

## (12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 44732 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 15/10**

(43) Date de publication :  
**30.11.2021**

---

(21) N° Dépôt :  
**44732**

(22) Date de Dépôt :  
**19.04.2017**

(30) Données de Priorité :  
**22.04.2016 WO PCT/EP2016/059056**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:  
**PCT/EP2017/059293 19.04.2017**

(71) Demandeur(s) :  
**BioNTech SE, An der Goldgrube 12 55131 Mainz (DE)**

(72) Inventeur(s) :  
**BAIERSDÖRFER, Markus ; KARIKÓ, Katalin**

(74) Mandataire :  
**MOROCCO INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES**

**(86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: EP17722695.8**

---

(54) Titre : **PROCÉDÉS DE PRODUCTION D'ARN SIMPLE BRIN**

(57) Abrégé : La présente invention concerne des procédés qui permettent d'obtenir de l'ARN simple brin (ARNsb). En outre, la présente invention concerne l'ARNsb qui peut être obtenu selon les procédés de l'invention et l'utilisation dudit ARNsb en thérapie.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de fourniture d'ARN simple brin (ARNsb), comprenant :
  - (i) la production d'une préparation d'ARN comprenant de l'ARNsb par transcription *in vitro* ;
  - (ii) la mise en contact de la préparation d'ARN avec un matériau cellulosique dans des conditions qui permettent la liaison d'ARN double brin (ARNdb) au matériau cellulosique et ne permettent pas la liaison d'ARNsb au matériau cellulosique ; et
  - (iii) la séparation de l'ARNsb du matériau cellulosique dans des conditions qui permettent la liaison d'ARNdb au matériau cellulosique et ne permettent pas la liaison d'ARNsb au matériau cellulosique,dans lequel  
à l'étape (ii) la préparation d'ARN est fournie sous la forme d'un liquide comprenant de l'ARNdb et un premier tampon et/ou le matériau cellulosique est fourni sous la forme d'une suspension dans un premier tampon, dans lequel le premier tampon comprend de l'eau, de l'éthanol et un sel à une concentration qui permet la liaison d'ARNdb au matériau cellulosique et qui ne permet pas la liaison d'ARNsb au matériau cellulosique ; et  
la concentration de l'éthanol dans le premier tampon est de 14 à 20 % (v/v) et la concentration du sel dans le premier tampon est de 15 à 70 mM.
  
2. Procédé de fourniture d'ARN simple brin (ARNsb), comprenant :
  - (i) la production d'une préparation d'ARN comprenant de l'ARNsb par transcription *in vitro* ;
  - (ii) la mise en contact de la préparation d'ARN avec un matériau cellulosique dans des conditions qui permettent la liaison d'ARN double brin (ARNdb) et d'ARNsb au matériau cellulosique ; et
  - (iii) la séparation de l'ARNsb du matériau cellulosique dans des conditions qui permettent la liaison d'ARNdb au matériau cellulosique et ne permettent pas la liaison d'ARNsb au matériau cellulosique,dans lequel  
l'étape (iii) comprend :
  - (1) le mélange du matériau cellulosique auquel l'ARNdb et l'ARNsb sont liés avec un premier tampon sous secousse et/ou agitation, dans lequel le premier tampon comprend de l'eau, de l'éthanol et un sel à une concentration qui permet la liaison d'ARNdb au matériau cellulosique et ne permet pas la liaison d'ARNsb au matériau cellulosique ; et

- (2) la séparation de la phase liquide comprenant de l'ARNsb du matériau cellulosique ;
- et
- la concentration de l'éthanol dans le premier tampon est de 14 à 20 % (v/v) et la concentration du sel dans le premier tampon est de 15 à 70 mM.
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'étape (ii) comprend le mélange de la préparation d'ARN comprenant de l'ARNsb avec le matériau cellulosique sous secousse et/ou agitation, de préférence pendant au moins 5 min, de manière davantage préférée pendant au moins 10 min.
4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel
- (a) le sel compris dans le premier tampon est le chlorure de sodium ; et/ou
  - (b) la concentration d'éthanol dans le premier tampon est de 14 à 16 % (v/v) ; et/ou
  - (c) la concentration du sel dans le premier tampon est de 20 à 60 mM ; et/ou
  - (d) le premier tampon comprend en outre une substance de tamponnage, de préférence le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), et/ou un agent chélatant, de préférence l'EDTA ; et/ou
  - (e) à l'étape (iii)
    - (α) le mélange de la préparation d'ARN, du matériau cellulosique, et du premier tampon est fourni dans un tube et l'étape (iii) comprend (1) l'application de gravité ou de force centrifuge au tube de sorte que les phases liquide et solide se séparent ; et (2) soit le recueil du surnageant comprenant de l'ARNsb, soit l'élimination du matériau cellulosique ; ou
    - (β) le mélange de la préparation d'ARN, du matériau cellulosique, et du premier tampon est fourni dans une colonne de spin ou un dispositif de filtre et l'étape (iii) comprend (1') l'application de gravité, de force centrifuge, de pression, ou de vide à la colonne de spin ou au dispositif de filtre de sorte que les phases liquide et solide se séparent ; et (2') le recueil de l'écoulement traversant comprenant de l'ARNsb.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 3, et 4, dans lequel les étapes (ii) et (iii) sont répétées une fois ou deux fois ou davantage, dans lequel la préparation d'ARNsb obtenue après l'étape (iii) d'un cycle d'étapes (ii) et (iii) est utilisée en tant que préparation d'ARN à l'étape (ii) du cycle suivant et à l'étape (ii) de chaque cycle d'étapes (ii) et (iii) un matériau cellulosique neuf est utilisé.

