



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116262926 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202211248922.5

C12N 15/12 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.12

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 116262926 A

US 2021340550 A1, 2021.11.04

US 2019359978 A1, 2019.11.28

WO 2022182835 A1, 2022.09.01

(43) 申请公布日 2023.06.16

US 2016083747 A1, 2016.03.24

US 2022235353 A1, 2022.07.28

(73) 专利权人 南京澄实生物医药科技有限公司  
地址 210061 江苏省南京市江北新区探秘路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

Robert Chen.Engineering circular RNA for enhanced protein production.《Nature Biotechnology》.2022,第41卷(第2期),第266左栏最后1段到第268页左栏第2段;第265页左栏第2段

(72) 发明人 韩梯云 徐实

Supplementary Table: Sequence information/5'UTR表单.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 陆惠中

审查员 赵建民

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

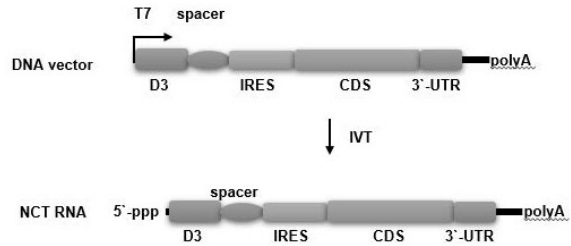
权利要求书1页 说明书23页  
序列表(电子公布) 附图10页

## (54) 发明名称

一种非加帽线性RNA重组核酸分子及其应用

## (57) 摘要

本发明提供一种非加帽线性RNA(NCT RNA)重组核酸分子及其应用。所述非加帽线性RNA重组核酸分子包含黄病毒属登革热病毒基因组sfRNA元件,间隔序列,翻译起始元件IRES,编码至少一个目标多肽的编码元件,3'-UTR元件,polyA序列。本发明还提供了包含所述重组核酸分子的表达盒、载体、细胞、药物组合物、试剂盒、应用以及制备方法等。本发明利用黄病毒科基因组sfRNA序列,保护RNA 5'端不被降解,提高了非加帽线性mRNA在细胞内的稳定性。同时,结合IRES或其衍生物对mRNA的调控,促使非加帽线性mRNA可持续、稳定的表达目的蛋白。



1. 一种非加帽线性RNA重组核酸分子,其特征在于:从5'至3'方向,所述重组核酸分子包括按如下顺序排列的元件:

序列如SEQ ID NO:5所示的登革热病毒sfRNA、序列如SEQ ID NO:12所示的间隔序列PABPs,序列如SEQ ID NO:7所示的柯萨奇病毒B3 IRES衍生体,编码至少一个目标多肽的编码元件,3'-UTR元件,polyA序列。

2. 一种表达盒,其包含权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子。

3. 一种载体,其包含权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子或权利要求2所述表达盒。

4. 一种细胞,其包含权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子或权利要求2所述表达盒或权利要求3所述载体;所述细胞为非动植物品种。

5. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子或权利要求2所述表达盒或权利要求3所述载体或权利要求4所述细胞。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

7. 一种试剂盒,其包含权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子。

8. 权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子或权利要求2所述表达盒或权利要求3所述载体或权利要求4所述细胞在制备治疗或预防疾病的药物组合物中的应用。

9. 权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子或权利要求2所述表达盒或权利要求3所述载体或权利要求4所述细胞在制备诊断、检测试剂盒中的应用。

10. 权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子或权利要求2所述表达盒或权利要求3所述载体或权利要求4所述细胞在体外制备非加帽线性RNA的用途。

11. 一种体外制备非加帽线性RNA重组核酸分子的方法,其特征在于:包括如下步骤:

转录步骤:将权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子,或权利要求2所述表达盒,或权利要求3所述载体体外转录形成非加帽线性RNA。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述方法还包括纯化所述非加帽线性RNA的步骤。

13. 一种在细胞内表达目标多肽的方法,其特征在于:所述方法包括将权利要求1所述非加帽线性RNA重组核酸分子,或权利要求2所述表达盒,或权利要求3所述载体转入细胞,并表达目标蛋白;所述方法为非疾病诊断或治疗目的。

## 一种非加帽线性RNA重组核酸分子及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及重组核酸分子领域,具体涉及一种非加帽线性RNA重组核酸分子及其应用。

### 背景技术

[0002] mRNA(信使核糖核酸,messenger Ribonucleic Acid)在蛋白质生产、以核酸疫苗形式用于基因治疗等方面具有重要的应用价值。相比于传统的疫苗,核酸疫苗具有免疫应答持久、自佐剂特性、制造工艺简单以及能够用于肿瘤预防和治疗等优势,在传染病和肿瘤等领域具有广阔的前景。IRES(内部核糖体,Internal RibosomeEntry Site)介导的环状RNA在真核细胞能够稳定持续的表达目的基因,证实IRES可以取代帽子类似物(cap analogue)用于体外mRNA的制备和体内目的基因的表达。相较于线性RNA,环状RNA由于其5'和3'末端首尾相连形成封闭的环状,表现出相较于线性mRNA对外切RNase更高的耐受性,因此使得环状RNA能够更长效、持久的表达。此外,相较于传统线性mRNA制备过程中繁琐的加帽、加尾以及核苷酸修饰,环状RNA的生产制备表现出更加高效以及成本低廉等特性。但是,如果采用常规IVT(In Vitro Transcription,体外转录)即不涉及加帽和核苷酸修饰,一步常规IVT反应制备的mRNA便具有持久、稳定表达目的蛋白的特性,如此相比于环状RNA,则会显著降低工艺难度,提高生产制备周期,进一步节省生产成本。

[0003] 目前IVT制备的线性mRNA,为确保mRNA在细胞内能够稳定持久的表达目的基因,采用的策略为酶法或者共转录的方式在mRNA的5'端添加m7G帽(m7G cap),3'端添加polyA序列。然而现有技术制备线性mRNA的方法存在诸多问题,例如,目前采用的线性mRNA需要酶法或共转录加帽才能确保目的基因在细胞内的稳定表达,其中酶法加帽涉及两步反应和纯化(IVT和加帽反应),共转录加帽制备mRNA虽只需一步IVT反应,但需要引入帽子类似物。因此从工艺难度和成本两个角度考虑,均不是最佳选项。环状RNA制备过程中虽不涉及加帽,但是环化效率,RNase R酶切效率以及严苛的纯化工艺要求,均会导致环状RNA制备工艺复杂,成本增加。

[0004] 现有技术提供了多种非加帽线性mRNA,例如CN112119162A(申请公布日2020.12.22)公开了一种核酸分子,其包含:至少一个表达控制序列,其包含具有病毒5'非翻译区(5'UTR)的病毒内部核糖体进入位点(IRES)元件;至少一个编码区,其与所述至少一个表达控制序列可操作地连接,并编码肽或蛋白质;和位于所述至少一个表达控制序列上游的多个腺苷和多个胸苷中的至少一个。其中所述病毒 IRES元件源自小核糖核酸病毒科(Picornaviridae),披膜病毒科(Togaviridae),双顺反子病毒科(Dicistroviridae),黄病毒科(Flaviridae),逆转录病毒科(Retroviridae)和疱疹病毒科(Herpesviridae)中的至少一种。所述核酸分子进一步包含位于所述5'UTR的下游的病毒3'非翻译区(3'UTR),并且其中所述至少一个编码区位于所述5'UTR和所述3'UTR之间。该专利文献教导了将源自黄病毒科的IRES元件引入5'UTR,然而并没有公开或暗示在IRES的上游引入其他序列,也不涉及利用黄病毒科基因组sfRNA,用来达到防止核酸降解,显著改善目的基因表达的作

用。

## 发明内容

[0005] 为了解决现有技术的缺陷,在非加帽线性RNA的体外制备中,防止核酸降解,提升非加帽线性RNA在细胞内的稳定性,以及目的基因在细胞内表达的稳定性和持久性,本发明提供一种非加帽线性RNA重组核酸分子及其应用。本发明还提供了包含所述非加帽线性RNA重组核酸分子的表达盒、载体、细胞、组合物、用于治疗疾病的用途、制备方法等。本发明的非加帽线性RNA在传染性疫苗、治疗性肿瘤疫苗、基于mRNA的树突状细胞肿瘤疫苗、基因治疗、蛋白质补充疗法等领域具有广阔的应用前景。

[0006] 本发明的一个方面提供了一种非加帽线性RNA重组核酸分子,其特征在于:从5'至3'方向,所述重组核酸分子包括按如下顺序排列的元件:

[0007] 黄病毒基因组sfRNA元件,间隔序列,翻译起始元件IRES,编码至少一个目标多肽的编码元件,3'-UTR元件,polyA序列;其中,所述黄病毒为登革热病毒,所述sfRNA的序列如SEQ ID NO:5所示。

[0008] 进一步地,所述IRES来源于柯萨奇病毒B3(Coxsackievirus B3) IRES,所述柯萨奇病毒B3 IRES序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] 进一步地,所述黄病毒基因组sfRNA来源于选自如下黄病毒属组的任意一种:寨卡病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒和塔马纳蝙蝠病毒(Tamana bat virus)。

[0010] 进一步地,所述翻译起始元件IRES来源于肠病毒71(Enterovirus 71) IRES、艾柯病毒29(Echovirus 29) IRES和人鼻病毒B3(human rhinovirus B3) IRES的任意一种,其中肠病毒71 IRES序列如SEQ ID NO:2所示,艾柯病毒29 IRES序列如SEQ ID NO:3所示,人鼻病毒B3 IRES序列如SEQ ID NO:4所示。

[0011] 进一步地,在所述IRES中整合入eIF4G适配体,获得IRES衍生体;优选地,所述IRES衍生体为柯萨奇病毒B3(Coxsackievirus B3) IRES衍生体、肠病毒71(Enterovirus 71) IRES衍生体、艾柯病毒29(Echovirus 29) IRES衍生体或人鼻病毒B3(human rhinovirus B3) IRES衍生体,序列分别如SEQ ID NO:7-10所示;其中eIF4G适配体序列如SEQ ID NO:6所示。

[0012] 进一步地,间隔序列如SEQ ID NO:11。

[0013] 进一步地,所述间隔序列为PABPs,所述PABPs序列如SEQ ID NO:12所示。

[0014] 进一步地,从5'至3'方向,所述重组核酸分子包括按如下顺序排列的元件:

[0015] 序列如SEQ ID NO:5所示的登革热病毒sfRNA、序列如SEQ ID NO:11所示的间隔序列,序列如SEQ ID NO:1所示的柯萨奇病毒B3 IRES,编码至少一个目标多肽的编码元件,3'-UTR元件,polyA序列;或者

