

SIB EX5929R

PB66127 SM

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 17739936.7, pubblicazione n° 3481838

a nome di GlaxoSmithKline Intellectual Property Development Limited

di 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, Regno Unito

* * * * *

"NUOVI PROCEDIMENTI PER LA PRODUZIONE DI OLIGONUCLEOTIDI"

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione si riferisce a nuovi procedimenti per la produzione di oligonucleotidi che sono adatti per l'uso nella produzione di oligonucleotidi modificati chimicamente, come quelli usati in terapia.

FONDAMENTO DELL'INVENZIONE

La sintesi chimica di oligonucleotidi e oligonucleotidi modificati attraverso la chimica del fosforamidito è ben consolidata ed è stato il metodo di scelta per sintetizzare questi biopolimeri a sequenza definita per diversi decenni. Il procedimento sintetico viene solitamente eseguito come una sintesi in fase solida in cui singoli nucleotidi vengono aggiunti in sequenza con l'aggiunta di ciascun nucleotide che richiede un ciclo di diversi passaggi chimici per aggiungere e deproteggere l'oligonucleotide in crescita ("oligo") in preparazione per il passaggio successivo. Al termine dell'aggiunta sequenziale dei nucleotidi l'oligo viene rilasciato dal supporto in fase solida, avviene un'altra deprotezione, poi l'oligonucleotide grezzo viene ulteriormente purificato mediante cromatografia su colonna.

Anche se questo metodo può essere considerato di routine e può essere automatizzato, ci sono diversi difetti in questa metodologia, specialmente se l'obiettivo è preparare oligonucleotidi su larga scala come sarebbe necessario per le terapie con oligonucleotidi. Queste carenze includono, ma non sono limitate a:

- 1) Limitazioni pratiche inerenti all'uso della cromatografia che la rendono inadatta alla purificazione di grandi quantità di oligonucleotidi. L'uso della cromatografia su larga scala è costoso ed è difficile da ottenere a causa delle limitazioni sulle dimensioni e sulle prestazioni della colonna.
- 2) Il numero di errori si accumula con la lunghezza dell'oligonucleotide sintetizzato. Di conseguenza, la natura sequenziale lineare dell'attuale procedimento si traduce in una diminuzione geometrica della resa. Ad esempio, se la resa per ciascun ciclo di aggiunta di nucleotidi è del 99%, la resa di un 20-mero sarebbe dell'83%.
- 3) Limiti di scala con sintetizzatori di oligonucleotidi sintetici e apparecchiature di purificazione e isolamento a valle: attualmente la quantità massima di prodotto che può essere prodotta in un singolo lotto è dell'ordine di 10 kg.

Vi è quindi la necessità di ridurre (o idealmente eliminare) la cromatografia su colonna ed eseguire la sintesi in un modo non puramente sequenziale per aumentare la resa.

La DNA polimerasi viene spesso usata per sintetizzare oligonucleotidi da usare in biologia molecolare e applicazioni simili. Tuttavia, la DNA polimerasi non è adatta per sintetizzare oligonucleotidi terapeutici a causa sia delle lunghezze relativamente brevi degli oligonucleotidi sia della necessità di discriminare tra nucleotidi con diverse modificazioni di desossiribosio o ribosio. Ad esempio, gli oligonucleotidi terapeutici sono spesso compresi tra 20 e 25 nucleotidi. La DNA polimerasi necessita di almeno 7 o 8 nucleotidi e, in modo ottimale, da 18 a 22 nucleotidi, come iniziatori in ciascuna direzione, quindi c'è poco da guadagnare nel cercare di sintetizzare un oligo terapeutico se gli iniziatori sono di dimensioni simili al prodotto desiderato. Inoltre, la DNA polimerasi richiede che tutti i nucleotidi siano presenti nella reazione e si basa sull'accoppiamento di basi di Watson-Crick per allineare i nucleotidi entranti. Pertanto, non è in grado di discriminare tra qualsiasi ordinamento di modificazioni di desossiribosio o ribosio, come quelle richieste da un gapmero, e il risultato sarebbe una miscela di modificazioni di desossiribosio o ribosio in una data posizione.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

L'invenzione fornisce un procedimento per la produzione di un prodotto oligonucleotidico a filamento singolo avente almeno un residuo nucleotidico modificato, in cui la modifica è scelta dal gruppo consistente nella modifica nella posizione 2' della porzione di zucchero, nella modifica della nucleobase e nella modifica della ossatura, e in cui il prodotto è prodotto su scala di grammi o chilogrammi, o superiore, e/o il procedimento è condotto in un reattore da 1 L o più grande, comprendente:

- a) il fornire un oligonucleotide modello (I) complementare alla sequenza del prodotto, detto modello avente proprietà che gli consentono di essere separato dal prodotto;
- b) il fornire una raccolta di oligonucleotidi (II) contenenti oligonucleotidi che sono segmenti della sequenza del prodotto, in cui almeno un segmento contiene almeno un residuo nucleotidico modificato e in cui la modifica è scelta dal gruppo costituito dalla modifica nella posizione 2' della porzione di zucchero, modifica della base azotata, e modifica della ossatura;

- c) il porre a contatto (I) e (II) in condizioni tali da consentire la riassociazione;
- d) l'unire gli oligonucleotidi di segmento mediante ligazione enzimatica con una ligasi per formare il prodotto;
- e) il modificare le condizioni per separare eventuali impurità, compresa la denaturazione dello stampo riassociato e dei filamenti di oligonucleotidi di impurità e la separazione delle impurità;
- f) il modificare le condizioni per separare il prodotto, comprendente il denaturare lo stampo riassociato e i filamenti di oligonucleotidi del prodotto e separare il prodotto; e
- g) riciclare il modello da usare in reazioni future.

Tale procedimento può essere usato per generare un prodotto oligonucleotidico a singolo filamento e isolarlo dalle impurità, ad es. come procedimento di produzione e purificazione.

WO01/64864A2 descrive la ricombinazione mediata dallo stampo di acido nucleico a filamento singolo, WO01/71037A1 descrive metodi per rilevare polinucleotide chinasi, US6004826A descrive un procedimento mediato da riparazione per amplificare e rilevare sequenze di acidi nucleici, e WO2009/097673A1 descrive la sintesi di DNA a filamento singolo.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1 Schema del procedimento dell'invenzione, inclusa una fase di modifica delle condizioni per rimuovere le impurità, ad es. una fase di lavaggio.

FIG. 2 Schema del procedimento dell'invenzione, comprese le fasi di unire/ligare gli oligonucleotidi di segmento per formare il prodotto e cambiare le condizioni per rimuovere le impurità.

FIG. 3 Schema di più configurazioni di modelli.

FIG. 4 Schema di base del procedimento dell'invenzione che viene eseguito in un sistema a flusso.

FIG. 5 Schema dettagliato del procedimento dell'invenzione che viene eseguito in un sistema a flusso: a) sezione di chimica di ligazione, b) sezione di purificazione di ligazione, e c) sezione di chimica di ligazione alternativa, e d) sezione di purificazione alternativa. N.B. le sezioni a) e b) (in alternativa c) e d)) possono essere eseguite in un unico passaggio, ad es. recipiente di raccolta in a) = uscita dalla fase di ligazione in b).

FIG. 6 Esempi di impurità che possono essere generate durante il procedimento dell'invenzione.

FIG. 7 Cromatogramma che mostra i risultati di una reazione di ligazione usando ligasi commerciale NEB T4 (SEQ. ID. N.: 3) e DNA non modificato (Esempio 1).

FIG. 8 Cromatogramma mostrante i risultati di una reazione di ligazione usando la ligasi T4 legata a PERLOZA (SEQ. ID. N.: 4) e DNA non modificato (Esempio 1).

FIG. 9 Cromatogramma che mostra i risultati di una reazione di ligazione usando la ligasi T4 legata a PERLOZA espressa secondo l'Esempio 2 e frammenti di oligonucleotidi modificati con 2'-OMe.

FIG. 10 tracce HPLC per l'Esempio 4: Traccia superiore (a) - Nessun controllo di ligasi. Traccia inferiore (b) - clone A4. Prodotto e modello co-eluiscono in questo metodo HPLC. Due frammenti (segmenti) di ligazione intermedi possono essere visti nella traccia del clone A4 a 10,3 e 11,2 minuti.

FIG. 11 Schema del "nucleo tri-stampo" usato nell'Esempio 13, comprendente un materiale di supporto denominato "nucleo" e tre sequenze di modello.

FIG. 12 Schema dell'impianto di ligazione semicontinuo usato nell'esempio 13.

FIG. 13 Schema dell'impianto di filtrazione senza uscita usato nell'esempio 14.

FIG. 14 Schema dell'impianto di filtrazione a flusso incrociato usato nell'esempio 14.

FIG. 15 cromatogrammi che mostrano i risultati degli esperimenti di filtrazione senza uscita usando la membrana NADIR da MWCO 10 kDa a 60°C nell'esempio 14. La figura a) è un cromatogramma della soluzione di retentato, che rimaneva nella cella di filtrazione e conteneva principalmente il nucleo tri-stampo, dopo due volumi di diafiltrazione; e il cromatogramma b) è della soluzione di permeato, arricchita nel prodotto dopo due volumi di diafiltrazione.

FIG. 16 Cromatogrammi che mostrano i risultati degli esperimenti di filtrazione tangenziale usando la membrana Snyder MWCO da 5 kDa a 50°C e pressione di 3,0 bar, nell'esempio 14, figura a) è un cromatogramma della soluzione di retentato, che conteneva principalmente nucleo tri-stampo e prodotto, dopo 20 volumi di diafiltrazione; e la figura b) è un cromatogramma del permeato, che conteneva principalmente oligonucleotidi di segmento, dopo 20 volumi di diafiltrazione.

FIG. 17 Cromatogrammi che mostrano i risultati degli esperimenti di filtrazione a flusso incrociato usando la

membrana Snyder 5 kDa MWCO a 80°C e pressione di 3,1 bar, nell'esempio 14. La Figura 17 mostra a) un cromatogramma della soluzione di retentato, che conteneva solo il nucleo a tre stampi, dopo 20 volumi di diafiltrazione; e la figura b) è un cromatogramma della soluzione permeato, che conteneva solo il prodotto, dopo 2 volumi di diafiltrazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

DEFINIZIONI

Come qui usato, il termine "oligonucleotide", o "oligo" in breve, significa un polimero di residui nucleotidici, desossiribonucleotidi (in cui l'oligonucleotide risultante è DNA), ribonucleotidi (in cui l'oligonucleotide risultante è RNA), o una loro miscela. Un oligonucleotide può essere interamente composto da residui nucleotidici come si trova in natura o può contenere almeno un nucleotide, o almeno un legame tra nucleotidi, che è stato modificato. Gli oligonucleotidi possono essere a filamento singolo o doppio filamento. Un oligonucleotide dell'invenzione può essere coniugato a un'altra molecola, ad es. N-acetilgalattosamina (GalNAc) o suoi multipli (aggregati di GalNAc).

Come qui usato, il termine "oligonucleotide terapeutico" significa un oligonucleotide che ha un'applicazione terapeutica. Un tale oligonucleotide contiene tipicamente uno o più residui o legami nucleotidici modificati. Gli oligonucleotidi terapeutici agiscono tramite uno dei diversi meccanismi, inclusi, ma non limitati a, antisenso, commutazione di giunzione o salto dell'esone, immunostimolazione e interferenza a RNA (RNAi), *ad es.* tramite microRNA (miRNA) e piccolo RNA interferente (siRNA). Un oligonucleotide terapeutico può essere un aptamero. Gli oligonucleotidi terapeutici di solito, ma non sempre, avranno una sequenza definita.

Come qui usato, il termine "stampo" indica un oligonucleotide con una sequenza che è complementare al 100% alla sequenza dell'oligonucleotide bersaglio (o prodotto).

Se non diversamente specificato, come qui usato, il termine "complementare" significa complementare al 100%.

Come qui usato, il termine "prodotto" significa l'oligonucleotide desiderato, avente una sequenza specifica, qui indicato anche come "oligonucleotide bersaglio".

Come qui usato, il termine "raccolta" si riferisce a un gruppo di oligonucleotidi che possono variare in sequenza,

possono essere più corti o più lunghi della sequenza bersaglio e potrebbero non avere la stessa sequenza della sequenza bersaglio. La raccolta di oligonucleotidi può essere il prodotto della sintesi di oligonucleotidi, ad es. sintesi chimica in fase solida attraverso chimica del fosforammidito, usata con o senza purificazione. La raccolta di oligonucleotidi può essere composto da segmenti della sequenza bersaglio. Ciascun segmento stesso può essere presente come una raccolta di quel segmento e può essere il prodotto della sintesi di oligonucleotidi, ad es. sintesi chimica in fase solida attraverso chimica del fosforammidito.

Come qui usato, il termine "riassociazione" indica l'ibridazione di oligonucleotidi complementari in un modo specifico della sequenza. Le "condizioni per consentire la riassociazione" dipenderanno dalla T_m degli oligonucleotidi complementari ibridati e risulteranno facilmente evidenti a una persona esperta nella tecnica. Ad esempio, la temperatura per la riassociazione può essere inferiore alla T_m degli oligonucleotidi ibridati. In alternativa, la temperatura per la riassociazione può essere vicina alla T_m degli oligonucleotidi ibridati, *ad es.* +/- 1, 2 o 3°C. La temperatura per la riassociazione è, in generale, non superiore a 10°C al di sopra della T_m degli oligonucleotidi ibridati. Le condizioni specifiche per consentire la riassociazione sono descritte nella sezione degli esempi.

Come qui usato, il termine "denaturazione" in relazione a un oligonucleotide a doppio filamento viene usato per indicare che i filamenti complementari non sono più riassociati. La denaturazione si verifica come risultato del cambiamento delle condizioni ed è talvolta indicata qui come separazione dei filamenti oligonucleotidici. Tale separazione dei filamenti può essere eseguita per esempio, aumentando la temperatura, cambiando il pH o cambiando la concentrazione di sale della soluzione tampone. La denaturazione di un oligonucleotide a doppio filamento (un "duplex") risulta in un oligonucleotide a filamento singolo che potrebbe essere un prodotto o un'impurità che viene "rilasciato" dallo stampo.

Come qui usato, il termine "impurezza" o "impurezze" significa oligonucleotidi che non hanno la sequenza di prodotto desiderata. Questi oligonucleotidi possono includere oligonucleotidi più corti del prodotto (ad esempio 1, 2, 3, 4, 5 o più residui nucleotidici più corti) o più lunghi del prodotto (ad esempio 1, 2, 3, 4, 5 o più residui nucleotidici più lunghi). Dove il procedimento di produzione include una fase in cui vengono formati

collegamenti tra segmenti, le impurità includono oligonucleotidi che rimangono se uno o più legami non si formano. Le impurità includono anche oligonucleotidi in cui sono stati incorporati nucleotidi errati, risultanti in un disaccoppiamento rispetto al modello. Un'impurità può avere una o più delle caratteristiche sopra descritte. Figura 6 mostra alcune delle impurità che possono formarsi.

Come qui usato, il termine "segmento" è una porzione più piccola di un oligonucleotide più lungo, in particolare una porzione più piccola di un prodotto o oligonucleotide bersaglio. Per un dato prodotto, quando tutti i suoi segmenti sono riassociati al suo modello e legati insieme, il prodotto viene formato.

Come qui usato, il termine "ligazione enzimatica" significa che il legame tra due nucleotidi adiacenti è formato per via enzimatica. Questo collegamento può essere un legame fosfodiesterico (PO) presente in natura o un collegamento modificato che include, ma non limitato a, fosforotioato (PS) o fosforamidato (PA).

Come qui usato, il termine "ligasi" significa un enzima che catalizza l'unione, *cioè* unione covalente, di due molecole oligonucleotidiche, *ad es.* mediante la formazione di un legame fosfodiesterico tra l'estremità 3' di un oligonucleotide (o segmento) e l'estremità 5' dello stesso o di un altro oligonucleotide (o segmento). Questi enzimi sono spesso indicati come DNA ligasi o RNA ligasi e usano cofattori: ATP (DNA ligasi eucariotiche, virali e di *Archaea*) o NAD (DNA ligasi procariotiche). Nonostante la loro presenza in tutti gli organismi, le DNA ligasi mostrano un'ampia diversità di sequenze di amminoacidi, dimensioni molecolari e proprietà (Nucleic Acids Research, 2000, vol. 28, n. 21, 4051-4058). Di solito sono membri della Classe enzimatica EC 6.5 come definita dall'Unione Internazionale di Biochimica e Biologia Molecolare, *cioè* ligasi usate per formare legami di esteri fosforici. Nell'ambito dell'invenzione è una ligasi in grado di unire un oligonucleotide non modificato a un altro oligonucleotide non modificato, una ligasi in grado di unire un oligonucleotide non modificato a un oligonucleotide modificato (*cioè* un oligonucleotide 5' modificato ad un oligonucleotide 3' non modificato e un oligonucleotide 5' non modificato in un oligonucleotide 3' modificato), nonché una ligasi in grado di unire un oligonucleotide modificato a un altro oligonucleotide modificato.

Come usato nella presente, una "ligasi termostabile" è una ligasi che è attiva a temperature elevate, *cioè* sopra la temperatura del corpo umano, *cioè* sopra 37°C. Una ligasi termostabile può essere attiva, per esempio, a 40°C -

65°C; o 40°C - 90°C; e così via.

Come qui usato, il termine "residuo nucleotidico modificato" o "oligonucleotide modificato" significa un residuo nucleotidico o oligonucleotide che contiene almeno un aspetto della sua chimica che differisce da un residuo nucleotidico o oligonucleotide presente in natura. Tali modifiche possono verificarsi in qualsiasi parte del residuo nucleotidico, *ad es.* zucchero, base o fosfato. Esempi di modifiche dei nucleotidi sono descritti di seguito.

Come qui usato, il termine "ligasi modificata" significa una ligasi che differisce da una ligasi naturale, "di tipo selvatico", per uno o più residui amminoacidici. Tali ligasi non si trovano in natura. Tali ligasi sono utili nei nuovi procedimenti dell'invenzione. Esempi di ligasi modificate sono descritti di seguito. I termini "ligasi modificata" e "ligasi mutante" sono usati in modo equivalente.

Come qui usato, il termine "gapmero" significa un oligonucleotide avente un "segmento distanziale" interno affiancato da due "segmenti di ala" esterni, in cui il segmento distanziale è costituito da una pluralità di nucleotidi che supportano la scissione da RNasi H e ciascun segmento di ala è costituito da uno o più nucleotidi chimicamente distinti dai nucleotidi all'interno di segmento distanziale.

Come qui usato, il termine "materiale di supporto" significa un composto o materiale ad alto peso molecolare che aumenta il peso molecolare dello stampo, consentendo in tal modo che venga trattenuto quando le impurità e i prodotti vengono separati dalla miscela di reazione.

Come usato nella presente, "identità percentuale" tra una sequenza di acido nucleico di interrogazione e una sequenza di acido nucleico in oggetto è il valore di "Identità", espresso come percentuale, che viene calcolato dall'algoritmo BLASTN quando una sequenza di acido nucleico in oggetto ha una copertura di interrogazione del 100% con una sequenza di acido nucleico di interrogazione dopo aver eseguito un allineamento BLASTN a coppie. Tali allineamenti BLASTN a coppie tra una sequenza di acido nucleico di interrogazione e una sequenza di acido nucleico in oggetto vengono eseguiti usando le impostazioni predefinite dell'algoritmo BLASTN disponibili sul sito Web del National Center for Biotechnology Institute con il filtro per le regioni a bassa complessità disattivato. È importante sottolineare che una sequenza di acido nucleico di interrogazione può

essere descritta da una sequenza di acido nucleico identificata in una o più rivendicazioni nella presente. La sequenza di interrogazione può essere identica al 100% alla sequenza in oggetto oppure può includere fino a un certo numero intero di alterazioni nucleotidiche rispetto alla sequenza in oggetto in modo tale che l'identità % sia inferiore al 100%. Ad esempio, la sequenza di interrogazione è almeno 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% identica alla sequenza in oggetto.

DICHIARAZIONE DELL'INVENZIONE

In un aspetto dell'invenzione, viene fornito un procedimento per produrre un prodotto oligonucleotidico a filamento singolo avente almeno un residuo nucleotidico modificato, in cui la modifica è scelta dal gruppo consistente nella modifica nella posizione 2' della porzione di zucchero, modifica della base azotata e modifica della ossatura, e in cui il prodotto è prodotto su scala di grammi o chilogrammi, o superiore, e/o il procedimento viene eseguito in un reattore da 1L o più grande, comprendente:

- a) il fornire un oligonucleotide di stampo (I) complementare alla sequenza del prodotto, detto stampo avente proprietà che gli consentono di essere separato dal prodotto;
- b) il fornire una raccolta di oligonucleotidi (II) contenenti oligonucleotidi che sono segmenti della sequenza del prodotto, in cui almeno un segmento contiene almeno un residuo nucleotidico modificato e in cui la modifica è scelta dal gruppo costituito dalla modifica nella posizione 2' della porzione di zucchero, modifica della base azotata e modifica della ossatura;
- c) il mettere a contatto (I) e (II) in condizioni per consentire la riassociazione;
- d) l'unire gli oligonucleotidi di segmento mediante ligazione enzimatica con una ligasi per formare il prodotto;
- e) il modificare le condizioni per separare eventuali impurità, compresa la denaturazione dello stampo riassociato e dei filamenti di oligonucleotidi di impurità e separare le impurità;
- f) il modificare le condizioni per separare il prodotto, comprendente il denaturare lo stampo riassociato e i filamenti di oligonucleotidi del prodotto e separare il prodotto; e
- g) il riciclare lo stampo per uso in reazioni future.

In una realizzazione dell'invenzione, non vi sono sostanzialmente nucleotidi nel recipiente di reazione. In una

realizzazione dell'invenzione, non ci sono nucleotidi nel recipiente di reazione. In particolare, il recipiente di reazione non comprende una raccolta di nucleotidi, *cioè* la reazione è sostanzialmente priva, preferibilmente priva di nucleotidi.

Un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, per cui la denaturazione risulta da un aumento di temperatura.

Un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, per cui gli oligonucleotidi di segmento vengono uniti mediante ligazione chimica. In un'altra realizzazione, la ligazione chimica è una reazione di chimica "click". In una realizzazione dell'invenzione, la ligazione chimica di oligonucleotidi di segmenti avviene in reazioni basate su modelli che producono legami di fosforamidato come descritto da Kalinowski et al. in ChemBioChem 2016, 17, 1150-1155.

Ancora un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, per cui gli oligonucleotidi di segmento sono lunghi da 3 a 15 nucleotidi. In un'altra realizzazione dell'invenzione i segmenti sono lunghi da 5 a 10 nucleotidi. In un'altra realizzazione dell'invenzione i segmenti sono lunghi da 5 a 8 nucleotidi. In un'altra realizzazione dell'invenzione i segmenti sono lunghi 5, 6, 7 o 8 nucleotidi. In una particolare realizzazione ci sono tre segmenti oligonucleotidici: un segmento 5' lungo 7 nucleotidi, un segmento centrale lungo 6 nucleotidi e un segmento 3' lungo 7 nucleotidi, che quando legati insieme formano un oligonucleotide che è lungo 20 nucleotidi (un "20-mero"). In una particolare realizzazione ci sono tre segmenti oligonucleotidici: un segmento 5' che è lungo 6 nucleotidi, un segmento centrale che è lungo 8 nucleotidi e un segmento 3' che è lungo 6 nucleotidi, che quando legati insieme formano un oligonucleotide che è lungo 20 nucleotidi (un "20-mero"). In una particolare realizzazione ci sono tre segmenti di oligonucleotidi: un segmento 5' lungo 5 nucleotidi, un segmento centrale lungo 10 nucleotidi e un segmento 3' lungo 5 nucleotidi, che quando legati insieme formano un oligonucleotide che è lungo 20 nucleotidi (un "20-mero"). In una particolare realizzazione ci sono quattro segmenti oligonucleotidici: un segmento 5' lungo 5 nucleotidi, un segmento centrale 5' lungo 5 nucleotidi, un segmento centrale 3' lungo 5 nucleotidi e un segmento 3' che è lungo 5 nucleotidi, che quando legati insieme formano un oligonucleotide lungo 20 nucleotidi (un "20-mero").

Una realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, per cui il prodotto è lungo da 10 a 200 nucleotidi. In un'altra realizzazione dell'invenzione, il prodotto è lungo da 15 a 30 nucleotidi. In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleotidi. In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 20 nucleotidi, un "20-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 21 nucleotidi, un "21-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 22 nucleotidi, un "22-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 23 nucleotidi, un "23-mero". In una realizzazione dell'invenzione, il prodotto è lungo 24 nucleotidi, un "24-mero". In una realizzazione dell'invenzione, il prodotto è lungo 25 nucleotidi, un "25-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 26 nucleotidi, un "26-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 27 nucleotidi, un "27-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 28 nucleotidi, un "28-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 29 nucleotidi, un "29-mero". In una realizzazione dell'invenzione il prodotto è lungo 30 nucleotidi, un "30-mero".

In una realizzazione dell'invenzione, il procedimento è un procedimento per produrre un oligonucleotide terapeutico. In una realizzazione dell'invenzione, il procedimento è un procedimento per produrre un oligonucleotide terapeutico a singolo filamento. In una realizzazione dell'invenzione, il procedimento è un procedimento per produrre un oligonucleotide terapeutico a doppio filamento.

Un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, in cui la proprietà che consente di separare lo stampo dal prodotto è che lo stampo è attaccato a un materiale di supporto. In un'altra realizzazione dell'invenzione, il materiale di supporto è un materiale di supporto solubile. In un'altra realizzazione dell'invenzione, il materiale di supporto solubile è scelto dal gruppo costituito da: polietilenglicole, un polimero organico solubile, DNA, una proteina, un dendrimero, un polisaccaride, un oligosaccaride e un carboidrato. In una realizzazione dell'invenzione il materiale di supporto è polietilenglicole (PEG). In un'altra realizzazione dell'invenzione, il materiale di supporto è un materiale di supporto insolubile. In un'altra realizzazione dell'invenzione, il materiale di supporto è un materiale di supporto solido. In un'altra realizzazione, il materiale di supporto solido è scelto dal gruppo costituito da: una perla di vetro, una perla

polimerica, un supporto fibroso, una membrana, una perla rivestita di streptavidina e cellulosa. In una realizzazione, il materiale di supporto solido è un granulo rivestito di streptavidina. In un'altra realizzazione, il materiale di supporto solido fa parte del recipiente di reazione stesso, *ad es.* una parete di reazione.

Una realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, in cui più copie ripetute dello stampo sono attaccate in modo continuo tramite un singolo punto di attacco al materiale di supporto. Le copie multiple ripetute del modello possono essere separate da un associatore, *ad es.* come mostrato nella Figura 3. Le copie ripetute multiple del modello possono essere ripetizioni dirette, *ad es.* non sono separate da un associatore.

Ancora un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, in cui la proprietà che consente di separare lo stampo dal prodotto è il peso molecolare dello stampo. Ad esempio, copie ripetute della sequenza modello possono essere presenti su un singolo oligonucleotide, con o senza una sequenza di associatore.

Un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, in cui lo stampo, o lo stampo e il materiale di supporto, vengono riciclati per l'uso in reazioni future, per esempio come descritto in dettaglio di seguito. Un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, in cui la reazione viene eseguita usando un procedimento a flusso continuo o semicontinuo, ad esempio come mostrato nella Figura 4 o Figura 5.

