

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 271**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2016 PCT/EP2016/062152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193206**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2016 E 16729807 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3303583**

54 Título: **Método para producir y purificar ARN, que comprende al menos una etapa de filtración de flujo tangencial**

30 Prioridad:

29.05.2015 WO PCT/EP2015/062002

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

10.12.2020

73 Titular/es:

**CUREVAC REAL ESTATE GMBH (100.0%)
Friedrich-Miescher-Straße 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**FUNKNER, ANDREAS;
DORNER, STEFANIE;
SEWING, STEFANIE;
KAMM, JOHANNES;
BROGHAMMER, NORBERT;
KETTERER, THOMAS y
MUTZKE, THORSTEN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 798 271 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 producir y purificar ARN, que comprende al menos una etapa de filtración de flujo tangencial

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos de filtración de flujo tangencial (TFF) para producir y purificar ARN.

10 **Antecedentes de la invención**

10 El ARN está emergiendo como un candidato innovador para una variedad de aplicaciones farmacéuticas, pero la purificación eficiente sigue siendo un desafío. Esto es parcialmente debido a los diferentes tipos y combinaciones de contaminantes no deseados en una muestra que han de separarse de una especie de ARN deseada para obtener una muestra pura de ARN. Tales contaminantes son normalmente componentes y subproductos de cualquier procedimiento anterior, por ejemplo fabricación de ARN. Cuando se usa transcripción *in vitro* para fabricar ARN grande, tras la transcripción exitosa la muestra contiene normalmente la especie de ARN deseada junto con diversos contaminantes tales como especies de ARN no deseadas, proteínas, espermidina, ADN o fragmentos del mismo, pirofosfatos, nucleótidos libres, endotoxinas, detergentes y disolventes orgánicos.

20 Las aplicaciones comerciales posteriores (por ejemplo, formulación y uso como una composición farmacéutica y/o vacuna) plantean limitaciones adicionales en cualquier método de purificación de ARN que requiere (i) un alto grado de pureza a la vez que se mantiene la estabilidad y funcionalidad del ARN; (ii) compatibilidad con cualquier requisito de formulación del ARN para la administración *in vivo*; y (iii) cumplimiento de buenas prácticas de fabricación. Además, con el fin de facilitar las aplicaciones industriales, cualquier método de purificación de ARN debe permitir una operación uniforme, rentable y eficiente en tiempo (por ejemplo, purificación rápida, fácil, reproducible, de alto rendimiento a gran escala).

30 La precipitación de ARN permite la concentración de la muestra así como el agotamiento de contaminantes de alto peso molecular y contaminantes de bajo peso molecular que contaminan (por ejemplo, proteínas y espermidina, respectivamente). Sin embargo, la precipitación no es el método de elección en procedimientos de producción a gran escala dado que la precipitación y resolubilización de ácidos nucleicos requiere mucho tiempo. Además, debe evitarse el uso de alcoholes y otros disolventes orgánicos en procedimientos de (buena) fabricación a gran escala.

35 Los métodos para la purificación de ARN se conocen en la técnica. Pascolo *et al.* (Methods Mol Med 2006; 127:23-40) describe un método para la purificación de ARNm a partir de una muestra de reacción de transcripción *in vitro* a escala analítica (purificación de 25 µg de ARN en 20 µl de volumen de muestra). El método implica tratamiento con DNasa seguido de precipitación del ARNm más largo con cloruro de litio. Sin embargo, los autores notifican que este método no proporciona ARN de alta pureza, ya que no retira por completo contaminantes tales como ADN y proteína. Además, el método implica el uso de disolventes orgánicos y es laborioso y requiere mucho tiempo, ya que implica hasta 36 etapas que requieren una extensiva manipulación manual de la muestra en diferentes condiciones, incluyendo al menos una etapa de incubación durante la noche. Por tanto, si bien este procedimiento puede satisfacer los requisitos para la investigación y purificación de ARN a escala de laboratorio, se ve afectado por un bajo grado de pureza de ARN, de reproducibilidad y no es adecuado para la purificación de ARN de calidad farmacéutica a escala comercial para la implementación en un procedimiento industrial.

45 El documento WO 2008/077592 A1 da a conocer un método para purificar ARN a escala preparativa con HPLC de fase inversa de par iónico usando una fase estacionaria inversa porosa. Se notifica que una ventaja particular de usar la fase estacionaria porosa especificada es que pueden evitarse presiones excesivamente altas, facilitando una purificación preparativa de ARN.

50 El documento WO 2014/140211 A1 da a conocer un método para purificar ARN grande a partir de una muestra, que comprende etapas de filtración de flujo tangencial, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de flujo continuo de perlas de núcleo o cualquier combinación de los mismos. También se da a conocer que se prefiere que no se añadan sales, distintas de las sales de tamponamiento, al tampón para la filtración de flujo tangencial. La filtración de flujo tangencial se realiza usando una membrana de fibras huecas. Sin embargo, las cantidades de carga de ácido nucleico descritas de la membrana son muy bajas y, por tanto, requerirán grandes áreas de membrana para la producción a gran escala (de g a kg) de ARNm.

60 El documento WO 2014/152966 A1 da a conocer un método para purificar ARN transcrito *in vitro*, en el que después de la transcripción *in vitro* de ARN, la mezcla de reacción se trata con un agente de desnaturalización de proteínas tal como urea y luego se somete a filtración de flujo tangencial usando una membrana de fibras huecas.

El documento CA 2 277 165 A1 describe un método para purificar o concentrar ADN plasmídico.

65 Nestola *et al.* (PLoS One 2014; 9:e115802) describe un método para la concentración/diafiltración de virus.

Karikó *et al.* (Nucleic Acids Res. 2011; 39:e142) describe un método para purificar ARN transcrito *in vitro* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

5 Sigue existiendo la necesidad de métodos de purificación de ARN adicionales, y en particular de aquellos que permiten una purificación rentable y eficiente en tiempo de ARN a escala industrial con alto rendimiento y pureza, estabilidad y/o vida útil de almacenamiento de calidad farmacéutica.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar métodos de producción y de purificación de ARN adicionales adecuados para la preparación de ARN a gran escala.

10 Sumario

La presente invención se refiere a métodos de producción y purificación de ARN tal como se define en las reivindicaciones.

15 Definiciones:

Por motivos de claridad y legibilidad, se proporcionan las siguientes definiciones. Cualquier característica técnica mencionada para estas definiciones debe leerse en todas y cada una de las realizaciones de la invención. Pueden proporcionarse específicamente definiciones y explicaciones adicionales en el contexto de estas realizaciones.

20 Enzima: las enzimas son biomoléculas catalíticamente activas que realizan reacciones bioquímicas tales como transcripción de ARN dependiente de ADN (por ejemplo, ARN polimerasas), o digestión de ADN bicatenario (por ejemplo, endonucleasas de restricción). Las enzimas se componen normalmente de aminoácidos y/o ARN (ribozimas, ARNnp).

30 Endonucleasas de restricción: las endonucleasas de restricción o enzimas de restricción son una clase de enzimas que se producen de manera natural en bacterias y en algunos virus. Las endonucleasas de restricción pueden usarse en el laboratorio para escindir moléculas de ADN en fragmentos más pequeños para la clonación molecular y la caracterización génica. Las enzimas de restricción se unen específicamente a y escinden ADN bicatenario en sitios específicos dentro de o adyacentes a una secuencia particular conocida como sitio de reconocimiento. La mayoría de las enzimas de restricción reconocen una secuencia de nucleótidos específica que tienen cuatro, cinco o seis nucleótidos de longitud y presentan una simetría doble. Algunas escinden ambas cadenas exactamente en el eje de simetría, generando fragmentos de ADN que portan extremos romos; otras escinden cada cadena en ubicaciones similares en lados opuestos del eje de simetría, creando fragmentos de ADN que portan extremos terminales monocatenarios (extremos cohesivos). Las endonucleasas de restricción se clasifican en cuatro grupos (tipos I, II, III y IV) basándose en su composición y los requisitos del cofactor enzimático, la naturaleza de su secuencia diana y la posición de su sitio de escisión de ADN con respecto a la secuencia diana. Todos los tipos de enzimas reconocen secuencias de ADN cortas específicas y llevan a cabo la escisión de ADN, produciendo fragmentos específicos con fosfatos en el extremo 5' terminal. Las endonucleasas de restricción reconocen y se unen a secuencias particulares de nucleótidos (el 'sitio de reconocimiento') en moléculas de ADN. Una vez unidas, escinden la molécula dentro (por ejemplo, BamHI), a un lado (por ejemplo, Sapl) o a ambos lados (por ejemplo, TspRI) de la secuencia de reconocimiento. Se prefiere particularmente el uso de las siguientes enzimas de restricción: BciVI (Bful), BcuI (SpeI), EcoRI, AatII, AgeI (BshTI), ApaI, BamHI, BglII, BlnI (Bpu1102I), BsrGI (Bsp1407), ClaI (Bsu15I), EcoRI, EcoRV (Eco32I), HindIII, KpnI, MluI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, NsiI, Mph1103I, PstI, PvuI, PvuII, SacI, Sall, Scal, SpeI, XbaI, XhoI, SacII (Cfr42I), XbaI. Las enzimas de restricción reconocen secuencias de ADN cortas y escinden ADN bicatenario en sitios específicos dentro de o adyacentes a estas secuencias. Se han descubierto aproximadamente 3.000 enzimas de restricción que reconocen alrededor de 230 secuencias de ADN diferentes. La mayoría se han encontrado en bacterias, pero también se han aislado a partir de virus, arqueas y eucariotas. Puede encontrarse una lista de enzimas de restricción conocidas en la base de datos Rebase: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>.

55 Sitio de restricción: un sitio de restricción, también denominado sitio de reconocimiento de enzima de restricción, es una secuencia de nucleótidos reconocida por una enzima de restricción. Un sitio de restricción es normalmente una secuencia de nucleótidos corta, preferiblemente palindrómica, por ejemplo una secuencia que comprende de 4 a 8 nucleótidos. Preferiblemente, un sitio de restricción se reconoce específicamente por una enzima de restricción. La enzima de restricción escinde normalmente una secuencia de nucleótidos que comprende un sitio de restricción en este sitio. En una secuencia de nucleótidos bicatenaria, tal como una secuencia de ADN bicatenario, la enzima de restricción corta normalmente ambas cadenas de la secuencia de nucleótidos. La mayoría de las endonucleasas de restricción reconocen sitios palindrómicos o parcialmente palindrómicos. Un palíndromo se define como la simetría de díada alrededor de un eje. Por ejemplo, la digestión de EcoRI produce extremos "cohesivos", mientras que la escisión de la enzima de restricción SmaI produce extremos "romos". Las secuencias de reconocimiento en ADN difieren para cada enzima de restricción, produciendo diferencias en la longitud, secuencia y orientación de la cadena (extremo 5' o extremo 3') de una "proyección" de extremo cohesivo de una enzima de restricción. Enzimas de restricción diferentes que reconocen la misma secuencia se conocen como neoesquizómeros. A menudo, estos escinden en diferentes ubicaciones de la secuencia. Enzimas diferentes que reconocen y escinden en la misma

ubicación se conocen como isoformas.

Proteína: una proteína comprende normalmente uno o más péptidos o polipéptidos. Una proteína se pliega normalmente en una forma tridimensional, que puede requerirse para que la proteína ejerza su función biológica. La secuencia de una proteína o un péptido se entiende normalmente como el orden, es decir la sucesión de sus aminoácidos.

Proteína recombinante: el término 'proteína recombinante' se refiere a proteínas que se han producido en un sistema heterólogo, es decir, en un organismo que no produce de manera natural una proteína de este tipo, o una variante de una proteína de este tipo. Alternativamente, el organismo puede producir de manera natural la proteína, pero en menores cantidades de modo que la expresión recombinante aumenta la cantidad de dicha proteína. Normalmente, los sistemas heterólogos usados en la técnica para producir proteínas recombinantes son bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) o determinadas líneas de cultivo celular de mamíferos.

ADN plasmídico (vectores): el término 'ADN plasmídico' o 'vector de ADN plasmídico' se refiere a una molécula de ácido nucleico circular, preferiblemente a una molécula de ácido nucleico artificial. Un ADN plasmídico en el contexto de la presente invención es adecuado para la incorporación o el hospedaje de una secuencia de ácido nucleico deseada, tal como una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un ARN y/o un marco de lectura abierto que codifica para al menos un péptido o polipéptido. Tales constructos/vectores de ADN plasmídico pueden ser vectores de almacenamiento, vectores de expresión, vectores de clonación, vectores de transferencia, etc. Un vector de almacenamiento es un vector que permite el almacenamiento conveniente de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, de una molécula de ARN. Por tanto, el ADN plasmídico puede comprender una secuencia que corresponde a (que codifica para), por ejemplo, una secuencia de ARN deseada o una parte de la misma, tal como una secuencia que corresponde al marco de lectura abierto y la UTR 5' y/o 3' de un ARNm. Puede usarse un vector de expresión para la producción de productos de expresión tales como ARN, por ejemplo ARNm en un procedimiento denominado transcripción *in vitro* de ARN. Por ejemplo, un vector de expresión puede comprender secuencias necesarias para la transcripción *in vitro* de ARN de un tramo de secuencia del vector, tal como una secuencia promotora, por ejemplo una secuencia promotora de ARN, preferiblemente las secuencias promotoras de ARN T3, T7 o SP6. Un vector de clonación es normalmente un vector que contiene un sitio de clonación, que puede usarse para incorporar secuencias de ácido nucleico (inserto) en el vector. Un vector de clonación puede ser, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector de bacteriófago. Un vector de transferencia puede ser un vector que es adecuado para la transferencia de moléculas de ácido nucleico en células u organismos, por ejemplo, vectores virales. Preferiblemente, un vector de ADN plasmídico en el sentido de la presente invención comprende un sitio de clonación múltiple, una secuencia promotora de ARN, opcionalmente un marcador de selección, tal como un factor de resistencia a los antibióticos, y una secuencia adecuada para la multiplicación del vector, tal como un origen de replicación. Particularmente, en el contexto de la presente invención se prefieren vectores de ADN plasmídico, o vectores de expresión, que comprenden promotores para ARN polimerasas dependientes de ADN tales como T3, T7 y Sp6. Como estructura principal del plásmido, se prefieren particularmente pUC19 y pBR322.

ADN molde: tal como se usa en el presente documento, el término 'ADN molde' (o 'molde de ADN') se refiere normalmente a una molécula de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de ARN que va a transcribirse *in vitro*. El ADN molde se usa como molde para la transcripción *in vitro* con el fin de producir el ARN codificado por el ADN molde. Por tanto, el ADN molde comprende todos los elementos necesarios para la transcripción *in vitro*, particularmente un elemento promotor para la unión de una ARN polimerasa dependiente de ADN, como por ejemplo las ARN polimerasas T3, T7 y SP6, en el extremo 5' de la secuencia de ADN que codifica para la secuencia de ARN diana. Además, el ADN molde puede comprender sitios de unión de cebador en 5' y/o 3' de la secuencia de ADN que codifica para la secuencia de ARN diana para determinar la identidad de la secuencia de ADN que codifica para la secuencia de ARN diana, por ejemplo mediante PCR o secuenciación de ADN. Tal como se usa en el presente documento, el término 'ADN molde' también puede referirse a un vector de ADN, tal como un ADN plasmídico, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de ARN. Además, el 'ADN molde' en el contexto de la presente invención puede ser una molécula de ADN lineal o circular.

Secuencia diana: una 'secuencia diana' tal como se usa en el presente documento se entiende normalmente como la secuencia del ARN que está codificada por la secuencia de ácido nucleico comprendida en el ADN molde. Por tanto, la secuencia diana es la secuencia que va a sintetizarse mediante transcripción *in vitro*, por ejemplo una secuencia que codifica para proteínas u otro ARN tal como se define en el presente documento como ARNs, ARN antisentido, etc.

Plásmido de ADN molde lineal: el plásmido de ADN molde lineal se obtiene poniendo en contacto el ADN plasmídico con una enzima de restricción en condiciones adecuadas de modo que la enzima de restricción corta el ADN plasmídico en su(s) sitio(s) de reconocimiento y altera la estructura del plásmido. Esta reacción se denomina reacción de linealización. Así, el ADN molde lineal comprende un extremo 5' libre y un extremo 3' libre, que no están ligados entre sí. Si el ADN plasmídico contiene sólo un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción, el ADN

molde lineal tiene el mismo número de nucleótidos que el ADN plasmídico. Si el ADN plasmídico contiene más de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción, el ADN molde lineal tiene un número de nucleótidos más pequeño que el ADN plasmídico. Entonces, el ADN molde lineal es el fragmento del ADN plasmídico que contiene los elementos necesarios para la transcripción *in vitro* de ARN, es decir un elemento promotor para la transcripción de ARN y el elemento de ADN molde. La secuencia de ADN que codifica para la secuencia de ARN diana del ADN molde lineal determina la secuencia del ARN transcrito mediante las reglas de apareamiento de bases.

Caperuza en 5': una caperuza en 5' es una entidad, normalmente un entidad nucleotídica modificada, que generalmente "ocupa" el extremo 5' de un ARNm maduro. Una caperuza en 5' puede estar formada normalmente por un nucleótido modificado (análogo de caperuza), particularmente por un derivado de un nucleótido guanina. Preferiblemente, la caperuza en 5' se liga al extremo 5'-terminal a través de un enlace de 5'-5'-trifosfato. Una caperuza en 5' puede estar metilada, por ejemplo m7GpppN (por ejemplo, m7G(5')ppp(5')G (m7G)), en la que N es el nucleótido 5'-terminal del ácido nucleico que porta la caperuza en 5', normalmente el extremo 5' de un ARN. Los ejemplos adicionales de estructuras de caperuza en 5' incluyen glicerilo, residuo (resto) desoxi abásico invertido, 4',5'-metilen-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, 3',4'-seco-nucleótido acíclico, 3,4-dihidroxibutil-nucleótido acíclico, 3,5-dihidroxipentil-nucleótido acíclico, resto de nucleótido invertido en 3'-3', resto abásico invertido en 3'-3', resto de nucleótido invertido en 3'-2', resto abásico invertido en 3'-2', 1,4-butanodiol-fosfato, 3'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexilfosfato, 3'-fosfato, 3'fosforotioato, fosforoditioato o resto metilfosfonato de puente o no de puente. Las estructuras de CAP en 5' modificadas adicionales que pueden usarse en el contexto de la presente invención son CAP1 (metilación de la ribosa del nucleótido adyacente de m7GpppN), CAP2 (metilación de la ribosa del 2º nucleótido en el sentido de 3' de m7GpppN), CAP3 (metilación de la ribosa del 3º nucleótido en el sentido de 3' de m7GpppN), CAP4 (metilación de la ribosa del 4º nucleótido en el sentido de 3' de m7GpppN), ARCA (análogo de caperuza antiinverso), ARCA modificada (por ejemplo, ARCA modificada con fosfotioato), inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina.

Secuencia de poli(A): una secuencia de poli(A), también denominada cola poli(A) o cola poli(A) 3', se entiende normalmente como una secuencia de nucleótidos adenina, por ejemplo, de hasta aproximadamente 400 nucleótidos adenina, por ejemplo desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 400, preferiblemente desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 400, más preferiblemente desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 300, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 250, lo más preferiblemente desde aproximadamente 60 hasta aproximadamente 250 nucleótidos adenina. Una secuencia de poli(A) se ubica normalmente en el extremo 3' de un ARNm. En el contexto de la presente invención, una secuencia de poli(A) puede ubicarse dentro de un ARNm o cualquier otra molécula de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, en un vector, por ejemplo, en un vector que sirve como molde para la generación de un ARN, preferiblemente un ARNm, por ejemplo, mediante transcripción del vector.

ARN, ARNm: ARN es la abreviatura habitual para ácido ribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir un polímero que consiste en monómeros nucleotídicos. Estos nucleótidos son habitualmente los monómeros de adenosina monofosfato, uridina monofosfato, guanosina monofosfato y citidina monofosfato, que están conectados entre sí a lo largo de la denominada estructura principal. La estructura principal está formada por enlaces fosfodiéster entre el azúcar, es decir ribosa, de un primer monómero y un resto fosfato de un segundo monómero adyacente. El orden específico de los monómeros, es decir el orden de las bases ligadas a la estructura principal con azúcar/fosfato se denomina la secuencia de ARN. Normalmente, el ARN puede obtenerse mediante transcripción de una secuencia de ADN, por ejemplo, en el interior de una célula. En células eucariotas, la transcripción se realiza normalmente en el interior del núcleo o la mitocondria. *In vivo*, la transcripción de ADN normalmente da como resultado el denominado ARN prematuro, que ha de procesarse para dar el denominado ARN mensajero, habitualmente abreviado como ARNm. El procesamiento del ARN prematuro, por ejemplo en organismos eucariotas, comprende una variedad de modificaciones posttranscripcionales diferentes tales como corte y empalme, ocupación del extremo 5', poliadenilación, exportación del núcleo o la mitocondria, y similares. La suma de estos procedimientos también se denomina maduración de ARN. El ARN mensajero maduro proporciona normalmente la secuencia de nucleótidos que puede traducirse en una secuencia de aminoácidos de un péptido o una proteína particular. Normalmente, un ARNm maduro comprende una caperuza en 5', opcionalmente una UTR 5', un marco de lectura abierto, opcionalmente una UTR 3' y una secuencia de poli(A). Aparte del ARN mensajero, existen varios tipos no codificantes de ARN que pueden estar implicados en la regulación de la transcripción y/o traducción, y la inmunomodulación. El término "ARN" abarca además otras moléculas de ARN codificantes, tales como ARN viral, ARN retroviral y ARN de replicón, ARN de interferencia pequeña (ARNip), ARN antisentido, ARN de CRISPR, ribozimas, aptómeros, ribointerruptores, ARN inmunoestimulante, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN nucleolar pequeño (ARNnop), microARN (miARN) y ARN que interacciona con Piwi (piARN).

Región no traducida 5' (UTR 5'): tal como se usa en el presente documento, el término 'UTR 5'' se refiere normalmente a una sección particular de ARN mensajero (ARNm). Está ubicada en 5' del marco de lectura abierto del ARNm. Normalmente, la UTR 5' comienza con el sitio de inicio de la transcripción y termina un nucleótido antes del codón de inicio del marco de lectura abierto. La UTR 5' puede comprender elementos para controlar la expresión

génica, también denominados elementos reguladores. Tales elementos reguladores pueden ser, por ejemplo, sitios de unión al ribosoma o un tracto de oligopirimidina 5'-terminal. La UTR 5' puede modificarse de manera postranscripcional, por ejemplo mediante la adición de una CAP en 5'. En el contexto de la presente invención, una UTR 5' corresponde a la secuencia de un ARNm maduro, que se ubica entre la CAP en 5' y el codón de inicio.

5 Preferiblemente, la UTR 5' corresponde a la secuencia, que se extiende desde un nucleótido ubicado en 3' hasta la CAP en 5', preferiblemente desde el nucleótido ubicado inmediatamente en 3' con respecto a la CAP en 5', hasta un nucleótido ubicado en 5' con respecto al codón de inicio de la región codificante de la proteína, preferiblemente hasta el nucleótido ubicado inmediatamente en 5' con respecto al codón de inicio de la región codificante de la proteína. El nucleótido ubicado inmediatamente en 3' con respecto a la CAP en 5' de un ARNm maduro corresponde
10 normalmente al sitio de inicio de la transcripción. El término "corresponde a" significa que la secuencia de UTR 5' puede ser una secuencia de ARN, tal como en la secuencia de ARNm usada para definir la secuencia de UTR 5', o una secuencia de ADN, que corresponde a tal secuencia de ARN. En el contexto de la presente invención, el término "una UTR 5' de un gen", tal como "una UTR 5' de un gen de TOP", es la secuencia, que corresponde a la UTR 5' del ARNm maduro derivado de este gen, es decir el ARNm obtenido mediante la transcripción del gen y la
15 maduración del ARNm premaduro. El término "UTR 5' de un gen" abarca la secuencia de ADN y la secuencia de ARN de la UTR 5'. Preferiblemente, la UTR 5' usada según la presente invención es heteróloga con respecto a la región codificante de la secuencia de ARNm. Incluso cuando se prefieren UTR 5' derivadas de genes que se producen de manera natural, también pueden usarse UTR diseñadas por ingeniería genética en el contexto de la presente invención.

20 Región no traducida 3' (UTR 3'): en el contexto de la presente invención, una UTR 3' es normalmente la parte de un ARNm ubicada entre la región codificante de la proteína (es decir, el marco de lectura abierto) y el extremo 3'-terminal del ARNm. Una UTR 3' de un ARNm no se traduce en una secuencia de aminoácidos. La secuencia de UTR 3' está codificada generalmente por el gen, que se transcribe en el ARNm respectivo durante el proceso de
25 expresión génica. En el contexto de la presente invención, una UTR 3' corresponde a la secuencia de un ARNm maduro ubicada en 3' con respecto al codón de parada de la región codificante de la proteína, preferiblemente inmediatamente en 3' con respecto al codón de parada de la región codificante de la proteína, y que se extiende hasta el lado 5' del extremo 3'-terminal del ARNm o de la secuencia de poli(A), preferiblemente hasta el nucleótido inmediatamente en 5' con respecto a la secuencia de poli(A). El término "corresponde a" significa que la secuencia
30 de UTR 3' puede ser una secuencia de ARN, tal como en la secuencia de ARNm usada para definir la secuencia de UTR 3', o una secuencia de ADN, que corresponde a tal secuencia de ARN. En el contexto de la presente invención, el término "una UTR 3' de un gen", tal como "una UTR 3' de un gen de albúmina", es la secuencia que corresponde a la UTR 3' del ARNm maduro derivado de este gen, es decir el ARNm obtenido mediante la transcripción del gen y la maduración del ARNm premaduro. El término "UTR 3' de un gen" abarca la secuencia de ADN y la secuencia de
35 ARN de la UTR 3'. Preferiblemente, la UTR 3' usada según la presente invención es heteróloga con respecto a la región codificante de la secuencia de ARNm. Incluso cuando se prefieren UTR 3' derivadas de genes que se producen de manera natural, también pueden usarse UTR diseñadas por ingeniería genética en el contexto de la presente invención.

40 ARN transcrito *in vitro*: un ARN transcrito *in vitro* es una molécula de ARN que se ha sintetizado a partir de un ADN molde, comúnmente un ADN molde plasmídico linealizado y purificado, un producto de PCR o un oligonucleótido. La síntesis de ARN se produce en un ensayo libre de células ("*in vitro*") catalizado por ARN polimerasas dependientes de ADN. En un procedimiento denominado transcripción *in vitro* de ARN, prácticamente todos los análogos nucleotídicos en ARN. Los ejemplos particulares de ARN polimerasas dependientes de ADN son las ARN
45 polimerasas T7, T3 y SP6. Un ARN transcrito *in vitro* puede comprender elementos tales como una caperuza en 5', opcionalmente una UTR 5', un marco de lectura abierto, opcionalmente una UTR 3', y una secuencia de poli(A). Aparte del ARN mensajero proteinogénico, existen varios tipos no codificantes de ARN que pueden estar implicados en la regulación de la transcripción y/o traducción. Todas tales moléculas de ARN tal como se define en el presente documento también pueden sintetizarse mediante transcripción *in vitro* de ARN.

50 Especie de ARN: el término "especie de ARN" indica un grupo de las mismas moléculas de ARN que son similares en su secuencia de ARN y/o su longitud de secuencia. Así, las moléculas de ARN dentro de una especie de ARN están codificadas por el mismo ADN molde. Si el ARN presente dentro de la muestra es un ARN codificante, una especie de ARN codifica para un péptido o una proteína diana.

55 ADN: ADN es la abreviatura habitual para ácido desoxirribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir un polímero que consiste en monómeros nucleotídicos. Estos nucleótidos son habitualmente los monómeros de desoxiadenosina monofosfato, desoxitimidina monofosfato, desoxiguanosina monofosfato y desoxicitidina monofosfato, que están compuestos, por sí mismos, por un resto de azúcar (desoxirribosa), un resto básico y un
60 resto fosfato, y polimerizan mediante una estructura principal característica. La estructura principal está formada, normalmente, por enlaces fosfodiéster entre el resto de azúcar del nucleótido, es decir desoxirribosa, de un primer monómero y un resto fosfato de un segundo monómero adyacente. El orden específico de los monómeros, es decir el orden de las bases ligadas a la estructura principal con azúcar/fosfato se denomina la secuencia de ADN. El ADN puede ser monocatenario o bicatenario. En la forma bicatenaria, los nucleótidos de la primera cadena se hibridan
65 normalmente con los nucleótidos de la segunda cadena, por ejemplo mediante apareamiento de bases A/T y apareamiento de bases G/C.

Sitio de clonación, sitio de clonación múltiple: un sitio de clonación se entiende normalmente como un segmento de una molécula de ácido nucleico que es adecuado para la inserción de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto. La inserción puede realizarse mediante cualquier método de biología molecular conocido por el experto en la técnica, por ejemplo mediante restricción y ligación. Un sitio de clonación comprende normalmente uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (sitios de restricción). Estos uno o más sitios de restricción pueden reconocerse por enzimas de restricción que escinden el ADN en estos sitios. Un sitio de clonación que comprende más de un sitio de restricción también puede denominarse sitio de clonación múltiple (SCM) o poliligador.

Marco de lectura abierto: un marco de lectura abierto (ORF) en el contexto de la invención puede ser normalmente una secuencia de varios tripletes de nucleótidos que pueden traducirse en un péptido o una proteína. Un marco de lectura abierto contiene preferiblemente un codón de inicio, es decir una combinación de tres nucleótidos consecutivos que codifican normalmente para el aminoácido metionina (ATG) en su extremo 5', y una región posterior, que presenta habitualmente una longitud que es un múltiplo de 3 nucleótidos. Un ORF está terminado preferiblemente por un codón de parada (por ejemplo, TAA, TAG, TGA). Normalmente, este es el único codón de parada del marco de lectura abierto. Por tanto, un marco de lectura abierto en el contexto de la presente invención es preferiblemente una secuencia de nucleótidos que consiste en un número de nucleótidos que puede dividirse por tres, que comienza con un codón de inicio (por ejemplo, ATG) y que termina preferiblemente con un codón de parada (por ejemplo, TAA, TGA o TAG). El marco de lectura abierto puede aislarse o puede incorporarse en una secuencia de ácido nucleico más grande, por ejemplo en un vector o un ARNm. Un marco de lectura abierto también puede denominarse "región codificante de la proteína".

Transcripción *in vitro* de ARN: el término "transcripción *in vitro* de ARN" (o 'transcripción *in vitro*') se refiere a un procedimiento en el que se sintetiza ARN, en particular ARNm, en un sistema libre de células (*in vitro*). Preferiblemente, se aplican vectores de clonación de ADN, particularmente vectores de ADN plasmídico, como molde para la generación de transcritos de ARN. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vector de transcripción. El ARN puede obtenerse mediante transcripción *in vitro* dependiente de ADN de un molde de ADN apropiado, que según la presente invención es preferiblemente un molde de ADN plasmídico linealizado. El promotor para controlar la transcripción *in vitro* de ARN puede ser cualquier promotor para cualquier ARN polimerasa dependiente de ADN. Los ejemplos particulares de ARN polimerasas dependientes de ADN son las ARN polimerasas T7, T3 y SP6. Un molde de ADN para la transcripción *in vitro* de ARN puede obtenerse mediante la clonación de un ácido nucleico, en particular ADNc correspondiente al ARN respectivo que va a transcribirse *in vitro*, y su introducción en un vector apropiado para la transcripción *in vitro* de ARN, por ejemplo en ADN plasmídico circular. El ADNc puede obtenerse mediante transcripción inversa de ARNm o síntesis química. Además, el molde de ADN para la síntesis *in vitro* de ARN también puede obtenerse mediante síntesis génica. Preferiblemente, se usan para la transcripción *in vitro* de ARN vectores de clonación que se designan generalmente como vectores de transcripción.

