

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-522526
(P2023-522526A)

(43)公表日 令和5年5月31日(2023.5.31)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	4 D 0 1 7
B 0 1 D 15/36 (2006.01)	B 0 1 D 15/36	
B 0 1 D 15/04 (2006.01)	B 0 1 D 15/04	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全21頁)

(21)出願番号	特願2022-543191(P2022-543191)	(71)出願人	521262714
(86)(22)出願日	令和3年4月16日(2021.4.16)		ザルトリウス ビーアイエー セパレーシ ョンズ ディー. オー. オー.
(85)翻訳文提出日	令和4年7月14日(2022.7.14)		スロベニア共和国 5 2 7 0 アイドフシ ユチナ ミルケ 2 1
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/059911	(74)代理人	110001519
(87)国際公開番号	WO2021/209601		弁理士法人太陽国際特許事務所
(87)国際公開日	令和3年10月21日(2021.10.21)	(72)発明者	ギャニオン、ピーター スタンリー
(31)優先権主張番号	20170184.4		アメリカ合衆国 8 9 1 0 1 ネバダ ラス ベガス、ラス ベガス ブールバード ノ ース 1 5 0 ユニット 1 8 1 1
(32)優先日	令和2年4月17日(2020.4.17)	F ターム (参考)	4D017 AA03 AA20 BA07 CA17 DA03 DB10
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
(81)指定国・地域	AP(BW,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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 アニオン交換体を用いる一本鎖RNA精製方法

(57)【要約】

一本鎖RNAを含む試料をアニオン交換体に適用するステップ、
18℃～25℃の範囲にある第1の温度で、0.5M～12.0Mの範囲にある第1のイオン強度を有する第1の塩溶液を用いて、前記アニオン交換体を洗浄するステップ、及び
35℃～80℃の範囲にある第2の温度で、第2のイオン強度を有する第2の塩溶液によって前記一本鎖RNAを溶出するステップ
を含み、
前記第1のイオン強度が前記第2のイオン強度よりも0.5M以上高いことを前提とする、
アニオン交換体を使用する一本鎖RNA精製方法。

Method Step	Temperature	Concentration of Salt
equilibrate sample	ambient	any
equilibrate column	ambient	any
load/wash sample	ambient	any
high salt wash	ambient	0.5 M > than elution
low/no salt wash	ambient	< 0.5 M
low/no salt wash	elevated	< 0.5 M
elute	elevated	as required

Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一本鎖 RNA を含む試料をアニオン交換体に適用するステップ、

18℃～25℃の範囲にある第1の温度で、0.5M～12.0Mの範囲にある第1のイオン強度を有する第1の塩溶液を用いて、前記アニオン交換体を洗浄するステップ、及び

35℃～80℃の範囲にある第2の温度で、第2のイオン強度を有する第2の塩溶液によって前記一本鎖 RNA を溶出するステップ

を含み、

前記第1のイオン強度が前記第2のイオン強度よりも0.5M以上高いことを前提とする、

アニオン交換体を使用する一本鎖 RNA 精製方法。

【請求項 2】

前記第1の塩溶液を用いる洗浄が1M～10M、又は2M～8M、又は4M～6Mの範囲にあるイオン強度で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第1の塩溶液を用いる洗浄がカオトロピック塩を用いて行われる、請求項1又は請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記カオトロピック塩がグアニジン塩、過塩素酸塩、チオシアン酸塩、又はこれらの混合物からなる群より選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記第1の塩溶液による洗浄が1mM～1000mM、又は5mM～500mM、又は10mM～100mM、又は20mM～50mMの範囲にある濃度のキレート剤を含む、請求項1～請求項4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第1の塩溶液による洗浄がエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、又はエチレンジアミントリ酢酸(EGTA)、及びトリス(2-アミノエチル)アミン(TREN)からなる群より選択される一種以上のキレート剤を含む、請求項1～請求項5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記一本鎖 RNA の溶出に使用される前記第2の塩溶液が45℃～70℃、又は50℃～70℃、又は55℃～70℃、又は60℃～70℃の範囲にある前記第2の温度で適用される、請求項1～請求項6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記アニオン交換体が四級アミノイオン交換基を有する強アニオン交換体、三級アミノイオン交換基を有する弱アニオン交換体、二級アミノイオン交換基を有する弱アニオン交換体、一級アミノ基を有する弱アニオン交換体、及び2種以上のアミノ基を有するアニオン交換体からなる群より選択される、請求項1～請求項7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 RNA のサイズが1000塩基～25000塩基の範囲である、請求項1～請求項8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、アニオン交換体を用いる一本鎖 RNA 精製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

メッセンジャー RNA (mRNA) の精製にアニオン交換クロマトグラフィーを使用することは公知である。300ヌクレオチド塩基以下であるものなどの小さい構築物は、クロ

10

20

30

40

50

マトグラフィー固相上で第四級アミノリガンドを使用する強アニオン交換体、及びクロマトグラフィー固相上で第三級アミノリガンドを使用する弱交換体を含む、従来のアニオン交換体上で精製することができる〔1〕。精製は最も一般的にはおおよそ中性のpH(pH 6.0~8.0)で行われ、溶出は塩化ナトリウム又は他の塩の上昇勾配を用いて行われる。

【0003】

300塩基を超える塩基を含むものなどのより大きなmRNA構築物は、周囲温度では強アニオン交換体からも弱アニオン交換体からも溶出されないことが示されているが、それらは操作温度が摂氏65度(65℃)のように十分に高い場合であれば溶出され得る〔2〕。

10

【0004】

溶出前の洗浄工程において塩を適用する技術は、RNAに加えてタンパク質及びDNAの精製を含む、アニオン交換クロマトグラフィーの分野全体にわたって公知である。試料をカラムに適用した後、カラムを高濃度の塩で洗浄して、結合の弱い汚染物質を退かせる(displace)ことによって、イオン交換体の表面から除去する。このアプローチに伴う公知の制限は、洗浄工程における塩の濃度が、目的の生成物を溶出するために必要とされる塩の量よりも低くなければならないことである〔2〕。洗浄ステップの塩濃度が目的の生成物を溶出するのに必要な濃度に近すぎると、生成物がある程度の量、潜在的には全量、汚染物質と共に除去されてしまう。

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

イオン交換クロマトグラフィーにおける使用(RNAの精製を含む)のためには多数の異なる種類の塩が使用又は示唆されている〔2〕。しかしながら、mRNAを溶出するのに必要な塩の濃度未満に洗浄工程の塩濃度を維持する必要性は残っている。カオトロピック塩(変性塩と呼ばれることもある)は高い操作温度を必要とせずに、アニオン交換体から大きなmRNAを溶出することが示唆されている〔2〕が、そうすることは実証されていない。洗浄塩として、それらは、全ての他の塩と同じ濃度限界、すなわち、mRNAを溶出するのに必要な塩の濃度より低いこと、によって制約されると理解されている。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

本発明の主題は、

- ・一本鎖RNAを含む試料をアニオン交換体に適用すること、
- ・第1の温度で第1のイオン強度を有する第1の塩溶液を用いて前記アニオン交換体を洗浄すること、及び
- ・第2の温度で第2のイオン強度を有する第2の塩溶液によって一本鎖RNAを溶出すること