[0016] 序列如SEQ ID NO:5所示的登革热病毒sfRNA、序列如SEQ ID NO:12所示的间隔序列PABPs,序列如SEQ ID NO:1所示的柯萨奇病毒B3 IRES,编码至少一个目标多肽的编码元件,3'-UTR元件,polyA序列;或者

[0017] 序列如SEQ ID NO:5所示的登革热病毒sfRNA、序列如SEQ ID NO:11所示的间隔序列,序列如SEQ ID NO:7所示的柯萨奇病毒B3 IRES衍生体,编码至少一个目标多肽的编码元件,3'-UTR元件,polyA序列;或者

[0018] 序列如SEQ ID NO:5所示的登革热病毒sfRNA、序列如SEQ ID NO:12所示的间隔序列PABPs,序列如SEQ ID NO:7所示的柯萨奇病毒B3 IRES衍生体,编码至少一个目标多肽的编码元件,3'-UTR元件,polyA序列。

[0019] 本发明的一个方面提供了一种表达盒,其包含所述非加帽线性RNA重组核酸分子。所述表达盒可用于表达所述非加帽线性RNA重组核酸分子。

[0020] 本发明的一个方面提供了一种载体,其包含非加帽线性RNA重组核酸分子。所述载体可用于表达所述非加帽线性RNA重组核酸分子。优选地,所述载体可以是病毒载体;优选地,所述病毒载体包含但不限于慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或逆转录病毒载体等;优选地,所述载体可以是非病毒载体;优选地,所述载体可以是哺乳细胞表达载体;优选地,所述表达载体可以是细菌表达载体;优选地,所述表达载体可以是真菌表达载体。

[0021] 本发明的一个方面提供了一种细胞,所述细胞包括所述非加帽线性RNA重组核酸分子或所述载体,所述细胞可表达非加帽线性RNA重组核酸分子。优选地,所述细胞为细菌细胞;优选地,所述细菌细胞为大肠杆菌细胞等;优选地,所述细胞为真菌细胞;优选地,所述真菌细胞为酵母细胞;优选地,所述酵母细胞为毕赤酵母细胞等;优选地,所述细胞为哺乳动物细胞;优选地,所述哺乳动物细胞为黑线仓鼠卵巢细胞(CHO)、人胚胎肾细胞(293)、B细胞、T细胞、DC细胞或NK细胞等。

[0022] 本发明的一个方面提供了一种药物组合物,其包含所述非加帽线性RNA重组核酸分子、表达盒、载体或细胞,优选地,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体,优选地,所述药学上可接受的载体包括以下中的一种或多种:药学上可接受的溶剂、分散剂、附加剂、塑形剂、药物辅料。

[0023] 本发明的一个方面提供了一种试剂盒,其包含所述非加帽线性RNA重组核酸分子。

[0024] 本发明的一个方面提供了所述非加帽线性RNA重组核酸分子、表达盒、载体或细胞在制备治疗或预防疾病的药物组合物中的应用。

[0025] 本发明的一个方面提供了所述非加帽线性RNA重组核酸分子在制备诊断、检测试剂盒中的应用。

[0026] 本发明的一个方面提供了一种治疗或预防疾病的方法,包括将本发明的所述非加帽线性RNA重组核酸分子、表达盒、载体、细胞或药物组合物给予有需要的受试者。

[0027] 本发明的一个方面提供了一种诊断、检测的方法,包括将本发明的所述非加帽线性RNA重组核酸分子、试剂盒或药物组合物给予有需要的受试者或样本。

[0028] 本发明的一个方面提供了所述非加帽线性RNA重组核酸分子、表达盒、载体、细胞或药物组合物用于治疗、预防疾病的用途。

[0029] 本发明的一个方面提供了所述非加帽线性RNA重组核酸分子、试剂盒、或药物组合物用于检测、诊断的用途。

[0030] 本发明的一个方面提供了所述非加帽线性RNA重组核酸分子或所述表达盒或所述载体或所述细胞在体外制备非加帽线性RNA的用途。

[0031] 本发明的一个方面提供了一种体外制备非加帽线性RNA重组核酸分子的方法,其特征在于:包括如下步骤:

[0032] 转录步骤:将所述非加帽线性RNA重组核酸分子,或所述载体体外转录形成非加帽线性RNA;

[0033] 可选地,所述方法还包括,纯化所述非加帽线性RNA的步骤。

[0034] 本发明的一个方面提供了一种在细胞内表达目标多肽的方法,其中,所述方法包括将所述非加帽线性RNA重组核酸分子,或所述表达盒、或所述载体转入细胞,并表达目标蛋白。

[0035] 本发明的一个方面提供了登革热病毒基因组sfRNA在体外制备非加帽线性RNA重组核酸分子中的应用,其特征在于:所述sfRNA的序列如SEQ ID NO:5所示。

[0036] 本发明的一个方面提供了登革热病毒基因组sfRNA和来源于柯萨奇病毒B3的IRES在体外制备非加帽线性RNA重组核酸分子中的应用,其特征在于:所述sfRNA序列如SEQ ID NO:5所示,所述IRES序列如SEQ ID NO:1所示。

[0037] 本发明的一个方面提供了一种设计间隔序列的方法,其中,所述方法包括如下步骤:

[0038] (1) 根据黄病毒科基因组sfRNA序列,确定sfRNA二级结构;

[0039] (2) 根据1型IRES序列,确定IRES二级结构;

[0040] (3) 根据(1)和(2)所述二级结构,设计间隔序列,其中,间隔序列不干扰(1)和(2)所述二级结构,且间隔序列内部不具有大于10bp的发卡结构;优选地,设计获得的间隔序列如SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12所示。

[0041] 本发明提供的非加帽线性RNA重组核酸分子具有以下一种或多种优益的技术效果:

[0042] 1、本发明的非加帽线性RNA重组核酸分子,利用黄病毒科基因组sfRNA序列,特别是登革热病毒基因组sfRNA序列,保护RNA 5'端不被降解,可获得功能化的非加帽线性RNA。

[0043] 2、黄病毒属登革热病毒基因组sfRNA与柯萨奇病毒B3 IRES (CVB3 IRES)组合的非加帽线性RNA (NCT RNA),对目的基因表达的改善有显著效果。

[0044] 3、与经典的加帽线性mRNA和环状RNA相比,本发明的NCT RNA架构下的目的基因在细胞中的蛋白表达与前两者相当,但本发明获得NCT RNA更简便、便捷、成本低。

[0045] 4、与商品化目标基因mRNA表达相比,本发明证实NCT RNA架构介导下的目的基因表达具有稳定、持久的特征。

[0046] 5、将eiF4G适配体整合至IRES内部获得IRES突变体,包含该突变体的NCT RNA可显著改善目的基因的表达水平。

[0047] 6、进一步将本发明非加帽线性RNA的间隔序列替换为PABPs (polyA结合蛋白所靶向的序列, PolyA Binding Protein sequence),可改善IRES所介导的基因表达。

[0048] 7、本发明NCT RNA在sfRNA和polyA的作用下,防止mRNA被核酸外切酶降解,从而提高了mRNA在细胞内的稳定性,延长了半衰期。同时,结合IRES或其衍生体对mRNA的调控,核糖体复合物与mRNA结合并在翻译起始位点起始翻译目的蛋白,以此促使非加帽线性mRNA可持续、稳定的表达目的蛋白。

[0049] 8、本发明NCT RNA在IVT过程中,不涉及帽子类似物和修饰碱基的引入,得到的RNA不涉及后处理步骤,极大的降低了制备工艺的难度和严苛的纯化要求,适合体外的大规模工业化制备。非加帽线性RNA适合体外大规模生产,在mRNA传染病疫苗、治疗性mRNA肿瘤疫苗、基于mRNA的树突状细胞肿瘤疫苗、基于mRNA的基因治疗、蛋白质补充疗法等领域具有广阔的应用前景。

## 附图说明

- [0050] 图1为本发明由DNA载体设计得到非加帽线性RNA的示意图。
- [0051] 图2为本发明登革热病毒基因组sfRNA(简称D3)的二级结构预测结果。
- [0052] 图3为本发明CVB3 IRES的二级结构预测结果。
- [0053] 图4为本发明EV71 IRES的二级结构预测结果。
- [0054] 图5为本发明E29 IRES的二级结构预测结果。
- [0055] 图6为本发明HRV-B3 IRES的二级结构预测结果。
- [0056] 图7为本发明eiF4G适配体的二级结构预测结果。
- [0057] 图8为本发明CVB3 IRES衍生体的二级结构预测结果。
- [0058] 图9为本发明EV71 IRES衍生体的二级结构预测结果。
- [0059] 图10为本发明E29 IRES衍生体的二级结构预测结果。
- [0060] 图11为本发明HRV-B3衍生体的二级结构预测结果。
- [0061] 图12为本发明NCT RNA1-6;NCT RNA 1-2,7-9-Fluc的示意图。
- [0062] 图13为本发明Capped RNA-Fluc和oRNA-Fluc的示意图。
- [0063] 图14为本发明NCT RNA 1-Fluc、NCT RNA 2-Fluc、Capped RNA-Fluc和oRNA-Fluc的体外表达结果。
- [0064] 图15A为本发明NCT RNA1-Fluc、商品化Fluc注射小鼠后24、48、72小时的Fluc表达成像照片。
- [0065] 图15B为本发明NCT RNA1-Fluc、商品化Fluc注射小鼠后24、48、72小时的相对光单位结果图表。
- [0066] 图16为本发明NCT RNA z- EGFP示意图。
- [0067] 图17为本发明NCT RNA1和NCT RNA z- EGFP的EGFP表达结果。
- [0068] 图18为本发明NCT RNA 1-Fluc、NCT RNA 2-Fluc、NCT RNA 7-Fluc、NCT RNA 8-Fluc和NCT RNA 9-Fluc的Fluc表达结果。
- [0069] 图19为本发明NCT RNA1、NCT RNA2、NCT RNA3、NCT RNA6的EGFP表达结果。