Secuencia de Kozak: tal como se usa en el presente documento, el término 'secuencia de Kozak' se refiere normalmente a una secuencia en una molécula de ARNm, que se reconoce por el ribosoma como el sitio de inicio de la traducción de una proteína codificada por esa molécula de ARNm. En una realización preferida, esa secuencia puede concordar con una secuencia consenso para una secuencia de nucleótidos que median la iniciación de la traducción, preferiblemente con la secuencia consenso (gcc)gccRccAUGG, en la que las letras minúsculas indican la base más común en una posición donde la base, no obstante, puede variar; las letras mayúsculas indican bases altamente conservadas, 'AUGG'; 'R' indica que está presente una purina (adenina o guanina, preferiblemente adenina) en esta posición; y la secuencia entre paréntesis es de significancia indeterminada.

HPLC: la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC; denominada anteriormente cromatografía de líquidos de alta presión) es una técnica en química analítica usada para separar los componentes en una mezcla, para identificar cada componente y para cuantificar cada componente. Se basa en bombas que hacen pasar un disolvente líquido presurizado que contiene la mezcla de la muestra a través de una columna llena de un material adsorbente sólido. Cada componente en la muestra interacciona de manera ligeramente diferente con el material adsorbente, lo que provoca velocidades de flujo diferentes para los diferentes componentes y que conduce a la separación de los componentes a medida que salen de la columna. La HPLC se distingue de la cromatografía de líquidos ("baja presión") tradicional en que las presiones operativas son significativamente mayores (50-350 bar), mientras que la cromatografía de líquidos ordinaria se basa normalmente en la fuerza de la gravedad para hacer pasar la fase móvil a través de la columna. Debido a la pequeña cantidad de muestra separada en HPLC analítica, las dimensiones de columna típicas son 2,1-4,6 mm de diámetro y 30-250 mm de longitud. Además, las columnas de HPLC se fabrican con partículas de adsorbente más pequeñas (2-50 micrómetros de tamaño de partícula promedio). Esto otorga a la HPLC un poder de resolución superior en la separación de mezclas, que es por lo que es una técnica cromatográfica popular. El esquema de un instrumento de HPLC incluye normalmente un inyector de muestras, bombas y un detector. El inyector de muestras lleva la mezcla de la muestra a la corriente de la fase móvil que la porta hacia la columna. Las bombas administran el flujo y la composición deseados de la fase móvil a través de la columna. El detector genera una señal proporcional a la cantidad de componente de la muestra que sale de la columna, permitiendo de ese modo el análisis cuantitativo de los componentes de la muestra. Un microprocesador

digital y un software de usuario controlan el instrumento de HPLC y proporcionan el análisis de datos. Algunos modelos de bombas mecánicas en un instrumento de HPLC pueden mezclar múltiples disolventes juntos en razones que cambian con el tiempo, generando un gradiente de composición en la fase móvil. Diversos detectores son de uso común, tales como UV/Vis, matriz de fotodiodos (PDA) o basados en espectrometría de masas. La mayoría de instrumentos de HPLC también tienen un horno para columna que permite el ajuste de la temperatura a la que se realiza la separación.

Liofilización: el secado por congelación, también denominado liofilización o criodesecación, es un procedimiento de deshidratación usado normalmente para conservar un material perecedero o hacer que el material sea más conveniente para el transporte. El secado por congelación funciona congelando el material y luego reduciendo la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente desde la fase sólida hasta la fase gas.

Acondicionamiento: el término “acondicionamiento” comprende proporcionar un compuesto, tal como ARN o ADN, en una forma adecuada, por ejemplo un tampón o disolvente adecuado, una concentración adecuada o propiedades bioquímicas o biofísicas adecuadas. El acondicionamiento puede realizarse, por ejemplo, usando TFF, por ejemplo en una etapa de concentración y/o diafiltración. Por tanto, el acondicionamiento incluye la concentración y el intercambio de tampón o disolvente mediante diafiltración.

Purificación: tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término “purificación” o “purificar” o “puro” significa que el ARN o ADN deseado en una muestra está separado y/o aislado de las impurezas, productos intermedios, subproductos y/o componentes de reacción presentes en la misma, o que al menos se agotan las impurezas, productos intermedios, subproductos y/o componentes de reacción de la muestra que comprende el ARN o ADN. Los ejemplos no limitativos de constituyentes no deseados de muestras que contienen ARN o ADN que, por tanto, requieren agotamiento pueden comprender fragmentos degradados o fragmentos que han surgido como resultado de la terminación prematura de la transcripción, o también transcritos excesivamente grandes si los plásmidos no están completamente linealizados. Además, los productos intermedios pueden reducirse de la muestra, tales como, por ejemplo, ADN molde. Adicionalmente, pueden tener que agotarse de la muestra de ARN/ADN los componentes de reacción tales como enzimas, proteínas, ADN y ARN bacteriano, moléculas pequeñas tales como espermidina, componentes del tampón, etc.. Además, pueden separarse las impurezas tales como disolventes orgánicos y los nucleótidos u otras moléculas pequeñas. Idealmente, el ARN tiene una pureza y/o integridad después de la purificación mayor que el material de partida. La pureza puede determinarse mediante métodos comúnmente conocidos por el experto, por ejemplo mediante cromatografía de gases, PCR cuantitativa, HPLC analítica o electroforesis en gel.

Filtración de flujo tangencial (TFF, *Tangential Flow Filtration*) o filtración de flujo cruzado: la filtración de flujo cruzado (también denominada filtración de flujo tangencial) es un tipo de filtración. La filtración de flujo cruzado es diferente de la filtración en línea, en la que la alimentación se hace pasar a través de una membrana o un lecho, quedando atrapados los sólidos en el filtro y liberándose el filtrado en el otro extremo. La filtración de flujo cruzado recibe su nombre debido a que la mayoría del flujo de alimentación se mueve tangencialmente a lo largo de la superficie del filtro, en vez de hacia el interior del filtro. La ventaja principal de esto es que la torta de filtración (que puede taponar el filtro) se retira por lavado sustancialmente durante el procedimiento de filtración, aumentando la duración de tiempo en que la unidad de filtración puede funcionar. Puede ser un procedimiento continuo, a diferencia de la filtración en línea discontinua. Este tipo de filtración se selecciona normalmente para alimentaciones que contienen una alta proporción de sólidos de tamaño de partícula pequeño (en los que el permeado es el de mayor valor) porque el material sólido puede bloquear (taponar) rápidamente la superficie del filtro con la filtración en línea. La presión aplicada provoca que una parte de la corriente de flujo pase a través de la membrana (filtrado/permeado) mientras que la parte restante (retenido) se hace recircular de nuevo al depósito de alimentación. El principio de trabajo general de TFF puede encontrarse en la bibliografía, véase por ejemplo Fernandez *et al.* (A BIOTECHNOLOGICA, Bd. 12, 1992, Berlín, páginas 49-56) o Rathore, AS *et al.* (Prep Biochem Biotechnol. 2011; 41(4):398-421). Además, el principio de TFF se ilustra en la figura 1. Las principales aplicaciones para TFF son concentración, diafiltración (desalación e intercambio de tampón/disolvente) y fraccionamiento de biomoléculas grandes de las pequeñas. Pueden usarse membranas con puntos de corte de peso molecular (MWCO) diferentes para TFF. En el contexto de la presente invención, se usan preferiblemente membranas de ultrafiltración para TFF.

Se usan generalmente dos configuraciones de filtro básicas para TFF. En filtros de cartucho (a menudo denominados filtros de fibras huecas), la membrana forma una serie de fibras huecas paralelas. La corriente de alimentación pasa a través de la luz de las fibras y se recoge el permeado de la parte exterior de las fibras. Los cartuchos se caracterizan en cuanto a longitud de fibra, diámetro de luz y número de fibras, así como tamaño de poro del filtro. En filtros de casete, se mantienen varias láminas planas de membrana separadas entre sí y de la carcasa del casete mediante pantallas de soporte. La corriente de alimentación pasa hacia el espacio entre dos láminas y se recoge el permeado del lado opuesto de las láminas. Los casetes se caracterizan en cuanto a longitud de paso de flujo y altura de canal, así como tamaño de poro de la membrana. La altura de canal se determina por el grosor de la pantalla de soporte. Tanto los cartuchos como los casetes se construyen de materiales elegidos por su resistencia mecánica, su compatibilidad química y física y sus bajos niveles de compuestos extraíbles y/o tóxicos.

Ultrafiltración: la ultrafiltración es un método de filtración que usa una membrana en la que fuerzas como la presión o gradientes de concentración conducen a una separación a través de una membrana semipermeable. Los sólidos y solutos suspendidos de alto peso molecular se retienen en el denominado retenido, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana en el permeado. Este procedimiento de separación se usa en la industria e investigación para purificar y concentrar disoluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da). La ultrafiltración no es fundamentalmente diferente de la microfiltración. Ambas realizan la separación basándose en la exclusión molecular o captura de partículas. Las membranas de ultrafiltración se definen por el punto de corte de peso molecular (MWCO) de la membrana de entre 2 y 100 nm (que corresponde a un MWCO entre 1 y 1000 kDa). La ultrafiltración se aplica en el modo de flujo cruzado o en línea.

Alimentación: material o disolución que se alimenta al filtro, por ejemplo la mezcla de reacción de linealización o la mezcla de reacción de la transcripción *in vitro* de ARN.

ARN de transferencia: un ARN de transferencia es una molécula adaptadora compuesta por ARN, normalmente de 76 a 90 nucleótidos de longitud que sirve como enlace físico entre la secuencia de nucleótidos de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y la secuencia de aminoácidos de proteínas. Eso lo hace portando un aminoácido a la maquinaria de síntesis de proteínas de una célula (ribosoma) tal como se dirige por una secuencia de tres nucleótidos (codón) en un ARN mensajero (ARNm). Como tal, los ARNt son un componente necesario de la traducción de proteínas, la síntesis biológica de nuevas proteínas según el código genético. La estructura de ARNt puede descomponerse en su estructura primaria, su estructura secundaria (normalmente visualizada como la estructura de hoja de trébol) y su estructura terciaria (todos los ARNt tienen una estructura tridimensional en forma de L similar que les permite ajustarse en los sitios P y A del ribosoma). La estructura de hoja de trébol se convierte en la estructura tridimensional en forma de L a través del apilamiento coaxial de las hélices, que es un motivo de estructura terciaria de ARN común.

ARN ribosómico (ARNr): componente ARN del ribosoma; el ARNr es esencial para la síntesis de proteínas en todos los organismos vivos. Constituye el material predominante dentro del ribosoma, que es aproximadamente el 60% de ARNr y el 40% de proteína en peso. Los ribosomas contienen dos ARNr principales y 50 o más proteínas. Los ARNr ribosómicos forman dos subunidades, la subunidad grande (LSU) y la subunidad pequeña (SSU). El ARNr de LSU actúa como una ribozima, catalizando la formación de enlaces peptídicos, el ARNm se intercala entre las subunidades pequeña y grande y el ribosoma cataliza la formación de un enlace peptídico entre los dos aminoácidos que están contenidos en el ARNr.

ARN viral: el ARN viral es ARN derivado de un virus, por ejemplo un retrovirus. Puede traducirse directamente en las proteínas virales deseadas. Pueden omitirse porciones del ARN viral durante la traducción. El resultado es que pueden crearse muchas proteínas diferentes a partir de una misma cadena de ARNm, con extremos 5' similares (en diversos grados) y extremos 3' iguales. O, pueden crearse proteínas diferentes a partir de ARN viral de sentido positivo y ARN viral de sentido negativo.

Replicones: un replicón es una molécula de ARN, o una región de un ARN, que se replica a partir de un solo origen de replicación.

ARN antisentido: el ARN antisentido (ARNas) o ARN complementario de interferencia con el ARNm (ARNcim) es un ARN monocatenario que es complementario a una porción de una cadena de ARNm transcrita dentro de una célula. El ARN antisentido puede introducirse, por ejemplo, en un célula para inhibir la traducción de un ARNm complementario mediante el apareamiento de bases con el mismo y la obstrucción física de la maquinaria de traducción.

ARN inmunoestimulante (ARNis): un ARN inmunoestimulante (ARNis) en el contexto de la invención puede ser normalmente un ARN que puede inducir una respuesta inmunitaria innata por sí mismo. Normalmente no tiene un marco de lectura abierto y, por tanto, no proporciona un antígeno peptídico o inmunógeno pero provoca una respuesta inmunitaria innata, por ejemplo, mediante la unión a una clase específica de receptor de tipo Toll (TLR) u otros receptores adecuados. Sin embargo, por supuesto los ARNm que tienen un marco de lectura abierto y que codifican para un péptido/proteína (por ejemplo, una función antigénica) también pueden inducir una respuesta inmunitaria innata.

ARN de interferencia pequeña (ARNip): también denominado ARN de interferencia corta o ARN de silenciamiento, es una clase de moléculas de ARN bicatenario de 20-25 pares de bases de longitud. El ARNip desempeña muchos papeles, pero es más notable en la ruta de interferencia de ARN (ARNi), en la que interfiere con la expresión de genes específicos con secuencias de nucleótidos complementarias. El ARNip funciona al hacer que el ARNm se descomponga después de la transcripción, lo que no da como resultado la traducción. El ARNip también actúa en rutas relacionadas con ARNi, por ejemplo, como un mecanismo antiviral o en la configuración de la estructura de cromatina de un genoma. Los ARNip tienen una estructura bien definida: un ARN bicatenario (ARNbc) corto (normalmente de 20 a 24 pb) con extremos 5' fosforilados y extremos 3' hidroxilados con dos nucleótidos de proyección. La enzima Dicer cataliza la producción de ARNip a partir de ARNbc largos y ARN de horquilla pequeños.

Ribozima: las ribozimas son enzimas de ácido ribonucleico, también denominadas ARN catalítico. Las ribozimas son moléculas de ARN que pueden catalizar reacciones bioquímicas específicas, similar a la acción de enzimas proteicas. Las ribozimas tienen diversas estructuras y mecanismos. Los ejemplos de ribozimas incluyen la ribozima de cabeza de martillo, la ribozima VS, Leadzyme y la ribozima de horquilla.

Aptómeros: los aptómeros (del latín *aptus*, ajustar, y del griego *meros*, parte) son moléculas oligonucleotídicas a base de ARN que se unen a una molécula diana específica. Los aptómeros se crean normalmente seleccionándolos de un gran conjunto de secuencias aleatorias, pero también existen aptómeros naturales en ribointerruptores. Los aptómeros también incluyen moléculas oligonucleotídicas a base de ARN que se unen a una molécula diana específica que se combinan con ribozimas para autoescindir en presencia de su molécula diana.

CRISPR (grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares): segmentos de ADN procariota que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases. Cada repetición se sigue por segmentos cortos de “ADN espaciador” de exposiciones previas a un virus o plásmido bacteriano. Los CRISPR se encuentran en aproximadamente el 40% de los genomas de bacterias secuenciadas y el 90% de arqueas secuenciadas. Los CRISPR se asocian a menudo con genes Cas que codifican para proteínas relacionadas con CRISPR. El sistema CRISPR/Cas es un sistema inmunitario procariota que confiere resistencia a elementos genéticos extraños tales como plásmidos y fagos y proporciona una forma de inmunidad adquirida. Los espaciadores de CRISPR reconocen y cortan estos elementos genéticos exógenos de una manera análoga al ARNi en organismos eucariotas.

ARN que interacciona con Piwi: la clase más grande de moléculas de ARN pequeñas no codificantes expresadas en células animales. Los piARN forman complejos ARN-proteína a través de interacciones con proteínas Piwi. Estos complejos de piARN se han relacionado con el silenciamiento génico tanto epigenético como postranscripcional de retrotransposones y con otros elementos en células de la línea germinal, particularmente aquellos en espermatogénesis. Son distintos del microARN (miARN) en tamaño (26-31 nt en vez de 21-24 nt), carecen de conservación de secuencia, y complejidad aumentada. Los piARN se han identificado tanto en vertebrados como en invertebrados, y aunque la biogénesis y los modos de acción varían de algún modo entre especies, se conservan varias características. Los piARN no tienen motivos de estructura secundaria claros, la longitud de un piARN es de entre 26 y 31 nucleótidos y el sesgo para una uridina en 5' es común para los piARN tanto en vertebrados como en invertebrados. Los piARN se encuentran en grupos en todo el genoma; estos grupos pueden contener tan pocos como diez o hasta muchos miles de piARN y pueden variar en tamaño desde uno hasta cien kb.

Modificación de ARN: el término “modificación de ARN” tal como se usa en el presente documento puede referirse a modificaciones químicas que comprenden modificaciones de la estructura principal así como modificaciones de azúcares o modificaciones de bases.

En este contexto, una molécula de ARN modificada tal como se define en el presente documento puede contener análogos/modificaciones de nucleótidos, por ejemplo modificaciones de la estructura principal, modificaciones de azúcares o modificaciones de bases. Una modificación de la estructura principal en conexión con la presente invención es una modificación en la que se modifican químicamente fosfatos de la estructura principal de los nucleótidos contenidos en una molécula de ARN tal como se define en el presente documento. Una modificación de azúcares en conexión con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos de la molécula de ARN tal como se define en el presente documento. Además, una modificación de bases en conexión con la presente invención es una modificación química del resto básico de los nucleótidos de la molécula de ARN. En este contexto, los análogos o las modificaciones de nucleótidos se seleccionan preferiblemente de análogos de nucleótidos, que pueden aplicarse para la transcripción y/o traducción.

Modificaciones de azúcares: los nucleósidos y nucleótidos modificados, que pueden incorporarse en una molécula de ARN modificada tal como se describe en el presente documento, pueden modificarse en el resto de azúcar. Por ejemplo, el grupo hidroxilo (OH) en 2' puede modificarse o reemplazarse por varios sustituyentes “oxilo” o “desoxilo” diferentes. Los ejemplos de modificaciones de grupo hidroxilo en 2' con “oxilo” incluyen, pero no se limitan a, alcoxilo o ariloxilo (-OR, por ejemplo, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; ácidos nucleicos “bloqueados” (LNA) en los que el hidroxilo en 2' está conectado, por ejemplo, por un puente de metileno, al carbono en 4' del mismo azúcar ribosa; y grupos amino (-O-amino, en el que el grupo amino, por ejemplo, NRR, puede ser alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) o aminoalcoxilo.

Las modificaciones con “desoxilo” incluyen hidrógeno, amino (por ejemplo, NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); o el grupo amino puede unirse al azúcar a través de un grupo de unión, en el que el grupo de unión comprende uno o más de los átomos de C, N y O.

El grupo azúcar también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por tanto, una molécula de ARN modificada puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa como el azúcar.

Modificaciones de la estructura principal:

La estructura principal de fosfato puede modificarse adicionalmente en los nucleósidos y nucleótidos modificados, que pueden incorporarse en una molécula de ARN modificada tal como se describe en el presente documento. Los grupos fosfato de la estructura principal pueden modificarse reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno por un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir el reemplazo completo de un resto fosfato sin modificar por un fosfato modificado tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforoamidatos, alquil o arilfosfonatos y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no unidos reemplazados por azufre. El grupo de unión fosfato también puede modificarse mediante el reemplazo de un oxígeno de unión por nitrógeno (fosforoamidatos con puente), azufre (fosforotioatos con puente) y carbono (metilfosfonatos con puente).

Modificaciones de bases:

Los nucleósidos y nucleótidos modificados, que pueden incorporarse en una molécula de ARN modificada tal como se describe en el presente documento, pueden modificarse adicionalmente en el resto de nucleobase. Los ejemplos de nucleobases encontrados en ARN incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina y uracilo. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos descritos en el presente documento pueden modificarse químicamente en la cara del surco mayor. En algunas realizaciones, las modificaciones químicas del surco mayor pueden incluir un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo o un grupo halo.

En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, los análogos/las modificaciones de nucleótidos se seleccionan de modificaciones de bases, que se seleccionan preferiblemente de 2-amino-6-cloropurina-ribosido-5'-trifosfato, 2-aminopurina-ribosido-5'-trifosfato; 2-aminoadenosina-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxicidina-trifosfato, 2-tiocitidina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 2'-fluorotimidina-5'-trifosfato, 2'-O-metil-inosina-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'-desoxicidina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-yodocitidina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxicidina-5'-trifosfato, 5-yodouridina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 5-metiluridina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxicidina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 6-azacitidina-5'-trifosfato, 6-azauridina-5'-trifosfato, 6-cloropurina-ribosido-5'-trifosfato, 7-deazaadenosina-5'-trifosfato, 7-deazaguanosina-5'-trifosfato, 8-azaadenosina-5'-trifosfato, 8-azidoadenosina-5'-trifosfato, bencimidazol-ribosido-5'-trifosfato, N1-metiladenosina-5'-trifosfato, N1-metilguanosina-5'-trifosfato, N6-metiladenosina-5'-trifosfato, O6-metilguanosina-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato o puromicina-5'-trifosfato, xantosina-5'-trifosfato. Se da preferencia particular a los nucleótidos para de modificaciones de bases seleccionados del grupo de nucleótidos con bases modificadas que consisten en 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 7-deazaguanosina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato y pseudouridina-5'-trifosfato.

En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetiluridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina.

En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina.

En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 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-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina y 2-metoxi-adenina.

En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

En algunas realizaciones, el nucleótido puede modificarse en la cara del surco mayor y puede incluir el reemplazo de hidrógeno en el C-5 de 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.

5 En realizaciones específicas adicionales, un ARN modificado puede comprender modificaciones de nucleósidos seleccionados de 6-aza-citidina, 2-tio-citidina, α -tio-citidina, pseudo-iso-citidina, 5-aminoalil-uridina, 5-yodo-uridina, N1-metil-pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, α -tio-uridina, 4-tio-uridina, 6-aza-uridina, 5-hidroxi-uridina, desoxitimidina, 5-metil-uridina, pirrolo-citidina, inosina, α -tio-guanosina, 6-metil-guanosina, 5-metil-citidina, 8-oxo-guanosina, 7-
10 deaza-guanosina, N1-metiladenosina, 2-amino-6-cloro-purina, N6-metil-2-amino-purina, pseudo-iso-citidina, 6-cloro-purina, N6-metil-adenosina, α -tio-adenosina, 8-azido-adenosina 7-deaza-adenosina.

Modificaciones de secuencia:

15 El término "modificación de ARN" tal como se usa en el presente documento puede referirse además a un ARN que se modifica en cuanto a la secuencia de nucleótidos en comparación con la secuencia de tipo natural. Particularmente, si el ARN es un ARN codificante, por ejemplo un ARNm, el ARN puede modificarse secuencialmente en la región codificante (marco de lectura abierto). Por otro lado, el contenido de G/C de la región del ARN modificado que codifica para un péptido o polipéptido puede ser mayor que el contenido de G/C de la
20 región codificante del ARN de tipo natural que codifica para el péptido o polipéptido, no cambiándose la secuencia de aminoácidos codificada con respecto a la de tipo natural. Esta modificación se basa en el hecho de que el orden de secuencia del dominio de ARN que va a traducirse es esencial para una traducción de ARN eficaz. En este respecto, la composición y secuencia de los diversos nucleótidos tiene que desempeñar una parte importante. En particular, las secuencias con un contenido elevado de G(guanosina)/C(citosina) son más estables que las
25 secuencias con un contenido elevado de A(adenosina)/U(uracilo). Por tanto, según la invención, a la vez que mantienen la secuencia de aminoácidos traducida, los codones varían con respecto al ARN de tipo natural de tal manera que tienen un mayor contenido de nucleótidos G/C. Dado que varios codones codifican para un mismo aminoácido (degeneración del código genético), es posible determinar los codones que son más favorables para la estabilidad (uso alternativo de codones). Por otro lado, también es posible proporcionar un ARN optimizado para
30 traducción mediante modificación de secuencia.

Concentración: la concentración es un procedimiento simple que implica la retirada de líquido de una disolución a la vez que se mantienen las moléculas de soluto. La concentración del soluto aumenta en proporción directa a la
35 disminución en el volumen de disolución, es decir reducir a la mitad el volumen duplica eficazmente la concentración de las moléculas de soluto.

Diafiltración: la diafiltración es el procedimiento de fraccionamiento que lava las moléculas más pequeñas a través de una membrana y deja las moléculas más grandes en el retenido sin cambiar finalmente la concentración. Puede usarse para retirar sales o intercambiar tampones o disolventes para introducir el producto en el tampón o disolvente deseado. En el contexto de la presente invención, la diafiltración frente a agua (API) y/o disolución de NaCl se
40 realiza con el fin de retirar LMWC y HMWC (por ejemplo, sales, oligonucleótidos cortos, proteínas pequeñas, espermidina y disolventes orgánicos). La diafiltración puede realizarse o bien de manera discontinua o, alternativamente, de manera continua. En la diafiltración continua, se añade la disolución de diafiltración al depósito de alimentación de muestra a la misma velocidad que se genera el filtrado. De este modo, el volumen en el depósito de muestra permanece constante, pero las moléculas pequeñas (por ejemplo, sales) que pueden permear libremente a través de la membrana se eliminan por lavado. Usando la retirada de sales como ejemplo, cada volumen de diafiltración (VD) adicional reduce adicionalmente la concentración de sal. En la diafiltración discontinua, se diluye en primer lugar la disolución y luego vuelve a concentrarse hasta el volumen de partida. Luego se repite este procedimiento hasta que se alcance la concentración requerida de moléculas pequeñas (por ejemplo, sales)
45 que permanecen en el depósito. Cada volumen de diafiltración (VD) adicional reduce adicionalmente la concentración de sal. La diafiltración continua requiere menos volumen de diafiltración para lograr el mismo grado de reducción de sales que la diafiltración discontinua.

Volumen de diafiltración (VD): un volumen de diafiltración individual es el volumen de retenido cuando se comienza la diafiltración.
55

deltaP (dp): describe la diferencia de presión de la presión de alimentación (p1) y la presión de retenido (p2) en TFF. El valor de dp es directamente proporcional a la velocidad de flujo sobre la membrana.

60 Presión de alimentación: la presión medida en el puerto de entrada de un cartucho/fibra hueca o un casete.

Velocidad de flujo de alimentación: volumen de disolución de alimentación cargada en la membrana del filtro por área de membrana dada durante un tiempo dado.

65 Presión transmembrana (PTM): la fuerza de impulso para el transporte de líquido a través de la membrana de ultrafiltración. Se calcula como la presión promedio aplicada a la membrana menos cualquier presión de filtrado. En

la mayoría de los casos, la presión en el puerto de filtrado es igual a cero.

Filtrado o permeado: la porción de muestra que ha fluido a través de la membrana.

- 5 Flujo: el flujo representa el volumen de disolución que fluye a través de un área de membrana dada durante un tiempo dado. Se expresa como LMH (litros por metro cuadrado por hora).

Velocidad de flujo de permeado: flujo de permeado dividido por el área de membrana efectiva (L/h/m²).

- 10 Flujo de permeado: velocidad de flujo del permeado (L/h).

Carga de membrana: cantidad de producto (ADN plasmídico linealizado o ARN transcrito *in vitro*) por área superficial de la membrana de filtro.

- 15 Integridad de ARN: la integridad relativa de ARN se determina preferiblemente como el porcentaje de ARN de longitud completa (es decir, ARN no degradado) con respecto a la cantidad total de ARN (es decir, ARN de longitud completa y fragmentos de ARN degradado (que aparecen como manchas en electroforesis en gel)). La integridad de ARN puede medirse y cuantificarse mediante electroforesis en gel de agarosa (EGA) y/o RP-HPLC analítica.

- 20 Punto de corte de peso molecular (MWCO, *Molecular Weight Cutt-Off*): el punto de corte de peso molecular de una membrana, a veces denominado límite de peso molecular nominal (NMWL, *Nominal Molecular Weight Limit*), se define por su capacidad para mantener un porcentaje dado de un soluto globular de un peso molecular definido. Sin embargo, la retención de soluto puede variar debido a la forma molecular, la estructura, la concentración de soluto, la presencia de otros solutos y las condiciones iónicas.

25 **Descripción detallada de la invención:**

La presente invención se refiere a un método para producir y purificar ARN, que comprende las etapas de

- 30 A) proporcionar ADN que codifica para el ARN;
- B) realizar la transcripción *in vitro* del ADN para dar lugar a una disolución que comprende ARN transcrito; y
- 35 C) realizar la diafiltración y/o concentración y/o purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito mediante una o más etapas de filtración de flujo tangencial (TFF), en el que el método comprende en la etapa C) las etapas de:
- C1) realizar opcionalmente la terminación de la transcripción;
- 40 C2) realizar la diafiltración y/o concentración y/o purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito mediante una o más etapas de TFF;
- 45 C3) realizar la purificación del ARN mediante un método de purificación adicional, en el que dicho método de purificación adicional no comprende una etapa de extracción con fenol/cloroformo y/o precipitación de ADN y/o ARN, en el que el método de purificación adicional se realiza por medio de HPLC de fase inversa; y
- 50 C4) realizar la diafiltración y/o concentración y/o purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito obtenida después de la etapa C3) mediante una o más etapas de TFF,
- en el que la al menos una o más etapas de TFF comprende usar un casete de membrana de TFF.

Además, la presente invención se refiere a un método para producir y purificar ARN, que comprende las etapas de

- 55 a) proporcionar ADN plasmídico que codifica para el ARN;
- b) realizar la linealización del ADN plasmídico en una reacción de linealización;
- 60 c) realizar opcionalmente la terminación de la reacción de linealización;
- d) realizar la concentración de la reacción de linealización que comprende ADN plasmídico linealizado mediante una etapa de TFF;
- 65 e) realizar la diafiltración de la reacción de linealización que comprende ADN plasmídico linealizado mediante una etapa de TFF;

f) realizar la transcripción del ADN para dar lugar una disolución que comprende ARN transcrito;

g) realizar opcionalmente la terminación de la transcripción;

5 h) realizar la diafiltración de la disolución que comprende el ARN transcrito mediante una etapa de TFF;

i) realizar la purificación del ARN mediante al menos un método de purificación adicional, en el que el método de purificación adicional se realiza por medio de HPLC de fase inversa;

10 j) realizar la concentración de la disolución que comprende el ARN transcrito obtenida después de la etapa i) mediante una etapa de TFF; y

k) realizar la diafiltración de la disolución que comprende el ARN transcrito obtenida después de la etapa j) mediante una primera y una segunda etapa de TFF;

15 en el que la TFF de las etapas j) o k) comprende usar un casete de membrana de TFF.

Las etapas individuales de los métodos según la presente invención pueden realizarse secuencialmente o pueden solaparse al menos parcialmente.

