

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 841**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2020** **PCT/EP2020/053453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2020** **WO20165158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2020** **E 20703061 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3924487**

54 Título: **Purificación de ARNm por filtración de flujo tangencial**

30 Prioridad:

11.02.2019 EP 19156522

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

03.10.2024

73 Titular/es:

ETHRIS GMBH (100.0%)
Semmelweisstrasse 3
82152 Planegg, DE

72 Inventor/es:

GEIGER, JOHANNES y
TREML, MARTIN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 980 841 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

Purificación de ARNm por filtración de flujo tangencial

La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de moléculas de ARNm que comprende (Ia) la purificación de moléculas de ARNm precipitadas a partir de una suspensión que comprende moléculas de ARNm precipitadas, (Ib) el lavado y la disolución de las moléculas de ARNm precipitadas purificadas, (IIa) la purificación de las moléculas de ARNm utilizando una solución que comprende un agente quelante, en donde el agente quelante es un agente quelante con al menos cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar, seguida por (IIb) el lavado de las moléculas de ARNm purificadas, en donde las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo utilizando filtración de flujo tangencial.

La información genética se almacena como ácido desoxirribonucleico (ADN) en la célula y se puede transcribir en ácido ribonucleico (ARN) cuando sea necesario. Tanto las moléculas de ADN como las de ARN están formadas por nucleótidos que consisten en una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y al menos un grupo fosfato. Existen diferentes tipos de moléculas de ARN, incluidas las moléculas de ARNm que llevan la información genética para la síntesis de proteínas. En las células eucariotas, estas moléculas de ARNm se transcriben a partir del ADN como moléculas de ARNm prematuras y posteriormente se modifican por medio de la adición, por ejemplo, de una caperuza de 5' y una cola de poliadenosina (poli(A)) de 3'. Las moléculas de ARNm maduro se transfieren desde el núcleo celular al citoplasma donde se traducen en proteínas. Por lo tanto, la secuencia de ADN, así como también la cantidad, la estabilidad y la eficiencia de traducción de la molécula de ARNm madura, determinan principalmente la síntesis de proteínas en una célula.

Para la optimización de la síntesis de una proteína deseada en una célula, por ejemplo, en contextos terapéuticos, los enfoques basados en ARNm representan una herramienta prometedora. El uso de moléculas de ARNm tiene la ventaja de que las moléculas se deben introducir solo en el citoplasma de una célula para la traducción de proteínas (Tavernier *et al.*, 2011, *J. Control Release*, 150(3):238 a 247; Yamamoto *et al.*, 2009, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71 (3):484 a 489). En comparación con el uso de la secuencia de ADN respectiva comprendida en un portador apropiado tal como un plásmido, el uso de moléculas de ARNm es además menos difícil, más eficaz y evita el riesgo considerable de alteración del ADN cromosómico si el plásmido o partes del mismo se incorporan al genoma. Las moléculas de ARNm se generan principalmente por medio de transcripción *in vitro*, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas. Dichos enfoques se basan en plantillas de ADN, que se generan por medio de linealización del propio ADN plasmídico o por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de un ADN plasmídico. Ambos enfoques están bien establecidos y se pueden ampliar con facilidad. Sin embargo, en ambos casos, las moléculas de ARNm se deben purificar antes de que se puedan usar en aplicaciones posteriores.

La purificación de moléculas de ARNm sintetizadas es crucial dado que los contaminantes afectan negativamente a la mayoría de las aplicaciones posteriores, en especial en contextos terapéuticos. Diferentes subproductos pueden contaminar las moléculas de ARNm deseadas, tales como los componentes usados y/o generados en procesos anteriores, tales como la síntesis de ARNm. En el caso de ambos enfoques, tanto *in vivo* e *in vitro*, se pueden producir fragmentos cortos de moléculas de ARNm, por ejemplo, por medio de hidrólisis y transcripción fallida. La hidrólisis de la molécula de ARNm puede ocurrir en presencia de un catalizador o una enzima, pero también de manera espontánea, y da como resultado la degradación de la molécula de ARNm respectiva y, por lo tanto, la formación de fragmentos de moléculas de ARNm de longitud variable. En el caso de transcripción abortada (véase, por ejemplo, Revyakin *et al.*, 2006, *Science*, 314 (5802):1139 a 1143), la ARN polimerasa se une al elemento promotor respectivo en una molécula de ADN para la transcripción, desenrolla la doble hebra de ADN que rodea el sitio de inicio de la transcripción y comienza con la síntesis de una molécula de ARNm. Sin embargo, en algunos casos, la ARN polimerasa no escapa de la región promotora del ADN, pero permanece estacionario mientras transcribe una parte de la molécula de ADN. A medida que el ADN desenrollado se acumula dentro de la enzima, la ARN polimerasa expulsa la parte del ADN en donde se almacena la información genética para la transcripción y libera la molécula de ARN sintetizada de uno a 15 nucleótidos de longitud (véase, por ejemplo, Goldman *et al.*, 2009), *Science*, 324 (5929):927 a 928). Para evitar, por ejemplo, una respuesta inmunitaria no deseada tras la administración de una composición farmacéutica que comprende tales fragmentos cortos de moléculas de ARNm, es muy deseable obtener moléculas de ARNm no fragmentadas purificadas para aplicaciones posteriores, en especial en contextos terapéuticos.

Existen diferentes enfoques para la purificación de moléculas de ARNm que incluyen precipitación y filtración, así como también combinaciones de las mismas. Para la eliminación de sales, nucleótidos y proteínas no deseados, los enfoques basados en la precipitación de ARN representan, por ejemplo, un procedimiento fácil y rentable para obtener moléculas de ARN purificadas como un sedimento que se puede resuspender en un tampón de elección. Se pueden usar diferentes soluciones para la precipitación que comprenden, por ejemplo, tiocianato de guanidina (GSCN), acetato de amonio (NH₄OAc), etanol, cloruro de litio y acetato de sodio (revisado, por ejemplo, por Walker y Lorsch, 2013, *Methods Enzymol.*, 530:337 a 343). Por otro lado, los procedimientos de filtración se basan en conceptos mecánicos para la purificación de una molécula diana tales como las moléculas de ARNm. En el caso de la filtración, se hace pasar un aporte, es decir, una solución o suspensión que comprende las moléculas diana tales como moléculas de ARNm, a través de una membrana de filtro, esta última se denomina como filtración de flujo tangencial (TFF).

El documento WO 2014/140211 describe métodos para purificar el ARN de una muestra que comprenden una o más etapas de filtración de flujo tangencial, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de flujo de microesferas de núcleo o combinaciones de las mismas. Los documentos WO 2014/152966 A1 y WO 2015/164773 A1 divulgan, por ejemplo, procedimientos para la purificación de moléculas de ARNm utilizando TFF con volúmenes variables de solución y/o suspensión. Las moléculas de ARNm se purifican por medio de la precipitación de las moléculas de ARNm utilizando, por ejemplo, urea, GSCN y/o cloruro de potasio y los precipitados se lavan varias veces. Sin embargo, en ambos casos no se muestra que los procedimientos sean capaces de purificar las moléculas de ARNm diana en vista de fragmentos cortos de ARNm tales como moléculas de ARNm fallidas y/o productos de hidrólisis.

El documento WO 2016/193206 A1 divulga un procedimiento para la producción y purificación de ARN, en donde la purificación de ARN comprende al menos una etapa de TFF y preferentemente ninguna etapa que comprenda una extracción con fenol/cloroformo y/o una precipitación de ADN y/o ARN. Además, las moléculas de ARN preferentemente se purifican por medio de la aplicación de una etapa de purificación adicional utilizando, por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico y/o aniónico y/o cromatografía de fase inversa. Al igual que con anterioridad, el documento no divulga la purificación de moléculas de ARN diana en vista de moléculas de ARNm fallidas y/o productos de hidrólisis de moléculas de ARNm.

El documento WO 2018/157133 A1 divulga procedimientos para la purificación a gran escala de moléculas de ARNm. La invención se refiere en especial al uso de una celda agitada o un dispositivo de filtración Nutsche agitado para la preparación de composiciones de moléculas de ARNm limpias y homogéneas. De acuerdo con lo mostrado en los ejemplos, las moléculas de ARNm se precipitan utilizando GSCN y el precipitado se lava utilizando una solución que comprende GSCN y etanol. Curiosamente, las composiciones de moléculas de ARNm obtenidas por medio del procedimiento reivindicado se comparan con composiciones que comprenden moléculas de ARNm purificadas utilizando TFF y se muestra que solo la purificación basada en TFF dio como resultado una solución que comprendía enzimas residuales además de las moléculas de ARNm diana.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de tener a mano soluciones alternativas para poder purificar eficientemente moléculas de ARNm a gran escala, en especial en vista de moléculas de ARNm fallidas y productos de hidrólisis de moléculas de ARNm, lo que garantiza niveles bajos de sales que pueden ser problemáticos para aplicaciones posteriores, tales como GSCN y utilizando un sistema que se puede automatizar con facilidad.

La presente solicitud aborda la necesidad de obtener moléculas de ARNm purificadas con alto rendimiento por medio del suministro de las realizaciones que se enumeran en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de moléculas de ARNm, dicho procedimiento comprende (Ia) la purificación de moléculas de ARNm precipitadas a partir de una suspensión que comprende moléculas de ARNm precipitadas utilizando una primera solución, (Ib) el lavado y la disolución de las moléculas de ARNm precipitadas purificadas obtenidas en la etapa (Ia) utilizando una segunda solución, (IIa) la purificación de las moléculas de ARNm a partir de las moléculas de ARNm disueltas obtenidas en la etapa (Ib) utilizando una tercera solución que comprende un agente quelante, en donde el agente quelante es un agente quelante con al menos cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar, seguido de (IIb) el lavado de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas en la etapa (IIa) utilizando una cuarta solución, en donde las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo utilizando filtración de flujo tangencial.

De manera sorprendente, se ha encontrado que el procedimiento de acuerdo con la presente invención da como resultado un alto grado de purificación de moléculas de ARNm y, por lo tanto, en una solución que comprende moléculas de ARNm purificadas pero sin o casi nada de productos de hidrólisis de moléculas de ARNm y moléculas de ARNm fallidas. En particular, se ha descubierto que por medio de la aplicación de dicho procedimiento se eliminan de manera eficaz los productos de hidrólisis de moléculas de ARNm, las moléculas de ARNm fallidas, las proteínas y las sales que pueden ser problemáticas para las aplicaciones posteriores. Por lo tanto, por medio de la aplicación del procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede obtener una solución que comprende moléculas de ARNm purificadas que es adecuada para aplicaciones posteriores tales como aplicaciones farmacéuticas.

En el contexto de la presente invención, la expresión "un procedimiento de purificación" se refiere a un procedimiento para la obtención de moléculas diana a partir de una mezcla, por ejemplo, una solución o suspensión, que comprende dichas moléculas diana que se han de purificar y componentes distintos de las moléculas diana, en donde la concentración de las moléculas diana aumenta o se potencia en la solución obtenida después de la realización de dicho procedimiento en comparación con la concentración de las moléculas diana en la mezcla antes de llevar a cabo dicho procedimiento. La purificación de moléculas diana también se puede denominar enriquecimiento de dichas moléculas diana por medio de la eliminación o al menos por medio de la eliminación sustancial de componentes distintos de las moléculas diana.

En el contexto de la presente invención, las moléculas diana son moléculas de ARNm. En la presente memoria, el término "ARNm" y la expresión "molécula de ARNm", que se usan de manera intercambiable, se refieren a una molécula de ARN monocatenaria constituida, por ejemplo, por nucleótidos A, C, G y/o U, es decir, nucleótidos que comprenden adenina, guanina, citosina y uracilo como base nitrogenada respectiva. Además, una molécula de ARNm

contiene una o más secuencias codificantes que se pueden usar como plantilla durante la síntesis de una secuencia de aminoácidos durante la traducción. Por lo tanto, la molécula de ARNm que se ha de purificar preferentemente comprende una secuencia de codificación, es decir, una secuencia que se puede traducir en una secuencia de aminoácidos tal como una proteína y que comprende un codón de inicio y un codón de terminación. La secuencia de codificación puede ser una secuencia de origen natural, una secuencia optimizada de codones parcial o totalmente derivada de la secuencia natural que se ha de usar o una secuencia artificial. La optimización de codones se refiere a una técnica que se aplica para maximizar la expresión de proteínas por medio del aumento de la eficiencia de traducción de la respectiva molécula de ARNm, dado que en algunos casos existen codones que algunas especies usan preferentemente para un aminoácido dado. Además, dicha molécula de ARNm podría comprender una región no traducida (UTR) 5' y/o 3', uno o más sitios de entrada de ribosomas internos (IRES), una o más secuencias adicionales para la promoción de la traducción y/o una o más modificaciones para ajustar y/o extender la duración de la acción. Otras características de las moléculas de ARNm se describen con más detalle a continuación.

Por lo tanto, se debe entender que el término "ARNm" significa cualquier molécula de ARN que sea adecuada para la expresión de una secuencia de aminoácidos o que sea traducible a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína. De este modo, una "molécula de ARNm" se debe entender como una molécula de ARNm que presenta una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza y, por lo tanto, se puede traducir en una secuencia de aminoácidos tal como una proteína con dicha secuencia de aminoácidos que muestra la actividad y/o propiedad por la que se caracteriza.

En la presente memoria, la expresión "secuencia de aminoácidos" abarca cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos, cada una de las cuales está enlazada por medio de enlaces peptídicos y se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos de interés. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos codificada tiene al menos 5 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 10 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 50, 100, 200 o 500 aminoácidos. Por lo tanto, la expresión "secuencia de aminoácidos" cubre péptidos cortos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, proteínas así como también fragmentos de los mismos, tales como partes de proteínas conocidas, preferentemente partes funcionales. Estos pueden ser, por ejemplo, partes biológicamente activas de una proteína o partes antigénicas tales como epítomos que pueden ser eficaces para generar anticuerpos. En lo que respecta a la función de la secuencia de aminoácidos, no existe limitación y las posibles secuencias de aminoácidos se describen con más detalle a continuación.

Por el contrario, los componentes que se van a eliminar durante la purificación de dichas moléculas de ARNm y, por lo tanto, los componentes distintos de las moléculas diana incluyen, por ejemplo, moléculas de ARNm que se degradan parcial o completamente por hidrólisis. La degradación por hidrólisis es un proceso aleatorio y los productos de degradación resultantes, en la presente memoria denominados "productos de hidrólisis" o también "productos de hidrólisis de moléculas de ARNm", son más cortos en al menos 1 nucleótido que la molécula de ARNm que se hidrolizó. Por lo tanto, dependiendo de la longitud de la molécula de ARNm que se hidrolizó, los productos de hidrólisis resultantes pueden tener, por ejemplo, una longitud de menos de 10.000 nucleótidos, preferentemente menos de 5000 nucleótidos, más preferentemente menos de 500 nucleótidos, incluso más preferentemente menos de 250 nucleótidos, incluso más preferentemente menos de 170 nucleótidos y lo más preferentemente menos de 120 nucleótidos. Otro ejemplo de componentes a eliminar son moléculas de ARNm fallidas que pueden tener una longitud de, por ejemplo, menos de 50 nucleótidos, preferentemente menos de 25 nucleótidos y más preferentemente menos de 15 nucleótidos.

Además, los componentes que se eliminarán durante la purificación de las moléculas de ARNm incluyen, por ejemplo, componentes usados durante la síntesis *in vitro* de las moléculas diana, tales como la transcripción *in vitro* de moléculas de ARNm y/o componentes comprendidos en las células usadas para la amplificación de plantillas para la síntesis de moléculas diana y/o para la transcripción de moléculas de ARNm. En el caso de la transcripción *in vitro* de moléculas de ARNm, dichos componentes comprenden, por ejemplo, proteínas tales como enzimas usadas para la transcripción *in vitro*; sales; iones tales como iones de magnesio; nucleosidtrifosfatos; mono, di y/o trifosfatos que incluyen caperuzas de 5' y/o análogos de caperuza de 5'; transcripciones fallidas; productos de hidrólisis; un tampón tal como ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS); y/o un agente quelante tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

El procedimiento de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo por medio de filtración de flujo tangencial (TFF). La TFF se caracteriza porque la suspensión o la solución que comprende las moléculas de ARNm que se han de purificar fluyen de manera tangencial a través de la superficie de una membrana de filtro, preferentemente las moléculas de ARNm se retienen en el retenido. Por lo tanto, por medio de la realización de la TFF para la purificación de las moléculas de ARNm, se evita la presencia de una torta de filtración que puede obstruir la membrana de filtración en el tiempo y, por lo tanto, se aumenta el tiempo de uso de la membrana de filtración.

Por lo tanto, el sistema para la purificación de moléculas diana de acuerdo con la presente invención es un sistema de TFF. Un sistema de TFF de manera típica comprende un dispositivo de filtro tal como una cápsula, casete y soporte, o módulo de fibra hueca, una bomba, una tubería, una válvula o abrazadera y un depósito de líquido y, de manera opcional, un manómetro (véase la **Figura 1**). Tal sistema de TFF se puede usar de forma continua incluso con concentraciones elevadas de moléculas de ARNm sin que se obstruyan los poros de la membrana de filtro. El uso de un sistema de TFF es ventajoso dado que permite la purificación de alto rendimiento de las moléculas de ARNm.

Es de destacar que el término "solución" se refiere comúnmente a una mezcla homogénea de dos o más sustancias y se aplica en particular al estado líquido de la materia, si bien también son posibles soluciones de gases y sólidos. En la presente memoria, el término "solución", en especial en el caso de la "primera solución", la "segunda solución", la "tercera solución" y la "cuarta solución" de acuerdo con la presente invención, comprende un líquido tal como agua, una mezcla de líquidos, preferentemente homogénea, así como también por ejemplo, una mezcla de un líquido y una sal, preferentemente disuelta.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento de purificación de moléculas de ARNm, en donde dicho procedimiento comprende como la etapa (1a) la purificación de moléculas de ARNm precipitadas a partir de una suspensión que comprende dichas moléculas de ARNm precipitadas. Dicha purificación se consigue utilizando una primera solución. La suspensión que comprende moléculas de ARNm precipitadas se puede obtener, por ejemplo, por medio de lisis celular o transcripción *in vitro*. Por lo tanto, las moléculas de ARNm precipitadas se deben purificar a partir de componentes de células o de mezclas de transcripción *in vitro*, tales como secuencias de aminoácidos que incluyen proteínas y enzimas, nucleósidos trifosfatos, componentes de tampón y, de manera opcional, caperuzas de 5' y análogos de caperuza de 5'. Las caperuzas de 5' y los análogos de caperuza de 5' pueden estar comprendidos en la suspensión usada para llevar a cabo la etapa (1a), por ejemplo, en el caso de que las moléculas de ARNm se hayan transcrito *in vitro* y se haya colocado la caperuza cotranscripcionalmente en 5'. Por lo tanto, la etapa (1a) es ventajoso para la eliminación de componentes celulares o componentes de mezclas de transcripción *in vitro* de moléculas de ARNm precipitadas.

En algunas realizaciones de la presente invención, la primera solución contiene acetato de amonio (NH_4OAc). Por lo tanto, las moléculas de ARNm precipitadas se purifican de la suspensión utilizando una primera solución que comprende NH_4OAc . Además, la primera solución preferentemente tiene un pH en el intervalo de 1 a 12, más preferentemente en el intervalo de 1 a 10, incluso más preferentemente en el intervalo de 3 a 9, y más preferentemente en el intervalo de 6 a 8. De este modo, las moléculas de ARNm precipitadas se purifican de la suspensión que comprende moléculas de ARNm precipitadas utilizando una primera solución que comprende NH_4OAc y tiene un pH en el intervalo de 1 a 12, preferentemente en el intervalo de 1 a 10, más preferentemente en el intervalo de 3 a 9, e incluso más preferentemente en el intervalo de 6 a 8.

El procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención además comprende como la etapa (1b) el lavado y la disolución de las moléculas de ARNm precipitadas purificadas obtenidas en la etapa (1a) descrito con anterioridad utilizando una segunda solución. Dicha segunda solución puede ser cualquier solución en donde las moléculas de ARNm se puedan resuspender y en donde las moléculas de ARNm permanezcan estables, es decir, no se hidrolizan, por ejemplo agua. La realización de la etapa (1b) es ventajosa para la eliminación en especial de componentes de la primera solución y para la obtención de moléculas de ARNm disueltas.

En algunas realizaciones de la presente invención, la segunda solución es agua.

El procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención además comprende, como etapa (11a), la purificación de las moléculas de ARNm a partir de las moléculas de ARNm disueltas obtenidas en la etapa (1b) utilizando una tercera solución que comprende un agente quelante, en donde el agente quelante es un agente quelante con al menos cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar. Esto es particularmente ventajoso para la eliminación de moléculas de ARNm fallidas y productos de hidrólisis de la solución que comprende las moléculas de ARNm disueltas.

La expresión "agente quelante" se refiere a moléculas que quelan cationes, y en particular a moléculas con grupos donantes que se pueden unir a un átomo central en un complejo de coordinación dependiendo de varios factores tales como el pH y/o la temperatura, la concentración del agente quelante y/o el tipo de catión que se va a quelar. Los agentes quelantes se pueden caracterizar, por ejemplo, por el número de dentados, es decir, el número de grupos donantes, por molécula y/o el número de posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar. Por ejemplo, el agente quelante EDTA tiene seis dentados y quela un catión divalente en un complejo catiónico divalente de agente quelante 1:1.

Preferentemente, en el contexto de la presente invención, la expresión "agente quelante" se refiere a agentes quelantes que son capaces de complejar cationes divalentes y/o trivalentes tales como por ejemplo iones divalentes de magnesio y calcio y/o iones de hierro trivalentes. Por lo general, los agentes quelantes con menos de cuatro posiciones de coordinación en el catión tienen menor actividad quelante en comparación con los agentes quelantes con cuatro o más posiciones de coordinación en el catión, en especial en vista de complejar de manera eficaz cationes divalentes y/o trivalentes.

Los agentes quelantes de acuerdo con la presente invención son agentes quelantes con al menos cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar, más preferentemente agentes quelantes con más de cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar, incluso más preferentemente al menos cuatro dentados por molécula, en la presente memoria también se denominan "agentes quelantes potentes", más preferentemente agentes quelantes con más de cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar que se usan en composiciones y/o

formulaciones farmacéuticas, e incluso más preferentemente EDTA. Los agentes quelantes con más de cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar que se usan en composiciones farmacéuticas se usan, por ejemplo, en antidotos que comprenden una solución de Na₂EDTA (por ejemplo, 2 g/10 ml; véase por ejemplo GUPharma GmbH) y/o EDTA de dinatrio cálcico (por ejemplo, 50 mg/ml, Amp.10 ml; compárese, por ejemplo, Laboratoires SERB) o, por ejemplo, usados como excipientes (compárese, por ejemplo, Phenhydan, Desitin Arzneimittel GmbH; o Soluvit N, Baxter; o Fluimucil, Zambon GmbH).

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, el agente quelante es EDTA.

En la **Tabla 1** se enumeran ejemplos de agentes quelantes preferidos, siendo el EDTA el agente quelante más preferido.

Tabla 1

Nombre	Abreviaturas	Dentados por molécula
Ácido nitrilotriacético	NTA	4
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	6
Ácido ciclohexanodiaminotetraacético	CDTA	6
Ácido dietilentriaminopentaacético	DTPA	8
Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético	EGTA	6
Ácido N-(2-hidroxiethyl)etilendiamina-N,N,N'-triácético	HEDTA	5
Trietilendiaminahexaacetato	TTHA	10
Ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico	EDDS	6
Ácido trans-1,2-diaminociclohexanotetraacético	DCTA	6
Ácido 1,3-propilendiamintetraacético	PDTA	6

Los agentes quelantes potentes tales como el EDTA pueden eliminar de manera eficaz cationes en especial divalentes tales como los cationes de magnesio. Los cationes de magnesio son necesarios, por ejemplo, por enzimas implicadas en la transcripción de moléculas de ARNm y, por lo tanto, están presentes en niveles elevados en mezclas de transcripción celular e *in vitro*. Los presentes inventores han descubierto que se puede lograr una eliminación eficaz de productos de hidrólisis y moléculas de ARNm fallidas utilizando un agente quelante potente tal como EDTA en la etapa (IIa), para de ese modo permitir un alto grado de purificación de moléculas de ARNm. Sin quedar ligados a teoría alguna, se plantea la hipótesis de que dichos cationes mencionados con anterioridad pueden apoyar la formación de estructuras secundarias y terciarias de moléculas de ARNm y que la eliminación en especial de cationes divalentes tales como los cationes de magnesio puede ser de particular relevancia para la purificación de moléculas de ARNm como moléculas de ARNm fallidas y productos de hidrólisis pueden tender a unirse a las moléculas de ARNm que se han de purificar en presencia de dichos cationes. Por lo tanto, se considera que por medio de la eliminación de cationes divalentes utilizando un agente quelante potente tal como EDTA en la etapa (IIa) se reduce el punto de fusión y se afecta la estructura secundaria y/o terciaria de las moléculas de ARNm. Por lo tanto, las moléculas de ARNm fallidas y los productos de hidrólisis se pueden eliminar como permeado. Por lo tanto, la etapa (IIa) es en particular ventajoso para la eliminación de moléculas de ARNm fallidas y productos de hidrólisis.

