(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 720 200**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/EP2014/055014**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140211**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14709704 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2970948**

(54) Título: **Procedimientos de purificación de ARN**

(30) Prioridad:

15.03.2013 US 201361799705 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2019

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

(72) Inventor/es:

BERLANDA SCORZA, FRANCESCO;
WEN, YINGXIA;
GEALL, ANDREW y
PORTER, FREDERICK

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 720 200 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

Procedimientos de purificación de ARN

Campo técnico

La presente invención está en el campo de la purificación de ARN y, en particular, de los procedimientos para la purificación y formulación a gran escala de ARN grande a partir de muestras complejas, tales como muestras obtenidas después de la transcripción *in vitro* de ARN, para uso farmacéutico, por ejemplo, para su uso en inmunización de animales.

Antecedentes de la técnica

El ARN está emergiendo como un candidato innovador para una variedad de aplicaciones farmacéuticas, pero la purificación eficaz continúa siendo un desafío. Esto se debe en parte a los diferentes tipos y combinaciones de contaminantes no deseados en una muestra que deben separarse de una especie de ARN deseada para obtener una muestra de ARN puro. Dichos contaminantes son normalmente componentes y subproductos de cualquier procedimiento anterior, por ejemplo, la fabricación de ARN. Cuando se usa la transcripción *in vitro* para fabricar ARN grande, después de una transcripción exitosa, la muestra contiene normalmente las especies de ARN deseadas junto con diversos contaminantes tales como especies de ARN no deseadas, proteínas, ADN o fragmentos de los mismos, pirofosfatos y nucleótidos libres.

Las aplicaciones comerciales posteriores (por ejemplo, la formulación y el uso como una composición farmacéutica y/o vacuna) presentan restricciones adicionales en cualquier procedimiento de purificación para ARN grande que requiere (i) un alto grado de pureza al tiempo que se conserva la estabilidad y funcionalidad del ARN; (ii) compatibilidad con cualquier requisito de formulación del ARN para la administración *in vivo*; y (iii) cumplimiento con las buenas prácticas de fabricación. Además, para facilitar las aplicaciones industriales, cualquier procedimiento de purificación de ARN debe permitir una operación consistente, rentable y eficaz con respecto al tiempo (por ejemplo, una purificación rápida, fácil, reproducible y de alto rendimiento a gran escala).

Los procedimientos para la purificación de ARN grande son conocidos en la técnica. Pascolo *y col.* (2006) describe un procedimiento para la purificación de ARNm de una muestra de reacción de transcripción *in vitro* a escala analítica (purificación de 25 µg de ARN en 20 µl de volumen de muestra). El procedimiento implica el tratamiento con DNasa seguido de la precipitación del ARNm más largo con cloruro de litio. Sin embargo, los autores informan que este procedimiento no proporciona ARN de alta pureza, ya que no elimina completamente contaminantes como ADN y proteína. Además, el procedimiento implica el uso de disolventes orgánicos y es laborioso y lento, implicando hasta 36 etapas que requieren un manejo manual extenso de la muestra en diferentes condiciones, incluida al menos una etapa de incubación durante la noche. Por lo tanto, si bien este procedimiento puede satisfacer los requisitos de investigación y purificación de ARN a escala de laboratorio, tiene un bajo grado de pureza de ARN, de reproducibilidad y no es adecuado para la purificación de ARN de calidad farmacéutica a escala comercial para su implementación en un procedimiento industrial.

El documento WO2008/077592 desvela un procedimiento para purificar ARN grande en una escala preparativa con HPLC de fase inversa de emparejamiento de iones usando una fase estacionaria inversa porosa. Se informa que una ventaja particular del uso de la fase estacionaria porosa especificada es que pueden evitarse presiones excesivamente altas, facilitando una purificación preparativa del ARN. Sin embargo, el procedimiento implica el uso de disolventes orgánicos agresivos (por ejemplo, acetonitrilo) y altas temperaturas (78 °C) para la columna de separación, y una temperatura baja (12 °C) para la muestra. No se ejemplifica la naturaleza del(de los) contaminante(s) que puede(n) separarse exitosamente de un ARN deseado usando el procedimiento, incluyendo cualquier requisito para las etapas anteriores, como el tratamiento con DNasa. Adicionalmente, la separación cromatográfica de ARN basada en HPLC de fase inversa de emparejamiento de iones o resina de intercambio iónico se basa en la carga total de la molécula y puede ser eficaz para la purificación de moléculas de ARN de hasta aproximadamente 4.000-5.000 bases. Sin embargo, la purificación de moléculas de ARN más grandes tiene efectos de exclusión por tamaño y mala recuperación. Además, se basa en la elución del ARN utilizando disolventes orgánicos, pero lo ideal sería evitarlos debido a posibles preocupaciones de seguridad sobre los residuos, los altos costes de compra, su impacto ambiental y los posibles efectos perjudiciales sobre la estabilidad y la potencia del ARN.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de procedimientos de purificación de ARN adicionales y mejorados, y en particular de aquellos que permitan una purificación rentable y eficaz con respecto al tiempo de ARN grandes a escala industrial con alto rendimiento y pureza de grado farmacéutico, al tiempo que conservan la estabilidad, la potencia biológica y la funcionalidad del ARN. Existe una necesidad particular de tales procedimientos en los que la muestra de partida es una muestra biológica compleja tal como las obtenidas después de la transcripción *in vitro* de ARN grande.

Divulgación de la invención

Para abordar estas necesidades, la invención proporciona un procedimiento para purificar ARN de una muestra de transcripción *in vitro*, que comprende una primera etapa de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo en

presencia de un tampón que contiene una sal de potasio, y además comprende una o más etapas de intercambio de tampones que comprende la filtración de flujo tangencial. Estas técnicas son útiles individualmente, pero muestran una eficacia muy alta cuando se usan en combinación o cuando se realizan en órdenes concretos. Los procedimientos pueden purificar el ARN de una manera altamente eficaz sin comprometer indebidamente la potencia o la estabilidad, para proporcionar composiciones en las que el ARN esté sustancialmente libre de contaminantes. Además, pueden realizarse sin la necesidad de disolventes orgánicos, y se prefiere que los procedimientos de la invención tengan lugar en condiciones acuosas. Una ventaja adicional de la invención es que utiliza componentes que son esencialmente desechables, lo que significa que pueden prepararse en forma completamente limpia (en particular, en forma libre de RNasa), usarse solo una vez, y desecharse, a continuación, de modo que se pueda evitar la contaminación al llevar a cabo ejecución tras ejecución, lo cual es particularmente útil cuando para evitar la contaminación con RNasa. Los procedimientos también son muy rápidos.

En una realización preferida, se usa un primer tampón en la etapa de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo y se usa un segundo tampón diferente en la etapa de filtración de flujo tangencial. El primer tampón es un tampón de purificación que contiene una sal de potasio. Preferentemente, el segundo tampón es un tampón de formulación diferente. Preferentemente, el tampón de purificación comprende cloruro de potasio o fosfato de potasio. Lo más preferentemente, el tampón de purificación comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 100-500 mM p.ej. 250 mM.

Por ejemplo, el tampón de purificación puede comprender cloruro de potasio a una concentración de entre 0-500 mM, tal como aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, o de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM, etc.

La invención proporciona un procedimiento para purificar ARN de una muestra de reacción de transcripción *in vitro*, en el que el ARN se purifica al menos al 99 % de pureza (por ejemplo, ≥99,5 %, ≥99,9 %, o incluso ≥99,95 %) en menos de 12 horas (por ejemplo, <8 horas, <6 horas, <4 horas o <2 horas).

En los procedimientos de la invención, las etapas generalmente implicarán desechar materiales que no contengan ARN (o que no contengan las especies de ARN deseadas) mientras se mantienen materiales que contienen ARN (o las especies de ARN deseadas). Por lo tanto, cuando una técnica divide un material de partida en fracciones, las fracciones deseadas se retendrán mientras que las fracciones no deseadas se pueden desechar; de manera similar, si una técnica retiene materiales no deseados pero permite el flujo continuo de ARN deseado, se retendrá el flujo continuo.

El ARN

De acuerdo con la invención, se purifica un ARN deseado a partir de una muestra de reacción de transcripción *in vitro* (TIV) que contiene ARN. El ARN deseado de la invención puede ser bicatenario pero preferentemente es monocatenario. Cuando el ARN es monocatenario, como el ARNm o un replicón de ARN autorreplicante, normalmente codifica una o más proteínas, y al menos una de estas es útilmente un inmunógeno como se discute más adelante, pero también puede ser cualquier agente terapéutico no inmunogénico o proteína profiláctica de interés (por ejemplo, tal como un componente de un medicamento de terapia génica). El ARN deseado de la invención puede ser circular, pero es preferentemente lineal.

El ARN puede ser de cadena (-), pero preferentemente es de cadena (+), de modo que puede traducirse por las células sin necesidad de que intervenga ninguna etapa de replicación, como la transcripción inversa. Los ARN preferidos de cadena + son autorreplicantes, como se describe a continuación. Preferentemente, el ARN no es un ARN vírico natural.

El ARN puede ser un ARN pequeño, mediano o grande. El número de nucleótidos por cadena de un ARN pequeño es de 10-30 (por ejemplo, ARNip). Un ARN mediano contiene entre 30-2000 nucleótidos por cadena (por ejemplo, ARNm no autorreplicantes). Un ARN grande contiene al menos 2.000 nucleótidos por cadena, por ej. al menos 2.500, al menos 3.000, al menos 4.000, al menos 5.000, al menos 6.000, al menos 7.000, al menos 8.000, al menos 9.000, o al menos 10.000 nucleótidos por cadena (por ejemplo, ARN autorreplicantes como se describe a continuación). La masa molecular de una molécula de ARN monocatenaria en g/mol (o Dalton) se puede aproximar usando la fórmula: masa molecular = (número de nucleótidos de ARN) x 340 g/mol.

Como se analiza en la el documento WO2011/005799, un ARN (particularmente un ARN autorreplicante) puede incluir, además de cualquier estructura de caperuza 5 ', uno o más nucleótidos que tengan una nucleobase modificada. Por ejemplo, un ARN puede incluir una o más nucleobases de pirimidina modificadas, tal como restos de pseudouridina y/o 5-metilcitosina. En algunas realizaciones, sin embargo, el ARN incluye nucleobases no modificadas, y puede incluir

nucleótidos no modificados, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son los ribonucleótidos naturales A, C, G y U (excepto para cualquier estructura de caperuza 5 ', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En otras realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza 5' que comprende una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

Un ARN usado con la invención incluye idealmente únicamente enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, pero en algunas realizaciones puede contener enlaces fosforamidato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

La invención es particularmente adecuada para la purificación de ARN autorreplicantes. Una molécula de ARN autorreplicante (replicón) puede, cuando se suministra a una célula de vertebrado, incluso sin ninguna proteína, conducir a la producción de múltiples ARN derivados mediante la transcripción de sí misma (a través de una copia no codificante que genera a partir de sí misma). Una molécula de ARN autorreplicante es, por lo tanto, normalmente una molécula de cadena + que puede traducirse directamente después del suministro a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que, a continuación, produce transcritos tanto codificantes como no codificantes del ARN suministrado. Por lo tanto, el ARN suministrado conduce a la producción de múltiples ARN derivados. Estos ARN derivados, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse ellos mismos para proporcionar la expresión *in situ* de una proteína codificada de interés (por ejemplo, un inmunógeno), o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado, que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* de una proteína (por ejemplo, un inmunógeno). Los resultados generales de esta secuencia de transcripciones son una gran amplificación en el número de los ARN replicones introducidos, por lo que el inmunógeno codificado se convierte en un importante producto de polipéptidos de las células. Los ARN autorreplicantes adecuados se desvelan en los documentos WO2012/006369 y WO2013/006838.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación es utilizar un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de cadena + se traducen después del suministro a una célula para dar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de cadena - genómica del ARN suministrado de cadena +. Estos transcritos de cadena - pueden transcribirse ellos mismos para dar copias adicionales del ARN parental de cadena + y también para dar un transcrito subgenómico que codifica el inmunógeno. La traducción del transcrito subgenómico conduce, de este modo, a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus sindbis, un virus del bosque semliki, un virus de encefalitis equina oriental, un virus de encefalitis equina venezolana, *etc.* Se pueden usar secuencias de virus mutantes o de tipo silvestre, p.ej. se ha utilizado en replicones el mutante TC83 atenuado de VEEV (documento WO2005/113782).

Una molécula de ARN autorreplicante preferida codifica, de este modo, (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un inmunógeno. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, p.ej. que comprende una o más de las proteínas del alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4.

Mientras que los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas de virión estructurales además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN autorreplicante de la invención no codifique proteínas estructurales de alfavirus. Por lo tanto, un ARN autorreplicante preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contienen ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales del alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo silvestre están ausentes de los ARN autorreplicantes de la invención y su lugar está ocupado por el gen o los genes que codifican el inmunógeno de interés, de modo que el transcrito subgenómico codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas estructurales del virión de alfavirus.

Por lo tanto, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención puede tener dos marcos de lectura abiertos. El primer marco de lectura abierto (5 ') codifica una replicasa; el segundo marco de lectura abierto (3') codifica un inmunógeno. En algunas realizaciones, el ARN puede tener marcos de lectura abiertos adicionales (por ejemplo, cadena abajo), por ejemplo, para codificar inmunógenos adicionales (véase a continuación) o para codificar polipéptidos accesorios.

Una molécula de ARN autorreplicante puede tener una secuencia de 5 ' que es compatible con la replicasa codificada.

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden tener varias longitudes, pero normalmente tienen una longitud de 5.000-25.000 nucleótidos, por ejemplo, 8.000-15.000 nucleótidos, o 9.000-12.000 nucleótidos.

Una molécula de ARN útil con la invención puede tener una caperuza 5'. Esta caperuza puede mejorar la traducción *in vivo* del ARN. La caperuza puede ser natural o no natural, y generalmente está unida al nucleótido 5 ' terminal del ARN por un enlace trifosfato de 5' a 5 '. Se conocen diversas estructuras de caperuza, p.ej., 7-metilguanosina (m7G), 3'-O-Me-m7G o "ARCA" (análogo de caperuza antiinverso), m2,2,7G, análogos de caperuza no metilados, *etc.*

El nucleótido 5 'de una molécula de ARN útil con la invención puede tener un grupo trifosfato 5'. En un ARN protegido con caperuza, este puede unirse a una 7-metilguanosina a través de un puente de 5' a 5'. Un trifosfato de 5 ' puede potenciar la unión de RIG-I y, por lo tanto, promover efectos adyuvantes.

Una molécula de ARN puede tener una cola de poli-A 3 '. También puede incluir una secuencia de reconocimiento de polimerasa poli-A (por ejemplo, AAUAAA) cerca de su extremo 3 '.

En una realización, un procedimiento de la invención se utiliza para purificar un ARNm modificado; en otra realización, un procedimiento de la invención se utiliza para purificar un ARNm no modificado;

La muestra que contiene ARN

De acuerdo con la invención, se purifica un ARN deseado a partir de una muestra de reacción de transcripción *in vitro* (TIV) que contiene ARN. Las muestras de reacción de TIV contienen una especie de ARN deseada y normalmente contaminantes, que incluyen ARN no deseado, ADN (por ejemplo, plantilla de ADN de IVT), proteínas (por ejemplo, ARN polimerasa, enzima de protección con caperuza, DNasa, inhibidor de RNasa), pirofosfatos y/o nucleótidos libres. Los nucleótidos libres se encuentran en mezclas de TIV como precursores de ARN sin reaccionar (por ejemplo, ribonucleósido trifosfato) o como productos de degradación de la digestión de ADN (por ejemplo, desoxinucleósido monofosfato). Un tampón típico para reacciones de TIV es un tampón basado en Tris, por ejemplo Tris 50 mM, pH 8,0. Una ventaja particular de usar TIV es que se produce un gran exceso de las especies de ARN deseadas en una reacción controlada y que las bases modificadas pueden introducirse fácilmente en el ARN. Por lo tanto, un procedimiento de la invención puede incluir una etapa de purificación previa a la fabricación del ARN por IVT. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para preparar un ARN purificado, que comprende las etapas de: (i) realizar la transcripción *in vitro* para proporcionar una muestra de reacción de TIV que comprende AR; y (ii) purificar el ARN de la muestra, que comprende una primera etapa de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo en presencia de un tampón que contiene una sal de potasio y una o más etapas adicionales de intercambio de tampón que comprenden filtración de flujo tangencial.

La TIV produce ARN a partir de una plantilla de ADN en una reacción bioquímica controlada, libre de células, que normalmente incluye enzimas (por ejemplo, ARN polimerasa y, por lo general, enzima de protección con caperuza), precursores de ARN (por ejemplo, ribonucleósido trifosfato), plantilla de ADN, agentes reductores (por ejemplo, DTT) y tampón adecuado. Después de la IVT, la plantilla de ADN debe eliminarse para evitar su presencia en el producto final y, por lo tanto, puede digerirse (por ejemplo, utilizando DNasa) o eliminarse. Se prefiere eliminar el ADN antes de la purificación, por ejemplo, utilizando DNasa.

Purificación de ARN a partir de una muestra que contiene ARN

La purificación de ARN se utiliza para eliminar las impurezas de las composiciones que comprenden un ARN particular de interés. Se pueden usar diferentes etapas de purificación para aislar el ARN de interés de componentes de la composición que no son ARN (por ejemplo, ADN y proteínas), así como de otro ARN contaminante.

