

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-511324
(P2025-511324A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全27頁)

(21)出願番号	特願2024-558364(P2024-558364)	(71)出願人	521262714
(86)(22)出願日	令和5年4月6日(2023.4.6)		ザルトリウス ビーアイエー セパレーシ
(85)翻訳文提出日	令和6年12月2日(2024.12.2)		ョンズ ディー. オー. オー.
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/059215		スロベニア共和国 5 2 7 0 アイドフシ
(87)国際公開番号	WO2023/194562		ユチナ ミルケ 2 1
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)	(74)代理人	110000796
(31)優先権主張番号	22167222.3		弁理士法人三枝国際特許事務所
(32)優先日	令和4年4月7日(2022.4.7)	(72)発明者	ブツ ヤスミナ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		スロベニア国 5 0 0 0 ノヴァ ゴリツァ
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く	(72)発明者	メグサー ポロナ
			スロベニア国 4 2 2 8 ジェレズニキ ナ
			クレス 1 1
		(72)発明者	セキルニク ロク
			スロベニア国 1 3 7 0 ロガテツ ノト
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 低pH処理によるRNA調製物からの二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の除去方法

(57)【要約】

本発明は、RNA調製物から二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を除去する方法であって、RNA調製物をpH1～pH5の範囲のpHでインキュベートする工程と、RNA調製物を精製に供して、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離によって生じた断片を除去する工程とを含む、方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R N A 調製物から二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を除去する方法であって、
(a) 前記 R N A 調製物を p H 1 ～ p H 5 の範囲の p H でインキュベートする工程と、
(b) 前記 R N A 調製物を精製に供して、前記二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離によって生じた断片を除去する工程と、
を含む、方法。

【請求項 2】

工程 (a) において、前記 R N A 調製物が 2 5 秒～1 時間インキュベートされる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

工程 (a) が、変性剤及び／又はキレート剤を含む緩衝液中で行われる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (a) が、4 ℃～5 0 ℃の温度で行われる、請求項 1 ～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (a) が、アフィニティークロマトグラフィー工程の一部として行われ、前記 R N A 調製物が、p H 6 ～p H 8 の範囲の p H でアフィニティークロマトグラフィー媒体にロードされ、その後、p H を p H 1 ～p H 5 の範囲の p H に低下させる、請求項 1 ～4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

(i) 前記 R N A 調製物が、工程 (a) において使用した p H で前記精製に供されるか、又は、

(i i) 前記 R N A 調製物の p H が、工程 (a) が p H 5 で既に行われていない場合、前記精製前に、工程 (a) において使用した p H よりも高い p H ～p H 5 の範囲の p H まで上昇されるか、又は、

(i i i) 前記 R N A 調製物の p H が、前記精製前に、p H 5 超～p H 7 の範囲の p H まで上昇される、

請求項 1 ～5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記精製が、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、I M A C (固定化金属アフィニティークロマトグラフィー) 、分子量カットオフ濾過、及び沈殿／抽出技術からなる群より選択される技術によって実施される、請求項 1 ～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

(i) 前記精製が、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、及び I M A C (固定化金属アフィニティークロマトグラフィー) からなる群より選択される技術によって実施され、

40

(i i) 工程 (a) 及び工程 (b) が、前記 R N A 調製物が前記クロマトグラフィー媒体に結合している間に同時に行われる、

請求項 1 ～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記技術が、四級アミン (Q A) 、三級アミン、二級アミン、及び一級アミンからなる群より選択される陰イオン交換リガンドを使用して、p H 1 ～p H 5 の範囲の p H で行われる陰イオン交換クロマトグラフィーである、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

50

【請求項 10】

前記陰イオン交換リガンドが、ジエチルアミノエチル（DEAE）又はジメチルアミノエチル（DMEA）である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記技術が、スルホン酸基を含有する陽イオン交換リガンド、硫酸基を含有する陽イオン交換リガンド、及びカルボキシル基を含有する陽イオン交換リガンドからなる群より選択される陽イオン交換リガンドを使用して、pH 1～pH 5 の範囲の pH で行われる陽イオン交換クロマトグラフィーである、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記技術が、親和性残基、疎水性相互作用残基、イオン交換残基、水素結合残基、金属キレート残基、芳香族残基、及びそれらの組合せからなる群より選択される複数の種類の化学残基を含むマルチモーダルリガンドを使用して、pH 1～pH 5 の範囲の pH で行われるマルチモーダルクロマトグラフィーである、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記技術が、アフィニティーリガンドを使用して、pH 1～pH 5 の範囲の pH で行われるアフィニティークロマトグラフィーである、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 RNA 調製物において調製される RNA が、メッセンジャー RNA（mRNA）、自己増幅 RNA（saRNA）及び環状 RNA（circRNA）からなる群より選択される、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物が、二本鎖 RNA（dsRNA）、二本鎖 DNA（dsDNA）、RNA-DNA ヘテロ二本鎖構造、及び多重鎖ホモ又はヘテロマー核酸構造からなる群より選択される非一本鎖核酸構造である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、RNA 調製物から二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を除去する方法であって、RNA 調製物を pH 1～pH 5 の範囲の pH でインキュベートする工程と、RNA 調製物を精製に供して、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離によって生じた断片を除去する工程とを含む、方法に関する。

【背景技術】

【0002】

mRNA ベースの COVID-19 ワクチンの最近の臨床的成功は、複数の治療領域におけるワクチンとして RNA ベースの治療薬の開発への前例のない投資を引き起こした。

【0003】

RNA は、in vitro 転写（IVT）反応において、RNA ポリメラーゼ酵素を使用して DNA 鋳型を RNA に酵素変換することによって生成される。治療用途に使用される RNA には、メッセンジャー RNA（mRNA）、自己増幅 RNA（saRNA）及び環状 RNA が含まれる。IVT 反応によって生じる不純物には、二本鎖及び多重鎖核酸種の範囲が含まれ、主な不純物は二本鎖 RNA（dsRNA）である。dsRNA は、宿主免疫系が侵入ウイルスとして dsRNA を認識する可能性のある免疫原性応答のため、RNA 治療薬において重要な不純物である。dsRNA 副生成物に対する細胞性自然免疫応答は、タンパク質合成及び細胞死の抑制を含む望ましくない結果につながる可能性があり、それにより、RNA 療法の有効性に有害な影響を与える可能性がある。

【0004】

2 つの主たる種類の dsRNA 副生成物が確認されており、1 つは、ランオフ生成物の 3' 伸長によって形成され、シス（同じ RNA 分子上で折り返される）又はトランス（第 2 の RNA 分子とのアニーリング）のいずれかでランオフ転写産物の本体の相補的配列と

アニーリングして、伸長した二本鎖を形成する。2つ目の種類のdsRNAは、アンチセンスRNA分子のランオフ転写産物とのハイブリダイゼーションによって形成される。アンチセンスRNA分子は、プロモーター及びランオフ転写産物非依存的に形成されることが報告されている。RNAポリメラーゼは非鋳型鎖にスイッチし、ランオフ生成物に対して相補的なRNA分子を生じ得る。

【0005】

したがって、dsRNAは明確に定義された不純物ではなく、異なった長さのRNA配列の不均一な集団を形成する。

【0006】

dsRNAの除去は通常、2つのクロマトグラフィー手法のうちの1つによって行われ、両方とも一本鎖(ssRNA)対dsRNAの相対的疎水性の違いを利用する。これらの第1の手法は逆相(RP)HPLCであり、第2の手法はクロマトグラフィーセルロース媒体を使用したクロマトグラフィーである。しかしながら、これらの現在の手法は非特異的であり、拡張性に乏しい。特に、RPクロマトグラフィーは、生物学的治療薬の製造において望ましくない高温及び有機溶媒の両方を利用する。さらに、3'伸長生成物はssRNAよりも長く、したがってより疎水性であるため除去されるが、ランオフ転写産物として生成されるアンチセンス転写産物は除去されない。さらに、クロマトグラフィー媒体としてのセルロースは定義が不十分であり、容易に拡張できない。さらに、分離を駆動する力は理解されておらず、したがって十分に制御されていない。

【0007】

dsRNAの除去のための第3の手法は、リボヌクレアーゼIIIを使用した酵素分解である。しかしながら、リボヌクレアーゼIIIは非特異的であり、すなわち、dsRNAだけでなくssRNAも消化する。さらに、製造プロセスにおける酵素の使用は望ましくないため、この手法はRNAの商業規模の製造について実現可能ではない。

【0008】

RNA調製物に関連する第2の重要なクラスの不純物は、RNAへのin vitro転写に使用された残留DNA鋳型である。DNA鋳型は通常、目的の遺伝子、5'及び3'UTR領域、ポリメラーゼ結合部位、並びに選択マーカーをコードするDNAの線状化形態である。RNA調製物中の残留プラスミド鋳型の存在は、免疫原性応答を引き起こす可能性があるため、残留プラスミドは最終的なRNA調製物から除去されなければならない。典型的な精製手法には、精製工程(沈殿、タンジェント流濾過(TFF)又はクロマトグラフィー)と組み合わせたIVT後のデオキシリボヌクレアーゼ処理が含まれる。この手法は非常に選択的で効率的であるが、更なる夾雑物(例えば、酵素)を導入し、これは精製プロセスにて除去する必要がある。デオキシリボヌクレアーゼ処理がない状態で、RNAの親和性精製(例えば、ポリアデニル化mRNAのオリゴdT精製)が達成するDNA除去レベルは高いが完全なものではなく、これは、親和性精製後の残留プラスミドが、特異的又は非特異的塩基対相互作用(本明細書において二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物として定義されるものを形成する)を介してRNA分子と相互作用しているものと推測される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、本発明の根底にある技術的課題は、RNA調製物から二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を除去するための改善された手段の提供であり、これは、高い特異性、良好な拡張性を示し、したがって、商業的に実現可能な規模でのRNAベースの治療薬の製造に好適でなければならない。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記の技術的課題に対する解決策は、特許請求の範囲に特徴付けられる実施の形態によって達成される。

【0011】

特に、本発明は、RNA調製物から二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を除去する方法であって、

(a) RNA調製物をpH1～pH5の範囲のpHでインキュベートする工程と、

(b) RNA調製物を精製に供して、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離によって生じた断片を除去する工程と、
を含む、方法に関する。

【0012】

RNAの調製に関連することができ、本発明に従って除去することができる二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物には、任意の非一本鎖核酸構造、特にdsRNA、dsDNA（例えば、IVT反応からの鋳型DNA）、RNA-DNAヘテロ二本鎖構造、及び多重鎖ホモ又はヘテロマー核酸構造（例えば、RNA鎖及び／又はDNA鎖（例えば、RNA/DNA三重鎖）の非特異的（すなわち、非ワトソン・クリック・ベース）会合によって形成される）が含まれる。特定の実施の形態において、RNAの調製に関連することができ、本発明に従って除去することができる二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物には、dsRNA、RNA-DNAヘテロ二本鎖構造、及び多重鎖ホモ又はヘテロマー核酸構造が含まれ、不純物としてのdsRNAが特に好ましい。