を含む、アニオン交換体を使用する一本鎖RNA精製方法であって、

前記第1の温度が前記第2の温度よりも5℃以上低く前記、第1のイオン強度が前記第2のイオン強度よりも0.5M以上高いことを前提とする、方法である。

40

【0007】

典型的には、第1の温度は18℃~25℃の範囲にある温度に規定することができる。

【0008】

本発明の方法のある実施形態では、第1の塩溶液での洗浄は0.5M~12.0M以上、又は1M~10M以上、又は2M~8M以上、又は4M~6M以上の範囲のイオン強度で行うことができる。

【0009】

本発明の方法の別の実施形態では、第1の塩溶液による洗浄はグアニジン塩、過塩素酸塩、チオシアン酸塩、又は塩の混合物からなる群よりの1種以上などのカオトロピック塩で行うことができる。

50

【0010】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、第1の塩溶液による洗浄は、1 mM～1 0 0 0 mM、又は5 mM～5 0 0 mM、又は1 0 mM～1 0 0 mM、又は2 0 mM～5 0 mMの範囲にある濃度のキレート剤を含み得る。

【0011】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、第1塩液による洗浄を行う方法はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、又はエチレングリコールビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、及びトリス(2-アミノエチル)アミン(TREN)からなる群より選択される一種以上のキレート剤を含むことができる。

【0012】

本発明の方法のさらなる実施形態では、一本鎖RNAを溶出するために使用される第2の塩溶液は、35℃～80℃、又は45℃～70℃、又は50℃～70℃、又は55℃～70℃、又は60℃～70℃の範囲にある第2の温度で適用され得る。

【0013】

本発明の方法のさらなる実施形態では、アニオン交換体は、四級アミノイオン交換基を有する強アニオン交換体、三級アミノイオン交換基を有する弱アニオン交換体、二級アミノイオン交換基を有する弱アニオン交換体、一級アミノ基を有する弱アニオン交換体、2種以上のアミノ基を有するアニオン交換体からなる群より選択され得る。

【0014】

典型的には、RNAのサイズは1 0 0 0塩基～2 5 0 0 0塩基の範囲であり得る。

【0015】

好ましい実施形態では、これは

- ・一本鎖RNAを含む試料をアニオン交換体に適用するステップ、
 - ・18℃～25℃の範囲にある第1の温度で、0.5 M～12.0 Mの範囲にある第1のイオン強度を有する第1の塩溶液を用いて、前記アニオン交換体を洗浄するステップ、及び
 - ・35℃～80℃の範囲にある第2の温度で、第2のイオン強度を有する第2の塩溶液によって前記一本鎖RNAを溶出するステップ
- を含み、

ここで、前記第1のイオン強度が前記第2のイオン強度よりも0.5 M以上高いことを前提とする、
アニオン交換体を使用する一本鎖RNA精製方法である。

【発明の効果】

【0016】

本発明の方法は、イオン交換クロマトグラフィーの分野における溶出前洗浄についての公知のルールを直接破るものであり、アニオン交換クロマトグラフィーによるRNA、特にmRNAの精製に、改良を提供するものである。この方法は、所望のmRNAを溶出するために使用される塩濃度よりも実質的に劇的に高い塩濃度を用いて洗浄を行うことを含む。さらに、溶出前洗浄の公知のルールとは反対に、その結果は、完全飽和までの濃度を含むカオトロピック塩の使用によって増強される。精製性能は、高濃度塩洗浄にキレート

【0017】

この方法は、所望の一本鎖mRNA(ssRNA)を溶出することなく、周囲温度でアニオン交換体からタンパク質、DNA、及び二本鎖RNA(dsRNA)の大部分を除去する、かかる洗浄の能力を利用する。ssRNAは、その後、高温での塩分勾配の手段によって回収される。溶出に先立って汚染物質の大部分を除去することによって、溶出勾配は、残る痕跡量レベルの汚染物質からのssRNAの超精製を提供することができる。この改善がなければ、これらの汚染物質は溶出勾配で溶出し、そこで、所望のssRNAと様々な程度にオーバーラップすることによって純度を損なうことが予想される。この改善は全てのサイズのRNAの精製に関連するが、特に、1 0 0 0～2 5 0 0 0塩基のサイズ範囲

10

20

30

40

50

のような、大型及び非常に大型の mRNA に関連する。

【0018】

本方法によって提供される性能改善はまた、アフィニティークロマトグラフィーとして当技術分野で公知の技術に匹敵するワークフローの単純化を可能にする。アフィニティークロマトグラフィーは、抗体のような生物特異的リガンドが固相に共有結合的に付着されている技術である。該抗体の標的を担持する汚染された試料が固相に適用されると、標的分子のみが捕捉され、一方、汚染物質は、カラムを通過して流出することによって除去される。カラムを洗浄して痕跡量レベルの所望されない物質種 (species) を洗い流した後、標的分子を単一の高度に精製された画分に溶出する。この場合、ssRNA を含有する未精製又は部分的に精製された試料は、周囲温度で高濃度塩中にロードされる。汚染物質の大部分は固相を通過して流出する。高度に精製された ssRNA が、上昇させた温度における塩勾配を用いた溶出の間に濃縮画分中に溶出される。

10

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明を実施するステップを図解し表にして、各操作温度及び塩濃度の範囲の例を強調したものである。

【図2】本発明を実施するステップを図解して、各操作温度及び塩濃度の範囲をグラフで示したものである。

【図3】ssRNA、DNA、並びに混入しているタンパク質、DNA及びmRNAを含有する、インビトロ転写混合物の結合に対しての、高濃度塩グアニジン-EDTA洗浄の効果を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下のセクションで、本発明をより詳細に説明する。

発明の一般的説明

一般的な態様において、本発明は、一本鎖メッセンジャーRNA(ssRNA)を含有する調製物から汚染物質及び不純物を除去するための固相抽出方法である。

【0021】

具体的態様において、本発明はアニオン交換クロマトグラフィーによるssRNAの精製に関し、ここで、汚染物質は周囲温度での高濃度塩洗浄 (high-salt wash) によって除去され、そしてssRNAはその後、上昇させた操作温度において、より低濃度の塩への塩勾配によって溶出される。

30

【0022】

ある実施形態では、ssRNA及び汚染物質を含有する元の試料は、インビトロ転写混合物、塩又は有機溶媒によってインビトロ転写混合物を沈殿させた後の再懸濁沈殿物、又は前の精製工程からのクロマトグラフィー画分の群からの1つからなる。したがって、ssRNAの相対純度は、全生体分子含有量のうちssRNAがほんのわずかな部分である非常に粗い精製 (very crude) でもよく、又は全生体分子含有量のうちssRNAが主要な割合を占める高度な精製でもよい。このような試料の中で、汚染物質種としては、dsRNA; ssRNAのインビトロ転写後に残存するDNA及び／又はDNA断片; インビトロ転写を促進するために使用された酵素を含むタンパク質; 及びインビトロ転写の間に安定に会合したか、又はインビトロ転写を実施するために使用されたDNAプラスミド又は酵素調製物中に予め存在した複数の汚染物質種を含むヘテロ凝集体又は複合体を含み得る。

40

【0023】

ある実施形態では、アニオン交換体は第四級アミンアニオン交換体などの強アニオン交換体である。密接に関連する実施形態では、アニオン交換体は第三級アミンアニオン交換体などの弱アニオン交換体である。別の密接に関連する実施形態では、弱アニオン交換体は第二級アミンアニオン交換体である。別の密接に関連する実施形態では、弱アニオン交換体は第一級アミンアニオン交換体である。別の密接に関連する実施形態では、アニオン