De acuerdo con la presente invención, la tercera solución comprende un agente quelante, en donde el agente quelante es un agente quelante con al menos cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar, preferentemente EDTA. De acuerdo con lo indicado con anterioridad, la capacidad de formación de complejos de los agentes quelantes se puede ver influida por el pH, dado que la constante de formación del complejo de un agente quelante dado está influida por el pH. Por ejemplo, el EDTA es en especial potente a valores de pH más altos, tales como a un pH entre 8 y 10, en vista de los iones de magnesio quelantes. Sin embargo, es deseable ajustar el pH en vista de una compensación óptima entre la capacidad complejante de un agente quelante dado y la estabilidad de las moléculas de ARNm que se han de purificar. En este contexto, se ha observado que un agente quelante potente tales como el EDTA puede eliminar de manera eficaz cationes en especial divalentes a un pH entre 1 y 10, preferentemente entre 6 y 8. Por lo tanto, sin quedar ligados a teoría alguna, se plantea la hipótesis de que por esto el punto de fusión, en especial de las moléculas de ARNm fallidas y los productos de hidrólisis que están unidos a las moléculas de ARNm, se pueden reducir por medio de agentes quelantes potentes tales como EDTA y, por lo tanto, las moléculas de ARNm fallidas y los productos de hidrólisis se pueden eliminar mientras que tienen un pH que al mismo tiempo se ajusta a un valor que preserve la estabilidad de las moléculas de ARNm que se han de purificar.

Por lo tanto, en una realización preferida, el valor de pH en la tercera solución que contiene un agente quelante se ajusta a un valor de pH en donde el agente quelante respectivo tiene una capacidad quelante óptima.

Por lo tanto, el uso, por ejemplo, de un agente quelante potente tal como EDTA a un pH entre 1 y 10, preferentemente a un pH entre 6 y 8, es ventajoso para una eliminación eficaz de cationes divalentes y, por lo tanto, a su vez, para una eliminación eficaz de moléculas de ARNm fallidas y productos de hidrólisis. En el caso de que se use uno de los agentes quelantes alternativos mencionados con anterioridad, podría ser necesario ajustar el pH a un valor de pH en donde dicha alternativa sea eficaz para la eliminación de iones, preferentemente cationes de magnesio divalentes.

Los intervalos de pH correspondientes se indican en la Tabla anterior para los agentes quelantes preferidos.

En algunas realizaciones, la tercera solución tiene un pH en el intervalo de 1 y 10, preferentemente en el intervalo entre 3 y 9, y más preferentemente en el intervalo entre 6 y 8.

El pH de la tercera solución se puede obtener utilizando un tampón. Los tampones preferidos (con sus respectivos intervalos de pH entre paréntesis) comprenden 2-[bis(2-hidroxietil)amino]-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (Bis-Tris; intervalo de pH 5,8 a 7,2), ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA; intervalo de pH 6,0 a 7,2), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES; intervalo de pH 6,1 a 7,5), ácido 1,4-piperazinodietanosulfónico (PIPES; intervalo de pH 6,1 a 7,5), ácido 2-hidroxi-3-morfolin-4-ilpropano-1-sulfónico (MOPSO; intervalo de pH 6,2 a 7,6), 1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano (Bis-Tris propano; intervalo de pH 6,3 a 9,5), ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES; intervalo de pH 6,4 a 7,8), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS; intervalo de pH 6,5 a 7,9), ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]etanosulfónico (TES; intervalo de pH 6,8 a 8,2), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES; intervalo de pH 6,8 a 8,2), ácido 3-(N,N-bis[2-hidroxietil]amino)-2-hidroxiopropanosulfónico (DIPSO; intervalo de pH 7,0 a 8,2), ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico (MOBS; intervalo de pH 6,9 a 8,3) y ácido 3-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]-2-hidroxiopropano-1-sulfónico (TAPSO; intervalo de pH 7,0 a 8,2). Un tampón en particular preferido es MOPS con un pH preferido entre 6 y 8, más preferentemente entre 6,5 y 7,5.

En algunas realizaciones, la tercera solución tiene un pH en el intervalo de 1 y 10, preferentemente en el intervalo entre 3 y 9, y más preferentemente en el intervalo entre 6 y 8, y comprende un tampón, preferentemente MOPS.

En algunas realizaciones de la presente invención, la tercera solución comprende un tampón de MOPS y preferentemente se obtiene por medio del ajuste del pH del tampón de MOPS antes de añadir un agente quelante como se ha definido anteriormente, preferentemente EDTA.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, la tercera solución que preferentemente comprende EDTA como agente quelante para la eliminación de cationes en especial divalentes tales como cationes de magnesio además comprende un tampón de MOPS y tiene un pH entre 6 y 8. En algunas realizaciones de la presente invención, la tercera solución se puede obtener por medio de la preparación de un tampón de MOPS, por medio del ajuste del pH de dicho tampón de MOPS a un pH entre 1 y 10, preferentemente entre 6 y 8, y luego por medio de la adición de EDTA como agente quelante preferido.

En algunas realizaciones de la presente invención, la tercera solución comprende MOPS 40 mM y EDTA 10 mM y tiene un pH entre 6 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5.

El procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención además comprende como la etapa (IIb) el lavado de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas en la etapa (IIa) utilizando una cuarta solución. La cuarta solución puede ser cualquier solución en donde las moléculas de ARNm permanezcan estables, es decir, no se hidrolizan. La etapa (IIb) es ventajoso para la eliminación de los componentes de la tercera solución, dicha cuarta solución comprende, por ejemplo, cloruro o citrato de sodio o siendo agua.

De acuerdo con lo indicado con anterioridad, la segunda y la cuarta solución pueden ser cualquier solución en donde las moléculas de ARNm permanezcan estables, es decir, no se hidrolizan. Dicho líquido puede ser, por ejemplo, agua, preferentemente agua libre de nucleasas o agua libre de ribonucleasa tal como agua para inyección (agua WFI). En el caso de la cuarta solución, dicho líquido además puede ser, por ejemplo, glucosa tamponada con HEPES, cloruro y/o citrato de sodio.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, la cuarta solución es agua.

En algunas realizaciones de la presente invención, la segunda y la cuarta solución son agua.

En algunas realizaciones de la presente invención, la cuarta solución comprende cloruro y/o citrato de sodio.

En algunas realizaciones de la presente invención, la segunda solución es agua y/o la cuarta solución es agua o comprende cloruro y/o citrato de sodio. Esto es ventajoso para obtener una solución que comprende las moléculas de ARNm purificadas después de la etapa (IIb) sin introducir componentes que tendrían que eliminarse en etapas adicionales antes del procesamiento o aplicación posterior.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la segunda solución es agua y la cuarta solución comprende cloruro y/o citrato de sodio, preferentemente a un pH entre 4 y 5. Esto es muy ventajoso en especial para contextos terapéuticos como cloruro y/o citrato de sodio preferentemente está comprendido en una composición farmacéutica que comprende las moléculas de ARNm purificadas. Por lo tanto, esto es ventajoso en vista de una formulación posterior de las moléculas de ARNm obtenidas en composiciones farmacéuticas como cloruro y/o citrato de sodio son componentes frecuentemente usados de composiciones farmacéuticas. Por lo tanto, el uso de una cuarta solución

que comprende cloruro o citrato de sodio, que es un componente preferido de las composiciones farmacéuticas, permite una integración rentable y en tiempo de las etapas necesarios para la purificación de dichas moléculas de ARNm y formularlas en una composición farmacéutica.

- 5 En el caso de que la cuarta solución comprenda cloruro y/o citrato de sodio, el pH de la cuarta solución preferentemente está entre 3 y 6, más preferentemente entre 3,5 y 5,5, e incluso más preferentemente entre 4 y 5.

En realizaciones preferidas del procedimiento de acuerdo con la presente invención, el etanol no está comprendido en ninguna de la primera, la segunda, la tercera y/o la cuarta solución usada en dicho procedimiento.

- 10 De acuerdo con lo indicado con anterioridad, de manera sorprendente se ha encontrado que por medio de la aplicación del procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede obtener un alto grado de purificación de moléculas de ARNm. Preferentemente, la solución obtenida por medio de la realización de dicho procedimiento comprende moléculas de ARNm purificadas pero nada o solo niveles muy bajos de productos de hidrólisis y moléculas de ARNm fallidas. Más preferentemente, el porcentaje de moléculas de ARNm es al menos 80 %, incluso más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos el 95 % de todas las moléculas de ARN (moléculas de ARNm, producto de hidrólisis y moléculas de ARNm fallidas) en la solución obtenida después de la etapa (IIb). Esto se puede medir por medio de procedimientos muy conocidos por aquéllos con experiencia en la técnica tales como como, por ejemplo, electroforesis en gel, análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o por medio de la investigación de electroferogramas obtenidos por electroforesis en gel capilar o electroforesis capilar tales como el análisis del analizador de fragmentos. El último enfoque se describe a modo de ejemplo con más detalle en los siguientes ejemplos.

- 25 En algunas realizaciones de la presente invención, al menos la etapa (IIa), preferentemente las etapas (Ia) a (IIb), se llevan a cabo a una temperatura entre 0 °C y 25 °C, preferentemente entre 2 °C y 8 °C. De este modo, el procedimiento de acuerdo con la presente invención preferentemente se lleva a cabo entre 0 °C y 25 °C al menos en el caso de la etapa (IIa), es decir, la purificación de las moléculas de ARNm a partir de las moléculas de ARNm disueltas obtenidas en la etapa (Ib) utilizando una tercera solución que comprende un agente quelante potente como se ha definido anteriormente, preferentemente EDTA. Por lo tanto, las moléculas de ARNm fallidas y los productos de hidrólisis se eliminan por medio de la realización de la etapa (IIa) a una temperatura entre 0 °C y 25 °C, preferentemente a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. Las temperaturas especialmente más bajas, tales como las temperaturas entre 2 °C y 8 °C, son ventajosas dado que la cantidad de degradación de las moléculas de ARNm por hidrólisis se reduce en comparación con la cantidad de degradación que se observa tras la realización en especial de la etapa (IIa) a una temperatura más alta, tal como una temperatura superior a 25 °C. De este modo, para la obtención de altas cantidades de moléculas de ARNm purificadas es ventajoso llevar a cabo al menos la etapa (IIa), preferentemente al menos las etapas (Ia) a (IIb) del procedimiento de acuerdo con la presente invención a una temperatura entre 0 °C y 25 °C, preferentemente entre 2 °C y 8 °C.

- 40 En algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de ARNm precipitadas comprendidas en la suspensión se obtienen por medio de transcripción *in vitro*, preferentemente utilizando una plantilla de ADN. Por lo tanto, las moléculas de ARNm que se han de purificar de acuerdo con la presente invención se pueden producir por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferentemente, las moléculas de ARNm se transcriben *in vitro* utilizando una plantilla de ADN.

- 45 La transcripción *in vitro* requiere una plantilla de ADN lineal o linealizada purificada que contiene un promotor, trifosfatos de ribonucleótidos, un sistema de tampón y una ARN polimerasa apropiada, tal como una ARN polimerasa T7. Por ejemplo, tal plantilla de ADN lineal purificado se puede sintetizar químicamente *in vitro*, seguido de manera opcional por la amplificación de la plantilla utilizando, por ejemplo, un procedimiento basado en PCR. De manera alternativa, se puede obtener una plantilla de ADN para la transcripción a partir de un plásmido de ADN que por lo general se obtiene por medio de lisis celular, se purifica y linealiza, por ejemplo, utilizando una enzima de restricción específica de sitio. En ambos casos, la secuencia de plantilla de ADN lineal obtenida se puede usar para la transcripción *in vitro* de moléculas de ARNm en presencia de nucleótidos A, C, G y U utilizando protocolos de laboratorio convencionales.

- 55 En algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de ARNm que se han de purificar se producen por medio de la transcripción *in vitro* en presencia de nucleótidos no modificados y/o modificados. Por lo tanto, las moléculas de ARNm que se han de purificar se pueden sintetizar por medio de transcripción *in vitro* basada en una plantilla de ADN lineal o linealizado utilizando nucleótidos modificados y/o no modificados. La expresión "nucleótido no modificado" usada en la presente memoria se refiere a nucleótidos A, C, G, T y U de acuerdo con lo descrito con anterioridad. En particular, en el caso de la transcripción *in vitro* de una molécula de ARNm, dicha expresión se refiere a nucleótidos A, C, G y U. La expresión "nucleótido modificado" usada en la presente memoria se refiere a cualquier isómero natural o sintetizado químicamente de nucleótidos A, C, G, T y U, así como también a cualquier análogo natural o sintetizado químicamente, nucleótido alternativo o modificado o isómero del mismo que tenga, por ejemplo, modificaciones químicas o residuos sustituidos. Los nucleótidos modificados pueden tener una modificación de base y/o una modificación de azúcar. Los nucleótidos modificados también pueden tener modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, con respecto a la caperuza de cinco cebadores de una molécula de ARNm. Los nucleótidos modificados

también incluyen nucleótidos que se sintetizan postranscripcionalmente por medio de modificación covalente de los nucleótidos. Además, es posible cualquier mezcla adecuada de nucleótidos modificados y no modificados. Se puede encontrar un número no limitante de ejemplos de nucleótidos modificados en la literatura (por ejemplo, Cantara *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39 (Issue suppl. 1):D195-D201; Helm y Alfonso, *Chem. Biol.*, 2014, 21(2):174 a 185; Carell *et al.*, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2012, 51 (29):7110 a 7131) y algunos nucleótidos modificados preferidos se mencionan a modo de ejemplo a continuación en función de sus respectivos residuos de nucleósidos:

1-metiladenosina, 2-metil-N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina, 2-metiladenosina, 2'-O-ribosilfosfato adenosina, N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6-acetiladenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-metiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina, 1,2'-O-dimetiladenosina, N6,2'-O-dimetiladenosina, 2'-O-metiladenosina, N6,N6,2'-O-trimetiladenosina, 2-metil-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metil-N6-metiladenosina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, 2-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6-2-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metil-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 7-metiladenosina, 2-metiladenosina, 2-metoxiadenosina, 2'-amino-2'-desoxiadenosina, 2'-azido-2'-desoxiadenosina, 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenosina, 7-deaza-8-aza-adenosina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina; 2-tiocitidina, 3-metilcitidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-hidroxicitidina, lisidina, N4-acetil-2'-O-metilcitidina, 5-formil-2'-O-metilcitidina, 5,2'-O-dimetilcitidina, 2-O-metilcitidina, N4,2'-O-dimetilcitidina, N4,N4,2'-O-trimetilcitidina, isocitidina, pseudocitidina, pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2'-metil-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, 5-yodocitidina, 5-bromocitidina, 2'-azido-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-fluor-2'-desoxicitidina, 5-aza-citidina, 3-metil-citidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-l-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-l-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-l-deaza-pseudoisocitidina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-l-metil-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina; 1-metilguanosina, N2,7-dimetilguanosina, N2-metilguanosina, 2'-O-ribosilfosfato guanosina, 7-metilguanosina, hidroxibutosa, 7-aminometil-7-deazaguanosina, 7-ciano-7-deazaguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, N2,7,2'-O-trimetilguanosina, N2,2'-O-dimetilguanosina, 1,2'-O-dimetilguanosina, 2'-O-metilguanosina, N2,N2,2'-O-trimetilguanosina, N2,N2J-trimetilguanosina, isoguanosina, 4-demetilwiosina, epoxiquenosina, hidroxibutosa submodificada, hidroxibutosa submodificada metilada, isowiosina, peroxibutosa, galactosil-queuosina, manosil-queuosina, queuosina, arqueosina, wibutosa, metilwiosina, wiosina, 7-aminocarboxipropildemetilwiosina, 7-aminocarboxipropilwiosina, éster metílico de 7-aminocarboxipropilwiosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina, N1-metilguanosina, 2'-amino-3'-desoxiguanosina, 2'-azido-2'-desoxiguanosina, 2'-fluoro-2'-desoxiguanosina, 2-tiouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, 3-metiluridina, 4-tiouridina, 5-metil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-carboximetiluridina, 5-carboximetilaminometiluridina, 5-hidroxiuridina, 5-metiluridina, 5-taurinometiluridina, 5-carbamometiluridina, éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)uridina, dihidrouridina, 5-metildihidrouridina, 5-metilaminometil-2-tiouridina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)-2'-O-metiluridina, 5-(isopentenilaminometil)uridina, 5-(isopentenilaminometil)-2-tiouridina, 3,2'-O-dimetiluridina, 5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina, 5-carbamohidroximetiluridina, 5-carbamometil-2'-O-metiluridina, 5-carbamometil-2-tiouridina, 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina, 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metiluridina, 5,2'-O-dimetiluridina, 2'-O-metiluridina, 2'-O-metil-2-tiouridina, 2-tio-2'-O-metiluridina, ácido uridin-5-oxiacético, 5-metoxycarbonilmetiluridina, éster metílico del ácido uridin-5-oxiacético, 5-metoxiuridina, 5-aminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometil-2-selenouridina, 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina, 5-taurinometil-2-tiouridina, pseudouridina, 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina, 1-metilpseudouridina, 3-metilpseudouridina, 2'-O-metilpseudouridina, 5-formiluridina, 5-aminometil-2-geraniluridina, 5-taurinometiluridina, 5-yodouridina, 5-bromouridina, 2'-metil-2'-desoxiuridina, 2'-amino-2'-desoxiuridina, 2'-azido-2'-desoxiuridina, 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, inosina, 1-metilinosina, 1,2'-O-dimetilinosina, 2'-O-metilinosina, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-l-metil-pseudouridina, 2-tio-l-metil-pseudouridina, 1-metil-l-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-l-deaza-pseudouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 1,2'-O-dimetiladenosina, 1,2'-O-dimetilguanosina, 1,2'-O-dimetilinosina, 2,8-dimetiladenosina, 2-metil-N6-isopentenil-adenosina, 2-geraniltiouridina, 2-lisidina, 2-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina cíclica, 2-metil-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metil-N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina, 2-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-selenouridina, 2-tio-2'-O-metiluridina, 2'-O-metiladenosina, 2'-O-metilcitidina, 2'-O-metilguanosina, 2'-O-metilinosina, 2'-O-metilpseudouridina, 2'-O-metiluridina, éster metílico del ácido 2'-O-metiluridina 5-oxiacético, 2'-O-ribosiladenosinafosfato, 2'-O-ribosilguanosinafosfato, 3,2'-O-dimetiluridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)-5,6-dihidrouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina, 5,2'-O-dimetilcitidina, 5,2'-O-dimetiluridina, éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)-2'-O-metiluridina, 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metiluridina, 5-aminometil-2-geraniltiouridina, 5-aminometil-2-selenouridina, 5-aminometiluridina, 5-carbamometil-2'-O-metiluridina, 5-carboxihidroximetiluridina, 5-carboximetil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-2-geraniltiouridina, 5-carboximetilaminometil-2-selenouridina, 5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina, 5-cianometiluridina, 5-formil-2'-O-metilcitidina, 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina, 5-metilaminometil-2-geraniltiouridina, 7-aminocarboxipropil-

demetilwiosina, 7-metilguanosina, 8-metiladenosina, N2,2'-O-dimetilguanosina, N2,7,2'-O-trimetilguanosina, N2,7-dimetilguanosina, N2,N2,2'-O-trimetilguanosina, N2,N2,7-trimetilguanosina, N2,N2,7-trimetilguanosina, N4,2'-O-dimetilcitidina, N4,N4,2'-O-trimetilcitidina, N4,N4-dimetilcitidina, N4-acetil-2'-O-metilcitidina, N6,2'-O-dimetiladenosina, N6,N6,2'-O-trimetiladenosina, N6-formiladenosina, N6-hidroximetiladenosina, agmatidina, 2-metil N6-treonilcarbamoiladenosina cíclica, glutamil-queuosina, guanosina añadida a cualquier nucleótido, 5' terminal guanilatada, hidroxí-N6-treonilcarbamoiladenosina; lo más preferentemente pseudo-uridina, N1-metil-pseudo-uridina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, 5-yodocitidina, 5-metilcitidina, 2-tiouridina, 5-yodouridina y/o 5-metil-uridina.

Además, la expresión "nucleótido modificado" comprende nucleótidos que contienen isótopos tales como deuterio. El término "isótopo" se refiere a un elemento que tiene el mismo número de protones pero diferente número de neutrones, lo que da como resultado diferentes números de masa. Por lo tanto, los isótopos de hidrógeno, por ejemplo, no se limitan al deuterio, sino que también incluyen tritio. Además, la molécula de ARNm también puede contener isótopos de otros elementos que incluyen, por ejemplo, carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo. También es posible que los nucleótidos modificados estén deuterados o contengan otro isótopo de hidrógeno o de oxígeno, carbono, nitrógeno o fósforo.

Por lo tanto, en el caso de que las moléculas de ARNm que se purifiquen se produzcan por medio de transcripción *in vitro* en presencia de cuatro tipos de nucleótidos, es decir, nucleótidos A, C, G y U, el número total de tipos de nucleótidos modificados puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, al menos un nucleótido de un tipo de nucleótido, por ejemplo, al menos un nucleótido U, puede ser un nucleótido modificado. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de un total de dos tipos de nucleótidos, por ejemplo, al menos un nucleótido U y al menos un nucleótido C, puede ser un nucleótido modificado. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de un total de tres tipos de nucleótidos, por ejemplo, al menos un nucleótido G, al menos un nucleótido U y al menos un nucleótido C, puede ser un nucleótido modificado. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de los cuatro tipos de nucleótidos puede ser un nucleótido modificado. En todas estas realizaciones se pueden modificar uno o más nucleótidos por tipo de nucleótido, siendo el porcentaje de dichos nucleótidos modificados por tipo de nucleótido 0 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 100 %.

En algunas realizaciones, el porcentaje total de nucleótidos modificados comprendidos en las moléculas de ARNm que se han de purificar es 0 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 100 %.

Las moléculas de ARNm que se han de purificar se pueden caracterizar, por ejemplo, porque se modifican del 0,5 al 50 %, preferentemente del 5 al 50 % de los nucleótidos U y del 5 al 50 % de los nucleótidos C. Dichos nucleótidos U modificados preferentemente son 5-yoduridina y dichos nucleótidos C modificados preferentemente son 5-yodocitidina.

En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm que se han de purificar se pueden caracterizar porque del 15 al 25 % de los nucleótidos U y del 5 al 15 % de los nucleótidos C están modificados, en donde dichos nucleótidos U modificados preferentemente son 5-metiluridina y dichos nucleótidos C modificados preferentemente son 5-yodocitidina.

En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm que se han de purificar se pueden caracterizar porque del 30 al 50 % de los nucleótidos U y del 10 al 20 % de los nucleótidos C están modificados, en donde dichos nucleótidos U modificados preferentemente son 5-yoduridina y dichos nucleótidos C modificados preferentemente son 5-yodocitidina.

En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm que se han de purificar se pueden caracterizar porque del 30 al 50 % de los nucleótidos U y del 5 al 15 % de los nucleótidos C están modificados, en donde dichos nucleótidos U modificados preferentemente son 5-yoduridina y dichos nucleótidos C modificados preferentemente son 5-yodocitidina.

En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm que se han de purificar se pueden caracterizar porque del 0,5 al 5 % de los nucleótidos U y del 25 al 35 % de los nucleótidos C están modificados, en donde dichos nucleótidos U modificados preferentemente son 2-tiouridina y dichos nucleótidos C modificados preferentemente son 5-metilcitidina.

Las moléculas de ARNm que se han de purificar también se pueden caracterizar, por ejemplo, porque del 50 al 100 %, preferentemente el 100 %, de los nucleótidos U están modificados. Dichos nucleótidos U modificados preferentemente son N1-metil-pseudo-uridina.

En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento comprende antes de la etapa (la) una etapa de obtención de una suspensión que comprende moléculas de ARNm precipitadas utilizando acetato de amonio. La precipitación de moléculas de ARNm es ventajosa para la eliminación de sales, nucleótidos y proteínas, en especial porque la precipitación de ARNm es fácil y rentable. Aquellos con experiencia en la materia conocen diferentes soluciones para la precipitación que comprenden, por ejemplo, GSCN, NH₄OAc, etanol, cloruro de litio, acetato de

sodio y cloruro de sodio. Sin embargo, en especial para aplicaciones terapéuticas, es muy ventajoso evitar sales como GSCN y LDS. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de ARNm se precipitan utilizando NH_4OAc . Por lo tanto, la suspensión usada en la etapa (1a) preferentemente se obtiene utilizando NH_4OAc para la precipitación de las moléculas de ARNm.

De acuerdo con lo indicado con anterioridad, en algunas realizaciones de la presente invención, la primera solución contiene acetato de amonio. Preferentemente, la cantidad total de NH_4OAc en la suspensión y la primera solución está entre 0,1 mol/l y 5 mol/l, preferentemente entre 1 mol/l y 4 mol/l, más preferentemente entre 2 mol/l y 3 mol/l, y por lo tanto menos de 5 mol/l, preferentemente menos de 4 mol/l, más preferentemente menos de 3 mol/l. La baja cantidad de acetato de amonio es muy ventajosa en vista de un procesamiento posterior eficaz en tiempo y coste. La primera solución puede tener además un pH en el intervalo de 1 a 12, preferentemente entre 6,5 y 7,5.

En algunas realizaciones de la presente invención, la primera solución contiene acetato de amonio, en donde la cantidad total de NH_4OAc en la suspensión y la primera solución está entre 1 mol/l y 4 mol/l, preferentemente entre 2 mol/l y 3 mol/l.

En algunas realizaciones de la presente invención, la primera solución tiene un pH en el intervalo de 1 a 12, preferentemente entre 6,5 y 7,5, y contiene acetato de amonio, en donde la cantidad total de NH_4OAc en la suspensión y la primera solución está entre 1 mol/l y 4 mol/l, preferentemente entre 2 mol/l y 3 mol/l.

En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm además comprende la adición de una quinta solución a las moléculas de ARNm disueltas obtenidas en la etapa (1b) antes de la purificación de las moléculas de ARNm utilizando una tercera solución que comprende un agente quelante de acuerdo con la etapa (1a). La quinta solución preferentemente comprende el mismo agente quelante que la tercera solución. Por lo tanto, la quinta solución preferentemente comprende EDTA como agente quelante para la eliminación de cationes en especial divalentes tales como cationes de magnesio, y de manera opcional tampón de MOPS. Sin embargo, la concentración del agente quelante comprendida en la quinta solución preferentemente es mayor que la concentración del agente quelante comprendida en la tercera solución. Por medio de la adición de la quinta solución a las moléculas de ARNm disueltas obtenidas en la etapa (1b) antes de llevar a cabo la etapa (1a), la composición de la solución en donde se suspenden las moléculas de ARNm obtenidas en la etapa (1b) se puede ajustar a la composición de la tercera solución usada en la etapa (1a). Esto tiene la ventaja de que se pueden reducir los efectos de dilución potenciales y, por lo tanto, se puede aumentar el rendimiento y/o la reproducibilidad de la purificación de la molécula de ARNm de acuerdo con el procedimiento divulgado en la presente memoria.

