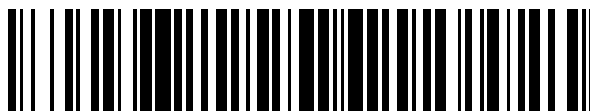


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 776**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2015 PCT/EP2015/001164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15188933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2015 E 15738263 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 3155129**

54 Título: **Método para mejorar la producción de ARN**

30 Prioridad:

10.06.2014 WO PCT/EP2014/001577

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

18.10.2019

73 Titular/es:

**CUREVAC AG (100.0%)
Paul-Ehrlich-Str. 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**WOCHNER, ANIELA;
ROOS, TILMANN y
KETTERER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 727 776 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

Método para mejorar la producción de ARN

La presente invención se refiere, entre otros, a un método para sintetizar una molécula de ARN de secuencia dada. Las moléculas terapéuticas de ácido ribonucleico (ARN) representan una clase emergente de fármacos. Las terapias basadas en ARN incluyen moléculas de ARNm que codifican antígenos para su uso como vacunas (Fotin-Mleczek et al. 2012. J. Gene Med. 14 (6): 428-439). Además, se prevé utilizar moléculas de ARN para terapias de reemplazo, por ejemplo proporcionar proteínas ausentes, tales como factores de crecimiento o enzimas, a los pacientes (Karikó et al., 2012. Mol. Ther. 20 (5): 948-953; Kormann et al., 2012. Nat. Biotechnol. 29 (2): 154-157). Además, se considera el uso terapéutico de moléculas de ARN inmunoestimuladoras no codificantes (WO2009/095226) y otros ARN no codificantes, tales como microARN y ARN largos no codificantes (Esteller, 2011. Nat. Rev. Genet. 12 (12): 861-74).

La expresión exitosa de proteínas a partir de ARN transfectado depende de la eficiencia de transfección, de la estabilidad del ARN y de la eficiencia de traducción. La estructura de cap5' y la cola 3' poli(A) son características importantes para la traducción eficiente del ARNm y la síntesis de proteínas en células eucarióticas. Los ARNm recién sintetizados están modificados con una estructura cap cuando el transcrito alcanza una longitud de 20 a 30 nucleótidos. En primer lugar, el nucleótido terminal 5' pppN se convierte en 5' GpppN por una enzima caperuza bi-funcional que tiene las actividades tanto de la ARN-5'-trifosfatasa como de la guanililtransferasa. Entonces, la parte GpppN es metilada por una segunda enzima con actividad de (guanina-7)-metiltransferasa para formar la estructura cap m7GpppN monometilada tipo 0. La cap tipo 0 se convierte luego en una estructura m7GpppN tipo 1 en el núcleo por 2'-O-metilación (Tcherepanova et al., 2008. BMC Mol. Biol. 9:90).

Las moléculas de ARN cortas pueden sintetizarse por métodos químicos, mientras que los ARN largos típicamente se obtienen mediante reacciones de transcripción *in vitro* que contienen una plantilla de ADN adecuada con un promotor derivado de bacteriófago, una ARN polimerasa, por ejemplo ARN polimerasa de bacteriófagos SP6, T3 o T7 y ribonucleósido-trifosfatos (NTP). Principalmente, las estructuras cap 5' se pueden introducir mediante dos protocolos en el ARN transcrito *in vitro*.

En el primer protocolo, la introducción de la caperuza se produce al mismo tiempo que el inicio de la transcripción (capping co-transcripción). En este enfoque, se debe añadir un análogo de dinucleótido cap, tal como m7G(5')ppp(5')G (m7G), a la mezcla de reacción. La plantilla de ADN generalmente se diseña de manera que el primer nucleótido transcrito es guanósina. El análogo de cap compite directamente con GTP por la incorporación como nucleótido inicial (nucleótido de inicio) y se incorpora tan fácilmente como cualquier otro nucleótido (WO2006/004648). Para favorecer la incorporación del análogo de cap, normalmente se usa un exceso molar del análogo de cap en relación al GTP (por ejemplo en una proporción 4:1) y la concentración de GTP se reduce en comparación con otros ribonucleósidos-trifosfato ATP, CTP y UTP. En estas condiciones, el GTP generalmente se convierte en el factor limitante para la síntesis de moléculas de ARN. En consecuencia, una alta proporción de los otros NTP (generalmente entre el 40 y el 70%) no se utilizan para la síntesis de ARN, sino que se desperdician. Con este enfoque, el rendimiento de ARN está típicamente limitado a aproximadamente 1 mg/ml (documento WO2006/004648).

En el segundo protocolo, la introducción de la caperuza se realiza en una reacción enzimática separada después de la transcripción *in vitro* (capping post-transcripción o enzimática). La enzima Cap del virus Vaccinia (VCE) posee las tres actividades enzimáticas necesarias para sintetizar una estructura cap m7G (ARN-5'-trifosfatasa, guanililtransferasa y guanina-7-metiltransferasa). Usando GTP como sustrato, la reacción VCE lleva a caps de ARN en la orientación correcta. Además, se puede crear una cap tipo 1 añadiendo una segunda enzima Vaccinia, 2'-O-metiltransferasa, a la reacción de introducción de la caperuza (Tcherepanova et al., 2008. BMC Mol. Biol. 9:90).

Se ha informado que el ARN transcrito *in vitro* por polimerasas de fago puede contener múltiples contaminantes, incluyendo moléculas de ARN de doble cadena generadas por la extensión 3'-auto-complementaria y moléculas de ARN cortas producidas por eventos abortivos de iniciación de la transcripción.

Las moléculas de ARN sintetizadas por la T7-ARN-polimerasa durante la transcripción run-off de las plantillas de ADN linealizadas pueden ser más largas que el ARN codificado (Triana-Alonso et al., 1995, JBC; 270 (11): 6298-6307). Después de dejar la plantilla de ADN, la ARN polimerasa puede unir un transcrito al sitio de la plantilla y el extremo 3' del transcrito al sitio del producto y extenderlo, si el extremo 3' no es parte de una estructura secundaria estable (auto-extensión 3' complementaria). Este efecto parece ser especialmente sensible a la concentración de UTP y una reducción exclusivamente de la concentración de UTP conduce a una transcripción fiel. Sin embargo, disminuir la concentración de UTP también puede afectar al rendimiento de ARN. Especialmente si el ARN contiene una cola poli(A), como es común en ARN tal como ARNm, un exceso de UTP no incorporado en la reacción de transcripción puede resultar en una incorporación de nucleótidos de uridina dependiente de la plantilla de ARN opuesta a la secuencia poli-A, lo que resulta en moléculas de ARN de doble hebra que pueden activar la respuesta inmune innata y disminuir la síntesis de proteínas (Kariko et al., 2011, Nucleic Acids Res .; 39 (21): e142).

Además de la molécula de ARN de longitud completa deseada, las reacciones de transcripción *in vitro* también pueden producir oligoribonucleótidos más pequeños, que son el resultado de eventos abortivos de inicio de la transcripción (Milligan, et al., 1987. Nucleic Acid Res. 15 (21): 8783-8798). Estos transcritos abortivos (prematurados) son moléculas de ARN cortas que se liberan prematuramente del complejo ternario consistente en ARN polimerasa, plantilla de ADN y cadena de ARN naciente. Típicamente, la mayoría de los transcritos abortivos tienen una longitud de dos a ocho nucleótidos y se forman debido a un ciclo abortivo durante el inicio. Curiosamente, se observó un aumento de la transcripción abortiva cuando las concentraciones de NTP eran inferiores a aproximadamente 2 mM (Kern et al., 1999. Biotechnol. Prog. 15, 174-184). Los transcritos abortivos no son deseables, ya que su síntesis consume NTP valiosos y reduce el rendimiento del producto de longitud completa.

Para el desarrollo exitoso de las terapias de ARN, la producción de moléculas de ARN como ingredientes farmacéuticos activos debe ser eficiente en términos de rendimiento, calidad, seguridad y coste, especialmente cuando el ARN se produce a gran escala y se requieren moléculas de ARN de longitud completa o moléculas de ARN de longitud completa con caperuza cap. Se describieron varios enfoques para aumentar la producción de moléculas de ARN mediante transcripción *in vitro*. Se espera que el uso de altas concentraciones de NTP aumente el rendimiento de las moléculas de ARN. Alternativamente, para la síntesis eficiente de moléculas de ARN con caperuza, se ha sugerido el ajuste de la relación entre el análogo cap y el GTP.

Las concentraciones de nucleótidos estándar para las reacciones de transcripción *in vitro* típicamente oscilan entre 1,5 y 16 mM (Milligan, et al., 1987. Nucleic Acid Res. 15(21): 8783-8798; Sampson & Uhlenbeck, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(4):1033-7; Cunningham & Ofengand 1990. Biotechniques 9(6):713-4; Weitzmann et al. 1990. Nucleic Acids Res. 18(12):3515-20; Gurevich et al. 1991. Anal. Bioquímica. 195(2):207-13). Se ha informado de posibles concentraciones de NTP de hasta 40 mM cuando las concentraciones de Mg⁺⁺ se ajustan en consecuencia, resultando en un aumento del rendimiento del ARN (US5256555).

En el mercado existen diversos kits de transcripción de alto rendimiento, por ejemplo el kit de síntesis de ARN de alto rendimiento T7 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), el kit de transcripción de alto rendimiento TranscriptAid™ T7 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), el kit de transcripción de alto rendimiento MEGAscript® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) o el kit de creación de mensajes de alto rendimiento AmpliCap-Max™ T7 (Epicentre, Madison, WI, EUA). Para todos los kits, se sugieren altas concentraciones de trabajo totales de NTP, de 30 a 40 mM, para las reacciones de transcripción estándar. Para la síntesis de ARNm con caperuza, las concentraciones de GTP oscilan entre 1,5 mM y 2 mM.

Aunque generalmente se recomiendan concentraciones altas de nucleótidos para maximizar el rendimiento de ARN en las reacciones de transcripción *in vitro*, el uso de concentraciones altas de NTP también puede tener desventajas. Por ejemplo, con altas concentraciones iniciales de NTP y concentraciones de Mg⁺⁺ suficientemente altas (por ejemplo, Mg(OAc)₂) se pueden obtener altos rendimientos de ARN. Sin embargo, a estas altas concentraciones, puede incorporarse una fracción más alta de NTP en los transcritos abortivos cortos (Kern et al., 1997. Biotechnol. Prog. 13, 747-756).

Para producir ARNm con caperuza co-transcripcionalmente en presencia del análogo cap, por razones económicas se requieren concentraciones de trabajo de NTP más bajas, ya que el análogo cap debe emplearse usado en exceso con respecto al GTP y es un factor de coste importante. Mayores proporciones entre el análogo cap y el GTP conducirán a una mayor proporción de ARN con caperuza, pero, por razones económicas y de rendimiento, se suele sugerir una proporción 4:1 (New England Biolabs, Capped RNA synthesis (E2040), <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/capped-ma-synthesis-e2040>).

Por ejemplo, para la transcripción de ARN con caperuza, las instrucciones del fabricante para el kit de síntesis de ARN de alto rendimiento T7 sugieren el uso de 2 mM GTP con un exceso 4:1 de análogo cap en relación al GTP. Se indican rendimientos por 20 µl de reacción de 40-50 µg de ARN, correspondiente a 2-2,5 mg/ml, con aproximadamente un 80% de transcritos de ARN con caperuza (New England Biolabs, Capped RNA synthesis (E2040), <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/capped-ma-synthesis-e2040>).

Para compensar el limitado rendimiento resultante de las bajas concentraciones de GTP, los rendimientos del ARN con caperuza se incrementan complementando la reacción con el nucleótido competidor (GTP, o ATP en caso de que se utilice una A-cap) de manera que se mantenga una relación de entre 1:1 y 1:50 GTP:análogo cap. Con este enfoque, la cantidad de ARN con caperuza producida por reacción podría duplicarse (WO2006/004648).

Las reacciones de transcripción *in vitro* típicamente se llevan a cabo como reacciones por lotes en las que se combinan todos los componentes y luego se incuban para permitir la síntesis de moléculas de ARN hasta que la reacción finaliza. Además, se desarrollaron reacciones alimentadas por lotes para aumentar la eficiencia de la reacción de transcripción *in vitro* (Kern et al., 1997. Biotecnología. Prog. 13, 747-756; Kern et al., 1999. Biotecnología. Prog. 15, 174-184). En un sistema de alimentación por lotes, se combinan todos los componentes, pero luego se añaden cantidades adicionales de algunos de los reactivos a lo largo del tiempo (por ejemplo NTP y magnesio) para mantener constantes las condiciones

de reacción. La estrategia de alimentación por lotes condujo a una mejora del 100% en el ARN por unidad de polimerasa de ARN o plantilla de ADN para una plantilla de ADN muy corta, de 38 pares de bases. Este método sólo se utilizó para la síntesis de moléculas de ARN sin caperuza con un trifosfato en el extremo 5'.

5 Se ha informado del uso de un biorreactor (reactor de transcripción) para la síntesis de moléculas de ARN por transcripción *in vitro* (WO1995/08626). El biorreactor está configurado de manera que los reactivos se suministran a través de una línea de alimentación al núcleo del reactor y los productos de ARN se eliminan pasando a través de una membrana de ultrafiltración (con un peso molecular nominal de corte de, por ejemplo, 100.000 dalton) a la corriente de salida.

10 En resumen, el rendimiento de las moléculas de ARN con caperuza a partir de reacciones de transcripción *in vitro* depende principalmente de dos factores: la concentración total de NTP disponible para su incorporación en la molécula de ARN y la relación análogo cap:GTP. Para la introducción cotranscripcional de una caperuza, las concentraciones de GTP normalmente son más reducidas en comparación con las de otros NTP. Este hecho limita el posible rendimiento de transcripción, especialmente para plantillas de alto contenido en GC.

15 En vista de lo anterior, existe una necesidad continua de medios y métodos de producción de ARN mejorados y económicos, especialmente para la producción de moléculas de ARN con caperuza de longitud completa que pueden traducirse en proteínas.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a un método para sintetizar una molécula de ARN de secuencia dada, comprendiendo los siguientes pasos:

20 a) determinar la fracción (1) de cada uno de los cuatro nucleótidos G, A, C y U de dicha molécula de ARN, y
b) sintetizar dicha molécula de ARN mediante transcripción *in vitro* en una mezcla de reacción de secuencia optimizada, donde dicha mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende los cuatro ribonucleótidos GTP, ATP, CTP y UTP, donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro ribonucleótidos en la mezcla de reacción de secuencia optimizada corresponde a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN, un tampón, una plantilla de ADN y una ARN-polimerasa.

25 La presente descripción también se refiere a un biorreactor para sintetizar moléculas de ARN de secuencia dada, teniendo el biorreactor un módulo de reacción para llevar a cabo reacciones de transcripción de ARN *in vitro* en una mezcla de reacción de secuencia optimizada, un módulo de captura para capturar temporalmente las moléculas de ARN transcritas y un módulo de control para controlar la alimentación de los componentes de la mezcla de reacción de secuencia optimizada en el módulo de reacción, comprendiendo el módulo de reacción una membrana de filtración para separar los
30 nucleótidos de la mezcla de reacción de secuencia optimizada, y basándose el control de la alimentación de los componentes de la mezcla de reacción de secuencia optimizada por el módulo de control en una concentración medida de nucleótidos individuales.

Definiciones

35 Se proporcionan las siguientes definiciones en pro de la claridad y la comprensión. Otras definiciones y explicaciones se pueden proporcionar específicamente en el contexto de estas realizaciones, tal como se discuten y explican posteriormente.

40 Estructura cap 5': Una cap 5' es típicamente un nucleótido modificado, en particular un nucleótido guanina, añadido al extremo 5' de una molécula de ARN. Preferentemente, la cap 5' se añade empleando un enlace 5'-5'-trifosfato. Una cap 5' puede estar metilada, por ejemplo m7GpppN, donde N es el nucleótido 5' terminal del ácido nucleico que porta la cap 5', típicamente el extremo 5' de un ARN. La cap 5' natural es m7GpppN.

Otros ejemplos de estructuras cap 5' incluyen glicerilo, un residuo abásico invertido desoxi (fracción), 4',5'-metileno-nucleótido, 1-(beta-D-eritrofuranosil)-nucleótido, 4'-tio-nucleótido, nucleótido carbocíclico, 1,5-anhidrohexitol-nucleótido, L-nucleótidos, alfa-nucleótido, nucleótido de base modificada, treo-pentofuranosil-nucleótido, nucleótido acíclico sec-3',4',
45 3,4-dihidroibutil-nucleótido acíclico, 3,5-dihidroxipentil- nucleótido acíclico, un residuo 3'-3'-nucleótido invertido, un residuo abásico 3'-3' invertido, un residuo 3'-2'-nucleótido invertido, un residuo abásico 3'-2' invertido, 1,4-butanodiol-fosfato, 3'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexil-fosfato, 3'-fosfato, 3'-fosforotioato, fosforoditioato o una fracción metilfosfonato puente o no puente.

50 Estructuras cap 5' particularmente preferentes son CAP1 (metilación de la ribosa del nucleótido adyacente de m7G), CAP2 (metilación de la ribosa del 2º nucleótido aguas abajo del m7G), CAP3 (metilación de la ribosa del 3er nucleótido aguas abajo del m7G), CAP4 (metilación de la ribosa del 4º nucleótido aguas abajo del m7G). Una estructura cap 5' puede estar formada por un análogo de cap.

5 Análogo de cap: Un análogo cap se refiere a un di-nucleótido no extensible que tiene la funcionalidad cap, lo que significa que facilita la traducción o localización y/o previene la degradación de la molécula de ARN cuando se incorpora en el extremo 5' de la molécula de ARN. No extensible significa que el análogo de cap se incorporará sólo en el extremo 5', ya que no tiene un 5'-trifosfato y, por tanto, no puede extenderse en la dirección 3' mediante una ARN-polimerasa dependiente de la plantilla.

10 Análogos de cap incluyen, pero no se limitan a, una estructura química seleccionada del grupo consistente en m⁷GpppG, m⁷GpppG, m⁷GpppA, m⁷GpppC; análogos de cap no metilados (por ejemplo GpppG); análogos de cap dimetilados (por ejemplo m₂,⁷GpppG), análogos de cap trimetilados (por ejemplo m₂,^{2,7}GpppG), análogos de cap dimetilados simétricos (por ejemplo m⁷Gpppm⁷G) o análogos de cap anti-reversos (por ejemplo ARCA; m⁷,^{2'}OmeGpppG, m⁷,^{2'}dGpppG, m⁷,^{3'}OmeGpppG, m⁷,^{3'}dGpppG y sus derivados tetrafosfato) (Stepinski et al., 2001. RNA 7(10):1486-95). En la Tabla 1 se muestran ejemplos de análogos de cap.

Tabla 1

Análogo de cap trifosfato	Análogo de cap tetrafosfato
m ⁷ Gp ₃ G	m ⁷ Gp ₄ G
m ₂ ^{7,3'-O} Gp ₃ G	b ⁷ Gp ₄ G
b ⁷ Gp ₃ G	b ⁷ m ^{3'-O} Gp ₄ G
e ⁷ Gp ₃ G	m ₂ ^{2,7} Gp ₄ G
m ₂ ^{2,7} Gp ₃ G	m ₃ ^{2,2,7} Gp ₄ G
m ₃ ^{2,2,7} Gp ₃ G	b ⁷ m ² Gp ₄ G
m ⁷ Gp ₃ 2'dG	m ⁷ Gp ⁴ m ⁷ G
m ⁷ Gp ₃ m ^{2'-O} G	
m ⁷ Gp ₃ m ⁷ G	
m ₂ ^{7,2'-O} Gp ₃ G	
m ₂ ^{7,2'-O} GpppsG (D1)	
m ₂ ^{7,2'-O} GpppsG (D2)	
m ₂ ^{7,2'-O} GppspG (D1)	
m ₂ ^{7,2'-O} GppspG (D2)	
m ₂ ^{7,2'-O} GpsppG (D1)	
m ₂ ^{7,2'-O} GpsppG (D2)	

15 Ya se han descrito anteriormente otros análogos de cap (US7074596, WO2008/016473, WO2008/157688, WO2009/149253, WO2011/015347 y WO2013/059475). La síntesis de dinucleótidos análogos de cap N⁷-(4-clorofenoxietil)-sustituídos ha sido descrita recientemente (Kore et al., 2013. Bioorg. Med. Chem. 21(15):4570-4).

Análogos de cap particularmente preferentes son G[5']ppp[5']G, m⁷G[5']ppp[5']G, m₃^{2,2,7}G[5']ppp[5']G, m₂^{7,3'-O}G[5']ppp[5']G (3'-ARCA), m₂^{7,2'-O}GpppG (2'-ARCA), m₂^{7,2'-O}GppspGD1 (β-S-ARCAD1) y m₂^{7,2'-O}GppspGD2 (β-S-ARCAD2).

20 Ácido nucleico: El término ácido nucleico significa cualquier molécula de ADN o ARN y se utiliza como sinónimo de polinucleótido. Además, en el término general "ácido nucleico" se incluyen explícitamente modificaciones o derivados de ácido nucleico tal como se definen aquí. Por ejemplo, el ácido peptidonucleico (PNA) también se incluye en el término "ácido nucleico".

25 ARN monocistrónico: Un ARN monocistrónico puede ser típicamente un ARN, preferiblemente un ARNm, que comprende sólo un marco de lectura abierto. Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de varios tripletes de nucleótidos (codones) que pueden traducirse en un péptido o proteína.

ARN bi/multicistrónico: Un ARN, preferentemente un ARNm, que típicamente puede tener dos (bicistrónico) o más (multicistrónico) marcos de lectura abiertos (ORF). Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de varios tripletes de nucleótidos (codones) que pueden traducirse en un péptido o proteína.

30 ARN inmunoestimulador: Un ARN inmunoestimulador (isARN) en el contexto de la descripción típicamente puede ser un ARN que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria innata. Un isARN usualmente no tiene un marco de lectura abierto y, por tanto, no proporciona un péptido-antígeno, pero provoca una respuesta inmunitaria innata, por ejemplo por enlace a un receptor de patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) (por ejemplo receptor tipo Toll (TLR)) u otros sensores de ARN intracelulares (por ejemplo RIG-I, MDA5 o PKR).

35 Análogos de nucleótidos: Análogos de nucleótidos son nucleótidos estructuralmente similares (análogos) a nucleótidos naturales que incluyen modificaciones del esqueleto fosfato, modificaciones de azúcar o modificaciones del nucleobase.

Síntesis de ácido nucleico: Las moléculas de ácido nucleico utilizadas según la invención tal como se definen aquí pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos tales como, por ejemplo, síntesis en fase sólida, propagación *in vivo* (por ejemplo propagación *in vivo* de virus), así como por métodos *in vitro*, tales como reacciones de transcripción *in vitro*.

5 Según la invención, la molécula de ARN se prepara mediante la transcripción *in vitro* de una molécula de ADN correspondiente. Esta plantilla de ADN comprende preferiblemente un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, seguida de la secuencia de nucleótidos codificante deseada para la molécula de ARN a preparar y una señal de parada para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN, que forma la plantilla de al menos un
10 ARN de interés, puede prepararse mediante proliferación fermentativa y aislamiento posterior como parte de un plásmido que puede ser replicado en bacterias. Plásmidos que pueden citarse como adecuados para la invención presente son, por ejemplo los plásmidos pUC18, pUC19, pBR322, pT7Ts (GenBank número de acceso U26404; Lai et al., Development 1995, 121: 2349 a 2360), la serie pGEM®, por ejemplo pGEM®-1 (número de acceso GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso GenBank X65327); véase también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin y Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

15 ARN: ARN es la abreviatura usual del ácido ribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir, un polímero consistente en nucleótidos. Estos nucleótidos habitualmente son monómeros adenosina-monofosfato, uridina-monofosfato, guanosina-monofosfato y citidina-monofosfato que están unidos entre sí a lo largo del llamado esqueleto. El esqueleto está formado por enlaces fosfodiéster entre el azúcar, es decir, la ribosa, de una primera fracción y una fracción fosfato de un segundo monómero adyacente. La sucesión específica de los monómeros se denomina secuencia de ARN.

20 ARN mensajero (ARNm): En las células eucarióticas, la transcripción se lleva a cabo típicamente dentro del núcleo de la mitocondria. *In vivo*, la transcripción del ADN da como resultado normalmente el llamado ARN prematuro, que tiene que ser procesado en el llamado ARN mensajero, usualmente abreviado como ARNm. El procesamiento del ARN prematuro, por ejemplo en organismos eucarióticos, comprende una variedad de diferentes modificaciones pos-transcripcionales, como empalme, cap 5', poliadenilación, exportación desde el núcleo o la mitocondria y similares. La suma de estos
25 procesos también se denomina maduración del ARN. El ARN mensajero maduro proporciona usualmente la secuencia de nucleótidos que se puede traducir en una secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína particular. Típicamente, un ARNm maduro comprende una cap 5', una 5'UTR, un marco de lectura abierto, una 3'UTR y una secuencia poli(A), cosa que no ocurre en esta combinación en la naturaleza.

ARN auto-replicante (replicones): Los ARN auto-replicantes son vectores de suministro basados en alfavirus que han sido desarrollados a partir del virus Semliki Forest (SFV), el virus Sindbis (SIN) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). Los alfavirus son virus de ARN de cadena única donde genes heterólogos de interés pueden sustituir a los genes estructurales del alfavirus. Al proporcionar los genes estructurales *in trans*, el ARN replicón se empaqueta en partículas de replicón (RP) que pueden utilizarse con fines de terapia génica o vacunación genética (véase, por ejemplo, Vander Veen et al., 2012). Alphavirus replicon vaccines. Animal Health Research Reviews, p. 1-9). Después de la entrada en la
35 célula huésped, el ARN genómico viral sirve inicialmente como un ARNm para la traducción de las proteínas virales no estructurales (nsP) necesarias para el inicio de la amplificación del ARN viral. La replicación del ARN ocurre vía la síntesis de un intermedio antisentido de longitud completa que se utiliza como plantilla para la síntesis de ARN de longitud genómica adicionales y para la transcripción de un ARN subgenómico sentido a partir de un promotor interno. Este ARN puede entonces considerarse como un ARN auto-replicante, ya que las proteínas no estructurales responsables de la replicación (y la transcripción de los genes heterólogos) todavía están presentes en dicho replicón. Estos vectores de alfavirus se denominan "replicones".
40

Secuencia de una molécula de ácido nucleico: La secuencia de una molécula de ácido nucleico se entiende típicamente como el orden particular e individual, esto es la sucesión, de sus nucleótidos.

Marco de lectura abierto: Un marco de lectura abierto (ORF) en el contexto de la invención típicamente puede ser una
45 secuencia de diversos tripletes de nucleótidos que se pueden traducir en un péptido o proteína. Un marco de lectura abierto preferiblemente contiene un codón de inicio, esto es una combinación de tres nucleótidos seguidos que codifican usualmente para el aminoácido metionina (ATG o AUG), en su extremo 5' y una región posterior que usualmente tiene una longitud múltiplo de 3 nucleótidos. Un ORF preferiblemente está terminado por un codón de parada (por ejemplo TAA, TAG, TGA). Típicamente, éste es el único codón de parada del marco de lectura abierto. Así, un marco de lectura abierto
50 en el contexto de la presente invención es preferiblemente una secuencia de nucleótidos que consiste en un número de nucleótidos que se pueden dividir entre tres, que inicia con un codón de inicio (por ejemplo ATG o AUG) y que preferiblemente termina con un codón de parada (por ejemplo TAA, TGA, o TAG o UAA, UAG, UGA, respectivamente). El marco de lectura abierto se puede aislar o se puede incorporar en una secuencia de ácido nucleico más larga, por ejemplo en un vector o un ARNm. Un marco de lectura abierto también se puede denominar "región de codificación de
55 proteína" o "región de codificación".

Mezcla de reacción de secuencia optimizada: Una mezcla de reacción para su uso en una reacción de transcripción *in vitro* de una molécula de ARN de secuencia dada que comprende los cuatro nucleósidos trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP

y UTP, donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro nucleósidos trifosfato (NTP) en la mezcla de reacción de secuencia optimizada corresponde a la fracción (1) del respectivo nucleótido en dicha molécula de ARN, un tampón, una plantilla de ADN y una ARN-polimerasa. Si un ribonucleótido no está presente en dicha molécula de ARN, el correspondiente nucleósido trifosfato tampoco está presente en la mezcla de reacción de secuencia optimizada.

5 Mezcla de secuencia optimizada de nucleósidos trifosfato: Una mezcla de nucleósidos trifosfato (NTP) para su uso en una reacción de transcripción *in vitro* de una molécula de ARN de secuencia dada que comprende los cuatro nucleósidos trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP, donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro nucleósidos trifosfato (NTP) en la mezcla de secuencia optimizada de nucleósidos trifosfato corresponde a la fracción (1) del respectivo nucleótido en dicha molécula de ARN. Si un ribonucleótido no está presente en dicha molécula de ARN, el correspondiente nucleósido trifosfato tampoco está presente en la mezcla de secuencia optimizada de nucleósidos trifosfato.

Nucleósidos trifosfato modificados: El término "nucleósidos trifosfato modificados" tal como se usa aquí se refiere a modificaciones químicas que comprenden modificaciones de esqueleto, así como modificaciones de azúcar o de bases. Estos nucleósidos trifosfato modificados también se denominan aquí como análogos (de nucleótidos).

15 En este contexto, los nucleósidos trifosfato modificados tal como se definen aquí son análogos/modificaciones de nucleótidos, por ejemplo modificaciones de esqueleto, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases. Una modificación de esqueleto en relación a la presente invención es una modificación donde los fosfatos del esqueleto de nucleótidos están modificados químicamente. Una modificación de azúcar en relación a la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos. Además, una modificación de bases en relación a la presente invención es una modificación química de la fracción de bases de los nucleótidos. En este contexto, los análogos o modificaciones de nucleótidos se seleccionan preferiblemente de entre análogos de nucleótidos que son aplicables para su transcripción y/o traducción.

Modificaciones de azúcar

25 Los nucleósidos y nucleótidos modificados que pueden usarse en el contexto de la presente invención pueden modificarse en el resto azúcar. Por ejemplo, el grupo 2'-hidroxilo (OH) puede modificarse o reemplazarse con diversos sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes. Ejemplos de modificaciones "oxi" del grupo 2'-hidroxilo incluyen, pero no se limitan a, alcoxi o ariloxi (-OR, por ejemplo, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) donde el 2'-hidroxilo está unido, por ejemplo mediante un puente de metileno, al carbono 4' del mismo azúcar de ribosa; y grupos amino (-O-amino, donde el grupo amino, por ejemplo NRR, puede ser alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamina) o aminoalcoxi.

30 Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno, amino (por ejemplo NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); o el grupo amino se puede unir al azúcar a través de un enlazador, comprendiendo el enlazador uno o más de los átomos C, N y O.

