



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202340460 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：111148622

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 12 月 16 日

(51)Int. Cl. : C12N15/10 (2006.01)

C12N15/113 (2010.01)

(30)優先權：2021/12/17 美國

63/291,185

(71)申請人：美商旗艦先鋒創新有限責任公司 (美國) FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI, LLC (US)

美國

(72)發明人：德波爾 亞歷珊卓 蘇菲 DE BOER, ALEXANDRA SOPHIE (NL)；普拉吉斯 尼可拉斯 麥卡尼 PLUGIS, NICHOLAS MCCARTNEY (US)；庫拉 安東尼 約瑟夫 CURA, ANTHONY JOSEPH (US)；法伯 約書亞 納森 FARB, JOSHUA NATHAN (US)；曼拉爾 迪尼斯庫馬爾 MANVAR, DINESHKUMAR (US)；米斯拉 圖斯哈爾 甘迪 MISRA, TUSHAR KANTI (IN)；尼爾森 珍妮佛 A NELSON, JENNIFER A. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：16 共 184 頁

(54)名稱

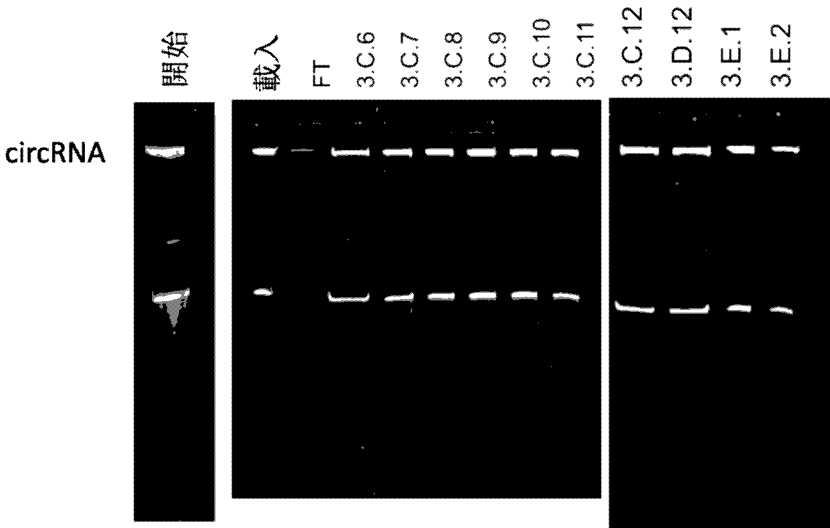
用於在變性條件下富集環狀RNA之方法

(57)摘要

本揭露關於用於例如從含有環狀多核糖核苷酸 (circRNA) 和線性多核糖核苷酸 (linRNA) 的多核糖核苷酸群富集 circRNA 之方法，其中該富集在變性條件下進行。還揭露了組成物，該等組成物包括在變性條件下的溶液中含有 circRNA 和 linRNA 的多核糖核苷酸群。進一步在本揭露之範圍內的是含有 circRNA 富集群的組成物，諸如藉由將該組成物暴露於一或多種變性條件而產生的組成物。

The present disclosure is directed to methods for the enrichment of circular polyribonucleotides (circRNA), e.g., from population of polyribonucleotides containing circRNA and linear polyribonucleotides (linRNA), where the enrichment is performed under denaturing conditions. Also disclosed are compositions including a population of polyribonucleotides containing circRNA and linRNA in a solution under denaturing conditions. Further within the scope of the present disclosure are compositions containing an enriched population of circRNA, such as a composition that was produced by exposing the composition to one or more denaturing conditions.

指定代表圖：



【圖 7】



【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於在變性條件下富集環狀RNA之方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR ENRICHMENT OF CIRCULAR RNA

UNDER DENATURING CONDITIONS

【中文】

本揭露關於用於例如從含有環狀多核糖核苷酸（**circRNA**）和線性多核糖核苷酸（**linRNA**）的多核糖核苷酸群富集**circRNA**之方法，其中該富集在變性條件下進行。還揭露了組成物，該等組成物包括在變性條件下的溶液中含有**circRNA**和**linRNA**的多核糖核苷酸群。進一步在本揭露之範圍內的是含有**circRNA**富集群的組成物，諸如藉由將該組成物暴露於一或多種變性條件而產生的組成物。

【英文】

The present disclosure is directed to methods for the enrichment of circular polyribonucleotides (**circRNA**), e.g., from population of polyribonucleotides containing **circRNA** and linear polyribonucleotides (**linRNA**), where the enrichment is performed under denaturing conditions. Also disclosed are compositions including a population of polyribonucleotides containing **circRNA** and **linRNA** in a solution under denaturing conditions. Further within the scope of the present disclosure are compositions containing an enriched population of **circRNA**, such as a composition that was produced by exposing the composition to one or more denaturing conditions.

【指定代表圖】 圖7

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於在變性條件下富集環狀RNA之方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR ENRICHMENT OF CIRCULAR RNA

UNDER DENATURING CONDITIONS

【技術領域】

【0001】 本揭露關於用於富集環狀RNA之方法，並且特別地涉及用於在變性條件下富集環狀RNA之方法。

【先前技術】

【0002】 多核糖核苷酸可用於多種治療和工程應用。因此，用於分離和純化多核糖核苷酸的新組成物和方法係可用的。

【發明內容】

【0003】 本揭露總體上關於用於例如從含有環狀多核糖核苷酸（circRNA）和線性多核糖核苷酸（linRNA）的多核糖核苷酸群富集circRNA之方法，其中富集在變性條件下進行。還揭露了組成物，該等組成物包括在變性條件下的溶液中含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸群。進一步在本揭露之範圍內的是含有circRNA富集群的組成物，諸如藉由將該組成物暴露於一或多種變性條件而產生的組成物。本揭露部分地基於本發明人的以下發現：在變性條件（例如，熱變性、pH或化學處理）下分離circRNA係用於從含有circRNA、linRNA或其他雜質或副產物的混合多核糖核苷酸群中純化和富集circRNA之穩健方法。此外，所揭露的方法有助於放大circRNA純化過程，從而允許生產和純化大量的circRNA。

【0004】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 在不包括使用凝膠電泳的變性條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0005】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將多核糖核苷酸群暴露於變性條件下，從而富集circRNA群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0006】 在一些實施方式中，(i) 多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸之總重量為至少1 μg （例如，至少5 μg 、至少10 μg 、至少25 μg 、至少50 μg 、至少100 μg 、至少250 μg 、至少500 μg 、至少750 μg 、至少1 mg、5 mg、10 mg、100 mg或1 g；或在5 μg 與100 μg 之間、在5 μg 與500 μg 之間、在5 μg 與1 mg之間、在5 μg 與10 mg之間、在500 μg 與100 mg之間、在500 μg 與1 g之間、在500 μg 與10 g之間、在100 mg與1 g之間、或在1 g與10 g之間）；(ii) 包括多核糖核苷酸群的樣本之總體積為至少500 μL （例如，至少1 mL、5 mL、10 mL、100 mL或1 L；或在500 μL 與100 mL之間、在500 μL 與1 L之間、在500 μL 與10 L、或在1 L與10 L之間）；或者 (iii) 樣本中多核糖核苷酸群之濃度為至少200 ng/ μL （例如，至少500 ng/ μL 、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL或50 mg/mL；或在200 ng/ μL 與100 mg/mL、在200 ng/ μL 與50 mg/mL之間，或在1 mg/mL與50 mg/mL之間）。在一些實施方式中，circRNA之長度為約100個核苷酸至約20,000個核苷酸（例如，約100個核苷酸至約500個核苷酸、約100個核苷酸至約750個核苷酸、約100個核苷酸至約

1,000個核苷酸、約100個核苷酸至約2,500個核苷酸、約100個核苷酸至約5,000個核苷酸、約100個核苷酸至約10,000個核苷酸、約500個核苷酸至約750個核苷酸、約750個核苷酸至約1,000個核苷酸、約750個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約2,000個核苷酸、約1,000個核苷酸至約5,000個核苷酸、約2,500個核苷酸至約5,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約10,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約10,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約15,000個核苷酸至約20,000個核苷酸、約100個核苷酸、約200個核苷酸、約300個核苷酸、約400個核苷酸、約500個核苷酸、約600個核苷酸、約700個核苷酸、約800個核苷酸、約900個核苷酸、約1,000個核苷酸、約1,250個核苷酸、約1,500個核苷酸、約1,750個核苷酸、約2,000個核苷酸、約3,000個核苷酸、約4,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約6,000個核苷酸、約7,000個核苷酸、約8,000個核苷酸、約9,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約11,000個核苷酸、約12,000個核苷酸、約13,000個核苷酸、約14,000個核苷酸、約15,000個核苷酸、約16,000個核苷酸、約17,000個核苷酸、約18,000個核苷酸、約19,000個核苷酸或約20,000個核苷酸）。在一些實施方式中，circRNA之長度小於1,000個核苷酸。

【0007】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該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之總重量為至少1 μg （例如，至少5 μg 、至少10 μg 、至少25 μg 、至少50 μg 、至少100 μg 、至少250 μg 、至少500 μg 、至少750 μg 、至少1 mg、5 mg、10 mg、100 mg或1 g；或在5 μg 與100 μg 之間、在5 μg 與500 μg 之間、在5 μg 與1 mg之間、在5 μg 與10 mg之間、在500 μg 與100 mg之間、在500 μg 與1 g之間、在500 μg 與10 g之間、在100 mg與1 g之間、或在1 g與10 g之間）；(ii) 包括多核糖核苷酸群的樣本之總體積為至少500

μL （例如，至少1 mL、5 mL、10 mL、100 mL或1 L；或在500 μL 與100 mL之間、在500 μL 與1 L之間、在500 μL 與10 L、或在1 L與10 L之間）；或者 (iii) 樣本中多核糖核苷酸群之濃度為至少200 ng/ μL （例如，至少500 ng/ μL 、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL或50 mg/mL；或在200 ng/ μL 與100 mg/mL、在200 ng/ μL 與50 mg/mL之間，或在1 mg/mL與50 mg/mL之間）；和 (b) 在變性條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0008】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸之總重量在1 μg 與1000 mg克之間（例如，在5 μg 與10 mg之間）。在一些實施方式中，包括多核糖核苷酸群的樣本之總體積在500 μL 與1000 mL之間。在一些實施方式中，樣本中多核糖核苷酸群之濃度在200 ng/ μL 與50 mg/mL之間。

【0009】 在一些實施方式中，circRNA之長度為約100個核苷酸至約20,000個核苷酸（例如，約100個核苷酸至約500個核苷酸、約100個核苷酸至約750個核苷酸、約100個核苷酸至約1,000個核苷酸、約100個核苷酸至約2,500個核苷酸、約100個核苷酸至約5,000個核苷酸、約100個核苷酸至約10,000個核苷酸、約500個核苷酸至約750個核苷酸、約750個核苷酸至約1,000個核苷酸、約750個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約2,000個核苷酸、約1,000個核苷酸至約5,000個核苷酸、約2,500個核苷酸至約5,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約10,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約10,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約15,000個核苷酸至約20,000個核苷酸、約100個核苷酸、約200個核苷酸、約300個核苷酸、約400個核苷酸、約500個核苷酸、約600個核苷酸、約700個核苷酸、約800個核苷酸、約900個核苷酸、約1,000個核苷酸、約1,250個核苷酸、約1,500個核苷酸、約1,750個核苷酸、

約2,000個核苷酸、約3,000個核苷酸、約4,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約6,000個核苷酸、約7,000個核苷酸、約8,000個核苷酸、約9,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約11,000個核苷酸、約12,000個核苷酸、約13,000個核苷酸、約14,000個核苷酸、約15,000個核苷酸、約16,000個核苷酸、約17,000個核苷酸、約18,000個核苷酸、約19,000個核苷酸或約20,000個核苷酸)。在一些實施方式中，circRNA之長度小於1,000個核苷酸。

【0010】 在一些實施方式中，分離步驟 (b) 在不包括使用凝膠電泳的變性條件下進行。

【0011】 在一些實施方式中，circRNA富集群基本上不含一或多種雜質或副產物。在一些實施方式中，一或多種雜質或副產物包括聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或乙二胺四乙酸 (EDTA)。

【0012】 在一些實施方式中，變性條件包括至少50°C的溫度 (例如，至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C或80°C)。在一些實施方式中，變性條件包括在50°C與85°C之間的溫度。在一些實施方式中，變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C (例如，至少55°C、60°C、65°C、70°C、75°C或80°C) 的溫度，然後是不超過8°C (例如，不超過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) 的溫度。

【0013】 在一些實施方式中，變性條件包括小於5 (例如小於4、3、2或1) 或大於9 (例如大於10、11、12或13) 的pH。在一些實施方式中，變性條件包括小於5 (例如小於4、3、2或1) 的pH。在一些實施方式中，變性條件包括大於9 (例如大於10、11、12或13) 的pH。

【0014】 在一些實施方式中，變性條件包括化學處理。在一些實施方式中，

化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0015】 在一些實施方式中，酸包括在1 mM與500 mM之間(例如，在2 mM至475 mM之間、在3 mM至450 mM之間、在4 mM至425 mM之間、在5 mM至400 mM之間、在10 mM至375 mM之間、在15 mM至350 mM之間、在20 mM至325 mM之間、在30 mM至300 mM之間、在40 mM至275 mM之間、在50 mM至250 mM之間、在60 mM至225 mM之間、在70 mM至200 mM之間、在80 mM至175 mM之間、在90 mM至150 mM之間、在100 mM至125 mM之間、或在110 mM至115 mM之間)的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0016】 在一些實施方式中，鹼包括在1 mM與500 mM之間(例如，在2 mM至475 mM之間、在3 mM至450 mM之間、在4 mM至425 mM之間、在5 mM至400 mM之間、在10 mM至375 mM之間、在15 mM至350 mM之間、在20 mM至325 mM之間、在30 mM至300 mM之間、在40 mM至275 mM之間、在50 mM至250 mM之間、在60 mM至225 mM之間、在70 mM至200 mM之間、在80 mM至175 mM之間、在90 mM至150 mM之間、在100 mM至125 mM之間、或在110 mM至115 mM之間)的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0017】 在一些實施方式中，有機溶劑包括至少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%與10%之間)的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0018】 在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇（PEG）。

在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0019】 在一些實施方式中，擁擠劑包括在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）的PEG或尿素。

【0020】 在一些實施方式中，螯合劑包括在1 mM與10 mM之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM或9 mM-10 mM）的乙二醇-雙(β -胺基乙基醚)-*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）、亞胺基二琥珀酸（IDS）、聚天冬胺酸、*S,S*-乙二胺-*N,N'*-二琥珀酸（EDDS）或甲

基甘胺酸二乙酸 (MGDA)。

【0021】 在一些實施方式中，洗滌劑包括在0.005%與0.05% (v/v) 之間 (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-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0022】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該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) 的溫度下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群，其中分離不包括使用凝膠電泳。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0023】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該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總品質為至少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1 mg、5 mg、10 mg、100 mg或1 g；或在5 μ g與100 μ g之間、在5 μ g與500 μ g之間、在5 μ g與1 mg之間、在5 μ g與10 mg之間、在500 μ g與100 mg之間、在500 μ g與1 g之間、在500 μ g與10 g之間、在100 mg與1 g之間、或在1 g與10 g之間)；(ii) 包括多核糖核苷酸群的樣本之總體積為至少500 μ L (例如，至少1 mL、5 mL、10 mL、100 mL或1 L；或在500 μ L與100 mL之間、在500 μ L與1 L之間、在500 μ L與10 L、或在1 L與10 L之間)；或者 (iii) 樣本中多核糖核苷酸群之濃度為至少200 ng/ μ L (例如，至少500 ng/ μ L、1 mg/mL、5

mg/mL、10 mg/mL或50 mg/mL；或在200 ng/ μ L 與 100 mg/mL、在200 ng/ μ L 與 50 mg/mL 之間，或在1 mg/mL 與 50 mg/mL之間）；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）的溫度下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0024】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將多核糖核苷酸群暴露於至少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）的溫度，從而富集circRNA群。在一些實施方式中，溫度在50°C與85°C之間。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0025】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 在小於5（例如，小於4、3、2或1）或大於9（例如，大於10、11、12或13）的pH下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群，其中分離不包括使用凝膠電泳。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0026】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該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總品質為至少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1 mg、5 mg、10 mg、100 mg或1 g；或在5 μ g與

100 μg 之間、在5 μg 與500 μg 之間、在5 μg 與1 mg之間、在5 μg 與10 mg之間、在500 μg 與100 mg之間、在500 μg 與1 g之間、在500 μg 與10 g之間、在100 mg與1 g之間、或在1 g與10 g之間)；(ii) 包括多核糖核苷酸群的樣本之總體積為至少500 μL (例如，至少1 mL、5 mL、10 mL、100 mL或1 L；或在500 μL 與100 mL之間、在500 μL 與1 L之間、在500 μL 與10 L、或在1 L與10 L之間)；或者 (iii) 樣本中多核糖核苷酸群之濃度為至少200 ng/ μL (例如，至少500 ng/ μL 、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL或50 mg/mL；或在200 ng/ μL 與100 mg/mL、在200 ng/ μL 與50 mg/mL之間，或在1 mg/mL與50 mg/mL之間)；和 (b) 在小於5 (例如，小於4、3、2或1) 或大於9 (例如，大於10、11、12或13) 的pH下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0027】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將多核糖核苷酸群暴露於小於5 (例如，小於4、3、2或1) 或大於9 (例如，大於10、11、12或13) 的pH，從而富集circRNA群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0028】 在一些實施方式中，pH小於5 (例如，小於4、3、2或1)。在一些實施方式中，pH大於9 (例如，大於10、11、12或13)。

【0029】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 在包括酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液的條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群，其中分

離不包括使用凝膠電泳。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0030】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該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總品質為至少1 μg （例如，至少5 μg 、至少10 μg 、至少25 μg 、至少50 μg 、至少100 μg 、至少250 μg ，至少500 μg 、至少750 μg 、至少1 mg、5 mg、10 mg、100 mg或1 g；或在5 μg 與100 μg 之間、在5 μg 與500 μg 之間、在5 μg 與1 mg之間、在5 μg 與10 mg之間、在500 μg 與100 mg之間、在500 μg 與1 g之間、在500 μg 與10 g之間、在100 mg與1 g之間、或在1 g與10 g之間）；(ii) 包括多核糖核苷酸群的樣本之總體積為至少500 μL （例如，至少1 mL、5 mL、10 mL、100 mL或1 L；或在500 μL 與100 mL之間、在500 μL 與1 L之間、在500 μL 與10 L之間、或在1 L與10 L之間）；或者 (iii) 樣本中多核糖核苷酸群之濃度為至少200 ng/ μL （例如，至少500 ng/ μL 、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL或50 mg/mL；或在200 ng/ μL 與100 mg/mL之間、在200 ng/ μL 與50 mg/mL之間，或在1 mg/mL與50 mg/mL之間）；和 (b) 在包括酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液的條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和/或量化linRNA群之步驟。

【0031】 在一方面，本揭露提供了一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將多核糖核苷酸群暴露於酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液中，從而富集circRNA群。還考慮了在上述條件下將circRNA群與linRNA群分離之方法，該方法視需要進一步包括量化circRNA群和

/或量化linRNA群之步驟。

【0032】 在一些實施方式中，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、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0033】 在一些實施方式中，鹼包括在1 mM與500 mM之間(例如，在2 mM至475 mM之間、在3 mM至450 mM之間、在4 mM至425 mM之間、在5 mM至400 mM之間、在10 mM至375 mM之間、在15 mM至350 mM之間、在20 mM至325 mM之間、在30 mM至300 mM之間、在40 mM至275 mM之間、在50 mM至250 mM之間、在60 mM至225 mM之間、在70 mM至200 mM之間、在80 mM至175 mM之間、在90 mM至150 mM之間、在100 mM至125 mM之間、或在110 mM至115 mM之間) 的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0034】 在一些實施方式中，有機溶劑包括至少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%與10%之間) 的二甲基亞砜、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0035】 在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM

與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或PEG。在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0036】 在一些實施方式中，攪擠劑包括在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的PEG或尿素。

【0037】 在一些實施方式中，螯合劑包括在1 mM與10 mM之間(例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM或9 mM-10 mM)的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

【0038】 在一些實施方式中，洗滌劑包括在0.005%與0.05% (v/v) 之間(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-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0039】 在一些實施方式中，步驟 (b) 包括對多核糖核苷酸群進行柱層析法，其中進行柱層析法包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。

【0040】 在一些實施方式中，分離在樣本載入步驟期間進行。在一些實施方式中，分離在柱洗滌步驟期間進行。在一些實施方式中，分離在洗脫步驟期間進行。

【0041】 在一些實施方式中，柱層析法包括快速蛋白液相層析法 (FPLC)、高壓液相層析法 (HPLC)、疏水相互作用層析法 (HIC)、陰離子交換層析法 (AEC)、混合模式層析法或親和層析法。

【0042】 在一些實施方式中，AEC包括使用陰離子交換樹脂，包括苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化矽、瓊脂糖凝膠、纖維素、葡聚糖、環氧多胺、甲基丙烯酸酯、瓊脂糖或丙烯酸。在一些實施方式中，陰離子交換樹脂包括離子交換劑，該離子交換劑包括四級銨、胺基乙基、二乙基胺基乙基或二乙基胺基丙基。在一些實施方式中，陰離子交換樹脂包括珠粒，其中珠粒具有45 μ m-165 μ m的珠粒直徑和直徑100 nm-1000 nm的孔徑。在一些實施方式中，AEC包括使用線性梯度洗脫或分步等度洗脫。在一些實施方式中，AEC包括使用在1 mL/min與150 mL/min之間的流速。

【0043】 在一些實施方式中，FPLC係逆相-FPLC (RP-FPLC)。

【0044】 在一些實施方式中，步驟 (b) 係藉由彙集純化的circRNA的多個級分來進行的。

【0045】 在一些實施方式中，circRNA和linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。在一些實施方式中，circRNA和linRNA具有相同的品質。在一些實施方式中，circRNA和linRNA缺少聚(A)尾。

【0046】 在一些實施方式中，該方法包括linRNA的核酸外切酶消化。在一些實施方式中，該方法不包括linRNA的核酸外切酶消化。在一些實施方式中，該方法不包括改善circRNA的富集的對circRNA或對linRNA的選擇性修飾。

【0047】 在一些實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係circRNA在多核糖核苷酸群中的百分比(w/w)的2倍。在一些實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)為至少65%(例如，至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)。在一些實施方式中，linRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)小於35%(例如，小於30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%)。

【0048】 在一些實施方式中，circRNA之長度為約100個核苷酸至約20,000個核苷酸(例如，約100個核苷酸至約500個核苷酸、約100個核苷酸至約750個核苷酸、約100個核苷酸至約1,000個核苷酸、約100個核苷酸至約2,500個核苷酸、約100個核苷酸至約5,000個核苷酸、約100個核苷酸至約10,000個核苷酸、約500個核苷酸至約750個核苷酸、約750個核苷酸至約1,000個核苷酸、約750個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約2,000個核苷酸、約1,000個核苷酸至約5,000個核苷酸、約2,500個核苷酸至約5,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約10,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約10,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約15,000個核苷酸至約20,000個核苷酸、約100個核苷酸、約200個核苷酸、約300個核苷酸、約400個核苷酸、約500個核苷酸、約600個核苷酸、約700個核苷酸、約800個核苷酸、約900個核苷酸、約1,000個核苷酸、約1,250個核苷酸、約1,500個核苷酸、約1,750個核苷酸、約2,000個核苷酸、約3,000個核苷酸、約4,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約6,000個核苷酸、約7,000個核苷酸、約8,000個核苷酸、約9,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約11,000個核苷酸、約12,000個核苷酸、約13,000個核苷酸、約14,000個

核苷酸、約15,000個核苷酸、約16,000個核苷酸、約17,000個核苷酸、約18,000個核苷酸、約19,000個核苷酸或約20,000個核苷酸)。在一些實施方式中，circRNA之長度小於1,000個核苷酸。

【0049】 在一方面，本揭露提供了包括多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中該多核糖核苷酸群處於變性條件下的溶液中，並且其中：(i) 多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的總品質為至少1 μg （例如，至少5 μg 、至少10 μg 、至少25 μg 、至少50 μg 、至少100 μg 、至少250 μg ，至少500 μg 、至少750 μg 、至少1 mg、5 mg、10 mg、100 mg或1 g；或在5 μg 與100 μg 之間、在5 μg 與500 μg 之間、在5 μg 與1 mg之間、在5 μg 與10 mg之間、在500 μg 與100 mg之間、在500 μg 與1 g之間、在500 μg 與10 g之間、在100 mg與1 g之間、或在1 g與10 g之間）；(ii) 包括多核糖核苷酸群的樣本之總體積為至少500 μL （例如，至少1 mL、5 mL、10 mL、100 mL或1 L；或在500 μL 與100 mL之間、在500 μL 與1 L之間、在500 μL 與10 L、或在1 L與10 L之間）；或者 (iii) 樣本中多核糖核苷酸群之濃度為至少500 ng/ μL （例如，至少500 ng/ μL 、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL或50 mg/mL；或在200 ng/ μL 與100 mg/mL、在200 ng/ μL 與50 mg/mL之間，或在1 mg/mL與50 mg/mL之間）。

【0050】 在一方面，本揭露提供了包括多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中該多核糖核苷酸群處於變性條件下的溶液中，並且其中，該溶液基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0051】 在一方面，本揭露提供了包括多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中：(a) 該組成物獲自包括核酸群的樣本；(b) 該組成物已暴露於一或多種變性條件；並且 (c) 該組成物基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0052】 在一方面，本揭露提供了包括circRNA富集群的組成物，其中：(a)

該組成物獲自包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；(b) 該組成物已暴露於一或多種變性條件；並且 (c) 該組成物基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0053】 在一些實施方式中，circRNA之長度為約100個核苷酸至約20,000個核苷酸（例如，約100個核苷酸至約500個核苷酸、約100個核苷酸至約750個核苷酸、約100個核苷酸至約1,000個核苷酸、約100個核苷酸至約2,500個核苷酸、約100個核苷酸至約5,000個核苷酸、約100個核苷酸至約10,000個核苷酸、約500個核苷酸至約750個核苷酸、約750個核苷酸至約1,000個核苷酸、約750個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約2,000個核苷酸、約1,000個核苷酸至約5,000個核苷酸、約2,500個核苷酸至約5,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約10,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約10,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約15,000個核苷酸至約20,000個核苷酸、約100個核苷酸、約200個核苷酸、約300個核苷酸、約400個核苷酸、約500個核苷酸、約600個核苷酸、約700個核苷酸、約800個核苷酸、約900個核苷酸、約1,000個核苷酸、約1,250個核苷酸、約1,500個核苷酸、約1,750個核苷酸、約2,000個核苷酸、約3,000個核苷酸、約4,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約6,000個核苷酸、約7,000個核苷酸、約8,000個核苷酸、約9,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約11,000個核苷酸、約12,000個核苷酸、約13,000個核苷酸、約14,000個核苷酸、約15,000個核苷酸、約16,000個核苷酸、約17,000個核苷酸、約18,000個核苷酸、約19,000個核苷酸或約20,000個核苷酸）。在一些實施方式中，circRNA之長度為1,000個核苷酸或更少。

【0054】 在一些實施方式中，一或多種雜質或副產物包括聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或EDTA。

【0055】 在一些實施方式中，變性條件包括至少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)的溫度。在一些實施方式中，變性條件包括在50°C與85°C之間的溫度。在一些實施方式中，變性條件包括至少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)的溫度，然後是不超過8°C(例如，不超過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)的溫度。

【0056】 在一些實施方式中，變性條件包括小於5(例如小於4、3、2或1)或大於9(例如大於10、11、12或13)的pH。

【0057】 在一些實施方式中，變性條件包括化學處理。在一些實施方式中，化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、攪攪劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0058】 在一些實施方式中，酸包括在1 mM與500 mM之間(例如，在2 mM至475 mM之間、在3 mM至450 mM之間、在4 mM至425 mM之間、在5 mM至400 mM之間、在10 mM至375 mM之間、在15 mM至350 mM之間、在20 mM至325 mM之間、在30 mM至300 mM之間、在40 mM至275 mM之間、在50 mM至250 mM之間、在60 mM至225 mM之間、在70 mM至200 mM之間、在80 mM至175 mM之間、在90 mM至150 mM之間、在100 mM至125 mM之間、或在110 mM至115 mM之間)的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0059】 在一些實施方式中，鹼包括在1 mM與500 mM之間(例如，在2 mM至475 mM之間、在3 mM至450 mM之間、在4 mM至425 mM之間、在5 mM至400 mM之間、在10 mM至375 mM之間、在15 mM至350 mM之間、在20 mM至325 mM之間、在30 mM至300 mM之間、在40 mM至275 mM之間、在50 mM至250 mM之

間、在60 mM至225 mM之間、在70 mM至200 mM之間、在80 mM至175 mM之間、在90 mM至150 mM之間、在100 mM至125 mM之間、或在110 mM至115 mM之間)的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0060】 在一些實施方式中，有機溶劑包括至少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%與10%之間)的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0061】 在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間 (例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或PEG。在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間 (例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0062】 在一些實施方式中，攪擠劑包括在100 mM與8 M之間 (例如，在

150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的PEG或尿素。

【0063】 在一些實施方式中，螯合劑包括在1 mM與10 mM之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM或9 mM-10 mM）的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

【0064】 在一些實施方式中，洗滌劑包括在0.005%與0.05% (v/v) 之間（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-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0065】 在一些實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 係circRNA在多核糖核苷酸群中的百分比 (w/w) 的2倍。在一些實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 為至少65%（例如，至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%）。在一些實施方式中，linRNA在circRNA富集群中的百分比 (w/w) 小於35%（例如，小於30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%）。

【0066】 在一些實施方式中，circRNA和linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。在一些實施方式中，circRNA和linRNA具有相同的品質。在一些實施方式中，circRNA和linRNA缺少聚(A)尾。

【0067】 在一方面，本揭露提供了一種確定circRNA的純度之方法，該方法

包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；(b) 在變性條件下藉由層析法分離circRNA與linRNA；和(c) 收集樣本的層析圖，包括circRNA的峰和linRNA的峰；(d) 計算每個峰下的面積以確定樣本中circRNA的純度。

【0068】 在一些實施方式中，變性條件不包括使用凝膠電泳。

【0069】 在一些實施方式中，變性條件包括至少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）的溫度。在一些實施方式中，變性條件包括在50°C與85°C之間的溫度。在一些實施方式中，變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C的溫度，然後是不超過8°C（例如，不超過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）的溫度。

【0070】 在一些實施方式中，變性條件包括小於5（例如小於4、3、2或1）或大於9（例如大於10、11、12或13）的pH。在一些實施方式中，變性條件包括小於5（例如小於4、3、2或1）的pH。在一些實施方式中，變性條件包括大於9（例如大於10、11、12或13）的pH。

【0071】 在一些實施方式中，變性條件包括化學處理。在一些實施方式中，化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0072】 在一些實施方式中，酸包括在1 mM與500 mM之間（例如，在2 mM至475 mM之間、在3 mM至450 mM之間、在4 mM至425 mM之間、在5 mM至400 mM之間、在10 mM至375 mM之間、在15 mM至350 mM之間、在20 mM至325 mM之間、在30 mM至300 mM之間、在40 mM至275 mM之間、在50 mM至250 mM之間、在60 mM至225 mM之間、在70 mM至200 mM之間、在80 mM至175 mM之

間、在90 mM至150 mM之間、在100 mM至125 mM之間、或在110 mM至115 mM之間)的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0073】 在一些實施方式中，鹼包括在1 mM與500 mM之間(例如，在2 mM至475 mM之間、在3 mM至450 mM之間、在4 mM至425 mM之間、在5 mM至400 mM之間、在10 mM至375 mM之間、在15 mM至350 mM之間、在20 mM至325 mM之間、在30 mM至300 mM之間、在40 mM至275 mM之間、在50 mM至250 mM之間、在60 mM至225 mM之間、在70 mM至200 mM之間、在80 mM至175 mM之間、在90 mM至150 mM之間、在100 mM至125 mM之間、或在110 mM至115 mM之間)的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0074】 在一些實施方式中，有機溶劑包括至少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%與10%之間)的二甲基亞砜、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0075】 在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或PEG。在一些實施方式中，離散劑包括在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在

200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0076】 在一些實施方式中，攪擠劑包括在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）的PEG或尿素。

【0077】 在一些實施方式中，螯合劑包括在1 mM與10 mM之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM或9 mM-10 mM）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）、亞胺基二琥珀酸（IDS）、聚天冬胺酸、*S,S*-乙二胺-*N,N'*-二琥珀酸（EDDS）或甲基甘胺酸二乙酸（MGDA）。

【0078】 在一些實施方式中，洗滌劑包括在0.005%與0.05%（v/v）之間（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-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0079】 在一些實施方式中，層析法包括液相層析法。在一些實施方式中，液相層析法選自由FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或親和層析法組成之群組。

【0080】 在一些實施方式中，純度的相對標準差（RSD）小於5%（例如小於4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%或0.5%）。

定義

【0081】 如本文所用，「一個/一種（a/an）」意指「至少一個/至少一種」或「一個/一種或多個/多種」，除非另有說明。此外，單數形式「一個/一種（a/an）」以及「該（該等）」包括複數個指示物，除非上下文中另外明確指明。

【0082】 如本文所用，「約」係指列舉值的 $\pm 10\%$ 的量。

【0083】 如本文所用，術語「載劑」係藉由對環狀多核糖核苷酸的共價修飾、經由部分或完全封裝劑或者它們的組合促進組成物（例如，環狀多核糖核苷酸）轉運或遞送到細胞中的化合物、組成物、試劑或分子。載劑之非限制性實例包括碳水化合物載劑（例如，酸酐修飾的植物糖原或糖原型材料）、奈米顆粒（例如，封裝或共價連接/結合到環狀多核糖核苷酸的奈米顆粒）、脂質體、融合體、離體分化的網狀紅血球、外泌體、蛋白質載劑（例如，共價連接到環狀多核糖核苷酸的蛋白質）或陽離子載劑（例如，陽離子脂質聚合物或轉染試劑）。