【0013】

この文脈において、「二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の除去」という用語には、汚染RNA若しくはDNA一本鎖、又はDNA二本鎖が標的RNA（すなわち、RNA調製物において調製されるRNA）にアニーリングし、結果として生じるdsRNA構造、又はRNA-DNAヘテロ二本鎖、若しくはRNA-DNA三重鎖、若しくは他の多重鎖構造が、標的RNAから汚染RNA又はDNA鎖（複数の場合もある）の解離を引き起こすことによって、その後除去される状況が明示的に含まれる。

【0014】

本発明によれば、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を含有するRNA調製物は、それぞれの核酸鎖を互いに解離させるpH1～pH5の範囲の低pH条件に供される。

【0015】

本明細書で使用される「RNA調製物」という用語は、好適な緩衝液中に標的RNAを含有する任意の物理的溶液に関する。pH1～pH5の範囲のpHでのRNA調製物のインキュベーションには、例えば、標的RNAが存在する緩衝液を酸性化することにより（例えば、緩衝液を酸性緩衝液と組み合わせることにより）、又は標的RNAを新しい（酸性）緩衝液に移すことにより、標的RNAにそれぞれのpH環境を提供する任意の手段が含まれる。

【0016】

本発明によれば、上記のRNA調製物は、pH1～pH5の範囲のpH（この範囲には境界値pH1及びpH5が明示的に含まれる）でインキュベートされる。好ましい実施の形態において、RNA調製物は、下限がpH1.0、pH1.1、pH1.2、pH1.3、pH1.4、pH1.5、pH1.6、pH1.7、pH1.8、pH1.9、及びpH2.0からなる群より選択され、上限がpH5.0、pH4.9、pH4.8、pH4.7、pH4.6、pH4.5、pH4.4、pH4.3、pH4.2、pH4.1、pH4.0、pH3.9、pH3.8、pH3.7、pH3.6、pH3.5、pH3.4、pH3.3、pH3.2、pH3.1、及びpH3.0からなる群より選択される範囲のpHでインキュベートされる。特定の実施の形態において、RNA調製物は、pH2～pH4の範囲、pH2～pH3.5の範囲、又はpH2～pH3の範囲のpHでインキュベートされる。例えば、RNA調製物は、約pH3でインキュベートすることができる。

【0017】

本発明の方法の工程(a)におけるインキュベーションは、核酸鎖の大部分を互いに解離させるのに十分な時間の間行うことができる。それぞれの持続時間は、温度、pH、及

10

20

30

40

50

び不純物の性質（例えば、二本鎖及び／又は多重鎖領域の長さに関して）を含む種々の要因に依存し、当業者によって適切に選択され得る。それぞれの持続時間は、数秒（例えば1秒を含む）～数時間の範囲であり、例示的な持続時間の範囲には、25秒～1時間、1分～1時間、10分～40分、20分～40分、25分～35分、例えば、約30分のインキュベーションが含まれる。

【0018】

特定の実施の形態において、本発明の方法の工程（a）は、酸性緩衝液中で行われる。任意の選択されたpH又はpH範囲に好適な緩衝液は当該技術分野において既知であり、当業者が選択又は設計することができる。この点に関する例示的な緩衝液には、2～5の範囲の pK_a を有する緩衝液が含まれる。具体的な例示的緩衝液としては、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、グリシン緩衝液、グリシルグリシン緩衝液、リンゴ酸緩衝液、マレイン酸緩衝液、リン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、ギ酸緩衝液、及びそれらの組合せが挙げられる。それぞれの緩衝液は、変性剤及び／又はキレート剤を含有することができ、変性剤は、好ましくはカオトロピック剤、有機溶媒、及びそれらの組合せである。それぞれのカオトロピック剤、有機溶媒、及びキレート剤は、特に限定されず、当該技術分野において既知である。そのようなカオトロピック剤としては、例えば、尿素、グアニジン、及びそれらの組合せが挙げられる。さらに、有機溶媒としては、例えばアセトニトリルが挙げられる。さらに、キレート剤としては、例えば、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）が挙げられる。

10

【0019】

本発明の方法の工程（a）は、好ましくは、4℃～50℃の温度、例えば、8℃～40℃、15℃～30℃、又は20℃～25℃、例えば、約20℃又は約25℃で行われる。特に、工程（a）は、周囲温度で行うことができる。代替的に、工程（a）は、周囲温度に対して高温で、例えば、25℃～50℃、25℃～40℃、又は30℃～40℃の温度で行うことができる。いずれの場合も、本発明の方法の工程（a）は、それ自体が二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離を引き起こす温度では行われず、例えば、方法は50℃より高い温度で行われない。

20

【0020】

特定の実施の形態において、本発明の方法の工程（a）は、アフィニティークロマトグラフィー工程の一部として行われ、RNA調製物が、pH6～pH8の範囲のpHで、例えば、約7のpHでアフィニティークロマトグラフィー媒体上にロードされ、その後、pHをpH1～pH5の範囲のpHまで低下させ、このように、本発明の方法の工程（a）を実行する。この点に関して好適なアフィニティリガンドは、特に限定されず、当該技術分野において既知である。それらには、標的RNAに対して相補的な核酸、例えば、オリゴdTが含まれる。

30

【0021】

本発明の方法の工程（b）において、RNA調製物を精製に供して、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離によって生じた断片を除去する。

【0022】

この工程（b）において除去される二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離によって生じた断片、すなわち、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の鎖が互いに解離することによって生じた断片は、標的RNAとは異なる混入一本鎖RNA、又は混入一本鎖DNAである。RNA調製物のそれぞれの精製を実施するための手段は、特に限定されず、当該技術分野において既知である。しかしながら、そのような手段は、以下で定義される通りであることが好ましい。

40

【0023】

特定の実施の形態において、RNA調製物は、工程（a）において使用されるpHで精製に供され、すなわち、pHは精製前に調節されない。他の特定の実施の形態において、RNA調製物のpHは、工程（a）において使用したpHよりも高いpHまで上昇されるが、pHは、精製前でpH5以下（pH5を含む）である。これらの実施の形態は、明ら

50

かな理由から、工程（a）が既にpH5で行われている場合には適用されない。更に他の特定の実施の形態において、RNA調製物のpHは、精製前でpH5超～pH7（pH7を含む）の範囲のpHまで上昇される。

【0024】

特定の実施の形態において、本発明の方法の工程（a）は、pH2～pH4の範囲のpHで、例えば、約pH3で行われ、その後、工程（b）における精製前に、pHは、pH4.5～pH5の範囲のpHまで、例えば、pH5まで上昇される。

【0025】

本明細書においてこれまで記載されるように、工程（a）及び工程（b）は、最初に工程（a）を行い、次に工程（b）を行うという順序で続いて行われる別個の工程である。したがって、特定の実施の形態において、工程（a）及び工程（b）は、この示された順序で続いて行われる別個の工程である。上記のように、そのような実施の形態において、工程（b）は、工程（a）において使用したpHと同じpHで行うことができ、又は工程（b）の前にpHを上昇させることができる。

【0026】

しかしながら、他の特定の実施の形態において、工程（a）及び工程（b）は同時に行うことができ、すなわち、工程（a）に従ったpH1～pH5の範囲のpHでのRNA調製物のインキュベーションは、工程（b）において二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物の解離によって生じた断片を除去するための精製プロセスの一部であり得る。例として、本明細書に記載のクロマトグラフィーベースの技術による精製の場合、本発明の方法の工程（a）は、RNA調製物がクロマトグラフィー媒体に結合している間に行うことができ、本発明の方法の工程（b）は、クロマトグラフィー媒体を使用して実施される。そのような実施の形態において、本発明によるpH変性は、それぞれの結合に有利な条件で（例えば、pH1～pH8の範囲のpHで、又はpH6～pH8の範囲のpHで、例えば約7のpHで）、RNA調製物をクロマトグラフィー媒体に結合させることによって実施され、次に、本発明の方法の工程（a）に従ってpH1～pH5のpH範囲までpHを低下させて、クロマトグラフィー媒体上で核酸鎖解離が実施され、解離したssRNA及び核酸不純物のそれに続く又は同時溶出が、例えばpH勾配、塩勾配又はそれらの組合せによって行われる。

【0027】

上記のように、RNA調製物のそれぞれの精製を実施するための手段は、本明細書で定義される通りであることが好ましい。詳細には、精製は、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、IMAC（固定化金属アフィニティークロマトグラフィー）、分子量カットオフ濾過、及び沈殿／抽出技術からなる群より選択される技術によって実施され得る。そのような技術を行うための手段は、特に限定されず、当該技術分野において既知である。

【0028】

上記のようなクロマトグラフィー技術の場合、クロマトグラフィー材料は、任意の好適な形態、例えば、当該技術分野において既知の多孔質粒子、膜、ナノ繊維、フィルター、及びモノリスの形態であり得る。

【0029】

特定の実施の形態において、精製は、陰イオン交換リガンドを使用して、pH1～pH5の範囲のpHで行われる陰イオン交換クロマトグラフィーによって実施される。それぞれの陰イオン交換リガンドは、特に限定されず、当該技術分野において既知である。この点に関して使用することができる例示的な陰イオン交換リガンドとしては、四級アミン（QA）、並びに三級、二級、及び一級アミンが挙げられ、ジエチルアミノエチル（DEAE）及びジメチルアミノエチル（DMAE）が特に好適である。上記のように、陰イオン交換クロマトグラフィーは、pH1～pH5の範囲のpH（この範囲には境界値pH1及

び pH 5 が明示的に含まれる)で行われるか、又は本発明の方法の工程 (a) について上記で定義した好ましい範囲の pH で行われる。関連する好ましい実施の形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、本発明の方法の工程 (a) と同じ pH で行われる。

【0030】

別の特定の実施の形態において、精製は、陽イオン交換リガンドを使用して、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH で行われる陽イオン交換クロマトグラフィーによって実施される。それぞれの陽イオン交換リガンドは、特に限定されず、当該技術分野において既知である。この点に関して使用することができる例示的な陽イオン交換リガンドとしては、スルホン酸基を含有する陽イオン交換リガンド、硫酸基を含有する陽イオン交換リガンド、及びカルボキシル基を含有する陽イオン交換リガンドが挙げられる。上記のように、陽イオン交換クロマトグラフィーは、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH (この範囲には境界値 pH 1 及び pH 5 が明示的に含まれる)で行われるか、又は本発明の方法の工程 (a) について上記で定義した好ましい範囲の pH で行われる。関連する好ましい実施の形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、本発明の方法の工程 (a) と同じ pH で行われる。