Come menzionato qui sopra, il procedimento è per la produzione su larga scala di oligonucleotidi, in particolare oligonucleotidi terapeutici. Nel contesto della presente invenzione, la produzione su larga scala di oligonucleotidi significa la produzione su una scala maggiore o uguale a 1 litro, *ad es.* il procedimento viene eseguito in un reattore da 1 L o più grande. In alternativa o in aggiunta, nel contesto della presente invenzione per produzione su larga scala di oligonucleotidi si intende la produzione su scala di grammi di prodotto, in particolare la produzione di maggiore o uguale a 10 grammi di prodotto. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto oligonucleotidico formato è su scala di grammi. In una realizzazione dell'invenzione la quantità di prodotto formato è maggiore o uguale a: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o

100 grammi. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto oligonucleotidico formato è maggiore o uguale a: 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 grammi. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto oligonucleotidico formato è di 500 grammi o maggiore. In una realizzazione dell'invenzione, il prodotto oligonucleotidico formato è su scala del chilogrammo. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto oligonucleotidico formato è di 1 kg o più. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto oligonucleotidico formato è maggiore o uguale a: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto oligonucleotidico formato è maggiore o uguale a: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 kg.

In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 10 grammi e 100 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 10 grammi e 50 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 100 grammi e 100 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 100 grammi e 50 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 500 grammi e 100 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 500 grammi e 50 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 1 kg e 50 kg. In una realizzazione dell'invenzione, la quantità di prodotto formato è compresa tra 10 kg e 50 kg.

In una realizzazione dell'invenzione, la produzione di oligonucleotidi avviene su una scala maggiore o uguale a: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 litri, ad es. in un reattore da 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 L. In una realizzazione dell'invenzione, la produzione di oligonucleotidi avviene su una scala maggiore o uguale a: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 litri, ad es. in un reattore da 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 L. In una realizzazione dell'invenzione, la produzione di oligonucleotidi avviene su una scala maggiore o uguale a: 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 litri, ad es. in reattore da 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 L.

In una realizzazione dell'invenzione, il volume del reattore è di circa 10.000 L, circa 5000 L, circa 2000 L, circa

1000 L, circa 500 L, circa 125 L, circa 50 L, circa 20 L, circa 10 L o circa 5 L.

In una realizzazione dell'invenzione, il volume del reattore è compreso tra 5 e 10.000 L, tra 10 e 5000 L, tra 20 e 2000 L o tra 50 e 1000 L.

Un oligonucleotide secondo la presente invenzione ha almeno una modifica dello scheletro, e/o almeno una modifica dello zucchero e/o almeno una modifica della base rispetto a un oligonucleotide a base di RNA o DNA. L'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, in cui il prodotto contiene almeno 1 residuo nucleotidico modificato. In un'altra realizzazione la modifica è nella posizione 2' della porzione di zucchero.

Gli oligonucleotidi usati nel procedimento dell'invenzione possono includere modifiche dello zucchero, *cioè* una versione modificata della porzione ribosilica, come RNA modificato in 2'-O come 2'-O-alchile o 2'-O-(sostituito)alchile *ad es.* 2'-O-metile, 2'-O-(2-cianoetile), 2'-O-(2-metossi)etile (2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etile, 2'-O-butirile, 2'-O-propargile, 2'-O-allile, 2'-O-(3-ammino)propile, 2'-O-(3-(dimetilammino)propile), 2'-O-(2-ammino)etile, 2'-O-(2-(dimetilammino)etile); 2'-desossi (DNA); 2'-O-(alogenoalcossi)metile (Arai K, et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 21, 6285) *ad es.* 2'-O-(2-cloroetossi)metile (MCEM), 2'-O-(2,2-dicloroetossi)metile (DCEM); 2'-O-alcossicarbonile *ad es.* 2'-O-[2-(metossicarbonil)etile] (MOCE), 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etile] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-dimetilcarbamoil)etile] (DCME); 2'-alogeno *ad es.* 2'-F, FANA (2'-F arabinosil acido nucleico); modifiche di carba-zucchero e aza-zucchero; 3'-O-alchile *ad es.* 3'-O-metile, 3'-O-butirile, 3'-O-propargile; e loro derivati.

In una realizzazione dell'invenzione, la modifica di zucchero è scelta dal gruppo costituito da 2'-Fluoro (2'-F), 2'-O-metile (2'-OMe), 2'-O-metossietile (2'-MOE), e 2'-amminico. Ancora in un'altra realizzazione, la modifica è 2'-MOE.

Altre modificazioni dello zucchero includono acido nucleico (BNA) "a ponte" o "biciclico", *ad es.* acido nucleico bloccato (LNA), xilo-LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, cEt (2'-O, 4'-C etile vincolato) LNA, cMOEt (2'-O, 4'-C metossietil) LNA vincolato, acido nucleico a ponte con etilene (ENA), triclo DNA; acido nucleico sbloccato (UNA); acido cicloesenil nucleico (CeNA), acido altrial nucleico (ANA), acido exitol nucleico

(HNA), HNA fluorurato (F-HNA), piranosil-RNA (p-RNA), 3'-desossipiranosil-DNA (p-DNA); morfolino (as *ad es.* in PMO, PPMO, PMOPlus, PMO-X); e loro derivati.

Gli oligonucleotidi usati nel procedimento dell'invenzione possono includere altre modifiche, come acido nucleico a base di peptide (PNA), PNA modificato con boro, acido nucleico ossipeptidico a base di pirrolidina (POPNA), acido nucleico a base di glicole o glicerolo (GNA), acido nucleico a base di treosio (TNA), acido nucleico a base di treoninolo aciclico (aTNA), oligonucleotidi con basi e scheletri integrati (ONIBs), oligonucleotidi pirrolidina-ammide (POM); e loro derivati.

In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide modificato comprende un oligomero morfolinico fosforodiammidato (PMO), un acido nucleico bloccato (LNA), un acido peptido-nucleico (PNA), un acido nucleico a ponte (BNA) come (S)-cEt-BNA o uno SPIEGELMER.

In un'altra realizzazione, la modifica è nella base azotata. Le modifiche di base includono versioni modificate delle basi naturali puriniche e pirimidiniche (*ad es.* adenina, uracile, guanina, citosina e timina), come inosina, ipoxantina, acido orotico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidina (*ad es.* 2-tiouracile, 2-tiotimina), "G-clamp" e suoi derivati, pirimidina 5-sostituita (*ad es.* 5-metilcitosina, 5-metiluracile, 5-alouracile, 5-propiniluracile, 5-propinilcitosina, 5-amminometiluracile, 5-idrossimetiluracile, 5-amminometilcitosina, 5-idrossimetilcitosina, Super T), 2,6-diamminopurina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-aza-2, 6-diamminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diamminopurina, Super G, Super A, e N⁴-etilcitosina, o loro derivati; N²-ciclopentilguanina (cPent-G), N²-ciclopentil-2-amminopurina (cPent-AP), e N²-propil-2-amminopurina (Pr-AP), o loro derivati; e basi degeneri o universali, come 2,6-difluorotoluene o basi assenti come siti abasici (*ad es.* 1-desossiribosio, 1,2-didesossiribosio, 1-desossi-2-O- metilribosio; o derivati di pirrolidina in cui l'ossigeno dell'anello è stato sostituito con azoto (azaribosio)). Esempi di derivati di Super A, Super G e Super T si possono trovare in US6683173. Si è osservato che cPent-G, cPent-AP e Pr-AP riducono gli effetti immunostimolatori quando incorporati in siRNA (Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. (2011), 133, 9200).

In una realizzazione dell'invenzione, la modifica di nucleobase è scelta dal gruppo costituito da 5-metil pirimidine, 7-deazaguanosine e nucleotidi abasici. In una realizzazione, la modifica è una 5-metil citosina.

Oligonucleotidi usati nel procedimento di questa invenzione possono includere una modifica di ossatura, *ad es.* una versione modificata del fosfodiesterio presente in RNA, come fosforotioato (PS), fosforoditioato (PS2), fosfonoacetato (PACE), fosfonoacetammide (PACA), tiofosfonoacetato, tiofosfonoacetammide, fosforotioato profarmaco, H-fosfonato, metil fosfonato, metil fosfonotioato, metil fosfato, metil fosforotioato, etil fosfato, etil fosforotioato, boranofosfato, boranofosforotioato, metil boranofosfato, metil boranofosforotioato, metil boranofosfonato, metilboranofosfonotioato, e loro derivati. Un'altra modifica include fosforammidato, fosforammidato, N3'→P5' fosforammidato, fosforodiammidato, fosforotiodiammidato, solfamato, dimetilene solfosido, solfonato, triazolo, ossalile, carbammato, metileneimmina (MMI), e tioacetammido acido nucleico (TANA); e loro derivati,

In un'altra realizzazione, la modifica è nella ossatura ed è scelta dal gruppo costituito da: fosforotioato (PS), fosforammidato (PA) e fosforodiammidato. In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide modificato è un oligomero morfolino fosforodiammidato (PMO). Un PMO ha una ossatura di anelli di metilenemorfolina con legami di fosforodiammidato. In una realizzazione dell'invenzione, il prodotto ha uno scheletro di fosforotioato (PS).

In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide comprende una combinazione di due o più modifiche come descritto sopra. Una persona esperta nella tecnica comprenderà che esistono molti derivati sintetici di oligonucleotidi.

In una realizzazione dell'invenzione, il prodotto è un gapmero. In una realizzazione dell'invenzione, le ali 5' e 3' del gapmero comprendono o sono costituite da nucleotidi modificati 2'-MOE. In una realizzazione dell'invenzione il segmento distanziale del gapmero comprende o è costituito da nucleotidi contenenti idrogeno nella posizione 2' della porzione di zucchero, *cioè* è simile al DNA. In una realizzazione dell'invenzione, le ali 5' e 3' del gapmero sono costituite da nucleotidi modificati 2'MOE e il segmento distanziale del gapmero è costituito da nucleotidi contenenti idrogeno nella posizione 2' della porzione di zucchero (*cioè* desossinucleotidi). In una realizzazione dell'invenzione, le ali 5' e 3' del gapmero sono costituite da nucleotidi modificati 2'MOE e il segmento distanziale del gapmero è costituito da nucleotidi contenenti idrogeno nella

posizione 2' della porzione di zucchero (cioè desossinucleotidi) e i legami tra tutti i nucleotidi sono legami di fosforotioato.

Una realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento come precedentemente descritto nella presente, in cui il prodotto risultante è più puro del 90%. In un'altra realizzazione, il prodotto è più puro del 95%. In un'altra realizzazione, il prodotto è più puro del 96%. In un'altra realizzazione, il prodotto è più puro del 97%. In un'altra realizzazione, il prodotto è più puro del 98%. In un'altra realizzazione, il prodotto è più puro del 99%. La purezza di un oligonucleotide può essere determinata usando qualsiasi metodo adatto, *ad es.* cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) o spettrometria di massa (MS), in particolare cromatografia liquida-MS (LC-MS), HPLC-MS o spettrometria di massa per elettroforesi capillare (CEMS).

Ancora un'altra realizzazione dell'invenzione fornisce un procedimento per produrre oligonucleotidi a doppio filamento, in cui 2 oligonucleotidi a filamento singolo complementari vengono prodotti mediante il metodo di qualsiasi realizzazione precedente e poi miscelati in condizioni tali da consentire la riassociazione. In una realizzazione, il prodotto è un siRNA.

Una realizzazione dell'invenzione fornisce un oligonucleotide prodotto mediante un procedimento precedentemente descritto nella presente. In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide prodotto è l'RNA. In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide prodotto è DNA. In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide prodotto comprende sia RNA che DNA. In un'altra realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide prodotto è un oligonucleotide modificato. In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide prodotto è un oligonucleotide antisense. In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide prodotto è un aptamero. In una realizzazione dell'invenzione, l'oligonucleotide prodotto è un miRNA. In una realizzazione dell'invenzione, il prodotto è un oligonucleotide terapeutico.

L'invenzione qui descritta utilizza le proprietà di legame degli oligonucleotidi per fornire un procedimento migliorato per la loro produzione. Fornendo un oligonucleotide stampo con complementarità del 100% alla sequenza bersaglio e regolando le condizioni di reazione in modo che il prodotto possa essere rilasciato e separato in condizioni specifiche, è possibile ottenere un prodotto con un alto grado di purezza.

Rilascio del prodotto (o impurità) dallo stampo, cioè denaturazione del duplex di prodotto (o impurità):stampo e separazione del prodotto (o impurità)

Il rilascio del prodotto (o se il procedimento include una fase aggiuntiva di rilascio di impurità, qualsiasi impurità) dallo stampo richiede la rottura dell'accoppiamento di basi di Watson-Crick tra il filamento di oligonucleotide dello stampo e il prodotto (o impurità). Il prodotto (o l'impurità) può quindi essere separato dallo stampo. Ciò può verificarsi come due passaggi separati o come un passaggio combinato.

Il rilascio e la separazione del prodotto (o dell'impurità) può avvenire in un'unica fase, se il procedimento viene eseguito in un reattore a colonna. L'esecuzione in un tampone che altera il pH o la concentrazione di sale o contiene un agente chimico che perturba l'accoppiamento delle basi (come la formammide o l'urea) causerà la denaturazione dei filamenti di oligonucleotidi e il prodotto (o impurità) verrà eluito nel tampone.

Quando il procedimento viene eseguito in altri recipienti di reazione, il rilascio e la separazione del prodotto (o dell'impurità) può avvenire come procedimento in due fasi. In primo luogo, le coppie di basi di Watson-Crick vengono perturbate per separare i filamenti, quindi il prodotto (o l'impurità) viene rimosso dal recipiente di reazione. Quando il rilascio e la separazione del prodotto vengono eseguiti come un procedimento in due fasi, la rottura delle coppie di basi di Watson-Crick può essere ottenuta alterando le condizioni del tampone (pH, sale) o introducendo un agente perturbante chimico (formammide, urea). In alternativa, anche l'innalzamento della temperatura provocherà la dissociazione dei due filamenti. Il prodotto (o le impurità) possono quindi essere rimossi dal recipiente di reazione tramite metodi che includono separazione basata sul peso molecolare, separazione basata sulla carica, separazione basata sull'idrofobicità, separazione basata su sequenza specifica o una combinazione di questi metodi.

Quando il procedimento viene eseguito in un reattore a flusso continuo o semicontinuo, il rilascio e la separazione del prodotto (o impurità) può avvenire in una o due fasi. Ad esempio, il rilascio e la separazione del prodotto (o impurità) in una fase potrebbe essere effettuato aumentando la temperatura per provocare la dissociazione dei due filamenti e separando i filamenti rilasciati sulla base del peso molecolare nella stessa parte del reattore che viene usata per aumentare la temperatura. Il rilascio e la separazione del prodotto (o impurità) in

due fasi potrebbe essere effettuato aumentando la temperatura per provocare la dissociazione dei due filamenti in una parte del reattore e separando i filamenti rilasciati in base al peso molecolare in una parte diversa del reattore.

Rilasciare e separare in modo specifico le impurità dallo stampo, ma trattenendo il prodotto sullo stampo

Le impurità si formano quando un nucleotide errato viene incorporato nel filamento dell'oligonucleotide durante l'estensione della catena o quando la reazione di estensione della catena termina precocemente. Le impurità si verificano anche quando la reazione include la fase di ligazione degli oligonucleotidi di segmento e una o più delle fasi di ligazione non si verificano. I tipi di impurità che possono sorgere sono illustrati nella Figura 6.

Le proprietà dell'accoppiamento di basi di Watson-Crick possono essere sfruttate per rilasciare in modo specifico eventuali impurità legate allo stampo prima del rilascio del prodotto. Ciascun oligonucleotide a doppio filamento si dissocerà in condizioni specifiche e tali condizioni sono diverse per le sequenze che non hanno complementarità del 100% rispetto alle sequenze con complementarità del 100%. La determinazione di tali condizioni rientra nelle competenze di una persona esperta.

Un modo comune per denaturare gli oligonucleotidi è di aumentare la temperatura. La temperatura alla quale metà delle coppie di basi sono dissociate, *cioè* quando il 50% del duplex è nello stato a filamento singolo, viene chiamata temperatura di fusione, T_m . Il mezzo più affidabile e accurato per determinare la temperatura di fusione è quello empirico. Tuttavia, questo è laborioso e di solito non necessario. Diverse formule possono essere usate per calcolare i valori di T_m (Nucleic Acids Research 1987, 15 (13): 5069-5083; PNAS 1986, 83 (11): 3746-3750; Biopolymers 1997, 44 (3): 217-239) e numerosi calcolatori della temperatura di fusione possono essere trovati *on-line*, ospitati da fornitori di reagenti e università. È noto che per una data sequenza oligonucleotidica, una variante con tutti i legami di fosforotioato fonderà a una temperatura inferiore rispetto a una variante con tutti i legami di fosfodiesteri. L'aumento del numero di legami di fosforotioato in un oligonucleotide tende ad abbassare la T_m dell'oligonucleotide per il suo bersaglio previsto.

Per separare in modo specifico le impurità da una miscela di reazione, viene innanzitutto calcolata la temperatura di fusione del duplex di prodotto:stampo. Poi il recipiente di reazione viene riscaldato a una prima temperatura,

ad es. una temperatura inferiore alla temperatura di fusione del duplex prodotto:stampo, ad esempio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 gradi centigradi al di sotto della temperatura di fusione. Ciò causerà la denaturazione degli oligonucleotidi che non sono il prodotto, *cioè* non sono complementari al 100% allo stampo, dallo stampo. Questi possono quindi essere rimossi dal recipiente di reazione usando uno dei metodi descritti sopra, *ad es.* separazione basata sul peso molecolare, separazione basata sulla carica, separazione basata sull'idrofobicità, separazione basata sulla sequenza specifica o una combinazione di questi metodi. Poi il recipiente di reazione verrà portato a una seconda temperatura più alta, ad es. al di sopra della temperatura di fusione calcolata, ad esempio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 gradi centigradi sopra la temperatura di fusione, per provocare la denaturazione del prodotto dallo stampo. Il prodotto può quindi essere rimosso dal recipiente di reazione usando uno dei metodi descritti sopra, *ad es.* separazione basata sul peso molecolare, separazione basata sulla carica, separazione basata sull'idrofobicità, separazione basata sulla sequenza specifica o una combinazione di questi metodi.

Un procedimento simile può essere usato quando l'agente perturbatore è un agente che provoca un cambiamento nel pH, concentrazione di sale o un agente perturbante chimico. L'agente perturbante viene aumentato in concentrazione fino a poco al di sotto della concentrazione alla quale il prodotto si dissocia, per provocare la denaturazione degli oligonucleotidi che non sono il prodotto dallo stampo. Queste impurità possono quindi essere rimosse dal recipiente di reazione usando uno dei metodi descritti sopra. L'agente di disturbo viene quindi aumentato in concentrazione fino al di sopra della concentrazione alla quale il prodotto si dissocia dallo stampo. Il prodotto può quindi essere rimosso dal recipiente di reazione usando uno dei metodi descritti sopra.

Il prodotto ottenuto da un procedimento come quello descritto sopra ha un alto grado di purezza senza la necessità di ulteriori passaggi di purificazione. Ad esempio, il prodotto ottenuto è puro per più del 95%.

Proprietà dello stampo

Lo stampo richiede una proprietà che gli consenta di essere trattenuto nel recipiente di reazione quando il prodotto viene rimosso, per evitare che diventi un'impurità nel prodotto. In altre parole, il modello ha proprietà che gli consentono di essere separato dal prodotto. In una realizzazione dell'invenzione, questa ritenzione è

ottenuta accoppiando lo stampo ad un materiale di supporto. Questo accoppiamento si traduce in un complesso di stampo-supporto che ha un peso molecolare elevato e può quindi essere trattenuto nel recipiente di reazione quando le impurità e il prodotto vengono rimossi, ad esempio mediante filtrazione. Lo stampo può essere accoppiato a un materiale di supporto solido come perle polimeriche, supporti fibrosi, membrane, perle rivestite di streptavidina, e cellulosa. Lo stampo può anche essere accoppiato a un materiale di supporto solubile come polietilenglicole, un polimero organico solubile, DNA, una proteina, un dendrimero, un polisaccaride, un oligosaccaride e un carboidrato.

Ogni materiale di supporto può avere più punti in cui è possibile attaccare uno stampo e ogni punto di attacco può avere più stampi attaccati, *ad es.* nel modo mostrato in Figura 3.

Lo stampo può avere esso stesso un alto peso molecolare, senza essere attaccato a un materiale di supporto, ad esempio, può essere una molecola con più copie dello stampo, *ad es.* separate da un associatore, nel modo mostrato in Figura 3.

La capacità di trattenere lo stampo nel recipiente di reazione consente anche di riciclare lo stampo per reazioni future, mediante recupero o mediante uso in un procedimento a flusso continuo o semicontinuo.

Metodi di separazione dello stampo dal prodotto (o impurità)

Le proprietà dello stampo, come descritto sopra, consentono la separazione dello stampo e del prodotto, o la separazione del prodotto legato allo stampo e delle impurità. È possibile usare separazione basata sul peso molecolare, separazione basata sulla carica, separazione basata sull'idrofobicità, separazione basata sulla sequenza specifica o una combinazione di questi metodi.

Nel caso in cui lo stampo è fissato a un supporto solido, la separazione dello stampo dal prodotto o la separazione delle impurità dal prodotto legato allo stampo si ottiene lavando il supporto solido in condizioni appropriate. Nei casi in cui lo stampo è accoppiato a un supporto solubile o è esso stesso composto da sequenze di stampo ripetute, la separazione dello stampo dal prodotto o la separazione del prodotto legato dallo stampo dalle impurità può essere ottenuta mediante una separazione basata sul peso molecolare. Ciò può essere ottenuto usando tecniche come l'ultra-filtrazione o la nano-filtrazione in cui il materiale del filtro viene scelto in modo

che la molecola più grande sia trattenuta dal filtro e la molecola più piccola passi attraverso. Nei casi in cui una singola fase di separazione dell'impurità dal complesso di stampo-prodotto o la separazione del prodotto dallo stampo non è abbastanza efficiente, è possibile impiegare più fasi di filtrazione sequenziale per aumentare l'efficienza di separazione e generare così un prodotto che soddisfi la purezza desiderata.

È desiderabile fornire un procedimento per la separazione di tali oligonucleotidi che sia efficiente e applicabile su scala di produzione industriale. "Therapeutic oligonucleotides: The state of the art in purification technologies" Sanghvi et. al. *Current Opinion in Drug Discovery* (2004) Vol. 7 No. 8 passa in rassegna procedimenti usati per la purificazione degli oligonucleotidi.

WO-A-01/55160 descrive la purificazione di oligonucleotidi formando legami imminici con contaminanti poi rimuovendo le impurità legate ad immina con cromatografia o altre tecniche. "Size Fractionation of DNA Fragments Ranging from 20 to 30000 Base Pairs by Liquid/Liquid chromatography" Muller et al. *Eur. J. Biochem* (1982) 128-238 descrive l'uso di una colonna solida di cellulosa microcristallina su cui è stata depositata una fase di PEG/destrano per la separazione di sequenze nucleotidiche. "Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction chromatography." Easter et. al. *The Analyst* (2010); 135(10) descrive la separazione di oligonucleotidi usando una variante di HPLC che impiega una fase di supporto di silice solida. "Fractionation of oligonucleotides of yeast soluble ribonucleic acids by countercurrent distribution" Doctor et al. *Biochemistry* (1965) 4(1) 49-54 descrive l'uso di una colonna solida secca impaccata con DEAE-cellulosa secca. "Oligonucleotide composition of a yeast lysine transfer ribonucleic acid" Madison et al; *Biochemistry*, 1974, 13(3) descrive l'uso della cromatografia in fase solida per la separazione di sequenze nucleotidiche.

La cromatografia liquido-liquido è un metodo di separazione noto. "Countercurrent Chromatography The Support-Free Liquid Stationary Phase" Billardello, B.; Berthod, A; Wilson & Wilson's *Comprehensive Analytical Chemistry* 38; Berthod, A., Ed.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam (2002) pp 177-200 fornisce un'utile descrizione generale della cromatografia liquido-liquido. Sono note varie tecniche di cromatografia liquido-liquido. Una tecnica è la cromatografia in controcorrente liquido-liquido (qui denominata "CCC").

Un'altra tecnica nota è la cromatografia a partizione centrifuga (qui denominata "CPC").

I metodi sopra descritti e i metodi esposti in WO 2013/030263 possono essere usati per separare un prodotto oligonucleotidico *ad es.* dallo stampo e/o un'impurità.

Oligonucleotidi usati come materiali di partenza

Gli oligonucleotidi usati come materiale di partenza per i procedimenti dell'invenzione sono qui descritti come una "raccolta" e una loro definizione è fornita sopra. La raccolta è un insieme non omogeneo di oligonucleotidi. Gli oligonucleotidi che formano la raccolta saranno stati prodotti con altri metodi di produzione di oligonucleotidi e quindi conterranno probabilmente un alto grado di impurità. Pertanto, quando questa raccolta di oligonucleotidi viene applicata a un procedimento dell'invenzione, la capacità di rimuovere in modo specifico le impurità come qui descritto risulta nella attuazione di un passaggio di purificazione.

La raccolta può contenere oligonucleotidi che devono essere della stessa lunghezza dell'oligonucleotide di stampo (sebbene conterrà impurità di lunghezze diverse, nonché residui incorporati in modo errato). La raccolta può anche essere composto da segmenti degli oligonucleotidi del prodotto, che sono uniti insieme mentre vengono assemblati sullo stampo. Ogni segmento sarà un insieme non omogeneo con impurità di lunghezze diverse e residui incorporati in modo errato.

Ligasi

Nel procedimento dell'invenzione rivendicata nella presente, viene usata una ligasi. In una realizzazione dell'invenzione, la ligasi è una ligasi dipendente da ATP. Le ligasi dipendenti da ATP hanno dimensioni comprese tra 30 e >100 kDa. In una realizzazione dell'invenzione, la ligasi è una ligasi dipendente da NAD. Gli enzimi dipendenti dal NAD sono altamente omologhi e sono proteine monomeriche di 70-80 kDa. In una realizzazione dell'invenzione, la ligasi è una ligasi termostabile. Una ligasi termostabile può essere derivata da un batterio termofilo.

In una realizzazione dell'invenzione, la ligasi è una ligasi modificata. Ad esempio, una ligasi modificata include una ligasi di DNA T4 modificata, una ligasi CC31 di fago di Enterobatteri modificata, una ligasi del fago Shf125875 di Shigella modificata, e una ligasi di Chlorella modificata.

In una realizzazione, la DNA ligasi di T4 di tipo selvatico è modificata nella posizione dell'amminoacido 368 o nella posizione dell'amminoacido 371 di SEQ. ID. N.: 3.

In una realizzazione, la ligasi mutante comprende o è costituita da SEQ. ID. N.: 3 in cui l'amminoacido in posizione 368 è R o K.

In una realizzazione, la ligasi mutante comprende o è costituita da SEQ. ID. N.: 3 in cui l'amminoacido in posizione 371 è uno qualsiasi dei seguenti amminoacidi: L, K, Q, V, P, R.