【0084】 如本文所用，術語「層析法」係指可用於從含有環狀多核糖核苷酸（circRNA）和線性多核糖核苷酸（linRNA）的多核糖核苷酸混合群中純化和富集circRNA群的各種層析方法。層析法包括柱層析法和非柱層析法，例如電泳方法，諸如毛細管凝膠電泳。層析法包括低壓或常壓液相層析法分離方法。這可包括FPLC（逆相（RP）-FPLC和正相（NP）-FPLC）、親和層析法、疏水相互作用層析法、陰離子交換層析法或混合模式層析法。

【0085】 如本文所用，術語「circRNA」、「環狀多核糖核苷酸」和「環狀RNA」可互換使用並且意指具有無游離端（即無游離3'或5'端）結構的多核糖核苷酸分子，例如通過共價鍵或非共價鍵形成環狀或無端結構的多核糖核苷酸分子。環狀多核糖核苷酸可為例如共價閉合的多核糖核苷酸。

【0086】如本文所用，術語「變性條件」係指破壞溶液中多核苷酸分子構型的任何條件或條件集，諸如物理或化學條件。變性條件下的多核苷酸可包括 **circRNA**、**linRNA**、線性多去氧核糖核苷酸 (**linDNA**) 或環狀多去氧核糖核苷酸 (**circDNA**)。變性條件係指互補鹼基對之間的氫鍵和其他非共價力 (例如范德華力或疏水相互作用) 被破壞的條件，從而減少或消除多核苷酸內與在生理條件下觀察到的結構相比有序的結構，諸如例如二級或三級聚合物結構 (例如，雙螺旋、莖環、堆積等)。變性條件可以減少、消除或重組一或多個多核苷酸的核酸殘基之間的分子內或分子間相互作用。變性條件也可以指聚合物內鄰近核酸單體之間的共價鍵被破壞的條件，諸如例如鄰近核苷之間的磷酸二酯鍵。不希望受理論的束縛，由於 **circRNA** 的環狀結構，**circRNA** 相對於 **linRNA** 能在樣本中選擇性富集，這限制了可能的構象範圍並使其不易變性，然而 **linRNA** 可能更靈活，並因此更易於藉由變性條件破壞二級和三級結構。變性條件可以在實驗環境中藉由操縱 **circRNA**、**linRNA**、**linDNA**、**circDNA** 或多肽所暴露的幾種條件之一來產生。變性條件之非限制性實例係例如熱變性、驟冷、酸性或鹼性 pH (例如，小於 pH 5 或大於 pH 9)，或化學處理 (例如，用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、螯合劑、擁擠劑、洗滌劑或鹽溶液)。

【0087】如本文所用，術語「洗脫物」係指在純化步驟 (例如，層析法步驟，例如，**RP-FPLC** 步驟) 期間從介質 (例如，疏水性固定相) 洗脫的含有分析物材料 (例如，**circRNA** 富集群) 的級分。可以藉由將洗脫液應用到介質來從介質中釋放洗脫物，從而釋放分析物。更具體地，洗脫物可以指在將洗脫液 (例如，洗脫緩衝劑，諸如含有機溶劑的緩衝劑) 應用到介質之後從介質中釋放的含有 **circRNA** 的級分。

【0088】如本文所用，術語「**linRNA**」和「線性多核糖核苷酸」可互換使用，並且係指具有 5' 和 3' 末端的多核糖核苷酸。在一些實施方式中，**linRNA** 具有

自由的5'末端或3'末端。在一些實施方式中，linRNA具有非共價連接的5'或3'末端。

【0089】如本文所用，術語「修飾的寡核苷酸」意指含有具有至少一個針對糖、核鹼基或核苷間鍵的修飾的核苷酸的寡核苷酸。

【0090】如本文所用，術語「修飾的核糖核苷酸」意指含有具有至少一個針對糖、核鹼基或核苷間鍵的修飾的核苷的核糖核苷酸。

【0091】如本文所用，術語「裸遞送」係用於遞送到細胞而無需載劑的幫助且無需對有助於遞送到細胞的部分的共價修飾的配製物。裸遞送配製物不含任何轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑或蛋白質載劑。例如，環狀多核糖核苷酸的裸遞送配製物係包括無共價修飾的環狀多核糖核苷酸並且不含載劑的配製物。

【0092】如本文所用的術語「多核苷酸」意指包括一或多個核酸亞基或核苷酸的分子，並且可以與「核酸」或「寡核苷酸」互換使用。多核苷酸可以包括一或多個選自腺苷（A）、胞嘧啶（C）、鳥嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）和尿嘧啶（U）或它們的變體的核苷酸。核苷酸可以包括核苷和至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個磷酸（PO₃）基團。核苷酸可以包括核鹼基、五碳糖（核糖或去氧核糖）以及一或多個磷酸基團。核糖核苷酸係其中糖為核糖的核苷酸。多核糖核苷酸、核糖核酸或RNA可以指包括經由磷酸二酯鍵聚合的多個核糖核苷酸的大分子。去氧核糖核苷酸係其中糖係去氧核糖的核苷酸。

【0093】如本文所用，短語「多核糖核苷酸混合群」係指多核糖核苷酸的異源群。此類多核糖核苷酸的異源群含有circRNA、linRNA和視需要的一或多種雜質或副產物（例如，本文所述之一或多種雜質或副產物）。

【0094】如本文所用，「多肽」意指最常藉由肽鍵連接在一起的胺基酸殘基（天然或非天然）的聚合物。如本文所用，該術語係指任何大小、結構或功能的蛋白質、多肽和肽。多肽可以包括基因產物、天然存在的多肽、合成的多肽、

同源物、直系同源物、同種同源物、片段以及前述物質的其他等同物、變體和類似物。多肽可為單分子或多分子複合物，如二聚體、三聚體或四聚體。它們還可以包括單鏈或多鏈多肽（如抗體或胰島素），並且可為締合的或連接的。最常見的二硫鍵存在於多鏈多肽中。術語多肽也可以應用於其中一或多個胺基酸殘基係對應的天然存在的胺基酸的人工化學類似物的胺基酸聚合物。

【0095】如本文可互換使用，術語「polyA」和「polyA序列」係指核酸分子之長度為至少5個核苷酸並且由腺苷殘基組成的非翻譯連續區域。在一些實施方式中，polyA序列之長度為至少10個、至少15個、至少20個、至少30個、至少40個或至少50個核苷酸。在一些實施方式中，polyA序列位於開讀框（例如編碼多肽的開讀框）的3'（例如下游），並且polyA序列位於終止元件（例如終止密碼子）的3'，使得polyA不被翻譯。在一些實施方式中，polyA序列位於終止元件和3'非翻譯區的3'。

【0096】如本文所用，術語「純化（purify/purifying/purification）」係指從含有異源混合物circRNA和linRNA等其它物質的樣本中去除雜質或副產物（例如linRNA）以產生含有circRNA富集群的組成物的一或多個步驟或過程，與原始混合物相比，該組成物的雜質或副產物（例如，linRNA）水平減少，或其中相對於起始混合物，linRNA或物質已減少按品質計40%或更多（例如，50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%或99%或更多）。

【0097】如本文所用，術語「純」和「純度」係指分析物（例如，circRNA）已被分離並且不含其他組分的程度。在核酸（例如，多核糖核苷酸）的背景下，分離的核酸（例如，circRNA）的純度可以相對於沒有任何污染物（例如，linRNA和其他物質）的核酸群來表現。例如，circRNA群的純度表示該群中有多少係circRNA（按分離材料的總品質計），這可以使用例如純circRNA作為參考來確定。在本揭露中發現的純度水平可為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)、大於95% (w/w) 或大於99% (w/w)。本揭露之「純」circRNA群的純度按品質計可以大於20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或高達70%。

「基本上純」的circRNA群可以基本上不含污染物或雜質或副產物（例如，linRNA），例如純度按品質計大於70%、75%、80%、85%、90%、95%或>99%。在一些實施方式中，污染物或雜質或副產物的水平不超過約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)。純度可以使用凝膠電泳、分光光度法（例如，賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）的NanoDrop）或其他適用於測量核酸群的純度的技術藉由檢測具體分析物（例如，circRNA）的水平並計算分析物 (w/w) 相對於總核酸含量（例如，如藉由本領域已知的測定確定）的百分比來確定。

【0098】如本文所用，短語「基本上不含一或多種雜質或副產物」係指樣本的性質，諸如含有circRNA富集群的樣本，該樣本不含一或多種雜質或副產物（例如，本文揭露的一或多種雜質或副產物）或含有最少量的一或多種雜質或副產物。一或多種雜質或副產物的最少量可以不超過20% (w/w)（例如，不超過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）。在另一個實例中，如果一或多種雜質或副產物以小於15% (w/w)（例如，不超過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，則樣本或circRNA富集群基本上不含該一或多種雜質或副產物。在另一個實例中，如果一或多種雜質或副產物以小於10% (w/w) (例如，不超過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，則樣本或circRNA富集群基本上不含該一或多種雜質或副產物。在另一個實例中，如果一或多種雜質或副產物以小於5% (w/w) (例如，不超過4% (w/w)、3% (w/w)、2% (w/w)、1% (w/w) 或更少) 的量存在，則樣本或circRNA富集群基本上不含該一或多種雜質或副產物。在又一個實例中，如果一或多種雜質或副產物以小於1% (w/w) (例如，不超過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，則樣本或circRNA富集群基本上不含該一或多種雜質或副產物。

【0099】如本文所用，「終止元件」係終止環狀或線性多核糖核苷酸中表現序列的翻譯的部分，諸如核酸序列。

【0100】如本文所用，「翻譯起始序列」係起始環狀或線性多核糖核苷酸中表現序列的翻譯的核酸序列。

【0101】如本文所用，術語「產率」係指在純化步驟或過程之後獲得的分析物 (例如，circRNA群) 與起始材料 (例如，多核糖核苷酸混合群，諸如例如circRNA和linRNA) 中分析物的量相比的相對量 (w/w)。產率可以表示為百分比。在本揭露之上下文中，可以使用測定 (例如，凝膠電泳或分光光度法) 測量起始材料和純化步驟後獲得的分析物中的分析物 (例如，circRNA) 的量。相對於例如多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群中存在的量，本揭露之方法可用於產生約20% (w/w) 或更高的circRNA富集群的產率。例如，該方法可用於產生約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) 或更高的純化circRNA的產率。

【0102】從以下實施方式、附圖以及請求項中，本發明之其他特徵和優點將會係顯而易見的。

【圖式簡單說明】

【0103】[圖1]顯示了在沒有尿素的情況下使用5 mL DEAE Sepharose弱AEX柱純化circRNA的層析圖結果。

【0104】[圖2]顯示了在5 mL DEAE Sepharose弱AEX柱上以尿素（離液鹽）作為變性條件純化circRNA的層析圖結果。

【0105】[圖3]顯示了在8mL DEAE弱AEX整體柱上以尿素（離液鹽）作為變性條件純化circRNA的層析圖結果。

【0106】[圖4]顯示了在8 mL QA強AEX整體柱上以尿素（離液鹽）作為變性條件純化15 mg circRNA的層析圖結果。

【0107】[圖5]顯示了在8 mL PrimaS整體柱上使用尿素（離液鹽）和pH作為變性條件純化7 mg circRNA的層析圖結果。

【0108】[圖6]顯示了使用1 mL HIC整體柱在高鹽和尿素變性條件下純化circRNA後的層析圖結果。

【0109】[圖7]顯示了使用1 mL HIC整體柱在高鹽和尿素變性條件下純化circRNA後的凝膠電泳結果。

【0110】[圖8]顯示了使用溫度、離散劑和有機溶劑變性條件分離後circRNA和linRNA分離的示例性層析圖結果。

【0111】[圖9]顯示了使用溫度、離散劑和有機溶劑變性條件分離circRNA

和linRNA後的HPLC分析結果。

【0112】 [圖10]顯示了使用溫度、離散劑和有機溶劑變性條件分離circRNA和linRNA後的HPLC分析結果。

【0113】 [圖11]顯示了在溫度和離散劑條件下純化circRNA後的示例性層析圖結果。

【0114】 [圖12]顯示了在溫度和離散劑條件下純化circRNA後的示例性凝膠電泳結果。

【0115】 [圖13]顯示了在高溫和有機溶劑變性條件下純化circRNA後的示例性層析圖結果。

【0116】 [圖14]顯示了兩次注水後circRNA的示例性層析圖。

【0117】 [圖15]顯示了空白注射的示例性層析圖。

【0118】 [圖16]顯示了具有分離峰的circRNA和linRNA標準品的示例性層析圖。

【實施方式】

【0119】 本文揭露了從含有環狀多核糖核苷酸(circRNA)和線性多核糖核苷酸(linRNA)的多核糖核苷酸異源群中純化和富集circRNA之方法，並且純化和富集在變性條件下進行。還揭露了組成物，該等組成物包括在變性條件下的溶液中含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸群，諸如例如，諸如基本上不含一或多種雜質或副產物的溶液。進一步在本揭露之範圍內的是含有circRNA富集群的組成物，諸如藉由將該組成物暴露於一或多種變性條件而產生的組成物。本揭露部分地基於本發明人的以下發現：在變性條件（例如，熱變性、pH或化學處理）下分離circRNA係用於從含有circRNA、linRNA或其他雜質或副產物的混合多核

糖核苷酸群中純化和富集circRNA之穩健方法，從而相對於其他方法提高純化和回收circRNA的產率。此外，所揭露的方法有助於放大circRNA純化過程，從而允許生產和純化大量的circRNA。

環狀多核糖核苷酸的純化

【0120】本揭露之特徵在於從含有多核糖核苷酸異源群（含有circRNA和linRNA）的樣本中純化和富集circRNA之方法，其中純化在本文揭露的變性條件下進行。在本揭露之上下文中，純化係指從含有多核糖核苷酸混合群（例如，linRNA和circRNA）以及不需要的雜質或副產物（例如，本文所述之雜質或副產物）的樣本中分離和富集靶多核糖核苷酸群（例如，circRNA）。因此，純化後，與在獲得circRNA純化群的樣本中相比，circRNA以增加的占總多核糖核苷酸的百分比（w/w）或較高的濃度存在。樣本中不需要的雜質或副產物可能是linRNA、聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或乙二胺四乙酸（EDTA）或它們的任何組合。所揭露的方法從多核糖核苷酸混合群中純化和富集circRNA，使得circRNA在circRNA富集群中的純度較佳地盡可能接近100%。該方法可用於製備純度範圍為約5%至約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%、大於95%（諸如97%或99%）、或大於99%）的circRNA富集群。在一些實施方式中，circRNA富集群的純度被測量為富集群的circRNA的量（例如，百分比量）相對於該富集群中linRNA或一或多種雜質或副產物的百分比量之百分比。例如，純度為95%的circRNA富集群含有95%的circRNA和5%的linRNA或一或多種雜質或副產物。

【0121】此外，相對於多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群中存在的量，該方法可用於產生約20%（w/w）或更高的circRNA富集群的產率。例如，相對於富集群中多核糖核苷酸的總數量，該方法可用於產生含有約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) 或更高的量之circRNA的circRNA富集群的產率。替代性地，相對於含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸的混合群，circRNA富集群可以含有約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) 或更高的量之circRNA。此外，相對於富集群中多核苷酸（例如，RNA或DNA）的總數量或多核糖核苷酸混合群中多核苷酸的總數量，circRNA富集群可以含有約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) 或更高的量之circRNA。

【0122】 目前揭露的純化方法可用於circRNA的製備純化方法，但是所揭露的方法也有利於circRNA的分析純化。製備純化涉及相對大量RNA的純化。例如，製備純化可用於純化至少0.5 mg（例如，至少0.6 mg、0.8 mg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1000 mg或更多）的RNA量。這種方法的好處係能夠純化比使用其他適用於小規模純化的方法（例如，瓊脂糖凝膠電泳）可以純化的量更大量的circRNA。

變性條件

【0123】 不希望受理論的束縛，本揭露部分地基於本發明人的以下令人驚訝的發現：可以在變性條件下進行circRNA的純化。在本揭露之上下文中，變性條件係指互補鹼基對之間的氫鍵和其他非共價力（例如范德華力或疏水相互作用）被破壞的條件，從而減少或消除多核苷酸內與在生理條件下觀察到的結構相

比有序的結構，諸如例如二級或三級聚合物結構（例如，雙螺旋、莖環、堆積等）。變性條件還指聚合物內鄰近核酸單體之間的共價鍵被破壞的條件，諸如例如鄰近核苷之間的磷酸二酯鍵。此外，變性條件可以改善從linRNA以及其他雜質或副產物中富集或分離circRNA。此類方法特別適用於以高通量放大或擴展本領域已知的RNA純化方法。因此，本揭露提供了多種變性條件，該變性條件可用於使用多種純化方法（例如本文揭露的那些）來處理含有多核糖核苷酸混合群的樣本。

熱變性

【0124】 本文揭露的方法涵蓋使用高溫、低溫或可變溫度條件從含有例如circRNA、linRNA和各種其他雜質或副產物（例如鹽、鎂、尿素、硼酸等）的多核糖核苷酸混合群富集circRNA。例如，熱變性可以在高溫條件下進行，諸如例如至少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或更高的溫度。在一個實例中，熱變性在至少50°C的溫度下進行。在另一個實例中，熱變性在至少50°C但不大於85°C的溫度下進行。在該等溫度條件下的熱變性可以進行足以例如藉由破壞多核苷酸內的分子內氫鍵使多核苷酸（例如，circRNA和linRNA等）變性的時間段。例如，熱變性可以在上述溫度下進行至少1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘、11分鐘、12分鐘、13分鐘、14分鐘、15分鐘、16分鐘、17分鐘、18分鐘、19分鐘、20分鐘、21分鐘、22分鐘、23分鐘、24分鐘、25分鐘、26分鐘、27分鐘、28分鐘、29分鐘、30分鐘、31分鐘、32分鐘、33分鐘、34分鐘、35分鐘、36分鐘、37分鐘、38分鐘、39分鐘、40分鐘、41分鐘、42分鐘、43分鐘、44分鐘、45分鐘、46分鐘、47分鐘、48分鐘、49分鐘、50分鐘或更長的時間段。暴露於熱變性條件可為連續的或不連續的（例如，暴露於高溫條件10分鐘，該10分鐘分為由時間間歇隔開的兩個5分鐘時段，該時間間歇例如

為30秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘或更長）。

【0125】熱變性也可以在可變溫度條件下進行。例如，可以藉由首先將樣本暴露於高溫條件（例如，例如上述高溫條件）持續至少1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘、11分鐘、12分鐘、13分鐘、14分鐘、15分鐘、16分鐘、17分鐘、18分鐘、19分鐘、20分鐘或更長的時間段，然後立即暴露於低溫條件來對含有包括circRNA和linRNA的多核糖核苷酸的異源混合物的樣本進行驟冷。低溫條件可包括不超過8°C（例如，不超過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）的溫度。通常，進行激冷使得高溫條件和低溫條件之間的時間間歇很短。相應地，樣本暴露於高溫條件與暴露於低溫條件之間的時間段一般不超過1分鐘、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。樣本暴露於低溫條件的時間段可為至少10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘、11分鐘、12分鐘、13分鐘、14分鐘、15分鐘、16分鐘、17分鐘、18分鐘、19分鐘、20分鐘或更長。

【0126】可以在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行上述熱變性方案。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行熱變性。此外，熱變性可以與樣本的層析純化並行（即，在層析純化期間）進行。例如，可以將樣本載入到層析柱中之前在足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的高溫下預溫育樣本或流動相。在另一個實例中，層析分離期間的熱變性可以藉由在用於純化的柱周圍放置夾套或套筒來進行，以達到足以使linRNA而非circRNA

變性的所需溫度條件。因此，樣本內linRNA的熱變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行熱變性。

pH變性

【0127】根據所揭露之方法，藉由將樣本暴露於變性pH條件，從含有包括circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性純化和富集circRNA。示例性pH條件包括酸性條件（例如，pH低於7）或鹼性條件（pH高於7），這會導致多核糖核苷酸的核苷酸內可電離基團的電離，從而導致二級結構丟失和linRNA而不是circRNA的選擇性變性。例如，合適的pH變性條件包括小於5（例如，小於4.5、4.0、3.5、3.0或更低的pH）或大於9（例如，大於9.5、10、10.5、11或更高的pH）的pH。

【0128】在一個實例中，pH變性在4.9的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.8的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.7的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.6的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.5的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.4的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.3的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.2的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.1的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在4.0的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.9的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.8的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.8的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.7的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.6的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.5的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.4的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.3的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.2的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在3.1的pH下進行。在又一個實例中，pH變性在3.0的pH下進行。

【0129】在又一個實例中，pH變性在9.1的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.2的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.3的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.4的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.5的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.6的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.7的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.8的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在9.9的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.1的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.2的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.3的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.4的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.5的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.6的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.7的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在10.8的pH下進行。在又一個實例中，pH變性在10.9的pH下進行。在另一個實例中，pH變性在11的pH下進行。

【0130】上述pH變性方案可在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行pH變性。此外，pH變性可以與樣本的層析純化並行（即，在層析純化期間）進行。例如，可以選擇或調節層析柱中使用的樣本緩衝劑（例如，載入緩衝劑）以具有足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的pH。因此，樣本內linRNA的pH變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行pH變性。

化學變性

【0131】本揭露涵蓋的另一種用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的方法係藉由化學處理進行的變性。在本揭露之上下文中，藉由化學處理進行的變性涵蓋用一或多種變性酸、鹼、有機溶劑、離散劑、螯合劑、擁擠劑、

洗滌劑或鹽溶液進行處理。

酸變性劑

【0132】基於酸性溶液可以使RNA分子內的可電離基團質子化，酸變性是使本文揭露的純化方法變性的合適方法。適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化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、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。在一些實施方式中，適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的酸包括在1 mM與500 mM之間 (例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0133】在一個實例中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有至少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)的乙酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的乙酸的溶液來進行的。

【0134】在另一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的鹽酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的鹽酸的溶液來進行的。

【0135】在另一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的水楊酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的水楊酸的溶液來進行的。

【0136】 在另一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的磷酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的磷酸的溶液來進行的。

【0137】 在另一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的硼酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的硼酸的溶液來進行的。

【0138】 在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的甲酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的甲酸的溶液來進行的。

【0139】 在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的草酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的草酸的溶液來進行的。

【0140】在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的檸檬酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的檸檬酸的溶液來進行的。

【0141】在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的苯甲酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的苯甲酸的溶液來進行的。

【0142】 在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的一氯乙酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的一氯乙酸的溶液來進行的。

【0143】 在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的二氯乙酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的二氯乙酸的溶液來進行的。

【0144】在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的三氯乙酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的三氯乙酸的溶液來進行的。

【0145】在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的抗壞血酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的抗壞血酸的溶液來進行的。

【0146】在又一個實例中，酸變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的硝酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的硝酸的溶液來進行的。

【0147】可以將樣本暴露於酸性變性條件持續足以使多核糖核苷酸(例如，linRNA或circRNA等)變性的時間。例如，將樣本暴露於酸性變性條件的時間可以持續大於30秒、45秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7

分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘或更長的時間。

【0148】上述酸性變性方案可以在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行酸性變性。此外，酸性變性可以與樣本的層析純化並行（即，在層析純化期間）進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑（例如載入緩衝劑）可以包括濃度足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述酸。因此，樣本內linRNA的酸性變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行酸性變性。

鹼性變性劑

【0149】基於鹼性溶液可以使RNA分子內的可電離基團去質子化，鹼性變性是使本文揭露的純化方法變性的合適方法。適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的鹼性條件包括含有至少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）的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉或胍的溶液。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間（例如 2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100

mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉或胍的溶液來進行的。

【0150】 在一個實例中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有至少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)的氫氧化鈉的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的氫氧化鈉的溶液來進行的。

【0151】 在另一個實例中，鹼性變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的氫氧化鉀的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-

475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM) 的氫氧化鉀的溶液來進行的。

【0152】 在另一個實例中，鹼性變性係藉由將樣本暴露於含有至少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) 的咪唑的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間 (例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM) 的咪唑的溶液來進行的。

【0153】 在另一個實例中，鹼性變性係藉由將樣本暴露於含有至少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) 的組胺酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間 (例如，2 mM-475

mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的組胺酸的溶液來進行的。

【0154】在另一個實例中，鹼性變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的碳酸氫鈉的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的碳酸氫鈉的溶液來進行的。

【0155】在又一個實例中，鹼性變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的胍的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、

3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的胍的溶液來進行的。

【0156】在又一個實例中，鹼性變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的三乙胺的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在1 mM與500 mM之間(例如，2 mM-475 mM、3 mM-450 mM、4 mM-425 mM、5 mM-400 mM、10 mM-375 mM、15 mM-350 mM、20 mM-325 mM、30 mM-300 mM、40 mM-275 mM、50 mM-250 mM、60 mM-225 mM、70 mM-200 mM、80 mM-175 mM、90 mM-150 mM、100 mM-125 mM、或110 mM-115 mM)的三乙胺的溶液來進行的。

【0157】可以將樣本暴露於鹼性變性條件持續足以使多核糖核苷酸(例如，circRNA和linRNA等)變性的時間。例如，將樣本暴露於鹼性變性條件的時間可以持續大於30秒、45秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘或更長的時間。

【0158】上述鹼性變性方案可以在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行鹼性變性。此外，鹼性變性可以與樣本的層析純化並行(即，在層析純化期間)進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑(例如載入緩衝劑)可以包括濃度足以使樣本的多核

糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述鹼。因此，樣本內linRNA的鹼性變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行鹼性變性。

有機溶劑

【0159】 有機溶劑可用作適合與所揭露的方法結合使用的變性劑。適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的有機溶劑包括至少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) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0160】 在一個實例中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有至少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) 的二甲基亞砷的溶液來進行的。

【0161】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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) 的三乙基乙酸銨的溶液來進行的。

【0162】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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) 的甲醇的溶液來進行的。

【0163】 在另一個實例中，鹼性變性係藉由將樣本暴露於含有至少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) 的乙醇的溶液來進行的。

【0164】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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-丙醇的溶液來進行的。

【0165】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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) 的異丙醇的溶液來進行的。

【0166】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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、三級丁醇或異丁醇)的溶液來進行的。

【0167】在另一個實例中,變性係藉由將樣本暴露於含有至少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-丁醇的溶液來進行的。

【0168】在另一個實例中,變性係藉由將樣本暴露於含有至少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-丁醇的溶液來進行的。

【0169】在另一個實例中,變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的三級丁醇的溶液來進行的。

【0170】在另一個實例中,變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的異丁醇的溶液來進行的。

【0171】在另一個實例中,變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的苯酚的溶液來進行的。

【0172】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的氯仿的溶液來進行的。

【0173】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的己烷的溶液來進行的。

【0174】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的乙腈的溶液來進行的。

【0175】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的甲醯胺的溶液來進行的。

【0176】在又一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的丙二醇的溶液來進行的。

【0177】 可以將樣本暴露於變性溶劑持續足以使多核苷酸(例如，circRNA和linRNA等)變性的時間。例如，將樣本暴露於鹼性變性條件的時間可以持續大於30秒、45秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘或更長的時間。

【0178】 上述變性方案可在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行變性。此外，變性可以與樣本的層析純化並行(即，在層析純化期間)進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑(例如載入緩衝劑)可以包括濃度足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述有機溶劑。因此，樣本內linRNA的變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行變性。

離散劑

【0179】 離散劑(例如，離液鹽)可用作適合與所揭露的方法結合使用的變性劑。適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的離散劑(例如，離液鹽)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、過氯酸鋰或聚乙二醇(PEG)。在一些實施方式中，適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多

核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的離散劑包括在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或PEG。

【0180】 在一個實例中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有至少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）的氯化胍的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）的尿素的溶液來進行的。

【0181】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的過氯酸鋰的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的過氯酸鋰的溶液來進行的。

【0182】 在另一個實例中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有小於1%(例如，小於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-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的去氧膽酸鹽的溶液來進行的。

【0183】 在一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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-麥芽糖苷的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的 β -d-麥芽糖苷的溶液來進行的。

【0184】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間(例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的正辛基葡萄糖苷的溶液來進行的。

【0185】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）的CHAPS的溶液來進行的。

【0186】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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)的去氧膽酸鹽的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350 mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間）的去氧膽酸鹽的溶液來進行的。

【0187】可以將樣本暴露於變性離散劑持續足以使多核苷酸（例如，circRNA和linRNA等）變性的時間。例如，將樣本暴露於鹼性變性條件可以持續

大於30秒、45秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘、11分鐘、12分鐘、13分鐘、14分鐘、15分鐘、16分鐘、17分鐘、18分鐘、19分鐘、20分鐘或更長的時間。

【0188】 上述變性方案可在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行利用離散劑的變性。此外，使用離散劑進行的變性可以與樣本的層析純化並行（即，在層析純化期間）進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑（例如載入緩衝劑）可以包括濃度足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述離散劑。因此，樣本內linRNA的變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行利用離散劑的變性。

擁擠劑

【0189】 基於擁擠劑可使溶液擁擠使得其他分子之間不會產生氫鍵，擁擠劑可用作適合與所揭露的方法結合使用的變性劑。適用於從含有包括linRNA、circRNA以及視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的擁擠劑包括PEG和尿素。

【0190】 在一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有至少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的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與8 M之間（例如，在150 mM與7.5 M之間、在200 mM與7 M之間、在250 mM與6.5 M之間、在300 mM與6 M之間、在350

mM與5.5 M之間、在400 mM與5 M之間、在450 mM與4.5 M之間、在500 mM與4 M之間、在600 mM與3.5 M之間、在700 mM與3 M之間、在800 mM與2.5 M之間、在900 mM與2 M之間、在1 M與1.5 M之間、在1.1 M與1.4 M之間、或在1.2 M與1.3 M之間)的PEG的溶液來進行的。

【0191】 PEG係指通式 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_n$ 的基團，其中 n 為整數，例如PEG₂-PEG₁₀₀。在一些實施方式中，PEG的分子量為200 Da至6000 Da（例如，400 Da至2500 Da、800 Da至2200 Da、1000 Da至2000 Da、200 Da、400 Da、600 Da、800 Da、1000 Da、1200 Da、1500 Da、2000 Da、2200 Da、2500 Da、3000 Da、3500 Da、4000 Da、4500 Da、5000 Da、5500 Da、或6000 Da）。

【0192】 上述變性方案可在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行利用擁擠劑的變性。此外，使用擁擠劑進行的變性可以與樣本的層析純化並行（即，在層析純化期間）進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑（例如載入緩衝劑）可以包括濃度足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述擁擠劑。因此，樣本內linRNA的變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行利用擁擠劑的變性。

螯合劑

【0193】 基於螯合劑可以螯合（即結合）金屬離子（例如， Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 和 K^+ 等），從而結合並穩定RNA分子（例如，linRNA）內的RNA二級和三級結構，螯合劑可以用作適合與所揭露的方法結合使用的變性劑。適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的螯合劑包括乙二醇-雙(β -胺基乙基醚)- 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、

次氨基三乙酸 (NTA)、亞胺基二琥珀酸 (IDS)、聚天冬胺酸、*S,S*-乙二胺-*N,N'*-二琥珀酸 (EDDS) 或甲基甘胺酸二乙酸 (MGDA)。在一些實施方式中，linRNA 而非 circRNA 的選擇性變性係藉由將含有包括 linRNA、circRNA 和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在 1 mM 與 10 mM 之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM、或 9 mM-10 mM）的 EGTA 或其衍生物、EDTA 或其衍生物、NTA、IDS、EDDS 或 MGDA 的溶液來進行的。

【0194】 在一個實例中，linRNA 而非 circRNA 的選擇性變性係藉由將含有包括 linRNA、circRNA 和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有 EGTA 或其衍生物的溶液來進行的。在一些實施方式中，該溶液含有在 1 mM 與 10 mM 之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM、或 9 mM-10 mM）的 EGTA 或其衍生物。

【0195】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有 EDTA 或其衍生物的溶液來進行的。在一些實施方式中，該溶液含有在 1 mM 與 10 mM 之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM、或 9 mM-10 mM）的 EDTA 或其衍生物。

【0196】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有 NTA 的溶液來進行的。在一些實施方式中，該溶液含有在 1 mM 與 10 mM 之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM、或 9 mM-10 mM）的 NTA。

【0197】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有 IDS 的溶液來進行的。在一些實施方式中，該溶液含有在 1 mM 與 10 mM 之間（例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8

mM、8 mM-9 mM、或9 mM-10 mM) 的IDS。

【0198】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有聚天冬胺酸的溶液來進行的。在一些實施方式中，該溶液含有在1 mM與10 mM之間(例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM、或9 mM-10 mM) 的聚天冬胺酸。

【0199】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有EDDS的溶液來進行的。在一些實施方式中，該溶液含有在1 mM與10 mM之間(例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM、或9 mM-10 mM) 的EDDS。

【0200】 在又一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有MGDA的溶液來進行的。在一些實施方式中，該溶液含有在1 mM與10 mM之間(例如，1 mM-2 mM、2 mM-3 mM、3 mM-4 mM、4 mM-5 mM、5 mM-6 mM、6 mM-7 mM、7 mM-8 mM、8 mM-9 mM、或9 mM-10 mM) 的MGDA。

【0201】 可以將樣本暴露於變性螯合劑持續足以使多核苷酸(例如，circRNA和linRNA等)變性的時間。例如，將樣本暴露於變性螯合劑可以持續大於30秒、45秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘、11分鐘、12分鐘、13分鐘、14分鐘、15分鐘、16分鐘、17分鐘、18分鐘、19分鐘、20分鐘或更長的時間。

【0202】 上述變性方案可在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行利用螯合劑的變性。此外，使用螯合劑進行的變性可以與樣本的層析純化並行(即，在層析純化期間)進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑(例如載入緩衝劑)可以包括濃度足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述螯合劑。因此，樣本內linRNA的變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步

驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行利用螯合劑的變性。

洗滌劑

【0203】洗滌劑可用作適合與所揭露的方法結合使用的變性劑。適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的洗滌劑包括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-麥芽糖苷。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由暴露含有包括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-麥芽糖苷的多核糖核苷酸混合群的樣本來進行的。

【0204】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有NP40的溶液來進行的。在一些實施方式中，變性係藉由將樣本暴露於含有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的溶液來進行的。

【0205】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有Tween-20的溶液來進行的。在一些實施方式中，變性係藉由將樣本暴露於含有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的溶液來進行的。

