

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 083**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C07H 1/06** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2018 PCT/US2018/019978**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2018 WO18157141**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2018 E 18711737 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022 EP 3585892**

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

30 Prioridad:

**27.02.2017 US 201762463981 P**

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

**13.10.2022**

73 Titular/es:

**TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)  
200 West Street  
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**DEROSA, FRANK;  
HEARTLEIN, MICHAEL;  
ABYSALH, JONATHAN;  
KARVE, SHRIRANG;  
DIAS, ANUSHA y  
CRAWFORD, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 925 083 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de purificación de ARN mensajero

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Las sustancias terapéuticas de ARN mensajero (ARNm) son nuevos agentes terapéuticos prometedores; por ejemplo, las terapias de reemplazo de ARNm pueden ser alternativas a las terapias tradicionales de reemplazo de proteínas. En una terapia de reemplazo de ARNm, un ARNm intacto que codifica una secuencia proteica específica se suministra a una célula diana y se traduce en una proteína intacta por la maquinaria de traducción nativa de la célula. El ARNm para dichas sustancias terapéuticas generalmente se sintetiza usando sistemas de transcripción *in vitro* con enzimas tales como ARN polimerasas que transcriben ARNm a partir de ADN plasmídico molde, junto con  
10 o seguido de la adición de una caperuza en 5' y poliadenilación en 3'. El resultado de tales reacciones es una composición que incluye ARNm de longitud completa y diversos contaminantes indeseables, por ejemplo proteínas, sales, amortiguadores y ácidos nucleicos que no son ARN, que generalmente se omiten para proporcionar un ARNm limpio y homogéneo que se puede usar en una terapia de reemplazo de ARNm.

15 Tradicionalmente, el ARNm se purifica a partir de reacciones de transcripción *in vitro* mediante sistemas de columna a base de sílice disponibles en el mercado, tal como el kit Qiagen RNeasy®, o por extracción de proteínas en una mezcla orgánica (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico) y posterior precipitación con etanol. Estos métodos tienen una escala limitada, ya que pueden proporcionar un máximo de cinco a diez mg de ARNm limpio y homogéneo; por tanto, son inadecuados para las necesidades de los usos clínicos y comerciales del ARNm.

20 El documento WO 2015/164773 se refiere a un método de purificación de ARNm que incluye las etapas de precipitar ARNm de una preparación impura; someter la preparación impura que comprende ARNm precipitado a un procedimiento de purificación que implica filtración por membrana, de modo que el ARNm precipitado se capture mediante una membrana; y eluir el ARNm precipitado capturado de la membrana volviendo a solubilizar el ARNm. Karikó et al, Nucleic Acids Research, 2011, vol. 39, núm. 21 se refiere a la eliminación de contaminantes de ARNm transcrito *in vitro* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

25 Métodos novedosos recientes, tal como la filtración de flujo tangencial (TFF), se han modificado para purificar ARNm precipitado procedente de reacciones de transcripción *in vitro*; esto ha aumentado mucho la escala de purificación. Sin embargo, los métodos adicionales adecuados para la purificación a gran escala de ARNm pueden ser útiles para el desarrollo clínico y comercial de sustancias terapéuticas de ARNm.

30 Por consiguiente, existe la necesidad de un método que produzca composiciones limpias y homogéneas de ARNm, por ejemplo que se puedan usar para purificar ARNm hasta un nivel de pureza e integridad que sea aceptable para usos terapéuticos. El método descrito aquí es más ventajoso porque aborda esta necesidad, incluyendo la preparación de cantidades a gran escala, pero de una manera rentable.

## SUMARIO DE LA INVENCION

35 La presente invención proporciona métodos muy eficaces para la purificación a gran escala de ARN mensajero (ARNm) de alta calidad adecuado para uso clínico. En particular, la presente invención proporciona métodos de purificación de ARNm basados en centrífuga de filtrado, lo que da como resultado una producción a gran escala sin precedentes de ARNm con alta pureza e integridad. Por tanto, la presente invención permite una fabricación más rentable de ARNm a una escala capaz de satisfacer diversas necesidades clínicas y comerciales.

40 Un aspecto de la presente invención es un método para preparar una composición de ARNm purificado. El método incluye las etapas de proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso removible de manera que el ARNm precipitado se captura en el sustrato poroso, purificando así los contaminantes del ARNm, en el que dicho sustrato poroso removible es una tela filtrante, un papel de filtro, una pantalla o un alambre malla, y en el que la velocidad de dicha centrifugación está entre 1000 RPM y 5000 RPM.

45 En otro aspecto, la invención presenta un método según las reivindicaciones para purificar al menos alrededor de 10 gramos de ARNm, que comprende las etapas de: proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso removible de modo que el ARNm precipitado se captura en el sustrato poroso, purificando así los contaminantes del ARNm; en el que el ARNm purificado total se recupera en una cantidad que da como resultado un rendimiento de al menos alrededor de 80%,  
50 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%; y/o el ARNm purificado total está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

55 En otro aspecto, la invención presenta un método según las reivindicaciones para purificar al menos alrededor de 25 gramos de ARNm, que comprende las etapas de: proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso de modo que el ARNm precipitado se captura en el sustrato poroso, purificando así los contaminantes del ARNm; en el que el ARNm purificado total se recupera en una cantidad que da como resultado un rendimiento de al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94% o 95%; y/o el ARNm purificado total está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

5 En otro aspecto, la invención presenta un método según las reivindicaciones para purificar al menos alrededor de 50 gramos de ARNm, que comprende las etapas de: proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso de modo que el ARNm precipitado se captura en el sustrato poroso, purificando así los contaminantes del ARNm; en el que el ARNm purificado total se recupera en una cantidad que da como resultado un rendimiento de al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%; y/o el ARNm purificado total está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

10 En otro aspecto, la invención presenta un método según las reivindicaciones para purificar al menos alrededor de 100 gramos de ARNm, que comprende las etapas de: proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso de modo que el ARNm precipitado se captura en el sustrato poroso, purificando así los contaminantes del ARNm; en el que el ARNm purificado total se recupera en una cantidad que da como resultado un rendimiento de al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%; y/o el ARNm purificado total está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

15 En otro aspecto, la invención presenta un método según las reivindicaciones para purificar al menos alrededor de 1 kilogramo de ARNm, que comprende las etapas de: proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso de modo que el ARNm precipitado se captura en el sustrato poroso, purificando así los contaminantes del ARNm; en el que el ARNm purificado total se recupera en una cantidad que da como resultado un rendimiento de al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%; y/o el ARNm purificado total está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

El sustrato poroso es removible. En realizaciones, un sustrato poroso es un papel de filtro o una tela de filtro.

25 En algunas realizaciones, el método comprende una etapa de producir primero la suspensión de ARNm precipitado proporcionando una disolución que comprende ARNm, y añadiendo a la disolución uno o más agentes que promuevan la precipitación de ARNm.

30 En algunas realizaciones, una suspensión que comprende ARNm precipitado comprende al menos un auxiliar de filtración que es un dispersante. En algunas realizaciones, un dispersante es uno o más de ceniza, arcilla, tierra de diatomeas, agente filtrante, perlas de vidrio, perlas de plástico, polímeros, perlas de polímero, perlas de polipropileno, perlas de poliestireno, sales (por ejemplo, sales de celulosa), arena y azúcares. En realizaciones, un dispersante comprende fibra de celulosa en polvo.

En algunas realizaciones, una suspensión comprende al menos 1 g, 10 g, 100 g, 1 kg, 10 kg, 100 kg, una tonelada métrica (1000 kg) o diez toneladas métricas (10.000 kg) de ARNm precipitado o cualquier cantidad intermedia.

35 En algunas realizaciones, la velocidad de centrifugación de la suspensión de ARNm está entre alrededor de 2000 RPM y alrededor de 4000 RPM, alrededor de 2000 RPM y alrededor de 4000 RPM, alrededor de 2000 RPM y alrededor de 3000 RPM, o alrededor de 2500 RPM y alrededor de 3500 RPM. En algunas realizaciones, la velocidad es alrededor de 3000 RPM. En algunas realizaciones, la velocidad es alrededor de 2500 RPM.

40 En algunas realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm son uno o más de un alcohol, un amortiguador, una sal, y/o un tensioactivo.

En algunas realizaciones, un alcohol es etanol.

En algunas realizaciones, un método comprende además añadir uno o más agentes a la suspensión que desnaturalizan las proteínas y/o mantienen las proteínas solubles en un medio acuoso.

45 En algunas realizaciones, uno o más agentes que desnaturalizan las proteínas y/o mantienen las proteínas solubles en un medio acuoso comprenden una sal. En algunas realizaciones, una sal es una sal caotrópica.

En algunas realizaciones, un método comprende además una etapa de lavar con un disolvente la composición de ARNm purificado. En algunas realizaciones, un disolvente es un alcohol. En algunas realizaciones, un alcohol es etanol.

50 En algunas realizaciones, un lavado se produce mediante centrifugación. En algunas realizaciones, la centrifugación para lavar la composición de ARNm purificado se realiza a una velocidad de entre alrededor de 50 RPM y alrededor de 500 RPM. En algunas realizaciones, la velocidad es alrededor de 200 RPM. En realizaciones, una velocidad es una velocidad entre alrededor de 100 RPM y alrededor de 3000 RPM.

En algunas realizaciones, un método comprende además una etapa de secar el ARNm capturado. En algunas realizaciones, el secado se produce mediante centrifugación. En algunas realizaciones, la centrifugación para secar

el ARNm capturado se realiza a una velocidad entre alrededor de 50 RPM y alrededor de 500 RPM, alrededor de 50 RPM y alrededor de 300 RPM, alrededor de 100 RPM y alrededor de 300 RPM, o alrededor de 150 RPM y alrededor de 250 RPM. En algunas realizaciones, la velocidad es alrededor de 200 RPM. En realizaciones, una velocidad es una velocidad entre alrededor de 1000 RPM y alrededor de 3000 RPM.

5 En realizaciones, el ARNm purificado seco se recolecta y almacena a una temperatura de o por debajo de alrededor de 0°C durante un período de tiempo de al menos alrededor de una semana a alrededor de dos años. En realizaciones, el ARNm purificado seco se almacena a una temperatura de alrededor de 0°C a alrededor de -40°C, o alrededor de 0°C, -10°C, -20°C, -30°C o -40°C. En realizaciones, el ARNm purificado seco se recolecta y almacena durante un período de tiempo de alrededor de una semana a alrededor de dos años, un período de tiempo de alrededor de una semana a alrededor de un año, o un período de tiempo que no supera alrededor de un año. En realizaciones, el ARNm purificado seco se almacena como un sólido. En las realizaciones, el ARNm purificado seco se reconstituye después del almacenamiento. En realizaciones, el ARNm purificado secado tiene sustancialmente la misma integridad que antes del almacenamiento.

15 En algunas realizaciones, un método comprende además una etapa de recolectar del sustrato poroso el ARNm capturado. En algunas realizaciones, la recolección se produce mientras la centrífuga está centrifugando. En algunas realizaciones, la recolección se produce a través de una cuchilla que elimina del sustrato poroso una parte del ARNm capturado. En algunas realizaciones, la recolección se produce mientras la centrífuga no está centrifugando.

20 En algunas realizaciones, un método comprende además una etapa de solubilizar el ARNm purificado en un medio acuoso, obteniendo así una disolución que comprende ARNm purificado. En algunas realizaciones, un medio acuoso es agua. En algunas realizaciones, la solubilización se produce dentro de la centrífuga. En algunas realizaciones, la solubilización se produce fuera de la centrífuga.

25 En algunas realizaciones, un método comprende además una o más etapas para separar el dispersante de la composición de ARNm purificado. En algunas realizaciones, una o más etapas para separar el dispersante del ARNm purificado comprenden lavar y secar el ARNm purificado.

En algunas realizaciones, un método comprende además solubilizar y eluir el ARNm purificado usando un medio acuoso mientras se filtra el dispersante. En realizaciones, un medio acuoso es agua.

En algunas realizaciones, una centrífuga es una centrífuga continua y/o la centrífuga está orientada vertical u horizontalmente, o la centrífuga es una centrífuga horizontal invertida.

30 En algunas realizaciones, una centrífuga comprende un puerto de alimentación de muestra y/o un puerto de descarga de muestra.

En algunas realizaciones, una centrífuga comprende un medio para mantener el sustrato poroso (por ejemplo, un sustrato poroso removible) a una temperatura preseleccionada.

35 En algunas realizaciones, un componente externo a la centrífuga comprende un medio para mantener el sustrato poroso (por ejemplo, un sustrato poroso removible) a una temperatura preseleccionada.

En algunas realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm son una sal caotrópica y un alcohol. En algunas realizaciones, una sal caotrópica es tiocianato de guanidina, y el alcohol es etanol.

En algunas realizaciones, el ARNm se pone en contacto con volúmenes iguales de un primer líquido que es un amortiguador de GSCN y un segundo líquido que es etanol absoluto o etanol acuoso.

40 En algunas realizaciones, el ARNm se pone en contacto con una disolución que comprende tanto la sal caotrópica como el alcohol.

En algunas realizaciones, una suspensión de ARNm se carga en la centrífuga a una velocidad de alrededor de 0,1 litros/min a alrededor de 5 litros/min, o alrededor de 0,1 litros/min a alrededor de 1 litro/min.

45 En algunas realizaciones, la recuperación de ARNm purificado es al menos alrededor de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, o 97%.

En algunas realizaciones, la recuperación de ARNm purificado es al menos 10 g, 20 g, 50 g, 100 g, 1 kg, 5 kg, 10 kg, 50 kg, o 100 kg por lote único.

En algunas realizaciones, el ARNm purificado está sustancialmente libre de impurezas de un procedimiento de síntesis de ARNm.

50 En algunas realizaciones, el ARNm purificado está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente, moldes de ADN y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro* de la única especie de ARNm.

En algunas realizaciones, el ARNm se sintetiza *in vitro*, y la suspensión proporcionada comprende una mezcla de reacción de síntesis de ARNm *in vitro*.

En algunas realizaciones, una suspensión proporcionada comprende secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

- 5 En algunas realizaciones, una disolución de ARNm purificada contiene menos de 5% de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, una disolución de ARNm purificado contiene menos de 1% de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, una disolución de ARNm purificado contiene menos de 0,5% de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.  
 10 En algunas realizaciones, una disolución de ARNm purificada contiene menos de 0,1% de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*. El método de la reivindicación 51, en el que la disolución de ARNm purificado está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

- 15 En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o los reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro* se miden mediante tinción de plata, electroforesis en gel, HPLC, UPLC, y/o electroforesis capilar. En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente comprenden menos de 15 bases. En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente comprenden alrededor de 8-12 bases.

En algunas realizaciones, los reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro* comprenden T7ARN polimerasa, ADNasa I, pirofosfatasa, y/o inhibidor de ARNasa.

- 20 En algunas realizaciones, una composición que comprende ARNm purificado de acuerdo con cualquier método de centrifugación descrito aquí comprende una purificación adicional (por ejemplo, una disolución que comprende ARNm purificado se purifica adicionalmente mediante un método tal como diálisis, diafiltración, y/o ultrafiltración (por ejemplo, filtración de flujo tangencial (TFF)). En realizaciones, una composición que se purifica adicionalmente (por ejemplo, con diálisis, diafiltración, y/o ultrafiltración) se purifica adicionalmente usando cualquier método de centrifugación descrito aquí, y opcionalmente, entonces se purifica adicionalmente mediante un método tal como diálisis, diafiltración, y/o ultrafiltración (por ejemplo, filtración de flujo tangencial (TFF)). En realizaciones, un método de purificación comprende al menos dos repeticiones de un método que comprende purificación por centrifugación seguida de purificación mediante diálisis (por ejemplo, filtración de flujo tangencial (TFF)); por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez repeticiones.  
 25 En realizaciones, un método de purificación comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez repeticiones de un método que comprende purificación por centrifugación seguida de purificación mediante diálisis, ultrafiltración, y/o diafiltración (por ejemplo, filtración de flujo tangencial (TFF)). En realizaciones, un método de purificación comprende dos, tres, o cuatro repeticiones de un método que comprende purificación por centrifugación seguida de purificación mediante diálisis, ultrafiltración, y/o diafiltración (por ejemplo, filtración de flujo tangencial (TFF)).

- 35 En algunas realizaciones, el ARNm se purifica antes de añadir una caperuza y una cola al ARNm.

En algunas realizaciones, el ARNm se purifica después de añadir una caperuza y una cola al ARNm.

En algunas realizaciones, el ARNm se purifica después de añadir una caperuza.

En algunas realizaciones, el ARNm se purifica tanto antes como después de añadir una caperuza y/o una cola al ARNm.

- 40 En algunas realizaciones, el ARNm es o mayor que alrededor de 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 11 kb, 12 kb, 13 kb, 14 kb, 15 kb, o 20 kb de longitud.

En algunas realizaciones, el ARNm comprende una o más modificaciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, una o más modificaciones comprenden azúcares modificados, bases modificadas, y/o cadenas principales de fosfato de azúcar modificadas.

- 45 En algunas realizaciones, el ARNm no está modificado.

En algunas realizaciones, el ARNm purificado tiene una integridad de al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. En algunas realizaciones, el ARNm purificado tiene una integridad del 95% o mayor. En algunas realizaciones, el ARNm purificado tiene una integridad del 98% o mayor. En algunas realizaciones, el ARNm purificado tiene una integridad del 99% o mayor.

- 50 En algunas realizaciones, una centrífuga es una centrífuga vertical.

En algunas realizaciones, una centrífuga es una centrífuga horizontal.

En algunas realizaciones, una centrífuga es una centrífuga invertida.

En algunas realizaciones, un método comprende además una etapa de dializar, ultrafiltrar, y/o diafiltrar la disolución de ARNm purificado. En algunas realizaciones, un método comprende además una disolución de ARNm purificado que se purifica adicionalmente usando filtración de flujo tangencial (TFF).

El método de la invención se puede usar para obtener una composición que comprende ARNm purificado seco.

- 5 En algunas realizaciones, a una etapa de lavado le sigue la solubilización y elución del ARNm purificado usando un medio acuoso.

10 En algunas realizaciones, a una etapa de solubilización le sigue la purificación del ARNm solubilizado usando diálisis, ultrafiltración, y/o diafiltración. En realizaciones, a una etapa de solubilización le sigue la purificación del ARNm solubilizado usando filtración de flujo tangencial (TFF). En las realizaciones que comprenden una filtración adicional de un ARNm solubilizado, el tamaño medio de los poros del filtro puede ser más pequeño que el tamaño de los poros del filtro usado en un método de purificación por centrifugación como se describe aquí. Por ejemplo, un tamaño de poro ejemplar puede ser alrededor de 0,01 micrómetros a alrededor de 0,1 micrómetros. En realizaciones, la purificación adicional comprende el uso de un filtro caracterizado por un corte de peso molecular de alrededor de 1000 Da a alrededor de 300 kDa, o alrededor de 1000 Da a alrededor de 1000 kDa. En realizaciones, 15 la purificación adicional comprende la purificación adicional que comprende el uso de un filtro caracterizado por un MWCO de alrededor de 1K, 3K, 5K, 10K, 30K, 50K, 100K, 300K, o 1000K, tal como un filtro caracterizado por un MWCO de alrededor de 30K, 50K, 100K, o 300K.

20 En algunas realizaciones, el ARNm purificado seco se almacena a una temperatura de alrededor de 0°C a alrededor de -40°C durante un período de al menos alrededor de una semana a alrededor de dos años, un período de hasta alrededor de dos años, o un período de hasta alrededor de un año.

En algunas realizaciones, el ARNm purificado seco se reconstituye después del almacenamiento.

En algunas realizaciones, el ARNm purificado seco tiene sustancialmente la misma integridad que antes del almacenamiento.

En algunas realizaciones, el ARNm es ARNm transcrito *in vitro*.

- 25 En algunas realizaciones, el ARNm es ARNm de caperuza y cola (C/T).

En algunas realizaciones, el ARNm es el ARNm final.

En algunas realizaciones, el ARNm codifica el receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR).

En algunas realizaciones, el ARNm codifica la ornitina transcarbamilasa (OTC).

- 30 El método de la presente invención puede usarse para preparar una composición de ARNm purificado. Tal composición puede comprender al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones preparadas usando el método de la invención se pueden usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite cualquier composición que comprenda ARNm purificado como se describe aquí. Un método para tratar una enfermedad o trastorno puede incluir una etapa de administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica del aspecto anterior.

- 35 El método de la presente invención se puede usar para preparar una disolución que incluya ARNm purificado.

El método de la presente invención se puede usar para preparar una composición farmacéutica que incluya la disolución que incluye ARNm purificado del aspecto anterior y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Una composición farmacéutica preparada usando el método de la presente invención se puede usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno, que incluye una etapa de administrar a un sujeto que lo necesita la composición farmacéutica.

45 Cualquier aspecto o realización descritos aquí se puede combinar con cualquier otro aspecto o realización como se describe aquí. Si bien la descripción se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la descripción, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

La bibliografía científica y de patentes a la que se hace referencia en este documento establece el conocimiento que está disponible para los expertos en la técnica.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

- 50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características anteriores y otras se apreciarán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada cuando se toma junto con los dibujos adjuntos. Sin embargo, los dibujos son solo para fines ilustrativos; no para limitación.

5 La FIG. 1 es una fotografía de una centrífuga de filtrado de laboratorio a escala de kilogramos con una cesta de seis pulgadas (428 cm<sup>2</sup>).

La FIG. 2 es una fotografía de una centrífuga peladora de filtración horizontal a escala de kilogramos con una cesta de 300 mm (1400 cm<sup>2</sup>).

10 La FIG. 3 es una imagen digital de un gel CE Fragment Analyzer™ para muestras de ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) purificadas a partir de lotes de uno, dos, o tres gramos. El producto de reacción de un gramo de FFL de caperuza y cola (C/T) purificado usando la presente invención se muestra en el carril 2. El producto de reacción de transcripción *in vitro* (IVT) de dos gramos purificado usando la presente invención se muestra en el carril 1. El producto de reacción de FFL de C/T de tres gramos que se purificó dos veces usando la presente invención se muestra en el carril 3. Los productos de reacción de FFL de IVT y C/T de control, que se purificaron usando un kit Qiagen®, se muestran respectivamente en los carriles 4 y 5.

15 La FIG. 4 es un gráfico de un electroferograma CE Fragment Analyzer™ que muestra un producto de reacción de FFL de IVT de dos gramos de purificado usando la presente invención (en azul) y un producto de reacción de IVT de control purificado usando un kit Qiagen® (en negro).

20 La FIG. 5 es un gráfico de un electroferograma CE Fragment Analyzer™ que muestra productos de reacción de ARNm de FFL de C/T de uno y dos gramos purificados usando la presente invención (respectivamente, negro y azul) y un producto de reacción de ARNm de FFL de C/T de control purificado usando un kit Qiagen® (rojo, Lote 8079-128).