35 El grupo azúcar también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del correspondiente carbono de la ribosa. Por tanto, un nucleótido modificado puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa como el azúcar.

Modificaciones de Esqueleto

40 Además, el esqueleto fosfato puede estar modificado en los nucleósidos y nucleótidos modificados. Los grupos fosfato del esqueleto pueden modificarse reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno con un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir la sustitución completa de un resto fosfato no modificado con un fosfato modificado como se describe aquí. Ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de borano-fosfato, hidrogenofosfonatos, fosforoamidatos, alquil- o aril-fosfonatos y fosfotriésteres. En los fosforoditioatos ambos oxígenos no enlazados están reemplazados por azufre. El enlazador de fosfato también puede modificarse por sustitución de oxígeno enlazante por nitrógeno (fosforoamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (metileno-fosfonatos puenteados).

Modificaciones de Bases

50 Los nucleósidos y nucleótidos modificados que pueden usarse en la presente invención pueden modificarse adicionalmente en el resto nucleobase. Ejemplos de nucleobases que se encuentran en el ARN incluyen, sin limitarse a, adenina, guanina, citosina y uracilo. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos aquí descritos pueden modificarse químicamente en la cara principal del surco. En algunas realizaciones, las principales modificaciones químicas de surco pueden incluir un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo o un grupo halo.

En realizaciones particularmente preferentes de la presente invención, los análogos/modificaciones de nucleótidos se seleccionan de entre modificaciones de bases, preferiblemente seleccionadas de 2-amino-6-cloropurinribósido-5'-trifosfato, 2-aminopurinribósido-5'-trifosfato; 2-aminoadenosina-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-deoxicitidina-trifosfato, 2-tiocitidina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 2'-fluorotimidina-5'-trifosfato, 2'-O-metilinosina-5'-trifosfato 4-tiouridina-5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidina-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato, 5-bromouridina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-yodocitidina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-yodouridina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 5-metiluridina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 6-azacitidina-5'-trifosfato, 6-azauridina-5'-trifosfato, 6-cloropurinribósido-5'-trifosfato, 7-deazaadenosina-5'-trifosfato, 7-deazaguanosina-5'-trifosfato, 8-azaadenosina-5'-trifosfato, 8-azidoadenosina-5'-trifosfato, benzimidazolribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosina-5'-trifosfato, N1-metilguanosina-5'-trifosfato, N6-metiladenosina-5'-trifosfato, N6-metilguanosina-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato o puromicina-5'-trifosfato, xantosina-5'-trifosfato. Tienen particular preferencia los nucleótidos para modificaciones de base seleccionados del grupo de nucleótidos modificados en bases consistente en 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 7-deazaguanosina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato y pseudouridina-5'-trifosfato.

En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen piridin-4-ona -ribonucleósido, 5-azauridina, 2-tio-5-azauridina, 2-tiouridina, 4-tiopseudouridina, 2-tiopseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetiluridina, 1-carboximetilpseudouridina, 5-propiniluridina, 1-propinilpseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometilpseudouridina, 5-taurinometil-2-tiouridina, 1-taurinometil-4-tiouridina, 5-metiluridina, 1-metilpseudouridina, 4-tio-1-metilpseudouridina, 2-tio-1-metilpseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desazapseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tiodihidrouridina, 2-tiodihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tiouridina, 4-metoxipseudouridina y 4-metoxi-2-tiopseudouridina.

En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 5-azacitidina, pseudoisocitidina, 3-metilcitidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroxiacetilcitidina, 1-metilpseudocitidina, pirrolocitidina, pirrolopseudoisocitidina, 2-tiocitidina, 2-tio-5-metilcitidina, 4-tiopseudoisocitidina, 4-tio-1-metilpseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deazapseudoisocitidina, 1-metil-1-deazapseudoisocitidina, zebularina, 5-azazebularina, 5-metilzebularina, 5-aza-2-tiozebularina, 2-tiozebularina, 2-metoxicitidina, 2-metoxi-5-metilcitidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metilpseudoisocitidina.

En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deazaadenina, 7-deaza-8-azaadenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metil-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiloadenina y 2-metoxiadenina.

En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen inosina, 1-metilinosina, wyosina, wybutosina, 7-deazaguanosina, 7-deaza-8-azaguanosina, 6-tioguanosina, 6-tio-7-deazaguanosina, 6-tio-7-deaza-8-azaguanosina, 7-metilguanosina, 6-tio-7-metilguanosina, 7-metilinosina, 6-metoxiguanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxoguanosina, 7-metil-8-oxoguanosina, 1-metil-6-tioguanosina, N2-metil-6-tioguanosina y N2,N2-dimetil-6-tioguanosina.

En algunas realizaciones, el nucleótido puede modificarse en la cara principal del surco y puede incluir reemplazar el hidrógeno en el C5 uracilo por un grupo metilo o un grupo halo.

En realizaciones específicas, un nucleósido modificado es 5'-O-(1-tiofosfato)adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)citidina, 5'-O-(1-tiofosfato)guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)pseudouridina.

En otras realizaciones específicas, los nucleótidos modificados incluyen modificaciones de nucleósido seleccionadas de 6-azacitidina, 2-tiocitidina, α -tiocitidina, pseudoisocitidina, 5-aminoaliluridina, 5-yodouridina, N1-metilpseudouridina, 5,6-dihidrouridina, α -tiouridina, 4-tiouridina, 6-azauridina, 5-hidroxiuridina, desoxitimidina, 5-metiluridina, pirrolocitidina, inosina, α -tioguanosina, 6-metilguanosina, 5-metilcitidina, 8-oxoguanosina, 7-deazaguanosina, N1-metiladenosina, 2-amino-6-cloropurina, N6-metil-2-aminopurina, pseudoisocitidina, 6-cloropurina, N6-metiladenosina, α -tioadenosina, 8-azidoadenosina, 7-deazaadenosina.

Otros nucleótidos modificados se han descrito anteriormente (documento WO2013052523).

50 Rendimiento: El rendimiento, también denominado rendimiento de reacción, es la cantidad de producto obtenido en una reacción química o enzimática. El rendimiento absoluto se puede dar como el peso en gramos o en moles (rendimiento molar). El rendimiento relativo, el rendimiento fraccional o el rendimiento porcentual, que sirven para medir la efectividad de un procedimiento sintético, se calculan dividiendo la cantidad de producto obtenido entre el rendimiento teórico (la unidad de medida para ambos debe ser la misma).

$$\text{rendimiento relativo} = (\text{rendimiento real}) / (\text{rendimiento teórico})$$

Rendimiento real: el rendimiento real se refiere a la cantidad de producto obtenido en una reacción química.

5 Rendimiento teórico: el rendimiento teórico es la cantidad máxima de producto que se puede producir en una reacción química o enzimática perfectamente eficiente. En realidad, la mayoría de las reacciones no son perfectamente eficientes; el rendimiento real de la reacción suele ser inferior al rendimiento teórico. El rendimiento teórico se calcula en función de la cantidad molar de reactivo limitante, teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción. Para el cálculo generalmente se asume que solo hay una reacción involucrada.

10 Rendimiento de ARN: El rendimiento de ARN es la cantidad de producto ARN obtenido en una reacción de transcripción *in vitro*. El rendimiento de ARN se puede expresar como la concentración de ARN (g/ml o mol/l). La multiplicación de la concentración de ARN con el volumen de reacción da la cantidad absoluta de ARN (en gramos o moles).

15 Rendimiento real de ARN: El rendimiento real de ARN es la cantidad determinada experimentalmente de producto de ARN en una reacción de transcripción *in vitro* en un punto temporal definido, por ejemplo el rendimiento tras completarse la reacción. Por ejemplo, la concentración de ARN se puede determinar midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro (Kolitz et al., 2013, Methods Enzymol. 530:331-6). Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 ng/μl de ARN (1 A260 = 40 ng/μl ARN).

20 Rendimiento teórico de ARN: El rendimiento teórico de ARN es el rendimiento máximo posible de ARN basado en los NTP disponibles en la reacción de transcripción *in vitro*. En una reacción de transcripción estándar con concentraciones iguales de los cuatro NTP (ATP, GTP, CTP, UTP), típicamente el nucleótido que corresponde al nucleótido más frecuente en la secuencia del ARN se convierte en el factor limitante. En una reacción de transcripción de secuencia optimizada que utiliza una mezcla de NTP de secuencia optimizada para la secuencia de ARN de interés, ninguno de los nucleótidos individuales se convierte en el factor limitante.

25 Para calcular el rendimiento teórico de ARN para una reacción de transcripción, la cantidad de cada NTP (en mol) presente al inicio de la reacción de transcripción se divide entre el número de nucleótido respectivo presente en la secuencia de la molécula de ARN, lo que resulta en el número posible de moléculas de ARN que se pueden sintetizar (en mol). Multiplicando por la masa molecular del ARN, se obtiene el rendimiento teórico del ARN en unidades de masa (gramo). En una reacción de transcripción estándar que utiliza concentraciones iguales de cada NTP, normalmente el NTP que corresponde al nucleótido más frecuente en la secuencia de ARN se convierte en el factor limitante. Por el contrario, en una reacción de transcripción de secuencia optimizada, ningún NTP se convertirá en el factor limitante, ya que todos los tipos de NTP están presentes en la misma proporción que los nucleótidos correspondientes en la secuencia de la molécula de ARN.

30 Rendimiento de ARN relativo: El rendimiento de ARN relativo, el rendimiento de ARN fraccional o el porcentaje de rendimiento de ARN, que sirven para medir la eficiencia de una reacción de transcripción *in vitro*, se calculan dividiendo la cantidad de producto de ARN obtenido (rendimiento de ARN real) entre el rendimiento de ARN teórico (la unidad de medida para ambos debe ser la misma):

35
$$\text{Rendimiento relativo del ARN} = (\text{Rendimiento real del ARN}) / (\text{Rendimiento teórico del ARN})$$

Para expresar la eficiencia de una reacción de transcripción *in vitro*, se puede calcular el porcentaje de rendimiento del ARN:

$$\% \text{ rendimiento de ARN} = (\text{rendimiento de ARN real}) / (\text{rendimiento de ARN teórico}) \times 100$$

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar una molécula de ARN de una secuencia dada, que comprende los siguientes pasos:

- 45 a) determinar la fracción (1) para cada uno de los cuatro nucleótidos G, A, C y U en dicha molécula de ARN, y
 b) sintetizar dicha molécula de ARN por transcripción *in vitro* en una mezcla de reacción de secuencia optimizada, donde dicha mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP, correspondiendo la fracción (2) de cada uno de los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) en la mezcla de reacción a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN, un tampón, una plantilla de ADN y una ARN-polimerasa.

50 En el contexto de la presente invención y como se muestra en el Ejemplo 1 y en las Figuras 5 y 6, se ha encontrado que el uso de una mezcla de reacción de secuencia optimizada que contiene los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP para la producción de una molécula de ARN de secuencia dada por transcripción *in vitro* da como

5 resultado un mayor rendimiento del producto de ARN y menos NTP no incorporados y, por tanto desperdiciados, en comparación con una mezcla de reacción no optimizada con concentraciones iniciales equimolares de los cuatro NTP. Este aspecto es especialmente valioso cuando es difícil de sintetizar y, por ello, se usan nucleótidos modificados costosos. En la mezcla de NTP de secuencia optimizada, GTP, ATP, CTP y UTP están representados en una fracción que
 5 corresponde a la fracción de dichos nucleótidos G, A, C y U que están presentes en dicha secuencia de ARN. En las reacciones de transcripción *in vitro* de secuencia optimizada, se prevé que los cuatro NTP se consuman en la misma medida y la transcripción continúe hasta que los NTP se agoten, por lo que se desperdicia menos material.

10 Además, se espera que la posibilidad antes mencionada de la síntesis de moléculas de ARN que son más largas que el ARN codificado, por ejemplo debido a la extensión 3'-autocomplementaria (Triana-Alonso et al., 1995, JBC; 270 (11): 6298-6307), se elimine cuando se usan mezclas de NTP de secuencia optimizadas, ya que no existe un exceso de UTP al final de la reacción. Especialmente si el ARN contiene una cola poli(A), como es común en ARN tal como ARNm, un exceso de UTP no incorporado en la reacción de transcripción puede dar lugar a la incorporación de nucleótidos de uridina dependiente de la plantilla de ARN opuestos a la secuencia poli-A, lo que resulta en moléculas de ARN de doble cadena que pueden activar la respuesta inmune innata y disminuir la síntesis de proteínas (Kariko et al., 2011, Nucleic Acids Res.;
 15 39 (21): el42).

Como se explicará en detalle más adelante, los métodos para la producción de moléculas de ARN que usan la transcripción *in vitro* son conocidos en la técnica. También es conocido el uso de análogos de nucleótidos para mejorar, por ejemplo, la estabilidad de la molécula de ARN. La presente invención se refiere a la concentración de los ribonucleósidos-trifosfato (NTP) en la mezcla de reacción de la reacción de transcripción *in vitro*.

20 En consecuencia, en una primera etapa del método de la presente invención, se determina la fracción (1) de cada uno de los cuatro nucleótidos G, A, C y U en dicha molécula de ARN. Esto se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo por simple recuento del número de nucleótidos o por métodos informáticos.

La fracción (1) de cada uno de los nucleótidos puede expresarse mediante cualquier término adecuado, incluido el número, porcentaje, fracción molar o porcentaje molar. La fracción mol o fracción molar (X_i) se define como la cantidad de un
 25 constituyente (expresado en moles), n_i , dividida entre la cantidad total de todos los constituyentes en una mezcla, n_{tot} . La suma de todas las fracciones molares es igual a 1. El mismo concepto expresado con un denominador de 100 es el mol por ciento o porcentaje molar (mol%).

Basándose en la determinación de la fracción de cada uno de los nucleótidos en dicha molécula de ARN, en una etapa
 30 adicional del método de la presente invención, dicha molécula de ARN se sintetiza por transcripción *in vitro* en una mezcla de reacción de secuencia optimizada, donde dicha mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP o análogos de los mismos, y donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) en la mezcla de reacción de secuencia optimizada corresponde a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN.

En una realización preferente, la etapa b) del método de la invención comprende las etapas de

35 b1) preparar una mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada que comprende los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP, donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) en la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada
 corresponde a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN, y

40 b2) sintetizar dicha molécula de ARN por transcripción *in vitro* en una mezcla de reacción de secuencia optimizada que comprende la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada de la etapa (b1), un tampón, una plantilla de ADN y una ARN-polimerasa.

Por consiguiente, en esta realización preferente, se prepara una mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada en base a la determinación de la fracción (1), que luego se agrega a la mezcla de reacción. Todas las
 45 definiciones indicadas anteriormente con respecto a la mezcla de reacción de secuencia optimizada, y especialmente aquellas con respecto a "fracción (1) corresponde a la fracción (2)" también se aplican a la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada.

En este contexto, el experto en la materia entenderá que si dicha molécula de ARN no contiene todos los nucleótidos G, A, C y U, respectivamente, lo mismo se aplicará también a la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada y a la mezcla de reacción de secuencia optimizada.

50 Según la invención, "fracción (1) corresponde a la fracción (2)" significa que la fracción de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) en la mezcla de secuencia de NTP optimizada o en la mezcla de reacción de secuencia optimizada se ha adaptado a la fracción de los nucleótidos en la molécula de ARN. El experto entenderá que no es necesario que la fracción (2) refleje exactamente la fracción (1), pero se requiere que la fracción individual (2) de cada ribonucleósido-trifosfato en la mezcla

de secuencia optimizada de NTP o en mezcla de reacción de secuencia optimizada refleje la fracción (1) del nucleótido correspondiente en dicha molécula de ARN.

Para evaluar con más detalle la relación entre la fracción (1) y la fracción (2), para la definición del término "fracción (1) se corresponde con la fracción (2)":

- 5 a) Con respecto a la fracción de ribonucleósidos-trifosfato en la mezcla de NTP de secuencia optimizada o en la mezcla de reacción de secuencia optimizada que corresponde al primer nucleótido de la molécula de ARN que se sintetiza, según una realización de la presente invención, es posible que la fracción (2) está en el rango de la fracción (1), por ejemplo, que esa fracción (1) y la fracción (2) difieran en no más del 25%, 20%, 15%, 10%, 7%, 5% o en un valor entre 0,1% y 5%.
- 10 b) Con respecto a los otros ribonucleósidos-trifosfato presentes en la mezcla de NTP de secuencia optimizada o en la mezcla de reacción de secuencia optimizada que no corresponden al primer nucleótido de dicha molécula de ARN, la fracción (2) está preferiblemente en el rango de la fracción (1), por ejemplo la fracción (1) y la fracción (2) difieren en no más del 25%, 20%, 15%, 10%, 7%, 5% o en un valor entre 0,1% y 5%.

15 En una realización preferente de la invención, se añade un nucleótido de inicio a la mezcla de NTP de secuencia optimizada o a la mezcla de reacción de secuencia optimizada antes de comenzar la transcripción *in vitro*. Un nucleótido de inicio es un nucleótido que corresponde al primer nucleótido de dicha molécula de ARN (posición +1). El nucleótido de inicio se puede añadir especialmente para aumentar la velocidad de iniciación de la ARN-polimerasa. Dichos nucleótidos de inicio también son conocidos en la técnica e incluyen un nucleósido-monofosfato, un nucleósido-difosfato, un nucleósido-trifosfato. El nucleótido de inicio puede ser un mononucleótido, un dinucleótido o un trinucleótido. En caso de que el primer nucleótido de dicha molécula de ARN sea G, el nucleótido de inicio es preferiblemente GTP o GMP.

20 En una realización preferente de la invención, dicho nucleótido de inicio es un dinucleótido. En una realización aún más preferente, el nucleótido de inicio es un análogo de cap.

25 En una realización preferente, el análogo de cap se selecciona del grupo consistente en G[5']ppp[5']G, m⁷G[5']ppp[5']G, m₃^{2,2,7}G[5']ppp[5']G, m₂^{7,3'-O}G[5']ppp[5']G (3'-ARCA), m₂^{7,2'-O}GpppG (2'-ARCA), m₂^{7,2'-O}GppSpG D1 (β-S-ARCA D1) y m₂^{7,2'-O}GppspG D2 (β-S-ARCA D2).

Sin embargo, de acuerdo con otra realización preferente, en la mezcla de NTP de secuencia optimizada o en la mezcla de reacción de secuencia optimizada, el nucleótido de inicio correspondiente al primer nucleótido de dicha molécula de ARN se añade en exceso en comparación con la fracción de ese nucleótido en dicha molécula de ARN que está en la primera posición de dicha molécula de ARN.

30 Preferiblemente, el nucleótido de inicio se añade a una concentración inicial en el rango de aproximadamente 1 a 20 mM, 1 a 17,5 mM, 1 a 15 mM, 1 a 12,5 mM, 1 a 10 mM, 1 a 7,5 mM, 1 a 5 mM o 1 a 2,5 mM. Aún con mayor preferencia, el nucleótido de inicio se añade a una concentración inicial de aproximadamente 5 a 20 mM o de 7,5 a 17,5 mM.

35 En una realización ilustrativa preferente de lo anterior, el primer nucleótido de la molécula de ARN es G, el nucleótido de inicio es un análogo de cap de G y el ribonucleósido-trifosfato correspondiente es GTP. En esta realización, el análogo de cap está presente en la mezcla de reacción en exceso en comparación con el GTP. Preferiblemente, el análogo de cap se añade con una concentración inicial en el rango de aproximadamente 1 a 20 mM, 1 a 17,5 mM, 1 a 15 mM, 1 a 12,5 mM, 1 a 10 mM, 1 a 7,5 mM, 1 a 5 mM o 1 a 2,5 mM. Aún con mayor preferencia, el análogo de cap se añade a una concentración inicial de aproximadamente 5 a 20 mM, 7,5 a 20 mM, 10 a 20 mM o 12,5 a 20 mM.

40 Los métodos para la transcripción *in vitro* son conocidos en la técnica (Geall et al., 2013. Semin. Immunol. 25(2): 152-159; Brunelle et al., 2013. Métodos Enzymol. 530: 101-14). Los reactivos utilizados en dicho método incluyen típicamente:

- 1) una plantilla de ADN linealizada con una secuencia promotora que tiene una alta afinidad de unión por su ARN-polimerasa respectiva, como las ARN-polimerasas codificadas por bacteriófagos,
- 2) ribonucleósidos-trifosfato (NTP) para las cuatro bases (adenina, citosina, guanina y uracilo);
- 3) un análogo de cap como se definió anteriormente (por ejemplo, m⁷G(5')ppp(5')G(m⁷G));
- 4) una ARN-polimerasa dependiente de ADN (por ejemplo, ARN-polimerasa de T7, T3 o SP6);
- 45 5) un inhibidor de ribonucleasa (ARNasa) para inactivar cualquier ARNasa contaminante;
- 6) una pirofosfatasa para degradar el pirofosfato, que puede inhibir la transcripción;
- 7) MgCl₂, que suministra Mg²⁺ como cofactor para la polimerasa;
- 50 8) un tampón para mantener un valor de pH adecuado, que también puede contener antioxidantes y poliaminas, como espermidina, en concentraciones óptimas.

De acuerdo con una realización preferente, la mezcla de reacción de secuencia optimizada utilizada para el método de la invención para sintetizar una molécula de ARN de secuencia dada comprende un tampón seleccionado del grupo consistente en ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) y tris(hidroximetil)-aminometano (Tris).

- 5 Preferiblemente, el tampón se usa en una concentración de 10 a 100 mM, de 10 a 75 mM, de 10 a 50 mM, de 10 a 40 mM, de 10 a 30 mM o de 10 a 20 mM. El valor de pH del tampón se puede ajustar con, por ejemplo, NaOH, KOH o HCl. Preferentemente, el tampón tiene un valor pH de 6 a 8,5, de 6,5 a 8,0, de 7,0 a 7,5, incluso con más preferencia 7,5. Con total preferencia se selecciona un tampón del grupo consistente en HEPES/KOH 80 mM, pH 7,5 y Tris/HCl 40 mM, pH 7,5.
- 10 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la ARN-polimerasa comprendida en la mezcla de reacción de secuencia optimizada se selecciona del grupo consistente en ARN polimerasa de T3, T7 y SP6. Preferiblemente, la concentración de ARN-polimerasa es de aproximadamente 1 a 100 nM, 1 a 90 nM, 1 a 80 nM, 1 a 70 nM, 1 a 60 nM, 1 a 50 nM, 1 a 40 nM, 1 a 30 nM, 1 a 20 nM o aproximadamente 1 a 10 nM. Con mayor preferencia, la concentración de ARN-polimerasa es de aproximadamente 10 a 50 nM, 20 a 50 nM o 30 a 50 nM. Es totalmente preferente una concentración de ARN-polimerasa de aproximadamente 40 nM. En este contexto, se prefiere una concentración de 500 a 10.000 U/ml de ARN-polimerasa. Es especialmente preferente una concentración de 1.000 a 7.500 U/ml y tiene particular preferencia una concentración de 2.500 a 5.000 Unidades/ml de ARN-polimerasa. El experto en la materia entenderá que la concentración de ARN- polimerasa está influenciada por la concentración de la plantilla de ADN.
- 15 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la concentración de la plantilla de ADN comprendida en la mezcla de reacción de secuencia optimizada está en un rango de aproximadamente 1 a 50 nM, 1 a 40 nM, 1 a 30 nM, 1 a 20 nM o aproximadamente 1 a 10 nM. Con mayor preferencia, la concentración de la plantilla de ADN es de aproximadamente 10 a 30 nM. Es especialmente preferente que la concentración de la plantilla de ADN sea de aproximadamente 20 nM. En este contexto, se prefiere especialmente una concentración de la plantilla de ADN de aproximadamente 1 a 200 µg/ml, con particular preferencia aproximadamente 10 a 100 µg/ml y con total preferencia aproximadamente 20 a 50 µg/ml (por ejemplo 25 o 50 µg/ml).
- 20 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende pirofosfatasa. Preferiblemente, la concentración de pirofosfatasa es de aproximadamente 1 a 20 unidades/ml, 1 a 15 unidades/ml, 1 a 10 unidades/ml, 1 a 5 unidades/ml o 1 a 2,5 unidades/ml. Aún con mayor preferencia, la concentración de pirofosfatasa es aproximadamente 1 unidad/ml o aproximadamente 5 unidades/ml.
- 25 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende iones Mg⁺⁺. Preferiblemente, los iones Mg⁺⁺ se proporcionan en forma de MgCl₂ o Mg(OAc)₂. Preferentemente, la concentración inicial de Mg⁺⁺ libre es de aproximadamente 1 a 100 mM, 1 a 75 mM, 1 a 50 mM, 1 a 25 mM, o 1 a 10 mM. Con mayor preferencia, la concentración inicial de Mg⁺⁺ libre es de aproximadamente 10 a 30 mM o aproximadamente 15 a 25 mM. Con particular preferencia la concentración inicial de Mg⁺⁺ libre es aproximadamente 24 mM. El experto en la materia entenderá que la elección de la concentración de Mg⁺⁺ está influenciada por la concentración de NTP total inicial.
- 30 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende un agente reductor para mantener la ARN-polimerasa en su estado activo. Preferiblemente, el agente reductor se selecciona del grupo consistente en ditioneitol (DTT), ditioneitrilol (DTE), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y β-mercaptoetanol. Preferiblemente, la concentración de reactivo reductor es de aproximadamente 1 a 50 mM, de 1 a 40 mM, de 1 a 30 mM, o 1 a 20 mM, o 1 a 10 mM. Con mayor preferencia, la concentración de reactivo reductor es de 10 a 50 mM o de 20 a 40 mM. Es totalmente preferente una mezcla de reacción de secuencia optimizada que comprende 40 mM de DTT.
- 35 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende una poliamina. Preferiblemente, la poliamina se selecciona del grupo consistente en espermina y espermidina. Preferiblemente, la concentración de poliamina es aproximadamente 1 a 25 mM, de 1 a 20 mM, de 1 a 15 mM, de 1 a 10 mM, de 1 a 5 mM o de aproximadamente 1 a 2,5 mM. Con mayor preferencia, la concentración de poliamina es aproximadamente 2 mM. Es totalmente preferente una mezcla de reacción de secuencia optimizada que comprende 2 mM de espermidina.
- 40 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende un inhibidor de ribonucleasa. Preferiblemente, la concentración de inhibidor de ribonucleasa es de aproximadamente 1 a 500 unidades/ml, 1 a 400 unidades/ml, 1 a 300 unidades/ml, 1 a 200 unidades/ml o 1 a 100 unidades/ml. Con especial preferencia, la concentración de inhibidor de ribonucleasa es aproximadamente 200 unidades/ml.
- 45 De acuerdo con una realización preferente de la invención, la concentración de NTP total inicial en la mezcla de NTP optimizada en secuencia o en la mezcla de reacción optimizada en secuencia es inferior a 20 mM, inferior a 15 mM, inferior a 10 mM, inferior a 7,5 mM, inferior a 5,0 mM o inferior a 2,5 mM.
- 50 Según la invención, el término concentración total inicial de nucleótidos significa la concentración total de NTP, por ejemplo la suma de las concentraciones de ATP, GTP, CTP y/o UTP inicialmente presentes en la mezcla de NTP optimizada en secuencia o en la mezcla de reacción optimizada en secuencia cuando los diversos componentes de la mezcla de reacción optimizada en secuencia se han reunido en el volumen final para llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro*.
- 55

Naturalmente, a medida que avanza la reacción, los nucleótidos se incorporarán a la molécula de ARN y, en consecuencia, la concentración de nucleótidos totales se reducirá progresivamente a partir de su valor inicial.

5 Un aspecto importante de la presente invención es que el uso de una mezcla de NTP de secuencia optimizada o de una mezcla de reacción de secuencia optimizada conduce a una mayor eficacia de la síntesis de ARN incluso a bajas concentraciones de nucleótidos totales iniciales (por ejemplo a 2 mM). Por el contrario, se ha sugerido previamente que para un aumento de ARN son necesarias altas concentraciones de nucleótidos totales, del orden de 12 mM a 40 mM (US6586218).

10 Además, se espera que la síntesis de moléculas cortas de ARN abortivo disminuya cuando la concentración de nucleótidos totales iniciales sea baja (por ejemplo 2,5 mM) en una mezcla de NTP de secuencia optimizada o en una mezcla de reacción de secuencia optimizada. Por el contrario, se observó un aumento en la transcripción abortiva cuando las concentraciones de NTP de una mezcla equimolar de NTP estándar se redujeron por debajo de aproximadamente 2 mM (Kern et al., 1999. Biotecnol. Prog. 15, 174-184).

15 Otra realización preferente de la invención se refiere a la forma en la que los NTP se añaden a la mezcla de NTP optimizada en secuencia o a la mezcla de reacción optimizada en secuencia. Los ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP o sus análogos pueden proporcionarse con un catión monovalente o divalente como contraión. Preferiblemente, el catión monovalente se selecciona del grupo consistente en Li⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺ o tris(hidroximetil)-aminometano (Tris). Preferiblemente, el catión divalente se selecciona del grupo consistente en Mg⁺⁺, Ba⁺⁺ y Mn⁺⁺.

Según una realización especialmente preferente de la invención, el contraión NTP es tris(hidroximetil)-aminometano (Tris).

20 Se sabe que las ARN-polimerasas de bacteriófagos son sensibles a la inhibición de la sal. Se ha descrito el impacto negativo de altas concentraciones de NaCl en los rendimientos de ARN (por ejemplo, Kern & Davis, 1997. Biotecnol. Prog., 13, 747-756; US 6.586.218 B2). Por tanto, altas concentraciones de Na-NTP, especialmente como consecuencia cuando se persigue una estrategia de alimentación NTP, podrían resultar en una disminución de los rendimientos de ARN. Esta limitación se puede sortear mediante el uso de Tris-nucleótidos, ya que la actividad de la ARN-polimerasa se ve menos afectada por altas concentraciones de Tris en comparación con altas concentraciones de Na. Como se muestra en el Ejemplo 5 y la Figura 12, el rendimiento de ARN es más sensible a la adición de Na en comparación con Tris.

25 Es conocido en la técnica que, en lugar de los ribonucleósido-trifosfato GTP, ATP, GTP y UTP, respectivamente, también se pueden emplear nucleósidos-trifosfato modificados (análogos) en reacciones de transcripción *in vitro*, por ejemplo para mejorar la estabilidad del ARN. Como se muestra en el Ejemplo 3 y la Figura 8, parte o todo el UTP en una mezcla de NTP optimizada en secuencia o en una mezcla de reacción optimizada en secuencia puede reemplazarse por pseudo-UTP.