【0206】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有Tween-80的溶液來進行的。在一些實施方式中，變性係藉由將樣本暴露於含有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的溶液來進行的。

【0207】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有CHAPS的溶液來進行的。在一些實施方式中，變性係藉由將樣本暴露於含有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的溶液來進行的。

【0208】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有辛基 β -D-哌喃葡萄糖苷的溶液來進行的。在一些實施方式中，變性係藉由將樣本暴露於含有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-哌喃葡萄糖苷的溶液來進行的。

【0209】在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有正十二烷基 β -d-麥芽糖苷的溶液來進行的。在一些實施方式中，變性係藉由將樣本暴露於含有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-麥芽糖苷的溶液來進行的。

【0210】可以將樣本暴露於變性洗滌劑持續足以使多核苷酸（例如，circRNA和linRNA等）變性的時間。例如，將樣本暴露於變性洗滌劑可以持續大於30秒、45秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘、11分鐘、12分鐘、13分鐘、14分鐘、15分鐘、16分鐘、17分鐘、

18分鐘、19分鐘、20分鐘或更長的時間。

【0211】 上述變性方案可在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行利用洗滌劑的變性。此外，利用洗滌劑的變性可以與樣本的層析純化並行（即，在層析純化期間）進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑（例如載入緩衝劑）可以包括濃度足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述洗滌劑。因此，樣本內linRNA的變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行利用洗滌劑的變性。

鹽溶液

【0212】 核酸聚合物的二級結構形成高度依賴於鹽濃度，鹽濃度決定了多核苷酸內鹼基配對和氫鍵形成的自由能。因此，如本文所述，使用鹽溶液係變性純化多核糖核苷酸的合適方法。適用於從含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本中選擇性富集和純化circRNA的洗滌劑包括含有例如氯化鈉(NaCl)、氯化鉀(KCl)、氯化鎂(MgCl)、氯化鈣(CaCl)、CsSO₄、NaSO₄、氯化鋰(LiCl)、溴化鋰(LiBr)以及本領域已知的其他鹽溶液。在一些實施方式中，鹽溶液含有在100 mM與1 M之間（例如，150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM）的NaCl、KCl、MgCl、CaCl、CsSO₄、NaSO₄、LiCl或LiBr。

【0213】 在一個實例中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有NaCl的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種

雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間（例如，150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM）的NaCl的溶液來進行的。

【0214】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有KCl的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間（例如，150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM）的KCl的溶液來進行的。

【0215】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有MgCl的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間（例如，150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM）的MgCl的溶液來進行的。

【0216】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有CaCl的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間（例如，150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM）的CaCl的溶液來進行的。

【0217】 在另一個實例中，變性係藉由將樣本暴露於含有CsSO₄的溶液來進行的。在一些實施方式中，linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包

括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間(例如, 150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM)的CsSO₄的溶液來進行的。

【0218】在另一個實例中, 變性係藉由將樣本暴露於含有NaSO₄的溶液來進行的。在一些實施方式中, linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間(例如, 150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM)的NaSO₄的溶液來進行的。

【0219】在另一個實例中, 變性係藉由將樣本暴露於含有LiCl的溶液來進行的。在一些實施方式中, linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間(例如, 150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM)的LiCl的溶液來進行的。

【0220】在另一個實例中, 變性係藉由將樣本暴露於含有LiBr的溶液來進行的。在一些實施方式中, linRNA而非circRNA的選擇性變性係藉由將含有包括linRNA、circRNA和視需要的一或多種雜質或副產物的多核糖核苷酸混合群的樣本暴露於含有在100 mM與1 M之間(例如, 150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM)的LiBr的溶液來進行的。

【0221】可以將樣本暴露於變性鹽溶液持續足以使多核苷酸(例如, circRNA和linRNA等)變性的時間。例如, 將樣本暴露於變性鹽溶液可以持續大

於30秒、45秒、1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、6分鐘、7分鐘、8分鐘、9分鐘、10分鐘、11分鐘、12分鐘、13分鐘、14分鐘、15分鐘、16分鐘、17分鐘、18分鐘、19分鐘、20分鐘或更長的時間。

【0222】 上述變性方案可在本文揭露的層析分離方法之前對樣本進行。替代性地，可在使用所揭露的方法進行層析分離後對樣本進行利用鹽溶液的變性。此外，利用鹽溶液的變性可以與樣本的層析純化並行（即，在層析純化期間）進行。例如，層析柱中使用的樣本緩衝劑（例如載入緩衝劑）可以包括濃度足以使樣本的多核糖核苷酸中的分子內氫鍵變性的上述鹽。因此，樣本內linRNA的變性可以在層析分離過程的任何階段期間進行，包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。此外，可以在不存在樣本層析純化的情況下對樣本進行利用鹽溶液的變性。

組合或多種變性劑

【0223】 本揭露進一步提供了使用兩種、三種、四種或更多種上述變性條件的組合以從含有circRNA、linRNA和其他物質的多核糖核苷酸混合群產生circRNA富集群。含有circRNA和linRNA混合群的樣本可以同時或依次（有或沒有時間間隙）經歷兩種、三種、四種或更多種所揭露的變性條件。兩種或更多種變性條件可來自相同類別的變性劑，例如選自本文所述離散劑的兩種或更多種離散劑、選自本文所述酸變性劑的兩種或更多種酸變性劑、選自本文所述鹼性變性劑的兩種或更多種鹼性變性劑、選自本文所述有機溶劑的兩種或更多種有機溶劑、選自本文所述螯合劑的兩種或更多種螯合劑、選自本文所述洗滌劑的兩種或更多種洗滌劑、或選自本文所述鹽溶液的兩種或更多種鹽溶液。兩種或更多種變性條件可以來自不同類別的變性劑。例如，兩種或更多種變性條件的組合可以如表1所述，其中熱變性選自本文所述之任何熱變性條件，pH變性選自本文所述之任何pH變性條件，酸變性劑選自本文所述之任何酸變性條件，鹼性變性劑選

自本文所述之任何鹼性變性條件，有機溶劑選自本文所述之任何有機溶劑條件，離散劑選自本文所述之任何離散劑條件，螯合劑選自本文所述之任何螯合劑條件，洗滌劑選自本文所述之任何洗滌劑條件，並且鹽溶液選自本文所述之任何鹽溶液條件。

[表1]：

變性條件	熱	pH	酸	鹼	有機溶劑	離散劑	螯合劑	洗滌劑	鹽溶液
熱									
pH	熱+pH								
酸	熱+酸	pH+酸	兩種或更多種酸						
鹼	熱+鹼	pH+鹼	酸+鹼	兩種或更多種鹼化劑					
有機溶劑	熱+有機溶劑	pH+有機溶劑	酸+有機溶劑	鹼+有機溶劑	兩種或更多種有機溶劑				
離散劑	熱+離散劑	pH+離散劑	酸+離散劑	鹼+離散劑	有機溶劑+離散劑	兩種或更多種離散劑			
螯合劑	熱+螯	pH+螯	酸+螯	鹼+	有機	離散劑	兩種或		

	合劑	合劑	合劑	螯合 劑	溶劑 +螯 合劑	+螯合 劑	更多種 螯合劑		
洗滌劑	熱+洗 滌劑	pH+洗 滌劑	酸+洗 滌劑	鹼+ 洗滌 劑	有機 溶劑 +洗 滌劑	離散劑 +洗滌 劑	螯合劑 +洗滌 劑	兩種或 更多種 洗滌劑	
鹽溶液	熱+鹽 溶液	pH+鹽 溶液	酸+鹽 溶液	鹼+ 鹽溶 液	有機 溶劑 +鹽 溶液	離散劑 +鹽溶 液	螯合劑 +鹽溶 液	洗滌劑 +鹽溶 液	兩種或 更多種 鹽溶液

【0224】 表1中所示的組合可以與第三、第四、第五或更多進一步的變性條件組合。

【0225】 例如，上述變性熱條件可以與上述變性pH條件組合以從含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群中產生circRNA富集群。替代性地，變性熱條件可以與本文所述之一或多種化學變性劑組合以產生circRNA富集群。此外，藉由使混合群與pH變性劑和化學變性劑接觸，可以從多核糖核苷酸混合群中產生circRNA富集群。

【0226】 本揭露還提供使用本文所述之一或多種變性條件與本領域已知的一或多種非變性條件（例如，溫度、pH、緩衝劑）的組合。在一些實施方式中，可以對含有多核糖核苷酸混合群（含有circRNA和linRNA）的樣本進行本文所述之熱變性與變性pH條件的組合。例如，可以將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）暴露於變性溫度，諸如至少50°C的溫度，例如在50°C與85°C之間（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) 的溫度，與暴露於變性pH條件(例如，大於5且小於9的pH，諸如例如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) 組合。

【0227】 在一些其他實施方式中，可以對含有多核糖核苷酸混合群(含有circRNA和linRNA) 的樣本進行本文所述之熱變性與非變性pH條件的組合。例如，可以將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) 暴露於變性溫度，諸如至少50°C的溫度，例如在50°C與85°C之間(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) 的溫度，與暴露於非變性pH條件(例如，大於5且小於9的pH，諸如例如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) 組合。

【0228】 在另一個實例中，可以將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) 暴露於變性pH條件(例如，大於5且小於9的pH，諸如例如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)，與暴露於非變性溫度，諸如例如低於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)的溫度組合。

【0229】 在另一個實例中，可以將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）暴露於變性離液條件，例如濃度為至少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，以及一或多種變性有機溶劑條件，例如濃度為至少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）的乙腈和二甲基亞砷。

【0230】 在另一個實例中，可以將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）暴露於變性離液條件，例如濃度為至少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，以及一或多種變性有機溶劑條件，例如濃度為至少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)的乙腈和二甲基亞碲，以及變性溫度，諸如至少50°C的溫度，例如在50°C與85°C之間(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)的溫度。

【0231】在另一個實例中，可以將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)暴露於變性離液條件，例如濃度為至少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，以及變性溫度，諸如至少50°C的溫度，例如在50°C與85°C之間(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)的溫度。在另一個實例中，可以將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)暴露於變性離液條件，例如濃度為至少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，以及變性pH條件(例如，大於5且小於9的pH，諸如例如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）。

【0232】 在另一個實例中，可以將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）暴露於變性有機溶劑條件，例如濃度為至少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）的乙腈和二甲基亞砜，以及變性溫度，諸如至少50°C的溫度，例如在50°C與85°C之間（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）的溫度。

【0233】 在另一個實例中，可以將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）暴露於變性有機溶劑條件，例如濃度為至少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）的乙腈和二甲基亞砜，以及變性pH條件（例如，大於5且小於9的pH，諸如例如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）。

【0234】 在本文描述的另一個實例中（例如，含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群）可以暴露於變性鹽條件，例如，NaCl、KCl、MgCl、CaCl、CsSO₄、NaSO₄、LiCl、或LiBr，濃度為在100 mM與1 M之間（例

如，150 mM-950 mM、200 mM-900 mM、250 mM-850 mM、300 mM-800 mM、350 mM-750 mM、400 mM-700 mM、450 mM-650 mM、500 mM-600 mM、或525 mM-575 mM) 的NaCl、KCl、MgCl、CaCl、CsSO₄、NaSO₄、LiCl或LiBr，以及變性pH條件(例如，大於5且小於9的pH，諸如例如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)。

純化方法

【0235】 本文揭露了可用於在變性條件下從含有circRNA和linRNA混合群的樣本中純化circRNA的多種方法。在一些實施方式中，純化方法係柱層析純化方法。柱層析方法通常採用其中使含有溶解的目標物質的溶液(通常稱為流動相)通過載入有由多孔顆粒製成的固定相的層析柱的過程。載入的溶液藉由柱，並且根據物質與固定相的相互作用分離該物質，這取決於分析物的物理化學特性。純化方法包括柱層析法，諸如例如快速蛋白液相層析法(FPLC；諸如例如逆相(RP)-FPLC)、疏水相互作用層析法(HIC)、陰離子交換層析法(AEC)、混合模式層析法(MMC)或親和層析法。下面更詳細地討論該等方法。

快速高效液相層析法

【0236】 本文描述的方法涉及使用FPLC方法從含有混合多核糖核苷酸或其他物質的樣本中純化和富集circRNA，該混合多核糖核苷酸含有circRNA和linRNA的一或多種不同群。

【0237】 FPLC係一種用於分離複雜物質混合物的既定方法，並且常用於與生物化學、分析化學和臨床化學相關的應用中。通常有兩種類型的FPLC方法，即逆相(RP)-FPLC和正相(NP)-FPLC。RP-FPLC與NP-FPLC的不同之處在於RP-FPLC使用非極性(即疏水性)固定相和極性或中等極性流動相，然而NP-

FPLC使用極性（親水性）固定相和非極性流動相階段。FPLC與高效液相層析法（HPLC）的主要差異在於與HPLC相比，FPLC使用較低的操作壓力（例如，<5巴）和較高的流速（臺式系統為1 mL/min-5 mL/min；工業規模純化以升/分鐘計）。通常，FPLC柱只能在最高3 MPa-4 MPa（435 psi-580 psi）的最大壓力下使用。RP-FPLC通常在至少包括帶有含流動相的洗脫液儲液器的泵、樣本輸入系統、含有疏水性固定相（例如樹脂、珠粒、膜等）的分離柱、和檢測器的設備上進行。RP-FPLC設備的另外的元件可包括用於收集在分離過程期間收集的各個級分的級分收集器。RP-FPLC下的核心原理係非極性分析物、非極性固定分析物之間的相互作用以及極性更高分析物的保留和洗脫時間更短。這是因為降低將分析物的疏水節段暴露於極性溶劑降低了與有序分析物-極性溶劑界面的最小化相關的自由能。因此，分析物的疏水性指數大致與其從層析柱上洗脫的時間成正比。非極性分析物的結合藉由降低流動相的極性而降低，從而導致分析物從層析柱中洗脫。影響分析物滯留時間的其他因素包括流動相中無機鹽的存在，無機鹽由於對流動相的影響（即增加表面張力）而導致分析物滯留時間增加。藉由改變分析物的疏水性，滯留時間也會受到流動相pH的影響。通常，流動相緩衝劑用於調節pH值以中和分析物上的任何殘留電荷，從而促進分析物與固定相之間的疏水相互作用。類似地，帶電分析物的極性可以藉由使用離子對藥劑（藉由離子相互作用中和分析物電荷）來降低。

【0238】 本文揭露的方法允許藉由利用circRNA與linRNA之間官能疏水性的差異，將circRNA群與含有circRNA和linRNA的混合多核糖核苷酸群分離；即，與linRNA相比，circRNA表現出更高的疏水性，從而導致circRNA更強地吸附到固定相並且因此洗脫時間更長。適合在RP-FPLC中用作逆相的材料包括但不限於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、多孔矽膠、非極性殘基改性的多孔矽膠（特別是用含烷基的殘基，更較佳的用含丁

基、辛基或十八烷基的殘基改性的多孔矽膠)、用苯基殘基改性的多孔矽膠、多孔聚甲基丙烯酸酯，其中特別地可以使用多孔聚苯乙烯聚合物或非烷基化(多孔)聚苯乙烯二乙基苯。具有聚苯乙烯二乙基苯的固定相本身係已知的。已經用於FPLC方法的可商購獲得的本身已知的聚苯乙烯二乙基苯可用於根據本發明之方法。對於根據本發明之方法非常特別較佳的非烷基化多孔聚苯乙烯二乙基苯係可以具有特別是(但不限於此) $8.0\ \mu\text{m} \pm 1.5\ \mu\text{m}$ 、特別是 $8.0\ \mu\text{m} \pm 0.5\ \mu\text{m}$ 的粒度，以及1000Å-1500Å、特別是1000Å-1200Å或3500Å-4500Å的孔徑的非烷基化多孔聚苯乙烯二乙基苯。

疏水相互作用層析法

【0239】 HIC係利用HIC流動相與目標靶分子(例如，circRNA)的疏水部分之間的相互作用的純化方法。HIC可以在結合-洗脫模式或流通模式下進行，在結合-洗脫模式中靶分子與固定相結合直到它在洗脫階段期間被洗脫，在流通模式中目標分子流過流動相，而雜質或副產物與固定相結合。在一些實施方式中，HIC可以使用結合-洗脫和流通模式的組合。

【0240】 HIC可以使用一或多種疏水配體。HIC疏水配體之非限制性實例包括烷基-、芳基-配體及它們的組合。例如，HIC固定相可選自由丁基、己基、苯基、辛基或聚丙二醇配體組成之群組。在一些實施方式中，HIC柱選自由以下組成之群組：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™ 三級丁基、WP HII-丙基(C3)™、CIMmultus C4 HLD、CIMmultus® OH、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。

【0241】 根據本文揭露之方法，HIC可以使用包括鹽的載入緩衝劑或洗滌緩衝劑。適用於HIC的鹽之非限制性實例包括硫酸銨、硫酸鈉、氯化鈉、氯化銨、溴化鈉或它們的組合。在一些實施方式中，載入緩衝劑和洗滌緩衝劑包括硫酸鹽、檸檬酸鹽或它們的組合。在各種實施方式中，載入緩衝劑或洗滌緩衝劑包括陽離子或陰離子或它們的組合，該陽離子包括 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Li^{+} 、 Cs^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Rb^{+} 、或 NH_4^{+} ，該陰離子包括 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 $\text{CH}_3\text{CO}_3^{-}$ 、 Cl^{-} 、 Br^{-} 、 NO_3^{-} 、 ClO_4^{-} 、 I^{-} 、或 SCN^{-} 。疏水相互作用在高鹽濃度下最強。高鹽濃度有利於目標circRNA群吸附到HIC柱上，但實際濃度可在大範圍內變化，這取決於目標circRNA的性質、鹽類型和所選的特定HIC配體。在一些實施方式中，鹽濃度在例如約50 mM至約5000 mM、約100 mM至約4000 mM、約1000 mM至約4000 mM、約50 mM至約2000 mM之範圍內，這部分地取決於鹽類型和HIC吸附劑。在一個實施方式中，鹽濃度為約50 mM、約55 mM、約60 mM、約65 mM、約70 mM、約75 mM、約80 mM、約85 mM、約90 mM、約100 mM、約200 mM、約300 mM、約400 mM、約500 mM、約600 mM、約700 mM、約800 mM、約900 mM、約1000 mM、約1200 mM、約1400 mM、約1600 mM、約1800 mM或約2000 mM。在一些實施方式中，載入緩衝劑和洗滌緩衝劑具有在約4.0與8.5之間或在約5.0與7.0之間的pH。在某些實施方式中，載入緩衝劑和洗滌緩衝劑具有約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0或約8.5的pH。在一些實施方式中，載入緩衝劑和洗滌緩衝劑相同或基本上相同。

【0242】 在進行HIC分離的示例性方法中，例如使用分批純化技術或使用柱或膜層析法或整體材料（稱為HIC介質或樹脂），使樣本（例如，含有多核糖核苷酸（諸如circRNA和linRNA）混合群的樣本）與HIC介質接觸。例如，在層析分離的情況下，採用通常為圓柱形形狀的層析設備來容納在適當的緩衝溶液中製備的層析支持介質（例如，HIC介質）。一旦層析材料被添加到層析設備中，

就使含有目標circRNA群的樣本在載入緩衝劑存在下與層析材料接觸，以允許目標circRNA或大部分雜質或副產物與HIC介質結合。樣本中的目標circRNA群與HIC介質結合，而雜質或副產物（諸如例如linRNA）流過，形成含有雜質或副產物的流通級分。然後可以在洗脫階段期間洗脫結合的circRNA，從而產生circRNA富集群。在一些實施方式中，與HIC介質結合的circRNA群係樣本中多核糖核苷酸總量的至少約20%、至少約30%、至少約40%、至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%、至少約95%或至少約98%。

陰離子交換層析法

【0243】 AEC根據目標核酸（例如，circRNA）的局部電荷與層析材料的局部電荷之間的差異來分離分子。填充的AEC柱或膜裝置可以在結合-洗脫模式、流通或混合模式下運行。用平衡緩衝劑或另一具有不同pH或傳導率的緩衝劑洗滌柱或膜裝置後，藉由增加洗脫緩衝劑的離子強度（即傳導率）以與溶質競爭AEC基質的帶電位點來實現產物回收。改變pH值並且由此改變溶質的電荷係實現溶質洗脫的另一種方式。傳導率或pH的變化可能是漸進的（梯度洗脫）或逐步的（分步洗脫）。

【0244】 陰離子或陽離子取代基可以連接到基體上，以形成用於層析法的陰離子或陽離子支持物。陰離子交換取代基之非限制性實例包括二乙基胺基乙基（DEAE）、季胺基乙基（QAE）和四級胺（Q）基團。陽離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）。纖維素離子交換介質諸如DE23™、DE32™、DE52™、CM-23™、CM-32™和CM-52™可從英國肯特郡梅德斯通（Maidstone, Kent）的沃特曼公司（Whatman Ltd）獲得。SEPHADEX®基和交聯離子交換劑亦係已知的。例如，DEAE-、QAE-、CM- 和 SP-SEPHADEX®，和 DEAE-、Q-、CM- 和 S-SEPHAROSE®，和 SEPHAROSE® Fast Flow，以及Capto™ S均可從GE醫療公司（GE Healthcare）獲

得。此外，DEAE和CM衍生的乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物諸如TOYOPEARL™ DEAE-650S 或M和TOYOPEARL™ CM-650S 或M都可從賓夕法尼亞州費城（Philadelphia, Pa）的Toso Haas公司（Toso Haas Co.）獲得，CIMmultus® QA、CIMmultus® DEAE、CIMmultus® EV、CIMmultus® EDA和CIMmultus® SO3可從賽多利斯公司（Sartorius）獲得，或者Nuvia S和UNOSphere™ S可從加利福尼亞州赫拉克勒斯（Hercules, Calif.）的伯樂公司（BioRad）獲得，Eshmun® S可從加利福尼亞州比勒裡卡（Billerica, Calif.）的EMD密理博公司（EMD Millipore）獲得。

混合模式層析法

【0245】 MMC係使用混合模式介質的層析法，諸如但不限於可從GE醫療公司獲得的 CaptoAdhere、來自賽多利斯公司的 CIMmultus® PrimaS 和 CIMmultus® H-Bond。此類介質包括MMC配體。在一些實施方式中，此類配體係指能夠提供至少兩個不同但協同作用的位點的配體，該位點與待結合的物質相互作用。該對偶點之一在配體和目標核酸之間提供了有吸引力的電荷-電荷相互作用類型。另一個位點通常提供電子受體-供體相互作用或疏水或親水相互作用。電子供體-受體相互作用包括諸如氫鍵、 π - π 、陽離子- π 、電荷轉移、偶極-偶極、誘導偶極等的相互作用。與傳統陰離子交換劑相比，混合模式功能可以提供不同的選擇性。MMC配體也稱為「多模式」層析法配體。

【0246】 根據本揭露，MMC介質可包括直接或經由間隔物偶合至有機或無機支持物（有時表示為基礎基質）的混合模式配體。支援物可為顆粒（諸如實質上球形的顆粒）、整料、過濾器、膜、表面、毛細管等形式。在某些實施方式中，支持物由天然聚合物製備，諸如交聯的碳水化合物材料，諸如瓊脂糖、瓊脂、纖維素、葡聚糖、殼聚糖、魔芋、角叉菜膠、結冷膠、藻酸鹽等。為了獲得高吸附能力，支援物可為多孔的，然後配體與外表面以及孔表面偶合。此類天然聚合

物支援物可以根據標準方法製備，諸如逆相懸浮凝膠(S Hjerten :Biochim Biophys Acta [生物化學生物物理學報] 79(2), 393-98 (1964)。替代性地，支援物可以由合成聚合物製備，諸如交聯的合成聚合物，例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯醯胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯基醯胺等。此類合成聚合物可以根據標準方法生產，參見例如「Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization [藉由懸浮聚合開發的苯乙烯基聚合物支持物]」(R Arshady : Chimica e L'Industria [化學與工業] 70(9), 70-75 (1988))。多孔天然或合成聚合物支持物也可從商業來源獲得，諸如安盛生物科學公司 (Amersham Biosciences)，瑞典烏普薩拉 (Uppsala, Sweden)。

純度評估

【0247】可以藉由本領域熟知的方法來評估circRNA富集群的純度。在實施方式中，按品質計，circRNA的純度係至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。純度可以例如藉由質譜法、HPLC、基於晶片的電泳、顯微鏡、圓二色(CD)光譜法、分光光度法、螢光法(例如，Qubit)、聚丙烯醯胺凝膠電泳成像、UV-Vis分光光度法、RNA電泳、RNase H分析或它們的任何組合來測量。在一些實施方式中，circRNA分子中含有在本文所述製劑中的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的多核糖核苷酸的總品質。

【0248】在一些實施方式中，當藉由質譜法、HPLC、基於晶片的電泳、顯微鏡、CD光譜法、分光光度法、螢光法(例如，Qubit)、聚丙烯醯胺凝膠電泳成像、UV-Vis分光光度法、RNA電泳或RNase H分析來測量時，circRNA製劑包括小於閾值量(例如，其中閾值量係用於circRNA製劑的參考標準，例如，藥物釋放規範)的linRNA分子。在一些實施方式中，circRNA製劑包括不可檢測水平

的linRNA分子。

【0249】在實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有小於1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL、1000 µg/mL、5000 µg/mL、10,000 µg/mL、或100,000 µg/mL的單核苷酸含量。

【0250】在實施方式中，按品質計，circRNA具有小於總核苷酸的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%、或其間的任何百分比的單核苷酸含量，其中總核苷酸含量為去氧核糖核苷酸分子和核糖核苷酸分子的總品質。

【0251】在實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有小於1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL、600 ng/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL、或2 mg/mL的linRNA含量，例如linRNA對應物或RNA片段。

【0252】在實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有小於0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、或50%的linRNA。

【0253】在實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有小於1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、

70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL、1000 µg/mL、5000 µg/mL、10,000 µg/mL、或100,000 µg/mL的DNA含量，例如模板DNA或細胞DNA（例如，宿主細胞DNA）。

【0254】在實施方式中，按品質計，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有小於總核苷酸的0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%的DNA含量，其中總核苷酸含量為去氧核糖核苷酸分子和核糖核苷酸分子的總品質。

【0255】在實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有小於0.1 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、或500 ng/mL的蛋白質（例如，細胞蛋白質（CP），例如酶）污染物。

【0256】在實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有小於0.1 ng、1 ng、5 ng、10 ng、15 ng、20 ng、25 ng、30 ng、35 ng、40 ng、50 ng、60 ng、70 ng、80 ng、90 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、或500 ng/毫克（mg）circRNA的蛋白質（例如CP，例如酶）污染物。

【0257】在實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）具有至少0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、0.1 µg/mL、0.5 µg/mL、1 µg/mL、2 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL、30 µg/mL、40 µg/mL、50 µg/mL、60 µg/mL、70 µg/mL、80 µg/mL、100 µg/mL、200 µg/mL、300 µg/mL、500 µg/mL、1000 µg/mL、5000 µg/mL、10,000 µg/mL、或100,000 µg/mL的circRNA濃度。

【0258】 在一些實施方式中，circRNA藉由層析法純化，例如液相層析法，例如FPLC（例如正相或逆相FPLC）、HPLC、HIC、AEC、MMC或親和層析法。

製備方法

【0259】 在一些實施方式中，本文描述的任何條件都可以用作從含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群製備circRNA的方法。

【0260】 在一些實施方式中，製備方法產生至少0.5 mg（例如，至少0.6 mg、0.8 mg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1000 mg或更多）的量的circRNA。本方法的優勢在於它們係高度可擴展的。

分析方法

【0261】 在一些實施方式中，本文描述的任何條件都可以用作從含有circRNA和linRNA的多核糖核苷酸混合群或circRNA富集群確定circRNA的純度的分析方法。本發明包括使用本文所述之一或多種變性條件重複確定多批次富集的circRNA的純度的方法。

【0262】 在一些實施方式中，分析方法使用層析法確定circRNA的純度，例如液相層析法，例如FPLC（例如，正相或逆相FPLC）、HPLC、HIC、AEC、MMC或親和層析法。

【0263】 在一些實施方式中，本分析方法的相對標準差（RSD）小於50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、或0.1%。在一些實施方式中，RSD係基於2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20個circRNA樣本計算的。

【0264】 在一些實施方式中，分析方法包括使用流動相。在一些實施方式中，流動相包括尿素、雙三丙烷（BTP）、乙腈、NaCl、水、鹽酸（HCl）或DMSO。

【0265】 在一些實施方式中，變性條件存在於流動相中。

【0266】 在一些實施方式中，將層析柱加熱以提供變性。在一些實施方式中，將circRNA樣本加熱，然後放置在柱中以進行變性。

【0267】 在一些實施方式中，circRNA樣本用諸如如上所述之變性劑的組合（例如尿素和乙腈的組合）變性。

【0268】 在一些實施方式中，分析方法包括確定雜質或副產物水平之步驟。

【0269】 在一些實施方式中，分析方法包括量化至少0.5 mg（例如，至少0.6 mg、0.8 mg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1000 mg或更多）的circRNA量的純度。

雜質和副產物

【0270】 本揭露之方法適用於生成製劑，該製劑包括circRNA群並具有降低的雜質或副產物水平，例如，與用本揭露之方法純化前的樣本中的雜質或副產物水平相比，或與含有100%（w/w）circRNA的不同樣本中的雜質或副產物水平相比具有降低的雜質或副產物水平。在一些實施方式中，本發明之方法生成具有目標circRNA群並且具有降低的總雜質或副產物水平的組成物。在一些實施方式中，總雜質或副產物水平降低的製劑不含雜質或副產物或基本上不含雜質或副產物。例如，低雜質或副產物組成物可含有約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.5%或更少的總雜質或副產物。在一些實施方式中，低雜質或副產物組成物包括約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%或更少的總雜質或副產物。

【0271】 在一些實施方式中，雜質或副產物係工藝相關的雜質或副產物。如本文所用，術語「工藝相關的雜質或副產物」係指存在於包括目標circRNA群但並非源自circRNA本身的組成物中的雜質或副產物。工藝相關的雜質或副產物包括但不限於宿主細胞蛋白（HCP）、宿主細胞核酸、層析材料和介質成分。例如，工藝相關的雜質或副產物可能包括聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或EDTA。如本文所用，「低雜質組成物」係指與其中雜質或副產物未減少的組成物相比包括降低水平的工藝相關雜質或副產物的組成物。例如，低工藝相關的雜質組成物可含有約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或更少的工藝相關的雜質或副產物。在一個實施方式中，低工藝相關的雜質組成物不含工藝相關的雜質或副產物或基本上不含工藝相關的雜質或副產物。

【0272】 在一些實施方式中，circRNA（例如，circRNA藥物製劑或組成物或circRNA生產中的中間體）基本上不含雜質或副產物。在各種實施方式中，包括circRNA的組成物中至少一種雜質或副產物的水平與在去除雜質或副產物的純化或處理之前的組成物相比降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%。在一些實施方式中，至少一種工藝相關的雜質或副產物的水平與在去除雜質或副產物的純化或處理之前的組成物相比降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%。在一些實施方式中，至少一種產物相關物質的水平與在去除雜質或副產物的純化或處理之前的組成物相比降低至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%。

【0273】 本領域熟知的方法可用於定量樣本中存在的雜質或副產物。例如，諸如紫外（UV）、近紅外光譜（NIR）、傅裡葉變換紅外光譜（FTIR）、螢

光光譜或拉曼光譜的光譜方法可用於以隨線、近線或線上模式監測雜質或副產物的水平。在一些實施方式中，可以在層析法步驟的洗滌線上或在收集容器中使用隨線、近線或線上監測方法以能夠實現所需的circRNA品質/回收。在一些實施方式中，UV信號可用作替代物以實現適當的產品品質/回收，其中UV信號可被適當地處理，包括但不限於諸如積分、微分、移動平均的處理技術，使得可以解決正常的過程變異性，並且可以實現靶標產品品質。在一些實施方式中，此類測量可以與線上稀釋方法結合，使得載入/洗滌的離子濃度/傳導率可以藉由回饋來控制，從而促進產品品質控制。

環狀多核糖核苷酸的產生

【0274】本揭露提供了用於產生circRNA之方法，包括例如重組技術或化學合成。例如，用於產生RNA環的DNA分子可以包括天然存在的原始核酸序列的DNA序列、其修飾形式或編碼通常未在自然中發現的合成多肽的DNA序列（例如，嵌合分子或融合蛋白）。DNA和RNA分子可以使用多種技術修飾，該等多種技術包括但不限於經典誘變技術和重組技術，諸如定點誘變、化學處理核酸分子以誘導突變、限制性酶切割核酸片段、連接核酸片段、聚合酶鏈鎖反應（PCR）擴增或誘變核酸序列的選定區域、合成寡核苷酸混合物以及連接混合物基團以「建造」核酸分子混合物及它們的組合。

【0275】circRNA可以根據任何可用的技術製備，包括但不限於化學合成和酶促合成。在一些實施方式中，線性初級構建體或線性RNA可被環化或者連環化以產生本文中所述之circRNA。環化或連環化的機制可以通過諸如例如化學、酶促、夾板連接或核酶催化的方法來發生。新形成的5'-3'鍵可為分子內鍵或分子間鍵。例如，可使用夾板連接酶（諸如SplintR®連接酶）來進行夾板連接。根據該方法，單鏈多核苷酸（夾板）（諸如單鏈DNA或RNA）可被設計成與linRNA的兩個末端雜交，使得在與單鏈夾板雜交時可將兩個末端並列。因此，夾板連接

酶可催化linRNA並列的兩個末端的連接，生成circRNA。在一些實施方式中，DNA或RNA連接酶可用於環狀多核苷酸的合成。作為非限制性實例，連接酶可為circ連接酶或環狀連接酶。

【0276】在另一個實例中，linRNA的5'或3'端可以編碼連接酶核酶序列，使得在體外轉錄期間，所得線性circRNA包括活性核酶序列，該活性核酶序列能夠連接linRNA的5'端至linRNA的3'端。連接酶核酶可衍生自第I組內含子、D型肝炎病毒、髮夾核酶，或者可藉由SELEX（藉由指數富集進行的配體系統進化）來進行選擇。

