(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0025769
(43) 공개일자 2023년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7035727
(22) 출원일자(국제) 2021년04월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월13일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/059903
(87) 국제공개번호 WO 2021/209595
국제공개일자 2021년10월21일
(30) 우선권주장
20170205.7 2020년04월17일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
사르토리우스 비아이에이 세퍼레이션스 디.오.오.
슬로베니아, 에스아이-5270 아이도브슈치나, 미르 체 21
(72) 발명자
페르시치, 스펠라
슬로베니아 5271 비파바 돌가 폴랴나 41
체르니고이, 우르
슬로베니아 5270 아이도브슈치나 플레이스 18
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 13 항

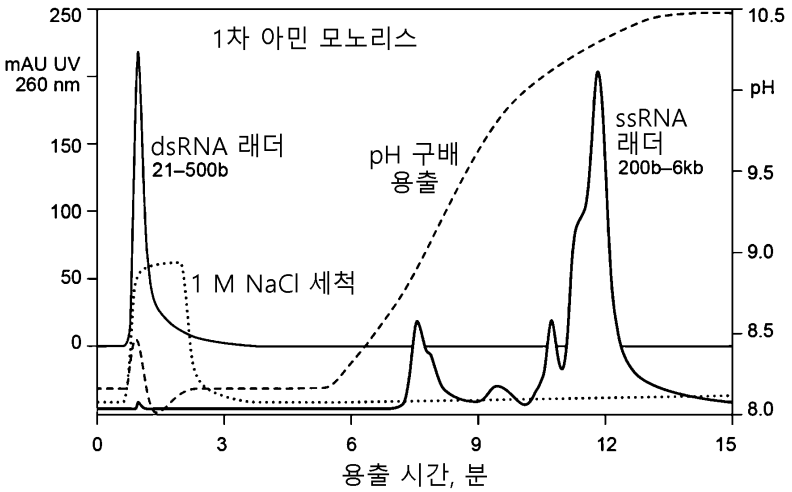
(54) 발명의 명칭 **단일 가닥 RNA 정제 방법**

(57) 요 약

- 단일 가닥 RNA에 적어도 우선적으로 결합하기에 충분한 pH 값에서, 단일 가닥 RNA를 함유한 샘플을 표면에 1차 아미노기를 주로 또는 전적으로 보유한 고체상에 적용하는 단계, 및

- 상기 고체상의 표면을 증가하는 pH에 노출시켜 상기 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계를 포함하는, 단일 가닥 RNA 정제 방법.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

돌렌, 다르코

슬로베니아 1360 브르니카 신야 고리카 48에이

가뇽, 피터 스탠리

미국 89101 네바다주 라스베가스 유닛 1811 라스베가스 블러바드 노스 150

명 세 서

청구범위

청구항 1

단일 가닥 RNA 정제 방법으로서, 상기 방법은:

- 단일 가닥 RNA에 적어도 우선적으로 결합하기에 충분한 pH 값에서, 단일 가닥 RNA를 함유한 샘플을 표면에 1차 아미노기를 주로(dominantly) 또는 전적으로(exclusively) 보유한 고체상에 적용하는 단계, 및

- 상기 고체상의 표면을 증가하는 pH에 노출시켜 상기 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 샘플을 적용하는 단계 후와 상기 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계 전에, 상기 고체상을 세척하는 적어도 하나의 단계가 단일 가닥 RNA를 용출하기 위해 사용된 용출 완충액에 비해 더 높은 이온 강도를 갖는 세척 완충액으로 제공되는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 세척하는 적어도 하나의 단계는 더 높은 이온 강도를 감소시키기 위해 제공되는 것인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플을 적용하는 단계 후와 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계 전에, 적어도 하나의 세척 단계는 단일 가닥 RNA가 고체상에 흡착된 상태를 유지하고 남아 있는 이중 가닥 RNA를 탈착시키는 증가된 pH를 갖는 세척 완충액으로 제공되는 것인, 방법.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세척 완충액의 이온 강도는 상기 단일 가닥 RNA를 용출하는데 필요한 염의 몰 농도에 비해 0.5 M 내지 12 M, 또는 1.0 M 내지 10 M, 또는 2.0 M 내지 8.0 M, 또는 4.0 M 내지 6.0 M 범위로 더 높은 이온 강도인 것인, 방법.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세척 완충액의 이온 강도는 카오트로픽 염의 농도로 조정되는데, 상기 카오트로픽 염은 특히, 구아니디늄 염, 티오시안산 염, 과염소산 염, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계는 pH 7.5 내지 pH 12.0, 또는 pH 8.0 내지 pH 11.5, 또는 pH 8.5 내지 pH 11, 또는 pH 9.0 내지 pH 10.5의 pH 범위의 pH를 갖는 용출 완충액에 의해 일어나는 것인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플을 고체상에 적용하는 단계는 약 pH 8.5보다 낮은 pH 값에서 일어나는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 혼합물에 접촉하기 전에 고체상의 표면의 환경에서, 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하기 위한 완충액에서 및/또는 샘플을 고체상에 적용하는 단계 및/또는 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계 사이에 사용되는 별도의 완충액에서, 킬레이팅제는 필수적으로 수성인 혼합물에 존재하는 것인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 킬레이팅제는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 시트르산의 염, 에틸렌 글리콜-비스(2-아미노에틸에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA), 트리스(2-아미노에틸) 아민 (TREN) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 가닥 RNA는 1000 염기 내지 25,000 염기의 크기인 것인, 방법.

청구항 12

단일 가닥 RNA 정제를 위한 표면에 1차 아미노기를 주로 또는 전적으로 포함하는 고체상의 용도.

청구항 13

제12항에 있어서, 단일 가닥 RNA는 증가하는 pH에 의해 이중 가닥 RNA로부터 정제되는 것인, 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이중 가닥 RNA 및 단일 가닥 RNA의 필수적으로 수성인 혼합물로부터 이중 가닥 RNA를 제거하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유전자 요법 적용을 위한 메신저 RNA (mRNA)의 합성은 원하는 단일 가닥 (ss) RNA 이외에 원하지 않는 이중 가닥 (ds) RNA의 하위집단들을 함유한 제제들을 생성한다. 이 dsRNA 종들은 염기-가닥 내에서 상보적인 서열들의 사슬내 상호작용에 의해 후-합성(post-synthesis)을 형성한다. dsRNA 서열들의 형성은 또한 이웃 ssRNA 분자들 간의 상보적 서열들과 쌍을 이루어, 사슬내 ds 서열들 또한 함유할 수 있는 비특이적인 사슬내 이량체 및 고차 다량체를 생성하는 것에 의해 일어날 수 있다. 이중 가닥 RNA는 대상체에 주입될 때 원하지 않는 잠재적으로 치명적인 면역 반응을 일으키므로, 이의 제거를 정제의 특정한 대상으로 삼았다.

[0003] mRNA 제제로부터 dsRNA 함량을 제거하는 방법은 공지되어 있다. dsRNA 오염의 수준은 셀룰로오스 기반의 크로마

토그래피 매질에서 친화성-흡착 크로마토그래피에 의해 감소될 수 있다 [1-3]. 흡착의 정확한 메커니즘은 규정되지 않았지만, dsRNA는 특정 조건 하에서 결합하는 반면에, ssRNA는 통과했다. 이 방법은 간단하고 실험실 규모에서 효과적이지만, 매우 낮은 용량(capacity)으로 인해 부담이 된다. 낮은 용량은 제조 규모에서 큰 컬럼 부피에 대응하며, 큰 완충액 부피, 큰 제조 영역, 및 제조 시설의 생산성을 저하시키는 연장된 공정 시간을 필요로 한다. 이 방법은 또한 처리된 ssRNA의 희석을 유발하고, 후속 정제 단계에 부담을 주는 생성물 부피 증가에 대응한다.

[0004] dsRNA의 수준은 대안적으로는 스티렌-디비닐-벤젠(styrene-divinyl-benzene; SDVB) 고체상을 사용한 역상 크로마토그래피(reverse phase chromatography; RPC)에 의해 감소될 수 있다 [4-7]. RPC는 화재 및 폭발의 위험을 완화시키기 위해 산업 규모에서 매우 비싼 가격의 특수 장비를 필요로 하는 독성 가연성 유기 용매를 사용한다. RPC는 또한 작업 환경에서 유기 용매 및 유해 폐기물 처리 문제와 관련이 있기 때문에 안전 문제의 추가 부담을 부과한다. 용매 문제 외에, RPS 분리는 최상의 결과를 얻기 위해 상승된 온도를 필요로 하는 추가 부담을 안고 있다.

[0005] 음이온 교환 크로마토그래피는 작은 mRNA (< 1000 염기)의 정제에 대한 유용성을 나타냈다 [8]. 현재까지 평가된 음이온 교환 매질은 4차 아민 (quaternary amine; QA) 교환기를 나타내는 소위 강한 음이온 교환기를 포함한다. 소위 약한 음이온 교환기, 특히, 3차 아민 리간드를 사용한 디에틸아미노에틸 (DEAE) 음이온 교환기 또한 평가되었다.

[0006] 음이온 교환 크로마토그래피는 큰 mRNA (1,000-10,000 염기)로부터 DNA 및 단백질 오염 물질을 제거하는데 제한된 유용성을 나타냈고, 상승된 작동 온도에서만 유용성을 나타냈다 [9]. 65℃까지 상승된 온도는 염화 나트륨 구배에서 큰 mRNA의 용출을 가능하게 한다. 하지만, 완충액, 샘플, 및 컬럼은 모두 공정의 전체 기간 동안 지정된 작동 온도로 사전 평형화되고 정확하게 유지되어야 하며, 생성물의 제조 수명 동안, 잠재적으로는 수년간, 모든 배치에 걸쳐 재현가능해야 하기 때문에, 고온 작업은 복합적인 실행 계획상의 부담을 부과한다.

[0007] 단백질들은 pH가 감소함에 따라 더 전기음성적이고 덜 전기음성적으로 되어, 결국 음이온 교환기와의 결합을 중단시키는 효과를 갖기 때문에, 감소하는 pH 구배에 의해 음이온 교환기로부터 용출되는 것으로 알려져 있다. 이 접근은 RNA에 작동되지 않고 작동할 수도 없는데, 이는 RNA의 전하 특성은 약 2.6 to pH 13.0에서 균일하게 유지되기 때문이다. pH를 증가시켜 음이온 교환기로부터 생체 분자들을 용출하는 것은 작동하지 않는 것으로 알려져 있는데, 이는 이들을 더 강하게 결합시키기 때문이다. 단백질들은 증가하는 pH 구배에 의해 양이온 교환기로부터 용출될 수 있지만, 이 방법은 ssRNA 및 dsRNA 둘 모두 양이온 교환기에 결합하지 않기 때문에 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는데 유용하지 않다.

발명의 내용

[0008] **요약**

[0009] 공지된 방법들보다 개선된, ssRNA를 갖는 혼합된 제제로부터 dsRNA를 제거하기 위한 신규한 방법이 개발되었다. 이는 모든 크기의 mRNA에 적합하지만, 특히, 1,000-25,000 염기 범위의 크기와 같은, 큰 mRNA 및 매우 큰 mRNA에 적합하다. 이 방법은 상승하는 pH 구배에 의해, 1차 아미노 고체상에 결합된 ssRNA 및 dsRNA의 분리를 가능하게 한다. ssRNA는 dsRNA보다 높은 pH에서 용출된다. 이 방법은 크기에 따른 ssRNA의 분획화를 허용한다.

[0010] 본 발명에 따르면, 단일 가닥 RNA 정제 방법이 청구되며, 하기 방법은:

[0011] - 단일 가닥 RNA에 적어도 우선적으로 결합하기에 충분한 pH 값에서, 단일 가닥 RNA를 함유한 샘플을 표면에 1차 아미노기를 주로(dominantly) 또는 전적으로(exclusively) 보유한 고체상에 적용하는 단계, 및

[0012] - 상기 고체상의 표면을 증가하는 pH에 노출시켜 상기 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계를 포함한다.

[0013] 본 발명의 방법의 일 구현예에서, 샘플을 적용하는 단계 후와 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계 전에, 단일 가닥 RNA를 용출하기 위해 사용된 용출 완충액에 비해 더 높은 이온 강도를 갖는 세척 완충액으로 고체상을 세척하는 적어도 하나의 단계가 제공될 수 있다.

[0014] 본 발명의 방법의 또 다른 구현예에서, 세척하는 적어도 하나의 단계는 더 높은 이온 강도를 감소시키기 위해 제공될 수 있다.

[0015] 본 발명의 방법의 추가 구현예에서, 샘플을 적용하는 단계 후와 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계 전에, 적어도

하나의 세척 단계는 단일 가닥 RNA가 고체상에 흡착된 상태를 유지하고 남아 있는 이중 가닥 RNA를 탈착시키는 증가된 pH를 갖는 세척 완충액으로 제공될 수 있다.

[0016] 세척 단계들은 샘플을 고체상에 적용하는 단계 후에 2개의 후속 세척 단계들로 조합될 수 있다.

[0017] 본 발명의 방법의 또 다른 구현예에서, 세척 완충액의 이온 강도는 단일 가닥 RNA를 용출하는데 필요한 완충액의 이온 강도에 비해 0.5 M 내지 12 M, 또는 1.0 M 내지 10 M, 또는 2.0 M 내지 8.0 M, 또는 4.0 M 내지 6.0 M의 범위로 더 높은 이온 강도로부터 선택될 수 있다. NaCl이 사용되는 경우, 이온 강도는 용액의 몰 농도에 대응한다. 예를 들면, ssRNA가 용출되는 대응하는 이온 강도가 2.0 M 미만일 때, 세척 완충액의 이온 강도는 2.5 M일 수 있다. 또 다른 예시에서, ssRNA가 용출되는 이온 강도가 0.5 M일 때, 세척 완충액의 이온 강도는 1.0 M일 수 있다.

[0018] 일반적으로, 세척 완충액의 몰 농도는 0.51 M 내지 12.0 M의 범위에 있는 반면에, ssRNA가 용출되는 몰 농도는 0.01 M 내지 0.5 M의 범위에 있다.

[0019] 본 발명의 방법의 또 다른 구현예에서, 세척 완충액의 이온 강도는 카오트로픽 염(chaotropic salt)의 농도로 조정될 수 있는데, 상기 카오트로픽 염은 구아니디늄 염, 티오시안산 염, 과염소산 염, 및 이들의 조합들로부터 선택된다.

[0020] 본 발명의 방법의 추가 구현예에서, 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계는 pH 7.5 내지 pH 12.0, 또는 pH 8.0 내지 pH 11.5, 또는 pH 8.5 내지 pH 11, 또는 pH 9.0 내지 pH 10.5의 pH 범위의 pH를 갖는 용출 완충액에 의해 일어날 수 있다.

[0021] 본 발명의 방법의 추가 구현예에서, 샘플을 고체상에 적용하는 단계는 약 pH 8.5 미만의 pH 값에서 일어날 수 있다.

[0022] 본 발명의 방법의 추가 구현예에서, 수성 혼합물에 접촉하기 전에 고체상의 표면의 환경에서, 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하기 위한 완충액에서 및/또는 샘플을 고체상에 적용하는 단계 및/또는 고체상의 표면으로부터 단일 가닥 RNA를 용출하는 단계 사이에 사용되는 별도의 완충액에서, 킬레이팅제는 필수적으로 수성인 혼합물(essentially aqueous mixture)에 존재할 수 있다..

[0023] 본 발명의 방법의 또 다른 구현예에서, 킬레이팅제는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 시트르산의 염, 인산, 또는 에틸렌 글리콜-비스(2-아미노에틸에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA), 트리스(2-아미노에틸)―아민 (TREN) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0024] 일반적으로, 단일 가닥 RNA는 1,000 염기 내지 25,000 염기 범위의 크기이다.

[0025] 본 발명의 대상은 또한 단일 가닥 RNA 정제를 위한 표면에 1차 아미노기를 주로 또는 전적으로 포함하는 고체상의 용도이다. 특히, 단일 가닥 RNA는 증가하는 pH에 의해 이중 가닥 RNA로부터 정제 또는 분리될 수 있다.

[0026] 이 방법의 놀라운 성질은 다양한 수준에서 선행 기술과 반대되는 교시를 한다는 사실로 강조된다. 공개된 기술은 주위 온도에서 강한 (QA) 및 약한 (DEAE) 음이온 교환기로 큰 dsRNA로부터 큰 ssRNA를 분리하는 것이 불가능하다고 교시한다.

[0027] 증가하는 pH에 의해 임의의 음이온 교환기로부터 임의의 생체 분자 종들을 용출하는 것은 불가능한 것으로 간주되는 것은 본 발명의 두 번째 놀라운 특성을 강조한다. 이는 수십년 동안 당업계에 공지된 기본 원리를 위반한다. 그 원리는 산성 용해물 (알짜 음전하)이 증가하는 pH에서 강한 음이온 교환기에 더 강하게 결합한다는 것이다. 음이온 교환기들이 pH 구배로 용출되는 드문 경우에, 음이온 교환기들은 전적으로 하강하는 pH 구배로 용출된다: 이는 본 발명의 방법과 반대된다.

[0028] 본 발명은 당업계에 전례 없는 세 번째 놀라운 특성을 구현한다. 예비 데이터는 pH 구배에 의해 1차 아미노 고체상으로부터 ssRNA를 용출하는 것은 크기에 따라 ssRNA 종들을 분류하며, 더 큰 ssRNA 종들을 용출하는데 더 큰 pH 값이 필요한 것을 입증한다. 놀랍게도, dsRNA 종들 간의 크기 구별은 비교적 열악하다.