20 El ARN que va a purificarse con el método según la invención es un ácido ribonucleico de cualquier tipo, preferiblemente tal como se define en el presente documento. En particular, el ARN se selecciona preferiblemente de ARNm, ARN viral, ARN retroviral y ARN de replicón, ARN de interferencia pequeña (ARNip), ARN antisentido, ARN de grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR), ribozimas, aptómeros, ribointerruptores, ARN inmunoestimulante, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN nucleolar pequeño (ARNnop), microARN (miARN) y ARN que interacciona con Piwi (piARN) o ARN de células completas (extracto de ARN total). El ARN que va a aislarse puede ser monocatenario o bicatenario. El ARN monocatenario puede formar opcionalmente estructuras secundarias mediante repliegamiento, siendo normalmente monocatenario el ARN que va a separarse. El ARN puede estar sin marcar o también marcado (con un marcador fluorescente o un radiomarcador o un epítipo de anticuerpo). Un ejemplo de un ARN marcado es ARN marcado con digoxigenina. El ARN también puede contener modificaciones (nucleótidos modificados), preferiblemente tal como se define en el presente documento.

35 En una realización preferida del método según la invención, el ARN que va a separarse tiene un tamaño de hasta aproximadamente 15000 nucleótidos (como molécula de ARN monocatenario) o pares de bases (como molécula de ARN bicatenario), en particular de 100 a 10000, más preferiblemente de 500 a 10000 nucleótidos o pares de bases, incluso más preferiblemente de 500 a 7000 nucleótidos o pares de bases e incluso más preferiblemente de 500 a 5000 nucleótidos o pares de bases. Para este tamaño de ARN, se ha demostrado que es posible lograr resultados muy buenos con respecto a la purificación del ARN, ya que el método según la invención es particularmente adecuado para ARN de este tamaño. Opcionalmente, sin embargo, también puede separarse de este modo fragmentos de ARN más pequeños, por ejemplo con una longitud de 30-500, 50-500 ó 100-500, o 20-200, 20-100, 20-50 ó 20-30 nucleótidos.

45 Si el ARN que va a separarse es un ARN codificante, por ejemplo un ARNm, ARN viral o ARN de replicón, codificará preferiblemente para péptidos o proteínas. El ARN puede codificar para una secuencia de proteína o un fragmento o una variante de la misma (por ejemplo, proteínas de fusión), preferiblemente seleccionados de proteínas o péptidos terapéuticamente activos, incluyendo proteínas adyuvantes, antígenos tumorales, antígenos de cáncer, antígenos patógenos (por ejemplo, seleccionados de antígenos animales, de antígenos virales, de antígenos protozoicos, de antígenos bacterianos), antígenos alérgenos, antígenos autoinmunitarios, o antígenos adicionales, alérgenos, anticuerpos, proteínas o péptidos inmunoestimuladores, receptores de células T específicos de antígeno, productos biológicos, péptidos penetrantes de células, proteínas secretadas, proteínas de membrana plasmática, proteínas citoplasmáticas o citoesqueléticas, proteínas unidas a la membrana intracelular, proteínas nucleares, proteínas asociadas con enfermedad humana, restos de direccionamiento o aquellas proteínas codificadas por el genoma humano para las que no se ha identificado indicación terapéutica pero que, no obstante, tienen utilidad en las áreas de investigación y descubrimiento.

50 En una realización preferida, el ARN obtenido según el método de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica o puede ser un componente de una composición farmacéutica junto con componentes adicionales.

60 Las etapas del método según la presente invención se describirán en lo siguiente con más detalle.

Etapa A:

65 En una realización preferida, el ADN que codifica para el ARN proporcionado en la etapa A) puede ser cualquier tipo de ADN, incluyendo ADN plasmídico, ADN genómico o fragmentos de ADN tales como fragmentos de ADN

obtenidos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En una realización preferida, el ADN proporcionado en la etapa A) es ADN plasmídico. El ADN plasmídico puede proporcionarse en una forma circular o en una forma linealizada. Se prefiere la forma linealizada y puede obtenerse, por ejemplo, mediante digestión con una enzima de restricción (linealización). Se prefieren las enzimas de restricción BciVI (Bful), BcuI (SpeI), EcoRI, AatII, AgeI (BshTI), ApaI, BamHI, BglII, BlnI (Bpu1102I), BsrGI (Bsp1407), ClaI (Bsu15I), EcoRI, EcoRV (Eco32I), HindIII, KpnI, MluI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, NsiI, Mph1103I, PstI, PvuI, PvuII, SacI, Sall, Scal, SpeI, XbaI, XhoI, SacII (Cfr42I), XbaI. El experto en la técnica sabe en qué condiciones puede realizarse la linealización del ADN y que las condiciones de linealización son dependientes de qué tipo de enzima de restricción se usa. En una realización, el ADN plasmídico puede acondicionarse o purificarse usando una o más etapas de TFF antes de la linealización.

La al menos una etapa de TFF puede comprender al menos una etapa de diafiltración y/o al menos una etapa de concentración. Las etapas de diafiltración y concentración pueden realizarse por separado pero también pueden solaparse al menos parcialmente. La al menos una o más etapas de TFF pueden retirar eficazmente contaminantes, tales como HMWC y LMWC, por ejemplo fragmentos de ADN, disolventes orgánicos, componentes de tampón tales como sales y detergentes. Por tanto, el uso de TFF puede reducir o suprimir la necesidad de purificar el ADN por medio de extracción con disolventes orgánicos tal como extracción con fenol/cloroformo y/o precipitación con alcohol de ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, por ejemplo mediante precipitación con alto contenido de sales/alcohol como precipitación con isopropanol/NaCl. Además, se encontró que, sorprendentemente, el uso de TFF no afecta negativamente a la estabilidad del ADN, por ejemplo debido a la tensión de cizallamiento durante el bombeo.

En realizaciones preferidas, la una o más etapas de TFF antes de la linealización se realiza tal como se describe para la etapa A3) de acondicionamiento y/o purificación del ADN linealizado mediante una o más etapas de TFF.

En una realización preferida, la reacción de linealización comprende:

1 µg de ADN plasmídico;

0,5 µl de tampón de reacción;

3 Unidades de enzima de restricción;

5 µl adicionales con API (agua para inyección).

La reacción se incuba preferiblemente durante de 4 a 5 horas a 37°C.

En una realización preferida adicional que es útil para producción a gran escala, la reacción de linealización comprende:

30 mg de ADN plasmídico;

15 ml de tampón de reacción (10x tampón de restricción)

9 ml de enzima de restricción [10 U/µl]

La reacción se llena hasta un volumen final de 150 ml usando API y se incuba durante de 4 a 5 horas a 37°C.

En una realización preferida, puede terminarse la reacción de linealización, por ejemplo la reacción de linealización usando una enzima de restricción. La terminación de la linealización puede realizarse mediante la adición de un agente que inhiba la actividad de la enzima de restricción. En una realización, la terminación de la linealización puede realizarse mediante la adición de una cantidad eficaz de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En otra realización preferida, la enzima de restricción se inactiva mediante inactivación por calor, por ejemplo mediante incubación a 65°C.

En una realización, el ADN plasmídico comprende al menos una secuencia de terminación. Esta secuencia media la terminación de la transcripción proporcionando señales en el ARN recién sintetizado que desencadenan procesos que liberan el ARN del complejo transcripcional.

En una realización preferida, se realizan una o más etapas de TFF después de la reacción de linealización. La una o más etapas de TFF pueden realizarse como una etapa de diafiltración para i) intercambiar el disolvente del ADN linealizado a condiciones requeridas para la transcripción y/o para ii) purificar del ADN linealizado; y/o como una etapa de concentración para concentrar el ADN linealizado. El acondicionamiento puede realizarse mediante al menos una etapa de diafiltración usando TFF para una disolución o un tampón de diafiltración.

En una realización preferida del método según la presente invención, el ADN proporcionado en la etapa A) es ADN

plasmídico como el ADN que codifica para el ARN, y el método comprende posteriormente a la etapa A) las etapas descritas anteriormente de:

5 A1) linealización del ADN plasmídico en una reacción de linealización;

A2) opcionalmente terminación de la reacción de linealización; y

10 A3) acondicionamiento y/o purificación de la reacción de linealización que comprende ADN plasmídico linealizado mediante una o más etapas de TFF.

15 La etapa A3 según la presente invención comprende el acondicionamiento y/o la purificación de la reacción de linealización que comprende ADN plasmídico linealizado mediante una o más etapas de TFF. La al menos una etapa de TFF puede comprender al menos una etapa de diafiltración usando TFF y/o al menos una etapa de concentración usando TFF. Las etapas de diafiltración y concentración pueden realizarse por separado pero también pueden solaparse al menos parcialmente. La al menos una o más etapas de TFF pueden retirar eficazmente contaminantes, tales como HMWC y LMWC, por ejemplo fragmentos de ADN, disolventes orgánicos, componentes de tampón tales como sales y detergentes. Por tanto, el uso de TFF puede reducir o suprimir la necesidad de purificar el ADN por medio de extracción con disolventes orgánicos tal como extracción con fenol/cloroformo y/o precipitación con alcohol de ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, por ejemplo mediante precipitación con alto contenido de sales/alcohol tal como precipitación con NaCl/isopropanol. Además, se encontró que, sorprendentemente, el uso de TFF no afecta negativamente a la estabilidad del ADN, por ejemplo debido a la tensión de cizallamiento durante el bombeo.

20 Por tanto, en una realización preferida, el método según la presente invención en la etapa A3, particularmente durante el acondicionamiento y/o la purificación de la reacción de linealización, no comprende una etapa de extracción con fenol/cloroformo y/o precipitación de ADN/y/o ARN.

25 En una realización preferida, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 comprende al menos una etapa de concentración. En este contexto, es particularmente preferido concentrar la reacción de linealización hasta al menos el 90%, el 80%, el 70%, el 60%, el 50%, el 40%, el 30% o hasta al menos el 13% del volumen original.

30 En una realización preferida, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 comprende al menos una etapa de concentración, en la que el ADN plasmídico linealizado se concentra desde una concentración inicial de aproximadamente 0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,15 g/l, 0,2 g/l, 0,25 g/l o 0,3 g/l de ADN plasmídico linealizado hasta una concentración final de aproximadamente 0,8 g/l, 0,9 g/l, 1,0 g/l, 1,1 g/l, 1,2 g/l, 1,3 g/l, 1,4 g/l o aproximadamente 1,5 g/l de ADN plasmídico linealizado.

35 En otra realización preferida, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 comprende al menos una etapa de concentración, en la que la reacción de linealización se concentra desde 0,2 g/l de ADN hasta 1,0 g/l o 1,5 g/l de ADN.

40 En una realización preferida adicional, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 comprende al menos una etapa de diafiltración.

45 En una realización preferida, la etapa de diafiltración se realiza con agua o una disolución acuosa de sal como disolución de diafiltración. Se prefiere particularmente una etapa de diafiltración con agua.

50 En una realización preferida, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 se realiza usando desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 volúmenes de diafiltración (VD) de disolución o tampón de diafiltración, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 VD de disolución o tampón de diafiltración y más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 12 VD de disolución o tampón de diafiltración, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 10 VD de disolución o tampón de diafiltración. En una realización particularmente preferida, la al menos una etapa de TFF se realiza usando aproximadamente 10 VD de disolución o tampón de diafiltración, particularmente agua.

55 Según una realización particularmente preferida, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 comprende al menos una etapa de concentración y al menos una etapa de diafiltración. Preferiblemente, la al menos una etapa de diafiltración se realiza después de la etapa de concentración de la etapa A3.

60 La TFF puede llevarse a cabo usando cualquier membrana de filtro adecuada. Por ejemplo, la TFF puede llevarse a cabo usando una membrana de fibras huecas de TFF o un casete de membrana de TFF. Se prefiere el uso de un casete de membrana de TFF. El punto de corte de peso molecular de la membrana de filtro puede seleccionarse dependiendo del tamaño del ADN, particularmente el ADN plasmídico. Cuanto mayor sea la molécula de ADN de interés, mayor será el punto de corte de peso molecular de la membrana que puede seleccionarse. En una realización preferida, el punto de corte de peso molecular de la membrana de filtro es ≤ 500 kDa, más preferiblemente ≤ 200 kDa y lo más preferiblemente ≤ 100 kDa. La membrana de filtro puede comprender cualquier

material de filtro adecuado, por ejemplo poli(éter sulfona) (PES), poli(éter sulfona) modificada (mPES), polisulfona (PS), polisulfona modificada (mPS), materiales cerámicos, polipropileno (PP), celulosa, celulosa regenerada o un derivado de celulosa, por ejemplo acetato celulosa, o combinaciones de los mismos.

- 5 Se prefiere particularmente en este contexto una membrana a base de celulosa (celulosa, celulosa regenerada o un derivado de celulosa) o una membrana de filtro a base de PES o mPES, particularmente con un MWCO de 100 kDa.

En una realización preferida, la carga de membrana de ADN de la membrana de TFF es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/cm² y preferiblemente desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2 mg/cm².

- 10 En una realización preferida, la carga de membrana de ADN de la membrana de TFF es de aproximadamente 0,1 a 0,6 mg/cm².

- 15 La velocidad de flujo de alimentación en la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 es de 500 a 1.500 l/h/m², preferiblemente de 600 a 1.200 l/h/m², más preferiblemente de 700 a 1.000 l/h/m² y lo más preferiblemente de 750 a 900 l/h/m².

- 20 En una realización preferida, se usa un casete de membrana de TFF en la etapa A3 para la al menos una etapa de TFF. Sorprendentemente, se encontró que los casetes de membrana de TFF son particularmente adecuados para el método según la presente invención. Los ejemplos de casetes de membrana de TFF son Sartocoon Slice 200 de 100 kDa, PES (Sartorius), Sartocoon Slice 200 de 300 kDa, PES (Sartorius), Omega Centramate T OS300T02, PES de 300 kDa (PALL), Omega Centramate T OS100T02, PES de 100 kDa (PALL) o NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión), de 100 kDa (NovaSep). Otro ejemplo es Sartocoon Slice 200 de 100 kDa, Hydrosart (Sartorius), que es una membrana a base de celulosa estabilizada, es decir una membrana de derivado de celulosa.

- 25 Se prefiere particularmente en este contexto un casete de membrana de TFF que comprende una membrana a base de celulosa o una membrana de filtro a base de PES o mPES con un MWCO de 100 kDa.

- 30 Se prefiere particularmente en este contexto un casete de membrana de TFF que comprende una membrana de filtro a base de mPES con un MWCO de 100 kDa, por ejemplo, un casete de membrana de TFF disponible comercialmente tal como NovaSep mPES con un MWCO de 100 kDa, o un casete de membrana a base de celulosa con un MWCO de 100 kDa, por ejemplo un casete de membrana de TFF disponible comercialmente tal como Hydrosart (Sartorius).

- 35 El uso de casetes de membrana de TFF proporciona las posibilidades de mayores velocidades de flujo de permeado en comparación con el uso de membranas de fibras huecas. Una mayor velocidad de flujo de permeado de la etapa de TFF puede dar como resultado un tiempo de procesamiento más rápido y, por consiguiente, menores costes de producción.

- 40 En una realización preferida de la presente invención, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 proporciona una velocidad de flujo de permeado de al menos 30 l/h/m², 50 l/h/m², 70 l/h/m² o 90 l/h/m², preferiblemente al menos 100 l/h/m², más preferiblemente al menos 110 l/h/m² e incluso más preferiblemente al menos 120 l/h/m². Además, preferiblemente, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 proporciona una velocidad de flujo de permeado de 30 l/h/m² a 100 l/h/m².

- 45 En otra realización preferida, la presión transmembrana (PTM) sobre el casete de membrana de TFF en esta etapa es desde aproximadamente 0,01 (0,1 bar) hasta aproximadamente 0,3 MPa (3 bar) y preferiblemente desde aproximadamente 0,1 (1 bar) hasta aproximadamente 0,2 MPa (2 bar), y lo más preferiblemente es de 0,1 MPa (1 bar). Además, se prefiere un deltaP (dp) de desde aproximadamente 0,05 (0,5 bar) hasta aproximadamente 0,5 MPa (5 bar), y particularmente de aproximadamente 0,1 MPa (1 bar). Los valores para PTM y dp de aproximadamente 0,1 MPa (1 bar) y aproximadamente 0,1 MPa (1 bar), respectivamente, son particularmente preferidos porque en estas condiciones el procedimiento no está impulsado por la capa de la torta.

- 50 En una realización preferida, al menos una o más etapas de TFF en la etapa A3 comprenden el uso de un casete de membrana de TFF que comprende una membrana a base de celulosa o derivado de celulosa. En una realización preferida, las etapas tanto de concentración como de diafiltración de TFF en la etapa A3 comprenden el uso de un casete de membrana de TFF que comprende una membrana a base de celulosa o derivado de celulosa. Es particularmente preferida una membrana Hydrosart (Sartorius) que proporciona altas velocidades de flujo de permeado y, al mismo tiempo, una alta estabilidad en presencia de disolventes orgánicos tales como acetonitrilo.

- 60 En otra realización preferida, al menos una o más etapas de TFF en la etapa A3 comprenden el uso de un casete de membrana de TFF a base de PES o mPES, por ejemplo una membrana a base de PES de Sartorius, más preferiblemente un casete de membrana a base de mPES de NovaSep.

- 65 En aún otra realización preferida, la al menos una o más etapas de TFF en la etapa A3 comprende el uso de una membrana de TFF con un punto de corte de peso molecular de aproximadamente 100 kDa.

En aún otra realización preferida, la al menos una o más etapas de TFF en la etapa A3 comprende el uso de una membrana de TFF con un punto de corte de peso molecular de aproximadamente 300 kDa.

5 Etapa B:

En la etapa B del método según la presente invención, el ADN (molde) puede transcribirse o bien *in vivo* o bien *in vitro* para dar lugar una disolución que comprende ARN.

10 En una realización preferida, el molde de ADN se transcribe *in vitro* para dar lugar una disolución que comprende ARN en un procedimiento denominado transcripción *in vitro* de ARN dependiente de ADN. La transcripción *in vitro* de ARN dependiente de ADN puede realizarse en presencia de una mezcla de transcripción *in vitro* (mezcla de TIV). La mezcla de TIV es una mezcla compleja de varios compuestos de alto y bajo peso molecular (HMWC/LMWC), por ejemplo ADN molde lineal, nucleósidos trifosfato (NTP), proteínas, por ejemplo proteínas de la maquinaria de transcripción y/o enzimas, espermidina y sales.

15 En general, puede producirse ARN "*in vitro*" a partir de un molde de ADN basado en PCR, o un molde de ADN linealizado basado en ADN plasmídico usando ARN polimerasas dependientes de ADN.

20 Se prefiere particularmente transcripción *in vitro* de ARN dependiente de ADN usando un molde de ADN plasmídico linealizado.

25 El ADN molde, preferiblemente el plásmido de ADN molde linealizado se transcribe en ARN usando transcripción *in vitro* de ARN dependiente de ADN. Esta reacción comprende normalmente un tampón de transcripción, nucleótidos trifosfato (NTP), un inhibidor de RNasa y una ARN polimerasa dependiente de ADN. Los NTP pueden seleccionarse de, pero no se limitan a, aquellos descritos en el presente documento incluyendo NTP que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural (modificados). La ARN polimerasa dependiente de ADN puede seleccionarse de, pero no se limita a, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6 y polimerasas mutantes tales como, pero sin limitarse a, polimerasas que pueden incorporar NTP modificados.

30 En realizaciones preferidas, se usan ARN polimerasas dependientes de ADN virales como la ARN polimerasa. Más preferiblemente, se usa una ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago seleccionada del grupo que comprende las polimerasas T3, T7 y/o Sp6 como la ARN polimerasa. Lo más preferiblemente, se usa ARN polimerasa T7 como una enzima para la transcripción *in vitro* de ARN dependiente de ADN.

35 En una realización preferida, pueden usarse 1-1000 Unidades (U de ARN polimerasa dependiente de ADN por μg de molde de ADN). Es incluso más preferido una concentración de 100 U de ARN polimerasa dependiente de ADN por μg de molde de ADN.

40 Durante la polimerización de ARN, el ARN puede ocuparse el extremo 5' de manera cotranscripcional con un análogo de caperuza tal como se define en el presente documento (por ejemplo, N7-MeGpppG).

Como tampón de transcripción, se prefieren los siguientes tampones: Tris 40 mM pH 7,5 o HEPES 80 mM. Se prefiere particularmente HEPES 80 mM.

45 En otra realización preferida, se prefiere tampón Tris-HCl 40 mM pH 7,5.

50 En una realización preferida, se usa una concentración de ADN molde de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se prefiere particularmente una concentración de ADN molde de aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

55 Para la transcripción, se usan nucleótidos trifosfato de la química deseada, incluyendo nucleótidos que se producen de manera natural (por ejemplo, al menos uno de los nucleótidos ATP, CTP, UTP y GTP) y/o nucleótidos modificados, preferiblemente nucleótidos modificados tal como se describe en el presente documento, o cualquier combinación de los mismos.

ATP, CTP, UTP y GTP se usan preferiblemente en una concentración de 0,5-10 mM, preferiblemente en una concentración de 3-5 mM y lo más preferiblemente en una concentración de 4 mM.

60 Los análogos de caperuza útiles incluyen, pero no se limitan a, N7-MeGpppG (=m7G(5')ppp(5')G), m7G(5')ppp(5')A, ARCA (análogo de caperuza antiinverso), ARCA modificada (por ejemplo, ARCA modificada con fosfotioato), inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina. Si se usa CAP en 5' (análogo de caperuza), la concentración de GTP se disminuye en comparación con los otros nucleótidos usados. Preferiblemente, se usa del 10 al 50% de GTP en comparación con la concentración de ATP, CTP y UTP. Lo más preferiblemente, se usa el 20-30% de GTP.

65

Además, el análogo de caperuza se usa preferiblemente en una concentración que es al menos la misma que la concentración de ATP, CTP y UTP.

5 La razón de análogo de caperuza:nucleótido, y preferiblemente de análogo de caperuza:GTP, puede variarse desde 10:1 hasta 1:1 para equilibrar el porcentaje de productos ocupados en los extremos con la eficacia de la reacción de transcripción, preferiblemente se usa una razón de análogo de caperuza:GTP de 4:1-5:1. En este contexto, se prefiere particularmente usar análogo de caperuza 5,8 mM y GTP 1,45 mM si ATP, UTP y CTP se usan en una concentración de 4 mM.

10 Puede añadirse opcionalmente $MgCl_2$ a la reacción de transcripción. Se prefiere una concentración de 1-100 mM. Se prefiere particularmente una concentración de 5-30 mM, y lo más preferiblemente se usa $MgCl_2$ 24 mM.

15 Puede añadirse opcionalmente ditioneitol (DTT) a la reacción de transcripción, preferiblemente a una concentración de 1-100mM, más preferiblemente 10-100 mM, y lo más preferiblemente 40 mM.

Puede añadirse opcionalmente un inhibidor de RNasa a la reacción de transcripción, preferiblemente 0,1-1 U/ μ l, lo más preferiblemente 0,2 U/ μ l.

20 Puede añadirse opcionalmente pirofosfatasa de *E. coli* a la reacción de transcripción, preferiblemente en una concentración de 1-10 U/ μ g de ADN molde, y más preferiblemente en una concentración de 5 U/ μ g de ADN molde. Esto garantiza que el magnesio, que es esencial para la transcripción, se mantenga en disolución y no precipite como pirofosfato de magnesio.

25 Puede usarse opcionalmente albúmina sérica bovina (BSA) en la reacción de transcripción, preferiblemente en una concentración de 1-1000 μ g/ml, más preferiblemente en una concentración de 100 μ g/ml. Lo más preferiblemente, BSA no está presente en la reacción de transcripción.

30 En una realización particularmente preferida, la mezcla de TIV comprende aminas alifáticas policatiónicas, preferiblemente espermidina. Las aminas alifáticas policatiónicas pueden interactuar con los ácidos nucleicos cargados negativamente. Se sabe que la presencia de la amina alifática policatiónica, preferiblemente espermidina, ayuda en el procedimiento de transcripción *in vitro* de ARN. Sin embargo, tiene que agotarse la espermidina residual de la disolución de ARN, particularmente si el ARN se usa con fines terapéuticos.

35 Por tanto, en vista de lo anterior, existe la necesidad de retirar la espermidina de la disolución de RNA transcrito *in vitro* en las etapas de purificación posteriores.

40 En una realización preferida, la mezcla de TIV comprende desde aproximadamente 0,1 mM hasta aproximadamente 10 mM de espermidina, preferiblemente desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 5 mM, y lo más preferiblemente aproximadamente 2 mM de espermidina.

En una realización particularmente preferida, la reacción de transcripción *in vitro* de ARN comprende los siguientes componentes:

45 1 μ g de ADN plasmídico linealizado,

ATP, CTP y UTP 4 mM,

GTP 1,45 mM,

50 análogo de CAP 5,8 mM,

HEPES 80 mM,

55 $MgCl_2$ 24 mM,

espermidina 2 mM,

DTT 40 mM,

60 5 U de pirofosfatasa,

4 U de inhibidor de RNasa, y

65 100 U de ARN polimerasa T7.

La reacción de transcripción *in vitro* puede incubarse a 37°C, preferiblemente durante al menos 4 horas.

En otra realización particularmente preferida, la transcripción *in vitro* de ARN para reacciones a gran escala comprende los siguientes componentes:

- 5 25 mg de ADN plasmídico linealizado,
 ATP, CTP y UTP 20 mM,
 10 GTP 7,25 mM,
 análogo de CAP 29 mM,
 HEPES 80 mM,
 15 MgCl₂ 24 mM,
 espermidina 2 mM,
 20 DTT 40 mM, y
 las enzimas pirofosfatasa (5 U por µg de ADN), inhibidor de RNasa (0,2 U/µl) y ARN polimerasa T7 (100 U por µg de ADN).

25 La reacción de transcripción *in vitro* de ARN puede incubarse a 37°C, preferiblemente durante al menos 4 horas.

Después de la transcripción *in vitro* de ARN del ADN, el ARN transcrito está presente en una disolución. La disolución comprende normalmente componentes de la mezcla de TIV, que normalmente todavía comprende proteínas tales como polimerasa y otras enzimas, BSA, HEPES, pirofosfatasa, etc., nucleótidos, sales y espermidina.

Etapa C:

35 La etapa C según la presente invención comprende acondicionamiento y/o purificación de la disolución que comprende ARN transcrito mediante una o más etapas de TFF, en la que la al menos una o más etapas de TFF comprende usar un casete de membrana de TFF. La al menos una etapa de TFF puede comprender al menos una etapa de diafiltración y/o al menos una etapa de concentración. Las etapas de diafiltración y concentración pueden realizarse por separado, pero también pueden solaparse al menos parcialmente. La al menos una o más etapas de TFF puede retirar eficazmente contaminantes, tales como HMWC y LMWC, por ejemplo fragmentos de ARN; fragmentos de ADN, proteínas, disolventes orgánicos, nucleósidos trifosfato, espermidina y componentes de tampón tales como sales y detergentes. Por tanto, el uso de TFF puede reducir o suprimir la necesidad de purificar el ARN por medio de extracción con disolventes orgánicos tal como extracción con fenol/cloroformo y/o precipitación con alcohol de ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, por ejemplo mediante precipitación con alto contenido de sales/alcohol tal como precipitación con NaCl/isopropanol. Además, se encontró que, sorprendentemente, el uso de TFF no afecta negativamente a la estabilidad del ARN, por ejemplo debido a la tensión de cizallamiento durante el bombeo.

50 Por tanto, en una realización preferida, el método según la presente invención no comprende una etapa de extracción con fenol/cloroformo y/o precipitación de ADN y/o ARN. Es una ventaja del método según la presente invención que el ARN purificado puede proporcionar una estabilidad de almacenamiento aumentada después de al menos una etapa de TFF en comparación, por ejemplo, con la estabilidad de almacenamiento del ARN en la mezcla de TIV.

55 Además, el método según la presente invención no comprende la adición de un agente de desnaturalización de proteínas tal como urea, tiocianato de guanidinio, KCl, dodecilsulfato de sodio, sarcosilo u otros detergentes en la mezcla de reacción de transcripción *in vitro* de ARN, antes de someterse a filtración de flujo tangencial.

60 En una realización preferida, la al menos una etapa de TFF en la etapa C comprende al menos una etapa de diafiltración.

La etapa de TFF en la etapa C2 es preferiblemente una etapa de diafiltración que se realiza preferiblemente con agua.

65 En una realización preferida, la al menos una etapa de TFF en la etapa C2 se realiza usando desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 volúmenes de diafiltración (VD) de disolución o tampón de diafiltración, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 VD de disolución o tampón de

diafiltración y más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 12 VD de disolución o tampón de diafiltración, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 VD de disolución o tampón de diafiltración. En una realización particularmente preferida, la al menos una etapa de TFF se realiza usando aproximadamente 10 VD de disolución o tampón de diafiltración.

5 En una realización preferida, la etapa de diafiltración se realiza con agua o una disolución acuosa de sal como disolución o tampón de diafiltración. En una realización preferida, la sal de la disolución acuosa de sal puede comprender haluros de metales alcalinos tales como NaCl, LiCl o KCl; sales orgánicas tales como NaOAc, haluros de metales alcalinotérreos tales como CaCl₂; fosfatos de metales alcalinos tales como Na₃PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄; o combinaciones de los mismos.

10 En una realización preferida, la sal de la disolución acuosa de sal comprende haluros de metales alcalinos tales como NaCl, LiCl o KCl; haluros de metales alcalinotérreos tales como CaCl₂, o combinaciones de los mismos.

15 En una realización más preferida, la disolución acuosa de sal comprende desde aproximadamente 0,1 M de haluro de metal alcalino hasta aproximadamente 1 M de haluro de metal alcalino, más preferiblemente desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,5 M de haluro de metal alcalino. Concentraciones mayores del intervalo preferido pueden conducir a la precipitación de ARN y, por consiguiente, el bloqueo de la membrana de TFF.

20 En otra realización preferida, la disolución acuosa de sal comprende NaCl. En una realización más preferida, la disolución acuosa de sal comprende desde aproximadamente 0,1 M de NaCl hasta aproximadamente 1 M de NaCl, más preferiblemente desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,5 M de NaCl.

25 En otra realización preferida, la disolución de diafiltración no comprende sales de tamponamiento.

En otra realización preferida, la disolución de diafiltración es agua, preferiblemente agua destilada y estéril, más preferiblemente agua para inyección.

30 En una realización preferida, la al menos una etapa de TFF se realiza usando desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 volúmenes de diafiltración (VD) de disolución o tampón de diafiltración, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 VD de disolución o tampón de diafiltración y más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 12 VD de disolución o tampón de diafiltración, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 VD de disolución o tampón de diafiltración.

35 En una realización particularmente preferida, la al menos una etapa de TFF se realiza usando aproximadamente 10 VD de disolución o tampón de diafiltración.