50

交換体は２種以上のアミン誘導体を含んで混合的特徴を有するものであってもよい。

【００２４】

ある実施形態では、塩洗浄が適用される周囲温度は１８℃～２５℃又は２０℃～２２℃の範囲内の温度として規定することができる。

【００２５】

ある実施形態では、ssRNAが溶出される上昇させた操作温度は３５℃～８５℃、又は４０℃～８０℃、又は４５℃～７５℃、又は５０℃～７０℃、又は５５℃～６５℃の範囲内、又はより低い範囲内、又は中間範囲内、又はより高い範囲内の値であり得る。

【００２６】

ある実施形態では、周囲温度での溶出前高濃度塩洗浄における塩の濃度は、上昇させた操作温度における塩の溶出濃度を、０．５Ｍ～１２Ｍ、又は１．０Ｍ～１０Ｍ、又は２．０Ｍ～８．０Ｍ、又は３．０Ｍ～６．０Ｍだけ超える。

【００２７】

ある実施形態では、周囲温度での溶出前高濃度塩洗浄における塩の種（species）は、上昇させた操作温度でssRNAを溶出するために使用される塩の種と同じである。

【００２８】

別の実施形態では、周囲温度での溶出前高濃度塩洗浄における塩の種は、上昇させた操作温度でssRNAを溶出するために使用される塩の種とは異なる。

【００２９】

関連する実施形態において、溶出前高濃度塩洗浄における塩の種はカオトロピック塩であり、ssRNAを溶出するために使用される塩の種は中性塩である。そのようなある実施形態において、カオトロピック塩は、グアニジニウム塩、チオシアネート塩、過塩素酸塩、又はそれらの組み合わせの群からのものである。別のこのような実施形態において、ssRNAを溶出するために使用される中性塩の種は、塩化ナトリウム、又は塩化カリウム、又は酢酸ナトリウム、又は酢酸カリウムである。別のこのような実施形態において、ssRNAを溶出するために使用される塩の種は、カオトロピック塩である。

【００３０】

RNAが、塩化ナトリウム又は塩化カリウムのような高濃度の中性塩によって、塩化リチウムのような他のものによるのと同様に、沈殿させられ得ることは、当業者によって認識されよう。沈殿は、クロマトグラフィー装置内のクロマトグラフィー性能を損なう可能性がある。したがって、カオトロピック塩などの非沈殿性塩によって溶出することは、より鋭い溶出ピーク、より高い分解能、及び所望のssRNAのより高い回収率などのより良好なクロマトグラフィー性能を支援し得る。溶出にカオトロピック塩を使用することが回避されることが望ましい場合、操作温度をさらに上昇させて、所望のssRNAを溶出するために必要とされる中性塩の濃度を減少させ得ることもまた、当業者によって認識されよう。

【００３１】

ある実施形態では、溶出前高濃度塩洗浄はキレート剤を含む。１つのこのような実施形態において、キレート剤は、２ｍＭ～２００ｍＭ、又は５ｍＭ～１００ｍＭ、又は１０ｍＭ～５０ｍＭ、又は２０ｍＭ～２５ｍＭ、又はより低い範囲、又は中間範囲、又は完全飽和までのより高い範囲の、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）であり得る。密接に関連する実施態様において、キレート剤は、EDTAについて記述されたのと同じ範囲の濃度に渡る、クエン酸の塩、又はリン酸、又はエチレンジアミン四酢酸（EGTA）、又はトリス（２-アミノエチル）アミン（TREN）、又は別のキレート剤、又はキレート剤の混合物である。

【００３２】

ある実施形態では、溶出前高濃度塩洗浄の後に低濃度塩洗浄又は無塩洗浄が続く、その結果、作動温度が周囲温度からssRNAの溶出のために選択された高い作動温度まで上昇する間にssRNAがアニオン交換体に結合したままとなる。

【００３３】

10

20

30

40

50

ある実施形態において、周囲温度でのアニオン交換体は、ssRNAを結合する工程のために、pH 3.0～9.0の範囲の任意のpHに平衡化され得る。試料はまた、0.0M～完全飽和の範囲の濃度を有する任意の種の塩を含有しうる。アニオン交換体を、pH 6.5～pH 7.5の範囲などの中性に近いpHに平衡化し、塩化ナトリウムなどの中性塩を約50mM～約100mMの濃度で含有することが、一般に好ましい。関連する実施形態では、試料がアニオン交換体が平衡化される条件に近い条件に平衡化されてもよい。異なる関連する実施形態においては、カラム及び試料は、異なる塩及びpH条件に平衡化される。

【0034】

ある実施形態では、この方法は周囲温度で開始される。アニオン交換体は、pHがおおよそ中性であり、追加の塩が無い又は低濃度の中性塩である緩衝液で平衡化される。ssRNAを含有する試料を、おおよそ同じ範囲の条件で滴定し、次いで濾過して固体を除去することができる。次いで、試料をアニオン交換体に適用し、その後、アニオン交換体を平衡緩衝液ですすいで、結合していない汚染物質をアニオン交換体の本体内の間隙空間から退かせる。キレート剤を含む溶出前高濃度塩洗浄緩衝液を、平衡化緩衝液とほぼ同じpHで適用する。最初の平衡条件下で結合したタンパク質、DNA、及びdsRNAの大部分は、アニオン交換体の表面から解離され、カラムから濯ぎ出される。カラムを元の平衡緩衝液で再び洗浄して、高濃度塩及びキレート剤を除去する。操作温度を上昇させ、塩濃度を増加させることによってssRNAを溶出する。

【0035】

周囲温度で開始される、異なる実施形態では、アニオン交換体は、溶出前高濃度塩洗浄を行うことを意図したものと同一組成の緩衝液で平衡化される。このようなある実施形態では、試料が、溶出前高濃度塩洗浄を行うことを意図するものと同一種及び濃度の塩を含有するように、予め平衡化される。このような実施形態では、汚染物質の大部分がアニオン交換体に結合しないことが認識されるであろう。カラムの間隙空間に残存する痕跡量レベルの非結合汚染物質は、溶出前高濃度塩洗浄緩衝液を適用することによって、ローディング後に洗い流すことができる。次いで、カラムを低濃度塩又は無塩の緩衝液で洗浄して、所望のssRNAがアニオン交換体に結合したままであり、一方、温度を上昇させ、そして塩濃度を増加させることによって、ssRNAが溶出されるようにすることができる。

【0036】

当業者は、上述の2つの実施形態が、同じ主要原理(key principle)、特に、高濃度塩洗浄では汚染物質の大部分がアニオン交換体によって結合されない、ということと共に使用する、互いのバリエーションを表すものである、ということ認識するであろう。

【0037】

本発明の方法は当技術分野で常用される任意の装置を使用して実施することができ、例えば、アニオン交換体はクロマトグラフィー装置に配置することができる。典型的には、固相表面は、他のクロマトグラフィーのフォーマットの中でも、モノリス、粒子充填カラム、ナノファイバー充填カラム、膜吸着体、又はヒドロゲルの形態であり得る。

【0038】

本発明の方法は、任意の単一の処理方法単独によって達成され得るよりも高度にssRNAを精製するために、1つ又は複数のさらなる処理方法によって先行され得、又は後続され得、又はその両方であり得る。

【0039】

発明の詳細な説明

用語「RNA」はリボ核酸を指す。

用語「mRNA」とはメッセンジャーRNAを指す。

【0040】

用語「インビトロ転写」とは、しばしばDNAプラスミドと呼ばれるDNA鋳型からmRNAを人工的に合成する化学的過程をいう。インビトロ転写混合物はまた、mRNA合

10

20

30

40

50

成のための原料がヌクレオチド塩基の形成で存在することを必要とする。実際の合成を行うための酵素も存在しなければならない。インビトロ転写の完了後、DNA鑄型は、合成を促進するために添加された酵素と同様に、除去されなければならない汚染物質となる。DNAプラスミド調製物又は酵素調製物中に存在した汚染物質も除去されなければならない。