In una realizzazione, il residuo(i) corrispondente descritto sopra in relazione alla DNA ligasi di T4 è mutato in una qualsiasi di ligasi di fago CC31 di Enterobatteri, ligasi di fago Shf125875 di Shigella, e ligasi di Chlorella. Regioni conservate di DNA ligasi sono descritte in Chem. Rev.2006, 106, 687-699 e Nucleic Acids Research, 2000, vol. 28, n. 21, 4051-4058. In una realizzazione, la ligasi è modificata in una regione di associatore.

In una realizzazione dell'invenzione, la ligasi comprende o è costituita da SEQ. ID. N.: 23 o una ligasi con almeno il 90% di identità di sequenza ad essa, escludendo una ligasi di tipo selvatico, ad es. ligasi CC31 fagica di Enterobatteri.

In una realizzazione dell'invenzione, la ligasi comprende o è costituita da una qualsiasi delle seguenti sequenze amminoacidiche: SEQ. ID. N.: 10-28.

In una realizzazione dell'invenzione, la ligasi è immobilizzata, ad es. su una perla.

In un aspetto dell'invenzione viene fornito l'uso di una ligasi comprendente la sequenza amminoacidica come esposta in SEQ. ID. N.: 6 o SEQ. ID. N.: 8 per legare un segmento 5', contenente una o più porzioni di zucchero modificate, ad un segmento 3', in cui tutte le porzioni di zucchero entro il segmento 3' non sono modificate. In una realizzazione dell'invenzione è fornito l'uso di una ligasi comprendente la sequenza amminoacidica come esposta in SEQ. ID. N.: 6 o SEQ. ID. N.: 8 per legare un segmento 5', contenente una o più porzioni di zucchero con una modifica 2'-OMe, in un segmento 3', in cui tutte le porzioni di zucchero all'interno di segmento 3' non sono modificate. In una realizzazione, tutte le porzioni di zucchero nel segmento 5' contengono una modifica 2'-OMe. In una realizzazione, il segmento 5' contiene 5 porzioni di zucchero con una modifica 2'-OMe.

ESEMPI

Abbreviazioni

OMe	O-metile
MOE	O-metossietile (ossatura di DNA) o metossietile (ossatura di RNA)
CBD	Dominio legante cellulosa
HPLC	cromatografia liquida ad alta prestazione
PBS	Soluzione salina tamponata con fosfato
HAA	Acetato di esilammonio
SDS PAGE	elettroforesi su gel di sodio dodecil solfato poliacrilammide
LCMS	cromatografia liquida spettrometria di massa
PO	fosfodiesteri
DTT	ditiotreitolo

Esempio 1: Assemblaggio di segmenti oligonucleotidici (DNA) e ligazione con DNA ligasi di T4 di tipo selvatico1.1 Sintesi chimica di sequenze di partenza e di regolazione

Al fine di dimostrare che più oligonucleotidi brevi ("segmenti") potevano essere assemblati nell'ordine corretto su un filamento di stampo complementare e ligati per fornire il prodotto finale desiderato ("bersaglio"), i segmenti, le sequenze bersaglio e di stampo, come descritto in dettaglio in Tabella 1, sono stati sintetizzati chimicamente usando metodi standard.

1.2 Analisi HPLC

L'analisi HPLC è stata eseguita usando una colonna Agilent ZORBAX Eclipse Plus XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm dp. Agilent P/N 993967-902) funzionante a 0,2 ml/min mentre l'assorbanza è stata monitorata a 258 nm. La colonna è stata mantenuta a 60°C. Sono stati iniettati 20 µl di campione ed è stato eseguito un gradiente dal 20 al 31% di tampone B per 20 minuti prima di essere incrementato fino all'80% di tampone B per 5 minuti.

Tampone A: 75 ml 1 M HAA, 300 ml di alcol isopropilico, 200 ml di acetonitrile, 4425 ml di acqua

Tampone B: 650 ml di alcol isopropilico, 350 ml di acetonitrile

Tabella 1

Nome	Sequenza	% purezza HPLC	Quantità (mg)
segmento 5'	5'-GGC CAA-3'	100,0	21,6
segmento centrale	5'-(p)ACC TCG GC-3'	96,9	58,1
segmento 3'	5'-(p)T TAC CT-3'	98,8	39,8
Bersaglio	5'-GGC CAA ACC TCG GCT TAC CT-3' (SEQ. ID. N.:1)	98,4	101,7
Stampo biotinilato	5'-biotina TT TAG GTA AGC CGA GGT TTG GCC-3' (SEQ. ID. N.:2)	96,9	130,7

1.3 Metodo di assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi con DNA ligasi di T4 commerciale (SEQ. ID. N.:3)

Il segmento 5', segmento centrale e segmento 3' sono stati assemblati sullo stampo: ogni segmento e lo stampo è stato sciolto in acqua ad una concentrazione di 1 mg/ml e poi mescolato come segue.

segmento 5'	2 µl
segmento centrale	2 µl
segmento 3'	2 µl
stampo biotinilato	2 µl
H ₂ O	36 µl

La soluzione oligonucleotidica combinata è stata incubata a 94°C per 5 minuti e raffreddata a 37°C prima di incubare a 37°C per altri 5 minuti per consentire ai segmenti di riassociarsi allo stampo. Sono stati quindi aggiunti 2 µl (equivalenti a 2 µg) di T4 DNA ligasi (NEB) e 4 µl di 1 x T4 Tampone di ligazione del DNA (NEB) e la reazione (volume di reazione totale 50 µl) è stata incubata a temperatura ambiente per un'ora. Successivamente, sono stati aggiunti 40 µl di sfere magnetiche rivestite di streptavidina e la sospensione è stata

incubata a temperatura ambiente per 10 minuti per consentire allo stampo biotinilato di legarsi alle sfere di streptavidina. Le sfere di streptavidina sono state lavate con 2 x 100 µl di PBS per rimuovere i segmenti non legati. Il lavaggio è stato analizzato mediante HPLC. La miscela di reazione è stata quindi incubata a 94°C per 10 minuti per separare i prodotti di ligazione legati (o qualsiasi segmento legato) dallo stampo prima di essere rapidamente raffreddata su ghiaccio per 'fondere' il DNA e interrompere la riassociazione dei prodotti oligonucleotidi (o segmenti) allo stampo. L'analisi della reazione di ligazione è stata quindi eseguita mediante HPLC.

1.4 Metodo di assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi con impasto di perle di DNA ligasi di T4 aziendale

1.4.1 Generazione di impasto di perle

La ligasi di T4 (SEQ. ID. N.: 4) fusa all'N-terminale con un dominio di legame della cellulosa (CBD) è stata prodotta usando metodi standard di clonazione, espressione ed estrazione. Questa sequenza di amminoacidi di T4 ligasi differisce dalla sequenza commerciale di T4 ligasi (SEQ. ID. N.: 3) in quanto la metionina N-terminale (M) è stata sostituita con glicina e serina (GS). Questo è stato fatto per aiutare la generazione e l'espressione della proteina di fusione del CBD. La proteina di fusione della ligasi CBD-T4 è stata espressa nelle cellule A1 BL21 (INVITROGEN). Supernatante è stato raccolto ed è stato aggiunto a 600 µl di perle PERLOZA 100 (PERLOZA) e agitato a 26°C per 1 ora. Le sfere di cellulosa PERLOZA sono state quindi raccolte e lavate con 2 ml di tampone (50 mM Tris pH 8,0, 200 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 10% glicerolo) seguite da 5 ml di PBS e infine risospese in 200 µl di PBS (10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl pH 7,4). Al fine di analizzare l'espressione della proteina, 15 µl della sospensione di sfere PERLOZA sono stati miscelati con 5 µl di tampone di caricamento SDS e incubati a 80°C per 10 minuti prima di essere fatti correre su un gradiente gel SDS PAGE (4-20%) secondo un protocollo standard.

1.4.2 Assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi mediante impasto di perle

Per la ligasi T4 legata alle sfere PERLOZA, il metodo di assemblaggio e ligazione in 1.3 di cui sopra è stato modificato come segue. Nella miscela di segmento iniziale, 36 µl di H₂O sono stati ridotti a 8 µl di H₂O. Dopo la riassociazione, 2 µl di DNA ligasi T4 commerciale sono stati sostituiti con 20 µl di sospensione di sfere

PERLOZA. Prima di aggiungere le sfere magnetiche della streptavidina, le sfere PERLOZA sono state centrifugate e il supernatante rimosso. Le sfere magnetiche di streptavidina sono state aggiunte al supernatante e incubate a temperatura ambiente per 10 minuti per consentire allo stampo biotinilato di legarsi alle sfere di streptavidina.

1.5 Risultati e conclusioni

Il prodotto, lo stampo e tutti e tre gli oligonucleotidi di segmento sono stati chiaramente risolti nel cromatogramma di controllo.

L'analisi HPLC delle reazioni della ligasi ha mostrato che alcuni segmenti oligonucleotidici non ligati rimanevano, ma la DNA ligasi di T4 commerciale (NEB) è stata in grado di catalizzare la ligazione dei tre segmenti per generare l'oligonucleotide prodotto desiderato (Figura 7). La DNA ligasi T4 legata a sfere PERLOZA sembrava essere meno efficiente nella ligazione dei segmenti oligonucleotidici, con segmenti oligonucleotidici che apparivano sia nel campione di lavaggio di controllo che nel campione di reazione (Figura 8). Tuttavia, è difficile essere sicuri se la stessa quantità di enzima fosse aggiunta alle sfere rispetto all'enzima commerciale e quindi non è stato possibile un confronto diretto dell'efficienza di ligazione.

Esempio 2: assemblaggio di segmenti oligonucleotidici modificati con ribosio 2'-OMe e ligazione con DNA ligasi T4 di tipo selvatico

2.1 2'OMe in ogni posizione nucleotidica in ogni segmento

Per determinare se la DNA ligasi T4 fosse in grado di legare segmenti oligonucleotidici con modifica nella posizione 2' dell'anello di ribosio, i segmenti oligonucleotidici sono stati sintetizzati con la stessa sequenza dell'esempio 1, ma la posizione 2' dell'anello di ribosio è stata sostituita con un gruppo OMe e la timidina è stata sostituita dall'uridina come mostrato di seguito.

Tabella 2

Nome	Sequenza	% purezza HPLC	Quantità (mg)
segmento 5' 2'-OMe	5'-GGC CAA-3'	21	97,8
segmento centrale 2'-OMe	5'-(p)ACC UCG GC-3'	15,5	97,7

segmento 3' 2'-OMe	5'-(p)U UAC CU-3'	21,2	98,1
Bersaglio 2'-OMe	5'-GGC CAA ACC UCG GCU UAC CU-3' (SEQ. ID. N.:5)	88	96,9

(p) = fosfato

L'assemblaggio, la ligazione e l'analisi HPLC sono state eseguite usando i metodi dell'esempio 1, con fusione sia della ligasi NEB commerciale che della ligasi CBD T4 legate a sfere PERLOZA. La quantità di acqua usata nella miscela di reazione per l'esperimento commerciale T4 DNA ligasi (NEB) era di 26 µl invece di 36 µl in modo che il volume di reazione finale fosse di 40 µl. La quantità di acqua usata nella miscela di reazione per l'esperimento in azienda di impasto di sferette di DNA ligasi T4 era di 23 µl e la quantità di perle usate era di 5 µl in modo che anche il volume di reazione finale fosse di 40 µl. Parallelamente sono stati eseguiti esperimenti di controllo che usano DNA non modificato rispetto al DNA 2'-OMe.

I risultati degli esperimenti di controllo erano in accordo con l'esempio 1. Nessun prodotto è stato rilevato usando HPLC per gli esperimenti 2'-OMe indicando che la DNA ligasi T4 non è in grado di legare completamente segmenti di oligonucleotidi modificati con 2'-OMe indipendentemente dal fatto che fosse usato una DNA ligasi di T4 commerciale o fusione di DNA ligasi T4 CBD aziendale legata alle sfere di PERLOZA.

2.2 2'-OMe in ogni posizione nucleotidica in un singolo segmento

Usando una soluzione da 1 mg/ml di ciascun oligonucleotide, sono state allestite le reazioni dettagliate nella Tabella 3.

Tabella 3

Esperimento 1 (Nessun controllo di ligasi)	Esperimento 2 (singolo segmento 2'-OMe - 3')	Esperimento 3 (singolo segmento 2'-OMe - 5')	Esperimento 4 (tutto 2'-OMe)	Esperimento 5 (tutto non modificato)	Volume non (µl)
stampo	stampo	stampo	stampo	stampo	2

segmento 5'	segmento 5'	segmento 2'-OMe sostituito 5'	segmento 2'-OMe sostituito 5'	segmento 5'	2
segmento 3'	segmento 2'-OMe sostituito 3'	segmento 3'	segmento 2'-OMe sostituito 3'	segmento 3'	2
Segmento centrale	Segmento centrale	Segmento centrale	segmento 2'-OMe sostituito centrale	Segmento centrale	2
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	fino a 40 totale

L'assemblaggio e la ligazione sono stati eseguiti usando i metodi dell'esempio 1 con ligasi NEB commerciale e DNA ligasi T4 legata a PERLOZA preparata in azienda.

Le reazioni sono state incubate a 94°C per 5 minuti, seguite da incubazione per 5 minuti a 37°C per consentire la riassociazione. 4 µl di 1x NEB T4 DNA ligasi tampone sono stati aggiunti a ciascuna reazione insieme a 5 µl (circa 2 µg) di DNA ligasi T4 preparata in azienda o 2 µl (circa 2 µg) di DNA ligasi commerciale T4 (a parte Esperimento 1 che era senza controllo di ligasi) e la reazione di ligazione è stata lasciata procedere per 2 ore a temperatura ambiente. Le sfere magnetiche di streptavidina sono state quindi aggiunte a ciascuna reazione e le reazioni sono state riscaldate a 94°C prima del raffreddamento rapido su ghiaccio come descritto nell'esempio 1 per separare lo stampo dai materiali e dai prodotti di partenza.

Le reazioni elaborate sono state divise in due: per metà sono state analizzate mediante HPLC come descritto per l'esempio 1 (sezione 1.2). L'altra metà del campione è stata conservata per la spettrometria di massa per confermare i risultati dell'HPLC.

La ligazione dei segmenti oligonucleotidici non modificati (esperimento 5) è avvenuta come previsto per formare un prodotto a tutta lunghezza. Una piccola quantità di ligazione è stata osservata quando il segmento 5' è stato sostituito con 2'-OMe (Esperimento 3) come mostrato nella Figura 9, ma non è stata osservata alcuna ligazione quando il segmento 3' è stato sostituito da 2'-OMe (Esperimento 2). Non è stato osservato alcun

prodotto significativo quando tutti e tre i segmenti sono stati sostituiti con 2'-OMe (Esperimento 4) in conformità con 2.1.

2.3 Conclusione

La DNA ligasi T4 di tipo selvatico è scarsa nel legare i segmenti oligonucleotidici sostituiti con 2'-OMe, ma leggermente meno sensibile alla modifica di segmento oligonucleotidico 5' rispetto al segmento 3'.

Esempio 3: assemblaggio e ligazione di segmento oligonucleotidico modificato con ribosio 2'-OMe con ligasi di tipo selvatico e mutanti

3.1 Materiali

Ligasi di fago Enterobacteria di tipo selvatico CC31 (SEQ. ID. N.: 6), ligasi di fago Shigella Shf125875 di tipo selvatico (SEQ. ID. N.: 8) e 10 ligasi di T4 mutanti di SEQ. ID. N.: 10-19, ciascuna fusa al terminale a un CBD, sono stati prodotti usando metodi standard di clonazione, espressione ed estrazione. Come descritto in 1.4.1, al fine di generare ed esprimere le proteine di fusione di CBD, la metionina N-terminale (M) è stata sostituita con glicina e serina (GS) in ogni caso (ad esempio SEQ. ID. N.: 7 per ligasi di fago Enterobacteria CC31 e SEQ. ID. N.: 9 per ligasi di fago Shigella Shf125875).

I seguenti oligonucleotidi sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida.

Tabella 4

Nome	Sequenza	% purezza HPLC	Quantità (mg)
segmento 5' *	5'-(OMe)G(OMe)G(OMe)C(OMe)C(OMe)AA-3'	99,35	24,7
segmento centrale	5'-(p)ACC TCG GC-3'	96,9	58,1
segmento 3'	5'-(p)TTA CCT-3'	97,88	29,5
Stampo biotinilato	5'-biotin TT TAG GTA AGC CGA GGT TTG GCC-3' (SEQ ID NO:2)	96,9	130,7

N.B. OMe indica sostituzione con 2 metossile sull'anello di ribosio

(p) = fosfato

* si noti che i primi 5 nucleotidi sono modificati con 2'-OMe (GGCCA), ma l'A finale non lo è

3.2 Metodo di assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi con impasti di perle di ligasi

3.2.1 Generazione di impasto di perle

Le ligasi fuse a CBD sono state legate a sfere PERLOZA come descritto in 1.4 per generare un impasto di perle.

3.2.2 Assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi mediante impasto di perle

Le reazioni di ligazione sono state preparate con i componenti seguenti fino a un volume finale di 50 µl in una piastra a 96 pozzetti:

2 µL	~ 1mg/mL di segmento 5' (2'-OMe)
2 µL	~ 1mg/mL di segmento centrale
2 µL	~ 1mg/mL di segmento 3'
2 µL	~ 1mg/mL di stampo
5 µL	Tampone di DNA ligasi NEB T4
22 µL	H ₂ O
15 µL	Impasto di perle legate PERLOZA

La reazione è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente prima dell'aggiunta della sospensione di perle PERLOZA per consentire ai segmenti di riassociarsi allo stampo. È stata aggiunta la sospensione di perle PERLOZA e la reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo un'ora di incubazione, la soluzione è stata trasferita in una piastra filtrante ACOPREP Advance 350 (PN 8082) e la piastra filtrante è stata collocata sopra una superpiastra ABGENE (Thermo Scientific, # AB-2800) e centrifugata per 10 minuti a 4.000 gpm per rimuovere la sospensione di perle PERLOZA. Le soluzioni sono state quindi analizzate mediante HPLC usando il metodo descritto nell'esempio 1 (sezione 1.2).

Ciascun assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi è stato ripetuto 6 volte per ciascuna ligasi.

3.3 Risultati e conclusioni

La ligasi di fago CC31 di Enterobacteria di tipo selvatico (SEQ. ID. N.: 6) e la ligasi del fago di Shigella di tipo selvatico Shf125875 (SEQ. ID. N.: 8) sono in grado di legare un segmento sostituito con 2'OME in 5' contenente cinque nucleobasi 2'-OME e una desossinucleobase a un segmento contenente solo DNA non modificato. Inoltre, mentre la DNA ligasi T4 di tipo selvatico (SEQ. ID. N.: 3 e 4) è scarsa nell'eseguire questa reazione, come mostrato nell'esempio 2 e riconfermato qui, un certo numero di mutazioni nelle posizioni 368 e 371 conferiscono la capacità di legare un segmento sostituito con 2'-OME in 5' contenente cinque basi azotate 2'OME e una desossinucleobase ad un segmento contenente solo DNA non modificato sulla ligasi (SEQ. ID. N.: 10-19).

Esempio 4: assemblaggio di segmenti oligonucleotidici modificati con ribosio 2'MOE e 5-metil pirimidina e ligazione con DNA ligasi mutanti

4.1 Materiali

I segmenti di oligonucleotidi modificati come indicato nella Tabella 5 seguente sono stati sintetizzati mediante metodi standard basati su fase solida.

Tabella 5

Segmento	Sequenza	PM	Massa (mg)	% purezza
segmento centrale	5'-(p)dCdCdTdCdGdG-3' 5'-(p)dCdTmTmAmCmCmT-	2044,122	39	98,96
Segmento MOE 3'-	3'	2699,679	52	97,79
Segmento MOE 5'-	5'-mGmGmCmCmAdAdA-3'	2644,771	48	99,13

(p) = fosfato, mX = basi MOE, dX = basi di DNA

tutte 5-metil pirimidine

DNA ligasi mutanti (SEQ. ID. N.: 20-28) basate sulla ligasi del fago CC31 di Enterobacteria di tipo selvatico, la ligasi T4 di tipo selvatico e la ligasi di fago di Shigella Shf125875 di tipo selvatico sono state fuse ciascuna all'estremità N con un dominio di legame di cellulosa (CBD), usando metodi standard di clonazione, espressione

ed estrazione. Le ligasi fuse a CBD sono state legate a perle PERLOZA come descritto in 1.4 per generare un impasto di perle. Per rilasciare le ligasi dalle perle PERLOZA, 2 μ l di proteasi TEV sono stati aggiunti alla sospensione e incubati per una notte a 4°C. La proteina scissa, ora priva del dominio di legame di cellulosa, è stata raccolta mediante centrifugazione per 10 minuti a 4000 rpm.

4.2 Metodo

La reazione è stata allestita come segue:

segmento centrale	20 μ M finale
MOE segmento 3'	20 μ M finale
MOE segmento 5'	20 μ M finale
Stampo	20 μ M finale
tampone di DNA ligasi NEB T4	5 μ l
DNA ligasi mutante	15 μ l
H ₂ O	per portare il volume di reazione finale a 50 μ l

Tutti i componenti sono stati miscelati e agitati su vortex prima dell'aggiunta di DNA ligasi. Le reazioni sono state incubate per 1 ora a 35°C. Dopo 1 ora le reazioni sono state interrotte riscaldando a 95°C per 5 minuti in un blocco per PCR.

I campioni sono stati analizzati sia mediante HPLC che mediante LCMS per confermare l'identità del prodotto secondo il protocollo HPLC usato nell'esempio 1 (sezione 1.2). Controlli di NEB T4 DNA ligasi commerciale e un controllo negativo (H₂O invece di qualsiasi ligasi) sono stati inclusi.

4.3 Risultati e conclusioni

Figura 10 mostra le tracce HPLC per la reazione di controllo e la reazione catalizzata da SEQ. ID. N.: 23 (clone A4 - ligasi di fago CC31 mutante di Enterobatteri). Il prodotto e lo stampo co-eluiscono usando questo metodo HPLC in modo che il prodotto appaia come un aumento dell'area del picco del prodotto + il picco dello stampo. Nella traccia di ligasi mutante (b) non solo aumenta il picco del prodotto + stampo, ma compaiono due nuovi

picchi a 10,3 e 11,2 minuti. Questi picchi corrispondono alla ligazione di segmento centrale con il segmento MOE 5' o il segmento MOE 3'. Inoltre, i picchi di segmento di ingresso sono sostanzialmente più piccoli del controllo in linea con l'aumento dei picchi del prodotto e intermedi. La traccia della ligasi T4 NEB commerciale (a) ha mostrato un leggero aumento dell'area del picco per stampo + prodotto, una piccola quantità di prodotto di ligazione intermedio insieme a una concomitante diminuzione dei segmenti oligonucleotidici in ingresso. La ligasi mutante (SEQ. ID. N.: 23), tuttavia, ha mostrato un'area di picco di prodotto + stampo sostanzialmente maggiore e una concomitante riduzione nelle aree dei picchi per i segmenti di oligonucleotidi in ingresso. Pertanto la ligasi mutante (SEQ. ID. N.: 23) è una ligasi molto più efficace per i segmenti 2'MOE sostituiti rispetto alla DNA ligasi di T4 commerciale. Miglioramenti simili sono stati mostrati per le altre ligasi mutanti (SEQ. ID. N.: 20, 21, 24-28).

Esempio 5: Effetto di differenti accoppiamenti nucleotidici nel sito di ligazione

5.1 Materiali

La ligasi CC31 del fago di Enterobacteria mutante (SEQ. ID. N.: 23) fusa all'N-terminale con un dominio di legame di cellulosa (CBD) è stata prodotta usando metodi standard di clonazione, espressione ed estrazione. La proteina di fusione di CBD-ligasi CC31 di fago di Enterobatteri mutante è stata aggiunta a 25 ml di perle di cellulosa PERLOZA 100 (PERLOZA) e agitata a 20°C per 1 ora. Le perle PERLOZA sono state quindi raccolte e lavate con 250 ml di tampone (Tris 50 mM pH 8,0, 200 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 10% glicerolo) seguite da 250 ml di PBS e infine risospese in 10 ml di PBS (10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl pH 7,4). Al fine di analizzare l'espressione della proteina, 15 μl della sospensione di perle PERLOZA sono stati miscelati con 5 μl di tampone di caricamento SDS e incubati a 80°C per 10 minuti prima di essere eseguiti su un gradiente gel SDS PAGE (4-20%) secondo un protocollo standard. Per il rilascio della ligasi dalle perle, sono stati aggiunti 70 μl di proteasi TEV e incubati per una notte a 4°C con agitazione. La ligasi è stata raccolta lavando le perle digerite con 80 ml di PBS. La ligasi è stata quindi concentrata fino a 1,2 ml usando un filtro Amicon da 30 Kd MCO.

I seguenti oligonucleotidi stampo di DNA biotinilati (Tabella 6) e oligonucleotidi di segmento di DNA (Tabella 7) sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida. Si noti che i nucleotidi in grassetto sono quelli

presenti nel sito di ligazione (cioè quei nucleotidi che sono stati uniti nella reazione di ligazione - tabella 7; e quei nucleotidi che sono complementari a quelli uniti tramite la reazione di ligazione - tabella 6).

Tabella 6:

Numero Stampo	Sequenza (nucleotidi complementari a nucleotidi di giunzione sono in grassetto)	SEQ. ID. N.
1	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG ACT GAGGC-3'	30
2	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG AGT GAGGC-3'	31
3	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG ATT GAGGC-3'	32
4	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG AAT GAGGC-3'	33
5	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TCT GAGGC-3'	34
6	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TGT GAGGC-3'	35
7	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TTT GAGGC-3'	36
8	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TAT GAGGC-3'	37
9	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CCT GAGGC-3'	38
10	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CGT GAGGC-3'	39
11	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CTT GAGGC-3'	40
12	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CAT GAGGC-3'	41
13	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG GCT GAGGC-3'	42
14	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG GGT GAGGC-3'	43
15	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG GTT GAGGC-3'	44
16	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG GAT GAGGC-3'	45

Tabella 7

Segmento	Identificatore	Sequenza (nucleotidi di giunzione sono in grassetto)
5'	A	5'-GCCTCAG-3'
5'	B	5'-GCCTCAC-3'
5'	C	5'-GCCTCAA-3'
5'	D	5'-GCCTCAT-3'
3'	E	5'-(p) T CTGCT-3'
3'	F	5'-(p) A CTGCT-3'
3'	G	5'-(p) C CTGCT-3'
3'	H	5'-(p) G CTGCT-3'

(p) = fosfato

N.B. si noti che, a differenza degli esempi precedenti, le reazioni di ligazione in questo esempio comportano l'unione di due segmenti: un segmento 5' e un segmento 3', cioè non c'è un segmento centrale.

5.2 Metodo

Le reazioni sono state allestite come segue:

Tabella 8

Stampo	Segmento 5'	Segmento 3'
1	A	E
2	B	E
3	C	E
4	D	E
5	A	F

6	B	F
7	C	F
8	D	F
9	A	H
10	B	H
11	C	H
12	D	H
13	A	G
14	B	G
15	C	G
16	D	G

Per ogni reazione da 50 μ L:

segmento 3' (1mM madre, 20 μ M finale)	1 μ l
segmento 5' (1mM madre, 20 μ M finale)	1 μ l
Stampo (1mM madre, 20 μ M finale)	1 μ l
Tampone di DNA ligasi NEB (per ligasi di T4)	5 μ l
DNA ligasi mutante CC31 (0,45 mM madre, 90 μ M finale)	10 μ l
H ₂ O	fino a 50 μ l

Ciascuna miscela di reazione è stata incubata a 35°C sia per 30 minuti che per 1 ora. Ciascuna reazione è stata terminata riscaldando a 95°C per 5 minuti. È stata eseguita l'analisi HPLC.