[0029] 본 발명은 또한 당업계에 전례 없는 네 번째 놀라운 특성을 구현한다. 실험 데이터는 dsRNA가 ssRNA가 동일한 표면에서 거동하는 것과 동일한 방식으로 1차 아미노 고체상과 상호작용하지 않음을 나타낸다. 이는 주어진 시험관 내 전사 혼합물에서 ssRNA 및 dsRNA가 조성적으로 동일하고, 동일한 서열에서 동일한 수의 뉴클레오티드 염기들을 가지고 있기 때문에 예상치 못한 것이다. 놀랍게도, 다양한 염은 원하는 ssRNA를 용출하지 않으면서 1차 아미노 고체상으로부터 대부분의 dsRNA를 치환(displacing)할 수 있다. 더 놀랍게도, ssRNA는 심지어 공지된

공격적 카오트로픽 염의 극도로 높은 농도에서도 용출되지 않는다.

[0030] 상승하는 pH 구배로 용출되는 1차 아미노 고체상의 역설적 거동; 전통적인 음이온 교환기에 기초한 예측을 위반한 이유, ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는 방법, 또는 ssRNA의 크기 분획화를 달성하는 방법을 설명하는 이론은 아직 개발되지 않았다.

[0031] ssRNA를 용출하기 앞서 dsRNA를 단순히 치환하는 것을 넘어서, 고염 세척은 ssRNA 및 단백질 및 DNA와 같은 오염 물질 사이에 안정한 복합체를 해리시킬 수 있는 독특한 기회를 제공한다. 이는 이제야 인식되기 시작한 분야의 주요 과제에 대한 해결책을 제공한다. 핵산은 오염 물질과 안정한 복합체로 자주 존재한다. 이러한 복합체들 중 일부는 순수한 핵산과 동일하거나 거의 동일한 조건 하에서 용출된다. 따라서, 이 복합체들은, 독립적인 오염 물질들의 특성들이 이러한 가능성을 배재해야 함에도 불구하고, 순수한 ssRNA 용출 분획이어야 하는 것에 오염 물질들을 몰래 가지고 오는 트로이 목마를 나타낸다. 해리시키는 고염 세척은 이러한 오염 물질 경로를 중단시키는 가능성을 제공한다. 이 접근의 복합체-해리 가능성(complex-dissociative potential)은 NaCl과 같은 중성 염보다 더 강한 해리 가능성를 구현하는 구아니딘과 같은 카오트로픽 염으로 킬레이팅제의 존재로 향상된다. 복합체-해리 가능성은 킬레이팅제의 존재로 인해 더 향상될 수 있다.

[0032] 고염 화학적 환경에서 오염 dsRNA가 1차 아미노 고체상에 결합하지 못하는 것은 친화성 크로마토그래피로서 당업계에 공지된 기술과 경쟁하는 작업 흐름 단순화(workflow simplification)를 가능하게 한다. 친화성 크로마토그래피는 항체와 같은 이중특이적 리간드가 고체상에 공유결합으로 부착되는 기술이다. 해당 항체의 표적을 보유한 오염된 샘플이 고체상에 적용되면, 오직 표적 분자만이 포획되고 오염 물질들은 컬럼을 통과하여 제거된다. 컬럼을 세척하여 미량 수준의 원하지 않은 종들을 세정한 후에, 표적 분자는 단일 고 정제 분획으로 용출된다. 본 발명의 경우에서, dsRNA 및 ssRNA를 함유한 샘플은 중성 pH에서 고염(high salt)으로 로딩된다. 대부분의 dsRNA는 고체상을 통과한다. 고 정제 ssRNA는 증가하는 pH에 의해 농축된 분획으로 용출된다.

[0033] 당업자는 이 작업 흐름 단순화가 본 발명의 기본 구성에 사용된 동일한 원리를 사용하는 작은 절차적 변경을 나타내고, 그 원리는 고농도의 염의 존재 하에서 1차 아미노 고체상에 의해 dsRNA가 결합되지 않는 것임을 이해할 것이다.

[0034] 본 발명의 마지막 놀라운 특징은 RNA와 조성이 다른 오염 물질들의 용출 거동이 ssRNA와는 다르지만, dsRNA와 유사하게 용출된다는 것이다. 이러한 오염 물질들은 단백질 및 DNA를 포함하고, 이들 모두 pH 구배에서 ssRNA보다 일찍 용출된다. 이들 대부분은 또한 상승하는 pH 구배에 의해 ssRNA로부터 이들의 미량 잔류물들을 분리하기 앞서 고체상에 적용된 염들에 의해 제거된다.

[0035] **본 발명의 일반적인 설명**

[0036] 일반적인 측면에서, 본 발명은 이중 가닥 메신저 RNA (dsRNA) 및 단일 가닥 메신저 RNA (ssRNA)의 혼합물을 함유한 제제로부터 이중 가닥 메신저 RNA (dsRNA)를 제거하는 고체상 추출 방법이다. 이는 크기에 따라 ssRNA 종들을 분리하는 방법과 추가로 관련이 있다.

[0037] 구체적인 측면에서, 본 발명은 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것, 및/또는 크기에 따라 ssRNA 종들을 분리하는 것에 관한 것이며, 이때, dsRNA 및 ssRNA는 1차 아미노 고체상에 비공유결합 상호작용으로 결합된다.

[0038] 또 다른 구체적인 측면에서, 본 발명은 상승하는 pH 구배에 의해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것에 관한 것이며, 이때, dsRNA는 ssRNA보다 낮은 pH 값에서 용출된다. 더 작은 ssRNA 종들이 더 큰 ssRNA 종들보다 낮은 pH 값에서 용출된다.

[0039] 보다 구체적인 측면에서, 본 발명은 pH 3.5 내지 pH 11.5, 또는 pH 4.5 내지 pH 11.5, pH 5.5 내지 pH 11.5, pH 6.5 내지 pH 11.5, 또는 pH 7.5 내지 pH 11.5, 또는 pH 8.5 내지 pH 11.5, 또는 pH 8.5 내지 pH 11.0, 또는 pH 8.5 내지 pH 10.5, 또는 pH 8.5 내지 pH 10.0, 또는 pH 8.5 내지 pH 9.5, 또는 pH 8.5 내지 pH 9.0의 범위, 또는 상기보다 높은 범위, 또는 낮은 범위, 또는 중간 범위에 걸친 pH 구배에 관한 것이다. 특정한 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는데 필요한 값 또는 상이한 크기의 ssRNA 종들을 분획화하는데 필요한 값은 이들 각각의 크기에 따라 달라질 것이기 때문에, pH의 범위가 특정된다.

[0040] 일 구현예에서, pH 값은 특정한 범위에 걸쳐 연속적으로 증가하여 소위 선형 구배를 형성할 수 있다. 관련된 일 구현예에서, pH는 분리된 단계로 불연속적으로 증가하여, 소위 단계 구배(step gradient)를 형성할 수 있다. 또 다른 관련된 구현예에서, 구배는 단일 단계로 이루어질 수 있다.

[0041] 또 다른 구현예에서, 증가하는 pH에 의한 용출은 ssRNA의 회수를 증가시키는 목적을 위해 염들의 존재 하에서

수행될 수 있다. 이러한 일 구현예에서, 염 종들은 10 mM 내지 250 mM, 또는 20 mM 내지 200 mM, 또는 50 mM 내지 100 mM 범위의 농도에서 염화 나트륨일 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, 염 종들은 유사한 범위 내의 농도에서 염화 칼륨, 유사한 범위 내의 농도에서 구아니딘-HCl, 또는 유사한 범위 내의 농도에서 구아니딘 티오시아네이트일 수 있다. 용출 동안에 염들을 포함시키는 것은 또한 더 낮은 pH 값에서 ssRNA가 용출되도록 한다.

[0042] 또 다른 측면에서, 본 발명은 1차 아미노 고체상에 결합된 ssRNA가 킬레이팅제로 세척되는 방법에 관한 것이다.

[0043] 일 구현예에서, 킬레이팅제는 2 mM 내지 200 mM, 또는 5 mM 내지 100 mM, 또는 10 mM 내지 50 mM, 또는 20 mM 내지 25 mM, 또는 상기보다 낮은 범위, 또는 중간 범위, 또는 최대 포화까지의 높은 범위의 농도에서 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)일 수 있다. 밀접하게 관련된 구현예에서, 킬레이팅제는 상기 EDTA에 대해 기재된 동일한 범위의 농도에 걸쳐 시트르산, 또는 인산, 또는 에틸렌 글리콜-비스(2-아미노에틸에테르)-N,N,N′ ,N′ -테트라아세트산 (EGTA), 또는 트리스(2-아미노에틸)아민의 염, 또는 또 다른 킬레이팅제, 또는 킬레이팅제들의 혼합물일 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 구현예에서, 킬레이팅제로 처리하는 것은 하기 중 어느 하나를 포함할 수 있다: 샘플에 킬레이팅제 첨가, 샘플을 금속 이온-무함유 완충액으로 완충액 교환, 샘플을 킬레이팅된 완충액으로 완충액 교환, 및 pH 용출 동안을 포함하여, 방법의 단계들을 수행하기 위해 금속 이온-무함유 완충액 또는 킬레이팅된 완충액 사용.

[0045] 일 측면에서, 본 발명은 dsRNA 및 ssRNA의 분리에 관한 것이며, 이때, 증가하는 pH에 의해 dsRNA 및 ssRNA의 최종 분리를 수행하기 앞서 1차 아미노 고체상은 dsRNA의 아집단을 제거하기 위해 염들로 세척된다. 모든 이러한 구현예들에서, 세척 동안의 염의 농도는 용출 동안에 존재하는 염의 농도보다 높다.

[0046] 일 구현예에서, 증가하는 pH에 의해 용출하기 앞서 고체상을 세척하기 위해 사용된 염은 최대 포화까지를 포함하여, 임의의 농도에서 염의 임의의 종들일 수 있다. 염이 약 5.0 M에서 포화하는 염화 나트륨인, 이러한 일 구현예에서, 염의 농도는 10 mM 내지 5 M, 또는 50 mM 내지 5 M, 또는 100 mM 내지 5 M, 또는 500 mM 내지 5 M, 또는 1 M 내지 5 M, 또는 2 M 내지 5 M, 또는 3 M 내지 5 M, 또는 4 M 내지 5 M의 범위, 또는 중간 범위에 있을 수 있으나, 바람직하게는 1 M 내지 5 M의 범위에 있을 수 있다. 밀접하게 관련된 일 구현예에서, 염은 염화 칼륨일 수 있다. RNA가 염화 나트륨 또는 염화 칼륨과 같은 중성 염들의 높은 농도에 의해 침전될 수 있기 때문에, 염화 리튬과 같은 다른 중성 염들에 의해서도 침전될 수 있음이 인식될 것이다. 샘플 적용 동안 또는 용출 동안에 RNA를 침전시키는 것은 고체상 크로마토그래피 장체를 통한 완충액의 흐름을 방해할 가능성이 높기 때문에 매우 바람직하지 않다는 것이 추가로 인식될 것이다. 엄밀히 말해서, 이는 염 세척이 샘플 로딩 후에 수행되고 용출에 앞서 과량이 염들이 제거되는 경우에, 문제가 되지 않아야 하지만, 비-RNA-침전 염들을 대신에 사용함으로써 이 문제를 완전히 방지하는 것이 종종 바람직할 것이다.

[0047] RNA-침전 염들이 비-RNA-침전 염들로 대체되는 일 구현예에서, 염은 약 6 M에서 포화하는 구아니디늄 염산염과 같은 카오트로픽 염이고, 농도는 10 mM 내지 6 M, 또는 50 mM 내지 6 M, 또는 100 mM 내지 6 M, 또는 500 mM 내지 6 M, 또는 1 M 내지 6 M, 또는 2 M 내지 6 M, 또는 3 M 내지 6 M, 또는 4 M 내지 6 M, 또는 5 M 내지 6 M의 범위, 또는 중간 범위의 값일 수 있지만, 바람직하게는 3 M 내지 4 M의 범위일 수 있다. 염이 약 12 M에서 포화하는 구아니딘 티오시안산 염과 같은 카오트로픽 염인 밀접하게 관련된 일 구현예에서, 농도는 10 mM 내지 12 M, 또는 50 mM 내지 12 M, 또는 100 mM 내지 12 M, 또는 500 mM 내지 12 M, 또는 1 M 내지 12 M, 또는 2 M 내지 12 M, 또는 3 M 내지 12 M, 또는 4 M 내지 12 M, 또는 5 M 내지 12 M, 또는 6 M 내지 12 M, 또는 7 M 내지 12 M, 또는 8 M 내지 12 M, 또는 9 M 내지 12 M, 또는 10 M 내지 12 M, 또는 11 M 내지 12 M의 범위, 또는 중간 범위의 값일 수 있으나, 바람직하게는 1.5 M 내지 3.0 M의 범위일 수 있다. 이 두 염들의 예시로부터 다른 염들이 최대 포화점을 넘지 않는 범위에서 유사하게 사용될 수 있음이 명백해질 것이다.

[0048] 일 구현예에서, 킬레이팅제들은 염들과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 염들 및/또는 킬레이팅제들로 처리하는 것은 하기 중 어느 하나를 포함할 수 있다: 샘플에 염들 및 킬레이팅제들 첨가, 샘플을 염- 및/또는 킬레이팅제-함유 완충액으로 완충액 교환, ssRNA의 용출을 포함하여, 방법의 단계들을 수행하기 위해 염- 및/또는 킬레이팅제-함유 완충액 사용. 일부 이러한 구현예에서, 염들의 종들, 킬레이팅제들, 및 이들 각각의 농도는 방법의 각 단계에서 달라질 수 있다.

[0049] 일부 구현예에서, dsRNA는 샘플을 고농도의 구아니딘 티오시안산 염과 같은 비-RNA-침전 염과 EDTA와 같은 킬레이팅제로 평형화함으로써 ssRNA로부터 분리될 수 있다. 고체상은 동일한 농도의 구아니딘 티오시안산 및 EDTA를 함유한 완충액으로 평형화될 수 있다. 샘플을 고체상에 적용하는 동안에, 대부분의 dsRNA는 고체상에 결합하지 못한다. 동일한 농도의 구아니딘 티오시안산 및 EDTA로 세척하는 단계가 끝나면, dsRNA는 미량 수준으로 감소된

다. 이어서, 구아니딘 티오시안산 및 EDTA는 이들을 함유하지 않는 완충액으로 시스템 밖으로 세척된다. 임의의 남아 있는 dsRNA는 증가하는 pH 구배에서 ssRNA로부터 분리된다.

[0050] 일부 목적을 위해 정제된 ssRNA의 양을 분리하는 목적인 예비 구현예에서, pH 9 이상에 접근하는 pH 값에 노출하는 것을 최소화하기 위해 pH 용출 후 곧바로 ssRNA의 pH를 중화시키는 것이 흔히 가장 바람직할 것이다. 실험 데이터는 본 발명의 방법을 수행하는데 필요한 기간 동안에만 알칼리성 조건에 노출된 ssRNA는 본래의 조성을 유지하고 무기한으로 안정한 상태를 유지함을 나타낸다. 필수적으로 즉각적인 중화는 분획을 중화 용액으로 수집하는 것에 의해 수행될 수 있다. 급속 중화는 분획 수집 후에 즉시 중화 용액을 첨가하는 것에 의해 대안적으로 수행될 수 있다. 중화는 또한 분획 수집 후에 크로마토그래피 또는 정용여과(diafiltration)를 포함하는 완충액 교환 방법들에 의해 수행될 수 있다. 모든 이러한 방법들은 흔히 실시되고 당업계, 예를 들면, 샘플의 용출 후 pH 중화가 일상적인 친화성 크로마토그래피 분야에서 익히 공지되어 있다

[0051] 본 발명의 방법은 당업계에 관례적인 임의의 장치를 사용하여 실시될 수 있으며, 예를 들면, 1차 아미노 고체상은 크로마토그래피 장치에 배치될 수 있다. 일반적으로, 고체상 표면은 모노리스(monolith), 패킹된 입자의 컬럼, 패킹된 나노섬유의 컬럼, 멤브레인 흡착기, 또는 하이드로겔, 기타 크로마토그래피 포맷의 형태로 있을 수 있다.

[0052] 본 방법은 분석적 또는 예비적(preparative) 적용을 수행할 목적으로 사용될 수 있다. 이는 모든 mRNA들에 적용될 수 있지만, 특히, 1,000 내지 25,000 염기 범위의 크기에서 가치가 있다. 특정 크로마토그래피 조건들은 RNA의 크기 및 적용된 샘플의 오염 물질 분포에 따라 달라질 수 있다. 임의의 특정한 ssRNA 종들에 대한 최상의 분석적 또는 예비적 결과를 달성하기 위해 특정 조건들을 조정하는 것은 수십년 동안 크로마토그래피 분야의 실무자들에게 알려진 실험 기술과 동일한 실험 기술을 사용한다.

[0053] 본 발명의 방법은 임의의 단일 처리 방법에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 높은 정도로 ssRNA를 정제하기 위한 하나 이상의 추가 처리 방법들이 선행되거나, 뒤따르거나, 둘 다일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 주위 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 염화 나트륨 단계에 의해 dsRNA를 제거하여, 1차 아미노 고체상을 이용해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것을 도시한다.

도 2는 주위 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 6 M 구아니딘 단계에 의해 dsRNA를 제거하여, 1차 아미노 고체상을 이용해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것을 도시한다.

도 3은 주위 온도에서 pH 구배에서 ssRNA가 강한 음이온 교환기 및 약한 음이온 교환기로부터 용출되지 못하는 것을 도시한다.

도 4는 주위 온도에서 pH 구배에 의해 1차 아미노 고체상을 이용해 ssRNA로부터 플라스미드 DNA를 분리하는 것을 도시한다.

도 5는 주위 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 염 단계에 의해 DNA를 제거하여, 1차 아미노 고체상을 이용해 ssRNA로부터 플라스미드 DNA를 분리하는 것을 도시한다.