25 La FIG. 6 es una imagen digital de un gel de tinción de plata SilverQuest™ que muestra enzimas residuales del procedimiento en una muestra de FFL de C/T de un gramo (carril 3) y enzimas del procedimiento no detectables en una muestra de FFL de C/T de tres gramos (carril 2), cada muestra purificada usando la presente invención. Los carriles 1, 4, 5, 6 y 7 son controles solo de enzimas del procedimiento.

La FIG. 7 incluye fotografías de IVIS Live Animal Images. Al animal de la derecha ("Tratado") se le dosificó ARNm de FFL purificado, usando la presente invención y formulado con nanopartículas lipídicas patentadas, y se le administró a través de gotas oftálmicas tópicas. Las imágenes se capturaron en IVIS Imager tras la inyección de luciferina IVT.

30 La FIG. 8 representa un gel de tinción de plata SilverQuest™ que compara las enzimas residuales del procedimiento en una muestra de ARNm de CFTR (carril 2) y una muestra de ARNm de CFTR purificado según el Ejemplo 6 (carril 3).

35 Cada una de la FIG. 9A y FIG. 9B representa un gel de tinción de plata SilverQuest™ que compara enzimas residuales del procedimiento en una muestra de ARNm de CFTR. Como se muestra en estas dos figuras, el ARNm purificado según el Ejemplo 7 (FIG. 9B, carril 3) comprende menos impurezas enzimáticas en comparación con el lote inicial de ARNm (FIG. 9A, carril 4).

40 La FIG. 10 muestra un gel de agarosa que compara diferentes lotes de ARNm de CFTR, incluyendo el ARNm purificado según los métodos descritos aquí. Las asignaciones de los carriles de gel incluyen: *carril 1*, perteneciente al marcador de peso molecular Ribo Rule HR; *carril 3*, perteneciente a ARNm de CFTR.10.1 preparado según el Ejemplo 8; *carril 4*, perteneciente al ARNm de CFTR.6.2 preparado según el Ejemplo 6; y *carril 5*, perteneciente a un lote de control de ARNm de CFTR purificado usando TFF.

La FIG. 11 representa un electroferograma que compara ARNm que codifica CFTR, y que ha sido reconstituido después de doce meses de almacenamiento en seco a -20°C, con un lote de ARNm que codifica CFTR preparado recientemente.

## 45 DEFINICIONES

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, a continuación se definen primero ciertos términos. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se exponen a lo largo de la memoria descriptiva.

50 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se indique específicamente, o sea obvio por el contexto, como se usa aquí, se entiende que el término "o" es inclusivo, y cubre tanto "o" como "y".

Las expresiones “por ejemplo” y “es decir”, como se usan aquí, se usan simplemente a modo de ejemplo, sin intención de limitar, y no deben interpretarse como que se refieren solo a los elementos enumerados explícitamente en la memoria descriptiva.

5 Se entiende que las expresiones “o más”, “al menos”, “más de”, y similares, por ejemplo “al menos uno”, incluyen, pero no se limitan a, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 10 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más del valor indicado. También se incluye cualquier número mayor o fracción intermedia.

15 Por el contrario, la expresión “no más de” incluye cada valor menor que el valor señalado. Por ejemplo, “no más de 100 nucleótidos” incluye 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, y 0 nucleótidos. También se incluye cualquier número menor o fracción intermedia.

20 Se entiende que las expresiones “pluralidad”, “al menos dos”, “dos o más”, “al menos segundo”, y similares, incluyen, pero no se limitan a, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 25 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más. También se incluye cualquier número mayor o fracción intermedia.

A lo largo de la memoria descriptiva se entenderá que la palabra “que comprende”, o variaciones como “comprende” o “comprendiendo”, implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

30 A menos que se indique específicamente, o sea obvio por el contexto, como se usa aquí, la expresión “alrededor de” se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Se puede entender que “alrededor de” está dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, o 0,001% del valor señalado. A menos que se aclare lo contrario por el contexto, todos los valores numéricos proporcionados aquí se modifican por la expresión “alrededor de”.

35 Como se usa aquí, el término “lote” se refiere a una cantidad de ARNm sintetizado en un momento determinado, por ejemplo producido de acuerdo con un solo pedido de fabricación durante el mismo ciclo de fabricación. Un lote puede referirse a una cantidad de ARNm sintetizado en una reacción que ocurre a través de una sola alícuota de enzima y/o una sola alícuota de molde de ADN para la síntesis continua bajo un conjunto de condiciones. En algunas realizaciones, un lote incluiría el ARNm producido a partir de una reacción en la que no todos los reactivos y/o componentes se suplementan y/o reponen a medida que avanza la reacción. El término “lote” no significaría 40 ARNm sintetizado en diferentes momentos que se combinan para lograr la cantidad deseada.

45 Como se usa aquí, el término “contaminantes”, como en “contaminantes del procedimiento”, se refiere a sustancias dentro de una cantidad confinada de líquido, gas, o sólido, que difieren de la composición química del material o compuesto diana. Los contaminantes también se conocen como impurezas. Los ejemplos de contaminantes o impurezas incluyen amortiguadores, proteínas (por ejemplo, enzimas), ácidos nucleicos, sales, disolventes, y/o disoluciones de lavado.

50 Como se usa aquí, el término “dispersante” se refiere a una partícula sólida que reduce la probabilidad de que un precipitado de ARNm forme un hidrogel. Un “dispersante” puede ser cualquier sustancia que sea insoluble en una varita del sistema de disolvente/amortiguador de lavado/choque que pueda mezclarse uniformemente con el precipitado de ARNm. Dichos dispersantes podrían ser cualquier sólido que sea insoluble después de la saturación (a una concentración dada). Los ejemplos de dispersantes incluyen, y no se limitan a, uno o más de ceniza, arcilla, tierra de diatomeas, agente filtrante, perlas de vidrio, perlas de plástico, polímeros, perlas de polipropileno, perlas de poliestireno, sales (por ejemplo, sales de celulosa), arena, y azúcares. La presente invención se puede usar con o sin un “dispersante”. En realizaciones, un dispersante son microesferas poliméricas (por ejemplo, microesferas de poli(estireno-co-divinilbenceno)). 55

Como se usa aquí, “expresión” de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los siguientes eventos: (1) producción de una molde de ARNm a partir de una secuencia de ADN (por ejemplo, por transcripción); (2) procesamiento de un transcrito de ARNm (por ejemplo, mediante ajuste, edición, formación de caperuza en 5', y/o



formación de extremo 3'); (3) traducción de un ARNm en un polipéptido o proteína; y/o (4) modificación postraduccional de un polipéptido o proteína. En esta solicitud, los términos "expresión" y "producción", y su equivalente gramatical, se usan indistintamente.

5 Como se usa aquí, "ARNm de longitud completa" es como se caracteriza cuando se usa un ensayo específico, por ejemplo electroforesis en gel y detección usando UV y espectroscopia de absorción UV con separación por electroforesis capilar. La longitud de una molécula de ARNm que codifica un polipéptido de longitud completa es al menos 50% de la longitud de una molécula de ARNm de longitud completa que se transcribe a partir del ADN diana y según se obtiene siguiendo cualquiera de los métodos de purificación descritos aquí, por ejemplo al menos 60%,  
10 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,01%, 99,05%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% de la longitud de una molécula de ARNm de longitud completa que se transcribe a partir del ADN diana y antes de la purificación según cualquier método descrito aquí.

Como se usa aquí, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que presenta una propiedad y/o actividad por la que se caracteriza.

15 Como se usa aquí, el término "hidrogel" se refiere a una red de cadenas poliméricas hidrófilas, por ejemplo ARNm, que forma un gel coloidal en el que el agua es el medio de dispersión. Usando el ARNm como ejemplo, es más difícil extraer o purificar el ARNm de un hidrogel que de una torta seca.

Como se usa aquí, el término "impurezas" se refiere a sustancias dentro de una cantidad confinada de líquido, gas o sólido, que difieren de la composición química del material o compuesto diana. Las impurezas también se conocen como contaminantes.

20 Como se usa aquí, la expresión "*in vitro*" se refiere a eventos que ocurren en un ambiente artificial, por ejemplo en un tubo de ensayo o vaso de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

Como se usa aquí, el término "aislado" se refiere a una sustancia y/o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) producida, preparada y/o fabricada por la mano del hombre.

25 Como se usa aquí, la expresión "ARN mensajero (ARNm)" se refiere a un polirribonucleótido que codifica al menos un polipéptido. El ARNm, como se usa aquí, abarca tanto el ARNm modificado como el no modificado. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. El ARNm puede purificarse a partir de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinantes, y opcionalmente purificarse, transcribirse *in vitro*, o sintetizarse químicamente.

30 Por lo general, se considera que el ARNm es el tipo de ARNm que transporta información desde el ADN hasta el ribosoma. La existencia de ARNm suele ser muy breve, e incluye procesamiento y traducción, seguido de degradación. Por lo general, el ARNm incluye una secuencia nucleotídica que tiene una región codificante que codifica un polipéptido, una región no traducida 5' (5'UTR) en dirección 5' de la región codificante, una región no traducida 3' (3'UTR) en dirección 3' de la región codificante, una caperuza en el extremo 5', y una región poliA o de poliadenilación en dirección 3' de la 3'UTR. Por lo general, en los organismos eucariotas, el procesamiento del ARNm comprende la transcripción del ARNm a partir del ADN, y la adición de una "caperuza" en el extremo N-terminal (5') y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). Una caperuza típica es una caperuza de 7-metilguanosa, que es una guanosa unida a través de un enlace 5'-5'-trifosfato al primer nucleótido transcrito. La presencia de la caperuza es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. La cola es típicamente un evento de poliadenilación mediante el cual se añade un resto de poliadenililo al extremo 3' de la molécula de ARNm. La presencia de esta "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación por exonucleasa. Los ribosomas suelen traducir el ARN mensajero en una serie de aminoácidos que forman una proteína.  
35  
40

45 En algunas realizaciones, un ARNm de la presente invención carece de una caperuza, o una cola, o ambas. Por lo tanto, un ARNm puede tener una caperuza y carecer de cola, un ARNm puede tener una cola y carecer de caperuza, y un ARNm puede carecer de caperuza y carecer de cola.

Cualquier ARNm capaz de traducirse en uno o más péptidos (por ejemplo, proteínas) o fragmentos peptídicos, se contempla dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un ARNm codifica uno o más péptidos naturales. En algunas realizaciones, un ARNm codifica uno o más péptidos modificados o no naturales.

50 Como se usa aquí, la expresión "integridad del ARNm" generalmente se refiere a la calidad de ARNm. En algunas realizaciones, la integridad del ARNm se refiere al porcentaje de ARNm que no se degrada (por ejemplo, el porcentaje de ARNm de longitud completa) después de un procedimiento de purificación, tal como cualquier método descrito aquí. La integridad del ARNm se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante electroforesis en gel de agarosa de ARN (por ejemplo, Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc.,  
55 1997, Current Protocols in Molecular Biology).

Como se usa aquí, la expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación riesgo/beneficio razonable.

5 Un “excipiente farmacéuticamente aceptable” significa un excipiente que es adecuado para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no indeseable biológicamente ni de otro modo, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Un “excipiente farmacéuticamente aceptable”, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, incluye tanto uno como más de uno de dichos excipientes.

10 Por lo general, una disolución de ARNm adecuada también puede contener un agente amortiguador y/o una sal. Generalmente, los agentes amortiguadores pueden incluir HEPES, sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, fosfato de potasio y fosfato de sodio.

Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge et al describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en *J. Pharmaceutical Sciences* (1977) 66:1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las derivadas de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácidos no tóxicas farmacéuticamente aceptables son las sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico, o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido masónico, o usando otros métodos usados en la técnica, tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canfosulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos, de metales alcalino-térreos, de amonio y de N<sup>+</sup>(alquilo de C<sub>1-4</sub>)<sub>4</sub>. Las sales de metales alcalinos o alcalino-térreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato y arilsulfonato. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales formadas a partir de la cuaternización de una amina usando un electrófilo apropiado, por ejemplo un haluro de alquilo, para formar una sal de amino alquilada cuaternizada.

La expresión “secuencias de ARN abortadas prematuramente”, como se usa aquí, se refiere a productos incompletos de una reacción de síntesis de ARNm (por ejemplo, una reacción de síntesis *in vitro*). Por diversas razones, las ARN polimerasas no siempre completan la transcripción de una molde de ADN; es decir, la síntesis de ARN termina prematuramente. Las posibles causas de la terminación prematura de la síntesis de ARN incluyen la calidad del molde de ADN, las secuencias terminadoras de polimerasa para una polimerasa particular presente en el molde, los amortiguadores degradados, la temperatura, el agotamiento de los ribonucleótidos, y las estructuras secundarias del ARNm. Las secuencias de ARN abortadas prematuramente pueden tener cualquier longitud que sea menor que la longitud prevista del producto transcripcional deseado. Por ejemplo, las secuencias de ARNm abortadas prematuramente pueden tener menos de 1000 bases, menos de 500 bases, menos de 100 bases, menos de 50 bases, menos de 40 bases, menos de 30 bases, menos de 20 bases, menos de 15 bases, menos de 10 bases o menos.

Como se usa aquí, la expresión “sustrato poroso” es cualquier sustancia sólida que permite el paso de un fluido mientras evita el paso de al menos una parte de un precipitado. El sustrato poroso usado en los métodos de la invención es un sustrato poroso removible. El tamaño de poros se puede definir, por ejemplo, de un tamaño específico de micrómetro o milímetro, o el tamaño de poros puede no estar definido. El sustrato es “removible” de una centrífuga. Por lo tanto, el sustrato puede ser parte de un tambor de centrífuga (cuando el tambor se puede retirar del resto de la centrífuga). En algunas realizaciones, el sustrato removible recubre (por ejemplo, se apoya) en la superficie interior de un tambor centrífugo. En algunas realizaciones, el sustrato recubre (por ejemplo, se apoya) en la superficie interior de un tambor centrífugo que tiene perforaciones que permiten el paso de fluido.

Como se usa aquí, el término “sustancialmente” se refiere a la condición cualitativa de exhibir una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Una persona con conocimientos normales en las técnicas biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si es que alguna vez, se completan y/o proceden a completarse, o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término “sustancialmente” se usa aquí para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

Como se usa aquí, la expresión “sustancialmente libre” se refiere a un estado en el que está presente una cantidad relativamente pequeña o ninguna de una sustancia a eliminar (por ejemplo, secuencias de ARN abortadas

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

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta solicitud y que se usan comúnmente en la técnica a la que pertenece esta solicitud. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### Métodos de Purificación

El ARNm puede presentar retos tanto en la síntesis como en la purificación, particularmente en preparaciones a gran escala. La presente invención se refiere a métodos que usan una plataforma centrífuga de filtrado junto con métodos alternativos de precipitación y procesamiento para capturar, lavar y recolectar con éxito el ARNm fabricado a una escala capaz de satisfacer la mayoría de las necesidades clínicas y comerciales.

Esta nueva descripción ilustra un camino a seguir para las terapias de reemplazo de ARNm, lo que le permite convertirse en una alternativa viable y exitosa a las terapias de reemplazo de enzimas y bioterapias más tradicionales que están actualmente disponibles.

Para convertirse en una alternativa viable y exitosa, el método para la purificación de ARNm debe ser robusto y escalable para garantizar que las capacidades de fabricación a gran escala estén disponibles para satisfacer todas las necesidades clínicas y comerciales. Un método de purificación de ARNm adecuado incluye una fácil escalabilidad, al mismo tiempo que proporciona un producto equivalente o mejor en comparación con los métodos de purificación de ARNm estándar de la industria actualmente disponibles. En particular, los atributos clave del método deben incluir altos rendimientos de ARNm posteriores a la purificación, mantenimiento de la integridad del ARNm posterior a la purificación, y eliminación de contaminantes relacionados con el procedimiento (por ejemplo, enzimas del procedimiento) por debajo de los niveles aceptables de contaminación.

Se describe aquí el uso de una centrífuga de filtrado (por ejemplo, vertical, horizontal, o invertida) como plataforma para la purificación de ARNm a escala clínica y comercial. Los datos presentados aquí muestran que el método es capaz de capturar ARNm sólido, precipitado con sal-EtOH, mediante filtración a través de un sustrato sólido poroso asociado a centrífuga; el método elimina simultáneamente los contaminantes del procedimiento y las sales precipitadas antes de la recolección de un ARNm purificado sólido o una suspensión de ARNm purificado en un medio acuoso.

Los resultados experimentales presentados aquí incluyen múltiples escalas (desde un gramo hasta cien gramos de ARNm) que verifican la viabilidad del método. Además, muestran que la presente invención es una alternativa capaz (y de menor coste) a los métodos actualmente disponibles para purificar ARNm para uso experimental, clínico o comercial. Además, la presente invención tiene un importante beneficio adicional de escalabilidad que no está disponible con los métodos y kits estándar de la industria. Los métodos descritos aquí proporcionarán escalabilidad más allá de lotes individuales de cien gramos, incluyendo lotes de kilogramos y toneladas métricas. Finalmente, los métodos descritos aquí son extremadamente rentables con respecto a los procedimientos actuales, tales como purificaciones basadas en cromatografía o en membranas de fibra hueca. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2011/068810; WO 2012/075040; WO 2014/152659; WO 2014/152673; WO 2014/152966; WO 2015/164773; WO 2016/004318; US 62/420,413; y PCT/US16/57044.

Por lo tanto, los métodos descritos aquí pueden ser ventajosos para la purificación de ARNm, incluyendo cantidades a gran escala de ARNm (por ejemplo, cualquier tamaño de lote o volumen de carga descrito aquí). Por ejemplo, los métodos de purificación que se describen aquí pueden proporcionar un mayor porcentaje de ARNm de longitud completa que se recupera de la purificación con respecto a la cantidad de ARNm de longitud completa antes de la purificación, por ejemplo en comparación con los métodos de purificación convencionales. Los métodos de purificación que se describen aquí pueden proporcionar un mayor porcentaje de ARNm de longitud completa con respecto a la mezcla de ARNm de longitud completa y contaminantes, por ejemplo en comparación con los métodos de purificación convencionales. Los métodos de purificación que se describen aquí pueden proporcionar ARNm que tiene un alto nivel de integridad aceptable para fines terapéuticos, con una pérdida mínima de ARNm completo debido a la purificación, por ejemplo en comparación con los métodos de purificación convencionales. Además, el ARNm purificado (incluyendo las composiciones o lotes de los mismos) preparado según los métodos descritos aquí puede tener características beneficiosas. Por ejemplo, una composición o lote de ARNm purificado como se describe aquí puede: comprender un mayor porcentaje de moléculas de ARNm de longitud completa; comprender una mayor cantidad de ARNm de longitud completa; y/o proporcionar una mayor actividad (por ejemplo, expresión mejorada o aumentada de proteína). Tales características pueden ser beneficiosas para usos terapéuticos. Por consiguiente, la

presente invención puede ser superior a los métodos usados actualmente para producir composiciones de ARNm purificado, por ejemplo para uso en terapias de reemplazo de ARNm. Un aspecto de la presente invención es un método para preparar una composición de ARNm purificado.

- 5 El método incluye las etapas de proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso removible de manera que el ARNm precipitado se captura en el sustrato poroso, purificando así los contaminantes del ARNm, en el que dicho sustrato poroso removible es una tela de filtro, un papel de filtro, una pantalla o un alambre malla, y en el que la velocidad de dicha centrifugación está entre 1000 RPM y 5000 RPM.

#### Precipitación de ARNm

- 10 Los métodos descritos aquí son adecuados para la purificación de ARNm en una suspensión proporcionada que comprende ARNm precipitado (por ejemplo, una mezcla de reacción de síntesis *in vitro*), en la que el ARNm se puede precipitar usando diversos métodos de precipitación conocidos en la técnica. Como se usa aquí, el término "precipitación" (o cualquier equivalente gramatical del mismo) se refiere a la formación de un sólido en una disolución. Cuando se usa con respecto al ARNm, el término "precipitación" se refiere a la formación de una forma  
15 sólida o insoluble de ARNm en un líquido.

Cualquiera y todos los métodos adecuados para precipitar ARNm pueden usarse para poner en práctica la presente invención.

- 20 En algunas realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm es un agente desnaturizante o resulta de condiciones desnaturizantes. Como se usa aquí, la expresión "condición desnaturizante" se refiere a cualquier condición química o física que pueda provocar la desnaturización. Las condiciones desnaturizantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, el uso de reactivos químicos, altas temperaturas, pH extremo, etc. En algunas realizaciones, una condición desnaturizante se logra mediante la adición de uno o más agentes desnaturizantes a una preparación impura que contiene ARNm a purificar. En algunas realizaciones, un agente desnaturizante adecuado para la presente invención es un agente  
25 desnaturizante de proteína y/o ADN. En algunas realizaciones, un agente desnaturizante puede ser: 1) una enzima (tal como una serina proteinasa o una ADNasa), 2) un ácido, 3) un disolvente, 4) un agente de reticulación, 5) un agente caotrópico, 6) un agente reductor, y/o 7) alta fuerza iónica a través de altas concentraciones de sal. En algunas realizaciones, un agente particular puede caer en más de una de estas categorías.

- 30 En algunas realizaciones, se pueden usar una o más enzimas como agentes desnaturizantes para degradar proteínas y moldes de ADN usados en la síntesis de ARNm. En algunas realizaciones, las enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, serina proteasas tales como quimotripsina y serina proteasas similares a quimotripsina, tripsina y serina proteasas similares a tripsina, elastasa y serina proteasas similares a elastasa, subtilisina y serina proteasas similares a subtilisina, y combinaciones de las mismas, desoxirribonucleasas (DNasas) tales como desoxirribonucleasa I, II y/o IV, enzimas de restricción tales como EcoRI, EcoRII, BamHI, HindIII, SphI,  
35 SphI, StuI, XbaI, y combinaciones de las mismas.

En algunas realizaciones, se puede usar un ácido como agente desnaturizante. En algunas realizaciones, un ácido adecuado puede ser ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido ascórbico, ácido sulfosalicílico, y combinaciones de los mismos.

- 40 En algunas realizaciones, se puede usar un disolvente como agente desnaturizante. En algunas realizaciones, un disolvente puede ser alcohol isopropílico, acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, etanol, metanol, denatonio, y combinaciones de los mismos. En realizaciones, un disolvente es un disolvente alcohólico (por ejemplo, metanol, etanol, o isopropanol). En realizaciones, un disolvente es un disolvente de cetona (por ejemplo, acetona, metiletilcetona, o metilisobutilcetona)

- 45 En algunas realizaciones, se puede usar un agente caotrópico como agente desnaturizante. Los agentes caotrópicos son sustancias que alteran la estructura de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos al interferir con fuerzas no covalentes tales como enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. En algunas realizaciones, un agente caotrópico puede ser urea, tiourea, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, acetato de litio, cloruro de magnesio, dodecilsulfato de sodio, perclorato de litio y combinaciones de los mismos.