5.3 Risultati e conclusioni

Tutte le reazioni hanno prodotto un picco del prodotto dopo 1 ora di incubazione nell'analisi HPLC. Di

conseguenza, il metodo di ligazione funziona per tutte le combinazioni di nucleotidi alle giunzioni da unire. L'ottimizzazione per migliorare la resa del prodotto è possibile, ma non è stata necessaria poiché i risultati erano conclusivi ed era chiaro che la reazione funzionava per tutte le combinazioni di nucleotidi alle giunzioni da unire.

Esempio 6: effetto di diverse modifiche nel sito di ligazione

6.1 Materiali

La ligasi CC31 del fago di Enterobatteri mutante (SEQ. ID. N.: 23) è stata prodotta come descritto in 5.1 ed è stata acquistata DNA ligasi di virus di Chlorella (SEQ. ID. N.: 29, disponibile in commercio come SplintR ligasi, NEB).

I seguenti oligonucleotidi di stampo biotinilati e oligonucleotidi di segmento (Tabella 9) sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida.

Tabella 9

Nome	Sequenza (modifica di giunzione in grassetto)
Stampo	5'-biotina TTTAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC-3' (SEQ. ID. N.:2)
segmento 5' (WT)	5'-GGCCAAA-3'
segmento 5' (Mo1)	5'-GGCCAA(OMe)A-3'
segmento 5' (Mo2)	5'-GGCCAA(F)A-3'
segmento centrale (WT)	5'-(p)CCTCGG-3'
segmento centrale (Mo4A)	5'-(p)(OMe)CCTCGG-3'
segmento centrale (Mo5A)	5'-(p)(F)CCTCGG-3'
segmento centrale (Mo7)	5'(p)(Me)CCTCGG- 3'
segmento 3' (WT)	5'-(p)CTTACCT-3'

segmento 3' (Mo8)	5'-(p)(Me)CTTACCT3'
-------------------	---------------------

OMe indica sostituzione con 2' metossile sull'anello di ribosio

F indica sostituzione con 2' fluoro sull'anello di ribosio

Tutti i restanti residui di zucchero sono residui di desossiribosio

Me indica 5-metil citosine

6.2 Metodo

Le reazioni sono state allestite come segue:

Tabella 10

Reazione	segmento 5'	Segmento centrale	segmento 3'
1	WT	WT	WT
2	WT	Mo4A	WT
3	WT	Mo5A	WT
4	WT	Mo7	WT
5	Mo1	WT	WT
6	Mo1	Mo4A	WT
7	Mo1	Mo5A	WT
8	Mo1	Mo7	WT
9	Mo2	WT	WT
10	Mo2	Mo4A	WT
11	Mo2	Mo5A	WT
12	Mo2	Mo7	WT
13	WT	WT	Mo8

14	WT	Mo4A	Mo8
15	WT	Mo5A	Mo8
16	WT	Mo7	Mo8
17	Mo1	WT	Mo8
18	Mo1	Mo4A	Mo8
19	Mo1	Mo5A	Mo8
20	Mo1	Mo7	Mo8
21	Mo2	WT	Mo8
22	Mo2	Mo4A	Mo8
23	Mo2	Mo5A	Mo8
24	Mo2	Mo7	Mo8

Per ogni reazione da 50 μ L:

segmento 3' (1mM, madre, 20 μ M finale)	1 μ l
segmento centrale (1mM, madre, 20 μ M finale)	1 μ l
segmento 5' (1 mM, madre, 20 μ M finale)	1 μ l
Stampo (1mM, madre, 20 μ M finale)	1 μ l
H ₂ O	fino a 50 μ l

Per ligasi CC31 di fago di Enterobacteria mutante (SEQ. ID. N.:23)

Tampone di DNA ligasi (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT)	5 μ l
DNA ligasi CC31 mutante (0,45 mM)	10 μ l
MnCl ₂ (50 mM)	5 μ l

ATP (10 mM) 10 µl

Mentre per DNA ligasi di virus di Chlorella (SEQ. ID. N.:29, disponibile in commercio come SplintR ligasi, NEB)

Tampone di DNA ligasi NEB (per Chlorella) 5 µl

DNA ligasi virus di Chlorella 2 µl

Ciascuna miscela di reazione è stata incubata a 20°C per 1 ora. Ciascuna reazione è stata terminata riscaldando a 95°C per 10 minuti. L'analisi HPLC è stata eseguita usando il metodo dell'esempio 1.

6.3 Risultati e conclusioni

Tutte le reazioni hanno prodotto un picco del prodotto nell'analisi HPLC. Di conseguenza, il metodo di ligazione funziona per tutte le combinazioni di modifiche provate alle giunzioni da unire. L'ottimizzazione per migliorare la resa del prodotto è possibile, ma non era necessaria poiché i risultati erano conclusivi ed era chiaro che la reazione funzionava per tutte le combinazioni di modifiche provate alle giunzioni da unire.

Esempio 7: capacità di usare diversi numeri di segmenti per costruire oligonucleotidi più grandi

7.1 Materiali

La ligasi CC31 del fago degli Enterobatteri mutanti (SEQ. ID. N.: 23) è stata prodotta come descritto in 5.1.

I seguenti oligonucleotidi di DNA stampo biotinilato e oligonucleotidi di segmento di DNA (Tabella 11) sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida.

Tabella 11

Nome	Sequenza
Stampo	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGAAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC-3' (SEQ. ID. N.:47)
segmento 5' (1)	5'-GGCCAAA-3'
segmento centrale (2)	5'-(p)CCTCGG-3'

segmento centrale/ segmento 3' (5)	5'-(p)TCTGCT-3'
segmento centrale (3)	5'-(p)CTTACCT-3'
segmento 3' (4)	5'-(p)TCGCACC-3'

(p) = fosfato.

7.2 Metodo

Le reazioni sono state allestite come segue:

Tabella 12

segmento 5'	Segmento(i) centrale	segmento 3'	numero totale di segmenti
1	2 e 3	5	4
1	2, 3 e 5	4	5

Le reazioni sono state eseguite in soluzione salina tamponata con fosfato, pH = 7,04 in un volume totale di 100 µl e allestite come segue:-

Stampo (20 µM finale)

Ciascun segmento (20 µM finale)

MgCl₂ (10 mM finale)

ATP (100 µM finale)

DNA ligasi CC31 mutante (25 µM finale)

Ciascuna reazione è stata incubata a 28°C per una notte prima di essere terminata riscaldando a 94°C per 1 minuto. I prodotti sono stati analizzati mediante HPLC - spettrometria di massa.

7.3 Risultati e conclusioni

La reazione che usa 4 segmenti ha formato un prodotto completamente legato di 27 coppie di basi di lunghezza.

La reazione che usa 5 segmenti ha formato un prodotto di 33 coppie di basi di lunghezza. In entrambi i casi la

massa del prodotto osservata era concorde con quella prevista per la sequenza desiderata. In conclusione, è chiaramente possibile assemblare più segmenti per generare oligonucleotidi della lunghezza e della sequenza desiderate come definite dalla sequenza di stampi complementari appropriata.

Esempio 8: Assemblaggio e ligazione di segmenti 5-10-5 per formare un gapmero, in cui i segmenti 5' e 3' comprendono (i) modifiche dello zucchero ribosio 2'-OMe, (ii) legami di fosforotioato o (iii) modificazioni dello zucchero ribosio 2'-OMe e legami di fosforotioato; e in cui il segmento centrale è DNA non modificato

8.1 Materiali

La ligasi CC31 di fago mutante di Enterobacteria (SEQ. ID. N.: 23) è stata prodotta come descritto in 5.1, il seguente oligonucleotide di DNA di stampo biotinilato e gli oligonucleotidi di segmento (Tabella 13) sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida.

Tabella 13

Nome	Sequenza
Stampo	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ. ID. N.:30)
segmento 3' (30Me)	5'-(p)(OMe)G(OMe)C(OMe)C(OMe)T(OMe)C-3'
segmento 3' (3PS+OMe)	5'-(p)(OMe)G*(OMe)C*(OMe)C*(OMe)T*(OMe)C-3'
segmento 3' (3PS)	5'-(p)G*C*C*T*C-3'
segmento centrale (D)	5'-(p)AGTCTGCTTC-3'
segmento 5' (50Me)	5'-(OMe)G(OMe)C(OMe)A(OMe)C(OMe)C-3'
segmento 5' (5PS+OMe)	5'-(OMe)G*(OMe)C*(OMe)A*(OMe)C*(OMe)C-3'
segmento 5' (5PS)	5'-G*C*A*C*C-3'

OMe indica sostituzione con 2' metossile sull'anello di ribosio

Tutti i restanti residui di zucchero sono residui di desossiribosio

*fosforotioato

8.2 Metodo

Le reazioni sono state allestite come segue:

Tabella 14

Reazione	segmento 3'	Segmento(i) centrale	segmento 5'
1	3PS	D	5PS
2	3OMe	D	5OMe
3	3PS+OMe	D	5PS+OMe

Ognuna delle reazioni 1, 2 e 3 è stata allestita in volume finale di 100 µl in soluzione salina tamponata con fosfato con i seguenti componenti:-

segmento 3'	20 µM finale
Segmento centrale	20 µM finale
segmento 5'	20 µM finale
Stampo	20 µM finale
MgCl ₂	10 mM finale
ATP	50 µM finale
Enzima	25 µM finale

Ogni miscela di reazione è stata incubata a 20°C durante la notte. Ciascuna reazione è stata terminata riscaldando a 95°C per 10 minuti. È stata eseguita l'analisi HPLC spettrometria di massa.

8.3 Risultati e conclusioni

In tutte e tre le reazioni è stato prodotto oligonucleotide di prodotto corrispondente alla ligazione riuscita di tutti e tre i frammenti.

Di conseguenza, la ligasi del fago CC31 di *Enterobacteria* mutante (SEQ. ID. N.: 23) è in grado di legare 3

segmenti insieme per formare un 'gapmero' dove le 'ali' 5' e 3' hanno una ossatura di fosforotioato, mentre la regione centrale ha una ossatura di fosfodiesteri e tutti i residui di zucchero nel gapmero sono residui di desossiribosio. Ligasi di fago di Enterobacteria CC31 (SEQ. ID. N.: 23) è anche in grado di legare 3 segmenti insieme per formare un 'gapmero' dove le 'ali' 5' e 3' hanno residui di 2'-metossiribosio (2'-OMe), mentre la regione centrale ha residui di desossiribosio e tutti i legami sono legami di fosfodiesteri. Infine, ligasi di fago di Enterobacteria CC31 (SEQ. ID. N.: 23) è in grado di legare 3 segmenti insieme per formare un 'gapmero' dove le 'ali' 5' e 3' hanno le modifiche combinate (una ossatura di fosforotioato e residui di 2'-metossiribosio), mentre la regione centrale ha residui di desossiribosio e legami di fosfodiesteri.

Esempio 9: Assemblaggio e ligazione di segmenti che comprendono acidi nucleici bloccati (LNA)

9.1 Materiali

La ligasi CC31 del fago di Enterobatteri mutante (SEQ. ID. N.: 23) è stata prodotta come descritto in 5.1. Una ligasi dipendente da NAD di Staphylococcus aureus mutante (NAD-14) è stata prodotta come descritto in 13.1

I seguenti oligonucleotidi di DNA stampo biotinitato e oligonucleotidi di segmento (Tabella 15) sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida.

Tabella 15

Nome	Sequenza
Stampo	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ. ID. N.:30)
Segmento 5'	5'- GCCTCAG-3'
Segmento LNA 5' (oligo 1)	5'-GCCTCA(LNA)G-3'
Segmento centrale	5'-(p)TCTGCT-3'
segmento centrale LNA (oligo 2)	5'-(p) (LNA)TCTGCT-3'

(p) = fosfato

LNA = acido nucleico bloccato

9.2 Metodo

Le reazioni sono state allestite come segue:

Volume di reazione 100 μ l

Volume di reazione	100 μ l
Stampo	20 μ M finale
Enzima	25 μ M finale
Tutti i segmenti oligonucleotidici	20 μ M finale

Le reazioni sono state allestite variando enzima (ligasi di fago di *Enterobacteria* CC31 mutante (SEQ. ID. N.:23) o NAD-14), catione divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) e combinazioni di segmenti oligonucleotidici come esposto in Tabella 16.

Tabella 16

Enzima	SEQ. ID. N.:23	SEQ. ID. N.:23	NAD-14	NAD-14
Catione divalente	10 mM $MgCl_2$	10 mM $MnCl_2$	10 mM $MgCl_2$	10 mM $MnCl_2$
Cofattore	100 μ M ATP	100 μ M ATP	100 μ M NAD	100 μ M NAD
Tampone	PBS, pH = 7,04	PBS, pH = 7,04	50 mM KH_2PO_4 , pH 7,5	50 mM KH_2PO_4 , pH 7,5
Segmento 5' + Segmento centrale	Prodotto	Prodotto	Prodotto	Prodotto
Oligo 1 + Segmento centrale	Prodotto	Prodotto	Prodotto	Prodotto
segmento 5' + Oligo 2	Prodotto	Prodotto	Prodotto	Prodotto
Oligo 1 + oligo 2	Nessun prodotto	Nessun prodotto	Nessun prodotto	Nessun prodotto

Ciascuna miscela di reazione è stata incubata a 28°C durante la notte. Ciascuna reazione è stata terminata

riscaldando a 94°C per 1 minuto. È stata effettuata analisi HPLC spettrometria di massa.

9.3 Risultati e conclusioni

L'oligonucleotide prodotto è stato prodotto nelle reazioni di reazione di controllo (solo oligonucleotidi non modificati) e dove un singolo acido nucleico bloccato è stato incluso in un segmento alla giunzione di ligazione indipendentemente dal fatto che fosse sul lato 3' o 5' della giunzione. Quando gli acidi nucleici bloccati sono stati inclusi su entrambi i lati (oligo 1 + oligo 2) non è stato rilevato alcun prodotto. I dati erano simili per entrambi gli enzimi e indipendentemente dall'uso di Mg²⁺ o Mn²⁺.

Fu possibile eseguire mutazioni enzimatiche e/o *screening* di selezione per identificare un enzima in grado di ligare segmenti con un acido nucleico bloccato sia sul lato 3' che 5' della giunzione.

Esempio 10: Assemblaggio e ligazione di tre segmenti (7-6-7) per formare un gapmero in cui i segmenti 5' e 3' comprendono modifiche dello zucchero ribosio 2'MOE e tutti i legami sono legami di fosforotioato, usando una variante di ligasi di fago di Enterobacteria CC31 in presenza di Mg²⁺ o Mn²⁺

10.1 Formazione di legami di fosforotioato

Al fine di determinare se una ligasi mutante di fago CC31 di Enterobatteri (SEQ. ID. N.: 23) fosse in grado di ligare segmenti di oligonucleotidi modificati con una ossatura di fosforotioato, modifiche dello zucchero di ribosio 2'MOE e basi pirimidiniche 5-metilate, le reazioni sono state eseguite usando i segmenti oligonucleotidici mostrati nella tabella 15. Le reazioni sono state eseguite in presenza di ioni Mg²⁺ e Mn²⁺.

10.2 Materiali

Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati chimicamente usando metodi standard come mostrato di seguito:

Tabella 17

Nome	Sequenza
segmento 5' 2'-MOE PS	5'-mG*mG*mC*mC*mA*dA*dA-3'
segmento centrale PS	5'-(p)*dC*dC*dT*dC*dG*dG-3'
segmento 3' 2'-MOE PS	5'-(p)*dC*dT*mU*mA*mC*mC*mU-3'

Stampo biotinilato	5'-biotin dT dT dT dA dG dG dT dA dA dG dC dC dG dA dG dG dT dT dT dG dG dC dC- 3' (SEQ ID NO:2)
--------------------	--

(p)* = 5-fosforotioato, * = legame di fosforotioato, mX = basi MOE, dX = basi di DNA

Tutti i segmenti e prodotto hanno 5-metil pirimidine (con l'eccezione dello stampo)

mT e m (Me)U sono considerati equivalenti

N.B. La molecola 2'MOE PS bersaglio prodotta per ligazione dei segmenti in tabella 17, quando ibridati allo stampo biotinilato mostrato in tabella 17, è:

5'-mG*mG*mC*mC*mA*dA*dA*dC*dC*dT*dC*dG*dG*dC*dT*mU*mA*mC*mC*mU-3' (SEQ. ID. N.:1)

Ligasi CC31 di fago di Enterobacteria mutante purificata (SEQ. ID. N.: 23) è stata preparata come descritto nell'esempio 5.1. È stata eseguita l'analisi HPLC.

10.3 Metodo di assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi con la variante di ligasi di fago di Enterobacteria CC31 (SEQ. ID. N.: 23)

Le reazioni sono state preparate come segue:

reazione di MgCl₂

10 x Tampone di DNA ligasi di T4 (NEB)* 5 ul

stampo 20 µM concentrazione finale

segmento 5' 2' MOE PS 20 µM concentrazione finale

segmento centrale PS 20 µM concentrazione finale

segmento 3' 2' MOE PS 20 µM concentrazione finale

Ligasi (24,3 µM) 10 µl

Acqua made fino a 50 µL

* tampone 1 x contiene 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5

Reazione MnCl₂

10 x tampone di ligasi*	5 µl
ATP (10 mM)	5 µl
MnCl ₂ (50 mM)	5 µl
Stampo	20 µM concentrazione finale
segmento 5' 2' MOE PS	20 µM concentrazione finale
segmento centrale PS	20 µM concentrazione finale
segmento 3' 2' MOE PS	20 µM concentrazione finale
Ligasi (24,3 µM)	10 µl
Acqua	portata fino a 50 mL

* tampone 1 x contiene 50 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, pH 7,5

Le reazioni finali contenevano 20 µM di ciascun segmento e stampo, 5 mM MgCl₂ o 5 mM MnCl₂, ATP 1 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 10 mM, pH 7,5 e ligasi 4,9 µM. Sono state preparate reazioni aggiuntive senza enzima e servivano come controllo negativo. Le reazioni sono state incubate per 16 ore a 25°C e poi spente riscaldando a 95°C per 5 minuti. Le proteine precipitate sono state eliminate mediante centrifugazione e i campioni sono stati analizzati mediante HPLC.

10.4 Risultati e conclusione

Il prodotto, lo stampo e gli oligonucleotidi di segmento sono stati chiaramente risolti nel cromatogramma di controllo e non è stata osservata alcuna ligazione. Reazioni di ligasi eseguite in presenza di 5 mM MgCl₂ portavano alla formazione di un prodotto intermedio formato dalla ligazione di segmento 5' e dei segmenti centrali, ma non è stato rilevato alcun prodotto a tutta lunghezza. Reazioni di ligasi eseguite in presenza di MnCl₂ ha prodotto sia prodotti a tutta lunghezza che intermedi (segmento 5' più segmento centrale intermedio). Entrambe le reazioni della ligasi hanno mostrato che rimanevano segmenti oligonucleotidici non ligati. Tuttavia, l'ottimizzazione del protocollo è possibile per massimizzare la resa del prodotto.

Esempio 11: Assemblaggio e ligazione di tre segmenti (7-6-7) per formare un gapmero in cui i segmenti 5'

e 3'c omprendono modifiche dello zucchero di ribosio 2'MOE e tutti i legami sono legami di fosforotioato, usando DNA ligasi di virus di Chlorella di tipo selvatico in presenza di Mg²⁺ nativo

11.1 Materiali

Al fine di determinare se la DNA ligasi del virus di Chlorella (SEQ. ID. N.: 29, disponibile in commercio come SplintR ligasi, NEB) fosse in grado di legare segmenti di oligonucleotidi modificati con una ossatura di fosforotioato, sono state apportate modifiche allo zucchero di ribosio 2'MOE e basi pirimidiniche 5-metilate le reazioni sono state eseguite usando i segmenti oligonucleotidici mostrati nell'esempio 10.2 tabella 17. Le reazioni sono state eseguite a 25°C, 30°C e 37°C per studiare l'effetto della temperatura sull'attività enzimatica.

11.2 Metodo di assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi con DNA ligasi di virus di Chlorella commerciale (SEQ. ID. N.: 29)

Ciascun segmento e stampo di oligonucleotide è stato sciolto in acqua priva di nucleasi come descritto di seguito:

Stampo biotinilato	249,6 ng/μl
segmento 5' 2' MOE PS	182,0 ng/μl
Segmento centrale PS	534,0 ng/μl
segmento 3' 2' MOE PS	531,0 ng/μl

Le reazioni sono state preparate come segue:

10 x buffer (NEB)*	6 μl
stampo	3,8 μl
segmento 5' 2' MOE PS	18,1 μl
segmento centrale PS	4,8 μl
segmento 3' 2' MOE PS	6,3 μl
Acqua	15 μl

SplintR ligasi (25 U/ μ l)

6 μ l

* tampone 1 x contiene 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5

Le reazioni finali contenevano 20 μ M di ogni segmento e stampo, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, ATP 1 mM, DTT 10 mM, pH 7,5 e 2,5 U/ μ l di ligasi. Le reazioni sono state incubate a 25°C, 30°C e 37°C. Sono state preparate reazioni aggiuntive senza enzima e servivano come controllo negativo. Dopo 16 ore di incubazione, le reazioni sono state spente riscaldando a 95°C per 10 minuti. Le proteine precipitate sono state eliminate mediante centrifugazione e i campioni sono stati analizzati mediante HPLC.

11.3 Risultati e conclusione

Il prodotto, lo stampo e gli oligonucleotidi di segmento sono stati risolti chiaramente nel cromatogramma di controllo e non è stata osservata alcuna ligazione. L'analisi HPLC delle reazioni della ligasi ha mostrato che i segmenti oligonucleotidici non ligati rimanevano, ma la DNA ligasi del virus di Chlorella era in grado di ligare con successo i segmenti. L'attività della ligasi aumenta con l'aumentare della temperatura. A 25°C la DNA ligasi del virus di Chlorella era in grado di ligare con successo il segmento 5' e il segmento centrale ma non è stato osservato alcun prodotto a tutta lunghezza. A 30°C e 37°C, è stato rilevato il prodotto a tutta lunghezza oltre all'intermedio formato dal segmento 5' e dal segmento centrale.

Esempio 12: Screening di una serie di 15 ATP e NAD ligasi per l'attività verso la ligazione di tre segmenti (7-6-7) per formare un gapmero in cui i segmenti 5' e 3' comprendono modifiche di zucchero ribosio 2'MOE e tutti i legami sono legami di fosforotioato

12.1 Materiali

Le ligasi dipendenti da ATP e NAD di tipo selvatico descritte nelle tabelle 18 e 19 sono state fuse ciascuna all'estremità N con un CBD. I geni sono stati sintetizzati, clonati in pET28a ed espressi in E.coli BL21(DE3) usando metodi standard di clonazione, espressione ed estrazione.

Tabella 18

Ligasi dipendenti da ATP

Nome	Origine	SEQ ID
------	---------	--------

M1I5D1_Pbcv	Paramecium bursaria Virus di Chlorella NE-JV-4	SEQ. ID. N.:48
M1I998_Pbcv	Paramecium bursaria Virus di Chlorella NIs1	SEQ. ID. N.:49
M1HX09_Pbcv	Paramecium bursaria Virus di Chlorella NE-JV-1	SEQ. ID. N.:50
M1HUL0_Atev	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella Canal-1	SEQ. ID. N.:51
M1HRK1_Atev	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella Br0604L	SEQ. ID. N.:52
M1I273_Atev	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella NE-JV-2	SEQ. ID. N.:53
M1I600_Atev	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella TN603,4,2	SEQ. ID. N.:54
M1H4A4_Atev	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella GM0701,1	SEQ. ID. N.:55
F5B464_Sphage	fago di Synechococcus S-CRM01	SEQ. ID. N.:56
A0A0F9M1S3	metagenoma di sedimento marino - proteina non caratterizzata	SEQ. ID. N.:57

Tabella 19

Ligasi dipendenti da NAD

Nome	Origine	SEQ ID
MtNAD	Mycobacterium tuberculosis (ceppo ATCC 25618/H37Rv)	SEQ. ID. N.:58
EfNAD	Enterococcus faecalis (ceppo ATCC 700802/V583)	SEQ. ID. N.:59

HiNAD	Haemophilus influenzae (ceppo ATCC 51907/DSM 11121/ KW20/Rd)	SEQ. ID. N.:60
SaNAD	Staphylococcus aureus	SEQ. ID. N.:61
SpNAD	Streptococcus pneumoniae (ceppo P1031)	SEQ. ID. N.:62

Le fusioni CBD-Ligasi sono state legate alle perle PERLOZA come descritto in 1.4 con le seguenti modifiche. Proteine di fusione CBD-ligasi sono state coltivate da una singola colonia di cellule BL21(DE3) (NEB) e coltivate in una coltura di espressione da 50 mL. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione, risospese in 5-10 mL di Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) e lisate mediante sonicazione. Il lisato è stato eliminato mediante centrifugazione e 1 mL di perle PERLOZA 100 (PERLOZA) (impasto semiliquido al 50%, pre-equilibrato con Tris-HCl 50 mM pH 7,5) è stato aggiunto al supernatante che è stato agitato a 20°C per 1 ora. Le perle di cellulosa PERLOZA sono state poi raccolte e lavate con 30 ml di tampone (50 mM Tris pH 8,0, 200 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 10% glicerolo) seguite da 10 ml di Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) e infine sono state risospese in 1 mL di Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Al fine di analizzare l'espressione della proteina, 20 µl della sospensione di perle PERLOZA sono stati miscelati con 20 µl di tampone di caricamento SDS e incubati a 95°C per 5 minuti prima di essere fatti correre su un gradiente gel SDS PAGE (4-20%) secondo un protocollo standard.

12.2 Metodo di assemblaggio e ligazione di oligonucleotidi modificati 2'MOE e fosforotioato

Sono stati usati segmenti di oligonucleotidi modificati con una ossatura di fosforotioato, modifiche dello zucchero ribosio 2'MOE e basi pirimidiniche 5-metilate mostrati nella tabella 17 dell'esempio 10.2. Ciascun segmento e stampo di oligonucleotidi è stato sciolto in acqua priva di nucleasi come descritto di seguito:

Stampo biotinilato	1500 ng/µl
segmento 5' 2' MOE PS	1008 ng/µl
Segmento centrale PS	725 ng/µl
segmento 3' 2' MOE PS	1112 ng/µl

La miscela di saggio ATP è stata preparata come segue:

stampo	85,6 μ l
segmento 5' 2' MOE PS	43,5 μ l
segmento centrale PS	46,8 μ l
segmento 3' 2' MOE PS	40,1 μ l
DTT 1M	8 μ l
MgCL ₂ 1M	4 μ l
ATP (50 mM)	16 μ l
Tris 0,5 M	80 μ l
acqua	476 μ l

La miscela di saggio NAD è stata preparata come segue:

stampo	85,6 μ l
segmento 5' 2' MOE PS	43,5 μ l
segmento centrale PS	46,8 μ l
segmento 3' 2' MOE PS	40,1 μ l
DTT 1M	8 μ l
MgCl ₂ 1M	4 μ l
NAD (50 mM)	1,6 μ l
Tris 0,5 M	80 μ l
acqua	490,4 μ l

Ciascuna proteina immobilizzata (40 μ l, 50% di impasto di perle PERLOZA) è stata pipettata in una provetta per PCR. Le perle sono state ridotte in pellet mediante centrifugazione e il supernatante è stato rimosso mediante

pipettaggio. La miscela di analisi (40 μ l) è stata aggiunta a ciascuna reazione (le reazioni finali contenevano 20 μ M di ciascun segmento e stampo, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, ATP 1 mM o NAD 100 μ M, DTT 10 mM, pH 7,5 e 40 μ l di ligasi su perle PERLOZA). Una reazione che non contiene proteine è servita come controllo negativo. Le reazioni sono state incubate per 18 ore a 30°C e poi spente riscaldando a 95°C per 10 minuti. Le proteine precipitate sono state eliminate mediante centrifugazione e i campioni sono stati analizzati mediante HPLC.

