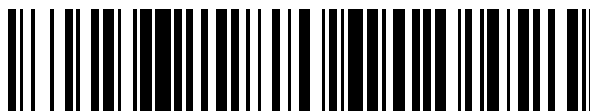


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 561**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/028441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14152966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14714150 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2970955**

54 Título: **Métodos para la purificación de ARN mensajero**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361784996 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.04.2019

73 Titular/es:

TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)
29 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421, US

72 Inventor/es:

HEARTLEIN, MICHAEL;
DEROSA, FRANK;
DIAS, ANUSHA y
KARVE, SHRIRANG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 708 561 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la purificación de ARN mensajero

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La terapia de ARN mensajero se está convirtiendo en un enfoque cada vez más importante para el tratamiento de una variedad de enfermedades. La terapia de ARN mensajero implica la administración de ARN mensajero (ARNm) en un paciente que necesita la terapia y la producción de la proteína codificada por el ARNm dentro del cuerpo del paciente. Por lo tanto, es importante garantizar la producción de un producto de ARNm altamente puro y seguro. Tradicionalmente, la purificación de ARN emplea columnas de giro e implica el uso de disolventes cáusticos o inflamables, como el etanol, que es indeseable para la administración terapéutica y la producción a gran escala.

15 SUMARIO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención proporciona métodos mejorados de ARNm de purificación que es adecuado para la administración como un producto farmacéutico basado en la filtración de flujo tangencial (TFF). Antes de la presente invención, la purificación de ARN emplea típicamente columnas de hilado e implica el uso de disolventes cáusticos o inflamables, como el etanol, que es indeseable para la administración terapéutica y la producción a gran escala. Además, el método de la técnica anterior típicamente no permite la separación de transcripciones incompletas conocidas como abortos prematuros o "shortmers", que se informa que son altamente inmunoestimulantes y cuya presencia puede alterar en gran medida la toxicidad y el perfil de tolerabilidad del ARNm como ingrediente farmacéutico activo (API). El documento WO 98/05673 describe la purificación del ADN plasmídico por filtración de flujo tangencial. El documento WO 2012/077080 describe un método para purificar sustancias diana unidas a partículas de contaminantes mediante filtración de flujo tangencial. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la filtración de flujo tangencial es sorprendentemente eficaz para eliminar reactivos, enzimas, subproductos, en particular, los shortmers, de la mezcla de producción de ARNm. Como se describe aquí, la filtración de flujo tangencial, particularmente en combinación con un tratamiento previo que usa un agente desnaturizante, puede eliminar de manera efectiva los reactivos, enzimas y subproductos que incluyen secuencias de ARN abortadas prematuramente (es decir, shortmers), mientras que se mantiene la integridad del ARNm. Más sorprendentemente, los presentes inventores han demostrado que la filtración de flujo tangencial se puede realizar con éxito usando solo tampones acuosos como disolventes sin usar ningún disolvente cáustico o inflamable. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método más eficaz, confiable y más seguro para purificar ARNm de aplicaciones terapéuticas a gran escala del proceso de fabricación.

[0003] La presente invención proporciona métodos de purificación de ARN mensajero (ARNm), incluyendo las etapas de (a) sintetizar ARNm mediante transcripción *In Vitro* usando los siguientes reactivos: (i) una plantilla de ADN circular que contiene un promotor lineal o; (ii) un conjunto de trifosfatos de ribonucleósido; (iii) un sistema tampón que incluye opcionalmente DTT y iones de magnesio; y (iv) una polimerasa de ARN; y opcionalmente (v) una ADNasa I, una pirofosfatasa y/o un inhibidor de ARNasa; (b) agregar un agente desnaturizante de proteínas a la preparación de la etapa (a), que comprende el ARNm sintetizado *In Vitro*, en donde el agente desnaturizante de proteínas es un agente caotrópico o una alta concentración de sal; y (c) purificar el ARNm de la preparación de la etapa (b) por filtración de flujo tangencial, en donde la filtración de flujo tangencial comprende (i) una presión transmembrana entre 1 y 30 libras por pulgada cuadrada; (ii) una velocidad de alimentación entre 50 y 500 mL/minuto; (iii) un caudal entre 10 y 100 mL/minuto; y (iv) un filtro que tiene un límite de peso molecular nominal de entre 200 kDa y 700 kDa, en el que el ARNm purificado de la etapa (c) contiene niveles indetectables de secuencias de ARN abortadas prematuramente y reactivos enzimáticos utilizados en la síntesis *In Vitro* según lo determinado por electroforesis de gel de agarosa o métodos cromatográficos.

[0004] La etapa (b) comprende añadir un agente desnaturizante de proteínas a la preparación impura. En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende incubar la preparación impura con el agente desnaturizante de proteínas agregado a temperatura ambiente durante aproximadamente 1-10 minutos (por ejemplo, aproximadamente 2-9, 2-8, 2-7, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6 minutos). En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende incubar la preparación impura con el agente desnaturizante de proteínas agregado a temperatura ambiente durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos. En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende incubar la preparación impura con el agente desnaturizante de proteínas añadido a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. En algunas realizaciones, un agente desnaturizante de proteínas adecuado se selecciona del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidinio, KCl, dodecilsulfato de sodio, otros detergentes y combinaciones de los mismos.

[0005] En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende la adición de urea a la preparación impura para lograr una concentración de urea resultante de alrededor de 1 M o más. En algunas realizaciones, la concentración de urea resultante es de aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, 5 M o más, 6 M o más, 7 M o más, 8 M o más, 9 M o más, o 10 M o más.

[0006] En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende la adición de tiocianato de guanidinio a la preparación impura para lograr una concentración de tiocianato de guanidinio resultante de alrededor de 1 M o más. En algunas realizaciones, la concentración de tiocianato de guanidinio resultante es aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, 5 M o más, 6 M o más, 7 M o más, 8 M o más, 9 M o más, o 10 M o más.

[0007] En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende la adición de KCl a la preparación impura para conseguir una concentración de KCl resultante de alrededor de 1 M o más. En algunas realizaciones, la concentración de KCl resultante es aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, o 5 M o más.

[0008] En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza utilizando disolventes solamente acuosos. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza utilizando agua como disolvente. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza a una velocidad de alimentación de aproximadamente 100-200 mL/minuto (por ejemplo, aproximadamente 100-180 mL/minuto, 100-160 mL/minuto, 100-140 mL/minuto, 110-190 mL/minuto, 110-170 mL/minuto, o 110-150 mL/minuto) y/o un caudal de aproximadamente 10-50 mL/minuto (por ejemplo, aproximadamente 10-40 mL/minuto, 10-30 mL/minuto, 20-50 mL/minuto, o 20-40 mL/minuto). En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza a una velocidad de alimentación de aproximadamente 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mL/minuto y/o una velocidad de flujo de aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 mL/minuto.

[0009] En algunas realizaciones, el ARNm purificado de la etapa (c) contiene secuencias indetectables de ARN prematuramente abortadas y/o reactivos enzimáticos utilizados en la síntesis *In Vitro* como se determina por el bromuro de etidio y/o tinción de Coomassie.

[0010] En algunas realizaciones, las secuencias de ARN prematuramente abortadas comprenden menos de 15 bases (por ejemplo, menos de 14, 13, 12, 11, 10, 9 u 8 bases). En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente comprenden aproximadamente 8-12 bases.

[0011] En algunas realizaciones, los reactivos enzimáticos utilizados en la síntesis *In Vitro* comprenden polimerasa ARN T7, ADNasa I, pirofosfatasa, e/o inhibidor de RNasa. En algunas realizaciones, los reactivos enzimáticos usados en la síntesis *In Vitro* comprenden polimerasa de ARN T7.

[0012] En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza antes de un casquillo y cola poli-A se añaden al ARNm sintetizado *In Vitro*. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza después de agregar una tapa y una cola de poli-A al ARNm sintetizado *In Vitro*. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza antes y después de que se agreguen una tapa y una cola de poli-A al ARNm sintetizado *In Vitro*.

[0013] En algunas realizaciones, el ARNm sintetizado *In Vitro* es mayor que aproximadamente 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, o 5 kb de longitud. En algunas realizaciones, el ARNm sintetizado *In Vitro* comprende una o más modificaciones para mejorar la estabilidad. En algunas realizaciones, una o más modificaciones se seleccionan de nucleótidos modificados, esqueletos de fosfato de azúcar modificados, región 5' y/o 3' no traducida. En algunas realizaciones, el ARNm sintetizado *In Vitro* no está modificado.

[0014] En algunas realizaciones, el ARNm purificado de la etapa (c) tiene una integridad mayor que aproximadamente 95% (por ejemplo, mayor que aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más). En algunas realizaciones, el ARNm purificado de la etapa (c) tiene una integridad superior al 98%. En algunas realizaciones, el ARNm purificado a partir de la etapa (c) tiene una integridad superior al 99%. En algunas realizaciones, el ARNm purificado a partir de la etapa (c) tiene una integridad de aproximadamente el 100%.

[0015] La presente invención también proporciona métodos para la fabricación de RNA mensajero (ARNm) incluye las etapas de la síntesis de ARNm *In Vitro*, y purificar los ARNm sintetizados *In Vitro* de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

[0016] Como se usa en el presente documento, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se utilizan como equivalentes. Cualquier número utilizado en esta solicitud con o sin aproximadamente/alrededor de está destinado a cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante.

[0017] Otras características, objetos, y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada que sigue. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, si bien indica realizaciones de la presente invención, se proporciona solo a modo de ilustración, no de limitación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

[0018] Las siguientes figuras son para propósitos de ilustración y no para limitación.

La Figura 1 muestra niveles de proteínas ejemplares en la transcripción *In Vitro* de muestras de ARNm de FFL

purificadas de acuerdo con los métodos proporcionados, incluida la exposición a la urea, junto con varios controles como se muestra por electroforesis en gel y tinción con Coomassie.

La Figura 2 muestra los niveles de ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) a modo de ejemplo en muestras de transcripción *In Vitro* purificadas de acuerdo con los métodos proporcionados en comparación con el ARNm purificado de acuerdo con métodos tradicionales como se muestra mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

La Figura 3 muestra niveles de proteínas ejemplares en muestras de transcripción *In Vitro* de ARNm de FFL purificado de acuerdo con los métodos proporcionados, que incluyen TFF con y sin exposición a urea 5M, en comparación con ARNm purificado de acuerdo con métodos tradicionales de electroforesis en gel y tinción con Coomassie.

La Figura 4 representa los datos de fluorescencia ejemplares reunidos a partir de ARNm de FFL purificado traducido a partir de métodos proporcionados en comparación con ARNm purificado proporcionado de métodos tradicionales.

La Figura 5 muestra niveles de proteína ejemplares de muestras de transcripción *In Vitro* de ARNm de Factor IX (FIX) purificado de acuerdo con los métodos proporcionados, incluida la exposición a proteinasa K y/o urea 5M, en comparación con ARNm purificado de acuerdo con los métodos tradicionales de electroforesis en gel y tinción con Coomassie.

La Figura 6 muestra los niveles de ARNm de FIX a modo de ejemplo en muestras de transcripción *In Vitro* purificadas de acuerdo con los métodos proporcionados como se muestra mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

La Figura 7 muestra niveles de proteínas ejemplares en muestras de transcripción *In Vitro* de ARNm regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) purificado según los métodos proporcionados, incluida la exposición a KCl 2M, en comparación con ARNm purificado según métodos tradicionales de electroforesis en gel y tinción con Coomassie.

