(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0118174
(43) 공개일자 2024년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 15/10* (2017.01) *C12N 15/113* (2010.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 15/101* (2013.01)
*C12N 15/113* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7024048
(22) 출원일자(국제) 2022년12월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/081826
(87) 국제공개번호 WO 2023/115013
국제공개일자 2023년06월22일
(30) 우선권주장
63/291,185 2021년12월17일 미국(US)

(71) 출원인
**플래그쉽 파이어니어링 이노베이션스 브이아이, 엘엘씨**
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 55 캠브리지 파크웨이 8 플로어
(72) 발명자
**데 보어, 알렉산드라, 소피**
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 8쓰 플로어
**플러기스, 니콜라스, 맥카트니**
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**양영준, 이상남**

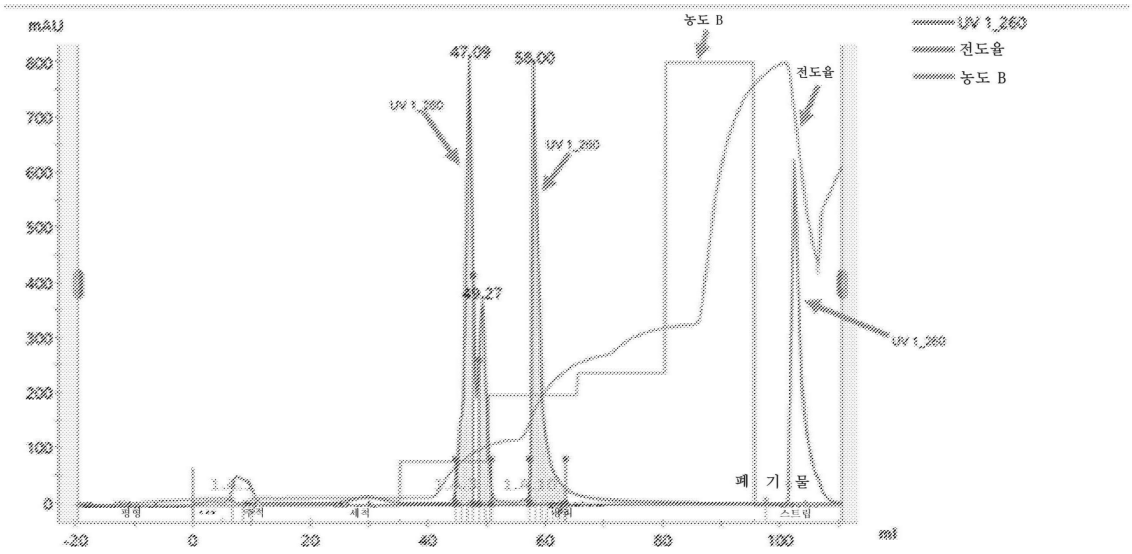
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 **변성 조건 하에서의 원형 RNA의 풍부화를 위한 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드(circRNA) 및 선형 폴리리보뉴클레오티드(linRNA)를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단으로부터의 circRNA의 풍부화를 위한 방법에 관한 것이며, 여기서 풍부화는 변성 조건 하에서 수행된다. 또한 변성 조건 하에서의 용액 내에 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물이 개시된다. 추가로 circRNA의 풍부화된 집단을 함유하는 조성물, 예컨대 조성물을 하나 이상의 변성 조건에 노출시킴으로써 생성된 조성물은 본 발명의 범위 내이다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
*C12N 2310/532* (2013.01)

(72) 발명자

**쿠라, 앤서니, 조셉**

미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 8쓰 플로어

**파브, 조슈아, 나탄**

미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 8쓰 플로어

**맨바, 디네쉬쿠마**

미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 8쓰 플로어

**미스라, 투샤, 칸티**

미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 8쓰 플로어

**넬슨, 제니퍼, 에이.**

미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 8쓰 플로어

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

원형 폴리리보뉴클레오티드(circRNA)의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

(a) circRNA 및 선형 폴리리보뉴클레오티드(linRNA)를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및

(b) 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계.

### 청구항 2

circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

(a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는, 단계; 및

(b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 변성 조건에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

(i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 적어도 1 μg이거나;

(ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나;

(iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL인, 방법.

### 청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 분리 단계 (b)는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 수행되고/거나; circRNA의 풍부화된 집단은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없고, 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함하는, 방법.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하거나; 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는 화학적 처리를 포함하는, 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 방법.

### 청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 방법.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하고/거나; 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 방법.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 PEG, 또는 우레아를 포함하는, 방법.

청구항 13

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 에틸렌 글리콜-비스(β-아미노에틸에테르)-*N,N,N′,N′*-테트라 아세트산(EGTA) 또는 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 그의 유도체, 니트릴로트리아세트산(NTA), 이미노디숙신산(IDS), 폴리아스파르트산, *S,S*-에틸렌디아민-*N,N′*-디숙신산(EDDS), 또는 메틸글리신디아세트산(MGDA)을 포함하는, 방법.

청구항 14

제7항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 노니데트(Nonidet) P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈(Tween)-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 폴리리보뉴클레오티드의 집단에 대해 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하고, 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 것은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하고; 분리는 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계 동안, 및/또는 용리 단계 동안 수행되는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 칼럼 크로마토그래피는 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC), 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환 크로마토그래피(AEC), 혼합 모드 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, AEC는 하기를 포함하는, 방법:

(i) 음이온 교환 수지의 사용으로서, 여기서 음이온 교환 수지는 스티렌-디비닐벤젠, 실리카, 세파로스, 셀룰로스, 덱스트란, 에폭시 폴리아민, 메타크릴레이트, 아가로스, 및 아크릴로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나; 음이온 교환 수지는 4차 암모늄, 아미노 에틸, 디에틸아미노에틸, 및 디에틸아미노프로필로 이루어진 군으로부터 선택되는 이온 교환제를 포함하고/거나; 음이온 교환 수지는 비드를 포함하고, 비드는 45~165 μm의 비드 직경 및 직경 100~1000 nm의 기공 크기를 갖는, 사용; 및/또는

(ii) 선형 구배 용리 또는 단계 등용매 용리의 사용; 및/또는

(iii) 1 mL/분 내지 150 mL/분인 유속의 사용.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 정제된 circRNA의 다수의 분획을 풀링함으로써 수행되는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함하거나 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함하지 않고/거나; 방법은 circRNA의 풍부화를 개선시키는 circRNA에 대한 또는 linRNA에 대한 선택적 변형을 포함하지 않는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 크고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%이고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만인, 방법.

청구항 22

circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하고, 폴리리보뉴클레오티드의 집단은 변성 조건 하에서의 용액 내에 있고,

(i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg이거나;

(ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나;

(iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 500 ng/μL인, 조성물.

청구항 23

circRNA의 풍부화된 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서

(a) 조성물은 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플로부터 수득되고, circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하고;

(b) 조성물은 하나 이상의 변성 조건에 노출되었고;

(c) 조성물은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 EDTA를 포함하는, 조성물.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하거나; 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 조성물.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 조성물.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는 화학적 처리를 포함하는, 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 조성물.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 조성물.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 조성물.

청구항 31

제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하고/거나; 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 조성물.

청구항 32

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 우레아를 포함하는, 방법.

청구항 33

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, EDDS, 또는 MGDA를 포함하는, 조성물.

청구항 34

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 NP40, CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 조성물.

청구항 35

제22항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 크고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%이고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만인, 조성물.

청구항 36

제22항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여하는, 조성물.

청구항 37

circRNA의 순도를 결정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

(a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는, 단계;

(b) 크로마토그래피에 의해 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하는 단계; 및

(c) circRNA에 대한 피크 및 linRNA에 대한 피크를 포함하는 샘플의 크로마토그램을 수집하는 단계;

(d) 각각의 피크하 면적을 계산하여 샘플 내의 circRNA의 순도를 결정하는 단계.

청구항 38

제37항에 있어서, 변성 조건은 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하거나; 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 방법.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 방법.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 변성 조건은 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는 화학적 처리를 포함하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 방법.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 방법.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 방법.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하고/거나; 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 방법.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 우레아를 포함하는, 방법.

청구항 47

제41항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, 폴리아스파르트산, EDDS, 또는 MGDA를 포함하는, 방법.

청구항 48

제41항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 노니데트 P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 방법.

청구항 49

제37항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피이고, 액체 크로마토그래피는 FPLC, HPLC, HIC, AEC, MMC, 또는 친화성 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 50

제37항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 순도의 상대 표준 편차(RSD)는 5% 미만인, 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

### *배 경 기 술*

[0001] 폴리리보뉴클레오티드는 다양한 치료 및 조작 적용에 유용하다. 따라서, 폴리리보뉴클레오티드를 분리하고 정제하기 위한 새로운 조성물 및 방법은 유용하다.

### *발명의 내용*

[0002] 본 발명은 일반적으로 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드(circRNA) 및 선형 폴리리보뉴클레오티드(linRNA)를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단으로부터의 circRNA의 풍부화를 위한 방법에 관한 것이며, 여기서 풍부화는 변성 조건 하에서 수행된다. 또한 변성 조건 하에서의 용액 내에 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물이 개시된다. 추가로 circRNA의 풍부화된 집단을 함유하는 조성물, 예컨대 조성물을 하나 이상의 변성 조건에 노출시킴으로써 생성된 조성물은 본 발명의 범위 내이다. 본 발명은 부분적으로 변성 조건(예를 들어, 열 변성, pH, 또는 화학적 처리) 하에서의 circRNA의 분리가 circRNA, linRNA, 또는 다른 불순물 또는 부산물을 함유하는 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단으로부터의 circRNA의 정제 및 풍부화를 위한 강건한 방법이라는 본 발명자들의 발견에 기반한다. 더욱이, 개시된 방법은 circRNA 정제 공정의 규모 확장을 용이하게 하고, 이로써 다량의 circRNA의 생성 및 정제를 허용한다.

[0003] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0004] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 변성 조건에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0005] 일부 실시 형태에서, (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 적어도 1 μg (예를 들어, 적어도 5 μg, 적어도 10, 적어도 25 μg, 적어도 50 μg, 적어도 100 μg, 적어도 250 μg, 적어도 500 μg, 적어도 750 μg, 적어도 1 mg, 5 mg, 10 mg, 100 mg, 또는 1 g; 또는 5 μg 내지 100 μg, 5 μg 내지 500 μg, 5 μg 내지 1 mg, 5 μg 내지 10 mg, 500 μg 내지 100 mg, 500 μg 내지 1 g, 500 μg 내지 10 g, 100 mg 내지 1g, 또는 1 g 내지 10 g)이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL(예를 들어, 적어도 1 mL, 5 mL, 10 mL, 100 mL, 또는 1 L; 또는 500 μL 내지 100 mL, 500 μL 내지 1 L, 500 μL 내지 10 L 또는 1L 내지 10 L)이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL(예를 들어, 적어도 500 ng/μL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 또는 50 mg/mL; 또는 200 ng/μL 내지 100 mg/mL, 200 ng/μL 내지 50 mg/mL, 또는 1 mg/mL 내지 50 mg/mL)이다. 일부 실시 형태에서, circRNA는 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오

티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 2,500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 2,500개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드, 약 200개의 뉴클레오티드, 약 300개의 뉴클레오티드, 약 400개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드, 약 600개의 뉴클레오티드, 약 700개의 뉴클레오티드, 약 800개의 뉴클레오티드, 약 900개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,500개의 뉴클레오티드, 약 1,750개의 뉴클레오티드, 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 3,000개의 뉴클레오티드, 약 4,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 6,000개의 뉴클레오티드, 약 7,000개의 뉴클레오티드, 약 8,000개의 뉴클레오티드, 약 9,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 11,000개의 뉴클레오티드, 약 12,000개의 뉴클레오티드, 약 13,000개의 뉴클레오티드, 약 14,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 16,000개의 뉴클레오티드, 약 17,000개의 뉴클레오티드, 약 18,000개의 뉴클레오티드, 약 19,000개의 뉴클레오티드, 또는 약 20,000개의 뉴클레오티드)의 길이를 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA는 1,000개 미만의 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0006] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 적어도 1 μg(예를 들어, 적어도 5 μg, 적어도 10, 적어도 25 μg, 적어도 50 μg, 적어도 100 μg, 적어도 250 μg, 적어도 500 μg, 적어도 750 μg, 적어도 1 mg, 5 mg, 10 mg, 100 mg, 또는 1 g; 또는 5 μg 내지 100 μg, 5 μg 내지 500 μg, 5 μg 내지 1 mg, 5 μg 내지 10 mg, 500 μg 내지 100 mg, 500 μg 내지 1 g, 500 μg 내지 10 g, 100 mg 내지 1 g, 또는 1 g 내지 10 g)이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL(예를 들어, 적어도 1 mL, 5 mL, 10 mL, 100 mL, 또는 1 L; 또는 500 μL 내지 100 mL, 500 μL 내지 1 L, 500 μL 내지 10 L 또는 1L 내지 10 L)이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL(예를 들어, 적어도 500 ng/μL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 또는 50 mg/mL; 또는 200 ng/μL 내지 100 mg/mL, 200 ng/μL 내지 50 mg/mL, 또는 1 mg/mL 내지 50 mg/mL)인, 단계; 및 (b) 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0007] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 1 μg 내지 1000 mg(예를 들어, 5 μg 내지 10 mg)이다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 500 μL 내지 1000 mL이다. 일부 실시 형태에서, 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 200 ng/μL 내지 50 mg/mL이다.

[0008] 일부 실시 형태에서, circRNA는 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 2,500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 2,500개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드, 약 200개의 뉴클레오티드, 약 300개의 뉴클레오티드, 약 400개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드, 약 600개의 뉴클레오티드, 약 700개의 뉴클레오티드, 약 800개의 뉴클레오티드, 약 900개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,500개의 뉴클레오티드, 약 1,750개의 뉴클레오티드, 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 3,000개의

뉴클레오티드, 약 4,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 6,000개의 뉴클레오티드, 약 7,000개의 뉴클레오티드, 약 8,000개의 뉴클레오티드, 약 9,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 11,000개의 뉴클레오티드, 약 12,000개의 뉴클레오티드, 약 13,000개의 뉴클레오티드, 약 14,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 16,000개의 뉴클레오티드, 약 17,000개의 뉴클레오티드, 약 18,000개의 뉴클레오티드, 약 19,000개의 뉴클레오티드, 또는 약 20,000개의 뉴클레오티드)의 길이를 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA는 1,000개 미만의 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0009] 일부 실시 형태에서, 분리 단계 (b)는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 수행된다.

[0010] 일부 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함한다.

[0011] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 또는 80℃)의 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 50℃ 내지 85℃의 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 또는 80℃)의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하(예를 들어, 7℃, 6℃, 5℃, 4℃, 3℃, 2℃, 1℃, 0℃, -1℃, -2℃, -3℃, -4℃, -5℃, -6℃, -7℃, -9℃, -10℃, -15℃, -20℃, -25℃, -30℃, -35℃, -40℃, -45℃, -50℃, -55℃, -60℃, -65℃, -70℃, -75℃, -80℃ 이하, 또는 그 미만)의 온도를 포함한다.

[0012] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만)의 pH를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH를 포함한다.

[0013] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 화학적 처리를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 화학적 처리는 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함한다.

[0014] 일부 실시 형태에서, 산은 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함한다.

[0015] 일부 실시 형태에서, 염기는 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함한다.

[0016] 일부 실시 형태에서, 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과; 또는 0.01% 내지 10%)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0017] 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함한다.

[0018] 일부 실시 형태에서, 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4

M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 PEG, 또는 우레아를 포함한다.

[0019] 일부 실시 형태에서, 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 에틸렌 글리콜-비스(β-아미노에틸 에테르)-*N,N,N′,N′*-테트라 아세트산(EGTA) 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, 니트릴로트리아세트산(NTA), 이미노-디숙신산(IDS), 폴리아스파르트산, *S,S*-에틸렌디아민-*N,N′*-디숙신산(EDDS), 또는 메틸글리신디아세트산(MGDA)을 포함한다.

[0020] 일부 실시 형태에서, 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 노니데트(Nonidet) P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈(Tween)-20, 또는 트윈-80을 포함한다.

[0021] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 또는 100℃)의 온도에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계로서, 여기서 분리는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0022] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg(예를 들어, 적어도 5 μg, 적어도 10, 적어도 25 μg, 적어도 50 μg, 적어도 100 μg, 적어도 250 μg, 적어도 500 μg, 적어도 750 μg, 적어도 1 mg, 5 mg, 10 mg, 100 mg, 또는 1 g; 또는 5 μg 내지 100 μg, 5 μg 내지 500 μg, 5 μg 내지 1 mg, 5 μg 내지 10 mg, 500 μg 내지 100 mg, 500 μg 내지 1 g, 500 μg 내지 10 g, 100 mg 내지 1 g, 또는 1 g 내지 10 g)이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL(예를 들어, 적어도 1 mL, 5 mL, 10 mL, 100 mL, 또는 1 L; 또는 500 μL 내지 100 mL, 500 μL 내지 1 L, 500 μL 내지 10 L 또는 1L 내지 10 L)이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL(예를 들어, 적어도 500 ng/μL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 또는 50 mg/mL; 또는 200 ng/μL 내지 100 mg/mL, 200 ng/μL 내지 50 mg/mL, 또는 1 mg/mL 내지 50 mg/mL)인, 단계; 및 (b) 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 또는 100℃)의 온도에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0023] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 또는 100℃)의 온도에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계. 일부 실시 형태에서, 온도는 50℃ 내지 85℃이다. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0024] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계로서, 여기서 분리는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0025] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg(예를 들어, 적

어도 5 μg, 적어도 10, 적어도 25 μg, 적어도 50 μg, 적어도 100 μg, 적어도 250 μg, 적어도 500 μg, 적어도 750 μg, 적어도 1 mg, 5 mg, 10 mg, 100 mg, 또는 1 g; 또는 5 μg 내지 100 μg, 5 μg 내지 500 μg, 5 μg 내지 1 mg, 5 μg 내지 10 mg, 500 μg 내지 100 mg, 500 μg 내지 1 g, 500 μg 내지 10 g, 100 mg 내지 1 g, 또는 1 g 내지 10 g)이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL(예를 들어, 적어도 1 mL, 5 mL, 10 mL, 100 mL, 또는 1 L; 또는 500 μL 내지 100 mL, 500 μL 내지 1 L, 500 μL 내지 10 L 또는 1L 내지 10 L)이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL(예를 들어, 적어도 500 ng/μL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 또는 50 mg/mL; 또는 200 ng/μL 내지 100 mg/mL, 200 ng/μL 내지 50 mg/mL, 또는 1 mg/mL 내지 50 mg/mL)인, 단계; 및 (b) 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0026] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0027] 일부 실시 형태에서, pH는 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만)이다. 일부 실시 형태에서, pH는 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)이다.

[0028] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액을 포함하는 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계로서, 여기서 분리는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0029] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg(예를 들어, 적어도 5 μg, 적어도 10, 적어도 25 μg, 적어도 50 μg, 적어도 100 μg, 적어도 250 μg, 적어도 500 μg, 적어도 750 μg, 적어도 1 mg, 5 mg, 10 mg, 100 mg, 또는 1 g; 또는 5 μg 내지 100 μg, 5 μg 내지 500 μg, 5 μg 내지 1 mg, 5 μg 내지 10 mg, 500 μg 내지 100 mg, 500 μg 내지 1 g, 500 μg 내지 10 g, 100 mg 내지 1 g, 또는 1 g 내지 10 g)이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL(예를 들어, 적어도 1 mL, 5 mL, 10 mL, 100 mL, 또는 1 L; 또는 500 μL 내지 100 mL, 500 μL 내지 1 L, 500 μL 내지 10 L 또는 1L 내지 10 L)이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL(예를 들어, 적어도 500 ng/μL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 또는 50 mg/mL; 또는 200 ng/μL 내지 100 mg/mL, 200 ng/μL 내지 50 mg/mL, 또는 1 mg/mL 내지 50 mg/mL)인, 단계; 및 (b) 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액을 포함하는 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0030] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계. 또한 상기 기재된 조건 하에서 linRNA의 집단으로부터 circRNA의 집단을 분리하는 방법으로서, 임의적으로 circRNA의 집단을 정량화하고/거나 linRNA의 집단을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이 고려된다.

[0031] 일부 실시 형태에서, 산은 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함한다.

[0032] 일부 실시 형태에서, 염기는 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함한다.

[0033] 일부 실시 형태에서, 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과; 또는 0.01% 내지 10%)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0034] 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 PEG를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함한다.

[0035] 일부 실시 형태에서, 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 PEG, 또는 우레아를 포함한다.

[0036] 일부 실시 형태에서, 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, EDDS, 또는 MGDA를 포함한다.

[0037] 일부 실시 형태에서, 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 NP40, CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함한다.

[0038] 일부 실시 형태에서, 단계 (b)는 폴리리보뉴클레오티드의 집단에 대해 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하고, 여기서 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 것은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함한다.

[0039] 일부 실시 형태에서, 분리는 샘플 로딩 단계 동안 수행된다. 일부 실시 형태에서, 분리는 칼럼 세척 단계 동안 수행된다. 일부 실시 형태에서, 분리는 용리 단계 동안 수행된다.

[0040] 일부 실시 형태에서, 칼럼 크로마토그래피는 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC), 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환 크로마토그래피(AEC), 혼합 모드 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피를 포함한다.

[0041] 일부 실시 형태에서, AEC는 스티렌-디비닐벤젠, 실리카, 세파로스, 셀룰로스, 덱스트란, 에폭시 폴리아민, 메타크릴레이트, 아가로스, 또는 아크릴을 포함하는 음이온 교환 수지의 사용을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 음이온 교환 수지는 4차 암모늄, 아미노 에틸, 디에틸아미노에틸, 또는 디에틸아미노프로필을 포함하는 이온 교환제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 음이온 교환 수지는 비드를 포함하고, 여기서 비드는 45~165 μm의 비드 직경 및 직경 100~1000 nm의 기공 크기를 갖는다. 일부 실시 형태에서, AEC는 선형 구배 용리 또는 단계 등용매 용리의 사용을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AEC는 1 mL/분 내지 150 mL/분인 유속의 사용을 포함한다.

[0042] 일부 실시 형태에서, FPLC는 역상-FPLC(RP-FPLC)이다.

[0043] 일부 실시 형태에서, 단계 (b)는 정제된 circRNA의 다수의 분획을 풀링함으로써 수행된다.

[0044] 일부 실시 형태에서, circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여한다.

[0045] 일부 실시 형태에서, 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 방법은 circRNA의 풍부화를 개선시키는 circRNA에 대한 또는 linRNA에 대한 선택적 변형을 포함하지 않는다.

[0046] 일부 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 크다. 일부 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%(예를 들어, 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)이다. 일부 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만(예를 들어, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만)이다.

[0047] 일부 실시 형태에서, circRNA는 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 2,500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 2,500개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드, 약 200개의 뉴클레오티드, 약 300개의 뉴클레오티드, 약 400개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드, 약 600개의 뉴클레오티드, 약 700개의 뉴클레오티드, 약 800개의 뉴클레오티드, 약 900개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,500개의 뉴클레오티드, 약 1,750개의 뉴클레오티드, 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 3,000개의 뉴클레오티드, 약 4,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 6,000개의 뉴클레오티드, 약 7,000개의 뉴클레오티드, 약 8,000개의 뉴클레오티드, 약 9,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 11,000개의 뉴클레오티드, 약 12,000개의 뉴클레오티드, 약 13,000개의 뉴클레오티드, 약 14,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 16,000개의 뉴클레오티드, 약 17,000개의 뉴클레오티드, 약 18,000개의 뉴클레오티드, 약 19,000개의 뉴클레오티드, 또는 약 20,000개의 뉴클레오티드)의 길이를 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA는 1,000개 미만의 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0048] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 폴리리보뉴클레오티드의 집단은 변성 조건 하에서의 용액 내에 있고, (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg(예를 들어, 적어도 5 μg, 적어도 10, 적어도 25 μg, 적어도 50 μg, 적어도 100 μg, 적어도 250 μg, 적어도 500 μg, 적어도 750 μg, 적어도 1 mg, 5 mg, 10 mg, 100 mg, 또는 1 g; 또는 5 μg 내지 100 μg, 5 μg 내지 500 μg, 5 μg 내지 1 mg, 5 μg 내지 10 mg, 500 μg 내지 100 mg, 500 μg 내지 1 g, 500 μg 내지 10 g, 100 mg 내지 1 g, 또는 1 g 내지 10 g)이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL(예를 들어, 적어도 1 mL, 5 mL, 10 mL, 100 mL, 또는 1 L; 또는 500 μL 내지 100 mL, 500 μL 내지 1 L, 500 μL 내지 10 L 또는 1L 내지 10 L)이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 500 ng/μL(예를 들어, 적어도 500 ng/μL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 또는 50 mg/mL; 또는 200 ng/μL 내지 100 mg/mL, 200 ng/μL 내지 50 mg/mL, 또는 1 mg/mL 내지 50 mg/mL)인, 조성물을 제공한다.

[0049] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 폴리리보뉴클레오티드의 집단은 변성 조건 하에서의 용액 내에 있고, 용액은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물을 제공한다.

[0050] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 (a) 조성물은 핵산의 집단을 포함하는 샘플로부터 수득되고; (b) 조성물은 하나 이상의 변성 조건에 노출되었고; (c) 조성물은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물을 제공한다.

[0051] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 풍부화된 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 (a) 조성물은 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플로부터 수득되고; (b) 조성물은 하나 이상의 변성 조건에 노출되었고; (c) 조성물은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물을 제공한다.

[0052] 일부 실시 형태에서, circRNA는 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 2,500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 2,500개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드, 약 200개의 뉴클레오티드, 약 300개의 뉴클레오티드, 약 400개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드, 약 600개의 뉴클레오티드, 약 700개의 뉴클레오티드, 약 800개의 뉴클레오티드, 약 900개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,500개의 뉴클레오티드, 약 1,750개의 뉴클레오티드, 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 3,000개의 뉴클레오티드, 약 4,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 6,000개의 뉴클레오티드, 약 7,000개의 뉴클레오티드, 약 8,000개의 뉴클레오티드, 약 9,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 11,000개의 뉴클레오티드, 약 12,000개의 뉴클레오티드, 약 13,000개의 뉴클레오티드, 약 14,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 16,000개의 뉴클레오티드, 약 17,000개의 뉴클레오티드, 약 18,000개의 뉴클레오티드, 약 19,000개의 뉴클레오티드, 또는 약 20,000개의 뉴클레오티드)의 길이를 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 갖는다.

[0053] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 EDTA를 포함한다.

[0054] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 또는 100℃)의 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 50℃ 내지 85℃의 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 또는 100℃)의 온도, 이어서 8℃ 이하(예를 들어, 7℃, 6℃, 5℃, 4℃, 3℃, 2℃, 1℃, 0℃, -1℃, -2℃, -3℃, -4℃, -5℃, -6℃, -7℃, -9℃, -10℃, -15℃, -20℃, -25℃, -30℃, -35℃, -40℃, -45℃, -50℃, -55℃, -60℃, -65℃, -70℃, -75℃, -80℃ 이하, 또는 그 미만)의 온도를 포함한다.

[0055] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH를 포함한다.

[0056] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 화학적 처리를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 화학적 처리는 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함한다.

[0057] 일부 실시 형태에서, 산은 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함한다.

[0058] 일부 실시 형태에서, 염기는 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함한다.

[0059] 일부 실시 형태에서, 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과; 또는 0.01% 내지 10%)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0060] 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 PEG를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함한다.

[0061] 일부 실시 형태에서, 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 PEG, 또는 우레아를 포함한다.

[0062] 일부 실시 형태에서, 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, EDDS, 또는 MGDA를 포함한다.

[0063] 일부 실시 형태에서, 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 NP40, CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함한다.

[0064] 일부 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 크다. 일부 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%(예를 들어, 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)이다. 일부 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만(예를 들어, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만)이다.

[0065] 일부 실시 형태에서, circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖는다. 일부 실시 형태에서, circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여한다.

[0066] 한 양태에서, 본 발명은 circRNA의 순도를 결정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법을 제공한다: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) 크로마토그래피에 의해 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하는 단계; 및 (c) circRNA에 대한 피크 및 linRNA에 대한 피크를 포함하는 샘플의 크로마토그램을 수집하는 단계; (d) 각각의 피크하 면적을 계산하여 샘플 내의 circRNA의 순도를 결정하는 단계.

[0067] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는다.

[0068] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 적어도 50℃(예를 들어, 적어도 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 또는 100℃)의 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 50℃ 내지 85℃의 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하(예를 들어, 7℃, 6℃, 5℃, 4℃, 3℃, 2℃, 1℃, 0℃, -1℃, -2℃, -3℃, -4℃, -5℃, -6℃, -7℃, -9℃, -10℃, -15℃, -20℃, -25℃, -30℃, -35℃, -40℃, -45℃, -50℃, -55℃, -60℃, -65℃, -70℃, -75℃, -80℃ 이하, 또는 그 미만)의 온도를 포함한다.

[0069] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 5 미만(예를 들어, 4, 3, 2, 또는 1 미만)의 pH를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 9 초과(예를 들어, 10, 11, 12, 또는 13 초과)의 pH를

포함한다.

[0070] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 화학적 처리를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 화학적 처리는 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함한다.

[0071] 일부 실시 형태에서, 산은 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함한다.

[0072] 일부 실시 형태에서, 염기는 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함한다.

[0073] 일부 실시 형태에서, 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과; 또는 0.01% 내지 10%)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0074] 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 PEG를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함한다.

[0075] 일부 실시 형태에서, 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 PEG, 또는 우레아를 포함한다.

[0076] 일부 실시 형태에서, 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 EGTA 또는 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 그의 유도체, 니트릴로트리아세트산(NTA), 이미노-디숙신산(IDS), 폴리아스파르트산, *S,S*-에틸렌디아민-*N,N'*-디숙신산(EDDS), 또는 메틸글리신디아세트산(MGDA)을 포함한다.

[0077] 일부 실시 형태에서, 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 노니데트 P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함한다.

[0078] 일부 실시 형태에서, 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 액체 크로마토그래피는 FPLC, HPLC, HIC, AEC, MMC, 또는 친화성 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0079] 일부 실시 형태에서, 순도의 상대 표준 편차(RSD)는 5% 미만(예를 들어, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.5%, 1%, 또는 0.5% 미만이다).

[0080] **정의**

[0081] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어가 하기에 정의된다. 본원에 정의된 용어는 본 발명과 관련된 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다.

[0082] 본원에 사용된 단수 형태는 달리 나타내지 않는 한, "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미한다. 또한, 단수 형태는 맥락이 명백하게 달리 나타내지 않는 한, 복수 언급대상을 포함한다.

[0083] 본원에 사용된 바와 같이, "약"은 나열된 값의 ± 10%의 양을 지칭한다.

[0084] 본원에 사용된 바와 같이, "담체"라는 용어는 부분적으로 또는 완전히 캡슐화제를 통해, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 공유 변형에 의해 세포 내로의 조성물(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드)의 수송 또는 전달을 용이하게 하는 화합물, 조성물, 시약, 또는 분자, 또는 이들의 조합이다. 담체의 비제한적인 예는 탄수화물 담체(예를 들어, 무수물-변형 피토 글리코겐 또는 글리코겐-유형 물질), 나노입자(예를 들어, 캡슐화하거나 공유적으로 연결된 나노입자는 원형 폴리리보뉴클레오티드에 결합함), 리포좀, 푸소좀, 생체외 분화된 망상적혈구, 엑소좀, 단백질 담체(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드에 공유적으로 연결된 단백질), 또는 양이온성 담체(예를 들어, 양이온성 지질중합체 또는 형질감염 시약)를 포함한다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같이, "크로마토그래피"라는 용어는 원형 폴리리보뉴클레오티드(circRNA) 및 선형 폴리리보뉴클레오티드(linRNA)를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터 circRNA의 집단을 정제하고 풍부화하는 데 사용될 수 있는 다양한 크로마토그래피적 방법을 지칭한다. 크로마토그래피는 칼럼 및 비-칼럼 크로마토그래피, 예를 들어 전기영동 방법, 예컨대 모세관 겔 전기영동을 포함한다. 크로마토그래피는 낮은 또는 정상 압력 액체 크로마토그래피 분리 방법을 포함한다. 이는 FPLC(역상(RP)-FPLC 및 정상(NP)-FPLC), 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 또는 혼합-모드 크로마토그래피를 포함할 수 있다.

[0086] 본원에 사용된 바와 같이, "circRNA", "원형 폴리리보뉴클레오티드", 및 "원형 RNA"라는 용어는 상호교환 가능하게 사용되며, 유리 단부를 갖지 않는(즉, 유리 3' 또는 5' 단부를 갖지 않는) 구조를 갖는 폴리리보뉴클레오티드 분자, 예를 들어 공유 또는 비-공유 결합을 통해 원형 또는 단부 없는 구조를 형성하는 폴리리보뉴클레오티드 분자를 의미한다. 원형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어, 공유적으로 폐쇄된 폴리리보뉴클레오티드일 수 있다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같이, "변성 조건"이라는 용어는 용액 내의 폴리뉴클레오티드의 분자 배열을 파괴하는 임의의 조건, 예컨대 물리적 또는 화학적 조건, 또는 조건의 세트를 지칭한다. 변성 조건 하에서의 폴리뉴클레오티드는 circRNA, linRNA, 선형 폴리데옥시리보뉴클레오티드(linDNA), 또는 원형 폴리데옥시리보뉴클레오티드(circDNA)를 포함할 수 있다. 변성 조건은 상보적 염기 쌍 사이의 수소 결합 및 다른 비-공유적 힘(예를 들어, 반 데르 발스 힘 또는 소수성 상호작용)이 파괴되고, 이로써 생리학적 조건 하에서 관찰되는 구조와 비교하여, 폴리뉴클레오티드 내의 정돈된 구조, 예컨대, 예를 들어, 2차 또는 3차 중합체 구조(예를 들어, 다른 것들 중에서도, 이중 나선, 스템-루프, 스태킹)를 감소시키거나 제거하는 조건을 지칭한다. 변성 조건은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드의 핵산 잔기 사이의 분자내 또는 분자간 상호작용을 감소시키거나, 제거하거나, 재조직화할 수 있다. 변성 조건은 또한 중합체 내의 인접한 핵산 단량체 사이의 공유 결합, 예컨대, 예를 들어, 인접한 뉴클레오시드 사이의 포스포디에스테르 결합이 파괴되는 조건을 지칭할 수 있다. 이론에 구애되기를 원하지는 않지만, circRNA는 그의 원형 구조로 인해 linRNA에 비해 샘플에서 선택적으로 풍부화될 수 있으며, 이는 가능한 입체형태의 범위를 제약하고 이를 변성에 대해 덜 감수성으로 만드는 반면, linRNA는 더 가요성일 수 있으며, 따라서, 변성 조건에 의해 2차 및 3차 구조의 파괴가 더 잘 될 수 있다. 변성 조건은 circRNA, linRNA, linDNA, circDNA, 또는 폴리펩티드가 노출되는 몇몇 조건 중 하나를 조작함으로써 실험적 환경에서 생성될 수 있다. 변성 조건의 비제한적인 예는 예를 들어, 열 변성, 쇼크-냉각, 산성 또는 알칼리성 pH(예를 들어, pH 5 미만 또는 pH 9 초과), 또는 화학적 처리(예를 들어, 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 킬레이트화제, 크라우딩제, 세정제, 또는 염 용액으로)이다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같이, "용리액"이라는 용어는 정제 단계(예를 들어, 크로마토그래피 단계, 예컨대, 예를 들어, RP-FPLC 단계) 동안 매질(예를 들어, 소수성 정지상)로부터 용리된 분석물 물질(예를 들어, circRNA의 풍부화된 집단)을 함유하는 분획을 지칭한다. 용리액은 용리제를 매질에 적용함으로써 매질로부터 방출되고, 이로써 분석물을 방출할 수 있다. 보다 구체적으로, 용리액은 용리제(예를 들어, 용리 완충제, 예컨대 유기 용매를 함유하는 완충제)를 매질에 적용한 후 매질로부터 방출된 circRNA를 함유하는 분획을 지칭할 수 있다.