Los procedimientos de la invención usan filtración por flujo tangencial y cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo. Estos procedimientos pueden realizarse en condiciones acuosas, por lo que los procedimientos de la invención no requieren el uso de disolventes orgánicos, y se realizan idealmente sin el uso de disolventes orgánicos, en particular sin el uso de disolventes orgánicos que puedan ser tóxicos cuando se administran a los seres humanos como parte de una composición farmacéutica y/o que pueden tener un impacto adverso en la estabilidad de los ARN grandes. Por lo tanto, los procedimientos de la invención se realizan idealmente sin el uso de acetonitrilo, cloroformo, fenol y/o metanol. Idealmente, se pueden realizar sin usar disolventes orgánicos.

Los procedimientos de la invención pueden realizarse convenientemente a temperatura ambiente.

Filtración de flujo tangencial (TFF)

La filtración de flujo tangencial (TFF) se puede usar para purificar un ARN de interés mediante la eliminación de especies de peso molecular más bajo. Por lo tanto, el procedimiento de la invención comprende una o más etapas de intercambio de tampón que comprenden TFF. TFF es particularmente útil para la purificación de especies de ARN grandes. Los inventores han demostrado que se puede lograr un alto rendimiento (al menos 90-95 %) y pureza (al menos 90-99,9 %) usando TFF para la purificación del ARN, mientras se conserva la estabilidad y la potencia del ARN purificado. De manera útil, la TFF también permite el intercambio de tampón (diálisis) al mismo tiempo que la purificación (o la TFF puede usarse con ARN purificado como una etapa separada de intercambio de tampón, por ejemplo, para cambiar a un tampón de formulación final). La TFF es fácil de operar, eficaz con respecto al tiempo (solo unos 70 minutos tanto para la purificación del ARN como para el intercambio de tampón) y evita la contaminación (por ejemplo, con la ARNasa) debido a la capacidad de operar como un sistema cerrado. La TFF es particularmente útil para la eliminación de nucleótidos libres de una mezcla de IVT.

La TFF implica pasar un líquido que contiene la muestra tangencialmente a través de una membrana de filtro. Por lo tanto, la TFF contrasta con la filtración sin salida, en la cual la muestra se pasa a través de una membrana en lugar de tangencialmente a ella. En la TFF, el lado de la muestra se mantiene normalmente a una presión positiva en relación con el lado del filtrado. A medida que el líquido fluye sobre el filtro, los componentes del mismo pueden pasar a través de la membrana hacia el filtrado. Los ribonucleósidos trifosfato, pequeños fragmentos de ácido nucleico, como el ADN de plantilla digerido, y/u otros componentes no deseados de la muestra de reacción de la TIV se eliminan generalmente en el filtrado, mientras que el ARN largo se recupera del retenido. Muchos sistemas TFF están disponibles

comercialmente (por ejemplo, utilizando fibras huecas, como las disponibles en GE Healthcare y Spectrum Labs). El límite de peso molecular (MWCO) de una membrana de TFF determina qué solutos pueden pasar a través de la membrana (es decir, al filtrado) y cuáles se retienen (es decir, en el retenido). El MWCO de un filtro de TFF usado con la invención se seleccionará de manera tal que sustancialmente todos los solutos de interés (es decir, las especies de ARN deseadas) permanezcan en el retenido, mientras que los componentes no deseados pasan al filtrado. El retenido puede hacerse recircular al depósito de alimentación para filtrarse de nuevo en ciclos adicionales. Comparado con la filtración sin salida, el retenido se elimina por lavado durante el procedimiento de filtración, minimizando la obstrucción de la membrana que se conoce en la técnica como "ensuciamiento de la membrana", manteniendo una tasa de filtración alta y constante a través de la membrana y aumentando la cantidad de tiempo en la que el procedimiento se puede operar de manera continua.

Los parámetros para operar la TFF de acuerdo con la invención se seleccionarán de manera que las impurezas puedan penetrar en la membrana del filtro, mientras que se retiene el ARN de interés, sin afectar significativamente la integridad y/o la potencia del ARN.

El tamaño de poro promedio de una membrana de filtro se denomina en la técnica "tamaño de poro de membrana". El tamaño de poro de la membrana generalmente se indica en kDa y se refiere a la masa molecular promedio de la partícula o macromolécula más pequeña que la membrana probablemente retenga. Como alternativa, el tamaño de poro de la membrana se puede establecer en µm y se refiere al diámetro de la partícula más pequeña que la membrana probablemente retendrá. El diámetro es proporcional a la masa molecular para moléculas de forma similar (por ejemplo, moléculas esféricas). Por ejemplo, un tamaño de poro de membrana de 500 kDa es equivalente a un tamaño de poro de membrana de aproximadamente 0,02 µm para una molécula esférica.

Los inventores han encontrado que un tamaño de poro de membrana de entre 250 y 1.000 kDa es útil cuando se purifica ARN grande, p. Ej. entre 250 y 750 kDa, o preferentemente entre 400 y 600 kDa. Es particularmente preferida, una membrana que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 500 kDa. Preferentemente, el tamaño de poro de la membrana se selecciona de tal manera que la relación del tamaño de la molécula de ARN de interés con respecto al tamaño de poro de la membrana sea al menos 1,5:1 (por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1 o al menos 6:1) y/o que la relación del tamaño de la impureza sin ARN más grande al tamaño de poro de la membrana sea al menos 1:1,5 (por ejemplo, al menos 1:2, al menos 1:3, al menos 1:4, al menos 1:5 o al menos 1:6).

Cuando una muestra comprende una especie de ARN deseada y una de ARN no deseada de un tamaño diferente, el procedimiento puede incluir dos o más etapas de filtración de flujo tangencial, en el que cada etapa usa un tamaño de poro de membrana diferente de tal manera que en una etapa se eliminan moléculas más pequeñas que las del ARN de interés y se retiene la fracción de retenido que contiene ARN, y en una o más etapas adicionales se eliminan las moléculas más grandes que el ARN de interés y se recupera el ARN de interés del filtrado.

La TFF puede llevarse a cabo utilizando cualquier membrana de filtro adecuada. Los inventores han encontrado que es particularmente ventajoso un filtro de fibra hueca. Un filtro de fibra hueca comprende normalmente una multitud (haz) de tubos huecos, con extremos abiertos (fibras), a través de los cuales el líquido que contiene la muestra pasa del lado de suministro al lado del retenido. Las paredes de los tubos están compuestas por una membrana (la membrana de filtro), que normalmente tiene una estructura interna tridimensional de cavidades interconectadas (poros). Los polímeros de membrana de filtro comunes que se pueden usar en la presente invención son polisulfona (PS), polietersulfona (PES). La PES puede modificarse (mPES) para tener un aumento de la hidrofilicidad y para tener mayores tasas de flujo de permeado que la PES no modificada. Se conocen varios procedimientos diferentes para transformar membranas de PES hidrófobas en membranas de PES hidrófilas. Los inventores han encontrado que las membranas hidrófilas y particularmente las membranas de polietersulfona modificada (mPES) son particularmente ventajosas para la purificación de ARN.

Las membranas de TFF pueden variar según su área de superficie eficaz. El área de superficie eficaz de la membrana normalmente se indica en cm^2 y se refiere a la superficie total de la membrana de filtro que se expone a la muestra. El área de superficie eficaz para las membranas de fibra hueca depende del diámetro promedio y la longitud eficaz de las fibras y del número total de fibras. Los inventores han encontrado que el área de membrana eficaz puede influir en el tiempo de operación del procedimiento de TFF y en la eficacia de la purificación de ARN y en el intercambio de tampón. Los parámetros de procesamiento determinados para volúmenes a pequeña escala se pueden usar para volúmenes más grandes manteniendo la longitud eficaz del filtro y aumentando el área de membrana eficaz (por ejemplo, aumentando el diámetro promedio de fibra y/o el número total de fibras).

Un procedimiento de TFF puede variar de acuerdo con la presión transmembrana que se aplica durante el procedimiento. La presión transmembrana es el diferencial de presión promedio entre el lado de suministro y el lado de filtrado de la membrana de filtro. Idealmente, la presión transmembrana se elige de modo que se logre un flujo elevado del fluido a través de la membrana mientras se mantiene una separación eficaz del ARN de interés de cualquier impureza y se evita la formación de una capa de gel en la superficie de la membrana de filtro. Los inventores han encontrado que se prefiere una presión transmembrana entre 1 psi (6895 Pa) y 5 psi (34475 Pa). Idealmente, la presión transmembrana se establece en aproximadamente 2 psi (13790 Pa).

Un procedimiento TFF puede variar de acuerdo con la velocidad de corte, o también conocido en la técnica como la velocidad de retenido. La velocidad de corte se expresa normalmente en segundos recíprocos (s^{-1}) y se puede calcular de acuerdo con las fórmulas conocidas en la técnica. Idealmente, la velocidad de corte se elige de manera que se logre un flujo elevado del fluido a través del filtro mientras se mantiene la integridad del ARN y se evita la formación de una capa de gel en la superficie de la membrana de filtro. Los inventores han encontrado que se prefiere una velocidad de corte entre 500-5.000 s^{-1}. Más preferentemente, se utiliza una velocidad de corte de aproximadamente 800 s^{-1}.

Por ejemplo, se puede usar una velocidad de corte de aproximadamente 500 s^{-1}, aproximadamente 600 s^{-1}, aproximadamente 700 s^{-1}, aproximadamente 800 s^{-1}, aproximadamente 900 s^{-1}, aproximadamente 1000 s^{-1}, aproximadamente 1100 s^{-1}, aproximadamente 1200 s^{-1}, aproximadamente 1300 s^{-1}, aproximadamente 1400 s^{-1}, aproximadamente 1500 s^{-1}, aproximadamente 1600 s^{-1}, aproximadamente 1700 s^{-1}, aproximadamente 1800 s^{-1}, aproximadamente 1900 s^{-1}, aproximadamente 2000 s^{-1}, aproximadamente 2500 s^{-1}, aproximadamente 800 s^{-1}, aproximadamente 3000 s^{-1}, aproximadamente 3500 s^{-1}, aproximadamente 4000 s^{-1}, aproximadamente 4500 s^{-1}, aproximadamente 5000 s^{-1}, de aproximadamente 500 s^{-1} a aproximadamente 5000 s^{-1}, de aproximadamente 500 s^{-1} a aproximadamente 4000 s^{-1}, de aproximadamente 500 s^{-1} a aproximadamente 3000 s^{-1}, de aproximadamente 500 s^{-1} a aproximadamente 2000 s^{-1}, de aproximadamente 500 s^{-1} a aproximadamente 1000 s^{-1}, de aproximadamente 600 s^{-1} a aproximadamente 5000 s^{-1}, de aproximadamente 600 s^{-1} a aproximadamente 4000 s^{-1}, de aproximadamente 600 s^{-1} a aproximadamente 3000 s^{-1}, de aproximadamente 600 s^{-1} a aproximadamente 2000 s^{-1}, de aproximadamente 600 s^{-1} a aproximadamente 1000 s^{-1}, de aproximadamente 700 s^{-1} a aproximadamente 5000 s^{-1}, de aproximadamente 700 s^{-1} a aproximadamente 4000 s^{-1}, de aproximadamente 700 s^{-1} a aproximadamente 3000 s^{-1}, de aproximadamente 700 s^{-1} a aproximadamente 2000 s^{-1}, de aproximadamente 700 s^{-1} a aproximadamente 1000 s^{-1}, de aproximadamente 800 s^{-1} a aproximadamente 5000 s^{-1}, de aproximadamente 800 s^{-1} a aproximadamente 4000 s^{-1}, de aproximadamente 800 s^{-1} a aproximadamente 3000 s^{-1}, de aproximadamente 800 s^{-1} a aproximadamente 2000 s^{-1}, de aproximadamente 800 s^{-1} a aproximadamente 1000 s^{-1}, etc. Se puede suministrar un fluido en el sistema de TFF además de la muestra que contiene ARN. El fluido es normalmente un tampón. La elección y la composición del tampón pueden influir en la eficacia de la purificación de ARN y/o en el intercambio de tampón, en los niveles de agregación de proteínas, en la separación de ARN-proteínas y en la estabilidad del ARN. Los tampones típicos incluyen aquellos basados en ácido cítrico y Tris. Los inventores han encontrado que un tampón basado en Tris, por ejemplo, que contiene Tris 10 mM, funciona particularmente bien. Preferentemente, el pH del tampón está entre 6,5 y 9,0, entre 7,0 y 8,5, entre 7,5 y 8,5, entre 7,8 y 8,2. Más preferentemente, el pH del tampón de muestra es 8,0.

Por ejemplo, el pH del tampón puede ser de aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,8, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,2, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,2, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,2, entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,2, entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,5, o entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,2, etc. El tampón puede contener además una o más sal(es), además de cualquier sal tamponante. Idealmente, se utilizará un tipo de sal y una concentración tal que las interacciones ARN-proteína se debiliten mientras se mantiene el ARN deseado en solución. Por ejemplo, se puede usar una concentración total de sal de entre 150 mM y 500 mM, o entre 200 y 300 mM. Preferentemente, la concentración de sal es de 250 mM. La sal puede ser cloruro de sodio.

Por ejemplo, el tampón puede contener una o más sal en una concentración de sal total de entre 0-500 mM, tal como aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, o de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM, etc.

Sin embargo, los inventores han encontrado que la concentración excesiva de sal en el tampón debería evitarse idealmente debido al riesgo de precipitación de ARN durante la TFF o a los efectos desventajosos en cualquier procedimiento posterior. Por lo tanto, se prefiere que no se añada sal, aparte de las sales tamponantes, al tampón para la purificación por TFF. Se sabe que la adición de EDTA a un tampón inhibe ventajosamente cualquier actividad de la RNasa. Sin embargo, los procedimientos de la invención pueden purificar ARN sin la adición de EDTA, por lo tanto el tampón puede estar libre de EDTA.

La relación de volumen del fluido adicional (es decir, el fluido que se agrega más allá de la muestra) puede influir en la eficacia de la eliminación de moléculas pequeñas durante la purificación de ARN y/o el intercambio de tampón. Sin

embargo, volúmenes más grandes aumentan el tiempo de operación. Normalmente, la relación de volumen del fluido adicional a la de la muestra está entre 5:1 y 10:1. Los inventores han encontrado que una relación de aproximadamente 8:1 es particularmente ventajosa para asegurar una purificación eficaz y/o un intercambio de tampón sin aumentar indebidamente el tiempo de operación.

Cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo

De acuerdo con la invención, el ARN se purifica utilizando cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo. El procedimiento de la invención comprende una primera etapa de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo. Los inventores han encontrado que esta técnica permite un procedimiento rápido de purificación a escala industrial para obtener ARN puro con alto rendimiento, y es particularmente ventajosa para eliminar proteínas contaminantes de una especie de ARN deseada, p. Ej. en una muestra de reacción IVT. Los inventores han demostrado que las especies de ARN muy grandes que comprenden más de 3 megadaltons pueden purificarse utilizando este procedimiento. Para el mejor conocimiento de los inventores, no hay procedimientos de la técnica anterior que permitan la purificación de tales especies de ARN grandes, en particular después de la IVT, usando cromatografía de perlas de núcleo o cualquier otro procedimiento. Sin embargo, este procedimiento no se limita a la purificación de moléculas de ARN grandes, y las moléculas de ARN de cualquier tamaño (por ejemplo, ARN mediano) se pueden purificar con este procedimiento siempre que se seleccione un tamaño de poro de perla adecuado, como se describe a continuación.

La cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo se puede realizar utilizando un formato de lote o un formato de columna. Se prefiere un formato de columna. La columna comprende la fase estacionaria. El formato de columna puede incluir aplicar una muestra que contiene ARN a la columna, recolectar el flujo continuo, y opcionalmente pasar el tampón de elución a través de la columna, y recolectar los eluatos o fracciones del mismo deseados. El procedimiento puede comprender etapas adicionales tales como etapas de lavado, p. después de aplicar la muestra a la columna, normalmente se agrega un tampón de "detección" a la columna. Se conocen en la técnica las configuraciones de cromatografía adecuadas, por ejemplo sistemas de cromatografía líquida tales como los sistemas de cromatografía líquida AKTA de GE Healthcare.

Después de aplicar la muestra que contiene ARN a la columna, su contenido puede desplazarse a través de la columna solo por la fuerza gravitacional o se puede aplicar presión externa para aumentar la velocidad de su paso. Después de la aplicación de la muestra que contiene ARN a la columna, también se puede aplicar un tampón a la columna, normalmente llamado en la técnica "tampón de detección", y pasar a través de la columna usando fuerza gravitacional solo o aplicando presión externa para aumentar la velocidad a la que los componentes de la muestra pasan a través de la columna. El caudal se puede establecer como caudal volumétrico (volumen de la fase móvil, por ejemplo, muestra y/o tampón de detección, que pasa a través de la columna por unidad de tiempo) o caudal lineal (distancia del frente de la fase móvil desplazada por unidad de tiempo). Los procedimientos para calcular el caudal y convertir de caudal lineal a volumétrico son conocidos en la técnica.

El medio de cromatografía está compuesto por perlas que están compuestas por un material poroso (matriz), generalmente formado por un polímero. La matriz comprende al menos dos capas, por ejemplo una capa interna (núcleo) rodeada por una capa externa (cubierta), pero la matriz también puede comprender una o más capas adicionales (intermedias) entre la capa interna y la capa externa.

Cada capa de matriz puede funcionalizarse con al menos un ligando, o puede no estar funcionalizada. Normalmente, las capas se pueden distinguir entre sí por la presencia o ausencia de al menos un ligando.