도 6은 주위 온도에서 염을 pH 구배 용출과 조합하는 것이 DNA 및 ssRNA의 분리에 미치는 영향을 도시한다.

도 7은 주위 온도에서 pH 구배에 의해 1차 아미노 고체상에서 작은 ssRNA로부터 큰 DNA 및 매우 큰 dsDNA를 분리하는 것을 도시한다.

도 8은 주위 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 조합된 킬레이터-카오트로프 단계에 의해 DNA를 제거하여, 1차 아미노 고체상을 이용해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것을 도시한다.

도 9는 킬레이팅 염을 포함하는 것에 의해 pH 구배에서 ssRNA가 용출되는 pH가 감소되는 것을 도시한다.

도 10은 1차 아미노 고체상과 상이한 시점에서의 시험관 내 전사 반응의 모니터링을 도시하며, 염의 존재 하에서 pH 구배로 용출되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 용어 1차 아미노 고체상은 표면(들)에 주로 또는 전적으로 1차 아미노 리간드들을 보유하는 크로마토그래피를 수행하기에 적합한 고체상을 지칭한다. 용어 "1차 아미노 고체상 " 또는 "1차 아미노기들을 보유한 고체상" 또

는 "1차 아민-보유 고체상" 또는 "1차 아미노-보유 고체상" 또는 "1차 아민 고체상"은 동의어이고 상호교환적으로 사용된다. 2차 아민은 고체상의 표면에 부재하거나 소량으로 존재해야만 한다. 3차 및 4차 아민은 부재하거나 매우 소량을 나타낸다. 음으로 하전된 잔기는 존재하지 않아야 한다. 비전하 소수성 잔기 또는 수소 결합 잔기는 존재할 수 있다.

[0056] 용어 "1차 아미노기"는 2개의 수소 원자 각각에 단일 공유결합으로 연결되고 탄소 원자에 단일 공유결합으로 연결된, 질소를 기술한다. 1차 아미노기는 이의 탄소 원자를 통해 고체상에 직접 공유결합으로 연결될 수 있다. 대안적으로는, 1차 아미노기는 고체상에 공유결합으로 연결된 소위 스페이서 암(spacer arm)에 대한 탄소 원자의 공유결합 부착에 의해 고체상에 간접적으로 연결될 수 있다. 1차 아미노기는 또한 폴리머의 반복 서브유닛들이 1차 아미노기들인, 고체상에 공유결합으로 연결된 폴리머 구조의 일부일 수 있다.

[0057] 고체상은 하나 이상의 다공성 멤프레인, 하나 이상의 섬유, 하나 이상의 다공성 입자 또는 비-다공성 입자, 또는 모노리스 고체상 형태의 크로마토그래피 고체상을 지칭할 수 있으며, 상기 모노리스 고체상은 단일 폴리머 혼합물로부터 합성된 모노리스, 또는 거대-골격(macro-skeleton)으로 먼저 합성된 모노리스 및 그 상단에 합성된 2차 리간드-보유 폴리머 상을 나타내는 소위 하이드로겔 (소위 하이드로겔)을 포함한다. 임의의 이러한 고체상 물질들은 크로마토그래피의 수행을 용이하게 하기 위해 하우징(housing)에 제공될 수 있다. 하우징에서 크로마토그래피 고체상은 일반적으로 크로마토그래피 장치, 흔히 컬럼으로 지칭된다.

[0058] 1차 아미노기를 보유한 크로마토그래피 고체상들은 공지되어 있고 상업적으로 이용가능하다. 일 예시는 Tosoh Biosciences에서 제조된 Toyopearl NH2-750F이라는 이름으로 판매되고 있으며, 이때, “NH2”는 1차 아민을 지칭한다. [www.separations.eu.tosohbioscience.com/solutions/process-media-products/by-mode/ion-exchange/anion-exchange/toyopearl-nh2-750f]. 판매되는 물질에 따르면 1차 아민기는 폴리아민의 형태임을 나타내는데, 이는 고체상에 공유결합으로 부착된 1차 아민 서브유닛이 반복된 폴리머임을 의미한다. 이러한 폴리머들은 일반적으로 1차 아미노기들 중 하나 이상을 통해 고체상의 표면에 연결되어 있다. 이 연결은 연결 아미노 잔기를 1차 아미노기에서 2차 아미노기로 전환하여, 고체상의 표면에 1차 아미노기 및 2차 아미노기의 혼합물을 생성하는 효과를 가진다.

[0059] 또 다른 예시는 Sartobind STIC PA라는 이름으로 Sartorius에서 제조된 것이며, 이때, “PA”는 1차 아민을 지칭한다 [www.sartorius.com/shop/ww/en/usd/sartobind-stic®-pa/c/M_Sartobind_STIC_PA]. 판매되는 물질에 따르면, 1차 아미노기는 폴리머의 형태, 특히, 폴리알릴아민의 형태임을 나타내는데, 고체상에 공유결합으로 부착된 1차 아미노 서브유닛이 반복되어 있다. 앞선 제품과 같이, 이러한 폴리머들은 일반적으로 하나 이상의 일차 아민기를 통해 고체상의 표면에 연결된다. 이 연결은 연결 아미노 잔기를 1차 아미노기에서 2차 아미노기로 전환하여, 고체상의 표면에 1차 아미노기 및 2차 아미노기의 혼합물을 생성하는 효과를 가진다.

[0060] 음이온 교환기를 포함하여 표면에 아민 유도체들을 갖는 크로마토그래피 고체상 제조 제품의 모든 주요 상업적 제조업체들은 정기적으로 또는 실험적으로 1차 아민기들을 주로 보유한 양으로 하전된 고체상을 생산하기 위한 당업계의 필요 지식 및 자원들을 나타낸다.

[0061] 1차 아민기들을 보유한 크로마토그래피 고체상들이 이들의 조성을 명확히 또는 완전히 나타내는 방식으로 명명되지 않을 수 있다는 점을 고려할 때, 주어진 크로마토그래피 고체상이 본 발명을 실시하기에 적절한 특징을 갖는지 결정하기 위한 간단한 분석적 방법을 갖는 것이 유용할 것이다. 이 결정을 하기 위한 하나의 간단한 방법은 문제의 크로마토그래피 고체상을 50 mM Tris, pH 7.5와 같은 완충액으로 평형화한 다음에, 각각 상이한 크기를 갖는 RNA 분자들의 아집단들을 함유한 소위 ssRNA 래더로 이루어진 샘플을 주입하는 것이다. 이러한 RNA 래더들은 일반적으로 50 내지 500 염기, 또는 100 내지 1000 염기, 또는 200 내지 6000 염기 또는 일부 다른 범위의 크기를 포함(cover)하며, Thermo Scientific 및 New England BioLabs와 같은 일반적인 공급업체로부터 상업적으로 제공된다. 샘플 주입 후에, 결합되지 않은 샘플 성분을 치환하기 위해 평형 완충액으로 간단히 세척하고, pH 7.5에서 약 pH 11까지의 선형 pH 구배로 1차 아미노 크로마토그래피 장치를 용출한다. 1차 아미노 고체상은 도 1에 도시된 바와 같이 크기가 증가하는 순서로 ssRNA 종들을 용출할 것이다. ssRNA가 용출되지 않거나 오직 가장 작은 종들만이 용출되는 경우, 이는 고체상에 2차 아미노기, 3차 아미노기, 및 4차 아미노기 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함하는, 비-1차 아민기들의 과도한 비율이 함유되어 있음을 나타내는 가능성이 있다.

[0062] 용어 "RNA 크기" 또는 "RNA의 크기"는 뉴클레오티드 가닥에서 염기들의 수를 지칭한다. 염기들은 일반적으로 “b”로 표시된다. 따라서, 100b라는 명칭은 뉴클레오티드 100개의 염기들의 RNA 가닥을 지칭한다. RNA 크기는 단일 가닥 (ssRNA) 및 이중 가닥 (dsRNA)을 나타내는 RNA 구조와 독립적이다. mRNA 합성 동안 생성된, 시약 및 생

성물 및 부산물의 혼합물을 나타내는 주어진 시험관 내 전사 혼합물은 ssRNA 및 dsRNA 둘 모두를 함유할 수 있으나, 둘 모두는 동일한 DNA 플라스미드로부터 유래하기 때문에 염기의 수와 관련하여 동일한 크기일 것이다. 일부 경우에, ssRNA 가닥들은 전단 응력(shear stress) 또는 효소 용해를 통한 처리(processing) 동안에 클리핑(clipping) 또는 절단되어, 이전의 완전한 가닥의 단편 하위집단들을 형성할 수 있다. 다른 경우에서, 불완전한 전사로부터 절단된 형태들이 가정적으로 발생될 수 있다. 공급원이 무엇이든, 크기에 따라 ssRNA를 분획화하는 본 발명의 방법의 능력은 원하지 않은 단편 형태들의 제거를 위한 도구를 제공한다.

[0063] 용어 "평형화된" 또는 "평형화"는 특정 화학적 환경을 생성하기 위해 고체상 및/또는 샘플에 수행되었던 화학적 컨디셔닝(chemical conditioning) 단계를 지칭한다. 고체상들은 관례적으로 원하는 pH 및 염 조성을 구현하는 완충액에 노출되어 컨디셔닝된다. 샘플들은 관례적으로 pH의 적정, 때때로 염 농도를 줄이기 위한 희석, 및 때때로 크로마토그래피, 또는 투석, 또는 접선 유동 여과 멤프레인을 이용한 정용여과를 포함하는 완충액 교환 기술들에 의해 컨디셔닝된다. 모든 이러한 방법들 및 이들 중 하나를 선택하는 기준은 수십년 동안 당업계에 알려져 있다.

[0064] 용어 "로딩" 또는 "샘플 적용"은 평형화된 샘플을 1차 아미노기들을 주로 보유한 평형화된 양으로 하전된 고체상과 접촉시키는 과정을 지칭한다. 이는 일반적으로 외력, 예컨대, 중력 또는 펌핑(pumping)에 의해 샘플을 장치에 통과하도록 하여 크로마토그래피 장치로 수행된다.

[0065] 용어 "흡착(adsorption)"은 생물학적 생성물을 화학적으로 상보적인 표면에 결합시키는 과정을 지칭한다. 흡착은 모세관의 물리적 작용을 통해 스펀지에 의해 물을 흡수하는 것과 유사하지만, 화학적 상호작용을 포함하지 않는 “흡수(absorption)”와 구별된다. 이 경우에 상보성은 정전기적 전하를 포함하는 것으로 이해된다. RNA의 표면상의 음의 정전기적 전하는 표면상의 1차 아미노기로 인해 전기양성으로 처리된 고체상의 표면에의 흡착을 매개한다. 크로마토그래피 고체상에의 생물학적 생성물의 흡착은 흔히 보다 친숙한 용어 “결합(binding)”으로 지칭된다.

[0066] 용어 "선택적 흡착"은 적어도 하나의 종의 흡착을 허용하는 반면에, 하나 이상의 다른 종의 흡착은 방지하는 조건을 의미한다. 이 경우에, 작동 조건은 dsRNA의 결합은 방지하는 반면에, ssRNA가 결합하는 것은 허용하도록 조정될 수 있다.

[0067] 용어 "탈착"은 생물학적 생성물을 이전에 흡착되었던 화학적으로 상보적인 표면으로부터 방출시키는 과정을 지칭한다. 본 발명의 방법의 경우, ssRNA의 탈착은 일반적으로 적어도 pH 9.0, 또는 pH 9.5의 알칼리 pH 값, 또는 pH 10.0 이상의 알칼리 pH 값을 필요로 할 것이다. 염들은 일반적으로 염의 부재일 때보다 낮은 pH에서 주어진 ssRNA 종들의 용출을 달성하는 효과와 함께, 탈착을 향상시키는데 사용될 수 있다. 하지만, 임의의 농도에서 어떠한 염 또는 염들의 조합도 산성 또는 중성 pH에서 큰 ssRNA의 용출을 달성하지 못한다.

[0068] 용어 "선택적 탈착"은 하나 이상의 다른 종들이 여전히 흡착되는 조건의 변화에 의해 하나 이상의 흡착된 종들이 고체상으로부터 방출되는 상황을 지칭한다. 이어서, 고체상 표면으로부터 다른 아집단(subset)의 종들을 방출하기 위해 다른 조건 세트가 적용될 수 있다. 이러한 일 경우에서, 대부분의 dsRNA는 중성 또는 거의 중성의 pH에서 높은 농도의 염의 적용에 의해 1차 아미노 고체상으로부터 제거될 수 있는 반면에, ssRNA는 여전히 결합되어 있다. 이러한 dsRNA가 선택적으로 탈착되었다고 말할 수 있다. ssRNA는 가능하게는 염의 존재 하에서, 알칼리 pH에서 후속 단계로 선택적 탈착될 것이다.

[0069] 용어 "세척된"은 장치 내 공극 또는 채널으로부터 결합되지 않은 종들을 치환시키기 위해 로딩된 컬럼을 세척 완충액에 노출시키는 과정을 지칭한다. 이 문맥에서, 용어 "세정된"은 동일한 의미를 가진다. 대부분의 기본적인 경우, 세척 완충액은 평형 완충액과 동일한 조성을 가지고 있다. 보다 복잡한 구성에서, 세척 완충액은 고체상으로부터 약하게 결합된 오염 물질들의 아집단을 화학적으로 방출시켜 원하는 생성물이 용출되기 전에 이들을 제거할 수 있는 추가 역할을 가질 수 있다. 또는, 첫 번째는 평형 완충액과 동일한 조건을 사용하지만, 두 번째는 고체상으로부터 약하게 결합된 오염 물질들의 아집단을 치환하여 용출 전에 아들이 제거될 수 있는 조건을 사용하는, 하나 초과의 세척 단계가 있을 수 있다. 세척은 또한 상이한 또는 보다 조절된 조건 세트 하에서 용출을 가능하게 하는 완충액으로 전환(transition)시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 오염 물질-치환 고-염 세척 후, 무-염(no-salt) pH 증가 구배에서 ssRNA를 용출하기 위한 조건을 설정하기 위해 무염(no-salt) 세척을 수행하는 것이 바람직할 수 있다. 이 세척이 없으면, 용출은 초기값으로 고염에서 시작하여, 염 농도는 감소하는 반면에, pH는 상승하는 구배가 생성된다.

[0070] 용어 "용출"은 크로마토그래피의 분야와 관련된 용어” 탈착” 의 특별한 경우를 나타낸다. 이는 로드 및 세척 단

계 후에 여전히 결합된 종들과 1차 아미노 고체상 사이에서 상호작용의 해리를 유발하기 위해 고체상이 존재하는 화학적 환경을 변화시키는 과정을 지칭한다. dsRNA가 고체상으로부터 제거되면, ssRNA는 pH의 단순한 증가, 또는 염과 함께 pH의 증가로 인해 용출될 수 있다.

[0071] 용출은 하나의 단계 또는 일련의 단계들로 수행될 수 있는데, 이때, 각 단계는 고체상 및 ssRNA 사이의 상호작용 힘을 감소시킨다. 조건의 변화는 또한 연속 또는 선형 방식으로 이루어질 수 있으며, 약하게 결합된 종들은 연속체(continuum)에서 초기에 탈착되는 반면에, 강하게 결합된 종들은 연속체에서 나중에 용출된다. 단계 형식 또는 선형 형식이든, 작동 조건의 변화는 일반적으로 구배, 특히 용출 구배로 지칭된다. 단계 구배들은 흔히 더 편리한 것으로 간주되지만, 선형 구배는 더 나은 재현성을 지원한다.

[0072] 용어 "주위 온도"는 일반적으로 표현 “실온” 또는 “상온”과 유사한 것으로 간주된다. 이는 일반적으로 약 20-22℃의 범위의 온도에 대응하지만, 약 18-25℃와 같은 더 넓은 범위 또한 포함할 수 있다.

[0073] 용어 "카오트로픽 염"은 이의 구성 이온들 중 적어도 하나가 Hofmeister 시리즈의 리오트로픽 이온들(Lyotropic ions) 및 카오트로픽 이온들에서 높은 카오트로픽 순위를 갖는 염 종들을 지칭한다. 리오트로픽 이온들은 Hofmeister 시리즈의 한쪽 끝에 있다. 카오트로픽 이온들은 이 시리즈의 반대쪽 끝에 있다. 카오트로픽 이온들은 흔히 생체 분자들에 의해 우선적으로 결합되는 것으로 기술된다. 카오트로픽 염들은 생체 분자들 내 및 생체 분자들 사이의 비-공유결합 상호작용을 완화하는 효과를 가지는데, 때때로 전체 구조를 불안정화하고 다성분 비공유결합 혼합물에서 각 성분들 사이의 상호작용을 해리하는 정도로 완화하는 효과를 가진다. 이들은 일반적으로 가용성을 증가시키는 효과를 갖는다. 카오트로픽 염의 예시들은 구아니디늄 염, 티오시안산 염, 및 과염소산 염 등을 포함한다. 일부 경우에서, 특정한 염의 음이온 및 양이온 모두 구아니딘 티오시아네이트의 경우와 같이 강한 카오트로픽이다. 이러한 염들은 오직 카오트로픽 음이온 또는 카오트로릭 양이온만을 포함하는 염들보다 더 높은 카오트로픽 잠재력(chaotropic potential)을 가진다. 리오트로픽 이온들은 Hofmeister 시리즈의 반대쪽 끝에 있다. 이들은 흔히 생체 분자들에 의해 우선적으로 배제되는 것으로 기술된다. 리오트로픽 이온들은 혼합물들의 개별 성분 사이의 비-특이적인 결합을 선호하여 생체 분자들을 안정화하는 효과를 가진다. 강한 리오트로픽 이온들은 일반적으로 큰 생체 분자들의 가용성을 감소시킨다. 리오트로픽 염의 예시들은 황산 암모늄, 인산 칼륨, 및 시트르산 나트륨 등을 포함한다. Hofmeister 시리즈에서 중간을 나타내는 염들은 생체 분자에 대한 안정성, 결합-해리, 또는 가용성에 중간 정도의 영향을 미치거나 거의 영향을 미치지 않는 경향이 있다. 예시들은 염화 나트륨 및 염화 칼륨과 같은 소위 중성 염들을 포함한다. 중성 염들이 안정성, 결합-해리, 또는 가용성에 영향을 미칠 수 있는 정도에서, 이들의 영향은 주로 쿨롱 (정전기) 힘을 통해 매개된다.