[0089] 본원에 사용된 바와 같이, "linRNA" 및 "선형 폴리리보뉴클레오티드"라는 용어는 상호교환 가능하게 사용되며, 5' 및 3' 단부를 갖는 폴리리보뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 실시 형태에서, linRNA는 유리 5' 단부 또는 3' 단부를 갖는다. 일부 실시 형태에서, linRNA는 비-공유적으로 연결된 5' 또는 3' 단부를 갖는다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같이, "변형된 올리고뉴클레오티드"라는 용어는 당, 핵염기, 또는 뉴클레오티드간 연결에 대한 적어도 하나의 변형을 갖는 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, "변형된 리보뉴클레오티드"라는 용어는 당, 핵염기, 또는 뉴클레오시드간 연결에 대한 적어도 하나의 변형을 갖는 뉴클레오시드를 함유하는 리보뉴클레오티드를 의미한다.

[0092] 본원에 사용된 바와 같이, "네이키드 전달"이라는 용어는 담체의 보조 없이 및 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 대한 공유 변형 없이 세포에 전달하기 위한 제형이다. 네이키드 전달 제형은 임의의 형질감염 시약, 양이온성 담체, 탄수화물 담체, 나노입자 담체, 또는 단백질 담체가 없다. 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 네이키드 전달 제형은 공유 변형이 없고 담체가 없는 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 제형이다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 하나 이상의 핵산 서브유닛, 또는 뉴클레오티드를 포함하는 분자를 의미하며, "핵산" 또는 "올리고뉴클레오티드"와 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 아데노신(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T) 및 우라실(U), 또는 그의 변이체로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드는 뉴클레오시드 및 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과의 포스페이트($PO_3$) 기를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드는 핵염기, 5탄당(리보스 또는 데옥시리보스 중 어느 하나), 및 하나 이상의 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 리보뉴클레오티드는 당이 리보스인 뉴클레오티드이다. 폴리리보뉴클레오티드, 리보핵산, 또는 RNA는 포스포디에스테르 결합을 통해 중합된 다수의 리보뉴클레오티드를 포함하는 거대 분자를 지칭할 수 있다. 데옥시리보뉴클레오티드는 당이 데옥시리보스인 뉴클레오티드이다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단"이라는 어구는 폴리리보뉴클레오티드의 이질적 집단을 지칭한다. 이러한 폴리리보뉴클레오티드의 이질적 집단은 circRNA, linRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물(예를 들어, 본원에 기재된 하나 이상의 불순물 또는 부산물)을 함유한다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리펩티드"는 대부분 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기(천연 또는 비천연)의 중합체를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어는 임의의 크기, 구조, 또는 기능의 단백질, 폴리펩티드, 및 펩티드를 지칭한다. 폴리펩티드는 유전자 생성물, 천연 발생 폴리펩티드, 합성 폴리펩티드, 상기의 동족체, 오르토로그, 파라로그, 단편 및 다른 등가물, 변이체, 및 유사체를 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 단일 분자 또는 다중-분자 복합체, 예컨대 이량체, 삼량체, 또는 사량체일 수 있다. 이들은 또한 단일 쇄 또는 다중쇄 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 인슐린을 포함할 수 있고, 회합되거나 연결될 수 있다. 가장 통상적으로 디술피드 연결은 다중쇄 폴리펩티드에서 발견된다. 폴리펩티드라는 용어는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공 화학적 유사체인 아미노산 중합체에도 적용될 수 있다.

[0096] 본원에서 상호교환 가능하게 사용된 바와 같이, "폴리A" 및 "폴리A 서열"이라는 용어는 적어도 5개의 뉴클레오티드의 길이이고 아데노신 잔기로 이루어진 핵산 분자의 비번역된 인접한 영역을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 폴리A 서열은 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 또는 적어도 50개의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 폴리A 서열은 오픈 리딩 프레임(예를 들어, 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임)에 대해 3'에(예를 들어, 그의 하류에) 위치하고, 폴리A 서열은 폴리A가 번역되지 않도록 종결 요소(예를 들어, 정지 코돈)에 대해 3'이다. 일부 실시 형태에서, 폴리A 서열은 종결 요소 및 3' 비번역된 영역에 대해 3'에 위치한다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같이, "정제하다", "정제하는 것", 및 "정제"라는 용어는 다른 물질 중에서도, circRNA 및 linRNA의 이질적 혼합물을 함유하는 샘플로부터 불순물 또는 부산물(예를 들어, linRNA)을 제거하여, 원래 혼합물과 비교하여 감소된 수준의 불순물 또는 부산물(예를 들어, linRNA)을 갖거나, 출발 혼합물에 비해 linRNA 또는 물질이 40 질량% 또는 그 초과(예를 들어, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 또는 그 초과) 감소된 circRNA의 풍부화된 집단을 함유하는 조성물을 생성하는 하나 이상의 단계 또는 공정을 지칭한다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같이, "순수한" 또는 "순도"라는 용어는 분석물(예를 들어, circRNA)이 단리되었고 다른 성분이 없는 정도를 지칭한다. 핵산(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드)의 맥락에서, 단리된 핵산(예를 들어, circRNA)의 순도는 임의의 오염물(예를 들어, linRNA 및 다른 물질)이 없는 핵산의 집단에 관하여 표현될 수 있다. 예를 들어, circRNA의 집단의 순도는 예를 들어, 순수한 circRNA를 기준물로서 사용하여 결정될 수 있는, 단리된 물질의 총 질량을 기준으로 얼마나 많은 집단이 circRNA인지를 나타낸다. 본 발명에서 발견된 순도의 수준은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 95% 초과, 또는 99% 초과(w/w)일 수 있다. 본 발명의 circRNA의 "순수한" 집단은 질량 기준으로 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 또는 최대 70% 초과 순수할 수 있다. circRNA의 "실질적으로 순수한" 집단은 오염물 또는 불순물 또는 부산물(예를 들어, linRNA)이 실질적으로 없으며, 예를 들어, 질량 기준으로

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 초과, 또는 99% 초과의 순도일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 오염물 또는 불순물 또는 부산물의 수준은 약 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1%(w/w) 이하이다. 순도는 겔 전기영동, 분광광도법(예를 들어, 써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)에 의한 나노드롭(NanoDrop)), 또는 핵산의 집단의 순도를 측정하는 데 적합한 다른 기법을 사용하여 특정 분석물(예를 들어, circRNA)의 수준을 검출하고, (예를 들어, 당업계에 알려진 검정에 의해 결정된 바와 같은) 총 핵산 함량에 비한 분석물의 백분율(w/w)을 계산함으로써 결정될 수 있다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같이, "하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는"이라는 어구는 하나 이상의 불순물 또는 부산물(예를 들어, 본원에 개시된 하나 이상의 불순물 또는 부산물)이 없거나, 하나 이상의 불순물 또는 부산물의 최소량을 함유하는 샘플, 예컨대 circRNA의 풍부화된 집단을 함유하는 샘플의 특성을 지칭한다. 하나 이상의 불순물 또는 부산물의 최소량은 20%(w/w) 이하(예를 들어, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%(w/w) 이하, 또는 그 미만)일 수 있다. 또 다른 예에서, 샘플 또는 circRNA의 풍부화된 집단은, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 15%(w/w) 미만(예를 들어, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%(w/w) 이하, 또는 그 미만)인 양으로 존재하는 경우, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다. 또 다른 예에서, 샘플 또는 circRNA의 풍부화된 집단은, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 10%(w/w) 미만(예를 들어, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%(w/w) 이하, 또는 그 미만)인 양으로 존재하는 경우, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다. 또 다른 예에서, 샘플 또는 circRNA의 풍부화된 집단은, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 5%(w/w) 미만(예를 들어, 4%, 3%, 2%, 1%(w/w) 이하 또는 그 미만)인 양으로 존재하는 경우, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다. 추가의 또 다른 예에서, 샘플 또는 circRNA의 풍부화된 집단은, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 1% 미만(0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%(w/w) 이하, 또는 그 미만)인 양으로 존재하는 경우, 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다.

[0100] 본원에 사용된 바와 같이, "종결 요소"는 원형 또는 선형 폴리리보뉴클레오티드에서 발현 서열의 번역을 종결시키는 모이어티, 예컨대 핵산 서열이다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같이, "번역 개시 서열"은 원형 또는 선형 폴리리보뉴클레오티드에서 발현 서열의 번역을 개시시키는 핵산 서열이다.

[0102] 본원에 사용된 바와 같이, "수율"이라는 용어는 출발 물질(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드, 예컨대, 예를 들어, circRNA 및 linRNA의 혼합된 집단) 내의 분석물의 양과 비교하여 정제 단계 또는 공정 후에 수득된 분석물(예를 들어, circRNA의 집단)의 상대적 양(w/w)을 지칭한다. 수율은 백분율로서 표현될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 출발 물질 내의 분석물(예를 들어, circRNA) 및 정제 단계 후에 수득된 분석물의 양은 검정(예를 들어, 겔 전기영동 또는 분광광도법)을 사용하여 측정될 수 있다. 본 발명의 방법은 예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단에 존재하는 양에 비해 약 20%(w/w) 또는 그 초과의 circRNA의 풍부화된 집단의 수율을 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 방법은 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90%(w/w) 또는 그 초과의 정제된 circRNA의 수율을 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0103] 본 발명의 다른 특색 및 이점은 하기 상세한 설명, 도면, 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

## *도면의 간단한 설명*

[0104] **도 1**은 5 mL DEAE 세파로스 약한 AEX 칼럼을 사용한 우레아를 이용하지 않은 circRNA의 정제에 대한 크로마토그램 결과를 보여준다.

**도 2**는 5 mL DEAE 세파로스 약한 AEX 칼럼 상의 변성 조건으로서, 우레아, 카오트로픽 염을 이용한 circRNA의 정제에 대한 크로마토그램 결과를 보여준다.

**도 3**은 8 mL DEAE 약한 AEX 모놀리틱 칼럼 상의 변성 조건으로서, 우레아, 카오트로픽 염을 이용한 circRNA의 정제의 크로마토그램 결과를 보여준다.

**도 4**는 8 mL QA 강한 AEX 모놀리틱 칼럼 상의 변성 조건으로서, 우레아, 카오트로픽 염을 이용한 15 mg의 circRNA의 정제의 크로마토그램 결과를 보여준다.

**도 5**는 8 mL 프리마S(PrimaS) 모놀리틱 칼럼 상의 변성 조건으로서 우레아, 카오트로픽 염, 및 pH를 이용한 7 mg의 circRNA의 정제의 크로마토그램 결과를 보여준다.

도 6은 1 mL HIC 모놀리틱 칼럼을 사용한 고염 및 우레아 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제 후의 크로마토그램 결과를 보여준다.

도 7은 1 mL HIC 모놀리틱 칼럼을 사용한 고염 및 우레아 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제 후의 겔 전기영동 결과를 보여준다.

도 8은 온도, 카오트로픽제, 및 유기 용매 변성 조건을 사용한 분리 후의 circRNA 및 linRNA의 분리의 예시적인 크로마토그램 결과를 보여준다.

도 9는 온도, 카오트로픽제, 및 유기 용매 변성 조건을 사용한 circRNA 및 linRNA의 분리 후의 HPLC 분석 결과를 보여준다.

도 10은 온도, 카오트로픽제, 및 유기 용매 변성 조건을 사용한 circRNA 및 linRNA의 분리 후의 HPLC 분석 결과를 보여준다.

도 11은 온도 및 카오트로픽제 조건을 이용한 circRNA의 정제 후의 예시적인 크로마토그램 결과를 보여준다.

도 12는 온도 및 카오트로픽제 조건을 이용한 circRNA의 정제 후의 예시적인 겔 전기영동 결과를 보여준다.

도 13은 고온 및 유기 용매 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제 후의 예시적인 크로마토그램 결과를 보여준다.

도 14는 2회의 물 주입 후의 circRNA의 예시적인 크로마토그램을 보여준다.

도 15는 블랭크 주입의 예시적인 크로마토그램을 보여준다.

도 16은 별개의 피크를 갖는 circRNA 및 linRNA 표준물의 예시적인 크로마토그램을 보여준다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0105] 원형 폴리리보뉴클레오티드(circRNA) 및 선형 폴리리보뉴클레오티드(linRNA)를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 이질적 집단으로부터의 circRNA의 정제 및 풍부화를 위한 방법이 본원에 개시되며, 정제 및 풍부화는 변성 조건 하에서 수행된다. 또한 변성 조건 하에서의 용액, 예컨대, 예를 들어, 예컨대 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는 용액 내에 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물이 개시된다. 추가로 circRNA의 풍부화된 집단을 함유하는 조성물, 예컨대 조성물을 하나 이상의 변성 조건에 노출시킴으로써 생성된 조성물은 본 발명의 범위 내이다. 본 발명은 부분적으로 변성 조건(예를 들어, 열 변성, pH, 또는 화학적 처리) 하에서의 circRNA의 분리가 circRNA, linRNA, 또는 다른 불순물 또는 부산물을 함유하는 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단으로부터의 circRNA의 정제 및 풍부화를 위한 강건한 방법이고, 이로써 다른 방법에 비해 회수된 circRNA의 정제 및 수율을 개선시킨다는 본 발명자들의 발견에 기반한다. 더욱이, 개시된 방법은 circRNA 정제 공정의 규모 확장을 용이하게 하고, 이로써 다량의 circRNA의 생성 및 정제를 허용한다.

[0106] **원형 폴리리보뉴클레오티드의 정제**

[0107] 본 발명은 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 이질적 집단을 함유하는 샘플로부터 circRNA를 정제 및 풍부화하는 방법을 특색으로 하며, 여기서 정제는 본원에 개시된 변성 조건 하에서 수행된다. 본 발명의 맥락에서, 정제는 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, linRNA 및 circRNA)뿐만 아니라 바람직하지 않은 불순물 또는 부산물(예를 들어, 본원에 기재된 불순물 또는 부산물)의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 표적 폴리리보뉴클레오티드 집단(예를 들어, circRNA)의 단리 및 풍부화를 지칭한다. 따라서, 정제 후, circRNA는 circRNA의 정제된 집단이 수득되는 샘플에서보다 총 폴리리보뉴클레오티드의 증가된 퍼센트(w/w)로 또는 더 높은 농도로 존재한다. 샘플 내의 원하지 않는 불순물 또는 부산물은 linRNA, 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 개시된 방법은 circRNA의 순도가 바람직하게는 circRNA의 풍부화된 집단에서 가능한 한 100%에 가깝도록, 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터 circRNA를 정제 및 풍부화한다. 방법은 약 5% 내지 약 99% 또는 그 초과(예를 들어, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 95% 초과, 예컨대 97% 또는 99%, 또는 99% 초과)의 범위의 순도로 circRNA의 풍부화된 집단을 제조하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, circRNA의 풍부화된 집단의 순도는 풍부화된 집단 내의 linRNA 또는 하나 이상의 불순물 또는 부산물의 백분율 양에 비해 풍부화된 집단의 circRNA의 양의 백분율(예를 들어, 백분율 양)로서 측정된다. 예를 들어, 95%의 순도를 갖는 circRNA의 풍부화된 집단은 95%의 circRNA 및 5%의 linRNA 또는 하나 이상의 불순물 또는 부

산물을 함유한다.

[0108] 또한, 방법은 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단에 또는 circRNA의 풍부화된 집단에 존재하는 양에 비해 약 20%(w/w) 또는 그 초과의 circRNA의 풍부화된 집단의 수율을 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 방법은 풍부화된 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총량에 비해 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90%(w/w) 또는 그 초과의 양으로 circRNA를 함유하는 circRNA의 풍부화된 집단의 수율을 생성하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, circRNA의 풍부화된 집단은 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단에 비해 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90%(w/w) 또는 그 초과의 양으로 circRNA를 함유할 수 있다. 추가로, circRNA의 풍부화된 집단은 풍부화된 집단 내의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, RNA 또는 DNA)의 총량 또는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 내의 폴리뉴클레오티드의 총량에 비해 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90%(w/w) 또는 그 초과의 양으로 circRNA를 함유할 수 있다.

[0109] 본원에 개시된 정제 방법은 circRNA의 전처리 정제 방법에 사용될 수 있지만, 개시된 방법은 또한 circRNA의 분석 정제에도 유리하다. 전처리 정제는 상대적으로 다량의 RNA의 정제와 관련된다. 예를 들어, 전처리 정제는 적어도 0.5 mg(예를 들어, 적어도 0.6, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mg, 또는 그 초과)의 RNA 양을 정제하는 데 사용될 수 있다. 이 방법의 이점은 소규모 정제에 적합한 다른 방법(예를 들어, 아가로스 겔 전기영동)을 사용하여 가능한 것보다 더 많은 양으로 circRNA의 정제를 수행하는 능력이다.

[0110] *변성 조건*

[0111] 이론에 구애되기를 원하지는 않지만, 본 발명은 부분적으로 circRNA의 정제가 변성 조건 하에서 수행될 수 있다는 본 발명자들의 놀라운 발견에 기반한다. 본 발명의 맥락 내에서, 변성 조건은 상보적 염기 쌍 사이의 수소 결합 및 다른 비-공유적 힘(예를 들어, 반 데르 발스 힘 또는 소수성 상호작용)이 파괴되고, 이로써 생리학적 조건 하에서 관찰되는 구조와 비교하여, 폴리뉴클레오티드 내의 정돈된 구조, 예컨대, 예를 들어, 2차 또는 3차 중합체 구조(예를 들어, 다른 것들 중에서도, 이중 나선, 스템-루프, 스태킹)를 감소시키거나 제거하는 조건을 지칭한다. 변성 조건은 또한 중합체 내의 인접한 핵산 단량체 사이의 공유 결합, 예컨대, 예를 들어, 인접한 뉴클레오시드 사이의 포스포디에스테르 결합이 파괴되는 조건을 지칭한다. 더욱이, 다른 불순물 또는 부산물 중에서도 linRNA로부터의 circRNA의 풍부화 또는 분리는 변성 조건에 의해 개선될 수 있다. 이러한 방법은 당업계의 알려진 RNA 정제 방법의 고 처리량에 있어서 규모 확장 또는 규모 확대에 특히 적합하다. 따라서, 본 발명은 다양한 정제 방법, 예를 들어, 본원에 개시된 것들을 사용하여 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 처리하는 데 사용될 수 있는 다양한 변성 조건을 제공한다.

[0112] *열 변성*

[0113] 본원에 개시된 방법은 예를 들어, circRNA, linRNA, 및 다양한 다른 불순물 또는 부산물(예를 들어, 염, 마그네슘, 우레아, 붕산 등)을 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터 circRNA를 풍부화하기 위한 높은, 낮은, 또는 가변적 온도 조건의 사용을 포괄한다. 예를 들어, 열 변성은 승온 조건, 예컨대, 예를 들어, 적어도 50℃, 적어도 55℃, 적어도 60℃, 적어도 65℃, 적어도 70℃, 적어도 75℃, 적어도 80℃, 적어도 85℃, 적어도 90℃, 적어도 95℃, 적어도 100℃, 또는 그 초과의 온도 하에서 수행될 수 있다. 한 예에서, 열 변성은 적어도 50℃의 온도 하에서 수행된다. 또 다른 예에서, 열 변성은 적어도 50℃ 그러나 85℃ 이하의 온도 하에서 수행된다. 이들 온도 조건 하에서의 열 변성은 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 파괴함으로써, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, circRNA 및 linRNA)를 변성시키는 데 충분한 기간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 열 변성은 상기 언급된 온도에서 적어도 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분, 21분, 22분, 23분, 24분, 25분, 26분, 27분, 28분, 29분, 30분, 31분, 32분, 33분, 34분, 35분, 36분, 37분, 38분, 39분, 40분, 41분, 42분, 43분, 44분, 45분, 46분, 47분, 48분, 49분, 50분, 또는 그 초과인 기간 동안 수행될 수 있다. 열 변성 조건에의 노출은 연속적 또는 불연속적일 수 있다(예를 들어, 예를 들어, 30초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 또는 그 초과의 시간 간격에 의해 분리된 2개의 5-분 블록으로 승온 조건에의 10-분 노출).

[0114] 열 변성은 또한 가변적 온도 조건 하에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 쇼크-냉각은 먼저 샘플을 승온 조건(예를 들어, 예를 들어, 상기 기재된 승온 조건)에 적어도 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분, 또는 그 초과의 기간 동안 노출시키고, 이어서

저온 조건에 즉시 노출시킴으로써 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 이질적 혼합물을 함유하는 샘플 상에서 수행될 수 있다. 저온 조건은 8℃ 이하(예를 들어, 7℃, 6℃, 5℃, 4℃, 3℃, 2℃, 1℃, 0℃, -1℃, -2℃, -3℃, -4℃, -5℃, -6℃, -7℃, -9℃, -10℃, -15℃, -20℃, -25℃, -30℃, -35℃, -40℃, -45℃, -50℃, -55℃, -60℃, -65℃, -70℃, -75℃, -80℃ 이하, 또는 그 미만)인 온도를 포함할 수 있다. 일반적으로, 쇼크-냉각은 고온 조건 및 저온 조건 사이의 시간 간격이 짧도록 수행된다. 따라서, 고온 조건 및 저온 조건에의 샘플의 노출 사이의 기간은 일반적으로 1분, 55초, 50초, 45초, 40초, 35초, 30초, 25초, 20초, 15초, 10초, 9초, 8초, 7초, 6초, 5초, 4초, 3초, 2초, 1초 이하, 또는 그 미만이다. 저온 조건에의 샘플의 노출은 적어도 10초, 20초, 30초, 40초, 50초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분, 또는 그 초과인 기간 동안일 수 있다.

[0115] 상기 언급된 열 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 열 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 열 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 샘플 또는 이동상은 크로마토그래피 칼럼 내로 샘플을 로딩하기 전에 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 승온에서 사전-인큐베이션될 수 있다. 또 다른 예에서, 크로마토그래피적 분리 동안의 열 변성은 linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 변성에 충분한 원하는 온도 조건을 달성하기 위해 정제에 사용되는 칼럼 주위에 재킷 또는 슬리브를 정치함으로써 수행될 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 열 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 열 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0116] *pH 변성*

[0117] 개시된 방법에 따르면, circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 정제 및 풍부화는 샘플을 변성 pH 조건에 노출시킴으로써 수행된다. 예시적인 pH 조건은 산성 조건(예를 들어, 7 미만의 pH) 또는 알칼리성 조건(7 초과의 pH)을 포함하며, 이는 폴리리보뉴클레오티드의 뉴클레오티드 내의 이온화 가능한 기의 이온화를 초래하여, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 2차 구조의 소실 및 선택적 변성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 적합한 pH-변성 조건은 5 미만의 pH(예를 들어, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0 미만, 또는 그 미만의 pH) 또는 9 초과의 pH(예를 들어, 9.5, 10, 10.5, 11 초과, 또는 그 초과의 pH)를 포함한다.

[0118] 한 예에서, pH 변성은 4.9의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.8의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.7의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.6의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.5의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.4의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.3의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.2의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.1의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 4.0의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.9의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.8의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.8의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.7의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.6의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.5의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.4의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.3의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.2의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 3.1의 pH에서 수행된다. 추가의 또 다른 예에서, pH 변성은 3.0의 pH에서 수행된다.

[0119] 추가의 또 다른 예에서, pH 변성은 9.1의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.2의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.3의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.4의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.5의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.6의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.7의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.8의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 9.9의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.1의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.2의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.3의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.4의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.5의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.6의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.7의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 10.8의 pH에서 수행된다. 추가의 또 다른 예에서, pH 변성은 10.9의 pH에서 수행된다. 또 다른 예에서, pH 변성은 11의 pH에서 수행된다.

[0120] 상기 언급된 pH 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다.

대안적으로, pH 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, pH 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 pH를 갖도록 선택되거나 조정될 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 pH 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, pH 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0121] *화학적 변성*

[0122] linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제를 위한 본 발명에 의해 포함되는 또 다른 방법은 화학적 처리에 의한 변성이다. 본 발명의 맥락 내에서, 화학적 처리에 의한 변성은 하나 이상의 변성 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 킬레이트화제, 크라우딩제, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포괄한다.

[0123] *산 변성제*

[0124] 산 변성은 산성 용액이 RNA 분자 내의 이온화 가능한 기를 양성자화할 수 있다는 것에 기반하여 본원에 개시된 변성 정제 방법에 적합한 방법이다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 산은 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함한다. 일부 실시 형태에서, linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 산은 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함한다.

[0125] 한 예에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 아세트산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 아세트산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0126] 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 염산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 염산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0127] 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%,

25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 살리실산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 살리실산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0128] 또 다른 예에서, 산성 변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 인산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 인산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0129] 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 붕산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 붕산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0130] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 포름산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 포름산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0131] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 옥살산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 옥살산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0132] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 시트르산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475

mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 시트르산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0133] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 벤조산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 벤조산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0134] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 모노클로로아세트산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 모노클로로아세트산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0135] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 디클로로아세트산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 디클로로아세트산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0136] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 트리클로로아세트산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 트리클로로아세트산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0137] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 아스코르브산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 아스코르브산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0138] 추가의 또 다른 예에서, 산-변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 질산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 질산을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0139] 산성 변성 조건에의 샘플의 노출은 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, linRNA 또는 circRNA)를 변성시키는 데 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 산성 변성 조건에의 샘플의 노출은 30초, 45초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분 초과, 또는 그 초과의 시간 동안일 수 있다.

[0140] 상기 언급된 산성 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 산성 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 산성 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 산을 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 산성 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 산성 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0141] *알칼리성 변성제*

[0142] 알칼리성 변성은 알칼리성 용액이 RNA 분자 내의 이온화 가능한 기를 탈양성저화할 수 있다는 것에 기반하여 본원에 개시된 변성 정제 방법에 적합한 방법이다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 알칼리성 조건은 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 또는 구아니딘을 함유하는 용액을 포함한다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0143] 한 예에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 수산화나트륨을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 수산화나트륨을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0144] 또 다른 예에서, 알칼리성 변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 수산화칼륨을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그

러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 수산화칼륨을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0145] 또 다른 예에서, 알칼리성 변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 이미다졸을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 이미다졸을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0146] 또 다른 예에서, 알칼리성 변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 히스티딘을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 히스티딘을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0147] 또 다른 예에서, 알칼리성 변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 중탄산나트륨을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 중탄산나트륨을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0148] 추가의 또 다른 예에서, 알칼리성 변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 구아니딘을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 구아니딘을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0149] 추가의 또 다른 예에서, 알칼리성 변성은 샘플을 적어도 0.5%(v/v)(예를 들어, 적어도 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 트리에틸아민을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 mM 내지 500 mM(예를 들어, 2~475 mM, 3~450 mM, 4~425 mM, 5~400 mM, 10~375 mM, 15~350 mM, 20~325 mM, 30~300 mM, 40~275 mM, 50~250 mM, 60~225 mM, 70~200 mM, 80~175 mM, 90~150 mM, 100~125 mM, 또는 110~115 mM)의 트리에틸아민을 함유하는

용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0150] 알칼리성 변성 조건에의 샘플의 노출은 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, circRNA 및 linRNA)를 변성시키는 데 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 알칼리성 변성 조건에의 샘플의 노출은 30초, 45초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분 초과, 또는 그 초과인 시간 동안일 수 있다.

[0151] 상기 언급된 알칼리성 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 알칼리성 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 알칼리성 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 염기를 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 알칼리성 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 알칼리성 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0152] *유기 용매*

[0153] 유기 용매는 개시된 방법과 함께 사용하는 데 적합한 변성제로서 이용될 수 있다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0154] 한 예에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 디메틸 술폭시드를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0155] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 트리에틸암모늄 아세테이트를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0156] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 메탄올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0157] 또 다른 예에서, 알칼리성 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 에탄올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0158] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1% (v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 2-프로판올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0159] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 이소프로판올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0160] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 부탄올(예를 들어, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 또는 이소부탄올)을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0161] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 1-부탄올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0162] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 2-부탄올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0163] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 t-부탄올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0164] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1% (v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 이소부탄올을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0165] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1% (v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 페놀을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0166] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 클로로포름을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0167] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 헥산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0168] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 아세토니트릴을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0169] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 포름아미드를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0170] 추가의 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 프로필렌 글리콜을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0171] 변성 용매에의 샘플의 노출은 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, circRNA 및 linRNA)를 변성시키는 데 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 알칼리성 변성 조건에의 샘플의 노출은 30초, 45초,

1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분 초과, 또는 그 초과인 시간 동안일 수 있다.

[0172] 상기 언급된 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 유기 용매를 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0173] *카오트로픽제*

[0174] 카오트로픽제(예를 들어, 카오트로픽 염)는 개시된 방법과 함께 사용하는 데 적합한 변성제로서 이용될 수 있다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 카오트로픽제(예를 들어, 카오트로픽 염)는 적어도 1%(v/v)(예를 들어, 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 PEG를 포함한다.

[0175] 한 예에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 적어도 1%(v/v)(예를 들어, 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 염화구아니디늄을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 우레아를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0176] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 1%(v/v)(예를 들어, 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 과염소산리튬을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 과염소산리튬을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0177] 또 다른 예에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1% 미만(예를 들어, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1% 미만, 또는 그 미만)의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나

이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 데옥시콜레이트를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0178] 한 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 n-도데실 β-d-말토시드를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 β-d-말토시드를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0179] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 n-옥틸글루코시드를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 n-옥틸글루코시드를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0180] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 CHAPS를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 CHAPS를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0181] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 데옥시콜레이트를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 데옥시콜레이트를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0182] 변성 카오트로픽제에의 샘플의 노출은 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, circRNA 및 linRNA)를 변성시키는 데 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 알칼리성 변성 조건에의 샘플의 노출은 30초, 45초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분 초과, 또는 그 초과인 시간 동안일 수 있다.

[0183] 상기 언급된 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 카오트로픽제를 이용한 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 카오트로픽제를 사용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수

행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 카오트로픽제를 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 카오트로픽제를 이용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0184] *크라우딩제*

[0185] 크라우딩제는 크라우딩제가 다른 분자 사이의 수소 결합이 일어나지 않을 수 있도록 용액을 크라우딩할 수 있다는 것에 기반하여 개시된 방법과 함께 사용하는 데 적합한 변성제로서 이용될 수 있다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 크라우딩제는 PEG 및 우레아를 포함한다.

[0186] 한 예에서, 변성은 샘플을 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 PEG를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 8 M(예를 들어, 150 mM 내지 7.5 M, 200 mM 내지 7 M, 250 mM 내지 6.5 M, 300 mM 내지 6 M, 350 mM 내지 5.5 M, 400 mM 내지 5 M, 450 mM 내지 4.5 M, 500 mM 내지 4 M, 600 mM 내지 3.5 M, 700 mM 내지 3 M, 800 mM 내지 2.5 M, 900 mM 내지 2 M, 1 M 내지 1.5 M, 1.1 M 내지 1.4 M, 또는 1.2 내지 1.3 M)의 PEG를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0187] PEG는 화학식 $(CH_2CH_2OH)n$의 기를 지칭하며, 여기서 n은 정수이며, 예를 들어, $PEG_2$~$PEG_{100}$이다. 일부 실시 형태에서, PEG는 200 Da 내지 6000 Da(예를 들어, 400 Da 내지 2500 Da, 800 Da 내지 2200 Da, 1000 Da 내지 2000 Da, 200 Da, 400 Da, 600 Da, 800 Da, 1000 Da, 1200 Da, 1500 Da, 2000 Da, 2200 Da, 2500 Da, 3000 Da, 3500 Da, 4000 Da, 4500 Da, 5000 Da, 5500 Da, 또는 6000 Da)의 분자량을 갖는다.

[0188] 상기 언급된 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 크라우딩제를 이용한 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 크라우딩제를 사용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 크라우딩제를 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 크라우딩제를 이용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0189] *킬레이트화제*

[0190] 킬레이트화제는 킬레이트화제가 RNA 분자(예를 들어, linRNA) 내의 RNA 2차 및 3차 구조에 결합하고 이를 안정화시키는 금속 이온(예를 들어, 다른 것들 중에서도, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, 및 $K^{+}$)에 킬레이트화(즉, 결합)할 수 있다는 것에 기반하여 개시된 방법과 함께 사용하는 데 적합한 변성제로서 이용될 수 있다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 킬레이트화제는 에틸렌 글리콜-비스(β-아미노에틸 에테르)-*N,N,N′,N′*-테트라 아세트산(EGTA) 또는 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 그의 유도체, 니트릴로트리아세트산(NTA), 이미노-디숙신산(IDS), 폴리아스파르트산, *S,S*-에틸렌디아민-*N,N′*-디숙신산(EDDS), 또는 메틸글리신디아세트산(MGDA)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 1 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, EDDS, 또는 MGDA를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0191] 한 예에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 EGTA 또는 그의 유도체를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 용액은 1 내지 10 mM(예를 들어,

1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 EGTA 또는 그의 유도체를 함유한다.

[0192] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 EDTA 또는 그의 유도체를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 용액은 1 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 EDTA 또는 그의 유도체를 함유한다.

[0193] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 NTA를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 용액은 1 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 NTA를 함유한다.

[0194] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 IDS를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 용액은 1 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 IDS를 함유한다.

[0195] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 폴리아스파르트산을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 용액은 1 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 폴리아스파르트산을 함유한다.

[0196] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 EDDS를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 용액은 1 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 EDDS를 함유한다.

[0197] 추가의 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 MGDA를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 용액은 1 내지 10 mM(예를 들어, 1~2 mM, 2~3 mM, 3~4 mM, 4~5 mM, 5~6 mM, 6~7 mM, 7~8 mM, 8~9 mM, 또는 9~10 mM)의 MGDA를 함유한다.

[0198] 변성 킬레이트화제에의 샘플의 노출은 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, circRNA 및 linRNA)를 변성시키는 데 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 변성 킬레이터에의 샘플의 노출은 30초, 45초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분 초과, 또는 그 초과인 시간 동안일 수 있다.

[0199] 상기 언급된 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 킬레이트화제를 이용한 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 킬레이트화제를 사용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 킬레이트화제를 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 킬레이트화제를 이용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0200] *세정제*

[0201] 세정제는 개시된 방법과 함께 사용하는 데 적합한 변성제로서 이용될 수 있다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 세정제는 노니데트 P-40(NP40), 폴리소르베이트(예를 들어, 트윈-20, 트윈-40, 트윈-60, 또는 트윈-80), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, 또는 n-도데실 β-말토시드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 0.005~0.05%(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 NP40, 폴리소르베이트(예를 들어, 트윈-20, 트윈-40, 트윈-60, 또는 트윈-80), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, 또는 n-도데실 β-말토시드를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 노출시킴으로써 수행된다.

[0202] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 NP40을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 변성은 샘플을 0.005~0.05%(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 NP40을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0203] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 트윈-20을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 변성은 샘플을 0.005~0.05%(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 트윈-20을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0204] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 트윈-80을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 변성은 샘플을 0.005~0.05%(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 트윈-80을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0205] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 CHAPS를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 변성은 샘플을 0.005~0.05%(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 CHAPS를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0206] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 옥틸 β-D-글루코피라노시드를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 변성은 샘플을 0.005~0.05%(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 옥틸 β-D-글루코피라노시드를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0207] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 n-도데실 β-말토시드를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, 변성은 샘플을 0.005~0.05%(예를 들어, 0.006~0.045%, 0.007~0.04%, 0.008~0.035%, 0.009~0.03%. 0.01~0.025%, 0.011~0.02%, 0.012~0.019%, 0.013~0.018%, 0.014~0.017%, 또는 0.015~0.016%)의 도데실 β-말토시드를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다.

[0208] 변성 세정제에의 샘플의 노출은 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, circRNA 및 linRNA)를 변성시키는 데 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 변성 세정제에의 샘플의 노출은 30초, 45초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분 초과, 또는 그 초과인 시간 동안일 수 있다.

[0209] 상기 언급된 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 세정제를 이용한 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 세정제를 이용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 세정제를 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 세정제를 이용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0210] *염 용액*

[0211] 핵산 중합체의 2차 구조 형성은 폴리뉴클레오티드 내의 염기 쌍형성 및 수소 결합 형성의 자유 에너지를 결정하는 염 농도에 매우 의존적이다. 따라서, 염 용액의 사용은 본원에 기재된 바와 같이, 폴리리보뉴클레오티드의 변성 정제에 적합한 방법이다. linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 circRNA의 선택적 풍부화 및 정제에 사용하는 데 적합한 염 용액은 예를 들어, 당업계에 알려진 다른 염 중에서도, 염화나트륨(NaCl), 염화칼륨(KCl), 염화마그네슘(MgCl), 염화칼슘(CaCl), $CsSO_4$, $NaSO_4$, 염화리튬(LiCl), 브롬화리튬(LiBr)을 함유하는 용액을 포함한다.

