

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3352584 DAL TITOLO:

"COMPOSIZIONI E METODI PER SINTETIZZARE RNA CON CAP 5'"

Depositata il:

\*\* \* \*\*

#### DESCRIZIONE

#### CAMPO

La presente invenzione descrive metodi e composizioni per la sintesi di RNA con cap 5'. In particolare, l'invenzione fornisce un nuovo cap che contiene i primer oligonucleotidici di inizio che hanno strutture naturali o modificate 5'-Cap 0, Cap 1, Cap 2 o trimetilguanosa-Cap (TMG-Cap). L'invenzione inoltre fornisce metodi per generare e usare efficientemente gli stessi per la preparazione di RNA con cap 5'.

#### FONDAMENTO

La seguente descrizione è fornita per aiutare la comprensione del lettore. Nella presente invenzione nessuna delle informazioni fornite o dei riferimenti citati è riconosciuta come tecnica anteriore.

L'RNA messaggero (mRNA), che codifica proteine fisiologicamente importanti per applicazioni terapeutiche, ha mostrato vantaggi significativi rispetto ai vettori plasmidici e virali basati sul DNA per il rilascio di materiale genetico. I più importanti di questi vantaggi sono:

- (i) alto livello di sicurezza (riduce il potenziale danno al genoma da integrazione virale o plasmidica),
- (ii) il rilascio dell'mRNA porta all'espressione immediata della proteina (a differenza delle risposte ritardate che generalmente si verificano con i plasmidi),
- (iii) l'mRNA permette un forte controllo dose-dipendente sull'espressione delle proteine e
- (iv) la semplicità della sintesi su larga scala di mRNA rispetto alla produzione di vettori plasmidici e virali.

Gli RNA messaggeri possono essere codificati praticamente per qualsiasi proteina nota e possono essere rilasciati in tessuti e organi specifici con una varietà di metodi noti agli esperti nella tecnica. Una volta rilasciati, questi mRNA dirigono l'espressione della proteina ribosomiale all'interno dei tessuti mirati con conseguente produzione di molte centinaia di proteine per molecola di mRNA.

Diversi elementi strutturali, presenti in ogni molecola di mRNA attivo, sono utilizzati per tradurre le proteine codificate in modo efficiente. Uno di questi elementi è una struttura Cap sull'estremità 5' degli mRNA, che è presente in tutti gli organismi eucarioti (e in alcuni virus). Le strutture Cap presenti in natura comprendono un residuo ribo-guanosina che è metilato in posizione N7 della base guanina. Questa 7-metilguanosa (<sup>m</sup>G) è

legata tramite una catena da 5'- a 5'-trifosfato all'estremità 5'- della molecola di mRNA. In tutta la presente domanda, 7m e m7 sono usati in modo intercambiabile con significato equivalente. La presenza del frammento  $7^m\text{Gppp}$  sull'estremità 5' è essenziale per la maturazione dell'mRNA, esso:

protegge gli mRNA dalla degradazione da parte delle esonucleasi,

facilita il trasporto degli mRNA dal nucleo al citoplasma e

svolge un ruolo chiave nell'assemblaggio del complesso di iniziazione della traduzione (*Cell* 9:645-653, (1976); *Nature* 266:235, (1977);

*Federation of Experimental Biologists Society Letter* 96:1-11, (1978); *Cell* 40:223-24, (1985); *Prog. Nuc. Acid Res.* 35:173-207 (1988); *Ann. Rev. Biochem.* 68:913-963, (1999) *J. Biol. Chem.* 274:30337-3040 (1999)).

Solo gli mRNA che portano la struttura Cap sono attivi nella traduzione Cap dipendente; l'"eliminazione del cap" degli mRNA provoca una perdita quasi completa della loro attività di stampo per la sintesi proteica (*Nature*, 255:33-37, (1975); *J. Biol. Chem.*, vol. 253:5228-5231, (1978); e *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:1189-1193 (1975)).

Un altro elemento dell'mRNA eucariotico è la presenza di residui nucleotidici 2'-O-metile in posizione 1 del trascritto (Cap 1), e in alcuni casi, in posizione 1 e 2 del trascritto (Cap 2). La 2'-O-metilazione dell'mRNA è necessaria per una maggiore efficacia della traduzione dell'mRNA *in vivo* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3952-3956 (1980)) e migliora ulteriormente la stabilità nucleasica dell'mRNA con cap 5'. L'mRNA con Cap 1 (e Cap 2) è un segno distintivo che permette alle cellule di riconoscere l'estremità 5' dell'mRNA in *buona fede* e, in alcuni casi, di discriminare i trascritti provenienti da elementi genetici infettivi (*Nucleic Acid Research* 43: 482-492 (2015)).

Un trascritto primario di mRNA porta un gruppo 5'-trifosfato (5'-pppmRNA) risultante dall'inizio della sintesi di RNA a partire da NTP (tipicamente GTP) *in vivo*. La conversione dell'estremità 5'-trifosforilata del trascritto dell'mRNA in una struttura Cap (Cap 0) avviene attraverso diverse fasi enzimatiche (*J. Biol. Chem.*, 250:9322, (1975); *J. Biol. Chem.*, 271:11936, (1996); *J. Biol. Chem.*, 267:16430, (1992)). Queste fasi di reazioni enzimatiche includono:

Fase 1: la RNA trifosfatasi converte il 5'-trifosfato dell'mRNA in un 5'-difosfato,  $pppN_1(pN)_x \rightarrow ppN_1(pN)_x + \text{fosfato inorganico}$ ;

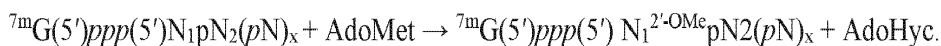
Fase 2: la RNA guaniltransferasi usa il GTP per trasferire un residuo GMP al 5'-difosfato dell'mRNA,  $ppN_1(pN)_x + \text{GTP} \rightarrow G(5')ppp(5')N_1(pN)_x + \text{pirofosfato inorganico}$ ; e

Fase 3: la guanina-7-metiltransferasi, usa la S-adenosil-metionina (AdoMet) come cofattore e trasferisce il gruppo metile da AdoMet all'azoto 7 della base guanina,  $G(5')ppp(5')N_1(pN)_x + \text{AdoMet} \rightarrow 7^mG(5')ppp(5')N_1(pN)_x + \text{AdoHyc}$ .

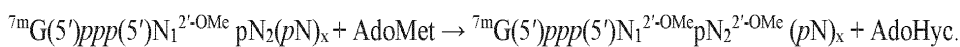
L'RNA che deriva da queste attività enzimatiche è indicato come " RNA con cap 5' " o "RNA con cap", e la combinazione di enzimi coinvolti in

questo processo che determina la formazione di "RNA con cap" è indicata come "enzimi di capping ". Gli enzimi di capping, comprese le forme clonate di tali enzimi, sono stati identificati e purificati da molte fonti e sono ben noti nella tecnica (*Prog. Acid Res. J. Mol. Biol.* 66:1-40 (2001); *Prog. Nucleic Acid Res. J. Mol. Biol.* 50:101-129, (1995); e *Microbiol. Rev.* 44:175, 1980)). L'RNA con cap che risulta dall'aggiunta del nucleotide cap all'estremità 5' dell'RNA primario da parte degli enzimi di capping è stato definito come RNA con cap con una "struttura Cap 0" (*J. Biol. Chem.*, 269:14974-14981, (1994); *J. Biol. Chem.*, 271:11936-11944 (1996)). Gli enzimi di capping sono stati usati per sintetizzare RNA con cap con una struttura Cap 0 *in vitro* (*J. Biol. Chem.*, 255:11588, (1980); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9573, (1997); *J. Biol. Chem.*, 267:16430, (1992); *J. Biol. Chem.*, 269:14974, (1994); e *J. Biol. Chem.*, 271:11936, (1996)).

L'RNA con cap con una struttura 5'-Cap 0 può essere ulteriormente trasformato *in vivo* in una struttura "Cap 1" dall'azione della (nucleoside-2'-O-) metiltransferasi (*J. Biol. Chem.*, 269:14974-14981, (1994); *J. Biol. Chem.* 271:11936-11944, (1996); e *EMBO* 21:2757-2768, (2002)). Per esempio, la mRNA (nucleoside-2'-O) metiltransferasi del virus vaccinia può catalizzare la metilazione del gruppo 2'-idrossile del penultimo nucleotide 5' dell'RNA con cap 5' avente struttura Cap 0 mediante la seguente reazione



È stato riportato che gli RNA con cap dimetilati con una struttura Cap 1 sono tradotti in modo più efficiente rispetto agli RNA con cap con una struttura Cap 0 (*Nucleic Acids Res.* 26:3208, (1998)). Le cellule eucariotiche utilizzano un'altra (nucleoside-2'-O) metiltransferasi (per esempio hMTR2 nelle cellule umane (*Nucleic Acids Res.* 39:4756 (2011)) per catalizzare la metilazione del gruppo 2'-idrossile del secondo nucleotide trascritto dell'RNA con cap 5' per convertire la struttura Cap 1 in una struttura Cap 2 mediante la seguente reazione:



Circa il 50% degli mRNA eucariotici hanno una struttura Cap 2.

Al fine di produrre lunghi RNA funzionali per vari studi biologici, un metodo di sintesi enzimatica *in vitro* di RNA primario è stato sviluppato a metà degli anni '80 (*Methods Enzymol.* 180:51-62 (1989); *Nucl. Acids Res.*, 10:6353-6362, (1982); *Meth. Enzymol.* 180:42-50 (1989) *Nucl. Acids Res.*, 12:7035-7056, (1984) e *Nucleic Acid Research* 15: 8783:8798, (1987)).

Dopo la trascrizione *in vitro*, il trascritto primario dell'mRNA che porta il gruppo 5'-trifosfato può essere ulteriormente sottoposto a capping con enzimi di capping. Tuttavia, il 5'-capping enzimatico *in vitro* è costoso, laborioso, inefficiente e difficile da controllare.

In considerazione di questi svantaggi, un altro metodo è stato sviluppato per la sintesi *in vitro* di mRNA con cap in cui un dinucleotide sintetizzato chimicamente  $^7\text{mG}(5')\text{ppp}(5')\text{G}$  (indicato anche come mCAP) è usato per iniziare la trascrizione (*RNA* 1: 957:967, (1995)). Il dinucleotide mCAP contiene la struttura 5'-Cap 0 dell'mRNA maturo ma non ha nucleosidi 2'-O-metilati caratteristici delle strutture Cap 1 e Cap 2.

Tuttavia, ci sono due svantaggi principali attribuiti all'inizio della trascrizione *in vitro* usando il dinucleotide sintetico mCAP. Il primo è una forte competizione tra mCAP e pppG per l'inizio della sintesi dell'mRNA. Quando l'mRNA è iniziato con pppG il ppp-mRNA risultante è inattivo nella traduzione e immunogeno a causa della presenza del 5'-trifosfato. Corrispondentemente, quando l'mRNA è iniziato con mCAP il risultante mRNA con cap 5' è attivo nella traduzione e non è altrettanto immunogeno.

Per migliorare il rapporto tra mRNA con cap 5' e 5'- senza cap (o 5'-trifosforilati; pppmRNA), si deve usare un eccesso di  $^7\text{mGpppG}$  rispetto pppG (da 4:1 a 10:1) per favorire la produzione di trascritti di mRNA con struttura 5'-Cap (fino all'80-90%). Il lato negativo di questo approccio è una significativa riduzione della resa complessiva di mRNA a causa di un rapido esaurimento della fornitura di GTP durante la trascrizione e una necessità di grandi quantità di un dimero sintetico mCAP che può essere costoso. Dopo la trascrizione è necessario un ulteriore trattamento della miscela grezza, contenente sia mRNA con cap 5' che 5'-pppmRNA, con fosfatasi alcalina per rimuovere i gruppi 5'-trifosfato senza cap dal pppmRNA al fine di ridurre l'immunogenicità dell'mRNA sintetizzato. La forma senza cap 5'-OH dell'mRNA ottenuta dopo il trattamento con la fosfatasi è inattiva e non partecipa al processo di traduzione.

Un altro svantaggio, un'iniziazione bidirezionale, può sorgere quando si usa un dinucleotide mCAP non simmetrico. C'è una tendenza del gruppo 3'-idrossile della parte caratteristica G o  $^7\text{mG}$  di  $^7\text{mGpppG}$  a servire come punto di inizio per l'allungamento trascrizionale con una probabilità quasi uguale. Porta tipicamente alla sintesi di due RNA isomerici della forma  $^7\text{mG}(5')\text{pppG}(\text{pN})_n$  e  $\text{G}(5')\text{ppp}^7\text{mG}(\text{pN})_n$ , in percentuali approssimativamente uguali, secondo le condizioni della reazione di trascrizione (*RNA* 1: 957:967, (1995)).

Per eliminare l'iniziazione bidirezionale della sintesi di mRNA con il dinucleotide mCAP è stato sviluppato un nuovo analogo mCAP modificato in cui il gruppo 3'-OH del residuo  $^7\text{mG}$  è sostituito con  $\text{OCH}_3$  ("OMe"):  $^7\text{mG}(3'\text{-O-Me})\text{pppG}$  (noto anche come Anti-Reverse Cap Analog (ARCA)). ARCA inizia la sintesi dell'mRNA solo nel corretto orientamento senso (*RNA* 7:1486-1495 (2001)). Diversi tipi di analoghi ARCA sono noti nella tecnica (vedi, per esempio, brevetto U.S. N. 7.074.596). Tuttavia, un grande eccesso molare di ARCA rispetto pppG è ancora necessario per garantire che la maggior parte delle molecole di trascritto di mRNA abbiano la struttura 5'-Cap. Un ulteriore svantaggio è che un mRNA con una

struttura Cap 1 non può essere sintetizzato usando un dimero Cap  $7^m\text{GpppG}^{2\text{-OMe}}$  (RNA 1: 957, (1995)) o il suo analogo ARCA.

Attualmente, le vie conosciute per la produzione di mRNA lunghi attivi contenenti una struttura Cap 1 consistono del capping enzimatico e 2'-O-metilazione enzimatica del trascritto mRNA 5'-trifosforilato o 2'-O-metilazione enzimatica del precursore mCAP con cap o ARCA con cap (Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, 25:337-340, (2006) e Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 25(3):307-14, (2006)). Entrambi gli approcci sono abbastanza laboriosi, difficili da controllare e, anche con una sostanziale ottimizzazione, nessuno dei due approcci può garantire una alta resa di un precursore di mRNA con cap e metilato (J. Gen. Virol., 91:112-121 (2010)). Inoltre, i metodi per preparare mRNA con una struttura Cap 2 sono ancora più difficili e i risultati sono meno prevedibili. Gli enzimi per convertire il Cap 1 in Cap 2 non sono attualmente disponibili in commercio.

