



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118510896 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202280085922.X

(22) 申请日 2022.12.16

(30) 优先权数据

63/291,185 2021.12.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081826 2022.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/115013 EN 2023.06.22

(71) 申请人 旗舰创业创新六公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 亚历山德拉·索菲·德波尔

尼古拉斯·麦卡特尼·普拉吉斯

安东尼·约瑟夫·库拉

约书亚·内森·法尔布

迪内希库玛·曼瓦尔

图沙尔·坎蒂·米斯拉

詹妮弗·A·尼尔森

(74) 专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司

公司 44658

专利代理师 黄幸兒 王怡瑾

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

权利要求书4页 说明书84页 附图16页

(54) 发明名称

用于在变性条件下富集环状RNA的方法

(57) 摘要

本披露涉及用于例如从含有环状多核糖核苷酸(circRNA)和线性多核糖核苷酸(linRNA)的多核糖核苷酸群富集circRNA的方法,其中所述富集在变性条件下进行。还披露了组合物,所述组合物包括在变性条件下的溶液中含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸群。进一步在本披露的范围内的是含有circRNA富集群的组合物,诸如通过将所述组合物暴露于一种或多种变性条件而产生的组合物。

1. 一种用于产生环状多核糖核苷酸 (circRNA) 的富集群的方法, 所述方法包括:
 - (a) 提供包含多核糖核苷酸群的样品, 所述多核糖核苷酸群包含 circRNA 和线性多核糖核苷酸 (linRNA); 和
 - (b) 在不包括使用凝胶电泳的变性条件下将所述 circRNA 与所述 linRNA 分离, 从而产生包含 1,000 个核苷酸或更少的长度的 circRNA 富集群。
2. 一种用于产生 circRNA 富集群的方法, 所述方法包括:
 - (a) 提供包含多核糖核苷酸群的样品, 所述多核糖核苷酸群包含 circRNA 和 linRNA, 其中所述 circRNA 包含 1,000 个核苷酸或更少的长度; 和
 - (b) 将所述多核糖核苷酸群暴露于变性条件, 从而富集 circRNA 群。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中:
 - (i) 所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量为至少 1 μ g;
 - (ii) 包含所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少 500 μ L; 或
 - (iii) 所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少 200ng/ μ L。
4. 如权利要求 2 或 3 所述的方法, 其中分离步骤 (b) 在不包括使用凝胶电泳的变性条件下进行; 和/或其中所述 circRNA 富集群基本上不含一种或多种杂质或副产物, 其中所述一种或多种杂质或副产物包含聚丙烯酰胺、硼酸、镁或乙二胺四乙酸 (EDTA)。
5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法, 其中所述变性条件包括至少 50 $^{\circ}$ C 的温度; 或者其中所述变性条件包括在不超过 30 秒的时间段内至少 50 $^{\circ}$ C 的温度, 然后是不超过 8 $^{\circ}$ C 的温度。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法, 其中所述变性条件包括小于 5 或大于 9 的 pH。
7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其中所述变性条件包括化学处理, 所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。
8. 如权利要求 7 所述的方法, 其中所述酸包含在 1mM 与 500mM 之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。
9. 如权利要求 7 或 8 所述的方法, 其中所述碱包含在 1mM 与 500mM 之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。
10. 如权利要求 7 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述有机溶剂包含至少 0.1% (v/v) 的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。
11. 如权利要求 7 至 10 中任一项所述的方法, 其中所述分散剂包含在 100mM 与 8M 之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇 (PEG); 和/或其中所述分散剂包含在 100mM 与 8M 之间的正十二烷基 β -d-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS 或脱氧胆酸盐。
12. 如权利要求 7 至 11 中任一项所述的方法, 其中所述拥挤剂包含在 100mM 与 8M 之间的 PEG 或尿素。
13. 如权利要求 7 至 12 中任一项所述的方法, 其中所述螯合剂包含在 1mM 与 10mM 之间的乙二醇-双(β -氨基乙基醚)-N,N',N'-四乙酸 (EGTA) 或其衍生物、乙二胺四乙酸 (EDTA) 或其衍生物、次氨基三乙酸 (NTA)、亚氨基二琥珀酸 (IDS)、聚天冬氨酸、S,S'-乙二胺-N,N'-二琥珀酸 (EDDS) 或甲基甘氨酸二乙酸 (MGDA)。
14. 如权利要求 7 至 13 中任一项所述的方法, 其中所述洗涤剂包含在 0.005% (v/v) 与

0.05% (v/v) 之间的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的方法, 其中步骤(b) 包括对多核糖核苷酸群进行柱色谱法, 其中进行柱色谱法包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤; 其中所述分离在所述样品加载步骤、所述柱洗涤步骤和/或所述洗脱步骤期间进行。

16. 如权利要求15所述的方法, 其中所述柱色谱法包括快速蛋白液相色谱法 (FPLC)、高压液相色谱法 (HPLC)、疏水相互作用色谱法 (HIC)、阴离子交换色谱法 (AEC)、混合模式色谱法或亲和色谱法。

17. 如权利要求16所述的方法, 其中所述AEC包括

(i) 使用阴离子交换树脂, 其中所述阴离子交换树脂选自由苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化硅、琼脂糖凝胶、纤维素、葡聚糖、环氧多胺、甲基丙烯酸酯、琼脂糖和丙烯酸组成的组; 和/或其中所述阴离子交换树脂包含选自由季铵、氨基乙基、二乙基氨基乙基和二乙基氨基丙基组成的组的离子交换剂; 和/或其中所述阴离子交换树脂包含珠粒, 其中所述珠粒具有45 μ m-165 μ m的珠粒直径和直径100nm-1000nm的孔径; 和/或

(ii) 使用线性梯度洗脱或分步等度洗脱; 和/或

(iii) 使用在1mL/min与150mL/min之间的流速。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的方法, 其中步骤(b) 通过汇集纯化的circRNA的多个级分来进行。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的核糖核苷酸序列; 和/或其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的质量; 和/或其中所述circRNA和所述linRNA缺少聚(A) 尾。

20. 如权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中所述方法包括所述linRNA的核酸外切酶消化或其中所述方法不包括所述linRNA的核酸外切酶消化; 和/或其中所述方法不包括改善所述circRNA的富集的对所述circRNA或对所述linRNA的选择性修饰。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的方法, 其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w) 是所述circRNA在所述多核糖核苷酸群中的百分比(w/w) 的2倍; 和/或其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w) 为至少65%; 和/或其中所述linRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w) 小于35%。

22. 一种包含多核糖核苷酸群的组合物, 所述多核糖核苷酸群包含circRNA和linRNA, 其中所述circRNA包含1,000个核苷酸或更少的长度, 其中所述多核糖核苷酸群处于变性条件下的溶液中, 并且其中:

(i) 所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g;

(ii) 包含所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L; 或

(iii) 所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少500ng/ μ L。

23. 一种包含circRNA富集群的组合物, 其中:

(a) 所述组合物获自包含多核糖核苷酸群的样品, 所述多核糖核苷酸群包含circRNA和linRNA, 其中所述circRNA包含1,000个核苷酸或更少的长度;

(b) 所述组合物已暴露于一种或多种变性条件; 并且

(c) 所述组合物基本上不含一种或多种杂质或副产物。

24. 如权利要求22或23所述的组合物,其中所述一种或多种杂质或副产物包含聚丙烯酰胺、硼酸、镁或EDTA。

25. 如权利要求22至24中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括至少50°C的温度;或者其中所述变性条件包括至少50°C的温度,然后是不超过8°C的温度。

26. 如权利要求22至25中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。

27. 如权利要求22至26中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括化学处理,所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

28. 如权利要求27所述的组合物,其中所述酸包含在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

29. 如权利要求27或28所述的组合物,其中所述碱包含在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

30. 如权利要求27至29中任一项所述的组合物,其中所述有机溶剂包含至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

31. 如权利要求27至30中任一项所述的组合物,其中所述分散剂包含在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG);和/或其中所述分散剂包含在100mM与8M之间的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

32. 如权利要求27至31中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包含在100mM与8M之间的聚乙二醇(PEG)或尿素。

33. 如权利要求27至32中任一项所述的组合物,其中所述螯合剂包含在1mM与10mM之间的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

34. 如权利要求27至33中任一项所述的组合物,其中所述洗涤剂包含在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

35. 如权利要求22至34中任一项所述的组合物,其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)是所述circRNA在所述多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍;和/或其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)为至少65%;和/或其中所述linRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)小于35%。

36. 如权利要求22至35中任一项所述的组合物,其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的核糖核苷酸序列;和/或其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的质量;和/或其中所述circRNA和所述linRNA缺少聚(A)尾。

37. 一种确定circRNA的纯度的方法,所述方法包括:

(a) 提供包含多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包含circRNA和linRNA,其中所述circRNA包含1,000个核苷酸或更少的长度;

(b) 在变性条件下通过色谱法将所述circRNA与所述linRNA分离;和

(c) 收集所述样品的色谱图,其包含所述circRNA的峰和所述linRNA的峰;

(d) 计算每个峰下的面积以确定所述样品中所述circRNA的纯度。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述变性条件不包括使用凝胶电泳。
39. 如权利要求37或38所述的方法,其中所述变性条件包括至少50°C的温度;或者其中所述变性条件包括在不超过30秒的时间段内至少50°C的温度,然后是不超过8°C的温度。
40. 如权利要求37至39中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。
41. 如权利要求37至40中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括化学处理,所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。
42. 如权利要求41所述的方法,其中所述酸包含在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。
43. 如权利要求41或42所述的方法,其中所述碱包含在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。
44. 如权利要求41至43中任一项所述的方法,其中所述有机溶剂包含至少0.1% (v/v) 的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。
45. 如权利要求41至44中任一项所述的方法,其中所述分散剂包含在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG);和/或其中所述分散剂包含在100mM与8M之间的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。
46. 如权利要求41至45中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包含在100mM与8M之间的聚乙二醇(PEG)或尿素。
47. 如权利要求41至46中任一项所述的方法,其中所述螯合剂包含在1mM与10mM之间的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、聚天冬氨酸、EDDS或MGDA。
48. 如权利要求41至47中任一项所述的方法,其中所述洗涤剂包含在0.005% (v/v) 与0.05% (v/v) 之间的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。
49. 如权利要求37至48中任一项所述的方法,其中所述色谱法为液相色谱法,其中所述液相色谱法选自FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或亲和色谱法组成的组。
50. 如权利要求37至49中任一项所述的方法,其中所述纯度的相对标准偏差(RSD)小于5%。

用于在变性条件下富集环状RNA的方法

背景技术

[0001] 多核糖核苷酸可用于多种治疗和工程应用。因此,用于分离和纯化多核糖核苷酸的新组合物和方法是可用的。

发明内容

[0002] 本披露总体上涉及用于例如从含有环状多核糖核苷酸(circRNA)和线性多核糖核苷酸(linRNA)的多核糖核苷酸群富集circRNA的方法,其中富集在变性条件下进行。还披露了组合物,所述组合物包括在变性条件下的溶液中含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸群。进一步在本披露的范围内的是含有circRNA富集群的组合物,诸如通过将所述组合物暴露于一种或多种变性条件而产生的组合物。本披露部分地基于本发明人的以下发现:在变性条件(例如,热变性、pH或化学处理)下分离circRNA是用于从含有circRNA、linRNA或其他杂质或副产物的混合多核糖核苷酸群中纯化和富集circRNA的稳健方法。此外,所披露的方法有助于放大circRNA纯化过程,从而允许生产和纯化大量的circRNA。

[0003] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)在不包括使用凝胶电泳的变性条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0004] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将多核糖核苷酸群暴露于变性条件下,从而富集circRNA群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0005] 在一些实施例中,(i)多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量为至少1 μ g(例如,至少5 μ g、至少10 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、至少250 μ g、至少500 μ g、至少750 μ g、至少1mg、5mg、10mg、100mg或1g;或在5 μ g与100 μ g之间、在5 μ g与500 μ g之间、在5 μ g与1mg之间、在5 μ g与10mg之间、在500 μ g与100mg之间、在500 μ g与1g之间、在500 μ g与10g之间、在100mg与1g之间、或在1g与10g之间);(ii)包括多核糖核苷酸群的样品的总体积为至少500 μ L(例如,至少1mL、5mL、10mL、100mL或1L;或在500 μ L与100mL之间、在500 μ L与1L之间、在500 μ L与10L之间、或在1L与10L之间);或者(iii)样品中多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L(例如,至少500ng/ μ L、1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或50mg/mL;或在200ng/ μ L与100mg/mL之间、在200ng/ μ L与50mg/mL之间,或在1mg/mL与50mg/mL之间)。在一些实施例中,circRNA的长度为约100个核苷酸至约20,000个核苷酸(例如,约100个核苷酸至约500个核苷酸、约100个核苷酸至约750个核苷酸、约100个核苷酸至约1,000个核苷酸、约100个核苷酸至约2,500个核苷酸、约100个核苷酸至约5,000个核苷酸、约100个核苷酸至约10,000个核苷酸、约500个核苷酸至约750个核苷酸、约750个核苷酸至约1,000个核苷酸、约750个核苷酸至约1,250个核苷酸、约

1,000个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约2,000个核苷酸、约1,000个核苷酸至约5,000个核苷酸、约2,500个核苷酸至约5,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约10,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约10,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约15,000个核苷酸至约20,000个核苷酸、约100个核苷酸、约200个核苷酸、约300个核苷酸、约400个核苷酸、约500个核苷酸、约600个核苷酸、约700个核苷酸、约800个核苷酸、约900个核苷酸、约1,000个核苷酸、约1,250个核苷酸、约1,500个核苷酸、约1,750个核苷酸、约2,000个核苷酸、约3,000个核苷酸、约4,000个核苷酸、约5,000个核苷酸、约6,000个核苷酸、约7,000个核苷酸、约8,000个核苷酸、约9,000个核苷酸、约10,000个核苷酸、约11,000个核苷酸、约12,000个核苷酸、约13,000个核苷酸、约14,000个核苷酸、约15,000个核苷酸、约16,000个核苷酸、约17,000个核苷酸、约18,000个核苷酸、约19,000个核苷酸或约20,000个核苷酸)。在一些实施例中,circRNA的长度小于1,000个核苷酸。

[0006] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i)多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量为至少1 μ g(例如,至少5 μ g、至少10 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、至少250 μ g、至少500 μ g、至少750 μ g、至少1mg、5mg、10mg、100mg或1g;或在5 μ g与100 μ g之间、在5 μ g与500 μ g之间、在5 μ g与1mg之间、在5 μ g与10mg之间、在500 μ g与100mg之间、在500 μ g与1g之间、在500 μ g与10g之间、在100mg与1g之间、或在1g与10g之间);(ii)包括多核糖核苷酸群的样品的总体积为至少500 μ L(例如,至少1mL、5mL、10mL、100mL或1L;或在500 μ L与100mL之间、在500 μ L与1L之间、在500 μ L与10L之间、或在1L与10L之间);或者(iii)样品中多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L(例如,至少500ng/ μ L、1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或50mg/mL;或在200ng/ μ L与100mg/mL之间、在200ng/ μ L与50mg/mL之间、或在1mg/mL与50mg/mL之间);和(b)在变性条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0007] 在一些实施例中,多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量在1 μ g与1000mg克之间(例如,在5 μ g与10mg之间)。在一些实施例中,包括多核糖核苷酸群的样品的总体积在500 μ L与1000mL之间。在一些实施例中,样品中多核糖核苷酸群的浓度在200ng/ μ L与50mg/mL之间。

[0008] 在一些实施例中,circRNA的长度为约100个核苷酸至约20,000个核苷酸(例如,约100个核苷酸至约500个核苷酸、约100个核苷酸至约750个核苷酸、约100个核苷酸至约1,000个核苷酸、约100个核苷酸至约2,500个核苷酸、约100个核苷酸至约5,000个核苷酸、约100个核苷酸至约10,000个核苷酸、约500个核苷酸至约750个核苷酸、约750个核苷酸至约1,000个核苷酸、约750个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约2,000个核苷酸、约1,000个核苷酸至约5,000个核苷酸、约2,500个核苷酸至约5,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约10,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约10,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约15,000个核苷酸至约20,000个核苷酸、约100个核苷酸、约200个核苷酸、约300个核苷酸、约400个核苷酸、约500个核苷酸、约600个核苷酸、约700个核苷酸、约800个核苷酸、约900个核苷酸、约1,000个核苷酸、约1,250个核苷酸、约1,500个核苷酸、约1,750个核苷酸、约2,000个核苷酸、约3,000个核苷酸)

酸、约4,000个核苷酸、约5,000个核苷酸、约6,000个核苷酸、约7,000个核苷酸、约8,000个核苷酸、约9,000个核苷酸、约10,000个核苷酸、约11,000个核苷酸、约12,000个核苷酸、约13,000个核苷酸、约14,000个核苷酸、约15,000个核苷酸、约16,000个核苷酸、约17,000个核苷酸、约18,000个核苷酸、约19,000个核苷酸或约20,000个核苷酸)。在一些实施例中, circRNA的长度小于1,000个核苷酸。

[0009] 在一些实施例中,分离步骤(b)在不包括使用凝胶电泳的变性条件下进行。

[0010] 在一些实施例中, circRNA富集群基本上不含一种或多种杂质或副产物。在一些实施例中,一种或多种杂质或副产物包括聚丙烯酰胺、硼酸、镁或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0011] 在一些实施例中,变性条件包括至少50°C的温度(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C或80°C)。在一些实施例中,变性条件包括在50°C与85°C之间的温度。在一些实施例中,变性条件包括在不超过30秒的时间段内至少50°C(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C或80°C)的温度,然后是不超过8°C(例如,不超过7°C、6°C、5°C、4°C、3°C、2°C、1°C、0°C、-1°C、-2°C、-3°C、-4°C、-5°C、-6°C、-7°C、-9°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-35°C、-40°C、-45°C、-50°C、-55°C、-60°C、-65°C、-70°C、-75°C、-80°C或更低)的温度。

[0012] 在一些实施例中,变性条件包括小于5(例如小于4、3、2或1)或大于9(例如大于10、11、12或13)的pH。在一些实施例中,变性条件包括小于5(例如小于4、3、2或1)的pH。在一些实施例中,变性条件包括大于9(例如大于10、11、12或13)的pH。

[0013] 在一些实施例中,变性条件包括化学处理。在一些实施例中,化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0014] 在一些实施例中,酸包括在1mM与500mM之间(例如,在2mM至475mM之间、在3mM至450mM之间、在4mM至425mM之间、在5mM至400mM之间、在10mM至375mM之间、在15mM至350mM之间、在20mM至325mM之间、在30mM至300mM之间、在40mM至275mM之间、在50mM至250mM之间、在60mM至225mM之间、在70mM至200mM之间、在80mM至175mM之间、在90mM至150mM之间、在100mM至125mM之间、或在110mM至115mM之间)的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0015] 在一些实施例中,碱包括在1mM与500mM之间(例如,在2mM至475mM之间、在3mM至450mM之间、在4mM至425mM之间、在5mM至400mM之间、在10mM至375mM之间、在15mM至350mM之间、在20mM至325mM之间、在30mM至300mM之间、在40mM至275mM之间、在50mM至250mM之间、在60mM至225mM之间、在70mM至200mM之间、在80mM至175mM之间、在90mM至150mM之间、在100mM至125mM之间、或在110mM至115mM之间)的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0016] 在一些实施例中,有机溶剂包括至少0.1%(v/v)(例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多;或在0.01%与10%之间)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0017] 在一些实施例中,离散剂包括在100mM与8M之间的尿素(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在

400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG)。在一些实施例中,分散剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0018] 在一些实施例中,拥挤剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的PEG或尿素。

[0019] 在一些实施例中,螯合剂包括在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM或9mM-10mM)的乙二醇-双(β -氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)或其衍生物、EDTA或其衍生物、次氨基三乙酸(NTA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、聚天冬氨酸、S,S'-乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)或甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)。

[0020] 在一些实施例中,洗涤剂包括在0.005%与0.05%(v/v)之间(例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%或0.015%-0.016%)的Nonidet P-40(NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0021] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)在至少50°C(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C、或100°C)的温度下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群,其中分离不包括使用凝胶电泳。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0022] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i)多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g(例如,至少5 μ g、至少10 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、至少250 μ g,至少500 μ g、至少750 μ g、至少1mg、5mg、10mg、100mg或1g;或在5 μ g与100 μ g之间、在5 μ g与500 μ g之间、在5 μ g与1mg之间、在5 μ g与10mg之间、在500 μ g与100mg之间、在500 μ g与1g之间、在500 μ g与10g之间、在100mg与1g之间、或在1g与10g之间);(ii)包括多核糖核苷酸群的样品的总体积为至少500 μ L(例如,至少1mL、5mL、10mL、100mL或1L;或在500 μ L与100mL之间、在500 μ L与1L之间、在500 μ L与10L、或在1L与10L之间);或者(iii)样品中多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L(例如,至少500ng/ μ L、1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或50mg/mL;或在200ng/ μ L与100mg/mL、在200ng/ μ L与50mg/mL之间,或在1mg/mL

与50mg/mL之间);和(b)在至少50°C(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C、或100°C)的温度下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0023] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将多核糖核苷酸群暴露于至少50°C(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C、或100°C)的温度,从而富集circRNA群。在一些实施例中,温度在50°C与85°C之间。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0024] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)在小于5(例如,小于4、3、2或1)或大于9(例如,大于10、11、12或13)的pH下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群,其中分离不包括使用凝胶电泳。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0025] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i)多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g(例如,至少5 μ g、至少10 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、至少250 μ g,至少500 μ g、至少750 μ g、至少1mg、5mg、10mg、100mg或1g;或在5 μ g与100 μ g之间、在5 μ g与500 μ g之间、在5 μ g与1mg之间、在5 μ g与10mg之间、在500 μ g与100mg之间、在500 μ g与1g之间、在500 μ g与10g之间、在100mg与1g之间、或在1g与10g之间);(ii)包括多核糖核苷酸群的样品的总体积为至少500 μ L(例如,至少1mL、5mL、10mL、100mL或1L;或在500 μ L与100mL之间、在500 μ L与1L之间、在500 μ L与10L、或在1L与10L之间);或者(iii)样品中多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L(例如,至少500ng/ μ L、1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或50mg/mL;或在200ng/ μ L与100mg/mL、在200ng/ μ L与50mg/mL之间,或在1mg/mL与50mg/mL之间);和(b)在小于5(例如,小于4、3、2或1)或大于9(例如,大于10、11、12或13)的pH下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0026] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将多核糖核苷酸群暴露于小于5(例如,小于4、3、2或1)或大于9(例如,大于10、11、12或13)的pH,从而富集circRNA群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0027] 在一些实施例中,pH小于5(例如,小于4、3、2或1)。在一些实施例中,pH大于9(例如,大于10、11、12或13)。

[0028] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)在包

括酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液的条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群,其中分离不包括使用凝胶电泳。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0029] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a) 提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i) 多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g(例如,至少5 μ g、至少10 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、至少250 μ g,至少500 μ g、至少750 μ g、至少1mg、5mg、10mg、100mg或1g;或在5 μ g与100 μ g之间、在5 μ g与500 μ g之间、在5 μ g与1mg之间、在5 μ g与10mg之间、在500 μ g与100mg之间、在500 μ g与1g之间、在500 μ g与10g之间、在100mg与1g之间、或在1g与10g之间);(ii) 包括多核糖核苷酸群的样品的总体积为至少500 μ L(例如,至少1mL、5mL、10mL、100mL或1L;或在500 μ L与100mL之间、在500 μ L与1L之间、在500 μ L与10L、或在1L与10L之间);或者(iii) 样品中多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L(例如,至少500ng/ μ L、1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或50mg/mL;或在200ng/ μ L与100mg/mL、在200ng/ μ L与50mg/mL之间,或在1mg/mL与50mg/mL之间);和(b) 在包括酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液的条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0030] 在一方面,本披露提供了一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a) 提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b) 将多核糖核苷酸群暴露于酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液中,从而富集circRNA群。还考虑了在上述条件下将circRNA群与linRNA群分离的方法,所述方法任选地进一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群的步骤。

[0031] 在一些实施例中,酸包括至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0032] 在一些实施例中,碱包括在1mM与500mM之间(例如,在2mM至475mM之间、在3mM至450mM之间、在4mM至425mM之间、在5mM至400mM之间、在10mM至375mM之间、在15mM至350mM之间、在20mM至325mM之间、在30mM至300mM之间、在40mM至275mM之间、在50mM至250mM之间、在60mM至225mM之间、在70mM至200mM之间、在80mM至175mM之间、在90mM至150mM之间、在100mM至125mM之间、或在110mM至115mM之间)的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0033] 在一些实施例中,有机溶剂包括至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多;或在0.01%与10%之间)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙

醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0034] 在一些实施例中, 分散剂包括在100mM与8M之间(例如, 在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的尿素、氯化胍、高氯酸锂或PEG。在一些实施例中, 分散剂包括在100mM与8M之间(例如, 在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0035] 在一些实施例中, 拥挤剂包括在100mM与8M之间(例如, 在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的PEG或尿素。

[0036] 在一些实施例中, 螯合剂包括在1mM与10mM之间(例如, 1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM或9mM-10mM)的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

[0037] 在一些实施例中, 洗涤剂包括在0.005%与0.05%(v/v)之间(例如, 0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%或0.015%-0.016%)的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0038] 在一些实施例中, 步骤(b)包括对多核糖核苷酸群进行柱色谱法, 其中进行柱色谱法包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。

[0039] 在一些实施例中, 分离在样品加载步骤期间进行。在一些实施例中, 分离在柱洗涤步骤期间进行。在一些实施例中, 分离在洗脱步骤期间进行。

[0040] 在一些实施例中, 柱色谱法包括快速蛋白液相色谱法(FPLC)、高压液相色谱法(HPLC)、疏水相互作用色谱法(HIC)、阴离子交换色谱法(AEC)、混合模式色谱法或亲和色谱法。

[0041] 在一些实施例中, AEC包括使用阴离子交换树脂, 包括苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化硅、琼脂糖凝胶、纤维素、葡聚糖、环氧多胺、甲基丙烯酸酯、琼脂糖或丙烯酸。在一些实施例中, 阴离子交换树脂包括离子交换剂, 所述离子交换剂包括季铵、氨基乙基、二乙基氨基乙基或二乙基氨基丙基。在一些实施例中, 阴离子交换树脂包括珠粒, 其中珠粒具有45 μ m-165 μ m的珠粒直径和直径100nm-1000nm的孔径。在一些实施例中, AEC包括使用线性梯度洗脱或分步等度洗脱。在一些实施例中, AEC包括使用在1mL/min与150mL/min之间的流速。

[0042] 在一些实施例中, FPLC是反相-FPLC(RP-FPLC)。

[0043] 在一些实施例中, 步骤(b)是通过汇集纯化的circRNA的多个级分来进行的。

[0044] 在一些实施例中,circRNA和linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。在一些实施例中,circRNA和linRNA具有相同的质量。在一些实施例中,circRNA和linRNA缺少聚(A)尾。

[0045] 在一些实施例中,所述方法包括linRNA的核酸外切酶消化。在一些实施例中,所述方法不包括linRNA的核酸外切酶消化。在一些实施例中,所述方法不包括改善circRNA的富集的对circRNA或对linRNA的选择性修饰。

[0046] 在一些实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是circRNA在多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍。在一些实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)为至少65%(例如,至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)。在一些实施例中,linRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)小于35%(例如,小于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%)。

[0047] 在一些实施例中,circRNA的长度为约100个核苷酸至约20,000个核苷酸(例如,约100个核苷酸至约500个核苷酸、约100个核苷酸至约750个核苷酸、约100个核苷酸至约1,000个核苷酸、约100个核苷酸至约2,500个核苷酸、约100个核苷酸至约5,000个核苷酸、约100个核苷酸至约10,000个核苷酸、约500个核苷酸至约750个核苷酸、约750个核苷酸至约1,000个核苷酸、约750个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约2,000个核苷酸、约1,000个核苷酸至约5,000个核苷酸、约2,500个核苷酸至约5,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约10,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约10,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约15,000个核苷酸至约20,000个核苷酸、约100个核苷酸、约200个核苷酸、约300个核苷酸、约400个核苷酸、约500个核苷酸、约600个核苷酸、约700个核苷酸、约800个核苷酸、约900个核苷酸、约1,000个核苷酸、约1,250个核苷酸、约1,500个核苷酸、约1,750个核苷酸、约2,000个核苷酸、约3,000个核苷酸、约4,000个核苷酸、约5,000个核苷酸、约6,000个核苷酸、约7,000个核苷酸、约8,000个核苷酸、约9,000个核苷酸、约10,000个核苷酸、约11,000个核苷酸、约12,000个核苷酸、约13,000个核苷酸、约14,000个核苷酸、约15,000个核苷酸、约16,000个核苷酸、约17,000个核苷酸、约18,000个核苷酸、约19,000个核苷酸或约20,000个核苷酸)。在一些实施例中,circRNA的长度小于1,000个核苷酸。

[0048] 在一方面,本披露提供了包括多核糖核苷酸群的组合物,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中所述多核糖核苷酸群处于变性条件下的溶液中,并且其中:(i)多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g(例如,至少5 μ g、至少10 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、至少250 μ g,至少500 μ g、至少750 μ g、至少1mg、5mg、10mg、100mg或1g;或在5 μ g与100 μ g之间、在5 μ g与500 μ g之间、在5 μ g与1mg之间、在5 μ g与10mg之间、在500 μ g与100mg之间、在500 μ g与1g之间、在500 μ g与10g之间、在100mg与1g之间、或在1g与10g之间);(ii)包括多核糖核苷酸群的样品的总体积为至少500 μ L(例如,至少1mL、5mL、10mL、100mL或1L;或在500 μ L与100mL之间、在500 μ L与1L之间、在500 μ L与10L、或在1L与10L之间);或者(iii)样品中多核糖核苷酸群的浓度为至少500ng/ μ L(例如,至少500ng/ μ L、1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或50mg/mL;或在200ng/ μ L与100mg/mL、在200ng/ μ L与50mg/mL之间,或在1mg/mL与50mg/mL之间)。

[0049] 在一方面,本披露提供了包括多核糖核苷酸群的组合物,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中所述多核糖核苷酸群处于变性条件下的溶液中,并且其中,所述

溶液基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0050] 在一方面,本披露提供了包括多核糖核苷酸群的组合物,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(a)所述组合物获自包括核酸群的样品;(b)所述组合物已暴露于一种或多种变性条件;并且(c)所述组合物基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0051] 在一方面,本披露提供了包括circRNA富集群的组合物,其中:(a)所述组合物获自包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;(b)所述组合物已暴露于一种或多种变性条件;并且(c)所述组合物基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0052] 在一些实施例中,circRNA的长度为约100个核苷酸至约20,000个核苷酸(例如,约100个核苷酸至约500个核苷酸、约100个核苷酸至约750个核苷酸、约100个核苷酸至约1,000个核苷酸、约100个核苷酸至约2,500个核苷酸、约100个核苷酸至约5,000个核苷酸、约100个核苷酸至约10,000个核苷酸、约500个核苷酸至约750个核苷酸、约750个核苷酸至约1,000个核苷酸、约750个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约2,000个核苷酸、约1,000个核苷酸至约5,000个核苷酸、约2,500个核苷酸至约5,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约10,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约10,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约15,000个核苷酸至约20,000个核苷酸、约100个核苷酸、约200个核苷酸、约300个核苷酸、约400个核苷酸、约500个核苷酸、约600个核苷酸、约700个核苷酸、约800个核苷酸、约900个核苷酸、约1,000个核苷酸、约1,250个核苷酸、约1,500个核苷酸、约1,750个核苷酸、约2,000个核苷酸、约3,000个核苷酸、约4,000个核苷酸、约5,000个核苷酸、约6,000个核苷酸、约7,000个核苷酸、约8,000个核苷酸、约9,000个核苷酸、约10,000个核苷酸、约11,000个核苷酸、约12,000个核苷酸、约13,000个核苷酸、约14,000个核苷酸、约15,000个核苷酸、约16,000个核苷酸、约17,000个核苷酸、约18,000个核苷酸、约19,000个核苷酸或约20,000个核苷酸)。在一些实施例中,circRNA的长度为1,000个核苷酸或更少。

[0053] 在一些实施例中,一种或多种杂质或副产物包括聚丙烯酰胺、硼酸、镁或EDTA。

[0054] 在一些实施例中,变性条件包括至少50°C(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C或100°C)的温度。在一些实施例中,变性条件包括在50°C与85°C之间的温度。在一些实施例中,变性条件包括至少50°C(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C或100°C)的温度,然后是不超过8°C(例如,不超过7°C、6°C、5°C、4°C、3°C、2°C、1°C、0°C、-1°C、-2°C、-3°C、-4°C、-5°C、-6°C、-7°C、-9°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-35°C、-40°C、-45°C、-50°C、-55°C、-60°C、-65°C、-70°C、-75°C、-80°C或更低)的温度。

[0055] 在一些实施例中,变性条件包括小于5(例如小于4、3、2或1)或大于9(例如大于10、11、12或13)的pH。

[0056] 在一些实施例中,变性条件包括化学处理。在一些实施例中,化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0057] 在一些实施例中,酸包括在1mM与500mM之间(例如,在2mM至475mM之间、在3mM至450mM之间、在4mM至425mM之间、在5mM至400mM之间、在10mM至375mM之间、在15mM至350mM之间、在20mM至325mM之间、在30mM至300mM之间、在40mM至275mM之间、在50mM至250mM之间、在60mM至225mM之间、在70mM至200mM之间、在80mM至175mM之间、在90mM至150mM之间、在100mM