일부 실시 형태에서, 염 용액은 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 NaCl, KCl, MgCl, CaCl, CsSO4, $NaSO_4$, LiCl, 또는 LiBr을 함유한다.

[0212] 한 예에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 NaCl을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된

집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 NaCl을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0213] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 KCl을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 KCl을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0214] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 MgCl을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 MgCl을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0215] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 CaCl을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 CaCl을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0216] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 $CsSO_4$를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 $CsSO_4$를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0217] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 $NaSO_4$를 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 $NaSO_4$를 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0218] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 LiCl을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 LiCl을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0219] 또 다른 예에서, 변성은 샘플을 LiBr을 함유하는 용액에 노출시킴으로써 수행된다. 일부 실시 형태에서, linRNA(그러나 circRNA는 아님)의 선택적 변성은 linRNA, circRNA, 및, 임의적으로, 하나 이상의 불순물 또는 부산물을 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 LiBr을 함유하는 용액을 이용하여 노출시킴으로써 수행된다.

[0220] 변성 염 용액에의 샘플의 노출은 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 다른 것들 중에서도, circRNA 및 linRNA)를 변성시키는 데 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 변성 염 용액에의 샘플의 노출은 30초, 45초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분 초과, 또는 그 초과인 시간 동안일 수 있다.

[0221] 상기 언급된 변성 프로토콜은 본원에 개시된 크로마토그래피적 분리 방법 전에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 염 용액을 이용한 변성은 개시된 방법을 사용한 크로마토그래피적 분리 후에 샘플 상에서 수행될 수 있다. 더욱이, 염 용액을 이용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제와 병행하여(즉, 그 동안) 수행될 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 사용되는 샘플 완충제(예를 들어, 로딩 완충제)는 샘플의 폴리리보뉴클

레오티드 내의 분자내 수소 결합을 변성시키는 데 충분한 농도로 상기 언급된 염을 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 내의 linRNA의 변성은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는 크로마토그래피적 분리 공정의 임의의 상 동안 수행될 수 있다. 추가로, 염 용액을 이용한 변성은 샘플의 크로마토그래피적 정제의 부재 하에서 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0222] *조합 또는 다수의 변성제*

[0223] 본 발명은 circRNA, linRNA, 및 다른 물질을 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하기 위해 조합으로 상기 언급된 변성 조건 중 2, 3, 4개 이상의 사용을 추가로 제공한다. circRNA 및 linRNA의 혼합된 집단을 함유하는 샘플은 개시된 변성 조건 중 2, 3, 4개 이상에 동시에 또는 순차적으로(시간적 간격과 함께 또는 없이) 적용될 수 있다. 2개 이상의 변성 조건은 동일한 카테고리의 변성제로부터의 것, 예를 들어, 본원에 기재된 카오트로픽제로부터 선택되는 2개 이상의 카오트로픽제, 본원에 기재된 산 변성제로부터 선택되는 2개 이상의 산 변성제, 본원에 기재된 알칼리성 변성제로부터 선택되는 2개 이상의 알칼리성 변성제, 본원에 기재된 유기 용매로부터 선택되는 2개 이상의 유기 용매, 본원에 기재된 킬레이트화제로부터 선택되는 2개 이상의 킬레이트화제, 본원에 기재된 세정제로부터 선택되는 2개 이상의 세정제, 또는 본원에 기재된 염 용액으로부터 선택되는 2개 이상의 염 용액일 수 있다. 2개 이상의 변성 조건은 상이한 카테고리의 변성제로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, 2개 이상의 변성 조건의 조합은 표 1에 기재된 바와 같을 수 있고, 여기서 열 변성은 본원에 기재된 임의의 열 변성 조건으로부터 선택되고, pH 변성은 본원에 기재된 임의의 pH 변성 조건으로부터 선택되고, 산 변성제는 본원에 기재된 임의의 산 변성 조건으로부터 선택되고, 알칼리성 변성제는 본원에 기재된 임의의 알칼리성 변성 조건으로부터 선택되고, 유기 용매는 본원에 기재된 임의의 유기 용매 조건으로부터 선택되고, 카오트로픽제는 본원에 기재된 임의의 카오트로픽제 조건으로부터 선택되고, 킬레이트화제는 본원에 기재된 임의의 킬레이트화제 조건으로부터 선택되고, 세정제는 본원에 기재된 임의의 세정제 조건으로부터 선택되고, 염 용액은 본원에 기재된 임의의 염 용액 조건으로부터 선택된다.

[0224] 표 1:

| 변성 조건 | 열 | pH | 산 | 알칼리성 | 유기 용매 | 카오트로픽제 | 킬레이트화제 | 세정제 | 염 용액 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 열 | | | | | | | | | |
| pH | 열 + pH | | | | | | | | |
| 산 | 열 + 산 | pH + 산 | 2 개 이상의 산 | | | | | | |
| 알칼리성 | 열 + 알칼리성 | pH + 알칼리성 | 산 + 알칼리성 | 2 개 이상의 알칼리성화제 | | | | | |
| 유기 용매 | 열 + 유기 용매 | pH + 유기 용매 | 산 + 유기 용매 | 알칼리성 + 유기 용매 | 2 개 이상의 유기 용매 | | | | |
| 카오트로픽제 | 열 + 카오트로픽제 | pH + 카오트로픽제 | 산 + 카오트로픽제 | 알칼리성 + 카오트로픽제 | 유기 용매 + 카오트로픽제 | 2 개 이상의 카오트로픽제 | | | |
| 킬레이트화제 | 열 + 킬레이트화제 | pH + 킬레이트화제 | 산 + 킬레이트화제 | 알칼리성 + 킬레이트화제 | 유기 용매 + 킬레이트화제 | 카오트로픽제 + 킬레이트화제 | 2 개 이상의 킬레이트화제 | | |
| 세정제 | 열 + 세정제 | pH + 세정제 | 산 + 세정제 | 알칼리성 + 세정제 | 유기 용매 + 세정제 | 카오트로픽제 + 세정제 | 킬레이트화제 + 세정제 | 2 개 이상의 세정제 | |
| 염 용액 | 열 + 염 용액 | pH + 염 용액 | 산 + 염 용액 | 알칼리성 + 염 용액 | 유기 용매 + 염 용액 | 카오트로픽제 + 염 용액 | 킬레이트화제 + 염 용액 | 세정제 + 염 용액 | 2 개 이상의 염 용액 |

[0225]

[0226] 표 1에 제시된 조합은 제3, 제4, 제5, 또는 그 초과의 추가의 변성 조건과 조합될 수 있다.

[0227] 예를 들어, 상기 기재된 변성 열 조건을 상기 기재된 변성 pH 조건과 조합하여 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터 circRNA의 풍부화된 집단을 생성할 수 있다. 대안적으로, 변성 열 조건을 본원에 기재된 하나 이상의 화학적 변성제와 조합하여 circRNA의 풍부화된 집단을 생성할 수 있다. 추가로, circRNA의 풍부화된 집단은 혼합된 집단을 pH 변성제 및 화학적 변성제와 접촉시킴으로써 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터 생성될 수 있다.

[0228] 본 발명은 또한 당업계에 알려진 하나 이상의 비-변성 조건(예를 들어, 온도, pH, 완충제)과 조합으로 본원에 기재된 변성 조건 중 하나 이상의 사용을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 열 변성은 변성 pH 조건과 조합으로 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플 상에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 변성 pH 조건(예를 들어, 5 초과 및 9 미만인 pH, 예컨대 예를 들어, 5.01, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 또는 8.99의 pH)에의 노출과 조합으로 변성 온도, 예컨대 적어도 50℃의 온도, 예를

들어, 50℃ 내지 85℃(예를 들어, 50℃, 51℃, 52℃, 53℃, 54℃, 55℃, 56℃, 57℃, 58℃, 59℃, 60℃, 61℃, 62℃, 63℃, 64℃, 65℃, 66℃, 67℃, 68℃, 69℃, 70℃, 71℃, 72℃, 73℃, 74℃, 75℃, 76℃, 77℃, 78℃, 79℃, 80℃, 81℃, 82℃, 83℃, 84℃, 또는 85℃)인 온도에 노출될 수 있다.

[0229] 일부 다른 실시 형태에서, 본원에 기재된 열 변성은 비-변성 pH 조건과 조합으로 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플 상에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 비-변성 pH 조건(예를 들어, 5 초과 및 9 미만인 pH, 예컨대 예를 들어, 5.01, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 또는 8.9의 pH)에의 노출과 조합으로 변성 온도, 예컨대 적어도 50℃의 온도, 예를 들어, 50℃ 내지 85℃(예를 들어, 50℃, 51℃, 52℃, 53℃, 54℃, 55℃, 56℃, 57℃, 58℃, 59℃, 60℃, 61℃, 62℃, 63℃, 64℃, 65℃, 66℃, 67℃, 68℃, 69℃, 70℃, 71℃, 72℃, 73℃, 74℃, 75℃, 76℃, 77℃, 78℃, 79℃, 80℃, 81℃, 82℃, 83℃, 84℃, 또는 85℃)인 온도에 노출될 수 있다.

[0230] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 비-변성 온도, 예컨대, 예를 들어, 50℃ 미만(예를 들어, 49℃, 48℃, 47℃, 46℃, 45℃, 44℃, 43℃, 42℃, 41℃, 40℃, 39℃, 38℃, 37℃, 36℃, 35℃, 34℃, 33℃, 32℃, 31℃, 30℃, 29℃, 28℃, 27℃, 26℃, 25℃, 24℃, 23℃, 22℃, 21℃, 20℃, 19℃, 18℃, 17℃, 16℃, 15℃, 14℃, 13℃, 12℃, 11℃, 10℃, 또는 그 미만)인 온도에의 노출과 조합으로 변성 pH 조건(예를 들어, 5 초과 및 9 미만인 pH, 예컨대 예를 들어, 5.01, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 또는 8.99의 pH)에 노출될 수 있다.

[0231] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 농도의 하나 이상의 변성 유기 용매 조건, 예를 들어, 아세토니트릴 및 디메틸 술폭시드에 추가적으로, 적어도 1%(v/v)(예를 들어, 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 농도의 변성 카오트로픽 조건, 예를 들어, 우레아에 노출될 수 있다.

[0232] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 변성 온도, 예컨대 적어도 50℃의 온도, 예를 들어, 50℃ 내지 85℃(예를 들어, 50℃, 51℃, 52℃, 53℃, 54℃, 55℃, 56℃, 57℃, 58℃, 59℃, 60℃, 61℃, 62℃, 63℃, 64℃, 65℃, 66℃, 67℃, 68℃, 69℃, 70℃, 71℃, 72℃, 73℃, 74℃, 75℃, 76℃, 77℃, 78℃, 79℃, 80℃, 81℃, 82℃, 83℃, 84℃, 또는 85℃)인 온도에 추가적으로, 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 농도의 하나 이상의 변성 유기 용매 조건, 예를 들어, 아세토니트릴 및 디메틸 술폭시드에 추가적으로, 적어도 1%(v/v)(예를 들어, 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 농도의 변성 카오트로픽 조건, 예를 들어, 우레아에 노출될 수 있다.

[0233] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 변성 온도, 예컨대 적어도 50℃의 온도, 예를 들어, 50℃ 내지 85℃(예를 들어, 50℃, 51℃, 52℃, 53℃, 54℃, 55℃, 56℃, 57℃, 58℃, 59℃, 60℃, 61℃, 62℃, 63℃, 64℃, 65℃, 66℃, 67℃, 68℃, 69℃, 70℃, 71℃, 72℃, 73℃, 74℃, 75℃, 76℃, 77℃, 78℃, 79℃, 80℃, 81℃, 82℃, 83℃, 84℃, 또는 85℃)인 온도에 추가적으로, 적어도 1%(v/v)(예를 들어, 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 농도의 변성 카오트로픽 조건, 예를 들어, 우레아에 노출될 수 있다. 또 다른 예에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 변성 pH 조건(예를 들어, 5 초과 및 9 미만인 pH, 예컨대 예를 들어, 5.01, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 또는 8.99의 pH)에 추가적으로 적어도 1%(v/v)(예를 들어, 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과)의 농도의 변성 카오트로픽 조건, 예를 들어, 우레아에 노출될 수 있다.

[0234] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 변성 온도, 예컨대 적어도 50℃의 온도, 예를 들어, 50℃ 내지 85℃(예를 들어, 50℃, 51℃, 52℃, 53℃, 54℃, 55℃, 56℃, 57℃, 58℃, 59℃, 60℃, 61℃, 62℃, 63℃, 64℃, 65℃, 66℃, 67℃, 68℃, 69℃, 70℃, 71℃, 72℃, 73℃, 74℃, 75℃, 76℃, 77℃, 78℃, 79℃, 80℃, 81℃, 82℃, 83℃, 84℃, 또는 85℃)인 온도에 추가적으로, 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 농도의 변성 유기 용매 조건, 예를 들어, 아세토니트릴 및 디메틸 술폭시드에 노출될 수 있다.

[0235] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)는 변성 pH 조건(예를 들어, 5 초과 및 9 미만인 pH, 예컨대 예를 들어, 5.01, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 또는 8.99의 pH)에 추가적으로, 적어도 0.1%(v/v)(예를 들어, 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 그 초과)의 농도의 변성 유기 용매 조건, 예를 들어, 아세토니트릴 및 디메틸 술폭시드에 노출될 수 있다.

[0236] 또 다른 예에서 본원에 기재된 것(예를 들어, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단)은 변성 pH 조건(예를 들어, 5 초과 및 9 미만인 pH, 예컨대 예를 들어, 5.01, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 또는 8.99의 pH)에 추가적으로 NaCl, KCl, MgCl, CaCl, $CsSO_4$, $NaSO_4$, LiCl, 또는 LiBr의 100 mM 내지 1 M(예를 들어, 150~950 mM, 200~900 mM, 250~850 mM, 300~800 mM, 350~750 mM, 400~700 mM, 450~650 mM, 500~600 mM, 또는 525~575 mM)의 농도의 변성 염 조건, 예를 들어, NaCl, KCl, MgCl, CaCl, $CsSO_4$, $NaSO_4$, LiCl, 또는 LiBr에 노출될 수 있다.

[0237] *정제 방법*

[0238] 변성 조건 하에서 circRNA 및 linRNA의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터 circRNA를 정제하는 데 사용될 수 있는 다양한 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시 형태에서, 정제 방법은 칼럼 크로마토그래피적 정제 방법이다. 칼럼 크로마토그래피적 방법은 일반적으로, 일반적으로 이동상으로 지칭되는 관심의 용해된 물질을 함유하는 용액이 다공성 과립으로 구성된 정지상으로 로딩된 크로마토그래피적 칼럼을 통해 채널을 거치는 공정을 이용한다. 로딩된 용액은 칼럼을 통과하고, 물질은 분석물의 물리화학적 특징에 의해 지배되는 정지상과의 상호작용에 기반하여 분리된다. 정제 방법은 칼럼 크로마토그래피, 예컨대, 예를 들어, 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC; 예컨대, 예를 들어, 역상(RP)-FPLC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환 크로마토그래피(AEC), 혼합 모드 크로마토그래피(MMC), 또는 친화성 크로마토그래피를 포함한다. 이들 방법은 하기에 보다 상세하게 논의된다.

[0239] *고속 성능 액체 크로마토그래피*

[0240] 본원에 기재된 방법은 circRNA 및 linRNA, 또는 다른 물질의 하나 이상의 별개의 집단을 함유하는 혼합된 폴리리보뉴클레오티드를 함유하는 샘플로부터 circRNA를 정제 및 풍부화하는 FPLC 방법의 사용을 수반한다.

[0241] FPLC는 물질의 복잡한 혼합물을 분리하는 확립된 방법이며, 생화학, 분석 화학, 및 임상 화학과 관련된 적용에

서 통상적으로 이용된다. 일반적으로 2가지 유형의 FPLC 방법, 즉, 역상(RP)-FPLC 및 정상(NP)-FPLC가 있다. RP-FPLC는 비극성(즉, 소수성) 정지상 및 극성 또는 중간 정도 극성 이동상을 이용하는 반면, NP-FPLC는 극성(친수성) 정지상 및 비-극성 이동상을 사용한다는 점에서, RP-FPLC는 NP-FPLC와 상이하다. FPLC는 HPLC와 비교하여 주로 더 낮은 작동 압력(예를 들어, 5 bar 미만) 및 더 높은 유속(벤치-탑 시스템에 대해 1~5 mL/분; 공업적 규모 정제에서 리터/분)의 사용에 의해 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 상이하다. 일반적으로, FPLC 칼럼은 단지 최대 3~4 MPa(435-580 psi)의 최대 압력에서만 사용될 수 있다. RP-FPLC는 일반적으로 적어도 이동상을 함유하는 용리제 저장소를 갖는 펌프, 샘플 투입 시스템, 소수성 정지상을 함유하는 분리 칼럼(예를 들어, 다른 것들 중에서도, 수지, 비드, 필름), 및 검출기를 포함하는 장치 상에서 수행된다. RP-FPLC 장치의 추가적인 요소는 분리 공정 동안 수집된 개별적 분획을 수집하기 위한 분획 수집기를 포함할 수 있다. RP-FPLC의 기저에 있는 핵심 원리는 비극성 분석물, 비극성 정지성 분석물 및 더 극성 분석물에 대해 더 짧은 체류 및 용리 시간 사이의 상호작용이다. 이는 극성 용매에의 분석물의 소수성 절편의 노출의 감소가 정돈된 분석물-극성 용매 계면의 최소화와 관련된 자유 에너지를 감소시키기 때문이다. 따라서, 분석물의 소수성 지수는 크로마토그래피 칼럼으로부터의 그의 용리 시간과 대략 비례한다. 비극성 분석물의 결합은 이동상의 극성을 감소시킴으로써 감소되고, 이로써 크로마토그래피 칼럼으로부터의 분석물의 용리를 초래한다. 분석물의 체류 시간에 영향을 미치는 다른 인자는 이동상에서의 무기 염의 존재를 포함하며, 이는 이동상에 대한 그들의 효과(즉, 표면 장력의 증가)에 의해 증가된 분석물 체류 시간을 발생시킨다. 체류 시간은 또한 분석물의 소수성을 변경시킴으로써 이동상의 pH에 의해 영향을 받을 수 있다. 일반적으로, 이동상 완충제는 분석물 상의 임의의 잔류 전하를 중성화시켜 분석물과 정지상 사이의 소수성 상호작용을 촉진시키기 위해 pH를 조정하는 데 사용된다. 유사하게, 하전된 분석물의 극성은 이온성 상호작용을 통해 분석물 전하를 중성화시키는 이온-쌍형성제를 이용함으로써 감소될 수 있다.

[0242] 본원에 개시된 방법은 circRNA와 linRNA 사이의 기능적 소수성의 차이를 레버리지함으로써 circRNA 및 linRNA를 함유하는 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단으로부터의 circRNA의 집단의 분리를 허용하며; 즉, circRNA는 linRNA와 비교하여 더 높은 소수성을 나타내고, 이로써 정지상에 대한 circRNA의 더 강한 흡착, 및, 결과적으로 더 긴 용리 시간을 초래한다. RP-FPLC에서 역상으로서 사용하는 데 적합한 물질은 다공성 폴리스티렌 중합체, (비-알킬화)(다공성) 폴리스티렌 디비닐벤젠 중합체, 다공성 실리카 겔, 비-극성 잔기로 변형된 다공성 실리카 겔, 특히 알킬 함유 잔기, 보다 바람직하게는 부틸-, 옥틸 또는 옥타데실 함유 잔기로 변형된 다공성 실리카 겔, 페놀성 잔기로 변형된 다공성 실리카 겔, 다공성 폴리메타크릴레이트를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 여기서 특히 다공성 폴리스티렌 중합체 또는 비-알킬화(다공성) 폴리스티렌 디비닐벤젠이 사용될 수 있다. 폴리스티렌 디비닐벤젠을 갖는 정지상은 그 자체로 알려져 있다. 상업적으로 입수가능한 FPLC 방법에 이미 사용되는 그 자체로 알려진 폴리스티렌 디비닐-벤젠은 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 방법을 위해 매우 특히 바람직한 비-알킬화 다공성 폴리스티렌 디비닐벤젠은 특히 8.0 ± 1.5 μm, 특히 8.0 ± 0.5 μm의 입자 크기, 및 1000~1500 A, 특히 1000~1200 A 또는 3500~4500 A의 기공 크기를 가질 수 있는 것이지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0243] *소수성 상호작용 크로마토그래피*

[0244] HIC는 관심 표적 분자(예를 들어, circRNA)의 소수성 모이어티와 HIC 이동상 사이의 상호작용을 레버리지하는 정제 방법이다. HIC는 표적 분자가 그것이 용리상 동안 용리될 때까지 정지상에 결합하는 결합-용리 모드, 또는 관심 분자는 이동상을 통해 유동하는 반면, 불순물 또는 부산물은 정지상에 결합하는 유통 모드 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시 형태에서, HIC는 결합-용리 및 유통 방식의 조합을 사용할 수 있다.

[0245] HIC는 하나 이상의 소수성 리간드를 이용할 수 있다. HIC 소수성 리간드의 비제한적인 예는 알킬-, 아릴-리간드, 및 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, HIC 정지상은 부틸, 헥실, 페닐, 옥틸, 또는 폴리프로필렌 글리콜 리간드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, HIC 칼럼은 캅토페닐(CaptoPhenyl), 저 또는 고 치환을 갖는 페닐 세파로스(Phenyl Sepharose)™ 6 고속 유동, 페닐 세파로스™ 하이 퍼포먼스(High Performance), 옥틸 세파로스(Octyl Sepharose)™ 하이 퍼포먼스, 프락토겔(Fractogel)™ EMD 프로필, 프락토겔™ EMD 페닐, 마크로-프렙(Macro-Prep)™ 메틸, 마크로-프렙™ t-부틸, WP HII-프로필(C3)™, CIM물투스(CIMmultus) C4 HLD, CIM물투스® OH, 토요펄(Toyopearl)™ 에테르, 토요펄™ 페닐, 토요펄™ 부틸, 토요스크린(ToyoScreen) PPG, 토요스크린 페닐, 토요스크린 부틸, 토요스크린 헥실, 하이스크린(HiScreen) 부틸 FF, 하이스크린 옥틸 FF, 및 토소(Tosoh) 헥실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0246] 본원에 개시된 방법에 따르면, HIC는 염을 포함하는 로드 완충제 또는 세척 완충제를 이용할 수 있다. HIC에 적합한 염의 비제한적인 예는 황산암모늄, 황산나트륨, 염화나트륨, 염화암모늄, 브롬화나트륨, 또는 이들의 조합

을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 로드 완충제 및 세척 완충제는 술페이트 염, 시트레이트 염, 또는 이들의 조합을 포함한다. 다양한 실시 형태에서, 로드 완충제 또는 세척 완충제는 $Ba^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Li^{+}$, $Cs^{+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Rb^{+}$, 또는 $NH_4^{+}$를 포함하는 양이온, 또는 $PO_4^{3-}$, $SO_4^{2-}$, $CH_3CO_3^{-}$, $Cl^{-}$, $Br^{-}$, $NO_3^{-}$, $ClO_4^{-}$, $I^{-}$, 또는 $SCN^{-}$를 포함하는 음이온 또는 이들의 조합을 포함한다. 소수성 상호작용은 높은 염 농도에서 가장 강하다. HIC 칼럼에의 관심 circRNA의 집단의 흡착은 높은 염 농도에 의해 선호되지만, 실제 농도는 관심 circRNA의 성질, 염 유형 및 선택되는 특정 HIC 리간드에 따라 폭넓은 범위에 걸쳐 다양할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 염 농도는 부분적으로 염 유형 및 HIC 흡착제에 따라, 예를 들어, 약 50 mM 내지 약 5000 mM, 약 100 mM 내지 약 4000 mM, 약 1000 mM 내지 약 4000 mM, 약 50 mM 내지 약 2000 mM의 범위이다. 한 실시 형태에서, 염 농도는 약 50 mM, 약 55 mM, 약 60 mM, 약 65 mM, 약 70 mM, 약 75 mM, 약 80 mM, 약 85 mM, 약 90 mM, 약 100 mM, 약 200 mM, 약 300 mM, 약 400 mM, 약 500 mM, 약 600 mM, 약 700 mM, 약 800 mM, 약 900 mM, 약 1000 mM, 약 1200 mM, 약 1400 mM, 약 1600 mM, 약 1800 mM 또는 약 2000 mM이다. 일부 실시 형태에서, 로드 완충제 및 세척 완충제는 약 4.0 내지 8.5 또는 약 5.0 내지 7.0의 pH를 갖는다. 특정 실시 형태에서, 로드 완충제 및 세척 완충제는 약 4.0, 약 4.5, 약 5.0, 약 5.5, 약 6, 약 6.5, 약 7.0, 약 7.5, 약 8.0, 또는 약 8.5의 pH를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 로드 완충제 및 세척 완충제는 동일하거나 실질적으로 동일하다.

[0247] HIC 분리를 수행하는 예시적인 방법에서, 샘플(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드, 예컨대, 예를 들어, circRNA 및 linRNA의 혼합된 집단을 함유하는 샘플)을 예를 들어, 회분식 정제 기법을 사용하여 또는 칼럼 또는 막 크로마토그래피 또는 모놀리틱 물질(HIC 매질 또는 수지로 지칭됨)을 사용하여 HIC 매질과 접촉시킨다. 예를 들어, 크로마토그래피적 분리의 맥락에서, 통상적으로 형상이 원통형인 크로마토그래피 장치는 적절한 완충제 용액에서 제조된 크로마토그래피 지지 매질(예를 들어, HIC 매질)을 함유하도록 이용된다. 크로마토그래피 물질을 크로마토그래피 장치에 첨가하면, 관심 circRNA의 집단을 함유하는 샘플을 로딩 완충제의 존재 하에서 크로마토그래피 물질에 접촉시켜 관심 circRNA 또는 불순물 또는 부산물의 실질적인 부분을 HIC 매질에 결합시킨다. 샘플 내의 관심 circRNA의 집단은 HIC 매질에 결합하는 반면, 불순물 또는 부산물, 예컨대, 예를 들어, linRNA는 유통하여, 불순물 또는 부산물을 함유하는 유통액 분획을 형성한다. 이어서 결합된 circRNA는 용리상 동안 용리되고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, HIC 매질에 결합하는 circRNA의 집단은 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총량의 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 98%이다.

[0248] *음이온 교환 크로마토그래피*

[0249] AEC는 관심 핵산(예를 들어, circRNA)의 국부 전하와 크로마토그래피 물질의 국부 전하 사이의 차이에 기반하여 분자를 분리한다. 패킹된 AEC 칼럼 또는 막 장치는 결합-용리 모드, 유통, 또는 하이브리드 모드에서 작동할 수 있다. 상이한 pH 또는 전도율을 갖는 평형 완충제 또는 또 다른 완충제를 갖는 칼럼 또는 막 장치를 세척한 후, 생성물 회수는 용리 완충제의 이온 강도(즉, 전도율)를 증가시켜 AEC 매트릭스의 하전된 부위에 대해 용질과 경쟁함으로써 달성된다. pH를 변화시키고 이로써 용질의 전하를 변경시키는 것은 용질의 용리를 달성하는 또 다른 방식이다. 전도율 또는 pH의 변화는 점진적(구배 용리) 또는 단계적(단계 용리)일 수 있다.

[0250] 음이온성 또는 양이온성 치환기는 크로마토그래피를 위한 음이온성 또는 양이온성 지지체를 형성하기 위해 매트릭스에 부착될 수 있다. 음이온성 교환 치환기의 비제한적인 예는 디에틸아미노에틸(DEAE), 4차 아미노에틸(QAE) 및 4차 아민(Q) 기를 포함한다. 양이온성 치환기는 카르복시메틸(CM), 술포에틸(SE), 술포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 술포네이트(S)를 포함한다. 셀룰로스 이온 교환 매질, 예컨대 DE23™, DE32™, DE52™, CM-23™, CM-32™, 및 CM-52™는 영국 켄트주 메이드스톤에 소재하는 와트만 엘티디.(Whatman Ltd.)로부터 입수가능하다. 세파덱스(SEPHADEX)®-기반 및 가교된 이온 교환제는 또한 알려져 있다. 예를 들어, DEAE-, QAE-, CM-, 및 SP-세파덱스® 및 DEAE-, Q-, CM- 및 S-세파로스® 및 세파로스® 패스트 플로우(Fast Flow), 및 캅토(Capto)™ S는 모두 지이 헬스케어(GE Healthcare)로부터 입수가능하다. 또한, DEAE 및 CM 유도체화된 에틸렌 글리콜-메타크릴레이트 공중합체 둘 모두, 예컨대 토요펄™ DEAE-650S 또는 M 및 토요펄™ CM-650S 또는 M은 미국 펜실베니아주 필라델피아에 소재하는 토소 하스 컴퍼니(Toso Haas Co.)로부터 입수가능하고, CIM물투스® QA, CIM물투스® DEAE, CIM물투스® EV, CIM물투스® EDA, 및 CIM물투스® SO3은 사르토리우스(Sartorius)로부터 입수가능하고, 누비아(Nuvia) S 및 우노스피어(UNOSphere)™ S는 미국 캘리포니아주 허큘레스에 소재하는 바이오래드(BioRad)로부터 입수가능하고, 에쉬무노(Eshmuno)® S는 미국 캘리포니아주 빌레리카에 소재하는 이엠디 밀리포어(EMD Millipore)로부터 입수가능하다.

[0251] *혼합 모드 크로마토그래피*

[0252] MMC는 혼합 모드 매질, 예컨대 지이 헬스케어로부터 입수가능한 캅토어드히어(CaptoAdhere), 사르토리우스로부터 입수가능한 CIM물투스® 프리마S, 및 CIM물투스® H-본드(그러나 이에 한정되는 것은 아님)를 이용하는 크로마토그래피이다. 이러한 매질은 MMC 리간드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 이러한 리간드는 결합되는 물질과 상호작용하는 적어도 2개의 상이하지만 공동-작동하는 부위를 제공할 수 있는 리간드를 지칭한다. 이들 부위 중 하나는 리간드와 관심 핵산 사이의 전하-전하 상호작용의 유인적 유형을 제공한다. 다른 부위는 전형적으로 전자 수용자-공여자 상호작용 또는 소수성 또는 친수성 상호작용을 제공한다. 전자 공여자-수용자 상호작용은 다른 것들 중에서도, 수소-결합, π-π, 양이온-π, 전하 전달, 쌍극자-쌍극자, 유도 쌍극자와 같은 상호작용을 포함한다. 혼합 모드 관능성은 전통적인 음이온 교환제와 비교하여 상이한 선택성을 제공할 수 있다. MMC 리간드는 또한 "다중모드" 크로마토그래피 리간드로 알려져 있다.

[0253] 본 발명에 따르면, MMC 매질은 때때로 직접적으로 또는 스페이서를 통해 베이스 매트릭스로 표시되는 유기 또는 무기 지지체에 커플링된 혼합 모드 리간드를 포함할 수 있다. 지지체는 다른 것들 중에서도, 입자, 예컨대 본질적으로 구형 입자, 모놀리스, 필터, 막, 표면, 모세관의 형태일 수 있다. 특정 실시 형태에서, 지지체는 천연 중합체, 예컨대 가교된 탄수화물 물질, 예컨대 다른 것들 중에서도, 아가로스, 아가, 셀룰로스, 덱스트란, 키토산, 곤약, 카라기난, 겔란, 알기네이트로부터 제조된다. 높은 흡착 용량을 얻기 위해, 지지체는 다공성일 수 있고, 리간드는 이어서 외부 표면뿐만 아니라 기공 표면에 커플링된다. 이러한 천연 중합체 지지체는 표준 방법, 예컨대 반전 현탁 겔화에 따라 제조될 수 있다(S Hjerten: BIOCHIM BIOPHYS ACTA 79(2), 393-98 (1964)). 대안적으로, 지지체는 합성 중합체, 예컨대 가교된 합성 중합체, 예를 들어, 다른 것들 중에서도, 스티렌 또는 스티렌 유도체, 디비닐벤젠, 아크릴아미드, 아크릴레이트 에스테르, 메타크릴레이트 에스테르, 비닐 에스테르, 비닐 아미드로부터 제조될 수 있다. 이러한 합성 중합체는 표준 방법에 따라 생성될 수 있으며, 예를 들어, 문헌["Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988))]을 참조한다. 다공성 천연 또는 합성 중합체 지지체는 또한 상업적 공급원, 예컨대 스웨덴 웁살라에 소재하는 아머샴 바이오사이언시스(Amersham Biosciences)로부터 입수가능하다.

[0254] *순도의 평가*

[0255] circRNA의 풍부화된 집단의 순도의 평가는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다. 한 실시 형태에서, circRNA는 질량 기준으로 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 순수하다. 순도는 예를 들어, 질량 분광법, HPLC, 칩-기반 전기영동, 현미경검사, 원형 이색성(CD) 분광학, 분광광도법, 형광분석법(예를 들어, 큐빗(Qubit)), 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 영상화, UV-Vis 분광광도법, RNA 전기영동, RN아제 H 분석, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 조제물 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 circRNA 분자에 함유된다.

[0256] 일부 실시 형태에서, circRNA 조제물은 질량 분광법, HPLC, 칩-기반 전기영동, 현미경검사, CD 분광학, 분광광도법, 형광분석법(예를 들어, 큐빗), 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 영상화, UV-Vis 분광광도법, RNA 전기영동, 또는 RN아제 H 분석에 의해 측정되는 경우, linRNA 분자의 역치 양 미만을 포함한다(예를 들어, 역치 양이 circRNA 조제물에 대한 참조 기준, 예를 들어, 제약 방출 명세인 경우). 일부 실시 형태에서, circRNA 조제물은 비검출가능한 수준의 linRNA 분자를 포함한다.

[0257] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL, 60 ng/mL, 70 ng/mL, 80 ng/mL, 90 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 400 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 μg/mL, 5000 μg/mL, 10,000 μg/mL, 또는 100,000 μg/mL 미만의 모노뉴클레오티드 함량을 갖는다.

[0258] 한 실시 형태에서, circRNA는 질량 기준으로 총 뉴클레오티드의 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 또는 그 사이의 임의의 백분율 미만의 모노뉴클레오티드 함량을 가지며, 여기서 총 뉴클레오티드 함량은 데옥시리보뉴클레오티드 분자 및 리보뉴클레오티드 분자의 총 질량이다.

[0259] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL, 60 ng/mL, 70 ng/mL, 80 ng/mL, 90 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 400 ng/mL, 500ng/mL, 600 ng/mL,

1 mg/mL, 1.5 mg/mL, 또는 2 mg/mL 미만의 linRNA 함량, 예를 들어, linRNA 대응물 또는 RNA 단편을 갖는다.

[0260] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만의 linRNA를 갖는다.

[0261] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL, 60 ng/mL, 70 ng/mL, 80 ng/mL, 90 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 400 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 μg/mL, 5000 μg/mL, 10,000 μg/mL, 또는 100,000 μg/mL 미만의 DNA 함량, 예를 들어, 주형 DNA, 예를 들어, 세포 DNA(예를 들어, 숙주 세포 DNA)를 갖는다.

[0262] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 질량 기준으로 총 뉴클레오티드의 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 미만의 DNA 함량을 가지며, 여기서 총 뉴클레오티드 분자는 데옥시리보뉴클레오티드 함량 및 리보뉴클레오티드 분자의 총 질량이다.

[0263] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL, 60 ng/mL, 70 ng/mL, 80 ng/mL, 90 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 400 ng/mL, 또는 500 ng/mL 미만의 단백질(예를 들어, 세포 단백질(CP), 예를 들어, 효소) 오염을 갖는다.

[0264] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 circRNA의 밀리그램(mg)당 0.1 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 15 ng, 20 ng, 25 ng, 30 ng, 35 ng, 40 ng, 50 ng, 60 ng, 70 ng, 80 ng, 90 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 또는 500 ng 미만의 단백질(예를 들어, CP, 예를 들어, 효소) 오염을 갖는다.