【0041】

用語「ssRNA」は、一本鎖mRNAを意味する。

【0042】

用語「dsRNA」は、二本鎖mRNAを意味する。インビトロ転写の間に、所望のssRNAに加えて、望ましくないdsRNAの亜集団が産生される。望ましくないdsRNA種は、塩基鎖内の相補的配列の鎖内相互作用によって自発的に転写後物（post-transcription）を形成する。dsRNA配列の形成はまた、隣接するssRNA分子間の相補的配列が対合し、それによって鎖内ds配列も含み得る非特異的鎖間二量体及び高次多量体が作られることによって発生し得る。二本鎖RNAは、被験体に注射されると、望ましくない、そして潜在的に致死的な免疫応答を誘発するため、その除去は精製の特定の目的となる。

【0043】

用語「RNAサイズ」は、鎖中のヌクレオチド塩基の数を指す。ヌクレオチド塩基は一般に「b」と記載される。したがって、1000bと示されればヌクレオチド1000塩基のRNA鎖を意味する。

【0044】

用語「アニオン交換体」は、その表面上に正に荷電した基を有する、クロマトグラフィーを実施するのに適した固相を指す。アニオン交換体上の正に荷電した基は、典型的には種々の型のアミノ基からなる。

【0045】

最も一般的なタイプのアニオン交換体は、一般に強アニオン交換体と呼ばれる。それは、クロマトグラフィー固相の表面に共有結合的に付着された四級アミノ基からなる。強アニオン交換体は広く市販されており、Q、QA、QAEなどのような名称を一般に有し、ここでQは第四級を指す。pH3～pH12のような広範囲のpH値にわたってそれらの完全な電荷を維持することから、強アニオン交換体と称される。

【0046】

次に最も一般的なタイプのアニオン交換体は、ジエチルアミノエチル（DEAE）基として第三級アミンを有する固相を含む、弱アニオン交換体からなる。pH範囲の上限で電荷を失い始めることから、弱交換体(weak exchangers)と称される。

【0047】

第一級アミノ基を有する弱アニオン交換体も知られており、市販されている。一例はTosoh Biosciencesによって製造されToyopearl NH2-750Fの名称で市販されており、ここで「NH2」は第一級アミンを指す[<https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/solutions/process-media-products/by-mode/ion-exchange/anion-exchange/toyopearl-nh2-750f>]。販促資料には第一級アミノ基がポリアミンの形態であると示されており、これは、それが固相に共有結合的に固定された第一級アミンサブユニットの繰り返しを有するポリマーであることを意味する。このようなポリマーは、典型的にはそれらの第一級アミノ基の1つ以上を介して固相の表面に連結される。この連結は連結アミノ残基を第一級アミノ基から第二級アミノ基に変換し、それによって固相の表面上に第一級アミノ基及び第二級アミノ基の混合物を生じる効果を有する。

【0048】

弱アニオン交換体の別の例は、Sartobind STIC PAの名称でSartoriusによって製造されており、ここで、「PA」は第一級アミンを指す[[www.sartorius.com/shop/ww/en/usd/sartobind-stic^{\(R\)}-pa/c/M_Sartobind_STIC_](http://www.sartorius.com/shop/ww/en/usd/sartobind-stic^(R)-pa/c/M_Sartobind_STIC_)]

PA]。販促資料には第一級アミノ基がポリマー、特にポリアリルアミンの形態であって、固相に共有結合的に固定された第一級アミノサブユニットの繰り返しを有するものであると示されている。前出の製品と同様に、このようなポリマーは、典型的にはその第一級アミノ基の1つ以上を介して固相の表面に連結される。この連結は連結アミノ残基を第一級アミノ基から第二級アミノ基に変換し、それによって固相の表面上に第一級アミノ基及び第二級アミノ基の混合物を生成する効果を有する。

【0049】

弱アニオン交換体の別の例は、Bakerbond PolyPEIの名称でJ. T. Bakerによって製造され、VWR[in.vwr.com/store/product/21666435/ion-exchange-chromatography-media-j-t-baker-bakerbond]を通じて市販されている。第二級アミノ基が多数を占めるが第一級アミノ基をなお含む固相の例としてはポリエチレンジアミン(PEI)を担持する固相表面がある。線状PEIポリマーはその末端に第一級アミノ基を有するが、線状ポリマーの各繰り返しノードに第二級アミノ基を有する。分岐PEIポリマーは、第一級アミノ基が各分岐の末端に1つあるので第一級アミノ基をより高い割合で有するが、全ての分岐の基部に第三級アミンも存在する。

【0050】

弱アニオン交換体の別の例は、CIMmultus EDAの名称でBIA Separationsによって製造され、ここでEDAはエチレンジアミンを意味する[www.biaseparations.com/en/products/monolithic-columns/products-for-preparative-applications/111/eda-aex-activated]。EDAを有する固相表面には第一級アミノ基及び第二級アミノ基のバランスがあり、第二級アミンがわずかに多い。

【0051】

アニオン交換体は、1つ以上の多孔質膜、1つ以上のナノファイバー、1つ以上の多孔質又は非多孔質の粒子、又はモノリシック固相(単一のポリマー混合物から合成されたモノリスを含む)の形態のクロマトグラフィー固相、又は、まずマクロ骨格として合成されその上に合成された二次リガンドを有するポリマー相を含んでなるモノリスである、いわゆるヒドロゲルであり得る。これらの固相材料のいずれも、クロマトグラフィーの実施を容易にするために、筐体(housing)中に配され得る。筐体内のクロマトグラフィー固相は、一般にクロマトグラフィー装置と称され、しばしばカラムと称される。

【0052】

用語「平衡化された」又は「平衡化」は、固相及び／又は試料に対して行われ特定の化学環境を作り出す化学コンディショニング工程を指す。固相は、通常、所望のpH及び塩組成を具体化する緩衝液に固相を曝すことによって調整される。試料は、通常、pHの滴定によって、時には希釈によって、そして時にはクロマトグラフィーによるものを含む緩衝液交換技術によって、又は透析によって、又はタンジェンシャルフロー濾過膜による限外濾過によって調整される。これらの方法及び1つ又は別のものを選択するための基準はすべて、当技術分野で知られている。

【0053】

用語「試料ローディング」又は「試料適用」又は「カラムローディング」は、平衡化された試料を、主に第一級アミノ基を有する平衡化された正に荷電された固相と接触させるプロセスをいう。これは、通常、クロマトグラフィー装置を用いて、重力又はポンプなどの外力の手段によって試料を装置に通過させることによって行われる。

【0054】

「吸着(adsorption)」という用語は、生物学的産物を化学的に相補的な表面に結合させるプロセスを指す。吸着は、毛管現象の物理的作用によるスポンジによる水の取り込みに似ている化学的相互作用は含まない吸収(absorption)とは異なる。アニオン交換体の場合の相補性には静電荷が関わりと理解されている。例えば、RNAの表面上の負の静電荷は、正に帯電した固相の表面へのその吸着を媒介する。クロマトグラフィー固相への生物学的生成物の吸着はしばしば、よりよく知られている用語「結合」を以って称される。