至125mM之间、或在110mM至115mM之间)的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0058] 在一些实施例中,碱包括在1mM与500mM之间(例如,在2mM至475mM之间、在3mM至450mM之间、在4mM至425mM之间、在5mM至400mM之间、在10mM至375mM之间、在15mM至350mM之间、在20mM至325mM之间、在30mM至300mM之间、在40mM至275mM之间、在50mM至250mM之间、在60mM至225mM之间、在70mM至200mM之间、在80mM至175mM之间、在90mM至150mM之间、在100mM至125mM之间、或在110mM至115mM之间)的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0059] 在一些实施例中,有机溶剂包括至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多;或在0.01%与10%之间)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0060] 在一些实施例中,分散剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的尿素、氯化胍、高氯酸锂或PEG。在一些实施例中,分散剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0061] 在一些实施例中,拥挤剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的PEG或尿素。

[0062] 在一些实施例中,螯合剂包括在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM或9mM-10mM)的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

[0063] 在一些实施例中,洗涤剂包括在0.005%与0.05% (v/v) 之间(例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%或0.015%-0.016%)的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0064] 在一些实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是circRNA在多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍。在一些实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)为至少65% (例如,至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)。

在一些实施例中,linRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)小于35%(例如,小于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%)。

[0065] 在一些实施例中,circRNA和linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。在一些实施例中,circRNA和linRNA具有相同的质量。在一些实施例中,circRNA和linRNA缺少聚(A)尾。

[0066] 在一方面,本披露提供了一种确定circRNA的纯度的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;(b)在变性条件下通过色谱法将circRNA与linRNA分离;和(c)收集样品的色谱图,包括circRNA的峰和linRNA的峰;(d)计算每个峰下的面积以确定样品中circRNA的纯度。

[0067] 在一些实施例中,变性条件不包括使用凝胶电泳。

[0068] 在一些实施例中,变性条件包括至少50°C(例如,至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C或100°C)的温度。在一些实施例中,变性条件包括在50°C与85°C之间的温度。在一些实施例中,变性条件包括在不超过30秒的时间段内至少50°C的温度,然后是不超过8°C(例如,不超过7°C、6°C、5°C、4°C、3°C、2°C、1°C、0°C、-1°C、-2°C、-3°C、-4°C、-5°C、-6°C、-7°C、-9°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-35°C、-40°C、-45°C、-50°C、-55°C、-60°C、-65°C、-70°C、-75°C、-80°C或更低)的温度。

[0069] 在一些实施例中,变性条件包括小于5(例如小于4、3、2或1)或大于9(例如大于10、11、12或13)的pH。在一些实施例中,变性条件包括小于5(例如小于4、3、2或1)的pH。在一些实施例中,变性条件包括大于9(例如大于10、11、12或13)的pH。

[0070] 在一些实施例中,变性条件包括化学处理。在一些实施例中,化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0071] 在一些实施例中,酸包括在1mM与500mM之间(例如,在2mM至475mM之间、在3mM至450mM之间、在4mM至425mM之间、在5mM至400mM之间、在10mM至375mM之间、在15mM至350mM之间、在20mM至325mM之间、在30mM至300mM之间、在40mM至275mM之间、在50mM至250mM之间、在60mM至225mM之间、在70mM至200mM之间、在80mM至175mM之间、在90mM至150mM之间、在100mM至125mM之间、或在110mM至115mM之间)的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0072] 在一些实施例中,碱包括在1mM与500mM之间(例如,在2mM至475mM之间、在3mM至450mM之间、在4mM至425mM之间、在5mM至400mM之间、在10mM至375mM之间、在15mM至350mM之间、在20mM至325mM之间、在30mM至300mM之间、在40mM至275mM之间、在50mM至250mM之间、在60mM至225mM之间、在70mM至200mM之间、在80mM至175mM之间、在90mM至150mM之间、在100mM至125mM之间、或在110mM至115mM之间)的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0073] 在一些实施例中,有机溶剂包括至少0.1%(v/v)(例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多;或在0.01%与10%之间)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0074] 在一些实施例中,离散剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在

200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的尿素、氯化胍、高氯酸锂或PEG。在一些实施例中,分散剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0075] 在一些实施例中,拥挤剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的PEG或尿素。

[0076] 在一些实施例中,螯合剂包括在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM或9mM-10mM)的EGTA或其衍生物、乙二胺四乙酸(EDTA)或其衍生物、次氨基三乙酸(NTA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、聚天冬氨酸、S,S'-乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)或甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)。

[0077] 在一些实施例中,洗涤剂包括在0.005%与0.05%(v/v)之间(例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%或0.015%-0.016%)的Nonidet P-40(NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0078] 在一些实施例中,色谱法包括液相色谱法。在一些实施例中,液相色谱法选自自由FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或亲和色谱法组成的组。

[0079] 在一些实施例中,纯度的相对标准偏差(RSD)小于5%(例如小于4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%或0.5%)。

[0080] 定义

[0081] 为了有利于理解本披露,下面定义多个术语。本文定义的术语具有与本披露相关的领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0082] 如本文所用,“一个/一种(a/an)”意指“至少一个/至少一种”或“一个/一种或多个/多种”,除非另有说明。此外,单数形式“一个/一种(a/an)”以及“所述(the)”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指明。

[0083] 如本文所用,“约”是指列举值的 $\pm 10\%$ 的量。

[0084] 如本文所用,术语“载剂”是通过对环状多核糖核苷酸的共价修饰、经由部分或完全包封剂或者它们的组合促进组合物(例如,环状多核糖核苷酸)转运或递送到细胞中的化合物、组合物、试剂或分子。载剂的非限制性实例包括碳水化合物载剂(例如,酸酐修饰的植物糖原或糖原型材料)、纳米颗粒(例如,包封或共价连接/结合到环状多核糖核苷酸的纳米颗粒)、脂质体、融合体、离体分化的网织红细胞、外泌体、蛋白质载剂(例如,共价连接到环

状多核糖核苷酸的蛋白质)或阳离子载剂(例如,阳离子脂质聚合物或转染试剂)。

[0085] 如本文所用,术语“色谱法”是指可用于从含有环状多核糖核苷酸(circRNA)和线性多核糖核苷酸(linRNA)的多核糖核苷酸混合群中纯化和富集circRNA群的各种色谱方法。色谱法包括柱色谱法和非柱色谱法,例如电泳方法,诸如毛细管凝胶电泳。色谱法包括低压或常压液相色谱法分离方法。这可包括FPLC(反相(RP)-FPLC和正相(NP)-FPLC)、亲和色谱法、疏水相互作用色谱法、阴离子交换色谱法或混合模式色谱法。

[0086] 如本文所用,术语“circRNA”、“环状多核糖核苷酸”和“环状RNA”可互换使用并且意指具有无游离端(即无游离3'或5'端)结构的多核糖核苷酸分子,例如通过共价键或非共价键形成环状或无端结构的多核糖核苷酸分子。环状多核糖核苷酸可以是例如共价闭合的多核糖核苷酸。

[0087] 如本文所用,术语“变性条件”是指破坏溶液中多核苷酸分子构型的任何条件或条件集,诸如物理或化学条件。变性条件下的多核苷酸可包括circRNA、linRNA、线性多脱氧核糖核苷酸(linDNA)或环状多脱氧核糖核苷酸(circDNA)。变性条件是指互补碱基对之间的氢键和其他非共价力(例如范德华力或疏水相互作用)被破坏的条件,从而减少或消除多核苷酸内与在生理条件下观察到的结构相比有序的结构,诸如例如二级或三级聚合物结构(例如,双螺旋、茎环、堆积等)。变性条件可以减少、消除或重组一个或多个多核苷酸的核酸残基之间的分子内或分子间相互作用。变性条件也可以指聚合物内邻近核酸单体之间的共价键被破坏的条件,诸如例如邻近核苷之间的磷酸二酯键。不希望受理论的束缚,由于circRNA的环状结构,circRNA相对于linRNA能在样品中选择性富集,这限制了可能的构象范围并使其不易变性,然而linRNA可能更灵活,并因此更易于通过变性条件破坏二级和三级结构。变性条件可以在实验环境中通过操纵circRNA、linRNA、linDNA、circDNA或多肽所暴露的几种条件之一来产生。变性条件的非限制性实例是例如热变性、骤冷、酸性或碱性pH(例如,小于pH 5或大于pH 9),或化学处理(例如,用酸、碱、有机溶剂、离散剂、螯合剂、拥挤剂、洗涤剂或盐溶液)。

[0088] 如本文所用,术语“洗脱物”是指在纯化步骤(例如,色谱法步骤,例如,RP-FPLC步骤)期间从介质(例如,疏水性固定相)洗脱的含有分析物材料(例如,circRNA富集群)的级分。可以通过将洗脱液应用到介质来从介质中释放洗脱物,从而释放分析物。更具体地,洗脱物可以指在将洗脱液(例如,洗脱缓冲剂,诸如含有机溶剂的缓冲剂)应用到介质之后从介质中释放的含有circRNA的级分。

[0089] 如本文所用,术语“linRNA”和“线性多核糖核苷酸”可互换使用,并且是指具有5'和3'末端的多核糖核苷酸。在一些实施例中,linRNA具有自由的5'末端或3'末端。在一些实施例中,linRNA具有非共价连接的5'或3'末端。

[0090] 如本文所用,术语“修饰的寡核苷酸”意指含有具有至少一个针对糖、核碱基或核苷间键的修饰的核苷酸的寡核苷酸。

[0091] 如本文所用,术语“修饰的核糖核苷酸”意指含有具有至少一个针对糖、核碱基或核苷间键的修饰的核苷的核糖核苷酸。

[0092] 如本文所用,术语“裸递送”是用于递送到细胞而无需载剂的帮助且无需对有助于递送到细胞的部分的共价修饰的配制品。裸递送配制品不含任何转染试剂、阳离子载剂、碳水化合物载剂、纳米颗粒载剂或蛋白质载剂。例如,环状多核糖核苷酸的裸递送配制品是包

括无共价修饰的环状多核糖核苷酸并且不含载剂的配制品。

[0093] 如本文所用的术语“多核苷酸”意指包括一个或多个核酸亚基或核苷酸的分子,并且可以与“核酸”或“寡核苷酸”互换使用。多核苷酸可以包括一个或多个选自腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)或它们的变体的核苷酸。核苷酸可以包括核苷和至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个磷酸(PO_3)基团。核苷酸可以包括核碱基、五碳糖(核糖或脱氧核糖)以及一个或多个磷酸基团。核糖核苷酸是其中糖为核糖的核苷酸。多核糖核苷酸、核糖核酸或RNA可以指包括经由磷酸二酯键聚合的多个核糖核苷酸的大分子。脱氧核糖核苷酸是其中糖是脱氧核糖的核苷酸。

[0094] 如本文所用,短语“多核糖核苷酸混合群”是指多核糖核苷酸的异源群。此类多核糖核苷酸的异源群含有circRNA、linRNA和任选的一种或多种杂质或副产物(例如,本文所述的一种或多种杂质或副产物)。

[0095] 如本文所用,“多肽”意指最常通过肽键连接在一起的氨基酸残基(天然或非天然)的聚合物。如本文所用,所述术语是指任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。多肽可以包括基因产物、天然存在的多肽、合成的多肽、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段以及前述物质的其他等同物、变体和类似物。多肽可以是单分子或多分子复合物,如二聚体、三聚体或四聚体。它们还可以包括单链或多链多肽(如抗体或胰岛素),并且可以是缔合的或连接的。最常见的二硫键存在于多链多肽中。术语多肽也可以应用于其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物。

[0096] 如本文可互换使用,术语“polyA”和“polyA序列”是指核酸分子的长度为至少5个核苷酸并且由腺苷残基组成的非翻译连续区域。在一些实施例中,polyA序列的长度为至少10个、至少15个、至少20个、至少30个、至少40个或至少50个核苷酸。在一些实施例中,polyA序列位于开放阅读框(例如编码多肽的开放阅读框)的3'(例如下游),并且polyA序列位于终止元件(例如终止密码子)的3',使得polyA不被翻译。在一些实施例中,polyA序列位于终止元件和3'非翻译区的3'。

[0097] 如本文所用,术语“纯化(purify/purifying/purification)”是指从含有异源混合物circRNA和linRNA等其它物质的样品中去除杂质或副产物(例如linRNA)以产生含有circRNA富集群的组合物的一个或多个步骤或过程,与原始混合物相比,所述组合物的杂质或副产物(例如,linRNA)水平减少,或其中相对于起始混合物,linRNA或物质已减少按质量计40%或更多(例如,50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%或99%或更多)。

[0098] 如本文所用,术语“纯”和“纯度”是指分析物(例如,circRNA)已被分离并且不含其他组分的程度。在核酸(例如,多核糖核苷酸)的背景下,分离的核酸(例如,circRNA)的纯度可以相对于没有任何污染物(例如,linRNA和其他物质)的核酸群来表达。例如,circRNA群的纯度表示所述群中有多少是circRNA(按分离材料的总质量计),这可以使用例如纯circRNA作为参考来确定。在本披露中发现的纯度水平可以是5% (w/w)、10% (w/w)、15% (w/w)、20% (w/w)、25% (w/w)、30% (w/w)、35% (w/w)、40% (w/w)、45% (w/w)、50% (w/w)、55% (w/w)、60% (w/w)、65% (w/w)、70% (w/w)、75% (w/w)、80% (w/w)、85% (w/w)、90% (w/w)、95% (w/w)、大于95% (w/w)或大于99% (w/w)。本披露的“纯”circRNA群的纯度按质量计可以大于20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或高达70%。“基本上纯”的circRNA群可以基本上不含污染物或杂质或副产物(例如,linRNA),例如纯度按质量

计大于70%、75%、80%、85%、90%、95%或>99%。在一些实施例中,污染物或杂质或副产物的水平不超过约20% (w/w)、15% (w/w)、12% (w/w)、10% (w/w)、9% (w/w)、8% (w/w)、7% (w/w)、6% (w/w)、5% (w/w)、4% (w/w)、3% (w/w)、2% (w/w)、或1% (w/w)。纯度可以使用凝胶电泳、分光光度法(例如,赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific)的NanoDrop)或其他适用于测量核酸群的纯度的技术通过检测具体分析物(例如,circRNA)的水平并计算分析物(w/w)相对于总核酸含量(例如,如通过本领域已知的测定确定)的百分比来确定。

[0099] 如本文所用,短语“基本上不含一种或多种杂质或副产物”是指样品的性质,诸如含有circRNA富集群的样品,所述样品不含一种或多种杂质或副产物(例如,本文披露的一种或多种杂质或副产物)或含有最少量的一种或多种杂质或副产物。一种或多种杂质或副产物的最少量可以不超过20% (w/w)(例如,不超过19% (w/w)、18% (w/w)、17% (w/w)、16% (w/w)、15% (w/w)、14% (w/w)、13% (w/w)、12% (w/w)、11% (w/w)、10% (w/w)、9% (w/w)、8% (w/w)、7% (w/w)、6% (w/w)、5% (w/w)、4% (w/w)、3% (w/w)、2% (w/w)、1% (w/w)或更少)。在另一个实例中,如果一种或多种杂质或副产物以小于15% (w/w)(例如,不超过14% (w/w)、13% (w/w)、12% (w/w)、11% (w/w)、10% (w/w)、9% (w/w)、8% (w/w)、7% (w/w)、6% (w/w)、5% (w/w)、4% (w/w)、3% (w/w)、2% (w/w)、1% (w/w)或更少)的量存在,则样品或circRNA富集群基本上不含所述一种或多种杂质或副产物。在另一个实例中,如果一种或多种杂质或副产物以小于10% (w/w)(例如,不超过9% (w/w)、8% (w/w)、7% (w/w)、6% (w/w)、5% (w/w)、4% (w/w)、3% (w/w)、2% (w/w)、1% (w/w)或更少)的量存在,则样品或circRNA富集群基本上不含所述一种或多种杂质或副产物。在又一个实例中,如果一种或多种杂质或副产物以小于5% (w/w)(例如,不超过4% (w/w)、3% (w/w)、2% (w/w)、1% (w/w)或更少)的量存在,则样品或circRNA富集群基本上不含所述一种或多种杂质或副产物。在又一个实例中,如果一种或多种杂质或副产物以小于1% (w/w)(例如,不超过0.9% (w/w)、0.8% (w/w)、0.7% (w/w)、0.6% (w/w)、0.5% (w/w)、0.4% (w/w)、0.3% (w/w)、0.2% (w/w)、0.1% (w/w)或更少)的量存在,则样品或circRNA富集群基本上不含所述一种或多种杂质或副产物。

[0100] 如本文所用,“终止元件”是终止环状或线性多核糖核苷酸中表达序列的翻译的部分,诸如核酸序列。

[0101] 如本文所用,“翻译起始序列”是起始环状或线性多核糖核苷酸中表达序列的翻译的核酸序列。

[0102] 如本文所用,术语“产率”是指在纯化步骤或过程之后获得的分析物(例如,circRNA群)与起始材料(例如,多核糖核苷酸混合群,诸如例如circRNA和linRNA)中分析物的量相比的相对量(w/w)。产率可以表示为百分比。在本披露的上下文中,可以使用测定(例如,凝胶电泳或分光光度法)测量起始材料和纯化步骤后获得的分析物中的分析物(例如,circRNA)的量。相对于例如多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群中存在的量,本披露的方法可用于产生约20% (w/w)或更高的circRNA富集群的产率。例如,所述方法可用于产生约25% (w/w)、30% (w/w)、35% (w/w)、40% (w/w)、45% (w/w)、50% (w/w)、55% (w/w)、65% (w/w)、70% (w/w)、75% (w/w)、80% (w/w)、85% (w/w)、或90% (w/w)或更高的纯化circRNA的产率。

[0103] 从以下具体实施方式、附图以及权利要求中,本发明的其他特征和优点将会是显而易见的。

附图说明

[0104] 图1显示了在没有尿素的情况下使用5mL DEAE Sepharose弱AEX柱纯化circRNA的色谱图结果。

[0105] 图2显示了在5mL DEAE Sepharose弱AEX柱上以尿素(离液盐)作为变性条件纯化circRNA的色谱图结果。

[0106] 图3显示了在8mL DEAE弱AEX整体柱上以尿素(离液盐)作为变性条件纯化circRNA的色谱图结果。

[0107] 图4显示了在8mL QA强AEX整体柱上以尿素(离液盐)作为变性条件纯化15mg circRNA的色谱图结果。

[0108] 图5显示了在8mL PrimaS整体柱上使用尿素(离液盐)和pH作为变性条件纯化7mg circRNA的色谱图结果。

[0109] 图6显示了使用1mL HIC整体柱在高盐和尿素变性条件下纯化circRNA后的色谱图结果。

[0110] 图7显示了使用1mL HIC整体柱在高盐和尿素变性条件下纯化circRNA后的凝胶电泳结果。

[0111] 图8显示了使用温度、离散剂和有机溶剂变性条件分离后circRNA和linRNA分离的示例性色谱图结果。

[0112] 图9显示了使用温度、离散剂和有机溶剂变性条件分离circRNA和linRNA后的HPLC分析结果。

[0113] 图10显示了使用温度、离散剂和有机溶剂变性条件分离circRNA和linRNA后的HPLC分析结果。

[0114] 图11显示了在温度和离散剂条件下纯化circRNA后的示例性色谱图结果。

[0115] 图12显示了在温度和离散剂条件下纯化circRNA后的示例性凝胶电泳结果。

[0116] 图13显示了在高温和有机溶剂变性条件下纯化circRNA后的示例性色谱图结果。

[0117] 图14显示了两次注水后circRNA的示例性色谱图。

[0118] 图15显示了空白注射的示例性色谱图。

[0119] 图16显示了具有分离峰的circRNA和linRNA标准品的示例性色谱图。

具体实施方式

[0120] 本文披露了从含有环状多核糖核苷酸(circRNA)和线性多核糖核苷酸(linRNA)的多核糖核苷酸异源群中纯化和富集circRNA的方法,并且纯化和富集在变性条件下进行。还披露了组合物,所述组合物包括在变性条件下的溶液中含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸群,诸如例如,诸如基本上不含一种或多种杂质或副产物的溶液。进一步在本披露的范围内的是含有circRNA富集群的组合物,诸如通过将所述组合物暴露于一种或多种变性条件而产生的组合物。本披露部分地基于本发明人的以下发现:在变性条件(例如,热变性、pH或化学处理)下分离circRNA是用于从含有circRNA、linRNA或其他杂质或副产物的混合多核糖核苷酸群中纯化和富集circRNA的稳健方法,从而相对于其他方法提高纯化和回收circRNA的产率。此外,所披露的方法有助于放大circRNA纯化过程,从而允许生产和纯化大量的circRNA。

[0121] 环状多核糖核苷酸的纯化

[0122] 本披露的特征在于从含有多核糖核苷酸异源群(含有circRNA和linRNA)的样品中纯化和富集circRNA的方法,其中纯化在本文披露的变性条件下进行。在本披露的上下文中,纯化是指从含有多核糖核苷酸混合群(例如,linRNA和circRNA)以及不需要的杂质或副产物(例如,本文所述的杂质或副产物)的样品中分离和富集靶多核糖核苷酸群(例如,circRNA)。因此,纯化后,与在获得circRNA纯化群的样品中相比,circRNA以增加的占总多核糖核苷酸的百分比(w/w)或较高的浓度存在。样品中不需要的杂质或副产物可能是linRNA、聚丙烯酰胺、硼酸、镁或乙二胺四乙酸(EDTA)或它们的任何组合。所披露的方法从多核糖核苷酸混合群中纯化和富集circRNA,使得circRNA在circRNA富集群中的纯度优选尽可能接近100%。所述方法可用于制备纯度范围为约5%至约99%或更高(例如,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、大于95%(诸如97%或99%)、或大于99%)的circRNA富集群。在一些实施例中,circRNA富集群的纯度被测量为富集群的circRNA的量(例如,百分比量)相对于所述富集群中linRNA或一种或多种杂质或副产物的百分比量的百分比。例如,纯度为95%的circRNA富集群含有95%的circRNA和5%的linRNA或一种或多种杂质或副产物。

[0123] 此外,相对于多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群中存在的量,所述方法可用于产生约20%(w/w)或更高的circRNA富集群的产率。例如,相对于富集群中多核糖核苷酸的总数量,所述方法可用于产生含有约20%(w/w)、25%(w/w)、30%(w/w)、35%(w/w)、40%(w/w)、45%(w/w)、50%(w/w)、55%(w/w)、65%(w/w)、70%(w/w)、75%(w/w)、80%(w/w)、85%(w/w)、或90%(w/w)或更高的量的circRNA的circRNA富集群的产率。替代性地,相对于含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸的混合群,circRNA富集群可以含有约20%(w/w)、25%(w/w)、30%(w/w)、35%(w/w)、40%(w/w)、45%(w/w)、50%(w/w)、55%(w/w)、65%(w/w)、70%(w/w)、75%(w/w)、80%(w/w)、85%(w/w)、或90%(w/w)或更高的量的circRNA。此外,相对于富集群中多核苷酸(例如,RNA或DNA)的总数量或多核糖核苷酸混合群中多核苷酸的总数量,circRNA富集群可以含有约20%(w/w)、25%(w/w)、30%(w/w)、35%(w/w)、40%(w/w)、45%(w/w)、50%(w/w)、55%(w/w)、65%(w/w)、70%(w/w)、75%(w/w)、80%(w/w)、85%(w/w)、或90%(w/w)或更高的量的circRNA。

[0124] 目前披露的纯化方法可用于circRNA的制备纯化方法,但是所披露的方法也有利于circRNA的分析纯化。制备纯化涉及相对大量RNA的纯化。例如,制备纯化可用于纯化至少0.5mg(例如,至少0.6mg、0.8mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1000mg或更多)的RNA量。这种方法的好处是能够纯化比使用其他适用于小规模纯化的方法(例如,琼脂糖凝胶电泳)可以纯化的量更大量的circRNA。

[0125] 变性条件

[0126] 不希望受理论的束缚,本披露部分地基于本发明人的以下令人惊讶的发现:可以在变性条件下进行circRNA的纯化。在本披露的上下文中,变性条件是指互补碱基对之间的氢键和其他非共价力(例如范德华力或疏水相互作用)被破坏的条件,从而减少或消除多核苷酸内与在生理条件下观察到的结构相比有序的结构,诸如例如二级或三级聚合物结构(例如,双螺旋、茎环、堆积等)。变性条件还指聚合物内邻近核酸单体之间的共价键被破坏

的条件,诸如例如邻近核苷之间的磷酸二酯键。此外,变性条件可以改善从linRNA以及其他杂质或副产物中富集或分离circRNA。此类方法特别适用于以高通量放大或扩展本领域已知的RNA纯化方法。因此,本披露提供了多种变性条件,该变性条件可用于使用多种纯化方法(例如本文披露的那些)来处理含有多核糖核苷酸混合群的样品。

[0127] 热变性

[0128] 本文披露的方法涵盖使用高温、低温或可变温度条件从含有例如circRNA、linRNA和各种其他杂质或副产物(例如盐、镁、尿素、硼酸等)的多核糖核苷酸混合群富集circRNA。例如,热变性可以在高温条件下进行,诸如例如至少50°C、至少55°C、至少60°C、至少65°C、至少70°C、至少75°C、至少80°C、至少85°C、至少90°C、至少95°C、至少100°C或更高的温度。在一个实例中,热变性在至少50°C的温度下进行。在另一个实例中,热变性在至少50°C但不大于85°C的温度下进行。在这些温度条件下的热变性可以进行足以例如通过破坏多核苷酸内的分子内氢键使多核苷酸(例如,circRNA和linRNA等)变性的时间段。例如,热变性可以在上述温度下进行至少1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟、30分钟、31分钟、32分钟、33分钟、34分钟、35分钟、36分钟、37分钟、38分钟、39分钟、40分钟、41分钟、42分钟、43分钟、44分钟、45分钟、46分钟、47分钟、48分钟、49分钟、50分钟或更长的时间段。暴露于热变性条件可以是连续的或不连续的(例如,暴露于高温条件10分钟,所述10分钟分为由时间间歇隔开的两个5分钟时段,所述时间间歇例如为30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟或更长)。

[0129] 热变性也可以在可变温度条件下进行。例如,可以通过首先将样品暴露于高温条件(例如,例如上述高温条件)持续至少1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟或更长的时间段,然后立即暴露于低温条件来对含有包括circRNA和linRNA的多核糖核苷酸的异源混合物的样品进行骤冷。低温条件可包括不超过8°C(例如,不超过7°C、6°C、5°C、4°C、3°C、2°C、1°C、0°C、-1°C、-2°C、-3°C、-4°C、-5°C、-6°C、-7°C、-9°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-35°C、-40°C、-45°C、-50°C、-55°C、-60°C、-65°C、-70°C、-75°C、-80°C或更低)的温度。通常,进行激冷使得高温条件和低温条件之间的时间间歇很短。相应地,样品暴露于高温条件与暴露于低温条件之间的时间段一般不超过1分钟、55秒、50秒、45秒、40秒、35秒、30秒、25秒、20秒、15秒、10秒、9秒、8秒、7秒、6秒、5秒、4秒、3秒、2秒、1秒或更短。样品暴露于低温条件的时间段可以是至少10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟或更长。

[0130] 可以在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行上述热变性方案。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行热变性。此外,热变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,可以将样品加载到色谱柱中之前在足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的高温下预温育样品或流动相。在另一个实例中,色谱分离期间的热变性可以通过在用于纯化的柱周围放置夹套或套筒来进行,以达到足以使linRNA而非circRNA变性的所需温度条件。因此,样品内linRNA的热变性可以在色谱分离过

程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行热变性。

[0131] pH变性

[0132] 根据所披露的方法,通过将样品暴露于变性pH条件,从含有包括circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性纯化和富集circRNA。示例性pH条件包括酸性条件(例如,pH低于7)或碱性条件(pH高于7),这会导致多核糖核苷酸的核苷酸内可电离基团的电离,从而导致二级结构丢失和linRNA而不是circRNA的选择性变性。例如,合适的pH变性条件包括小于5(例如,小于4.5、4.0、3.5、3.0或更低的pH)或大于9(例如,大于9.5、10、10.5、11或更高的pH)的pH。

[0133] 在一个实例中,pH变性在4.9的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.8的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.7的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.6的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.5的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.4的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.3的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.2的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.1的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在4.0的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.9的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.8的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.8的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.7的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.6的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.5的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.4的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.3的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.2的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在3.1的pH下进行。在又一个实例中,pH变性在3.0的pH下进行。

[0134] 在又一个实例中,pH变性在9.1的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.2的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.3的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.4的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.5的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.6的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.7的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.8的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在9.9的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.1的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.2的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.3的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.4的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.5的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.6的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.7的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在10.8的pH下进行。在又一个实例中,pH变性在10.9的pH下进行。在另一个实例中,pH变性在11的pH下进行。

[0135] 上述pH变性方案可在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行pH变性。此外,pH变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,可以选择或调节色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如,加载缓冲剂)以具有足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的pH。因此,样品内linRNA的pH变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行pH变性。

[0136] 化学变性

[0137] 本披露涵盖的另一种用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质

或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的方法是通过化学处理进行的变性。在本披露的上下文中,通过化学处理进行的变性涵盖用一种或多种变性酸、碱、有机溶剂、分散剂、螯合剂、拥挤剂、洗涤剂或盐溶液进行处理。

[0138] 酸变性剂

[0139] 基于酸性溶液可以使RNA分子内的可电离基团质子化,酸变性是使本文披露的纯化方法变性的合适方法。适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的酸包括至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。在一些实施例中,适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的酸包括在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0140] 在一个实例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的乙酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的乙酸的溶液来进行的。

[0141] 在另一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的盐酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的盐酸的溶液来进行的。

[0142] 在另一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的水杨酸的溶液来进行的。在一些实施例,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的水杨酸的溶液来进行的。

[0143] 在另一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的磷酸的溶液来进行的。在一些实施例,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的磷酸的溶液来进行的。

[0144] 在另一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的硼酸的溶液来进行的。在一些实施例,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的硼酸的溶液来进行的。

[0145] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的甲酸的溶液来进行的。在一些实施例,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的甲酸

的溶液来进行的。

[0146] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的草酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的草酸的溶液来进行的。

[0147] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的柠檬酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的柠檬酸的溶液来进行的。

[0148] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的苯甲酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的苯甲酸的溶液来进行的。

[0149] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的一氯乙酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-

250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的一氯乙酸的溶液来进行的。

[0150] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的二氯乙酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的二氯乙酸的溶液来进行的。

[0151] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的三氯乙酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的三氯乙酸的溶液来进行的。

[0152] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的抗坏血酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的抗坏血酸的溶液来进行的。

[0153] 在又一个实例中,酸变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的硝酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、

5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的硝酸的溶液来进行的。

[0154] 可以将样品暴露于酸性变性条件持续足以使多核糖核苷酸(例如,linRNA或circRNA等)变性的时间。例如,将样品暴露于酸性变性条件的时间可以持续大于30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟或更长的时间。

[0155] 上述酸性变性方案可以在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行酸性变性。此外,酸性变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述酸。因此,样品内linRNA的酸性变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行酸性变性。

[0156] 碱性变性剂

[0157] 基于碱性溶液可以使RNA分子内的可电离基团去质子化,碱性变性是使本文披露的纯化方法变性的合适方法。适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的碱性条件包括含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠或胍的溶液。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠或胍的溶液来进行的。

[0158] 在一个实例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的氢氧化钠的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的氢氧化钠的溶液来进行的。

[0159] 在另一个实例中,碱性变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少

1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的氢氧化钾的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的氢氧化钾的溶液来进行的。

[0160] 在另一个实例中,碱性变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的咪唑的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的咪唑的溶液来进行的。

[0161] 在另一个实例中,碱性变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的组氨酸的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的组氨酸的溶液来进行的。

[0162] 在另一个实例中,碱性变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的碳酸氢钠的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的碳酸氢钠的溶液来进行的。

[0163] 在又一个实例中,碱性变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的胍的溶液来进行的。在一些实施例,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的胍的溶液来进行的。

[0164] 在又一个实例中,碱性变性是通过将样品暴露于含有至少0.5% (v/v) (例如,至少1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的三乙胺的溶液来进行的。在一些实施例,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与500mM之间(例如,2mM-475mM、3mM-450mM、4mM-425mM、5mM-400mM、10mM-375mM、15mM-350mM、20mM-325mM、30mM-300mM、40mM-275mM、50mM-250mM、60mM-225mM、70mM-200mM、80mM-175mM、90mM-150mM、100mM-125mM、或110mM-115mM)的三乙胺的溶液来进行的。

[0165] 可以将样品暴露于碱性变性条件持续足以使多核糖核苷酸(例如,circRNA和linRNA等)变性的时间。例如,将样品暴露于碱性变性条件的时间可以持续大于30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟或更长的时间。

[0166] 上述碱性变性方案可以在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行碱性变性。此外,碱性变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述碱。因此,样品内linRNA的碱性变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行碱性变性。