## 具体实施方式

- [0070] 定义和术语
- [0071] 术语“非加帽线性RNA”,即“NCT RNA”,又称Non-Capped Translatable RNA,是利用黄病毒科基因组sfRNA序列,保护RNA 5`端被降解,以此获得功能化的非加帽线性RNA。
- [0072] 术语“sfRNA”:亚基因组黄病毒RNA(subgenomic flaviviral ribonucleic acid, sfRNA),是来自病毒基因组的一部分。在被黄病毒感染的宿主细胞中,存在大量的基因组RNA不完全降解而形成的sfRNA的积累。
- [0073] 术语“IRES”(Internal ribosome entry site,IRES)又称内部核糖体进入位点,其属于翻译控制元件,通常位于所关注基因的5`端,并使得以帽非依赖性方式翻译RNA。经转录的IRES可直接结合核糖体亚单位,以使得mRNA起始密码子在核糖体中适当地取向进行翻译。IRES序列通常位于mRNA的5`UTR中(起始密码子的正上游)。IRES在功能上取代各种与真核生物翻译机制相互作用的蛋白因子的需求。
- [0074] 术语“翻译起始元件”是指能够招募核糖体,起始RNA分子的翻译过程的任意的序

列元件。

[0075] 术语“编码区”,CDS(coding dna sequence) CDS 是基因中DNA或RNA为蛋白质编码区域,该区域通常开始于5'末端的起始密码子并结束于3'端的终止密码子。

[0076] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0077] 术语“重组核酸分子”指具有在自然界中不连接在一起的序列的多核苷酸。重组多核苷酸可包括在合适的载体中,且该载体可用于转化至合适的宿主细胞。然后多核苷酸在重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”“重组蛋白”“融合蛋白”等。

[0078] 术语“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的DNA结构。重组表达载体可包括,例如包含(1)对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合,例如启动子和增强子;(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列;以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建。载体的性质并不重要,并可以使用任何载体,包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本公开的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成的DNA序列,例如病毒质粒、细菌质粒、噬菌体DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体DNA的组合中衍生的载体,来自如慢病毒、逆转录病毒、牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40和伪狂犬病等病毒的DNA。

[0079] 术语“5' -UTR”,指“5' 非翻译区”或“5' UTR”,为转录成初级RNA转录本(前体mRNA)并位于编码序列上游的一部分基因。初级转录本是初始RNA产物,包含内含子和外显子,由DNA转录产生。许多初级转录本必须经过RNA加工以形成具有生理活性的RNA。形成成熟mRNA的加工过程包括修饰末端、切除内含子、加帽和/或从前体RNA上剪切出各rRNA分子。因此,mRNA的5' UTR是不会被翻译成蛋白质并位于编码序列上游的一部分mRNA。在基因组序列中,5' UTR通常被定义为位于转录起始点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5' 非翻译区(5' UTR)长度可以是几十个碱基到几百个碱基。

[0080] 术语“3' -UTR”,指“3' -非翻译区”或“3' UTR”,涉及位于基因的3'端,在蛋白质编码区的终止密码子下游,并且被转录但不翻译成氨基酸序列的区域,或涉及RNA分子中的对应区域。3' -非翻译区通常从翻译产物的终止密码子延伸至通常在转录过程之后附着的多聚(A)序列。哺乳动物mRNA的3' -非翻译区通常具有已知为AAUAAA六核苷酸序列的同源区。该序列可能是多聚(A)附着信号并且经常位于多聚(A)附着位点上游的10至30个碱基处。3' -非翻译区可以包含一个或更多个反向重复,其可以折叠以产生茎环结构,所述结构充当核糖核酸外切酶的屏障或与已知提高RNA稳定性的蛋白质(例如RNA结合蛋白)相互作用。

[0081] 术语“polyA”,指“多聚腺苷酸序列”、“多聚(A)序列”或“多聚(A)尾”,是指通常位于RNA分子的3'端的腺苷酸残基序列。本发明允许这样的序列通过DNA模板基于在与编码链互补的链中的重复胸苷酸残基来在RNA转录期间附着,然而所述序列在正常情况下不在DNA中编码,而是在细胞核中转录后通过模板独立性RNA聚合酶附着至RNA的游离3'端。

[0082] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原代细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞,也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。术语“重组宿主

细胞”涵盖导入重组核酸分子、重组表达载体、非加帽线性RNA后不同于亲本细胞的宿主细胞,重组宿主细胞具体通过转化来实现。本公开的宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞,主要是能够导入本公开的重组核酸分子、重组表达载体、非加帽线性RNA等的细胞即可。

[0083] 术语“个体”、“患者”或者“受试者”包括哺乳动物和禽类。哺乳动物和禽类包括但不限于,家养动物(例如,猪、牛、羊、鸡、鸭、猫、狗和马等),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),兔,以及啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠等)。

[0084] 术语“转化、转染、转导”具有本领域技术人员普遍理解的意思,即将外源性的DNA导入宿主的过程。

[0085] 术语“治疗”是指:在罹患疾病之后,使受试者接触(例如给药)本发明的非加帽线性RNA、组合物等,从而与不接触时相比使该疾病的症状减轻,并不意味着必需完全抑制疾病的症状。罹患疾病是指:身体出现了疾病症状。

[0086] 术语“预防”是指:在罹患疾病之前,通过使受试者接触(例如给药)本发明的非加帽线性RNA、组合物等,从而与不接触时相比减轻罹患疾病后的症状,并不意味着必需完全抑制患病。

[0087] 术语“有效量”指本发明的重组核酸分子、重组表达载体、非加帽线性RNA、疫苗或组合物的这样的量或剂量,其以单一或多次剂量施用患者后,在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。有效量可以由技术人员通过考虑以下多种因素来容易地确定:诸如哺乳动物的物种;大小、年龄和健康状况;涉及的具体疾病;疾病的程度或严重性;个体患者的应答;施用的具体抗体;施用模式;施用制剂的生物利用率特征;选择的给药方案;和任何伴随疗法的使用。

[0088] 术语“药学上可接受的载体”是指在药物生产领域中广泛采用的辅助物料。使用载体的主要目的在于提供一种使用安全、性质稳定和/或具有特定功能性的药物组合物,还在于提供一种方法,以便在为受试者体内得到有效吸收。药学上可接受的载体可以是具有惰性的填充剂,也可以是为药用组合物提供某种功能(例如稳定组合物的整体pH值或防止组合物中活性成分的降解)的功效成分。药学上可接受的载体的非限制性实例包括但不限于粘合剂、助悬剂、乳化剂、稀释剂(或填充剂)、成粒剂、粘胶剂、崩解剂、润滑剂、抗粘合剂、助流剂、胶凝剂、吸收延迟剂、溶解抑制剂、增强剂、吸附剂、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、着色剂、矫味剂和甜味剂等。

[0089] 除非另外定义或由背景清楚指示,否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所述领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0090] 实施例1NCT RNA构建

[0091] (1) 根据DNA载体设计得到非加帽线性RNA(NCT RNA),其框架示意图如图1所示。其中,DNA载体的结构从5'至3'依次为:T7启动子、D3(黄病毒属登革热病毒基因组sfRNA)、spacer(间隔序列)、IRES、CDS(目标基因编码区)、3'-UTR、polyA,依据IVT设计得到相应NCT RNA,其结构从5'至3'依次为:D3(黄病毒属登革热病毒基因组sfRNA)、spacer(间隔序列)、IRES、CDS(目标基因编码区)、3'-UTR、polyA。图1中的5'-ppp表示IVT过程中第一个碱基NTP所携带的三磷酸自由基,因为NCT RNA不涉及加帽,致使其mRNA 5'末端为三磷酸基团。

[0092] (2) 选取经验证具有高表达蛋白的翻译起始元件序列CVB3(柯萨奇病毒B3, Cocksackievirus B3) IRES(序列如SEQ ID NO:1所示)、EV71(肠病毒71, Enterovirus 71)

IRES (序列如SEQ ID NO:2所示)、E29 (艾柯病毒29, Echovirus 29) IRES (序列如SEQ ID NO:3所示) 和HRV-B3 (人鼻病毒, human rhinovirus B3) IRES (序列如SEQ ID NO:4所示)。

[0093] (3) 使用软件RNAfold对登革热病毒基因组sfRNA (D3, 序列如SEQ ID NO:5所示) 进行二级结构预测, 预测结果如图2所示。

[0094] (4) 使用软件RNAfold分别对CVB3 IRES、EV71 IRES、E29 IRES和HRV-B3 IRES进行二级结构预测, 预测结果分别如图3, 图4, 图5, 图6所示。

[0095] (5) 根据(3)和(4)预测的二级结构, 设计用于NCT RNA的间隔序列(spacer)。间隔序列要求发卡结构少, 不干扰(3)和(4)的二级结构, 优选设计得到两条间隔序列, 间隔序列1如序列如SEQ ID NO:11所示, 间隔序列2为PABPs序列, 如序列如SEQ ID NO:12所示。

[0096] (6) 使用软件RNAfold对eiF4G适配体(序列如SEQ ID NO:6所示)进行二级结构预测, 预测结果如图7所示。

[0097] (7) 根据(4)和(6)预测的二级结构, 将eiF4G适配体核酸分子整合至CVB3 IRES、EV71 IRES、E29 IRES和HRV-B3 IRES的IRES domain IV中, 并保持CVB3 IRES、EV71 IRES、E29 IRES和HRV-B3 IRES整体结构不变, 整合后得到分别得到CVB3 IRES衍生体(序列如SEQ ID NO:7所示)、EV71 IRES衍生体(序列如SEQ ID NO:8所示)、E29 IRES衍生体(序列如SEQ ID NO:9所示)、HRV-B3 IRES衍生体(序列如SEQ ID NO:10所示), 使用软件RNAfold分别对CVB3 IRES衍生体、EV71 IRES衍生体、E29 IRES衍生体和HRV-B3 IRES衍生体进行二级结构预测, 预测结果分别如图8, 图9, 图10, 图11所示。

[0098] 表1 本发明NCT RNA涉及元件的具体序列

[0099]

元件名称	序列
------	----

CVB3 IRES	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAG GCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGT ACCTTTGTGCGCCTGTTTTATAACCCCTCCCC AACTGTAACCTAGAAGTAACACACACCGATCAA CAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATC AAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAAT AGACTGCTCACGCGTTGAAGGAGAAAGCGTTC GTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTA ACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCAGC ACTACCCAGTG TAGATCAGGTCGATGAGTCAC CGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTG CGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGG ACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTA TTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAAT GCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTC AAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACT CTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTG TTTCATTTTATTCTATACTGGCTGCTTATGGT GACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTG GATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTAT ATATCCCTTTGTTGGGTTTATAACCACTTAGCTT GAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTAA GTTGAATACAGCAAA (SEQ ID NO:1)
-----------	---