Un'altra complicazione significativa della sintesi *in vitro* di mRNA, specialmente nella produzione su larga scala, è la necessità di isolare e purificare le molecole di mRNA attive che portano Cap da tutte le forme di mRNA senza cap che sono inattive e in alcuni casi immunogene. Sfortunatamente, questi metodi non sono banali e spesso richiedono una sintesi di analoghi mCAP modificati con parti caratteristiche tag di affinità coniugate che permettono un più facile isolamento e purificazione del trascritto RNA con cap. I metodi di sintetizzazione degli analoghi di mCAP con tag di affinità come reporter/affinità e i nuovi protocolli per l'isolamento dell'RNA con cap dalla miscela di reazione di trascrizione sono noti nell'arte (vedi, per esempio, brevetto U.S. N. 8.344.118). Sebbene questi approcci sono efficienti, richiedono l'uso di analoghi mCAP più costosi e permettono la preparazione e l'isolamento di mRNA contenenti solo la struttura Cap 0.

La sintesi *in vitro* di RNA naturali e modificati trova uso in una varietà di applicazioni, tra cui ribozima, antisenso, studi biofisici e biochimici. Inoltre, i trascritti di mRNA con cap sono utilizzati per applicazioni che richiedono la sintesi proteica, come gli esperimenti di espressione *in vivo* (utilizzando la microiniezione, la trasfezione e l'infezione), gli esperimenti di traduzione *in vitro* e i saggi, nonché varie applicazioni terapeutiche, diagnostiche, lo sviluppo di vaccini, marcatura e il rilevamento.

WO 2008/016473 A2 descrive analoghi del cap che sono metilati nella posizione N7 di una o entrambe le guanosine del cap dinucleotidico così come nella posizione 3' dell'anello di ribosio. I gruppi sostituenti sull'anello di ribosio fanno sì che il cap sia incorporato nell'orientamento senso.

WO 2008/016473 A2 fornisce anche metodi per la preparazione degli analoghi con cap e sono contemplati anche metodi di utilizzo di specie di mRNA contenenti tali analoghi.

WO 2009/058911 A2 riguarda la sintesi di RNA con cap /con tag e i metodi di utilizzo.

Thillier et al. ("Synthesis of 5' cap-0 and cap-1 RNA using solid-phase chemistry coupled with enzymatic methylation by human (guanine-N7)-

methyl transferase", RNA, vol. 18, no. 4, pagine 856-868) spiega come hanno combinato un metodo di sintesi chimica e un saggio di metilazione enzimatica per produrre oligonucleotidi di RNA che portano un cap-0 o un cap-1. RNA corti sono stati sintetizzati su supporto solido tramite la fosforilazione del 5'-OH terminale e l'attivazione tramite imidazolo. Dopo la deprotezione e il rilascio dal supporto, i GpppN-RNA o i GpppN<sub>2'-Om</sub>-RNA sono stati purificati prima che il gruppo N<sup>7</sup>-metilico venisse aggiunto per via enzimatica utilizzando la (guanina-N<sup>7</sup>)-metil transferasi umana per produrre <sup>7m</sup>GpppN-RNA (cap-0) o <sup>7m</sup>GpppN<sub>2'-Om</sub>-RNA(cap-1). Gli RNA che portano diverse strutture cap (cap, cap-0 o cap-1) agiscono come substrati bona fide che imitano gli RNA con cap cellulari e possono essere utilizzati per studi biochimici e strutturali.

Sawai et al. ("Synthesis and Reactions of Nucleoside 5'-Diphosphate Imidazolide. A Nonenzymatic Capping Agent for 5'-Monophosphorylated Oligoribonucleotides in Aqueous Solution", Journal of Organic Chemistry, vol. 64, n. 16, pagine 5836-5840) descrive la sintesi di adenosina e 7-metilguanosa 5'-difosfato imidazolide da imidazolo e i corrispondenti nucleosidi 5'-difosfati. Sawai et al. spiegano che il legame fosforimidazolide dei composti era soggetto all'idrolisi e idrolizzato gradualmente in soluzione acquosa neutra, ma era più stabile di quello dei corrispondenti imidazolide del nucleoside 5'-monofosfato. La metilguanosa 5'-difosfato imidazolide ha reagito con guanosa 5'-monofosfato o oligoribonucleotidi 5'-monofosforilati in soluzione acquosa neutra in presenza di un catalizzatore ionico Mn<sup>2+</sup> che converte la porzione cap di mRNA o nei m<sup>7</sup>Gppp-oligoribonucleotidi con cap. La reazione di condensazione dell'imidazolide dell'adenosina 5'-difosfato con l'adenosina 5'-monofosfato è avvenuta in modo simile in soluzione acquosa neutra da parte di un catalizzatore ionico metallico bivalente come Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup>, producendo diadenosina 5',5'-trifosfato.

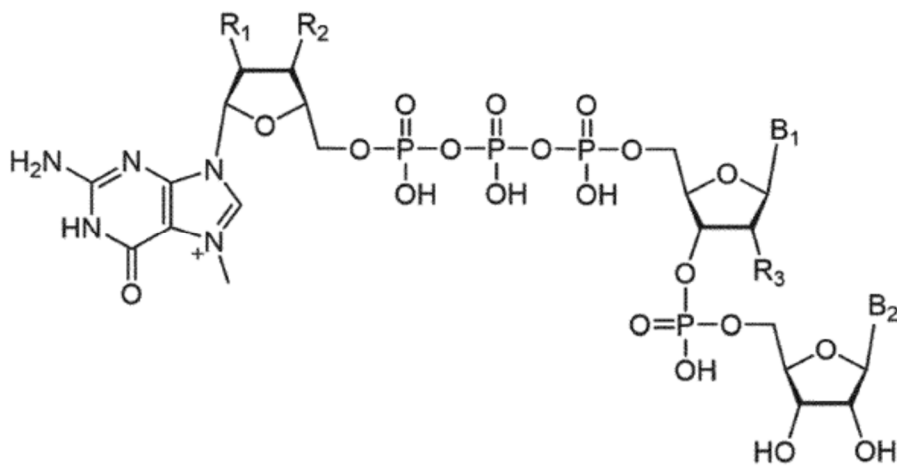
Koukhareva et al. ("Chemical Route to the Capped RNAs", Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, vol. 23, n. 10, pagine 1667-1680) riporta un approccio chimico convenzionale per la preparazione di quantità milligrammi di corti oligonucleotidi, di RNA con cap. Il metodo si basa sull'uso di un precursore reattivo, m<sup>7</sup>GppQ [P<sup>1</sup>-7-metilguanosa-5'-O-ile, P<sup>2</sup>-O-8-(5-clorochinilil)pirofosfato]. Il precursore reagisce con corto RNA 5'-fosforilato non protetto in presenza di CuCl<sub>2</sub> in mezzi organici. Koukhareva et al. dimostrano la fattibilità dell'approccio con la sintesi del pentaribonucleotide con cap m<sup>7</sup>GpppGpApCpU.

Di conseguenza, c'è necessità nell'industria di composizioni e metodi che consentono la sintesi su larga scala di mRNA che sono (a) meno laboriosi rispetto ai metodi convenzionali, (b) eliminano o riducono l'iniziazione bi-direzionale durante la trascrizione, (c) determinano rese più elevate di mRNA, ad un (d) costo ridotto rispetto ai metodi attuali, (e) riduce la produzione di prodotti eterogenei con sequenze 5' diverse e (f) non richiedono ulteriori reazioni enzimatiche per incorporare le strutture Cap 1 e Cap 2 nell'mRNA sintetizzato. Vi è necessità della sintesi di vari mRNA contenenti nucleosidi modificati e/o non naturali, che portano modificazioni specifiche e/o tag di affinità come coloranti fluorescenti, un

radioisotopo, un tag di massa e/o un partner di una coppia di legami molecolari come biotina a o vicino l'estremità 5' della molecola.

### RIEPILOGO

Sono forniti nella presente metodi e composizioni per sintetizzare RNA con cap 5'. In una funzione della presente invenzione, è fornito un complesso che comprende un primer oligonucleotidico con cap di inizio e uno stampo di DNA, il primer oligonucleotidico con cap di inizio che comprende la seguente struttura:



in cui

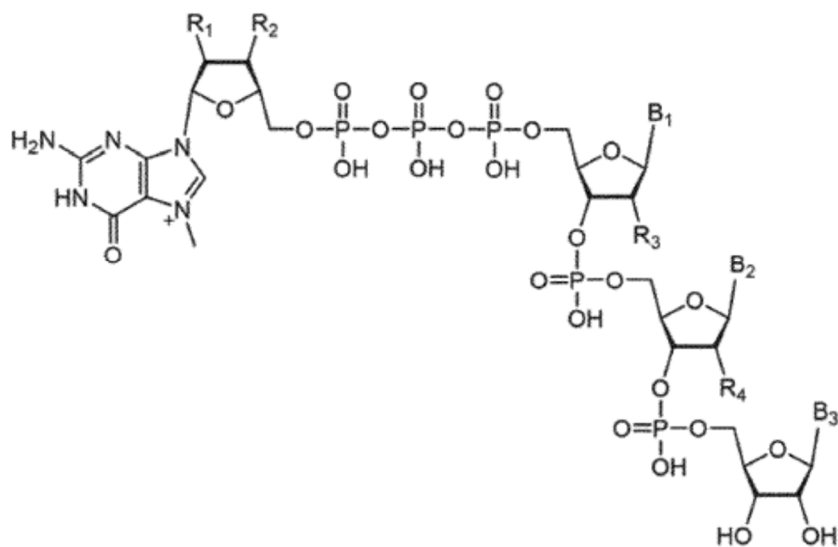
B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> sono indipendentemente una base nucleosidica naturale, modificata o non naturale;

R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> sono indipendentemente OH o O-metile; e

R<sub>3</sub> è OH o OMe,

in cui il DNA stampo comprende una regione promotore che comprende un sito di inizio trascrizionale con un primo nucleotide in posizione nucleotidica +1 e un secondo nucleotide in posizione nucleotidica +2; e in cui B<sub>1</sub> è completamente complementare alla base nucleosidica sullo stampo di acido nucleico in posizione stampo di trascrizione +1 e B<sub>2</sub> ibrida con il nucleotide in posizione +2.

In un altro aspetto della presente invenzione, è fornito un complesso che comprende un primer oligonucleotide con cap di inizio e uno stampo di DNA, in cui il primer oligonucleotide con cap di inizio comprende una struttura:



in cui

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> sono indipendentemente una base nucleosidica naturale, modificata o non naturale; e

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> sono indipendentemente OH o O-metile;

dove il DNA stampo comprende una regione promotore che comprende un sito di inizio trascrizionale con un primo nucleotide in posizione nucleotidica +1, un secondo nucleotide in posizione nucleotidica +2, e un terzo nucleotide in posizione nucleotidica +3;

e in cui B<sub>1</sub> è completamente complementare alla base nucleosidica sullo stampo di acido nucleico in posizione stampo di trascrizione +1, B<sub>2</sub> ibrida con il nucleotide in posizione +2 e B<sub>3</sub> ibrida con il nucleotide in posizione +3.

Sono inoltre forniti metodi per sintetizzare le molecole di RNA che comprendono un cap che contiene il primer oligonucleotidico di inizio della Formula I in una miscela che comprende uno stampo polinucleotidico e una RNA polimerasi in condizioni favorevoli alla trascrizione mediante RNA polimerasi dello stampo polinucleotidico e successivamente incubando la miscela risultante per un tempo sufficiente a consentire la trascrizione di detto stampo.

#### BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Figura 1 mostra un metodo esemplificativo di preparazione della 7-metilguanosina 5'-difosfato (pp<sup>7m</sup>G) dalla guanosina 5'-difosfato;

La Figura 2 mostra un metodo esemplificativo di preparazione della 7-metilguanosina 5'-difosfato imidazolido (Im-pp<sup>7m</sup>G) da pp<sup>7m</sup>G;

La Figura 3 mostra un metodo esemplificativo di preparazione della 3'-O-metilguanosina 5'-fosfato (pG3<sub>ome</sub>) dalla 3'-O-metilguanosina;

La Figura 4 mostra un metodo esemplificativo di preparazione della 3'-O-metilguanosina 5'-fosforimidazolide (Im-pG<sub>3'Ome</sub>) da pG<sub>3'Ome</sub>;

La Figura 5 mostra un metodo esemplificativo di preparazione della 3'-O-metilguanosina 5'-difosfato (ppG<sub>3'Ome</sub>) da Im-pG<sub>3'Ome</sub>;

La Figura 6 mostra un metodo esemplificativo per la preparazione di 7-metil-3'-O-metilguanosina 5'-difosfato (pp<sup>7m</sup>G<sub>3'Ome</sub>) da ppG<sub>3'Ome</sub>;

La Figura 7 mostra un metodo esemplificativo per la preparazione di 7-metil-3'-O-metilguanosina 5'-difosfato imidazolide (Im-pp<sup>7m</sup>G<sub>3'Ome</sub>) da pp<sup>7m</sup>G<sub>3'Ome</sub>;

La Figura 8 mostra una procedura generale per la preparazione di pN<sub>2-OR</sub>pN oligonucleotidi (R<sub>1</sub> = H o Me);

La Figura 9 mostra una procedura generale per la sintesi di oligonucleotidi di inizio con strutture Cap 0, Cap 1 o Cap 2;

La Figura 10A mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la Formula I in cui: B<sub>1</sub> è guanina; M è 0; L è 1; da q<sub>1</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è O-metile; X<sub>1</sub> è O; X<sub>2</sub> è O; X<sub>13</sub> è O; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è O; Z<sub>1</sub> è O; Z<sub>2</sub> è O; Z<sub>22</sub> è O;

La Figura 10B mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la Formula I in cui: B<sub>1</sub> è guanina; B<sub>10</sub> è guanina; M è 0; L è 1; q<sub>1</sub> è 1; da q<sub>2</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è H; X<sub>1</sub> è O; X<sub>2</sub> è O; X<sub>4</sub> è O; X<sub>13</sub> è O; Y<sub>1</sub> è OH; Y<sub>2</sub> è OH; Y<sub>4</sub> è OH; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è O; Z<sub>1</sub> è O; Z<sub>2</sub> è O; Z<sub>4</sub> è O; Z<sub>5</sub> è O; Z<sub>22</sub> è O; R<sub>4</sub> è O-metile;

La Figura 10C mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la Formula I in cui: B<sub>1</sub> è guanina; B<sub>10</sub> è guanina; M è 0; L è 1; q<sub>1</sub> è 1; da q<sub>2</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è O-metile; X<sub>1</sub> è O; X<sub>2</sub> è O; X<sub>4</sub> è O; X<sub>13</sub> è O; Y<sub>1</sub> è OH; Y<sub>2</sub> è OH; Y<sub>4</sub> è OH; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è O; Z<sub>1</sub> è O; Z<sub>2</sub> è O; Z<sub>4</sub> è O; Z<sub>5</sub> è O; Z<sub>22</sub> è O; R<sub>4</sub> è O-metile;