30 En consecuencia, de acuerdo con una realización preferente de la invención, una parte o todos de al menos un ribonucleósido-trifosfato en la mezcla de NTP optimizada en secuencia o en la mezcla de reacción optimizada en secuencia se reemplaza por un nucleósido-trifosfato modificado.

35 En una realización preferente de la invención, dicho nucleósido-trifosfato modificado se selecciona del grupo consistente en pseudouridina-5'-trifosfato, 1-metilpseudouridina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 4-tiouridina-5'-trifosfato y 5-metilcitolidina-5'-trifosfato.

40 El experto en la materia entenderá que solo es posible establecer exactamente las concentraciones de los componentes individuales de la mezcla de NTP de secuencia optimizada o de la mezcla de reacción de secuencia optimizada antes del inicio de la transcripción *in vitro*. Por consiguiente, en una realización preferente de la presente invención, los números y las fracciones definidas anteriormente reflejan las condiciones iniciales presentes en la mezcla de reacción de secuencia optimizada o en la mezcla de NTP de secuencia optimizada antes del inicio de la transcripción.

De acuerdo con otra realización preferente de la invención, durante la transcripción *in vitro*, la mezcla de reacción de secuencia optimizada se complementa con la mezcla de ribonucleósido-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada como se define aquí.

45 En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que el rendimiento de ARN puede aumentarse adicionalmente alimentando cantidades adicionales de la mezcla de NTP optimizada en secuencia en la reacción de transcripción *in vitro* (alimentación de NTP). Como se muestra en el Ejemplo 1 y la Figura 6, la adición de una mezcla de NTP optimizada en secuencia adicional aumenta significativamente el rendimiento de ARN.

50 La nueva mezcla de NTP optimizada en secuencia se agrega de manera que se mantenga la relación deseada entre el análogo cap y el nucleótido correspondiente, por ejemplo GTP (por ejemplo 4:1). Preferiblemente, la nueva mezcla de NTP optimizada en secuencia se añade al final de la reacción de transcripción *in vitro*, cuando se consumen todos los nucleótidos de la mezcla de reacción optimizada en secuencia. La relación entre el análogo cap restante y el nucleótido

5 correspondiente recién agregado, por ejemplo GTP (por ejemplo 4:1) puede mantenerse básicamente porque cerca del 100% del análogo cap permanece al final de la reacción de transcripción, ya que solo se puede incorporar un análogo cap por molécula de ARN. Esta estrategia resulta en la misma eficiencia de terminación, mayores rendimientos (> 4,5 veces, dependiendo de la secuencia de ARN) y costes dramáticamente reducidos. Además, el mayor contenido de NTP evita la precipitación de las moléculas de ARN durante la transcripción, como se observa habitualmente en las concentraciones estándar de NTP (tanto en reacciones estándar como en secuencias optimizadas).

10 La incorporación de NTP dependiente de la secuencia también permite monitorear el progreso de la reacción de transcripción *in vitro*. Como se muestra en el Ejemplo 6 y la Figura 13, el progreso de la reacción de transcripción *in vitro* puede monitorizarse separando los nucleótidos no incorporados de la reacción de transcripción *in vitro* y midiendo la absorbancia a 260 nm. La razón es que la disminución de la concentración total de los cuatro NTP se correlaciona directamente con la cantidad de ARN sintetizado. Este enfoque no sería posible de forma tan directa si se utiliza una mezcla de NTP estándar con la misma proporción de nucleósidos-trifosfatos. Una disminución de la absorción a 260 nm puede traducirse directamente en moléculas de ARN producidas si los NTP se separan del ARN y el ADN para evitar interferencias, por ejemplo mediante filtración a través de una membrana con un corte de bajo peso molecular.

15 Los métodos para la cuantificación de ácidos nucleicos y nucleótidos son conocidos en la técnica. Los métodos espectroscópicos para la cuantificación de ácidos nucleicos incluyen medidas de la absorbancia tradicionales (Kolitz et al., 2013. Métodos Enzymol. 530: 331-6) y técnicas de fluorescencia más sensibles, que utilizan colorantes fluorescentes como bromuro de etidio y un fluorómetro con una longitud de onda de excitación adecuada (por ejemplo 302 o 546 nm) (Gallagher, 2011. Current Protocols in Molecular Biology. 93:A.3D.1-A.3D.14). En consecuencia, en una realización preferente de la invención, la síntesis de dicha molécula de ARN por transcripción *in vitro* es seguida de separación y cuantificación los NTP no incorporados.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, dicha molécula de ARN se selecciona del grupo consistente en moléculas de ARN no codificantes y codificantes.

25 Una molécula de ARN no codificante (ARNnc) es una molécula de ARN funcional que no se traduce en un péptido o proteína. Las moléculas de ARN no codificantes incluyen ARN altamente abundantes y funcionalmente importantes, como ARN transferente (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr), así como ARN como ARNsno, microARN, ARNsi, ARNsn, ARNex y ARNpi, y ARNnc largos que incluyen por ejemplo Xist y HOTAIR (Esteller, 2011. Rev. Genet. 12(12):861-74). Además, las moléculas de ARN no codificantes incluyen moléculas de ARN inmunoestimuladoras (ARNis).

30 Preferiblemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN lineal monocatenario. Con mayor preferencia, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN no codificante monocatenario lineal largo. En este contexto, se prefiere particularmente que el ARNis lleve un trifosfato en su extremo 5'.

35 El ARN inmunoestimulador (ARNis) puede comprender cualquier secuencia de ARN conocida por ser inmunoestimulante, incluyendo, sin limitarse a, secuencias de ARN que representan y/o codifican ligandos de TLR, preferiblemente seleccionados de miembros de la familia humana TLR1 a TLR10 o miembros de la familia murina TLR1 a TLR3, más preferiblemente seleccionados de miembros de la familia humana TLR1 a TLR10, aún más preferiblemente de TLR7 y TLR8, ligandos para receptores intracelulares de ARN (como RIG-I, MDA-5 o PKR) (Meylan y Tschopp, 2006. Mol. Cell 22, 561-569) o cualquier otra secuencia de ARN inmunoestimulador. Además, las moléculas de ARN inmunoestimuladoras pueden incluir cualquier otro ARN capaz de provocar una respuesta inmune innata. Sin limitarse a, tal ARN inmunoestimulador puede incluir ARN ribosómico (ARNr), ARN transferente (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ARN viral (ARNv). Preferiblemente, el ARN inmunoestimulador es un ARN no codificante. Dicho ARN inmunoestimulador puede comprender una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000, o de 5 a 1.000, de 5 a 500, de 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

Según otra realización particularmente preferente, tales moléculas de ARN inmunoestimuladoras consisten en o comprenden un ARN de fórmula (I):

45
$$(N_u G_i X_m G_n N_v)_a, \text{ (fórmula (I))}$$

donde:

G es guanosina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanosina (guanina) o uridina (uracilo), preferiblemente guanosina (guanina) o uno de sus análogos;

50 X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos), preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo de los mismos;

N es una secuencia de ácido nucleico de una longitud de aproximadamente 4 a 50, preferiblemente de aproximadamente 4 a 40, más preferiblemente de aproximadamente 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, cada N se

selecciona independientemente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);

- a es un número entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 15, en especial de 1 a 10;
- 5 l es un entero de 1 a 40, donde
cuando $l = 1$, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma,
cuando $l > 1$, al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;
- 10 m es un entero y es al menos 3; donde
cuando $m = 3$, X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, y
cuando $m > 3$, están presentes al menos 3 uridinas sucesivas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo);
- n es un entero de 1 a 40, donde,
cuando $n = 1$, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma,
cuando $n > 1$, al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;
- 15 u, v pueden ser, independientemente uno de otro, un entero de 0 a 50, preferiblemente cuando $u = 0$, $v \geq 1$ o cuando $v = 0$, $u \geq 1$;

donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (I) tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 100 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 150 nucleótidos, aún más preferiblemente de al menos 200 nucleótidos y con especial preferencia de al menos 250 nucleótidos .

- 20 De acuerdo con una realización especialmente preferente, la molécula de ARN según la fórmula (I) puede seleccionarse de, por ejemplo, la siguiente secuencia:

```
GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAACGUAGC
CGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGU
CUGCCUAUAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGG
UUAUCUCCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAA
UCCAGCGAUGAUGCUGGCCAGAUUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUC
AUCGAGGGUCGCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGCCAGUUCUGAGA
CUUCGCUAGAGACUACAGUACAGCUGCAGUAGUAACCACUGCGGCUAUUG
CAGGAAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGCUCACUAUG
AUUAAGAACCAGGUGGAGUGUCACUGCUCUCGAGGUCUCACGAGAGCGCUC
GAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACG
AUCACAGAGAACUUCUAUUCAUGCAGGUCUGCUCUAG (R2025; SEQ ID NO: 4)
```

- 25 Un ARN codificador es una molécula de ARN funcional que puede traducirse en un péptido o proteína. Preferiblemente, la molécula de ARN codificante comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un péptido o proteína.

En este contexto, la molécula de ARN codificante puede comprender un marco de lectura abierto (ORF) (monocistrónico), dos (bicistrónico) o más (multicistrónico). La molécula de ARN codificante puede ser una molécula de ARN mensajero (ARNm), una molécula de ARN viral o una molécula de ARN autorreplicante (replicón). Preferiblemente, la molécula de ARN es un ARNm.

- 30 Según una realización preferente de la invención, dicha molécula de ARN tiene una longitud superior a 100 nucleótidos. Es igualmente preferente que el ARN tenga una longitud entre 100 y 15.000 nucleótidos, 100 y 12.500 nucleótidos, 100 y 10.000 nucleótidos, 100 y 7.500 nucleótidos, 100 y 5.000 nucleótidos, 100 y 2.500 nucleótidos, 100 y 1.500 nucleótidos o 100 y 1.000 nucleótidos.

- 35 En una realización preferente de la invención, dicha síntesis de una molécula de ARN de una secuencia dada se realiza como una síntesis a gran escala.

De acuerdo con la presente invención, el término "gran escala" se refiere a un rendimiento de reacción de dicha molécula de ARN en el orden de cantidades de miligramos, preferiblemente de al menos un gramo.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, la reacción de transcripción *in vitro* se lleva a cabo en un biorreactor, también denominado reactor de transcripción o reactor de ARN para la síntesis a gran escala de ARN. Así, el biorreactor puede adaptarse para llevar a cabo el método descrito anteriormente de la presente invención.

5 De acuerdo con la presente invención, dicho biorreactor para sintetizar moléculas de ARN de secuencia dada, preferiblemente a gran escala, es un sistema de reactor de transcripción *in vitro* diseñado modularmente, comprendiendo un módulo de reacción para llevar a cabo las reacciones de transcripción de ARN *in vitro* en una mezcla de reacción optimizada en secuencia, un módulo de captura para capturar temporalmente las moléculas de ARN transcritas y un módulo de control para controlar la entrada de los componentes de la mezcla de reacción de secuencia optimizada en el módulo de reacción. Aquí, el módulo de reacción comprende una membrana de filtración para separar los nucleótidos de la mezcla de reacción y el control de la alimentación de los componentes de la mezcla de reacción de secuencia optimizada por el módulo de control se basa en una medida de la concentración de los nucleótidos separados.

15 El término biorreactor o reactor de transcripción tal como se usa aquí se refiere a una cámara o tubo de ensayo o columna donde se lleva a cabo una reacción de transcripción *in vitro* bajo condiciones específicas. El biorreactor puede regularse térmicamente para mantener con precisión una temperatura específica, generalmente entre 4 y 40°C. El biorreactor se puede configurar con una línea de entrada o alimentación y un puerto de salida. El biorreactor puede ser una célula agitada dotada de velocidades de agitación variables.

20 De acuerdo con la presente invención, el biorreactor comprende una membrana de filtración para separar nucleótidos de la mezcla de reacción, en particular para separar nucleótidos y otros componentes de bajo peso molecular de la mezcla de reacción de secuencia optimizada. La introducción de una membrana de filtración en dicho sistema de flujo, por ejemplo una membrana de ultrafiltración, se usa para separar componentes de alto peso molecular, por ejemplo proteínas y/o polinucleótidos, de componentes de bajo peso molecular, como nucleótidos. La membrana de filtración sirve para retener selectivamente la plantilla de ADN inmovilizada, la ARN-polimerasa y las moléculas de ARN sintetizadas en el núcleo del reactor del módulo de reacción, mientras que las moléculas más pequeñas, como los nucleótidos (NTP), pueden atravesar la membrana de filtración hasta un compartimento separado más pequeño del módulo de reacción, esto es, el compartimento de filtración. La concentración de nucleótidos se puede medir, por ejemplo, mediante análisis espectroscópico del fluido separado que contiene los componentes de bajo peso molecular. Alternativamente, la concentración de nucleótidos se puede medir mediante un sistema HPLC en línea. La aplicación de una mezcla de NTP de secuencia optimizada en este sistema de reactor permite medir en tiempo real la concentración de nucleótidos durante la reacción de transcripción *in vitro* con el fin de monitorear el progreso de la reacción de transcripción *in vitro*.

30 Las membranas de filtración adecuadas pueden consistir en varios materiales conocidos por los expertos en la técnica (van de Merbel, 1999) J. Chromatogr. A 856 (1 -2): 55-82). Por ejemplo, las membranas pueden consistir en celulosa regenerada o modificada o en materiales sintéticos. Éstos últimos incluyen polisulfona (PSU), poliacrilonitrilo (PAN), polimetilmetacrilato (PMMA), mezclas de poliaryl-éter-sulfonas, polivinilpirrolidona y poliamida (Polyamix. RTM.). Por ejemplo, las polisulfonas incluyen [poli(oxi-1,4-fenilsulfonil-1,4-fenil)polietersulfona, PES abreviado]. En algunas realizaciones ilustrativas, la polietersulfona se puede utilizar como membrana semipermeable para el uso de acuerdo con la descripción. En algunos casos, las membranas de PES incluyen una mayor hidrofiliidad (y/o mejor humectabilidad de la membrana con agua) en comparación con las membranas de PSU. En algunas realizaciones, la humectabilidad de las membranas de PES se puede aumentar, por ejemplo, incluyendo el polímero soluble en agua polivinilpirrolidona.

40 Un parámetro importante que influye en el flujo de moléculas a través de la membrana de filtración es el tamaño de poro o la distribución de tamaño de poro. Una membrana de filtración generalmente se caracteriza por su valor de corte de peso molecular (MWCO), es decir, una limitación de tamaño específica, que se define como la masa molecular del compuesto más pequeño que queda retenida en más del 90%. Para cada aplicación, se debe seleccionar un valor de MWCO adecuado para que los compuestos de alto peso molecular se retengan lo suficiente, pero al mismo tiempo se asegure un transporte rápido del analito. La membrana de filtración del biorreactor de la presente invención puede tener 45 un MWCO en un rango de 10 a 100 kDa, 10 a 75 kDa, 10 a 50 kDa, 10 a 25 kDa o 10 a 15 kDa. Aún con mayor preferencia, la membrana de filtración tiene un MWCO en un intervalo de aproximadamente 10 a 50 kDa. Preferiblemente, la membrana de filtración se selecciona del grupo de celulosa regenerada, celulosa modificada, polisulfona (PSU), poliacrilonitrilo (PAN), polimetilmetacrilato (PMMA), alcohol de polivinilo (PVA) y poliarietersulfona (PAES).

50 De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, el biorreactor comprende una plantilla de ADN inmovilizada sobre un soporte sólido como base para la reacción de transcripción de ARN. La inmovilización de la plantilla de ADN permite el uso repetido de la plantilla y reduce la contaminación del producto de ARN por ADN residual. Además, la inmovilización hace que el uso de ADN sea prescindible para la eliminación de la plantilla de ADN del producto de ARN final. La plantilla de ADN, que preferiblemente está inmovilizada sobre un soporte sólido en el núcleo de reacción del módulo de reacción, puede representar una molécula de ADN sintetizada químicamente, un fragmento de restricción de ADN aislado, un plásmido o una molécula de ADN amplificada, por ejemplo mediante un proceso de amplificación tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La plantilla de ADN puede ser un dúplex de doble cadena o una 55 unidad que comprende una región promotora de doble cadena aguas arriba de una región de codificación de ARN

monohebra. La plantilla de ADN puede estar modificada con un ligando para inmovilización en un soporte sólido en el extremo 5', en el extremo 3' o en un nucleótido interno de una hebra de ADN.

De acuerdo con la invención, el término "soporte sólido" se refiere a cada soporte no disuelto que es capaz de inmovilizar una molécula de ADN en su superficie. El soporte sólido puede seleccionarse del grupo consistente en agarosa, agarosa modificada, sefarosa, poliestireno, látex, celulosa y partículas ferro o ferrimagnéticas. Los métodos y estrategias para elegir los soportes sólidos apropiados y para acoplar moléculas de ADN a dichos soportes sólidos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Arndt-Jovin et al. 1975. EUR. J. Biochem. 54(2): 41 1-8; Kerrigan et al., 2001. Current Protocols in Molecular Biology. 24: 12.10.1-12.10.18; WO 1995/08626). La inmovilización de la plantilla de ADN en el soporte sólido puede ser mediante un enlace covalente o no covalente. Preferiblemente, la inmovilización de la plantilla de ADN se produce mediante un enlace no covalente. Por ejemplo, la inmovilización de una plantilla de ADN en un soporte sólido puede producirse mediante una interacción no covalente biotina-estreptavidina. La cadena no codificante de la plantilla de ADN puede modificarse con un grupo biotina en el extremo 5', cuya función es inmovilizar la cadena de ADN en una matriz de soporte sólido que comprende la proteína estreptavidina. La cadena de codificación de ADN complementaria de la plantilla de ADN puede permanecer no inmovilizada. También es posible inmovilizar las plantillas de ADN en soportes sólidos mediante otros tipos de enlaces no covalentes, por ejemplo interacciones poli(A)-poli(T) y poli(G)-poli(C). Con igual preferencia, la inmovilización de la plantilla de ADN se produce vía un enlace covalente, por ejemplo un enlace éster o derivado del mismo. En general, antes del acoplamiento, el soporte sólido puede contener grupos activos tales como NHS, carbodimida, etc. para permitir la reacción de acoplamiento con la molécula de ADN. La molécula de ADN se puede acoplar al soporte sólido por acoplamiento directo (por ejemplo utilizando grupos funcionales como grupos amino, sulfhidrilo, carboxilo, hidroxilo, aldehído y cetona). El enlace al material de soporte sólido puede implicar espaciadores para optimizar la separación espacial de la plantilla de ADN del soporte. El espaciador se puede proporcionar mediante la inserción de nucleótidos adicionales en el extremo 5' de la plantilla de ADN.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, el módulo de captura del biorreactor comprende una resina/fase sólida para capturar las moléculas de ARN transcritas y para separar las moléculas de ARN transcritas de otros componentes solubles de la mezcla de reacción de transcripción optimizada en secuencia. Preferiblemente, el módulo de captura comprende medios para purificar las moléculas de ARN transcritas capturadas, por ejemplo mediante un proceso de lavado o similar. Además preferiblemente, el módulo de captura comprende medios para eluir las moléculas de ARN transcritas capturadas, preferiblemente con un tampón de elución.

De acuerdo con una realización preferente adicional, el biorreactor comprende además un módulo de reflujo para devolver la mezcla de reacción optimizada en secuencia filtrada residual, es decir, los otros componentes solubles de la mezcla de reacción de transcripción optimizada en secuencia además de las moléculas de ARN transcritas, al módulo de reacción desde el módulo de captura después de capturar las moléculas de ARN transcritas, preferiblemente donde los medios para devolver la mezcla de reacción optimizada en secuencia filtrada residual son una bomba. Aquí, el módulo de reflujo comprende preferiblemente enzimas inmovilizadas, tales como pirofosfatasa, o una resina para capturar componentes disruptivos, tales como fosfato.

En una realización preferente, el biorreactor comprende al menos un electrodo selectivo de iones. En el contexto de la presente invención, el término "electrodo selectivo de iones" se refiere a un transductor (por ejemplo, un sensor) que convierte la actividad de un ion específico disuelto en una solución en un potencial eléctrico, pudiendo medirse el potencial eléctrico, por ejemplo, utilizando un voltímetro o un pHímetro. En particular, el término "electrodo selectivo de iones" tal como se usa aquí comprende un sistema que comprende o consiste en una membrana con una permeabilidad selectiva, separando la membrana típicamente dos electrolitos. Un electrodo selectivo de iones como se usa aquí típicamente comprende una parte detectora, que preferiblemente comprende una membrana de permeabilidad selectiva, y un electrodo de referencia. La membrana es típicamente una membrana selectiva de iones que se caracteriza por diferentes permeabilidades para diferentes tipos de iones. Preferiblemente, el al menos un electrodo selectivo de iones del biorreactor comprende una membrana seleccionada del grupo consistente en una membrana de vidrio, una membrana de estado sólido, una membrana de base líquida y una membrana compuesta.

En realizaciones preferentes, el biorreactor tal como se describe aquí comprende al menos un electrodo selectivo de iones, donde el al menos un electrodo selectivo de iones comprende o consiste en un sistema que comprende una membrana, preferiblemente una membrana como se describe aquí, más preferiblemente una membrana electroquímica, con diferentes permeabilidades para diferentes tipos de iones, donde la membrana, preferiblemente una membrana como se describe aquí, más preferiblemente una membrana electroquímica, preferiblemente separa dos electrolitos. En una realización, la membrana comprende o consiste en una capa de un electrolito sólido o una solución de electrolito en un disolvente inmiscible con agua. La membrana está preferiblemente en contacto con una solución de electrolito en uno o ambos lados. En una realización preferente, el electrodo selectivo de iones comprende un electrodo de referencia interno. Dicho electrodo de referencia interno puede reemplazarse, en algunas realizaciones, por ejemplo por un contacto metálico o por un aislante y una capa semiconductor.

Un electrodo selectivo de iones permite una medida altamente sensible, rápida, exacta y no destructiva de la actividad de los iones o la concentración de iones en diferentes medios. Además de las medidas directas de la actividad iónica o la

concentración de iones, pueden servir, en particular empleando una curva de calibración, para el monitoreo continuo de cambios de concentración, como elementos para el control de la dosificación de agentes o como electrodos indicadores muy precisos en valoraciones potenciométricas.

5 En realizaciones preferentes, el biorreactor comprende al menos un electrodo selectivo de iones, preferiblemente como se describe aquí, para medir la concentración de uno o más tipos de iones en al menos un compartimento del biorreactor. Por ejemplo, el al menos un electrodo selectivo de iones se puede usar para medir la concentración de uno o más tipos de iones en un módulo de reacción, un módulo de control o un módulo de reflujo del biorreactor. Preferiblemente, el al menos un electrodo selectivo de iones se usa para medir la concentración de uno o más tipos de iones en el módulo de reacción, más preferiblemente en el núcleo de reacción o en el compartimento de filtración. Además, el al menos un electrodo selectivo de iones puede estar comprendido en una unidad sensora del biorreactor, preferiblemente como se define aquí. El electrodo selectivo de iones puede ubicarse en el propio biorreactor, en el biorreactor o fuera del biorreactor (por ejemplo, conectado al biorreactor por un bypass). En el contexto de la presente invención, la frase "el biorreactor comprende al menos un electrodo selectivo de iones" puede así referirse a una situación donde el al menos un electrodo selectivo de iones es parte del biorreactor o a una situación donde el al menos un electrodo selectivo de iones es una entidad física separada con respecto al biorreactor, pero que se usa en relación con el biorreactor.

Según algunas realizaciones, el biorreactor comprende al menos un electrodo selectivo de iones, preferiblemente como se describe aquí, para medir la concentración de uno o más tipos de iones en un líquido comprendido en al menos un compartimento del biorreactor, donde el ion preferiblemente se selecciona del grupo consistente en H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- y PO_4^{3-} .

20 Según algunas realizaciones, el biorreactor comprende al menos un electrodo selectivo de iones, preferiblemente como se describe aquí, conectado a un potenciómetro, preferiblemente un potenciómetro multicanal (por ejemplo un potenciómetro de iones CITSens de 6 canales, alta resolución; C-CIT Sensors AG, Suiza).

En una realización preferente, el biorreactor comprende al menos un electrodo selectivo de iones donde el al menos un electrodo selectivo de iones es preferiblemente un electrodo de tubo, más preferiblemente seleccionado del grupo consistente en un electrodo de tubo selectivo de Mg^{2+} , un electrodo de tubo selectivo de Na^+ , un electrodo de tubo selectivo de Cl^- , un electrodo de tubo selectivo de PO_4^{3-} , un electrodo de tubo selectivo de pH y un electrodo de tubo selectivo de Ca^{2+} , preferiblemente utilizado en conexión con potenciómetro. Aún más preferiblemente, el biorreactor comprende al menos un electrodo selectivo de iones donde el al menos un electrodo selectivo de iones se selecciona preferiblemente del grupo consistente en un electrodo minitubo CITSens selectivo de ion Mg^{2+} un electrodo minitubo CITSens selectivo de ion Na^+ , un electrodo minitubo CITSens selectivo de ion de ion Cl^- , un electrodo minitubo CITSens selectivo de ion PO_4^{3-} , un electrodo minitubo CITSens selectivo de pH y un electrodo minitubo CITSens selectivo de Ca^{2+} (todos de C-CIT Sensors AG, Suiza), preferiblemente en conexión con un potenciómetro, más preferiblemente con un potenciómetro multicanal, como un potenciómetro de iones CITSens de 6 canales, alta resolución (C-CIT Sensors AG, Suiza).

35 Los electrodos selectivos de iones tienen numerosas ventajas de uso práctico. Por ejemplo, no afectan la solución ensayada, lo que permite medidas no destructivas. Además, los electrodos selectivos de iones son móviles, adecuados para determinaciones directas, así como sensores de titulación, y rentables. La principal ventaja del uso de un electrodo selectivo de iones en un biorreactor (por ejemplo, un reactor de transcripción) es la posibilidad de medir *in situ* sin recolección de muestras y de manera no destructiva.

40 De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, el biorreactor, o más precisamente el módulo de control del biorreactor, comprende una unidad sensora para el análisis de parámetros críticos de proceso, como el valor pH, la conductividad y la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción de secuencia optimizada. Preferiblemente, la unidad sensora del biorreactor comprende un sensor, tal como una celda de flujo UV para UV 260/280nm, para la medida en tiempo real de la concentración de nucleótidos durante la reacción de transcripción *in vitro*. Preferiblemente, el sensor de la unidad sensora mide la concentración de nucleótidos como parámetro de proceso mediante análisis fotométrico.

45 De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, el biorreactor comprende un módulo de control. La recopilación de datos y los análisis realizados por el módulo de control permiten el control del sistema integrado de bombeo (actuador) para alimentaciones repetidas de componentes de la mezcla de NTP optimizada en secuencia o de componentes de la mezcla de reacción optimizada en secuencia, por ejemplo componentes tampón, ARN-polimerasa o nucleótidos. El estricto control y la regulación permiten llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro* en condiciones óptimas de estado estable, lo que resulta en un alto rendimiento del producto. Preferiblemente, el módulo de control controla la adición de la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) optimizada en secuencia a la mezcla de reacción de secuencia optimizada, preferiblemente comprendiendo dicho biorreactor un accionador para añadir la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato optimizada en secuencia (NTP) a la mezcla de reacción de secuencia optimizada. Además, el actuador también puede agregar otros componentes de reacción de la mezcla de reacción optimizada en secuencia, como componentes tampón, o Mg^{2+} , a la mezcla de reacción de transcripción *in vitro*. De acuerdo con una realización preferente adicional de la presente invención, el biorreactor funciona en un modo semi-lote o en un modo continuo. El término semi-

lote como se usa aquí se refiere a la operación de la reacción de transcripción *in vitro* como una serie repetitiva de reacciones de transcripción. Por ejemplo, se permite que la reacción continúe durante un tiempo finito, momento en el cual se retira el producto, se agregan nuevos reactivos y se repite la reacción completa. El término flujo continuo tal como se usa aquí se refiere a una reacción que se lleva a cabo continuamente en un núcleo de biorreactor añadiéndose reactivos suplementarios constantemente mediante una línea de alimentación de entrada y eliminándose los productos constantemente a través de un puerto de salida. Un reactor de flujo continuo controla el suministro de reactivo y la eliminación del producto mediante los caudales controlados del dispositivo, lo cual es ventajoso para reacciones con limitaciones de reactivo y productos inhibidores.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ARN que se obtiene mediante el método de la invención como se describe aquí. Preferiblemente, el ARN obtenido por el método de la invención se caracteriza por una actividad inmunoestimuladora reducida en comparación con el ARN obtenido por los métodos de la técnica anterior, en particular en comparación con el ARN obtenido por un método de transcripción *in vitro* donde la mezcla de NTP no está optimizada con respecto a la secuencia de transcripción, tal como un método que utiliza una mezcla de NTP equimolar estándar.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de una mezcla de ribonucleósido-trifosfato (NTP) optimizada en secuencia para una molécula de ARN de secuencia dada para la síntesis de dicha molécula de ARN.

Especialmente, de acuerdo con una realización preferente de la invención, la mezcla de NTP optimizada en secuencia ha sido optimizada mediante un método que comprende los pasos de:

- a) determinar la fracción (1) de cada uno de los cuatro nucleótidos G, A, C y U en dicha molécula de ARN, y
- b) preparar la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) optimizada en secuencia que comprende los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP, donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro ribonucleósidos-trifosfato en la mezcla optimizada de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) corresponde a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN.

En un aspecto adicional, la presente descripción también se refiere a una mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada para la síntesis de una molécula de ARN de secuencia dada, que comprende los cuatro ribonucleósidos-trifosfato GTP, ATP, CTP y UTP, donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro ribonucleósidos-trifosfato en la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato optimizada en secuencia (NTP) corresponde a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN.

En un aspecto adicional, la presente descripción también se refiere a un kit que comprende una mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) optimizada en secuencia para una molécula de ARN de secuencia dada como se define arriba. La mezcla de NTP optimizada en secuencia se puede proporcionar en un tubo que contiene los cuatro tipos de NTP (GTP, ATP, CTP y UTP) o cada NTP en un tubo separado. Todas las definiciones o realizaciones específicas realizadas anteriormente con respecto al método de la invención también se aplican a dicho kit de la invención.

Breve descripción de las figuras

Las figuras que se muestran a continuación son meramente ilustrativas y describirán la presente invención de forma adicional. Estas figuras no deben interpretarse para limitar la presente invención a las mismas.

Figura 1: secuencia de ARNm optimizada en G/C de R1871 que codifica el antígeno de células madre de próstata de Homo sapiens (HsPSCA), que corresponde a la SEC ID NO: 1.

Figura 2: secuencia de ARNm optimizada en G/C de R2988 que codifica la luciferasa de Photinus pyralis (PpLuc), que corresponde a la SEC ID NO: 2.