Por ejemplo, el núcleo puede funcionalizarse con N ligandos diferentes, mientras que la cubierta se funcionaliza con no más de N-1 de estos ligandos. N puede ser cualquier entero positivo, por ejemplo 1. Por ejemplo, el núcleo puede funcionalizarse con un ligando, mientras que la cubierta se funcionaliza con uno o más ligandos diferentes, o puede no funcionalizarse con ningún ligando. En una realización preferida, el núcleo se funcionaliza con un ligando, mientras que la cubierta no se funcionaliza con ningún ligando.

Preferentemente, al menos un ligando es un ligando que tiene múltiples funcionalidades, por ejemplo, el ligando es tanto hidrófobo como está cargado positivamente. Por ejemplo, el ligando puede ser una mono-(Cl-C8)alquil-amina, por ejemplo el ligando puede ser octilamina ($CH_3(CH_2)_7NH_2$).

Preferentemente, el núcleo se funcionaliza con un ligando, en el que el ligando tiene múltiples funcionalidades, por ejemplo, el ligando es tanto hidrófobo como está cargado positivamente, por ejemplo, el ligando puede ser una mono-(C1-C8)alquil-amina, por ejemplo, el ligando puede ser octilamina, y la cubierta no se funcionaliza con ningún ligando.

La matriz tiene un tamaño de poro definido y, por lo tanto, evita que una proporción de moléculas entren al núcleo en función del tamaño de las moléculas, que se recogen en la columna de flujo continuo (modo de flujo continuo). Las moléculas que son capaces de pasar a través de la matriz entran en el núcleo, donde pueden retenerse, normalmente uniéndose a un ligando. Las moléculas retenidas se pueden eluir de las perlas utilizando un eluyente adecuado (modo de elución por enlace). Normalmente, el eluyente es una solución que comprende hidróxido de sodio (NaOH) y un disolvente.

Los parámetros de la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo se seleccionarán de manera tal que un ARN

deseado pueda recuperarse selectivamente de una o más de la(s) fracción o fracciones de flujo continuo, sin afectar significativamente la integridad y/o la potencia del ARN.

Preferentemente, la matriz es una matriz porosa, por ejemplo agarosa, preferentemente una agarosa altamente reticulada.

El tamaño de poro de la matriz generalmente se indica en kDa y se refiere a la masa molecular promedio de la partícula más pequeña que la matriz probablemente rechace (también conocida como MWCO). Como alternativa, el tamaño de poro de la matriz se puede establecer en µm y se refiere al diámetro de la partícula más pequeña que la matriz probablemente rechace, como se describe anteriormente para TFF. El tamaño de los poros se selecciona de modo que el límite esté por debajo del tamaño del ARN pero por encima del tamaño de la proteína. Usando este procedimiento, pueden purificarse especies de ARN que son más grandes que el límite molecular de las perlas. Más preferentemente, la especie de ARN deseada es la molécula más grande en la muestra a purificar. Por lo tanto, de acuerdo con este procedimiento, el ARN se recupera de una o más de las fracciones de flujo continuo.

Los inventores han encontrado que para la purificación de ARN grandes es útil un MWCO /tamaño de poro de al menos 250 kDa, por ejemplo, al menos 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa, 600 kDa, o al menos 700 kDa, *etc.* Es particularmente preferido un límite de peso molecular de al menos aproximadamente 700 kDa. En general, el MWCO se selecciona de tal manera que la relación del peso molecular de la molécula de ARN de interés con respecto al MWCO sea al menos 1,5:1 (por ejemplo, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1 o al menos 6:1) y/o que la relación del peso molecular de la impureza sin ARN más grande al MWCO sea al menos 1:1,5 (por ejemplo, al menos 1:2, al menos 1:3, al menos 1:4, al menos 1:5 o al menos 1:6).

El diámetro promedio (tamaño de partícula) de las perlas se seleccionará para permitir una purificación eficaz del ARN con un tiempo de operación mínimo sin afectar significativamente la integridad y/o la potencia del ARN debido a las presiones excesivas requeridas para la realización. Las partículas más grandes y los poros más grandes normalmente permiten el uso de presiones más bajas, pero la eficacia de separación puede reducirse. Los inventores han encontrado que se prefiere un tamaño de partícula de aproximadamente 50-100 µm, en el que es más preferido un tamaño de partícula de aproximadamente 60-90 µm, y en el que es incluso más preferido un tamaño de partícula de aproximadamente 70-80 µm. El más preferid es un tamaño de partícula de aproximadamente 85 µm.

Un medio ejemplar de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo son las perlas Capto ™ Core 700 de GE Healthcare.

El ARN se recupera selectivamente de la columna en el flujo continuo. Las proteínas y los ácidos nucleicos cortos se retienen en las perlas. Las fracciones de flujo continuo que contienen ARN se pueden identificar midiendo la absorción de UV a 260 nm. La composición que comprende el ARN de interés recogido en el flujo continuo está altamente purificada en relación con la preparación antes de la etapa de cromatografía con perlas de núcleo. Las fracciones eluidas múltiples que contienen el ARN de interés se pueden combinar antes del tratamiento adicional.

De acuerdo con la invención, la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo se lleva a cabo en presencia de un tampón que contiene una sal de potasio. Se agrega una cantidad de sal de potasio a la muestra que contiene ARN antes de que la muestra pase a través de la columna. Los inventores han encontrado que esto es particularmente ventajoso para la eliminación de impurezas de proteínas. Se puede usar cualquier sal de potasio adecuada a una concentración adecuada, por ejemplo, entre aproximadamente 100 mM y 500 mM.

Por ejemplo, se puede agregar una sal de potasio a la muestra que contiene ARN en una concentración final de entre 0-500 mM, tal como aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 600 mM, aproximadamente 700 mM, aproximadamente 750 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 550 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 550 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 550 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 400 mM, etc.

Los inventores han encontrado que una concentración de sal de entre aproximadamente 125 mM y 250 mM es particularmente ventajosa, dando como resultado la purificación de ARN con un alto rendimiento de ARN y una eliminación de proteínas eficaz. Como alternativa, cuando se requiere un alto rendimiento de ARN más que la eliminación de impurezas de proteínas, por ejemplo, cuando se usa una muestra que está sustancialmente libre de proteínas, se puede usar una concentración de sal de no más de 250 mM, o preferentemente no más de 125 mM. Cuando se requiere un alto rendimiento de ARN y/o una alta eficacia de eliminación de nucleótidos más que la eliminación de impurezas de proteínas, por ejemplo, cuando se utiliza una muestra que está sustancialmente libre de proteínas pero que contiene grandes cantidades de nucleótidos libres, se utiliza una concentración de sal de no más

de 250 mM, preferentemente no más de 125 mM.

Una sal de potasio adecuada es normalmente una sal que minimiza los niveles de precipitación de ARN en comparación con las sales menos preferidas cuando se usa a la misma concentración y pH. Los inventores han encontrado que normalmente el fosfato de potasio y/o el cloruro de potasio son particularmente adecuados, y las prefieren frente al fosfato de sodio y el cloruro de sodio, porque las sales de potasio minimizan de manera ventajosa los niveles de precipitación de ARN en comparación con las sales de sodio cuando se usan a la misma concentración y pH. En general, los inventores han encontrado que se prefiere el uso de cationes con kosmotropicidad creciente.

La muestra que contiene ARN se puede diluir antes de que la muestra pase a través de la columna. Por ejemplo, la muestra se puede diluir con un volumen de diluyente que corresponde a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 2 veces, o aproximadamente 1 vez del volumen de la muestra. Una dilución de 1 vez significa que se agrega a la muestra un volumen de un diluyente que es igual al volumen de la muestra. Se puede usar cualquier diluyente adecuado y normalmente será un tampón. Un diluyente adecuado es aquel que no interfiere con ninguna etapa posterior de purificación o intercambio de tampón. Por ejemplo, el diluyente puede ser un tampón que es el mismo que el tampón de la muestra que contiene ARN (por ejemplo, Tris 50 mM, pH 8,0).

El caudal se puede variar para lograr una recuperación de ARN y/o eliminación de proteínas mejorada. Un caudal lineal de entre 200 y 500 cm/h es ventajoso cuando se desea una alta recuperación de ARN. Un caudal de entre 50 y 300 cm/h es ventajoso cuando se desea un alto nivel de eliminación de proteínas. Normalmente, se utiliza un caudal de entre 250 y 300 cm/h, preferentemente de aproximadamente 275 cm/h para la recuperación y la eliminación de proteínas optimizada.

La adición de una sal de potasio, la dilución de la muestra y la variación del caudal, como se describe anteriormente, se pueden combinar de manera útil. Por ejemplo, la muestra que contiene ARN se puede diluir y se puede agregar una cantidad de sal a la muestra antes de que la muestra pase a través de la columna. Un procedimiento particularmente ventajoso para la purificación de ARN grande con alta pureza, rendimiento y tiempos de operación cortos es uno en el que la muestra se diluye 4 veces antes de aplicar la muestra a la columna, la cromatografía se realiza a un caudal lineal de 275 cm/h y se agrega sal a la muestra y/o al tampón de detección a 250 mM (por ejemplo, KCl).

La cromatografía con perlas de núcleo es particularmente útil para eliminar proteínas contaminantes de un ARN de interés. Se logran resultados particularmente buenos cuando la muestra que contiene ARN que se aplica a la columna de cromatografía en una única ejecución de purificación no contiene más de 5 -15 mg de proteína total por ml de fase estacionaria (es decir, perlas de núcleo), p. Ej., no más de 10 mg/ml o no más de 13 mg/ml. Estos valores son particularmente relevantes cuando la proteína total se compone de proteínas que son normalmente componentes de una reacción de transcripción *in vitro*, tal como la polimerasa T7, enzima de protección con caperuza, el inhibidor de la RNasa y la pirofosfatasa.

Cuando se realiza una purificación a gran escala, las columnas de cromatografía pueden conectarse entre sí en serie para aumentar la capacidad.

Los inventores también han encontrado que se pueden alcanzar niveles de pureza incluso más altos (por ejemplo, eliminando de manera más eficaz los nucleótidos libres remanentes de la IVT) cuando a una etapa de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo le sigue una etapa de TFF. La etapa de TFF se puede utilizar para realizar simultáneamente la purificación de ARN, en particular la eliminación de nucleótidos y el intercambio de tampón utilizando un tampón de formulación durante el procedimiento de purificación/intercambio de tampón. El tampón de formulación es diferente al tampón de purificación utilizado en las etapas anteriores.

Combinación de los procedimientos

El procedimiento de la invención puede incluir opcionalmente una etapa adicional de TFF para el intercambio de tampón y/o la purificación de ARN.

Cuando una combinación de procedimientos comprende dos etapas del mismo procedimiento, p. ej. una etapa de la filtración de flujo tangencial y una etapa adicional de filtración de flujo tangencial, se usan normalmente dos tampones diferentes en la primera etapa y en la segunda etapa. Normalmente, el primer tampón es diferente del segundo tampón en al menos un componente y/o característica. Por ejemplo, la concentración de sal, el tipo de sal, la tonicidad, el pH o la cantidad de contaminantes pueden ser diferentes. Normalmente, los tampones se basarán en diferentes sistemas de tamponamiento, por ejemplo, el primer tampón puede ser un tampón basado en Tris o fosfato, mientras que el segundo tampón es un tampón basado en citrato.

Los inventores han demostrado que la combinación de los procedimientos mencionados anteriormente conduce a ventajas aún mayores en términos de pureza (por ejemplo, eliminación de ribonucleósidos trifosfato, proteínas, ADN y fragmentos de los mismos) y de rendimiento del producto de ARN final, de facilidad de operación, de eficacia de tiempo y de escalabilidad del procedimiento global.

Características del aparato

Una ventaja de los procedimientos desvelados en el presente documento es que utilizan componentes que son desechables. Por lo tanto, algunos o todos los aparatos en los que se realiza el procedimiento se pueden desechar después de que se realice el procedimiento. Por ejemplo, se pueden desechar todas las columnas de TFF y/o las columnas de flujo continuo con perlas de núcleo, al igual que los tubos y conectores que se usaron para conectarlos. Estos componentes pueden desecharse como residuos de riesgo biológico.

Por lo tanto, los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usar componentes de aparatos desechables. Además, los procedimientos de la invención usarán, en general, componentes de aparatos que pueden descontaminarse fácilmente de la RNasa. Este requisito puede reflejarse en los materiales, la forma, la configuración y las dimensiones de los componentes.

Procedimientos rápidos

Como se menciona anteriormente, la invención proporciona un procedimiento para purificar ARN de una muestra de reacción de IVT, en el que el ARN se purifica al menos al 99 % de pureza en menos de 12 horas.

De manera similar, la invención proporciona un procedimiento para purificar ARN de una muestra de reacción de TIV que contiene ARN, ADN, pirofosfatos y nucleótidos libres (como precursores de ARN sin reaccionar y/o como productos de degradación de ARN o ADN), en el que el procedimiento proporciona material final en menos de 12 horas que está libre de ADN, pirofosfatos y nucleótidos libres.

La muestra que contiene ARN es el producto de una reacción de IVT, y por lo tanto contendrá los contaminantes típicos de TIV analizados anteriormente.

El ARN se puede preparar a una pureza elevada, p.ej., ≥99,5 %, ≥99,9 %, o incluso ≥99,95 %. Por lo tanto, al menos el 99 % o más de los componentes en el material purificado (que no sean agua y sales de tampón) son un ARN de interés.

El procedimiento se puede completar, para proporcionar el ARN purificado, en menos de 12 horas, por ej. <8 horas, <6 horas, <4 horas o <2 horas.

El procedimiento puede usar cualquiera de las etapas (y combinaciones de las mismas) desveladas en otra parte en el presente documento. El procedimiento se realiza idealmente utilizando condiciones acuosas en todo momento.

Composiciones farmacéuticas

El ARN purificado de acuerdo con la presente invención es útil como un componente en composiciones farmacéuticas, por ejemplo para su uso como una vacuna en inmunización de sujetos contra diversas enfermedades. Estas composiciones incluirán normalmente ARN y un transportador farmacéuticamente aceptable. Una discusión completa de los transportadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Gennaro *y col.* Una composición farmacéutica también puede incluir uno o más componentes adicionales tales como inmunopotenciadores de moléculas pequeñas (por ejemplo, agonistas de TLR). Una composición farmacéutica también puede incluir un sistema de suministro para el ARN, p.ej., un liposoma, una emulsión de aceite en agua o una micropartícula.

Una composición farmacéutica puede estar sustancialmente libre de contaminantes resultantes de la fabricación y purificación del ARN. Cuando se usa IVT, tales contaminantes pueden incluir proteínas, p. ej., enzimas tales como polimerasa, en particular polimerasa T7, y enzima de protección con caperuza, nucleótidos libres y ADN plantilla y/o fragmentos de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir el ARN en agua corriente (por ejemplo, a.p.i.) o en un tampón de formulación final, por ejemplo, un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón histidina o un tampón citrato. Las sales de tampón se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM.

Las composiciones pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad del ARN mediante la eliminación de iones que pueden acelerar la hidrólisis del fosfodiéster. De este modo, una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, *etc.* Dichos quelantes están presentes normalmente entre 10-500 µM, por ejemplo,. 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato sódico, también puede actuar como un quelante, mientras que, ventajosamente, también proporciona actividad tamponante.

Las composiciones pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl, p.ej., alrededor de 9 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas pueden tener un pH entre 5,0 y 9,5 p.ej.,. entre 6,0 y 8,0.

Las composiciones farmacéuticas pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, p.ej. entre 240-360 mOsm/kg, o entre 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más conservantes, como el tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren las composiciones sin mercurio y se pueden preparar vacunas sin conservantes. Las composiciones

farmacéuticas son preferentemente estériles.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente no pirogénicas, por ejemplo, contienen <1 UE (unidad de endotoxinas, una medida convencional) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis.

Las composiciones farmacéuticas están preferentemente libres de gluten.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en forma de dosis unitaria. En algunas realizaciones, una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1-1,0 ml, por ej., alrededor de 0,5 ml.

Las composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones. La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, en forma de un inhalador, usando un spray fino. La composición puede prepararse para administración nasal, auditiva u ocular, p.ej., como spray o gotas. Son normales los inyectables para administración intramuscular.

Cuando una composición incluye un sistema de suministro, generalmente será un liposoma (por ejemplo, véase el documento WO2012/006376, documento WO2012/030901, documento WO2012/031043, documento WO2012/031046, y documento WO2013/006825), una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, véase el documento WO2012/006380, documento WO2013/006834, y documento WO2013/006837), o una micropartícula (por ejemplo, véase el documento WO2012/006359). Las composiciones pueden comprender una cantidad inmunológicamente eficaz de ARN, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y físico del individuo que se vaya a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se vaya a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, *etc.),* la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por parte del médico tratante y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de pruebas habituales. El contenido de ARN de las composiciones de la invención se expresará generalmente en términos de cantidad de ARN por dosis. Una dosis preferida tiene ≤100 µg de ARN (por ejemplo, de 10 -100 µg, como aproximadamente 10 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg o 100 µg), pero la expresión se puede ver a niveles mucho más bajos, por ejemplo, ≤1 µg/dosis, ≤ 100 ng/dosis, ≤ 10 ng/dosis, ≤ 1 ng/dosis, *etc.*

Procedimientos de tratamiento y usos médicos

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden usar *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno de interés.