La Figura 8 muestra los niveles de ARNm de CFTR a modo de ejemplo en muestras de transcripción *In Vitro* purificadas según los métodos proporcionados, incluida la exposición a KCl 2M, como se muestra mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

La Figura 9 muestra los niveles de ARNm de CFTR a modo de ejemplo en muestras de transcripción *In Vitro* purificadas de acuerdo con los métodos proporcionados, incluida la exposición a KCl 2M, en comparación con el ARNm purificado de acuerdo con los métodos tradicionales, como se muestra por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

DEFINICIONES

[0019] A fin de que la presente invención se entenderá más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

[0020] *Animal*: Como se usa aquí, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a los humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal manipulado genéticamente y/o un clon.

[0021] *Aproximadamente o alrededor de*: Como se usa aquí, el término "aproximadamente" o "alrededor de", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

[0022] *Biológicamente activo*: Como se usa aquí, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y en particular en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico en ese organismo, se considera biológicamente activo.

[0023] Expresión: Como se usa en el presente documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la traducción de un ARNm en un polipéptido (por ejemplo, cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo), montar múltiples polipéptidos (por ejemplo, cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo) en una proteína intacta (por ejemplo, anticuerpo) y/o modificación postraduccional de un polipéptido o proteína completamente ensamblada (por ejemplo, anticuerpo). En esta aplicación, los términos "expresión" y "producción", y su equivalente gramatical, se usan de manera intercambiable.

[0024] Funcional: Como se usa en este documento, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que se exhibe una propiedad y/o la actividad por la que se caracteriza.

[0025] Mejorar, aumentar o reducir: Como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores relativos a una medición de línea de base, tales como una medición en el mismo individuo antes de iniciar el tratamiento descrito en este documento, o una medición en un sujeto de control (o sujeto de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito en este documento. Un "sujeto de control" es un sujeto que padece la misma forma de enfermedad que el sujeto que está siendo tratado, que tiene aproximadamente la misma edad que el sujeto que está siendo tratado.

[0026] Impurezas: como se usa en este documento, el término "impurezas" se refiere a sustancias dentro de una cantidad limitada de líquido, gas o sólido, que difieren de la composición química del material o compuesto diana. Las impurezas también se conocen como contaminantes.

[0027] In Vitro: Como se usa aquí, el término "*In Vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, por ejemplo, en un recipiente de tubo de ensayo o reacción, en cultivo celular, etc, en lugar de dentro de un organismo multi-celular.

[0028] In Vivo: Como se usa aquí, el término "*In Vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo multicelular, como un animal no humano y humanos. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (en oposición a, por ejemplo, sistemas *In Vitro*).

[0029] Aislado: Como se usa aquí, el término "aislado" se refiere a una sustancia y/o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los componentes con los que se asoció cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o más de aproximadamente el 99% de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados son aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente el 99%, o más del 99% de pureza. Como se usa en este documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Como se usa en el presente documento, el cálculo del porcentaje de pureza de sustancias y/o entidades aisladas no debe incluir excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.).

[0030] ARN mensajero (ARNm): como se usa en el presente documento, el término "ARN mensajero (ARNm)" se refiere a un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido. El ARNm como se usa en este documento abarca tanto el ARN modificado como el no modificado. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes.

[0031] Integridad de ARNm: Como se usa aquí, el término "integridad de ARNm" generalmente se refiere a la calidad de ARNm. En algunas realizaciones, la integridad del ARNm se refiere al porcentaje de ARNm que no se degrada después de un proceso de purificación (por ejemplo, filtración de flujo tangencial). La integridad del ARNm se puede determinar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa de ARN (por ejemplo, Ausubel y otros, John Wiley & Sons, Inc., 1997. *Current Protocols in Molecular Biology*).

[0032] Ácido nucleico: Como se usa aquí, el término "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que es o puede ser incorporado en una cadena de polinucleótido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que es o puede incorporarse a una cadena de polinucleótido a través de un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a una cadena de polinucleótido que comprende residuos de ácido nucleico individuales. En algunas realizaciones, el "ácido nucleico" abarca el ARN, así como el ADN y/o el ADNc de cadena simple y/o de doble

cadena. Además, los términos "ácido nucleico", "ADN", "ARN" y/o términos similares incluyen análogos de ácido nucleico, es decir, análogos que tienen un esqueleto de fosfodiéster distinto al de la columna vertebral. Por ejemplo, los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, se consideran dentro del alcance de la presente divulgación. El término "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y/o codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y/o ARN pueden incluir intrones. Los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinantes y opcionalmente purificarse, sintetizarse químicamente, *etc.* Cuando sea apropiado, por ejemplo, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, los ácidos nucleicos pueden comprender análogos de nucleósidos tales como análogos que tienen bases modificadas químicamente o azúcares, modificaciones del esqueleto, *etc.* Una secuencia de ácido nucleico se presenta en la dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosa, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina); análogos de nucleósidos (*p. ej.*, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metilo adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilo-citidina, C-5 propinilo-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinilo-uridina, C5-propinilo-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxogadenosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases químicamente modificadas; bases biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces 5'-N-fosforamida). En algunas realizaciones, la presente invención se dirige específicamente a "ácidos nucleicos no modificados", es decir, ácidos nucleicos (por ejemplo, polinucleótidos y residuos, incluidos nucleótidos y/o nucleósidos) que no se han modificado químicamente para facilitar o lograr el suministro.

[0033] Paciente: Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que se puede administrar una composición proporcionada, por ejemplo, para propósitos experimental, diagnóstico, profiláctico, cosmético, y/o terapéutico. Los pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y/o humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un humano. Un humano incluye formas pre y post natales.

[0034] Farmacéuticamente aceptable: El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí, se refiere a sustancias que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuadas para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, alérgica respuesta u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable entre beneficio y riesgo.

[0035] Secuencias de ARN prematuramente abortadas: El término "secuencias de ARN prematuramente abortadas", como se usa aquí, se refiere a los productos incompletos de una reacción de síntesis de ARNm (por ejemplo, una reacción de síntesis *In Vitro*). Por diversas razones, polimerasas de ARN no siempre completan la transcripción de una plantilla de ADN; Es decir, la síntesis de ARN termina prematuramente. Las posibles causas de la terminación prematura de la síntesis de ARN incluyen la calidad de la plantilla de ADN, las secuencias terminadoras de polimerasa para una polimerasa particular presente en la plantilla, los tampones degradados, la temperatura, el agotamiento de ribonucleótidos y las estructuras secundarias de ARNm. Las secuencias de ARN abortadas prematuramente pueden tener cualquier longitud que sea menor que la longitud prevista del producto transcripcional deseado. Por ejemplo, las secuencias de ARNm abortadas prematuramente pueden ser menos de 1.000 bases, menos de 500 bases, menos de 100 bases, menos de 50 bases, menos de 40 bases, menos de 30 bases, menos de 20 bases, menos de 15 bases, menos de 10 bases o menos.

[0036] Sal: Como se usa aquí, el término "sal" se refiere a un compuesto iónico que resulta o puede resultar de una reacción de neutralización entre un ácido y una base.

[0037] Sujeto: Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdos, oveja, caballo, humano o primate). Un humano incluye formas pre y post natales. En muchas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta a un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa aquí de manera intercambiable con "individual" o "paciente". Un sujeto puede padecer o es susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede o no mostrar síntomas de la enfermedad o trastorno.

[0038] Sustancialmente: Como se usa aquí, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir extensión o grado de una propiedad característica o de interés total o casi total. Una persona con experiencia ordinaria en las artes biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, se completan y/o proceden a completarse o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

[0039] Sustancialmente libre: Como se usa aquí, el término "sustancialmente libre" se refiere a un estado en el que sea retirada relativamente poca o ninguna cantidad de una sustancia (por ejemplo, secuencias de ARN

prematuramente abortadas) están presentes. Por ejemplo, "sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente" significa que las secuencias de ARN abortadas prematuramente están presentes a un nivel inferior a aproximadamente el 5%, 4%, 3%, 2%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7% %, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% o menos (p/p) de la impureza. Alternativamente, "sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente" significa que las secuencias de ARN abortadas prematuramente están presentes a un nivel inferior a aproximadamente 100 ng, 90 ng, 80 ng, 70 ng, 60 ng, 50 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg, 10 pg, o menos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0040] La presente invención proporciona métodos mejorados para la purificación de ARNm a partir de una preparación impura (por ejemplo, mezcla de reacción de síntesis *In Vitro*) basada en la filtración de flujo tangencial. El método de la invención de acuerdo con la presente invención incluye las etapas de (a) sintetizar ARNm mediante transcripción *In Vitro* usando los siguientes reactivos: (i) una plantilla de ADN lineal o circular que contiene un promotor; (ii) un conjunto de trifosfatos de ribonucleósido; (iii) un sistema tampón que incluye opcionalmente DTT e iones de magnesio; y (iv) una polimerasa de ARN; y opcionalmente (v) una ADNasa I, una pirofosfatasa y/o un inhibidor de ARNasa; (b) agregar un agente desnaturalizante de proteínas a la preparación de la etapa (a), que comprende el ARNm sintetizado *In Vitro*, en donde el agente desnaturalizante de proteínas es un agente caotrópico o una alta concentración de sal; y (c) purificar el ARNm de la preparación de la etapa (b) por filtración de flujo tangencial, en donde el ARNm purificado de la etapa (c) en donde la filtración de flujo tangencial comprende (i) una presión transmembrana entre 1 y 30 libras por pulgada cuadrada; (ii) una velocidad de alimentación entre 50 y 500 mL/minuto; y (iii) un caudal entre 10 y 100 mL/minuto, en el que el ARNm purificado de la etapa (c) contiene niveles no detectables de secuencias de ARN abortadas prematuramente y reactivos enzimáticos utilizados en la síntesis *In Vitro* según lo determinado por electroforesis en gel de agarosa o métodos cromatográficos.

[0041] Se describen varios aspectos de la invención en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

Síntesis de ARNm

[0042] El ARNm se suele considerar como el tipo de ARN que transporta información del ADN al ribosoma. La existencia de ARNm suele ser muy breve e incluye el procesamiento y la traducción, seguidos de la degradación. Típicamente, en los organismos eucarióticos, el procesamiento del ARNm comprende la adición de una "tapa" en el extremo N-terminal (5'), y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). Una cápsula típica es una cápsula de 7-metilguanosina, que es una guanosina que está unida a través de un enlace 5'-5'-trifosfato al primer nucleótido transcrito. La presencia de la tapa es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucarióticas. La cola es típicamente un evento de poliadenilación por el cual se agrega un resto poliadenililo al extremo 3' de la molécula de ARNm. La presencia de esta "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de la exonucleasa. El ARN mensajero es traducido por los ribosomas en una serie de aminoácidos que forman una proteína.

[0043] Los ARNm se sintetizan a través de la transcripción *In Vitro* (TIV). En resumen, la TIV se realiza típicamente con una plantilla de ADN lineal o circular que contiene un promotor, un conjunto de trifosfatos de ribonucleótido, un sistema de tampón que puede incluir DTT e iones de magnesio, y una polimerasa de ARN apropiada (por ejemplo, polimerasa de ARN T3, T7 o SP6), ADNasa I, pirofosfatasa e/o inhibidor de ARNasa. Las condiciones exactas variarán según la aplicación específica. La presencia de estos reactivos es indeseable en el producto final de acuerdo con varias realizaciones y, por lo tanto, puede denominarse impurezas y una preparación que contiene una o más de estas impurezas puede denominarse una preparación impura.

