

一种含核酸构建体的药物组合物及其医药用途

技术领域

本公开涉及药物制剂领域，具体涉及一种含核酸构建体的药物组合物，及其医药用途。

背景技术

基因治疗和基因接种疫苗可以为多种疾病提供高度特异性和个性化治疗、预防方案，包括遗传病、自身免疫疾病、癌或肿瘤相关疾病以及炎症性疾病等。

DNA、RNA 均可用作基因治疗或基因接种疫苗。DNA 稳定、易操作，但存在 DNA 片段插入患者基因组导致突变事件(如受损基因功能丧失)等的风险。RNA 能避免不希望的基因组整合，但因为遍在的 RNA 酶，RNA 易被降解。因此，需要提高 RNA 的稳定性，使其编码的蛋白产物在体内积累，以实现疾病的治疗或预防，以及，在储存、施用的过程中保持 RNA 结构和功能的完整性。已经发现天然存在的真核 mRNA 分子中含有稳定化元件，例如，其 5'端、3'端的非翻译区(UTR)，以及如 5'帽结构或 3'聚腺苷酸尾的其它结构特征。5'UTR 和 3'UTR 是成熟前(premature)mRNA 元件，在 mRNA 加工过程中，成熟 mRNA 特有的结构特征(如 5'帽和 3'聚腺苷酸尾)被添加于转录的(成熟前)mRNA。关于 UTR 和 mRNA 稳定性的相关性，已有研究显示， α -球蛋白 mRNA 的 3'UTR 是 α -球蛋白 mRNA 稳定性的重要因素(Nancy D Rodgers et al, RNA. 2002 Dec;8(12):1526-37; Z Wang et al, Mol Cell Biol. 1999 Jul;19(7):4552-60.)。

外周动脉疾病(Peripheral artery disease, PAD)是指由一系列由供应肢体动脉、内脏器官及脑部的结构和功能异常导致的非冠状动脉系统综合征，其特征非冠状动脉血液循环发生狭窄、闭塞和瘤样病变，累及主动脉及分支动脉。在 PAD 中，下肢缺血性疾病在临床上最为常见，主要病因包括动脉粥样硬化(Atherosclerosis obliterans, ASO)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(Diabetic artery obliterans, DAO)和血栓闭塞性脉管炎(Thrombosis angiitis obliterans, TAO)。严重下肢缺血(Critical limb ischemia, CLI)属于 ASO 发展的晚期阶段，糖尿病足(Diabetic foot ulcer, DFU)属于 DAO 的一种，两者均属于外周血管病变性疾病，其发病特征均为下肢血管狭窄或闭塞、远端血液灌注不足导致的双腿疼痛、溃疡及坏死。目前治疗 CLI 和 DFU 的有效措施是通过手术或者腔内介入进行血运重建，但超 40%的患者因为年龄、合并并发症等不满足血运重建要求，只能通过药物保守治疗。药物治疗仅能延缓疾病进程，无法治愈。

肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)是一种多功能间质源性生长因子，当其与细胞膜表面受体 c-met 结合后，引起胞内酪氨酸残基磷酸化，招募衔接蛋白，促进激酶活性，进而激活下游信号通路。HGF 是胚胎发育、组织器官再生、

伤口愈合和血管发生等过程的重要调节因子，能促进内皮细胞和平滑肌细胞增殖和迁移，促进缺血部位微血管网络重建，抑制细胞凋亡。研究结果显示，裸质粒肌肉注射递送 hHGF-cDNA 能有效促进鼠和家兔缺血下肢的血流灌注(Y Taniyama et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. Gene Ther . 2001 Feb;8(3):181-9)。临床数据显示，小腿肌肉注射裸质粒可促进患者创面愈(S Cui et al. Clinical Safety and Preliminary Efficacy of Plasmid pUDK-HGF Expressing Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Patients with Critical Limb Ischemia. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2015 Oct;50(4):494-501.)。但是，使用裸质粒递送药物存在体内转染效率低、给药剂量负担大、DNA 整合风险高及治疗费用成本高等不足，且临床数据显示并未改善趾肱指数、经皮氧分压及截肢率，因此药物仍有较大提升空间。

本公开提供这样的 mRNA，其含有新结构的 5'UTR、3'UTR，降低 mRNA 的早期降解或稳定 mRNA 的降解，但不损失更或增强蛋白翻译效率。所述 mRNA 稳定性更高，可应用于基因治疗、基因接种疫苗。以及，本公开提供能够表达人肝细胞生长因子(Human Hepatocyte growth factor, hHGF)的 mRNA，及其脂质纳米颗粒(Lipid nanoparticles, LNP)递送系统，可以实现外源 hHGF 蛋白在体内高效、快速转化，具有无整合风险、易于工业级放大的优点，是较裸质粒更为理想的治疗方案，可用作 CLI、DFU 等多种疾病的基因治疗药物。

20

发明内容

本公开提供了一种脂质纳米颗粒，包含核酸构建体和脂质相。

在一些实施方案中，所述的脂质相包含至少一种阳离子脂质。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质选自叔胺脂质。

25 在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和支链尾部。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和至少三条支链尾部。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和三条支链尾部。

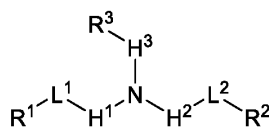
30 在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和至少四条支链尾部。

在一些实施方案中，本公开所述支链尾部可以是包含 6-20 碳原子的饱和或不饱和的疏水性尾部。

35 在一些实施方案中，本公开所述支链尾部可以是包含 6-20 碳原子的饱和疏水性尾部。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质包含游离的羟基端。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物，



A

其中, L^1 和 L^2 各自独立地选自 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_x-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a-$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a-$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^a-$ 或键, R^a 选自氢或 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基;

5 H^1 和 H^2 各自独立地选自 C_{1-12} 亚杂烷基、 C_{1-12} 亚烷基、 C_{2-12} 亚烯基;

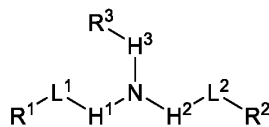
H^3 选自 C_{1-24} 亚烷基、 C_{2-24} 亚烯基、 C_{3-8} 亚环烷基或 C_{3-8} 亚环烯基;

R^1 和 R^2 各自独立地选自 C_{1-24} 烷基或 C_{2-24} 烯基;

R^3 选自氢、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$ 、 $-\text{OR}^5$ 或 $-\text{NR}^5\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, R^4 选自 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基, R^5 选自氢、 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基;

10 x 选自 0、1 或 2。

在一些实施方案中, 本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物,



A

其中, L^1 和 L^2 各自独立地选自 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$;

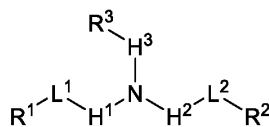
15 H^1 和 H^2 各自独立地选自 C_{1-12} 亚杂烷基、 C_{1-12} 亚烷基、 C_{2-12} 亚烯基;

H^3 选自 C_{1-24} 亚烷基、 C_{1-24} 亚杂烷基、 C_{2-24} 亚烯基;

R^1 和 R^2 各自独立地选自 C_{1-24} 烷基或 C_{2-24} 烯基;

R^3 选自氢、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$ 、 $-\text{OR}^5$ 或 $-\text{NR}^5\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, R^4 选自 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基, R^5 选自氢、 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基。

20 在一些实施方案中, 本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物,



A

其中, L^1 和 L^2 各自独立地选自 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$;

H^1 和 H^2 各自独立地选自 C_{1-12} 亚杂烷基、 C_{1-12} 亚烷基、 C_{2-12} 亚烯基;

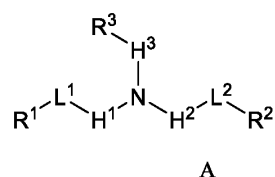
H^3 选自 C_{1-24} 亚烷基、 C_{1-24} 亚杂烷基、 C_{2-24} 亚烯基;

25 R^1 和 R^2 各自独立地选自 C_{1-24} 烷基或 C_{2-24} 烯基;

R^3 选自氢、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$ 、 $-\text{OR}^5$ 或 $-\text{NR}^5\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, R^4 选自 C_{1-6}

烷基或 C₂₋₆ 烯基, R⁵ 选自氢、C₁₋₆ 烷基或 C₂₋₆ 烯基。

在一些实施方案中, 本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物,



其中, L¹ 和 L² 各自独立地选自 -C(O)O-、-OC(O)-;

5 H¹ 和 H² 各自独立地选自 C₁₋₁₂ 亚杂烷基、C₁₋₁₂ 亚烷基、C₂₋₁₂ 亚烯基;

H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚烷基、C₁₋₂₄ 亚杂烷基、C₂₋₂₄ 亚烯基;

R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₁₋₂₄ 烷基或 C₂₋₂₄ 烯基;

R³ 选自 -OR⁵, R⁵ 选自氢。

10 在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 H¹ 和 H² 中至少一个为亚杂烷基, 所示亚杂烷基包含至少一个选自 O、N 和 S 的杂原子。

在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 H¹ 选自 C₁₋₁₂ 亚杂烷基, 优选 C₂₋₉ 亚杂烷基。在一些实施方案中, 亚杂烷基为至少含有一个氧原子的亚杂烷基。在一些实施方案中, 亚杂烷基为含有二个氧原子的亚杂烷基。在一些实施方案中, 亚杂烷基为至少含有一个氮原子的亚杂烷基。在一些实施方案中, 亚杂烷基为至少含有一个氧原子的亚杂烷基。

15 在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 H¹ 和 H² 中至少一个为 C₁₋₉ 亚烷基、C₂₋₁₀ 亚烯基。

在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 H³ 选自 C₂₋₂₄ 亚烯基; 或 H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚烷基。在另一些实施方案中, H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚杂烷基。

20 在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 H³ 选自 C₁₋₈ 亚烷基。在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 H³ 选自 C₂₋₆ 亚烷基。

在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 L¹ 和 L² 选自 -C(O)O-。

在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 L¹ 和 L² 选自 -OC(O)-。

25 在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₂₋₂₄ 烷基 (包括但不限于 C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基、C₆ 烷基、C₇ 烷基、C₈ 烷基、C₉ 烷基、C₁₀ 烷基、C₁₁ 烷基、C₁₂ 烷基、C₁₃ 烷基、C₁₄ 烷基、C₁₅ 烷基、C₁₆ 烷基、C₁₇ 烷基、C₁₈ 烷基、C₁₉ 烷基、C₂₀ 烷基、C₂₁ 烷基)。在另一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₄₋₁₈ 烷基。

30 在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自支链 C₄₋₁₈ 烷基。

在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自直链 C₄₋₁₈ 烷基。

在一些实施方案中, 式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 选自直链 C₄₋₁₈ 烷基, R² 选

自支链 C₄₋₁₈ 烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 选自支链 C₄₋₁₈ 烷基，R² 选自支链 C₄₋₁₈ 烷基。

一些实施方案提供的式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₂₋₂₄ 烯基（包括但不限于 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基、C₁₂ 烯基、C₁₃ 烯基、C₁₄ 烯基、C₁₅ 烯基、C₁₆ 烯基、C₁₇ 烯基、C₁₈ 烯基、C₁₉ 烯基、C₂₀ 烯基、C₂₁ 烯基）。另一些实施方案提供的式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₄₋₁₈ 烯基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自支链 C₄₋₁₈ 烯基。

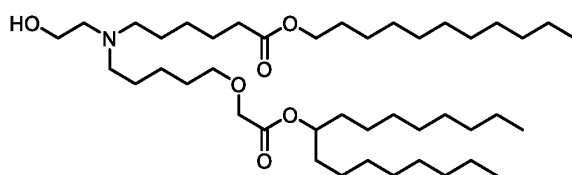
在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自直链 C₄₋₁₈ 烯基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 选自直链 C₄₋₁₈ 烯基，R² 选自支链 C₄₋₁₈ 烯基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 选自支链 C₄₋₁₈ 烯基，R² 选自支链 C₄₋₁₈ 烯基。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质可选自 N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、1,2-二油酰基三甲基丙烷氯化铵(DOTAP)(也称为 N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵和 1,2-二油酰氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二-γ-亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ-DLenDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油氧基-3-吗啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亚油氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)或 3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯基-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氮烷二基)双十二烷-2-醇(C12-200)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基

乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28 31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-M-C3-DMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(MC3 Ether)、4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丁烷-1-胺(MC4 Ether)、((4-羟基丁基)氮杂二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)、8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷基氧基)己基]氨基]辛酸 1-辛基壬基酯 (SM-102)、式 I 所示化合物,或上述阳离子脂质任何组合。



I

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质为式 I 所示化合物。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质为((4-羟基丁基)氮杂二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质为 8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷基氧基)己基]氨基]辛酸 1-辛基壬基酯 (SM-102)。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 10~75%,包括但不限于 15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 15~49%,包括但不限于 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%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~70%。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~60%。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%。

5 在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 42~49%。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 45%。

10 在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 46%。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 47%。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 48%。

15 在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 49%。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~40%，包括但不限于 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%或任意两数之间的值。

20 在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 40~70%，包括但不限于 40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%或任意两数之间的值。

25 在一些实施方案中，本公开所述的脂质相包含至少一种非阳离子脂质。

30 在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%，包括但不限于 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%或任意两数之间的值。

35 在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 50~65%。

在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总

脂质的摩尔量的 40~55%。

在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 55~62%。

5 在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%。

在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~50%。

在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~50%。

10 在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~40%。

在一些实施方案中，本公开所述的非阳离子脂质可选自磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物。

15 在一些实施方案中，本公开所述的磷脂可选自 1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双十一烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0 Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-硬脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)以及其混合物。

在一些实施方案中，本公开所述的磷脂为 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

35 在一些实施方案中，本公开所述的磷脂为 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

在一些实施方案中，本公开所述的磷脂与阳离子脂质的重量的比为 1:20~10:1；优选所述磷脂与阳离子脂质的重量的比为 1:20~5:1；优选所述磷脂与阳离子脂质的重量的比为 1:10~5:1；更优选所述磷脂与阳离子脂质的重量的比为 1:10~1:1。

5 在一些实施方案中，本公开所述的磷脂的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~40%，包括但不限于 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%或任意两数之间的值。

10 在一些实施方案中，本公开所述的磷脂的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~20%。

在一些实施方案中，本公开所述的磷脂的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 15%。

在一些实施方案中，本公开所述的磷脂的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20%。

15 在一些实施方案中，本公开所述的磷脂的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 10~20%。

在一些实施方案中，本公开所述的磷脂的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 10%。

20 在一些实施方案中，胆固醇衍生物包括但不限于谷固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、熊果酸。

另一方面，本公开所述的胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~60%，包括但不限于 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、25 53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，本公开所述的胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%。

在一些实施方案中，本公开所述的胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~45%。

30 在一些实施方案中，本公开所述的胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 35~45%。

在一些实施方案中，本公开所述的胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~35%。

35 在一些实施方案中，本公开所述的胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 40.5%。

在一些实施方案中，本公开所述的胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米颗粒中

存在的总脂质的摩尔量的 45%。

在一些实施方案中，本公开所述的胆固醇或其衍生物与磷脂的摩尔比为 1.0~5.0，包括但不限于 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0 或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米颗粒中胆固醇或其衍生物与磷脂的摩尔比 2.0~5.0。

另一方面，本公开所述脂质相中还含有至少一种缀合脂质，所述缀合脂质包括但不限于 PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的神经酰胺、PEG 修饰的二烷基胺、PEG 修饰的二酰基甘油、PEG 修饰的二烷基甘油。

在一些实施方案中，所述缀合脂质选自二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000)，二肉豆蔻酰甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000(DMG-PEG2000) 和甲氧基聚乙二醇双十四烷基乙酰胺 (ALC-0159)。

在一些实施方案中，所述缀合脂质选自二肉豆蔻酰甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000。

在一些实施方案中，所述缀合脂质选自二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000。

在一些实施方案中，缀合脂质起抑制脂质纳米颗粒（颗粒）聚集。

在一些实施方案中，本公开所述的缀合脂质的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 0.5~4%，包括但不限于 0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%、2.2%、2.4%、2.6%、2.8%、3.0%、3.2%、3.4%、3.6%、3.8%、4.0% 或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，本公开所述的缀合脂质的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 0.5~1.0%。

在一些实施方案中，本公开所述的缀合脂质的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 1.5~2.5%。

在一些实施方案中，本公开所述的缀合脂质的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 1~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的缀合脂质的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 1.5%。

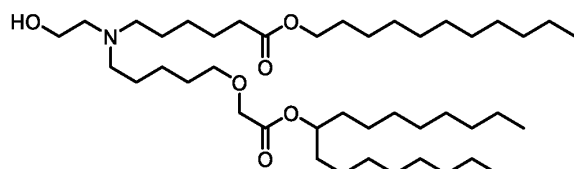
在一些实施方案中，本公开所述的缀合脂质的含量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的 2.0%。

在一些实施方案中，所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:100~1:1；优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:100~1:2；优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:50~1:1；优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:50~1:2；优

选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:25~1:2; 优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:20~1:2。

在一些实施方案中, 本公开所述的脂质纳米颗粒包含:

- a) 核酸构建体;
- 5 b) 阳离子脂质, 所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐, 所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%,



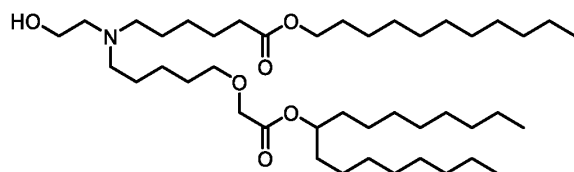
I ;

- c) 非阳离子脂质, 所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物, 其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%, 所述胆固醇或其衍生物
- 10 占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%;

和 d) 缀合脂质, 所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中, 本公开所述的脂质纳米颗粒包含:

- a) 核酸构建体;
- b) 阳离子脂质, 所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐, 所述阳
- 15 离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%;



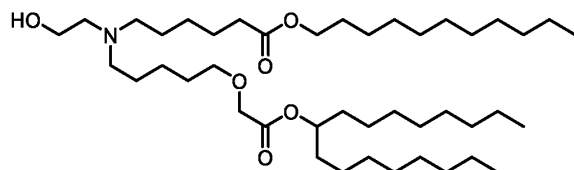
I ;

- c) 非阳离子脂质, 所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物, 其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%, 所述胆固醇或其衍生物
- 20 占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%;

和 d) 缀合脂质, 所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中, 本公开所述的脂质纳米颗粒包含:

- a) 核酸构建体;
- b) 阳离子脂质, 所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐, 所述阳
- 离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%;



I

;

c) 非阳离子脂质, 所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物, 其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%, 所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%;

5 和 d) 缀合脂质, 所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

另一方面, 本公开所述的纳米颗粒制剂, 所述纳米颗粒制剂的平均粒径为 10nm~200nm。

在一些实施方案, 所述纳米颗粒制剂的平均粒径为 40~150nm。

在一些实施方案, 所述纳米颗粒制剂的平均粒径为 40~140nm。

10 另一方面, 本公开还提供一种冻干组合物, 其包含前述的脂质纳米颗粒。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干制剂, 其由前述脂质纳米颗粒或前述的冻干组合物经冷冻干燥获得。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂, 包含上述脂质纳米颗粒和氯化钠。

15 在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:10~10:1。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:10~5:1。

20 在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~5:1。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~5:1。

25 在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~5:1。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~4:1。

30 在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~3:1。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂中, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~3:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或制剂中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~2:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或制剂中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~2:1。

5 另一方面，本公开所述的冻干组合物或制剂还包含至少一种冻干保护剂。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、麦芽糖中的一种或几种；优选冻干保护剂选自蔗糖、蔗糖和海藻糖组合。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂为蔗糖。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂为海藻糖和甘露醇的组合；

10 在一些实施方案中，所述冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 200:1~1:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 150:1~1:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 100:1~1:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 100:1~20:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 800:1~20:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 50:1~20:1。

15 在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物或制剂中，包含浓度为 5% w/v 至 20% w/v 的冻干保护剂，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的冻干保护剂。

在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物中，包含浓度为 5% w/v 至 20% w/v 的蔗糖，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的蔗糖，优选包含 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖，优选包含浓度为 8% w/v 的蔗糖。

20 在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物或制剂中，包含浓度为 5% w/v 至 20% w/v 的海藻糖，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的海藻糖。

在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物或制剂中，包含浓度为 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 1% w/v 至 10% w/v 的海藻糖；优选 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 2% w/v 至 8% w/v 的海藻糖。

25 另一方面，本公开所述的冻干组合物或制剂还包含缓冲剂。

在一些实施方案中，缓冲剂选自(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、4-吗啉乙磺酸(MES)、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

在一些实施方案中，缓冲剂是 TRIS。

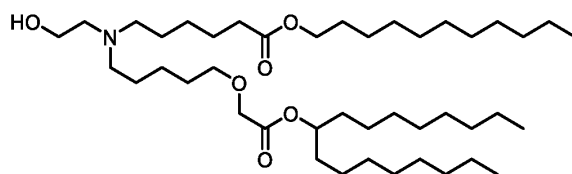
30 在一些实施方案中，缓冲剂的浓度为约 10mM 至约 100mM；优选缓冲剂的浓度为约 15mM 至约 75mM；更优选缓冲剂的浓度为约 10mM 至约 40mM。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或制剂包含：

i. 核酸构建体；

ii. 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

35 iii. 阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，



I ;

iv. 非阳离子脂质, 所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物, 其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%, 所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%; 和

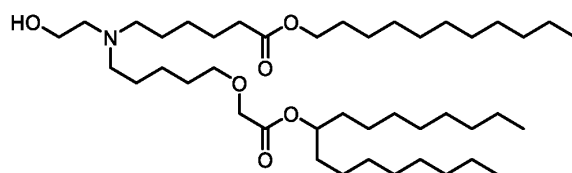
5 v. 缀合脂质, 所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂包含:

i. 核酸构建体;

ii. 氯化钠, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1;

10 iii. 阳离子脂质, 所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐, 所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%;



I ;

iv. 非阳离子脂质, 所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物, 其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%, 所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%; 和

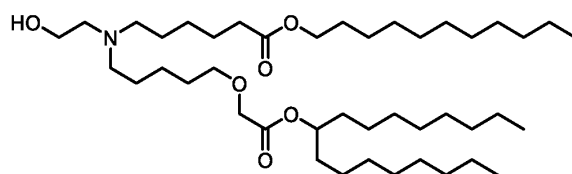
15 v. 缀合脂质, 所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中, 本公开所述的冻干组合物或制剂包含:

i. 核酸构建体;

ii. 氯化钠, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1;

20 iii. 阳离子脂质, 所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐, 所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%;



I ;

iv. 非阳离子脂质, 所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物, 其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%, 所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%; 和

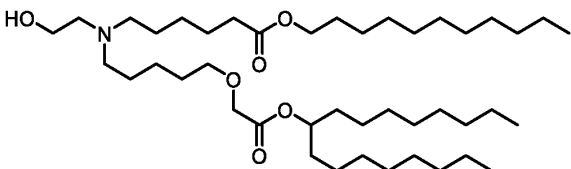
v. 缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或制剂包含：

- 1) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；
- 2) 脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含：

5 核酸构建体；

 阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，



I ;

 非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

 和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

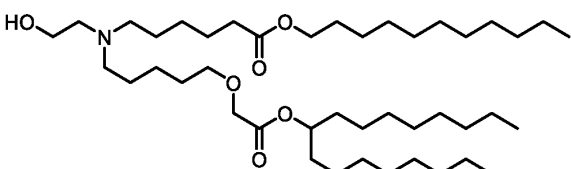
- 3) 任选冻干保护剂，所述冻干保护剂的浓度为 5% w/v 至 15% w/v。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或制剂包含：

- 15 1) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；
- 2) 脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含：

 核酸构建体；

 阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；



I ;

 非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

 和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%；

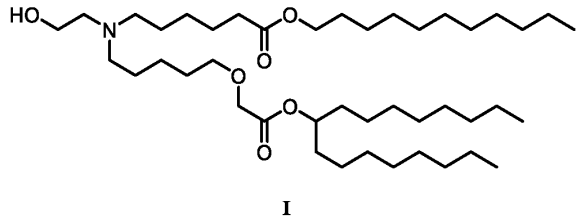
- 25 3) 任选冻干保护剂，所述冻干保护剂的浓度为 5% w/v 至 15% w/v。

 在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或制剂包含：

- 1) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；
- 2) 脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含：

核酸构建体；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；



5 非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

 和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%；

3) 任选冻干保护剂，所述冻干保护剂的浓度为 5% w/v 至 15% w/v。

10 在一些实施方案中，所述冻干组合物或制剂中活性剂的量为约 0.01mg/mL 至约 1mg/mL、约 0.05mg/mL 至约 0.5mg/mL、约 0.1mg/mL 至约 0.5mg/mL、或约 0.2mg/mL、约 0.05mg/mL，或约 0.02mg/mL。

 在一些实施方案中，所述活性剂与阳离子脂质的重量比为 1:10~1:60；优选活性剂与阳离子脂质的重量比为 1:10~1:50；优选活性剂与阳离子脂质的重量比为 15 1:10~1:40。

 在一些实施方案中，前述任一项脂质纳米颗粒或冻干组合物或制剂，其中，所述核酸构建体包含 ORF。在一些实施方案中，所述 ORF 编码肝细胞生长因子(HGF)、抗体或其抗原结合片段。一些具体的实施方案中，所述 ORF 编码人肝细胞生长因子(HGF)。一些具体的实施方案中，所述 ORF 编码抗 PD-1 抗体或其抗原结合片 20 段。

 本公开还提供一种冻干制剂的制备方法，所述方法包括以下步骤：

- a. 提供如前述脂质纳米颗粒在液体介质中的悬浮液；以及
- b. 调节所述液体介质从而形成包含 NaCl 的混悬液；
- c. 冷冻干燥。

25 在一些实施方案中，本公开所述的制备方法，其中所述体介质包含 5% w/v 至 20% w/v 的蔗糖，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的蔗糖。

 在一些实施方案中，本公开所述的制备方法，其中所述体介质包含 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 1% w/v 至 10% w/v 的海藻糖。

 在一些实施方案中，本公开所述的制备方法，其中所述体介质包含 10-200mM NaCl；优选包含 10-150mM NaCl；更优选包含 20-150mM NaCl；更优选包含 20-120mM NaCl；更优选包含 50-150mM NaCl；更优选包含 50-120mM NaCl；更优选包含 70-120mM NaCl。 30

本公开还提供一种降低冻干组合物或冻干制剂中脂质纳米颗粒平均粒径的方法，包括在冻干过程中添加或使用氯化钠。

本公开还提供一种降低冻干组合物或冻干制剂复溶后脂质纳米颗粒平均粒径的方法，包括在冻干过程中添加或使用氯化钠。

5 本公开还提供一种氯化钠在降低冻干组合物或冻干制剂中脂质纳米颗粒平均粒径的用途。

本公开还提供一种氯化钠在降低冻干组合物或冻干制剂复溶后脂质纳米颗粒平均粒径的用途，包括在冻干过程中添加或使用氯化钠。

10 在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或冻干制剂经复溶后，脂质纳米颗粒的平均粒径增长不超过 100%。在一些实施方案，所述脂质纳米颗粒的平均粒径增长不超过 80%。在一些实施方案，所述脂质纳米颗粒的平均粒径增长不超过 60%。

15 在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或冻干制剂，在冻干出箱后即刻检测 mRNA 完整性，其中 mRNA 的完整性不低于 75%，或 mRNA 的完整性不低于 80%，或 mRNA 的完整性不低于 85%，或 mRNA 的完整性不低于 86%，或 mRNA 的完整性不低于 87%，或 mRNA 的完整性不低于 88%，或 mRNA 的完整性不低于 89%，或 mRNA 的完整性不低于 90%。所述即刻检验为出箱后 1h 内进行检测。

20 在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物或冻干制剂，冻干出箱后在 37℃ 放置 72h 后检测 mRNA 完整性，其中 mRNA 的完整性不低于 75%，或 mRNA 的完整性不低于 80%，或 mRNA 的完整性不低于 85%，或 mRNA 的完整性不低于 86%，或 mRNA 的完整性不低于 87%，或 mRNA 的完整性不低于 88%，或 mRNA 的完整性不低于 89%，或 mRNA 的完整性不低于 90%。

25 本公开提供了一种复溶溶液，所述复溶溶液是通过将前述冻干组合物或制剂经复溶剂复溶制备获得。在某些实施方案中，所述的复溶溶液选自但不限于注射用水，生理盐水、葡萄糖溶液或下述复溶剂。

另一方面，本公开还提供一种药物组合物，包含脂质纳米颗粒、复溶剂。

另一方面，本公开还提供一种药物组合物，包含冻干组合物、复溶剂。

30 另一方面，本公开还提供一种药物组合物，包括脂质纳米颗粒、氯化钠和复溶剂。

本公开提供了一种制备前述药物组合物的方法，包括在制备冻干组合物中添加或使用氯化钠。本公开提供了一种制备前述药物组合物的方法，包括将冻干组合物或制剂复溶的步骤。

35 本公开提供了一种制备复溶溶液的方法，其包含制备前述的冻干组合物，所述冻干组合物经冷冻干燥处理，得到所述冻干制剂；以及，

所述冻干制剂经复溶得到所述复溶溶液。

本公开提供了一种制备冻干制剂的方法，其包含制备前述的冻干组合物，所述冻干组合物经冷冻干燥处理，得到所述冻干制剂。

在一些实施方案中，本所述的复溶剂包含分散剂。

5 在一些实施方案中，本公开所述的分散剂可选自泊洛沙姆、聚乙烯醇、羟乙基纤维素、聚乙二醇、聚山梨酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、脂肪酸山梨坦、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯氢化蓖麻油、N-烷基吡咯烷酮。

10 在一些实施方案中，本公开所述的分散剂可选自泊洛沙姆 188、聚乙烯醇、羟乙基纤维素、聚乙二醇 400、聚山梨酯 20（吐温 20）、月桂酸山梨坦（司盘 20）、聚氧乙烯单硬脂酸酯（卖泽 45）、聚氧乙烯月桂醇醚（苿泽 35）、N-乙基吡咯烷酮（NMP）。

在一些实施方案中，本公开所述的分散剂可选自泊洛沙姆 188。

在一些实施方案中，本公开所述的分散剂占复溶剂的重量百分比为 0.01-5.0%。

在一些实施方案中，本公开所述的分散剂占复溶剂的重量百分比为 0.01-3.0%。

15 在一些实施方案中，本公开所述的分散剂占复溶剂的重量百分比为 0.05-3.0%。

在一些实施方案中，本公开所述的分散剂占复溶剂的重量百分比为 0.05-2.0%。

在一些实施方案中，本公开所述的分散剂占复溶剂的重量百分比为 0.05-1.0%。

在一些实施方案中，本公开所述的复溶剂中还包含增粘剂。

20 在一些实施方案中，本公开所述的增粘剂可选自黄原胶（Xc）、聚维酮（PVP）、透明质酸钠（HA）、羧甲基纤维素钠（CMC-Na）、壳聚糖（CTS）。

在一些实施方案中，本公开所述的增粘剂可选自黄原胶（Xc）、聚维酮（PVP）、透明质酸钠（HA）、羧甲基纤维素钠（CMC-Na）。

在一些实施方案中，本公开所述的聚维酮（PVP）为聚维酮 K90（PVP-K90）。

在一些实施方案中，本公开所述的增黏剂占复溶剂的重量百分比为 0.01-5.0%。

25 在一些实施方案中，本公开所述的增黏剂占复溶剂的重量百分比为 0.01-3.0%。

在一些实施方案中，本公开所述的增黏剂占复溶剂的重量百分比为 0.05-3.0%。

在一些实施方案中，本公开所述的增黏剂占复溶剂的重量百分比为 0.05-2.0%。

本公开还提供一种制品，其包括容器，该容器中装有如前述的脂质纳米颗粒、如前述的冻干组合物、如前述的药物组合物或如前述的复溶溶液。

30 本公开还提供一种制品，包含：

1) 前述的冻干组合物或冻干制剂，和，

2) 复溶剂。

本公开还提供一种喷雾制剂，包含前述冻干组合物、冻干制剂或复溶溶液。

在某些实施方案中，所述制品包含独立包装的冻干组合物或制剂和复溶剂。

35 在某些实施方案中，所述容器为中性硼硅玻璃管制注射剂瓶或雾化给药的装置。在某些实施方案中，所述制品中包含药品说明书。

本公开提供的如前述的脂质纳米颗粒、如前述的冻干组合物、如前述的药物组合物或如前述的复溶溶液具有良好的稳定性，粒径增长可控，mRNA 表达优异。

本公开还提供如前述的脂质纳米颗粒、如前述的冻干组合物、如前述的药物组合物或如前述的复溶溶液，其用于治疗或缓解疾病或病症的药物。

5 在一些实施方案中，前述任一脂质纳米颗粒中包含核酸构建体。所述核酸构建体包含：至少一个可调节目的基因表达的核酸元件，所述核酸元件为 UTR。以及，所述核酸构建体可含有一个或多个目的基因，所述目的基因例如为 HGF。

核酸构建体

10 本公开提供核酸构建体，其包含：

- (a) 开放阅读框(ORF)，和
- (b) 非翻译区元件(UTR)。

一些实施方案中，核酸构建体为 DNA 分子；一些实施方案中，核酸构建体为 RNA 分子(例如，mRNA)。

15 一些实施方案中，所述 ORF 为编码目的基因的多核苷酸序列。

一些实施方案中，所述目的基因为异源的。另一些实施方案中，所述目的基因为内源的。一些实施方案中，所述目的基因为一个或多个(例如，2、3、4 个)。

一些实施方案中，所述 UTR 源自基因 ACTG1、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、FAM166A、NDUFB9、CHCHD10、SLC38A2、NDUFA11、NDUFV3、PRDX5、GUK1、IAH1、ABHD16A、SLC25A39、ATPIF1、ANAPC11、CCDC12、MRPL14 或 APOA1BP 的 UTR。一些实施方案中，上述基因是人基因。

20 一些实施方案中，所述 UTR 为 3'非翻译区元件(3'UTR)或 5'非翻译区元件(5'UTR)。

一些实施方案中，所述 3'UTR 和 5'UTR 是相同或不同来源的，例如源自相同或不同的基因。例如，3'UTR 源自基因 ACTG1 的 3'UTR，5'UTR 源自基因 ACTG1 的 5'UTR。又例如，3'UTR 源自基因 CTSB 的 3'UTR，5'UTR 源自基因 CHCHD10 的 5'UTR。一些实施方案中，所述 5'UTR 和 3'UTR 源自相同物种或不同物种。