La Figura 10D mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la Formula I in cui: B<sub>1</sub> è adenina; B<sub>10</sub> è guanina; M è 0; L è 1; q<sub>1</sub> è 1; da q<sub>2</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è H; X<sub>1</sub> è O; X<sub>2</sub> è O; X<sub>4</sub> è O; X<sub>13</sub> è O; Y<sub>1</sub> è OH; Y<sub>2</sub> è OH; Y<sub>4</sub> è OH; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è O; Z<sub>1</sub> è O; Z<sub>2</sub> è O; Z<sub>4</sub> è O; Z<sub>5</sub> è O; Z<sub>22</sub> è O; R<sub>4</sub> è O-metile;

La Figura 10E mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la formula I in cui: B<sub>1</sub> è adenina; B<sub>10</sub> è guanina; M è 0; L è 1; q<sub>1</sub> è 1; da q<sub>2</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è O-metile; X<sub>1</sub> è O; X<sub>2</sub> è O; X<sub>4</sub> è O; X<sub>13</sub> è O; Y<sub>1</sub> è OH; Y<sub>2</sub> è OH; Y<sub>4</sub> è OH; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è O; Z<sub>1</sub> è O; Z<sub>2</sub> è O; Z<sub>4</sub> è O; Z<sub>5</sub> è O; Z<sub>22</sub> è O; R<sub>4</sub> è O-metile;

La Figura 10F mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la Formula I in cui: B<sub>1</sub> è citosina; B<sub>10</sub> è guanina; M è 0; L è 1; q<sub>1</sub> è 1; da q<sub>2</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è H; X<sub>1</sub> è O; X<sub>2</sub> è O; X<sub>4</sub> è O; X<sub>13</sub> è O; Y<sub>1</sub> è OH; Y<sub>2</sub> è OH; Y<sub>4</sub> è OH; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è O; Z<sub>1</sub> è O; Z<sub>2</sub> è O; Z<sub>4</sub> è O; Z<sub>5</sub> è O; Z<sub>22</sub> è O; R<sub>4</sub> è O-metile;

La Figura 10G mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la Formula I in cui: B<sub>1</sub> è citosina;

B<sub>10</sub> è guanina; M è 0; L è 1; q<sub>1</sub> è 1; da q<sub>2</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è O-metile; X<sub>1</sub> è 0; X<sub>2</sub> è O; X<sub>4</sub> è 0; X<sub>13</sub> è 0; Y<sub>1</sub> è OH; Y<sub>2</sub> è OH; Y<sub>4</sub> è OH; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è 0; Z<sub>1</sub> è O; Z<sub>2</sub> è 0; Z<sub>4</sub> è O; Z<sub>5</sub> è O; Z<sub>22</sub> è 0; R<sub>4</sub> è O-metile;

La Figura 10H mostra la struttura dei primer oligonucleotidici con cap di inizio utilizzati negli esempi secondo la Formula I in cui: B<sub>1</sub> è adenina; B<sub>2</sub> è guanina; B<sub>10</sub> è guanina; M è 0; L è 1; q<sub>1</sub> è 1; q<sub>2</sub> è 1; da q<sub>3</sub> a q<sub>9</sub> sono 0; R<sub>1</sub> è H; R<sub>2</sub> è H; R<sub>3</sub> è O-metile; X<sub>1</sub> è O; X<sub>2</sub> è O; X<sub>4</sub> è O; X<sub>5</sub> è O; X<sub>13</sub> è O; Y<sub>1</sub> è OH; Y<sub>2</sub> è OH; Y<sub>4</sub> è OH; Y<sub>5</sub> è OH; Y<sub>13</sub> è OH; Z<sub>0</sub> è 0; Z<sub>1</sub> è 0; Z<sub>2</sub> è O; Z<sub>4</sub> è 0; Z<sub>5</sub> è O; Z<sub>6</sub> è O; Z<sub>22</sub> è 0; R<sub>4</sub> è O-metile; R<sub>5</sub> è O-metile;

La Figura 11 mostra l'attività luciferasica degli mRNA sottoposti a capping co-trascrizionalmente;

Le Figure 12A-12H mostrano collettivamente l'efficienza di capping degli mRNA sottoposti a capping co-trascrizionalmente con 12A) ARCA, 12B) <sup>m7</sup>GpppG<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub>, 12C) <sup>m7</sup>G<sub>3</sub>OmepppG<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub>, 12D) <sup>m7</sup>GpppA<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub>, 12E) <sup>m7</sup>G<sub>3</sub>OmepppA<sub>2</sub>-OmeP<sub>G</sub>, 12F) <sup>m7</sup>GpppC<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub>, 12G) <sup>m7</sup>G<sub>3</sub>OmepppC<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub>, 12H) <sup>m7</sup>G<sub>3</sub>OmepppA<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub><sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub>. L'efficienza di capping nelle Figure 11B-11G è uguale o significativamente superiore a quella osservata nella figura 11A; e

Le Figure 13A-13D mostrano collettivamente l'efficienza di capping e la fedeltà di iniziazione degli mRNA sottoposti a capping co-trascrizionalmente con <sup>m7</sup>GpppA<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub> su uno stampo di trascrizione, in cui la Figura 13A illustra l'uso di residui 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina nelle posizioni +1 e +2 dello stampo usando la formulazione Primer/NTP 2; la Figura 13B illustra l'uso di residui 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina nelle posizioni +1 e +2 dello stampo usando la formulazione Primer/NTP 3; la Figura 13C illustra l'uso di residui 2'-deossitimidina nelle posizioni +1 e +2 dello stampo usando la formulazione Primer/NTP 2; e la Figura 13D illustra l'uso di residui 2'-deossicitidina nelle posizioni +1 e +2 dello stampo usando la formulazione Primer/NTP 3.

Le Figure 14A e 14B mostrano collettivamente il confronto della traduzione in cellule differenziate THP-1 di mRNA prodotto con oligonucleotide con cap di inizio <sup>m7</sup>GpppA<sub>2</sub>OmeP<sub>G</sub> su uno stampo di trascrizione con residui 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina nelle posizioni stampo +1 e +2 rispetto uno stampo di trascrizione con residui citidina nelle posizioni stampo +1 e +2.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Se non definito diversamente, tutti i termini usati qui hanno lo stesso significato che sono comunemente compresi da un esperto nella tecnica a cui appartiene la presente invenzione. Nel caso in cui ci sia una pluralità di definizioni per un termine, prevalgono quelle di questa sezione.

Come usato qui in relazione ai valori numerici, il termine "approssimativamente" o "circa" significa più o meno il 30% del valore indicato, compresi tutti i valori all'interno dell'intervallo definito, compreso il valore dichiarato.

Come usati nella presente, i termini "acido nucleico", "sequenza nucleotidica" o "sequenza di acido nucleico" si riferiscono ad un oligonucleotide,

polinucleotide o qualsiasi frammento di esso, qualsiasi ribo o deossiribo derivato e a molecole naturali o sintetiche contenenti residui nucleotidici naturali e/o modificati e legami internucleotidici. Queste frasi si riferiscono anche al DNA o all'RNA di origine naturale (*per esempio*, genomica) o sintetica che può essere a singolo, doppio, triplo o tetra filamento e può rappresentare il filamento senso o antisenso, o a qualsiasi materiale simile al DNA o all'RNA. Un "RNA equivalente", in riferimento a una sequenza di DNA, è composto dalla stessa sequenza lineare di nucleotidi della sequenza di DNA di riferimento con l'eccezione che tutte o la maggior parte delle occorrenze della base azotata timina sono sostituite da uracile, e lo scheletro zucchero consiste di ribosio invece di 2'-deossiribosio. Ulteriori scheletri alternativi di acido nucleico adatti per i metodi e le composizioni forniti qui includono ma non sono limitati a fosforotioato, fosforoselenoato, alchil fosfotriestere, aril fosfotriestere, alchilfosfonato, arilfosfonato, fosfoboronato, acido nucleico morfolinico (MNA), acidi nucleici bloccati (LNA), acidi nucleici peptidici (PNA).

Come usato qui, il termine "primer" o "primer oligonucleotidico" si riferisce ad un ribo- o deossiribo- o ribo/deossiribo-oligonucleotide chimerico, a singolo filamento, può essere naturale o sintetico, e solitamente include una sequenza compresa tra circa 2 e circa 10 nucleotidi, da circa 3 a circa 8 nucleotidi o da circa 3 a circa 5 nucleotidi. I primer oligonucleotidici possono contenere uno o più gruppi di modificazione. I primer oligonucleotidici possono includere RNA, DNA e/o altri nucleosidi modificati. L'esperto è in grado di progettare e preparare primer oligonucleotidici che sono adatti per la trascrizione della sequenza di DNA stampo.

Come usati nella presente, i termini "analoghi oligonucleotidici con cap di inizio" o "primer oligonucleotidici con cap di inizio" si riferiscono ad un primer oligonucleotidico di inizio contenente la struttura Cap 0, Cap 1, Cap 2 o TMG-Cap sull'estremità 5' del primer. Il primer con cap ha un gruppo 3'-OH non modificato o aperto e può essere esteso dalla RNA polimerasi attraverso l'incorporazione di un NTP sull'estremità 3' del primer. È in grado di avviare la trascrizione *in vitro* sotto il controllo di un promotore in un sistema di trascrizione contenente i componenti necessari: stampo di DNA (*ad es.*, DNA plasmidico), RNA polimerasi, nucleosidi 5'-trifosfati e tampone appropriato. Anche usato qui, "primer di inizio" o "primer oligonucleotide di inizio" si riferisce a un oligonucleotide che porta un gruppo 3'-OH terminale che è un substrato valido per la RNA polimerasi. In alcuni esempi, il primer oligonucleotidico di inizio è un substrato per l'RNA polimerasi e può essere allungato dall'incorporazione dell'NTP sull'estremità 3' del primer. Il primer oligonucleotidico di iniziazione è complementare allo stampo di DNA nel sito di inizio.

Come usata qui, l'espressione "non sostituito" o "non modificato" nel contesto del primer oligonucleotidico con cap di inizio e NTP si riferisce ad un primer oligonucleotidico con cap di inizio e NTP che non è stato modificato.

Come usata qui, l'espressione "primer oligonucleotide con cap di inizio modificato" si riferisce a un primer oligonucleotide con cap di inizio che contiene uno o più gruppi di modificazione aggiuntivi.

Come usata qui, l'espressione "gruppo di modificazione" si riferisce a qualsiasi parte caratteristica chimica che può essere attaccata al primer di inizio in posizioni, che includono, ma non sono limitate a, lo zucchero, la base nucleosidica, il ponte trifosfato, e/o il fosfato internucleotidico (*ad es.*, Domanda di Brevetto U.S. N. 20070281308). Il gruppo di modificazione di un primer oligonucleotidico con cap di inizio può essere un gruppo di qualsiasi natura compatibile con il processo di trascrizione.

Come usata qui, l'espressione "legame internucleotidico" si riferisce al legame o ai legami che legano due nucleosidi di un primer oligonucleotide o acido nucleico e può essere un legame fosfodiesterico naturale o un legame modificato.

Come usato qui, il termine "tracciante" o "tracciante rilevabile" si riferisce a qualsiasi composto o combinazione di composti che possono essere attaccati o altrimenti associati a una molecola in modo che la molecola possa essere rilevata direttamente o indirettamente rilevando il tracciante. Un tracciante rilevabile può essere un radioisotopo (*ad esempio*, carbonio, fosforo, iodio, indio, zolfo, trizio *ecc.*), un isotopo di massa (*ad esempio*, H<sup>2</sup>, C<sup>13</sup> o N<sup>15</sup>), un colorante o fluoroforo (*ad esempio*, cianina, fluoresceina o cumarina), un aptene (*ad esempio*, biotina) o qualsiasi altro agente che può essere rilevato direttamente o indirettamente.

Come usato qui, il termine "ibridare" o "ibridare in modo specifico" si riferisce ad un processo in cui il primer oligonucleotidico con cap di inizio si riassocia ad uno stampo di DNA in condizioni stringenti in modo adatto durante una reazione di trascrizione. Le ibridazioni con il DNA sono condotte con un primer oligonucleotidico con cap di inizio che, in certi esempi, è lungo 3-10 nucleotidi compresa la struttura 5'-5' del cap invertito. Le tecniche di ibridazione dell'acido nucleico sono ben note nella tecnica (*ad es.*, Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Seconda Edizione, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.(1989) Ausubel, F.M., *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J. (1994)).

Come usato qui, il termine "complemento", "complementare" o "complementarietà" nel contesto di un complesso di un primer oligonucleotidico con cap di inizio e uno stampo di DNA si riferisce alle regole standard di appaiamento delle basi di Watson/Crick. Per esempio, la sequenza "5'-A-G-T-C-3'" è complementare alla sequenza "3'-T-C-A-G-5'". Alcuni nucleotidi non naturali o sintetici possono essere inclusi negli acidi nucleici qui descritti; questi includono, senza limiti, nucleosidi, nucleotidi e acidi nucleici modificati da basi e zuccheri, come inosina, 7-deazaguanosina, 2'-O-metilguanosina, 2'-fluoro-2'-deossicitidina, pseudouridina, Acidi Nucleici Bloccati (LNA) e Acidi Nucleici Peptidici (PNA). La complementarietà non ha bisogno di essere perfetta; i duplex possono contenere coppie di basi spaiate, degenerate o nucleotidi non appaiati. Gli esperti nella tecnica possono determinare la stabilità del duplex empiricamente considerando una serie di variabili tra cui, per esempio, la lunghezza dell'oligonucleotide, la composizione e la sequenza delle basi dell'oligonucleotide, l'incidenza di coppie di basi non appaiate, la forza ionica, i

componenti del tampone di ibridazione e le condizioni di reazione.

La complementarità può essere "completa" o "totale" in cui tutte le basi nucleotidiche di due filamenti di acido nucleico sono appaiate secondo le regole di appaiamento delle basi riconosciute, può essere "parziale" in cui solo alcune delle basi nucleotidiche di un primer oligonucleotidico con cap di inizio e un target di DNA sono appaiate secondo le regole di appaiamento delle basi riconosciute, o può essere "assente" dove nessuna delle basi nucleotidiche di due filamenti di acido nucleico sono appaiate secondo le regole di appaiamento delle basi riconosciute. Il grado di complementarità tra un primer oligonucleotide con cap di inizio e uno stampo di DNA può avere un effetto significativo sulla forza di ibridazione tra l'oligonucleotide con cap di inizio e lo stampo di DNA e corrispondentemente l'efficienza della reazione. Il termine complementarità può anche essere usato in riferimento ai singoli nucleotidi. Per esempio, un particolare nucleotide all'interno di un oligonucleotide può essere notato per la sua complementarità, o la sua mancanza, con un nucleotide all'interno di un altro filamento, in contrasto o in confronto alla complementarità tra il resto di un primer oligonucleotide con cap di inizio e il filamento di DNA.