【0277】在另一個實例中，可藉由使用至少一個非核酸部分將linRNA環化或連環化。例如，至少一個非核酸部分可與linRNA的5'末端附近和/或3'末端附近的區或特徵反應，以環化或連環化linRNA。在另一個實例中，至少一個非核酸部分可位於或連接到或鄰近linRNA的5'末端和/或3'末端。非核酸部分可為同源或異源的。作為非限制性實例，非核酸部分可為鍵，例如疏水鍵、離子鍵、可生物降解的鍵或可切割的鍵。作為另一非限制性實例，非核酸部分係連接部分。作為又另一非限制性實例，非核酸部分可為寡核苷酸或肽部分，例如如本文中所述之適體或非核酸連接基。

【0278】在另一個實例中，linRNA可以藉由自剪接進行環化或連環化。在一些實施方式中，linRNA可包括環E序列以自連接。在另一實施方式中，linRNA可包括自環化內含子，例如，5'和3'剪接接合，或者自環化催化內含子，例如I族、II族或III族內含子。I型內含子自剪接序列之非限制性實例可包括衍生自T4噬菌體基因td的自剪接置換內含子-外顯子序列以及四膜蟲的插入序列（IVS）rRNA、藍藻魚腥藻屬（cyanobacterium Anabaena）的pre-tRNA-Leu基因或四膜蟲的pre-rRNA。

【0279】在一些實施方式中，多核糖核苷酸可以包括催化內含子片段，諸

如第I組催化內含子片段的3'這一半和第I組催化內含子片段的5'這一半。第一退火區域和第二退火區域可位於催化內含子片段內。第I組催化內含子係自剪接核酶，它們經由雙金屬離子磷醯基轉移機制催化它們本身從mRNA、tRNA和rRNA先質中切除。重要的是，RNA本身無需外源酶（諸如連接酶）即可自催化內含子去除。

【0280】 在一些實施方式中，第I組催化內含子片段的3'這一半和第I組催化內含子片段的5'這一半來自魚腥藍細菌pre-tRNA-Leu基因或四膜蟲pre-rRNA。

【0281】 在一些實施方式中，第I組催化內含子片段的3'這一半和第I組催化內含子片段的5'這一半來自魚腥藍細菌pre-tRNA-Leu基因，並且3'外顯子片段包括第一退火區域，並且5'外顯子片段包括第二退火區域。第一退火區域可以包括例如5至50個、例如10至15個（例如10、11、12、13、14或15個）核糖核苷酸，並且第二退火區域可以包括例如5至50個、例如10至15個（例如10、11、12、13、14或15個）核糖核苷酸。

【0282】 在一些實施方式中，第I組催化內含子片段的3'這一半和第I組催化內含子片段的5'這一半來自四膜蟲pre-rRNA，並且第I組催化內含子片段的3'這一半包括第一退火區域，並且5'外顯子片段包括第二退火區域。在一些實施方式中，3'外顯子包括第一退火區域，並且第I組催化內含子片段的5'這一半包括第二退火區域。第一退火區域可以包括例如6至50個、例如10至16個（例如10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸，並且第二退火區域可以包括例如6至50個、例如10至16個（例如10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸。

【0283】 在一些實施方式中，第I組催化內含子片段的3'這一半和第I組催化內含子片段的5'這一半來自魚腥藍細菌pre-tRNA-Leu基因、四膜蟲pre-rRNA或T4噬菌體td基因。

【0284】 在一些實施方式中，第I組催化內含子片段的3'這一半和第I組催化

內含子片段的5'一半來自T4噬菌體td基因。3'外顯子片段可以包括第一退火區域，並且第I組催化內含子片段的5'這一半可以包括第二退火區域。第一退火區域可以包括例如2至16個、例如10至16個（例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸，並且第二退火區域可以包括例如2至16個、例如10至16個（例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16個）個核糖核苷酸。

【0285】 在一些實施方式中，第I組催化內含子片段的3'這一半係線性多核糖核苷酸的5'末端。

【0286】 在一些實施方式中，第I組催化內含子片段的5'這一半係線性多核糖核苷酸的3'末端。

【0287】 在另一個實例中，linRNA可以由非核酸部分環化或連環化，該非核酸部分引起位於、鄰近或連接到linRNA的5'端和3'端的原子、分子表面之間的吸引力。可藉由分子間作用力或分子內作用力將一或多個linRNA環化或連環化。分子間作用力之非限制性實例包含偶極-偶極力、偶極誘導的偶極力、誘導的偶極誘導的偶極力、范德華力和倫敦色散力（London dispersion force）。分子內作用力之非限制性實例包含共價鍵、金屬鍵、離子鍵、共振鍵、抓氫鍵（agnostic bond）、偶極鍵、軛合、超軛合和反向鍵。

【0288】 在另一個實例中，linRNA可在5'末端附近和3'末端附近包括核酶RNA序列。當序列暴露於核酶的剩餘部分時，核酶RNA序列可共價地連接到肽。共價地連接至5'末端和3'末端附近的核酶RNA序列的肽可以彼此締合，從而引起linRNA環化或連環化。在另一實例中，共價地連接到核酶RNA序列5'末端和3'末端附近的肽可致使線性初級構建體或線性mRNA在使用本領域已知的方法（例如但不限於蛋白質連接）進行連接後環化或連環化。用於在本發明之線性初級構建體或linRNA中使用的核酶之非限制性實例，或者摻入或共價地連接肽的方法的

非窮舉列表在美國專利申請案號US 20030082768中描述，將該專利申請案的內容藉由援引以其全文併入本文中。

【0289】在另一個實例中，環化的化學方法可用於生成circRNA。此類方法可以包括但不限於點擊化學（例如，基於炔烴和疊氮化物之方法，或可點擊的鹼基）、烯烴複分解、胺基磷酸酯連接、半縮醛胺-亞胺交聯、鹼基修飾、或它們的任何組合。

【0290】在另一個實例中，使用產生線性RNA的在無細胞系統中轉錄（例如，藉由體外轉錄）的去氧核糖核苷酸模板來產生環狀多核糖核苷酸。線性多核糖核苷酸產生剪接相容的多核糖核苷酸，該剪接相容的多核糖核苷酸可自剪接以產生環狀多核糖核苷酸。

【0291】在一些實施方式中，藉由如下方式（例如，在無細胞系統中）產生環狀多核糖核苷酸：提供線性多核糖核苷酸；以及在適於剪接線性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位點的條件下自剪接線性多核糖核苷酸，從而產生環狀多核糖核苷酸。

【0292】在一些實施方式中，藉由如下方式產生環狀多核糖核苷酸：提供編碼線性多核糖核苷酸的去氧核糖核苷酸；在無細胞系統中轉錄去氧核糖核苷酸以產生線性多核糖核苷酸；視需要純化剪接相容的線性多核糖核苷酸；以及在適於剪接線性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位點的條件下自剪接線性多核糖核苷酸，從而產生環狀多核糖核苷酸。

【0293】在一些實施方式中，藉由如下方式產生環狀多核糖核苷酸：提供編碼線性多核糖核苷酸的去氧核糖核苷酸；在無細胞系統中轉錄去氧核糖核苷酸以產生線性多核糖核苷酸，其中轉錄在適於剪接線性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位點的條件下在溶液中發生，從而產生環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸包含5'斷裂內含子和3'斷裂內含子（例如，用於產生

circRNA的自剪接構建體）。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸包含5'退火區域和3'退火區域。

【0294】 在一些實施方式中，該線性多核糖核苷酸從去氧核糖核酸（例如，本文所述之去氧核糖核酸，如DNA載體、線性化DNA載體、或cDNA）產生。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸藉由在無細胞系統中轉錄（例如，體外轉錄）由去氧核糖核酸轉錄。

【0295】 在另一個實例中，可以在細胞（例如，原核細胞或真核細胞）中產生環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，向細胞提供外源多核糖核苷酸（例如，本文所述之線性多核糖核苷酸或編碼此處所述之線性多核糖核苷酸的轉錄的DNA分子）。線性多核糖核苷酸可在細胞中由向細胞提供的外源DNA分子轉錄。線性多核糖核苷酸可在細胞中由向細胞暫態提供的外源重組DNA分子轉錄。在一些實施方式中，外源DNA分子不整合到細胞的基因組中。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸在細胞中由併入細胞的基因組中的重組DNA分子轉錄。

【0296】 在一些實施方式中，細胞為原核細胞。在一些實施方式中，包括本文所述之多核糖核苷酸的原核細胞可為細菌細胞或古菌細胞。例如，包括本文所述之多核糖核苷酸的原核細胞可為大腸桿菌（*E coli*）、嗜鹽古菌（例如，沃氏鹽富饒菌（*Haloferax volcanii*））、鞘胺醇單胞菌（*Sphingomonas*）、藍菌（例如，細長聚球藻（*Synechococcus elongatus*）、螺旋藻（*Spirulina*）（節旋藻（*Arthrospira*））屬和集胞藻屬（*Synechocystis* spp.））、鏈黴菌（*Streptomyces*）、放線菌（*actinomycetes*）（例如，野野村菌屬（*Nonomuraea*）、北裡孢菌屬（*Kitasatospora*）或溫雙歧菌屬（*Thermobifida*））、芽孢桿菌屬（*Bacillus* spp.）（例如，枯草芽孢桿菌（*Bacillus subtilis*）、炭疽芽孢桿菌（*Bacillus anthracis*）、蠟樣芽孢桿菌（*Bacillus cereus*））、 β 變形菌（*betaproteobacteria*）（例如，伯克氏菌（*Burkholderia*））、 α 變形菌（*alphaproteobacterial*）（例如，土壤桿菌

(*Agrobacterium*))、假單胞菌(*Pseudomonas*) (例如, 惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)) 和腸桿菌(*enterobacteria*)。原核細胞可在培養基中生長。原核細胞可包含在生物反應器中。

【0297】細胞可為真核細胞。在一些實施方式中, 真核細胞係單細胞真核細胞。在一些實施方式中, 單細胞真核細胞係單細胞真菌細胞, 諸如酵母細胞(例如, 釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 和其他酵母屬(*Saccharomyces spp.*)、酒香酵母屬(*Brettanomyces spp.*)、裂殖酵母屬(*Schizosaccharomyces spp.*)、有孢圓酵母屬(*Torulaspora spp.*) 和畢赤酵母屬(*Pichia spp.*))。在一些實施方式中, 單細胞真核細胞係單細胞動物細胞。單細胞動物細胞可為從多細胞動物中分離並在培養物中生長的細胞或其子代細胞。在一些實施方式中, 單細胞動物細胞可為去分化的。在一些實施方式中, 單細胞真核細胞係單細胞植物細胞。單細胞植物細胞可為從多細胞植物中分離並在培養物中生長的細胞或其子代細胞。在一些實施方式中, 單細胞植物細胞可為去分化的。在一些實施方式中, 單細胞植物細胞來自植物愈傷組織。在一些實施方式中, 單細胞細胞係植物細胞原生質體。在一些實施方式中, 單細胞真核細胞係單細胞真核藻類細胞, 諸如單細胞綠藻、矽藻、眼蟲或甲藻。目標單細胞真核藻類之非限制性實例包括鹽生杜氏藻(*Dunaliella salina*)、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、以若夫小球藻(*Chlorella zofingiensis*)、兩生紅球藻(*Haematococcus pluvialis*)、富油新綠藻(*Neochloris oleoabundans*) 和其他新綠藻屬(*Neochloris spp.*)、葡萄原管藻(*Protosiphon botryoides*)、布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)、隱球菌屬(*Cryptococcus spp.*)、萊茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 和其他衣藻屬(*Chlamydomonas spp.*)。在一些實施方式中, 單細胞真核細胞係原生生物細胞。在一些實施方式中, 單細胞真核細胞係原生動物細胞。

【0298】 在一些實施方式中, 真核細胞係多細胞真核生物的細胞。例如,

多細胞真核生物可選自由脊椎動物、無脊椎動物、多細胞真菌、多細胞藻類和多細胞植物組成之群組。在一些實施方式中，真核生物體係人。在一些實施方式中，真核生物體係非人脊椎動物。在一些實施方式中，真核生物體係無脊椎動物。在一些實施方式中，真核生物係多細胞真菌。在一些實施方式中，真核生物體係多細胞植物。在實施方式中，真核細胞係人的細胞或非人哺乳動物的細胞，該非人哺乳動物如非人靈長類動物（例如，猴、猿）、有蹄類動物（例如，牛科動物，包括牛、水牛、野牛、綿羊、山羊、和麝牛；豬；駱駝科動物，包括駱駝、美洲駝、和羊駝；鹿，羚羊；和馬科動物，包括馬和驢）、肉食動物（例如，狗、貓）、齧齒動物（例如，大鼠、小鼠、豚鼠、倉鼠、松鼠）、或兔類動物（例如，兔子、野兔）。在實施方式中，真核細胞係鳥的細胞，諸如鳥類類群雞形目（例如雞、火雞、野雞、鵪鶉）、雁形目（例如鴨、鵝）、古顎下綱（例如鴛鳥、鸕鶿）、鴿形目（例如鴿子、野鴿）或鸚形目（例如鸚鵡）的成員。在一些實施方式中，真核細胞係節肢動物（例如昆蟲、蛛形綱、甲殼動物）、線蟲、環節動物、蠕蟲或軟體動物的細胞。在一些實施方式中，真核細胞係多細胞植物的細胞，諸如被子植物（其可為雙子葉植物或單子葉植物）、裸子植物（例如針葉樹、蘇鐵、買麻藤類植物、銀杏）、蕨類、馬尾植物、石鬆類或苔蘚植物。在實施方式中，真核細胞係真核多細胞藻類的細胞。

【0299】 真核細胞可在培養基中生長。真核細胞可包含在生物反應器中。

【0300】 生物反應器之實例包括但不限於攪拌罐（例如，充分混合的）生物反應器和管式（例如，活塞流）生物反應器、氣升式生物反應器、膜攪拌罐、旋轉過濾攪拌罐、振動混合器、流體床反應器、和膜生物反應器。操作生物反應器的模式可為間歇的或連續的過程。當試劑和產物流連續地進出系統時，生物反應器係連續的。間歇式生物反應器可以具有連續的再循環流，但沒有連續的試劑進料或產物收穫。

【0301】 本揭露之一些方法涉及大規模產生環狀多核糖核苷酸。對於大規模產生方法，該方法可在1升（L）至50 L或更大（例如，5 L、10 L、15 L、20 L、25 L、30 L、35 L、40 L、45 L、50 L或更大）的體積中進行。在一些實施方式中，該方法可以在5 L至10 L、5 L至15 L、5 L至20 L、5 L至25 L、5 L至30 L、5 L至35 L、5 L至40 L、5 L至45 L、10 L至15 L、10 L至20 L、10 L至25 L、20 L至30 L、10 L至35 L、10 L至40 L、10 L至45 L、10 L至50 L、15 L至20 L、15 L至25 L、15 L至30 L、15 L至35 L、15 L至40 L、15 L至45 L、或15 L至50 L的體積中進行。在一些實施方式中，生物反應器可以產生至少1 g的環狀RNA。在一些實施方式中，生物反應器可以產生1 g-200 g的環狀RNA（例如，1 g-10 g、1 g-20 g、1 g-50 g、10 g-50 g、10 g-100 g、50 g-100 g、或50 g-200 g的circRNA）。在一些實施方式中，產生的量係每升（例如，每升1-200 g）、每批次或反應（例如，每批次或反應1-200 g）或每單位時間（例如，每小時或每天1-200 g）測量的。在一些實施方式中，可以串聯使用超過一個的生物反應器以提高生產能力（例如，可以串聯使用一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個或九個生物反應器）。製造本文描述的circRNA的方法描述於例如Khudyakov & Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications* [人工DNA：方法與應用], CRC Press [CRC出版社] (2002)；Zhao, *Synthetic Biology: Tools and Applications* [合成生物學：工具與應用] (第一版), Academic Press [學術出版社] (2013)；以及Egli和Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids* [人工核酸的化學與生物學], (第一版), Wiley-VCH [威利-VCH出版社] (2012)。

【0302】 多種合成circRNA的方法也在別處進行了描述（參見例如，美國專利案號US 6210931、美國專利案號US 5773244、美國專利案號US 5766903、美國專利案號US 5712128、美國專利案號US 5426180、美國公開案號US 20100137407、國際公開案號W01992001813、國際公開案號W02010084371和Petkovic等人，

Nucleic Acids Res. [核酸研究] 43:2454-65 (2015)；其各自的内容藉由援引以其全文併入本文中）。

環狀多核糖核苷酸

【0303】本揭露之特徵在於circRNA組成物以及製備和純化circRNA之方法。在一些實施方式中，circRNA由linRNA產生（例如，藉由本領域已知的方法，包括藉由酶促連接或藉由自催化RNA）。在一些實施方式中，linRNA從去氧核糖核苷酸模板（例如，載體、線性化載體或cDNA）轉錄。

【0304】circRNA可以包括諸如一或多個編碼序列、一或多個非編碼序列或它們的組合的特徵。circRNA可以包括一或多個編碼序列，例如編碼多肽表現的編碼序列。每個編碼序列可以可操作地連接到內部核糖體進入位點（IRES）或一或多個調節序列或它們的組合。circRNA可以包括一或多個非編碼序列，例如，特異性結合靶標（諸如蛋白質或核酸）的非編碼序列。circRNA的特徵描述於例如國際專利公開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藉由援引併入。

【0305】待純化的circRNA的大小可為適合本文揭露的純化方法的任何大小。

【0306】例如，待純化的circRNA之長度可以為至少20,000個核苷酸、至少19,000個核苷酸、至少18,000個核苷酸、至少17,000個核苷酸、至少16,000個核苷酸、至少15,000個核苷酸、至少14,000個核苷酸、至少13,000個核苷酸、至少12,000個核苷酸、至少11,000個核苷酸、至少10,000個核苷酸、至少9,000個核苷酸、至少8,000個核苷酸、至少7,000個核苷酸、至少6,000個核苷酸、至少5,000個核苷酸、至少4,000個核苷酸、至少3,000個核苷酸、至少2,000個核苷酸、至少1,000個核苷酸、至少900個核苷酸、至少800個核苷酸、至少700個核苷酸、至少600個核苷酸、

至少500個核苷酸、至少400個核苷酸、至少300個核苷酸、至少200個核苷酸、或至少100個核苷酸。

【0307】 例如，待純化的circRNA之長度可以小於約20,000個核苷酸、小於約19,000個核苷酸、小於約18,000個核苷酸、小於約17,000個核苷酸、小於約16,000個核苷酸、小於約15,000個核苷酸、小於約14,000個核苷酸、小於約13,000個核苷酸、小於約12,000個核苷酸、小於約11,000個核苷酸、小於約10,000個核苷酸、小於約9,000個核苷酸、小於約8,000個核苷酸、小於約7,000個核苷酸、小於約6,000個核苷酸、小於約5,000個核苷酸、小於約4,000個核苷酸、小於約3,000個核苷酸、小於約2,000個核苷酸、小於約1,000個核苷酸、小於約900個核苷酸、小於約800個核苷酸、小於約700個核苷酸、小於約600個核苷酸、小於約500個核苷酸、小於約400個核苷酸、小於約300個核苷酸、小於約200個核苷酸、或小於約100個核苷酸。

【0308】 例如，待純化的circRNA之長度可以為約100個核苷酸至約20,000個核苷酸（例如，約100個核苷酸至約500個核苷酸、約100個核苷酸至約750個核苷酸、約100個核苷酸至約1,000個核苷酸、約100個核苷酸至約2,500個核苷酸、約100個核苷酸至約5,000個核苷酸、約100個核苷酸至約10,000個核苷酸、約500個核苷酸至約750個核苷酸、約750個核苷酸至約1,000個核苷酸、約750個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約1,250個核苷酸、約1,000個核苷酸至約2,000個核苷酸、約1,000個核苷酸至約5,000個核苷酸、約2,500個核苷酸至約5,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約10,000個核苷酸、約5,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約10,000個核苷酸至約15,000個核苷酸、約15,000個核苷酸至約20,000個核苷酸、約100個核苷酸、約200個核苷酸、約300個核苷酸、約400個核苷酸、約500個核苷酸、約600個核苷酸、約700個核苷酸、約800個核苷酸、約900個核苷酸、約1,000個核苷酸、約1,250個核苷酸、約1,500個核苷酸、約1,750個核苷酸、

約2,000個核苷酸、約3,000個核苷酸、約4,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約6,000個核苷酸、約7,000個核苷酸、約8,000個核苷酸、約9,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約11,000個核苷酸、約12,000個核苷酸、約13,000個核苷酸、約14,000個核苷酸、約15,000個核苷酸、約16,000個核苷酸、約17,000個核苷酸、約18,000個核苷酸、約19,000個核苷酸或約20,000個核苷酸）。

【0309】 根據本文揭露的方法之從多核糖核苷酸混合群中純化circRNA可以對任何種類的circRNA進行，包括單鏈或雙鏈circRNA，含有二級結構的circRNA和缺乏任何二級結構的circRNA，標記或未標記的circRNA（例如，螢光標記的、放射性標記的、抗體標記的等）。

【0310】 所選的用於純化的circRNA可能包括天然存在的DNA或RNA核苷（例如，腺嘌呤、胸苷、鳥苷、胞苷、尿苷或肌苷），或者circRNA可能包括非天然存在的（即修飾的）核鹼基、核苷間鍵或糖。在一些實施方式中，所選的用於純化的circRNA包括天然存在的核苷。在circRNA被修飾的情況下，它可能含有修飾的核糖核苷（例如，含有修飾的核鹼基或修飾的核糖部分）或修飾的核苷間鍵（例如，硫代磷酸酯和胺基磷酸酯等）。通常，摻入此類修飾以穩定RNA分子並減少核酸酶的水解。本揭露具體考慮的對circRNA的修飾包括WO 2020/198403中描述的核鹼基修飾。

【0311】 在一些實施方式中，本揭露之circRNA的基本上所有核苷或核苷間鍵均為修飾的核苷。在一些實施方式中，所揭露的circRNA的所有核苷或核苷間鍵均為修飾的核苷。其中「基本上所有核苷均為修飾的核苷」的circRNA在很大程度上但不是完全被修飾並且可以包括不超過五個、四個、三個、兩個或一個天然存在的核苷。在一些實施方式中，circRNA可以包括不超過五個、四個、三個、兩個或一個替代性核苷。在一些實施方式中，修飾的circRNA包括至少1個（例如，至少2個、5個、10個、15個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、

80個、90個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個、1500個、2000個、2500個、3000個、3500個、4000個、4500個、5000個、5500個、6000個、6500個、7000個或更多個)修飾的核苷。上述修飾(包括對核鹼基、糖部分或核苷間鍵的修飾)在其保留未修飾的RNA序列中編碼之資訊(例如,每個密碼子編碼的胺基酸)和不干擾蛋白質翻譯之範圍內可以併入本文所述之circRNA中。

多肽表現序列

【0312】 在一些實施方式中,本文所述之多核糖核苷酸包括一或多個表現序列,其中每個表現序列編碼多肽。在一些實施方式中,該環狀多核糖核苷酸包括兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種或更多種表現序列。

【0313】 每個編碼的多肽可為線性或分支的。多肽之長度可為從約5至約40,000個胺基酸、約15至約35,000個胺基酸、約20至約30,000個胺基酸、約25至約25,000個胺基酸、約50至約20,000個胺基酸、約100至約15,000個胺基酸、約200至約10,000個胺基酸、約500至約5,000個胺基酸、約1,000至約2,500個胺基酸或者其間的任何範圍。在一些實施方式中,長度少於約40,000個胺基酸、少於約35,000個胺基酸、少於約30,000個胺基酸、少於約25,000個胺基酸、少於約20,000個胺基酸、少於約15,000個胺基酸、少於約10,000個胺基酸、少於約9,000個胺基酸、少於約8,000個胺基酸、少於約7,000個胺基酸、少於約6,000個胺基酸、少於約5,000個胺基酸、少於約4,000個胺基酸、少於約3,000個胺基酸、少於約2,500個胺基酸、少於約2,000個胺基酸、少於約1,500個胺基酸、少於約1,000個胺基酸、少於約900個胺基酸、少於約800個胺基酸、少於約700個胺基酸、少於約600個胺基酸、少於約500個胺基酸、少於約400個胺基酸、少於約300個胺基酸或更少的多肽可能是有用的。

【0314】 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

一些情況下，該多肽可為參考多肽的功能性片段或變體（例如，酶的酶解活性片段或變體）。例如，該多肽可為本文所述之任一多肽的功能活性變體，例如在指定區域或整個序列上與本文所述之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。在一些情況下，多肽可以與目標蛋白具有至少50%（例如，至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%、或更大）同一性。

【0315】 多肽的一些實例包括但不限於螢光標籤或標誌物、抗原、治療性多肽、或用於農業應用的多肽。

【0316】 治療性多肽可為激素、神經遞質、生長因子、酶（例如，氧化還原酶、代謝酶、粒線體酶、加氧酶、脫氫酶、ATP非依賴性酶、溶酶體酶、去飽和酶）、細胞介素、抗原結合多肽（例如，抗原結合抗體或抗體樣片段，諸如單鏈抗體、奈米抗體或其他含有Ig重鏈或輕鏈的多肽）、Fc融合蛋白、抗凝劑、血液因子、骨形態發生蛋白、干擾素、介白素或溶栓劑。

【0317】 用於農業應用的多肽可為細菌素、溶素、抗微生物多肽、抗真菌多肽、根瘤富含C的肽、細菌細胞調節肽、肽毒素、殺蟲多肽（例如，殺蟲多肽或殺線蟲多肽）、抗原結合多肽（例如，抗原結合抗體或抗體樣片段，諸如單鏈抗體、奈米抗體或其他含有Ig重鏈或輕鏈的多肽）、酶（例如，核酸酶、澱粉酶、纖維素酶、肽酶、脂肪酶、幾丁質酶）、肽資訊素或轉錄因子。

【0318】 在一些情況下，多核糖核苷酸表現人蛋白。在一些情況下，多核糖核苷酸表現非人蛋白。

【0319】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸表現抗體，例如抗體片段或其一部分。在一些實施方式中，由環狀多核糖核苷酸表現的抗體可為任何同種型

的，如IgA、IgD、IgE、IgG、IgM。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸表現抗體的一部分，如輕鏈、重鏈、Fc片段、CDR（互補決定區）、Fv片段、或Fab片段、其另外的部分。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸表現抗體的一或多個部分。例如，環狀多核糖核苷酸可以包括多於一個表現序列，其中每一個表現抗體的一部分，並且其總和可以構成該抗體。在一些情況下，環狀多核糖核苷酸包括一個編碼抗體重鏈的表現序列和另一個編碼抗體輕鏈的表現序列。在一些情況下，當環狀多核糖核苷酸在細胞或無細胞環境中表現時，輕鏈和重鏈可以經受適當的修飾、折疊或其他翻譯後修飾以形成功能性抗體。

【0320】 在實施方式中，多肽包括多個多肽，例如，一個多肽序列的多個拷貝、或多個不同的多肽序列。在實施方式中，多個多肽藉由連接基胺基酸或間隔胺基酸連接。

【0321】 在一些實施方式中，表現序列包括poly-A序列（例如，在表現序列的3'端）。在一些實施方式中，poly-A序列之長度大於10個核苷酸。在一個實施方式中，poly-A序列之長度大於15個核苷酸（例如，至少或大於約10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、70個、80個、90個、100個、120個、140個、160個、180個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、600個、700個、800個、900個、1,000個、1,100個、1,200個、1,300個、1,400個、1,500個、1,600個、1,700個、1,800個、1,900個、2,000個、2,500個或3,000個核苷酸）。在一些實施方式中，根據國際專利公開案號WO 2019/118919 A1的[0202]-[0204]中對poly-A序列的描述來設計poly-A序列，該文獻藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，表現序列缺少poly-A序列（例如，在表現序列的3'端）。

【0322】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括polyA、缺少polyA或具有修飾的polyA以調節環狀多核糖核苷酸的一或多種特性。在一些實施方式

中，缺少polyA或具有修飾的polyA的環狀多核糖核苷酸改善一或多種功能特性，例如免疫性（例如免疫或炎症反應的一或多種標誌物的水平）、半衰期和/或表現效率。

內部核糖體進入位點

【0323】 在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括一或多個內部核糖體進入位點（IRES）元件。在一些實施方式中，IRES與一或多個表現序列可操作連接（例如，每個IRES與一或多個表現序列可操作連接）。在實施方式中，IRES位於異源啟動子與編碼序列的5'端之間。

【0324】 包括在多核糖核苷酸中的合適的IRES元件包括能夠接合真核核糖體的RNA序列。在一些實施方式中，IRES元件係至少約5 nt、至少約8 nt、至少約9 nt、至少約10 nt、至少約15 nt、至少約20 nt、至少約25 nt、至少約30 nt、至少約40 nt、至少約50 nt、至少約100 nt、至少約200 nt、至少約250 nt、至少約350 nt、或至少約500 nt。

【0325】 在一些實施方式中，IRES元件衍生自生物體的DNA，該生物體包括但不限於病毒、哺乳動物或果蠅。此類病毒DNA可以衍生自但不限於小核糖核酸病毒互補DNA（cDNA）以及EMCV cDNA和脊髓灰質炎病毒cDNA。在一個實施方式中，衍生IRES元件的果蠅DNA包括但不限於來自黑腹果蠅（*Drosophila melanogaster*）的觸角足基因。

【0326】 在一些實施方式中，如果存在，IRES序列係以下病毒的IRES序列：桃拉綜合症（Taura syndrome）病毒、錐獵蝨（Triatoma）病毒、泰勒氏腦脊髓炎病毒（Theiler's encephalomyelitis virus）、猿猴病毒40、紅火蟻（*Solenopsis invicta*）病毒1、禾穀縊管蚜（*Rhopalosiphum padi*）病毒、網狀內皮組織增生病毒、人脊髓灰質炎病毒1、普勞提婭失速腸病毒（*Plautia stali* intestine virus）、喀什米爾蜜蜂病毒、人鼻病毒2（HRV-2）、假桃病毒葉蟬病毒-1（*Homalodisca coagulata* virus-1）

1)、人類免疫缺乏病毒1型、假桃病毒葉蟬病毒-1、Himetobi P病毒、C型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、GB型肝炎病毒、口蹄疫病毒、人類腸道病毒71、馬鼻炎病毒、茶尺蠖 (*Ectropis obliqua*) 小核糖核酸樣病毒、腦心肌炎病毒 (EMCV)、果蠅C病毒、十字花科煙草病毒、蟋蟀麻痹病毒、牛病毒性腹瀉病毒1、黑皇后細胞病毒、蚜蟲致死性麻痹病毒、禽腦脊髓炎病毒 (AEV)、急性蜜蜂麻痹病毒、木槿褪綠環斑病毒 (*Hibiscus chlorotic ringspot virus*)、經典豬瘟病毒、人FGF2、人SFTPA1、人AML1/RUNX1、果蠅觸角足、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、果蠅reaper、犬Scamper、果蠅Ubx、人UNR、小鼠UtrA、人VEGF-A、人XIAP、薩里病毒 (*Salivirus*)、科薩病毒 (*Cosavirus*)、副腸孤病毒 (*Parechovirus*)、果蠅無毛、釀酒酵母 (*S. cerevisiae*) TFIID、釀酒酵母YAP1、人c-src、人FGF-1、猿猴小核糖核酸病毒、蕪菁皺縮病毒 (*Turnip crinkle virus*)、愛知病毒 (*Aichivirus*)、Crohivirus、埃可病毒11、eIF4G的適配體、柯薩奇病毒 (*Coxsackievirus*) B3 (CVB3) 或柯薩奇病毒A (CVB1/2)。在又另一實施方式中，IRES係柯薩奇病毒B3 (CVB3) 的IRES序列。在其他的實施方式中，IRES係腦心肌炎病毒 (EMCV) 的IRES序列。在其他的實施方式中，IRES係泰勒氏腦脊髓炎病毒的IRES序列。

【0327】 在一些實施方式中，IRES序列與野生型IRES序列相比具有修飾的序列。在一些實施方式中，當野生型IRES的最後一個核苷酸不是胞嘧啶核酸殘基時，可以修飾野生型IRES序列的最後一個核苷酸以使其為胞嘧啶殘基。例如，在一些實施方式中，IRES序列係CVB3 IRES序列，其中末端腺苷殘基被修飾為胞嘧啶殘基。在一些實施方式中，IRES序列係腸道病毒71 (EV17) IRES，其中末端鳥苷殘基被修飾為胞嘧啶殘基。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括側接

至少一個（例如2、3、4、5個或更多個）表現序列的至少一個IRES。在一些實施方式中，IRES側接至少一個（例如2、3、4、5個或更多個）表現序列的兩側。在一些實施方式中，多核糖核苷酸在每個表現序列的一側或兩側包括一或多個IRES序列，導致一或多種肽和/或一或多種多肽的分離。

【0328】 在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括IRES（例如，可操作地連接至編碼區的IRES）。例如，多核糖核苷酸可包括任何IRES，其描述於Chen等人 *Mol. Cell* [分子細胞] 81(20):4300-4318, 2021；Jopling等人 *Oncogene* [致癌基因] 20:2664-2670, 2001；Baranick等人 *PNAS* [美國科學院院報] 105(12):4733-4738, 2008；Lang等人 *Molecular Biology of the Cell* [細胞分子生物學] 13(5):1792-1801, 2002；Dorokhov等人 *PNAS* [美國科學院院報] 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* [科學] 268:415-417, 1995；Fan等人 *Nature Communication* [自然通訊] 13(1):3751-3765, 2022和國際公開案號WO 2021/263124，其各自均藉由援引以其整體併入本文。

調節元件

【0329】 在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括一或多個調節元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括調節元件，例如修飾多核糖核苷酸內表現序列的表現的序列。

【0330】 調節元件可包括與編碼表現產物的表現序列相鄰定位之序列。調節元件可與相鄰序列可操作連接。如與不存在調節元件時表現的產物的量相比，調節元件可以增加表現的產物的量。另外，一個調節元件可以增加串聯附接的多個表現序列表現的產物的量或數量。因此，一個調節元件可以增強一或多個表現序列的表現。也可以使用多種調節元件，例如，差異性地調節不同表現序列的表

