負荷	生物負荷	≤ 1 CFU/ 10 mL

【0401】因此，在一些實施例中，如本文別處所描述，建立所提供之RNA組合物以以下中之一或多者為特徵的釋放及/或測試評估：

a)加帽RNA之百分比在約40-70%之範圍內或更高，在一些實施例中高於約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或更多。

b)RNA完整性高於約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。

c)殘餘dsRNA水準低於約2000 pg dsRNA/μg RNA、約1500 pg dsRNA/μg RNA、約1000 pg dsRNA/μg RNA、約500 pg dsRNA/μg RNA

RNA、約250 pg dsRNA/ μ g RNA、約100 pg dsRNA/ μ g RNA或更低。

d)殘餘DNA水準在約0.1-1000 ng DNA/mg RNA、約50-1,000 ng DNA/mg RNA、約50-950 ng DNA/mg RNA、約50-900 ng DNA/mg RNA、約50-850 ng DNA/mg RNA內，或在一些實施例中低於或等於約500 ng DNA/mg RNA、約480 ng DNA/mg RNA、約450 ng DNA/mg RNA、約420 ng DNA/mg RNA、約390 ng DNA/mg RNA、約360 ng DNA/mg RNA、約330 ng DNA/mg RNA、約300 ng DNA/mg RNA、約270 ng DNA/mg RNA、約240 ng DNA/mg RNA、約210 ng DNA/mg RNA或更低。

等效物

【0402】 熟習此項技術者將認識到或僅僅使用常規實驗即能夠確定本文所描述之本發明特定實施例的許多等效物。本發明之範圍不旨在限於以上描述，而是如以下申請專利範圍中所闡述。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種產生RNA之方法，該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充包含UTP或其功能類似物且實質上不含CTP或ATP或其功能類似物之組合物。

【請求項2】

一種產生RNA之方法，該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中CTP或其功能類似物之起始濃度等於ATP或其功能類似物之起始濃度，且其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充UTP或其功能類似物。

【請求項3】

一種產生包含具有降低之雙股(ds) RNA含量之RNA的組合物之方法，其中該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充包含UTP或其功能類似物且實質上不含CTP或ATP或其功能類似物之組合物。

【請求項4】

一種產生包含具有降低之雙股(ds) RNA含量之RNA的組合物之方法，其中該方法包括使用反應混合物自DNA模板轉錄RNA，該反應混合物包含腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中CTP或其功能類似物之起始濃度等於ATP或其功能類似物之起始濃度，且其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP或ATP或其功能類似物之起始濃度，其中該方法包括在轉錄反應過程中為該反應混合物補充UTP或其功能類似物。

【請求項5】

如請求項3或4之方法，其中與包含使用等莫耳量之腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物自相同DNA模板轉錄之RNA的組合物之dsRNA含量相比，該包含RNA之組合物之雙股(ds) RNA含量降低。

【請求項6】

如請求項3至5中任一項之方法，其中與包含使用等莫耳量之腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物自相同DNA模板轉錄之RNA的組合物之免疫原性相比，該包含RNA之組合物的免疫原性降低。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之方法，其中尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物以限制轉錄速率之起始濃度存在。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之方法，其中尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似

物之起始濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約1:1.5與約1:15之間。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之方法，其中當UTP或其功能類似物之濃度接近耗竭時，為該反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物補充至少一次尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物連續補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【請求項12】

如請求項1至10中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物週期性補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之方法，其中為該反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物維持或恢復UTP或其功能類似物之濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之濃度的初始比率。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之方法，其中為該反應混合物補充尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，直至該轉錄反應結束。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類

似物之起始濃度低於胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物以限制轉錄速率之起始濃度存在。

【請求項17】

如請求項15或16之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約1:1.5與約1:15之間。

【請求項18】

如請求項15至17中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中當GTP或其功能類似物之濃度接近耗竭時，為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【請求項20】

如請求項15至19中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物補充至少一次鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【請求項21】

如請求項15至20中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該反應混合物連續補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【請求項22】

如請求項15至20中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中，為該

反應混合物週期性補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物。

【請求項23】

如請求項15至22中任一項之方法，其中為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物維持或恢復GTP或其功能類似物之濃度與胞苷三磷酸(CTP)或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物之濃度的初始比率。