Come usato qui, il termine "completo", "totale" o "perfettamente" complementare significa che ciascuna delle basi nucleotidiche di un primer oligonucleotidico con cap di inizio e un target di DNA sono appaiati esattamente secondo le regole di accoppiamento delle basi riconosciute.

Come usato qui, il termine "sostanzialmente complementare" si riferisce a due sequenze che si ibridano in condizioni di ibridazione stringenti. Gli esperti nella tecnica capiranno che le sequenze sostanzialmente complementari non devono necessariamente ibridare lungo tutta la loro lunghezza. In particolare, le sequenze sostanzialmente complementari possono comprendere una sequenza contigua di basi che non ibridano con una sequenza target e possono essere posizionate 3' o 5' rispetto una sequenza contigua di basi che si ibridano in condizioni di ibridazione stringenti con la sequenza target.

Come usato qui, il termine "specifico" in riferimento a una sequenza di primer oligonucleotidico con cap di inizio e alla sua capacità di ibridare con uno stampo di DNA è una sequenza che ha almeno il 50% di identità di sequenza con una parte dello stampo di DNA quando il primer oligonucleotidico con cap di inizio e il filamento di DNA sono allineati. Livelli più alti di identità di sequenza che possono essere preferiti includono almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 99%, e preferibilmente il 100% di identità di sequenza.

Come usato qui, il termine "nucleoside" include tutti i nucleosidi presenti in natura, comprese tutte le forme di basi nucleosidiche e furanosidi trovate in natura. Basi cicliche che si trovano più comunemente nei nucleosidi naturali sono gli anelli purinici e pirimidinici. Gli anelli purinici naturali includono, per esempio, adenina, guanina e N<sup>6</sup>-metiladenina. Gli anelli pirimidinici naturali includono, per esempio, citosina, timina, 5-

metilcitosina, pseudouracile. I nucleosidi naturali, ad esempio, includono, ma non sono limitati a, ribo, 2'-O-metile o 2'-deossiribo derivati di adenosina, guanosina, citidina, timidina, uridina, inosina, 7-metilguanosina o pseudouridina.

Come usato qui, i termini "analoghi nucleosidici", "nucleosidi modificati" o "derivati nucleosidici" includono nucleosidi sintetici come descritto qui. I derivati nucleosidici includono anche i nucleosidi che hanno parti caratteristiche modificate base o/e zucchero, con o senza gruppi protettivi e includono, per esempio, 2'-deossi-2'-fluorouridina, 5-fluorouridina e simili. I composti e i metodi qui forniti includono tali basi cicliche e i loro analoghi sintetici, così come gli zuccheri base sostituiti da eterocicli non naturali e gli zuccheri base aciclici sostituiti. Altri derivati nucleosidici che possono essere utilizzati includono, per esempio, nucleosidi LNA, purine alogeno sostituite (*per esempio*, 6-fluoropurina), pirimidine alogeno sostituite, N<sup>6</sup>-etiladenina, N<sup>4</sup>-(alchil)-citosina, 5-etilcitosina, e simili (Brevetto U.S. N. 6.762.298).

Come usate qui, le espressioni "base universale", "base degenerata", "analogo della base universale" e "analogo della base degenerata" includono, per esempio, un analogo nucleosidico con una base artificiale che è, in certi esempi, riconoscibile dalla RNA polimerasi come sostituto di uno degli NTP naturali (*per esempio*, ATP, UTP, CTP e GTP) o altri NTP specifici. Le basi universali o degenerate sono descritte in Loakes, D., *Nucleic Acids Res.*, 29:2437-2447 (2001); Crey-Desbiolles, C., *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, 33:1532-1543 (2005); Kincaid, K., *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, 33:2620-2628 (2005); Preparata, FP, Oliver, JS, *J. Comput. Biol.* 753-765 (2004); e Hill, F., *et. al.*, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 95:4258-4263 (1998)).

Come usata qui, l'espressione "NTP modificato" si riferisce a un nucleoside 5'-trifosfato che ha un gruppo chimico parte caratteristica legato in qualsiasi posizione, compreso lo zucchero, la base, la catena trifosfato, o qualsiasi combinazione di queste tre posizioni. Esempi di tali NTP si possono trovare, per esempio in "Nucleoside Triphosphates and Their Analogs: Chemistry, Biotechnology and Biological Applications," Vaghefi, M., ed., Taylor and Francis, Boca Raton (2005).

Come usato qui, il termine "oligonucleotide modificato" include, per esempio, un oligonucleotide che contiene un nucleoside modificato, un legame internucleotidico modificato, o che ha qualsiasi combinazione di nucleosidi modificati e legami internucleotidici. Esempi di modificazioni del legame internucleotidico dell'oligonucleotide, inclusi i derivati fosforotioato, fosfotriestere e metilfosfonati (Stec, W.J., *et al.*, *Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:709-722 (1994); Lebedev, A.V., *et al.*, *E., Perspect. Drug Discov. Des.*, 4:17-40 (1996); e Zon, *et al.*, Domanda di Brevetto U.S. N. 20070281308). Altri esempi di modificazioni del legame internucleotidico possono essere trovati in Waldner, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem., Letters* 6:2363-2366 (1996).

Il termine "promotore" qui utilizzato si riferisce a una regione dell'dsDNA stampo che dirige e controlla l'inizio della trascrizione di una particolare sequenza di DNA (ad esempio un gene). I promotori si trovano sullo stesso filamento e a monte del DNA (verso la regione 5' del filamento senso). I

promotori sono tipicamente immediatamente adiacenti (o parzialmente sovrapposti) alla sequenza di DNA da trascrivere. Le posizioni dei nucleotidi nel promotore sono indicate rispetto al sito di inizio trascrizione, dove inizia la trascrizione del DNA (posizione +1). Il primer oligonucleotide di inizio è complementare al sito di iniziazione della sequenza del promotore (che, in alcuni esempi, è alle posizioni +1 e +2 e, nel caso di tetrameri di inizio, alle posizioni +1, +2 e +3).

Come usato qui, i termini "trascrizione" o "reazione di trascrizione" si riferiscono ai metodi noti nella tecnica per produrre enzimaticamente RNA che è complementare allo stampo di DNA, producendo così il numero di copie di RNA da una sequenza di DNA. La molecola di RNA sintetizzata nella reazione di trascrizione è chiamata "trascritto di RNA", "trascritto primario" o "trascritto". La reazione di trascrizione che coinvolge le composizioni e i metodi qui forniti impiega "primer oligonucleotidici con cap di inizio". La trascrizione dello stampo di DNA può essere esponenziale, non lineare o lineare. Uno stampo di DNA può essere un DNA lineare a doppio filamento, un DNA lineare parzialmente a doppio filamento, un DNA circolare a doppio filamento, un DNA plasmidico, un amplicone PCR, uno stampo di acido nucleico modificato che è compatibile con RNA polimerasi.

Come usato qui, il termine "acile" denota il gruppo  $-C(O)R^a$ , dove  $R^a$  è idrogeno, alchile a catena corta, cicloalchile, eterociclice, arile, eteroarile e simili.

Come usata qui, l'espressione "acile sostituito" denota il gruppo  $-C(O)R^a$ , in cui  $R^a$  è alchile a catena corta sostituito, cicloalchile sostituito, eterociclice sostituito, arile sostituito, eteroarile sostituito e simili.

Come usato qui, il termine "acilossi" denota il gruppo  $-OC(O)R^b$ , in cui  $R^b$  è idrogeno, alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, cicloalchile, cicloalchile sostituito, eterociclice, eterociclice sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, eteroarile sostituito, e simili.

Come usato qui, il termine "alchile" si riferisce a una catena idrocarburica a legame singolo che va, in alcuni esempi, da 1-20 atomi di carbonio, e che va, in alcuni esempi, da 1-8 atomi di carbonio; gli esempi includono metile, etile, propile, isopropile, n-butile, sec-butile, isobutile, terz-butile, pentile, isoamile, esile, ottile, dodecanile e simili.

Come usata qui, l'espressione "alchile a catena corta" si riferisce a una catena lineare o una catena ramificata idrocarburica che vanno, in alcuni esempi, da 1-6 atomi di carbonio, e che vanno in alcuni esempi da 2-5 atomi di carbonio. Gli esempi includono etile, propile, isopropile e simili.

Come usato qui, il termine "alchenile" si riferisce ad un idrocarburo a catena lineare o ramificata, che ha uno o più doppi legami e, se non diversamente specificato, contiene da circa 2 a circa 20 atomi di carbonio, e variando in alcuni esempi da circa 2 a circa 10 atomi di carbonio, e varia in alcuni esempi da circa 2 a circa 8 atomi di carbonio, e variando in alcuni esempi da circa 2 a circa 6 atomi di carbonio. Esempi di radicali

alchenilici includono vinile, allile, 1,4-butadienile, isopropenile e simili.

Come usato qui, il termine "alchenilarile" si riferisce ai gruppi arilici alchenil-sostituiti e "alchenilarile sostituito" si riferisce ai gruppi alchenilarile che portano inoltre uno o più sostituenti come esposto qui.

Come usato qui, il termine "alchenilene" si riferisce a gruppi idrocarbure bivalenti a catena lineare o ramificata aventi almeno un doppio legame carbonio-carbonio, e tipicamente contenenti 2-20 atomi di carbonio, e variano in alcuni esempi da 2-12 atomi di carbonio, e variano in alcuni esempi da 2-8 atomi di carbonio, e "alchenilene sostituito" si riferisce a gruppi alchenilene che portano inoltre uno o più sostituenti come esposto qui.

Come usato qui, il termine "alchilene" si riferisce al gruppo idrocarbure bivalente contenente 1-20 atomi di carbonio, e che varia in alcuni esempi da 1-15 atomi di carbonio, a catena lineare o ramificata, da cui due atomi di idrogeno sono presi dallo stesso atomo di carbonio o da atomi di carbonio diversi. Esempi di alchilene includono, ma non sono limitati a, metilene ( $-\text{CH}_2-$ ), etilene ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), e simili.

Come usato qui, il termine "alchinile" si riferisce ad un idrocarbure a catena lineare o ramificata, che ha uno o più tripli legami e contiene da circa 2-20 atomi di carbonio, e variando in alcuni esempi da circa 2-10 atomi di carbonio, e variano in alcuni esempi da circa 2-8 atomi di carbonio, e variano in alcuni esempi da circa 2-6 atomi di carbonio. Esempi di radicali alchinilici includono etinile, propinile (propargile), butinile e simili.

Come usato qui, il termine "alchilarile" si riferisce ai gruppi arilici alchinil-sostituiti e "alchilarile sostituito" si riferisce ai gruppi alchilarile che portano inoltre uno o più sostituenti come esposto qui.

Come usato qui, il termine "alcossi" denota il gruppo  $-\text{OR}^c$ , dove  $\text{R}^c$  è alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, arile, arile sostituito, aralchile, aralchile sostituito, eteroalchile, eteroarilalchile, cicloalchile, cicloalchile sostituito, cicloeteroalchile o cicloeteroalchile sostituito come definito.

Come usato qui, il termine "alcossi a catena corta" denota il gruppo  $-\text{OR}^d$ , dove  $\text{R}^d$  è un alchile a catena corta.

Come usato qui, il termine "alchilarile" si riferisce ai gruppi arile alchile sostituiti e "alchilarile sostituito" si riferisce ai gruppi alchilarile con uno o più sostituenti come indicato qui.

Come usato qui, il termine "alchiltio" si riferisce al gruppo  $-\text{S-R}^h$ , in cui  $\text{R}^h$  è alchile.

Come usato qui, il termine "alchiltio sostituito" si riferisce al gruppo  $-\text{S-R}^i$ , in cui  $\text{R}^i$  è un alchile sostituito.

Come usato qui, il termine "alchinilene" si riferisce a gruppi idrocarbure bivalenti a catena lineare o ramificata che hanno almeno un triplo legame carbonio-carbonio, e tipicamente aventi nell'intervallo di circa 2-12 atomi di carbonio, e variano in alcuni esempi da circa 2-8 atomi di carbonio, e

"alchilene sostituito" si riferisce a gruppi alchilenici con uno o più sostituenti come indicato qui.

Come usato qui, il termine "ammido" denota il gruppo  $-C(O)NR^jR^k$ , in cui  $R^j$  e  $R^k$  possono essere indipendentemente idrogeno, alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, alchile, alchile sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, o eteroarile sostituito.

Come usata qui, l'espressione "ammido sostituito" indica il gruppo  $-C(O)NR^kR^k$ , in cui  $R^k$  e  $R^k$  sono indipendentemente idrogeno, alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, o eteroarile sostituito, a condizione, tuttavia, che almeno uno tra  $R^k$  e  $R^k$  non sia idrogeno.  $R^kR^k$  in combinazione con l'azoto può formare un anello eterociclico o eteroarilico facoltativamente sostituito.

Come usato qui, il termine "ammino" o "ammina" denota il gruppo  $-NR^nR^n$ , in cui  $R^n$  e  $R^n$  possono essere indipendentemente idrogeno, alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, alchile, alchile sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, o eteroarile sostituito come definito qui. Una "ammina bivalente" indica il gruppo  $-NH-$ . Una "ammina bivalente sostituita" indica il gruppo  $-NR-$  in cui  $R$  è alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, alchile, alchile sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, o eteroarile sostituito.

Come usata qui, l'espressione "ammino sostituito" o "ammina sostituita" indica il gruppo  $-NR^pR^p$ , in cui  $R^p$  e  $R^p$  sono indipendentemente idrogeno, alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, alchile, alchile sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, eteroarile sostituito, purché, tuttavia, almeno uno tra  $R^p$  e  $R^p$  non sia idrogeno.  $R^pR^p$  in combinazione con l'azoto può formare un anello eterociclico o eteroarilico facoltativamente sostituito.

Come usato qui, il termine "arile" si riferisce alle specie aril-carboniliche come il benzoile e "arile sostituito" si riferisce ai gruppi arile che portano inoltre uno o più sostituenti come stabilito qui.