6. Procédé selon la revendication 2, dans lequel l'étape (ii) comprend
  - (1) le mélange de la préparation d'ARN comprenant de l'ARNsb avec le matériau cellulosique sous secousse et/ou agitation, de préférence pendant au moins 5 min, de manière davantage préférée pendant au moins 10 min ; et
  - (2) la séparation du matériau cellulosique auquel sont liés l'ARNdb et l'ARNsb du reste.
  
7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel à l'étape (ii) la préparation d'ARN est fournie sous la forme d'un liquide comprenant de l'ARNsb et un deuxième tampon et/ou le matériau cellulosique est fourni sous la forme d'une suspension dans un deuxième tampon, dans lequel le deuxième tampon comprend de l'eau, de l'éthanol et un sel, de préférence le chlorure de sodium, à une concentration qui permet la liaison d'ARNdb et d'ARNsb au matériau cellulosique.
  
8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel
  - (a) la concentration d'éthanol dans le deuxième tampon est d'au moins 35 % (v/v), de préférence de 38 à 42 % (v/v) ; et/ou
  - (b) la concentration du sel dans le premier tampon est de 15 à 70 mM, de préférence de 20 à 60 mM ; et/ou
  - (c) le deuxième tampon comprend en outre une substance de tamponnage, de préférence le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), et/ou un agent chélatant, de préférence l'EDTA ; et/ou
  - (d) à l'étape (ii)(2)
    - (α) le mélange de la préparation d'ARN et du matériau cellulosique obtenu à l'étape (ii)(1) est fourni dans un tube et l'étape (ii)(2) comprend (2a) l'application de gravité ou de force centrifuge au tube de sorte que les phases liquide et solide se séparent ; et (2b) soit l'élimination du surnageant, soit le recueil du matériau cellulosique auquel sont liés l'ARNdb et l'ARNsb ; ou
    - (β) le mélange de la préparation d'ARN et du matériau cellulosique obtenu à l'étape (ii)(1) est fourni dans une colonne de spin ou un dispositif de filtre et l'étape (ii)(2) comprend (2a') l'application de gravité, de force centrifuge, de pression, ou de vide à la colonne de spin ou au dispositif de filtre de sorte que les phases liquide et solide se séparent ; et (2b') le rejet de l'écoulement traversant ; et/ou
  - (e) l'étape (ii) comprend en outre (3) l'ajout d'une aliquote du deuxième tampon au matériau cellulosique auquel sont liés l'ARNdb et l'ARNsb ; (4) l'incubation

du mélange résultant sous secousse et/ou agitation, de préférence pendant au moins 5 min, de manière davantage préférée pendant au moins 10 min ; et (5) la séparation du matériau cellulosique auquel sont liés l'ARNdb et l'ARNsb de la phase liquide ; et éventuellement (6) la répétition des étapes (3) à (5) une fois ou deux fois ou davantage.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 et 6 à 8, dans lequel
- (a) à l'étape (iii)(1) le matériau cellulosique auquel sont liés l'ARNdb et l'ARNsb est mélangé avec le premier tampon sous secousse et/ou agitation pendant au moins 5 min, de préférence pendant au moins 10 min ; et/ou
  - (b) le sel compris dans le premier tampon est le chlorure de sodium ; et/ou
  - (c) la concentration d'éthanol dans le premier tampon est de 14 à 16 % (v/v) ; et/ou
  - (d) la concentration du sel dans le premier tampon est de 20 à 60 mM ; et/ou
  - (e) le premier tampon comprend une substance de tamponnage, de préférence le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), et/ou un agent chélatant, de préférence l'EDTA ; et/ou
  - (f) à l'étape (iii)
    - (α) le mélange du matériau cellulosique et du premier tampon est fourni dans un tube et l'étape (iii)(2) comprend (2a) l'application de gravité ou de force centrifuge au tube de sorte que les phases liquide et solide se séparent ; et (2b) soit le recueil du surnageant comprenant de l'ARNsb, soit l'élimination du matériau cellulosique ; ou
    - (β) le mélange du matériau cellulosique et du premier tampon est fourni dans une colonne de spin ou un dispositif de filtre et l'étape (iii)(2) comprend (2a') l'application de gravité, de force centrifuge, de pression, ou de vide à la colonne de spin ou au dispositif de filtre ; et (2b') le recueil de l'écoulement traversant comprenant de l'ARNsb ; et/ou
  - (g) les étapes (ii) et (iii) sont répétées une fois ou deux fois ou davantage, dans lequel la préparation d'ARNsb obtenue après l'étape (iii) d'un cycle d'étapes (ii) et (iii) est utilisée en tant que préparation d'ARN à l'étape (ii) du cycle suivant et à l'étape (ii) de chaque cycle d'étapes (ii) et (iii) un matériau cellulosique neuf est utilisé.
10. Procédé selon la revendication 2, dans lequel à l'étape (ii) le matériau cellulosique est fourni dans une colonne, l'étape (ii) comprend le chargement de la préparation d'ARN sur la colonne dans des conditions qui permettent la liaison d'ARNdb et