En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm además comprende la desfosforilación y/o la poliadenilación y/o la colocación de la caperuza posterior de las moléculas de ARNm. Por lo tanto, las moléculas de ARNm no solo se pueden purificar utilizando el procedimiento de la presente invención, sino que además se pueden modificar para garantizar su capacidad para traducirse en secuencias funcionales de aminoácidos tales como proteínas. Dichas modificaciones comprenden la desfosforilación de las moléculas de ARNm para eliminar, por ejemplo, los mono, di y/o trifosfatos 5' que se añaden durante la síntesis o transcripción *in vitro* de las moléculas de ARNm y/o durante la colocación de la caperuza de 5' cotranscripcional; la poliadenilación de las moléculas de ARNm como la cola de poli(A) es un determinante principal del tiempo de vida de una molécula de ARNm en la mayoría de los casos; y la colocación de la caperuza posterior de moléculas de ARNm en el caso de que no se lleve a cabo la colocación de la caperuza cotranscripcional de 5'. Como en especial las caperuzas de 5' y las colas de poli(A) de 3' se consideran los principales determinantes de la eficiencia del ARNm, la incorporación de tales características en un procedimiento de purificación de moléculas de ARNm es ventajosa en vista de la maximización del tiempo y la rentabilidad del procesamiento de la molécula de ARNm y la maximización de la duración de acción de las moléculas de ARNm purificadas.

La presencia de una caperuza de 5' es ventajosa para la mejora de la estabilidad de las moléculas de ARNm y, por lo tanto, para la prolongación de la duración de la acción de las moléculas de ARNm.

Por lo tanto, en el caso de que las moléculas de ARNm precipitadas que se han de purificar no comprendan una caperuza de 5' o un análogo de caperuza de 5', en las moléculas de ARNm preferentemente se coloca la caperuza postranscripcionalmente en 5', por ejemplo, por medio de la adición enzimática de una caperuza de C1-m7G o una caperuza de m7GpppG. Sin embargo, más preferentemente, en las moléculas de ARNm se coloca la caperuza en 5' cotranscripcionalmente, por ejemplo, utilizando un análogo de caperuza ARCA o por medio de la aplicación de tecnología Trilink (tecnología CleanCap; compárese el documento US 2018/273576 A1). En este caso, el uso del procedimiento de TFF de acuerdo con la presente invención es ventajoso para la eliminación del análogo de caperuza limpia.

Además, en el caso de que las moléculas de ARNm precipitadas que se han de purificar no comprendan una cola de poli(A) de 3', las moléculas de ARNm se poliadenilan de manera enzimática preferentemente con una cola de poli(A) que consiste en al menos 100 nucleótidos A, preferentemente en al menos 120 nucleótidos A, más preferentemente en al menos 240 nucleótidos A. De manera opcional, la cola de poli(A) que se añadirá comprende nucleótidos que no son A, preferentemente nucleótidos G dentro de la secuencia de la cola de poli(A) y/o en un extremo de la cola de

poli(A), en donde dicho extremo no se debe añadir al extremo 3' de las moléculas de ARNm que se han de purificar. Se ha descubierto que la adición de una cola de poli(A) a las moléculas de ARNm es ventajosa para la prolongación de la duración de la acción de dicha molécula de ARNm y, por lo tanto, para la obtención de los niveles de traducción deseados.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención además comprende la desfosforilación de las moléculas de ARNm.

En otras realizaciones de la presente invención, el procedimiento además comprende la poliadenilación de las moléculas de ARNm.

En otras realizaciones más de la presente invención, el procedimiento además comprende la colocación de la caperuza posterior de las moléculas de ARNm.

En algunas realizaciones, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención comprende al menos la desfosforilación y la poliadenilación de las moléculas de ARNm.

En algunas realizaciones, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención comprende al menos la desfosforilación y la colocación de la caperuza posterior de las moléculas de ARNm, en donde la desfosforilación de las moléculas de ARNm se lleva a cabo después de la colocación de la caperuza posterior de las moléculas de ARNm.

En algunas realizaciones de la presente invención, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm comprende la desfosforilación de las moléculas de ARNm obtenidas de la etapa (Ib), seguido de la realización de las etapas (Ia) a (IIb), seguido de la poliadenilación de las moléculas de ARNm obtenidas, seguido de la realización repetida de las etapas (Ia) a (IIb), en donde la última etapa (Ia) preferentemente se lleva a cabo a una temperatura entre 20 °C y 30 °C, preferentemente entre 23 °C y 27 °C, más preferentemente a 25 °C, seguido de manera opcional por la filtración del retenido obtenido que comprende las moléculas de ARNm. Por lo tanto, para la maximización de la eficiencia del coste y el tiempo del procesamiento de moléculas de ARNm, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm además comprende las etapas de la desfosforilación y la poliadenilación de las moléculas de ARNm. En particular, se ha encontrado que es ventajoso incorporar los dos últimas etapas junto con etapas adicionales para la purificación de las moléculas de ARNm para eliminar también los componentes introducidos durante la desfosforilación y la poliadenilación.

Por lo tanto, en especial en el caso de que las moléculas de ARNm que se han de purificar comprendan una caperuza de 5' o un análogo de caperuza de 5' añadido cotranscripcionalmente, el procedimiento de purificación de las moléculas de ARNm puede comprender las siguientes etapas. En primer lugar, las moléculas de ARNm precipitadas se purifican a partir de una suspensión que comprende dichas moléculas de ARNm precipitadas utilizando una primera solución en la etapa (Ia), dicha primera solución preferentemente comprende acetato de amonio. Las moléculas de ARNm precipitadas purificadas se lavan luego en la etapa (Ib) y se disuelven utilizando una segunda solución, preferentemente agua, para la eliminación de, por ejemplo, proteínas, sales y nucleósidos trifosfatos. A continuación, las moléculas de ARNm disueltas se desfosforilan por medio de procedimientos conocidos por aquéllos con experiencia en la técnica para la eliminación de mono-, di- y trifosfatos 5' de moléculas de ARN que podrían no haber estado con caperuza. Las moléculas de ARNm desfosforilado se purifican con la primera solución, que preferentemente comprende acetato de amonio, en una etapa adicional (Ia) y posteriormente se lavan con la segunda solución, que preferentemente es agua, en una etapa adicional (Ib). Las moléculas de ARNm obtenidas de este modo se purifican de manera adicional en la etapa (IIa) utilizando una tercera solución que comprende un agente quelante, como se ha definido anteriormente, preferentemente EDTA, y preferentemente MOPS a un pH entre 0 y 8, más preferentemente a un pH entre 6,5 y 7,5, para la eliminación de moléculas de ARNm fallidas y productos de hidrólisis. A continuación, la tercera solución se elimina por medio de la realización de una etapa de lavado en la etapa (IIb) utilizando una cuarta solución. Si no se requiere una etapa de poliadenilación, por ejemplo, porque se usó una plantilla de ADN que comprende una secuencia que codifica una cola de poli(A) para la transcripción *in vitro*, las moléculas de ARNm purificadas obtenidas se lavan en la etapa (IIb) utilizando una cuarta solución, que preferentemente comprende citrato y/o cloruro de sodio, y dicha etapa (IIb) es seguido de manera opcional por una etapa de filtración adicional utilizando, por ejemplo, una membrana de filtro con un tamaño de poro de menos de 0,3 µm. En el caso de que una etapa de poliadenilación sea ventajoso, por ejemplo, porque se usó una plantilla de ADN que no comprende una secuencia que codifica una cola de poli(A) para la transcripción *in vitro*, las moléculas de ARNm purificadas obtenidas se lavan en la etapa (IIb) utilizando una cuarta solución, preferentemente agua, y luego se puede alargar por medio de la adición enzimática de una cola de poli(A) de 3' utilizando protocolos de laboratorio de rutina para garantizar la prolongación de la acción de las moléculas de ARNm, por ejemplo, por medio de la adición de poli(A) polimerasa. A continuación, las moléculas de ARNm se someten a las etapas (Ia) a (IIb) de acuerdo con lo descrito con anterioridad, excepto que la etapa (Ia) preferentemente se lleva a cabo a una temperatura entre 20 °C y 30 °C, preferentemente entre 23 °C y 27 °C, más preferentemente a 25 °C, por ejemplo, para la eliminación de la poli(A) polimerasa añadida, y excepto que la cuarta solución usada en la etapa (IIb) preferentemente comprende citrato y/o cloruro de sodio, para obtener moléculas de ARNm purificadas que comprenden caperuzas de 5' o análogos de caperuza de 5' y colas de poli(A) de 3'. De manera opcional, las moléculas de ARNm purificadas obtenidas se pueden someter a una etapa de

filtración adicional utilizando, por ejemplo, una membrana de filtro con un tamaño de poro de menos de 0,3 μm .

En el caso de que las moléculas de ARNm que se han de purificar no comprendan una caperuza de 5' o un análogo de caperuza de 5' cotranscripcionalmente añadido, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa adicional de, preferentemente de manera enzimática, la adición después de la transcripción de una caperuza de 5' o un análogo de caperuza de 5' en comparación con el procedimiento descrito con anterioridad. Por lo tanto, el procedimiento de purificación de las moléculas de ARNm puede comprender las siguientes etapas. Primero, las moléculas de ARNm precipitadas se purifican a partir de una suspensión que comprende dichas moléculas de ARNm precipitadas utilizando una primera solución en la etapa (Ia), preferentemente dicha primera solución comprende acetato de amonio. Las moléculas de ARNm precipitadas purificadas se lavan luego en la etapa (Ib) y se disuelven utilizando una segunda solución, preferentemente agua, para la eliminación de, por ejemplo, proteínas, sales y nucleósidos trifosfatos. A continuación, el procedimiento además comprende la colocación de la caperuza de las moléculas de ARNm obtenidas en la etapa (Ib) seguido de la realización de las etapas (Ia) y (Ib), la desfosforilación de las moléculas de ARNm obtenidas, seguido de la realización de las etapas (Ia) a (IIb). Si no se requiere una etapa de poliadenilación, por ejemplo, porque se usó una plantilla de ADN que comprende una secuencia que codifica una cola de poli(A) para la transcripción *in vitro*, las moléculas de ARNm purificadas obtenidas se lavan en la etapa (IIb) utilizando una cuarta solución, que preferentemente comprende citrato y/o cloruro de sodio, y dicha etapa (IIb) es seguido de manera opcional por una etapa de filtración adicional utilizando, por ejemplo, una membrana de filtro con un tamaño de poro de menos de 0,3 μm . En el caso de que una etapa de poliadenilación sea ventajoso, por ejemplo, porque se usó una plantilla de ADN que no comprende una secuencia que codifica una cola de poli(A) para la transcripción *in vitro*, las moléculas de ARNm purificadas obtenidas se lavan en la etapa (IIb) utilizando una cuarta solución, preferentemente agua, y luego se puede alargar por medio de la adición enzimática de una cola de poli(A) de 3' utilizando protocolos de laboratorio de rutina para garantizar la prolongación de la acción de las moléculas de ARNm, por ejemplo, por medio de la adición de poli(A) polimerasa. A continuación, las moléculas de ARNm se someten a las etapas (Ia) a (IIb), en donde la etapa (Ia) preferentemente se lleva a cabo a una temperatura entre 20 °C y 30 °C, preferentemente entre 23 °C y 27 °C, más preferentemente a 25 °C, por ejemplo, para la eliminación de la poli(A) polimerasa añadida, y en donde la etapa (IIb) se lleva a cabo utilizando una cuarta solución que preferentemente comprende citrato y/o cloruro de sodio, seguido de manera opcional por la filtración del retenido obtenido que comprende las moléculas de ARNm.

Por lo tanto, las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo preferentemente antes de llevar a cabo cualquier alargamiento de moléculas de ARNm tal como la poliadenilación de 3' y de manera opcional la colocación de la caperuza en 5'. En particular, las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo preferentemente antes de la poliadenilación de 3' de moléculas de ARNm, y las etapas (Ia) a (Ib) se llevan a cabo preferentemente antes de la colocación de la caperuza de 5'. Esto se aplica en las cuatro realizaciones descritas con anterioridad, es decir, para la purificación de moléculas de ARNm en las que se coloca la caperuza cotranscripcional y postranscripcionalmente en 5', respectivamente.

Además, en las cuatro realizaciones descritas con anterioridad, las etapas de desfosforilación de las moléculas de ARNm seguidos por la realización de las etapas (Ia) y (Ib) pueden ser opcionales. Por lo tanto, algunas realizaciones corresponden a las cuatro realizaciones descritas con anterioridad, excepto las etapas de desfosforilación de las moléculas de ARNm seguidos por la realización de las etapas (Ia) y (Ib).

Una TFF se puede llevar a cabo por el uso como dispositivo de filtro de una cápsula, un casete y un soporte de casete, o un módulo de fibra hueca. En especial, los módulos de fibra hueca permiten rutas de flujo desechables, preesterilizadas y completamente preensambladas que permiten el procesamiento estéril y proporcionan un procedimiento rentable para envasar membranas de filtro.

Las membranas de filtro usadas para la purificación de moléculas de ARNm pueden ser de cualquier tipo de materiales adecuados para la purificación de moléculas de ARNm y, por lo tanto, no interactúan con las moléculas de ARNm que se han de purificar. Los ejemplos de materiales de membranas de filtro incluyen polietersulfona no modificada (PES), polietersulfona modificada (mPES), membrana de fibra hueca de mPES, fluoruro de polivinilideno (PVDF), acetato de celulosa, nitrocelulosa, éster de celulosa mixto (ME), polietileno de MW ultra alto (UPE), polifluorotetraetileno (PTFE), nailon, polisulfona (PS), poliacrilonitrilo, polipropileno, cloruro de polivinilo, difluoruro de polivinilideno (PVDF) y combinaciones de los mismos.

Las membranas de filtro se caracterizan por su valor de punto de corte de peso molecular (MWCO), que se refiere al peso molecular más bajo de partículas en Da, de los cuales el 90 % son retenidos por la membrana. Preferentemente, una membrana de filtro tiene un tamaño de poro que es apropiado para retener moléculas de ARNm mientras permite componentes de tamaño más pequeño que el MWCO y, por lo tanto, el tamaño de los poros, para pasar a través de la membrana de filtro como permeado. Como se deben eliminar diferentes componentes de diferentes tamaños, es ventajoso ajustar el tamaño de los poros de la membrana de filtro al tamaño de los componentes a eliminar en la etapa respectivo del procedimiento de acuerdo con la presente invención.

En algunas realizaciones de la presente invención, en el caso de la etapa (Ia) se usa una membrana de filtro con un punto de corte de peso molecular de entre 300 kDa y 0,65 μm para la TFF, preferentemente de 500 kDa, y/o en el caso de las etapas (Ib) y (IIb) se usa una membrana de filtro con un punto de corte de peso molecular de entre 1 kDa

y 0,65 µm, preferentemente entre 1 kDa y 300 kDa, más preferentemente entre 1 kDa y 50 kDa, incluso más preferentemente de 50 kDa, 70 kDa, y/o 100 kDa, y/o en el caso de la etapa (IIa) se usa una membrana de filtro con un punto de corte de peso molecular de al menos 50 kDa, preferentemente de al menos 70 kDa, más preferentemente de 70 kDa o 100 kDa. La membrana de filtro usada en la TFF es crucial dado que el tamaño de los poros de la membrana de filtro determina el tamaño de las partículas, tales como las moléculas de ARNm y los componentes que pueden atravesar la membrana de filtro y, por lo tanto, están incluidos en el permeado.

Por lo tanto, el MWCO de la membrana de filtro preferentemente es de al menos 300 kDa o 0,065 µm en el caso de la etapa (Ia). Preferentemente, el MWCO se selecciona del grupo que consiste en 300 kDa, 500 kDa, 750 kDa, 0,05 µm, 0,1 µm, 0,2 µm, 0,45 µm, 0,5 µm, 0,65 µm, siendo en particular preferido un MWCO de 500 kDa. Esto es ventajoso para la retención de moléculas de ARNm precipitadas mientras se eliminan, por ejemplo, enzimas y proteínas contenidas en células que se lisaron para obtener moléculas de ARNm que se han de purificar o, en el caso de moléculas de ARNm transcritas *in vitro*, enzimas, nucleosidtrifosfatos modificados y no modificados, caperuzas de 5', análogos de caperuza de 5' y componentes de tampón comprendidos en mezclas de reacción de transcripción *in vitro*. Por lo tanto, el valor de MWCO apropiado se puede elegir por medio de la consideración de, por ejemplo, el tamaño de las enzimas que se usaron en las etapas de preprocesamiento, tales como la transcripción *in vitro* de las moléculas de ARNm que se han de purificar, y que se eliminarán por medio de TFF en la etapa (I a). La T7RNA polimerasa es una enzima muy conocida en la técnica que no se eliminará de manera eficaz en el caso de usar una membrana de filtro que tenga un MWCO de menos de 100 kDa. Cuando se aplica en la etapa (Ia) un MWCO en el intervalo de 1 kDa a 750 kDa, la TFF se puede denominar como ultrafiltración, mientras que en el caso de la aplicación de un MWCO en el intervalo de 0,05 µm a 0,65 µm, la TFF se puede denominar como microfiltración.

En el caso de las etapas (Ib) y (IIb), el MWCO preferentemente es al menos 1 kDa, preferentemente entre 1 kDa y 50 kDa, más preferentemente al menos 50 kDa, e incluso más preferentemente al menos 70 kDa. Preferentemente, el MWCO se selecciona del grupo que consiste en 1 kDa, 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa, 70 kDa, 100 kDa, 300 kDa, 0,05 µm, 0,1 µm, 0,2 µm, 0,45 µm, 0,5 µm, y 0,65 µm, siendo en particular preferido un MWCO de 50 kDa, 70 kDa o 100 kDa. Esto es ventajoso para la purificación de las moléculas de ARNm mientras se eliminan de manera eficaz las sales y otros componentes comprendidos en la solución respectiva tal como acetato de amonio, agentes quelantes tales como EDTA, tampón tales como MOPS, moléculas de ARNm fallidas y/o productos de hidrólisis. En el caso de moléculas de ARNm comparativamente grandes, también se podría considerar un MWCO de más de 300 kDa.

En el caso de la etapa (IIa), el MWCO preferentemente es al menos 50 kDa, más preferentemente al menos 70 kDa, incluso más preferentemente 70 kDa o 100 kDa. Cuando se usa, por ejemplo, un tampón de MOPS-EDTA de acuerdo con lo descrito con anterioridad, se prefiere en particular un MWCO de 100 kDa. En el caso de que se apliquen otros agentes quelantes potentes u otras combinaciones potentes de agente quelante-tampón, incluso se puede considerar el MWCO con 100 kDa y más para la purificación de moléculas de ARNm comparativamente grandes.

Además, los procesos que usan TFF se pueden caracterizar en función de diferentes variables, las dos más importantes son la presión transmembrana y el caudal.

La "presión transmembrana" (TMP) se refiere a la fuerza impulsora que impulsa los componentes a través de la membrana de filtro. En algunas realizaciones, la presión transmembrana está en el caso de las etapas (Ia) y (Ib), por ejemplo, en una escala de laboratorio de 500 mg de ARNm en el caso típico, entre 10 kPa (100 mbar) y 50 kPa (500 mbar), preferentemente entre 20 kPa (200 mbar) y 40 kPa (400 mbar), y en el caso de las etapas (IIa) y (IIb) entre 0,2 kPa (2 mbar) y 2 kPa (20 mbar), preferentemente entre 0,5 kPa (5 mbar) y 1,5 kPa (15 mbar).

El término "flujo" se refiere al volumen de solución que fluye a través de un sistema de TFF y en especial en el área de la membrana de filtro con un "caudal" que se refiere al volumen de solución que fluye a través de dicho sistema durante un tiempo determinado. Por lo tanto, el caudal o la velocidad de flujo cruzado se refieren a la tasa de flujo de una solución a través de la membrana de filtro. En algunas realizaciones, el caudal en el caso de las etapas (Ia) y (Ib) está, por ejemplo, en una escala de laboratorio de 500 mg de ARNm en el caso típico, entre 1,5 l/min y 2,5 l/min, preferentemente entre 1,6 l/min y 1,9 l/min, y en el caso de las etapas (IIa) y (IIb) entre 0,2 l/min y 0,6 l/min, preferentemente entre 0,35 l/min y 0,45 l/min.

En realizaciones en particular preferidas de la presente invención, el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm se lleva a cabo utilizando TFF continua. La TFF continua se refiere a un sistema de TFF en donde el retenido se usa como aporte para otra serie de TFF. En la presente memoria, el término "aporte" se refiere a una solución o una suspensión que comprende las moléculas de ARNm que se han de purificar. Por lo tanto, el aporte inicial que comprende las moléculas de ARNm y se somete a una primera serie de filtración utilizando TFF, y el retenido obtenido que comprende las moléculas de ARNm se usa de nuevo como aporte para otra serie de TFF por medio de la circulación de al menos las moléculas de ARNm. Esto es ventajoso para la mejora del nivel de purificación debido a las etapas repetidos de purificación de forma automatizada mientras se reduce el riesgo de perder moléculas de ARNm debido a una transferencia entre sistemas.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de ARNm están comprendidas en un

retenido después de la filtración de flujo tangencial, preferentemente al menos en un retenido obtenido por medio de las etapas (Ia) a (IIa). En el caso de la etapa (IIb), las moléculas de ARNm pueden estar comprendidas en un retenido o un permeado.

- 5 En algunas realizaciones, las moléculas de ARNm están comprendidas en el retenido obtenido por las etapas (Ia) a la etapa (IIb).

10 En algunas realizaciones de la presente invención, el retenido obtenido en la etapa (Ia) se usa como solución de aporte para la filtración de flujo tangencial en la etapa (Ib), el retenido obtenido en la etapa (Ib) se usa como solución de aporte en la etapa (IIa), y el retenido obtenido de la etapa (IIa) se usa como solución de aporte en la etapa (IIb). Por lo tanto, la presente invención preferentemente se lleva a cabo utilizando TFF continua para llevar a cabo al menos las etapas (Ia) a (IIb). De manera más específica, las moléculas de ARNm preferentemente están circulando en un sistema de TFF continua para purificación de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, en una realización de la presente invención al menos las etapas (Ia) a (IIa), preferentemente las etapas (Ia) a (IIb), se llevan a cabo utilizando TFF continua.

15 Una ventaja adicional de un sistema de TFF es que se puede usar con facilidad para diafiltración y en especial para diafiltración continua. Por medio de diafiltración, las partes de una solución o suspensión se pueden intercambiar por otras. Por ejemplo, en la diafiltración discontinua, primero se diluye una solución y luego se concentra de nuevo al volumen inicial. Sin embargo, esto puede afectar negativamente a la funcionalidad de las moléculas de ARNm que se han de purificar.

20 Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la presente invención, las moléculas de ARNm que se han de purificar están circulando al menos para las etapas (Ia) a (IIb) en un sistema de TFF continua para purificación de acuerdo con el procedimiento descrito con anterioridad utilizando diafiltración de volumen constante. La diafiltración de volumen constante o continuo se refiere a un proceso de filtración, en donde se retiene un volumen constante en el sistema de filtración. Por lo tanto, se añade la misma cantidad de solución o suspensión que el volumen de solución o suspensión que pasa por la membrana de filtro como permeado. Por lo tanto, el volumen del retenido es el mismo que el volumen que se alimenta inicialmente al sistema de TFF, es decir, el volumen del aporte, y el volumen de lavado, es decir, el volumen de diafiltración, es el mismo volumen que el volumen de permeado. La combinación de TFF continua y diafiltración continua es ventajosa para la eliminación de contaminantes como permeado mientras se mantienen las moléculas de ARNm que se han de purificar en la parte circulante del sistema de TFF a volumen constante para la preservación de su función.

- 25 Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, al menos las etapas (Ia) a (IIa), preferentemente las etapas (Ia) a (IIb), se llevan a cabo utilizando diafiltración, preferentemente diafiltración continua.

30 En algunas realizaciones de la presente invención, el volumen de diafiltración de cualquiera de la primera, la segunda, la tercera y/o la cuarta solución es al menos 1 vez el volumen de suspensión de la etapa (Ia), por ejemplo, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, preferentemente al menos 10 veces. La determinación de dicho volumen de diafiltración es de especial interés en vista de una compensación óptima entre la eficiencia del tiempo y el coste y el nivel de purificación a alcanzar. Se ha encontrado que el volumen de diafiltración de cualquiera de la primera, la segunda, la tercera y/o la cuarta solución es al menos 1 vez el volumen de suspensión de la etapa (Ia), preferentemente al menos 10 veces. Esto es ventajoso para garantizar una eliminación sustancial de componentes al mismo tiempo que permite un procesamiento de alto rendimiento y, por lo tanto, la purificación de la molécula de ARNm a gran escala.

35 En algunas realizaciones, el volumen de diafiltración es 1 vez el volumen de suspensión de la etapa (Ia) y, por lo tanto, del volumen de suspensión que comprende las moléculas de ARNm precipitadas alimentadas inicialmente al sistema de TFF en la etapa (Ia).

40 En algunas realizaciones, el volumen de diafiltración es el doble del volumen de suspensión.

45 En algunas realizaciones, el volumen de diafiltración es 3 veces el volumen de suspensión.

50 En algunas realizaciones, el volumen de diafiltración es 4 veces el volumen de suspensión.

55 En algunas realizaciones, el volumen de diafiltración es 5 veces el volumen de suspensión.

60 Aún en algunas realizaciones, el volumen de diafiltración es al menos 5 veces el volumen de suspensión de la etapa (Ia).