Come usato qui, il termine "arile" da solo o in combinazione si riferisce a fenile, naftile o eterociclico aromatico fuso opzionalmente con un cicloalchile di 5-10 membri nell'anello, e in alcuni esempi 5-6, membri nell'anello e/o opzionalmente sostituito con da 1 a 3 gruppi o sostituenti alogeno, idrossi, alcossi, alchilio, alchilsolfonile, alchilsolfonile, acilossi, arilossi, eteroarilossi, ammino facoltativamente mono- o di-sostituito con gruppi alchilici, arilici o eteroarilici, ammidino, urea facoltativamente sostituita con gruppi alchilici, arilici, eteroarilici o eterociclici, amminosolfonile facoltativamente N-mono- o N,N-di-sostituiti con gruppi alchilici, arilici o eteroarilici, alchilsolfonilammino, arilsolfonilammino, eteroarilsolfonilammino, alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, eteroarilcarbonilammino, o simili.

Come usato qui, il termine "arilossi" denota il gruppo  $-OAr$ , in cui  $Ar$  è un gruppo arile, o arile sostituito.

Come usato qui, il termine "carbociclo" si riferisce a un gruppo saturo, insaturo o aromatico che ha un anello singolo o più anelli condensati composti da atomi di carbonio legati. Gli anelli possono essere facoltativamente non sostituiti o sostituiti con, ad esempio, alogeno, alchile a catena

corta, alcossi, alchiltio, acetilene ( $-C=CH$ ), ammino, ammido, azido, carbossile, idrossile, arile, arilossi, eterociclo, eteroarile, eteroarile sostituito, nitro ( $-NO_2$ ), ciano ( $-CN$ ), tiolo ( $-SH$ ), solfammido ( $-S(O)_2NH_2$ , e simili).

Come usato qui, il termine "guanidinile" denota il gruppo  $-N=C(NH_2)_2$  e "guanidinile sostituito" denota il gruppo  $-N=C(NR_2)_2$ , in cui ogni R è indipendentemente H, alchile, alchile sostituito, arile o arile sostituito come indicato qui.

Come usato qui, il termine "alo" o "alogeno" si riferisce a tutti gli alogeni, cioè, cloro (Cl), fluoro (F), bromo (Br), e iodo (I).

Come usato qui, il termine "eteroarile" si riferisce a una struttura ciclica aromatica monociclica contenente 5 o 6 atomi nell'anello, o un gruppo aromatico biciclico con 8-10 atomi, contenente uno o più, e in alcuni esempi 1-4, e in alcuni esempi 1-3, e in alcuni esempi 1-2 eteroatomi indipendentemente selezionati dal gruppo O, S, e N, e facoltativamente sostituiti con 1-3 gruppi o sostituenti di alo, idrossi, alcossi, alchiltio, alchilsolfonile, alchilsolfonile, acilossi, arilossi, eteroarilossi, ammino facoltativamente mono- o di-sostituito con gruppi alchilici, arilici o eteroarilici, ammidino, urea facoltativamente sostituita con gruppi alchile, arile, eteroarile o eterociclice, amminosolfonile facoltativamente N-mono- o N,N-di-sostituito con gruppi alchilici, arilici o eteroarilici, alchilsolfonilammino, arilsolfonilammino, eteroarilsolfonilammino, alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, eteroarilcarbonilammino, o simili. L'eteroarile è anche inteso includere S o N ossidati, come solfinile, solfonile, e N-ossido di un azoto terziario dell'anello. Un atomo di carbonio o di azoto è il punto di attacco della struttura ciclica eteroarilic in modo da mantenere un anello aromatico stabile. Esempi di gruppi eteroarilici sono ftalimide, piridinile, piridazinile, pirazinile, chinazolinile, purinile, indolile, chinolinile, pirimidinile, pirrolile, ossazolile, tiazolile, tienile, isossazolile, ossatiadiazolile, isotiazolile, tetrazolile, imidazolile, triazinile, furanile, benzofurile, indolile e simili. Un eteroarile sostituito contiene un sostituente attaccato ad un carbonio o azoto disponibile per produrre un composto stabile.

Come usata qui, l'espressione "eteroarile sostituito" si riferisce a un eterociclo facoltativamente mono o polisostituito con uno o più gruppi funzionali, per esempio, alogeno, alchile a catena corta, alcossi a catena corta, alchiltio, acetilene, ammino, ammido, carbossile, idrossile, arile, arilossi, eterociclo, eterociclo sostituito, etarile, etarile sostituito, nitro, ciano, tiolo, solfammido, e simili.

Come usato qui, il termine "eterociclo" si riferisce ad un gruppo saturo, insaturo o aromatico che ha un singolo anello (*ad esempio*, morfolino, piridile o furile) o più anelli condensati (*ad esempio*, naftpiridile, chinossalile, chinolinile, indolizinile o benzo[b]tienile) e con atomi di carbonio e almeno un etero atomo, come N, O o S, nell'anello, che può opzionalmente essere non sostituito o sostituito con, *ad esempio*, alogeno, alchile a catena corta, alcossi a catena corta, alchiltio, acetilene, ammino, ammido, carbossile, idrossile, arile, arilossi, eterociclo, etarile, etarile sostituito, nitro, ciano, tiolo, solfammido e simili.

Come usata qui, l'espressione "eterociclo sostituito" si riferisce ad un eterociclo sostituito con 1 o più, *ad esempio*, 1, 2 o 3 sostituenti selezionati dal gruppo consistente di alchile facoltativamente sostituito, alchenile facoltativamente sostituito, alchinile facoltativamente sostituito, alogeno, idrossi, alcossi, alchiltio, alchilsolfonile, alchilsolfonile, acilossi, arile, arile sostituito, arilossi, eteroarilossi, ammino, ammido, ammidino, urea facoltativamente sostituita con gruppi alchilici, arilici, eteroarilici o eterociclicili, amminosolfonile facoltativamente N-mono- o N,N-di-sostituito con gruppi alchilici, arilici o eteroarilici, alchilsolfonilammino, arilsolfonilammino, eteroarilsolfonilammino, alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, eteroarilcarbonilammino, acile, carbossile, eterociclo, eterociclo sostituito, etarile, etarile sostituito, nitro, ciano, tiolo, solfonammido e osso, attaccati in qualsiasi punto disponibile per produrre un composto stabile.

Come usato nella presente, il termine "idrocarbile" si riferisce a qualsiasi radicale organico il cui scheletro comprende solo carbonio e idrogeno. Così, idrocarbile include alchile, cicloalchile, alchenile, cicloalchenile, alchinile, arile, alchilarile, arilalchile, arilalchenile, alchenilarile, arilalchinile, alchinarile e simili

Ome usato nella presente, il termine "idrocarbile sostituito" si riferisce a qualsiasi gruppo idrocarbile di cui sopra con uno o più sostituenti selezionati tra idrossi, idrocarbilossi, idrocarbilossi sostituito, alchiltio, alchiltio sostituito, ariltio, ariltio sostituito, ammino, alchilammino, alchilammino sostituito, carbossi, -C(S)SR, -C(O)SR, -C(S)NR<sub>2</sub>, in cui ogni R è indipendentemente idrogeno, alchile o alchile sostituito, nitro, ciano, alo, -SO<sub>3</sub>M o -OSO<sub>3</sub>M, dove M è H, Na, K, Zn, Ca, o meglumina, guanidinile, guanidinile sostituito, idrocarbile, idrocarbile sostituito, idrocarbilarcarbonile, idrocarbilarcarbonile sostituito, idrocarbilarbossicarbonile, idrocarbilarbossicarbonile sostituito, idrocarbilarcarbonilossi, idrocarbilarcarbonilossi sostituito, acile, acilossi, eterociclico, eterociclico sostituito, eteroarile, eteroarile sostituito, eteroarilcarbonile, eteroarilcarbonile sostituito, carbammile, monoalchilcarbammile, dialchilcarbammile, arilcarbammile, un gruppo carbammato, un gruppo ditiocarbammato, aroile, aroile sostituito, organosolfonile, organosolfonile sostituito, organosolfinile, alchilsolfonile sostituito, alchilsolfonilammino, alchilsolfonilammino sostituito, arilsolfonilammino, arilsolfonilammino sostituito, un gruppo solfonammide, solfurile, e simili, compresi due o più dei gruppi sopra descritti attaccati alla parte caratteristica idrocarbile mediante tali parti caratteristiche di legame/spaziatore come -O-, -S-, -NR-, dove R è idrogeno, alchile o alchile sostituito, -C(O)-, -C(S)-, -C(=NR')-, -C(=CR'<sub>2</sub>)-, dove R' è alchile o alchile sostituito, -O-C(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR- (o -NR-C(O)-O-), -NR-C(O)-, -NR-C(O)-NR-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR-, -O-S(O)<sub>2</sub>-, -O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-S(O)<sub>2</sub>-NR-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR-, -O-NR-C(O)-, -O-NR-C(O)-O-, -O-NR-C(O)-NR-, -NR-O-C(O)-, -NR-O-C(O)-O-, -NR-O-C(O)-NR-, -O-NR-C(S)-, -O-NR-C(S)-O-, -O-NR-C(S)-NR-, -NR-O-C(S)-, -NR-O-C(S)-O-, -NR-O-C(S)-NR-, -O-C(S)-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR- (o -NR-C(S)-O-), -NR-C(S)-, -NR-C(S)-NR-, -S-S(O)<sub>2</sub>-, -S-S(O)<sub>2</sub>-O-, -S-S(O)<sub>2</sub>-NR-, -NR-O-S(O)-, -NR-O-S(O)-O-, -NR-

O-S(O)-NR-, -NR-O-S(O)<sub>2</sub>-, -NR-O-S(O)<sub>2</sub>-O-, -NR-O-S(O)<sub>2</sub>-NR-, -O-NR-S(O)-, -O-NR-S(O)-O-, -O-NR-S(O)-NR-, -O-NR-S(O)<sub>2</sub>-O-, -O-NR-S(O)<sub>2</sub>-NR-, -O-NR-S(O)<sub>2</sub>-, -O-P(O)R<sub>2</sub>, -S-P(O)R<sub>2</sub>-, o -NR-P(O)R<sub>2</sub>-, dove ogni R è indipendentemente idrogeno, alchile o alchile sostituito, e simili.

Come usato qui, il termine "idrossile" o "idrossi" si riferisce al gruppo -OH.

Come usato qui, il termine "osso" si riferisce a un sostituito ossigeno con doppio legame al carbonio attaccato.

Come usato qui, il termine "solfinile" denota il gruppo -S(O)-.

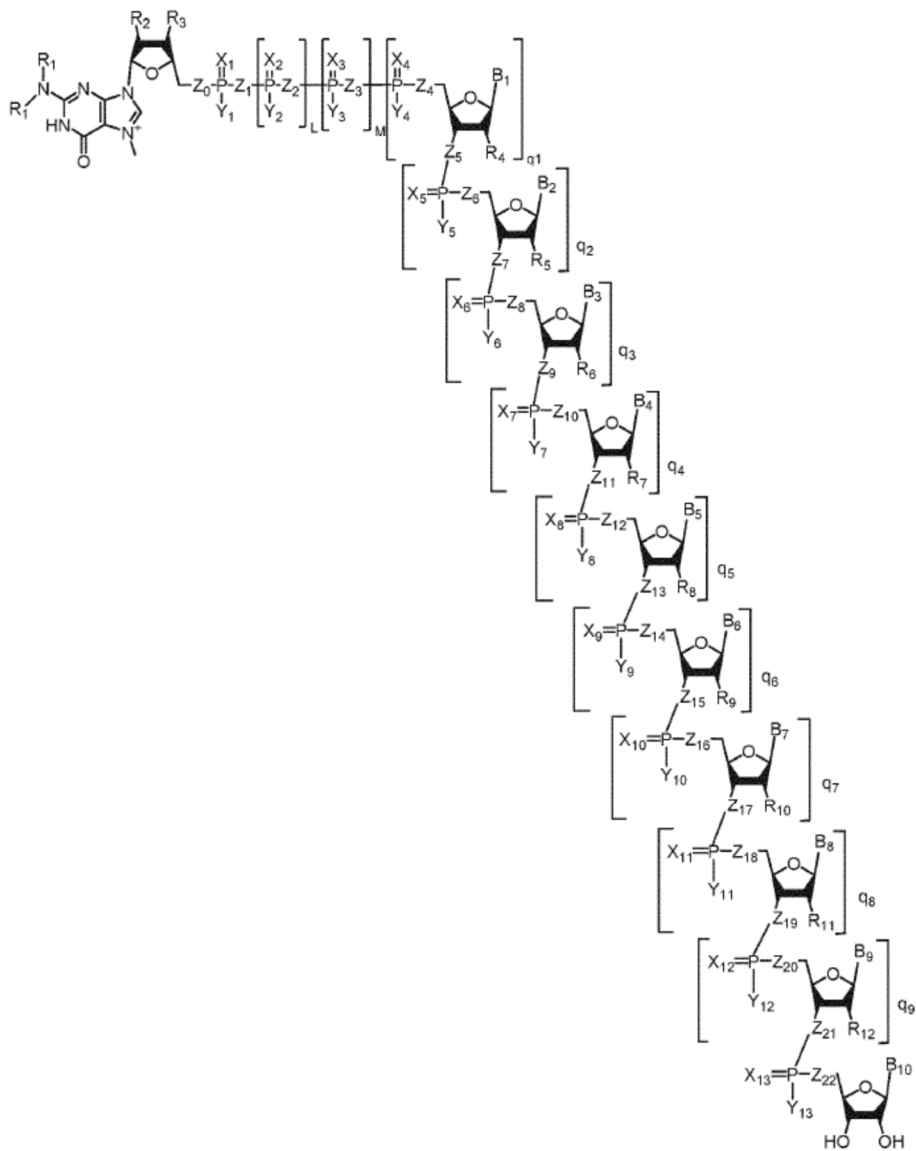
Come usato qui, il termine "solfinile sostituito" denota il gruppo -S(O)R<sup>1</sup>, in cui R<sup>1</sup> è alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, cicloalchile, cicloalchile sostituito, cicloalchilalchile, cicloalchilalchile sostituito, eterociclile, eterociclile sostituito, eterocicilalchile, etereocicilalchile sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, eteroarile sostituito, eteroaralchile, eteroaralchile sostituito, aralchile o aralchile sostituito.

Come usato qui, il termine "solfonile" denota il gruppo -S(O)<sub>2</sub>-.

Come usata qui, l'espressione "solfonile sostituito" indica il gruppo -S(O)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, in cui R<sup>1</sup> è alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, cicloalchile, cicloalchile sostituito, cicloalchilalchile, cicloalchilalchile sostituito, eterociclile, eterociclile sostituito, eterocicilalchile, etereocicilalchile sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, eteroarile sostituito, eteroaralchile, eteroaralchile sostituito, aralchile o aralchile sostituito.

Come usato qui, il termine "solforile" denota il gruppo -S(O)<sub>2</sub>-.