現。

【0331】 在一些實施方式中，調節元件係翻譯調節子。翻譯調節子可以調節多核糖核苷酸中表現序列的翻譯。翻譯調節子可為翻譯強化子或抑制子。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與至少一個表現序列相鄰的至少一個翻譯調節子。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與每個表現序列相鄰的翻譯調節子。在一些實施方式中，翻譯調節子存在於每個表現序列的一側或兩側，導致表現產物例如一或多種肽和/或一或多種多肽的分離。

【0332】 在一些實施方式中，調節元件係微RNA (miRNA) 或miRNA結合位點。

【0333】 調節元件的其他實例在例如國際專利公開案號WO 2019/118919的第[0154]-[0161]段中描述，該文獻藉由援引以其全文據此併入。

翻譯起始序列

【0334】 在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括至少一個翻譯起始序列。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與表現序列可操作地連接的翻譯起始序列。

【0335】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸編碼多肽並且可包括翻譯起始序列，例如起始密碼子。在一些實施方式中，翻譯起始序列包括Kozak或Shine-Dalgarno序列。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與表現序列相鄰的翻譯起始序列，例如Kozak序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列係非編碼起始密碼子。在一些實施方式中，翻譯起始序列（例如Kozak序列）存在於每個表現序列的一側或兩側，導致表現產物的分離。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與表現序列相鄰的至少一個翻譯起始序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列為多核糖核苷酸提供構象靈活性。在一些實施方式中，翻譯起始序列在多核糖核苷酸的基本上單鏈的區域內。翻譯起始序列的其他實例在國際專利公開案號WO

2019/118919的第[0163]-[0165]段中描述，該文獻藉由援引以其全文據此併入。

【0336】 多核糖核苷酸可包括多於1個起始密碼子，諸如但不限於至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少11個、至少12個、至少13個、至少14個、至少15個、至少16個、至少17個、至少18個、至少19個、至少20個、至少25個、至少30個、至少35個、至少40個、至少50個、至少60個或多於60個起始密碼子。翻譯可在第一個起始密碼子上起始或以在第一個起始密碼子的下游起始。

【0337】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸可在不是第一個起始密碼子的密碼子（例如AUG）處起始。多核糖核苷酸的翻譯可以起始於替代性翻譯起始序列，如但不限於ACG、AGG、AAG、CTG/CUG、GTG/GUG、ATA/AUA、ATT/AUU、TTG/UUG。在一些實施方式中，翻譯在選擇性條件（例如，應激誘導條件）下在替代性翻譯起始序列處開始。作為非限制性實例，多核糖核苷酸的翻譯可在替代性翻譯起始序列（諸如ACG）處開始。作為另一非限制性實例，多核糖核苷酸翻譯可以在替代性翻譯起始序列CTG/CUG處開始。作為另一非限制性實例，多核糖核苷酸翻譯可以在替代性翻譯起始序列GTG/GUG處開始。作為另一非限制性實例，多核糖核苷酸可以在重複相關的非AUG（RAN）序列，如包括短段的重複RNA（例如CGG、GGGGCC、CAG、CTG）的替代性翻譯起始序列處開始翻譯。

終止元件

【0338】 在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括至少一個終止元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與表現序列可操作地連接的終止元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸缺少終止元件。

【0339】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且每個表現序列可或可不具有終止元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括一

或多個表現序列，並且表現序列缺少終止元件，使得多核糖核苷酸被連續翻譯。終止元素的排除可導致表現產物的滾環翻譯或連續表現。

【0340】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且每個表現序列可或可不具有終止元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且表現序列缺少終止元件，使得環狀多核糖核苷酸被連續翻譯。由於缺少核糖體停滯或脫落，終止元件的排除可能導致表現產物例如肽或多肽的滾環翻譯或連續表現。在此類實施方式中，滾環翻譯通過每個表現序列表現連續表現產物。在一些其他實施方式中，表現序列的終止元件可為交錯元件的一部分。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸中的一或多個表現序列包括終止元件。然而，在環狀多核糖核苷酸中進行滾環翻譯或後繼（例如，第二、第三、第四、第五等）表現序列的表現。在此類情況下，當核糖體遇到終止元件（例如，終止密碼子）並終止翻譯時，表現產物可以從核糖體上脫落。在一些實施方式中，在核糖體例如核糖體的至少一個亞基與環狀多核糖核苷酸保持接觸時翻譯終止。

【0341】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸在一或多個表現序列的端部包括終止元件。在一些實施方式中，一或多個表現序列連續包括兩個或更多個終止元件。在此類實施方式中，翻譯終止並且滾環翻譯終止。在一些實施方式中，核糖體與環狀多核糖核苷酸完全脫離。在一些此類實施方式中，在環狀多核糖核苷酸中後繼（例如，第二、第三、第四、第五等）表現序列的產生可能需要核糖體在起始翻譯之前與環狀多核糖核苷酸重新接合。通常，終止元件包括發出翻譯終止信號的框內核苷酸三聯體，例如UAA、UGA、UAG。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸中的一或多個終止元件係移碼終止元件，諸如但不限於可終止翻譯的框外或-1和+1移碼閱讀框（例如，隱藏終止子）。移碼終止元件包括出現在表現序列的第二閱讀框和第三閱讀框中的核苷酸三聯體TAA、TAG和TGA。

移碼終止元件在防止mRNA的誤讀中可能很重要，mRNA的誤讀通常對細胞有害。在一些實施方式中，終止元件係終止密碼子。

【0342】終止元件的其他實例在國際專利公開案號WO 2019/118919的第[0169]-[0170]段中描述，該文獻藉由援引以其全文據此併入。

非翻譯區

【0343】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括非翻譯區（UTR）。包括基因的基因組區域的UTR可以轉錄但不翻譯。在一些實施方式中，UTR可以被包括在本文所述之表現序列的翻譯起始序列的上游。在一些實施方式中，UTR可以被包括在本文所述之表現序列的下游。在一些情況下，第一表現序列的一個UTR與第二表現序列的另一個UTR相同或連續或重疊。

【0344】示例性非翻譯區在國際專利公開案號WO 2019/118919的第[0197]-[201]段中描述，該文獻藉由援引以其全文據此併入。

【0345】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括poly-A序列。示例性poly-A序列在國際專利公開案號WO 2019/118919的第[0202]-[0205]段中描述，該文獻藉由援引以其全文據此併入。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少poly-A序列。

【0346】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括內嵌有一段或多段的腺苷和尿苷的UTR。該等AU富集簽名可能會增加表現產物的轉化率。

【0347】富含UTR AU的元件（ARE）的引入、去除或修飾可用於調節環狀多核糖核苷酸的穩定性或免疫性（例如，免疫或炎症反應的一或多種標誌物的水平）。工程化特定的環狀多核糖核苷酸時，可以將ARE的一或多個拷貝引入環狀多核糖核苷酸中，並且ARE的該等拷貝可以調節表現產物的翻譯和/或產生。同樣，可以對ARE進行鑒別和去除或工程化至環狀多核糖核苷酸以調節細胞內穩定性，從而影響所得蛋白質的翻譯和產生。

【0348】 應當理解，可以將來自任何基因的任何UTR摻入環狀多核糖核苷酸的相應側翼區中。

【0349】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少3'-UTR，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少poly-A序列，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少終止元件，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少內部核糖體進入位點，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少帽，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR、3'-UTR和IRES，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸進一步包括以下序列中的一或多種：編碼一或多個miRNA的序列、編碼一或多個複製蛋白的序列、編碼外源基因的序列、編碼治療劑的序列、調節元件（例如，翻譯調節子，例如翻譯強化子或抑制子）、翻譯起始序列、靶向內源基因的一或多種調節核酸（例如，siRNA、lncRNA、shRNA）和編碼治療性mRNA或蛋白質的序列。

【0350】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少3'-UTR。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少poly-A序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少終止元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少內部核糖體進入位點。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少核酸外切酶的降解易感性。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少降解易感性的事實可能意味著環狀多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解，或在僅存在核酸外切酶時被降解的有限程度例如與不存在核酸外切酶時相當或相似。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解。在一

些實施方式中，當暴露於核酸外切酶時，環狀多核糖核苷酸降解減少。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少與帽結合蛋白的結合。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'帽。

交錯元件

【0351】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與表現序列相鄰的至少一個交錯元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與每個表現序列相鄰的交錯元件。在一些實施方式中，交錯元件存在於每個表現序列的一側或兩側，導致表現產物例如一或多種肽和/或一或多種多肽的分離。在一些實施方式中，交錯元件係一或多個表現序列的一部分。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且該一或多個表現序列中的每一個藉由環狀多核糖核苷酸上的交錯元件與後繼的表現序列隔開。在一些實施方式中，交錯元件阻止由 (a) 單個表現序列的兩輪翻譯或 (b) 兩個或更多個表現序列的一輪或多輪翻譯生成單一多肽。在一些實施方式中，交錯元件係與該一或多個表現序列分離的序列。在一些實施方式中，交錯元件包括該一或多個表現序列的表現序列的一部分。

非編碼序列

【0352】 在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括一或多個非編碼序列，例如不編碼多肽表現的序列。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個或更多個非編碼序列。在一些實施方式中，多核糖核苷酸不編碼多肽表現序列。

【0353】 非編碼序列可為天然的或合成的序列。在一些實施方式中，非編碼序列可以改變細胞行為，如例如淋巴細胞行為。在一些實施方式中，該非編碼序列對於細胞RNA序列係反義的。

【0354】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括調節核酸，該調節核酸係

RNA或RNA樣結構，典型地為約5個至500個鹼基對（bp）（取決於特定的RNA結構，例如miRNA 5 bp-30 bp，lncRNA 200 bp-500 bp）並且可以具有與細胞內表現的靶基因中的編碼序列相同（互補）或幾乎相同（基本上互補）的核鹼模體列。

【0355】長非編碼RNA（lncRNA）被定義為長於100個核苷酸的非蛋白編碼轉錄物。通常，大多數（約78%）的lncRNA的特徵為組織特異性的。以與附近蛋白質編碼基因相反的方向轉錄的發散lncRNA（占哺乳動物基因組中總lncRNA的-20%大比例）可能會調節附近基因的轉錄。在一個實施方式中，本文提供的多核糖核苷酸包括lncRNA的有義鏈。在一個實施方式中，本文提供的多核糖核苷酸包括lncRNA的反義鏈。

蛋白結合序列

【0356】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個蛋白質結合位點，使得蛋白質例如核糖體能夠結合至RNA序列中的內部位點。藉由將蛋白質結合位點（例如核糖體結合位點）工程化至環狀多核糖核苷酸中，環狀多核糖核苷酸可以逃避或更少地被宿主的免疫系統檢測到，藉由掩蔽宿主免疫系統成分中的環狀多核糖核苷酸來調節降解或調節翻譯。

【0357】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括至少一個免疫蛋白結合位點，例如用於逃避免疫反應，例如細胞毒性T淋巴細胞（CTL）反應。在一些實施方式中，免疫蛋白結合位點係結合至免疫蛋白並且有助於掩蔽為外源性的環狀多核糖核苷酸的核苷酸序列。在一些實施方式中，免疫蛋白結合位點係結合至免疫蛋白並有助於將環狀多核糖核苷酸隱藏為外源或外來的核苷酸序列。

【0358】核糖體與線性RNA接合的傳統機制包括核糖體與RNA的加帽5'端的結合。從5'端開始，核糖體遷移到起始密碼子，於是形成第一肽鍵。根據本揭露，環狀多核糖核苷酸的翻譯的內部起始（即，不依賴帽）不需要游離末端或加

帽端。而是，核糖體結合至未加帽的内部位點，由此核糖體在起始密碼子處開始多肽延長。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個RNA序列，該RNA序列包括核糖體結合位點，例如起始密碼子。

【0359】 天然5'UTR具有在翻譯起始中起作用的特徵。它們帶有類似科紮克序列的簽名，該等序列眾所周知參與核糖體起始多種基因的翻譯的過程。科紮克序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG，其中R係起始密碼子（AUG）的三個鹼基上游的嘌呤（腺嘌呤或鳥嘌呤），後接另一個「G」。還已知5'UTR形成參與延長因子結合的二級結構。

【0360】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼與蛋白質結合的蛋白質結合序列。在一些實施方式中，蛋白質結合序列靶向環狀多核糖核苷酸或將其定位至特定靶標。在一些實施方式中，蛋白質結合序列特異性結合蛋白質的精氨酸富集區。

【0361】 在一些實施方式中，蛋白質結合位點包括但不限於與蛋白質的結合位點，諸如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、RBFOX2、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或任何其他結合RNA的蛋白質。

使用方法

【0362】 在一些實施方式中，如本文所述製備的多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）用作治療或農業中的效應子。

【0363】 例如，可向受試者投與藉由本文所述之方法純化的多核糖核苷酸（例如，在藥物、獸用或農業組成物中）。在一些實施方式中，受試者係脊椎動物（例如哺乳動物、鳥、魚、爬行動物或兩棲動物）。在一些實施方式中，受試者係人。在一些實施方式中，受試者係非人哺乳動物。在實施方式中，受試者係非人哺乳動物，諸如非人靈長類動物（例如猴、猿）、有蹄類動物（例如家牛、水牛、綿羊、山羊、豬、駱駝、美洲駝、羊駝、鹿、馬、驢）、肉食動物（例如狗、貓）、齧齒動物（例如大鼠、小鼠）或兔類動物（例如兔）。在實施方式中，受試者係鳥，諸如鳥類類群雞形目（例如雞、火雞、野雞、鵪鶉）、雁形目（例如鴨、鵝）、古顎下綱（例如鸕鳥、鸕鷀）、鴿形目（例如鴿子、野鴿）或鸚形目（例如鸚鵡）的成員。在實施方式中，受試者係無脊椎動物，諸如節肢動物（例如昆蟲、蜘蛛、甲殼類動物）、線蟲、環節動物、蠕蟲或軟體動物。在實施方式中，受試者係無脊椎動物農業有害生物或者寄生在無脊椎動物或脊椎動物宿主上的無脊椎動物。在實施方式中，受試者係植物，諸如被子植物（其可為雙子葉植物或單子葉植物）或裸子植物（例如針葉樹、蘇鐵、買麻藤類植物、銀杏）、蕨類、馬尾植物、石鬆類或苔蘚植物。在實施方式中，受試者係真核藻類（單細胞或多細胞）。在實施方式中，受試者係具有農業或園藝重要性的植物，諸如行間作物、生產水果的植物和樹木、蔬菜、樹木以及觀賞植物（包括觀賞花、灌木、樹木、地被植物和草坪草）。

【0364】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種藉由向受試者提供本文所述之組成物或配製物來改變受試者的方法。在一些實施方式中，組成物或配製物係或包括核酸分子（例如，本文所述之DNA分子或RNA分子），並且向真核受試者提供多核苷酸。在一些實施方式中，組成物或配製物係或包括包含本文所述之核酸的真核或原核細胞。

【0365】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種藉由向對其有需要的受試者提供本文所述之組成物或配製物來治療受試者的病症之方法。在一些實施方式中，組成物或配製物係或包括核酸分子（例如，本文所述之DNA分子或多核糖核苷酸），並且向真核受試者提供多核苷酸。在一些實施方式中，組成物或配製物係或包括包含本文所述之核酸的真核或原核細胞。

【0366】 在一些實施方式中，本揭露提供了一種藉由向受試者提供包含本文所述之多核苷酸的真核或原核細胞來向受試者提供多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）之方法。

配製物

【0367】 在本揭露之一些實施方式中，藉由本文所述之方法製備的多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）或其製劑可被配製在組成物中，例如用於遞送到細胞、植物、無脊椎動物、非人脊椎動物或人類受試者的組成物，例如農業、獸用或藥物組成物。在一些實施方式中，多核糖核苷酸被配製在藥物組成物中。在一些實施方式中，組成物包括多核糖核苷酸和稀釋劑、載劑、佐劑或它們的組合。在特定實施方式中，組成物包括本文所述之多核糖核苷酸和載劑或不含任何載劑的稀釋劑。在一些實施方式中，包括多核糖核苷酸和不含任何載劑的稀釋劑的組成物用於將多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）裸遞送給受試者。

【0368】 藥物組成物可視需要包括一或多種另外的活性物質，例如治療和/或預防活性物質。藥物組成物可以視需要包括充當本文所述之組成物（例如，

包括環狀多核糖核苷酸的組成物)的媒介物或介質的非活性物質，諸如由美國食品和藥品管理局(United States Food and Drug Administration)(FDA)批准並且在非活性成分數據中列出的任一種非活性成分。本發明之藥物組成物可為無菌的和/或無熱原的。可在以下文獻中找到藥劑的配製和/或製造中的一般考慮：例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy [雷明頓：藥物科學與實踐]第21版, Lippincott Williams & Wilkins [利平科特•威廉斯和威爾金斯出版公司], 2005(藉由援引併入本文中)。非活性物質之非限制性實例包括溶劑、水性溶劑、非水性溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、制粒劑、崩解劑、黏結劑、緩衝劑(例如，磷酸鹽緩衝鹽水(PBS))、潤滑劑、油、及其混合物。

【0369】 儘管本文提供的藥物組成物的描述主要針對適合於投與至人的藥物組成物，但是熟悉該項技術者應理解，此類組成物通常適合於投與至任何其他動物，例如非人動物，例如非人哺乳動物。為了使組成物適合於投與於各種動物而對適合於投與於人的藥物組成物的修飾係熟知的，並且普通獸醫藥理師可僅通過普通實驗(如果有的話)來設計和/或進行此種修飾。設想投與藥物組成物的受試者包括但不限於人和/或其他靈長類動物；哺乳動物，包括商業相關的哺乳動物，諸如牛、豬、馬、綿羊、貓、狗、小鼠和/或大鼠；和/或鳥類，包括商業相關的鳥類，諸如家禽、雞、鴨、鵝和/或火雞。

【0370】 本文中所述之藥物組成物的配製物可藉由藥理學領域中已知的或以後開發的任何方法來製備。通常，此類製備方法包括以下步驟：使活性成分與賦形劑和/或一或多種其他輔助成分結合，並且然後，如果必要和/或期望的話，將產品分開、成形和/或包裝。

【0371】 在一些實施方式中，關於製劑中存在的線性多核糖核苷酸分子的

量的參考標準係存在不超過1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL、600 ng/mL、1 µg/ml、10 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL、200 g/mL、300 µg/mL、400 µg/mL、500 µg/mL、600 µg/mL、700 µg/mL、800 µg/mL、900 µg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL、或2 mg/mL的線性多核糖核苷酸分子。

【0372】 在一些實施方式中，關於製劑中存在的環狀多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總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。

【0373】 在一些實施方式中，關於製劑中存在的線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過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) 的線性多核糖核苷酸分子。

【0374】 在一些實施方式中，關於製劑中存在的帶切口多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過0.5% (w/w)、1% (w/w)、2% (w/w)、5% (w/w)、10% (w/w)、或15% (w/w) 的帶切口多核糖核苷酸分子。

【0375】 在一些實施方式中，關於製劑中存在的組合的帶切口和線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過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) 的組合的帶切口和線性多核糖核苷酸分子。在一些實施方式中，藥物製劑係最終環狀多核糖核苷酸成品藥的中間體藥物製劑。在一些實施方式中，藥物製劑係原料藥或活性藥物成分 (API)。在一些實施方式中，藥物製劑係用於投與至受試者的成品藥。

【0376】 在一些實施方式中，對環狀多核糖核苷酸的製劑（在減少線性 RNA 之前、期間或之後）進一步處理以基本上去除 DNA、蛋白質污染物（例如，細胞蛋白質（諸如宿主細胞蛋白質）或蛋白質工藝雜質）、內毒素、單核苷酸分子、和/或工藝相關雜質。

鹽類

【0377】 在一些情況下，本文提供的組成物或藥物組成物包括一或多種鹽。為了控制張度，本文提供的組成物可以包括生理鹽諸如鈉鹽。其他鹽可以包括氯化鉀、磷酸二氫鉀、磷酸氫二鈉和/或氯化鎂等。在一些情況下，該組成物與一或多種藥學上可接受的鹽一起配製。該一或多種藥學上可接受的鹽可以包括無機離子，諸如，例如鈉、鉀、鈣、鎂離子等的那些鹽。此類鹽可以包括與無機酸或有機酸的鹽，該無機酸或有機酸諸如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲磺酸、對甲苯磺酸、乙酸、富馬酸、琥珀酸、乳酸、苦杏仁酸、蘋果酸、檸檬酸、酒石酸或馬來酸。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

緩衝劑/pH

【0378】 本文提供的組成物或藥物組成物可以包括一或多種緩衝劑，諸如 Tris 緩衝劑；硼酸鹽緩衝劑；琥珀酸鹽緩衝劑；組胺酸緩衝劑（例如，含氫氧化鋁佐劑）；或檸檬酸鹽緩衝劑。在一些情況下，包含 5-20 mM 範圍內的緩衝劑。

【0379】 本文提供的組成物或藥物組成物可以具有約 5.0 至約 8.5、約 6.0 至

約8.0、約6.5至約7.5、或約7.0至約7.8的pH。該組成物或藥物組成物可以具有約7的pH。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

稀釋劑

【0380】 在一些實施方式中，本揭露之組成物包括多核糖核苷酸或其藉由本文所述方法製備的製劑和稀釋劑。

【0381】 稀釋劑可為非載劑賦形劑。非載劑賦形劑用作組成物（諸如，如本文所述之環狀多核糖核苷酸）的媒介物或介質。非載劑賦形劑用作組成物（諸如，如本文所述之線性多核糖核苷酸）的媒介物或介質。非載劑賦形劑之非限制性實例包括溶劑、水性溶劑、非水性溶劑、分散介質、稀釋劑、分散劑、助懸劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、制粒劑、崩解劑、黏合劑、緩衝劑（例如，磷酸鹽緩衝鹽水（PBS））、潤滑劑、油或其混合物。非載劑賦形劑可為經美國食品和藥物管理局（FDA）批准並列在非活性成分數據庫中的不表現出細胞穿透作用的任一種非活性成分。非載劑賦形劑可為適於投與給非人類動物（例如，適合獸醫用途）的任何非活性成分。為了使組成物適於向各種動物投與，對適於向人投與的組成物的修飾得到很好的理解，並且普通技術的獸醫藥理師可以僅通過普通的實驗（如果有）來設計和/或進行此類修飾。

【0382】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）可以以裸遞送配製物的形式遞送，諸如包含稀釋劑。裸遞送配製物將多核糖核苷酸遞送至細胞，無需借助於載劑並且無需對線性多核糖核苷酸、加帽的多核糖核苷酸或其複合物進行修飾或部分或完全封裝。

【0383】 裸遞送配製物係不含載劑的配製物並且其中多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾，或者沒有對環狀多核糖核苷酸的部分或完全封裝。在一些實施方式中，沒有結合有助於

遞送至細胞的部分的共價修飾的多核糖核苷酸係未與蛋白質、小分子、顆粒、聚合物或生物聚合物共價結合的多核糖核苷酸。沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的多核糖核苷酸不含經修飾的磷酸基團。例如，沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的多核糖核苷酸不含硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼代磷酸鹽、有機磷酸酯、磷酸氫鹽、胺基磷酸酯、二胺基磷酸酯、烷基或芳基磷酸酯或磷酸三酯。

【0384】 在一些實施方式中，裸遞送配製物不含以下任何或全部：轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑、或蛋白質載劑。在一些實施方式中，裸遞送配製物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、脂轉染胺（lipofectamine）、聚乙烯亞胺、聚(三亞甲基亞胺)、聚(四亞甲基亞胺)、聚丙烯亞胺、胺基糖苷-多胺、雙去氧-二胺基-b-環糊精、精胺、亞精胺、聚(2-二甲胺基)乙基甲基丙烯酸酯、聚(離胺酸)、聚(組胺酸)、聚(精胺酸)、陽離子化明膠、樹狀聚合物、殼聚糖、1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷（DOTAP）、N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨（DOTMA）、1-[2-(油醯基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羥乙基)咪唑鎘氯化物（DOTIM）、2,3-二油醯基氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷銨三氟乙酸酯（DOSPA）、3B-[N-(N,N'-二甲基胺基乙烷)-胺基甲醯基]膽固醇鹽酸鹽（DC-膽固醇鹽酸鹽）、雙十七烷基醯胺基甘胺醯亞精胺（DOGS）、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨（DDAB）、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨（DMRIE）、N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化銨（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。

【0385】 在某些實施方式中，裸遞送配製物包括非載劑賦形劑。在一些實施方式中，非載劑賦形劑包括不表現出細胞穿透作用的非活性成分。在一些實施方式中，非載劑賦形劑包括緩衝劑，例如PBS。在一些實施方式中，非載劑賦形

劑係溶劑、非水性溶劑、稀釋劑、助懸劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、成粒劑、崩解劑、黏合劑、緩衝劑、潤滑劑或油。

【0386】 在一些實施方式中，裸遞送配製物包括稀釋劑。稀釋劑可為液體稀釋劑或固體稀釋劑。在一些實施方式中，稀釋劑係RNA增溶劑、緩衝劑或等滲劑。RNA增溶劑之實例包括水、乙醇、甲醇、丙酮、甲醯胺或2-丙醇。緩衝劑之實例包括2-(N-咪啉代)乙磺酸 (MES)、Bis-Tris、2-[(2-胺基-2-側氧基乙基)-(羧甲基)胺基]乙酸 (ADA)、N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙烷磺酸 (ACES)、哌啶-N,N'-雙(2-乙烷磺酸) (PIPES)、2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]乙烷磺酸 (TES)、3-(N-咪啉代)丙磺酸 (MOPS)、4-(2-羥乙基)-1-哌啶乙烷磺酸 (HEPES)、Tris、Tricine、Gly-Gly、Bicine或磷酸鹽。等滲劑之實例包括甘油、甘露醇、聚乙二醇、丙二醇、海藻糖或蔗糖。

脂質奈米顆粒

【0387】 本揭露提供的組成物、方法和遞送系統可以採用本文所述之任何合適的載劑或遞送形式，在某些實施方式中包括脂質奈米顆粒 (LNP)。在一些實施方式中，脂質奈米顆粒包括一或多種離子脂質，諸如非陽離子脂質（例如，中性或陰離子或兩性離子脂質）；一或多種軛合的脂質（諸如WO 2019217941的表5中描述的PEG軛合的脂質或軛合至聚合物的脂質；將其藉由援引以其整體併入本文）；一或多種固醇（例如，膽固醇）。

【0388】 可用於形成奈米顆粒（例如，脂質奈米顆粒）的脂質包括例如WO 2019217941（藉由援引併入）的表4中描述的那些—例如，含脂質的奈米顆粒可包括WO 2019217941的表4中的一或多種脂質。脂質奈米顆粒可以包括另外的要素，諸如聚合物，諸如WO 2019217941（藉由援引併入）的表5中描述的聚合物。

【0389】 在一些實施方式中，軛合的脂質，當存在時，可以包括以下的一

或多種：PEG-二醯基甘油（DAG）（諸如1-(單甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻醯甘油（PEG-DMG））、PEG-二烷氧基丙基（DAA）、PEG-磷脂、PEG-神經醯胺（Cer）、聚乙二醇化磷脂醯乙醇胺（PEG-PE）、PEG琥珀酸二醯基甘油（PEGS-DAG）（諸如4-0-(2',3'-二(十四烷醯氧基)丙基-1-0-(ω-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯（PEG-S-DMG））、PEG二烷氧基丙基胺基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺鈉鹽，以及在WO 2019051289的表2中描述的那些（藉由援引併入）或前述的組合。另外的示例性PEG-脂質軛合物例如在US 5,885,613、US 6,287,591、US 2003/0077829、US 2003/0077829、US 2005/0175682、US 2008/0020058、US 2011/0117125、US 2010/0130588、US 2016/0376224、US 2017/0119904、US 2018/0028664和WO 2017/099823（所有該等的內容藉由援引以其全文併入本文）中描述。

【0390】 在一些實施方式中，可以摻入脂質奈米顆粒中的固醇包括膽固醇或膽固醇衍生物中的一或多種，諸如W02009/127060或US 2010/0130588（藉由援引併入）中的那些。另外的示例性固醇包括植物固醇，包括藉由援引併入本文的Eygeris等人(2020)，[dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386)中描述的那些。

【0391】 在一些實施方式中，脂質顆粒包括可電離脂質、非陽離子脂質、抑制顆粒聚集的軛合脂質和固醇。

【0392】 可用於脂質奈米顆粒配製物中的示例性可電離脂質包括但不限於WO 2019051289（藉由援引併入本文）的表1中所列的那些。另外的示例性脂質包括但不限於下式中的一或多種：US 2016/0311759的X；US 20150376115或US 2016/0376224中的I；US 20160151284的I、II或III；US 20170210967的I、IA、II或IIA；US 20150140070的I-c；US 2013/0178541的A；US 2013/0303587或US 2013/0123338的I；US 2015/0141678的I；US 2015/0239926的II、III、IV或V；US 2017/0119904的I；WO 2017/117528的I或II；US 2012/0149894的A；US

2015/0057373的A ;WO 2013/116126的A ;US 2013/0090372的A ;US 2013/0274523的A ; US 2013/0274504的A ; US 2013/0053572的A ; W02013/016058的A ; W02012/162210的A ; US 2008/042973的I ; US 2012/01287670的I、II、III或IV ; US 2014/0200257的I或II ; US 2015/0203446的I、II或III ; US 2015/0005363的I或III ; US 2014/0308304的I、IA、IB、IC、ID、II、IIA、IIB、IIC、IID或III-XXIV ; US 2013/0338210 ; W02009/132131的I、II、III或IV ; US 2012/01011478的A ; US 2012/0027796的I或XXXV ; US 2012/0058144的XIV或XVII ; US 2013/0323269的 ; US 2011/0117125的I ; US 2011/0256175的I、II或III ; US 2012/0202871的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII ; US 2011/0076335的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、X、XII、XIII、XIV、XV或XVI ; US 2006/008378的I或II ; US 2013/0123338的I ; US 2015/0064242的I或X-A-Y-Z ; US 2013/0022649的XVI、XVII或XVIII ; US 2013/0116307的I、II或III ; US 2013/0116307的I、II或III ; US 2010/0062967的I或II ; US 2013/0189351的I-X ; US 2014/0039032的I ; US 2018/0028664的V ; US 2016/0317458的I ; US 2013/0195920的I ; US 10,221,127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 ; US 2019/0136231的A ; WO 2020/219876的II ; US 2012/0027803的I ; US 2019/0240349的OF-02 ; US 10,086,013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-O13或503-O13 ; US 9,708,628的TS-P4C2 ; WO2020/106946的I ; WO 2020/106946的I ; 以及WO 2021/113777的(1)、(2)、(3)或(4)。示例性脂質還包括WO 2021/113777的表1-16中任一個的脂質。

【0393】 示例性非陽離子脂質包括但不限於二硬脂醯-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂醯磷脂醯膽鹼 (DSPC)、二油醯磷脂醯膽鹼 (DOPC)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼 (DPPC)、二油醯磷脂醯膽鹼 (DOPG)、二棕櫚醯磷脂醯甘油 (DPPG)、

二油醯磷脂醯乙醇胺 (DOPE)、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼 (POPC)、棕櫚醯油醯磷脂醯乙醇胺 (POPE)、二油醯-磷脂醯乙醇胺4-(N-馬來醯亞胺甲基)-環己烷-1-甲酸酯 (DOPE-mal)、二棕櫚醯磷脂醯乙醇胺 (DPPE)、二肉豆蔻醯磷酸乙醇胺 (DMPE)、二硬脂醯-磷脂醯-乙醇胺 (DSPE)、單甲基-磷脂醯乙醇胺 (諸如 16-O-單甲基PE)、二甲基-磷脂醯乙醇胺 (諸如 16-O-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂醯-2-油醯-磷脂醯乙醇胺 (SOPE)、氫化大豆磷脂醯膽鹼 (HSPC)、卵磷脂醯膽鹼 (EPC)、二油醯磷脂醯絲胺酸 (DOPS)、神經鞘磷脂 (SM)、二肉豆蔻醯磷脂醯膽鹼 (DMPC)、二肉豆蔻醯磷脂醯甘油 (DMPG)、二硬脂醯磷脂醯甘油 (DSPG)、二芥醯基磷脂醯膽鹼 (DEPC)、棕櫚醯油醯磷脂醯甘油 (POPG)、二反油烯醯-磷脂醯乙醇胺 (DEPE)、卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂 (ESM)、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、雙十六烷基磷酸、溶血磷脂醯膽鹼、二亞油醯基磷脂醯膽鹼或其混合物。應當理解，也可以使用其他二醯基磷脂醯膽鹼和二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。該等脂質中的醯基基團較佳的為源自具有 C10-C24 碳鏈的脂肪酸的醯基基團，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。在某些實施方式中，另外的示例性脂質包括但不限於 Kim 等人 (2020) [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386) (藉由援引併入本文) 中描述的那些。在一些實施方式中，此類脂質包括發現會改善用 mRNA 進行肝臟轉染的植物脂質 (例如 DGTS)。

【0394】 適合用於脂質奈米顆粒中的非陽離子脂質的其他實例包括但不限於非磷脂質，例如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙醯基棕櫚酸酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸酯、烷基-芳基硫酸酯、聚乙氧基化脂肪酸醯胺、雙十八烷基二甲基溴化銨、神經醯胺、鞘磷脂等。其他非陽離子脂質在 WO 2017/099823 或美國專

利公開US 2018/0028664（它們的內容藉由援引以其全文併入本文）中描述。

編號實施方式

【0395】 [1] 一種用於產生環狀多核糖核苷酸（circRNA）的富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和線性多核糖核苷酸（linRNA）；和 (b) 在不包括使用凝膠電泳的變性條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。

【0396】 [2] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將多核糖核苷酸群暴露於變性條件下，從而富集circRNA群。

【0397】 [3] 如實施方式[1]或[2]所述之方法，其中：(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸之總重量為至少1 μg ；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

【0398】 [4] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中：(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸之總重量為至少1 μg ；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；和 (b) 在變性條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。

【0399】 [5] 如實施方式[1]至[4]中任一項所述之方法，其中該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸之總重量在1 μg 與1000 mg 之間。

