(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115768888 A
(43)申请公布日 2023.03.07

(21)申请号 202180029140.X
(22)申请日 2021.04.16
(30)优先权数据
20170205.7 2020.04.17 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/059903 2021.04.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/209595 EN 2021.10.21
(71)申请人 赛多利斯比亚分离有限责任公司
地址 斯洛文尼亚阿吉多夫西纳
(72)发明人 S•佩尔西奇 U•塞尼戈吉
D•多伦茨 P•S•加农
(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 徐迅 崔佳佳
(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)

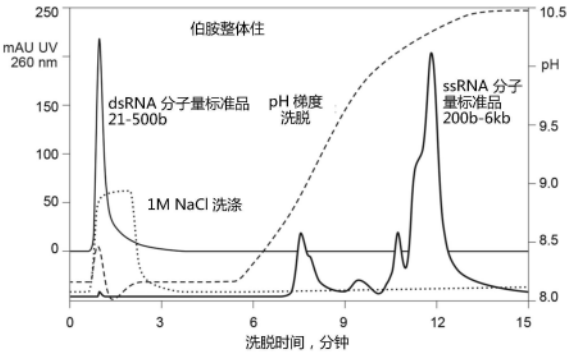
权利要求书1页 说明书22页 附图5页

(54)发明名称

单链RNA的纯化方法

(57)摘要

一种单链RNA纯化方法，包括步骤：-在足以结合至少大部分单链RNA的pH值下，将含有单链RNA的样品施加到固相上，所述固相表面主要含有或仅含有伯氨基，-将所述固相表面暴露于升高的pH值，从而从固相表面洗脱单链RNA。



CN 115768888 A

1.一种单链RNA纯化方法,其特征在于,包括步骤:

-在足以结合至少大部分单链RNA的pH值下,将含有单链RNA的样品施加到固相上,所述固相表面主要含有或仅含有伯氨基,

-将所述固相表面暴露于升高的pH值,从而从固相表面洗脱单链RNA。

2.如权利要求1所述的方法,其特征在于,在施加样品之后和在洗脱单链RNA之前,至少进行一个使用洗涤缓冲液洗涤固相的步骤,与洗脱单链RNA所用的洗脱缓冲液相比,所述洗涤缓冲液具有较高的离子强度。

3.如权利要求2所述的方法,其特征在于,至少进行一个洗涤步骤以降低较高的离子强度。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,在施加样品之后和在洗脱单链RNA之前,至少进行一个使用洗涤缓冲液洗涤的步骤,所述洗涤缓冲液具有升高的pH,其保持单链RNA吸附在固相上并解吸附其余的双链RNA。

5.如权利要求2-4中任一项所述的方法,其特征在于,与洗脱单链RNA所需盐的摩尔浓度相比,所述洗涤缓冲液的离子强度高出0.5M至12M、或1.0M至10M、或2.0M至8.0M、或4.0M至6.0M。

6.如权利要求2-5中任一项所述的方法,其特征在于,所述洗涤缓冲液的离子强度用离液盐的浓度进行调节,特别是选自下组的离液盐:胍盐、硫氰酸盐、高氯酸盐及其组合。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其特征在于,通过使用pH在pH7.5至pH12.0、或pH8.0至pH11.5、或pH8.5至pH11、或pH9.0至pH10.5范围内的洗脱缓冲液从固相表面洗脱单链RNA。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其特征在于,在低于约pH8.5的pH值下将所述样品施加到所述固相中。

9.如权利要求1-8中任一项所述的方法,其特征在于,螯合剂存在于基本为水性的混合物中、在接触水性混合物之前的固相表面环境中、用于从固相表面洗脱单链RNA的缓冲液中和/或将样品施用于固相和/或从固相表面洗脱单链RNA的步骤之间所用的单独缓冲液中。

10.如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述的螯合剂独立地选自下组:乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸盐、磷酸、或乙二醇-双(2-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、或三(2-氨基乙基)胺(TREN)、或其混合物。

11.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其特征在于,所述单链RNA的大小在1000碱基至25000碱基范围内。

12.表面上主要含有或仅含有伯氨基的固相用于纯化单链RNA的用途。

13.如权利要求12所述的用途,其特征在于,通过升高pH的方法从双链RNA中纯化单链RNA。

单链RNA的纯化方法

[0001] 本发明涉及一种从基本为水性的双链RNA和单链RNA的混合物中除去双链RNA的方法。

背景技术

[0002] 在基因治疗领域应用的信使RNA(mRNA)制剂的合成中,除了所需要的单链(ss)RNA外,产生了还含有不需要的双链(ds)RNA亚群的制品。这些dsRNA物质通过碱基链内互补序列的链内相互作用发生后合成。dsRNA序列的形成也可以通过相邻ssRNA分子之间的互补序列配对而发生,从而产生非特异性链间二聚体和高阶多聚体,其中也可能包含链内ds序列。双链RNA在施用到受试者体内时会触发不需要的和可能致命的免疫反应,这使得除去双链RNA成为纯化的一个特定目标。

[0003] 已知降低mRNA制剂中dsRNA含量的方法。通过在基于纤维素的色谱介质上进行亲和吸附色谱,可以降低dsRNA杂质水平[1-3]。吸附的确切机制尚未明确,但在一定条件下dsRNA结合而ssRNA流过。该方法在实验室规模上简单有效,但受限于容量非常低。在制造规模下,低容量对应于大体积色谱柱,需要大量缓冲液、大的制造区域和加工时间的延长,从而降低制造设施的生产率。该方法还导致处理后的ssRNA稀释,使得纯化步骤后的产物体积增加。

[0004] 也可以使用苯乙烯-二乙烯基苯(SDVB)固相,通过反相色谱法(RPC)来降低dsRNA的水平[4-7]。RPC使用有毒易燃有机溶剂,需要极其昂贵的工业规模专用设备来降低火灾和爆炸风险。由于其涉及工作环境中的有机溶剂毒性和危险废物处理问题,RPC还带来了进一步的安全问题负担。除了溶剂问题外,RPC分离通常还需要进一步提高温度以获得最佳结果。

[0005] 阴离子交换色谱法已证明可用于纯化小mRNA(<1000碱基)[8]。迄今为止评估过的阴离子交换介质包括所谓的强阴离子交换剂,即季胺(QA)阴离子交换剂。还评估了所谓的弱阴离子交换器,特别是使用叔胺配体的二乙氨基乙基(DEAE)阴离子交换器。

[0006] 阴离子交换色谱法在从大mRNA(1000-10000碱基)中去除DNA和蛋白质杂质方面的效用有限,仅在较高的工作温度下[9]。将温度升高到65℃可以在氯化钠梯度中洗脱大mRNA。然而,高温操作带来了复合后勤负担,因为在整个过程中,缓冲液、样品和色谱柱都必须预平衡到指定的工作温度,并精确保持在指定的工作温度,并且在可能持续数年的产品制造期内的所有批次中都可重复。

[0007] 众所周知,蛋白质可以通过降低的pH梯度从阴离子交换剂中洗脱,因为随着pH值的降低,蛋白质正电性上升而负电性下降,最终使其暂停与阴离子交换剂的结合。这种方法不会也不能用于RNA,因为其电荷特性在pH 2.6到pH 13.0之间维持一致。已知通过增加pH值从阴离子交换剂中洗脱生物分子是不起作用的,因为这会使它们结合得更牢固。通过增加的pH梯度可以从阳离子交换剂中洗脱蛋白质,但该方法对于从ssRNA中分离dsRNA无用,因为二者均不与阳离子交换剂结合。

[0008] 概要

[0009] 开发了一种用于从具有ssRNA的混合制剂中去除dsRNA的新方法，该方法是对已知方法的改进。其涉及所有大小的mRNA，但尤其涉及大的和非常大的mRNA(例如在1000-25000个碱基的大小范围内)。通过升高pH梯度的方式，该方法能够分离与伯氨基固相结合的ssRNA和dsRNA。ssRNA在比dsRNA更高的pH下洗脱。该方法还允许根据ssRNA的大小进行分馏。

[0010] 本发明请求保护一种单链RNA纯化方法，包括步骤：

[0011] -在足以结合至少大部分单链RNA的pH值下，将含有单链RNA的样品施加到固相上，所述固相表面上主要含有或仅含有伯氨基，

[0012] -将所述固相表面暴露于升高的pH值，从而自固相表面洗脱单链RNA。

[0013] 在本发明方法的一实施方式中，在施加样品之后和在洗脱单链RNA之前，可以至少进行一个使用洗涤缓冲液洗涤固相的步骤，与洗脱单链RNA所用的洗脱缓冲液相比，所述洗涤缓冲液具有较高的离子强度。

[0014] 在本发明方法的另一实施方式中，可以进行至少一个洗涤步骤以降低较高的离子强度。

[0015] 在本发明方法的另一实施方式中，在施加样品之后和在洗脱单链RNA之前，可以至少进行一个使用洗涤缓冲液洗涤的步骤，所述洗涤缓冲液具有升高的pH，其保持单链RNA吸附在固相上并解吸其余的双链RNA。

[0016] 所述洗涤步骤可以由将样品施加到固相之后的两个后续洗涤步骤组合而成。

[0017] 在本发明方法的另一实施方式中，与洗脱单链RNA所需缓冲液的离子强度相比，所述洗涤缓冲液的离子强度高出0.5M至12M、或1.0M至10M、或2.0M至8.0M、或4.0M至6.0M。如果使用NaCl，则离子强度对应于溶液的摩尔浓度。

[0018] 例如，当洗脱ssRNA的离子强度小于2.0M时，对应的洗涤缓冲液的离子强度可以为2.5M。在另一实施例中，当洗脱ssRNA的离子强度为0.5M时，洗涤缓冲液的离子强度可以为1.0M。

[0019] 通常，洗涤缓冲液的摩尔浓度在0.51M至12.0M的范围内，而洗脱ssRNA的摩尔浓度在0.01M至0.5M的范围内。

[0020] 在本发明方法的另一种实施方式中，所述洗涤缓冲液的离子强度可以用离液盐的浓度进行调节，特别是选自下组的离液盐：胍盐、硫氰酸盐、高氯酸盐及其组合。

[0021] 在本发明方法的另一种实施方式中，可以通过使用pH在pH 7.5至pH 12.0、或pH 8.0至pH 11.5、或pH 8.5至pH 11、或pH 9.0至pH 10.5范围内的洗脱缓冲液从固相表面洗脱单链RNA。

[0022] 在本发明方法的另一种实施方式中，可以在低于约pH 8.5的pH值下将所述样品施加到所述固相中。

[0023] 在本发明方法的另一种实施方式中，螯合剂可以存在于基本上为水性的混合物中、在接触水性混合物之前的固相表面环境中、用于从固相表面洗脱单链RNA的缓冲液中和/或将样品施用于固相和/或从固相表面洗脱单链RNA的步骤之间所用的单独缓冲液中。

[0024] 在本发明方法的另一种实施方式中，所述的螯合剂可以独立地选自下组：乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸盐、磷酸、或乙二醇-双(2-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、或三(2-氨基乙基)胺(TREN)、或其混合物。

[0025] 典型地,所述单链RNA的大小在1000碱基至25000碱基范围内。

[0026] 本发明的主题还包括在表面上主要含有或仅含有伯氨基的固相用于纯化单链RNA的用途。特别是可以通过增加pH值将单链RNA从双链RNA中纯化或分离。

[0027] 该方法的令人惊讶的性质突出表现在它在多个层次上存在现有技术的相反教导。已发表的技术表明,在环境温度下,用强(QA)和弱(DEAE)阴离子交换剂从大的双链RNA中分离大的ssRNA是不可能的。

[0028] 这凸显了本发明的第二个令人惊讶的特点,即通过增加pH值从任意阴离子交换剂中洗脱任意生物分子种类被认为是不可能的。这违反了几十年来业内已知的基本原则。其原理是,酸性溶质(净负电荷)与强阴离子交换剂的结合随着pH值的增加而更强。在用pH梯度洗脱阴离子交换剂的少有情况下,其仅用下降的pH梯度洗脱:与本发明的方法相反。

[0029] 本发明体现了本领域前所未有的第三个令人惊讶的特征。初步数据表明,通过pH梯度从伯氨基固相中洗脱ssRNA是按照ssRNA种类大小排序的,洗脱较大的ssRNA种类需要更高的pH值。值得注意的是,dsRNA种类之间的大小区分相对较弱。

[0030] 本发明还体现了本领域前所未有的第四个令人惊讶的特征。实验数据表明,dsRNA与伯氨基固相的相互作用方式与ssRNA在同一表面的作用方式不同。这是出乎意料的,因为在给定的体外转录混合物中,ssRNA和dsRNA在组分上是相同的,在同一序列中具有相同数量的核苷酸碱基。值得注意的是,多种盐能够在不洗脱所需ssRNA的前提下从伯氨基固相中置换出大多数dsRNA。更值得注意的是,即使极高浓度的已知侵蚀性离液盐也不能洗脱ssRNA。

[0031] 还没有理论能解释伯氨基固相随pH梯度升高而洗脱的矛盾反应;为什么它违背了基于传统阴离子交换剂的预期,它是如何从ssRNA中分离dsRNA的,或者它是如何实现ssRNA的大小分级的。

[0032] 除了在洗脱ssRNA之前简单地置换dsRNA外,高盐洗涤提供了一个独特的机会,可以解离ssRNA与蛋白质和DNA等杂质之间原本稳定的复合物。这为该领域刚开始认识到的一个重大挑战提供了一个解决方案。核酸经常与杂质以稳定的络合物形式存在。其中一些复合物与纯核酸在相同或几乎相同的条件下洗脱。因此,这些复合物是将杂质引入本应为纯ssRNA洗脱物中的特洛伊木马,即便单独杂质的性质应排除这种可能性。解离性高盐洗涤液提供了中止该污染途径的可能性。具有比中性盐(如NaCl)更强解离电位的离液盐(如胍)增强了这种方法的复合物解离电位。螯合剂的存在可以进一步提高复合物的解离电位。

[0033] 在高盐化学环境中的杂质dsRNA无法与伯氨基固相结合还使工作流程得以简化,可与本领域已知的亲和色谱技术相媲美。亲和色谱是一种将生物特异性配体(如抗体)共价固定在固相上的技术。当将含有该抗体靶标的含杂质样品施加到固相时,仅靶分子会被捕获,杂质则流过色谱柱而被消除。在洗涤色谱柱以冲洗掉痕量水平的非目的物质后,在单个高度纯化的部分中洗脱目标分子。在本申请中,含有dsRNA和ssRNA的样品在中性pH下加载到高盐中。大多数dsRNA流过固相。通过增加pH值,高纯度ssRNA在浓缩部分中洗脱。