【請求項24】

如請求項15至23中任一項之方法，其中為該反應混合物補充鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物，直至該轉錄反應結束。

【請求項25】

如請求項1至24中任一項之方法，其中該方法不包括在該轉錄反應過程中為該轉錄混合物補充胞苷三磷酸(CTP)及/或腺苷三磷酸(ATP)或其功能類似物。

【請求項26】

如請求項1至25中任一項之方法，其中該反應混合物包含對應於RNA分子中之第一核苷酸的起始核苷酸。

【請求項27】

如請求項26之方法，其中該起始核苷酸為核苷單磷酸、核苷二磷酸、核苷三磷酸或二核苷三磷酸。

【請求項28】

如請求項26或27之方法，其中該起始核苷酸為5'帽或5'帽類似物。

【請求項29】

如請求項28之方法，其中該5'帽類似物選自由以下組成之群：
 $G[5']ppp[5']G$ 、 $m^7G[5']ppp[5']G$ 、 $m_3^{2,2,7}G[5']ppp[5']G$ 、 $m_2^{7,3'}$

$^{\circ}\text{G}[5']\text{ppp}[5']\text{G}$ (3'-ARCA)、 $m_2^{7,2'}\text{-}^{\circ}\text{GpppG}$ (2'-ARCA)、 $m_2^{7,2'}\text{-}^{\circ}\text{GppspG}$ D1 (β -S-ARCA D1)、 $m_2^{7,2'}\text{-}^{\circ}\text{GppspG}$ D2 (β -S-ARCA D2)及 $m_2^{7,3'}\text{-}^{\circ}\text{Gppp}(m^{2'}\text{-}^{\circ})\text{ApG}$ (CC413)。

【請求項30】

如請求項28或29之方法，其中該反應混合物中之該5'帽或5'帽類似物與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物相比以過量存在。

【請求項31】

如請求項30之方法，其中5'帽或5'帽類似物之起始濃度與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度的比率介於約2:1與約20:1之間。

【請求項32】

如請求項31之方法，其中5'帽或5'帽類似物之起始濃度與鳥苷三磷酸(GTP)或其功能類似物之起始濃度的比率為約4:1。

【請求項33】

如請求項1至32中任一項之方法，其中該反應混合物進一步包含RNA聚合酶、緩衝劑及至少一種單價或二價陽離子。

【請求項34】

如請求項33之方法，其中該陽離子為 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、三(羥甲基)胺基甲烷陽離子、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 或 Mn^{2+} 。

【請求項35】

如請求項33或34之方法，其中該RNA聚合酶選自由以下組成之群：
T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶及SP6 RNA聚合酶。

【請求項36】

如請求項1至35中任一項之方法，其中尿苷三磷酸(UTP)之該功能類

似物選自由以下組成之群：假UTP、N1-甲基假UTP、2-硫代-UTP及4-硫代-UTP。

【請求項37】

如請求項1至36中任一項之方法，其中鳥苷三磷酸(GTP)之該功能類似物選自由以下組成之群：7-去氦-GTP、N1-甲基-GTP及O6-甲基-GTP。

【請求項38】

如請求項1至37中任一項之方法，其中該DNA模板編碼以下中之一或多者：5'非轉譯區(UTR)、3' UTR、開放閱讀框及聚(A)尾。

【請求項39】

如請求項1至38中任一項之方法，其中該RNA包含以下中之一或多者：5'非轉譯區(UTR)、3' UTR、開放閱讀框及聚(A)尾。

【請求項40】

如請求項39之方法，其中該RNA編碼至少一種肽或蛋白質。

【請求項41】

如請求項1至40中任一項之方法，其中該RNA為mRNA。

【請求項42】

如請求項1至41中任一項之方法，其中在該轉錄反應過程中該反應混合物之pH值保持實質上恆定。

【請求項43】

如請求項1至42中任一項之方法，其中實時監測該轉錄反應之進展。

【請求項44】

如請求項1至43中任一項之方法，其中使用生物反應器進行該方法。

【請求項45】

一種RNA，其係藉由如請求項1至44中任一項之方法產生。

【請求項46】

一種包含RNA之組合物，其係藉由如請求項3至44中任一項之方法產生。

【請求項47】

一種治療個體之方法，該方法包括以下步驟：

- (i) 獲得藉由如請求項1至44中任一項之方法產生之RNA，或獲得藉由如請求項3至44中任一項之方法產生之包含RNA之組合物，及
- (ii) 向該個體投與該RNA或該包含RNA之組合物。