Todas las etapas de TFF en la etapa C pueden llevarse a cabo usando cualquier membrana de filtro adecuada. Por ejemplo, la TFF puede llevarse a cabo usando una membrana de fibras huecas de TFF o un casete de membrana de TFF. Se prefiere el uso de un casete de membrana de TFF. El punto de corte de peso molecular de la membrana de filtro puede seleccionarse dependiendo del tamaño de las moléculas de ARN deseadas producidas. Cuanto mayor sea la molécula de ARN de interés, mayor será el punto de corte de peso molecular de la membrana que puede seleccionarse, respectivamente. En una realización preferida, el punto de corte de peso molecular de la membrana de filtro es ≤ 500 kDa, más preferiblemente ≤ 200 kDa y lo más preferiblemente ≤ 100 kDa. La membrana de filtro puede comprender cualquier material de filtro adecuado, por ejemplo poli(éter sulfona) (PES), poli(éter sulfona) modificada (mPES), polisulfona (PS), polisulfona modificada (mPS), materiales cerámicos, polipropileno (PP), celulosa, celulosa regenerada o un derivado de celulosa, por ejemplo acetato de celulosa, o combinaciones de los mismos. Se prefiere particularmente en este contexto una membrana a base de celulosa (celulosa, celulosa regenerada o un derivado de celulosa), una membrana de filtro a base de PES o mPES, particularmente con un MWCO de 100 kDa.

40 En una realización preferida, la carga de membrana de ARN de la membrana de TFF es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/cm² y preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 mg/cm².

55 En una realización particularmente preferida, la carga de membrana de ARN de la membrana de TFF en la etapa C2 es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 6,5 mg/cm².

60 La velocidad de flujo de alimentación en la al menos una etapa de TFF en la etapa C2 es de 100 a 1.500 l/h/m², preferiblemente de 150 a 1.300 l/h/m², más preferiblemente de 200 a 1.100 l/h/m² y lo más preferiblemente de 300 a 1.050 l/h/m².

65 En una realización preferida, se usa un casete de membrana de TFF. Sorprendentemente, se encontró que los casetes de membrana de TFF son particularmente adecuados para el método según la presente invención. Los ejemplos de casetes de membrana de TFF son Sartocoon Slice 200 de 100 kDa, PES (Sartorius), Sartocoon Slice 200 de 300 kDa, PES (Sartorius), Omega Centramate T OS300T02, PES de 300 kDa (PALL), Omega Centramate T OS100T02, PES de 100 kDa (PALL) o NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión), 100 kDa (NovaSep). Otro

ejemplo es Sartocoon Slice 200 de 100 kDa, Hydrosart (Sartorius), que es una membrana a base de celulosa estabilizada, es decir una membrana de derivado de celulosa.

- 5 Se prefiere particularmente en este contexto un casete de membrana de TFF que comprende una membrana de filtro a base de mPES con un MWCO de 100 kDa, por ejemplo, un casete de membrana de TFF disponible comercialmente tal como NovaSep mPES con un MWCO de 100 kDa, o un casete de membrana a base de celulosa con un MWCO de 100 kDa, por ejemplo un casete de membrana de TFF disponible comercialmente tal como Hydrosart (Sartorius).
- 10 El uso de casetes de membrana de TFF proporciona las posibilidades de mayores velocidades de flujo de permeado en comparación con el uso de membranas de fibras huecas. Una mayor velocidad de flujo de permeado de la etapa de TFF puede dar como resultado una mayor concentración del retenido y, por tanto, un producto de ARN más concentrado y un tiempo de procesamiento más rápido y, por consiguiente, menores costes de producción.
- 15 En una realización preferida de la presente invención, la al menos una etapa de TFF en la etapa C2 proporciona una velocidad de flujo de permeado de al menos 20 l/h/m², 40 l/h/m², 60 l/h/m², 80 l/h/m² o 90 l/h/m², preferiblemente al menos 100 l/h/m², más preferiblemente al menos 110 l/h/m² e incluso más preferiblemente al menos 120 l/h/m². Además, preferiblemente, la al menos una etapa de TFF en la etapa A3 proporciona una velocidad de flujo de permeado de 20 l/h/m² a 100 l/h/m².
- 20 En otra realización preferida, la presión transmembrana (PTM) sobre el casete de membrana de TFF en la etapa C2 es desde aproximadamente 0,01 (0,1 bar) hasta aproximadamente 0,3 MPa (3 bar) y preferiblemente desde aproximadamente 0,05 (0,5 bar) hasta aproximadamente 0,2 MPa (2 bar), y lo más preferiblemente desde aproximadamente 0,075 (0,75 bar) hasta aproximadamente 0,15 MPa (1,5 bar) o desde aproximadamente 0,1 MPa (1 bar) hasta aproximadamente 0,15 MPa (1,5 bar). Además, se prefiere un deltaP (dp) de desde aproximadamente 0,05 (0,5 bar) hasta aproximadamente 0,5 MPa (5 bar), más preferiblemente de desde aproximadamente 0,05 (0,5 bar) hasta aproximadamente 0,1 MPa (1 bar) y particularmente de aproximadamente 0,1 MPa (1 bar). Los valores para PTM y dp de aproximadamente 0,15 MPa (1,5 bar) y aproximadamente 0,1 MPa (1 bar), respectivamente, son particularmente preferidos porque en estas condiciones el procedimiento no está impulsado por la capa de la torta.
- 25 En una realización preferida, los valores para PTM son de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,15 y para dp son de aproximadamente 0,1 MPa.
- 30 En una realización preferida, al menos una o más etapas de TFF comprenden el uso de un casete de membrana de TFF que comprende una membrana a base de celulosa. Se prefiere particularmente una membrana Hydrosart (Sartorius) y una membrana NovaSep que proporcionan altas velocidades de flujo de permeado y, al mismo tiempo, una alta estabilidad en presencia de disolventes orgánicos tales como acetonitrilo.
- 35 En otra realización preferida, al menos una o más etapas de TFF comprenden el uso de un casete de membrana de TFF a base de PES o mPES, por ejemplo un casete de membrana a base de PES, más preferiblemente un casete de membrana a base de mPES de NovaSep.
- 40 En aún otra realización preferida, la al menos una o más etapas de TFF comprende el uso de una membrana de TFF con un punto de corte de peso molecular de aproximadamente 100 kDa.
- 45 En aún otra realización preferida, la al menos una o más etapas de TFF comprende el uso de una membrana de TFF con un punto de corte de peso molecular de aproximadamente 50 kDa.
- 50 En una realización del método de la invención, se usa el mismo casete de membrana de TFF para más de una o incluso todas las etapas de TFF. El uso de la misma membrana de TFF para más de una etapa de TFF es particularmente ventajoso porque reduce la cantidad de residuos desechables, los costes y el tiempo del método de producción de ARN de la invención.
- 55 En una realización preferida, el método según la presente invención no comprende el uso de una membrana de fibras huecas de TFF en ninguna de las etapas de TFF.
- 60 La etapa C) del método de la invención comprende al menos un método de purificación adicional C3 antes y después de una o más etapas de TFF. En una realización preferida, el método de purificación adicional se realiza después de una primera etapa de TFF C2 y antes de una segunda etapa de TFF C4. Según la divulgación, el al menos un método de purificación adicional se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, absorbedores de membrana, cromatografía de fase inversa, cromatografía de fase normal, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en modo mixto, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxiapatita (HA), o combinaciones de los mismos. En otra realización, el al menos un método de purificación adicional no comprende ninguna de cromatografía de hidroxiapatita y cromatografía de flujo continuo de perlas de núcleo.
- 65

Según la invención, el al menos un método de purificación adicional se realiza antes de al menos una etapa de TFF.

5 Según la divulgación, el al menos un método de purificación adicional se realiza por medio de métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de líquidos a presión de baja a normal. Según la invención, el al menos un método de purificación adicional se realiza por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

10 Según la divulgación, el al menos un método de purificación adicional es un método de cromatografía de fase inversa, preferiblemente un método de HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Según la invención, el al menos un método de purificación adicional es un método de HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Preferiblemente, la cromatografía de fase inversa comprende el uso de una fase inversa porosa como fase estacionaria.

15 En una realización preferida del método según la invención, el material de fase inversa porosa se proporciona con un tamaño de partícula de 8,0 μm a 50 μm , en particular de 8,0 a 30 μm , todavía más preferiblemente aproximadamente 30 μm . El material de fase inversa puede estar presente en forma de pequeñas esferas. El método según la invención puede realizarse particularmente de manera favorable con una fase inversa porosa con este tamaño de partícula, opcionalmente en forma de perlas, en el que se obtiene resultados de separación particularmente buenos.

20 En otra realización preferida, la fase inversa usada en el método según la invención puede ser porosa y puede tener tamaños de partícula específicos. Para fases inversas estacionarias que no son porosas y, por tanto, difieren por completo en cuanto al tamaño de partícula del contenido de la presente invención, tal como se describe, por ejemplo, por A. Azarani y K.H. Hecker (Nucleic Acids Research, vol. 29, n.º 2 e7), por otro lado, se desarrollan presiones excesivamente altas, de tal manera que es posible la purificación preparativa del ARN sólo con gran dificultad, si acaso.

25 En una realización preferida del método según la invención, la fase inversa tiene un tamaño de poro de 1000 Å a 5000 Å, en particular un tamaño de poro de 1000 Å a 4000 Å, más preferiblemente de 1500 Å a 4000 Å, de 2000 Å a 4000 Å o de 2500 Å a 4000 Å. Se prefieren particularmente tamaños de poro para las fases inversas de 1000 Å a 2000 Å, más preferiblemente de 1000 Å a 1500 Å y lo más preferiblemente de 1000 Å a 1200 Å o de 3500-4500 Å. Se prefiere más un tamaño de poro de 4000 Å. Para una fase inversa que tiene estos tamaños de poro, se logran resultados particularmente buenos en cuanto a purificación del ARN usando el método según la invención, por tanto, se evitan en particular las presiones elevadas desarrolladas en el método según A. Azarani y K.H. Hecker, mediante lo cual se hace posible la separación preparativa de una manera particularmente favorable. A tamaños de poro por debajo de 1000 Å, la separación de moléculas de ARN se empeora.

30 Un tamaño de poro de 1000 Å a 5000 Å, en particular un tamaño de poro de 1000 Å a 4000 Å, más preferiblemente de 1500 Å a 4000 Å, de 2000 Å a 4000 Å o de 2500 Å a 4000 Å puede ser adecuado para separar un ARN de otros componentes de una mezcla, teniendo el ARN un tamaño tal como se mencionó anteriormente de hasta aproximadamente 15000 nucleótidos (como molécula de ARN monocatenario) o pares de bases (como molécula de ARN bicatenario), en particular de 100 a 10000, más preferiblemente de 500 a 10000 nucleótidos o pares de bases, incluso más preferiblemente de 800 a 5000 nucleótidos o pares de bases e incluso más preferiblemente de 800 a 2000 nucleótidos o pares de bases. Sin embargo, el tamaño de poro de la fase inversa también puede seleccionarse dependiendo del tamaño del ARN que va a separarse, es decir puede seleccionarse un tamaño de poro más grande si van a separarse moléculas de ARN más grandes y pueden seleccionarse tamaños de poro más pequeños si pueden seleccionarse moléculas de ARN más pequeñas. Esto es debido al efecto de que la retención de las moléculas de ARN y la separación no sólo dependen de la interacción de la fase (inversa) sino también de la posibilidad de que las moléculas se introduzcan dentro de los poros de la matriz y, por tanto, se proporcione un efecto de retención adicional. Sin limitarse a ello, por ejemplo, puede usarse, por tanto, un tamaño de poro para la fase inversa de aproximadamente 2000 Å a aproximadamente 5000 Å, más preferiblemente de aproximadamente 2500 a aproximadamente 4000, lo más preferiblemente de aproximadamente 3500 a aproximadamente 4500 Å, para separar moléculas de ARN más grandes, por ejemplo moléculas de ARN de 100 a 10000, más preferiblemente de 500 a 10000 nucleótidos o pares de bases, incluso más preferiblemente de 800 a 5000 nucleótidos o pares de bases e incluso más preferiblemente de 800 a 2000 nucleótidos o pares de bases. Alternativamente, sin limitarse a ello, puede usarse un tamaño de poro para las fases inversas de aproximadamente 1000 Å a aproximadamente 2500 Å, más preferiblemente de aproximadamente 1000 Å a aproximadamente 2000 Å y lo más preferiblemente de aproximadamente 1000 Å a 1200 Å para separar moléculas de ARN más pequeñas, por ejemplo también pueden separarse de esta manera moléculas de ARN de aproximadamente 30-1000, 50-1000 ó 100-1000, o de 20-200, 20-100, 20-50 ó 20-30 nucleótidos.

65 En general, cualquier material conocido que va a usarse como fase estacionaria de fase inversa, en particular cualquier material polimérico, puede usarse para el método de la invención, si puede proporcionarse ese material en forma porosa. La fase estacionaria puede estar compuesta por material orgánico y/o inorgánico. Los ejemplos de polímeros que van a usarse para la presente invención son poliestirenos (no alquilados), poliestirenodivinilbencenos (no alquilados), materiales monolíticos, gel de sílice, gel de sílice modificada con residuos apolares, particularmente

gel de sílice modificada con residuos que contienen alquilo, más preferiblemente con residuos que contienen butilo, octilo y/u octadecilo, gel de sílice modificada con residuos fenílicos, polimetacrilatos, etc., u otros materiales adecuados, por ejemplo para cromatografía en gel u otros métodos cromatográficos tal como se mencionó anteriormente, tal como dextrano, incluyendo por ejemplo materiales de Sephadex® y Sephacryl®, agarosa, mezclas de dextrano/agarosa, poli(acrilamida), etc.

En una realización particularmente preferida, el material para la fase inversa es un polímero de poliestireno poroso, un polímero de poliestirenodivinilbenceno (poroso) (no alquilado), gel de sílice porosa, gel de sílice porosa modificada con residuos apolares, particularmente gel de sílice porosa modificada con residuos que contiene alquilo, más preferiblemente con residuos que contienen butilo, octilo y/u octadecilo, gel de sílice porosa modificada con residuos fenílicos, polimetacrilatos porosos, en el que, en particular, puede usarse un polímero de poliestireno poroso o un poliestirenodivinilbenceno (poroso) no alquilado. Las fases estacionarias con poliestirenodivinilbenceno se conocen *per se*. Pueden usarse poliestirenodivinilbencenos conocidos *per se* ya usados para métodos de HPLC, que pueden obtenerse comercialmente, para el método según la invención.

Un poliestirenodivinilbenceno poroso no alquilado que es particularmente muy preferido para el método según la invención es uno que, sin limitarse al mismo, puede tener, en particular, un tamaño de partícula de $8,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$, en particular $8,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$, y un tamaño de poro de 1000-1500 Å, en particular 1000-1200 Å o 3500-4500 Å, y lo más preferiblemente un tamaño de partícula de 4000 Å. Con este material para las fases inversas, pueden lograrse las ventajas descritas anteriormente del método según la invención de una manera particularmente favorable.

Esta fase estacionaria descrita con más detalle anteriormente se ubica convencionalmente en una columna. Se usa convencionalmente acero V2A como material para la columna, pero también pueden usarse otros materiales para la columna siempre que sean adecuados para las condiciones prevalentes durante la HPLC. Convencionalmente, la columna es recta. Es favorable que la columna de HPLC tenga una longitud de 5 cm a 100 cm y un diámetro de 4 mm a 50 cm. Las columnas usadas para el método según la invención pueden tener, en particular, las siguientes dimensiones: 25 cm de longitud y 20 mm de diámetro o 25 cm de longitud y 50 mm de diámetro, o 25 cm de longitud y 10 cm de diámetro o cualquier otra dimensión con respecto a longitud y diámetro, siempre que sean adecuadas para la recuperación preparativa de ARN, siendo factible incluso longitudes de varios metros y también diámetros más grandes en caso de aumento de escala. En este caso, las dimensiones están orientadas hacia lo que es técnicamente posible con cromatografía de líquidos.

La selección de la fase móvil depende del tipo de separación deseada. Esto significa que la fase móvil establecida para una separación específica, tal como puede conocerse, por ejemplo, a partir de la técnica anterior, no puede aplicarse directamente a un problema de separación diferente con una perspectiva de éxito suficiente. Para cada problema de separación, las condiciones de elución ideales, en particular la fase móvil usada, han de determinarse mediante pruebas empíricas.

En una realización preferida del método de HPLC según la invención, se usa una mezcla de un disolvente acuoso y un disolvente orgánico como fase móvil para la elución del ARN. Es favorable usar un tampón como el disolvente acuoso que tiene, en particular, un pH de 6,0-8,0, por ejemplo de aproximadamente 7, por ejemplo 7,0; preferiblemente el tampón es acetato de trietilamonio (TEAA), en particular, preferiblemente un tampón de TEAA de 0,02 M a 0,5 M, en particular de 0,08 M a 0,12 M, muy particularmente de aproximadamente 0,1 M, que, tal como se describió anteriormente, también actúa como contraión para el ARN en el método del emparejamiento de iones.

En una realización preferida, el disolvente orgánico que se usa en la fase móvil comprende acetonitrilo, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol y acetona, o una mezcla de los mismos, muy en particular, preferiblemente acetonitrilo. Para estos disolventes orgánicos, en particular acetonitrilo, la purificación del ARN tiene lugar de una manera particularmente favorable con el método según la invención.

En una realización particularmente preferida del método según la invención, la fase móvil es una mezcla de acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7, y acetonitrilo.

Se ha demostrado que es particularmente favorable para el método según la invención que la fase móvil contenga del 5,0% en vol. al 25,0% en vol. de disolvente orgánico, en relación con la fase móvil, y que esto se enrase hasta el 100% en vol. con el disolvente acuoso. Normalmente, en el caso de separación por gradiente, se aumenta la proporción de disolvente orgánico, en particular en al menos el 10%, más preferiblemente en al menos el 50% y lo más preferiblemente en al menos el 100%, opcionalmente en al menos el 200%, en relación con el % en vol. inicial en la fase móvil. En una realización preferida, en el método según la invención, la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil asciende en el transcurso de la separación mediante HPLC hasta desde 3 hasta 9, preferiblemente desde 4 hasta 7,5, en particular el 5,0% en vol., en cada caso en relación con la fase móvil. Más preferiblemente, la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil se aumenta en el transcurso de la separación mediante HPLC desde 3 hasta 9, en particular del 5,0% en vol. hasta el 20,0% en vol., en cada caso en relación con la fase móvil. Todavía más preferiblemente, el método se realiza de tal manera que la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil se aumenta en el transcurso de la separación mediante HPLC desde 6,5 hasta 8,5, en particular del 7,5% en vol., hasta el 17,5% en vol., en cada caso en relación con la fase móvil.

Se ha demostrado que es incluso más particularmente favorable para el método según la invención que la fase móvil contenga del 7,5% en vol. al 17,5% en vol. de disolvente orgánico, en relación con la fase móvil, y que esto se enrase hasta el 100% en vol. con el disolvente acuoso tamponado.

5 En el caso del método según la invención, la elución puede tener lugar de manera isocrática o por medio de separación por gradiente. En la separación isocrática, la elución del ARN tiene lugar con un solo eluyente o una mezcla constante de una pluralidad de eluyentes, en la que pueden usarse como eluyente los disolventes descritos anteriormente con detalle.

10 En una realización preferida del método según la invención, se realiza separación por gradiente. A este respecto, la composición del eluyente se varía por medio de un programa de gradientes. El equipo necesario para la separación por gradiente se conoce por el experto en la técnica. En este caso, la elución por gradiente puede tener lugar o bien en el lado de baja presión mediante cámaras de mezclado o bien en el lado de alta presión mediante bombas adicionales.

15 Preferiblemente, en el método según la invención, la proporción de disolvente orgánico, tal como se describió anteriormente, se aumenta en relación con el disolvente acuoso durante la separación por gradiente. Los agentes descritos anteriormente pueden usarse en este caso como disolvente acuoso y, del mismo modo, los agentes descritos anteriormente pueden usarse como disolvente orgánico.

20 Por ejemplo, la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil puede aumentarse en el transcurso de la separación mediante HPLC desde el 5,0% en vol. hasta el 20,0% en vol., en cada caso en relación con la fase móvil. En particular, la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil puede aumentarse en el transcurso de la separación mediante HPLC desde el 7,5% en vol. hasta el 17,5% en vol., en particular desde el 9,5 hasta el 14,5% en vol., en cada caso en relación con la fase móvil.

25 El siguiente programa de gradientes ha demostrado ser particularmente favorable para la purificación de ARN con el método según la invención:

30 Eluyente A: acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7

Eluyente B: acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7, con el 25% en vol. de acetonitrilo

35 Composición del eluyente:

inicio: el 62% de A y el 38% de B (del 1° al 3° minuto)

40 aumento hasta el 58% de B (aumento del 1,67% de B por minuto), (3°-15° minuto)

el 100% de B (del 15° al 20° minuto)

Otro ejemplo de un programa de gradientes se describe a continuación, usándose el mismo eluyente A y B:

45 Composición del eluyente:

- nivel inicial: el 62% de A y el 38% de B (1°-3° min)
- intervalo de separación I: gradiente del 38%-49,5% de B (aumento del 5,75% de B/min) (3°-5° min)
- intervalo de separación II: gradiente del 49,5%-57% de B (aumento del 0,83% de B/min) (5°-14° min)
- intervalo de enjuague: el 100% de B (15°-20° min)

55 La velocidad de flujo del eluyente se selecciona de tal manera para que tenga lugar una buena separación del ARN de los otros constituyentes contenidos en la muestra que va a investigarse. La velocidad de flujo del eluyente seleccionada para el método según la invención puede ascender hasta desde 1 ml/min hasta varios litros por minuto (en el caso de aumento de escala), en particular de aproximadamente 1 a 1000 ml/min, más preferiblemente de 5 ml a 500 ml/min, incluso más preferiblemente más de 100 ml/min, dependiendo del tipo y el alcance del aumento de escala. Esta velocidad de flujo puede establecerse y regularse mediante la bomba.

60 La detección tiene lugar de manera favorable con un detector de UV a 254 nm, en la que puede realizarse una medición de referencia a 600 nm. Sin embargo, puede usarse alternativamente cualquier otro método de detección, con el que puede detectarse el ARN descrito anteriormente con más detalle de una manera satisfactoria y fiable.

65

En realizaciones preferidas, la RP-HPLC se realiza tal como se describe en el documento WO 2008/077592.

5 Tal como se describió anteriormente, el uso de métodos de cromatografía de fase inversa requiere normalmente el uso de disolventes orgánicos tales como acetonitrilo (ACN), metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, ácido trifluoroacético (TFA), trifluoroetanol (TFE), o combinaciones de los mismos. Sin embargo, puede ser necesario eliminar posteriormente estos disolventes orgánicos del conjunto que contiene ARN. Además, otros contaminantes derivados de etapas de producción o purificación anteriores, tales como espermidina, todavía pueden estar presentes en el conjunto que contiene ARN después de la RP-HPLC y deben retirarse.

10 Según la invención, al menos una etapa de TFF en la etapa C se realiza después de realizar el al menos un método de purificación adicional. Esta al menos una etapa de TFF después del al menos un método de purificación puede comprender al menos una primera etapa de diafiltración. Preferiblemente, la primera etapa de diafiltración se realiza con una disolución acuosa de sal como disolución de diafiltración. En una realización preferida, la sal de la disolución acuosa de sal puede comprender haluros de metales alcalinos tales como NaCl, LiCl o KCl; sales orgánicas tales como NaOAc, haluros de metales alcalinotérreos tales como CaCl₂; fosfatos de metales alcalinos tales como Na₃PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄; o combinaciones de los mismos. En una realización preferida, la sal de la disolución acuosa de sal puede comprender haluros de metales alcalinos tales como NaCl, LiCl o KCl; haluros de metales alcalinotérreos tales como CaCl₂. En una realización más preferida, la disolución acuosa de sal comprende desde aproximadamente 0,1 M de haluro de metal alcalino hasta aproximadamente 1 M de haluro de metal alcalino, más preferiblemente desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,5 M de haluro de metal alcalino. En otra realización preferida, la disolución acuosa de sal comprende NaCl. En una realización más preferida, la disolución acuosa de sal comprende de aproximadamente 0,1 M de NaCl a aproximadamente 1 M de NaCl, más preferiblemente desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,5 M de NaCl. En una realización particularmente preferida, la disolución acuosa de sal comprende 0,2 M de NaCl. En otra realización preferida, la disolución acuosa de sal no comprende sales de tamponamiento. La presencia de la sal puede ser ventajosa para retirar la espermidina contaminante del conjunto de ARN. En una realización preferida, la primera etapa de diafiltración se realiza usando desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 VD de disolución de diafiltración, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 VD de disolución de diafiltración y más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 12 VD de disolución de diafiltración, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración. En una realización particularmente preferida, la primera etapa de diafiltración se realiza usando aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración.

35 En una realización preferida, la carga de membrana de ARN en la al menos una etapa de membrana de TFF (después del al menos un método de purificación) es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/cm² y preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 mg/cm².

40 En una realización particularmente preferida, la carga de membrana de ARN de la membrana de TFF es de aproximadamente 2 mg/cm² a aproximadamente 2,5 mg/cm².

En una realización preferida de la presente invención, la al menos una etapa de TFF (después del al menos un método de purificación) proporciona una velocidad de flujo de alimentación de 500 a 2.000 l/h/m², preferiblemente de 600 a 1.800 l/h/m², más preferiblemente de 700 a 1.600 l/h/m² y lo más preferiblemente de 900 a 1.500 l/h/m².

45 En una realización preferida de la presente invención, la al menos una etapa de TFF (después del al menos un método de purificación) proporciona una velocidad de flujo de permeado de al menos 20 l/h/m², preferiblemente al menos 50 l/h/m², más preferiblemente al menos 100 l/h/m² e incluso más preferiblemente al menos 150 l/h/m².

50 En una realización preferida de la presente invención, la al menos una etapa de TFF (después del al menos un método de purificación) proporciona una velocidad de flujo de permeado de aproximadamente 25 l/h/m² a aproximadamente 140 l/h/m².

55 En otra realización preferida, la presión transmembrana (PTM) sobre el casete de membrana de TFF en la al menos una etapa de TFF (después del al menos un método de purificación) es de desde aproximadamente 0,01 (0,1 bar) hasta aproximadamente 0,3 MPa (3 bar) y preferiblemente desde aproximadamente 0,05 (0,5 bar) hasta aproximadamente 0,2 MPa (2 bar), y lo más preferiblemente desde aproximadamente 0,075 (0,75 bar) hasta aproximadamente 0,15 MPa (1,5 bar). Además, se prefiere un deltaP (dp) de desde aproximadamente 0,05 (0,5 bar) hasta aproximadamente 0,5 MPa (5 bar), más preferiblemente de desde aproximadamente 0,05 (0,5 bar) hasta aproximadamente 0,1 MPa (1 bar) y particularmente de aproximadamente 0,1 MPa (1 bar). Los valores para PTM y dp de aproximadamente 0,15 MPa (1,5 bar) y aproximadamente 0,1 MPa (1 bar), respectivamente, son particularmente preferidos porque en estas condiciones el procedimiento no está impulsado por la capa de la torta.

65 En una realización preferida, los valores para PTM son de desde aproximadamente 0,1 (1 bar) hasta aproximadamente 0,15 (1,5 bar) y para dp son de aproximadamente 0,1 MPa (1 bar).

En otra realización preferida, la al menos una etapa de TFF después del al menos un método de purificación

adicional comprende al menos una etapa de concentración del ARN, que se realiza preferiblemente antes de la primera etapa de diafiltración descrita anteriormente. En una realización preferida, el conjunto de ARN resultante del al menos un método de purificación adicional se concentra hasta una concentración de desde aproximadamente 0,1 g/l hasta aproximadamente 10 g/l, preferiblemente hasta una concentración de desde aproximadamente 1 g/l hasta aproximadamente 10 g/l y más preferiblemente hasta una concentración de desde aproximadamente 2 g/l hasta aproximadamente 5 g/l. En una realización particularmente preferida, el conjunto de ARN resultante del al menos un método de purificación adicional se concentra hasta una concentración de desde aproximadamente 0,1 g/l hasta aproximadamente 5 g/l. La concentración de ARN mediante TFF puede reducir el tiempo global del procedimiento.

En aún otra realización preferida, la primera etapa de diafiltración después del al menos un método de purificación se sigue por una segunda etapa de diafiltración usando TFF. En una realización incluso más preferida, la segunda etapa de diafiltración se realiza usando agua como disolución de diafiltración. En una realización preferida, la primera etapa de diafiltración se realiza usando desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 VD de disolución de diafiltración y más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 12 VD de disolución de diafiltración, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración. En una realización particularmente preferida, la segunda etapa de diafiltración se realiza usando aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración. En una realización preferida, una etapa de concentración del ARN usando TFF se realiza después de la segunda etapa de diafiltración.

En una realización particularmente preferida, el al menos un método de purificación adicional se sigue por al menos una etapa de concentración del ARN, al menos una primera etapa de diafiltración y al menos una segunda etapa de diafiltración usando TFF tal como se describió anteriormente.

En una realización particularmente preferida, la etapa de diafiltración después del al menos un método de purificación adicional así como la etapa de concentración después del al menos un método de purificación adicional usando TFF se realizan a temperaturas de desde 0°C hasta 20°C, más preferiblemente desde 5°C hasta 20°C, incluso más preferiblemente desde 10°C hasta 20°C, incluso más preferiblemente a temperaturas por debajo de 20°C, incluso más preferiblemente a temperaturas por debajo de 17°C.

En aún otra realización particularmente preferida, el método comprende en la etapa C) las etapas de:

C1) opcionalmente terminación de la transcripción;

C2) acondicionamiento y/o purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito *in vitro* mediante una o más etapas de TFF;

C3) purificación del ARN mediante cualquier método de purificación adicional tal como se describió anteriormente, y

C4) acondicionamiento y/u opcionalmente purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito obtenido después de la etapa C3) mediante una o más etapas de TFF.

En una realización preferida, la terminación de la transcripción opcional de la etapa C1) puede comprender la adición de una cantidad eficaz de un agente de formación de complejos catiónicos tal como EDTA. El EDTA puede detener eficazmente la reacción de transcripción *in vitro* y también desactiva las nucleasas y estabiliza el ARN debido al agotamiento de cationes divalentes. Además, la adición de EDTA a la mezcla de TIV da como resultado la reducción parcial de turbidez que posiblemente se produce. También se encontró que la adición de EDTA permite mayores velocidades de flujo durante las etapas de TFF posteriores.

En una realización preferida, se añade desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 mM de EDTA, preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 mM de EDTA e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 30 mM de EDTA. En una realización particularmente preferida, se añade 25 mM de EDTA.

Sorprendentemente, se encontró que la TFF es particularmente adecuada para el acondicionamiento de la disolución que comprende el ARN transcrito en comparación con otros métodos de acondicionamiento alternativos tales como el uso de cromatografía de afinidad en columna de cromatografía de líquidos de resolución rápida (FPLC) que mostró una unión irreversible de ARN y sólo pudo lograrse la elución de ARN mediante el lavado de la columna con NaOH o la mayoría del ARN se encontró en el flujo continuo.

En otra realización preferida, la etapa C4 comprende al menos una primera etapa de diafiltración usando TFF tal como se describió anteriormente; más preferiblemente al menos una primera etapa de diafiltración usando TFF y al menos una segunda etapa de diafiltración tal como se describió anteriormente; e incluso más preferiblemente al menos una etapa de concentración usando TFF tal como se describió anteriormente, al menos una primera etapa de

diafiltración usando TFF y al menos una segunda etapa de diafiltración tal como se describió anteriormente.