[0034] 本领域的经验人士将认识到,该工作流程简化表示采用本发明基本配置中所用相同原理的微小程序变化,该原理是在高浓度盐存在时,dsRNA不与伯氨基固相结合。

[0035] 本发明的最后一个令人惊讶的特点是,组成不同于RNA洗脱物的杂质的洗脱反应类似于dsRNA,但不同于ssRNA。这些杂质包括蛋白质和DNA,它们在pH梯度下早于ssRNA被洗

脱。在通过升高的pH梯度将其痕量残留物从ssRNA中分离出来之前，它们中的大多数也已被施加到固相的盐去除。

[0036] 发明概述

[0037] 在总体方面，本发明是一种固相萃取方法，用于从含有dsRNA和单链信使RNA(ssRNA)混合物的制品中去除双链信使RNA(dsRNA)。其还涉及根据大小分离ssRNA种类的方法。

[0038] 在一具体方面，本发明涉及从ssRNA中分离dsRNA，和/或根据大小分离ssRNA种类，其中dsRNA和ssRNA通过非共价相互作用结合到伯氨基固相。

[0039] 在另一具体方面，本发明涉及通过升高的pH梯度从ssRNA中分离dsRNA，其中dsRNA在低于ssRNA的pH值下洗脱。较小的ssRNA种类相比较大的ssRNA种类在较低的pH值下洗脱。

[0040] 在更具体的方面，本发明涉及在pH 3.5至pH 11.5、或pH 4.5至pH 11.5、pH 5.5至pH 11.5、pH 6.5至pH 11.5、或pH 7.5至pH 11.5、或pH 8.5至pH 11.5、或pH 8.5至pH 11.0、或pH 8.5至pH 10.5、或pH 8.5至pH 10.0、或pH 8.5至pH 9.5、或pH 8.5至pH 9.0、或更高范围、或更低范围、或中间范围的pH梯度。pH范围是特定的，因为从特定ssRNA中分离dsRNA或分离不同大小的ssRNA种类所需的值将取决于其各自的大小。

[0041] 在一实施方式中，pH值可以在特定范围内连续增加，形成所谓的线性梯度。在相关实施方式中，pH值可在离散步骤中不连续地增加，形成所谓的阶梯梯度。在另一相关实施方式中，梯度可以由单个步骤组成。

[0042] 在另一个实施方式中，可以在盐存在的情况下通过增加pH值进行洗脱，以提高ssRNA的回收率。在一种这样的实施方式中，盐类可以是浓度范围为10mM至250mM、或20mM至200mM、或50mM至100mM的氯化钠。在另一个这样的实施方式中，盐类可以是浓度在类似范围内的氯化钾，或浓度在类似范围内的盐酸胍，或浓度在类似范围内的硫氰酸胍。在洗脱过程中加入盐也会导致ssRNA在较低的pH值下洗脱。

[0043] 在另一方面，本发明涉及一种方法，其中用螯合剂洗涤结合到伯氨基固相的ssRNA。

[0044] 在一个实施方式中，所述螯合剂可以是乙二胺四乙酸(EDTA)，其浓度为2mM至200mM、或5mM至100mM、或10mM至50mM、或20mM至25mM、或更低范围、或中间范围、或更高范围直至完全饱和。在密切相关的实施方式中，所述螯合剂可以是柠檬酸或磷酸的盐、或乙二醇-双(2-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、或三(2-氨基乙基)胺、或另一螯合剂、或与所述EDTA相同浓度范围的螯合剂的混合物。

[0045] 在本发明的一个实施方式中，使用螯合剂进行的处理可以包括以下任何一种：向样品中添加螯合剂、将样品缓冲液交换到无金属离子缓冲液中、将样品缓冲液交换到螯合缓冲液中、以及使用无金属离子或螯合缓冲液来执行该方法的步骤，包括在pH洗脱期间。

[0046] 在一个方面，本发明涉及dsRNA和ssRNA的分离，其中在通过增加pH值进行dsRNA和ssRNA的最终分离之前，先用盐洗涤伯氨基固相以去除dsRNA亚群。在所有这些实施方式中，洗涤期间的盐浓度大于洗脱期间存在的盐浓度。

[0047] 在一个实施方式中，在通过增加pH值的洗脱之前用来洗涤固相的盐可以是任意浓度的任意种类的盐，包括高达完全饱和的盐。在一个这样的实施方式中，所述盐是氯化钠，其饱和度约为5.0M，盐的浓度可以在10mM至5M、或50mM至5M、或100mM至5M、或500mM至5M、或

1M至5M、或2M至5M的范围内、或3M至5M、或4M至5M、或中间的范围，但优选在1M至5M的范围内。在一个密切相关的实施方式中，所述盐可以是氯化钾。这一点将被认识到，原因是RNA可能由高浓度的中性盐(如氯化钠或氯化钾)以及诸如氯化锂之类的其他盐沉淀。将进一步认识到，由于其可能会干扰通过固相色谱装置的缓冲液流，在样品施加期间或洗脱期间的RNA沉淀将是非常不希望的。严格来说，如果在样品加载后进行盐洗，并且在洗脱之前去除多余的盐，则其应当不会成为问题。然而，通常最好使用非RNA沉淀盐来完全避免该问题。

[0048] 在用非RNA沉淀盐代替RNA沉淀盐的一个实施方式中，所述盐为离液盐，例如盐酸胍，其在约6M时饱和，其浓度可以是10mM至6M、或50mM至6M、或100mM至6M、或500mM至6M、或1M至6M、或2M至6M、或3M至6M、或4M至6M、或5M至6M的范围内、或中间范围的值，但最好在3M到4M的范围内。在盐为离液盐，例如硫氰酸胍的一密切相关的实施方式中，其在约12M时饱和，浓度可以是10mM到12M、或50mM到12M、或100mM到12M、或500mM到12M、或1M到12M、或2M到12M、或3M到12M、或4M到12M、或5M到12M的值、或6M至12M、或7M至12M、或8M至12M、或9M至12M、或10M至12M、或11M至12M的范围内、或中间范围的值，但最好在1.5M至3.0M的范围内。从这两种盐的示例中可以明显看出，其他盐可以在高达但不超过饱和点的范围内类似地使用。

[0049] 在一个实施方式中，螯合剂可与盐结合使用。在本发明的各种实施方式中，用盐和/或螯合剂处理可包括以下任何一种:向样品中添加盐和螯合剂，将样品缓冲液交换成含盐和/或螯合剂的缓冲液，将样品缓冲液交换成含盐和/或螯合剂的缓冲液，以及使用含盐和/或螯合剂的缓冲液来执行该方法的步骤，包括洗脱ssRNA。在一些这样的实施方式中，盐、螯合剂的种类、及其各自的浓度在方法的每个步骤中可能不同。

[0050] 在一些实施方式中，可通过将样品平衡到高浓度的非RNA沉淀盐(例如硫氰酸胍)加螯合剂(例如EDTA)，来从ssRNA中分离dsRNA。可以将固相平衡到含有相同浓度的硫氰酸胍和EDTA的缓冲液中。在将样品施加到固相的过程中，大多数dsRNA无法与固相结合。在用相同浓度的硫氰酸胍和EDTA洗涤步骤结束时，dsRNA被降低到痕量水平。然后用不含硫氰酸胍和EDTA的缓冲液将其从系统中洗出。以逐渐增加的pH梯度将任意剩余的dsRNA从ssRNA中分离出来。

[0051] 在为某种目的分离大量纯化的ssRNA为目标的制备实施方式中，最常见的做法是在pH洗脱后不久中和ssRNA的pH值，以尽量减少其暴露于接近pH 9或以上的pH值。实验数据表明，如ssRNA仅在进行本发明方法所需的时间内暴露于碱性条件下，可保留其天然组分并无限期保持稳定。瞬时中和基本上可以通过将组分收集到中和溶液中来进行。快速中和也可以通过在收集组分后立即添加中和溶液来执行。也可以在收集组分后通过缓冲液交换方法(包括色谱法或渗滤)进行中和。所有这些方法在本领域中都是常用且众所周知的，例如在亲和色谱领域中样品的洗脱后pH中和是常规的。

[0052] 本发明的方法可以使用本领域惯用的任何装置来实施，例如，伯氨基固相可以安置在色谱装置中。通常，所述固相表面可以是整体柱、填充颗粒柱、填充纳米纤维柱、膜吸附器或水凝胶等色谱形式。

[0053] 该方法可用于分析或制备应用的目的。它适用于所有mRNA，但对大小在1000碱基到25000碱基之间的mRNA特别有价值。根据RNA的大小和所施加的样品中的杂质分布，特定的色谱条件可能会有所不同。调整特定条件以获得任何特定ssRNA种类的最佳分析或制备

结果所使用的相同实验技能是色谱技术从业者数十年来已知的。

[0054] 在本发明的方法的之前或之后，或之前和之后可以有一个或多个额外的处理方法，以将ssRNA纯化到比任何单个处理方法单独实现所更高的程度。

[0055] 附图简述

[0056] 图1显示了在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前使用氯化钠步骤消除dsRNA，从而在伯胺固相上将dsRNA从ssRNA中分离。

[0057] 图2显示了在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前使用6M胍步骤消除dsRNA，从而在伯胺固相上将dsRNA从ssRNA中分离。

[0058] 图3显示了在环境温度下，无法用pH梯度从强阴离子交换剂和弱阴离子交换剂中洗脱ssRNA。

[0059] 图4显示了在环境温度下，通过pH梯度在伯氨基固相上将质粒DNA从ssRNA中分离。

[0060] 图5显示了在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前使用盐步骤消除DNA，从而在伯胺固相上将DNA质粒从ssRNA中分离。

[0061] 图6显示了环境温度下将盐与pH梯度洗脱相结合对分离DNA和ssRNA的效果。

[0062] 图7显示了在环境温度下，通过pH梯度在伯氨基固相上将大DNA和超大dsRNA从小ssRNA中分离。

[0063] 图8显示了在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前联用螯合剂-离液步骤消除DNA，从而在伯氨基固相上将dsRNA从ssRNA中分离。

[0064] 图9显示了通过使用螯合盐在pH梯度中降低洗脱ssRNA的pH值。

[0065] 图10显示了在盐存在的情况下用pH梯度洗脱伯胺固相，监测不同时间点的体外转录反应。

[0066] 发明详述

[0067] 术语伯氨基固相是指适合进行色谱分析的固相，其表面主要含有或仅含有伯氨基配体。术语“伯氨基固相”或“含有伯氨基的固相”或“含有伯胺的固相”或“含伯氨基固相”或“含伯胺固相”或“伯胺固相”是同义的，可以互换。固相表面应不存在仲胺或少量存在仲胺，不应存在或仅应有一小部分叔胺和季胺，不应存在带负电的残留物，可能存在不带电的疏水残基或氢键残基。

[0068] 术语“伯氨基”描述了通过单个共价键分别连接到两个氢原子、并通过单个共价键连接到碳原子的氮原子。伯氨基可以通过其碳原子直接共价连接到固相。或者，伯氨基可以通过其碳原子共价连接到所谓的间隔臂(该间隔臂共价连接到固相)从而间接连接到固相。伯氨基也可以是共价连接到固相的聚合物结构的一部分，其中聚合物的重复亚单位包括伯氨基。

[0069] 所述固相可以是下列形式的固相：一个或多个多孔膜、一个或多个纤维、一个或多个多孔或非多孔颗粒、或整体柱固相，包括由单一聚合物混合物合成的整体柱、或是所谓的水凝胶，其表现为首先合成为宏观骨架的整体柱，并在其上合成带有次级配体的聚合物相。这些固相材料中的任何一种都可以设置在外壳中以促进色谱性能。外壳中的色谱固相一般指色谱装置，通常称为色谱柱。

[0070] 带有伯氨基的色谱固相是已知的并且可商购获得。一个实例是东草生命科学(Tosoh Biosciences)制造的名为Toyopearl NH2-750F的市售产品，其中“NH2”指的是伯胺

[www.separations.eu.tosohbioscience.com/solutions/process-medi a-products/by-mode/ion-exchange/anion-exchange/toyopearl-nh2-750f]。销售材料表明伯氨基为多胺的形式,意味着它是一种聚合物,其重复的伯胺亚单元共价固定在固相上。这种聚合物通常通过它们的一个或多个伯氨基连接到固相表面。这种连接具有将连接的氨基残基从伯氨基转化为仲氨基的作用,从而在固相表面产生伯氨基和仲氨基的混合物。

[0071] 另一个例子是赛多利斯(Sartorius)制造的,名为Sartobind STIC PA,其中“PA”指的是伯胺[www.sartorius.com/shop/ww/en/usd/sartobind-stic®-pa/c/M_Sartobind_STIC_PA]。销售材料表明伯氨基是聚合物的形式,特别是聚烯丙基胺,其具有重复的伯氨基亚单元,共价地附着在固相上。与前述的产品一样,这种聚合物通常通过它的一个或多个伯氨基连接到固相的表面。这种连接具有将连接的氨基残基从伯氨基转化为仲氨基的作用,从而在固相表面产生伯氨基和仲氨基的混合物。

[0072] 所有主要的色谱固相商业生产商都制造表明含有胺衍生物的产品,包括阴离子交换剂,这表明在该领域存在必要的知识和资源,可以在常规或实验基础上生产主要含有伯氨基的带正电固相。

[0073] 鉴于含有伯氨基的色谱固相的命名方式可能无法清楚或完全地揭示其组成,因此,使用简单的分析方法来测定给定的色谱固相是否具有实施本发明的适当特性将有所助益。进行该测定的一种简单方法是用缓冲液(例如50mM Tris,pH 7.5)平衡所述色谱固相,然后注入由所谓的ssRNA分子量标准品组成的样品,其包含大小各不相同的RNA分子亚群。这种RNA分子量标准品通常覆盖50到500个碱基,或100到1000个碱基,或200到6000个碱基,或一些其他范围,并可从常见供应商(如赛默科技(Thermo Sci-entific)和新英格兰生物实验室(New England Biolabs))购买。在注入样品和用平衡缓冲液短暂洗涤以置换未结合的样品组分后,用pH 7.5至约pH 11的线性pH梯度洗脱伯氨基色谱装置。如图1所示,伯氨基固相将按从小到大的顺序洗脱ssRNA种类。如果ssRNA没有洗脱或仅洗脱了最小的种类,则可能表明固相包含过多的非伯氨基,包括仲氨基、叔氨基和季氨基中的任意一种或任意组合。