La presente invenzione fornisce metodi e composizioni per la sintesi di RNA con cap5' in cui i primer oligonucleotidici con cap di inizio hanno la formula generale <sup>m</sup>7Gppp[N<sub>2</sub>ome]n[N]m in cui <sup>m</sup>7G è guanosina N7-metilata o qualsiasi analogo della guanosina, N è qualsiasi nucleoside naturale, modificato o non naturale "n" può essere qualsiasi numero intero da 1 a 4 e "m" può essere un numero intero da 1 a 9. L'invenzione descrive primer oligonucleotidici con cap aventi la struttura della Formula I:



Formula I

In cui:

ognuno da B<sub>1</sub> a B<sub>10</sub> è indipendentemente una base nucleosidica naturale, modificata o non naturale;

M è 0 o 1;

L è 0 o 1;

$q_1$  è 1;

ognuno da  $q_2$  a  $q_9$  è indipendentemente 0 o 1;

$R_1$  è H o metile;

$R_2$  e  $R_3$  sono indipendentemente H, OH, alchile, O-alchile, ammina, azide, alogeno, un linker o un marcatore rilevabile;

ognuno da  $X_1$  a  $X_{13}$  è indipendentemente O o S;

ognuno da  $Y_1$  fino a  $Y_{13}$  è indipendentemente OH, SH,  $BH_3$ , arile, alchile, O-alchile o O-arile;

ciascuno da  $Z_1$  a  $Z_{22}$  è indipendentemente O, S, NH,  $CH_2$ ,  $C(\text{alogeno})_2$  o  $CH(\text{alogeno})$  e

ciascuno da  $R_4$  a  $R_{12}$  sono indipendentemente, H, OH, OMe o un marcatore rilevabile.

In alcuni esempi il primer oligonucleotidico con cap è un trimero ( $q^2-q^9 = 0$ ), tetramero ( $q^3-q^9 = 0$ ), pentamero ( $q^4-q^9 = 0$ ), esamero ( $q^5-q^9 = 0$ ), eptamero ( $q^6-q^9 = 0$ ), ottamero ( $q^7-q^9 = 0$ ), nanomero ( $q^8-q^9 = 0$ ), decamero ( $q^9 = 0$ ) o un undecamero. Un certo numero di esempi di primer trimeri oligonucleotidici con cap di inizio sono presentati nella seguente Tabella I:

Tabella I

	Sequence of Initiating Capped Oligonucleotide Primer
	m <sup>7</sup> GpppApA
	m <sup>7</sup> GpppApC
	m <sup>7</sup> GpppApG
	m <sup>7</sup> GpppApU
	m <sup>7</sup> GpppCpA
	m <sup>7</sup> GpppCpC
	m <sup>7</sup> GpppCpG
	m <sup>7</sup> GpppCpU
	m <sup>7</sup> GpppGpA
	m <sup>7</sup> GpppGpC
	m <sup>7</sup> GpppGpG
	m <sup>7</sup> GpppGpU
	m <sup>7</sup> GpppUpA
	m <sup>7</sup> GpppUpC
	m <sup>7</sup> GpppUpG
	m <sup>7</sup> GpppUpU
	m <sup>7</sup> G <sub>3'</sub> OmepppApA
	m <sup>7</sup> G <sub>3'</sub> OmepppApC
	m <sup>7</sup> G <sub>3'</sub> OmepppApG
	m <sup>7</sup> G <sub>3'</sub> OmepppApU
	m <sup>7</sup> G <sub>3'</sub> OmepppCpA
	m <sup>7</sup> G <sub>3'</sub> OmepppCpC
	m <sup>7</sup> G <sub>3'</sub> OmepppCpG

	$m^7G_3'OmepppCpU$
	$m^7G_3'OmepppGpA$
	$m^7G_3'OmepppGpC$
	$m^7G_3'OmepppGpG$
	$m^7G_3'OmepppGpU$
	$m^7G_3'OmepppUpA$
	$m^7G_3'OmepppUpC$
	$m^7G_3'OmepppUpG$
	$m^7G_3'OmepppUpU$
	$m^7G_3'OmepppA_2'Ome pA$
	$m^7G_3'OmepppA_2'Ome pC$
	$m^7G_3'OmepppA_2'Ome pG$
	$m^7G_3'OmepppA_2'Ome pU$
	$m^7G_3'OmepppC_2'Ome pA$
	$m^7G_3'OmepppC_2'Ome pC$
	$m^7G_3'OmepppC_2'Ome pG$
	$m^7G_3'OmepppC_2'Ome pU$
	$m^7G_3'OmepppG_2'Ome pA$
	$m^7G_3'OmepppG_2'Ome pC$
	$m^7G_3'OmepppG_2'Ome pG$
	$m^7G_3'OmepppG_2'Ome pU$
	$m^7G_3'OmepppU_2'Ome pA$
	$m^7G_3'OmepppU_2'Ome pC$
	$m^7G_3'OmepppU_2'Ome pG$
	$m^7G_3'OmepppU_2'Ome pU$
	$m^7GpppA_2'Ome pA$
	$m^7GpppA_2'Ome pC$
	$m^7GpppA_2'Ome pG$
	$m^7GpppA_2'Ome pU$
	$m^7GpppC_2'Ome pA$
	$m^7GpppC_2'Ome pC$
	$m^7GpppC_2'Ome pG$
	$m^7GpppC_2'Ome pU$
	$m^7GpppG_2'Ome pA$
	$m^7GpppG_2'Ome pC$
	$m^7GpppG_2'Ome pG$
	$m^7GpppG_2'Ome pU$
	$m^7GpppU_2'Ome pA$
	$m^7GpppU_2'Ome pC$
	$m^7GpppU_2'Ome pG$
	$m^7GpppU_2'Ome pU$

"Sequence of Initiating Capped Oligonucleotide Primer" = Sequenza di primer oligonucleotidico con cap di inizio

Altri primer oligonucleotidici con cap di inizio descritti nel presente documento includono quelli che hanno analoghi di base noti o nuovi. I metodi per sintetizzare - primer oligonucleotidici con cap di inizio sono esemplificati negli esempi seguenti.

### Trascrizione

Negli eucarioti, la trascrizione degli RNA messaggeri (mRNA) è effettuata dalla RNA polimerasi II. Si tratta di un enzima complicato a più subunità con una regolazione complessa. Per effettuare la trascrizione su larga scala *in vitro*, le ricerche usano comunemente polimerasi fagiche a singola subunità derivate dai batteriofagi T7, T3, SP6, K1-5, K1E, K1F o K11. Questa famiglia di polimerasi ha sequenze promotore semplici e minime di ~17 nucleotidi che non richiedono proteine accessorie e hanno vincoli minimi della sequenza nucleotidica di inizio. Sebbene la presente domanda si concentri sulla T7 RNA Polymerase (T7 RNAP), un esperto nella tecnica capirebbe che ciò potrebbe essere realizzato con altre RNA polimerasi.

T7 RNAP esiste in almeno due stati proteici. Il primo è chiamato "complesso abortivo" ed è associato all'iniziazione trascrizionale. Il secondo è una conformazione molto processiva chiamata "complesso di allungamento". La trascrizione *in vitro* può essere suddivisa in sei fasi: 1) legame della RNA polimerasi alla sequenza promotore, 2) inizio della trascrizione, 3) allungamento non processivo chiamato trascrizione abortiva durante il quale la polimerasi rilascia frequentemente lo stampo di DNA e brevi trascritti abortivi, 4) conversione del complesso aperto nel complesso chiuso, 5) allungamento processivo e 6) terminazione trascrizionale. Una quantità significativa di RNA prodotto durante la trascrizione consiste in brevi frammenti abortivi di ~2-8 nucleotidi di lunghezza (Biochemistry 19:3245-3253 (1980); Nucleic Acids Res. 9:31-45 (1981); Nucleic Acids Res. 15:8783-8798 (1987); Biochemistry 27:3966-3974 (1988)). Dopo la sintesi di circa 10-14 basi, le RNA polimerasi sfuggono al ciclo abortivo, perdendo allo stesso tempo i contatti sequenza-specifici con il DNA promotore, e formando un complesso di allungamento processivo, in cui la catena di RNA si estende in modo indipendente dalla sequenza (*J. Mol. Biol.* 183:165-177 (1985); *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:3614-3618(1986); *Mol. Cell Biol.* 7:3371-3379 (1987)).

La sequenza di consenso per i promotori T7 classe III putativi include 17 bp di sequenza a monte e 6 bp a valle del sito di inizio trascrizione (*Cell* 16:815-25 (1979)). La posizione del primo nucleotide trascritto è comunemente indicata come il nucleotide +1 trascritto dell'RNA, il secondo nucleotide trascritto come +2 nucleotide trascritto e così via (Tabella 2). Durante la trascrizione, i due filamenti si fondono per formare una bolla di trascrizione e il filamento inferiore del duplex (mostrato da 3' a 5' in Tabella 2) è lo stampo per la trascrizione. Per i nucleotidi trascritti +3 e oltre, il filamento stampo definisce l'identità dei nucleotidi trascritti principalmente attraverso le interazioni di appaiamento delle basi Watson-Crick. Qui il

nucleotide che codifica il primo nucleotide trascritto dell'RNA è definito come il nucleotide +1 stampo. Nell'esempio mostrato in Tabella 2, il nucleotide trascritto +1 è G e il nucleotide stampo +1 è C. Allo stesso modo il nucleotide trascritto +4 è A e il nucleotide stampo +4 è T.

Tabella 2

Posizione nel trascritto		111111	
Sequenza trascritto		pppGGGAGA	
Filamento superiore promotore	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA...-3'	↑	SEQ ID NO. 1
Filamento inferiore promotore	3'-ATTATGCTGAGTGATATCCCTCT...-5'	↓	SEQ ID NO. 2
Posizione nello stampo		111111	

A differenza della DNA polimerasi, la T7 RNAP inizia la sintesi dell'RNA in assenza di un primer. La prima fase dell'iniziazione è chiamata sintesi *de novo* dell'RNA, in cui la RNA polimerasi riconosce una sequenza specifica sullo stampo di DNA, seleziona la prima coppia di nucleotidi trifosfati complementari ai residui dello stampo nelle posizioni +1 e +2, e catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico per formare un dinucleotide. I nucleotidi di inizio hanno affinità inferiori per la polimerasi rispetto a quelli usati durante l'allungamento. Il valore K<sub>d</sub> è di 2 mM per il primo NTP di inizio e di 80 μM per il secondo, mentre il K<sub>d</sub> è di circa 5 μM per gli NTP durante l'allungamento (*J. Mol. Biol.* (2007) 370,256-268). Si è scoperto che la sintesi *de novo* è la fase velocità limitante durante la trascrizione. T7 RNAP mostra una forte preferenza per il GTP come nucleotide di inizio (*J. Biol. Chem.*, 248: 2235-2244 (1973)). Tra i 17 promotori T7 nel genoma, 15 iniziano con GTP (e 13 con pppGpG), mentre non vi è alcuna preferenza evidente NTP durante l'allungamento della trascrizione (*J. Mol. Biol.* 370:256-268 (2007)). T7 RNA polimerasi inizia scarsamente su promotori che codificano A in posizione +1; la trascrizione invece inizia prevalentemente con una G codificata in posizione +2 (*J. Biol. Chem.*, 278:2819-2823 (2003)).

Durante la sintesi *de novo* dell'RNA, il legame dei nucleotidi di inizio è ottenuto principalmente dall'energia libera creata dall'impilamento delle basi, dalle interazioni specifiche tra i residui della polimerasi, le parti caratteristiche guanina dei nucleotidi di inizio e le interazioni di complementarità delle basi (*J. Mol. Biol.* 370:256-268 (2007)).

È noto che T7 RNAP può anche iniziare con primer oligonucleotidici corti. Per esempio, è noto che 13 promotori nel genoma T7 iniziano con pppGpG (*J. Mol. Biol.* 370:256-268 (2007)). Diversi gruppi hanno dimostrato che T7 RNAP può iniziare da primer dinucleotidici (*Biochemistry* 24:5716-5723 (1985)). Axelrod *et al.* hanno dimostrato che un dinucleotide GpA senza cap poteva iniziare da nucleotidi stampo +1 e +2 che erano 2'-deossicitidina e 2'-deossitimidina, rispettivamente (stampo "CT") Le loro condizioni di reazione erano 200 micromolari (μM) dimeri e 100 μM ATP, CTP, GTP e UTP. La loro miscela di reazione conteneva anche 100 μM 3' dATP, 3' dCTP, 3' dUTP o 50 μM 3' dGTP. Essi osservano solo

RNA iniziati da GpA e non una miscela di RNA iniziati da GpA e RNA trifosfato 5' da iniziazione GTP. Questo è probabilmente dovuto alle condizioni di reazione impiegate. 100  $\mu$ M GTP è ben al di sotto della Kd di 2 mM della polimerasi T7 per la prima guanosina di inizio (J. Mol. Biol. (2007) 370,256-268). Poiché il GTP compete per l'iniziazione con l'oligonucleotide di inizio, utilizzando una bassa concentrazione di GTP favorisce l'iniziazione di GpA, ma determina una bassa resa di trascrizione (rendimento massimo calcolato stimato essere <150  $\mu$ g / mL di reazione). Quando si inizia la trascrizione sullo stampo "CT" con ApG, CpG, UpG o GpG, hanno osservato la formazione di trascritti di RNA con un ulteriore nucleotide non stampo 5' (A, C, U o G, rispettivamente).

Axelrod *et al.* hanno anche usato un dinucleotide GpG senza cap per avviare la sintesi dell'RNA su un promotore in cui i nucleotidi stampo +1 e +2 erano 2'-deossicitidina (stampo "CC"). Hanno osservato una bassa fedeltà di iniziazione e hanno osservato tre diversi prodotti di trascrizione. Essi affermano, "Un esame dell'autoradiografia indica che un membro di ogni tripletta è derivato dall'iniziazione con GpG in posizione normale (+1), il secondo membro di ogni tripletta è risultato dall'iniziazione con GpG in posizione anomala (-1), e il terzo membro di ogni tripletta è derivato dall'iniziazione con guanosina trifosfato in posizione normale. Pertanto, GpG è un iniziatore relativamente debole con il promotore  $\phi$  10 (stampo "CC"), così come con il promotore  $\phi$  1.1A (stampo "CT"), e non è in grado di impedire la normale iniziazione con guanosina trifosfato alla concentrazione che è stata utilizzata" Non hanno osservato l'iniziazione con un dinucleotide GpA con promotore  $\phi$  10 (stampo "CC"). CpA, ApC e ApA non sono serviti come iniziatori su nessuno degli stampi "TC" e "CC" di cui sopra, presumibilmente perché questi non possono ibridare con i nucleotidi dello stampo nelle posizioni +1 e +2. Il metodo descritto in Axelrod *et al.* è stato progettato per la produzione di quantità molto piccoli trascritti radioattivi per il sequenziamento e non è adatto per la produzione su larga scala di quantità farmaceutiche utili di RNA. Se concentrazioni più elevate (~ 5 mM) dimero di inizio e NTP, tra cui GTP, sono state utilizzate per aumentare la resa di RNA, il risultato atteso è una bassa percentuale di RNA che inizia con dimero di inizio poiché GTP compete in modo efficiente con dimero per l'iniziazione dai nucleotidi +1 a concentrazioni NTP più vicine al Kd (2 mM), producendo elevate percentuali di RNA che inizia con pppG.