【請求項48】

一種治療個體之方法，該方法藉由向該個體投與如請求項45之RNA或如請求項46之包含RNA之組合物來進行。

【請求項49】

一種藉由活體外轉錄產生RNA之方法，該方法包括：

在活體外轉錄反應期間限制UTP或其功能類似物之濃度。

【請求項50】

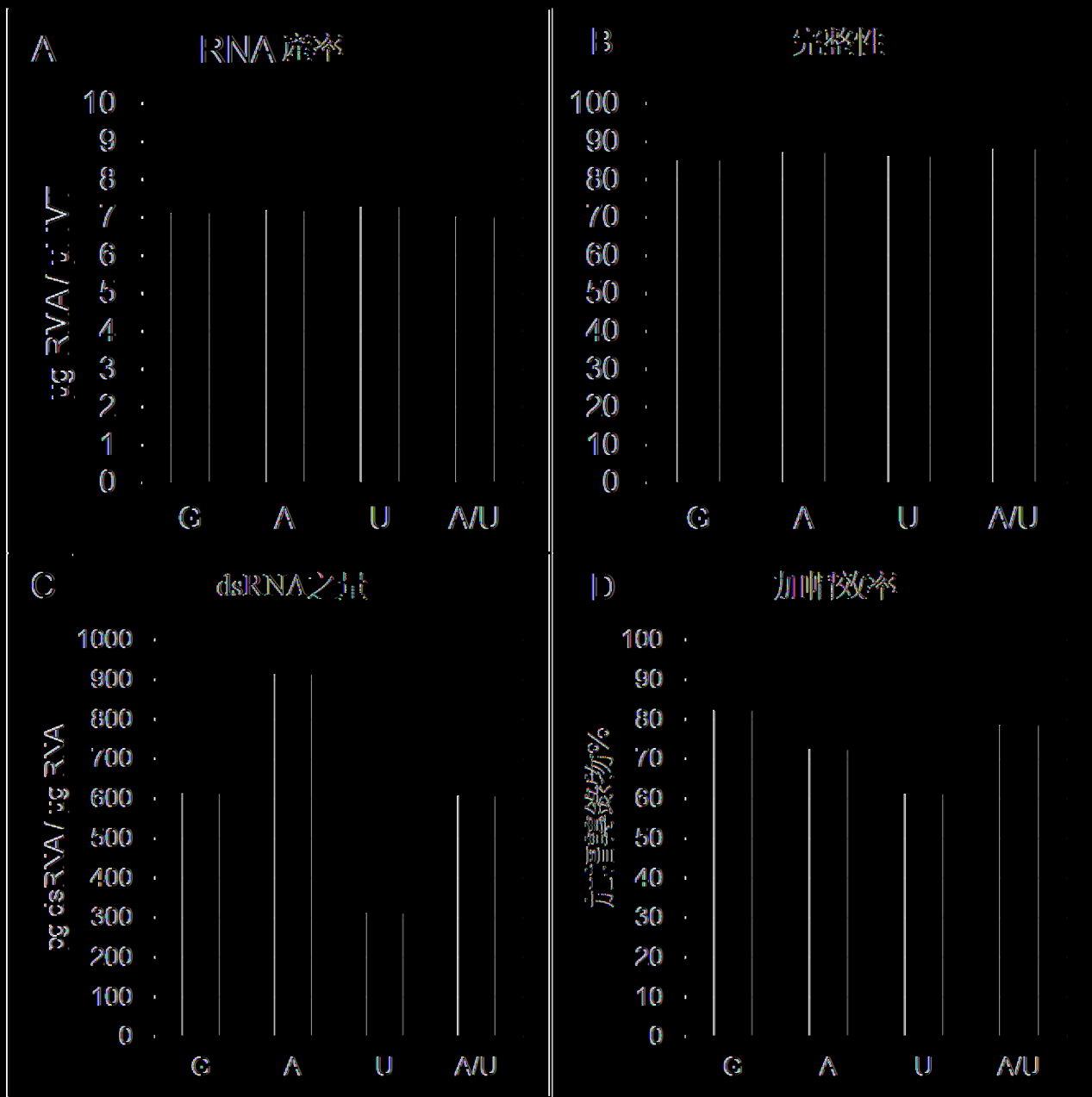
一種活體外轉錄反應，其包括：