[0074] 术语“RNA大小”是指核苷酸链中碱基的数量。碱基通常记为“b”。因此,所称的100b是指含100核苷酸碱基的RNA链。RNA大小与RNA构象(即单链(ssRNA)和双链(dsRNA))无关。给定的体外转录混合物(即在合成mRNA过程中产生的试剂、产物和副产物的混合物),可能同时包含ssRNA和dsRNA,但两者在碱基数量上大小相同,因为两者都来自相同的DNA质粒。在某些情况下,通过剪切应力或酶解,ssRNA链可能在加工过程中被切断或截断,从而形成先前完整链的碎片亚群。在其他情况下,截断形式可能是由不完整转录引起的。无论来源如何,本发明方法根据大小分离ssRNA的能力提供了一种去除非目的性碎片物质的工具。

[0075] 术语“平衡”是指在固相和/或样品上进行化学调节,以构建特定的化学环境的步骤。固相的调节通常通过将其暴露于含所需pH和盐的缓冲液来进行。样品调节通常通过pH滴定来进行,有时通过稀释以降低盐浓度,有时通过缓冲液交换技术,包括通过色谱、或透析、或通过使用切向流滤膜的渗滤。所有这些方法和选择一种或另一种的标准是本领域已知晓数十年。

[0076] 术语“加载”或“样品施加”是指使经平衡的样品与经平衡的主要负载伯氨基的带正电荷固相接触的过程。其通常是通过使用色谱设备,利用重力或泵送等外力使样品通过

设备来完成的。

[0077] 术语“吸附”是指将生物制品结合到化学互补表面的过程。吸附与吸收不同，吸收可以比作海绵通过毛细管的物理作用吸收水，但不涉及化学相互作用。本申请中的互补性应理解为与静电荷相关。RNA表面的负静电荷介导其吸附于由于表面上的伯氨基而带正电的固相表面。生物制品对色谱固相的吸附通常由更为人所熟悉的术语“结合”指代。

[0078] 术语“选择性吸附”是指允许至少一种物质吸附，同时阻止一种或多种其他物质吸附的条件。在本申请中，可以调整操作条件以防止dsRNA的结合，同时允许ssRNA结合。

[0079] 术语“解吸附”是指将生物制品从先前所吸附的化学互补表面上释放的过程。在本发明的方法中，ssRNA的解吸附通常需要至少pH 9.0、或pH 9.5、或pH 10.0、或更高的碱性pH值。可以使用盐增强解吸附，相比于无盐情况，其通常具有在更低的pH值下实现洗脱给定ssRNA种类的作用。然而，任何浓度的盐或盐的组合都不能在酸性或中性pH下洗脱大的ssRNA。

[0080] 术语“选择性解吸附”是指通过改变条件，使一种或多种吸附的物质从固相表面释放，而一种或多种其他物质仍被吸附的情况。随后可以应用另一组不同的条件从固相表面释放另一亚组的物质。在一个这样的例子中，可以通过应用中性或近似中性pH的高浓度盐，从伯氨基固相中去除大部分dsRNA，但使单链RNA仍然结合。这些dsRNA可以称为被选择性解吸附。在后续步骤中，ssRNA将在碱性pH并可能存在盐的条件下被选择性解吸附。

[0081] 术语“洗涤”是指为了从装置内的孔或通道中置换未结合的物质的目的，将加载的柱暴露于清洁缓冲液的过程。本文中的术语“冲洗”具有相同的含义。在最基本的情况下，洗涤缓冲液与平衡缓冲液具有相同的配方。在更复杂的配置中，洗涤缓冲液可能具有额外的作用，能够化学性地从固相释放弱结合杂质亚群，以便在洗脱所需产物之前将其去除。或者，清洗步骤可以大于一个，其中第一个步骤使用与平衡缓冲液相同的条件，但第二个步骤使用从固相中置换弱结合杂质亚群的条件，以便在洗脱之前将其去除。洗涤也可用来向缓冲液过渡，以在不同的或更受控的条件下进行洗脱。例如，在置换杂质的高盐洗涤后，可能需要进行无盐洗涤以设置在无盐的上升pH梯度中洗脱ssRNA的条件。如果不进行洗涤，洗脱将默认从高盐开始，形成一个盐浓度下降而pH值上升的梯度。

[0082] 术语“洗脱”代表术语“解吸附”在色谱领域中的特殊情况。它是指改变固相所处化学环境，从而导致在加载和洗涤步骤后仍然结合的伯氨基固相与物质之间相互作用分离的过程。从固相中去除双链RNA后，可以通过单独增加pH值或通过增加pH值并结合盐来洗脱ssRNA。

[0083] 洗脱可以在一个或一系列步骤中进行，其中每个步骤都使固相和ssRNA之间相互作用的强度降低。条件变化也可以以连续或线性方式进行，其导致连续体中弱结合的种类在早期解吸附，而连续体中强结合的种类在后期洗脱。无论是分步式还是线性形式，操作条件的变化通常被称为梯度，特别是洗脱梯度。通常认为分步梯度更方便，但线性梯度通常具有更好的再现性。

[0084] 术语“环境温度”通常被认为与“室温”或“常温”的表述类似。其通常对应于约20-22℃范围内的温度，但也可以包括更广泛的范围，例如约18-25℃。

[0085] 术语“离液盐”是指其组成离子中的至少一种在感胶离子和离液离子的霍夫梅斯特序列中具有高离液序列的盐种类。感胶离子位于霍夫梅斯特序列(Hofmeister series)

的一端，离液离子位于序列的另一端。离液离子通常被描述为优先与生物分子结合。离液盐具有松解生物分子内部和之间的非共价相互作用的作用，有时能达到破坏整体结构和解离多组分非共价混合物中各个元素之间相互作用的程度。其通常具有增加溶解度的效果。离液盐的例子包括胍盐、硫氰酸盐和高氯酸盐等。在某些情况下，特定盐的阴离子和阳离子均具有强烈的离液性，例如硫氰酸胍。此类盐比仅包含离液阴离子或离液阳离子的盐具有更高的离液能力。感胶离子位于霍夫梅斯特序列的另一端。它们通常被描述为优先被生物分子排除。感胶离子具有稳定生物分子的作用，有利于非特异性混合物中各个元素之间的连接。强感胶离子通常会降低大生物分子的溶解度。感胶盐的例子包括硫酸铵、磷酸钾和柠檬酸钠等。位于霍夫梅斯特序列中间的代表性盐对生物分子的稳定性、结合-解离或溶解度的影响趋于温和或很低。其示例包括所谓的中性盐，如氯化钠和氯化钾。中性盐可能在一定程度上影响稳定性、结合-解离或溶解度，其影响主要通过库仑(静电)力介导。

[0086] 术语“多价金属阳离子”是指金属的带正电荷离子形式，其中离子的净电荷为2或更大。多价金属阳离子包括净电荷均为2+的钙、镁和锌、净电荷为3的铁、和其他具有相似或不同价的离子。所有这些离子都对核酸具有亲和力，它们通过配位键结合。配位键比离子键强15-60倍，这意味着即使在饱和浓度的盐中，多价金属阳离子与核酸或其他生物分子也能维持结合。多价金属阳离子在RNA的纯化中可能存在问题，因为它们可以促进dsRNA序列的形成或稳定现有的dsRNA序列。它们还可以促进多个RNA分子之间、RNA和DNA分子之间、以及RNA、DNA和蛋白质杂质之间复合物的形成，或稳定已存在的复合物(结合物)。

[0087] 在本发明方法的描述中，术语“螯合剂”是指这样的分子：其具有与多价金属阳离子形成强配位键的能力，以至于它们能够竞争性地从金属离子与生物分子(包括核酸，包括mRNA)的在先结合物中除去这些金属离子。

[0088] 术语“核酸酶”是指能够切割核酸链的蛋白质，理想情况下切割为单个核苷酸，双核苷酸或三联体。核酸酶有两大类：裂解DNA的DNA酶和裂解RNA的RNA酶。应严格避免RNA酶，因为它们会破坏ssRNA产物。DNA酶通常用于通过破坏用于产生mRNA的DNA质粒模板来简化纯化。DNA酶经常需要使用多价金属阳离子辅助因子才能正常工作。如上所述，多价金属阳离子会干扰RNA纯化。

[0089] 术语“蛋白酶”或“蛋白水解酶”是指具有将其他蛋白质切割成小片段的能力的蛋白质。这有时被用作在色谱步骤之前减少蛋白质污染的方法，色谱步骤可能会收到此类污染的影响。许多蛋白酶(如胰蛋白酶)需要多价金属阳离子辅助因子才能正常发挥作用。如上所述，多价金属阳离子会干扰RNA纯化。通常用于此目的的蛋白酶包括蛋白酶K，其即使没有多价金属阳离子辅助因子也能发挥良好的效果。

[0090] 如果有期望或需要，在方法执行期间是否纳入盐可能部分取决于后续分析方法或纯化步骤的选择。例如，如果后续方法不耐盐，则适宜在没有盐或盐浓度足够低以避免干扰的情况下，从主要含有伯氨基的带正电固相中洗脱ssRNA。如果后续方法对盐具有高度耐受性，则设备的洗脱可以采用后续步骤能耐受的高盐物质浓度。

[0091] 在一个实施方式中，在pH梯度终点缓冲液中加入50mM NaCl，会导致ssRNA在低于终点缓冲液中不含NaCl时的pH值下洗脱。仅梯度终点缓冲液中存在50mM NaCl表明，ssRNA不是仅仅在pH梯度中洗脱，而是通过同时增加NaCl和增加pH的梯度来洗脱。在一个密切相关的实施方式中，在pH梯度终点缓冲液中加入100mM NaCl会导致RNA在低于梯度终点缓冲

液含50mM NaCl时的pH值下洗脱。在这两种情况下，当在梯度终点缓冲液中加入NaCl时，ssRNA的回收率显著增加。在0mM NaCl时dsDNA和ssRNA之间的距离最宽。当终点缓冲液包含50mM NaCl时，该距离减小，当终点缓冲液包含100mM NaCl时，距离进一步减小，但在100mM时仍然良好分离。类似浓度的其他盐可以替代使用，包括离液盐和螯合盐。

[0092] 在一个实施方式中，从伯氨基固相中进行pH梯度洗脱，以根据大小分离ssRNA种类，在梯度中较小的种类比较大的种类更早洗脱。

[0093] 以下一系列基本方法选项的一般非限制性描述说明了方法执行方式的变化，并为更详细地讨论操作变量提供了一个平台。应理解这些情况中提到的缓冲条件旨在提供如何实施该方法的一般思路，并且缓冲配方需要优化以匹配不同大小和含有不同杂质的ssRNA种类。

[0094] 在一个实施方式中，将色谱装置形式(例如整体柱)的伯氨基固相平衡至接近中性的pH值，例如20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、pH 7.5±0.5。通过缓冲液交换将含有dsRNA和ssRNA混合物的样品平衡至20mM Tris，20mM bis-tris丙烷，20mM甘氨酸，pH 7.5±0.5。然后使用20个装置体积或50个装置体积或100个装置体积的、从平衡缓冲液到20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、100mM NaCl、pH 11±0.5的终点缓冲液进行线性pH梯度洗脱色谱装置，其中装置体积数用作调整梯度期间pH变化速率(也即梯度的斜率)的手段。这种方法可能对分析应用特别有用，因为dsRNA、ssRNA、DNA片段和蛋白质都将结合到含伯胺固相，并被梯度洗脱，从而提示样品、产品和杂质的总含量。这种方法也可以作为开发制备分离条件的起点。

[0095] 在另外的实施方式中，可以在相同条件下加载伯胺固相，然后用3M NaCl溶液洗涤，以去除大部分dsRNA、DNA和蛋白质杂质。然后通过不含多余盐的后续清洗去除NaCl，以便在没有多余盐的情况下开始ssRNA的pH梯度洗脱。将结果与先前描述的实施方式进行比较，能够评估NaCl洗涤对ssRNA纯度的提高程度。测定最有利的NaCl浓度，以实现产品纯度和产品回收率的最佳平衡是色谱技术中众所周知的常规操作。

[0096] 在密切相关的实施方式中，先前实施方式中的一个或两个的pH梯度缓冲液中可以含有50mM氯化钠。在其他密切相关的实施方式中，pH梯度缓冲液中可以含有100mM氯化钠。在其他密切相关的实施方式中，可用任意其他盐取代氯化钠。

[0097] 在另一相关实施方式中，可以在相同条件下加载伯氨基固相，然后用3M盐酸胍溶液洗涤，以在通过pH梯度洗脱所需ssRNA产物之前去除大部分dsRNA。胍洗涤之后用无胍盐洗涤，以便在没有多余盐的情况下开始ssRNA的pH梯度洗脱。在密切相关的实施方式中，pH梯度缓冲液中可以含有100mM氯化钠。在另一密切相关的实施方式中，可用异硫氰酸胍取代盐酸胍。将结果与前面描述的两个实施方式进行比较，能够评估胍洗涤对ssRNA纯度的提高程度。

[0098] 在代表上述系列延伸的相关实施方式中，可以将浓度为20mM的螯合剂(例如但不限于乙二胺四乙酸(EDTA))与胍联合使用，旨在解离金属稳定的复合物，并在洗脱ssRNA之前从固相置换出非ssRNA类物。将结果与前述三种实施方式进行比较，能够评估离液盐-螯合剂洗涤液提高ssRNA纯度的程度(如果有的话)。

[0099] 在其他相关实施方式中，可以评估在不同pH值下使用其他盐种类或盐种类组合进行的洗涤，以在洗脱ssRNA之前最大限度地清除dsRNA。基本概念是通常在不会导致ssRNA洗

脱的最高pH值下，应用最高浓度的最强解离性的盐，因为此类条件可在洗脱所需的ssRNA之前最大化地去除非目的杂质亚群。随后可以进行调整，以确定达到预期效果所需的最低盐浓度。

[0100] 在一些实施方式中，可以修改线性pH梯度的斜率，以改变在该梯度中洗脱的物质之间的分离程度，或者特别是改善不同大小的ssRNA分子之间的分馏。如果以10个装置体积的pH梯度洗脱不能产生所需的分离度，则洗脱期可延长至20个装置体积，或50、或100个装置体积或以上。