Pitulle *et al.* hanno dimostrato che la trascrizione con T7 RNAP potrebbe essere iniziata con oligonucleotidi senza cap (da 2 a 6-mer) (*Gene*, 112:101-105 (1992)). Questi oligonucleotidi avevano un 5'-OH o un 5' monofosfato. Hanno anche iniziato la trascrizione con un oligonucleotide della struttura Biotin-ApG. Tutti gli oligonucleotidi utilizzati in questo studio contenevano un G 3' terminale. Pitulle *et al.* hanno anche dimostrato che i residui 2'-O-metilici e i residui deossi potrebbero essere inclusi all'interno della sequenza del primer per produrre trascritti di RNA con residui 2'-O-metilici o 2'-deossi alla o vicino all'estremità 5' dell'RNA. È chiaro in questa pubblicazione, che il residuo di guanosina 3' terminale del qualsiasi oligonucleotide di inizio accoppiato con il nucleotide stampo +1. Ciò determina nucleotidi non stampo aggiunti all'estremità 5' dell'RNA

trascritto. In particolare, gli autori affermano, "Anche le variazioni di sequenza in questo segmento sono facilmente possibili, poiché non è richiesto alcun appaiamento di basi con il DNA stampo eccetto Y-G terminale " Quindi nessuno dei primer oligonucleotidici di inizio è completamente complementare solo al nucleotide "C" stampo in posizione +1 e non a nessun nucleotide nelle posizioni successive (+2, +3 ecc.). Questo è confermato nei successivi articoli sui metodi di questo gruppo (Methods Mol Biol.74: 99-110 (1997), Methods Mol. Biol. 252:9-17 (2004)). I loro metodi differiscono dal metodo descritto qui in cui tutti i nucleotidi del primer oligonucleotide con cap di inizio completamente complementari ai nucleotidi stampo nelle posizioni +1 e seguenti. Kleineidam *et al.* hanno creato trascritti di tRNA 5'modificati iniziando con dimeri o trimeri modificati con zuccheri 2'-deossi o 2'-O-metile (*Nucleic Acids Research* 21:1097-1101 (1993)). Ancora una volta gli autori affermano che la guanosina 3'-terminale del primer inizia al nucleotide "C" stampo +1.

Un altro studio di Ishikawa *et al.* ha dimostrato che i trimeri di oligonucleotidi di inizio con cap della struttura  ${}^m7\text{GpppApG}$ ,  ${}^m7\text{Gppp}{}^m6\text{ApG}$ ,  ${}^m7\text{GpppA}{}_{2'\text{Ome}}\text{pG}$  o  ${}^m7\text{Gppp}{}^m6\text{A}{}_{2'\text{Ome}}\text{pG}$  potrebbero iniziare la trascrizione su stampo con residui di 2'-deossicitidina nelle posizioni +1 e +2 del stampo (stampo "CC"; *Nucleic Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009)*). Gli autori dichiarano, "Il risultato diverso dal caso dell'utilizzo di  ${}^m7\text{G5'pppG}$  può essere causato dall'accoppiamento di basi tra l'adenosina aggiuntiva (N1) in  ${}^m7\text{G5'pppN1pG}$  e la 2'-deossitimidina nel promotore T7 in posizione -1." Questo metodo differisce chiaramente dal metodo descritto qui dove i nucleotidi +1 e +2 del l'oligonucleotide trimero con cap di inizio si accoppiano con i +1 e +2 dei nucleotidi stampo. Ishikawa *et al.* hanno usato 6 mM di trimero oligonucleotide di inizio, 0,9 mM di GTP e 7,5 mM di ATP, CTP e UTP. Gli autori hanno usato un eccesso maggiore di 6 volte del primer oligonucleotidico con cap, il componente nucleotidico più costoso della reazione di trascrizione, rispetto al GTP in competizione per guidare la reazione di trascrizione verso l'RNA con cap rispetto al pppRNA che aumenta il costo totale dell'RNA sintetizzato. D'altra parte, una bassa concentrazione di GTP (0,9 mM) limita la resa totale dell'RNA nella reazione di trascrizione (teoricamente a meno di 1,4 mg/mL). Al contrario, il metodo qui descritto non richiede la limitazione della concentrazione di qualsiasi NTP per ottenere sia un'efficiente capping dell'RNA sia una maggiore resa di RNA (da 2 a 6 mg/mL) e permettendo così una produzione di mRNA di alta qualità ad un costo commercialmente utile.

Nessuna delle pubblicazioni descritta sopra ha misurato direttamente l'efficienza di capping dell'RNA, quindi è sconosciuta l'entità di capping in questi studi.

È importante notare che in tutti gli studi descritti sopra, il nucleotide stampo +1 è 2'-deossicitidina (*Biochemistry* 24:5716-5723 (1985), *Gene*, 112:101-105 (1992), *Methods Mol. Biol.*74: 99-110 (1997), *Methods Mol. Biol.* 252:9-17, (2004), *Nucleic Acids Research* 21:1097-1101 (1993), *Nucleic Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009)*).

In più di 20 anni dalla pubblicazione degli studi di iniziazione della trascrizione con primer oligonucleotidici, non ci sono esempi pubblicati di iniziazione della trascrizione con primer oligonucleotidici di inizio contenenti strutture a cap invertito da 5'- a 5' fino alla pubblicazione di una breve relazione in Nucleic Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009).

I metodi e le composizioni qui forniti per la preparazione di RNA con cap 5' includono, ma non sono limitati a, mRNA, piccolo RNA nucleare (snRNA), piccolo RNA nucleolare (snoRNA), piccolo RNA specifico del corpo cajal (scaRNA). Questi metodi implicano l'uso di un cap contenente primer oligonucleotidici, nucleosidi 5'-trifosfati (NTP) e RNA polimerasi per la sintesi di RNA basata sul DNA e controllata da un promotore. I metodi possono utilizzare un primer oligonucleotide con cap di inizio che fornisce utilità nella sintesi di RNA, in particolare la sintesi di mRNA con cap. Il primer oligonucleotidico di inizio ha una struttura che assomiglia al Cap 0, Cap 1, Cap 2 o TMG-Cap delle molecole di RNA naturale, che includono unità nucleosidiche 2'-O-metilate al penultimo Cap 1 e vicino al penultimo Cap 2 in posizioni 5' dell'RNA. La struttura naturale del Cap 0 non ha unità nucleosidiche 2'-O-metilate.

I metodi e le composizioni per la preparazione di RNA inclusi, senza limiti, mRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, RNA di trasferimento (tRNA), RNA ribosomiale (rRNA) e RNA di trasferimento-messaggero(tmRNA) che portano modificazioni a o vicino all'estremità 5' della molecola. Questi metodi comportano l'uso di primer oligonucleotidici di inizio con o senza Cap, nucleosidi 5'-trifosfati (NTP) e RNA polimerasi per la sintesi di RNA da DNA stampo e controllata da promotori. I metodi possono usare un primer oligonucleotidico modificato che porta modificazioni strutturali che forniscono utilità nella sintesi di RNA; in particolare la sintesi di RNA 5'-modificato.

Il primer oligonucleotidico con cap di inizio ha un gruppo 3'-OH aperto che permette l'inizio della sintesi di RNA mediata dalla RNA polimerasi su uno stampo di DNA aggiungendo unità nucleotidiche all'estremità 3' del primer. Il primer oligonucleotidico con cap di inizio è sostanzialmente complementare alla sequenza di DNA stampo nel sito di inizio della trascrizione (cioè, il sito di inizio si trova più vicino al terminale 3' di una sequenza promotore e può sovrapporsi alla sequenza promotore). In certi esempi, il primer oligonucleotidico con cap di inizio dirige la sintesi dell'RNA prevalentemente in una direzione ("senso") a partire dall'estremità 3' del primer. Il primer oligonucleotide con cap di inizio può superare qualsiasi nucleoside 5'-trifosfato per l'avvio della sintesi dell'RNA, riducendo così al minimo la produzione dell'RNA che inizia con il primer oligonucleotide con cap di inizio e portando al massimo una produzione di RNA che inizia con 5'-trifosfato-nucleoside (tipicamente GTP).

La produzione di mRNA mediante trascrizione *in vitro* utilizza RNA polimerasi fagiche altamente attive (T3, T7, SP6 e altre). La RNA polimerasi lavora sotto il controllo di un promotore specifico che è incorporato in un costrutto di DNA plasmidico davanti a una sequenza nucleotidica stampo.

Il processo di trascrizione di solito inizia con il nucleoside purina 5'-trifosfato (tipicamente GTP) e continua fino a quando la RNA polimerasi

incontra una sequenza di terminazione o completa lo stampo di DNA.

Come descritto sopra, gli analoghi dinucleotidici mCAP,  $^7\text{mG}(5')\text{ppp}(5')\text{N}$ , che contengono Cap 0 sono stati utilizzati per l'avvio della trascrizione *in vitro* (*ad es.*, RNA 1: 957-967 (1995)). Le molecole di RNA con cap prodotte usando questi analoghi dinucleotidici contengono Cap 0. Tuttavia solo circa il 50% delle molecole di RNA sintetizzate con il cap hanno il corretto orientamento "senso" di Cap 0. Per convertire l'RNA con Cap 0 in RNA con Cap 1 deve essere eseguita un'ulteriore reazione enzimatica utilizzando la (nucleoside-2'-O) metiltransferasi. Tuttavia questa conversione può non essere quantitativa; non è facile da controllare ed è difficile separare gli RNA Cap 0 rimanenti dagli RNA Cap 1. Inoltre, la competizione degli NTP (in particolare GTP) per l'inizio della trascrizione riduce ulteriormente la quantità di molecole di RNA con cap attive prodotte.

Inoltre, analoghi dinucleotidici modificati, come  $^7\text{mG}_{3'\text{Ome}}(5')\text{ppp}(5')\text{N}$  e altri analoghi ARCA correlati, che portano il residuo  $^7\text{mG}$  modificato con posizione 3' e/o 2' bloccata sul ribosio, sono stati utilizzati per l'avvio della trascrizione *in vitro* (*ad es.*, RNA 7:1486-1495 (2001)). Questi analoghi del cap ARCA dirigono la sintesi dell'RNA solo nell'orientamento "senso" e quindi producono una molecola di RNA con Cap 0 (naturale) sul terminale 5' (con modificazioni 2' e/o 3' al residuo  $^7\text{mG}$ ). Tali RNA sono più attivi nei sistemi di traduzione rispetto agli RNA preparati utilizzando analoghi dinucleotidici standard,  $^7\text{mG}(5')\text{ppp}(5')\text{N}$ . Per convertire l'RNA con ARCA Cap 0 in RNA con ARCA Cap 1 deve essere eseguita un'ulteriore reazione enzimatica con (nucleoside-2'-O) metiltransferasi simile a quella richiesta necessaria per gli analoghi dinucleotidici precedentemente descritti. Questo metodo ha gli stessi svantaggi di quello sviluppato per gli analoghi dinucleotidici mCAP; la conversione di RNA con Cap 0 in RNA con ARCA Cap 1 può non essere quantitativa; la reazione non è facile da controllare, è difficile separare gli RNA Cap 0 rimanenti dagli RNA Cap 1 e la competizione con gli NTP (in particolare GTP) per l'avvio della trascrizione riduce ulteriormente la quantità di molecole di RNA con cap attive prodotte.

Primer oligonucleotidici corti (da 2 a 6-mer) con residuo guanosina 3'-terminale sono stati utilizzati per l'avvio della trascrizione *in vitro* (Pitulle, C. *et al.*, *Gene*, 112:101-105(1992)). Questi primer oligonucleotidici contenevano residui di ribonucleoside modificati e non modificati (*ad esempio*, i residui di ribonucleoside modificati includevano residui nucleoside 2'-O-metilati e residui 2'-deossiribonucleoside). I primer oligonucleotidici più corti (da dimeri a tetrameri) sostanzialmente superano il GTP per l'avvio della trascrizione, mentre i primer più lunghi (da pentameri a esameri) sono molto meno efficienti nell'avvio della trascrizione rispetto al GTP. Ciò avviene poichè questi primer più lunghi (come sono progettati) hanno una bassa percentuale di complementarità con lo stampo di DNA nel sito di iniziazione. Al contrario, il dimero, AG (come progettato), era complementare allo stampo di DNA nel sito di iniziazione. Le molecole di RNA prodotte utilizzando primer oligonucleotidici, discussi in questa sezione, avevano nucleoside interno 2'-O-metilato ma non contenevano 5'-Cap 0, Cap1, Cap 2 o TMG-cap. Per convertire l'RNA senza struttura cap

in RNA con struttura Cap 1, Cap 2 o TMG-cap sarebbe necessario eseguire ulteriori reazioni enzimatiche utilizzando enzimi di capping. Tuttavia tale conversione ha gli stessi svantaggi di quelli indicati sopra.

Altri oligonucleotidi corti di RNA contenenti strutture a cap e residui nucleosidici interni 2'-O-metilati sono stati preparati chimicamente (Ohkubo *et al.*, *Org. Letters* 15:4386-4389 (2013)). Questi brevi oligonucleotidi con cap sono stati legati con un frammento "privo di cap" (senza struttura 5'-cap) di RNA lungo usando la DNA ligasi T4 e una scheggia di DNA complementare oligonucleotide. L'RNA finale sintetizzato con questo metodo chimico-enzimatico aveva sia residui nucleosidici interni 2'-O-metilati che la struttura 5'-TMG-cap. Tuttavia solo brevi RNA con cap (<200-mer) sono stati preparati usando questo approccio di ligazione. Inoltre, i rendimenti erano bassi (15-30%). Non è facile controllare e ottimizzare la reazione di ligazione del T4DNA e richiede un laborioso processo di separazione mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e l'isolamento degli RNA con cap dai rimanenti RNA senza cap. La separazione di lunghi (500 -10000 basi) mRNA con cap dai rimanenti mRNA senza cap con il metodo PAGE non è fattibile.