RNA模板，該RNA模板包含引導模板轉錄以產生具有聚A序列元件之轉錄物的啟動子；

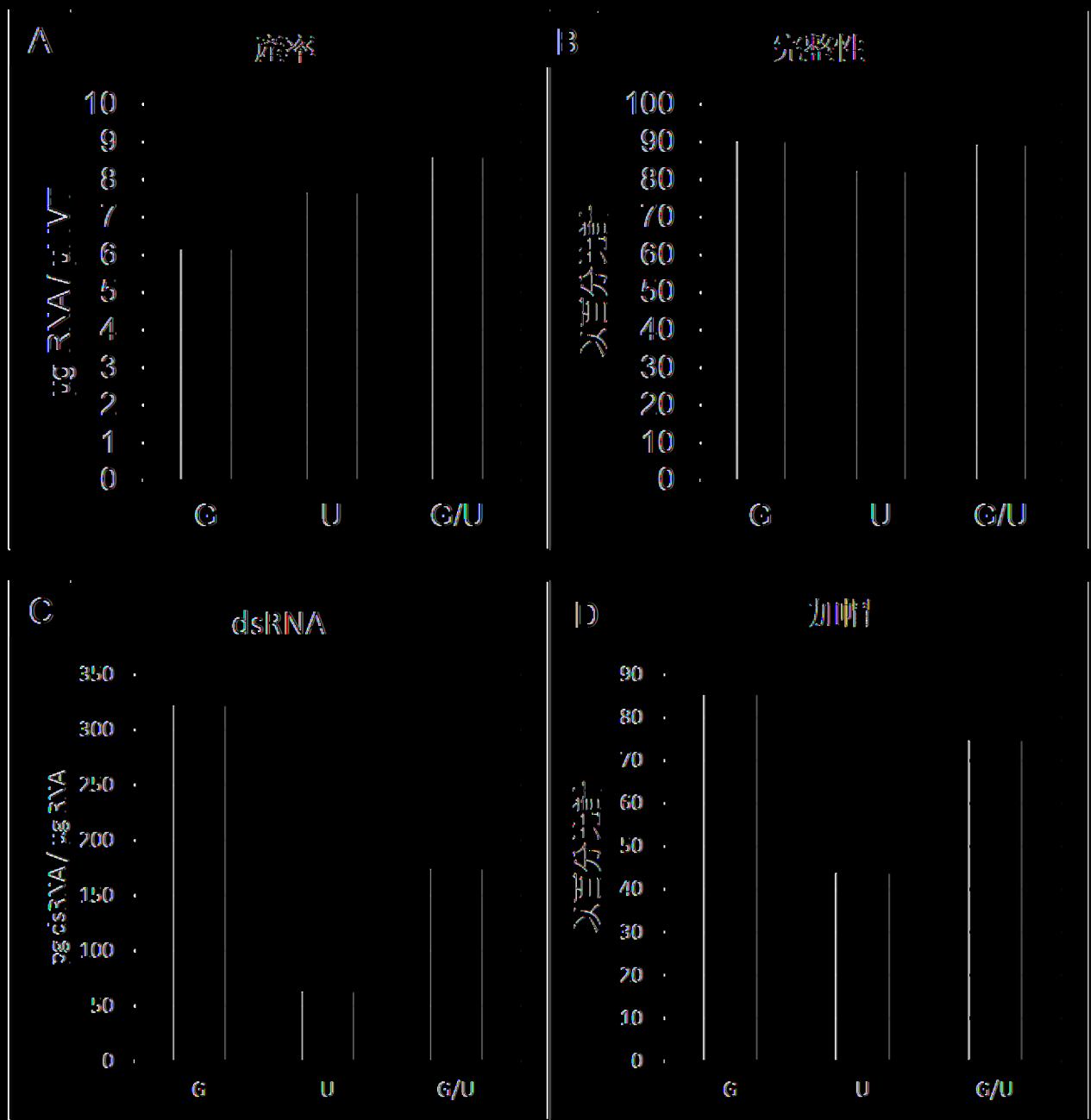
RNA聚合酶，該RNA聚合酶作用於該啟動子；及

腺苷三磷酸(ATP)、鳥苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)或其功能類似物，其中UTP或其功能類似物之起始濃度低於CTP及/或ATP或其功能類似物之濃度。