65 En algunas realizaciones, el volumen de diafiltración es al menos 10 veces el volumen de suspensión de la etapa (Ia) y, por lo tanto, del volumen de suspensión que comprende las moléculas de ARNm precipitadas alimentadas inicialmente al sistema de TFF en la etapa (Ia). Se ha descubierto que el uso de un volumen de diafiltración de al menos 10 veces el volumen alimentado inicialmente al sistema de TFF es ventajoso para la eliminación sustancial de

los componentes destinados a la etapa respectivo de acuerdo con lo descrito con anterioridad.

Por lo tanto, se prefiere que el volumen de diafiltración de cualquiera de la primera, la segunda, la tercera y/o la cuarta solución sea al menos 10 veces el volumen de suspensión de la etapa (la). Es incluso más preferido que al menos el volumen de diafiltración de la tercera y la cuarta solución sea al menos 10 veces el volumen de suspensión de la etapa (la).

En algunas realizaciones, el volumen de diafiltración de la primera, la segunda, la tercera y la cuarta solución es al menos 10 veces el volumen de suspensión de la etapa (la).

Un sistema cerrado, totalmente automatizable para la obtención de moléculas de ARNm purificadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se muestra a modo de ejemplo en la **Figura 2**. El sistema comprende el sistema de TFF continua que se muestra en la **Figura 1** que está en conexión fluida con un sistema de producción de ARNm, preferentemente a través de una primera válvula. Es de destacar que el término "válvula" usado en la presente memoria incluye válvulas, (por ejemplo, llaves de paso de dos y/o tres vías), abrazaderas y conectores MPC; preferentemente válvulas y/o conectores MPC. Además, se prefiere que se use un conector MPC en combinación con una abrazadera. Por lo tanto, dos elementos, por ejemplo, dos tuberías, se pueden conectar de una manera que permita un solo uso y/o garantice la compatibilidad con varios sistemas, la estabilidad frente a altas presiones y/o cambios de presión, por ejemplo, en una de las tuberías y/o bajos costes.

El sistema de producción de ARNm puede comprender un recipiente de reacción y al menos un recipiente adicional. El recipiente de reacción y el al menos un recipiente adicional preferentemente están en conexión fluida entre sí y con el sistema de TFF a través de una tubería de conexión. La primera válvula es posicionada entre la tubería de conexión del sistema de producción de ARNm y una tubería del sistema de TFF, preferentemente la tubería en donde circula el aporte desde el depósito hasta el dispositivo de filtro. De manera alternativa, el sistema de producción de ARNm puede estar en conexión fluida con la tubería en donde el retenido circula desde el dispositivo de filtro hasta el depósito, o con el depósito. Es de destacar que el término "tubería" usado en la presente memoria se puede referir a una tubería, un tubo, una cañería o una combinación de los mismos. Además, la tubería de conexión del sistema de producción de ARNm puede comprender una bomba auxiliar. Una bomba auxiliar es ventajosa para ajustar de manera automática las velocidades de los líquidos transferidos a través de la tubería de conexión.

Las moléculas de ARNm que se han de purificar de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se pueden obtener, por ejemplo, por medio del cultivo de células para la amplificación de moléculas de ARNm celular o, preferentemente, por medio de transcripción *in vitro* (IVT). En el caso de que las moléculas de ARNm se obtengan a partir de células, se pueden cultivar células tales como células de *E. coli* en un fermentador en condiciones de cultivo específicas de células adecuadas para la producción de moléculas de ARNm. Los parámetros de dichas condiciones de cultivo preferentemente se regulan de manera automática, por ejemplo, por medio del suministro de cantidades respectivas de medio de cultivo, gas y/o tampón. Por lo tanto, el sistema de producción de ARNm puede comprender un recipiente de reacción y al menos un recipiente adicional, en donde el recipiente de reacción es un fermentador y el al menos un recipiente adicional comprende, por ejemplo, un medio de cultivo, gas y/o solución tampón respectivos. De manera alternativa, si las moléculas de ARNm que se han de purificar se obtienen por medio de IVT, una plantilla de IVT, por ejemplo, una plantilla de ADN respectiva para IVT de la molécula de ARNm diana que se han de purificar, y reactivos de IVT tales como una enzima para IVT, por ejemplo, una ARN polimerasa de T7, y se requiere una mezcla de NTP. Por lo tanto, el sistema de producción de ARNm puede comprender un recipiente de reacción y al menos un recipiente adicional, en donde el al menos un recipiente adicional comprende al menos uno de dichos reactivos de IVT.

Por lo tanto, el recipiente de reacción preferentemente está en conexión fluida con al menos un recipiente adicional, preferentemente al menos un primer recipiente adicional y un segundo recipiente adicional.

El primer recipiente adicional puede comprender al menos uno de dichos reactivos de IVT y preferentemente está en conexión fluida con el recipiente de reacción a través de la tubería de conexión y una segunda y una tercera válvula. La segunda válvula preferentemente está posicionada entre el recipiente de reacción y la tubería de conexión, y la tercera válvula entre la tubería de conexión y el primer recipiente adicional. Por medio del cierre de la primera válvula y la apertura de la segunda y la tercera válvula, se pueden producir moléculas de ARNm, por ejemplo, por medio de IVT, preferentemente dentro del recipiente de reacción. Por medio del cierre de la tercera válvula y la apertura de la primera y la segunda válvula, las moléculas de ARNm producidas se pueden transferir desde el sistema de producción de ARNm al sistema de TFF.

El segundo recipiente adicional puede comprender una solución para la precipitación de moléculas de ARNm, en donde dicha solución preferentemente comprende acetato de amonio (NH_4OAc), por ejemplo, NH_4OAc 5 M. Preferentemente, el segundo recipiente adicional está en conexión fluida con la tubería de conexión a través de una cuarta válvula. Por medio de la apertura de la segunda y la cuarta válvula y el cierre de la primera y la tercera válvula, las moléculas diana se pueden precipitar, preferentemente en el recipiente de reacción o, en el caso de que el recipiente de reacción sea un fermentador, en el segundo recipiente adicional. Después de la apertura de la primera válvula, las moléculas de ARNm precipitadas en suspensión se pueden transferir desde el sistema de producción de

ARNm al sistema de TFF para la purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Por lo tanto, el sistema mostrado en la **Figura 2** comprende un sistema de TFF, preferentemente un sistema de diafiltración continuo, con un depósito. Preferentemente, el depósito está en conexión fluida con al menos tres recipientes adicionales, es decir, al menos un tercer recipiente adicional, un cuarto recipiente adicional y un quinto recipiente adicional, a través de al menos una quinta, una sexta y una séptima válvula, respectivamente. El tercer recipiente adicional puede comprender la primera solución, el cuarto recipiente adicional la segunda solución, y el quinto recipiente adicional la tercera solución de acuerdo con la presente invención. Si la segunda y la cuarta solución difieren entre sí, el depósito preferentemente está en conexión fluida con un sexto recipiente adicional que comprende la cuarta solución, por ejemplo, a través de una octava válvula. Por lo tanto, se prefiere que el tercer recipiente adicional comprenda la primera solución, en donde la primera solución comprenda NH_4OAc , por ejemplo, NH_4OAc 2,5 M, para la purificación de moléculas de ARNm precipitadas, el cuarto recipiente adicional es agua, por ejemplo, agua para inyección (WFI) como segunda solución, el quinto recipiente adicional es la tercera solución, en donde la tercera solución comprende EDTA como agente quelante y de manera opcional MOPS. En el caso de que la cuarta solución no sea agua, el sexto recipiente adicional preferentemente comprende cloruro y/o citrato de sodio. Además, podría estar presente una bomba auxiliar para el ajuste automático de las velocidades de los líquidos transferidos desde cualquiera de dichos al menos tres recipientes adicionales al depósito.

Por lo tanto, el depósito preferentemente comprende moléculas de ARNm precipitadas en suspensión que se han transferido desde el sistema de producción de ARNm a través de la primera válvula por medio de la apertura de la primera válvula durante un período de tiempo predeterminado. Por medio de la apertura de la quinta válvula durante un período de tiempo predeterminado, la primera solución se puede añadir a las moléculas de ARNm precipitadas en suspensión y la mezcla luego se puede transferir durante al menos una serie de TFF continua al dispositivo de filtro, en donde la membrana de filtro preferentemente tiene un punto de corte de peso molecular de entre 300 kDa y 0,65 μm . Por lo tanto, la suspensión que comprende las moléculas de ARNm precipitadas se puede purificar, por ejemplo, a partir de componentes de mezclas de IVT tales como proteínas, sales y/o NTP de acuerdo con la etapa (Ia) del procedimiento divulgado en la presente memoria. La suspensión que comprende las moléculas de ARNm precipitadas purificadas preferentemente se transfiere de nuevo al depósito como retenido. Para la realización de la etapa (Ib) y, por lo tanto, para el lavado y la disolución de las moléculas de ARNm precipitadas purificadas obtenidas en la etapa (Ia), se abre la sexta válvula durante un período de tiempo predeterminado. Por lo tanto, la segunda solución se puede añadir a la suspensión que comprende las moléculas de ARNm precipitadas en el depósito. Por medio de la realización de al menos una serie de TFF continua utilizando el dispositivo de filtro, preferentemente con una membrana de filtro que tiene un punto de corte molecular entre 1 kDa y 0,65 μm , por ejemplo, se puede eliminar el NH_4OAc comprendido en la primera solución. Por medio de la apertura de la séptima válvula durante un período de tiempo predeterminado, la tercera solución se puede añadir a las moléculas de ARNm lavadas y disueltas en el depósito. Por medio de la realización de al menos una serie de TFF continua utilizando el dispositivo de filtro, en donde la membrana de filtro preferentemente tiene un punto de corte de peso molecular de 50 kDa, más preferentemente de 100 kDa, las moléculas de ARNm fallidas y los productos de hidrólisis de moléculas de ARNm se pueden eliminar de manera eficaz de acuerdo con la etapa (IIa) del procedimiento divulgado en la presente memoria. Para el lavado de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas en la etapa (IIa), por ejemplo, por medio de la eliminación de componentes de la tercera solución, se puede llevar a cabo la etapa (IIb). Por lo tanto, la sexta o la octava válvula se abre durante un período de tiempo predeterminado para la adición de agua o la cuarta solución que comprende cloruro y/o citrato de sodio a las moléculas de ARNm purificadas durante al menos una serie de TFF continua utilizando el dispositivo de filtro que comprende una membrana de filtro, preferentemente con un punto de corte de peso molecular de 50 kDa.

De manera opcional, se lleva a cabo una etapa adicional entre la etapa (Ib) y (IIa). Por lo tanto, el sistema de TFF además puede comprender un séptimo recipiente adicional que está en conexión fluida, por ejemplo, con el depósito, preferentemente a través de una novena válvula. Dicho séptimo recipiente adicional puede comprender la quinta solución, en donde la quinta solución preferentemente comprende al menos el agente quelante de la tercera solución, preferentemente EDTA, en una concentración más alta que dicha tercera solución. Por medio de la apertura de la novena válvula durante un período de tiempo predeterminado después de la realización de la etapa (Ib), la quinta solución se puede añadir a las moléculas de ARNm disueltas en la segunda solución. Esto tiene la ventaja de que el rendimiento y la reproducibilidad del procedimiento de la invención se pueden aumentar por medio de la reducción del tiempo que se requiere para el ajuste de la concentración de al menos el agente quelante en el sistema de TFF a la concentración respectiva de acuerdo con lo especificado en la presente memoria para la tercera solución. Además, podría estar presente una bomba auxiliar para el ajuste automático de las velocidades de los líquidos transferidos desde el séptimo recipiente adicional al depósito (no mostrado).

De manera opcional, el sistema de producción de moléculas de ARNm además puede comprender un recipiente intermedio, preferentemente en conexión fluida con la tubería de conexión del sistema de producción de moléculas de ARNm, preferentemente a través de una válvula intermedia. El recipiente intermedio puede ser una bolsa, preferentemente estéril. Por medio de la apertura de la primera válvula y la válvula intermedia durante un período de tiempo predeterminado, al menos una fracción de la suspensión o la solución que comprende las moléculas de ARNm se puede transferir desde el sistema de TFF al sistema de producción de moléculas de ARNm y/o desde el sistema de producción de moléculas de ARNm al sistema de TFF. Esto puede resultar ventajoso para el almacenamiento de

al menos una fracción de dicha suspensión o solución, preferentemente durante un período de tiempo predeterminado. Por lo tanto, al menos dicha fracción de dicha suspensión o solución se puede objetar a una serie adicional de purificación, por ejemplo, las etapas (Ia) y (Ib), las etapas (IIa) y (IIb) y/o una combinación de las mismas. Además, durante el almacenamiento de al menos una fracción de la suspensión o solución en el recipiente intermedio, el sistema de TFF y/o el sistema de producción de moléculas de ARNm se pueden limpiar, lavar con agua y/o tampón y/o esterilizar. De manera opcional o alternativa, el recipiente intermedio se puede usar para la obtención de al menos una fracción de la solución o suspensión comprendida en el recipiente intermedio, preferentemente la solución o la suspensión que comprende las moléculas de ARNm purificadas. De manera opcional, el sistema además puede comprender un filtro para una etapa de filtración adicional (no representado). Dicho filtro puede comprender una membrana de filtro con un tamaño de poro de menos de 0,3 μm , por ejemplo de 0,22 μm , para una etapa de filtración final y, por lo tanto, puede ser útil para una filtración final de la suspensión que comprende las moléculas de ARNm purificadas obtenidas del recipiente intermedio.

Podría ser ventajoso modificar las moléculas de ARNm que se han de purificar, por ejemplo, por medio de la desfosforilación y la adición de una caperuza de 5' y/o una cola de poli(A) de 3'. En particular, las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo preferentemente al menos una vez antes de la poliadenilación de 3' de moléculas de ARNm, y las etapas (Ia) a (Ib) se llevan a cabo preferentemente al menos una vez antes de la colocación de la caperuza en 5'. De manera opcional, las moléculas de ARNm obtenidas se pueden desfosforilar después de al menos una primera etapa (Ia) y al menos una primera etapa (Ib) seguido de al menos una segunda etapa (Ia) y al menos una segunda etapa (Ib). Por lo tanto, el sistema además puede comprender uno o más de los siguientes (no representados): un segundo recipiente adicional, que preferentemente comprende los reactivos necesarios para la colocación de la caperuza y preferentemente en conexión fluida con la tubería de conexión del sistema de producción de ARNm a través de una cuarta válvula, un segundo recipiente adicional, que preferentemente comprende los reactivos necesarios para la desfosforilación y preferentemente en conexión fluida con la tubería de conexión del sistema de producción de ARNm a través de una cuarta válvula, y un segundo recipiente adicional, que preferentemente comprenden reactivos necesarios para la adición enzimática de una cola de poli(A), por ejemplo, al menos una poli(A) polimerasa, y preferentemente en conexión fluida con la tubería de conexión del sistema de producción de ARNm a través de una cuarta válvula. Por medio de la apertura de la primera válvula y la válvula intermedia durante un período de tiempo predeterminado, al menos una fracción de la suspensión respectiva que comprende las moléculas de ARNm que se han de purificar se puede transferir desde el sistema de TFF al recipiente intermedio del sistema de producción de ARNm. Por medio del cierre de la primera válvula y la apertura de la cuarta, la cuarta y/o la cuarta válvula, se puede llevar a cabo la colocación de la caperuza, la desfosforilación y/o la poliadenilación de las moléculas de ARNm, preferentemente en el recipiente intermedio. De manera alternativa o adicional, en el caso de que el recipiente de reacción no sea un fermentador, se puede usar el recipiente de reacción en lugar del recipiente intermedio y, por lo tanto, se abre la segunda válvula en lugar de la válvula intermedia. Por medio del cierre de la cuarta, la cuarta y/o la cuarta válvula y la apertura de la primera válvula, la suspensión que comprende las moléculas de ARNm modificadas se puede transferir desde el sistema de producción de moléculas de ARNm al sistema de TFF.

Es de destacar que el dispositivo de filtro puede comprender más de una membrana de filtro que se puede cambiar de manera automática. Preferentemente, el dispositivo de filtro comprende más de una unidad de dispositivo de filtro, por ejemplo, cada una comprende una columna de filtro, y las moléculas de ARNm se transfieren para una TFF continua a al menos una de las unidades que tiene una membrana de filtro con un punto de corte de peso molecular de acuerdo con lo especificado con anterioridad para la etapa del procedimiento respectivo.

Además, de acuerdo con lo mostrado en la **Figura 2**, el sistema puede comprender una salida, por ejemplo, un recipiente de salida en conexión fluida con el depósito, por ejemplo, a través de una décima válvula. Preferentemente, dicho recipiente de salida se refiere o está en conexión fluida con una bolsa estéril, preferentemente de un solo uso, para el almacenamiento de al menos una fracción de la solución o suspensión que comprende las moléculas de ARNm purificadas. Por medio de la apertura de la décima válvula, se pueden obtener moléculas de ARNm purificadas. De manera alternativa, en la etapa (IIb) (la última llevada a cabo), las moléculas de ARNm purificadas pueden estar incluidas en el permeado en lugar del retenido. De manera opcional, el sistema además puede comprender un filtro para una etapa de filtración adicional (no representado). Dicho filtro puede comprender una membrana de filtro con un tamaño de poro de menos de 0,3 μm , por ejemplo, de 0,22 μm , para una etapa de filtración final y, por lo tanto, puede ser útil para una filtración final de la suspensión que comprende las moléculas de ARNm purificadas, por ejemplo, el permeado o de acuerdo con lo obtenido del recipiente de salida. Además, podría estar presente una bomba auxiliar para el ajuste automático de las velocidades de los líquidos transferidos desde el depósito a la salida (no mostrada).

El sistema además puede comprender un elemento de enfriamiento y/o calentamiento, preferentemente regulado de manera automática (no mostrado). Dicho elemento de enfriamiento y/o calentamiento puede estar posicionado al menos parcialmente alrededor de uno o más de las tuberías, recipientes (por ejemplo, recipiente de reacción, recipiente intermedio, recipiente adicional y/o depósito) y/o el dispositivo de filtro. Preferentemente, un elemento de enfriamiento está posicionado al menos parcialmente alrededor del depósito y/o el dispositivo de filtro. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo a una temperatura entre 0 °C y 25 °C, preferentemente para la mayoría de las etapas entre 2 °C y 8 °C por medio del control del respectivo elemento de enfriamiento y/o calentamiento. Por lo tanto, se pueden obtener grandes cantidades de moléculas de ARNm purificadas.

Preferentemente, el sistema además puede comprender un elemento, preferentemente regulado de manera automática, para la regulación del pH (no mostrado). Dicho elemento puede comprender un dispositivo para la medición del pH de una solución y/o suspensión, tal como un medidor de pH, y de manera opcional un recipiente de regulación del pH, en donde este último preferentemente está en conexión fluida con al menos uno de los recipientes (por ejemplo, recipiente de reacción, recipiente provisional, recipiente adicional y/o depósito). Por lo tanto, se puede medir y/o controlar el pH de la solución o suspensión en el recipiente respectivo. De manera adicional o alternativa, se puede medir el pH del permeado, preferentemente de forma continua. Por lo tanto, el proceso de purificación de ARNm se puede controlar y verificar la calidad.

Además, se puede medir la concentración y/o pureza de ácido nucleico, preferentemente utilizando el permeado. Esto se puede hacer, por ejemplo, de manera fotométrica por medio de la medición de la absorbancia de moléculas que incluyen moléculas de ARNm en el intervalo de UV a aproximadamente 260 y 280 nm. Por ejemplo, un cociente de un valor obtenido a aproximadamente 260 nm con un valor obtenido a aproximadamente 280 nm puede ser indicativo de la pureza del ácido nucleico respectivo en una solución o una suspensión. Por ejemplo, una relación de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,0 puede ser indicativa de moléculas de ADN o ARN de alta pureza, mientras que, por ejemplo, una relación de menos de 1,8 puede ser indicativa de impurezas, por ejemplo, de proteínas. Por lo tanto, se puede obtener información sobre la composición, por ejemplo, del permeado, incluidas las concentraciones de moléculas de ARNm. De manera opcional o alternativa, la concentración de la molécula de ARNm se puede determinar con base en una medición de conductividad, preferentemente continua. Por lo tanto, el sistema además puede comprender un elemento, preferentemente regulado de manera automática, para la cuantificación de ácidos nucleicos (no mostrado) tal como un espectrómetro y/o un espectrofotómetro, por ejemplo una nanogota, y/o medios para la realización de una medición de conductividad.

Cualquiera de los recipientes (por ejemplo, el recipiente de reacción, el recipiente intermedio, el recipiente adicional y/o el depósito) o todos los recipientes pueden estar posicionados en una balanza respectiva. Por lo tanto, se puede medir el peso del recipiente respectivo, se puede determinar el peso de la solución o la suspensión que comprende las moléculas de ARNm que se han de purificar o purificar en el recipiente respectivo, y se puede añadir la cantidad apropiada de una solución o componente respectivo, por ejemplo, de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta y/o la quinta solución y/o los reactivos de IVT. Por lo tanto, el proceso de producción y/o purificación de ARNm se puede optimizar y automatizar.

Para garantizar una regulación automática del proceso de producción y/o purificación de ARNm, el sistema preferentemente comprende medios de control adaptados para el control de los medios mencionados con anterioridad, por ejemplo, válvulas, bombas (auxiliares), un elemento de calentamiento y/o enfriamiento, un elemento para la regulación del pH, un elemento para la cuantificación de ácidos nucleicos, un medio para la realización de una medida de conductividad y/o una balanza. En la presente memoria, el término "sistema" se debe entender como dispositivo y se puede usar de manera intercambiable con el mismo.

Con respecto a la tubería de conexión del sistema de producción de moléculas de ARNm, dicha tubería de conexión puede ser una tubería de conexión de acuerdo con lo mostrado en la Figura 2, por ejemplo, un recipiente de reacción de conexión fluida y otros recipientes en serie. De manera alternativa, la tubería de conexión se puede referir a dos o más tuberías que conectan los respectivos recipientes. De este modo, la tubería de conexión se puede referir, por ejemplo, al menos a una primera tubería que conecta de manera fluida el recipiente de reacción y el primer recipiente adicional y una segunda tubería que conecta de manera fluida el recipiente de reacción y el segundo recipiente adicional. Preferentemente, una o más de dichas dos o más tuberías comprenden una válvula entre los respectivos recipientes y, de manera opcional, una bomba auxiliar.

Cualquiera de los componentes del sistema descrito con anterioridad puede ser un componente de un solo uso. Preferentemente, uno o más de los recipientes (por ejemplo, recipiente intermedio, recipiente de reacción y/o recipiente adicional) y/o una o más de las válvulas (intermedias) pueden ser un recipiente y una válvula de un solo uso respectivos, respectivamente. Preferentemente, el recipiente intermedio y/o el recipiente de reacción es un recipiente de un solo uso respectivo. De manera opcional, todo el sistema puede ser un sistema para un solo uso, por ejemplo, para la producción y purificación de una molécula de ARNm específica. Esto tiene la ventaja de que la molécula de ARNm respectiva se puede producir y purificar en condiciones estériles al mismo tiempo que se evitan las etapas de lavado, limpieza y/o esterilización que consumen tiempo y dinero que de otro modo serían necesarios para reducir el riesgo de contaminación. Por lo tanto, preferentemente uno o más componentes del sistema descrito con anterioridad son respectivos componentes de un solo uso.

Un sistema de acuerdo con lo mostrado a modo de ejemplo en la **Figura 2** tiene varias ventajas. En un sistema cerrado de este tipo, se minimiza el riesgo de contaminación, por ejemplo, por ribonucleasa, mientras que al mismo tiempo se puede aumentar el rendimiento dado que se puede evitar la obstrucción de las membranas de filtro utilizando TFF continua. Además, dicho sistema es fácil de manejar, por ejemplo, a través de una transferencia de líquido regulada por bomba, e incluso completamente automatizable, por ejemplo, por medio de la regulación automática de las bombas y/o válvulas (auxiliares). Además, es con facilidad escalable y bien ajustable de acuerdo con los requisitos específicos del cliente. Por lo tanto, la purificación de alto rendimiento de moléculas de ARNm se puede llevar a cabo de una

manera altamente eficaz y automatizada de acuerdo con el procedimiento divulgado utilizando un sistema de acuerdo con lo mostrado en la **Figura 2**.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica que comprende (a) la purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm descrito con anterioridad, y (b) la formulación de las moléculas de ARNm obtenidas de este modo en una composición farmacéutica. Esto es de especial interés para la aplicación de moléculas de ARNm purificadas en contextos farmacéuticos tales como la administración de moléculas de ARNm para permitir la síntesis de una proteína, cuyo déficit o defecto está asociado a una enfermedad y/o cuya presencia es necesaria o beneficiosa en una célula.

Preferentemente, la función de la secuencia de aminoácidos, que se puede traducir a partir de la molécula de ARNm purificada de acuerdo con la presente invención, en la célula o en las proximidades de la célula es necesaria o beneficiosa, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos en la forma carente o defectuosa del cual es un desencadenante de una enfermedad o una dolencia, cuya provisión puede moderar o prevenir una enfermedad o una dolencia, o una secuencia de aminoácidos que puede promover un proceso que es beneficioso para el cuerpo, en una célula o sus alrededores. La secuencia de aminoácidos codificada puede ser la secuencia de aminoácidos completa o una variante funcional del mismo. Además, la secuencia de aminoácidos codificada puede actuar como factor, inductor, regulador, estimulador o enzima, o un fragmento funcional de la misma, donde esta secuencia de aminoácidos es una cuya función es necesaria con el fin de remediar un trastorno, en particular un trastorno metabólico o con el fin de iniciar procesos *in vivo* tales como la formación de nuevos vasos sanguíneos, tejidos, etc. En la presente memoria, se entiende por variante funcional un fragmento que en la célula puede asumir la función de la secuencia de aminoácidos cuya función en la célula es necesaria o la falta o la forma defectuosa de la cual es patógena.