12.3 Risultati e conclusione

Il prodotto, lo stampo e gli oligonucleotidi di segmento sono stati chiaramente risolti nel cromatogramma di controllo e non è stata osservata alcuna ligazione. L'analisi HPLC delle reazioni della ligasi ha mostrato che tutte le proteine hanno catalizzato il successo della ligazione di segmento 5' e di segmento centrale per formare un prodotto intermedio, ma solo alcune ligasi hanno catalizzato la ligazione di tutti e tre i segmenti per ottenere il prodotto a tutta lunghezza come descritto nella tabella 20. La ligasi dipendente da NAD da *Staphylococcus aureus* (SaNAD, SEQ. ID. N.: 61) ha fornito il prodotto più completo. L'ottimizzazione per migliorare la resa del prodotto è possibile e nell'ambito delle competenze della persona esperta.

Tabella 20

Nome del gene	SEQ. ID. N.:	Conversione (%)*	
		Intermedio	prodotto
M1I5D1_Pbcv	48	5,0	0,8
M1I998_Pbcv	49	5,1	0,0
M1HX09_Pbcv	50	14,4	6,6
M1HUL0_Atcv	51	9,5	2,0
M1HRK1_Atcv	52	2,8	9,4
M1I273_Atcv	53	12,0	6,4

M1I600_Atcv	54	8,8	5,1
M1H4A4_Atcv	55	2,1	0,0
F5B464_Sphage	56	2,1	0,0
A0A0F9M1S3_ms_metagenoma	57	1,4	0,0
MtNAD	58	7,1	0,0
EfNAD	59	19,1	0,0
HiNAD	60	0,3	0,0
SaNAD	61	10,5	11,8
SpNAD	62	19,0	0,0

* La conversione è stata calcolata dall'area di picco HPLC rispetto allo stampo che non viene consumato nella reazione e serve da standard interno. Conversione = $\text{area prodotto}/(\text{area di stampo} + \text{prodotto}) \cdot 100$

Esempio 13: reazione di ligazione semicontinua

13.1 Materiali

Una ligasi di *Staphylococcus aureus* mutante (NAD-14) fusa al terminale N a un CBD è stata prodotta usando metodi standard di clonazione, espressione ed estrazione. La ligasi mutante CBD-NAD-14 è stata poi legata a perle PERLOZA: 50 ml di lisato proteico sono stati aggiunti a 7,5 ml di perle PERLOZA, incubate a temperatura ambiente per 1 ora e poi le perle sono state raccolte in una colonna di vetro (BioRad Econo-Column 10 cm lunghezza, diametro 2,5 cm # 7372512). Le perle sono state lavate con 200 ml di tampone Y (50 mM Tris8, 500 mM NaCl, 0,1% di Tween 20, 10% di glicerolo), poi con 200 ml di tampone Z (50 mM Tris8, 200 mM NaCl, 0,1% di Tween 20, 10% di glicerolo) e 200 ml PBS. La concentrazione stimata della ligasi NAD-14 mutante sulle perle era di 69 μM di ligasi per ml di perle.

Il seguente stampo di oligonucleotide di DNA e oligonucleotidi di segmento (Tabella 21) sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida.

Tabella 21

Segmento	Sequenza	PM	% purezza HPLC
Stampo 3	5' TTTGGTGC GAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ. ID. N.:30)		
segmento centrale	5'-(p)dTdCdTdGdCdT-3'	1865,4	97,5
MOE segmento 3'	5'-(p)dTdCmGmCmAmCmC-3'	2546,7	98,0
MOE segmento 5'	5'-mGmCmCmUmCdAdG-3'	2492,7	98,3

(p) = fosfato, mX = basi MOE, dX = basi DNA

tutte 5-metil pirimidine

tutti i legami sono legami di fosfodiester

È stato prodotto un "nucleo a tre stampe" (circa 24 kDa) comprendente un materiale di supporto denominato "nucleo" e tre sequenze di stampo (Figura 11). Ogni copia dello stampo è stata legata in modo covalente, nel proprio punto di attacco individuale, al "nucleo". La molecola di "nucleo tri-stampo" ha un peso molecolare superiore rispetto all'oligonucleotide (prodotto) bersaglio (complementare al 100% alla sequenza di stampo), consentendo in tal modo di essere trattenuta quando le impurità e i prodotti vengono separati dalla miscela di reazione. Va notato che in questo caso particolare la sequenza di stampo era SEQ. ID. N.: 30 e tre copie erano attaccate al nucleo. Nell'esempio seguente, viene prodotto anche un nucleo tri-stampo, ma con una sequenza di stampo differente. Di conseguenza, poiché la sequenza dello stampo varia tra gli esempi, così fa anche il nucleo a tre stampe.

È stata preparata la seguente miscela di reazione (volume totale 5 ml):

250 µl	1 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,5	(50 mM finale)
108 µl	0,07011 M segmento centrale	(1,5 mM finale)
137 µl	0,05481 M segmento 3'	(1,5 mM finale)

168 µl	0,04461 M segmento 5'	(1,5 mM finale)
750 µl	0,00387M nucleo (Stampo)	(0,55 mM finale)
350 µl	50mM NAD ⁺	(3,5 mM finale)
1000 µl	50mM MgCl ₂	(10 mM finale)
2237 µl	H ₂ O senza nucleasi	

13.2 Metodi

È stato allestito un sistema semi-continuo come mostrato nella Figura 12.

4 ml di perle PERLOZA e ligasi mutante immobilizzata NAD-14 sono stati impaccati in una colonna Pharmacia XK16 (B). Un bagno d'acqua e una pompa peristaltica (C) sono stati usati per mantenere la temperatura della colonna, usando il compartimento d'acqua della colonna, a 30°C. Le perle sono state equilibrate facendo scorrere 120 ml (30x volumi di colonna) di tampone contenente 50 mM di KH₂PO₄ a pH 7,5 per 120 minuti a 1 ml/min. Una pompa AKTA Explorer A1 (A) è stata usata per creare il flusso attraverso la colonna Pharmacia XK16.

Dopo l'equilibratura della colonna, la miscela di reazione da 5 ml (ben miscelata mediante agitazione su vortex) è stata caricata sulla colonna, raccolta nel tubo del serbatoio (D) e fatta ricircolare attraverso la colonna usando la pompa AKTA Explorer A1. La miscela di reazione è stata fatta ricircolare attraverso il sistema ad una portata di 1 ml/min in modalità di circolazione continua per 16 ore. I campioni sono stati raccolti dopo 30 minuti, 60 minuti, 90 minuti, 4 ore, 5 ore, 6 ore, 7 ore, 14 ore e 16 ore per l'analisi HPLC.

13.3 Risultati e conclusioni

Tabella 22

Campione	segmento 5' (%)	Segmento centrale (%)	Segmento 3' (%)	5' + intermedio centrale (%)	Prodotto (%)
30 min	7,80	11,00	24,00	39,40	4,40
60 min	3,30	4,50	18,80	41,50	18,90

90 min	2,10	2,80	15,10	33,80	34,40
4 ore	1,80	2,40	9,60	19,20	56,80
5 ore	1,72	2,40	8,30	15,70	61,50
6 ore	1,69	2,50	8,60	15,90	69,40
7 ore	1,70	2,40	8,30	14,80	70,90
14 ore	2,00	2,70	1,60	5,40	88,10
16 ore	0,80	1,90	1,70	3,30	89,50

La percentuale di ciascun segmento, intermedio e prodotto è espressa come area del picco frazionario rispetto all'area del picco del nucleo tri-stampo.

In conclusione, la reazione a flusso semicontinuo ha funzionato e dopo 16 ore la reazione era quasi completa.

Esempio 14: Separazione di oligonucleotidi di diverse dimensioni mediante filtrazione: a) separazione di un oligonucleotide 20-mero (SEQ. ID. N.: 1) e un nucleo comprendente tre oligonucleotidi 20-meri non complementari (SEQ. ID. N.: 30); (b) separazione di un oligonucleotide 20-mero (SEQ. ID. N.: 1) dagli oligonucleotidi di segmento 6-mero e 8-mero (vedere Tabella 1) e un nucleo comprendente tre oligonucleotidi 20-meri complementari (SEQ. ID. N.: 2)

14.1 Materiali

Tutti gli oligonucleotidi usati sono stati sintetizzati mediante metodi standard in fase solida.

È stato usato un nucleo a tre stampi, come descritto in 13.1 (Figura 11).

È stata usata una varietà di filtri di diversi valori di soglia di peso molecolare e di diversi produttori, come mostrato nelle tabelle 23 e 24.

14.2 Metodi

14.2.1 Configurazione e protocollo di filtrazione a fondo cieco per lo screening di membrane polimeriche: (protocollo 1)

È stato allestito un impianto di filtrazione a fondo cieco come mostrato nella Figura 13, comprendente una cella

di filtrazione a fondo cieco MET posta in un bagno d'acqua poggiato su un agitatore magnetico e una piastra riscaldante. La pressione all'interno della cella era fornita da un flusso di azoto.

Il "coupon" di membrana (14 cm²) da provare è stato prima tagliato alla dimensione appropriata e posto nella cella. La membrana è stata dapprima condizionata con acqua per HPLC (200 ml) e poi con tampone PBS (200 ml). La cella è stata poi depressurizzata, la soluzione PBS rimanente è stata rimossa e sostituita con una soluzione contenente oligonucleotidi (40 ml di oligonucleotidi in PBS alla concentrazione di 1 g/L). La cella è stata posta su una piastra di agitazione calda e la soluzione è stata riscaldata alla temperatura desiderata mentre veniva agitata mediante agitazione magnetica. La pressione è stata applicata alla cella (mirando a circa 3,0 bar; la pressione effettiva è stata registrata in ogni caso). L'agitazione della soluzione è stata interrotta o proseguita e la soluzione permeata è stata raccolta (circa 20 ml) e analizzata mediante HPLC. Il flusso è stato registrato. Il sistema è stato poi depressurizzato per consentire il campionamento e l'analisi mediante HPLC della soluzione di retentato. È stato poi aggiunto altro tampone PBS (20 ml) alla cella di filtrazione e la procedura precedente è stata ripetuta 3 volte. La membrana è stata infine lavata con tampone PBS.

Tutti i campioni sono stati analizzati mediante HPLC senza alcuna diluizione.

14.2.2 Configurazione e protocollo di filtrazione tangenziale per lo screening di membrane polimeriche: (protocollo 2)

Un impianto di filtrazione a flusso incrociato è stato allestito come mostrato nella Figura 14. Il recipiente di alimentazione (1) costituito da una beuta conica conteneva la soluzione di oligonucleotidi da purificare. La soluzione è stata pompata in una cella di filtrazione a flusso incrociato (4) usando una pompa per HPLC (2) mentre la temperatura all'interno della cella è stata mantenuta usando una piastra calda (3). La soluzione all'interno della cella è stata fatta ricircolare usando una pompa ad ingranaggi (6). Un manometro (5) permetteva di leggere la pressione durante l'esperimento. Campioni della soluzione di retentato sono stati prelevati dalla valvola di campionamento (7) mentre la soluzione di permeato è stata campionata dal recipiente di raccolta del permeato (8).

Il "coupon" di membrana da provare è stato dapprima tagliato alla dimensione appropriata e posto nella cella. Il

sistema è stato lavato con una soluzione PBS (100 ml). La temperatura della soluzione è stata regolata al punto di regolazione desiderato. Nel sistema è stata alimentata una soluzione contenente prodotti oligonucleotidici in PBS (7,5 ml a 1 g/L). La soluzione PBS è stata poi pompata nel sistema usando la pompa HPLC a una velocità di flusso corrispondente alla velocità di flusso della soluzione permeata (tipicamente 3 ml/min). La pressione è stata registrata usando il manometro. La soluzione retentato è stata campionata per l'analisi HPLC ogni 5 volumi di diafiltrazione. La soluzione permeata è stata campionata per l'analisi HPLC ad ogni volume di diafiltrazione. L'esperimento è stato interrotto dopo 20 volumi di diafiltrazione.

Nel caso dell'esperimento che usa la membrana Snyder avente un valore soglia di peso molecolare di 5 kDa (numero di lotto 120915R2) e SEQ. ID. N.: 46 e SEQ. ID. N.: 30, la metodologia di cui sopra è stata modificata come segue. Il "coupon" di membrana da provare è stato dapprima tagliato alla dimensione appropriata e posto nella cella. Il sistema è stato lavato con una soluzione di fosfato di potassio (100 ml, 50 mM, pH 7,5). La temperatura della soluzione è stata regolata al punto di regolazione desiderato. Una soluzione contenente prodotti oligonucleotidici in fosfato di potassio (circa 1 g/L) è stata aggiunta ad acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) (230 µL di una soluzione 500 mM). La soluzione è stata poi immessa nel sistema. Il tampone fosfato di potassio è stato poi pompato nel sistema usando la pompa HPLC ad una portata corrispondente alla portata della soluzione di permeato (tipicamente 4 ml/min). La pressione è stata registrata usando il manometro. La soluzione di retentato è stata campionata per l'analisi HPLC ogni 5 volumi di diafiltrazione. La soluzione permeata è stata campionata per l'analisi HPLC ad ogni volume di diafiltrazione. L'esperimento è stato interrotto dopo 15 volumi di diafiltrazione

14.3 Risultati

Tabella 23: risultati per gli esperimenti di filtrazione a fondo cieco seguendo il protocollo 1 (14.2.1)

Agitazione (sì o no)	Membrana	MWCO (kDa)	numero lotto	SEQ. ID. N.:	Temp. (°C)	Rigetto (%)	
						Prodotto	nucleo tri-stampo
Sì	NADIR	10	226162	1 e 30	60	38	96

Sì	NADIR	10	226162	1 e 2	60	90	98
					80	40	43
Sì	NADIR	10	226162	1 e 2	60	83	92
					65	77	84
					70	38	41
					75	12	20
Sì	NADIR	5	226825	1 e 2	60	97	95
					65	99	93
					70	97	92
					75	90	95
No	NADIR	5	226825	1 e 2	75	66	96
No	NADIR	10	226162	1 e 2	75	80	80
No	Snyder	5	120915R2	1 e 2	75	97	98
No	Osmonics	5	622806PT	1 e 2	75	99	98
No	Osmonics	10	622806PW	1 e 2	75	86	95

MWCO = soglia di peso molecolare

Nell'esperimento che usa la membrana NADIR da 10 kDa MWCO a 60°C, è stata dimostrata una chiara separazione tra la sequenza del prodotto (SEQ. ID. N.: 1) e il nucleo tri-stampo non complementare (comprendente SEQ. ID. N.: 30). La Figura 15 mostra a) un cromatogramma della soluzione di retentato, che rimaneva nella cella di filtrazione e conteneva principalmente nucleo tri-stampo, dopo due volumi di diafiltrazione; e b) un cromatogramma del permeato, soluzione arricchita nel prodotto, dopo due volumi di diafiltrazione.

Tabella 24: risultati per gli esperimenti di filtrazione a flusso incrociato (seguendo protocollo 2) (14.2.2)

Membrana	MwCO (kDa)	numero lotto	SEQ ID NO	Temp. (°C)	Pressione	volume di diafiltrazione	Rigetto (%)			Prodotto
							Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3	
Osmonics	10	622806PW	1 e 2	75	3,1	0	N/A	N/A	N/A	100
						5	N/A	N/A	N/A	64
						10	N/A	N/A	N/A	40
						15	N/A	N/A	N/A	12
Snyder	5	120915R2	1 e 2	75	3,1	0	N/A	N/A	N/A	100
				82		N/A	N/A	N/A	88	
				75		N/A	N/A	N/A	98	
				75		N/A	N/A	N/A	98	
Snyder	5	120915R2	1 e 2	75	3,1	20	N/A	N/A	N/A	96
				85		N/A	N/A	N/A	99	
				5		N/A	N/A	N/A	63	
				10		N/A	N/A	N/A	79	
Snyder	5	120915R2	1 e 2+ segmenti da tabella 1	50	3,0	0	N/A	N/A	N/A	100
						5	39	39	40	100
						10	82	86	86	100
						15	77	81	79	100
Snyder	5	120915R2	1 e 2	80	3,1	20	*	*	*	100
						0	N/A	N/A	N/A	96

Membrana	MWCO (kDa)	numero lotto	SEQ ID NO	Temp. (°C)	Pressione	volume di diafiltrazione	Rigetto (%)		
							Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Snyder	5	120915R2	46 e 30	80	3,4	5	N/A	N/A	22
						10	N/A	N/A	10
						20	N/A	N/A	38
						0	N/A	N/A	98
						5	N/A	N/A	83
						10	N/A	N/A	68
15	N/A	N/A	72						

MWCO = soglia di peso molecolare

* Concentrazione di soluti troppo bassa tale da impedire un'analisi significativa

Nell'esperimento che usa la membrana Snyder da 5 kDa MWCO a 50°C e una pressione di 3,0 bar, è stata dimostrata una chiara separazione tra le sequenze di segmenti (vedere tabella 1) e il nucleo a tre stampi

complementare (comprendente SEQ. ID. N.: 2) e il prodotto (SEQ. ID. N.: 1). La Figura 16 mostra a) un cromatogramma della soluzione di retentato, che conteneva principalmente nucleo tri-stampo e prodotto, dopo 20 volumi di diafiltrazione; e b) un cromatogramma del permeato, che conteneva principalmente oligonucleotidi di segmento, dopo 20 volumi di diafiltrazione.

Nell'esperimento che usa la membrana Snyder da 5 kDa MWCO a 80°C e pressione di 3,1 bar, è stata dimostrata una chiara separazione tra il nucleo a tre stampe complementare (che comprende SEQ. ID. N.: 2) e il prodotto (SEQ. ID. N.: 1). La Figura 17 mostra a) un cromatogramma della soluzione retentato, che conteneva solo nucleo tri-stampo, dopo 20 volumi di diafiltrazione; e b) un cromatogramma della soluzione di permeato, che conteneva solo il prodotto, dopo 2 volumi di diafiltrazione.

14.4 Conclusioni

Oligonucleotidi di diverse lunghezze e pesi molecolari possono essere separati usando filtrazione. Come mostrato sopra, il tipo di membrana e le condizioni, come la temperatura, influenzano il livello di separazione. Per un dato insieme di oligonucleotidi di diverse lunghezze/pesi molecolari, è possibile selezionare membrane e condizioni adatte per consentire la separazione richiesta. Ad esempio, abbiamo dimostrato che gli oligonucleotidi di segmento ("shortmer" di 6 e 8 nucleotidi di lunghezza), come delineato nella tabella 1, possono essere separati dall'oligonucleotide del prodotto (oligonucleotide 20-mero con SEQ. ID. N.: 1) e nucleo tri-stampo (comprendente 3 x 20-meri di SEQ. ID. N.: 2 attaccato ad un supporto solido), e l'oligonucleotide del prodotto e il nucleo a tre stampe possono, a loro volta, essere separati l'uno dall'altro.

Conclusioni generali

Abbiamo dimostrato che è possibile sintetizzare oligonucleotidi, inclusi gli oligonucleotidi con una gamma di modificazioni chimiche rilevanti dal punto di vista terapeutico, in soluzione assemblando brevi segmenti di oligonucleotidi su uno stampo complementare, ligando i segmenti insieme e separando l'oligonucleotide prodotto da entrambe le impurità e dal suo stampo complementare in un procedimento efficiente che è scalabile e adatto per la produzione di oligonucleotidi terapeutici su larga scala.

Sintetizzando oligonucleotidi in soluzione abbiamo evitato i vincoli di aumento di scala imposti dai metodi in

fase solida. Usando le proprietà intrinseche del DNA per riconoscere in modo specifico le sequenze complementari e legare sequenze complementari con un'affinità che riflette sia la fedeltà della sequenza complementare che la lunghezza della sequenza complementare, siamo stati in grado di produrre oligonucleotidi di elevata purezza senza la necessità di cromatografia. Ciò migliora sia l'efficienza del procedimento di produzione che la scalabilità del procedimento. Recuperando lo stampo in uno stato invariato durante il procedimento di separazione siamo in grado di riutilizzare lo stampo per ulteriori cicli di sintesi e così abbiamo evitato le conseguenze economiche di dover realizzare un equivalente di stampo per ogni equivalente di prodotto oligonucleotidico formato.

Infine, sebbene sia noto che le ligasi di tipo selvatico leghino efficacemente il DNA normale, abbiamo dimostrato che le modifiche al DNA comportano una diminuzione dell'efficienza di ligazione e le modifiche multiple al DNA sono additive nel loro effetto sulla diminuzione dell'efficienza della ligazione che può, in alcuni casi, rendere la DNA ligasi completamente inefficace. Abbiamo mostrato che mediante un'appropriata mutazione ed evoluzione delle DNA ligasi, l'efficienza della ligazione può essere ripristinata e le DNA ligasi opportunamente modificate sono catalizzatori efficaci per sintetizzare oligonucleotidi che contengono molteplici modificazioni.

ELENCO DI SEQUENZE

SEQ. ID. N.	Identificatore di sequenza
1	Esempio 1 sequenza oligonucleotidica di prodotto desiderato ("bersaglio")
2	Esempio 1-4, 6, 10 e 11 sequenza oligonucleotidica di stampo
3	sequenza di proteina DNA ligasi di T4 di tipo selvatico
4	Sequenza di proteina di DNA ligasi di T4 di tipo selvatico (fusa a CBD)
5	Esempio 2 sequenza bersaglio
6	Sequenza di proteina di DNA ligasi CC31 di fago di Enterobacteria di tipo selvatico
7	Sequenza di proteina di DNA ligasi CC31 di fago di Enterobacteria di tipo selvatico (fusa a CBD)
8	Sequenza di proteina di DNA ligasi Shf125875 di fago di Shigella di tipo selvatico
9	Sequenza di proteina di DNA ligasi Shf125875 di fago di Shigella di tipo selvatico (fusa a CBD)
10	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
11	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
12	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
13	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
14	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
15	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
16	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
17	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)

18	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
19	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
20	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
21	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
22	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura T4)
23	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura di fago di Enterobacteria CC31 - clone A4)
24	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura di fago di Enterobacteria CC31)
25	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura di fago di Enterobacteria CC31)
26	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura di fago di Enterobacteria CC31)
27	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura di fago di Enterobacteria CC31)
28	Sequenza di proteina di ligasi mutante (struttura di fago di Shigella Shf125875)
29	Sequenza di proteina di ligasi di Chlorella di tipo selvatico
30	Esempio 5, 8 e 9 sequenza oligonucleotidica di stampo
31	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
32	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
33	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
34	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
35	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
36	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
37	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
38	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo

39	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
40	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
41	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
42	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
43	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
44	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
45	Esempio 5 sequenza oligonucleotidica di stampo
46	Esempio 14 sequenza oligonucleotidica "20-merica"
47	Esempio 7 sequenza oligonucleotidica di stampo
48	Paramecium bursaria Virus di Chlorella NE-JV-4 ligasi
49	Paramecium bursaria Virus di Chlorella NIs1 ligasi
50	Paramecium bursaria Virus di Chlorella NE-JV-1 ligasi
51	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella Canal-1 ligasi
52	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella Br0604L ligasi
53	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella NE-JV-2 ligasi
54	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella TN603.4.2 ligasi
55	Acanthocystis turfacea Virus di Chlorella GM0701.1 ligasi
56	Synechococcus fago S-CRM01 ligasi
57	Ligasi metagenoma di sedimento marino
58	Mycobacterium tuberculosis (ceppo ATCC 25618/H37Rv) ligasi
59	Enterococcus faecalis (ceppo ATCC 700802/V583) ligasi

60	Haemophilus influenzae (ceppo ATCC 51907/DSM 11121/ KW20/Rd) ligasi
61	Staphylococcus aureus ligasi
62	Streptococcus pneumoniae (ceppo P1031) ligasi

SEQ. ID. N.:1

GGCCAAACCTCGGCTTACCT

SEQ. ID. N.:2

TTTAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC

SEQ ID NO:3

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILNIENQVWNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:4

GSILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTL
 ATRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 EPEGLDFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDV
 RFSKLEQMTSGYDKVILNIENQVWNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIVGIY
 YPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 VKLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ. ID. N.:5

GGC CAA ACC UCG GCU UAC CU

SEQ ID NO:6

MILDIIINEIASIGSTKEKEAIIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPAPA
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFALE
 LMVQGYSQMILNIENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKEVITIDLRIVDIYEHKQ
 PGKAGGFYLESEGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKLFLPI
 AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO:7

GSILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
 VWTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVLRLDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPAP
 AQLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGDLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPL
 DDIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRA
 LELMVQGYSQMILIHVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKEVITIDLRIVDIYEHS
 KQPGKAGGFYLESECGLIKVAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKLF
 LPIAIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO:8

MILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPERSQAYGELLEDDMLDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDEVLRVMMRDLEVGASVSIANKVWPGLIQLQPQMLASAYDEKLITKNIK
 WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADEL MEMTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
 VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
 RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKYYVDQGLEGIILKNRDSYWENKRSKNLIKFEVIDIALEV
 YEHKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTTHKTVDGVKVLPLDERHDLDRERLMAEAREGKLGRIADC
 ECNGWVHSGREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

SEQ ID NO:9

GSILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPERSQAYGELLEDDMLDFIEFTLA
 ATRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDEVLRVMMRDLEVGASVSIANKVWPGLIQLQPQMLASAYDEKLITKNIK
 WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADEL MEMTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
 VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
 RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKYYVDQGLEGIILKNRDSYWENKRSKNLIKFEVIDIALEV
 YEHKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTTHKTVDGVKVLPLDERHDLDRERLMAEAREGKLGRIADC
 ECNGWVHSGREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

SEQ ID NO:10

MILKILNEIASIGSTKQKQAIKKNKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLDMLDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDDEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIK
 PAFKADGARCFAEVRGDELDDVRLSRAGNEYLGDLKKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLDAYPENS KAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILNENQVNNLDEAKVIYKYYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKRVIDVLDKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFIESECGLIKVAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIGKILECECNGWLKSDGRTDYV
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:11

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKGVIDVDLKVIGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:12

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKVIDVDLKVIGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:13

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKVILVDLKVIGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:14

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKVIVVDLKVIGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:15

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFEVIQVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:16

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFEVIVVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:17

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFEVIRVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:18

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPLQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFEAIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:19

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFALQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEKIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:20

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFALQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKRVIVVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:21

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFALQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKKIVIEVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:22

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGGKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFALQKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGDLFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIEQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKKIVHVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO:23