EV71 IRES	TTAAACAGCTGTGGGTTGTCACCCACCCACAG GGTCCACTGGGCGCTAGTACACTGGTATCTCGG TACCTTTGTACGCCTGTTTTATAACCCCTCCCT GATTTGCAACTTAGAAGCAACGCAAACCAGATC AATAGTAGGTGTGACATAACCAGTCGCATCTTGA TCAAGCACTTCTGTATCCCCGGACCGAGTATCA ATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAAAACGT CCGTTACCCGGCTAACTACTTCGAGAAGCCTAG TAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCA GCACTCCCCCGTGTAGATCAGGTCGATGAGTC ACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGC TGCGTTGGCGGCCTGCCTATGGGGTAACCCATA GGACGCTCTAATACGGACATGGCGTGAAGAGTC TATTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGA ATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATAACC TTAATCCAAAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAA CTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCG TGTTTCTTTTTATTCTTGTATTGGCTGCTTATG GTGACAATTAAGAATTGTTACCATATAGCTAT TGGATTGGCCATCCAGTGTCAAACAGAGCTATT GTATATCTCTTTGTTGGATTACACCTCTCACT CTTGAAACGTTACACACCCTCAATTACATTATA CTGCTGAACACGAAGCG (SEQ ID NO:2)
-----------	---

E29 IRES	ttaaaacagcctgtgggttgatccccaccacag ggcccactgggcgctagcactctggtatcacgg tacctttgtgcgctgttttatacttctcccc caactgcaacttagaagtaacacaaaccgatca acagtcagcgtggcacaccagccacgttttgat caaacacttctgtttaccccgactgagtatcaa tagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgtt cgttatccggccaactacttcgagaaacctagt aacgccatggaagttgtggagtgtttcgctcag cactacccagtgtagatcaggttgatgagtca ccgcattccccacgggtgaccgtggcggtggct gcgttggcggcctgcccatggggaaacctatgg gacgctcttatacagacatggtgcgaagagtct attgagctagttggtagtcctccggccccctgaa tgcggctaataccaactgcgagacatacactct caagccagagggtagtgtgtcgtaatgggcaac tctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgt gtttcattttattcctatactggctgcttatgg tgacaattgagagattgttaccatatactatt ggattggccatccggtgactaacagagctatta tatatctttttgttgggtttataaccacttagct tgaaagaggttaaaactctacattacattttaa tactgaacaccgcaa (SEQ ID NO:3)
----------	--

HRV-B3 IRES	<p>TTAAAACAGCGGATGGGTACCCACCATCCGAC  CCACTGGGTGTAGTACTCTGGTACTTCGTACCT  TTGTACGCCTGTTCTTCCCATTGTACCC TTCCT  GAACTTCCAACCCAAGTAACGTTAGAAGCTCAA  CATTTAGTACAACAGGAAGCACCACATCCAGTG  GTGTTTAGTACAAGCACTTCTGTTTCCCCGGAG  CGAGGTATAGGCTGTACCCACTGCCAAAAACCT  TTAACCGTTATCCGCCAACCAACTACGTAAAAG  CTAGTAGTATTATGTTTTTAACTAGGCGTTCGA  TCAGGTGGATTTCCCCTCCACTAGTTTGGTCGA  TGAGGCTAGGAATTCCCCACGGGTGACCGTGTC  CTAGCCTGCGTGGCGGCCAACCCAGCTTATGCT  GGGACGCCTTTTTATAGACATGGTGTGAAGACT  CGCATGTGCTTGGTTGTGATTCTCCGGCCCCT  GAATGCGGCTAACCTTAACCCTGGAGCCTTGTG  TCACAAACCAGTGATGATAAGGTCGTAATGAGC  AATTCGGGACGGGACCGACTACTTTGGGTGTC  CGTGTTCCTATTTTTCTTATTATTGTCTTATG  GTCACAGCATATATATAACATATACTGTGATC  (SEQ ID NO:4)</p>
D3	<p>taaaagtcaggtcggatcaagccatagtacgga  aaaaactatgctacctgtgagccccgtccaagg  acgttaaagaagtcaggccatcacaatgcc  cagcttgagtaaactgtgcagcctgtagctcca  cctgagaaggtgtaaaaaatctgggaggccaca  aacatggaagctgtacgcatggcgtagtgga  tagcggttagaggagaccctcccttacaatc  gcagcaacaac (SEQ ID NO:5)</p>
eiF4G适配体	<p>ACTCACTATTTGTTTTTCGCGCCAGTTGCAAAA  AGTGTCG (SEQ ID NO:6)</p>

CVB3 IRES衍生体	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAG GCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGT ACCTTTGTGCGCCTGTTTTATAACCCCTCCCC AACTGTAACCTAGAAGTAACACACACCGATCAA CAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATC AAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAAT AGACTGCTCACGCGTTGAAGGAGAAAGCGTTC GTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTA ACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCAGC ACTACCCCACTGTAGATCAGGTCGATGAGTCAC CGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTG CGTTGGCGGCCTGCCCATGGGACTCACTATTTG TTTTCGCGCCAGTTGCAAAAAGTGTGCGCCAT GGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGT CTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTG AATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACC CTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCA ACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCC GTGTTTCATTTTATTCTATACTGGCTGCTTAT GGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTA TTGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTAT TATATATCCCTTTGTTGGGTTTATAACCACTTAG CTTGAAAGAGGTTAAAAACATTACAATTCATTGT TAAGTTGAATACAGCAAA (SEQ ID NO:7)
--------------	--

EV71 IRES衍生体	TTAAACAGCTGTGGGTTGTCACCCACCCACAG GGTCCACTGGGCGCTAGTACACTGGTATCTCGG TACCTTTGTACGCCTGTTTTATACCCCCTCCCT GATTTGCAACTTAGAAGCAACGCAAACCAGATC AATAGTAGGTGTGACATAACCAGTCGCATCTTGA TCAAGCACTTCTGTATCCCCGGACCGAGTATCA ATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAAAACGT CCGTTACCCGGCTAACTACTTCGAGAAGCCTAG TAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCA GCACTCCCCCGTGTAGATCAGGTCGATGAGTC ACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGC TGCGTTGGCGGCCTGCCTATGGGCCACTCACTA TTTGTTCGCGCCAGTTGCAAAAAGTGTCCG GCCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGCGTG AAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGTAGTCTCCGG CCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCA CATAACCCTAATCCAAAGGGCAGTGTGTCGTAA CGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGG GTGTCCGTGTTTCTTTTTATTCTTGTATTGGCT GCTTATGGTGACAATTAAGAATTGTTACCATA TAGCTATTGGATTGGCCATCCAGTGTCAAACAG AGCTATTGTATATCTCTTTGTTGGATTACACC TCTCACTCTTGAAACGTTACACACCCTCAATTA CATTATACTGCTGAACACGAAGCG (SEQ ID NO:8)
--------------	---

E29 IRES衍生体	ttaaaacagcctgtgggttgatccccaccacag ggcccactgggcgctagcactctggtatcacgg tacctttgtgcgctgttttataacttctcccc caactgcaacttagaagtaacacaaaccgatca acagtcagcgtggcacaccagccacgttttgat caaacacttctgtttaccccggactgagtatcaa tagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgtt cgttatccggccaactacttcgagaaacctagt aacgcatggaagttgtggagtgtttcgctcag cactacccagtgtagatcaggttgatgagtca ccgcatccccacgggtgaccgtggcggtggct gcgttggcggcctgcccattgggACTCACTATTT GTTTTCGCGCCAGTTGCAAAAAGTGTGccca tgggacgctctttatacagacatggtgcgaagag tctattgagctagttggtagtcctccggcccct gaatgcbggctaatacccaactgcbggagcatacac tctcaagccagagggtagtggtgctaatgggc aactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtc cgtgtttcattttattcctatactggctgctta tggtgacaattgagagattggtaccatatagct attggattggccatccggtgactaacagagcta ttatatactttttgttgggtttataccactta gcttgaaagaggttaaaactctacattacattt taatactgaacaccgcaa (SEQ ID NO:9)
-------------	--

<p>HRV-B3衍生体</p>	<p>TTAAACAGCGGATGGGTACCCACCATCCGAC                  CCACTGGGTGTAGTACTCTGGTACTTCGTACCT                  TTGTACGCCTGTTCTTCCCATTGTACCCTTCTT                  GAACTTCCAACCCAAGTAACGTTAGAAGCTCAA                  CATTTAGTACAACAGGAAGCACCACATCCAGTG                  GTGTTTAGTACAAGCACTTCTGTTTCCCCGGAG                  CGAGGTATAGGCTGTACCCACTGCCAAAAACCT                  TTAACCGTTATCCGCCAACCAACTACGTAAAAG                  CTAGTAGTATTATGTTTTTAACTAGGCGTTCGA                  TCAGGTGGATTTCCCCTCCACTAGTTTGGTCGA                  TGAGGCTAGGAATTCCCCACGGGTGACCGTGTC                  CTAGCCTGCGTGGCGGCCAACCCAGCCCACTCA                  CTATTTGTTTTTCGCGCCAGTTGCAAAAAGTGT                  CGGGGCTGGGACGCCTTTTTATAGACATGGTGT                  GAAGACTCGCATGTGCTTGGTTGTGATTCTCC                  GGCCCTGAATGCGGCTAACCTTAACCCTGGAG                  CCTTGTTGCACAAACCAGTGATGATAAGGTCGT                  AATGAGCAATTCCGGGACGGGACCGACTACTTT                  GGGTGTCCGTGTTTCTTATTTTTCTTATTATTG                  TCTTATGGTCACAGCATATATATAACATATACT                  GTGATC (SEQ ID NO:10)</p>
<p>间隔序列1</p>	<p>AAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAACAAAAAA                  AACAAAAAACCACAAAAACAAAAACACA                  (SEQ ID NO:11)</p>
<p>间隔序列2</p>	<p>AAAAAAAAAACCAAAAAAAAAAAAAACAAAAAA                  AAAAAATAATTGACTAA (SEQ ID NO:12)</p>
<p>3' -UTR</p>	<p>CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCC                  TTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCGA                  CCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCACCTCCACCT                  GCCCCACTCACCACTCTGCTAGTTCCAGACAC                  CTCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGC                  TTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAG                  TGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTAAC                  TAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTT                  GTGCCAGCCACACC (SEQ ID NO:13)</p>
<p>polyA</p>	<p>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:14)</p>

EGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGG GTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGAC GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAG GGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCC GTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACC TACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTG AACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC AACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGC AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACT CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAA (SEQ ID NO:15)
------	--