Preferentemente, dicha secuencia de aminoácidos es ventajosa con respecto a aplicaciones con fines complementarios o médicos para generar o regenerar funciones fisiológicas provocadas por la biosíntesis de secuencias de aminoácidos subóptima y, por lo tanto, también para influir de manera favorable directa o indirectamente en el curso de enfermedades. Los trastornos con una base genética conocida son, por ejemplo, fibrosis quística, hemofilia, hipertensión, nivel elevado de colesterol, cáncer, trastornos neurodegenerativos, enfermedades mentales y otros. Un catálogo en línea con actualmente 22.993 entradas de Genes Humanos y Trastornos Genéticos junto con sus genes respectivos y una descripción de sus fenotipos están disponibles en la página web de ONIM (Herencia Mendeliana en Línea en el Hombre) (<http://onim.org>); las secuencias de cada uno están disponibles en la base de datos de Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Como ejemplos no limitantes, la siguiente **Tabla 2** enumera algunas enfermedades congénitas y los genes correspondientes. Debido al alto grado de interacción de las vías de señalización celular, la mutación de un determinado gen provoca una multiplicidad de síntomas patológicos, de los cuales solo uno característico se enumera en la **Tabla 2**.

La proteína también puede tener el potencial de inducir una reacción inmunogénica que actúa, por ejemplo, como un antígeno. Dichas proteínas se prestan a aplicaciones con fines complementarios o médicos, incluida la vacunación.

Tabla 2

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Hemopatías		
Anemia de Fanconi	Anemia y neutropenia, evidencia de que un mecanismo de reparación del ADN está afectado	FANCA, autosómico recesivo
Hemofilia-A	Sangrado anormal	Factor de coagulación VIII, cromosómico X recesivo
Hemofilia-B	Sangrado anormal	Factor de coagulación IX, cromosómico X recesivo
Esferocitosis hereditaria (varios tipos)	eritrocitos de forma esférica (esferocitos)	Ankirina (ANK1)
Hemoglobinuria paroxística nocturna	Anemia y presencia de sangre en la orina	PIG-A, cromosómico X
Porfiria cutánea tardía	Sobrepresión de hemo, sobrecarga de hierro	Uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD), autosómica recesiva
Inmunodeficiencia combinada grave (SCID)	Debido a la síntesis de ADN alterada, inmunodeficiencia grave en la inmunidad humoral y celular	Adenosina desaminasa, autosómica recesiva, IL-2R-γ, JAK3, (IL-7R-α, RAG1/2, Artemis, CD3δ, CD3ε
Anemia falciforme	Hemoglobina anormal (HbS)	β-Hemoglobina (HB), autosómica recesiva
Talasemia (forma α y β)	Falta de hemoglobina α o β que provoca anemia	Eliminación de HBA1 y/o HBA2,

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Enfermedad de Von Willebrand (tres tipos conocidos, el tipo III es el más severo)	Sangrado anormal, hemorragia similar a la hemofilia A y B	Formas autosómicas dominantes y recesivas
Cáncer		
Melanoma maligno	La mutación P16 conduce a la proliferación incontrolada de fibroblastos	Inhibidor de quinasa dependiente de Cyclin 2 (CDKN2)
Neurofibromatosis (2 tipos)	Los tumores benignos en los nervios auditivos conducen a la sordera	NF1, NF2, autosómico dominante
Sordera (oído)		
Sordera	Pérdida de la audición	Sordera-1A (DFNB1), autosómica recesiva
Síndrome de Pendred	Pérdida de la audición	Pendrina (PDS), autosómica recesiva
Corazón		
Ataxia telangiectasia	Reparación de daños en el ADN alterada,	ATM,
Aterosclerosis	Aumento del colesterol en sangre	apoE,
Síndrome de LQT (QT largo)	Defecto del canal de potasio	LQT1 y otros genes
Síndrome de Von-Hippel Lindau	Crecimiento anormal de los vasos sanguíneos que puede provocar cáncer.	VHL, autosómico dominante
Síndrome de William Beuren	La supresión de elastina da como resultado defectos vasculares, estenosis aórtica supraauricular	Supresión de genes de elastina y LIM quinasa
Trastornos metabólicos y enfermedades por almacenamiento de glucógeno		
Adrenoleucodistrofia	Transporte y metabolismo de ácidos grasos alterados	ABCD1, cromosómico X
Alcaptonuria	Defecto en el metabolismo del nitrógeno, la orina se oscurece cuando se expone al oxígeno	Oxidasa homogentísica, autosómica recesiva
Diabetes de tipo I	Producción alterada de insulina	IDDM1, IDDM2, GCK,...
Galactosemia	Trastorno del metabolismo de la galactosa	Gen de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), autosómico recesivo
Enfermedad de Gauche	Alteración del metabolismo de las grasas.	Glucocerebrosidasa
Absorción insuficiente de glucosa galactosidasa	Transporte alterado de glucosa y galactosa fuera de la luz intestinal que resulta en diarrea	SGLT1, autosómico recesivo
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo I, enfermedad de Von-Gierke	Acumulación de glucosa en hígado y riñón.	Glucosa-6-Fosfatasa, autosómica recesiva
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo II, enfermedad de Pompe	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, cardiomegalia	α -1-glucosidasa, autosómica recesiva
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo III, enfermedad de Cori	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, hepatomegalia	Enzima desramificante autosómica recesiva

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo V, enfermedad de McArdle	No se puede clasificar el glucógeno en las células musculares.	Fosforilasa muscular, autosómica recesiva
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	La incapacidad para mantener el glutatión conduce a anemia hemolítica	G6PD, cromosómico X recesivo
Hemocromatosis hereditaria (4 tipos)	Exceso de hierro en el cuerpo (en especial en el hígado) debido a la absorción excesiva de hierro en el intestino.	Hemocromatosis (HFE)
Homocistinuria	Defecto del metabolismo del nitrógeno	Defecto de la cistación sintetasa, autosómico recesivo
Síndrome de Lesh Nyhan	Acumulación de ácido úrico que conduce a gota, cálculos de ureato y pérdida de masa muscular.	HPRT1, cromosómico X
Cetoaciduria de cadena ramificada	El defecto del metabolismo de los aminoácidos conduce a la acumulación de α -cetoácidos y a la muerte en los primeros meses si no se trata	Alfa deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH)
Síndrome de Menkes	Capacidad reducida para absorber cobre, conduce a la muerte en la infancia si no se trata	ATP7A, Cromosómico X recesivo
Obesidad	Peso corporal elevado	Los niveles elevados de leptina poligénica pueden influir
Fenilcetonuria	La incapacidad para descomponer la fenilalanina en tirosina conduce a retraso mental.	Fenilalanina hidroxilasa (PAH), autosómica recesiva
Enfermedad de Tangier	niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad en plasma	Gen del casete 1 de unión a ATP (ABCA1)
Síndrome de Zellweger (conduce a la muerte en bebés)	Niveles altos de hierro y cobre en sangre.	PXR1 (receptor en la superficie de los peroxisomas)
Enfermedad de Wilson	Acumulación de cobre en el cerebro y el hígado.	ATP7B (ATPasa tipo P), autosómica recesiva
Sistema musculoesquelético		
Acondroplasia	Estatura baja con cabeza grande debido a la lenta proliferación de condrocitos.	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF3R),
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth y su forma más grave Síndrome de Dejerine-Sottas	Degeneración de los músculos de las extremidades.	Diferentes formas provocadas por diferentes mutaciones genéticas, autosómica recesiva y cromosómica X
Síndrome de Cockayne (2 tipos)	Envejecimiento prematuro y baja estatura, pérdida de la reparación del ADN "sobre la marcha"	proteína de complemento cruzado de reparación de escisión del grupo 8 (ERCC8)
Displasia condroectodérmica	Malformación de huesos y polidactilia.	EVC, autosómico recesivo
Displasia diastrófica (DTD)	Manos malformadas, defecto del transportador de sulfato	Gen DTDST
Distrofia muscular de Duchenne	Aumento de tamaño del tejido muscular con la consiguiente pérdida de función.	DMD, cromosómico X recesivo
Fibrodiasplasia osificante progresiva	Formación de hueso heterotópico	NOG, BMP, autosómico dominante

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Ataxia de Friedreich	Agrandamiento del corazón y pérdida progresiva de la coordinación muscular.	Frataxina, autosómica recesiva
Hipofosfatasa	Producción de una versión anormal de fosfatasa alcalina que afecta el proceso de mineralización.	ALPL, autosómica recesiva
Síndrome de Marfan	Trastorno del tejido conectivo por deficiencia de fibrilina	Fibrilina 1 (FBN), autosómica dominante
Distrofia miotónica (inicio durante la edad adulta temprana)	Defecto de la proteína quinasa en las células del músculo esquelético	Distrofia miotónica proteína quinasa (DMPK), autosómica dominante
Osteogénesis imperfecta (varios tipos)	El defecto en la formación de colágeno tipo I conduce a múltiples fracturas después del nacimiento	COL1A1, COL1A2
Síndrome de Prader-Willi	Disminución del tono muscular y retraso mental.	SNRPN (pequeña ribonucleoproteína N) eliminada debido a una supresión en el cromosoma 15
Neuronas y Cerebro		
Enfermedad de Alzheimer	Aumento de la producción de amiloide, incapacidad progresiva para recordar hechos.	Poligénico, PS1, PS2,...
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (varias formas)	Degeneración progresiva de las células de las neuronas motoras (defecto en la eliminación de radicales superóxido)	Superóxido dismutasa 1 (SOD1), varios genes implicados
Síndrome de Angelman	Retraso mental con risa inadecuada	Impresión genómica en el cromosoma 15
Piruvato deshidrogenasa	Defectos neurológicos si no se tratan	Piruvato deshidrogenasa, autosómica recesiva
Enfermedad de Refsum	La acumulación de ácido fitánico conduce a una neuropatía periférica.	Fitanoil-CoA hidroxilasa (PHYH), autosómica recesiva
Síndrome de Rett	Retraso mental con desarrollo detenido entre los 6 y los 18 meses de edad	Proteína de unión a metil-CpG-2 (MECP2), cromosómico X dominante
Enfermedad de Tay-Sachs (varias formas de gravedad)	La descomposición alterada del gangliósido GM2 conduce a daño neurológico	HEXA (β -hexosaminidasa A), autosómica recesiva
Enfermedad de LaFora	Forma agresiva de epilepsia.	EPM2A, autosómico recesivo
Temblor esencial (formas variables)	Agitación incontrolable	ETM1, ETM2, autosómico dominante
Síndrome X frágil	Falta de proteína de unión a ARN FMR1, retraso mental	El gen FMR1 no se expresa debido a una amplificación CGG en la región 5'UTR
Enfermedad de Huntington	Demencia progresiva con inicio en la edad adulta	HTT (Huntington), autosómico dominante
Intestino		
Síndrome de Bartter (3 tipos)	enfermedad renal	Gen del canal B del cloruro de riñón (CLCNKB), autosómico recesivo
Enfermedad renal poliquística (2 tipos)	enfermedad renal	PDK1, PDK2, autosómica dominante, también se conoce una forma autosómica recesiva (ARPKD)
Pulmón		
Alfa-1-antitripsina	Alvéolos defectuosos debido a la liberación incontrolada de elastasa	SERPINA1, codominante autosómico

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Asma	Trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias.	Poligénico
Fibrosis quística	Mucosidad excesivamente viscosa debido a un transporte defectuoso de iones de Cl ⁻	CFTR (regulador transmembrana de conductancia de fibrosis quística), autosómico recesivo
Disfunción del metabolismo de los tensioactivos (varios tipos)	Los recién nacidos tienen un peso corporal normal, pero ninguno se infla	Transportador de casetes de unión a ATP (ABCA3)
Discinesia ciliar primaria	Mucosidad excesivamente viscosa debido a una función de los cilios defectuosa/faltante	DNAI1, CCNO, CCDC40 entre otros
Enfermedades por almacenamiento lisosómico		
Enfermedad de Fabry	Más allá de otras, lesiones cutáneas por acumulación de trihexósido de ceramida	α-galactosidasa A, cromosómico X recesivo
Enfermedad de Gaucher de tipo I: forma adulta (vida útil normal bajo tratamiento). Tipo II: forma infantil (muerte antes de 1 año). Tipo III: forma juvenil (inicio en la primera infancia, menos grave que el Tipo II)	Acumulación de glucocerebrósidos (gangliósidos, esfingolípidos)	Glucocerebrosidasa, autosómica recesiva,
Síndrome de Hunter	Acumulación de mucopolisacáridos	L-iduronosulfato sulfatasa, cromosómico X recesivo
Síndrome de Hurler (muerte a los 10 años)	Acumulación de mucopolisacáridos	α-L-iduronidasa, autosómica recesiva
Enfermedad de Niemann-Pick (tres formas distintas A, B, C)	Defecto en la liberación de colesterol de los lisosomas, acumulación de esfingomielina	Esfingomielinasa autosómica recesiva
Enfermedad de Tay-Sachs (muerte a los 4 años)	Acumulación de gangliósido GM2 en células neuronales	Hexosaminidasa A, autosómica recesiva
Piel		
Albinismo	Defecto del metabolismo del nitrógeno	Deficiencia de tirosinasa, autosómica recesiva
Albinismo oculocutáneo de tipo II	Biosíntesis reducida del pigmento de melanina.	OCA2, autosómico recesivo
Síndrome de Ehlers-Danlos (varios tipos)	Hernia común del diafragma, desprendimiento de retina	Varios defectos en la síntesis de colágeno
Epidermólisis ampollosa (varios tipos, incluidos EB simple, EB de unión, EB distrófica y síndrome de Kindler)	Defectos en el mantenimiento de la estabilidad estructural de los queratinocitos o la adhesión del queratinocito a la dermis subyacente	Epidermólisis ampollosa de tipo macular (EBM), Epidermólisis ampollosa 3 progresiva (EBR3), Epidermólisis ampollosa 4 pseudojuntal (EBR4), Desmoplaquina (DSP), Placofilina-1 (PKP1), creatina (KRT5, KRT14), plectina (PLEC), ITGA subunidad de integrina (ITGB4), subunidades de laminina (LAMA3, LAMP3, LAMB3, LAMC2), colágeno (COL17A1, COL7A1 (autosómico dominante), FERMT1, autosómico recesivo
Enfermedad de Hartnup	Defecto en la captación de triptófano en el tubo gastrointestinal, piel sensible a la luz	SLC6A19, autosómico recesivo

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Telangiectasia hemorrágica hereditaria, síndrome de Osler-Weber-Rendu	Telangiectasia de la piel y membranas mucosas.	Endogлина (ENG), autosómica dominante
Hipercolesterolemia familiar	elevación del colesterol sérico unido a lipoproteínas de baja densidad, acumulación en la piel y arteriosclerosis	Receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), apolipoproteína B (APOB), autosómico dominante
Xeroderma pigmentosa	defecto de la piel y melanoma debido a la exposición a los rayos UV	Defecto de reparación del ADN, autosómico recesivo
Calvicie de patrón masculino	Conversión alterada de testosterona en dihidrotestosterona en la piel	5- α -reductasa
Enfermedades genéticas del hígado		
Trastornos del metabolismo de los aminoácidos	Interrupciones en el proceso de varias etapas que descompone el aminoácido tirosina y fenilalanina	FAH, TAT, HPD, autosómico recesivo
Beta-talasemia intermedia	Escasez de glóbulos rojos maduros	HBB, autosómico recesivo
Síndrome de Crigler-Najjar	Deficiencia de glucuronidación en donde la bilirrubina se disuelve en agua	UGT1A1, autosómica recesiva
Trastornos de la oxidación de ácidos grasos	Deficiencia en el procesamiento de ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos de cadena muy larga que resulta en letargo e hipoglucemia	HADHA, ACADVL autosómico recesivo
Trastornos del metabolismo de la fructosa	Gluconeogénesis alterada que provoca hipoglucemia	FBP1, ALDOB, autosómico recesivo
Galactosemia	Deficiencia en el procesamiento de galactosa	GALT, GALK1, GALE, autosómico recesivo
Enfermedades por almacenamiento de glucógeno	La ruptura alterada de glucosa 6-fosfato y glucógeno conduce a la acumulación de glucógeno, así como también a moléculas de glucógeno anormales que provocan daño celular	G6PC, SLC37A4, AGL, GBE1, autosómico recesivo
Trastorno de biosíntesis de hemo	Disminución de la uroporfirinógeno descarboxilasa que da como resultado la acumulación de compuestos llamados porfirinas que provocan niveles tóxicos en el hígado	UROD autosómico dominante, ALAS2 dominante ligado al cromosoma X, ALAD autosómico recesivo
Trastornos del metabolismo (transporte) de lípidos	Escasez de proteína funcional, que impide el movimiento del colesterol y otros lípidos, provocando su acumulación en las células	NPC1, NPC2 autosómico recesivo, LDLR, autosómico dominante
Trastornos del metabolismo de los metales	Trastornos en el almacenamiento y transporte de hierro y cobre que provocan acumulación en tejidos y órganos	ATP7B, HAMP, HFE, HFE2, autosómico recesivo
Trastornos de los ácidos orgánicos (acidurias/acidemias)	Descomposición interrumpida de varios componentes básicos de proteínas (aminoácidos), ciertos lípidos y colesterol	BCKDHA, BCKDHB y DBT, PCCA y PCCB, MUT, MMAA, MMAB, MMADHC, MCEE, IVD, MCCC1 o MCCC2, autosómico recesivo

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Hiperoxaluria primaria de tipo 1	Desglose interrumpido del glicoxilato que conduce a daño renal	AGXT, GRHPR, autosómico recesivo
Colestasis intrahepática familiar progresiva	Acumulación de ácidos biliares en las células del hígado que provocan daño hepático	ATP8B1, autosómico recesivo
Trastorno de la actividad de los trombocitos	La falta de actividad enzimática altera el equilibrio habitual entre sangrado y coagulación	ADAMTS13, autosómica recesiva
Trastornos del ciclo de la urea	Trastorno del ciclo de la urea que provoca una forma de hiperamonemia	OTC (trastorno ligado al cromosoma X), CPS1, ASS1 y SLC25A13, ASL, autosómico recesivo

Con respecto a la etapa de purificar moléculas de ARNm, se aplica lo mismo que se describió con anterioridad en relación con el procedimiento de purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con la presente invención, en donde dicho procedimiento comprende las etapas de (Ia) la purificación de moléculas de ARNm precipitadas a partir de una suspensión que comprende moléculas de ARNm precipitadas utilizando una primera solución, (Ib) el lavado y la disolución de las moléculas de ARNm precipitadas purificadas obtenidas en la etapa (Ia) utilizando una segunda solución, (IIa) la purificación de las moléculas de ARNm a partir de las moléculas de ARNm disueltas obtenidas en la etapa (Ib) utilizando una tercera solución que comprende un agente quelante como se ha definido anteriormente tal como EDTA, seguido de (IIb) el lavado de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas en la etapa (IIa) utilizando una cuarta solución, en donde las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo utilizando filtración de flujo tangencial.

En cuanto a la etapa de formulación de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas de este modo en una composición farmacéutica, dicha etapa puede comprender la adición de cloruro o citrato de sodio en el caso de que las moléculas de ARNm purificadas con agua se usen como cuarta solución usada en la etapa (IIb) y en la última etapa (IIb) en el caso de más de una etapa (IIb), respectivamente. Esto es ventajoso en el caso de que las moléculas de ARNm purificadas no se obtengan en una solución que ya contenga cloruro o citrato de sodio o en el caso de que las moléculas de ARNm purificadas se obtengan en una solución que contenga ya sea cloruro o citrato de sodio pero a una concentración diferente a la deseada para la administración. En el último caso, el procedimiento además podría comprender una etapa de determinación de la concentración respectiva y su ajuste si es necesario. Preferentemente, las moléculas de ARNm purificadas están comprendidas en una solución que además comprende cloruro o citrato de sodio en una concentración ventajosa para la administración utilizando una cuarta solución que comprende dicho cloruro o citrato de sodio en la concentración respectiva con un pH entre 3 y 6, preferentemente entre 4 y 5, en (la última) etapa (IIb) del procedimiento de purificación de moléculas de ARNm descrito con anterioridad.

La formulación de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas en una composición farmacéutica puede comprender la etapa de añadir un portador aceptable para uso farmacéutico. Las moléculas de ARNm purificadas preferentemente se incluyen en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad suficiente para inducir una respuesta terapéutica detectable en el sujeto al que se ha de administrar la composición farmacéutica. Las moléculas de ARNm purificadas y/o la composición farmacéutica pueden estar en soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles, así como también cremas y supositorios, pero también pueden tener la forma de polvos, comprimidos o aerosoles.

La expresión "portador aceptable para uso farmacéutico" que se usa en la presente memoria se refiere a compuestos químicos, materiales, ingredientes y/o composiciones que, dentro del alcance del juicio médico sólido, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesiva u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Por lo tanto, un portador aceptable para uso farmacéutico es una sustancia inactiva formulada junto con la sustancia activa para uso farmacéutico para facilitar su manipulación en vista de las consideraciones de dosis, adsorción, solubilidad o farmacocinética.

Los ejemplos de portadores aceptables para uso farmacéutico adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, tampón, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes y soluciones estériles. En particular, los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios salinos y tamponados. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos tales como oleato de etilo. Otros ejemplos de portadores aceptables para uso farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa, citrato, fosfato y otros ácidos orgánicos; contraiones formadores de sal, por ejemplo, sodio y potasio; polipéptidos de bajo peso molecular (> 10 residuos de aminoácidos); proteínas, por ejemplo, albúmina de suero o gelatina; polímeros hidrófilos, por ejemplo, polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como histidina, glutamina, lisina, asparagina, arginina o glicina; carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; monosacáridos; disacáridos; otros azúcares, por ejemplo sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; agentes quelantes, por ejemplo, EDTA; tensioactivos no iónicos, por ejemplo, monolaurato de polioxietilensorbitán, disponible en el mercado con el nombre comercial Tween, propilenglicol, Pluronic o polietilenglicol; antioxidantes que

incluyen metionina, ácido ascórbico y tocoferol; y/o conservantes, por ejemplo, cloruro de octadecil dimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenol, butílico o bencílico; alquil-parabenos, por ejemplo, metil- o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol). Los portadores aceptables para uso farmacéutico adecuados y sus formulaciones se describen con mayor detalle en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17.^a ed., 1985, Mack Publishing Co. Además, también pueden estar presentes conservantes, estabilizadores y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, nanosistemas o liposomas y similares.

La presente invención se refiere además a un método para producir una composición farmacéutica que comprende (a) purificar moléculas de ARNm de acuerdo con el método divulgado en la presente memoria, y (b) formular las moléculas de ARNm así obtenidas en una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. La composición farmacéutica así producida comprende moléculas de ARNm purificadas de acuerdo con cualquiera de los métodos respectivos divulgados en la presente memoria y formuladas de acuerdo con el método descrito anteriormente. La composición farmacéutica es ventajosa para el ajuste y/o la mejora de la traducción de una secuencia de aminoácidos tal como una proteína en las células de un sujeto al que se administra la composición farmacéutica, en donde la presencia de dicha secuencia de aminoácidos tal como una proteína es beneficiosa y/o necesaria para el sujeto, por ejemplo, en el contexto de una enfermedad.

Con respecto a la composición farmacéutica, las moléculas de ARNm, su purificación y la formulación de la composición farmacéutica, se aplica lo mismo que se indicó con anterioridad, incluidas las características y ventajas mencionadas en el contexto de las realizaciones respectivas descritas con anterioridad.

La composición farmacéutica que se producirá de acuerdo con la presente invención se puede administrar a través de una amplia gama de clases de formas y vías de administración conocidas por aquéllos con experiencia, tales como inyección con aguja, uso de inhaladores, nebulizadores, cremas, espumas, geles, lociones y ungüentos. La dosis y la duración de la acción dependen de la función que deban cumplir dichas moléculas de ARNm purificadas y se deben ajustar de manera deliberada en cada caso. La duración de la acción será lo más larga posible, por ejemplo, si dichas moléculas de ARNm purificadas se usan para una terapia crónica de una enfermedad debida a un gen deficiente, mientras que con otras indicaciones se puede ajustar a una ventana de tiempo específica. Además, es posible la administración sistémica de dichas moléculas de ARNm purificadas formuladas en una composición farmacéutica adecuada.

Figura 1: descripción general de un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) continua con moléculas de ARNm circulantes de acuerdo con el procedimiento divulgado. Las moléculas de ARNm están en suspensión en la etapa (Ia), disueltas en la etapa (Ib) y en solución en el caso de las etapas (IIa) y (IIb), respectivamente.

Figura 2: descripción general de un sistema de ejemplo para la purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con el procedimiento divulgado (con posiciones representadas a modo de ejemplo de válvulas, bombas (auxiliares) y/o recipientes (adicionales)).

Figura 3: SDS-PAGE seguida de tinción de coomassie coloidal del retenido de TFF que comprende moléculas de ARNm que codifican tdTomato no modificado después de la purificación de la mezcla de transcripción *in vitro* (IVT) respectiva de acuerdo con las etapas (Ia) y (Ib) a TA. Carril 1: mezcla de enzimas en acetato de amonio (NH₄OAc) como control; carril 2: mezcla de enzimas después de cebar el sistema de TFF; carril 3: mezcla de enzimas después de la TFF en agua libre de nucleasas; carril 4: mezcla de IVT; carril 5: mezcla de IVT después de cebar el sistema de TFF; carril 6: mezcla de IVT después de la TFF en agua libre de nucleasas; carril 7: mezcla de enzimas en agua libre de nucleasas como control. La mezcla de enzimas consistió en inhibidor de ribonucleasa, ARN polimerasa T7, pirofosfatasa inorgánica y desoxirribonucleasa I.