【0031】

更に特定の実施の形態において、精製は、マルチモーダルリガンド、例えば、イオン交換／水素結合特性を組み合わせたりガンド、若しくはイオン交換／芳香族部分を組み合わせたりガンド、又はそれらの組合せを使用して、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH で行われるマルチモーダルクロマトグラフィーによって実施される。それぞれのマルチモーダルリガンドは、特に限定されず、当該技術分野において既知である。この点に関して使用することができる例示的なマルチモーダルリガンドとしては、CIM Prima S、CIM Prima H、CIM H-bond、Capto MMC、Sartobind ST IC、及び Toyopearl NH2 が挙げられる。一般に、親和性残基、疎水性相互作用残基、イオン交換残基、水素結合残基、金属キレート残基、及び芳香族残基、並びにそれらのあらゆる組合せからなる群より選択される複数の種類の化学残基を含む任意の種類のマルチモーダルリガンドが、本発明の方法に好適であり得る。上記のように、マルチモーダルクロマトグラフィーは、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH (この範囲には境界値 pH 1 及び pH 5 が明示的に含まれる)で行われるか、又は本発明の方法の工程 (a) について上記で定義した好ましい範囲の pH で行われる。関連する好ましい実施の形態において、マルチモーダルクロマトグラフィーは、本発明の方法の工程 (a) と同じ pH で行われる。

【0032】

また更なる特定の実施の形態において、精製は、アフィニティーリガンド、例えばオリゴ d T 又は標的 RNA に対して相補的な他の配列特異的核酸リガンドを使用して、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH で行われるアフィニティークロマトグラフィーによって実施される。上記のように、アフィニティークロマトグラフィーは、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH (この範囲には境界値 pH 1 及び pH 5 が明示的に含まれる)で行われるか、又は本発明の方法の工程 (a) について上記で定義した好ましい範囲の pH で行われる。関連する好ましい実施の形態において、アフィニティークロマトグラフィーは、本発明の方法の工程 (a) と同じ pH で行われる。

【0033】

代替的な特定の実施の形態において、精製は、

- (i) サイズ排除クロマトグラフィー、
- (i i) 逆相クロマトグラフィー、
- (i i i) 疎水性相互作用クロマトグラフィー、
- (i v) IMA C (固定化金属アフィニティークロマトグラフィー)、
- (i v) 分子量カットオフ濾過、又は、
- (v) 沈殿／抽出技術、

によって実施され、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH で、又は pH 5 超 ~ pH 7 の範囲の pH で行われる。上記のように、これらの精製技術は、pH 1 ~ pH 5 の範囲の pH (この範

10

20

30

40

50

図には境界値 pH 1 及び pH 5 が明示的に含まれる)で行うことができるか、又は本発明の方法の工程 (a) について上記で定義した好ましい範囲の pHで行うことができる。関連する好ましい実施の形態において、これらの精製技術は、本発明の方法の工程 (a) と同じ pHで行われる。代替的に、上記の精製技術は、pH 5 超～pH 7 の範囲の pH (この範囲には境界値 pH 7 が明示的に含まれる)で行うことができ、すなわち、これらの技術は、本発明の方法の工程 (a) の後及び工程 (b) の前に、RNA 調製物の pHをそれぞれの pHに調節する工程の後に行うことができる。

【0034】

標的 RNA、すなわち、本発明の方法で使用される RNA 調製物において調製される RNA は、メッセンジャー RNA (mRNA)、自己増幅 RNA (saRNA) 及び環状 RNA (circRNA) からなる群より選択することができ、mRNA が特に好ましい。

【0035】

本明細書で使用される場合、「含む ("comprising"/"comprises") 」という用語は、「から本質的になる ("consisting essentially of"/"consists essentially of") 」及び「のみからなる ("consisting of"/"consists of") 」という用語を明示的に含み、すなわち、これらの用語の全ては、本明細書において互いに区別なく使用可能である。

【0036】

さらに、本明細書で使用される場合、「約」という用語は、好ましくは、±10%、より好ましくは±8%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、±1%、又は±0.5%の指定された値の修飾語句を表す。したがって、例として、「約100」という用語は、90～110、92～108、94～106、95～105、96～104、97～103、98～102、99～101、又は99.5～100.5の範囲を含むことができる。

【0037】

本発明は、RNA 調製物から二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を除去する方法について記載する。この方法は、pH調節の使用を適用して、RNA ベースの治療薬、例えば、mRNA、saRNA、又はcircRNAから不純物を除去する。pH調節は、二本鎖及び／又は多重鎖出発物質の変性時に生じた一本鎖断片を除去するための精製工程と組み合わせられる。

【0038】

二本鎖及び／又は多重鎖核酸構造の形成、並びに構造の安定性は、核酸塩基対形成の基本原理に依存する。形成は、C-G塩基対及びA-U塩基対の間の標準的な水素結合相互作用によって駆動される (図1)。正確な塩基対の形成、したがってdsRNAの形成は、標準的な結合相互作用、すなわち、C-G及びA-Uの形成によって駆動される。標準的な相互作用を形成するには、グアノシンはN1のプロトン化 (pH>1.6) を必要とし、アデノシンは非プロトン化N1 (pH>3.5) を必要とし、シトシンは非プロトン化N3 (pH>4.2) を必要とし、ウリジンはプロトン化N3 (pH<9.2) を必要とする。

【0039】

RNAの生成、精製、及び保存に標準的に使用されるpH範囲 (すなわち、pH5～9) では、したがって、4つのヌクレオシド全てが、塩基対形成に好適にプロトン化され、その結果二本鎖が形成される。リン酸骨格はpH>1で脱プロトン化され、したがって、RNAは、作業pHにて負に荷電した分子表面 (リン酸骨格) を含有し、これは多くの精製手法で使用されている特性である。

【0040】

RNAの生成、精製、及び保存に標準的に使用されるpH範囲 (すなわち、pH5～9) では、したがって、4つのヌクレオシド全てが、クロマトグラフィー支持体に固定化されたアフィニティーリガンド、例えば、ポリデオキシチミジン酸 (poly-deoxythymidinic acid) (オリゴdT) との塩基対形成のために好適にプロトン化される。本発明に

よる pH の低下は、アフィニティーリガンドとの塩基対形成を破壊し、したがって標的 RNA 分子が放出され、同時に多重鎖及び／又は二本鎖相互作用（RNA-RNA 又は RNA-DNA）を変性させる。

【0041】

短い RNA 二本鎖（20 量体未満）について、水素結合受容体のプロトン化が塩基対形成を破壊し、RNA 二本鎖の変性をもたらすことが実証されており、pH の低下に伴う RNA 二本鎖の溶融温度の低下として測定される。より一般的な点として、低 pH が、G-C 塩基対のプロトン化及び得られた塩基対形成のために核酸の変性（又は少なくとも不安定化）をもたらすことが以前に観察された。さらに、プロトン化は、DNA 二本鎖における非標準的相互作用、例えば A-C 及び C-C を安定化することを実証された。二本鎖 DNA の変性は、酸性条件におけるインキュベーションによって示された。しかしながら、この概念は、短い RNA 二本鎖が mRNA 等の治療的に関連する RNA を表しておらず、dsDNA が dsRNA、ssRNA、ssDNA 又は他の二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物で汚染された ssRNA を表していない、生物学的製剤の精製の文脈において実証されていない。

【0042】

したがって、本発明は、RNA 調製物中に存在する二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を、低 pH 駆動鎖分離により一本鎖形態に変性させ、標準的な塩基対形成の破壊を引き起こすことに関する。二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物は、周囲温度～やや高温にて、pH 1～pH 5、好ましくは pH 2～pH 4 の pH 範囲での RNA 調製物のインキュベーションにより、RNA から解離される。この pH 範囲は、塩基対形成に関与する塩基のプロトン化に十分であり、標準的な塩基対形成をサポートすることができなくなる。リン酸骨格は非プロトン化されたままであり、したがって RNA は全体的に負電荷を保持する。クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、グリシン緩衝液、又は他の酸性緩衝液を使用することができる。変性を促進する添加剤、例えばカオトロップ、例えば尿素又はグアニジンを使用して、酸性条件下での二本鎖及び／又は多重鎖変性を促進することができる。当該技術分野において既知の他の変性剤、例えばアセトニトリルを低 pH で使用して、変性を補助することができる。構造的二価カチオンの除去を促進するキレート剤（Chelators）、例えば EDTA を使用して、酸性条件下での二本鎖及び／又は多重鎖変性を促進することができる。低 pH での変性に必要な温度は、周囲温度～やや高温（例えば 4℃～50℃、好ましくは周囲温度）である。

【0043】

本発明によれば、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を含有する RNA は低 pH でインキュベートして、二本鎖及び／又は多重鎖種を解離させることができ、次に、pH は pH 5 超～pH 7 まで上昇される。この pH の上昇は RNA に長期安定性を付与するが、不純物は再形成されないか、又は完全には再形成されないため、そのような不純物によって引き起こされる潜在的な免疫応答は、*in vivo* で RNA を投与しても活性化されない。

【0044】

さらに、二本鎖及び／又は多重鎖核酸不純物を含有する RNA は低 pH でインキュベートして、二本鎖及び／又は多重鎖種を解離させることができ、次に、pH は pH 5～pH 7（低 pH が pH 5 未満の場合は pH 5）まで上昇され、調製物は二本鎖及び／又は多重鎖解離によって生じた断片を除去するために精製される。代替的に、それぞれの不純物を含有する RNA は低 pH でインキュベートすることができ、次に、二本鎖及び／又は多重鎖解離によって生じた断片を除去するために精製され、精製は変性に使用される pH 範囲（例えば pH 2～pH 4）で実施される。

【0045】

本発明は、dsRNA 及び RNA-DNA 二本鎖及び／又は多重鎖構造の破壊、並びにイオン交換（陽イオン及び陰イオン交換）、サイズ排除、逆相、疎水性相互作用、又はマルチモーダルクロマトグラフィー支持体に使用されるクロマトグラフィー媒体（多孔質粒子、ナノ繊維、膜、モノリス）への調製される RNA の結合に使用される通常ではない p

10

20

30

40

50

H 範囲を利用することができる。さらに、分子量カットオフ装置、例えばタンジェント流濾過装置を使用することができる。

【0046】

この文脈において、陰イオン交換リガンドは、通常ではない pH 範囲でを使用することができる。リン酸骨格が持つ強い負電荷のために、mRNA 等の RNA 分子は、pH 1.6 以上では強く負に荷電している。陰イオン交換リガンド、例えば四級アミン (QA)、三級アミン (例えば DEAE)、二級アミン (例えばエチレンジアミン)、一級アミン、又は少なくとも 1 つの陰イオン交換モダリティを含むマルチモーダルリガンドは、pH 1 ~ pH 11 又は pH 1 ~ pH 13 (それぞれ弱陰イオン交換体及び強陰イオン交換体) の pH 範囲で正に荷電している。したがって、RNA は、pH 1 ~ pH 2 という低い pH 範囲で正に荷電したリガンドに結合することができる。これは一般的な慣行ではなく、実際に直感に反する。なぜなら、当該技術分野における陰イオン交換リガンドの使用は中性から塩基性の条件であり、mRNA の精製のための陰イオン交換体の使用について報告されている最低 pH 値は pH 5 であるからである。本発明は、pH 1 ~ pH 5、具体的には pH 2 ~ pH 4 の通常ではない pH 範囲において、RNA 及び陰イオン交換リガンドの電荷の相補性を利用する。dsRNA 構造を形成する標的 RNA にアニールされた RNA 断片、及び RNA-DNA 構造を形成する残留 DNA 断片は、選択された緩衝液 (例えば、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、グリシン緩衝液、グリシルグリシン緩衝液、リンゴ酸緩衝液、マレイン酸緩衝液、リン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、又はギ酸緩衝液) 中の塩勾配又は pH 勾配を使用して、主 ssRNA 鎖から分離される。更なる態様として、任意の非解離二本鎖及び／又は多重鎖構造は、ssRNA 構造とは異なって陰イオン交換リガンドに結合することができる。したがって、精製制御の更なる層を提供する。当該技術分野において既知の変性を促進する添加剤、例えばカオトロップ、例えば尿素若しくはグアニジン、又はキレート剤、例えば EDTA 若しくはクエン酸塩、又は有機溶媒、例えばアセトニトリル若しくはエタノールを使用して、移動相中の二本鎖及び／又は多重鎖変性を促進し、それによって方法の選択性を更に高めることができる。分離温度は、クロマトグラフィー分離並びに二本鎖及び／又は多重鎖変性の最適バランスをもたらすように最適化することができる。