- 50 En algunas realizaciones, se puede usar un agente reductor como agente desnaturizante. Los agentes reductores son compuestos que donan un electrón a otra especie, de este modo oxidándose ellos mismos. En algunas realizaciones, un agente reductor puede ser hidruro de litio y aluminio, amalgama de sodio, diborano, borohidruro de sodio, sulfitos, hidruro de diisobutilaluminio, fosfitos, monóxido de carbono, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, o tris(2-carboxietil)fosfina, y combinaciones de los mismos.

- 55 En algunas realizaciones, también se pueden usar uno o más de pH, calor y/o metales pesados (tales como plomo, mercurio o cadmio) como agentes desnaturizantes para proporcionar una condición desnaturizante. Se sabe que los extremos de pH hacen que una proteína se desnaturalice. Aunque la cadena principal de una cadena proteica es

neutra, los restos de aminoácidos que componen la proteína a menudo contienen grupos ácidos y básicos. Estos grupos suelen estar cargados y pueden formar puentes salinos con un grupo de carga opuesta. En consecuencia, los extremos de pH pueden cambiar las cargas de estos grupos ácidos y básicos, interrumpiendo los puentes salinos.

- 5 En algunas realizaciones, cambios menos drásticos en el pH también pueden afectar la actividad y solubilidad de una proteína. Al igual que los aminoácidos individuales, las proteínas tienen un punto isoeléctrico en el que el número de cargas negativas es igual al número de cargas positivas. Este es frecuentemente el punto de mínima solubilidad en agua. En el pH isoeléctrico, no hay carga neta en la molécula. Las moléculas individuales tienen tendencia a acercarse unas a otras, coagularse y precipitar de la disolución. A un pH por encima o por debajo del pH isoeléctrico, las moléculas tienen una carga neta negativa o positiva, respectivamente. Por lo tanto, cuando las moléculas de proteína se acercan entre sí, tienen la misma carga general y se repelen entre sí.

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

15 En algunas realizaciones, las sales de iones metálicos, tales como mercurio (II), plomo (II) y plata, pueden usarse como agentes desnaturalizantes debido a su capacidad para formar enlaces fuertes con grupos disulfuro y con los iones carboxilato de los aminoácidos ácidos. Por lo tanto, interrumpen tanto los puentes de disulfuro como los enlaces salinos, y hacen que la proteína precipite de la disolución como una sal insoluble de metal-proteína.

- 20 En algunas realizaciones, también se pueden usar altas concentraciones de sal (alta salinidad) como agente desnaturalizante. Se sabe que las altas concentraciones de sales hacen que tanto las proteínas como los ácidos nucleicos precipiten de disolución acuosa. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 1M y 10M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 2M y 9M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 2M y 8M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede estar entre 2M y 5M, inclusive. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 1M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 2M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 3M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 4M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 5M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 6M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 7M. En algunas realizaciones, una alta concentración de sal puede ser mayor que la concentración 8M. En algunas realizaciones, se usa una única sal como agente desnaturalizante. En algunas realizaciones, se usa más de una sal como agente desnaturalizante.

- 35 En algunas realizaciones, una sal usada como agente desnaturalizante puede ser una sal de calcio, una sal de hierro, una sal de magnesio, una sal de potasio, una sal de sodio, o una combinación de las mismas. Las sales específicas ejemplares adecuadas para uso como agentes desnaturalizantes en algunas realizaciones incluyen, pero no se limitan a, cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de litio (LiCl), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), bromuro de potasio (KBr), bromuro de sodio (NaBr), bromuro de litio (LiBr). En algunas realizaciones, el agente desnaturalizante al que se somete la preparación impura es cloruro de potasio (KCl). En algunas realizaciones, se añade KCl de manera que la concentración de KCl resultante sea alrededor de 1 M o mayor. En algunas realizaciones, se añade KCl de manera que la concentración de KCl resultante sea alrededor de 2 M o mayor, 3 M o mayor, 4 M o mayor, o 5 M o mayor.

- 45 En una realización, se añade una disolución de sal de alta concentración (por ejemplo, una sal caotrópica tal como tiocianato de guanidina) a una composición inicial que contiene ARNm, para desnaturalizar y solubilizar las proteínas contaminantes, seguido de la adición de un alcohol (por ejemplo, etanol) para precipitar selectivamente ARNm. Después de la precipitación del ARNm, la suspensión resultante se agita continuamente dentro del dispositivo de filtración mientras se aplica presión a la suspensión para empujar el líquido madre a través del filtro, o se aplica vacío para retirar el licor madre a través del filtro. Más tarde, el precipitado dentro de la suspensión se lava o se diafiltra con una mezcla de sal y alcohol, seguido de un lavado con alto contenido de alcohol para producir un precipitado libre de contaminación, por ejemplo proteína, sal, amortiguador, y ácido nucleico que no sea ARN. La disolución posterior en agua del ARNm precipitado produce una composición de ARNm purificado. En algunas realizaciones, se añade un soporte sólido, tales como perlas de poliestireno de un tamaño conocido, para aumentar la capacidad de purificación dentro de un volumen de filtración dado.

- 55 En algunas realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm son uno o más de un alcohol, un amortiguador, una sal, y/o un tensioactivo. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol.

En algunas realizaciones, el método incluye además una etapa de añadir uno o más agentes que desnaturalizan las proteínas (por ejemplo, ARN polimerasa y ADNasa I, que se añade después de la transcripción para eliminar las moldes de ADN) y/o mantienen las proteínas solubles en un medio acuoso. En algunas realizaciones, uno o más

agentes que desnaturalizan las proteínas y/o mantienen las proteínas solubles en un medio acuoso es una sal, por ejemplo una sal caotrópica.

5 En realizaciones de los métodos, una etapa de precipitación comprende el uso de una sal caotrópica (por ejemplo, tiocianato de guanidina) y/o un disolvente alcohólico (por ejemplo, etanol absoluto o una disolución acuosa de alcohol, tal como una disolución acuosa de etanol). En realizaciones de los métodos, una etapa de precipitación comprende el uso de una sal caotrópica (por ejemplo, tiocianato de guanidina) y un disolvente alcohólico (por ejemplo, etanol absoluto o una disolución acuosa de alcohol, tal como una disolución acuosa de etanol).

10 En realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm comprenden tiocianato de guanidina (por ejemplo, una disolución que comprende alrededor de 1-5M de tiocianato de guanidina). En realizaciones, un agente que promueve la precipitación del ARNm es un amortiguador de GSCN (por ejemplo, una disolución acuosa que comprende tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, pH 6,5, sal sódica de N-lauroilsarcosina al 0,5%).

15 En realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm incluyen un disolvente alcohólico (por ejemplo, etanol tal como etanol absoluto). En realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación de ARNm es una disolución acuosa de un alcohol (por ejemplo, etanol acuoso). En realizaciones, uno o más agentes que promueven la precipitación de ARNm es etanol absoluto.

20 En realizaciones, se usan dos agentes para promover la precipitación del ARNm, en la que un agente comprende tiocianato de guanidina (por ejemplo, una disolución acuosa de tiocianato de guanidina tal como un amortiguador de GSCN), y un segundo agente comprende un disolvente alcohólico (por ejemplo, etanol). En realizaciones, los dos agentes se usan secuencial o simultáneamente. En realizaciones, el método incluye el uso de una disolución que comprende tiocianato de guanidina (por ejemplo, un amortiguador de GSCN) y un alcohol (por ejemplo, etanol absoluto o una disolución acuosa de un alcohol tal como etanol acuoso).

#### Auxiliares de Filtración (Incluyendo Dispersantes)

25 En algunas realizaciones, se usa un auxiliar de filtración en un método descrito aquí (por ejemplo, durante la centrifugación).

30 En algunas realizaciones, un auxiliar de filtración es un dispersante. En algunas realizaciones, la composición de ARNm precipitado incluye al menos un dispersante, por ejemplo uno o más de ceniza, arcilla, tierra de diatomeas, agente filtrante, perlas de vidrio, perlas de plástico, polímeros, perlas de polipropileno, perlas de poliestireno, sales (por ejemplo, sales de celulosa), arena, y azúcares. En algunas realizaciones, el dispersante es una perla. En algunas realizaciones, la composición de ARNm precipitado no comprende un dispersante.

En algunas realizaciones, una etapa de añadir uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm se lleva a cabo en ausencia de cualquier dispersante.

En algunas realizaciones, una etapa de añadir uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm se lleva a cabo en presencia de al menos un dispersante.

35 En algunas realizaciones, se añade un dispersante a la suspensión obtenida tras la adición de uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm.

40 Por lo tanto, en realizaciones, un método de purificación puede incluir además una o más etapas para separar el dispersante del precipitado de ARNm purificado, por ejemplo lavando y secando la torta. El método puede incluir además una etapa de solubilizar y eluir el ARNm purificado de la torta usando un medio acuoso, por ejemplo agua, mientras se filtra el dispersante. En realizaciones, una etapa de precipitación y una etapa de secado se pueden realizar simultáneamente.

45 En realizaciones, un auxiliar de filtración es una sal tal como celulosa. En realizaciones, un auxiliar de filtración de celulosa es fibra de celulosa en polvo (por ejemplo, Solka-Floc® o Sigmacell Cellulose 20). En realizaciones, un auxiliar de filtración de celulosa es una fibra de celulosa en polvo tal como Solka-Floc® 100 NF o Sigmacell Cellulose Type 20 (20 µm).

#### Escala y Cantidades Recuperadas

50 Una ventaja particular proporcionada por la presente invención es la capacidad de purificar ARNm, en particular, ARNm sintetizado *in vitro*, a gran escala o escala comercial. Por ejemplo, el ARNm sintetizado *in vitro* se puede purificar a una escala igual o mayor que alrededor de 1 gramo, 10 gramos, 50 gramos, 100 gramos, 200 gramos, 300 gramos, 400 gramos, 500 gramos, 600 gramos, 700 gramos, 800 gramos, 900 gramos, 1 kg, 5 kg, 10 kg, 50 kg, 100 kg, 1000 kg, o 10000 kg por lote. En realizaciones, el ARNm sintetizado *in vitro* se puede purificar a una escala de o mayor que alrededor de 1 kg.

En una realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 10 gramos por lote. En una realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 20 gramos por lote. En una

realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 25 gramos por lote. En una realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 50 gramos por lote. En otra realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 100 gramos por lote. En aún otra realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 1 kg por lote. En aún otra realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 10 kg por lote. En aún otra realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 100 kg por lote. En aún otra realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 1000 kg por lote. En aún otra realización particular, el ARNm sintetizado *in vitro* puede purificarse a una escala de 10.000 kg por lote.

Como se muestra en los ejemplos a continuación, con los métodos de la invención puede lograrse fácilmente un lote que comprende ARNm purificado en una cantidad de 10 gramos o más (por ejemplo, 25 gramos, 50 gramos, o 100 gramos, o más).

En algunas realizaciones, el ARNm se purifica a una escala igual o mayor que 1 gramo, 5 gramos, 10 gramos, 15 gramos, 20 gramos, 25 gramos, 30 gramos, 35 gramos, 40 gramos, 45 gramos, 50 gramos, 75 gramos, 100 gramos, 150 gramos, 200 gramos, 250 gramos, 300 gramos, 350 gramos, 400 gramos, 450 gramos, 500 gramos, 550 gramos, 600 gramos, 650 gramos, 700 gramos, 750 gramos, 800 gramos, 850 gramos, 900 gramo, 950 gramos, 1 kg, 2,5 kg, 5 kg, 7,5 kg, 10 kg, 25 kg, 50 kg, 75 kg, o 100 kg por lote.

En algunas realizaciones, la disolución que comprende ARNm incluye al menos un gramo, diez gramos, cien gramos, un kilogramo, diez kilogramos, cien kilogramos, una tonelada métrica, diez toneladas métricas, o más ARNm, o cualquier cantidad entre ellas. En algunas realizaciones, un método descrito aquí se usa para purificar una cantidad de ARNm que es al menos alrededor de 250 mg de ARNm. En una realización, un método descrito aquí se usa para purificar una cantidad de ARNm que es al menos alrededor de 250 mg de ARNm, alrededor de 500 mg de ARNm, alrededor de 750 mg de ARNm, alrededor de 1000 mg de ARNm, alrededor de 1500 mg de ARNm, alrededor de 2000 mg de ARNm, o alrededor de 2500 mg de ARNm. En realizaciones, un método descrito aquí se usa para purificar una cantidad de ARNm que es al menos alrededor de 250 mg de ARNm a alrededor de 500 g de ARNm. En realizaciones, un método descrito aquí se usa para purificar una cantidad de ARNm que es al menos alrededor de 500 mg de ARNm a alrededor de 250 g de ARNm, alrededor de 500 mg de ARNm a alrededor de 100 g de ARNm, alrededor de 500 mg de ARNm a alrededor de 50 g de ARNm, alrededor de 500 mg de ARNm a alrededor de 25 g de ARNm, alrededor de 500 mg de ARNm a alrededor de 10 g de ARNm, o alrededor de 500 mg de ARNm a alrededor de 5 g de ARNm. En realizaciones, un método descrito aquí se usa para purificar una cantidad de ARNm que es al menos alrededor de 100 mg de ARNm a alrededor de 10 g de ARNm, alrededor de 100 mg de ARNm a alrededor de 5 g de ARNm, o alrededor de 100 mg de ARNm a alrededor de 1 g de ARNm.

En algunas realizaciones, un método descrito aquí proporciona una cantidad recuperada de ARNm purificado que es al menos alrededor de 50%, alrededor de 55%, alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, o alrededor de 95%. En algunas realizaciones, un método descrito aquí proporciona una cantidad recuperada de ARNm purificado que es al menos alrededor de 70% (por ejemplo, al menos alrededor de 70%, 75%, 80%, u 85%).

#### Velocidad de Centrifugación

En algunas realizaciones, la velocidad de centrifugación de la suspensión de ARNm está entre alrededor de 2000 RPM y alrededor de 4000 RPM, por ejemplo alrededor de 3000 RPM. En algunas realizaciones, la velocidad es alrededor de 2500 RPM. Estas velocidades de centrifugación producen un precipitado de ARNm más fino que las velocidades fuera de los intervalos mencionados anteriormente.

#### Etapas opcionales ejemplares para la purificación

Los métodos descritos aquí pueden ser fácilmente modificados por un experto en la técnica. Se describen aquí modificaciones ejemplares, que incluyen etapas ejemplares adicionales.

En algunas realizaciones, el método incluye además una etapa de lavar, por ejemplo mediante centrifugación, la composición de ARNm purificado con un disolvente orgánico, por ejemplo un alcohol. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol. La centrifugación para lavar la composición de ARNm purificado puede realizarse a una velocidad de entre alrededor de 50 RPM y alrededor de 500 RPM, por ejemplo alrededor de 200 RPM. En realizaciones, una velocidad es una velocidad entre alrededor de 100 RPM y alrededor de 3000 RPM.

En algunas realizaciones, el método incluye además una etapa de secar, por ejemplo mediante centrifugación, la composición de ARNm purificado. La centrifugación para secar la composición de ARNm purificado puede realizarse a una velocidad de entre alrededor de 50 RPM y alrededor de 500 RPM, por ejemplo alrededor de 200 RPM. En realizaciones, una velocidad es una velocidad entre alrededor de 1000 RPM y alrededor de 3000 RPM.

En algunas realizaciones, el método incluye además una etapa de recolectar la composición de ARNm purificado del sustrato poroso (por ejemplo, un sustrato poroso removible). La recolección puede ocurrir mientras la centrífuga está centrifugando, o mientras la centrífuga no está centrifugando. La recolección puede ocurrir a través de una cuchilla

que elimina una porción (por ejemplo, una cinta y un bloque) de la composición de ARNm purificado que precipita sobre el sustrato poroso (por ejemplo, un sustrato poroso removible).

5 En algunas realizaciones, el método incluye además una etapa de solubilizar la composición de ARNm purificado en un medio acuoso, por ejemplo agua, obteniendo así una disolución que comprende ARNm purificado. La solubilización puede ocurrir dentro de la centrífuga, o fuera de la centrífuga. La solubilización puede incluir una etapa de pulverizar la composición de ARNm purificado.

10 En algunas realizaciones, el método incluye además una o más etapas para separar el dispersante de la composición de ARNm purificado. La una o más etapas para separar el dispersante del precipitado de ARNm purificado pueden incluir lavar y secar (por ejemplo, varias veces) la composición de ARNm purificado. La separación puede incluir pulverizar la composición de ARNm purificado. La separación del dispersante del precipitado de ARNm purificado puede incluir además solubilizar y eluir el ARNm purificado de la composición de ARNm purificado usando un medio acuoso, por ejemplo agua, mientras se filtra el dispersante.

15 En algunas realizaciones, un método según la presente invención comprende además una etapa de purificación adicional (por ejemplo, diálisis, diafiltración, y/o ultrafiltración) de la disolución de ARNm purificado. En algunas realizaciones, la disolución de ARNm purificado se dializa con citrato de sodio 1 mM usando una membrana de corte de peso molecular (MWCO) de 100 kDa.

20 Un procedimiento de purificación según la presente invención puede llevarse a cabo durante o después de la síntesis. Por ejemplo, el ARNm se puede purificar como se describe aquí antes de añadir una caperuza y/o una cola al ARNm. En algunas realizaciones, el ARNm se purifica después de añadir una caperuza y/o una cola al ARNm. En algunas realizaciones, el ARNm se purifica después de añadir una caperuza. En algunas realizaciones, el ARNm se purifica tanto antes como después de añadir una caperuza y/o una cola al ARNm. En general, una etapa de purificación como se describe aquí se puede llevar a cabo después de cada etapa de la síntesis de ARNm, opcionalmente junto con otros procedimientos de purificación, tales como diálisis, diafiltración, y/o ultrafiltración; por ejemplo usando filtración de flujo tangencial (TFF). Por ejemplo, el ARNm se puede someter a una purificación adicional (por ejemplo, diálisis, diafiltración, y/o ultrafiltración) para eliminar las secuencias truncadas ("shortmers") tras la síntesis inicial (por ejemplo, con o sin una cola), y luego someter a precipitación y purificación como se describe aquí, y luego, tras la adición de la caperuza y/o de la cola, volver a purificarse por precipitación y purificación. En realizaciones, una purificación adicional comprende el uso de filtración de flujo tangencial (TFF).

#### Caracterización de ARNm Purificado

30 En diversas realizaciones, la presente invención puede usarse para purificar ARNm sintetizado *in vitro* a partir de una preparación impura que contiene una mezcla de reacción de síntesis de ARNm *in vitro*. En algunas realizaciones, la preparación impura comprende secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

35 En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm purificadas se detectan mediante transferencia, electroforesis capilar, cromatografía, fluorescencia, electroforesis en gel, HPLC, tinción de plata, espectroscopia, ultravioleta (UV), o UPLC, o una combinación de los mismos. En la presente invención se incluyen otros métodos de detección conocidos en la técnica.

40 En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm purificadas se detectan usando espectroscopia de absorción UV con separación por electroforesis capilar. En esta realización, una composición o un lote proporciona un número menor de picos, picos con una base más estrecha, y/o picos más altos cuando se detecta mediante electroforesis capilar con respecto a una composición o un lote que tiene un porcentaje menor de moléculas de ARNm de longitud completa. Por ejemplo, la composición o el lote proporciona un número menor de picos, picos con una base más estrecha, y/o picos más altos cuando se detecta usando electroforesis capilar con respecto a una composición o un lote que incluye ARNm transcrito usando T7 o SP6 como se describe aquí.

45 En algunas realizaciones, un método descrito aquí proporciona ARNm purificado que está sustancialmente libre de enzimas o reactivos en la disolución usada para preparar el ARNm (por ejemplo, T7 o S6ARN polimerasa, ADNasa I, pirofosfatasa, y/o inhibidor de ARNasa). En algunas realizaciones, una disolución que comprende ARNm a purificar comprende reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*, incluyendo ARN polimerasas (por ejemplo, T7 ARN polimerasa ("T7") y/o SP6 ARN polimerasa ("SP6")), ADNasa I, pirofosfatasa, y/o inhibidor de ARNasa, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el método descrito aquí proporciona ARNm purificado que está sustancialmente libre de T7 ARN polimerasa ("T7"). En algunas realizaciones, el método descrito aquí proporciona ARNm purificado que está sustancialmente libre de SP6 ARN polimerasa ("SP6"). En algunas realizaciones, el método descrito aquí proporciona ARNm purificado que está sustancialmente libre de ADNasa I. En algunas realizaciones, el método descrito aquí proporciona ARNm purificado que está sustancialmente libre de pirofosfatasa. En algunas realizaciones, el método descrito aquí proporciona ARNm purificado que está sustancialmente libre de inhibidor de ARNasa. En algunas realizaciones, la determinación de estar sustancialmente libre de cualquiera de las enzimas o reactivos antes mencionados usados para preparar el ARNm se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa. En algunas realizaciones, la determinación de estar sustancialmente libre



de cualquiera de las enzimas o reactivos antes mencionados usados para preparar el ARNm se realiza mediante SDS-PAGE con tinción de plata.

5 En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 90% de la T7 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 95% de la T7 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 98% de la T7 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 99% de la T7 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina sustancialmente toda la T7 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 10 5% (por ejemplo, menos de alrededor de 4%, 3%, 2% o 1%) de la T7 polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 1% (por ejemplo, menos de alrededor de 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% o 0,1%) de la T7 polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene T7 polimerasa indetectable usada en síntesis *in vitro*, incluyendo lo determinado, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y/o tinción con Coomassie. Los porcentajes de T7 polimerasa descritos anteriormente pueden determinarse mediante cuantificación densitométrica de electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente, los porcentajes de T7 polimerasa como se han descrito anteriormente pueden determinarse mediante técnicas conocidas, tales como métodos conocidos de cuantificación y separación cromatográfica.

20 En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 90% de la SP6 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 95% de la SP6 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 98% de la SP6 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 99% de la SP6 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina sustancialmente toda la SP6 ARN polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 25 5% (por ejemplo, menos de alrededor de 4%, 3%, 2%, o 1%) de la SP6 polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 1% (por ejemplo, menos de alrededor de 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1%) de la SP6 polimerasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene SP6 polimerasa indetectable usada en síntesis *in vitro*, incluyendo lo determinado, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y/o tinción con Coomassie. Los porcentajes de SP6 polimerasa como se han descrito anteriormente pueden determinarse mediante cuantificación densitométrica de electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente, los porcentajes de SP6 polimerasa como se han descrito anteriormente pueden determinarse mediante técnicas conocidas, tales como métodos conocidos de cuantificación y separación cromatográfica.