[0074] 용어 "다가 금속 양이온"은 이온의 알짜 전하가 2 이상인 양으로 하전된 금속의 이온 형태를 지칭한다. 다가 금속 양이온은 칼슘, 마그네슘, 및 아연을 포함하며, 이들 모두 2+의 알짜 전하를 갖고, 유사하거나 상이한 이온가를 갖는 다른 것들 중에 3+의 알짜 전하를 갖는 제3철을 포함한다. 모든 이러한 이온들은 핵산에 친화성을 가지며, 배위 결합을 통해 핵산에 결합한다. 배위 결합은 이온 결합 보다 15-60배 더 강하며, 이는 핵산 또는 다른 생체 분자에의 다가 금속 양이온의 결합이 심지어 포화 농도의 염에서도 지속됨을 의미한다. 다가 금속 양이온들은 dsRNA 서열들의 형성을 촉진하거나 기존 dsRNA 서열들을 안정화할 수 있기 때문에 RNA 정제에 문제가 될 수 있다. 이들은 다중 RNA 분자들 사이, RNA 및 DNA 분자 사이, 및 RNA, DNA, 및 단백질 오염 물질 사이에서 복합체의 형성을 촉진하거나 기존 복합체 (결합)를 안정화할 수 있다.

[0075] 본 발명의 방법의 맥락에서, 용어 "킬레이팅제"는 다가 금속 양이온과 이러한 강한 배위 결합을 형성하는 능력을 갖는 분자를 지칭하며, mRNA를 비롯한 핵산을 포함하는 생체 분자와의 이전의 결합으로부터 금속 이온들을 경쟁적으로 제거할 수 있다.

[0076] 용어 "뉴클레아제" 또는 "뉴클레아제 효소"는 핵산들의 사슬들을 절단하는 능력을 갖는 단백질들을 지칭하며, 이상적으로는 개별 뉴클레오티드, 이중(doublet), 또는 삼중 (triplet)으로 절단한다. 이들은 2개의 주요 부류들이 있다: DNA를 용해시키는 DNAse 효소들, 및 RNA를 용해시키는 RNAase. RNAse들은 ssRNA 생성물을 파괴하므로 엄격히 피해야 한다. DNAse들은, mRNA를 생성하는데 사용하는 DNA 플라스미드 주형을 파괴함으로써 정제를 단순화하는데 흔히 사용된다. DNAse 효소들은 적절히 기능하기 위해 다가 금속 양이온 보조-인자의 사용을 자주 필요로 한다. 다가 금속 양이온은 앞서 논의된 바와 같이 RNA 정제를 방해할 수 있다.

[0077] 용어 "프로테아제" 또는 "프로테이나제(proteinase)" 또는 "단백질분해 효소"는 다른 단백질들을 작은 단편들로 절단하는 능력을 갖는 단백질을 지칭한다. 이는 때때로 단백질 오염으로 인해 부담이 지워질 수 있는 크로마토그래피 단계들에 앞서 단백질 오염을 줄이는 방법으로 사용된다. 많은 프로테아제들, 예컨대, 트립신은 적절히 기능하기 위해 다가 금속 이온 보조-인자를 필요로 한다. 다가 금속 양이온들은 앞서 언급한 바와 같이 RNA 정

제를 방해할 수 있다. 이 목적으로 사용되는 프로테아제들은 다가 금속 이온 보조-인자의 부재 하에서도 우수한 결과를 제공하는 프로테이나제 K(proteinase K)를 포함한다.

[0078] 본 방법을 수행하는 동안 염을 포함하기로 한 결정은 원하거나 필요한 경우 후속 분석 방법 또는 정제 단계를 선택하는데 있을 수 있다. 예를 들면, 후속 방법이 염을 허용하지 않는 경우, 염의 부재 하에서 또는 간섭을 피하기에 충분히 낮은 염 농도에서 1차 아미노기를 주로 보유한 양으로 하전된 고체상으로부터 ssRNA를 용출하는 것이 유리할 것이다. 후속 방법이 염의 허용이 높은 경우, 장치의 용출은 후속 단계에 의해 허용되는 염 종들의 상당한 농도를 사용할 수 있다.

[0079] 일 구현예에서, pH 구배 종점에서 50 mM NaCl을 포함하는 것은 종점 완충액에서 NaCl이 부재한 것보다 더 낮은 pH에서 ssRNA가 용출되도록 한다. 오직 구배 종점 완충액에만 50 mM NaCl이 존재하는 것은 전적으로 pH 구배에서 용출하기 보다는, ssRNA가 NaCl 증가 및 pH 증가의 동시 구배에 의해 용출되는 것을 시사한다. 밀접하게 관련된 일 구현예에서, pH 구배 종점 완충액에서100 mM NaCl을 포함하는 것은 구배 종점 완충액이 50 mM NaCl을 포함할 때보다 낮은 pH에서 RNA가 용출되도록 한다. 두 경우 모두에서, 구배 종점 완충액에 NaCl이 포함되는 경우, ssRNA의 회수가 상당히 증가한다. dsDNA 및 ssRNA 사이의 분리는 0 mM NaCl에서 가장 넓다. 이는 종점 완충액이 50 mM NaCl을 함유할 때 감소하고, 종점 완충액이 100 mM NaCl을 함유할 때 더 감소하지만, 분리는 100 mM에서 여전히 우수하다. 카오트로픽 염들, 및 킬레이팅 염들을 포함하는 다른 염들의 유사한 농도들로 대체될 수 있다.

[0080] 일 구현예에서, pH 구배 용출은 크기에 따라 ssRNA 종들을 분리하기 위해 수행될 수 있으며, 더 작은 종들은 더 큰 종들에 비해 구배에서 더 일찍 용출된다.

[0081] 기본적인 방법 옵션들에 대한 하기 일련의 일반적인 비-제한적인 설명들은 어떻게 방법이 수행될 수 있는지에 대한 변경을 예시하고 작동 변수들의 보다 상세한 논의를 위한 플랫폼을 제공한다. 각 시나리오에서 언급된 완충액 조건들은 어떻게 방법이 실시될 수 있는지에 대한 일반적인 생각을 제공하는 것을 의도하고, 상이한 크기 및 상이한 오염 물질 로드를 갖는 sRNA 종들 수용하는데 완충액 조성의 최적화가 필요할 것임이 이해된다.

[0082] 일 구현예에서, 모노리스와 같은 크로마토그래피 장치 형태의 1차 아미노 고체상은 중성에 가까운 pH 값, 예컨대, 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, pH 7.5 ± 0.5로 평형화된다. dsRNA 및 ssRNA의 혼합물을 함유한 20 mM 트리스(Tris), 20 mM 비스-트리스-프로판(bis-tris-propane), 20 mM 글라이신, pH 7.5 ± 0.5으로 완충액 교환에 의해 평형화된다. 이어서, 크로마토그래피 장치는 20 장치 부피에 걸쳐, 또는 50 장치 부피에 걸쳐, 또는 100 장치 부피에 걸쳐 평형 완충액에서 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 100 mM NaCl, pH 11 ± 0.5까지의 종점 완충액까지의 선형 pH 구배로 용출되는데, 이때, 장치 부피의 수는 구배 동안 pH가 변화하는 속도, 즉, 구배의 기울기를 조정하는 수단으로 사용된다. 이 접근은 dsRNA, ssRNA, DNA 단편, 및 단백질 모두 1차 아민-보유 고체상에 결합하고 구배 내에서 용출되어, 샘플의 총 함량; 생성물 및 오염물질의 지표를 제공할 것이기 때문에 분석적 적용에 특히 유용할 수 있다. 이 접근은 또한 예비적 분리를 위한 조건 개발을 위한 출발점으로 사용될 수 있다.

[0083] 상이한 일 구현예에서, 일차 아민 고체상은 동일한 조건 하에서 로딩된 다음에, 대부분의 dsRNA, DNA, 및 단백질 오염을 제거하기 위해 3 M NaCl로 세척될 수 있다. 이어서, NaCl은 과량의 염이 없는 후속 세척에 의해 자체적으로 제거되어 ssRNA의 pH 구배 용출이 과량의 염의 부재 하에서 시작되도록 한다. 앞서 설명된 구현예의 결과들을 비교하면 NaCl 세척이 ssRNA의 순도를 개선하는 정도를 평가할 수 있을 것이다. NaCl의 가장 바람직한 농도를 결정하는 것은 생성물의 순도 및 생성물의 회수의 최상의 균형을 달성하는 것이 목적인 크로마토그래피 분야에서 익히 공지된 일상적인 작업이다.

[0084] 밀접하게 관련된 구현예에서, 이전 구현예들 중 하나 또는 둘 모두는 pH 구배 완충액에 50 mM 염화 나트륨을 포함할 수 있다. 다른 밀접하게 관련된 구현예에서, 100 mM 염화 나트륨이 pH 구배 완충액에 포함될 수 있다. 다른 밀접하게 관련된 구현예에서, 임의의 다른 염이 염화 나트륨을 대체할 수 있다.

[0085] 도 다른 관련된 구현예에서, 1차 아민 고체상은 동일한 조건으로 로딩된 다음에, pH 구배에 의해 원하는 ssRNA 생성물을 용출하기 앞서 대부분의 dsRNA를 제거하기 위해 3 M 구아니딘-HCl의 용액으로 세척될 수 있다. 구아니딘 세척은 ssRNA의 pH 구배 용출이 과량의 염의 부재 하에서 시작되도록 구아니딘 염이 없는 세척이 뒤따른다. 밀접하게 관련된 일 구현예에서, 100 mM 염화 나트륨이 pH 구배 완충액에 포함될 수 있다. 또 다른 밀접하게 관련된 구현예에서, 구아니딘-HCl은 구아니딘 이소티오시아네이트로 대체될 수 있다. 2개의 앞서 설명된 구현예들의 결과를 비교하면 구아니딘 세척이 ssRNA의 순도를 개선하는 정도를 평가할 수 있을 것이다.

[0086] 상기 시리즈의 확장을 나타내는 관련 구현예에서, 제한 없이, 20 mM 농도의 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)과 같은 킬레이팅제는, ssRNA를 용출하기 앞서 금속-안정화된 복합체를 해리시키고 고체상으로부터 비-ssRNA 종들을 치환하기 위한 의도로 구아니딘과 조합될 수 있다. 3개의 앞서 설명된 구현예들과 결과를 비교하면 카오트로프-킬레이터(chaotrope-chelator) 세척이 ssRNA의 순도를 개선하는 정도를 평가할 수 있을 것이다.

[0087] 다른 관련된 구현예에서, 다양한 pH 값에서 다른 염 종들 또는 염 종들의 조합들을 이용한 세척은 ssRNA를 용출하기 앞서 dsRNA의 제거(clearance)를 최대화하기 위해 평가될 수 있다. 기본 개념은 일반적으로 ssRNA의 용출을 유발하지 않는 가장 높은 pH에서 가장 높은 농도의 최대의 해리성 염(dissociative salt)을 적용하는 것이며, 이러한 조건은 원하는 ssRNA를 용출하기 앞서 원하지 않는 오염 물질의 가장 큰 아집단을 제거할 가능성이 높다라는 개념을 갖는다. 원하는 효과를 달성하는데 필요한 최소 염 농도를 결정하기 위해 후속 조정이 이루어질 수 있다.

[0088] 일부 구현예에서, 선형 pH 구배의 기울기는 그 구배에서 용출되는 종들 사이의 분리 정도를 변경하거나, 특히, 상이한 크기의 ssRNA 분자들 사이의 분획화를 개선하기 위해 변형될 수 있다. 10 장치 부피의 pH 구배로 용출하는 것이 원하는 정도의 분리를 생성하지 않으면, 지속시간은 20 장치 부피, 또는 50, 또는 100 장치 부피 또는 그 이상으로 연장될 수 있다.

[0089] 일부 구현예에서, 원하는 ssRNA를 용출하고 dsRNA로부터 분리하기 위해 pH 증가하는 것은 단계적으로 수행될 수 있다. dsRNA 함량이 이전 세척 단계에서 충분히 감소된 경우에, 방법을 단순화하고 가능한 가장 높은 농도 및 가능한 가장 낮은 부피에서 용출된 ssRNA를 얻기 위해 ssRNA는 단일 단계로 용출될 수 있다. 단계적 용출은 대안적으로는 pH를 증가하는 단계를 연속하여 수행될 수 있다. 개별 단계들은 특정 제제의 필요에 따라 상대적으로 크지 않거나, 클 수 있다. 일부 구현예에서, 원하는 ssRNA를 용출하기 위한 pH 증가는 단일 단계로 수행될 수 있다.

[0090] 일 구현예에서, dsRNA 및 ssRNA를 함유한 샘플은 대부분의 dsRNA에 의한 결합을 배제하는 pH에서 1차 아미노 고체상에 로딩될 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, Mrna의 크기에 따라, 샘플 로딩 동안의 pH는 pH 8.0, 또는 pH 8.5, 또는 pH 9.0, 또는 ssRNA의 결합을 방지하지 않는 더 높은 pH일 수 있다.

[0091] 특별한 경우를 나타내는 일 구현예에서, ssRNA는 일정한 pH에서 염 구배에 의해 용출될 수 있다. 이는 먼저 pH가 ssRNA가 염 부재 하에서 용출될 값 바로 아래까지 상승되는 것이 필요하다. 이어서, 염 구배는 그 pH에 적용될 것이다. 이 실시예는 고정된 pH에서 염 구배의 표준 음이온 교환 용출 포맷과 피상적인 유사성을 보유하나, 이는 큰 mRNA에 대한 염 구배가 상승된 작동 온도에서만 성공적이기 때문에 ssRNA로부터 dsRNA를 분리하는 분야에서 여전히 구별된다.

[0092] 크로마토그래피 컬럼에 샘플들을 로딩하기 위한 조건으로 샘플들을 평형화하는 많은 방법들은 당업자에게 알려져 있다. 임의의 이러한 방법들은 방법의 본질을 변경하지 않고 사용될 수 있다. 이러한 방법들 중에는 실험실 규모의 투석 방법, 접선 유동 여과 멤브레인을 이용한 정용여과, 및 완충액 교환 크로마토그래피 방법이 있다. 일부 경우에서, 적절한 샘플 평형화는 샘플을 표적 pH로 적정하고, 필요한 경우, 샘플을 물 또는 낮은-염 또는 염을 함유하지 않는 완충액으로 희석시켜 달성될 수 있다.

[0093] 일 구현예에서, 증가하는 pH에 의해 dsRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것은 ssRNA 및 고체상의 1차 아미노기 사이의 수소결합과 경쟁하는 당의 존재로 인해 증대될 수 있으며, ssRNA가 당이 부재할 때보다 낮은 pH에서 용출되도록 하는 예측된 결과를 갖는다. 이러한 일 구현예에서, 당은 소르비톨, 자이리톨, 또는 만니톨, 트레할로스(trehalose), 또는 수크로스, 또는 또 다른 당 또는 당들의 조합이다. 이러한 일부 구현예에서, 당의 농도는 0.1% 내지 20%, 또는 1% 내지 20%, 또는 5% 내지 20%, 또는 10% 내지 20%의 범위, 또는 상기보다 높은 범위, 낮은 범위, 또는 중간 범위의 값일 수 있다.

[0094] 관련된 일 구현예에서, 증가하는 pH에 의해 dsRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것은 ssRNA 및 고체상의 1차 아미노기 사이의 수소결합과 경쟁하는 비이온성 카오트로프의 존재로 인해 증대될 수 있으며, ssRNA가 카오트로프가 부재할 때보다 낮은 pH에서 용출되도록 하는 예측된 결과를 갖는다. 이러한 일 구현예에서, 카오트로프는 우레아이다. 이러한 일부 구현예에서, 우레아의 농도는 0.1 M 내지 10 M, 또는 1 M 내지 9 M, 또는 2 M 내지 8 M, 또는 4 M 내지 6 M의 범위, 또는 상기보다 높은 범위, 낮은 범위, 또는 중간 범위의 값일 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, 카오트로프는 디메틸 설폭사이드이다. 일부 이러한 구현예에서, 디메틸 설폭사이드의 농도는 최대 99%이다. 다른 관련된 구현예에서, 비이온성 카오트로프는 pH 구배에 의해 원하는 ssRNA를 용출하기 앞서 세척 단계 동안에 적용될 수 있다.

[0095] 또 다른 구현예에서, 증가하는 pH에 의해 dsRNA로부터 dsRNA를 분리하는 것은 알칼리성 아미노산의 존재에 의해 증대될 수 있으며, ssRNA가 알칼리성 아미노산이 부재할 때보다 낮은 pH에서 용출되도록 하는 예측된 결과를 갖는다. 이러한 일 구현예에서, 알칼리성 아미노산은 히스티딘, 또는 히스타민, 또는 라이신, 또는 아르기닌, 또는 다른 알칼리성 아미노산 또는 알칼리성 아미노산들의 혼합물이다. 이러한 일 구현예에서, 히스티딘의 농도는 1 mM 내지 250 mM, 또는 10 mM 내지 250 mM, 또는 20 mM 내지 250 mM, 또는 50 mM 내지 250 mM, 또는 100 mM 내지 250 mM의 범위, 또는 상기보다 높은 범위, 낮은 범위, 또는 중간 범위의 값일 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, 라이신의 농도는 1 mM 내지 10 M, 또는 10 mM 내지 10 M, 또는 100 mM 내지 10 M, 또는 1 M 내지 10 M의 범위, 또는 상기보다 높은 범위, 낮은 범위, 또는 중간 범위의 값일 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, 아르기닌의 농도는 1 mM 내지 850 mM, 또는 10 mM 내지 850 mM, 또는 100 mM 내지 850 mM, 또는 425 mM 내지 850 mM의 범위, 또는 상기보다 높은 범위, 낮은 범위, 또는 중간 범위의 값일 수 있다.