[0044] Los ARNm pueden purificarse a escala comercial. En algunas realizaciones, el ARNm se purifica en una escala de 0,1 gramos, 0,5 gramos, 1 gramo, 2 gramos, 3 gramos, 4 gramos, 5 gramos, 6 gramos, 7 gramos, 8 gramos, 9 gramos, 10 gramos, 20 gramos, 30 gramos, 40 gramos, 50 gramos, 60 gramos, 70 gramos, 80 gramos, 90 gramos, 100 gramos, 200 gramos, 300 gramos, 400 gramos, 500 gramos, 600 gramos, 700 gramos, 800 gramos, 900 gramos, o 1.000 gramos por lote.

[0045] De acuerdo con diversas realizaciones, la presente invención puede usarse para purificar ARNm sintetizado *In Vitro* de una variedad de longitudes. En algunas realizaciones, la presente invención se puede usar para purificar ARNm sintetizado *In Vitro* de más de aproximadamente 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 11 kb, 12 kb, 13 kb, 14 kb o 15 kb de longitud. En algunas realizaciones, la presente invención se puede usar para purificar ARNm que contiene una o más modificaciones que típicamente mejoran la estabilidad. En algunas realizaciones, una o más modificaciones se seleccionan de nucleótidos modificados, esqueletos de fosfato de azúcar modificados, región 5' y/o 3' no traducida. En algunas realizaciones, la presente invención se puede usar para purificar ARNm sintetizado *In Vitro* que no está modificado.

[0046] Típicamente, los ARNm se modifican para mejorar la estabilidad. Las modificaciones del ARNm pueden

incluir, por ejemplo, modificaciones de los nucleótidos del ARN. Un ARNm modificado puede incluir, por ejemplo, modificaciones de la estructura principal, modificaciones de azúcar o modificaciones de base. En algunas realizaciones, el anticuerpo que codifica ARNm (por ejemplo, cadena pesada y cadena ligera que codifica ARNm) puede sintetizarse a partir de nucleótidos naturales y/o análogos de nucleótidos (nucleótidos modificados) que incluyen, entre otros, purinas (adenina (A), guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C), uracilo (U)) y análogos de nucleótidos modificados o derivados de purinas y pirimidinas, como por ejemplo 1-metilo-adenina, 2-metilo-adenina, 2-metil-N-6-isopentenil-adenina, N6-metilo-adenina, N6-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metilo-citosina, 4-acetilo-citosina, 5-metilo-citosina, 2,6-diaminopurina, 1-metilo-guanina, 2-metilo-guanina, 2,2-dimetilo-guanina, 7-metilo-guanina, inosina, 1-metilo-inosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidro-uracilo, 2-tio-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-carboximetilaminometilo-2-tio-uracilo, 5-(carboxihidroximetilo)-uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetilaminometilo-uracilo, 5-metilo-2-tio-uracilo, 5-metilo-uracilo, N-uracil-5 éster metílico del ácido oxiacético, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tio-uracilo, 5'-metoxycarbonilmetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, ácido uracil-5-oxiacético, éster metílico, ácido uracil-5-oxiacético (v), 1-metilo-pseudouracilo, queosina, β-D-manosilo-queosina, wybutoxosina y fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, 7-deazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. La preparación de tales análogos es conocida por un experto en la técnica, por ejemplo, de la patente de EE.UU. N° 4.373.071, Patente de EE.UU. N° 4.401.796, Patente de EE.UU. N° 4.415.732, Patente de EE.UU. N° 4.458.066, Patente de EE.UU. N° 4.500.707. Patente de EE.UU. N° 4.668.777. Patente de EE.UU. N° 4.973.679, Patente de EE.UU. N° 5.047.524, Patente de EE.UU. N° 5.132.418, Patente de EE.UU. N° 5.153.319, Patente de EE.UU. N°s 5.262.530 y 5.700.642.

[0047] Típicamente, la síntesis de ARNm incluye la adición de un "tope" en el extremo de N-terminal (5'), y una 'cola' en el extremo de C-terminal (3'). La presencia de la tapa es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucarióticas. La presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de la exonucleasa.

[0048] Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ARNm incluyen una estructura de tapa 5'. Una tapa 5' se agrega típicamente de la siguiente manera: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; el trifosfato de guanosina (GTP) se agrega luego a los fosfatos terminales a través de una transferasa de guanilo, produciendo un enlace 5'5' trifosfato; y el 7-nitrógeno de la guanina se metila luego por una metiltransferasa. Los ejemplos de estructuras de tapa incluyen, pero no se limitan a, m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

[0049] En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una región no traducida 5' y/o 3'. En algunas realizaciones, una región 5' no traducida incluye uno o más elementos que afectan la estabilidad o traducción de un ARNm, por ejemplo, un elemento sensible al hierro. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' puede tener una longitud de aproximadamente 50 a 500 nucleótidos.

[0050] En algunas realizaciones, una región no traducida 3' incluye uno o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para las proteínas que afectan la estabilidad de la ubicación de un ARNm en una célula, o uno o más sitios de unión para ARNm. En algunas realizaciones, una región 3' no traducida puede tener una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos o más.

[0051] La presente invención puede usarse para purificar los ARNm que codifican una variedad de proteínas. Los ejemplos no limitantes de la purificación de los ARNm que codifican luciferasa de luciérnaga, Factor IX y CFTR, se describen en detalle en la sección de Ejemplos.

Condiciones de desnaturalización y agentes de desnaturalización

[0052] Típicamente, el cambio de la conformación de un ácido nucleico o proteína, ya sea temporal o permanentemente mediante la interrupción de las fuerzas intermoleculares se llama desnaturalización. La desnaturalización resulta en un cambio estructural y, a menudo, en una pérdida de actividad. Dado que la conformación nativa de una molécula suele ser la más soluble en agua, la ruptura de las estructuras secundarias y terciarias de una molécula puede causar cambios en la solubilidad y puede provocar la precipitación de la proteína o del ácido nucleico de la solución. Sorprendentemente, como se describe en el presente documento, el uso de una condición de desnaturalización en combinación con la filtración de flujo tangencial (TFF) puede facilitar la purificación del ARNm mientras que se mantiene la integridad del ARNm.

[0053] Tal como se utiliza aquí, el término "condición desnaturalizante" se refiere a cualquier condiciones químicas o físicas que puede causar la desnaturalización. Condiciones desnaturalizantes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, reactivos químicos, altas temperaturas, pH extremo, etc.

[0054] En algunas realizaciones de la descripción, una condición de desnaturalización se logra mediante la adición de uno o más agentes desnaturalizantes a una preparación impura contiene ARNm para ser purificado. En algunas realizaciones, un agente desnaturalizante adecuado es una proteína y/o un agente desnaturalizante de ADN. En algunas realizaciones, un agente desnaturalizante puede ser: 1) una enzima (tal como una proteinasa de serina o una ADNasa), 2) un ácido, 3) un disolvente, 4) un agente de reticulación, 5) un agente caotrópico, 6) un agente

reductor, y/o 7) alta fuerza iónica a través de concentraciones de alto contenido de sal. En algunas realizaciones, un agente particular puede caer en más de una de estas categorías.

[0055] En algunas realizaciones de la descripción, una o más enzimas se pueden usar como agentes desnaturalizantes para degradar las proteínas y las plantillas de ADN utilizadas en la síntesis de ARNm. En algunas realizaciones, las enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, proteasas de serina tales como proteasas de serina de quimotripsina y similares a quimotripsina, proteasas de serina de tripsina y similares a tripsina, proteasas de serina similares a elastasa y similares a elastasa, y combinaciones de las mismas, desoxirribonucleasas (DNasas) tales como desoxirribonucleasa I, II y/o IV, enzimas de restricción tales como EcoRI, EcoRII, BamHI, HindIII, SpeI, SphI, StuI, XbaI y combinaciones de las mismas.

[0056] En algunas realizaciones de la descripción, un ácido puede ser utilizado como un agente desnaturalizante. En algunas realizaciones, un ácido adecuado puede ser ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido ascórbico, ácido sulfosalicílico y combinaciones de los mismos.

[0057] En algunas realizaciones de la descripción, un disolvente puede usarse como un agente desnaturalizante. En algunas realizaciones, un disolvente puede ser alcohol isopropílico, acetona, cetona de etilo de metilo, cetona de isobutilo de metilo, etanol, metanol, denatonio y combinaciones de los mismos.

[0058] En algunas realizaciones de la invención, un agente cootrópico puede ser demandado como un agente desnaturalizante. Los agentes cootrópicos son sustancias que alteran la estructura de macromoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos al interferir con fuerzas no covalentes, como los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals. En algunas realizaciones, un agente cootrópico puede ser urea, tiourea, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, acetato de litio, cloruro de magnesio, dodecilo sulfato de sodio, perclorato de litio y combinaciones de los mismos.

[0059] En algunas realizaciones de la invención, una preparación impura que contiene ARNm para purificarse se trata con urea. En algunas realizaciones, se agrega una cantidad de urea de modo que la concentración de urea resultante sea aproximadamente 1M o más. En algunas realizaciones, la urea se agrega de tal manera que la concentración de urea resultante sea aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, 5 M o más, 6 M o más, 7 M o más, 8 M o más, 9 M o más, o 10 M o más. En algunas realizaciones, una preparación impura que contiene ARNm a purificar se trata con tiocianato de guanidinio. En algunas realizaciones, se agrega una cantidad de tiocianato de guanidinio de manera que la concentración de tiocianato de guanidinio resultante sea aproximadamente 1M o más. En algunas realizaciones, se agrega tiocianato de guanidinio de modo que la concentración de tiocianato de guanidinio resultante sea aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, 5 M o más, 6 M o más, 7 M o más, 8 M o más, 9 M o más, o 10 M o más.

[0060] En algunas realizaciones de la descripción, un agente reductor puede usarse como un agente desnaturalizante. Los agentes reductores son compuestos que donan un electrón a otra especie y se oxidan. En algunas realizaciones, un agente reductor puede ser hidruro de litio y aluminio, amalgama de sodio, diborano, borohidruro de sodio, sulfitos, hidruro de diisobutilaluminio, fosfitos, monóxido de carbono, 2-mercaptoetanol, ditiotreitolo o fosfato de tris(2-carboxietilo) y combinaciones de los mismos.

[0061] En algunas realizaciones de la descripción, uno o más de pH, calor, y/o metales pesados (tales como plomo, mercurio y cadmio) también se pueden utilizar unos agentes desnaturalizantes. Se sabe que los extremos del pH causan que se desnaturalice una proteína. Aunque el esqueleto de una cadena de proteína es neutral, los residuos de aminoácidos que comprenden la proteína a menudo contienen grupos ácidos y básicos. Estos grupos suelen estar cargados y pueden formar puentes de sal con un grupo de carga opuesta. En consecuencia, los extremos del pH pueden cambiar las cargas en estos grupos ácidos y básicos, interrumpiendo los puentes salinos.

[0062] En algunas realizaciones de la descripción, los cambios menos drásticos en el pH pueden también afectar a la actividad y la solubilidad de una proteína. Al igual que los aminoácidos individuales, las proteínas tienen un punto isoelectrico en el que el número de cargas negativas es igual al número de cargas positivas. Esto es frecuentemente el punto de mínima solubilidad en agua. En el pH isoelectrico, no hay carga neta en la molécula. Las moléculas individuales tienden a acercarse unas a otras, a coagularse y a precipitarse fuera de la solución. A un pH por encima o por debajo del pH isoelectrico, las moléculas tienen una carga neta negativa o positiva, respectivamente. Así, cuando las moléculas de proteína se aproximan unas a otras, tienen la misma carga general y se rechazan unas a otras.