10

20

【0047】

代替的に、陽イオン交換リガンドを、低 pH 処理後の標的 RNA の精製に使用することができる。これは直感に反する。なぜなら、例えば mRNA は、pH 1.9 ~ pH 13 の pH 範囲で強く負に荷電しているが、陽イオン交換クロマトグラフィー支持体は正に荷電した種と結合するからである。

30

【0048】

さらに、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、所望の RNA 標的分子から二本鎖及び／又は多重鎖不純物の pH 変性によって生じた一本鎖断片を分離することができる。サイズ排除クロマトグラフィーは、変性に使用される pH 範囲 (例えば pH 2 ~ pH 4) 又は中性／弱酸性 pH (例えば pH 5 ~ pH 7、変性に使用される pH 範囲が pH 5 未満の場合は pH 5) で行うことができる。親 RNA とのハイブリダイゼーションによって二本鎖及び／又は多重鎖種を形成した小さな断片、及び 3' 伸長 dsRNA 種は、サイズによって標的 RNA から分離される。

40

【0049】

さらに、逆相クロマトグラフィー又は疎水性相互作用クロマトグラフィーを使用して、標的 RNA と比較した断片の異なる疎水性に基づいて、所望の RNA 標的分子から二本鎖及び／又は多重鎖不純物の pH 変性によって生じた一本鎖断片を分離することができる。逆相クロマトグラフィー及び疎水性相互作用クロマトグラフィーは、変性に使用される pH 範囲 (例えば pH 2 ~ pH 4) 又は中性／弱酸性 pH (例えば pH 5 ~ pH 7、変性に使用される pH 範囲が pH 5 未満の場合は pH 5) で行うことができる。

【0050】

クロマトグラフィー精製を使用する全ての実施の形態において、クロマトグラフィー精

50

製は特定のクロマトグラフィー媒体に限定されず、標的 pH 範囲での結合を容易にする適切に荷電されたポリマーを含有する任意の形式、例えばモノリス、膜、フィルター、ナノ繊維、又は多孔質粒子を使用することができる。

【0051】

さらに、変性に使用される pH 範囲（例えば pH 2～pH 4）又は上昇した pH 範囲（例えば pH 5～pH 7、変性に使用される pH 範囲が pH 5 未満の場合は pH 5）で操作されるタンジェント流濾過を使用して、標的 RNA 分子から二本鎖及び／又は多重鎖核酸の pH 変性によって生じた断片／不純物を分離することができる。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】（A）dsRNAの化学構造及び（B）ヌクレオシドのプロトン化平衡を示す図である。ボックスは低 pH 処理によって達成されるプロトン化状態を表す。

【図2】mRNAの pH 処理が mRNA の安定性に影響を及ぼすことなく dsRNA 含有量を減少させることを示す図である。pH 6 への再中和は dsRNA の再形成を引き起こさない。左：ドットプロット（J2 抗体）。右：アガロースゲル電気泳動。

【図3】A．低 pH による dsRNA の変性は温度依存であることを示す図である。eGFP（995 nt）を、4℃、室温（RT）及び 40℃にて 30 分間、2.9～4.1 の範囲の異なる pH 値でインキュベートした。J2 抗体を用いたドットプロットを行って、dsRNA の量を決定した。B．長い dsRNA 鎖の変性には、変性のために低 pH と共に高温を必要とすることを示す図である。Magi2 dsRNA（1000 bp 完全補体 dsRNA）を、pH 3（試料 1）又は pH 6（試料 3）で 50℃にて 20 分間インキュベートし、次に、pH 3 に緩衝液交換した（それぞれ試料 2 及び試料 4）。変性は、A）PAGE 及び B）J2 ドットプロットにより監視した。

【図4】アフィニティー精製された mRNA の低 pH への 60 分間までの曝露が mRNA の分解を引き起こさないことを示す図である。A．eGFP（995 nt）を pH 3 で i）15 分間、ii）30 分間又は iii）60 分間インキュベートし、次に、pH を pH 6 に上昇させた。断片分析器（BioAnalyzer、Agilent）を使用して、pH 6 に中和した直後（i～iii）又は同じ試料を 4℃～8℃で 1 日保存した後（iv～vi）の断片化の程度を決定した。B．試料 i～試料 vi のアガロースゲル電気泳動。レーン 1：Riboruler HR、レーン 2：pH 3、15 分、レーン 3：pH 3、30 分、レーン 4：pH 3、60 分、レーン 5～レーン 7：レーン 2～レーン 4 の試料を 4℃～8℃で 1 日保存した後に分析したもの。

【図5】mRNA を含有する IVT 混合物の低 pH への曝露が J2 ドットプロットによって測定した dsRNA 含有量の減少を引き起こすことを示す図である。i）mRNA を含有する IVT 混合物を、T（25℃）にて 30 分間、pH 3 でインキュベートした。ii）mRNA を含有する IVT 混合物を、IVT 反応緩衝液（pH 7.9）中で分析した。

【図6】クロマトグラフィーによる dsRNA 構造の除去と組み合わせた mRNA の低 pH 処理の一例を示す図である。eGFP（995 nt）を pH 3.0 の 100 mM グリシン中で周囲温度にて 25 分間インキュベートした。その後、pH を 100 mM グリシン pH 10 で pH 6 に上昇させた。次に、試料を pH 5 で CIM PrimaH カラム（弱陰イオン交換体、芳香族性、及び水素結合の要素を組み合わせたプロトタイプのマルチモーダルカラム）にロードし、20 mM クエン酸塩、20 mM リン酸 Na、10 mM EDTA 緩衝系で作製した pH 勾配（pH 5～pH 7.5）で溶出した。A：CIM PrimaH にて pH 3 でインキュベートした eGFP mRNA の溶出クロマトグラム。赤：260 nm、青：280 nm、緑：直線勾配、灰色：pH トレース、茶：伝導率。B：出発物質、CIM PrimaH 溶出画分 1 及び溶出画分 2、並びにその場洗浄（高 pH 洗浄、CIP）の PAGE ゲル。C：eGFP（L）、並びに CIM PrimaH 溶出画分 1 及び溶出画分 2、並びにその場洗浄（高 pH 洗浄、CIP）の J2 ドットプロット。D：出発物質、CIM PrimaH 溶出画分 1 及び溶出画分 2、並びにその場洗浄（高 pH 洗浄、CIP）のゲルの AGE。

10

20

30

40

50

【図 7】陽イオン交換クロマトグラフィーによる dsRNA 構造の除去のための低 pH 処理 mRNA の一例を示す図である。eGFP (995 nt) を、pH 3.0 の 100 mM グリシン中で周囲温度にて 20 分間インキュベートするか、又は陽イオン交換クロマトグラフィー用に直接調製した。試料を移動相 A である 50 mM グリシン pH 3 で希釈し、pH 3 で CIM SO₃ カラムにロードし、pH 3 ~ pH 10 の pH 勾配で溶出した。A : CIM SO₃ での eGFP mRNA の溶出クロマトグラム。緑：未処理 mRNA、赤：pH 3 処理 mRNA、B : 出発物質 (pH 3 で前処理、又は前処理なし)、フローズルー (FT) 画分並びに溶出画分 E1、E2 及び CIP のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)。C : 対応する画分の J2 ドットプロット。

【図 8】クロマトグラフィー分離と組み合わせた低 pH 処理が残留 DNA 鑄型の除去をもたらすことを示す図である。eGFP (995 nt) は pH 3.0 の 100 mM グリシン中で周囲温度にて 25 分間インキュベートするか、又は低 pH で処理しなかった。次に、両方の試料を、pH 勾配を使用して CIM PrimaH で精製した。主溶出画分をリボヌクレアーゼ処理及び AGE により残留 DNA プラスミド鑄型の存在について分析した。レーン 1 : GeneRuler、レーン 2 : 50 ng eGFP DNA 鑄型、レーン 3 : 30 ng eGFP DNA 鑄型、レーン 4 : 10 ng eGFP DNA 鑄型、レーン 5 : 5 ng eGFP DNA 鑄型、レーン 6 : 2 ng eGFP DNA 鑄型、レーン 7 : 1 ng eGFP DNA 鑄型、レーン 8 : オリゴ dT で精製した mRNA (出発物質)、レーン 9 : pH 3 処理 mRNA の PrimaH 溶出画分、レーン 10 : 未処理 mRNA の PrimaH 溶出画分。

【図 9】mRNA (eGFP、995 nt) を pH 3.0 の異なる濃度のグリシン (5 mM ~ 200 mM、図に示す) 中で周囲温度にて 15 分間インキュベートするか、又は処理しなかった (レーン「mRNA」) ものについて示す図である。得られた材料を J2 ドットプロットで分析して dsRNA の存在を検出し、アガロースゲル電気泳動 (2% ゲル) で変性条件下での mRNA の安定性を評価した。dsRNA の変性には、最低 25 mM のグリシン pH 3 が必要であった。

【図 10】mRNA (eGFP、995 nt) を異なる濃度の NaCl (250 mM ~ 2 M) の存在下、35 mM グリシン pH 3 で変性させ、J2 ドットプロットにより分析したもののについて示す図である。ドットプロットは、250 mM 以上の NaCl 濃度が低 pH の dsRNA の変性を防いだことを示した。これは、250 mM 以上の NaCl 濃度は pH 変性と共に使用できないことを意味する。

【図 11】mRNA (eGFP、995 nt) を pH 3 の 75 mM グリシン中で 20 分間インキュベートしたもののについて示す図である。得られた生成物を CIM C4 HLD カラムにロードし、カラムを 10 mM グリシン pH 3 で 1 mL / 分にて洗浄した。mRNA は移動相 B (10 mM クエン酸 pH 5.1) への段階勾配で溶出した。得られた溶出画分を J2 ドットプロットにより分析して dsRNA の除去を確認し、アガロースゲル電気泳動 (2% ゲル) により mRNA の完全性を評価した。i) CIM C4 HLD 精製の HPLC クロマトグラム (数字「1」は保持時間 4.1 分 ~ 4.3 分の溶出画分を表す)。ii) J2 ドットプロット：1 : mRNA eGFP (未処理)、2 : CIM C4 HLD 溶出画分 (保持時間 4.1 分 ~ 4.3 分)。iii) AGE：1 : Riboruler HR、2 : mRNA eGFP (未処理)、3 : CIM C4 HLD 溶出画分。