[0101] 在一些实施方式中，可以分步增加pH值以洗脱所需的ssRNA并将其与dsRNA分离。如果在之前的洗涤步骤中dsRNA含量已充分减少，则可以在单个步骤中洗脱ssRNA，以达到简化方法、并尽可能高的浓度和尽可能低的体积获得洗脱的ssRNA的目的。分步洗脱也可以在增加pH值的连续步骤中进行。根据具体制剂的需要，单个步骤可能相对适度，也可能较大。在一些实施方式中，可以在单个步骤中增加pH值以洗脱所需的ssRNA。

[0102] 在一个实施方式中，含有dsRNA和ssRNA的样品可以在能阻止大部分dsRNA结合的pH值下加载到伯氨基固相上。在一些这样的实施方式中，根据mRNA的大小，样品加载期间的pH值可以是pH 8.0、或pH 8.5、或pH 9.0，或不阻止ssRNA结合的更高pH值。

[0103] 在特殊情况的实施方式中，可通过恒定pH下的盐梯度洗脱ssRNA。这将首先要求将pH升高到刚好低于在盐溶液中洗脱ssRNA的值的点。然后在该pH值下应用盐梯度。该实施方式表面上类似于固定pH下盐梯度的标准阴离子交换洗脱形式，但在分离dsRNA和ssRNA方面仍然与众不同，因为大mRNA的盐梯度洗脱只有在升高的操作温度下才能成功。

[0104] 本领域技术人员已知将样品平衡至将其加载到色谱柱上的条件的许多方法。这些方法中的任何一种都可以在不改变本方法正确性质的情况下使用。这些方法包括实验室规模的透析方法、切向流滤膜透析过滤方法、和缓冲液交换色谱法。在某些情况下，可以通过滴定样品至目标pH值、和在必要时用水或含低盐或不含盐的缓冲液稀释样品来实现充分的样品平衡。

[0105] 在一个实施方式中，通过升高pH值从dsRNA中分离dsRNA可以在存在糖的条件下强化，糖与ssRNA和固相的伯氨基之间的氢键竞争，预期结果是使ssRNA在低于无糖的pH值下洗脱。在一个这样的实施方式中，所述糖是山梨醇或木糖醇，或甘露醇、海藻糖或蔗糖、或其他糖或糖的组合。在一些这样的实施方式中，糖的浓度可以在0.1％到20％、或1％到20％、或5％到20％、或10％到20％的范围内，或者在较高、较低或中等范围内的值。

[0106] 在一个相关实施方式中，通过升高pH值从dsRNA中分离dsRNA可以在存在非离子离液盐的条件下强化，非离子离液盐与ssRNA和固相的伯氨基之间的氢键竞争，预期结果是使ssRNA在低于不存在离液盐的pH值下洗脱。在一个这样的实施方式中，所述离液盐是尿素。在一些这样的实施方式中，尿素的浓度可以在0.1M到10M、或1M到9M、或2M到8M、或4M到6M的范围内，或是在较高、较低或中等范围内的值。在另一个这样的实施方式中，所述离液盐是二甲基亚砜。在一些此类实施方式中，二甲基亚砜的浓度高达99％。在其他相关实施方式中，可在通过pH梯度洗脱所需ssRNA之前的洗涤步骤中应用非离子离液盐。

[0107] 在另一个实施方式中，通过升高pH值从dsRNA中分离dsRNA可以在存在碱性氨基酸的条件下强化，预期结果是使ssRNA在低于没有碱性氨基酸的pH值下洗脱。在一个这样的实施方式中，所述碱性氨基酸是组氨酸，或组胺，或赖氨酸，或精氨酸，或其他碱性氨基酸或碱

性氨基酸的混合物。在一个这样的实施方式中，组氨酸的浓度可以在1mM到250mM、或10mM到250mM、或20mM到250mM、或50mM到250mM、或100mM到250mM的范围内，或是在较高、较低或中等范围内的值。在另一个这样的实施方式中，赖氨酸的浓度可以是1mM到10M、或10mM到10M、或100mM到10M、或1M到10M，或在较高、较低或中等范围内的值。在另一个这样的实施方式中，精氨酸的浓度可以在1mM到850mM、或10mM到850mM、或100mM到850mM、或425mM到850mM的范围内，或在更高、更低或中间范围内的值。

[0108] 已知包括mRNA在内的核酸对多价金属阳离子具有很高的亲和力。它们主要通过金属离子和沿着核酸骨架的带负电磷脂酸残基之间的配位键相互形成牢固的结合。已知钙和镁都参与这种相互作用且都是电荷为2+的二价金属阳离子。三价铁是一种带3+电荷的三价阳离子，与核酸的相互作用更为剧烈。在这些离子中的任意一种与核酸相互作用的每一点上，都会中和等量的负电荷。这产生了一种表面上的期望，即给定mRNA分子上的负电荷将减少，并削弱mRNA与阴离子交换剂的相互作用。相反，多价金属阳离子的添加通常会导致非特异性交联的形成，从而导致ssRNA形成大聚集体，不会在pH梯度下从含伯胺的固相中洗脱。

[0109] 由于mRNA制备中通常会添加多价金属阳离子，因此建议在所有实施方式中采取步骤以减少其含量，并优选在将其加载到主要含有伯氨基的带正电固相之前从样品中完全消除多价金属阳离子；或者至少在洗脱设备之前采取步骤去除它们。提前清除它们至少还有两个原因。第一个原因是它们可能会促进链内和链间dsRNA序列的形成或稳定。第二个原因是金属离子稳定了核酸和蛋白质之间的非特异性结合，基本上在它们之间形成了一个稳定的桥梁。由于配位键的强度是离子键的15到60倍，因此配位复合物即使在饱和水平的非金属盐(包括NaCl和胍盐)中也能够存在。这使得尽可能移除多价金属阳离子对于从本发明方法中获得最高ssRNA纯度并将其回收至关重要。如果能有效移除多价金属阳离子，则可以使用高浓度的离液盐(如胍盐)、以及在较小程度上使用高浓度的非离液盐(如NaCl)，来实现核酸-蛋白质复合物的有效解离。感胶离子盐(lyotropic salt)可能产生相反的影响。

[0110] 在一些实施方式中，在样品制备期间进行核酸-金属杂质复合物的螯合剂或螯合剂-高盐解离和/或进行螯合剂或螯合剂离液盐洗涤，随后可以进行洗涤步骤，该步骤不含除用于控制pH的试剂以外的盐。这将使ssRNA能够在低盐环境中洗脱。

[0111] 在其他实施方式中，可通过增加pH值在ssRNA洗脱期间保持螯合剂和高盐浓度。在其他实施方式中，可在保留高盐的同时消除螯合剂。在其他实施方式中，可在保留螯合剂的同时消除高盐。

[0112] 本发明的一个特别的优点是，其从ssRNA制剂中除去DNA质粒的能力使得不需要对体外转录混合物或部分纯化的体外转录混合物进行核酸酶消化。这具有非常高的价值，因为核酸酶消化需要添加镁离子才能使酶具有活性。这些镁离子可能使得所需ssRNA与自身和与其他样品组分交联，从而降低所需ssRNA产物的回收率。通过使核酸酶消化无需进行，就不必添加镁离子，ssRNA的回收就不受影响。

[0113] 尽管本发明方法能够从ssRNA中分离质粒DNA，但可能需要核酸酶消化，考虑到这一点，可以进行核酸酶消化，然后可以用过量的螯合剂洗涤主要含有伯氨基的带正电固相，以置换出残留的镁离子。在一个这样的实施方式中，在存在5mM核酸酶的情况下对质粒DNA进行核酸酶消化后，可以用含10-50mM范围EDTA或更多EDTA的螯合剂进行洗涤。

[0114] 在一个从体外转录混合物开始的实施方案中，为了清除多价金属阳离子，将EDTA

添加到10-50mm的最终浓度。假设pH值在pH 7和pH 8.0之间,如有必要,可以过滤样品,然后将其加载到平衡至50mM Tris、100mM NaCl、10mM EDTA、pH 8.0的伯氨基色谱装置中。样品加载后,用10-20倍装置体积的50mM Tris、3mM盐酸胍、20mM EDTA、pH 8.0洗涤装置。然后用20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、pH 8.0洗涤色谱柱,将胍和EDTA从装置中冲洗出来,并准备洗脱ssRNA。然后使用50倍装置体积线性梯度洗脱ssRNA至20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、250mM精氨酸、pH 11.0。收集组分后,立即通过添加1M乙酸中和含有ssRNA峰的容器。

[0115] 在代表上述实施方式的扩展的一个实施方式中,将本发明方法后的中和样品加载到Oligo dT亲和层析设备以进行最终纯化。

[0116] 在代表上述实施方式的扩展的另一个实施方式中,将中和样品加载到疏水相互作用色谱装置以进行最终纯化。

[0117] 在一个从体外转录混合物开始的实施方案中,通过添加氯化锂(LiCl)使混合物沉淀至2.0M至2.5M的最终浓度。弃上清,用50mM Tris、100mM NaCl、20mM EDTA、pH 8.0重悬沉淀物,必要时过滤以去除浑浊。然后将样品加载到平衡至50mM Tris、100mM NaCl、10mM EDTA、pH 8.0的伯氨基固相中。样品加载后,用10-20倍装置体积的50mM Tris、1.5mM异硫氰酸胍、20mM EDTA、pH 8.0洗涤。然后用20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、100mM NaCl、pH 8.0洗涤色谱柱,将胍和EDTA从装置中冲洗出来,并准备洗脱ssRNA。然后使用50倍装置体积线性梯度洗脱ssRNA至20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、100mM NaCl、pH 11.0。收集组分后,立即通过将1M乙酸以该组分体积5%的最终比例加入以中和含有ssRNA峰的容器。在一个密切相关的实施方式中,用NaCl或其他盐代替LiCl沉淀mRNA。在另一个密切相关的实施方式中,通过将乙醇添加到约2.5%的最终比例来沉淀mRNA。

[0118] 工业方法开发人员通常倾向于避免使用酶,因为这会增加方法的费用,并且因为加入的任何物质都必须在其后移除,并且必须进行测试以记录其已移除。然而,在开发项目的早期使用酶可能是一条便利的捷径,使公司能够更早地进入临床试验,然后开发不需要使用酶的更高级的方法。如上所述,体外转录混合物通常用DNAase酶处理,以清除用作mRNA生产模板的DNA质粒。RNA纯化也可以使用蛋白水解酶来减少给定体外转录中的蛋白质杂质量。在一些实施方式中,在进行本发明方法之前,可首先用DNAse处理体外转录混合物以清除质粒,然后用蛋白水解酶(例如蛋白酶K)清除DNAse和大部分其他蛋白质杂质。在其他实施方式中,由于本发明的方法使得DNAse无需使用,因此可以仅用蛋白酶K或其他蛋白水解酶处理体外转录混合物。

[0119] 在一个实施方式中,用蛋白质酶K处理体外转录混合物以减少蛋白质含量。样品通过膜过滤器过滤以去除颗粒,然后加载到平衡至50mM Tris、10mM EDTA、pH 8.0的伯胺固相上。样品加载后,用10-20倍装置体积的50mM Tris、3mM盐酸胍、20mM EDTA、pH 8.0洗涤装置。然后用20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、50mM NaCl、pH 8.0洗涤色谱柱,将胍和EDTA从装置中冲洗出来,并准备洗脱ssRNA。然后使用50倍装置体积线性梯度洗脱ssRNA至20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、50mM NaCl、pH 11.0。收集组分后,立即通过添加1M乙酸中和含有ssRNA峰的容器。

[0120] 在一个实施方案中,用2M异硫氰酸胍和20mM EDTA处理体外转录混合物。如有必要,将pH值调节至7.5±0.5,如有必要,过滤样品以去除固体。在20mM Tris、20mM bis-tris

丙烷、和20mM甘氨酸、pH 8.0中用2M异硫氰酸胍和20mM EDTA平衡伯氨基固相。将样品加载到固相，然后加入平衡缓冲液，直到紫外吸光度接近零。然后用20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、50mM NaCl、pH 8.0洗涤固相，然后pH梯度洗脱至20mM Tris、20mM bis-tris丙烷、20mM甘氨酸、20mM EDTA、pH 11.0。梯度可以以单个步骤、一系列步骤或连续(线性)形式进行。收集组分后，立即通过添加1M乙酸中和含有ssRNA峰的容器。

[0121] 尽管本发明对于中止在高温下分离dsRNA和ssRNA的需求有益，但并不排除这样做的可能性。

[0122] 在一些实施方式中，在环境温度下执行该方法之前，可将样品平衡到升高的温度，例如37℃、45℃、56℃、60℃、70℃、或中间、更高或更低的温度。

[0123] 在一些实施方式中，本发明的方法可以在高温下进行，例如37℃、45℃、56℃、60℃、70℃、或中间、更高或更低的温度。在此类实施方式中，ssRNA将在低于环境温度的pH值下洗脱。

[0124] 在一些实施方式中，可以将样品平衡到升高的温度，并且可以在升高的温度下执行该方法。

[0125] 在一个实施方式中，本发明的方法可以与使用Oligo dT(OdT)配体的亲和色谱法相结合。这两种方法可以以任意所需的顺序结合。

[0126] 在一个实施方式中，本发明的方法可以与疏水相互作用色谱(HIC)的方法相结合。这两种方法可以以任意所需的顺序结合。在一个这样的实施方式中，HIC固相上的疏水配体可以由苯基组成。在另一个这样的实施方式中，HIC固相上的疏水配体可由丁基组成。在另一个这样的实施方式中，HIC固相上的疏水配体可由己基组成。在其它这样的实施方式中，HIC固相上的疏水配体可以由不同的脂肪族或芳香族基团组成、或者由同时表现出脂肪族和芳香族性质的基团组成。

[0127] 在一个实施方式中，本发明的方法可以与反相色谱(RPC)的方法相结合。这两种方法可以以任意所需的顺序结合。在这样的一个实施方式中，可以利用用于合成固相的苯乙烯二乙烯基苯(SDVB)聚合物的天然疏水性来赋予固相表面疏水性。在另一个这样的实施方式中，可以利用附着在固相表面的配体的疏水性来赋予固相表面疏水性，其中该配体为脂肪族烃、或芳香族烃、或脂肪族-芳香族混合性质的配体。