La respuesta inmunitaria es idealmente protectora e idealmente involucra anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. Se puede provocar una respuesta de refuerzo.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede ser útil en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un vertebrado.

Al provocar una respuesta inmunitaria en el vertebrado, el vertebrado puede protegerse contra diversas enfermedades y/o infecciones, por ej., contra enfermedades bacterianas y/o víricas como se analiza anteriormente. Las composiciones descritas en el presente documento son inmunogénicas, y son más idealmente composiciones de vacunas. Las vacunas pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar una infección), pero normalmente serán profilácticas.

El vertebrado referido en el presente documento es idealmente un mamífero, tal como un ser humano o un mamífero veterinario grande (por ejemplo, caballos, vacas, ciervos, cabras, cerdos). Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es idealmente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es idealmente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad, *etc.*

Las vacunas se pueden usar para tratar tanto a niños como a adultos. Por lo tanto, un paciente humano puede ser menor de 1 año, menor de 5 años, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o al menos 55 años de edad. Los pacientes ideales para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥50 años de edad, ≥60 años de edad y preferentemente, ≥65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≤5 años de edad), pacientes hospitalizados, los trabajadores de la salud, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos o pacientes inmunodeficientes. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos y se pueden usar de manera más general en una población.

Normalmente, las composiciones descrita en el presente documento se administrarán directamente a un paciente. Puede lograrse el suministro directo mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o al espacio intersticial de un tejido). Las rutas de suministro alternativas incluyen rectal, oral (por ejemplo, comprimido o spray), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea,

intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosal. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también se puede usar como alternativa la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para desencadenar inmunidad sistémica y/o mucosal, idealmente, para desencadenar una inmunidad sistémica y/o mucosal mejorada.

La dosificación puede ser una pauta en una sola dosis o una pauta en múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta multidosis, las diversas dosis pueden administrarse por vías iguales o diferentes, por ejemplo, un cebado parenteral y un refuerzo mucosal, un cebado mucosal y un refuerzo parenteral, *etc.* Las dosis múltiples se administrarán normalmente al menos con 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, *etc.*). Se pueden administrar dosis múltiples aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, por ej., a la edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se utiliza a menudo en el Programa Ampliado de Inmunización ("EPI") de la Organización Mundial de la Salud. Se pueden administrar dos dosis primarias con una diferencia de dos meses, por ej., con una diferencia de aproximadamente 7, 8 o 9 semanas, seguidas de una o más dosis de refuerzo de aproximadamente 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, p. ej., aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. Se pueden administrar tres dosis primarias con una diferencia de dos meses, por ej., con una diferencia de aproximadamente 7, 8 o 9 semanas, seguidas de una o más dosis de refuerzo de aproximadamente 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, p. ej. aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

General

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra cosa, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura.

La expresión "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente", en relación con un valor numérico *x*, es opcional y significa, por ejemplo, *x*±10 %.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Las referencias a carga, a cationes, a aniones, a zwitteriones, *etc.,* se toman a pH 7.

El término "rendimiento" en el contexto de la presente invención representa la fracción de ARN contenida en la muestra después de la purificación en comparación con antes de la purificación. Normalmente, el rendimiento se expresa como% de rendimiento, calculado de acuerdo con la fórmula: [(cantidad de ARN posterior a la purificación/cantidad de ARN antes de la purificación) x 100]. Las cantidades de ARN en una muestra se pueden medir usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando un tinte fluorescente específico de ARN como RiboGreen®.

El término "purificación" o "purificar" significa que un ARN deseado en una muestra se separa de los componentes no deseados. "Purificación de ARN" por lo tanto, se refiere a procedimientos para purificar un ARN de interés de una composición que comprende el ARN de interés e impurezas. Por lo tanto, después de la purificación, el ARN está presente en una forma más pura que antes de la purificación. Esto significa que los componentes no deseados están presentes en cantidades más bajas en relación con la cantidad de ARN deseado que antes de la purificación. Los constituyentes no deseados de las muestras que contienen ARN que pueden necesitar separarse del ARN deseado pueden incluir ADN, desoxinucleósidos monofosfato, ribonucleósidos trifosfato, especies de ARN no deseadas (por ejemplo, ARN que es más largo/más corto que el tamaño de un ARN deseado o está fuera de un intervalo de tamaño de ARN deseado, o ARN bicatenario frente a ARN monocatenario), desoxioligonucleótidos, proteínas (en particular, enzimas como las ARN polimerasas, por ejemplo, polimerasa T7, enzima de protección con caperuza de ARNm, pirofosfatasa, DNasa, inhibidores de RNasa), *etc.*

Las palabras "potencia" o "funcionalidad" describen la función biológica prevista de la molécula de ARN y el nivel al que se conserva esa función después de la purificación en comparación con antes de la purificación del ARN. Por ejemplo, si la potencia del ARN permanece sin cambios después de la purificación, entonces la extensión de una función biológica concreta del ARN no ha cambiado, por ejemplo, según se mide por el nivel de expresión *in vivo* de cualquier proteína codificada en relación con una cierta cantidad de ARN de entrada.

La palabra "estabilidad" se refiere a la medida en que una molécula de ARN conserva su integridad estructural y resiste la degradación durante manipulaciones físicas o químicas. Por ejemplo, si la estabilidad del ARN permanece sin cambios después de la purificación, entonces el nivel de integridad estructural no ha cambiado, por ejemplo, medido

al analizar el tamaño promedio de ARN o la distribución de tamaño de ARN.

Las expresiones "preparativa", "gran escala", "escala comercial" y "escala industrial" en relación con un procedimiento de purificación de ARN significan que pueden purificarse grandes cantidades de ARN hasta una pureza de al menos el 90 %. Estas cantidades tan grandes son, por ejemplo, al menos 0,5 mg, 1 mg, 2,5 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, 500 mg, o incluso al menos 1000 mg utilizando el procedimiento de presente invención.

La expresión "fase estacionaria" se refiere a la fase no móvil contenida en un lecho cromatográfico.

La expresión "tamaño de partícula" se refiere al diámetro promedio de una partícula de fase estacionaria.

La expresión "tamaño de poro" se refiere al tamaño promedio de la partícula más pequeña que una fase estacionaria rechazará o que una membrana retendrá en el lado de la muestra. El tamaño se expresa normalmente en diámetro de partícula o masa molecular.

La expresión "gradiente de elución" significa que la composición del eluyente se varía a lo largo del procedimiento de elución de manera continua o escalonada. En cambio, la "elución isocrática" procede utilizando una composición de eluyente fija durante todo el procedimiento de elución.

Una "etapa" es diferente de otra etapa de purificación de ARN o intercambio de tampón cuando las etapas usan diferentes procedimientos (por ejemplo, filtración de flujo tangencial frente a cromatografía con hidroxiapatita) o cuando las etapas usan el mismo procedimiento pero se realizan en diferentes condiciones (por ejemplo, usando un tampón diferente, una membrana diferente, o una fase estacionaria diferente).

Cuando se realiza una segunda etapa "después" o "seguido " de otra primera etapa, la segunda etapa puede realizarse inmediatamente después de la primera etapa anterior en el procedimiento, es decir, no se realiza ninguna otra etapa entre la primera etapa y la segunda etapa, excepto las etapas como la dilución o el almacenamiento que pueden tener lugar entre las dos etapas. Como alternativa, pueden realizarse otras etapas entre la primera y la segunda etapa.

Cuando se realiza una primera etapa "antes" o "precedente" de otra segunda etapa, la primera etapa puede realizarse inmediatamente antes de la etapa posterior en el procedimiento, es decir, no se realiza ninguna otra etapa entre la primera etapa y la segunda etapa, excepto las etapas como la dilución o el almacenamiento que pueden tener lugar entre las dos etapas. Como alternativa, pueden realizarse otras etapas entre la primera y la segunda etapa.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el resultado de la purificación de ARN usando filtración de flujo tangencial y cromatografía con hidroxiapatita: muestra de reacción de transcripción *in vitro* - eliminación de proteínas - muestra de reacción de transcripción *in vitro* antes de la purificación (carril 1), después de la filtración de flujo tangencial (carril 2), después de la cromatografía con hidroxiapatita (carril 3), después de la filtración de flujo tangencial (carril 4).
Las FIGS. 2A-2B muestran el resultado de la purificación de ARN usando cromatografía con hidroxiapatita. La FIG. 2A ilustra la serie de iones de Hofmeister en función de su capacidad para precipitar proteínas. La FIG. 2B muestra el análisis dinámico de dispersión de luz del tamaño de partícula de ARN agregado en varios tampones de elución - eje x: concentración de sal en mM; eje y: radio de las partículas en nm.
La FIG. 3A muestra el resultado de la purificación de ARN usando filtración de flujo tangencial y cromatografía con hidroxiapatita: muestra de reacción de transcripción *in vitro* - eliminación de proteínas - muestra de reacción de transcripción *in vitro* antes de la purificación (carril 1), después de la filtración de flujo tangencial (carril 2), después de la cromatografía con hidroxiapatita (carril 3). La FIG. 3B muestra el resultado de la purificación de ARN usando filtración de flujo tangencial y cromatografía con hidroxiapatita: muestra de reacción de transcripción *in vitro* - Eliminación de ADN - ADN por mg de ARN presente en una muestra de reacción de transcripción *in vitro* antes de la purificación (primer punto de datos de la izquierda), después de la filtración de flujo tangencial (segundo punto de datos), después de la cromatografía con hidroxiapatita (tercer punto de datos).
Las FIGS. 4A-4B muestran el resultado de la purificación de ARN usando cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo: muestra de reacción de transcripción *in vitro* - eliminación de proteínas - muestra de transcripción *in vitro* antes de la purificación (carril 1), flujo continuo después de la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo (carril 2), elución después de la limpieza de la columna en el sitio (carril 3).
La FIG. 5 muestra el resultado de la purificación de ARN usando cromatografía de flujo continuo con perlas del núcleo: muestra de reacción de transcripción *in vitro* -efecto de la sal en la muestra y el tampón de persecución sobre la eliminación de proteínas.
La FG. 6A muestra el resultado de la cuantificación de ARN o ARN más nucleótidos. La FIG. 6B y la FIG. 6D muestran el resultado de la filtración de flujo tangencial frente a la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo - muestra de reacción de transcripción *in vitro* - eliminación de nucleótidos. La FIG. 6C muestra el resultado de la filtración de flujo tangencial frente a la cromatografía de flujo continuo con perlas del núcleo frente a la cromatografía de flujo continuo con perlas del núcleo y la cromatografía con hidroxiapatita frente a la filtración de flujo tangencial y la cromatografía con hidroxiapatita - muestra de reacción de transcripción *in vitro* - eliminación de proteínas.
Las FIGS. 7A-7G muestran el resultado de la purificación de ARN usando una combinación de procedimientos descritos en el presente documento: muestra de reacción de transcripción *in vitro* - efecto sobre la recuperación

de ARN, eliminación de proteínas, eliminación de nucleótidos y eliminación de ADN. La FIG. 7A muestra la recuperación del ARN medida por cuantificación directa mediante el ensayo RiboGreen® (dilución de la muestra 10.000 veces). La FIG. 7B muestra la pureza de la muestra de ARN por ELISA cuantitativo (polimerasa T7, las muestras en cursiva están por debajo de LOQ). El gráfico muestra T7 detectable, por debajo de LOQ para la mayoría de las muestras por ELISA. La FIG. 7C muestra la pureza de la muestra de ARN por ELISA cuantitativo (de protección con caperuza, las muestras en cursiva están por debajo del LOQ (límite de cuantificación por sus siglas en inglés), "0" es igual a debajo del LOD (límite de detección por sus siglas en inglés)). El gráfico muestra a de protección con caperuza por debajo de LOD en la muestra P3, post CC250 y P2 y P4, post HTP. La FIG. 7D muestra la pureza de la muestra de ARN por SDS page- con tinción de plata (4 ug de ARN cargado por carril). La FIG. 7E muestra la eliminación de nucleótidos, expresada como la relación de cuantificación por DO/ cuantificación por RiboGreen® (el eje Y se refiere a DO/ RiboGreen®). La FIG. 7F muestra el remanente de ADN plásmido, utilizando el ensayo qPCR en plásmido. ADN antes de la purificación: 1,0 ng/dosis. Después de la purificación: 0,6/0,7 ng/dosis. La concentración más baja se encontró después de la cromatografía HTP. Se utilizó el mismo cartucho de TFF (filtración de flujo tangencial por sus siglas en inglés) en los 4 procedimientos/etapas: posible remanente. No se utilizó ningún control de fondo (tampón) en este experimento. La FIG. 7G muestra el nivel de contaminación de proteína de *E. coli,* utilizando anticuerpos policlonales de avena de la proteína del hospedador *(E. coli)* (marcados con HRP) para *E. coli.* En este ensayo el L.O.D. (límite de detección) es 1 ng/banda, se cargaron 4 ug de ARN en cada carril. La figura muestra ese contaminante del hospedador por debajo de 1 ng/proteína.

La FIG. 8 muestra el diseño de un enfoque experimental estadísticamente significativo para la cromatografía de flujo continuo con perlas del núcleo - muestra de reacción de transcripción *in vitro* - optimización de parámetros - concentración de sal: 0 mM (-1) a 500 mM a (1); dilución de la muestra: sin dilución (1) a dilución de 4 veces (-1); caudal (velocidad lineal): 50 cm/h (-1) a 500 cm/h (1).

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

Ejemplo 1: *Procedimiento para cuantificar el rendimiento de ARN y la eliminación de nucleótidos.*

El ARN se cuantificó en muestras utilizando un tinte fluorescente específico de ARN (RiboGreen®). Se compararon los niveles de ARN antes y después de la purificación para calcular el % de rendimiento de ARN. RiboGreen® no detecta nucleótidos libres.

Los nucleótidos libres se encuentran en la reacción de transcripción *in vitro* (IVT) no purificada e incluyen precursores sin reaccionar para el ARN (ribonucleósidos trifosfato) y productos de degradación de la digestión con DNasa (desoxinucleósidos monofosfato). Se desarrolló un procedimiento para medir los nucleótidos en presencia de ARN. El ARN puro se midió con RiboGreen® (Figura 6A, 1ª barra) y por densidad óptica (DO) a 260 nm, utilizando 40 como un coeficiente de extinción patrón aproximado para el ARN (2ª barra). Se añadió una mezcla de nucleótidos a la muestra de ARN puro en un exceso de diez veces al ARN en masa. Las muestras resultantes se midieron de nuevo con RiboGreen® (3ª barra) y por DO (4ª barra).

Los resultados muestran que la medición de RiboGreen® no se ve afectada por la presencia de nucleótidos en la muestra, mientras que los valores de DO detectados reflejan la concentración total de ARN y nucleótidos en la muestra. La presencia de nucleótidos, como un indicador para la eliminación de nucleótidos después de una etapa de purificación de ARN, se calculó como la relación de la medición de DO y la medición del ensayo RiboGreen®. Una relación de aproximadamente 1 indica ARN puro, es decir, afina nucleótido completo. Las relaciones por encima de 1 indican la presencia de nucleótidos en la muestra.

Ejemplo 2: *Purificación de ARN e intercambio de tampones mediante filtración de flujo tangencial.*

Se produjo un replicón de ARN de 10 kb a través de la transcripción y protección terminal con caperuza *in vitro* con enzimas, plantilla, sustancia y tampones completamente definidos por los químicos. Se utilizó un Sistema de Filtración de Flujo Tangencial KrosFlo Research IIi (Spectrum Laboratories) tanto para la purificación de ARN como para el intercambio de tampón en un solo sistema cerrado. Se probaron varios parámetros para obtener resultados óptimos como se indica a continuación: química de membrana, tamaño del poro de la membrana, área de la membrana, presión transmembrana, velocidad de corte (velocidad de retenido), volumen de tampón, capacidad del tampón, pH del tampón, concentración de sal de la muestra y la presencia de EDTA en el tampón.

Parámetros considerados para la optimización	Impacto teórico en la calidad del ARN	Condiciones examinadas	Condición seleccionada
	Cartucho de TFF		
Química de membrana	Interacción de la membrana con ARN y proteína Recuperación de ARN y eliminación de proteínas	mPES, PS (Spectrum y Watersep)	**mPES de Spectrum**
Tamaño de poro de la membrana	Retener partículas de gran MW y eliminar moléculas de MW pequeño Recuperación de ARN y eliminación de proteínas	500 kD, 750 kD MWCO 0,05 y 0,1 µm	**500 kD MWCO**

Área de la membrana	Eficacia de intercambio de tampón Tiempo de operación	20,52,115 cm^2	**115 cm^2**

Parámetros considerados para la optimización	Impacto teórico en la calidad del ARN	Condiciones examinadas	Condición seleccionada
	Variables del sistema TFF		
TMP (presión transmembrana)	Separación de ARN/proteína Formación de la capa de gel	1-5 Psi	**2 Psi**
Velocidad de corte (velocidad de retenido)	Integridad de ARN Formación de la capa de gel	1000-5000 S^{-1}	**~800 S^{-1}**
Volumen de tampón de diálisis	Eliminación de moléculas pequeñas Eficacia de intercambio de tampón Tiempo de operación	Volumen de muestra 5x-10x	**volumen de muestra 8x**

Parámetros considerados para la optimización	**Impacto teórico en la calidad del ARN**	**Condiciones examinadas**	**Condición seleccionada**
	Tampón de purificación		
Capacidad del tampón	Eficacia de intercambio de tampón (cambio de tampón de la síntesis de ARN y a la formulación)	Citrato 2, 10 mM y Tris 10, 50 mM	**Tris 10 mM**
pH del tampón	Interacción del ARN con la proteína Agregación de proteínas	pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 y 9,0	**pH 8,0**
Concentración de sal	Interacción del ARN con la proteína	NaCl 150, 250 y 500 mM	**NaCl 250 mM**
EDTA	Interacción del ARN con la proteína de unión al ARN Estabilidad del ARN	0, 1, 10 y 20 mM	**0 mM Estabilidad**

Se realizaron cuatro ejecuciones de consistencia utilizando las condiciones optimizadas y se demostró que el procedimiento de filtración de flujo tangencial purifica el ARN con una alta recuperación (> 95 %), la pureza medida por la eliminación de proteínas (> 90 % de la ARN polimerasa T7 eliminada, según lo cuantificado por ELISA; 5 ng polimerasa T7 por 75 **µ**g de ARN después de la purificación; > 95 % de vacuna que protege con caperuza la enzima eliminada, según lo cuantificado por ELISA) y medida como eliminación de nucleótidos (> 99,9 % de nucleótidos libres eliminados, según lo cuantificado utilizando el ensayo del Ejemplo 1), potencia (sin cambio en la potencia después de la purificación) y estabilidad (el ARN es estable después de la purificación). La operación como un único sistema cerrado evita la contaminación con agentes exógenos como la RNasa. El procedimiento es rápido (aproximadamente 70 minutos en total) y fácil de operar.