[0096] mRNA를 포함하는 핵산들은 다가 금속 양이온에 높은 친화성을 갖는 것으로 알려져 있다. 이들은 핵산 백본을 따라 주로 금속 이온과 음으로 하전된 포스파티딘산 잔기 사이의 배위 결합을 통해 서로 강한 결합을 형성한다. 칼슘 및 마그네슘 둘 모두 이러한 상호작용에 참여하는 것으로 알려져 있고 둘 모두 2+의 전하를 갖는 2가 금속 양이온이다. 3+의 전하를 갖는 3가 양이온인 제3철은 핵산과 더 공격적으로 상호작용한다. 이 이온들 중 어느 하나가 핵산과 상호작용하는 각 지점에서, 이는 동등한 수의 음전하를 중화한다. 이는 주어진 mRNA 분자의 음전하가 mRNA및 음이온 교환기의 상호작용을 감소시키고 약화시킬 것이라는 피상적인 기대를 만든다. 대신에, 다가 금속 양이온의 첨가는 일반적으로 ssRNA가 pH 구배에서 1차 아민-보유 고체상로부터 용출되지 않는 큰 응집체의 형성을 유발하는 비-특이적인 교차 결합의 형성을 초래한다.

[0097] 다가 금속 양이온들은 일반적으로 mRNA 제제에 첨가되기 때문에, 모든 구현예에서 1차 아미노기들을 주로 보유한 양으로 하전되니 고체상에 샘플들을 로딩하기 전에 샘플들로부터 다가 금속 양이온들의 함량을 감소시키고 바람직하게는 다가 금속 양이온들을 완전히 제거하는 단계를 수행하는 것이 권장되고; 또는 적어도 이 장치를 용출하기 전에 다가 금속 양이온들을 제거하는 단계를 수행하는 것이 권장된다. 다가 금속 양이온들을 먼저 제거하는 적어도 2개의 추가 이유들이 있다. 첫 번째 이유는 이들이 사슬내 및 사슬간 dsRNA 서열들의 형성 또는 안정화를 촉진하는 경향이 있을 수 있다. 두 번째 이유는 금속 이온들은 핵산 및 단백질 사이의 비-특이적인 결합을 안정화하여, 필수적으로 이들 사이의 안정한 가교를 형성한다. 배위 결합은 15 내지 60 배의 범위로 이온 결합보다 더 강하기 때문에, 배위 복합체들은 심지어 NaCl 및 구아니디늄 염들을 포함하는 비-금속 염들의 포화 수준에 노출되어도 쉽게 살아남는다. 이는 가능한 한 다가 금속 양이온들의 추출이 본 발명의 방법으로부터 가장 높은 ssRNA 순도 및 회수를 얻는데 필수적인 것으로 만든다. 다가 금속 양이온들의 효과적인 추출이 제공되면, 핵산-단백질 복합체의 효과적인 해리는 고농도의 구아니디늄 염들과 같은 카오트로픽 염들로 달성될 수 있으며, 고농도의 NaCl과 같은 비-카오트로픽 염들로는 낮은 정도로 달성될 수 있다. 리오트로픽 염들은 반대의 영향을 미칠 가능성이 높다.

[0098] 핵산-금속-오염 물질 복합체의 킬레이터 또는 킬레이터-고-염(chelator-high-salt) 해리가 샘플 제조 동안 수행되고/되거나 킬레이터 또는 킬레이팅-카오트로프 세척이 수행되는 일부 구현예에서, pH 조절을 제공하는데 사용하는 제제 이외의 염을 함유하지 않는 세척 단계가 뒤따를 수 있다. 이는 ssRNA가 낮은 염 환경에서 용출되도록 한다.

[0099] 다른 구현예에서, 킬레이팅제 및 고염 농도는 pH를 증가시킴으로써 ssRNA의 용출 동안에 유지될 수 있다. 다른 구현예에서, 킬레이팅제는 제거되는 반면에, 고염은 유지될 수 있다. 다른 구현예에서, 고염은 제거되는 반면에, 킬레이팅제는 유지될 수 있다.

[0100] 본 발명의 특정한 이익은 ssRNA 제제로부터 DNA 플라스미드를 제거하는 능력이 시험관 내 전사 혼합물, 또는 부분적으로 정제된 시험관 내 전사 혼합물의 뉴클레아제 분해를 수행할 필요가 없게 만드는 것이다. 이는 뉴클레아제 분해는 효소를 활성화하기 위해 마그네슘 이온들의 첨가를 필요로 하기 때문에 불균형적으로 높은 가치를 갖는다. 이러한 마그네슘 이온들은 잠재적으로 원하는 ssRNA의 ssRNA 자체 및 다른 샘플 성분과의 가교 결합에 기여하여, 원하는 ssRNA 생성물의 회수가 감소되는 실시 결과를 갖는다. 뉴클레아제 분해를 불필요하게 만듦으로써, 마그네슘 이온들의 첨가는 불필요해지고, ssRNA의 회수가 저해되지 않는다.

[0101] 본 발명의 방법의 ssRNA로부터 플라스미드 DNA를 분리하는 능력에도 불구하고 뉴클레아제 분해가 바람직할 수 있는 정도까지, 분해가 수행된 후에, 1차 아미노기들을 주로 보유한 양으로 하전된 고체상은 과량의 킬레이팅제로 세척되어 잔류 마그네슘 이온을 치환할 수 있다. 이러한 일 구현예에서, 5 mM 뉴클레아제 효소의 존재 하에서 플라스미드 DNA의 뉴클레아제 분해 후에, 10 mM 내지 50 mM, 또는 그 이상의 EDTA를 함유한 킬레이팅 세척이

수행될 수 있다.

[0102] 시험관 내 전사 혼합물로 시작한 일 구현예에서, EDTA는 다가 금속 양이온을 제거(scavenging)하기 위한 목적으로 10 내지 50 mm의 최종 농도로 첨가된다. pH가 pH 7 내지 pH 8.0의 범위인 것으로 가정하면, 샘플은 필요한 경우 여과된 다음에, 50 mM 트리스, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0으로 평형화된 1차 아미노기 크로마토그래피 장치에 로딩된다. 샘플 로딩 후에, 장치는 10 내지 20 장치 부피 동안 50 mM 트리스, 3 M 구아니딘-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0으로 세척된다. 이어서, 컬럼은 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 8.0으로 세척되어 장치 밖으로 구아니딘 및 EDTA가 플러싱(flushing)되고 ssRNA의 용출을 준비한다. 이어서, ssRNA는 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 250 mM 아르기닌, pH 11.0의 50 장치 부피 선형 구배로 용출된다. 분획 수집 직후에, ssRNA 피크를 함유한 용기는 1 M 아세트산을 첨가하여 중화된다.

[0103] 상기 구현예의 확장을 나타내는 일 구현예에서, 본 발명의 방법 후에 중화된 샘플은 최종 정제를 위해 올리고 dT 친화성 크로마토그래피 장치에 적용된다.

[0104] 상기 구현예의 확장을 나타내는 대안적인 구현예에서, 중화된 샘플은 최종 정제를 위해 소수성 상호작용 크로마토그래피 장치에 적용된다.

[0105] 시험관 내 전사 혼합물로 시작하는 일 구현예에서, 혼합물은 2.0 M 내지 2.5 M의 최종 농도로 염화 리튬 (LiCl)을 첨가함으로써 침전된다. 상층액을 버리고 침전물은 50 mM 트리스, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, pH 8.0으로 재현탁되고 필요한 경우 탁도를 제거하기 위해 여과된다. 이어서, 샘플은 50 mM 트리스, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0으로 평형화된 1차 아미노 고체상에 로딩된다. 샘플 로딩 후에, 장치는 10 내지 20 장치 부피 동안 50 mM 트리스, 1.5 M 구아니딘-이소티오시아네이트, 20 mM EDTA, pH 8.0으로 세척된다. 이어서, 컬럼은 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 100 mM NaCl, pH 8.0으로 세척되어 장치 밖으로 구아니딘 및 EDTA가 플러싱되고 ssRNA의 용출을 준비한다. 이어서, ssRNA는 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 100 mM NaCl, pH 11.0의 50 장치 부피 선형 구배로 용출된다. 분획 수집 직후에, ssRNA 피크를 함유한 용기는 분획 부피의 5%의 최종 비율로 1 M 아세트산을 첨가하여 중화된다. 밀접하게 관련된 일 구현예에서, mRNA는 LiCl을 대신하여 NaCl 또는 또 다른 염으로 침전된다. 밀접하게 관련된 또 다른 구현예에서, mRNA는 약 2.5%의 최종 비율로 에탄올을 첨가하여 침전된다.

[0106] 산업 공정 개발자들은 흔히 효소 사용을 피하는 것을 선호하는데, 왜냐하면, 공정 비용이 증가하고 넣어진 어떠한 것도 나중에 제거되어야 하고, 제거되었음을 입증하기 위해 테스트가 수행되어야 하기 때문이다. 하지만, 개발 프로그램 초기의 효소 사용은 회사가 임상 시험에 더 일찍 진입하고, 나중에 효소 사용을 필요로 하지 않는 공정의 보다 개선된 버전을 개발할 수 있는 편리한 지름길일 수 있다. 앞서 언급한 바와 같이, mRNA의 생성을 위해 주형으로 사용된 DNA 주형을 제거하기 위해 시험관 내 전사 혼합물들은 일반적으로 DNAase 효소들로 처리된다. RNA 정제는 주어진 시험관내 전사에서 단백질 오염 물질 로드를 줄이기 위해 단백질분해 효소들을 또한 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 시험관 내 전사 혼합물은 먼저 플라스미드를 제거하기 위해 DNAse로 처리된 후에, 본 발명의 방법을 사용하기 앞서 DNAse 및 다른 단백질 오염 물질들의 벌크를 제거하기 위해 프로테이나제 K와 같은 단백질분해 효소로 처리될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 DNAse를 사용하는 것을 불필요하게 만들기 때문에, 시험관 내 전사 혼합물은 전적으로 프로테이나제 K 또는 또 다른 단백질분해 효소로 처리될 수 있다.

[0107] 일 구현예에서, 시험관내 전사 혼합물은 단백질 로드를 감소시키기 위해 프로테이나제 k로 처리된다. 샘플은 멤프레인 필터를 통해 여과되어 미립자를 제거한 다음에, 50 mM 트리스, 10 mM EDTA, pH 8.0으로 평형화된 1차 아미노 고체상에 로딩된다. 샘플 로딩 후에, 장치는 10 내지 20 장치 동안 50 mM 트리스, 3 M 구아니딘-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0으로 세척된다. 이어서, 컬럼은 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 50 mM NaCl, pH 8.0으로 세척되어 장치 밖으로 구아니딘 및 EDTA가 플러싱되고 ssRNA의 용출을 준비한다. 이어서, ssRNA는 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 50 mM NaCl, pH 11.0까지의 50 장치 부피 선형 구배로 용출된다. 분획 수집 직후에, ssRNA 피크를 함유한 용기는 1 M 아세트산을 첨가하여 중화된다.

[0108] 일 구현예에서, 시험관 내 전사 혼합물은 2 M 구아니딘 이소티오시아네이트 및 20 mM EDTA로 처리된다. 필요한 경우, pH는 7.5± 0.5로 조정되고, 필요한 경우, 샘플은 고체를 제거하기 위해 여과된다. 1차 아미노 고체상은 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 및 20 mM 글라이신, pH 8.0에서 2 M 구아니딘 이소티오시아네이트 및 20 mM EDTA로 평형화된다. 샘플은 고체상에 로딩된 다음에, UV 흡광도가 0에 도달할 때까지 평형 완충액으로 추적되었다. 이어서, 고체상은 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 50 mM NaCl, pH 8.0으로 세척된 다음에, 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 20 mM EDTA, pH 11.0까지의 pH

구배로 용출되었다. 구배는 단일 단계, 일련의 단계 또는 연속 (선형) 포맷으로 수행될 수 있다. 분획 수집 직후에, ssRNA 피크를 함유한 용기는 1 M 아세트산을 첨가하여 중화된다.

[0109] 본 발명의 방법은 상승된 온도에서 dsRNA 및 ssRNA의 분리를 수행할 필요를 중단시키는 이점을 제공하지만, 그렇게 할 가능성을 배제하지 않는다.

[0110] 일부 구현예에서, 샘플은 주위 온도에서 방법을 수행하기 앞서 상승된 온도, 예컨대, 37℃, 45℃, 56℃, 60℃, 70℃, 또는 상기보다 중간 온도, 높은 온도, 또는 낮은 온도로 평형화될 수 있다.

[0111] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 상승된 온도, 예컨대, 37℃, 45℃, 56℃, 60℃, 70℃, 또는 상기보다 중간 온도, 높은 온도, 또는 낮은 온도에서 수행될 수 있다. 이러한 구현예에서, ssRNA는 주위 온도에서 용출되는 것보다 낮은 pH에서 용출될 것이다.

[0112] 일부 구현예에서, 샘플은 상승된 온도에서 평형화될 수 있고 방법은 상승된 온도에서 수행될 수 있다.

[0113] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 올리고 dT (OdT) 리간드를 사용한 친화성 크로마토그래피와 조합될 수 있다. 이 2개의 방법들은 임의의 원하는 순서로 조합될 수 있다.

[0114] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)와 조합될 수 있다. 이 2개의 방법들은 임의의 원하는 순서로 조합될 수 있다. 이러한 일 구현예에서, HIC 고체상에 대한 소수성 리간드는 페닐기로 이루어질 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, HIC 고체상에 대한 소수성 리간드는 부틸기로 이루어질 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, HIC 고체상에 대한 소수성 리간드는 헥실기로 이루어질 수 있다. 다른 이러한 구현예에서, HIC 고체상에 대한 소수성 리간드는 상이한 지방족 또는 방향족기, 또는 지방족 및 방향족 특성 둘 모두를 구현하는 기로 이루질 수 있다.

[0115] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 역상 크로마토그래피 (RPC)의 방법과 조합될 수 있다. 이 2개의 방법들은 임의의 원하는 순서로 조합될 수 있다. 이러한 일 구현예에서, 고체상 표면의 소수성 성질은 고체상을 합성하는데 사용되는 스티렌 디비닐벤젠 (SDVB)의 고유한 소수성에 의해 부여될 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, 고체상 표면의 소수성 성질은 고체상의 표면에 부착된 리간드의 소수성에 의해 부여될 수 있으며, 이때, 이 리간드는 지방족 탄화수소, 또는 방향족 탄화수소, 또는 혼합된 지방족-방향족 특성의 리간드를 나타낸다.

[0116] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(hydroxyapatite chromatography)의 방법과 조합될 수 있다. 이 2개의 방법들은 임의의 원하는 순서로 조합될 수 있다.

[0117] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 OdT 리간드를 사용한 친화성 크로마토그래피 및 RPC와 함께 조합될 수 있다. 이 3개의 방법들은 임의의 원하는 순서로 조합될 수 있다.

[0118] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 DNA 플라스미드의 제제로부터 ssRNA를 제거하는데 사용될 수 있다. 밀접하게 관련된 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 단백질 제제로부터 ssRNA를 제거하는데 사용될 수 있다. 이러한 일 구현예에서, 본 방법은 mRNA의 합성을 위해 사용된 효소 제제로부터 오염 ssRNA를 제거하는데 사용될 수 있다. 이러한 구현예들 중 어느 하나에서, 샘플은 DNA 및 단백질이 1차 아미노기들을 주로 보유한 양으로 하전된 고체상에 결합되는 산성-내지-중성 pH 조건 및 낮은 염 농도에서 로딩될 수 있다. 이어서, 이는 ssRNA가 고체상의 표면에 결합된 채로 두면서 ssRNA오염물질에 대한 순도의 정도를 증가시키기 위해 염 구배로 용출될 수 있다. 오로지 ssRNA를 제거하기 위한 의도인 밀접하게 관련된 구현예에서, 샘플 및 고체상 조건은 RNA는 결합된 반면에 DNA 및 단백질은 고체상을 통과하도록 하는 산성-내지-중성 pH에서 고농도의 염을 포함할 수 있다.

[0119] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 샘플에서 ssRNA의 양을 정량화하기 위한 분석적 도구로 사용될 수 있다. 이러한 일 구현예에서, 산성-내지-중성 pH에서 샘플은 고 농도의 염과 혼합되어 대부분의 비-RNA 종들이 결합하지 못할 수 있다. 이어서, 1차 아미노 고체상은 pH의 증가하는 구배에 의해 용출되어 결합된 ssRNA를 크기 증가에 따라 분류할 수 있다. 밀접하게 관련된 일 구현예에서, 1차 아민 고체상은 검정의 민감도를 최대화하기 위한 목적으로 단일 피크에서 모든 ssRNA를 용출하기에 충분한 알칼리 pH까지 단일 단계로 용출될 수 있다. 관련된 일 구현예에서, 1차 아민 고체상은 25 mM NaOH, 또는 50 mM NaOH, 또는 100 mM NaOH, 또는 상기보다 높은 농도, 낮은 농도, 또는 중간 농도까지의 선형 구배로 용출될 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, 일차 아미노 고체상은 25 mM NaOH, 또는 50 mM NaOH, 또는 100 mM NaOH, 또는 상기보다 높은 농도, 낮은 농도, 또는 중간 농도까지 증분 단계(incremental step)로 용출될 수 있다. 또 다른 이러한 구현예에서, 일차 아미노 고체상은 25 mM NaOH, 또는 50 mM NaOH, 또는 100 mM NaOH, 또는 상기보다 높은 농도, 낮은 농도, 또는 중간 농도까지 단일 단계로 용출될 수 있다. 상기 구현예들 중 어느 하나에서, 샘플을 1차 아미노 고체상에 로딩한 후에, 형광을 생성

하기 위해 RNA와 상호작용하는 염료가 주입될 수 있고, 형광 염료-RNA 복합체는 형광 모니터를 통과하여 검정의 민감도를 증폭시킬 수 있다. 이러한 일 구현예에서, 염료는 Ribogreen일 수 있다.