【図 12】mRNA (Cas9、4000 nt) を含有する in vitro 転写 (IVT) 反応混合物を pH 3 の 25 mM グリシン中で 20 分間インキュベートしたもののについて示す図である。得られた生成物を CIM C4 HLD カラムにロードし、カラムを 10 mM グリシン pH 3 で 1 mL / 分にて洗浄した。mRNA は移動相 B (10 mM クエン酸 pH 5.1) への段階勾配で溶出した。得られた溶出画分を J2 ドットプロットにより分析して dsRNA の除去を確認した。i) CIM C4 HLD 精製溶出画分の HPLC クロマトグラム、数字 1 は溶出画分 (保持時間 4.1 分 ~ 4.4 分) を表す。ii) J2 ドットプロット：1 : IVT mRNA Cas9 (未処理)、2 : CIM C4 HLD フローズルー (FT) 画分、3 : CIM C4 HLD 溶出画分 (保持時間 4.1

10

20

30

40

50

分～4.4分)。

【図13】mRNA (eGFP、995nt)を移動相A (50mMリン酸Na、0.5M NaCl、pH7.5)で希釈し、1mL/分にてCIMオリゴdTカラム (1mL)にロードしたもののについて示す図である。カラムを10mLの移動相B (50mMリン酸Na、pH7.5)で洗浄し、次に、移動相C (100mMグリシン、pH3)への段階勾配で溶出した。溶出画分をJ2ドットプロットにより分析してdsRNAの変性を確認した。溶出画分1及び溶出画分2 (保持時間22.8分～24.2分)において部分的な変性が示され、溶出画分3 (保持時間24.2分～26分)において完全な変性が示された。溶出画分3の安定性をアガロースゲル電気泳動によって確認した。i) CIMオリゴdT精製のHPLクロマトグラム。数字は溶出画分を表す (1:保持時間22.8分～23.8分、2:保持時間23.8分～24.2分、3:保持時間24.2分～26分)。ii) J2ドットプロット: 1-mRNA eGFP (未処理)、2: CIMオリゴdT溶出画分1、3: CIMオリゴdT溶出画分2、4: CIMオリゴdT溶出画分3。iii) AGE: 1: Riboruler HR、2: mRNA eGFP (未処理)、3: CIMオリゴdT溶出画分3。

10

【図14】mRNA (eGFP、995nt)を移動相A (50mMリン酸Na、0.5M NaCl、pH7.5)で希釈し、1mL/分にてPorosオリゴ(dT)25カラム (1mL)にロードしたもののについて示す図である。カラムを9mLの移動相B (50mMリン酸Na、pH7.5)で洗浄し、次に、移動相C (100mMグリシン、pH3)への段階勾配で溶出した。溶出画分をJ2ドットプロットにより分析してdsRNAの変性を確認した。溶出画分1 (18.4～18.9)において部分的な変性が示され、溶出画分2 (保持時間18.9分～20.3分)において完全な変性が示された。溶出画分2の安定性をアガロースゲル電気泳動によって確認した。i) Porosオリゴ(dT)25のHPLCクロマトグラム。溶出画分は数字で表す。1:保持時間18.4分～18.9分、2:保持時間18.9分～20.3分。ii) J2ドットプロット: 1-mRNA eGFP (未処理)、2-Porosオリゴ(dT)25溶出画分1、3-Porosオリゴ(dT)25溶出画分2。iii) AGE: 1: mRNA eGFP (未処理)、2: Porosオリゴ(dT)25溶出画分1、3-Porosオリゴ(dT)25溶出画分2。

20

【図15】mRNA (eGFP、995nt)を移動相A (50mMリン酸Na、0.5M NaCl、pH7.5)で希釈し、1mL/分にてPorosオリゴdTカラム (1mL)にロードしたもののについて示す図である。カラムを9mLの移動相B (50mMリン酸Na、pH7.5)で洗浄し、次に、移動相C (100mMグリシン、pH3)への段階勾配で溶出した。次に、得られたpH3溶出液を移動相A (10mMグリシン、pH3)で希釈し、1mL/分にてCIM C4 HLDカラムにロードした。mRNAは移動相B (50mMクエン酸塩、pH5.1)への段階勾配で溶出した。得られた溶出画分をJ2ドットプロットにより分析してdsRNAの除去を確認した。A) Porosオリゴ(dT)25精製のHPLCクロマトグラム。数字1は保持時間18.4分～18.9分の溶出画分を表し、数字2は保持時間18.9分～20.3分の溶出画分を表す。B) オリゴdT溶出液のCIM C4 HLD精製のHPLCクロマトグラム。数字1は保持時間7.9分～8.3分の溶出画分を表す。C) J2ドットプロット: 1: mRNA eGFP (未処理)、2: CIM C4 HLD溶出画分1。

30

40

【図16】RNA (eGFP、995nt)をpH3の25mMグリシンにて15分間インキュベートしたもののについて示す図である。得られた生成物を移動相A (50mMクエン酸、pH5)で希釈し、1mL/分にてCIM PrimaHカラムにロードした。mRNAは移動相B (100mMリン酸、pH7.5)への直線勾配で溶出した。得られた溶出画分をJ2ドットプロットにより分析してdsRNAの除去を確認した。i) 低pH変性mRNAのCIM PrimaH分離のHPLCクロマトグラム。数字1は保持時間9.6分～9.9分の溶出画分を表し、数字2は保持時間9.9分～10.5分の溶出画分を表す。ii) J2ドットプロット: 1-mRNA eGFP (未処理)、2: CIM

50

P r i m a H 溶出画分 1、3 : C I M P r i m a H 溶出画分 2。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明を以下の実施例により更に説明するが、それらに限定されるものではない。

【実施例】

【0054】

実施例 1 :

e G F P (高感度緑色蛍光タンパク質、995ヌクレオチド)をコードするmRNAをI V T (i n v i t r o 転写)反応で生成し、d s R N A (二本鎖RNA)を除去しないオリゴdTアフィニティークロマトグラフィーで精製した。少なくとも40塩基対のd s R N A 配列に特異的なJ2抗体を用いたドットブロット分析により、試料中のd s R N A 不純物の存在を確認した。

10

【0055】

d s R N A の変性に必要なpH範囲を、室温にて広いpH範囲(2.9~4.1、グリシン緩衝液を指定されたpH値で使用した)におけるmRNAのインキュベーションにより試験した。試料は、A G E (アガロースゲル電気泳動、100ng)又はドットブロットアッセイ(800ng)にロードする前に、室温にて30分間インキュベートした。pH 2.9~4.1でのmRNAのインキュベーションは、主mRNA A G E バンドの強度を減少させなかったが、ドットブロットシグナルの強度はpHの低下と共に減少した。シグナルはpH 6で最も強く、pH 3.9~4.1でも強いシグナルが依然として観察された。シグナルはpH 3.5で著しく減少し、pH 3.2以下では可視化されず、d s R N A 構造は解離したが、mRNAは無傷であったことを示唆している。

20

【0056】

次に、mRNAをpH 3で20分間インキュベートし、次に、pH 6に上昇させた。A G E の結果は、pH 6に上昇すると低分子量バンドの出現を示したが、ドットブロットはシグナルを示さず、d s R N A 構造が再形成されなかったことを示唆している(図2)。

【0057】

d s R N A 変性の温度依存性は、e G F P (995nt)を、4℃、室温(RT)及び40℃にて30分間、2.9~4.1の範囲の異なるpH値でインキュベートすることによって実証した。J2抗体を用いたドットブロットを行って、d s R N A の量を決定し、d s R N A シグナルの温度及びpH依存の減少を実証した。d s R N A シグナルは4℃にてpH 3.2で依然として検出されたが、40℃では、d s R N A シグナルはpH 3.9以上でのみ検出された(図3)。

30

【0058】

二本鎖変性には温度よりもpHが必要であることを実証するために、完全に相補的なd s R N A 配列(1000塩基対)M a g i 2を、pH 3又はpH 6のいずれかで、50℃にて20分間インキュベートした。pH 6では、J2ドットブロットによって示されるように、高温(50℃)は二本鎖を変性させるのに十分ではなかった(図3B)が、pH 3ではd s R N A シグナルは消失した。pH 3への緩衝液交換により、d s R N A シグナルは消失した(図3B、試料4)。

40

【0059】

低pH処理がmRNAの安定性に影響を及ぼさないことを実証するために、e G F P (995nt)を室温にてpH 3で15分間、30分間及び60分間インキュベートした後、pH 6に中和した。次に、断片化をB i o A n a l y z e r 及びA G E によって測定した(それぞれ図4A及び図4B)。いずれの方法でも顕著な分解は観察されず、d s R N A の変性に必要な持続時間の低pHへのmRNAの曝露はmRNAの分解を引き起こさないことを示している。

【0060】

手法の一般性を実証するために、次に、e G F P mRNAを含有する未精製I V T 反応混合物をpH 3でインキュベートするか、又は処理せずに、d s R N A シグナルをR N

50

A精製がない状態でJ2ドットプロットによって測定した。ドットプロットはpH3でのdsRNAシグナルの消失を実証した(図5i)が、pH処理がない状態では消失しなかった(図5ii)。

【0061】

低pH処理mRNAの精製を実証するために、eGFPをコードするmRNAをpH3.0の100mMグリシン中で周囲温度にて20分間インキュベートした。次に、試料のpHをグリシン緩衝液(pH10)でpH6に上昇させ、次に、試料をpH5で弱陰イオン交換体、芳香族性、及び水素結合の要素を組み合わせたプロトタイプのマルチモーダルカラム(PrimaH)にロードし、20mMクエン酸、20mMリン酸Na、10mMEDTA緩衝系で作製したpH勾配(pH5~pH7.5)で溶出した。(図6A)。2つの溶出画分(1及び2)を、J2抗体を用いたドットプロットにより分析した。

【0062】

結果は、pH3でインキュベートした場合、PrimaHへのmRNAの強い結合を実証した(図6)。mRNAのpH処理は、J2ドットプロット、画分1及び画分2によって実証されるように、溶出画分中のdsRNA含有量の顕著な減少をもたらした(図6)。

【0063】

陽イオン交換体による低pH処理mRNAの精製を実証するために、eGFPをコードするmRNAをpH3.0の100mMグリシン中で周囲温度にて20分間インキュベートするか、又は未処理とした。両方の試料を移動相A(MPA、50mMグリシン pH3)で別個に希釈し、Convective Interaction Media(CIM)SO3カラムにロードし、pH勾配3~10で溶出した(図7A)。出発物質(低pHで処理又は未処理のmRNA)、フロースルー画分及び2つの溶出画分(1及び2)を、PAGE及びJ2抗体を用いたドットプロットによって分析した(図7B、図7C)。結果は、pH3での前処理、又はMPA(50mMグリシン pH3)での試料の希釈の両方が、ドットプロットシグナルの減少によって実証されるように、dsRNAの変性をもたらすことを実証した。ssRNAはフロースルーにおいて溶出し、ドットプロットはdsRNAの不存在を示す(図7C)。