一些实施方案中，所述 5'UTR 位于 ORF 的上游。一些实施方案中，所述核酸构建体中的 5'UTR 位于 ORF 的 5'末端。一些实施方案中，所述 3'UTR 位于 ORF 的下游。一些实施方案中，所述核酸构建体中的 3'UTR 位于 ORF 的 3'末端。

30 一些实施方案中，前述核酸构建体中，其包含：

- (a) 开放阅读框(ORF)，
- (b-1) 3'UTR，所述 3'UTR 源自基因 ACTG1、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、FAM166A 或 NDUFB9 的 3'UTR；和

35 (b-2) 5'UTR，所述 5'UTR 源自基因 ACTG1、ATP6V0B、ATP6V0E1、CFL1、COX4I1、CTSB、FAM166A、NDUFB9、CHCHD10、SLC38A2、NDUFA11、NDUFV3、

PRDX5、GUK1、IAH1、ABHD16A、SLC25A39、ATPIF1、ANAPC11、CCDC12、MRPL14 或 APOA1BP 的 5'UTR。

一些实施方案中，前述核酸构建体中，其包含：

(a) 开放阅读框(ORF)，

5 (b-1) 3'UTR，所述 3'UTR 源自基因 CTSB、FAM166A 或 NDUFB9 的 3'UTR；
和

(b-2) 5'UTR，所述 5'UTR 源自基因 ACTG1、CHCHD10 或 NDUFA11 的 5'UTR。

一些实施方案中，前述核酸构建体(例如，DNA 或 RNA 分子)中，所述 3'UTR
源自基因 ACTG1 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:58 所示或与之任
10 一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 ATP6V0B 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:2、3 或 SEQ
ID NO:59、60 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 ATP6V0E1 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:4、5 或 SEQ
ID NO:61、62 所示或与之任一具有同一性的序列；

15 所述 3'UTR 源自基因 CFL1 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:6、7、8 或 SEQ ID
NO:63、64、65 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 COX4I1 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:9、10、11 或
SEQ ID NO:66、67、68 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 CTSB 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69
20 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 3'UTR 源自基因 FAM166A 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID
NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列；或

所述 3'UTR 源自基因 NDUFB9 的 3'UTR，其含有 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID
NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列。

25 一些实施方案中，前述核酸构建体(例如，DNA 或 RNA 分子)中，所述 5'UTR
源自基因 ACTG1 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之
任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 ATP6V0B 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:16、17 或 SEQ
ID NO:73、74 所示或与之任一具有同一性的序列；

30 所述 5'UTR 源自基因 ATP6V0E1 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:18、19 或 SEQ
ID NO:75、76 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 CFL1 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:20、21、22 或 SEQ
ID NO:77、78、79 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 COX4I1 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:23、24、25 或
35 SEQ ID NO:80、81、82 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 CTSB 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:83

所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 FAM166A 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:84 所示或与之任一具有同一性的序列；

5 所述 5'UTR 源自基因 NDUFB9 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:85 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 CHCHD10 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:29、30 或 SEQ ID NO:86、87 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 SLC38A2 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:88 所示或与之任一具有同一性的序列；

10 所述 5'UTR 源自基因 NDUFA11 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 NDUFV3 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:90 所示或与之任一具有同一性的序列；

15 所述 5'UTR 源自基因 PRDX5 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:34 或 SEQ ID NO:91 所示的序列；

所述 5'UTR 源自基因 GUK1 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:35、36、37 或 SEQ ID NO:92、93、94 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 IAH1 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:95 所示或与之任一具有同一性的序列；

20 所述 5'UTR 源自基因 ABHD16A 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:39 或 SEQ ID NO:96 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 SLC25A39 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:40 或 SEQ ID NO:97 所示或与之任一具有同一性的序列；

25 所述 5'UTR 源自基因 ATP1F1 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:41 或 SEQ ID NO:98 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 ANAPC11 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:42、43 或 SEQ ID NO:99、100 所示或与之任一具有同一性的序列；

所述 5'UTR 源自基因 CCDC12 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:101 所示或与之任一具有同一性的序列；

30 所述 5'UTR 源自基因 MRPL14 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:102 所示或与之任一具有同一性的序列；或

所述 5'UTR 源自基因 APOA1BP 的 5'UTR，其含有 SEQ ID NO:46、47 或 SEQ ID NO:103、104 所示或与之任一具有同一性的序列。

一些实施方案中，提供核酸构建体(例如，DNA 或 RNA 分子)，其包含：

35 (a) 开放阅读框(ORF)，

(b-1) 3'UTR，和

(b-2) 5'UTR;

其中, 所述 3'UTR 和 5'UTR 选自如下任一组合:

- 1) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:58 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
5 或与之任一具有同一性的序列;
- 2) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:59 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 3) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:60 所示或与之任一具有同一
10 性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 4) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:61 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 15 5) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:62 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 6) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:63 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
20 或与之任一具有同一性的序列;
- 7) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:64 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 8) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:65 所示或与之任一具有同一
25 性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 9) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:66 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 30 10) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:67 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
或与之任一具有同一性的序列;
- 11) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:68 所示或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示
35 或与之任一具有同一性的序列;
- 12) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同

一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列；

13) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列；

14) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一或 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有同一性的序列；

15) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同一性的序列；

16) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:73 所示或与之任一具有同一性的序列；

17) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:74 所示或与之任一具有同一性的序列；

18) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:75 所示或与之任一具有同一性的序列；

19) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:76 所示或与之任一具有同一性的序列；

20) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:77 所示或与之任一具有同一性的序列；

21) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:78 所示或与之任一具有同一性的序列；

22) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:79 所示或与之任一具有同一性的序列；

23) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:80 所示或与之任一具有同一性的序列；

24) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与

之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:24 或 SEQ ID NO:81 所示或与之任一具有同一性的序列；

25) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:82 所示
5 或与之任一具有同一性的序列；

26) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:83 所示或与之任一具有同一性的序列；

27) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:84 所示
10 或与之任一具有同一性的序列；

28) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:85 所示或与之任一具有同一性的序列；

29) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示
15 或与之任一具有同一性的序列；

30) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示
20 或与之任一具有同一性的序列；

31) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:88 所示或与之任一具有同一性的序列；

32) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示
25 或与之任一具有同一性的序列；

33) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:90 所示或与之任一具有同一性的序列；

34) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:34 或 SEQ ID NO:91 所示
30 或与之任一具有同一性的序列；

35) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:35 或 SEQ ID NO:92 所示
35 或与之任一具有同一性的序列；

36) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列；

之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:36 或 SEQ ID NO:93 所示或与之任一具有同一性的序列；

37) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:37 或 SEQ ID NO:94 所示或与之任一具有同一性的序列；

38) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:95 所示或与之任一具有同一性的序列；

39) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:39 或 SEQ ID NO:96 所示或与之任一具有同一性的序列；

40) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:40 或 SEQ ID NO:97 所示或与之任一具有同一性的序列；

41) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:41 或 SEQ ID NO:98 所示或与之任一具有同一性的序列；

42) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:42 或 SEQ ID NO:99 所示或与之任一具有同一性的序列；

43) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:100 所示或与之任一具有同一性的序列；

44) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:101 所示或与之任一具有同一性的序列；

45) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:102 所示或与之任一具有同一性的序列；

46) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:46 或 SEQ ID NO:103 所示或与之任一具有同一性的序列；或

47) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一或 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:104 所示或与之任一具有同一性的序列。

一些实施方案中，提供核酸构建体(例如，DNA 或 RNA 分子)，其包含：

(a) 开放阅读框(ORF),

(b-1) 3'UTR, 和

(b-2) 5'UTR;

所述 3'UTR 源自基因 CTSB、FAM166A 或 NDUFB9 的 3'UTR, 所述 5'UTR
5 源自基因 ACTG1、CHCHD10 或 NDUFA11 的 5'UTR;

例如, 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12、13、14 任一或 SEQ ID NO:69、70、
71 任一或与之任一具有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15、29、30、
32 任一或 SEQ ID NO:72、86、87、89 任一或与之任一具有同一性的序列;

又例如, 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具
10 有同一性的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一
具有同一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同
一性的序列,

15 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:72 所示或与之任一具有同
一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示或与之任一具有同
20 一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示或与之任一具有同
一性的序列,

25 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:86 所示或与之任一具有同
一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示或与之任一具有同
一性的序列,

30 所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示或与之任一具有同
一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性
的序列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:87 所示或与之任一具有同
35 一性的序列,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:69 所示或与之任一具有同一性

的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列，

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:70 所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列，或

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:71 所示或与之任一具有同一性的序列，所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:89 所示或与之任一具有同一性的序列。

以上实施方案中，“具有同一性”涵盖具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性、以及前述任意两个数值之间的范围，包括整数和小数。例如“具有至少 90%同一性”或“具有至少 95%同一性”。

一些实施方案中，所述 3'UTR 和/或 5'UTR 为上述 3'UTR 和/或 5'UTR 的变体，所述变体例如为截短体、核苷酸突变体，所述变体仍然保持与前述本公开的 3'UTR 和/或 5'UTR 相似的活性或功能，例如仍然保持调控 ORF 编码目的基因表达蛋白的功能。

一些实施方案中，前述本公开提供的核酸构建体中，还包含：

(c) 多聚腺苷酸(poly-A)尾。

一些具体实施方案中，所述核酸构建体中的 poly-A 尾位于 3'UTR 的下游。一些具体实施方案中，所述核酸构建体中的 poly-A 尾位于 3'UTR 的 3'末端。一些具体实施方案中，所述 poly-A 尾在所述核酸构建体的 3'末端。一些具体实施方案中，poly-A 尾的长度为至少约 50、100、120、150、200、300、400、500 个核苷酸。

一些具体实施方案中，所述 poly-A 尾选自 A120、A30L70、HGH polyA、SV40polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或 SV40late polyA。例如，所述 A30L70 为 SEQ ID NO:52 所示的序列；所述 A120 包含 120 个腺嘌呤核苷酸。

一些实施方案中，前述本公开提供的核酸构建体中，表达的目的基因(即，开放阅读框 ORF)为肝细胞生长因子(HGF)、抗体或其抗原结合片段。例如，与肿瘤抗原结合的抗体或其抗原结合片段、与病毒抗原结合的抗体或其抗原结合片段等。

一些具体实施方案中，所述 ORF 编码的多肽或蛋白是荧光蛋白或荧光素酶(luciferase)，例如 SEQ ID NO:126 所示的序列。

一些具体实施方案中，所述 HGF 为人肝细胞生长因子(hHGF)。

一些具体实施方案中，hHGF 的编码序列包含选自如下 1)-3)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列；

2) 如 SEQ ID NO: 110-113 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列；

3) 如 SEQ ID NO:128-131 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、

96%、97%、98%、99%、100%同一性的 RNA 序列。

一些具体实施方案中，所述表达 HGF 作为目的基因的核酸构建体中包含 SEQ ID NO:115、116、127 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的序列。

5 一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

一些具体实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的编码序列包含选自如下 1)-4)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，和编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列；

2) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列中 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，和编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列中 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如，是根据 Kabat 编号系统定义的；

3) 如 SEQ ID NO: 119 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列，和如 SEQ ID NO: 120 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列；

4) 如 SEQ ID NO: 121 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列，和如 SEQ ID NO: 122 所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列。

25 一些具体实施方案中，所述表达抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的核酸构建体中包含 SEQ ID NO:124 和 125 所示的序列，或与 SEQ ID NO:124 和 125 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的序列。

一些实施方案中，前述本公开提供的核酸构建体为 DNA 或 RNA，例如，为 mRNA。

30 一些实施方案中，从 5'至 3'方向上，前述本公开提供的核酸构建体(DNA 或 RNA)含有如下 1)-6)中任一：

- 1) 5'UTR，和 ORF；
- 2) ORF，和 3'UTR；
- 3) 5'UTR，ORF，和 3'UTR；
- 35 4) 5'UTR，ORF，3'UTR，和 poly-A 尾巴；
- 5) 5'UTR，ORF，和 poly-A 尾巴；

6) ORF, 3'UTR, 和 poly-A 尾巴;

所述 5'UTR 和 3'UTR 可以源自相同或不同的基因。

一些实施方案中,从 5'至 3'方向上,前述本公开提供的核酸构建体(DNA) 含有如下 1)-4)中任一:

- 5 1) 5'UTR, 和 ORF;
 2) ORF, 和 3'UTR;
 3) 5'UTR, ORF, 和 3'UTR;
 4) 5'UTR, ORF, 3'UTR, 和 poly-A 尾巴;

所述 5'UTR 和 3'UTR 可以源自相同或不同的基因。

- 10 一些具体实施方案中,所述 1)、3)、4)中的 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:15-47 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述 1)-4)中的 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:110 所示或其密码子优化的核苷酸序列(例如 SEQ ID NO:111-113)。一些具体实施方案中,所述 1)-4)中的 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:119 和 120 所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述 2)-4)中的 3'UTR 包含或为如 SEQ ID
15 NO:1-14 任一所示的核苷酸序列。

一些实施方案中,前述本公开提供的核酸构建体(RNA 或 mRNA)还包含:

(d) 5'帽结构(5'Cap)。

- 一些具体实施方案中,所述 RNA 分子中的 5'Cap 结构位于 5'UTR 的上游。一些实施方案中,所述 RNA 分子中的 5'Cap 结构位于 5'UTR 的 5'末端。在一些实
20 施方案中,5'帽结构是本领域技术人员已知的帽结构,如 Cap0(第一个核碱基的甲基化,例如 m⁷GpppN)、Cap1(m⁷GpppN 的相邻核苷酸的核糖的额外甲基化,例如 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG)、Cap2(m⁷GpppN 下游第 3 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、Cap3(m⁷GpppN 下游第 3 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、Cap4(m⁷GpppN 下游第 4 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、ARCA(抗反向帽类似物)、修饰的
25 ARCA(例如,硫代磷酸酯修饰的 ARCA)、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟代-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和 2-叠氮基-鸟苷。

一些具体实施方案中,使用化学 RNA 合成或 RNA 体外转录(共转录加帽)形成 5' Cap 结构(如 Cap0 或 Cap1)。

- 一些具体实施方案中,使用加帽酶(例如牛痘病毒加帽酶和/或帽依赖性 2'-O 甲基转移酶)经由酶促加帽来形成 5'-帽结构(如 Cap0 或 Cap1)。一些实施方案中,使用固定化加帽酶,添加 5'帽结构(Cap0 或 Cap1)。此处全文引入 WO2016/193226 中的加帽方法和手段。

- 一些具体实施方案中,所述 5'Cap 选自 ARCA、3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU、m⁷Gppp(A2'O-MOE)pG、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、
35 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG 、 m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeG)pG 或 m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。一些具体实施方案中,所述 5'Cap 为 3'-O-

Me-m⁷G(5')ppp(5')G 或 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。

一些实施方案中,从 5'至 3'方向上,前述本公开提供的核酸构建体(RNA 或 mRNA)含有如下 1)-5)中任一:

- 1) 5'UTR, 和 ORF;
 - 2) ORF, 和 3'UTR;
 - 3) 5'UTR, ORF, 和 3'UTR;
 - 4) 5'UTR, ORF, 3'UTR, 和 poly-A 尾巴;
 - 5) 5'Cap, 5'UTR, ORF, 3'UTR, 和 poly-A 尾;
- 所述 5'UTR 和 3'UTR 可以源自相同或不同的基因。

一些具体实施方案中,所述 1)、3)、4)、5)中的 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:72-104 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述 1)-5)中的 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:128-131 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述 2)-5)中的 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:58-71 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,结构包括但不限于 Cap0、Cap1(例如 m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG)、Cap2、Cap3、Cap4、ARCA。

一些实施方案中,本公开提供核酸构建体(DNA),从 5'至 3'方向上,依次包含 5'UTR、ORF、3'UTR,可选地,可在 3'方向上进一步包含 poly-A 尾。一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:15-47 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:110 所示或其密码子优化的核苷酸序列(例如 SEQ ID NO:111-113),所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:1-14 任一所示的核苷酸序列。一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:15-47 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:119 和 120 所示的核苷酸序列,所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:1-14 任一所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述核酸构建体包含如 SEQ ID NO:115、116 或 127 所示的核苷酸序列。

一些实施方案中,本公开提供核酸构建体(RNA 或 mRNA),从 5'至 3'方向上,依次包含 5'UTR、ORF、3'UTR,可选地,可在 3'方向上进一步包含 poly-A 尾。一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:72-104 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:128-131 任一所示的核苷酸序列,所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:58-71 任一所示的核苷酸序列,和所述 poly-A 尾巴包含或为 120 个连续的腺苷酸或如 SEQ ID NO:52 所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述核酸构建体包含如 SEQ ID NO:132 所示的核苷酸序列。

一些实施方案中,所述 5'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:72-104 任一所示的核苷酸序列,所述 ORF 包含或为如 SEQ ID NO:121 和 122 所示的核苷酸序列,所述 3'UTR 包含或为如 SEQ ID NO:58-71 任一所示的核苷酸序列,和所述 poly-A 尾巴包含或为 120 个连续的腺苷酸或如 SEQ ID NO:52 所示的核苷酸序列。一些具体实施方案中,所述核酸构建体包含如 SEQ ID NO:124 或 125 所示的核苷酸序列。

一些实施方案中，前述任一种核酸构建体(DNA 或 RNA 分子)，其中，所述 UTR 用于提高所述 ORF 表达蛋白的表达水平。示例性地，一些具体的实施方案中，与 SEQ ID NO:48 或 50 所示的 5'UTR 相比，本公开中 SEQ ID NO:15-47、72-104 任一序列所示的 5'UTR 具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。一些具体的
5 实施方案中，与 SEQ ID NO:49 或 51 所示的 5'UTR 相比，本公开中 SEQ ID NO:1-14、58-71 任一序列所示的 3'UTR 具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。一些具体的实施方案中，与 SEQ ID NO:48 和 49 所示的 5'UTR 和 3'UTR 的组合相比，本公开中 SEQ ID NO:15-47、72-104 任一序列所示的 5'UTR，与 SEQ ID NO:1-14、58-71 任一序列所示的 3'UTR 的组合，具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。一些具体的实施方案中，与 SEQ ID NO:50 和 51 所示的 5'UTR 和 3'UTR 的组合相比，本公开中 SEQ ID NO:15-47、72-104 任一序列所示的 5'UTR，与 SEQ ID NO:1-14、58-71 任一序列所示的 3'UTR 的组合，具有提高的调控 ORF 表达目标蛋白的表达量。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体，其表达目标蛋白的表达量是 BioN
15 载体的约 1-约 20 倍，例如约 1 倍、约 1.1 倍、约 1.2 倍、约 1.3 倍、约 1.4 倍、约 1.5 倍、约 1.6 倍、约 1.7 倍、约 1.8 倍、约 1.9 倍、约 2 倍、约 2.1 倍、约 2.3 倍、约 2.5 倍、约 2.8 倍、约 3 倍、约 3.2 倍、约 3.4 倍、约 3.8 倍、约 4 倍、约 4.5 倍、约 5 倍、约 5.2 倍、约 5.5 倍、约 5.8 倍、约 6 倍、约 7 倍、约 8 倍、约 10 倍、约 12 倍、约 15 倍等。一些具体的实施方案中，本公开中的核酸构建体为表达目标蛋白的 mRNA 分子，所述 mRNA 分子表达目标蛋白的表达量是 BioN 载体的约 1-约 20 倍。一些具体的实施方案中，所述 BioN 载体包含 SEQ ID NO:50 或 107 所示的 5'UTR；和/或，包含 SEQ ID NO:51 或 108 所示的 3'UTR。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体，其表达目标蛋白的表达量是 Mod
25 载体的约 1-约 20 倍，例如约 1 倍、约 1.1 倍、约 1.2 倍、约 1.3 倍、约 1.4 倍、约 1.5 倍、约 1.6 倍、约 1.7 倍、约 1.8 倍、约 1.9 倍、约 2 倍、约 2.1 倍、约 2.3 倍、约 2.5 倍、约 2.8 倍、约 3 倍、约 3.2 倍、约 3.4 倍、约 3.8 倍、约 4 倍、约 4.5 倍、约 5 倍、约 5.2 倍、约 5.5 倍、约 5.8 倍、约 6 倍、约 7 倍、约 8 倍、约 10 倍、约 12 倍、约 15 倍等。一些具体的实施方案中，本公开中的核酸构建体为表达目标蛋白的 mRNA 分子，所述 mRNA 分子表达目标蛋白的表达量是 BioN 载体的约 1-约 20 倍。一些具体的实施方案中，所述 Mod 载体包含 SEQ ID NO:48 或 105 所示的 5'UTR；和/或，包含 SEQ ID NO:49 或 106 所示的 3'UTR。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体被递送于受试者体内，在约 0.5-1.5h 后表达目标蛋白(例如，hHGF 蛋白)。一些实施方案中，本公开中的核酸构建体被递送于受试者体内，在约 2h-10h(例如，约 2h、约 3h、约 4h、约 5h、约 6h、约 7h、
35 约 8h、约 10h 等)达到表达峰值。一些具体的实施方案中，本公开中的核酸构建体为表达目标蛋白的 mRNA 分子，例如，所述核苷酸构建体为表达 hHGF 蛋白的

mRNA 分子。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体被递送于受试者体内，具有高于 Collatogene 质粒的药代动力学性能。一些具体的实施方案中，核酸构建体为 mRNA 分子，所述 mRNA 分子与 Collatogene 质粒相比，具有提高的药代动力学性能(例如，C_{max}、AUC_{0-inf}、MRT_{0-inf})。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，能够改善缺血受试者血下肢的血流灌注比率。示例性地，注射 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF) 的下肢缺血小鼠可实现改善的血流灌注比率。其中，注射约 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)的下肢缺血小鼠可实现恢复至约 90%以上的血流灌注。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，能够改善诱导下肢缺血的受试者的缺血性坏死。示例性地，注射 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)的下肢缺血小鼠的下肢均能保持良好的完整性且并未出现下肢坏死情况。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，可促进各组缺血下肢肌肉中的血管新生。示例性地，在给予 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)治疗的情况下，均可显著促进各组缺血下肢肌肉中的血管新生，且新生血管数量相对 PBS 组具有明显的统计学差异($p < 0.05$)。

一些实施方案中，本公开中的核酸构建体(例如，表达 hHGF 蛋白的 m-A16-B12 (hHGF))，能够改善糖尿病受试者的创面愈合。示例性地，在注射 50 ng/只、200 ng/只和 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)的 Db/Db 糖尿病小鼠模型，小鼠的创面均得到良好的愈合。其中，在第 14 天，50 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)创面愈合率达 66 %，200 ng/只和 500 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)能够实现 100 %的伤口愈合。

本公开提供的 mRNA，其含有新结构的 5'UTR、3'UTR，使得 mRNA 的早期降解降低或稳定降解，但不损失更或增强蛋白翻译效率。所述 mRNA 稳定性更高，可应用于基因治疗、基因接种疫苗。以及，本公开提供能够表达人肝细胞生长因子 (Human Hepatocyte growth factor, hHGF) 的 mRNA，及其脂质纳米颗粒(Lipid nanoparticles, LNP)递送系统，可以实现外源 hHGF 蛋白在体内高效、快速转化，具有无整合风险、易于工业级放大的优点，是较裸质粒更为理想的治疗方案，可用作 CLI、DFU 等多种疾病的基因治疗药物。

多核苷酸

本公开还提供经分离的多核苷酸，其包含(a) 开放阅读框(ORF)。示例性地，开放阅读框(ORF)编码肝细胞生长因子(HGF)，例如人肝细胞生长因子(hHGF)。

一些实施方案中，所述 hHGF 的编码序列包含选自如下 1)-3)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的核酸序列或其密码子优化的序

列；

2) 如 SEQ ID NO: 110-113 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 DNA 序列；

3) 如 SEQ ID NO:128-131 任一所示或与之具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的 RNA 序列。

一些具体实施方案中，所述多核苷酸的 5'端可以包含前述本公开提供的任意 5'UTR，和/或所述多核苷酸的 3'端可以包含前述本公开提供的任意 3'UTR。

一些具体实施方案中，所述多核苷酸的 5'端可以包含前述本公开提供的任意 5'Cap，和/或所述多核苷酸的 3'端可以包含前述本公开提供的任意 poly-A 尾。

一些实施方案中，所述多核苷酸是 RNA，例如 mRNA。

修饰

为了进一步改善本公开的 RNA 或多核苷酸的关于蛋白质表达的稳定性的，所述 RNA 或多核苷酸可进一步包含一种或多种修饰(包括化学修饰)，例如骨架修饰、糖修饰、碱基修饰和/或脂质修饰等。在一些实施方案中，所述 RNA 或多核苷酸被均匀地修饰成某个特定修饰(例如，在整个序列中完全修饰)。例如，可以用假尿苷(例如，N1-甲基假尿苷)均匀地修饰 RNA，使得序列中的每个 U 是假尿苷。

与本公开有关的骨架修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含的核苷酸的骨架的磷酸酯的化学修饰。一些实施方案中，所述骨架修饰包括但不限于用修饰的磷酸酯完全取代骨架中未修饰的磷酸酯部分，例如可以通过用不同的取代基取代一个或多个氧原子来修饰主链的磷酸基团。一些实施方案中，所述修饰的磷酸酯包括但不限于硫代磷酸酯、亚磷酸硒酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯、磷酸氢酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基磷酸酯和磷酸三酯。

与本公开有关的糖修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含的核苷酸的糖的化学修饰。一些实施方案中，所述糖修饰包括但不限于将 RNA 分子的 2'羟基(OH)修饰或替换为许多不同的“氧基”或“脱氧”取代基。一些实施方案中，所述“氧基”修饰包括但不限于烷氧基、芳氧基、聚乙二醇(PEG)等的取代修饰。一些实施方案中，“脱氧”修饰包括但不限于氢、氨基(例如 NH₂、烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸)修饰。

与本公开有关的碱基修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含的核苷酸的碱基部分的化学修饰。一些实施方案中，所述碱基修饰包括对核苷酸中腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶的修饰。例如，本文所述的核苷和核苷酸可在主凹槽表面上被化学修饰。一些实施方案中，主要的凹槽化学修饰可包括氨基、硫醇基、烷基或卤素基团。一些实施方案中，所述碱基修饰包括但不限于用假尿苷、1-甲基-伪尿苷、5-氮杂胞苷、5-甲基胞嘧啶-5'-三磷酸或 2-甲氧基腺嘌呤修饰。一些实施方案中，所述碱基修饰为假尿苷修饰。例如，可以用假尿苷均匀地修饰 RNA，使得序列中的每个 U 是假尿苷。

与本公开有关的脂质修饰是指本公开 RNA 或多核苷酸中包含脂质修饰。一些实施方案中,所述脂质修饰包括但不限于本公开的 RNA 或多核苷酸共价连接至少一个接头,以及相应的接头与至少一个脂质共价连接。一些实施方案中,所述脂质修饰包括但不限于本公开的 RNA 或多核苷酸与至少一个脂质共价连接(无接头)。

5 UTRs

UTRs(5'UTR 和/或 3'UTR)可以作为侧翼区域提供给本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸分子。UTRs 可以与在本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸分子中的编码区同源或异源。侧翼区域可以包含一个或多个 5'UTR 和/或 3'UTR,所述 UTRs 可以是相同的或不同的序列。侧翼区域的任何部分可以进行密码子优化。
10 在密码子优化之前和/或之后,侧翼区域的任何部分可以独立地包含一个或多个不同的结构或化学修饰。

为了改变本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸的一种或多种特性,将与本公开的 ORF 异源的 UTRs 引入或工程化合成到本公开的核酸构建体、RNA 或多核苷酸中。然后将所述重组核酸构建体、RNA 或多核苷酸施用于细胞、组织或生物
15 体,并测量结果,如蛋白质水平、定位和/或半衰期,以评估异源 UTR 对本公开的、RNA 或多核苷酸产生的有益影响。一些实施方案中,所述 UTR 包括野生 UTR 或其变体,所述 UTR 变体包括在末端添加或去除一个或多个核苷酸,包括 A、T、C 或 G。一些实施方案中,所述 UTR 变体也包括任何方式进行的密码子优化或修改。一些实施方案中,所述 UTR 变体也包括本公开任何实施方式的衍生序列,例如在
20 天然 UTR 序列的基础上,将部分核苷酸进行点突变,突变后的变体的对目的基因表达量、稳定性维持不变或得到提高。所述对目的基因表达量、稳定性的检测方法是本领域常规的,例如本公开实施例 3、4 中的检测方法。

载体

本公开还提供载体,其包含前述任一项所述的核酸构建体、RNA 或多核苷酸。
25 其中核酸构建体、RNA 或多核苷酸可存在于载体中和/或可为载体的一部分,该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可为表达载体,即可提供核酸构建体、RNA 或多核苷酸编码多肽表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸,其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员
30 的常识。对本公开的编码多肽的表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、终止子、选择标记物、前导序列、报告基因等。

一些实施方案中,所述载体是能表达本公开目的基因(例如 HGF)的治疗载体,例如质粒(例如裸质粒),腺病毒载体,腺相关病毒载体,和慢病毒载体。

本公开的核酸构建体可基于本公开的核苷酸序列的信息通过已知的方式(例如
35 通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得,和/或可从适合的天然来源加以分离。

一些实施方案中，本公开的载体还包含启动子，例如所述启动子在所述核酸构建体 5'UTR 的 5'末端，例如所述启动子为 T7 启动子、T7 lac 启动子、Tac 启动子、Lac 启动子、Trp 启动子。

宿主细胞

5 本公开还提供一种宿主细胞，其包含前述任一项所述的核酸构建体、RNA 或多核苷酸。一些实施方案中，所述细胞能够表达一种或多种本公开核酸构建体、RNA 或多核苷酸编码的多肽。一些实施方案中，所述宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

生产或制备方法

25 本公开提供一种制备本公开核酸构建体、RNA 或多核苷酸的方法，以及制备其编码多肽的方法。

用于制备产生核酸构建体、RNA 或多核苷酸，及其编码多肽的方法及试剂，例如特定适合载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本公开的编码多肽的方法中的蛋白分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。

30 一些实施方案中，所述制备核酸构建体或多核苷酸的方法包括培养前述的宿主细胞，并从培养物中回收产生的核酸构建体或多核苷酸。本公开的核酸构建体或多核苷酸，及其编码多肽也可以通过本领域已知的其它产生方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

一些实施方案中，制备 RNA 分子的方法包括：制备核酸构建体或载体，然后利用所述核酸构建体或载体进行逆转录，得到 RNA 分子。一些具体的实施方案中，35 所述方法还包括对所述 RNA 分子的 5'端添加 5'Cap。

一些实施方案中，RNA 可进一步包含一种或多种修饰(包括化学修饰)，例如骨架修饰、糖修饰、碱基修饰和/或脂质修饰等。在一些实施方案中，所述 RNA 或多核苷酸被均匀地修饰成某个特定修饰(例如，在整个序列中完全修饰)。例如，可以用假尿苷(例如，N1-甲基假尿苷)均匀地修饰 RNA，使得序列中的每个 U 是假尿苷
5 (例如，N1-甲基假尿苷)。

治疗疾病的方法和制药用途

本公开提供了前述脂质纳米颗粒、冻干组合物、冻干制剂、复溶溶液、喷雾制剂或药物组合物用于制备预防、治疗、缓解上述疾病或症状的药物的制药用途。

10 本公开提供了前述脂质纳米颗粒、冻干组合物、冻干制剂、复溶溶液、喷雾制剂或药物组合物在预防、治疗、缓解疾病或症状中用途和方法。

本公开提供一种预防、治疗、缓解疾病或症状的方法，包括给患者或受试者施用预防和/或治疗有效量的前述脂质纳米颗粒、冻干组合物、冻干制剂、复溶溶液、喷雾制剂或药物组合物。

15 一些实施方案中，包括向有需要的受试者施用有效量的前述脂质纳米颗粒、冻干组合物、冻干制剂、复溶溶液、喷雾制剂或药物组合物的方法，用于预防、治疗、缓解疾病或症状。

一些实施方案中，所述疾病或症状选自选自缺血性疾病、代谢综合征、糖尿病及其并发症、再狭窄，以及神经损伤；

20 优选地，所述缺血性疾病选自冠状动脉疾病(CAD)、外周动脉疾病(PAD)、心肌梗死、肢体缺血、血栓闭塞性脉管炎(TAO)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO)；更优选地，所述肢体缺血为下肢缺血，最优选地，所述肢体缺血为严重下肢缺血(CLD)；

优选地，所述糖尿病及其并发症选自糖尿病周围神经病变、糖尿病足(DFU)、
25 糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO)；

优选地，所述再狭窄选自手术后再狭窄、灌注后再狭窄；

优选地，所述神经损伤选自神经退行性疾病、创伤性神经损伤、周围神经病变；更优选地，所述神经退行性疾病选自肌萎缩性侧索硬化(ALS)、帕金森氏病、痴呆病，所述周围神经病变为糖尿病周围神经病变。

30 本公开的药物组合物可以通过胃肠外给药的方式用于治疗需要这种治疗的患者。胃肠外给药途径可选择皮下注射、肌肉注射或静脉注射。

附图说明

图 1A 至图 1C 为载体构建示意图。其中，图 1A 为 5' UTR 元件筛选载体构建的示意图，对照为含有 Moderna 公司的 5' UTR 及 3' UTR 元件的 mRNA 序列，
35 即 5' UTR-Fluc- α 球蛋白 3' UTR-120A(简称为 Mod.)，其 5' -UTR 为人工核酸

序列，3' UTR 源自人 α 球蛋白的 mRNA。构建 5' UTR 筛选载体时，通过合适的酶切位点替换 5' UTR 区域。PmcI 为线性化酶切位点。图 1B 为 3' UTR 元件筛选载体构建的示意图，对照为 Mod.，构建 3' UTR 筛选载体时，通过合适的酶切位点替换 3' UTR 区域。图 1C 为 5' 及 3' UTR 元件组合筛选载体构建的示意图，
5 对照为 Mod.，构建 5' UTR 及 3' UTR 元件组合筛选载体时，通过合适的酶切位点替换 5' 及 3' UTR 区域或全基因合成。