[0167] 有机溶剂

[0168] 有机溶剂可用作适合与所披露的方法结合使用的变性剂。适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的有机溶剂包括至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0169] 在一个实例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、

circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的二甲基亚砜的溶液来进行的。

[0170] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的三乙基乙酸铵的溶液来进行的。

[0171] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的甲醇的溶液来进行的。

[0172] 在另一个实例中,碱性变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的乙醇的溶液来进行的。

[0173] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的2-丙醇的溶液来进行的。

[0174] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的异丙醇的溶液来进行的。

[0175] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的丁醇(例如,1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇或异丁醇)的溶液来进行的。

[0176] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的1-丁醇的溶液来进行的。

[0177] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的2-丁醇的溶液来进行的。

[0178] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少

0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的叔丁醇的溶液来进行的。

[0179] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的异丁醇的溶液来进行的。

[0180] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的苯酚的溶液来进行的。

[0181] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的氯仿的溶液来进行的。

[0182] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的己烷的溶液来进行的。

[0183] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的乙腈的溶液来进行的。

[0184] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的甲酰胺的溶液来进行的。

[0185] 在又一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的丙二醇的溶液来进行的。

[0186] 可以将样品暴露于变性溶剂持续足以使多核苷酸(例如,circRNA和linRNA等)变性的时间。例如,将样品暴露于碱性变性条件的时间可以持续大于30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟或更长的时间。

[0187] 上述变性方案可在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行变性。此外,变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述有机溶剂。因此,样品内linRNA的变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱

洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行变性。

[0188] 分散剂

[0189] 分散剂(例如,离液盐)可用作适合与所披露的方法结合使用的变性剂。适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的分散剂(例如,离液盐)包括至少1% (v/v) (例如,至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG)。在一些实施例中,适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的分散剂包括在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的尿素、氯化胍、高氯酸锂或PEG。

[0190] 在一个实例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有至少1% (v/v) (例如,至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的氯化胍的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的尿素的溶液来进行的。

[0191] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少1% (v/v) (例如,至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的高氯酸锂的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的高氯酸锂的溶液来进行的。

[0192] 在另一个实例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、

circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有小于1% (例如, 小于1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或更少) 的正十二烷基 β -d-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐的溶液来进行的。在一些实施例中, linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间 (例如, 在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间) 的脱氧胆酸盐的溶液来进行的。

[0193] 在一个实例中, 变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如, 至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多) 的正十二烷基 β -d-麦芽糖苷的溶液来进行的。在一些实施例中, linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间 (例如, 在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间) 的 β -d-麦芽糖苷的溶液来进行的。

[0194] 在另一个实例中, 变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如, 至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多) 的正辛基葡萄糖苷的溶液来进行的。在一些实施例中, linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间 (例如, 在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间) 的正辛基葡萄糖苷的溶液来进行的。

[0195] 在另一个实例中, 变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如, 至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多) 的CHAPS的溶液来进行的。在一些实施例中, linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间 (例如, 在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间) 的CHAPS的溶液来进行的。

[0196] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的脱氧胆酸盐的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的脱氧胆酸盐的溶液来进行的。

[0197] 可以将样品暴露于变性分散剂持续足以使多核苷酸(例如,circRNA和linRNA等)变性的时间。例如,将样品暴露于碱性变性条件可以持续大于30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟或更长的时间。

[0198] 上述变性方案可在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行利用分散剂的变性。此外,使用分散剂进行的变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述分散剂。因此,样品内linRNA的变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行利用分散剂的变性。

[0199] 拥挤剂

[0200] 基于拥挤剂可使溶液拥挤使得其他分子之间不会产生氢键,拥挤剂可用作适合与所披露的方法结合使用的变性剂。适用于从含有包括linRNA、circRNA以及任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的拥挤剂包括PEG和尿素。

[0201] 在一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的PEG的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与8M之间(例如,在150mM与7.5M之间、在200mM与7M之间、在250mM与6.5M之间、在300mM与6M之间、在350mM与5.5M之间、在400mM与5M之间、在450mM与4.5M之间、在500mM与4M之间、在600mM与3.5M之间、在700mM与3M之间、在800mM与2.5M之间、在900mM与2M之间、在1M与1.5M之间、在1.1M与1.4M之间、或在1.2M与1.3M之间)的PEG的溶液来进行的。

[0202] PEG是指通式 $(CH_2CH_2OH)_n$ 的基团,其中n为整数,例如PEG₂-PEG₁₀₀。在一些实施例中,PEG的分子量为200Da至6000Da(例如,400Da至2500Da、800Da至2200Da、1000Da至2000Da、200Da、400Da、600Da、800Da、1000Da、1200Da、1500Da、2000Da、2200Da、2500Da、

3000Da、3500Da、4000Da、4500Da、5000Da、5500Da、或6000Da)。

[0203] 上述变性方案可在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行利用拥挤剂的变性。此外,使用拥挤剂进行的变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述拥挤剂。因此,样品内linRNA的变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行利用拥挤剂的变性。

[0204] 螯合剂

[0205] 基于螯合剂可以螯合(即结合)金属离子(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 和 K^{+} 等),从而结合并稳定RNA分子(例如,linRNA)内的RNA二级和三级结构,螯合剂可以用作适合与所披露的方法结合使用的变性剂。适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的螯合剂包括乙二醇-双(β -氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)或其衍生物、乙二胺四乙酸(EDTA)或其衍生物、次氮基三乙酸(NTA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、聚天冬氨酸、S,S'-乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)或甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA的溶液来进行的。

[0206] 在一个实例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有EGTA或其衍生物的溶液来进行的。在一些实施例中,所述溶液含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的EGTA或其衍生物。

[0207] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有EDTA或其衍生物的溶液来进行的。在一些实施例中,所述溶液含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的EDTA或其衍生物。

[0208] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有NTA的溶液来进行的。在一些实施例中,所述溶液含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的NTA。

[0209] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有IDS的溶液来进行的。在一些实施例中,所述溶液含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的IDS。

[0210] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有聚天冬氨酸的溶液来进行的。在一些实施例中,所述溶液含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的聚天冬氨酸。

[0211] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有EDDS的溶液来进行的。在一些实施例中,所述溶液含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-

6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的EDDS。

[0212] 在又一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有MGDA的溶液来进行的。在一些实施例中,所述溶液含有在1mM与10mM之间(例如,1mM-2mM、2mM-3mM、3mM-4mM、4mM-5mM、5mM-6mM、6mM-7mM、7mM-8mM、8mM-9mM、或9mM-10mM)的MGDA。

[0213] 可以将样品暴露于变性螯合剂持续足以使多核苷酸(例如,circRNA和linRNA等)变性的时间。例如,将样品暴露于变性螯合剂可以持续大于30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟或更长的时间。

[0214] 上述变性方案可在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行利用螯合剂的变性。此外,使用螯合剂进行的变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述螯合剂。因此,样品内linRNA的变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行利用螯合剂的变性。

[0215] 洗涤剂

[0216] 洗涤剂可用作适合与所披露的方法结合使用的变性剂。适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的洗涤剂包括Nonidet P-40(NP40)、聚山梨酯(例如,Tween-20、Tween-40、Tween-60或Tween-80)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷或正十二烷基 β -d-麦芽糖苷。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过暴露含有包括0.005%-0.05%(例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%、或0.015%-0.016%)的NP40、聚山梨酯(例如,Tween-20、Tween-40、Tween-60或Tween-80)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷或正十二烷基 β -d-麦芽糖苷的多核糖核苷酸混合群的样品来进行的。

[0217] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有NP40的溶液来进行的。在一些实施例中,变性是通过将样品暴露于含有0.005%-0.05%(例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%、或0.015%-0.016%)的NP40的溶液来进行的。

[0218] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有Tween-20的溶液来进行的。在一些实施例中,变性是通过将样品暴露于含有0.005%-0.05%(例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%、或0.015%-0.016%)的Tween-20的溶液来进行的。

[0219] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有Tween-80的溶液来进行的。在一些实施例中,变性是通过将样品暴露于含有0.005%-0.05%(例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、

0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%、或0.015%-0.016%)的Tween-80的溶液来进行的。

[0220] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有CHAPS的溶液来进行的。在一些实施例中,变性是通过将样品暴露于含有0.005%-0.05% (例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%、或0.015%-0.016%)的CHAPS的溶液来进行的。

[0221] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷的溶液来进行的。在一些实施例中,变性是通过将样品暴露于含有0.005%-0.05% (例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%、或0.015%-0.016%)的辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷的溶液来进行的。

[0222] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有正十二烷基 β -d-麦芽糖苷的溶液来进行的。在一些实施例中,变性是通过将样品暴露于含有0.005%-0.05% (例如,0.006%-0.045%、0.007%-0.04%、0.008%-0.035%、0.009%-0.03%、0.01%-0.025%、0.011%-0.02%、0.012%-0.019%、0.013%-0.018%、0.014%-0.017%、或0.015%-0.016%)的十二烷基 β -d-麦芽糖苷的溶液来进行的。

[0223] 可以将样品暴露于变性洗涤剂持续足以使多核苷酸(例如,circRNA和linRNA等)变性的时间。例如,将样品暴露于变性洗涤剂可以持续大于30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟或更长的时间。

[0224] 上述变性方案可在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行利用洗涤剂的变性。此外,利用洗涤剂的变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述洗涤剂。因此,样品内linRNA的变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行利用洗涤剂的变性。

[0225] 盐溶液

[0226] 核酸聚合物的二级结构形成高度依赖于盐浓度,盐浓度决定了多核苷酸内碱基配对和氢键形成的自由能。因此,如本文所述,使用盐溶液是变性纯化多核糖核苷酸的合适方法。适用于从含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品中选择性富集和纯化circRNA的洗涤剂包括含有例如氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、氯化镁(MgCl)、氯化钙(CaCl)、 CsSO_4 、 NaSO_4 、氯化锂(LiCl)、溴化锂(LiBr)以及本领域已知的其他盐溶液。在一些实施例中,盐溶液含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的NaCl、KCl、MgCl、CaCl、 CsSO_4 、 NaSO_4 、LiCl或LiBr。

[0227] 在一个实例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有NaCl

的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的NaCl的溶液来进行的。

[0228] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有KCl的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的KCl的溶液来进行的。

[0229] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有MgCl的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的MgCl的溶液来进行的。

[0230] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有CaCl的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的CaCl的溶液来进行的。

[0231] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有CsSO₄的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的CsSO₄的溶液来进行的。

[0232] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有NaSO₄的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的NaSO₄的溶液来进行的。

[0233] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有LiCl的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的LiCl的溶液来进行的。

[0234] 在另一个实例中,变性是通过将样品暴露于含有LiBr的溶液来进行的。在一些实施例中,linRNA而非circRNA的选择性变性是通过将含有包括linRNA、circRNA和任选的一种或多种杂质或副产物的多核糖核苷酸混合群的样品暴露于含有在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、

450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的LiBr的溶液来进行的。

[0235] 可以将样品暴露于变性盐溶液持续足以使多核苷酸(例如,circRNA和linRNA等)变性的时间。例如,将样品暴露于变性盐溶液可以持续大于30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟或更长的时间。

[0236] 上述变性方案可在本文披露的色谱分离方法之前对样品进行。替代性地,可在使用所披露的方法进行色谱分离后对样品进行利用盐溶液的变性。此外,利用盐溶液的变性可以与样品的色谱纯化并行(即,在色谱纯化期间)进行。例如,色谱柱中使用的样品缓冲剂(例如加载缓冲剂)可以包括浓度足以使样品的多核糖核苷酸中的分子内氢键变性的上述盐。因此,样品内linRNA的变性可以在色谱分离过程的任何阶段期间进行,包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。此外,可以在不存在样品色谱纯化的情况下对样品进行利用盐溶液的变性。

[0237] 组合或多种变性剂

[0238] 本披露进一步提供了使用两种、三种、四种或更多种上述变性条件的组合以从含有circRNA、linRNA和其他物质的多核糖核苷酸混合群产生circRNA富集群。含有circRNA和linRNA混合群的样品可以同时或依次(有或没有时间间隙)经历两种、三种、四种或更多种所披露的变性条件。两种或更多种变性条件可来自相同类别的变性剂,例如选自本文所述离散剂的两种或更多种离散剂、选自本文所述酸变性剂的两种或更多种酸变性剂、选自本文所述碱性变性剂的两种或更多种碱性变性剂、选自本文所述有机溶剂的两种或更多种有机溶剂、选自本文所述螯合剂的两种或更多种螯合剂、选自本文所述洗涤剂的两种或更多种洗涤剂、或选自本文所述盐溶液的两种或更多种盐溶液。两种或更多种变性条件可以来自不同类别的变性剂。例如,两种或更多种变性条件的组合可以如表1所述,其中热变性选自本文所述的任何热变性条件,pH变性选自本文所述的任何pH变性条件,酸变性剂选自本文所述的任何酸变性条件,碱性变性剂选自本文所述的任何碱性变性条件,有机溶剂选自本文所述的任何有机溶剂条件,离散剂选自本文所述的任何离散剂条件,螯合剂选自本文所述的任何螯合剂条件,洗涤剂选自本文所述的任何洗涤剂条件,并且盐溶液选自本文所述的任何盐溶液条件。

[0239] 表1:

[0240]

变性条件	热	pH	酸	碱	有机溶剂	离散剂	螯合剂	洗涤剂	盐溶液
热									
pH	热+pH								
酸	热+酸	pH+酸	两种或更多种酸						
碱	热+碱	pH+碱	酸+碱	两种或更多种碱化剂					
有机溶剂	热+有机溶剂	pH+有机溶剂	酸+有机溶剂	碱+有机溶剂	两种或更多种有机溶剂				
离散剂	热+离散剂	pH+离散剂	酸+离散剂	碱+离散剂	有机溶剂+离散剂	两种或更多种离散剂			
螯合剂	热+螯合剂	pH+螯合剂	酸+螯合剂	碱+螯合剂	有机溶剂+螯合剂	离散剂+螯合剂	两种或更多种螯合剂		
洗涤剂	热+洗涤剂	pH+洗涤剂	酸+洗涤剂	碱+洗涤剂	有机溶剂+洗涤剂	离散剂+洗涤剂	螯合剂+洗涤剂	两种或更多种洗涤剂	
盐溶液	热+盐溶液	pH+盐溶液	酸+盐溶液	碱+盐溶液	有机溶剂+盐溶液	离散剂+盐溶液	螯合剂+盐溶液	洗涤剂+盐溶液	两种或更多种盐溶液

[0241] 表1中所示的组合可以与第三、第四、第五或更多进一步的变性条件组合。

[0242] 例如,上述变性热条件可以与上述变性pH条件组合以从含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群中产生circRNA富集群。替代性地,变性热条件可以与本文所述的一种或多种化学变性剂组合以产生circRNA富集群。此外,通过使混合群与pH变性剂和化学变性剂接触,可以从多核糖核苷酸混合群中产生circRNA富集群。

[0243] 本披露还提供使用本文所述的一种或多种变性条件与本领域已知的一种或多种非变性条件(例如,温度、pH、缓冲剂)的组合。在一些实施例中,可以对含有多核糖核苷酸混合群(含有circRNA和linRNA)的样品进行本文所述的热变性与变性pH条件的组合。例如,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性温度,诸如至少50°C的温度,例如在50°C与85°C之间(例如,50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、或85°C)的温度,与暴露于变性pH条件(例如,大于5且小于9的pH,诸如例如5.01、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、

8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或8.99的pH)组合。

[0244] 在一些其他实施例中,可以对含有多核糖核苷酸混合群(含有circRNA和linRNA)的样品进行本文所述的热变性与非变性pH条件的组合。例如,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性温度,诸如至少50°C的温度,例如在50°C与85°C之间(例如,50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、或85°C)的温度,与暴露于非变性pH条件(例如,大于5且小于9的pH,诸如例如5.01、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、或8.9的pH)组合。

[0245] 在另一个实例中,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性pH条件(例如,大于5且小于9的pH,诸如例如5.01、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或8.99的pH),与暴露于非变性温度,诸如例如低于50°C(例如,49°C、48°C、47°C、46°C、45°C、44°C、43°C、42°C、41°C、40°C、39°C、38°C、37°C、36°C、35°C、34°C、33°C、32°C、31°C、30°C、29°C、28°C、27°C、26°C、25°C、24°C、23°C、22°C、21°C、20°C、19°C、18°C、17°C、16°C、15°C、14°C、13°C、12°C、11°C、10°C或更低)的温度组合。

[0246] 在另一个实例中,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性离液条件,例如浓度为至少1%(v/v)(例如,至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的尿素,以及一种或多种变性有机溶剂条件,例如浓度为至少0.1%(v/v)(例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的乙腈和二甲基亚砷。

[0247] 在另一个实例中,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性离液条件,例如浓度为至少1%(v/v)(例如,至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的尿素,以及一种或多种变性有机溶剂条件,例如浓度为至少0.1%(v/v)(例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的乙腈和二甲基亚砷,以及变性温度,诸如至少50°C的温度,例如在50°C与85°C之间(例如,50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69

°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、或85°C)的温度。

[0248] 在另一个实例中,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性离液条件,例如浓度为至少1% (v/v) (例如,至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的尿素,以及变性温度,诸如至少50°C的温度,例如在50°C与85°C之间(例如,50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、或85°C)的温度。在另一个实例中,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性离液条件,例如浓度为至少1% (v/v) (例如,至少1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、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%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多)的尿素,以及变性pH条件(例如,大于5且小于9的pH,诸如例如5.01、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或8.99的pH)。

[0249] 在另一个实例中,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性有机溶剂条件,例如浓度为至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的乙腈和二甲基亚砜,以及变性温度,诸如至少50°C的温度,例如在50°C与85°C之间(例如,50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、或85°C)的温度。

[0250] 在另一个实例中,可以将本文描述的多核糖核苷酸(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)暴露于变性有机溶剂条件,例如浓度为至少0.1% (v/v) (例如,至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或更多)的乙腈和二甲基亚砜,以及变性pH条件(例如,大于5且小于9的pH,诸如例如5.01、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或8.99的pH)。

[0251] 在本文描述的另一个实例中(例如,含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群)可以暴露于变性盐条件,例如,NaCl、KCl、MgCl、CaCl、CsSO₄、NaSO₄、LiCl、或LiBr,浓度为在100mM与1M之间(例如,150mM-950mM、200mM-900mM、250mM-850mM、300mM-

800mM、350mM-750mM、400mM-700mM、450mM-650mM、500mM-600mM、或525mM-575mM)的NaCl、KCl、MgCl、CaCl、CsSO₄、NaSO₄、LiCl或LiBr,以及变性pH条件(例如,大于5且小于9的pH,诸如例如5.01、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或8.99的pH)。

[0252] 纯化方法

[0253] 本文披露了可用于在变性条件下从含有circRNA和linRNA混合群的样品中纯化circRNA的多种方法。在一些实施例中,纯化方法是柱色谱纯化方法。柱色谱方法通常采用其中使含有溶解的目标物质的溶液(通常称为流动相)通过加载有由多孔颗粒制成的固定相的色谱柱的过程。加载的溶液通过柱,并且根据物质与固定相的相互作用分离所述物质,这取决于分析物的物理化学特性。纯化方法包括柱色谱法,诸如例如快速蛋白液相色谱法(FPLC;诸如例如反相(RP)-FPLC)、疏水相互作用色谱法(HIC)、阴离子交换色谱法(AEC)、混合模式色谱法(MMC)或亲和色谱法。下面更详细地讨论这些方法。

[0254] 快速高效液相色谱法

[0255] 本文描述的方法涉及使用FPLC方法从含有混合多核糖核苷酸或其他物质的样品中纯化和富集circRNA,所述混合多核糖核苷酸含有circRNA和linRNA的一种或多种不同群。

[0256] FPLC是一种用于分离复杂物质混合物的既定方法,并且常用于与生物化学、分析化学和临床化学相关的应用中。通常有两种类型的FPLC方法,即反相(RP)-FPLC和正相(NP)-FPLC。RP-FPLC与NP-FPLC的不同之处在于RP-FPLC使用非极性(即疏水性)固定相和极性或中等极性流动相,然而NP-FPLC使用极性(亲水性)固定相和非极性流动相阶段。FPLC与高效液相色谱法(HPLC)的主要区别在于与HPLC相比,FPLC使用较低的操作压力(例如,<5巴)和较高的流速(台式系统为1mL/min-5mL/min;工业规模纯化以升/分钟计)。通常,FPLC柱只能在最高3MPa-4 MPa(435psi-580psi)的最大压力下使用。RP-FPLC通常在至少包括带有含流动相的洗脱液储液器的泵、样品输入系统、含有疏水性固定相(例如树脂、珠粒、膜等)的分离柱、和检测器的设备上进行。RP-FPLC设备的另外的元件可包括用于收集在分离过程期间收集的各个级分的级分收集器。RP-FPLC下的核心原理是非极性分析物、非极性固定分析物之间的相互作用以及极性更高分析物的保留和洗脱时间更短。这是因为降低将分析物的疏水节段暴露于极性溶剂降低了与有序分析物-极性溶剂界面的最小化相关的自由能。因此,分析物的疏水性指数大致与其从色谱柱上洗脱的时间成正比。非极性分析物的结合通过降低流动相的极性而降低,从而导致分析物从色谱柱中洗脱。影响分析物保留时间的其他因素包括流动相中无机盐的存在,无机盐由于对流动相的影响(即增加表面张力)而导致分析物保留时间增加。通过改变分析物的疏水性,保留时间也会受到流动相pH的影响。通常,流动相缓冲剂用于调节pH值以中和分析物上的任何残留电荷,从而促进分析物与固定相之间的疏水相互作用。类似地,带电分析物的极性可以通过使用离子对药剂(通过离子相互作用中和分析物电荷)来降低。

[0257] 本文披露的方法允许通过利用circRNA与linRNA之间官能疏水性的差异,将circRNA群与含有circRNA和linRNA的混合多核糖核苷酸群分离;即,与linRNA相比,circRNA表现出更高的疏水性,从而导致circRNA更强地吸附到固定相并且因此洗脱时间更

长。适合在RP-FPLC中用作反相的材料包括但不限于多孔聚苯乙烯聚合物、(非烷基化)(多孔)聚苯乙烯二乙烯基苯聚合物、多孔硅胶、非极性残基改性的多孔硅胶(特别是用含烷基的残基,更优选含丁基、辛基或十八烷基的残基改性的多孔硅胶)、用苯基残基改性的多孔硅胶、多孔聚甲基丙烯酸酯,其中特别地可以使用多孔聚苯乙烯聚合物或非烷基化(多孔)聚苯乙烯二乙烯基苯。具有聚苯乙烯二乙烯基苯的固定相本身是已知的。已经用于FPLC方法的可商购获得的本身已知的聚苯乙烯二乙烯基苯可用于根据本发明的方法。对于根据本发明的方法非常特别优选的非烷基化多孔聚苯乙烯二乙烯基苯是可以具有特别是(但不限于此) $8.0\mu\text{m} \pm 1.5\mu\text{m}$ 、特别是 $8.0\mu\text{m} \pm 0.5\mu\text{m}$ 的粒度,以及1000A-1500A、特别是1000A-1200A或3500A-4500A的孔径的非烷基化多孔聚苯乙烯二乙烯基苯。

[0258] 疏水相互作用色谱法

[0259] HIC是利用HIC流动相与目标靶分子(例如,circRNA)的疏水部分之间的相互作用的纯化方法。HIC可以在结合-洗脱模式或流通模式下进行,在结合-洗脱模式中靶分子与固定相结合直到它在洗脱阶段期间被洗脱,在流通模式中目标分子流过流动相,而杂质或副产物与固定相结合。在一些实施例中,HIC可以使用结合-洗脱和流通模式的组合。

[0260] HIC可以使用一种或多种疏水配体。HIC疏水配体的非限制性实例包括烷基-、芳基-配体及它们的组合。例如,HIC固定相可选自由丁基、己基、苯基、辛基或聚丙二醇配体组成的组。在一些实施例中,HIC柱选自由以下组成的组:CaptoPhenyl、具有低或高取代的苯基Sepharose™6 Fast Flow、苯基Sepharose™High Performance、辛基Sepharose™High Performance、Fractogel™EMD丙基、Fractogel™EMD苯基、Macro-Prep™甲基、Macro-Prep™叔丁基、WP HII-丙基(C3)™、CIMmultus C4 HLD、**CIMmultus®** 0H、Toyopearl™醚、Toyopearl™苯基、Toyopearl™丁基、ToyoScreen PPG、ToyoScreen苯基、ToyoScreen丁基、ToyoScreen己基、HiScreen丁基FF、HiScreen辛基FF、和Tosoh己基。

[0261] 根据本文披露的方法,HIC可以使用包括盐的加载缓冲剂或洗涤缓冲剂。适用于HIC的盐的非限制性实例包括硫酸铵、硫酸钠、氯化钠、氯化铵、溴化钠或它们的组合。在一些实施例中,加载缓冲剂和洗涤缓冲剂包括硫酸盐、柠檬酸盐或它们的组合。在各种实施例中,加载缓冲剂或洗涤缓冲剂包括阳离子或阴离子或它们的组合,所述阳离子包括 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Li^{+} 、 Cs^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Rb^{+} 、或 NH_4^{+} ,所述阴离子包括 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 $\text{CH}_3\text{CO}_3^{-}$ 、 Cl^{-} 、 Br^{-} 、 NO_3^{-} 、 ClO_4^{-} 、 I^{-} 、或 SCN^{-} 。疏水相互作用在高盐浓度下最强。高盐浓度有利于目标circRNA群吸附到HIC柱上,但实际浓度可在大范围内变化,这取决于目标circRNA的性质、盐类型和所选的特定HIC配体。在一些实施例中,盐浓度在例如约50mM至约5000mM、约100mM至约4000mM、约1000mM至约4000mM、约50mM至约2000mM的范围内,这部分地取决于盐类型和HIC吸附剂。在一个实施例中,盐浓度为约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约100mM、约200mM、约300mM、约400mM、约500mM、约600mM、约700mM、约800mM、约900mM、约1000mM、约1200mM、约1400mM、约1600mM、约1800mM或约2000mM。在一些实施例中,加载缓冲剂和洗涤缓冲剂具有在约4.0与8.5之间或在约5.0与7.0之间的pH。在某些实施例中,加载缓冲剂和洗涤缓冲剂具有约4.0、约4.5、约5.0、约5.5、约6、约6.5、约7.0、约7.5、约8.0或约8.5的pH。在一些实施例中,加载缓冲剂和洗涤缓冲剂相同或基本上相同。

[0262] 在进行HIC分离的示例性方法中,例如使用分批纯化技术或使用柱或膜色谱法或整体材料(称为HIC介质或树脂),使样品(例如,含有多核糖核苷酸(诸如circRNA和linRNA))

混合群的样品)与HIC介质接触。例如,在色谱分离的情况下,采用通常为圆柱形形状的色谱设备来容纳在适当的缓冲溶液中制备的色谱支持介质(例如,HIC介质)。一旦色谱材料被添加到色谱设备中,就使含有目标circRNA群的样品在加载缓冲剂存在下与色谱材料接触,以允许目标circRNA或大部分杂质或副产物与HIC介质结合。样品中的目标circRNA群与HIC介质结合,而杂质或副产物(诸如例如linRNA)流过,形成含有杂质或副产物的流通级分。然后可以在洗脱阶段期间洗脱结合的circRNA,从而产生circRNA富集群。在一些实施例中,与HIC介质结合的circRNA群是样品中多核糖核苷酸总量的至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或至少约98%。

[0263] 阴离子交换色谱法

[0264] AEC根据目标核酸(例如,circRNA)的局部电荷与色谱材料的局部电荷之间的差异来分离分子。填充的AEC柱或膜装置可以在结合-洗脱模式、流通或混合模式下运行。用平衡缓冲剂或另一具有不同pH或电导率的缓冲剂洗涤柱或膜装置后,通过增加洗脱缓冲剂的离子强度(即电导率)以与溶质竞争AEC基质的带电位点来实现产物回收。改变pH值并且由此改变溶质的电荷是实现溶质洗脱的另一种方式。电导率或pH的变化可能是渐进的(梯度洗脱)或逐步的(分步洗脱)。

[0265] 阴离子或阳离子取代基可以连接到基体上,以形成用于色谱法的阴离子或阳离子支持物。阴离子交换取代基的非限制性实例包括二乙基氨基乙基(DEAE)、季氨基乙基(QAE)和季胺(Q)基团。阳离子取代基包括羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸根(P)和磺酸根(S)。纤维素离子交换介质诸如DE23TM、DE32TM、DE52TM、CM-23TM、CM-32TM和CM-52TM可从英国肯特郡梅德斯通(Maidstone,Kent)的沃特曼公司(Whatman Ltd)获得。SEPHADEX®基和交联离子交换剂也是已知的。例如,DEAE-、QAE-、CM-和SP-SEPHADEX®,和DEAE-、Q-、CM-和S-SEPHAROSE®,和SEPHAROSE®Fast Flow,以及CaptoTMS均可从GE医疗公司(GE Healthcare)获得。此外,DEAE和CM衍生的乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物诸如TOYOPEARLTMDEAE-650S或M和TOYOPEARLTMCM-650S或M都可从宾夕法尼亚州费城(Philadelphia,Pa)的Toso Haas公司(Toso Haas Co.)获得,CIMmultus®QA、CIMmultus®DEAE、CIMmultus®EV、CIMmultus®EDA和CIMmultus®S03可从赛多利斯公司(Sartorius)获得,或者Nuvia S和UNOSphereTMS可从加利福尼亚州赫拉克勒斯(Hercules,Calif.)的伯乐公司(BioRad)获得,Eshmuno®S可从加利福尼亚州比勒里卡(Billerica,Calif.)的EMD密理博公司(EMD Millipore)获得。

[0266] 混合模式色谱法

[0267] MMC是使用混合模式介质的色谱法,诸如但不限于可从GE医疗公司获得的CaptoAdhere、来自赛多利斯公司的CIMmultus®PrimaS和CIMmultus®H-Bond。此类介质包括MMC配体。在一些实施例中,此类配体是指能够提供至少两个不同但协同作用的位点的配体,所述位点与待结合的物质相互作用。这些位点之一在配体和目标核酸之间提供了有吸引力的电荷-电荷相互作用类型。另一个位点通常提供电子受体-供体相互作用或疏水或亲水相互作用。电子供体-受体相互作用包括诸如氢键、 π - π 、阳离子- π 、电荷转移、偶极-偶极、诱导偶极等的相互作用。与传统阴离子交换剂相比,混合模式功能可以提供不同的选择

性。MMC配体也称为“多模式”色谱法配体。

[0268] 根据本披露,MMC介质可包括直接或经由间隔物偶联至有机或无机支持物(有时表示为基础基质)的混合模式配体。支持物可以是颗粒(诸如实质上球形的颗粒)、整料、过滤器、膜、表面、毛细管等形式。在某些实施例中,支持物由天然聚合物制备,诸如交联的碳水化合物材料,诸如琼脂糖、琼脂、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、魔芋、角叉菜胶、结冷胶、藻酸盐等。为了获得高吸附能力,支持物可以是多孔的,然后配体与外表面以及孔表面偶联。此类天然聚合物支持物可以根据标准方法制备,诸如反相悬浮凝胶(S Hjerten:Biochim Biophys Acta[生物化学生物物理学报]79(2),393-98(1964)。替代性地,支持物可以由合成聚合物制备,诸如交联的合成聚合物,例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯基酰胺等。此类合成聚合物可以根据标准方法生产,参见例如“Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization[通过悬浮聚合开发的苯乙烯基聚合物支持物]”(R Arshady:Chimica e L'Industria[化学与工业]70(9),70-75(1988))。多孔天然或合成聚合物支持物也可从商业来源获得,诸如安盛生物科学公司(Amersham Biosciences),瑞典乌普萨拉(Uppsala, Sweden)。

[0269] 纯度评估

[0270] 可以通过本领域熟知的方法来评估circRNA富集群的纯度。在实施例中,按质量计,circRNA的纯度是至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。纯度可以例如通过质谱法、HPLC、基于芯片的电泳、显微镜、圆二色(CD)光谱法、分光光度法、荧光法(例如,Qubit)、聚丙烯酰胺凝胶电泳成像、UV-Vis分光光度法、RNA电泳、RNase H分析或它们的任何组合来测量。在一些实施例中,circRNA分子中含有在本文所述制剂中的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的多核糖核苷酸的总质量。

[0271] 在一些实施例中,当通过质谱法、HPLC、基于芯片的电泳、显微镜、CD光谱法、分光光度法、荧光法(例如,Qubit)、聚丙烯酰胺凝胶电泳成像、UV-Vis分光光度法、RNA电泳或RNase H分析来测量时,circRNA制剂包括小于阈值量(例如,其中阈值量是用于circRNA制剂的参考标准,例如,药物释放规范)的linRNA分子。在一些实施例中,circRNA制剂包括不可检测水平的linRNA分子。

[0272] 在实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有小于1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、300ng/mL、400ng/mL、500ng/mL、1000μg/mL、5000μg/mL、10,000μg/mL、或100,000μg/mL的单核苷酸含量。

[0273] 在实施例中,按质量计,circRNA具有小于总核苷酸的0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、或其间的任何百分比的单核苷酸含量,其中总核苷酸含量为脱氧核糖核苷酸分子和核糖核苷酸分子的总质量。

[0274] 在实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有小于1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、