Fluc	ATGGAGGACGCCAAGAACATCAAGAAGGGCCCC GCCCCCTTCTACCCCCTGGAGGACGGCACCGCC GGCGAGCAGCTGCACAAGGCCATGAAGCGGTAC GCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTCACCGAC GCCCACATCGAGGTGGACATCACCTACGCCGAG TACTTCGAGATGAGCGTGCGGCTGGCCGAGGCC ATGAAGCGGTACGGCCTGAACACCAACCACCGG ATCGTGGTGTGCAGCGAGAACAGCCTGCAGTTC TTCATGCCCGTGCTGGGCGCCCTGTTTCATCGGC GTGGCCGTGGCCCCCGCCAACGACATCTACAAC GAGCGGGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGC CAGCCCACCGTGGTGTTCGTGAGCAAGAAGGGC CTGCAGAAGATCCTGAACGTGCAGAAGAAGCTG CCCATCATCCAGAAGATCATCATCATGGACAGC AAGACCGACTACCAGGGCTTCCAGAGCATGTAC ACCTTCGTGACCAGCCACCTGCCCCCGGCTTC AACGAGTACGACTTCGTGCCCCGAGAGCTTCGAC CGGGACAAGACCATCGCCCTGATCATGAACAGC AGCGGCAGCACCGGCCTGCCAAGGGCGTGGCC CTGCCCCACCGACCGCCTGCGTGCGGTTTCAGC CACGCCCCGGACCCCATCTTCGGCAACCAGATC ATCCCCGACACCGCCATCCTGAGCGTGGTGCCC TTCCACCACGGCTTCGGCATGTTACACCACCCTG GGCTACCTGATCTGCGGCTTCCGGGTGGTGCTG ATGTACCGGTTTCGAGGAGGAGCTGTTCTGCGG AGCCTGCAGGACTACAAGATCCAGAGCGCCCTG CTGGTGCCACCCTGTTTCAGCTTCTTCGCCAAG AGCACCTGATCGACAAGTACGACCTGAGCAAC CTGCACGAGATCGCCAGCGGCGGCGCCCCCTG AGCAAGGAGGTGGGCGAGGCCGTGGCCAAGCGG TTCCACCTGCCCCGCATCCGGCAGGGCTACGGC CTGACCGAGACCACCAGCGCCATCCTGATCACC CCCGAGGGCGACGACAAGCCCGGCGCCGTGGGC AAGGTGGTGCCCTTCTTCGAGGCCAAGGTGGTG GACCTGGACACCGGCAAGACCCTGGGCGTGAAC CAGCGGGGCGAGCTGTGCGTGCGGGGCCCCATG ATCATGAGCGGCTACGTGAACAACCCCGAGGCC ACCAACGCCCTGATCGACAAGGACGGCTGGCTG CACAGCGGCGACATCGCCTACTGGGACGAGGAC
------	--

	GAGCACTTCTTCATCGTGGACCGGCTGAAAAGC CTGATCAAGTACAAGGGCTACCAGGTGGCCCC GCCGAGCTGGAGAGCATCCTGCTGCAGACCCC AACATCTTCGACGCCGGCGTGGCCGGCCTGCCC GACGACGACGCCGGCGAGCTGCCCCGCCCGTG GTGGTGCTGGAGCACGGCAAGACCATGACCGAG AAGGAGATCGTGGACTACGTGGCCAGCCAGGTG ACCACCGCCAAGAAGCTGCGGGGCGGCGTGGTG TTCGTGGACGAGGTGCCAAGGGCCTGACCGGC AAGCTGGACGCCCGGAAGATCCGGGAGATCCTG ATCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGATCGCCGTG TGATAG (SEQ ID NO:16)
--	--

[0100] 实施例2制备NCT RNA

[0101] (1) 基因合成

[0102] 设计质粒的合成与克隆构建(委托金斯瑞完成),将所得基因片段连接到pUC57载体;

[0103] (2) 线性化质粒模版制备

[0104] 1) 质粒抽提

[0105] a. 将合成的穿刺菌活化,活化条件37°C/250rpm/3~4h;

[0106] b. 取活化菌液扩大培养,培养条件:37°C/250rpm/过夜;

[0107] c. 质粒抽提(使用天根无内毒素小量中提试剂盒),测260/280的OD值。

[0108] 2) 质粒酶切

[0109] 采用SapI或BspQI单酶切的方法酶切上述步骤1)中制备的质粒,酶切体系如表2所示。

[0110] 表2 酶切体系

[0111]	试剂	体积
	质粒	10ug
	酶(1000U)	5ul
	10x buffer	50ul
	无Nuclease水	总体积 500ul

[0112] 37°C酶切过夜。采用通用型DNA纯化试剂盒(天根生化科技有限公司)回收酶切产物,测定OD值并用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物。纯化的线性质粒模版用于体外转录。

[0113] (3) 体外转录制备非加帽线性mRNA

[0114] 1) 体外转录

[0115] 采用T7体外转录试剂盒(Vazyme T7 High Yield RNA Transcription Kit)合成mRNA,转录体系如表3所示。

[0116] 表3转录体系

[0117]	试剂	体积
	T7 RNA Polymerase Mix	2 ul

10x Transcription Buffer	2 ul
UTP Solution	2 ul
ATP Solution	2 ul
CTP Solution	2 ul
GTP Solution	2 ul
模板 (1ug)	x ul
加RNase-free ddH <sub>2</sub> O达到终体积	20 ul

[0118] 37°C 孵育2h,然后用DNase I消化线性DNA模板。消化条件:37°C消化15min。

[0119] 2) 非加帽线性mRNA纯化

[0120] 将上述1)所得转录产物,使用LiCl沉淀方法纯化,测定OD值及1%变性琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA大小。

[0121] 1%变性琼脂糖凝胶配制方法如下:

[0122] 1) 称取1g琼脂糖,至72ml nuclease-free, H<sub>2</sub>O中,微波炉加热溶解;

[0123] 2) 上述琼脂糖冷却至55-60°C时,在通风橱加0.1%的gel red,10ml10x MOPS,18ml 甲醛,灌胶;

[0124] 3) 变性琼脂糖凝胶电泳流程如下:取等体积样本RNA与2x loading buffer,65-70°C变性5-10min。上样,采用100v/30min条件进行电泳,其后采用凝胶成像系统拍照。

[0125] 通过本实施例2制备获得NCT RNA1-6;NCTRNA 1-2,7-9-Fluc;Capped RNA-Fluc; oRNA-Fluc,其结构从5'至3'依次为:

[0126] NCT RNA1:D3、spacer、CVB3 IRES、EGFP,3'-UTR、polyA。

[0127] NCT RNA2:D3、CVB3 IRES、EGFP,3'-UTR、polyA。

[0128] NCT RNA3:D3、PABPs、CVB3 IRES、EGFP,3'-UTR、polyA。

[0129] NCT RNA4:CVB3 IRES、EGFP,3'-UTR、polyA。

[0130] NCT RNA5:spacer、CVB3 IRES、EGFP,3'-UTR、polyA。

[0131] NCT RNA6:D3、spacer、整合eiF4G适配体的CVB3 IRES、EGFP,3'-UTR、polyA。

[0132] NCT RNA 1-Fluc:D3、spacer、CVB3 IRES、Fluc,3'-UTR、polyA。

[0133] NCT RNA 2-Fluc:D3、CVB3 IRES、Fluc,3'-UTR、polyA。

[0134] NCT RNA 7-Fluc:D3、spacer、EMCV IRES、Fluc,3'-UTR、polyA。

[0135] NCT RNA 8-Fluc:D3、spacer、E29 IRES、Fluc,3'-UTR、polyA。

[0136] NCT RNA 9-Fluc:D3、spacer、EV71 IRES、Fluc,3'-UTR、polyA。

[0137] Capped RNA-Fluc:5'-UTR、Fluc,3'-UTR、polyA。

[0138] oRNA-Fluc:主要元件为IRES、Fluc、polyA。

[0139] NCT RNA1-6中EGFP为增强绿色荧光蛋白基因,NCT RNA1-2,7-9-Fluc中Fluc为萤火虫荧光素酶。Capped RNA-Fluc为加帽RNA示例。oRNA-Fluc为环状RNA示例。图12给出了本发明NCT RNA1-6;NCT RNA 1-2,7-9-Fluc的示意图。图13给出了本发明Capped RNA-Fluc和oRNA-Fluc的示意图。

[0140] 其中,NCT RNA1的spacer是间隔序列1;

[0141] NCT RNA2是sfRNA直接与CVB3 IRES相连,没有spacer;

[0142] NCT RNA3的spacer是间隔序列2即PABPs;