35 En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 90% de la ADNasa I usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 95% de la ADNasa I usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 98% de la ADNasa I usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 99% de la ADNasa I usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina sustancialmente toda la ADNasa I usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 40 5% (por ejemplo, menos de alrededor de 4%, 3%, 2%, o 1%) de la ADNasa I usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 1% (por ejemplo, menos de alrededor de 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1%) de la ADNasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene ADNasa I indetectable usada en síntesis *in vitro*, incluyendo lo determinado, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y/o tinción con Coomassie. Los porcentajes de ADNasa I descritos anteriormente pueden determinarse mediante cuantificación densitométrica de electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente, los porcentajes de ADNasa I como se han descrito anteriormente pueden determinarse mediante técnicas conocidas, tales como métodos conocidos de cuantificación y separación cromatográfica.

55 En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 90% de la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 95% de la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 98% de la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 99% de la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina sustancialmente toda la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina sustancialmente toda la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 60 5% (por ejemplo, menos de alrededor de 4%, 3%, 2%, o 1%) de la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 1% (por ejemplo, menos del 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1%) de la pirofosfatasa usada en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene pirofosfatasa indetectable usada

en síntesis *in vitro*, incluyendo lo determinado, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y/o tinción con Coomassie. Los porcentajes de pirofosfatasa descritos anteriormente pueden determinarse mediante cuantificación densitométrica de electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente, los porcentajes de pirofosfatasa descritos anteriormente pueden determinarse mediante técnicas conocidas, tales como métodos de cuantificación y separación cromatográfica conocidos.

En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 90% del inhibidor de ARNasa usado en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 95% del inhibidor de ARNasa usado en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 98% del inhibidor de ARNasa usado en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 99% del inhibidor de ARNasa usado en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, un método según la invención elimina sustancialmente todo el inhibidor de ARNasa usado en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 5% (por ejemplo, menos de alrededor de 4%, 3%, 2%, o 1%) del inhibidor de ARNasa usado en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 1% (por ejemplo, menos de alrededor de 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1%) del inhibidor de ARNasa usado en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene un inhibidor de ARNasa indetectable usado en síntesis *in vitro*, incluyendo lo determinado, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y/o tinción con Coomassie. Los porcentajes de inhibidor de ARNasa como se describe anteriormente pueden determinarse mediante cuantificación densitométrica de electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente, los porcentajes de inhibidor de ARNasa como se describe anteriormente pueden determinarse mediante técnicas conocidas, tales como métodos conocidos de cuantificación y separación cromatográfica.

En algunas realizaciones, la presente invención elimina o elimina un alto grado de secuencias de ARN abortadas prematuramente (también conocidas como "shortmeros"). En algunas realizaciones, un método según la invención elimina más de alrededor de 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o sustancialmente todas las secuencias de ARN abortadas prematuramente. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 5% (por ejemplo, menos de alrededor de 4%, 3%, 2%, o 1%) de secuencias de ARN abortadas prematuramente. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene menos de alrededor de 1% (por ejemplo, menos de alrededor de 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1%) de secuencias de ARN abortadas prematuramente. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención contiene secuencias de ARN abortadas prematuramente indetectables según lo determinado, por ejemplo, por tinción con bromuro de etidio y/o Coomassie. En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente comprenden menos de 15 bases (por ejemplo, menos de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3 bases). En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente contienen alrededor de 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, u 8-10 bases.

En algunas realizaciones, una disolución de ARNm purificado contiene menos de alrededor de 5% (por ejemplo, menos de alrededor de 4,5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,1%) de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*. En ciertas realizaciones, la disolución de ARNm purificado contiene menos de alrededor de 1% (por ejemplo, menos de alrededor de 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, o 0,5%) de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*. En ciertas realizaciones, una disolución de ARNm purificado contiene menos de alrededor de 0,5% (por ejemplo, menos de alrededor de 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1%) de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, una disolución de ARNm purificado contiene menos de alrededor de 0,1% de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*. En algunas realizaciones, una disolución de ARNm purificado está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.

En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente y/o los reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro* se miden mediante tinción de plata, electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de líquidos de ultra rendimiento (UPLC), y/o electroforesis capilar.

En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente contienen menos de 15 bases (por ejemplo, menos de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3 bases). En algunas realizaciones, las secuencias de ARN abortadas prematuramente contienen alrededor de 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, u 8-10 bases.

En algunas realizaciones, el ARNm purificado usando un método descrito aquí mantiene un alto grado de integridad. La integridad del ARNm se puede determinar usando métodos particularmente descritos aquí, tal como electroforesis en gel de agarosa TAE o por SDS-PAGE con tinción de plata, o por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por electroforesis en gel de agarosa de ARN. En algunas realizaciones, el ARNm purificado tiene una integridad de alrededor de 95% o mayor (por ejemplo, de alrededor de 96%, 97%, 98% o 99% o mayor). En algunas realizaciones, el ARNm purificado tiene una integridad de alrededor de 98% o mayor. En algunas realizaciones, el ARNm purificado tiene una integridad de alrededor de 99% o mayor. En algunas realizaciones, el ARNm purificado según la presente invención tiene una integridad de aproximadamente 100%. En algunas

realizaciones, un método descrito aquí proporciona una composición que tiene una mayor actividad, por ejemplo al menos dos, tres, cuatro, cinco o más, de polipéptidos traducidos con respecto a una composición que tiene un porcentaje más bajo de moléculas de ARNm de longitud completa.

#### ARNm

- 5 Los métodos de purificación descritos aquí son adecuados para la purificación de cualquier ARNm. Los ARNm ejemplares se describen en este documento.

La presente invención puede usarse para purificar cualquier ARNm. Por lo general, se considera que el ARNm es el tipo de ARN que transporta información desde el ADN hasta el ribosoma. La existencia del ARNm suele ser muy breve, e incluye el procesamiento y la traducción, seguidos de la degradación. Normalmente, en los organismos eucariotas, el procesamiento del ARNm comprende la adición de una "caperuza" en el extremo N-terminal (5') y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). Una caperuza típica es una caperuza de 7-metilguanosa, que es una guanosa unida a través de un enlace de 5'-5'-trifosfato al primer nucleótido transcrito. La presencia de la caperuza es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. La cola es típicamente un evento de poliadenilación mediante el cual se añade un resto de poliadenililo al extremo 3' de la molécula de ARNm. La presencia de esta "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación por exonucleasas. Los ribosomas traducen el ARN mensajero en una serie de aminoácidos que forman una proteína.

La presente invención puede usarse para purificar los ARNm que codifican una variedad de proteínas. Los ejemplos no limitativos de purificación incluyen la purificación de los ARNm que codifican OTC y CFTR.

#### Síntesis, incluida la síntesis a gran escala de ARNm

20 Los ARNm según la presente invención se pueden sintetizar según cualquiera de una variedad de métodos conocidos. Por ejemplo, los ARNm según la presente invención se pueden sintetizar a través de transcripción *in vitro* (IVT). Brevemente, la IVT generalmente se realiza con una molde de ADN lineal o circular que contiene un promotor, un grupo de trifosfatos de ribonucleótidos, un sistema amortiguador que puede incluir DTT e iones de magnesio, y una ARN polimerasa apropiada (por ejemplo, T3, T7 o SP6 ARN polimerasa), ADNasa I, pirofosfatasa, y/o inhibidor de ARNasa. Las condiciones exactas variarán según la aplicación específica. La presencia de estos reactivos es indeseable en el producto final según varias realizaciones, y por lo tanto pueden denominarse impurezas, y una preparación que contiene una o más de estas impurezas puede denominarse preparación impura. En algunas realizaciones, la transcripción *in vitro* ocurre en un solo lote.

30 Otro aspecto de la presente invención es un método para producir una composición enriquecida en moléculas de ARNm de longitud completa que tienen más de 500 nucleótidos de longitud y. El método incluye una etapa de transcribir *in vitro* una o más moléculas de ADN diana con una ARN polimerasa (por ejemplo, SP6 o T7) para producir moléculas de ARNm purificadas en las que al menos 80% de las moléculas de ARNm purificadas son moléculas de ARNm de longitud completa. El método produce una composición que incluye al menos 100 mg de ARNm que está enriquecido para ARNm de longitud completa.

35 Otro aspecto de la presente invención es un método para la producción a gran escala de moléculas de ARNm de longitud completa. El método incluye una etapa de transcribir *in vitro*, en un solo lote, una o más moléculas de ADN diana con una ARN polimerasa (por ejemplo, SP6 o T7) para producir moléculas de ARNm purificadas que tienen más de 500 nucleótidos de longitud. Al menos 80% de las moléculas de ARNm purificadas son moléculas de ARNm de longitud completa. La producción a gran escala produce al menos 100 mg de ARNm en un solo lote.

40 Otro aspecto más de la presente invención es un método para producir una composición enriquecida en polipéptidos de longitud completa. El método incluye una etapa de transcribir *in vitro*, en un solo lote, al menos una molécula de ADN diana con una ARN polimerasa (por ejemplo, SP6 o T7) para producir al menos 100 mg de moléculas de ARNm que tienen más de 500 nucleótidos de longitud; al menos 80% de las moléculas de ARNm son moléculas de ARNm de longitud completa. El método incluye además una etapa de traducir las moléculas de ARNm para producir una composición enriquecida en polipéptidos de longitud completa.

En algunas realizaciones, al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,01%, 99,05%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% de las moléculas de ARNm purificadas son moléculas de ARNm de longitud completa.

50 En algunas realizaciones, una composición o un lote incluye al menos 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 5 g, 10 g, 25 g, 50 g, 75 g, 100 g, 250 g, 500 g, 750 g, 1 kg, 5 kg, 10 kg, 50 kg, 100 kg, 1000 kg, o más ARNm.

En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm tienen más de 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10,000 o más nucleótidos de longitud; también se incluye en la presente invención el ARNm que tiene cualquier longitud intermedia.

En algunas realizaciones, una composición o un lote tiene un mayor porcentaje de moléculas de ARNm de longitud completa que una composición o un lote que incluye ARNm transcrito usando T7.

5 En algunas realizaciones, una composición proporciona una mayor cantidad, por ejemplo al menos dos, tres, cuatro, cinco, o más, de polipéptidos de longitud completa con respecto a una composición que tiene un porcentaje menor de moléculas de ARNm de longitud completa.

En algunas realizaciones, una composición proporciona una mayor actividad, por ejemplo al menos dos, tres, cuatro, cinco, o más, de polipéptidos traducidos con respecto a una composición que tiene un porcentaje menor de moléculas de ARNm de longitud completa.

10 En algunas realizaciones, una composición o un lote se prepara sin la etapa de eliminar específicamente moléculas de ARNm que no son moléculas de ARNm de longitud completa.

En algunas realizaciones, la SP6 comprende una etiqueta que permite purificar, aislar y/o detectar la SP6. Una etiqueta ejemplar es una etiqueta his. Otras etiquetas de este tipo conocidas en la técnica se incluyen en la presente invención.

15 En algunas realizaciones, la secuencia de ADN a transcribir puede optimizarse para facilitar una transcripción y/o traducción más eficaz. Por ejemplo, la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a los elementos reguladores en cis (por ejemplo, caja TATA, señales de terminación, y sitios de unión a proteínas), sitios de recombinación artificial, sitios chi, contenido de dinucleótidos CpG, islas CpG negativas, contenido de GC, sitios de deslizamiento de polimerasa, y/u otros elementos relevantes para la transcripción; la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a los sitios de empalme crípticos, la estructura secundaria del ARNm, la energía libre estable del ARNm, las secuencias repetitivas, el motivo de inestabilidad del ARNm, y/u otros elementos relevantes para el procesamiento y la estabilidad del ARNm; la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto al sesgo del uso de codones, adaptabilidad de codones, sitios chi internos, sitios de unión ribosómica (por ejemplo, IRES), sitios poliA prematuros, secuencias de Shine-Dalgarno (SD), y/u otros elementos relevantes para la traducción; y/o la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto al contexto del codón, la interacción codón-anticodón, los sitios de pausa de la traducción, y/u otros elementos relevantes para el plegamiento de proteínas. En la presente invención se pueden usar métodos de optimización conocidos en la técnica, por ejemplo GeneOptimizer de ThermoFisher y OptimumGene™, que se describe en el documento US 20110081708.

20

25

30 En algunas realizaciones, el molde de ADN incluye una región no traducida 5' y/o 3'. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' incluye uno o más elementos que afectan la estabilidad o la traducción de un ARNm, por ejemplo un elemento sensible al hierro. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' puede tener entre alrededor de 50 y 500 nucleótidos de longitud.

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

40 Las secuencias de 3' y/o 5' UTR ejemplares pueden derivar de moléculas de ARNm que son estables (por ejemplo, globina, actina, GAPDH, tubulina, histona, y enzimas del ciclo del ácido cítrico) para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido. Por ejemplo, una secuencia de 5' UTR puede incluir una secuencia parcial de un gen inmediato temprano 1 (IE1) del CMV, o un fragmento del mismo, para mejorar la resistencia a la nucleasa y/o mejorar la vida media del polinucleótido. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humana (hGH) o un fragmento de la misma en el extremo 3' o la región no traducida del polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para estabilizar aún más el polinucleótido. En general, estas características mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la vida media) del polinucleótido con respecto al mismo polinucleótido sin tales características, e incluyen, por ejemplo, características hechas para mejorar la resistencia de dichos polinucleótidos a la digestión con nucleasas in vivo.

45

#### Longitud del ARNm

Según diversas realizaciones, la presente invención puede usarse para purificar ARNm sintetizado *in vitro* de una variedad de longitudes. En algunas realizaciones, la presente invención puede usarse para purificar ARNm sintetizado *in vitro* de o más de alrededor de 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 11 kb, 12 kb, 13 kb, 14 kb, 15 kb, o 20 kb de longitud. En algunas realizaciones, la presente invención puede usarse para purificar ARNm sintetizado *in vitro* que oscila de alrededor de 1-20 kb, alrededor de 1-15 kb, alrededor de 1-10 kb, alrededor de 5-20 kb, alrededor de 5-15 kb, alrededor de 5-12 kb, alrededor de 5-10 kb, alrededor de 8-20 kb, o alrededor de 8-15 kb de longitud. Por ejemplo, los ARNm típicos pueden tener una longitud de alrededor de 1 kb a alrededor de 5 kb. Más típicamente, el ARNm tendrá una longitud de alrededor de 1 kb a alrededor de 3 kb. Sin embargo, en algunas realizaciones, el ARNm en la composición de la invención es mucho más largo (mayor que alrededor de 20 kb). En algunas realizaciones, una o más modificaciones se seleccionan de nucleótidos modificados, cadenas principales de fosfato de azúcar modificadas, región no traducida 5' y/o 3'. En

50

55

algunas realizaciones, la presente invención puede usarse para purificar ARNm sintetizado *in vitro* que no está modificado.

#### Nucleótidos de ARNm Modificados

5 En ciertas realizaciones, los nucleótidos de ARNm se modifican para proporcionar "ARNm modificado". Un ARNm modificado según la invención puede incluir de este modo, por ejemplo, modificaciones del esqueleto, modificaciones del azúcar, o modificaciones de la base. En algunas realizaciones, los ARNm que codifican anticuerpos (por ejemplo, ARNm que codifican cadenas pesadas y cadenas ligeras) se pueden sintetizar a partir de nucleótidos naturales y/o análogos de nucleótidos (nucleótidos modificados) que incluyen, pero no se limitan a, purinas (adenina (A), guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C), uracilo (U)), y como análogos de nucleótidos modificados o derivados de purinas y pirimidinas, tales como por ejemplo 1-metil-adenina, 2-metil-adenina, 2-metil-N-6-isopentenil-adenina, N6-metil-adenina, N6-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metil-citosina, 4-acetil-citosina, 5-metil-citosina, 2,6-diaminopurina, 1-metil-guanina, 2-metil-guanina, 2,2-dimetil-guanina, 7-metil-guanina, inosina, 1-metil-inosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidro-uracilo, 2-tio-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tio-uracilo, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetilaminometil-uracilo, 5-metil-2-tio-uracilo, 5-metil-uracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tio-uracilo, 5'-metoxycarbonilmetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 1-metil-pseudouracilo, queosina, .beta.-D-manosil-queosina, wybutoxosina, y fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, 7-desazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. La preparación de tales análogos es conocida por un experto en la técnica, por ejemplo desde la patente U.S. nº 4.373.071, patente U.S. nº 4.401.796, patente U.S. nº 4.415.732, patente U.S. nº 4.458.066, patente U.S. nº 4.500.707, patente U.S. nº 4.668.777, patente U.S. nº 4.973.679, patente U.S. nº 5.047.524, patente U.S. nº 5.132.418, patente U.S. nº 5.153.319, patentes U.S. nº 5.262.530 y 5.700.642.

25 Por lo general, la síntesis de ARNm incluye la adición de una "caperuza" en el extremo N-terminal (5') y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). La presencia de la caperuza es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. La presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación por exonucleasas.

30 En algunas realizaciones, un método incluye además una etapa de añadir una caperuza y/o añadir una cola de poliA al ARNm purificado o al ARNm de longitud completa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ARNm incluyen una estructura de caperuza en 5'. Por lo general, se añade una caperuza en 5' de la siguiente manera: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido en 5', dejando dos fosfatos terminales; después se añade trifosfato de guanosina (GTP) a los fosfatos terminales a través de una guanilil transferasa, lo que produce un enlace trifosfato 5'5'5'; y el 7-nitrógeno de la guanina se metila entonces por una metiltransferasa. Los ejemplos de estructuras de caperuza incluyen, pero no se limitan a, m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

35 Mientras que el ARNm proporcionado por reacciones de transcripción *in vitro* pueden ser deseables en algunas realizaciones, se contemplan otras fuentes de ARNm dentro del alcance de la invención, incluyendo el ARNm de tipo salvaje producido a partir de bacterias, hongos, plantas, y/o animales.

40 En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una región no traducida 5' y/o 3'. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' incluye uno o más elementos que afectan la estabilidad o la traducción de un ARNm, por ejemplo un elemento sensible al hierro. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' puede tener entre alrededor de 10 y 50 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' puede tener entre alrededor de 50 y 500 nucleótidos de longitud.

45 En algunas realizaciones, una región no traducida 3' incluye una o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para proteínas que afectan la estabilidad de ubicación de un ARNm en una célula, o uno o más sitios de unión para miARN. En algunas realizaciones, una región no traducida 3' puede tener entre 10 y 50 nucleótidos de longitud o más. En algunas realizaciones, una región no traducida 3' puede tener entre 50 y 500 nucleótidos de longitud o más.

#### Centrífugas

50 En la presente invención se puede usar cualquier centrífuga si proporciona centrifugación y es capaz de separar sólidos y líquidos de una mezcla sólido-líquido al hacer pasar el líquido a través de un sustrato poroso (por ejemplo, una cesta, un filtro, un tambor centrífugo perforado, y una pantalla).

55 Los ejemplos no limitativos de tipos de centrífugas adecuados incluyen centrífugas de filtrado por lotes, centrífugas de filtro inversor, centrífugas de empuje, centrífugas de pelado (por ejemplo, centrífuga de pelado horizontal, centrífuga de pelado vertical, y centrífuga de pelado con sifón), centrífugas de péndulo, centrífugas de pantalla/desplazamiento, y centrífugas de descarga deslizante. En algunas realizaciones, la centrífuga es una centrífuga continua, y/o la centrífuga está orientada vertical u horizontalmente, o la centrífuga es una centrífuga horizontal invertida.

En algunas realizaciones, la centrífuga comprende un puerto de alimentación de muestra y/o un puerto de descarga de muestra.

En algunas realizaciones, la centrífuga comprende un medio para mantener el sustrato poroso (por ejemplo, un sustrato poroso removible) a una temperatura preseleccionada.

- 5 En algunas realizaciones, un componente externo a la centrífuga comprende un medio para mantener el sustrato poroso (por ejemplo, un sustrato poroso removible) a una temperatura preseleccionada.

En algunas realizaciones, la centrífuga es capaz de unirse de forma reversible a un sustrato poroso removible.

- 10 En la presente invención se puede usar cualquier centrífuga de tipo filtración. A menudo, tales centrífugas incluyen un tambor que está perforado para permitir el flujo de fluidos. El tambor perforado acepta un sustrato poroso, por ejemplo una tela de filtro, un papel de filtro, una pantalla, y una malla de alambre. En la presente invención, el sustrato poroso es un sustrato poroso removible, y es una tela de filtro, un papel de filtro, una pantalla, o una malla de alambre. Una suspensión fluye desde el interior hacia el exterior a través del sustrato poroso removible, y después a través del tambor perforado. De esta forma se retiene el material sólido, y se eliminan los líquidos de la suspensión.

- 15 Un sustrato poroso removible (tal como una tela filtrante o un papel filtrante) usado en cualquiera de los métodos descritos aquí puede presentar una variedad de tamaños y tipos de poros de filtro. Por ejemplo, un filtro de centrífuga puede tener un tamaño medio de poros de alrededor de 0,01 micrómetros a alrededor de 200 micrómetros, de alrededor de 1 micrómetro a alrededor de 2000 micrómetros, de alrededor de 0,2 micrómetros a alrededor de 5 micrómetros, o de alrededor de 1 micrómetro a alrededor de 3 micrómetros. En realizaciones, un tamaño medio de poros es alrededor de 0,5 micrómetros o mayor, alrededor de 0,75 micrómetros o mayor, alrededor de 1 micrómetro o mayor, alrededor de 2 micrómetros o mayor, alrededor de 3 micrómetros o mayor, alrededor de 4 micrómetros o mayor, o alrededor de 5 micrómetros o mayor. Los métodos aquí pueden acomodar una variedad de tamaños de poros de filtro mientras aún retienen ARNm y sin ensuciar un filtro.
- 20

En cada una de estas centrífugas, el tambor puede orientarse verticalmente u orientarse horizontalmente.

- 25 Las centrífugas adecuadas pueden alimentarse por lotes o alimentarse de forma continua.

- Las centrífugas adecuadas en la presente invención son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Scott, K. y Hughes, R., "Industrial Membrane Separation Technology", Springer Science & Business Media, 1996; Tarleton, S. y Wakeman, R., "Filtration: Equipment Selection, Modelling and Process Simulation", Elsevier, 1999; Tarleton, S. y Wakeman, R., "Solid/Liquid Separation: Scale-up of Industrial Equipment". Elsevier, 2005; Wakeman, R. y Tarleton, S., "Solid/ Liquid Separation: Principles of Industrial Filtration". Elsevier, 2005; Tarleton, S. y Wakeman, R., "Solid/liquid separation: equipment selection and process design". Elsevier, 2006; y Sutherland, K. y Chase, G., "Filters and Filtration Handbook". Elsevier, 2011. Véanse también, los documentos US1292758A; US1478660A; US3269028A; US3411631A; US3419148A; US3438500A; US3483991A; US3491888A; US3623613A; US3684099A; US3774769A; US3980563A; US4193874A; US4193874A; US4193874A; US4269711A; US4381236A; US4944874A; US5004540A; US5091084A; US5092995A; US5244567A; US5277804A; US5286378A; US5306423A; US5378364A; US5380434A; US5397471A; US5421997A; US5433849A; US5468389A; US5472602A; US5713826A; US6736968B2; US6736968B2; US6736968B2; US7168571B2; US7425264B2; US8021289B2; US8257587B2; US9126233B2; US9297581B2; US20040108281A1; US20040108281A1; US20050245381A1; US20060021931A1; US20060175245A1; US20080149558A1; US20100120598A1; US20100216623A1; US20120285868A1; US20140360039A1; AU2007350788A1; AU2007350788B2; EP1372862A1; EP3040127A1; EP845296A1; WO2004033105A1; WO2008122067A1; WO2014043541A1; WO2016025862A1; WO2016112426A1; WO2016112427A1; y WO2016112428A1.
- 30
- 35
- 40

Una centrífuga descrita anteriormente se puede usar en los métodos descritos a continuación, y para producir las composiciones descritas a continuación.