[0128] 在一个实施方式中，本发明的方法可以与羟基磷灰石色谱法结合，这两种方法可以以任意所需的顺序结合。

[0129] 在一个实施方式中，本发明的方法可以与使用OdT配体的亲和层析和与RPC结合。这三种方法可以以任意所需的顺序进行。

[0130] 在一个实施方式中，本发明的方法可用于从DNA质粒制剂中去除ssRNA。在密切相关的实施方式中，本发明的方法可用于从蛋白质制剂中去除ssRNA。在一个这样的实施方式中，该方法可用于从用于合成mRNA的酶制剂中去除杂质ssRNA。在这些实施方式中的任何一个中，样品可在酸性至中性pH条件和低盐浓度下加载，在此条件下DNA和蛋白质结合到主要含有伯氨基的带正电固相。然后，可以用盐梯度洗脱它们，以提高其相对于杂质的纯度，同时使ssRNA结合到固相表面。在仅旨在去除ssRNA的密切相关实施方式中，样品和固相条件可含有在酸性至中性pH下的高浓度盐，使DNA和蛋白质流过固相，而RNA发生结合。

[0131] 在一个实施方式中，本发明的方法可用作分析工具来定量样品中的ssRNA量。在一

个这样的实施方式中，可将酸性至中性pH下的样品与高浓度的盐混合，以使大多数非ssRNA分子无法结合。然后，可以通过增加pH梯度洗脱伯氨基固相，按从小到大对结合的ssRNA进行排序。在密切相关的实施方式中，伯胺固相可在单一步骤中洗脱至足够碱性的pH值，以在单峰中洗脱所有ssRNA，从而最大限度地提高测定的灵敏度。在相关的实施方式中，伯胺固相可以用线性梯度洗脱至25mM NaOH、或50mM NaOH、或100mM NaOH、或更高、更低或中间浓度。在另一相关的实施方式中，伯氨基固相可以用递增步骤洗脱至25mM NaOH、或50mM NaOH、或100mM NaOH、或更高、更低或中间浓度。在相关的实施方式中，伯氨基固相可以用单步骤洗脱至25mM NaOH、或50mM NaOH、或100mM NaOH、或更高、更低或中间浓度。在上述任一实施方式中，在将样品加载到伯氨基固相上后，可注入与RNA相互作用产生荧光的染料，并将荧光染料-RNA复合物通过荧光监视器放大测定的灵敏度。在一个这样的实施方式中，染料可以是RiboGreen。

[0132] 在一个实施方式中，本发明的方法可以试剂盒的形式提供以便于应用。试剂盒包括两个或多个固相，其中至少一个是伯胺固相，以及描述本发明方法的说明书。在一个这样的实施方式中，第二固相是Oligo-dT色谱装置。在另一个这样的实施方式中，第二固相是疏水相互作用色谱装置。在另一个这样的实施方式中，第二固相是Oligo-dT色谱装置，第三固相是疏水相互作用色谱装置。

[0133] 在根据本发明所述的使用固相进行mRNA纯化的典型方案中，如下所述使用伯胺整体柱。

[0134] 在环境温度下，伯胺整体柱在水环境下纯化大单链mRNA(ssRNA)。它去除dsRNA、DNA、蛋白质和内毒素，同时按大小顺序分离ssRNA(图1)。它可以用于研究级ssRNA的一步纯化或作为多步纯化过程中的高分辨率捕获步骤。它还可以快速高分辨率分析体外转录混合物、部分纯化的样品、色谱组分和制剂药物的特性。

[0135] 伯胺整体柱采用阴离子交换和氢键的独特组合，在升高的pH梯度中纯化ssRNA。DNA、蛋白质和dsRNA在ssRNA之前洗脱。高盐洗涤可在洗脱前去除大部分dsRNA、DNA和蛋白质，从而提高纯化性能。值得注意的是，即使在饱和浓度的离液盐中，ssRNA仍保持结合。在高盐洗涤过程中加入螯合剂进一步增强杂质消除，并保留pH梯度以去除残留的痕量杂质和聚合物。

[0136] 如果需要，可以通过使用CIMmultus Oligo dT的亲和色谱法、使用CIMmultus C4 HLD的疏水作用色谱法或使用CIMmultus SDVB的反相色谱法(有关任何这些色谱柱的更多信息，请联系比亚分离)进一步纯化伯胺整体柱中的ssRNA组分。伯胺整体柱也可用作精制方法，尤其是在高盐步骤样沉淀或疏水相互作用色谱后，因为高盐样品无需进一步制备即可加载。

[0137] 伯胺整体柱是一种径向流动色谱装置。其被设计为用于将流体从柱体外引入到内部。这具有稳定柱体物理结构的效果，并且在洗脱期间具有浓度效应，从而提高分离性能。在进行任何实验之前，需确保将装置连接到色谱仪，以使流动方向遵循设备上的标记。注意，一些色谱仪软件中内置了默认的反向流动功能，可以在没有警告的情况下使流动方向反转。在进行任何实验之前，请确保此功能已禁用。

[0138] 伯胺整体柱在20％乙醇中运输。建议在实际使用之前，按如下所述对其进行消毒和再生。并且建议在没有样本的情况下跑柱，以提供比较实验结果的基线。一些缓冲组分吸

收紫外线,缓冲之间的一些跃迁可能会产生折射率伪影,可能会混淆实验结果的解释。

[0139] 样品和制备:伯胺整体柱可用于处理体外转录混合物,包括用DNAse和/或蛋白酶K消化后的混合物,以及从盐或有机溶剂沉淀物中再悬浮的ssRNA,或从其他纯化方法中部分纯化的ssRNA。含有二价金属阳离子的样品应使用约为金属离子估计浓度10倍的螯合剂处理。加样前必须通过离心或过滤(0.45μm)去除颗粒。样品pH值应在pH 6.0和8.0之间。不考虑含盐量。

[0140] 缓冲液A:平衡缓冲液/梯度起始缓冲液。20mM Tris,20mM bis-tris丙烷,20mM甘氨酸,50mM NaCl,pH 8.0。

[0141] 缓冲液B.高盐洗涤缓冲液。50mM Tris,3.0mM盐酸胍,20mM EDTA,pH 8.0。

[0142] 缓冲液C.梯度终点缓冲液。20mM Tris,20mM bis-tris丙烷,20mM甘氨酸,50mM NaCl,pH 11.0。

[0143] 缓冲液D.清洁/消毒缓冲液。2M NaCl,1M NaOH。

[0144] 缓冲液E.再生缓冲液。3.0M醋酸铵。

[0145] 用缓冲液A平衡色谱柱:通过色谱柱泵送平衡缓冲液,直到输出pH值和电导率与输入缓冲液相同。流速:10柱体积(CV)/分钟。

[0146] 注入样品。在加载大体积样品,尤其是加载诸如体外转录混合物之类的粗样品期间,观察操作压力。如有必要,降低流速,以将工作压力保持在可接受的范围内。

[0147] 洗涤1,使用缓冲液A:5-10CV的平衡缓冲液。无需等待紫外线信号完全恢复到基线,因为后续高盐洗涤步骤将消除残留杂质。

[0148] 洗涤2,使用缓冲液B:10-20CV的平衡缓冲液。注意,胍吸收紫外线因而产生一个即时峰值。DNA和dsRNA通常以接近峰值的较尖锐的峰洗脱。继续洗涤,直到胍峰达到水平平台。

[0149] 洗涤3,使用缓冲液A:10-20CV的平衡缓冲液或洗涤直到UV恢复到基线。

[0150] 洗脱梯度至缓冲液C:50-100CV线性梯度至100%梯度终点缓冲液,然后在100%下保持10CV。洗脱后立即中和各部分。

[0151] 使用缓冲液D进行清洁/消毒。建议每次运行后使用10-20CV的消毒缓冲液进行处理,因为这将显示在pH梯度结束时,是否仍有大量材料与色谱柱结合。可在洗脱时收集并中和消毒步骤的内容物,以供进一步分析。如果色谱柱加载了体外转录混合物,则可能需要将消毒步骤的持续时间延长至1小时。如果污染严重,可能需要将消毒时间延长到16-24小时。在消毒过程中保持最小流速往往会产生更好的结果,因为它会不断补充OH离子,并将污垢从柱中冲洗出来,而不仅仅是在其中水解它们。

[0152] 色谱柱再生:用20CV缓冲液A或水冲洗色谱柱中的NaOH,然后用20CV缓冲液E冲洗。这是为了从整体柱表面置换氢氧化物,因为它们会阻碍色谱柱的平衡,并可能在洗脱过程中产生pH伪影。

[0153] 储存:色谱柱用缓冲液A或水消毒并冲洗后,储存在20%乙醇中。

[0154] 典型色谱图如图8所示。

[0155] 变化、优化和故障排除

[0156] 使用色谱图作为优化单个步骤持续时间的指南。

[0157] 高盐洗液可能具有广泛的变化,例如使用浓度高达完全饱和的不同离液盐和不同

浓度的螯合剂。方案中给出的浓度旨在作为起点。如果较低浓度提供同等纯度，则较低的量将减少材料费用并简化缓冲液制备。

[0158] 可以用非离液盐替代离液盐，但在使用高浓度的沉淀RNA的盐时要小心。此类盐包括氯化钠、氯化钾、氯化锂等。初步实验结果表明，用1M氯化钠洗涤可清除大部分dsRNA和DNA，但也可能需要延长洗涤时间，以将紫外线吸收率恢复到基线(图1)。

[0159] 可以简化工作流程，将胍和EDTA直接添加到样品中，并将色谱柱平衡到高盐洗涤缓冲液状态。在加样后使用高盐缓冲液进行第一次洗涤，然后使用上述缓冲液A进行第二次洗涤，然后进行洗脱。注意，这种方法也可能支持更高的ssRNA结合能力，因为它将阻止dsRNA和DNA对结合表面积的竞争。该方法还可以减少色谱柱结垢。

[0160] 可以完全省略高盐洗涤步骤。当目标是测定dsRNA和ssRNA或DNA和ssRNA的相对量时，这可能是样品分析表征的优选方法。该方法通常不区分dsRNA和DNA。

[0161] 在pH梯度中省略盐将增加dsRNA和ssRNA的分离，但可能会降低回收率，也会增加洗脱时的pH值。可以使用沉淀RNA的盐，只需将其浓度保持在沉淀水平以下(图6)。在pH洗脱期间也可使用促进RNA溶解度的盐，如离液盐，但需考虑到它们可能会干扰后续的纯化方法。

[0162] 在pH梯度期间可以升高工作温度，从而使溶质提前洗脱。不受控制的工作温度可能会影响再现性。

[0163] 线性pH梯度可以转换为阶跃梯度形式。在某些情况下，例如CIMmultus dsX-beta联合正交纯化方法，可以通过单个pH步骤洗脱ssRNA。

[0164] 清洗不充分的迹象可能包括：在一系列运行过程中操作压力逐渐增加、在给定物质比前一次运行更早或更晚洗脱的情况下发生的选择性转移，和/或尽管没有进样但在洗脱过程中出现的鬼峰。

[0165] 通过以下非限制性示例进一步解释本发明。

实施例

[0166] 实施例1

[0167] 在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前使用盐步骤消除dsRNA，从而在伯胺固相上将dsRNA从ssRNA中分离。

[0168] 将含有21b至500b dsRNA分子的dsRNA标准品和200b至6000b ssRNA分子的ssRNA标准品的样品施加到整体柱色谱装置式的伯胺固相中。将伯胺整体柱平衡至20mM Tris、20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、pH 8.0。施加样品并进行洗涤，以从整体柱内部通道中置换出未结合的物质。然后应用20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、1M NaCl、pH 8.0进行洗涤步骤，然后进行另一个洗涤步骤以除去NaCl。然后对整体柱进行线性梯度洗脱至20mM Tris、20mM BIS-TRIS丙烷、20mM甘氨酸、pH 11.0。如图1所示，在NaCl步骤中所有dsRNA物质都被洗脱，而ssRNA仍保持结合并在后续pH梯度中洗脱。

[0169] 在dsRNA分子量之间没有观察到明显的大小分离，但在ssRNA分子量之间观察到明显的分离。

[0170] 实施例2

[0171] 在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前使用含6M胍-HCL和20mM EDTA的洗涤

步骤消除dsRNA，从而在伯胺固相上将dsRNA从ssRNA中分离。

[0172] 将含有21b至500b dsRNA分子的dsRNA标准品和大小为5000b的ssRNA的样品施加到整体柱色谱装置式的伯胺固相中。将伯胺整体柱平衡至20mM Tris、20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、pH 8.0。施加样品并进行洗涤，以从整体柱内部通道中排出未结合的物质。然后应用20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、6M胍、20mM EDTA、pH 8.0进行洗涤步骤，然后进行另一个洗涤步骤以除去胍-HCL和EDTA。然后用20mM Tris、20mM BIS-TRIS丙烷、20mM甘氨酸、pH 11.0的线性梯度对整体柱进行洗脱。如图2所示，在盐步骤中所有dsRNA物质都被洗脱，而ssRNA仍保持结合并在后续pH梯度中洗脱。

[0173] 实施例3

[0174] pH梯度无法从强阴离子交换剂和弱阴离子交换剂中洗脱ssRNA。

[0175] 检验使用强(季胺，QA)阴离子交换剂和弱(叔胺，DEAE)阴离子交换剂时ssRNA在pH梯度下的表现，将其作为实验对照与伯氨基固相上pH梯度洗脱的性能相比较。两种阴离子交换剂均为1mL体积的整体柱装置的物理形式。将柱子平衡至20mM Tris、20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、pH 8.0。注入含约5000核苷酸碱基(5000b)ssRNA的样品，并使用平衡缓冲液洗涤排出未结合物质。然后用线性梯度洗脱柱子至20mM Tris、20mM BIS-TRIS丙烷、20mM甘氨酸、pH 11.0。图3显示了在强阴离子交换剂和弱阴离子交换剂上，pH梯度均不能洗脱ssRNA，只有用1M NaOH清洗柱子才能去除。

[0176] 实施例4

[0177] 在环境温度下，通过pH梯度在伯氨基固相上将质粒DNA从ssRNA中分离。

[0178] 将含有大小约为6000个碱基对的超螺旋dsDNA质粒和大小为约5000b的ssRNA的样品施加到整体柱色谱装置式的伯胺固相中。将伯胺整体柱平衡至20mM Tris、20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、pH 8.0。施加样品并进行洗涤，以从整体柱内部通道中排出未结合的物质。然后线性梯度洗脱整体柱至20mM Tris、20mM BIS-TRIS丙烷、20mM甘氨酸、pH 11.0。如图4所示，DNA质粒首先被洗脱，与之后洗脱的ssRNA很好地区分开。