- [0143] NCT RNA4没有sfRNA和spacer,只有CVB3 IRES;
- [0144] NCT RNA5 没有sfRNA,spacer是间隔序列1;
- [0145] NCT RNA6 的sfRNA和CVB3之间的spacer是间隔序列1。
- [0146] NCT RNA 1-2-Fluc采用了CVB3 IRES ,NCT RNA7-9-Fluc采用了不同的IRES。
- [0147] 除了NCT RNA3以外,上述NCT RNA 中spacer均是间隔序列1。
- [0148] 实施例3体外合成的非加帽线性RNA在体外表达的验证
- [0149] 本实施例采用非加帽线性RNA框架,用于表达萤火虫荧光素酶蛋白的 NCT RNA 1-Fluc、NCT RNA 2-Fluc,其中Capped RNA-Fluc和oRNA-Fluc作为对照。实验结果如图14所示,图14中横坐标为不同的RNA,其中No.1为oRNA-Fluc;No.2为Capped RNA-Fluc;No.3为NCT RNA2-Fluc;No.4为NCT RNA1-Fluc。纵坐标为化学发光信号,纵坐标值越高代表细胞中蛋白表达量越高。图14结果表明,与经典的加帽线性mRNA和环状RNA相比,本发明的NCT RNA架构下的Fluc在HEK293T细胞中的蛋白表达与前两者相当,说明本发明中的NCT RNA框架可用来表达多种蛋白,且蛋白表达达到了预期需求。
- [0150] 此外,图14中NCT RNA 1-Fluc和NCT RNA 2-Fluc二者结构差别仅在于前者D3与CVB3之间存在序列如SEQ ID NO:11所示的spacer。NCT RNA 1-Fluc纵坐标的值要高于NCT RNA 2-Fluc纵坐标的值,可见,包含spacer的本发明NCT RNA框架蛋白表达量更高,效果更好。
- [0151] 其中,检测方法为Fluc检测,如下:
- [0152] HEK293T细胞,在黑边透明底的96孔板上铺板,次日,按照每孔转染350ng mRNA的量转染表达Fluc的NCT RNA,对照用capped Fluc mRNA,于转染后的24h,加入终浓度为300ng/u1的D-荧光素钠,用酶标仪检测化学发光信号。
- [0153] 实施例4动物实验验证非加帽线性RNA在体内的表达
- [0154] 本实施例采用NCT RNA框架,以NCT RNA1-Fluc为示例,制备NCT RNA1-Fluc。对照组设置商品化Fluc(apexbio公司,EZ cap<sup>TM</sup>Firefly Luciferase mRNA)。选用Balb/c小鼠,行肌肉注射,给药量为5ug对照组加脂质体LNP、5ug NCT RNA1-Fluc加脂质体LNP。成像前小鼠注射部位和腹部剃毛,于给药后的24、48、72小时动物成像观察Fluc在小鼠体内的表达情况,以此判定两种mRNA在体内的稳定性和Fluc表达的持久性。小鼠24、48、72小时成像照片结果如图15A所示。检测相对光单位结果如图15B所示,图15B横坐标为给药后时间(小时),纵坐标为化学发光信号(RLU),纵坐标值越高代表细胞中mRNA蛋白表达量越高。图15A照片和图15B图表结果显示,NCT RNA1-Fluc所介导的Fluc在小鼠体内的表达,与对照相比,24、48、72小时NCT RNA1-Fluc表达量均高于商品化Fluc,从表达效果来看,NCT RNA1-Fluc表达稳定性和持久性相对更好。表明NCT RNA架构介导下的Fluc表达具有稳定、持久的特征。
- [0155] 实施例5本发明NCT RNA采用登革热病毒sfRNA(D3)效果比其他黄病毒sfRNA效果更好
- [0156] 本实施例采用非加帽线性RNA框架,用于表达EGFP的 NCT RNA1。此外,构建对照NCT RNA z- EGFP,其结构从5'至3'依次为:
- [0157] NCT RNA z- EGFP:Z3、spacer、CVB3 IRES、EGFP,3'-UTR、polyA。
- [0158] NCT RNA z- EGFP与NCT RNA1的区别仅在于,二者使用不同的黄病毒sfRNA,NCT RNA1采用登革热病毒sfRNA(D3),NCT RNA z- EGFP采用寨卡病毒sfRNA(Z3)。图16中给出了

NCT RNA z- EGFP示意图。其中寨卡病毒(Zika) sfRNA序列(如SEQ ID NO:17所示)如下:

[0159] TTGTCAGGCCTGCTAGTCAGCCACAGCTTGGGGAAAGCTGTGCAGCCTGTGACCCCCCAGGAGAAGC  
TGGGAAACCAAGCCCATAGTCAGGCCGAGAACGCCATGGCACGGAAGAAGCCATGCTGCCTGTGAGCCCCTCAGAG  
GACACTGAGTC (SEQ ID NO:17)

[0160] EGFP的表达实验结果如图17所示,结果显示,使用登革热病毒sfRNA (D3) 的NCT RNA1的EGFP的表达量明显高于采用寨卡病毒sfRNA (Z3) 的NCT RNA z- EGFP。这表明,本发明NCT RNA采用登革热病毒sfRNA (D3) 比其采用他黄病毒sfRNA的目标蛋白表达量更高,效果更好。

[0161] 其中,检测方法如下:

[0162] EGFP检测:HEK293T细胞,在透明塑料24孔培养板上单孔铺板,次日转染1ug表达EGFP的NCT RNA,对照用capped EGFP mRNA,分别于转染后的24、48和72h通过倒置荧光显微镜观察HEK293T细胞中EGFP的表达情况并拍照。

[0163] 实施例6本发明NCT RNA采用D3与CVB3 IRES组合相对于与其他IRES组合效果更佳

[0164] 本实施例采用非加帽线性RNA框架,用于表达萤火虫荧光素酶蛋白的NCT RNA 1-Fluc、NCT RNA 2-Fluc、NCT RNA 7-Fluc、NCT RNA 8-Fluc、NCT RNA 9-Fluc。

[0165] 其中,NCT RNA 7-Fluc中EMCV指EMCV IRES,EMCV为脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus),EMCVIRES的序列(如SEQ ID NO:18所示)如下:

[0166] TTGCCAGTCTGCTCGATATCGCAGGCTGGGTCCGTGACTACCCACTCCCCCTTCAACGTGAAGGCTA  
CGATAGTGCCAGGGCGGGTACTGCCGTAAGTGCCACCCAAACAACAACAACAAAACAACTCCCCCTCCCCCCCC  
TTACTATACTGGCCGAAGCCACTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTACATGCTATTTTCTACCGCATTACCG  
TCTTATGGTAATGTGAGGGTCCAGAACCTGACCCTGTCTTCTTGACGAACACTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGA  
CAAAGGAGTGTAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTAAAGACAAACAACGTCT  
GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGTGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAG  
ATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTC  
CTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGG  
TGCACGTGCTTTACACGTGTTGAGTCGAGGTGAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCT  
TTGAAAACCACGATTACAAT (SEQ ID NO:18)。

[0167] NCT RNA 1-Fluc、NCT RNA 2-Fluc与NCT RNA 7-Fluc、NCT RNA 8-Fluc、NCT RNA 9-Fluc的区别在于使用了不同病毒的IRES,NCT RNA 1-Fluc、NCT RNA 2-Fluc采用了CVB3 IRES,NCT RNA 7-9-Fluc采用了不同的IRES,NCT RNA 7采用EMCV IRES,NCT RNA 8-Fluc采用E29 IRES,NCT RNA 9-Fluc采用EV71 IRES。

[0168] 实验结果如图18所示,图18中横坐标为不同的RNA,其中No.3为NCT RNA 2-Fluc; No.4为NCT RNA 1-Fluc; No.5为NCT RNA 7-Fluc; No.6为NCT RNA 8-Fluc; No.7为NCT RNA 9-Fluc。纵坐标为化学发光信号,纵坐标值越高代表细胞中蛋白表达量越高。图18结果表明, No.3、No.4纵坐标的值要高于No.5- No.7纵坐标的值。可见,采用D3与CVB3 IRES组合的本发明NCT RNA框架,与D3与其他病毒IRES组合相比,蛋白表达量更高,效果更好。

[0169] 其中,检测方法为Fluc检测,如下:

[0170] HEK293T细胞,在黑边透明底的96孔板上铺板,次日,按照每孔转染350ng mRNA的量转染表达Fluc的NCT RNA,对照用capped Fluc mRNA,于转染后的24h,加入终浓度为

300ng/u1的D-荧光素钠,用酶标仪检测化学发光信号。

[0171] 实施例7本发明NCT RNA分别采用eiF4G适配体、PABPs效果更佳

[0172] 本实施例采用非加帽线性RNA框架,用于表达EGFP的 NCT RNA1、NCT RNA2、NCT RNA3、NCT RNA6,以及对照Capped mRNA。NCT RNA6与NCT RNA1的区别仅在于前者NCT RNA6采用的eiF4G适配体核酸分子整合至CVB3 IRES的CVB3 IRES衍生体(CVB3+eiF4G aptamer, CVB3 IRES衍生体序列如SEQ ID NO:7所示),后者NCT RNA1采用的是CVB3 IRES(序列如SEQ ID NO:1所示)。NCT RNA3与NCT RNA1的区别仅在于前者NCT RNA3采用的间隔序列为PABPs(PABPs序列如SEQ ID NO:12所示),后者NCT RNA1采用的间隔序列为spacer(spacer序列如SEQ ID NO:11所示)。

[0173] EGFP的表达实验结果如图19所示,结果显示,使用的NCT RNA6的EGFP的表达量高于NCT RNA1。这表明,本发明NCT RNA整合eiF4G适配体的IRES衍生体比未采用eiF4G适配体的IRES的目标蛋白表达量更高,效果更好。将eiF4G适配体整合至IRES内部,由IRES突变体组合的NCT RNA,可显著改善目的基因的表达水平。图19的结果还显示,使用的NCT RNA3的EGFP的表达量高于NCT RNA1。这表明,本发明NCT RNA采用PABPs作为间隔序列比采用spacer作为间隔序列的目标蛋白表达量更高,效果更好,PABPs可改善IRES所介导的基因表达。

[0174] 其中,检测方法如下:

[0175] EGFP检测:HEK293T细胞,在透明塑料24孔培养板上单孔铺板,次日转染1ug表达EGFP的NCT RNA,对照用capped EGFP mRNA,分别于转染后的24、48和72h通过倒置荧光显微镜观察HEK293T细胞中EGFP的表达情况并拍照。

[0176] 本公开的上述实施例仅是为清楚地说明本公开所作的举例,而并非是对本公开的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本公开的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本公开权利要求的保护范围之内。