[0063] En algunas realizaciones de la descripción, el calor se puede utilizar como un agente desnaturalizante. El calor puede suministrar energía cinética a las moléculas de proteína, haciendo que sus átomos vibren más rápidamente. En algunas realizaciones, esto interrumpirá fuerzas relativamente débiles, tales como enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas. El calor también se usa en la esterilización para desnaturalizar y, por lo tanto, destruir las enzimas en las bacterias.

[0064] En algunas realizaciones de la descripción, las sales de iones metálicos tales como el mercurio (II), plomo (II), y la plata se puede usar como agentes de desnaturalización debido a su capacidad para formar enlaces fuertes con los grupos disulfuro y con los iones carboxilato de los aminoácidos ácidos. Por lo tanto, interrumpen los puentes disulfuro y los enlaces salinos y hacen que la proteína se precipite fuera de la solución como una sal metal-proteína insoluble.

[0065] En algunas realizaciones de la invención, las altas concentraciones de sal (elevada salinidad) también pueden usarse como un agente desnaturalizante. Se sabe que las altas concentraciones de sales causan que tanto las proteínas como los ácidos nucleicos se precipitan de una solución acuosa. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 1M y 10M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 2M y 9M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 2M y 8M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 2M y 5M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 1M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 2M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 3M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 4M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 5M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 6M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 7M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 8M. En algunas realizaciones, se usa una sola sal como agente desnaturalizante. En algunas realizaciones, se usa más de una sal como agente desnaturalizante.

[0066] En algunas realizaciones de la invención, una sal que se usa como un agente desnaturalizante puede ser una sal de calcio, una sal de hierro, una sal de magnesio, una sal de potasio, una sal de sodio, o una combinación de los mismos. Las sales específicas ejemplares adecuadas para uso como agentes desnaturalizantes en algunas realizaciones incluyen, pero no se limitan a, cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de litio (LiCl), cloruro de calcio (CaCl₂), bromuro de potasio (KBr), bromuro de sodio (NaBr), bromuro de litio (LiBr). En algunas realizaciones, el agente desnaturalizante al que se somete la preparación impura es cloruro de potasio (KCl). En algunas realizaciones, se agrega KCl de tal manera que la concentración de KCl resultante es aproximadamente 1M o más. En algunas realizaciones, se agrega KCl de tal manera que la concentración de KCl resultante es de aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, o 5 M o más.

[0067] En algunas realizaciones de la invención, puede ser deseable incubar la preparación impura con uno o más agentes desnaturalizantes para un período de tiempo. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante menos de un minuto. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante un minuto. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante dos minutos. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante tres minutos. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante cuatro minutos. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante cinco minutos. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante diez minutos. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante una hora. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con un agente desnaturalizante durante dos horas.

[0068] En algunas realizaciones de la invención, se incuba la preparación impura con uno o más agentes desnaturalizantes a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20-25°C). En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con uno o más agentes desnaturalizantes a una temperatura por debajo de la temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la preparación impura se incuba con uno o más agentes desnaturalizantes a una temperatura superior a la temperatura ambiente.

Purificación

[0069] En varias realizaciones, antes y/o después de la exposición a una condición de desnaturalización, filtración de flujo tangencial se utiliza para purificar el ARNm a partir de una preparación impura. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza antes de agregar una tapa y una cola de poli-A al ARNm sintetizado *In Vitro*. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza después de agregar una tapa y una cola de poli-A al ARNm sintetizado *In Vitro*. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza antes y después de que se agreguen una tapa y una cola de poli-A al ARNm sintetizado *In Vitro*.

Filtración de membrana tradicional

[0070] En general, filtración de membrana implica separar sólidos de líquidos utilizando una o más interpuestas membranas permeables. La filtración por membrana también se puede usar para filtrar partículas de una muestra gaseosa. Hay dos formas principales de filtración por membrana: la filtración pasiva que se produce únicamente debido a la difusión de la solución y la filtración activa que utiliza presión positiva o presión negativa (es decir, vacío)

para forzar el líquido o gas a través de la membrana.

[0071] La filtración de membrana tradicional es también conocida como filtración "punto muerto". En este formato, la alimentación se carga en una membrana y se fuerza mediante presión positiva o negativa. La filtración sin salida tiende a ser barata y simple, y los principales inconvenientes son el ensuciamiento o la obstrucción de la membrana con soluto que no penetra lentamente o que se permea lentamente (también denominado retenido), y la polarización de la concentración. En general, las membranas tienden a obstruirse o ensuciarse más rápidamente a medida que aumentan las fuerzas motrices. Cuando una membrana se atasca, la velocidad de filtración se reduce y, finalmente, ningún permeado puede pasar hasta que el filtro se cambie o se limpie. La polarización de la concentración es un fenómeno en el que el soluto no permeable se acumula en la superficie de un filtro y eventualmente forma un tipo de membrana secundaria, que impide el desplazamiento del soluto permeable a través de la membrana. Como resultado, la filtración sin salida se utiliza normalmente en procesos de tipo de lote.

Filtración de flujo tangencial

[0072] Filtración de flujo tangencial (TFF), también conocida como filtración de flujo cruzado, es un tipo de filtración en la que el material a filtrar se pasa tangencialmente a través de un filtro en lugar de a través del mismo. En TFF, el permeado no deseado pasa a través del filtro, mientras que el retenido deseado pasa a lo largo del filtro y se recoge aguas abajo. Es importante tener en cuenta que el material deseado suele estar contenido en el retenido en TFF, que es lo opuesto a lo que normalmente se encuentra en la filtración tradicional sin salida.

[0073] Dependiendo del material a filtrar, TFF se utiliza generalmente, ya sea para microfiltración o ultrafiltración. La microfiltración se define típicamente como casos en los que el filtro tiene un tamaño de poro de entre 0,05 µm y 1,0 µm, inclusive, mientras que la ultrafiltración típicamente involucra filtros con un tamaño de poro de menos de 0,05 µm. El tamaño del poro también determina los límites de peso molecular nominal (NMWL), también conocido como corte de peso molecular (MWCO) para un filtro particular, con membranas de microfiltración que tienen NMWL de más de 1.000 kilodaltons (kDa) y filtros de ultrafiltración que tienen NMWL de entre 1 kDa y 1.000 kDa.

[0074] Una ventaja principal de filtración de flujo tangencial es que las partículas no permeables que pueden agregarse en y bloquear el filtro (a veces denominadas "torta de filtro") durante la filtración de "punto muerto" tradicional, se desplazan a lo largo de la superficie del filtro. Esta ventaja permite que la filtración de flujo tangencial se use ampliamente en procesos industriales que requieren un funcionamiento continuo, ya que el tiempo de inactividad se reduce significativamente porque, por lo general, no es necesario retirar y limpiar los filtros.

[0075] La filtración de flujo tangencial se puede utilizar para varios propósitos, incluyendo la concentración y la diafiltración, entre otros. La concentración es un proceso mediante el cual se elimina el solvente de una solución mientras que se retienen las moléculas de soluto. Para concentrar efectivamente una muestra, se usa una membrana que tiene un NMWL o MWCO que es sustancialmente más bajo que el peso molecular de las moléculas de soluto a retener. En general, un experto puede seleccionar un filtro que tenga un NMWL o MWCO de tres a seis veces por debajo del peso molecular de la(s) molécula(s) diana.

[0076] La diafiltración es un proceso de fraccionamiento mediante el cual se pasan pequeñas partículas no deseadas a través de un filtro, mientras que las moléculas más grandes deseadas se mantienen en el retenido sin cambiar la concentración de esas moléculas en solución. La diafiltración se usa a menudo para eliminar sales o tampones de reacción de una solución. La diafiltración puede ser continua o discontinua. En la diafiltración continua, se agrega una solución de diafiltración a la alimentación de la muestra a la misma velocidad que se genera el filtrado. En la diafiltración discontinua, la solución se diluye primero y luego se concentra de nuevo a la concentración de partida. La diafiltración discontinua se puede repetir hasta alcanzar la concentración deseada de las moléculas de soluto.

[0077] Por lo menos tres variables de proceso que son importantes en un proceso de TFF típica: la presión transmembrana, la velocidad de alimentación y la velocidad del permeado de flujo. La presión transmembrana es la fuerza que impulsa el fluido a través del filtro, llevando consigo moléculas permeables. En algunas realizaciones, la presión transmembrana está entre 1 y 30 libras por pulgada cuadrada (psi), inclusive.

[0078] La velocidad de alimentación (también denominada la velocidad de flujo transversal) es la tasa del flujo de solución a través del canal de alimentación y a través del filtro. La velocidad de alimentación determina la fuerza que arrastra las moléculas que, de otro modo, pueden obstruir o ensuciar el filtro y, por lo tanto, restringir el flujo de filtrado. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 50 y 500 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 50 y 400 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 50 y 300 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 50 y 200 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 75 y 200 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 100 y 200 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 125 y 175 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación es de 130 mL/minuto. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación está entre 60 mL/min y 220 mL/min. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación es de 60 mL/min o más. En algunas realizaciones, la velocidad de

alimentación es de 100 mL/min o más. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación es de 150 mL/min o más. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación es de 200 mL/min o más. En algunas realizaciones, la velocidad de alimentación es de 220 mL/min o más.

[0079] La velocidad de flujo del permeado es la velocidad a la que se retira el permeado del sistema. Para una velocidad de alimentación constante, el aumento de las tasas de flujo de permeado puede aumentar la presión a través del filtro, lo que lleva a tasas de filtración mejoradas, mientras que también aumenta potencialmente el riesgo de obstrucción o ensuciamiento del filtro. Los principios, la teoría y los dispositivos utilizados para TFF se describen en Michaels et al., "Tangential Flow Filtration" in Separations Technology, Pharmaceutical and Biotechnology Applications (WP Olson, editor, Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, Illinois). 1995). Véase también la patente de EE.UU. N^{os} 5.256.294 y 5.490.937 para una descripción de la filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (HP-TFF), que representa una mejora de TFF. En algunas realizaciones, el caudal está entre 10 y 100 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal está entre 10 y 90 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal está entre 10 y 80 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal está entre 10 y 70 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal está entre 10 y 60 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal está entre 10 y 50 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal está entre 10 y 40 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal está entre 20 y 40 mL/minuto. En algunas realizaciones, el caudal es de 30 mL/minuto.

[0080] Puede ser utilizada cualquier combinación de diferentes variables de proceso descritas en este documento. En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza a una velocidad de alimentación de aproximadamente 100-200 mL/minuto (por ejemplo, aproximadamente 100-180 mL/minuto, 100-160 mL/minuto, 100-140 mL/minuto, 110-190 mL/minuto, 110-170 mL/minuto, o 110-150 mL/minuto) y/o un caudal de aproximadamente 10-50 mL/minuto (por ejemplo, aproximadamente 10-40 mL/minuto, 10-30 mL/minuto, 20-50 mL/minuto, o 20-40 mL/minuto). En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza a una velocidad de alimentación de aproximadamente 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mL/minuto y/o una velocidad de flujo de aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 mL/minuto.

[0081] Otras tasas de flujo para acomodar gran escala de purificación (comercial) implicarían la filtración de flujo tangencial que se llevan a cabo a una velocidad de alimentación de aproximadamente 10 L-200 L/minuto (por ejemplo, aproximadamente 10-180 L/minuto, 100-160 L/minuto, 100-140 L/minuto, 110-190 L/minuto, 110-170 L/minuto, o 110-150 L/minuto) y/o un caudal de aproximadamente 10-50 L/minuto (por ejemplo, aproximadamente 10-40 L/minuto, 10-30 L/minuto, 20-50 L/minuto o 20-40 L/minuto). En algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial se realiza a una velocidad de alimentación de aproximadamente 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 L/minuto y/o una velocidad de flujo de aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 L/minuto.