Como se muestra en las FIG. 6B y 6D y la Fig. 7E el procedimiento es particularmente útil para eliminar nucleótidos libres de la muestra. Como se muestra en la FIG. 5 (carril 11), la FIG. 6C y las FIG. 7B, 7C y 7D, las impurezas de proteínas también se eliminan de manera eficaz de la muestra.

Ejemplo 3: *Purificación de ARN utilizando cromatografía con hidroxiapatita (no dentro del ámbito de la invención)*

Para probar si la cromatografía con hidroxiapatita podría ser útil para la purificación de ARN grande, se cargaron 80 µg de ARN de 10 kb (replicón) purificado con cloruro de litio de una reacción de transcripción *in vitro* en una columna de hidroxiapatita y se eluyeron con un gradiente lineal de fosfato compuesto de proporciones variables de tampón A (tampón fosfato 10 mM, pH 6,8) y tampón B (tampón fosfato 500 mM, pH 6,8). Se encontró que el ARNm puede unirse y recuperarse de manera eficaz de una columna de hidroxiapatita. El rendimiento/recuperación de ARN se midió cargando cantidades idénticas de ARNm purificado con cloruro de litio de una reacción de transcripción *in vitro* en una columna de hidroxiapatita o se introdujo en el sistema de cromatografía sin pasar por la columna. Se calculó el área bajo los picos de elución y la relación utilizada como indicador del rendimiento del ARN después del paso de la columna en comparación con la purificación sin pasar por la columna (1401,25 mAu/ml frente a 1934,76 mAu/ml). El rendimiento de ARN se calculó como 72 %. El ARN de 10 kb purificado con cloruro de litio (replicón) de una reacción de transcripción *in vitro* se cargó en una columna de hidroxiapatita y se eluyó utilizando tampón fosfato. Las fracciones 4, 5 y 6 recogidas se cargaron en un gel de ARN desnaturalizante, lo que confirma que la lectura de densidad óptica está asociada con el ARN.

Para probar si el ARN se puede separar más eficazmente de contaminantes como proteínas o ADN no digerido usando cromatografía con hidroxiapatita, se analizó la dinámica de elución del ARN purificado en presencia de varias cantidades de una sal (cloruro de sodio 0-1000 mM) en el tampón de elución. Se añadió cloruro de sodio a ambos tampones de elución A y B para tener una concentración constante en todo el gradiente de fosfato. El desplazamiento hacia la derecha del pico de elución del ARN muestra que se requiere una concentración creciente de fosfato para la

elución del ARN con concentraciones crecientes de sal. Esto permite la configuración de diferentes condiciones para separar adicionalmente el ARN de las proteínas u otras impurezas. La adición de sal al tampón de elución de fosfato puede, por lo tanto, explotarse para optimizar el fraccionamiento del ARN de las impurezas. Se encontró que el rendimiento de ARNm está inversamente relacionado con la concentración de cloruro de sodio en el tampón de elución.

Para probar si el ARN se puede separar más eficazmente del ADN (plantilla no digerida), se sometieron 100 µg de ADN puro o ARN puro a cromatografía con hidroxiapatita utilizando los mismos parámetros. Se utilizó un gradiente continuo de un tampón de elución de fosfato de potasio. Se determinó el efecto de las condiciones de elución en la separación del ADN del ARN. Se encontró que el ADN se eluye a concentraciones de fosfato más altas que el ARN (desplazamiento hacia la derecha del pico de elución). Por lo tanto, los inventores idearon un procedimiento de elución por etapas, en el que la concentración de fosfato en el tampón de elución aumenta por etapas, en lugar de hacerlo de manera continua. Por lo tanto, el ARN se puede eluir selectivamente seleccionando una concentración de fosfato de tampón de elución a la cual se eluye el ARN pero no el ADN u otros contaminantes. A continuación, se realizó una prueba de ejecución en la que se mezclaron cantidades iguales de ARN purificado y ADN hasta una cantidad total de 200 µg en solución y se sometieron a cromatografía con hidroxiapatita utilizando un gradiente de elución por etapas de Tampón A y B.

En una elución en gradiente, la elución de ARN se produjo a una conductividad del tampón de alrededor de 21,04 mS/cm. La elución del ADN se produjo a alrededor de 30,52 mS/cm. Esto demuestra que en presencia de una mezcla de ARN/ADN, una concentración de aproximadamente 180 mM de fosfato de potasio (o cualquier concentración de fosfato de potasio que dé como resultado un valor de conductividad por encima de 21,04 mS/cm y por debajo de 30,52 mS/cm) eluye selectivamente el ARN y no el ADN. A continuación, se realizó una prueba de ejecución en la que se analizó el ADN purificado en las mismas condiciones descritas anteriormente. No se observó elución por debajo de aproximadamente 180 mM (~ 18 % B) de fosfato de potasio. Los resultados muestran que el ARN y el ADN se pueden separar de manera eficaz con una elución por etapas. La elución del ADN se puede lograr con un 38 % de tampón B, aproximadamente 380 mM de fosfato de potasio (o cualquier concentración de fosfato de potasio que dé como resultado un valor de conductividad superior a 30,52 mS/cm). Usando filtración por flujo tangencial y cromatografía con hidroxiapatita (muestra de reacción de transcripción *in vitro*), se optimizaron las condiciones de elución para separar el ADN del ARN.

Al comparar varios tampones fosfato útiles para la elución del ARN durante la cromatografía con hidroxiapatita, se encontró que un tampón fosfato de potasio funciona mejor que un fosfato de sodio para mantener el ARN en solución y es un mejor candidato para la elución en columna de hidroxiapatita. Los experimentos de dispersión dinámica de la luz (Figura 2) mostraron que una concentración creciente de fosfato de sodio en el tampón de elución durante la cromatografía con hidroxiapatita conduce a un tamaño de partícula aparente cada vez mayor del ARN eluido, probablemente debido a la precipitación del ARN inducida por la sal "precipitación de proteínas"). Este efecto se reduce cuando se usa fosfato de potasio en lugar de fosfato de sodio a la misma concentración, con concentraciones de hasta 500 mM. Se analizó un tampón fosfato de potasio para determinar la elución del ARN de una columna de hidroxiapatita y se realizó de manera comparable con un tampón fosfato de sodio en términos de pureza y recuperación del ARN para este procedimiento. Por lo tanto, el fosfato de potasio se identifica como la sal de elección para la purificación de ARN mediante cromatografía con hidroxiapatita.

A continuación, se analizó una reacción de transcripción *in vitro* no purificada que contiene 100 µg de un replicón de ARN de 10 kb usando cromatografía con hidroxiapatita. Las fracciones 1, 2 y 3 recogidas se cargaron en un gel de ARN desnaturalizante. No se vio ARN en el gel. Las fracciones B9 (que corresponden a la fracción que precede directamente a la fracción 2) y C1 (que corresponde a la fracción 3) se analizaron mediante HPLC de fase inversa. El tiempo de elución se comparó con los nucleótidos naturales, lo que confirma que los picos de elución observados en la DO 260 utilizando una muestra de reacción de transcripción *in vitro* no purificada estaban compuestos principalmente por nucleótidos libres de la reacción de transcripción *in vitro*.

Ejemplo 4: *Purificación de ARN utilizando filtración de flujo tangencial y cromatografía con hidroxiapatita (no dentro del ámbito de la invención)*

Se probó una combinación de filtración de flujo tangencial seguida por cromatografía con hidroxiapatita para mejorar la eficacia de la purificación de ARN de una muestra de reacción de transcripción *in vitro*, y en particular para la eliminación de nucleótidos antes de que la muestra se use en cromatografía con hidroxiapatita. Se utilizó una reacción de transcripción *in vitro* no purificada que contenía un producto de replicón de ARN de 10 kb como muestra inicial. Las FIG.3A y 3B muestran que tal combinación de procedimientos permite la eliminación eficaz de nucleótidos en la etapa de filtración de flujo tangencial y del ADN (reducido a 5,93 ng de ADN por mg de ARN purificado) y proteína (reducida a niveles por debajo de detección) en la etapa de cromatografía con hidroxiapatita, permitiendo la recuperación de ARN puro (> 80 %) después de la etapa de cromatografía con hidroxiapatita (para la elución se usó un gradiente de elución por etapas como se describe en el Ejemplo 3). Esto es particularmente útil ya que se puede omitir la digestión del ADN plantilla del procedimiento de purificación de ARN en general, lo que lleva a tiempos de operación más rápidos.

La FIG. 1 confirma adicionalmente la eficacia de la eliminación de proteínas utilizando una etapa de cromatografía con hidroxiapatita, lo que demuestra que el nivel de impurezas de proteínas se reduce a un nivel inferior al nivel de

detección utilizando tinción con plata (se cargaron 4 µg de ARN purificado por carril). Se usó una etapa adicional opcional de filtración de flujo tangencial para intercambiar el tampón fosfato en el que el ARN purificado se eluye después de la cromatografía con hidroxiapatita a un tampón citrato adecuado para aplicaciones posteriores.

La FIG. 6C (carril "TFF0HTP0" frente a carril "Entrada") también confirma la utilidad de un procedimiento de purificación de ARN que combina la filtración de flujo tangencial seguida de una cromatografía con hidroxiapatita para eliminar las impurezas de proteínas de una muestra que contiene ARN.

Ejemplo 5: *Purificación de ARN utilizando cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo.*

La cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo se probó para la purificación del ARN. Se utilizó una reacción de transcripción *in vitro* no purificada (en Tris 50 mM, pH 8,0) que contenía un producto de replicón de ARN de 10 kb como muestra inicial. Inicialmente, se utilizó una columna HiScreen Capto ™ Core 700 (código de producto: 17-5481-15), en un sistema FPLC ÄKTAa Explorer 100 de GE. La muestra se diluyó en un tampón Tris 50 mM, pH 8,0, a una concentración de ARN final de 600 ng/µl (volumen final: 8,5 ml, que contenían 5,1 mg de ARN). La muestra se inyectó en la columna y se detectó con tampón Tris (50 mM) hasta que se completó la elución de la muestra. El flujo se ajustó a 1 ml/min (correspondiente a 125 cm/h). La limpieza de la columna in el sitio (CIP) y la regeneración se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se encontró que el ARN se puede recuperar en la columna de flujo continuo (por ejemplo, muestra de reacción de transcripción *in vitro*, 5,1 mg de ARN, el ARN se eluyó en flujo continuo). Las figuras 4A y 4B muestran que el ARN se recupera del flujo continuo de la columna a un alto nivel de rendimiento (FIG.4B, carril 2 frente al carril 1) y contiene niveles más bajos de impurezas de proteínas en comparación con la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo (FIG. 4A, carril 2 frente a carril 1).

Para probar el efecto de la presencia de sal en la eliminación de las impurezas de proteínas utilizando cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo, se analizaron las concentraciones crecientes de cloruro de sodio o fosfato de sodio añadido a la muestra después de la purificación y en el tampón de detección. Las condiciones cromatográficas para estas purificaciones fueron equivalentes a las especificadas anteriormente. Las fracciones de flujo continuo que contenían una cantidad igual de ARN purificado (5 µg) se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con plata. La FIG 5 muestra que una concentración creciente de sal se correlaciona positivamente con el nivel de eliminación de contaminantes proteínicos. Se añadió sal a la muestra y al tampón de detección. Las flechas indican dos proteínas contaminantes (polimerasa T7 y una subunidad grande de la enzima de protección con caperuza). La muestra de control en el extremo derecho es después de la purificación de una reacción de transcripción *in vitro* utilizando solo filtración de flujo tangencial. En conclusión, el aumento de la concentración de sal facilita la eliminación del remanente de proteínas, lo que lleva a una masa de proteínas final que está por debajo del nivel de detección utilizando un gel de poliacrilamida teñido con plata y 5 µg de ARN.

Se optimizaron, aún más, las condiciones para la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo, en particular, se varió y evaluó la concentración de sal (0-500 mM), el caudal (50-500 cm/h) y la dilución de la muestra (dilución de 4 veces a no diluida; antes de la aplicación a la columna) por su efecto sobre el nivel de rendimiento de ARN (recuperación), eliminación de proteínas (polimerasa T7 y/o enzima de protección con caperuza) y eliminación de nucleótidos después de la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo y la presión previa a la columna y el tiempo de operación del procedimiento de cromatografía. La FIG. 8 muestra el diseño de un enfoque experimental estadísticamente significativo. Se indican los intervalos de valores para las variables probadas y los parámetros de salida que se evaluaron. Detalles del modelo: Diseños de Superficies de Respuesta, Diseños Compuestos Centrales, Inscrito. La muestra de partida fue una muestra de reacción de transcripción *in vitro* no purificada que contenía el ARN de interés. El remanente de proteínas se evaluó mediante una SDS page con tinción de plata del material de flujo continuo y se cuantificó por densitometría de las bandas de proteínas. Se cuantificó la eliminación de nucleótidos y el rendimiento del ARN como se describe en el Ejemplo 1.

La Tabla 1 muestra los valores de salida del rendimiento de ARN (recuperación), eliminación de proteínas (polimerasa T7 y enzima de protección con caperuza), valores de DO260 nm, tiempo de operación y presión previa a la columna después de una cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo ejecutada en diferentes condiciones (muestras A-T).

Tabla 1

Muestras	CCI Inscrito												Ribogreen			UA	Flujo continuo	Pre columna
	Caudal	Sal	Conc	Caudal cm/h	Sal mM	Conc	Vol iny	ARN iny ug	ul en GEL	DO promedio ng/ul	total	recuperación %	ng/ul	total	recuperación %	Proteína	Tiempo	Presión
A	-0,594	-0,594	-0,594	141,3	101,5	0,402	500	106,0	19,9	91,9	229,6	95,2	112,8	281,9	116,8	0,162	0,0176	0,140
B	0,594	-0,594	-0,594	408,7	101,5	0,402	500	306,5	19,9	103,9	259,6	107,6	119,3	298,2	123,6	0,297	0,0061	0,260
C	-0,594	0,594	-0,594	141,3	398,5	0,402	500	106,0	19,9	131,0	327,5	135,7	105,1	262,8	108,9	0,083	0,0176	0,140
D	0,594	0,594	-0,594	408,7	398,5	0,402	500	306,5	19,9	142,9	357,1	148,0	102,3	255,7	106,0	0,100	0,0061	0,260
E	-0,594	-0,594	0,594	141,3	101,5	0,848	500	106,0	9,4	227,7	569,3	111,9	214,8	537,1	105,6	0,180	0,0083	0,160
F	0,594	-0,594	0,594	408,7	101,5	0,848	500	306,5	9,4	254,8	636,9	125,2	237,4	593,5	116,7	0,221	0,0029	0,260
G	-0,594	0,594	0,594	141,3	398,5	0,848	500	106,0	9,4	259,6	648,9	127,6	183,2	458,0	90,0	0,080	0,0083	0,160
H	0,594	0,594	0,594	408,7	398,5	0,848	500	306,5	9,4	291,1	727,8	143,1	202,4	506,1	99,5	0,122	0,0029	0,280
I	0,000	0,000	0,000	275,0	250,0	0,625	500	206,3	12,8	204,0	509,9	136,0	198,5	496,2	132,3	0,160	0,0058	0,200
L	0,000	0,000	0,000	275,0	250,0	0,625	500	206,3	12,8	206,1	515,1	137,4	191,6	479,0	127,7	0,169	0,0058	0,200
M	0,000	0,000	0,000	275,0	250,0	0,625	500	206,3	12,8	206,4	516,0	137,6	160,7	401,6	107,1	0,144	0,0058	0,200
N	0,000	0,000	0,000	275,0	250,0	0,625	500	206,3	12,8	211,8	529,5	141,2	174,3	435,7	116,2	0,104	0,0058	0,200
O	-1,000	0,000	0,000	50,0	250,0	0,625	500	37,5	12,8	180,8	452,0	120,5	157,7	394,1	105,1	0,062	0,0320	0,070
P	1,000	0,000	0,000	500,0	250,0	0,625	500	375,0	12,8	210,7	526,8	140,5	197,7	494,3	131,8	0,112	0,0032	0,320
Q	0,000	-1,000	0,000	275,0	0,0	0,625	500	206,3	12,8	140,3	350,6	93,5	178,1	445,1	118,7	0,156	0,0058	0,210
R	0,000	1,000	0,000	275,0	500,0	0,625	500	206,3	12,8	208,2	520,4	138,8	142,1	355,2	94,7	0,064	0,0058	0,200
S	0,000	0,000	-1,000	275,0	250,0	0,250	500	206,3	32,0	72,0	180,0	120,0	76,4	190,9	127,3	0,018	0,0145	0,200
T	0,000	0,000	1,000	275,0	250,0	1,000	500	206,3	8,0	315,9	789,8	131,6	269,6	674,1	112,3	0,096	0,0036	0,200

Los parámetros de salida de la eliminación de la polimerasa T7 y la eliminación de la enzima de protección con caperuza en las muestras A-T se cuantificaron mediante la resolución del flujo continuo de la cromatografía con perlas de núcleo usando electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de plata, seguida de cuantificación utilizando densitometría de las bandas de proteínas. Se usó como control una muestra de transcripción *in vitro* no purificada. Se analizaron de nuevo los resultados de acuerdo con las condiciones de la cromatografía: efecto de la concentración de sal y la dilución de la muestra en la recuperación del ARN, eliminación de la polimerasa T7 (cuantificación en unidades relativas) y eliminación de la enzima de protección con caperuza (cuantificación en unidades relativas); efecto del caudal y dilución de sal en la recuperación de ARN, la eliminación de la polimerasa T7 y la eliminación de la enzima de protección con caperuza; efecto del caudal y concentración de sal en la recuperación de ARN, la eliminación de la polimerasa T7 y la eliminación de la enzima de protección con caperuza.