Figura 4: SDS-PAGE seguida de tinción de coomassie coloidal del retenido de TFF que comprende moléculas de ARNm que codifican tdTomato no modificado después de la purificación de la mezcla de transcripción *in vitro* (IVT) respectiva de acuerdo con las etapas (Ia) y (b) a TA. Carril 1: mezcla de enzimas en agua libre de nucleasas como control; carril 2: mezcla de IVT antes de la TFF; carril 3: mezcla de IVT después de cebar el sistema de TFF; carril 4: mezcla de IVT después de la TFF en agua libre de nucleasas; carril 5: mezcla de IVT después de la TFF en agua libre de nucleasas (después de la diafiltración con acetato de amonio 2,5 M y agua libre de nucleasas, la mezcla respectiva se concentró 2,5 veces para detectar de manera eficaz la eliminación de proteínas). La mezcla de enzimas consistió en inhibidor de ribonucleasa, ARN polimerasa T7, pirofosfatasa inorgánica y desoxirribonucleasa I.

Figura 5: SDS-PAGE seguida de tinción de coomassie coloidal del retenido de TFF que comprende moléculas de ARNm que codifican tdTomato no modificado después de la purificación de la mezcla de transcripción *in vitro* (IVT) respectiva de acuerdo con las etapas (Ia) y (b) a 4 °C. Carril 1: mezcla de enzimas en agua libre de nucleasas como control; carril 2: mezcla de IVT antes de la TFF; carril 3: mezcla de IVT después de un volumen de lavado (igual al volumen de aporte inicial); carril 4: mezcla de IVT después de la TFF en agua libre de nucleasas; carril 5: mezcla de IVT después de la TFF en agua libre de nucleasas (después de la diafiltración con acetato de amonio 2,5 M y agua libre de nucleasas, la mezcla respectiva se concentró 2,5 veces para detectar de manera eficaz la eliminación de proteínas). La mezcla de enzimas consistió en inhibidor de ribonucleasa, ARN polimerasa T7, pirofosfatasa inorgánica y desoxirribonucleasa I.

Figura 6: A) transferencia Western de proteína hCFTR traducida en células HEK293 después de la transfección con ARNm de hCFTR purificado con TFF y ARNm de hCFTR purificado por precipitación con acetato de amonio

seguido de lavado con etanol al 70 %, formulado utilizando Lipofectamine Messenger Max. Como encargado de la casa, se muestran las bandas de proteína Hsp90. Las células no transfectadas se usaron como control negativo. B) La hCFTR expresada se cuantificó por medio de análisis densitométrico utilizando el *software* Image Lab y se normalizó a la proteína HSP90. Se usaron células no transfectadas (UT) como control negativo.

Figura 7: cantidades residuales de diferentes moléculas de ARNm enriquecidas que no son hCFTR en comparación con la cantidad de moléculas de ARNm diana de hCFTR después de variar los volúmenes de lavado en porcentaje. La filtración de flujo tangencial se llevó a cabo a TA.

Figura 8: cantidades residuales de diferentes moléculas de ARNm enriquecidas que no son hCFTR en comparación con la cantidad de moléculas de ARNm diana de hCFTR después de variar los volúmenes de lavado en porcentaje. La filtración de flujo tangencial se llevó a cabo a 4 °C.

Figura 9: se llevó a cabo electroforesis en gel capilar utilizando el analizador de fragmentos a partir de ARNm de tdTomate enriquecido con diferentes oligonucleótidos de ADN (15 nt, 25 nt y 120 nt) que contenían un oligonucleótido de ADN antisentido de 25 nt antes (A) y después (B) de la purificación de TFF a 4 °C. El marcador inferior es un patrón interno proporcionado en el kit de reactivos del analizador de fragmentos para normalizar los tiempos de retención del pico en cada serie capilar (oligonucleótido de ARN de 15 nt de longitud).

Figura 10: representativamente, el flujo de permeado se midió en diferentes puntos de ajuste de presión transmembrana.

Figura 11: se llevó a cabo electroforesis en gel capilar utilizando el analizador de fragmentos a partir de ARNm de hCFTR enriquecido con oligonucleótidos de ADN de 25 nt y 120 nt de longitud y moléculas de ARNm de GLP-1 de 256 nt de longitud antes de la purificación de acuerdo con el procedimiento 1 (A), después de la etapa (Ib) (B), después de la etapa (IIa) (C) y después de la etapa (IIb) (D) a TA. El marcador inferior es un patrón interno proporcionado en el kit de reactivos del analizador de fragmentos para normalizar los tiempos de retención del pico en cada serie capilar (oligonucleótido de ARN de 15 nt de longitud).

Figura 12: se llevó a cabo electroforesis en gel capilar utilizando el analizador de fragmentos a partir de ARNm de hCFTR enriquecido con oligonucleótidos de ADN de 25 nt y 120 nt de longitud y moléculas de ARNm de GLP-1 de 256 nt de longitud antes (A) y después (B) de la purificación de acuerdo con el procedimiento 2 a TA. El marcador inferior es un patrón interno proporcionado en el kit de reactivos del analizador de fragmentos para normalizar los tiempos de retención del pico en cada serie capilar (oligonucleótido de ARN de 15 nt de longitud).

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los siguientes ejemplos, que se dan con fines ilustrativos y no a modo de limitación.

Ejemplos

Los procedimientos y materiales se describen en la presente memoria para su uso en la presente divulgación; también se pueden usar otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Las abreviaturas usadas en la presente memoria y sus respectivas descripciones se enumeran en la **Tabla 3**.

Tabla 3

Abreviatura	Descripción
°C	Grado Celsius
CFTR	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IVT	Transcripción <i>in vitro</i>
kDa	Kilodalton
l // ml	Litro // Mililitro
M // mm	Molar // Millimolar
mbar	Millibar
Min	Minuto
mg	Miligramo
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mPES	Polietersulfona Modificada
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero (ARN)
MWCO	Punto de corte de peso molecular
NaOH	Hidróxido de sodio
nt	Nucleótidos
NH ₄ OAc	Acetato de amonio, CH ₃ COONH ₄
RT	Temperatura ambiente, por ejemplo, entre 20 °C y 25 °C, por ejemplo 22 °C
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TFF	Filtración de flujo tangencial
TMP	Presión transmembrana

X	veces
μl	Microlitro
%	Porcentaje

Materiales y procedimientos

Materiales, Dispositivos, Software y Sistema de prueba usados

5

Los materiales se enumeran en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Material	Proveedor	Núm. de Cat.
Solución de acetato de amonio 5 M con un pH de 7	Sigma-Aldrich	09691-1L
Filtro TFF de 50 kDa mPES	Spectrumlabs	C02-E050-05-N
Filtro TFF de 100 kDa mPES	Spectrumlabs	C02-E100-05-N
Filtro TFF de 300 kDa mPES	Spectrumlabs	C02-E300-05-N
Filtro TFF de 500 kDa mPES	Spectrumlabs	C02-E500-05-N
Agua HiPerSolv Chromanorm para HPLC	VWR	83650.320
Aqua ad inyectabilia	B. Braun	3703444
Solución de sal disódica de EDTA pH 7	Sigma-Aldrich	E7889
MOPS BioUltra para biología molecular	Sigma-Aldrich	6947
Solución de hidróxido de sodio al 32 %	Carl Roth	T197.1
Kit de análisis de ARN de sensibilidad estándar (15 nt)	Advanced Analytical	DNF-471
Lipofectamine® MessengerMax™	Thermo Fisher Scientific	LMRNA015
Luminata Classico	Millipore	WBLUC0500
Suplemento MEM, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific	41090028
Patrón de doble color de proteína Precision Plus	Bio-Rad	161-0374
Membranas secantes precortadas de PVDF, 0,2 μm	Thermo Fisher Scientific	LC2002
Roti-Load	Carl Roth	K930.1
SuperSignal™ West Femto	Thermo Fisher Scientific	34095
TRIS-Acetato 3 a 8 %, 1 mm, 15 pocillos	Thermo Fisher Scientific	EA03755BOX
TRIS-Tampón de migración de acetato	Thermo Fisher Scientific	LA0041
TRIPSINA 0,05 % EDTA	Thermo Fisher Scientific	25300054
Diluyente/Bloqueador WesternBreeze®	Thermo Fisher Scientific	WB7050
Solución de Lavado WesternBreeze® (16X)	Thermo Fisher Scientific	WB7003
AcM anti-CFTR humano de ratón	R&D Systems	MAB25031
AcM anti-HSP90 de ratón	Origene	TA500494
cOmplete™, Inhibidor de Proteasa sin EDTA	Sigma-Aldrich	11873580001
Ditiotreitol (DTT)	GE Healthcare	17-1318-02

(continuación)

Material	Proveedor	Núm. de Cat.
Solución de desoxirribonucleasa I (2500 U/ml)	Thermo Fisher Scientific	90083
DPBS 1x sin Ca y Mg	Thermo Fisher Scientific	14190-169
Suero fetal bovino, inactivado por calor	Thermo Fisher Scientific	10500064
IgG de burro anti-ratón-HRP	Abcam	ab6820
Coomassie coloidal	Roth	A152.1
Ácido o-fosfórico, 85 % de rotipurano, p.a., ACS, ISO	Carl Roth	63661.
Inhibidor de RiboLick ribonucleasa	Thermo Fisher Scientific	
Desoxirribonucleasa I (libre de ribonucleasa)	Thermo Fisher Scientific	
Pirofosfatasa inorgánica	Thermo Fisher Scientific	
ARN polimerasa de T7	Thermo Fisher Scientific	
Bolt 4 a 12 % Bis-Tris Plus 10 pozos	Invitrogen	NW04120BOX
Tampón de carga de muestras Bolt LDS (4x)	Life technologies	B0007
Patrones de dos colores de proteínas Precision Plus	BioRad	161-0374
Tampón de migración Bolt MES SDS 20x	Life technologies	B0002
Solución de cloruro de magnesio	Sigma-Aldrich	M1028
Espermidina	Sigma-Aldrich	85578
Solución de ditioneitol (DTT)	Sigma-Aldrich	43816
GTP	Jena Bioscience	NU-1012
ATP	Jena Bioscience	NU-1010
CTP	Jena Bioscience	NU-1011
UTP	Jena Bioscience	NU-1013
Análogo de caperuza ARCA	Jena Bioscience	NU-855

Los dispositivos se enumeran en la **Tabla 5**.

Tabla 5

Dispositivo	Proveedor
Sistema KR2i TFF	Spectrum Laboratories, Inc.
Analizador de fragmentos	Advanced Analytical
Chemidoc XRS	Laboratorios BioRad
Mini Tanque de Gel Novex Bolt	Life technologies

5

El *software* se enumera en la **Tabla 6**.

Tabla 6

Software	Proveedor
ProSize 3.0	Advanced Analytical
Excel Plug In	Spectrum Laboratories, Inc.
MS Excel	Microsoft
Image Lab	Laboratorios BioRad
Open Lab Chem Station	Agilent

10

El sistema de prueba se enumera en la **Tabla 7**.

Tabla 7

Sistema de prueba	Especies	Cepa
HEK 293	Humana	N/A

Purificación de una mezcla de IVT por medio de TFF: etapas (Ia) y (Ib)

15

A continuación, se usó una mezcla de transcripción *in vitro* (IVT) que comprende moléculas de ARNm diana de tdTomato transcritas *in vitro* sin modificar con 1644 nucleótidos (nt) de longitud. Además, se usó una mezcla de enzimas que comprende ARN polimerasa de T7, pirofosfatasa inorgánica, inhibidor de ribonucleasa y Desoxirribonucleasa I.

20

Precipitación de ARN

Cada una de la mezcla de IVT y la mezcla enzimática se precipitó con una cantidad igual de NH₄OAc 5 M helado con

un pH de 7 hasta una concentración final de NH_4OAc 2,5 M y se incubaron en hielo durante al menos 30 minutos. Antes de la TFF, la mezcla respectiva se diluyó 1:1 con NH_4OAc 2,5 M con un pH de 7 hasta una concentración final de aproximadamente 0,5 mg/ml de ARNm en la mezcla. La IVT o mezcla de enzimas se conectó al sistema de TFF, que inicialmente se cebó durante 10 minutos por medio de la circulación de la mezcla de IVT a 50 ml/min con la pinza de permeado cerrada.

Etapas (la): Eliminación de proteínas, nucleótidos y sales

La diafiltración de la mezcla respectiva se llevó a cabo a 50 ml/min a una TMP constante de aproximadamente 200 a 30 kPa (300 mbar) utilizando una columna de filtro de MPES de MWCO de 500 kDa. La mezcla respectiva se diafiltró con 10 volúmenes de lavado de NH_4OAc 2,5 M con un pH de 7. Esta etapa eliminó de manera eficaz enzimas, nucleótidos así como también componentes de tampón de la transcripción *in vitro*. La etapa (la) se puede usar para eliminar cualquier otra proteína y/o enzima de cualquier otra etapa de producción intermedio (por ejemplo, desfosforilación, colocación de caperuza posterior, poliadenilación, etc.). Para algunas enzimas (por ejemplo, poli(A) polimerasa, que se une con alta afinidad a las moléculas de ARNm de interés), se puede añadir un detergente (por ejemplo, SDS, LDS, etc.) al tampón de acetato de amonio con un pH de 7. En el caso de que la poli(A) polimerasa sea usada para la poliadenilación, la etapa posterior (la) preferentemente se lleva a cabo a una temperatura entre 20 °C y 30 °C, preferentemente entre 23 °C y 27 °C, más preferentemente a 25 °C. Esta temperatura es ventajosa para la eliminación eficaz de la poli(A) polimerasa.

Etapas (lb): Eliminación de NH_4OAc de la etapa (la)

Con el fin de eliminar el NH_4OAc y resolver las moléculas de ARNm, se usó una columna de filtro de MPES de MWCO de 100 kDa para diafiltración con 10 volúmenes de lavado utilizando agua libre de nucleasas a un caudal de 50 ml/min y una TMP de aproximadamente 20 a 30 kPa (200-300 mbar). De manera alternativa, se puede usar una columna de filtro de MPES de MWCO de 50 kDa dependiendo del tamaño de la molécula de ARNm.

Para investigar la eficiencia de purificación de las etapas (la) y (lb), el retenido de TFF que comprende las moléculas de ARNm se puede tomar una muestra antes y después de la TFF (es decir, la etapa (lb)) y analizarse, por ejemplo, utilizando medición de UV, analizador de fragmentos, electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) seguido de, por ejemplo, tinción de coomassie coloidal.

De acuerdo con lo mostrado en las Figuras 3 a 5, las enzimas se pueden eliminar de manera eficaz de las moléculas de ARNm por medio de la aplicación de las etapas (la) y (lb) de acuerdo con lo descrito con anterioridad. De ese modo, las moléculas de ARNm fueron retenidas por la columna de TFF, mientras que las enzimas y/o proteínas se eliminaron de manera eficaz. El análisis del pico de frotis reveló que el pico previo de frotis era del 4,7 % antes de la purificación de TFF y tenía una desviación de +1,3 % para la purificación de TFF a 4 °C y + 1,8 % después de la purificación de TFF llevada a cabo a TA. Por lo tanto, no se pudo observar degradación del ARNm.

Purificación de ARNm precipitado y disuelto vía TFF: Desarrollo de las etapas (lla) y (llb)

A continuación, se usó el ARNm precipitado y disuelto para una purificación adicional.

Prueba de diferentes membranas de filtración y el efecto de EDTA en la transmisión de ARNm

Se ensayaron diferentes membranas de filtro que tenían tamaños de poro variables con respecto a la transmisión de moléculas de ARNm utilizando agua libre de nucleasas sola o agua libre de nucleasas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM adicional. Se ensayaron cuatro columnas de mPES que tenían un punto de corte de peso molecular (MWCO) de 500 kDa, 300 kDa, 100 kDa y 50 kDa, respectivamente. La presión transmembrana (TMP) se ajustó utilizando la abrazadera de retenido en el sistema de TFF y se mantuvo a 4 kPa (40 mbar) para las columnas con un MWCO de 500 kDa y 50 kDa, respectivamente, y a 10 kPa (100 mbar) para las columnas con un MWCO de 100 kDa y 300 kDa, respectivamente. La bomba principal se ajustó a un caudal de 15 ml/min y la TFF se llevó a cabo a TA. La concentración inicial de la molécula de ARNm en el aporte fue de 0,1 mg/ml y las concentraciones de la molécula de ARNm en el concentrado y el permeado se midieron utilizando mediciones de UV. Cada columna se probó con volúmenes de lavado de 10 veces del volumen de muestra original.

Sin EDTA, las moléculas de ARNm fueron retenidas por la columna probada que tenía un MWCO de 500 kDa. Se asumió que los tamaños de poro más pequeños (es decir, 300 kDa, 100 kDa y 50 kDa) tampoco permitirían la etapa de las moléculas de ARNm y, por lo tanto, no se ensayaron más sin la presencia de EDTA.

Con EDTA, las moléculas de ARNm se movieron de manera sorprendente a través de los poros de la membrana de filtro MWCO de 500 kDa y también se perdieron parcialmente utilizando la membrana de filtro MWCO de 300 kDa. Sin embargo, las moléculas de ARNm se podrían retener con éxito utilizando las membranas de filtro de MWCO de 100 y 50 kDa en presencia de EDTA 10 mM. Por lo tanto, se eligió la columna MWCO de 100 kDa para la filtración de moléculas de ARNm en los experimentos que se muestran a continuación.

Cabe señalar que en algunos casos se observó una precipitación esporádica de las moléculas de ARNm después de la filtración con EDTA 10 mM. Sin embargo, esta precipitación se podría evitar de manera eficaz utilizando un tampón que comprenda MOPS 40 mM y EDTA 10 mM.

5 *Preparación de un tampón de diafiltración de MOPS 40 mM y EDTA 10 mM*

Se preparó un tampón de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 1 M, en donde el MOPS se disolvió en agua libre de nucleasas. El pH del tampón de MOPS 1 M se ajustó luego a un pH de 7 utilizando NaOH al 32 %. El tampón de MOPS 1 M obtenido que tiene un pH de 7 se mezcló con EDTA 0,5 M y agua libre de nucleasas para obtener finalmente un tampón de diafiltración que comprendía MOPS 40 mM y EDTA 10 mM.

Determinación de los volúmenes de tampón de lavado para eliminar oligonucleótidos de ácido nucleico

La eficiencia del proceso de TFF, es decir, el número mínimo de ciclos de lavado necesarios para la eliminación completa de impurezas tales como los oligonucleótidos de ácido nucleico que representan transcripciones fallidas y/o productos de hidrólisis, depende en gran medida del rechazo de la molécula por el filtro de membrana y del tamaño de sus poros. Por lo tanto, se investigó el efecto respectivo de los volúmenes de tampón de lavado para determinar el número de ciclos de lavado necesarios para eliminar los oligonucleótidos de ácido nucleico enriquecidos del ARNm precipitado y disuelto que comprende las moléculas de ARNm de interés.

Para este experimento, el caudal de TFF se estableció en 15 ml/min y la TMP se mantuvo constante a aproximadamente 4 kPa (40 mbar) utilizando una columna de filtro de MPES de MWCO de 100 kDa. En un volumen total de aporte de 5 ml, se añadieron 500 µl de moléculas de ARNm con un oligonucleótido de ADN de 10 nt de longitud que representa el 2,5 % de la molécula de ARNm diana (m/m), oligonucleótido de ADN de 50 nt de longitud que representa el 2,5 % de la molécula de ARNm diana (m/m) y oligonucleótidos de ADN de 120 nt de longitud que representan el 5 % de la molécula de ARNm diana (m/m). Las muestras para el análisis de HPLC de fase inversa se extrajeron después de volúmenes de lavado de 5 veces, 10 veces, 15 veces y 20 veces del volumen de aporte original con el tampón de diafiltración que comprende MOPS 40 mM y EDTA 10 mM. Antes de extraer la muestra, se cerró la pinza de permeado y se abrió la válvula de retenido para la circulación del retenido a 50 ml/min durante 5 minutos. Para cada ciclo de lavado, se extrajeron 100 µl de muestra utilizando una jeringa estéril y las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis. La TFF se llevó a cabo a temperatura ambiente. Las muestras se investigaron utilizando análisis de HPLC de fase inversa, el área detectada a 260 nm es representativa de las cantidades relativas de oligonucleótido de ADN en la muestra. Las áreas correspondientes antes de la TFF (control) se establecieron al 100 % de oligonucleótido.

En todos los casos, no se pudieron detectar oligonucleótidos de ácido nucleico después de aplicar volúmenes de lavado de 5 veces, 10 veces, 15 veces y 20 veces al volumen de aporte, respectivamente. Por lo tanto, los resultados mostraron que ya después de volúmenes de lavado de 5 veces con tampón de lavado, no se podían detectar más oligonucleótidos de ácido nucleico en el retenido. Se determinó que un volumen de lavado mínimo de 10 veces con tampón de lavado era suficiente para la eliminación de los oligonucleótidos de ácido nucleico de las moléculas de ARNm.

Determinación de los volúmenes de lavado con agua libre de nucleasas para la eliminación de EDTA

Dado que la eliminación de los oligonucleótidos de ADN por medio de TFF se lleva a cabo utilizando tampón de lavado, es decir tampón de diafiltración que comprende MOPS 40 mM y EDTA 10 mM, una etapa de filtración posterior es ventajoso para el intercambio del tampón de lavado con agua libre de nucleasas. Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento para determinar la cantidad de ciclos de lavado necesarios para la eliminación del tampón de lavado de las moléculas de ARNm. Del experimento anterior, la solución de aporte que comprende las moléculas de ARNm y tiene un volumen total de aproximadamente 5 ml que se había filtrado previamente con volúmenes de lavado de 20 veces de tampón de diafiltración se diafiltró con agua libre de nucleasas a un caudal de 15 ml/min y una TMP constante de 4 kPa (40 mbar) utilizando una columna de filtro de MPES de MWCO de 100 kDa. Se tomaron muestras para el análisis de HPLC de fase inversa después de volúmenes de lavado de 5 veces, 10 veces, 15 veces y 20 veces del volumen de aporte original con agua libre de nucleasas. Con el fin de cuantificar la cantidad de EDTA residual después de cada ciclo de lavado con agua libre de nucleasas se tituló el tampón de diafiltración que comprendía MOPS 40 mM y EDTA 10 mM y se registró una curva estándar de calibración (véase la **Tabla 6**; curva estándar de calibración MOPS-EDTA: $\log(y) = 0,6467 \log(x) + 1,9128$; $r = 0,99462$; $r^2 = 0,99877$; modelo de curva: $\log/\log$). Dado que el tampón de MOPS solo no muestra señal de absorción a 260 nm, las concentraciones indicadas en la **Tabla 8** y la **Tabla 9** corresponden a la concentración de EDTA. El experimento se llevó a cabo a 22 °C TA. En la **Tabla 9** se muestran los datos después de la eliminación de EDTA después de cada ciclo de lavado.

De acuerdo con lo mostrado en la **Tabla 9**, las cantidades decrecientes de EDTA de acuerdo con el área del pico detectada por HPLC de fase inversa a 260 nm después de aumentar los volúmenes de lavado revelaron que un mínimo de 10 veces los volúmenes de lavado con agua libre de nucleasas eran necesarios para la eliminación parcial del EDTA residual.

Tabla 8

EDTA cSOLL [mM]	Área pico 260 nm	EDTA calculado [mM]	Precisión	Precisión absoluta
1,00	74,864	0,92	92 %	8 %
0,80	68,269	0,79	99 %	1 %
0,50	56,447	0,57	115 %	15 %
0,10	19,282	0,10	96 %	4 %
0,05	13,057	0,05	100 %	0 %

Tabla 9

ID	ÁREA MOPS-EDTA	EDTA residual [mM]
20X tampón de lavado, 0X agua libre de nucleasas	205,65	Por encima de ULOQ
20X tampón de lavado, 5X agua libre de nucleasas	60,7	0,65
20X tampón de lavado, 10X agua libre de nucleasas	24,3	0,14
20X tampón de lavado, 15X agua libre de nucleasas	7,8	Por debajo de LOQ
20X tampón de lavado, 20X agua libre de nucleasas	13,8	0,05

5 Prueba de los parámetros determinados

En los experimentos anteriores que se llevaron a cabo a TA, se determinó el número mínimo de ciclos de lavado con tampón de diafiltración necesarios para la eliminación de los oligonucleótidos de ADN en la etapa (IIa), así como también el número mínimo de ciclos de lavado con agua libre de nucleasas necesarios para la eliminación del EDTA residual en la etapa (IIb). Para probar los parámetros determinados, se añadieron 500 µg de ARNm enriquecidos con oligonucleótidos de ácido nucleico de 10 nt de longitud que representan el 2,5 % del volumen de la molécula de ARNm diana, oligonucleótido de ADN de 50 nt de longitud que representa el 2,5 % del volumen de la molécula de ARNm diana y oligonucleótido de ADN de 120 nt de longitud que representa el 5 % del volumen de la molécula de ARNm diana en un volumen de aporte total de 5 ml (denominado "Antes de la TFF" en la **Tabla 8** y la **Tabla 9**).

Para los experimentos que se describen a continuación, se usó la siguiente configuración si no se indica lo contrario: La solución de aporte que comprende 0,1 mg/ml de moléculas de ARNm se diafiltró utilizando una columna de filtro de MPES de MWCO de 100 kDa a un caudal de 15 ml/min y una TMP de aproximadamente 4 kPa (40 mbar). Los volúmenes de lavado aplicados fueron en ambos casos 10 veces, es decir, 10 veces el volumen de lavado con tampón de diafiltración que comprende MOPS 40 mM y EDTA 10 mM seguido de un volumen de lavado de 10 veces con agua libre de nucleasas (denominado "Después de la TFF" en la **Tabla 8** y la **Tabla 9**). Dado que las moléculas de ARNm son propensas a degradarse por hidrólisis, en especial a temperaturas elevadas, los experimentos se llevaron a cabo a 4 °C, es decir, utilizando agua helada, para mantener la hidrólisis de la molécula de ARNm al mínimo.