【0400】 [6] 如實施方式[1]至[5]中任一項所述之方法，其中包括該多核糖核苷酸群的該樣本的總體積在500 μL 與1000 mL 之間。

【0401】 [7] 如實施方式[1]至[6]中任一項所述之方法，其中該樣本中該多

核糖核苷酸群之濃度在200 ng/ μ L與50 mg/mL之間。

【0402】 [8] 如實施方式[4]至[7]中任一項所述之方法，其中該分離步驟(b)在不包括使用凝膠電泳的變性條件下進行。

【0403】 [9] 如實施方式[1]至[8]中任一項所述之方法，其中該circRNA富集群基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0404】 [10] 如實施方式[9]所述之方法，其中該一或多種雜質或副產物包括聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或乙二胺四乙酸（EDTA）。

【0405】 [11] 如實施方式[1]至[10]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度。

【0406】 [12] 如實施方式[11]所述之方法，其中該等變性條件包括在50°C與85°C之間的溫度。

【0407】 [13] 如實施方式[1]至[12]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【0408】 [14] 如實施方式[1]至[13]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【0409】 [15] 如實施方式[14]所述之方法，其中該等變性條件包括小於5的pH。

【0410】 [16] 如實施方式[14]所述之方法，其中該等變性條件包括大於9的pH。

【0411】 [17] 如實施方式[1]至[16]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括化學處理。

【0412】 [18] 如實施方式[17]所述之方法，其中該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0413】 [19] 如實施方式[18]所述之方法，其中該酸包括在1 mM與500

mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0414】 [20] 如實施方式[18]或[19]所述之方法，其中該鹼包括在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0415】 [21] 如實施方式[18]至[20]中任一項所述之方法，其中該有機溶劑包括至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0416】 [22] 如實施方式[18]至[21]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇 (PEG)。

【0417】 [23] 如實施方式[18]至[22]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0418】 [24] 如實施方式[18]至[23]中任一項所述之方法，其中該攪攪劑包括在100 mM與8 M之間的PEG或尿素。

【0419】 [25] 如實施方式[18]至[24]中任一項所述之方法，其中該螯合劑包括在1 mM與10 mM之間的乙二醇-雙(β -胺基乙基醚)-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)、亞胺基二琥珀酸 (IDS)、聚天冬胺酸、S,S-乙二胺-N,N'-二琥珀酸 (EDDS) 或甲基甘胺酸二乙酸 (MGDA)。

【0420】 [26] 如實施方式[18]至[25]中任一項所述之方法，其中該洗滌劑包括在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0421】 [27] 一種用於產生環狀多核糖核苷酸 (circRNA) 的富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括

circRNA和線性多核糖核苷酸 (linRNA)；和 (b) 在至少50°C的溫度下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群，其中該分離不包括使用凝膠電泳。

【0422】 [28] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中：(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的總品質為至少1 μg ；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；和 (b) 在至少50°C的溫度下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。

【0423】 [29] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將該多核糖核苷酸群暴露於至少50°C的溫度，從而富集該circRNA群。

【0424】 [30] 如實施方式[27]至[29]中任一項所述之方法，其中該溫度在50°C與85°C之間。

【0425】 [31] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 在小於5或大於9的pH下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群，其中該分離不包括使用凝膠電泳。

【0426】 [32] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中：(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的總品質為至少1 μg ；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；和 (b) 在小於5或大於9的pH下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。

【0427】 [33] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供

包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將該多核糖核苷酸群暴露於小於5或大於9的pH，從而富集該circRNA群。

【0428】 [34] 如實施方式[31]至[33]中任一項所述之方法，其中該pH小於5。

【0429】 [35] 如實施方式[31]至[33]中任一項所述之方法，其中該pH大於9。

【0430】 [36] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 在包括酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液的條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群，其中分離不包括使用凝膠電泳。

【0431】 [37] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中：(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的總品質為至少1 μg ；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；和 (b) 在包括酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液的條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。

【0432】 [38] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將多核糖核苷酸群暴露於酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液中，從而富集circRNA群。

【0433】 [39] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該酸包括至少0.5% (v/v) 的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯

甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0434】 [40] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該鹼包括在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0435】 [41] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該有機溶劑包括至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0436】 [42] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇 (PEG)。

【0437】 [43] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0438】 [44] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該攪擠劑包括在100 mM與8 M之間的聚乙二醇 (PEG) 或尿素。

【0439】 [45] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該螯合劑包括在1 mM與10 mM之間的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

【0440】 [46] 如實施方式[36]至[38]中任一項所述之方法，其中該洗滌劑包括在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0441】 [47] 如實施方式[1]至[46]中任一項所述之方法，其中步驟 (b) 包括對該多核糖核苷酸群進行柱層析法，其中進行柱層析法包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟。

【0442】 [48] 如實施方式[47]所述之方法，其中該分離在樣本載入步驟期間進行。

【0443】 [49] 如實施方式[46]或[47]所述之方法，其中該分離在柱洗滌步驟期間進行。

【0444】 [50] 如實施方式[47]至[49]中任一項所述之方法，其中該分離在洗脫步驟期間進行。

【0445】 [51] 如實施方式[47]至[50]中任一項所述之方法，其中該柱層析法包括快速蛋白液相層析法（FPLC）、高壓液相層析法（HPLC）、疏水相互作用層析法（HIC）、陰離子交換層析法（AEC）、混合模式層析法或親和層析法。

【0446】 [52] 如實施方式[51]所述之方法，其中該AEC包括使用選自由苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化矽、瓊脂糖凝膠、纖維素、葡聚糖、環氧多胺、甲基丙烯酸酯、瓊脂糖和丙烯酸組成之群組的陰離子交換樹脂。

【0447】 [53] 如實施方式[52]所述之方法，其中該陰離子交換樹脂包括選自由四級銨、胺基乙基、二乙基胺基乙基和二乙基胺基丙基組成之群組的離子交換劑。

【0448】 [54] 如實施方式[52]或[53]所述之方法，其中陰離子交換樹脂包括珠粒，其中該珠粒具有45 μm -165 μm 的珠粒直徑和直徑100 nm-1000 nm的孔徑。

【0449】 [55] 如實施方式[51]至[54]中任一項所述之方法，其中該AEC包括使用線性梯度洗脫或分步等度洗脫。

【0450】 [56] 如實施方式[51]至[55]中任一項所述之方法，其中該AEC包括使用在1 mL/min與150 mL/min之間的流速。

【0451】 [57] 如實施方式[51]所述之方法，其中該FPLC係逆相-FPLC（RP-FPLC）。

【0452】 [58] 如實施方式[1]至[57]中任一項所述之方法，其中步驟 (b) 藉

由彙集純化的circRNA的多個級分來進行。

【0453】 [59] 如實施方式[1]至[58]中任一項所述之方法，其中該circRNA和該linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。

【0454】 [60] 如實施方式[1]至[59]中任一項所述之方法，其中該circRNA和該linRNA具有相同的品質。

【0455】 [61] 如實施方式[1]至[60]中任一項所述之方法，其中該circRNA和該linRNA缺少聚(A)尾。

【0456】 [62] 如實施方式[1]至[61]中任一項所述之方法，其中該方法包括該linRNA的核酸外切酶消化。

【0457】 [63] 如實施方式[1]至[61]中任一項所述之方法，其中該方法不包括該linRNA的核酸外切酶消化。

【0458】 [64] 如實施方式[1]至[63]中任一項所述之方法，其中該方法不包括改善該circRNA的富集的對該circRNA或對該linRNA的選擇性修飾。

【0459】 [65] 如實施方式[1]至[64]中任一項所述之方法，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)係該circRNA在該多核糖核苷酸群中之百分比(w/w)的2倍。

【0460】 [66] 如實施方式[1]至[65]中任一項所述之方法，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)為至少65%。

【0461】 [67] 如實施方式[1]至[66]中任一項所述之方法，其中該linRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)小於35%。

【0462】 [68] 如實施方式[1]至[67]中任一項所述之方法，其中該circRNA包括1,000個核苷酸或更少之長度。

【0463】 [69] 一種包括多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中該多核糖核苷酸群處於變性條件下的溶液中，並且其中：

(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的總品質為至少1 μg ；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

【0464】 [70] 一種包括多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中該多核糖核苷酸群處於變性條件下的溶液中，並且其中該溶液基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0465】 [71] 一種包括多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中：

- (a) 該組成物獲自包括核酸群的樣本；
- (b) 該組成物已暴露於一或多種變性條件；並且
- (c) 該組成物基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0466】 [72] 一種包括circRNA富集群的組成物，其中：

- (a) 該組成物獲自包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；
- (b) 該組成物已暴露於一或多種變性條件；並且
- (c) 該組成物基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0467】 [73] 如實施方式[69]至[72]中任一項所述之組成物，其中該一或多種雜質或副產物包括聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或EDTA。

【0468】 [74] 如實施方式[69]至[73]中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度。

【0469】 [75] 如實施方式[69]至[74]中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括在50°C與85°C之間的溫度。

【0470】 [76] 如實施方式[69]至[75]中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【0471】 [77] 如實施方式[69]至[73]中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【0472】 [78] 如實施方式[69]至[73]中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括化學處理。

【0473】 [79] 如實施方式[78]所述之組成物，其中該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0474】 [80] 如實施方式[79]所述之組成物，其中該酸包括在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0475】 [81] 如實施方式[79]或[80]所述之組成物，其中該鹼包括在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0476】 [82] 如實施方式[79]至[81]中任一項所述之組成物，其中該有機溶劑包括至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0477】 [83] 如實施方式[79]至[82]中任一項所述之組成物，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇（PEG）。

【0478】 [84] 如實施方式[79]至[82]中任一項所述之組成物，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0479】 [85] 如實施方式[79]至[84]中任一項所述之方法，其中該擁擠劑包括在100 mM與8 M之間的聚乙二醇（PEG）或尿素。

【0480】 [86] 如實施方式[79]至[85]中任一項所述之組成物，其中該螯合劑包括在1 mM與10 mM之間的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、

EDDS或MGDA。

【0481】 [87] 如實施方式[79]至[86]中任一項所述之組成物，其中該洗滌劑包括在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0482】 [88] 如實施方式[69]至[87]中任一項所述之組成物，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比 (w/w) 係該circRNA在該多核糖核苷酸群中之百分比 (w/w) 的2倍。

【0483】 [89] 如實施方式[69]至[88]中任一項所述之組成物，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比 (w/w) 為至少65%。

【0484】 [90] 如實施方式[69]至[89]中任一項所述之組成物，其中該linRNA在該circRNA富集群中之百分比 (w/w) 小於35%。

【0485】 [91] 如實施方式[69]至[90]中任一項所述之組成物，其中該circRNA和該linRNA具有相同的核糖核苷酸序列。

【0486】 [92] 如實施方式[69]至[91]中任一項所述之組成物，其中該circRNA和該linRNA具有相同的品質。

【0487】 [93] 如實施方式[69]至[92]中任一項所述之組成物，其中該circRNA和該linRNA缺少聚(A)尾。

【0488】 [94] 如實施方式[69]至[93]中任一項所述之組成物，其中該circRNA包括1,000個核苷酸或更少之長度。

【0489】 [95] 一種確定circRNA的純度之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；(b) 在變性條件下藉由層析法分離circRNA與linRNA；和 (c) 收集樣本的層析圖，包括circRNA的峰和linRNA的峰；(d) 計算每個峰下的面積以確定樣本中circRNA的純度。

【0490】 [96] 如實施方式[95]所述之方法，其中該等變性條件不包括使用凝膠電泳。

【0491】 [97] 如實施方式[95]或[96]所述之方法，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度。

【0492】 [98] 如實施方式[97]所述之方法，其中該等變性條件包括在50°C與85°C之間的溫度。

【0493】 [99] 如實施方式[95]至[98]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【0494】 [100] 如實施方式[95]至[99]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【0495】 [101] 如實施方式[100]所述之方法，其中該等變性條件包括小於5的pH。

【0496】 [102] 如實施方式[100]所述之方法，其中該等變性條件包括大於9的pH。

【0497】 [103] 如實施方式[95]至[102]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括化學處理。

【0498】 [104] 如實施方式[103]所述之方法，其中該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、攪擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0499】 [105] 如實施方式[104]所述之方法，其中該酸包括在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0500】 [106] 如實施方式[104]或[105]所述之方法，其中該鹼包括在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0501】 [107] 如實施方式[104]至[106]中任一項所述之方法，其中該有機溶劑包括至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0502】 [108] 如實施方式[104]至[107]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇 (PEG)。

【0503】 [109] 如實施方式[104]至[108]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0504】 [110] 如實施方式[104]至[109]中任一項所述之方法，其中該攪拌劑包括在100 mM與8 M之間的聚乙二醇 (PEG) 或尿素。

【0505】 [111] 如實施方式[104]至[110]中任一項所述之方法，其中該螯合劑包括在1 mM與10 mM之間的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、聚天冬胺酸、EDDS或MGDA。

【0506】 [112] 如實施方式[104]至[111]中任一項所述之方法，其中該洗滌劑包括在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-哌喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0507】 [113] 如實施方式[95]至[112]中任一項所述之方法，其中該層析法包括液相層析法。

【0508】 [114] 如實施方式[113]所述之方法，其中該液相層析法選自由FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或親和層析法組成之群組。

【0509】 [115] 如實施方式[95]至[114]中任一項所述之方法，其中該純度的相對標準差 (RSD) 小於5%。

【0510】 [116] 如實施方式[95]至[115]中任一項所述之方法，其中該

circRNA包括少於1,000個核苷酸或更少之長度。

【0511】 [117] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括以下步驟：(a) 提供多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 在不包括使用凝膠電泳的變性條件下將circRNA與linRNA分離，從而產生circRNA富集群。

【0512】 [118] 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；和 (b) 將多核糖核苷酸群暴露於變性條件下，從而富集circRNA群。

【0513】 [119] 如實施方式[117]或[118]所述之方法，其中：(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸之總重量為至少1 μg ；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

【0514】 [120] 如實施方式[118]或[119]所述之方法，其中該分離步驟 (b) 在不包括使用凝膠電泳的變性條件下進行；和/或其中該circRNA富集群基本上不含一或多種雜質或副產物，其中該一或多種雜質或副產物包括聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或乙二胺四乙酸（EDTA）。

【0515】 [121] 如實施方式[117]至[120]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度；或者其中該等變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【0516】 [122] 如實施方式[117]至[121]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【0517】 [123] 如實施方式[117]至[122]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括化學處理，該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0518】 [124] 如實施方式[123]所述之方法，其中該酸包括在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0519】 [125] 如實施方式[123]或[124]所述之方法，其中該鹼包括在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0520】 [126] 如實施方式[123]至[125]中任一項所述之方法，其中該有機溶劑包括至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砜、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0521】 [127] 如實施方式[123]至[126]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氧酸鋰或聚乙二醇 (PEG)；和/或其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0522】 [128] 如實施方式[123]至[127]中任一項所述之方法，其中該攪拌劑包括在100 mM與8 M之間的PEG或尿素。

【0523】 [129] 如實施方式[123]至[128]中任一項所述之方法，其中該螯合劑包括在1 mM與10 mM之間的乙二醇-雙(β -胺基乙基醚)-*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)、亞胺基二琥珀酸 (IDS)、聚天冬胺酸、*S,S*-乙二胺-*N,N'*-二琥珀酸 (EDDS) 或甲基甘胺酸二乙酸 (MGDA)。

【0524】 [130] 如實施方式[123]至[129]中任一項所述之方法，其中該洗滌劑包括在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0525】 [131] 如實施方式[117]至[130]中任一項所述之方法，其中步驟(b) 包括對該多核糖核苷酸群進行柱層析法，其中進行柱層析法包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟；其中該分離在該樣本載入步驟、該柱洗滌步驟和/或該洗脫步驟期間進行。

【0526】 [132] 如實施方式[131]所述之方法，其中該柱層析法包括快速蛋白液相層析法(FPLC)、高壓液相層析法(HPLC)、疏水相互作用層析法(HIC)、陰離子交換層析法(AEC)、混合模式層析法或親和層析法。

【0527】 [133] 如實施方式[132]所述之方法，其中該AEC包括(i) 使用陰離子交換樹脂，其中該陰離子交換樹脂選自由苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化矽、瓊脂糖凝膠、纖維素、葡聚糖、環氧多胺、甲基丙烯酸酯、瓊脂糖和丙烯酸組成之群組；和/或其中該陰離子交換樹脂包括選自由四級銨、胺基乙基、二乙基胺基乙基和二乙基胺基丙基組成之群組的離子交換劑；和/或其中該陰離子交換樹脂包括珠粒，其中該珠粒具有45 μm -165 μm 的珠粒直徑和直徑100 nm-1000 nm的孔徑；和/或(ii) 使用線性梯度洗脫或分步等度洗脫；和/或(iii) 使用在1 mL/min與150 mL/min之間的流速。

【0528】 [134] 如實施方式[117]至[133]中任一項所述之方法，其中步驟(b) 藉由彙集純化的circRNA的多個級分來進行。

【0529】 [135] 如實施方式[117]至[134]中任一項所述之方法，其中該circRNA和該linRNA具有相同的核糖核苷酸序列；和/或其中該circRNA和該linRNA具有相同的品質；和/或其中該circRNA和該linRNA缺少聚(A)尾。

【0530】 [136] 如實施方式[117]至[135]中任一項所述之方法，其中該方法包括該linRNA的核酸外切酶消化或其中該方法不包括該linRNA的核酸外切酶消化；和/或其中該方法不包括改善該circRNA的富集的對該circRNA或對該linRNA的選擇性修飾。

【0531】 [137] 如實施方式[117]至[136]中任一項所述之方法，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比（w/w）係該circRNA在該多核糖核苷酸群中之百分比（w/w）的2倍；和/或其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比（w/w）為至少65%；和/或其中該linRNA在該circRNA富集群中之百分比（w/w）小於35%。

【0532】 [138] 如實施方式[117]至[137]中任一項所述之方法，其中該circRNA包括1,000個核苷酸或更少之長度。

【0533】 [139] 一種包括多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA，其中該多核糖核苷酸群處於變性條件下的溶液中，並且其中：(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的總品質為至少1 μg；(ii) 包括該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL；或者 (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少500 ng/μL。

【0534】 [140] 一種包括circRNA富集群的組成物，其中：(a) 該組成物獲自包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；(b) 該組成物已暴露於一或多種變性條件；並且 (c) 該組成物基本上不含一或多種雜質或副產物。

【0535】 [141] 如實施方式[139]或[140]所述之組成物，其中該一或多種雜質或副產物包括聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或EDTA。

【0536】 [142] 如實施方式[139]至[141]中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度；或者其中該等變性條件包括至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【0537】 [143] 如實施方式[139]至[142]中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【0538】 [144] 如實施方式[139]至[143]中任一項所述之組成物，其中該

等變性條件包括化學處理，該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0539】 [145] 如實施方式[144]所述之組成物，其中該酸包括在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0540】 [146] 如實施方式[144]或[145]所述之組成物，其中該鹼包括在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0541】 [147] 如實施方式[144]至[146]中任一項所述之組成物，其中該有機溶劑包括至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0542】 [148] 如實施方式[144]至[147]中任一項所述之組成物，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇 (PEG)；和/或其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0543】 [149] 如實施方式[144]至[148]中任一項所述之方法，其中該擁擠劑包括在100 mM與8 M之間的聚乙二醇 (PEG) 或尿素。

【0544】 [150] 如實施方式[144]至[149]中任一項所述之組成物，其中該螯合劑包括在1 mM與10 mM之間的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

【0545】 [151] 如實施方式[144]至[150]中任一項所述之組成物，其中該洗滌劑包括在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0546】 [152] 如實施方式[139]至[151]中任一項所述之組成物，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比（w/w）係該circRNA在該多核糖核苷酸群中之百分比（w/w）的2倍；和/或其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比（w/w）為至少65%；和/或其中該linRNA在該circRNA富集群中之百分比（w/w）小於35%。

【0547】 [153] 如實施方式[139]至[152]中任一項所述之組成物，其中該circRNA和該linRNA具有相同的核糖核苷酸序列；和/或其中該circRNA和該linRNA具有相同的品質；和/或其中該circRNA和該linRNA缺少聚(A)尾。

【0548】 [154] 如實施方式[139]至[153]中任一項所述之組成物，其中該circRNA包括1,000個核苷酸或更少之長度。

【0549】 [155] 一種確定circRNA的純度之方法，該方法包括：(a) 提供包括多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包括circRNA和linRNA；(b) 在變性條件下藉由層析法將該circRNA與該linRNA分離；和 (c) 收集該樣本的層析圖，包括該circRNA的峰和該linRNA的峰；(d) 計算每個峰下的面積以確定該樣本中該circRNA的純度。

【0550】 [156] 如實施方式[155]所述之方法，其中該等變性條件不包括使用凝膠電泳。

【0551】 [157] 如實施方式[155]或[156]所述之方法，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度；或者其中該等變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【0552】 [158] 如實施方式[155]至[157]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【0553】 [159] 如實施方式[155]至[158]中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括化學處理，該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、

螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【0554】 [160] 如實施方式[159]所述之方法，其中該酸包括在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【0555】 [161] 如實施方式[159]或[160]所述之方法，其中該鹼包括在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【0556】 [162] 如實施方式[159]至[161]中任一項所述之方法，其中該有機溶劑包括至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砜、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【0557】 [163] 如實施方式[159]至[162]中任一項所述之方法，其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇 (PEG)；和/或其中該離散劑包括在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【0558】 [164] 如實施方式[159]至[162]中任一項所述之方法，其中該攪拌劑包括在100 mM與8 M之間的聚乙二醇 (PEG) 或尿素。

【0559】 [165] 如實施方式[159]至[164]中任一項所述之方法，其中該螯合劑包括在1 mM與10 mM之間的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、聚天冬胺酸、EDDS或MGDA。

【0560】 [166] 如實施方式[159]至[165]中任一項所述之方法，其中該洗滌劑包括在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【0561】 [167] 如實施方式[155]至[166]中任一項所述之方法，其中該層

析法為液相層析法，其中該液相層析法選自由FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或親和層析法組成之群組。

【0562】 [168] 如實施方式[155]至[167]中任一項所述之方法，其中該純度的相對標準差（RSD）小於5%。

【0563】 [169] 如實施方式[155]至[168]中任一項所述之方法，其中該circRNA包括1,000個核苷酸或更少之長度。

實例

【0564】 提出以下實例是為了向熟悉該項技術者提供可以如何使用、製備和評價本文所述之組成物和方法的描述，並且旨在純粹作為本發明之示例，而不旨在限制諸位發明人認為是其發明的範圍。

實例1：在變性條件下從含有RNA混合群（包括circRNA和linRNA）的樣本中富集circRNA

【0565】 根據目前揭露之方法，熟悉該項技術者可以藉由使樣本經受本文所述之一或多種變性條件從含有circRNA、線性RNA（linRNA）或其他雜質或副產物（例如，本文所述之雜質或副產物）的多核糖核苷酸混合群產生環狀RNA（circRNA）富集群。

【0566】 首先，獲得含有多核糖核苷酸混合群（含有circRNA和linRNA）的樣本。樣本可含有至少200 μg 的多核糖核苷酸總品質，總體積為至少500 μL ，或者樣本中的多核糖核苷酸濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。隨後製備體外轉錄（IVT）RNA樣本並進行本領域熟知的初始純化步驟。IVT樣本可在純化前進行預處理以去除大的污染物、碎片和其他大分子。也可將IVT樣本離心以分離出沈澱物和上清液。根據需要，可以進行幾輪緩衝劑洗滌和離心。藉由使IVT樣本經受本文所述之一或多種變性條件（例如，熱變性，pH變性，利用酸、鹼、有機溶劑、離散

劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液進行的化學變性)來進行純化,其中變性條件基本上使linRNA和circRNA內的結構牽連變性。藉由變性條件進行的純化單獨進行或與本領域已知的柱層析分離技術(例如,陰離子交換層析法、疏水相互作用層析法、混合模式層析法或親和層析法)組合進行。在進行柱層析純化的情況下,在平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟或洗脫步驟期間將含有多核糖核苷酸的樣本暴露於變性條件。該方法可能包括或者可能不包括樣本中linRNA分子的核酸外切酶介導的消化。

【0567】因此,純化進行到從樣本中獲得所需的circRNA的純度的程度。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的2%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的3%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的4%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的5%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的6%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的7%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的8%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的9%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的10%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的11%(w/w)。在實施方式中,circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核

糖核苷酸群中的circRNA的12%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的13%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核
糖核苷酸群中的circRNA的14%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的15%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核
糖核苷酸群中的circRNA的16%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的17%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核
糖核苷酸群中的circRNA的18%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的19%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核
糖核苷酸群中的circRNA的20%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的21%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核
糖核苷酸群中的circRNA的22%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的23%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核
糖核苷酸群中的circRNA的24%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的25%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核
糖核苷酸群中的circRNA的26%（w/w）。在實施方式中，circRNA在circRNA富
集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的27%(w/w)。
在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比（w/w）係樣本中混合多核

糖核苷酸群中的circRNA的28% (w/w)。在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的29%(w/w)。在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的30% (w/w)。在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的31%(w/w)。在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的32% (w/w)。在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的33%(w/w)。在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的34% (w/w)。在實施方式中，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)係樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的35%(w/w)。在實施方式中，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)的數量的circRNA和小於65% (w/w) (例如，小於64%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更低)的數量的linRNA。例如，circRNA在circRNA富集群中的百分比(w/w)可能是樣本中混合多核糖核苷酸群中的circRNA的2倍(w/w)。

實例2：以不同濃度的離散劑和鹽作為變性條件純化circRNA

【0568】 進行以下實驗以評估不同濃度的離散劑（在本例中為6 M尿素）和鹽（在本例中為氯化鈉（NaCl））變性和拆分或進一步純化circRNA的能力，進行了以下實驗。

【0569】 使用5 mL DEAE Sepharose柱純化藉由夾板連接生成的環狀RNA。該柱用50 mM Tris，pH 7平衡和洗滌，並載入環狀RNA。使用300 mM NaCl、700 mM NaCl、1 M NaCl、3 M NaCl的分步洗脫或使用 300 mM NaCl+0.6 M尿素、

700 mM NaCl+1.5 M尿素、1 M NaCl+1.8 M尿素和3 M NaCl+6 M尿素的分步洗脫來洗脫柱。彙集相關級分並藉由PAGE分析所得富集材料。數據如下表2所示。不存在尿素的層析圖顯示在圖1中。在58.00 mL處表示的峰係circRNA，並且所有其他峰均為雜質。存在尿素的層析圖顯示在圖2中，代表存在尿素的分步洗脫。在56.89 mL處表示的峰係circRNA，並且所有其他峰均為雜質。

[表2]：

凝膠/泳道號	樣本	%circRNA	%linRNA
凝膠1/泳道1	輸入（或IVT）	44	55
凝膠2/泳道1	+尿素	66	34
凝膠2/泳道8	-尿素	56	43

【0570】 在兩次純化之前，藉由PAGE測量的circRNA和linRNA的起始材料純度百分比分別為44.6%和55.4%。在不存在尿素的情況下，circRNA純度百分比為56.4%，並且線性純度百分比為43.6%。添加6 M尿素導致circRNA和linRNA的純度分別為65.9%和34.1%。為了開發1 mL–8 L柱體積或更大的可擴展工藝，進行了以下純化以瞭解尿素在恒定濃度下的純度改進。

實例3：在離散劑和高鹽變性條件下純化circRNA

【0571】 進行以下實驗以評估不同濃度的離散劑（在本例中為6 M尿素）和鹽（在本例中為氯化鈉（NaCl））變性和拆分或進一步純化circRNA的能力，進行了以下實驗。

【0572】 為了純化環狀RNA，在存在6 M尿素的情況下使用8 mL DEAE整體柱。

【0573】 該實驗以約200 mg/mL、pH 7進行，在環狀RNA連接後未清洗。樣本用樣本緩衝劑（100 mM Tris-HCl pH 7.0、6 M尿素、10 mM EDTA）按1：1稀釋至最終濃度為3 M尿素，並將7.5 mg載入到8 mL柱上。樣本載入後柱用50 mM

Tris-HCl pH 7.0、6 M 尿素、5 mM EDTA 平衡和洗滌，並用 20 CV 線性梯度至 100% 的 50 mM Tris-HCL pH 7.0、6 M 尿素、1 M NaCl、5 mM EDTA 洗脫，然後用 10 CV 線性梯度至 100% 的 50 mM Tris-HCL pH 7.0、6 M 尿素、3M NaCl、5 mM EDTA 洗脫。在重新平衡之前，用 1 M NaOH 清洗柱。評價如圖 3 所示的層析圖並彙集峰。藉由 PAGE 定量 200 ng 的純度，與載入材料相比，並展示在下表 3 中。

[表3]：

樣本	%circRNA	%linRNA
起始材料	47	53
circRNA洗脫峰	58	42

【0574】 藉由PAGE得到的起始材料circRNA純度百分比為47%，並且使用上面剛描述的條件純化後，circRNA純度百分比為58.%。

【0575】 對來自BIA分離公司（BIA separation）的QA 8 mL 整體柱進行與上面剛描述的相同的實驗條件，除了緩衝劑的pH為pH 8.0。記錄藉由PAGE測量的純度並顯示在表4中。圖4顯示了7 mg circRNA IVT起始材料的純化。在圖中，136.89 mL 處的5個峰係雜質，並且在層析圖中circRNA峰分別表示在242.43 mL 處。

[表4]：

樣本	級分	%circRNA	%linRNA
起始材料	NA	49	51
circRNA洗脫峰	B4	62	38
circRNA洗脫峰	B5	64	36

【0576】 輸入起始材料或載入是由6PAGE定量的49%的circRNA。級分B4內洗脫的circRNA的circRNA純度為62%，並且級分B5內洗脫的circRNA的circRNA純度為64%。

實例4：在高鹽、高pH、螯合劑、離散劑變性條件下純化circRNA

【0577】 為了評估兩種或更多種變性條件變性和拆分或進一步純化circRNA的能力，進行了以下實驗。

【0578】 體外轉錄後用水將2 mL的28 mg/mL（根據Quibit約56 mg）的環狀RNA稀釋至9 mL，然後用樣本緩衝劑（pH 7.0 100 mM Tris-HCl、6 M尿素、10 mM EDTA）1：1稀釋至18 mL。將樣本載入到具有氫鍵和陰離子交換的8 mL柱上。柱用50 mM碳酸氫鹽pH 7.0、6 M尿素、5 mM EDTA平衡和洗滌，然後施加20 CV線性梯度至100%的50 mM碳酸氫鹽pH 10.0、6 M尿素、5 mM EDTA、1 M NaCl，然後施加10 CV線性梯度至100%的50 mM Tris-HCl pH 10.0、6 M尿素、5 mM EDTA、3M NaCl。在重新平衡之前，用0.1 M NaOH、3M NaCl和0.1 M乙酸、3M NaCl清洗柱。層析圖結果展示在圖5中。

[表5]：

樣本	% circRNA	% linRNA
起始材料	60	37
circRNA洗脫峰	63	35

【0579】 藉由PAGE定量，載入的circRNA%為60%，並且線性%為37%。根據PAGE，263.22 mL處的峰含有62.91%的circRNA純度和35.19%的linRNA純度。所有其他峰均為雜質。

實例5：在高鹽、螯合劑、溫度和離散劑變性條件下純化circRNA

【0580】 為了評估兩種或更多種變性條件變性和拆分或進一步純化circRNA的能力，使用高鹽、螯合劑、溫度和離散劑（在本例中為尿素）作為變性條件進行了以下實驗。

【0581】 使用HIC純化對含有多核糖核苷酸混合群的樣本進行實驗，所述多核糖核苷酸混合群含有circRNA、linRNA或其他雜質或副產物（例如，本文所

述之雜質或副產物)。在樣本中存在3 M NaCl的情況下進行純化，然後在同一柱上同一運行期間以依次順序用3 M NaCl、6 M 尿素洗脫，緊接著用0 M NaCl、6 M 尿素進行另外的分步洗脫，緊接著用0 M NaCl、0 M 尿素進行洗脫，並且樣本載入全部含有50 mM磷酸鈉pH 7.0、5 mM EDTA的基礎緩衝劑。在存在3 M NaCl、50 mM磷酸鈉pH 7.0、5 mM EDTA的情況下，針對2.17 mg/mL（柱體積）環狀RNA測試以下條件：室溫、50°C、60°C和75°C，各自持續10 min，然後在室溫下將樣本載入到1 mL 丁基高配體密度（HLD）HIC柱上。

【0582】圖6、圖7和表6顯示了使用1 mL C4 HLD柱純化環狀RNA後的結果，其中樣本如上所述在20°C下溫育10 min，並以2.17 mg載入到柱上。

[表6]：

樣本	級分	%circRNA
起始材料		61.5
在14.47 ml處流通	3.A.9	na
在58.51 ml處的洗脫峰	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處的小峰	3.D.12	64.6
在88.40 ml處的洗脫峰	3.E.1	63.7
	3.E.2	60.4

【0583】第一個凝膠的輸入起始材料係61.5%的circRNA。流通（FT）的RNA含量非常少，並且大部分RNA與柱結合。在58.52 mL處的第一個洗脫峰包

括級分 3.C.6-3.C.12，藉由 PAGE，該級分的 circRNA 純度範圍為 58.0%-71.2% circRNA 純度，取決於測試的級分。在 88.40 mL 處的第二個洗脫峰包括級分 3.E.1 和 3.E.2，根據 PAGE，該級分分別含有 63.7% 和 60.4% 的 circRNA 純度。

實例6：在高溫、離散劑、有機溶劑和高鹽變性條件下純化 circRNA

【0584】為了評估兩種或更多種變性條件變性和拆分或進一步純化 circRNA 的能力，進行了以下實驗。

【0585】將含有 circRNA 和 linRNA 混合物的 10 mg IVT RNA 樣本載入到陰離子交換寡核苷酸柱上，並使用線上流動加熱器在 80°C 下進行整個純化。平衡和洗滌的柱條件為 20 mM 雙三丙烷、6 M 尿素、20% ACN pH 7.0，並且樣本藉由 30%-60% 和 6 CV 線性梯度至 20 mM 雙三丙烷、6 M 尿素、1 M NaCl、20% ACN pH 7.0 洗脫。收集圖 8 中的層析圖，並且 circRNA 表示為 PN:7，和線性 RNA 表示為 PN:8 和 PN:9。結果如表 7 所示。