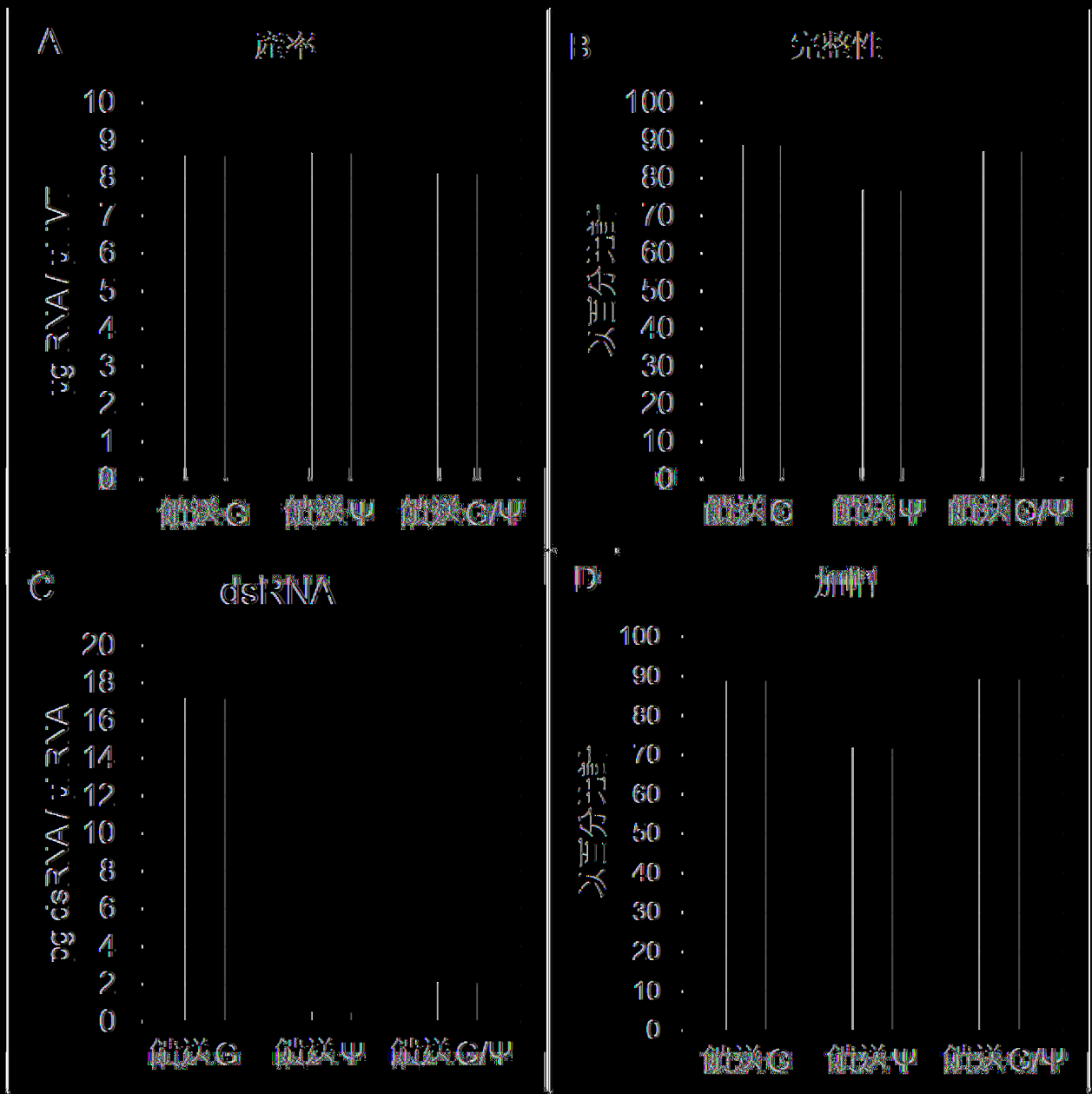
(發明圖式)