Utilizando una reacción de transcripción *in vitro* no purificada como muestra de inicio, se determinó el volumen máximo de muestra por volumen de columna (VC) a partir del cual se elimina suficiente proteína usando cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo. Se determinó el efecto de la relación de volumen de muestra a columna sobre la eliminación de proteínas. Las muestras se diluyeron hasta una relación máxima muestra/VC de 10:1 (VC: 1 ml; ID: 0,7 cm; altura: 2,5 cm, Vel. l: 250 cm/h; caudal: 1,6 ml/min; tiempo de contacto: 36 segundos) o 64:1 (CV: 0,137 ml; ID: 0,5 cm; altura: 0,7 cm, Vel. l: 250 cm/h; caudal: 0,82 ml/min; tiempo de contacto: 10 segundos) y se añadió cloruro de potasio a una concentración final de 250 mM. Se analizó el flujo continuo de cada ejecución mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y con tinción de plata. Se encontró que el avance de la proteína se produjo cuando la relación muestra-VC superó aproximadamente 10:1, en las condiciones utilizadas. En conclusión, una relación muestra/VC de hasta 10 ARN purificados eficazmente a partir de impurezas de proteínas en la condición experimental utilizada (por ejemplo, 10 ml de reacción de TIV puede diluirse a 40 ml y purificarse eficazmente con una columna de 1 ml).

Además, se compararon varias muestras y/o composiciones de tampones de detección para su uso en cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo con respecto al grado de precipitación de ARN observado en estos tampones, medidos usando dispersión dinámica de la luz y un tamaño de partícula aparente creciente como un indicador de precipitación de ARN. La Tabla 2 resume los resultados de la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo: análisis de la dispersión dinámica de la luz del tamaño de partícula del agregado de ARN en presencia de varias sales. La segunda columna se refiere a la concentración de sal en mM. Los números en las columnas 3-7 son el radio de partícula en nm. La Tabla muestra que el tampón fosfato de potasio (pH 6,5) y el tampón cloruro de potasio (pH 8,0) son buenos candidatos para una purificación de flujo continuo optimizada.

Tabla 2

		Tris 10 mM pH 8,0 + NaCl	Tris 10 mM pH 8,0 + KCl	KP04 pH 6,5	KP04 pH 8,0	NaP04 pH 6,5
NaCl (mM)	0	20,3				
	83	23,2	22,3	21,1	20,2	21,9
	167	21,8	20,4	20,1	19,8	22,2
	250	22	19,7	20	20,7	23,8
	333	23,9	19,4	20,7	23,1	26,8
	417	27,6	20,2	21,3	26,6	31,8
	500	32,6	21,3	22,5	31,1	39,8

Ejemplo 6: *Purificación de ARN utilizando cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo y filtración de flujo tangencial.*

Utilizando una reacción de transcripción *in vitro* no purificada como muestra de inicio que contenía un producto de replicón de ARN de 10 kb, se comparó la eliminación de nucleótidos y proteínas mediante la filtración de flujo tangencial o la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo (utilizando concentraciones de cloruro de potasio de 0, 250 o 500 mM en la muestra). Las FIG. 6B y 6D muestran que la filtración de flujo tangencial elimina de manera eficaz las impurezas de nucleótidos. La FIG. 6C muestra que la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo elimina de manera eficaz las impurezas de proteínas en presencia de cloruro de potasio. Por lo tanto, cuando se necesite eliminar las impurezas de nucleótidos y proteínas, se necesita que la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo va seguida por filtración de flujo tangencial.

Ejemplo 7: *Purificación de ARN utilizando cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo y cromatografía con hidroxiapatita (no dentro del ámbito de la invención)*

A veces, puede no desearse la presencia de sales adicionales como el cloruro de potasio en la muestra y/o en el tampón de detección. Utilizando una reacción de transcripción *in vitro* no purificada como muestra de inicio que contenía un replicón de ARN de 10 kb, se comparó la eliminación de proteínas mediante cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo (sin sal adicional, es decir, cloruro de potasio 0 mM) sola o seguida por cromatografía con hidroxiapatita (también sin sal adicional, es decir, cloruro de sodio 0 mM). La FIG. 6C (carril "CC0HTP0" frente a

carril "CC0") muestra que se puede lograr una eliminación eficaz de proteínas incluso en ausencia de sal adicional, cuando la cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo va seguida por cromatografía con hidroxiapatita.

Ejemplo 8: *Combinaciones de procedimientos para la purificación de ARN e intercambio de tampones.*

Se diseñaron cuatro flujos de procedimiento diferentes (P1-P4) para la purificación del ARN (Tabla 3) y se compararon con respecto a la recuperación/rendimiento y pureza del ARN (Figuras 6A-6G).

Tabla 3

	Flujo de procedimiento		
Opciones:	Purificación	→	Intercambio de Tampón
1	TFF (puri b.)	→	TFF (formulación b.)
2	TFF (sin sales) → CL (hidroxiapatita)	→	TFF (formulación b.)
3	Perlas de núcleo de GE (250 KCl)	→	TFF (formulación b.)/SEC
4	Perlas de núcleo de GE (sin sales) → CL (hidroxiapatita)	→	TFF (formulación b.)

Se utilizó una reacción *in vitro* que contenía un replicón de ARN de interés de 10 kb como muestra inicial.

La pureza del ARN se relacionó con el nivel de proteína (polimerasa T7, enzima de protección con caperuza, inhibidor de RNasa, pirofosfatasa, proteínas de *E. coli* transferidas de la amplificación de la plantilla de ADN), ADN plásmido y nucleótidos después de cada etapa. La recuperación de ARN y los niveles de nucleótidos se midieron utilizando los procedimientos del Ejemplo 1. Los niveles de proteína se midieron utilizando ELISA o electroforesis en gel de poliacrilamida seguido con tinción de plata o detección basada en anticuerpos (transferencia Western). Los niveles de ADN se midieron por PCR cuantitativa.

Se puede utilizar una etapa de filtración de flujo tangencial para intercambiar el tampón, pero cuando esto da como resultado un aumento de la pureza, también es una etapa de purificación.

Para fines de comparación, se realizó una etapa de digestión de ADN utilizando DNasa para todos los procedimientos después de la TIV y antes de aplicar la muestra al sistema de cromatografía/filtración. Sin embargo, cabe señalar que esta etapa no es obligatoria, por ejemplo, cuando se utiliza cromatografía con hidroxiapatita.

Las figuras 7A-7G muestran que el remanente de proteínas (T7 y la enzima de protección con caperuza) se observa solo con el procedimiento 1. La cromatografía con hidroxiapatita y la cromatografía de perlas de núcleo pueden eliminar el remanente de proteínas de manera eficaz. Las trazas se detectan después de la purificación, por debajo del nivel de detección del ensayo ELISA. La purificación de flujo continuo con perlas de núcleo seguida de filtración de flujo tangencial es más fácil de operar que la cromatografía con hidroxiapatita. El rendimiento de ARN fue: P1: 74,8 %, P2: 37,3 %, P3: 76,2 %, P4: 60,7 % (la recuperación de ARN se resume en la Tabla 4). La eliminación de nucleótidos se completó en todos los procedimientos en el producto final. El tiempo de procedimiento varía de 45 minutos a 84 minutos para todos los procedimientos. La concentración de ADN en el producto final fue de 0,6 ng de ADN por 75 µg de ARN. El nivel de contaminación de la proteína de *E. coli* estaba por debajo del nivel de detección del procedimiento de transferencia Western utilizado. El tamaño de partícula de ARN aparente medido por dispersión dinámica de la luz en el producto final fue de 40-45 nm de radio para todos los procedimientos.

Tabla 4

	Etapa:	**Etapa de recuperación**	**Recuperación total**
P1	**1 -TFF250**	13,8	
	2 - TFFfb	543,4	74,8
P2	**1 -TFF0**	81,9	
	2 - HTP0	77,0	63,0
	3 - TFFfb	59,2	37,3
P3	**1 - CC250**	88,7	
	2 - TFFfb	85,9	76,2
P4	**1 - CC0**	90,1	
	2 -HTP0	88,8	79,9
	3 - TFFfb	75,9	60,7

Ejemplo 9: Purificación de ARN a gran escala

Se usó una combinación de filtración de flujo tangencial seguida de cromatografía con hidroxiapatita para la purificación de ARN preparativa a partir de una muestra de reacción de transcripción *in vitro*. Se utilizó una reacción de transcripción *in vitro* no purificada que contenía 6 mg de un producto de replicón de ARN protegido con caperuza de 10 kb como muestra inicial. La filtración de flujo tangencial se realizó utilizando Tris 10 mM, pH 8,0. Se retuvo la fracción que contenía ARN. Se añadió cloruro de potasio a la muestra a una concentración final de 500 mM, y la muestra se aplicó a la columna de hidroxiapatita (CHT ™ Ceramic Hidroxiapatita Tipo II, tamaño de partícula de 40 µm, Biorad, en una columna Hi Scale 26 de GE, 20 cm de altura, 100 ml; ejecutada en un explorador GE ÄKTA 100; caudal 10 ml/min; velocidad lineal 300 cm/h). Los tampones de elución fueron tampón A (fosfato de potasio 10 mM, pH 6,5) y tampón B (fosfato de potasio 1 M, pH 6,5). El ARN se eluyó selectivamente con 18 % de tampón B (fosfato de potasio 180 mM). Los resultados demuestran que este procedimiento logra una purificación de ARN preparativa a gran escala con alto rendimiento y pureza.

Se usó una combinación de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo seguida de TFF para la purificación de ARN preparativa a partir de una muestra de reacción de transcripción *in vitro*. Se utilizó una reacción de transcripción *in vitro* no purificada que contenía 120 mg de un producto de replicón de ARN protegido con caperuza de 10 kb como muestra inicial. La muestra se diluyó 4 veces, a continuación, se añadió opcionalmente cloruro de potasio a 250 o 500 mM, y se aplicó la muestra a una columna de flujo continuo con perlas de núcleo usando perlas de Core 700 de Capto™. La cromatografía se realizó a un caudal lineal de 275 cm/h (25 ml/min volumétricos) con un tiempo de contacto de 2,21 ’. El flujo continuo que contenía ARN se purificó, a continuación, adicionalmente, se concentró 2 veces y se intercambió el tampón en el tampón de formulación final (todo en un solo procedimiento) utilizando TFF (módulo de fibra hueca, límite de 500 kDa, mPES).

El procedimiento se probó con 100 ml de ARN de TIV protegido con caperuza (aproximadamente 120 mg), utilizando una columna Captocore de 50 ml (Captocore 700, 2,6 cm de diámetro interno, 10 cm de altura ejecutada en las condiciones descritas anteriormente, caudal de 25 ml/min) y un cartucho de TFF de 790 cm^2 (mismas condiciones, flujo 200 ml/min). El material final tenía características comparables al procedimiento de menor escala en términos de actividad, pureza y rendimiento. Incluso en experimentos preliminares, el procedimiento tuvo un rendimiento de aproximadamente el 80 % por etapa, lo que dio una recuperación del 65 % en general, y se completó en 70’ (12 minutos para la etapa de Captocore, 58 minutos para TFF).

La siguiente tabla muestra los parámetros del procedimiento adecuados para cuatro columnas disponibles que pueden manejar volúmenes de muestra de 10 a 1000 ml:

	Volumen de la muestra (ml)	**Velocidad lineal (cm/h)**	**Tiempo de contacto (min)**	**Diámetro interno (cm)**	Área (cm2)	Altura (cm)	Volumen de columna (ml)	Muestra/VC	Volumen de dilución final (ml)	Caudal (ml/min)	Tiempo del procedimiento (min)
GE HiScreen	**10**	**275**	**2,21**	**0,77**	0,47	10,13	4,71	2,12	40	2,1	19
GE HiScale 26/20	**100**	**275**	**2,21**	**2,60**	5,31	10,13	53,75	1,86	400	24,3	16
GE HiScale 26/20	**200**	**275**	**2,21**	**2,60**	5,31	10,13	53,75	3,72	800	24,3	33
Spectra/Chrom 50/100	**1000**	**275**	**2,21**	**5,00**	19,63	10,13	198,78	5,03	4000	89,9	44

La tabla muestra el caudal como una velocidad lineal, lo que significa que los diámetros internos de las columnas son irrelevantes para definir el procedimiento. La velocidad lineal puede mantenerse constante en los procedimientos de ampliación. El diámetro de la columna diferente se utiliza para calcular el caudal en ml/min, a fin de mantener constante la velocidad lineal y, por lo tanto, mantener el mismo tiempo de contacto (es decir, el tiempo que la muestra permanece en la columna).

REFERENCIAS

Andrews-Pfannkoch y col. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(15):5039-5045.
Beland y col. J Chromatogr. 1979; 174(1): 177-186.
Bernardi. Nature. 1965; 206:779-783.
Eon-Duval y col. Anal Biochem. 2003; 316(1):66-73.
Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472
Guerrero-Germán y col. Bioprocess Biosyst Eng. 2009; 32(5):615-623.
Kahn y col. Biotechnol Bioeng. 2000; 69(1):101-106.
Kamalay y col. Proc Natl Acad Sci USA. 1984; 81(9):2801-2805.
Kendall y col. Biotechnol Bioeng. 2002; 79(7):816-822.
Løvdal y col. Dis Aquat Organ. 2002; 49(2): 123-128.
Pascolo S. Methods Mol Med. 2006;127:23-40.
Zhang y col. PLOS Biol. 2006; 4(1):108-118.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de ARN de una muestra de reacción de transcripción *in vitro* (TIV), que comprende una primera etapa de cromatografía de flujo continuo con perlas de núcleo en presencia de un tampón que contiene una sal de potasio, en el que el procedimiento comprende además una o más etapas de intercambio de tampón que comprenden filtración de flujo tangencial.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal de potasio es fosfato de potasio o cloruro de potasio.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la sal de potasio es cloruro de potasio a una concentración de 100-500 mM.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARN se purifica a una escala preparativa.

5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento no comprende el uso de cloruro de litio, disolventes orgánicos, temperaturas superiores a 70 °C, y/o digestión enzimática de ADN.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento incluye desechar materiales que no contengan ARN o las especies de ARN deseadas, y mantener materiales que contengan ARN o el ARN deseado.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra contiene ARN y uno o más de: ADN plásmido, desoxioligonucleótidos, desoxinucleósidos monofosfato, ribonucleósidos trifosfato y proteína.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra contiene ARN y no más de cuatro de: ADN plásmido, desoxioligonucleótidos, desoxinucleósidos monofosfato, ribonucleósidos trifosfato y proteína; y, opcionalmente, en el que la muestra no contiene ADN genómico y/o una membrana celular o fragmentos de la misma.

9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARN es un ARN monocatenario, por ejemplo un ARNm.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARN comprende una secuencia lineal de al menos 1.000 nucleótidos, por ej., al menos 5.000 nucleótidos.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento utiliza una fase estacionaria hidrófila y/o una membrana hidrófila.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende además una etapa de fabricación de ARN, por ejemplo, utilizando transcripción *in vitro* de ARN.

13. Un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica que comprende las etapas de:

(a) purificar ARN de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y
(b) formular el ARN purificado como una composición farmacéutica.