[0082] Como se describió anteriormente, los filtros utilizados en TFF pueden tener cualquiera de una variedad de tamaños de poros, y por lo tanto NMWL. El filtro tiene un NMWL de entre 200 kDa y 700 kDa. En algunas realizaciones, un filtro tendrá un NMWL entre 200 kDa y 500kDa. En algunas realizaciones, un filtro tiene un NMWL de 300 kDa. En algunas realizaciones, un filtro tiene un NMWL de 500 kDa.

[0083] En algunas realizaciones, una filtración de flujo tangencial de acuerdo con la invención se lleva a cabo utilizando disolventes solamente acuosos. En algunas realizaciones, una filtración de flujo tangencial de acuerdo con la invención se realiza usando agua como disolvente.

Caracterización del ARNm purificado.

[0084] En diversas realizaciones, el ARNm purificado de acuerdo con la presente invención está sustancialmente libre de impurezas de proceso de la síntesis de ARNm, incluyendo, pero no limitado a, las secuencias prematuramente abortadas de ARN, las plantillas de ADN, y/o reactivos enzimáticos utilizados en síntesis *In Vitro*.

[0085] Una ventaja particular proporcionada por la presente invención es la capacidad para retirar o eliminar un alto grado de secuencias de ARN prematuramente abortadas (también conocidos como "shortmers"). El ARNm purificado de acuerdo con la presente invención contiene secuencias de ARN abortadas prematuramente no detectables como se determina, por ejemplo, mediante tinción con bromuro de etidio y/o Coomassie. En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente comprenden menos de 15 bases (por ejemplo, menos de 14, 13, 12, 11, 10, 9 u 8 bases). En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente comprenden aproximadamente 8-12 bases.

[0086] Un método de acuerdo con la presente invención elimina un alto grado de reactivos de enzima usados en síntesis *In Vitro* incluyendo, pero no limitado a polimerasa de ARN de T7, ADNasa I, pirofosfatasa, y/o el inhibidor de ARNasa. En algunas realizaciones, la presente invención es particularmente eficaz para eliminar la polimerasa de ARN de T7. El ARNm purificado de acuerdo con la presente invención contiene reactivos enzimáticos indetectables utilizados en la síntesis *In Vitro*, incluidos los determinados, por ejemplo, mediante tinción con bromuro de etidio y/o Coomassie.

[0087] En diversas realizaciones, el ARNm purificado utilizando un método descrito en el presente documento

mantiene un alto grado de integridad. Como se usa en el presente documento, el término "integridad del ARNm" generalmente se refiere a la calidad del ARNm después de la purificación. En algunas realizaciones, la integridad del ARNm se refiere al porcentaje de ARNm que no se degrada después de la filtración de flujo tangencial. La integridad del ARNm se puede determinar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa de ARN (por ejemplo, Ausubel y otros, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Current Protocols in Molecular Biology). En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención tiene una integridad mayor que aproximadamente el 95% (por ejemplo, mayor que aproximadamente el 96%, 97%, 98%, 99% o más). En algunas realizaciones, el ARNm purificado de acuerdo con la presente invención tiene una integridad superior al 98%. En algunas realizaciones, el ARNm purificado de acuerdo con la presente invención tiene una integridad superior al 99%. En algunas realizaciones, el ARNm purificado de acuerdo con la presente invención tiene una integridad de aproximadamente el 100%.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación y purificación de ARN mensajero (ARNm)

Síntesis de ARNm

[0088] En cada uno de los ejemplos siguientes, la síntesis de ARNm se llevó a cabo bajo condiciones completas RNasa libre. Todos los tubos, viales, puntas de pipeta, pipetas, tampones, etc. debían estar libres de nucleasas, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

[0089] En los siguientes ejemplos, a menos que se describa lo contrario, el ARNm se sintetizó mediante transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN linealizado. Para producir el constructo de precursor de ARNm (TIV) deseado, una mezcla de ~ 100 ug de ADN linealizado, rNTP (3,33 mM), DTT (1 0 mM), polimerasa de ARN T7. inhibidor de la RNasa, pirofosfatasa y tampón de reacción (10x, 800 mM Hepes. (pH 8,0), 20 mM espermidina, 250 mM de MgCl₂, pH 7,7) se preparó con agua libre de RNasa hasta un volumen final de 2,24 ml. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante un intervalo de tiempo entre 20 minutos y 120 minutos. Una vez completado, la mezcla se trata con DNasa I durante 15 minutos adicionales y se apaga en consecuencia.

Adición de tapa 5' y cola 3'

[0090] El producto de ARNm purificado de la etapa de TIV mencionada (y posiblemente filtración TFF inicial también) se desnaturalizó a 65°C durante 10 minutos. Por separado, porciones de GTP (20 mM), S-adenosilo metionina, inhibidor de la RNasa, 2'-O-metiltransferasa y transferasa de guanililo se mezclan con tampón de reacción (10x, Tris-HCl 500 mM (pH 8,0), KCl 60 mM, MgCl₂ 12,5 mM) a una concentración final de 8,3 mL. Tras la desnaturalización, el ARNm se enfría en hielo y luego se agrega a la mezcla de reacción. La solución combinada se incubó durante un intervalo de tiempo a 37°C durante 20-90 minutos. Al finalizar, se agregan partes alícuotas de ATP (20 mM), polimerasa políA y tampón de reacción de colas (10x, Tris-HCl 500 mM (pH 8,0), NaCl 2,5 M, MgCl₂ 100 mM) y la mezcla de reacción total se incubó adicionalmente a 37°C por un intervalo de tiempo de 20-45 minutos. Una vez completada, la mezcla de reacción final se apaga y se purifica en consecuencia.

Purificación a través de filtración de flujo tangencial

[0091] En los siguientes ejemplos, a menos que se describa lo contrario, el sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) consistía en una membrana de filtración y una bomba peristáltica (sistema Millipore Labscale TFF) con la circulación tangencial del fluido a través de la membrana a una velocidad de alimentación de ~ 130 mL/min con un caudal de 30 mL/min para el permeado. La membrana TFF empleada fue una MidiKros 500kDa mPES 115cm² (Spectrum Labs). Antes del uso, el cartucho de filtro se lavó con agua libre de nucleasas y se limpió adicionalmente con NaOH 0,2N. Finalmente, el sistema se limpió con agua libre de nucleasas hasta que el pH del permeado y el retenido alcanzó un pH ~6.

Ejemplo 2. Análisis de ARNm purificado.

Pruebas de presencia de enzimas en ARNm purificado

[0092] A menos que se describa lo contrario, se realizaron geles de proteínas teñidas con Coomassie estándar para determinar la presencia de cualquier enzima de reactivos residuales presentes antes y después de purificaciones. En algunos casos, también se realizaron los ensayos de BCA.

Evaluación de la integridad del ARNm mediante ensayos de electroforesis en gel de agarosa

[0093] A menos que se describa lo contrario, el tamaño y la integridad del ARN mensajero se evaluaron mediante electroforesis en gel. Se emplearon geles de agarosa al 1,0% autovertidos o geles de agarosa de 1,2% prefabricados de Invitrogen E-Gel. El ARN mensajero se cargó a 1,0-1,5 µg de cantidades por pocillo. Una vez completadas, las bandas de ARN mensajero se visualizaron utilizando bromuro de etidio.

Ensayos de integridad de ARNm In Vitro

[0094] A menos que se describa lo contrario, transfecciones *In Vitro* de ARNm de luciferasa de luciérnaga se realizaron utilizando células HEK293T. Las transfecciones de un microgramo de cada construcción de ARNm se realizaron en pocillos separados utilizando lipofectamina. Las células se recolectaron en puntos de tiempo seleccionados (por ejemplo, 4 horas, 8 horas, etc.) y se analizó la producción de proteína respectiva. Para el ARNm de FFL, los lisados celulares se analizaron para determinar la producción de luciferasa mediante ensayos de bioluminiscencia.

Análisis de bioluminiscencia

[0095] En los ejemplos que incluyen una evaluación fluorescente de ARN proporcionada, el ensayo de bioluminiscencia se llevó a cabo utilizando un Sistema de Ensayo de Luciferasa Promega (Ítem # E1500), a menos que se especifique lo contrario. El reactivo de ensayo de luciferasa se preparó añadiendo 10 ml de tampón de ensayo de luciferasa a sustrato de ensayo de luciferasa y se mezcló mediante vórtice. Aproximadamente 20 μ L de muestras de homogeneizado se cargaron en una placa de 96 pocillos, seguido de 20 μ L de control de placa en cada muestra. Por separado, se agregaron 120 μ L de reactivo de ensayo de luciferasa (preparado como se describe anteriormente) a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. A continuación, cada placa se insertó en las cámaras apropiadas con un instrumento Molecular Device Flex Station y se midió la luminiscencia (medida en unidades de luz relativa (RLU)).

Ejemplo 3. Generación y purificación del ARN mensajero (ARNm) de luciferasa de luciérnaga (FFL)

[0096] Este ejemplo ilustra que, de acuerdo con diversas realizaciones, una combinación de filtración de flujo tangencial (TFF) y un agente desnaturizante puede ser utilizado de acuerdo con métodos proporcionados para producir un producto de ARNm altamente purificado. En este ejemplo, la urea se utiliza como agente desnaturizante de proteínas.

[0097] En este ejemplo, un lote de cinco miligramo de ARN de luciferasa de luciérnaga (FFL) (SEQ ID NO: 1, a continuación) fue transcrito a través de los métodos *In Vitro* descritos anteriormente para producir el constructo intermedio antes mencionado sin tapa y sin cola poliA. Esta reacción mantuvo un volumen total de 2,24 ml y se detuvo al finalizar con un volumen equivalente de urea 10M, llevando la concentración final de urea 5M. La solución resultante se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y se transfirió al depósito del sistema de filtración de flujo tangencial (TFF). La muestra se diluyó a 200 ml con agua libre de nucleasas y se lavó con 1200 ml de agua libre de nucleasas mediante ultrafiltración de 200 ml cada vez. Después de esto, la muestra se trató con 200 ml de citrato de sodio 10 mM (pH 6,4) seguido de 600 ml de lavado con agua libre de nucleasa. Finalmente la muestra se concentró hasta ~ 2 ml y se determinó la concentración final a través de la absorción a 260 nm ($\lambda_{\max}$).

ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado por codón (FFL) (SEQ ID NO: 1)

[0098]

5 **X₂**AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGA
 AGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCCUGGUG
 CCCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUUUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCC
 AGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGA
 AUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGGUGGAGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUAUGC
 CCGUGUUGGGUGCCCUGUUAUCGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUA
 10 CAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUCGUAUUC
 GUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUAUCCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUC
 AUACAAAAGAUAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCA
 UGUACACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGU
 GCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCCUGAUCAUGAACAGUAGUGGC
 15 AGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAU
 UCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAU
 CCUCAGCGUGGUGCCAUUUCACCAACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGGGCUAC
 UUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUC
 20 UUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAUUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAU
 UUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA
 CGAGAUCGCCAGCGGGCGGGGCGCCGCUACGCAAGGAGGUAGGUGAGGGCCGUGGCC
 AAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCA
 GCGCCAUUCUGAUACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGU
 25 GGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGG
 UGUGAACACGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCCAUGAUCAUGAGCGGCUAC
 GUUAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCGCACA
 30 GCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGUGGACCGGCU
 GAAGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGC
 AUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUGCGCCGGCCUGCCCCGACG
 ACGAUGCCGGCGAGCUGCCCCGCCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAU
 35 GACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUACAACCGCCAAGAA
 GCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAA
 GUUGGACGCCCCGAAGAUCGCGGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAG
 AUCGCCGUGUAY₂

Secuencias UTR 5' y 3':

40 **[0099]**

X₂ =
GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

45 Y₂ =
UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

50 **[0100]** Aproximadamente 5 mg de ARN de luciferasa de luciérnaga purificado con TFF se tapó y se coló en un
 volumen final de reacción de 9 ml, como se describió anteriormente. Una porción de esta mezcla de reacción (6,7
 ml) se trató con urea 5 M durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT) y se purificó utilizando TFF.
 Aproximadamente 1,5 mg de la mezcla de reacción tapa/cola se purificó mediante TFF utilizando únicamente agua y
 se aisló. Por separado, otra pequeña porción de la mezcla de reacción tapa/cola se purificó utilizando un kit de
 purificación Qiagen RNeasy de acuerdo con el protocolo publicado. Los tres lotes de ARNm de FFL finales aislados
 55 se separaron y transfectaron en células HEK293T como se describe a continuación. Los lisados celulares se
 analizaron para determinar la presencia de proteína FFL a través de la detección de fluorescencia (actividad FFL).

60 **[0101]** En este ejemplo, a fin de eliminar las enzimas de reacción en este ejemplo, una porción de la mezcla de
 reacción FFL ARNm TIV se sometió a urea 10M que resulta en una concentración final de urea 5M. Esta solución se
 incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y luego se purificó mediante TFF como se describe
 anteriormente. La Figura 1 muestra un gel de proteína teñido con Coomassie que muestra el ARNm resultante
 aislado después de TFF empleando las condiciones de urea mencionadas anteriormente. No hay una enzima
 detectable presente al finalizar.

[0102] Después de producir el producto de ARNm de FFL tapado y colado, se emplearon métodos de TFF para

purificar el ARNm diana final. Partes de la misma mezcla de reacción tapa/cola se dividieron en partes alícuotas por separado y se purificaron mediante TFF sin urea o mediante métodos de columna de hilatura (Qiagen RNeasy Kit) para comparación. Se realizó una comparación del ARNm final aislado mediante TFF o columna de hilatura usando electroforesis en gel y se muestra en la Figura 2. Además, los niveles de enzimas residuales se monitorizaron a través del gel de proteínas (Figura 3). En la Figura 2, se pueden ver claramente las respectivas bandas de ARNm del FFL "TIV" que migran a ~1900 nt con el ARNm final cubierto y atado (C/T) de aproximadamente 2100 nt de largo. La banda "más corta" típicamente observada usando aislamiento de columna de giro después de la etapa de tapa/cola se observa de hecho en el carril 4.

[0103] Es evidente que la banda más corta no se presenta después de la etapa tapa/cola cuando se emplea ARNm purificado por TFF. Si bien pueden eliminarse cantidades sustanciales de reactivos enzimáticos utilizando cualquiera de los dos métodos de purificación, las impurezas más cortas no pueden eliminarse. Esto demostró que los métodos de filtración de flujo tangencial descritos aquí son un método exitoso y eficiente para la purificación de secuencias abortadas prematuramente durante la transcripción del ARNm.

[0104] Con el fin de determinar si ARNm proporcionado se puede traducir en la proteína deseada, se hizo una comparación de cada uno de los constructos ARNm FFL aislados (TFF vs columna de giro). Cada una de los tres constructos enumerados a continuación se transfectaron en células HEK293T y la producción de proteína FFL correspondiente se evaluó mediante la actividad de la proteína FFL en forma de luminiscencia de FFL tras la exposición a luciferina (*vida supra*).

Constructos FFL:

[0105]

1. FFL TIV purificada a través de TFF (urea) y paso C/T a través de TFF (sin urea)
2. FFL TIV purificada a través de TFF (urea) y paso C/T a través de TFF (urea)
3. FFL TIV purificada a través de columna de centrifugación y paso C/T a través de la columna de giro

[0106] Una comparación de la producción de luminiscencia de la proteína FFL producida a partir se representa en la Figura 4. La integridad del ARNm FFL purificado por TFF se mantiene durante todo el proceso de filtración de flujo tangencial en las condiciones descritas (exposición a urea 5M).

Ejemplo 4. Generación y purificación del ARNm del factor IX (FIX)

[0107] Este ejemplo ilustra además que, de acuerdo con diversas realizaciones, una combinación de filtración de flujo tangencial (TFF) y un agente desnaturante puede ser utilizado de acuerdo con métodos proporcionados para producir un producto de ARNm altamente purificado. En este ejemplo, se usa tiocianato de guanidinio como agente desnaturante de proteínas.

[0108] En este ejemplo, una segunda especie de ARNm fue producida y purificada, este tiempo de codificación para el Factor IX (SEQ ID NO: 4, a continuación). Inicialmente, se transcribió un lote de cinco miligramos de ARN del Factor IX (FIX) a través de métodos *In Vitro* como se describió anteriormente para producir el ARN mencionado anteriormente sin tapa y sin cola poliA. Esta reacción mantuvo un volumen total de 2,24 ml y se detuvo al completarse mediante la adición de proteinasa K (4mg/ml reacción de TIV) que se incubó en la mezcla de reacción a 37°C durante 5 minutos. Una vez completado, se añadió tiocianato de guanidinio 6M (4,3 ml, final ~ 4M) y la solución resultante se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y se transfirió al depósito del sistema TFF. La muestra se diluyó a 200 ml con agua libre de nucleasas y se lavó con 1600 ml de agua libre de nucleasas mediante ultrafiltración de 200 ml a la vez. Tras la finalización, la muestra se concentró hasta ~ 2 ml y se determinó la concentración final a través de la absorción a 260 nm ($\lambda_{\max}$).

ARNm del factor humano IX (FIX) (SEQ ID NO: 4)

X₁AUGCAGCGCGUGAACAUCAUGGCAGAAUCACCAGGCCUCAUCACCAUCUG
 CCUUUUAGGAUAUCUACUCAGUGCUGAAUGUACAGUUUUUCUUGAUCAUGAAAA
 5 CGCCAACAAAAUUCUGAGGCGGAGAAGGAGGUAAAUUCAGGUAAAUUGGAAGA
 GUUUGUUC AAGGGAACCUUGAGAGAGAAUGUAUGGAAGAAAAGUGUAGUUUUGA
 AGAAGCACGAGAAGUUUUUGAAAAACACUGAAAGAACAACUGAAUUUUGGAAGCA
 GUAUGUUGAUGGAGAUCAGUGUGAGUCCAAUCCAUGUUUAAAUGGCGGCAGUUG
 10 CAAGGAUGACAUUAAUCCUAUGAAUGUUGGUGUCCCUUUGGAUUUGAAGGAAA
 GAACUGUGAAUUAGAUGUAACAUGUAACAUAAGAAGUAGGAGCAGUUGGAGCAGUU
 UUGUAAAAAUAGUGCUGAUAAACAAGGUGGUUUGCUCCUGUACUGAGGGAUUUCG
 ACUUGCAGAAAACCAGAAGUCCUGUGAACCCAGCAGUGCCAUUCCAUGUGGAAG
 15 AGUUUCUGUUUCACAAACUUCUAAGCUCACCCGUGCUGAGGCUGUUUUUCCUGAU
 GUGGACUAUGUAAAUUCUACUGAAGCUGAAACCAUUUUGGAUAAACUACUCAA
 AGCACCCAAUCAUUUAAUGACUUCACUCGGGUUGUUGGUGGAGAAGAUGCCAAA
 CCAGGUCAAUUCUUUGGCAGGUUGUUUUGAAUGGUAAAGUUGAUGCAUUCUGU
 20 GGAGGCUCUAUCGUUAAUGAAAAAUGGAUUGUAACUGCUGCCCACUGUGUUGAA
 ACUGGUGUUAAAAUACAGUUGUCGAGGUGAACAUAAUUAUUGAGGAGACAGAA
 CAUACAGAGCAAAAGCGAAAUGUGAUUCGAAUUAUCCUCACCACAACUACAAU
 GCAGCUAUUAAUAGUACAACCAUGACAUUGCCCUUCUGGAACUGGACGAACCCU
 25 UAGUGCUAAACAGCUACGUUACACCUAUUUGCAUUGCUGACAAGGAAUACACGA
 ACAUCUCCUCAAAUUGGAUCUGGCUAUGUAAGUGGCUGGGGAAGAGUCUUC
 ACAAAGGGAGAUACAGCUUAGUUCUUCAGUACCUUAGAGUCCACUUGUUGACC
 GAGCCACAUGUCUUCGAUCUACAAAGUUCACCAUCUAUAACAACAUUUCUGUGC
 30 UGGCUUCCAUGAAGGAGGUAGAGAUUCAUGUCAAGGAGAUAGUGGGGGACCCCA
 UGUUACUGAAGUGGAAGGGACCAGUUUCUUAACUGGAUUUAUAGCUGGGGUGA
 AGAGUGUGCAAUGAAAGGCAAAUUGGAUUUAUACCAAGGUUAUCCCGGUAUGU
 CAACUGGAUUAAAGGAAAAACAAAGCUCACUUAAY₁

Secuencias UTR 5' y 3':

[0109]

X₁ =
 GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCUAGAAGACACC
 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCG
 45 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (*SEQ ID NO: 5*)

Y₁ =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCC
 50 ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (*SEQ ID NO: 6*)

[0110] También se realizó el método anterior como se describe anteriormente, con la adición de actinomicina D (10 µg/ml de reacción TIV) durante la etapa de proteinasa K. Al apagar la reacción de la TIV con proteinasa K (con o sin actinomicina D), también se puede lograr la eliminación exitosa de todas las enzimas (Figura 5). Mientras que la Proteinasa K puede facilitar la eliminación, la fabricación a gran escala de una sustancia farmacológica de ARNm requeriría que esta enzima se produzca a gran escala incurriendo en costos adicionales innecesarios, y por lo tanto, puede que no sea un enfoque deseado en algunas realizaciones. Como se muestra en la Figura 6, el ARNm de FIX producido como se describió anteriormente (con y sin actinomicina D), así como el ARNm de FIX purificado usando urea 5M, no contiene niveles detectables de shortmers, similares a los resultados para el ARNm de FFL como se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 5. Generación y purificación del ARNm del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)

[0111] Este ejemplo ilustra además que, de acuerdo con diversas realizaciones, una combinación de filtración de flujo tangencial (TFF) y un agente desnaturizante puede ser utilizado de acuerdo con métodos proporcionados para producir un producto de ARNm altamente purificado. En este ejemplo, se usa cloruro de potasio como agente desnaturizante de proteínas.

[0112] En este ejemplo, una tercera especie de ARNm fue producida y purificada, esta vez codificando para el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR, SEQ ID NO: 7, a continuación). Inicialmente, se transcribió un lote de cinco miligramos de ARN de CFTR a través de métodos *In Vitro* como se describe anteriormente para producir el ARN mencionado anteriormente sin tapa y sin cola de poliA. Esta reacción mantiene un volumen total de 2,24 ml y se detuvo una vez completada mediante la adición de KCl 2M (~ 200 ml). La solución resultante se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y se transfirió al depósito del sistema TFF. La muestra se diafiltró a un volumen constante de 200 ml con KCl 2M en agua libre de nucleasas durante tres a cuatro diavolumenes. Después de este tiempo, la solución resultante se lavó con 400 ml de agua libre de nucleasas mediante ultrafiltración de 200 ml a la vez. Después de esto, la muestra se trató con 200 ml de citrato de sodio 1 mM (pH 6,4) seguido de 600 ml de lavado con agua libre de nucleasa. Finalmente, la muestra se concentró hasta ~ 2 ml y se determinó la concentración final a través de la absorción a 260 nm ($\lambda_{\max}$).