Figura 3: secuencia de ARNm optimizada en G/C de R1626 que codifica para péptido señal de Mucina-1 de Homo sapiens/receptor del factor de crecimiento epidérmico/proteína de fusión Mucin-1 (EGFR/Mucin-1), que corresponde a la SEC ID NO: 3.

Figura 4: secuencia de ARN inmunoestimulador no codificante de R2025, que corresponde a la SEC ID NO: 4.

Figura 5: Rendimiento de ARN con el tiempo para el ARNm que codifica HsPSCA (R1871) y EGFR/Mucina-1 (R1626). Los ARNm se sintetizaron por transcripción *in vitro* como se muestra en el Ejemplo 1. (A) El rendimiento de ARN de las reacciones de transcripción estándar alcanza, después de unos 30 minutos, una meseta de aprox. 1,4 mg/ml de ARN para el ARN de 5.337 nucleótidos que codifica EGFR/Mucin-1 (R1626) y de aprox. 1,8 mg/ml de ARN para el ARN de 589 nucleótidos que codifica HsPSCA (RI 871). (B) El rendimiento de ARN de las reacciones de transcripción optimizadas en secuencia es significativamente mayor en comparación con las reacciones de transcripción estándar.

Después de 60 minutos (R1626) y 120 minutos (R1871), ambos ARN alcanzan una meseta similar de aproximadamente 3,9 mg/ml de ARN. Se muestran la media y la desviación estándar de triplicados.

5 Figura 6: comparación de los rendimientos de ARN obtenidos a partir del uso de mezclas de nucleótidos estándar y de secuencia optimizada (CapNTP) para el ARNm que codifica HsPSCA (R1871), Luciferasa (PpLuc, R2988) y EGFR/Mucin-1 (R1626). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 1 (tiempo de reacción 5 horas). Los rendimientos de ARN para las tres moléculas de ARN diferentes de diferente longitud son aproximadamente los mismos para cada tipo de reacción de transcripción. Sin embargo, se obtienen diferentes rendimientos dependiendo de la mezcla de nucleótidos utilizada para la transcripción *in vitro*. La transcripción estándar (concentración de NTP igual para cada NTP) produce aproximadamente 1,5 mg/ml de ARN, transcripción con una mezcla de Cap-NTP doblemente concentrada (2xCapNTP) aproximadamente 3,0 mg/ml de ARN, transcripción optimizada de secuencia (seq-opt) aproximadamente 3,9 mg/ml de ARN y transcripción de secuencia optimizada con NTP alimentado aproximadamente 6,75 mg/ml ARN. Se muestran la media y la desviación estándar de triplicados.

15 Figura 7: análisis de la eficacia de terminación alcanzada por la transcripción *in vitro* estándar y con secuencia optimizada del ARNm de luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc). Los ARN se escindieron con la ribozima HHNUH2d de cabeza de martillo como se describe en el Ejemplo 2 y los fragmentos de ARN resultantes se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (dPAGE). Los ARN sin cap (no cap) y con cap enzimático (E-cap) sirvieron como controles. Se lograron eficiencias de limitación comparables cuando se usaron mezclas de NTP estándar y de secuencia optimizada para la síntesis de ARNm que codifican la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc).

20 Figura 8: comparación del rendimiento de ARN utilizando UTP y pseudo-UTP en mezclas de NTPcap optimizadas en secuencia para el péptido señal de Mucina-1/receptor del factor de crecimiento epidérmico/proteína de fusión Mucina-1 (EGFR/Mucina-1) ARNm (R1626) y tallo de próstata ARNm de antígeno celular (HsPSCA) (R1871). Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 3. En las mezclas, el UTP se reemplazó con 0%, 10% o 100% de pseudo-UTP (psU) como se indica. Se muestra la media y la desviación estándar de triplicados.

25 Figura 9: comparación de los rendimientos de ARN teóricos y reales para el ARN inmunoestimulador no codificante R2025 utilizando mezclas de NTP estándar (iguales) y de secuencia optimizada (seqopt) en presencia de nucleótidos adicionales (13,45 mM concentración total de NTP; 13,45 mM cap o GTP para mezclas iguales (exceso de 4 veces sobre GTP); 11,2 mM cap o GTP para mezclas de NTP optimizadas en secuencia (exceso de 4 veces sobre GTP)). Barras blancas: rendimientos reales. Barras negras: rendimientos teóricos. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 4. Se muestran la media y la desviación estándar de triplicados.

30 Figura 10: comparación del rendimientos de ARN teóricos y reales para el ARNm que codifica el antígeno de células madre de próstata de *Homo sapiens* (HsPSCA) (R1871) utilizando relaciones de NTP estándar (iguales) y de secuencia optimizada en presencia de nucleótidos adicionales (13,45 mM concentración total de NTP; 13,45 mM cap o GTP para mezclas iguales (exceso de 4 veces sobre GTP); 13,7 mM cap o GTP para mezclas de NTP optimizadas en secuencia (exceso de 4 veces sobre GTP)). Barras blancas: rendimientos reales. Barras negras: rendimientos teóricos. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.

35 Figura 11: eficiencia de transcripción utilizando mezclas de NTP optimizadas en secuencia de Na-NTP o Tris-NTP, en presencia de las respectivas sales agregadas (NaCl; Tris/HCl, pH 7,5). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 5.

40 Figura 12: monitoreo del progreso de la reacción de transcripción de secuencia optimizada midiendo la cantidad de ARN producido y el consumo de la mezcla de nucleótidos. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 6.

45 Figura 13: rendimiento de ARN para el ARNm que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc) (R2988) según la concentración de cap. El ARNm se sintetizó por transcripción *in vitro* utilizando concentraciones totales de NTP 4 mM y 13,45 mM de la mezcla de NTP optimizada para la secuencia PpLuc en presencia de concentraciones variables de análogo de cap. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 7. (A) ARN real [mg/ml]. (B) Rendimiento relativo de ARN [%].

50 Figura 14: rendimiento de ARN para el ARNm que codifica el antígeno de células madre de próstata de *Homo sapiens* (HsPSCA) (R1871) dependiendo de la concentración de cap. El ARNm se sintetizó por transcripción *in vitro* utilizando concentraciones totales de NTP 2 mM, 4 mM y 13,45 mM de la mezcla de NTP optimizada en secuencia de HsPSCA en presencia de concentraciones variables de análogo de cap. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 7. (A) Rendimiento real de ARN [mg/ml]. (B) Rendimiento relativo de ARN [%].

Figura 15: rendimiento de ARN para el ARNm que codifica el antígeno de células madre de próstata de *Homo sapiens* (HsPSCA) (R1871) según la concentración de nucleótidos de inicio GTP. El ARNm se sintetizó por transcripción *in vitro* utilizando concentraciones totales de NTP de 13,45 mM de la mezcla de NTP optimizada en secuencia de HsPSCA,

a la que se añadió el nucleótido de inicio de GTP hasta una concentración de 20 mM. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 8. (A) Rendimiento real de ARN [mg/ml]. (B) Rendimiento relativo de ARN [%].

Figura 16: rendimiento de ARN para el ARNm que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc) (R2988) según la concentración de nucleótidos de inicio de GTP. El ARNm se sintetizó por transcripción *in vitro* utilizando concentraciones totales de NTP de 13,45 mM de la mezcla de NTP optimizada de la secuencia PpLuc a la que se añadió nucleótido de inicio de GTP hasta una concentración de 20 mM. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 8. (A) Rendimiento real de ARN [mg/ml]. (B) Rendimiento relativo de ARN [%].

Figura 17: rendimiento de ARN para ARNm que codifica EGFR/Mucin-1 (R1626) dependiendo de la concentración de nucleótidos de inicio de GTP. El ARNm se sintetizó por transcripción *in vitro* utilizando concentraciones totales de NTP de 13,45 mM de la mezcla de NTP optimizada en secuencia EGFR/Mucina-1 a la que se añadió el nucleótido de inicio de GTP hasta una concentración de 20 mM. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 8. (A) Rendimiento real de ARN [mg/ml]. (B) Rendimiento relativo de ARN [%].

Figura 18: biorreactor en una ilustración esquemática, que incluye módulos para procesos continuos o semi lote, con ADN lineal inmovilizado con resina como plantilla para la reacción de transcripción.

Figura 19: inmunoestimulación reducida por ARN sintetizado con una mezcla de NTP de secuencia optimizada en comparación con una mezcla de NTP equimolar estándar. Los niveles de citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes celulares se midieron como se describe en el Ejemplo 10.

Figura 20: secuencia de ARNm optimizada en G/C que codifica HA de Influenza A H1N1 (Netherlands 2009), que corresponde a la SEC ID NO: 6 (Ejemplo 11).

Figura 21: rendimiento de ARN con el tiempo para un ARNm que codifica HA (Ejemplo 11). El rendimiento de ARN en diferentes puntos de tiempo se muestra para el ARN obtenido por transcripción *in vitro* en un biorreactor usando una mezcla de NTP estándar (TS(1)), por transcripción optimizada en secuencia en un biorreactor sin alimentación (TS(2)), por transcripción de secuencia optimizada en un biorreactor con alimentación (TS(3)), o por transcripción optimizada en secuencia en un biorreactor con concentración reducida de ARN-polimerasa T7 y concentración reducida de la plantilla (TS(4)), respectivamente.

Figura 22: expresión superficial de la proteína HA según se determina mediante análisis de citometría de flujo (Ejemplo 11). La media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) se determinó para las células transfectadas con el ARN obtenido por transcripción *in vitro* en un biorreactor utilizando una mezcla de NTP estándar (TS (1)), mediante la transcripción de secuencia optimizada en un biorreactor sin alimentación (TS(2)), por transcripción de secuencia optimizada en un biorreactor con alimentación (TS(3)), o por transcripción de secuencia optimizada en un biorreactor con concentración reducida de ARN-polimerasa T7 y concentración de plantilla reducida (TS(4)), respectivamente.

Figura 23: inmunoestimulación por ARN sintetizado por transcripción *in vitro* en un biorreactor usando una mezcla de NTP estándar (TS (1)), por transcripción optimizada en secuencia en un biorreactor sin alimentación (TS(2)), por transcripción optimizada en secuencia en un biorreactor con alimentación (TS(3)), o mediante transcripción optimizada en secuencia en un biorreactor con concentración de ARN-polimerasa T7 reducida y concentración de plantilla reducida (TS(4)), respectivamente. Los niveles de citoquinas y quimiocinas en sobrenadantes celulares se midieron como se describe en el Ejemplo 11.

Ejemplos

Los ejemplos mostrados a continuación son meramente ilustrativos y describen adicionalmente la presente invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación del ARNm

1. Preparación de constructos de ADN y ARNm

Para el presente ejemplo, se prepararon secuencias de ADN que codifican ARNm del antígeno de células madre de próstata de *Homo sapiens* (HsPSCA) (R1871), ARNm de luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc) (R2988) y proteína de fusión del receptor de la mucina 1 Mucin-1 (EGFR)/Mucin-1 (R1626) y se utilizaron para las siguientes reacciones de transcripción *in vitro*.

De acuerdo con una primera preparación, se construyó un vector para la transcripción *in vitro* que contiene un promotor T7 seguido de una secuencia que codifica las proteínas mencionadas anteriormente. Los constructos se prepararon modificando la secuencia de codificación de tipo salvaje mediante la introducción de una secuencia optimizada en GC para la estabilización, seguida de una secuencia de estabilización derivada de la alfa-globina-3'-UTR (muag (mutada alfa-

globina-3'-UTR), un tramo de 64 adenosinas (secuencia poli-A), un tramo de 30 citosinas (secuencia poli-C) y un tallo-bucle de histona.

Además, se construyó un vector para la transcripción *in vitro* que contiene un promotor T7 seguido de la secuencia que codifica un ARN inmunestimulador (R2025), que no codifica una proteína.

5 Los constructos de ARN y sus composiciones de nucleótidos se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2, respectivamente.

Tabla 1: ARNs

Descripción	Identificador (número R)	Secuencia	SEQ ID NO
ARNm de HsPSCA	R1871	Figura 1	1
ARNm de PpLuc	R2988	Figura 2	2
ARNm de EGFR/Mucin-1	R1626	Figura 3	3
ARN no codificante	R2025	Figura 4	4

Tabla 2: Composición de nucleótidos de los ARN

ARN	Longitud (nt)	G	C	A	U
HsPSCA	589	150 (25,5%)	205 (34,8%)	154 (26,1%)	80 (13,6%)
PpLuc	1870	571 (30,5%)	604 (32,3%)	428 (22,9%)	267 (14,3%)
EGFR/Mucin-1	5337	1630 (30,5%)	1967 (36,9%)	1096 (20,3%)	654(12,3%)
ARN no codificante	547	114 (20,8%)	111 (20,2%)	112 (20,5%)	210 (38,4%)

10

2. Transcripción *in vitro*

Los respectivos plásmidos de ADN preparados de acuerdo con el párrafo 1 se transcribieron *in vitro* utilizando polimerasa T7. Posteriormente, el ARNm se purificó utilizando PureMessenger® (Cure Vac, Tubingen, Alemania; WO2008/077592A1).

15 El volumen de reacción de transcripción estándar fue de 20 µl. Para la posterior purificación por HPLC de los ARNm, por ejemplo para el análisis de cap, se prepararon reacciones de 1 ml.

20 Las plantillas de plásmido de ADN linealizado (50 µg/ml) se transcribieron a 37°C durante tres horas (o como se indica) en HEPES / KOH 80 mM, pH 7,5, MgCl₂ 24 mM, espermidina 2 mM, DTT 40 mM, 5 U/ml pirofosfatasa (Thermo Fisher Scientific), inhibidor de ARNasa Ribolock 200 U/ml (Thermo Fisher Scientific), ARN polimerasa T7 5000 U/ml (Thermo Fisher Scientific). Se añadieron ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de acuerdo con las secciones 3 a 7 a continuación, respectivamente. Después de la transcripción, la plantilla de ADN se eliminó por digestión con DNaseI (Roche) (100 U/ml, CaCl₂ 1 mM, 30 minutos a 37°C).

25 Los ARN se precipitaron en LiCl 2,86M en un volumen de reacción 3,45 veces durante 16 horas a -20°C, seguido de centrifugación (30 minutos, 16.000g, 4°C). Los pellets se lavaron en cinco volúmenes de reacción de transcripción de etanol al 75% (tubos invertidos, centrifugado 5 minutos, 16.000g, 4°C), se secaron y se redisolieron en 2,5 volúmenes de reacción de transcripción de H₂O. Los rendimientos de ARN se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop®. Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 ng/µl de ARN (1 A₂₆₀ = 40 ng/µl ARN).

30 Para determinar el número de nucleótidos incorporados, la cantidad total de ARN producido se convirtió en el número de moléculas producidas dividiendo entre la masa molecular. Multiplicando por el número de nucleótidos respectivo presente en la secuencia se obtuvieron los nucleótidos incorporados. Para determinar los nucleótidos restantes (en %) al final de la reacción de transcripción, este número se dividió entre el número de nucleótidos disponibles, según:

Ecuación (1):

$$NTP (residual)(\%) = \left[1 - \frac{Rendimiento\ ARN \times \text{número de NTP en ARNm}}{[NTP (inicial)] \times \text{volumen de reacción}} \right] \times 100$$

El rendimiento de ARN indica el número de moléculas producidas por reacción (nmol). La concentración inicial de NTP [NTP (inicial)] se indica en mM, el volumen de reacción en µl.

5 Para calcular la concentración residual de los nucleótidos respectivos, los NTP disponibles al comienzo de la reacción se multiplicaron por el porcentaje de NTP residual al final de una reacción de transcripción (ver arriba) de acuerdo con:

Ecuación (2):

$$NTP (residual)(mM) = NTP (inicial) [mM] \times NTP (residual) [\%]$$

3. Transcripción in vivo estándar en presencia de análogo de cap

10 Para la producción de ARN de 5'-cap usando análogo de cap, la transcripción estándar se realizó con 5,8 mM de análogo cap m7G(5')ppp(5')G, ATP 4 mM, CTP 4 mM, UTP 4 mM y 1,45 mM GTP (todos Thermo Fisher Scientific) (ver Tabla 3). El análogo de cap y el GTP se utilizaron en una proporción 4:1.

Tabla 3: Concentración de nucleótidos (mM) para reacciones de transcripción *in vitro* estándar

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	5,8	1,45	4	4	4
PpLuc	5,8	1,45	4	4	4
EGFR/Mucin-1	5,8	1,45	4	4	4

15 Tabla 4: Cantidad de nucleótidos que quedan al final de las reacciones de transcripción estándar (después de 2,5 horas, en porcentaje de nucleótidos al comienzo de la reacción)

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,86	17,35	59,05	69,24	84,02
PpLuc	99,96	16,39	67,94	77,28	85,83
EGFR/Mucin-1	99,99	16,37	63,42	79,80	87,84

Tabla 5: Concentración de nucleótidos (mM) que permanecen al final de una reacción de transcripción *in vitro* estándar (después de 2,5 horas)

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	5,79	0,25	2,36	2,77	3,36
PpLuc	5,80	0,24	2,72	3,09	3,43
EGFR/Mucin-1	5,80	0,24	2,54	3,19	3,51

20 El rendimiento típico de las transcripciones de ARN en una transcripción estándar es de aproximadamente 1,5 mg/ml de reacción.

4. Transcripción in vitro en presencia de análogo de cap utilizando concentraciones dobles de análogo de cap y NTP (2xCapNTP)

25 Las concentraciones de análogo de Cap y NTP se duplicaron en comparación con las condiciones de transcripción estándar, por lo que las reacciones se llevaron a cabo en 11,6 mM m7G(5')ppp(5')C análogo de cap, 8 mM ATP, 8 mM CTP, 8 mM UTP y 2,9 mM GTP (todos Thermo Fisher Scientific) (ver Tabla 3). El análogo de cap y GTP se utilizaron en una proporción 4:1.

Tabla 6: Concentración de nucleótidos (mM) para reacciones de transcripción *in vitro* 2xCapNTP

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	11,6	2,9	8	8	8
PpLuc	11,6	2,9	8	8	8
EGFR/Mucin-1	11,6	2,9	8	8	8

30 Tabla 7: Cantidad de nucleótidos que quedan al final de las reacciones de transcripción de 2xCapNTP (después de 2,5 horas, en porcentaje de nucleótidos al comienzo de la reacción)

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,87	23,45	62,08	71,51	85,20
PpLuc	99,96	17,93	68,53	77,70	86,09
EGFR/Mucin-1	99,99	20,15	65,07	80,72	88,39

El rendimiento típico de una transcripción que utiliza concentraciones dobles de análogo de cap y NTP es aproximadamente 3 mg/ml de reacción.

5. Transcripción *in vitro* optimizada en secuencia en presencia de análogo de cap

- 5 Para las reacciones de transcripción *in vitro* de secuencia optimizada, se calculó la concentración de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) para cada secuencia individual de acuerdo con la composición de nucleótidos de la secuencia (Tabla 2), de modo que la concentración total de todos los NTP fue de 13,45 mM como en las reacciones de transcripción estándar. La concentración de análogo de cap fue cuatro veces mayor que la concentración calculada para GTP, de modo que se obtuvo una relación cap:GTP de 4:1.

10 Tabla 8: Concentraciones de nucleótidos (nM) para la transcripción *in vitro* con secuencia optimizada

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	13,6	3,4	4,7	3,5	1,8
PpLuc	16,4	4,1	4,3	3,1	1,9
EGFR/Mucin-1	16,4	4,1	5,0	2,7	1,7

Tabla 9: Cantidad de nucleótidos restantes al final de la transcripción optimizada de secuencia (después de 2,5 horas, en porcentaje de nucleótidos al inicio de la reacción)

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,86	14,83	14,71	14,57	14,83
PpLuc	99,96	14,62	14,72	14,76	14,85
EGFR/Mucin-1	99,99	14,60	14,82	14,51	25,04

15

Tabla 10: Concentración de nucleótidos (mM) que permanecen al final de una reacción de transcripción *in vitro* con secuencia optimizada (después de 2,5 horas)

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	13,58	0,51	0,69	0,51	0,27
PpLuc	16,39	0,60	0,64	0,45	0,29
EGFR/Mucin-1	16,40	0,60	0,74	0,40	0,25

El rendimiento de ARN típico de una transcripción que utiliza un análogo de cap optimizado en secuencia y NTP es de aproximadamente 3,9 mg/ml de reacción.

20 6. Transcripción *in vitro* optimizada de secuencia en presencia de análogo de cap con alimentación de NTP

Para las reacciones de transcripción *in vitro* de secuencia optimizada, se calculó la concentración de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) para cada secuencia individual de acuerdo con la composición de nucleótidos de la secuencia (Tabla 2), de modo que la concentración total de todos los NTP fue de 13,45 mM como en las transcripciones estándar. La concentración del análogo de cap fue cuatro veces mayor que la concentración calculada para GTP, de modo que se obtuvo una relación cap/GTP de 4:1 (ver Tabla 7).

25

Para la alimentación de NTP, se agregaron NTP 13,45 mM sin análogo de cap (en un volumen de 2,69 µl) a la mezcla de reacción después de 2,5 horas. Como en este momento, >99% del análogo de cap todavía estaba presente en la reacción de transcripción, pudo mantenerse la relación Cap/GTP 4:1.

30 Tabla 11: Cantidad de nucleótidos que quedan al final de la transcripción optimizada de secuencia con alimentación de NTP (después de 5 h, en porcentaje de nucleótidos al comienzo de la reacción)

ARN	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,75	26,3	26,2	26,1	26,3
PpLuc	99,94	26,1	26,2	26,2	26,3
EGFR/Mucin-1	99,98	26,1	26,3	26,0	26,5

El rendimiento de ARN típico de una transcripción que utiliza un análogo de cap optimizado de secuencia y NTP seguidos de alimentación de NTP es alrededor de 6,75 mg/ml de reacción.

7. Transcripción estándar *in vitro* de ARN sin cap

Para la producción de ARN de trifosfato 5' sin cap, la transcripción se realizó en presencia de 4 mM de cada ATP, GTP, CTP y UTP (todos Thermo Fisher Scientific). Se usaron ARN sin cap como control en el ensayo de análisis cap (Figura 7).

8. ARNm con cap enzimático

- 5 El cap enzimático se realizó utilizando el sistema cap ScriptCap™ m⁷G (Celscript, Madison, WI, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, por reacción, 60 µg de ARN sin cap se desnaturalizaron térmicamente (10 minutos, 65°C) en un volumen de 68,5 µl y se enfriaron inmediatamente en hielo (5 minutos). Después de la adición de los componentes de la reacción (1x tampón ScriptCap Capping, 1 mM GTP, 0,1 mM SAM, 1000 U/ml de inhibidor ScripGuard RNase, 400 U/ml ScriptCap Capping Enzyme) hasta un volumen final de 100 µl, las reacciones se incubaron durante 1 hora 37°C. Los ARN se precipitaron en LiCl 2,86 M en un volumen de reacción de 3,45 veces durante 16 horas a -20°C, seguido de centrifugación (30 minutos, 16.000g, 4°C). Los pellets se lavaron en 0,5 volúmenes de reacción, 75% de etanol (invertido, centrifugado 5 minutos, 16000g, 4°C), se secaron y se volvieron a disolver en H₂O. En el ensayo de análisis de cap (Figura 7) se utilizaron ARN con cap enzimáticamente como control.

9. Resultados

- 15 El rendimiento de ARN de las reacciones de transcripción *in vitro* estándar y con secuencia optimizada se determinó en puntos de tiempo definidos durante hasta dos horas como se describió anteriormente (párrafo 2).

Como se puede ver en la Figura 5A, después de aproximadamente 30 minutos, el rendimiento de ARN de las reacciones de transcripción estándar alcanza una meseta de aproximadamente 1,4 mg/ml para el ARN de 5337 nucleótidos que codifica EGFR/Mucin-1 (R1626) y de aproximadamente 1,8 mg/ml para el ARN de 589 nucleótidos que codifica HsPSCA (R1871).

Como puede verse en la Figura 5B, el rendimiento de ARN de las reacciones de transcripción optimizadas en secuencia es significativamente mayor en comparación con las reacciones de transcripción estándar.

Después de 60 minutos (R1626) y 120 minutos (R126), respectivamente, ambos ARN alcanzan una meseta similar de aproximadamente 3,9 mg/ml.

- 25 Como se puede ver en la Figura 6, los rendimientos de ARN para las tres moléculas de ARN diferentes de diferente longitud son aproximadamente los mismos para cada tipo de reacción de transcripción después de cinco horas.

La transcripción estándar (concentración igual de NTP) produce aproximadamente 1,5 mg/ml de ARN, la transcripción con una mezcla concentrada de Cap-NTP (2xCapNTP) aproximadamente 3,0 mg/ml de ARN, la transcripción de secuencia optimizada es de aproximadamente 3,9 mg/ml de ARN y la transcripción de secuencia optimizada con NTP alimentado alrededor de 6,75 mg/ml de ARN.

Por tanto, la reacción de transcripción de secuencia optimizada da como resultado un aumento de aproximadamente el triple en el rendimiento de ARN en comparación con las reacciones de transcripción estándar. Este rendimiento se puede aumentar más o menos al doble al complementar la reacción con NTP (alimentación de NTP).

Ejemplo 2: Ensayo de análisis de CAP

- 35 1. Principio del ensayo

La ribozima cabeza de martillo HHNUH2d (5'-GCAUGGCUGAUGAGGCCUCGACCGAUAGGUCGAGGCCGAAAAGCUUUCUCCC-3') (SEQ ID NO: 5) se incubó con los ARN transcritos *in vitro* del ejemplo 1 y los productos de escisión se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (dPAGE).

- 40 2. Reacción de escisión de la ribozima

Por reacción, 10 pmol de HHNUH2d y 10 pmol del ARN de la generación 4 respectiva se recoció en EDTA 0,625 mM en un volumen total de 6 µl (2 minutos a 95°C, 0,1°C/segundos a 25°C, 10 minutos a 25°C). Después de la adición de 4 µl de MgCl₂ 100 mM, Tris/HCl 125 mM, pH 7,5 (concentración final de MgCl₂ 40 mM, Tris/HCl 50 mM), la reacción se incubó a 25°C durante una hora. Para el análisis mediante PAGE, la reacción 1x se detuvo con 30 µl de formamida al 95%, EDTA 20 mM.

3. Separación de geles, cuantificación de productos de escisión y cálculo del grado de cap.

Las reacciones detenidas se desnaturalizaron con calor (se calentaron a 80°C durante 2 minutos, se pusieron inmediatamente en hielo durante 5 minutos) y se separaron en un gel de poli(acrilamida) desnaturalizante al 10% de 10 cm x 8 cm x 1,0 mm (urea 8M (AppliChem), 20% acrilamida: bisacrilamida 19:1 (AppliChem), 1xTBE, 1% APS (AppliChem), 0,1% TEMED (AppliChem); 180 V, 2 horas, Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad)). Los geles se tiñeron durante 10 minutos en 1:10.000 SYBR Gold (Invitrogen) en TBE y se documentaron en un sistema de documentación de gel E-BOX VX2 con 312 nm-Transiluminador UV (PepLab) (excitación máxima para SYBR Gold: aprox. 300 nm, emisión: aprox. 537 nm).

Para determinar la proporción cap en las preparaciones de ARNm, se cuantificaron las bandas de los productos de escisión de 13-mer respectivos (derivados de la fracción sin cap) o de 14-mer (derivados de la fracción cap) utilizando el software de análisis Quantity One 1-D (BioRad). Los grados de ARN con y sin cap, respectivamente, se calcularon de acuerdo con:

Ecuación (4):

$$ARN\ cap\ (\%) = \frac{Intensidad\ de\ señal\ 14\ mer}{\sum\ intensidades\ de\ señal\ (13\ mer + 14\ mer)} \times 100$$

Ecuación (5):

$$ARN\ no - cap\ (\%) = \frac{Intensidad\ de\ señal\ 13\ mer}{\sum\ intensidades\ de\ señal\ (13\ mer + 14\ mer)} \times 100$$

4. Resultados

Como se puede ver en la Figura 7, se lograron eficiencias de terminación cap comparables para mezclas de NTP estándar y de secuencia optimizada para el ARNm de luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc).

20 Ejemplo 3: Comparación de los rendimientos de ARN utilizando UTP y pseudo-UTP en mezclas de nucleótidos optimizadas en secuencia

Las reacciones de transcripción *in vitro* se pueden realizar reemplazando uno o más de los cuatro nucleótidos ATP, GTP, CTP y UTP por análogos de nucleótidos. Ejemplos de tales NTP modificados son pseudouridina (psU o Ψ)-trifosfato y 5-metilcitosina (5mC)-trifosfato. El porcentaje de nucleótido modificado en la mezcla puede variar de 0% a 100% del nucleótido natural que reemplaza. Para probar si es posible usar nucleótidos modificados como pseudouridina (psU)-trifosfato en mezclas de nucleótidos optimizadas en secuencia, la UTP se reemplazó por un 10% y un 100% de pseudouridina-trifosfato. En una reacción de control, se utilizó 100% de UTP.

Transcripción in vitro optimizada de secuencia en presencia de análogo de cap

Para las reacciones de transcripción *in vitro* de secuencia optimizada, se calculó la concentración de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) para cada secuencia individual de acuerdo con la composición de nucleótidos de la secuencia (Tabla 2), de modo que la concentración total de todos los NTP fue de 13,45 mM como en las reacciones de transcripción estándar. La concentración del análogo de cap fue cuatro veces mayor que la concentración calculada para GTP, de modo que se obtuvo una relación CAP/GTP de 4:1.

Resultados

Como puede verse en la Figura 8, el uso de UTP y pseudo-UTP en mezclas de nucleótidos de secuencia optimizada con análogo de cap (mezclas de CapNTP) da como resultado rendimientos de ARN comparables independientemente del porcentaje de pseudo-UTP en la mezcla de nucleótidos de secuencia optimizada. Esto se demostró para dos ARNm diferentes que codifican el péptido señal Mucina-1/ receptor del factor de crecimiento epidérmico / proteína de fusión Mucina-1 (EGFR / Mucina-1) (R1626) y el ARNm del antígeno de células madre de próstata (HsPSCA), respectivamente.

40 Ejemplo 4: Comparación de los rendimientos de ARN teóricos y reales utilizando mezclas de nucleótidos estándar y de secuencia optimizada

Las reacciones de transcripción se ensamblaron como se describe en el Ejemplo 1, Sección 2. Los NTP se distribuyeron por igual (equimolar) o se distribuyeron de acuerdo con la secuencia del ARN producido como se describe en el Ejemplo 1, Sección 5. Para algunas reacciones, se agregó un nucleótido adicional (GTP o análogo de cap) en una proporción de 4:1 sobre GTP.