图 2 为本公开不同的 3' UTR 元件在不同细胞系中的效果评估结果。将含有不同 3' UTR 元件的 mRNA 转染至 HEK293、HeLa 和 A549 细胞中，在转染后 24h 检测荧光素酶表达，评估 3' UTR 序列对蛋白表达量的影响。使用 Mod.作为对照，
10 并将 Mod.的表达水平设为 1。结果显示，在不同细胞系中，3' UTR 元件对蛋白表达量的影响具有一致性。

图 3 为本公开不同 3' UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 3' UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。
15 结果显示，编号为 B9、B10、B12、B13、B14 的 3' UTR 元件可显著提高蛋白的表达量。

图 4 为本公开不同 5' UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5' UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。
20 结果显示，编号为 A1、A3-A7、A9-A14 的 5' UTR 元件可显著提高蛋白的表达量。

图 5 为本公开不同 5' UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5' UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。
25 结果显示，编号为 A15、A16、A18-A19、A21、A24、A27、A28、A30-A33 的 5' UTR 元件可显著提高蛋白的表达量。

图 6 为本公开不同 5' UTR 元件对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5' UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h 和 48h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 BioN.作为对照，将其表达水平设为 1。结果显示，编号为 A1、A15、A16 和 A18 的 5' UTR 元件相较于对照的核酸分子均可显著
30 提高蛋白的表达量。

图 7 为本公开 UTR 元件组合对 mRNA 表达效率的影响结果。将含有不同 5' UTR 和 3' UTR 元件的 mRNA 通过脂转染转导至 HEK293 细胞中，在转染 6h、24h、48h 和 72h 后检测荧光素酶的表达水平。使用 Mod.作为对照，将其表达水平设为 1。结果显示，编号为 A1、A15、A16、A18 的 5' UTR 元件与编号为 B12、
35 B13、B14 的 3' UTR 元件进行组合均可显著提高蛋白的表达量。

图 8A 至图 8B 为本公开 UTR 元件组合对不同目的蛋白的表达效率的影响结

果。图 8A 为 HEK293 细胞中, 含有本公开筛选出的 5' UTR 及 3' UTR 元件的 mRNA 对 hHGF 表达量的调控, 结果显示, 相较于对照 Mod., 编号为 A1 A15、A16、A18 的 5' UTR 元件与编号为 B12、B13、B14 的 3' UTR 元件进行组合可显著提高 hHGF 的表达量。图 8B 为 HEK293 细胞中, 含有本公开筛选出的 5' UTR 及 3' UTR 元件的 mRNA 对抗 PD-1 抗体表达量的调控, 结果显示, 相较于对照 Mod., A1-B12、A15-B12 的 UTR 组合可显著提高抗 PD-1 抗体的表达量。

图 9 为本公开 m-A16-B12(hHGF)及对照质粒在小鼠肌肉组织中 hHGF 蛋白表达水平随时间变化的实验结果示意图。结果显示, 注射 m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 质粒均可有效表达 hHGF 蛋白, m-A16-B12 (hHGF)于肌肉注射 1 h 后即可表达 hHGF, 注射后 6 h, 出现 hHGF 的表达峰值, 呈剂量依赖, 且低剂量的 m-A16-B12 (hHGF)即可达到与 Collatogene 表达 AUCinf(hr*pg/mg protein)相当的水平。

图 10A 至图 10B 为本公开 m-A16-B12(hHGF)及对照质粒对下肢缺血小鼠模型治疗效果的结果。图 10A 为表明 m-A16-B12(hHGF)及 Collatogene 质粒对下肢缺血小鼠模型血流灌注影响的研究方案示意图及实验结果照片。图 10B 为表明 m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 质粒对下肢缺血小鼠模型血流灌注比率的统计结果。结果显示, 在 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)和 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒进行治疗的情况下, 各小鼠缺血下肢的血流灌注比率相对于对照组有明显的改善, 且缺血下肢的血流灌注比率随时间的进展逐渐得到恢复; 50 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)组表现出与 200 ng/只 Collatogene 裸质粒组相近的血流恢复效果; 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)组显著优于 200 ng/只 Collatogene 裸质粒组的血流恢复效果, 可实现恢复至 90%以上的血流灌注情况。

图 11A 至图 11B 为本公开 m-A16-B12 (hHGF)及对照质粒对下肢缺血小鼠模型治疗效果的结果。图 11A 为下肢缺血小鼠模型下肢坏死不同程度的评分标准及代表性照片。图 11B 为表明 m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 质粒对下肢缺血小鼠模型下肢坏死影响的统计结果。实验结果显示, 在注射 m-A16-B12 (hHGF)和 Collatogene 裸质粒治疗组中, 各小鼠的下肢均能保持良好的完整性且并未出现下肢坏死情况。

图 12 为本公开 m-A16-B12 (hHGF)及对照质粒对下肢缺血小鼠模型血管新生影响的代表性照片及统计结果。结果显示, 给予 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)和 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒治疗的情况下, 均可显著促进缺血下肢肌肉中的血管新生。

图 13 为本公开 m-A16-B12 (hHGF)及对照质粒对全皮层损伤的 Db/Db 小鼠模型创口影响的治疗方案、代表性照片及统计结果。结果显示, 在 50 ng/只、200 ng/只和 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)和 200 μ g/只 Collatogene 裸质粒的处理下, 相对于对照组, 小鼠的创面均得到良好的愈合, 且 m-A16-B12 (hHGF)的促创面愈合

情况显著优于 200 μg/只 Collatogene 裸质粒。

图 14 为本公开 m-A16-B12(hHGF) 及对照质粒对全皮层损伤的 Db/Db 小鼠模型组织重构影响的代表性照片。结果显示，在 m-A16-B12(hHGF)的治疗下，各组小鼠创面上皮均完成上皮全覆盖，完成组织重构。而对照组及 200μg/只 Collatogene 裸质粒组均未完成上皮再覆盖，创口处胶原蛋白异常增生，结构紊乱。

图 15：处方 1-4 冻干前在不同缓冲液中的粒径。

图 16：处方 1-4 冻干复溶后的粒径。

图 17：处方 1-4 冻干前后粒径变化率。

图 18：处方 1-4 冻干出箱后的 mRNA 完整性。

图 19：处方 7-9 冻干出箱后的 mRNA 完整性。

图 20：处方 1-4 在 37℃ 高温放置条件下的 mRNA 完整性。

图 21：处方 7-9 在 37℃ 高温放置条件下的 mRNA 完整性。

图 22：处方 7 和 9 冻干产品的细胞转染表达量荧光值强度。

具体实施方式

一、术语

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学。除非在本公开中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J. Biol. Chem, 243, p3558(1968)中所述。

“序列”一般应理解为既包括相关氨基酸序列，又包括编码所述序列的核酸序列或核苷酸序列，除非本公开需要进一步限定的解释。

“同源性”或“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100%的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“约”、“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内，所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如，“约”可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者，“约”或“基本上包含”可意味着至多 20%的范围，例如 1%至 15%之间、在 1%至 10%之间、在 1%至 5%之间、在 0.5%至 5%之间、在 0.5%至 1%之间变化，本公开中，数字或数值范围之前有术语“约”的每种情况也包括给定数的实施方案。除非另外说明，否则当具体值在本公开和权

利要求中出现时,“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括三羟甲基氨基甲烷(Tris)、醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸盐缓冲剂”是包含组氨酸根离子的缓冲剂。组氨酸盐缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸盐,组氨酸-醋酸盐,组氨酸-磷酸盐,组氨酸-硫酸盐等缓冲剂,优选组氨酸-盐酸盐缓冲剂或组氨酸-醋酸盐缓冲剂,组氨酸-醋酸盐缓冲剂是组氨酸与醋酸配制而成,组氨酸-盐酸盐缓冲剂是组氨酸与组氨酸盐酸盐配制而成,或组氨酸与盐酸配制而成。

“磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选地磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述抗体与其他化学组分的混合物,所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是保持活性成分的稳定性,促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

本公开中,“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

本公开中所述药物组合物的溶液形式,若无特殊说明,其中的溶剂均为水。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

“施用”、“给予”和“处理”,当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当其应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂,例如包含本公开的任一种抗体或其药物组合物作为治疗剂,所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种增殖性疾病或其症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如受试者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过

医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。本公开的受试者可以是动物或人类受试者。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。
除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

术语“脂质相”是指脂质纳米颗粒中所有脂质的总称，包括但不限于阳离子脂质、非阳离子脂质、磷脂、胆固醇或其衍生物、缀合脂质等本领域技术人员公知的可用于制备脂质纳米颗粒的脂质。

术语“脂质”是指一类有机化合物，其包括但不限于脂肪酸的酯，并且特征是在水中不溶，但是在许多有机溶剂中是可溶的。通常将它们分成至少三类：(1)“简单脂质”，其包括脂肪和油以及蜡；(2)“化合物脂质”，其包括磷脂和糖脂；和(3)“衍生的脂质”诸如类固醇。

术语“阳离子脂质”指在选定的 pH 值，诸如生理 pH 值(例如，pH 为约 7.0)下携带净正电荷的许多脂质物种中的任何一种。

术语“阴离子脂质”指在生理 pH 值下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括，但不限于，磷脂酰甘油、心磷脂、二酰磷脂酰丝氨酸、二酰磷脂酸、N-十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)，和其它与中性脂质连接的阴离子修饰基团。

术语“中性脂质”指在选定的 pH 值下以不带电荷或中性两性离子形式存在的许多脂质物种中的任何一种。在生理 pH 值下，这样的脂质包括，例如，二酰磷脂酰胆碱、二酰磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰甘油。

术语“两亲性脂质”部分地指任何适合的材料，其中脂质材料的疏水部分定向到疏水相中，而亲水部分定向到水相。亲水性质来自极性 or 带电基团诸如糖类、磷酸

根、羧基、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基和其它类似基团的存在。疏水性可以通过包含非极性基团而赋予，所述基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂族烃基和由一个或多个芳族、脂环族或杂环基团取代的这样的基团。两亲性化合物的实例包括但不限于磷脂、氨基脂和鞘脂类。

5 术语“非阳离子脂质”指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。
 术语“缀合脂质”指抑制脂质颗粒聚集的结合脂质。所述缀合脂质包括，但不限于 PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的神经酰胺、PEG 修饰的二烷基胺、PEG 修饰的二酰基甘油、PEG 修饰的二烷基甘油。

 术语“哺乳动物”指任何哺乳动物物种诸如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚
10 鼠、兔、家畜等。

 本公开所述“平均粒径”（Z-average Size）例如“平均粒径小于 2000 nm”是光强平均值，由不同种类粒子所贡献的光强计算而得。所述“平均粒径”可通过本领域技术人员熟知的常规粒度测量技术测量颗粒的平均粒径。这样的技术包括例如沉降场流分级，光子相关光谱，光散射等。

15 本公开多分散系数“PDI”（Polydispersity Index）体现了粒子粒径均一程度，是粒径表征的一个重要指数。

 术语“混入”、“混合”表示的意思是不限定组分的加入顺序，例如将 A 混入 B，可以表达 A 加入 B 的意思，也可以表达 B 加入 A 的意思，将 A 和 B 混合，可以表达 A 加入 B 混合的意思，也可以表达 B 加入 A 混合的意思。

20 本公开中数值为仪器测量值，存在一定程度的误差，一般而言，正负 10%均属于合理误差范围内。当然需要考虑该数值所用之处的上下文，例如，活性成分的粒径，该数值为测量后误差变化不超过正负 10%，可以为正负 9%、正负 8%、正负 7%、正负 6%、正负 5%、正负 4%、正负 3%、正负 2%或正负 1%，优选正负 5%。

 本公开式 I 化合物参照 WO2023125738A 中方法制备，并将相关内容本公开以
25 示说明。

检测过程中使用的设备及方法如下：

总含量和包封率：

30 mRNA-LNP 在 2% Triton X-100 作用下，能释放包被在脂质里面的 mRNA，mRNA 与 RiboGreen 结合，在酶标仪荧光模式下，选择激发光 485nm，发射光 535nm，可进行读取。荧光染料法检测使用 Triton X-100 处理释放前、释放后样品中的 mRNA 含量，分别测得 Free RNA 与 Total RNA 含量，Total RNA 含量即总含量，Total RNA 与 Free RNA 的差值占 Total RNA 的比例即为样品包封率。

35 总含量和包封率检测仪器：Molecular Devices -多功能酶标仪。

dsRNA 检测：

应用双抗夹心酶联免疫法（ELISA法）检测体外转录RNA类产品原液中dsRNA的含量。用捕获抗体包被微孔板，形成固相抗体，向固相抗体微孔板中加入dsRNA标准品和待测样品，然后加入检测抗体，最后加入辣根过氧化物酶标记的酶标二抗，形成“包被抗体-抗原-酶标检测抗体”复合物，经过洗涤后加入显色液显色，显色液在HRP酶的催化下转化成蓝色并在酸的作用下最终转换成黄色，颜色的深浅与样品中dsRNA的量呈正相关。

dsRNA 检测仪器：Molecular Devices -多功能酶标仪

HGF 检测：

本实验收集mRNA药物（脂质体形式）感染HEK293细胞3天后的表达上清作为检测样品。采用双抗体夹心ELISA法，将抗人HGF抗体包被于微孔板上，样品和标准品中的人HGF会与固定在板上的抗体结合，游离的成分被洗去；接着加入生物素化的抗人HGF检测抗体进行孵育，洗涤去除未结合的物质后，加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶（Streptavidin-HRP）孵育。洗涤去除未结合的试剂后，加入TMB底物溶液（显色剂）。溶液颜色与结合的目标蛋白成正比；加入终止液；用酶标仪测定吸光度。

HGF检测仪器：Molecular Devices -多功能酶标仪

实施例与测试例

通过以下实施例进一步详细说明本披露。这些实施例仅用于说明性目的，而并不用于限制本披露的范围。

本披露实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience，NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1. mRNA 的制备

1.1 5’UTR 和 3’UTR 的筛选

为了筛选到可提高蛋白表达效率的 3’-非翻译区元件(3’UTR 元件)、5’-非翻译区元件(5’UTR 元件)，本实施例筛选了管家基因 mRNA 中的 UTR 序列。

首先，通过数据库 (https://esbl.nhlbi.nih.gov/helixweb/Database/NephronRNAseq/Housekeeping_Genes.html)确定了包括 Abhd16a 等 301 个候选人管家基因。然后，通过生物信息学方法对上述基因的表达水平进行分析及表达量排序，并调取基因的转录本及 UTR 序列信息。进一步根据基因的表达水平及 UTR 序列长短对 UTR 元件进行筛选，获得了多个候选 UTR 序列，从中筛选获得了编号为 A1 至 A33 的 33 个 5’UTR，和编号为 B1 至 B14 的 14 个 3’UTR，基因来源和序列号如表 1 和表 2 所示。

表 1. 筛选获得的新 3'UTR

3'UTR 编号	基因来源 (均为智人(Homo sapiens))	对应 DNA 的 序列号	对应 mRNA 的 序列号
B1	ACTG1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:58
B2	ATP6V0B	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:59
B3	ATP6V0B	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:60
B4	ATP6V0E1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:61
B5	ATP6V0E1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:62
B6	CFL1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:63
B7	CFL1	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:64
B8	CFL1	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:65
B9	COX4I1	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:66
B10	COX4I1	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:67
B11	COX4I1	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:68
B12	CTSB	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:69
B13	FAM166A	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:70
B14	NDUFB9	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:71

表 2. 筛选获得的新 5'UTR

5'UTR 编号	基因来源 (均为智人(Homo sapiens))	对应 DNA 的 序列号	对应 mRNA 的 序列号
A1	ACTG1	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:72
A2	ATP6V0B	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:73
A3	ATP6V0B	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:74
A4	ATP6V0E1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:75
A5	ATP6V0E1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:76
A6	CFL1	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:77
A7	CFL1	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:78
A8	CFL1	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:79
A9	COX4I1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:80
A10	COX4I1	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:81
A11	COX4I1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:82
A12	CTSB	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:83
A13	FAM166A	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:84
A14	NDUFB9	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:85
A15	CHCHD10	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:86
A16	CHCHD10	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:87
A17	SLC38A2	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:88

A18	NDUFA11	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:89
A19	NDUFV3	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:90
A20	PRDX5	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:91
A21	GUK1	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:92
A22	GUK1	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:93
A23	GUK1	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:94
A24	IAH1	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:95
A25	ABHD16A	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:96
A26	SLC25A39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:97
A27	ATPIF1	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:98
A28	ANAPC11	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:99
A29	ANAPC11	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:100
A30	CCDC12	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:101
A31	MRPL14	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:102
A32	APOA1BP	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:103
A33	APOA1BP	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:104

1.2 mRNA 的制备

将 1.1 筛选获得的 UTR 构建至用于体外转录的 DNA 载体中，以获得稳定表达 5'UTR 及 3'UTR 元件的 mRNA。所述载体含有 T7 启动子，作为开放阅读框 (ORF)的编码萤火虫荧光素酶(Firefly Luciferase, Fluc)的序列(SEQ ID NO:126)，和多聚腺苷酸(polyA)序列，polyA 序列后接用于线性化载体的限制性位点。所述 polyA 选自 A120(即，120 个连续的腺苷酸)或 A30L70 (SEQ ID NO:52)。通过合适的酶切位点将 5'UTR 及 3'UTR 元件构建分别构建至开放阅读框 ORF (Fluc)的 5'端及 3'端。构建好的载体示例如图 1A 至图 1C，5'UTR 和 3'UTR 的组合方式参见表 3。

本实施例中所使用的对照载体包括 polyA 为 A120 Mod.-120A (SEQ ID NO:53)、polyA 为 A30L70 的 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54)和 BioN.-A30L70 (SEQ ID NO:55)，目的基因均为 Fluc，通过全基因合成构建。不同 UTR 元件分别通过酶切的方法构建至上述载体，其中，载体 V-B1 至 V-B14 的构建载体为 Mod.-120A，选用酶切位点为 AgeI 和 SacII，其 polyA 均为 A120，其使用的对照为 Mod.-120A (SEQ ID NO:53)；载体 V-A1 至 V-A14 的构建载体为 Mod.-120A (SEQ ID NO:53)，选用酶切位点为 BamHI 和 NheI，其 polyA 均为 A120，其使用的对照也为 Mod.-120A (SEQ ID NO:53)；V-A15 至 V-A33 的构建载体为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54)，选用酶切位点为 BamHI 和 NheI，其 polyA 均为 A30L70，其使用的对照为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54)；载体 V-A1-B12、V-A1-B13 和 V-A1-B14 的构建载体为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54)，选用酶切位点为 BamHI 和 SacII，其 polyA 均为 A30L70，其使用的对照为 Mod.-A30L70 (SEQ ID NO:54)和 BioN.-A30L70 (SEQ ID NO:55)。

插入的 UTR 元件基因片段均为全基因合成(苏州金唯智生物科技有限公司)，片段通过酶切连接构建至相应载体，载体构建完成后需进行酶切及测序鉴定，鉴定正确后用于下一步实验。

表 3. 载体中 5'UTR 和 3'UTR 的组合方式

载体编号 (对应的 mRNA 编号)	5'UTR	3'UTR
Mod.	Mod. 5'UTR (SEQ ID NO:48)	α -球蛋白 3'UTR (SEQ ID NO:49)
V-B1 (m-B1)		B1 (SEQ ID NO:1)
V-B2 (m-B2)		B2 (SEQ ID NO:2)
V-B3 (m-B3)		B3 (SEQ ID NO:3)
V-B4 (m-B4)		B4 (SEQ ID NO:4)
V-B5 (m-B5)		B5 (SEQ ID NO:5)
V-B6 (m-B6)		B6 (SEQ ID NO:6)
V-B7 (m-B7)		B7 (SEQ ID NO:7)
V-B8 (m-B8)		B8 (SEQ ID NO:8)
V-B9 (m-B9)		B9 (SEQ ID NO:9)
V-B10 (m-B10)		B10 (SEQ ID NO:10)
V-B11 (m-B11)		B11 (SEQ ID NO:11)
V-B12 (m-B12)		B12 (SEQ ID NO:12)
V-B13 (m-B13)		B13 (SEQ ID NO:13)
V-B14 (m-B14)		B14 (SEQ ID NO:14)
V-A1 (m-A1)	A1 (SEQ ID NO:15)	α -球蛋白 3'UTR (SEQ ID NO:49)
V-A2 (m-A2)	A2 (SEQ ID NO:16)	
V-A3 (m-A3)	A3 (SEQ ID NO:17)	
V-A4 (m-A4)	A4 (SEQ ID NO:18)	
V-A5 (m-A5)	A5 (SEQ ID NO:19)	
V-A6 (m-A6)	A6 (SEQ ID NO:20)	
V-A7 (m-A7)	A7 (SEQ ID NO:21)	
V-A8 (m-A8)	A8 (SEQ ID NO:22)	
V-A9 (m-A9)	A9 (SEQ ID NO:23)	
V-A10 (m-A10)	A10 (SEQ ID NO:24)	
V-A11 (m-A11)	A11 (SEQ ID NO:25)	
V-A12 (m-A12)	A12 (SEQ ID NO:26)	
V-A13 (m-A13)	A13 (SEQ ID NO:27)	
V-A14 (m-A14)	A14 (SEQ ID NO:28)	
V-A15 (m-A15)	A15 (SEQ ID NO:29)	
V-A16 (m-A16)	A16 (SEQ ID NO:30)	

V-A17 (m-A17)	A17 (SEQ ID NO:31)	
V-A18 (m-A18)	A18 (SEQ ID NO:32)	
V-A19 (m-A19)	A19 (SEQ ID NO:33)	
V-A20 (m-A20)	A20 (SEQ ID NO:34)	
V-A21 (m-A21)	A21 (SEQ ID NO:35)	
V-A22 (m-A22)	A22 (SEQ ID NO:36)	
V-A23 (m-A23)	A23 (SEQ ID NO:37)	
V-A24 (m-A24)	A24 (SEQ ID NO:38)	
V-A25 (m-A25)	A25 (SEQ ID NO:39)	
V-A26 (m-A26)	A26 (SEQ ID NO:40)	
V-A27 (m-A27)	A27 (SEQ ID NO:41)	
V-A28 (m-A28)	A28 (SEQ ID NO:42)	
V-A29 (m-A29)	A29 (SEQ ID NO:43)	
V-A30 (m-A30)	A30 (SEQ ID NO:44)	
V-A31 (m-A31)	A31 (SEQ ID NO:45)	
V-A32 (m-A32)	A32 (SEQ ID NO:46)	
V-A33 (m-A33)	A33 (SEQ ID NO:47)	
V-A1-B12 (m-A1-B12)	A1 (SEQ ID NO:15)	B12 (SEQ ID NO:12)
V-A1-B13 (m-A1-B13)	A1 (SEQ ID NO:15)	B13 (SEQ ID NO:13)
V-A1-B14 (m-A1-B14)	A1 (SEQ ID NO:15)	B14 (SEQ ID NO:14)
BioN.	α -1-球蛋白 5'UTR (SEQ ID NO:50)	haplogroup U8b1b1 mitochondrion (SEQ ID NO:51)

将表 3 中的载体(即, DNA 模板)通过限制性内切酶处理消化, 使 DNA 模板线性化, 再使用 T7-RNA 聚合酶体外转录。对于体外转录, 使用 T7 RNA 聚合酶(Roche)、相应的反应缓冲剂、焦磷酸酶、RNase 抑制剂和 NTP。为了有效加帽 RNA, 向反应中加入过量的帽类似化合物 ARCA (3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G, Trilink, N-7003-1)或 CleanCap (m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, Trilink, N-7113), 其中图 2 至图 5 中所用的 RNA 生产选用 ARCA 进行加帽, 图 6 至图 9 中所用的 RNA 选用 CleanCap 进行加帽。同时, 为了降低 mRNA 的免疫源性并提高翻译效率, 本公开中的 mRNA 均进行了核酸修饰, 将反应体系中的尿苷-三磷酸(Uridine triphosphate, 简称为 UTP)全部替换为 N1-甲基-假尿苷-三磷酸(N1-methyl-pseudouridine triphosphate, 简称为 1m- ψ UTP, 购于 ThermoFisher), 该修饰方法参考专利 US 2014/0194494 A1。体外转录体系在 37℃下孵育 2.5 小时后, 通过羧化磁珠(Invitrogen)来纯化 RNA 并重悬于无核酶水中, 通过分光光度法和在 5200 生物分析仪(Agilent)上分析来评估 RNA 的浓度和质量。经检测, 获得目的 mRNA。

本公开 Mod.的 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO: 53、54 所示, BioN.的 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO:55 所示。Mod.中的 5'UTR 及 3'UTR 序列与

Moderna 公司的专利及发表文献中的序列一致(US10849920B2、WO2013151667A1、US10730924B2、DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.017), BioN.的 5'UTR 及 3'UTR 序列源自于专利 WO 2018/160540。

5 示例性的给出 V-B1 线性化后序列, 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO: 56 所示; V-A1 线性化后的序列, 5'UTR 至 polyA 的序列如 SEQ ID NO: 57 所示。

1.3 5'UTR、3'UTR 及其组合的功能验证

本实施例使用 mRNA 脂质转染的荧光素酶表达系统进行 UTR 的功能验证。

10 实验方法:将人胚胎肾细胞(HEK293, 购自 ATCC)以 4×10⁴ 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板。次日, 通过 Lipofectamine™ MessengerMAX™ mRNA 转染试剂进行转染, 每孔转染 100ng 前述实施例 2 中制备获得的加帽 mRNA, 转染 6 小时后, 更换新鲜培养基。吸出 100 μL 培养基并加入 50 μL 荧光素酶底物, 使用 PerkinElmer 多功能酶标仪检测发光强度。人宫颈癌细胞(HeLa, 购自 ATCC)和人肺癌细胞(A549, 购自 ATCC)的实验方法同 HEK293。

15 评估方法:表 4 至表 7、表 9 至表 11 中, 将参比的阳性对照 Mod.在不同细胞系中的荧光素表达量设置为 1, 计算不同 mRNA 相对阳性对照 Mod.的表达量倍数。表 8 中, 将参比的阳性对照 BioN.在不同细胞系中的荧光素表达量设置为 1, 计算不同 mRNA 相对阳性对照 BioN.的表达量倍数。表格中的数值均为检测平均值的倍数。

20 1) 3'UTR 在不同细胞系中调控目的基因表达能力的检测

为验证不同 3'UTR 在不同细胞系中调控目的基因的表达能力, 用实施例 2 的方法生产表达荧光素酶(Fluc)的 mRNA, 将生产的 RNA 进行 ARCA 加帽, polyA 尾结构为 A120。将 RNA 转染至人 HeLa、HEK293 和 A549 细胞染, 并在转染后 24 小时测量荧光素酶水平, 结果参见表 4 和图 2。

25 表 4. 携带不同 3'UTR 的 mRNA 表达荧光素酶(Fluc)的表达量
(ARCA 加帽, 目的基因均为 Fluc, polyA 均为 A120)

mRNA 编号	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	细胞系		
			HeLa	HEK293	A549
Mod.	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106	1	1	1
m-B1		SEQ ID NO: 58	1.25	1.52	1.55
m-B2		SEQ ID NO: 59	1.72	1.85	1.94
m-B3		SEQ ID NO: 60	1.56	1.66	1.83
m-B4		SEQ ID NO: 61	1.63	1.68	1.77
m-B5		SEQ ID NO: 62	0.99	1.01	1.08
m-B6		SEQ ID NO: 63	1.13	1.30	1.40
m-B7		SEQ ID NO: 64	1.41	1.72	1.69
m-B8		SEQ ID NO: 65	1.31	1.40	1.57

m-B9		SEQ ID NO: 66	2.04	1.71	2.13
m-B10		SEQ ID NO: 67	1.72	1.83	1.82
m-B11		SEQ ID NO: 68	1.65	1.61	1.63
m-B12		SEQ ID NO: 69	2.29	2.22	2.24
m-B13		SEQ ID NO: 70	2.21	2.27	2.28
m-B14		SEQ ID NO: 71	2.07	1.92	2.27

结果显示，在不同细胞系中，相较于 Mod.阳性对照，B1 至 B14 的 3'UTR 对蛋白表达量的影响具有一致性，不同细胞系间无显著性差异($p>0.05$)，说明本公开筛选获得的 3'UTR 元件对蛋白表达量的影响具有普适性，能够用于提高目的基因的蛋白表达水平。

5 2) 3'UTR 在细胞中的调控目的基因表达时长的检测

为检测不同 3'UTR 在细胞中调控目的基因表达时间的能力，将表 4 中的 mRNA 转染至 HEK293 细胞中，并在转染后 6h、24h、48h 和 72h 测量荧光素酶表达水平，结果参见表 5 和图 3。

表 5. 携带不同 3'UTR 的 mRNA 表达荧光素酶(Fluc)的表达量

mRNA 编号	HEK293			
	6h	24h	48h	72h
Mod.	1	1	1	1
m-B1	2.61	1.88	1.73	1.40
m-B2	2.26	1.94	1.78	1.38
m-B3	2.09	1.95	1.67	1.51
m-B4	2.08	1.80	1.93	2.10
m-B5	1.41	1.05	1.04	0.98
m-B6	1.59	1.47	1.44	1.29
m-B7	1.77	1.76	1.78	1.53
m-B8	1.69	1.75	1.64	1.41
m-B9	1.99	3.39	2.32	1.78
m-B10	2.96	2.83	2.36	2.05
m-B11	2.52	2.13	1.99	1.68
m-B12	2.95	2.54	2.71	2.01
m-B13	2.44	2.77	2.56	2.54
m-B14	2.99	2.44	2.68	2.51

10 结果显示，在 HEK293 细胞中，3'UTR 元件的改变可影响目的蛋白的表达量，除 B5-3'UTR 元件，其他 3'UTR 元件均可提高蛋白表达量 1.2 倍以上，且在不同检测时间点均具有显著性差异($p<0.05$)，其中 B12、B13、B14 的 3'UTR 元件效果最佳，可提高蛋白表达量 2 倍以上，且具有较好的时间延续性。

3) 5'UTR 在细胞中的调控目的基因表达的检测

15 为检测不同 5'UTR 在细胞中调控目的基因表达时间的能力，用前述方法制备

m-A26	SEQ ID NO:97		0.70	0.69	0.93	0.89
m-A27	SEQ ID NO:98		1.62	1.62	2.09	1.94
m-A28	SEQ ID NO:99		1.39	1.34	1.76	1.65
m-A29	SEQ ID NO:100		1.01	1.04	1.28	1.34
m-A30	SEQ ID NO:101		1.37	1.27	1.13	1.06
m-A31	SEQ ID NO:102		1.17	1.09	1.34	1.43
m-A32	SEQ ID NO:103		1.31	1.41	1.64	1.60
m-A33	SEQ ID NO:104		1.31	1.20	1.44	1.42

图 4 和图 5 分别通过不同的加帽方式和 polyA 尾结构进行筛选，结果显示，在不同的筛选载体中，5'UTR 元件的改变均可影响目的蛋白的表达量，5'UTR 元件对目标蛋白表达水平的提高具有通用性。其中，编号 A1、A3 至 A7、A9 至 A16、A18、A21、A24、A27、A28、A32、A33 的 5'UTR 元件，均可提高蛋白表达量 1.2 倍以上，且在 24h、48h、72h 的检测时间点均具有显著性差异($p < 0.05$)，其中 A1、A15、A16、A18 的 5'UTR 元件效果最佳，可提高蛋白表达量 2 倍以上，且具有较好的时间延续性。

4) 候选 5'UTR 相较于阳性对照 BioN.载体调控目的基因表达强度的检测

为检测不同候选 5'UTR 相较于阳性对照 BioN.载体调控目的基因表达强度的能力，将前述筛选到的较佳的 A1、A15、A16、A18 的 5'UTR 元件构建至含有 A30L70 polyA 尾元件的载体中，用前述方法生产表达荧光素酶(Fluc)的 mRNA 并转染至 HEK293 细胞中，在转染后 6h、24h、48h 和 72h 测量荧光素酶表达水平，结果参见表 8 和图 6。

表 8. 携带不同 5'UTR 的 mRNA 表达荧光素酶(Fluc)的表达量
(Cleancap 加帽，目的基因均为 Fluc，polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	HEK293		
			6h	24h	48h
BioN.	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:108	1	1	1
m-A1	SEQ ID NO:72	α -球蛋白 (SEQ ID NO:106)	1.34	1.78	1.92
m-A15	SEQ ID NO:86		1.32	1.58	1.76
m-A16	SEQ ID NO:87		1.01	1.37	1.54
m-A18	SEQ ID NO:89		1.07	1.29	1.49

结果显示，候选的 5'UTR 元件均相较于 BioN.载体，在 24h 和 48h 时均可提高蛋白表达量至少高于 1.2 倍，且均具有显著性差异($p < 0.05$)。

5) 不同 5'UTR 和 3'UTR 组合在细胞中的调控目的基因表达的检测

为了研究不同的 5'-UTR 和 3'UTR 组合对 mRNA 中目的蛋白表达的影响，将含有不同 5'UTR 和 3'-UTR 元件组合的 mRNA 与 Moderna 公司选用的 5'UTR 和 3'UTR 相比，结果参见表 9 和图 7。

表 9. 携带不同 5'UTR 和 3'UTR 组合的 mRNA 的表达量

(Cleancap 加帽，目的基因均为 Fluc，polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	HEK293			
			6h	24h	48h	72h
Mod.	SEQ ID NO:105	SEQ ID NO:106	1	1	1	1
m-A1-B12	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:69	2.78	3.06	2.46	2.96
m-A1-B13		SEQ ID NO:70	2.62	2.67	2.30	2.57
m-A1-B14		SEQ ID NO:71	2.20	2.14	1.74	1.90
m-A15-B12	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:69	2.11	2.14	1.78	1.90
m-A15-B13		SEQ ID NO:70	2.04	2.15	1.74	1.87
m-A15-B14		SEQ ID NO:71	2.09	1.90	1.68	1.68
m-A16-B12	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:69	2.32	2.02	1.82	1.81
m-A16-B13		SEQ ID NO:70	2.43	1.96	1.78	1.89
m-A16-B14		SEQ ID NO:71	2.30	1.79	1.63	1.68
m-A18-B12	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:69	1.87	1.90	1.27	1.41
m-A18-B13		SEQ ID NO:70	2.17	2.31	1.71	2.08
m-A18-B14		SEQ ID NO:71	1.40	1.66	1.31	1.51