10

20

30

40

50

【0055】

「選択的吸着」という用語は、1つ以上の他の種の吸着を防止しながら、少なくとも1つの種の吸着を可能にする条件を指す。本件の場合、操作条件はssRNAが結合することを可能にしながら、汚染物質の結合を防止するように調節され得る。

【0056】

用語「脱着」は、予め吸着された化学的に相補的な表面から生物学的生成物を放出するプロセスを指す。本発明の方法では、ssRNAの脱着が高い操作温度における塩の存在を必要とする。

【0057】

「選択的脱着」という用語は、1つ又は複数の吸着された種が、1つ又は複数の他の種を依然として吸着させたままにする条件の変化によって、固相表面から放出される状況を指す。次いで、固相表面から異なるサブセットの種を放出するために、さらに異なる条件のセットを適用することができる。あるこのような場合において、ssRNAが結合したままとしながら汚染物質の大部分はアニオン交換体から除去され得る。汚染物質は、選択的に脱着されたと言われる。ssRNAは、後続の塩を用いる溶出工程において、高い操作温度で選択的に脱着される。

【0058】

用語「洗浄された」は慣例的に、装置内の細孔又はチャネルから未結合種を退かす目的で、装填されたカラムを清浄な緩衝液に曝露するプロセスをいう。本文脈において、用語「濯がれた」は、同じ意味を有する。最も基本的な場合、洗浄緩衝液は平衡緩衝液と同じ組成を有する。洗浄緩衝液の慣例的な使用は、時には、試料をロードするために使用されるよりは高いが固相から所望の生成物を溶出するために必要とされるよりは低い濃度の塩を用いた洗浄工程を使用する。

【0059】

本発明の方法の文脈において、用語「溶出前高濃度塩洗浄」又は「高濃度塩洗浄」は、慣例的な塩洗浄工程によっては放出されない汚染物質を固相から化学的に放出するという、基本的に異なる役割を果たす。これは、塩がssRNAを溶出させることができない周囲温度で高濃度塩洗浄を適用することによって可能になる。

【0060】

用語「低濃度塩洗浄」又は「無塩」洗浄は、温度が上昇している間にssRNAが結合したままであるように、溶出前高濃度塩洗浄の後、操作温度を上昇させる前に塩を除去するために行われる洗浄を指す。低濃度塩洗浄において含まれる塩は、選択された高い操作温度でssRNAを溶出するのに必要な塩よりも少ないと理解される。

【0061】

用語「溶出」は、クロマトグラフィーの分野に関連する用語「脱着」の特別な場合を表す。本件の場合、それは、ssRNAが回収できるように固相とssRNAとの間の相互作用を破壊するため、アニオン交換体が存在する化学的環境を変化させるプロセスを指す。

【0062】

溶出は、各工程がアニオン交換体とssRNAとの間の相互作用をより大きな程度まで破壊する、一工程又は一連の工程で行われ得る。また、条件の変更は、漸進的、連続的、又は直線的に行われうる。動作条件の変化は、ステップ形式であろうと線形形式であろうと、一般に勾配、特に溶出勾配と呼ばれる。ステップ勾配はしばしば、より便利であると考えられるが、線形勾配は典型的には再現性をより良好とすることを助ける。

【0063】

用語「カオトロピック塩」はその構成イオンの少なくとも1つが、リオトロピックイオン及びカオトロピックイオンのホフマイスターシリーズにおいて高いカオトロピック順位を有する塩種を指す。リオトロピックイオンは、ホフマイスターシリーズの一端に存在する。カオトロピックイオンは、シリーズの反対側の端部に存在する。カオトロピックイオンはしばしば、生体分子によって優先的に結合されると記載される。カオトロピック塩は

10

20

30

40

50

生体分子内及び生体分子間の非共有相互作用を緩和し、時には、共有結合していない多成分からなる物質の混合体 (multicomponent noncovalent mixtures) 中のそれぞれの要素間の構造全体を不安定化し、相互作用を解離させる効果を有する。それらは、通常、溶解度を増加させる効果を有し、沈殿をほとんど又は全く引き起こさない。カオトロピック塩の例には、とりわけ、グアニジニウム塩、チオシアネート、及び過塩素酸塩が含まれる。場合によっては、グアニジンチオシアネートの場合のように、特定の塩のアニオン及びカチオンの両方が強くカオトロピックである。このような塩は、カオトロピックアニオン又はカオトロピックカチオンのみを含む塩よりもカオトロピックポテンシャルが高い。リオトロピックイオンは、ホフマイスターシリーズの反対側の端部に存在する。それらは、しばしば、生体分子によって優先的に排除されると記載される。リオトロピックイオンは生体分子を安定化させる効果を有し、混合物の個々の要素間の非特異的会合に有利に働く。強いリオトロピックイオンは、通常、大きな生体分子の溶解度を低下させ、しばしば沈殿を引き起こす。リオトロピック塩の例としては、とりわけ、硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、及びクエン酸ナトリウムが挙げられる。ホフマイスターシリーズの中間体である塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、及び酢酸カリウムなどのいわゆる中性塩が挙げられる。タンパク質に対するそれらの影響は、主にクーロン (静電) 力によって媒介される。タンパク質の溶解性及び安定性に対するそれらの効果は穏やかである傾向があるが、mRNA の溶解性を実質的に低下させて高塩濃度で沈殿させる。

10

【0064】

20

用語「多価金属カチオン」は、イオンの正味電荷が2以上である金属の正に荷電したイオン形態を指す。多価金属カチオンとしては、類似又は異なる原子価を有するものの中でもとりわけ、いずれも2+の正味電荷を有するものであるカルシウム、マグネシウム、及び亜鉛、並びに3+の正味電荷を有する鉄が挙げられる。これらのイオンは全て、それらが配位結合を介して結合する核酸に対して親和性を有する。配位結合はイオン結合よりも15~60倍強く、これは多価金属カチオンの核酸又は他の生体分子への結合が塩の飽和濃度でさえも持続することを手段する。多価金属カチオンは、dsRNA配列の形成を促進するか、又は既存のdsRNA配列を安定化し得るので、RNAの精製において問題となり得る。それらはまた複数のRNA分子間、RNA分子とDNA分子の間、及びRNAとDNAと汚染物質であるタンパク質との間の、複合体 (会合体) の形成を促進するか、又は既存の複合体を安定化しうる。

30

【0065】

本発明の方法の文脈において、「キレート剤」という用語は、mRNAを含む核酸を含む生体分子との以前の会合からかかる金属イオンを競合的に除去することができる、多価金属カチオンと前述のような強力な配位結合を形成する能力を有する分子を指す。キレート化剤の例としては、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、又はエチレングリコールビス (2-アミノエチルエーテル) -N, N, N', N'-四酢酸 (EGTA)、トリス (2-アミノエチル) アミン (TREN)、リン酸、及びクエン酸が挙げられる。

【0066】

用語「複合体 (complexes)」又は「会合体 (associations)」又は「ヘテロ凝集体 (heteroaggregates)」は、複数の種の生体分子がそれらの様々な表面化学的特徴による非特異的化学的相互作用を介して分子間で凝集したものを指す。複合体の安定性を促進及び維持する非特異的化学相互作用としては、静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用、及び配位結合が挙げられる。これらの相互作用により、RNAはDNA及びタンパク質と安定な複合体を形成しうる。このような複合体はしばしば、所望の生成物に類似した特性を有する。従って、それらは、独立した汚染物質の性質がその可能性を排除すべきであるにもかかわらず、純粋なssRNA溶出画分であるべきものに汚染物質を密かに持ち込む、トロイの木馬となる。