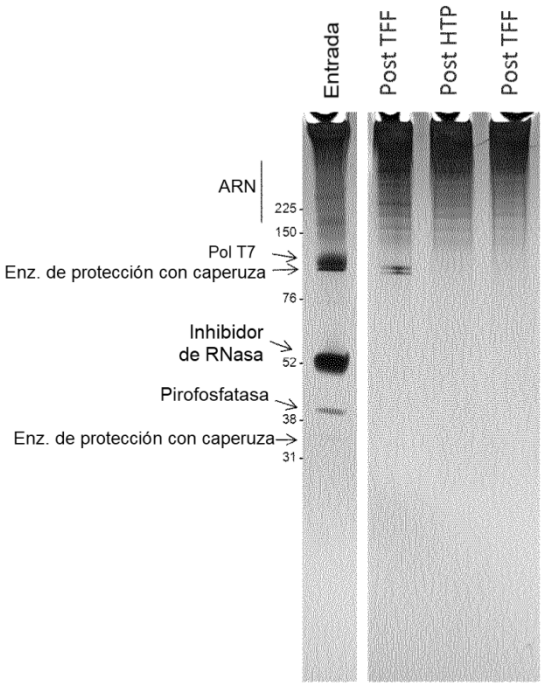

Entrada
Post TFF
Post HTP
Post TFF
ARN
225
150
Pol T7
Enz. de protección con caperuza
76
Inhibidor
de RNasa
52
Pirofosfatasa
38
Enz. de protección con caperuza
31

FIG. 1

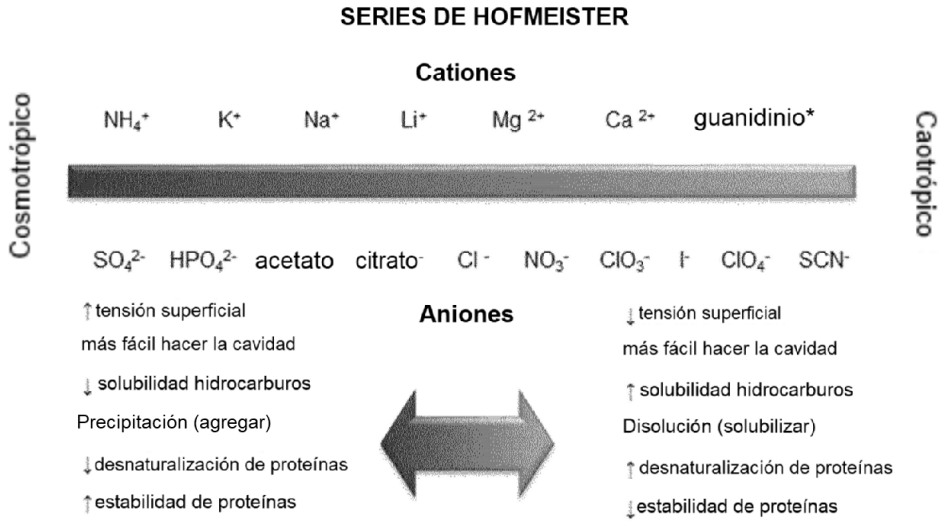

SERIES DE HOFMEISTER
Cationes
Cosmotrópico
NH_4^+ K^+ Na^+ Li^+ Mg^{2+} Ca^{2+} guanidinio*
Caotrópico
SO_4^{2-} HPO_4^{2-} acetato citrato$^-$ Cl^- NO_3^- ClO_3^- I^- ClO_4^- SCN^-
Aniones
↑tensión superficial
más fácil hacer la cavidad
↓solubilidad hidrocarburos
Precipitación (agregar)
↓desnaturalización de proteínas
↑estabilidad de proteínas
↓tensión superficial
más fácil hacer la cavidad
↑solubilidad hidrocarburos
Disolución (solubilizar)
↑desnaturalización de proteínas
↓estabilidad de proteínas

FIG. 2A

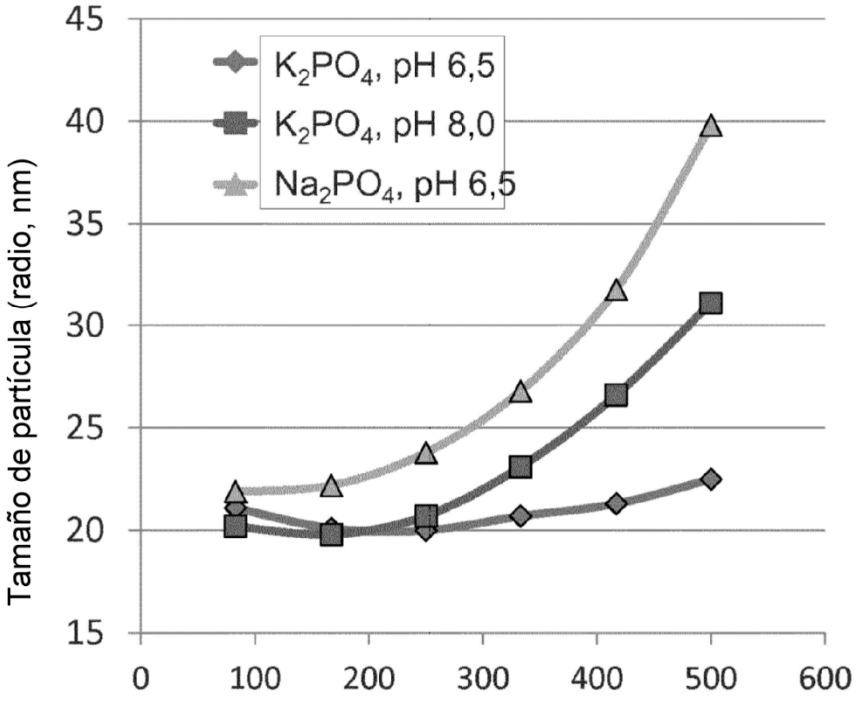

45
40
35
30
25
20
15
0
100
200
300
400
500
600
Tamaño de partícula (radio, nm)
K_2PO_4, pH 6,5
K_2PO_4, pH 8,0
Na_2PO_4, pH 6,5

FIG. 2B

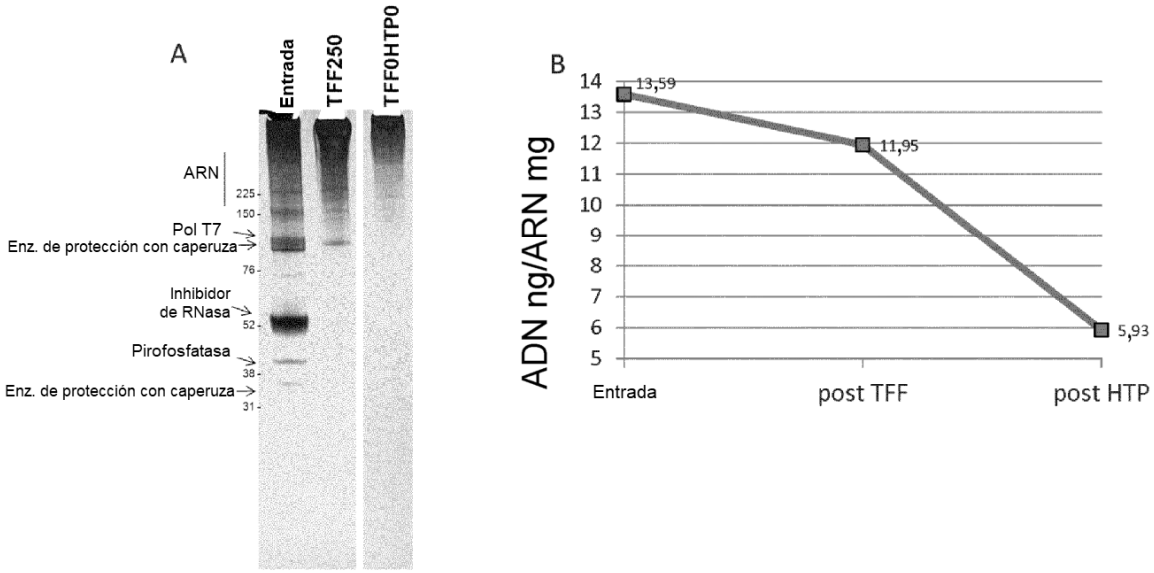

A
Entrada
TFF250
TFF0HTP0
ARN
225
150
Pol T7
Enz. de protección con caperuza
76
Inhibidor
de RNasa
52
Pirofosfatasa
38
Enz. de protección con caperuza
31
B
ADN ng/ARN mg
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
13,59
11,95
5,93
Entrada
post TFF
post HTP

FIG. 3

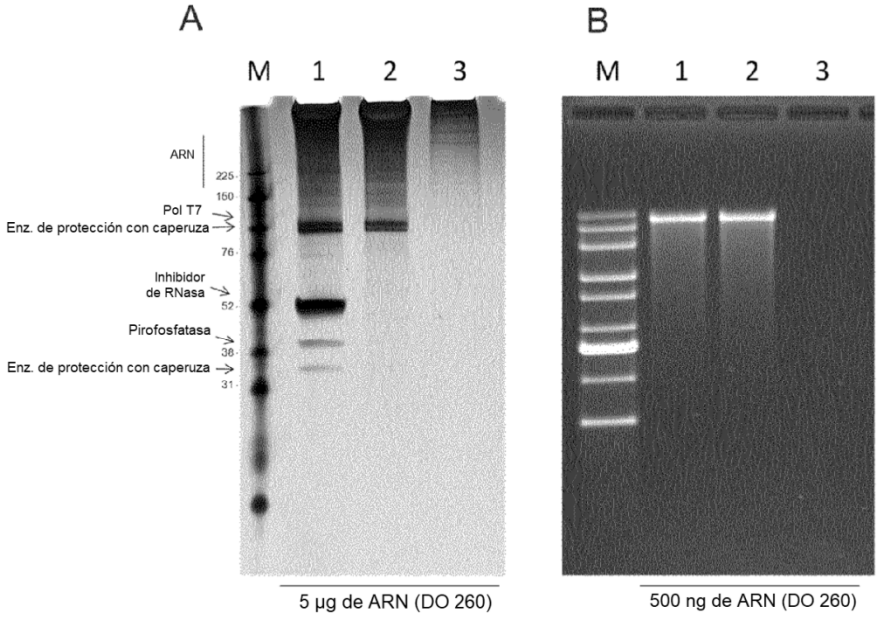

A
M 1 2 3
ARN
225
160
Pol T7
Enz. de protección con caperuza
76
Inhibidor
de RNasa
52
Pirofosfatasa
38
Enz. de protección con caperuza
31
5 µg de ARN (DO 260)
B
M 1 2 3
500 ng de ARN (DO 260)

FIG. 4

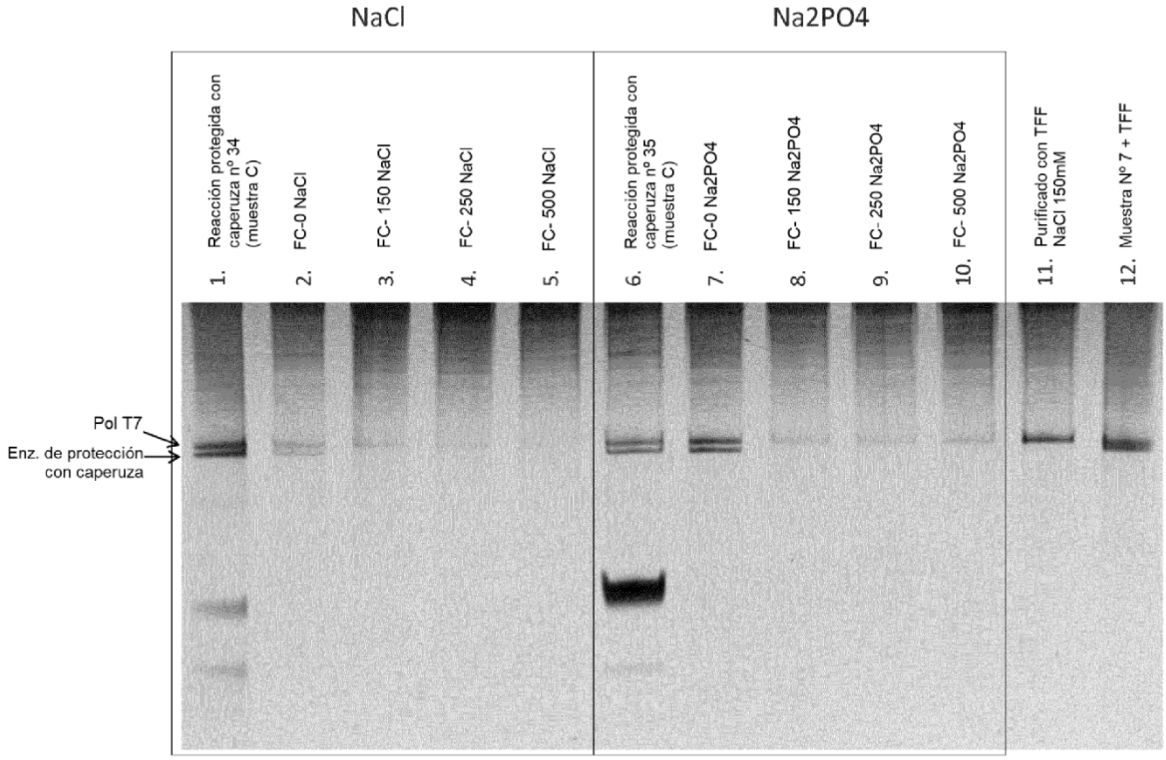
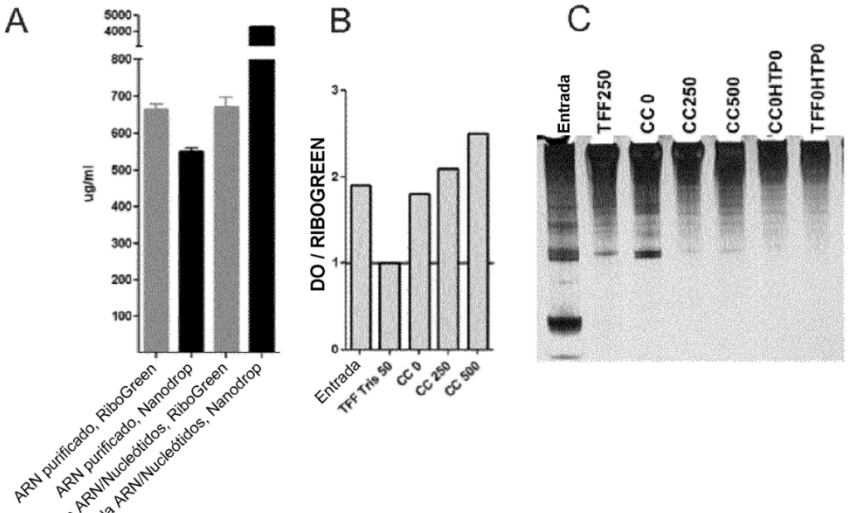

NaCl
Na2PO4
1. Reacción protegida con caperuza nº 34 (muestra C)
2. FC-0 NaCl
3. FC- 150 NaCl
4. FC- 250 NaCl
5. FC- 500 NaCl
6. Reacción protegida con caperuza nº 35 (muestra C)
7. FC-0 Na2PO4
8. FC- 150 Na2PO4
9. FC- 250 Na2PO4
10. FC- 500 Na2PO4
11. Purificado con TFF NaCl 150mM
12. Muestra Nº 7 + TFF
Pol T7
Enz. de protección con caperuza

FIG. 5



D

	Ribogreen ug/ml	desv. estándar	nanodrop promedio	desv. estándar	relación
Entrada	**609,9**	17,1	***1188,8***	105,5	1,9
TFF Tris50	**109,5**	0,5	**107,6**	1,1	1,0
CC 0 KCl	**194,2**	12,0	**354,5**	0,9	1,8
CC 250 KCl	**162,0**	8,8	**338,1**	0,4	2,1
CC 500 KCl	**142,4**	2,3	**362,5**	1,5	2,5

FIG. 6

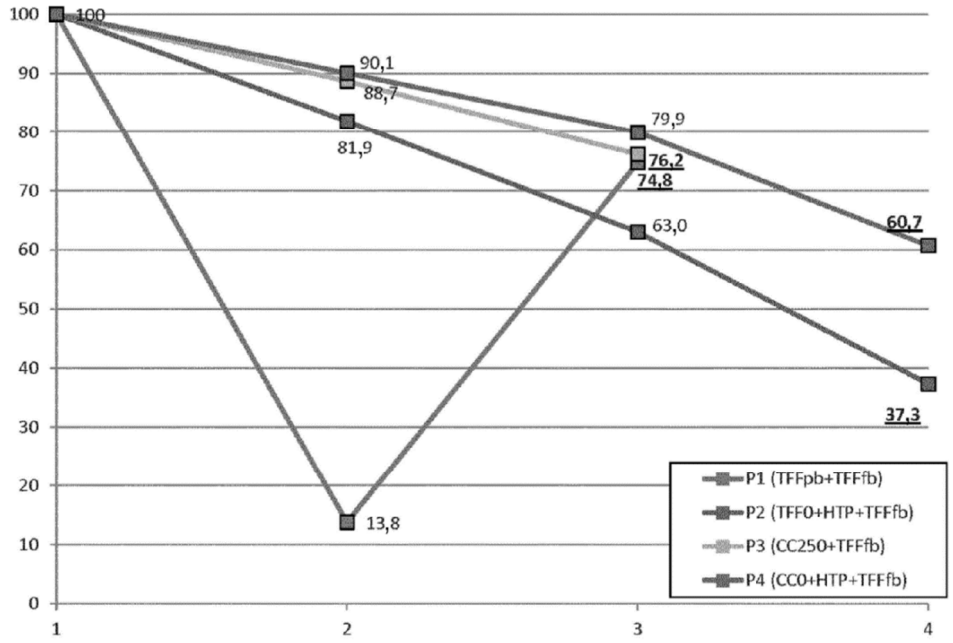

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
100
90,1
88,7
81,9
79,9
76,2
74,8
63,0
60,7
37,3
13,8
P1 (TFFpb+TFFfb)
P2 (TFF0+HTP+TFFfb)
P3 (CC250+TFFfb)
P4 (CC0+HTP+TFFfb)