【0064】

クロマトグラフィー分離と組み合わせた低pH処理が残留DNA鋳型の除去をもたらすことを実証するために、eGFP(995nt)を中和前にpH3.0の100mMグリシン中で周囲温度にて25分間インキュベートし、対照は低pHで処理しなかった。次に、両方の試料を、上記のようにpH勾配を使用してCIM PrimaHで精製した。主溶出画分を、10µgのmRNAをリボヌクレアーゼAで処理(mRNAを酵素的に消化するため)することにより、残留DNAプラスミド鋳型の存在について分析し、10µgのmRNAのリボヌクレアーゼA消化の生成物をAGEにロードした。リボヌクレアーゼAはRNAを選択的に消化するが、DNAは消化せず、残留DNAシグナルを親線状化プラスミドの標準希釈液(範囲50ng~1ng)と比較する。pH3処理mRNAのPrimaH溶出を、本方法を使用してAGEで分析したところ、残留プラスミドのシグナルは検出されなかった。pH未処理mRNAのPrimaH溶出は、10µgのmRNA当たり2ng~5ngのDNAプラスミドの存在を示した(図8)。

【0065】

実施例2:

eGFP(高感度緑色蛍光タンパク質、995ヌクレオチド)をコードするmRNAをIVT(in vitro転写)反応で生成し、dsRNA(二本鎖RNA)を除去しないオリゴdTアフィニティークロマトグラフィーで精製した。少なくとも40塩基対のdsRNA配列に特異的なJ2抗体を用いたドットプロット分析により、試料中のdsRNA不純物の存在を確認した。

【0066】

dsRNAの変性に必要なpH3での緩衝液モル濃度を、室温にて広い緩衝液濃度範囲

10

20

30

40

50

(pH 3で5 mM~200 mMグリシン緩衝液)におけるmRNAのインキュベーションにより試験した。試料は、室温にて15分間インキュベートしてから、AGE (2%アガロースゲル電気泳動、500 ng) 又はドットブロットアッセイ (1000 ng) にロードした。5 mM~200 mMグリシン緩衝液 pH 3の濃度範囲におけるmRNAのインキュベーションは、ドットブロット強度の減少をもたらした。J2シグナルは非処理試料 (未処理対照) において最も強く、pH 3の5 mM緩衝液とともにインキュベートした試料においても強いシグナルが依然として観察された。シグナルは、10 mM緩衝液で著しく減少し、25 mM以上の緩衝液では可視化されず、dsRNA構造が解離したことを示唆しているが、アガロースゲルは、試験したグリシン緩衝液の全ての濃度においてmRNAが無傷であったことを示した (図9)。

10

【0067】

実施例3:

dsRNA変性の塩依存性を、室温 (RT) にて15分間、250 mM~2 Mの範囲の異なる濃度のNaClの存在下、25 mMグリシン pH 3でeGFP (995 nt) をインキュベートすることにより実証した。J2抗体を用いたドットブロットを行ってdsRNAシグナルの量を決定したところ、50 mM NaClの存在下では検出されなかったが、少なくとも250 mMの塩濃度では、J2ドットブロットシグナルが増加し、NaClがpH 3でのdsRNAの変性を防ぐことを示唆している (図10)。

【0068】

実施例4:

疎水性相互作用クロマトグラフィーによる低pH処理mRNAの精製を実証するために、eGFPをコードするmRNAをpH 3.0の75 mMグリシン中で周囲温度にて20分間インキュベートした。試料をCIM C4 HLDカラムにロードし、10 mMクエン酸 pH 5.1への段階勾配で溶出した (図11、i)。出発物質 (未処理のmRNA) 及び溶出画分をAGE及びJ2抗体を用いたドットブロットにより分析した (図11、iii)。結果は、低pHインキュベーションに続く疎水性クロマトグラフィーカラムによる精製が、溶出画分におけるドットブロットシグナルの減少によって実証されるように、dsRNAの変性、ssRNAの精製をもちこすことを実証した (図11、ii)。

20

【0069】

実施例5:

手法の一般性を実証するために、Cas9 mRNA (4000 nt) を含有する未精製IVT反応混合物を25 mMグリシン pH 3中で周囲温度にて20分間インキュベートした。試料をCIM C4 HLDカラムにロードし、10 mMクエン酸 pH 5.1への段階勾配で溶出した (図12、i)。得られた溶出画分におけるdsRNAシグナルをJ2ドットブロットによって測定したところ、dsRNAシグナル3の顕著な減少が実証され (図12、ii)、dsRNAが変性し、ssRNAが精製されたことが確認された。

30

【0070】

実施例6:

カラムでの低pH処理によるmRNA変性の可能性をアフィニティークロマトグラフィーで実証した。eGFPをコードするmRNAを移動相A (50 mM リン酸Na、0.5 M NaCl、pH 7.5) で希釈し、Convective Interaction Media (CIM) オリゴdTカラムにロードし、次に、移動相B (50 mMリン酸Na pH 7.5) で洗浄した。mRNAを100 mMグリシン pH 3への段階勾配で溶出した (図13、i)。出発物質 (mRNA) 及び溶出画分をAGE及びJ2抗体を用いたドットブロットにより分析した (図13、ii及びiii)。AGEでは顕著な分解は観察されず、精製プロセス中の低pHへのmRNAの曝露はRNA完全性に影響を及ぼさないことを示している (図13、iii)。pH 3でのオリゴdTによるmRNAの溶出はdsRNAの変性をもたらし、溶出画分におけるドットブロットシグナルの減少によって確認された (図13、ii)。

40

50

【0071】

実施例7：

手法の一般性を実証するために、eGFPをコードするmRNAを移動相A（50mMリン酸Na、0.5M NaCl、pH7.5）で希釈し、Porosオリゴ（dT）25カラムにロードし、次に、移動相B（50mMリン酸Na、pH7.5）で洗浄した。mRNAを100mMグリシン pH3への段階勾配で溶出した（図14、i）。出発物質（mRNA）及び溶出画分をAGE及びJ2抗体を用いたドットプロットにより分析した（図14、ii及びiii）。顕著な分解は観察されず、精製プロセス中の低pHへのmRNAの曝露はRNA完全性に影響を及ぼさないことを示している（図14、iii）。pH3でのオリゴdTによるmRNAの溶出はdsRNAの変性をもたらし、溶出画分におけるドットプロットシグナルの減少によって確認された（図14、ii）。

10

【0072】

実施例8：

オリゴdTカラムによる溶出の低pHでの変性によって生じたdsRNA断片を除去するために、CIM C4 HLDによるオリゴdT溶出液のクロマトグラフィー分離を行った。eGFP（995nt）をコードするmRNAを移動相A（50mMリン酸Na、0.5M NaCl、pH7.5）で希釈し、Porosオリゴ（dT）25カラムにロードし、次に、移動相B（50mMリン酸Na、pH7.5）で洗浄した（図15、A）。次に、得られたpH3溶出液を10mMグリシン pH3で希釈し、CIM C4 HLDカラムにロードした。mRNA溶出は、pH5.1の50mMクエン酸塩への段階勾配によって行った（図15、B）。出発物質（mRNA）及びC4 HLD溶出画分を、J2抗体を用いたドットプロットにより分析した（図15、C）。ドットプロットによりC4 HLD溶出におけるdsRNAシグナルの顕著な減少が実証され、dsRNA構造は解離し除去されたが、mRNAは無傷であったことを示唆している。

20

【0073】

実施例9：

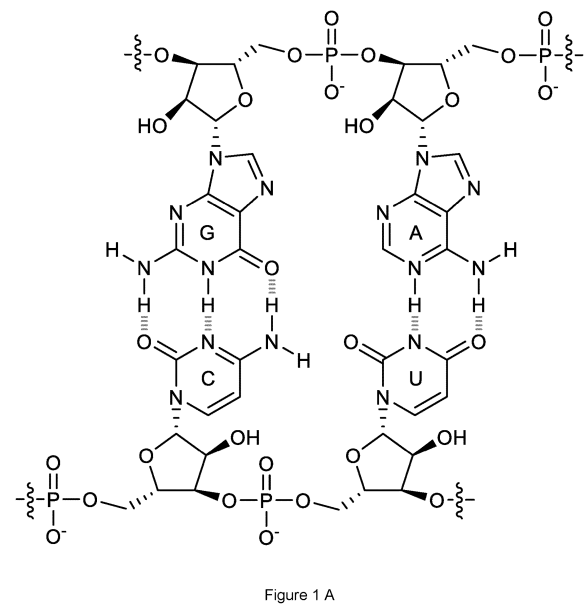
低pH処理したmRNA試料からのssRNAの精製は、マルチモーダルクロマトグラフィーと組み合わせた低pH処理によって更に実証し、eGFP（995nt）をpH3.0の25mMグリシン中で周囲温度にて15分間インキュベートした。得られた生成物を移動相A（50mMクエン酸、pH5）で希釈し、50mMクエン酸塩、及び100mMリン酸Na緩衝系で作製したpH勾配（pH gradient pH gradient）（pH5～pH7.5）を使用してCIM PrimaHで精製した（図16、i）。得られた溶出画分を、J2抗体を用いたドットプロットによって分析したところ、溶出画分1におけるdsRNA含有量の顕著な減少が示された（図16、ii）。