[0120] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 키트 형태로 제공되어 이의 실시를 용이하게 할 수 있다. 키트는 2개 이상의 고체상을 포함할 것이며, 이들 중 적어도 하나는 1차 아민 고체상이고, 본 발명의 방법을 설명하는 지침을 포함할 것이다. 이러한 일 구현예에서, 제2 고체상은 올리고-dT 크로마토그래피 장치일 것이다. 또 다른 이러한 구현예에서, 제2 고체상은 소수성 상호작용 크로마토그래피 장치일 것이다. 또 다른 이러한 구현예에서, 제2 고체상은 올리고-dT 크로마토그래피 장치이고 제3 고체상은 소수성 상호작용 크로마토그래피 장치일 것이다.

[0121] 본 발명에 따라 사용된 바와 같이, 고체상을 이용한 mRNA 정제의 일반적인 프로토콜에서, 1차 아민 모노리스가 하기와 같이 사용된다.

[0122] 1차 아민 모노리스는 주위 온도에서 수성 조건 하에서 큰 단일 가닥 mRNA (ssRNA)를 정제한다. 이는 크기가 큰 순서대로 ssRNA를 분획화하면서 dsRNA, DNA, 단백질, 및 엔도톡신을 제거한다 (도 1). 이는 연구 등급 ssRNA의 1단계 정제를 위해 사용되거나 다단계 정제 과정에서 고분해능(high-resolution) 분획 단계로 사용될 수 있다. 이는 또한 시험관 내 전사 혼합물, 부분적으로 정제된 분획, 및 제형화된 원료 의약품의 빠른 고분해능 분석적 특성화를 가능하게 한다.

[0123] 1차 아민 모노리스는 증가하는 pH 구배에서 ssRNA를 정제하는 음이온 교환 및 수소 결합의 독특한 조합을 사용한다. DNA, 단백질, 및 dsRNA는 ssRNA에 앞서 용출된다. 정제 성능은 용출에 앞서 대부분의 dsRNA, DNA, 및 단백질을 제거하는 고염 세척에 의해 향상된다. 놀랍게도, ssRNA는 심지어 카오트로픽 염들의 포화 농도에서도 여전히 결합되어 있다. 고염 세척 동안 킬레이팅제를 포함하는 것은 오염 제거를 더 향상시키고 pH 구배가 남아 있는 미량 수준의 오염물질 및 응집체를 제거하도록 두었다.

[0124] 1차 아민 모노리스로부터의 ssRNA 분획은 원하는 경우 CIMmultus 올리고 dT를 사용한 친화성 크로마토그래피, CIMmultus C4 HLD를 사용한 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 CIMmultus SDVB를 사용한 역상 크로마토그래피에 의해 더 정제될 수 있다 (이 컬럼들 중 어느 하나에 대한 보다 자세한 정보는 BIA Separations에 문의). 1차 아민 모노리스는, 고염 샘플들이 추가 샘플 제조 없이 로딩될 수 있기 때문에, 특히, 침전 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피와 같은 고염 단계 후에, 연마(polishing) 방법으로도 사용될 수 있다.

[0125] 1차 아민 모노리스는 반경 방향 흐름 크로마토그래피 장치(radial flow chromatography device)이다. 이는 실린더의 바깥으로부터 안쪽으로 흐름을 분배하도록 설계된다. 이는 실린더의 물리적 구조를 안정화하는 효과를 가지며, 용출 동안 농축 효과를 가져 분리 성능을 개선한다. 임의의 실험을 수행하기 전에, 흐름 방향이 장치의 표시를 따르도록 유닛을 크로마토그래프에 연결해야 한다. 일부 크로마토그래프는 경고 없이 흐름 방향을 시킬 수 있는 역류 기능이 소프트웨어에 초기값으로 내장되어 있는 것을 유의한다. 임의의 실험을 수행하기 전에 이 기능을 비활성화하는 것을 확인한다.

[0126] 1차 아민 모노리스는 20% 에탄올 중 전달된다. 실제 사용 전에 하기 기재한 바와 같이 살균 및 재생하는 것이 권장된다. 또한 실험 결과를 비교할 기준선을 제공하기 위해 샘플 없이 실행을 수행하는 것이 권장된다. 일부 완충액 성분은 UV를 흡수하고 완충액들 사이의 일부 전환은 실험 결과의 해석을 혼란스럽게 할 수 있는 굴절 지수(refractive index) 아티팩트를 생성할 수 있다.

[0127] 샘플 및 제조: 1차 아민 모노리스는, DNAse 및/또는 프로테이나제 K로 분해한 후, 염 또는 유기 용매 침전물로부터 재현탁된 ssRNA, 또는 다른 정제 방법으로부터 부분적으로 정제된 ssRNA를 포함하여, 시험관 내 전사 혼합물을 처리하는데 사용될 수 있다. 2가 금속 양이온을 함유한 샘플은 금속 이온의 농도의 약 10배에서 킬레이팅제로 처리되어야 한다. 미립자는 주입에 앞서 원심분리 또는 여과 (0.45 μm)에 의해 제거되어야 한다. 샘플 pH는 pH 6.0 내지 pH 8.0이어야 한다. 염 함량은 고려 대상이 아니다.

[0128] 완충액 A: 평형 완충액/구배 시작 완충액. 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 50 mM NaCl, pH 8.0.

[0129] 완충액 B. 고염 세척 완충액. 50 mM Tris, 3.0 M 구아니딘-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0.

[0130] 완충액 C. 구배 종점 완충액. 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 50 mM NaCl, pH 11.0.

[0131] 완충액 D. 세척/살균 완충액. 2 M NaCl, 1 M NaOH.

[0132] 완충액 E. 재생 완충액. 3.0 M 암모늄 아세테이트

[0133] 완충액 A을 이용한 컬럼 평형화: 출력 pH 및 전도도가 입력 완충액과 동일할 때까지 평형 완충액을 펌핑한다. 유속: 10 컬럼 부피 (CV)/min.

[0134] 샘플 주입. 큰 부피의 샘플, 특히, 시험관 내 전사 혼합물과 같은 미정제 샘플(crude sample)을 적용하는 동안 작동 압력을 관찰한다. 필요한 경우 유속을 감소시켜 허용가능한 한도 내의 작동 압력을 유지한다.

[0135] 완충액 A를 이용한 세척1: 5-10 CV의 평형 완충액. 후속 고염 세척 단계에 의해 오염물질이 제거되기 때문에, UV 신호가 완전히 되돌아올 때까지 기다릴 필요가 없다.

[0136] 완충액 B를 이용한 세척2: 10-20 CV의 평형 완충액. 구아니딘이 UV를 흡수하기 때문에 즉각적인 피크가 있을 것을 주목한다. DNA 및 dsRNA는 일반적으로 피크의 마루에 도달하는 꽤 날카로우 피크로 용출된다. 구아니딘 피크가 고원(plateau) 수준에 도달할 때까지 세척을 계속한다.

[0137] 완충액 A를 이용한 세척3: 10-20 CV의 평형 완충액 또는 UV가 기준선에 되돌아올 때까지.

[0138] 완충액 C까지의 용출 구배: 100% 구배 종점 완충액까지의 50-100 CV 선형 구배, 이어서, 10 CV 동안 100%에서 유지한다. 용출 직후 분획을 중화한다.

[0139] 완충액 D를 이용한 세척/살균. 상당한 양의 물질이 pH 구배의 종점에서 컬럼에 결합되어 있기 때문에 매 실행 후에 10-20 CV의 살균 완충액을 처리하는 것이 권장된다. 추가 분석을 위한 용출시, 살균 단계의 내용물들은 수집되어 중화될 수 있다. 컬럼이 시험관 내 전사 혼합물로 로딩된 경우에, 살균 단계를의 지속시간을 1시간으로 연장하는 것이 필요할 수 있다. 심한 파울링(fouling)의 경우, 살균의 지속시간을 16-24시간으로 연장하는 것이 필요할 수 있다. 살균 동안 최소 유속을 유지하는 것은 OH 이온을 연속적으로 보충하고 단순히 그 자리에서 오염물(foulant)를 가수분해 하는 대신에 컬럼 밖으로 오염물을 세척하기 때문에 더 나은 결과를 생성하는 경향이 있다.

[0140] 컬럼 재생: 20 CV 완충액 A 또는 물을 이용해 컬럼으로부터 NaOH를 플러싱한 다음에, 20 CV의 완충액 E를 이용해 세척한다. 이는 수산화 반대 이온들은 컬럼의 평형화를 지연시키고 용출 동안 pH 아티팩트(pH artifact)를 생성할 수 있기 때문에, 모노리스의 표면으로부터 수산화 반대 이온들을 치환시키기 위함이다.

[0141] 저장: 완충액 A 또는 물로 컬럼을 살균 및 플러싱한 후에, 20 에탄올 중에 저장한다.

[0142] 대표적인 크로마토그램은 도 8에 도시되어 있다.

[0143] 변형, 최적화, 및 문제 해결

[0144] 크로마토그램을 개별 단계의 지속시간을 최적화하기 위한 가이드로서 사용한다.

[0145] 예를 들어, 최대 포화(full saturation)까지의 상이한 카오트로픽 염 및 상이한 농도의 킬레이팅제를 사용하는 고염 세척의 광범위한 변형이 가능하다. 프로토콜에 제공된 농도는 출발점으로 의도된다. 더 낮은 농도가 동등한 순도를 제공하는 경우, 더 적은 양은 물질 비용을 감소시키고 완충액 제조를 단순화시킬 것이다.

[0146] 비-카오트로픽 염은 카오트로픽 염을 대체할 수 있지만, RNA를 침전시키는 고농도의 염을 적용할 때는 주의해야 한다. 비-카오트로픽 염은 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 리튬 등을 포함한다. 예비 실험은 1 M 염화 나트륨을 이용한 세척은 대부분의 dsRNA 및 DNA를 제거하지만 UV 흡광도를 기준선으로 복원하기 위한 연장된 세척이 또한 필요할 수 있음을 나타낸다 (도 1).

[0147] 구아니딘 및 EDTA를 샘플에 직접 첨가하고, 컬럼을 고염 세척 완충액으로 평형화하는 작업 흐름 단순화가 수행될 수 있다. 샘플 로딩 후에 고염 완충액을 사용하여 제1 세척한 다음, 상기 완충액 A를 사용하여 제2 세척하고, 이어서, 용출한다. 이 접근은 dsRNA 및 DNA가 결합 표면적을 경쟁하는 것을 방지할 것이기 때문에 더 높은 ssRNA 결합 성능(binding capacity)을 지지할 수 있음을 주목한다. 컬럼 파울링 또한 이 접근에 의해 감소될 수 있다.

[0148] 고염 세척 단계는 완전히 생략될 수 있다. 이는 dsRNA 및 ssRNA, 또는 DNA 또는 ssRNA의 상대량을 결정하는 것이 목적인 샘플의 분석적 특성화에 바람직할 수 있다. 이 방법은 일반적으로 dsRNA 및 DNA 를 구별하지 않는다.

[0149] pH 구배에서 염을 생략하는 것은 dsRNA 및 ssRNA의 분리를 증가시키지만, 회수가 저하될 수 있고 용출이 일어나는 pH를 증가시킬 것이다. RNA를 침전시키는 염의 사용은 그 농도가 침전 수준 훨씬 아래에서 유지되는 한 허용

가능하다 (도 6). 카오트로프와 같이 RNA의 가용성을 촉진하는 염들은 pH 용출 동안 사용될 수 있지만, 후속 정제 방법을 방해할 수 있음을 고려한다.

[0150] 작동 온도는 pH 구배 동안 상승될 수 있으며, 용질이 더 일찍 용출되도록 하는 효과를 갖는다. 조절되지 않는 작동 온도는 재현성을 저해할 수 있다.

[0151] 선형 pH 구배는 단계 구배 포맷으로 전환될 수 있다. CIMmultus dsX-beta가 직교 정제 방법(orthogonal purification method)과 조합된 것과 같은 일부 경우에서, ssRNA를 단일 pH 단계로 용출하는 것이 실용적일 수 있다.

[0152] 부적절한 세척의 표시는 일련의 실행에 걸친 작동 압력의 점진적 증가, 주어진 종이 이전 실행보다 일찍 또는 나중에 용출되는 선택성 변화, 및/또는 어떠한 샘플도 주입되지 않았음에도 용출 동안에 피크가 나타나는 고스트 피크(ghost peak)의 출현을 포함한다.

[0153] 본 발명은 하기 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 설명된다.

[0154] **실시예**

[0155] 실시예 1.

[0156] 주위 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 염 단계에 의해 dsRNA를 제거하여, 1차 아미노 고체상을 이용해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리.

[0157] 21b 내지 500b 범위의 dsRNA 래더 dsRNA 분자 및 200b 내지 6000b 크기 범위의 ssRNA 분자를 갖는 ssRNA 래더를 함유한 샘플을 모노리스 크로마토그래피 장치 형태의 1차 아민 고체상에 적용했다. 1차 아민 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 8.0으로 평형화했다. 샘플을 적용하고, 세척하여 모노리스 내 채널로부터 결합되지 않은 물질들을 치환했다. 이어서, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 1 M NaCl, pH 8.0을 이용한 세척 단계를 적용한 다음에, 또 다른 세척 단계를 수행하여 NaCl을 제거했다. 이어서, 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 11.0까지의 선형 구배로 용출했다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 모든 dsRNA 종들은 NaCl 단계에서 용출된 반면에, ssRNA는 여전히 결합되어 있었고 나중에 pH 구배에서 용출되었다. dsRNA 래더에서 종 간에 명백한 크기 분리가 관찰되지 않지만, ssRNA에서 종 간에 명확한 분리가 관찰된다.

[0158] 실시예 2.

[0159] 주변 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 6 M 구아니딘-HCl 및 20 mM EDTA를 함유한 세척 단계에 의해 dsRNA를 제거하여, 1차 아민 고체상을 이용해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리.

[0160] 21b 내지 500b 범위의 dsRNA 및 5000b 크기의 ssRNA를 함유한 샘플을 모노리스 크로마토그래피 장치 형태의 1차 아민 고체상에 적용했다. 1차 아민 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 8.0으로 평형화했다. 샘플을 적용하고, 세척하여 모노리스 내의 채널로부터 결합되지 않은 물질을 치환하였다. 이어서, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 6 M 구아니딘, 20 mM EDTA, pH 8.0의 세척 단계를 적용한 다음에, 또 다른 세척 단계를 수행하여 구아니딘 및 EDTA를 제거했다. 이어서, 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 11.0까지의 선형 구배로 용출했다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 모든 dsRNA 종들은 염 단계에서 용출된 반면에, ssRNA는 여전히 결합되어 있었고 나중에 pH 구배에서 용출되었다.

[0161] 실시예 3.

[0162] pH 구배는 강한 음이온 교환기 및 약한 음이온 교환기로부터 ssRNA를 용출하지 못함.

[0163] 1차 아미노 고체상에 대한 pH 구배 용출의 성능을 비교하기 위한 실험 대조군으로서 강한 (4차 아민 QA) 음이온 교환기 및 약한 (3차 아민, DEAE) 음이온 교환기를 사용하여 pH 구배에서 ssRNA의 거동을 특성화했다. 두 음이온 교환기 모두 부피가 1 mL인 모노리스 장치의 물리적 형태였다. 컬럼을 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 8.0으로 평형화했다. 약 5000개의 뉴클레오티드 염기들 (5000b)을 함유한 샘플을 주입하고 컬럼을 평형 완충액으로 세척하여 결합되지 않은 물질을 치환했다. 이어서, 컬럼을 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 11.0까지의 선형 구배로 용출했다. 도 3은 ssRNA가 강한 음이온 교환기 또는 약한 음이온 교환기에서 pH 구배 내에서 용출되지 않고 오직 1 M NaOH으로 컬럼을 세척하는 것에 의해서만 제거되었음을 나타낸다.

[0164] 실시예 4.

[0165] 주위 온도에서 pH 구배에 의해 1차 고체상을 이용하여 ssRNA로부터 플라스미드 DNA를 분리.

[0166] 약 6000 염기쌍 크기의 슈퍼코일 dsRNA 플라스미드 및 약 5000 염기 크기의 ssRNA를 함유한 샘플을 모노리스 크로마토그래피 장치 형태의 1차 아민 고체상에 적용했다. 1차 아민 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 8.0으로 평형화했다. 샘플을 적용용하고, 세척하여 모노리스 내의 채널에서 결합되지 않은 물질을 치환했다. 이어서, 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 11.0까지의 선형 구배로 용출했다. 도 4에 나타낸 바와 같이, DNA 플라스미드가 먼저 용출되고, 나중에 ssRNA가 잘 분리되었다.

[0167] 실시예 5.

[0168] 주위 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 염 단계에 의해 DNA를 제거하여 1차 아미노 고체상을 이용해 ssRNA로부터 플라스미드 DNA를 분리.