40

【0067】

多価金属カチオンによる抽出の効果を考えると、核酸-タンパク質複合体の効果的な解

50

離は、高濃度のグアニジニウム塩のようなカオトロピック塩により、及びより少ない程度で、高濃度のNaClのような非カオトロピック塩により、達成することができる。リオトロピック塩は、逆の影響を与える可能性がある。

【0068】

高濃度塩洗浄は、これらの複合体を構成する汚染物質がより容易に除去されるように該複合体を解離させる可能性を提供する。カオトロピック塩の複合体解離性は、中性塩よりも大きく、リオトロピック塩よりもはるかに大きい。キレート剤の存在は、複合体の個々の構成成分間の多価金属カチオン結合を排除することによって、複合体を解離するのをさらに助ける。

【0069】

用語「ヌクレアーゼ」又は「ヌクレアーゼ酵素」は、核酸鎖を理想的には個々のヌクレオチド、ダブレット、又はトリプレットに切断する能力を有するタンパク質を指す。2つの主要なクラスとして、DNAを溶解するDNase酵素と、RNAを溶解するRNase酵素とがある。RNaseは、ssRNA製品を破壊するので、厳密に回避されるべきである。DNaseはしばしば、mRNAを産生するために使用されるDNAプラスミド鑄型を破壊することによって精製を単純化するために使用される。DNase酵素はしばしば、適切に機能するために多価金属カチオン補因子の使用を必要とする。多価金属カチオンは、上記のようにRNA精製を妨害し得る。

【0070】

「プロテアーゼ」又は「プロテイナーゼ」又は「タンパク質分解酵素」という用語は、他のタンパク質を小さな断片に切断する能力を有するタンパク質を指す。これは、タンパク質による汚染が負担となりうるクロマトグラフィー工程の前に、かかる汚染を減少させる方法として使用されることがある。トリプシンなどの多くのプロテアーゼは、適切に機能するために多価金属カチオン補因子を必要とする。多価金属カチオンは、上記のようにRNA精製を妨害し得る。この目的のために一般に使用されるプロテアーゼには、多価金属カチオン補因子の非存在下でも良好な結果を提供するプロテイナーゼKが含まれる。

【0071】

以下の基本的な方法オプションについての一連の一般的な非限定的な説明は、前記方法がどのように実行され得るかのバリエーションを示し、動作変数についてより詳細に議論するための土台を提供する。これらのシナリオの各々において言及される緩衝液条件は、この方法がどのように実施され得るかの一般的な概念を提供することを意図するものであって、所定の試料に最良に適用するには、典型的には緩衝液の組成の最適化が必要とされるであろうことが理解される。このことは、各ssRNAが異なるサイズであり得るので、本技術分野の経験者の間で理解される。ssRNAの濃度にも変動があり得る。また、試料中に存在する汚染物質の同一性及び割合にも当然に差異があろう。

【0072】

ある実施形態では、QAモノリスなどのクロマトグラフィー装置の形態である強アニオン交換体を、周囲温度で、トリス20mM、塩化ナトリウム100mM、pH7.5±0.5などの中性に近いpH値に平衡化する。インビトロ転写混合物を、同様のpH、塩、及び温度で平衡化する。必要であればそれを濾過して固体を除去し、次いでアニオン交換体に適用する。次いで、アニオン交換体を、トリス20mM、グアニジン-HCl 3M、EDTA20mM、pH7.5±0.5で洗浄する。高濃度塩キレート洗浄に続いて、元の平衡化緩衝液による洗浄を行い、過剰の塩及びキレート剤を除去する。操作温度を65℃に再設定し、そしてアニオン交換体を、平衡緩衝液から開始し、トリス20mM、塩化ナトリウム1.5M（pH7.5±0.5）の終点緩衝液に徐々に移行する、装置容積の50倍量の線形塩勾配で溶出する。その後、アニオン交換体は、水酸化ナトリウム1Mを含有する緩衝液を適用することによって洗浄及び消毒され得る。

【0073】

異なる実施形態では、DEAEモノリスなどのクロマトグラフィー装置の形態であるの弱アニオン交換体を、トリス20mM、グアニジン-HCl 3M、EDTA20mM、

10

20

30

40

50

pH 7.5 ± 0.5 で周囲温度で平衡化する。インビトロ転写混合物に、グアニジンを最終濃度 3 M まで添加する。インビトロ転写混合物に、EDTA を 20 mM の最終濃度まで添加する。任意でインビトロ転写混合物の pH を pH 7.5 ± 0.5 に調整し、必要であれば濾過して固体を除去する。試料をアニオン交換体に適用し、次いで UV 吸光度がベースラインに達するまで平衡緩衝液で洗浄する。アニオン交換体をトリス 20 mM、塩化ナトリウム 100 mM で洗浄して、グアニジン及び EDTA を除去する。操作温度を 65 °C に再設定し、そしてアニオン交換体を、平衡緩衝液から開始し、トリス 20 mM、塩化ナトリウム 1.5 M (pH 7.5 ± 0.5) の終点緩衝液に徐々に移行する、装置容積の 50 倍量の線形塩勾配で溶出する。その後、アニオン交換体は、水酸化ナトリウム 1 M を含有する緩衝液を適用することによって洗浄及び消毒され得る。

10

【0074】

上述の2つの実施形態は両方とも同じ重要な原理を使用する、互いのバリエーションを表すこと、特に、汚染物質の大部分のアニオン交換体による結合は高濃度塩洗浄によって解かれることが、本技術分野の経験者には認識されよう。

【0075】

密接に関連する実施形態では、アニオン交換体は弱アニオン交換体である。そのようなある実施形態では、弱アニオン交換体は、第三級アミンアニオン交換体、第二級アミンアニオン交換体、第一級アミンアニオン交換体、又は第一級アミノ基と第二級アミノ基の混合物、又は第一級アミノ基と第二級アミノ基と第三級アミノ基の混合物を含有する弱アニオン交換体からなる群の1つである。

20

【0076】

別の密接に関連する実施形態において、試料は、mRNA を沈殿させるために塩で処理されたインビトロ転写混合物であり、mRNA は、mRNA が可溶である緩衝液によって別のものによって再懸濁されている。別の密接に関連する実施形態において、試料は、mRNA を沈殿させるために有機溶媒で処理されたインビトロ転写混合物であり、mRNA は、mRNA が可溶である緩衝液によって別のものによって再懸濁されている。別の密接に関連する実施形態では、試料は、mRNA を転写するための DNA プラスミド鋳型を断片化するために DNase 酵素で処理されたインビトロ転写混合物である。別の密接に関連する実施形態において、試料は、タンパク質を断片化するためにプロテアーゼ酵素で処理されたインビトロ転写混合物である。別の密接に関連する実施形態において、試料は、DNAase 酵素、次いでプロテアーゼ酵素で処理されたインビトロ転写混合物である。別の密接に関連する実施形態において、試料は、前の精製工程からのクロマトグラフィー画分である。

30

【0077】

別の密接に関連する実施形態では、操作 pH は pH 7.0 ± 0.5 である。類似の密接に関連する実施形態では、操作 pH は pH 6.5 ± 0.5 である。類似の密接に関連する実施形態では、操作 pH は pH 8.0 ± 0.5 である。

【0078】

別の密接に関連する実施形態では、平衡化緩衝液中で使用される塩は塩化カリウム、又は酢酸ナトリウム、又は酢酸カリウムであり得る。1つのこのような実施形態において、平衡化緩衝液の塩濃度は、0 mM ~ 500 mM、又は 10 mM ~ 250 mM、又は 50 mM ~ 100 mM の範囲にある値であり得る。