- 45 Composiciones y Métodos de Tratamiento

- La presente invención proporciona métodos para producir una composición enriquecida con moléculas de ARNm de longitud completa que tienen más de 500 nucleótidos de longitud y codifican un péptido o polipéptido de interés. La presente descripción también proporciona métodos para producir una composición terapéutica enriquecida con moléculas de ARNm de longitud completa que codifican un péptido o polipéptido de interés para uso en la administración a o el tratamiento de un sujeto, por ejemplo un sujeto humano o una célula de un sujeto humano o una célula que es tratada y suministrada a un sujeto humano.
- 50

- Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento del pulmón de un sujeto o una célula pulmonar. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
- 55

- (CFTR). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína miembro 3 de la subfamilia A del casete de unión a ATP. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína de la cadena intermedia 1 del axonema de la dineína. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína de cadena pesada axonemal 5 de la dineína (DNAH5). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína alfa-1-antitripsina. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína forkhead box P3 (FOXP3). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una o más proteínas tensioactivas, por ejemplo una o más de la proteína A tensioactiva, la proteína B tensioactiva, la proteína C tensioactiva, y la proteína D tensioactiva.
- En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento del hígado de un sujeto o una célula hepática. Dichos péptidos y polipéptidos pueden incluir aquellos asociados con un trastorno del ciclo de la urea, asociados con un trastorno de almacenamiento lisosomal, asociados con un trastorno de almacenamiento de glucógeno, asociados con un trastorno del metabolismo de aminoácidos, asociados con un trastorno fibrótico o del metabolismo de los lípidos, asociados con acidemia metilmalónica, o asociados con cualquier otro trastorno metabólico para el que la administración o el tratamiento del hígado o de una célula hepática con ARNm de longitud completa enriquecido proporcione un beneficio terapéutico.
- En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína asociada con un trastorno del ciclo de la urea. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína ornitina transcarbamilasa (OTC). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína arginosuccinato sintetasa 1. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína carbamoil fosfato sintetasa I. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína arginosuccinato liasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína arginasa.
- En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína alfa galactosidasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína glucocerebrosidasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína iduronidasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína N-acetil-alfa-D-glucosaminidasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína heparano N-sulfatasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína galactosamina-6 sulfatasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína beta-galactosidasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína lipasa lisosomal. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína arilsulfatasa B (N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica el factor de transcripción EB (TFEB).
- En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína asociada con un trastorno de almacenamiento de glucógeno. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína alfa-glucosidasa ácida. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína glucosa-6-fosfatasa

(G6PC). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína glucógeno fosforilasa hepática. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína fosfoglicerato mutasa muscular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la enzima desramificadora de glucógeno.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína asociada con el metabolismo de aminoácidos. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la enzima fenilalanina hidroxilasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la enzima glutaril-CoA deshidrogenasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la enzima propionil-CoA caboxilasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica para la enzima oxalasa alanilgioxilato aminotransferasa.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína asociada con un metabolismo de lípidos o un trastorno fibrótico. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un inhibidor de mTOR. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica para la proteína 8B1 transportadora de fosfolípidos ATPasa (ATP8B1). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica uno o más inhibidores de NF-kappa B, tal como uno o más de I-kappa B alfa, regulador 1 del desarrollo relacionado con interferón (IFRD1), y Sirtuina 1 (SIRT1). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína PPAR-gamma o una variante activa.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína asociada con la academia metilmalónica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína metilmalonil CoA mutasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína metilmalonil CoA epimerasa.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa para el que la administración a o el tratamiento del hígado puede proporcionar un beneficio terapéutico. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína ATP7B, también conocida como proteína de la enfermedad de Wilson. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la enzima porfobilinógeno desaminasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una o más enzimas de coagulación, tal como el Factor VIII, el Factor IX, el Factor VII, y el Factor X. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína de la hemocromatosis humana (HFE).

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento de la cardiovascular de un sujeto o una célula cardiovascular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína del factor A de crecimiento endotelial vascular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína relaxina. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína proteína 9 morfogenética ósea. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica para la proteína receptora de la proteína 2 morfogenética ósea.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento del músculo de un sujeto o una célula muscular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína distrofina. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína frataxina. En



ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento del músculo cardíaco de un sujeto o una célula del músculo cardíaco. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína que modula uno o ambos canales de potasio y de sodio en el tejido muscular o en una célula muscular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína que modula un canal Kv7.1 en tejido muscular o en una célula muscular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína que modula un canal Nav1.5 en tejido muscular o en una célula muscular.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento del sistema nervioso de un sujeto o una célula del sistema nervioso. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína de supervivencia de la neurona motora 1. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína de supervivencia de la neurona motora 2. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína frataxina. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica para la proteína del miembro 1 de la subfamilia D del casete de unión a ATP (ABCD1). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína CLN3.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento de la sangre o la médula ósea de un sujeto o una célula de la sangre o la médula ósea. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína beta globina. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína tirosina cinasa de Bruton. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una o más enzimas de coagulación, tal como el Factor VIII, el Factor IX, el Factor VII, y el Factor X.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento del riñón de un sujeto o una célula renal. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína de cadena alfa 5 de colágeno tipo IV (COL4A5).

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración a o el tratamiento del ojo de un sujeto o una célula ocular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica para la proteína miembro 4 de la subfamilia A del casete de unión a ATP (ABCA4). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína retinosquisina. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína de 65 kDa (RPE65) específica del epitelio pigmentario de la retina. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la proteína centrosomal de 290 kDa (CEP290).

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un péptido o polipéptido para uso en la administración o el tratamiento con una vacuna para un sujeto o una célula de un sujeto. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de un agente infeccioso, tal como un virus. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno del virus de la gripe. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno del virus sincitial respiratorio. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno del virus de la rabia. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de citomegalovirus. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de rotavirus. En

ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de un virus de la hepatitis, tal como el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B o el virus de la hepatitis C. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno del virus del papiloma humano. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de un virus del herpes simple, tal como el virus del herpes simple 1 o el virus del herpes simple 2. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de un virus de la inmunodeficiencia humana, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 o el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de un metapneumovirus humano. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno de un virus de parainfluenza humana, tal como el virus de parainfluenza humana tipo 1, el virus de parainfluenza humana tipo 2, o el virus de parainfluenza humana tipo 3. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno del virus de la malaria. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno del virus zika. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno del virus chikungunya.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno asociado con un cáncer de un sujeto o identificado a partir de una célula cancerosa de un sujeto. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno determinado a partir de la propia célula cancerosa de un sujeto, es decir, para proporcionar una vacuna contra el cáncer personalizada. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un antígeno expresado a partir de un gen KRAS mutante.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede ser parte de una proteína de fusión. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un anticuerpo contra OX40. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un anticuerpo contra VEGF. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un anticuerpo contra el factor alfa de necrosis tisular. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un anticuerpo contra CD3. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un anticuerpo contra CD19.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica un inmunomodulador. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la interleucina 12. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica la interleucina 23. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica para la interleucina 36 gamma. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una variante constitutivamente activa de una o más proteínas estimuladoras de genes de interferón (STING).

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una endonucleasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína endonucleasa de ADN guiada por ARN, tal como la proteína Cas 9. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína meganucleasa. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir una composición terapéutica enriquecida con ARNm de longitud completa que codifica una proteína nucleasa de dedos de zinc.

El método de la presente invención se puede usar para preparar una composición de ARNm purificado, por ejemplo una composición farmacéutica que incluye la composición de ARNm purificado y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Las composiciones farmacéuticas preparadas usando el método de la presente invención se pueden usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno, que incluye una etapa de administrar la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite.

El método de la presente invención se puede usar para preparar una disolución que incluye ARNm purificado.

El método de la presente invención se puede usar para preparar una composición farmacéutica que incluye la disolución que incluye ARNm purificado del aspecto anterior y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Las composiciones farmacéuticas preparadas usando el método de la presente invención se pueden usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno, que incluye una etapa de administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica del aspecto anterior.

El método de la presente invención se puede usar para preparar una composición que incluye un precipitado de ARNm purificado.

15 El método de la presente invención se puede usar además para preparar una composición farmacéutica que incluye un precipitado de ARNm purificado producido por un aspecto y/o realización anterior y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Una composición farmacéutica preparada usando el método de la presente invención se puede usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica del aspecto anterior.

25 Las enseñanzas adicionales relevantes para la presente invención se describen en uno o más de los siguientes documentos: WO 2010/053572; WO 2011/068810; WO 2012/075040; WO 2012/170889; WO 2012/170930; WO 2013/063468; WO 2013/149140; WO 2013/149141; WO 2013/185067; WO 2013/185069; WO 2014/089486; WO 2014/152513; WO 2014/152659; WO 2014/152673; WO 2014/152774; WO 2014/152966; WO 2014/153052; WO 2015/061461; WO 2015/061467; WO 2015/061491; WO 2015/061500; WO 2015/148247; WO 2015/164773; WO 2015/184256; WO 2015/200465; WO 2016/004318; WO 2016/149508; WO/2014/152940; PCT/US16/57044; US 62/320.073; US 62/349.331; US 62/420.413; US 62/420.421; US 62/420.428; US 62/420.435; US 62/421.007; US 62/421.021, y las solicitudes relacionadas presentadas el 27 de febrero de 2017 por el Solicitante, tituladas  
30 "SÍNTESIS A GRAN ESCALA DE ARN MENSAJERO" (US 62/464.043), "MÉTODOS PARA LA PURIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO" (US 62/463.998), y "NUEVO ARNm DE CFTR CON CODONES OPTIMIZADOS" (US 62/464.215).

35 Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica o estudio de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Las referencias citadas aquí no se admiten como estado de la técnica de la invención reivindicada. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos, y no pretenden ser limitativos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Diseño Experimental General

Reacción de IVT:

40 El ARN se transcribió *in vitro* (IVT) usando los siguientes procedimientos ejemplares. Brevemente, por cada gramo de ARNm transcrito, se preparó una reacción que contiene 8 mg de un plásmido de ADN bicatenario linealizado con un promotor específico de ARN polimerasa, ARN polimerasa (por ejemplo, SP6 polimerasa o T7polimerasa), inhibidor de ARNasa, pirofosfatasa, NTP 29 mM, DTT 10 mM, y un amortiguador de reacción (10x - HEPES 800 mM, espirimidina 20 mM, MgCl 250 mM, pH 7,7), y entonces se incubó a 37°C durante 60 min una cantidad suficiente  
45 (QS) hasta 179 ml con agua libre de ARNasa. Entonces, la reacción se inactivó mediante la adición de ADNasa I y un amortiguador de ADNasa I (10x - Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 25 mM, pH 7,6), para facilitar la digestión del molde de ADN bicatenario en preparación para la purificación. El volumen de reacción final fue 204 ml.

Reacción de Adición de Caperuza y de Cola (*Capping y Tailing, C/T*):

50 El ARNm transcrito *in vitro* se modificó enzimáticamente mediante adición de una estructura de caperuza 0 en 5' de N<sup>7</sup>-metilguanilato usando guanilato transferasa y la adición de un grupo metilo en la posición 2' O del penúltimo nucleótido, que da como resultado una estructura de caperuza 1 usando 2' O-metiltransferasa como se describe por (Fechter, P.; Brownlee, G. G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249). Tras la adición de la estructura de caperuza 1, se añadió enzimáticamente, usando poli-A polimerasa, una cola de poliadenilato al extremo 3' del ARNm transcrito *in vitro*. Brevemente, se estableció una reacción de encaperuzamiento para cada gramo de IVT purificado, que contenía GTP 2,5 mM, S-adenosil metionina

246  $\mu$ M, inhibidor de ARNasa, 2'-Ometil transferasa, guanilil transferasa, un amortiguador de reacción (10x - Tris-HCl 500 mM pH 8,0,  $MgCl_2$  60 mM y  $MgCl_2$  12,5 mM) y QS hasta 650 ml con  $H_2O$  libre de ARNasa, después se incubó a 37°C durante 60 minutos. Tras la incubación, se inició una reacción de adición de cola añadiendo amortiguador de adición de cola (10x - Tris-HCl 500 mM pH 8,0, NaCl 2,5 mM,  $MgCl_2$  100 mM) ATP 3,7 mM, poli-A polimerasa, y QS hasta 800 ml con  $H_2O$  libre de ARNasa. La reacción de adición de cola se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos antes de la adición de EDTA 12,5 mM para la inactivación.

#### Precipitación del ARN:

Generalmente, por cada gramo de ARNm (reacción de IVT, reacción de C/T, o ARNm acuoso previamente purificado), se realizaron precipitaciones de sal-EtOH de la siguiente manera. El ARNm se llevó hasta 1 g/l usando  $H_2O$  libre de ARNasa, y después se añadió un volumen igual de amortiguador de GSCN que contenía tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 6,5 y N-lauroilsarcosina al 0,5%. La disolución de ARNm se mezcló completamente y se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos con agitación continua. A continuación, se añadió un volumen igual de etanol absoluto a la disolución de ARNm-GSCN, y se mezcló continuamente durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la precipitación.

#### 15 Configuración de la Centrífuga:

Una centrífuga de filtración vertical con una cesta de seis pulgadas y 438  $cm^2$  de área superficial del filtro, o una centrífuga peladora de filtración horizontal con cesta de 300 mm y 1400  $cm^2$  área superficial del filtro (FIG. 1 y FIG. 2, respectivamente) se preparó como sigue. El cuenco de centrífuga de filtrado vertical se preparó colocando un papel de filtro en el interior de la cesta de centrífuga de seis pulgadas. El cuenco de centrífuga horizontal se preparó colocando varios papeles de filtro en el interior de la cesta de 300 mm, seguido de una tela peladora de polipropileno de un micrómetro personalizada con cesta de filtro de cuerda soldada. Para cualquiera de las centrífugas, la tubería se conectó a la alimentación de muestra y al puerto de descarga. El tubo de alimentación de muestra se hizo pasar a través de una bomba peristáltica y dentro de una vasija de TFF de diez litros, y el tubo de descarga de muestra se hizo pasar a través de una bomba peristáltica y dentro de una vasija de residuos de veinte litros. La centrífuga se puso en marcha a 3000 RPM y se desinfectó con cinco litros de alimentación de NaOH 0,1N a través del puerto de alimentación, a cuatro litros por minuto, y se eliminó a través del puerto de descarga con la bomba de descarga ajustada a 550 RPM. El sistema se neutralizó entonces con cinco lavados de cinco litros de  $H_2O$ , siguiendo el mismo método de carga y extracción.

#### Análisis del ARN

La integridad del ARN (que incluye la longitud de la cola de poli-A para las muestras de C/T) se analizó con el CE Fragment Analyzer™ con un kit de análisis de ARNm de sensibilidad estándar (Advanced Analytical Tech.) con una carga total de ARNm de 300 ng. Las enzimas residuales del procedimiento se analizaron preparando 20  $\mu$ g de ARNm digerido con RNasa I en amortiguador de carga y reducción de muestras NuPAGE, separando las muestras en un gel NuPage 10% bis-tris a 200 V durante 35 minutos (Invitrogen). Después, las proteínas residuales se visualizaron usando el kit de tinción de plata SilverQuest™ (Invitrogen). La actividad de luciferasa se midió en ratones dosificados con ARNm de FFL, purificado según la presente invención y formulado con una nanopartícula lipídica patentada, seguido de la intensidad de flujo capturada en el sistema IVIS Imager veinticuatro horas después de la dosificación y tras la administración del sustrato de luciferasa, luciferina.

#### Cantidades Recuperadas de ARNm

La masa inicial de un ARNm que se va a purificar se calcula en función de la cantidad teóricamente esperada de producto determinada por las cantidades iniciales de reactivo en una reacción de IVT y/o de caperuza/cola usada para preparar el ARNm que se va a purificar. El porcentaje de rendimiento se calcula como la relación entre el producto obtenido y la cantidad teóricamente esperada de producto.

#### Almacenamiento a Largo Plazo

El ARNm purificado obtenido según los métodos descritos aquí se puede almacenar como un sólido seco (por ejemplo, tras la separación de un filtro) a bajas temperaturas (por ejemplo, por debajo de 0°C, tal como alrededor de -20°C) durante períodos de tiempo de al menos alrededor de 1-24 meses, o durante un período de tiempo de alrededor de una semana a alrededor de 24 meses.

### Ejemplo 2: Purificación de ARNm de un gramo a tres gramos

50 Método 1: Centrífuga vertical, purificación de la reacción de C/T de un gramo de FFL (elución con  $H_2O$ )

Se llevó a cabo una reacción de C/T de luciferasa de luciérnaga (FFL) de un gramo como se describió anteriormente. Después del tratamiento con ADNasa I, la reacción de un gramo se llevó a QS hasta un litro con  $H_2O$  libre de ARNasa, y se precipitó con volúmenes iguales de amortiguador de GSCN y EtOH (véase anteriormente), y entonces se cargó en una centrífuga de filtración vertical a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 3000 RPM hasta que se capturó todo el precipitado. El precipitado de ARNm recogido en el

filtro de la centrífuga se lavó con dos litros de disolución de lavado de GSCN-EtOH (57,6% de GSCN y 42,4% de EtOH) con una centrífuga a 3000 RPM. A continuación, el precipitado de ARNm se lavó con diez litros de EtOH al 80% y se cargó de nuevo a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante diez minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. A continuación, el ARNm se suspendió en H<sub>2</sub>O como sigue. Se dejó la centrífuga a 3000 RPM, se añadió un litro de H<sub>2</sub>O a la cesta de la centrífuga a través del puerto de alimentación de muestra, y el filtrado (ARN/H<sub>2</sub>O) se devolvió a la vasija de elución a través del puerto de descarga de muestra para su recirculación. La recirculación continuó durante quince minutos antes de que se recogiera la elución de un litro, y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

10 Método 2: Centrífuga vertical, purificación de la reacción de IVT de dos gramos de FFL (elución con H<sub>2</sub>O)

Se llevó a cabo una reacción de IVT de luciferasa de luciérnaga (FFL) de dos gramos como se describió anteriormente. Después del tratamiento con ADNasa I, la reacción de dos gramos se llevó a QS hasta un litro con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, y se precipitó con volúmenes iguales de amortiguador de GSCN y EtOH (véase anteriormente), y entonces se cargó en una centrífuga de filtración vertical a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 3000 RPM hasta que se capturó todo el precipitado. El precipitado de ARNm recogido en el filtro de la centrífuga se lavó con 2,5 litros de disolución de lavado de GSCN-EtOH (57,6% de GSCN y 42,4% de EtOH) a través del puerto de alimentación de muestra con una centrífuga a 3000 RPM. A continuación, el precipitado de ARNm se lavó con diez litros de EtOH al 80% y se cargó de nuevo a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante diez minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. A continuación, el ARNm se suspendió en H<sub>2</sub>O como sigue. Se dejó la centrífuga a 3000 RPM, se añadió un litro de H<sub>2</sub>O a la cesta de la centrífuga a través del puerto de alimentación de muestra, y el filtrado (ARNm/H<sub>2</sub>O) se devolvió a la vasija de elución a través del puerto de descarga de muestra para su recirculación (Lavado de elución nº 1). La recirculación continuó durante treinta minutos antes de que se recogiera todo el litro de elución, y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se llevó a cabo una segunda elución de un litro de H<sub>2</sub>O como se describe con el Lavado de elución nº 1, pero tras cinco minutos de recirculación, la segunda elución de un litro se recogió (Lavado de elución nº 2), y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. El rendimiento total de ARNm del 95% se calculó en función de la cantidad total de ARNm purificado recuperado en comparación con la cantidad inicial de ARNm (véase la Tabla 1).

30 Método 3: Centrífuga vertical, ARNm de luciferasa de FFL de tres gramos (elución con H<sub>2</sub>O):

Tres gramos de ARNm de C/T de luciferasa de luciérnaga (FFL) previamente purificado se llevó a QS hasta dos litros con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, y se precipitó con volúmenes iguales de amortiguador de GSCN y EtOH (véase anteriormente), y entonces se cargó en una centrífuga de filtración vertical a una velocidad de 0,5 litros/min a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 3000 RPM. El precipitado de ARNm recogido en el filtro de la centrífuga se lavó con 2,5 litros de disolución de lavado de GSCN-EtOH (57,6% de GSCN y 42,4% de EtOH) a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga a 3000 RPM. A continuación, el precipitado de ARNm se lavó con diez litros de EtOH al 80% a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante diez minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. A continuación, el ARNm se suspendió en H<sub>2</sub>O como sigue. Se dejó la centrífuga a 3000 RPM, se añadieron dos litros de H<sub>2</sub>O a la cesta de la centrífuga a través del puerto de alimentación de muestra, y el filtrado (ARNm/H<sub>2</sub>O) se devolvió a la vasija de elución a través del puerto de descarga de muestra para su recirculación. La recirculación continuó durante quince minutos antes de que se recogieran los dos litros de elución (Lavado de elución nº 1), y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. El rendimiento total de ARNm del 97% se calculó en función de la cantidad total de ARNm purificado recuperado en comparación con la cantidad inicial de ARNm (véase la Tabla 1).

A esta escala, la precipitación actual, la captura a través de la centrifugación por filtración, el lavado del producto y la suspensión final de la diana de ARNm purificado (luciferasa de luciérnaga (FFL)) dieron como resultado recuperaciones de rendimiento que oscilan de 95% a 97% (véase la Tabla 1).