40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、300ng/mL、400ng/mL、500ng/mL、600ng/mL、1mg/mL、1.5mg/mL、或2mg/mL的linRNA含量,例如linRNA对应物或RNA片段。

[0275] 在实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有小于0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、或50%的linRNA。

[0276] 在实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有小于1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、300ng/mL、400ng/mL、500ng/mL、1000μg/mL、5000μg/mL、10,000μg/mL、或100,000μg/mL的DNA含量,例如模板DNA或细胞DNA(例如,宿主细胞DNA)。

[0277] 在实施例中,按质量计,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有小于总核苷酸的0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%的DNA含量,其中总核苷酸含量为脱氧核糖核苷酸分子和核糖核苷酸分子的总质量。

[0278] 在实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有小于0.1ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、300ng/mL、400ng/mL、或500ng/mL的蛋白质(例如,细胞蛋白质(CP),例如酶)污染物。

[0279] 在实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有小于0.1ng、1ng、5ng、10ng、15ng、20ng、25ng、30ng、35ng、40ng、50ng、60ng、70ng、80ng、90ng、100ng、200ng、300ng、400ng、或500ng/毫克(mg) circRNA的蛋白质(例如CP,例如酶)污染物。

[0280] 在实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)具有至少0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、0.1μg/mL、0.5μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL、40μg/mL、50μg/mL、60μg/mL、70μg/mL、80μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、300μg/mL、500μg/mL、1000μg/mL、5000μg/mL、10,000μg/mL、或100,000μg/mL的circRNA浓度。

[0281] 在一些实施例中,circRNA通过色谱法纯化,例如液相色谱法,例如FPLC(例如正相或反相FPLC)、HPLC、HIC、AEC、MMC或亲和色谱法。

[0282] 制备方法

[0283] 在一些实施例中,本文描述的任何条件都可以用作从含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群制备circRNA的方法。

[0284] 在一些实施例中,制备方法产生至少0.5mg(例如,至少0.6mg、0.8mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1000mg或更多)的量的circRNA。本方法的优势在于它们是高度可扩展的。

[0285] 分析方法

[0286] 在一些实施例中,本文描述的任何条件都可以用作从含有circRNA和linRNA的多

核糖核苷酸混合群或circRNA富集群确定circRNA的纯度的分析方法。本发明包括使用本文所述的一种或多种变性条件重复确定多批次富集的circRNA的纯度的方法。

[0287] 在一些实施例中,分析方法使用色谱法确定circRNA的纯度,例如液相色谱法,例如FPLC(例如,正相或反相FPLC)、HPLC、HIC、AEC、MMC或亲和色谱法。

[0288] 在一些实施例中,本分析方法的相对标准偏差(RSD)小于50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、或0.1%。在一些实施例中,RSD是基于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个circRNA样品计算的。

[0289] 在一些实施例中,分析方法包括使用流动相。在一些实施例中,流动相包括尿素、双三丙烷(BTP)、乙腈、NaCl、水、盐酸(HCl)或DMSO。

[0290] 在一些实施例中,变性条件存在于流动相中。

[0291] 在一些实施例中,将色谱柱加热以提供变性。在一些实施例中,将circRNA样品加热,然后放置在柱中以进行变性。

[0292] 在一些实施例中,circRNA样品用诸如如上所述的变性剂的组合(例如尿素和乙腈的组合)变性。

[0293] 在一些实施例中,分析方法包括确定杂质或副产物水平的步骤。

[0294] 在一些实施例中,分析方法包括量化至少0.5mg(例如,至少0.6mg、0.8mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1000mg或更多)的circRNA量的纯度。

[0295] 杂质和副产物

[0296] 本披露的方法适用于生成制剂,所述制剂包括circRNA群并具有降低的杂质或副产物水平,例如,与用本披露的方法纯化前的样品中的杂质或副产物水平相比,或与含有100%(w/w)circRNA的不同样品中的杂质或副产物水平相比具有降低的杂质或副产物水平。在一些实施例中,本发明的方法生成具有目标circRNA群并且具有降低的总杂质或副产物水平的组合物。在一些实施例中,总杂质或副产物水平降低的制剂不含杂质或副产物或基本上不含杂质或副产物。例如,低杂质或副产物组合物可含有约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.5%或更少的总杂质或副产物。在一些实施例中,低杂质或副产物组合物包括约5%、4%、3%、2.5%、2.4%、2.3%、2.2%、2.1%、2%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.5%、0.1%或更少的总杂质或副产物。

[0297] 在一些实施例中,杂质或副产物是工艺相关的杂质或副产物。如本文所用,术语“工艺相关的杂质或副产物”是指存在于包括目标circRNA群但并非源自circRNA本身的组合物中的杂质或副产物。工艺相关的杂质或副产物包括但不限于宿主细胞蛋白(HCP)、宿主细胞核酸、色谱材料和介质成分。例如,工艺相关的杂质或副产物可能包括聚丙烯酰胺、硼酸、镁或EDTA。如本文所用,“低杂质组合物”是指与其中杂质或副产物未减少的组合物相比包括降低水平的工艺相关杂质或副产物的组合物。例如,低工艺相关的杂质组合物可含有约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或更少的工艺相关的杂质或副产物。在一个实施例中,低工艺相关的杂质组合物不含工艺相关的杂质或副产物或基本上不

含工艺相关的杂质或副产物。

[0298] 在一些实施例中,circRNA(例如,circRNA药物制剂或组合物或circRNA生产中的中间体)基本上不含杂质或副产物。在各种实施例中,包括circRNA的组合物中至少一种杂质或副产物的水平与在去除杂质或副产物的纯化或处理之前的组合物相比降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%。在一些实施例中,至少一种工艺相关的杂质或副产物的水平与在去除杂质或副产物的纯化或处理之前的组合物相比降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%。在一些实施例中,至少一种产物相关物质的水平与在去除杂质或副产物的纯化或处理之前的组合物相比降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%。

[0299] 本领域熟知的方法可用于定量样品中存在的杂质或副产物。例如,诸如紫外(UV)、近红外光谱(NIR)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、荧光光谱或拉曼光谱的光谱方法可用于以随线、近线或在线模式监测杂质或副产物的水平。在一些实施例中,可以在色谱法步骤的洗涤线上或在收集容器中使用随线、近线或在线监测方法以能够实现所需的circRNA质量/回收。在一些实施例中,UV信号可用作替代物以实现适当的产品质量/回收,其中UV信号可被适当地处理,包括但不限于诸如积分、微分、移动平均的处理技术,使得可以解决正常的过程变异性,并且可以实现靶标产品质量。在一些实施例中,此类测量可以与在线稀释方法结合,使得加载/洗涤的离子浓度/电导率可以通过反馈来控制,从而促进产品质量控制。

[0300] 环状多核糖核苷酸的产生

[0301] 本披露提供了用于产生circRNA的方法,包括例如重组技术或化学合成。例如,用于产生RNA环的DNA分子可以包括天然存在的原始核酸序列的DNA序列、其修饰形式或编码通常未在自然中发现的合成多肽的DNA序列(例如,嵌合分子或融合蛋白)。DNA和RNA分子可以使用多种技术修饰,所述多种技术包括但不限于经典诱变技术和重组技术,诸如定点诱变、化学处理核酸分子以诱导突变、限制性酶切割核酸片段、连接核酸片段、聚合酶链式反应(PCR)扩增或诱变核酸序列的选定区域、合成寡核苷酸混合物以及连接混合物基团以“建造”核酸分子混合物及它们的组合。

[0302] circRNA可以根据任何可用的技术制备,包括但不限于化学合成和酶促合成。在一些实施例中,线性初级构建体或线性RNA可被环化或者连环化以产生本文中所述的circRNA。环化或连环化的机制可以通过诸如例如化学、酶促、夹板连接或核酶催化的方法来发生。新形成的5'-3'键可以是分子内键或分子间键。例如,可使用夹板连接酶(诸如SplintR®连接酶)来进行夹板连接。根据该方法,单链多核苷酸(夹板)(诸如单链DNA或RNA)可被设计成与linRNA的两个末端杂交,使得在与单链夹板杂交时可将两个末端并列。因此,夹板连接酶可催化linRNA并列的两个末端的连接,生成circRNA。在一些实施例中,DNA或RNA连接酶可用于环状多核苷酸的合成。作为非限制性实例,连接酶可以是circ连接酶或环状连接酶。

[0303] 在另一个实例中,linRNA的5'或3'端可以编码连接酶核酶序列,使得在体外转录期间,所得线性circRNA包括活性核酶序列,所述活性核酶序列能够连接linRNA的5'端至linRNA的3'端。连接酶核酶可衍生自第I组内含子、丁型肝炎病毒、发夹核酶,或者可通过SELEX(通过指数富集进行的配体系统进化)来进行选择。

[0304] 在另一个实例中,可通过使用至少一个非核酸部分将linRNA环化或连环化。例如,至少一个非核酸部分可与linRNA的5'末端附近或3'末端附近的区或特征反应,以环化或连环化linRNA。在另一个实例中,至少一个非核酸部分可位于或连接到或邻近linRNA的5'末端或3'末端。非核酸部分可以是同源或异源的。作为非限制性实例,非核酸部分可以是键,例如疏水键、离子键、可生物降解的键或可切割的键。作为另一非限制性实例,非核酸部分是连接部分。作为又另一非限制性实例,非核酸部分可以是寡核苷酸或肽部分,例如如本文中所述的适体或非核酸接头。

[0305] 在另一个实例中,linRNA可以通过自剪接进行环化或连环化。在一些实施例中,linRNA可包括环E序列以自连接。在另一实施例中,linRNA可包括自环化内含子,例如,5'和3'剪接接合,或者自环化催化内含子,例如I族、II族或III族内含子。I型内含子自剪接序列的非限制性实例可包括衍生自T4噬菌体基因td的自剪接置换内含子-外显子序列以及四膜虫的插入序列(IVS)rRNA、蓝藻鱼腥藻属的pre-tRNA-Leu基因或四膜虫的pre-rRNA。

[0306] 在一些实施例中,多核糖核苷酸可以包括催化内含子片段,诸如第I组催化内含子片段的3'这一半和第I组催化内含子片段的5'这一半。第一退火区域和第二退火区域可位于催化内含子片段内。第I组催化内含子是自剪接核酶,它们经由双金属离子磷酸基转移机制催化它们本身从mRNA、tRNA和rRNA前体中切除。重要的是,RNA本身无需外源酶(诸如连接酶)即可自催化内含子去除。

[0307] 在一些实施例中,第I组催化内含子片段的3'这一半和第I组催化内含子片段的5'这一半来自鱼腥蓝细菌pre-tRNA-Leu基因或四膜虫pre-rRNA。

[0308] 在一些实施例中,第I组催化内含子片段的3'这一半和第I组催化内含子片段的5'这一半来自鱼腥蓝细菌pre-tRNA-Leu基因,并且3'外显子片段包括第一退火区域,并且5'外显子片段包括第二退火区域。第一退火区域可以包括例如5至50个、例如10至15个(例如10、11、12、13、14或15个)核糖核苷酸,并且第二退火区域可以包括例如5至50个、例如10至15个(例如10、11、12、13、14或15个)核糖核苷酸。

[0309] 在一些实施例中,第I组催化内含子片段的3'这一半和第I组催化内含子片段的5'这一半来自四膜虫pre-rRNA,并且第I组催化内含子片段的3'这一半包括第一退火区域,并且5'外显子片段包括第二退火区域。在一些实施例中,3'外显子包括第一退火区域,并且第I组催化内含子片段的5'这一半包括第二退火区域。第一退火区域可以包括例如6至50个、例如10至16个(例如10、11、12、13、14、15或16个)核糖核苷酸,并且第二退火区域可以包括例如6至50个、例如10至16个(例如10、11、12、13、14、15或16个)核糖核苷酸。

[0310] 在一些实施例中,第I组催化内含子片段的3'这一半和第I组催化内含子片段的5'这一半来自鱼腥蓝细菌pre-tRNA-Leu基因、四膜虫pre-rRNA或T4噬菌体td基因。

[0311] 在一些实施例中,第I组催化内含子片段的3'这一半和第I组催化内含子片段的5'一半来自T4噬菌体td基因。3'外显子片段可以包括第一退火区域,并且第I组催化内含子片段的5'这一半可以包括第二退火区域。第一退火区域可以包括例如2至16个、例如10至16个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个)核糖核苷酸,并且第二退火区域可以包括例如2至16个、例如10至16个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个)个核糖核苷酸。

[0312] 在一些实施例中,第I组催化内含子片段的3'这一半是线性多核苷酸的5'末端。

[0313] 在一些实施例中,第I组催化内含子片段的5'这一半是线性多核糖核苷酸的3'末端。

[0314] 在另一个实例中,linRNA可以由非核酸部分环化或连环化,所述非核酸部分引起位于、邻近或连接到linRNA的5'端和3'端的原子、分子表面之间的吸引力。可通过分子间作用力或分子内作用力将一个或多个linRNA环化或连环化。分子间作用力的非限制性实例包含偶极-偶极力、偶极诱导的偶极力、诱导的偶极诱导的偶极力、范德华力和伦敦色散力(London dispersion force)。分子内作用力的非限制性实例包含共价键、金属键、离子键、共振键、抓氢键(agnostic bond)、偶极键、缀合、超级合和反向键。

[0315] 在另一个实例中,linRNA可在5'末端附近和3'末端附近包括核酶RNA序列。当序列暴露于核酶的剩余部分时,核酶RNA序列可共价地连接到肽。共价地连接至5'末端和3'末端附近的核酶RNA序列的肽可以彼此缔合,从而引起linRNA环化或连环化。在另一实例中,共价地连接到核酶RNA序列5'末端和3'末端附近的肽可致使线性初级构建体或线性mRNA在使用本领域已知的方法(例如但不限于蛋白质连接)进行连接后环化或连环化。用于在本发明的线性初级构建体或linRNA中使用的核酶的非限制性实例,或者掺入或共价地连接肽的方法的非穷举列表在美国专利申请号US20030082768中描述,将所述专利申请案的内容通过援引以其全文并入本文中。

[0316] 在又一个实例中,环化的化学方法可用于生成circRNA。此类方法可以包括但不限于点击化学(例如,基于炔烃和叠氮化物的方法,或可点击的碱基)、烯烃复分解、氨基磷酸酯连接、半缩醛胺-亚胺交联、碱基修饰、或它们的任何组合。

[0317] 在另一个实例中,使用产生线性RNA的在无细胞系统中转录(例如,通过体外转录)的脱氧核糖核苷酸模板来产生环状多核糖核苷酸。线性多核糖核苷酸产生剪接相容的多核糖核苷酸,所述剪接相容的多核糖核苷酸可自剪接以产生环状多核糖核苷酸。

[0318] 在一些实施例中,通过如下方式(例如,在无细胞系统中)产生环状多核糖核苷酸:提供线性多核糖核苷酸;以及在适于剪接线性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位点的条件下自剪接线性多核糖核苷酸,从而产生环状多核糖核苷酸。

[0319] 在一些实施例中,通过如下方式产生环状多核糖核苷酸:提供编码线性多核糖核苷酸的脱氧核糖核苷酸;在无细胞系统中转录脱氧核糖核苷酸以产生线性多核糖核苷酸;任选地纯化剪接相容的线性多核糖核苷酸;以及在适于剪接线性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位点的条件下自剪接线性多核糖核苷酸,从而产生环状多核糖核苷酸。

[0320] 在一些实施例中,通过如下方式产生环状多核糖核苷酸:提供编码线性多核糖核苷酸的脱氧核糖核苷酸;在无细胞系统中转录脱氧核糖核苷酸以产生线性多核糖核苷酸,其中转录在适于剪接线性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位点的条件下在溶液中发生,从而产生环状多核糖核苷酸。在一些实施例中,线性多核糖核苷酸包含5'断裂内含子和3'断裂内含子(例如,用于产生circRNA的自剪接构建体)。在一些实施例中,线性多核糖核苷酸包含5'退火区域和3'退火区域。

[0321] 在一些实施例中,所述线性多核糖核苷酸从脱氧核糖核酸(例如,本文所述的脱氧核糖核酸,如DNA载体、线性化DNA载体、或cDNA)产生。在一些实施例中,线性多核糖核苷酸通过无细胞系统中转录(例如,体外转录)由脱氧核糖核酸转录。

[0322] 在另一个实例中,可以在细胞(例如,原核细胞或真核细胞)中产生环状多核糖核

苷酸。在一些实施例中,向细胞提供外源多核糖核苷酸(例如,本文所述的线性多核糖核苷酸或编码此处所述的线性多核糖核苷酸的转录的DNA分子)。线性多核糖核苷酸可在细胞中由向细胞提供的外源DNA分子转录。线性多核糖核苷酸可在细胞中由向细胞瞬时提供的外源重组DNA分子转录。在一些实施例中,外源DNA分子不整合到细胞的基因组中。在一些实施例中,线性多核糖核苷酸在细胞中由并入细胞的基因组中的重组DNA分子转录。

[0323] 在一些实施例中,细胞是原核细胞。在一些实施例中,包括本文所述的多核糖核苷酸的原核细胞可以是细菌细胞或古菌细胞。例如,包括本文所述的多核糖核苷酸的原核细胞可以是大肠杆菌(*E. coli*)、嗜盐古菌(例如,沃氏盐富饶菌(*Haloferax volcanii*))、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)、蓝菌(例如,细长聚球藻(*Synechococcus elongatus*)、螺旋藻(*Spirulina*) (节旋藻(*Arthrospira*)) 属和集胞藻属(*Synechocystis* spp.))、链霉菌(*Streptomyces*)、放线菌(*actinomycetes*) (例如,野野村菌属(*Nonomuraea*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)或温双歧菌属(*Thermobifida*))、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.) (例如,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*))、 β 变形菌(*betaproteobacteria*) (例如,伯克氏菌(*Burkholderia*))、 α 变形菌(*alphaproteobacterial*) (例如,土壤杆菌(*Agrobacterium*))、假单胞菌(*Pseudomonas*) (例如,恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*))和肠杆菌(*enterobacteria*)。原核细胞可在培养基中生长。原核细胞可包含在生物反应器中。

[0324] 细胞可以是真核细胞。在一些实施例中,真核细胞是单细胞真核细胞。在一些实施例中,单细胞真核细胞是单细胞真菌细胞,诸如酵母细胞(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和其他酵母属(*Saccharomyces* spp.)、酒香酵母属(*Brettanomyces* spp.)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces* spp.)、有孢圆酵母属(*Torulaspora* spp.)和毕赤酵母属(*Pichia* spp.))。在一些实施例中,单细胞真核细胞是单细胞动物细胞。单细胞动物细胞可以是来自多细胞动物中分离并在培养物中生长的细胞或其子代细胞。在一些实施例中,单细胞动物细胞可以是去分化的。在一些实施例中,单细胞真核细胞是单细胞植物细胞。单细胞植物细胞可以是来自多细胞植物中分离并在培养物中生长的细胞或其子代细胞。在一些实施例中,单细胞植物细胞可以是去分化的。在一些实施例中,单细胞植物细胞来自植物愈伤组织。在一些实施例中,单细胞细胞是植物细胞原生质体。在一些实施例中,单细胞真核细胞是单细胞真核藻类细胞,诸如单细胞绿藻、硅藻、眼虫或甲藻。目标单细胞真核藻类的非限制性实例包括盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、以若夫小球藻(*Chlorella zofingiensis*)、雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)、富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)和其他新绿藻属(*Neochloris* spp.)、葡萄原管藻(*Protosiphon botryoides*)、布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)、隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和其他衣藻属(*Chlamydomonas* spp.)。在一些实施例中,单细胞真核细胞是原生生物细胞。在一些实施例中,单细胞真核细胞是原生动物细胞。

[0325] 在一些实施例中,真核细胞是多细胞真核生物的细胞。例如,多细胞真核生物可选自由脊椎动物、无脊椎动物、多细胞真菌、多细胞藻类和多细胞植物组成的组。在一些实施例中,真核生物体是人。在一些实施例中,真核生物体是非人脊椎动物。在一些实施例中,真核生物体是无脊椎动物。在一些实施例中,真核生物是多细胞真菌。在一些实施例中,真核

生物体是多细胞植物。在实施例中,真核细胞是人的细胞或非人哺乳动物的细胞,所述非人哺乳动物如非人灵长类动物(例如,猴、猿)、有蹄类动物(例如,牛科动物,包括牛、水牛、野牛、绵羊、山羊、和麝牛;猪;骆驼科动物,包括骆驼、美洲驼、和羊驼;鹿,羚羊;和马科动物,包括马和驴)、肉食动物(例如,狗、猫)、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、松鼠)、或兔类动物(例如,兔子、野兔)。在实施例中,真核细胞是鸟的细胞,诸如鸟类类群鸡形目(例如鸡、火鸡、野鸡、鹌鹑)、雁形目(例如鸭、鹅)、古颚下纲(例如鸵鸟、鸸鹋)、鸽形目(例如鸽子、野鸽)或鸚形目(例如鸚鵡)的成员。在一些实施例中,真核细胞是节肢动物(例如昆虫、蛛形纲、甲壳动物)、线虫、环节动物、蠕虫或软体动物的细胞。在一些实施例中,真核细胞是多细胞植物的细胞,诸如被子植物(其可以是双子叶植物或单子叶植物)、裸子植物(例如针叶树、苏铁、买麻藤类植物、银杏)、蕨类、马尾植物、石松类或苔藓植物。在实施例中,真核细胞是真核多细胞藻类的细胞。

[0326] 真核细胞可在培养基中生长。真核细胞可包含在生物反应器中。

[0327] 生物反应器的实例包括但不限于搅拌罐(例如,充分混合的)生物反应器和管式(例如,活塞流)生物反应器、气升式生物反应器、膜搅拌罐、旋转过滤搅拌罐、振动混合器、流化床反应器、和膜生物反应器。操作生物反应器的模式可以是间歇的或连续的过程。当试剂和产物流连续地进出系统时,生物反应器是连续的。间歇式生物反应器可以具有连续的再循环流,但没有连续的试剂进料或产物收获。

[0328] 本披露的一些方法涉及大规模产生环状多核糖核苷酸。对于大规模产生方法,所述方法可在1升(L)至50L或更大(例如,5L、10L、15L、20L、25L、30L、35L、40L、45L、50L或更大)的体积中进行。在一些实施例中,所述方法可以在5L至10L、5L至15L、5L至20L、5L至25L、5L至30L、5L至35L、5L至40L、5L至45L、10L至15L、10L至20L、10L至25L、20L至30L、10L至35L、10L至40L、10L至45L、10L至50L、15L至20L、15L至25L、15L至30L、15L至35L、15L至40L、15L至45L、或15L至50L的体积中进行。在一些实施例中,生物反应器可以产生至少1g的环状RNA。在一些实施例中,生物反应器可以产生1g-200g的环状RNA(例如,1g-10g、1g-20g、1g-50g、10g-50g、10g-100g、50g-100g、或50g-200g的circRNA)。在一些实施例中,产生的量是每升(例如,每升1-200g)、每批次或反应(例如,每批次或反应1-200g)或每单位时间(例如,每小时或每天1-200g)测量的。在一些实施例中,可以串联使用超过一个的生物反应器以提高生产能力(例如,可以串联使用一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个生物反应器)。

[0329] 制造本文描述的circRNA的方法描述于例如Khudyakov&Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications* [人工DNA:方法与应用], CRC Press [CRC出版社] (2002); Zhao, *Synthetic Biology: Tools and Applications* [合成生物学:工具与应用] (第一版), Academic Press [学术出版社] (2013); Muller和Appel, 来自RNA Biol [核糖核酸生物学], 2017, 14(8):1018-1027; 以及Egli和Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids* [人工核酸的化学与生物学], (第一版), Wiley-VCH [威利-VCH出版社] (2012)。制备环状多核糖核苷酸的其他方法已在例如以下中描述:国际公开号W0 2022/247943、美国专利号US11000547、国际公开号W0 2018/191722、国际公开号W0 2019/236673、国际公开号W0 2020/023595、国际公开号W0 2022/204460、国际公开号W0 2022/204464和国际公开号W0 2022/204466。

[0330] 多种合成circRNA的方法也在别处进行了描述(参见例如,美国专利号US 6210931、美国专利号US 5773244、美国专利号US 5766903、美国专利号US 5712128、美国专利号US 5426180、美国公开号US20100137407、国际公开号WO 1992001813、国际公开号WO 2010084371和Petkovic等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究]43:2454-65(2015);其各自的内容通过援引以其全文并入本文中)。

[0331] 环状多核糖核苷酸

[0332] 本披露的特征在于circRNA组合物以及制备和纯化circRNA的方法。在一些实施例中,circRNA由linRNA产生(例如,通过本领域已知的方法,包括通过酶促连接或通过自催化RNA)。在一些实施例中,linRNA从脱氧核糖核苷酸模板(例如,载体、线性化载体或cDNA)转录。

[0333] circRNA可以包括诸如一个或多个编码序列、一个或多个非编码序列或它们的组合的特征。circRNA可以包括一个或多个编码序列,例如编码多肽表达的编码序列。每个编码序列可以可操作地连接到内部核糖体进入位点(IRES)或一个或多个调节序列或它们的组合。circRNA可以包括一个或多个非编码序列,例如,特异性结合靶标(诸如蛋白质或核酸)的非编码序列。circRNA的特征描述于例如国际专利公开WO 2019/118919、WO 2020/023655、WO 2020/180751、WO 2020/180752、WO 2020/181013、WO 2020/198403、WO 2020/257730、WO 2020/257727、WO 2020/252436,其各自就其中描述的circRNA通过援引并入。

[0334] 待纯化的circRNA的大小可以是适合本文披露的纯化方法的任何大小。

[0335] 例如,待纯化的circRNA的长度可以为至少20,000个核苷酸、至少19,000个核苷酸、至少18,000个核苷酸、至少17,000个核苷酸、至少16,000个核苷酸、至少15,000个核苷酸、至少14,000个核苷酸、至少13,000个核苷酸、至少12,000个核苷酸、至少11,000个核苷酸、至少10,000个核苷酸、至少9,000个核苷酸、至少8,000个核苷酸、至少7,000个核苷酸、至少6,000个核苷酸、至少5,000个核苷酸、至少4,000个核苷酸、至少3,000个核苷酸、至少2,000个核苷酸、至少1,000个核苷酸、至少900个核苷酸、至少800个核苷酸、至少700个核苷酸、至少600个核苷酸、至少500个核苷酸、至少400个核苷酸、至少300个核苷酸、至少200个核苷酸、或至少100个核苷酸。

[0336] 例如,待纯化的circRNA的长度可以小于约20,000个核苷酸、小于约19,000个核苷酸、小于约18,000个核苷酸、小于约17,000个核苷酸、小于约16,000个核苷酸、小于约15,000个核苷酸、小于约14,000个核苷酸、小于约13,000个核苷酸、小于约12,000个核苷酸、小于约11,000个核苷酸、小于约10,000个核苷酸、小于约9,000个核苷酸、小于约8,000个核苷酸、小于约7,000个核苷酸、小于约6,000个核苷酸、小于约5,000个核苷酸、小于约4,000个核苷酸、小于约3,000个核苷酸、小于约2,000个核苷酸、小于约1,000个核苷酸、小于约900个核苷酸、小于约800个核苷酸、小于约700个核苷酸、小于约600个核苷酸、小于约500个核苷酸、小于约400个核苷酸、小于约300个核苷酸、小于约200个核苷酸、或小于约100个核苷酸。

[0337] 例如,待纯化的circRNA的长度可以为约100个核苷酸至约20,000个核苷酸(例如,约100个核苷酸至约500个核苷酸、约100个核苷酸至约750个核苷酸、约100个核苷酸至约1,000个核苷酸、约100个核苷酸至约2,500个核苷酸、约100个核苷酸至约5,000个核苷酸、约100个核苷酸至约10,000个核苷酸、约500个核苷酸至约750个核苷酸、约750个核苷酸至约

1,000个核苷酸、约750个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约1,250个核苷酸、约1,000个核苷酸至约2,000个核苷酸、约1,000个核苷酸至约5,000个核苷酸、约2,500个核苷酸至约5,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约10,000个核苷酸、约5,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约10,000个核苷酸至约15,000个核苷酸、约15,000个核苷酸至约20,000个核苷酸、约100个核苷酸、约200个核苷酸、约300个核苷酸、约400个核苷酸、约500个核苷酸、约600个核苷酸、约700个核苷酸、约800个核苷酸、约900个核苷酸、约1,000个核苷酸、约1,250个核苷酸、约1,500个核苷酸、约1,750个核苷酸、约2,000个核苷酸、约3,000个核苷酸、约4,000个核苷酸、约5,000个核苷酸、约6,000个核苷酸、约7,000个核苷酸、约8,000个核苷酸、约9,000个核苷酸、约10,000个核苷酸、约11,000个核苷酸、约12,000个核苷酸、约13,000个核苷酸、约14,000个核苷酸、约15,000个核苷酸、约16,000个核苷酸、约17,000个核苷酸、约18,000个核苷酸、约19,000个核苷酸或约20,000个核苷酸)。

[0338] 根据本文披露的方法的从多核糖核苷酸混合群中纯化circRNA可以对任何种类的circRNA进行,包括单链或双链circRNA,含有二级结构的circRNA和缺乏任何二级结构的circRNA,标记或未标记的circRNA(例如,荧光标记的、放射性标记的、抗体标记的等)。

[0339] 所选的用于纯化的circRNA可能包括天然存在的DNA或RNA核苷(例如,腺嘌呤、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷或肌苷),或者circRNA可能包括非天然存在的(即修饰的)核碱基、核苷间键或糖。在一些实施例中,所选的用于纯化的circRNA包括天然存在的核苷。在circRNA被修饰的情况下,它可能含有修饰的核糖核苷(例如,含有修饰的核碱基或修饰的核糖部分)或修饰的核苷间键(例如,硫代磷酸酯和氨基磷酸酯等)。通常,掺入此类修饰以稳定RNA分子并减少核酸酶的水解。本披露具体考虑的对circRNA的修饰包括WO 2020/198403中描述的核碱基修饰。

[0340] 在一些实施例中,本披露的circRNA的基本上所有核苷或核苷间键都是修饰的核苷。在一些实施例中,所披露的circRNA的所有核苷或核苷间键都是修饰的核苷。其中“基本上所有核苷都是修饰的核苷”的circRNA在很大程度上但不是完全被修饰并且可以包括不超过五个、四个、三个、两个或一个天然存在的核苷。在一些实施例中,circRNA可以包括不超过五个、四个、三个、两个或一个替代性核苷。在一些实施例中,修饰的circRNA包括至少1个(例如,至少2个、5个、10个、15个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个、1500个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个、5500个、6000个、6500个、7000个或更多个)修饰的核苷。上述修饰(包括对核碱基、糖部分或核苷间键的修饰)在其保留未修饰的RNA序列中编码的信息(例如,每个密码子编码的氨基酸)和不干扰蛋白质翻译的范围内可以并入本文所述的circRNA中。

[0341] 多肽表达序列

[0342] 在一些实施例中,本文所述的多核糖核苷酸包括一个或多个表达序列,其中每个表达序列编码多肽。在一些实施例中,所述环状多核糖核苷酸包括两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种表达序列。

[0343] 每个编码的多肽可以是线性或分支的。多肽的长度可以是约5至约40,000个氨基酸、约15至约35,000个氨基酸、约20至约30,000个氨基酸、约25至约25,000个氨基酸、约50至约20,000个氨基酸、约100至约15,000个氨基酸、约200至约10,000个氨基酸、约500至

约5,000个氨基酸、约1,000至约2,500个氨基酸或者其间的任何范围。在一些实施例中,长度少于约40,000个氨基酸、少于约35,000个氨基酸、少于约30,000个氨基酸、少于约25,000个氨基酸、少于约20,000个氨基酸、少于约15,000个氨基酸、少于约10,000个氨基酸、少于约9,000个氨基酸、少于约8,000个氨基酸、少于约7,000个氨基酸、少于约6,000个氨基酸、少于约5,000个氨基酸、少于约4,000个氨基酸、少于约3,000个氨基酸、少于约2,500个氨基酸、少于约2,000个氨基酸、少于约1,500个氨基酸、少于约1,000个氨基酸、少于约900个氨基酸、少于约800个氨基酸、少于约700个氨基酸、少于约600个氨基酸、少于约500个氨基酸、少于约400个氨基酸、少于约300个氨基酸或更少的多肽可能是有用的。

[0344] 本文包括的多肽可包括天然存在的多肽或非天然存在的多肽。在一些情况下,所述多肽是或包括参考多肽的功能性片段或变体(例如,酶的酶解活性片段或变体)。例如,所述多肽可以是本文所述的任一多肽的功能活性变体,例如在指定区域或整个序列上与本文所述的多肽或天然存在的多肽的序列具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性。在一些情况下,多肽可以与目标蛋白具有至少50%(例如,至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%、或更大)同一性。

[0345] 多肽的一些实例包括但不限于荧光标签或标志物、抗原、治疗性多肽、或用于农业应用的多肽。

[0346] 治疗性多肽可以是激素、神经递质、生长因子、酶(例如,氧化还原酶、代谢酶、线粒体酶、加氧酶、脱氢酶、ATP非依赖性酶、溶酶体酶、去饱和酶)、细胞因子、抗原结合多肽(例如,抗原结合抗体或抗体样片段,诸如单链抗体、纳米抗体或其他含有Ig重链或轻链的多肽)、Fc融合蛋白、抗凝剂、血液因子、骨形态发生蛋白、干扰素、白介素或溶栓剂。