[0265] 한 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 적어도 0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 0.1 μg/mL, 0.5 μg/mL,1 μg/mL, 2 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL, 40 μg/mL, 50 μg/mL, 60 μg/mL, 70 μg/mL, 80 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL, 300 μg/mL, 500 μg/mL, 1000 μg/mL, 5000 μg/mL, 10,000 μg/mL, 또는 100,000 μg/mL의 circRNA 농도를 갖는다.

[0266] 일부 실시 형태에서, circRNA는 크로마토그래피, 예를 들어, 액체 크로마토그래피, 예를 들어, FPLC(예를 들어, 정상 또는 역상 FPLC), HPLC, HIC, AEC, MMC, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다.

[0267] *전처리 방법*

[0268] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 임의의 조건은 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단으로부터의 circRNA의 전처리 방법으로서 사용될 수 있다.

[0269] 일부 실시 형태에서, 적어도 0.5 mg(예를 들어, 적어도 0.6, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mg, 또는 그 초과)의 circRNA 양을 생성하는 전처리 방법. 본 방법은 매우 규모 확장가능하다는 점에서 유리하다.

[0270] *분석 방법*

[0271] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 임의의 조건은 circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단 또는 circRNA의 풍부화된 집단으로부터의 circRNA의 순도를 결정하는 분석 방법으로서 사용될 수 있다. 본 발명은 본원에 기재된 하나 이상의 변성 조건을 사용하여 풍부화된 circRNA의 회분의 순도를 반복적으로 결정하는 방법을 포함한다.

[0272] 일부 실시 형태에서, 분석 방법은 크로마토그래피, 예를 들어, 액체 크로마토그래피, 예를 들어, FPLC(예를 들어, 정상 또는 역상 FPLC), HPLC, HIC, AEC, MMC, 또는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 circRNA의 순도를 결정한다.

[0273] 일부 실시 형태에서, 본 분석 방법은 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.1% 미만의 상대 표준 편차(RSD)를 갖는다. 일부 실시 형태에서, RSD는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 circRNA 샘플에 기반하여 계산된다.

[0274] 일부 실시 형태에서, 분석 방법은 이동상의 사용을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 이동상은 우레아, 비스-트리스 프로판(BTP), 아세토니트릴, NaCl, 물, 염산(HCl), 또는 DMSO를 포함한다.

[0275] 일부 실시 형태에서, 변성 조건은 이동상에서 발견된다.

[0276] 일부 실시 형태에서, 크로마토그래피 칼럼은 가열되어 변성을 제공한다. 일부 실시 형태에서, circRNA 샘플은 변성을 위해 칼럼에 정치되기 전에 가열된다.

[0277] 일부 실시 형태에서, circRNA 샘플은 변성제, 예컨대 상기 기재된 것의 조합, 예를 들어, 우레아 및 아세토니트릴의 조합으로 변성된다.

[0278] 일부 실시 형태에서, 분석 방법은 불순물 또는 부산물 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

[0279] 일부 실시 형태에서, 분석 방법은 적어도 0.5 mg(예를 들어, 적어도 0.6, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mg, 또는 그 초과)의 circRNA 양의 순도를 정량화하는 것을 포함한다.

[0280] *불순물 및 부산물*

[0281] 본 발명의 방법은 예를 들어, 본 발명의 방법에 의한 정제 전의 샘플 내의 불순물 또는 부산물의 수준과 비교하여 또는 100%(w/w) circRNA를 함유하는 상이한 샘플 내의 불순물 또는 부산물의 수준과 비교하여, 감소된 수준의 불순물 또는 부산물을 갖고 circRNA의 집단을 포함하는 조제물을 생성하는 데 적합하다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 관심 circRNA의 집단을 갖고 감소된 수준의 총 불순물 또는 부산물을 갖는 조성물을 생성한다. 일부 실시 형태에서, 감소된 수준의 총 불순물 또는 부산물을 갖는 조제물은 불순물 또는 부산물이 없거나 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다. 예를 들어, 낮은 불순물 또는 부산물 조성물은 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.5%, 또는 그 미만의 총 불순물 또는 부산물을 함유할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 낮은 불순물 또는 부산물 조성물은 약 5%, 4%, 3%, 2.5%, 2.4%, 2.3%, 2.2%, 2.1%, 2%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.5%, 0.1%, 또는 그 미만의 총 불순물 또는 부산물을 포함한다.

[0282] 일부 실시 형태에서, 불순물 또는 부산물은 공정-관련 불순물 또는 부산물이다. 본원에 사용된 바와 같이, "공정-관련 불순물 또는 부산물"이라는 용어는 관심 circRNA의 집단을 포함하는 조성물에 존재하지만 circRNA 자체로부터 유래되지는 않는 불순물 또는 부산물을 지칭한다. 공정-관련 불순물 또는 부산물은 숙주 세포 단백질(HCP), 숙주 세포 핵산, 크로마토그래피 물질, 및 매질 성분을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 공정-관련 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 EDTA를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "낮은 불순물 조성물"은 불순물 또는 부산물이 감소되지 않은 조성물과 비교하여 감소된 수준의 공정-관련 불순물 또는 부산물을 포함하는 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 낮은 공정-관련 불순물 조성물은 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 그 미만의 공정-관련 불순물 또는 부산물을 함유할 수 있다. 한 실시 형태에서, 낮은 공정-관련 불순물 조성물은 공정-관련 불순물 또는 부산물이 없거나 공정-관련 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다.

[0283] 일부 실시 형태에서, circRNA(예를 들어, circRNA 제약 조제물 또는 조성물 또는 circRNA의 생성에서 중간체)는 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다. 다양한 실시 형태에서, circRNA를 포함하는 조성물 내의 적어도 하나의 불순물 또는 부산물의 수준은 불순물 또는 부산물을 제거하기 위한 정제 또는 처리 전의 조성물의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%만큼 감소된다. 일부 실시 형태에서, 적어도 하나의 공정-관련 불순물 또는 부산물의 수준은 불순물 또는 부산물을 제거하기 위한 정제 또는 처리 전의 조성물의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%만큼 감소된다. 일부 실시 형태에서, 적어도 하나의 생성물-관련 물질의 수준은 불순물 또는 부산물을 제거하기 위한 정제 또는 처리 전의 조성물의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%만큼 감소된다.

[0284] 당업계에 잘 알려진 방법은 샘플에 존재하는 불순물 또는 부산물의 정량화에 사용될 수 있다. 예를 들어, 분광학 방법, 예컨대 자외선(UV), 근적외선 분광학(NIR), 푸리에-변형 적외선 분광학(FTIR), 형광 분광학, 또는 라만 분광학을 사용하여 온-라인, 앳-라인, 또는 인-라인 모드로 불순물 또는 부산물의 수준을 모니터링할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 온-라인, 앳-라인, 또는 인-라인 모니터링 방법은 원하는 circRNA 품질/회수의 달성을 가능하게 하기 위해, 크로마토그래피 단계의 세척 라인 상에서 또는 수집 용기에서 사용될 수 있다. 일부 실시

형태에서, UV 신호는 적절한 생성물 품질/회수를 달성하기 위한 대용물로서 사용될 수 있으며, 여기서 UV 신호는 정상 공정 가변성이 다루어질 수 있고, 표적 생성물 품질이 달성될 수 있도록, 적분, 미분, 이동 평균과 같은 프로세싱 기법을 포함하여 적절하게 프로세싱될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시 형태에서, 이러한 측정은 로드/세척의 이온 농도/전도율이 피드백에 의해 제어되고, 이로써 생성물 품질 제어를 용이하게 할 수 있도록, 인-라인 희석 방법과 조합될 수 있다.

[0285] **원형 폴리리보뉴클레오티드의 생성**

[0286] 본 발명은 예를 들어, 재조합 기술 또는 화학적 합성을 포함하는 circRNA를 생성하는 방법을 제공한다. 예를 들어, RNA 서클을 생성하는 데 사용되는 DNA 분자는 천연 발생 원래 핵산 서열, 그의 변형된 버전의 DNA 서열, 또는 자연에서 통상적으로 발견되지 않는 합성 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 분자 또는 융합 단백질)를 코딩하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. DNA 및 RNA 분자는 고전적인 돌연변이유발 기법 및 재조합 기법, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발, 돌연변이를 유도하기 위한 핵산 분자의 화학적 처리, 핵산 단편의 제한 효소 절단, 핵산 단편의 라이게이션, 핵산 서열의 선택된 영역의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭 또는 돌연변이유발, 올리고뉴클레오티드 혼합물의 합성 및 핵산 분자의 혼합물을 "수립하기" 위한 혼합물 그룹의 라이게이션 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 다양한 기법을 사용하여 변형될 수 있다.

[0287] circRNA는 화학적 합성 및 효소적 합성을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 임의의 이용가능한 기법에 따라 제조될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 선형 1차 구축물 또는 선형 RNA는 원형화 또는 연쇄화되어 본원에 기재된 circRNA를 생성할 수 있다. 원형화 또는 연쇄화의 메카니즘은 예를 들어, 화학적, 효소적, 스플린트 라이게이션, 또는 리보자임-촉매 방법과 같은 방법을 통해 일어날 수 있다. 새롭게 형성된 5'-3' 연결은 분자내 연결 또는 분자간 연결일 수 있다. 예를 들어, 스플린트 리가제, 예컨대 스플린트R(SplintR)® 리가제는 스플린트 라이게이션에 사용될 수 있다. 이 방법에 따르면, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드(스플린트), 예컨대 단일-가닥 DNA 또는 RNA는, 2개의 말단이 혼성화 시에 단일-가닥 스플린트와 병치될 수 있도록, linRNA의 둘 모두의 말단과 혼성화하도록 설계될 수 있다. 따라서, 스플린트 리가제는 linRNA의 병치된 2개의 말단의 라이게이션을 촉매하여, circRNA를 생성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, DNA 또는 RNA 리가제는 원형 폴리뉴클레오티드의 합성에 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, 리가제는 circ 리가제 또는 원형 리가제일 수 있다.

[0288] 또 다른 예에서, linRNA의 5' 또는 3' 단부 중 어느 하나는 시험관내 전사 동안, 생성된 선형 circRNA가 linRNA의 5' 단부를 linRNA의 3' 단부에 라이게이션할 수 있는 활성 리보자임 서열을 포함하도록, 리가제 리보자임 서열을 코딩할 수 있다. 리가제 리보자임은 그룹 I 인트론, 간염 델타 바이러스, 헤어핀 리보자임으로부터 유래될 수 있거나, SELEX(지수적 풍부화에 의한 리간드의 체계적인 진화)에 의해 선택될 수 있다.

[0289] 또 다른 예에서, linRNA는 적어도 하나의 비-핵산 모이어티를 사용함으로써 원형화되거나 연쇄화될 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 비-핵산 모이어티는 linRNA를 원형화하거나 연쇄화하기 위해 linRNA의 5' 말단 부근의 또는 3' 말단 부근의 영역 또는 특색과 반응할 수 있다. 또 다른 예에서, 적어도 하나의 비-핵산 모이어티는 linRNA의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치하거나 그에 또는 그 부근에 연결될 수 있다. 비-핵산 모이어티는 동종 또는 이종일 수 있다. 비제한적인 예로서, 비-핵산 모이어티는 소수성 연결, 이온성 연결, 생체분해 가능한 연결, 또는 절단 가능한 연결과 같은 연결일 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 비-핵산 모이어티는 라이게이션 모이어티이다. 추가의 또 다른 비제한적인 예로서, 비-핵산 모이어티는 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드 모이어티, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 압타머 또는 비-핵산 링커일 수 있다.

[0290] 또 다른 예에서, linRNA는 자기-스플라이싱에 의해 원형화되거나 연쇄화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, linRNA는 자기-라이게이션하는 루프 E 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시 형태에서, linRNA는 자기-원형화 인트론, 예를 들어, 5' 및 3' 스플라이스 연접부, 또는 자기-원형화 촉매 인트론, 예컨대 그룹 I, 그룹 II, 또는 그룹 III 인트론을 포함할 수 있다. 그룹 I 인트론 자기-스플라이싱 서열의 비제한적인 예는 T4 박테리오파지 유전자 td로부터 유래된 자기-스플라이싱 교환된 인트론-엑손 서열, 및 테트라히메나(Tetrahymena), 시아노박테리아 아나바에나(Anabaena) 프리-tRNA-Leu 유전자, 또는 테트라히메나 프리-rRNA의 개재 서열(IVS) rRNA를 포함할 수 있다.

[0291] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 촉매 인트론 단편, 예컨대 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반을 포함할 수 있다. 제1 및 제2 어닐링 영역은 촉매 인트론 단편 내에 위치할 수 있다. 그룹 I 촉매 인트론은 2-금속 이온 포스포릴 전달 메카니즘을 통해 mRNA, tRNA, 및 rRNA 전구체로부터의 그들 자신의 삭제를 촉매하는 자기-스플라이싱 리보자임이다. 중요하게는, RNA 자체는 외인성 효소, 예컨대 리가제를 요구하지 않으면서 인트론 제거를 자기-촉매한다.

[0292] 일부 실시 형태에서, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자, 또는 테트라히메나 프리-rRNA로부터의 것이다.

[0293] 일부 실시 형태에서, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자로부터의 것이며, 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 15개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 15개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0294] 일부 실시 형태에서, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 테트라히메나 프리-rRNA로부터의 것이며, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 제1 어닐링 영역을 포함하고, 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 3' 엑손은 제1 어닐링 영역을 포함하고, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0295] 일부 실시 형태에서, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자, 테트라히메나 프리-rRNA, 또는 T4 파지 td 유전자로부터의 것이다.

[0296] 일부 실시 형태에서, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 5' 그룹 I 촉매 인트론 단편은 T4 파지 td 유전자로부터의 것이다. 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함할 수 있고, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함할 수 있다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 2 내지 16개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 2 내지 16개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0297] 일부 실시 형태에서, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 선형 폴리뉴클레오티드의 5' 말단이다.

[0298] 일부 실시 형태에서, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 말단이다.

[0299] 또 다른 예에서, linRNA는 linRNA의 5' 및 3' 단부에서의, 부근의, 또는 그에 연결된 원자, 분자 표면 사이의 유인력을 유발하는 비-핵산 모이어티에 의해 원형화되거나 연쇄화될 수 있다. 하나 이상의 linRNA는 분자간 힘 또는 분자내 힘에 의해 원형화되거나 연쇄화될 수 있다. 분자간 힘의 비제한적인 예는 쌍극자-쌍극자 힘, 쌍극자-유도된 쌍극자 힘, 유도된 쌍극자-유도된 쌍극자 힘, 반 데르 발스 힘, 및 런던 분산력을 포함한다. 분자내 힘의 비제한적인 예는 공유 결합, 금속 결합, 이온 결합, 공명 결합, 애그노스틱 결합, 양극성 결합, 컨쥬게이션, 하이퍼컨쥬게이션 및 반결합을 포함한다.

[0300] 또 다른 예에서, linRNA는 5' 말단 부근에 및 3' 말단 부근에 리보자임 RNA 서열을 포함할 수 있다. 리보자임 RNA 서열은 서열이 리보자임의 나머지에 노출되는 경우 펩티드에 공유적으로 연결시킬 수 있다. 5' 말단 및 3' 말단 부근의 리보자임 RNA 서열에 공유적으로 연결된 펩티드는 서로와 회합되고, 이로써 linRNA가 원형화되거나 연쇄화되는 것을 유발할 수 있다. 또 다른 예에서, 5' 말단 및 3' 말단 부근의 리보자임 RNA에 공유적으로 연결된 펩티드는 선형 1차 구축물 또는 선형 mRNA가 당업계에 알려진 다양한 방법, 예컨대 단백질 라이게이션(그러나 이에 한정되는 것은 아님)을 사용하여 라이게이션에 적용된 후 원형화되거나 연쇄화되는 것을 유발할 수 있다. 본 발명의 선형 1차 구축물 또는 linRNA에 사용하기 위한 리보자임의 비제한적인 예 또는 펩티드를 혼입시키거나 공유적으로 연결시키는 방법의 비-완전한 목록은 미국 특허 출원 제US20030082768호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0301] 추가의 또 다른 예에서, 화학적 원형화 방법을 사용하여 circRNA를 생성할 수 있다. 이러한 방법은 클릭 화학(예를 들어, 알킨 및 아지드-기반 방법, 또는 클릭화 가능한 염기), 올레핀 치환, 포스포르아미데이트 라이게이션, 헤미아미날-이민 가교, 염기 변형, 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0302] 또 다른 예에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 RNA를 생성하기 위해 무세포 시스템에서 전사된 데옥시리보뉴클레오티드 주형을 사용하여(예를 들어, 시험관내 전사에 의해) 생성된다. 선형 폴리리보뉴클레오티드는 스플

라이싱-혼화성 폴리리보뉴클레오티드를 생성하며, 이는 자기-스플라이싱되어 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성할 수 있다.

[0303] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 제공하고; 선형 폴리리보뉴클레오티드를 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 및 5' 스플라이스 부위의 스플라이싱에 적합한 조건 하에서 자기-스플라이싱하고; 이로써 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성함으로써 생성된다(예를 들어, 무세포 시스템에서).

[0304] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 코딩하는 데옥시리보뉴클레오티드를 제공하고; 데옥시리보뉴클레오티드를 무세포 시스템에서 전사하여 선형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하고; 임의적으로 스플라이싱-혼화성 선형 폴리리보뉴클레오티드를 정제하고; 선형 폴리리보뉴클레오티드를 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 및 5' 스플라이스 부위의 스플라이싱에 적합한 조건 하에서 자기-스플라이싱하고, 이로써 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성함으로써 생성된다.

[0305] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 코딩하는 데옥시리보뉴클레오티드를 제공하고; 데옥시리보뉴클레오티드를 무세포 시스템에서 전사하여 선형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하고(여기서 전사는 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 및 5' 스플라이스 부위의 스플라이싱에 적합한 조건 하에서 용액에서 일어남), 이로써 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성함으로써 생성된다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 5' 스플린트-인트론 및 3' 스플린트-인트론(예를 들어, circRNA를 생성하기 위한 자기-스플라이싱 구축물)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 5' 어닐링 영역 및 3' 어닐링 영역을 포함한다.

[0306] 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 데옥시리보핵산, 예를 들어, 본원에 기재된 데옥시리보핵산, 예컨대 DNA 벡터, 선형화된 DNA 벡터, 또는 cDNA로부터 생성된다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 무세포 시스템에서의 전사(예를 들어, 시험관내 전사)에 의해 데옥시리보핵산으로부터 전사된다.

[0307] 또 다른 예에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 세포, 예를 들어, 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 생성될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 외인성 폴리리보뉴클레오티드가 세포에 제공된다(예를 들어, 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 또는 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드의 전사를 코딩하는 DNA 분자). 선형 폴리리보뉴클레오티드는 세포에 제공된 외인성 DNA 분자로부터 세포에서 전사될 수 있다. 선형 폴리리보뉴클레오티드는 세포에 일시적으로 제공된 외인성 재조합 DNA 분자로부터 세포에서 전사될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 외인성 DNA 분자는 세포의 게놈 내로 통합되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 세포의 게놈 내로 혼입된 재조합 DNA 분자로부터 세포에서 전사된다.

[0308] 일부 실시 형태에서, 세포는 원핵 세포이다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 원핵 세포는 박테리아 세포 또는 고세균 세포일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 원핵 세포는 이. 콜라이(E. coli), 호염성 고세균(예를 들어, 할로페락스 볼카니(Haloferax volcaniii)), 스핑고모나스(Sphingomonas), 시아노박테리아(예를 들어, 시네코코쿠스 엘론가투스(Synechococcus elongatus), 스피룰리나(*Spirulina*)(아르트로스피라(Arthrospira)) 종, 및 시네코시스티스(Synechocystis) 종), 스트렙토미세스(Streptomyces), 악티노미세테스(예를 들어, 노노무라에아(Nonomuraea), 키타사토스포라(Kitasatospora), 또는 써모비피다(Thermobifida)), 바실루스(Bacillus) 종(예를 들어, 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 바실루스 안트라시스(Bacillus anthracis), 바실루스 세레우스(Bacillus cereus)), 베타프로테오박테리아(예를 들어, 부르크홀데리아(Burkholderia)), 알파프로테오박테리아(예를 들어, 아그로박테리움(Agrobacterium)), 슈도모나스(Pseudomonas)(예를 들어, 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)), 및 엔테로박테리아일 수 있다. 원핵 세포는 배양 배지에서 성장될 수 있다. 원핵 세포는 생물반응기에 함유될 수 있다.

[0309] 세포는 진핵 세포일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 진핵 세포는 단세포 진핵 세포이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵은 단세포 진균 세포, 예컨대 효모 세포(예를 들어, 사카로미세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae) 및 다른 사카로미세스(Saccharomyces) 종, 브레타노미세스(Brettanomyces) 종, 쉬조사카로미세스(Schizosaccharomyces) 종, 토룰라스포라(Torulaspora) 종, 및 피키아(Pichia) 종)이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 단세포 동물 세포이다. 단세포 동물 세포는 다세포 동물로부터 단리되거나 배양에서 성장된 세포, 또는 그의 딸 세포일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 동물 세포는 탈분화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 단세포 식물 세포이다. 단세포 식물 세포는 다세포 식물로부터 단리되거나 배양에서 성장된 세포, 또는 그의 딸 세포일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 식물 세포는 탈분화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 식물 세포는 식물 캘러스로부터의 것이다. 실시 형태에서, 단세포 세포는 식물 세포

원형질체이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 단세포 진핵 조류 세포, 예컨대 단세포 녹조류, 규조류, 유글레나류, 또는 와편모충류이다. 관심 단세포 진핵 조류의 비제한적인 예는 두날리엘라 살리나(Dunaliella salina), 클로렐라 불가리스(Chlorella vulgaris), 클로렐라 조핀기엔시스(Chlorella zofingiensis), 해마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis), 네오클로리스 올레오아분단스(Neochloris oleoabundans) 및 다른 네오클로리스(Neochloris) 종, 프로토시폰 보트리오이데스(Protosiphon botryoides), 보트리오코쿠스 브라우니이(Botryococcus braunii), 크립토코쿠스(Cryptococcus) 종, 클라미도모나스 레인하르드티이(Chlamydomonas reinhardtii) 및 다른 클라미도모나스(Chlamydomonas) 종을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 원생생물 세포이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 원충 세포이다.

[0310] 일부 실시 형태에서, 진핵 세포는 다세포 진핵생물의 세포이다. 예를 들어, 다세포 진핵생물은 척추 동물, 무척추 동물, 다세포 진균, 다세포 조류, 및 다세포 식물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 인간이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 비-인간 척추 동물이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 무척추 동물이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 다세포 진균이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 다세포 식물이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 인간의 세포 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 유인원), 유제류(예를 들어, 소, 버팔로, 비손, 양, 염소, 및 사향 소를 포함하는 소과; 돼지; 낙타, 라마, 및 알파카를 포함하는 낙타과; 사슴, 영양; 및 말 및 당나귀를 포함하는 말과), 육식동물(예를 들어, 개, 고양이), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스, 기니아 피그, 햄스터, 다람쥐), 또는 토끼목(예를 들어, 토끼, 헤어(hare))의 세포이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 조류, 예컨대 조류 분류군 순계목(예를 들어, 닭, 칠면조, 꿩, 메추라기), 기러기목(예를 들어, 오리, 거위), 고관목(예를 들어, 타조, 에뮤), 비둘기목(예를 들어, 피존, 도브), 또는 앵무새목(예를 들어, 앵무새)의 구성원의 세포이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 세포는 절지동물(예를 들어, 곤충류, 거미류, 갑각류), 선충류, 환형동물, 연충, 또는 연체동물의 세포이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 세포는 다세포 식물, 예컨대 피자 식물(쌍자엽 또는 단자엽일 수 있음), 나자 식물(예를 들어, 침엽수, 소철류, 마황문, 은행나무), 양치식물, 쇠뜨기, 석송, 또는 선태식물의 세포이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 진핵 다세포 조류의 세포이다.

[0311] 진핵 세포는 배양 배지에서 성장될 수 있다. 진핵 세포는 생물반응기에 함유될 수 있다.

[0312] 생물반응기의 예는 제한 없이, 교반 탱크(예를 들어, 잘 혼합된) 생물반응기 및 관상(예를 들어, 플러그 유동) 생물반응기, 에어리프트 생물반응기, 막 교반 탱크, 스핀 필터 교반 탱크, 진동혼합기, 유동층 반응기, 및 막 생물반응기를 포함한다. 생물반응기를 작동하는 방식은 회분식 또는 연속식 공정일 수 있다. 생물반응기는 시약 및 생성물 스트림이 연속적으로 공급되고 있고 시스템으로부터 빼내어지는 경우 연속적이다. 회분식 생물반응기는 연속적 재순환 유동을 가질 수 있지만, 시약 또는 생성물 수확물의 연속적 공급은 갖지 않을 수 있다.

[0313] 본 발명의 일부 방법은 원형 폴리리보뉴클레오티드의 대규모 생성에 관한 것이다. 대규모 생성 방법을 위해, 방법은 1 리터(L) 내지 50 L, 또는 그 초과(예를 들어, 5 L, 10 L, 15 L, 20 L, 25 L, 30 L, 35 L, 40 L, 45 L, 50 L, 또는 그 초과)의 부피에서 수행될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 방법은 5 L 내지 10 L, 5 L 내지 15 L, 5 L 내지 20 L, 5 L 내지 25 L, 5 L 내지 30 L, 5 L 내지 35 L, 5 L 내지 40 L, 5 L 내지 45 L, 10 L 내지 15 L, 10 L 내지 20 L, 10 L 내지 25 L, 20 L 내지 30 L, 10 L 내지 35 L, 10 L 내지 40 L, 10 L 내지 45 L, 10 L 내지 50 L, 15 L 내지 20 L, 15 L 내지 25 L, 15 L 내지 30 L, 15 L 내지 35 L, 15 L 내지 40 L, 15 L 내지 45 L, 또는 15 내지 50 L의 부피에서 수행될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 생물반응기는 적어도 1 g의 원형 RNA를 생성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 생물반응기는 1~200 g의 원형 RNA(예를 들어, 1~10 g, 1~20 g, 1~50 g, 10~50 g, 10~100 g, 50~100 g, 50~200 g의 원형 RNA)를 생성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 생성되는 양은 리터당(예를 들어, 리터당 1~200 g), 회분 또는 반응당(예를 들어, 회분 또는 반응당 1~200 g), 또는 단위 시간당(예를 들어, 시간당 또는 일당 1~200 g) 측정된다. 일부 실시 형태에서, 생성 용량을 증가시키기 위해 하나 초과의 생물반응기가 일련으로 이용될 수 있다(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9개의 생물반응기가 일련으로 사용될 수 있다).

[0314] 본원에 기재된 circRNA를 제조하는 방법은 예를 들어, 문헌[Khudyakov & Fields, Artificial DNA: Methods and Applications, CRC Press (2002)]; [in Zhao, Synthetic Biology: Tools and Applications, (First Edition), Academic Press (2013)]; [Muller and Appel, from RNA Biol, 2017, 14(8):1018-1027]; 및 [Egli & Herdewijn, Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids, (First Edition), Wiley-VCH (2012)]에 기재되어 있다. 원형 폴리리보뉴클레오티드를 제조하는 다른 방법은 예를 들어, 국제 공개 제WO2022/247943호, 미국 특허 제US11000547호, 국제 공개 제WO2018/191722호, 국제 공개 제WO2019/236673호, 국제 공개 제

WO2020/023595호, 국제 공개 제WO2022/204460호, 국제 공개 제WO2022/204464호, 및 국제 공개 제WO2022/204466호에 기재되어 있다.

[0315] circRNA를 합성하는 다양한 방법은 또한 다른 곳에 기재되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제US6210931호, 미국 특허 제US5773244호, 미국 특허 제US5766903호, 미국 특허 제US5712128호, 미국 특허 제US5426180호, 미국 공개 제US20100137407호, 국제 공개 제WO1992001813호, 국제 공개 제WO2010084371호, 및 문헌[Petkovic et al., Nucleic Acids Res. 43:2454-65 (2015)]을 참조하며; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다).

[0316] **원형 폴리리보뉴클레오티드**

[0317] 본 발명은 circRNA 조성물, 및 circRNA를 제조 및 정제하는 방법을 특색으로 한다. 일부 실시 형태에서, circRNA는 linRNA로부터 생성된다(예를 들어, 효소적 라이게이션에 의해 또는 자가-촉매 RNA에 의해서를 포함하는 당업계에 알려진 방법에 의해). 일부 실시 형태에서, linRNA는 데옥시리보뉴클레오티드 주형(예를 들어, 벡터, 선형화된 벡터, 또는 cDNA)으로부터 전사된다.

[0318] circRNA는 하나 이상의 코딩 서열, 하나 이상의 비-코딩 서열, 또는 이들의 조합과 같은 특색을 포함할 수 있다. circRNA는 하나 이상의 코딩 서열, 예를 들어, 폴리펩티드의 발현을 코딩하는 코딩 서열을 포함할 수 있다. 각각의 코딩 서열은 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 하나 이상의 조절 서열, 또는 이들의 조합에 작동가능하게 연결될 수 있다. circRNA는 하나 이상의 비-코딩 서열, 예를 들어, 표적, 예컨대 단백질 또는 핵산에 특이적으로 결합하는 비-코딩 서열을 포함할 수 있다. circRNA의 특색은 예를 들어, 국제 특허 공개 제WO 2019/118919호, 제WO 2020/023655호, 제WO 2020/180751호, 제WO 2020/180752호, 제WO 2020/181013호, 제WO 2020/198403호, 제WO 2020/257730호, 제WO 2020/257727호, 제WO 2020/252436호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 기재된 circRNA에 관하여 참조로 포함된다.

[0319] 정제되는 circRNA의 크기는 본원에 개시된 정제 방법에 적합한 임의의 크기의 것일 수 있다.

[0320] 예를 들어, 정제되는 circRNA는 적어도 20,000개의 뉴클레오티드, 적어도 19,000개의 뉴클레오티드, 적어도 18,000개의 뉴클레오티드, 적어도 17,000개의 뉴클레오티드, 적어도 16,000개의 뉴클레오티드, 적어도 15,000개의 뉴클레오티드, 적어도 14,000개의 뉴클레오티드, 적어도 13,000개의 뉴클레오티드, 적어도 12,000개의 뉴클레오티드, 적어도 11,000개의 뉴클레오티드, 적어도 10,000개의 뉴클레오티드, 적어도 9,000개의 뉴클레오티드, 적어도 8,000개의 뉴클레오티드, 적어도 7,000개의 뉴클레오티드, 적어도 6,000개의 뉴클레오티드, 적어도 5,000개의 뉴클레오티드, 적어도 4,000개의 뉴클레오티드, 적어도 3,000개의 뉴클레오티드, 적어도 2,000개의 뉴클레오티드, 적어도 1,000개의 뉴클레오티드, 적어도 900개의 뉴클레오티드, 적어도 800개의 뉴클레오티드, 적어도 700개의 뉴클레오티드, 적어도 600개의 뉴클레오티드, 적어도 500개의 뉴클레오티드, 적어도 400개의 뉴클레오티드, 적어도 300개의 뉴클레오티드, 적어도 200개의 뉴클레오티드, 또는 적어도 100개의 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있다.

[0321] 예를 들어, 정제되는 circRNA는 약 20,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 19,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 18,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 17,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 16,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 15,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 14,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 15,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 14,0000개 미만의 뉴클레오티드, 약 13,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 12,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 11,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 10,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 9,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 8,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 7,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 6,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 5,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 4,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 3,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 2,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 1,000개 미만의 뉴클레오티드, 약 900개 미만의 뉴클레오티드, 약 800개 미만의 뉴클레오티드, 약 700개 미만의 뉴클레오티드, 약 600개 미만의 뉴클레오티드, 약 500개 미만의 뉴클레오티드, 약 400개 미만의 뉴클레오티드, 약 300개 미만의 뉴클레오티드, 약 200개 미만의 뉴클레오티드, 또는 약 100개 미만의 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있다.

[0322] 예를 들어, 정제되는 circRNA는 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 2,500개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 750개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 750개의 뉴클레오티드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티

드 내지 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 2,500개의 뉴클레오티드 내지 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드 내지 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드, 약 200개의 뉴클레오티드, 약 300개의 뉴클레오티드, 약 400개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드, 약 600개의 뉴클레오티드, 약 700개의 뉴클레오티드, 약 800개의 뉴클레오티드, 약 900개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 1,250개의 뉴클레오티드, 약 1,500개의 뉴클레오티드, 약 1,750개의 뉴클레오티드, 약 2,000개의 뉴클레오티드, 약 3,000개의 뉴클레오티드, 약 4,000개의 뉴클레오티드, 약 5,000개의 뉴클레오티드, 약 6,000개의 뉴클레오티드, 약 7,000개의 뉴클레오티드, 약 8,000개의 뉴클레오티드, 약 9,000개의 뉴클레오티드, 약 10,000개의 뉴클레오티드, 약 11,000개의 뉴클레오티드, 약 12,000개의 뉴클레오티드, 약 13,000개의 뉴클레오티드, 약 14,000개의 뉴클레오티드, 약 15,000개의 뉴클레오티드, 약 16,000개의 뉴클레오티드, 약 17,000개의 뉴클레오티드, 약 18,000개의 뉴클레오티드, 약 19,000개의 뉴클레오티드, 또는 약 20,000개의 뉴클레오티드)의 길이를 가질 수 있다.

[0323] 본원에 개시된 방법에 따른 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터의 circRNA의 정제는 단일- 또는 이중-가닥 circRNA, 2차 구조를 함유하는 circRNA 및 임의의 2차 구조를 결여하는 circRNA, 표지된 또는 비표지된 circRNA(예를 들어, 다른 것들 중에서도, 형광 표지된, 방사성표지된, 항체-표지된)를 포함하는 임의의 종류의 circRNA에 대해 수행될 수 있다.

[0324] 정제를 위해 선택되는 circRNA는 천연 발생 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드(예를 들어, 아데닌, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 또는 이노신)를 포함할 수 있거나, circRNA는 비-천연 발생(즉, 변형된) 핵염기, 뉴클레오시드간 연결, 또는 당을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 정제를 위해 선택되는 circRNA는 천연 발생 뉴클레오시드에 포함된다. circRNA가 변형되는 경우, 이는 변형된 리보뉴클레오시드(예를 들어, 변형된 핵염기 또는 변형된 리보스 모이어티를 함유함) 또는 변형된 뉴클레오시드간 연결(예를 들어, 다른 것들 중에서도, 포스포로티오에이트 및 포스포로아미데이트)을 함유할 수 있다. 일반적으로, 이러한 변형은 RNA 분자를 안정화시키고 뉴클레아제에 의한 가수분해를 감소시키기 위해 혼입된다. 본 발명에 의해 구체적으로 고려되는 circRNA에 대한 변형은 제WO 2020/198403호에 기재된 핵염기 변형을 포함한다.

[0325] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 circRNA의 실질적으로 모든 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드이다. 일부 실시 형태에서, 개시된 circRNA의 모든 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드이다. "실질적으로 모든 뉴클레오시드가 변형된 뉴클레오시드인" circRNA는 대체로 변형되지만 전적으로 변형되지는 않으며, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 천연 발생 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, circRNA는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 대안적인 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 변형된 circRNA는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000개 또는 그 초과)의 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 핵염기, 당 모이어티, 또는 뉴클레오시드간 연결에 대한 변형을 포함하는 상기 언급된 변형은 비변형된 RNA 서열에서 코딩된 정보(예를 들어, 각각의 코돈에 의해 코딩되는 아미노산)를 보유하고 단백질 번역을 방해하지 않는 정도로 본원에 기재된 circRNA 내로 혼입될 수 있다.

[0326] *폴리펩티드 발현 서열*

[0327] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 여기서 각각의 발현 서열은 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 발현 서열을 포함한다.