Esta configuración dio como resultado la eliminación eficaz de oligonucleótidos de ADN de las tres longitudes ensayadas (**Tabla 10**) así como también del tampón de diafiltración residual (**Tabla 11**) de acuerdo con lo determinado utilizando HPLC de fase inversa. Además, el análisis de los picos de frotis se llevó a cabo después de la electroforesis en gel capilar utilizando el analizador de fragmentos antes y después de la purificación (**Tabla 12**). Los análisis de picos de frotis indicaron que la integridad del ARNm no varió debido a la purificación de TFF y, por lo tanto, no se vio afectada por el procedimiento.

Tabla 10

	Área pico de oligonucleótidos de ADN		
	Longitud 10 nt	Longitud 50 nt	Longitud 120 nt
Antes de la TFF	100 %	100 %	100 %
Después de la TFF	0,0 %	0,0 %	0,0 %

Tabla 11

	Área pico MOPS-EDTA	MOPS-EDTA residual [mM]
Antes de la TFF	193,0	Por encima del límite superior de cuantificación
Después de la TFF	27,4	0,17

Tabla 12

	Pico previo de frotis [%]
Referencia (sin MOPS-EDTA)	20,0
Antes de la TFF con MOPS-EDTA, pH 7; Duplicado 1	18,2
Antes de la TFF con MOPS-EDTA, pH 7; Duplicado 2	15,4
10 veces tampón de lavado, 10 veces agua libre de nucleasas; Duplicado 1	17,4
10 veces tampón de lavado, 10 veces agua libre de nucleasas; Duplicado 2	16,5

Determinación de la eficiencia de traducción de moléculas de ARNm purificadas.

Además, resultó de gran interés determinar la eficacia de traducción de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas. Por lo tanto, se sembraron $1,4 \times 10^6$ células HEK293 en placas de 6 pocillos y se transfectaron con 3,75 µg de moléculas de ARNm purificadas de acuerdo con lo descrito con anterioridad y de acuerdo con un procedimiento estándar, respectivamente. La transfección se llevó a cabo utilizando MessengerMax (1:15). Después de 24 h, las células se lisaron e investigaron utilizando SDS-page y transferencia Western, respectivamente, utilizando 50 µg de lisado celular cada una.

- De acuerdo con lo que se puede observar en la **Figura 6**, se detectó una cantidad comparable de moléculas de ARNm utilizando transferencia Western (**A**) y se cuantificó (**B**).

Determinación de un umbral para la eliminación de ARNm con diferentes longitudes.

- Se añadió un total de 300 µg de ARNm de hCFTR diana de ARNm con diferentes moléculas de ARNm que variaban en longitud utilizando un volumen total de 5 ml. En particular, se usaron 6 tipos diferentes de moléculas de ARNm para enriquecimiento, cada tipo representa el 16,7 % del volumen de la molécula de ARNm diana. Tres tipos de moléculas de ARNm presentaban una caperuza y una cola de poli(A) y tenían una longitud total de 3632 nt, 1864 nt y 1111 nt, respectivamente. Dos tipos no tenían caperuza ni cola de poli(A) y presentaban una longitud total de 494 nt y 256 nt, respectivamente. El último tipo se refería a un oligonucleótido de ADN de 120 nt de longitud que sirvió como control positivo.

- La solución que comprende la molécula de ARNm enriquecida se filtró de acuerdo con lo descrito con anterioridad a TA (**Figura 7**) y 4 °C (**Figura 8**), respectivamente. Las muestras se extrajeron antes de la TFF (directamente después de la preparación de la muestra), después de volúmenes de lavado 5 veces, 10 veces, 15 veces y 20 veces del volumen de muestra original utilizando el tampón de diafiltración descrito con anterioridad, y después de un lavado adicional utilizando volúmenes de lavado de 10 veces de agua libre de nucleasas. Para cada ciclo de lavado, se extrajeron 100 µl de muestra utilizando una jeringa estéril y se mantuvo en hielo hasta el análisis. La transmisión de las moléculas a través de los poros del filtro se evaluó por medio de electroforesis en gel capilar utilizando un analizador de fragmentos.

- De acuerdo con lo mostrado en la **Figura 7** y la **Figura 8**, se pudo observar un punto de corte para las moléculas de ARNm que tienen al menos una longitud de 951 nt utilizando una columna de mPES de 100 kDa. Para moléculas de ARNm que tienen una longitud de menos de 951 nt, las columnas que tienen un MWCO más bajo podrían ser ventajosas, tales como por ejemplo, columnas de mPES de 50 kDa o 70 kDa.

Aumento de la concentración de la molécula de ARNm de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml

- En el siguiente conjunto final de experimentos (**Figura 9**), el procedimiento de filtrado descrito a continuación se aplicó a una solución que comprendía ARNm de tdTomato no modificado de 1644 nt de longitud sin modificar como molécula de ARNm diana. En particular, se analizó un total de 5 ml de solución de aporte que comprende 1 mg/ml de moléculas de ARNm, correspondientes a un total de 5 mg de moléculas de ARNm, así como también un oligonucleótido de ADN de 15 nt y un oligonucleótido antisentido de 25 nt de longitud, que se une de forma complementaria a la molécula de ARNm de interés, que representa el 2,5 % de la molécula de ARNm diana (m/m), y oligonucleótidos de 120 nt de longitud que representan el 5 % de la molécula de ARNm diana (m/m). Esta solución de aporte enriquecida se diafiltró a 4 °C utilizando una columna de filtro de MPES de MWCO de 100 kDa a un caudal de 15 ml/min y una TMP de aproximadamente 4 kPa (40 mbar). Los volúmenes de lavado aplicados fueron i) volumen de lavado de 10 veces con agua libre de nucleasas, seguido de ii) volumen de lavado de 10 veces con tampón de diafiltración que comprende MOPS 40 mM y EDTA 10 mM, seguido de iii) volumen de lavado de 10 veces con agua libre de nucleasas.

- Los valores de frotis se investigaron como un indicador de la integridad del ARNm. En particular, se obtuvieron los siguientes valores de frotis: un pico previo de frotis del 6,4 % antes de la TFF, así como también un pico previo de frotis del 5,9 % después de la TFF. Las áreas pico previo de frotis reflejan la proporción de productos hidrolizados relacionados con el ARNm. Por lo tanto, no se pudieron medir productos de hidrólisis por medio del análisis del analizador de fragmentos y se pudo demostrar que la purificación de TFF no afecta la integridad del ARNm.

Esquema de ejemplo para la determinación de parámetros óptimos de TFF por medio de la aplicación de medidas de rutina

- La siguiente es una breve descripción de cómo aquéllos con experiencia en la materia pueden optimizar el procedimiento de TFF descrito con anterioridad por medio de la aplicación de medidas de rutina.

Etapas (la)

- El caudal de TFF se puede ajustar para lograr una velocidad de cizallamiento suficiente con el fin de hacer recircular las moléculas de ARNm precipitadas a través del sistema de TFF y barrer las moléculas de ARNm precipitadas de la

superficie del filtro. Por medio de la apertura de la pinza de permeado, se puede lograr un flujo de permeado suficiente. La eliminación de la enzima se puede determinar, por ejemplo, por medio de análisis SDS-Page y los volúmenes de lavado requeridos se pueden ajustar por medio de medidas de rutina (preferentemente, de 1 a 20 volúmenes de lavado; más preferentemente, de 5 a 15; lo más preferentemente, de 9 a 11). Un volumen de lavado se define como un volumen igual de medio de diafiltración, por ejemplo, tampón de acetato de amonio con un pH de 7, del volumen de aporte inicial.

Etapas (Ib)

Se pueden aplicar los mismos parámetros que se describen en la etapa (Ia). De este modo, el tampón se puede intercambiar, por ejemplo, por agua libre de nucleasas con el fin de resolver las moléculas de ARNm y eliminar el tampón (por ejemplo, acetato de amonio). La eliminación del tampón se puede determinar, por ejemplo, por medio de conductividad, medición de UV y los volúmenes de lavado requeridos se pueden ajustar por medio de medidas de rutina (preferentemente, de 1 a 20 volúmenes de lavado; más preferentemente, de 5 a 15; lo más preferentemente, de 9 a 11). Un volumen de lavado se define como un volumen igual de medio de diafiltración, por ejemplo, agua libre de nucleasas, del volumen de aporte inicial.

Etapas (IIa)

El caudal de TFF se puede ajustar para lograr una velocidad de cizallamiento suficiente con el fin de hacer recircular las moléculas de ARNm a través del sistema de TFF y barrer las moléculas de ARNm de la superficie del filtro. Por medio de la apertura de la pinza de permeado, se puede lograr un flujo de permeado suficiente. La pérdida de ARNm de interés se puede controlar, por ejemplo, por medio de medición de UV (por ejemplo, medición en línea/fuera de línea) en la línea de permeado. Si se observa una pérdida de ARNm de interés, el caudal y/o la TMP se pueden ajustar por medio de medidas de rutina hasta que no se observe ninguna pérdida adicional de ARNm de interés. Los volúmenes de lavado requeridos se pueden ajustar por medio de medidas de rutina que dependen de la cantidad de impurezas (por ejemplo, transcripciones fallidas y/o productos de hidrólisis); (preferentemente, de 1 a 20 volúmenes de lavado; más preferentemente, de 5 a 15; lo más preferentemente, de 9 a 11). Un volumen de lavado se define como un volumen igual de medio de diafiltración, por ejemplo, MOPS-EDTA a un pH de 7, del volumen de aporte inicial.

Etapas (IIb)

Se pueden aplicar los mismos parámetros que se describen en la etapa (IIa). De este modo, el tampón se puede intercambiar, por ejemplo, por agua libre de nucleasas con el fin de eliminar el tampón, por ejemplo, MOPS-EDTA. La eliminación del tampón se puede determinar, por ejemplo, por medio de conductividad, medición de UV y los volúmenes de lavado requeridos se pueden ajustar por medio de medidas de rutina (preferentemente, de 1 a 20 volúmenes de lavado; más preferentemente, de 5 a 15; lo más preferentemente, de 9 a 11). Un volumen de lavado se define como un volumen igual de medio de diafiltración, por ejemplo, agua libre de nucleasas, del volumen de aporte inicial.

Los experimentos de fluctuación de TMP pueden ser útiles para determinar las condiciones óptimas para la purificación de moléculas de ARNm. A modo de ejemplo, se diafiltró un total de 5 ml de solución de aporte que comprendía una concentración de molécula de ARNm diana de 1,0 mg/ml en el tampón de diafiltración usado en la etapa (IIa) de acuerdo con lo descrito con anterioridad utilizando una columna de filtro de MPES de MWCO de 100 kDa y un caudal de 15 ml/min. El flujo de permeado se midió en ml/min a 6 valores de TMP diferentes que oscilaban entre aproximadamente 5 kPa (50 mbar) (y aproximadamente 15 kPa (150 mbar). De acuerdo con lo que se puede observar en la **Figura 10** para el ARNm de tdTomato, se determinó que la TMP óptima era de aproximadamente 5 kPa (50 mbar) a un caudal de 15 ml/min, pero esto podría depender de la configuración experimental.

Ejemplo comparativo

A continuación, se describe un ejemplo que se llevó a cabo con el fin de comparar los resultados obtenidos por el procedimiento divulgado en la presente memoria (enfoque 1) y por el procedimiento divulgado en el documento WO 2015/164773 A1 (enfoque 2).

Enfoque 1

El ARNm de hCFTR no modificado y transcrito *in vitro* (compárese el documento US 9713626 B2; sedimento de 5 mg) se enriqueció con oligonucleótidos de ADN de 25 nucleótidos (nt) y 120 nt de longitud, así como también con moléculas de péptido 1 similar al glucagón de 256 nt de longitud (moléculas de ARNm de GLP-1 (**SEQ ID NO: 1**). Los oligonucleótidos de ADN de 25 nt de longitud se añadieron al ARNm en una proporción del 2,5 % con respecto a la cantidad total de ARNm en µg. Los oligonucleótidos de ADN de 120 nt de longitud se añadieron al ARNm en una proporción del 5,0 % con respecto a la cantidad total de ARNm en µg. Además, las moléculas de ARNm de GLP-1 de 256 nt de longitud se añadieron al ARNm en una proporción del 16 % con respecto a la cantidad total de ARNm en µg.

Las moléculas de ARNm enriquecidas se precipitaron utilizando NH_4OAc 2,5 M (pH 7).

Para la eliminación de proteínas, sales y transcripciones fallidas, la etapa (Ia) se llevó a cabo con volúmenes de lavado de 10 veces de NH_4OAc 2,5 M utilizando un MPES de MWCO de 500 kDa con un caudal de 50 ml/min y ~20-30 kPa (200-300 mbar) de TMP (concentración de ARNm: 0,5 mg/ml).

Para la eliminación de NH_4OAc y para la resolución de las moléculas de ARNm, la etapa (Ib) se llevó a cabo con volúmenes de lavado de 10 veces de agua libre de nucleasas utilizando un MPES de MWCO de 50 kDa con un caudal de 50 ml/min y ~20 a 30 kPa (200-300 mbar) de TMP (concentración de ARNm: 0,5 mg/ml).

Para la eliminación de cationes divalentes, transcripciones fallidas y/o productos de hidrólisis, la etapa (IIa) se llevó a cabo con volúmenes de lavado de 10 veces de MOPS 40 mM y EDTA 10 mM utilizando un MPES de MWCO de 100 kDa con un caudal de 15 ml/min y ~2 kPa (20 mbar) de TMP (concentración de ARNm: 1,0 mg/ml).

Para la eliminación del tampón de diafiltración MOPS-EDTA, la etapa (IIb) se llevó a cabo utilizando volúmenes de lavado de 10 veces de agua libre de nucleasas utilizando un MPES de MWCO de 100 kDa con un caudal de 15 ml/min y ~2 kPa (20 mbar) de TMP (concentración de ARNm: 1,0 mg/ml).

Las moléculas de ARNm obtenidas se investigaron utilizando un analizador de fragmentos/HPLC de fase inversa en vista de la eliminación de oligonucleótidos con picos, y un Nanodrop para la determinación de la recuperación de moléculas de ARNm.

Procedimiento 2 (de acuerdo con lo descrito en el documento WO 2015/164773 A1)

El ARNm de hCFTR no modificado y transcrito *in vitro* (compárese el documento US 9713626 B2; sedimento de 10,26 mg) se enriqueció con oligonucleótidos de ADN de 25 nucleótidos (nt) y 120 nt de longitud, así como también con moléculas de ARNm de GLP-1 de 256 nt de longitud (SEQ ID NO: 1). Los oligonucleótidos de ADN de 25 nt de longitud se añadieron al ARNm en una proporción del 2,5 % con respecto a la cantidad total de ARNm en μg . Los oligonucleótidos de ADN de 120 nt de longitud se añadieron al ARNm en una proporción del 5,0 % con respecto a la cantidad total de ARNm en μg . Y las moléculas de ARNm de GLP-1 de 256 nt de longitud se añadieron al ARNm en una proporción del 16 % con respecto a la cantidad total de ARNm en μg .

Las moléculas de ARNm enriquecidas se precipitaron utilizando i) tiocianato de guanidinio; lauril sarcosilo de sodio y citrato de sodio hasta concentraciones finales de tiocianato de guanidinio 2,09 M; lauril sarcosilo de sodio al 0,26 % y citrato de sodio 13,0 mM y ii) etanol absoluto hasta una concentración final de ~38 % de EtOH, y se incubó durante 5 minutos a TA.

La carga se llevó a cabo utilizando ~22 ml de ARNm precipitado con un caudal de ~6 ml/min utilizando un MPES de MWCO de 500 kDa (concentración de ARNm: 0,52 mg/ml).

El lavado se llevó a cabo por medio de la repetición de los dos etapas de flujo >5 veces con un caudal de ~6 ml/min utilizando un MPES de MWCO de 500 kDa (concentración de ARNm: 0,52 mg/ml): etapa a) lavado utilizando 5 ml de tiocianato de guanidinio 2,09 M; lauril sarcosilo de sodio al 0,26 %; Citrato de sodio 13,0 mM; ~38 % de EtOH y etapa b) lavado con 5 ml de etanol al 80 %.

La elución (etapa C) se llevó a cabo por medio del tratamiento del ARNm sólido obtenido con 5 ml de agua libre de nucleasas y una recirculación durante de 5 a 10 minutos (permeado cerrado) para garantizar la disolución. Este procedimiento se repitió hasta que no se recuperaron más moléculas de ARNm utilizando un caudal de ~6 ml/min y un MPES de MWCO de 500 kDa (concentración de ARNm: 0,52 mg/ml).

La diálisis (etapa D) se llevó a cabo utilizando ~5 volúmenes de lavado con citrato de sodio 1 mM (pH 6,4), un caudal de ~6 ml/min y un MPES de MWCO de 100 kDa (concentración de ARNm: 0,52 mg/ml).

Las moléculas de ARNm obtenidas se investigaron utilizando un analizador de fragmentos/HPLC de fase inversa en vista de la eliminación de oligonucleótidos con picos, y un Nanodrop para la determinación de la recuperación de moléculas de ARNm.

Es de destacar que el siguiente cambio se llevó a cabo en el caso del procedimiento 2 descrito con anterioridad en comparación con el procedimiento descrito en el documento WO 2015/164773 A1: después de la reducción de escala lineal para mantener constante la velocidad de corte en la columna de filtro, el caudal inicialmente planificado fue de 6 ml/min. Sin embargo, este caudal dio como resultado un TMP muy bajo, es decir el caudal de permeado efectivo fue de 0 ml/min y no fue posible la diafiltración. Por lo tanto, el caudal se incrementó gradualmente hasta que se observó una TMP suficiente que condujo a un flujo de permeado considerable. Por lo tanto, el caudal final usado para las etapas a) a d) osciló entre 20 a 24 ml/min (caudal de permeado entre 1,1 y 1,25 ml/min).

Los resultados que se muestran en la **Tabla 13** se obtuvieron por medio del análisis del analizador de fragmentos que

se llevó a cabo para muestras de ARNm de hCFTR no purificadas y purificadas. Los respectivos electroferogramas se muestran en la **Figura 11** para el procedimiento 1 y en la **Figura 12** para el procedimiento 2, respectivamente.

Tabla 13

Etapas de proceso	Cantidad residual de oligo de ADN de 25 nt [%]	Cantidad residual de oligo de ADN de 120 nt [%]	Cantidad residual de ARNm de 256 nt [%]
Antes de la purificación	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Ia/Ib	0,0 %	1,1 %	81,6 %
Ila	0,0 %	0,0 %	2,3 %
Ilb	0,0 %	0,0 %	2,4 %
Etapas C	0,0 %	25,6 %	86,6 %
Etapas D	0,0 %	5,7 %	91,4 %

En el caso del procedimiento 1, la eliminación de los oligonucleótidos de ADN enriquecidos (25 nt y 120 nt) se logró principalmente por medio de la etapa (Ia)/(Ib). Se requirió la etapa (Ila) para eliminar el ARNm de 256 nt que representa productos hidrolíticos más largos. La etapa (Ilb) no eliminó más el ARNm de 256 nt, lo que demuestra que para la eliminación de productos hidrolíticos y secuencias fallidas, la etapa (Ila) es esencial utilizando un agente quelante potente tal como EDTA.

En el caso del procedimiento 2, la eliminación de los oligonucleótidos de ADN enriquecidos (25 nt y 120 nt) solo se logró parcialmente por medio de las etapas A C. La etapa D no eliminó completamente los oligonucleótidos de ADN de 120 nt. El ARNm de 256 nt que representa productos hidrolíticos más largos permaneció casi completamente en la muestra después de la purificación de TFF. Por lo tanto, llevar a cabo una diálisis utilizando citrato de sodio 1 mM (etapa D) no tuvo un efecto fuerte sobre la eliminación adicional de los oligonucleótidos de ADN de 120 nt de longitud que representan moléculas de ARNm fallidas y en especial del ARNm de 256 nt de longitud que representa productos hidrolíticos más largos.

A continuación, la secuencia de ARNm de 256 nt de longitud usada en la presente memoria se describe con más detalle.

SEQ ID NO: 1

Secuencia GLP-1 optimizada para codones

GGGAGA **CUGCCAAGAU**GAAGAUGAUGCAUCCUGUGGCUGUGCGUGUUCGGCCUGUUC
 CUGGCCACCCUGUUCCTCCAUACAGCUGGCAGAUCCUGUGGAAAGCGGCCUG
 AGCAGCGAGGAUAGCGCCAGCAGCGAGAGCUUCGCCAAGCGGAUCAAGAGAC
 ACGGCGAGGGCACCUUCACCAGCGACGUGUCCAGCUACCUGGAAGGCCAGG
 CCGCCAAAGAGUUUAUCGCCUGGCUCGUGAAGGGCAGAGGCUGA^{GAAUU}

Parte del promotor T7, **C: Ethris 5'UTR mínimo, seguido de un nucleótido U adicional, TISU 5'UTR, codón de inicio**, secuencia de ARNm de GLP-1 optimizada con codón, codón de terminación, parte del sitio de restricción EcoRI.

Se usó ARNm no poliadenilado para experimentos de adición.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de moléculas de ARNm, comprendiendo dicho procedimiento

- (Ia) la purificación de moléculas de ARNm precipitadas a partir de una suspensión que comprende moléculas de ARNm precipitadas utilizando una primera solución,
 (Ib) el lavado y la disolución de las moléculas de ARNm precipitadas purificadas obtenidas en la etapa (Ia) utilizando una segunda solución,
 (IIa) la purificación de las moléculas de ARNm a partir de las moléculas de ARNm disueltas obtenidas en la etapa (Ib) utilizando una tercera solución que comprende un agente quelante, en donde el agente quelante es un agente quelante con al menos cuatro posiciones de coordinación en el catión que se va a quelar, seguido de
 (IIb) el lavado de las moléculas de ARNm purificadas obtenidas en la etapa (IIa) utilizando una cuarta solución,

en donde las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo utilizando filtración de flujo tangencial.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente quelante es EDTA.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la tercera solución tiene un pH entre 1 y 10.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la tercera solución comprende un tampón de MOPS.

5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las etapas (Ia) a (IIb) se llevan a cabo a una temperatura de entre 0 °C y 25 °C.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde antes de la etapa (Ia) dicha suspensión se obtiene utilizando acetato de amonio para la precipitación de las moléculas de ARNm, y en donde la primera solución contiene acetato de amonio.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la segunda solución es agua y/o en donde la cuarta solución es agua o comprende cloruro y/o citrato de sodio.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las moléculas de ARNm están comprendidas en un retenido después de la filtración de flujo tangencial.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el retenido obtenido en la etapa (Ia) se usa como solución de aporte para la filtración de flujo tangencial en la etapa (Ib), el retenido obtenido de la etapa (Ib) como solución de aporte en la etapa (IIa), y el retenido obtenido de la etapa (IIa) como solución de aporte en la etapa (IIb).

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las moléculas de ARNm comprendidas en la suspensión se obtienen por medio de transcripción *in vitro*.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el procedimiento además comprende la desfosforilación y/o la poliadenilación y/o la colocación de la caperuza posterior de las moléculas de ARNm.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el procedimiento comprende la desfosforilación de las moléculas de ARNm obtenidas de la etapa (Ib), seguida de la realización de las etapas (Ia) a (IIb), seguidas de la poliadenilación de las moléculas de ARNm obtenidas, seguida de la realización de las etapas (Ia) a (IIb).

13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde en el caso de la etapa (Ia) se usa una membrana de filtro con un punto de corte de peso molecular de entre 300 kDa y 0,65 µm para filtración de flujo tangencial, y/o en donde en caso de las etapas (Ib) y (IIb) se usa una membrana de filtro con un punto de corte de peso molecular de entre 1 kDa y 0,65 µm, y/o en donde en caso de la etapa (IIa) se usa una membrana de filtro con un punto de corte de peso molecular de al menos 70 kDa.

14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde un volumen de diafiltración de cualquiera de la primera, la segunda, la tercera y/o la cuarta solución es al menos 1 vez el volumen de suspensión de la etapa (Ia).

15. Un procedimiento de producción de una composición farmacéutica que comprende

- (a) la purificación de moléculas de ARNm de acuerdo con un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y
 (b) la formulación de las moléculas de ARNm así obtenidas en una composición farmacéutica.