40

【0079】

別の密接に関連する実施形態において、高濃度塩洗浄緩衝液の塩種は、グアニジンチオシアネート、又はチオシアン酸ナトリウム、又はチオシアン酸カリウム、又は過塩素酸カリウム、又は過塩素酸ナトリウム、又は塩化ナトリウム、又は塩化カリウムである。そのようなある実施形態では、高濃度塩洗浄緩衝液の塩濃度は、上昇した温度で ssRNA を 0.5 M ~ 10.0 M、又は 1.0 M ~ 8.0 M、又は 2.0 M ~ 6.0 M、又は 3.0 M ~ 4.0 M で溶出するのに必要な塩の量よりも高い。いくつかの塩は極めて高い濃度では溶解せず、したがって、それらの濃度限界はそれらが飽和する濃度よりも低くなければ

50

ならないことは認識されるであろう。また、最も高い塩濃度では汚染物質をより効率的に除去することができるが、性能の改善はある点を過ぎると軽微であり得ることも認識されるであろう。このような場合、使用者によって判断される、汚染物質の適切なクリアランスを達成する最低レベルまで、濃度を低下させることが適切である。多くの実施形態において、塩洗浄の好ましい濃度は、3.0 M～4.0 Mの範囲である。さらに、ほとんどの場合、カオトロピック塩は、より望ましい結果を生じることが認識されるであろう。

【0080】

別の密接に関連する実施形態において、高濃度塩洗浄緩衝液中のEDTAの濃度は、5 mM～飽和濃度、又は10 mM～1000 mM、又は20 mM～500 mM、又は50 mM～100 mMの範囲内の値である。別の密接に関連する実施形態において、キレート剤は、EGTA又はTRENである。リン酸及びクエン酸のようなキレート剤も使用され得るが、ホフマイスターシリーズにおける強力なリオトロピックアニオンとしてのそれらの立ち位置は、それらの提供し得る結果が劣ったものでありうることを示唆する。ある実施形態では、キレート剤が高濃度塩洗浄には存在しない。ある実施形態では、キレート剤は高濃度塩洗浄を行うために使用される塩である。ある実施形態では、キレート剤がプロセスのすべてのステップで使用される。ある実施形態では、キレート剤がプロセスのいくつかのステップでのみ使用される。ある実施形態では、異なるプロセス工程において同じキレート剤が異なる濃度で使用される。ある実施形態では、異なるプロセス工程において異なるキレート剤又はキレート剤の混合物が使用される。

【0081】

別の密接に関連する実施形態において、上昇させた操作温度でssRNAを溶出するために使用される塩の種は、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、又は酢酸カリウム、又はリジンの塩、又はヒスチジンの塩、又は塩アルギニン、又はグアニジンの塩、又はチオシアン酸塩、又は過塩素酸塩、又は複数種の塩の組み合わせであり得る。いくつかのそのような実施形態では、ssRNAが溶出する塩濃度を低下させる目的で、ソルビトール、キシリトール、マンニトール、トレハロース、スクロース、又は別の糖、又は複数種の糖の組合せなどの、強力な水素供与能を有する非イオン性添加剤を含めることができる。いくつかのこのような実施形態において、糖の濃度は、1%～20%の範囲であり得る。他のこのような実施形態において、尿素は糖と同じ意図で使用され得、ここで、尿素の濃度は1 M～10 Mの範囲である。

【0082】

本発明の特別な利点は、ssRNA調製物からDNAプラスミドを除去するその能力によって、インビトロ転写混合物又は部分的に精製されたインビトロ転写混合物のヌクレアーゼ消化を実施することが不必要になることである。このことは、ヌクレアーゼ消化が酵素を活性にするためにマグネシウムイオンの添加を必要とすることから、不釣り合いに高い価値を有する。それらのマグネシウムイオンは潜在的に、所望のssRNAと、それ自体及び他の試料成分との架橋に寄与し、実際の結果として、所望のssRNA製品の収率を低減し得る。ヌクレアーゼ消化を不要にすることにより、マグネシウムイオンの添加も不要となり、ssRNAの収率が損なわれない。

【0083】

ある実施形態では、本発明の方法はオリゴdT (OdT) リガンドを使用するアフィニティークロマトグラフィーの方法と組み合わせることができる。前記2つの方法は、所望の任意の順序で組み合わせることができる。

【0084】

ある実施形態では、本発明の方法は疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) の方法と組み合わせることができる。前記2つの方法は、所望の任意の順序で組み合わせることができる。そのようなある実施形態では、HIC固相上の疎水性リガンドがフェニル基からなり得る。別のそのような実施形態では、HIC固相上の疎水性リガンドがブチル基からなり得る。別のそのような実施形態では、HIC固相上の疎水性リガンドがヘキシル基からなり得る。他のそのような実施形態では、HIC固相上の疎水性リガンドが異なる

脂肪族基及び芳香族基、又は脂肪族の特性と芳香族の特性との両方を具現化する基からなり得る。

【0085】

ある実施形態では、本発明の方法は逆相クロマトグラフィー（RPC）の方法と組み合わせることができる。前記2つの方法は、所望の任意の順序で組み合わせることができる。そのようなある実施形態では、固相表面の疎水性は、固相の合成に使用されるスチレンジビニルベンゼン（SDVB）ポリマーの本来の疎水性によって付与され得る。別のそのような実施形態では、固相表面の疎水性は、固相の表面に付着したリガンドの疎水性によって付与され得、ここで該リガンドは脂肪族炭化水素、又は芳香族炭化水素、又は脂肪族-芳香族の特性を混合して備えるリガンド（a ligand of mixed aliphatic-aromatic character）である。

10

【0086】

ある実施形態では、本発明の方法はヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーの方法と組み合わせることができる。前記2つの方法は、所望の任意の順序で組み合わせることができる。

【0087】

ある実施形態では、本発明の方法はOdTリガンドを使用するアフィニティークロマトグラフィー及びRPCと組み合わせることができる。前記3つの方法は、所望の任意の順序で実施することができる。関連する実施形態では、本発明の方法は任意の他の2つの方法、又はそれ以上と組み合わせることができる。

20

【0088】

本明細書に引用される全ての参考文献は、本明細書中の明示的な教示と矛盾しない範囲で、参照により組み込まれる。

【実施例】

【0089】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに説明される。

【0090】

実施例1．高濃度塩洗浄の手段による、強アニオン交換体に結合したDNAの除去

強（四級アミノ）アニオン交換モノリスを、トリス50mM、pH 7.5で20℃で平衡化した。mRNAのインビトロ転写のための鑄型として使用されるようなプラスミドDNA（5000bp）からなる試料を20℃で注入した。モノリスを平衡化緩衝液で20℃で洗浄し、次いで同温度でトリス50mM、EDTA20mM、グアニジン-HCl 3.0M、pH 7.5を含有する高濃度塩洗浄を行った。トリス50mM、pH 7.5を含有する低濃度塩洗浄液を20℃で適用して、グアニジン及びEDTAを洗い流した。操作温度を65℃に上昇させ、アニオン交換体をトリス20mM、塩化ナトリウム2.0M、pH 7.5までの直線勾配で溶出に供した。イオン交換体を水酸化ナトリウム1.0M、塩化ナトリウム2.0Mで洗浄した。アニオン交換体に適用されたDNAは、注入時に結合し、平衡化緩衝液を用いた洗浄の間は結合したままであり、高濃度塩洗浄において溶出した。別の実験において、任意の試料の注入を省略することを除き前記条件を繰り返すことによって、基準緩衝液ベースラインを作製した。カラム平衡化、試料注入、平衡緩衝液での洗浄、及び高濃度塩洗浄の主要画分（leading portion）を表すクロマトグラムの部分は図1に示され、ここでDNAは薄い灰色影領域によって示される。