30

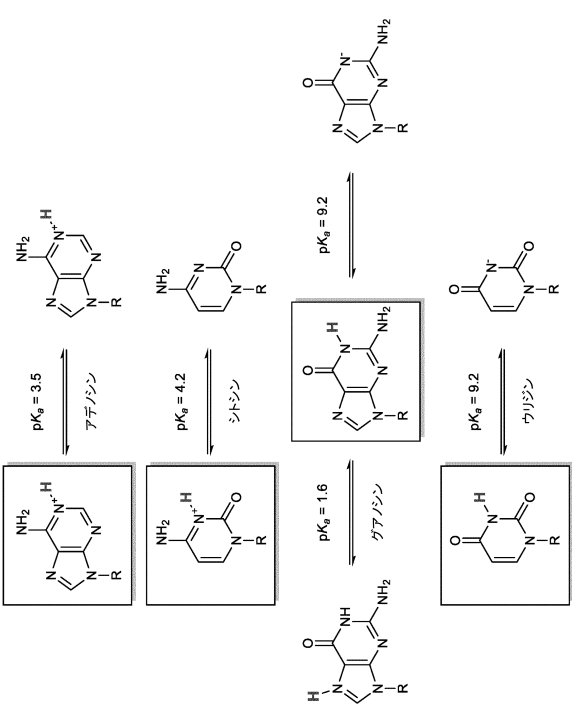
40

50

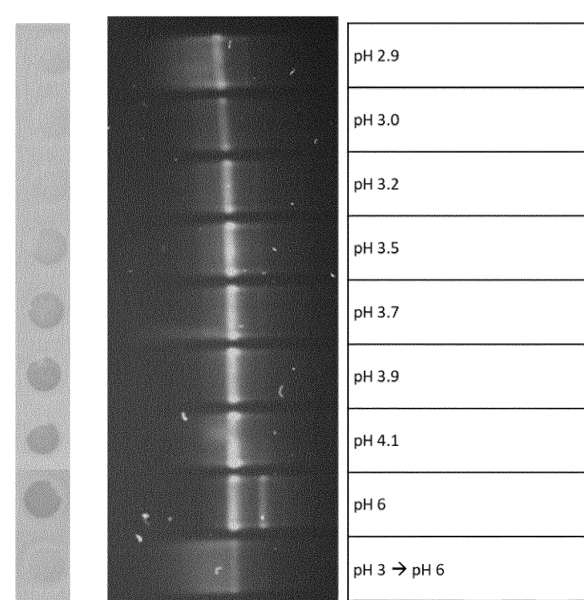
【図面】
【図 1 A】



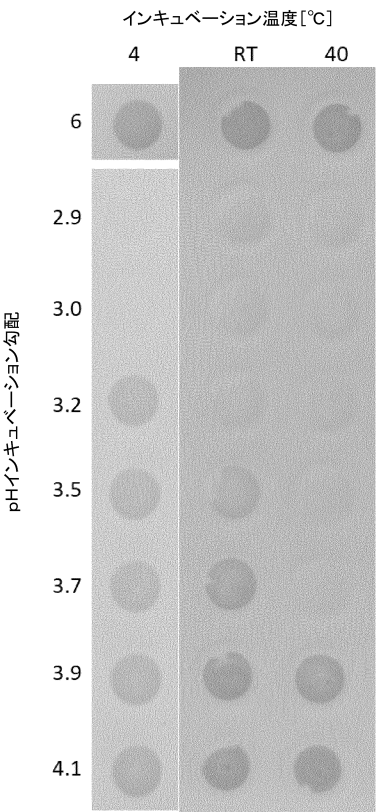
【図 1 B】



【図 2】



【図 3 A】



10

20

30

40

50

【図 3 B】

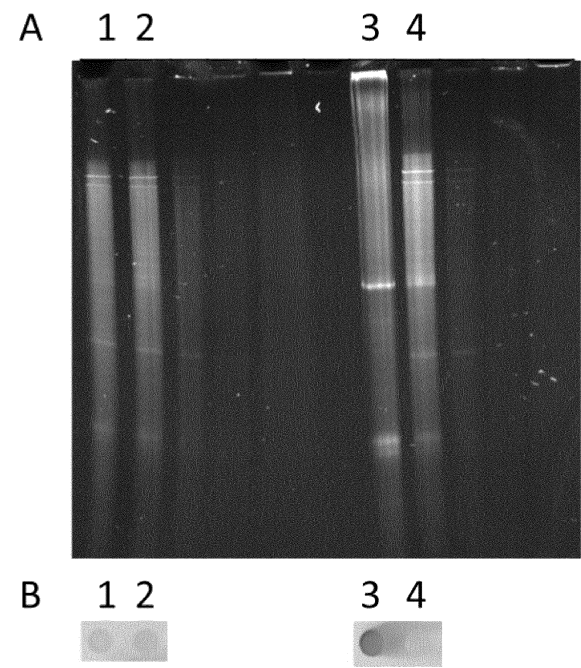


Figure 3 B

【図 4 A】

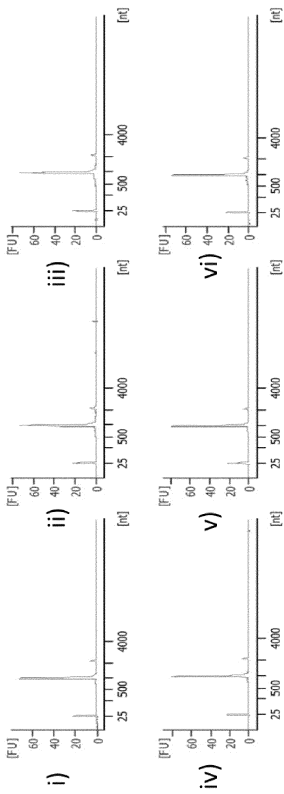


Figure 4 A

【図 4 B】

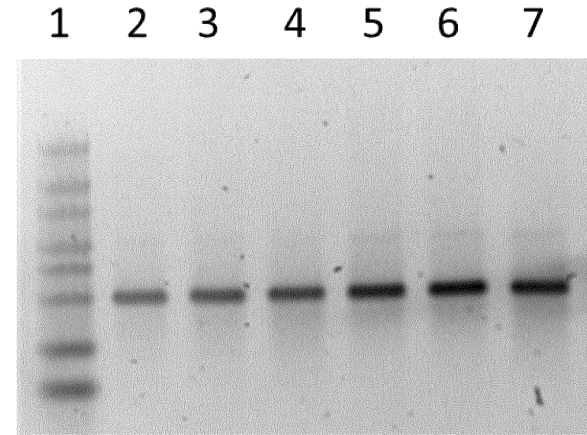


Figure 4 B

【図 5】

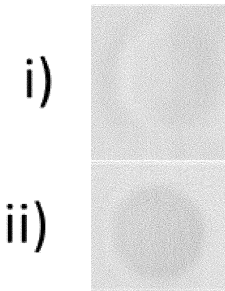


Figure 5

【図 6 A】

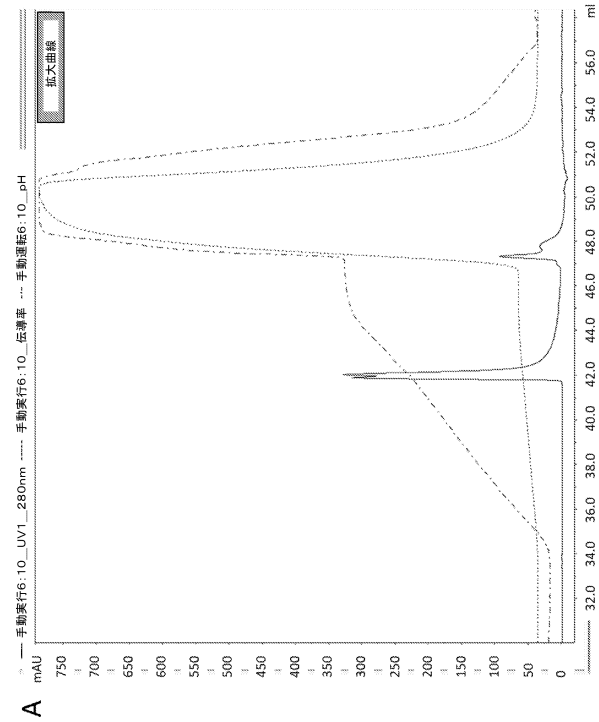
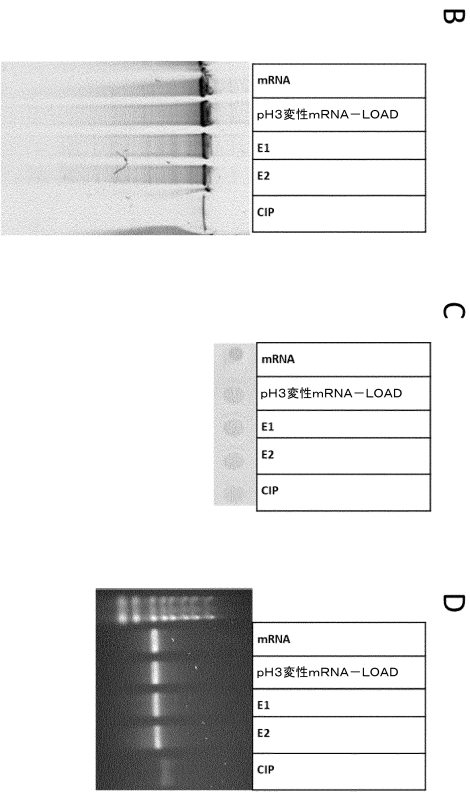


Figure 6 A

【図 6 B C D】



【図 7 A】

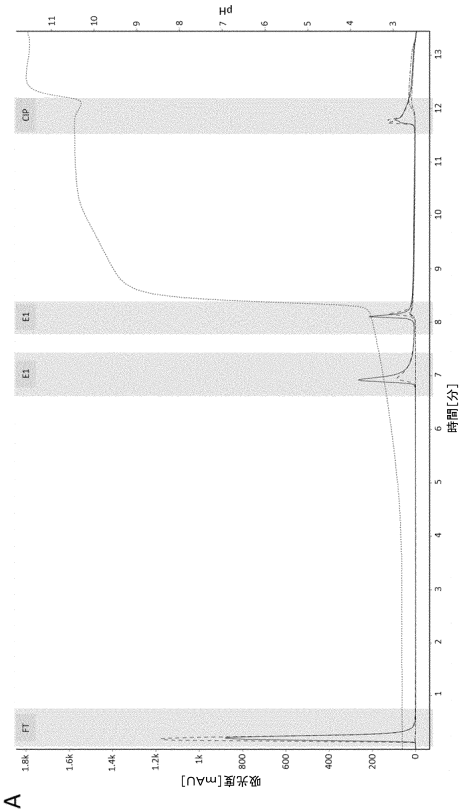
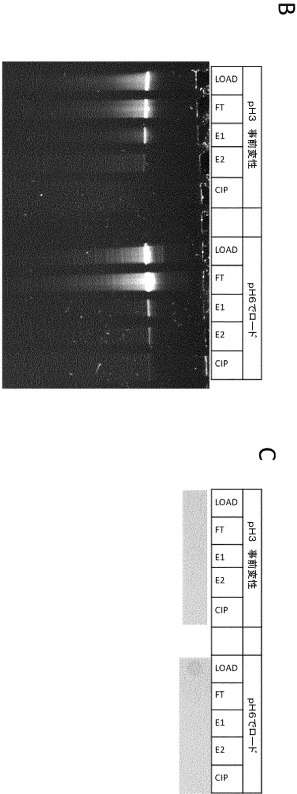