[0179] 实施例5

[0180] 在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前使用盐步骤消除DNA，从而在伯胺固相上将DNA质粒从ssRNA中分离。

[0181] 将含有大小约为6000个碱基对的超螺旋dsDNA质粒和大小为约5000b的ssRNA的样品施加到整体柱色谱装置式的伯胺固相中。将伯胺整体柱平衡至20mM Tris、20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、pH 8.0。施加样品并进行洗涤，以从整体柱内部通道中排出未结合的物质。然后应用20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、1M NaCl、pH 8.0进行洗涤步骤，然后进行另一个洗涤步骤以除去NaCl。然后用线性梯度洗脱柱子至20mM Tris、20mM BIS-TRIS丙烷、20mM甘氨酸、pH 11.0。如图5所示，在盐步骤中DNA质粒被洗脱，而ssRNA仍保持结合并在后续pH梯度中洗脱。

[0182] 实施例6

[0183] 环境温度下将盐与pH梯度洗脱相结合对分离DNA和ssRNA的效果。

[0184] 进行了一系列分离，比较单纯pH梯度洗脱、终点缓冲液含有50mM NaCl的pH梯度洗脱、和终点缓冲液含有1000mM NaCl的pH梯度洗脱。在每个实验中，将含有大小约为6000个碱基对的超螺旋dsDNA质粒和大小为约5000b的ssRNA的样品施加到整体柱色谱装置式的伯

胺固相中。将伯胺整体柱平衡至100mM Tris、pH 8.0。施加样品并进行洗涤，以从整体柱内部通道中排出未结合的物质。在第一个实验中，线性梯度洗脱整体柱至125mM甘氨酸、pH 10.5。在第二个实验中，线性梯度洗脱整体柱至125mM甘氨酸、50mM NaCl、pH 10.5。在第三个实验中，线性梯度洗脱整体柱至125mM甘氨酸、100mM NaCl、pH 10.5。如图6所示，不含氯化钠时，ssRNA峰的中心出现在pH 10.2处。梯度终点缓冲液中含50mM氯化钠时，ssRNA在pH 10.0处洗脱。梯度终点缓冲液中含100mM氯化钠时，ssRNA在pH 9.9处洗脱。当氯化钠在整个pH梯度中保持在50mM水平的浓度时，ssRNA在pH 9.8处洗脱(未显示)。当氯化钠在整个pH梯度中保持在100mM水平的浓度时，ssRNA在pH 9.6处洗脱(未显示)。含有氯化钠会引起对其他目的的影响。在没有NaCl的情况下，DNA和ssRNA之间的分离程度最大，而较大量的NaCl进一步减少了分离。然而，在氯化钠存在时，ssRNA的回收率明显提高。

[0185] 实施例7

[0186] dsRNA和DNA反应的均匀性。

[0187] 从上述实验中，显而易见dsRNA和DNA的表现相似，两者都通过盐洗消除，这表明两者都会通过pH梯度与ssRNA分离，并且还表明DNA可以用作dsRNA表现的模型来验证本发明的方法。进行实验以测试本发明方法在极端恶劣情况下的表现，该情况在从代表性转录混合物中纯化ssRNA的过程中永远不会发生。该测试涉及从大小约为13,000个碱基的dsRNA中分离出相对较小的约1700个碱基的ssRNA，并将13kb dsRNA与约6000个碱基对的DNA质粒的洗脱表现进行比较。将伯胺整体柱平衡至100mM Tris、pH 8.0。在每个实验中，施加样品并进行洗涤，以从整体柱内部通道中排出未结合的物质。随后线性梯度洗脱整体柱至125mM甘氨酸、pH 10.5的。如图7所示，与预期一致，通过洗脱，DNA和非常大的dsRNA很大程度共洗脱了，早于小得多的ssRNA。与其他例子相比，ssRNA和两种较大杂质之间的分离程度降低了，但仍能明显看到清晰的分离。在实际操作中，给定的体外转录混合物中的dsRNA将包含与ssRNA相同数量的碱基。与实施例4相比显示，ssRNA由于大小而在pH梯度中较晚洗脱，这表明无论dsRNA和ssRNA大小如何，本发明都能使二者之间良好分离。考虑到在用pH梯度洗脱ssRNA之前可以通过盐洗非常容易地去除dsRNA，这一点可能没有实际意义，但这表明即使没有盐洗，本发明也可以实现有效分离。图7的结果也值得注意，因为它们表明本发明可适用于至少15,000b，可能适用于高达25,000b或更大的ssRNA。

[0188] 实施例8

[0189] 在环境温度下，通过在pH梯度洗脱ssRNA之前使用组合的螯合剂-离液剂步骤消除DNA，从而在伯胺固相上将dsRNA从ssRNA中分离。

[0190] 将含有6000bp超螺旋dsDNA质粒和5000b ssRNA的样品施加到整体柱色谱装置式的伯胺固相中。将伯胺整体柱平衡至20mM Tris、20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、pH 8.0。施加样品并进行洗涤，以从整体柱内部通道中排出未结合的物质。然后应用20mM BIS-TRIS-丙烷、20mM甘氨酸、1M胍-HCL、20mM EDTA、pH 8.0进行洗涤步骤，然后进行另一个洗涤步骤以除去胍-HCL和EDTA。然后用20mM Tris、20mM BIS-TRIS丙烷、20mM甘氨酸、pH 11.0的线性梯度对整体柱进行洗脱。图8显示大部分DNA质粒在胍-EDTA(离液剂-螯合剂)洗涤中被清除。在pH梯度中，剩余的结合的DNA在ssRNA之前被洗脱。

[0191] 比较图8(使用1M胍)和图5(使用6M胍)，结果表明1M胍-HCl不足以在洗脱ssRNA之前完全处理掉DNA。在图5中，dsRNA峰集中在6M胍洗涤峰的前沿。在图8中，DNA在胍洗液的前

部开始洗脱，但明显晚于图5，并且有明显的拖尾。紧接在ssRNA峰之前洗脱的DNA/ssRNA峰的相对大小进一步支持了1M盐酸胍没有提前完全处理掉DNA/dsRNA的结论。然而，还要注意的是，在用1M胍提前洗涤后，ssRNA在单个峰中洗脱(图8)，而图5(6M胍之后)中虽然观察到预期的ssRNA峰，但其后接有随后洗脱的物质，这些物质被解释为聚合物。该对比表明，调整离液剂浓度以提供DNA/sdRNA的最佳清除率而不改变所需ssRNA的特性，作为过程优化的常规部分将是有价值的。

[0192] 实施例9

[0193] 通过含多价阴离子物降低ssRNA洗脱pH值。

[0194] 进行了一系列实验，在pH梯度中分馏DNA和ssRNA的混合物。将伯胺固相平衡至100mM Tris、pH 8.0。上样，然后用平衡缓冲液洗涤样品。以125mM甘氨酸、pH 10.5为终点缓冲液，施加125个设备体积量的线性梯度。在第二次运行中，重复所述条件，但向缓冲液中加入100mM柠檬酸盐。在第三次运行中，重复所述条件，但向缓冲液中加入100mM乙二胺四乙酸(EDTA)。如图9所示，两种添加剂都大幅降低了DNA和ssRNA洗脱的pH值，其中使用EDTA观察到的pH降低最强。两者的pH降低程度也大于100mM氯化钠所达到的程度(图6)。与氯化钠结果的相同之处是盐的存在增加了洗脱梯度中DNA和ssRNA的回收率。另一个相似之处是，无论用氯化钠、柠檬酸盐或EDTA洗脱，均无法在pH值为8.0或更低的pH值下洗脱ssRNA。

[0195] 实施例10

[0196] 在存在盐的pH梯度洗脱之前，用高盐洗涤纯化ssRNA。

[0197] 将色谱装置(例如整体柱)形式的伯胺固相平衡至50mM Tris，20mM EDTA，2M异硫氰酸胍，8.0±0.5。紫外线监测器归零。向样品中添加EDTA和异硫氰酸胍，并将样品pH调节至pH 8.0±0.5。如有必要，过滤样品以去除浑浊。将样品施加到伯胺整体柱上，并用平衡缓冲液洗涤整体柱，直到基线归零。在强螯合-离液盐溶液中施加和洗涤样品，旨在防止dsRNA、DNA和蛋白质结合和/或将其去除到痕量水平。然后以至少10倍装置体积的50mM Tris、5mM EDTA、100mM异硫氰酸胍、pH 8.0±0.5洗涤整体柱。然后线性梯度洗脱ssRNA至65mM甘氨酸、5mM EDTA、100mM异硫氰酸胍，pH 10.5±0.5。在整个方法中均保持螯合剂的存在，以防止由于可能存在多价金属阳离子而产生的不利影响。用100mM异硫氰酸胍替代实施例6中所述的100mM氯化钠或实施例9中所述的100mM柠檬酸盐或100mM EDTA，以避免降低ssRNA的溶解度。在平行实验中，如果需要，增加异硫氰酸胍的浓度，目的是进一步降低洗脱ssRNA的pH值。在平行实验中，如果需要，用不同的盐取代离液盐硫氰酸胍。在平行实验中，如果需要，可以改变螯合剂的种类和浓度。

[0198] 实施例11

[0199] 用组合pH-盐联合梯度从伯胺固相中洗脱体外转录混合物。

[0200] 制备以下缓冲液：缓冲液A，含有50mM Hepes，pH 7.0；缓冲液B，含有50mM Hepes，200mM焦磷酸钠，pH 8.5；缓冲液C，含有100mM氢氧化钠和2.0M氯化钠；缓冲液D，含1.5M Hepes，pH 7.0。伯胺整体柱具有2μm的通道和100μL床体积，储存于20％乙醇中，用50CV的水以2mL/min(20CV/min)的流速进行洗涤。用缓冲液A平衡色谱柱，并注入自反应开始后30秒采集的25μL体外转录混合物样品。用20CV缓冲液A洗涤色谱柱，然后施加40CV线性梯度至20％缓冲液B，随后施加10CV维持在20％缓冲液B的梯度。该阶段洗脱核苷酸和双链物质，包括DNA质粒。施加10CV线性梯度至50％缓冲液B的以洗脱mRNA，然后将梯度保持在50％B。额

外施加10CV线性梯度至100％B，然后将梯度保持10CV。用缓冲液C洗涤色谱柱，然后用缓冲液D将pH恢复到7。重新平衡色谱柱，并注入体外转录开始后4小时采集的样品。按照之前的样品进行洗脱。运行完成后，用20％乙醇清洗色谱柱并将其储存在其中。所有色谱步骤均在环境温度下进行。洗脱曲线如图10所示。长虚线表示30秒时采集的样品对应的剖面。实线表示4小时时采集的样品对应的剖面。短虚线表示电导率。与预期相同，在体外转录过程中，组成核苷酸(如CTP、UTP、ATP和GTP)的水平降低到较低水平，反映出它们并入到了新合成的mRNA中。

[0201] 参考文献

[0202] 本文引用的所有参考文献均以引用方式完全并入，其并入内容与本文的明确教导不矛盾。

[0203] [1]M Baiersdorfer,G Boros,H Murumatsu,A Mahini,I Vlatkovic,U Sahin,K Kariko,一种从体外转录的mRNA中去除dsRNA污染物的束状方法(A fascile method for the removal of dsRNA contaminant from in vitro-transcribed mRNA),分子治疗:核酸(Molecular therapy:nucleic acids),15(2019)

[0204] [2]S.Urayama,Y.Yoshida-Takashima,M.Yoshida,Y.Tomaru,H.Moriyama,K.Takai,T.Nunoura,基于核酸组成和结构的使用串联柱层析的病毒基因组分级分离回收新方法(A New Fractionation and Recovery Method of Viral Genomes Based on Nucleic Acid Composition and Structure Using Tandem Column Chromatography).Microbes Environ.30,(2015)199-203.

[0205] [3]R.Franklin,RNA噬菌体R17的复制中间体的纯化和性质(Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17).Proc.Natl.Acad.Sci.USA 55,(1966)1504-1511.

[0206] [4]A Nwokeoji,AW Kung,P Kilby,D Portwood,M Dickman,使用离子对反相色谱和质谱法纯化和表征dsRNA(Purification and characterization of dsRNA using ion pair reverse phase chromatography and mass spectrometry),J.Chromatography A 1484(2017)14-25.

[0207] [5]A Nwokeoji,M Earll,P Kilby,D.Portwood,M.Dickman,使用离子对反相色谱对双链RNA进行高分辨率指纹图谱(High resolution fingerprinting of double-stranded RNA using ion-pair reversed phase chromatography),J.Chromatography B 1104(2019)212-219.

[0208] [6]K Kariko,H Muramatsu,J Ludwig,D.Weismann,产生用于治疗的最佳mRNA:HPLC纯化可消除免疫激活并改善核苷修饰的蛋白质编码mRNA的翻译(Generating the optimal mRNA for therapy:HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified,protein-encoding mRNA),核酸研究(Nucleic acid research),39(2011)e142.

[0209] [7]D.Weismann,N.Pardi,H Murumatsu,K Kariko,HPLC纯化体外转录长RNA(HPLC purification of in vitro transcribed long RNA),分子生物学方法(ethods Molecular Biology),969(2013)43-54.

[0210] [8]A Romanovskaya,LP Sarin,DH Bramford,MM Poranen,使用对流相互作用介

质单片阴离子交换柱高通量纯化双链R.N.A.分子(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.