30

40

【0091】

実施例2．高濃度塩洗浄液の手段による、DNA、タンパク質、mRNAを含むインビトロ転写液からの汚染物質の除去

実施例1に記載したDNA試料に代えてインビトロ転写混合物に置き換えたことを除いて、実施例1の条件を繰り返した。結合しなかった汚染物質は、注入直後にアニオン交換体を通過した。結合した汚染物質を高濃度塩洗浄によってカラムから解離させ、それらを溶離させた。カラム平衡化、試料注入、平衡緩衝液での洗浄、及び高濃度塩水洗浄の主要画分を表すクロマトグラムの部分を図1に示す。高濃度塩水洗浄によって除去された汚染

50

物質は、暗灰色影領域によって示される。図に示すように、洗浄によって除去された汚染物質の量は、実施例 1 で除去された DNA の量よりも多い。これは、DNA、dsRNA、及びタンパク質を含むインビトロ転写混合物の汚染物質含量がより高いことの指標である。

【0092】

実施例 3．高濃度塩洗浄の間における、強アニオン交換体への ssRNA 結合の持続性
200b～6000b の範囲のサイズの ssRNA を含有する ssRNA ラダーを含有する試料に置き換えたことを除いて、実施例 1 及び 2 の条件を繰り返した。注射時に結合した ssRNA は平衡化緩衝液での洗浄の間結合したままであり、高濃度塩洗浄の間も結合したままであった。カラム平衡化、試料注入、平衡化緩衝液での洗浄、及び高濃度塩洗浄の主要画分を表すクロマトグラムの部分を図 1 に示すが、UV プロファイルは汚染物質の除去が影付きピークで明らかであった実施例 1 及び 2 とは対照的に、ベースラインのプロファイルと厳密に平行であることに留意されたい。続いて、ssRNA は 65℃ の塩勾配で溶出された。

【0093】

参考文献

[1] A Romanovskaya, LP Sarin, DH Bramford, MM Poranen, High-throughput purification of double-stranded R.N.A. molecules using convective interaction media monolithic anion exchange columns, J. Chromatography A, 1278 (2013) 54-60.

[2] WO2014/144767A1

【0094】

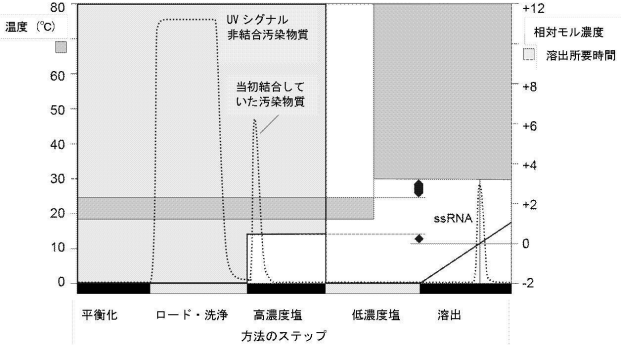
本明細書における明示的教示と不整合がない限りにおいて、本明細書で引用された文献は全て、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【図面】

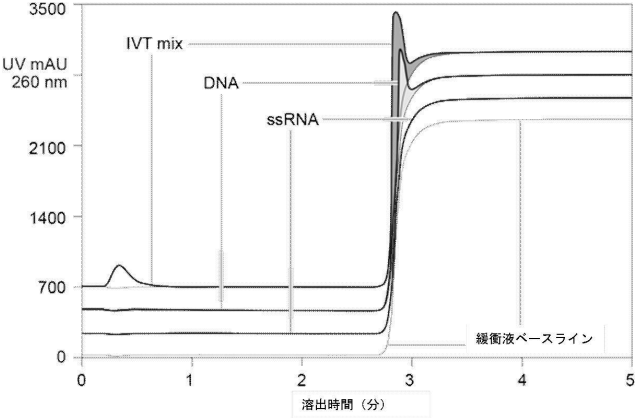
【図 1】

方法のステップ	温度	塩濃度
試料の平衡化	周囲温度	任意
カラムの平衡化	周囲温度	任意
試料のロード・洗浄	周囲温度	任意
高濃度塩洗浄	周囲温度	溶出より 0.5M 超高
低濃度塩洗浄／無塩洗浄	周囲温度	< 0.5 M
低濃度塩洗浄／無塩洗浄	上昇温度	< 0.5 M
溶出	上昇温度	所要濃度

【図 2】



【図 3】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/059911

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.
A	WO 2014/144767 A1 (MODERNA THERAPEUTICS INC [US]) 18 September 2014 (2014-09-18) cited in the application claims 1-86; figure 1	1-9
A	----- ALESIA ROMANOVSKAYA ET AL: "High-throughput purification of double-stranded RNA molecules using convective interaction media monolithic anion exchange columns", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 1278, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 54-60, XP055735680, AMSTERDAM, NL ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.050 cited in the application the whole document ----- -/--	1-9
☒ 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		Date of mailing of the international search report
7 July 2021		27/07/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Westphal-Daniel, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/059911

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/096179 A1 (CUREVAC AG [DE]) 31 May 2018 (2018-05-31) examples 1-3 -----	1-9
A	WO 2009/100172 A1 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES [US]; TAKKELLAPATI SUDHAKAR RAO [US] ET AL.) 13 August 2009 (2009-08-13) example 1 -----	1-9
A	MARKUS BAIERSDÖRFER ET AL: "A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA", MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS, vol. 15, 1 April 2019 (2019-04-01), pages 26-35, XP055660222, US ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1016/j.omtn.2019.02.018 the whole document -----	1-9
A	WO 2017/182524 A1 (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH [DE]) 26 October 2017 (2017-10-26) claims 1-45; examples 1-11 -----	1-9
A	US 2005/019814 A1 (LAUGHARN JAMES A [US] ET AL) 27 January 2005 (2005-01-27) examples 1-20 -----	1-9
A	CN 103 993 002 A (BIOMICS BIOTECHNOLOGIES CO LTD) 20 August 2014 (2014-08-20) abstract -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/059911

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014144767 A1	18-09-2014	EP 2983804 A1 US 2016024141 A1 WO 2014144767 A1	17-02-2016 28-01-2016 18-09-2014
WO 2018096179 A1	31-05-2018	US 2020318097 A1 WO 2018096179 A1	08-10-2020 31-05-2018
WO 2009100172 A1	13-08-2009	EP 2250182 A1 US 2010292446 A1 WO 2009100172 A1	17-11-2010 18-11-2010 13-08-2009
WO 2017182524 A1	26-10-2017	AU 2017251983 A1 BR 112018069417 A2 CA 3020481 A1 CN 109072232 A EP 3445850 A1 JP 2019517782 A KR 20180135451 A RU 2018136601 A SG 10202010471U A SG 11201807573V A US 2019153425 A1 WO 2017182524 A1 ZA 201805949 B	27-09-2018 22-01-2019 26-10-2017 21-12-2018 27-02-2019 27-06-2019 20-12-2018 22-05-2020 27-11-2020 30-10-2018 23-05-2019 26-10-2017 18-12-2019
US 2005019814 A1	27-01-2005	NONE	
CN 103993002 A	20-08-2014	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,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