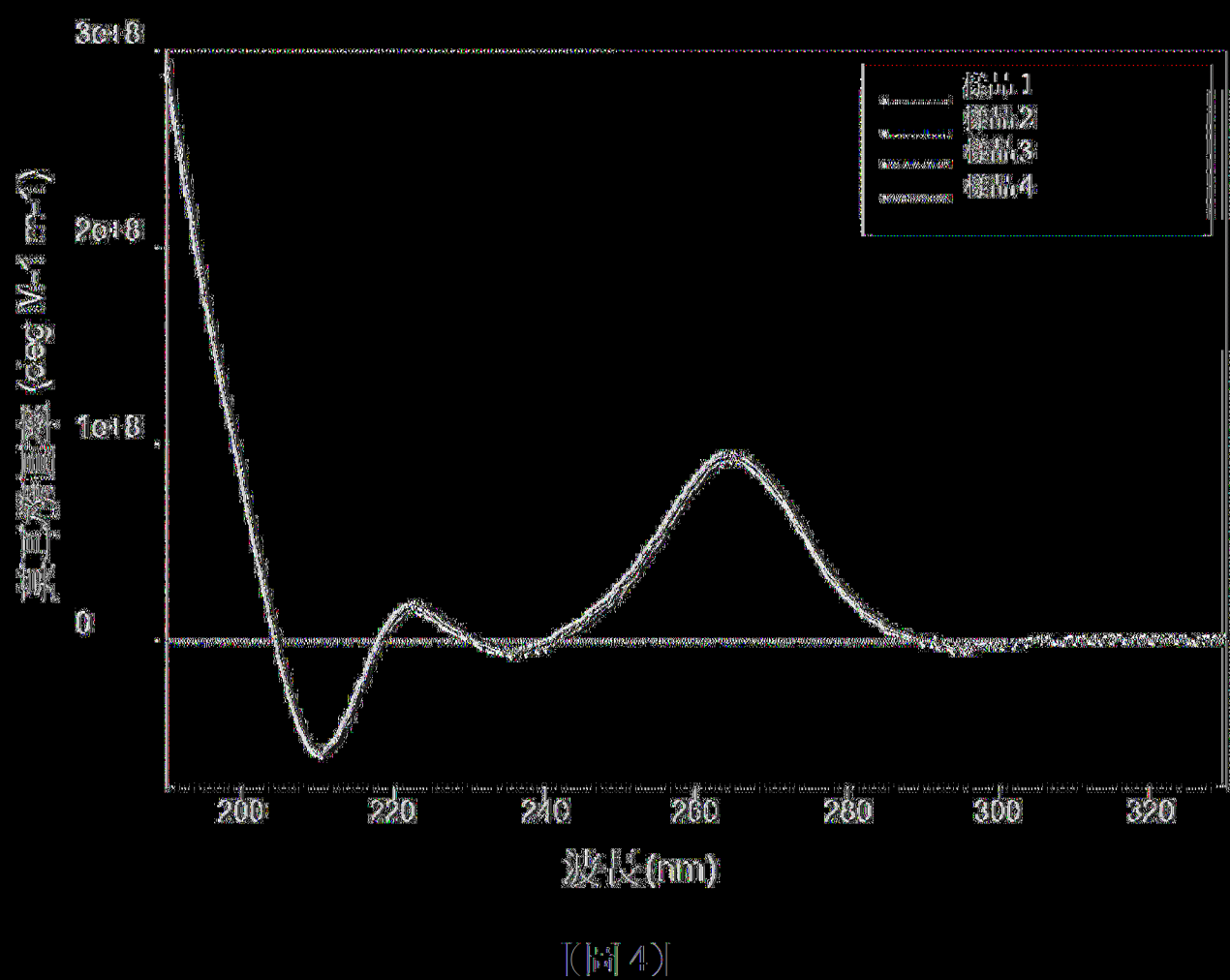
(圖 1)



【圖 2】



|(圖 3)|



[(圖) 4]