d'ARNsb au matériau cellulosique, et l'étape (iii) comprend l'éluion de l'ARNsb du matériau cellulosique dans des conditions qui permettent la liaison d'ARNdb au matériau cellulosique et ne permettent pas la liaison d'ARNsb au matériau cellulosique.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel à l'étape (ii) la préparation d'ARN est fournie et chargée sur la colonne sous la forme d'un liquide comprenant de l'ARNsb et un deuxième tampon, dans lequel le deuxième tampon comprend de l'eau, de l'éthanol et un sel, de préférence le chlorure de sodium, à une concentration qui permet la liaison d'ARNdb et d'ARNsb au matériau cellulosique.
12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel
  - (a) la concentration d'éthanol dans le deuxième tampon est d'au moins 35 % (v/v), de préférence de 38 à 42 % (v/v) ; et/ou
  - (b) la concentration du sel dans le premier tampon est de 15 à 70 mM, de préférence de 20 à 60 mM ; et/ou
  - (c) le deuxième tampon comprend une substance de tamponnage, de préférence le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), et/ou un agent chélatant, de préférence l'EDTA ; et/ou
  - (d) l'étape (iii) est effectuée à l'aide du premier tampon en tant qu'éluant, dans lequel le premier tampon est de préférence le premier tampon défini dans la revendication 9(b), la revendication 9(c), la revendication 9(d), et/ou la revendication 9(e).
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel
  - (a) la préparation d'ARN est produite par l'utilisation d'une ARN polymérase choisie dans le groupe constitué par les ARN polymérases T3, T7 et SP6 ; et/ou
  - (b) avant l'étape (ii) la préparation d'ARN est soumise à au moins un traitement de pré-purification, dans lequel l'au moins un traitement de pré-purification comprend de préférence au moins l'une parmi : la précipitation d'acides nucléiques ; la liaison d'acides nucléiques à des billes magnétiques ; l'ultrafiltration ; et la dégradation d'ADN ; et/ou
  - (c) l'ARNsb est un ARNm ou un ARN inhibiteur tel qu'une ARN antisens, un ARNsi, ou un ARNmi ; et/ou
  - (d) l'ARNsb a une longueur d'au moins 2 700 nt, de préférence d'au moins 3 000 nt, de manière davantage préférée d'au moins 3 500 nt, de manière davantage préférée d'au moins 4 500 nt ; et/ou

- (e) le matériau cellulosique comprend des fibres de cellulose, de préférence des fibres de cellulose de qualité appropriée pour une utilisation en tant que réactif de chromatographie de partage ; et/ou
  - (f) avant la mise en contact avec la préparation d'ARN à l'étape (ii) le matériau cellulosique est fourni sous la forme d'un matériau cellulosique lavé.
14. Procédé selon la revendication 13(f), dans lequel le lavage du matériau cellulosique comporte
- (I) le mélange du matériau cellulosique avec une solution de lavage sous secousse et/ou agitation, de préférence pendant au moins 5 min ; et
  - (II) soit l'élimination du liquide, soit le recueil du matériau cellulosique ; et éventuellement
  - (III) la répétition des étapes (I) et (II) une fois ou deux fois ou davantage.
15. Procédé selon la revendication 14, dans lequel
- (A) si l'étape (ii) est effectuée dans des conditions qui permettent la liaison d'ARN<sub>db</sub> au matériau cellulosique lavé et ne permettent pas la liaison d'ARN<sub>sb</sub> au matériau cellulosique lavé, la solution de lavage a la composition du premier tampon défini dans la revendication 1, la revendication 4(a), la revendication 4(b), la revendication 4(c), et/ou la revendication 4(d), ou
  - (B) si l'étape (ii) est effectuée dans des conditions qui permettent la liaison d'ARN<sub>db</sub> et d'ARN<sub>sb</sub> au matériau cellulosique lavé, la solution de lavage a la composition du deuxième tampon défini dans la revendication 7, la revendication 8(a), la revendication 8(b), et/ou la revendication 8(c).