[0328] 각각의 코딩된 폴리펩티드는 선형 또는 분지형일 수 있다. 폴리펩티드는 약 5개 내지 약 40,000개의 아미노산, 약 15개 내지 약 35,000개의 아미노산, 약 20개 내지 약 30,000개의 아미노산, 약 25개 내지 약 25,000개의 아미노산, 약 50개 내지 약 20,000개의 아미노산, 약 100개 내지 약 15,000개의 아미노산, 약 200개 내지 약 10,000개의 아미노산, 약 500개 내지 약 5,000개의 아미노산, 약 1,000개 내지 약 2,500개의 아미노산, 또는 그들 사이의 임의의 범위의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 약 40,000개 미만의 아미노산, 약 35,000개 미만의 아미노산, 약 30,000개 미만의 아미노산, 약 25,000개 미만의 아미노산, 약 20,000개 미만의 아미노산, 약 15,000개 미만의 아미노산, 약 10,000개 미만의 아미노산, 약 9,000개 미만의 아미노산, 약 8,000개 미만의 아미노산, 약 7,000개 미만의 아미노산, 약 6,000개 미만의 아미노산, 약 5,000개 미만의 아

미노산, 약 4,000개 미만의 아미노산, 약 3,000개 미만의 아미노산, 약 2,500개 미만의 아미노산, 약 2,000개 미만의 아미노산, 약 1,500개 미만의 아미노산, 약 1,000개 미만의 아미노산, 약 900개 미만의 아미노산, 약 800개 미만의 아미노산, 약 700개 미만의 아미노산, 약 600개 미만의 아미노산, 약 500개 미만의 아미노산, 약 400개 미만의 아미노산, 약 300개 미만의 아미노산의 길이를 갖거나, 그 미만이 유용할 수 있다.

[0329] 본원에 포함된 폴리펩티드는 천연 발생 폴리펩티드 또는 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 폴리펩티드는 기준 폴리펩티드의 기능적 단편 또는 변이체(예를 들어, 효소의 효소적으로 활성인 단편 또는 변이체)이거나 이를 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 천연 발생 폴리펩티드의 서열과, 예를 들어, 특정된 영역에 걸쳐 또는 전체 서열에 걸쳐, 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 본원에 기재된 폴리펩티드 중 임의의 것의 기능적으로 활성인 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 폴리펩티드는 관심 단백질과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 그 초과) 동일성을 가질 수 있다.

[0330] 폴리펩티드의 일부 예는 형광 태그 또는 마커, 항원, 치료 폴리펩티드, 또는 농업적 적용을 위한 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0331] 치료 폴리펩티드는 호르몬, 신경전달물질, 성장 인자, 효소(예를 들어, 옥시도리덕타제, 대사 효소, 미토콘드리아 효소, 옥시게나제, 데히드로게나제, ATP-독립적 효소, 리소좀 효소, 데사추라제), 사이토카인, 항원 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항원 결합 항체 또는 항체-유사 단편, 예컨대 단일 쇄 항체, 나노바디 또는 다른 Ig 중쇄 또는 경쇄 함유 폴리펩티드), Fc 융합 단백질, 항응고물, 혈액 인자, 골 형태형성 단백질, 인터페론, 인터루킨, 또는 혈전용해제일 수 있다.

[0332] 농업적 적용을 위한 폴리펩티드는 박테리오신, 리신, 항미생물 폴리펩티드, 항진균 폴리펩티드, 소절 C-풍부 펩티드, 균세포 조절 펩티드, 펩티드 독소, 살충 폴리펩티드(예를 들어, 살곤충 폴리펩티드 또는 살선충 폴리펩티드), 항원 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항원 결합 항체 또는 항체-유사 단편, 예컨대 단일 쇄 항체, 나노바디 또는 다른 Ig 중쇄 또는 경쇄 함유 폴리펩티드), 효소(예를 들어, 뉴클레아제, 아밀라제, 셀룰라제, 펩티다제, 리파제, 키티나제), 펩티드 페로몬, 또는 전사 인자일 수 있다.

[0333] 일부 경우에, 폴리리보뉴클레오티드는 인간 단백질을 발현한다. 일부 경우에, 폴리리보뉴클레오티드는 비-인간 단백질을 발현한다.

[0334] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 항체, 예를 들어, 항체 단편, 또는 그의 부분을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드에 의해 발현되는 항체는 임의의 이소타입, 예컨대 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM의 것일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 부분, 예컨대 경쇄, 중쇄, Fc 단편, CDR(상보성 결정 영역), Fv 단편, 또는 Fab 단편, 그의 추가의 부분을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 하나 이상의 부분을 발현한다. 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 초과의 발현 서열을 포함할 수 있으며, 그의 각각은 항체의 부분을 발현하고, 그의 합은 항체를 구성할 수 있다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 중쇄를 코딩하는 하나의 발현 서열, 및 항체의 경쇄를 코딩하는 또 다른 발현 서열을 포함한다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드가 세포 또는 무세포 환경에서 발현되는 경우, 경쇄 및 중쇄는 적절한 변형, 폴딩, 또는 다른 번역후 변형에 적용되어 기능적 항체를 형성할 수 있다.

[0335] 실시 형태에서, 폴리펩티드는 다수의 폴리펩티드, 예를 들어, 하나의 폴리펩티드 서열의 다수의 카피, 또는 다수의 상이한 폴리펩티드 서열을 포함한다. 실시 형태에서, 다수의 폴리펩티드는 링커 아미노산 또는 스페이서 아미노산에 의해 연결된다.

[0336] 일부 실시 형태에서, 발현 서열은 폴리A 서열을 포함한다(예를 들어, 발현 서열의 3' 단부에). 일부 실시 형태에서, 폴리A 서열의 길이는 10개 초과의 뉴클레오티드의 길이이다. 한 실시 형태에서, 폴리A 서열은 15개 초과의 뉴클레오티드의 길이(예를 들어, 적어도 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 또는 3,000개의 뉴클레오티드 또는 그 초과)이다. 일부 실시 형태에서, 폴리A 서열은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제 WO2019/118919A1호의 [0202]~[0204]에서의 폴리A 서열의 설명에 따라 설계된다. 일부 실시 형태에서, 발현 서열은 폴리A 서열을 결여한다(예를 들어, 발현 서열의 3' 단부에).

[0337] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리A를 포함하거나, 폴리A를 결여하거나, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 하나 이상의 특징을 조정하도록 변형된 폴리A를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 폴리A를 결여하거나 변형된 폴리A를 갖는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 기능적 특징, 예를 들어, 면역원성(예를 들어, 면역 또는 염증 반응의 하나 이상의 마커의 수준), 반감기, 및/또는 발현 효율을 개선시킨다.

[0338] *내부 리보솜 진입 부위*

[0339] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, IRES는 하나 이상의 발현 서열에 작동가능하게 연결된다(예를 들어, 각각의 IRES는 하나 이상의 발현 서열에 작동가능하게 연결된다). 실시 형태에서, IRES는 이종 프로모터와 코딩 서열의 5' 단부 사이에 위치한다.

[0340] 폴리리보뉴클레오티드에 포함시키는 데 적합한 IRES 요소는 진핵 리보솜을 결착할 수 있는 RNA 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, IRES 요소는 적어도 약 5 nt, 적어도 약 8 nt, 적어도 약 9 nt, 적어도 약 10 nt, 적어도 약 15 nt, 적어도 약 20 nt, 적어도 약 25 nt, 적어도 약 30 nt, 적어도 약 40 nt, 적어도 약 50 nt, 적어도 약 100 nt, 적어도 약 200 nt, 적어도 약 250 nt, 적어도 약 350 nt, 또는 적어도 약 500 nt이다.

[0341] 일부 실시 형태에서, IRES 요소는 바이러스, 포유동물, 또는 드로소필라(Drosophila)를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 유기체의 DNA로부터 유래된다. 이러한 바이러스 DNA는 EMCV cDNA 및 폴리오바이러스 cDNA와의 피코르나바이러스 상보적 DNA(cDNA)로부터 유래될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 한 실시 형태에서, IRES 요소가 유래되는 드로소필라 DNA는 드로소필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster)로부터의 안테나페디아(Antennapedia) 유전자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0342] 일부 실시 형태에서, 존재하는 경우, IRES 서열은 타우라 증후군 바이러스, 트리아토마(Triatoma) 바이러스, 타일러 뇌척수염 바이러스, 원숭이 바이러스 40, 솔레놉시스 인빅타(Solenopsis invicta) 바이러스 1, 로팔로시품 파디(Rhopalosiphum padi) 바이러스, 망상내피증 바이러스, 인간 폴리오바이러스 1, 플라우티아 스톨(Plautia stall) 장 바이러스, 카슈미르 벌 바이러스, 인간 리노바이러스 2(HRV-2), 호말로디스카 코아굴라타(Homalodisca coagulata) 바이러스- 1, 인간 면역결핍 바이러스 유형 1, 호말로디스카 코아굴라타 바이러스- 1, 히메토비(Himetobi) P 바이러스, C형 간염 바이러스, A형 간염 바이러스, GB형 간염 바이러스, 구제역 바이러스, 인간 엔테로바이러스 71, 말 비염 바이러스, 엑트로피스 오블리쿠아(Ectropis obliqua) 피코르나-유사 바이러스, 뇌심근염 바이러스(EMCV), 드로소필라 C 바이러스, 크루시퍼 토바모(Crucifer tobamo) 바이러스, 귀뚜라미 마비 바이러스, 소 바이러스성 설사 바이러스 1, 블랙 퀸 세포(Black Queen Cell) 바이러스, 진딧물 치사성 마비 바이러스, 조류 뇌척수염 바이러스(AEV), 급성 벌 마비 바이러스, 히비스쿠스 황백화 윤문병 바이러스, 고전적 돼지열 바이러스, 인간 FGF2, 인간 SFTPA1, 인간 AML1/RUNX1, 드로소필라 안테나페디아, 인간 AQP4, 인간 AT1R, 인간 BAG-1, 인간 BCL2, 인간 BiP, 인간 c-IAP1 , 인간 c-myc, 인간 eIF4G, 마우스 NDST4L, 인간 LEF1, 마우스 HIF1 알파, 인간 n.myc, 마우스 Gtx, 인간 p27kip1, 인간 PDGF2/c-sis, 인간 p53, 인간 Pim-1, 마우스 Rbm3, 드로소필라 레아퍼(Drosophila reaper), 카나인 스캠퍼(Canine Scamper), 드로소필라 Ubx, 인간 UNR, 마우스 UtrA, 인간 VEGF-A, 인간 XIAP, 살리바이러스, 코사바이러스, 파레코바이러스, 드로소필라 헤어리스, 에스. 세레비지아에(S. cerevisiae) TFIID, 에스. 세레비지아에 YAP1, 인간 c-src, 인간 FGF-1, 원숭이 피코마바이러스, 순무 주름 바이러스, 아이치바이러스, 크로히바이러스, 에코바이러스 11, eIF4G에 대한 압타머, 콕사키바이러스 B3(CVB3) 또는 콕사키바이러스 A(CVB1/2)의 IRES 서열이다. 추가의 또 다른 실시 형태에서, IRES는 콕사키바이러스 B3(CVB3)의 IRES 서열이다. 추가의 실시 형태에서, IRES는 뇌심근염 바이러스(EMCV)의 IRES 서열이다. 추가의 실시 형태에서, IRES는 타일러 뇌척수염 바이러스의 IRES 서열이다.

[0343] 일부 실시 형태에서, IRES 서열은 야생형 IRES 서열과 비교하여 변형된 서열을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 야생형 IRES의 마지막 뉴클레오티드가 시토신 핵산 잔기가 아닌 경우, 야생형 IRES 서열의 마지막 뉴클레오티드는 시토신 잔기이도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, IRES 서열은 CVB3 IRES 서열이고, 여기서 말단 아데노신 잔기는 시토신 잔기로 변형된다. 일부 실시 형태에서, IRES 서열은 엔테로바이러스 71(EV17) IRES이고, 여기서 말단 구아노신 잔기는 시토신 잔기로 변형된다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 발현 서열에 플랭킹된 적어도 하나의 IRES를 포함한다. 일부 실시 형태에서, IRES는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 발현 서열의 양측에 플랭킹된다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측 상에 하나 이상의 IRES 서열을 포함하여, 생성된 펩티드(들) 및 또는 폴리펩티드(들)의 분리를 초래한다.

[0344] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 IRES(예를 들어, 코딩 영역에 작동가능하게 연결된

IRES)를 포함한다. 예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드는 문헌[Chen et al. *Mol. Cell* 81(20):4300-4318, 2021]; [Jopling et al. *Oncogene* 20:2664-2670, 2001]; [Baranick et al. *PNAS* 105(12):4733~4738, 2008]; [Lang et al. *Molecular Biology of the Cell* 13(5):1792-1801, 2002]; [Dorokhov et al. *PNAS* 99(8):5301-5306, 2002]; [Wang et al. *Nucelic Acids Research* 33(7):2248-2258, 2005]; [Petz et a. *Nucleic Acids Research* 35(8):2473-2482, 2007]; [Chen et al. *Science* 268:415-417, 1995]; [Fan et al. *Nature Communication* 13(1):3751-3765, 2022], 및 국제 공개 제WO2021/263124호에 기재된 바와 같은 임의의 IRES를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0345] *조절 요소*

[0346] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 조절 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 조절 요소, 예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드 내의 발현 서열의 발현을 변형시키는 서열을 포함한다.

[0347] 조절 요소는 발현 생성물을 코딩하는 발현 서열에 인접하여 위치한 서열을 포함할 수 있다. 조절 요소는 인접한 서열에 작동적으로 연결될 수 있다. 조절 요소는 조절 요소가 존재하지 않는 경우 발현된 생성물의 양과 비교하여 발현된 생성물의 양을 증가시킬 수 있다. 또한, 하나의 조절 요소는 탠덤으로 부착된 다수의 발현 서열에 대해 발현된 생성물의 양 또는 수를 증가시킬 수 있다. 따라서, 하나의 조절 요소는 하나 이상의 발현 서열의 발현을 증진시킬 수 있다. 다수의 조절 요소는 또한 예를 들어, 상이한 발현 서열의 발현을 차등적으로 조절하는데 사용될 수 있다.

[0348] 일부 실시 형태에서, 조절 요소는 번역 조정제이다. 번역 조정제는 폴리리보뉴클레오티드에서 발현 서열의 번역을 조정할 수 있다. 번역 조정제는 번역 증진제 또는 억제제일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 하나의 발현 서열에 인접한 적어도 하나의 번역 조정제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열에 인접한 번역 조정제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 번역 조정제는 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측에 존재하여, 발현 생성물, 예를 들어, 펩티드(들) 및 또는 폴리펩티드(들)의 분리를 초래한다.

[0349] 일부 실시 형태에서, 조절 요소는 마이크로RNA(miRNA) 또는 miRNA 결합 부위이다.

[0350] 조절 요소의 추가의 예는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919호의 단락 [0154]~[0161]에 기재되어 있다.

[0351] *번역 개시 서열*

[0352] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 하나의 번역 개시 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 번역 개시 서열을 포함한다.

[0353] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하고, 번역 개시 서열, 예를 들어, 시작 코돈을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 코작(Kozak) 또는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 인접한 번역 개시 서열, 예를 들어, 코작 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 비-코딩 시작 코돈이다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열, 예를 들어, 코작 서열은 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측에 존재하여, 발현 생성물의 분리를 초래한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 인접한 적어도 하나의 번역 개시 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 폴리리보뉴클레오티드에 대한 형태적 유연성을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 폴리리보뉴클레오티드의 실질적으로 단일 가닥 영역 내에 있다. 번역 개시 서열의 추가의 예는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제2019/118919호의 단락 [0163]~[0165]에 기재되어 있다.

[0354] 폴리리보뉴클레오티드는 1개 초과의 시작 코돈, 예컨대 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개 또는 60개 초과의 시작 코돈(그러나 이에 한정되는 것은 아님)을 포함할 수 있다. 번역은 제1 시작 코돈 상에서 개시될 수 있거나, 제1 시작 코돈의 하류에서 개시될 수 있다.

[0355] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 제1 시작 코돈이 아닌 코돈, 예를 들어, AUG에서 개시될 수 있다.

폴리리보뉴클레오티드의 번역은 대안적인 번역 개시 서열, 예컨대 ACG, AGG, AAG, CTG/CUG, GTG/GUG, ATA/AUA, ATT/AUU, TTG/UUG(그러나 이에 한정되는 것은 아님)에서 개시될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 번역은 선택적 조건, 예를 들어, 스트레스 유도 조건 하에서 대안적인 번역 개시 서열에서 시작한다. 비제한적인 예로서, 폴리리보뉴클레오티드의 번역은 대안적인 번역 개시 서열, 예컨대 ACG에서 시작할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 폴리리보뉴클레오티드 번역은 대안적인 번역 개시 서열, CTG/CUG에서 시작할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 폴리리보뉴클레오티드 번역은 대안적인 번역 개시 서열, GTG/GUG에서 시작할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 폴리리보뉴클레오티드는 반복부-관련 비-AUG(RAN) 서열, 예컨대 반복적 RNA의 짧은 스트레치를 포함하는 대안적인 번역 개시 서열, 예를 들어, CGG, GGGGCC, CAG, CTG에서 번역을 시작할 수 있다.

[0356] *종결 요소*

[0357] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 최소 하나의 종결 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 종결 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 종결 요소를 결여한다.

[0358] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 각각의 발현 서열은 종결 요소를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 발현 서열은, 폴리리보뉴클레오티드가 연속적으로 번역되도록, 종결 요소를 결여한다. 종결 요소의 배제는 발현 생성물의 롤링 서클 번역 또는 연속적 발현을 발생시킬 수 있다.

[0359] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 각각의 발현 서열은 종결 요소를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 발현 서열은, 원형 폴리리보뉴클레오티드가 연속적으로 번역되도록, 종결 요소를 결여한다. 종결 요소의 배제는 리보솜 멈춤 또는 탈락의 결여로 인해, 발현 생성물, 예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드의 롤링 서클 번역 또는 연속적 발현을 발생시킬 수 있다. 이러한 실시 형태에서, 롤링 서클 번역은 각각의 발현 서열을 통해 연속적 발현 생성물을 발현한다. 일부 다른 실시 형태에서, 발현 서열의 종결 요소는 스태거 요소의 일부일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 하나 이상의 발현 서열은 종결 요소를 포함한다. 그러나, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 뒤이은(예를 들어, 제2, 제3, 제4, 제5 등의) 발현 서열의 롤링 서클 번역 또는 발현이 수행된다. 이러한 경우에, 발현 생성물은 리보솜이 종결 요소, 예를 들어, 정지 코돈에 직면할 때 리보솜을 탈락시킬 수 있고, 번역을 종결시킨다. 일부 실시 형태에서, 번역은 리보솜, 예를 들어, 리보솜의 적어도 하나의 서브유닛이 원형 폴리리보뉴클레오티드와 접촉하여 남아 있는 동안 종결된다.

[0360] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열의 단부에 종결 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 발현 서열은 잇달아 2개 이상의 종결 요소를 포함한다. 이러한 실시 형태에서, 번역은 종결되고, 롤링 서클 번역은 종결된다. 일부 실시 형태에서, 리보솜은 원형 폴리리보뉴클레오티드와 완전히 탈착된다. 일부 이러한 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 뒤이은(예를 들어, 제2, 제3, 제4, 제5 등의) 발현 서열의 생성은 번역의 개시 전에 리보솜이 원형 폴리리보뉴클레오티드와 재결착하는 것을 요구할 수 있다. 일반적으로, 종결 요소는 번역의 종결을 신호화하는 프레임내 뉴클레오티드 삼중자, 예를 들어, UAA, UGA, UAG를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 하나 이상의 종결 요소는 프레임-이동된 종결 요소, 예컨대 번역을 종결시킬 수 있는 오프-프레임 또는 -1 및 + 1 이동된 리딩 프레임(예를 들어, 히든 스톱)(그러나 이에 한정되는 것은 아님)이다. 프레임-이동된 종결 요소는 발현 서열의 제2 및 제3 리딩 프레임에서 보이는 뉴클레오티드 삼중자, TAA, TAG, 및 TGA를 포함한다. 프레임-이동된 종결 요소는 종종 세포에 유해한 mRNA의 오해독을 방지하는 데 있어서 중요할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 종결 요소는 정지 코돈이다.

[0361] 종결 요소의 추가의 예는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제2019/118919호의 단락 [0169]~[0170]에 기재되어 있다.

[0362] *비번역된 영역*

[0363] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 비번역된 영역(UTR)을 포함한다. 유전자를 포함하는 게놈 영역의 UTR은 전사되지만 번역되지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, UTR은 본원에 기재된 발현 서열의 번역 개시 서열의 상류에 포함될 수 있다. 일부 실시 형태에서, UTR은 본원에 기재된 발현 서열의 하류에 포함될 수 있다. 일부 경우에, 제1 발현 서열에 대한 하나의 UTR은 제2 발현 서열에 대한 또 다른 UTR과 동일하거나, 그와

연속적이거나 그와 중첩한다.

[0364] 예시적인 비번역된 영역은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919호의 단락 [0197]~[201]에 기재되어 있다.

[0365] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리A 서열을 포함한다. 예시적인 폴리A 서열은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919호의 단락 [0202]~[0205]에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리A 서열을 결여한다.

[0366] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 그 내에 내포된 아데노신 및 우리딘의 하나 이상의 스트레치를 갖는 UTR을 포함한다. 이들 AU 풍부 특징은 발현 생성물의 턴오버 속도를 증가시킬 수 있다.

[0367] UTR AU 풍부 요소(ARE)의 도입, 제거, 또는 변형은 원형 폴리리보뉴클레오티드의 안정성, 또는 면역원성(예를 들어, 면역 또는 염증 반응의 하나 이상의 마커의 수준)을 조정하는 데 유용할 수 있다. 특정 원형 폴리리보뉴클레오티드를 조작하는 경우, ARE의 하나 이상의 카피는 원형 폴리리보뉴클레오티드에 도입될 수 있고, ARE의 카피는 발현 생성물의 번역 및/또는 생성을 조정할 수 있다. 마찬가지로, ARE는 확인되고 제거되거나 원형 폴리리보뉴클레오티드 내로 조작되어 세포내 안정성을 조정하고, 따라서 생성된 단백질의 번역 및 생성에 영향을 미칠 수 있다.

[0368] 임의의 유전자로부터의 임의의 UTR은 원형 폴리리보뉴클레오티드의 각각의 플랭킹 영역 내로 혼입될 수 있음을 이해해야 한다.

[0369] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5'-UTR을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현에 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 3'-UTR을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현에 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리A 서열을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 종결 요소를 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 내부 리보솜 진입 부위를 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 캡을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5'-UTR, 3'-UTR, 및 IRES를 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하기 서열 중 하나 이상을 포함한다: 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 서열, 하나 이상의 복제 단백질을 코딩하는 서열, 외인성 유전자를 코딩하는 서열, 치료제를 코딩하는 서열, 조절 요소(예를 들어, 번역 조정제, 예를 들어, 번역 증진제 또는 억제제), 번역 개시 서열, 내인성 유전자를 표적화하는 하나 이상의 조절 핵산(예를 들어, siRNA, lncRNA, shRNA), 및 치료 mRNA 또는 단백질을 코딩하는 서열.

[0370] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5'-UTR을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 3'-UTR을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리A 서열을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 종결 요소를 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 내부 리보솜 진입 부위를 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제에 의한 분해 감수성을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드가 분해 감수성을 결여한다는 사실은 원형 폴리리보뉴클레오티드가 엑소뉴클레아제에 의해 분해되지 않거나, 엑소뉴클레아제의 존재하에서 단지 제한된 정도로, 예를 들어, 엑소뉴클레아제의 부재 하에서와 대등하거나 유사한 정도로 분해됨을 의미할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제에 의해 분해되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제에 노출되는 경우 감소된 분해를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 캡-결합 단백질에의 결합을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5' 캡을 결여한다.

[0371] *스태거 요소*

[0372] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 인접한 적어도 하나의 스태거 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열에 인접한 스태거 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측에 존재하여, 발현 생성물, 예를 들어, 펩티드(들) 및 또는 폴리펩티드(들)의 분리를 초래한다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 하나 이상의 발현 서열의 부분이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 하나 이상

의 발현 서열 각각은 원형 폴리리보뉴클레오티드 상의 스태거 요소에 의해 뒤이은 발현 서열로부터 분리된다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 (a) 단일 발현 서열의 번역의 2개의 라운드로부터의 또는 (b) 2개 이상의 발현 서열의 번역의 하나 이상의 라운드로부터의 단일 폴리펩티드의 생성을 방지한다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 하나 이상의 발현 서열로부터 별개의 서열이다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 하나 이상의 발현 서열의 발현 서열의 부분을 포함한다.

[0373] *비-코딩 서열*

[0374] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 비-코딩 서열, 예를 들어, 폴리펩티드의 발현을 코딩하지 않는 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 비-코딩 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 폴리펩티드 발현 서열을 코딩하지 않는다.

[0375] 비코딩 서열은 천연 또는 합성 서열일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 비코딩 서열은 세포 거동, 예컨대, 예를 들어, 림프구 거동을 변경시킬 수 있다. 일부 실시 형태에서, 비코딩 서열은 세포 RNA 서열에 대해 안티센스이다.

[0376] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 전형적으로 약 5~500 염기 쌍(bp)(특이적 RNA 구조에 따라, 예를 들어, miRNA 5~30 bps, IncRNA 200~500 bps)의 RNA 또는 RNA-유사 구조인 조절 핵산을 포함하고, 세포 내의 발현된 표적 유전자 내의 코딩 서열과 동일한(상보적) 또는 거의 동일한(실질적으로 상보적) 핵염기 서열을 가질 수 있다. 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 더 작은 miRNA 중간체 또는 성숙 miRNA로 프로세싱될 수 있는, 약 50 내지 약 1000 bp일 수 있는, 더 작은 RNA, 예를 들어, miRNA 전구체로 프로세싱될 수 있는 RNA 전구체를 코딩하는 조절 핵산을 포함한다.

[0377] 긴 비-코딩 RNA(IncRNA)는 100개 초과의 뉴클레오티드의 비-단백질 코딩 전사체로서 정의된다. 많은 IncRNA는 조직 특이적인 것으로서 특성화된다. 인근의 단백질-코딩 유전자에 대해 반대 방향에서 전사되는 분기성 IncRNA는 (포유동물 게놈 내의 총 IncRNA의 상당한 비율(예를 들어, 약 20%)을 포함하고), 가능하게는 인근의 유전자의 전사를 조절한다. 한 실시 형태에서, 본원에서 제공된 폴리리보뉴클레오티드는 IncRNA의 센스 가닥을 포함한다. 한 실시 형태에서, 본원에서 제공된 폴리리보뉴클레오티드는 IncRNA의 안티센스 가닥을 포함한다.

[0378] *단백질-결합 서열*

[0379] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 단백질, 예를 들어, 리보솜이 RNA 서열 내의 내부 부위에 결합하는 것을 가능하게 하는 하나 이상의 단백질 결합 부위를 포함한다. 단백질 결합 부위, 예를 들어, 리보솜 결합 부위를 원형 폴리리보뉴클레오티드 내로 조작함으로써, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 숙주의 면역계에 의한 검출을 회피하거나 감소된 검출을 가질 수 있고, 원형 폴리리보뉴클레오티드를 숙주의 면역계의 성분으로부터 마스킹함으로써, 조정된 분해, 또는 조정된 번역을 가질 수 있다.

[0380] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어 면역 반응, 예를 들어, 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 회피하기 위해, 적어도 하나의 면역단백질 결합 부위를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 면역단백질 결합 부위는 면역단백질에 결합하고 원형 폴리리보뉴클레오티드를 외인성으로서 마스킹하는 것을 보조하는 뉴클레오티드 서열이다. 일부 실시 형태에서, 면역단백질 결합 부위는 면역단백질에 결합하고 원형 폴리리보뉴클레오티드를 외인성 또는 외래로서 은폐시키는 것을 보조하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0381] 선형 RNA에 대한 리보솜 결착의 전통적인 메카니즘은 RNA의 캡핑된 5' 단부에 대한 리보솜 결합을 수반한다. 5' 단부로부터, 리보솜은 개시 코돈으로 이동하고, 그 때 제1 펩티드 결합이 형성된다. 본 발명에 따르면, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 번역의 내부 개시(즉, 캡-독립적)는 유리 단부 또는 캡핑된 단부를 요구하지 않는다. 오히려, 리보솜은 비-캡핑된 내부 부위에 결합하고, 그에 의해 리보솜은 개시 코돈에서 폴리펩티드 신장을 시작한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 리보솜 결합 부위, 예를 들어, 개시 코돈을 포함하는 하나 이상의 RNA 서열을 포함한다.

[0382] 천연 5' UTR은 번역 개시에서 역할을 하는 특색을 보유한다. 이들은 리보솜이 많은 유전자의 번역을 개시시키는 과정에 관여하는 것으로 통상적으로 알려져 있는 코작 서열과 같은 특징을 갖는다. 코작 서열은 컨센서스 CCR(A/G)CCAUGG를 갖고, 여기서 R은 시작 코돈(AUG)의 3개의 염기 상류에 있는 퓨린(아데닌 또는 구아닌)이고, 여기에 또 다른 'G'가 이어진다. 5' UTR은 또한 신장 인자 결합에 관여하는 2차 구조를 형성하는 것으로 알려졌다.

[0383] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 단백질에 결합하는 단백질 결합 서열을 코딩한다. 일부 실시 형태에서, 단백질 결합 서열은 원형 폴리리보뉴클레오티드를 특이적 표적에 표적화하거나 국재화한다. 일부 실시 형태에서, 단백질 결합 서열은 단백질의 아르기닌-풍부 영역에 특이적으로 결합한다.

[0384] 일부 실시 형태에서, 단백질 결합 부위는 단백질, 예컨대 ACIN1, AGO, APOBEC3F, APOBEC3G, ATXN2, AUH, BCCIP, CAPRIN1, CELF2, CPSF1, CPSF2, CPSF6, CPSF7, CSTF2, CSTF2T, CTCF, DDX21, DDX3, DDX3X, DDX42, DGCR8, EIF3A, EIF4A3, EIF4G2, ELAVL1, ELAVL3, FAM120A, FBL, FIP1L1, FKBP4, FMR1, FUS, FXR1, FXR2, GNL3, GTF2F1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, HNRNPUL1, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, ILF3, KHDRBS1, LARP7, LIN28A, LIN28B, m6A, MBNL2, METTL3, MOV10, MSI1, MSI2, NONO, NONO, NOP58, NPM1, NUDT21, PCBP2, POLR2A, PRPF8, PTBP1, RBFOX2, RBM10, RBM22, RBM27, RBM47, RNPS1, SAFB2, SBDS, SF3A3, SF3B4, SIRT7, SLBP, SLTM, SMNDC1, SND1, SRRM4, SRSF1, SRSF3, SRSF7, SRSF9, TAF15, TARDBP, TIA1, TNRC6A, TOP3B, TRA2A, TRA2B, U2AF1, U2AF2, UNK, UPF1, WDR33, XRN2, YBX1, YTHDC1, YTHDF1, YTHDF2, YWHAG, ZC3H7B, PDK1, AKT1, 또는 RNA에 결합하는 임의의 다른 단백질에 대한 결합 부위를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0385] **사용 방법**

[0386] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드)는 요법 또는 농업에서 이펙터로서 사용된다.

[0387] 예를 들어, 본원에 기재된 방법에 의해 정제된 폴리리보뉴클레오티드는 대상체에게 투여될 수 있다(예를 들어, 제약, 수의학, 또는 농업 조성물로). 일부 실시 형태에서, 대상체는 척추 동물(예를 들어, 포유동물, 조류, 어류, 파충류, 또는 양서류)이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 비-인간 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 유인원), 유제류(예를 들어, 소, 버팔로, 양, 염소, 돼지, 낙타, 라마, 알파카, 사슴, 말, 당나귀), 육식동물(예를 들어, 개, 고양이), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스), 또는 토끼목(예를 들어, 토끼)이다. 실시 형태에서, 대상체는 조류, 예컨대 조류 분류군 순계목(예를 들어, 닭, 칠면조, 꿩, 메추라기), 기러기목(예를 들어, 오리, 거위), 고관목(예를 들어, 타조, 에뮤), 비둘기목(예를 들어, 피존, 도브), 또는 앵무새목(예를 들어, 앵무새)의 구성원이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물, 예컨대 절지동물(예를 들어, 곤충류, 거미류, 갑각류), 선충, 환형동물, 연충, 또는 연체동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물 농업적 해충 또는 무척추동물 또는 척추동물 숙주 상에 기생하는 무척추동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 식물, 예컨대 피자 식물(쌍자엽 또는 단자엽일 수 있음) 또는 나자 식물(예를 들어, 침엽수, 소철류, 마황문, 은행나무), 양치식물, 쇠뜨기, 석송, 또는 선태식물이다. 실시 형태에서, 대상체는 진핵 조류(단세포 또는 다세포)이다. 실시 형태에서, 대상체는 농업적으로 또는 원예적으로 중요한 식물, 예컨대 줄뿌림 작물 식물, 과실-생산 식물 및 나무, 채소, 나무, 및 관상용 꽃, 관목, 나무, 지표식물, 및 잔디풀을 포함하는 관상용 식물이다.

[0388] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 조성물 또는 제형을 대상체에게 제공함으로써 대상체를 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 핵산 분자(예를 들어, 본원에 기재된 DNA 분자 또는 RNA 분자)이거나 이를 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 진핵 대상체에게 제공된다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 진핵 또는 원핵 세포이거나 이를 포함한다.

[0389] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 조성물 또는 제형을 대상체에게 제공함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 핵산 분자(예를 들어, 본원에 기재된 DNA 분자 또는 폴리리보뉴클레오티드)이거나 이를 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 진핵 대상체에게 제공된다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 진핵 또는 원핵 세포이거나 이를 포함한다.

[0390] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 진핵 또는 원핵 세포를 대상체에게 제공함으로써 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드)를 대상체에게 제공하는 방법을 제공한다.

[0391] **제형**

[0392] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드) 또는 그의 조제물은 조성물, 예를 들어, 세포, 식물, 무척추 동물, 비-인간 척추 동물, 또는 인간 대상체에의 전달을 위한 조성물, 예를 들어, 농업, 수의학, 또는 제약 조성물로 제형화될 수 있다. 일부

실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 제약 조성물로 제형화된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 폴리리보뉴클레오티드 및 희석제, 담체, 보조제, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 조성물은 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드 및 담체 또는 임의의 담체가 없는 희석제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 임의의 담체가 없는 희석제를 갖는 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 조성물은 대상체에의 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드)의 네이키드 전달을 위해 사용된다.

[0393] 제약 조성물은 임의적으로 하나 이상의 추가적인 활성 물질, 예를 들어, 치료적으로 및/또는 예방적으로 활성 물질을 포함할 수 있다. 제약 조성물은 임의적으로 본원에 기재된 조성물(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 조성물, 예컨대 미국 식품 의약국(FDA)에 의해 승인되고 불활성 성분 데이터베이스에 열거된 불활성 성분 중 어느 하나)에 대한 비히클 또는 매질로서 역할을 하는 불활성 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 멸균성 및/또는 피로겐-무함유일 수 있다. 제형 및/또는 제약 작용제의 제조에 있어서 일반적 고려사항은 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005](본원에 참조로 포함됨)에서 발견될 수 있다. 불활성 물질의 비제한적인 예는 용매, 수성 용매, 비-수성 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 조제, 표면 활성제, 등장성제, 증점제, 유화제, 보존제, 중합체, 펩티드, 단백질, 세포, 히알루로니다제, 분산제, 과립화제, 붕해제, 결합제, 완충제(예를 들어, 포스페이트 완충 염수(PBS)), 윤활제, 오일, 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0394] 본원에서 제공된 제약 조성물의 설명은 원칙적으로 인간에의 투여에 적합한 제약 조성물에 관한 것이지만, 이러한 조성물은 일반적으로 임의의 다른 동물에의, 예를 들어, 비-인간 동물, 예를 들어, 비-인간 포유동물에의 투여에 적합함을 당업자는 이해할 것이다. 인간에의 투여에 적합한 제약 조성물을 변형하여 조성물을 다양한 동물에의 투여에 적합하게 만드는 것은 잘 이해되어 있으며, 통상의 기술을 갖는 수의학 약리학자는 존재하는 경우, 단지 통상적인 실험으로 이러한 변형을 설계하고/거나 수행할 수 있다. 제약 조성물의 투여가 고려되는 대상체는 인간 및/또는 다른 영장류; 상업적으로 관련된 포유동물, 예컨대 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 개, 마우스, 및/또는 래트를 포함하는 포유동물; 및/또는 상업적으로 관련된 조류, 예컨대 가금류, 닭, 오리, 거위, 및/또는 칠면조를 포함하는 조류를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0395] 본원에 기재된 제약 조성물의 제형은 약리학의 분야에서 알려진 또는 이후에 개발될 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 회합시키고, 이어서, 필요할 경우 및/또는 바람직할 경우, 생성물을 분할하고/거나, 형상화하고/거나, 패키징하는 단계를 포함한다.