Figura 1

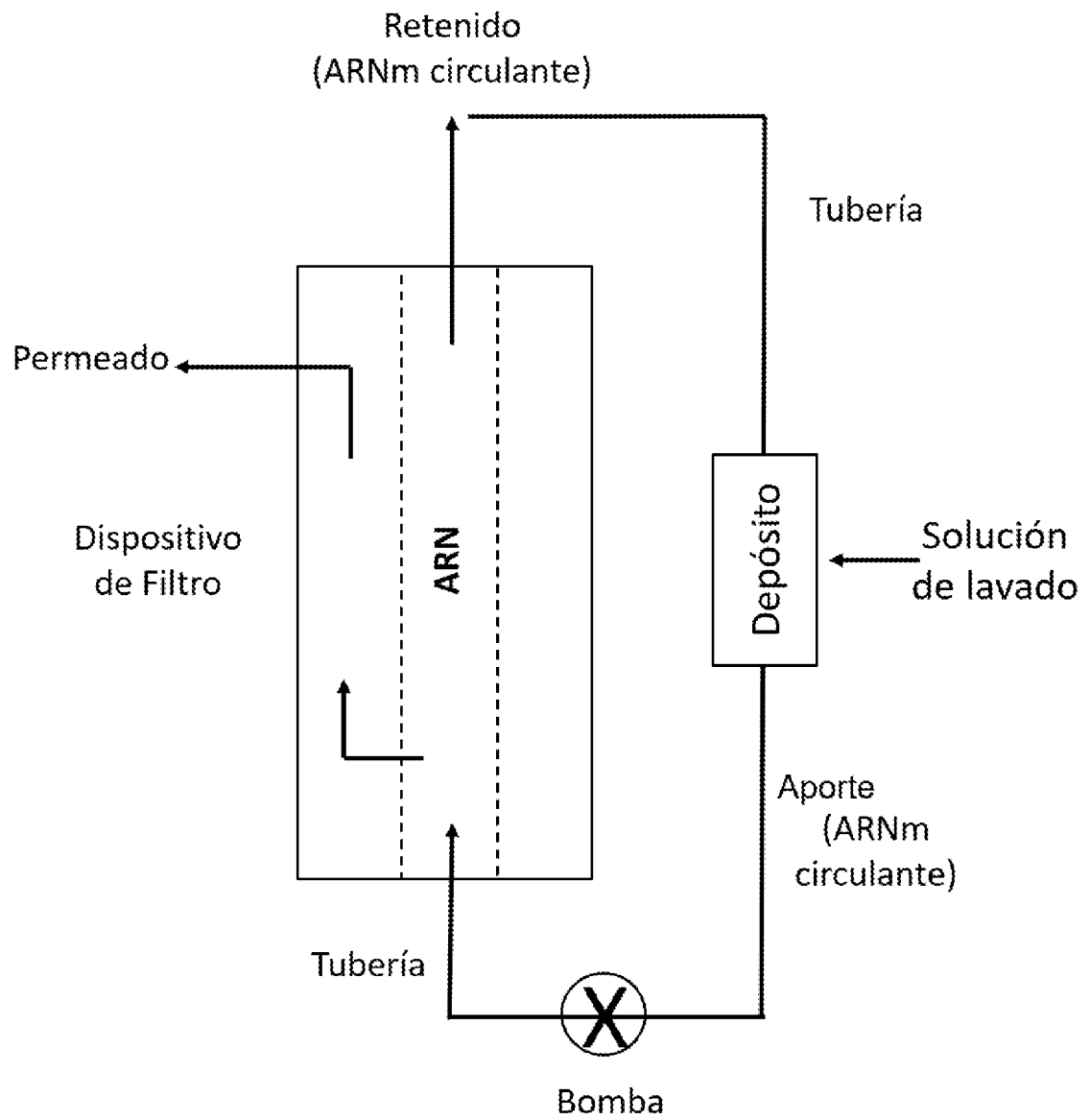


Figura 2

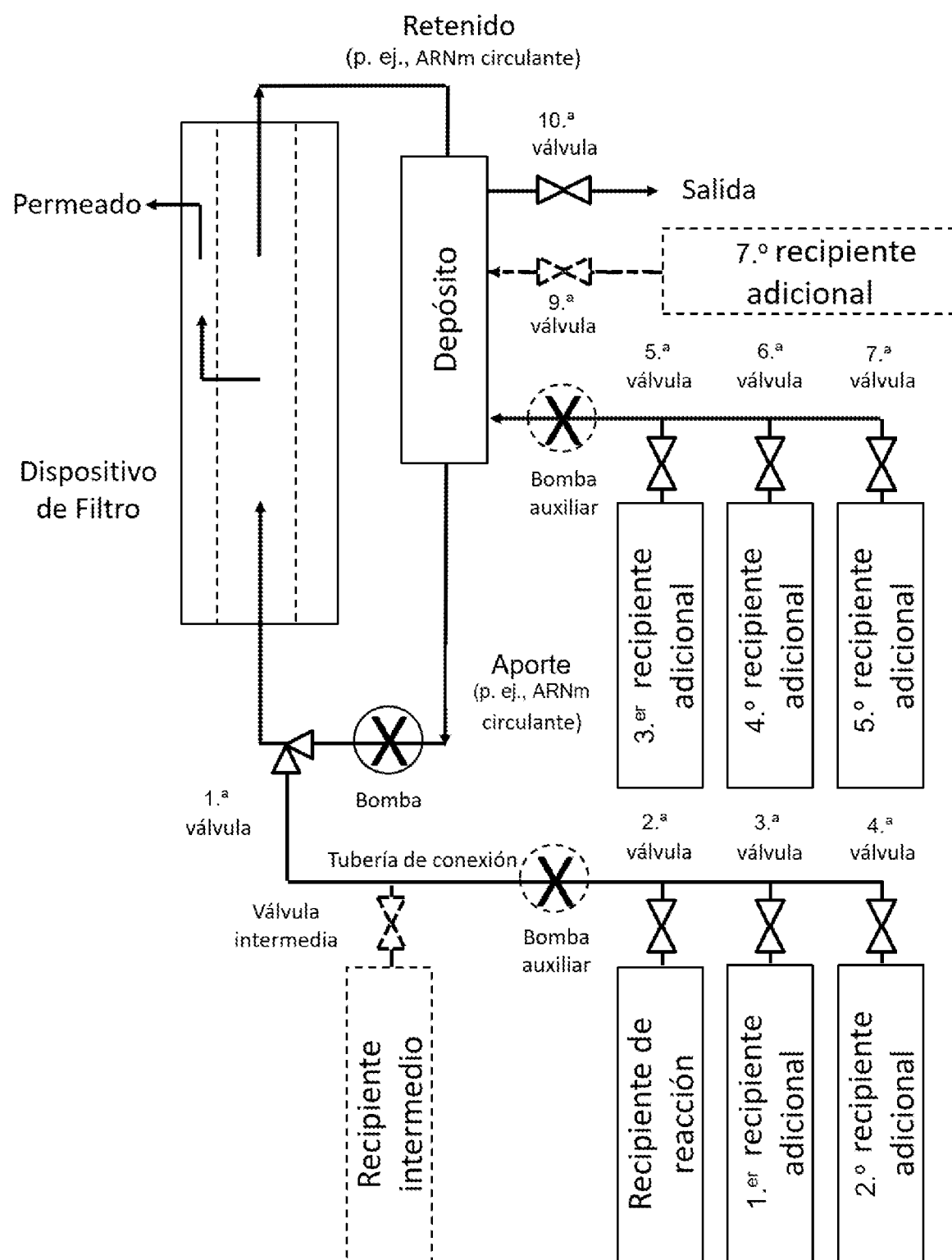


Figura 3

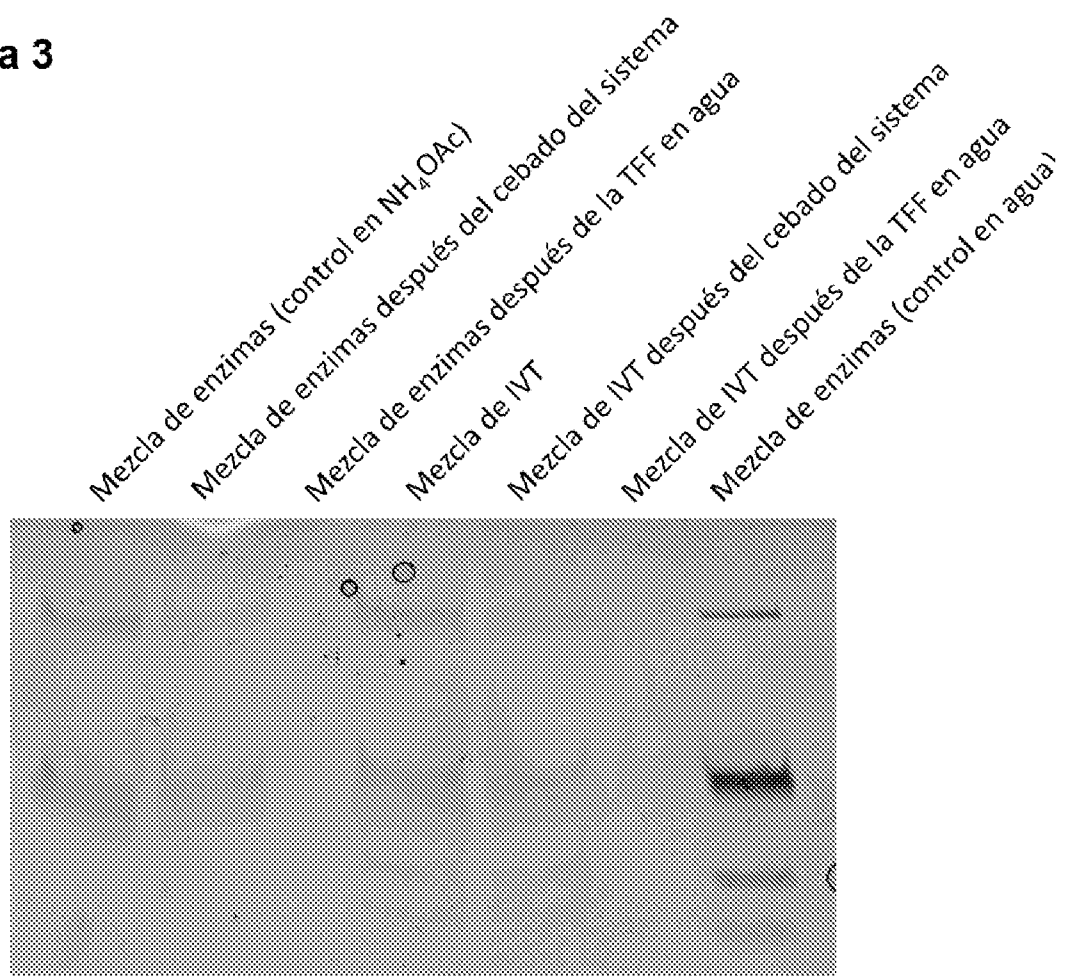


Figura 4

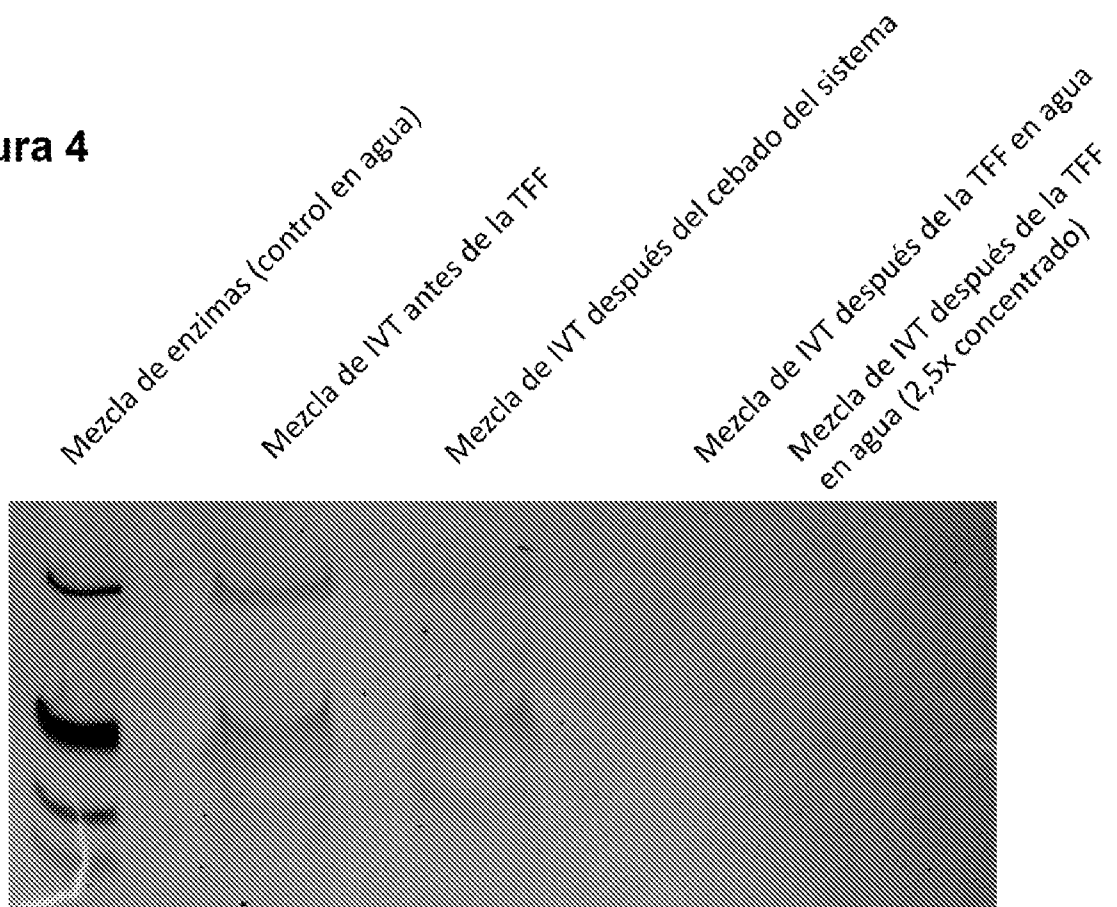


Figura 5

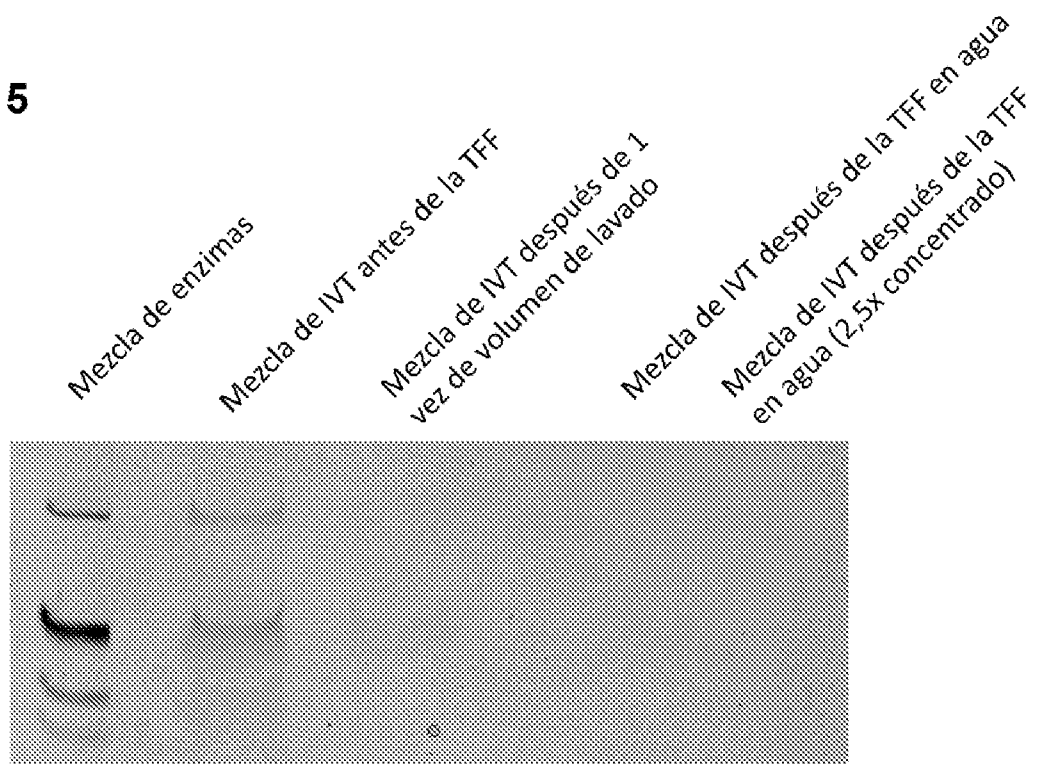
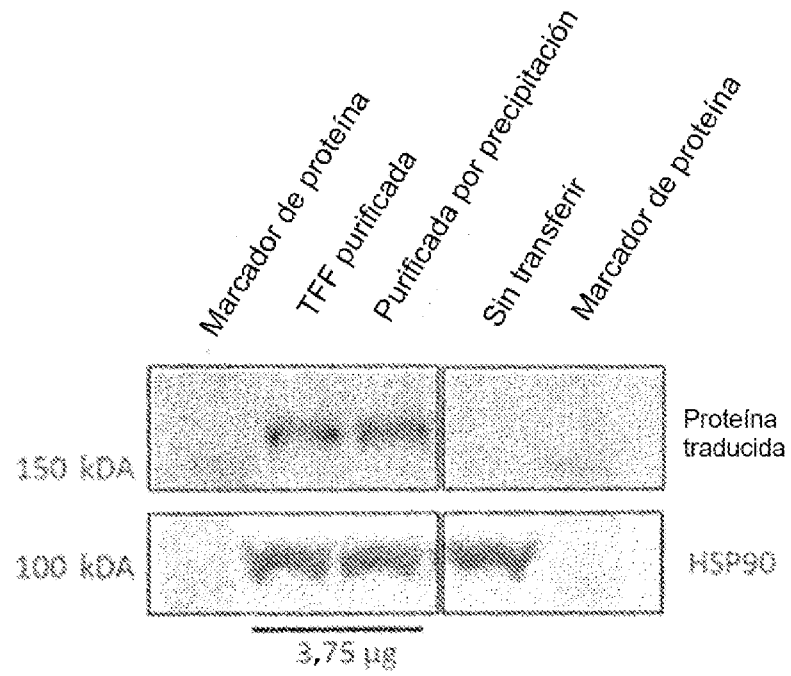


Figura 6

A



B

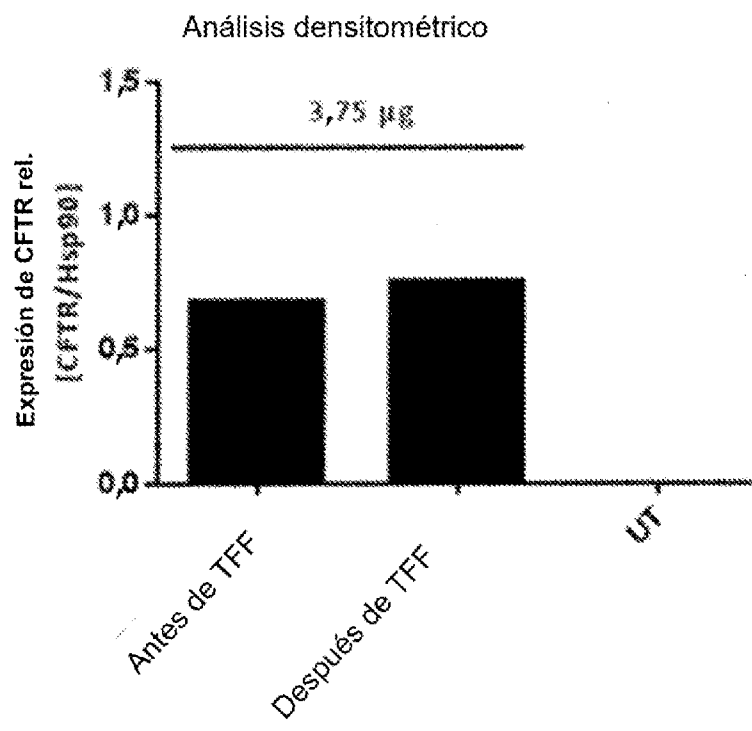


Figura 7

	Cantidad de ARN enriquecido normalizado a ARN hCFTR <i>SNIM</i> [®] después de x volúmenes de lavado [%]					
Tamaño de ARNm [nt]	Antes de la TFF	5 veces tampón de lavado	10 veces tampón de lavado	15 veces tampón de lavado	20 veces tampón de lavado	20 veces tampón de lavado 10 veces agua libre de nucleasas
3632	17,1 %	17,5 %	16,6 %	18,3 %	19,0 %	18,1 %
1864	12,1 %	12,4 %	12,9 %	13,0 %	14,2 %	12,9 %
951	13,9 %	13,4 %	15,3 %	13,2 %	15,3 %	12,2 %
494	17,4 %	11,3 %	9,4 %	8,0 %	7,2 %	6,2 %
256	20,3 %	4,6 %	2,0 %	1,1 %	0,8 %	0,7 %

Figura 8

	Cantidad de ARN enriquecido normalizado a ARN hCFTR <i>SNIM</i> [®] después de x volúmenes de lavado [%]					
Tamaño de ARNm [nt]	Antes de la TFF	5 veces tampón de lavado	10 veces tampón de lavado	15 veces tampón de lavado	20 veces tampón de lavado	20 veces tampón de lavado 10 veces agua libre de nucleasas
3632	17,2 %	18,7 %	19,6 %	18,3 %	19,6 %	18,7 %
1864	13,1 %	14,2 %	14,6 %	13,9 %	14,2 %	13,7 %
951	15,6 %	15,1 %	15,0 %	14,2 %	15,0 %	14,6 %
494	19,0 %	14,2 %	12,6 %	10,5 %	10,2 %	9,3 %
256	22,4 %	6,4 %	3,7 %	2,2 %	1,8 %	1,5 %

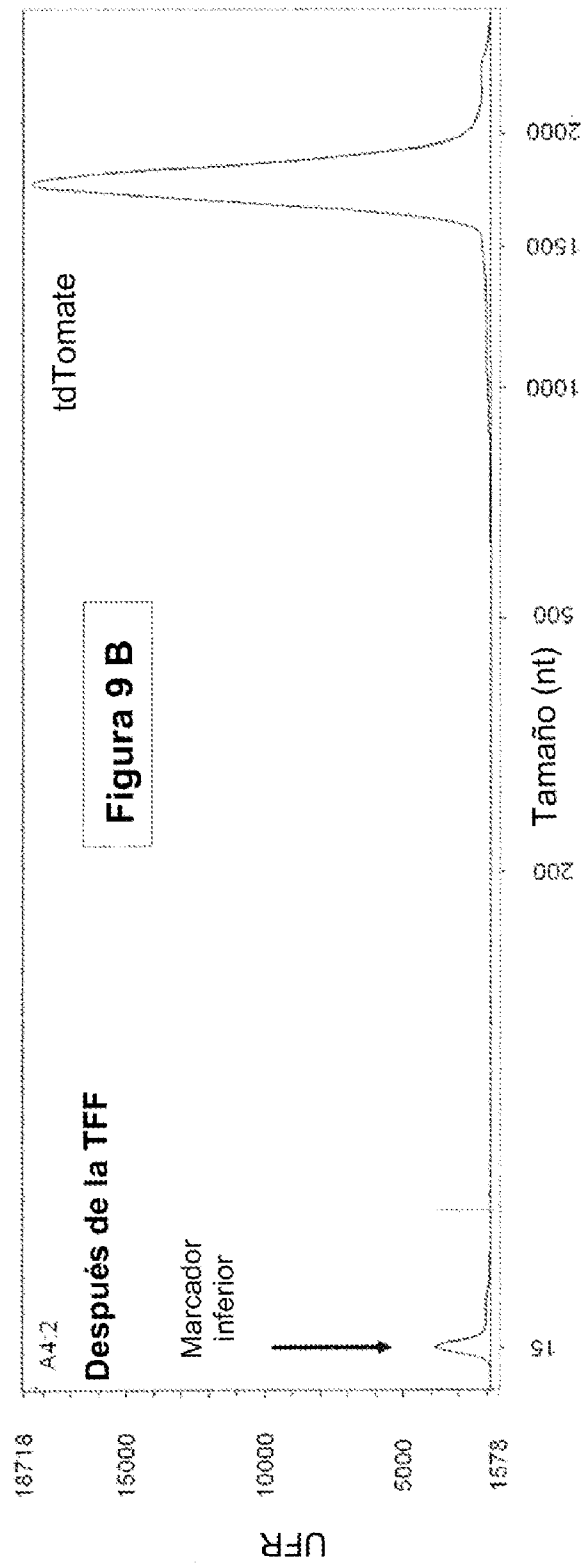
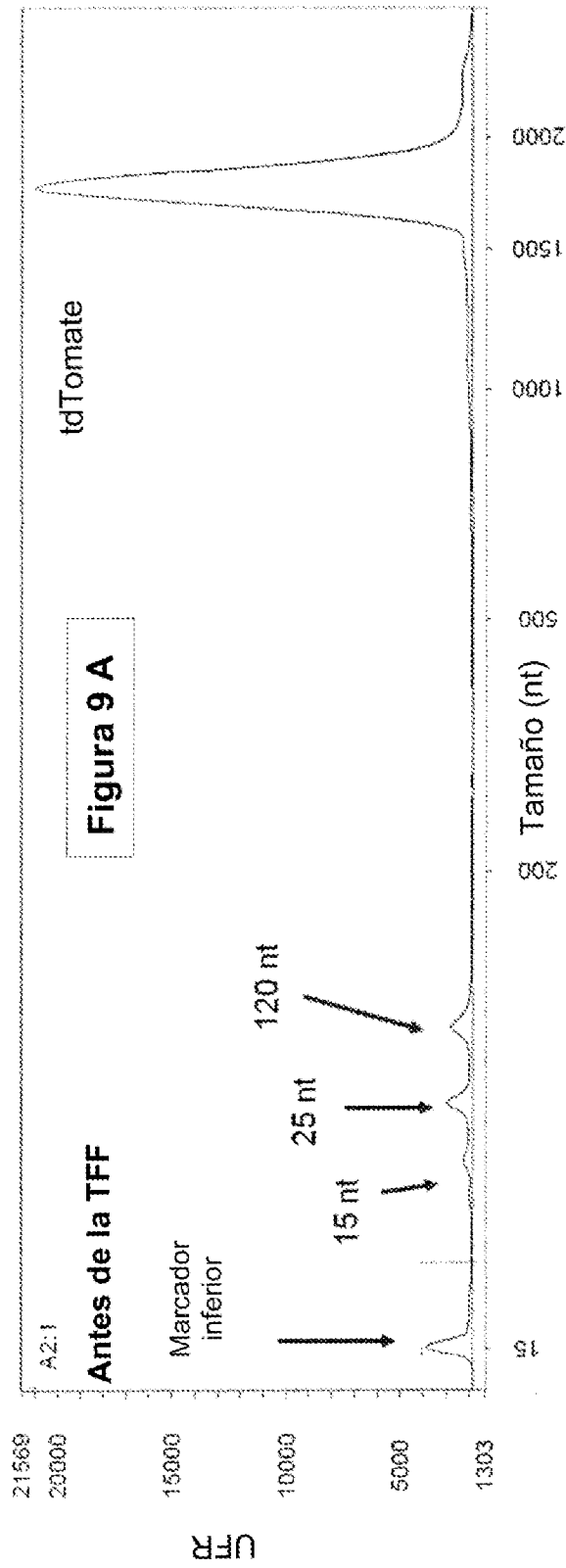


Figura 10