Figure 7 A

【図 7 B C】



10

20

30

40

50

【図 8】

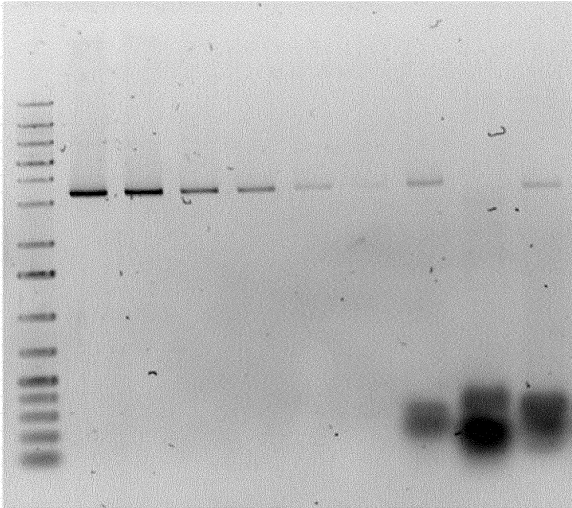


Figure 8

【図 9】

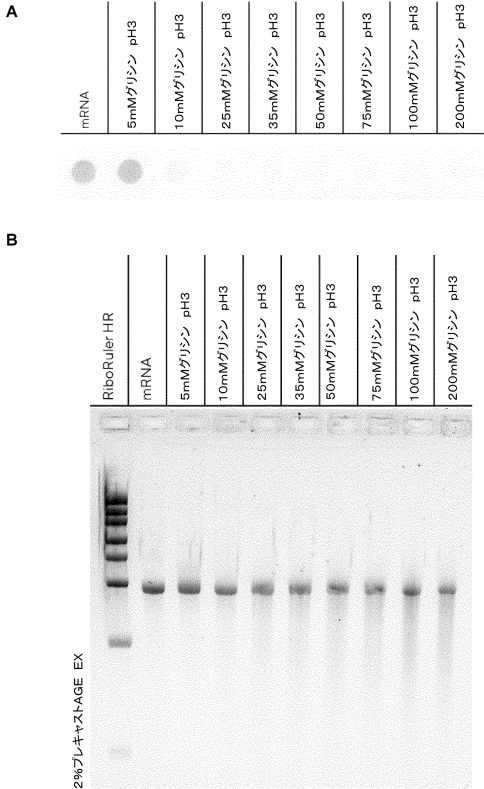


Figure 9

【図 10】

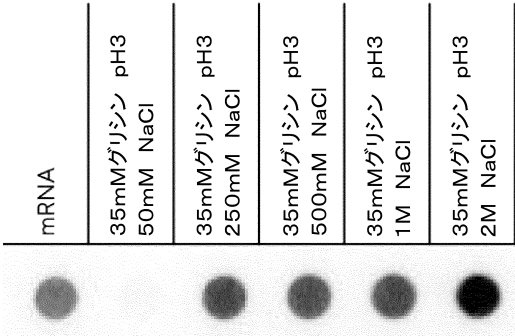


Figure 10

【図 11】

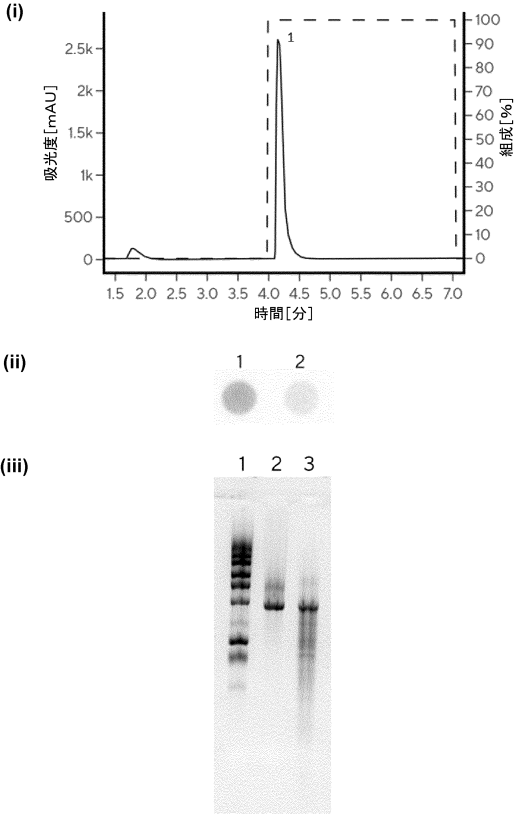


Figure 11

10

20

30

40

50

【図 1 2】

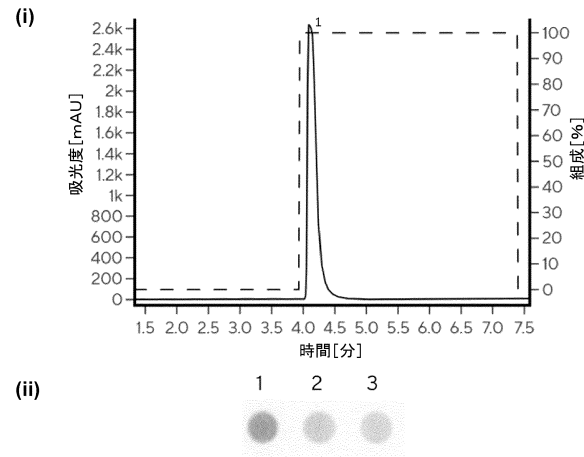


Figure 12

【図 1 3】

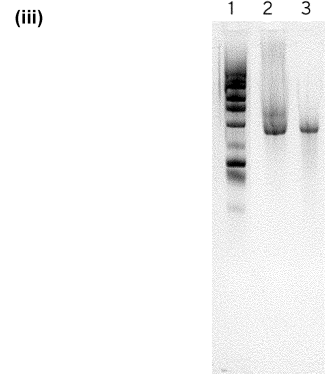
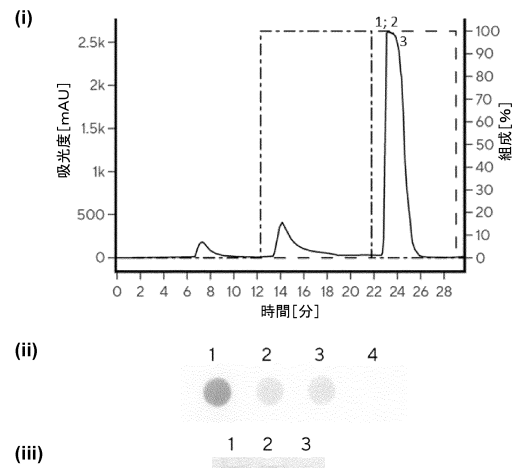


Figure 13

【図 1 4】

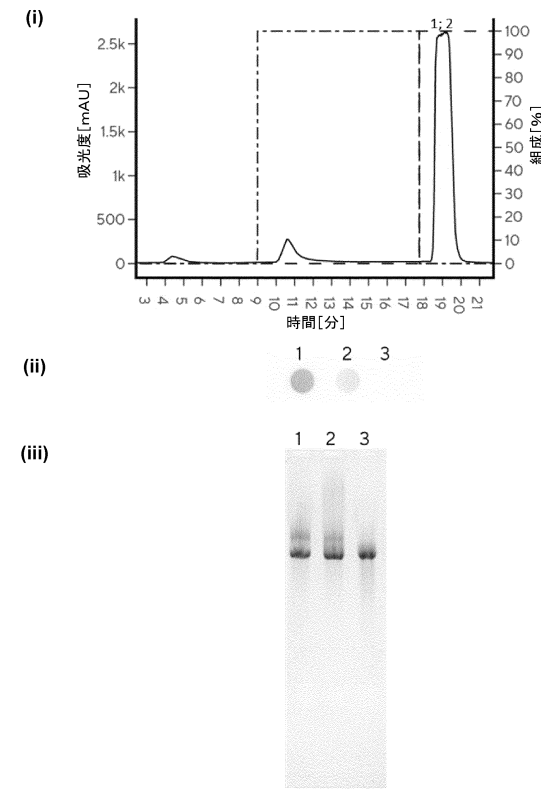


Figure 14

【図 1 5】

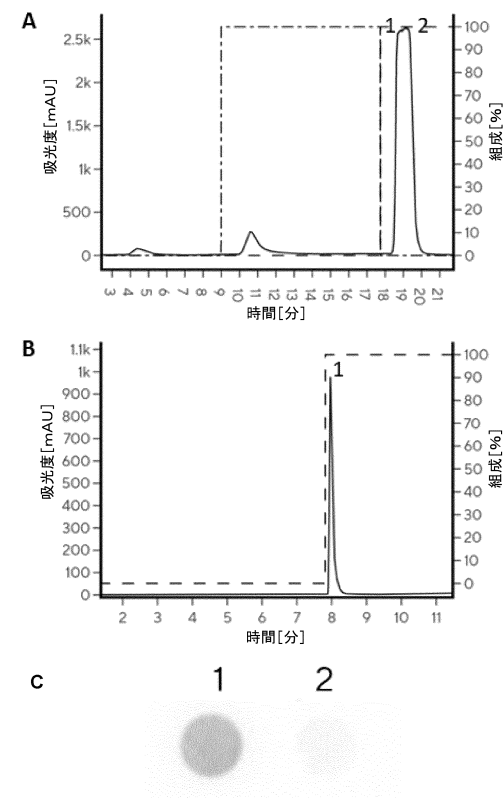


Figure 15

10

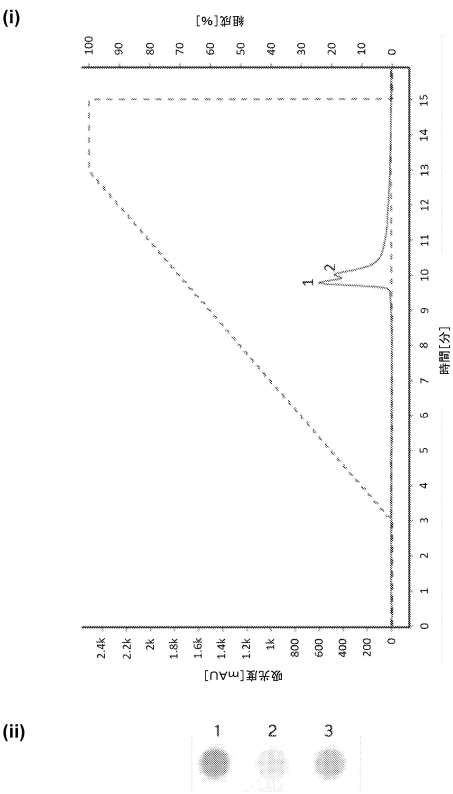
20

30

40

50

【図 16】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/070381 A2 (PROMEGA CORP [US]; BITNER REX M [US] ET AL.) 21 June 2007 (2007-06-21) page 16, lines 19-22; claims 1-5; examples 18, 23 -----	1-4, 6, 7, 14, 15
A	US 10 954 507 B2 (QIAGEN GMBH [DE]) 23 March 2021 (2021-03-23) page 8, lines 13-15; example 1 -----	1-15
A	US 6 120 985 A (LAUGHARN JR JAMES A [US] ET AL) 19 September 2000 (2000-09-19) example 15 -----	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 June 2023

Date of mailing of the international search report

14/06/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seroz, Thierry

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/059215

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007070381	A2	21-06-2007	EP 1963526 A2	03-09-2008
			US 2007172855 A1	26-07-2007
			US 2012059160 A1	08-03-2012
			WO 2007070381 A2	21-06-2007
US 10954507	B2	23-03-2021	AU 2015289027 A1	12-01-2017
			CN 106574265 A	19-04-2017
			EP 3169780 A1	24-05-2017
			JP 6689251 B2	28-04-2020
			JP 2017520268 A	27-07-2017
			US 2017198279 A1	13-07-2017
			WO 2016009059 A1	21-01-2016
US 6120985	A	19-09-2000	AU 745925 B2	11-04-2002
			CA 2307876 A1	14-05-1999
			EP 1027160 A1	16-08-2000
			JP 2001521818 A	13-11-2001
			US 6120985 A	19-09-2000
			WO 9922868 A1	14-05-1999

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW
,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL
,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
ランスカ ツェスタ 5 5