[表7]：

級分	產率 (mg)	% circRNA 純度
7	0.5	57
8	1.5	96
9	0.9	94
10	0.4	8
11	0.7	2
12	0.6	2
總計	4.6	

【0586】根據 HPLC 分析方法，含有 circRNA 的級分 7、8 和 9 分別產生 0.5 mg、1.5 mg 和 0.9 mg 的材料，circRNA 純度分別為 57%、96% 和 94%。根據 HPLC 分析方法，包括級分 10、11 和 12 的 linRNA 峰分別含有 0.4 mg、0.7 mg 和 0.6 mg 的材料，circRNA 純度分別為 8%、2% 和 2%。

【0587】 級分8和9的HPLC分析結果顯示在圖9中。

【0588】 級分10、11和12的HPLC分析結果顯示在圖10中。

實例7：在不同的溫度、螯合劑和離散劑變性條件下純化circRNA

【0589】 本實例演示了在將circRNA與linRNA和其他雜質或副產物分離時使用溫度、螯合劑和離散劑作為變性條件，其中在整個實驗過程中存在0.5 M鹽酸胍。

【0590】 使用0.1 ml QA整體柱，並將IVT生成的circRNA樣本於5°C在自動進樣器內注射到用50 mM Tris、6 M尿素、5 mM EDTA pH 8平衡的柱上。柱用線性梯度至100%的50 mM Tris、6 M尿素、5 mM EDTA、1 M NaCl pH 8洗脫，並在45°C、55°C、65°C、75°C和85°C（85°C層析曲線未在圖中顯示）下以1 ml/min運行，分別如圖11和圖12所示。層析圖內展示的每個數字對應於載入到PAGE上進行分析的樣本。

實例8：在高溫和有機溶劑變性條件下純化circRNA

【0591】 為了評估兩種或更多種變性條件變性和拆分或進一步純化circRNA的能力，進行了以下實驗。

【0592】 在該方法中，使用離子對逆相HPLC利用溫度和有機溶劑變性條件分離circRNA和linRNA。將circRNA/linRNA樣本注射到陰離子交換寡核苷酸柱（例如，DNAPac PA200寡核苷酸柱）上。初始層析法條件為53%流動相A（100 mM TEAA水溶液）和47%流動相B（100 mM TEAA，於25%乙腈水溶液中）。在運行期間將柱加熱至75°C。根據表8進行circRNA和linRNA的洗脫。圖13顯示示例性層析圖結果。

[表8]：

時間（分鐘）	%流動相A	%流動相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

實例9：在不同pH變性條件下純化circRNA

【0593】 本實例描述了在將circRNA與linRNA和其他雜質或副產物分離時使用pH作為變性條件。測試了小於5（例如，4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1或小於1）或大於9（例如，9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13或大於13）的變性pH條件。

實例10：在鹽和不同pH變性條件下純化circRNA

【0594】 本實例描述了在將circRNA與linRNA和其他雜質或副產物分離時使用不同的pH和鹽溶液變性條件。

【0595】 待測試的鹽係NaCl、KCl、MgCl、CaCl、CsSO₄、NaSO₄、LiCl和/或LiBr。測試在100 mM與1 M之間的變性鹽溶液濃度以及小於5（例如，4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1或小於1）或大於9（例如，9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13或大於13）的變性pH條件。待測試的鹽溶液和/或pH條件在洗滌步驟中添加，恰好在純化之前添加到樣本中或添加到平衡緩衝劑或洗脫緩衝劑中。

實例11：在有機溶劑變性條件下純化circRNA

【0596】 本實例描述了在將circRNA與linRNA和其他雜質或副產物分離時使用有機溶劑作為變性條件。測試了至少10%（v/v）的變性有機溶劑濃度。測試的有機溶劑包括二甲基亞砜、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、

地那銨和/或丙二醇。待測試的有機溶劑在洗滌步驟中添加，恰好在純化之前添加到樣本中或添加到平衡緩衝劑或洗脫緩衝劑中。

實例12：在洗滌劑變性條件下純化circRNA

【0597】 本實例描述了在將circRNA與linRNA和其他雜質或副產物分離時使用洗滌劑作為變性條件。待測試的洗滌劑包括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-麥芽糖苷，濃度範圍為0.00001%至20%。待測試的洗滌劑在洗滌步驟期間添加，恰好在純化之前添加到樣本中或添加到平衡緩衝劑或洗脫緩衝劑中。

實例13：變性條件下的分析方法

【0598】 本實例演示了變性條件在分析方法中的用途。

【0599】 分析型陰離子交換（AEX）HPLC-UV方法被證明能夠從linRNA中拆分出circRNA，並且因此適用於在存在linRNA的情況下確定circRNA樣本的純度。

【0600】 在該方法中，將circRNA樣本注射到陰離子交換寡核苷酸柱（例如，DNAPac PA200寡核苷酸柱）上。初始層析法條件為85%流動相A（20 mM Bis-Tris、6 M尿素pH 7.0）和15%流動相B（20 mM Bis-Tris、6 M尿素、1 M NaCl pH 7.0）。在運行期間將柱加熱至80°C。使用高達10%流動相A/90%流動相B的梯度洗脫circRNA和linRNA。

【0601】 圖14顯示了在水中濃度為0.2223 mg/mL的circRNA的示例性層析圖，其中隨後進行兩次注水。

實例14：變性條件下的分析方法

【0602】 本實例演示了變性條件在分析方法中的用途。

【0603】 通過將濃度為20%的有機變性劑乙腈添加到流動相中，進一步修

改了上述實例9中的分析方法。其他修改包括改變緩衝劑鹽以提高流動相的緩衝能力。

【0604】 具體來說，將circRNA樣本注射到陰離子交換寡核苷酸柱上。在注射前，藉由用變性劑（例如DMSO）稀釋或直接稀釋到流動相A（20 mM雙三丙烷、6 M尿素pH 7.0）中來製備樣本。初始層析法條件為85%流動相A和15%流動相B（20 mM雙三丙烷、6 M尿素、1 M NaCl pH 7.0）。在運行期間將柱加熱至80°C。使用高達10%流動相A（20 mM Bis-Tris、6 M尿素 pH 7.0）和90%流動相B（20 mM Bis-Tris、6 M尿素、1 M NaCl，pH 7.0）的梯度進行circRNA和linRNA的洗脫。圖15顯示了空白注射的層析圖。circRNA和linRNA標準品給出了單獨的峰，如圖16所示。

其他實施方式

【0605】 上述說明書中所提及的所有出版物、專利和專利申請藉由援引併入本文中，其程度如同每個單獨的出版物、專利或專利申請被明確且單獨地指示以藉由援引以其整體併入本文中。在不脫離本發明之範圍和精神的情況下，本發明所述之方法、藥物組成物和套組的各種修改和變化對熟悉該項技術者將係顯而易見的。雖已結合實施方式描述了本發明，但應當理解，能夠進行進一步修改並且所要求的發明不應當過度地局限於此類具體實施方式。事實上，對於熟悉該項技術者顯而易見的用於進行本發明之所述方式的各種修改旨在落入本發明之範圍內。本申請旨在涵蓋本發明之任何變化、使用或改編，其通常遵循本發明之原理並且包括與本揭露之此類偏離，屬於本發明所屬領域內的已知慣例，並且可能是適用於本文所述之基本特徵。

【符號說明】

【0606】 無

【生物材料寄存】

【0607】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種用於產生環狀多核糖核苷酸（circRNA）的富集群之方法，該方法包括：

(a) 提供包含多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包含circRNA和線性多核糖核苷酸（linRNA）；和

(b) 在不包括使用凝膠電泳的變性條件下將該circRNA與該linRNA分離，從而產生包含1,000個核苷酸或更少之長度的circRNA富集群。

【請求項2】 一種用於產生circRNA富集群之方法，該方法包括：

(a) 提供包含多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包含circRNA和linRNA，其中該circRNA包含1,000個核苷酸或更少之長度；和

(b) 將該多核糖核苷酸群暴露於變性條件，從而富集circRNA群。

【請求項3】 如請求項1或2所述之方法，其中：

(i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸之總重量為至少1 μg ；

(ii) 包含該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或

(iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

【請求項4】 如請求項2或3所述之方法，其中分離步驟 (b) 在不包括使用凝膠電泳的變性條件下進行；和/或其中該circRNA富集群基本上不含一或多種雜質或副產物，其中該一或多種雜質或副產物包含聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或乙二胺四乙酸（EDTA）。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度；或者其中該等變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【請求項6】 如請求項1至5中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括小

於5或大於9的pH。

【請求項7】 如請求項1至6中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括化學處理，該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【請求項8】 如請求項7所述之方法，其中該酸包含在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【請求項9】 如請求項7或8所述之方法，其中該鹼包含在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【請求項10】 如請求項7至9中任一項所述之方法，其中該有機溶劑包含至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【請求項11】 如請求項7至10中任一項所述之方法，其中該離散劑包含在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇（PEG）；和/或其中該離散劑包含在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【請求項12】 如請求項7至11中任一項所述之方法，其中該擁擠劑包含在100 mM與8 M之間的PEG或尿素。

【請求項13】 如請求項7至12中任一項所述之方法，其中該螯合劑包含在1 mM與10 mM之間的乙二醇-雙(β -胺基乙基醚)-*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、次氨基三乙酸（NTA）、亞胺基二琥珀酸（IDS）、聚天冬胺酸、*S,S*-乙二胺-*N,N'*-二琥珀酸（EDDS）或甲基甘胺酸二乙酸（MGDA）。

【請求項14】 如請求項7至13中任一項所述之方法，其中該洗滌劑包含在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【請求項15】 如請求項1至14中任一項所述之方法，其中步驟(b)包括對多核糖核苷酸群進行柱層析法，其中進行柱層析法包括平衡步驟、樣本載入步驟、柱洗滌步驟和洗脫步驟；其中該分離在該樣本載入步驟、該柱洗滌步驟和/或該洗脫步驟期間進行。

【請求項16】 如請求項15所述之方法，其中該柱層析法包括快速蛋白液相層析法(FPLC)、高壓液相層析法(HPLC)、疏水相互作用層析法(HIC)、陰離子交換層析法(AEC)、混合模式層析法或親和層析法。

【請求項17】 如請求項16所述之方法，其中該AEC包括

(i) 使用陰離子交換樹脂，其中該陰離子交換樹脂選自由苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化矽、瓊脂糖凝膠、纖維素、葡聚糖、環氧多胺、甲基丙烯酸酯、瓊脂糖和丙烯酸組成之群組；和/或其中該陰離子交換樹脂包含選自由四級銨、胺基乙基、二乙基胺基乙基和二乙基胺基丙基組成之群組的離子交換劑；和/或其中該陰離子交換樹脂包含珠粒，其中該等珠粒具有45 μ m-165 μ m的珠粒直徑和直徑100 nm-1000 nm的孔徑；和/或

(ii) 使用線性梯度洗脫或分步等度洗脫；和/或

(iii) 使用在1 mL/min與150 mL/min之間的流速。

【請求項18】 如請求項1至17中任一項所述之方法，其中步驟(b)藉由彙集純化的circRNA的多個級分來進行。

【請求項19】 如請求項1至18中任一項所述之方法，其中該circRNA和該linRNA具有相同的核糖核苷酸序列；和/或其中該circRNA和該linRNA具有相同的品質；和/或其中該circRNA和該linRNA缺少聚(A)尾。

【請求項20】如請求項1至19中任一項所述之方法，其中該方法包括該linRNA的核酸外切酶消化或其中該方法不包括該linRNA的核酸外切酶消化；和/或其中該方法不包括改善該circRNA的富集的對該circRNA或對該linRNA的選擇性修飾。

【請求項21】如請求項1至20中任一項所述之方法，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)係該circRNA在該多核糖核苷酸群中之百分比(w/w)的2倍；和/或其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)為至少65%；和/或其中該linRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)小於35%。

【請求項22】一種包含多核糖核苷酸群的組成物，該多核糖核苷酸群包含circRNA和linRNA，其中該circRNA包含1,000個核苷酸或更少之長度，其中該多核糖核苷酸群處於變性條件下的溶液中，並且其中：

- (i) 該多核糖核苷酸群中多核糖核苷酸的總品質為至少1 μg ；
- (ii) 包含該多核糖核苷酸群的該樣本之總體積為至少500 μL ；或
- (iii) 該樣本中該多核糖核苷酸群之濃度為至少500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

【請求項23】一種包含circRNA富集群的組成物，其中：

- (a) 該組成物獲自包含多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包含circRNA和linRNA，其中該circRNA包含1,000個核苷酸或更少之長度；
- (b) 該組成物已暴露於一或多種變性條件；並且
- (c) 該組成物基本上不含一或多種雜質或副產物。

【請求項24】如請求項22或23所述之組成物，其中該一或多種雜質或副產物包含聚丙烯醯胺、硼酸、鎂或EDTA。

【請求項25】如請求項22至24中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度；或者其中該等變性條件包括至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【請求項26】如請求項22至25中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【請求項27】如請求項22至26中任一項所述之組成物，其中該等變性條件包括化學處理，該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、攪擠劑、螯合劑、洗滌劑或鹽溶液處理。

【請求項28】如請求項27所述之組成物，其中該酸包含在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【請求項29】如請求項27或28所述之組成物，其中該鹼包含在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【請求項30】如請求項27至29中任一項所述之組成物，其中該有機溶劑包含至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【請求項31】如請求項27至30中任一項所述之組成物，其中該離散劑包含在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇（PEG）；和/或其中該離散劑包含在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【請求項32】如請求項27至31中任一項所述之方法，其中該攪擠劑包含在100 mM與8 M之間的聚乙二醇（PEG）或尿素。

【請求項33】如請求項27至32中任一項所述之組成物，其中該螯合劑包含在1 mM與10 mM之間的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、EDDS或MGDA。

【請求項34】如請求項27至33中任一項所述之組成物，其中該洗滌劑包含在

0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的NP40、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -d-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

【請求項35】 如請求項22至34中任一項所述之組成物，其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)係該circRNA在該多核糖核苷酸群中之百分比(w/w)的2倍；和/或其中該circRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)為至少65%；和/或其中該linRNA在該circRNA富集群中之百分比(w/w)小於35%。

【請求項36】 如請求項22至35中任一項所述之組成物，其中該circRNA和該linRNA具有相同的核糖核苷酸序列；和/或其中該circRNA和該linRNA具有相同的品質；和/或其中該circRNA和該linRNA缺少聚(A)尾。

【請求項37】 一種確定circRNA的純度之方法，該方法包括：

- (a) 提供包含多核糖核苷酸群的樣本，該多核糖核苷酸群包含circRNA和linRNA，其中該circRNA包含1,000個核苷酸或更少之長度；
- (b) 在變性條件下藉由層析法將該circRNA與該linRNA分離；和
- (c) 收集該樣本的層析圖，其包含該circRNA的峰和該linRNA的峰；
- (d) 計算每個峰下的面積以確定該樣本中該circRNA的純度。

【請求項38】 如請求項37所述之方法，其中該等變性條件不包括使用凝膠電泳。

【請求項39】 如請求項37或38所述之方法，其中該等變性條件包括至少50°C的溫度；或者其中該等變性條件包括在不超過30秒的時間段內至少50°C的溫度，然後是不超過8°C的溫度。

【請求項40】 如請求項37至39中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括小於5或大於9的pH。

【請求項41】 如請求項37至40中任一項所述之方法，其中該等變性條件包括化學處理，該化學處理包括用酸、鹼、有機溶劑、離散劑、擁擠劑、螯合劑、洗

滌劑或鹽溶液處理。

【請求項42】如請求項41所述之方法，其中該酸包含在1 mM與500 mM之間的乙酸、鹽酸、水楊酸、磷酸、硼酸、甲酸、草酸、檸檬酸、苯甲酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、抗壞血酸或硝酸。

【請求項43】如請求項41或42所述之方法，其中該鹼包含在1 mM與500 mM之間的氫氧化鈉、氫氧化鉀、咪唑、組胺酸、碳酸氫鈉、胍或三乙胺。

【請求項44】如請求項41至43中任一項所述之方法，其中該有機溶劑包含至少0.1% (v/v) 的二甲基亞砷、三乙基乙酸銨、甲醇、乙醇、2-丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三級丁醇、異丁醇、苯酚、氯仿、己烷、乙腈、甲醯胺、丙酮、地那銨或丙二醇。

【請求項45】如請求項41至44中任一項所述之方法，其中該離散劑包含在100 mM與8 M之間的尿素、氯化胍、過氯酸鋰或聚乙二醇（PEG）；和/或其中該離散劑包含在100 mM與8 M之間的正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、正辛基葡萄糖苷、CHAPS或去氧膽酸鹽。

【請求項46】如請求項41至45中任一項所述之方法，其中該攪攪劑包含在100 mM與8 M之間的聚乙二醇（PEG）或尿素。

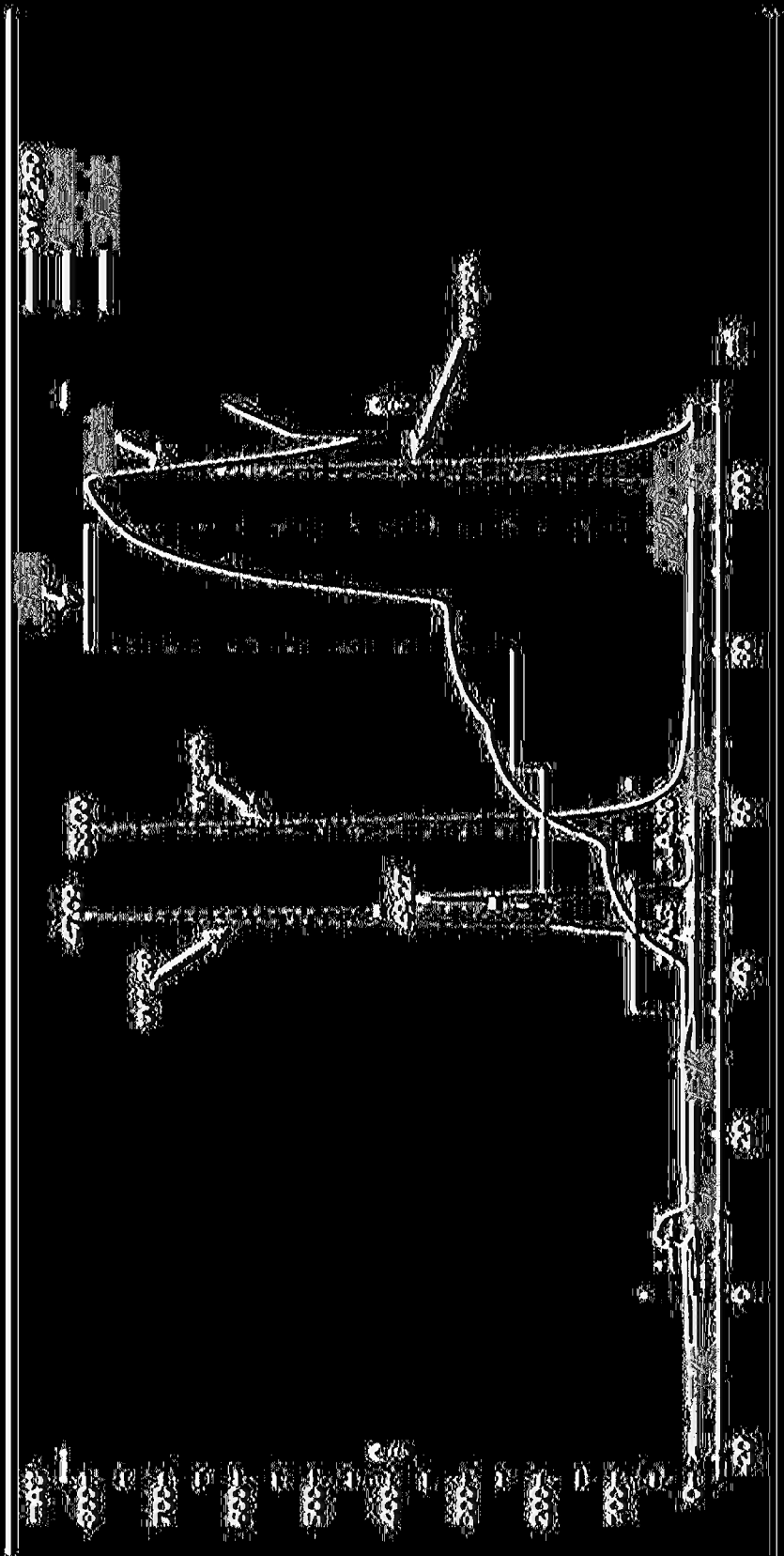
【請求項47】如請求項41至46中任一項所述之方法，其中該螯合劑包含在1 mM與10 mM之間的EGTA或其衍生物、EDTA或其衍生物、NTA、IDS、聚天冬胺酸、EDDS或MGDA。

【請求項48】如請求項41至47中任一項所述之方法，其中該洗滌劑包含在0.005% (v/v) 與0.05% (v/v) 之間的Nonidet P-40 (NP40)、CHAPS、辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β -D-麥芽糖苷、Tween-20或Tween-80。

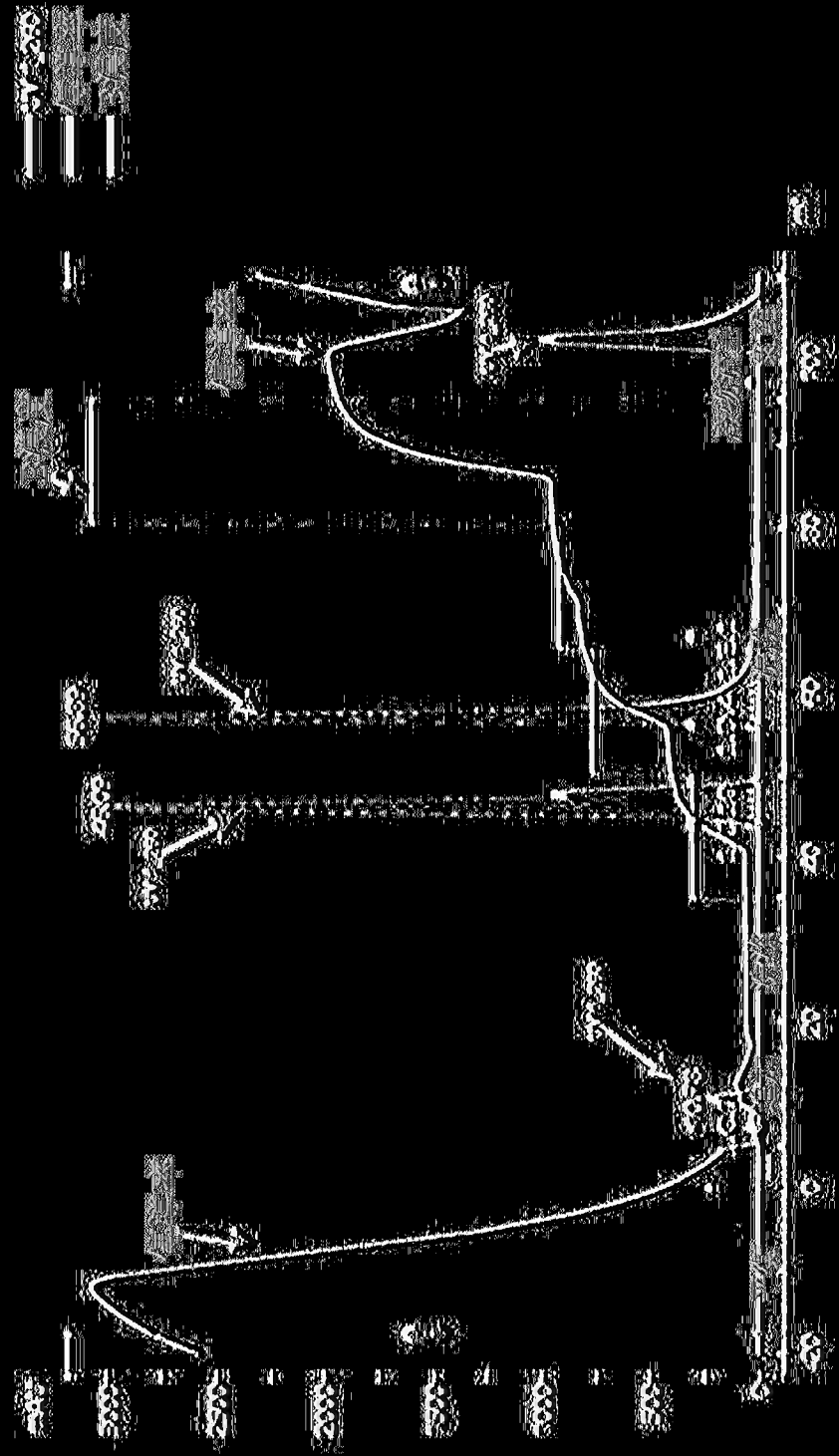
【請求項49】如請求項37至48中任一項所述之方法，其中該層析法為液相層析法，其中該液相層析法選自由FPLC、HPLC、HIC、AEC、MMC或親和層析法

組成之群組。

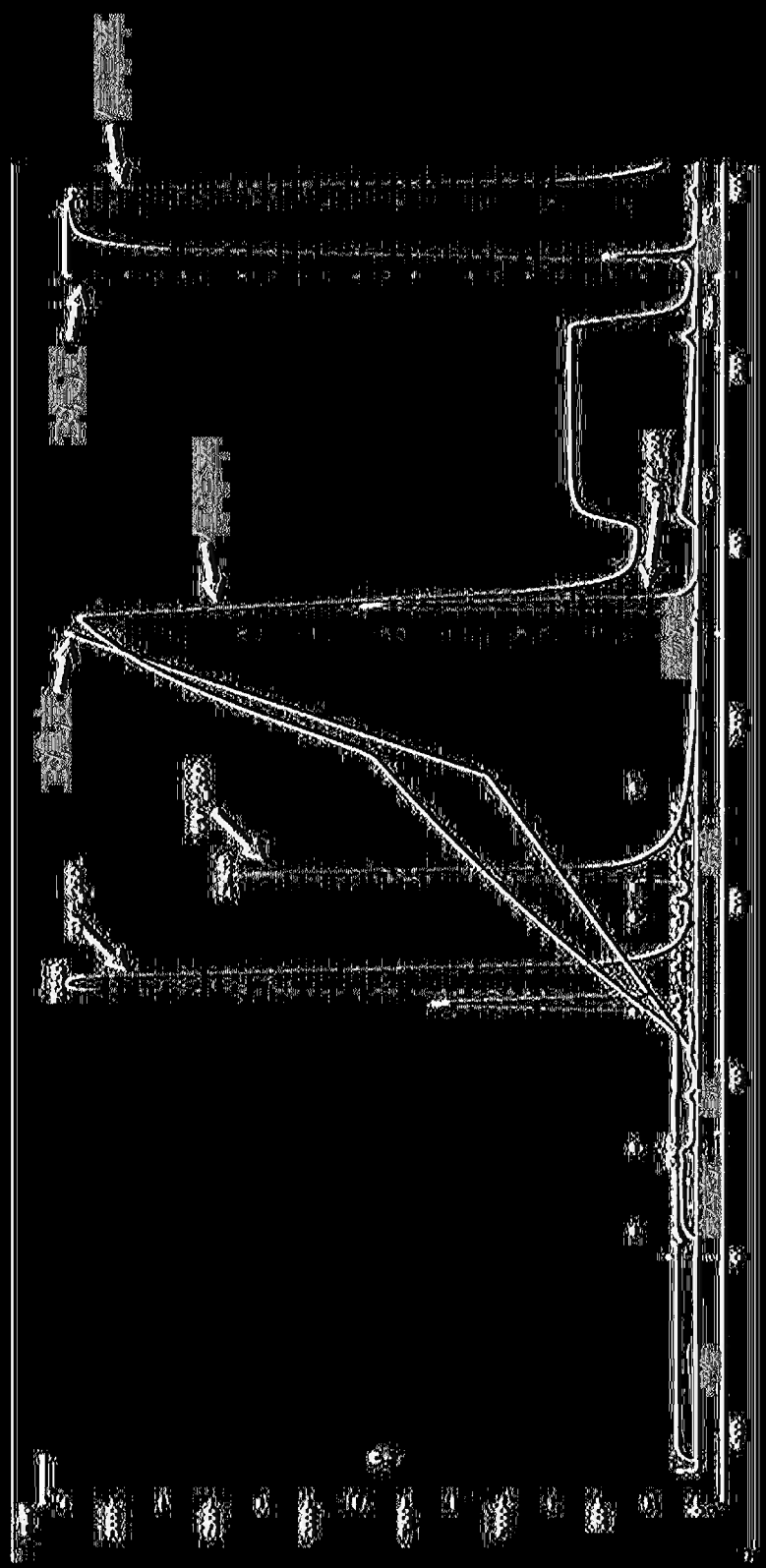
【請求項50】如請求項37至49中任一項所述之方法，其中該純度的相對標準差（RSD）小於5%。



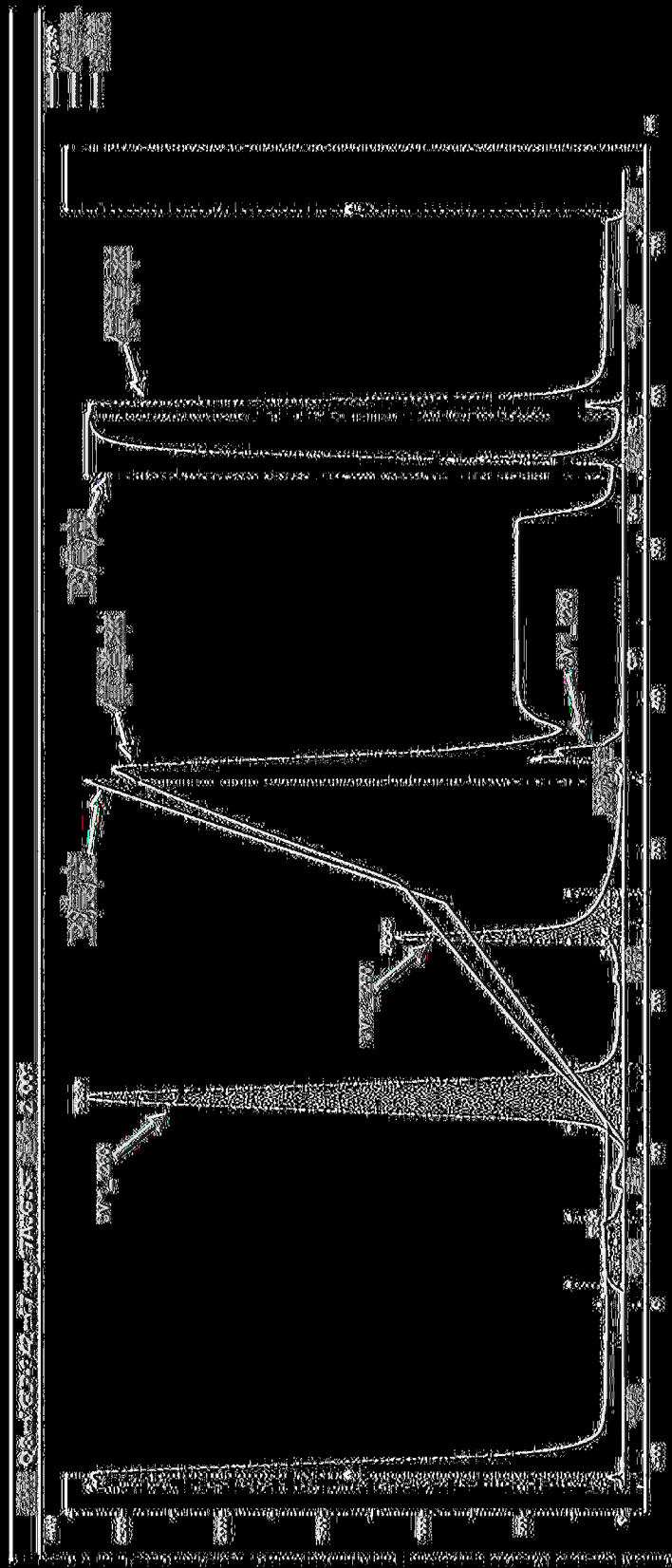
【圖式】



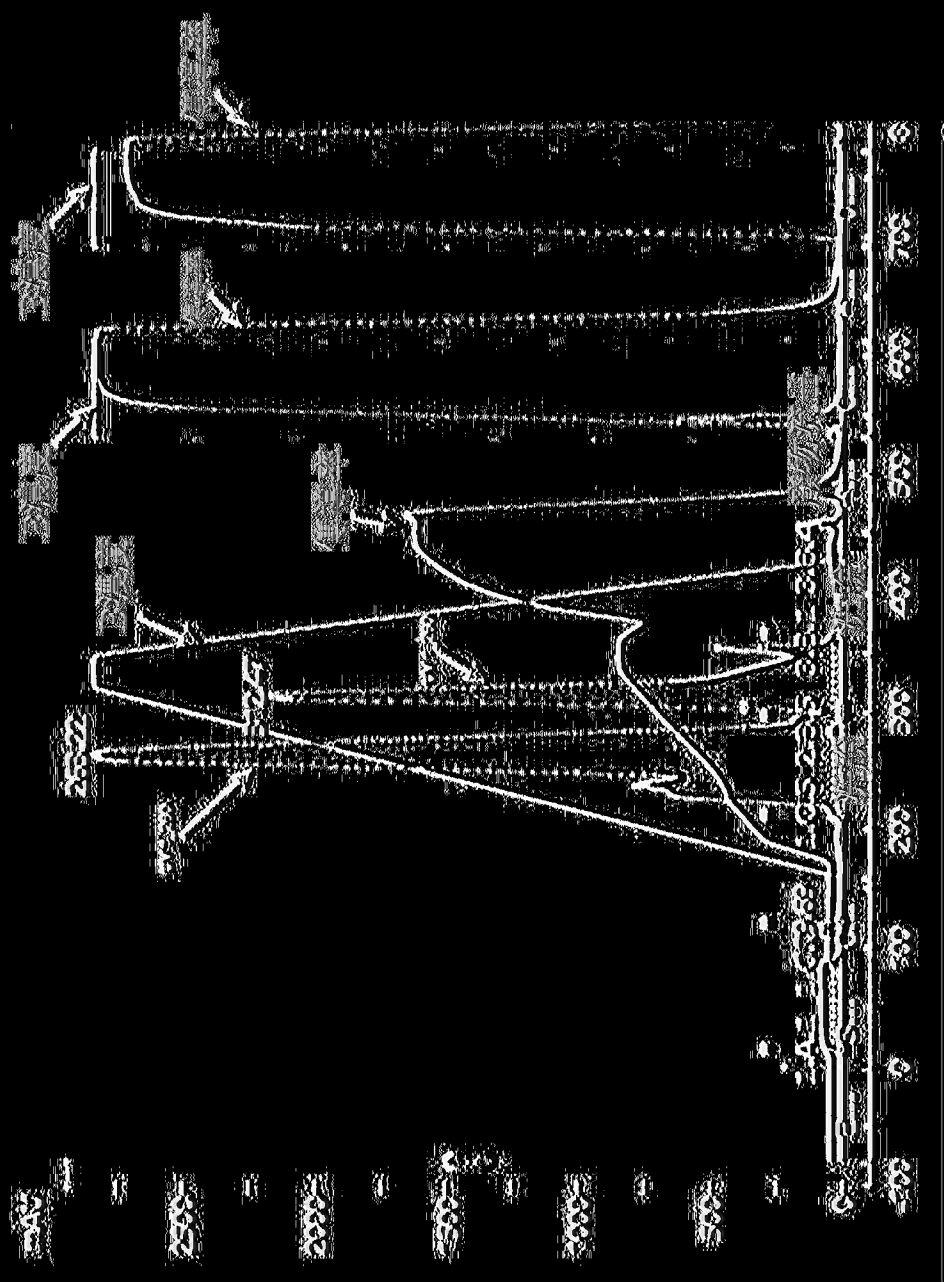
[圖 2]