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKIEKNIKFPAPA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRALE
LMVQGYEQMILIHENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGILKNIGAFWENTRSKNLYKFKRVIVIDLRIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO:24

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKIEKNIKFPAPA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRALE
LMVQGYEQMILIHENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGILKNIGAFWENTRSKNLYKFKKVIKIDLRIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO:25

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKIEKNIKFPAPA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRALE
LMVQGYEQMILIHENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGILKNIGAFWENTRSKNLYKFKGVIFIDLRIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO:26

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKIEKNIKFPAPA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRALE
LMVQGYEQMILIHENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGILKNIGAFWENTRSKNLYKFKGVILIDLRIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO:27

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQLASSYDEKIEKNIKFPAPA
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRALE
 LMVQGYSQMILIENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKRVIFIDLRIVDIYEHKQ
 PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEEGRDYVKLFLPI
 AIKMRRDKDVANTFADIWGDFFHEVTGL

SEQ ID NO:28

MILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPERSQAYGLLELDDMLDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDEVLRVMMRDLEVGASVSIANKVWPGLIQLQPQLASAYDEKLITKNIK
 WPFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADELMEMTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
 VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
 RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKYVDQGLEIILKNRDSYWENKRSKNLIKFKRVIVIALEVVG
 YYEHKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTTHKTVDGVKLIPLDERHDLDRERLMAEAREGKLGRIADC
 ECNGVWVHSGREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

SEQ ID NO:29

MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTEFKPIRNSVMNRLLTELLPEGSDGEISIEGATFQD
 TTSVMTGHKMYNAKFSYYWFDYVTDPLKKYIDRVEDMKNYITVPHILEHAQVKIIPVVEINNITELLQYER
 DVLSKGFEGVMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMALFKNTNTKTKDNFGYSKRSTHKSGKV
 EEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTGFADQRRDFWQNKESYIGKMKVFKYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDR

SEQ. ID. N.:30

TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC

SEQ. ID. N.:31

TTTGGTGCGAAGCAGAGTGAGGC

SEQ. ID. N.:32

TTTGGTGCGAAGCAGATTGAGGC

SEQ. ID. N.:33

TTTGGTGCGAAGCAGAATGAGGC

SEQ. ID. N.:34

TTTGGTGCGAAGCAGTCTGAGGC

SEQ. ID. N.:35

TTTGGTGCGAAGCAGTGTGAGGC

SEQ. ID. N.:36

TTTGGTGCGAAGCAGTTTGAGGC

SEQ. ID. N.:37

TTTGGTGCGAAGCAGTATGAGGC

SEQ. ID. N.:38

TTTGGTGCGAAGCAGCCTGAGGC

SEQ. ID. N.:39

TTTGGTGCGAAGCAGCGTGAGGC

SEQ. ID. N.:40

TTTGGTGCGAAGCAGCTTGAGGC

SEQ. ID. N.:41

TTTGGTGCGAAGCAGCATGAGGC

SEQ. ID. N.:42

TTTGGTGCGAAGCAGGCTGAGGC

SEQ. ID. N.:43

TTTGGTGCGAAGCAGGGTGAGGC

SEQ. ID. N.:44

TTTGGTGCGAAGCAGGTTGAGGC

SEQ. ID. N.:45

TTTGGTGCGAAGCAGGATGAGGC

SEQ. ID. N.:46

GCCUCAGTCTGCTTCGCACC

SEQ. ID. N.:47

TTTGGTGCGAAGCAGAAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC

SEQ ID NO:48

MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTEFKPIRNSVMNRLLTELLPEGSDGEISIEGATFQD

TTSVMTGHKMYNAKFSYYWFDYVTDPLKKYSRVEDMKNYITAHPHILDHEQVKIPLIPVEINNITELLQYE

RDVLSKGFEGVMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMALFKNTNTKTKDNFGYSKRSTHKNKG

VEEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDADQRRDFWQNKESYIGKMKFKYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDH

SEQ ID NO:49

MTIAKPLLAATLENLDDVKFCLVTPKIDGIRSLKQQHMLSRTEFKPIRNSVMNKLLSELLPEGADGEICIEDSTFQA

TTSVMTGHKVVYDEKFSYYWFDYVDDPLKSYTDRVNDMKKYVDDHPHILEHEQVKIPLIPVEINNIDELSQYE

RDVLAKGFEGVMIRRPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMSPRLKNTNAKSKDNLGYSKRSTHKSQK

VEETMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDDEQRKHFWENKDSYIGKLLKFKYFEMGSKDAPRFPVFIGIRHEEDC

SEQ ID NO:50

MTAIQKPLLAASFKCLTVADVKYVPVFATPKLDGIRALKIDGAFVSRFTFKPIRNRAIADALQDLLPNGSDGEILSGST
 FQDASSAVMTAKAGIGANTIFYWFDYVKDDPNKPYLDRMTDMENYLKERPEILNDDRIKIVPLIPKKIETKDELD
 TFEKICLDQGFEGVMIRSGAGKYKFRSTEKEGILIKIKQFEDDEAVVIGFTPMQNTNTNDKSMNELGDMKRSSHK
 DGKVNLDTLGALEVDWNGITFSIGTGFDHALRDKLWSEKDLIGKIVKFKYFAQGVKTAPRFPVFIGFRDPDDM

SEQ ID NO:51

MAIQKPLLAASLKKMSVGDLTFFVYATPKLDGIRALKVGGTIVSRFTFKPVRNSAISEVLASILPDGSDGEILSGKTF
 QESTSTVMTADAGLGSMTFFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKSFTDRHPEILKDKRVTVPLFPKKIDTTEELHE
 FEKWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTNDKKNLQLGEMRRTSH
 QDGKVELEMLGALDVDWNGIRFSIGTGFDRTTRVDLWKRREGVIGKIVKFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDKDD
 M

SEQ ID NO:52

MAIQKPLLAASLKKLSVDDLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRFTFKPIRNNTTISKVLTSLLPDGSDEILSGKTFQ
 DSTSTVMSADAGIGSGTTFWFDYVKDDPNKGYLDRIADIKKFIDCRPEILKDSRVIIVPLFPKKIDTAEELNVFEK
 WCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTNDKKNLQLGEMRRTSHQDG
 KVDLDMLGALDVDWNGIRFGIGTGFDKDTREDLWKRDSIIGKIVKFKYFSQGVKTAPRFPVFLGFRDKNDM

SEQ ID NO:53

MAIQKPLLAASLKKLSVDDLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTIVSRFTFKPIRNNTTISNVLMSELLPDGSDEILSGKTF
 QDSTSTVMSADAGIGSGTTFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKKFVDSHPEILKDRRVTVPLIPKKIDTVEELNV
 FEQWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNVNDKKNLQLGEMRRTSH
 KDGKIDLEMLGALDVEWNGIRFGIGTGFDKDTREDLWKRDSIIGKIVKFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDEND
 M

SEQ ID NO:54

MAIQKPLLAASLKKMSVDNLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRFTFKPIRNNTTISKVLASLLPDGSDEILSGKTF
 QDSTSTVMTTDAGIGSDTTFFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKTQVDPHPEILKDCVTVPLFPKKIDTPEELHV
 FEKWCLDQGFEGVMVRTAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTNDKKNLQLGEMRRTSH
 QDGKVDLDMLGALDVDWNGIRFSIGTGFDKDTREDLWKRDSIVGKVVFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDEN
 DM

SEQ ID NO:55

MAIQKPLLAASLKKMSVDDLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRFTFKPVRNSAISEVLASLLPDGSDEILSGKTF
 QDSTSTVMTTDAGIGSDTTFFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKTQVDPHPEMLKDNHVTIVPLIPKKIDTVEELNI
 FEKWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTNDKKNLQLGEMRRTSH
 QDGKIDLEMLGALDVDWNGIRFSIGTGFDRTTRVDLWKRREGVIGRTIKFKYFGQGIKTAPRFPVFLGFRDKDD
 M

SEQ ID NO:56

MLAGNFDPKKAKFPYCATPKIDGIRFLMVNGRALSRTFKPIRNEYIQKLLSKHLPDGIDGELTCGDTFQSSTSAIM
 RIAGEPDFKAWIFDYVDPDSTSILPFIERFDQISDIIYNGPIPFKHQVLGQSILYNIDDLNR YEEACLNEG YEGVML
 RDPYGYTKFGRSSTNEGILLKVKRFEDA EATVIRIDEKMSNQIAEKDNFGRTRKRSSCLDGMVPMETT GALFVRN
 SDGLEFSIGSGLNDEM RDEIWKNKSSYIGKLVKYKYPQGVKDLPRHPVFLGFRDPDDM

SEQ ID NO:57

MDAHELMKLN EYAERQNKQKQKQITKPLAASLKDITQLDYSKGYLATQKLDGIRALMIDGKLVSR TFKPIRNN
 HIREMLEDLVDPGADGEIVCPGAFQATSSGVMSANGEPEFIYMFYVKKDDITKEYWRR TQDMVQWLINQGPT
 RTPGLSKLKL VPTLIKNDHLKTYETECIDKGFEGVILRTPDSPYKCGRSTAKQEWLLKLR FADDEAVVIGFTEK
 MHNDNEATKDKFGHTVRSSHKENKRPAGTLGSLIVRDIKTEIEFEIGTFDDEL RQKIWDARPEWDGLCVKYKH
 FAISGVKEKPRFSPFIGVRDVEDM

SEQ ID NO:58

MSSPDADQTAPEVLRQWQALAEVREHQFRYYVRDAP IISDAEFDELLRRLEALEEQHPELRTPDSPTQLVGG A
 GFATDFEPVDHLERMLS LDNAFTADELA AAWAGRIHA EVGDAAHYLCELKIDGVALSLVYREGRL TRASTRGDGR
 TGEDVTLNARTIADVPERLTPGDDYPVEVLEVRGEVFFRLDDFQALNASLVEEGKAPFANPRNSAAGSLRQKDP
 AVTARRRLRMICHGLGHVEGFRPATLHQAYLALRAWGLPVEHTTLATDLAGVRERIDYWG EHRHEVDHEIDG
 VVVKVDEVALQRRLGSTRAPRWAIAYKYPPEEAQT KLLDIRVNVGRTGRITPFAFMT PVKVAGSTVQATLHN
 ASEIKRKGVLIGD TVVIRKAGDVIPEVLGPVVELR DGSEREFIMPTTCPECGSPLAPEKEGDADIRCPNARGCPGQ
 LRERVFHVASRNGLDIEVLGYEAGVALLQAKVIADEGELFALTERDLLRTDLFR TKAGELSANGKRLLVNLDKAKA
 APLWRVLVALSIRHVGP TAARALATEFGSLDAIAA AASTDQLAAVEGVGPTIAAAVTEWFAVDWHREIVDKWRAA
 GVRMVDERDESVPR TLAGLTIVVTGSLTGFSRDDAKEAIVARGGKAAGSVSKKTN YVVAGDSPGSKYDKAVELG
 VPILDEDGFRLLADGPASRT

SEQ ID NO:59

MEQQPLTLTAATTRAQELRKQLNQYSHEYVVDQPSVEDYVYDRLYKELVDIETEF PDLITPDSPTQRVGGKVL S
 GFKAPHDIPMYSLNDGFSKEDIFAFDERVRKAIGKPVAYCC ELKIDGLAISLRYENG V FVRGATRGDGT VGENIT
 ENLRTVRSVPMRLTEPISVEVRGECYMPKQSFVALNEEREENGQDIFANPRNAAAGSLRQLD TKIVAKRNLNTFL
 YTVADFGPMKAKTQFEALEELSAIGFRTNPERQLCQSID EWWAYIEEYHEKRSTLPYEIDGIVIKVNEFALQDELG
 FTVKAPRWAIAYKFPPEEAETVVEDIEWTIGRTG VWTPTAVMAPVRVAGTTVSRASLHNADFIQMKDIRLNDHVI
 IYKAGDIIPEVAQVLVEKRAADSQPYEMPTHCPICHSELVHLDEEVALRCINPKCPAQIKEGLNHFVSRNAMNIDG
 LGPRVLAQMYDKGLVKDVADLYFLTEEQLMTLDKIKEKSANNIYTAIQGSKENSVERLIFGLGIRHVGAKAAKILA
 EHFGLPTLSRATAEEI VALDSIGETIADSVVTYFENE EHVHMAELEKAQVNLTYKGLRTEQLAEVESPFKDKTV
 VLTGKLAQYTREEAKEKIENLGGKVTG SVSKKTDIVVAGEDAGSKLTKAESLGVTVWNEQEMVDALDASHF

SEQ ID NO:60

MTNIQTQLDNLRKTLRQY EYEHVLDNPSVPDSEYDRLFHQLKALELEHPEFLTSDSPTQRVGAKPLSGFSQIRH
 EIPMLSLDNAFSDAEFNAFVKRIEDRLILLPKPLTFCCPEKLDGLAVSILYVNGELTQAATRGGTTGEDITANIRT
 IRNVPLQLLTDNPPARLEVRGEVFMHAGFERLNKYALEHNEKTFANPRNAAAGSLRQLDPNITSKRPLVLNAYGI
 GIAEGVDLPTTHYARLQWLK SIGIPVNPEIRLCNGADEV LGFYRDIQNKRSSLG YDIDGTVLKINDIALQNELGFI
 SKAPRWAIAYKFPAQEEL TLLNDVEFQVGR TGAITPVAKLEPVFVAGVTVSNATLHNGDEIERLNIAIGD TVWIRR
 AGDVIPQIIGVLHERRPDNAKPIIFPTNCPVCSQIIRIEGEAVARCTGGLFCAAQRKEALKHFVSRKAMDIDGVG
 GKLIEQLVDRELIHTPADLFLKDLTTLRLERMGAKSAENALNSLENAKSTTLARFIFALGIREVGEATALNLANHF
 KTLDALKDANLEELQQVPDVG EVVANRIFIFWREAHNVAVVEDLIAQGVHWETVEVKEASENLFKDKTVVLTGT
 LTQMGRNEAKALLQQLGAKVSGSVSSKTD FVIAGDAAGSKLAKAQELNITVLTEEEFLAQITR

SEQ ID NO:61

MADLSSRVNELHDLLNQSYEYVEDNPSVPDSEYDKLLHELKIEEEHPEYKTVDSPTVRVGGEAQASFNKVNH
 DTPMLSLGNAFNEDDLRKFQRIREQIGNVEYMCELKIDGLAVSLKYVDGYFVQGLTRGDGTTGEDITENLKTIH
 AIPLKMKKEPLNVEVRGEAYMPRRSFLRLNEEKEKNDEQLFANPRNAAAGSLRQLDSKLTAKRKL SVFIYSVNDFT
 DFNARSQSEALDELKLGFTTNKNRARNNDIGVLEYIEKWT SQRESLPYDIDGIVIKVNDLDQQDEMGTQKS
 PRWAIAYKFAEEVTKLLDIELSIGRTGVVPTPTAILEPVK VAGTTVSRASLHNEDLIHDRDIRIGDSVVVKKAGDI
 IPEVRSIPERRPEDAVTYHMPHTPCSCGHELVRIEGEVALRCINPKCQAQLVEGLIHFVSRQAMNIDGLGTKIIQ
 QLYQSELIKDVADIFYLTEEDLLPLDRMGQKKVDNLLAAIQQAKDNSLENLLFGLGIRHLGVKASQVLAEKYETID
 RLLTVTEAEIHDIGDKVAQSVTYLENEDIRALIQLKDKHVNMIYKGIKTS DIEGHPEFSGKTIVLTGKHLHQ
 MTRNEASKWLASQGAKVTSSVTKN TDVVIAGEDAGSKLTKAQSLGIEIWTEQQFVDKQNELNS

SEQ ID NO:62

MNKR MNELVALLNRYATEYYTSDNPSVSDSEYDRLYRELVELETAYPEQVLADSPTHR VGGKVLDFEKEYSHQY
 PLYSLQDAFSREELDAFDARVRKEVAHPTYICELKIDGLSISLTYEKGILVAGVTRGDG SIGENITENLKRVDIPL
 TLPEELDITVRGECYMPRASFDQVNQARQENGEPEFANPRNAAAGTLRQLDTAVVAKRNLATFLYQEASPSTRD
 SQEKGLKYLEQLGFVVPKRILAENIDEIWNFIQEVGQERENLPYDIDGVVIVKVN DLASQEELGFTVKAPKWA
 VAYKFAEEKEAQLLSVDWTVGRTGVVPTPTANLTPVQLAGTTVSRATLHNVDYIAEKDIRKDDTVIVYKAGDIIPAV
 LRVVESKRVSEEKLDIPTNCPSCNSDLLHFEDEVALRCINPRCPAQIMEGLIH FASRDAMNITGLGPSIVEKLF
 AANLVKDVA DIYRLQEEDFLLLEGVKEKSAKLYQAIQASKENSAEKLLFGLGIRHVGSKASQLLLQYFH
 SIENLYQADS EEVASIESLGGVIAKSLQTYFATEGSEILLRELKETGVNLDYKGQTVVADAALSGLTWLTGK
 LERLKRSEAKSKLE SLGAKVTGVS SKTDLVWVGADAGSKLQKAQELGIQVRDEAWLES

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di un prodotto oligonucleotidico a filamento singolo avente almeno un residuo nucleotidico modificato, in cui la modifica è scelta dal gruppo consistente nella modifica nella posizione 2' della porzione di zucchero, nella modifica della base azotata, e nella modifica dell'ossatura, e in cui il prodotto è prodotto su scala di grammi o chilogrammi, o superiore, e/o il procedimento viene eseguito in un reattore da 1 L o più grande, comprendente:

- a) il fornire un oligonucleotide di stampo (I) complementare alla sequenza del prodotto, detto stampo avente proprietà che gli consentono di essere separato dal prodotto;
- b) il fornire una raccolta di oligonucleotidi (II) contenente oligonucleotidi che sono segmenti della sequenza del prodotto, in cui almeno un segmento contiene almeno un residuo nucleotidico modificato e in cui la modifica è scelta dal gruppo consistente nella modifica alla posizione 2' della porzione di zucchero, modifica della base azotata, e modifica dell'ossatura;
- c) il portare a contatto (I) e (II) in condizioni tali da consentire la riassociazione;
- d) l'unire gli oligonucleotidi segmenti mediante ligazione enzimatica con una ligasi per formare il prodotto;
- e) il modificare le condizioni per separare qualsiasi impurità, compresa la denaturazione dello stampo riassociato e filamenti di oligonucleotidi di impurità e la separazione delle impurità;
- f) il modificare le condizioni per separare il prodotto, comprendente denaturare lo stampo riassociato e filamenti di oligonucleotidi di prodotto e separare il prodotto; e
- g) il riciclare lo stampo per uso in reazioni future.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui la denaturazione risulta da un aumento della temperatura, una variazione del pH, o una variazione della concentrazione di sale in una soluzione tampone.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, comprendente due passaggi di aumento della temperatura: i) per denaturare qualsiasi impurità riassociata e ii) per denaturare il prodotto riassociato.

4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui i segmenti sono lunghi da 3 a 15 nucleotidi.

5. Procedimento secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il prodotto è lungo da 10 a 200 nucleotidi, opzionalmente è lungo da 20 a 30 nucleotidi, opzionalmente è lungo da 20 a 25 nucleotidi.
6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui detto prodotto è lungo 20 nucleotidi, detto prodotto comprendente tre oligonucleotidi segmenti:
 - (i) un segmento 5' che è lungo 7 nucleotidi, un segmento centrale che è lungo 6 nucleotidi e un segmento 3' che è lungo 7 nucleotidi;
 - (ii) un segmento 5' che è lungo 6 nucleotidi, un segmento centrale che è lungo 8 nucleotidi e un segmento 3' che è lungo 6 nucleotidi; o
 - (iii) un segmento 5' che è lungo 5 nucleotidi, un segmento centrale che è lungo 10 nucleotidi e un segmento 3' che è lungo 5 nucleotidi.
7. Procedimento secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la proprietà che consente di separare lo stampo dal prodotto è che lo stampo è attaccato a un materiale di supporto.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui il materiale di supporto è un materiale di supporto solubile, opzionalmente in cui il materiale di supporto è scelto dal gruppo costituito da polietilenglicole, un polimero organico solubile, DNA, una proteina, un dendrimero, un polisaccaride, un oligosaccaride, e un carboidrato.
9. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui il materiale di supporto è un materiale di supporto insolubile, opzionalmente in cui il materiale di supporto è scelto dal gruppo costituito da: una perla di vetro, una perla polimerica, un supporto fibroso, una membrana, una perla rivestita di streptavidina, cellulosa o fa parte del recipiente di reazione stesso, ad es. una parete di reazione.
10. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-9, in cui più copie ripetute dello stampo sono attaccate in modo continuo attraverso un unico punto di attacco al materiale di supporto.
11. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, in cui la proprietà che consente di separare lo stampo dal prodotto è il peso molecolare dello stampo.
12. Procedimento secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la reazione viene condotta usando un procedimento a flusso continuo o semi-continuo.

13. Procedimento secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la modifica è nella posizione 2' della porzione di zucchero ed è scelta dal gruppo costituito da 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE e gruppo 2'-amminico, o in cui l'oligonucleotide comprende un PMO, un LNA, un PNA, un BNA o uno SPIEGELMER.
14. Procedimento secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la modifica è nella base azotata ed è scelta dal gruppo costituito da una 5-metil pirimidina, una 7-deazaguanosina e un nucleotide abasico.
15. Procedimento secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la modifica è nell'ossatura ed è scelta dal gruppo costituito da fosforotioato, fosforammidato e fosforodiammidato.
16. Procedimento secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il prodotto risultante è puro almeno al 90%, opzionalmente in cui il prodotto è puro almeno al 95%, opzionalmente in cui il prodotto è puro almeno al 98%.
17. Procedimento per produrre un prodotto oligonucleotidico a doppio filamento, in cui 2 oligonucleotidi a filamento singolo complementari vengono prodotti mediante il metodo di qualsiasi rivendicazione precedente e poi miscelati in condizioni tali da consentire la riassociazione.
18. Procedimento come rivendicato in qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il procedimento è per produrre un oligonucleotide terapeutico.
19. Procedimento come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-16 o 18, in cui il prodotto oligonucleotidico è un gapmero.

Figure 2

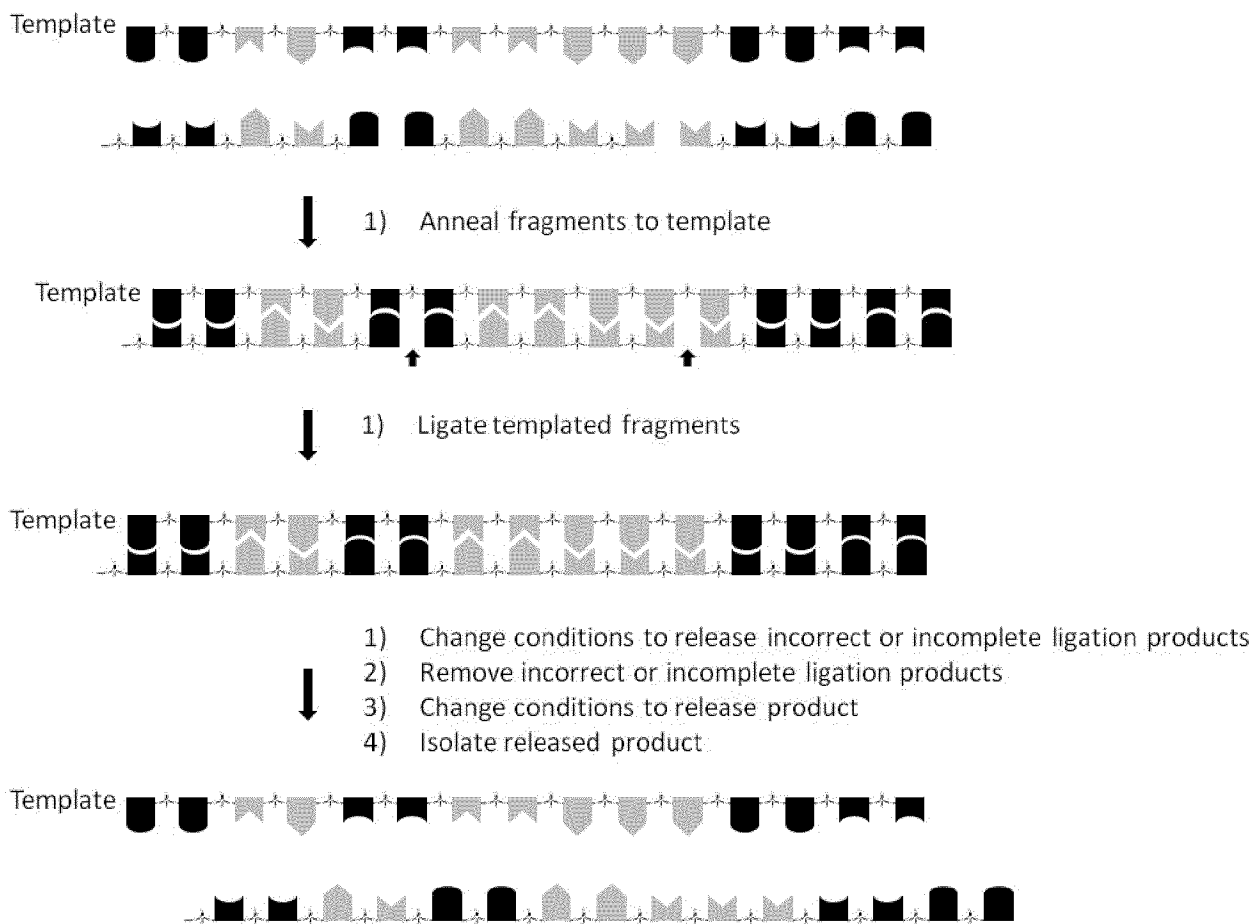
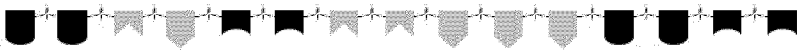