[0347] 用于农业应用的多肽可以是细菌素、溶素、抗微生物多肽、抗真菌多肽、根瘤富含C的肽、细菌细胞调节肽、肽毒素、杀虫多肽(例如,杀虫多肽或杀线虫多肽)、抗原结合多肽(例如,抗原结合抗体或抗体样片段,诸如单链抗体、纳米抗体或其他含有Ig重链或轻链的多肽)、酶(例如,核酸酶、淀粉酶、纤维素酶、肽酶、脂肪酶、几丁质酶)、肽信息素或转录因子。

[0348] 在一些情况下,多核糖核苷酸表达人蛋白。在一些情况下,多核糖核苷酸表达非人蛋白。

[0349] 在一些实施例中,多核糖核苷酸表达抗体,例如抗体片段或其一部分。在一些实施例中,由环状多核糖核苷酸表达的抗体可以是任何同种型的,如IgA、IgD、IgE、IgG、IgM。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸表达抗体的一部分,如轻链、重链、Fc片段、CDR(互补决定区)、Fv片段、或Fab片段、其另外的部分。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸表达抗体的一个或多个部分。例如,环状多核糖核苷酸可以包括多于一个表达序列,其中每一个表达抗体的一部分,并且其总和可以构成所述抗体。在一些情况下,环状多核糖核苷酸包括一个编码抗体重链的表达序列和另一个编码抗体轻链的表达序列。在一些情况下,当环状多核糖核苷酸在细胞或无细胞环境中表达时,轻链和重链可以经受适当的修饰、折叠或其他翻译后修饰以形成功能性抗体。

[0350] 在实施例中,多肽包括多个多肽,例如,一个多肽序列的多个拷贝、或多个不同的

多肽序列。在实施例中,多个多肽通过接头氨基酸或间隔氨基酸连接。

[0351] 在一些实施例中,表达序列包括polyA序列(例如,在表达序列的3'端)。在一些实施例中,polyA序列的长度大于10个核苷酸。在一个实施例中,polyA序列的长度大于15个核苷酸(例如,至少或大于约10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、70个、80个、90个、100个、120个、140个、160个、180个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、600个、700个、800个、900个、1,000个、1,100个、1,200个、1,300个、1,400个、1,500个、1,600个、1,700个、1,800个、1,900个、2,000个、2,500个或3,000个核苷酸)。在一些实施例中,根据国际专利公开号W0 2019/118919A1的[0202]-[0204]中对polyA序列的描述来设计polyA序列,所述文献通过援引以其全文并入本文。在一些实施例中,表达序列缺少polyA序列(例如,在表达序列的3'端)。

[0352] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括polyA、缺少polyA或具有修饰的polyA以调节环状多核糖核苷酸的一种或多种特性。在一些实施例中,缺少polyA或具有修饰的polyA的环状多核糖核苷酸改善一种或多种功能特性,例如免疫原性(例如免疫或炎症反应的一种或多种标志物的水平)、半衰期和/或表达效率。

[0353] 内部核糖体进入位点

[0354] 在一些实施例中,本文所述的多核糖核苷酸包括一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)元件。在一些实施例中,IRES与一个或多个表达序列可操作连接(例如,每个IRES与一个或多个表达序列可操作连接)。在实施例中,IRES位于异源启动子与编码序列的5'端之间。

[0355] 包括在多核糖核苷酸中的合适的IRES元件包括能够接合真核核糖体的RNA序列。在一些实施例中,IRES元件是至少约5nt、至少约8nt、至少约9nt、至少约10nt、至少约15nt、至少约20nt、至少约25nt、至少约30nt、至少约40nt、至少约50nt、至少约100nt、至少约200nt、至少约250nt、至少约350nt、或至少约500nt。

[0356] 在一些实施例中,IRES元件衍生自生物体的DNA,所述生物体包括但不限于病毒、哺乳动物或果蝇。此类病毒DNA可以衍生自但不限于小核糖核酸病毒互补DNA(cDNA)以及EMCV cDNA和脊髓灰质炎病毒cDNA。在一个实施例中,衍生IRES元件的果蝇DNA包括但不限于来自黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的触角足基因。

[0357] 在一些实施例中,如果存在,IRES序列是以下病毒的IRES序列:桃拉综合征(Taura syndrome)病毒、锥猎蝽(*Triatoma*)病毒、泰勒氏脑脊髓炎病毒(Theiler's encephalomyelitis virus)、猿猴病毒40、红火蚁(*Solenopsis invicta*)病毒1、禾谷缢管蚜(*Rhopalosiphum padi*)病毒、网状内皮组织增生病毒、人脊髓灰质炎病毒1、普劳提娅失速肠病毒(*Plautia stali* intestine virus)、克什米尔蜜蜂病毒、人鼻病毒2(HRV-2)、假桃病毒叶蝉病毒-1(*Homalodisca coagulata* virus-1)、人类免疫缺陷病毒1型、假桃病毒叶蝉病毒-1、Himetobi P病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、GB型肝炎病毒、口蹄疫病毒、人类肠道病毒71、马鼻炎病毒、茶尺蠖(*Ectropis obliqua*)小核糖核酸样病毒、脑心肌炎病毒(EMCV)、果蝇C病毒、十字花科烟草病毒、蟋蟀麻痹病毒、牛病毒性腹泻病毒1、黑皇后细胞病毒、蚜虫致死性麻痹病毒、禽脑脊髓炎病毒(AEV)、急性蜜蜂麻痹病毒、木槿褪绿环斑病毒(*Hibiscus chlorotic ringspot* virus)、经典猪瘟病毒、人FGF2、人SFTPA1、人AML1/RUNX1、果蝇触角足、人AQP4、人AT1R、人BAG-1、人BCL2、人BiP、人c-IAP1、人c-myc、人eIF4G、

小鼠NDST4L、人LEF1、小鼠HIF1 α 、人n.myc、小鼠Gtx、人p27kip1、人PDGF2/c-sis、人p53、人Pim-1、小鼠Rbm3、果蝇reaper、犬Scamper、果蝇Ubx、人UNR、小鼠UtrA、人VEGF-A、人XIAP、萨里病毒(Salivirus)、科萨病毒(Cosavirus)、副肠孤病毒(Parechovirus)、果蝇无毛、酿酒酵母(*S.cerevisiae*)TFIID、酿酒酵母YAP1、人c-src、人FGF-1、猿猴小核糖核酸病毒、芜菁皱缩病毒(Turnip crinkle virus)、爱知病毒(Aichivirus)、Crohivirus、埃可病毒11、eIF4G的适配体、柯萨奇病毒(Coxsackievirus) B3 (CVB3) 或柯萨奇病毒A (CVB1/2)。在又一实施例中, IRES是柯萨奇病毒B3 (CVB3) 的IRES序列。在其他的实施例中, IRES是脑心肌炎病毒(EMCV) 的IRES序列。在其他的实施例中, IRES是泰勒氏脑脊髓炎病毒的IRES序列。

[0358] 在一些实施例中, IRES序列与野生型IRES序列相比具有修饰的序列。在一些实施例中, 当野生型IRES的最后一个核苷酸不是胞嘧啶核酸残基时, 可以修饰野生型IRES序列的最后一个核苷酸以使其为胞嘧啶残基。例如, 在一些实施例中, IRES序列是CVB3 IRES序列, 其中末端腺苷残基被修饰为胞嘧啶残基。在一些实施例中, IRES序列是肠道病毒71 (EV17) IRES, 其中末端鸟苷残基被修饰为胞嘧啶残基。在一些实施例中, 多核糖核苷酸包括侧接至少一个(例如2、3、4、5个或更多个)表达序列的至少一个IRES。在一些实施例中, IRES侧接至少一个(例如2、3、4、5个或更多个)表达序列的两侧。在一些实施例中, 多核糖核苷酸在每个表达序列的一侧或两侧包括一个或多个IRES序列, 导致一种或多种肽和/或一种或多种多肽的分离。

[0359] 在一些实施例中, 本文所述的多核糖核苷酸包括IRES(例如, 可操作地连接至编码区的IRES)。例如, 多核糖核苷酸可包括任何IRES, 其描述于Chen等人Mol. Cell [分子细胞] 81 (20) : 4300-4318, 2021; Jopling等人Oncogene [致癌基因] 20: 2664-2670, 2001; Baranick等人PNAS [美国科学院院报] 105 (12) : 4733-4738, 2008; Lang等人Molecular Biology of the Cell [细胞分子生物学] 13 (5) : 1792-1801, 2002; Dorokhov等人PNAS [美国科学院院报] 99 (8) : 5301-5306, 2002; Wang等人Nucleic Acids Research [核酸研究] 33 (7) : 2248-2258, 2005; Petz等人Nucleic Acids Research [核酸研究] 35 (8) : 2473-2482, 2007; Chen等人Science [科学] 268: 415-417, 1995; Fan等人Nature Communication [自然通讯] 13 (1) : 3751-3765, 2022和国际公开号W0 2021/263124, 其各自均通过援引以其整体并入本文。

[0360] 调节元件

[0361] 在一些实施例中, 本文所述的多核糖核苷酸包括一个或多个调节元件。在一些实施例中, 多核糖核苷酸包括调节元件, 例如修饰多核糖核苷酸内表达序列的表达的序列。

[0362] 调节元件可包括与编码表达产物的表达序列相邻定位的序列。调节元件可与相邻序列可操作连接。如与不存在调节元件时表达的产物的量相比, 调节元件可以增加表达的产物的量。另外, 一个调节元件可以增加串联附接的多个表达序列表达的产物的量或数量。因此, 一个调节元件可以增强一个或多个表达序列的表达。也可以使用多种调节元件, 例如, 差异性地调节不同表达序列的表达。

[0363] 在一些实施例中, 调节元件是翻译调节子。翻译调节子可以调节多核糖核苷酸中表达序列的翻译。翻译调节子可以是翻译增强子或抑制子。在一些实施例中, 多核糖核苷酸包括与至少一个表达序列相邻的至少一个翻译调节子。在一些实施例中, 多核糖核苷酸包括与每个表达序列相邻的翻译调节子。在一些实施例中, 翻译调节子存在于每个表达序列的一侧或两侧, 导致表达产物例如一种或多种肽和/或一种或多种多肽的分离。

[0364] 在一些实施例中,调节元件是微RNA(miRNA)或miRNA结合位点。

[0365] 调节元件的其他实例在例如国际专利公开号W0 2019/118919的第[0154]-[0161]段中描述,所述文献通过援引以其全文据此并入。

[0366] 翻译起始序列

[0367] 在一些实施例中,本文所述的多核糖核苷酸包括至少一个翻译起始序列。在一些实施例中,多核糖核苷酸包括与表达序列可操作地连接的翻译起始序列。

[0368] 在一些实施例中,多核糖核苷酸编码多肽并且可包括翻译起始序列,例如起始密码子。在一些实施例中,翻译起始序列包括Kozak或Shine-Dalgarno序列。在一些实施例中,多核糖核苷酸包括与表达序列相邻的翻译起始序列,例如Kozak序列。在一些实施例中,翻译起始序列是非编码起始密码子。在一些实施例中,翻译起始序列(例如Kozak序列)存在于每个表达序列的一侧或两侧,导致表达产物的分离。在一些实施例中,多核糖核苷酸包括与表达序列相邻的至少一个翻译起始序列。在一些实施例中,翻译起始序列为多核糖核苷酸提供构象灵活性。在一些实施例中,翻译起始序列在多核糖核苷酸的基本上单链的区域内。翻译起始序列的其他实例在国际专利公开号W0 2019/118919的第[0163]-[0165]段中描述,所述文献通过援引以其全文据此并入。

[0369] 多核糖核苷酸可包括多于1个起始密码子,诸如但不限于至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少50个、至少60个或多于60个起始密码子。翻译可在第一个起始密码子上起始或以在第一个起始密码子的下游起始。

[0370] 在一些实施例中,多核糖核苷酸可在不是第一个起始密码子的密码子(例如AUG)处起始。多核糖核苷酸的翻译可以起始于替代性翻译起始序列,如但不限于ACG、AGG、AAG、CTG/CUG、GTG/GUG、ATA/AUA、ATT/AUU、TTG/UUG。在一些实施例中,翻译在选择性条件(例如,应激诱导条件)下在替代性翻译起始序列处开始。作为非限制性实例,多核糖核苷酸的翻译可在替代性翻译起始序列(诸如ACG)处开始。作为另一非限制性实例,多核糖核苷酸翻译可以在替代性翻译起始序列CTG/CUG处开始。作为另一非限制性实例,多核糖核苷酸翻译可以在替代性翻译起始序列GTG/GUG处开始。作为另一非限制性实例,多核糖核苷酸可以在重复相关的非AUG(RAN)序列,如包括短段的重复RNA(例如CGG、GGGGCC、CAG、CTG)的替代性翻译起始序列处开始翻译。

[0371] 终止元件

[0372] 在一些实施例中,本文所述的多核糖核苷酸包括至少一个终止元件。在一些实施例中,多核糖核苷酸包括与表达序列可操作地连接的终止元件。在一些实施例中,多核糖核苷酸缺少终止元件。

[0373] 在一些实施例中,多核糖核苷酸包括一个或多个表达序列,并且每个表达序列可或缺不具有终止元件。在一些实施例中,多核糖核苷酸包括一个或多个表达序列,并且表达序列缺少终止元件,使得多核糖核苷酸被连续翻译。终止元素的排除可导致表达产物的滚环翻译或连续表达。

[0374] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括一个或多个表达序列,并且每个表达序列可或缺不具有终止元件。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括一个或多个表达序列,

并且表达序列缺少终止元件,使得环状多核糖核苷酸被连续翻译。由于缺少核糖体停滞或脱落,终止元件的排除可能导致表达产物例如肽或多肽的滚环翻译或连续表达。在此类实施例中,滚环翻译通过每个表达序列表达连续表达产物。在一些其他实施例中,表达序列的终止元件可以是交错元件的一部分。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸中的一个或多个表达序列包括终止元件。然而,在环状多核糖核苷酸中进行滚环翻译或后继(例如,第二、第三、第四、第五等)表达序列的表达。在此类情况下,当核糖体遇到终止元件(例如,终止密码子)并终止翻译时,表达产物可以从核糖体上脱落。在一些实施例中,在核糖体例如核糖体的至少一个亚基与环状多核糖核苷酸保持接触时翻译终止。

[0375] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸在一个或多个表达序列的端部包括终止元件。在一些实施例中,一个或多个表达序列连续包括两个或更多个终止元件。在此类实施例中,翻译终止并且滚环翻译终止。在一些实施例中,核糖体与环状多核糖核苷酸完全脱离。在一些此类实施例中,在环状多核糖核苷酸中后继(例如,第二、第三、第四、第五等)表达序列的产生可能需要核糖体在起始翻译之前与环状多核糖核苷酸重新接合。通常,终止元件包括发出翻译终止信号的框内核苷酸三联体,例如UAA、UGA、UAG。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸中的一个或多个终止元件是移码终止元件,诸如但不限于可终止翻译的框外或-1和+1移码阅读框(例如,隐藏终止子)。移码终止元件包括出现在表达序列的第二阅读框和第三阅读框中的核苷酸三联体TAA、TAG和TGA。移码终止元件在防止mRNA的误读中可能很重要,mRNA的误读通常对细胞有害。在一些实施例中,终止元件是终止密码子。

[0376] 终止元件的其他实例在国际专利公开号W0 2019/118919的第[0169]-[0170]段中描述,所述文献通过援引以其全文据此并入。

[0377] 非翻译区

[0378] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括非翻译区(UTR)。包括基因的基因组区域的UTR可以转录但不翻译。在一些实施例中,UTR可以被包括在本文所述的表达序列的翻译起始序列的上游。在一些实施例中,UTR可以被包括在本文所述的表达序列的下游。在一些情况下,第一表达序列的一个UTR与第二表达序列的另一个UTR相同或连续或重叠。

[0379] 示例性非翻译区在国际专利公开号W0 2019/118919的第[0197]-[201]段中描述,所述文献通过援引以其全文据此并入。

[0380] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括polyA序列。示例性polyA序列在国际专利公开号W0 2019/118919的第[0202]-[0205]段中描述,所述文献通过援引以其全文据此并入。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少polyA序列。

[0381] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括内嵌有一段或多段的腺苷和尿苷的UTR。这些AU富集签名可能会增加表达产物的转化率。

[0382] 富含UTR AU的元件(ARE)的引入、去除或修饰可用于调节环状多核糖核苷酸的稳定性或免疫原性(例如,免疫或炎症反应的一种或多种标志物的水平)。工程化特定的环状多核糖核苷酸时,可以将ARE的一个或多个拷贝引入环状多核糖核苷酸中,并且ARE的所述拷贝可以调节表达产物的翻译和/或产生。同样,可以对ARE进行鉴别和去除或工程化至环状多核糖核苷酸以调节细胞内稳定性,从而影响所得蛋白质的翻译和产生。

[0383] 应当理解,可以将来自任何基因的任何UTR掺入环状多核糖核苷酸的相应侧翼区中。

[0384] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少5'-UTR,并且能够从其一个或多个表达序列表达蛋白。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少3'-UTR,并且能够从其一个或多个表达序列表达蛋白。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少polyA序列,并且能够从其一个或多个表达序列表达蛋白。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少终止元件,并且能够从其一个或多个表达序列表达蛋白。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少内部核糖体进入位点,并且能够从其一个或多个表达序列表达蛋白。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少帽,并且能够从其一个或多个表达序列表达蛋白。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少5'-UTR、3'-UTR和IRES,并且能够从其一个或多个表达序列表达蛋白。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸进一步包括以下序列中的一种或多种:编码一个或多个miRNA的序列、编码一个或多个复制蛋白的序列、编码外源基因的序列、编码治疗剂的序列、调节元件(例如,翻译调节子,例如翻译增强子或抑制子)、翻译起始序列、靶向内源基因的一种或多种调节核酸(例如,siRNA、lncRNA、shRNA)和编码治疗性mRNA或蛋白质的序列。

[0385] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少5'-UTR。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少3'-UTR。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少polyA序列。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少终止元件。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少内部核糖体进入位点。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少核酸外切酶的降解易感性。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少降解易感性的事实可能意味着环状多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解,或在仅存在核酸外切酶时被降解的有限程度例如与不存在核酸外切酶时相当或相似。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解。在一些实施例中,当暴露于核酸外切酶时,环状多核糖核苷酸降解减少。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少与帽结合蛋白的结合。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸缺少5'帽。

[0386] 交错元件

[0387] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括与表达序列相邻的至少一个交错元件。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括与每个表达序列相邻的交错元件。在一些实施例中,交错元件存在于每个表达序列的一侧或两侧,导致表达产物例如一种或多种肽和/或一种或多种多肽的分离。在一些实施例中,交错元件是一个或多个表达序列的一部分。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括一个或多个表达序列,并且所述一个或多个表达序列中的每一个通过环状多核糖核苷酸上的交错元件与后继的表达序列隔开。在一些实施例中,交错元件阻止由(a)单个表达序列的两轮翻译或(b)两个或更多个表达序列的一轮或多轮翻译生成单一多肽。在一些实施例中,交错元件是与所述一个或多个表达序列分离的序列。在一些实施例中,交错元件包括所述一个或多个表达序列的表达序列的一部分。

[0388] 非编码序列

[0389] 在一些实施例中,本文所述的多核糖核苷酸包括一个或多个非编码序列,例如不编码多肽表达的序列。在一些实施例中,多核糖核苷酸包括两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个非编码序列。在一些实施例中,多核糖核苷酸不编码多肽表达序列。

[0390] 非编码序列可以是天然的或合成的序列。在一些实施例中,非编码序列可以改变细胞行为,如例如淋巴细胞行为。在一些实施例中,所述非编码序列对于细胞RNA序列是反义的。

[0391] 在一些实施例中,多核糖核苷酸包括调节核酸,所述调节核酸是RNA或RNA样结构,典型地为约5个至500个碱基对(bp)(取决于特定的RNA结构,例如miRNA 5bp-30bp, lncRNA 200bp-500bp)并且可以具有与细胞内表达的靶基因中的编码序列相同(互补)或几乎相同(基本上互补)的核碱基序列。在实施例中,环状多核糖核苷酸包括编码可加工成较小RNA的RNA前体的调节核酸,例如,miRNA前体,其可以是约50至约1000bp,其可加工成较小的miRNA中间体或成熟miRNA。

[0392] 长非编码RNA(lncRNA)被定义为长于100个核苷酸的非蛋白编码转录物。许多lncRNA特征在于组织特异性的。以与附近蛋白质编码基因相反的方向转录的发散lncRNA(占哺乳动物基因组中总lncRNA的大比例(例如约20%))并可能调节附近基因的转录。在一个实施例中,本文提供的多核糖核苷酸包括lncRNA的有义链。在一个实施例中,本文提供的多核糖核苷酸包括lncRNA的反义链。

[0393] 蛋白结合序列

[0394] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括一个或多个蛋白质结合位点,使得蛋白质例如核糖体能够结合至RNA序列中的内部位点。通过将蛋白质结合位点(例如核糖体结合位点)工程化至环状多核糖核苷酸中,环状多核糖核苷酸可以逃避或更少地被宿主的免疫系统检测到,通过掩蔽宿主免疫系统成分中的环状多核糖核苷酸来调节降解或调节翻译。

[0395] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括至少一个免疫蛋白结合位点,例如用于逃避免疫反应,例如细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应。在一些实施例中,免疫蛋白结合位点是结合至免疫蛋白并且有助于掩蔽为外源性的环状多核糖核苷酸的核苷酸序列。在一些实施例中,免疫蛋白结合位点是结合至免疫蛋白并有助于将环状多核糖核苷酸隐藏为外源或外来的核苷酸序列。

[0396] 核糖体与线性RNA接合的传统机制包括核糖体与RNA的加帽5'端的结合。从5'端开始,核糖体迁移到起始密码子,于是形成第一肽键。根据本披露,环状多核糖核苷酸的翻译的内部起始(即,不依赖帽)不需要游离末端或加帽端。而是,核糖体结合至未加帽的内部位点,由此核糖体在起始密码子处开始多肽延长。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包括一个或多个RNA序列,所述RNA序列包括核糖体结合位点,例如起始密码子。

[0397] 天然5'UTR具有在翻译起始中起作用的特征。它们带有类似科扎克序列的签名,所述序列众所周知参与核糖体起始多种基因的翻译的过程。科扎克序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG,其中R是起始密码子(AUG)的三个碱基上游的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),后接另一个'G'。还已知5'UTR形成参与延长因子结合的二级结构。

[0398] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸编码与蛋白质结合的蛋白质结合序列。在一些实施例中,蛋白质结合序列靶向环状多核糖核苷酸或将其定位至特定靶标。在一些实施例中,蛋白质结合序列特异性结合蛋白质的精氨酸富集区。

[0399] 在一些实施例中,蛋白质结合位点包括但不限于与蛋白质的结合位点,诸如ACIN1、AGO、APOBEC3F、APOBEC3G、ATXN2、AUH、BCCIP、CAPRIN1、CELF2、CPSF1、CPSF2、CPSF6、CPSF7、CSTF2、CSTF2T、CTCF、DDX21、DDX3、DDX3X、DDX42、DGCR8、EIF3A、EIF4A3、EIF4G2、ELAVL1、ELAVL3、FAM120A、FBL、FIP1L1、FKBP4、FMR1、FUS、FXR1、FXR2、GNL3、GTF2F1、HNRNPA1、HNRNPA2B1、HNRNPC、HNRNPK、HNRNPL、HNRNPM、HNRNPU、HNRNPUL1、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、ILF3、KHDRBS1、LARP7、LIN28A、LIN28B、m6A、MBNL2、METTL3、MOV10、MSI1、

MSI2、NONO、NONO-、NOP58、NPM1、NUDT21、PCBP2、POLR2A、PRPF8、PTBP1、RBF0X2、RBM10、RBM22、RBM27、RBM47、RNPS1、SAFB2、SBDS、SF3A3、SF3B4、SIRT7、SLBP、SLTM、SMNDC1、SND1、SRRM4、SRSF1、SRSF3、SRSF7、SRSF9、TAF15、TARDBP、TIA1、TNRC6A、TOP3B、TRA2A、TRA2B、U2AF1、U2AF2、UNK、UPF1、WDR33、XRN2、YBX1、YTHDC1、YTHDF1、YTHDF2、YWHAG、ZC3H7B、PDK1、AKT1或任何其他结合RNA的蛋白质。

[0400] 使用方法

[0401] 在一些实施例中,如本文所述制备的多核糖核苷酸(例如,环状多核糖核苷酸)用作治疗或农业中的效应子。

[0402] 例如,可向受试者施用通过本文所述的方法纯化的多核糖核苷酸(例如,在药物、兽用或农业组合物中)。在一些实施例中,受试者是脊椎动物(例如哺乳动物、鸟、鱼、爬行动物或两栖动物)。在一些实施例中,受试者是人。在一些实施例中,受试者是非人哺乳动物。在实施例中,受试者是非人哺乳动物,诸如非人灵长类动物(例如猴、猿)、有蹄类动物(例如家牛、水牛、绵羊、山羊、猪、骆驼、美洲驼、羊驼、鹿、马、驴)、肉食动物(例如狗、猫)、啮齿动物(例如大鼠、小鼠)或兔类动物(例如兔)。在实施例中,受试者是鸟,诸如鸟类类群鸡形目(例如鸡、火鸡、野鸡、鹌鹑)、雁形目(例如鸭、鹅)、古颚下纲(例如鸵鸟、鸸鹋)、鸽形目(例如鸽子、野鸽)或鹦形目(例如鹦鹉)的成员。在实施例中,受试者是无脊椎动物,诸如节肢动物(例如昆虫、蜘蛛、甲壳类动物)、线虫、环节动物、蠕虫或软体动物。在实施例中,受试者是无脊椎动物农业有害生物或者寄生在无脊椎动物或脊椎动物宿主上的无脊椎动物。在实施例中,受试者是植物,诸如被子植物(其可以是双子叶植物或单子叶植物)或裸子植物(例如针叶树、苏铁、买麻藤类植物、银杏)、蕨类、马尾植物、石松类或苔藓植物。在实施例中,受试者是真核藻类(单细胞或多细胞)。在实施例中,受试者是具有农业或园艺重要性的植物,诸如行间作物、生产水果的植物和树木、蔬菜、树木以及观赏植物(包括观赏花、灌木、树木、地被植物和草坪草)。

[0403] 在一些实施例中,本披露提供了一种通过向受试者提供本文所述的组合物或配制品来改变受试者的方法。在一些实施例中,组合物或配制品是或包括核酸分子(例如,本文所述的DNA分子或RNA分子),并且向真核受试者提供多核苷酸。在一些实施例中,组合物或配制品是或包括包含本文所述的核酸的真核或原核细胞。

[0404] 在一些实施例中,本披露提供了一种通过向对其有需要的受试者提供本文所述的组合物或配制品来治疗受试者的病症的方法。在一些实施例中,组合物或配制品是或包括核酸分子(例如,本文所述的DNA分子或多核糖核苷酸),并且向真核受试者提供多核苷酸。在一些实施例中,组合物或配制品是或包括包含本文所述的核酸的真核或原核细胞。

[0405] 在一些实施例中,本披露提供了一种通过向受试者提供包含本文所述的多核苷酸的真核或原核细胞来向受试者提供多核糖核苷酸(例如,环状多核糖核苷酸)的方法。

[0406] 配制品

[0407] 在本披露的一些实施例中,通过本文所述的方法制备的多核糖核苷酸(例如,环状多核糖核苷酸)或其制剂可被配制在组合物中,例如用于递送到细胞、植物、无脊椎动物、非人脊椎动物或人类受试者的组合物,例如农业、兽用或药物组合物。在一些实施例中,多核糖核苷酸被配制在药物组合物中。在一些实施例中,组合物包括多核糖核苷酸和稀释剂、载剂、佐剂或它们的组合。在特定实施例中,组合物包括本文所述的多核糖核苷酸和载剂或不

含任何载剂的稀释剂。在一些实施例中,包括多核糖核苷酸和不含任何载剂的稀释剂的组合物用于将多核糖核苷酸(例如,环状多核糖核苷酸)裸递送给受试者。

[0408] 药物组合物可任选地包括一种或多种另外的活性物质,例如治疗和/或预防活性物质。药物组合物可以任选地包括充当本文所述的组合物(例如,包括环状多核糖核苷酸的组合物)的媒介物或介质的非活性物质,诸如由美国食品和药品管理局(United States Food and Drug Administration) (FDA) 批准并且在非活性成分数据中列出的任一种非活性成分。本发明的药物组合物可以是无菌的和/或无热原的。可在以下文献中找到药剂的配制和/或制造中的一般考虑:例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy [雷明顿:药物科学与实践]第21版,Lippincott Williams&Wilkins[利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司],2005(通过援引并入本文中)。非活性物质的非限制性实例包括溶剂、水性溶剂、非水性溶剂、分散介质、稀释剂、分散体、悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂、乳化剂、防腐剂、聚合物、肽、蛋白质、细胞、透明质酸酶、分散剂、制粒剂、崩解剂、粘结剂、缓冲剂(例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS))、润滑剂、油、及其混合物。

[0409] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要针对适合于施用至人的药物组合物,但是本领域技术人员应理解,此类组合物通常适合于施用至任何其他动物,例如非人动物,例如非人哺乳动物。为了使组合物适合于施用于各种动物而对适合于施用于人的药物组合物的修饰是熟知的,并且普通兽医药理师可仅通过普通实验(如果有的话)来设计和/或进行此种修饰。设想施用药物组合物的受试者包括但不限于人和/或其他灵长类动物;哺乳动物,包括商业相关的哺乳动物,诸如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或鸟类,包括商业相关的鸟类,诸如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0410] 本文中所述的药物组合物的配制品可通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。通常,此类制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分结合,并且然后,如果必要和/或期望的话,将产品分开、成形和/或包装。

[0411] 在一些实施例中,关于制剂中存在的线性多核糖核苷酸分子的量的参考标准是存在不超过1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、300ng/mL、400ng/mL、500ng/mL、600ng/mL、1μg/mL、10μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、300μg/mL、400μg/mL、500μg/mL、600μg/mL、700μg/mL、800μg/mL、900μg/mL、1mg/mL、1.5mg/mL、或2mg/mL的线性多核糖核苷酸分子。

[0412] 在一些实施例中,关于制剂中存在的环状多核糖核苷酸分子的量的参考标准是占药物制剂中的总核糖核苷酸分子至少30% (w/w)、40% (w/w)、50% (w/w)、60% (w/w)、70% (w/w)、80% (w/w)、85% (w/w)、90% (w/w)、91% (w/w)、92% (w/w)、93% (w/w)、94% (w/w)、95% (w/w)、96% (w/w)、97% (w/w)、98% (w/w)、99% (w/w)、99.1% (w/w)、99.2% (w/w)、99.3% (w/w)、99.4% (w/w)、99.5% (w/w)、99.6% (w/w)、99.7% (w/w)、99.8% (w/w)、99.9% (w/w)、或100% (w/w)的分子。

[0413] 在一些实施例中,关于制剂中存在的线性多核糖核苷酸分子的量的参考标准是占药物制剂中的总核糖核苷酸分子不超过0.5% (w/w)、1% (w/w)、2% (w/w)、5% (w/w)、10% (w/w)、15% (w/w)、20% (w/w)、25% (w/w)、30% (w/w)、40% (w/w)、50% (w/w)的线性多核糖核苷酸分子。

[0414] 在一些实施例中,关于制剂中存在的带切口多核糖核苷酸分子的量的参考标准是占药物制剂中的总核糖核苷酸分子不超过0.5% (w/w)、1% (w/w)、2% (w/w)、5% (w/w)、10% (w/w)、或15% (w/w)的带切口多核糖核苷酸分子。

[0415] 在一些实施例中,关于制剂中存在的组合的带切口和线性多核糖核苷酸分子的量的参考标准是占药物制剂中的总核糖核苷酸分子不超过0.5% (w/w)、1% (w/w)、2% (w/w)、5% (w/w)、10% (w/w)、15% (w/w)、20% (w/w)、25% (w/w)、30% (w/w)、40% (w/w)、50% (w/w)的组合的带切口和线性多核糖核苷酸分子。在一些实施例中,药物制剂是最终环状多核糖核苷酸成品药的中间体药物制剂。在一些实施例中,药物制剂是原料药或活性药物成分(API)。在一些实施例中,药物制剂是用于施用至受试者的成品药。

[0416] 在一些实施例中,对环状多核糖核苷酸的制剂(在减少线性RNA之前、期间或之后)进一步处理以基本上去除DNA、蛋白质污染物(例如,细胞蛋白质(诸如宿主细胞蛋白质)或蛋白质工艺杂质)、内毒素、单核苷酸分子、和/或工艺相关杂质。

[0417] 盐类

[0418] 在一些情况下,本文提供的组合物或药物组合物包括一种或多种盐。为了控制张度,本文提供的组合物可以包括生理盐诸如钠盐。其他盐可以包括氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和/或氯化镁等。在一些情况下,所述组合物与一种或多种药学上可接受的盐一起配制。该一种或多种药学上可接受的盐可以包括无机离子,诸如,例如钠、钾、钙、镁离子等的那些盐。此类盐可以包括与无机酸或有机酸的盐,所述无机酸或有机酸诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、乙酸、富马酸、琥珀酸、乳酸、扁桃酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸或马来酸。多核糖核苷酸可以线性或环状形式存在。