Tabla 1: Sumario de la elución y recuperación para purificación de ARNm mediante centrífuga

| Descripción de la purificación mediante centrífuga | Número del lavado de elución | Tiempo de elución (min) | Volumen del lavado de elución (l) | Concentración de ARNm (g/l) | Rendimiento (g) | % de recuperación |
|--|------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------|
| 2 gramos de ARNm <sup>1</sup>                      | #1                           | 30                      | 1,0                               | 1,80                        | 1,8             | 90                |
|  | #2                           | 5                       | 1,0                               | 0,12                        | 0,1             | 5                 |
|  | <b>Totales</b>               | <b>35</b>               | <b>2,0</b>                        |                             | <b>1,9</b>      | <b>95</b>         |

| Descripción de la purificación mediante centrifuga | Número del lavado de elución | Tiempo de elución (min) | Volumen del lavado de elución (l) | Concentración de ARNm (g/l) | Rendimiento (g) | % de recuperación |
|--|------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------|
| 3 gramos de ARNm <sup>2</sup>                      | #1                           | 15                      | 2,0                               | 1,44                        | 2,9             | 97                |
|  | <b>Totales</b>               | 15                      | 2,0                               |                             | 2,9             | 97                |
| 10 gramos de ARNm <sup>3</sup>                     | #1                           | 60                      | 2,9                               | 2,1                         | 6,1             | 61                |
|  | #2                           | 60                      | 3,0                               | 1,3                         | 3,9             | 39                |
|  | <b>Totales</b>               | <b>120</b>              | <b>5.9</b>                        |                             | <b>10.0</b>     | <b>100</b>        |
| 10 gramos de ARNm <sup>4</sup>                     | #1                           | 30                      | 5                                 | 1,12                        | 5,5             | 55                |
|  | #2                           | 30                      | 5                                 | 0,69                        | 3,5             | 35                |
|  | #3                           | 15                      | 2                                 | 0,32                        | 0,6             | 6                 |
|  | <b>Totales</b>               | <b>75</b>               | <b>12</b>                         |                             | <b>9.6</b>      | <b>96</b>         |
| 100 gramos de ARNm <sup>4</sup>                    |                              | 3 días (4320 min)       | 50                                | 1,9                         | 95              | 95                |

1- ARNm de FFL después de la reacción de IVT, como se describe en el Ejemplo 2, Método 2  
 2- ARNm de FFL después de la reacción de caperuza y cola (C/T), como se describe en el Ejemplo 2, Método 3  
 3- ARNm de CFTR después de la reacción de caperuza y cola (C/T) y usando una centrifuga vertical, como se describe en el Ejemplo 3, Método 1  
 4- ARNm de CFTR después de la reacción de caperuza y cola (C/T) y usando una centrifuga horizontal, como se describe en el Ejemplo 3, Método 3  
 5- ARNm de CFTR después de la reacción de IVT, como se describe en el Ejemplo 5

El análisis de imágenes en gel CE Fragment Analyzer™ del ARNm de FFL de centrifuga de filtrado reveló bandas individuales definidas del peso molecular apropiado para los experimentos de uno, dos y tres gramos (FIG. 3, carriles 1, 2, 3). Las bandas eran equivalentes a controles de FFL purificados Qiagen® (FIG. 3, carriles 4, 5).

5 El electroferograma CE Fragment Analyzer™ de la FIG. 4 compara el ARNm de FFL de la reacción de IVT de dos gramos purificado según la presente invención con un control purificado Qiagen® (azul y negro, respectivamente). Los datos muestran que ambas muestras presentan tamaños, perfiles de pico, e intensidades similares.

10 Asimismo, el electroferograma CE Fragment Analyzer™ de la FIG. 5 compara el ARNm de C/T de FFL de uno y dos gramos purificado según la presente invención con un control purificado Qiagen® (negro y azul frente a rojo). Los datos muestran que todas las muestras exhiben un perfil de pico e intensidades similares, mientras que las diferencias de tamaño, medidas por la ubicación del pico a lo largo del eje x, se atribuyen a diferencias en las longitudes de la cola de poli-A del ARNm de C/T de FFL. Estos datos muestran que las muestras de ARNm purificadas según la presente invención exhiben una banda definida única del tamaño e intensidad apropiados en comparación con las muestras de control.

15 El tamaño de la muestra de FFL de IVT sin C/T fue casi idéntico al de la muestra de ARNm de FFL purificada Qiagen®. El análisis adicional de la imagen del gel de tinción de plata SilverQuest™ revela que después de una segunda ronda de purificación (FIG. 6, carril 2 frente a carril 3), el ARNm de C/T de FFL purificado por la presente invención exhibió la eliminación de niveles detectables de todas las enzimas del procedimiento. Estos datos muestran que la presente invención es capaz de preparar ARNm purificado que carece de niveles detectables de  
 20 enzimas del procedimiento.

Finalmente, el ARNm de C/T de FFL (purificado usando la presente invención) se formuló con una nanopartícula lipídica patentada y se dosificó a través de colirios tópicos a animales. Veinticuatro horas después de la dosificación, se administró luciferina a los ratones a través de una inyección IVT, y se midió la actividad de la luciferasa y se tomaron imágenes en el IVIS Lumina. Se observó una señal de flujo significativa con una media de grupo de 62193

p/s (véase la Tabla 1 y la FIG. 7), lo que demuestra una producción exitosa de proteína activa a partir de ARNm purificado usando tales métodos. Estos datos muestran que el ARNm purificado mediante centrifugación se puede traducir de manera eficiente, *in vivo*, en proteínas funcionales.

- 5 Juntos, estos datos demuestran que el método de purificación basado en centrífuga que se describe aquí se puede usar para purificar eficientemente el ARNm de alta calidad, lo que da como resultado recuperaciones de rendimiento, perfiles de integridad, pureza y funcionalidad equivalentes a las del método Qiagen® de purificación de ARNm a pequeña escala, estándar en la industria. Además, la presente invención tiene un beneficio adicional significativo de escalabilidad que no está disponible con los métodos y kits estándar en la industria existentes.

### Ejemplo 3: Purificación de ARNm a escala de diez gramos

- 10 Método 1: Centrífuga vertical, purificación de ARNm de CFTR de diez gramos (elución con H<sub>2</sub>O):

Se sintetizaron diez gramos de ARNm del receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR) usando la SP6 polimerasa de acuerdo con la reacción de IVT y la reacción de caperuza y cola (C/T) como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

- 15 El ARNm de CFTR de C/T resultante se llevó a QS hasta diez litros con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, y se precipitó con volúmenes iguales de amortiguador de GSCN y EtOH (véase anteriormente), y entonces se cargó en la centrífuga de filtración vertical a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 3000 RPM. El precipitado de ARNm recogido en el filtro de la centrífuga se lavó con cinco litros de disolución de lavado de GSCN-EtOH (57,6% de GSCN y 42,4% de EtOH) a través del puerto de alimentación de muestra, funcionando la centrífuga a 3000 RPM. A continuación, el precipitado de ARNm se lavó con diez litros de EtOH al 80% a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante quince minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. A continuación, el ARNm se suspendió en H<sub>2</sub>O como sigue. Se dejó la centrífuga a 3000 RPM, se añadieron 2,9 litros de H<sub>2</sub>O a la cesta de la centrífuga a través del puerto de alimentación de muestra, y el filtrado (ARN/H<sub>2</sub>O) se devolvió a la vasija de elución a través del puerto de descarga de muestra para su recirculación. La recirculación continuó durante sesenta minutos antes de que se recogiera la elución de tres litros (Lavado de elución n<sup>o</sup> 1), y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se realizó una segunda elución con tres litros de H<sub>2</sub>O, como se describe para el Lavado de elución n<sup>o</sup> 1; después de sesenta minutos de recirculación, se recogió la segunda elución (Lavado de elución n<sup>o</sup> 2), y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. El rendimiento total de ARNm del 100% se calculó en función de la cantidad total de ARNm purificado recogido en comparación con la cantidad inicial de ARNm (véase la Tabla 1).
- 20  
25  
30

Método 2: Centrífuga vertical, diez gramos de reacción de IVT de OTC (recolección de purificación de ARNm seco):

- 35 Se llevó a cabo una reacción de IVT de diez gramos de ornotina transcarbamilasa (OTC) usando SP6 polimerasa como se describió anteriormente. Después del tratamiento con ADNasa I, la reacción de diez gramos se llevó a QS hasta tres litros con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, y se precipitó con volúmenes iguales de amortiguador de GSCN y EtOH (véase anteriormente), y entonces se cargó en la centrífuga de filtración vertical a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 3000 RPM. El precipitado de ARNm recogido en el filtro de la centrífuga se lavó con cinco litros de disolución de lavado de GSCN-EtOH (57,6% de GSCN y 42,4% de EtOH) a través del puerto de alimentación de muestra, funcionando la centrífuga a 3000 RPM. A continuación, el precipitado de ARNm se lavó con diez litros de EtOH al 80% a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante treinta minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. El precipitado de ARNm seco se recogió manualmente de la membrana del filtro, se seccionó en piezas manejables, y se almacenó en una botella estéril de 250 ml a -20°C para almacenamiento a largo plazo.
- 40

Método 3: Centrífuga horizontal, purificación de diez gramos de ARNm de CFTR (elución con H<sub>2</sub>O):

- 45 Diez gramos de ARNm de C/T del receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR) de IVT según la reacción de IVT y la reacción de caperuza y cola (C/T) como se describe en el Ejemplo 1 anterior. El ARNm se llevó entonces QS hasta diez litros con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, y se precipitó como se describe anteriormente, pero con una relación de 1 de ARNm: 2,3 de amortiguador de GSCN: 1,7 de EtOH al 100%, y entonces se cargó en la centrífuga de filtración horizontal a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 2750 RPM. El precipitado de ARNm recogido en el filtro de la centrífuga se lavó con diez litros de EtOH al 80% a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga a 2500 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante quince minutos mientras se giraba a 2500 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. A continuación, el ARNm se suspendió en H<sub>2</sub>O como sigue. La centrífuga se dejó a 2500 RPM, se añadieron cinco litros de H<sub>2</sub>O a la cesta de la centrífuga a través del puerto de alimentación de muestra, y el filtrado (ARN/H<sub>2</sub>O) se devolvió a la vasija de elución a través del puerto de descarga de muestra para su recirculación. La recirculación continuó durante treinta minutos antes de que se recogieran los cinco litros de elución (Lavado de elución n<sup>o</sup> 1), y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se realizó una segunda elución de cinco litros como se describe para el Lavado de elución n<sup>o</sup> 1, y después de treinta minutos de recirculación, la segunda elución (Lavado
- 50  
55

de elución nº 2) se recogió, y la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se realizó una elución final de dos litros en las mismas condiciones, y se recogió (Lavado de elución nº 3) después de quince minutos de recirculación. Nuevamente, la concentración de ARNm se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. El rendimiento total de ARNm del 96% se calculó en función de la cantidad total de ARNm purificado recogido en comparación con la cantidad inicial de ARNm (véase la Tabla 1).

Este ejemplo demuestra que las centrífugas de filtración, tanto verticales como horizontales, pueden capturar y purificar ARNm de manera eficaz.

El análisis del sumario de rendimientos en la Tabla 1 para el ARNm de CFTR de diez gramos purificado con una centrífuga vertical (véase la nota 3 al pie) y el ARNm de CFTR de diez gramos purificado con una centrífuga horizontal (véase la nota 4 al pie) reveló un porcentaje de recuperación del 100% y 96%, respectivamente.

Aquí también se llevó a cabo un método de recolección alternativo en el que, tras la etapa final de lavado y secado, el ARNm se recolectó mediante la eliminación manual del ARNm precipitado seco de la membrana del filtro, con el almacenamiento posterior a -20°C (datos no mostrados).

Juntos, estos datos demuestran que el método de purificación basado en centrífuga según la presente invención puede capturar y purificar eficientemente al menos diez gramos de ARNm precipitado a un nivel de pureza e integridad aceptable para uso terapéutico, por ejemplo en un estudio clínico. La capacidad de la centrífuga de filtrado para proporcionar dos métodos distintos de recolección de ARNm le brinda al investigador o al médico la capacidad de continuar procesando el ARNm de manera acuosa en tiempo real o almacenar el precipitado sólido para necesidades a largo plazo en un tamaño de volumen de muestra significativamente reducido.

#### **Ejemplo 4: Purificación de ARNm a escala de cincuenta gramos**

Cincuenta gramos de ARNm de C/T del receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR) de IVT se sintetizaron según la reacción de IVT y la reacción de caeruzza y cola (C/T) como se describe en el Ejemplo 1 anterior. El producto de reacción de ARNm se llevó a QS hasta diez litros con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, y se precipitó con volúmenes iguales de amortiguador de GSCN y EtOH (véase anteriormente), y entonces se cargó en la centrífuga de filtración vertical a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 3000 RPM. El precipitado de ARNm recogido en el filtro de la centrífuga se lavó con cinco litros de disolución de lavado de GSCN-EtOH (57,6% de GSCN y 42,4% de EtOH) a través del puerto de alimentación de muestra, funcionando la centrífuga a 3000 RPM. A continuación, el precipitado de ARNm se desalinizó con un lavado de veinte litros de EtOH al 80% a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante treinta minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. El precipitado de ARNm seco se recogió manualmente de la membrana del filtro, se seccionó en piezas manejables, y se almacenó en una botella estéril de 500 ml a -20°C para almacenamiento a largo plazo.

Estos datos demuestran la capacidad de las centrífugas de filtrado para capturar y purificar cincuenta gramos de ARNm precipitado en un solo lote.

#### **Ejemplo 5: Purificación de ARNm a escala de cien gramos**

Se llevó a cabo una reacción de IVT de cien gramos del receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR) usando SP6 ARN polimerasa según la reacción de IVT descrita en el Ejemplo 1 anterior. La reacción inactivada se llevó a QS hasta veinte litros con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, y se precipitó con volúmenes iguales de amortiguador de GSCN y EtOH (véase anteriormente), y entonces se cargó en una centrífuga de filtración vertical a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a 3000 RPM. El precipitado de ARNm recogido en el filtro de la centrífuga se lavó con cinco litros de disolución de lavado de GSCN-EtOH (57,6% de GSCN y 42,4% de EtOH) a través del puerto de alimentación de muestra, funcionando la centrífuga a 3000 RPM. A continuación, el precipitado de ARNm se lavó con un lavado de EtOH al 80% de cincuenta litros a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante treinta minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. El precipitado de ARNm seco se recogió manualmente de la membrana del filtro, se seccionó en piezas manejables, y se almacenó en una botella estéril de dos litros a -20°C para almacenamiento a largo plazo.

Doce meses más tarde, el ARNm se reconstituyó, durante 3 días, en cincuenta litros de H<sub>2</sub>O en una vasija de acero inoxidable con camisa y enfriador a 10°C. La concentración de la disolución de ARNm reconstituido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se calculó el rendimiento total de ARNm, y se comparó con el rendimiento teórico basado en la escala de reacción. Como se muestra en la FIG. 11, un electroferograma del ARNm reconstituido es sustancialmente similar a un lote de ARNm que codifica CFTR preparado recientemente.

Este ejemplo demuestra que la centrífuga de filtrado fue capaz de capturar cien gramos de ARNm precipitado en un solo lote. Después del almacenamiento a largo plazo, el ARNm reconstituido muestra una recuperación del 95% del ARNm (véase la Tabla 1, nota 5 al pie).



Estos datos demuestran la capacidad de las centrífugas de filtrado para capturar cien gramos de ARNm precipitado en un solo lote.

#### **Ejemplo 6: Purificación de > 20 gramos de ARNm**

5 El presente ejemplo describe una purificación a gran escala de un lote de ARNm del receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR).

10 El ARNm de CFTR se sintetizó usando SP6 ARN polimerasa según la reacción de IVT como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Después, el producto de reacción de ARNm se sometió a una precipitación inicial, y la purificación usando una centrífuga horizontal (H300P) en presencia de 250 g de adyuvante de filtración (fibra de celulosa en polvo Solka-Floc® 100NF) produjo 22 gramos de ARNm de CFTR, que entonces se purificó adicionalmente usando diálisis para producir sin pérdida medible de ARNm.

15 El ARNm de CFTR obtenido se encaperuzó y se le añadió una cola según la reacción de caperuza y cola (C/T) como se describe en el Ejemplo 1 anterior, que produjo 21,8 gramos de ARNm de CFTR de C/T. El ARNm de C/T se diluyó hasta 10 l, y entonces se purificó inicialmente usando una centrífuga horizontal (H300P) en presencia de 250 g de adyuvante de filtración de celulosa (Solka-Floc® 100NF) para producir 21,8 gramos de ARNm de C/T. El ARNm obtenido se purificó entonces adicionalmente usando diálisis, para producir una cantidad inicial de 21,1 gramos de ARNm de CFTR ("CFTR.6.1").

20 El ARNm de CFTR obtenido ("CFTR 6.1") se combinó y entonces se concentró hasta 1,9 g/l (18,67 g de ARNm). Después, el ARNm se purificó con una centrífuga horizontal (H300P; 50 l) en presencia de 250 g de adyuvante de filtración de celulosa (Solka-Floc® 100NF), y se obtuvieron 17,5 g de ARNm. A continuación, el ARNm se purificó adicionalmente usando diálisis, para proporcionar un rendimiento final de 16,5 g de ARNm ("CFTR.6.2").

25 Las proteínas residuales se visualizaron mediante electroforesis en gel usando tinción de plata SilverQuest™ como se describe anteriormente en el Ejemplo 1, y los resultados se muestran en la FIG. 8. La FIG. 8 incluye el ARNm final purificado de acuerdo con este ejemplo (carril 3), y muestra que el presente método puede reducir con éxito las impurezas enzimáticas en una preparación de ARNm a gran escala, como sería necesario para el ARNm adecuado para usos terapéuticos.

#### **Ejemplo 7: Purificación de > 30 gramos de ARNm**

El presente ejemplo describe una purificación a gran escala de un lote de ARNm del receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR).

30 El ARNm de CFTR se transcribió usando SP6 ARN polimerasa según la reacción de IVT como se describe en el Ejemplo 1 anterior. A continuación, el producto de reacción de ARNm se sometió a una precipitación inicial, y la purificación usando una centrífuga horizontal (H300P) en presencia de 500 g de adyuvante de filtración de celulosa (Solka-Floc® 100NF) produjo 49,5 g de ARNm de CFTR, que entonces se purificó adicionalmente usando diálisis para producir 44,7 g de ARNm.

35 A continuación, el ARNm obtenido se encaperuzó y se le añadió una cola según la reacción de caperuza y cola (C/T) como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Los 44,7 gramos de ARNm de C/T se diluyeron entonces hasta 10 l, antes de la purificación inicial usando una centrífuga horizontal (H300P) en presencia de 500 g de adyuvante de filtración de celulosa (Solka-Floc® 100NF), seguido de diálisis, para producir 37,3 gramos de ARNm de CFTR de C/T ("CFTR.7.1").

40 El ARNm de C/T obtenido, CFTR.7.1, se combinó entonces y se concentró hasta alrededor de 2 g/l (18,67 g de ARNm). El ARNm se purificó con una centrífuga horizontal (H300P; 100 l) en presencia de 500 g de adyuvante de filtración de celulosa (Solka-Floc® 100NF), y se obtuvieron 33,7 g de ARNm. A continuación, el ARNm se purificó adicionalmente usando diálisis, para proporcionar un rendimiento final de 32,6 g de ARNm ("CFTR.7.2").

45 Las proteínas residuales se visualizaron mediante electroforesis en gel usando tinción de plata SilverQuest™ como se describe anteriormente en el Ejemplo 1, y los resultados se muestran en la FIG. 9A y la FIG. 9B. Véanse las FIG. 9A y FIG. 9B. Como se muestra en estas dos figuras, el método ejemplificado dio como resultado que el ARNm de C/T obtenido final comprendiera menos impurezas enzimáticas (FIG. 9B, carril 3).

#### **Ejemplo 8: Purificación de 10 gramos de ARNm de CFTR**

El ARNm del receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR) se preparó según la IVT con SP6 ARN polimerasa descrita anteriormente.

50 El ARNm de CFTR se purificó usando una centrífuga horizontal. La reacción inactivada se llevó a QS hasta ocho litros con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa. La mezcla de reacción se añadió a 4,6 l de amortiguador de GSCN y se mezcló durante 10 min. A continuación, se añadieron 3,4 l de EtOH al 100%, y se mezcló durante 5 min (3,3 l de EtOH al 100% (véase anteriormente) y entonces se cargó (2,0 l/min) en una centrífuga de filtración vertical (papel de filtro de 1 µm, tela de filtro SLW de 1 µm) a través del puerto de alimentación de muestra, con la centrífuga configurada a

3000 RPM (1740G). El precipitado de ARNm recolectado en el filtro de la centrífuga se lavó con diez litros de disolución de lavado GSCN (carga a 2,0 l/min) a través del puerto de alimentación de muestra, funcionando la centrífuga a 3000 RPM. Después, el precipitado de ARNm se lavó con veinte litros de lavado de EtOH al 80% a través del puerto de alimentación de muestra, permaneciendo la centrífuga a 3000 RPM. El precipitado de ARNm se secó durante quince minutos mientras se giraba a 3000 RPM con todos los puertos abiertos a las condiciones ambientales. El precipitado de ARNm seco se suspendió en agua (2 x 5 l) y se reunió hasta un rendimiento de 8,3 g de ARNm (83% de recuperación).

A continuación, el ARNm obtenido también se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF). Se preparó una disolución (0,909 mg/l) del ARNm purificado descrito anteriormente diluyendo 8,3 g del ARNm purificado en 9,15 l de H<sub>2</sub>O libre de ARNasa. La disolución se concentró hasta 2 l usando una columna de TFF con un flujo de permeado de fondo de H<sub>2</sub>O. QS hasta 10 l, y concentración repetida durante un total de tres veces. Las eluciones de la columna de TFF se recolectaron sujetando el permeado superior, deteniendo la bomba KMPi y deteniendo la bomba de permeado inferior antes de recolectar la muestra concentrada frente a la conexión en T. Se determinó el peso y la concentración de cada elución, y se calculó el rendimiento. Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2. Sumario de elución de diálisis

| Elución           | Vol (l) | Conc (g/l) | Rendimiento (g)  |
|-------------------|---------|------------|------------------|
| E1                | 2,25    | 2,98       | 6,7              |
| E2                | 0,99    | 1,42       | 1,4              |
| E3                | 0,69    | 1,39       | 0,9              |
| Rendimiento total |         |            | 9,0 gramos (90%) |

El ARNm de CFTR también se puede modificar con una reacción de caperuza y cola (C/T). 9 g de ARNm de CFTR obtenidos tras la diálisis de IVT se diluyeron hasta 2 g/l. Para la reacción de encaperuzamiento, el ARNm se trató con 153 mg de GauT, 113 mg de 2'OM, 1,44 MU de RNase Inh; y para la reacción de la cola, el ARNm se trató con 261 mg de poliadenilato polimerasa (PAP). La reacción tenía un volumen final de 7,2 l, con la reacción de encaperuzamiento agitada a 37°C durante 90 minutos, y la reacción de la cola agitada a 25°C durante 30 minutos.