[0169] 약 6000개의 염기쌍 크기의 슈퍼코일 dsDNA 및 약 5000개의 염기 크기의 ssRNA를 함유한 샘플을 모노리스 크로마토그래피 장치 형태의 1차 아민 고체상에 적용했다. 1차 아민 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 8.0으로 평형화했다. 샘플을 적용하고, 세척하여 모노리스 내의 채널로부터 결합되지 않은 물질을 치환했다. 이어서, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 1 M NaCl, pH 8.0의 세척 단계를 적용한 다음에, 또 다른 세척 단계를 수행하여 NaCl을 제거했다. 이어서, 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 11.0까지의 선형 구배로 용출했다. 도 5에 나타낸 바와 같이, DNA 플라스미드는 염 단계에서 용출된 반면에, ssRNA는 여전히 결합되어 있었고 나중에 pH 구배에서 용출되었다.

[0170] 실시예 6.

[0171] 주위 온도에서 염을 pH 구배 용출과 조합하는 것이 DNA 및 ssRNA 분리에 미치는 영향.

[0172] 단일 pH 구배 용출을, 종점 완충액이 50 mM NaCl을 함유한 pH 구배 용출, 종점 완충액이 1000 mM을 함유한 pH 구배 용출과 비교하여, 일련의 분리들을 수행했다. 각 실험에서, 약 6000 염기쌍 크기의 dsDNA 플라스미드 및 약 5000 염기 크기의 ssRNA를 함유한 샘플을 모노리스 크로마토그래피 장치 형태의 1차 아민 고체상에 적용했다. 1차 아민 모노리스를 100 mM 트리스, pH 8.0로 평형화했다. 샘플을 적용하고, 세척하여 모노리스 내의 채널로부터 결합되지 않은 물질을 치환했다. 첫 번째 실험에서, 모노리스를 125 mM 글라이신, pH 10.5까지의 선형 구배로 용출했다. 두 번째 실험에서, 모노리스를 125 mM 글라이신, 50 mM NaCl, pH 10.5까지의 선형 구배로 용출했다. 세 번째 실험에서, 모노리스를 125 mM 글라이신, 100 mM NaCl, pH 10.5까지의 선형 구배로 용출했다. 도 6에 나타낸 바와 같이, ssRNA 피크의 중심은 염화 나트륨이 포함되지 않을 때 pH 10.2에서 일어났다. 구배 종점 완충액으로 50 mM일 때, ssRNA는 pH 10.0에서 용출됐다. 구배 종점 완충액으로 100 mM 염화 나트륨일 때, ssRNA는 pH 9.9에서 용출됐다. 염화 나트륨이 pH 구배에 걸쳐 50 mM의 농도 수준으로 유지되는 경우에, ssRNA는 pH 9.8에서 용출되었다 (나타내지 않음). 염화 나트륨이 pH 구배에 걸쳐 100 mM의 농도 수준으로 유지되는 경우에, ssRNA는 pH 9.6에서 용출되었다 (나타내지 않음). 염화 나트륨을 포함하는 것은 다른 흥미로운 효과들을 유발했다. DNA와 ssRNA 사이의 분리는 NaCl의 부재 하에서 가장 높았고 NaCl의 양이 더 많을수록 분리가 감소했다. 하지만, ssRNA의 회수는 염화 나트륨의 존재 하에서 분명히 개선되었다.

[0173] 실시예 7.

[0174] dsRNA 및 DNA에 의한 반응의 균일성.

[0175] 앞의 실험에서 명백하듯이, dsRNA 및 DNA는 유사하게 거동하였는데, 둘 모두 염 세척에 의해 제거되었고, 둘 모두 pH 구배 내에서 ssRNA로부터 분리되어야 함을 시사하며, 또한 DNA가 본 발명의 방법을 특성화 하기 위한 dsRNA 거동의 모델로 사용될 수 있음을 시사한다. 대표적인 전사 혼합물로부터 ssRNA를 정제하는 과정에서 절대 일어나지 않을 극도로 최악의 경우에서 본 발명의 방법의 능력을 테스트하기 위해 실험을 수행했다. 이 테스트는 약 13,000 염기 크기의 dsRNA로부터 약 1700 염기의 상대적으로 작은 ssRNA를 분리하는 것, 및 13kb dsRNA의 용출 거동을 약 6000 염기쌍의 DNA 플라스미드와 비교하는 것을 포함했다. 1차 아민 모노리스를 100 mM 트리스, pH 8.0으로 평형화했다. 각 실험에서, 샘플을 적용하고, 세척하여 모노리스 내의 채널로부터 결합되지 않은 물질을 치환했다. 이어서, 모노리스를 125 mM 글라이신, pH 10.5까지의 선형 구배로 용출했다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 예상과 일치하여, DNA 및 매우 큰 dsRNA 둘 모두는 훨씬 더 작은 ssRNA보다 먼저 큰 정도로 공동-용출되었다. ssRNA 및 2개의 더 큰 오염물질들 사이의 분리 정도는 다른 실시예에 비해 감소되었지만, 그럼에도

불구하고 명확한 분리가 분명했다. 실제 실시에서, 주어진 시험관 내 전사 혼합물에서 dsRNA는 ssRNA와 동일한 수의 염기들을 함유할 것이다. 실시예 4와 비교한 결과, ssRNA는 크기에 따라 pH 구배에서 나중에 용출됨을 나타냈으며, 이는 본 발명이 크기에 상관없이 dsRNA 및 ssRNA 사이의 우수한 분리를 제공할 것임을 시사한다. pH 구배로 ssRNA를 용출하기 앞서 dsRNA가 염 세척에 의해 쉽게 제거될 수 있다는 점에서 논쟁이 될 수 있지만, 이는 본 발명이 심지어 염 세척 없이도 효과적인 분리를 달성할 수 있음을 보여준다. 도 7의 결과는 또한 본 발명이 적어도 15,000b 및 가능하게는 최대 25,000b 이상의 ssRNA와 잘 작동해야 함을 보여준다는 점에서 주목할 만하다.

[0176] 실시예 8.

[0177] 주위 온도에서 pH 구배에 의해 ssRNA를 용출하기 앞서 조합된 킬레이터-카오트로프(chelator-chaotrope) 단계에 의해 DNA를 제거하여, 1차 아민 고체상을 이용해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리.

[0178] 6000bp 슈퍼코일 dsDNA 플라스미드 및 5000b ssRNA를 함유한 샘플을 모노리스 크로마토그래피 장치 형태의 1차 아민 고체상에 적용했다. 1차 아민 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 8.0으로 평형화했다. 샘플을 적용하고, 세척하여 모노리스 내의 채널로부터 결합되지 않은 물질을 치환했다. 이어서, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, 1 M 구아니딘-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0의 세척 단계를 적용한 다음에, 또 다른 세척 단계를 수행하여 구아니딘 및 EDTA를 제거했다. 이어서, 모노리스를 20 mM 트리스, 20 mM 비스-트리스-프로판, 20 mM 글라이신, pH 11.0 까지의 선형 구배로 용출했다. 도 8은 대부분의 DNA 플라스미드가 구아니딘-DNA (카오트로프-킬레이터) 세척에서 제거되었음을 나타낸다. 남아 있는 결합된 DNA는 pH 구배에서 ssRNA에 앞서 용출되었다.

[0179] 도 8 (1 M 구아니딘 사용)과 도 5 (6 M 구아니딘 사용)를 비교하면, 결과는 1 M 구아니딘-HCl은 ssRNA를 용출하기 앞서 DNA를 완전히 제거(dispose)하기에 불충분함을 시사한다. 도 5에서, dsRNA 피크는 6 M 구아니딘 세척 피크의 앞 가장 자리에 집중되어 있다. 도 8에서, DNA는 구아니딘 세척의 앞쪽을 향해 용출되기 시작하지만, 도 5에서보다 나중에 용출되고 눈에 띄는 테일링(tailing)이 있다. ssRNA 피크에 직전에 용출되는 DNA/ssRNA 피크의 상대적 크기는 1M 구아니딘 HCl이 DNA/dsRNA를 미리 완전히 제거하지 못한다는 결론을 추가로 뒷받침한다. 하지만, ssRNA는, ssRNA 피크가 예측한 바와 같이 관찰되었지만 나중에 응집체로 해석되는 용출 물질이 뒤따르는 도 5 (6 M 구아니딘 후)와 대비하여, 1M 구아니딘로 사전 세척한 후에는 단일 피크로 용출되는 것 (도 8)을 또한 주목한다. 이 비교는 원하는 ssRNA의 거동을 변경하지 않고 DNA/sdRNA의 최상의 제거를 제공하기 위해 카오트로프 농도를 조정하는 것이 공정 최적화의 일상적인 부분으로서 가치가 있음을 시사한다.

[0180] 실시예 9.

[0181] 다가 음이온을 포함하는 것에 의해 ssRNA 용출 pH의 감소.

[0182] 일련의 실험들을 수행했으며, 이때, DNA 및 ssRNA의 혼합물이 pH 구배에서 분획화되었다. 일차 아민 고체상을 100 mM 트리스, pH 8.0으로 평형화했다. 이어서, 샘플을 로딩한 다음에, 평형 완충액으로 세척했다. 125 장치 부피의 선형 구배를 125 mM 글라이신, pH 10.5의 종점 완충액에 적용했다. 두 번째 실행에서, 이 조건들을 100 mM 시트레이트를 완충액에 첨가하는 것을 제외하고 반복했다. 세 번째 실행에서, 100 mM 에틸렌디아민테트라아세테이트 (EDTA)를 완충액에 첨가하는 것을 제외하고 이 조건들을 반복했다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 두 첨가제 모두 두 DNA 및 ssRNA가 용출되는 pH를 크게 감소시켰으며, EDTA에서 가장 강력한 pH 감소가 나타났다. 둘 모두의 pH 감소 정도 또한 100 mM 염화 나트륨에서 달성된 것 (도 6)보다 더 컸다. 염화 나트륨 결과와의 공통점은 염의 존재가 용출 구배에서 DNA 및 ssRNA의 회수를 증가시켰다는 것이다. 또 다른 유사점은 염화 나트륨, 시트레이트, 또는 EDTA를 이용한 용출은 pH 8.0 이하의 pH 값에서 용출하지 못했다는 것이다.

[0183] 실시예 10.

[0184] 염의 존재 하에서 pH 구배로 용출하기 앞서 고염 세척을 이용해 ssRNA를 정제.

[0185] 모노리스와 같은 크로마토그래피 장치의 형태의 1차 아민 고체상을 50 mM 트리스, 20 mM EDTA, 2 M 구아니딘 이소티오시아네이트, 8.0 ± 0.5로 평형화했다. UV 모니터를 제로화했다(zeroed). EDTA 및 구아니딘 이소티오시아네이트를 샘플에 첨가하고 샘플 pH를 pH 8.0 ± 0.5로 조정했다. 필요한 경우 샘플을 여과하여 탁도를 제거했다. 샘플을 1차 아민 모노리스에 적용하고 모노리스를 기준선이 0으로 돌아올 때까지 평형 완충액으로 세척했다. 강한 킬레이팅-카오트로프 용액에서 샘플 적용 및 세척은 dsRNA, DNA, 및 단백질의 결합을 방지하고/하거나 dsRNA, DNA, 및 단백질을 미량 수준으로 제거하는 것을 의도한다. 이어서, 모노리스를 50 mM 트리스, 5 mM EDTA, 100 mM 구아니딘 이소티오시아네이트, pH 8.0 ± 0.5의 적어도 10 장치 부피 동안 세척했다. 이어서,

ssRNA를 65 mM 글라이신, 5 mM EDTA, 100 mM 구아니딘 이소티오시아네이트, pH 10.5 ± 0.5까지의 선형 구배로 용출했다. 본 발명에 전체 킬레이팅제의 존재를 유지시켜 다가 금속 양이온의 잠재적 존재로 인한 부작용을 방지했다. 100 mM 구아니딘 이소티오시아네이트를 실시예 6에 기재된 100 Mm 염화 나트륨 또는 실시예 9에 기재된 100 mM 시트레이트 또는 100 mM EDTA로 대체하여 ssRNA의 가용성 감소를 피했다. 병렬 실험(parallel experiment)에서, 원하는 경우, 구아니딘 이소티오시아네이트의 농도를 ssRNA가 용출되는 pH를 더 감소시킬 의도로 증가시켰다. 병렬 실험에서, 원하는 경우, 카오트로픽 염 구아니딘 티오시아네이트를 상이한 염으로 교체했다. 병렬 실험에서, 원하는 경우, 킬레이팅제의 종 및 농도를 변경했다.

[0186] 실시예 11.

[0187] 조합된 pH-염 구배로 1차 아민 고체상으로부터 시험관 내 전사 혼합물을 용출.

[0188] 하기 완충액을 제조했다: 50 mM Hepes, pH 7.0을 함유한 완충액 A; 50 mM Hepes, 200 mM 피로포스페이트 나트륨, pH 8.5를 함유한 완충액 B; 100 mM 수산화 나트륨, 2.0 M 염화 나트륨을 함유한 완충액 C; 및 1.5 M Hepes, pH 7.0을 함유한 완충액 D. 2 μm 채널 및 20% 에탄올 중 저장된 100 μL의 충진 부피(bed volume)를 갖는 1차 아민 모노리스를 2 mL/min (20 CV/min)의 유속에서 50 CV 물로 세척했다. 컬럼을 완충액 A로 평형화하고 반응 시작으로부터 30s에 취한 시험관 내 전사 혼합물의 25 μL 샘플을 주입했다. 컬럼을 완충액 A의 20 CV로 세척한 다음에, 20% 완충액 B까지의 40 CV 선형 구배를 적용했고, 이어서, 20% 완충액 B에서 10 CV 구배를 유지했다. 이 세그멘트는 뉴클레오티드 및 DNA 플라스미드를 포함하는 이중 가닥 종들을 용출했다. 50% 완충액 B까지의 10 CV 선형 구배를 적용하여 mRNA를 용출했고, 이어서, 50% B에서 구배를 유지했다. 100% B까지의 추가의 10 CV 선형 구배를 적용한 다음에, 10 CV 구배를 유지했다. 컬럼을 완충액 C로 세척한 다음에, 완충액 D를 이용해 pH 7로 복원했다. 컬럼을 재-평형화했고 시험관 내 전사 개시 후 4 h에 취한 샘플을 주입했다. 이전 샘플과 마찬가지로 용출을 수행했다. 실행 완료 후에, 컬럼을 20% 에탄올로 세척하고 그 용액 중에 저장했다. 모든 크로마토그래피 단계들을 주위 온도에서 수행했다. 용출 프로파일을 도 10에 나타냈다. 30s에 취한 샘플에 대응하는 프로파일을 긴 파선으로 나타냈다. 4 h에 취한 샘플에 대응하는 프로파일을 실선으로 나타냈다. 짧은 파선은 전도도를 나타낸다. 예측한 바와 같이, CTP, UTP, ATP, 및 GTP와 같은 구성 뉴클레오티드들의 수준은 시험관 내 전사 과정에 걸쳐 더 낮은 수준으로 감소되어, 새로 합성된 mRNA로의 통합을 반영한다.

[0189] **참고문헌**

[0190] 본 명세서에서 인용된 모든 참고문헌들은 전 범위가 본 명세서의 명시적 교시와 모순되지 않는 범위에서 참조로 포함된다.

[0191] [1] M Baiersdorfer, G Boros, H Murumatsu, A Mahini, I Vlatkovic, U Sahin, K Kariko, A fascile method for the removal of dsRNA contaminant from in vitro-transcribed mRNA, Molecular therapy: nucleic acids, 15 (2019)

[0192] [2] S. Urayama, Y. Yoshida-Takashima, M. Yoshida, Y. Tomaru, H. Moriyama, K. Takai, T. Nunoura, 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.

[0193] [3] R. Franklin, Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, (1966) 1504-1511.

[0194] [4] A Nwokeoji, AW Kung, P Kilby, D Portwood, M Dickman, Purification and characterization of dsRNA using ion pair reverse phase chromatography and mass spectrometry, J. Chromatography A 1484 (2017) 14-25.

[0195] [5] A Nwokeoji, M Earll, P Kilby, D. Portwood, M. Dickman, High resolution fingerprinting of double-stranded RNA using ion-pair reversed phase chromatography, J. Chromatography B 1104 (2019) 212-219.

[0196] [6] K Kariko, H Muramatsu, J Ludwig, D. Weismann, Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA, Nucleic acid research, 39 (2011) e142.

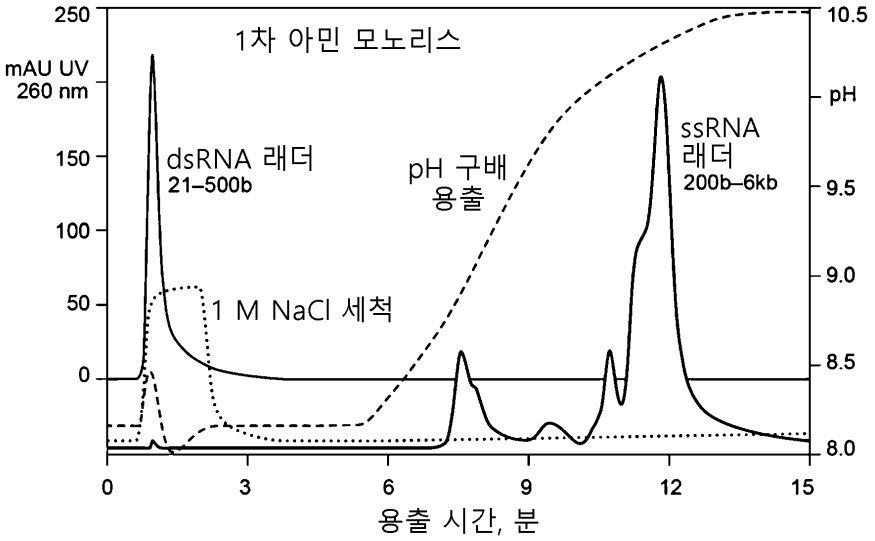
[0197] [7] D. Weismann, N. Pardi, H Murumatsu, K Kariko, HPLC purification of in vitro transcribed long RNA, Methods Molecular Biology, 969 (2013) 43-54.