FIG. 7A

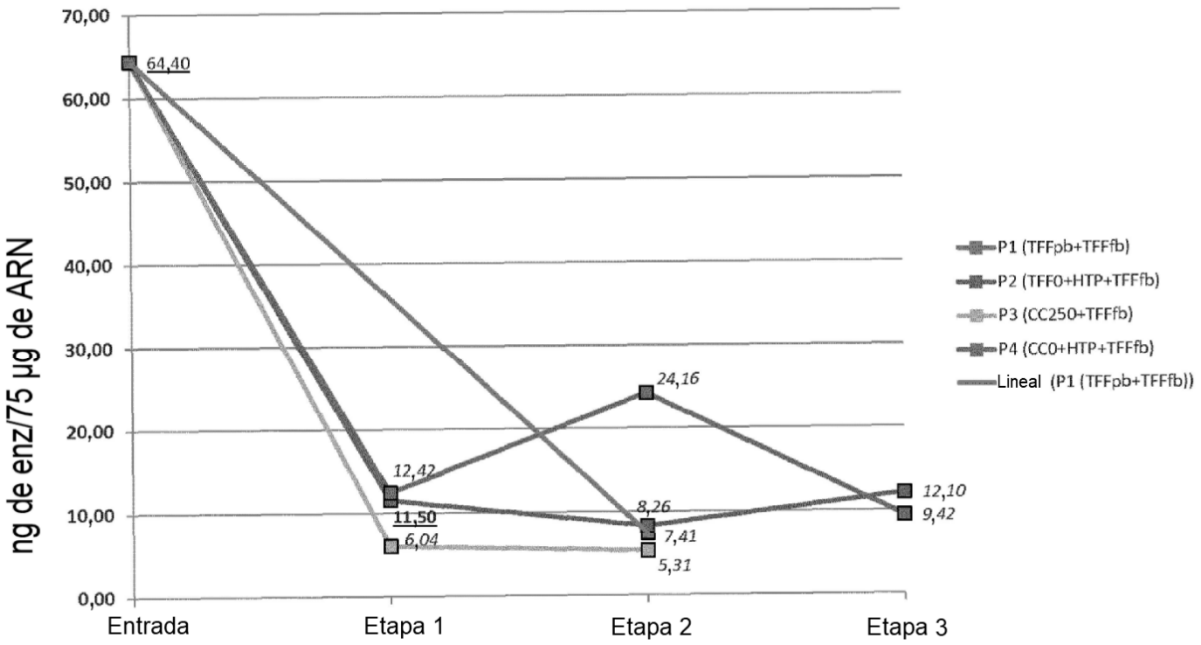

70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
ng de enz/75 µg de ARN
64,40
12,42
11,50
6,04
24,16
8,26
7,41
5,31
12,10
9,42
Entrada
Etapa 1
Etapa 2
Etapa 3
P1 (TFFpb+TFFfb)
P2 (TFF0+HTP+TFFfb)
P3 (CC250+TFFfb)
P4 (CC0+HTP+TFFfb)
Lineal (P1 (TFFpb+TFFfb))

FIG. 7B

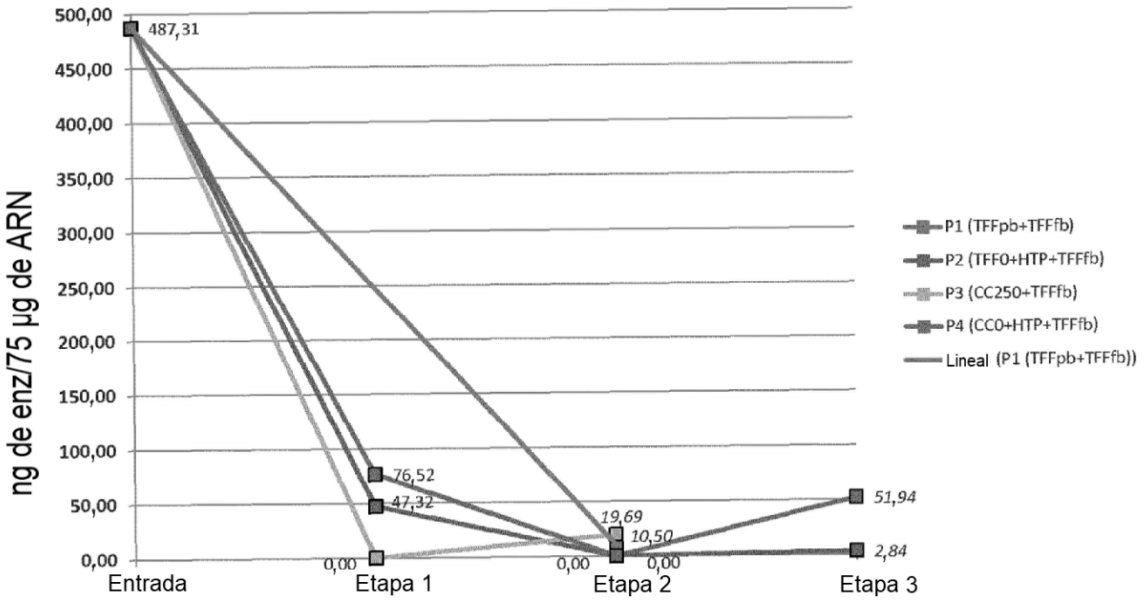

ng de enz/75 µg de ARN
500,00
450,00
400,00
350,00
300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
487,31
76,52
47,32
0,00
19,69
10,50
0,00
0,00
51,94
2,84
Entrada
Etapa 1
Etapa 2
Etapa 3
P1 (TFFpb+TFFfb)
P2 (TFF0+HTP+TFFfb)
P3 (CC250+TFFfb)
P4 (CC0+HTP+TFFfb)
Lineal (P1 (TFFpb+TFFfb))

FIG. 7C

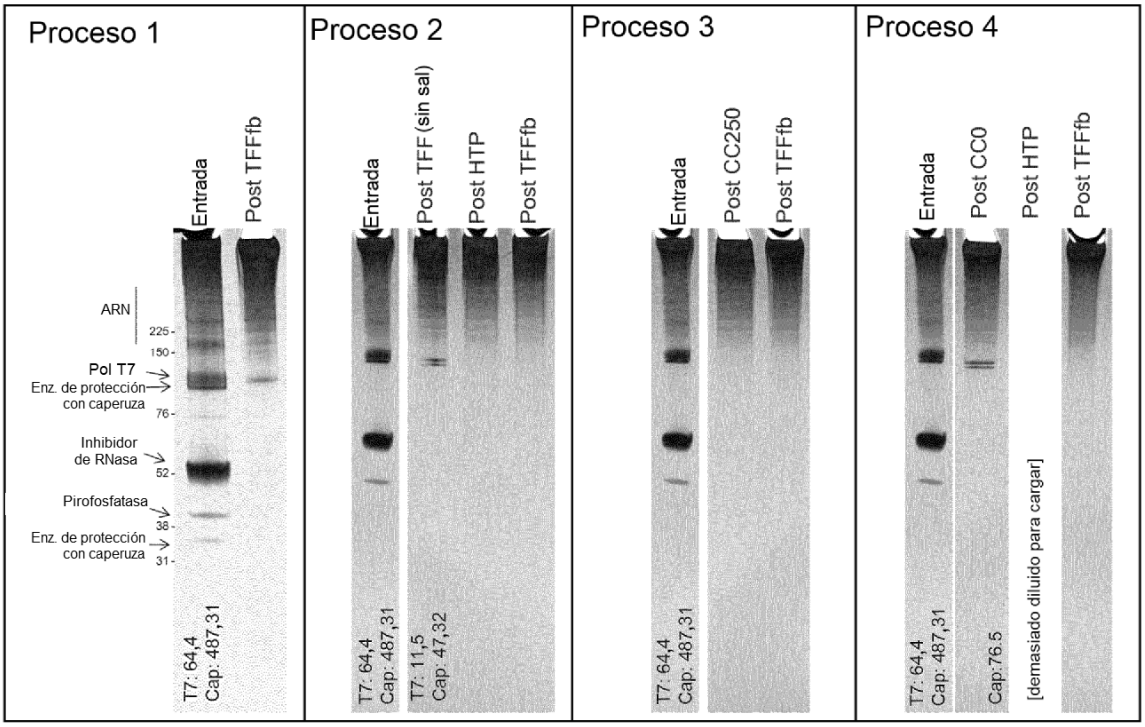

Proceso 1
Entrada
Post TFFfb
ARN
225
150
Pol T7
Enz. de protección con caperuza
76
Inhibidor de RNasa
52
Pirofosfatasa
38
Enz. de protección con caperuza
31
T7: 64,4
Cap: 487,31
Proceso 2
Entrada
Post TFF (sin sal)
Post HTP
Post TFFfb
T7: 64,4
Cap: 487,31
T7: 11,5
Cap: 47,32
Proceso 3
Entrada
Post CC250
Post TFFfb
T7: 64,4
Cap: 487,31
Proceso 4
Entrada
Post CC0
Post HTP
Post TFFfb
T7: 64,4
Cap: 487,31
Cap:76.5
[demasiado diluido para cargar]

FIG. 7D

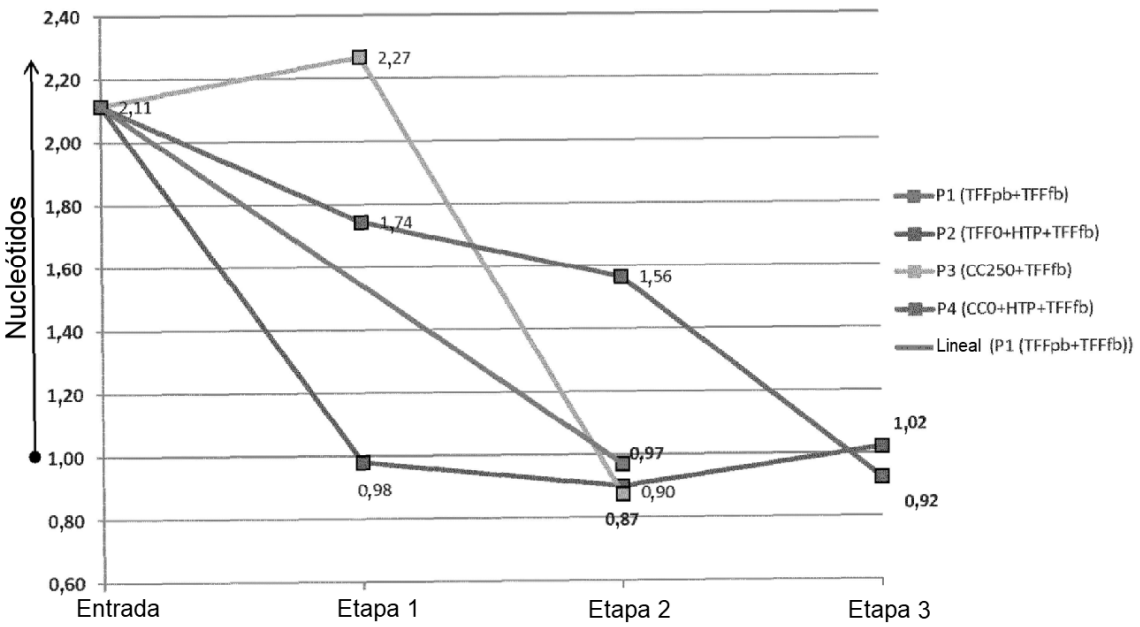

2,40
2,20
2,00
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
Nucleótidos
2,11
2,27
1,74
1,56
0,98
0,97
0,90
0,87
1,02
0,92
Entrada
Etapa 1
Etapa 2
Etapa 3
P1 (TFFpb+TFFfb)
P2 (TFF0+HTP+TFFfb)
P3 (CC250+TFFfb)
P4 (CC0+HTP+TFFfb)
Lineal (P1 (TFFpb+TFFfb))

FIG. 7E

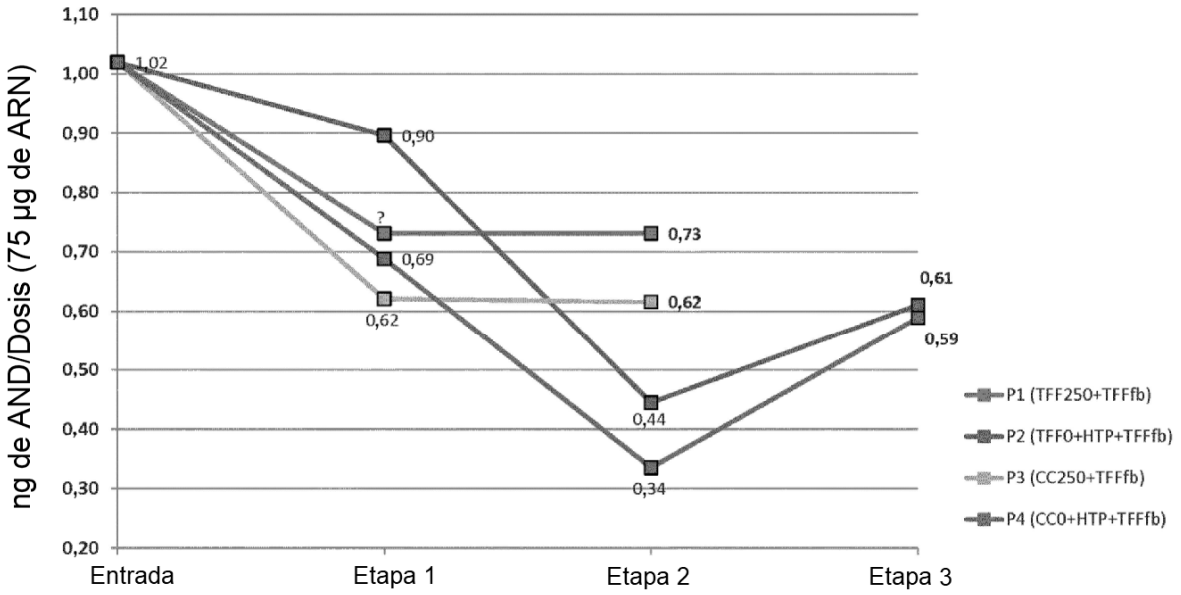

ng de AND/Dosis (75 µg de ARN)
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
1,02
0,90
?
0,73
0,69
0,62
0,62
0,61
0,59
0,44
0,34
Entrada
Etapa 1
Etapa 2
Etapa 3
P1 (TFF250+TFFfb)
P2 (TFF0+HTP+TFFfb)
P3 (CC250+TFFfb)
P4 (CC0+HTP+TFFfb)

FIG. 7F

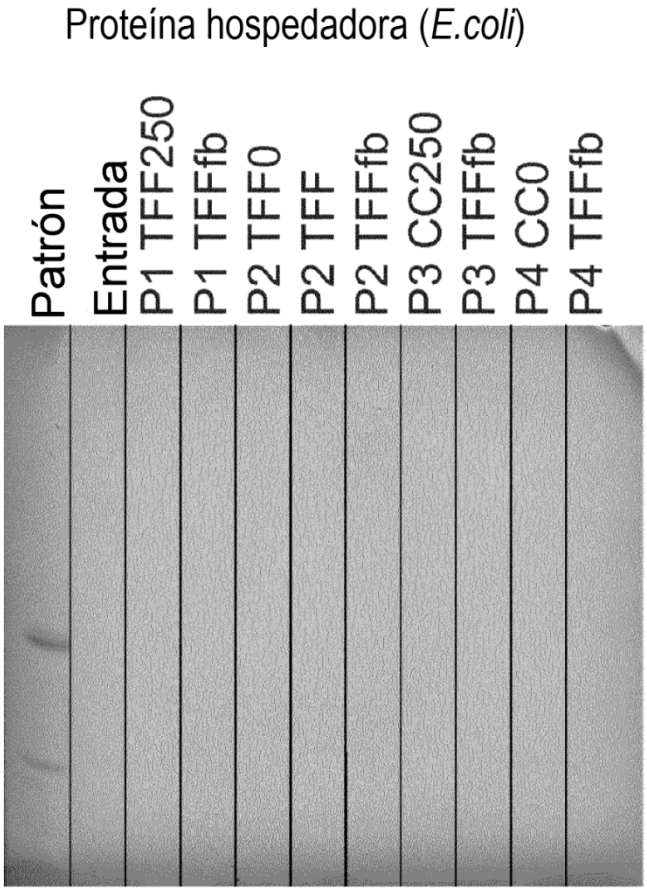
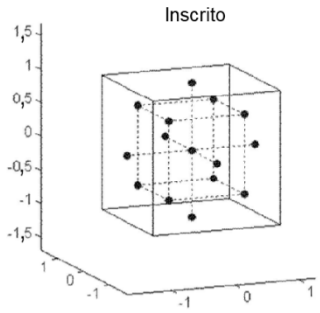

Proteína hospedadora (*E.coli*)
Patrón
Entrada
P1 TFF250
P1 TFFfb
P2 TFF0
P2 TFF
P2 TFFfb
P3 CC250
P3 TFFfb
P4 CC0
P4 TFFfb

FIG. 7G

A



B

Factores elegidos para el estudio e intervalo:

	Intervalo	
	-1	+1
Flujo (cm/h)	50	500
Sal	0	500
Conc.	0,25	1

Resultados:

- Recuperación
- Eliminación de T7
- Eliminación de enz. de protección con caperuza
- Eliminación de nucleótidos
- Presión de la precolumna
- Tiempo

FIG. 8