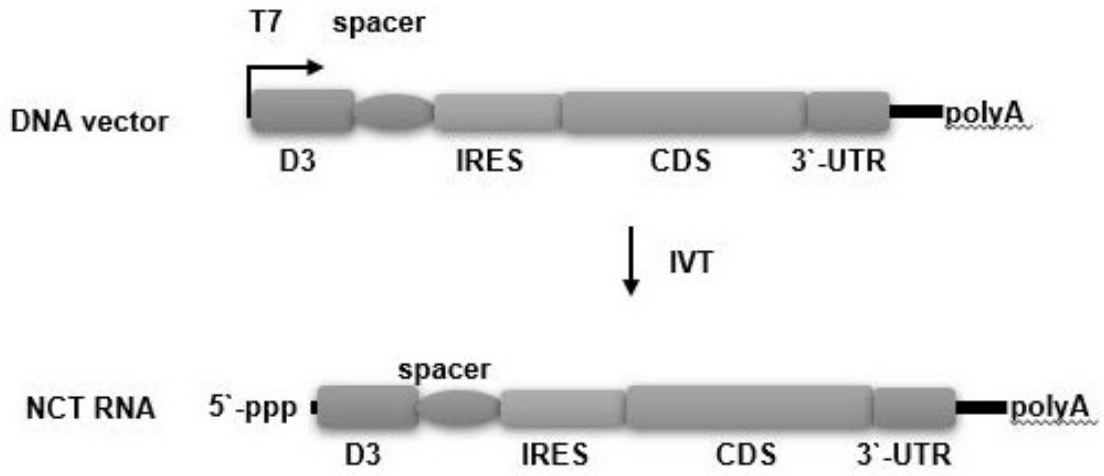


图1

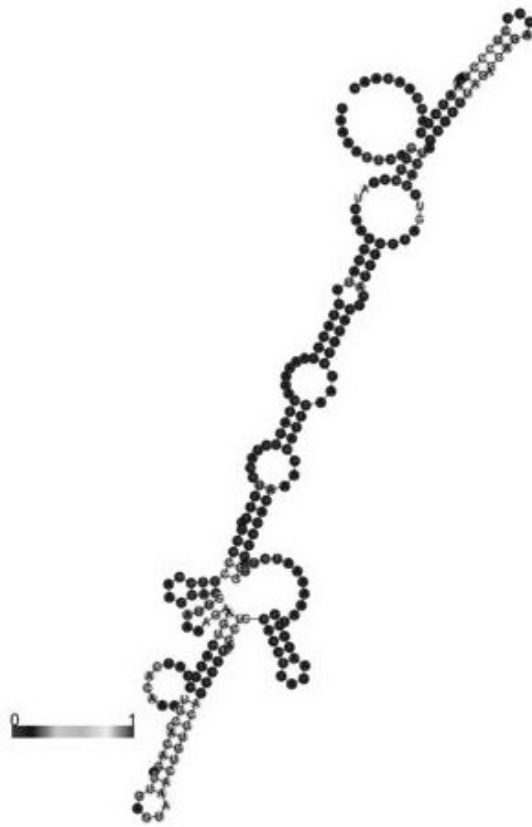


图2

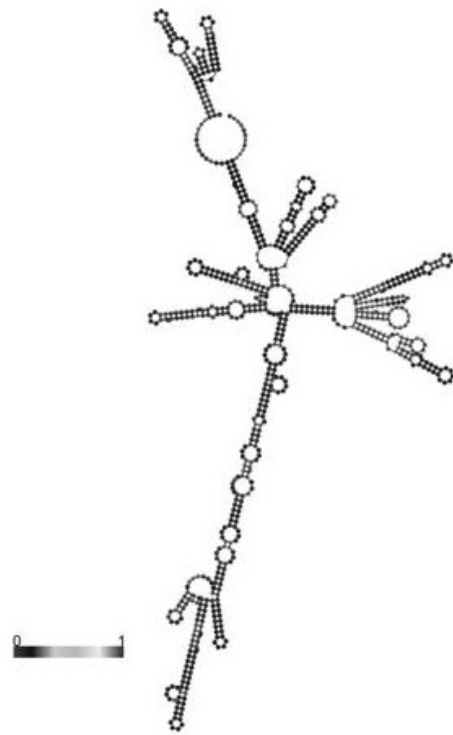


图3

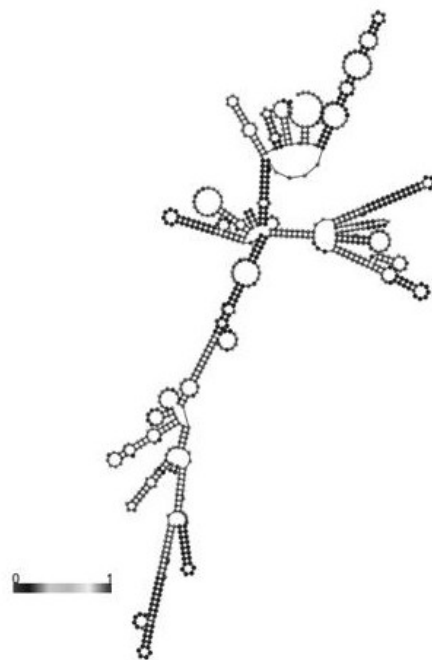


图4

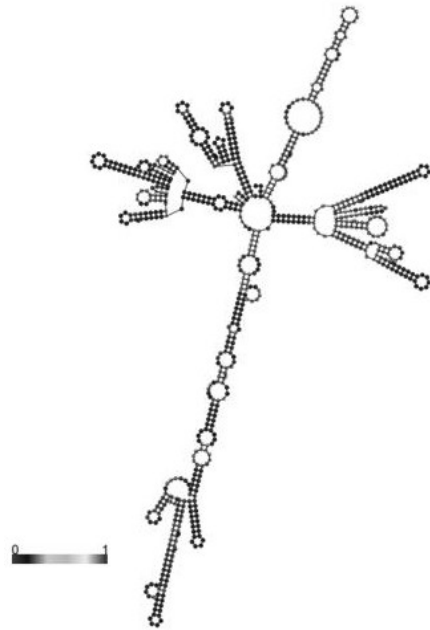


图5

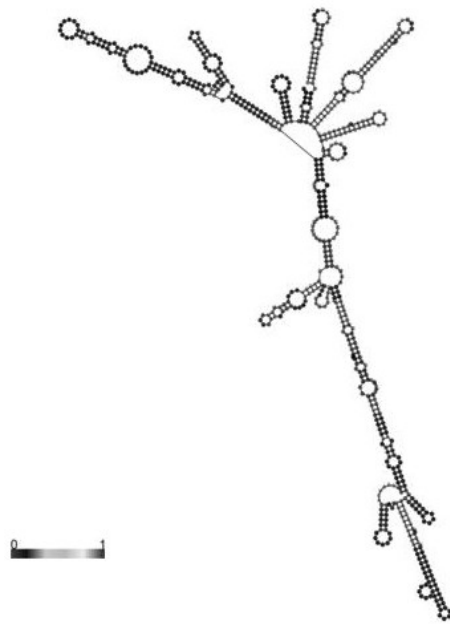


图6



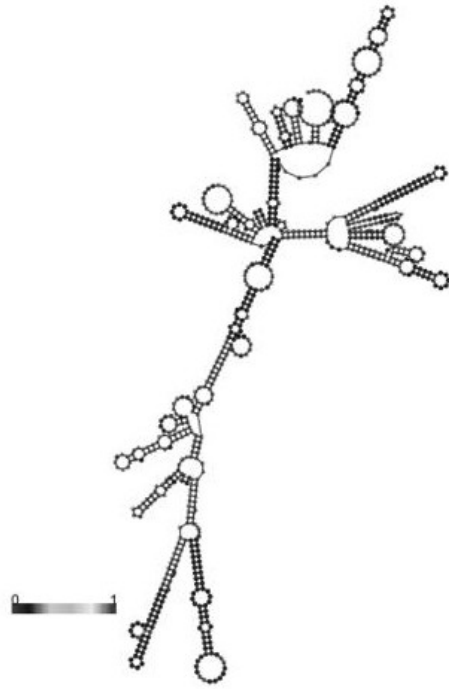


图9

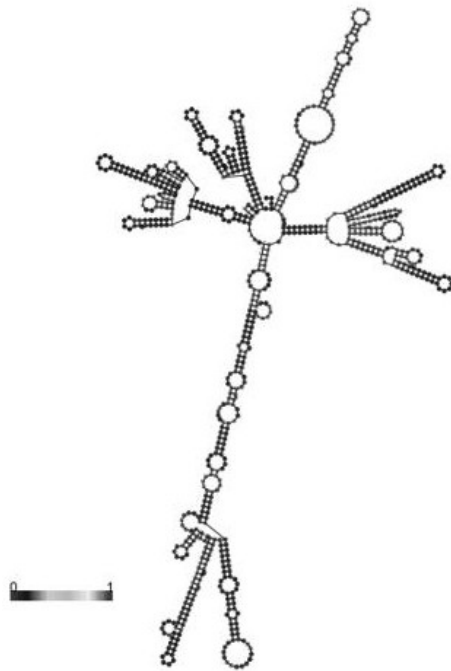


图10

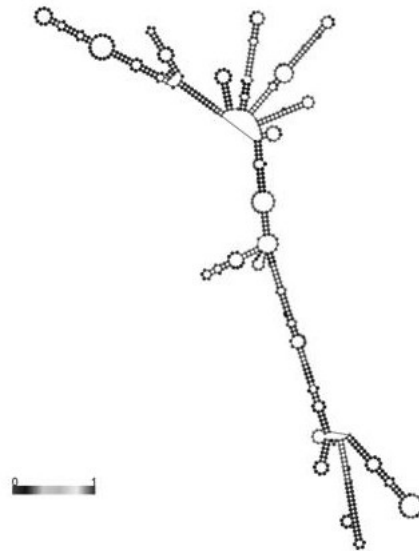


图11