[0419] 缓冲剂/pH

[0420] 本文提供的组合物或药物组合物可以包括一种或多种缓冲剂,诸如Tris缓冲剂;硼酸盐缓冲剂;琥珀酸盐缓冲剂;组氨酸缓冲剂(例如,含氢氧化铝佐剂);或柠檬酸盐缓冲剂。在一些情况下,包含5-20mM范围内的缓冲剂。

[0421] 本文提供的组合物或药物组合物可以具有约5.0至约8.5、约6.0至约8.0、约6.5至约7.5、或约7.0至约7.8的pH。所述组合物或药物组合物可以具有约7的pH。多核糖核苷酸可以线性或环状形式存在。

[0422] 稀释剂

[0423] 在一些实施例中,本披露的组合物包括多核糖核苷酸或其通过本文所述方法制备的制剂和稀释剂。

[0424] 稀释剂可以是非载剂赋形剂。非载剂赋形剂用作组合物(诸如,如本文所述的环状多核糖核苷酸)的媒介物或介质。非载剂赋形剂用作组合物(诸如,如本文所述的线性多核糖核苷酸)的媒介物或介质。非载剂赋形剂的非限制性实例包括溶剂、水性溶剂、非水性溶剂、分散介质、稀释剂、分散剂、助悬剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂、乳化剂、防腐剂、聚合物、肽、蛋白质、细胞、透明质酸酶、分散剂、制粒剂、崩解剂、粘合剂、缓冲剂(例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS))、润滑剂、油或其混合物。非载剂赋形剂可以是经美国食品和药物管理局(FDA)批准并列在非活性成分数据库中的不表现出细胞穿透作用的任一种非活性成分。非载剂赋形剂可以是适于施用给非人类动物(例如,适合兽医用途)的任何非活性成分。为了使组合物适于向各种动物施用,对适于向人施用的组合物的修饰得到很好的理解,并且普

通技术的兽医药理师可以仅通过普通的实验(如果有)来设计和/或进行此类修饰。

[0425] 在一些实施例中,多核糖核苷酸(例如,环状多核糖核苷酸)可以以裸递送配制品的形式递送,诸如包含稀释剂。裸递送配制品将多核糖核苷酸递送至细胞,无需借助于载剂并且无需对线性多核糖核苷酸、加帽的多核糖核苷酸或其复合物进行修饰或部分或完全包封。

[0426] 裸递送配制品是不含载剂的配制品并且其中多核糖核苷酸(例如,环状多核糖核苷酸)没有结合有助于递送至细胞的部分的共价修饰,或者没有对环状多核糖核苷酸的部分或完全包封。在一些实施例中,没有结合有助于递送至细胞的部分的共价修饰的多核糖核苷酸是未与蛋白质、小分子、颗粒、聚合物或生物聚合物共价结合的多核糖核苷酸。没有结合有助于递送至细胞的部分的共价修饰的多核糖核苷酸不含经修饰的磷酸基团。例如,没有结合有助于递送至细胞的部分的共价修饰的多核糖核苷酸不含硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼代磷酸盐、有机磷酸酯、磷酸氢盐、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、烷基或芳基磷酸酯或磷酸三酯。

[0427] 在一些实施例中,裸递送配制品不含以下任何或全部:转染试剂、阳离子载剂、碳水化合物载剂、纳米颗粒载剂、或蛋白质载剂。在一些实施例中,裸递送配制品不含植物糖原辛烯基琥珀酸酯、植物糖原 β -糊精、酸酐改性的植物糖原 β -糊精、脂转染胺(lipofectamine)、聚乙烯亚胺、聚(三亚甲基亚胺)、聚(四亚甲基亚胺)、聚丙烯亚胺、氨基糖苷-多胺、双脱氧-二氨基-b-环糊精、精胺、亚精胺、聚(2-二甲氨基)乙基甲基丙烯酸酯、聚(赖氨酸)、聚(组氨酸)、聚(精氨酸)、阳离子化明胶、树状聚合物、壳聚糖、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟乙基)咪唑鎓氯化物(DOTIM)、2,3-二油酰基氧基-N-[2(精胺甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷铵三氟乙酸酯(DOSPA)、3B-[N-(N,N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐(DC-胆固醇盐酸盐)、双十七烷基酰胺基甘氨酸亚精胺(DOGS)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)或球蛋白。

[0428] 在某些实施例中,裸递送配制品包括非载剂赋形剂。在一些实施例中,非载剂赋形剂包括不表现出细胞穿透作用的非活性成分。在一些实施例中,非载剂赋形剂包括缓冲剂,例如PBS。在一些实施例中,非载剂赋形剂是溶剂、非水性溶剂、稀释剂、助悬剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂、乳化剂、防腐剂、聚合物、肽、蛋白质、细胞、透明质酸酶、分散剂、成粒剂、崩解剂、粘合剂、缓冲剂、润滑剂或油。

[0429] 在一些实施例中,裸递送配制品包括稀释剂。稀释剂可以是液体稀释剂或固体稀释剂。在一些实施例中,稀释剂是RNA增溶剂、缓冲剂或等渗剂。RNA增溶剂的实例包括水、乙醇、甲醇、丙酮、甲酰胺或2-丙醇。缓冲剂的实例包括2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、Bis-Tris、2-[(2-氨基-2-氧代乙基)-(羧甲基)氨基]乙酸(ADA)、N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙烷磺酸(ACES)、哌嗪-N,N'-双(2-乙烷磺酸)(PIPES)、2-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]乙烷磺酸(TES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、Tris、Tricine、Gly-Gly、Bicine或磷酸盐。等渗剂的实例包括甘油、甘露醇、聚乙二醇、丙二醇、海藻糖或蔗糖。

[0430] 脂质纳米颗粒

[0431] 本披露提供的组合物、方法和递送系统可以采用本文所述的任何合适的载剂或递送形式,在某些实施例中包括脂质纳米颗粒(LNP)。在一些实施例中,脂质纳米颗粒包括一种或多种离子脂质,诸如非阳离子脂质(例如,中性或阴离子或两性离子脂质);一种或多种缀合的脂质(诸如WO 2019217941的表5中描述的PEG缀合的脂质或缀合至聚合物的脂质;将其通过援引以其整体并入本文);一种或多种固醇(例如,胆固醇)。

[0432] 可用于形成纳米颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的脂质包括例如WO 2019217941(通过援引并入)的表4中描述的那些—例如,含脂质的纳米颗粒可包括WO 2019217941的表4中的一种或多种脂质。脂质纳米颗粒可以包括另外的要素,诸如聚合物,诸如WO 2019217941(通过援引并入)的表5中描述的聚合物。

[0433] 在一些实施例中,缀合的脂质,当存在时,可以包括以下的一种或多种:PEG-二酰基甘油(DAG)(诸如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEGS-DAG)(诸如4-0-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-0-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐,以及在WO 2019051289的表2中描述的那些(通过援引并入)或前述的组合。另外的示例性PEG-脂质缀合物例如在US 5,885,613、US 6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US 2010/0130588、US2016/0376224、US2017/0119904、US2018/0028664和WO 2017/099823(所有这些的内容通过援引以其全文并入本文)中描述。

[0434] 在一些实施例中,可以掺入脂质纳米颗粒中的固醇包括胆固醇或胆固醇衍生物中的一种或多种,诸如WO 2009/127060或US2010/0130588(通过援引并入)中的那些。另外的示例性固醇包括植物固醇,包括通过援引并入本文的Eygeris等人(2020),dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386中描述的那些。

[0435] 在一些实施例中,脂质颗粒包括可电离脂质、非阳离子脂质、抑制颗粒聚集的缀合脂质和固醇。

[0436] 可用于脂质纳米颗粒配制品中的示例性可电离脂质包括但不限于WO 2019051289(通过援引并入本文)的表1中所列的那些。另外的示例性脂质包括但不限于下式中的一种或多种:US2016/0311759的X;US20150376115或US 2016/0376224中的I;US20160151284的I、II或III;US20170210967的I、IA、II或IIA;US20150140070的I-c;US2013/0178541的A;US2013/0303587或US 2013/0123338的I;US2015/0141678的I;US2015/0239926的II、III、IV或V;US 2017/0119904的I;WO 2017/117528的I或II;US2012/0149894的A;US2015/0057373的A;WO 2013/116126的A;US2013/0090372的A;US2013/0274523的A;US 2013/0274504的A;US2013/0053572的A;WO 2013/016058的A;WO 2012/162210的A;US2008/042973的I;US2012/01287670的I、II、III或IV;US2014/0200257的I或II;US2015/0203446的I、II或III;US2015/0005363的I或III;US2014/0308304的I、IA、IB、IC、ID、II、IIA、IIB、IIC、IID或III-XXIV;US2013/0338210;WO 2009/132131的I、II、III或IV;US2012/01011478的A;US2012/0027796的I或XXXV;US2012/0058144的XIV或XVII;US2013/0323269的;US2011/0117125的I;US 2011/0256175的I、II或III;US2012/0202871的I、II、III、IV、V、

VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII；US2011/0076335的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、X、XII、XIII、XIV、XV或XVI；US2006/008378的I或II；US2013/0123338的I；US 2015/0064242的I或X-A-Y-Z；US2013/0022649的XVI、XVII或XVIII；US 2013/0116307的I、II或III；US2013/0116307的I、II或III；US2010/0062967的I或II；US2013/0189351的I-X；US2014/0039032的I；US2018/0028664的V；US 2016/0317458的I；US2013/0195920的I；US10,221,127的5、6或10；WO 2018/081480的III-3；WO 2020/081938的I-5或I-8；US 9,867,888的18或25；US2019/0136231的A；WO 2020/219876的II；US2012/0027803的1；US2019/0240349的0F-02；US10,086,013的23；Miao等人(2020)的cKK-E12/A6；WO 2010/053572的C12-200；Dahlman等人(2017)的7C1；Whitehead等人的304-013或503-013；US 9,708,628的TS-P4C2；WO 2020/106946的I；WO 2020/106946的I；以及WO 2021/113777的(1)、(2)、(3)或(4)。示例性脂质还包括WO2021/113777的表1-16中任一个的脂质。

[0437] 示例性非阳离子脂质包括但不限于二硬脂酰-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺(诸如16-0-单甲基PE)、二甲基-磷脂酰乙醇胺(诸如16-0-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、神经鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、二反油烯酰-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、双十六烷基磷酸、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或其混合物。应当理解,也可以使用其他二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基基团优选为源自具有C10-C24碳链的脂肪酸的酰基基团,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。在某些实施例中,另外的示例性脂质包括但不限于Kim等人(2020) [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386) (通过援引并入本文) 中描述的那些。在一些实施例中,此类脂质包括发现会改善用mRNA进行肝脏转染的植物脂质(例如DGTS)。

[0438] 适合用于脂质纳米颗粒中的非阳离子脂质的其他实例包括但不限于非磷脂质,例如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙酰基棕榈酸酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸酯、烷基-芳基硫酸酯、聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂等。其他非阳离子脂质在WO 2017/099823或美国专利公开US2018/0028664(它们的内容通过援引以其全文并入本文) 中描述。

[0439] 编号实施例

[0440] [1]一种用于产生环状多核糖核苷酸(circRNA)的富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和线性多核糖核苷酸(linRNA);和(b)在不包括使用凝胶电泳的变性条件下将circRNA与linRNA分离,从而产

生circRNA富集群。

[0441] [2]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将多核糖核苷酸群暴露于变性条件下,从而富集circRNA群。

[0442] [3]如实施例[1]或[2]所述的方法,其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L。

[0443] [4]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L;和(b)在变性条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。

[0444] [5]如实施例[1]至[4]中任一项所述的方法,其中所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量在1 μ g与1000mg之间。

[0445] [6]如实施例[1]至[5]中任一项所述的方法,其中包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积在500 μ L与1000mL之间。

[0446] [7]如实施例[1]至[6]中任一项所述的方法,其中所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度在200ng/ μ L与50mg/mL之间。

[0447] [8]如实施例[4]至[7]中任一项所述的方法,其中所述分离步骤(b)在不包括使用凝胶电泳的变性条件下进行。

[0448] [9]如实施例[1]至[8]中任一项所述的方法,其中所述circRNA富集群基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0449] [10]如实施例[9]所述的方法,其中所述一种或多种杂质或副产物包括聚丙烯酰胺、硼酸、镁或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0450] [11]如实施例[1]至[10]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括至少50 $^{\circ}$ C的温度。

[0451] [12]如实施例[11]所述的方法,其中所述变性条件包括在50 $^{\circ}$ C与85 $^{\circ}$ C之间的温度。

[0452] [13]如实施例[1]至[12]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括在不超过30秒的时间段内至少50 $^{\circ}$ C的温度,然后是不超过8 $^{\circ}$ C的温度。

[0453] [14]如实施例[1]至[13]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。

[0454] [15]如实施例[14]所述的方法,其中所述变性条件包括小于5的pH。

[0455] [16]如实施例[14]所述的方法,其中所述变性条件包括大于9的pH。

[0456] [17]如实施例[1]至[16]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括化学处理。

[0457] [18]如实施例[17]所述的方法,其中所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0458] [19]如实施例[18]所述的方法,其中所述酸包括在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸

或硝酸。

[0459] [20]如实施例[18]或[19]所述的方法,其中所述碱包括在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0460] [21]如实施例[18]至[20]中任一项所述的方法,其中所述有机溶剂包括至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0461] [22]如实施例[18]至[21]中任一项所述的方法,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG)。

[0462] [23]如实施例[18]至[22]中任一项所述的方法,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0463] [24]如实施例[18]至[23]中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包括在100mM与8M之间的PEG或尿素。

[0464] [25]如实施例[18]至[24]中任一项所述的方法,其中所述螯合剂包括在1mM与10mM之间的乙二醇-双(β -氨基乙基醚)-N,N',N'-四乙酸(EGTA)或其衍生物、EDTA或其衍生物、次氨基三乙酸(NTA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、聚天冬氨酸、S,S'-乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)或甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)。

[0465] [26]如实施例[18]至[25]中任一项所述的方法,其中所述洗涤剂包括在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的Nonidet P-40(NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0466] [27]一种用于产生环状多核糖核苷酸(circRNA)的富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和线性多核糖核苷酸(linRNA);和(b)在至少50°C的温度下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群,其中所述分离不包括使用凝胶电泳。

[0467] [28]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L;和(b)在至少50°C的温度下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。

[0468] [29]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将所述多核糖核苷酸群暴露于至少50°C的温度,从而富集所述circRNA群。

[0469] [30]如实施例[27]至[29]中任一项所述的方法,其中所述温度在50°C与85°C之间。

[0470] [31]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)在小于5或大于9的pH下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群,其中所述分离不包括使用凝胶电泳。

[0471] [32]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积

为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L;和(b)在小于5或大于9的pH下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。

[0472] [33]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将所述多核糖核苷酸群暴露于小于5或大于9的pH,从而富集所述circRNA群。

[0473] [34]如实施例[31]至[33]中任一项所述的方法,其中所述pH小于5。

[0474] [35]如实施例[31]至[33]中任一项所述的方法,其中所述pH大于9。

[0475] [36]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)在包括酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液的条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群,其中分离不包括使用凝胶电泳。

[0476] [37]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L;和(b)在包括酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液的条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。

[0477] [38]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将多核糖核苷酸群暴露于酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液中,从而富集circRNA群。

[0478] [39]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述酸包括至少0.5% (v/v)的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0479] [40]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述碱包括在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0480] [41]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述有机溶剂包括至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0481] [42]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述离散剂包括在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG)。

[0482] [43]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述离散剂包括在100mM与8M之间的正十二烷基 β -d-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0483] [44]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包括在100mM与8M之间的聚乙二醇(PEG)或尿素。

[0484] [45]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述螯合剂包括在1mM与10mM之间的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

[0485] [46]如实施例[36]至[38]中任一项所述的方法,其中所述洗涤剂包括在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0486] [47]如实施例[1]至[46]中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括对所述多核糖核苷酸群进行柱色谱法,其中进行柱色谱法包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤。

[0487] [48]如实施例[47]所述的方法,其中所述分离在样品加载步骤期间进行。

[0488] [49]如实施例[46]或[47]所述的方法,其中所述分离在柱洗涤步骤期间进行。

[0489] [50]如实施例[47]至[49]中任一项所述的方法,其中所述分离在洗脱步骤期间进行。

[0490] [51]如实施例[47]至[50]中任一项所述的方法,其中所述柱色谱法包括快速蛋白液相色谱法(FPLC)、高压液相色谱法(HPLC)、疏水相互作用色谱法(HIC)、阴离子交换色谱法(AEC)、混合模式色谱法或亲和色谱法。

[0491] [52]如实施例[51]所述的方法,其中所述AEC包括使用选自由苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化硅、琼脂糖凝胶、纤维素、葡聚糖、环氧多胺、甲基丙烯酸酯、琼脂糖和丙烯酸组成的组的阴离子交换树脂。

[0492] [53]如实施例[52]所述的方法,其中所述阴离子交换树脂包括选自由季铵、氨基乙基、二乙基氨基乙基和二乙基氨基丙基组成的组的离子交换剂。

[0493] [54]如实施例[52]或[53]所述的方法,其中阴离子交换树脂包括珠粒,其中所述珠粒具有45 μm -165 μm 的珠粒直径和直径100nm-1000nm的孔径。

[0494] [55]如实施例[51]至[54]中任一项所述的方法,其中所述AEC包括使用线性梯度洗脱或分步等度洗脱。

[0495] [56]如实施例[51]至[55]中任一项所述的方法,其中所述AEC包括使用在1mL/min与150mL/min之间的流速。

[0496] [57]如实施例[51]所述的方法,其中所述FPLC是反相-FPLC(RP-FPLC)。

[0497] [58]如实施例[1]至[57]中任一项所述的方法,其中步骤(b)通过汇集纯化的circRNA的多个级分来进行。

[0498] [59]如实施例[1]至[58]中任一项所述的方法,其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。

[0499] [60]如实施例[1]至[59]中任一项所述的方法,其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的质量。

[0500] [61]如实施例[1]至[60]中任一项所述的方法,其中所述circRNA和所述linRNA缺少聚(A)尾。

[0501] [62]如实施例[1]至[61]中任一项所述的方法,其中所述方法包括所述linRNA的核酸外切酶消化。

[0502] [63]如实施例[1]至[61]中任一项所述的方法,其中所述方法不包括所述linRNA的核酸外切酶消化。

[0503] [64]如实施例[1]至[63]中任一项所述的方法,其中所述方法不包括改善所述circRNA的富集的对所述circRNA或对所述linRNA的选择性修饰。

[0504] [65]如实施例[1]至[64]中任一项所述的方法,其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)是所述circRNA在所述多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍。

[0505] [66]如实施例[1]至[65]中任一项所述的方法,其中所述circRNA在所述circRNA

富集群中的百分比(w/w)为至少65%。

[0506] [67]如实施例[1]至[66]中任一项所述的方法,其中所述linRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)小于35%。

[0507] [68]如实施例[1]至[67]中任一项所述的方法,其中所述circRNA包括1,000个核苷酸或更少的长度。

[0508] [69]一种包括多核糖核苷酸群的组合物,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中所述多核糖核苷酸群处于变性条件下的溶液中,并且其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少500ng/ μ L。

[0509] [70]一种包括多核糖核苷酸群的组合物,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中所述多核糖核苷酸群处于变性条件下的溶液中,并且其中所述溶液基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0510] [71]一种包括多核糖核苷酸群的组合物,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中:

[0511] (a)所述组合物获自包括核酸群的样品;

[0512] (b)所述组合物已暴露于一种或多种变性条件;并且

[0513] (c)所述组合物基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0514] [72]一种包括circRNA富集群的组合物,其中:

[0515] (a)所述组合物获自包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;

[0516] (b)所述组合物已暴露于一种或多种变性条件;并且

[0517] (c)所述组合物基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0518] [73]如实施例[69]至[72]中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种杂质或副产物包括聚丙烯酰胺、硼酸、镁或EDTA。

[0519] [74]如实施例[69]至[73]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括至少50 $^{\circ}$ C的温度。

[0520] [75]如实施例[69]至[74]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括在50 $^{\circ}$ C与85 $^{\circ}$ C之间的温度。

[0521] [76]如实施例[69]至[75]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括至少50 $^{\circ}$ C的温度,然后是不超过8 $^{\circ}$ C的温度。

[0522] [77]如实施例[69]至[73]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。

[0523] [78]如实施例[69]至[73]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括化学处理。

[0524] [79]如实施例[78]所述的组合物,其中所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0525] [80]如实施例[79]所述的组合物,其中所述酸包括在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0526] [81]如实施例[79]或[80]所述的组合物,其中所述碱包括在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0527] [82]如实施例[79]至[81]中任一项所述的组合物,其中所述有机溶剂包括至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0528] [83]如实施例[79]至[82]中任一项所述的组合物,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG)。

[0529] [84]如实施例[79]至[82]中任一项所述的组合物,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0530] [85]如实施例[79]至[84]中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包括在100mM与8M之间的聚乙二醇(PEG)或尿素。

[0531] [86]如实施例[79]至[85]中任一项所述的组合物,其中所述螯合剂包括在1mM与10mM之间的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

[0532] [87]如实施例[79]至[86]中任一项所述的组合物,其中所述洗涤剂包括在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0533] [88]如实施例[69]至[87]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)是所述circRNA在所述多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍。

[0534] [89]如实施例[69]至[88]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)为至少65%。

[0535] [90]如实施例[69]至[89]中任一项所述的组合物,其中所述linRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)小于35%。

[0536] [91]如实施例[69]至[90]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。

[0537] [92]如实施例[69]至[91]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的质量。

[0538] [93]如实施例[69]至[92]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA和所述linRNA缺少聚(A)尾。

[0539] [94]如实施例[69]至[93]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA包括1,000个核苷酸或更少的长度。

[0540] [95]一种确定circRNA的纯度的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;(b)在变性条件下通过色谱法将circRNA与linRNA分离;和(c)收集样品的色谱图,包括circRNA的峰和linRNA的峰;(d)计算每个峰下的面积以确定样品中circRNA的纯度。

[0541] [96]如实施例[95]所述的方法,其中所述变性条件不包括使用凝胶电泳。

[0542] [97]如实施例[95]或[96]所述的方法,其中所述变性条件包括至少50°C的温度。

[0543] [98]如实施例[97]所述的方法,其中所述变性条件包括在50°C与85°C之间的温度。

[0544] [99]如实施例[95]至[98]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括在不超过30秒的时间段内至少50°C的温度,然后是不超过8°C的温度。

[0545] [100]如实施例[95]至[99]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。

[0546] [101]如实施例[100]所述的方法,其中所述变性条件包括小于5的pH。

[0547] [102]如实施例[100]所述的方法,其中所述变性条件包括大于9的pH。

[0548] [103]如实施例[95]至[102]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括化学处理。

[0549] [104]如实施例[103]所述的方法,其中所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0550] [105]如实施例[104]所述的方法,其中所述酸包括在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0551] [106]如实施例[104]或[105]所述的方法,其中所述碱包括在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0552] [107]如实施例[104]至[106]中任一项所述的方法,其中所述有机溶剂包括至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0553] [108]如实施例[104]至[107]中任一项所述的方法,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG)。

[0554] [109]如实施例[104]至[108]中任一项所述的方法,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0555] [110]如实施例[104]至[109]中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包括在100mM与8M之间的聚乙二醇(PEG)或尿素。

[0556] [111]如实施例[104]至[110]中任一项所述的方法,其中所述螯合剂包括在1mM与10mM之间的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、聚天冬氨酸、EDDS或MGDA。

[0557] [112]如实施例[104]至[111]中任一项所述的方法,其中所述洗涤剂包括在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的Nonidet P-40(NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0558] [113]如实施例[95]至[112]中任一项所述的方法,其中所述色谱法包括液相色谱法。

[0559] [114]如实施例[113]所述的方法,其中所述液相色谱法选自由FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或亲和色谱法组成的组。

[0560] [115]如实施例[95]至[114]中任一项所述的方法,其中所述纯度的相对标准偏差(RSD)小于5%。

[0561] [116]如实施例[95]至[115]中任一项所述的方法,其中所述circRNA包括少于1,000个核苷酸或更少的长度。

[0562] [117]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括以下步骤:(a)提供多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)在不包括使用凝胶

电泳的变性条件下将circRNA与linRNA分离,从而产生circRNA富集群。

[0563] [118]一种用于产生circRNA富集群的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;和(b)将多核糖核苷酸群暴露于变性条件下,从而富集circRNA群。

[0564] [119]如实施例[117]或[118]所述的方法,其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总重量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少200ng/ μ L。

[0565] [120]如实施例[118]或[119]所述的方法,其中所述分离步骤(b)在不包括使用凝胶电泳的变性条件下进行;和/或其中所述circRNA富集群基本上不含一种或多种杂质或副产物,其中所述一种或多种杂质或副产物包括聚丙烯酰胺、硼酸、镁或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0566] [121]如实施例[117]至[120]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括至少50 $^{\circ}$ C的温度;或者其中所述变性条件包括在不超过30秒的时间段内至少50 $^{\circ}$ C的温度,然后是不超过8 $^{\circ}$ C的温度。

[0567] [122]如实施例[117]至[121]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。

[0568] [123]如实施例[117]至[122]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括化学处理,所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0569] [124]如实施例[123]所述的方法,其中所述酸包括在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0570] [125]如实施例[123]或[124]所述的方法,其中所述碱包括在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0571] [126]如实施例[123]至[125]中任一项所述的方法,其中所述有机溶剂包括至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0572] [127]如实施例[123]至[126]中任一项所述的方法,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG);和/或其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0573] [128]如实施例[123]至[127]中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包括在100mM与8M之间的PEG或尿素。

[0574] [129]如实施例[123]至[128]中任一项所述的方法,其中所述螯合剂包括在1mM与10mM之间的乙二醇-双(β -氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)或其衍生物、EDTA或其衍生物、次氨基三乙酸(NTA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、聚天冬氨酸、S,S'-乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)或甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)。

[0575] [130]如实施例[123]至[129]中任一项所述的方法,其中所述洗涤剂包括在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的Nonidet P-40(NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0576] [131]如实施例[117]至[130]中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括对所述多核糖核苷酸群进行柱色谱法,其中进行柱色谱法包括平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤和洗脱步骤;其中所述分离在所述样品加载步骤、所述柱洗涤步骤和/或所述洗脱步骤期间进行。

[0577] [132]如实施例[131]所述的方法,其中所述柱色谱法包括快速蛋白液相色谱法(FPLC)、高压液相色谱法(HPLC)、疏水相互作用色谱法(HIC)、阴离子交换色谱法(AEC)、混合模式色谱法或亲和色谱法。

[0578] [133]如实施例[132]所述的方法,其中所述AEC包括(i)使用阴离子交换树脂,其中所述阴离子交换树脂选自自由苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化硅、琼脂糖凝胶、纤维素、葡聚糖、环氧多胺、甲基丙烯酸酯、琼脂糖和丙烯酸组成的组;和/或其中所述阴离子交换树脂包括选自季铵、氨基乙基、二乙基氨基乙基和二乙基氨基丙基组成的组的离子交换剂;和/或其中所述阴离子交换树脂包括珠粒,其中所述珠粒具有45 μ m-165 μ m的珠粒直径和直径100nm-1000nm的孔径;和/或(ii)使用线性梯度洗脱或分步等度洗脱;和/或(iii)使用在1mL/min与150mL/min之间的流速。

[0579] [134]如实施例[117]至[133]中任一项所述的方法,其中步骤(b)通过汇集纯化的circRNA的多个级分来进行。

[0580] [135]如实施例[117]至[134]中任一项所述的方法,其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的核糖核苷酸序列;和/或其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的质量;和/或其中所述circRNA和所述linRNA缺少聚(A)尾。

[0581] [136]如实施例[117]至[135]中任一项所述的方法,其中所述方法包括所述linRNA的核酸外切酶消化或其中所述方法不包括所述linRNA的核酸外切酶消化;和/或其中所述方法不包括改善所述circRNA的富集的对所述circRNA或对所述linRNA的选择性修饰。

[0582] [137]如实施例[117]至[136]中任一项所述的方法,其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)是所述circRNA在所述多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍;和/或其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)为至少65%;和/或其中所述linRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)小于35%。

[0583] [138]如实施例[117]至[137]中任一项所述的方法,其中所述circRNA包括1,000个核苷酸或更少的长度。

[0584] [139]一种包括多核糖核苷酸群的组合物,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA,其中所述多核糖核苷酸群处于变性条件下的溶液中,并且其中:(i)所述多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的总质量为至少1 μ g;(ii)包括所述多核糖核苷酸群的所述样品的总体积为至少500 μ L;或者(iii)所述样品中所述多核糖核苷酸群的浓度为至少500ng/ μ L。

[0585] [140]一种包括circRNA富集群的组合物,其中:(a)所述组合物获自包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;(b)所述组合物已暴露于一种或多种变性条件;并且(c)所述组合物基本上不含一种或多种杂质或副产物。

[0586] [141]如实施例[139]或[140]所述的组合物,其中所述一种或多种杂质或副产物包括聚丙烯酰胺、硼酸、镁或EDTA。

[0587] [142]如实施例[139]至[141]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括至

少50°C的温度;或者其中所述变性条件包括至少50°C的温度,然后是不超过8°C的温度。

[0588] [143]如实施例[139]至[142]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。

[0589] [144]如实施例[139]至[143]中任一项所述的组合物,其中所述变性条件包括化学处理,所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0590] [145]如实施例[144]所述的组合物,其中所述酸包括在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0591] [146]如实施例[144]或[145]所述的组合物,其中所述碱包括在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0592] [147]如实施例[144]至[146]中任一项所述的组合物,其中所述有机溶剂包括至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0593] [148]如实施例[144]至[147]中任一项所述的组合物,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG);和/或其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0594] [149]如实施例[144]至[148]中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包括在100mM与8M之间的聚乙二醇(PEG)或尿素。

[0595] [150]如实施例[144]至[149]中任一项所述的组合物,其中所述螯合剂包括在1mM与10mM之间的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

[0596] [151]如实施例[144]至[150]中任一项所述的组合物,其中所述洗涤剂包括在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0597] [152]如实施例[139]至[151]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)是所述circRNA在所述多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍;和/或其中所述circRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)为至少65%;和/或其中所述linRNA在所述circRNA富集群中的百分比(w/w)小于35%。

[0598] [153]如实施例[139]至[152]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的核糖核苷酸序列;和/或其中所述circRNA和所述linRNA具有相同的质量;和/或其中所述circRNA和所述linRNA缺少聚(A)尾。

[0599] [154]如实施例[139]至[153]中任一项所述的组合物,其中所述circRNA包括1,000个核苷酸或更少的长度。

[0600] [155]一种确定circRNA的纯度的方法,所述方法包括:(a)提供包括多核糖核苷酸群的样品,所述多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA;(b)在变性条件下通过色谱法将所述circRNA与所述linRNA分离;和(c)收集所述样品的色谱图,包括所述circRNA的峰和所述linRNA的峰;(d)计算每个峰下的面积以确定所述样品中所述circRNA的纯度。

[0601] [156]如实施例[155]所述的方法,其中所述变性条件不包括使用凝胶电泳。

[0602] [157]如实施例[155]或[156]所述的方法,其中所述变性条件包括至少50°C的温

度;或者其中所述变性条件包括在不超过30秒的时间段内至少50°C的温度,然后是不超过8°C的温度。

[0603] [158]如实施例[155]至[157]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括小于5或大于9的pH。

[0604] [159]如实施例[155]至[158]中任一项所述的方法,其中所述变性条件包括化学处理,所述化学处理包括用酸、碱、有机溶剂、分散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液处理。

[0605] [160]如实施例[159]所述的方法,其中所述酸包括在1mM与500mM之间的乙酸、盐酸、水杨酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、柠檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗坏血酸或硝酸。

[0606] [161]如实施例[159]或[160]所述的方法,其中所述碱包括在1mM与500mM之间的氢氧化钠、氢氧化钾、咪唑、组氨酸、碳酸氢钠、胍或三乙胺。

[0607] [162]如实施例[159]至[161]中任一项所述的方法,其中所述有机溶剂包括至少0.1% (v/v)的二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵或丙二醇。

[0608] [163]如实施例[159]至[162]中任一项所述的方法,其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的尿素、氯化胍、高氯酸锂或聚乙二醇(PEG);和/或其中所述分散剂包括在100mM与8M之间的正十二烷基 β -d-麦芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或脱氧胆酸盐。

[0609] [164]如实施例[159]至[162]中任一项所述的方法,其中所述拥挤剂包括在100mM与8M之间的聚乙二醇(PEG)或尿素。

[0610] [165]如实施例[159]至[164]中任一项所述的方法,其中所述螯合剂包括在1mM与10mM之间的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、聚天冬氨酸、EDDS或MGDA。

[0611] [166]如实施例[159]至[165]中任一项所述的方法,其中所述洗涤剂包括在0.005% (v/v)与0.05% (v/v)之间的Nonidet P-40(NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麦芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

[0612] [167]如实施例[155]至[166]中任一项所述的方法,其中所述色谱法为液相色谱法,其中所述液相色谱法选自FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或亲和色谱法组成的组。