[0396] 일부 실시 형태에서, 조제물에 존재하는 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자의 양에 대한 참조 기준은 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL, 60 ng/mL, 70 ng/mL, 80 ng/mL, 90 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 400 ng/mL, 500 ng/mL, 600 ng/mL, 1 μg/mL, 10 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, 200 g/mL, 300 μg/mL, 400 μg/mL, 500 μg/mL, 600 μg/mL, 700 μg/mL, 800 μg/mL, 900 μg/mL, 1 mg/mL, 1.5 mg/mL, 또는 2 mg/mL 이하의 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자의 존재이다.

[0397] 일부 실시 형태에서, 조제물에 존재하는 원형 폴리리보뉴클레오티드 분자의 양에 대한 참조 기준은 제약 조제물 내의 총 리보뉴클레오티드 분자의 적어도 30%(w/w), 40%(w/w), 50%(w/w), 60%(w/w), 70%(w/w), 80%(w/w), 85%(w/w), 90%(w/w), 91%(w/w), 92%(w/w), 93%(w/w), 94%(w/w), 95%(w/w), 96%(w/w), 97%(w/w), 98%(w/w), 99%(w/w), 99.1%(w/w), 99.2%(w/w), 99.3%(w/w), 99.4%(w/w), 99.5%(w/w), 99.6%(w/w), 99.7%(w/w), 99.8%(w/w), 99.9%(w/w), 또는 100%(w/w) 분자이다.

[0398] 일부 실시 형태에서, 조제물에 존재하는 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자의 양에 대한 참조 기준은 제약 조제물 내의 총 리보뉴클레오티드 분자의 0.5%(w/w), 1%(w/w), 2%(w/w), 5%(w/w), 10%(w/w), 15%(w/w), 20%(w/w), 25%(w/w), 30%(w/w), 40%(w/w), 50%(w/w) 이하의 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자이다.

[0399] 일부 실시 형태에서, 조제물 내에 존재하는 니킹된 폴리리보뉴클레오티드 분자의 양에 대한 참조 기준은 제약 조제물 내의 총 리보뉴클레오티드 분자의 0.5%(w/w), 1%(w/w), 2%(w/w), 5%(w/w), 10%(w/w), 또는 15%(w/w) 이하의 니킹된 폴리리보뉴클레오티드 분자이다.

[0400] 일부 실시 형태에서, 조제물 내에 존재하는 조합된 니킹된 및 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자의 양에 대한 참조 기준은 제약 조제물 내의 총 리보뉴클레오티드 분자의 0.5%(w/w), 1%(w/w), 2%(w/w), 5%(w/w), 10%(w/w), 15%(w/w), 20%(w/w), 25%(w/w), 30%(w/w), 40%(w/w), 50%(w/w) 이하의 조합된 니킹된 및 선형 폴리리보뉴클레

오티드 분자이다. 일부 실시 형태에서, 제약 조제물은 최종 원형 폴리리보뉴클레오티드 약물 생성물의 중간체 제약 조제물이다. 일부 실시 형태에서, 제약 조제물은 약물 물질 또는 활성 제약 성분(API)이다. 일부 실시 형태에서, 제약 조제물은 대상체에의 투여를 위한 약물 생성물이다.

[0401] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 조제물은 DNA, 단백질 오염(예를 들어, 세포 단백질, 예컨대 숙주 세포 단백질 또는 단백질 공정 불순물), 내독소, 모노뉴클레오티드 분자, 및/또는 공정-관련 불순물을 실질적으로 제거하기 위해 (선형 RNA의 환원 전에, 동안 또는 후에) 추가로 프로세싱된다.

[0402] *염*

[0403] 일부 경우에, 본원에서 제공된 조성물 또는 제약 조성물은 하나 이상의 염을 포함한다. 긴장성을 제어하기 위해, 생리학적 염, 예컨대 나트륨 염은 본원에서 제공된 조성물에 포함될 수 있다. 다른 염은 염화칼륨, 인산이수소칼륨, 인산이나트륨, 및/또는 염화마그네슘 등을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조성물은 하나 이상의 제약상 허용되는 염으로 제형화된다. 하나 이상의 제약상 허용되는 염은 무기 이온, 예컨대, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 이온 등의 것들을 포함할 수 있다. 이러한 염은 무기 또는 유기 산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 인산, 질산, 황산, 메탄 술폰산, p-톨루엔 술폰산, 아세트산, 푸마르산, 숙신산, 락트산, 만델산, 말산, 시트르산, 타르타르산, 또는 말레산과의 염을 포함할 수 있다. 폴리리보뉴클레오티드는 선형 또는 원형 형태 중 어느 하나로 존재할 수 있다.

[0404] *완충제/pH*

[0405] 본원에서 제공된 조성물 또는 제약 조성물은 하나 이상의 완충제, 예컨대 트리스 완충제; 보레이트 완충제; 숙시네이트 완충제; 히스티딘 완충제(예를 들어, 수산화알루미늄 보조제를 가짐); 또는 시트레이트 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는, 일부 경우에, 5~20 mM 범위로 포함된다.

[0406] 본원에서 제공된 조성물 또는 제약 조성물은 약 5.0 내지 약 8.5, 약 6.0 내지 약 8.0, 약 6.5 내지 약 7.5, 또는 약 7.0 내지 약 7.8의 pH를 가질 수 있다. 조성물 또는 제약 조성물은 약 7의 pH를 가질 수 있다. 폴리리보뉴클레오티드는 선형 또는 원형 형태 중 어느 하나로 존재할 수 있다.

[0407] *희석제*

[0408] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 폴리리보뉴클레오티드, 또는 그의 조제물 및 희석제를 포함한다.

[0409] 희석제는 비-담체 부형제일 수 있다. 비-담체 부형제는 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 예컨대 원형 폴리리보뉴클레오티드에 대한 비히클 또는 매질로서 역할을 한다. 비-담체 부형제는 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 예컨대 선형 폴리리보뉴클레오티드에 대한 비히클 또는 매질로서 역할을 한다. 비-담체 부형제의 비제한적인 예는 용매, 수성 용매, 비-수성 용매, 분산 매질, 희석제, 분산액, 현탁 조제, 표면 활성제, 등장성제, 증점제, 유화제, 보존제, 중합체, 펩티드, 단백질, 세포, 히알루로니다제, 분산제, 과립화제, 붕해제, 결합제, 완충제(예를 들어, 포스페이트 완충 염수(PBS)), 윤활제, 오일, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 비-담체 부형제는 세포-침투 효과를 나타내지 않는 미국 식품의약국(FDA)에 의해 승인되고 불활성 성분 데이터베이스에 열거된 불활성 성분 중 어느 하나일 수 있다. 비-담체 부형제는 비-인간 동물에의 투여에 적합한, 예를 들어, 수의학 용도에 적합한 임의의 불활성 성분일 수 있다. 인간에의 투여에 적합한 조성물을 변형하여 조성물을 다양한 동물에의 투여에 적합하게 만드는 것은 잘 이해되어 있으며, 통상의 기술을 갖는 수의학 약리학자는 존재하는 경우, 단지 통상적인 실험으로 이러한 변형을 설계하고/거나 수행할 수 있다.

[0410] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드)는 예컨대 희석제를 포함하는 네이키드 전달 제형으로서 전달될 수 있다. 네이키드 전달 제형은 담체의 보조 없이 및 폴리리보뉴클레오티드, 캡핑된 폴리리보뉴클레오티드, 또는 이들의 복합체의 변형 또는 부분적 또는 완전한 캡슐화 없이 폴리리보뉴클레오티드를 세포에 전달한다.

[0411] 네이키드 전달 제형은 담체가 없는 제형이고, 여기서 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드)는 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공유 변형이 없거나, 폴리리보뉴클레오티드의 부분적 또는 완전한 캡슐화가 없다. 일부 실시 형태에서, 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공유 변형이 없는 폴리리보뉴클레오티드는 단백질, 소분자, 입자, 중합체, 또는 생체중합체에 공유적으로 결합되지 않는 폴리리보뉴클레오티드이다. 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공유 변형이 없는 폴리리보뉴클레오티드는 변형된 포스페이트 기를 함유하지 않는다. 예를 들어, 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공

유 변형이 없는 폴리리보뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 포스포로셀레네이트, 보라노포스페이트, 오르가노포스페이트 에스테르, 히드로겐 포스포네이트, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르를 함유하지 않는다.

[0412] 일부 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 형질감염 시약, 양이온성 담체, 탄수화물 담체, 나노입자 담체, 또는 단백질 담체 중 임의의 것 또는 전부가 없다. 일부 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 피토글리코겐 옥테닐 숙시네이트, 피토글리코겐 베타-덱스트린, 무수물-변형된 피토글리코겐 베타-덱스트린, 리포펙타민, 폴리에틸렌이민, 폴리(트리메틸렌이민), 폴리(테트라메틸렌이민), 폴리프로필렌이민, 아미노글리코시드-폴리아민, 디데옥시-디아미노-b-시클로덱스트린, 스페르민, 스페르미딘, 폴리(2-디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(리신), 폴리(히스티딘), 폴리(아르기닌), 양이온화 젤라틴, 덴드리머, 키토산, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드(DOTIM), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트(DOSPA), 3B-[N-( N\N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일]콜레스테롤 히드로클로라이드(DC-콜레스테롤 HC1), 디헵타데실아미도글리실 스페르미딘(DOGS), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로마이드(DMRIE), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC), 인간 혈청 알부민(HSA), 저-밀도 지단백질(LDL), 고-밀도 지단백질(HDL), 또는 글로불린이 없다.

[0413] 특정 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 비-담체 부형제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 비-담체 부형제는 세포-침투 효과를 나타내지 않는 불활성 성분을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 비-담체 부형제는 완충제, 예를 들어 PBS를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 비-담체 부형제는 용매, 비-수성 용매, 희석제, 현탁 조제, 표면 활성제, 등장성제, 증점제, 유화제, 보존제, 중합체, 펩티드, 단백질, 세포, 히알루로니다제, 분산제, 과립화제, 붕해제, 결합제, 완충제, 윤활제, 또는 오일이다.

[0414] 일부 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 희석제를 포함한다. 희석제는 액체 희석제 또는 고체 희석제일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 희석제는 RNA 가용화제, 완충제, 또는 등장성제이다. RNA 가용화제의 예는 물, 에탄올, 메탄올, 아세톤, 포름아미드, 및 2-프로판올을 포함한다. 완충제의 예는 2-(N-모르폴리노)에탄 술폰산(MES), 비스-트리스, 2-[(2-아미노-2-옥소에틸)-(카르복시메틸)아미노]아세트산(ADA), N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산(ACES), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산)(PIPES), 2-[[1,3-디히드록시-2-(히드록시메틸)프로판-2-일]아미노]에탄술폰산(TES), 3-(N-모르폴리노)프로판 술폰산(MOPS), 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산(HEPES), 트리스, 트리신, Gly-Gly, 비신, 또는 포스페이트를 포함한다. 등장성제의 예는 글리세린, 만니톨, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 트레할로스, 또는 수크로스를 포함한다.

[0415] *지질 나노입자*

[0416] 본 발명에 의해 제공된 조성물, 방법, 및 전달 시스템은 특정 실시 형태에서, 지질 나노입자(LNP)를 포함하는 본원에 기재된 임의의 적합한 담체 또는 전달 양상을 이용할 수 있다. 지질 나노입자는 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 이온성 지질, 예컨대 비-양이온성 지질(예를 들어, 중성 또는 음이온성 또는 양쪽이온성 지질); 하나 이상의 컨쥬게이트된 지질(예컨대 PEG-컨쥬게이트된 지질 또는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2019217941호의 표 5에 기재된 중합체에 컨쥬게이트된 지질); 하나 이상의 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤)을 포함한다.

[0417] 나노입자 제형(예를 들어, 지질 나노입자)에서 사용될 수 있는 지질은 예를 들어, 참조로 포함되는 제WO2019217941호의 표 4에 기재된 것들을 포함하며-예를 들어, 지질-함유 나노입자는 제WO2019217941호의 표 4의 지질 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 지질 나노입자는 추가적인 요소, 예컨대 중합체, 예컨대 참조로 포함되는 제WO2019217941호의 표 5에 기재된 중합체를 포함할 수 있다.

[0418] 일부 실시 형태에서, 컨쥬게이트된 지질은 존재하는 경우, PEG-디아실글리세롤(DAG)(예컨대 1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG)), PEG-디알킬옥시프로필(DAA), PEG-인지질, PEG-세라미드(Cer), PEG화 포스파티딜에탄올로아민(PEG-PE), PEG 숙시네이트 디아실글리세롤(PEGS-DAG)(예컨대 4-0-(2',3'-디(테트라데카노일옥시)프로필-1-0-(w-메톡시(폴리에톡시)에틸) 부탄디오에이트(PEG-S-DMG)), PEG 디알콕시프로필카르밤, N-(카르보닐-메톡시폴리 에틸렌 글리콜 2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 나트륨 염, 및 제WO2019051289호(참조로 포함됨)의 표 2에 기재된 것들, 또는 상기의 조합 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 추가적인 예시적인 PEG-지질 컨쥬게이트는 예를 들어 제US5,885,613호, 제US6,287,591호, 제US2003/0077829호, 제US2003/0077829호, 제US2005/0175682호, 제US2008/0020058호, 제US2011/0117125호, 제

US2010/0130588호, 제US2016/0376224호, 제US2017/0119904호, 제US2018/0028664호, 및 제WO2017/099823호에 기재되어 있으며, 이들 모두의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0419] 일부 실시 형태에서, 지질 나노입자 내로 혼입될 수 있는 스테롤은 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체 중 하나 이상, 예컨대 참조로 포함되는 제WO2009/127060호 또는 제US2010/0130588호의 것들을 포함한다. 추가적인 예시적인 스테롤은 본원에 참조로 포함되는 문헌[Eygeris et al. (2020), dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386]에 기재된 것들을 포함하는 피토스테롤을 포함한다.

[0420] 일부 실시 형태에서, 지질 입자는 이온화 가능한 지질, 비-양이온성 지질, 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이트된 지질, 및 스테롤을 포함한다.

[0421] 지질 나노입자 제형에서 사용될 수 있는 예시적인 이온화 가능한 지질은 제한 없이, 본원에 참조로 포함되는 제WO2019051289호의 표 1에 열거된 것들을 포함한다. 추가적인 예시적인 지질은 제한 없이, 하기 화학식 중 하나 이상을 포함한다: 제US2016/0311759호의 X; 제US20150376115호 또는 제US2016/0376224호의 I; 제US20160151284호의 I, II 또는 III; 제US20170210967호의 I, IA, II 또는 IIA; 제US20150140070호의 I-c; 제US2013/0178541호의 A; 제US2013/0303587호 또는 제US2013/0123338호의 I; 제US2015/0141678호의 I; 제US2015/0239926호의 II, III, IV 또는 V; 제US2017/0119904호의 I; 제WO2017/117528호의 I 또는 II; 제US2012/0149894호의 A; 제US2015/0057373호의 A; 제WO2013/116126호의 A; 제US2013/0090372호의 A; 제US2013/0274523호의 A; 제US2013/0274504호의 A; 제US2013/0053572호의 A; 제WO2013/016058호의 A; 제WO2012/162210호의 A; 제US2008/042973호의 I; 제US2012/01287670호의 I, II, III 또는 IV; 제US2014/0200257호의 I 또는 II; 제US2015/0203446호의 I, II 또는 III; 제US2015/0005363호의 I 또는 III; 제US2014/0308304호의 I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID 또는 III~XXIV; 제US2013/0338210호의; 제WO2009/132131호의 I, II, III 또는 IV; 제US2012/01011478호의 A; 제US2012/0027796호의 I 또는 XXXV; 제US2012/0058144호의 XIV 또는 XVII; 제US2013/0323269호의; 제US2011/0117125호의 I; 제US2011/0256175호의 I, II 또는 III; 제US2012/0202871호의 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII; 제US2011/0076335호의 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV 또는 XVI; 제US2006/008378호의 I 또는 II; 제US2013/0123338호의 I; 제US2015/0064242호의 I 또는 X-A-Y-Z; 제US2013/0022649호의 XVI, XVII 또는 XVIII; 제US2013/0116307호의 I, II 또는 III; 제US2013/0116307호의 I, II 또는 III; 제US2010/0062967호의 I 또는 II; 제US2013/0189351호의 I~X; 제US2014/0039032호의 I; 제US2018/0028664호의 V; 제US2016/0317458호의 I; 제US2013/0195920호의 I; 제US10,221,127호의 5, 6 또는 10; 제WO2018/081480호의 III-3; 제WO2020/081938호의 I-5 또는 I-8; 제US9,867,888호의 18 또는 25; 제US2019/0136231호의 A; 제WO2020/219876호의 II; 제US2012/0027803호의 1; 제US2019/0240349호의 OF-02; 제US10,086,013호의 23; 문헌[Miao et al (2020)]의 cKK-E12/A6; 제WO2010/053572호의 C12-200; 문헌[Dahlman et al (2017)]의 7C1; 문헌[Whitehead et al]의 304-O13 또는 503-O13; 제US9,708,628호의 TS-P4C2; 제WO2020/106946호의 I; 제WO2020/106946호의 I; 및 제WO2021/113777호의 (1), (2), (3), 또는 (4). 예시적인 지질은 제WO2021/113777호의 표 1~16 중 어느 하나의 지질을 추가로 포함한다.

[0422] 예시적인 비-양이온성 지질은 디스테아로일-sn-글리세로-포스포에탄올아민, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민(예컨대 16-O-모노메틸 PE), 디메틸-포스파티딜에탄올아민(예컨대 16-O-디메틸 PE), 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 수소화된 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 난(egg) 포스파티딜콜린(EPC), 디올레오일 포스파티딜세린(DOPS), 스핑고미엘린(SM), 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC), 디미리스토일 포스파티딜글리세롤(DMPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG), 디에루코일포스파티딜콜린(DEPC), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG), 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민(DEPE), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스핑고미엘린, 난 스핑고미엘린(ESM), 세팔린, 카르디오리핀, 포스파티드산, 세레브로시드, 디세틸포스페이트, 리소포스파티딜콜린, 디리놀레오일포스파티딜콜린 또는 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 디아실 포스파티딜콜린 및 디아실포스파티딜에탄올아민 인지질도 또한 사용될 수 있는 것이 이해된다. 이들 지질 내의 아실 기는 바람직하게는 C10-C24 탄소 쇄를 갖는 지방산, 예를 들어, 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일, 또는 올레오일로부터 유래된 아실 기이다. 추가적인 예시적인 지질은, 특정 실시 형태에서, 제한 없이, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Kim et

al. (2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386]에 기재된 것들을 포함한다. 이러한 지질은 일부 실시 형태에서, mRNA(예를 들어, DGTS)로의 간 형질감염을 개선시키는 것으로 관찰된 식물 지질을 포함한다.

[0423] 지질 나노입자에 사용하는 데 적합한 비-양이온성 지질의 다른 예는 제한 없이, 인을 함유하지 않는 지질, 예컨대, 예를 들어, 스테아릴 아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤 리신 올레에이트, 헥사데실 스테아레이트, 이소프로필 미리스테이트, 양쪽성 아크릴계 중합체, 트리에탄올아민-라우릴 술페이트, 알킬-아릴 술페이트 폴리에틸옥실화 지방산 아미드, 디옥타데실 디메틸 암모늄 브로마이드, 세라미드, 스핑고미엘린 등을 포함한다. 다른 비-양이온성 지질은 제WO2017/099823호 또는 미국 특허 공개 제US2018/0028664호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0424] **넘버링된 실시 형태**

[0425] [1] 원형 폴리리보뉴클레오티드(circRNA)의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 선형 폴리리보뉴클레오티드(linRNA)를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계.

[0426] [2] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 변성 조건에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계.

[0427] [3] (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL인, 실시 형태 [1] 또는 [2]의 방법.

[0428] [4] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서: (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL인, 단계; 및 (b) 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계.

[0429] [5] 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 1 μg 내지 1000 mg인, 실시 형태 [1]~[4] 중 어느 하나의 방법.

[0430] [6] 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 500 μL 내지 1000 mL인, 실시 형태 [1]~[5] 중 어느 하나의 방법.

[0431] [7] 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 200 ng/μL 내지 50 mg/mL인, 실시 형태 [1]~[6] 중 어느 하나의 방법.

[0432] [8] 분리 단계 (b)는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 수행되는, 실시 형태 [4]~[7] 중 어느 하나의 방법.

[0433] [9] circRNA의 풍부화된 집단은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 실시 형태 [1]~[8] 중 어느 하나의 방법.

[0434] [10] 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함하는, 실시 형태 [9]의 방법.

[0435] [11] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하는, 실시 형태 [1]~[10] 중 어느 하나의 방법.

[0436] [12] 변성 조건은 50℃ 내지 85℃의 온도를 포함하는, 실시 형태 [11]의 방법.

[0437] [13] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 실시 형태 [1]~[12] 중 어느 하나의 방법.

[0438] [14] 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [1]~[13] 중 어느 하나의 방법.

[0439] [15] 변성 조건은 5 미만의 pH를 포함하는, 실시 형태 [14]의 방법.

[0440] [16] 변성 조건은 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [14]의 방법.

[0441] [17] 변성 조건은 화학적 처리를 포함하는, 실시 형태 [1]~[16] 중 어느 하나의 방법.

[0442] [18] 화학적 처리는 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는, 실시 형태 [17]의 방법.

[0443] [19] 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 실시 형태 [18]의 방법.

[0444] [20] 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 실시 형태 [18] 또는 [19]의 방법.

[0445] [21] 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 실시 형태 [18]~[20] 중 어느 하나의 방법.

[0446] [22] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는, 실시 형태 [18]~[21] 중 어느 하나의 방법.

[0447] [23] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 실시 형태 [18]~[22] 중 어느 하나의 방법.

[0448] [24] 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 PEG, 또는 우레아를 포함하는, 실시 형태 [18]~[23] 중 어느 하나의 방법.

[0449] [25] 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 에틸렌 글리콜-비스(β-아미노에틸 에테르)-N,N,N',N'-테트라 아세트산(EGTA) 또는 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 그의 유도체, 니트릴로트리아세트산(NTA), 이미노디숙신산(IDS), 폴리아스파르트산, S,S-에틸렌디아민-N,N'-디숙신산(EDDS), 또는 메틸글리신디아세트산(MGDA)을 포함하는, 실시 형태 [18]~[24] 중 어느 하나의 방법.

[0450] [26] 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 노니데트 P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 실시 형태 [18]~[25] 중 어느 하나의 방법.

[0451] [27] 원형 폴리리보뉴클레오티드(circRNA)의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 선형 폴리리보뉴클레오티드(linRNA)를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 적어도 50℃의 온도에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계로서, 여기서 분리는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 단계.

[0452] [28] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서: (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL인, 단계; 및 (b) 적어도 50℃의 온도에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계.

[0453] [29] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 적어도 50℃의 온도에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계.

[0454] [30] 온도는 50℃ 내지 85℃인, 실시 형태 [27]~[29] 중 어느 하나의 방법.

[0455] [31] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 5 미만 또는 9 초과의 pH에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계로서, 여기서 분리는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 단계.

[0456] [32] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서: (i) 폴리리보뉴클레오티

드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL인, 단계; 및 (b) 5 미만 또는 9 초과의 pH에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계.

[0457] [33] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 5 미만 또는 9 초과의 pH에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계.

[0458] [34] pH는 5 미만인, 실시 형태 [31]~[33] 중 어느 하나의 방법.

[0459] [35] pH는 9 초과인, 실시 형태 [31]~[33] 중 어느 하나의 방법.

[0460] [36] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액을 포함하는 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계로서, 여기서 분리는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 단계.

[0461] [37] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL인, 단계; 및 (b) 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액을 포함하는 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계.

[0462] [38] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계.

[0463] [39] 산은 적어도 0.5%(v/v)의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0464] [40] 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0465] [41] 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0466] [42] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0467] [43] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0468] [44] 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 우레아를 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0469] [45] 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, EDDS, 또는 MGDA를 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0470] [46] 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 NP40, CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 실시 형태 [36]~[38] 중 어느 하나의 방법.

[0471] [47] 단계 (b)는 폴리리보뉴클레오티드의 집단에 대해 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하고, 칼럼 크

로마토그래피를 수행하는 것은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하는, 실시 형태 [1]~[46] 중 어느 하나의 방법.

[0472] [48] 분리는 샘플 로딩 단계 동안 수행되는, 실시 형태 [47]의 방법.

[0473] [49] 분리는 칼럼 세척 단계 동안 수행되는, 실시 형태 [46] 또는 [47]의 방법.

[0474] [50] 분리는 용리 단계 동안 수행되는, 실시 형태 [47]~[49] 중 어느 하나의 방법.

[0475] [51] 칼럼 크로마토그래피는 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC), 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환 크로마토그래피(AEC), 혼합 모드 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피를 포함하는, 실시 형태 [47]~[50] 중 어느 하나의 방법.

[0476] [52] AEC는 스티렌-디비닐벤젠, 실리카, 세파로스, 셀룰로스, 덱스트란, 에폭시 폴리아민, 메타크릴레이트, 아가로스, 및 아크릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 음이온 교환 수지의 사용을 포함하는, 실시 형태 [51]의 방법.

[0477] [53] 음이온 교환 수지는 4차 암모늄, 아미노 에틸, 디에틸아미노에틸, 및 디에틸아미노프로필로 이루어진 군으로부터 선택되는 이온 교환제를 포함하는, 실시 형태 [52]의 방법.

[0478] [54] 음이온 교환 수지는 비드를 포함하고, 비드는 45~165 μm의 비드 직경 및 직경 100~1000 nm의 기공 크기를 갖는, 실시 형태 [52] 또는 [53]의 방법.

[0479] [55] AEC는 선형 구배 용리 또는 단계 등용매 용리의 사용을 포함하는, 실시 형태 [51]~[54] 중 어느 하나의 방법.

[0480] [56] AEC는 1 mL/분 내지 150 mL/분인 유속의 사용을 포함하는, 실시 형태 [51]~[55] 중 어느 하나의 방법.

[0481] [57] FPLC는 역상-FPLC(RP-FPLC)인, 실시 형태 [51]의 방법.

[0482] [58] 단계 (b)는 정제된 circRNA의 다수의 분획을 풀링함으로써 수행되는, 실시 형태 [1]~[57] 중 어느 하나의 방법.

[0483] [59] circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖는, 실시 형태 [1]~[58] 중 어느 하나의 방법.

[0484] [60] circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖는, 실시 형태 [1]~[59] 중 어느 하나의 방법.

[0485] [61] circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여하는, 실시 형태 [1]~[60] 중 어느 하나의 방법.

[0486] [62] 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함하는, 실시 형태 [1]~[61] 중 어느 하나의 방법.

[0487] [63] 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함하지 않는, 실시 형태 [1]~[61] 중 어느 하나의 방법.

[0488] [64] 방법은 circRNA의 풍부화를 개선시키는 circRNA에 대한 또는 linRNA에 대한 선택적 변형을 포함하지 않는, 실시 형태 [1]~[63] 중 어느 하나의 방법.

[0489] [65] circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 큰, 실시 형태 [1]~[64] 중 어느 하나의 방법.

[0490] [66] circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%인, 실시 형태 [1]~[65] 중 어느 하나의 방법.

[0491] [67] circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만인, 실시 형태 [1]~[66] 중 어느 하나의 방법.

[0492] [68] circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 갖는, 실시 형태 [1]~[67] 중 어느 하나의 방법.

[0493] [69] circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 폴리리보뉴클레오티드의 집단은 변성 조건 하에서의 용액 내에 있고, (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 500 ng/μL인, 조성물.

[0494] [70] circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 폴리리보뉴클

레오티드의 집단은 변성 조건 하에서의 용액 내에 있고, 용액은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물.

[0495] [71] circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서

[0496] (a) 조성물은 핵산의 집단을 포함하는 샘플로부터 수득되고;

[0497] (b) 조성물은 하나 이상의 변성 조건에 노출되었고;

[0498] (c) 조성물은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물.

[0499] [72] circRNA의 풍부화된 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서

[0500] (a) 조성물은 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플로부터 수득되고;

[0501] (b) 조성물은 하나 이상의 변성 조건에 노출되었고;

[0502] (c) 조성물은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물.

[0503] [73] 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 EDTA를 포함하는, 실시 형태 [69]~[72] 중 어느 하나의 조성물.

[0504] [74] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하는, 실시 형태 [69]~[73] 중 어느 하나의 조성물.

[0505] [75] 변성 조건은 50℃ 내지 85℃의 온도를 포함하는, 실시 형태 [69]~[74] 중 어느 하나의 조성물.

[0506] [76] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 실시 형태 [69]~[75] 중 어느 하나의 조성물.

[0507] [77] 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [69]~[73] 중 어느 하나의 조성물.

[0508] [78] 변성 조건은 화학적 처리를 포함하는, 실시 형태 [69]~[73] 중 어느 하나의 조성물.

[0509] [79] 화학적 처리는 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는, 실시 형태 [78]의 조성물.

[0510] [80] 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 실시 형태 [79]의 조성물.

[0511] [81] 염기는 1 mM 내지 500 mM 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 실시 형태 [79] 또는 [80]의 조성물.

[0512] [82] 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 실시 형태 [79]~[81] 중 어느 하나의 조성물.

[0513] [83] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는, 실시 형태 [79]~[82] 중 어느 하나의 조성물.

[0514] [84] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 실시 형태 [79]~[82] 중 어느 하나의 조성물.

[0515] [85] 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 우레아를 포함하는, 실시 형태 [79]~[84] 중 어느 하나의 방법.

[0516] [86] 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, EDDS, 또는 MGDA를 포함하는, 실시 형태 [79]~[85] 중 어느 하나의 조성물.

[0517] [87] 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 NP40, CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 실시 형태 [79]~[86] 중 어느 하나의 조성물.

[0518] [88] circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 큰, 실시 형태 [69]~[87] 중 어느 하나의 조성물.

[0519] [89] circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%인, 실시 형태 [69]~[88] 중 어느 하나의 조성물.

[0520] [90] circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만인, 실시 형태 [69]~[89] 중 어느 하나의 조성물.

[0521] [91] circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖는, 실시 형태 [69]~[90] 중 어느 하나의 조성물.

[0522] [92] circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖는, 실시 형태 [69]~[91] 중 어느 하나의 조성물.

[0523] [93] circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여하는, 실시 형태 [69]~[92] 중 어느 하나의 조성물.

[0524] [94] circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는, 실시 형태 [69]~[93] 중 어느 하나의 조성물.

[0525] [95] circRNA의 순도를 결정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) 크로마토그래피에 의해 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하는 단계; 및 (c) circRNA에 대한 피크 및 linRNA에 대한 피크를 포함하는 샘플의 크로마토그램을 수집하는 단계; (d) 각각의 피크하 면적을 계산하여 샘플 내의 circRNA의 순도를 결정하는 단계.

[0526] [96] 변성 조건은 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 실시 형태 [95]의 방법.

[0527] [97] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하는, 실시 형태 [95] 또는 [96]의 방법.

[0528] [98] 변성 조건은 50℃ 내지 85℃의 온도를 포함하는, 실시 형태 [97]의 방법.

[0529] [99] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 실시 형태 [95]~[98] 중 어느 하나의 방법.

[0530] [100] 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [95]~[99] 중 어느 하나의 방법.

[0531] [101] 변성 조건은 5 미만의 pH를 포함하는, 실시 형태 [100]의 방법.

[0532] [102] 변성 조건은 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [100]의 방법.

[0533] [103] 변성 조건은 화학적 처리를 포함하는, 실시 형태 [95]~[102] 중 어느 하나의 방법.

[0534] [104] 화학적 처리는 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는, 실시 형태 [103]의 방법.

[0535] [105] 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 실시 형태 [104]의 방법.

[0536] [106] 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 실시 형태 [104] 또는 [105]의 방법.

[0537] [107] 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 실시 형태 [104]~[106] 중 어느 하나의 방법.

[0538] [108] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는, 실시 형태 [104]~[107] 중 어느 하나의 방법.

[0539] [109] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 실시 형태 [104]~[108] 중 어느 하나의 방법.

[0540] [110] 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 우레아를 포함하는, 실시 형태 [104]~[109] 중 어느 하나의 방법.

[0541] [111] 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, 폴리아스파르트산, EDDS, 또는 MGDA를 포함하는, 실시 형태 [104]~[110] 중 어느 하나의 방법.

[0542] [112] 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 노니데트 P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 실시 형태 [104]~[111] 중 어느 하나의 방법.

[0543] [113] 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피를 포함하는, 실시 형태 [95]~[112] 중 어느 하나의 방법.

[0544] [114] 액체 크로마토그래피는 FPLC, HPLC, HIC, AEC, MMC, 또는 친화성 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는, 실시 형태 [113]의 방법.

[0545] [115] 순도의 상대 표준 편차(RSD)는 5% 미만인, 실시 형태 [95]~[114] 중 어느 하나의 방법.

[0546] [116] circRNA는 1,000개 미만의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는, 실시 형태 [95]~[115] 중 어느 하나의 방법.

[0547] [117] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하고, 이로써 circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 단계.

[0548] [118] circRNA의 풍부화된 집단을 생성하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 변성 조건에 노출시키고, 이로써 circRNA의 집단을 풍부화하는 단계.

[0549] [119] (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 중량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 200 ng/μL인, 실시 형태 [117] 또는 [118]의 방법.

[0550] [120] 분리 단계 (b)는 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는 변성 조건 하에서 수행되고/거나; circRNA의 풍부화된 집단은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없고, 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함하는, 실시 형태 [118] 또는 [119]의 방법.

[0551] [121] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하거나; 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 실시 형태 [117]~[120] 중 어느 하나의 방법.

[0552] [122] 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [117]~[121] 중 어느 하나의 방법.

[0553] [123] 변성 조건은 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는 화학적 처리를 포함하는, 실시 형태 [117]~[122] 중 어느 하나의 방법.

[0554] [124] 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 실시 형태 [123]의 방법.

[0555] [125] 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 실시 형태 [123] 또는 [124]의 방법.

[0556] [126] 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 실시 형태 [123]~[125] 중 어느 하나의 방법.

[0557] [127] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하고/거나; 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 실시 형태 [123]~[126] 중 어느 하나의 방법.

[0558] [128] 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 PEG, 또는 우레아를 포함하는, 실시 형태 [123]~[127] 중 어느 하나의 방법.

[0559] [129] 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 에틸렌 글리콜-비스(β-아미노에틸 에테르)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-테트라 아세트산(EGTA) 또는 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 그의 유도체, 니트릴로트리아세트산(NTA), 이미노디숙신산(IDS), 폴리아스파르트산, *S*,*S*-에틸렌디아민-*N*,*N*′-디숙신산(EDDS), 또는 메틸글리신디아세트산

(MGDA)을 포함하는, 실시 형태 [123]~[128] 중 어느 하나의 방법.

[0560] [130] 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 노니데트 P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 실시 형태 [123]~[129] 중 어느 하나의 방법.

[0561] [131] 단계 (b)는 폴리리보뉴클레오티드의 집단에 대해 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하고, 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 것은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 및 용리 단계를 포함하고; 분리는 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계 동안, 및/또는 용리 단계 동안 수행되는, 실시 형태 [117]~[130] 중 어느 하나의 방법.

[0562] [132] 칼럼 크로마토그래피는 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC), 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환 크로마토그래피(AEC), 혼합 모드 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피를 포함하는, 실시 형태 [131]의 방법.

[0563] [133] AEC는 (i) 음이온 교환 수지의 사용으로서, 여기서 음이온 교환 수지는 스티렌-디비닐벤젠, 실리카, 세파로스, 셀룰로스, 덱스트란, 에폭시 폴리아민, 메타크릴레이트, 아가로스, 및 아크릴로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나; 음이온 교환 수지는 4차 암모늄, 아미노 에틸, 디에틸아미노에틸, 및 디에틸아미노프로필로 이루어진 군으로부터 선택되는 이온 교환제를 포함하고/거나; 음이온 교환 수지는 비드를 포함하고, 비드는 45~165 μm의 비드 직경 및 직경 100~1000 nm의 기공 크기를 갖는, 사용; 및/또는 (ii) 선형 구배 용리 또는 단계 등용매 용리의 사용; 및/또는 (iii) 1 mL/분 내지 150 mL/분인 유속의 사용을 포함하는, 실시 형태 [132]의 방법.