结果显示，本公开筛选的 5'UTR 和 3'-UTR 元件组合相较于 Moderna 公司选用的 5'UTR 和 3'UTR 元件，在 24h、48h 及 72h 检测时间点，均可提高蛋白表达量 1.3 倍以上，且均具有显著性差异($p<0.05$)。以上 1)-5)中的目的蛋白均为荧光素酶(Fluc)，以下 6)中的目的蛋白为分泌型蛋白(例如 hHGF，抗 PD-1 抗体)。

6) 不同 5'UTR 和 3'UTR 组合调控分泌型目的蛋白表达的检测

为了研究不同的 5'-UTR 和 3'UTR 组合对 mRNA 表达分泌型蛋白的影响，这里将 mRNA 构建为 ORF 表达的目的蛋白为人肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, hHGF)或抗 PD-1 抗体。

所述 hHGF 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 109 所示，其 DNA 序列为 SEQ ID NO: 110 所示，经密码子优化后获得 mRNA OS1、OS2、OS3，其优化的密码子序列为 SEQ ID NO:129-131 所示。

所述 PD-1 抗体的重链和轻链的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO: 117、118 所示，重链和轻链的 DNA 序列分别为 SEQ ID NO: 119、120 所示，重链和轻链的 mRNA 序列分别为 SEQ ID NO:121、122 所示。

首先，为了提高 hHGF 蛋白的翻译效率，本公开对野生型 hHGF(SEQ ID NO: 110)的核苷酸序列进行了密码子优化，优化后的序列有 hHGF-OS1(SEQ ID NO: 111)、hHGF-OS2(SEQ ID NO: 112)和 hHGF-OS3(SEQ ID NO: 113)，相应的 mRNA 序列分别为 SEQ ID NO:129-131 所示。将上述天然 hHGF 及密码子序列优化后的 hHGF 序列构建至载体中，生产 mRNA。通过 ELISA 检测 hHGF 蛋白的表达量，

证明 hHGF 密码子优化序列能够提高 hHGF 蛋白的表达量。

将含有不同 5'UTR 和 3'-UTR 元件组合的表达 hHGF-OS2 的 mRNA(对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:112)，与含有 Moderna 公司的 5'UTR 和 3'UTR 元件组合的表达 hHGF-OS2 的 mRNA Mod.(hHGF) (对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:114)相比。用所述编码 hHGF 的 mRNA 转染 HEK293 细胞，在转染后 6h、24h、48h 和 72h 收集上清并通过 ELISA 检测 hHGF 蛋白的表达量，评估候选载体表达 HGF 的增加/延长。结果参见表 10 和图 8A。

表 10. 携带不同 5'UTR 和 3'UTR 组合的 mRNA 的目的蛋白表达量
(Cleancap 加帽，目的基因均为 hHGF，polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号 (序列号)	5'UTR 的 mRNA 序列号	3'UTR 的 mRNA 序列号	hHGF 蛋白量 (ng/mL)			
			6h	24h	48h	72h
Mod.(hHGF) (SEQ ID NO:114)	SEQ ID NO:105	SEQ ID NO:106	1.16	21.83	26.89	15.37
m-A1-B12(hHGF) (SEQ ID NO:115)		SEQ ID NO:69	2.06	38.65	41.49	23.76
m-A1-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	1.98	30.19	30.57	19.00
m-A1-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	2.27	34.61	37.75	19.33
m-A15-B12(hHGF) (SEQ ID NO:116)	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:69	1.84	33.15	36.79	19.06
m-A15-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	2.14	31.68	36.60	25.04
m-A15-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	1.74	30.08	26.85	14.81
m-A16-B12(hHGF) (SEQ ID NO:127)	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:69	2.34	40.39	42.82	24.50
m-A16-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	1.95	30.53	32.31	20.36
m-A16-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	2.22	33.56	37.61	21.10
m-A18-B12(hHGF)	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:69	2.45	49.06	55.14	30.24
m-A18-B13(hHGF)		SEQ ID NO:70	1.94	38.38	38.05	25.52
m-A18-B14(hHGF)		SEQ ID NO:71	1.93	36.75	38.37	23.25

将含有不同 5'UTR 和 3'UTR 元件组合的表达抗 PD-1 抗体全长的 mRNA(对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:124-125)，与含有 Moderna 公司的 5'UTR 和 3'UTR 元件组合的表达抗 PD-1 抗体的 mRNA(对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO:123)相比。用编码抗 PD-1 抗体全长的 mRNA 转染 HEK293 细胞，在转染后 6h、24h、48h 和 72h 收集上清并通过 ELISA 检测抗 PD-1 抗体的表达量，评估候选载体表达抗 PD-1 抗体的增加/延长，结果参见表 11 和图 8B。

表 11. 携带不同 5'UTR 和 3'UTR 组合的 mRNA 的目的蛋白表达量
(Cleancap 加帽，目的基因均为抗 PD-1 抗体的重链和轻链，polyA 均为 A30L70)

mRNA 编号 (相应的 DNA 序列号)	抗 PD-1 抗体(ng/mL)			
	6h	24h	48h	72h
Mod.(PD-1 Ab) (SEQ ID NO:123)	2.79	23.11	30.04	28.23

m-A1-B12(PD-1 Ab) (SEQ ID NO:124)	3.22	33.47	52.50	43.19
m-A15-B12(PD-1 Ab) (SEQ ID NO:125)	2.77	34.39	45.72	49.90

以上结果显示，持续表达分泌蛋白 hHGF 和抗 PD-1 抗体 72 小时后，本公开筛选得到的 5'UTR 和 3'UTR 组合相较于 Moderna 公司选用的 5'UTR 和 3'UTR 元件能够显著提高分泌蛋白的表达量($p<0.05$)。

5

1.4 表达 hHGF 的 mRNA 在小鼠体内表达 hHGF 蛋白的验证

为了确定 mRNA 分子 m-A16-B12 (hHGF) (对应 DNA 序列为 SEQ ID NO:127) 在动物体内表达 hHGF 的能力，使用脂质纳米颗粒 LNP(包含 50 mol % 可离子化脂质(SM-102)，10 mol% DSPC，38.5 mol% 胆固醇，1.5 mol% PEG-DMG)进行 mRNA 的递送，以下实施例 5 和实施例 6 中也使用相同的脂质纳米颗粒 LNP。阳性对照为 Collategene 质粒 (AnGes 公司)，通过裸质粒给药方式。Balb/c 小鼠(6-8w，雄)随机分成 4 组，每组 33 只，对小鼠腓肠肌肌肉注射不同剂量的 m-A16-B12(hHGF) 及 Collategene 质粒，而后按表 12 方案安排如下各实验组：1)注射 1.0 μg/只的 m-A16-B12 (hHGF)；2)注射 0.3 μg/只的 m-A16-B12 (hHGF)；3)注射 0.1 μg/只的 m-A16-B12 (hHGF)；4)注射 200 μg/只的 Collategene 裸质粒。在 1 h、2 h、4 h、6 h、24 h、48 h、72 h、96 h、168 h、216 h 及 336 h 获取小鼠腓肠肌标本，使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液将肌肉组织匀浆裂解，离心取上清，使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 hHGF 蛋白浓度，使用 ELISA 方法评价 hHGF 的表达水平。各组数据用平均值±标准差(Mean ± SD)表示，使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

20 表 12. m-A16-B12 (hHGF)及 Collategene 在体内表达 hHGF 的实验分组情况

组别	G1	G2	G3	G4
动物数量	33	33	33	33
待测药物	Plasmid (Collategene)	m-A16-B12 (hHGF)	m-A16-B12 (hHGF)	m-A16-B12 (hHGF)
给药剂量	200 μg	0.1 μg	0.3 μg	1.0 μg
给药途径	i.m.			
给药频率	Single-dose			
检测指标	血浆、肌肉取材，检测 hHGF 蛋白含量			
样品收集	给药后 1 h/2 h/4 h/6 h/24 h/48 h/72 h/96 h/D7/D10/D14 取材			

实验结果如图 9 的 A 所示，m-A16-B12 (hHGF)于肌肉注射 1 h 后即可表达 hHGF 蛋白，注射后 6 h 达到表达峰值，呈剂量依赖。如图 9 的 B 所示，Collategene 于注射后 7 天达到表达峰值；m-A16-B12 (hHGF)递送 48 h 后蛋白表达量下降，1 μg/只剂量 m-A16-B12 (hHGF)在 72 h 时的蛋白表达量与 Collategene 相当。同时，
25 对各组 PK 数据进行统计发现，即使是最低剂量 0.1 μg 的 m-A16-B12 (hHGF)，其

C_{max} 也是 Collatogene 的 5 倍以上, 且 0.1 μg 的 m-A16-B12 (hHGF)其 AUC_{inf}(hr*pg/mg protein)也与 Collatogene 相当(表 13)。因此, m-A16-B12 (hHGF)可实现 hHGF 在动物体内的高效表达, 且各时间点血浆中未检测到 hHGF 表达。

表 13. m-A16-B12 (hHGF)及 Collatogene 在体内表达 hHGF 的结果

途径	待测药物	剂量(μg)	C _{max} (pg/mg 蛋白)	AUC _{0-inf} (hr*pg/mg 蛋白)	MRT _{0-inf} (h)
I.M.	m-A16-B12 (hHGF)	0.1 μg	369.1±24.8	16158.3±978.7	201.5±73.8
		0.3 μg	463.1±16.5	20133.6±770.2	125.9±26.4
		1 μg	570.6±42.5	29652.8±2555.9	142.8±71.9
	Collatogene	200 μg	78.0±5.7	15300.4±491.2	183.5±3.0

5

1.5 表达 hHGF 的 mRNA 对下肢缺血小鼠模型的治疗功能验证

下肢缺血小鼠模型是模拟人的严重下肢缺血的经典小鼠模型, 建模使用 6-8 周的雄性 Balb/c 小鼠, 方法如下: 1)麻醉动物, 取仰卧位放置在手术台上, 后肢彻底脱毛, 固定后肢, 消毒手术部位皮肤; 2)从膝盖向大腿内侧切开一个约 1 厘米长的皮肤切口, 依次切开、解剖皮下脂肪组织, 充分显露股动脉; 3)使用显微弯镊, 轻轻刺穿膜状股鞘, 暴露神经血管包, 分离股动脉与股静脉和神经处腹股沟附近的近端位置, 分离干净后, 在股动脉近端下方用 6-0 缝合线结扎股动脉近端; 4)在靠近膝盖的远端将股动脉和股静脉分开, 在远端下方用 6-0 缝合线结扎股动脉的末端在腘动脉的近端; 5)缝合创口。

15 使用实施例 1.4 中的 LNP 作为载体递送 m-A16-B12 (hHGF), Collatogene 以裸质粒形式给药。将下肢缺血模型小鼠随机分成 4 组, 每组 5 只, 分别对小鼠腓肠肌进行肌肉注射 m-A16-B12 (hHGF)和 Collatogene 裸质粒, 实验分组如下: 1)注射 500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF); 2)注射 50 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF); 3)注射 200 μg/只的 Collatogene 裸质粒; 4)注射等体积 PBS 作为对照组。造模当日计为第 0 天, 20 在进行各实验组治疗后的第 0 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天、第 12 天以及第 14 天观察腿部状况, 使用血流仪检测小鼠下肢血流灌注情况, 拍照记录。

按以下公式计算各组的血流灌注比率: 血流灌注比率=当日小鼠下肢血流灌注量/该小鼠第 0 天的下肢血流灌注量×100 %; 各组数据用平均值±标准差(Mean ± SD)表示, 使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

25 结果如图 10A 和图 10B 所示, 在注射 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)和 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒进行治疗的情况下, 各小鼠缺血下肢的血流灌注比率相对于对照组有明显的改善, 且缺血下肢的血流灌注比率随时间的进展逐渐得到恢复。在其中, 注射 50 ng/只 m-A16-B12 (hHGF)组表现出与注射 200 ng/只

Collatogene 裸质粒组相近的血流恢复效果;尤其,注射 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF) 组显著优于 200 ng/只 Collatogene 裸质粒组的血流恢复效果,可实现恢复至 90% 以上的血流灌注情况。

5 为了进一步确定 m-A16-B12 (hHGF)对下肢缺血小鼠模型下肢坏死程度的治疗
效果,在给药之后的第 14 天,对小鼠的腿部状况进行观察,拍照记录,并通过如
图 11A 的基准对小鼠的下肢坏死程度进行评分,此时使用的基准如下:0=下肢自
我脱离;1=腿部坏死;2=脚坏死;3=>2 个脚趾变色;4=1 个脚趾变色;5=>2 个
指甲变色;6=1 个指甲变色;7=无坏死。各组数据用平均值±标准差(Mean ± SD)表
示,使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

10 结果如图 11B 所示,在诱导小鼠下肢缺血后,对照组的小鼠在术后 2 周内,
下肢发生明显的缺血坏死情况,至第 14 天,部分小鼠的下肢发生完全脱落;而在
注射 m-A16-B12 (hHGF)和 Collatogene 裸质粒治疗组中,各小鼠的下肢均能保持良
好的完整性且并未出现下肢坏死情况,表明 m-A16-B12 (hHGF)具有与对照
Collatogene 裸质粒相当的下肢缺血改善能力。

15 CD31 是血管新生的中要标志物,为了确定 m-A16-B12 (hHGF)在促进下肢缺
血小鼠模型血管新生中的作用,在给药后第 14 天,取小鼠缺血组织附近的腓肠肌
样本,制备石蜡切片,通过 CD31 抗体对切片样本中的 CD31 进行免疫组化染色,
拍照,经 ImageJ(NIH)软件分析,计算 CD31 染色面积。各组数据用平均值±标准差
(Mean ± SD)表示,使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

20 结果如图 12 所示,在给予 50 ng/只、500 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF)和 200 ng/
只的 Collatogene 裸质粒治疗的情况下,均可显著促进各组缺血下肢肌肉中的血管
新生,且新生血管数量相对 PBS 组具有明显的统计学差异($p<0.05$),50 ng/只 m-
A16-B12 (hHGF)组表现出与 200 ng/只的 Collatogene 裸质粒相当的促血管新生作
用,且 m-A16-B12 (hHGF)给药组表现出剂量依赖的促血管新生情况。

25

1.6 表达 hHGF 的 mRNA 对全皮层损伤 Db/Db 小鼠模型的治疗功能验证

Db/Db 小鼠模型是经典的糖尿病小鼠模型,因其 Leptin 受体基因缺陷小鼠,
致使小鼠随周龄增长表现出与糖尿病病人相似的高血糖、高血脂及胰岛素抵抗等
特征。本实验通过全皮层损伤模型模拟糖尿病足患者难以愈合的皮肤损伤。上述
30 Db/Db 小鼠模型的制造方法如下:小 Db/Db 鼠麻醉后脱毛膏脱毛,75 %酒精棉球消
毒。使用直径 8 mm 皮肤取材器 biopunch 在腰背部造成全层皮肤创伤。

为了确定 m-A16-B12 (hHGF)对全皮层损伤小鼠模型创面愈合的治疗效果,而
用实施例 1.4 中的 LNP 递送 m-A16-B12 (hHGF),对照 Collatogene 以裸质粒形式
给药,给药方式为分 4 点的皮下注射。将全皮层损伤模型的 Db/Db 小鼠按体重及
35 血糖水平分成 5 组,每组 7 只。实验分组如下:1)注射 500 ng/只的 m-A16-B12
(hHGF);2)注射 200 ng/只的 m-A16-B12 (hHGF);3)注射 50 ng/只的 m-A16-B12

(hHGF); 4)注射 200 μg/只的 Collatogene 裸质粒; 5)注射等体积 PBS 的对照组。造模当日计为第 0 天, 在进行各实验组治疗后, 分别在第 0 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 10 天、第 12 天以及第 14 天观察疮口恢复状况, 对创伤部位进行拍照, 图像经 ImageJ(NIH)软件分析, 计算创面面积。

5 按以下公式计算创面愈合百分率: $P = (AD - A0) / A0 \times 100\%$ (P: 创口愈合百分率; AD: 拍照日创口面积; A0: 术后当日创口面积)。

各组创面愈合百分率用平均值±标准差(Mean ± SD)表示, 使用 Graphpad Prism 9.0 软件作图及统计。

结果如图 13 所示, 在注射 50 ng/只、200 ng/只和 500 ng/只 m-A16-B12 (hHGF) 10 和 200 μg/只 Collatogene 裸质粒的处理下, 相较于对照组, 小鼠的创面均得到良好的愈合。而且, m-A16-B12 (hHGF)对小鼠创面愈合情况的促进呈剂量依赖性, 在第 14 天, 50 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)创面愈合率达 66 %, 200 ng/只和 500 ng/只剂量的 m-A16-B12 (hHGF)能够实现 100 %的伤口愈合情况; 同时, m-A16-B12 (hHGF)的促创面愈合情况显著优于 200 μg/只 Collatogene 裸质粒($p < 0.05$), 即使是 15 较低剂量(50 ng/只)的 m-A16-B12 (hHGF)也表现出与 200 μg/只 Collatogene 裸质粒具有显著性差异的创面愈合百分率($p < 0.05$)。

为了确定 m-A16-B12 (hHGF)对全皮层损伤小鼠模型组织重构的治疗效果, 而通过马松染色评价上皮再生、组织重构情况。在给药之后第 17 天, 获取小鼠全皮层标本, 制备石蜡切片, 使用马松染色对小鼠皮肤组织进行染色。

20 结果如图 14 所示, 在 m-A16-B12 (hHGF)的治疗下, 各组小鼠创面上皮均完成上皮全覆盖, 且低剂量组创口处上皮异常增厚, 胶原蛋白增生; 中高剂量组上皮恢复至正常厚度, 胶原蛋白有序排列, 完成组织重构。而对照组及 200 μg/只 Collatogene 裸质粒组均未完成上皮再覆盖, 创口处胶原蛋白异常增生, 结构紊乱。

25 实施例 2:

LNP 脂质颗粒的制备

分别将化合物 1 (式 I 化合物 参照 WO2023125738A 制备获得)、DSPC、胆固醇、DMG-PEG 2000 溶液, 以一定摩尔百分比混合 (mol%), 即各组分摩尔量占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔量的百分比, 混合配制乙醇脂质溶液。四组分的 30 摩尔比按表 14 中所示进行配制。将编码荧光素酶蛋白的 mRNA 溶于 pH 4 乙酸盐缓冲剂, 配制 mRNA 水溶液。将乙醇脂质溶液和 mRNA 水溶液通过微流控按 1:3 体积比混合, 总脂质与 mRNA 的重量比约为 20:1 制备脂质体。在 20 mM Tris 溶液中透析除去乙醇, 得到包封 mRNA 的脂质体纳米颗粒组合物。

脂质颗粒组合物表征

35 表征方法

使用 Malvern Zetasizer Pro, 以 173°反向散射检测模式, 利用动态光散射检测

脂质体纳米颗粒的纳米颗粒径和多分散系数 PDI。

使用 Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit RNA 定量检测试剂盒，测定脂质体包封率。

表 14

编号	化合物 1 mol %	DSPC mol %	胆固醇 mol %	PEG-DMG mol %	粒径 nm	PDI	包封率 %
1	48.0	10.0	40.5	1.5	90.8	0.12	97

5

实施例 3:

脂质颗粒组合物的冻干

按实施例 2 制备脂质纳粒，并将制备好的脂质纳米颗粒通过超滤置换到冻干制剂缓冲剂中（含有 20 mM Tris, pH 7.5、8%蔗糖、5%海藻糖和对应下表的不同浓度的氯化钠溶液）。将脂质纳米颗粒的冻干制剂溶液灌装到 2 mL 西林瓶中，0.6 mL/瓶，每瓶中阳离子脂质浓度为 1.78 mg/mL。置于冻干机中。分别经过-45℃预冻 3 小时，一次干燥温度-40℃ 30 小时和二次干燥温度 30℃ 10 小时，真空度为 0.05 mmbar。出箱后即为最终的冻干成品。

取冻干成品，加入 0.6 mL 注射用水复溶后分别按照前述方法检测脂质纳米颗粒的粒径。分别比较脂质纳米颗粒冻干前后冻干后的粒径大小。检测结果如表 15 和图 15-17 所示。

表 15

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒径 (nm)	变化率 (%)
处方 1	0	0	94.3	186.7	98.0
处方 2	25	1:1.2	86.4	128.2	48.4
处方 3	50	1.6:1	85.4	118.3	38.5
处方 4	100	3.3:1	73.7	99.2	34.6

使用冻干制剂缓冲剂将以上实验的脂质纳米颗粒原液分别稀释到 1/2 和 1/3 浓度，得的脂质纳米颗粒按以上实验操作进行灌装和冻干。分别检测冻干复溶后脂质纳米颗粒的粒径。检测结果如表 16 所示。

表 16

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒径 (nm)	变化率 (%)
处方 5	100	6.6:1	74.7	101.4	35.7
处方 6	100	9.9:1	73.4	100.4	36.8

将制备好的脂质纳米粒通过超滤换液置换到另一组冻干制剂缓冲液中（含有

20 mM Tris, pH 7.5、8%蔗糖和对应下表的不同浓度的氯化钠溶液)。将脂质纳米粒的冻干制剂溶液灌装到 2 mL 西林瓶中, 0.6 mL/瓶, 每瓶中阳离子脂质浓度为 2.38 mg/mL。置于冻干机中。分别经过-45℃预冻 3 小时, 一次干燥温度-40℃ 30 小时和二次干燥温度 30℃ 10 小时, 真空度为 0.05 mmbar。出箱后即为最终的冻干成品。

取冻干成品, 加入 0.6 mL 注射用水复溶后分别按照前述方法检测脂质纳米粒的粒径。分别比较脂质纳米粒冻干前后冻干后的粒径大小, 检测结果如表 17。

表 17

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒径 (nm)	变化率 (%)
处方 7	0	0	93.5	162.6	73.9
处方 8	25	1:1.6	81.5	121.8	49.4
处方 9	50	1.2:1	82.0	121.7	48.4

实施例 4:

评估脂质纳米粒组合物中 mRNA 的完整性

按实施例 3 得到冻干的脂质纳米粒, 分别使用毛细管电泳仪器 (安捷伦 5200 片段分析仪) 检测各组样品中 mRNA 的完整性。

mRNA 易降解, 且受温度影响, 温度升高, mRNA 稳定性降低。随着放置时间延长, 在高温条件下会出现降解, 完整性降低。而冻干过程中由一次干燥到二次干燥有温度上升, 其二次干燥温度较高, 因此评估不同处方中氯化钠在冻干工艺过程和高温放置条件下的 mRNA 完整性。表 18 和图 18-21 所示, 随着氯化钠浓度的提高冻干出箱后 mRNA 完整性提高。同样在 37℃高温放置条件下, 随着氯化钠浓度的提高 mRNA 完整性提高。

表 18

编号	NaCl 浓度 (mM)	mRNA 完整性 (%)	
		冻干出箱后	37℃ 72 小时
处方 1	0	87.7	72.7
处方 2	25	88.1	75.3
处方 3	50	88.3	76.6
处方 4	100	91.8	81.3
处方 7	0	86.9	72.9
处方 8	25	87.2	77.2
处方 9	50	90.2	80.0

实施例 5:

评估脂质纳米粒在细胞上的 mRNA 递送效率

将 HEK 293 细胞接种到 96 孔板培养过夜, 待细胞密度达到 80%以上, 将包封

5 荧光素酶 mRNA 的脂质纳米颗粒溶液（处方 7 冻干产品和处方 9 冻干产品）加入到细胞板孔培养基中，mRNA 剂量为 100 ng/孔。24 小时后，使用荧光素酶报告基因检测试剂盒（Promega）和酶标仪检测表达荧光素酶蛋白的荧光强度。荧光强度值即酶标仪检测到的荧光数值，代表荧光素酶蛋白的表达量，强光强度越高即蛋白表达量越高。每个化合物对应的脂质纳米颗粒至少 3 组重复计算平均荧光值强度。

表 19

编号	平均荧光强度
处方 7	2.34E+07
处方 9	4.12E+07

10 结论：如表 19 和图 22 所示荧光强度，处方 9 对应的脂质纳米颗粒冻干产品表达量显著高于处方 7，图 22 中***代表统计学显著差异，P<0.001。

实施例 6 HGF-mRNA-LNP 喷雾制剂制备工艺：

15 制备 HGF-mRNA-LNP 冻干粉。根据实施例 2 中的方法制备 HGF-mRNA-LNP（0.09mg m-A16-B12，1.07mg 式 I 所示的阳离子脂质，阳离子脂质、DSPC、胆固醇、DMG-PEG 2000 各组分摩尔量占脂质纳米颗粒总摩尔量的百分比分别为 48 mol%、10 mol%、40.5 mol%、1.5 mol%），根据实施例 3 中处方 4 制备得到 HGF-mRNA-LNP 冻干粉（处方 10）。取冻干成品，加入 0.6 mL 注射用水复溶后分别按照前述方法检测脂质纳米粒的粒径。分别比较脂质纳米粒冻干前后冻干后的粒径大小。结果见表 20。

表 20

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子 脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒 径 (nm)	变化率 (%)
处方 10	100	3.3:1	76.8	102.5	33.5

20 配制复溶剂，除菌过滤，用于复溶上述 HGF-mRNA-LNP 冻干粉，以制备喷雾制剂。

实施例 7. 复溶剂组分-分散剂的筛选

25 mRNA-LNP 以溶液形式（冻干粉复溶后）存在时，其颗粒存在较大的稳定性，表现为颗粒存在聚集、粒径增长的趋势。当 LNP 经过雾化给药装置进行雾化时，LNP 颗粒会在外在的机械挤压或剪切力作用下进一步增加聚集的可能。为降低 LNP 在雾化过程中发送颗粒聚集的风险，需在复溶剂中添加分散剂。分别配制（重量比）复溶剂为 WFI、0.2% PF68（泊洛沙姆 188）、0.2% PF127（泊洛沙姆 407）、
30 0.25% PVA（聚乙烯醇）、0.1% HEC（羟乙基纤维素）、1% PEG400（聚乙二醇 400）。使用一次性鼻腔给药装置进行雾化，用距离雾化喷嘴 3cm 位置收集雾化后的溶液，

检测雾化后收集溶液和雾化前的复溶后药液的粒径、PDI、mRNA 总含量、包封率作为评价指标。

结果见表 21，采用不同复溶剂复溶 LNP 冻干粉，与注射用水（WFI）复溶相比，只有采用 0.2% PF127 复溶后 LNP 粒径显著下降(81.3nm vs 96.7nm),说明 0.2% PF127 复溶后可能 LNP 的结构受到了破坏。其他组分复溶剂复溶后 LNP 粒径与 WFI 复溶后粒径相比无显著性差异。同时，其他组分复溶剂复溶后药液的 mRNA 总含量、包封率均与 WFI 复溶后药液的该项指标相当。以喷雾前后药液的粒径、PDI 和 mRNA 总含量、包封率的变化来看，各组分复溶剂复溶后药液在喷雾前后这几个指标均无显著性差异。这说明使用一次性鼻腔给药装置进行喷雾的过程 LNP 粒子结构的损伤、药液的吸附等均处于较低的风险水平。

综合来看，0.2% PF68、0.25% PVA、0.1% HEC、1% PEG400 均可作为复溶剂组分-分散剂。

表 21. 复溶剂组分-分散剂的筛选结果

复溶剂配方		粒径 (nm)	PDI	mRNA 总 含量 (μ g/ml)	包封率
WFI	喷雾前	96.7	0.22	66.88	81.7%
	喷雾后	98.6	0.21	67.20	77.5%
0.2% PF68	喷雾前	96.7	0.19	79.27	86.7%
	喷雾后	98.1	0.22	81.24	81.2%
0.2% PF127	喷雾前	81.3	0.16	82.27	83.0%
	喷雾后	84.1	0.18	84.02	81.2%
0.25% PVA	喷雾前	98.7	0.17	77.64	86.4%
	喷雾后	103.3	0.22	76.17	79.4%
0.1% HEC	喷雾前	101.5	0.17	78.47	87.5%
	喷雾后	105.6	0.23	83.97	83.9%
1% PEG400	喷雾前	100.7	0.18	72.93	79.8%
	喷雾后	103.0	0.20	73.66	83.8%

实施例 8. 复溶剂组分-增粘剂的筛选

本品作为外用喷雾制剂需要具备一定的粘度以增加药液在给药部位的滞留时间。筛选黄原胶（Xc）、聚维酮 K90（PVP-K90）、透明质酸钠（HA）、羧甲基纤维素钠（CMC-Na）、壳聚糖（CTS）作为增粘剂，具体处方如下（重量比）：

- 1) 0.24%黄原胶（Xc）；
- 2) 0.5% 聚维酮 K90（PVP-K90）；
- 3) 0.1%透明质酸钠（HA）；
- 4) 0.5%羧甲基纤维素钠（CMC-Na）；

5) 0.2%壳聚糖（CTS）。

配制上述每种复溶剂，然后经过滤、灌装，加塞，轧盖后备用。采用一次性鼻腔给药装置移取上述每种复溶剂复溶冻干粉后进行喷雾，收集喷雾后样品。检测喷雾前后样品的粒径、PDI、包封率、mRNA 总含量。其结果如下表 22 所示

5表 22. 复溶剂组分-增粘剂的筛选

复溶剂配方		粒径 (nm)	PDI	mRNA 总 含量 (μ g/ml)	包封率
WFI	喷雾前	96.7	0.22	66.88	81.7%
	喷雾后	98.6	0.21	67.20	77.5%
0.24% Xc	喷雾前	101.7	0.15	70.42	82.7%
	喷雾后	103.2	0.21	72.12	81.2%
0.5% PVPK90	喷雾前	98.4	0.13	73.14	83.3%
	喷雾后	100.1	0.18	74.02	82.2%
0.1% HA	喷雾前	98.6	0.16	71.69	84.4%
	喷雾后	97.1	0.21	76.37	81.4%
0.5% CMC-Na	喷雾前	104.5	0.16	80.13	84.5%
	喷雾后	100.5	0.20	83.87	83.9%
0.2% CTS	喷雾前	99.2	0.18	72.23	83.8%
	喷雾后	107.5	0.25	69.66	79.8%

根据上述结果，0.2%壳聚糖（CTS）作为复溶剂，复溶样品进行喷雾后，其粒径和 PDI 相比喷雾前呈现增长趋势（107.5nm vs 99.2nm），提示样品在喷雾后可能发上了颗粒聚集。其他几种复溶剂（0.24% Xc, 0.5% PVPK90, 0.1% HA, 0.5% CMC-
10 Na）均能在喷雾前后保持 LNP 颗粒结构的稳定。

同时对以喷雾后药液粘度和喷雾粒径作为评价指标对上述复溶剂进行筛选，其结构如下表 23 所示：

表 23. 复溶剂组分-增粘剂的筛选（喷雾形态和模式）

复溶剂配方	粘度 (mPa s)	喷雾面积 (mm ²)	椭圆比	Dmax (mm)	Dmin (mm)
WFI	1.42	2553.2	1.205	62.64	52.00
0.24% Xc	1.98	2628.5	1.135	60.24	53.07
0.5% PVPK90	2.02	1832.4	1.453	71.82	49.43
0.1% HA	1.37	2231.2	1.217	67.44	55.41
0.5% CMC-Na	1.64	2472.2	1.189	63.04	53.02
0.2% CTS	2.21	1923.9	1.365	72.08	52.81

15由上述结果可知，与注射用水复溶喷雾相比，0.5% PVPK90 和 0.2% CTS 复溶喷雾后药液的粘度更大，喷雾面积更小，具有更高的椭圆比。这说明 0.5% PVPK90

和 0.2% CTS 复溶后药液变得更粘稠, 难以获得更好的喷雾形态(喷雾面积和椭圆比)。其他组分复溶剂(0.24% Xc、0.1% HA、0.2% CTS)相比注射用水(WFI)的喷雾效果无显著性差异。

5 实施例 9. 复溶剂组分确定

复溶剂组分需综合考虑喷雾后药液粘度、LNP 结构的稳定性、喷雾形态和模式等。按照下表 24 进行复溶剂组分的配制，然后采用一次性鼻腔给药装置进行喷雾制备，采集喷雾后样品，检测喷雾后药液粘度、粒径、PDI、mRNA 总含量和包封率，并作为评价指标进行复溶剂组分的筛选。试验的结果如下表 25 所示：。

10 表 24 复溶剂组分筛选试验设计

样品批号	复溶剂组分-分散剂	复溶剂组分-增粘剂	考察指标
1	WFI	WFI	喷雾前后 药液粘度、粒径、 PDI、 mRNA 总含量 包封率
2	1% PEG-400	1% PVP-K90	
3	0.2% PF68	1% PVP-K90	
4	1% PEG-400	0.5% PVP-K90	
5	0.2% PF68	0.5% PVP-K90	
6	1% PEG-400	0.25% PVP-K90	
7	0.2% PF68	0.25% PVP-K90	

表 25. 复溶剂组分筛选的试验结果

复溶剂配方		粘度 (mPa s)	粒径 (nm)	PDI	mRNA 总含量 (μg/ml)	包封率
WFI	喷雾前	1.42	95.85	0.21	59.64	81.9%
	喷雾后		98.75	0.22	57.60	82.4%
1% PEG-400+ 1% PVP-K90	喷雾前	3.72	106.4	0.21	77.74	85.1%
	喷雾后		103.6	0.22	63.06	76.7%
0.2% PF68+ 1% PVP-K90	喷雾前	3.83	106.5	0.22	84.42	85.5%
	喷雾后		106.5	0.20	72.04	85.5%
1% PEG-400+ 0.5% PVP-K90	喷雾前	2.19	102.7	0.23	74.41	86.1%
	喷雾后		105.6	0.24	67.01	77.2%
0.2% PF68+ 0.5% PVP-K90	喷雾前	2.05	98.99	0.20	82.19	86.9%
	喷雾后		105.9	0.23	72.36	81.1%
1% PEG-400+ 0.25% PVP-	喷雾前	1.73	96.95	0.16	73.53	87.0%
	喷雾后		105.7	0.23	64.34	73.5%
0.2% PF68+ 0.25% PVP- K90	喷雾前	1.78	97.4	0.16	82.48	88.9%
	喷雾后		105.7	0.20	73.03	80.0%