- Por tanto, en una realización preferida, la al menos una primera etapa de diafiltración en la etapa C4 se realiza con una disolución acuosa de sal como disolución de diafiltración. En una realización preferida, la sal de la disolución acuosa de sal puede comprender haluros de metales alcalinos tales como NaCl, LiCl o KCl; sales orgánicas tales como NaOAc, haluros de metales alcalinotérreos tales como CaCl₂; fosfatos de metales alcalinos tales como Na₃PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄; o combinaciones de los mismos. En una realización preferida, la sal de la disolución acuosa de sal puede comprender haluros de metales alcalinos tales como NaCl, LiCl o KCl; haluros de metales alcalinotérreos tales como CaCl₂. En una realización más preferida, la disolución acuosa de sal comprende desde aproximadamente 0,1 M de haluro de metal alcalino hasta aproximadamente 1 M de haluro de metal alcalino, más preferiblemente desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,5 M de haluro de metal alcalino. En otra realización preferida, la disolución acuosa de sal comprende NaCl. En una realización más preferida, la disolución acuosa de sal comprende de aproximadamente 0,1 M de NaCl a aproximadamente 1 M de NaCl, más preferiblemente desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,5 M de NaCl. En una realización particularmente preferida, la disolución acuosa de sal comprende 0,2 M de NaCl. En otra realización preferida, la disolución acuosa de sal no comprende sales de tamponamiento. La presencia de la sal puede ser ventajosa para retirar la espermidina contaminante del conjunto de ARN. En una realización preferida, la primera etapa de diafiltración se realiza usando desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 VD de disolución de diafiltración, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 VD de disolución de diafiltración y más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 12 VD de disolución de diafiltración, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración. En una realización particularmente preferida, la primera etapa de diafiltración se realiza usando aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración.
- En una realización preferida, la al menos una segunda etapa de diafiltración se realiza usando agua como disolución de diafiltración. En una realización preferida, la primera etapa de diafiltración se realiza usando desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 VD de disolución de diafiltración, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 VD de disolución de diafiltración y más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 12 VD de disolución de diafiltración, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración. En una realización particularmente preferida, la segunda etapa de diafiltración se realiza usando aproximadamente 10 VD de disolución de diafiltración. En una realización preferida, una etapa de concentración del ARN usando TFF se realiza después de la segunda etapa de diafiltración.
- En una realización particularmente preferida, la disolución de diafiltración no comprende sales de tamponamiento en ninguna de las etapas de TFF del método de la invención.

- Se prefiere particularmente que todas las etapas de TFF según la presente invención, es decir las etapas A3, C2 y C4 tal como se define en el presente documento, se realicen con el mismo tipo de membrana de TFF, preferiblemente con el mismo tipo de casete de membrana de TFF. Incluso más preferiblemente, todas las etapas de TFF según la presente invención se realizan con un casete de membrana de TFF que comprende una membrana de filtro a base de mPES con un MWCO de 100 kDa o una membrana de filtro a base de celulosa con un MWCO de 100 kDa, por ejemplo, casetes de membrana de TFF disponibles comercialmente tales como NovaSep mPES con un MWCO de 100 kDa y casete de membrana a base de celulosa Hydrosart (Sartorius) con un MWCO de 100 kDa. Lo más preferiblemente, todas las etapas de TFF según la presente invención se realizan con un casete de membrana de TFF que comprende una membrana de filtro a base de celulosa con un MWCO de 100 kDa.

- El experto apreciará fácilmente que las observaciones anteriores sobre la etapa A3 de la reivindicación 2 también se aplican a las etapas d) y e) de la reivindicación 13. De manera similar, las observaciones anteriores sobre la etapa C2 de la reivindicación 1 también se aplican a la etapa h) de la reivindicación 13 y las observaciones anteriores sobre la etapa C4 de la reivindicación 1 también se aplican a las etapas j) y k) de la reivindicación 13, respectivamente.

Etapas D a F opcionales:

- En aún otra realización, el método según la presente invención comprende al menos una etapa D) de formulación adicional, por ejemplo la complejación del ARN purificado con compuestos policatiónicos, tales como polímeros policatiónicos, o péptidos o proteínas policatiónicos, por ejemplo protamina. En este contexto, el agotamiento de espermidina es absolutamente necesario con el fin de proporcionar una complejación suficiente con compuestos policatiónicos.

En aún otra realización, el método según la presente invención comprende además las etapas E) de llenado y/o F) de liofilización.

- La presente invención se realizó con el apoyo del Gobierno en virtud del Acuerdo n.º HR0011-11-3-0001 concedido por DARPA. El Gobierno tiene determinados derechos en la invención.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1: La corriente de alimentación pasa en paralelo a la cara de la membrana a medida que una porción pasa a través de la membrana (permeado/filtrado) (figura 1A) mientras que la parte restante (retenido) se hace recircular desde el módulo de filtración de nuevo hasta el depósito de alimentación (figura 1B; adaptada de la bibliografía de Millipore n.º TB032); son posibles la concentración, la diafiltración (desalación e intercambio de tampón) y el fraccionamiento de las moléculas grandes de las pequeñas.

10 Figura 2: Resultados de selección de MWCO con ADNp linealizado

15 La figura 2A muestra los resultados de experimentos de selección de MWCO a partir de reacciones de linealización de tres plásmidos diferentes: P0625 (2626 pb), P1040 (3907 pb) y P0532 (7362 pb). Puede observarse fácilmente que el uso de filtros de centrifugación de ambos fabricantes con un MWCO de 100 kDa retuvo a los tres ADNp linealizados diferentes casi por completo, mientras que mayores MWCO conducen a una pérdida de ADN plasmídico linealizado.

20 La figura 2B muestra la electroforesis en gel de agarosa de ADN de la selección de MWCO con el plásmido P1040 linealizado (3907 pb). Las muestras de linealización de P1040 y las muestras de filtración resultantes se muestran en la electroforesis en gel de agarosa de ADN. LA: 0,5 µg de la reacción de linealización como control. Se diluyeron las muestras analizadas y se aplicó la cantidad fija de 0,5 µg de ADN por carril al gel. Si la concentración de ADN era demasiado baja, se aplicó la cantidad máxima de ADN. Debido a la normalización en la aplicación de ADN, no puede darse información cuantitativa en cuanto a la retención de ADN. Sin embargo, el análisis muestra que la integridad de ADN no disminuyó durante la filtración. Además puede observarse a partir del gel que MWCO mayores de 100 kDa conducen a una pérdida de ADN plasmídico en el retenido.

Figura 3: Resultados de la selección de MWCO con ARNm.

30 La figura 3A muestra los resultados de la selección de MWCO de ARN después de la reacción de transcripción para tres longitudes de ARNm diferentes (R1871: 589 nt, R1265: 1870 nt, R 1626: 5337 nt). Puede observarse fácilmente que el uso de filtros de centrifugación de ambos fabricantes con un MWCO de 100 kDa retiene los tres ARNm diferentes por completo.

35 La figura 3B muestra la electroforesis en gel de agarosa de ARN para las muestras de filtración resultantes del ARN R1265. Se diluyeron las muestras analizadas y se aplicó la cantidad fija de 1 µg de ARNm por carril al gel. Si la concentración de ARNm era demasiado baja, se aplicó la cantidad máxima de ARNm. Debido a la normalización en la aplicación de ARNm, no puede darse información cuantitativa en cuanto a la retención de ARNm.

40 Sin embargo, el análisis muestra que la integridad de ARNm no disminuyó durante la filtración. El gel reflejó los mismos resultados, tal como se midió en la medición de la concentración de ARN, que el ARN R1265 se retuvo por completo por la membrana de 100 kDa.

45 Figura 4: Selección de la velocidad de flujo del módulo de fibras huecas.

50 Se usó ARN en API (3775 nt, ARNm después de la reacción de transcripción, diafiltrado en API) para realizar una selección de la velocidad de flujo usando una membrana de fibras huecas (GE, PES, 100 kDa, 50 cm²). Tal como se mostró anteriormente, un aumento en el flujo de alimentación (FF) condujo a un aumento en el flujo de permeado, además la adición de presión (0,5 bar) al retenido mostró un impacto sobre la velocidad de flujo de permeado.

Figura 5: Velocidades de flujo de permeado de diferentes casetes de TFF a un dp y una PTM de 1 bar. Las velocidades de flujo para los tres casetes de TFF diferentes estaban en un intervalo de 126 a 140 l/h/m².

55 Figura 6: Estabilidad de ARN después de la reacción de transcripción (A) y después de la diafiltración de TFF con respecto a API durante varias horas (B). La integridad de ARN (área relativa de producto de longitud completa) se determinó mediante RP-HPLC analítica después del almacenamiento a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 5°C y -20°C). La reacción de transcripción *in vitro* sin TFF se analizó para determinar la integridad de ARN después de 1, 3, 5, 7, 10, 13, 14, 53 y 61 días. La reacción de transcripción *in vitro* después de TFF se analizó para determinar la integridad de ARN después de 1, 5, 7, 12, 14 y 33 días.

65 Figura 7: Prueba de diferentes membranas para la etapa de agotamiento de espermidina. Se sometieron a prueba dos membranas (Novasep mPES de 100 kDa e Hydrosart de Sartorius a base de celulosa de 100 kDa) para la etapa de agotamiento de espermidina usando NaCl 0,2 M para la diafiltración. Ambas membranas mostraron velocidades de flujo comparables.

Figura 8: Prueba de diferentes membranas para TFF de la reacción de linealización con una mayor carga de membrana. Para la concentración y diafiltración de la reacción de linealización, se sometieron a prueba membranas de TFF fabricadas de diferentes materiales, con un MWCO de 100 kDa y un área de membrana de 200 cm² de diferentes proveedores (las membranas a base de PES Sartocon Slice 200 de Sartorius y las NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión) de NovaSep y la membrana a base de celulosa Sartocon Slice 200, Hydrosart de Sartorius) con una alta carga de membrana (5,6 y 6 g de ADN plasmídico/m²).

Las velocidades de flujo en la etapa de concentración se muestran en la figura 8A. La reacción de linealización se concentró desde 0,2 g/l hasta aproximadamente 1,5 g/l. Se usaron los siguientes parámetros: dp y PTM = 1 bar (P1 = 1,5 bar, P2 = 0,5 bar y P3 = 0 bar).

Las velocidades de flujo en la etapa de diafiltración se muestran en la figura 8B. La reacción de linealización se diafiltró frente a 10 volúmenes de diafiltración de API con los mismos parámetros usados para la concentración.

Todas las membranas sometidas a prueba mostraron resultados similares. Durante la concentración de la reacción de linealización (figura 8A), las velocidades de flujo disminuyeron rápidamente, pero durante la diafiltración en API (figura 8B) las velocidades de flujo aumentaron de nuevo. Ambas membranas a base de PES (PES de Sartorius y mPES de NovaSet) mostraron resultados similares, sin embargo, la membrana Hydrosart (Sartorius) mostró mayores velocidades de flujo de permeado.

Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa de ADNp linealizado.

- 1.) Marcador de tamaño de ADN
- 2.) Permeado de TFF después de la concentración (10 µl)
- 3.) Permeado de TFF después de la diafiltración (10 µl)
- 4.) Retenido de TFF (3 µl de 0,1 g/l)
- 5.) Plásmido linealizado de control (1,8 µl de 0,17 g/l)
- 6.) Plásmido circular de control (3 µl de 0,1 g/l)
- 7.) Vacío
- 8.) Marcador de tamaño de ADN

Sólo es visible una cantidad insignificante de ADN plasmídico en el permeado de la etapa de concentración y de la etapa de diafiltración.

Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa de ARN de muestras de permeado y retenido tomadas durante la TFF de los conjuntos de RP-HPLC.

- 1.) Marcador de ARN
- 2.) Conjunto I de RP-HPLC
- 3.) Conjunto II de RP-HPLC
- 4.) Conjunto III de RP-HPLC
- 5.) Permeado de TFF
- 6.) Permeado de TFF (40x concentrado)
- 7.) Conjunto I de retenido de TFF
- 8.) Conjunto II de retenido de TFF
- 9.) Conjunto III de retenido de TFF
- 10.) Producto final
- 11.) Control

12.) Control

13.) Vacío

14.) Marcador de ARN

Figura 11: Muestras de SDS-PAGE de proteínas tomadas durante el procedimiento de producción y purificación de ARN.

1 Marcador de proteína

2 Retenido de TFF después de la linealización

3 Reacción de transcripción

4 Retenido de TFF antes de la RP-HPLC

5 Retenido de TFF antes de la RP-HPLC

6 Retenido de TFF antes de la RP-HPLC

7 Conjunto I de retenido de TFF después de la RP-HPLC

8 Conjunto II de retenido de TFF después de la RP-HPLC

9 Conjunto III de retenido de TFF después de la RP-HPLC

10 Producto final

11 Control

12 Marcador de proteína

Figura 12: Velocidades de flujo de permeado de TFF. Concentración de la reacción de linealización de ADNp desde 0,2 hasta 1,5 g/l de ADN, usando Hydrosart de 100 kDa, dp y PTM de 1 bar; carga de membrana: 6 g/m²; concentración desde 0,2 g/l de ADN hasta 1,5 g/l de ADN.

Figura 13: Velocidades de flujo de permeado de TFF. Diafiltración de ADNp linealizado en 10 VDF de API usando Hydrosart de 100 kDa, dp y PTM de 1 bar; carga de membrana: 6 g/m².

Figura 14: Velocidades de flujo de permeado de TFF. Diafiltración de la mezcla de TIV de ARN en 10 VDF de API usando Hydrosart de 100 kDa, dp y PTM de 1 bar; carga de membrana: 56 g/m²;

Figura 15: Velocidades de flujo de permeado de TFF. Concentración del conjunto de ARN de RP-HPLC, usando Hydrosart de 100 kDa, dp y PTM de 1 bar; carga de membrana: 20 g/m²; concentración desde 0,1 g/l de ARN hasta 5 g/l de ARN; temperatura de 17°C.

Figura 16: Velocidades de flujo de permeado de TFF. Diafiltración del ARN, usando Hydrosart de 100 kDa, dp y PTM de 1 bar. (A) Diafiltración del ARN en 10 VDF de NaCl 0,2 M; (B) diafiltración del ARN en 10 VDF de API.

Ejemplos:

Ejemplo 1 - Materiales

Los siguientes materiales de la tabla 1 se usaron en la sección experimental posterior:

Tabla 1: Materiales

Equipo	Fabricante
Vivaflow 50, PES, 100 kDa	Sartorius
Sartocon Slice 200 de 100 kDa, PES	Sartorius
Sartocon Slice 200 de 100 kDa, Hydrosart (membrana a base de celulosa)	Sartorius

Equipo	Fabricante
Sartocon Slice 200 de 300 kDa, PES	Sartorius
Omega Centramate T OS100T02, PES, 100 kDa	PALL GmbH
NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión), 100 kDa	NovaSep
Módulo de fibras huecas, 100 kDa, PES	GE-Healthcare
Filtro de centrifugación Nanosep® (100 kDa), PES	Pall GmbH
Filtro de centrifugación Nanosep® (300 kDa), PES	Pall GmbH
Filtro de centrifugación Nanosep® (1000 kDa), PES	Pall GmbH
Filtro de centrifugación Vivaspin® 500 (100 kDa), PES	Sartorius
Filtro de centrifugación Vivaspin® 500 (300 kDa), PES	Sartorius
Filtro de centrifugación Vivaspin® 500 (1000 kDa), PES	Sartorius
Módulo Vivaflow 50, PES, 100 kDa	Sartorius
Sartoflow Slice 200, PES, 100 kDa	Sartorius

Métodos generales:

Ejemplo 2 - Linealización de ADN plasmídico:

5

Las siguientes condiciones se usaron para la linealización del ADN plasmídico:

1 µg de ADN plasmídico

10

0,5 µl de tampón de reacción

3 Unidades de enzima de restricción EcoRI

15

5 µl adicionales con API (agua para inyección)

La reacción se incubó durante 3 horas a 37°C y se detuvo mediante inactivación por calor de la enzima de restricción (65°C, 30 minutos).

20

Ejemplo 3 - Descripción general del procedimiento de TFF

Todos los tubos y el recipiente de retenido se limpiaron con EtOH al 75% y agua y se ensamblaron. El casete de membrana se fijó en el soporte correspondiente, según las instrucciones del fabricante, y, respectivamente, la membrana de fibras huecas se conectó al sistema. Después de eso, el sistema y la membrana se enjuagaron con al menos 1 l de agua, 1 l de NaOH 1 M o 0,5 M durante 1 hora (para la retirada de posibles contaminantes, como RNasas) y se lavó de nuevo con agua, hasta que el valor de pH en el permeado era neutro. Posteriormente, todo el sistema se enjuagó con agua para inyección (API) o disolución o tampón de diafiltración.

25

3.1 - Etapa de concentración

30

Se llenó la disolución de ADN/ARN en el recipiente de retenido y, opcionalmente, se concentró hasta la concentración requerida estableciendo las presiones indicadas.

3.2 - Etapa de diafiltración

35

Después de la etapa de concentración opcional, se comenzó la diafiltración. Por tanto, el tubo de diafiltración se colocó en la disolución o el tampón de diafiltración. Durante la diafiltración, la cantidad de permeado que dejaba el sistema se reemplazó de manera automática por disolución o tampón de diafiltración, debido al vacío emergente. Cuando se alcanzó el volumen de diafiltración (vd) requerido, se añadió opcionalmente una disolución o un tampón de diafiltración diferente al sistema y se llevó a cabo una segunda etapa de diafiltración. Antes de la finalización de la etapa de TFF, opcionalmente, se concentró de nuevo el retenido hasta el volumen requerido, antes de la retirada del retenido del sistema. Posteriormente, se enjuagó el sistema con 25 ml de API (agua para inyección) o tampón (válvula de permeado cerrada). El líquido de enjuague se juntó opcionalmente con el retenido de la TFF. Opcionalmente, se midió la concentración de ARN/ADN y se calculó la recuperación de ácido nucleico.

40

45

3.3 - Mantenimiento del sistema/membrana

Después del uso de las membranas, se enjuagó el casete con 0,5 l de agua, posteriormente con NaOH 0,5 M o 1 M durante 1 hora y de nuevo con agua, hasta que el pH en el permeado era neutro. Después de eso, se determinó el valor de flujo de permeado de agua para verificar la limpieza de la membrana. Al final, se retiró la membrana del sistema de TFF y se almacenó o bien en NaOH 0,1 M o bien en EtOH al 20%. Después de eso, se limpió el sistema de TFF con EtOH al 75% y agua y se almacenó en seco.

Ejemplo 4 - Transcripción *in vitro*

4.1 - Transcripción *in vitro*

Los plásmidos de ADN linealizados se transcribieron *in vitro* usando polimerasa T7. La transcripción *in vitro* se realizó en presencia de un análogo de CAP (m7GpppG). La transcripción *in vitro* se llevó a cabo en análogo de CAP m7G(5')ppp(5')G 5,8 mM, ATP 4 mM, CTP 4 mM, UTP 4 mM y GTP 1,45 mM, 50 µg/ml de plásmido de ADN, HEPES 80 mM, MgCl₂ 24 mM, espermidina 2 mM, DTT 40 mM, 100 U/µg de ARN polimerasa T7 de ADN, 5 U/µg de ADN pirofosfatasa y 0,2 U/µl de inhibidor de RNasa. La reacción de transcripción *in vitro* se incubó durante 4 horas a 37°C. Después de la transcripción, la reacción se detuvo mediante la adición de ETDA hasta una concentración final de 25 mM.

4.2 – Retirada del molde de ADN: tratamiento con DNasa I

Para digerir el molde de ADN, se añadieron 6 µl de DNasa I (1 mg/ml) y 0,2 µl de disolución de CaCl₂ (0,1 M)/µg de ADN plasmídico a la reacción de transcripción, y se incubó durante 3 h a 37°C.

Ejemplo 5 - Purificación mediante HPLC del ARN

El ARN se purificó usando la tecnología PureMessenger® (CureVac, Tübingen, Alemania; documento WO2008/077592A1).

En resumen, se purificó la reacción de transcripción acondicionada con TFF usando cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa (RP-HPLC). La RP-HPLC se realizó con una columna macroporosa de estireno/divinilbenceno (tamaño de partícula de 30 µm, tamaño de poro de 4000 Å) y unas dimensiones de columna de 21,2 mm x 250 mm (volumen de 88,25 ml).

Se preparó 1 g/l de ARN en acetato de trietilamonio (TEAA) 100 mM, se filtró con un filtro de PVDF de 5 µm y se usó para la RP-HPLC preparativa. Después de montar la columna (almacenada en acetonitrilo al 88%), se enjuagó la disolución de almacenamiento con agua ultra pura. A continuación, se cargó la muestra de ARN sobre la columna y se eluyó con un gradiente de eluyente B/eluyente A (eluyente A: acetato de trietilamonio (TEAA) 100 mM en agua para inyección (API), pH 7,0; eluyente B: TEAA 100 mM en acetonitrilo al 25%) empezando con el 100% de eluyente A y finalizando con el 100% de eluyente B. Durante el procedimiento de elución, las fracciones se recogieron de manera automática. Posteriormente, se analizaron las fracciones para determinar el contenido de ARN mediante determinación fotométrica (A260) y la integridad de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa o HPLC analítica.

Ejemplo 6 - Métodos analíticos

6.1 - Electroforesis en gel de ARN

El ARN se separó en geles de agarosa que contenían formaldehído (el 0,7% p/p de formaldehído, el 1,2% p/v de agarosa) en tampón de ácido 3-morfolinopropanosulfónico (para detalles sobre el método, véase Sambrook, Russel: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory, 2000.). Las muestras de ARN se desnaturalizaron en tampón de muestra de ARN (Thermo Scientific) a 80°C durante 5 min antes de la carga sobre el gel. Se cargó 1 µg de ARN por carril.

6.2 - Electroforesis en gel de proteínas (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE se realizó con geles Mini-PROTEAN TGX al 12% listos para usar (Bio-Rad). Se adquirieron 4x tampón de carga de muestra Laemmli y 10x tampón de ejecución de SDS-PAGE de Bio-Rad. Se mezclaron las muestras con 4x tampón de carga y se incubó a 95°C durante 5 min. La carga de muestra se normalizó con respecto a 10 µg de ARN por carril. Se aplicó una tensión de 150 mV (correspondiente a aproximadamente 35 mA por gel) hasta que la banda marcadora más pequeña alcanzó el extremo inferior del gel. La visualización de bandas de proteínas se realizó con el tinte Simply Blue Safe listo para usar (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Alternativamente, se usó el kit de tinte Pierce Silver (Thermo Scientific) con el fin de aumentar la sensibilidad de tinción.

6.3 - Cuantificación de espermidina unida a ARN

La espermidina se cuantificó mediante un protocolo modificado tal como se describe en Flores *et al.* (Plant Physiol. (1982) 69, 701-706)). En resumen, la espermidina se somete a benzoilación en condiciones alcalinas seguido de extracción con dietil éter. La espermidina benzoilada se detecta y cuantifica mediante HPLC o espectrometría de masas. Se usa hexametildiamina como patrón interno.

6.4 - Determinación de disolventes residuales

El contenido de disolventes residuales en la muestra de ARN se determinó usando cromatografía de gases cuantitativa con detector de ionización de llama (GC-FID).

Pruebas piloto:

Ejemplo 7 - Experimentos de selección de poro:

7.1 - Selección de MWCO con ADN plasmídico.

Para la determinación de un MWCO (punto de corte de peso molecular) adecuado de las membranas usadas en TFF, se llevó a cabo una selección de MWCO. Por tanto, se usaron filtros de centrifugación, ya que requieren pequeños volúmenes. Se sometieron a prueba filtros de centrifugación de dos fabricantes diferentes (filtro de centrifugación Nanosep® (100 kDa, 300 kDa y 1000 kDa), PES de PALL GmbH y filtro de centrifugación Vivaspin® 500 (100 kDa, 300 kDa y 1000 kDa), PES de Sartorius) con un MWCO de 100, 300 y 1000 kDa. Antes de su uso, se enjuagaron los filtros de centrifugación con 500 µl de API (agua para inyección), y se eliminó por completo el API del compartimento de permeado. Posteriormente, se añadieron 300 µl de tres reacciones de linealización diferentes (véase el ejemplo 2) y se centrifugaron a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante. Después de que aproximadamente la mitad del volumen pasara la membrana, se detuvo la centrifugación y se determinó el volumen exacto en la cámara de permeado y retenido. Luego se enjuagó la cámara de retenido con 100 µl de API y se combinó con el retenido. Además de la medición del volumen, también se determinó la concentración de ADN en la disolución inicial y la disolución de retenido. La concentración de ADN se determinó fotométricamente midiendo la absorción a 260 nm. La figura 2A muestra los resultados de la selección de MWCO de reacciones de linealización de tres plásmidos diferentes: P0625 (2626 pb), P1040 (3907 pb), P0532 (7362 pb). Puede observarse fácilmente que el uso de filtros de centrifugación de ambos fabricantes con MWCO de 100 kDa retiene los tres ADNp linealizados diferentes casi por completo, mientras que un MWCO mayor conduce a una pérdida de ADN plasmídico linealizado. Las muestras de linealización P1040 y las muestras de filtración resultantes se muestran en la figura 2B mediante electroforesis en gel de agarosa de ADN. Se diluyeron las muestras analizadas, y se aplicó la cantidad fija de 0,5 µg de ADN por carril al gel, si la concentración de ADN era demasiado baja, se aplicó la cantidad máxima de ADN. Debido a la normalización en la aplicación de ADN, no puede darse información cuantitativa en cuanto a la retención de ADN. Sin embargo, el análisis muestra que la integridad de ADN no disminuyó durante la filtración. Además puede observarse a partir del gel que un MWCO mayor de 100 kDa conduce a una pérdida de ADN plasmídico en el retenido. Por tanto, se eligió un MWCO de 100 kDa para experimentos adicionales en cuanto a TFF de ADN plasmídico linealizado.

7.2 - Selección de MWCO con ARN

El experimento se llevó a cabo de la misma manera tal como se describió para la selección de MWCO con ADNp (ejemplo 7.1). Antes de su uso, se enjuagaron los filtros de centrifugación con 500 µl de API, y se eliminó por completo el API del compartimento de permeado. Posteriormente, se añadieron 300 µl de tres reacciones de transcripción diferentes y se centrifugó a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante. Después de que aproximadamente la mitad del volumen pasara la membrana, se detuvo la centrifugación y se determinó el volumen exacto en la cámara de permeado y retenido. Luego se enjuagó la cámara de retenido con 100 µl de API y se combinó con el retenido. Además de la medición del volumen, también se determinó fotométricamente la concentración de ARN midiendo la absorción a 260 nm en la disolución inicial y la disolución de retenido. La figura 3A muestra los resultados de la selección de MWCO de ARN después de la reacción de transcripción según el ejemplo 4 para tres longitudes de ARNm diferentes (R1871: 589 nt, R1265: 1870 nt, R 1626: 5337 nt). Puede observarse fácilmente que el uso de filtros de centrifugación de ambos fabricantes con un MWCO de 100 kDa retiene los tres ARNm diferentes por completo. Además, en la figura 3B, se muestra la electroforesis en gel de agarosa de ARN para las muestras de filtración resultantes del ARN R1265. Se diluyeron las muestras analizadas, y se aplicó la cantidad fija de 1 µg de ARNm por carril al gel, si la concentración de ARNm era demasiado baja, se aplicó la cantidad máxima de ARNm. Debido a la normalización en la aplicación de ARNm, no puede darse información cuantitativa en cuanto a la retención de ARNm. Sin embargo, el análisis muestra que la integridad de ARNm no disminuyó durante la filtración. El gel refleja los mismo resultados, tal como se mide en la medición de la concentración de ARN, que el ARN R1265 se retiene por completo por la membrana de 100 kDa, con un MWCO mayor el ARN es visible en el permeado. Por tanto, se seleccionó un MWCO de 100 kDa para experimentos adicionales en cuanto a TFF de disoluciones de ARN.

Ejemplo 8 - Selección de parámetros de diferentes membranas

Se usó una reacción de transcripción *in vitro* de R2587 (según el ejemplo 4) ya diafiltrada en API para la selección de parámetros. Se examinaron las diferentes membranas (Sartocon Slice 200 de 100 kDa, PES de Sartorius, Sartocon Slice 200 de 100 kDa, Hydrosart (membrana a base de celulosa) de Sartorius y NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión), 100 kDa de Novasep) en cuanto a flujo de permeado frente a PTM y dp, respectivamente. La carga de muestra fue de 0,1 mg de ARN/cm² de membrana. La membrana Hydrosart (membrana a base de celulosa de Sartorius) mostró la velocidad de flujo de permeado más alta en comparación con las otras membranas sometidas a prueba (membranas a base de poli(éter sulfona) (PES) de Sartorius y NovaSep). Tal como puede observarse a partir de los resultados tal como se muestra en la tabla 2, son necesarias una diferencia de presión sobre la membrana (dp) de al menos 0,5 bar y una presión transmembrana (PTM) de al menos 0,75 bar para lograr una velocidad de flujo de al menos 100 l/h/m²

Tabla 2: Velocidades de flujo resultantes de los diferentes parámetros seleccionados para los experimentos de selección

					Sartorius, PES, 100 kDa	NovaSet, mPES, 100 kDa	Hydrosart de 100 kDa
p1 [bar]	p2 [bar]	p3 [bar]	dp [bar]	PTM [bar]	Flujo [l/h/m ²]	Flujo [l/h/m ²]	Flujo [l/h/m ²]
0,5	0	0	0,5	0,25	45	54,6	72
1	0,5	0	0,5	0,75	133,8	141,6	171
1,5	1	0	0,5	1,25	164,4	172,8	235,8
1	0	0	1	0,5	87,6	85,2	135,9
1,5	0,5	0	1	1	180	178,8	233,1
2	1	0	1	1,5	238,8	215,4	307,8
1,5	0	0	1,5	0,75	138,6	120	198,9
2	0,5	0	1,5	1,25	228,6	247,2	298,8
2,5	1	0	1,5	1,75	280,8	308,4	381,6
2	0	0	2	1	185,4	181,2	270
2,5	0,5	0	2	1,5	270	308,1	352,8

Basándose en estos experimentos, se eligieron los siguientes parámetros para la TFF de la reacción de transcripción:

Tabla 3: Parámetros seleccionados para la TFF de la reacción de transcripción

Presión de alimentación (p1)	Presión de retenido (p2)	Presión de permeado (p3)	dp	PTM
1,5 bar (= 0,15 MPa)	0,5 bar (= 0,05 MPa)	0 bar (= 0 MPa)	1 bar (= 0,1 MPa)	1 bar (= 0,1 MPa)

Ejemplo 9 - TFF con mayor carga de membrana

9.1 - TFF de reacción de transcripción usando un módulo de fibras huecas

Se usó una reacción de transcripción *in vitro* de ARN (R2587 con 3775 nt), diafiltrada en API para realizar una selección de la velocidad de flujo en una membrana de fibras huecas (módulo de fibras huecas, 100 kDa, PES, 50 cm² de GE Healthcare). La carga de membrana era de aproximadamente 2,0 mg de ARN/cm². Tal como se muestra en la figura 4, un aumento en el flujo de alimentación (FF) conduce a un aumento en el flujo de permeado, además la adición de presión de retenido (0,05 MPa) mostró un impacto sobre la velocidad de flujo de permeado. Las velocidades flujo eran de entre 5 y 85 l/h/m² (véase la figura 4).