Después se llevó a cabo una purificación inicial usando una centrífuga horizontal (H300P). La mezcla de la reacción de caperuza y cola (7,2 l) se trató con 17 l de amortiguador de GSCN y 12,6 l de etanol. Después, la mezcla se filtró usando H300P (papel de filtro de 1 µM, tela de filtro de tejido de una sola capa (SLW) de 1 µM), con un caudal de carga de 2,0 l/min y teniendo la centrífuga una velocidad de rotación de 3000 RPM (1740G). El precipitado se lavó con 25 l de una disolución acuosa que es etanol al 80% (caudal de carga de 2,0 l/min y velocidad de rotación de 3000 RPM). A continuación, el precipitado se secó durante 10 minutos en la centrífuga (velocidad de rotación de 3000 RPM). A continuación, se recirculó agua para suspender el ARNm de la tela filtrante (dos eluciones de 3,5 l de agua cada una). La primera elución (E1) tuvo una duración de 15 minutos, y la segunda elución (E2) tuvo una duración de una hora. Los dos eluatos se agruparon para producir 7,6 g de ARNm (rendimiento/recuperación total del 76%).

Se realizó una segunda purificación del ARNm obtenido. El ARNm obtenido se trató con 17 l de amortiguador de GSCN y 12,6 l de etanol. Después, la mezcla se filtró usando H300P (papel de filtro de 1 µM, tela de filtro de tejido de doble capa (DLW) de 1 µM), con un caudal de carga de 2,0 l/min y teniendo la centrífuga una velocidad de rotación de 3000 RPM (1740G). A continuación, el filtrado se volvió a cargar usando estas mismas condiciones, y se lavó con 10 l de un amortiguador de lavado GSCN (caudal de carga de 2,0 l/min y velocidad de rotación de 3000 RPM). A continuación, el precipitado se lavó con 25 l de una disolución acuosa de etanol al 80% (caudal de carga de 2,0 l/min y velocidad de rotación de 3000 RPM). A continuación, el precipitado se secó durante 10 minutos en la centrífuga (velocidad de rotación de 3000 RPM). A continuación, se recirculó agua para suspender el ARNm de la tela filtrante (dos eluciones de 3,5 l de agua cada una). La primera elución (E1) tuvo una duración de 15 minutos, y la segunda elución (E2) tuvo una duración de una hora. Los dos eluatos se agruparon para producir 6,8 g de ARNm (rendimiento/recuperación total del 68%).

A continuación, el ARNm obtenido también se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF). 6,5 l de material que comprende los 6,8 g del ARNm obtenido (concentración - 1,044 mg/ml) se concentraron hasta 2 l después de la columna de TFF con un flujo de permeado inferior de H<sub>2</sub>O (K04-E100-05-N; caudal de 2,0 l/min). QS hasta 10 l, incluyendo la adición de citrato de sodio 10 mM, y la disolución se reconcentró. La dilución y la concentración se realizaron entonces un total de seis veces, aunque el citrato de sodio se añadió sólo a la primera carga. Las eluciones se recolectaron sujetando el permeado superior, deteniendo la bomba KMPi y deteniendo la bomba de permeado inferior antes de recolectar la muestra concentrada a través de la conexión en T. Cada elución se pesó para determinar el volumen, y se determinaron las especificaciones para cada elución con el fin de determinar la

concentración y calcular el rendimiento. El procedimiento se repitió según fue necesario para maximizar la recuperación de ARNm, y la Tabla 3 proporciona un sumario de las eluciones de diálisis. Se obtuvo un rendimiento total de 7,6 g de ARNm (76% de rendimiento).

Tabla 3. Sumario de elución de diálisis

| Elution           | Vol (L) | Conc. (g/l) | Rendimiento (g) |
|-------------------|---------|-------------|-----------------|
| E1                | 1,78    | 2,70        | 4,81            |
| E2                | 1,20    | 1,25        | 1,49            |
| E3                | 1,00    | 0,68        | 0,68            |
| E4                | 0,90    | 0,66        | 0,59            |
| Rendimiento total |         |             | 7,6 (76%)       |

5

Entonces se llevó a cabo una dilución de diálisis final y llenado/acabado. A continuación, 7,2 g de ARNm (4,82 l; concentración = 1,46 mg/ml) se diluyeron hasta 7,0 l (concentración = 1,06 mg/ml), y el ARNm de CFTR (CFTR. 10.1) se filtró a través de un cartucho de filtración estéril de 0,22 µM en botellas de almacenamiento.

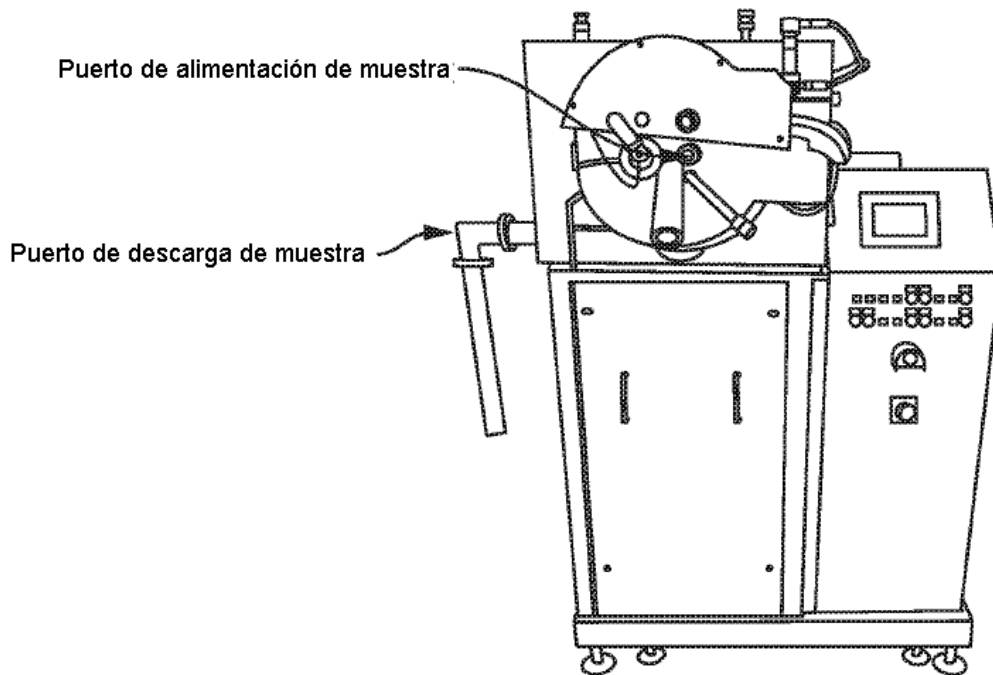
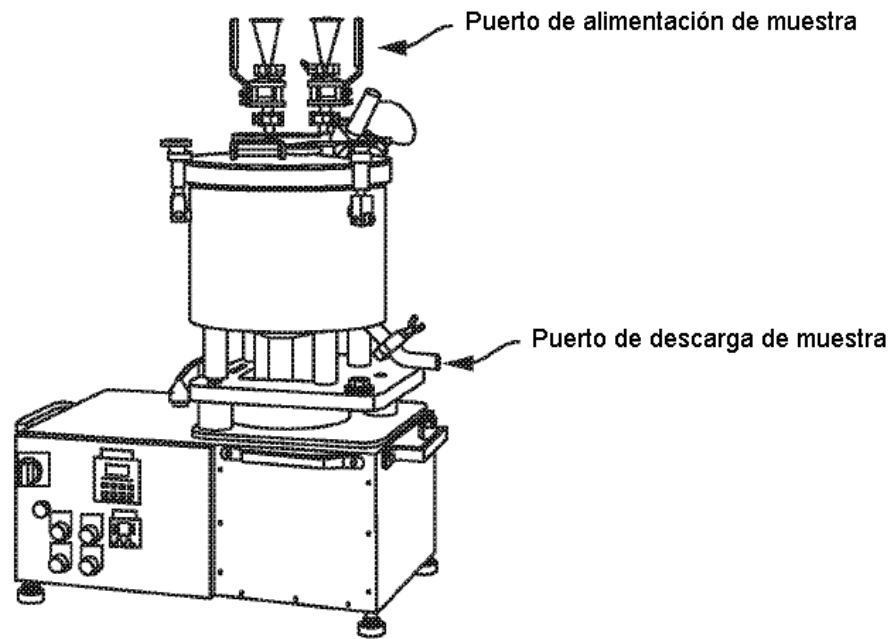
10

La FIG. 10 muestra un gel de agarosa que compara diferentes lotes de ARNm de CFTR purificado según los métodos descritos aquí. Cada carril se cargó a 0,5 µg por pocillo. Las asignaciones de los carriles de gel incluyen: *carril 1*, perteneciente al marcador de peso molecular Ribo Rule HR; *carril 3*, perteneciente al ARNm de CFTR. 10.1 preparado según el Ejemplo 8; *carril 4*, perteneciente al ARNm de CFTR.6.2 preparado según el Ejemplo 6; y *carril 5*, perteneciente a un lote de control de ARNm de CFTR purificado usando TFF.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar ARNm, que comprende las etapas de:  
 proporcionar una suspensión que comprende ARNm precipitado; y  
 5 centrifugar la suspensión en una centrífuga que comprende un sustrato poroso removible, de modo que el ARNm precipitado se capture en el sustrato poroso removible, purificando así los contaminantes del ARNm, en el que dicho sustrato poroso removible es una tela filtrante, un papel de filtro, una pantalla o una malla de alambre, y en el que la velocidad de dicha centrifugación está entre 1000 RPM y 5000 RPM.
- 10 2. El método de la reivindicación anterior, en el que dicho método comprende además una etapa de producir en primer lugar la suspensión de ARNm precipitado, proporcionando una disolución que comprende ARNm y añadiendo a la disolución uno o más agentes que promuevan la precipitación del ARNm.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión que comprende ARNm precipitado comprende al menos un auxiliar de filtración que es un dispersante, opcionalmente en el que el dispersante es uno o más de ceniza, arcilla, tierra de diatomeas, agente filtrante, perlas de vidrio, perlas de plástico, polímeros, perlas de polipropileno, perlas de poliestireno, sales de celulosa, arena, y azúcares, por ejemplo fibra de celulosa en polvo.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que el método comprende además una o más etapas para separar el dispersante de la composición de ARNm purificado.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que la una o más etapas para separar el dispersante del ARNm purificado comprenden lavar y secar el ARNm purificado, comprendiendo además opcionalmente solubilizar y eluir el ARNm purificado usando un medio acuoso, al tiempo que se filtra el dispersante.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión comprende al menos 1 g, 10 g, 100 g, 1 kg, 10 kg, 100 kg, una tonelada métrica, o diez toneladas métricas de ARNm precipitado o cualquier cantidad intermedia.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la velocidad de centrifugación de la suspensión de ARNm está entre 2000 RPM y 4000 RPM, 2000 RPM y 3000 RPM, o 2500 RPM y 3500 RPM, por ejemplo 3000 RPM o 2500 RPM.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además añadir uno o más agentes a la suspensión que desnaturalizan las proteínas y/o mantienen las proteínas solubles en un medio acuoso.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en el que el uno o más agentes que desnaturalizan las proteínas y/o mantienen las proteínas solubles en un medio acuoso comprenden una sal, por ejemplo una sal caotrópica.
- 50 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en el que el uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm son uno o más de un alcohol, un amortiguador, una sal, y/o un tensioactivo, por ejemplo etanol.
- 55 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en el que el uno o más agentes que promueven la precipitación del ARNm son una sal caotrópica y un alcohol, por ejemplo tiocianato de guanidina y etanol.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en el que:  
 i) el ARNm se pone en contacto con volúmenes iguales de un primer líquido, que es un amortiguador de GSCN, y un segundo líquido, que es etanol absoluto o etanol acuoso, o  
 ii) el ARNm se pone en contacto con una disolución que comprende tanto la sal caotrópica como el alcohol.
- 65 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de lavar la composición de ARNm purificado con un disolvente, en el que opcionalmente el disolvente es un alcohol, por ejemplo etanol.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el lavado se produce mediante centrifugación, opcionalmente en el que la centrifugación para lavar la composición de ARNm purificado se realiza a una velocidad de entre 50 RPM y 500 RPM o 100 y 1000 RPM, por ejemplo 200 rpm.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de secar el ARNm capturado, en el que el secado se produce mediante centrifugación, opcionalmente en el que la centrifugación para secar el ARNm capturado se realiza a una velocidad de entre 50 RPM y 500 RPM, 50 RPM y 300 RPM, 100 RPM y 300 RPM, 150 RPM y 250 RPM, o 1000 y 3000 RPM, por ejemplo 200 rpm.

- 5 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de solubilizar en un medio acuoso el ARNm purificado, obteniendo así una disolución que comprende ARNm purificado, opcionalmente en el que la solubilización ocurre dentro de la centrífuga, o la solubilización ocurre fuera de la centrífuga.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la recuperación de ARNm purificado es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, o 97%.
- 10 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la recuperación de ARNm purificado es al menos 10 g, 20 g, 50 g, 100 g, 1 kg, 5 kg, 10 kg, 50 kg, o 100 kg por lote único.
- 15 19. Un método para producir al menos 100 mg de ARNm en un solo lote, comprendiendo dicho método transcribir *in vitro* una molécula de ADN con una ARN polimerasa para producir moléculas de ARNm que tienen más de 500 nucleótidos de longitud, y purificar las moléculas de ARNm con el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 20 20. El método de la reivindicación 19, en el que el ARNm purificado está sustancialmente libre de impurezas del procedimiento de síntesis de ARNm, opcionalmente en el que el ARNm purificado está sustancialmente libre de secuencias de ARN abortadas prematuramente, de la molécula de ADN y/o de reactivos enzimáticos usados en síntesis *in vitro*.