[0211] [9]WO 2014/144767 A1

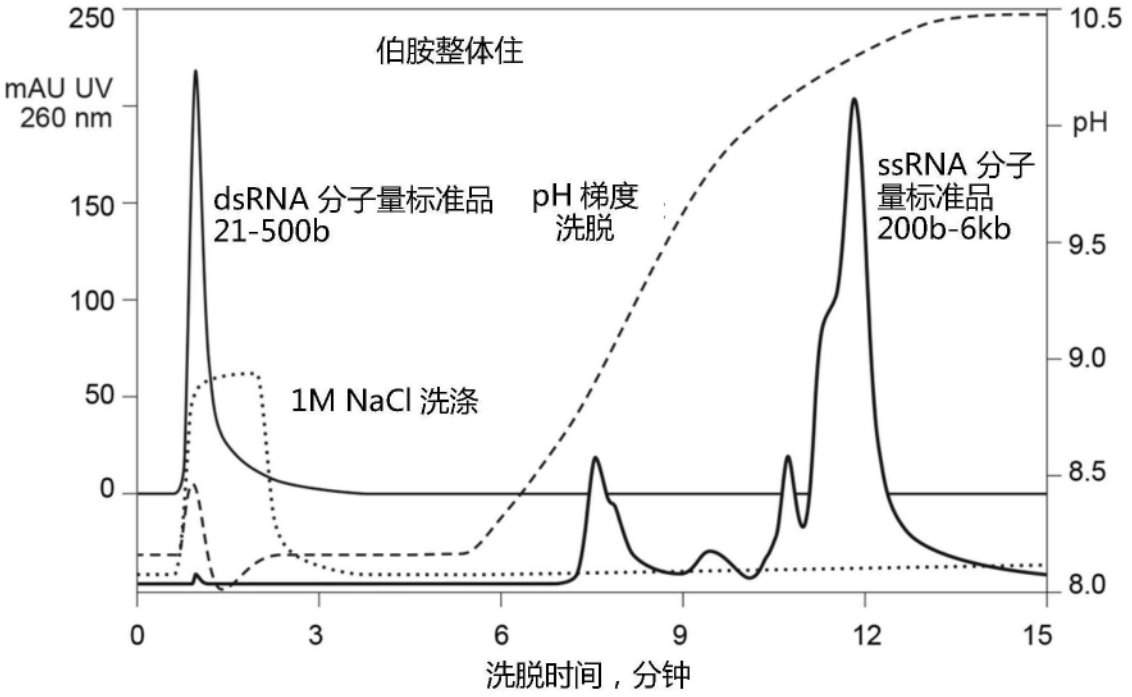

伯胺整体住
mAU UV
260 nm
250
150
100
50
0
dsRNA 分子量标准品
21-500b
pH 梯度
洗脱
1M NaCl 洗涤
ssRNA 分子
量标准品
200b-6kb
10.5
pH
9.5
9.0
8.5
8.0
0
3
6
9
12
15
洗脱时间，分钟

图1

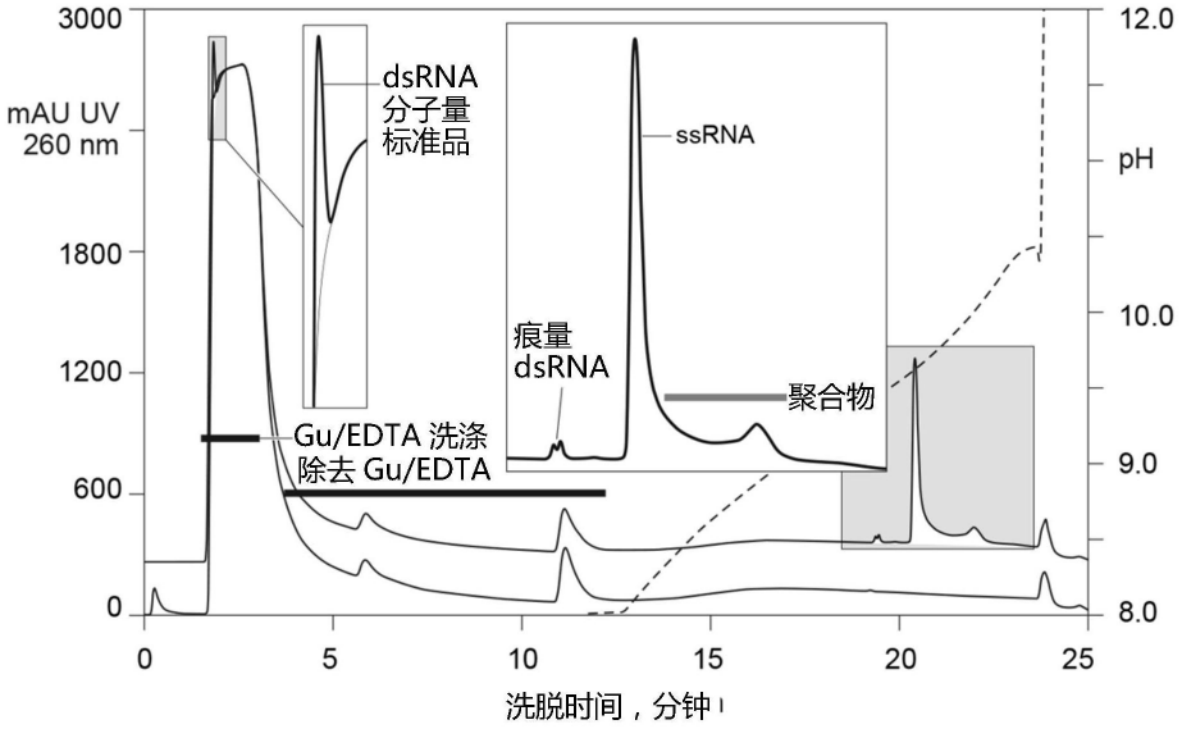

3000
mAU UV
260 nm
1800
1200
600
0
dsRNA
分子量
标准品
ssRNA
痕量
dsRNA
聚合物
Gu/EDTA 洗涤
除去 Gu/EDTA
12.0
pH
10.0
9.0
8.0
0
5
10
15
20
25
洗脱时间，分钟

图2

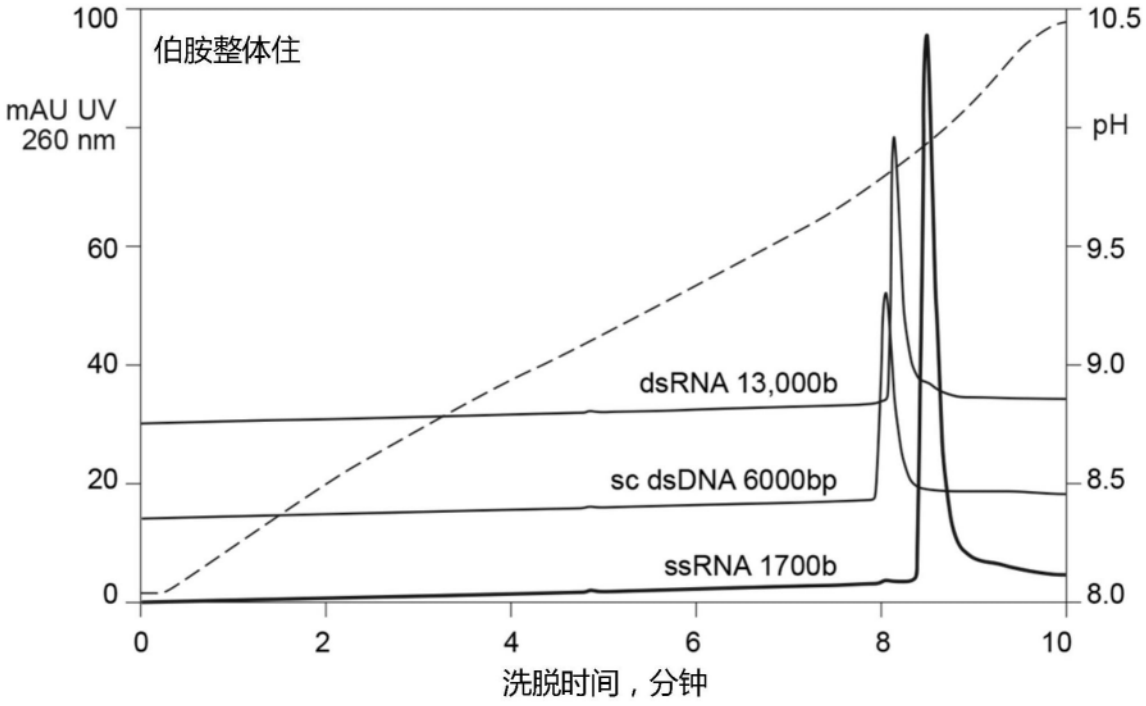

伯胺整体住
mAU UV
260 nm
pH
dsRNA 13,000b
sc dsDNA 6000bp
ssRNA 1700b
洗脱时间，分钟

图3

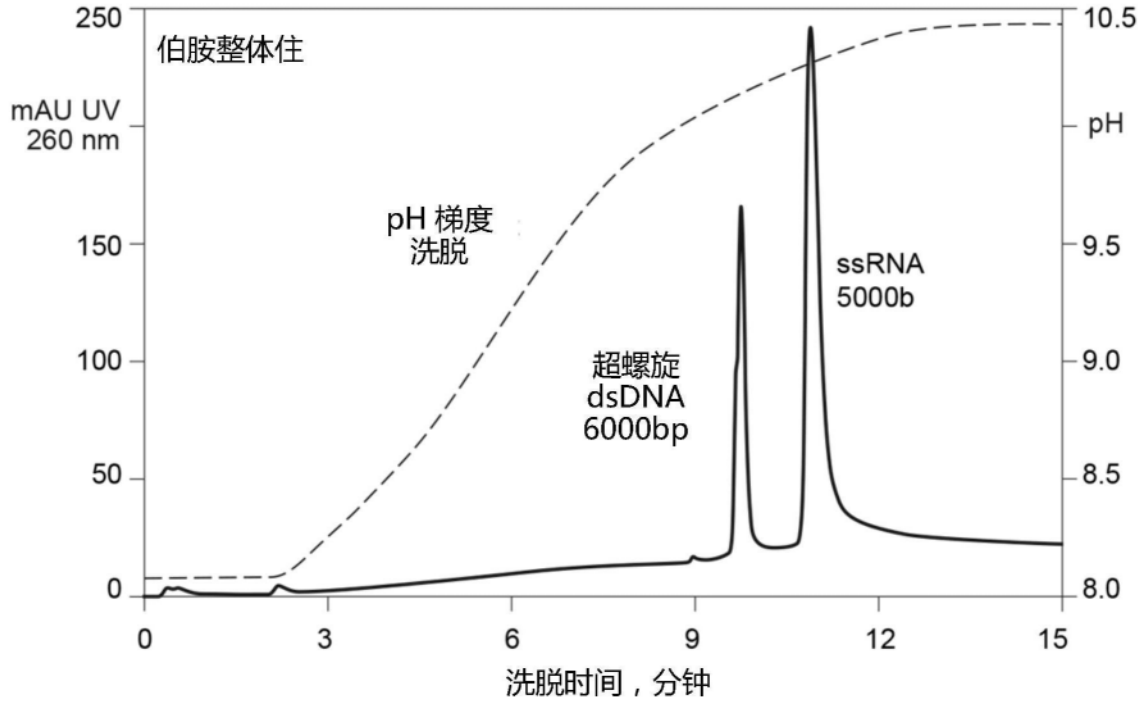

伯胺整体住
mAU UV
260 nm
pH
pH 梯度
洗脱
ssRNA
5000b
超螺旋
dsDNA
6000bp
洗脱时间，分钟

图4

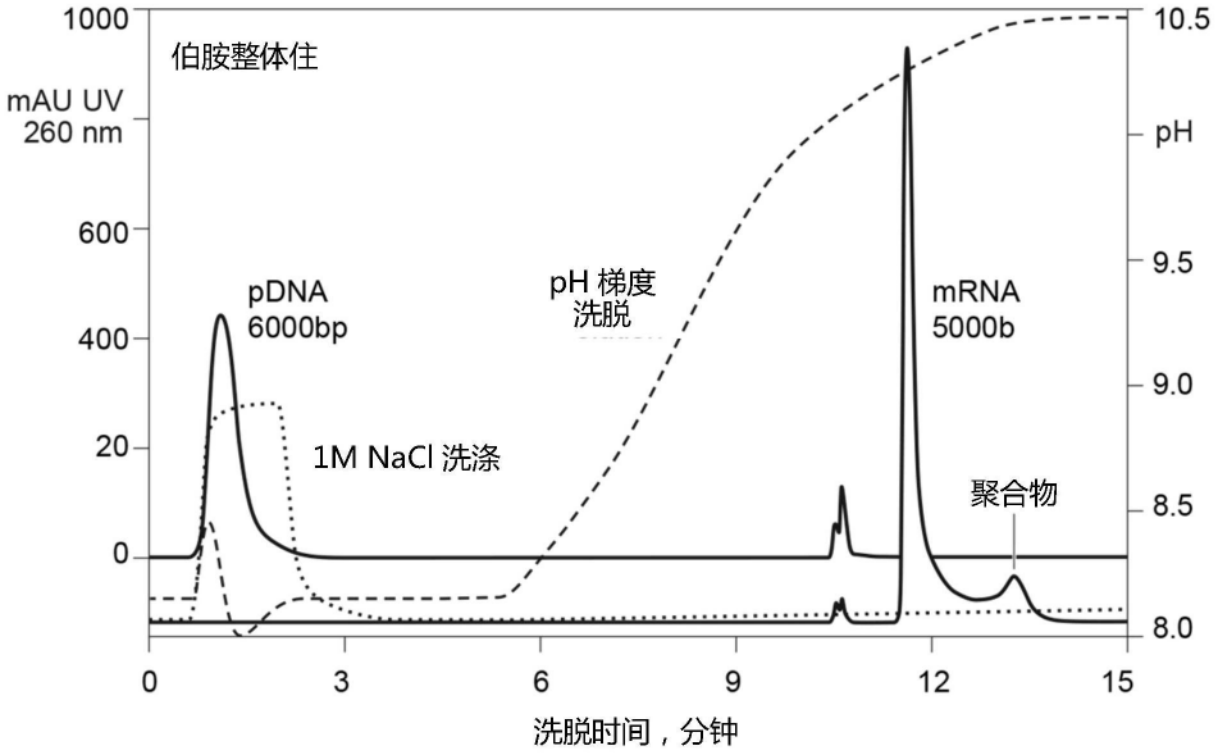

伯胺整体住
mAU UV
260 nm
1000
600
400
20
0
pDNA
6000bp
1M NaCl 洗涤
pH 梯度
洗脱
mRNA
5000b
聚合物
10.5
pH
9.5
9.0
8.5
8.0
0
3
6
9
12
15
洗脱时间，分钟