从试验结果来看，含有 1% PVP-K90 组分的复溶剂粘度最大，其次是含 0.5% PVP-K90，含 0.25% PVP-K900 的复溶剂粘度最低。从喷雾前后的粒径和 PDI 变化、mRNA 总含量和包封率变化以及与 WFI 相比，含 1%PEG-400 组分的复溶剂在喷雾后包封率和 mRNA 总含量相比喷雾前有所下降。故而，优选 0.2% PF68+1% PVP-K90、0.2% PF68+0.5% PVP-K90 和 0.2% PF68+0.25% PVP-K90 作为复溶剂组分。

实施例 10. 复溶剂组分确定-HGF 表达

进一步的，需要引入喷雾形态和模式以及喷雾后药液主成分（LNP）的生物学活性作为关键指标进一步筛选和评价复溶剂组分。复溶剂组分如下：

- 1) 1% PVP-K90+1%PEG-400
- 2) 1% PVP-K90+0.2% PF68
- 3) 0.5% PVP-K90+1% PEG-400
- 4) 0.5% PVP-K90+0.2% PF68
- 5) 0.25% PVP-K90+1% PEG-400
- 6) 0.25% PVP-K90+0.2% PF68
- 7) 0.2% PF68
- 8) 1.5% PK90
- 9) 1% PEG-400
- 10) 0.1% HEC
- 11) 0.25% PVA
- 12) 0.2% PF127
- 13) WFI

按照上述配方配制每种复溶剂，然后经过滤、灌装，加塞，轧盖后备用。采用一次性鼻腔给药装置移取上述每种复溶剂复溶冻干粉后进行喷雾，收集喷雾后样品。检测喷雾后样品的粘度、渗透压粒径、PDI、包封率、mRNA 总含量、喷雾模式，同时将收集的样品检测其在 HEK293 细胞（CCTCC）细胞中的 HGF 表达，其结果如下表 26 所示

表 26. 复溶剂组分筛选（生物学活性）

复溶剂 配方	粘度 (mPa s)	渗透压 (mosm) (LNP)	喷雾粒径 (3cm 空洞 距离, D50, um)	喷雾面积 (mm^2)	HGF 表达 (ng/mL)
1	3.72	347	177.3	86.4	117.2
2	3.83	334	193.3	72.2	201.5
3	2.19	354	68.84	549.3	259.9
4	2.05	312	60.70	500.3	308.1

5	1.73	346	148.2	83.8	287.3
6	1.78	311	39.24	756.0	278.1
7	1.24	321	27.08	1766.7	279.2
8	5.97	334	337.2	13.9	378.2
9	1.02	348	25.13	1453.0	228.9
10	1.25	318	26.33	1615.3	227.7
11	1.16	316	30.81	1255.0	320.0
12	1.12	324	28.43	1676.3	0.1
13	1.42	295	24.51	1812.7	220.2

从表 26 中结果可知，配方 12（0.2% PF127）复溶样品并进行喷雾后，样品的 HGF 表达几乎为 0，显示该组分复溶剂可能对 LNP 有很大的破坏作用使其在复溶和喷雾后丧失了生物学活性。配方 1（1% PVP-K90+1%PEG-400）、配方 2（1% PVP-K90+0.2% PF68）、配方 5（0.25% PVP-K90+1% PEG-400）和配方 8（1.5% PVP-K90）复溶样品喷雾后喷雾粒径较大、喷雾面积较小和药液粘度较高。剩余配方的复溶剂均呈现出较高的 HGF 表达水平、粘度适中、喷雾面积较大、喷雾粒径较小的现象。

10

序列表

>B1 (ACTG1 3'UTR)
CCGACTACCTCATGAAGATCCTCACTGAGCGAGGCTACAGCTTACCACCACGGCCGAG
15 CGGGAATCGTGC GCGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC
AGGAGATGGCCACCGCCGCATCCTCCTTCTCTGAGAAAGAGCTACGAGCTGCCCCGAT
GGCCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCGGTTCCGGTGTCCGGAGGCGCTGTTCCAGCC
TTCCTTCCTGGGTATGGAATCTTGCGGCATCCACGAGACCACCTTCAACTCCATCATGA
AGTGTGACGTGGACATCCGCAAAGACCTGTACGCCAACACGGTGCTGTGCGGGCGGCAC
20 CACCATGTACCCGGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACCGCCCTGGCGCCC
AGCACCATGAAGATCAAGATCATCGCACCCCCAGAGCGCAAGTACTCGGTGTGGATCG
GTGGCTCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATTAG
SEQ ID NO:1

25 >B2 (ATP6V0B 3'UTR)
ATGATATGTGTGGGTGGGGCCGTCCTCACTTTTATTTATTGCTGGTTTTCTGGGACAG
CTGGAGCTGTGTCCCTTAGCCTTTCAGAGGCTTGGTGTTTCAGGGCCCTCCCTGCACTCCC
CTCTTGCTGCGTGTGATTGAGGCACTGCAGTCCAGGCCGAGTCTCAGTGCGGGGA
GCAGGCTGCTGCTGACTCTGTGCAGCTGCGCACCTGTGTCCCCCACCTCCACCCTCA
30 ACCCATCTTCCTAGTGTGTTGTGAAATAAACTTGGTATTTGTCT
SEQ ID NO:2

>B3 (ATP6V0B 3'UTR)
GTTGAAGAACTTCTCTACCGAGCAGCCCGTAACCCCTTTTCTCCCTCACTGCTGCA
35 GGAGTCTGCTACACCATTTTGTGATTGGGCTTCCGCTTTGATGTGGCATGGTTCCTGACG
GAGACTTCGCCCTTCATGTGGTCCAACCTGGGCATTGGCCTAGCTATCTCCCTGTCTGTG
GTTGGGGCAGCCTGGGGCATCTATATTACCGGCTCCTCCATCATTGGTGGAGGAGTGAA
GGCCCCCAGGATCAAGACCAAGAACCTGGTCAGCATCATCTTCTGTGAGGCTGTGGCCA
TCTACGGCAT

SEQ ID NO:3

>B4 (ATP6V0E1 3'UTR)
GGAAGAAGACATGCTCTACAGTGCTCAGTCTTTGAGGTGACTATGCTTGTGACCTTTCTT
5 ATCAGTATGGTCAGGCAGTCAGAGTTTGCCTTGACTTTTTCTCACATTTTATGGCCATTT
TAACACGTGGCAAGGGCAAGCTGCTGAATGCAAACACGATCTGAAGAGCAGAAATAAA
ATTGGAACCTTAAGCCTTAGCTTACCTAAATCTCATTAAAGATTCTTTTT

SEQ ID NO:4

10 >B5 (ATP6V0E1 3'UTR)
ATGCAAAATCACCTCCAAACCAGACCACTTTTCTTGACTTGCCGTGTTTTGGCCATTAGCT
GCCTTAAACGTTAACAGCACATTTGAATGCCTTATTCTACAATGCAGCGTGTTCCTTT
GCCTTTTTTGCACTTTGGTGAATTACGTGCCTCCATAACCTGAACTGTGCCGACTCCACA
AAACGATTATGTACTCTTCTGAGATAGAAGATGCTGTTCTTCTGAGAGATACGTTACTCT
15 CTCCTTGGAATCTGTGGATTTGAAGATGGCTCCTGCCTTCTCACGTGGGAATCAGTGAA
GTGTTTAGAAACTGCTGCAAGACAAACAAGACTCCAGTGGGGTGGTCAGTAGGAGAGC
ACGTTACAGAGGGAAGAGCCATCTCAACAGAATCGCACCAAACTATACTTTCAGGATGA
ATTCTTCTTTCTGCCATCTTTTGAATAAATATTTTCCTCCTTTC

SEQ ID NO:5

20 >B6 (CFL1 3'UTR)
GCCCCCTTCTGGCCCCCTGCCTGGAGCATCTGGCAGCCCCACACCTGCCCTTGGGGGTTG
CAGGCTGCCCCCTTCTGCCAGACCGGAGGGGCTGGGGGGATCCCAGCAGGGGGAGGG
CAATCCCTTCACCCAGTTGCCAAACAGACCCCCACCCCTGGATTTTCCTTCTCCCTC
25 CATCCCTTGACGGTTCTGGCCTTCCCAAACCTGCTTTTGATCTTTTGATTCTCTGGGCTG
AAGCAGACCAAGTTCCCCCAGGCACCCAGTTGTGGGGGAGCCTGTATTTTTTTTAAC
AACATCCCCATTCCCCACCTGGTCCTCCCCCTTCCCATGCTGCCAACTTCTAACCGCAAT
AGTGACTCTGTGCTTGTCTGTTAGTTCTGTGTATAAATGGAATGTTGTGGAGATGACCC
CTCCCTGTGCCGGCTGGTTCTCTCCCTTTTCCCCTGGTCACGGCTACTCATGGAAGCAG
30 GACCAGTAAGGGACCTTCGATT

SEQ ID NO:6

>B7 (CFL1 3'UTR)
GCCCCCTTCTGGCCCCCTGCCTGGAGCATCTGGCAGCCCCACACCTGCCCTTGGGGGTTG
35 CAGGCTGCCCCCTTCTGCCAGACCGGAGGGGCTGGGGGGATCCCAGCAGGGGGAGGG
CAATCCCTTCACCCAGTTGCCAAACAGACCCCCACCCCTGGATTTTCCTTCTCCCTC
CATCCCTTGACGGTTCTGGCCTTCCCAAACCTGCTTTTGATCTTTTGATTCTCTGGGCTG
AAGCAGACCAAGTTCCCCCAGGCACCCAGTTGTGGGGGAGCC

SEQ ID NO:7

40 >B8 (CFL1 3'UTR)
GCCCCCTTCTGGCCCCCTGCCTGGAGCATCTGGCAGCCCCACACCTGCCCTTGGGGGTTG
CAGGCTGCCCCCTTCTGCCAGACCGGAGGGGCTGGGGGGATCCCAGCAGGGGGAGGG
CAATCCCTTCACCCAGTTGCCAAACAGACCCCCACCCCTGGATTTTCCTTCTCCCTC
45 CATCCCTTGACGGTTCTGGCCTTCCCAAACCTGCTTTTGATCTTTTGATTCTCTGGGCTG
AAGCAGACCAAGTTCCCCCAGGCACCCAGTTGTGGGGGAGCCTGTATTTTTTTTAAC
AACATCCCCATTCCCCACCTGGTCCTCCCCCTTCCCATGCTGCCAACTTCTAACCGCAAT
AGTG

SEQ ID NO:8

50 >B9 (COX4I1 3'UTR)
GAGATGCTGGCCTGCGCCTGCACCTGCGCCTGGCTCTGTACCGCCATGCAACTCCATG
CCTATTTACTGGAAACCTGTTATGCCAAACAGTTGTACCACTGCTAATAAATGACCAGT
TTACCTGAAA

55 SEQ ID NO:9

>B10 (COX4I1 3'UTR)
AGGGACCCACAGGCGCGCCAGCAGCTCTCGGAAGCGTTGTATCGCATTAAAGTTCAAG

GAGAGCTTTGCTGAGATGAACAGGGGCTCGAACGAGTGGAAGACGGTTGTGGGCGGTG
CCATGTTCTTCATCGGTTTCACCGCGCTCGTTATCATGTGGCAGAAGCACTATGGGCTTA
GCCTCCAAGTGGGACTACGAAAAGAACGAGTGGAAGAAGTGAGAGATGCTGGCCTGCG
CCTGCACCTGCGCCTGGCTCTGTACCGCCATGCAACTCCATGCCTATTACTGGAAACC
5 TGTATATGCCAAACAGTTGTACCACT

SEQ ID NO:10

>B11 (COX4II 3'UTR)
AGAGGACCTTCTGCTTTTAGCTTATTTTGTGCTAACTTTTTACAAACAAAGGGCTAATT
10 TTAATAATGTCAGTGTTGTCAGTGGTCAGAAACCGTGTGTTTGAGCGGGTGTGAGTGGC
AGGTGGCTCTGCTGACCTGGTGGCTGGTGTGTCGGGAGGATTTAACCTGTGTGAGGGAT
TGGCCTAGAAACAACCTGTTGAGATAGTCTTGCCCCATAACCTGTCTCACACCGTAGTG
TACGGCCCCCTCCCGCAAAGCTTTGACAAAGAGTGGGTGGCCAAGCAGACCAAGAGGA
TGCTGGAC

15 SEQ ID NO:11

>B12 (CTSB 3'UTR)
TCTGCCGTGGGCCTGTCGTGCCAGTCCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCCTGGA
ACTGCATGTTCTTGCGACTCTTGGGACTTCATCTTAACCTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTT
20 TTCAACCATGGCATCCCTCCCCCAATTAGTTCCTGTATCCTCGTCAACCTTCTCTGTA
AGTGCCTGGTAAGCTTGCCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTA

SEQ ID NO:12

>B13 (FAM166A 3'UTR)
25 AAATGCTTTAATGGTGGTGTCTGTACAGCATGGATGTGGACAGGGAAAACAGCAAGTG
CACACAGTGGGACAGGCCACAGGACAGGCTGGGAGTGAATAAAGAGTTTCACACTGCT

SEQ ID NO:13

>B14 (NDUFB9 3'UTR)
30 TATCTAAGTGTATCAATTTAACATTTATAATCACCTTACAAGTAAGTTAAAGTGCATTCC
CTGGTCGTTTTGGCTTTGTCTTTGATTTTGCTTCAGATCTCCTTCTCTTTAGTCCTTTGTCT
GACTTTTTTGCCTTCTTGCTATACTTTCCCTCAACCTGCCTCTCCACTATTTCTTAGGCA
TTTTTCAGTCATG

SEQ ID NO:14

35 >A1 (ACTG1 5'UTR)
CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTGCGGTTTCTCTGCCGGTTCGCA

SEQ ID NO:15

40 >A2 (ATP6V0B 5'UTR)
GGGCGGGCGGACAGACTGCGGGACGGACGGTGGACGCTGGGACGCGTTTGTAGCTCCG
GCCCCGCCGTTCCGACCCCCGCCGCGTCCCGCCATGACGGGGCTAGCACTGCTCTAC
TCCGGGGTCTTCGTGGCCTTCTGGGCCTGCGCGCTGGCCGTGGGTTCCTGACGGAGACT
TCGCCCTTC

45 SEQ ID NO:16

>A3 (ATP6V0B 5'UTR)
AGACTGCGGGACGGACGGTGGACGCTGGGACGCGTTTGTAGCTCCGGCCCCGCCGTTCC
50 GACCCCCGCCGCCGTCGCCGCC

SEQ ID NO:17

>A4 (ATP6V0E1 5'UTR)
GGGGTAGGGGTTGGCGCTCAGGCGGCGACC

SEQ ID NO:18

55 >A5 (ATP6V0E1 5'UTR)
GTCACGCGGTCACTATTGACACTTCCTGGTGGGATCCGAGTGAGGCGACGGGGTAGG
GGTTGGCGCTCAGGCGGCGACC

SEQ ID NO:19

5 >A6 (CFL1 5'UTR)
GGCCGGCGGGAAGACTCCGTTACCCAGCGAGCGAGGCGGCGGCGCAGGGCCAGCGGA
CTCCATTTCCCGTCGGCTCGCGGTGGGAGCGCCGGAAGCCCGCCCCACCCCTCATTGTG
CGGCTCCTACTAAACGGAAGGGGCGGGAGAGGCCGCGTTCAGTCGGGTCCCGGCAGC
GGCTGCAGCGCTCTCGTCTTCTGCGGCTCTCGGTGCCCTCTCCTTTTCGTTTCCGGAAC
SEQ ID NO:20

10 >A7 (CFL1 5'UTR)
CTCCTGGCTCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGTAGGAAGAGTTTAAAGACCTCGA
GGCCTCTGGGCACTTGAGTTTGGCCTCCGGTGTGGCTGTCTCTGATGGTGTCAAGGT
GTTCAACGAC
SEQ ID NO:21

15 >A8 (CFL1 5'UTR)
ACGTGGCCGGCTTCTTCTGCAGTTCCGGGGAGTTTGGGGGACCAGATTTACCTTGGATT
GCCCCCTCCCTCTCCTGGCTCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGCCTCCGGTGTGGCT
GTCTCTGATGGTGTCAAGGTGTTCAACGAC
20 SEQ ID NO:22

>A9 (COX4I1 5'UTR)
GCGGCCTTGCTCTCTCCGGTCGCGGGACACCGGGTGTAGAGGGCGGTTCGCGGCGGGC
AGTGGCGGCAGA
25 SEQ ID NO:23

>A10 (COX4I1 5'UTR)
GGGACACCGGGTGTAGAGGGCGGTTCGCGGCGGGCAGTGGCGGCAGA
30 SEQ ID NO:24

>A11 (COX4I1 5'UTR)
CGCGGCCTTGCTCTCTTCCGGTCGCGGGACACCGGGTGTAGAGGGCGGTTCGCGGCGGGC
AGTGGCGGCAGA
35 SEQ ID NO:25

>A12 (CTSB 5'UTR)
GGCCGGGGCTGGCCCAGGCTACGGCGGCTGCAGGGCTCCGGCAACCGCTCCGGCAACG
CCAACCGCTCCGCTGCGCGCAGGCTGGGCTGCAGGCTCTCGGCTGCAGCGCTGGGTGGA
TCTAGGATCCGGCTTCCAAC
40 SEQ ID NO:26

>A13 (FAM166A 5'UTR)
AAGGGAGCTGGATGCCGGGAGGGACTGGAGCCAGCAAGGCCAGAGTGAAAGCAAA
45 SEQ ID NO:27

>A14 (NDUFB9 5'UTR)
GCAGCAGGCGTGAGTTTCCCGGCTCTCCGCGCGGCCGGGGAAGGTCAGCGCCGTA
50 SEQ ID NO:28

>A15 (CHCHD10 5'UTR)
GGCATTGTCCCCGCGACAGCACCGCTGCCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCCGGGTCCCACC
GCCGCCACC
55 SEQ ID NO:29

>A16 (CHCHD10 5'UTR)
CCGCTGCCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCCGGGTCCCACCGCCGCCACC
60 SEQ ID NO:30

- >A17 (SLC38A2 5'UTR)
ATGTCCTTTTTGTGTGTTTGTTCATGGTATTCCTATGAA
SEQ ID NO:31
- 5 >A18 (NDUFA11 5'UTR)
GCTTCCCGAGCTGGCGGGGTCCGTGGTGCGGGATCGAGATTGCGGGCT
SEQ ID NO:32
- 10 >A19 (NDUFV3 5'UTR)
GGCGGCTGTTTCAGGCGCGGGTGCGCGCGCAGCTGCTGTGGCCCTGCTTGCTGCGCCCGC
TGTCACCGCC
SEQ ID NO:33
- 15 >A20 (PRDX5 5'UTR)
CGCGCCTGCGCAGTGAGGGCGGCCCAGGCCCCGCTTCCGCAGGGTGTCGCCCGCTGTGCC
GCTAGCGGTGCCCCGCCTGCTGCGGTGGCACCAGCCAGGAGGCGGAGTGGAAGTGGCC
GTGGGGCGGGT
SEQ ID NO:34
- 20 >A21 (GUK1 5'UTR)
CAGCAGATGGGGACTAGAGGCCGCACTGCTATCCACAGCCTCTCTTCTACCCCCAGGC
SEQ ID NO:35
- 25 >A22 (GUK1 5'UTR)
GCTGGCCGGGCTGGCTGCGGCCGCCCTGGGCCGGGCCCCACCGGACGCCTCTCTTCTCA
CCCCAGGC
SEQ ID NO:36
- 30 >A23 (GUK1 5'UTR)
AGAGGTGGCCCCGGATGCTGCGGCGCCCGCTGGCCGGGCTGGCTGCGGCCGCCCTGGG
CCGGGCCCCACCGGACGCCTCTCTTCTACCCCCAGGC
SEQ ID NO:37
- 35 >A24 (IAH1 5'UTR)
TGGCTGGCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGGCTGCTCC
SEQ ID NO:38
- 40 >A25 (ABHD16A 5'UTR)
GGAGGGCGGGGCCGGCAGGGGGACCTGCTGCTGGAAGAGCAGCGGCCCGAGCCGGGG
CC
SEQ ID NO:39
- 45 >A26 (SLC25A39 5'UTR)
TTTCGGCGTCGGCCTAGGTGCGCTGCGAGCGCGCGCGGACCGCGCACAGGCGGGCGGAG
CCGGTATGGGCCCCGCCTGACCCTGGGCGCCGCGCCGCACGAGCACCAGCCTAGAGCCA
GGACTGAAGCTTCAAG
SEQ ID NO:40
- 50 >A27 (ATPIF1 5'UTR)
CGAGAGACTGCTTGCTGCGGCAGAGACGCCAGAGGTGCAGCTCCAGCAGCA
SEQ ID NO:41
- 55 >A28 (ANAPC11 5'UTR)
CGGAGTTTCGTCATGTTGGCCAGGCCCATTTGAGATCTTTGAAGATATCCTCAACGTGA
GGCTCTGCTGCC
SEQ ID NO:42
- >A29 (ANAPC11 5'UTR)

- GGGCGCGGCTTCGGCGGGCGGCAGCCGCTGCAGACGAGCTGCGGGCTCTGCTGCC
SEQ ID NO:43
- >A30 (CCDC12 5'UTR)
5 GCCTGCGCGATGCAAGACGGGAGAAAAGGAGGGGGCGTACGCGGGCAAG
SEQ ID NO:44
- >A31 (MRPL14 5'UTR)
10 ATCGCGTCCGCCGGGCTGGGCCTGGCGCGCAGGCGCTAGGAAGAGGCCGCGTGGGGCG
AAGGCGGCGCTTGGCTGGTGGGGCCCGCGGCGGGATTTCCCGGCGGCGAGAGCGGA
TCTATCTTGGGATCCC
SEQ ID NO:45
- >A32 (APOA1BP 5'UTR)
15 GCCGGGGGCGCGCGCTCTGCGAGCTGG
SEQ ID NO:46
- >A33 (APOA1BP 5'UTR)
20 GCCGGGGCGCGGCGGGCCGGGGCGCGCGCTCTGCGAGCTGG
SEQ ID NO:47
- > Mod. 5'UTR
GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC
25
SEQ ID NO:48
- > α -球蛋白 3'UTR
TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGGC
TCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCTGACCCGTACCCCGTGGTCTT
TGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC
30
SEQ ID NO:49
- > α -1 球蛋白 5'UTR
AGACGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC
35
SEQ ID NO:50
- > haplogroup U8b1b1 mitochondrion 3'UTR
CTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCC
GAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCA
CCTCTGCTAGTTCAGACACCTGCTATACTAATCGCTAGCCGCGTCGCTCCCCAGGGTTG
40 GTCAATTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGCCCAAGCACGCCACACCCCC
ACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAACAGCAATG
CA GCTCAAAACGCTTAGCCTAG
SEQ ID NO:51
- > A30L70 PolyA
45 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA
SEQ ID NO:52
- >5'UTR-Fluc- α 球蛋白 3'UTR-120A (Mod.-120A)
50 GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGACG
CCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGG
AGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTA
CAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGG
55 TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCA
GTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAG
TTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCG
CAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCAAAAAGGGGTTGCAAAAATTTTGAACGTGCAAAA

AAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGAT
TTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATT
TTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGA
TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCG
5 CATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTT
GTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATT
CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTA
CAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCT
GATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGCGCTCCCTCTC
10 TAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGA
TATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACC
GGGCGCGGTGCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCG
GGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTAT
GTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
15 CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCG
CCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAAATCCA
TCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGAC
GCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAA
AAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGG
20 AGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAA
ATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTACAAGG
ATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCAT
GCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCTTCTGCACCCGTACCCCG
TGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAA
25 AA
AATTATTGTTT
AAACATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:53

30 >5'UTR-Fluc- α 球蛋白 3'UTR-A30L70 (Mod.-A30L70)
GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGACG
CCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGG
AGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTGGAACAATTGCTTTTTA
CAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCG
35 TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCA
GTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAG
TTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCG
CAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAA
AAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGAT
40 TTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATT
TTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGA
TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCG
CATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTT
GTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATT
45 CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTA
CAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCT
GATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGCGCTCCCTCTC
TAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGA
TATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACC
50 GGGCGCGGTGCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCG
GGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTAT
GTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCG
CCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCA
55 TCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGAC
GCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAA
AAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGG
AGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAA

ATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTACAAGG
ATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCAT
GCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCTCCCCCTCCTGCACCCGTACCCCG
TGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAA
5 AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AATTATTGTTTAAACATTTAA
ATTCTAGA

SEQ ID NO:54

10 > α -1-球蛋白 5'UTR-Fluc- haplogroup U8b1b1 mitochondrion 3'UTR-A30L70 (BioN.)
AGACGAACUAGUUAUUCUUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCATGGA
AGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACC
GCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTG
CTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCC
15 GTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCG
TATGCAGTGAAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAG
TTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGC
ATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTGCAAAAAATTTTGAACGT
GCAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAACGGATTACC
20 AGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTCTGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTAAATGAAT
ACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCC
TCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAG
ATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTT
AAGTGTGTTCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATG
25 TGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTC
AGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTCGCCAAA
AGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCT
CCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAG
GCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATG
30 ATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTG
GATACCGGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTA
TGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGAT
GGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGT
TGACCGCTGAAGTCTCTGATTAAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGG
35 AATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTGCGCAGGTCTTCCCGAC
GATGACGCCGGTGAACTTCCCGCCGCGGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGAC
GGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGC
GGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAA
GAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTA
40 CAAGGATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGCTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCA
ATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCGACCTCGGGTCCCAG
GTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTGCTAT
ACTAATCGCTAGCCGCGTCGCTCCCCAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACACCGAG
ACCTGGTCCAGAGCCCCAAGCACGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTT
45 TAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAACAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCTC
GAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAA
AAA
AAAAAAATTATTGTTTAAACATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:55

50 >5'UTR-Fluc- ACTG1 3'UTR-120A (B1)
GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGACG
CCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGG
AGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTA
55 CAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCG
TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCA
GTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCA
TTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCG

CAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAA
AAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGAT
TTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATT
TTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGA
5 TCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCG
CATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAAGTGT
GTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATT
CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTA
CAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCT
10 GATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGCGCTCCCCTCTC
TAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGA
TATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACC
GGGCGCGGTGCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCG
GGAACACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCTATGATTAT
15 GTCCGGTTATGTAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCG
CCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCA
TCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGAC
GCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAA
20 AAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGG
AGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAA
ATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGGATTACAAGG
ATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGGCCGACTACCTCATGAAGATCCTCACTGAGC
GAGGCTACAGCTTACCACCACGGCCGAGCGGGAAATCGTGCGCGACATCAAGGAGAA
25 GTGTGTCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCCGATCCTCCTCTT
CTCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCCGATGGCCAGGTATCACCATTGGCAATGAGCG
GTTCCGGTGTCCGGAGGCGCTGTTCCAGCCTTCTTCTGGGTATGGAATCTTGCGGCAT
CCACGAGACCACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGACGTGGACATCCGCAAAGACCTGT
ACGCCAACACGGTGCTGTGCGGGCGGCACCACCATGTACCCGGGCATTGCCGACAGGAT
30 GCAGAAGGAGATCACCGCCCTGGCGCCAGCACCATGAAGATCAAGATCATCGCACCC
CCAGAGCGCAAGTACTCGGTGTGGATCGGTGGCTCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCT
CCAGCAGATGTGGATTAGCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AATTATTGTTTAAACATTTAA
35 TTCTAGA

SEQ ID NO:56

>ACTG1 5'UTR-Fluc- α 球蛋白 3'UTR-120A (A1)
CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTGCGGTTTCTCTGCCGGTTCGACGCCACC
40 ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATG
GAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTTGGAAC
AATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAA
TGTCGTTTCGGTTGGCAGAAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATC
GTCGATGCAGTGAAAACTCTCTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATC
45 GGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTAT
GGGCATTTTCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGA
ACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGAT
TACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAAT
GAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAA
50 CTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGT
GAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGA
TTTTAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGAT
ATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCC
TTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCA
55 AAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGC
GCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTAT
CAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGG
GATGATAAACCGGGCGCGGTGCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGA

TCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGT
CCTATGATTATGTCCGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAA
GGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCA
TCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAA
5 TTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTTCGAGGTCTTCCC
GACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTGTGTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGAT
GACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGGAAAAAGTTG
CGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACG
CAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGG
10 ATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAGGGCCCACCGTTGATAATAGGCTGGAGCCTC
GGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCTCCCTTCTCTGCACCC
GTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAA
AA
AA
15 ATTATTGTTTAAACATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:57

>B1 mRNA 序列(ACTG1 3'UTR)
CCGACUACCUCUAUGAAGAUCCUCACUGAGCGAGGCUACAGCUUACACCACCACGGCCG
20 AGCGGGAAAUCGUGCGCGACAUCAAGGAGAAGCUGUGCUACGUCGCCCUGGACUUCG
AGCAGGAGAUGGCCACCGCCGAUCCUCCUCUUCUCUGGAGAAGAGCUACGAGCUGC
CCGAUGGCCAGGUCAUCACCAUUGGCAUAGAGCGGUUCCGGUGUCCGGAGGCGCUGU
UCCAGCCUUCUUCUGGGUAUGGAUUCUUGCGCAUCCACGAGACCACCUUCAACU
CCAUCAUGAAGUGUGACGUGGACAUCGCAAGACCUGUACGCCAACACGGUGUCUGU
25 CGGCGGGACCAUGUACCCGGGCAUUGCCGACAGGAUGCAGGAAGGAGAUACCG
CCUGGGCGCCAGCACAUGAAGAUCAAGAUCAUCGCACCCCAAGAGCGCAAGUACU
CGGUGUGGAUCGGUGGCUCUCCUUGGCCUCACUGUCCACCUUCCAGCAGAUGUGGA
UUAG

SEQ ID NO:58

30 >B2 mRNA 序列(ATP6V0B 3'UTR)
AUGAUUUGUGUGGGUGGGGCCGUGCCUCACUUUUUUUUUUAUUGCUGGUUUUCCUGGG
ACAGCUGGAGCUGUGUCCCUUAGCCUUUCAGAGGCUUGGUGUUCAGGGCCCUCCUG
CACUCCCUUCUUGCUGCGUGUUGAUUUGGAGGCACUGCAGUCCAGGCCGAGUCCUCA
35 GUGCGGGGAGCAGGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCAGCUGCGCACCUGUGUCCCCCA
CCUCCACCCUCAACCCAUCUCCUAGUGUUUGUGAAUAAACUUGGUUUUUGUCU

SEQ ID NO:59

>B3 mRNA 序列(ATP6V0B 3'UTR)
40 GUUGAAGAACUUCUCUCUACCGAGCAGCCCGUAACCCCUUUUUUCUCCUCACUGCU
GCAGGAGUCUGCUACACCAUUUUUGAUUUGGGCUUCCGCUUUGAUUGGCAUGGUU
CCUGACGGAGACUUCGCCCUCAUGUGGUCCAACCGGGCAUUGGCCUAGCUAUCUC
CCUGUCUGUGGUUGGGGAGCCUGGGGCAUCUAUUAUACCGGCUCCUCAUAUUGG
UGGAGGAGUGAAGGCCCCAGGAUCAAGACCAAGAACCUGGUCAGCAUCAUCUUCUG
45 UGAGGCUGUGGCCAUCAACGGCAU

SEQ ID NO:60

>B4 mRNA 序列(ATP6V0E1 3'UTR)
50 GGAAGAAGACAUGCUCUACAGUGCUCAGUCUUUGAGGUGACUAUGCUUGUGACCUU
UCUUAUCAGUAUGGUCAGGCAGUCAGAGUUUGCCUUGACUUUUUCACAUUUUAU
GGCAUUUUUAAACGUGGCAAGGGCAAGCUGCUGAAUGCAAACACGAUCUGAAGAGC
AGAAUAAAAUUGGAACUUAAGCCUUAGCUUACCUAAAUCUAUUAAGAUUCUUUU
U

SEQ ID NO:61

55 >B5 mRNA 序列(ATP6V0E1 3'UTR)
AUGCAAAAUACCUCCAAACCAGACCACUUUUCUUGACUUGCCUGUUUUGGCCAUUA
GCUGCCUUAACGUUAACAGCACAUUUGAAUGCCUUAUUCUACAAUGCAGCGUGUUU

UCCUUUGCCUUUUUUGCACUUUGGUGAAUUACGUGCCUCCAUAACCUGAACUGUGCC
GACUCCACAAAACGAUUAUGUACUCUUCUGAGAUAGAAGAUGCUGUUCUUCUGAGA
GAUACGUUACUCUCUCCUUGGAAUCUGUGGAUUUGAAGAUGGCUCCUGCCUUCUCAC
GUGGGAAUCAGUGAAGUGUUUAGAAACUGCUGCAAGACAAACAAGACUCCAGUGGG
5 GUGGUCAGUAGGAGAGCACGUUCAGAGGGAAGAGCCAUCUCAACAGAAUCGCACCAA
ACUAUACUUUCAGGAUGAAUUUCUUCUUCUGCCAUCUUUUGGAAUAAAUUUUUC
CUCCUUUC

SEQ ID NO:62

10 >B6 mRNA 序列(CFL1 3'UTR)
GCCCCUUCUGGCCCCUGCCUGGAGCAUCUGGCAGCCCCACACCUGCCCCUUGGGGGU
UGCAGGCUGCCCCCUUCCUGCCAGACCGGAGGGGCUGGGGGGAUCCAGCAGGGGGA
GGGCAAUCCCUUCACCCAGUUGCCAAACAGACCCCCACCCCUUGGAUUUUCUUCU
CCCUGCAUCCCUUGACGGUUCUGGCCUUCCCAAACUGCUUUUGAUCUUUUGAUUCCU
15 CUUGGGCUGAAGCAGACCAAGUUCSCCCAGGCACCCAGUUGUGGGGGAGCCUGUA
UUUUUUUUAACAACAUCSCCAUUCSCCACCUGGUCCUCCSCCUUCCCAUGCUGCCAAC
UUCUAACCGCAAUAGUGACUCUGUCUUGUCUUGUUUAGUUCUGUGUAUAAUGGAA
UGUUGUGGAGAUGACCCUCCUGUGCCGGCUGGUUCCUCUCCCUUUUCCSCUGGUC
ACGGCUACUCAUGGAAGCAGGACCAGUAAGGGACCUUCGAUU