Figure 3

Single Template



Repeating Template

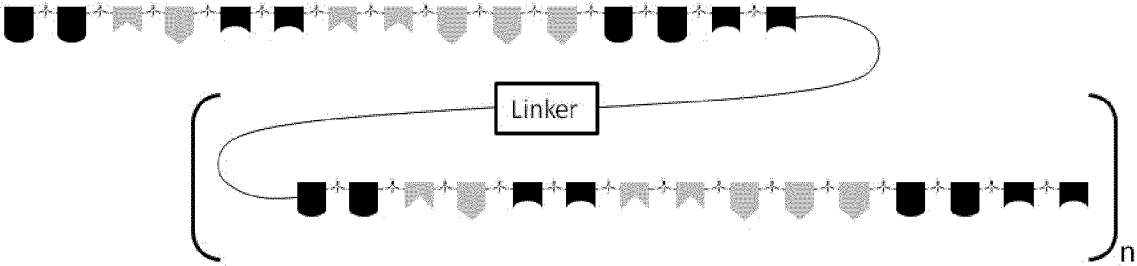


Figure 4

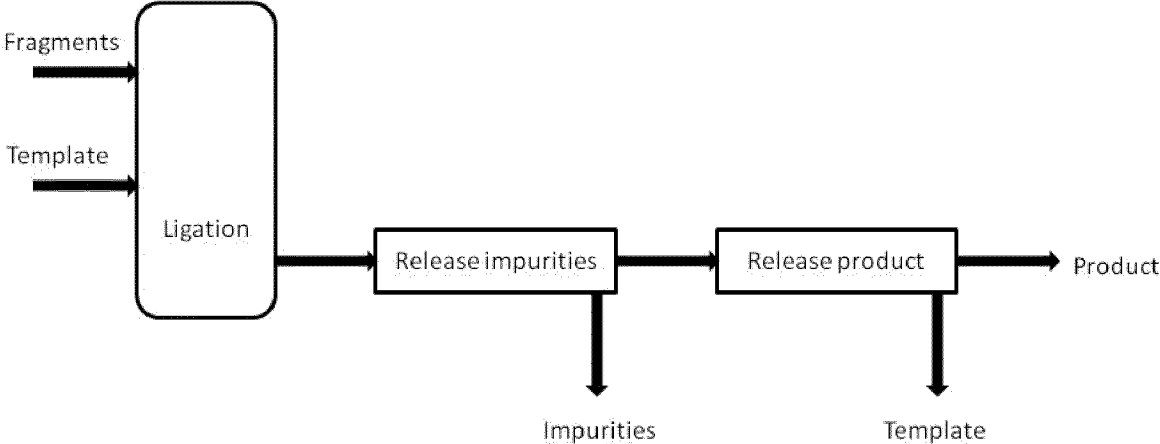
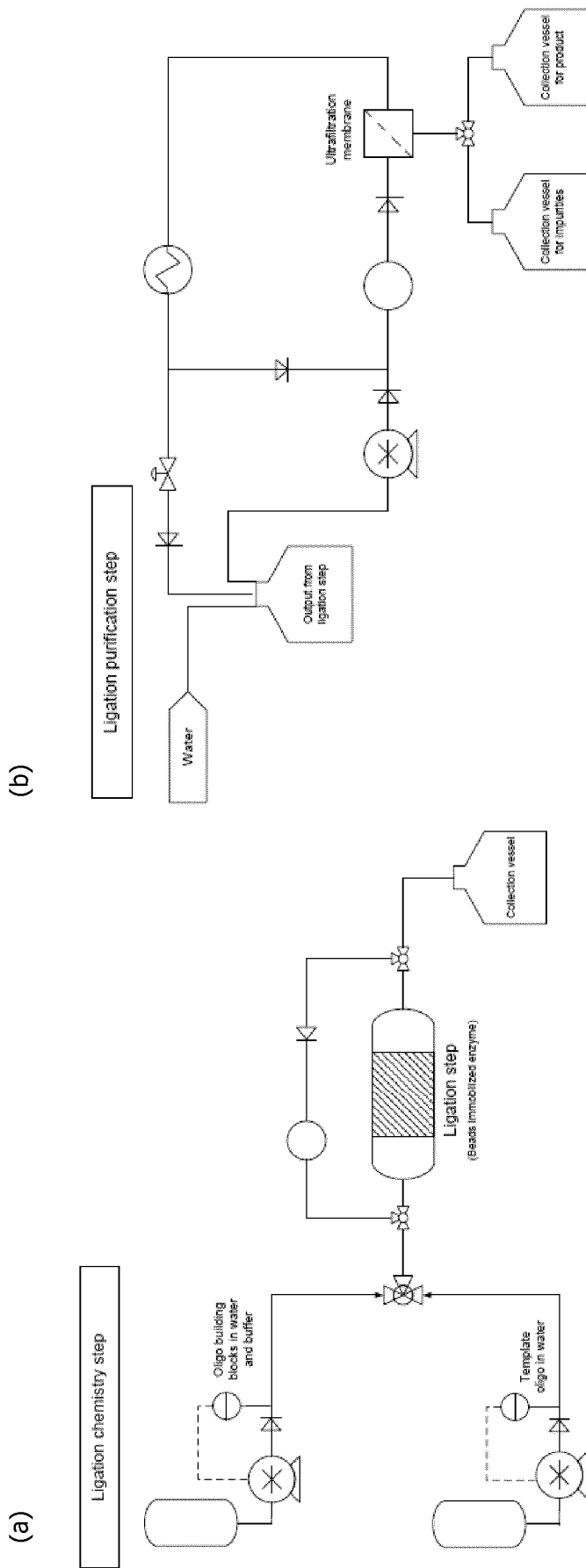
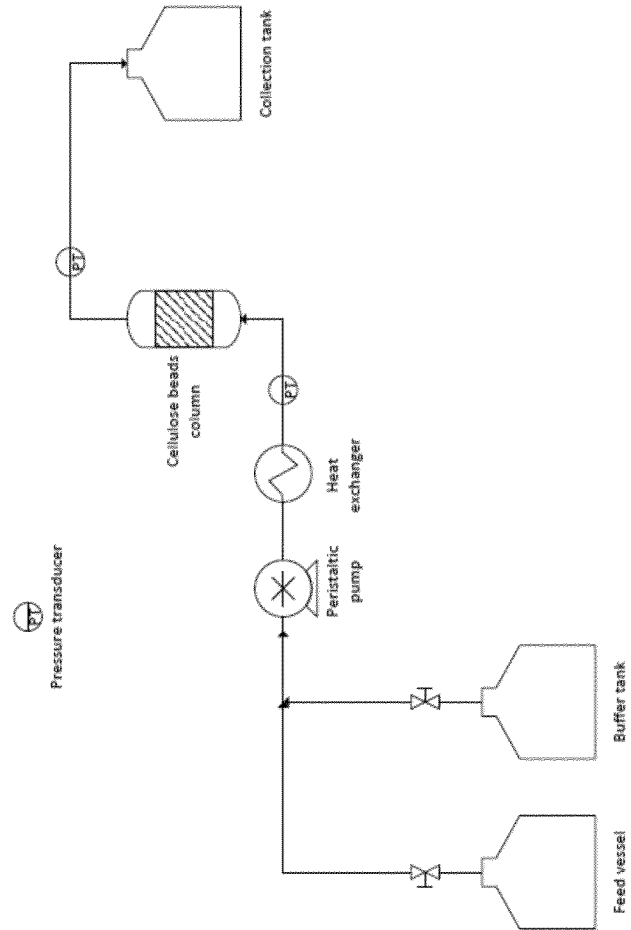


Figure 5



(c)



(d)

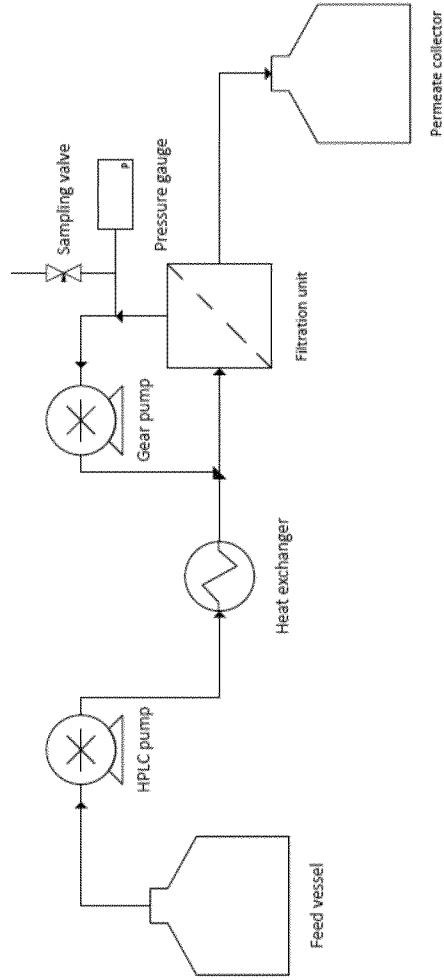
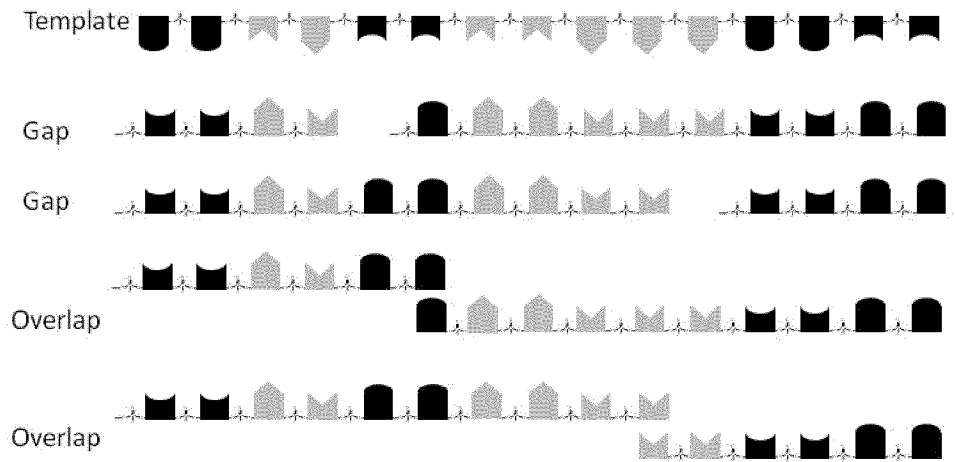


Figure 6

Gaps or overlaps arising from missing or additional nucleotides



Impurities arising from missing or additional nucleotides

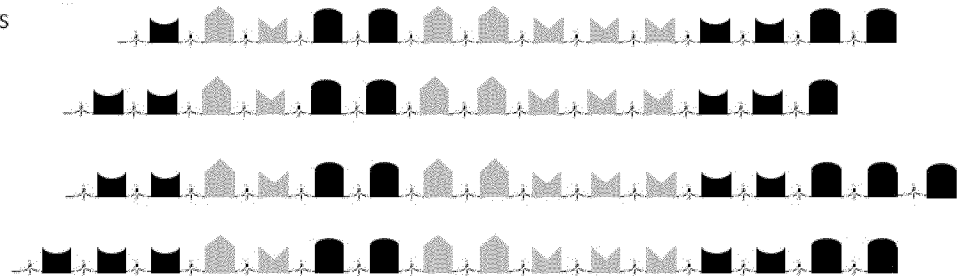


Figure 7

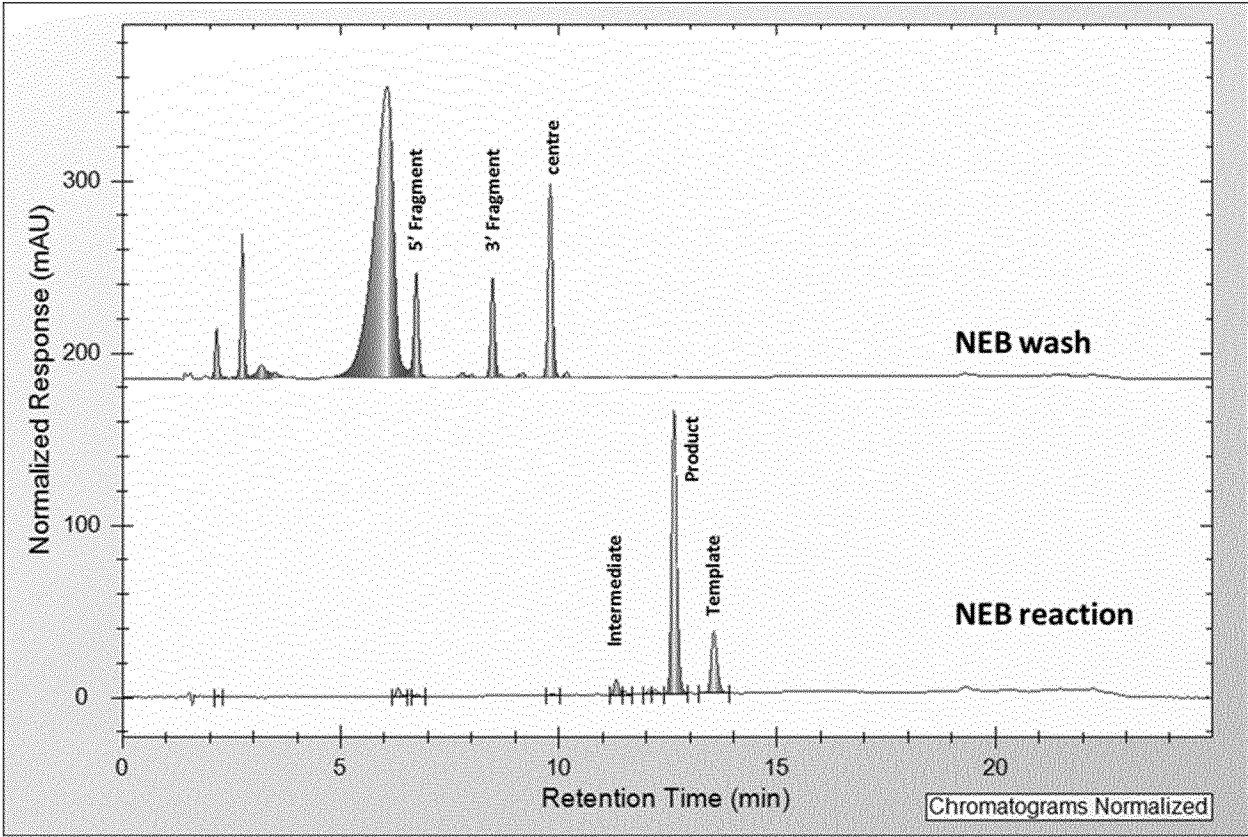


Figure 8

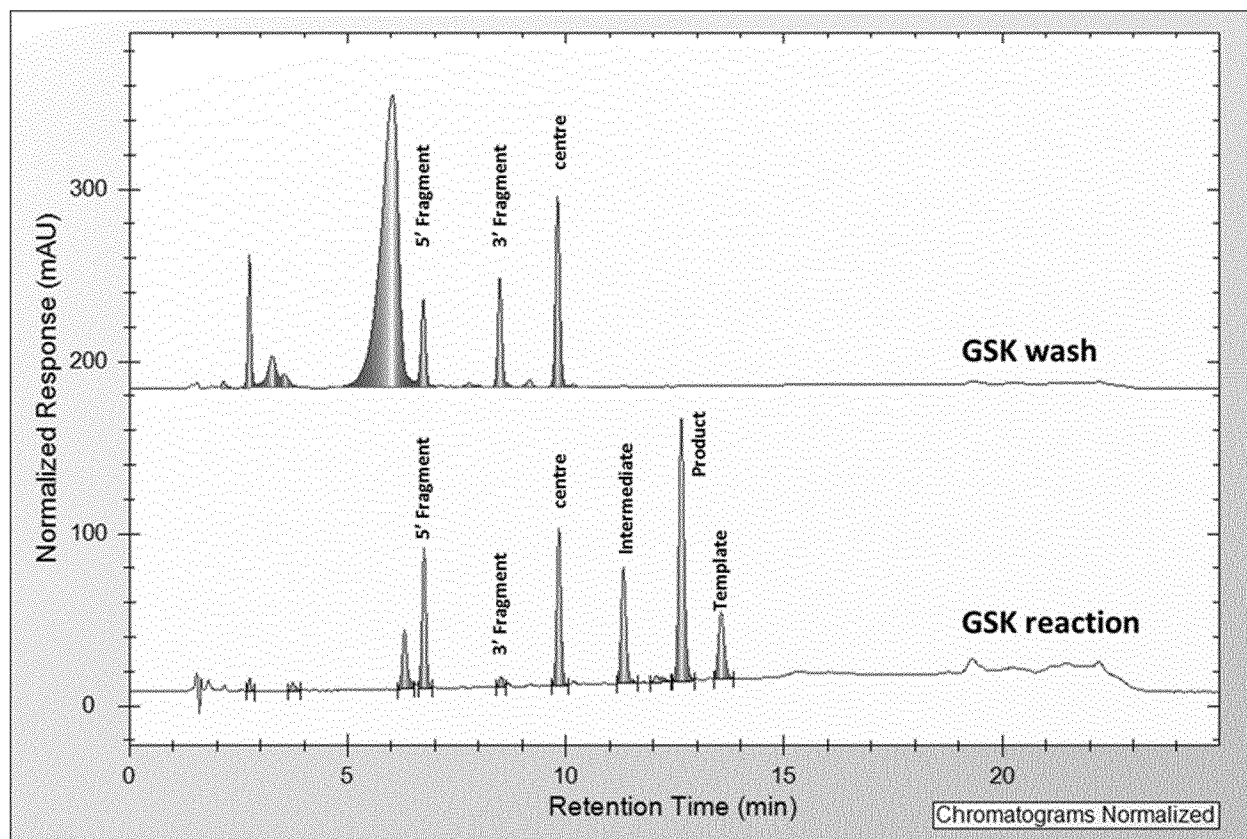
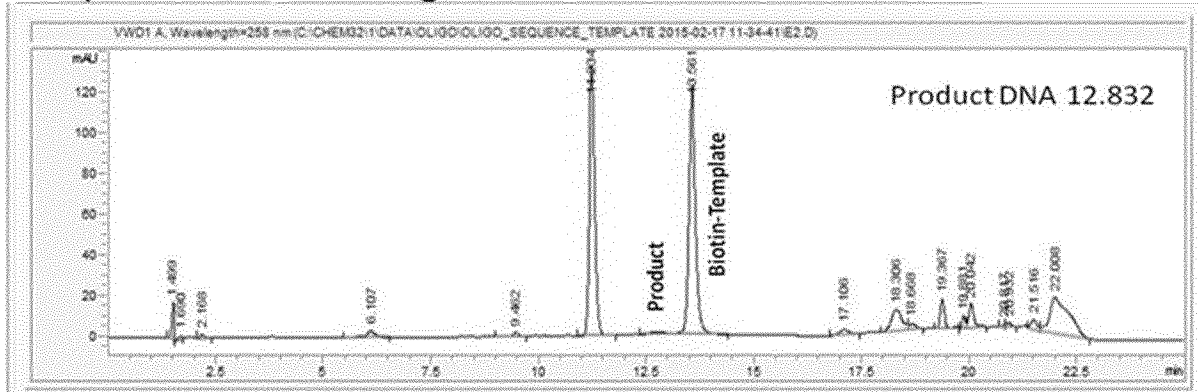
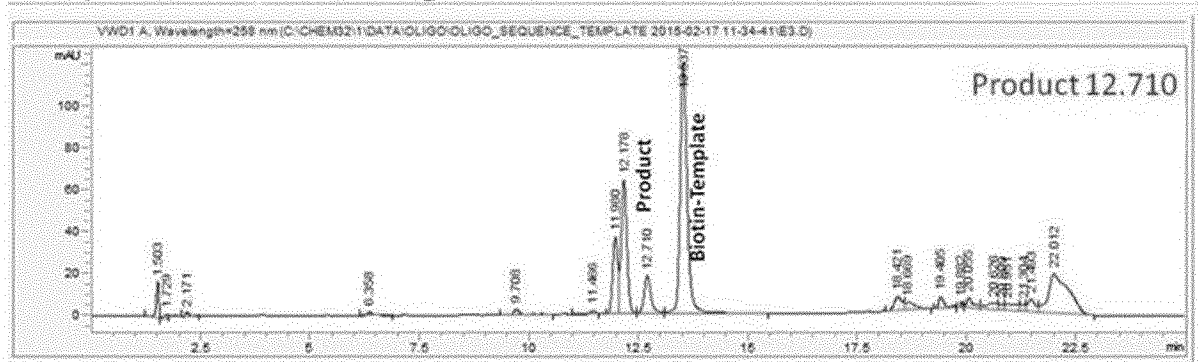


Figure 9

Experiment 2: 3' fragment 2'MeO substituted



Experiment 3: 5' fragment 2'MeO substituted



Experiment 4: all fragments 2'OMe substituted

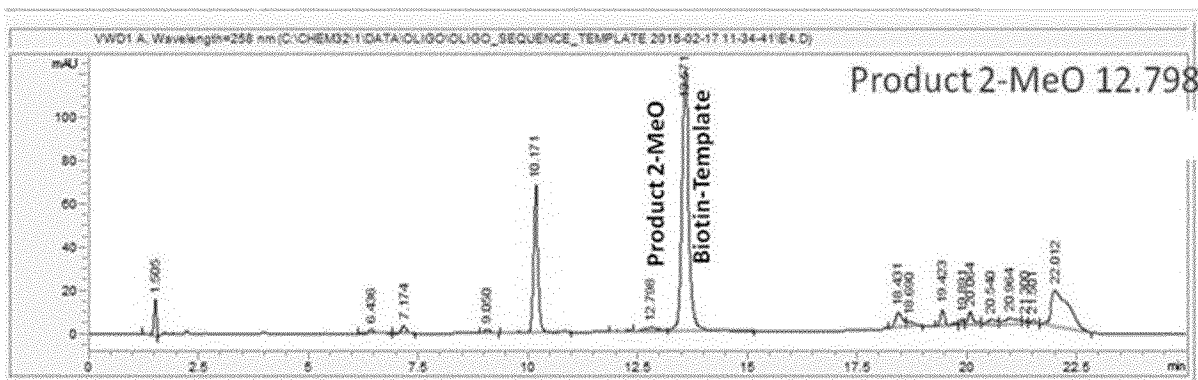
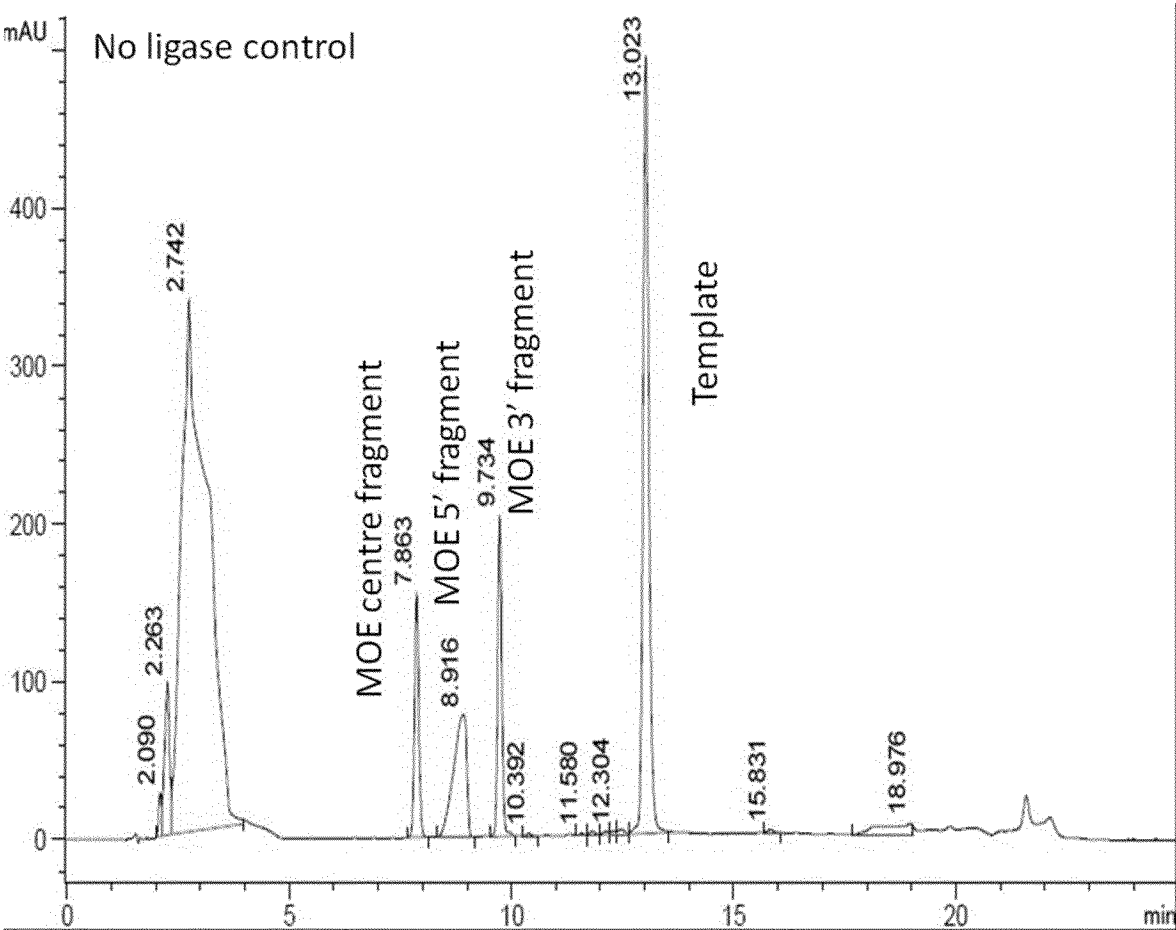


Figure 10

(a)



(b)