45 *Resultados*

Como puede verse en la Figura 9, el rendimiento real de ARN para R2025 se puede aumentar para mezclas de NTP optimizadas en secuencia en comparación con mezclas de NTP estándar (mezcla de NTP igual). Como se puede ver en la Figura 10, el rendimiento real de ARN para el ARNm que codifica el antígeno de células madre de próstata de Homo sapiens (HsPSCA; R1871) puede aumentar para mezclas de NTP optimizadas en secuencia en comparación con mezclas de NTP estándar (mezcla de NTP igual).

Ejemplo 5: Influencia de los contraiones de NTP en los rendimientos de ARN

El impacto de los contraiones de NTP en el rendimiento de ARN se investigó utilizando un ARNm que codifica el péptido señal de Mucina-1 de Homo sapiens / receptor del factor de crecimiento epidérmico / proteína de fusión Mucin-1 (EGFR/Mucin-1, R1626) como ejemplo. Las reacciones de transcripción se ensamblaron como se describe en el Ejemplo 1, Sección 2, utilizando relaciones NTP optimizadas en secuencia y una concentración total de NTP de 13,45 mM. Los NTP contenían Na⁺ o Tris⁺ (ambos Thermo Scientific) como contraiones. Además, las reacciones de Na-NTP se complementaron con diferentes concentraciones de NaCl, las reacciones de Tris-NTP con Tris/HCl. Después de 2,5 horas de tiempo de reacción, los ARN se purificaron y su concentración se determinó como se describe en el Ejemplo 1, Sección 2.

Resultados

Como se puede ver en la Figura 11, el rendimiento de ARN para el péptido señal de mucina-1 de Homo sapiens / receptor del factor de crecimiento epidérmico / proteína de fusión Mucin-1 (EGFR/Mucin-1, R1626) usando una mezcla de NTP optimizada en secuencia se mantuvo aproximadamente igual hasta una concentración de Tris-HCl 150 mM. Por el contrario, el rendimiento de ARN comenzó a disminuir a concentraciones de NaCl superiores a 75 mM.

Se ha descrito el impacto negativo de altas concentraciones de NaCl en los rendimientos de ARN (por ejemplo, Kern et al., 1997. Biotecnol. Prog., 13, 747-756; US 6.586.218 B2). Así, altas concentraciones de Na-NTP, especialmente como consecuencia cuando se persigue una estrategia de alimentación NTP, podrían resultar en una disminución de los rendimientos de ARN. Esta limitación debe evitarse con Tris-NTP, ya que la actividad de la polimerasa no se ve afectada por altas concentraciones de Tris/HCl.

Ejemplo 6: Seguimiento del progreso de la reacción de transcripción

Se desarrollaron reacciones de transcripción a gran escala (350 µl) del antígeno de células madre de próstata de Homo sapiens (HsPSCA; R1871) como se describe en la Sección 2 del Ejemplo 1, utilizando relaciones NTP optimizadas en secuencia y una concentración total de NTP Tris-NTP 13,45 mM. El análogo de cap estaba presente en un exceso 4:1 sobre GTP. En puntos de tiempo definidos (15/30/60/90/120 minutos después del inicio de la reacción), se tomó una muestra de 20 µl, el ARN se purificó y se determinó su absorbancia a 260 nm como se describe en el Ejemplo 1, Sección 2. Se tomó una segunda muestra de 40 µl en el mismo momento y se filtró a través de un dispositivo Microcon YM10 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) (16000g, 5 minutos, 17°C). La absorbancia del flujo a 260 nm, correspondiente al análogo de cap no incorporado y NTP, se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (T009-Technical Bulletin NanoDrop 1000% 8000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EEUU).

Resultados

Como se puede ver en la Figura 12, el uso de una mezcla de ribonucleótidos de secuencia optimizada permite medir el progreso de la reacción de transcripción *in vitro* mediante la determinación de la concentración de nucleótido total residual en puntos de tiempo definidos. La disminución de la concentración total de NTP se correlaciona directamente con la cantidad de ARN sintetizado.

Así, el progreso de la reacción de transcripción se puede determinar con precisión en función de la concentración total de NTP medida en un momento dado y calcular los moles de NTP consumidos. En base a esta información, es posible calcular la cantidad de ARN sintetizado.

Este procedimiento es especialmente útil para controlar continuamente el progreso de una reacción de transcripción, por ejemplo en un reactor de transcripción. Esto no sería posible si se usa una mezcla de NTP estándar, ya que el consumo de NTP no reflejaría tan fácilmente la cantidad de ARN sintetizado.

Ejemplo 7: Rendimiento de ARN para mezclas de nucleótidos optimizadas en secuencia en función de la concentración de Cap

Las reacciones de transcripción se desarrollaron como se describe en el Ejemplo 1, Sección 2, y se llevaron a cabo a concentraciones totales de NTP de 2 mM, 4 mM y 13,45 mM de NTP, como se indica en las Figuras 14 y 15. Los NTP se distribuyeron de acuerdo con la secuencia del ARN producido como se describe en el Ejemplo 1, Sección 5 (mezcla de

ribonucleótidos optimizada para la secuencia de PpLuc y HsPSCA). Las reacciones se realizaron a diversas concentraciones (0, 0,25, 2,0, 10, 16 y 20 mM) del análogo de cap (m7G(5')ppp(5')G) como se indica en las Figuras 14 y 15.

Resultados

- 5 Como se puede ver en la Figura 13 A, el rendimiento real de ARN para el ARNm de PpLuc aumenta con concentraciones más altas de análogo de cap. El rendimiento real de ARN es mayor para una concentración total de NTP de 13,45 mM en comparación con 4 mM. La Figura 13B muestra que el rendimiento relativo de ARN para ARNm de PpLuc aumenta hasta una concentración de análogo cap de aproximadamente 16 mM. El aumento del rendimiento relativo de ARN es más fuerte una concentración de NTP baja (4 mM) que para una concentración de NTP alta (13,45 mM).
- 10 Como puede verse en la Figura 14 A, el rendimiento real de ARN para el ARNm de HsPSCA aumenta con concentraciones más altas de análogo de cap. El rendimiento real de ARN es mayor para una concentración total de NTP de 13,45 mM en comparación con 4 mM y 2 mM. La Figura 14B muestra que el rendimiento relativo de ARN para el ARNm de HsPSCA aumenta hasta una concentración de análogo de cap de aproximadamente 16 mM. El aumento más fuerte del rendimiento relativo de ARN se observa para la concentración más baja de NTP analizada (2 mM).
- 15 Estos resultados demuestran que el uso de una mezcla de ribonucleótidos de secuencia optimizada conduce a una mayor eficiencia de la síntesis de ARN con cap incluso a bajas concentraciones de nucleótidos totales iniciales (por ejemplo 2 mM). Por el contrario, se ha sugerido previamente que para un aumento de ARN son necesarias altas concentraciones de nucleótidos totales, del orden de 12 mM a 40 mM (US6586218).
- 20 La comparación de ARNm de PpLuc (1870 nucleótidos) y ARNm de HsPSCA (589 nucleótidos) muestra que los rendimientos de ARN relativos son independientes de la longitud del ARN para una concentración de NTP total definida.

Ejemplo 8: Rendimiento de ARN para mezclas de nucleótidos optimizadas en secuencia en función de la concentración de nucleótidos de inicio GTP

Las reacciones de transcripción se desarrollaron como se describe en el Ejemplo 1, Sección 2, y se llevaron a cabo a una concentración total de NTP de la mezcla de nucleótidos de secuencia optimizada de 13,45 mM para P625, PI 040 y P532.

- 25 Los NTP se distribuyeron de acuerdo con la secuencia del ARN producido tal como se describe en el Ejemplo 1, Sección 5 (mezcla de ribonucleótidos optimizada en secuencia para PpLuc, HsPSCA y EGFR/Mucin-1). Las reacciones se realizaron agregando concentraciones definidas (0, 0,25, 2,0, 10, 16 y 20 mM) de nucleótido de inicio GTP a la mezcla de secuencia de NTP optimizada, como se indica en las Figuras 16 a 18.

Resultados

- 30 Como puede verse en la Figura 15A y 15B, el rendimiento real y relativo de ARN para el ARNm de HsPSCA aumenta hasta una concentración de nucleótidos de inicio GTP de aproximadamente 10 mM y disminuye a concentraciones más altas de GTP.
- 35 Como puede verse en la Figura 16A y 16B, el rendimiento real y relativo de ARN para el ARNm de PpLuc aumenta ligeramente hasta una concentración de nucleótidos de inicio GTP de aproximadamente 10 mM y luego disminuye a concentraciones de GTP más altas.
- Como se puede ver en la Figura 17A y 17B, el rendimiento real y relativo de ARN para el ARNm de EGFR/Mucina aumenta hasta una concentración de nucleótidos de inicio GTP de aproximadamente 10 mM y disminuye a concentraciones más altas de GTP.
- 40 Estos resultados demuestran que el uso de una mezcla de ribonucleótidos de secuencia optimizada y una cantidad adicional del nucleótido de inicio GTP conduce a una mayor eficiencia de la síntesis de ARN hasta una concentración de nucleótido de inicio GTP de aproximadamente 10 mM.

Ejemplo 9: Biorreactor

- 45 La Figura 18 muestra una realización preferente de un biorreactor 1 de acuerdo con la presente invención en una ilustración esquemática. La estructura modular del biorreactor 1 es evidente a partir de la Figura 18. Aquí, el biorreactor 1 consta de varios módulos de biorreactor 2, 3, 4, 5. El módulo de reacción 1 es un recipiente de reacción utilizado para un proceso continuo o semi-lote para sintetizar moléculas de ARN de secuencia dada. El módulo de reacción 2 contiene ADN inmovilizado con resina, utilizado como plantilla para la reacción de transcripción de ARN. Aquí, la inmovilización del ADN permite un uso repetido de la plantilla y reduce la contaminación del producto de ARN deseado por cualquier tipo de ADN residual. Además, la inmovilización de la plantilla de ADN reemplaza el uso de enzima ADNasa para la digestión terminal

del ADN. Después de la transcripción, las moléculas de ARN producidas pueden liberarse por lotes o de manera continua en el módulo de captura 3. El módulo de captura 3 contiene una resina/fase sólida para capturar las moléculas de ARN y separar el ARN de otros componentes solubles de la reacción de transcripción. Posteriormente, las moléculas de ARN pueden dispensarse desde el biorreactor 1 mediante una línea de salida o similar (no se muestra) a una unidad receptora o similar, donde se puede llevar a cabo una mayor elución y purificación del ARN. Se puede proporcionar un líquido de lavado y/o tampón de elución al módulo de captura 3 mediante un tanque de lavado y tampón 31 respectivo conectado al área de transferencia entre el módulo de reacción 2 y el módulo de captura 3.

Para poder monitorear y controlar el proceso de transcripción en el módulo de reacción 2, se proporciona una membrana de ultrafiltración 21 para separar los componentes de alto peso molecular, tales como proteínas y polinucleótidos, de los componentes de bajo peso molecular, tales como nucleótidos, en el módulo de reacción 2. La membrana separa un núcleo de reacción 22, donde se lleva a cabo la reacción de transcripción del ARN, desde un compartimento de filtración 23, en el que se recibe la mezcla de reacción filtrada. En base a la concentración de nucleótidos de la mezcla de reacción filtrada en el compartimento de filtración 23 del módulo de reacción 2, utilizado como parámetro de proceso crítico, la alimentación de nucleótidos, componentes tampón y/o enzimas en el módulo de reacción 2 desde un tanque de alimentación 24 puede controlarse y regularse mediante una bomba de alimentación 43, que permite realizar la reacción de transcripción del ARN en una condición óptima de estado estacionario que produce un alto rendimiento transcripcional. Como medio de medida se proporciona una unidad sensora 41 para medir los parámetros de reacción en la mezcla de reacción. Aquí, la unidad sensora 41 comprende al menos un sensor para el análisis fotométrico, tal como una celda de flujo UV para UV 260/280 nm, en el fluido filtrado que contiene los componentes de bajo peso molecular, el fluido filtrado que se extrae del compartimento de filtración 23, circulado por una bomba de recirculación 25 y devuelta al compartimento de filtración 23. En la línea de circulación, el sensor de la unidad sensora 41 está provisto para monitorear en tiempo real el fluido filtrado dentro del compartimento de filtración 23. La aplicación de una mezcla de ribonucleótidos de secuencia optimizada en el biorreactor 1 permite medir en tiempo real la concentración de nucleótidos en el compartimento de filtración 23 durante la reacción de transcripción del ARN en el núcleo de reacción 22 del módulo de reacción 2. La unidad sensora 41 es parte del módulo de control 4, que comprende además un controlador 42 y un accionador en forma de bomba de alimentación 43. La unidad sensora 41 y la bomba de alimentación 43 están conectadas al controlador 42 para proporcionar señales de medida y recibir señales de instrucción desde el controlador 42. Además, otros parámetros críticos del proceso, como el pH del fluido filtrado o la conductividad del fluido filtrado, pueden analizarse mediante sensores adecuados adicionales de la unidad sensora 41. La recopilación y el análisis de datos por parte del controlador 42, generalmente en forma de un sistema informático o similar, permite el control de la bomba de alimentación 43 como un actuador para alimentaciones repetidas de nucleótidos, componentes de tampón y/o enzimas al módulo de reacción 2, así como el control de bombas adicionales del biorreactor 1 para ajustar parámetros clave del proceso en condiciones óptimas de reacción en estado estable.

Con el fin de evitar residuos, el biorreactor 1 de la realización preferente comprende además un módulo de reflujo 5 conectado al módulo de captura 3, recogiendo el módulo de reflujo 5 las materias primas no utilizadas, como nucleótidos y enzimas, y recirculándolas al módulo de reacción 2 mediante una bomba de reflujo 51. El módulo de reflujo 5 contiene enzimas inmovilizadas, como pirofosfatasa, o resina para capturar componentes perjudiciales, como fosfato o similares.

Ejemplo 10: Actividad inmunoestimuladora de las moléculas de ARN

En este ejemplo, se compararon las propiedades inmunoestimuladoras de las moléculas de ARN sintetizadas con una mezcla de NTP optimizada en secuencia y una mezcla equimolar de NTP estándar. La inmunoestimulación se determinó midiendo los niveles de citoquinas y quimiocinas en sobrenadantes de células transfectadas con ARNm.

Las reacciones de transcripción *in vitro* estándar y con secuencia optimizada para el ARNm de luciferasa (pPluc) se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Posteriormente, el ARNm se purificó por precipitación con LiCl.

45 Ensayo de inmunoestimulación

Se sembraron células HeLa a una densidad de 4×10^5 células por pocillo en una placa de 6 pocillos en 2 ml de medio de cultivo celular HeLa, consistente en medio Gibco® RPMI 1640 suplementado con HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM y 100 UI/ml de penicilina/estreptomina (todos de Lonza, Basilea, Suiza) y un 10% de suero de ternera fetal (Perbio Science, Bonn, Alemania). Al día siguiente, las células se transfectaron con 2 µg de ARN o agua para inyección (WFI) como control negativo utilizando Lipofectamina® 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Alemania, catálogo no. 11668-027). Brevemente, el reactivo Lipofectamina® y el ARN se diluyeron cada uno en medio Opti-MEM® (Life Technologies), se combinaron en una relación ARN:Lipofectamina® 1:1,5 y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. El control negativo contenía WFI en lugar de ARN mezclado con Lipofectamina®. Mientras tanto, las células se lavaron una vez con 2 ml de medio Gibco® RPMI 1640 suplementado con HEPES 25 mM y L-glutamina 2 mM (medio libre de suero y penicilina/estreptomina) y se añadieron 2 ml de suero libre y de medio libre de penicilina/estreptomina a las células, seguido de la adición de 0,5 ml de la mezcla de transfección de ARN:Lipofectamina®. Después de la incubación durante

4 horas a 371°C y 5% de CO₂, el medio que contenía la mezcla de transfección se reemplazó por 2 ml de medio de cultivo celular HeLa.

- 5 Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes libres de células y se midió la concentración de IL-6, CXCL10 y CCL5 mediante el Arreglo de Perlas Citométricas (CBA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences) utilizando los siguientes kits: kit Human Soluble Protein Master Buffer (nº catálogo 558264), Assay Diluent (nº de catálogo 560104), Human IL-6 Flex Set (nº catálogo 558276), Human IL-6 Flex Set (nº catálogo 558280), Human CXCL10 Flex Set (nº catálogo 558280) y Human CCL5 Flex Set (nº catálogo 558324) (todos los kits de BD Biosciences). Los datos se analizaron utilizando el software FCAP Array v3.0 (BD Biosciences).

Resultados

- 10 Como se puede ver en la Figura 19, los niveles secretados de IL-6, CXCL10 y CCL5 fueron inferiores para el ARN sintetizado con la mezcla de NTP optimizada en secuencia en comparación con el mismo ARN sintetizado con una mezcla de NTP equimolar estándar, lo que indica una menor actividad inmunoestimuladora del ARN resultante de la mezcla NTP optimizada en secuencia.

Ejemplo 11: Transcripción *in vitro* en un biorreactor

- 15 *Preparación del ADN utilizado para la transcripción in vitro (P1140):*

Se preparó un vector de ADN para la transcripción *in vitro* (P1140) mediante la inserción de los siguientes elementos en un vector de ADN (pCV32 (KanR)):

- 5'UTR: 32L4 (Top-UTR)
 20 ORF: HA de H1N1 (Países Bajos2009) (enriquecido en GC)
 3' UTR: Albumin7

La transcripción *in vitro* del vector de ADN obtenido da como resultado una molécula de ARN con una longitud de 2083 nt. La secuencia de ARN respectiva (SEC ID NO: 6) se ilustra en la Fig. 20.

El constructo de ARN se caracteriza por la siguiente composición de nucleótidos:

- 25 G = 540 (25,92%)
 C = 676 (32,45%)
 A = 541 (25,97%)
 U = 326 (15,65%)
 G / C = 58,37%

Linealización del vector de ADN:

- 30 El plásmido P1140 se linealizó usando las siguientes condiciones:

0,5 µg ADN plásmido
 1,5 µl 10 x tampón de reacción
 1 µl EcoRI
 hasta 15 µl WFI (agua para inyección)

- 35 La reacción se incubó durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con isopropanol.

Transcripción in vitro:

Mezcla cap/NTP estándar

Mezcla cap/NTP estándar	4 µl	Concentración final (mM)
Cap (100 mM)	1,16	5,8
ATP (100 mM)	0,8	4
CTP (100 mM)	0,8	4
UTP (100 mM)	0,8	4
GTP (100 mM)	0,29	1,45
WFI	0,15	

(La concentración final de NTP sin cap es 13,45 mM)

ES 2 727 776 T3

Cálculo de NTP y cap:

La misma concentración total de NTP de 13,45 mM utilizada en la reacción de transcripción estándar se usa para la transcripción optimizada en secuencia. Se utiliza una cantidad de GTP cuadruplicada para el análogo de cap.

P1140	G	C	A	U	Cap	Total
2083 nt	540	676	541	326		2083
%	25,9	32,5	26,0	15,7		100
Cada mM (total 12,45 mM NTP)	3,5	4,4	3,5	2,1		13,45
Análogo cap (4xGTP)					13,9	13,9
Conc. total cap/NTP (mM)						27,4

Preparación de la mezcla optimizada en secuencia Cap/NTP para P1140:

P1140	G	C	A	U	Cap	H ₂ O (hasta 7 µl)	Volumen final (µl)
Por reacción (µl NTP 100 mM)	0,70	0,87	0,70	0,42	2,79	1,52	7,00

5 5x Tampón de transcripción:

- 400 mM HEPES
 - 120 mM MgCl₂
 - 10 mM espermidina
 - 200 mM TDT
- 10 25 U/ml pirofosfatasa inorgánica

Se probaron 4 diferentes reacciones de transcripción en un biorreactor:

Como biorreactor, se utilizó un biorreactor DasBox de Dargip. La reacción se agitó a 50 rpm. En los puntos de tiempo indicados, se retiraron muestras de 20 µl. La concentración de ARN se midió determinando la absorción a 260 nm después de la precipitación con LiCl.

15 Se usaron cuatro condiciones diferentes para la transcripción *in vitro*:

1. Transcripción utilizando una mezcla de NTP estándar

Reactivo	Hasta 80.000 µl
Plásmido ADN linealizado (P1140) [0,48 µg/µl] (µl)	8300
5 x tampón de transcripción (µl)	16000
Mezcla estándar cap/NTP (µl)	16000
Inhibidor de ARNasa [400 U/µl] (µl)	400
ARN-polimerasa T7 [200 U/µl] (µl)	2000
WFI (µl)	37300
Volumen final	80000

La reacción de transcripción se incubó durante 3 horas a 37°C.

Posteriormente, se añadieron 6 µl de ADNasa I (1 mg/ml) y 0,2 µl de solución de CaCl₂ (0,1 M)/µg de plantilla de ADN a la reacción de transcripción y se incubó durante 2 horas a 37°C.

20 2. Transcripción de secuencia optimizada (1,5 h sin alimentación)

Reactivo	Hasta 80.000 µl
Plásmido ADN linealizado (P1140) [0,48 µg/µl] (µl)	8300
5 x tampón de transcripción (µl)	16000
Mezcla secuencia optimizada cap/NTP (µl)	28000
Inhibidor de ARNasa [40 U/µl] (µl)	400
ARN-polimerasa T7 [200 U/µl] (µl)	2000
WFI (µl)	25300
Volumen final	80000

La reacción de transcripción se incubó durante 1,5 horas a 37°C.

Posteriormente, se añadieron 6 µl de ADNasa I (1 mg/ml) y 0,2 µl de solución de CaCl₂ (0,1 M)/µg de plantilla de ADN a la reacción de transcripción, y se incubó durante 2 horas a 37°C.

3. Transcripción optimizada en secuencia con alimentación

Reactivo	Hasta 80.000 µl
Plásmido ADN linealizado (P1140) [0,48 µg/µl] (µl)	8300
5 x tampón de transcripción (µl)	16000
Mezcla secuencia optimizada cap/NTP (µl)	28000
Inhibidor de ARNasa [40 U/µl] (µl)	400
ARN-polimerasa T7 [200 U/µl] (µl)	2000
WFI (µl)	25300
Volumen final	80000

La reacción de transcripción se incubó durante 1,5 horas a 37°C.

- 5 Se añadieron 12.934,6 µl de la mezcla de secuencia optimizada Cap/NTP y 5 x tampón de transcripción después de 1,5 h. La reacción de transcripción se incubó durante 1,5 h adicionales a 37°C.

Posteriormente, se añadieron 6 µl de ADNasa I (1 mg/ml) y 0,2 µl de solución de CaCl₂ (0,1 M)/µg de plantilla de ADN a la reacción de transcripción, y se incubó durante 2 horas a 37°C.

- 10 4. Transcripción optimizada en secuencia con concentración de ARN polimerasa T7 reducida y concentración de plantilla reducida

Reactivo	Hasta 80.000 µl
Plásmido ADN linealizado (P1140) [0,48 µg/µl] (µl)	4200
5 x tampón de transcripción (µl)	16000
Mezcla secuencia optimizada cap/NTP (µl)	28000
Inhibidor de ARNasa [40 U/µl] (µl)	400
ARN-polimerasa T7 [200 U/µl] (µl)	1000
WFI (µl)	30400
Volumen final	80000

Resultados:

La transcripción de la mezcla de transcripción de secuencia optimizada da como resultado concentraciones más altas de ARN transcrito en comparación con la transcripción en condiciones estándar (Fig. 21, TS(1)). Una alimentación adicional con nucleótidos y un tampón de transcripción aumentó aún más la cantidad de ARN transcrito (Fig. 21, TS(3)).

- 15 Rendimiento:

ID muestra	[ARN] (mg)
P1140-TS(1)	130,6
P1140-TS(2)	317,1
P1140-TS(3)	656,4
P1140-TS(4)	312,6

Expresión e inmunoestimulación:

- 20 Se sembraron células HeLa a una densidad de 4×10^5 por pocillo en una placa de 6 pocillos en 2 ml de medio de cultivo celular HeLa consistente en medio Gibco® RPMI 1640 suplementado con HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM y 100 UI/ml penicilina/estreptomicina (todas de Lonza, Basilea, Suiza) y un 10% de suero de ternera fetal (Perbio Science, Bonn, Alemania). Al día siguiente, las células se transfectaron con diferentes concentraciones de 2 µg de ARN o agua para inyección (WFI) como control negativo utilizando Lipofectamina® 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Alemania, catálogo no.11668-027). Brevemente, el reactivo Lipofectamina y el ARN se diluyeron cada uno en medio Opti-MEM® (Life Technologies), se combinaron en una proporción ARN:Lipofectamina 1:1,5 y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. El control negativo contenía WFI en lugar de ARN mezclado con Lipofectamina2000. Mientras tanto, las células se lavaron una vez con 2 ml de medio Gibco® RPMI 1640 suplementado con HEPES 25 mM y L-glutamina 2 mM (medio de suero y libre de penicilina/estreptomicina), se añadieron 2 ml de suero y medio libre de penicilina/estreptomicina a las células después de la adición de 0,5 ml de ARN:lipolectamina a la mezcla de transfección.
- 25

Tras la incubación durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂, se eliminó el medio que contenía la mezcla de transfección y se agregaron 2 ml del medio de cultivo celular HeLa.

Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y las células.

Expresión proteica:

- 5 La expresión superficial de la proteína HA se determinó mediante análisis de citometría de flujo. Las células HeLa adherentes se lavaron una vez con 1 ml de PBS y se recogieron utilizando un tampón de desprendimiento sin tripsina (Tris HCl 40 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM). Las células se incubaron con anticuerpo anti-HA monoclonal de ratón (H1N1) (Immune Technology, Nueva York, EE. UU.) seguido de un anticuerpo secundario conjugado con FITC anti-ratón (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania). Las células se midieron en un BD FACS Canto y se analizaron utilizando la versión 10.6 del software FlowJo. El análisis estadístico se realizó utilizando un software Graph Pad Prism, versión 5.01.

Resultados:

El ARN transcrito en una mezcla de reacción de secuencia optimizada (Fig. 22, TS(2), TS(3), TS(4)) resultó en una expresión más alta de la proteína HA codificada que el ARN transcrito en condiciones estándar (Fig. 22, TS(1)).

Inmunoestimulación

- 15 Las concentraciones de IL-6, CXCL10 y CCL5 se midieron en sobrenadantes sin células mediante una matriz de perlas citométricas (CBA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences) utilizando los siguientes kits:

Reactivo	Nº catálogo
kit Human Soluble Protein Master Buffer	558264
Assay Diluent	560104
Human IL-6 Flex Set	558276
Human CXCL10 Flex Set	558280
Human CCL5 Flex Set	558324

Los datos se analizaron utilizando el software FCAP Array v3.0 (BD Biosciences). El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graph Pad Prism, versión 5.01.

Resultados:

- 20 El ARN transcrito en condiciones estándar (Fig. 23, TS1) indujo niveles más altos de las citoquinas IL-6, CXCL10 y CCL5 en células HeLa en comparación con los ARN transcritos en una mezcla de reacción de secuencia optimizada (Fig. 23, TS2, TS3, TS4).