9.2 - TFF usando módulos de casete de TFF

Se usó una reacción de transcripción *in vitro* de ARN (R2312 con 1885 nt), diafiltrada en API para realizar una TFF usando los siguientes parámetros de TFF (tabla 4):

Tabla 4: Parámetros de TFF usando módulos de casete de membrana de TFF

Presión de alimentación (p1)	Presión de retenido (p2)	Presión de permeado (p3)	dp	PTM
0,15 MPa	0,05 MPa	0 MPa	0,1 MPa	0,1 MPa

La carga de membrana era de aproximadamente 4,5 mg de ARN/cm². Se usaron los casetes de PES de Sartorius, 100 kDa, NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión) de 100 kDa de Novasep así como Hydrosart de 100 kDa de Sartorius (membrana a base de celulosa) como módulos de TFF, respectivamente. Las velocidades de flujo de permeado obtenidas eran mayores que para las membranas de fibras huecas con valores entre aproximadamente 125 y 140 l/h/m² tal como se muestra en la figura 5. Por tanto, el procedimiento de diafiltración es más rápido usando casetes de membrana de TFF debido a las mayores velocidades de flujo en comparación con las velocidades de flujo usando membranas de fibras huecas.

Ejemplo 10 - Estabilidad de ARN durante la TFF

Se diafiltró una muestra que contenía ARNm (R2564; 2083 nt) con API durante varias horas a temperatura ambiente usando el casete de membrana de PES de 100 kDa de Sartorius y los parámetros de TFF tal como se describió anteriormente en el ejemplo 9.2. La estabilidad de ARN después de la reacción de transcripción se comparó con la estabilidad de ARN después de la TFF posterior. La estabilidad, es decir la integridad de ARN (área relativa de producto de longitud completa) se determinó mediante RP-HPLC analítica.

Los resultados se resumen en la figura 6.

Los datos de estabilidad mostraron que el ARNm en la mezcla de reacción de transcripción sólo era estable si se almacenaba a -20°C durante hasta 60 días (85-90%); a 5°C, la integridad comenzó a disminuir lentamente desde el principio (disminuyó desde el 85% hasta el 61% en 61 días). Se midió una disminución muy rápida en la integridad (descenso desde el 81% hasta el 51% a lo largo de 14 días) si el ARNm se almacenaba a temperatura ambiente. Por otro lado, el ARNm después de la TFF de la mezcla de reacción de transcripción tal como se describió anteriormente era estable a lo largo de 30 días si se almacenaba a -20°C y a 5°C. Si el ARNm se almacenaba a temperatura ambiente, todavía mostraba altas integridades durante al menos 7 días y luego disminuían lentamente hasta el 80% de integridad en 33 días. A partir de este experimento, puede concluirse que se logró un mayor grado de estabilidad de ARN mediante la TFF de ARNm en API en comparación con la estabilidad de ARN en la reacción de transcripción *in vitro* sin purificación mediante TFF.

Ejemplo 11 - TFF del conjunto de RP-HPLC que contiene ARN

11.1 - Parámetros de TFF para la diafiltración del conjunto de RP-HPLC

Se usaron muestras de ARN purificadas mediante RP-HPLC (tal como se describió en el ejemplo 5) en API, TEAA 0,1 M, acetonitrilo al 13% para la selección de parámetros. Se examinaron las diferentes membranas (Hydrosart (membrana a base de celulosa) de Sartorius, Omega Centramate T OS100T02, PES de 100 kDa de PALL y membranas a base de PES con un MWCO de 100 kDa y 300 kDa de Sartorius) en cuanto a PTM frente a flujo de permeado y a diferentes concentraciones de ARN (tabla 5). Las diferentes membranas se comportaron de manera similar durante los experimentos de selección de PTM. En general, cuanto mayor son dp y PTM, mayor es el flujo medido (tabla 5). A mayores valores de PTM, el procedimiento tiende a estar controlado por la formación de la capa de la torta (flujo de permeado máximo alcanzado, flujo de permeado independiente de PTM).

Tabla 5: Resultados de la selección de parámetros

Conc. de ARN [µg/µl]	p1 [bar]	p2 [bar]	p3 [bar]	dp [bar]	PTM [bar]	PES de 100 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Hydrosart de 100 kDa [l/h/m ²]	PES de 300 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Centramate de 100 kDa de PALL [l/h/m ²]
0,1	0,5	0	0	0,5	0,25	43,2	73,8	49,2	94,8
0,1	1	0,5	0	0,5	0,75	104,4	160,2	120	182,4
0,1	1,5	1	0	0,5	1,25	118,8	171	129,6	204
0,1	1	0	0	1	0,5	46,8	126,9	123,6	127,8
0,1	1,5	0,5	0	1	1	106,8	200,7	182,4	207,6
0,1	2	1	0	1	1,5	130,2	211,5	194,4	258

ES 2 798 271 T3

Conc. de ARN [µg/µl]	p1 [bar]	p2 [bar]	p3 [bar]	dp [bar]	PTM [bar]	PES de 100 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Hydrosart de 100 kDa [l/h/m ²]	PES de 300 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Centramate de 100 kDa de PALL [l/h/m ²]
0,1	1,5	0	0	1,5	0,75	68,4	178,2	144	154,8
0,1	2	0,5	0	1,5	1,25	118,8	225,9	204	242,4
0,1	2,5	1	0	1,5	1,75	151,2	248,4	219,6	304,8
0,1	2	0	0	2	1	86,4	205,2	169,2	199,2
0,1	2,5	0,5	0	2	1,5	129,6	260,1	224,4	282
0,1	3	1	0	2	2	165,6		0	0
Conc. de ARN [µg/µl]	p1 [bar]	p2 [bar]	p3 [bar]	dp [bar]	PTM [bar]	PES de 100 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Hydrosart de 100 kDa [l/h/m ²]	PES de 300 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Centramate de 100 kDa de PALL [l/h/m ²]
1	0,5	0	0	0,5	0,25	22,8	62,4	42	56,4
1	1	0,5	0	0,5	0,75	65,7	95,4	78	108
1	1,5	1	0	0,5	1,25	76,5	97,2	85,2	117,6
1	1	0	0	1	0,5	42,3	105,6	74,4	84
1	1,5	0,5	0	1	1	87,3	138	106,8	133,2
1	2	1	0	1	1,5	103,5	135,6	112,8	142,8
1	1,5	0	0	1,5	0,75	59,4	136,8	99,6	112,8
1	2	0,5	0	1,5	1,25	99,9	160,8	124,8	159,6
1	2,5	1	0	1,5	1,75	130,8	165,6	130,8	176,4
1	2	0	0	2	1	75,6	166,2	121,2	139,2
1	2,5	0,5	0	2	1,5	118,8	178,8	138	184,8
1	3	1	0	2	2				
Conc. de ARN [µg/µl]	p1 [bar]	p2 [bar]	p3 [bar]	dp [bar]	PTM [bar]	PES de 100 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Hydrosart de 100 kDa [l/h/m ²]	PES de 300 kDa de Sartorius [l/h/m ²]	Centramate de 100 kDa de PALL [l/h/m ²]
1,5	0,5	0	0	0,5	0,25	22,8	57,6	38,4	48,6
1,5	1	0,5	0	0,5	0,75	69,6	85,5	67,2	95,4
1,5	1,5	1	0	0,5	1,25	74,4	90	69,6	109,8
1,5	1	0	0	1	0,5	38,4	104,4	67,2	84,6
1,5	1,5	0,5	0	1	1	78	126	92,4	135
1,5	2	1	0	1	1,5	98,4	118,8	93,6	165
1,5	1,5	0	0	1,5	0,75	46,8	127,8	88,8	117
1,5	2	0,5	0	1,5	1,25	93,6	136,8	114	168
1,5	2,5	1	0	1,5	1,75	114		126	189
1,5	2	0	0	2	1	73,2		117	147
1,5	2,5	0,5	0	2	1,5	110,4		133,2	180
1,5	3	1	0	2	2				

Aunque valores mayores de dp y PTM pueden conducir a un aumento en las velocidades de flujo, se seleccionaron los siguientes parámetros para experimentos a gran escala (tabla 6):

Tabla 6: Parámetros seleccionados para la TFF del conjunto de RP-HPLC

Presión de alimentación (p1)	Presión de retenido (p2)	Presión de permeado (p3)	dp	PTM
0,1-0,2 MPa	0,05-0,1 MPa	0 MPa	0,05-0,1 MPa	0,075-0,15 MPa

5 Se seleccionaron los intervalos para PTM y dp tal como se muestra en la tabla 6 porque en estas condiciones el procedimiento no está completamente impulsado por la capa de la torta. Aunque mayores valores de dp (específicamente valores mayores de p1) conducen a un aumento adicional de la velocidad de flujo, la aplicación en procedimientos a gran escala se ve dificultada debido a restricciones en la fuerza de la bomba. Además, se prefiere una fuerza de cizallamiento menor (menores valores de dp y PTM) en cuanto a la estabilidad de ARN.

10

11.2 - Agotamiento de espermidina mediante TFF

En experimentos previos, el conjunto de RP-HPLC concentrada se diafiltró con agua (API). En este caso, se observó una concentración de espermidina residual relativamente alta en la disolución de ARN final. Para eliminar la espermidina, se introdujo una etapa de diafiltración adicional antes de la diafiltración final en agua. Se seleccionaron diferentes disoluciones de diafiltración (tabla 7). Se diafiltraron aproximadamente 5-10 ml de una disolución que contenía ARN (R2564) después de la purificación mediante RP-HPLC con 100-200 ml de disolución de diafiltración, seguido de diafiltración con 100-200 ml de agua. En este caso, se aplicaron casetes de membrana a base de PES Vivaflow (Sartorius) de un solo uso con un MWCO de entre 10 y 100 kDa. Las muestras se analizaron después de 10, 20, 30 y 40 volúmenes de intercambio de diafiltración, respectivamente. Finalmente, se concentró el retenido hasta aproximadamente 0,5 g/l y se determinó la cantidad de espermidina tal como se describió en el ejemplo 6.3. Como control, el ARN no se acondicionó usando TFF sino que se precipitó mediante precipitación con cloruro de litio (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989), y se determinó la cantidad de espermidina contaminante tal como se describió en el ejemplo 6.3.

25

Los resultados se resumen en la tabla 7.

Tabla 7: Concentración de espermidina después de la TFF usando diferentes disoluciones de diafiltración

30

Composición de tampón de diafiltración	Concentración de espermidina (μg de espermidina/mg de ARN)
agua	100,81
fosfato de sodio 20 mM, pH 6,2	53,31
cloruro de sodio 0,5 M	0,01
cloruro de sodio 0,2 M	0,08
Precipitación con cloruro de litio	0,04

La diafiltración del conjunto de RP-HPLC usando TFF con agua pura o fosfato de sodio 20 mM no retiró de manera eficaz la espermidina unida a ARN. La aplicación de disoluciones de diafiltración con alto contenido de sales, por ejemplo disoluciones a base de NaCl, dio como resultando el agotamiento sustancialmente completo de espermidina unida a ARN. Además, se retiraron de manera eficaz sales (por ejemplo, TEAA), disolventes orgánicos (TEA, ACN).

35

Los experimentos de optimización posteriores han demostrado que la concentración de NaCl podía reducirse hasta al menos 0,2 M con el fin de aumentar las velocidades de flujo de permeado durante la diafiltración sin afectar a la eficacia de agotamiento de espermidina. La adición directa de NaCl al conjunto de RP-HPLC concentrado (concentración final de -0,5 M o 0,2 M, respectivamente) dio como resultado un agotamiento de espermidina más rápido mediante TFF (se requiere menos disolución de diafiltración para lograr el agotamiento de espermidina). La aplicación de mayores concentraciones de NaCl en la disolución de diafiltración no es aconsejable ya que esto puede conducir a la precipitación de ARN y, por consiguiente, al bloqueo de la membrana de TFF. La etapa de agotamiento de espermidina puede realizarse después de la purificación mediante RP-HPLC o directamente después de la transcripción *in vitro*.

45

11.3 - Prueba de diferentes membranas para la etapa de agotamiento de espermidina:

Se analizaron adicionalmente dos membranas (mPES de 100kDa de Novasep e Hydrosart a base de celulosa de 100 kDa de Sartorius). Se sometieron a prueba ambas membranas a una mayor carga de muestra (aproximadamente 2 mg de ARN/cm² de membrana) para la diafiltración. Para la concentración y diafiltración, se eligieron los siguientes parámetros: dp = 1 bar y PTM = 1,5 bar, carga de membrana: 2,0 mg de ARNm/cm² de

50

membrana. Se concentró el ARNm en API, TEAA 0,1 M, acetonitrilo al 13% y NaCl 0,2 M desde 0,1 g/l hasta 5 g/l y se determinaron las velocidades de flujo. Se realizó la diafiltración frente a 10 volúmenes de diafiltración (vd) de disolución de NaCl 0,2 M y 10 vd de API.

5 Resultados:

El tiempo global para la concentración y diafiltración de 380 mg de ARNm fue muy similar: NovaSet: 2,8 h, Hydrosart: 2,68 h. Las velocidades de flujo respectivas para la etapa de diafiltración se muestran en la figura 7.

10 Ejemplo 12 - TFF de reacción de linealización con una mayor carga de membrana

Para la concentración y diafiltración de la reacción de linealización, se sometieron a prueba membranas de TFF fabricadas de diferentes materiales, con un MWCO de 100 kDa y un área de membrana de 200 cm² de diferentes proveedores (las membranas a base de PES Sartoclon Slice 200 de Sartorius y NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión) de NovaSep y la membrana a base de celulosa Sartoclon Slice 200, Hydrosart de Sartorius) con una alta carga de membrana (5,6 y 6 g de ADN plasmídico/m²). Los parámetros seleccionados para la TFF de la reacción de transcripción también se aplicaron en esta etapa, ya que mostraron buenos resultados anteriormente. Por tanto, se seleccionaron dp y PTM = 1 bar (P1 = 1,5 bar, P2 = 0,5 bar y P3 = 0 bar) para concentrar ADNp (120 mg de P1452.8) desde 0,2 g/l hasta aproximadamente 1,5 g/l y, después de eso, para la diafiltración frente a 10 volúmenes de diafiltración de API.

20 Resultados:

25 Todas las membranas sometidas a prueba mostraron resultados similares. Durante la concentración de la reacción de linealización (figura 8A), las velocidades de flujo disminuyeron rápidamente, pero durante la diafiltración en API (figura 8B), las velocidades de flujo aumentaron de nuevo. Ambas membranas a base de PES (PES de Sartorius y mPES de NovaSet) mostraron resultados similares, sin embargo, la membrana Hydrosart (Sartorius) mostró mayores velocidades de flujo de permeado.

30 Ejemplo 13 - Procedimiento completo

13.1 - Linealización de ADNp

Se llevó a cabo la linealización del ADN plasmídico P1141 según el ejemplo 2.

35 13.2 - Concentración y diafiltración de ADNp linealizado usando TFF

40 Para la filtración de flujo tangencial de la reacción de linealización, se usó un casete de filtro Vivaflow50 (membrana de PES, MWCO de 100 kDa, Sartorius). Antes del montaje del sistema de diafiltración, se lavaron exhaustivamente todos los componentes en contacto con producto (tubos, tanque de alimentación, etc.) con etanol y agua. A continuación, se lavó el sistema con agua ultra pura. Después se desinfectó químicamente el sistema con una disolución de NaOH 500 mM. Posteriormente, se lavó el sistema con API hasta que se midió un pH de 7 en el retenido. Después se llenó el tanque de alimentación con 150 ml de reacción de linealización según el ejemplo 2.

45 En una primera etapa de concentración, se filtraron aproximadamente 100 ml de reacción de restricción, para obtener 50 ml de retenido con una mayor concentración de ADNp. A continuación, se aplicó vacío al tanque de alimentación y se conectó el tubo de alimentación a un frasco con API. Después se realizó el procedimiento de diafiltración con 10 volúmenes (500 ml en total) de API. Posteriormente, se concentró el retenido tanto como fuese posible. Después de la concentración, se recogió el retenido en un tubo de reacción de 50 ml estéril. Se analizó el
50 retenido en un gel de agarosa de ADN (véase la figura 9). Las disoluciones de retenido se almacenaron a -20°C. Para la electroforesis en gel de agarosa, la concentración de ADN se determinó midiendo la absorción a 260 nm. Se usaron las cantidades indicadas de ADN para la electroforesis en gel.

55 Resultados

Determinación fotométrica de la concentración de ADN después de la concentración y diafiltración:

La concentración de ADN de las diferentes muestras de ADN se determinó midiendo la absorción a 260 nm:

60 Tabla 8: Concentración de plásmido

	Concentración [g/l]	Volumen para el gel de agarosa [μl]
Permeado de la etapa de concentración	n/a	10
Permeado de la etapa de diafiltración	n/a	10

	Concentración [g/l]	Volumen para el gel de agarosa [μ l]
Retenido de la etapa de diafiltración	0,10	3
Plásmido linealizado	0,17	1,8
Control de plásmido	0,10	3

Se determinó fotométricamente que la de concentración ADNbc en el retenido era de 1,05 g/l en un volumen final de 22 ml. La diafiltración del ADNp linealizado usando TFF produjo el 96,6% de ADN de entrada.

5 Electroforesis en gel de agarosa:

Sólo es visible una cantidad insignificante de ADN plasmídico en el permeado de la etapa de concentración y de la etapa de diafiltración.

10 13.3 - Transcripción *in vitro* de ARN

Se incubaron 800 ml de mezcla de transcripción *in vitro* tal como se describió en el ejemplo 4 durante 3 h a 37°C. A continuación, se añadieron CaCl₂ y DNasa I y posteriormente se incubó durante 2 h a 37°C.

15 13.4 - Diafiltración de la reacción de transcripción

Se usó el sistema de TFF Sartoflow 200 con dos membranas de PES (Sartorius, 200 cm², 100 kDa) para intercambiar el tampón de tres alícuotas (400 ml cada una) de la reacción de transcripción por API (parámetros del procedimiento indicados en la tabla 9). En primer lugar, se limpiaron el recipiente y los tubos con agua ultra pura, etanol y API. Luego se montó el sistema y se colocó el casete de filtro en el soporte Sartocon según las instrucciones del fabricante. Se limpió todo el sistema con agua ultra pura. Posteriormente, se desinfectó químicamente el sistema mediante un lavado de 1 hora con NaOH 1 M. Luego se lavó el sistema con API hasta que se midió un pH de 7 en el retenido y se equilibró el sistema con 500 ml de API. Después de eso, se añadieron 400 ml de reacción de transcripción (véase 13.3) al depósito del retenido, se ajustaron las presiones (dp y PTM) a 1 bar y se inició el procedimiento de diafiltración frente a 10 volúmenes de diafiltración (VDF) de agua para inyección (API). Después de la diafiltración mediante TFF, se midió fotométricamente la concentración de ARN.

Tabla 9: Parámetros de TFF usados para la diafiltración de la reacción de transcripción

Parámetros	
Cantidad de ARN [mg]	2100 - 2200
Volumen de disolución de ARN [ml]	410 - 430
membrana	Sartorius, PES, 100 kDa
Número de membranas	2
presiones [bar]	P1 = 1,5 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM y dp = 1 bar
Volumen de diafiltración de API [l]	4,1 - 4,3
Carga de membrana [mg de ARN/cm ²]	5 - 5,6

30

Resultados:

La concentración final del ARN después de la diafiltración fue de 5 g/l y la tasa de recuperación total del ARN después del intercambio de tampón mediante diafiltración fue del 98%.

35

Ejemplo 13.5 - Purificación mediante RP-HPLC de la reacción de transcripción acondicionada

Se diluyó la disolución de ARN obtenida del ejemplo 13.4 hasta TEAA 100 mM y una concentración de 1 g/l mediante la adición de acetato de trietilamonio (TEAA) 1 M y API. El ARN se purificó por etapas según el ejemplo 5. Se recogieron las fracciones de HPLC, se juntaron las fracciones que contenían producto y se dividieron en tres conjuntos I a III. Además, las fracciones se analizaron para determinar el contenido de ARN (UV260/280) y se analizó cada fracción para determinar la integridad de ARN.

40

Resultados:

Tabla 10: Determinación de la concentración de ARN y la integridad de ARN después de la purificación mediante RP-HPLC

Conjuntos	Volumen	Conc. de ARN	Cantidad de ARN	integridad
Conjunto I	Aprox. 7,2 l	0,12 g/l	Aprox. 840 mg	97,8%
Conjunto II	Aprox. 7,3 l	0,12 g/l	Aprox. 840 mg	97,7%
Conjunto III	Aprox. 6,2 l	0,12 g/l	Aprox. 744 mg	95,7%

5 En comparación con el material de partida (ARN acondicionado con TFF), la integridad pudo aumentarse en >10% (integridad de ARN del 86,5% antes de la RP-HPLC) mediante la separación de las especies de ARN malogradas.

10 Ejemplo 13.6 - Concentración y diafiltración del conjunto de RP-HPLC mediante TFF

Las tres conjuntos de ARN purificadas mediante RP-HPLC se procesaron por separado usando una etapa de concentración y diafiltración adicional con TFF para separar adicionalmente el ARN de las impurezas (por ejemplo, contaminaciones de espermidina) y para intercambiar el disolvente.

15 En primer lugar, se concentró cada conjunto desde 0,12 g/l hasta aproximadamente 5 g/l usando TFF. Se añadió una disolución de NaCl 5 M al retenido para conseguir una concentración final de 0,2 M de NaCl. Luego se realizó una diafiltración frente a NaCl 0,2 M (10 VDF) para retirar las impurezas de espermidina. A continuación, se intercambió la disolución de diafiltración por API (10 VDF). Los parámetros del procedimiento se muestran en la tabla 11. Después de la TFF, se determinó la concentración de ARN midiendo la absorción a 260 nm. Para la
20 electroforesis en gel de agarosa, se usaron las cantidades indicadas de ARN para la electroforesis en gel.

Tabla 11: Parámetros usados para la TFF de los conjuntos de RP-HPLC

	Conjunto 1	Conjunto 2	Conjunto 3
Presiones usadas para la concentración [bar]	P1 = 2 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM = 1,2 dp = 1,5	P1 = 2 P2 = 1 P3 = 0 PTM = 1,5 dp = 1,0	P1 = 2 P2 = 1 P3 = 0 PTM = 1,5 dp = 1,0
Presiones usadas para la diafiltración [bar]	P1 = 2 P2 = 1 P3 = 0 PTM = 1,5 dp = 1,0	P1 = 2 P2 = 1 P3 = 0 PTM = 1,5 dp = 1,0	P1 = 2 P2 = 1 P3 = 0 PTM = 1,5 dp = 1,0
Membrana de TFF	Membrana Hydrosart de 200 cm ² ; 100 kDa	Membrana Hydrosart de 200 cm ² ; 100 kDa	Membrana Hydrosart de 200 cm ² ; 100 kDa
Carga de membrana	2,1 mg de ARN/cm ²	2,1 mg de ARN/cm ²	1,9 mg de ARN/cm ²
Volumen inicial	7,2 l	7,3 l	6,2 l

25 Resultados:

Se determinó espectrométricamente que el rendimiento después de la diafiltración era del 94,44%, el 94,3% y el 90,5%, respectivamente.

30 Electroforesis en gel de agarosa:

Se analizaron las muestras del procedimiento de diafiltración de TFF después de la purificación mediante RP-HPLC. Las muestras respectivas se analizaron usando electroforesis en gel de agarosa (véase la figura 10). El esquema de carga del gel de agarosa de ARN respectivo se muestra en la tabla 12.

35 Tabla 12: Esquema de carga de muestras de permeado y retenido tomadas durante la TFF de los conjuntos de RP-HPLC.

Carril	Muestra	Conc. de ARN [µg/µl]	Volumen usado para la electroforesis en gel de agarosa [µl]
--------	---------	----------------------	---

Carril	Muestra	Conc. de ARN [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Volumen usado para la electroforesis en gel de agarosa [μl]
1	Marcador de ARN		8
2	Conjunto I de RP-HPLC	0,12	9
3	Conjunto II de RP-HPLC	0,12	9
4	Conjunto III de RP-HPLC	0,12	9
5	Permeado de TFF	n.a.	9
6	Permeado de TFF (40x concentrado)	n.a.	9
7	Conjunto I de retenido de TFF	5,00	1
8	Conjunto II de retenido de TFF	5,00	1
9	Conjunto III de retenido de TFF	4,84	1
10	Producto final	4,84	1
11	Control	5,00	1
12	Control	1,00	1
13	vacío		
14	Marcador de ARN		8

Resultados:

5 Las muestras de permeado de TFF no contenían niveles de ARN detectables (aunque las muestras se habían concentrado 40x). Las muestras de retenido de TFF y el conjunto de ARN acondicionado con TFF final contenían ARN de integridad de aproximadamente el 100%, todas aquellas con un tamaño de banda de 2476 de bases, que concordaba con el tamaño teóricamente esperado.

Ejemplo 13.7 - Determinación del contenido de proteína usando un ensayo de BCA

10 Para determinar el contenido de proteína en las muestras, se usó la prueba de BCA. Se midió fotométricamente la concentración de proteína total contenida en una muestra mediante absorción a 562 nm en comparación con un patrón de proteína (albúmina sérica bovina, BSA). La prueba se realizó usando un kit de BCA disponible comercialmente, según las instrucciones del fabricante. Para producir una disolución madre de disolución de 15 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina sérica bovina (BSA), se mezclaron 20 μl de disolución de BSA [1 mg/ml] con 980 μl de agua para inyección. Esta disolución madre de BSA se usó para generar una curva patrón usando disoluciones de BSA de diferentes concentraciones (50 μl cada una, diluidas en API): 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El contenido de proteína se determinó en muestras de la TFF después de la reacción de linealización (ejemplo 13.2), de la reacción de transcripción (ejemplo 13.3), antes de la RP-HPLC (ejemplo 13.4) y después de la RP-HPLC y la 20 TFF frente a NaCl 0,2 M (ejemplos 13.5 y 13.6).

Resultados:

25 Las mediciones se realizaron en un fotómetro convencional. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Concentraciones de proteína determinadas

	Muestra	A562nm (UA) promedio	Dilución	proteína [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Conc. de ARN/ADN [mg/ml]	proteína/ARN [$\mu\text{g}/\text{mg}$]
1	Retenido de TFF después de la linealización	0,717	20	324,2	1,05	308,8
2	Reacción de transcripción	0,404	1000	6823,4	5,07	1345,8
3	Retenido de TFF antes de la RP-HPLC	0,596	10	122,9	4,30	28,6

	Muestra	A562nm (UA) promedio	Dilución	proteína [µg/ml]	Conc. de ARN/ADN [mg/ml]	proteína/ARN [µg/mg]
4	Retenido de TFF antes de la RP-HPLC	0,632	10	136	5,2	26,7
5	Retenido de TFF antes de la RP-HPLC	0,625	10	131,2	5,22	25,1
6	Conjunto I de retenido de TFF después de la RP-HPLC	0,397	2	13,2	5,03	2,6
7	Conjunto II de retenido de TFF después de la RP-HPLC	0,352	2	10,7	5,00	2,1
8	Conjunto III de retenido de TFF después de la RP-HPLC	0,455	2	16,6	4,84	3,4

Se muestran los valores del ensayo de BCA. 1: retenido de TFF de la reacción de linealización; 2: reacción de transcripción; 3-5: retenidos de TFF de las reacciones de transcripción antes de la RP-HPLC; 6-8: retenidos de TFF de las reacciones de transcripción después de la RP-HPLC

5 Pudo observarse un agotamiento por etapas del contenido de proteína por ARN a lo largo de todo el procedimiento de purificación de ARN.

SDS-PAGE:

10 Se usó SDS-PAGE para determinar el contenido de proteína en las diferentes muestras. Se usaron las cantidades indicadas de muestras para SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la figura 11.

15 Tabla 14: Muestras usadas para SDS PAGE

Carril	Muestra	Conc. de ARN/ADN [mg/ml]	Volumen [µl]
1	Marcador de proteína		
2	Retenido de TFF después de la linealización	1,05	9,5
3	Reacción de transcripción	5,07	2,0
4	Retenido de TFF antes de la RP-HPLC	4,30	2,3
5	Retenido de TFF antes de la RP-HPLC	5,2	2,0
6	Retenido de TFF antes de la RP-HPLC	5,22	1,9
7	Conjunto I de retenido de TFF después de la RP-HPLC	5,03	2,0
8	Conjunto II de retenido de TFF después de la RP-HPLC	5,00	2,0
9	Conjunto III de retenido de TFF después de la RP-HPLC	4,84	2,1
10	Producto final	4,84	2,1
11	control	5,00	2,0
12	Marcador de proteína		

No fueron detectables bandas de proteína en las muestras después de la purificación mediante RP-HPLC.

Ejemplo 13.8 - Determinación de la concentración de espermidina

20 La concentración de espermidina se midió en los retenidos de TFF antes de la RP-HPLC (ejemplo 13.4) y después

de la purificación mediante RP-HPLC y TFF frente a NaCl 0,2 M (ejemplos 13.5 y 13.6) según el ejemplo 6.3.

Resultados:

5 Tabla 15: Concentraciones de espermidina en muestras de ARN

Muestra	Conc. de ARN [g/l]	Espermidina/ARN [ng/mg]
Retenido de TFF antes de la RP-HPLC (1:20)	0,22	39964,50
Retenido de TFF antes de la RP-HPLC (1:20)	0,26	39039,21
Retenido de TFF antes de la RP-HPLC (1:20)	0,26	37748,26
Conjunto I de RP-HPLC	0,12	1834,98
Conjunto II de RP-HPLC	0,12	30,08
Conjunto III de RP-HPLC	0,12	110,90
Conjunto I de retenido de TFF después de RP-HPLC	5,03	1,00
Conjunto II de retenido de TFF después de RP-HPLC	5,00	3,08
Conjunto III de retenido de TFF después de RP-HPLC	4,84	1,48

Resultados:

10 La espermidina fue detectable en muestras de los retenidos de TFF antes de la purificación mediante RP-HPLC. En las muestras purificadas mediante RP-HPLC y TFF usando NaCl 0,2 M, sólo fue detectable una cantidad muy baja de espermidina (véase la tabla 15).

Ejemplo 13.9 - Determinación de disolventes orgánicos

15 La concentración de acetonitrilo (ACN) y TEAA se determinó según el ejemplo 6.4.

Resultados:

20 La muestra final después de la purificación mediante RP-HPLC y TFF contenía menos de 40 ppm de ACN y menos de 2 ppm de TEAA.

Ejemplo 14 - Visión general del procedimiento y parámetros clave del procedimiento:

25 En lo siguiente, se ilustra un ejemplo adicional del método de la invención, que proporciona los parámetros del procedimiento del método para cada una de las etapas individuales incluyendo la concentración de la reacción de linealización y diafiltración de ADN plasmídico linealizado, la diafiltración de la reacción de transcripción *in vitro* de ARN y la concentración y diafiltración de una fracción de ARN de RP-HPLC.