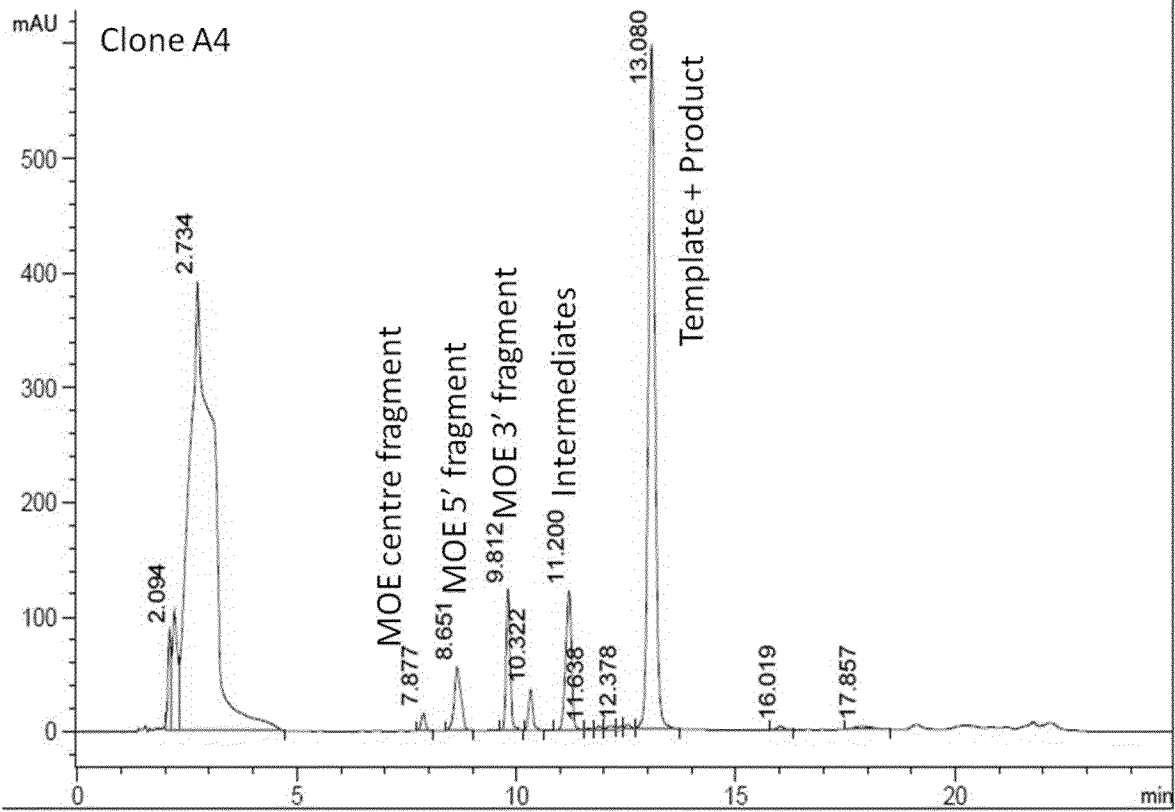


Figure 11

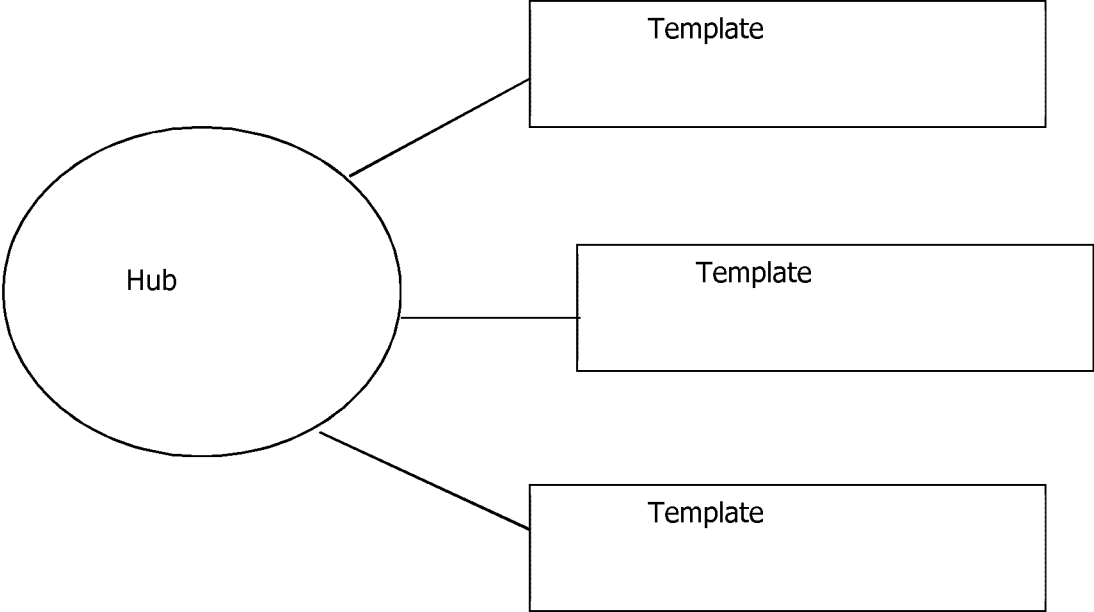


Figure 12

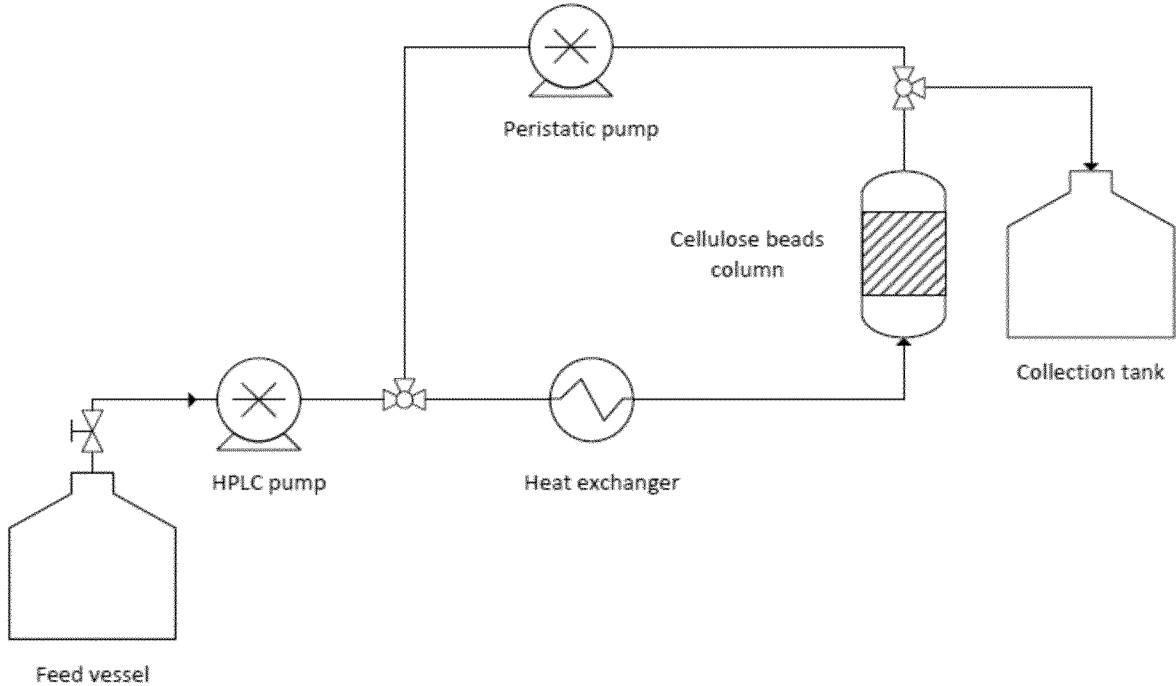


Figure 13

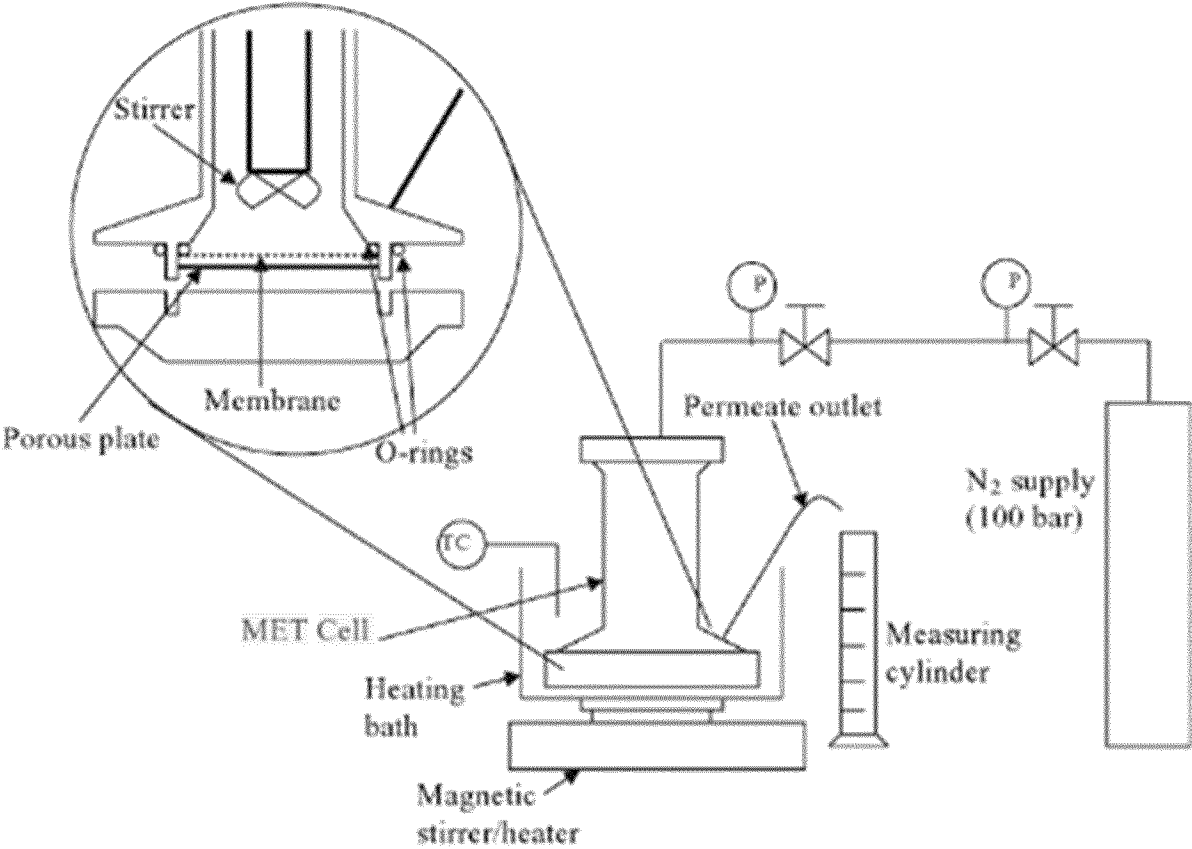


Figure 14

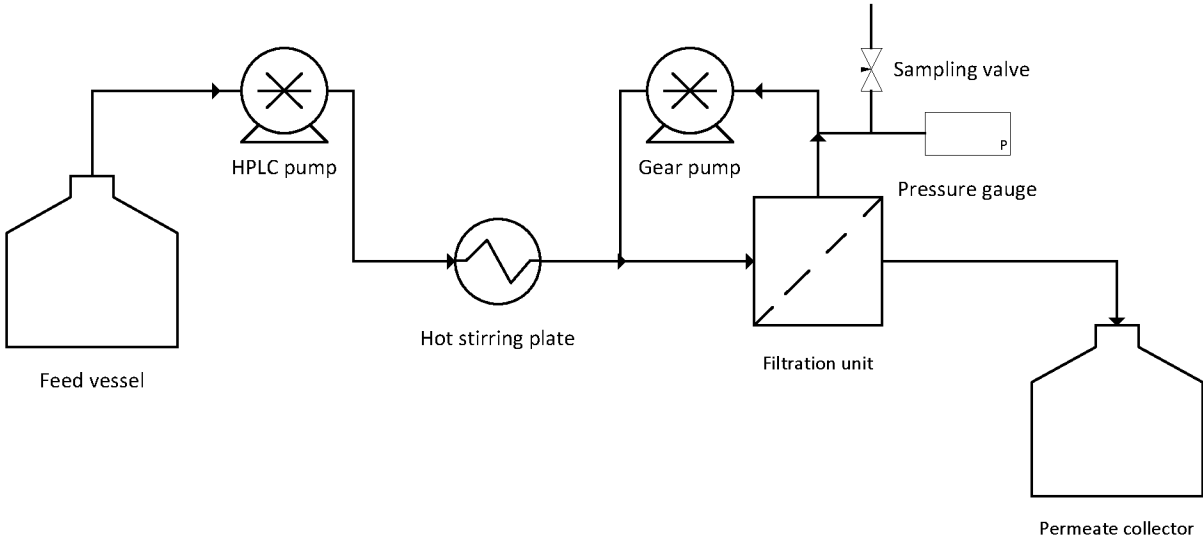
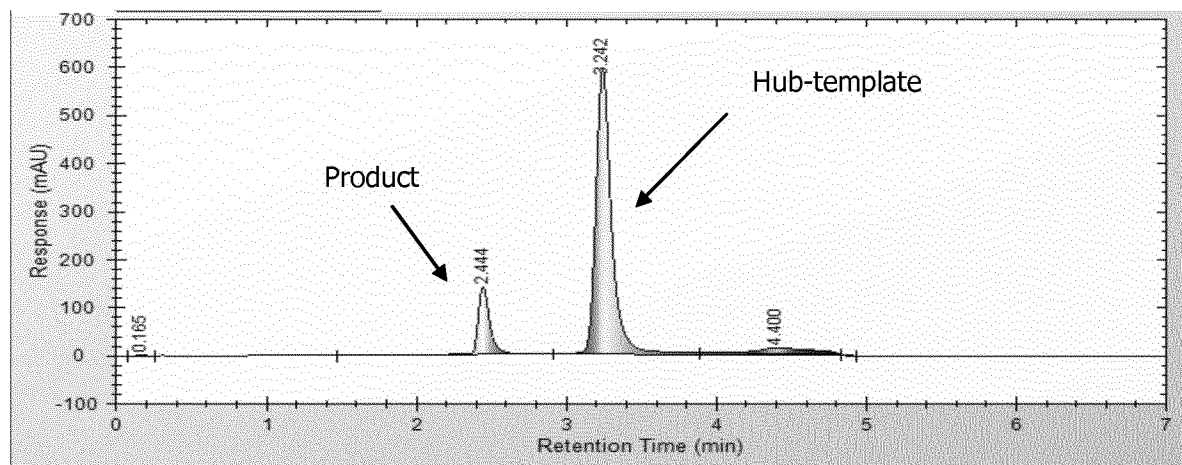


Figure 15

(a)



(b)

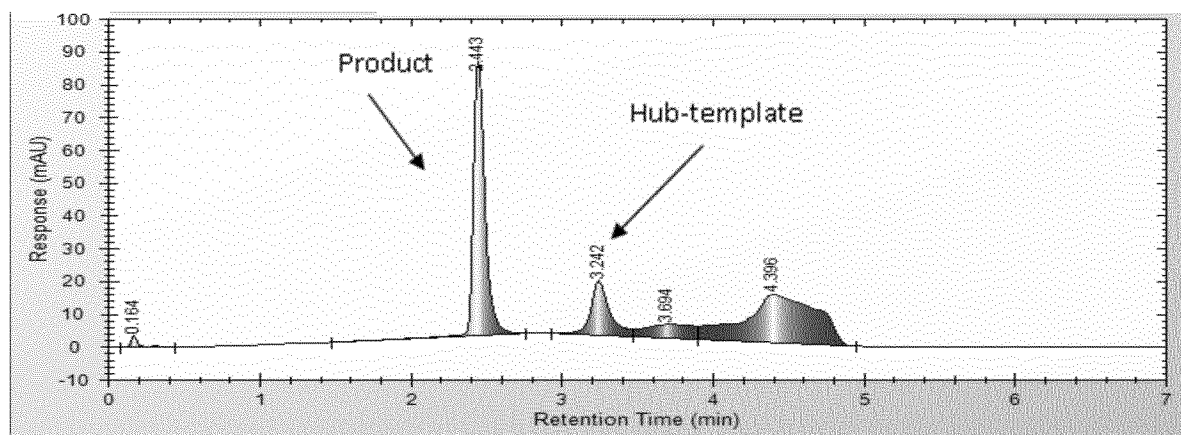
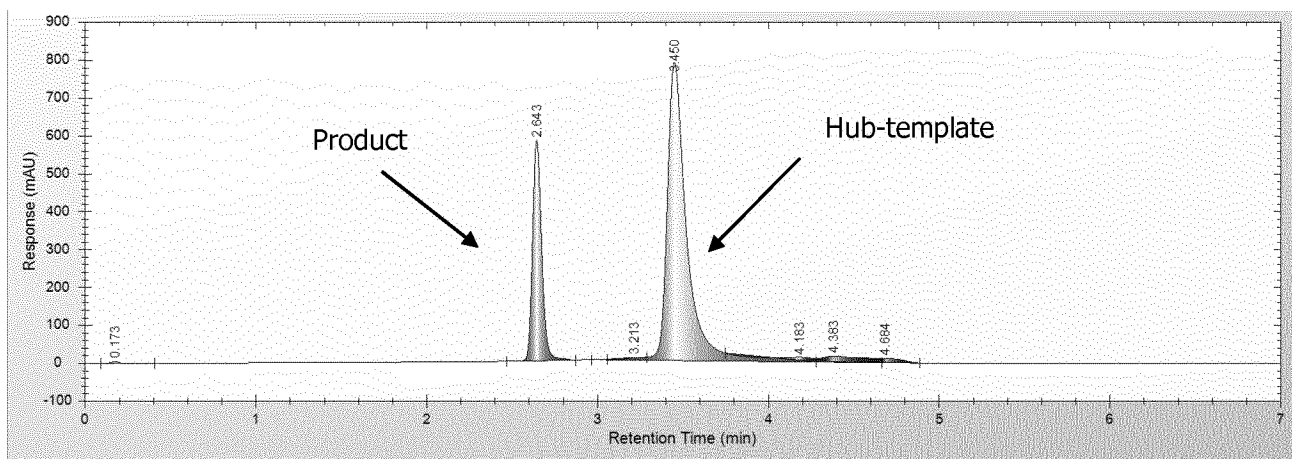


Figure 16

(a)



(b)

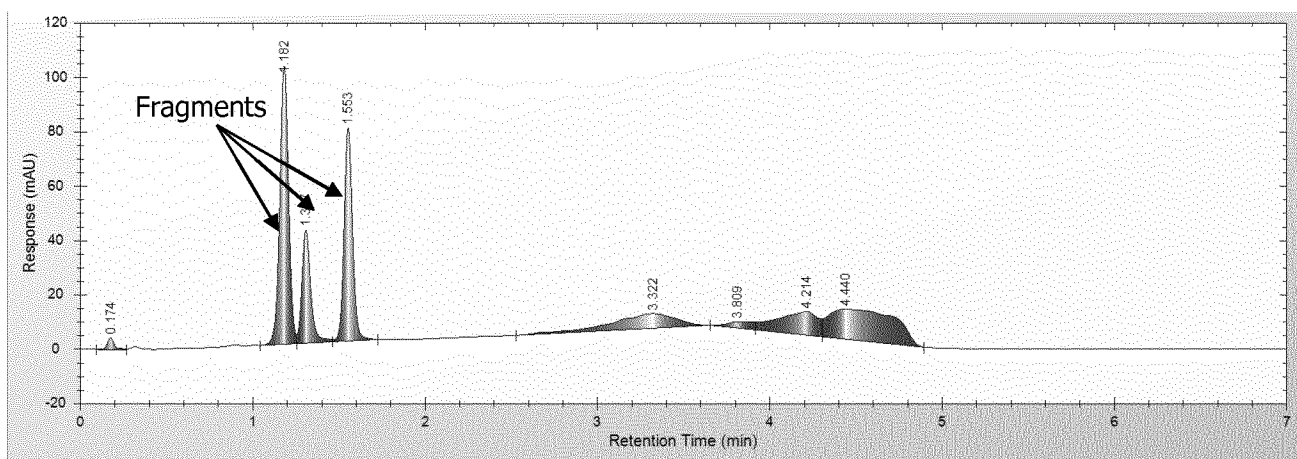
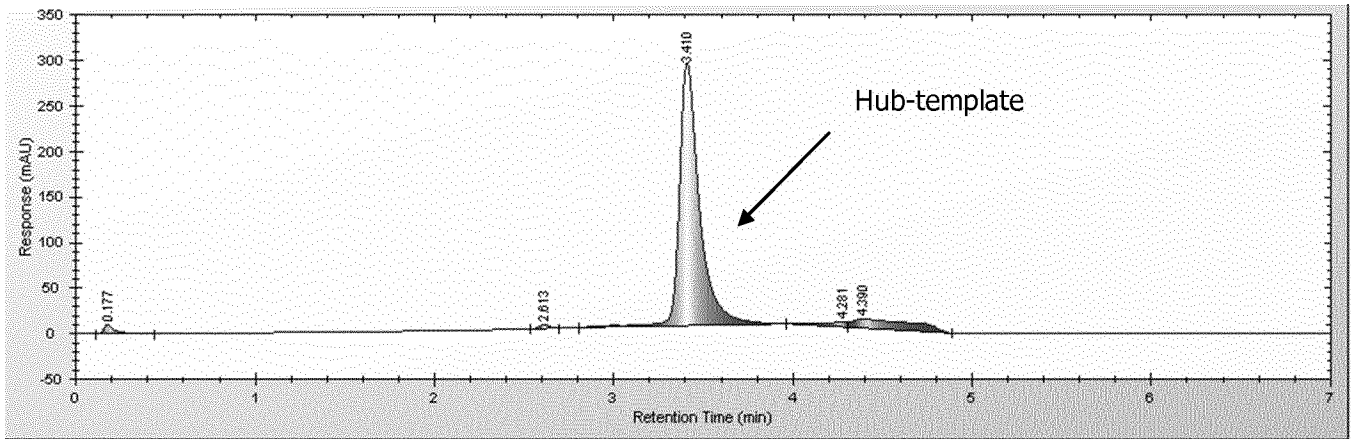
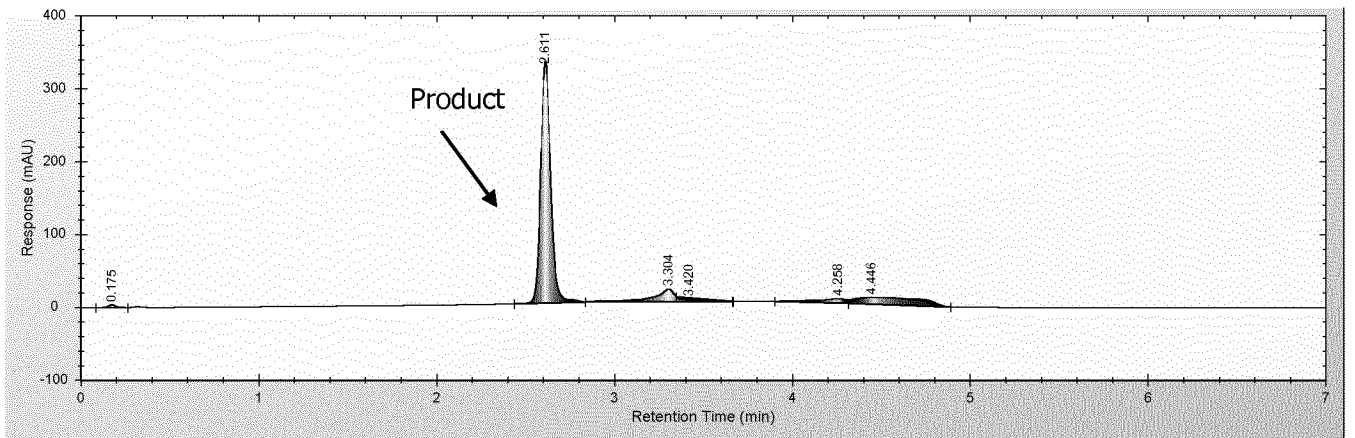


Figure 17

(a)



(b)



EX5929R – TRADUZIONE LEGENDE

Figure 1-17

Figure: figura

Fig. 1

Template	Stampo
Anneal under conditions that only product binds to template	Riassociare in condizioni in cui solo il prodotto si lega allo stampo
Wash out impurities	Lavare via le impurezze
Change conditions to release product	Cambiare le condizioni per rilasciare il prodotto
Isolate released product	Isolare il prodotto rilasciato

Fig. 2

Template	Stampo
Anneal fragments to template	Riassociare i frammenti allo stampo
Ligate templated fragments	Ligare frammenti con stampo
<ol style="list-style-type: none"> 1) Change conditions to release incorrect or incomplete ligation products 2) Remove incorrect or incomplete ligation products 3) Change conditions to release product 4) Isolate released product 	<ol style="list-style-type: none"> 1) cambiare le condizioni per rilasciare prodotti di ligazione errati o incompleti 2) rimuovere prodotti di ligazione errati o incompleti 3) cambiare le condizioni per rilasciare il prodotto 4) isolare il prodotto rilasciato

Fig. 3

Single template	Stampo singolo
Repeating template	Stampo ripetuto
Linker	Associatore

Fig. 4

Template	Stampo
Fragments	Frammenti
Ligation	Ligazione
Release impurities	Rilasciare le impurezze
Impurities	Impurezze
Release product	Rilasciare il prodotto
Product	Prodotto

Fig. 5a-c

Ligation chemistry step	Passaggio di chimica di ligazione
-------------------------	-----------------------------------

Oligo building blocks in water and buffer	Blocchi di partenza di oligo in acqua e tampone
Ligation purification step	Passaggio di purificazione di ligazione
Water	Acqua
Output from ligation step	Uscita da passaggio di ligazione
Ultrafiltration membrane	Membrana di ultrafiltrazione
Template oligo in water	Oligo stampo in acqua
Ligation step	Passaggio di ligazione
Beads immobilized enzyme	Enzima immobilizzato su perle
Collection vessel	Recipiente di raccolta
Collection vessel for impurities	Recipiente di raccolta per impurezze
Collection vessel for product	Recipiente di raccolta per prodotto

Fig. 5d

Pressure transducer	Trasduttore di pressione
Cellulose beads column	Colonna di perle di cellulosa
Collection tank	Serbatoio di raccolta
Feed vessel	Recipiente di alimentazione
HPLC pump	Pompa per HPLC
Heat exchanger	Scambiatore di calore
Gear pump	Pompa a ingranaggi
Filtration unit	Unità di filtrazione
Sampling valve	Valvola di campionamento
Pressure gauge	Manometro
Peristaltic pump	Pompa peristaltica
Buffer tank	Serbatoio del tampone
Permeate collector	Raccogliatore di permeato

Fig. 6

gaps or overlaps arising from missing or additional nucleotides	Lacune o sovrapposizioni derivanti da nucleotidi mancanti o aggiuntivi
Template	Stampo
Gap	Lacuna
Overlap	Sovrapposizione
Impurities arising from missing or additional nucleotides	Impurezze derivanti da nucleotidi mancanti o aggiuntivi

Fig. 7

Normalized response	Risposta normalizzata
5' fragment	Frammento 5'
3' fragment	Frammento 3'
Centre	Centro
NEB wash	Lavaggio NEB
Intermediate	Intermedio
Product	Prodotto
Template	Stampo
NEB reaction	Reazione NEB
Retention time	Tempo di ritenzione
Chromatograms normalized	Cromatogrammi normalizzati

Fig. 8

Normalized response	Risposta normalizzata
5' fragment	Frammento 5'
3' fragment	Frammento 3'
Centre	Centro
GSK wash	Lavaggio GSK
Intermediate	Intermedio
Product	Prodotto
Template	Stampo
GSK reaction	Reazione GSK
Retention time	Tempo di ritenzione
Chromatograms normalized	Cromatogrammi normalizzati

Fig. 9

Experiment	Esperimento
3' fragment	Frammento 3'
2'MeO substituted	Sostituito con 2'MeO
Wavelength	Lunghezza d'onda
Product DNA	DNA prodotto
Product	Prodotto
Biotin-template	Biotina-stampo
5' fragment	Frammento 5'

All fragments 2'OMe substituted	Tutti i frammenti sostituiti con 2'OMe
---------------------------------	--

Fig. 10a

No ligase control	Controllo senza ligasi
MOE centre fragment	Frammento centrale MOE
MOE 5' fragment	Frammento 5' MOE
MOE 3' fragment	Frammento 3' MOE
Template	Stampo

Fig. 10b

Template + product	Stampo + prodotto
MOE centre fragment	Frammento centrale MOE
MOE 5' fragment	Frammento 5' MOE
MOE 3' fragment	Frammento 3' MOE
Intermediates	Intermedi

Fig. 11

Hub	Nucleo
Template	Stampo

Fig. 12

Peristaltic pump	Pompa peristaltica
Cellulose bead column	Colonna di perle di cellulosa
Collection tank	Serbatoio di raccolta
HPLC pump	Pompa per HPLC
Heat exchanger	Scambiatore di calore
Feed vessel	Recipiente di alimentazione

Fig. 13

Stirrer	Agitatore
Membrane	Membrana
Porous plate	Piastra porosa
O-rings	O-rings
Permeate outlet	Uscita permeato
N2 supply	Alimentazione N2
MET cell	Cella MET
Heating bath	Bagno riscaldante

Measuring cylinder	Cilindro di misurazione
Magnetic stirrer/heater	Agitatore/riscaldatore magnetico

Fig. 14

Hot stirring plate	Piastra agitante calda
HPLC pump	Pompa per HPLC
Gear pump	Pompa ad ingranaggi
Feed vessel	Recipiente di alimentazione
Filtration unit	Unità di filtrazione
Sampling valve	Valvola di campionamento
Pressure gauge	Manometro
Permeate collector	Raccoglitore di permeato

Fig. 15

Product	Prodotto
Response	Risposta
Hub-template	Nucleo-stampo
Retention time	Tempo di ritenzione

Fig. 16

Product	Prodotto
Response	Risposta
Hub-template	Nucleo-stampo
Retention time	Tempo di ritenzione
Fragments	Frammenti

Fig. 17

Response	Risposta
Hub-template	Nucleo-stampo
Retention time	Tempo di ritenzione
Product	Prodotto