ES 2 727 776 T3

LISTADO SE SECUENCIAS

<110> CureVac GmbH

<120> Métodos para mejorar la producción de ARN

<130> CU01P165WO2

5 <160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 589

<212> ARN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia ARNm optimizada en G/C de R1871 que codifica para antígeno de células madre de próstata de Homo sapiens (HsPSCA)

<400> 1

gggagaaaagc uuaccaugaa ggccgugcug cucgcgcugc ugauggccgg ccuggcccug 60

cagccggggga ccgcccugcu gugcuacagc ugcaaggccc aggucucgaa cgaggacugc 120

cugcaggugg agaacugcac gcagcugggc gagcagugcu ggaccgcccg gauccgcgcc 180

gugggcccugc ucaccgugau cagcaagggc ugcagccuga acugcgugga cgacagccag 240

gacuacuacg ugggcaagaa gaacaucacc ugcugcgaca ccgaccugug caacgccagc 300

ggcgcccacg cccugcagcc cgcggccgcc auccuggccc ugcugcccgc ccugggcccug 360

cugcucuggg gccccggcca gcugugacca cuaguuaaa gacugacuag cccgaugggc 420

cucccaacgg gccuccucc ccuccuugca ccgagauuaa uaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaugcau cccccccccc 540

15 cccccccccc cccccccccc caaaggcucu uuucagagcc accagaauu 589

<210> 2

<211> 1870

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Secuencia ARNm optimizada en G/C de R2988 que codifica para luciferasa de Photinus pyralis (PpLuc)

<400> 2

ES 2 727 776 T3

gggagaaaagc uuaccaugga ggacgcccaag aacaucaaga agggcccggc gcccuucuaac 60
 ccgcuggagg acgggaccgc cggcgagcag cuccacaagg ccaugaagcg guacgccug 120
 gugccgggca cgaucgccuu caccgacgcc cacaucgagg ucgacaucac cuacgcggag 180
 uacuucgaga ugagcgugcg ccuggccgag gccaugaagc gguacggccu gaacaccaac 240
 caccggaucg uggugugcuc ggagaacagc cugcaguucu ucaugccggu gcugggcgcc 300
 cucuucaucg gcguggccgu cgccccggcg aacgacaucu acaacgagcg ggagcugcug 360
 aacagcaugg ggaucaagca gccgaccgug guguucguga gcaagaaggc ccugcagaag 420
 auccugaacg ugcagaagaa gcugcccauc auccagaaga ucaucaucau ggacagcaag 480
 accgacuacc agggcuucca gucgauguac acguucguga ccagccaccu cccgccgggc 540
 uucaacgagu acgacuucgu cccggagagc uucgaccggg acaagaccu cgcccugauc 600
 augaacagca gcggcagcac cggccugccg aagggggugg cccugccgca ccggaccgcc 660
 ugcgugcgcu ucucgcacgc ccgggacccc aucuucggca accagaucau cccggacacc 720
 gccauccuga gcguggugcc guuccaccac ggcuucggca uguucacgac ccugggcuac 780
 cucaucugcg gcuuccgggu gguccugaug uaccgguucg aggaggagcu guuccugcgg 840
 agccugcagg acuacaagau ccagagcgcg cugcucgugc cgaccuguu cagcuucuuc 900
 gccaaagagca cccugaucga caaguacgac cugucgaacc ugcacgagau cgccagcggg 960
 ggcgccccgc ugagcaagga ggugggcgag gccguggcca agcgguuca ccuccgggc 1020
 auccgccagg gcuacggccu gaccgagacc acgagcgcg uccugaucac ccccagggg 1080
 gacgacaagc cgggcgccgu gggcaaggug gucccguucu ucgaggccaa ggugguggac 1140
 cuggacaccg gcaagaccu gggcgugaac cagcggggcg agcugugcgu gcgggggccc 1200
 augaucauga gcggcuacgu gaacaacccg gaggccacca acgcccucu cgacaaggac 1260
 ggcuuggcugc acagcggcga caucgccuac ugggacgagg acgagcacuu cuucaucguc 1320
 gaccggcuga agucgcugau caaguacaag ggcuaccagg uggcgccggc cgagcuggag 1380
 agcauccugc uccagcacc caacaucuuc gacgccggcg uggccgggcu gccggacgac 1440
 gacgccggcg agcugccggc cgcgguggug gugcuggagc acggcaagac caugacggag 1500
 aaggagaucg ucgacuacgu ggccagccag gugaccacc ccaagaagcu gcggggcggc 1560

ES 2 727 776 T3

gugguguuucg uggacgaggu cccgaagggc cugaccggga agcucgacgc ccggaagauc 1620
 cgcgagaucc ugaucaaggc caagaagggc ggcaagaucg ccgugugagg acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua 1740
 auaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaugca uccccccccc cccccccccc cccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc 1860
 caccagaauu 1870

<210> 3

<211> 5337

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia ARNm optimizada en G/C de R1626 que codifica para péptido señal Mucina-1/receptor de factor de crecimiento epidérmico/proteína de fusión Mucin-1 de Homo sapiens (EGFR/Mucin-1)

<400> 3

gggagaaagc uuaccaugac ccccggcacc cagagcccgu ucuuccugcu ccugcugcuc 60
 acggugcuga ccgucgugac cgggaugcgg ccgagcggca ccgccggggc ggcccugcuc 120
 gcccugcugg ccgcccugug ccccgccucg cgcgcgucgg aggagaagaa ggugugccag 180
 ggcacgagca acaagcugac ccagcucggc accuucgagg accacuuccu gagccugcag 240
 cggauguuca acaacugcga ggucgugcug ggcaaccugg agaucaccua cgugcagcgg 300
 aacuacgacc ugagcuuccu caagaccauc caggaggugg ccggcuacgu gcugaucgcc 360
 cugaacaccg uggagcggau cccgcuggag aaccugcaga ucauccgggg caacauguac 420
 uacgagaaca gcuacgccc uggccguccuc agcaacuacg acgccaacaa gacggggcug 480
 aaggagcugc cgaugcggaa ccugcaggag auccugcacg gcgcggugcg cuucucgaac 540
 aaccggccc ugugcaacgu ggagagcauc caguggcggg acaucgugag cagcgacuuc 600
 cucagcaaca ugagcaugga cuuccagaac caccugggcu cgugccagaa gugcgacccg 660
 agcugcccga acggcagcug cuggggcgcc ggcgaggaga acugccagaa gcugaccaag 720
 aucaucugcg cccagcagug cagcggggcg ugccggggca agagccccag cgacugcugc 780
 10 cacaaccagu gcgccgccgg cugcaccggc ccgcgggagu cggacugccu ggugugccgg 840

ES 2 727 776 T3

aaguuccgcg acgaggcgac cugcaaggac accugcccgc cgcugaugcu guacaacccg 900
accacguacc agauggacgu gaacccggag ggcaaguaca gcuucggcgc caccugcguc 960
aagaagugcc cccggaacua cguggugacc gaccacggga gcugcgugcg ggccugcggc 1020
gccgacagcu acgagaugga ggaggacggc gugcggaagu gcaagaagug cgagggcccg 1080
ugccggaagg ugugcaacgg caucggcauc ggggaguuca aggacagccu cagcaucaac 1140
gccaccaaca ucaagcacuu caagaacugc accucgauca gcggcgaccu gcacauccug 1200
ccggucgccu uccggggcga cagcuucacc cacacgccgc cgcuggaccc gcaggagcug 1260
gacauccuga agaccgugaa ggagaucacc ggcuuccucc ugauccaggc guggcccag 1320
aaccgcaccg accugcacgc cuucgagaac cuggagauca uccggggccg gaccaagcag 1380
cacggccagu ucagccuggc cguggugagc cugaacauca ccagccucgg gcugcggucg 1440
cugaaggaga ucagcgacgg cgacgugauc aucagcggca acaagaaccu gugcuacgcc 1500
aacacgauca acuggaagaa gcuguucggc accagcggcc agaagaccaa gaucaucagc 1560
aaccggggcg agaacagcug caaggccacc gggcaggugu gccacgcccu gugcucgccg 1620
gagggcugcu ggggcccggg gccgcgggac ugcgucagcu gccgcaacgu gagccggggc 1680
cgggagugcg uggacaagug caaccuccug gagggcgagc cgcgggaguu cguggagaac 1740
agcgagugca uccagugcca cccggagugc cugccccagg cgaugaacau caccugcacc 1800
ggccgggggc cggacaacug cauccagugc gcccacuaca ucgacggccc gcacugcgug 1860
aagacgugcc cggccggcgu gaugggcgag aacaacacc uggucuggaa guacgccgac 1920
gccggccacg ugugccaccu gugccacccg aacugcaccu acggcugcac cgggcccggc 1980
cuggagggcu gccccaccaa cggcccgaag aucccagca ucgccaccgg cauggugggc 2040
gcgcuccugc ugcugcuggu gguggcccug gggaucggcc ucuucaugcg gcgccggcac 2100
aucgucgga agcggacgcu gcggcggcug cugcaggagc gcgagcuggu cgagccgcug 2160
accccgagcg gcgaggcccc gaaccaggcc cuccugcggg uccugaagga gaccgaguuc 2220
aagaagauca aggugcuggg cucgggcgcc uucggcaccg uguacaaggg gcuguggauc 2280
cccgagggcg agaaggugaa gaucccggug gccaucaagg agcugcggga ggcgaccagc 2340
ccgaaggcca acaaggagau ccucgacgag gccuacguga uggccagcgu cgacaacccg 2400

ES 2 727 776 T3

cacgugugcc ggcugcuggg caucugccug accagcacgg ugcagcugau cacccagcug 2460
 augccguucg gcugccuccu ggacuacgug cgggagcaca aggacaacau cggcagccag 2520
 uaccugcuga acuggugcgu gcagaucgcc aagggauga acuaccugga ggaccggcgc 2580
 cuggugcacc gggaccucgc cgcgcggaac guccugguga agaccccgca gcacgugaag 2640
 aucaccgacu ucgggcuggc caagcugcug ggcgccgagg agaaggagua ccacgccgag 2700
 ggcggcaagg ugcccaucaa guggauggcc cuggagagca uccuccaccg gaucuacacc 2760
 caccagucgg acguguggag cuacggcgug accgucuggg agcugaugac guucggcagc 2820
 aagccguacg acgggauccc ggccagcgag aucagcagca uccuggagaa gggcgagcgg 2880
 cugccgcagc cgccgaucug caccaucgac guguacauga ucauggugaa gugcuggaug 2940
 aucgacgcgg acucgcggcc caaguuccgc gagcugauca ucgaguucag caaugggcc 3000
 cgggacccgc agcgguaccu ggugauccag ggcgacgagc ggaugcaccu cccgagcccg 3060
 accgacagca acuucuaccg ggcccugaug gacgaggagg acauggacga cgugguggac 3120
 gccgacgagu accugauccc gcagcagggc uucuucagca gcccgucgac cagccggacc 3180
 ccgucguga gcagccugag cgccaccagc aacaacucga cggucgccug caucgaccgc 3240
 aacggccucc agagcugccc caucaaggag gacagcuucc ugcagcggua cagcagcgac 3300
 ccgaccggcg cgcugaccga ggacagcauc gacgacaccu uccugccggu gccggaguac 3360
 aucaaccagu cggugccgaa gcggcccgcc gggagcgugc agaaccgggu guaccacaac 3420
 cagccgcuga acccggcccc gagccgggac ccgcacuacc aggaccccca cagcaccgcc 3480
 gugggcaacc cggaguaccu gaacaccguc cagccgacgu gcgugaacag caccuucgac 3540
 agcccggccc acugggcccga gaagggcucg caccagauca gccucgacaa cccggacuac 3600
 cagcaggacu ucuucccgaa ggaggcgaag cccaacggca ucuucaaggg cagcaccgcc 3660
 gagaacgccg aguaccugcg gguggccccg cagagcagcg aguucaucgg cgccuccggc 3720
 cacgccagcu ccacccccgg gggcgagaag gagacgagcg ccaccagcg guccagcgug 3780
 ccuuccagca ccgagaagaa cgcgguccu augaccagcu ccgugcugag cucccacagc 3840
 cccggguccg gcagcuccac gaccagggc caggacguga ccucgcccc ggccaccgag 3900
 cccgccagcg gguccgccgc gacguggggc caggacguca ccagcgugcc cgugacccgc 3960

ES 2 727 776 T3

cccgcccugg ggagcaccac gccgcccgcc cacgacguca ccuccgcccc cgacaacaag 4020
 cccgcgccgg gcagcaccgc cccccccgcc cacgggguga ccuccgcccc cgacacgcgg 4080
 ccggcccccg gcagcaccgc gccccccgcc cacggcguga ccuccgcccc ggacaccgcg 4140
 ccggcccccg gcagcaccgc cccccccgcc cacgggguga ccuccgcccc ggacacgcgg 4200
 cccgcccccg gcagcaccgc cccgcccgcc cacggcguga cguccgcgcc cgacaaccgc 4260
 cccgcccugg ggagcaccgc cccgcccgug cacaacguga ccuccgccag cggcuccgcg 4320
 agcggguccg ccagcacccu cguccacaac ggcacguccg cccgggccac caccaccccc 4380
 gccagcaagu ccacgcccuu cagcaucccg ucccaccaca gcgacacccc caccaccug 4440
 gcgucccaca gcacgaagac cgacgccucc agcaccacc acuccagcgu gccccgcug 4500
 accagcuca accacagcac guccccgcag cucagcaccg ggguguccuu cuucuuccug 4560
 agcuuccaca ucuccaaccu gcaguuaac agcucccucg aggaccccag caccgacuac 4620
 uaccaggagc ugcagcggga caucuccgag auguuccugc agaucuacaa gcagggcggc 4680
 uuccucgggc ugagcaacau caaguuccgc cccggcuccg ucguggugca gcugaccuc 4740
 gccuuccggg aggggacgau caacguccac gacguggaga cccaguuaa ccaguacaag 4800
 accgaggccg ccagccgcua caaccugacc aucuccgacg ugagcgucuc cgacgugccc 4860
 uucccguaa gcgcgaguc cggcgccggc gugcccggg ccgugugcca gugccggcgc 4920
 aagaacuacg ggcagcucga caucuuccc gcccgggaca cguaccacc gaugagcgag 4980
 uaccgaccu accacacca cggccgcua gucccccca gcuccaccga ccggagcccc 5040
 uacgagaagg uguccgccgg gaacggcggc agcucccuga gcuacaccaa cccggcggug 5100
 gccgccgccu ccgccaaccu ggaggaccag guggaccccc ggcugaucga cggcaaguga 5160
 ggacuaguua uaagacugac uagcccgaug ggccucccaa cgggcccucc uccccuccuu 5220
 gcaccgagau uaauaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 5280
 aaaaaaaaa aaaaaaaaua ucccccccc ccccccccc ccccccccc ccucuag 5337

<210> 4

<211> 547

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ARN inmunostimuladora no codificante de R2025

ES 2 727 776 T3

<400> 4

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg	120
auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguaaauu cccuuuuuu uuuuuuuuuu	180
uuuuuaguua augcgucuac ugaauccagc gaugaugcug gccagaucu ucgaccacaa	240
gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu	300
cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuauugcag	360
gaaaucccg uacagguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag	420
guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggaagaau	480
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgacg aucacagaga acuucuauc augcaggucu	540
gcucuag	547

<210> 5

<211> 52

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> ribozima cabeza de martillo HHNUH2d

<400> 5

10 gcauggcuga ugaggccucg accgauaggu cgaggccgaa aagcuuucuc cc 52

<210> 6

<211> 2083

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Secuencia de ARNm optimizada en G/que codifica para HA de la gripe A H1N1 (Países Bajos 2009)

<400> 6

ggggcgucg cuacggaggu ggcagccauc uccuucucg caucaagcuu accaugaagg	60
ccauccuggu gguccuccug uacaccuucg ccaccgcgaa cgccgacacg cugugcaucg	120

ES 2 727 776 T3

gcuaccacgc caacaacagc accgacaccg uggacaccgu gcucgagaag aacgucacgg 180
 ugacccacuc cgugaaccug cuggaggaca agcacaacgg gaagcucugc aagcugcggg 240
 gcgucgcccc gcugcaccuc gggaagugca acaucgccgg cuggauccug gggaaacccgg 300
 agugcgagag ccuguccacc gcgagcuccu ggagcuacau cguggagacc uccagcuccg 360
 acaacggcac gugcuacccc ggcgacuuca ucgacuacga ggagcuccgc gagcagcuga 420
 gcuccgugag cuccuucgag cgguucgaga ucuuccccaa gaccagcucc uggcccaacc 480
 acgacagcaa caaggggguc accgccgccu gcccgcacgc cggcgcgaag uccuucuaca 540
 agaaccugau cuggcucgug aagaagggga acagcuaccc caagcugucc aagagcuaca 600
 ucaacgacaa gggcaaggag gugcuggucc ucugggggau ccaccacccc agcaccuccg 660
 ccgaccagca gagccuguac cagaacgccg acgccuacgu guucgugggc uccagccgcu 720
 acuccaagaa guucaagccc gagaucgcca uccggccgaa gguccgcgac caggagggcc 780
 ggaugaacua cuacuggacg cugguggagc ccggggacaa gaucaccuuc gaggcgaccg 840
 gcaaccucgu ggucacccgc uacgccuucg ccauggagcg gaacgccggg agcggcauca 900
 ucaucuccga ccccccgug cacgacugca acacgaccug ccagaccccc aagggcgcca 960
 ucaacaccag ccugcccuuc cagaacaucc accccaucac gaucgggaag ugccccagu 1020
 acgugaaguc caccaagcug cgccucgca ccggccugcg gaacgucggg agcauccagu 1080
 cccgcgggcu guucggcgcc aucgccgggu ucaucgaggg cggcuggacc gggauuggg 1140
 acggcuggua cggguaccac caccagaacg agcagggcag cggguacgcc gccgaccuca 1200
 aguccacgca gaacgcgauc gacgagauca ccaacaaggu gaacagcguc aucgagaaga 1260
 ugaacacca guuaccgcc gugggcaagg aguucaacca ccuggagaag cggaucgaga 1320
 accugaacaa gaaggucgac gacggcuucc ucgacaucug gacguacaac gccgagcugc 1380
 uggugcuccu ggagaacgag cgcaccucgg acuaccacga cuccaacgug aagaaccucu 1440
 acgagaaggu ccggagccag cugaagaaca acgccaagga gaucgggaac ggcugcuucg 1500
 aguucuacca caagugcgac aacaccugca uggaguccgu gaagaacggg accuacgacu 1560
 accccaagua cagcgaggag gccaaagcuga accgcgagga gaucgacggc gugaagcucg 1620
 aguccacgcg gaucuaccag auccuggcga ucuacagcac cgucgccagc ucccuggugc 1680

ES 2 727 776 T3

ucguggucag	ccugggggcc	aucuccuucu	ggaugugcag	caacggcucc	cugcagugcc	1740
gcaucugcau	cugaccacua	gugcaucaca	uuuaaaagca	ucucagccua	ccaugagaau	1800
aagagaaaga	aaaugaagau	caauagcuua	uucaucucu	uuucuuuuuc	guugguguaa	1860
agccaacacc	cugucuaaaa	aacauaaau	ucuuuaauca	uuuugccucu	uuucucugug	1920
cuucaauuaa	uaaaaaaugg	aaagaaccua	gaucuaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1980
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaau	gcauc(ccccc	cccccccccc	2040
cccccccccc	cccccaaagg	cucuuuucag	agccaccaga	auu		2083

REIVINDICACIONES

1. Método para sintetizar una molécula de ARN de secuencia dada, que comprende los siguientes pasos:
 - a) determinar la fracción (1) para cada uno de los cuatro nucleótidos G, A, C y U de dicha molécula de ARN, y
 - b) sintetizar dicha molécula de ARN mediante transcripción *in vitro* en una mezcla de reacción de secuencia optimizada, donde dicha mezcla de reacción de secuencia optimizada comprende los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP, donde la fracción (2) de cada uno de los cuatro ribonucleósidos-trifosfato en la mezcla de reacción de secuencia optimizada corresponde a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN, un tampón, una plantilla de ADN y una ARN-polimerasa.
2. Método de la reivindicación 1, donde la etapa b) comprende los pasos de
 - b1) preparar una mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada que comprende los cuatro ribonucleósidos-trifosfato (NTP) GTP, ATP, CTP y UTP, donde la fracción (2) de cada uno los cuatro ribonucleósidos-trifosfato en la mezcla ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada corresponden a la fracción (1) del nucleótido respectivo en dicha molécula de ARN, y
 - b2) sintetizar dicha molécula de ARN mediante transcripción *in vitro* en la mezcla de reacción de secuencia optimizada que comprende la mezcla de NTP del paso (b1), un tampón, una plantilla de ADN y una ARN-polimerasa.
3. Método de la reivindicación 1 o 2, donde, antes del comienzo de la transcripción *in vitro*, se agrega un nucleótido de inicio a la mezcla de reacción de secuencia optimizada que corresponde al primer nucleótido de dicha molécula de ARN.
4. Método de la reivindicación 3, donde dicho nucleótido de inicio es un nucleósido-monofosfato, un nucleósido-difosfato, nucleósido-trifosfato o un dinucleósido-trifosfato o un análogo de cap.
5. Método de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde dicho nucleótido de inicio se añade en exceso en comparación con la fracción de ese nucleótido en dicha molécula de ARN en la primera posición de dicha molécula de ARN.
6. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde para los nucleótidos que no se corresponden con el primer nucleótido de la fracción de molécula de ARN (1) y la fracción (2) difieren como máximo en un 10%.
7. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde una parte o la totalidad de al menos un ribonucleósido-trifosfato es reemplazado por un nucleósido-trifosfato modificado, seleccionándose dicho nucleósido-trifosfato modificado preferentemente del grupo consistente en pseudouridina-5'-trifosfato, 1-metilpseudouridina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 4-tiouridina-5'-trifosfato y 5-metilcitidina-5'-trifosfato.
8. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde, en el curso de la transcripción *in vitro*, la mezcla de reacción optimizada en secuencia se complementa con la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) optimizada en secuencia como se define en la reivindicación 2 b1).
9. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha molécula de ARN se selecciona del grupo consistente en moléculas de ARN no codificantes y codificantes, preferentemente un ARNm.
10. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicha molécula de ARN tiene una longitud superior a 100 nucleótidos y/o donde dicha síntesis de una molécula de ARN de secuencia dada se realiza como una síntesis a gran escala y/o donde el contraión de NTP es tris(hidroximetil)-aminometano (Tris).
11. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la síntesis de dicha molécula de ARN por transcripción *in vitro* es seguida de separación y cuantificación de los NTP no incorporados.
12. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la síntesis de dicha molécula de ARN mediante transcripción *in vitro* se lleva a cabo en un biorreactor (1), preferentemente comprendiendo dicho biorreactor (1) una plantilla de ADN inmovilizada sobre un soporte sólido.
13. Método de la reivindicación 12, donde dicho biorreactor (1) comprende una membrana de filtración (21) para separar nucleótidos de la mezcla de reacción de secuencia optimizada, preferentemente seleccionándose dicha

membrana de filtración (21) del grupo de celulosa regenerada, celulosa modificada, polisulfona (PSU), poliacrilonitrilo (PAN), polimetilmetacrilato (PMMA), alcohol polivinílico (PVA) y poliariletersulfona (PAES).

14. Método de la reivindicación 13, donde dicha membrana de filtración (21) tiene un corte de peso molecular en un intervalo de aproximadamente 10 a 50 kDa.
- 5 15. Método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde dicho biorreactor (1) comprende una unidad sensora (41) para la medida en tiempo real de la concentración de nucleótidos durante la reacción, preferentemente dicha unidad sensora (41) mide la concentración de nucleótidos mediante análisis fotométrico.
- 10 16. Método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde dicho biorreactor comprende un módulo de control (4) que controla la adición de la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada como se define en la reivindicación 2 b1) y/o donde dicho biorreactor (1) comprende un actuador (43) que añade la mezcla de ribonucleósidos-trifosfato (NTP) de secuencia optimizada como se define en la reivindicación 2 b1) y/o donde dicho biorreactor (1) comprende una resina para capturar las moléculas de ARN y separar las moléculas de ARN de los otros componentes de la mezcla de reacción de transcripción y/o donde dicho biorreactor (1) funciona en un modo semi-lotes o en un modo continuo.
- 15 17. Método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde dicho biorreactor (1) comprende al menos un electrodo selectivo de iones, preferentemente empleándose el al menos un electrodo selectivo de iones para medir la concentración de uno o más tipos de iones en un líquido comprendido en al menos un compartimento del biorreactor (1), donde el ion preferentemente se selecciona del grupo consistente en H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- y PO_4^{3-} .

20

SEQ ID NO. 1: R1871 HsPSCA

GGGAGAAAGCUUACCAUGAAGGCCGUGCUGCUCGCGCUGCUGAUGGCCGGCCUGGCCUGCAGCCGGGGACCGCC
CUGCUGUGCUACAGCUGCAAGGCCAGGUCUCGAACGAGGACUGCCUGCAGGUGGAGAACUGCACGCAGCUGGGC
GAGCAGUGCUGGACCGCCGGAUCCGCGCCGUGGGCCUGCUCACCGUGAUCAGCAAGGGCUGCAGCCUGAACUGC
GUGGACGACAGCCAGGACUACUACGUGGGCAAGAAGAACAUCACCUGCUCGACACCGACCUGUGCAACGCCAGC
GGCGCCACGCCUGCAGCCGCGGCCGCAUCCUGGCCUGCUGCCCGCCUGGGCCUGCUCUGGGGCCCC
GGCCAGCUGUGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCUCCUUGCA
CCGAGAUUAAUAA
UGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 1

SEQ ID NO. 2: R2988 PpLuc

GGGAGAAAGCUUACCAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCCUUCUACCCGCUGGAGGACGGG
ACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCUUGGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCC
CACAU CGAGGUCGACAUCACCUACGCGGAGUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUAC
GGCCUGAACACCAACCACCGGAUCGUGGUGUGUCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUC AUGCCGGUGCUGGGCGCC
CUCUUCAUCGGCGUGGCCGUCGCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCUGAACAGCAUGGGGAUC
AGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAAGAUCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUC
AUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGC
CACCUCCCGCCGGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAUC
AUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUUGCCGCACCGGACCGCCUGCGUGCGCUUCUG
CACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACACCGCCAUCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCAC
GGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUACCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAG
GAGCUGUUCUGCGGAGCCUGCAGGACUACAAGAUCCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCUUC
GCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCGCCAGCGGGGGCGCCCGCUGAGC
AAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCCCGGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACC
ACGAGCGGAUCCUGAUCACCCCGAGGGGGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAG
GCCAAGGUGGUGGACCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCCG
AUGAUCAUGAGCGGCUACGUGAACAAACCGGAGGCCACCAACGCCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGC
GGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGUGGACCGGCCUGAAGUCGUGAUAAGUACAAG
GGCUACCAGGUGGGCGCCGGCCGAGCUGGAGAGCAUCCUGCUCACGACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCC
GGGCUGCCGGACGACGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGAG
AAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGGCGGCUGGUGUUCGUGGAC
GAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAUCGCGGAGAUCCUGAUAAGGCCAAGAAGGGC
GGCAAGAUCGCCGUGUGAGGACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGGCCUCCUCCCUUC
CUUGCACCGAGAUUAUAAA
AAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 2

SEQ ID NO. 3: R1626 EGFR/Mucin-1

GGGAGAAAGCUUACCAUGACCCCCGGCAGCCAGAGCCCGUUCUUCUGCUCUCCUGCUCACGGUGCUGACCGUC
 GUGACCGGGAUGCGGCCGAGCGGCACCGCCGGGGCGGCCUUCGUCGCCCUGCUGGCCGCCUUGUGCCCCGCCUCG
 CGCGCGCUGGAGGAGAAGAAGGUGUGCCAGGGCAGAGCAACAAGCUGACCCAGCUCGGCACCUCGAGGACCAC
 UUCUGAGCCUGCAGCGGAUGUUCACAACUGCGAGGUCGUCUGGGCAACCUGGAGAUCACCUACGUGCAGCGG
 AACUACGACCUGAGCUUCCUCAAGACCAUCCAGGAGGUGGCCGGCUACGUGCUGAUCGCCUGAACACCGUGGAG
 CGGAUCCCGCUGGAGAACCUGCAGAUCAUCCGGGGCAACAUGUACUACGAGAACAGCUACGCCUUGGCCGUCUC
 AGCAACUACGACGCCAACAGACGGGGCUGAAGGAGCUGCCGAUCGCGGAACCUGCAGGAGAUCUCCACGGCGCG
 GUGCGCUUCUCGAACAACCCGGCCUUGUGCAACGUGGAGAGCAUCCAGUGGGGGACAUCGUGAGCAGCGACUUC
 CUCAGCAACAUGAGCAUGGACUUCAGAACACCUGGGCUCGUGCCAGAAGUGCGACCCGAGCUGCCCCGAACGGC
 AGCUCUGGGGGCGCCGGCGAGGAGAACUGCCAGAAGCUGACCAAGAUAUCUGCGCCAGCAGUGCAGCGGGCGG
 UGCCGGGGCAAGAGCCCCAGCGACUGCUGCCACAACCAGUGCGCCGCGCGGCGUCACCGGCCCGGGGAGUCGGAC
 UGCCUGGUGUGCCGGAAGUUCGCGACGAGGCGACCUGCAAGGACACCUGCCCGCGCUGAUGCUGUACAACCCG
 ACCACGUACCAGAUGGACGUGAACCCGGAGGGCAAGUACAGCUUCGGCGCCACCUGCGUCAAGAAGUGCCCCGG
 AACUACGUGGUGACCGACCACGGGAGCUGCGUGCGGGCCUUCGGCGCCGACAGCUACGAGAUGGAGGAGGACGGC
 GUGCGGAAGUGCAAGAAGUGCGAGGGCCCGUGCCGGAAGGUGUGCAACGGCAUCGGCAUCGGGGAGUUCAGGAC
 AGCCUCAGCAUCAACGCCACCAACAUCAAGCACUUCAGAACUGCACCUCGAUCAGCGGCGACCUGCACAUCUG
 CCGGUCGCCUUCGGGGCGACAGCUUACCCACACGCCCGCCGUGGACCCGACAGGAGCUGGACAUCUGAAGACC
 GUGAAGGAGAUCACCGGCUUCCUCCUGAUCAGGCGUGGCCCGAGAACCGCACCGACCUGCACGCCUUCGAGAAC
 CUGGAGAUAUCCGGGGCCGGACCAAGCAGCACGGCCAGUUCAGCCUGGCCGUGGUGAGCCUGAACAUACCAGC
 CUCGGGUCUGCGGUCGUGAAGGAGAUACGCGACGGCGACGUGAUAUCAGCGGCAACAAGAACCUGUGCUACGCC
 AACACGAUAACUGGAAGAAGCUGUUCGGCACCAGCGGCCAGAAGACCAAGAUAUCAGCAACCGGGGCGAGAAC
 AGCUGCAAGGCCACCGGGCAGGUGUGCCACGCCUUGUCUCGCCGAGGGCUGCUGGGGCCCGGAGCCGCGGGAC
 UGCGUCAGCUGCCGAACGUGAGCCGGGGCCGGGAGUGCGUGGACAAGUGCAACCUCUGGAGGGCGAGCCGCGG
 GAGUUCGUGGAGAACAGCGAGUGCAUCCAGUGCCACCCGGAGUGCCUGCCCCAGGCGAUGAACAUACCUGCACC
 GCGCGGGGGCCGGACAACUGCAUCCAGUGCGCCACUACAUCGACGGCCCCGACUGCGUGAAGACGUGCCCGGCC
 GGCGUGAUGGGCGAGAACAACACCUGGUCUGGAAGUACGCCGACGCCCGCCACGUGUGCCACCUGUGCCACCCG
 AACUGCACCUACGGCUGCACCGGGCCGGGCCUGGAGGGCUGCCCCACCAACGGCCCCGAAGAUCCGAGCAUCGCC
 ACCGGCAUGGUGGGCGCGUCCUGCUCUGCUGGUGGUGGCCUUGGGGAUCGGCCUCUUAUGCGGGCGCCGGCAC
 AUCGUGCGGAAGCGGACGCUGCGGGCGGUCUGCAGGAGCGGAGCUGGUCGAGCCGUGACCCGAGCGGGCAG
 GCCCGAACCAGGCCUCCUGCGGAUCCUGAAGGAGACCGAGUUCAGAAGAUAAGGUGCUGGGCUCGGGGCGCC
 UUCGGCACCGUGUACAAGGGGCGUGGAUCCCCGAGGGCGAGAAGGUGAAGAUCGGUGGCCAUCAAGGAGCUG
 CGGGAGGGCAGCCCGAAGGCCAACAGGAGAUCUCGACGAGGCCUACGUGAUGGCCAGCGUCGACAACCCG
 CACGUGUGCCGGCUGCUGGGCAUCUGCCUGACCAGCACGGUGCAGCUGAUAACCCAGCUGAUGCCGUUCGGCUGC
 CUCCUGGACUACGUGCGGGAGCAAGGACAACAUCGGCAGCCAGUACCUGCUGAACUGGUGCGUGCAGAUCCG