[0613] [168]如实施例[155]至[167]中任一项所述的方法,其中所述纯度的相对标准偏差(RSD)小于5%。

[0614] [169]如实施例[155]至[168]中任一项所述的方法,其中所述circRNA包括1,000个核苷酸或更少的长度。

[0615] 实例

[0616] 提出以下实例是为了向本领域普通技术人员提供可以如何使用、制备和评价本文所述的组合物和方法的描述,并且旨在纯粹作为本发明的示例,而不旨在限制诸位发明人认为是其发明的范围。

[0617] 实例1:在变性条件下从含有RNA混合群(包括circRNA和linRNA)的样品中富集circRNA

[0618] 根据目前披露的方法,本领域普通技术人员可以通过使样品经受本文所述的一种或多种变性条件从含有circRNA、线性RNA(linRNA)或其他杂质或副产物(例如,本文所述的

杂质或副产物)的多核糖核苷酸混合群产生环状RNA(circRNA)富集群。

[0619] 首先,获得含有多核糖核苷酸混合群(含有circRNA和linRNA)的样品。样品可含有至少200 μ g的多核糖核苷酸总质量,总体积为至少500 μ L,或者样品中的多核糖核苷酸浓度为至少200ng/ μ L。随后制备体外转录(IVT)RNA样品并进行本领域熟知的初始纯化步骤。IVT样品可在纯化前进行预处理以去除大的污染物、碎片和其他大分子。也可将IVT样品离心以分离出沉淀物和上清液。根据需要,可以进行几轮缓冲剂洗涤和离心。通过使IVT样品经受本文所述的一种或多种变性条件(例如,热变性,pH变性,利用酸、碱、有机溶剂、离散剂、拥挤剂、螯合剂、洗涤剂或盐溶液进行的化学变性)来进行纯化,其中变性条件基本上使linRNA和circRNA内的结构牵连变性。通过变性条件进行的纯化单独进行或与本领域已知的柱色谱分离技术(例如,阴离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法、混合模式色谱法或亲和色谱法)组合进行。在进行柱色谱纯化的情况下,在平衡步骤、样品加载步骤、柱洗涤步骤或洗脱步骤期间将含有多核糖核苷酸的样品暴露于变性条件。所述方法可能包括或者可能不包括样品中linRNA分子的核酸外切酶介导的消化。

[0620] 因此,纯化进行到从样品中获得所需的circRNA的纯度的程度。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的2%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的3%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的4%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的5%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的6%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的7%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的8%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的9%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的10%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的11%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的12%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的13%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的14%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的15%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的16%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的17%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的18%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的19%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的20%(w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)是样品中混合多核糖核苷酸群中

的circRNA的21% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的22% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的23% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的24% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的25% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的26% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的27% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的28% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的29% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的30% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的31% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的32% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的33% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的34% (w/w)。在实施例中,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的35% (w/w)。在实施例中,circRNA富集群具有至少35% (w/w) (例如,至少36%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 的数量的circRNA和小于65% (w/w) (例如,小于64%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更低) 的数量的linRNA。例如,circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 可能是样品中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的2倍 (w/w)。

[0621] 实例2:以不同浓度的离散剂和盐作为变性条件纯化circRNA

[0622] 进行以下实验以评估不同浓度的离散剂(在本例中为6M尿素)和盐(在本例中为氯化钠(NaCl))变性和拆分或进一步纯化circRNA的能力,进行了以下实验。

[0623] 使用5mL DEAE Sepharose柱纯化通过夹板连接生成的环状RNA。所述柱用50mM Tris,pH 7平衡和洗涤,并加载环状RNA。使用300mM NaCl、700mM NaCl、1M NaCl、3M NaCl的分步洗脱或使用300mM NaCl+0.6M尿素、700mM NaCl+1.5M尿素、1M NaCl+1.8M尿素和3M NaCl+6M尿素的分步洗脱来洗脱柱。汇集相关级分并通过PAGE分析所得富集材料。数据如下表2所示。不存在尿素的色谱图显示在图1中。在58.00mL处表示的峰是circRNA,并且所有其他峰都是杂质。存在尿素的色谱图显示在图2中,代表存在尿素的分步洗脱。在56.89mL处表示的峰是circRNA,并且所有其他峰都是杂质。

[0624] 表2:

[0625]

凝胶/泳道号	样品	%circRNA	%linRNA
凝胶1/泳道1	输入(或IVT)	44	55
凝胶2/泳道1	+尿素	66	34
凝胶2/泳道8	-尿素	56	43

[0626] 在两次纯化之前,通过PAGE测量的circRNA和linRNA的起始材料纯度百分比分别为44.6%和55.4%。在不存在尿素的情况下,circRNA纯度百分比为56.4%,并且线性纯度百分比为43.6%。添加6M尿素导致circRNA和linRNA的纯度分别为65.9%和34.1%。为了开发1mL-8L柱体积或更大的可扩展工艺,进行了以下纯化以了解尿素在恒定浓度下的纯度改进。

[0627] 实例3:在离散剂和高盐变性条件下纯化circRNA

[0628] 进行以下实验以评估不同浓度的离散剂(在本例中为6M尿素)和盐(在本例中为氯化钠(NaCl))变性和拆分或进一步纯化circRNA的能力,进行了以下实验。

[0629] 为了纯化环状RNA,在存在6M尿素的情况下使用8mL DEAE整体柱。

[0630] 所述实验以约200mg/mL、pH 7进行,在环状RNA连接后未清洗。样品用样品缓冲剂(100mM Tris-HCl pH 7.0、6M尿素、10mM EDTA)按1:1稀释至最终浓度为3M尿素,并将7.5mg加载到8mL柱上。样品加载后柱用50mM Tris-HCl pH 7.0、6M尿素、5mM EDTA平衡和洗涤,并用20CV线性梯度至100%的50mM Tris-HCl pH 7.0、6M尿素、1M NaCl、5mM EDTA洗脱,然后用10CV线性梯度至100%的50mM Tris-HCl pH 7.0、6M尿素、3M NaCl、5mM EDTA洗脱。在重新平衡之前,用1M NaOH清洗柱。评价如图3所示的色谱图并汇集峰。通过PAGE定量200ng的纯度,与加载材料相比,并展示在下表3中。

[0631] 表3:

[0632]	样品	%circRNA	%linRNA
	起始材料	47	53
	circRNA洗脱峰	58	42

[0633] 通过PAGE得到的起始材料circRNA纯度百分比为47%,并且使用上面刚描述的条件纯化后,circRNA纯度百分比为58. %。

[0634] 对来自BIA分离公司(BIA separation)的QA 8mL整体柱进行与上面刚描述的相同的实验条件,除了缓冲剂的pH为pH 8.0。记录通过PAGE测量的纯度并显示在表4中。图4显示了7mg circRNA IVT起始材料的纯化。在图中,136.89mL处的5个峰是杂质,并且在色谱图中circRNA峰分别表示在242.43mL处。

[0635] 表4:

	样品	级分	%circRNA	%linRNA
[0636]	起始材料	NA	49	51
	circRNA 洗脱峰	B4	62	38
[0637]	circRNA 洗脱峰	B5	64	36

[0638] 输入起始材料或加载是由6PAGE定量的49%的circRNA。级分B4内洗脱的circRNA的circRNA纯度为62%,并且级分B5内洗脱的circRNA的circRNA纯度为64%。

[0639] 实例4:在高盐、高pH、螯合剂、离散剂变性条件下纯化circRNA

[0640] 为了评估两种或更多种变性条件变性和拆分或进一步纯化circRNA的能力,进行了以下实验。

[0641] 体外转录后用水将2mL的28mg/mL(根据Quibit约56mg)的环状RNA稀释至9mL,然后

用样品缓冲剂 (pH 7.0 100mM Tris-HCl、6M尿素、10mM EDTA) 1:1稀释至18mL。将样品加载到具有氢键和阴离子交换的8mL柱上。柱用50mM碳酸氢盐pH 7.0、6M尿素、5mM EDTA平衡和洗涤,然后施加20CV线性梯度至100%的50mM碳酸氢盐pH 10.0、6M尿素、5mM EDTA、1M NaCl,然后施加10CV线性梯度至100%的50mM Tris-HCl pH 10.0、6M尿素、5mM EDTA、3M NaCl。在重新平衡之前,用0.1M NaOH、3M NaCl和0.1M乙酸、3M NaCl清洗柱。色谱图结果展示在图5中。

[0642] 表5:

[0643]	样品	%circRNA	%linRNA
	起始材料	60	37
	circRNA洗脱峰	63	35

[0644] 通过PAGE定量,加载的circRNA%为60%,并且线性%为37%。根据PAGE,263.22mL处的峰含有62.91%的circRNA纯度和35.19%的linRNA纯度。所有其他峰都是杂质。

[0645] 实例5:在高盐、螯合剂、温度和离散剂变性条件下纯化circRNA

[0646] 为了评估两种或更多种变性条件变性和拆分或进一步纯化circRNA的能力,使用高盐、螯合剂、温度和离散剂(在本例中为尿素)作为变性条件进行了以下实验。

[0647] 使用HIC纯化对含有多核糖核苷酸混合群的样品进行实验,所述多核糖核苷酸混合群含有circRNA、linRNA或其他杂质或副产物(例如,本文所述的杂质或副产物)。在样品中存在3M NaCl的情况下进行纯化,然后在同一柱上同一运行期间以依次顺序用3M NaCl、6M尿素洗脱,紧接着用0M NaCl、6M尿素进行另外的分步洗脱,紧接着用0M NaCl、0M尿素进行洗脱,并且样品加载全部含有50mM磷酸钠pH 7.0、5mM EDTA的基础缓冲剂。在存在3M NaCl、50mM磷酸钠pH 7.0、5mM EDTA的情况下,针对2.17mg/mL(柱体积)环状RNA测试以下条件:室温、50℃、60℃和75℃,各自持续10min,然后在室温下将样品加载到1mL丁基高配体密度(HLD)HIC柱上。

[0648] 图6、图7和表6显示了使用1mL C4 HLD柱纯化环状RNA后的结果,其中样品如上所述在20℃下温育10min,并以2.17mg加载到柱上。

[0649] 表6:

[0650]	样品	级分	%circRNA
	起始材料		61.5
	在 14.47 ml 处流通	3.A.9	na
	在 58.51 ml 处的洗脱峰	3.C.6	58.7
		3.C.7	58
		3.C.8	58.2
		3.C.9	59.7
		3.C.10	60.5
		3.C.11	64.4
		3.C.12	71.2
	在 84 ml 处的小峰	3.D.12	64.6
	在 88.40 ml 处的洗脱峰	3.E.1	63.7
		3.E.2	60.4

[0651] 第一个凝胶的输入起始材料是61.5%的circRNA。流通 (FT) 的RNA含量非常少,并且大部分RNA与柱结合。在58.52mL处的第一个洗脱峰包括级分3.C.6-3.C.12,通过PAGE,所述级分的circRNA纯度范围为58.0%-71.2% circRNA纯度,取决于测试的级分。在88.40mL处的第二个洗脱峰包括级分3.E.1和3.E.2,根据PAGE,所述级分分别含有63.7%和60.4%的circRNA纯度。

[0652] 实例6:在高温、离散剂、有机溶剂和高盐变性条件下纯化circRNA

[0653] 为了评估两种或更多种变性条件变性和拆分或进一步纯化circRNA的能力,进行了以下实验。

[0654] 将含有circRNA和linRNA混合物的10mg IVT RNA样品加载到阴离子交换寡核苷酸柱上,并使用在线流动加热器在80℃下进行整个纯化。平衡和洗涤的柱条件为20mM双三丙烷、6M尿素、20% ACN pH 7.0,并且样品通过30%-60%和6CV线性梯度至20mM双三丙烷、6M尿素、1M NaCl、20% ACN pH 7.0洗脱。收集图8中的色谱图,并且circRNA表示为PN:7,和线性RNA表示为PN:8和PN:9。结果如表7所示。

[0655] 表7:

[0656]	级分	产率 (mg)	%circRNA纯度
	7	0.5	57
	8	1.5	96
	9	0.9	94
	10	0.4	8
	11	0.7	2
	12	0.6	2
	总计	4.6	

[0657] 根据HPLC分析方法,含有circRNA的级分7、8和9分别产生0.5mg、1.5mg和0.9mg的

材料,circRNA纯度分别为57%、96%和94%。根据HPLC分析方法,包括级分10、11和12的linRNA峰分别含有0.4mg、0.7mg和0.6mg的材料,circRNA纯度分别为8%、2%和2%。

[0658] 级分8和9的HPLC分析结果显示在图9中。

[0659] 级分10、11和12的HPLC分析结果显示在图10中。

[0660] 实例7:在不同的温度、螯合剂和离散剂变性条件下纯化circRNA

[0661] 本实例演示了在将circRNA与linRNA和其他杂质或副产物分离时使用温度、螯合剂和离散剂作为变性条件,其中在整个实验过程中存在0.5M盐酸胍。

[0662] 使用0.1ml QA整体柱,并将IVT生成的circRNA样品于5°C在自动进样器内注射到用50mM Tris、6M尿素、5mM EDTA pH 8平衡的柱上。柱用线性梯度至100%的50mM Tris、6M尿素、5mM EDTA、1M NaCl pH 8洗脱,并在45°C、55°C、65°C、75°C和85°C (85°C色谱曲线未在图中显示)下以1ml/min运行,分别如图11和图12所示。色谱图内展示的数字对应于加载到PAGE上进行分析的样品。

[0663] 实例8:在高温和有机溶剂变性条件下纯化circRNA

[0664] 为了评估两种或更多种变性条件变性和拆分或进一步纯化circRNA的能力,进行了以下实验。

[0665] 在该方法中,使用离子对反相HPLC利用温度和有机溶剂变性条件分离circRNA和linRNA。将circRNA/linRNA样品注射到阴离子交换寡核苷酸柱(例如,DNAPac PA200寡核苷酸柱)上。初始色谱法条件为53%流动相A(100mM TEAA水溶液)和47%流动相B(100mM TEAA,于25%乙腈水溶液中)。在运行期间将柱加热至75°C。根据表8进行circRNA和linRNA的洗脱。图13显示示例性色谱图结果。

[0666] 表8:

[0667]

时间(分钟)	%流动相A	%流动相B
3.00	53.0	47.0
3.50	53.0	47.0
10.00	51.0	49.0
10.50	0.0	100.0
11.50	0.0	100.0
12.00	53.0	47.0
20.00	53.0	47.0

[0668] 实例9:在不同pH变性条件下纯化circRNA

[0669] 本实例描述了在将circRNA与linRNA和其他杂质或副产物分离时使用pH作为变性条件。测试了小于5(例如,4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1或小于1)或大于9(例如,9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13或大于13)的变性pH条件。

[0670] 实例10:在盐和不同pH变性条件下纯化circRNA

[0671] 本实例描述了在将circRNA与linRNA和其他杂质或副产物分离时使用不同的pH和盐溶液变性条件。

[0672] 待测试的盐是NaCl、KCl、MgCl、CaCl、CsSO₄、NaSO₄、LiCl和/或LiBr。测试在100mM与1M之间的变性盐溶液浓度以及小于5(例如,4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1或小于1)或大于9(例如,9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13或大于13)的变性pH条件。待测试的盐溶液和/或

pH条件在洗涤步骤中添加,恰好在纯化之前添加到样品中或添加到平衡缓冲剂或洗脱缓冲剂中。

[0673] 实例11:在有机溶剂变性条件下纯化circRNA

[0674] 本实例描述了在将circRNA与linRNA和其他杂质或副产物分离时使用有机溶剂作为变性条件。测试了至少10% (v/v) 的变性有机溶剂浓度。测试的有机溶剂包括二甲基亚砜、三乙基乙酸铵、甲醇、乙醇、2-丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、异丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲酰胺、丙酮、地那铵和/或丙二醇。待测试的有机溶剂在洗涤步骤中添加,恰好在纯化之前添加到样品中或添加到平衡缓冲剂或洗脱缓冲剂中。

[0675] 实例12:在洗涤剂变性条件下纯化circRNA

[0676] 本实例描述了在将circRNA与linRNA和其他杂质或副产物分离时使用洗涤剂作为变性条件。待测试的洗涤剂包括Nonidet P-40 (NP40)、聚山梨酯(例如,Tween-20、Tween-40、Tween-60或Tween-80)、Triton X 100、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷和/或正十二烷基 β -D-麦芽糖苷,浓度范围为0.00001%至20%。待测试的洗涤剂在洗涤步骤期间添加,恰好在纯化之前添加到样品中或添加到平衡缓冲剂或洗脱缓冲剂中。

[0677] 实例13:变性条件下的分析方法

[0678] 本实例演示了变性条件在分析方法中的用途。

[0679] 分析型阴离子交换(AEX) HPLC-UV方法被证明能够从linRNA中拆分出circRNA,并且因此适用于在存在linRNA的情况下确定circRNA样品的纯度。

[0680] 在该方法中,将circRNA样品注射到阴离子交换寡核苷酸柱(例如,DNAPac PA200寡核苷酸柱)上。初始色谱法条件为85%流动相A(20mM Bis-Tris、6M尿素pH 7.0)和15%流动相B(20mM Bis-Tris、6M尿素、1M NaCl pH 7.0)。在运行期间将柱加热至80°C。使用高达10%流动相A/90%流动相B的梯度洗脱circRNA和linRNA。

[0681] 图14显示了在水中浓度为0.2223mg/mL的circRNA的示例性色谱图,其中随后进行两次注水。

[0682] 实例14:变性条件下的分析方法

[0683] 本实例演示了变性条件在分析方法中的用途。

[0684] 通过将浓度为20%的有机变性剂乙腈添加到流动相中,进一步修改了上述实例9中的分析方法。其他修改包括改变缓冲剂盐以提高流动相的缓冲能力。

[0685] 具体来说,将circRNA样品注射到阴离子交换寡核苷酸柱上。在注射前,通过用变性剂(例如DMSO)稀释或直接稀释到流动相A(20mM双三丙烷、6M尿素pH 7.0)中来制备样品。初始色谱法条件为85%流动相A和15%流动相B(20mM双三丙烷、6M尿素、1M NaCl pH 7.0)。在运行期间将柱加热至80°C。使用高达10%流动相A(20mM Bis-Tris、6M尿素pH 7.0)和90%流动相B(20mM Bis-Tris、6M尿素、1M NaCl, pH 7.0)的梯度进行circRNA和linRNA的洗脱。图15显示了空白注射的色谱图。circRNA和linRNA标准品给出了单独的峰,如图16所示。

[0686] 其他实施例

[0687] 上述说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请通过援引并入本文中,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被明确且单独地指示以通过援引以其整体并入本文中。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明所述的方法、药物组合物和试剂盒的各种修改和变化对本领域技术人员将是显而易见的。虽已结合具体实施例描述了本发

明,但应当理解,能够进行进一步修改并且所要求的发明不应当过度地局限于此类具体实施例。事实上,对于本领域技术人员显而易见的用于进行本发明的所述方式的各种修改旨在落入本发明的范围内。本申请旨在涵盖本发明的任何变化、使用或改编,其通常遵循本发明的原理并且包括与本披露的此类偏离,属于本发明所属领域内的已知惯例,并且可能是适用于本文所述的基本特征。