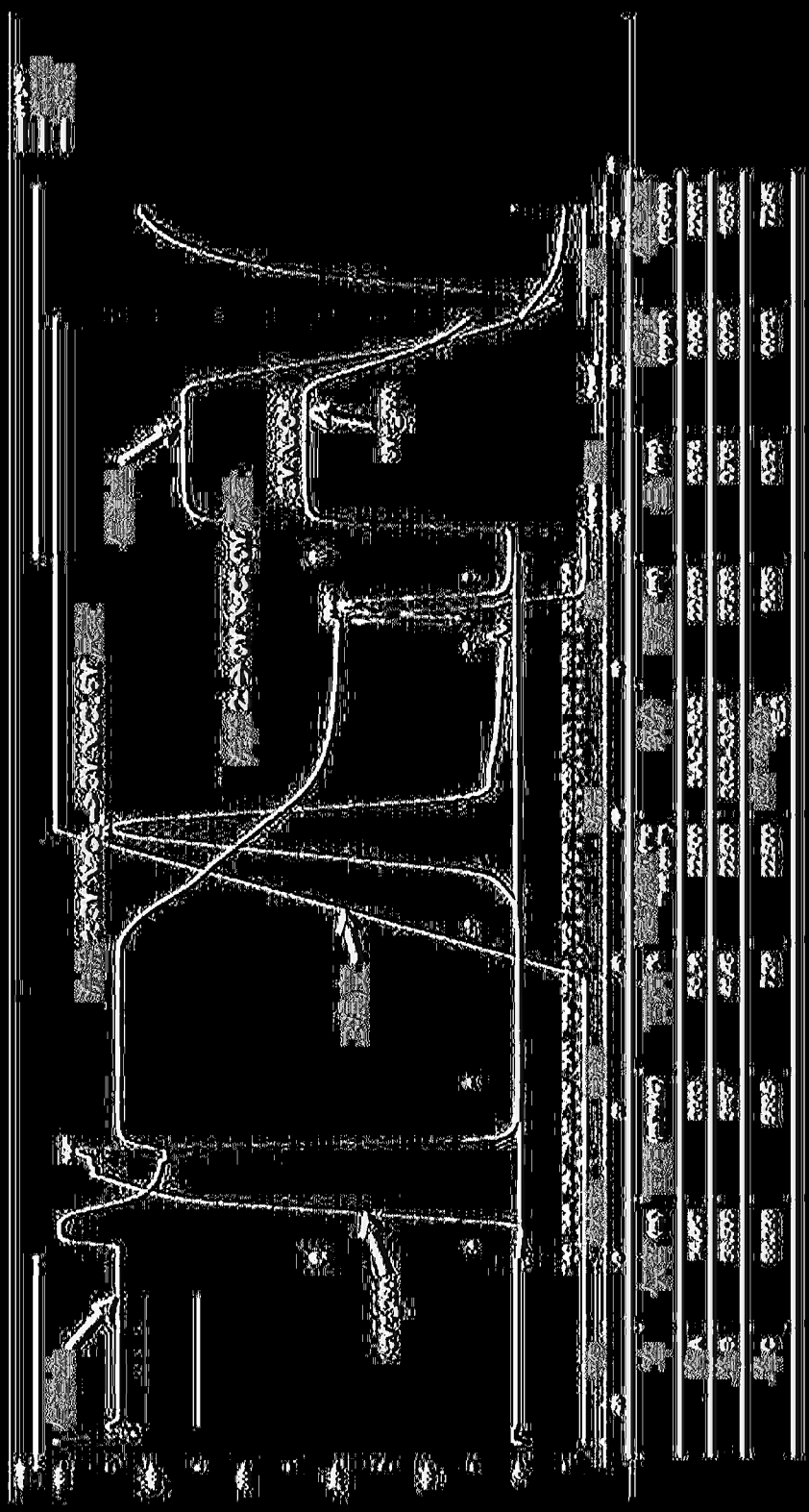
【圖3】



[圖 7]



[圖 5]



[圖 6]

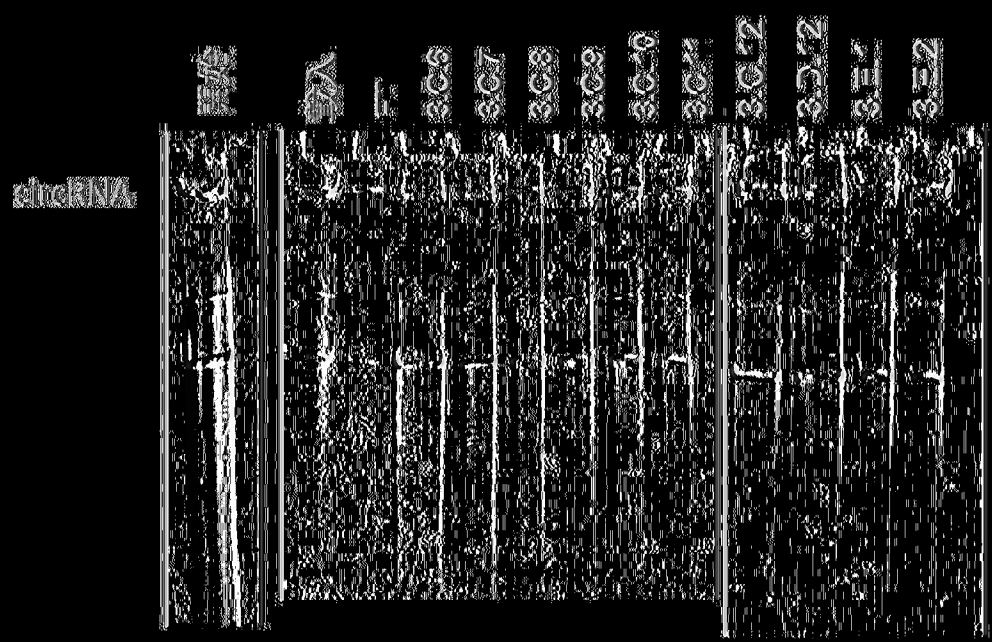
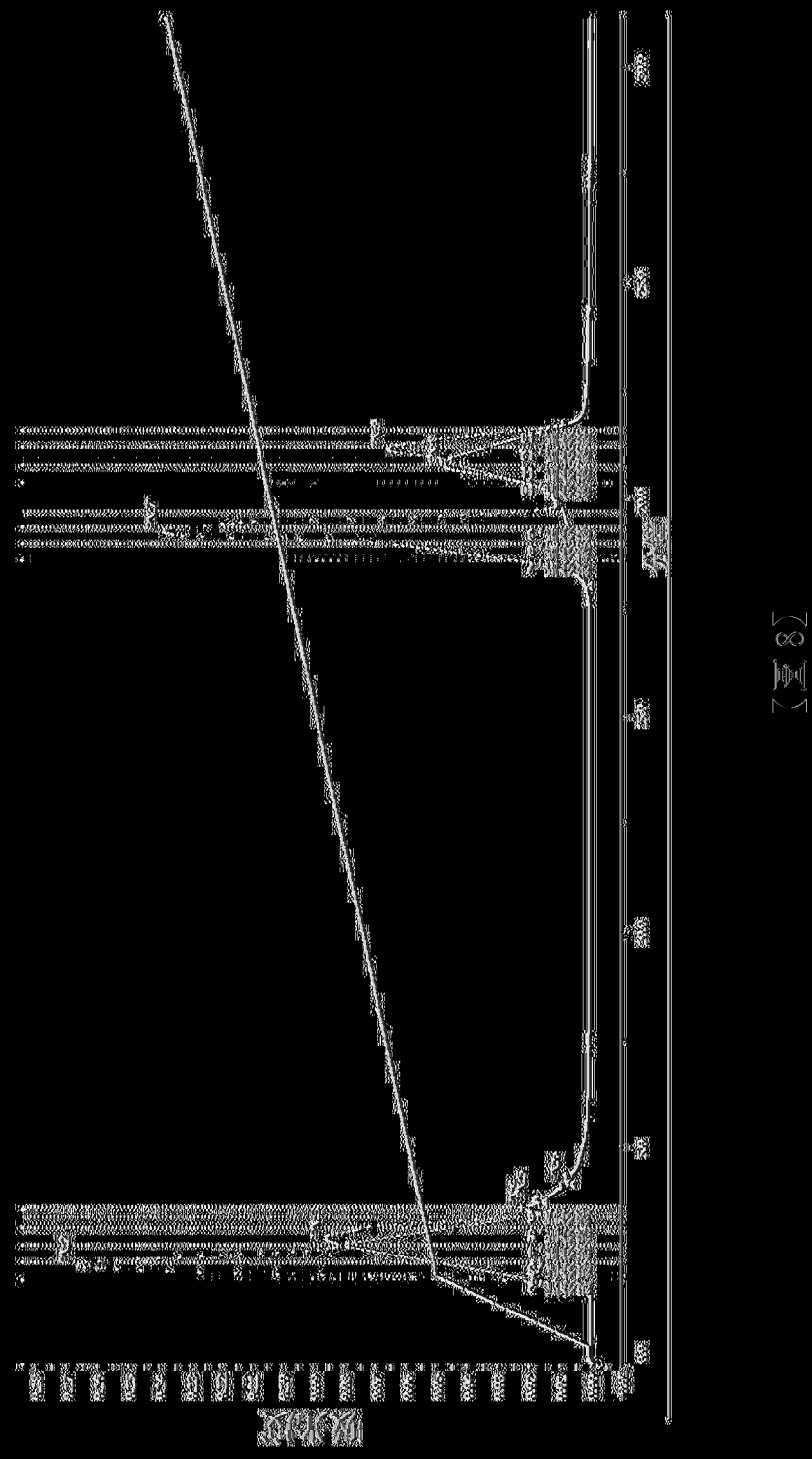
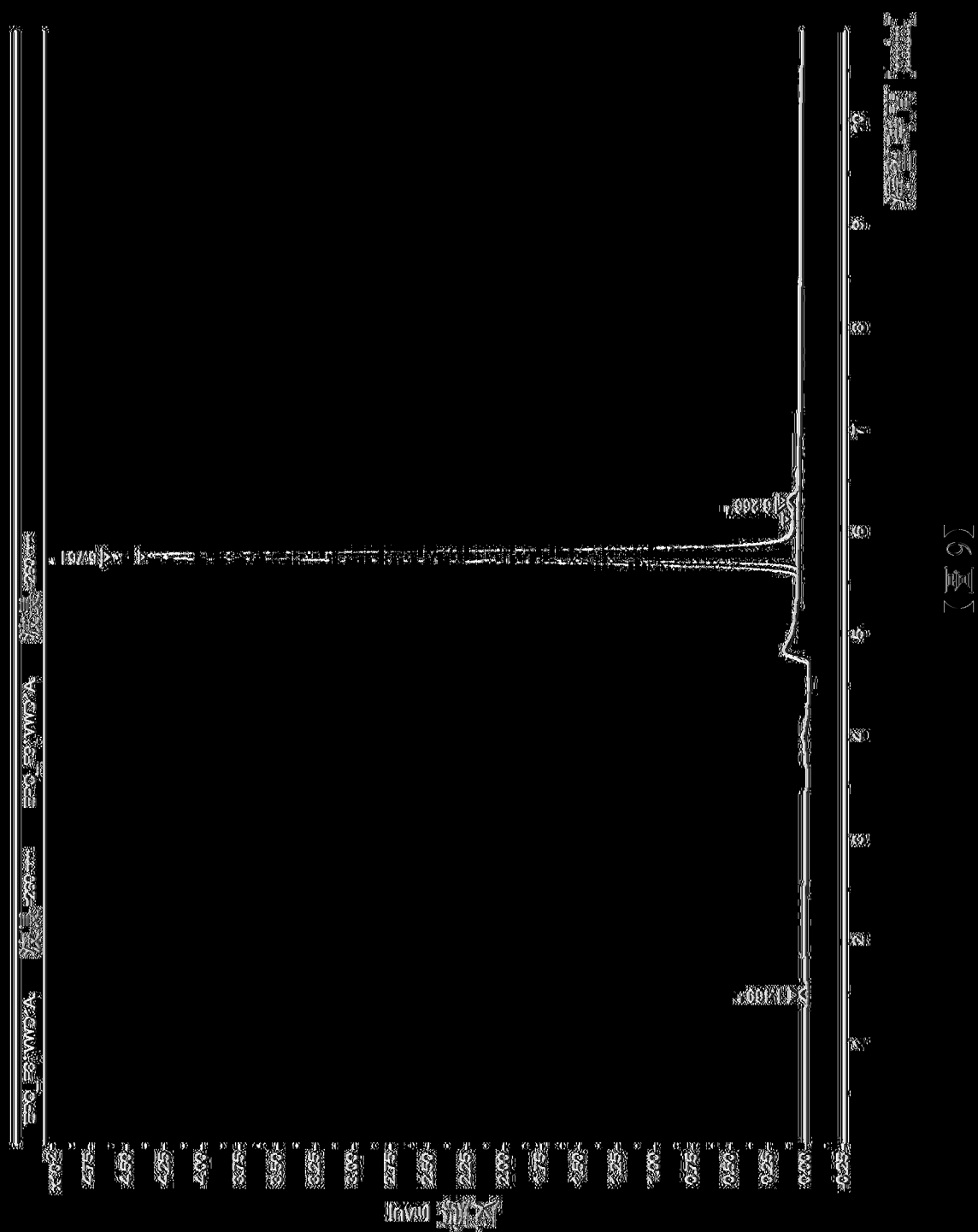
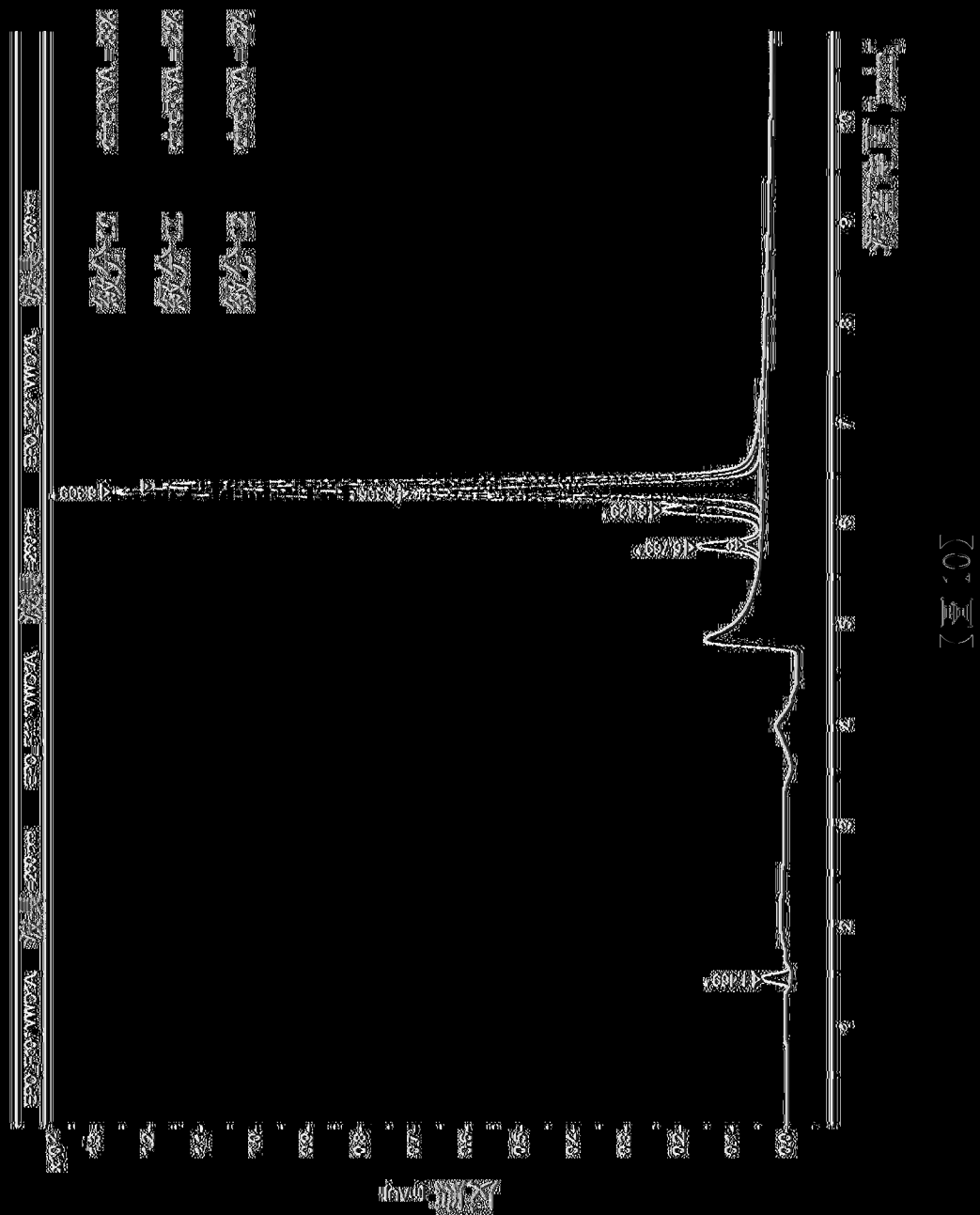


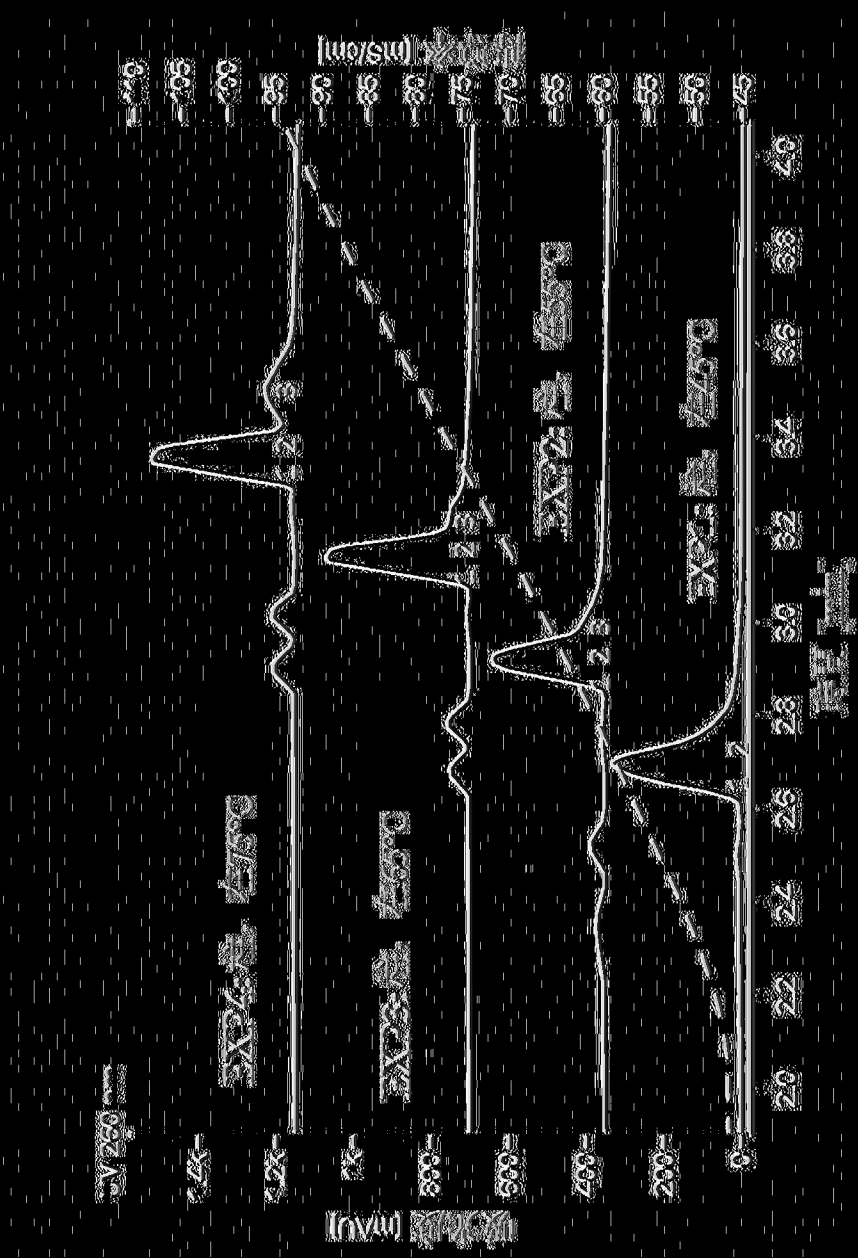
FIG. 1



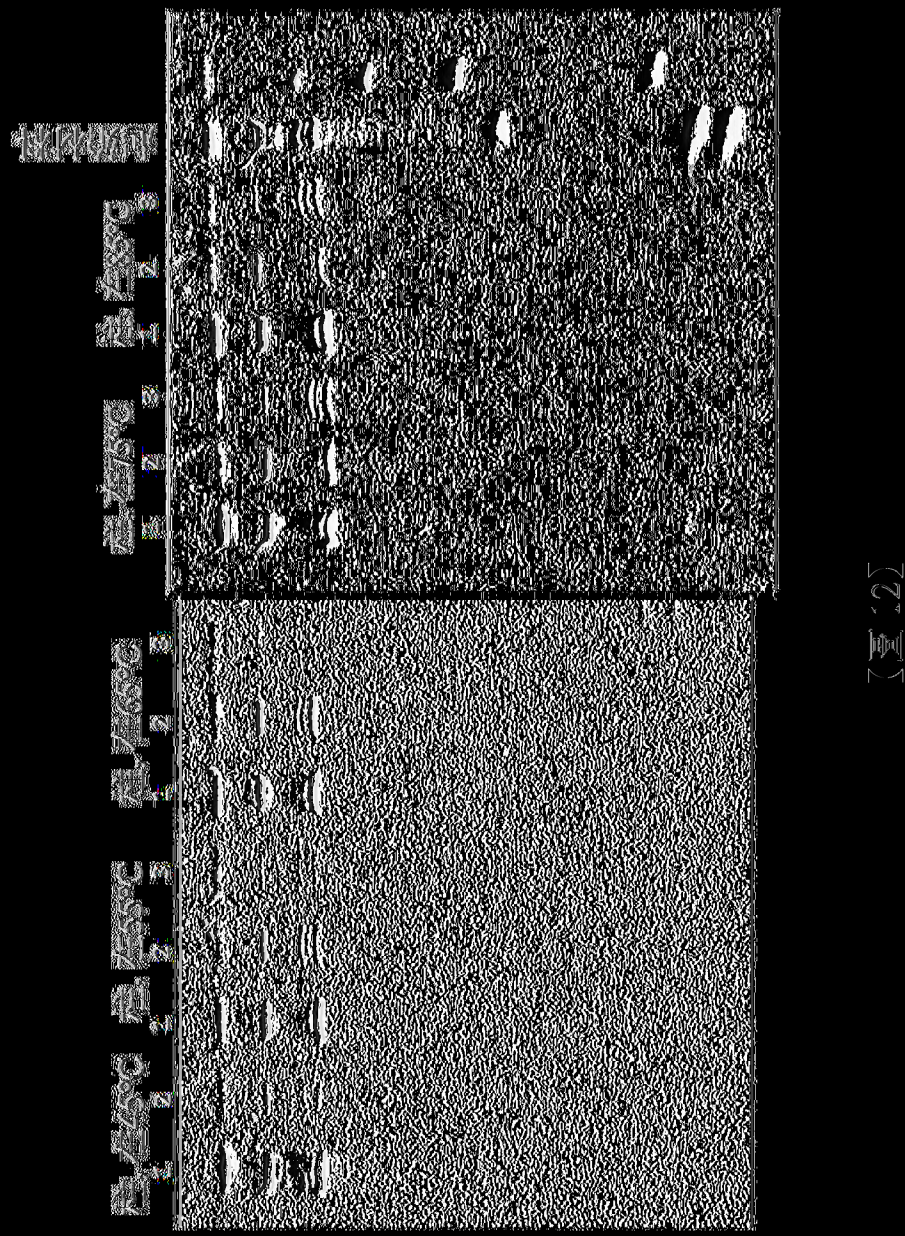
[8]

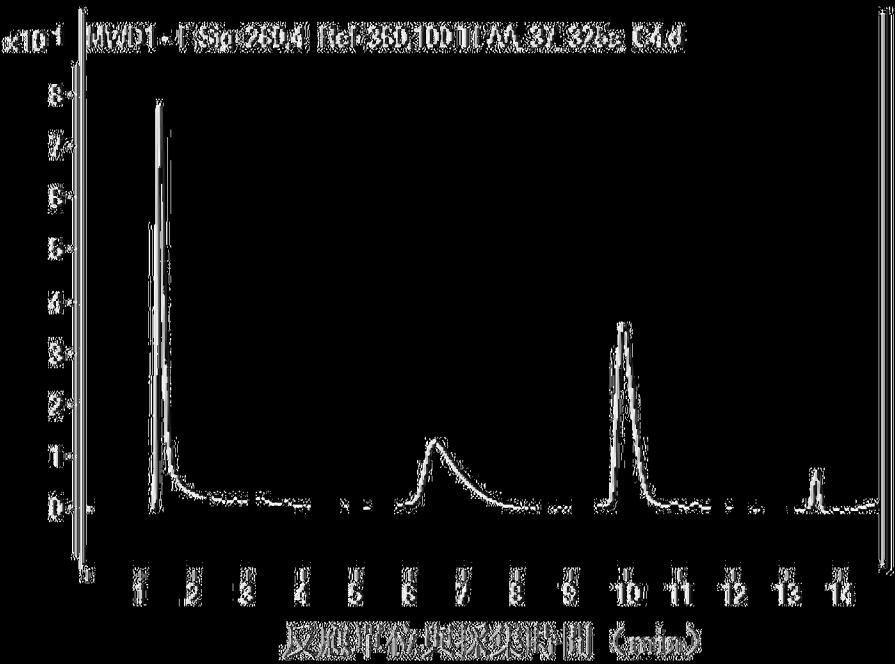




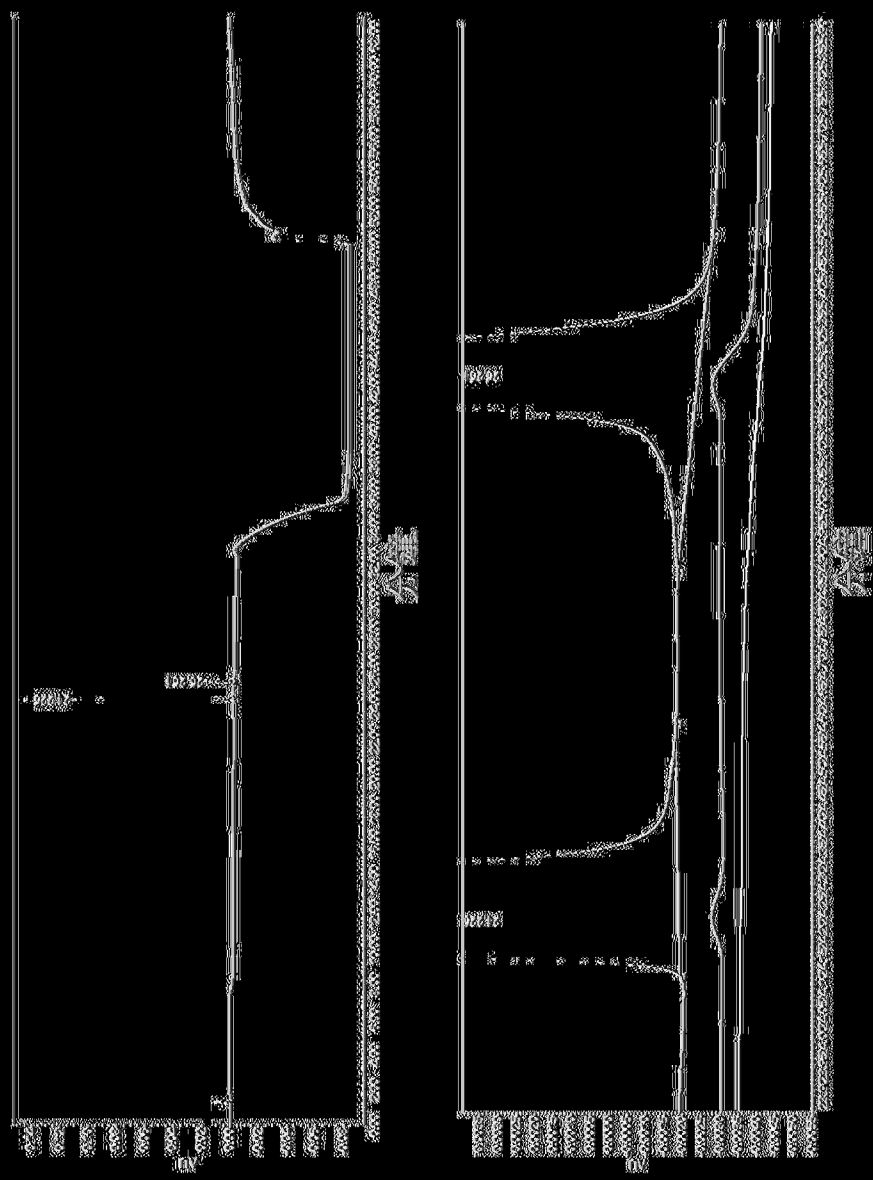


【圖 1】

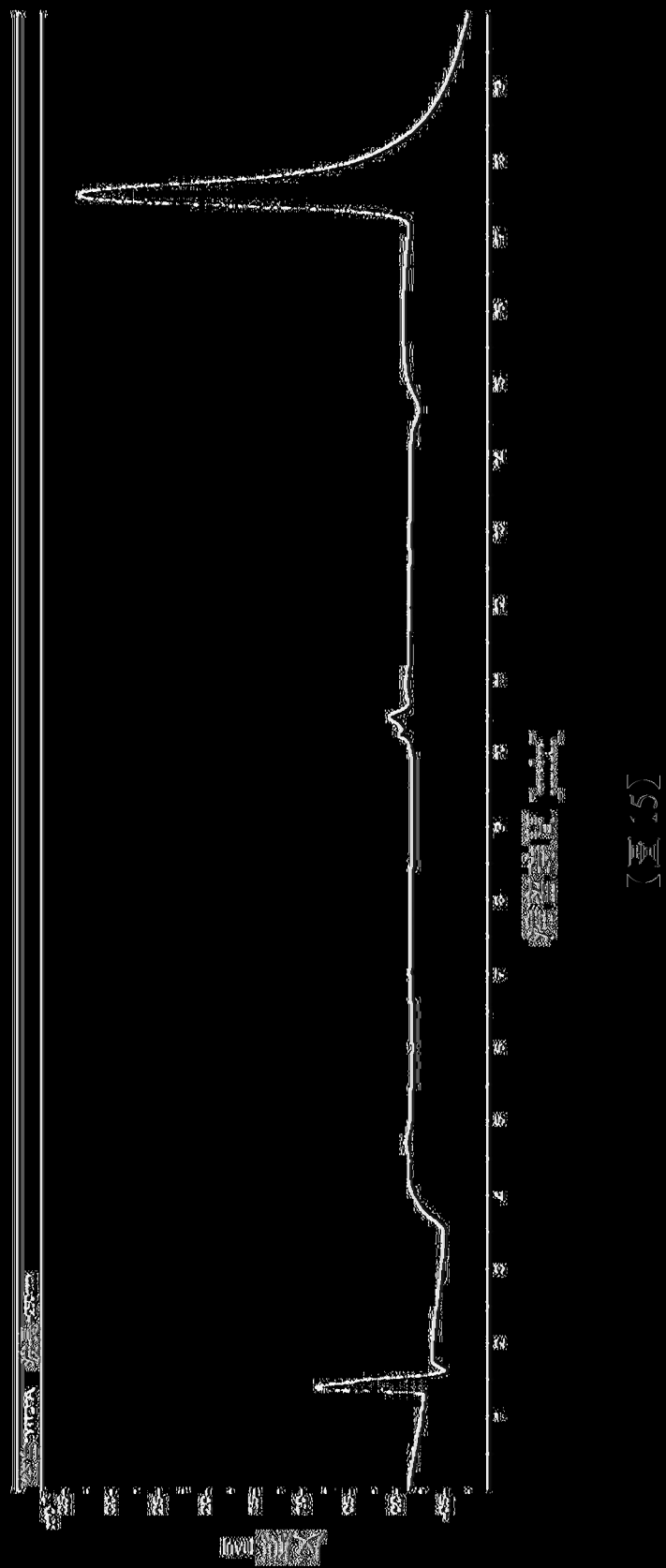




[(圖13)]



[圖 4]



【図15】