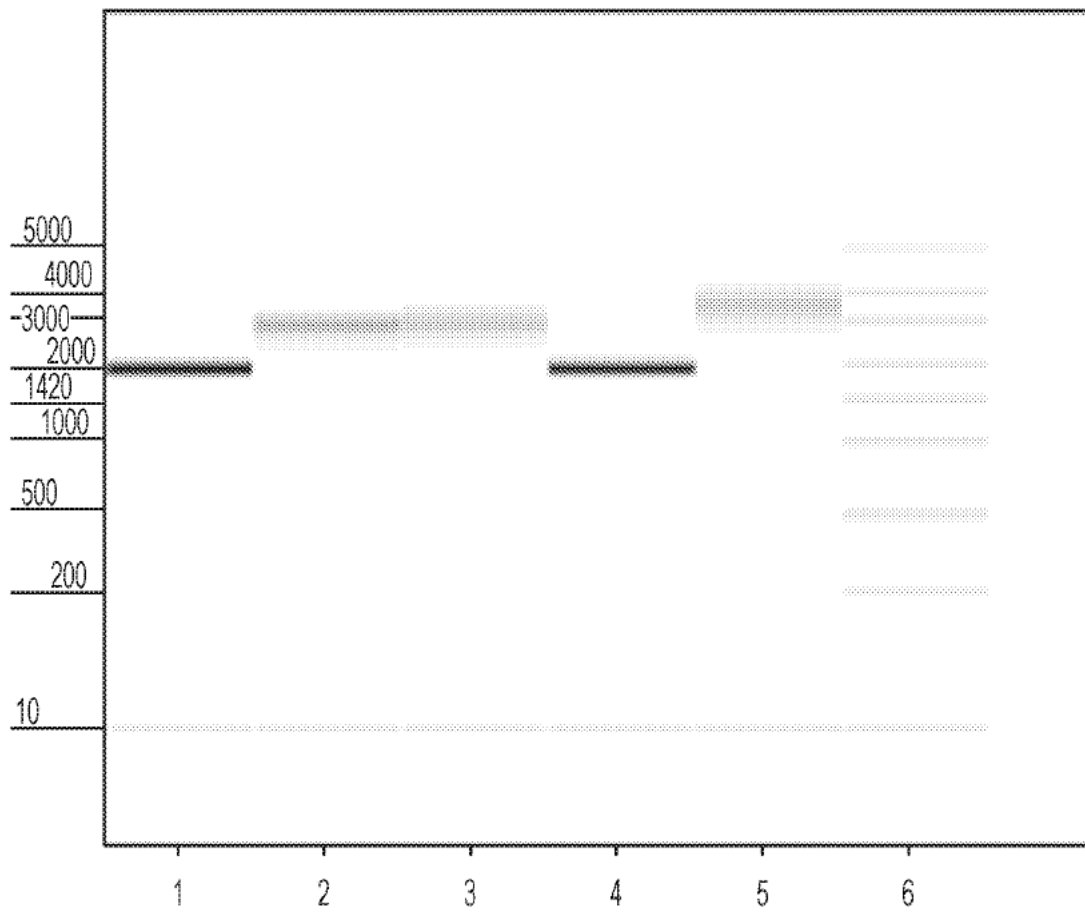


FIG. 3

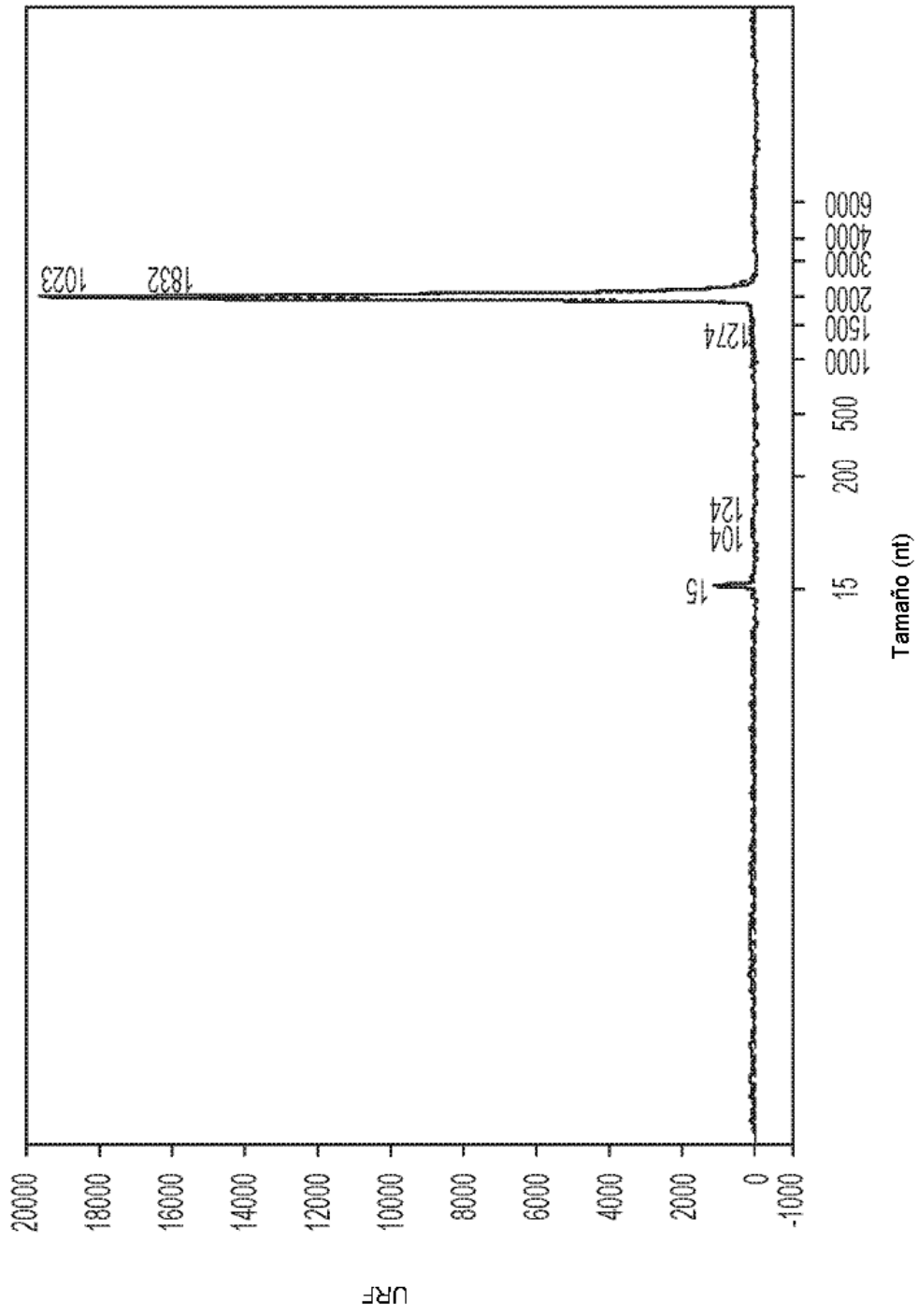


FIG. 4



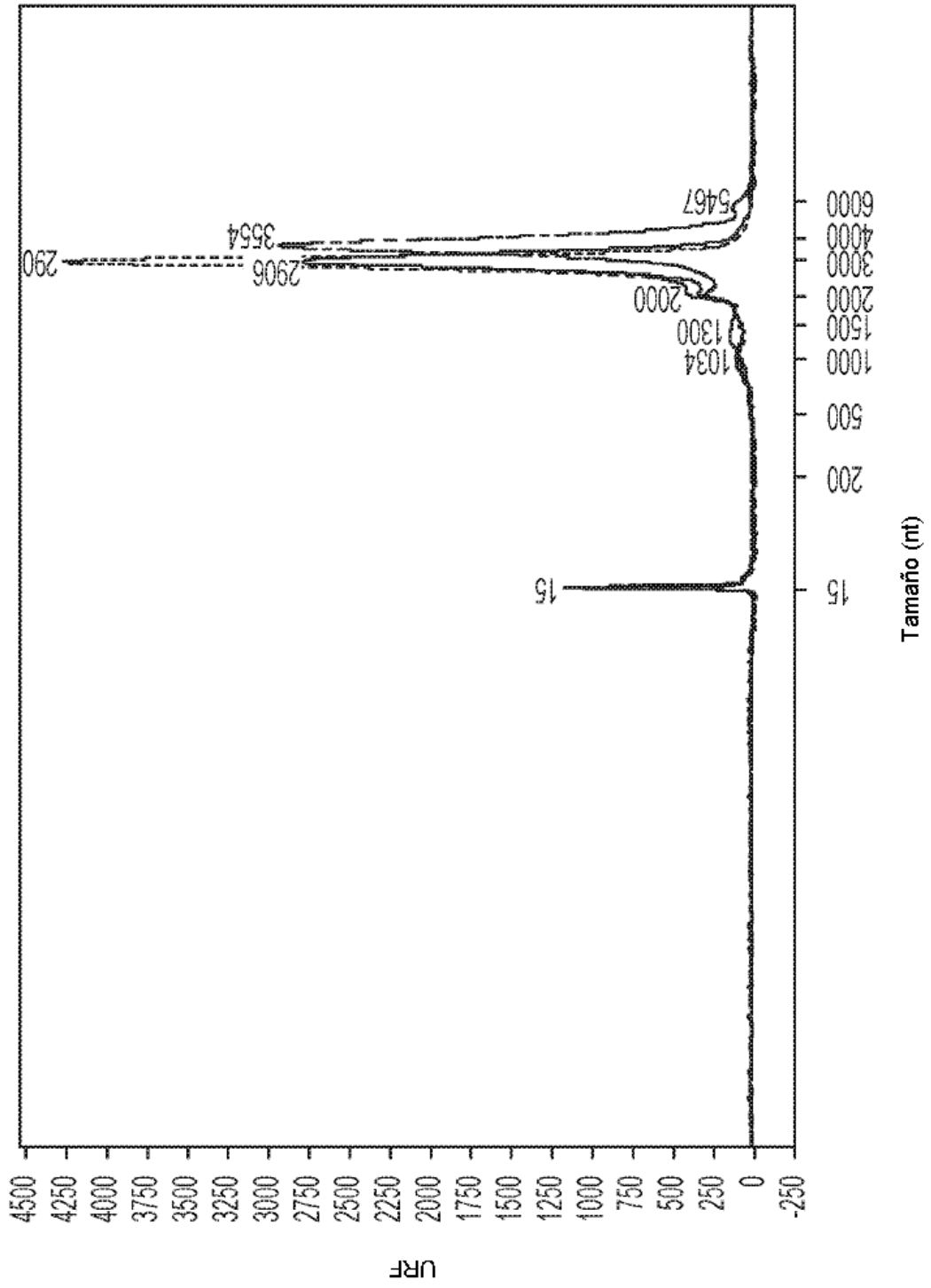


FIG. 5

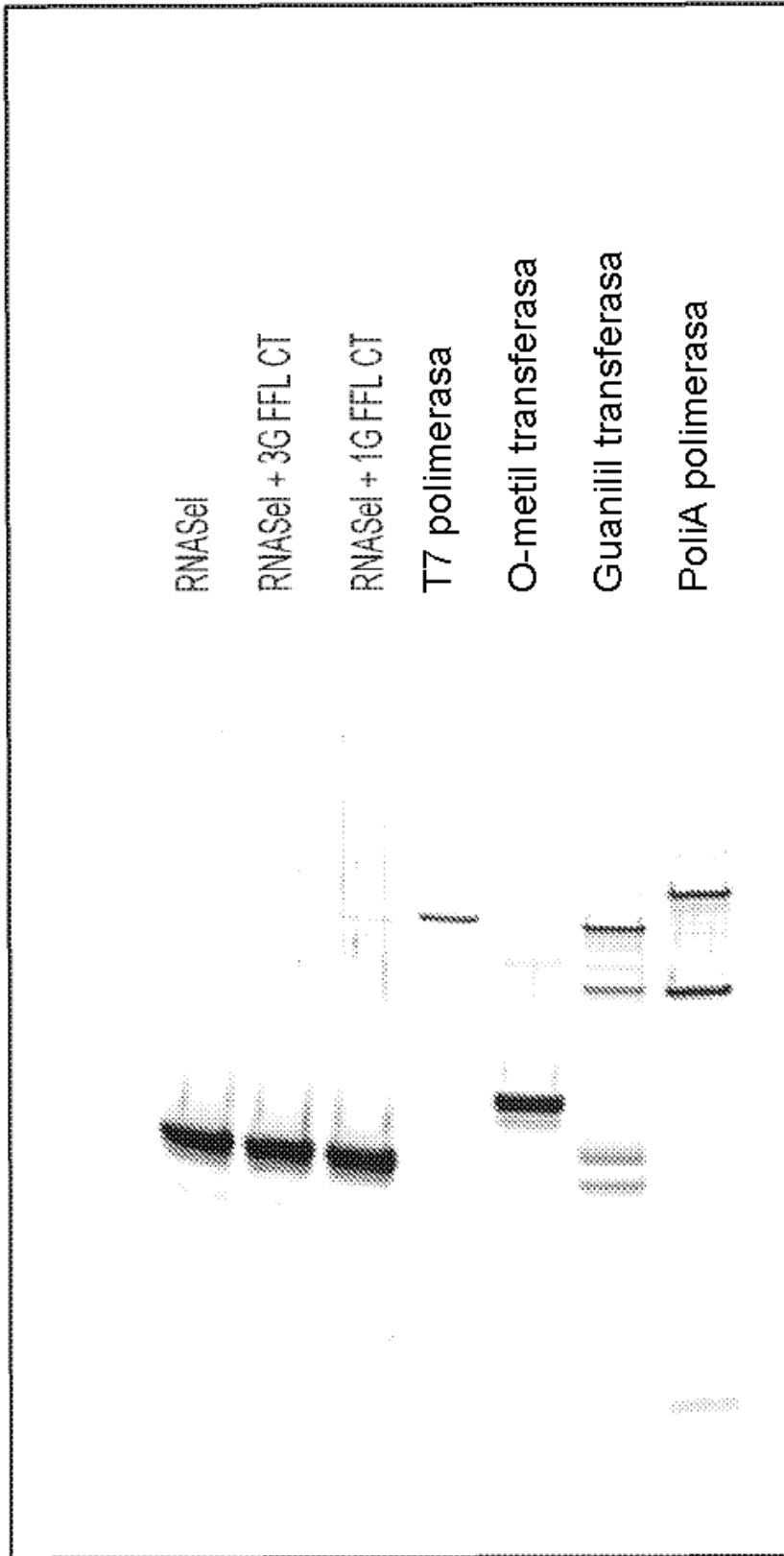


FIG. 6

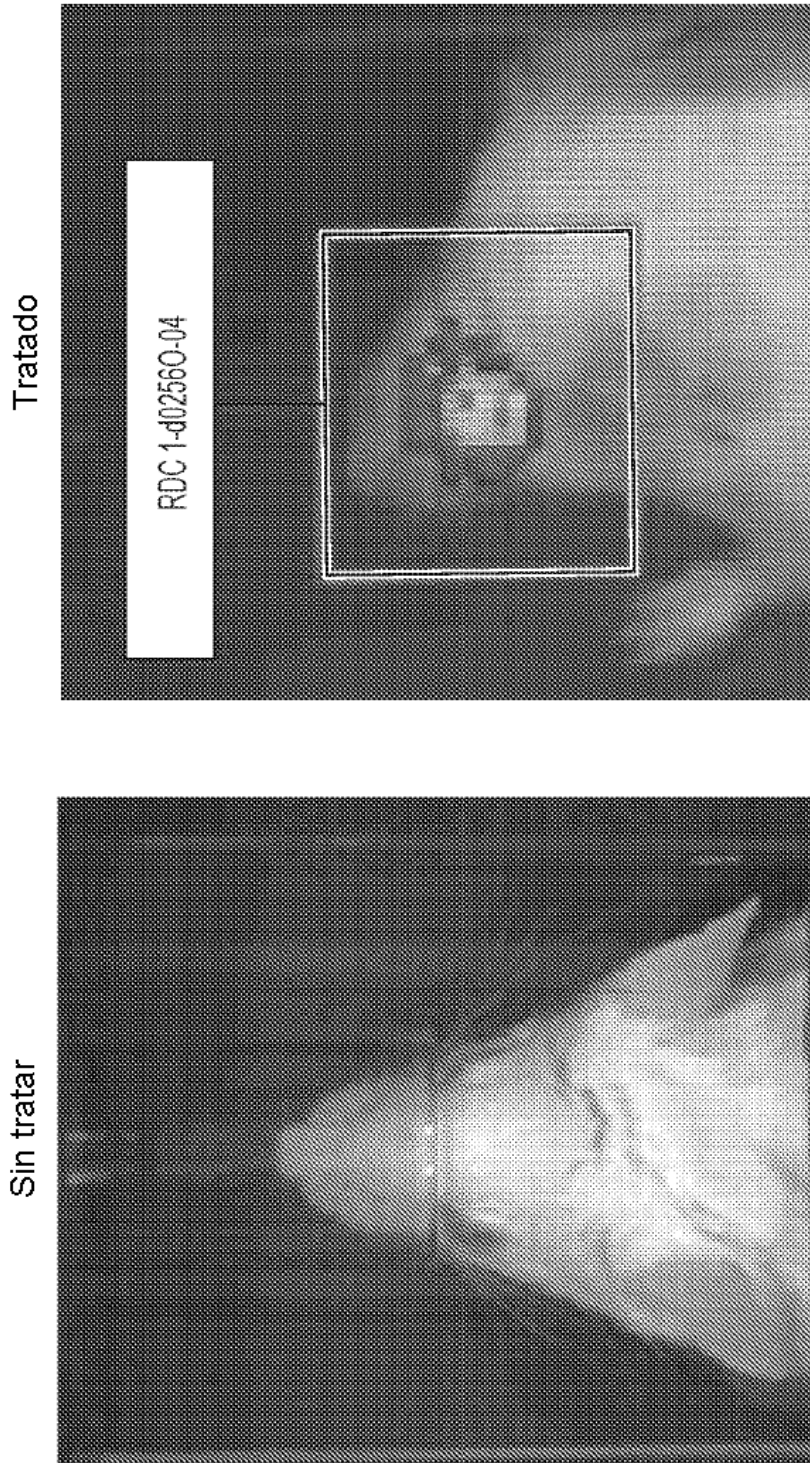


FIG. 7

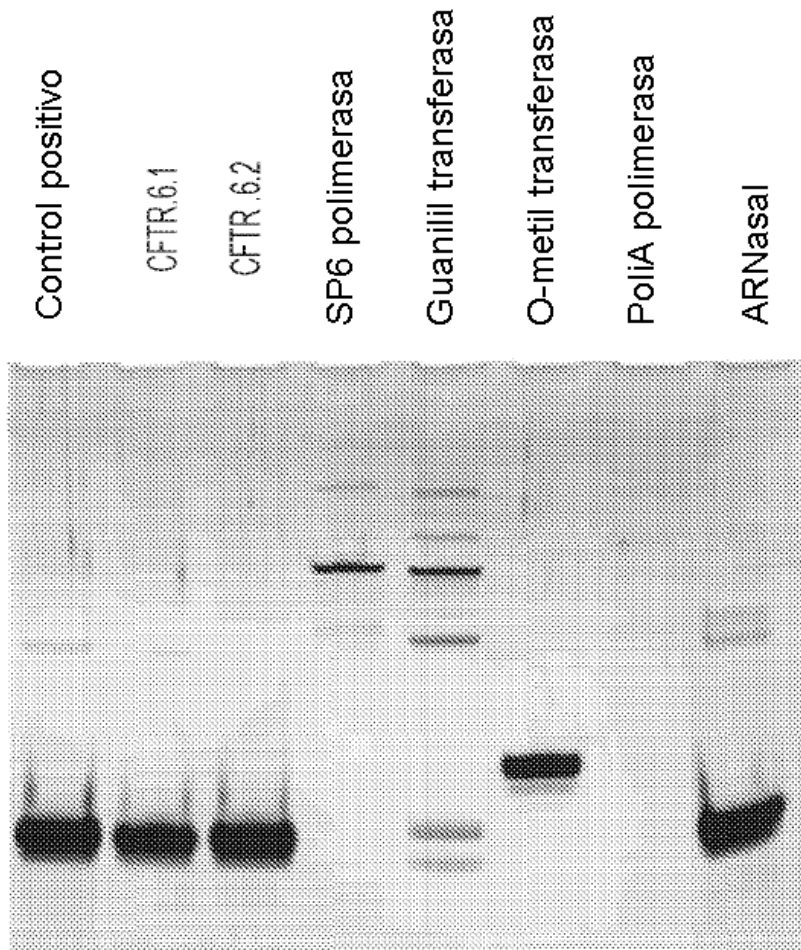


FIG. 8

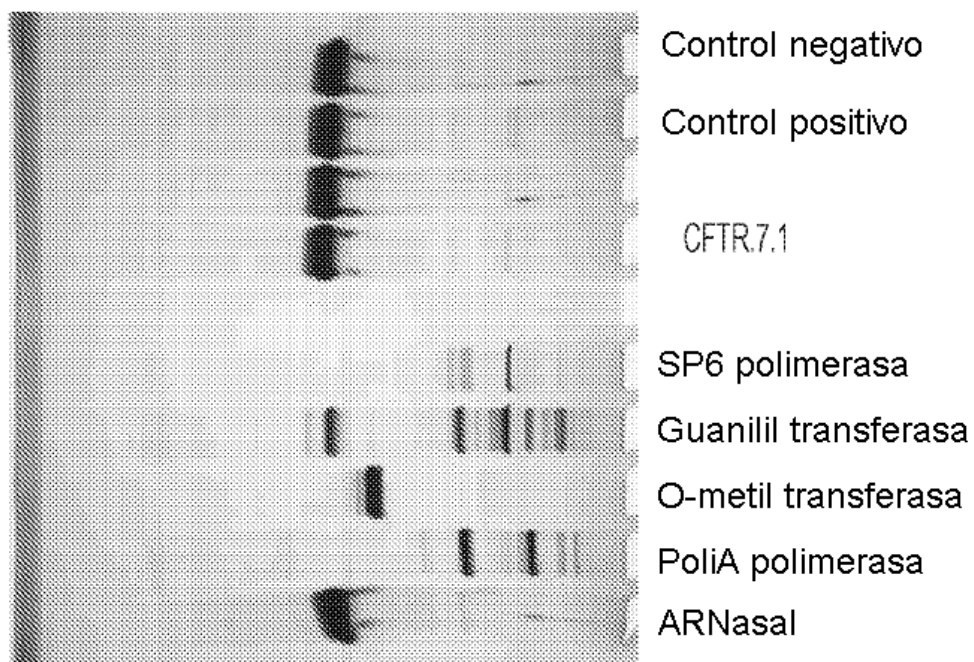


FIG. 9A

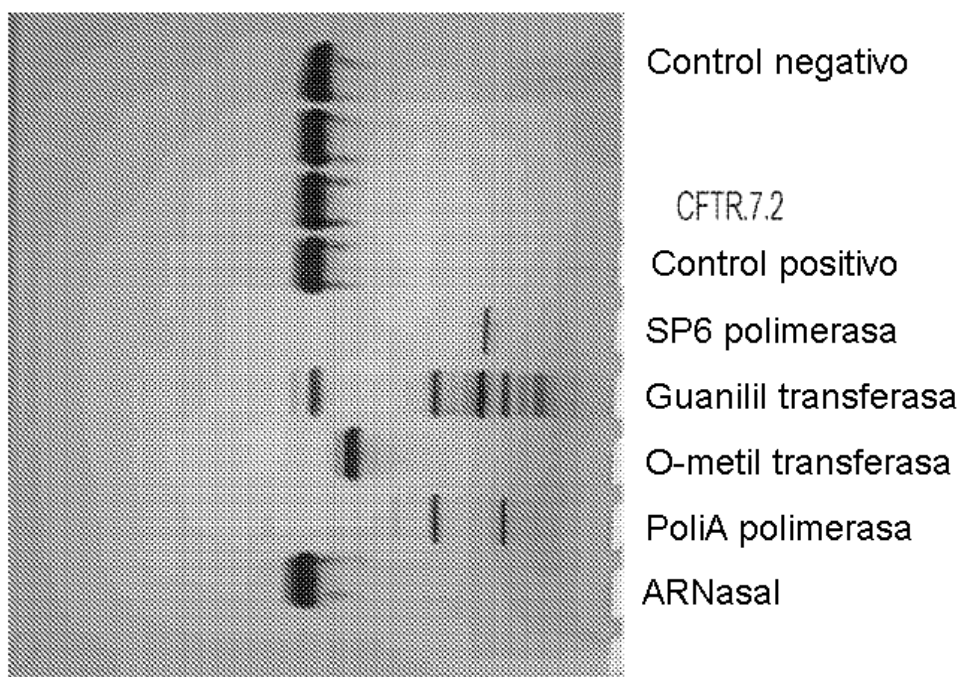


FIG. 9B

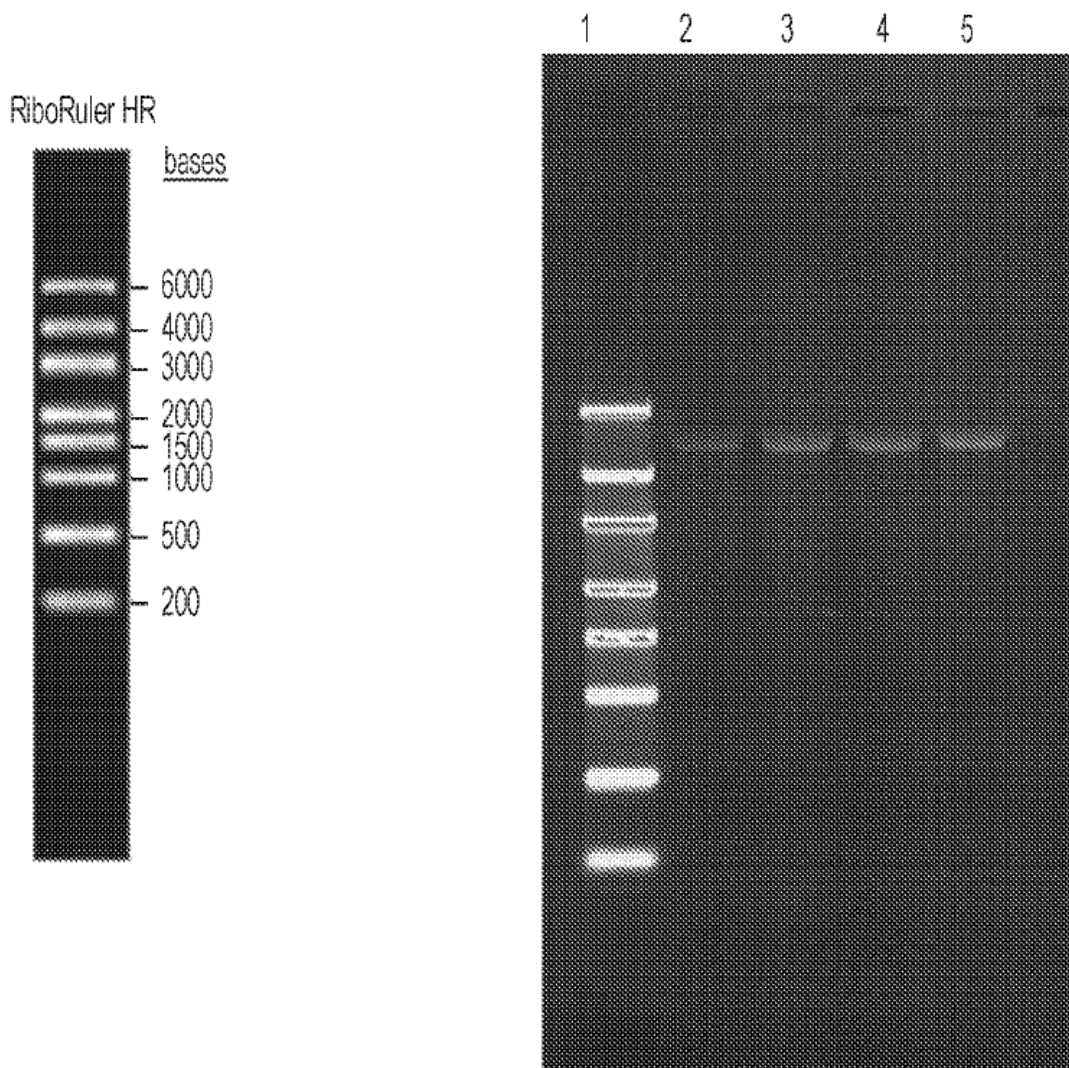


FIG. 10

(1)A3: 25G T7 CFTR Cent Xlal  
(1)A2: 100G T7 CFTR Re-Con

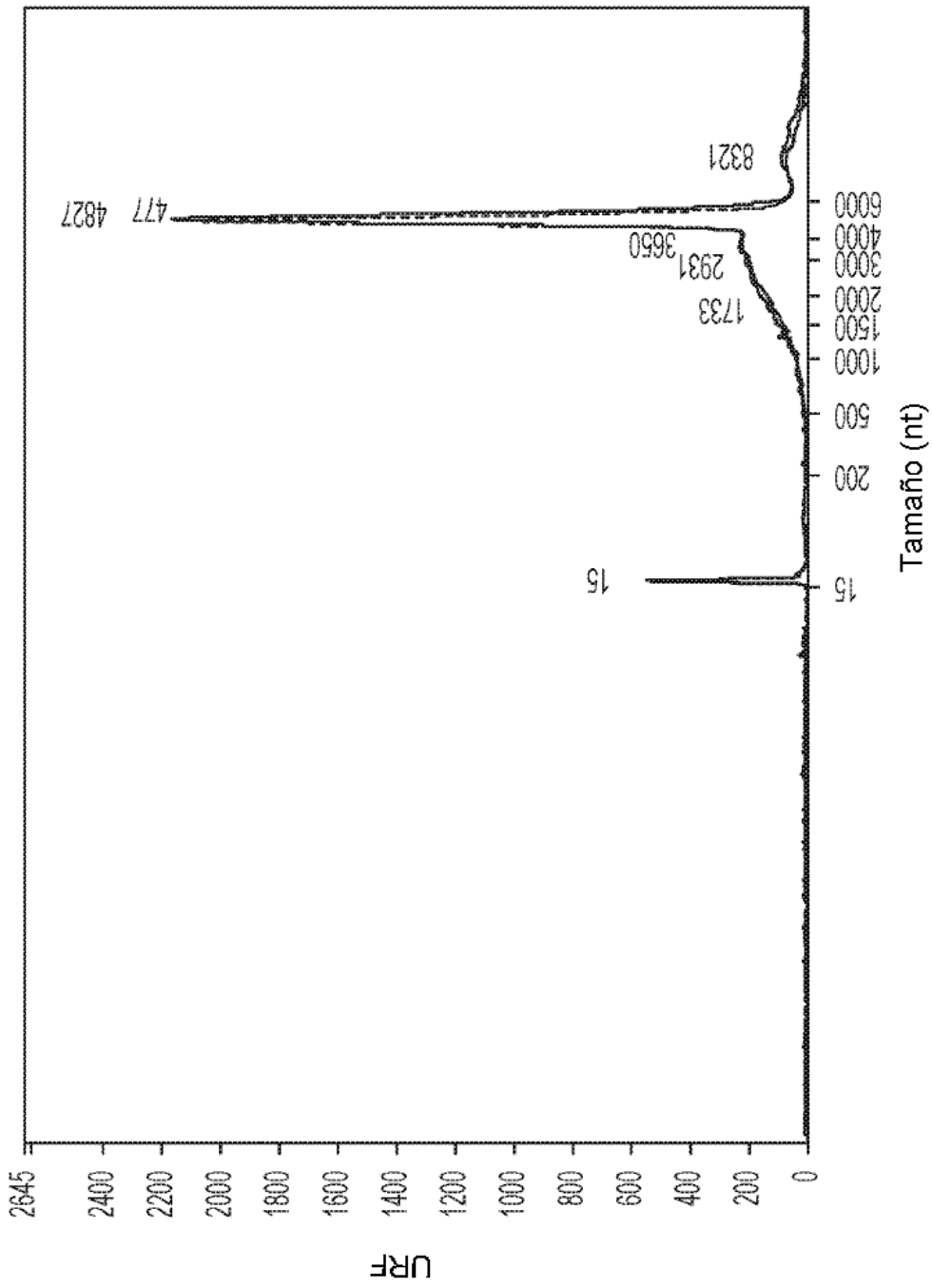


FIG. 11