[0564] [134] 단계 (b)는 정제된 circRNA의 다수의 분획을 풀링함으로써 수행되는, 실시 형태 [117]~[133] 중 어느 하나의 방법.

[0565] [135] circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여하는, 실시 형태 [117]~[134] 중 어느 하나의 방법.

[0566] [136] 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함하거나, 방법은 linRNA의 엑소뉴클레아제 소화를 포함하지 않고/거나; 방법은 circRNA의 풍부화를 개선시키는 circRNA에 대한 또는 linRNA에 대한 선택적 변형을 포함하지 않는, 실시 형태 [117]~[135] 중 어느 하나의 방법.

[0567] [137] circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 크고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%이고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만인, 실시 형태 [117]~[136] 중 어느 하나의 방법.

[0568] [138] circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는, 실시 형태 [117]~[137] 중 어느 하나의 방법.

[0569] [139] circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 폴리리보뉴클레오티드의 집단은 변성 조건 하에서의 용액 내에 있고, (i) 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량은 적어도 1 μg이거나; (ii) 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플의 총 부피는 적어도 500 μL이거나; (iii) 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 집단의 농도는 적어도 500 ng/μL인, 조성물.

[0570] [140] circRNA의 풍부화된 집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 (a) 조성물은 circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플로부터 수득되고; (b) 조성물은 하나 이상의 변성 조건에 노출되었고; (c) 조성물은 하나 이상의 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물.

[0571] [141] 하나 이상의 불순물 또는 부산물은 폴리아크릴아미드, 붕산, 마그네슘, 또는 EDTA를 포함하는, 실시 형태 [139] 또는 [140]의 조성물.

[0572] [142] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하거나; 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 실시 형태 [139]~[141] 중 어느 하나의 조성물.

[0573] [143] 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [139]~[142] 중 어느 하나의 조성물.

[0574] [144] 변성 조건은 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는 화학적 처리를 포함하는, 실시 형태 [139]~[143] 중 어느 하나의 조성물.

[0575] [145] 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모

노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 실시 형태 [144]의 조성물.

[0576] [146] 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 실시 형태 [144] 또는 [145]의 조성물.

[0577] [147] 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 실시 형태 [144]~[146] 중 어느 하나의 조성물.

[0578] [148] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하고/거나; 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 실시 형태 [144]~[147] 중 어느 하나의 조성물.

[0579] [149] 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 우레아를 포함하는, 실시 형태 [144]~[148] 중 어느 하나의 방법.

[0580] [150] 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, EDDS, 또는 MGDA를 포함하는, 실시 형태 [144]~[149] 중 어느 하나의 조성물.

[0581] [151] 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 NP40, CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 실시 형태 [144]~[150] 중 어느 하나의 조성물.

[0582] [152] circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 폴리리보뉴클레오티드 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)보다 2배 더 크고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 적어도 65%이고/거나; circRNA의 풍부화된 집단 내의 linRNA의 퍼센트(w/w)는 35% 미만인, 실시 형태 [139]~[151] 중 어느 하나의 조성물.

[0583] [153] circRNA 및 linRNA는 동일한 리보뉴클레오티드 서열을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 동일한 질량을 갖고/거나; circRNA 및 linRNA는 폴리(A) 꼬리를 결여하는, 실시 형태 [139]~[152] 중 어느 하나의 조성물.

[0584] [154] circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는, 실시 형태 [139]~[153] 중 어느 하나의 조성물.

[0585] [155] circRNA의 순도를 결정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법: (a) circRNA 및 linRNA를 포함하는 폴리리보뉴클레오티드의 집단을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) 크로마토그래피에 의해 변성 조건 하에서 linRNA로부터 circRNA를 분리하는 단계; 및 (c) circRNA에 대한 피크 및 linRNA에 대한 피크를 포함하는 샘플의 크로마토그램을 수집하는 단계; (d) 각각의 피크하 면적을 계산하여 샘플 내의 circRNA의 순도를 결정하는 단계.

[0586] [156] 변성 조건은 겔 전기영동의 사용을 포함하지 않는, 실시 형태 [155]의 방법.

[0587] [157] 변성 조건은 적어도 50℃의 온도를 포함하거나; 변성 조건은 적어도 50℃의 온도, 이어서 30초 이하의 기간 내에 8℃ 이하의 온도를 포함하는, 실시 형태 [155] 또는 [156]의 방법.

[0588] [158] 변성 조건은 5 미만 또는 9 초과의 pH를 포함하는, 실시 형태 [155]~[157] 중 어느 하나의 방법.

[0589] [159] 변성 조건은 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 처리를 포함하는 화학적 처리를 포함하는, 실시 형태 [155]~[158] 중 어느 하나의 방법.

[0590] [160] 산은 1 mM 내지 500 mM의 아세트산, 염산, 살리실산, 인산, 붕산, 포름산, 옥살산, 시트르산, 벤조산, 모노클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 아스코르브산, 또는 질산을 포함하는, 실시 형태 [159]의 방법.

[0591] [161] 염기는 1 mM 내지 500 mM의 수산화나트륨, 수산화칼륨, 이미다졸, 히스티딘, 중탄산나트륨, 구아니딘, 또는 트리에틸아민을 포함하는, 실시 형태 [159] 또는 [160]의 방법.

[0592] [162] 유기 용매는 적어도 0.1%(v/v)의 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄, 또는 프로필렌 글리콜을 포함하는, 실시 형태 [159]~[161] 중 어느 하나의 방법.

[0593] [163] 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 우레아, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하고/거나; 카오트로픽제는 100 mM 내지 8 M의 n-도데실 β-d-말토시드, n-옥틸글루코시드, CHAPS, 또는 데옥시콜레이트를 포함하는, 실시 형태 [159]~[162] 중 어느 하나의 방법.

[0594] [164] 크라우딩제는 100 mM 내지 8 M의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 우레아를 포함하는, 실시 형태 [159]~[162] 중 어느 하나의 방법.

[0595] [165] 킬레이터는 1 mM 내지 10 mM의 EGTA 또는 그의 유도체, EDTA 또는 그의 유도체, NTA, IDS, 폴리아스파르트산, EDDS, 또는 MGDA를 포함하는, 실시 형태 [159]~[164] 중 어느 하나의 방법.

[0596] [166] 세정제는 0.005% 내지 0.05%(v/v)의 노니데트 P-40(NP40), CHAPS, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, n-도데실 β-d-말토시드, 트윈-20, 또는 트윈-80을 포함하는, 실시 형태 [159]~[165] 중 어느 하나의 방법.

[0597] [167] 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피이고, 액체 크로마토그래피는 FPLC, HPLC, HIC, AEC, MMC, 또는 친화성 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는, 실시 형태 [155]~[166] 중 어느 하나의 방법.

[0598] [168] 순도의 상대 표준 편차(RSD)는 5% 미만인, 실시 형태 [155]~[167] 중 어느 하나의 방법.

[0599] [169] circRNA는 1,000개의 뉴클레오티드 또는 그 미만의 길이를 포함하는, 실시 형태 [155]~[168] 중 어느 하나의 방법.

[0600] **실시예**

[0601] 하기 실시예는 당업자에게 본원에 기재된 조성물 및 방법을 사용하고, 제조하고, 평가하는 방법의 설명을 제공하기 위해 제시되며, 본 발명을 순수하게 예시하는 것으로 의도되고, 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0602] **실시예 1: circRNA 및 linRNA를 포함하는 RNA의 혼합된 집단을 함유하는 샘플로부터의 변성 조건 하에서의 circRNA의 풍부화**

[0603] 본 개시된 방법에 따르면, 당업자는 샘플을 본원에 기재된 하나 이상의 변성 조건에 적용함으로써 원형 RNA(circRNA), 선형 RNA(linRNA), 또는 다른 불순물 또는 부산물(예를 들어, 본원에 기재된 불순물 또는 부산물)을 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단으로부터 circRNA의 풍부화된 집단을 생성할 수 있다.

[0604] 먼저, circRNA 및 linRNA를 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플을 수득한다. 샘플은 적어도 200 μg인 폴리리보뉴클레오티드의 총 질량을 함유하거나, 적어도 500 μL의 총 부피를 갖거나, 적어도 200 ng/μL인 샘플 내의 폴리리보뉴클레오티드의 농도를 가질 수 있다. 후속적으로 시험관내 전사(IVT) RNA 샘플을 제조하고, 당업계에 잘 알려진 초기 정제 단계에 적용한다. 큰 오염물, 잔해, 및 다른 거대분자를 제거하기 위해 IVT 샘플을 정제 전에 사전-프로세싱할 수 있다. IVT 샘플을 또한 원심분리하여 침전 및 상청액을 분리할 수 있다. 몇 라운드의 완충제 세척 및 원심분리를 필요에 따라 수행할 수 있다. 정제는 IVT 샘플을 본원에 기재된 하나 이상의 변성 조건(예를 들어, 열 변성, pH 변성, 산, 염기, 유기 용매, 카오트로픽제, 크라우딩제, 킬레이터, 세정제, 또는 염 용액으로의 화학적 변성)에 적용함으로써 수행되고, 여기서 변성 조건은 linRNA 및 circRNA 내의 구조적 영향을 실질적으로 변성시킨다. 변성 조건에 의한 정제는 단독으로 또는 당업계에 알려진 칼럼 크로마토그래피적 분리 기법(예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피)과 조합으로 수행된다. 칼럼 크로마토그래피적 정제가 수행되는 경우, 변성 조건에의 폴리리보뉴클레오티드를 함유하는 샘플의 노출은 평형 단계, 샘플 로딩 단계, 칼럼 세척 단계, 또는 용리 단계 동안 수행된다. 방법은 샘플 내의 linRNA 분자의 엑소뉴클레아제-매개 소화를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다.

[0605] 따라서, 정제는 샘플로부터 circRNA의 바람직한 순도가 달성되는 정도까지 수행된다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 2%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 3%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 4%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 5%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 6%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 7%(w/w)이다. 실시 형

태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 8%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 9%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 10%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 11%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 12%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 13%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 14%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 15%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 16%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 17%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 18%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 19%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 20%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 21%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 22%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 23%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 24%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 25%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 26%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 27%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 28%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 29%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 30%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 31%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 32%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 33%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 34%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 35%(w/w)이다. 실시 형태에서, circRNA의 풍부화된 집단은 적어도 35%(w/w)(예를 들어, 적어도 36%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과)의 양의 circRNA 및 65%(w/w) 미만(예를 들어, 64%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 그 미만)인 linRNA 양을 갖는다. 예를 들어, circRNA의 풍부화된 집단 내의 circRNA의 퍼센트(w/w)는 샘플 내의 혼합된 폴리리보뉴클레오티드의 집단 내의 circRNA의 2배 더 클 수 있다(w/w).

[0606] **실시예 2: 변성 조건으로서 다양한 농도의 카오트로픽제 및 염을 이용한 circRNA의 정제**

[0607] 다양한 농도의 카오트로픽제(이 경우 6 M 우레아) 및 염(이 경우 염화나트륨(NaCl))이 circRNA를 변성시키고 분해하거나 추가로 정제하는 능력을 평가하기 위해 하기 실험을 수행하였으며, 하기 실험을 수행하였다.

[0608] 5 mL DEAE 세파로스 칼럼을 사용하여 스플린트 라이게이션에 의해 생성된 원형 RNA를 정제하였다. 칼럼을 평형화시키고, 50 mM 트리스, pH 7로 세척하고, 원형 RNA로 로딩하였다. 칼럼을 300 mM NaCl, 700 mM NaCl, 1 M NaCl, 3 M NaCl에서 단계 용리로 또는 300 mM NaCl + 0.6 M 우레아, 700 mM NaCl + 1.5 M 우레아, 1 M NaCl +

1.8 M 우레아 및 3 M NaCl + 6M 우레아에서 우레아로 단계 용리로 용리하였다. 관련 분획을 풀링하고, 생성된 풍부화된 물질을 PAGE에 의해 분석하였다. 데이터는 하기 표 2에 제시된다. 우레아가 존재하지 않는 크로마토그램은 도 1에 제시된다. 58.00 mL에서 표시된 피크는 circRNA이고, 모든 다른 피크는 불순물이다. 우레아가 존재하는 크로마토그램은 도 2에 제시되며, 우레아와 함께 존재하는 단계 용리를 나타낸다. 56.89 mL에서 표시된 피크는 circRNA이고, 모든 다른 피크는 불순물이다.

[0609] 표 2:

[0610]

| 겔/레인 번호 | 샘플 | %circRNA | %linRNA |
|---|---|---|---|
| 겔 1/레인 1 | 투입 (또는 IVT) | 44 | 55 |
| 겔 2/레인 1 | + 우레아 | 66 | 34 |
| 겔 2/레인 8 | - 우레아 | 56 | 43 |

[0611] 둘 모두의 정제 전에 PAGE에 의해 측정된 출발 물질 순도는 circRNA 및 linRNA 백분율에 대해 각각 44.6% 및 55.4%였다. 우레아의 부재 하에서 circRNA 퍼센트 순도는 56.4%였고, 선형은 43.6%였다. 6 M 우레아의 첨가는 circRNA 및 linRNA에 대해 각각 65.9% 및 34.1% 순도를 발생시켰다. 1 mL ~ 8 L 칼럼 부피 또는 그 초과로 확장 가능한 공정을 개발하기 위해, 일정한 농도에서 우레아의 순도 개선을 이해하기 위해 하기 정제를 수행하였다.

[0612] **실시예 3: 카오트로픽제 및 고염 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0613] 다양한 농도의 카오트로픽제(이 경우 6 M 우레아) 및 염(이 경우 염화나트륨(NaCl))이 circRNA를 변성시키고 분해하거나 추가로 정제하는 능력을 평가하기 위해 하기 실험을 수행하였으며, 하기 실험을 수행하였다.

[0614] 원형 RNA를 정제하기 위해 6 M 우레아의 존재 하에서 8 mL DEAE 모놀리틱 칼럼을 사용하였다.

[0615] 실험을 7의 pH에서 원형 RNA 라이게이션 후 세정되지 않은 약 200 mg/mL에 대해 수행하였다. 샘플을 샘플 완충제(100 mM 트리스-HCl pH 7.0, 6 M 우레아, 10 mM EDTA)로 1:1로 3 M 우레아의 최종 농도로 희석하고, 7.5 mg을 8 mL 칼럼 상으로 로딩하였다. 칼럼을 평형화하고, 샘플 로드 후 50 mM 트리스-HCl pH 7.0, 6 M 우레아, 5 mM EDTA로 세척하고, 20 CV 선형 구배로 50 mM 트리스-HCL pH 7.0, 6 M 우레아, 1 M NaCl 5 mM EDTA의 100%로 용리하고, 이어서 10 CV 선형 구배에서 50 mM 트리스-HCL pH 7.0, 6 M 우레아, 3 M NaCl, 5 mM EDTA의 100%로 용리하였다. 칼럼을 재평형화하기 전에 1 M NaOH로 세척하였다. 도 3에 제시된 바와 같은 크로마토그램을 평가하고, 피크를 풀링하였다. PAGE에 의해, 로딩된 물질과 비교하여 200 ng을 순도에 대해 정량하고, 하기 표 3에 제시하였다.

[0616] 표 3:

[0617]

| 샘플 | %circRNA | %linRNA |
|---|---|---|
| 출발 물질 | 47 | 53 |
| circRNA 용리 피크 | 58 | 42 |

[0618] PAGE에 의한 출발 물질 circRNA 퍼센트 순도는 47%이며, 바로 상기 기재된 조건을 사용한 정제 후 circRNA 순도 퍼센트는 58.%이다.

[0619] 완충제의 pH가 pH 8.0이라는 점을 제외하고는 바로 상기 기재된 것과 동일한 실험 조건을 BIA 분리로부터의 QA 8 mL 모놀리틱 칼럼에 대해 수행하였다. PAGE에 의해 측정한 순도를 기록하였으며, 표 4에 제시된다. 도 4는 7 mg의 circRNA IVT 출발 물질의 정제를 보여준다. 도 5에서 136.89 mL에서의 피크는 불순물이고, circRNA 피크는 크로마토그램에서 242.43 mL에 각각 표시된다.

[0620] 표 4:

[0621]

| 샘플 | 분획 | %circRNA | %linRNA |
|---|---|---|---|
| 출발 물질 | NA | 49 | 51 |
| circRNA 용리 피크 | B4 | 62 | 38 |
| circRNA 용리 피크 | B5 | 64 | 36 |

[0622] 투입 출발 물질 또는 로드는 6PAGE에 의해 정량화된 49% circRNA이다. 분획 B4 내에서 용리된 circRNA는

circRNA에 대해 62% 순수하고, 분획 B5에 대해 64% 순수하다.

[0623] **실시예 4: 고염, 높은 pH, 킬레이트화제 및 카오트로픽제 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0624] 2개 이상의 변성 조건이 circRNA를 변성시키고 분해하거나 추가로 정제하는 능력을 평가하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[0625] 시험관내 전사 후 28 mg/mL(큐빗에 의해 약 56 mg)의 원형 RNA의 2 mL를 물로 희석하고, 이어서 1:1 샘플 완충제(pH 7.0 100 mM 트리스-HCl, 6 M 우레아, 10 mM EDTA)로 18 mL로 희석하였다. 샘플을 수소 결합 및 음이온 교환을 갖는 8 mL 칼럼 상으로 로딩하였다. 칼럼을 평형화하고, 50 mM 비카르보네이트 pH 7.0, 6 M 우레아, 5 mM EDTA로 세척하고, 20 CV 선형 구배를 50 mM 비카르보네이트 pH 10.0, 6 M 우레아, 5 mM EDTA, 1 M NaCl의 100%에 적용하고, 이어서 10 CV 선형 구배를 50 mM 트리스-HCl pH 10.0, 6 M 우레아, 5 mM EDTA, 3 M NaCl의 100%에 적용하였다. 칼럼을 재평형화하기 전에 0.1 M NaOH 3 M NaCl 및 0.1 M 아세트산 3 M NaCl로 세정하였다. 크로마토그램 결과는 도 5에 제시된다.

[0626] 표 5:

[0627]

| 샘플 | %circRNA | %linRNA |
|---|---|---|
| 출발 물질 | 60 | 37 |
| circRNA 용리 피크 | 63 | 35 |

[0628] PAGE 정량화에 의해 로드 circRNA%는 60%이고, 선형에 대해서는 37%이다. PAGE에 의해 263.22 mL에서의 피크는 62.91%의 circRNA 및 35.19% linRNA 순도를 함유하였다. 모든 다른 피크는 불순물이다.

[0629] **실시예 5: 고염, 킬레이트화제, 온도 및 카오트로픽제 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0630] 2개 이상의 변성 조건이 circRNA를 변성시키고 분해하거나 추가로 정제하는 능력을 평가하기 위해 고염, 킬레이트화제, 온도 및 카오트로픽제(이 경우 우레아)를 변성 조건으로서 사용하여 하기 실험을 수행하였다.

[0631] circRNA, linRNA, 또는 다른 불순물 또는 부산물(예를 들어, 본원에 기재된 불순물 또는 부산물)을 함유하는 폴리리보뉴클레오티드의 혼합된 집단을 함유하는 샘플에 대해 HIC 정제를 사용하여 실험을 수행하였다. 샘플 내에 3 M NaCl의 존재 하에서 정제를 수행하고, 이어서 3 M NaCl, 6 M 우레아로 용리하고, 바로 이어서 0 M NaCl, 6 M 우레아, 바로 이어서 0 M NaCl, 0 M 우레아로 추가적인 단계 용리를 모두 50 mM 인산나트륨, pH 7.0, 5 mM EDTA의 염기 완충제를 함유하는 동일한 샘플 로드 및 동일한 칼럼 상에서 동일한 실행 동안 순차적으로 수행하였다. 3 M NaCl, 50 mM 인산나트륨, pH 7.0, 5 mM EDTA의 존재 하에서 2.17 mg/mL(칼럼 부피) 원형 RNA에 대해 하기 조건을 테스트한 후, 실온에서 샘플을 1 mL 부틸 고 리간드 밀도(HLD) HIC 칼럼 상으로 로딩하였다: 실온, 50℃, 60℃ 및 75℃에서 각각 10분 동안.

[0632] 도 6, 도 7 및 표 6은 상기 언급된 바와 같이 샘플을 20C에서 10분 동안 인큐베이션하고, 2.17 mg으로 칼럼 상으로 로딩한 1 mL C4 HLD 칼럼을 사용하여 원형 RNA를 정제한 후의 결과를 보여준다.

[0633] 표 6:

[0634]

| 샘플 | 분획 | %circRNA |
|---|---|---|
| 출발 물질 | | 61.5 |
| 14.47 ml 에서의 유통 | 3.A.9 | na |
| 58.51 ml 에서의 용리 피크 | 3.C.6 | 58.7 |
| | 3.C.7 | 58 |
| | 3.C.8 | 58.2 |
| | 3.C.9 | 59.7 |
| | 3.C.10 | 60.5 |
| | 3.C.11 | 64.4 |
| | 3.C.12 | 71.2 |
| 84 ml 에서의 작은 피크 | 3.D.12 | 64.6 |
| 88.40 ml 에서의 용리 피크 | 3.E.1 | 63.7 |
| | 3.E.2 | 60.4 |

[0635] 첫 번째 겔에 대한 투입 출발 물질은 61.5% circRNA였다. 유통액(FT)은 RNA를 거의 함유하지 않았고, 대다수의 RNA는 칼럼에 결합되었다. 분획 3.C.6 ~ 3.C.12를 포함하는 58.52 mL에서의 첫 번째 용리 피크는 테스트된 분획에 따라 PAGE에 의한 58.0~71.2% circRNA 순도의 circRNA 순도 범위를 가졌다. 분획 3.E.1 및 3.E.2를 포함하

는 88.40 mL에서의 두 번째 용리 피크는 각각 PAGE에 의한 63.7% 및 60.4%의 circRNA 순도를 함유하였다.

[0636] **실시예 6: 고온, 카오트로픽제, 유기 용매, 및 고염 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0637] 2개 이상의 변성 조건이 circRNA를 변성시키고 분해하거나 추가로 정제하는 능력을 평가하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[0638] 음이온 교환 올리고뉴클레오티드 칼럼 상으로 circRNA 및 linRNA의 혼합물을 포함하는 IVT RNA의 10 mg 샘플을 로딩하고, 인-라인 유동 히터를 사용하여 80℃에서 전체 정제를 수행하였다. 평형 및 세척을 위한 칼럼 조건은 20 mM 비스-트리스 프로판, 6 M 우레아, 20% ACN, pH 7.0이며, 샘플을 30% ~ 60% 및 6 CV 선형 구배에 의해 20 mM 비스-트리스 프로판, 6 M 우레아, 1 M NaCl, 20% ACN, pH 7.0으로 용리하였다. 도 8의 크로마토그램을 수집하였고, circRNA는 PN:7로 표시하고, 선형 RNA는 PN:8 및 PN:9로 표시하였다. 결과는 표 7에 제시된다.

[0639] 표 7:

[0640]

| 분획 | 수득량 (mg) | % circRNA 순도 |
|---|---|---|
| 7 | 0.5 | 57 |
| 8 | 1.5 | 96 |
| 9 | 0.9 | 94 |
| 10 | 0.4 | 8 |
| 11 | 0.7 | 2 |
| 12 | 0.6 | 2 |
| 총 | 4.6 | |

[0641] circRNA를 함유하는 분획 7, 8 및 9는 HPLC 분석 방법에 의해 각각 57%, 96% 및 94% circRNA 순도로 0.5 mg, 1.5 mg 및 0.9 mg의 물질을 산출하였다. 분획 10, 11 및 12를 포함하는 linRNA 피크는 HPLC 분석 방법에 의해 각각 8%, 2% 및 2% circRNA 순도로 0.4, 0.7 및 0.6 mg의 물질을 함유하였다.

[0642] 분획 8 및 9 HPLC 분석 결과는 도 9에 제시된다.

[0643] 분획 10, 11, 12 HPLC 분석 결과는 도 10에 제시된다.

[0644] **실시예 7: 다양한 온도, 킬레이트화제, 및 카오트로픽제 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0645] 본 실시예는 linRNA, 및 다른 불순물 또는 부산물로부터의 circRNA의 분리에서 변성 조건으로서 온도, 킬레이트화제, 및 카오트로픽제의 사용을 입증하며, 여기서 실험(들) 전반에 걸쳐 0.5 M 구아니딘-HCl이 존재한다.

[0646] 0.1 ml QA 모놀리틱 칼럼을 사용하고, 5℃의 자동 샘플러 내에서 IVT로 생성된 circRNA 샘플을 50 mM 트리스, 6 M 우레아, 5 mM EDTA, pH 8로 평형화된 칼럼 상으로 주입하였다. 칼럼을 100% 50 mM 트리스, 6 M 우레아, 5 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8로 선형 구배로 용리하고, 도 11 및 도 12에 제시된 바와 같이 각각 45℃, 55℃, 65℃, 75℃ 및 85℃(85℃ 크로마토그래피 곡선은 도면에 제시되지 않음)에서 1 ml/분으로 실행하였다. 크로마토그램 내에 제시된 각각의 숫자는 분석을 위해 PAGE 상으로 로딩된 샘플에 상응한다.

[0647] **실시예 8: 고온 및 유기 용매 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0648] 2개 이상의 변성 조건이 circRNA를 변성시키고 분해하거나 추가로 정제하는 능력을 평가하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[0649] 이 방법에서, 온도 및 유기 용매 변성 조건을 사용하여 이온-쌍 역상 HPLC를 사용하여 circRNA 및 linRNA를 분리하였다. 음이온 교환 올리고뉴클레오티드 칼럼(예를 들어, DNAPac PA200 올리고뉴클레오티드 칼럼) 상으로 circRNA/linRNA의 샘플을 주입하였다. 초기 크로마토그래피 조건은 53% 이동상 A(물 중 100 mM TEAA) 및 47% 이동상 B(물 중 25% 아세토니트릴 중 100 mM TEAA)였다. 칼럼을 실행하는 동안 75℃까지 가열하였다. circRNA 및 linRNA의 용리를 표 8에 따라 수행하였다. 도 13은 예시적인 크로마토그램 결과를 보여준다.

[0650] 표 8:

| 시간 (분) | % 이동상 A | % 이동상 B |
|---|---|---|
| 3.00 | 53.0 | 47.0 |
| 3.50 | 53.0 | 47.0 |
| 10.00 | 51.0 | 49.0 |
| 10.50 | 0.0 | 100.0 |
| 11.50 | 0.0 | 100.0 |
| 12.00 | 53.0 | 47.0 |
| 20.00 | 53.0 | 47.0 |

[0651]

[0652] **실시예 9: 다양한 pH 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0653] 본 실시예는 linRNA, 및 다른 불순물 또는 부산물로부터의 circRNA의 분리에서 변성 조건으로서 pH의 사용을 기재한다. 5 미만(예를 들어, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예를 들어, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 또는 13 초과)의 변성 pH 조건을 테스트한다.

[0654] **실시예 10: 염 및 다양한 pH 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0655] 본 실시예는 linRNA, 및 다른 불순물 또는 부산물로부터의 circRNA의 분리에서 다양한 pH 및 염 용액 변성 조건의 사용을 기재한다.

[0656] 테스트할 염은 NaCl, KCl, MgCl, CaCl, $CsSO_4$, $NaSO_4$, LiCl 및/또는 LiBr이다. 100 mM 내지 1 M의 변성 염 용액 농도를 5 미만(예를 들어, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 또는 1 미만) 또는 9 초과(예: 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 또는 13 초과)의 변성 pH 조건으로 테스트한다. 테스트할 염 용액 및/또는 pH 조건은 세척 단계에서 첨가하거나, 정제 직전에 샘플 내로 첨가하거나, 평형 완충제 또는 용리 완충제 내로 첨가한다.

[0657] **실시예 11: 유기 용매 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0658] 본 실시예는 linRNA, 및 다른 불순물 또는 부산물로부터의 circRNA의 분리에서 변성 조건으로 유기 용매의 사용을 기재한다. 적어도 10%(v/v)의 변성 유기 용매 농도를 테스트한다. 테스트한 유기 용매는 디메틸 술폭시드, 트리에틸암모늄 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 이소부탄올, 페놀, 클로로포름, 헥산, 아세토니트릴, 포름아미드, 아세톤, 데나토늄 및/또는 프로필렌 글리콜을 포함한다. 테스트할 유기 용매는 세척 단계에서 첨가하거나, 정제 직전에 샘플 내로 첨가하거나, 평형 완충제 또는 용리 완충제 내로 첨가한다.

[0659] **실시예 12: 세정제 변성 조건을 이용한 circRNA의 정제**

[0660] 본 실시예는 linRNA, 및 다른 불순물 또는 부산물로부터의 circRNA의 분리에서 변성 조건으로 세정제의 사용을 기재한다. 테스트할 세정제는 0.00001% ~ 20% 범위의 농도로 노니데트 P-40(NP40), 폴리소르베이트(예를 들어, 트윈-20, 트윈-40, 트윈-60 또는 트윈-80), 트리톤 X 100, CHAPS, 옥틸 β-D 글루코피라노시드 및/또는 n-도데실 β-말토시드를 포함한다. 테스트할 세정제는 세척 단계 동안 첨가하거나, 정제 직전에 샘플 내로 첨가하거나, 평형 완충제 또는 용리 완충제 내로 첨가한다.

[0661] **실시예 13: 변성 조건 하에서의 분석 방법**

[0662] 본 실시예는 분석 방법에서 변성 조건의 사용을 입증한다.

[0663] 분석 음이온 교환(AEX) HPLC-UV 방법은 linRNA로부터 circRNA를 분리할 수 있는 것으로 입증되었으며, 따라서 linRNA의 존재 하에서 circRNA 샘플의 순도를 결정하는 데 적합하다.

[0664] 이 방법에서, 음이온 교환 올리고뉴클레오티드 칼럼(예를 들어, DNAPac PA200 올리고뉴클레오티드 칼럼) 상으로 circRNA 샘플을 주입하였다. 초기 크로마토그래피 조건은 85% 이동상 A(20 mM 비스-트리스, 6 M 우레아, pH 7.0) 및 15% 이동상 B(20 mM 비스-트리스, 6 M 우레아, 1 M NaCl, pH 7.0)였다. 칼럼을 실행하는 동안 80℃까지 가열하였다. 최대 10% 이동상 A/90% 이동상 B의 구배를 사용하여 circRNA 및 linRNA의 용리를 수행하였다.

[0665] 도 14는 물 중 0.2223 mg/mL 농도에서 2회의 물 주입 후의 circRNA의 예시적인 크로마토그램을 보여준다.

[0666] **실시예 14: 변성 조건 하에서의 분석 방법**

[0667] 본 실시예는 분석 방법에서 변성 조건의 사용을 입증한다.

[0668] 상기 실시예 9에 기재된 분석 방법을 이동상에 20%의 농도로 유기 변성제 아세토니트릴을 첨가하는 것으로 추가로 변형하였다. 다른 변형은 이동상의 완충 용량을 개선시키기 위해 완충 염을 변경하는 것을 포함한다.

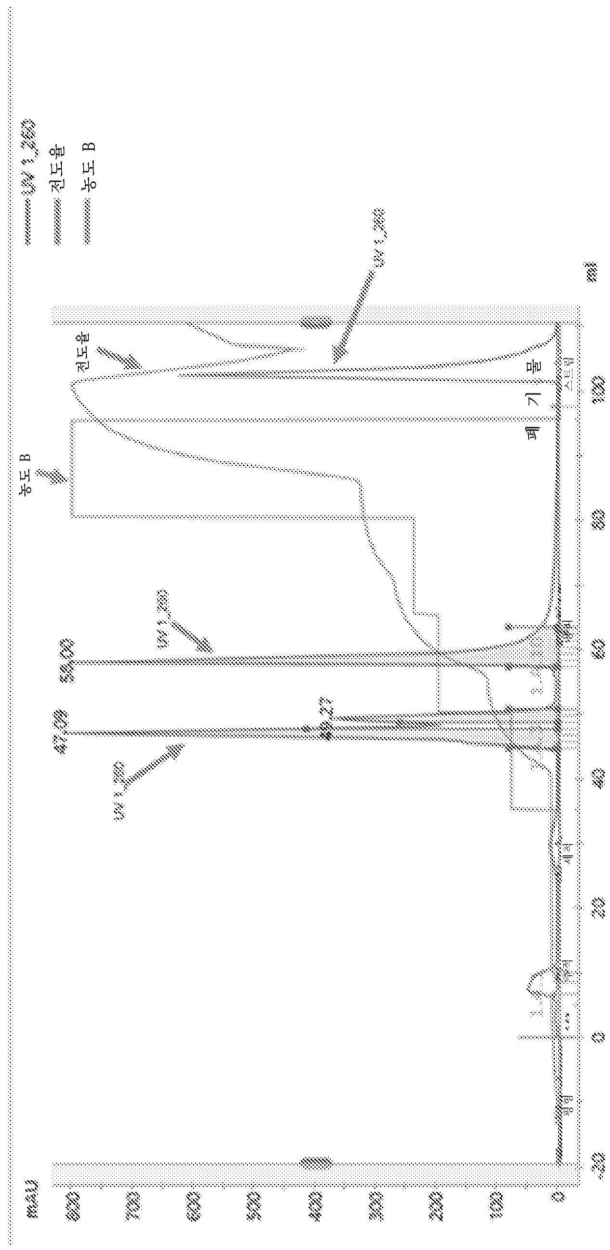
[0669] 구체적으로, 음이온 교환 올리고뉴클레오티드 칼럼 상으로 circRNA 샘플을 주입하였다. 샘플을 변성제(예를 들어, DMSO)로 희석함으로써 제조하거나, 주입 전에 이동상 A(20 mM 비스-트리스 프로판, 6 M 우레아, pH 7.0)에 직접 희석하였다. 초기 크로마토그래피 조건은 85% 이동상 A 및 15% 이동상 B(20 mM 비스-트리스 프로판, 6 M 우레아, 1 M NaCl, pH 7.0)였다. 칼럼을 실행하는 동안 80℃까지 가열하였다. circRNA 및 linRNA의 용리를 최대 10% 이동상 A(20 mM 비스-트리스, 6 M 우레아, pH 7.0) 및 90% 이동상 B(20 mM 비스-트리스, 6 M 우레아, 1 M NaCl, pH 7.0)의 구배를 사용하여 수행하였다. 도 15는 블랭크 주입의 크로마토그램을 보여준다. 도 16에 제시된 바와 같이 CircRNA 및 linRNA 표준물은 별개의 피크를 제공하였다.