ARNm del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística optimizado por codón (CFTR) (SEQ ID NO: 7)

X₁AUGCAGCGGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUC
AUGGACUCGGCCUAUCCUUAGAAAGGGGUAUCGGCAGAGGCCUUGAGUUGUCUGA
CAUCUACCAGAUCCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCGAA
CGGGAAUGGGACCGCGAACUCGCGUCUAAGAAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCAC
UGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCGGUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCG
GGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCCUGUUGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUCGUA
CGACCCCGAUAAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGCGAUCUACCUCGGGAUCGGACUG
UGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCCAGCAAUCUUCGGCCUCC
AUCACAUCGGUAUGCAGAUUCGGAUUCGCUAUGUUUAGCUUGAUCUACAAAAAGA
CACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUCCAUCGGUCAGUUGGUGU
CCCUGCUUAGUAAUAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAUUU
CGUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCCUUUUGAUGGGCCUUAUUUGGGAGCU
GUUGCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUU

UCAGGCUGGGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAA
 5 AAUCUCGGAAAGACUCGUCAUCACUUCGGAAAUGAUCGAAAACAUCAGUCGGUC
 AAAGCCUAUUGCUGGGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCCGCCAA
 ACUGAGCUGAAACUGACCCGCAAGGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAG
 CGUUCUUCUUUUCGGGUUCUUCGUUGUCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCU
 10 GAUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAUUUUCACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGU
 AUUGCGCAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGGCCGUGCAGACAUGGUAUGA
 CUCGCUUGGAGCGAUAACAAAAUCCAAGACUUCUUGCAAAAAGCAAGAGUACAA
 GACCCUGGAGUACAAUCUUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUGUGACGGC
 15 UUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUAACAA
 CAACCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUCCCUGUUUUUCUCGAACUUCUCCUG
 CUCGGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUU
 CUCGCGGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUU
 AUGGGGGAGCUUGAGCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCA
 20 UUCUGUAGCCAGUUUUCAUUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAGAGAAUCAUU
 UUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACCGAUACAGAUCCGUCAUUAAGGCGUGCCAG
 UUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCGCCGAGAAGGAUAAACUUGUCUUGGGAGAA
 GGGGGUAUUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGCGGAUCAGCCUCGCGAGAGCG
 25 GUUAACAAAGAUGCAGAUUUGUAUUCUGCUUGAUUACCGUUUGGAUACCUCGAC
 GUAUUGACAGAAAAAGAAUCUUCGAGUCGUGCGUGUGUAAACUUAUGGCUAAU
 AAGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAUUGGAACACCUUAAGAAGGCGGACAAG
 AUCCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUACGGGCACUUCUCAGAGUUGC
 AAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCA
 30 GUUCAGCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAAACCGCUGCACCAGUUCUG
 CUUGAGGGUGAUGCCCCGGUAUCGUGGACCGAGACAAAGAAGCAGUCGUUUAAG
 CAGACAGGAGAAUUUGGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUAUUAAAC
 UCAAUUCGCAAGUUCUCAAUUCGUCCAGAAAACUCCACUGCAGAUUGAUGGAAU
 35 GAAGAGGAUUCGGACGAACCCUGGAGCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAG
 AGCAAGGGGAGGCCAUUCUUCCCCGGAUUUCGGUGAUUUCAACCGGACCUACACU
 UCAGGCGAGGCGAAGGCAAUCCGUGCUCAACCUCUUGACGCAUUCGGUAAACAG
 GGGCAAAACAUUCACCGCAAAACGACGGCCUCAACGAGAAAAGUGUCACUUGCAC
 40 CCCAGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUUCGCAAGAAAC
 CGGACUUGAGAUACGCGAAGAAAUCAUUGAAGAAGAUUUGAAAGAGUGUUUCU
 UGAUGACAUGGAAUCAAUCCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUACUUGCGUUA
 CAUCACGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCUCUGGAUCUU
 45 CUCGCUAGAGGUCGACGUCACUUGUGGUCCUCUGGCUGCUUGGUAAUACGCCCU
 UGCAAGACAAAGGCAAUUCUACACACUCAAGAAACAAUCCUAUGCCGUGAUUA
 UCACUUCUACAAGCUCGUAUUACGUGUUUACAUCUACGUAGGAGUGGCCGACAC
 UCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCGAGGACUCCACUCGUUCACACGCUUAUCACU
 GUCUCCAAGAUAUCCACCAUAAGAUGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCCAUGU
 50 CCACCUUGAAUACGCUCAAGGCGGGAGGUUUUUGAAUCGCUUCUCAAAAGAU
 UUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCCCUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGUUGU
 GCUGAUCGUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGCUUGCCUCCAGCCUACAUUU
 UGUCGCGACCGUCCGGUGAUCGUGGCGUUUAUCAUGCUGCGGGCCUAUUUCUUG

55

60

65

CAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUAUCUUU
 ACGCAUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGCCUUUGGCAGG
 5 CAGCCCUACUUUGAAACACUGUUCACAAAGCGCUGAAUCUCCAUAACGGCAAU
 GGUUUUUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUGCGCAUUGAGAUGAUUU
 UUGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUUAUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGG
 GCGAGGGACGGGUCGGUAUUAUCCUGACACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUU
 10 UGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUUU
 CGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAUGCCGACGGAGGGAAAGCCACAAAAAGUA
 CGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUUGAGUAAGGUAUAUGAUCUUCGAGAACAGUC
 ACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGUCAGAUGACCGUGAAGGACC
 15 UGACGGCAAUAACACCGAGGGAGGGAACGCAAUCCUUGAAAACAUCUCGUUCA
 GCAUUAAGCCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUCAGGAAAAU
 CGACGUUGCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAUCAGGA
 UCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGCGGAAAGCGUUUG
 20 GAGUAAUCCCCCAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGA
 UCCUUAUGAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGG
 CCUUCGGAGUGUAAUCGAGCAGUUUCCGGGAAACUCGACUUUGUCCUUGUAGA
 UGGGGGAUGCGUCCUGUCGCAUGGGCACAAGCAGCUCAUGUGCCUGGCGCGAUCC
 25 GUCCUCUCUAAAGCGAAAAUUCUUCUUGGAUGAACCUUCGGCCCAUCUGGACC
 CGGUAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGACACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCAC
 GGUGAUUCUCUGUGAGCAUCGUUUCGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUCU
 UGUAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCAUCAGAGCUGCUUAAU
 30 GAGAGAUCAUUGUUCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUU
 CCACACAGAAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUUCGCGGCCUUGAAAG
 AAGAGACUGAAGAAGAAGUUAAGACACGCGUCUUUAAY₁

Secuencias UTR 5' y 3':

[0113]

X₁ =

GGACAGAUCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAAGAAGACACC
 40 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGGG
 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (*SEQ ID NO: 5*)

Y₁ =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUGCC
 45 ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (*SEQ ID NO: 6*)

[0114] En este ejemplo, con el fin de eliminar las enzimas de la reacción, se utilizó diafiltración de KCl 2M. La
 exposición a grandes volúmenes de KCl 2M dio como resultado la eliminación exitosa de todas las enzimas
 presentes en la mezcla de reacción (incluida la polimerasa T7) según se determinó mediante electroforesis de gel de
 proteínas (Figura 7). Como se muestra a través de la electroforesis en gel de agarosa, el ARN mensajero diana
 55 permanece intacto después de la exposición a tales condiciones (Figura 8).

[0115] Además, tras taponado y colado de la construcción CFTR TIV, se puede purificar con éxito la transcripción
 CFTR final (tapado y colado) a través de TFF usando KCl 2M. Cuando se compara este producto aislado final con el
 mismo producto purificado mediante los métodos de columna giratoria, se observa una banda "más corta" muy
 60 disminuida según se determina mediante electroforesis en gel (Figura 9).

Reivindicaciones

1. Un método de purificación de ARN mensajero (ARNm), que comprende

5 (a) sintetizar ARNm mediante transcripción *In Vitro* utilizando los siguientes reactivos:

- (i) una plantilla de ADN lineal o circular que contiene un promotor;
- (ii) un conjunto de trifosfatos de ribonucleósido;
- (iii) un sistema tampón que incluye opcionalmente DTT e iones de magnesio; y
- 10 (iv) una polimerasa de ARN; y opcionalmente
- (v) una ADNasa I, una pirofosfatasa y/o un inhibidor de ARNasa;

(b) añadir un agente desnaturalizante de proteínas a la preparación de la etapa (a), que comprende el ARNm sintetizado *In Vitro*, en el que el agente desnaturalizante de proteínas es un agente caotrópico o una alta concentración de sal; y

(c) purificar el ARNm de la preparación de la etapa (b) mediante filtración de flujo tangencial, en donde la filtración de flujo tangencial comprende:

- (i) una presión transmembrana entre 1 y 30 libras por pulgada cuadrada;
- (ii) una velocidad de alimentación entre 50 y 500 mL/minuto;
- (iii) un caudal entre 10 y 100 mL/minuto; y
- 20 (iv) un filtro que tiene un límite de peso molecular nominal de entre 200 kDa y 700 kDa,

en donde el ARNm purificado de la etapa (c) contiene niveles indetectables de secuencias de ARN abortadas prematuramente y reactivos enzimáticos usados en síntesis *In Vitro* según lo determinado por electroforesis en gel de agarosa o métodos cromatográficos.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende

(i) agregar un agente desnaturalizante de proteínas a la preparación impura, opcionalmente en donde la preparación impura con el agente desnaturalizante de proteínas agregado se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos, en donde opcionalmente el agente desnaturalizante de proteínas se selecciona del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidinio, KCl, dodecilo sulfato de sodio y sus combinaciones; y/o

(ii) agregar urea a la preparación impura para lograr una concentración de urea resultante de aproximadamente 1 M o más, opcionalmente, en donde la concentración de urea resultante es de aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, 5 M o más, 6 M o más, 7 M o más, 8 M o más, 9 M o más, o 10 M o más; y/o

(iii) agregar tiocianato de guanidinio a la preparación impura para lograr una concentración de tiocianato de guanidinio resultante de aproximadamente 4 M o más, en donde opcionalmente la concentración de tiocianato de guanidinio resultante es de aproximadamente 4 M o más, 5 M o más, 6 M o más, 7 M o más, 8 M o más, 9 M o más, o 10 M o más; y/o

(iv) agregar KCl a la preparación impura para lograr una concentración de KCl resultante de aproximadamente 1 M o más, opcionalmente, en donde la concentración de KCl resultante es de aproximadamente 2 M o más, 3 M o más, 4 M o más, o 5 M o más.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la filtración de flujo tangencial se realiza usando solo disolventes acuosos, opcionalmente en el que la filtración de flujo tangencial se realiza usando agua como disolvente.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARNm se purifica a una escala de o más de 0,1 gramos, 1 gramo, 10 gramos, 100 gramos o 1.000 gramos por lote.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las secuencias de ARN abortadas prematuramente comprenden menos de 15 bases o aproximadamente 8-12 bases.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los reactivos enzimáticos usados en la síntesis *In Vitro* comprenden polimerasa de ARN T7, ADNasa I, pirofosfatasa e/o inhibidor de ARNasa.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la filtración de flujo tangencial se realiza además después de que se hayan agregado una tapa y una cola de poli-A al ARNm sintetizado *In Vitro*.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARNm sintetizado *In Vitro* es mayor que aproximadamente 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb o 5 kb de longitud.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARNm sintetizado *In Vitro* comprende una o más modificaciones para mejorar la estabilidad, opcionalmente en el que una o más modificaciones se seleccionan de nucleótidos modificados, esqueletos de fosfato de azúcar modificado, región 5' y/o

3' no traducida.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el ARNm sintetizado *In Vitro* no está modificado.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARNm purificado de la etapa (c) tiene una integridad mayor que el 95%, mayor que el 98% o mayor que el 99%.