Fig. 3

AAGGGCAUGAACUACCUGGAGGACCGGGCGCCUGGUGCACCGGGACCUCGCCGCGGGAACGUCCUGGUGAAGACC
 CCGCAGCACGUGAAGAUCACCGACUUCGGGCUGGCCAAGCUGCUGGGCGCCGAGGAGAAGGAGUACCACGCCGAG
 GGCGGCAAGGUGCCCAUCAAGUGGAUGGCCUUGGAGAGCAUCCUCCACCGGAUCUACACCCACCAGUCGGACGGUG
 UGGAGCUACGGCGUGACCGUCUGGGAGCUGAUGACGUUCGGCAGCAAGCCGUACGACGGGAUCCCGGCCAGCGAG
 AUCAGCAGCAUCCUGGAGAAGGGCGAGCGGCUGCCGACGCCCGCAUCUGCACCACUAGCAGUGUACAUGAUGAUG
 GUGAAGUGCUGGAUGAUCGACGCGGACUCGCGGCCAAGUUCGCGAGCUGAUCUAGAGUUCAGCAAGAUGGCC
 CGGGACCCGACGCGGUACCUGGUGAUCAGGGCGACGAGCGGAUGCACCUCCCGAGCCCGACCGACAGCAACUUC
 UACCGGGCCUGAUGGACGAGGAGACAUGGACGACGUGGUGGACGCCGACGAGUACCUGAUCGCCGACGAGGGC
 UUCUUCAGCAGCCCGUCGACCAGCCGGACCCCGCUGCUGAGCAGCCUGAGCGCCACCAGCAACAACUCGACGGUC
 GCCUGCAUCGACCGCAACGGCCUCCAGAGCUGCCCCAUCAAGGAGGACAGCUUCCUGCAGCGGUACAGCAGCGAC
 CCGACCGGCGCGCUGACCGAGGACAGCAUCGACGACACCUUCCUGCCGGUGCCGGAGUACAUAACCAGUCGGUG
 CCGAAGCGGCCCGCCGGGAGCGUGCAGAAACCGGUGUACCACAACCAGCCGCUGAACC CGGCCCGAGCCGGGAC
 CCGCACUACCAGGACCCCCACAGCACCGCCGUGGGCAACCCGGAGUACCUGAACACCGUCCAGCCGACGUGCGUG
 AACAGCACCUCGACAGCCCGGCCACUGGGCCAGAAAGGCUUCGACCCAGAUACGCCUCGACAACCCGGACUAC
 CAGCAGGACUUCUCCGAAGGAGGCGAAGCCCAACGGCAUCUUAAGGGCAGCACCGCCGAGAACGCCGAGUAC
 CUGCGGGUGGCCCGCAGAGCAGCGAGUUAUCGGCGCCUCCGGCCACGCCAGCUCCACCCCGGGGGCGAGAAG
 GAGACGAGCGCCACCCAGCGGUCCAGCGUCCUCCAGCACCGAGAAGAACCGGGUCCUCCAUAGACCAGUCGGUG
 CUGAGCUCCACAGCCCGGGUCCGGCAGCUCCACGACCCAGGGCCAGGACGUGACCCUCGCCCGGCCACCGAG
 CCGCCAGCGGGUCCGCCGCGACGUGGGGCCAGGACGUCACCAGCGUGCCCGUGACCCCGCCCGCCUUGGGGAGC
 ACCACGCCGCCCGCCACGACGUCACCUCGCCCCCGACAACAAGCCCGCGCCGGGCAGCACCGCCCCCCCCGCC
 CACGGGGUGACCUCGCCCGCCGACAGCGGGCCGGCCCCCGGCAGCACCGCGCCCCCGCCACGGCGUGACCUC
 GCCCGGACACCGCCCGGCCCGGCAGCACCGCCCCCGCCACGGGGUGACCUCGCCCGGCACAGCGG
 CCGCCCCCGGCAGCACCGCCCCCGCCCGCCACGGCGUACAGUCCGCGCCCGACAACCGCCCCGCCUUGGGGAGC
 ACCGCCCGCCCGUGCACAACGUGACCUCGCCAGCGGUCCGCGAGCGGGUCCGCCAGCACCCUCGUCCACAAC
 GGCAGUCCGCCCGGGCCACCACCAACCCCGCCAGCAAGUCCACGCCUUCAGCAUCCCGUCCACCACAGCGAC
 ACCCCACCAACCCUGGCGUCCACAGCACGAAGACCGACGCCUCCAGCACCCACCACUCCAGCGUGCCCCCGCUG
 ACCAGCUCCAACCACAGCACGUCCCCGAGCUCAGCACCGGGGUGUCCUUCUUCUCCUGAGCUUCCACAUCUCC
 AACCGCAGUUAACAGCUCCUCGAGGACCCAGCACCGACUACUACCAGGAGCUGCAGCGGGACAUUCGCGAG
 AUGUCCUGCAGAUUAACAAGCAGGGCGGCUUCCUCGGGCUGAGCAACAUAAGUUCGCCCGGCUCGGUGCGUG
 GUGCAGCUGACCCUCGCCUUCGGGAGGGGACGAUCAACGUCCACGACGUGGAGACCCAGUUAACCAGUACAAG
 ACCGAGGCCGCCAGCCGCUACAACCGUACCAUCUCCGACGUGAGCGUCUCCGACGUGCCUUCGGUUCAGCGCG
 CAGUCCGGCGCCGGCGUGCCCGGGCCGUGUGCCAGUGCCGGCGCAAGAUAACGGGCAGCUCGACAUCUCCCC
 GCCCGGACACGUACCACCGAUGAGCGAGUACCCGACCUACCACACCCACGGCCGCUACGUCCCCCCAGCUCC
 ACCGACCGGAGCCCUACGAGAAGGUGUCCGCCGGGAACGGCGGCAGCUCCUGAGCUACACCAACCCGGCGGUG
 GCCGCCCCUCCGCCAACCGGAGGACAGGUGGACCCCGGCUGAUCGACGGCAAGUGAGGACUAGUUAUAAGA
 CUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCGAGAUAAUAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAUAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCUAG

Fig. 3 continuación

SEQ ID NO. 4: R2025

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUUGUACAACGUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
UUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUAAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUA
CGGUUAAUCUCCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCCA
GAUCUUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCGCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGCCAGUU
CUGAGACUUCGCUAGAGACUACAGUUACAGCUGCAGUAGUAACCACUGCGGCUAUUGCAGGAAAUCCCGUUCAGG
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGCUCACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGUCACUGCUCUCGAGGUCUCACG
AGAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCACAGAGAACUUC
UAUUCAUGCAGGUCUGCUCUAG

Fig. 4

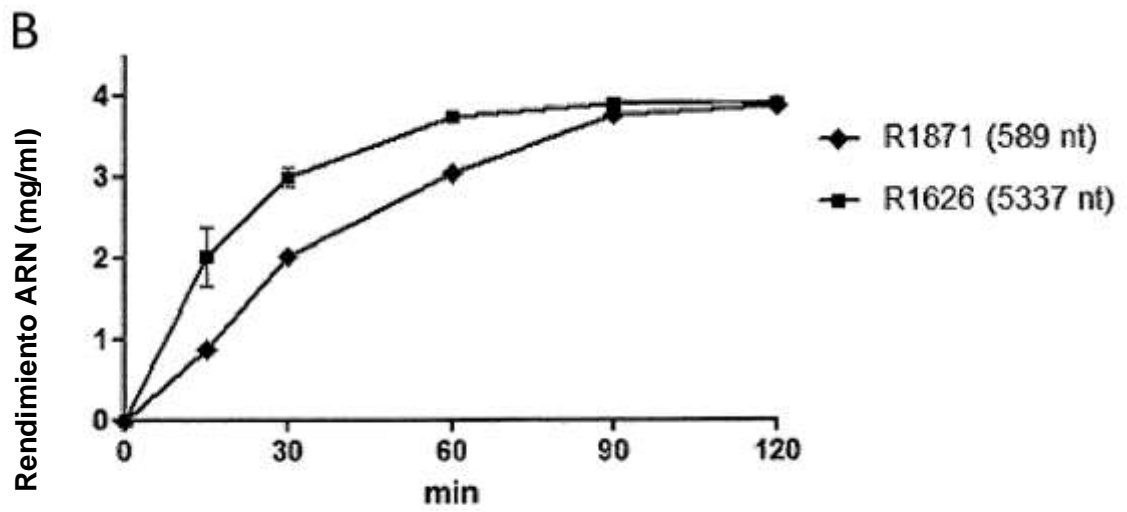
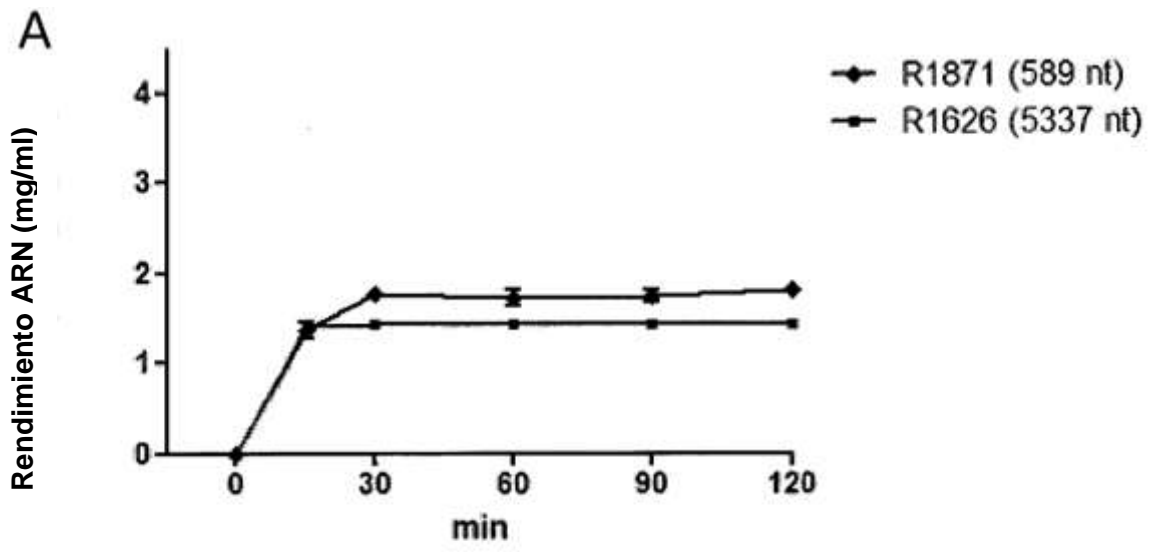


Fig. 5

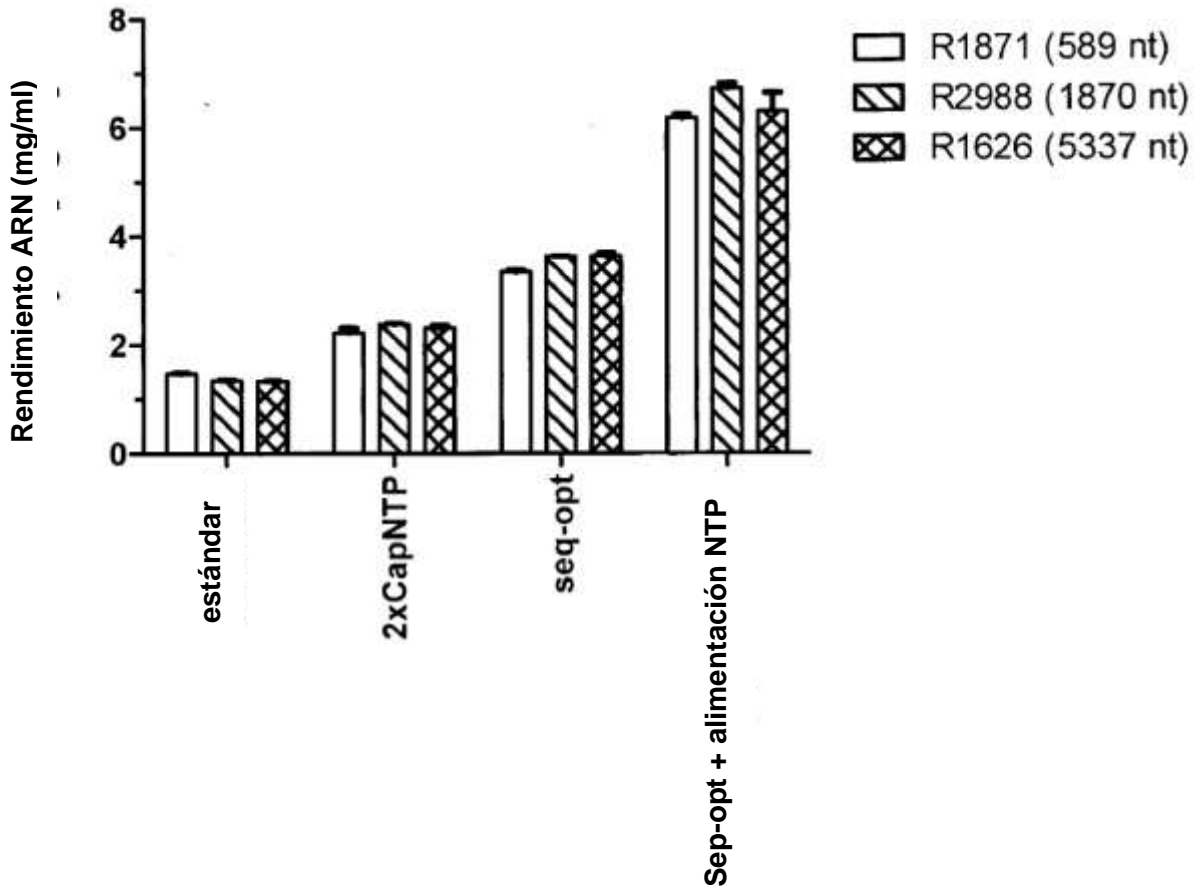


Fig. 6

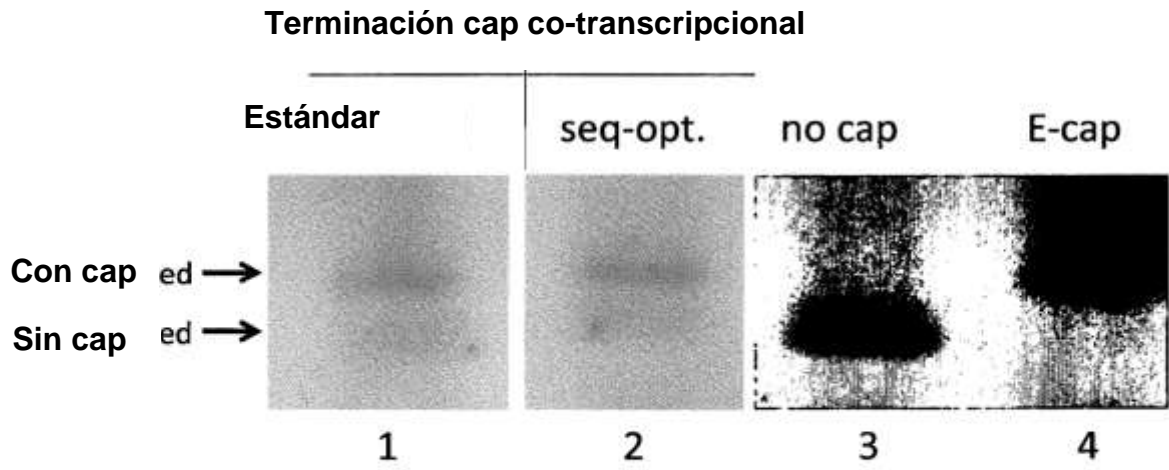


Fig. 7

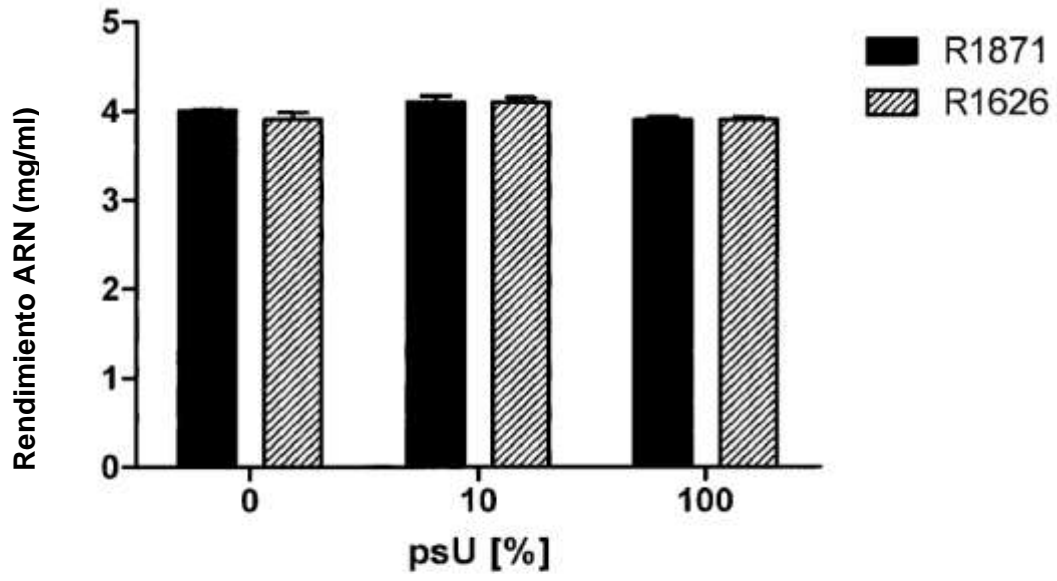
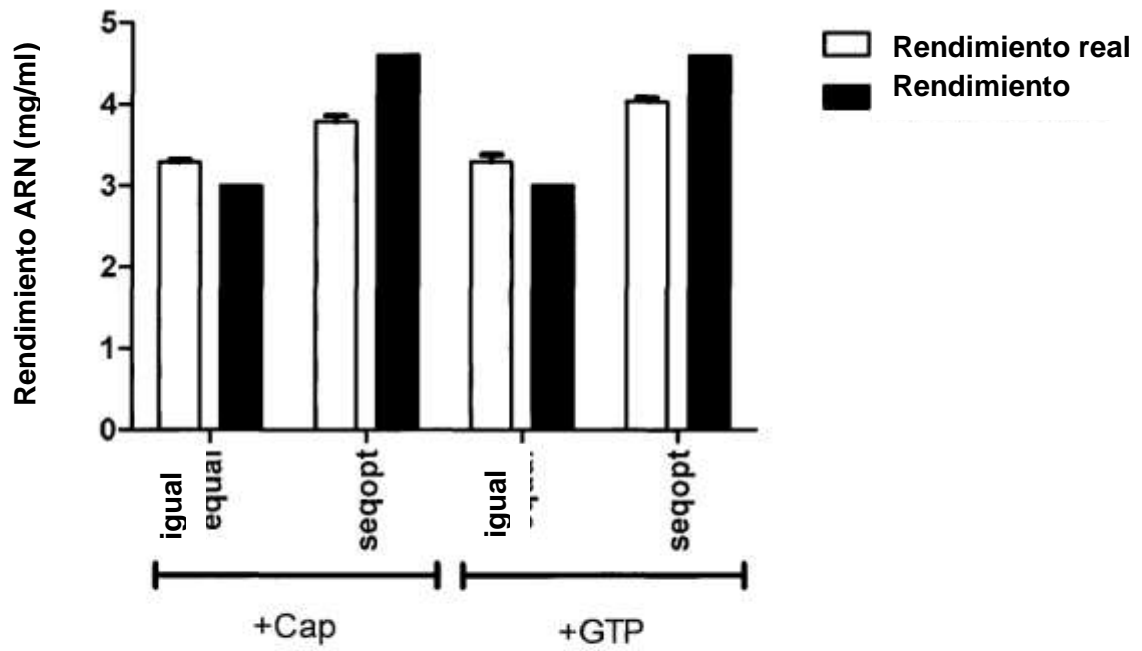
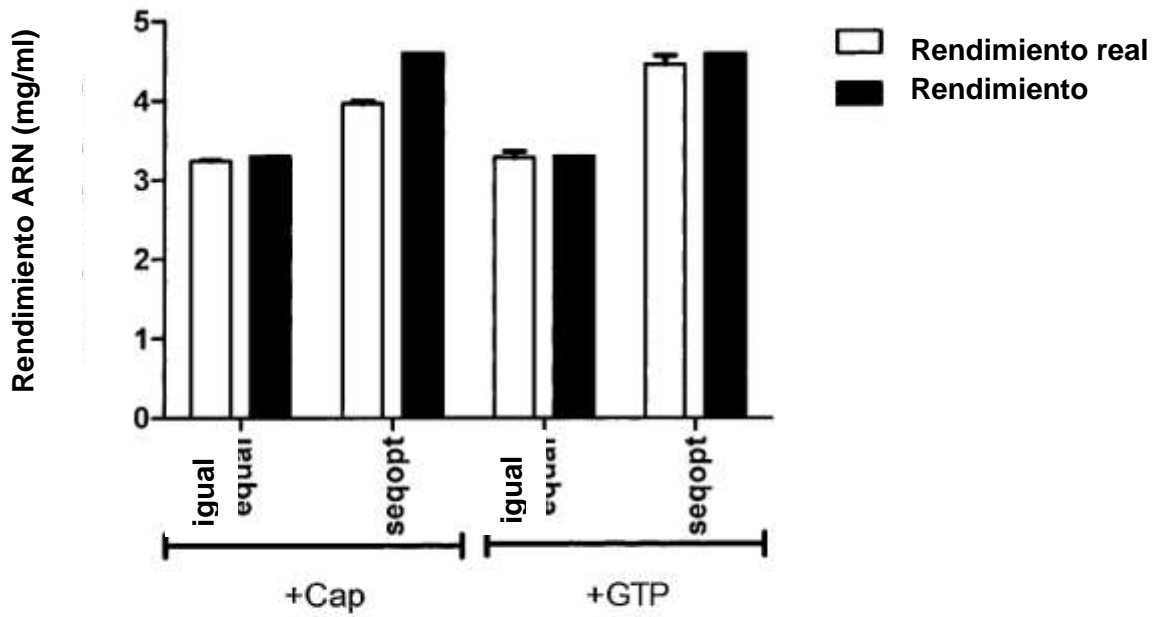


Fig. 8



concentración de aditivo (=4xGTP)
 11,2 mM para mezclas NTP seqopt
 13,45 mM para mezclas NTP igual

Fig. 9



concentración de aditivo (=4xGTP)
 13,7 mM para mezclas NTP seqopt
 13,45 mM para mezclas NTP igual

Fig. 10

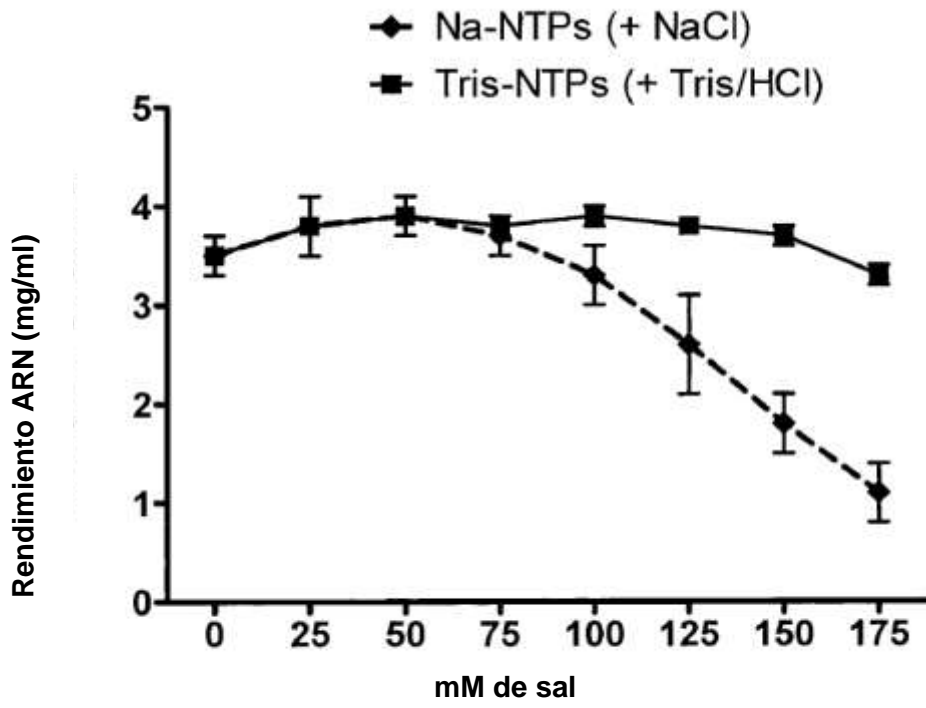


Fig. 11

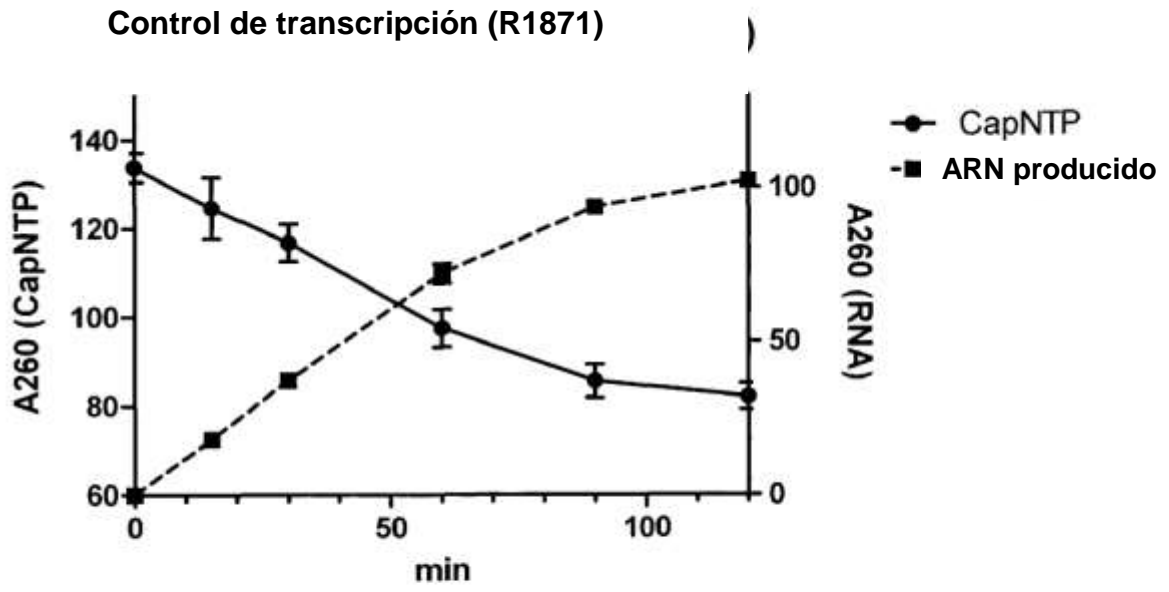


Fig. 12

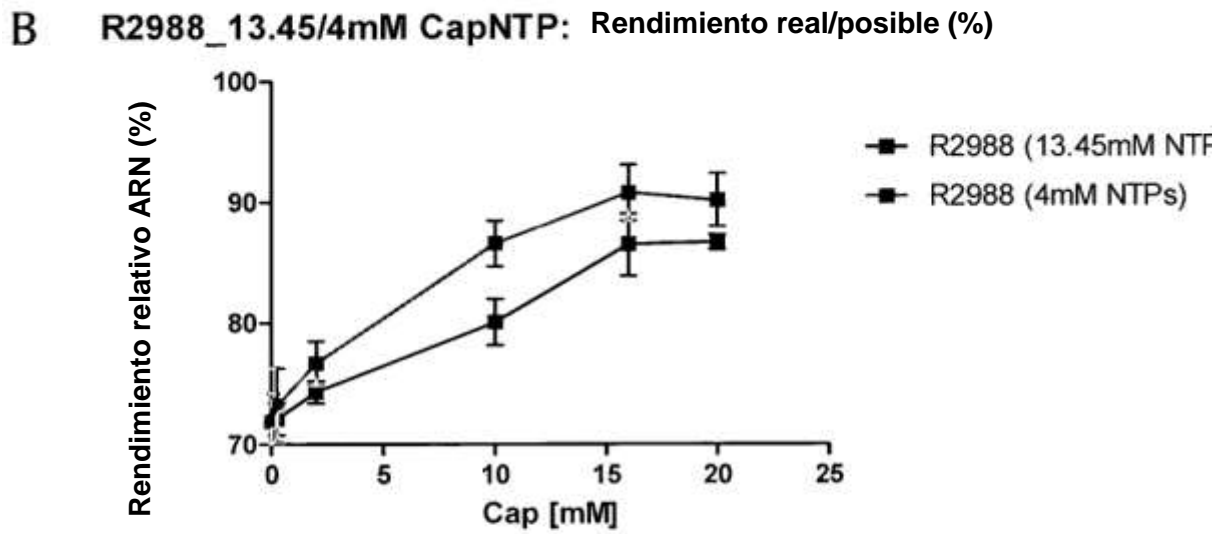
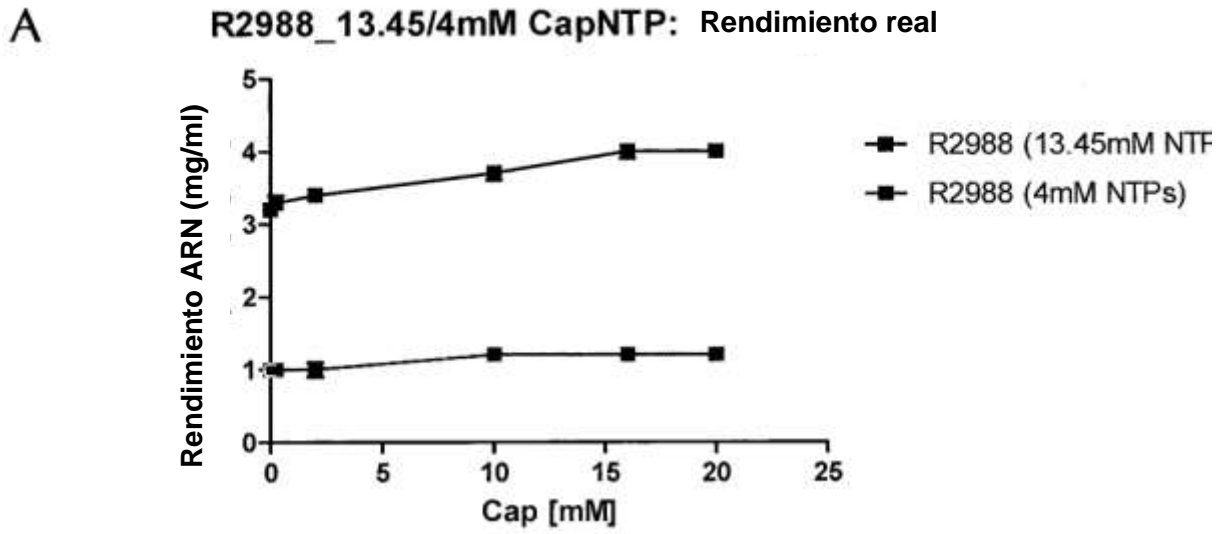