20 SEQ ID NO:63

>B7 mRNA 序列 (CFL1 3'UTR)
GCCCCUUCUGGCCCCUGCCUGGAGCAUCUGGCAGCCCCACACCUGCCCCUUGGGGGU
UGCAGGCUGCCCCCUUCCUGCCAGACCGGAGGGGCUGGGGGGAUCCAGCAGGGGGA
25 GGGCAAUCCCUUCACCCAGUUGCCAAACAGACCCCCACCCCUUGGAUUUUCUUCU
CCCUCCAUCCCUUGACGGUUCUGGCCUUCSCCAACUGCUUUUGAUCUUUUGAUUCCU
CUUGGGCUGAAGCAGACCAAGUUCSCCCAGGCACCCAGUUGUGGGGGAGCC

SEQ ID NO:64

30 >B8 mRNA 序列 (CFL1 3'UTR)
GCCCCUUCUGGCCCCUGCCUGGAGCAUCUGGCAGCCCCACACCUGCCCCUUGGGGGU
UGCAGGCUGCCCCCUUCCUGCCAGACCGGAGGGGCUGGGGGGAUCCAGCAGGGGGA
GGGCAAUCCCUUCACCCAGUUGCCAAACAGACCCCCACCCCUUGGAUUUUCUUCU
CCCUCCAUCCCUUGACGGUUCUGGCCUUCSCAAACUGCUUUUGAUCUUUUGAUUCCU
35 CUUGGGCUGAAGCAGACCAAGUUCSCCCAGGCACCCAGUUGUGGGGGAGCCUGUA
UUUUUUUUAACAACAUCSCCAUUCSCCACCUGGUCCUCCSCCUUCCCAUGCUGCCAAC
UUCUAACCGCAAUAGUG

SEQ ID NO:65

40 >B9 mRNA 序列 (COX4II 3'UTR)
GAGAUGCUGGCCUGCGCCUGCACCUGCGCCUGGCUCUGUCACCGCCAUGCAACUCCA
UGCCUAUUUACUGGAAACCUGUUAUGCCAAACAGUUGUACCACUGCUAAUAAAUGAC
CAGUUUACCUGAAA

SEQ ID NO:66

45 >B10 mRNA 序列 (COX4II 3'UTR)
AGGGACCCACAGGCGCGCCAGCAGCUCUGGAAGCGUUGUAUCGCAUUAAAGUCAA
GGAGAGCUUUGCUGAGAUGAACAGGGGCUCGAACGAGUGGAAGACGGUUGUGGGCG
GUGCCAUGUUCUUCUACGGUUCACCGCGCUCGUUAUCAUGUGGCAGAAGCACUAUG
50 GGCUUAGCCUCCAAGUGGGACUACGAAAAGAACGAGUGGAAGAAGUGAGAGAUGCU
GGCCUGCGCCUGCACCUGCGCCUGGCUCUGUCACCGCCAUGCAACUCCAUGCCUAUU
UACUGGAAACCUGUUAUGCCAAACAGUUGUACCACU

SEQ ID NO:67

55 >B11 mRNA 序列 (COX4II 3'UTR)
AGAGGACCUUCUGCUUUUAGCUUUUUGUUGCUAACUUUUUACAAACAAAGGGCU
AAUUUUAAAUGUCAGUGUUGUCAGUGGUCAGAAACCGUGUGUUUGAGCGGGUGUU

GAGUGGCAGGUGGCUCUGCUGACCUGGUGGCUGGUGUGUCGGGAGGAUUUAACCUG
UGUGAGGGAUUGGCCUAGAAACAACCUGUUGAGAUAGUCUUGCCCCAUAAACCUGUCU
CACACCGUAGUGUACGGCCCCCUCCGCAAAGCUUUGACAAAGAGUGGGUGGCCAAG
CAGACCAAGAGGAUGCUGGAC

5 SEQ ID NO:68

>B12 mRNA 序列 (CTSB 3'UTR)
UCUGCCGUGGGCCUGUCGUGCCAGUCCUGGGGGCGAGAUCCGGGAGAAUCACGUCCUG
GAACUGCAUGUUCUUGCGACUCUUGGGACUUCUUCUUAACUUCUCGCGUCCCCAGCC
10 AUGUUUUAACCAUGGCAUCCCUCCCCCAAUUAGUUCUCCUGUCAUCCUCGUCAACCU
UCUCUGUAAGUGCCUGGUAAGCUUGCCCUUGCUUAAGAACUCAAACAUAGCUGUGC
UCUA

SEQ ID NO:69

>B13 mRNA 序列 (FAM166A 3'UTR)
AAAUGCUUUAAUGGUGGUGUCUGUACAGCAUGGAUGUGGACAGGGAAAACAGCAAG
UGCACACAGUGGGACAGGCCACAGGACAGGCUGGGAGUGAAUAAAGAGUUCACACU
GCU

15 SEQ ID NO:70

>B14 mRNA 序列 (NDUFB9 3'UTR)
UAUCUAAGUGUAUCAAUUUAAACAUUUUAAUACACCUUACAAGUAAGUUAAGUGCA
UCCCCUGGUCGUUUUUGGCUUUGUCUUUGAUUUUGCUUCAGAUCCUUCUCUUUAGU
CCUUUGUCUGACUUUUUUGCCUUCUUGCUAUACUUUCCCUCAACCUGCCUCUCCACU
20 AUUUUCUUAGGCAUUUUUCAGUCAUG

25 SEQ ID NO:71

>A1 mRNA 序列 (ACTG1 5'UTR)
CUCUCGCACUCUGUUCUUCGCGCCGCUCCGCCGUCGCGUUUCUCUGCCGGUCGCA

30 SEQ ID NO:72

>A2 mRNA 序列 (ATP6V0B 5'UTR)
GGGCGGGCGGACAGACUGCGGGACGGACGGUGGACGCGUGGGACGCGUUUGUAGCUCC
GGCCCCGCCGUUCCGACCCCCGCCGCCGUCGCGCCGAUGACGGGGCUAGCACUGCUCU
35 ACUCCGGGGUCUUCGUGGCCUUCUGGGCCUGCGCGCUGGCCGUGGGUUCUGACGGA
GACUUCGCCCCUUC

SEQ ID NO:73

>A3 mRNA 序列 (ATP6V0B 5'UTR)
AGACUGCGGGACGGACGGUGGACGCGUGGGACGCGUUUGUAGCUCCGGCCCCGCCGUU
40 CCGACCCCCGCCGCCGUCGCGCC

SEQ ID NO:74

>A4 mRNA 序列 (ATP6V0E1 5'UTR)
GGGGUAGGGGUUGGCGCUCAGGCGGCGACC

45 SEQ ID NO:75

>A5 mRNA 序列 (ATP6V0E1 5'UTR)
GUCACGCGGUCAGCUAUUGACACUUCUUGGUGGGAUCCGAGUGAGGCGACGGGGUAG
50 GGGUUGGCGCUCAGGCGGCGACC

SEQ ID NO:76

>A6 mRNA 序列 (CFL1 5'UTR)
GGCCGGCGGGAAGACUCCGUUACCCAGCGAGCGAGGCGGCGGCGCAGGGCCAGCGGA
55 CUCCAUUUCCCGUCGGCUCGCGGUGGGAGCGCCGGAAGCCCCGCCACCCCUCAUUG
UGCGGCUCUACUAAACGGAAGGGGCCGGGAGAGGCCGCGUUCAGUCGGGUCCCCGGC
AGCGGCUCGACGCGUCUCGUCUUCGCGGCUCUCGGUGCCCUCCUUUUCGUUUC

GGAAAC

SEQ ID NO:77

5 >A7 mRNA 序列 (CFL1 5'UTR)
CUCCUGGCUCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGUAGGAAGAGUUUAAAGACCUCG
AGGCCUCUGGGCACUUGAGUUUGGCCUCCGGUGUGGCUGUCUCUGAUGGUGUCAUCA
AGGUGUUAACGAC

SEQ ID NO:78

10 >A8 mRNA 序列 (CFL1 5'UTR)
ACGUGGCCGGCUUCUUCUGCAGUUCGGGGAGUUUGGGGGACCAGAUUUACCUUGGA
UUGCCCCUCCUCUCCUGGCUCGGGCACCCCGAAGCACGACGCAGAGCCUCCGGUGU
GGCUGUCUCUGAUGGUGUCAUCAAGGUGUUAACGAC

SEQ ID NO:79

15 >A9 mRNA 序列 (COX4I1 5'UTR)
GCGGCCUUGCUCUCUCCGGUCGCGGGACACCGGGUGUAGAGGGCGGUCGCGGCGGG
CAGUGGCGGCAGA

SEQ ID NO:80

20 >A10 mRNA 序列 (COX4I1 5'UTR)
GGGACACCGGGUGUAGAGGGCGGUCGCGGCGGGCAGUGGCGGCAGA

SEQ ID NO:81

25 >A11 mRNA 序列 (COX4I1 5'UTR)
CGCGGCCUUGCUCUCUCCGGUCGCGGGACACCGGGUGUAGAGGGCGGUCGCGGCGG
GCAGUGGCGGCAGA

SEQ ID NO:82

30 >A12 mRNA 序列 (CUSB 5'UTR)
GGCCGGGGCUGGCCCAGGCUACGGCGGCUGCAGGGCUCGGCAACCGCUCGGGCAAC
GCCAACCGCUCGCGCAGGCUGGGCUGCAGGCUCUCGGCUGCAGCGCUGGGU
GGAUCUAGGAUCCGGCUUCCAAC

SEQ ID NO:83

35 >A13 mRNA 序列 (FAM166A 5'UTR)
AAGGGAGCUGGAUGCCGGGAGGGACUGGAGCCAGCAAGGCCAGAGUGAAAGCAAA

SEQ ID NO:84

40 >A14 mRNA 序列 (NDUFB9 5'UTR)
GCAGCAGGCGUGCAGUUUCCCGGCUCUCCGCGCGGCCGGGAAGGUCAGCGCCGUA

SEQ ID NO:85

45 >A15 mRNA 序列 (CHCHD10 5'UTR)
GGCAUUUGUCCCCGCGACAGCACCGCUGCCGCCGUCUCUAAGGUCGCCCGGGUCCCA
CCGCCGCCACC

SEQ ID NO:86

50 >A16 mRNA 序列 (CHCHD10 5'UTR)
CCGCUGCCGCCGUCUCUAAGGUCGCCCGGGUCCACCGCCGCCACC

SEQ ID NO:87

55 >A17 mRNA 序列 (SLC38A2 5'UTR)
AUGUCUUUUUUGUGUGUUUGUUUCAUGGUAUUCUAUGAA

SEQ ID NO:88

>A18 mRNA 序列 (NDUFA11 5'UTR)

- GCUUCCCGAGCUGGCGGGGUCCGUGGUGCGGGAUCGAGAUUGC GGCU
SEQ ID NO:89
- 5 >A19 mRNA 序列 (NDUFV3 5'UTR)
GGCGGCUGUUCAGGCGCGGGUGCGCGCGCAGCUGCUGUGGCCUGCUUGGUGCGCCC
GCUGUCACCGCC
SEQ ID NO:90
- 10 >A20 mRNA 序列 (PRDX5 5'UTR)
CGCGCCUGCGCAGUGGAGGCGGCCCCAGGCCCCGCCUCCGCAGGGUGUCGCCCGCUGUG
CCGCUAGCGGUGCCCCGCCUGCUGCGGUGGCACCAGCCAGGAGGCGGAGUGGAAGUG
GCCGUGGGGCGGGU
SEQ ID NO:91
- 15 >A21 mRNA 序列 (GUK1 5'UTR)
CAGCAGAUUGGGACUAGAGGCCGCACUGCUAUCCACAGCCUCUCUUCUCACCCCCAG
GC
SEQ ID NO:92
- 20 >A22 mRNA 序列 (GUK1 5'UTR)
GCUGGCCGGGCUGGCUGCGGCCGCCUGGGCCGGGCCCCACCGGACGCCUCUCUUCUC
ACCCCCAGGC
SEQ ID NO:93
- 25 >A23 mRNA 序列 (GUK1 5'UTR)
AGAGGUGGCCCCGGAUGCUGCGGCGCCCGCUGGCCGGGCGGCGGCGCCGCCUGG
GCCGGGCCCCACCGGACGCCUCUCUUCUCACCCCCAGGC
SEQ ID NO:94
- 30 >A24 mRNA 序列 (IAH1 5'UTR)
UGGCUGGCGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGGCUGCUCC
SEQ ID NO:95
- 35 >A25 mRNA 序列 (ABHD16A 5'UTR)
GGAGGGCGGGGCCGGCAGGGGGACCUGCUGCUGGAAGAGCAGCGGCCCGAGCCGGGG
CC
SEQ ID NO:96
- 40 >A26 mRNA 序列 (SLC25A39 5'UTR)
UUUCGGCGUCGGCCUAGGUGCGCUGCGAGCGCGCGCGGACCGCGCACAGGCGGCGGA
GCCGGUAUGGGCCCCGCCUGACCCUGGGCGCCGCGCCGCACGAGCACCAGCCUAGAGC
CAGGACUGAAGCUUCAAG
SEQ ID NO:97
- 45 >A27 mRNA 序列 (AUPIF1 5'UTR)
CGAGAGACUGCUUGCUGCGGCAGAGACGCCAGAGGUGCAGCUCCAGCAGCA
SEQ ID NO:98
- 50 >A28 mRNA 序列 (ANAPC11 5'UTR)
CGGAGUUUCGUCAUGUUGGCCAGGCCCAUUUGAGAUCUUUGAAGAUAUCCUCAACGU
GAGGCUCUGCUGCC
SEQ ID NO:99
- 55 >A29 mRNA 序列 (ANAPC11 5'UTR)
GGGCGCGGCUUCGGCGGGCGGCAGCCGCGCAGACGAGCUGCGGGCUCUGCUGCC
SEQ ID NO:100

- >A30 mRNA 序列 (CCDC12 5'UTR)
GCCUGCGCGAUGCAAGACGGGAGAAAAGGAGGGGCGUACGCGGGCAAG
SEQ ID NO:101
- 5 >A31 mRNA 序列 (MRPL14 5'UTR)
AUCGCGUCCGCCGGGCGUGGCGCGCAGGCGCUAGGAAGAGGCCGCGUGGGGC
GAAGGCGGCGCUUGGCGUGGGGGCCGCGGCGGGAUUUCCCCGGGCGGCGAGAGCG
GAUCUAUCUUGGGAUCCC
SEQ ID NO:102
- 10 >A32 mRNA 序列 (APOA1BP 5'UTR)
GCCGGGGGCGCGCGCUCUGCGAGCUGG
SEQ ID NO:103
- 15 >A33 mRNA 序列 (APOA1BP 5'UTR)
GCCGGGGCCGGGCCGGGGCGGCGCGCUCUGCGAGCUGG
SEQ ID NO:104
- > Mod. 5'UTR mRNA 序列
20 GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAAAGAGCCACC
SEQ ID NO:105
- > α -球蛋白 3'UTR mRNA 序列
25 UGAUAAUAGGCUAGGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAG
CCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGG
GCGGC
SEQ ID NO:106
- > α -1 球蛋白 5'UTR mRNA 序列
30 AGACGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC
SEQ ID NO:107
- > haplogroup U8b1b1 mitochondrion 3'UTR mRNA 序列
35 CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUCCCCGUCCUGGGUACC
CCGAGUCUCCCCGACCUCGGGUCCAGGUAUGCUCACCACCUGCCCCACUCA
CCACCUCUGCUAGUUCAGACACCUAGCUAUACUAAUCGCUAGCCGCGUCGCUCCCCA
GGGUUGGUCAAUUUCUGGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGCCCAAGCACGCC
ACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUA
ACAGCAAUGCA GCUCAAACGCUUAGCCUAG
40
SEQ ID NO:108
- >hHGF 氨基酸序列
MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKTKK
VNTADQCANRCTRNGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKD
45 YIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGG
PWCFTSNPEVRYEVC DIPQCSEVECMTNCGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTTPHRHKFLP
ERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQ
GQGEGRGTVNTIWNIGPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFT
TDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDKNMEDLHRHIF
50 WEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCA
KTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGI
HDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTS
CSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICAGAEKIGSGPCEGD
YGGPLVCEQHKKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIHKIILTYKVPQS
55
SEQ ID NO:109
- >hHGF 核苷酸序列

ATGTGGGTGACCAAACTCCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCTCCTGCATCTCCTC
CTGCTCCCCATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTCAT
GAATTCAAAAAATCAGCAAAGACTACCCTAATCAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAA
AACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACT
5 TCCATTCACTTGCAAGGCTTTTGTGTTTTGATAAAGCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCC
CTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAAGAATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGA
AAACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCAGCTACAAGGGAACAG
TATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCCATGATACCACACGAAC
ACAGCTTTTGCCTTCGAGCTATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAAACACTACTGTGCAAAATC
10 CTCGAGGGGAAGAAGGGGGACCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGA
AGTCTGTGACATTCCTCAGTGTTCAGAAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTA
TCGAGGTCTCATGGATCATACAGAATCAGGCAAGATTTGTCAGCGCTGGGATCATCAGAC
ACCACACCGGCACAAATTCCTGCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTA
TTGCCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGTCTATACTCTTGACCCTCACACCCG
15 CTGGGAGTACTGTGCAATTAACATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCC
TTTGGAACAACCTGAATGCATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATA
CCATTTGGAATGGAATTCATGTGTCAGCGTTGGGATTCTCAGTATCCTCACGAGCATGACAT
GACTCCTGAAAATTTCAAGTGCAAGGACCTACGAGAAAATTACTGCCGAAATCCAGATG
GGTCTGAATCACCCCTGGTGTTTTACCCTGATCCAAACATCCGAGTTGGCTACTGCTCCC
20 AAATTCCAAACTGTGATATGTCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGCAAAAATT
ATATGGGCAACTTATCCCAAACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAACA
TGGAAGACTTACATCGTCATATCTTCTGGGAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATT
ACTGCCGAAATCCAGATGATGATGCTCATGGACCCTGGTGTCTACACGGGAAATCCACTCA
TTCTTGGGATTATTGCCCTATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACCACCTACAATAGTCAAT
25 TTAGACCATCCCGTAATATCTTGTGCCAAAACGAAACAATTGCGAGTTGTAATGGGATT
CCAACACGAACAACATAGGATGGATGGTTAGTTTGAGATACAGAAATAAACATATCTGC
GGAGGATCATTGATAAAGGAGAGTTGGGTTCTTACTGCACGACAGTGTTCCTTCTCGA
GACTTGAAAGATTATGAAGCTTGGCTTGGAAATTCATGATGTCCACGGAAGAGGAGATGA
GAAATGCAACAGGTTCTCAATGTTTCCCAGCTGGTATATGGCCCTGAAGGATCAGATCT
30 GGTTTTAATGAAGCTTGCCAGGCCTGCTGTCTGGATGATTTTGTAGTACGATTGATTTA
CCTAATTATGGATGCACAATTCCTGAAAAGACCAGTTGCAGTGTATGAGCTGGGGCTAC
ACTGGATTGATCAACTATGATGGCCTATTACGAGTGGCACATCTCTATATAATGGGAAATG
AGAAATGCAGCCAGCATCATCGAGGGAAGGTGACTCTGAATGAGTCTGAAATATGTGCT
GGGGCTGAAAAGATTGGATCAGGACCATGTGAGGGGGATTATGGTGGCCCACTTGTGTTGT
35 GAGCAACATAAAATGAGAATGGTTCTTGGTGTCAATTGTTCTGGTCTGGATGTGCCATT
CCAAATCGTCCTGGTATTTTTGTCCGAGTAGCATATTATGCAAAATGGATACACAAAATTAT
TTAACATATAAGGTACCACAGTCATAG

SEQ ID NO:110

40 >hHGF 密码子优化序列 1(hHGF-OS1)
ATGTGGGTGACCAAACTGCTCCCCGCTCTGCTGCTGCAGCATGTGCTGCTCCACCTGCTG
CTGCTGCCAATCGCCATCCCCTACGCTGAAGGACAGCGGAAGCGCAGAAACACAATTCA
CGAATTCAAGAAGTCCGCCAAAACAACACTGATCAAGATCGACCCTGCCCTGAAAATCA
AAACCAAGAAGGTGAACACTGCCGATCAGTGCGCCAACAGATGCACAAGAAACAAAGG
45 CCTGCCCTTCACATGCAAGGCCTTTGTGTTTCGACAAGGCCAGAAAGCAGTGCCTGTGGT
TCCCTTTCAACAGCATGAGCTCTGGCGTGAAGAAAGAGTTTCGGCCACGAATTCGACCTG
TACGAGAACAAGGATTACATCAGAAATTGTATCATCGGCAAGGGCAGAAGCTACAAAGG
CACAGTGTCCATCACAAAAGCGGCATTAAGTGTGAGCCTTGGAGCAGCATGATCCCTCA
CGAGCACAGCTTCCTGCCTAGCTCTTACAGAGGCAAGGACCTGCAGGAGAATTACTGCC
50 GGAACCCTAGAGGCGAGGAAGGCGGCCCTTGGTGTCTTACCAGCAACCCTGAGGTGCG
GTACGAGGTGTGTGACATCCCCAGTGCAGCGAAGTGGAATGCATGACCTGTAATGGCG
AGAGCTACAGAGGCCTCATGGACCATACAGAGAGCGGAAAGATTTGTCAAAGATGGGAT
CACCAGACACCTCACAGACACAAATTCCTGCCCCGAAAGATATCCTGACAAGGGCTTCGA
CGACAATACTGTCAGAAATCCTGATGGCCAACCCAGACCTTGGTGTCTACACCCTGGATCC
55 TCATACCAGATGGGAGTACTGTGCCATCAAGACCTGCGCTGATAATACCATGAACGACAC
CGATGTGCCTCTGGAAACAACCGAGTGCATCCAGGGACAGGGCGAAGGCTACCGGGGC
ACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCCTGCCAGAGATGGGACAGCCAGTACCCCCA
CGAACACGATATGACCCCTGAGAACTTCAAGTGCAAGGACCTGAGAGAAAATTACTGCA

GAAACCCAGACGGAAGCGAGTCTCCTTGGTGTTTTACCACCGACCCCAACATCCGGGTG
GGTTACTGCAGCCAAATCCCCAATTGCGACATGAGCCACGGCCAGGACTGCTACCGGGG
AAACGGCAAAAACATGAGGCAATCTGAGCCAGACCCGGAGCGGTCTGACCTGCTCCA
TGTGGGATAAGAACATGGAAGATCTGCACCGGCACATCTTCTGGGAGCCTGACGCTTCTA
5 AGCTGAACGAGAACTACTGTAGGAACCCAGACGACGATGCCACGGTCCCTGGTGCTAC
ACCGGCAACCCGCTGATCCCTTGGGACTATTGTCCTATCAGCCGCTGCGAGGGCGATACA
ACACCTACCATCGTGAACCTGGACCACCCTGTGATCTCTTGCGCCAAGACCAAGCAGCT
GAGAGTGGTGAACGGCATCCCAACACGGACCAACATCGGATGGATGGTCTCCCTGAGAT
ACCGGAACAAGCACATCTGCGGCGGCTCTCTGATCAAGGAATCTTGGGTCTGACCGCC
10 AGACAGTGCTTCCCCAGCCGGGACCTGAAGGACTATGAGGCCTGGCTGGGAATCCACGA
CGTGACCGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAAGCAAGTGCTGAACGTGTCCAGCTGGTG
TACGGCCCTGAGGGATCTGATCTGGTCTGATGAAACTGGCCAGACCCGCCGTGCTGGA
CGACTTTGTGTCCACCATCGACCTGCCTAACTACGGCTGCACCATCCCTGAAAAGACCAG
CTGCAGCGGTGACGGCTGGGGCTATACAGGCCTGATCAACTACGACGGTCTGCTGCGGGT
15 TGCTCACCTGTACATCATGGGCAACGAGAAGTGACGCCAGCACCACAGAGGAAAAGTTA
CACTTAACGAGAGCGAGATCTGCGCCGGCGCCGAGAAAATCGGCTCCGGCCCTTGTGAA
GGCGACTACGGAGGCCCTCTGGTGTGCGAACAGCACAAAGATGAGAATGGTGCTGGGCGT
GATCGTGCCCGGAAGAGGGCTGTGCAATCCCTAATAGGCCCGGCATTTTCGTGCGGGTGGC
CTACTACGCCAAGTGATCCACAAGATCATCTGACGTACAAGGTGCCTCAGAGCTGA
20 SEQ ID NO:111

>hHGF 密码子优化序列 2(hHGF-OS2)
ATGTGGGTACCAAACCTGCTGCCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTGCACCTGCT
GCTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGAGAAAAGCGGAGAAAATACCATTCA
25 CGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACATGATCAAGATCGACCCTGCCCTGAAAATCA
AGACCAAGAAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACAAGAAAACAAAGG
CCTGCCTTTACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAAGCAGTGCCTGTGGTT
CCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGAATTTCGGTCACGAGTTCGACCTGT
ACGAGAATAAGGACTACATTAGAACTGCATCATCGGCAAGGGCCGGAGCTACAAGGGC
30 ACCGTGAGCATACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAGTTCATGATCCCTCAT
GAGCACAGCTTCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGCAGGAGAACTATTGTAG
AAATCCCAGAGGGCAGGAAGGAGGACCCTGGTGTTTTACCAGCAACCCAGAGGTGCGG
TACGAGGTGTGCGACATACCCAGTGACGAGGTTGGAATGCATGACATGCAACGGCGA
GAGCTACCGGGGCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAAATCTGCCAAAGATGGGATC
35 ACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCGAGAGATACCCTGACAAGGGCTTCGAC
GACAATTACTGCCGGAACCTGATGGACAGCCTAGACCTTGGTGCTACACCCTGGACCCT
CACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGCCGATAACACCATGAACGACAC
CGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGCCAGGGCGAGGGCTACAGGGGC
ACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTGACGGTGGGACAGCCAATACCCCCA
40 CGAACATGATATGACCCCAGAAAACCTTCAAGTGCAAAAGATCTGCGGGAAAACCTACTGTA
GAAACCCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGCTTACCACCGACCCTAACATCAGGGTG
GGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGCGCATGAGCCACGGTCAGGACTGCTACAGAGG
AAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGACCAGAAGCGGCCTGACCTGCAGC
ATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCACATCTTTTGGGAGCCTGACGCCAG
45 CAAGCTGAATGAGAACTACTGTCGGAACCCTGACGACGATGCTCACGGCCCTTGGTGCT
ACACAGGCAACCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGTCCTATTAGCAGGTGTGAAGGCGACA
CGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGTGATCAGCTGTGCTAAAACAAAGCAA
CTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCGACCCGGACCAACATCGGATGGATGGTCAGCCTGCG
GTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCCTGATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAG
50 CCAGACAGTGTTTTCCAGCAGAGATCTGAAGGACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCAC
GACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAAGCAGGTTCTGAACGTGTCCCAGCTGG
TGTACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTGATGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGG
ATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAATTACGGATGTACAATTCTGAAAAGACCT
CCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCGGACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAG
55 TGGCCACCTGTATATCATGGGCAACGAGAAGTGACGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTG
ACCCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCGGAGCCGAGAAAATCGGATCTGGCCCTGCGA
AGGAGATTACGGCGGCCCTCTGGTCTGCGAGCAGCACAAAGATGAGAATGGTGCTGGGCG
TGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCCATCCCTAACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGG

CCTATTACGCCAAATGGATCCACAAAATCATCCTGACATACAAGGTCCCACAGTCTTGA
SEQ ID NO:112

>hHGF 密码子优化序列 3(hHGF-OS3)

5 ATGTGGGTGACCAAGCTGCTGCCCCGCCCTGCTCCTGCAGCACGTGCTGCTGCACCTGCT
CCTGCTGCCCCATCGCCATCCCCTACGCCGAGGGGCGAGAGAAAGAGAAGAAACACCATCC
ACGAGTTCAAGAAGAGCGCCAAGACCACCCTGATCAAGATCGACCCCGCCCTGAAGATC
AAGACCAAGAAGGTGAACACCGCCGATCAGTGCGCCAACAGATGCACAAGAAACAAGG
GCCTGCCCTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGACAAGGCTAGAAAGCAGTGCCTGTGG
10 TTCCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAGGAGTTCGGCCACGAGTTCGACCT
GTACGAGAACAAAGGACTACATCAGAACTGCATCATCGGCAAGGGCAGAAGCTACAAG
GGCACCGTGAGCATCACCAAGAGCGGCATCAAGTGTGAGCCCTGGAGCAGCATGATCCC
CCATGAGCACAGCTTCCTGCCTAGCAGCTACAGAGGGAAGGACCTGCAAGAGAACTACT
GCAGAAACCTAGAGGGCGAGGAGGGCGGCCCTTGGTGTTTCAAGCAATCCCAGAGGT
15 GAGATACGAGGTGTGCGACATCCCCTCAGTGCAGCGAGGTGGAGTGCATGACCTGCAACG
GCGAAAGCTATAGAGGCCTGATGGACCACCCGAGAGCGGCAAGATTTGTACGCGGTGG
GATCACCAACCCCCACAGACACAAGTTCCTGCCCCGAGAGATACCCCGACAAGGGCTT
CGACGACAATTACTGTAGAAACCCCGACGGGCGCCCTAGACCCTGGTGTTACACCCTGG
ACCCCCACACAAGATGGGAGTACTGCGCCATCAAGACCTGCGCCGACAACACCATGAAC
20 GACACCGACGTGCCCCCTGGAGACCACCGAGTGCATCCAAGGCCAAGGCGAGGGCTACA
GAGGCACCGTGAAACACCATCTGGAACGGCATTCCCTGTCAGAGATGGGACAGCCAATAC
CCCCATGAACACGATATGACCCCGAGAACTTCAAGTGCAAGGACCTGAGAGAGAACTA
CTGCCGGAACCCCGATGGCAGCGAATCCCCTTGGTGCTTACCACCGACCCCAACATCA
GAGTGGGCTACTGCAGCCAAATCCCCAACTGCGACATGAGCCACGGCCAAGACTGTTAC
25 AGAGGGAACGGCAAGAATACTATGGGCAACCTGAGCCAAACAAGAAGCGGCCTGACCT
GCAGCATGTGGGACAAGAACATGGAGGACCTGCACAGACACATCTTCTGGGAGCCCGA
CGCTAGCAAGCTGAACGAGAACTACTGTGCGAACCCCGACGACGATGCCACGGCCCCCT
GGTGCTACACCGGCAACCCCTGATCCCCTGGGACTACTGCCCCATCAGCAGATGCGAG
GGCGACACACCCCCACCATCGTGAACCTGGACCACCCCGTGATCAGCTGTGCCAAGAC
30 CAAGCAACTGAGAGTGGTGAACGGCATCCCCACAAGAACCAACATTGGCTGGATGGTG
AGCCTGAGATACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGCAGCCTGATCAAGGAGAGCTGGG
TGCTGACCGCTAGACAGTGCTTCCCTAGCAGAGACCTGAAGGACTACGAGGCCTGGCTG
GGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGTAACAAGTGCTGAACGTGA
GCCAATGTTGACGGCCCCGAGGGCAGCGACCTGGTGCTGATGAAGCTGGCTAGACCC
35 GCCGTGCTGGACGACTTCGTGAGCACCATCGACCTGCCCCAACTACGGCTGCACCATCCC
CGAGAAGACAAGCTGCAGCGTGTACGGCTGGGGCTACACCGGCCTGATCAACTACGACG
GCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTACATCATGGGCAACGAGAAGTGCAGCCAACACCAC
CGGGGCAAAGTGACCCTGAACGAGAGCGAGATCTGCGCCGGGGCTGAGAAAATCGGCA
GCGGGCCCTGCGAGGGGGACTACGGGGGCCCCCTGGTGTCGAGCAGCACAAGATGAG
40 AATGGTGCTGGGCGTGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCCATCCCCAACAGACCCGGCA
TCTTCGTGAGAGTGGCCTACTACGCCAAGTGGATCCACAAGATCATCCTGACCTACAAGG
TGCCTCAGAGCTGA

SEQ ID NO:113

45 >5'UTR-hHGF- α 球蛋白 3'UTR-A30L70 (Mod.-hHGF-OS2)
GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCGCTAGCCTTA
AGGCCACCATGTGGGTACCAAACCTGCTGCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTG
CACCTGCTGCTGCTGCCTATCGCCATCCCCTACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAA
ATACCATTACGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAAGATCGACCCCTGC
50 CCTGAAAATCAAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACA
AGAAACAAAGGCCTGCCTTTACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAGC
AGTGCCTGTGGTTCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGTAATTCGGTCA
GAGTTCGACCTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAACTGCATCATCGGCAAGGGCC
GGAGCTACAAGGGCACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAG
55 TTCCATGATCCCTCATGAGCACAGCTTCCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGC
AGGAGAACTATTGTAGAAATCCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCTGGTGTTTACCAG
CAACCCAGAGGTGCGGTACGAGGTGTGCGACATACCCAGTGCGAGCGAGGTGGAATGC
ATGACATGCAACGGCGAGAGCTACCGGGGCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAA

ATCTGCCAAAGATGGGATCACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCGAGAGAT
ACCCTGACAAGGGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCCTGATGGACAGCCTAGACCT
TGGTGCTACACCCTGGACCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGC
CGATAACACCATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGC
5 CAGGGCGAGGGCTACAGGGGCACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTACGC
GGTGGGACAGCCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCCAGAAAACCTTCAAGTGCAA
AGATCTGCGGGAAAACTACTGTAGAAAACCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGCTTCA
CCACCGACCCTAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGGGACATGAGC
CACGGTCAGGACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGA
10 CCAGAAGCGGCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCA
CATCTTTTGGGAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTCCGAACCCTGACG
ACGATGCTCACGGCCCTTGGTGCTACACAGGCAACCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGT
CCTATTAGCAGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGT
GATCAGCTGTGCTAAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCCGACCCGGACC
15 AACATCGGATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCC
TGATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTTCCTCCAGCAGAGATCTGAAG
GACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCA
AGCAGGTTCTGAACGTGTCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTG
ATGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAA
20 TTACGGATGTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCG
GACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCCACCTGTATATCATGGGCAACGAG
AAGTGCAGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCG
GAGCCGAGAAAAATCGGATCTGGCCCCCTGCGAAGGAGATTACGGCGGCCCTCTGGTCTG
CGAGCAGCACAAGATGAGAATGGTGTCTGGCGTGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCC
25 ATCCCTAACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAAATGGATCCACAA
AATCATCTTGACATAACAAGTCCACAGTCTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCA
TGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCTCCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCC
GTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
30 AAAGTTTAAACATTAAATTC
TAGA

SEQ ID NO:114

>ACTG1 5'UTR-hHGF-CTSB 3'UTR-A30L70 (A1B12-hHGF-OS2)
35 CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTGCGGTTTCTCTGCCGGTTCGCAGCTAGC
GCCACCATGTGGGTACCAAACCTGCTGCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTGCA
CCTGCTGCTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAAATA
CCATTACGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAAGATCGACCCTGCCCTG
AAAATCAAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACAAGA
40 AACAAAGGCCTGCCTTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAGCAGTG
CCTGTGGTTCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGAATTCGGTACAGAGT
TCGACCTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAAACTGCATCATCGGCAAGGGCCGGAG
CTACAAGGGCACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAGTTCC
ATGATCCCTCATGAGCACAGCTTCCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGCAGGA
45 GAACTATTGTAGAAATCCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCTGGTGTTCCTACAGCAAC
CCAGAGGTGCGGTACGAGGTGTGCGACATACCCAGTGCAGCGAGGTGGAATGCATGA
CATGCAACGGCGAGAGCTACCGGGGCCCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAAATCTG
CCAAAGATGGGATCACCAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCGAGAGATACCCT
GACAAGGGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCCTGATGGACAGCCTAGACCTTGGT
50 GTACACCCTGGACCCCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGCCGAT
AACACCATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGGCCAGG
GCGAGGGCTACAGGGGCACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTACGCGGTG
GGACAGCCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCCAGAAAACCTTCAAGTGCAAAGAT
CTGCGGGGAAAACTACTGTAGAAAACCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGCTTACCAC
55 CGACCCTAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGCGACATGAGCCAC
GGTCAGGACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGACCA
GAAGCGGCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCACAT
CTTTTGGGAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTCCGAACCCTGACGAC

GATGCTCACGGCCCTTGGTGCTACACAGGCAACCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGTCTT
ATTAGCAGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGTGA
TCAGCTGTGCTAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCGACCCGGACCAA
CATCGGATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCCTG
5 ATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTTTTCCAGCAGAGATCTGAAGG
ACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAA
GCAGGTTCTGAACGTGTCCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTGA
TGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAAT
TACGGATGTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCGG
10 ACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTATATCATGGGCAACGAGA
AGTGCAGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCGG
AGCCGAGAAAAATCGGATCTGGCCCTGCGAAGGAGATTACGCGGGCCCTCTGGTCTGC
GAGCAGCACAAGATGAGAATGGTGCTGGGCGTGATCGTGCCCGGCAGAGGCTGCGCCA
TCCCTAACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAAATGGATCCACAAA
15 ATCATCTGACATACAAGGTCCCACAGTCTTGATAAGGGCCCACCGGTTCTGCCGTGGG
CCTGTCGTGCCAGTCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCTTGAACTGCATGTTT
TTGCGACTCTTGGGACTTCATCTTAACCTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTTTTCAACCATGG
CATCCCTCCCCCAATTAGTTCCTGTATCCTCGTCAACCTTCTCTGTAAGTGCCTGGTA
AGCTTGCCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACCGCGGAAAAAAAAAAAA
20 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAGTTTAAACATTTA
AATTCTAGA

SEQ ID NO:115

25 >CHCHD10 5'UTR-hHGF-CTSB 3'UTR-A30L70 (A15B12-hHGF-OS2)
GGCATTTGTCCCCGCGACAGCACCCTGCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCCGGTCCCACC
GCCGCCACCGCTAGCGCCACCATGTGGGTACCAAACCTGCTGCCCCGCCCTGCTGCTGCA
GCACGTGCTCCTGCACCTGCTGCTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGA
GAAAGCGGAGAAATACCATTACGAATTTAAGAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAA
30 GATCGACCTGCCCTGAAAATCAAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCT
AATAGATGCACAAGAAACAAAGGCCTGCCTTTCACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAA
GGCCAGAAAGCAGTGCCTGTGTTTCCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAA
GAATTCGGTCACGAGTTTCGACCTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAACTGCATCAT
CGGCAAGGGCCGGAGCTACAAGGGCACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGC
35 CAGCCATGGAGTTCCATGATCCCTCATGAGCACAGCTTCCTGCCAAGCTCTTACCGGGG
AAAGGATCTGCAGGAGAACTATTGTAGAAATCCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCTGG
TGTTTACCAGCAACCCAGAGGTGCGGTACGAGGTGTGCGACATACCCCAGTGCAGCG
AGGTGGAATGCATGACATGCAACGGCGAGAGCTACCGGGGCCTGATGGACCACACAGA
GAGCGGCAAAATCTGCCAAAGATGGGATCACAGACCCCTCATAGGCACAAGTTCTTG
40 CCCGAGAGATACCCTGACAAGGGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCTGATGGAC
AGCCTAGACCTTGGTGCTACACCCTGGACCCCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATC
AAGACATGTGCCGATAACACCATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACCTGAGT
GTATCCAGGGCCAGGGCGAGGGCTACAGGGGCACCGTGAACACCATCTGGAACGGCAT
CCCTTGTCAGCGGTGGGACAGCCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCAGAAAAC
45 TTCAAGTGCAAAGATCTGCGGGAAAACCTACTGTAGAAACCCTGACGGCTCCGAGAGCC
CTGGTGCTTACCACCGACCCTAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAAC
TGCGACATGAGCCACGGTCAGGACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCA
ACCTGAGCCAGACCAGAAAGCGGCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAACATGGAAGA
TCTGCACCGGCACATCTTTTGGGAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTC
50 GGAACCCTGACGACGATGCTCACGGCCCTTGGTGCTACACAGGCAACCCTCTGATCCCT
TGGGACTATTGTCCTATTAGCAGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCT
GGATCACCCAGTGATCAGCTGTGCTAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATC
CCGACCCGGACCAACATCGGATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCT
GCGGCGGTAGCCTGATCAAGGAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTTTCCAGC
55 AGAGATCTGAAGGACTACGAGGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCG
ACGAGAAGTGCAAGCAGGTTCTGAACGTGTCCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTC
TGATCTGGTTCTGATGAAGCTTGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCAT
CGACCTGCCAAATTACGGATGTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCT

GGGGCTACACCGGACTCATCAACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCCCACCTGTATATC
ATGGGCAACGAGAAGTGCAGCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCCTGAACGAGTCTG
AAATCTGCGCCGGAGCCGAGAAAATCGGATCTGGCCCCTGCGAAGGAGATTACGGCGG
CCCTCTGGTCTGCGAGCAGCACAAGATGAGAATGGTGCTGGGCGTGATCGTGCCCCGGC
5 AGAGGCTGCGCCATCCCTAACCGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAA
ATGGATCCACAAAATCATCCTGACATAACAAGGTCCCACAGTCTTGATAAGGGCCCCACCG
GTTCTGCCGTGGGCCTGTCGTGCCAGTCTTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCCTG
GAACTGCATGTTCTTGCGACTCTTGGGACTTCATCTTAACTTCTCGCTGCCCCAGCCATG
TTTTCAACCATGGCATCCCTCCCCAATTAGTTCCTGTCTCATCCTCGTCAACCTTCTCTGT
10 AAGTGCCTGGTAAGCTTGCCCTTGCTTAAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACCGCG
GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAG
TTTAAACATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:116

15 >PD-1 抗体重链氨基酸序列
MEWSWVFLFLLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAP
GKGLEWVATISGGGANTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLY
YFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
20 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:117

25 >PD-1 抗体轻链氨基酸序列
MSVPTQVLGLLLLWLTDA RCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPG
KAPKLLIYTATSLADGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKV
30 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:118

>PD-1 抗体重链 DNA 序列
35 ATGGAATGGTCTGGGTGTTCTTCTTCTTCTGTCCTGACACCGGCGTGCACTCCGAA
GTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGACAGCTGGCGGATCTCTGAGACTGTC
TTGTGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACATGATGAGCTGGGTGCGACAGGCC
CTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTGGCGGAGGCGCAACACCTACTA
CCCCGACTCTGTGAAGGGCCGTTACCATCTCTCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGT
40 ACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGCA
GCTGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTTCTA
CCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCCACCG
CTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTCTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCAGCAGTGCTGCAGTCTCCGCGCTG
45 TACTCCCTGTCTCCGTGCTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAATCTAAGT
ACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCTGTGTTTC
TGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC
GTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG
50 GCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTA
CCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC
AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGG
CCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGAT
GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCG
55 CCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACATAAGACCACCCCCCTGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTG
GCAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC
ACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGAAAG

SEQ ID NO:119

>PD-1 抗体轻链 DNA 序列

ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATG
5 CGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGA
CCATCACCTGTCTGGCCTCCCAGACCATCGGCACCTGGCTGACCTGGTATCAGCAGAA
CCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACACCGCCACCAGTCTGGCCGATGGCGTGCC
CTTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCA
GCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGTACTCCATCCCCTGGACCTTTG
10 GCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTC
CCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCAGTGTCTGTGCCTGCTGAACAA
CTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGC
AACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCTC
CACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG
15 ACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:120

>PD-1 抗体重链 mRNA 序列

AUGGAAUGGUCCUGGGUGUUCUGUUCUUCUGUCCUGUACCGGCGUGCAGUCC
20 GAAGUGCAGCUGGUGGAAUCUGGCGGCGGACUGGUGCAGCCUGGCGGAUCUCUGAG
ACUGUCUUGUGCCGCCUCCGGCUUCACCUUCUCCAGCUACAUGAUGAGCUGGGUGCG
ACAGGCCCCUGGCAAGGGACUGGAAUGGGUGGCCACAAUCUCUGGCGGAGGCGCCAA
CACCUACUACCCCGACUCUGUGAAGGGCCGGUUCACCAUCUCUCGGGACAACGCCAA
GAACUCCUGUACCGUGCAGAUGAACAGCCUGCGGGCCGAGGACACCGCCGUGUACUA
25 CUGUGCCCCGGCAGCUGUACUACUUCGACUACUGGGGCCAGGGCACCACCGUAGCCGU
GUCCUCUGCUUUCUACCAAGGGCCCCUCCGUGUUCUCCUCUGGCUCUUGCAGACGU
CACCUCGAGUCCACCGCUGCUCUGGGCUGCCUCGUGAAGGACUACUUCCCCCGAGCC
UGUGACAGUGUCCUGGAACUCUGGGCGCCUGACCUCUGGCGUGCACACCUUUCAGC
AGUGCUGCAGUCCUCCGGCCUGUACUCCUGUCCUCCGUCGUGACAGUGCCCUCAG
30 CUCUCUGGGCACCAAGACCUACACCUGUAACGUGGACCACAAGCCUCCAACACCAA
GGUGGACAAGAGAGUGGAAUCUAAGUACGGCCCUCCUUGCCCCCUUGUCCUGCCCC
UGAAUUUCUGGGCGGACCCUCUGUGUUUCUGUUCUCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCU
GAUGAUCUCCCGGACCCCCGAAGUGACCUGCGUGGUGGUGGAUGUGUCCAGGAAGA
UCCCGAGGUGCAGUUCAAUUGGUACGUGGACGGCGUGGAAGUGCACAAUGCCAAGAC
35 CAAGCCUAGAGAGGAACAGUUAACUCCACCUACCGGGUGGUGUCCGUGCUGACCCGU
GCUGCAUCAGGACUGGCUGAACGGCAAAGAGUACAAGUGCAAGGUGUCCAACAAGG
GCCUGCCCAGCUCCAUCGAAAAGACCAUCUCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAAC
CCCAGGUGUACACACUGCCUCCAAGCCAGGAAGAGAUGACCAAGAACCAGGUGUCCC
UGACCUGCCUCGUGAAAGGCUUCUACCCUCCGAUAUCGCCGUGGAUUGGGAGUCCA
40 ACGGCCAGCCUGAGAACAACUACAAGACCACCCCCCUUGUCUGGACUCCGACGGCU
CCUUCUUUCUGUACUCUCGCCUGACCGUGGACAAGUCCCGGUGGCAGGAAGGCAACG
UGUUCUCCUGCAGCGUGAUGCACGAGGCCUCGACAACCACUACACCCAGAAGUCCC
UGUCCUGUCUCUGGGAAG

SEQ ID NO:121

45

>PD-1 抗体轻链 mRNA 序列

AUGUCCGUGCCUACCCAGGUGCUGGGACUGCUGCUGCUGUGGCUGACCGACGCCAGA
UGCGACAUCAGAUAGACCCAGUCCCCUCCAGCCUGUCUGCCUCUGUGGGCGACAGA
GUGACCAUACCCUGUCUGGCCUCCAGACCAUCGGCACCUGGCUGACCUUGUAUCAG
50 CAGAAGCCUGGCAAGGCCCCCAAGCUGCUGAUCUACACCGCCACCAGUCUGGCCGAU
GGCGUGCCCUUAGAUUCUCCGGCUCUGGCUCUGGCACCGACUUUACCCUGACCAUC
AGCUCCUGCAGCCCGAGGACUUCGCCACCUACUACUGCCAGCAGGUGUACUCCAUC
CCUGGACCUUUGGCGGAGGCACCAAGGUGGAAAUCAAGCGGACCGUGGCCGUCUCC
UCCGUGUUAUCUUCUCCACCUUCCGACGAGCAGCUGAAGUCCGGAACCGCCAGUGUC
55 GUGUGCCUGCUGAACAACUUCUACCCCCGCGAGGCCAAGGUGCAGUGGAAGGUGGAC
AACGCCCUGCAGUCCGGCAACUCCAGGAUCCGUGACCGAGCAGGACUCCAAGGAC
AGCACCUACUCCUGUCCUCCACCCUGACCCUGUCCAAGGCCGACUACGAGAAGCAC
AAGGUGUACGCCUGCGAAGUGACCCACCAGGGCCUGUCUAGCCCCGUGACCAAGUCU

UUCAACCGGGGCGAGUGC

SEQ ID NO:122

>5'UTR-anti PD-1- α 球蛋白 3'UTR-A30L70 (Mod.- anti PD-1)

5 GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAATGGT
CCTGGGTGTTCTTCTTCTTCTGTCCTGTGACCAACCGGCGTGCCTCCGAAGTGCAGCTGG
TGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCC
TCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACATGATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGCAAGGG
ACTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTGGCGGAGGCGCCAACACCTACTACCCCGACTCTG
10 TGAAGGGCCGGTTTACCATTCTCTCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATG
AACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGCAGCTGTACTACTT
CGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGCCCCCT
CCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCCACCGCTGCTCTGGGCT
GCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTG
15 ACCTCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCAGTGTGTCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTCTGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGA
CCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAATCTAAGTACGGCCCTCCC
TGCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCTGTGTTTCTGTTCCCCCA
AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG
20 ATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT
GCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGG
TGTCACAACAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCA
GCCCCGGGAACCCCAAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAAC
25 CAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATG
GGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGG
CAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT
CCCTGTCCCTGTCTCTGGGAAAGGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCGGCGAC
30 GTGGAGGAGAACCCCGGCCCATGTCCGTGCCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCT
GTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTG
CCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGCCTCCCAGACCATCGGCACCTGG
CTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACACCGCCAC
CAGTCTGGCCGATGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCCGACTTTAC
35 CCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGT
ACTCCATCCCCCTGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGC
CGTCCCTCCGTGTTTCTTCTTCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCA
GTGTCGTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG
GACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGG
40 ACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTT
CAACCGGGGCGAGTGCTGATAAGGGCCCCACCGTTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTG
GCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCTTCCCCAGCCCCCTCTCCCTTCTGCAACCGTAC
CCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCCTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAAAA
45 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AATTATTGTTTAAACA
TTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:123

>ACTG1 5'UTR- anti PD-1-CTSB 3'UTR-A30L70 (A1B12- anti PD-1)

50 CTCTCGCACTCTGTTCTTCCGCCGCTCCGCCGTGCGGTTTCTCTGCCGGTGCACACCA
TGGAATGGTCTTGGGTGTTCTTCTTCTTCTGTCCTGACCAACCGGCGTGCCTCCGAAG
TGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCT
TGTGCCGCCCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACATGATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCC
55 TGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTGGCGGAGGCGCCAACACCTACTAC
CCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCTCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA
CCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGCAG
CTGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTTCTACC

AAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCCACCGCT
GCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTC
TGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTTCCAGCAGTGTGACAGTCTCCGGCCTGT
ACTCCCTGTCTCCGTCTGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACCT
5 GTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAAATCTAAGTA
CGGCCCTCCCTGCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCTGTGTTTCT
GTTCCCCCAAAGCCCCAAGGACACCTTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC
GTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACC
10 GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA
GTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCC
AAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC
GTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGC
15 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGC
AGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGAAAGGCCACCAACTTCTCCCTGTGAAGCAGG
CCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACT
GCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCA
20 GCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGCCTCCAGACCATC
GGCACCTGGCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA
CACCGCCACCAGTCTGGCCGATGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCA
CCGACTTTACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC
CAGCAGGTGTACTCCATCCCCCTGGACCTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCTAAGC
25 GGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCTATCTTCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCC
GGAACCGCCAGTGTCTGTGCTGTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCTGTCCAAGGCCGACTA
CGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTG
30 ACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGTGATAAGGGCCACCGGTCTGCCGTGGGCCTG
TCGTGCCAGTCTTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCTCTGGAAGTGCATGTTCTTGC
GACTCTTGGGACTTTCATCTTAACCTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTTTTCAACCATGGCATC
CTCCCCCAATTAGTTCCCTGTCATCCTCGTCAACCTTCTCTGTAAGTGCCTGGTAAGCT
TGCCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACTCGAGCCGCGGAAAAAAAAAA
35 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AATTATTGTTTAAA
CATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:124

40 >CHCHD10 5'UTR- anti PD-1-CTSB 3'UTR-A30L70 (A15B12- anti PD-1)
GGCATTGTCCCGCGACAGCACCGCTGCCGCGTCTCTAAGGTTCGCCCCGGTCCCACC
GCCGCCACCATGGAATGGTCCCTGGGTGTTCTGTTCTTCTGTCCGTGACCACCGGCGTG
CACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT
GAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACATGATGAGCTGGGTGC
45 GACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTGGCGGAGGCGCCAA
CACCTACTACCCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCTCGGGACAACGCCAAGA
ACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGT
GCCCGGCAGCTGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCT
TGCTTCTACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGA
50 GTCCACCGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGT
CCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCAGTGTCTGCAGTCC
TCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCTCGTGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAG
ACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG
AATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGTCTGCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCT
55 CTGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAA
GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAAC
TCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAA

AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATC
TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGG
AAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCC
GATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCC
5 CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGT
CCCGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA
CCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGAAAGGCCACCACTTCTCCCTGC
TGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGCCCCATGTCCGTGCCTACCCAGGT
GCTGGGACTGCTGCTGTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGT
10 CCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGCCTCCC
AGACCATCGGCACCTGGCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCT
GCTGATCTACACCGCCACCAGTCTGGCCGATGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTG
GCTCTGGCACCAGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAGCAGGTGTACTCCATCCCCCTGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGA
15 AATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAGCAGC
TGAAGTCCGGAACCGCCAGTGTCTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGGCC
AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGA
CCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAG
GCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTA
20 GCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGATAAGGGCCACCGGTCTGCCG
TGGGCCTGTCTGTGCCAGTCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCTGGAACCTGCAT
GTTCTTGCGACTCTTGGGACTTCATCTTAACTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTTTTCAACC
ATGGCATCCCTCCCCCAATTAGTTCCTGTCTCCTCGTCAACCTTCTCTGTAAGTGCT
GGTAAGCTTGGCCTTGTCTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACTCGAGCCGCGGA
25 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AATTA
TTGTTTAAACATTTAAATTCTAGA

SEQ ID NO:125

30 >萤火虫荧光素酶核苷酸序列(Firefly Luciferase, Fluc)
ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATG
GAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTTGGAAAC
AATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAA
TGCCGTTTCGGTTGGCAGAAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATC
35 GTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTTGGGCGCGTTATTTATC
GGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTAT
GGGCATTTTCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTGCAAAAAATTTTGA
ACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGAT
TACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAAT
40 GAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAA
CTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGT
GAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAAAATCATTCCGGATACTGCGA
TTTTAAGTGTTGTTCATTCCATCACGGTTTGGAAATGTTTACTACACTCGGATATTTGAT
ATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCC
45 TTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCA
AAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGC
GCTCCCCCTCTTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTAT
CAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGG
GATGATAAACCGGGCGCGGTCCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGA
50 TCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGT
CCTATGATTATGTCCGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAA
GGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCA
TCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAA
TTGGAATCCATCTTGTCTCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTGCGAGGTCTTCCC
55 GACGATGACCGCGGTGAACCTCCCGCCCGCTTGTGTGTTTGGAGCACGGAAAGACGAT
GACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCGCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTG
CGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACG
CAAGAAAAATCAGAGAGATCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGT

AA

SEQ ID NO:126

>HGF-OS2 表达载体 CHCHD10 5'UTR- hHGF-CTSB 3'UTR-A30L70(A16B12-HGF-OS2)

5 CCGCTGCCCGCCGTCTCTAAGGTCGCCCCGGGTCCCACCGCCGCCACCGCTAGCGCCACCA
TGTGGGTACCAAACCTGCTGCCCCGCCCTGCTGCTGCAGCACGTGCTCCTGCACCTGCTG
CTGCTGCCTATCGCCATCCCTTACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAAATACCATTCA
CGAATTTAAGAAAGAGCGCCAAGACCACACTGATCAAGATCGACCCTGCCCTGAAAATC
AAGACCAAGAAAGTGAACACAGCCGACCAATGCGCTAATAGATGCACAAGAAACAAA
10 GGCCTGCCTTTACCTGCAAGGCCTTCGTGTTTCGATAAGGCCAGAAAGCAGTGCCTGTG
GTTCCCCCTTCAACAGCATGAGCAGCGGCGTGAAGAAAGAATTCGGTCACGAGTTCGAC
CTGTACGAGAATAAGGACTACATTAGAAACTGCATCATCGGCAAGGGCCGGAGCTACA
AGGGCACCGTGAGCATCACCAAGTCTGGCATCAAGTGCCAGCCATGGAGTTCATGATC
CCTCATGAGCACAGCTTCCTGCCAAGCTCTTACCGGGGAAAGGATCTGCAGGAGAACTA
15 TTGTAGAAATCCCAGAGGGCGAGGAAGGAGGACCCTGGTGTGTTTACCAGCAACCCAGAG
GTGCGGTACGAGGTGTGCGACATACCCAGTGCAGCGAGGTGGAATGCATGACATGCA
ACGGCGAGAGCTACCGGGGCCTGATGGACCACACAGAGAGCGGCAAAATCTGCCAAAG
ATGGGATCACCGAGCCCCCTCATAGGCACAAGTTCCTGCCCGAGAGATACCCTGACAAG
GGCTTCGACGACAATTACTGCCGGAACCCTGATGGACAGCCTAGACCTTGGTGTCTACAC
20 CCTGGACCCTCACACCAGATGGGAATACTGCGCCATCAAGACATGTGCCGATAACACC
ATGAACGACACCGATGTGCCACTCGAGACAACTGAGTGTATCCAGGGCCAGGGCGAGG
GCTACAGGGGACCGTGAACACCATCTGGAACGGCATCCCTTGTGACGCGTGGGACAG
CCAATACCCCCACGAACATGATATGACCCAGAAAACCTTCAAGTGCAAAGATCTGCGG
GAAAACCTACTGTAGAAACCCCTGACGGCTCCGAGAGCCCTTGGTGTCTTACCACCGACCC
25 TAACATCAGGGTGGGCTACTGTAGCCAGATCCCCAACTGCGACATGAGCCACGGTGAG
CACTGCTACAGAGGAAACGGCAAGAATTACATGGGCAACCTGAGCCAGACCGAAGCG
GCCTGACCTGCAGCATGTGGGACAAAAACATGGAAGATCTGCACCGGCACATCTTTTGG
GAGCCTGACGCCAGCAAGCTGAATGAGAACTACTGTGGAACCCTGACGACGATGCTC
ACGGCCCTTGGTGTCTACACAGGCAACCCTCTGATCCCTTGGGACTATTGTCCTATTAGC
30 AGGTGTGAAGGCGACACGACCCCTACAATCGTGAACCTGGATCACCCAGTGATCAGCT
GTGCTAAAACAAAGCAACTGAGAGTGGTGAATGGTATCCCCAGCCGGACCAACATCGG
ATGGATGGTCAGCCTGCGGTACAGAAACAAGCACATCTGCGGCGGTAGCCTGATCAAG
GAATCCTGGGTGTTGACAGCCAGACAGTGTGTTTCCAGCAGAGATCTGAAGGACTACGA
GGCCTGGCTGGGCATCCACGACGTGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGTGCAAGCAGGTT
35 CTGAACGTGTCCAGCTGGTGTACGGCCCCGAGGGCTCTGATCTGGTTCTGATGAAGCT
TGCTAGACCCGCTGTGCTGGATGACTTCGTGTCCACCATCGACCTGCCAAATTACGGAT
GTACAATTCCTGAAAAGACCTCCTGTTCTGTGTACGGCTGGGGCTACACCGGACTCATC
AACTATGACGGCCTGCTGAGAGTGGCCACCTGTATATCATGGGCAACGAGAAGTGCA
GCCAGCACCATAGAGGCAAGGTGACCCCTGAACGAGTCTGAAATCTGCGCCGGAGCCGA
40 GAAAATCGGATCTGCCCCCTGCGAAGGAGATTACGGCGGCCCTCTGGTCTGCGAGCAG
CACAAGATGAGAATGGTGTGCTGGGCGTGTGCTGCCCCGCGAGAGGCTGCGCCATCCCTA
ACGGCCTGGAATCTTCGTGCGCGTGGCCTATTACGCCAAATGGATCCACAAAATCATC
CTGACATACAAGGTCCCACAGTCTTGATAAGGGCCCACCGGTTCTGCCGTGGGCTGTC
GTGCCAGTCTGGGGGCGAGATCGGGAGAATCACGTCTGGAACATGCATGTTCTTGCGA
45 CTCTTGGGACTTCATCTTAACTTCTCGCTGCCCCAGCCATGTTTTCAACCATGGCATCCC
TCCCCCAATTAGTTCCTGTCTCCTCGTCAACCTTCTCTGTAAGTGCCTGGTAAGCTTG
CCCTTGCTTAAGAACTCAAAACATAGCTGTGCTCTACCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGTTTAAACATTTAAATTCT
50 AGA

SEQ ID NO:127

>hHGF 蛋白的 mRNA 序列

55 AUGUGGGUGACCAAACUCCUGCCAGCCCUGCUGCUGCAGCAUGUCCUCCUGCAUCUC
CUCCUGCUCCCCAUCGCCAUCCCCUAUGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAUACA
AUUCAUGAAUUCAAAAAUCAGCAAAGACUACCCUAAUCAAUAGAUGCAGCACUG
AAGAUAAAAACCAAAAAAGUGAAUACUGCAGACCAUUGUCUAAUAGAUGUACUAG
GAUAAAGGACUUCACUUCACUUGCAAGGCUUUUGUUUUUGAUAAAGCAAGAAAAC

AAUGCCUCUGGUUCCCCUCAAUAGCAUGUCAAGUGGAGUGAAAAAAGAAUUUGGC
CAUGAAUUUGACCUCUAUGAAAACAAAGACUACAUUAGAAACUGCAUCAUUGGUAA
AGGACGCAGCUACAAGGGAACAGUAUCUAUCACUAAGAGUGGCAUCAAUUGCAGCC
CUGGAGUUGCAUGAUACCACACGAACACAGCUUUUUGCCUUCGAGCUAUCGGGGUAA
5 AGACCUACAGGAAAACUACUGUCGAAAUCCUCGAGGGGAAGAAGGGGGACCCUGGU
GUUUCACAAGCAAUCCAGAGGUACGCUACGAAGUCUGUGACAUUCCUCAGUGUUCAG
AAGUUGAAUGCAUGACCUGCAAUUGGGGAGAGUUUUCGAGGUCUCAUGGAUCAUACA
GAAUCAGGCAAGAUUUGCAGCGCUGGGAUCAUCAGACACCACACCGGCACAAAUUC
UUGCCUGAAAAGAUAUCCCGACAAGGGCUUUGAUGAUAAUUAUUGCCGCAAUCCCGAU
10 GGCCAGCCGAGGCCAUGGUGCUAUACUCUUGACCCUCACACCCGCUGGGAGUACUGU
GCAAUUAAAAACUAGCGCUGACAAUACUAUGAAUGACACUGAUGUCCUUUGGAAAC
AACUGAAUGCAUCCAAGGUCAAGGAGAAGGCUACAGGGGCACUGUCAAUACCAUUU
GGAAUGGAAUUGCAUGUCAGCGUUGGGGAUUCUCAGUAUCCUCACGAGCAUGACAUG
ACUCCUGAAAAUUUCAAGUGCAAGGACCUACGAGAAAAUUACUGCCGAAAUCCAGAU
15 GGGUGUGAAUACCCUGGUGUUUACCACUGAUCCAACAUCAGAGUUGGCUACUGC
UCCCAAUUCCAAACUGUGAUUUGUCACAUGGACAAGAUUGUUUACUGUGGGAUUGG
CAAAAAUUUAUUGGGCAACUUUACCCAAACAAGAUUCUGGACUAAUUGUCAAUGU
GGGACAAGAACAUGGAAGACUUACAUCGUCAUUUCUUCUGGGAACCAGAUGCAAGU
AAGCUGAAUGAGAAUUACUGCCGAAAUCCAGAUUGAUGCUCAUGGACCCUGGUG
20 CUACACGGGAAAUCCACUCAUUCUUUGGGAUUUAUUGCCCUAUUUCUCGUUGUGAAGG
UGAUACCACACCUACAUAUAGUCAUUUAGACCAUCCCGUAAUUCUUGUGCCAAAAC
GAAACAAUUGCGAGUUGUAAAUGGGAUUCCAACACGAACAAACAUAGGAUGGAUGG
UUAGUUUGAGAUACAGAAUAAACAUAUCUGCGGAGGAUCAUUGAUAAAGGAGAGU
UGGGUUCUUACUGCACGACAGUGUUUCCCUUCUCGAGACUUGAAAGAUUAUGAAGC
25 UUGGCUUGGAAUUCUAUGAUGUCCACGGAAGAGGAGAUAGAGAAUUGCAAACAGGUUC
UCAUGUUUCCCGAGCUGGUUAUUGGCCCUGAAGGAUCAGAUUCUGGUUUUAUGAAG
CUUGCCAGGCCUGCUGUCCUGGAUGAUUUUGUUAGUACGAUUGAUUUACCUAAUUA
UGGAUGCACAAUCCUGAAAAAGACCAGUUGCAGUGUUUAUGGCUGGGGCUACACUG
GAUUGAUCAACUAUGAUGGCCUAAUACGAGUGGCACAUCUCUAUUAUAAUGGGAAA
30 GAGAAUUGCAGCCAGCAUCAUCGAGGGAAGGUGACUCUGAAUGAGUCUGAAAUAUG
UGCUGGGGCGUAAAAGAUUGGAUCAGGACCAUGUGAGGGGGAUUAUGGUGGGCCAC
UUGUUUGUGAGCAACAUAUAAUUGAGAAUGGUUCUUGGUGUCAUUGUUCUGGUCGU
GGAUGUGCCAUCCAAAUCGUCCUGGUUUUUUGUCCGAGUAGCAUAUUAUGCAA
AUGGAUACACAAAUAUUUUAAACAUAUAAGGUACACAGUCAUAG
35

SEQ ID NO:128

>hHGF 密码子优化 mRNA 序列 1(hHGF-OS1)
AUGUGGGUGACCAAACUGCUCUCCCGCUCUGCUGCUGCAGCAUGUGCUGCUCCACCUG
CUGCUGCUGCCAAUCGCCAUCCCCUACGCUGAAGGACAGCGGAAGCGCAGAAACACA
40 AUUCACGAAUUCAGAAGUCCGCCAAAACAACACUGAUCAAGAUCGACCCUGCCUG
AAAAUCAAAACCAAGAAGGUGAACACUGCCGAUCAGUGCGCCAACAGAUGCACAAGA
AACAAAGGCCUGCCCUUACAUGCAAGGCCUUUGUGUUCGACAAGGCCAGAAAGCAG
UGCCUGUGGUUCCCUUUAACAGCAUGAGCUCUGGCGUGAAGAAAGAGUUCGGCCAC
GAAUUCGACCUGUACGAGAACAAGGAUUACAUCAGAAAUUGUAUCAUCGGCAAGGG
45 CAGAAGCUACAAAGGCACAGUGUCCAUCACCAAAAGCGGCAUUAAGUGUCAGCCUUG
GAGCAGCAUGAUCCCUACAGACACAGCUUCCUGCCUAGCUCUACAGAGGCAAGGA
CCUGCAGGAGAAUACUGCCGGAACCCUAGAGGCGAGGAAGGCGGCCCUUGGUGCUU
UACCAGCAACCCUGAGGUGCGGUACGAGGUGUGUGACAUCCCCAGUGCAGCGAAGU
GGAAUGCAUGACCUGUAAUUGGCGAGAGCUACAGAGGCCUCAUGGACCAUACAGAGA
50 GCGGAAAGAUUUGUCAAAAGAUUGGAUCACCAGACACCUCACAGACACAAAUCCUGC
CCGAAAGAUUCCUGACAAGGGCUUCGACGACAACUACUGCAGAAAUCCUGAUGGCC
AACCCAGACCUUGGUGCUACACCCUGGAUCCUCAUACCAGAUUGGAGUACUGUGCCA
UCAAGACCUGCGCUGAUAAUACCAUGAACGACACCGAUGUGCCUCUGGAAACAACCG
AGUGCAUCCAGGGACAGGGCGAAGGCUACCGGGGACCGUGAACACCAUCUGGAACG
55 GCAUCCCCUGCCAGAGAUUGGGACAGCCAGUACCCCCACGAACACGAUAUGACCCUG
AGAACUUAAGUGCAAGGACCUAGAGAAAAUUACUGCAGAAACCCAGACGGAAGC
GAGUCUCCUUGGUGUUUUACCACCGACCCCAACAUCGGGGUGGGUUACUGCAGCCAA
AUCCCCAAUUGCGACAUGAGCCACGGCCAGGACUGCUACCGGGGAAACGGCAAAAAC