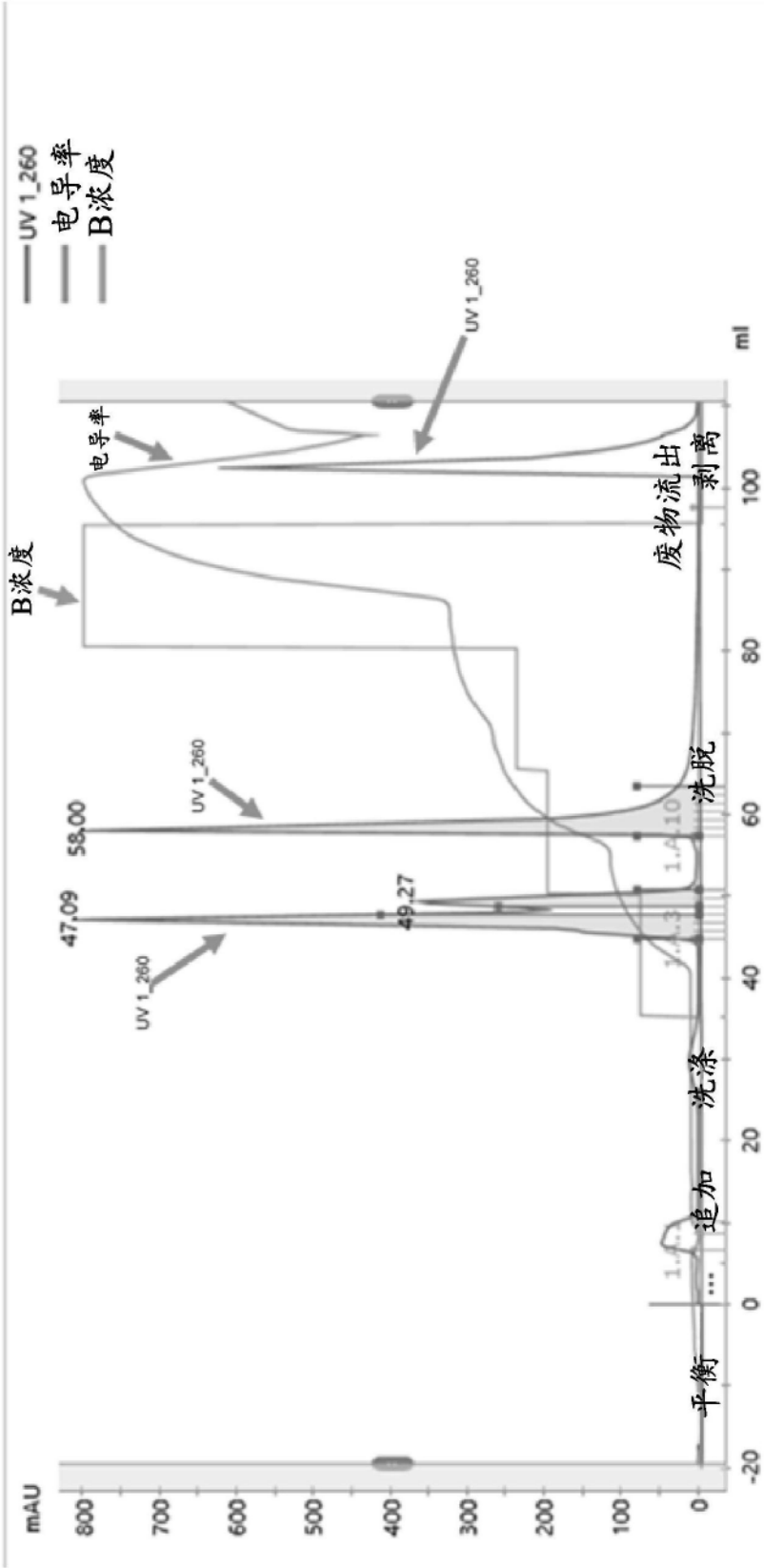


图1

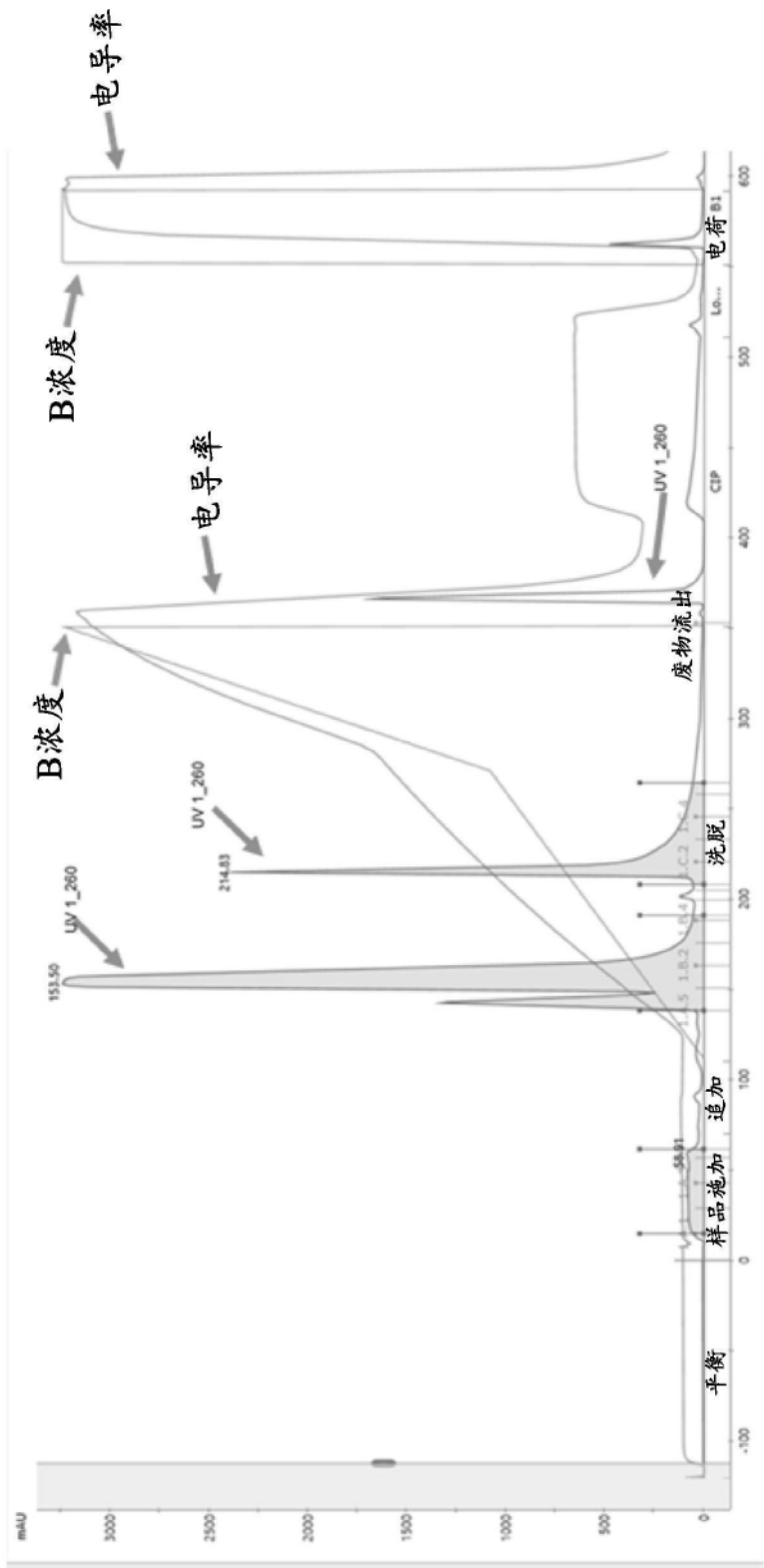


图3

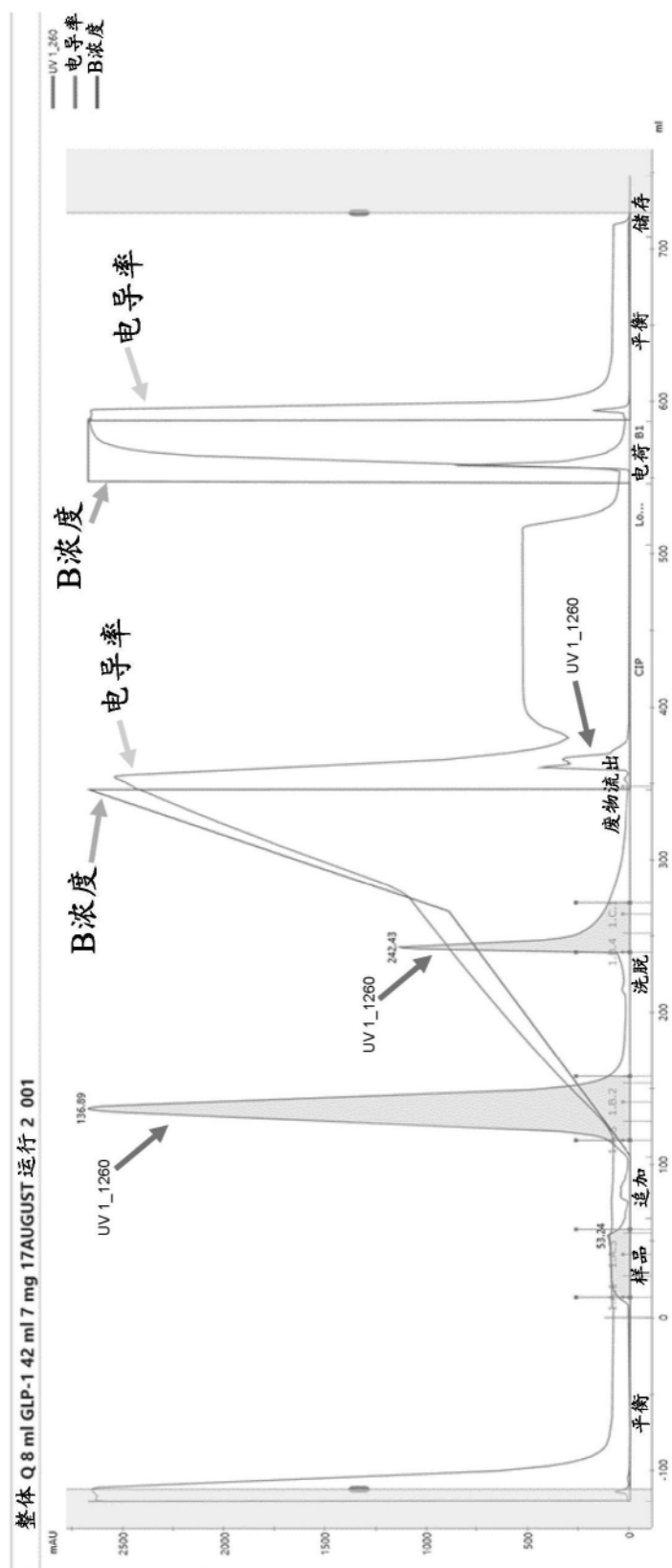


图4

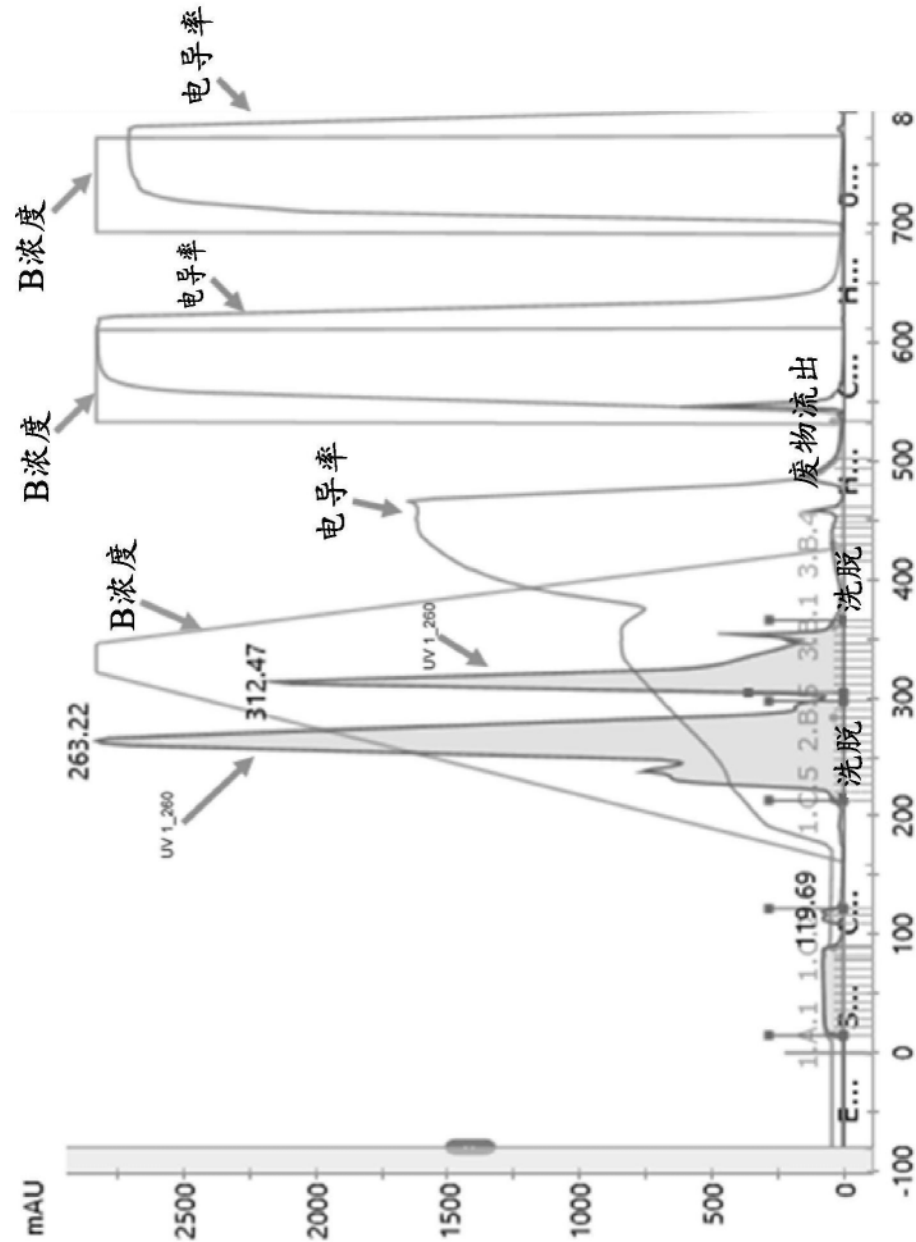


图5

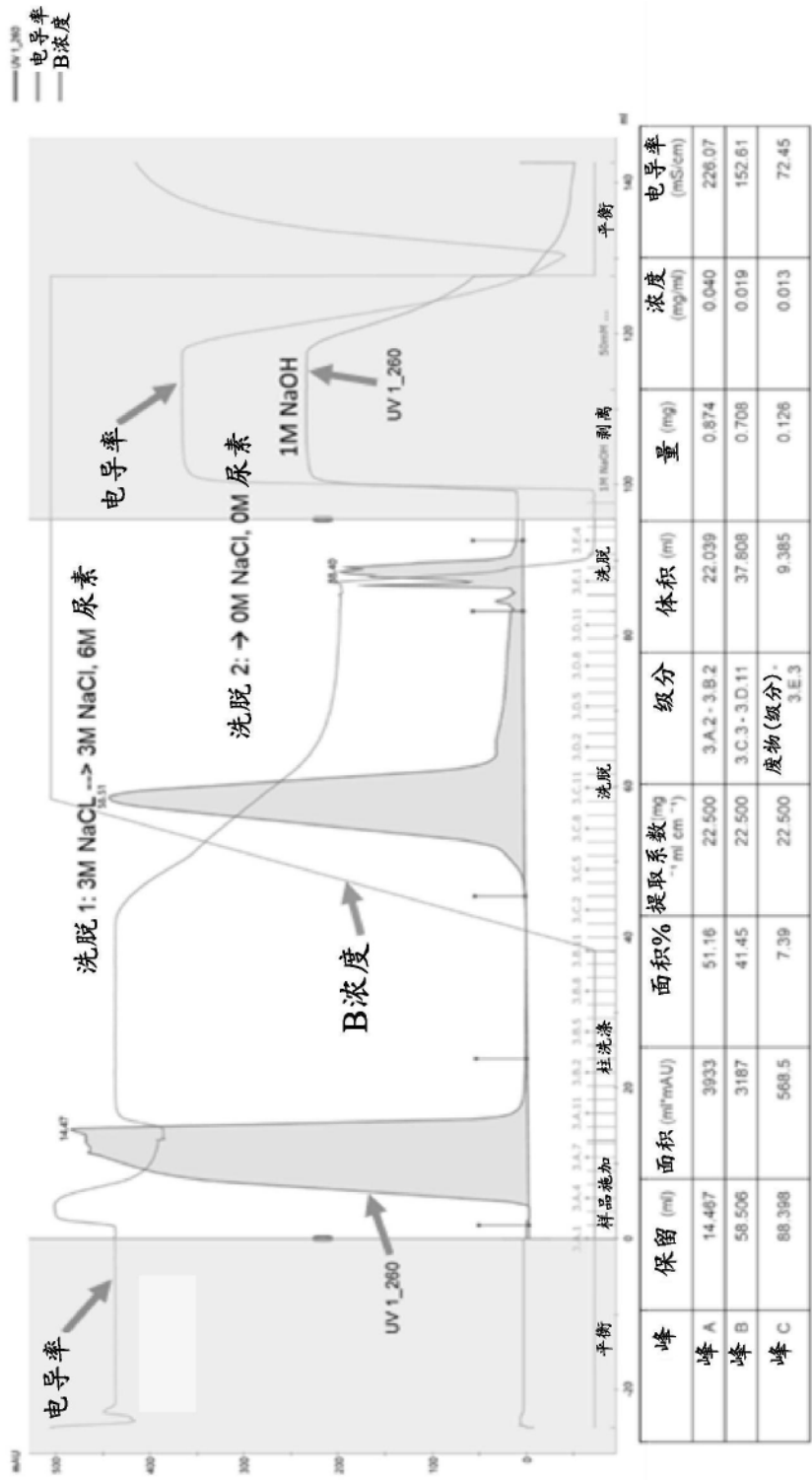


图6

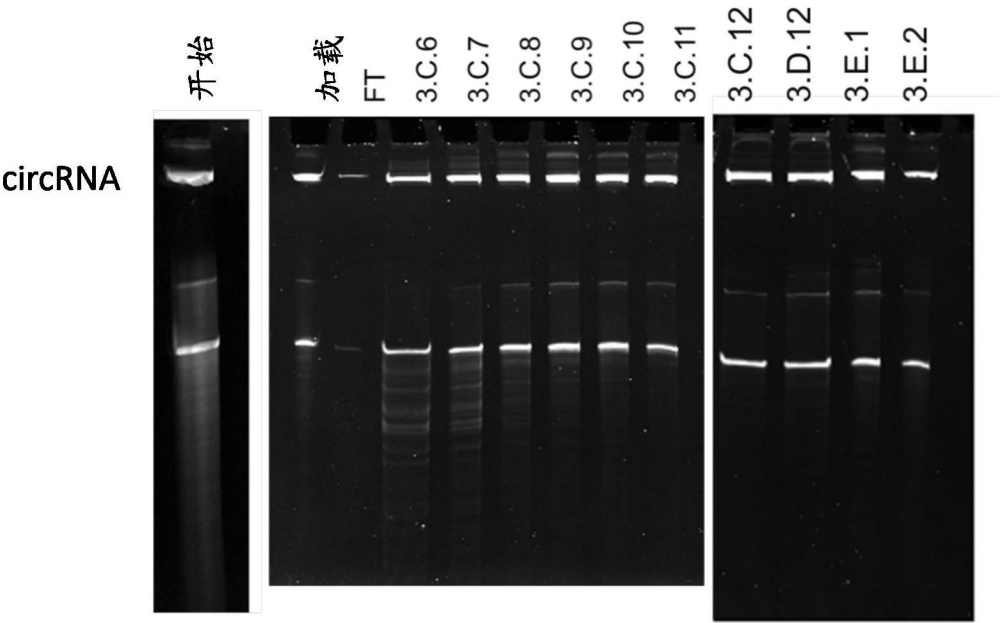


图7

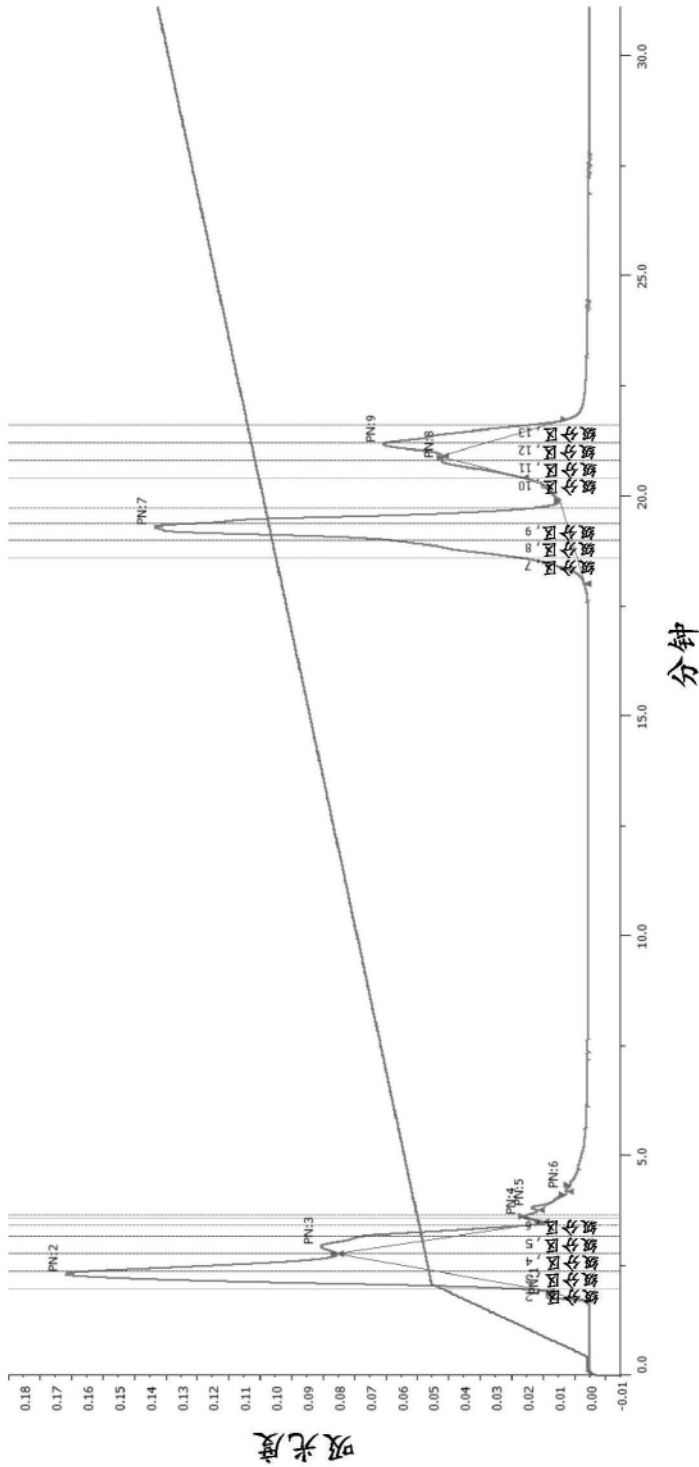


图8

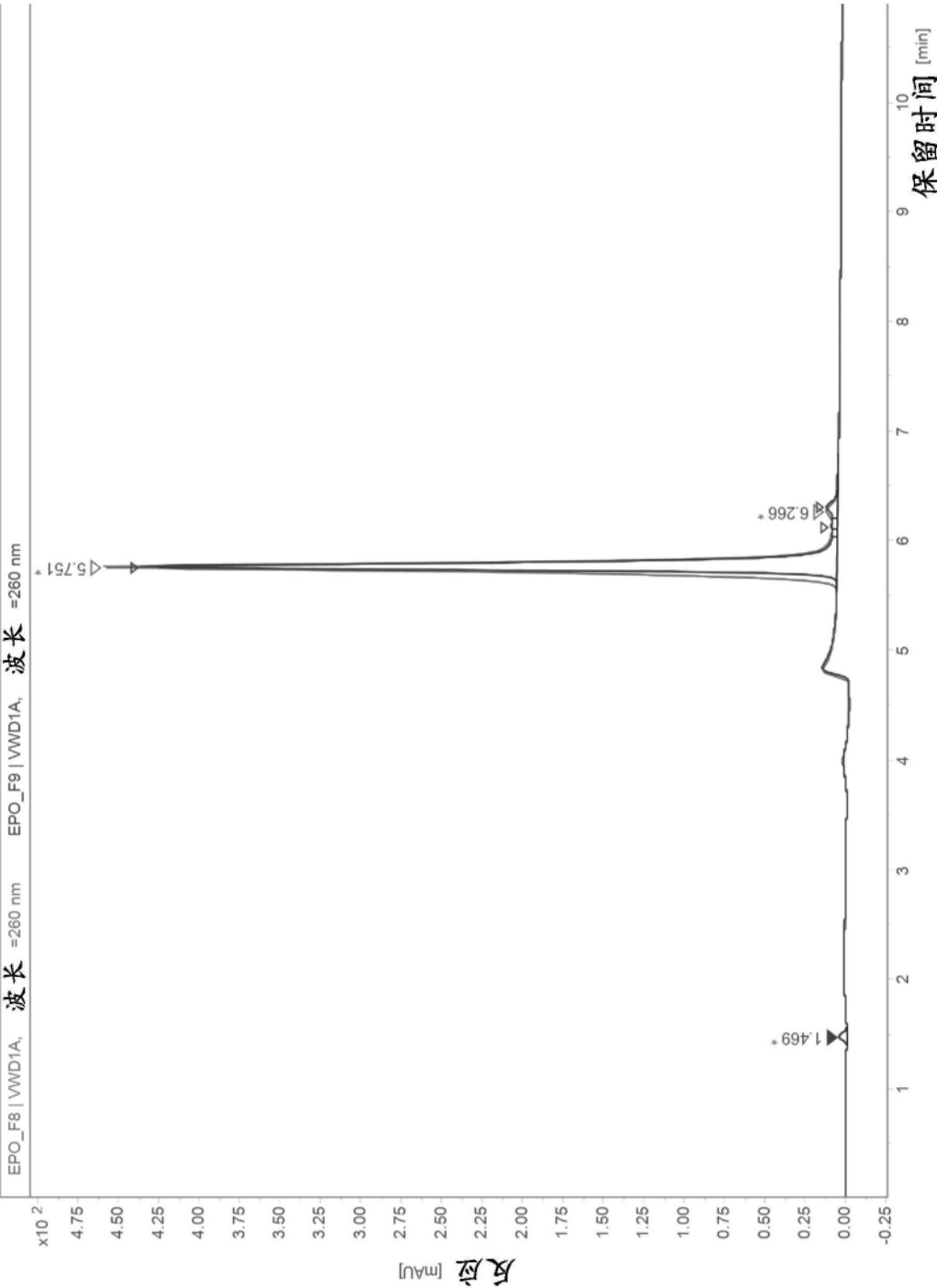


图9

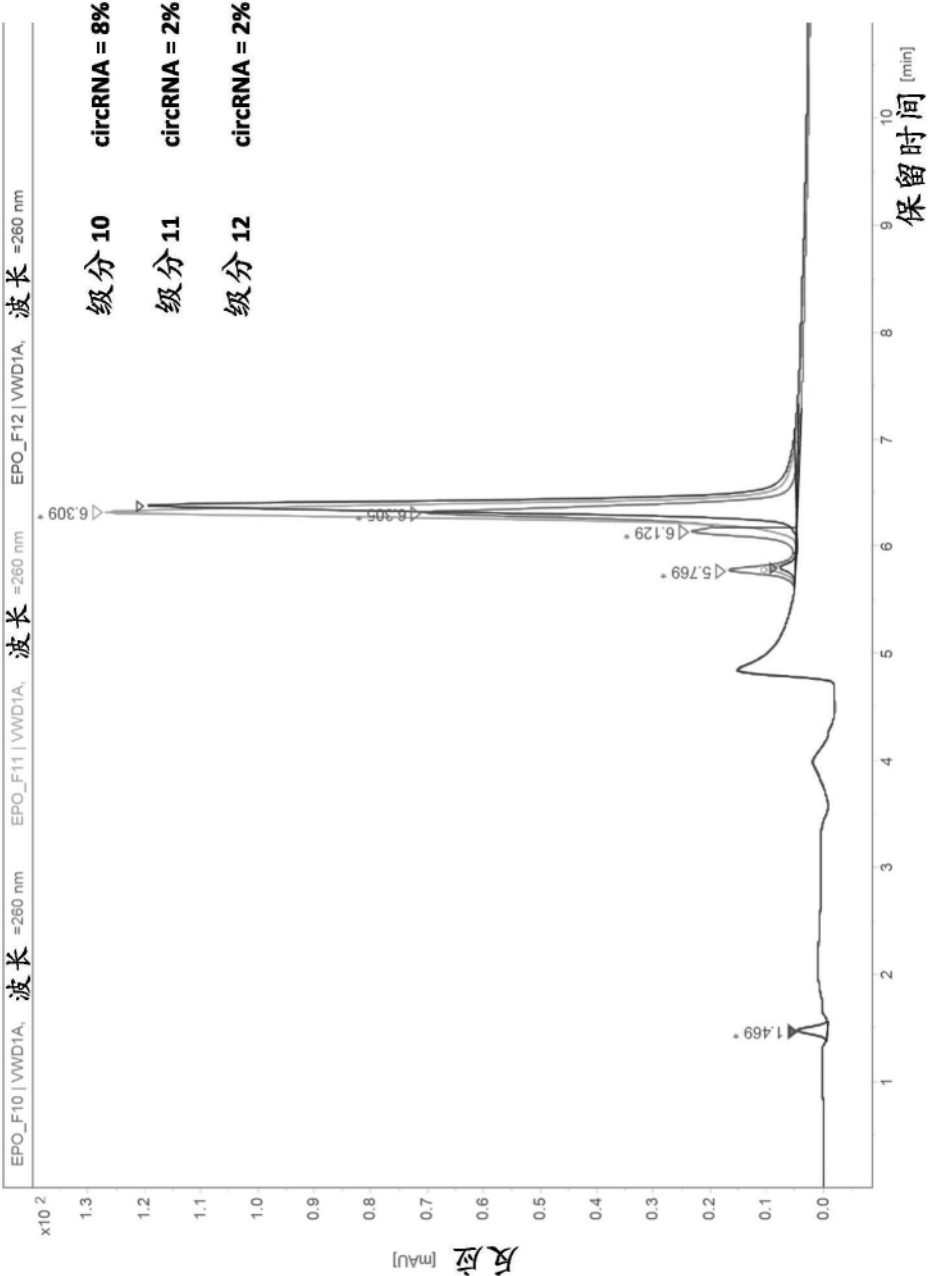


图10

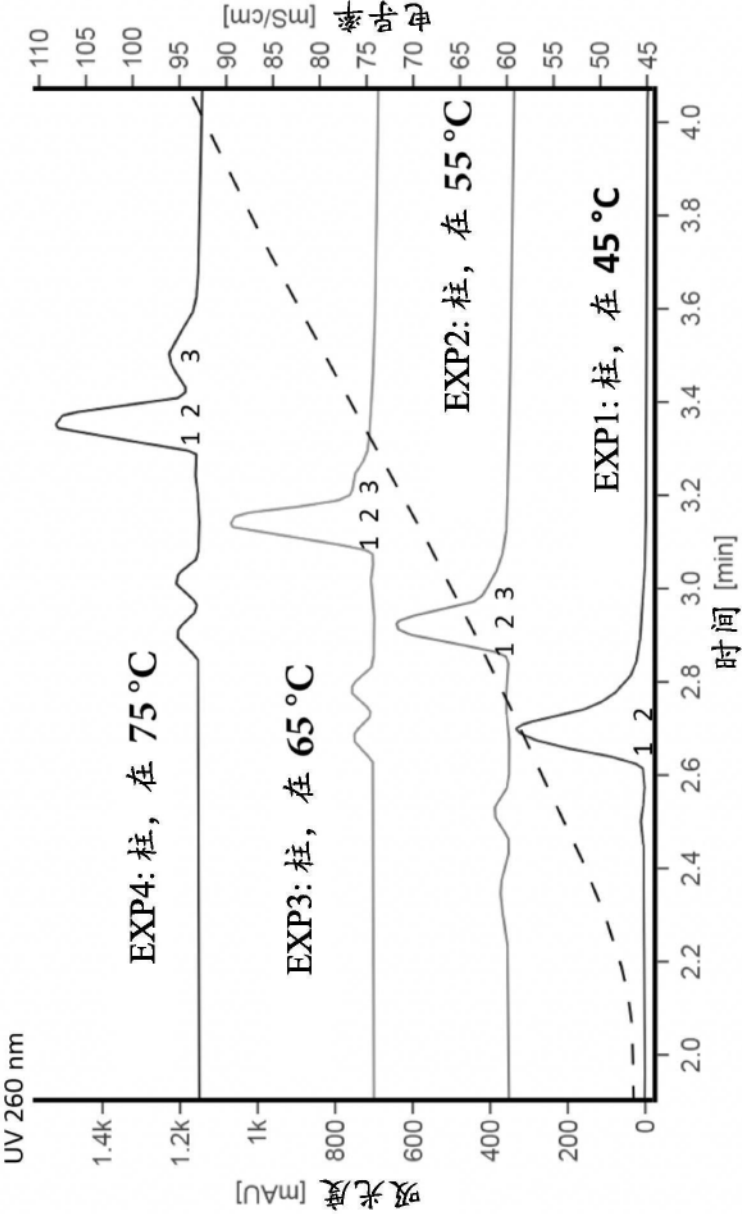


图11

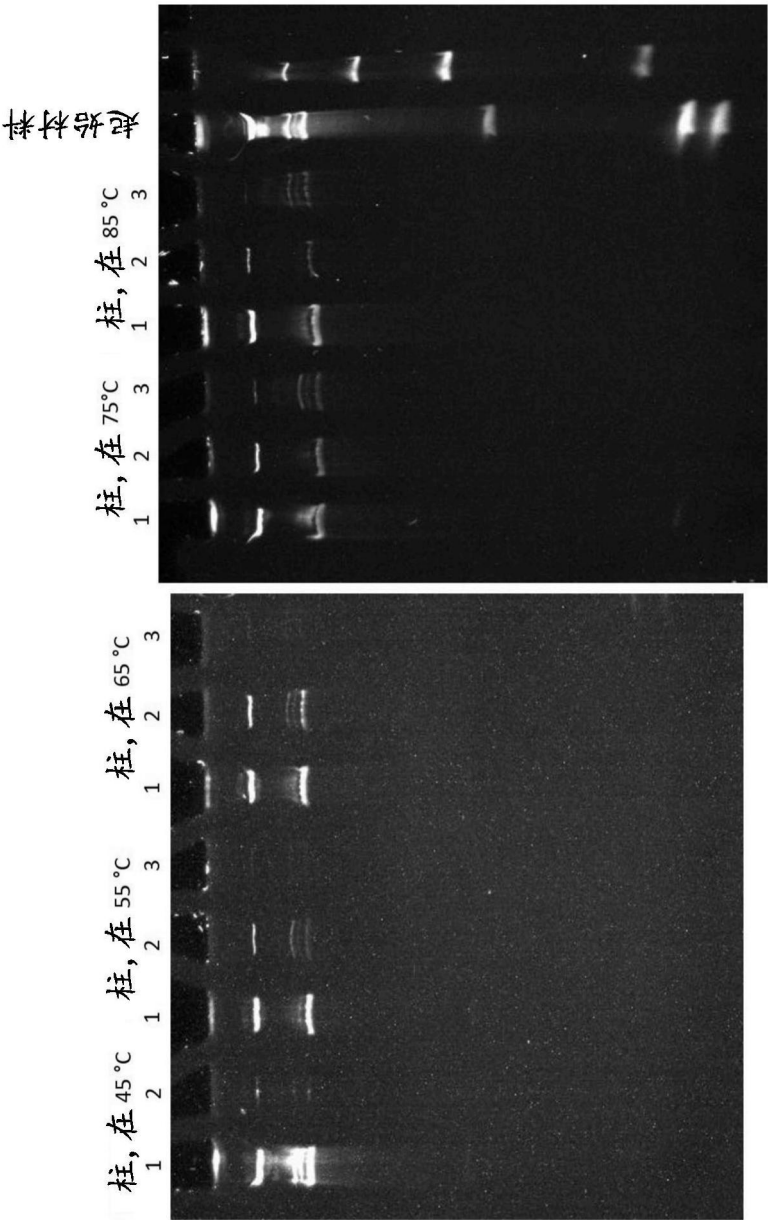


图12

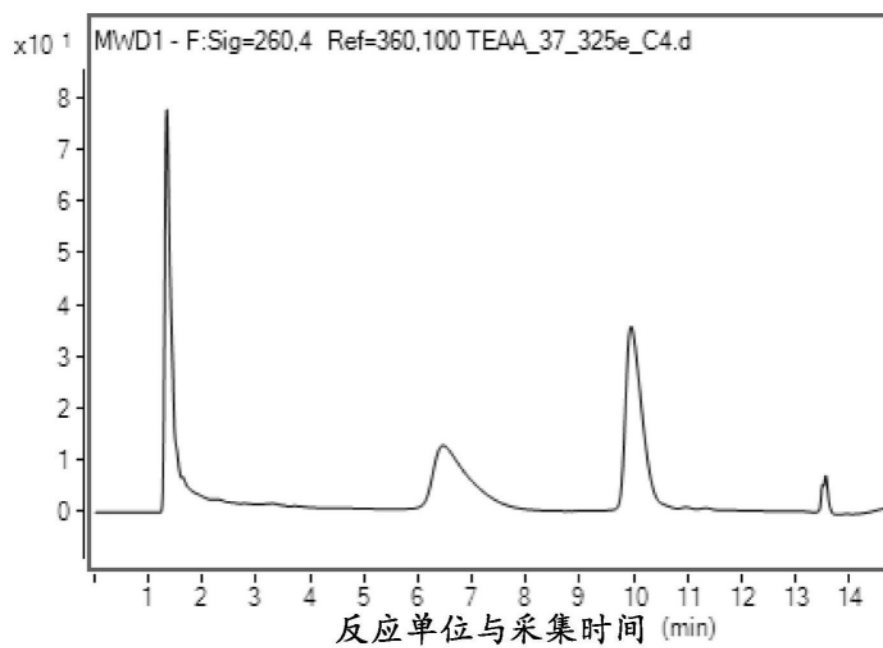


图13

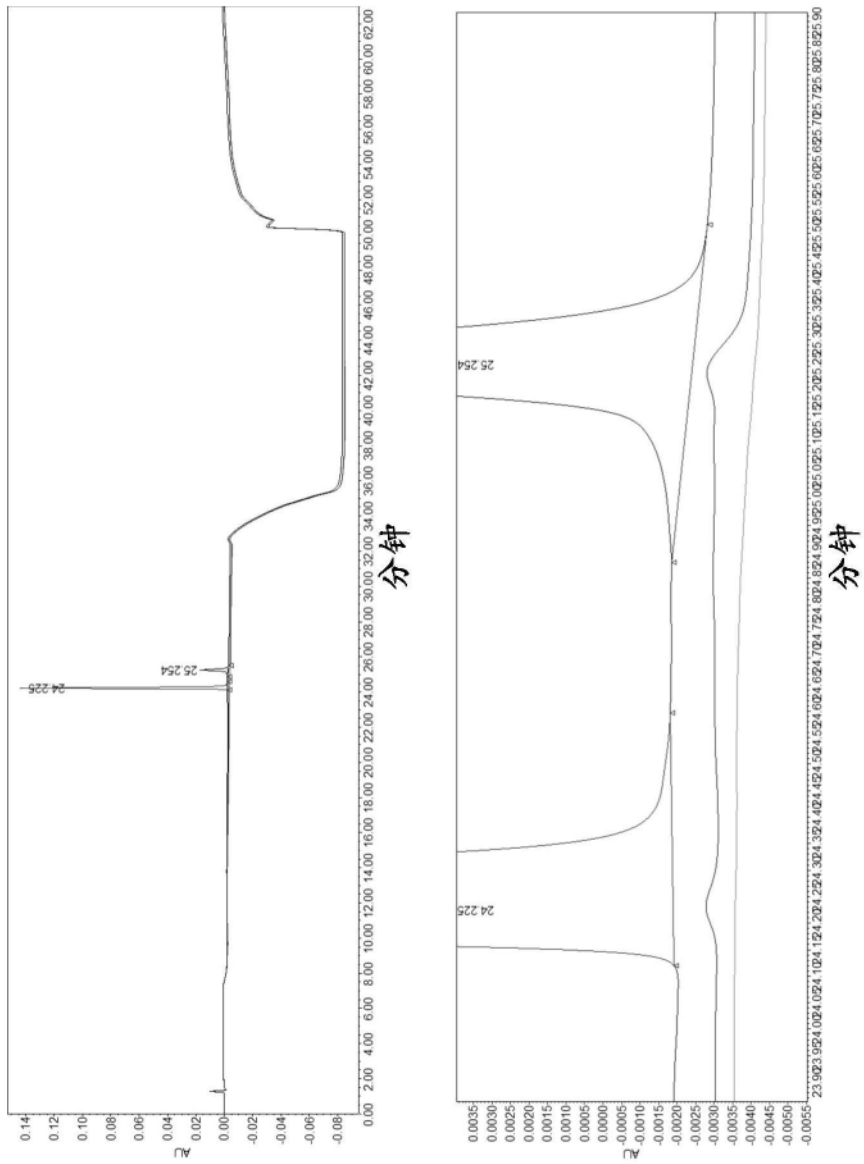


图14

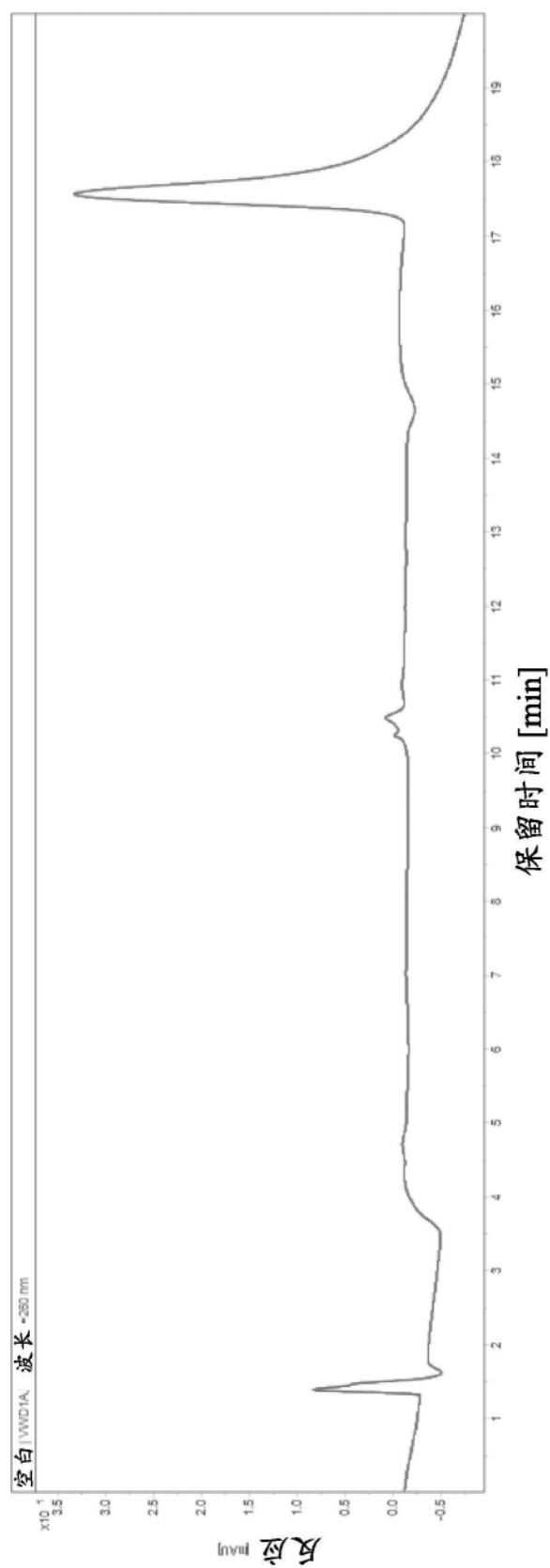


图15

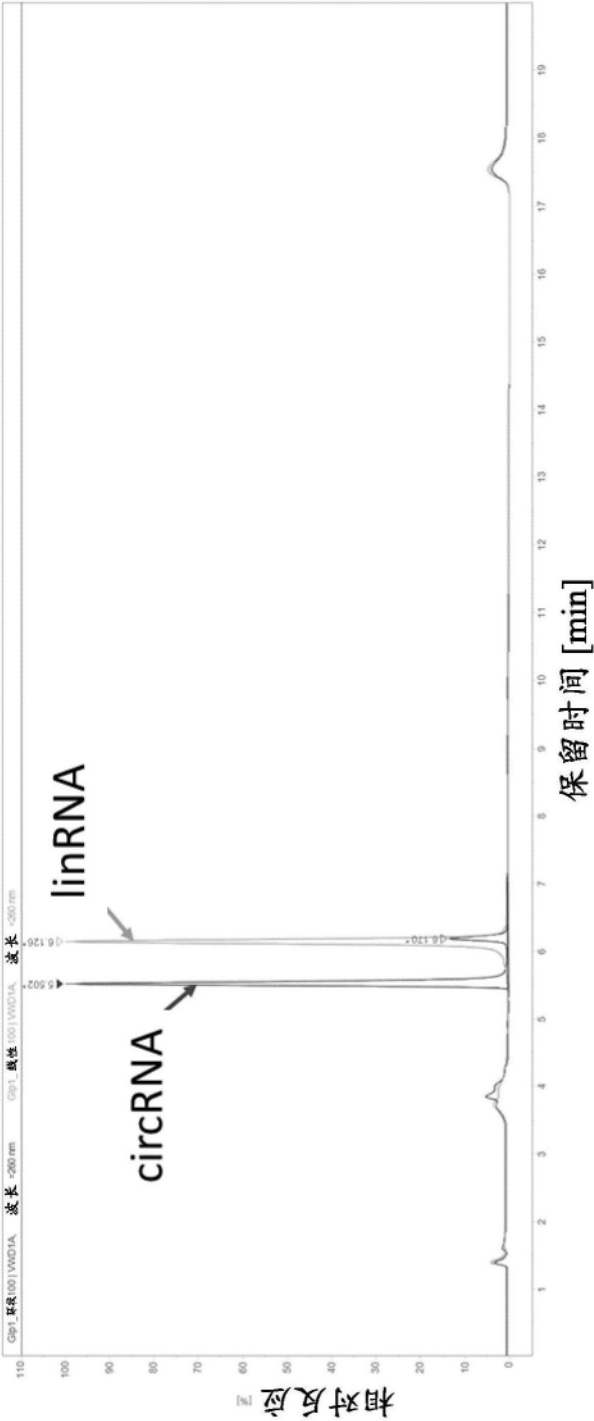


图16