[0670] **다른 실시 형태**

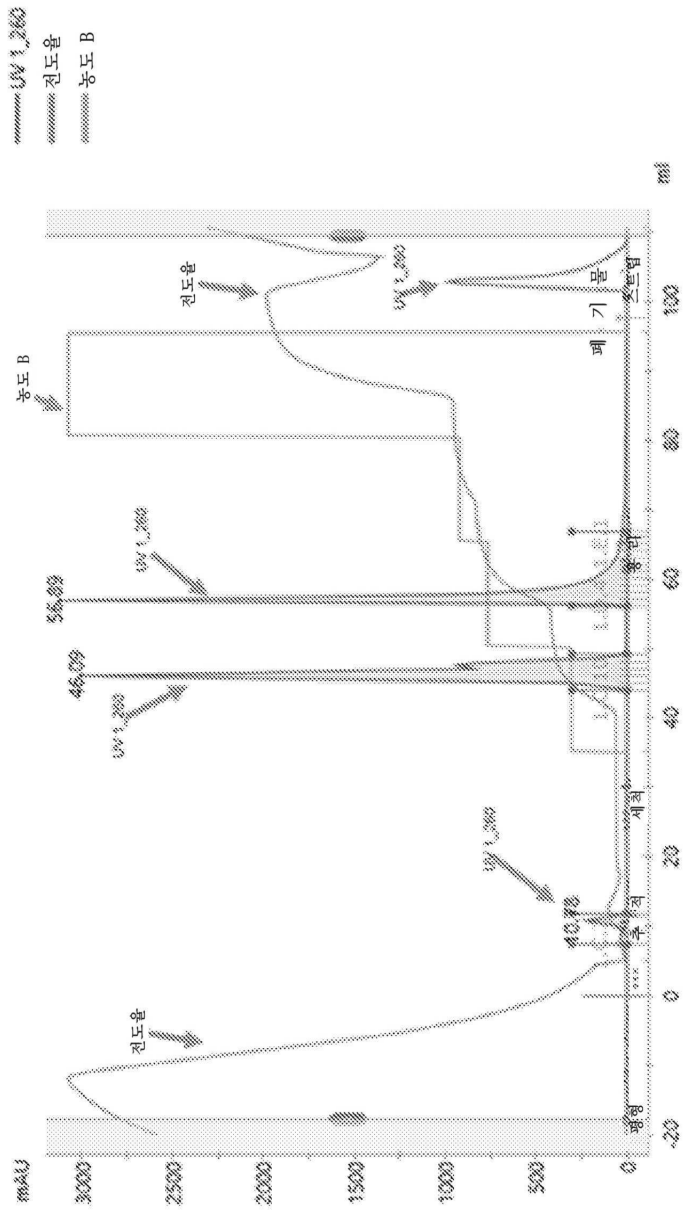
[0671] 상기 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 각 개별 공보, 특허 또는 특허 출원이 그 전체가 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다. 본 발명의 기재된 방법, 제약 조성물, 및 키트의 다양한 변형 및 변동은 본 발명의 범위 및 취지로부터 벗어나지 않으면서 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명을 구체적인 실시 형태와 관련하여 기재하였지만, 본 발명은 추가의 변형이 가능하며 청구된 바와 같은 본 발명은 이러한 구체적인 실시 형태에 과도하게 제한되지 않아야 함이 이해될 것이다. 실제로, 당업자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 기재된 방식의 다양한 변형은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고 본 발명이 관련되는 기술 분야 내의 알려진 통상적인 관행에 해당되는 본 발명으로부터 벗어나는 것을 포함하고 본원에 제시된 필수적인 특색에 적용될 수 있는 본 발명의 모든 변동, 용도 또는 개조를 커버하는 것으로 의도된다.

## 도면

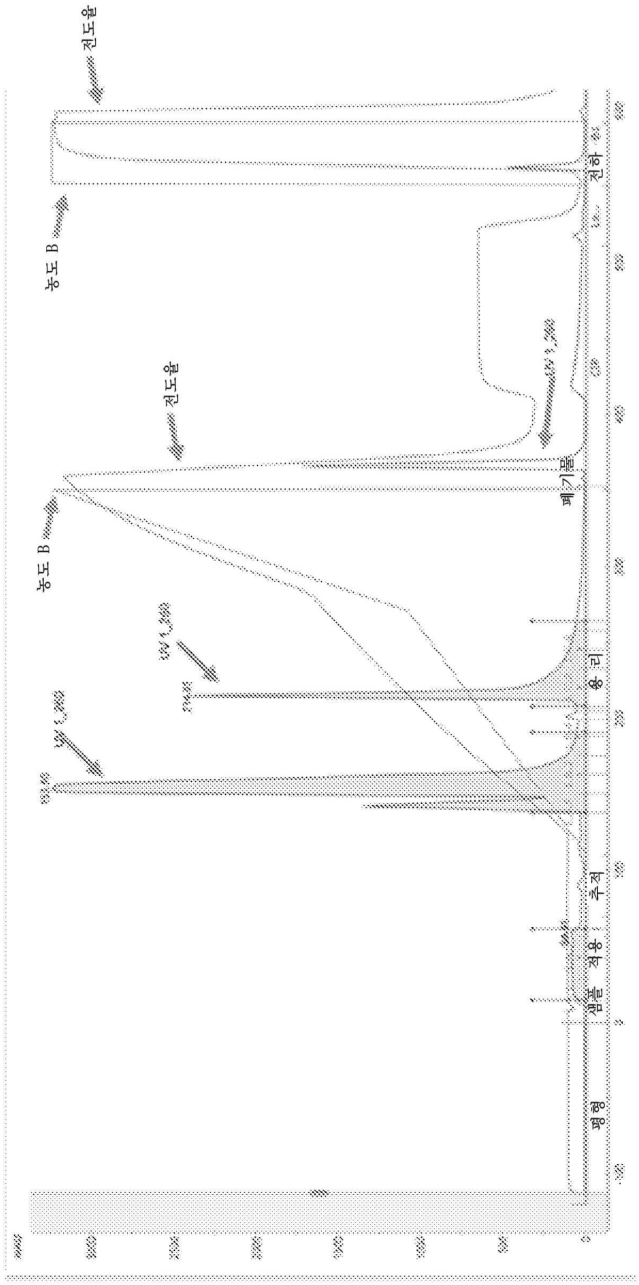
### 도면1



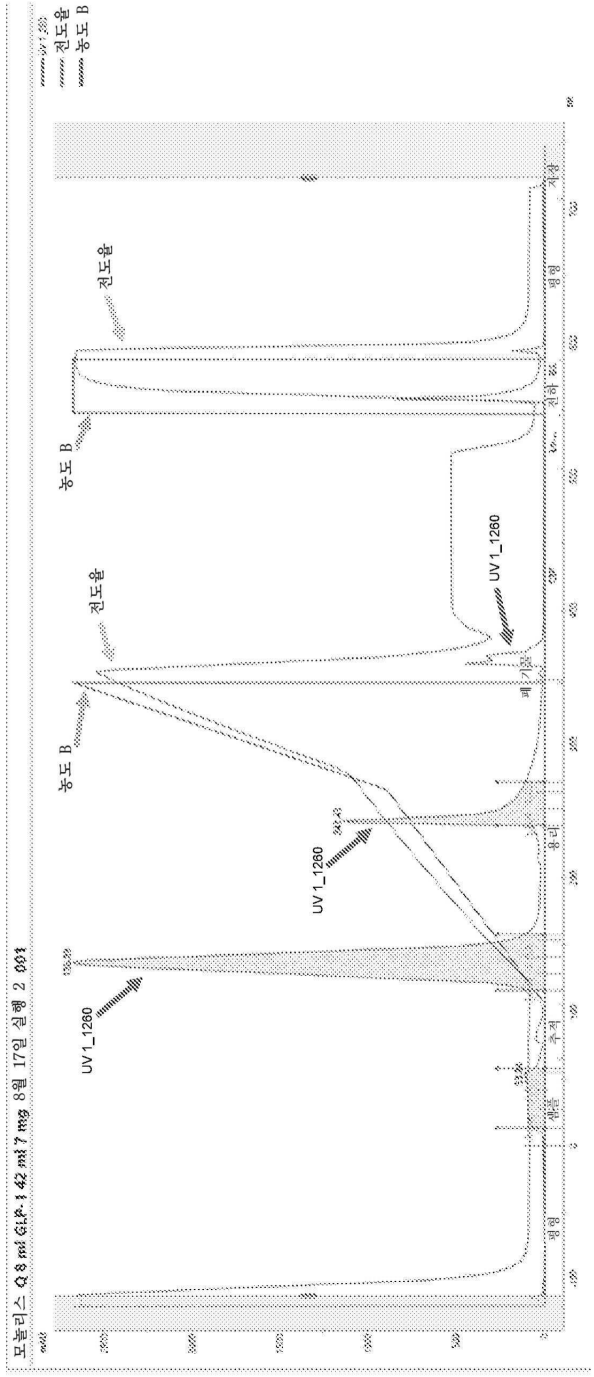
도면2


UV 1_260
전도율
농도 B
mAU
ml
평형
주 적
세척
용 리
폐 기 물
스트립
40.78
46.09
56.89
-20
0
20
40
60
80
100
0
500
1000
1500
2000
2500
3000

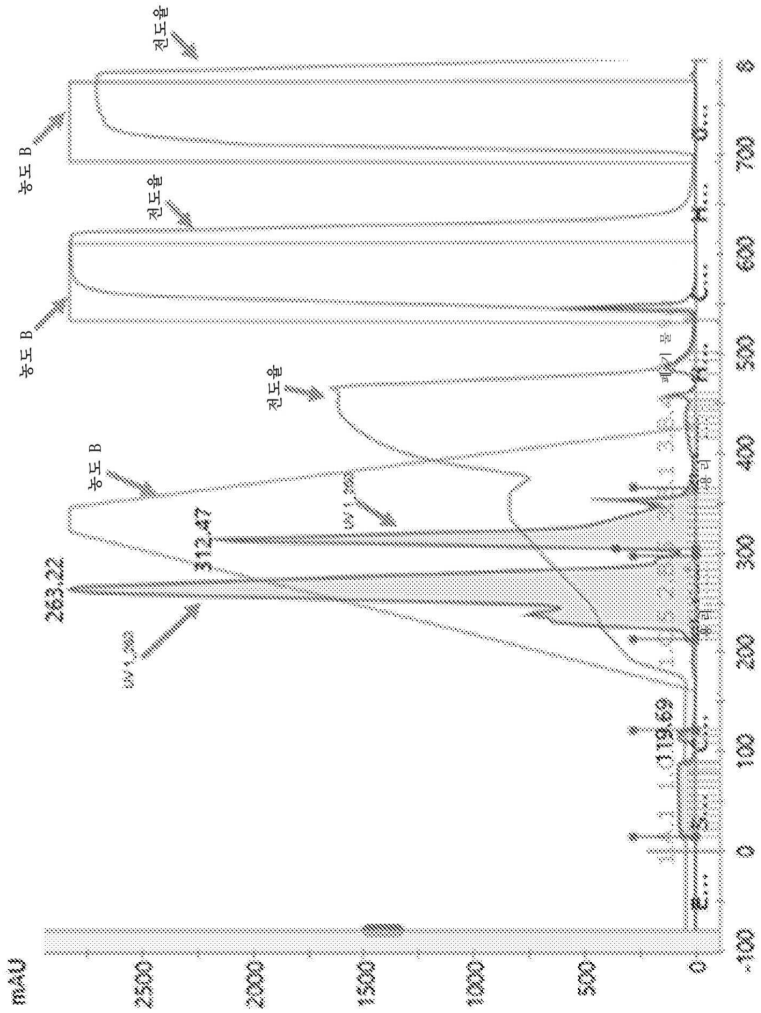
도면3



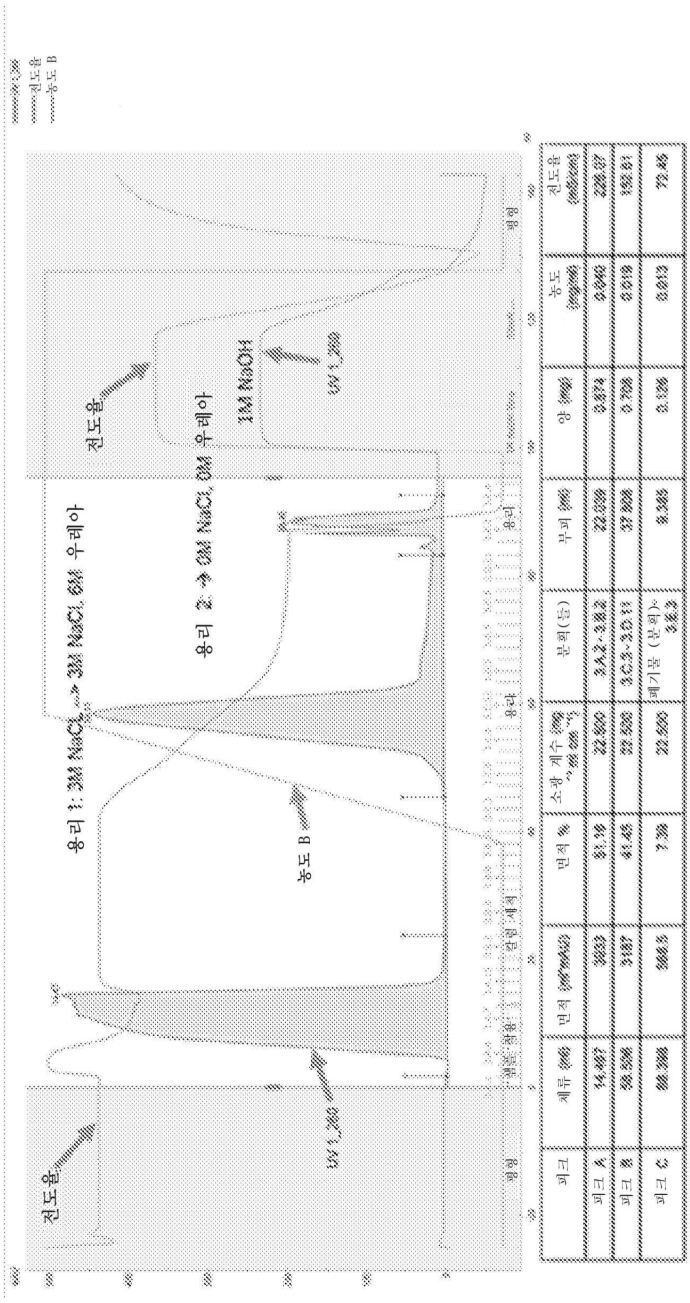
도면4



도면5

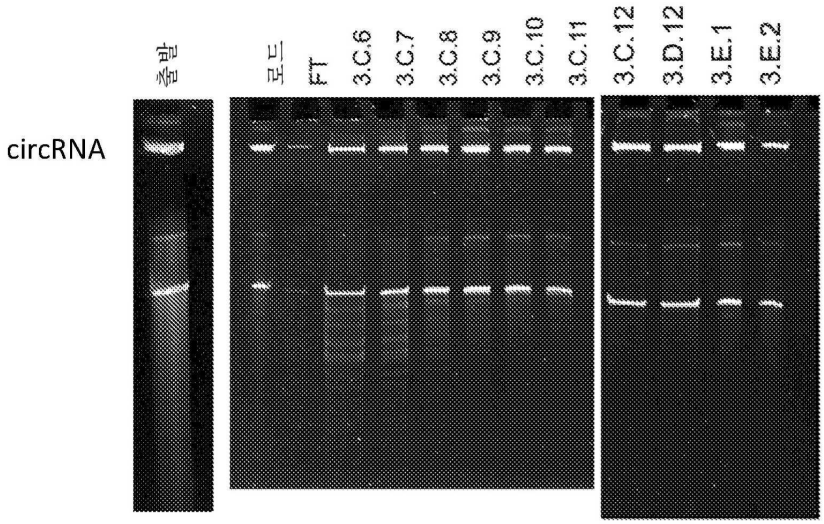

mAU
2500
2000
1500
1000
500
0
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
800
농도 B
농도 B
농도 B
농도 B
전도율
전도율
전도율
전도율
263.22
312.47
119.69

도면6

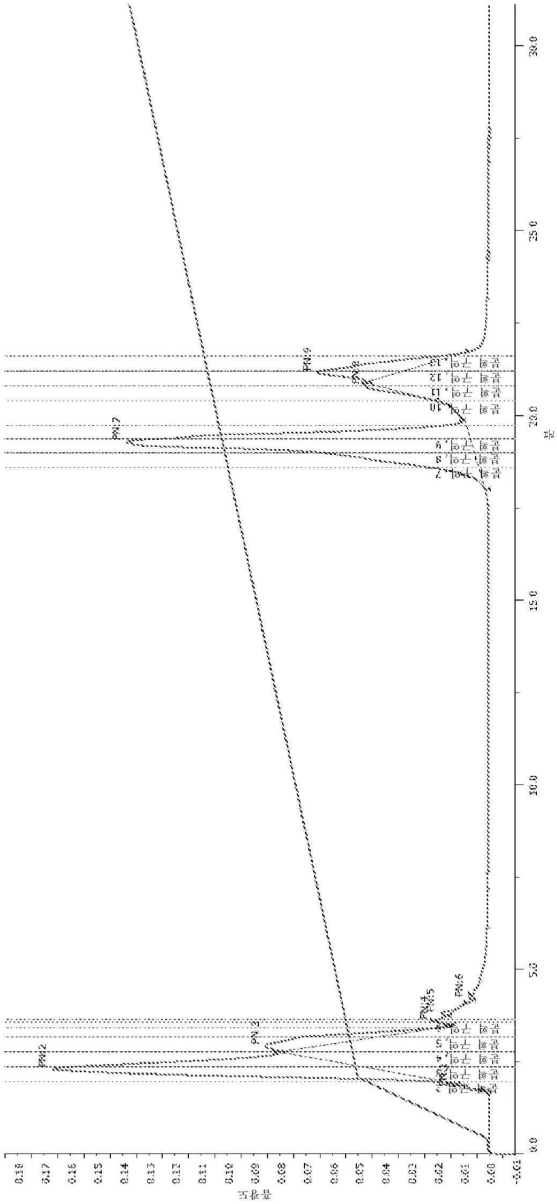



| 피크 | 체류 (ml) | 면적 (ml*mAU) | 면적 % | 소광 계수 (mg ~ml cm⁻¹) | 분획(들) | 부피 (ml) | 양 (mg) | 농도 (mg/ml) | 전도율 (mS/cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 피크 A | 14.467 | 3033 | 81.16 | 22.500 | 3.A.2~3.B.2 | 22.039 | 0.574 | 0.040 | 226.07 |
| 피크 B | 58.508 | 3187 | 41.45 | 22.500 | 3.C.3~3.D.11 | 37.808 | 0.708 | 0.019 | 152.61 |
| 피크 C | 68.308 | 566.5 | 7.38 | 22.500 | 폐기물 (분획)~3.E.3 | 9.345 | 0.126 | 0.013 | 73.45 |

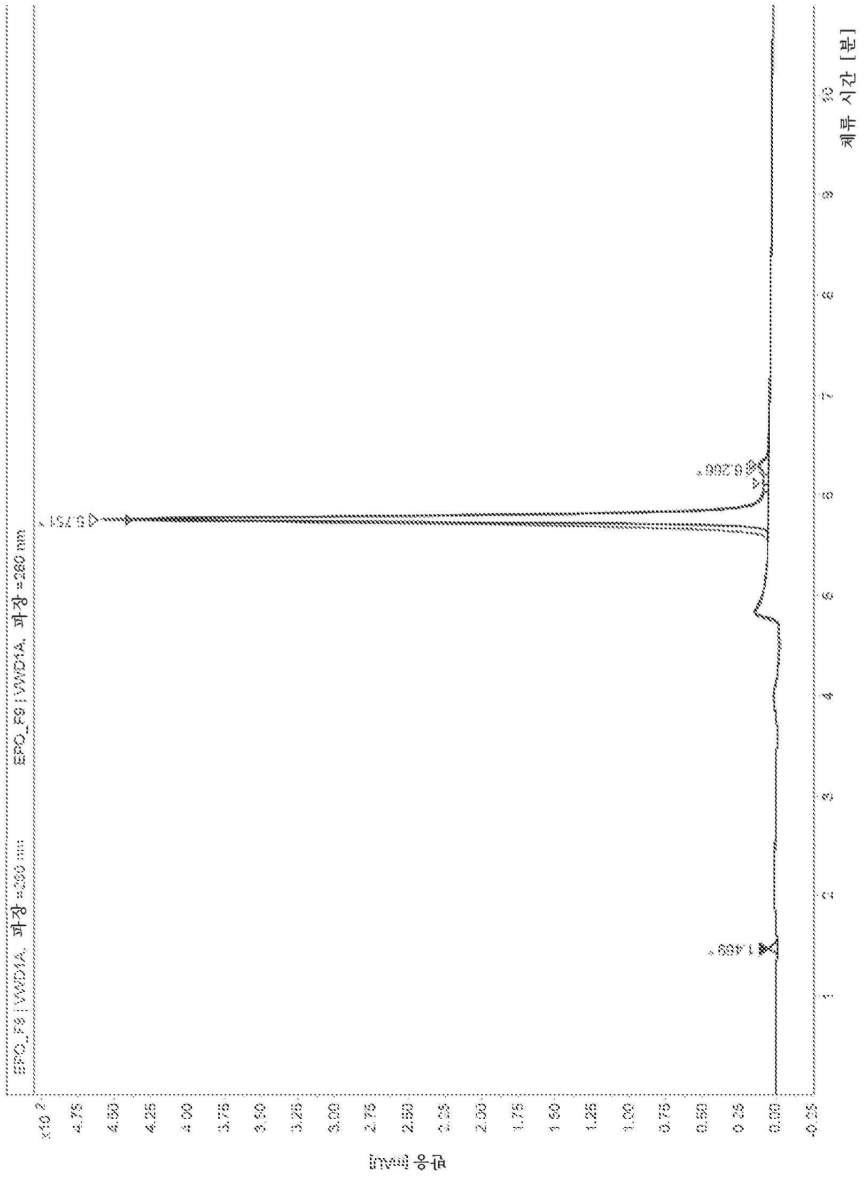
도면7



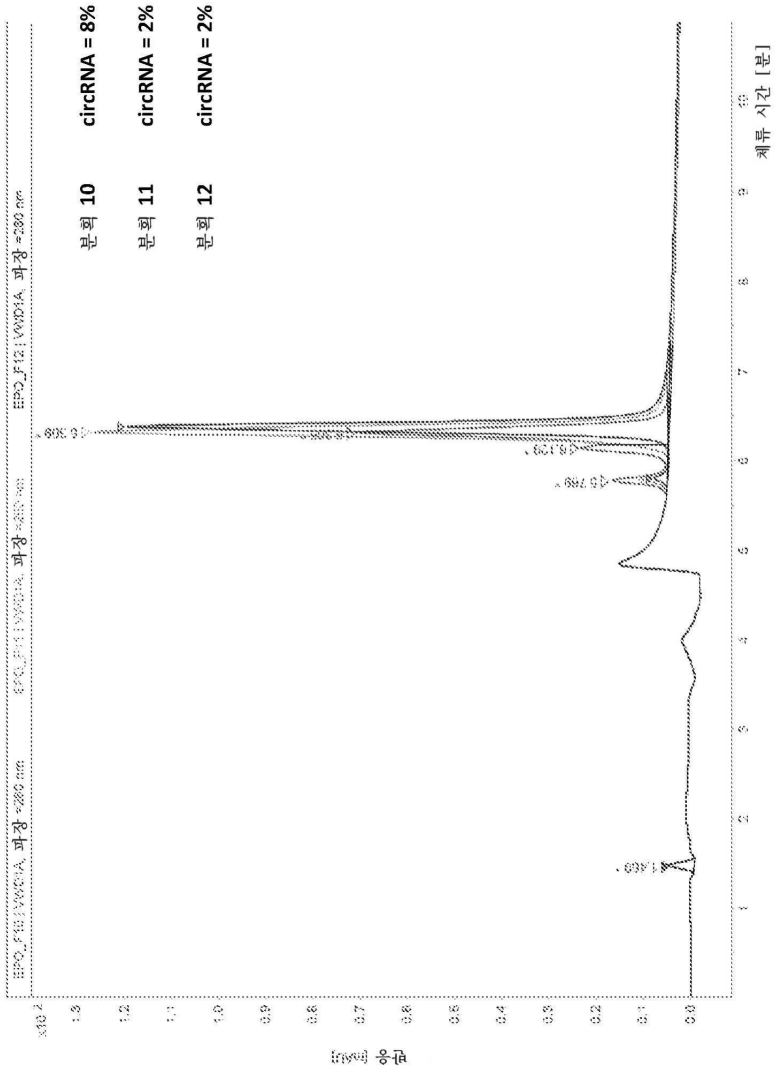
도면8


흡광도
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
-0.01
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
분
PN-2
PN-3
PN-4
PN-5
PN-6
PN-7
PN-8
PN-9
분획 구역 1
분획 구역 2
분획 구역 3
분획 구역 4
분획 구역 5
분획 구역 6
분획 구역 7
분획 구역 8
분획 구역 9
분획 구역 10
분획 구역 11
분획 구역 12
분획 구역 13

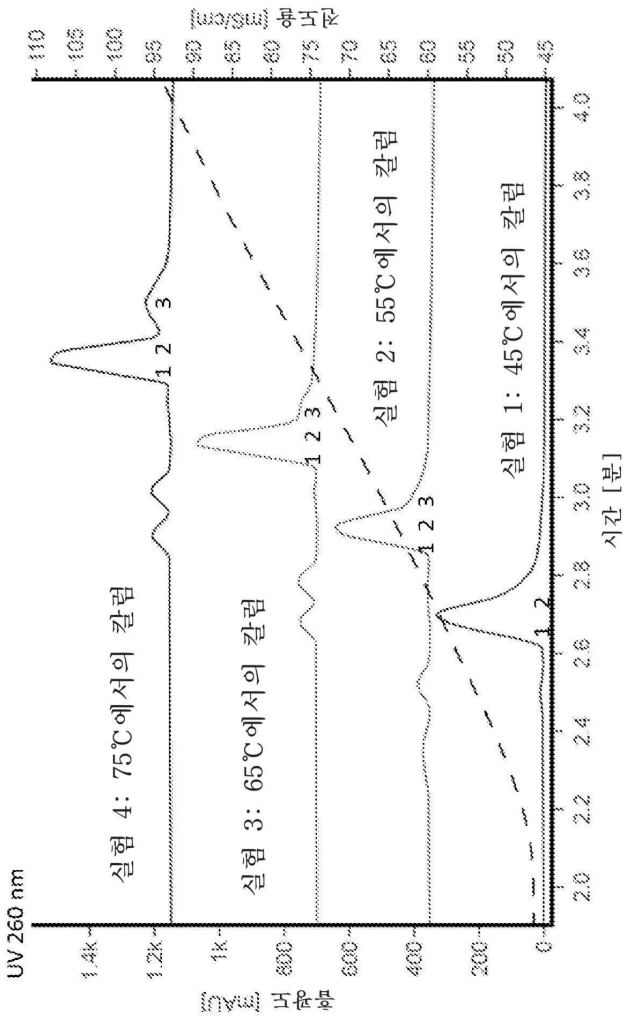
도면9


EPO_F9 | VWD1A, 파장 =280 nm
EPO_F9 | VWD1A, 파장 =280 nm
5.751
6.266
1.469
체류 시간 [분]
반응 [mAU]

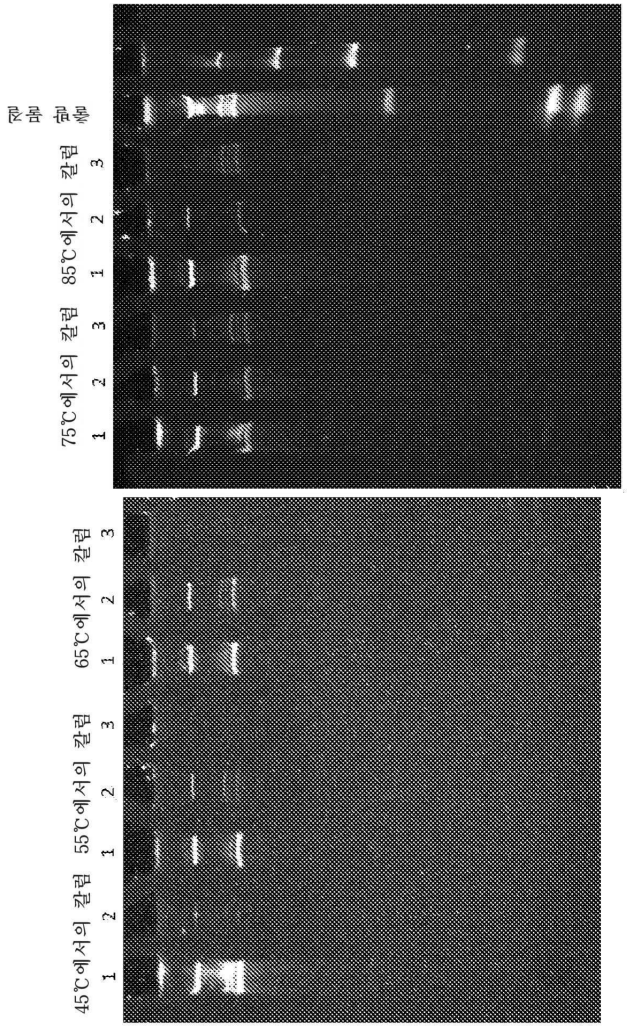
도면10



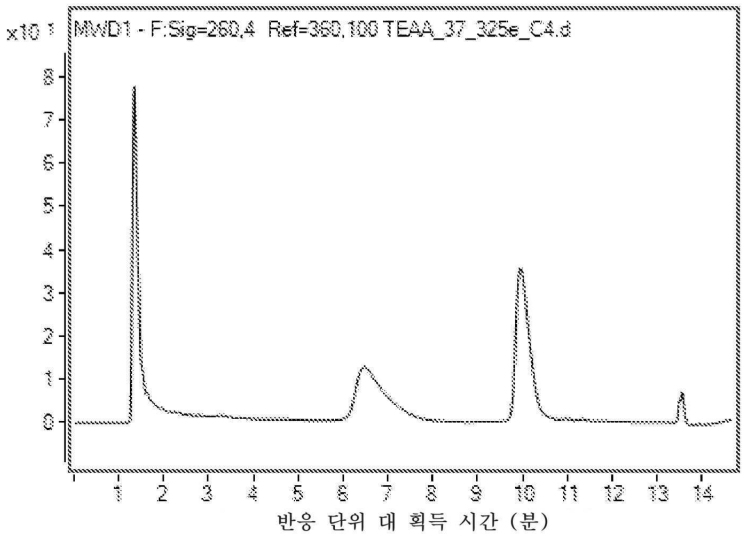
도면11


UV 260 nm
흡광도 [mAU]
전도율 [mS/cm]
시간 [분]
실험 4: 75℃에서의 칼럼
실험 3: 65℃에서의 칼럼
실험 2: 55℃에서의 칼럼
실험 1: 45℃에서의 칼럼
1 2 3
1 2 3
1 2 3
1 2

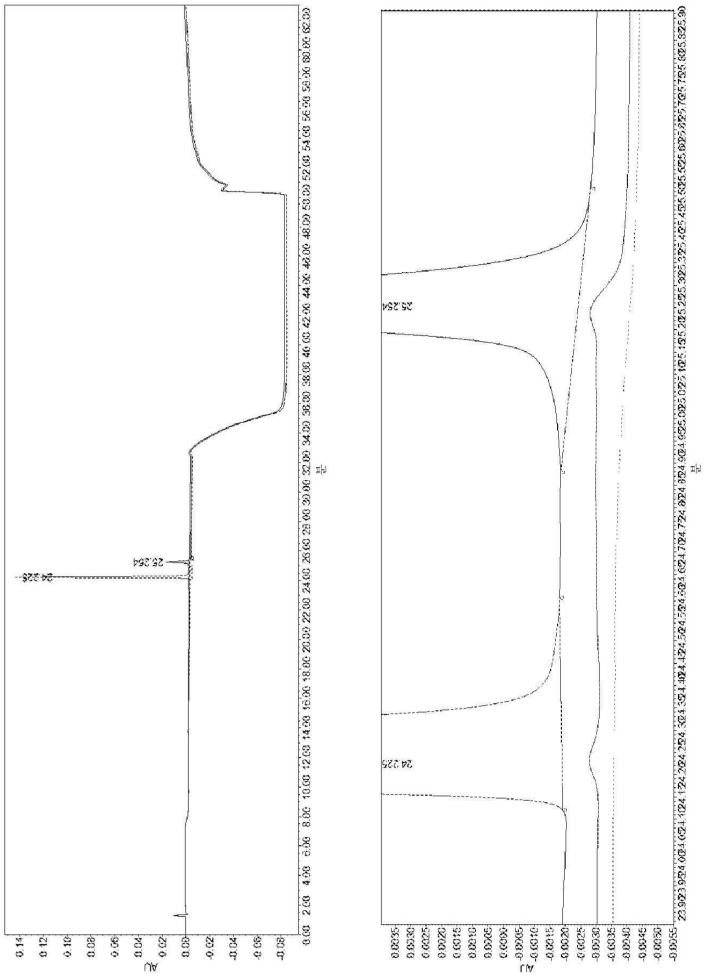
도면12


75℃에서의 칼럼
85℃에서의 칼럼
65℃에서의 칼럼
55℃에서의 칼럼
45℃에서의 칼럼

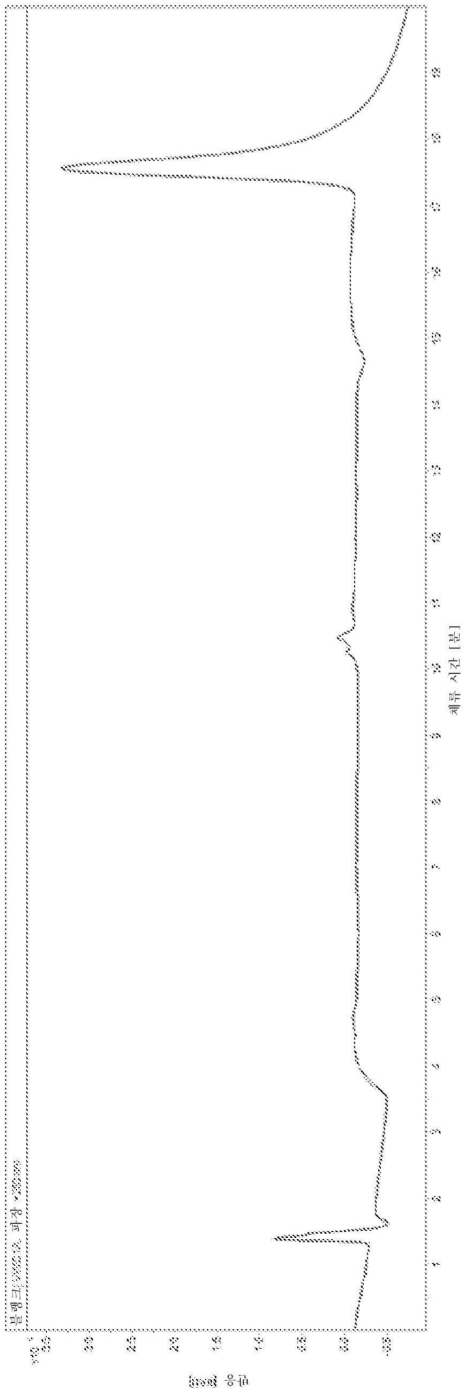
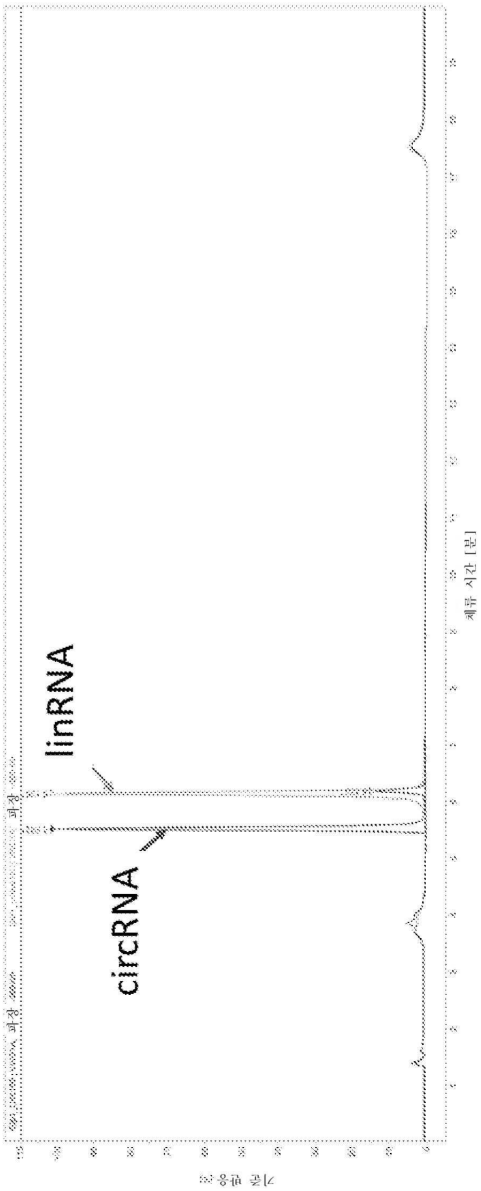
도면13


x10 1
MWD1 - F:Sig=260,4 Ref=360,100 TEAA_37_325e_C4.d
반응 단위 대 획득 시간 (분)

도면14



도면15



도면16