UACAUGGGCAAUCUGAGCCAGACCCGGAGCGGUCUGACCUGCUCCAUGUGGGAUAAAG
AACAUUGGAAGAUCUGCACCCGGCACAUCUUCUGGGAGCCUGACGCUUCUAAGCUGAAC
GAGAACUACUGUAGGAACCCAGACGACGAUGCCACGGUCCCUUGGUGCUACACCCGGC
AACC CGCUGAUCCCUUGGGACU AUUGUCCUAUCAGCCGCU GCGAGGGCGAUACAACA
5 CCUACCAUCGUGAACCUGGACCACCCUGUGAUCUCUUGCGCCAAGACCAAGCAGCUG
AGAGUGGUGAACGGCAUCCCAACACGGACCAACAUCGGAUGGAUGGUCUCCUGAGA
UACCGGAACAAGCACAUUCGCGGCGGCUCUCUGAUCAAGGAAUCUUGGGUCCUGACC
GCCAGACAGUGCUUCCCGAGCCGGGACCUGAAGGACUAUGAGGCCUGGCUGGGAAUC
CACGACGUGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGUGCAAGCAAGUGCUGAACGUGUCCAG
10 CUGGUGUACGGCCUGAGGGAUUCUGAUCUGGUCCUGAUGAAACUGGGCCAGACCCGCC
GUGCUGGACGACUUUGUGUCCACCAUCGACCUGCCUAACUACGGCUGCACCAUCCCU
GAAAAGACCAGCUGCAGCGUGUACGGCUGGGGCUAUACAGGCCUGAUCAACUACGAC
GGUCUGCUGCGGGUUGCUCACCUGUAUCAUAUGGGCAACGAGAAGUGCAGCCAGCAC
CACAGAGGAAAGGUUACACUUAACGAGAGCGAGAUCUGCGCCGGCGCCGAGAAAAUC
15 GGCUCCGGCCCUUGUGAAGGCGACUACGGAGGCCUCUGGUGUGCGAACAGCACAAAG
AUGAGAAUGUGCUGGGCGUGAUCGUGCCCGAAGAGGCUGUGCAAUCCCUAAUAG
GCCCCGCAUUUUCGUGCGGGUGGCCUACUACGCCAAGUGGAUCCACAAGAUCAUCCU
GACGUACAAGGUGCCUCAGAGCUGA

SEQ ID NO:129

20

>hHGF 密码子优化 mRNA 序列 2(hHGF-OS2)
AUGUGGGUACCAAACUGCUGCCCGCCUGCUGCUGCAGCACGUGCUCCUGCACCUUG
CUGCUGCUGCCUAUCGCCAUCCCUUACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAGAAAUACC
AUUCACGAAUUUAAGAAGAGCGCCAAGACCACACUGAUCAAGAUCGACCCUGCCCUUG
25 AAAUACAAGACCAAGAAAGUGAACACAGCCGACCAUUGCGCUAAUAGAUGACACAAGA
AACAAAGGCCUGCCUUUCACCUGCAAGGCCUUCGUGUUCGAUAAGGCCAGAAAGCAG
UGCCUGUGGUUCCCUUCAACAGCAUGAGCAGCGGCGUGAAGAAAGAAUUCGGUCAC
GAGUUCGACCUGUACGAGAAUAAGGACUACAUAAGAAACUGCAUCAUCGGCAAGGG
CCGGAGCUACAAGGGCACCGUGAGCAUACCAAGUCUGGCAUCAAGUGCCAGCCAUG
30 GAGUCCAUGAUCCCUCAUGAGCACAGCUUCCUGCCAAGCUCUUAACCGGGGAAAGGA
UCUGCAGGAGAAUAUUGUAGAAAUCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCUGGUGUU
UUACCAGCAACCCAGAGGUGCGGUACGAGGUGUGCGACAUACCCAGUGCAGCGAGG
UGGAAUGCAUGACAUGCAACGGCGAGAGCUACCGGGGCCUGAUGGACCACACAGAGA
GCGGAGAAAAUCUGCCAAAGAUUGGGAUCACAGACCCCUCAUAGGCACAGUCCUGC
35 CCGAGAGAUACCCUGACAAGGGCUUCGACGACAAUUAUCGCCGGAACCCUGAUGGAC
AGCCUAGACCUUGGUGCUACACCCUGGACCCUCACACCAGAUGGGAAUACUGCGCCA
UCAAGACAUGUGCCGAUAACACCAUGAACGACACCGAUGUGCCACUCGAGACAACUG
AGUGUAUCCAGGGCCAGGGCGAGGGCUACAGGGGCACCGUGAACACCAUCUGGAACG
GCAUCCCUUGUCAGCGGUGGGACAGCCAAUACCCCCACGAACAUGAUUAGACCCAG
40 AAAACUUAAGUGCAAAGAUCUGCGGGAAAACUACUGUAGAAACCCUGACGGUCUCCG
AGAGCCCUUGGUGCUUACACCACCGACCCUAACAUCAGGGUGGGCUACUGUAGCCAGA
UCCCCAACUGCGACAUGAGCCACGGUCAGGACUGCUACAGAGGAAACGGCAAGAAU
ACAUGGGCAACCUAGAGCCAGACCAGAAGCGGCCUGACCUGCAGCAUGUGGGACAAAA
ACAUGGAAGAUCUGCACCGGCACAUUUUUGGGAGCCUGACGCCAGCAAGCUGAAUG
45 AGAACUACUGUCGGAACCCUGACGACGAUGCUCACGGCCCUUGGUGCUACACAGGCA
ACCCUCUGAUCCCUUGGGACU AUUGUCCUAUUAAGCAGGUGUGAAGGCGACACGACCC
CUACAAUCGUGAACCUGGAUACCCAGUGAUCAGCUGUGCUAAAACAAAGCAACUGA
GAGUGGUGAAUGGUAUCCCGACCCGGACCAACAUCGGAUGGAUGGUCAGCCUGCGGU
ACAGAAACAAGCACAUUCGCGGCGGUAGCCUGAUCAAGGAAUCCUGGGUGUUGACAG
50 CCAGACAGUGUUUCCAGCAGAGAUUCUGAAGGACUACGAGGCCUGGCUGGGCAUCC
ACGACGUGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGUGCAAGCAGGUUCUGAACGUGUCCAGC
UGGUGUACGGCCCCGAGGGCUCUGAUCUGGUUCUGAUGAAGCUUGCUAGACCCGCGUG
UGCUGGAUGACUUCGUGUCCACCAUCGACCUGCCAAAUACGGAUGUAACA AUCCUG
AAAAGACCUCUGUUCUGUGUACGGCUGGGGCUACACCGGACUCAUCAACUUGACG
55 GCCUGCUGAGAGUGGCCCACCUUAUAUCAUGGGCAACGAGAAGUGCAGCCAGCACC
AUAGAGGCAAGGUGACCCUGAACGAGUCUGAAAUCUGCGCCGAGCCGAGAAAAUCG
GAUCUGGCCCCUGCGAAGGAGAUUACGGCGGCCUCUGGUCUGCGAGCAGCAAGA
UGAGAAUGGUGCUGGGCGUGAUCGUGCCCGCAGAGGCUGCGCAUCCCUAACCGGC

CUGGAAUCUUCGUGCGGUGGGCCUAUUACGCCAAAUGGAUCCACAAAAUCAUCCUGA
CAUACAAGGUCCCACAGUCUUGA

SEQ ID NO:130

5 >hHGF 密码子优化 mRNA 序列 3(hHGF-OS3)

AUGUGGGUGACCAAGCUGCUGCCCCGCCUGCUCCUGCAGCACGUGCUGCUGCACCUG
CUCCUGCUGCCCCAUCGCCAUCCCCUACGCCGAGGGGCAGAGAAAGAGAAGAAACACC
AUCCACGAGUUAAGAAGAGCGCCAAGACCACCCUGAUCAAGAUCGACCCCGCCUG
AAGAUCAAGACCAAGAAGGUGAACACCGCCGAUCAGUGCGCCAACAGAUGCACAAGA
10 AACAAGGGCCUGCCCCUACACCUGCAAGGCCUUCGUGUUCGACAAGGCUAGAAAGCAG
UGCCUGUGGUUCCCCUUAACAGCAUGAGCAGCGGCGUGAAGAAGGAGUUCGGCCAC
GAGUUCGACCUGUACGAGAACAAGGACUACAUCAGAAACUGCAUCAUCGGCAAGGGC
AGAAGCUACAAGGGCACCGUGAGCAUCACCAAGAGCGGCAUCAAGUGUCAGCCUGG
AGCAGCAUGAUCCCCCAUGAGCACAGCUUCCUGCCUAGCAGCUACAGAGGGAAGGAC
15 CUGCAAGAGAACUACUGCAGAAACCCUAGAGGCGAGGAGGGCGGCCCUUGGUGUUUC
ACAAGCAAUCCCGAGGUGAGAUACGAGGUGUGCGACAUCCCUAGUGCAGCGAGGUG
GAGUGCAUGACCUGCAACGGCGAAAGCUAUAGAGGCCUGAUGGACCACACCGAGAGC
GGCAAGAUUUGUCAGCGGUGGGAUCACCAAACCCCCACAGACACAAGUUCUGCCC
GAGAGAUACCCCGACAAGGGCUUCGACGACAAUACUGUAGAAACCCCGACGGGCAG
20 CCUAGACCCUGGUGUACACCCUGGACCCCCACACAAGUAGGAGUACUGCGCCAUC
AAGACCUGCGCCGACAACACCAUGAACGACACCGACGUGCCCCUGGAGACCACCGAG
UGCAUCCAAGGCCAAGGCGAGGGCUACAGAGGCACCGUGAACACCAUCUGGAACGGC
AUUCCUGUCAGAGAUAGGACAGCCAAUACCCCCAUGAACACGAUAUGACCCCGAG
AACUUAAGUGCAAGGACCUGAGAGAGAACUACUGCCGGAACCCCGAUGGCAGCGAA
25 UCCCCUUGGUGCUUACACACCGACCCCAACAUCAGAGUGGGCUACUGCAGCCAAAUC
UCCACUGCGACAUGAGCCACGGCCAAGACUGUACAGAGGGAACGGCAAGAACUAC
AUGGGCAACCUGAGCCAAACAAGAAGCGGCCUGACCUGCAGCAUGUGGGACAAGAAC
AUGGAGGACCUGCACAGACACAUCUUCUGGGAGCCCGACGCUAGCAAGCUGAACGAG
AACUACUGUCGGAACCCCGACGACGAUGCCACGGCCCCUGGUGCUACACCGGCAAC
30 CCCUGAUCCCCUGGGACUACUGCCCCAUCAGCAGAUUGCGAGGGGCGACACCACCCCA
CCAUCGUGAACCCUGGACCACCCCGUGAUCAGCUGUGCCAAGACCAAGCAACUGAGAG
UGGUGAACGGCAUCCCCACAAGAACCAACAUUGGCUUGGAUGGUGAGCCUGAGAUACA
GAAACAAGCACAUCUGCGGCGGCAGCCUGAUCAAGGAGAGCUGGGUGCGACCGCUA
GACAGUCUUCUCCUAGCAGAGACCUGAAGGACUACGAGGCCUGGCUGGGCAUCCACG
35 ACGUGCACGGCAGAGGCGACGAGAAGUGUAAACAAGUGCUGAACGUGAGCCAACUG
GUGUACGGCCCCGAGGGCAGCGACCUGGUGCUAUGAAGCUGGCUAGACCCGCGUG
CUGGACGACUUCGUGAGCACCAUCGACCUGCCCAACUACGGCUGCACCAUCCCCGAG
AAGACAAGCUGCAGCGUGUACGGCUGGGGCUACACCGGCCUGAUCAACUACGACGGC
CUGCUGAGAGUGGGCCACCUUGUACAUAUGGGCAACGAGAAGUGCAGCCAACACCAC
40 CGGGGCAAAGUGACCCUGAACGAGAGCGAGAUCUGCGCCGGGGCUGAGAAAAUCGGC
AGCGGCCCCUGCGAGGGGGGACUACGGGGGCCCCUGGUGUGCGAGCAGCACAAGAUG
AGAAUGGUGCUGGGCGUGAUCGUGCCCGCAGAGGCUGCGCCAUCCCCAACAGACCC
GGCAUCUUCGUGAGAGUGGCCUACUACGCCAAGUGGAUCCACAAGAUAUCCUGACC
UACAAGGUGCCUCAGAGCUGA

SEQ ID NO:131

45 >CHCHD10 5'UTR- hHGF-CTSB 3'UTR-A120

AGGGAAGCUUCCGUGCCGCGGUCUCUAAGGUCGCCCCGGGUCCACCGCCGCCACCGC
CGCCACCAUGUGGGUACCAAACUGCUGCCCCGCCUGCUGCUGCAGCACGUGCUCCU
50 GCACCUGCUGCUGGCCUAUCGCCAUCCCUUACGCCGAAGGCCAGAGAAAGCGGAG
AAAUACCAUUCACGAUUUAAGAAGAGCGCCAAGACCACACUGAUCAAGAUCCGACCC
UGCCUGAAAAUCAAGACCAAGAAAGUGAACACAGCCGACCAUUGCGCUAAUAGAUG
CACAAGAAACAAAGGCCUGCCUUCACCUGCAAGGCCUUCGUGUUCGAUAAGGCCAG
AAAGCAGUGCCUGUGGUUCCCCUUAACAGCAUGAGCAGCGGCGUGAAGAAAGAAU
55 CGGUCACGAGUUCGACCUGUACGAGAAUAAGGACUACAUAAGAAACUGCAUCAUCGG
CAAGGGCCGGAGCUACAAGGGCACCGUGAGCAUCACCAAGUCUGGCAUCAAGUGCCA
GCCAUGGAGUUCGAUGAUCCCUCAUGAGCACAGCUUCCUGCCAAGCUCUUAACGGGG
AAAGGAUCUGCAGGAGAACUAUUGUAGAAAUCCAGAGGCGAGGAAGGAGGACCCU

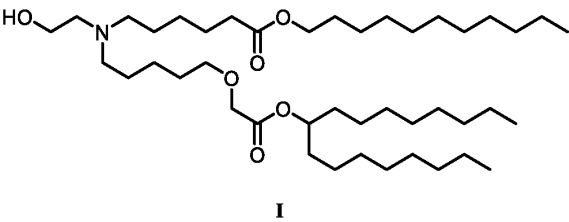
GGUGUUUUACCAGCAACCCAGAGGUGCGGUACGAGGUGUGCGACAUAACCCAGUGCA
GCGAGGUGGAAUGCAUGACAUGCAACGGCGAGAGCUACCGGGGCCUGAUGGACCACA
CAGAGAGCGGCAAAAUCUGCCAAAGAUGGGAUCACCAGACCCCUCAUAGGCACAAGU
UCCUGCCCCGAGAGAUACCCUGACAAGGGCUUCGACGACAAUUAUCUGCCGGAACCCUG
5 AUGGACAGCCUAGACCUUGGUGCUACACCCUGGACCCUCACACCAGAUGGGAAUACU
GCGCCAUCAAGACAUGUGCCGAUAACACCAUGAACGACACCGAUGUGCCACUCGAGA
CAACUGAGUGUAUCCAGGGCCAGGGCGAGGGCUACAGGGGCACCGUGAACACCAUCU
GGAACGGCAUCCCUUGUCAGCGGUGGGACAGCCAAUACCCCCACGAACAUGAUUGA
10 CCCCAGAAAACUUAAGUGCAAAGAUCUGCGGGAAAACUACUGUAGAAAACCCUGACG
GCUCCGAGAGCCCUUGGUGCUUACACCACCGACCCUAAACAUACAGGGUGGGCUACUGUA
GCCAGAUCCCCAACUGCGACAUGAGCCACGGUCAGGACUGCUACAGAGGAAACGGCA
AGAAUUAUAUGGGCAACCUAGAGCCAGACCAGAAGCGGGCCUGACCUGCAGCAUGUGGG
ACAAAAACAUGGAAGAUCUGCACCCGGCACAUCUUUUGGGAGCCUGACGCCAGCAAGC
UGAAUGAGAAUACUGUCGGAACCCUGACGACGAUGCUCACGGCCCUUGGUGCUACA
15 CAGGCAACCCUCUGAUCCCUUGGGACUUAUUGUCCUAAUAGCAGGUGUGAAGGCGACA
CGACCCCUACAAUCGUGAACCUUGGAUCACCCAGUGAUCAGCUGUGCUAAAAACAAGC
AACUGAGAGUGGUGAAUGGUAUCCCGACCCGGACCAACAUCGGAUGGAUGGUCAGCC
UGCUGUACAGAAACAAGCACAUCUGCGGGCGGUAGCCUGAUCAAGGAAUCCUGGGUGU
UGACAGCCAGACAGUGUUUCCCCAGCAGAGAUCUGAAGGACUACGAGGCCUGGCUGG
20 GCAUCCACGACGUGCAGGCGAGGGCGACGAGAAGUGCAAGCAGGUUCUGAACGUGU
CCCAGCUGGUGUACGGCCCCGAGGGCUCUGAUCUGGUUCUGAUGAAGCUUUCUAGAC
CCGCUUGUGCUGGAUGACUUCGUGUCCACCAUCGACCUGCCAAAUAACGGAUGUACAA
UUCUGAAAAAGACCUCCUGUUCUGUGUACGGCUGGGGCUACACCGGACUCAUCAACU
AUGACGGCCUGCUGAGAGUGGCCCACCUGUAUAUCAUGGGCAACGAGAAGUGCAGCC
25 AGCACCAUAGAGGCAAGGUGACCCUGAACGAGUCUGAAAUCUGCGCCGGAGCCGAGA
AAAUCGGAUCUGGGCCCCUGCGAAGGAGAUUACGGCGGGCCUCUGGUCUGCGAGCAGC
ACAAGAUGAGAAUGGUGCUGGGCGUGAUCGUGCCCCGGCAGAGGCUGCGCCAUCCCUA
ACCGGCCUGGAAUCUUCGUGCGCGUGGCCUAUUAACGCCAAAUGGAUCCACAAAAUCA
UCCUGACAUACAAGGUCCCACAGUCUUGAACCGGUUCUGCCGUGGGCCUGUCGUGCC
30 AGUCCUGGGGGCGAGAUCCGGGAGAAUCACGUCCUGGAACUGCAUGUUCUUGCGACUC
UUGGGACUUAUCUUAACUUCUCGCGUGCCCCAGCCAUGUUUUAACCAUGGCAUCCC
UCCCCCAAUAGUUCCCUUGCAUCCUCGUAACCUUCUCUGUAAGUGCCUGGUAAGC
UUGCCCUUGCUUAAGAACUCAAAACAUAAGCUGUGCUCUACCGCGGAAAAAAAAAAAA
AA
35 AAUUAU
UUCUAG

SEQ ID NO:132

权利要求书:

1. 一种脂质纳米颗粒，包含核酸构建体和脂质相，
核酸构建体包含：
5 (a) 开放阅读框(ORF)，和
(b) 非翻译区元件(UTR)，所述 UTR 源自基因 ACTG1、ATP6V0B、ATP6V0E1、
CFL1、COX4I1、CTSB、FAM166A、NDUFB9、CHCHD10、SLC38A2、NDUFA11、
NDUFV3、PRDX5、GUK1、IAH1、ABHD16A、SLC25A39、ATPIF1、ANAPC11、
CCDC12、MRPL14 或 APOA1BP 的 UTR；

10 脂质相包含式 I 所示的阳离子脂质，



2. 根据权利要求 1 中所述的脂质纳米颗粒，其中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%；优选阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~70%；更优选阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 40~70%。

3. 根据权利要求 1 所述的脂质纳米颗粒，其中所述脂质纳米粒包含至少一种非阳离子脂质，优选所述的非阳离子脂质选自磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物。

4. 根据权利要求 3 所述的脂质纳米颗粒，其中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%；优选非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%；更优选非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~50%。

5. 根据权利要求 3 所述的脂质纳米颗粒，其中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~30%。

6. 根据权利要求 3 所述的脂质纳米颗粒，其中胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~60%，优选胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%；更优选胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~45%。

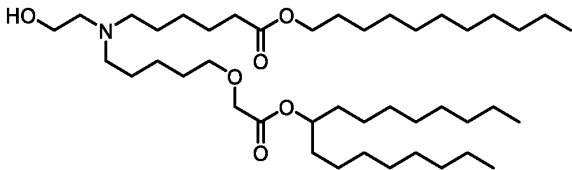
7. 根据权利要求 1 所述的脂质纳米颗粒，其中所述脂质纳米粒中还含有至少一种缀合脂质；优选冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 0.5~5%。

5

8. 根据权利要求 1 所述的脂质纳米颗粒，其中包含

a) 核酸构建体；

b) 阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，



10

I ;

c) 非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和 d) 缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米颗粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

15

9. 一种冻干组合物，其包含权利要求 1-8 中任一项所述的脂质纳米颗粒。

10. 根据权利要求 9 所述的冻干组合物，包含权利要求 1-8 中任一项所述的脂质纳米颗粒和氯化钠，优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:10~10:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~5:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~5:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~5:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~4:1。

20

11. 根据权利要求 9-10 中任一项所述的冻干组合物，包含至少一种冻干保护剂，优选所述冻干保护剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、麦芽糖中的一种或几种；优选冻干保护剂选自蔗糖、蔗糖和海藻糖组合。

25

12. 一种冻干制剂，其是由权利要求 1-8 中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求 9-11 任一项所述的冻干组合物经冷冻干燥获得；优选地，所述冻干制剂中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:10~10:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~5:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~5:1；更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~5:1；更

30

优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~4:1。

13.一种复溶溶液，其是权利要求 12 所述的冻干制剂经复溶剂复溶获得；优选复溶剂为水；更优选复溶剂为注射用水。

5

14. 一种制品，包含：

1) 权利要求 9-11 任一项所述的冻干组合物或权利要求 12 所述的冻干制剂，
和，

2) 复溶剂；

10 优选地，所述制品包含独立包装的冻干组合物和复溶剂，优选所述复溶剂为水；
更优选复溶剂为注射用水。

15 15. 一种喷雾制剂，包含权利要求 9-11 任一项所述的冻干组合物、权利要求
12 所述的冻干制剂或权利要求 13 所述的复溶溶液。

15

16. 制备复溶溶液的方法，其包含制备权利要求 9-11 任一项所述的冻干组
合物，所述冻干组合物经冷冻干燥处理，得到所述冻干制剂；以及，
所述冻干制剂经复溶得到所述复溶溶液；
优选所述复溶剂为水；更优选复溶剂为注射用水。

20

17. 制备冻干制剂的方法，其包含制备权利要求 9-11 任一项所述的冻干组
合物，所述冻干组合物经冷冻干燥处理，得到所述冻干制剂。

18. 根据权利要求 1-8 任一项所述的脂质纳米颗粒，其中，所述核酸构建体包
25 含：

(a) 开放阅读框(ORF)，和

(b) 非翻译区元件(UTR)，所述 UTR 包含如下序列：

SEQ ID NO:12、26 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

SEQ ID NO:1、15 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

30 SEQ ID NO:2、3、16、17 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

SEQ ID NO:4-5、18-19 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

SEQ ID NO:6-8、20-22 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

SEQ ID NO:9-11、23-25 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

SEQ ID NO:13、27 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

35 SEQ ID NO:14、28 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

SEQ ID NO:29、30 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，

- SEQ ID NO:35-37 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:42、43 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:46、47 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:31-34、38-41、44-45 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
5 SEQ ID NO:69、83 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:58、72 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:59-60、73-74 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:61-62、75-76 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:63-65、77-79 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
10 SEQ ID NO:66-68、80-82 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:70、84 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:71、85 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:86、87 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:92-94 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
15 SEQ ID NO:99、100 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，
SEQ ID NO:103、104 任一或与之具有至少 90%同一性的序列，或
SEQ ID NO:88-91、95-98、101-102 任一或与之具有至少 90%同一性的序列。

19. 根据权利要求 18 所述脂质纳米颗粒，其中，(b)包含选自如下任一的 3’
20 非翻译区元件(3’ UTR)和 5’ 非翻译区元件(5’ UTR)的组合：
1) 所述 3’ UTR 含有 SEQ ID NO:1 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5’ UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
序列；
2) 所述 3’ UTR 含有 SEQ ID NO:2 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
25 所述 5’ UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
序列；
3) 所述 3’ UTR 含有 SEQ ID NO:3 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5’ UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
序列；
30 4) 所述 3’ UTR 含有 SEQ ID NO:4 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5’ UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
序列；
5) 所述 3’ UTR 含有 SEQ ID NO:5 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5’ UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
35 序列；
6) 所述 3’ UTR 含有 SEQ ID NO:6 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

7) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:7 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
5 序列；

8) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:8 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
序列；

9) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:9 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
10 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
序列；

10) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:10 所示或与之具有至少 90%同一性的序
列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一
性的序列；

11) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:11 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，
15 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
序列；

12) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:12 所示或与之具有至少 90%同一性的序
列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一
20 性的序列；

13) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:13 所示或与之具有至少 90%同一性的序
列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一
性的序列；

14) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:14 所示或与之具有至少 90%同一性的序
25 列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15-47 任一所示或与之任一具有至少 90%同一
性的序列；

15) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同
一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:15 所示或与之具有至少 90%同一性的
序列；

16) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同
30 一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:16 所示或与之具有至少 90%同一性的
序列；

17) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同
一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:17 所示或与之具有至少 90%同一性的
35 序列；

18) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同

一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:18 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

19) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:19 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

20) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:20 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

21) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:21 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

22) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:22 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

23) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:23 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

24) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:24 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

25) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:25 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

26) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:26 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

27) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:27 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

28) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:28 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

29) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:29 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

30) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同

一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:30 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

31) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:31 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

32) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:32 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

33) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:33 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

34) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:34 所示或与之具有至少 90%、95%同一性的序列；

35) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:35 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

36) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:36 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

37) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:37 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

38) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:38 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

39) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:39 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

40) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:40 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

41) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:41 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

42) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同

一性的序列, 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:42 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

43) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:43 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

44) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:44 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;

45) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:45 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

46) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:46 所示或与之任一具有至少 90%的序列; 或

47) 所述 3' UTR 含有 SEQ ID NO:1-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 含有 SEQ ID NO:47 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

48) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:58 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

49) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:59 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

50) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:60 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

51) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:61 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

52) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:62 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

53) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:63 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

54) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:64 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

55) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:65 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

56) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:66 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

57) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:67 所示或与之具有至少 90%同一性的序列,

所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

58) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:68 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

5 59) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

60) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:70 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的
10 序列；

61) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:71 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72-104 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列；

62) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的
15 序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:72 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

63) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:73 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

64) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:74 所示或与之具有至少 90%同一性的
20 序列；

65) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:75 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

25 66) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:76 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

67) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:77 所示或与之具有至少 90%同一性的
30 序列；

68) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:78 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

35 69) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列，所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:79 所示或与之具有至少 90%同一性的序列；

- 70) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:80 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 71) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:81 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 72) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:82 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 73) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:83 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 74) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:84 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 75) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:85 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 76) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:86 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 77) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:87 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 78) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:88 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 79) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:89 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 80) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:90 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 81) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:91 所示或与之任一具有至少 90%、95%同一性的序列;

- 82) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:92 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 83) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:93 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 84) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:94 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 85) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:95 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 86) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:96 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 87) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:97 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 88) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:98 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 89) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:99 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 90) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:100 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 91) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:101 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 92) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:102 所示或与之具有至少 90%同一性的序列;
- 93) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO: 58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:103 所示或与之具有至少 90%同一性的序列; 或

94) 所述 3'UTR 含有 SEQ ID NO:58-71 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5'UTR 含有 SEQ ID NO:104 所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

5 20. 根据权利要求 1-8、18-19 任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中,

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO:15、29、30、32 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列; 或,

所述 3'UTR 包含 SEQ ID NO:69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序
10 列, 所述 5'UTR 包含 SEQ ID NO:72、86、87、89 任一所示或与之任一具有至少 90%同一性的序列;

优选地,

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:12 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO:15、29、30、32 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列,
15

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:13 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 15、29、30、32 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列,

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:14 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 15、29、30、32 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列,
20

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 15 所示或与之具有至少 90%同一性的序列,

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 29 所示或与之具有至少 90%同一性的序列,
25

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 30 所示或与之具有至少 90%同一性的序列,

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:12-14 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 32 所示或与之具有至少 90%同一性的序列,
30

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 72、86、87、89 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列,

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:70 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 72、86、87、89 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列,
35

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO:71 所示或与之具有至少 90%同一性的序列, 所

述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 72、86、87、89 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 72 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

5 所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 86 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，

所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 87 所示或与之具有至少 90%同一性的序列，或

10 所述 3' UTR 包含 SEQ ID NO: 69-71 任一所示或与之具有至少 90%同一性的序列，所述 5' UTR 包含 SEQ ID NO: 89 所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

21. 根据权利要求 1-8、18-20 任一项所述的脂质纳米颗粒，其中，所述核酸构建体还包含：

15 (c) 多聚腺苷酸(poly-A)尾；

优选地，所述 poly-A 尾选自 A120、A30L70、HGH polyA、SV40polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或 SV40late polyA；

20 优选地，所述 poly-A 尾选自 A120 或 A30L70，所述 A120 包含 120 个腺嘌呤核苷酸，所述 A30L70 包含 SEQ ID NO: 52 所示或与之具有至少 90%同一性的序列。

22. 根据权利要求 1-8、18-21 任一项所述的脂质纳米颗粒，其中，所述 ORF 编码肝细胞生长因子(HGF)、抗体或其抗原结合片段，优选为人肝细胞生长因子(hHGF)、抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

25

23. 根据权利要求 22 所述的脂质纳米颗粒，所述 ORF 包含选自如下 1)-2)中的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的多核苷酸序列；

2) 如 SEQ ID NO: 110-113、128-131 中任一项所示或与之具有至少 90%同一性的多核苷酸序列；

30 或者，所述 ORF 包含选自如下 1)-4)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列的多核苷酸序列，和/或编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列的多核苷酸序列；

2) 编码如 SEQ ID NO: 117 所示重链氨基酸序列中 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的多核苷酸序列，和编码如 SEQ ID NO: 118 所示轻链氨基酸序列中 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的多核苷酸序列，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或

35

Contact 编号系统定义的, 优选根据 Kabat 编号系统定义的;

3) 如 SEQ ID NO: 119 所示或与之具有至少 90% 同一性的多核苷酸序列, 和/或如 SEQ ID NO: 120 所示或与之具有至少 90% 同一性的多核苷酸序列;

4) 如 SEQ ID NO: 121 所示或与之具有至少 90% 同一性的多核苷酸序列, 和/或如 SEQ ID NO: 122 所示或与之具有至少 90% 同一性的多核苷酸序列。

24. 如权利要求 22-23 任一项所述的脂质纳米颗粒, 其包含 SEQ ID NO:115、116、127、132 中任一所示或与之具有至少 90% 同一性的序列; 或, 包含 SEQ ID NO:124 所示或与之具有至少 90% 同一性的序列和/或 SEQ ID NO:125 所示或与之具有至少 90% 同一性的序列。

25. 根据权利要求 1-8、18-24 任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中, 所述核酸构建体为 DNA 或 RNA, 优选为 RNA, 更优选为 mRNA。

26. 根据权利要求 25 所述的脂质纳米颗粒, 其中, 所述 RNA 还包含: (d) 5' 帽结构(5'Cap);

优选地, 所述 5'Cap 选自 Cap0、Cap1、Cap2、Cap3、Cap4、ARCA、修饰的 ARCA、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟代-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和 2-叠氮基-鸟苷;

更优选地, 所述 5'Cap 选自 ARCA、3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU、m⁷Gppp(A2'O-MOE)pG、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG、m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeG)pG 或 m⁷(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG。

27. 根据权利要求 25 所述的脂质纳米颗粒, 其中, 所述 RNA 包含一种或多种修饰, 优选地, 所述修饰包括骨架修饰、糖修饰、碱基修饰和/或脂质修饰; 更优选地, 所述碱基修饰为尿嘧啶修饰。

28. 治疗和/或预防疾病的方法, 包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1-8、18-27 中任一项所述的脂质纳米颗粒、权利要求 9-11 中任一项所述的冻干组合物, 权利要求 12 所述的冻干制剂、权利要求 13 所述的复溶溶液、权利要求 14 所述的制品或权利要求 15 所述的喷雾制剂;

所述疾病选自缺血性疾病、代谢综合征、糖尿病及其并发症、再狭窄, 以及神经损伤;

优选地, 所述缺血性疾病选自冠状动脉疾病(CAD)、外周动脉疾病(PAD)、心肌梗死、肢体缺血、血栓闭塞性脉管炎(TAO)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO); 更优选地, 所述肢体缺血为下肢缺血, 最优选地, 所述肢体缺血为严重下肢缺血

(CLI);

优选地，所述糖尿病及其并发症选自糖尿病周围神经病变、糖尿病足(DFU)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO)；

优选地，所述再狭窄选自手术后再狭窄、灌注后再狭窄；

- 5 优选地，所述神经损伤选自神经退行性疾病、创伤性神经损伤、周围神经病变；
更优选地，所述神经退行性疾病选自肌萎缩性侧索硬化(ALS)、帕金森氏病、痴呆病，所述周围神经病变为糖尿病周围神经病变。