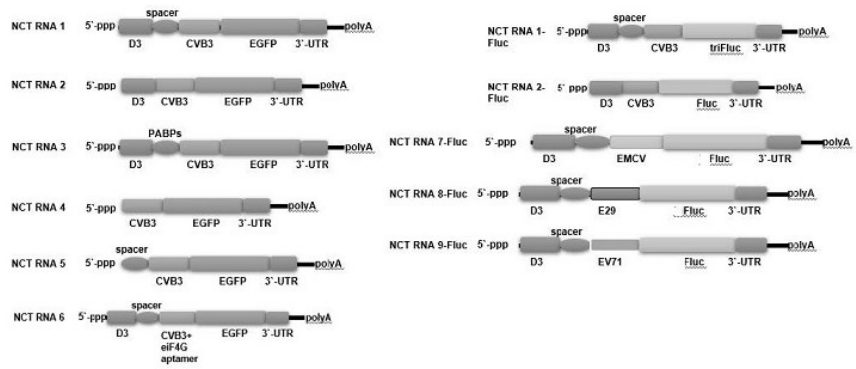


图12

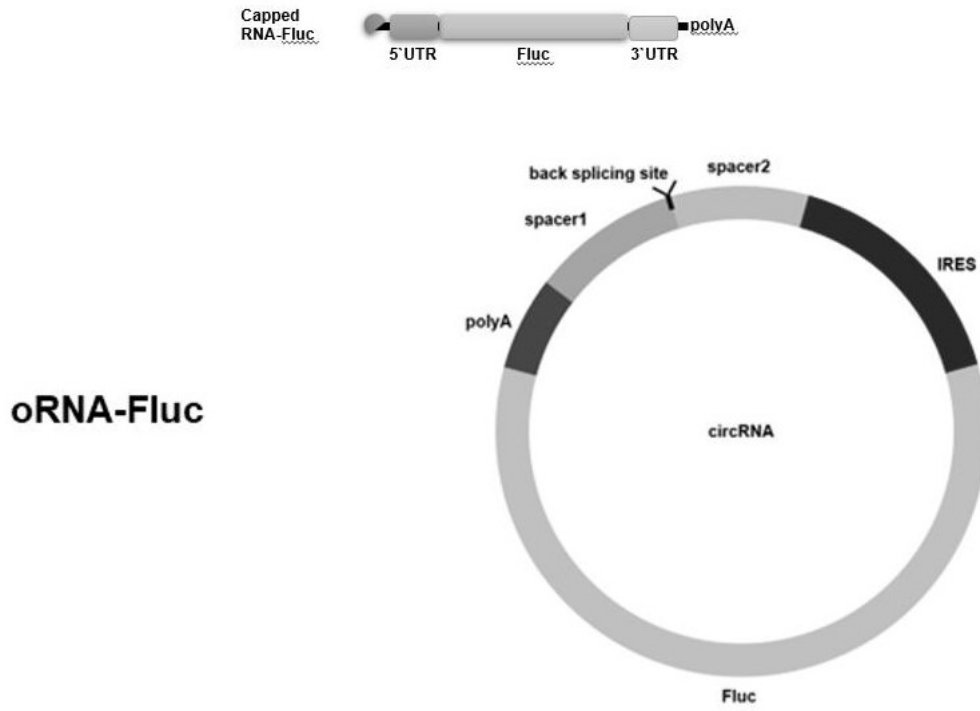


图13

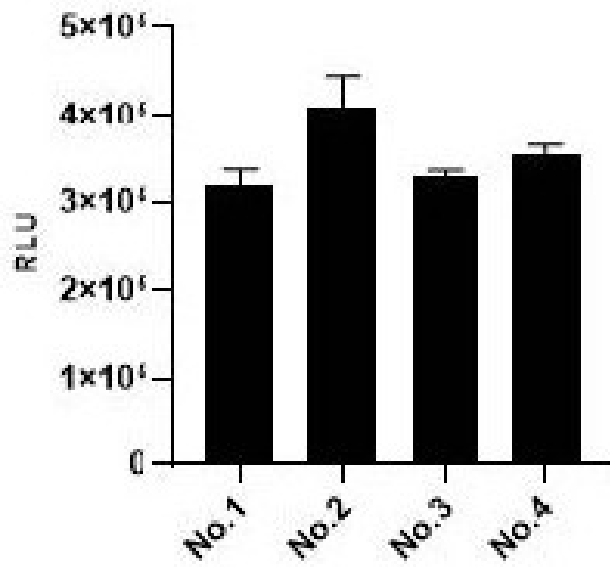


图14

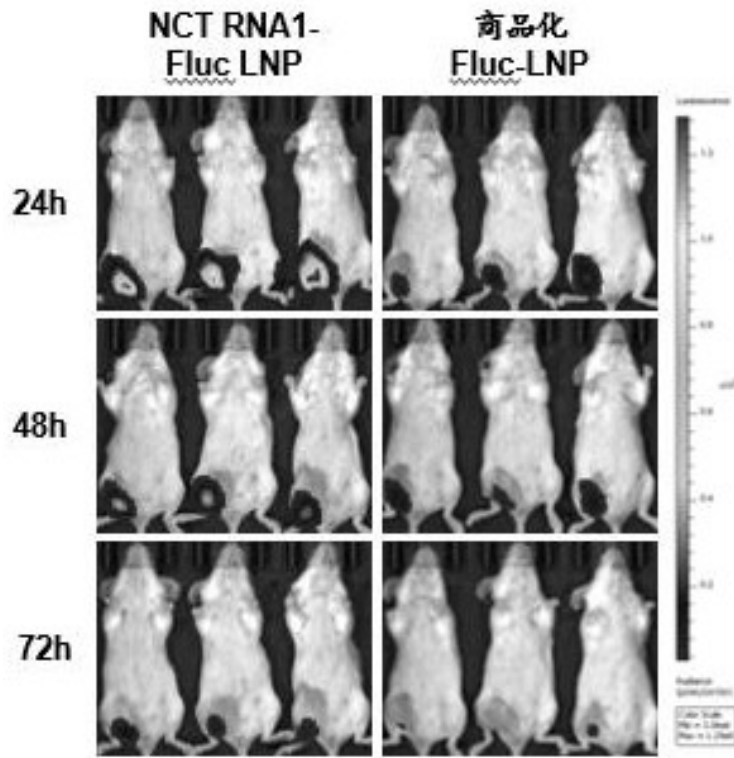


图15A

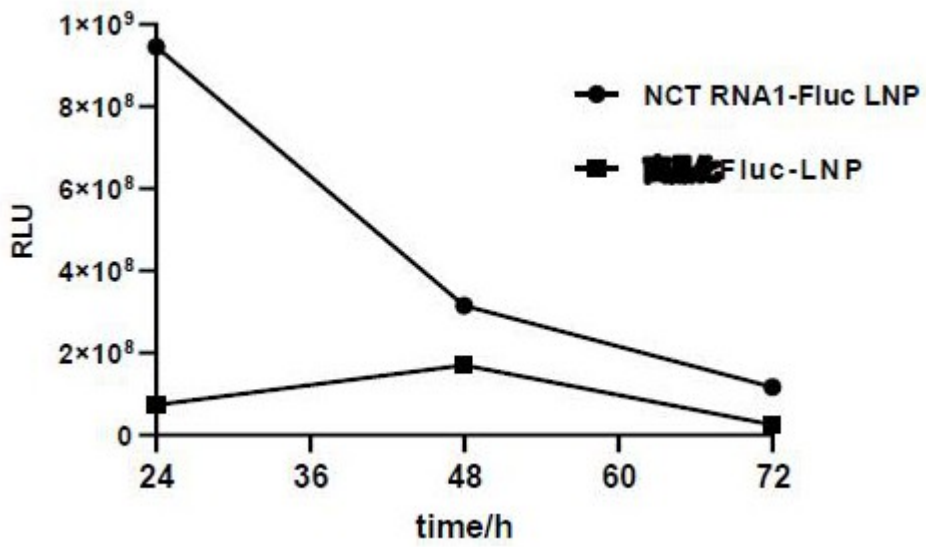


图15B

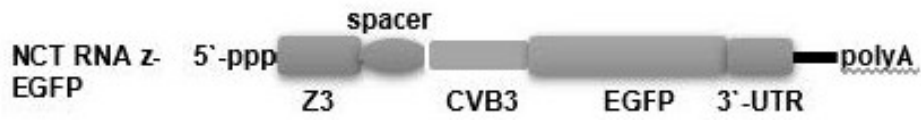


图16

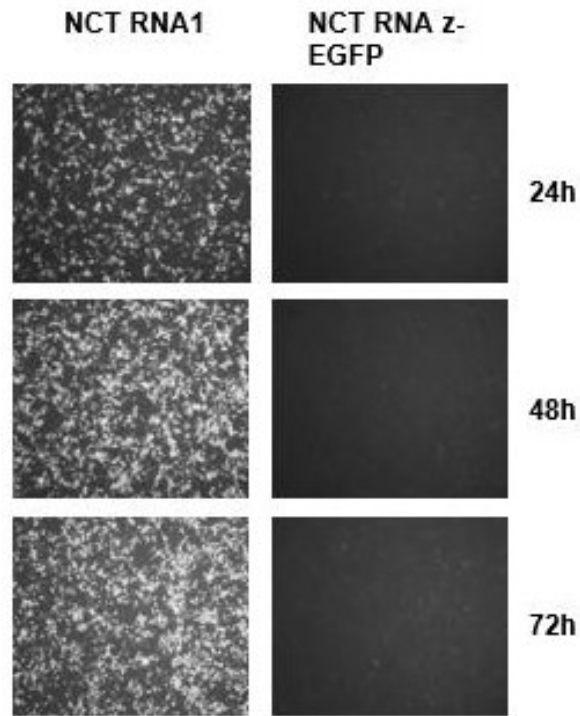


图17

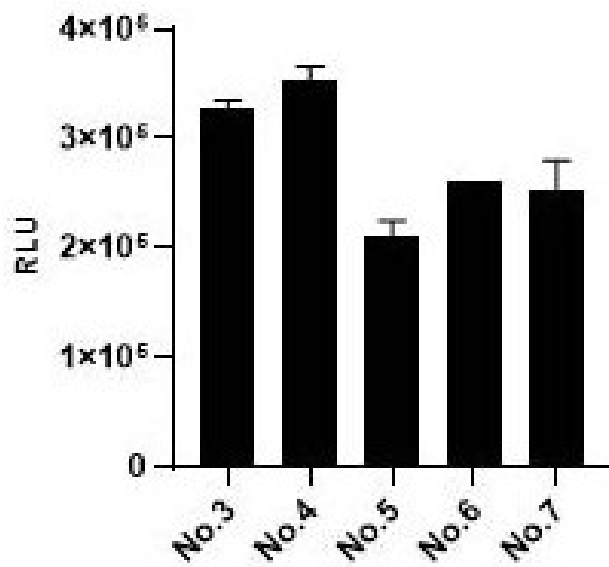


图18

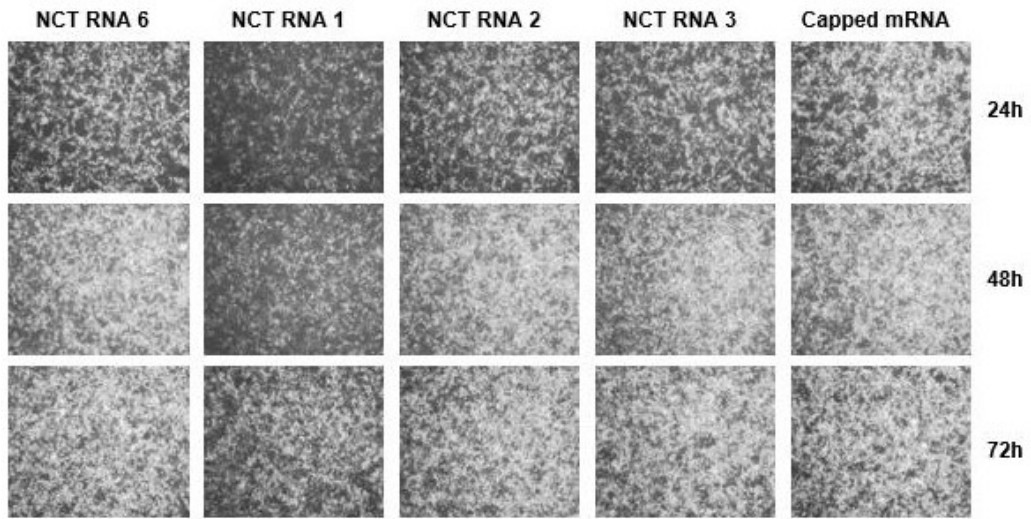


图19