[0198] [8] 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.

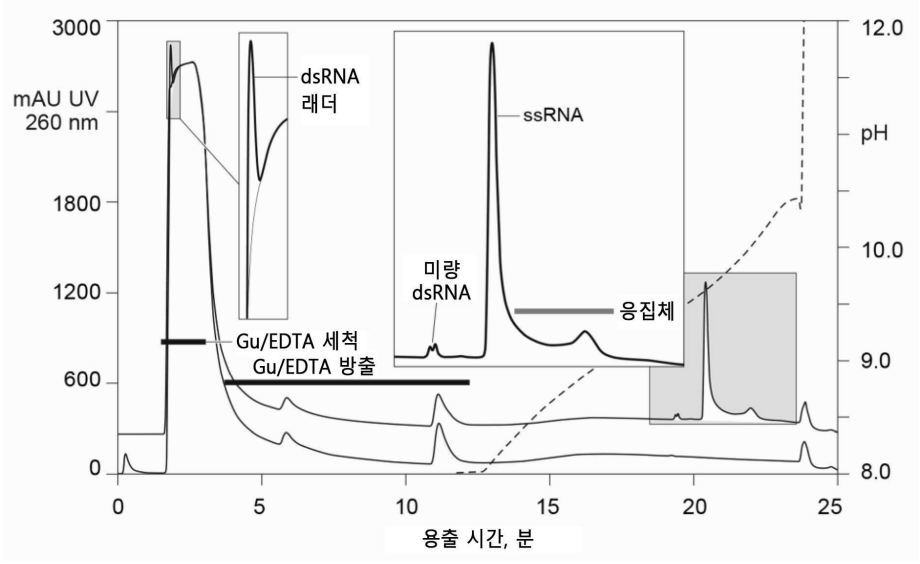
[0199] [9] WO 2014/144767 A1

도면

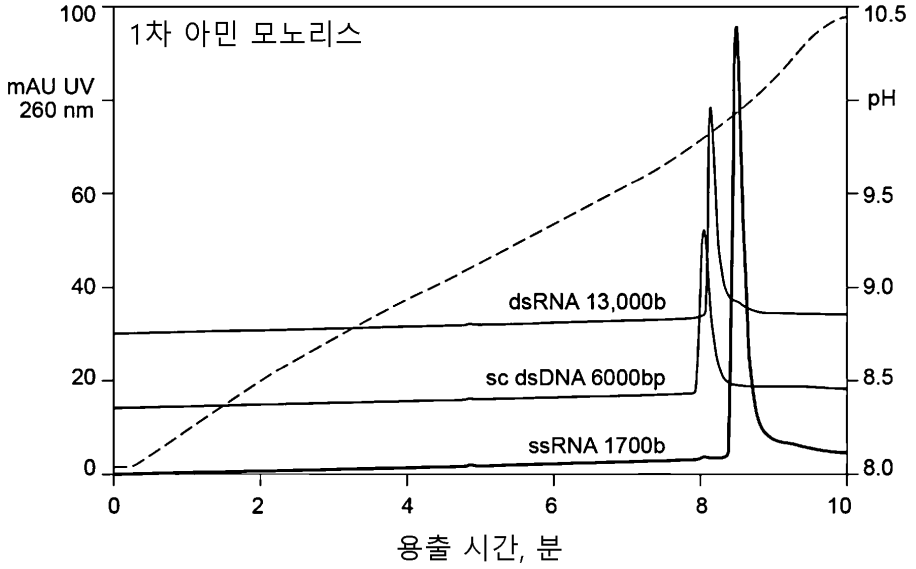
도면1



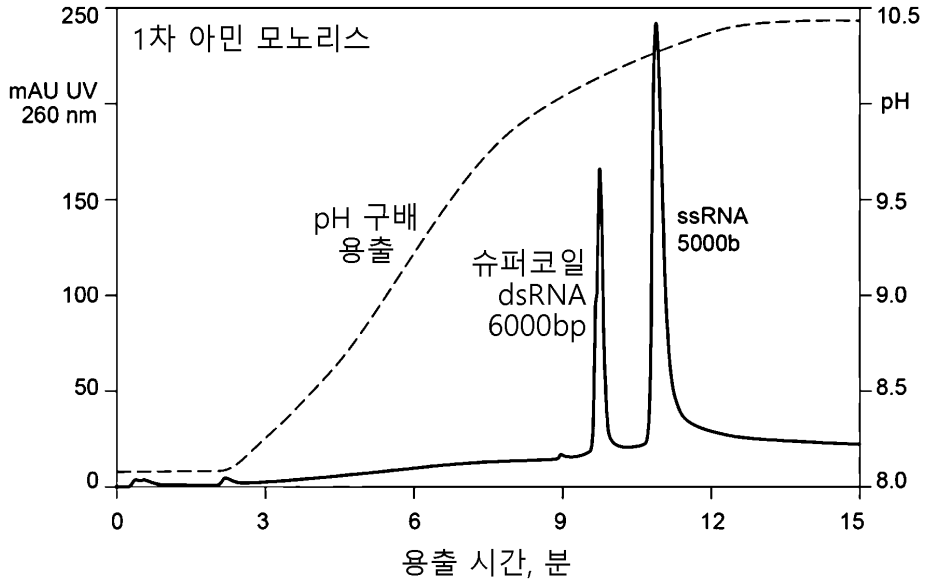
도면2



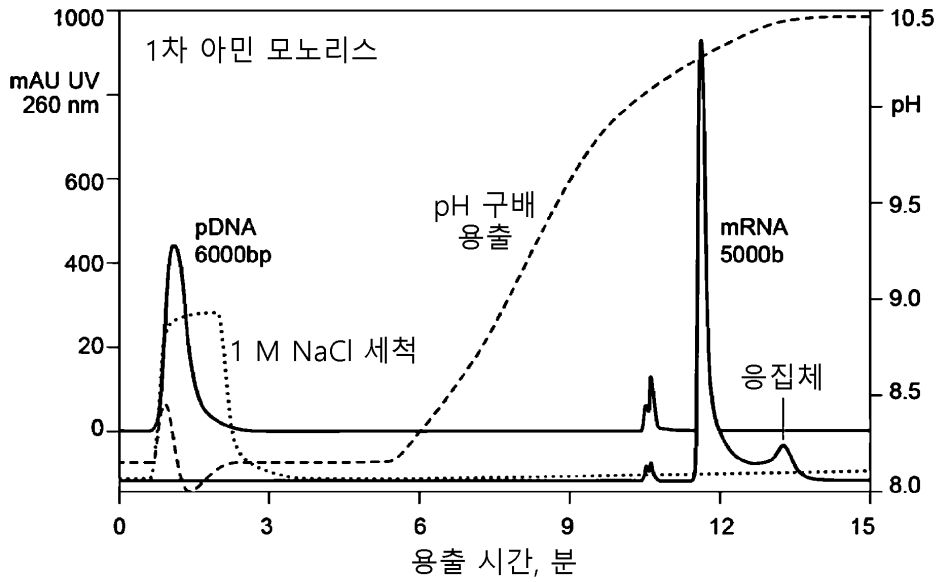
도면3


1차 아민 모노리스
mAU UV
260 nm
pH
dsRNA 13,000b
sc dsDNA 6000bp
ssRNA 1700b
용출 시간, 분

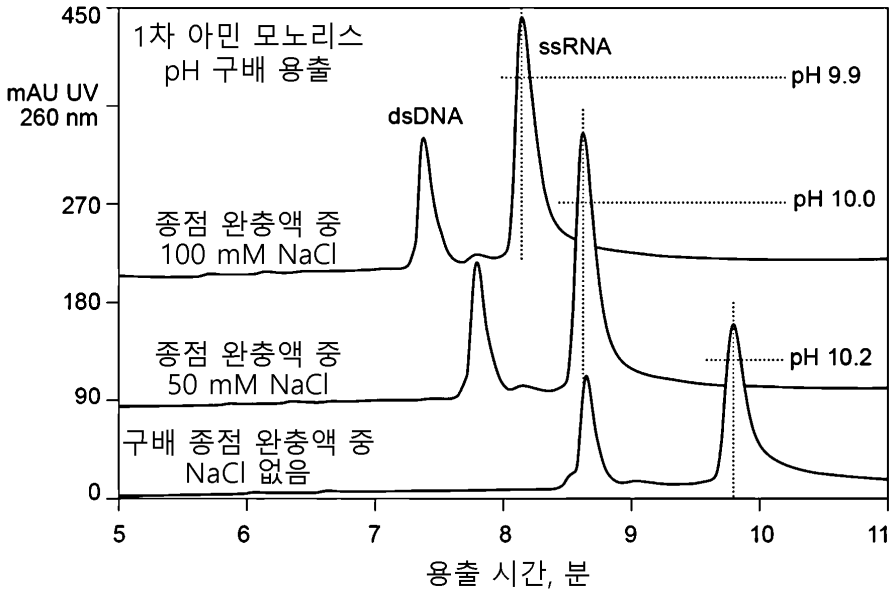
도면4


1차 아민 모노리스
mAU UV
260 nm
pH
pH 구배
용출
슈퍼코일
dsRNA
6000bp
ssRNA
5000b
용출 시간, 분

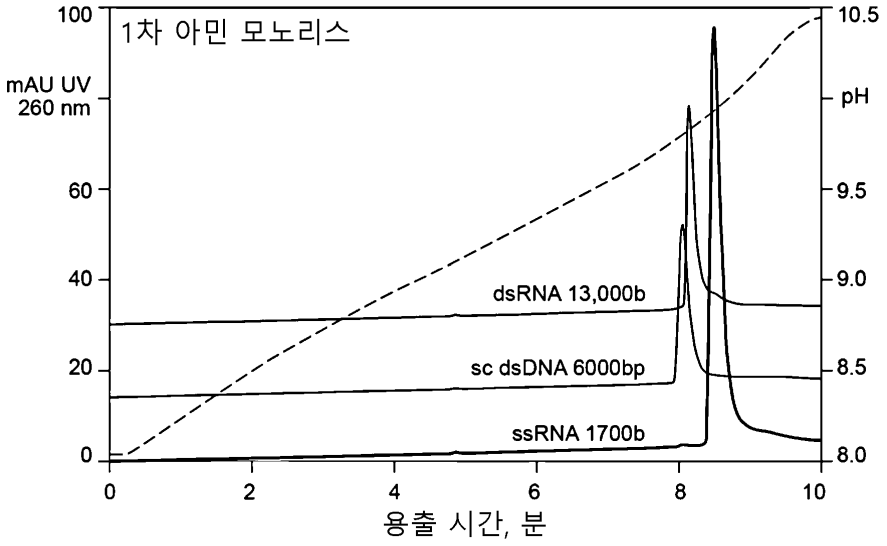
도면5


1000
mAU UV
260 nm
600
400
20
0
1차 아민 모노리스
pDNA
6000bp
pH 구배
용출
1 M NaCl 세척
mRNA
5000b
응집체
10.5
pH
9.5
9.0
8.5
8.0
0
3
6
9
12
15
용출 시간, 분

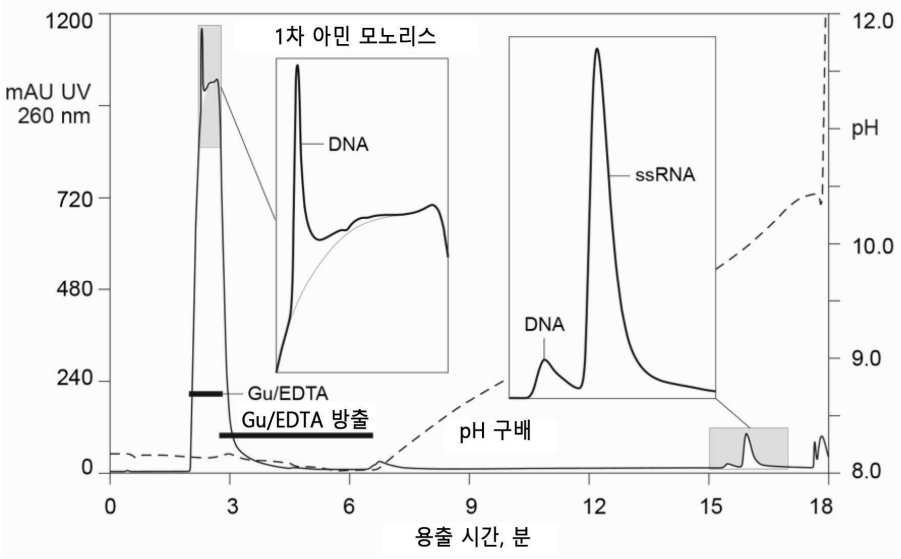
도면6


450
mAU UV
260 nm
270
180
90
0
1차 아민 모노리스
pH 구배 용출
ssRNA
dsDNA
pH 9.9
pH 10.0
pH 10.2
종점 완충액 중
100 mM NaCl
종점 완충액 중
50 mM NaCl
구배 종점 완충액 중
NaCl 없음
5
6
7
8
9
10
11
용출 시간, 분

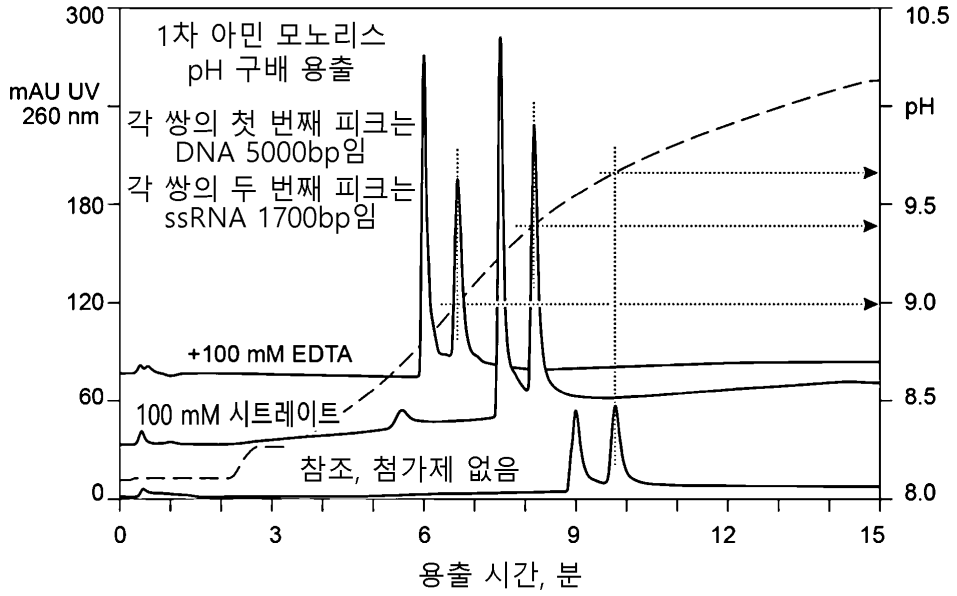
도면7


1차 아민 모노리스
mAU UV
260 nm
pH
dsRNA 13,000b
sc dsDNA 6000bp
ssRNA 1700b
용출 시간, 분

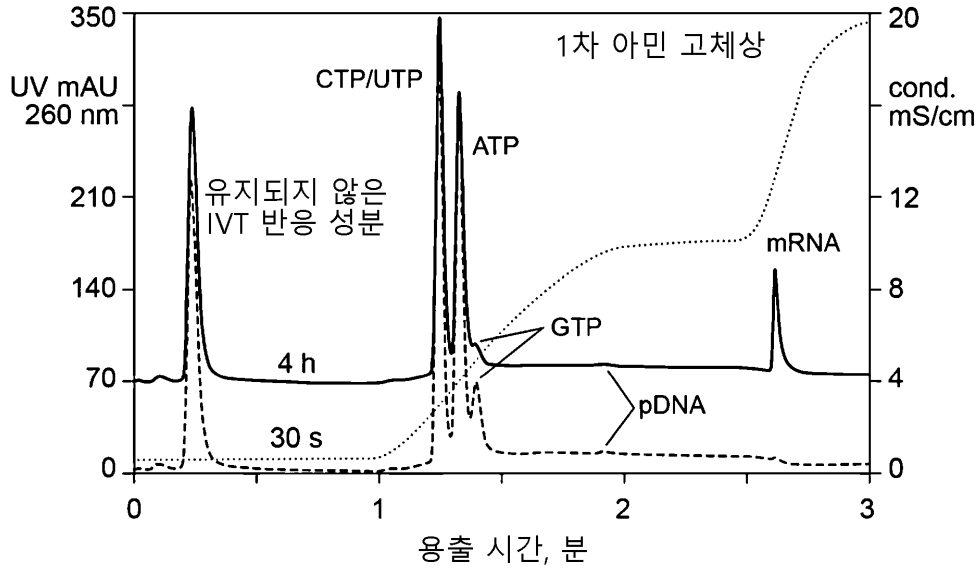
도면8


1차 아민 모노리스
mAU UV
260 nm
pH
DNA
ssRNA
DNA
Gu/EDTA
Gu/EDTA 방출
pH 구배
용출 시간, 분

도면9


1차 아민 모노리스
pH 구배 용출
각 쌍의 첫 번째 피크는
DNA 5000bp임
각 쌍의 두 번째 피크는
ssRNA 1700bp임
mAU UV
260 nm
pH
+100 mM EDTA
100 mM 시트레이트
참조, 첨가제 없음
용출 시간, 분

도면10


1차 아민 고체상
UV mAU
260 nm
cond.
mS/cm
CTP/UTP
ATP
유지되지 않은
IVT 반응 성분
mRNA
GTP
4 h
pDNA
30 s
용출 시간, 분