12. Un método para fabricar ARN mensajero (ARNm) que comprende:

sintetizar ARNm *In Vitro*; y
purificar el ARNm sintetizado *In Vitro* usando un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

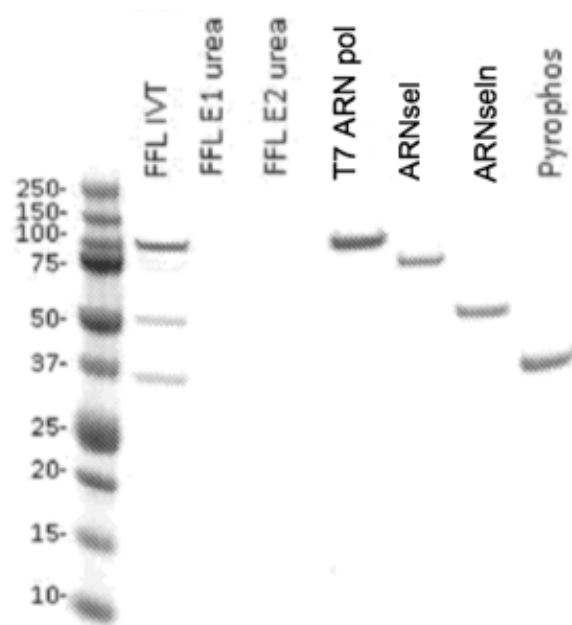


FIG. 1

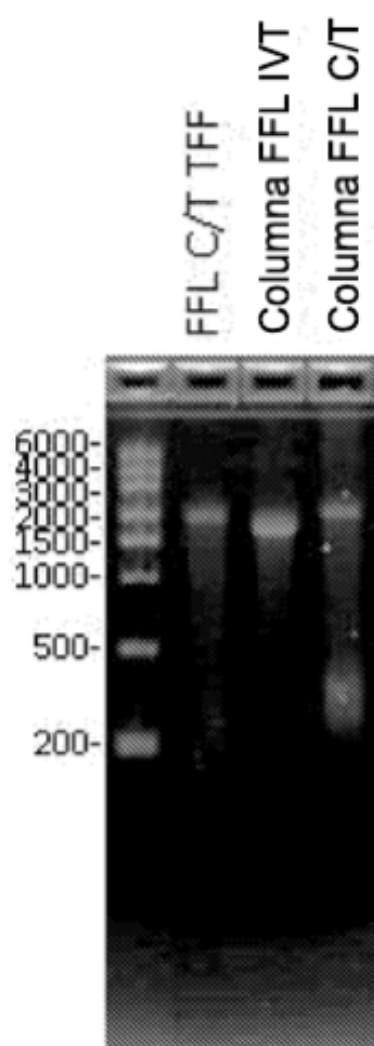


FIG. 2

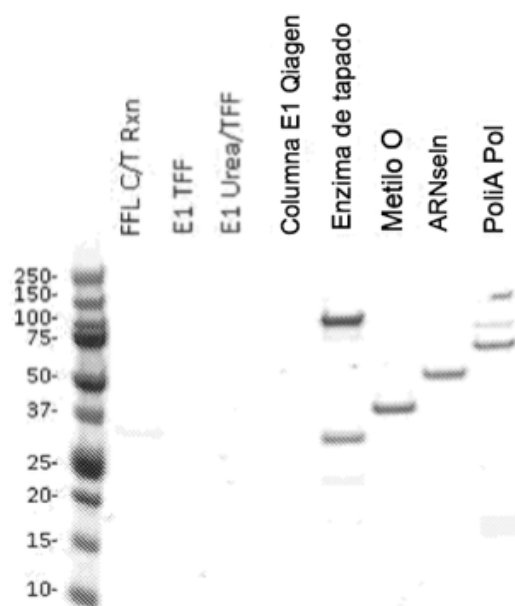


FIG. 3

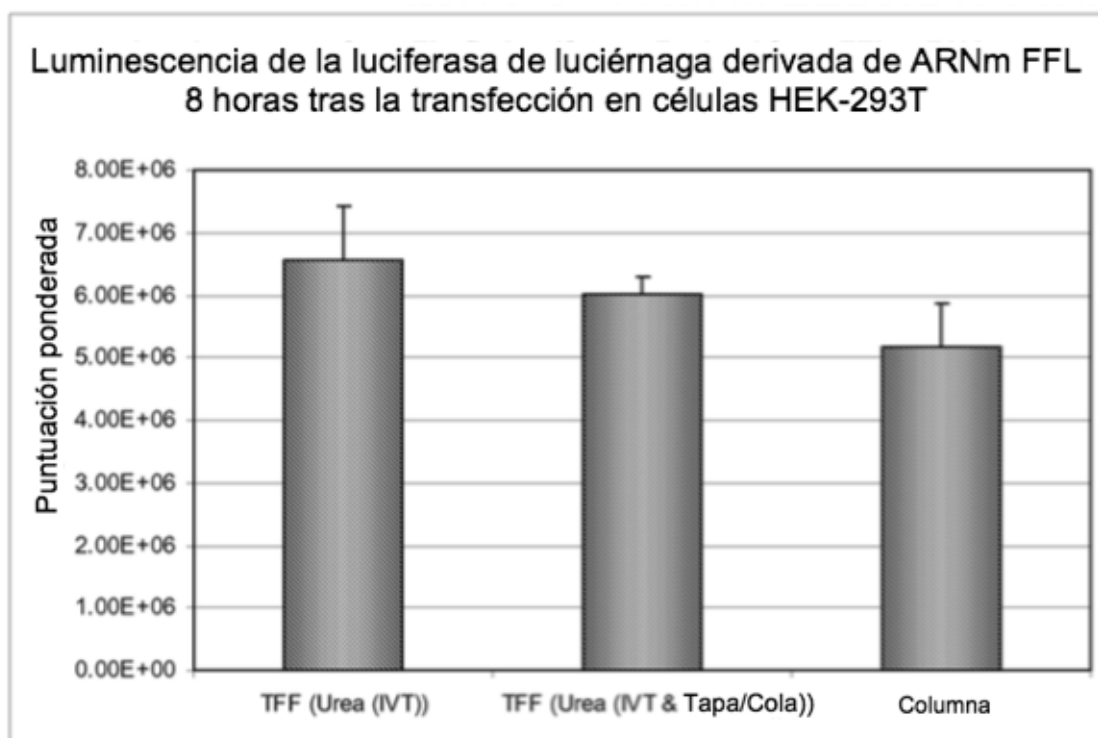


FIG. 4

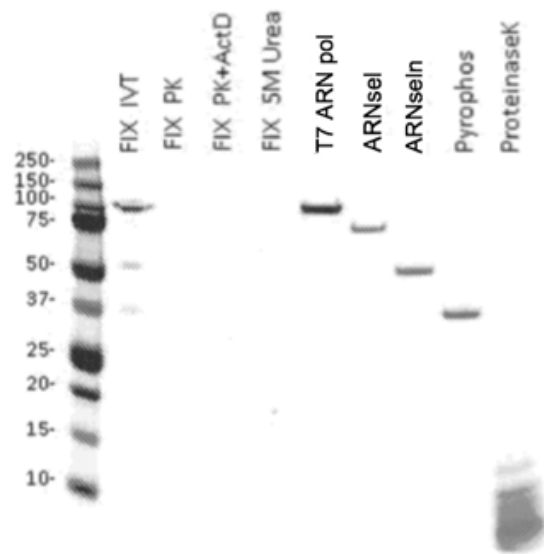


FIG. 5

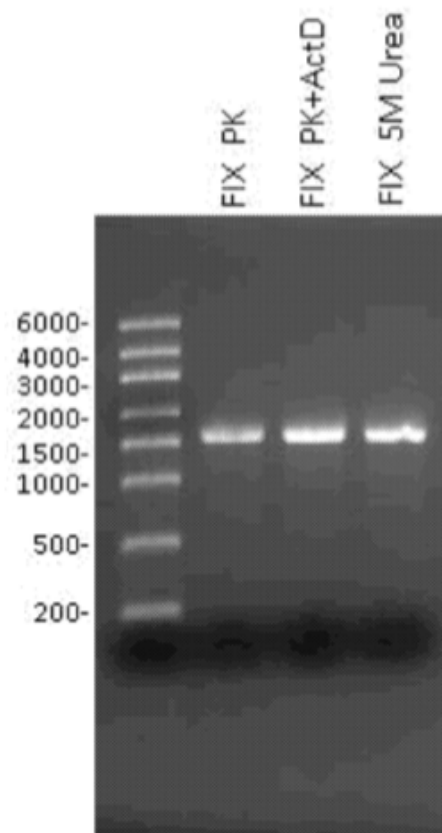


FIG. 6

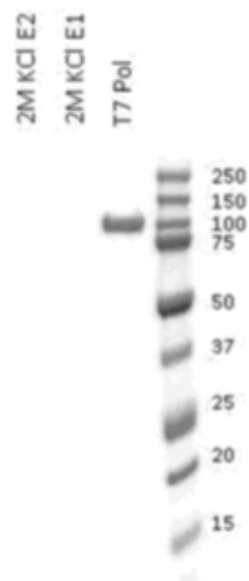


FIG. 7

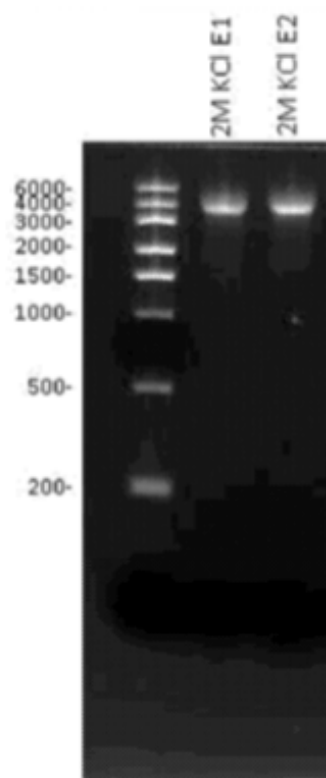


FIG. 8

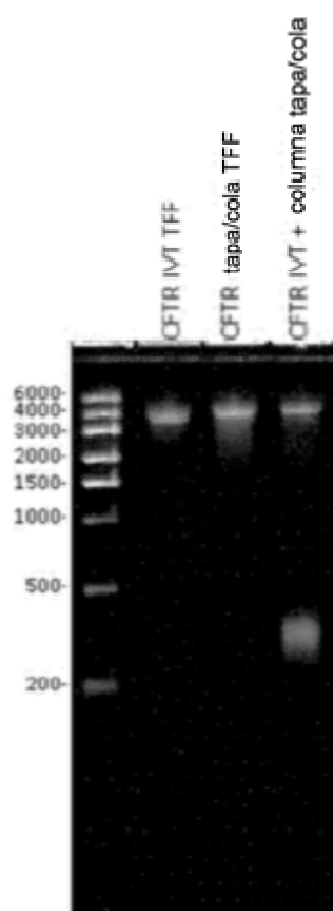


FIG. 9