30 14.1 - Concentración de la reacción de linealización y diafiltración de ADN plasmídico linealizado usando TFF:

La linealización del ADN plasmídico se realizó tal como se describió en el ejemplo 2. Para la filtración de flujo tangencial de la reacción de linealización (llevada a cabo según el ejemplo 2), se usó un casete de filtro Hydrosart (membrana a base de celulosa, MWCO de 100 kDa, Sartorius). El procedimiento de concentración de ADN plasmídico así como el procedimiento de diafiltración se realizaron tal como se explicó anteriormente (véase el ejemplo 13). El resultado de la concentración de la mezcla de linealización se proporciona en la figura 12. El resultado de la diafiltración del ADN plasmídico linealizado se proporciona en la figura 13. Los parámetros relevantes del procedimiento se resumen en la tabla 16.

40 Tabla 16: Parámetros del procedimiento de TFF de concentración y diafiltración de ADN plasmídico

	Parámetro del procedimiento	
Concentración de la	Concentración de ADNp inicial [g/l]	0,2

	Parámetro del procedimiento	
reacción de linealización	Presiones usadas para la concentración de la mezcla de linealización de ADNp [bar]	P1 = 1,5 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM = 1 dp = 1
	Concentración de ADNp obtenida [g/l]	1,0 ó 1,5
Diafiltración del ADNp linealizado en API	Presiones usadas para la diafiltración de ADNp linealizado [bar]	P1 = 1,5 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM = 1 dp = 1
	VDF	10
	Tampón de DF	API
Parámetros generales	Casetes de membrana de TFF	Casete de membrana Hydrosart; 200 cm ² ; 100 kDa o NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión)
	Carga de membrana	0,1 - 0,6 mg de ADN/cm ²
	Velocidad de flujo de alimentación [l/h/m ²]	750 - 900
	Velocidad de flujo de permeado [l/h/m ²]	30 - 100

14.2 - Diafiltración de la reacción de TIV de ARN mediante TFF:

5 La transcripción *in vitro* de ARN se realizó tal como se describió en el ejemplo 4. Para la filtración de flujo tangencial de la reacción de TIV de ARN (llevada a cabo según el ejemplo 4), se usó un casete de filtro Hydrosart (membrana a base de celulosa, MWCO de 100 kDa, Sartorius). El acondicionamiento de la reacción de TIV de ARN se realizó tal como se explicó anteriormente (véase el ejemplo 13). El resultado de la diafiltración de la reacción de TIV de ARN se proporciona en la figura 14. Los parámetros relevantes del procedimiento se resumen en la tabla 17.

10 Tabla 17: Parámetros del procedimiento de TFF de la diafiltración de la reacción de TIV de ARN

Parámetro del procedimiento	
Presiones usadas para la diafiltración de la reacción de TIV de ARN [bar]	P1 = 1,5 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM = 1-1,5 dp = 1
VDF	10
Tampón de DF	API
Casetes de membrana de TFF	Casete de membrana Hydrosart; 200 cm ² ; 100 kDa o NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión), 100 kDa
Carga de membrana	2,5 - 6,5 mg de ARN/cm ²
Velocidad de flujo de alimentación [l/h/m ²]	300 - 1050
Velocidad de flujo de permeado [l/h/m ²]	20 - 120

14.3 - Concentración y diafiltración del conjunto de ARN de RP-HPLC

15 El ARN transcrito *in vitro* se purificó mediante RP-HPLC tal como se describió en el ejemplo 5. Para la filtración de flujo tangencial del conjunto de ARN de RP-HPLC, se usó un casete de filtro Hydrosart (membrana a base de celulosa, MWCO de 100 kDa, Sartorius). La concentración del conjunto de ARN de RP-HPLC se realizó tal como se explicó anteriormente (véase el ejemplo 13). El resultado de la concentración del ARN de RP-HPLC se proporciona

en la figura 15. La diafiltración del ARN en NaCl 0,2 M y una diafiltración adicional del ARN en API se realizaron tal como se explicó anteriormente (véase el ejemplo 13). El resultado de la diafiltración del conjunto de ARN de RP-HPLC se proporciona en la figura 16. Los parámetros relevantes del procedimiento se resumen en la tabla 18.

5 Tabla 18: Parámetros del procedimiento de TFF de la concentración y diafiltración de ARN de RP-HPLC

	Parámetro del procedimiento	
Concentración del conjunto de ARN de RP-HPLC	Concentración de ARN inicial [g/l]	0,1
	Presiones usadas para la concentración de la mezcla de linealización de ADNp [bar]	P1 = 1,5 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM = 1 dp = 1
	Concentración de ARN obtenida [g/l]	
Diafiltración del conjunto de ARN de RP-HPLC en tampón de NaCl	Presiones usadas para la diafiltración de ARN [bar]	P1 = 1,5 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM = 1 - 1,5 dp = 1
	VDF	10
	Tampón de DF	NaCl 0,2 M
Diafiltración del conjunto de ARN de RP-HPLC en API	Presiones usadas para la diafiltración de ARN [bar]	P1 = 1,5 P2 = 0,5 P3 = 0 PTM = 1 - 1,5 dp = 1
	VDF	10
	Tampón de DF	API
Parámetros generales	Casetes de membrana de TFF	Casete de membrana Hydrosart; 200 cm ² ; 100 kDa o NovaSet-LS ProStream (mPES de baja unión), 100 kDa
	Carga de membrana	2 mg - 2,5 mg de ARN/cm ²
	Velocidad de flujo de alimentación [l/h/m ²]	900 - 1500
	Velocidad de flujo de permeado [l/h/m ²]	25 - 140
	Temperatura [°C]	17°C o <17°C

REIVINDICACIONES

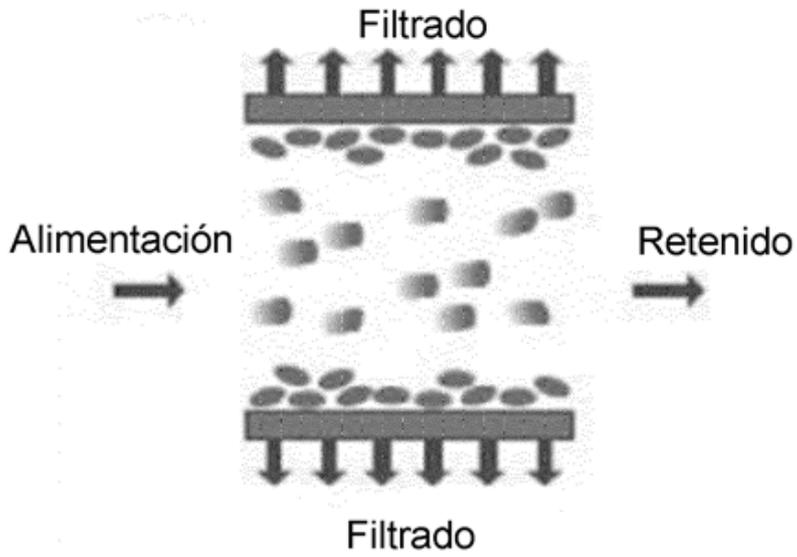
1. Método para producir y purificar ARN, que comprende las etapas de
 - 5 A) proporcionar ADN que codifica para el ARN;
 - B) realizar la transcripción *in vitro* del ADN para dar lugar una disolución que comprende ARN transcrito; y
 - 10 C) realizar la diafiltración y/o concentración y/o purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito mediante una o más etapas de filtración de flujo tangencial (TFF), en el que el método comprende en la etapa C) las etapas de:
 - 15 C1) realizar opcionalmente la terminación de la transcripción;
 - C2) realizar la diafiltración y/o concentración y/o purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito mediante una o más etapas de TFF;
 - 20 C3) realizar la purificación del ARN mediante un método de purificación adicional, en el que dicho método de purificación adicional no comprende una etapa de extracción con fenol/cloroformo y/o precipitación de ADN y/o ARN, en el que el método de purificación adicional se realiza por medio de HPLC de fase inversa; y
 - 25 C4) realizar la diafiltración y/o concentración y/o purificación de la disolución que comprende el ARN transcrito obtenida después de la etapa C3) mediante una o más etapas de TFF,

en el que la al menos una o más etapas de TFF comprende usar un casete de membrana de TFF.
2. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa A) se proporciona ADN plasmídico como ADN que codifica para el ARN y el método comprende posteriormente a la etapa A) las etapas de:
 - A1) linealización del ADN plasmídico en una reacción de linealización;
 - A2) opcionalmente terminación de la reacción de linealización; y
 - 35 A3) diafiltración y/o concentración y/o purificación de la reacción de linealización que comprende ADN plasmídico linealizado mediante una o más etapas de TFF.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la etapa C) comprende al menos una etapa de diafiltración usando TFF y/o al menos una etapa de concentración usando TFF.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la al menos una etapa de diafiltración usando TFF en la etapa C) comprende diafiltración con una disolución acuosa de sal.
- 45 5. Método según la reivindicación 4, en el que la disolución acuosa de sal es una disolución de NaCl, preferiblemente una disolución acuosa que comprende desde aproximadamente 0,1 M de NaCl hasta aproximadamente 1 M de NaCl, más preferiblemente una disolución que comprende desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,5 M de NaCl.
- 50 6. Método según la reivindicación 3, en el que la al menos una etapa de diafiltración usando TFF de la etapa C) comprende diafiltración con agua.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el método no comprende una etapa de usar una membrana de fibras huecas de TFF.
- 55 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la al menos una o más etapas de TFF comprende usar una membrana de TFF con un punto de corte de peso molecular de ≤ 500 kDa, preferiblemente de ≤ 200 kDa y lo más preferiblemente de ≤ 100 kDa.
- 60 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la al menos una o más etapas de TFF comprende usar una membrana de TFF que comprende al menos una de una membrana de poli(éter sulfona) (PES), de poli(éter sulfona) modificada (mPES), de derivado de celulosa o combinaciones de los mismos.
- 65 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la al menos una o más etapas de TFF comprende usar una membrana de TFF que comprende una membrana de derivado de celulosa con un

punto de corte de peso molecular de aproximadamente 100 kDa.

- 5 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que todas las etapas de TFF se realizan con la misma membrana de TFF, preferiblemente en el que la membrana de TFF es según las reivindicaciones 7 a 10.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la membrana de TFF es una membrana de derivado de celulosa.
- 10 13. Método para producir y purificar ARN, que comprende las etapas de
- 15 a) proporcionar ADN plasmídico que codifica para el ARN;
 - b) realizar la linealización del ADN plasmídico en una reacción de linealización;
 - c) realizar opcionalmente la terminación de la reacción de linealización;
 - 20 d) realizar la concentración de la reacción de linealización que comprende ADN plasmídico linealizado mediante una etapa de TFF;
 - e) realizar la diafiltración de la reacción de linealización que comprende ADN plasmídico linealizado mediante una etapa de TFF;
 - 25 f) realizar la transcripción del ADN para dar lugar una disolución que comprende ARN transcrito;
 - g) realizar opcionalmente la terminación de la transcripción;
 - h) realizar la diafiltración de la disolución que comprende el ARN transcrito mediante una etapa de TFF;
 - 30 i) realizar la purificación del ARN mediante al menos un método de purificación adicional, en el que el método de purificación adicional se realiza por medio de HPLC de fase inversa;
 - 35 j) realizar la concentración de la disolución que comprende el ARN transcrito obtenida después de la etapa i) mediante una etapa de TFF; y
 - k) realizar la diafiltración de la disolución que comprende el ARN transcrito obtenida después de la etapa j) mediante una primera y una segunda etapa de TFF;
- 40 en el que la TFF de las etapas j) o k) comprende usar un casete de membrana de TFF.

A



B

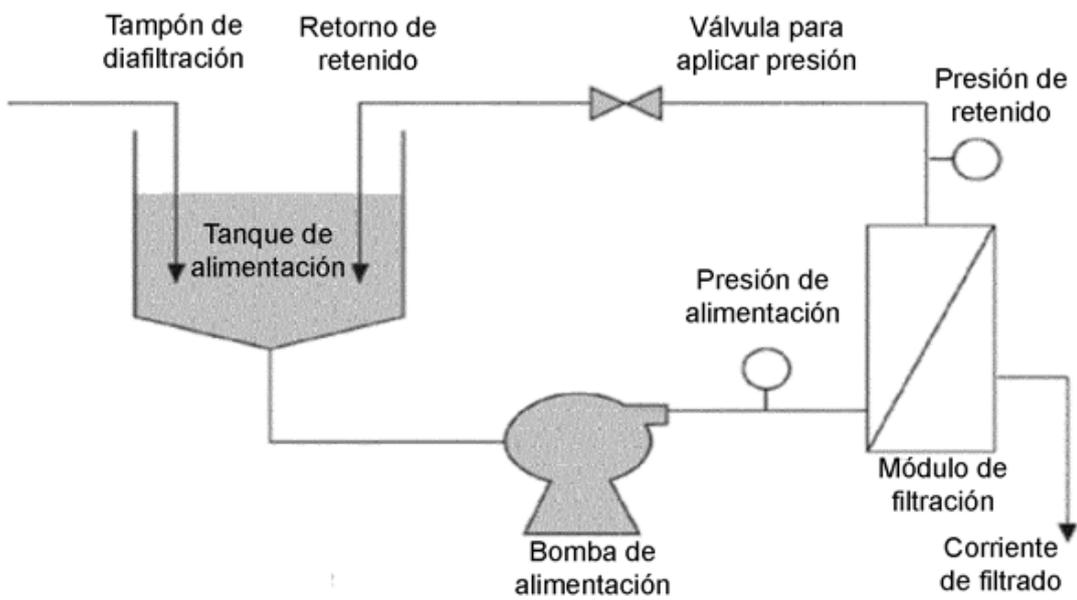
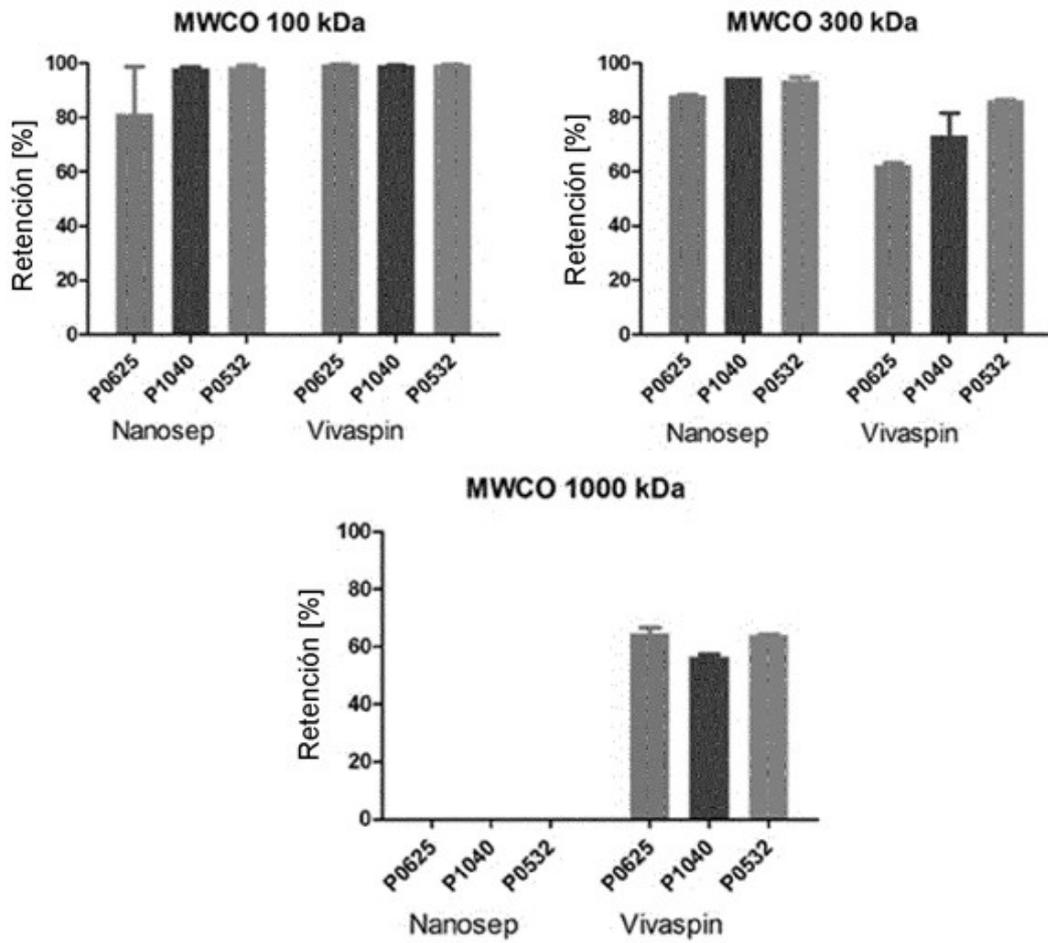


Figura 1

A



B

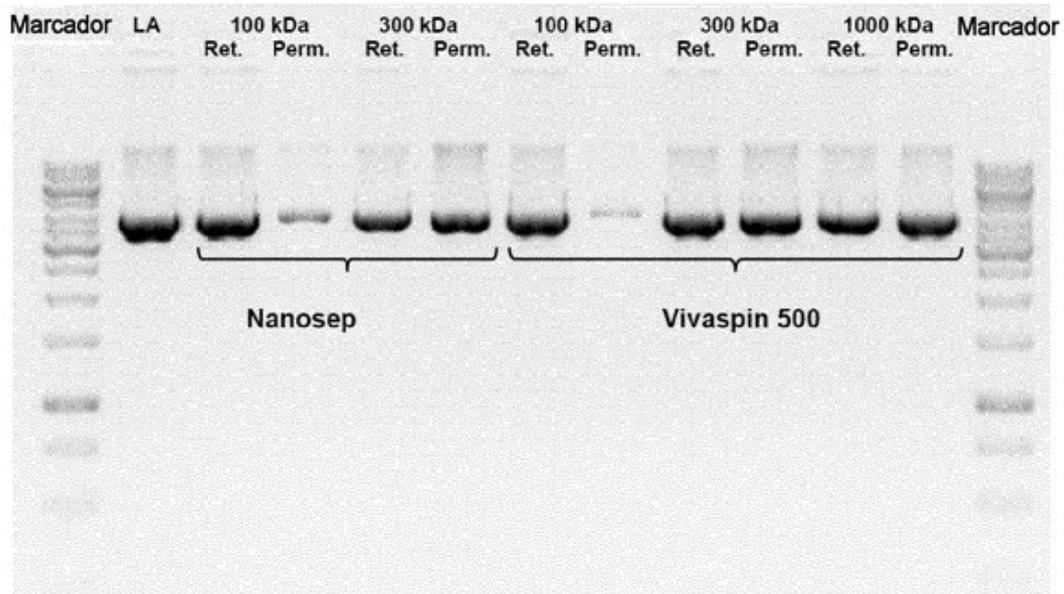
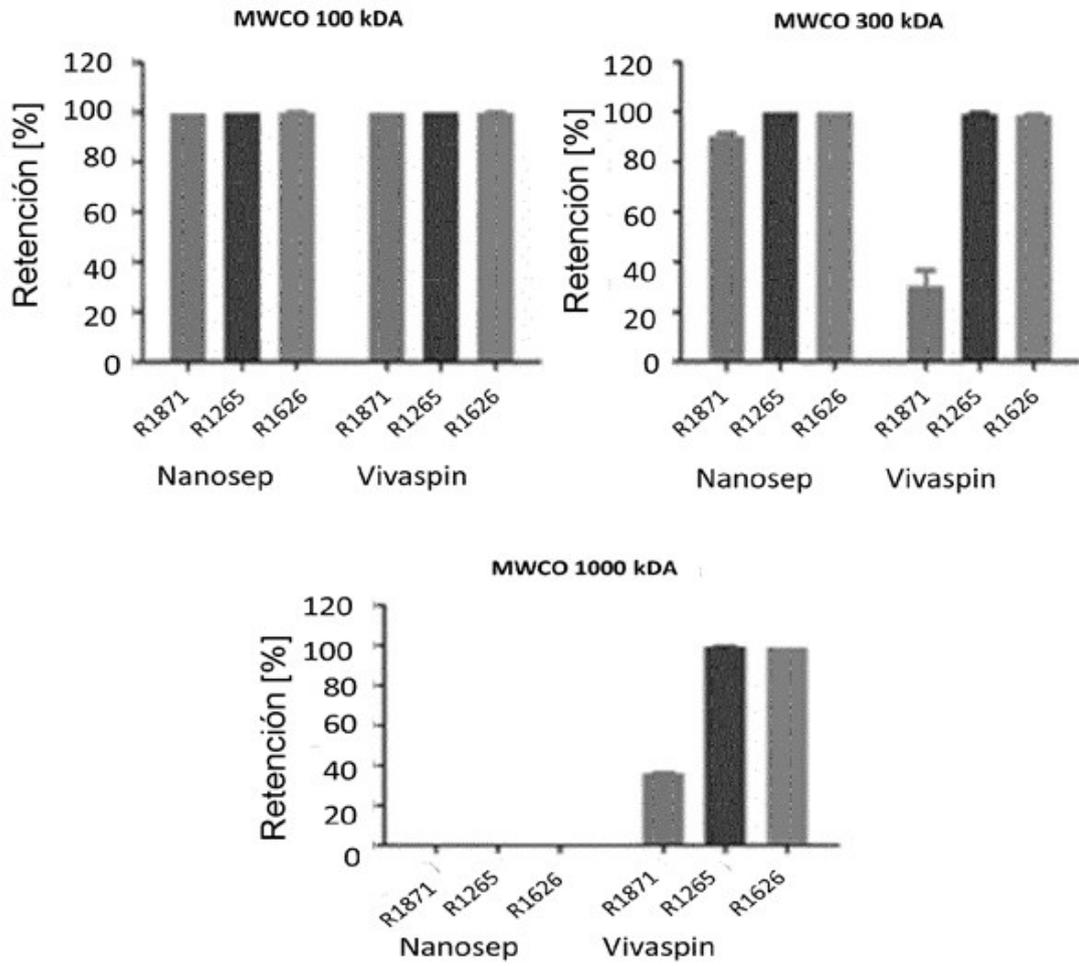


Figura 2

A



B

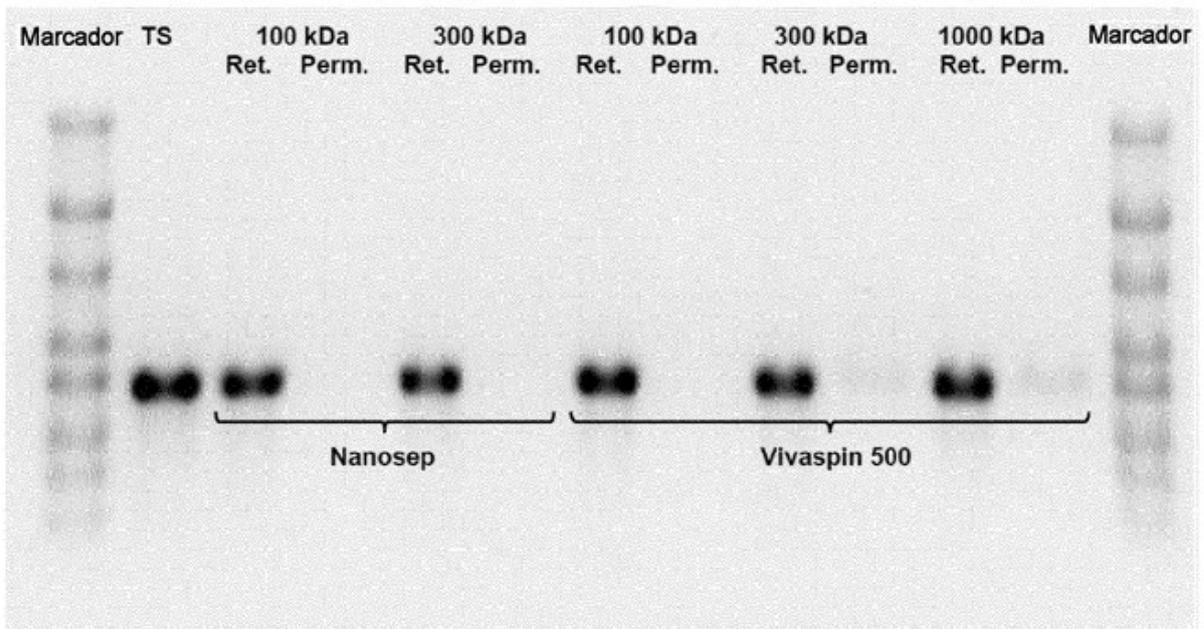


Figura 3

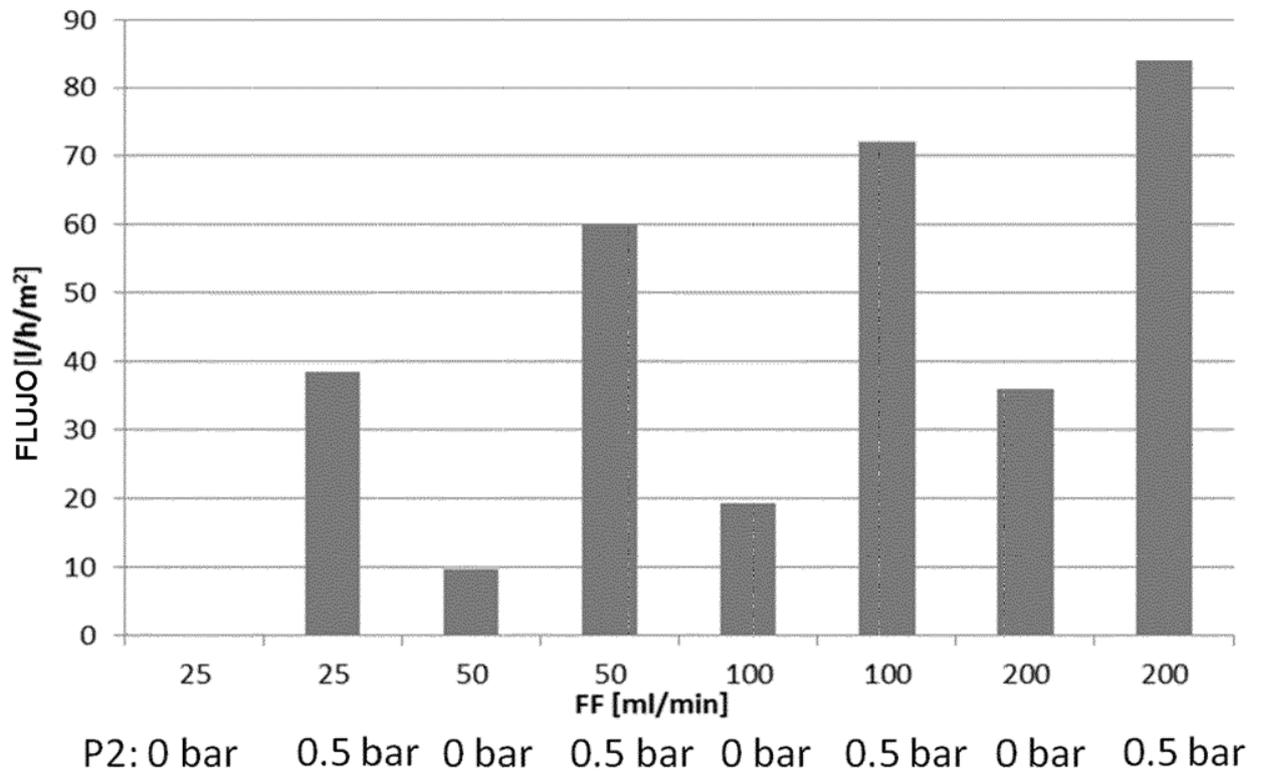


Figura 4

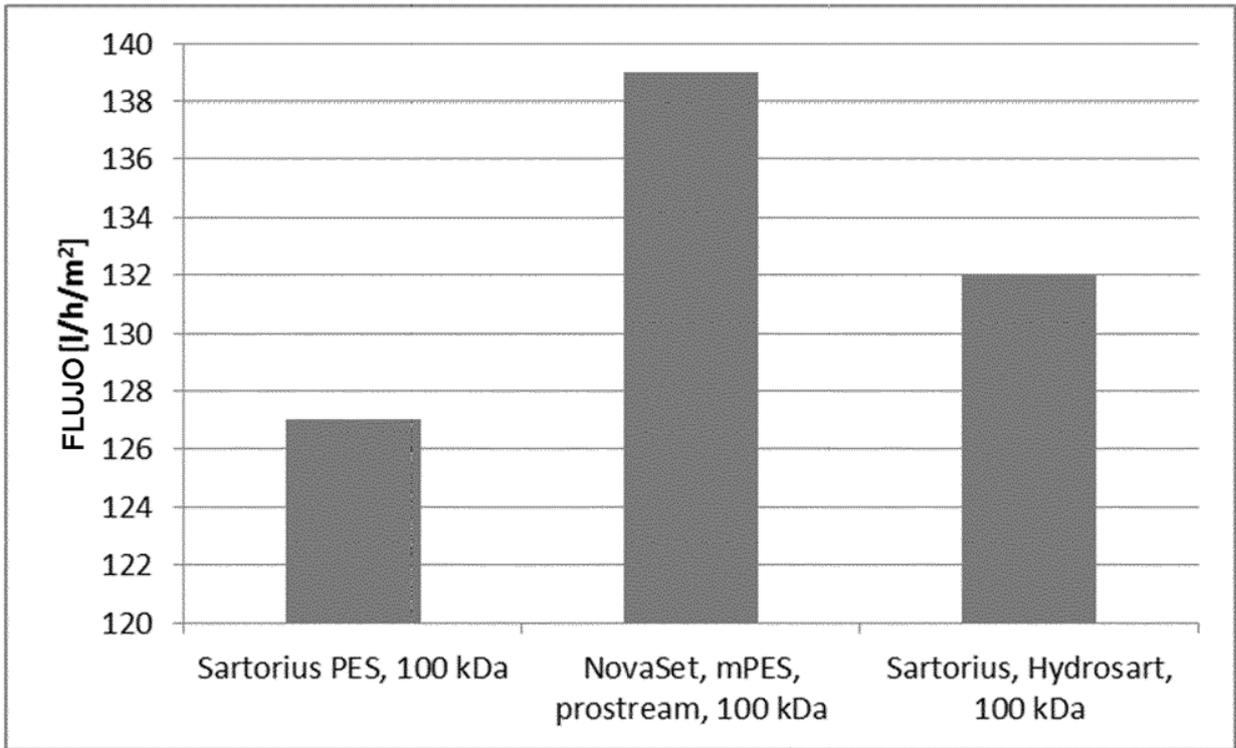
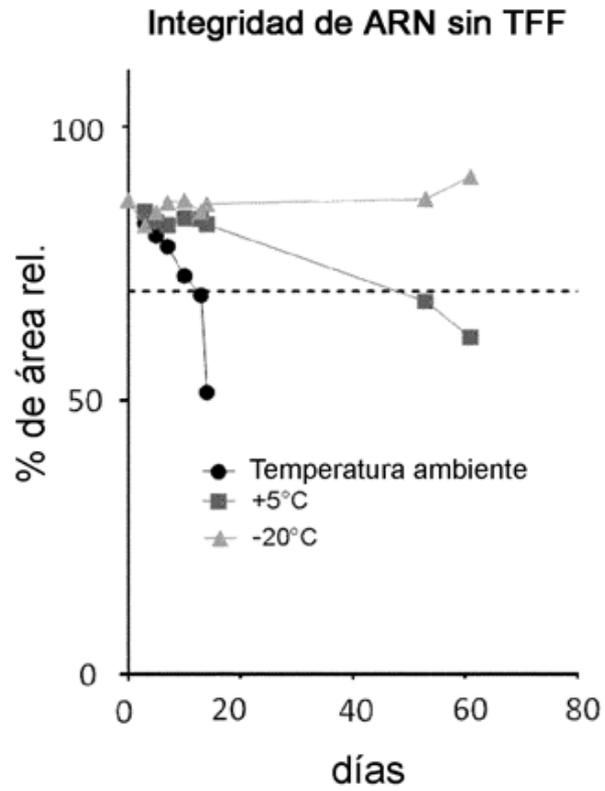