Fig. 13

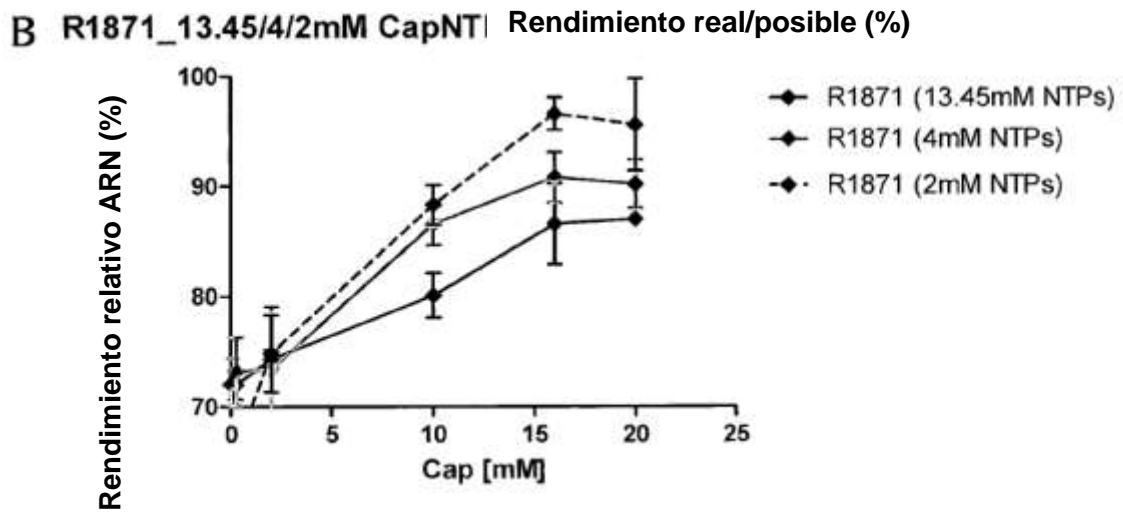
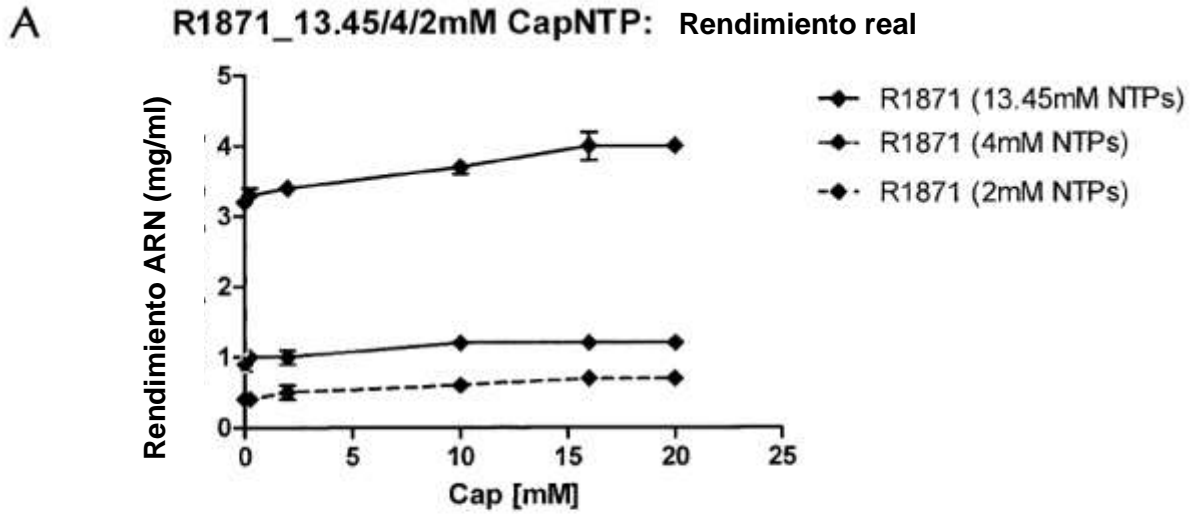


Fig. 14

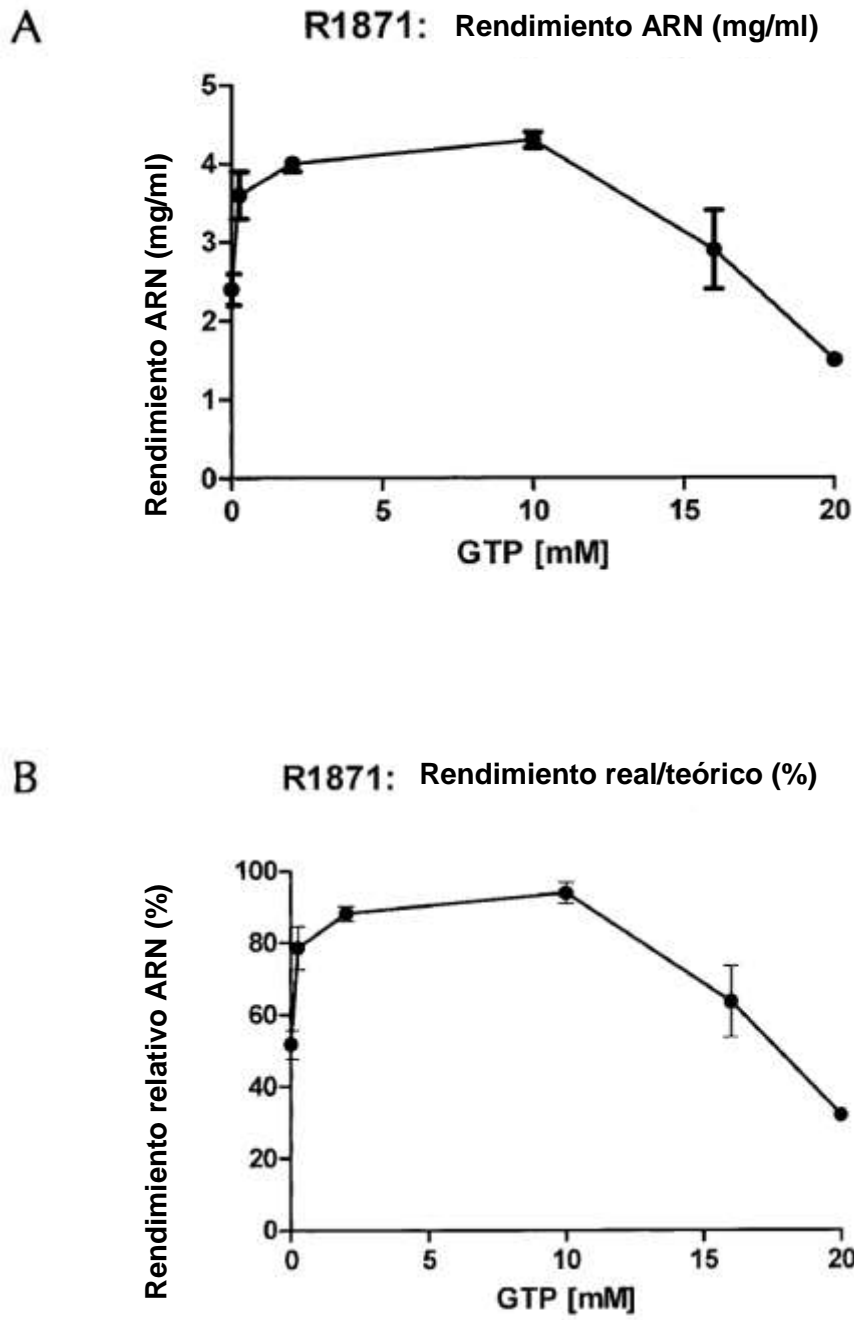
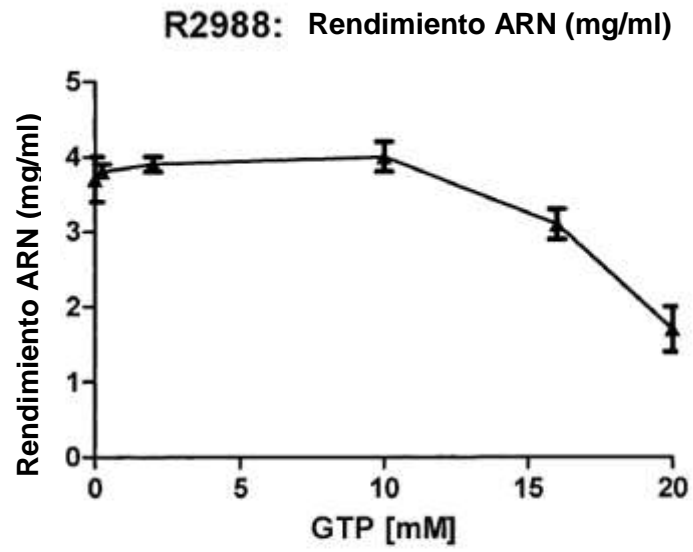


Fig. 15

A



B

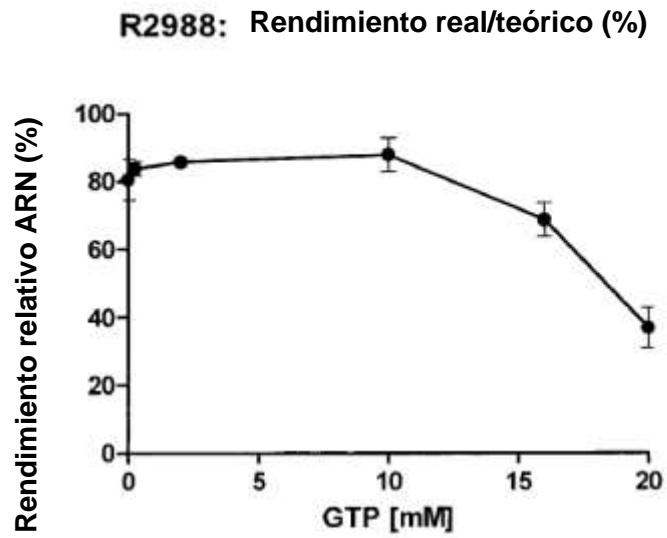


Fig. 16

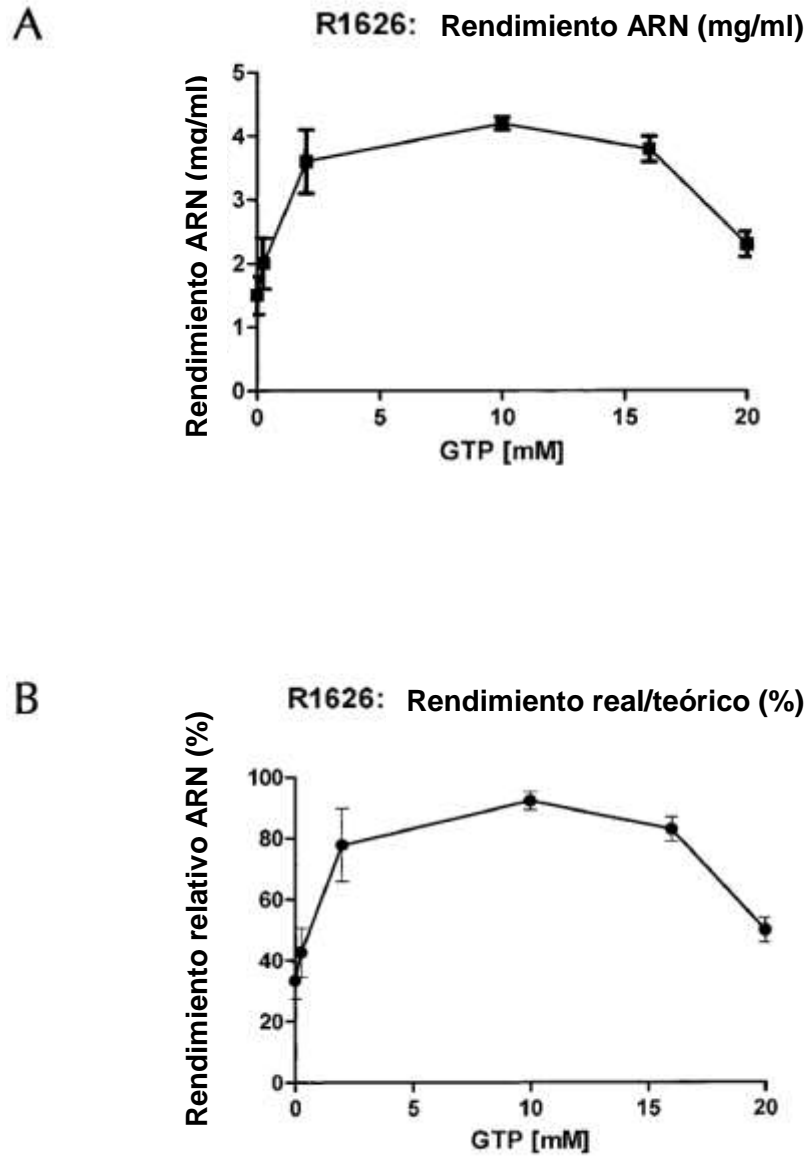


Fig. 17

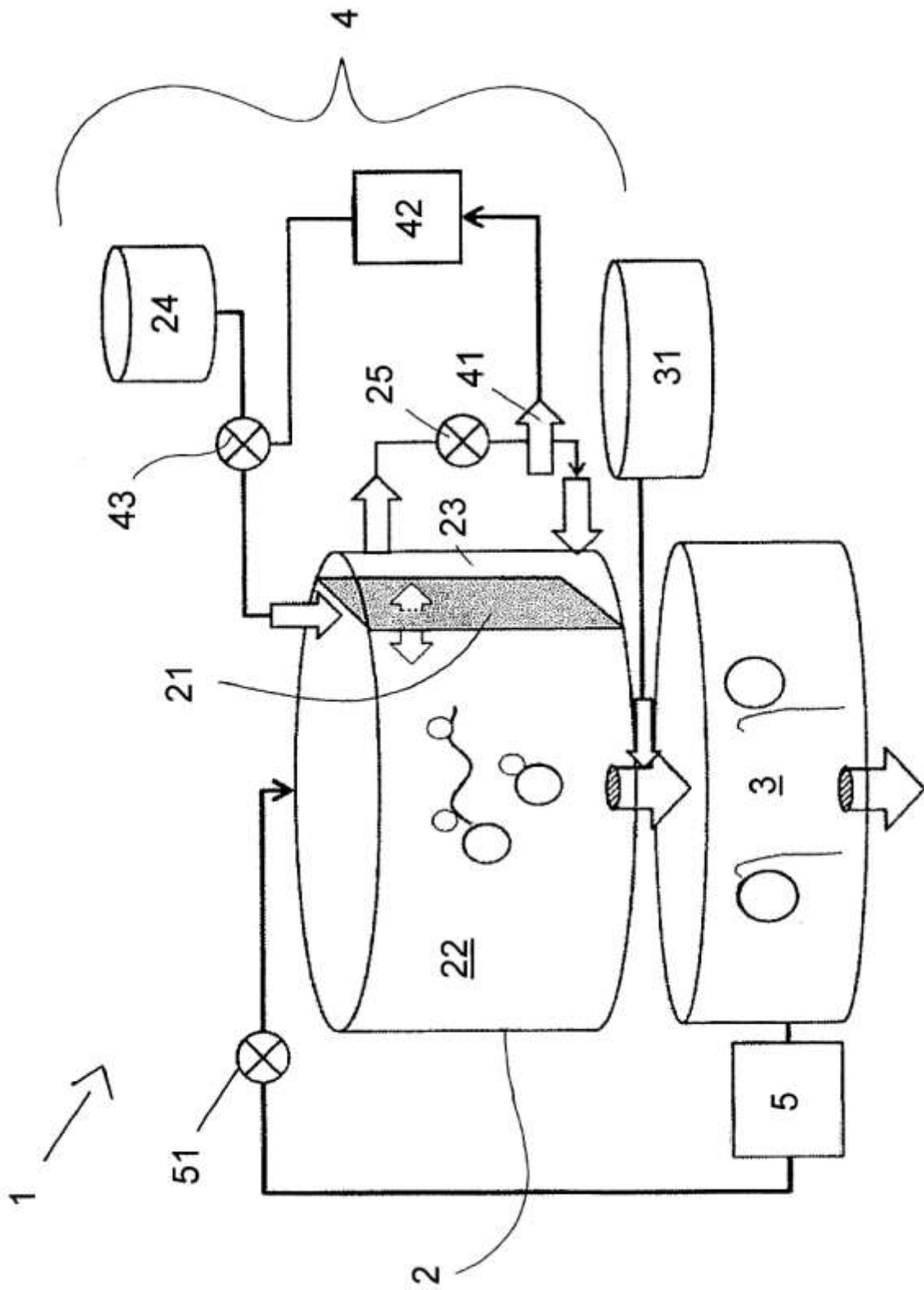


Fig. 18

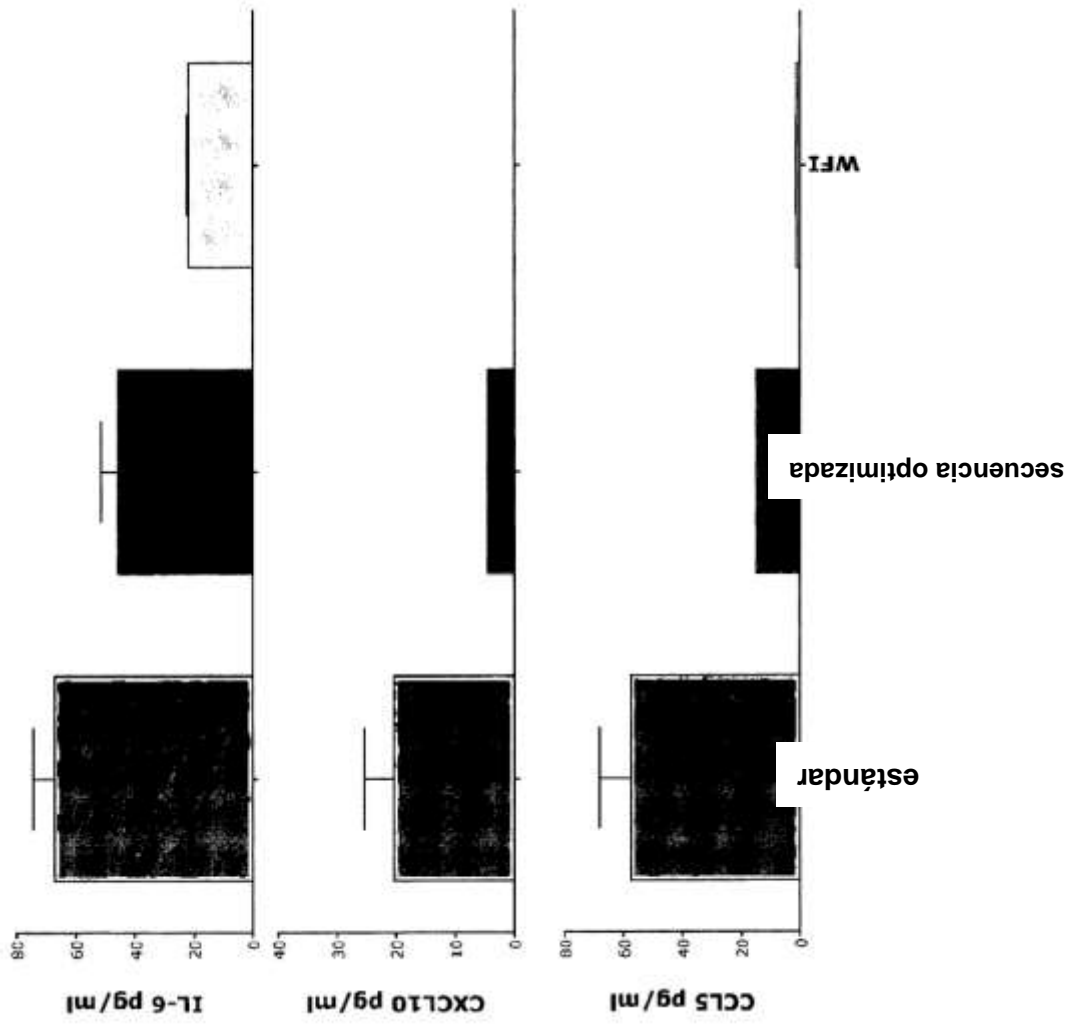


Fig. 19

SEQ ID NO. 6:

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGAAGG
 CCAUCCUGGUGGUCCUCCUGUACACCUUCGCCACCGCGAACGCCGACACGCUGUGCAUCG
 GCUACCACGCCAACACAGCACCAGCACCCGUGGACACCGUGCUCGAGAAGAACGCUCACGG
 UGACCCACUCCGUGAACCGUGCUGGAGGACAAGCACAAACGGGAAGCUCUGCAAGCUGCGGG
 GCGUCGCCCCGCGUCACCUCGGGAAGUGCAACAUCGCCGGCUGGAUCCUGGGGAACCCGG
 AGUGCGAGAGCCUGUCCACCGGAGCUCUCUGGAGCUACAUCGUGGAGACCUCCAGCUCGG
 ACAACGGCACGUGCUAACCCCGGCGACUUCAUCGACUACGAGGAGCUCGCCGAGCAGCUGA
 GCUCCGUGAGCUCUUCGAGCGGUUCGAGAUCUUCCECAAGACCAGCUCUCCUGGCCAACC
 ACGACAGCAACAAGGGGGUCACCGCCGCCUGCCCGCACGCCGGCGGAAGUCCUUCUACA
 AGAACCUGAUCUGGCUCUGAAGAAGGGGAACAGCUACCCCAAGCUGUCCAAGAGCUACA
 UCAACGACAAGGGCAAGGAGGUGCUGGUCCUCUGGGGAUCCACCACCCAGCACCUCGG
 CCGACCAGCAGAGCCUGUACCAGAACGCCGACGCCUACGUGUUCGUGGGCUCAGCCGCU
 ACUCCAAGAAGUUCAGCCCGAGAUCGCCAUCGCGCCGAAGGUCCGCGACCAGGAGGGCC
 GGAUGAACUACUACUGGACGCUGGUGGAGCCCGGGGACAAGAUACCUUCGAGGGCACC
 GCAACCUCGUGGUCCCCCGCUACGCCUUCGCCAUGGAGCGGAACGCCGGGAGCGGCAUCA
 UCAUUCGCCACACCCCGUGCACGACUGCAACACGACCUGCCAGACCCCGAAGGGCGCCA
 UCAACACCAGCCUGCCUUCAGAAUAUCACCCCAUCACGAUCGGGAAGUGCCCAAGU
 ACGUGAAGUCCACCAAGCUCGCCUUCGCGACCCGGCCUGCGGAACGUCCCGAGCAUCCAGU
 CCCGCGGGCUGUUCGGCGCCAUCGCCGGGUUCAUCGAGGGCGGCUGGACCGGGAUGGUGG
 ACGGCUGGUACGGGUACCACCACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGGUACGCCGCCGACCUCA
 AGUCCACGCAGAACCGGAUCGACGAGAUCACCAACAAGGUGAACAGCGUCAUCGAGAAGA
 UGAACACCCAGUUCACCGCCUGGGCAAGGAGUUAACCACCUGGAGAAGCGGAUCGAGA
 ACCUGAACAAAGAGGUCGACGACGGCUUCCUCGACAUCUGGACGUACAACGCCGAGCUGC
 UGGUGCUCUGGAGAACGAGCGCACCCUGGACUACCACGACUCCAACGUGAAGAACCUCU
 ACGAGAAGGUCCGGAGCCAGCUGAAGAACAACGCCAAGGAGAUCCGGAAACGGCUGCUUCG
 AGUUCUACCACAAGUGCGACAACACCCUGCAUGGAGUCCGUGAAGAACGGGACCUACGACU
 ACCCAAGUACAGCGAGGAGGCCAAGCUGAACC GCGAGGAGAUCCGACGGCGUGAAGCUCG
 AGUCCACGCGGAUCUACCAGAUCUCCUGGCGAUCUACAGCACCGUCGCCAGCUCUCCUGGUGC
 UCGUGUCAGCCUGGGGGCCAUCUCCUUCUGGAUGUGCAGCAACGGCUCUCCUGCAGUGCC
 GCAUCUGCAUCUGACCACUAGUGCAUCAUUAUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAU
 AAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAA
 AGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUUAUUAUUUUUUGCCUCUUUUUCUGUG
 CUUCAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAUU

Fig. 20

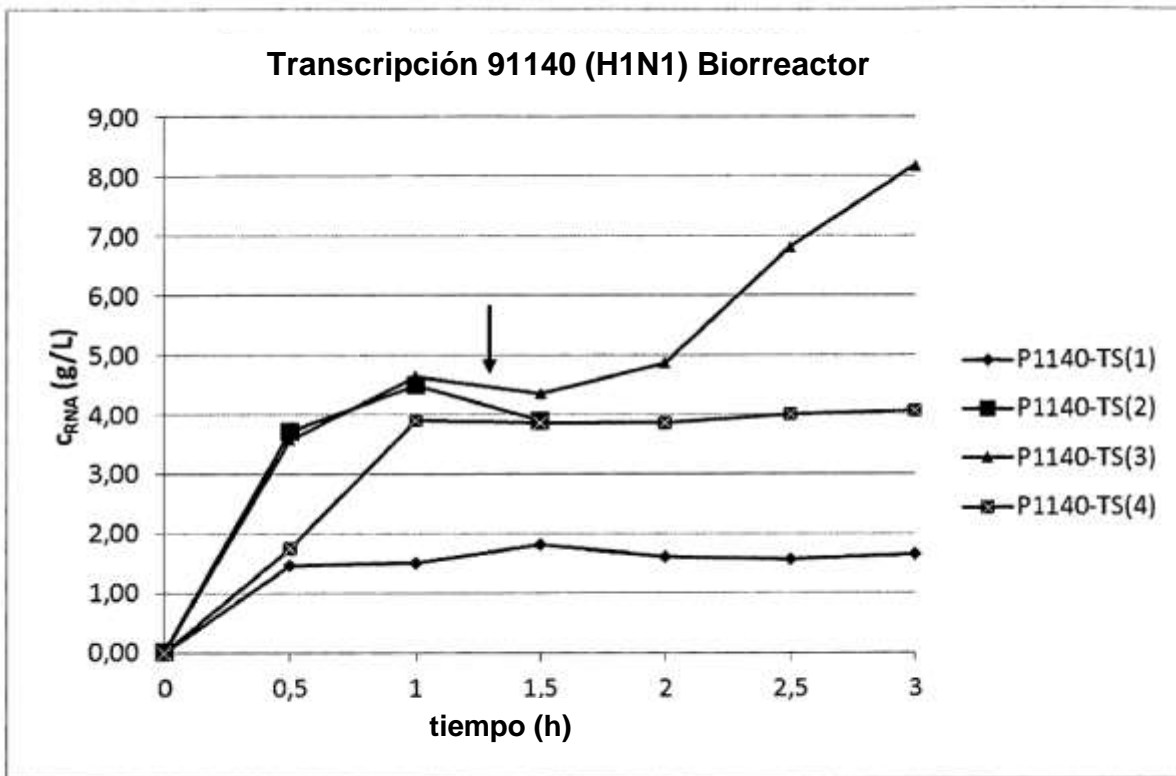


Fig. 21

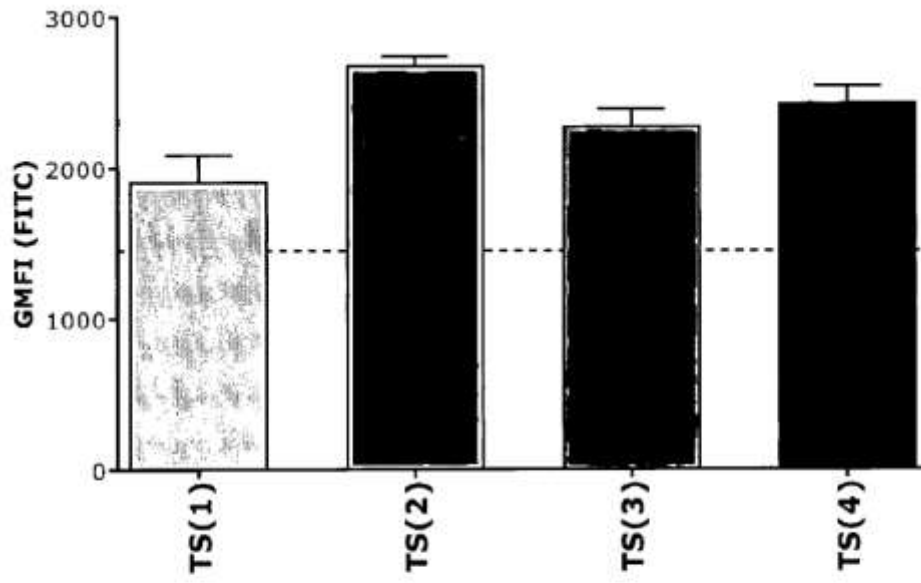


Fig. 22

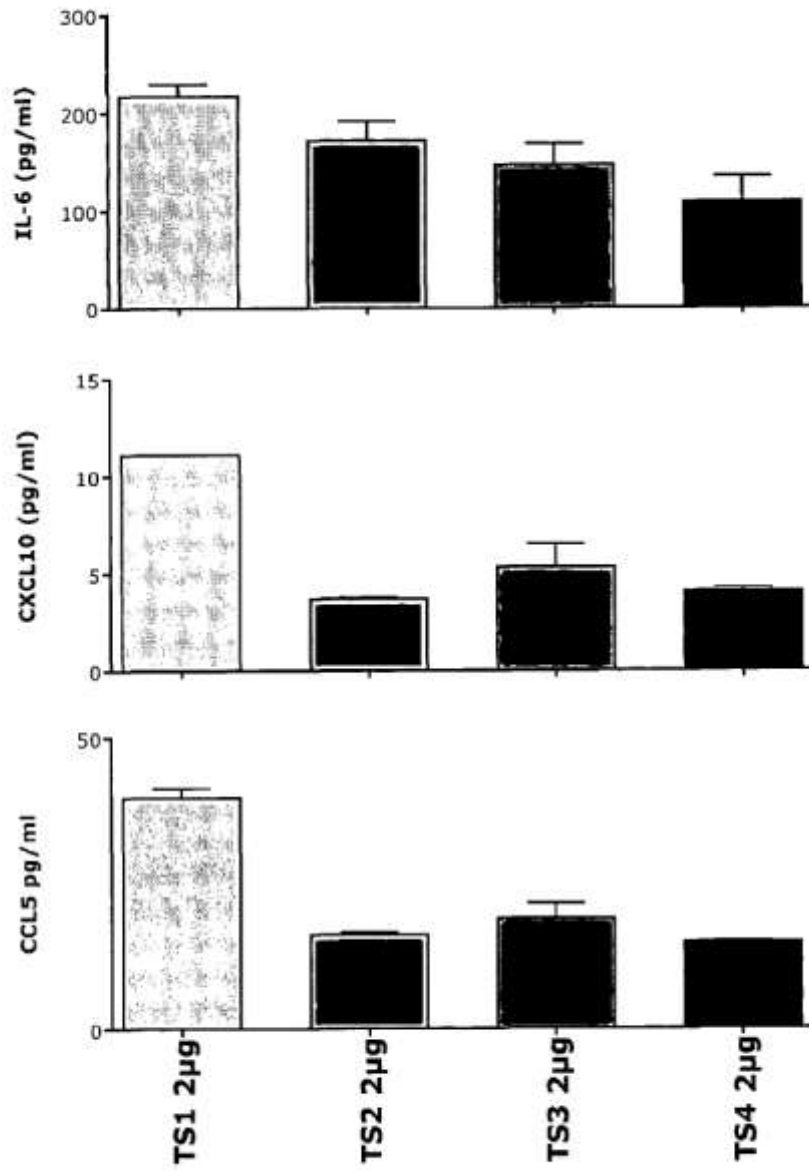


Fig. 23