图5

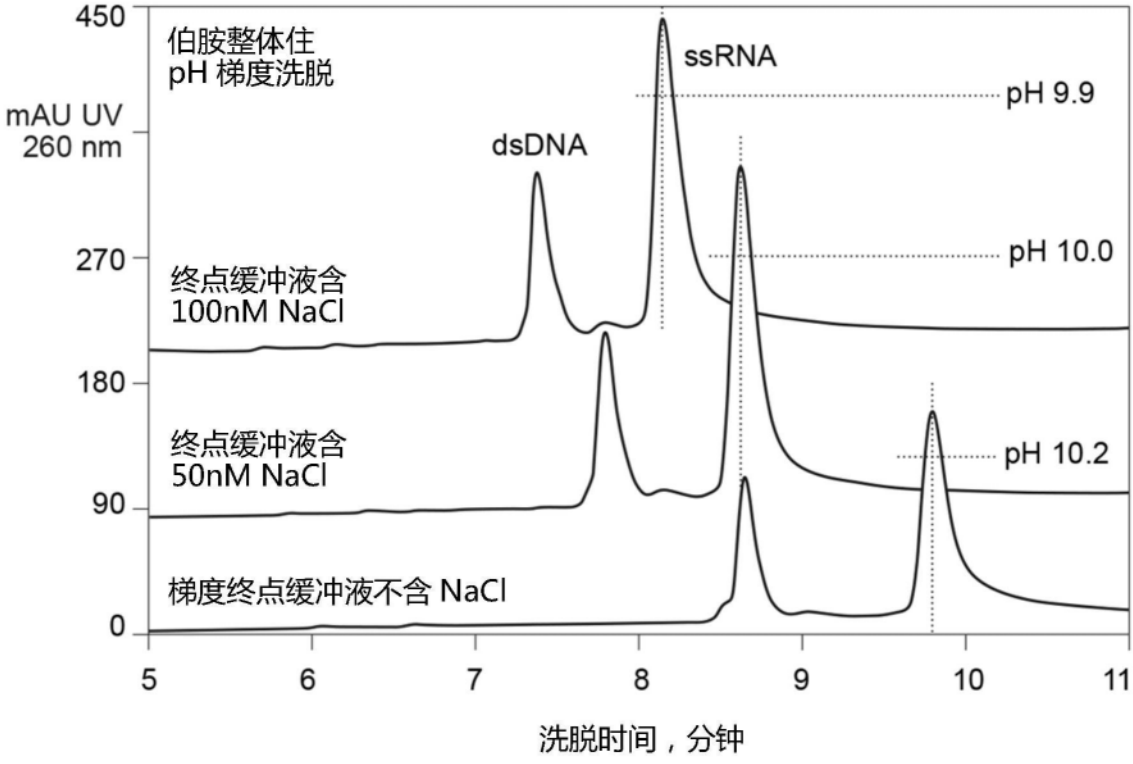

伯胺整体住
pH 梯度洗脱
mAU UV
260 nm
450
270
180
90
0
dsDNA
ssRNA
pH 9.9
pH 10.0
pH 10.2
终点缓冲液含
100nM NaCl
终点缓冲液含
50nM NaCl
梯度终点缓冲液不含 NaCl
5
6
7
8
9
10
11
洗脱时间，分钟

图6

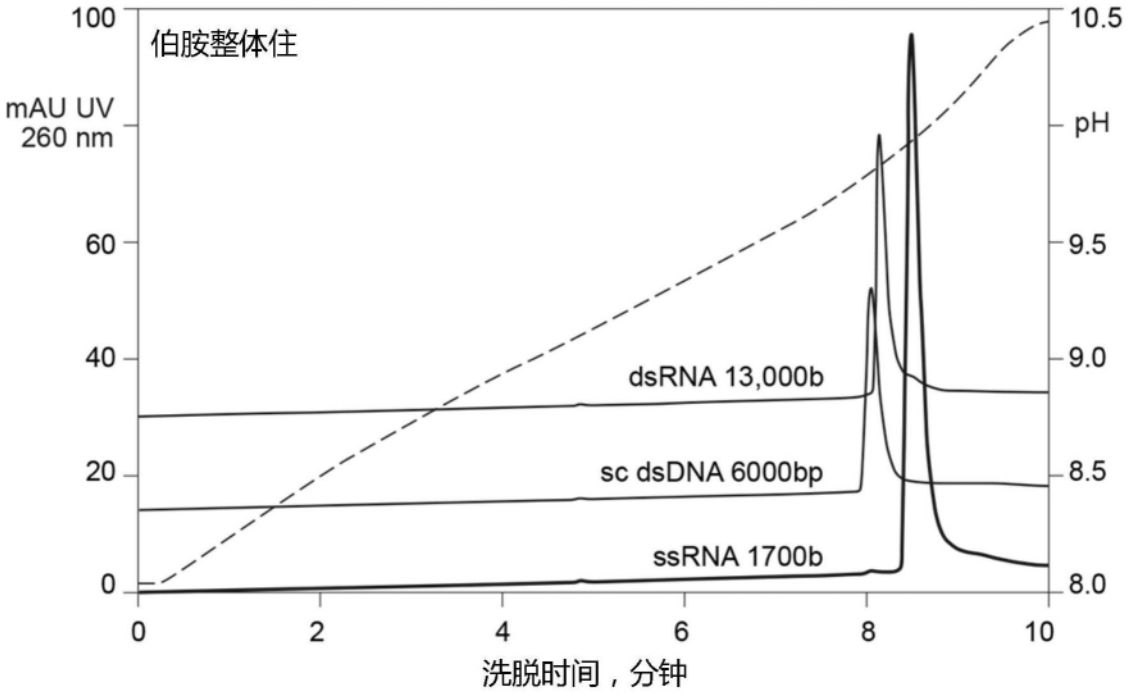

伯胺整体住
mAU UV
260 nm
pH
dsRNA 13,000b
sc dsDNA 6000bp
ssRNA 1700b
洗脱时间，分钟

图7

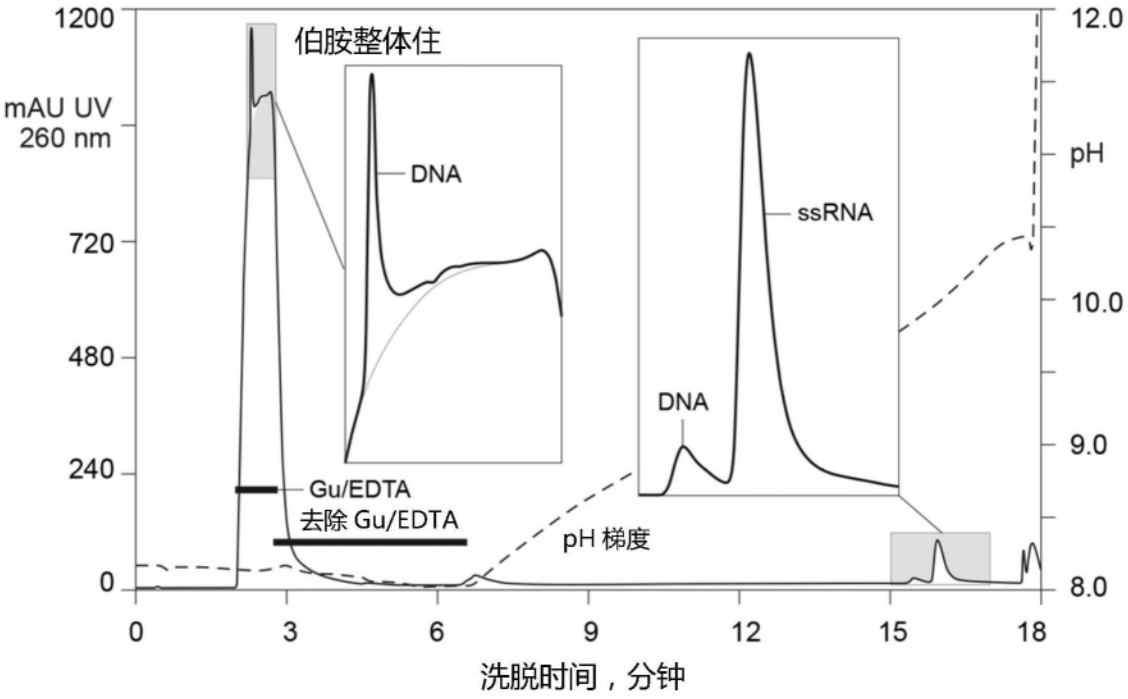

伯胺整体住
mAU UV
260 nm
pH
DNA
ssRNA
DNA
Gu/EDTA
去除 Gu/EDTA
pH 梯度
洗脱时间，分钟

图8

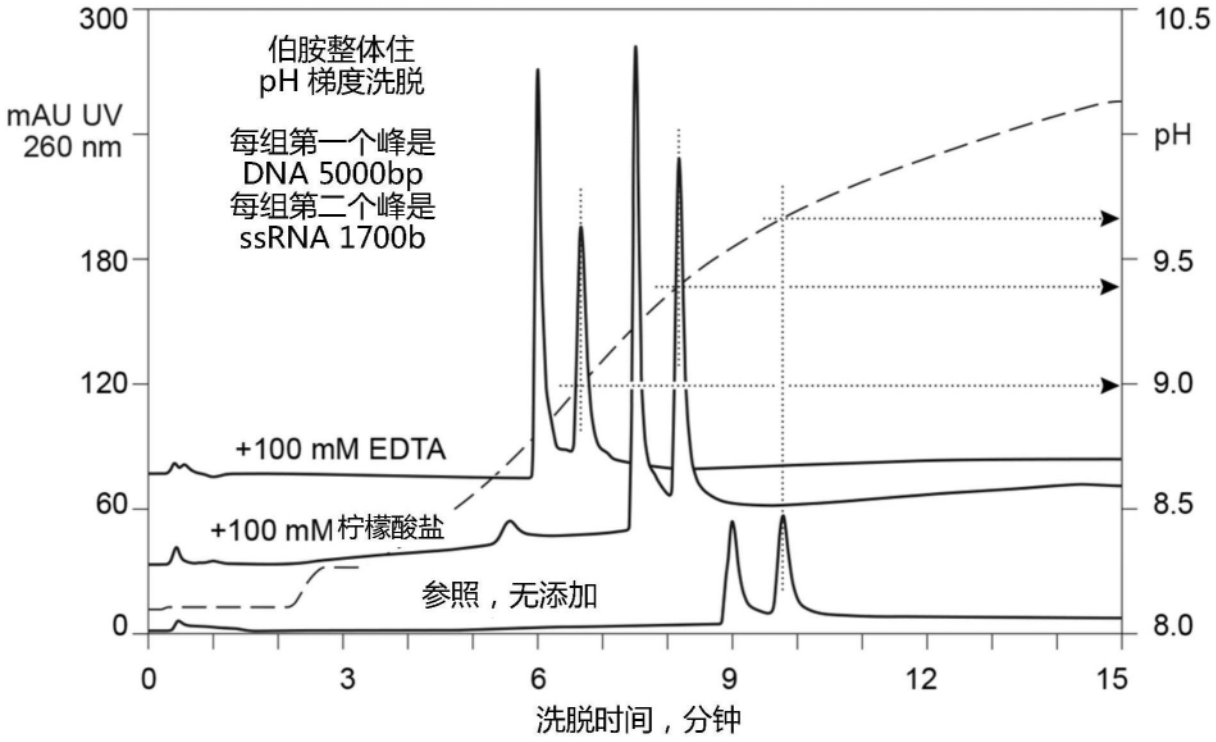

伯胺整体住
pH 梯度洗脱
每组第一个峰是
DNA 5000bp
每组第二个峰是
ssRNA 1700b
mAU UV
260 nm
pH
+100 mM EDTA
+100 mM柠檬酸盐
参照，无添加
洗脱时间，分钟

图9

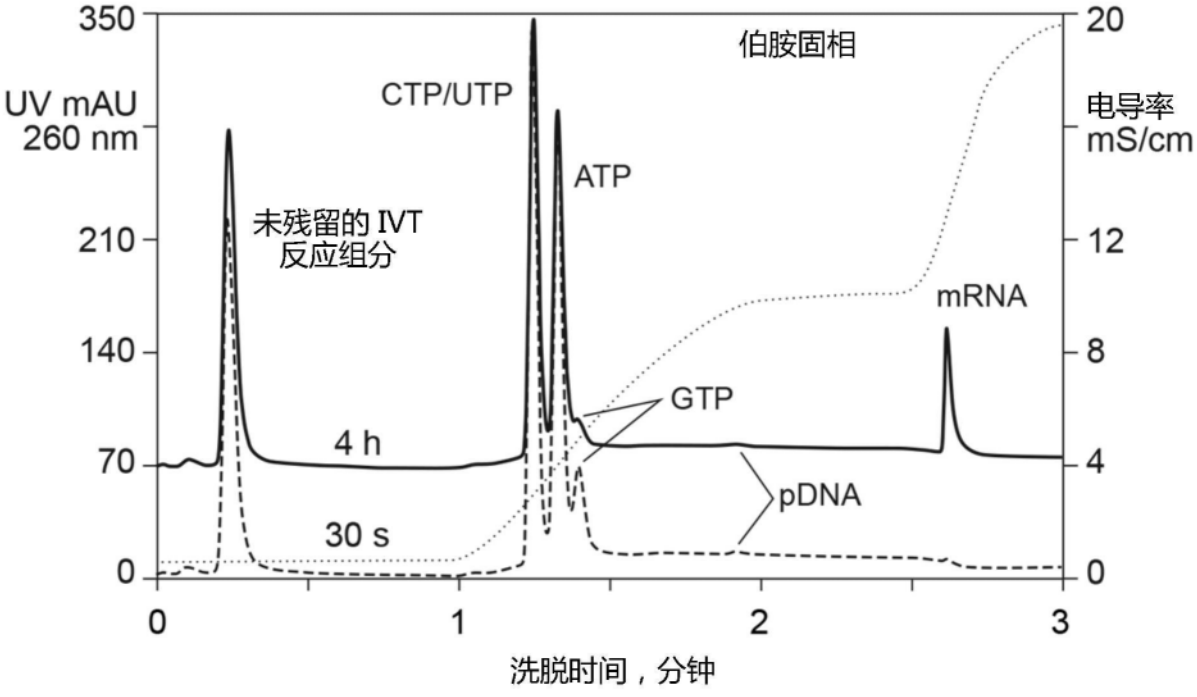

伯胺固相
UV mAU
260 nm
电导率
mS/cm
CTP/UTP
ATP
未残留的 IVT
反应组分
mRNA
GTP
4 h
pDNA
30 s
洗脱时间，分钟

图10