Figura 5

A



B

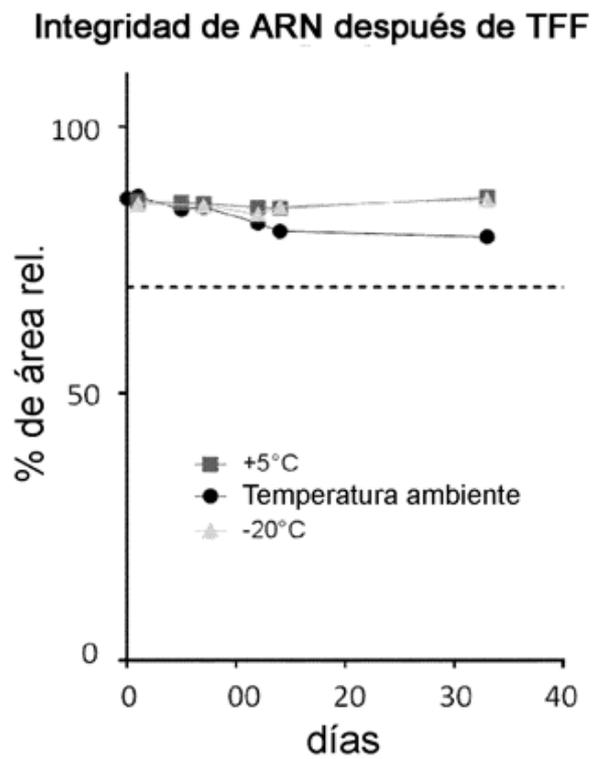


Figura 6

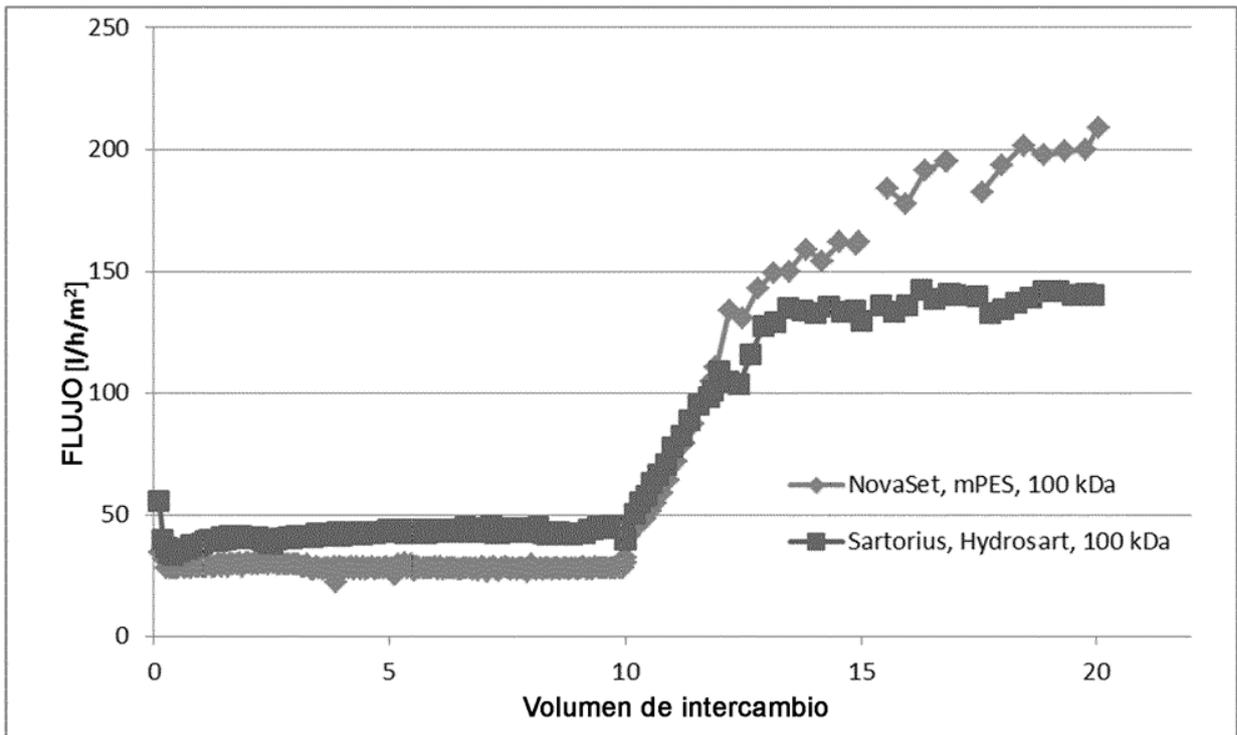


Figura 7

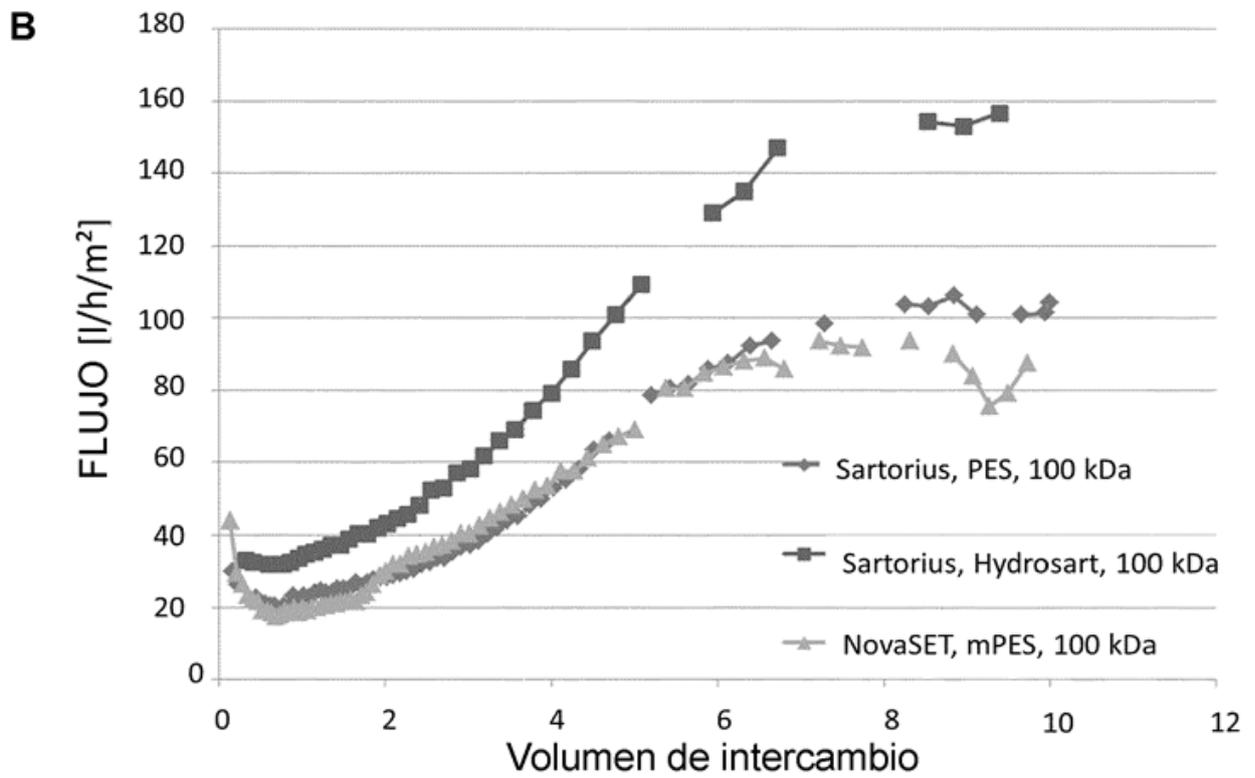
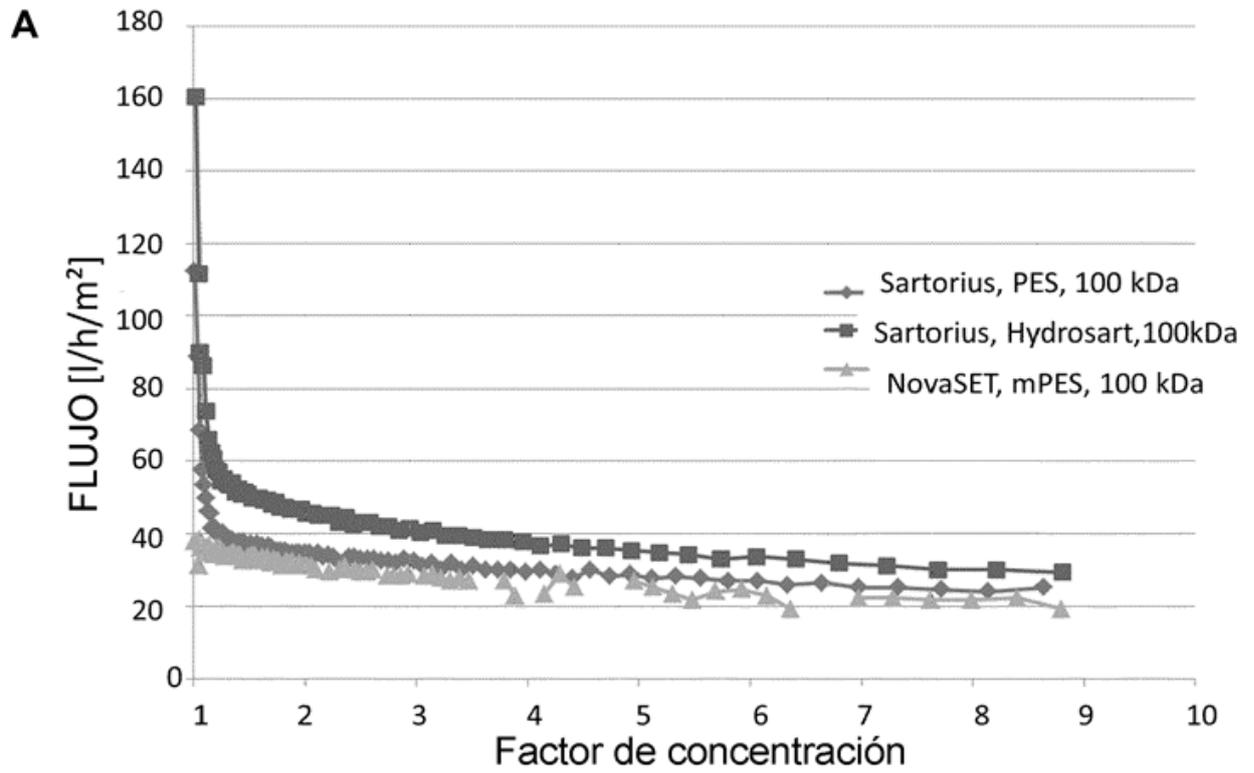


Figura 8



Figura 9

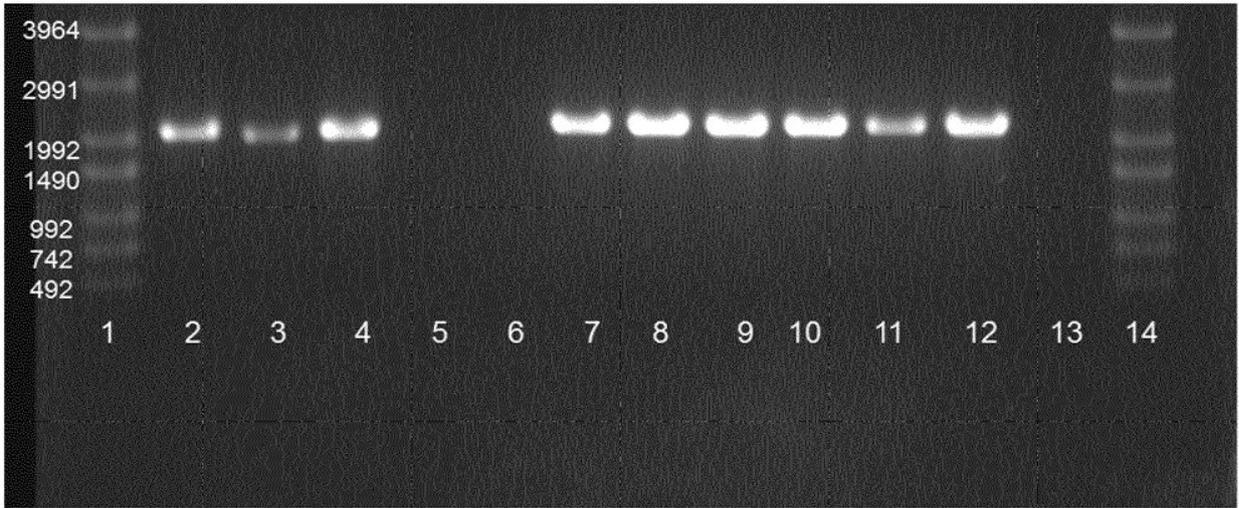


Figura 10

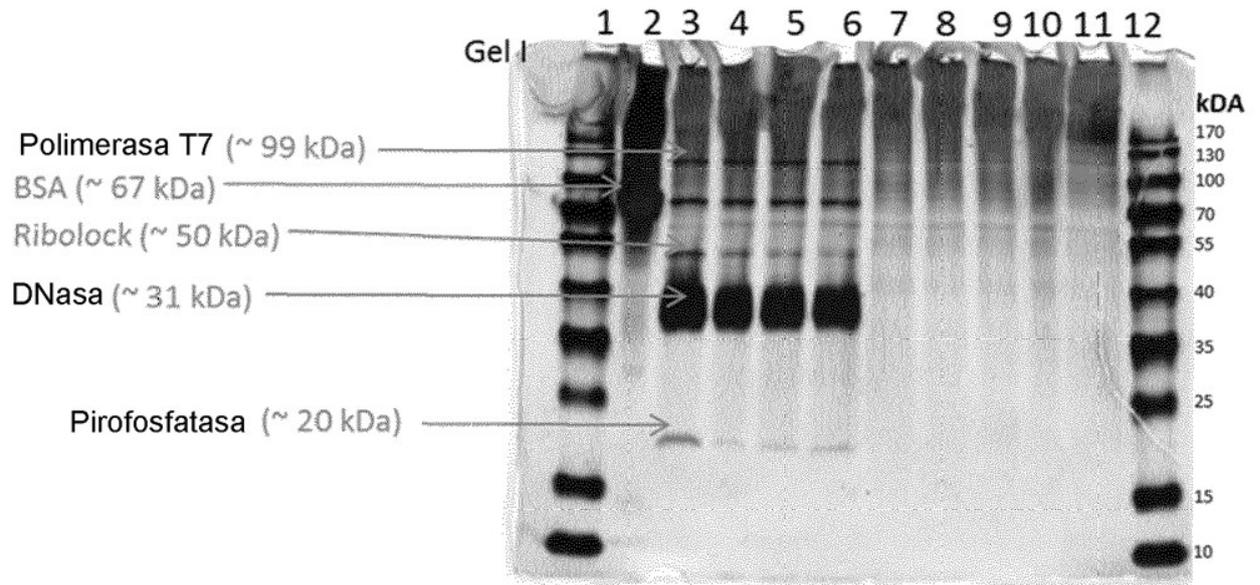


Figura 11

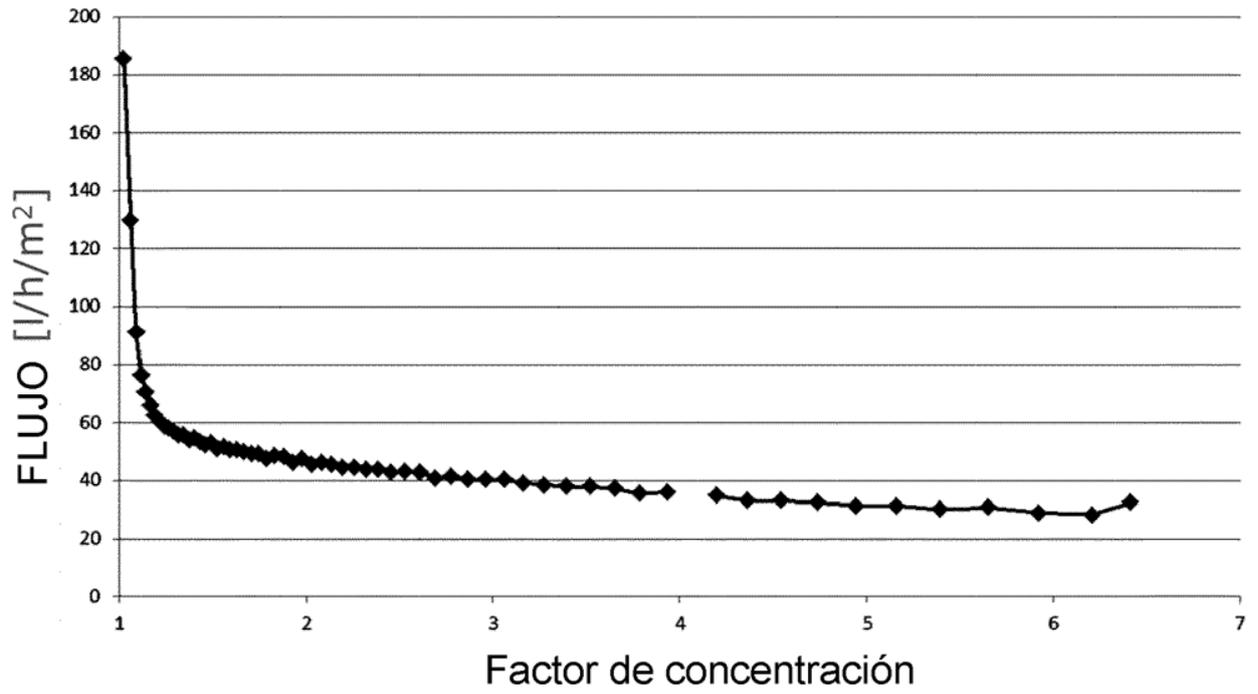


Figura 12

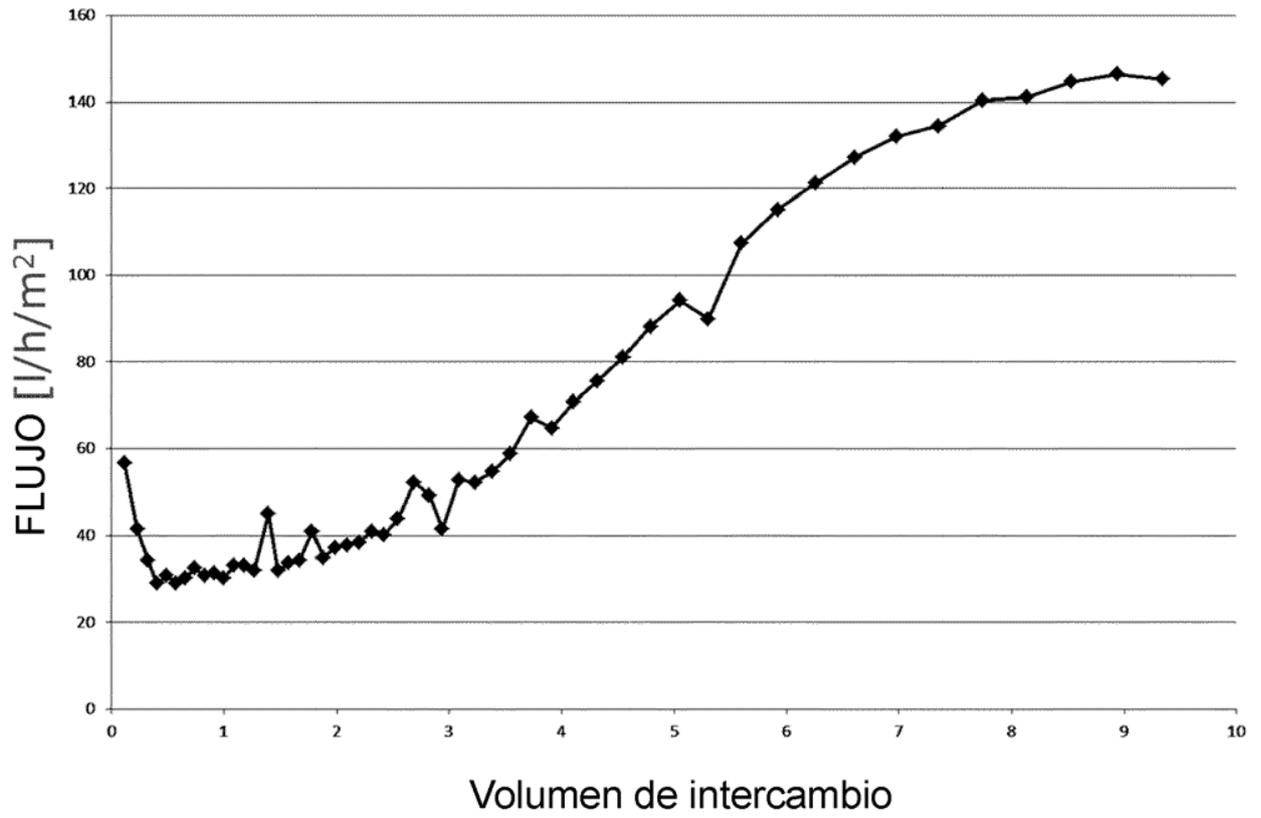


Figura 13

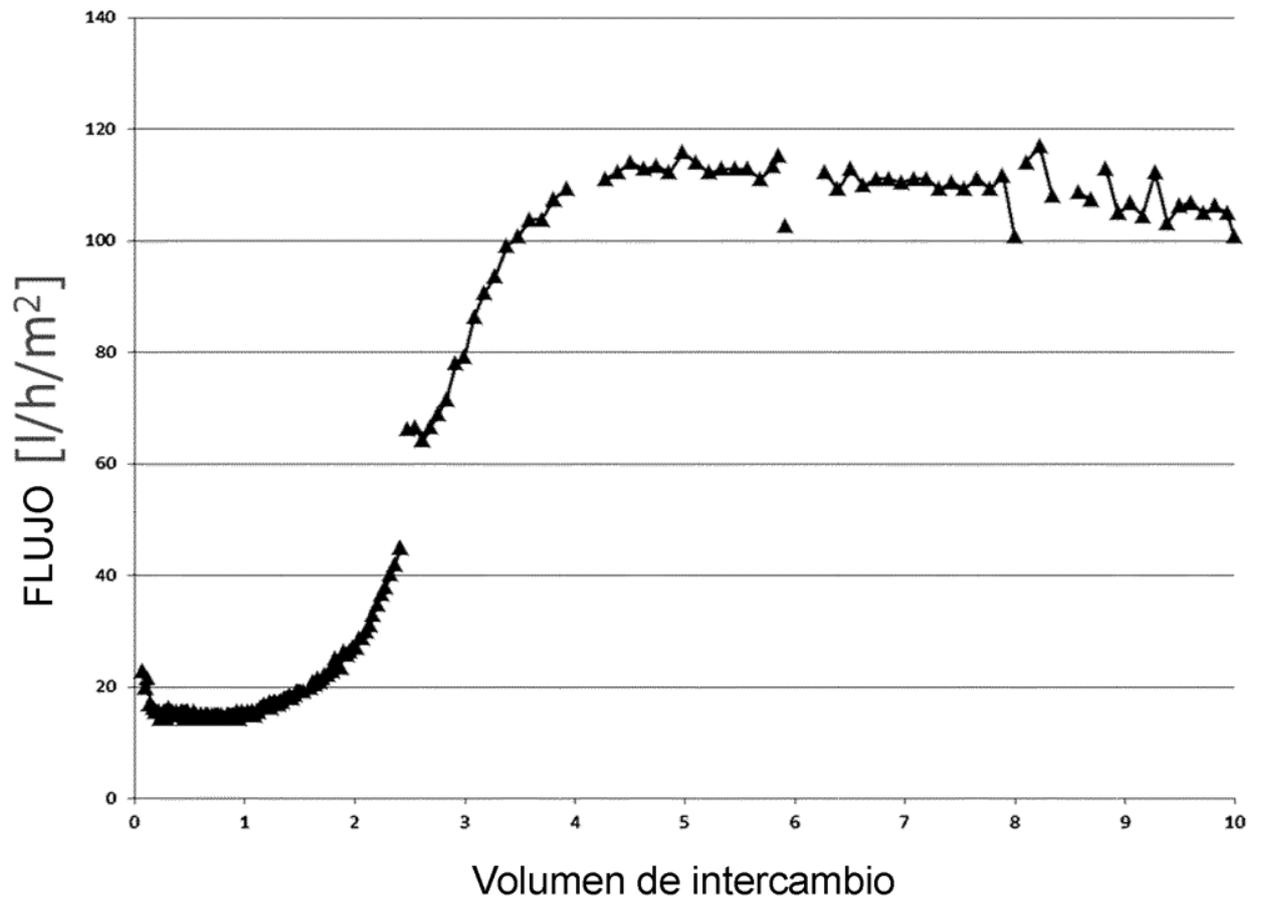


Figura 14

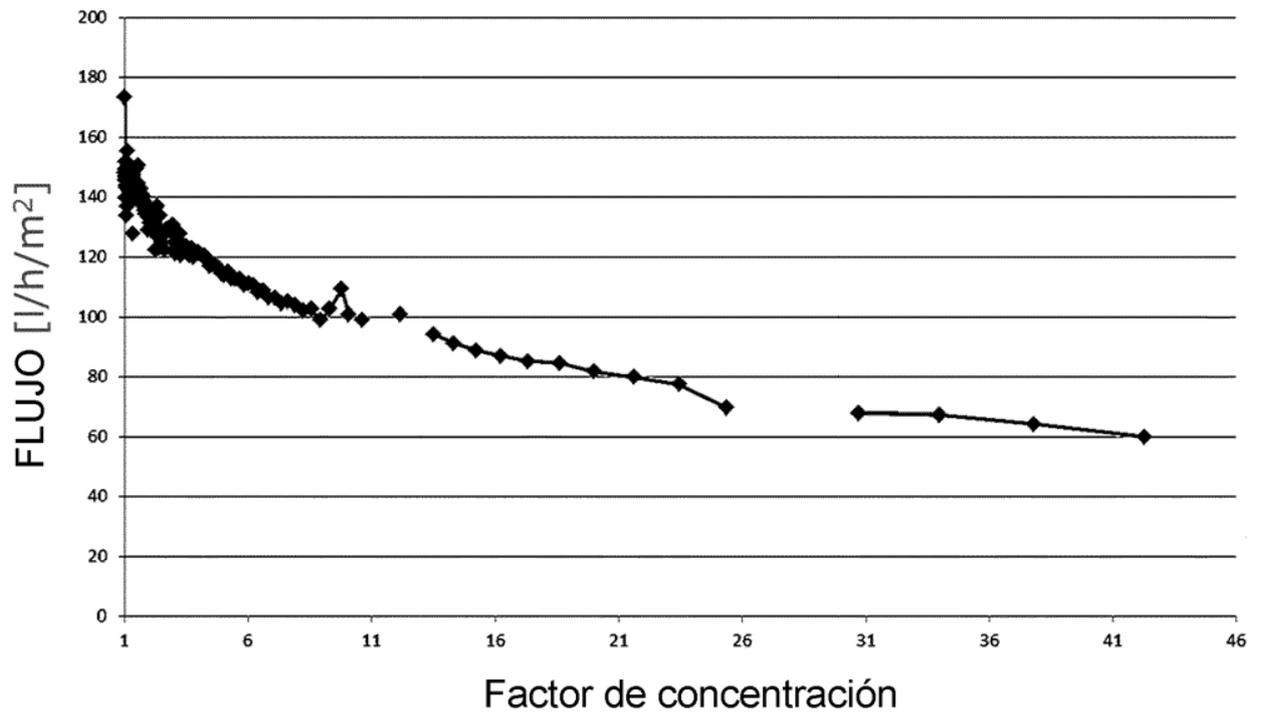


Figura 15

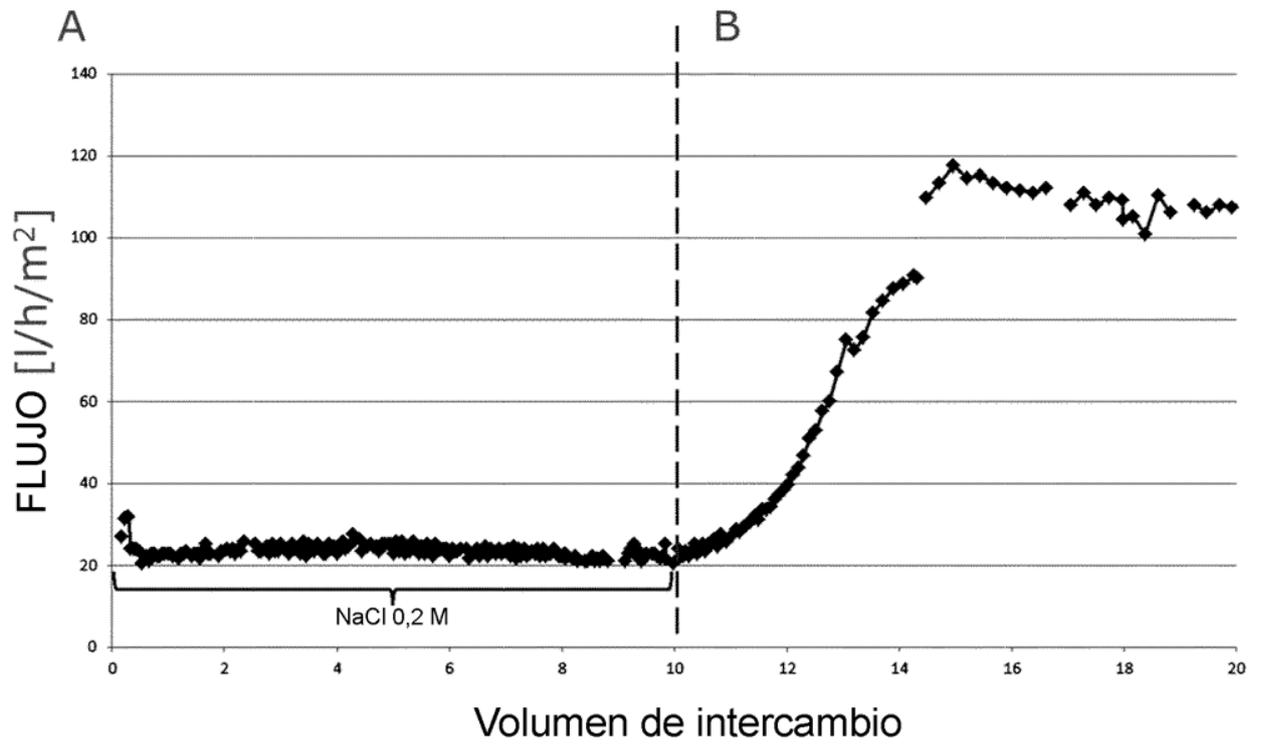


Figura 16