Infine, il nucleoside 5'-modificato o il mononucleotide 5'-modificato o il dinucleotide 5'-modificato, tipicamente un derivato della guanosina, sono stati usati per iniziare la trascrizione *in vitro* dell'RNA (*Gene*, 112:101-105 (1992) e *Bioconjug. Chem.* 10371-378 (1999)). Questi nucleosidi e nucleotidi di inizio possono portare traccianti o gruppi di affinità (*ad esempio* biotina) e, quando incorporati sull'estremità 5' dell'RNA, permetterebbero un facile rilevamento, isolamento e purificazione dell'RNA sintetizzato. Questo RNA 5' marcato o con tag può essere necessario per alcune applicazioni. Tuttavia questa strategia non è stata utilizzata per la preparazione di mRNA con strutture Cap 0, Cap 1, Cap 2 o TMG-cap. Sono fornite composizioni dei primer oligonucleotidici con cap di inizio della Formula I. Inoltre sono forniti i metodi in cui l'RNA è sintetizzato usando i primer oligonucleotidici con cap di inizio delle Formule I.

#### **Primer oligonucleotidico con cap di inizio**

I primer oligonucleotidici con cap di inizio qui descritti hanno una sequenza di ibridazione che può essere complementare a una sequenza sullo stampo di DNA nel sito di iniziazione. La lunghezza della sequenza di ibridazione dei primer per l'uso nei metodi e nelle composizioni qui fornite dipende da diversi fattori tra cui l'identità della sequenza nucleotidica stampo e la temperatura alla quale questo primer viene ibridato al DNA stampo o utilizzato durante la trascrizione *in vitro*. La determinazione della lunghezza desiderata di una specifica sequenza nucleotidica di un primer oligonucleotidico con cap per l'uso nella trascrizione può essere facilmente determinata da un comune esperto nella tecnica o mediante sperimentazione di routine. Per esempio, la lunghezza di un acido nucleico o di un oligonucleotide può essere determinata in base a una specificità o selettività di ibridazione desiderata.

In alcuni esempi, la lunghezza nucleotidica del primer oligonucleotidico con cap di inizio (incluso il nucleotide invertito 5'-5' Cap) è compresa tra 3 e circa 9, in alcuni esempi la lunghezza nucleotidica del primer oligonucleotidico con cap di inizio (incluso Cap) è compresa tra 3 e circa 7, in alcuni esempi la lunghezza del nucleotide del primer oligonucleotidico con cap di inizio (incluso Cap) è compresa tra 3 e circa 5, e in alcuni esempi la lunghezza del nucleotide del primer oligonucleotidico con cap di inizio (incluso Cap) è circa 3. La lunghezza della sequenza di ibridazione all'interno del primer oligonucleotidico con cap di inizio può essere uguale o inferiore alla lunghezza totale del primer oligonucleotidico con cap di inizio.

La presenza della sequenza di ibridazione costringe un primer oligonucleotidico con cap di inizio ad allinearsi prevalentemente con la sequenza complementare dello stampo di DNA nel sito di iniziazione solo nell'orientamento desiderato(cioè, l'orientamento "senso"). Nell'orientamento senso, la trascrizione dell'RNA inizia con il residuo di guanosina invertito(cioè,  $7^mG(5')ppp(5') N...$ ) La dominanza dell'orientamento in avanti dell'allineamento del primer sullo stampo di DNA (Figura 1) sull'orientamento "antisenso" errato è mantenuta dalla termodinamica del complesso di ibridazione. Quest'ultima è determinata dalla lunghezza della sequenza di ibridazione del primer oligonucleotidico con cap di inizio e dall'identità delle basi coinvolte nell'ibridazione con il DNA stampo. L'ibridazione nell'orientamento senso desiderato può anche dipendere dalla temperatura e dalle condizioni di reazione alle quali lo stampo di DNA e il primer oligonucleotidico con cap di inizio sono ibridati o utilizzati durante la trascrizione *in vitro*.

Il primer oligonucleotide con cap di inizio descritto qui migliora l'efficacia dell'inizio della trascrizione rispetto all'efficacia dell'inizio con GTP, ATP, CTP o UTP standard. In alcuni esempi, l'iniziazione della trascrizione è considerata potenziata quando la sintesi di RNA inizia prevalentemente dal primer oligonucleotidico con cap di inizio e non da qualsiasi NTP nella miscela di trascrizione. La maggiore efficienza dell'inizio della trascrizione determina una maggiore resa del trascritto RNA. L'efficienza aumentata di inizio della trascrizione può essere aumentata a circa 10%, circa 20%, circa 40%, circa 60%, circa 80%, circa 90%, circa 100%, circa 150%, circa 200% o circa 500% sopra la sintesi di RNA con i metodi convenzionali senza di inizio con cap. In certi esempi, i "primer oligonucleotidici con cap di inizio" superano qualsiasi NTP (compreso il GTP) per l'avvio della trascrizione. Un comune esperto nella tecnica è in grado di determinare facilmente il livello di attività del substrato e l'efficacia dei primer oligonucleotidici con cap di inizio. Un esempio di un metodo per determinare l'efficacia del substrato è illustrato nell'esempio 13). In alcuni esempi, l'iniziazione avviene dal primer oligonucleotidico con cap piuttosto che da un NTP, il che determina un livello superiore di capping dell'mRNA trascritto.

Sono forniti metodi in cui RNA è sintetizzato utilizzando un primer oligonucleotide con cap di inizio che ha sostituzioni o modificazioni. Le

sostituzioni e le modificazioni del primer oligonucleotidico con cap di inizio non possono compromettere sostanzialmente la sintesi dell'RNA. Le sintesi di prova di routine possono essere eseguite per determinare se i risultati desiderabili della sintesi possono essere ottenuti con i primer oligonucleotidici con cap di inizio modificati. Gli esperti nella tecnica possono eseguire tali esperimenti di routine per determinare se si possono ottenere risultati desiderabili. La sostituzione o la modificazione del primer oligonucleotidico con cap di inizio includono, per esempio, una o più basi nucleosidiche modificate, uno o più zuccheri modificati, uno o più legami internucleotidici modificati e/o uno o più ponti trifosfati modificati. L'oligonucleotide con cap di inizio modificato, che può includere uno o più gruppi di modificazione dei metodi e delle composizioni qui forniti, può essere allungato dalla RNA polimerasi sullo stampo di DNA mediante incorporazione di NTP sul gruppo aperto 3'-OH. Il primer oligonucleotide con cap di inizio può includere nucleosidi naturali di RNA e DNA, nucleosidi modificati o analoghi nucleosidici. Il primer oligonucleotidico con cap di inizio può contenere legami fosfodiesteri internucleotidici naturali o modificazioni degli stessi, o una loro combinazione.

In un esempio il gruppo di modificazione può essere un gruppo termicamente labile che si dissocia da un primer oligonucleotidico con cap modificato ad una velocità crescente con l'aumento della temperatura del mezzo di reazione enzimatica. Esempi di gruppi termicamente labili per oligonucleotidi e NTP sono descritti in *Nucleic Acids Res.*, 36:e131 (2008), *Collect. Symp. Ser.*, 10:259-263 (2008) e *Analytical Chemistry*, 81:4955-4962 (2009).

Sono forniti metodi in cui RNA è sintetizzato in cui almeno uno o più NTP è aggiunto ad una reazione di trascrizione può avere una modificazione come descritto qui. La modificazione di almeno un NTP può non compromettere sostanzialmente la sintesi mediata dalla RNA polimerasi di RNA. La modificazione dell'NTP può includere, per esempio, una o più basi nucleosidiche modificate, uno o più zuccheri modificati, uno o più 5'-trifosfati modificati. L'NTP modificato può essere incorporato all'estremità 3' del primer oligonucleotidico con cap di inizio e non blocca la trascrizione e supporta l'ulteriore allungamento del primer.

In un altro esempio, il gruppo di modificazione di un primer oligonucleotide con cap di inizio può essere un tracciante rilevabile o un marcatore rilevabile. Pertanto, dopo la trascrizione, l'RNA target, contenente il tracciante o il marcatore rilevabile, può essere identificato per dimensione, massa, colore e/o cattura di affinità. In alcuni esempi, il tracciante o il marcatore rilevabile è un colorante fluorescente; e il tracciante di cattura per affinità è la biotina. In alcuni esempi, uno o più componenti di una reazione di trascrizione (primer oligonucleotidico con cap di inizio e/o NTP) possono essere marcati con un tracciante o un marcatore rilevabile. Così, dopo la trascrizione, la molecola di RNA può essere identificata, per esempio, per dimensione, massa, cattura di affinità o colore. In alcuni esempi, il tracciante rilevabile è un colorante fluorescente; e il tracciante di cattura di affinità è la biotina.

Metodi standard di sintesi chimica ed enzimatica possono essere utilizzati per sintetizzare i "primer oligonucleotidici con cap di inizio" e sono descritti qui nella sezione Esempi.

### **Kit**

Sono contemplati anche i kit che includono il "primer oligonucleotidico con cap di inizio " per eseguire la trascrizione. Per esempio, i kit possono contenere tutti i reagenti di trascrizione per la sintesi di RNA comuni (*ad esempio*, FLuc mRNA). Più specificamente, un kit può contenere: un "primer oligonucleotide con cap di inizio "; un contenitore contrassegnato per la trascrizione; istruzioni per eseguire la sintesi dell'RNA; e uno o più reagenti selezionati dal gruppo consistente di uno o più primer oligonucleotide con cap di inizio modificato o non modificato, uno o più NTP non modificato, uno o più NTP modificato (*ad es.*, pseudouridina 5'-trifosfato), una RNA polimerasi, altri enzimi, un tampone di reazione, magnesio e uno stampo di DNA.

I primer oligonucleotidici con cap di inizio descritti qui hanno un vantaggio significativo rispetto ai metodi e alle composizioni attuali che coinvolgono l'uso di vari nucleosidi, nucleotidi e oligonucleotidi di inizio o l'uso di derivati dinucleotidici polifosfati contenenti struttura Cap 0, come mCAP e ARCA. I primer oligonucleotidici con cap sono compatibili con i sistemi di trascrizione e i reagenti esistenti e non sono necessari enzimi o reagenti aggiuntivi. Inoltre, l'uso oligonucleotidici con cap di inizio rende inutili diverse fasi non enzimatiche ed enzimatiche (come il capping e la 2'-O-metilazione) riducendo così la complessità del processo e il costo della sintesi di RNA.

Sebbene i metodi esemplificativi descritti qui si riferiscano alla reazione di trascrizione mediata da T7 RNA polimerasi, un certo numero di altre RNA polimerasi conosciute nella tecnica per uso nelle reazioni di trascrizione può essere utilizzato con le composizioni e i metodi descritti qui. Altri enzimi, comprese le varianti naturali o mutate che possono essere utilizzate includono, per esempio, le RNA polimerasi SP6 e T3 e le RNA polimerasi da altre fonti, comprese le RNA polimerasi termostabili.

Alcuni metodi di replicazione e amplificazione dell'acido nucleico possono includere la trascrizione come parte del processo. Tra questi metodi ci sono: l'amplificazione mediata dalla trascrizione (TMA) e l'amplificazione basata sulla sequenza dell'acido nucleico (NASBA), il sequenziamento di DNA e RNA e altre reazioni di estensione dell'acido nucleico note nell'arte. L'esperto capirà che altri metodi possono essere utilizzati al posto di, o insieme a, metodi di trascrizione, comprese le varianti delle reazioni di trascrizione sviluppate in futuro.

### **Usi terapeutici**

La presente invenzione contempla anche la produzione di mRNA contenenti il primer oligonucleotidico con cap di inizio per l'uso come agenti terapeutici in una composizione farmaceutica, l'introduzione di RNA contenenti il primer oligonucleotidico con cap di inizio nelle cellule per

trattare una condizione medica delle cellule o l'introduzione di RNA contenenti il primer oligonucleotidico con cap di inizio nelle cellule che utilizzano questi RNA per produrre proteine che possono avere un effetto terapeutico sulle cellule ospiti.

Un metodo per il trattamento di una condizione che utilizza un RNA contenente un primer oligonucleotidico con cap di inizio comprende la fase di somministrazione dell'RNA contenente il primer oligonucleotidico con cap di inizio della Formula I o una composizione che comprende tale RNA ad un soggetto che ha, o sospettato di avere una condizione i cui sintomi/sintomologie possono essere ridotti di gravità o eliminati.

Un RNA contenente il primer oligonucleotide con cap di inizio della Formula I "composto", quando formulato in un veicolo farmaceuticamente accettabile e/o in un sale farmaceuticamente accettabile ad una concentrazione di 4 mg/ml o meno, è efficace per produrre una riduzione dei sintomi e/o delle sintomatologie di almeno il 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o maggiore rispetto ad un individuo non trattato con il solo veicolo farmaceuticamente accettabile.

Le composizioni farmaceutiche possono essere formulate per la somministrazione tramite iniezione o altre vie appropriate note all'esperto nella tecnica per il trattamento di una particolare condizione. Una composizione iniettabile per la somministrazione parenterale contiene tipicamente il composto attivo in una soluzione adatta e/o un vettore farmaceutico come soluzione fisiologica sterile. La composizione può anche essere formulata come una sospensione in un lipide o fosfolipide, in una sospensione liposomiale o in un'emulsione acquosa.

I metodi per preparare una varietà di composizioni e/o formulazioni sono noti all'esperto nella tecnica, *vedi* Remington's Pharmaceutical Sciences (19<sup>a</sup> Ed., Williams & Wilkins, 1995). La composizione da somministrare conterrà una quantità del composto selezionato in una quantità farmaceuticamente sicura ed efficace per aumentare l'espressione della proteina desiderata nelle cellule o nei tessuti target.

In alcuni esempi, la composizione farmaceutica contiene almeno lo 0,1% (p/v) del composto, come descritto sopra, in alcuni esempi, la composizione farmaceutica contiene più dello 0,1%, in alcuni esempi, la composizione farmaceutica contiene fino a circa il 10%, in alcuni esempi, la composizione farmaceutica contiene fino a circa il 5%, e in alcuni esempi, la composizione farmaceutica contiene fino a circa l'1% (p/v) del composto. La scelta di una concentrazione adatta dipende da fattori come la dose desiderata, la frequenza e il metodo di rilascio dell'agente attivo.

Per il trattamento di un soggetto, come un mammifero o un uomo, i dosaggi sono determinati in base a fattori quali il peso e la salute generale del soggetto, la condizione trattata, la gravità dei sintomi, *ecc.* I dosaggi e le concentrazioni sono determinati per produrre il beneficio desiderato evitando gli effetti collaterali indesiderati. I dosaggi tipici dei composti del soggetto sono nell'intervallo da circa 0,0005 a 500 mg/giorno per un paziente umano, e vanno in alcuni esempi tra circa 1-100 mg/giorno. Per esempio, i regimi a dosi più alte includono *ad esempio* 50-100, 75-100, o 50-75 mg/giorno, e i regimi a dosi più basse includono *ad esempio* 1-50, 25-50, o 1-25 mg/giorno.

La presente invenzione è illustrata dai seguenti esempi non limitativi. Un comune esperto nella tecnica sa facilmente come sintetizzare o ottenere commercialmente i reagenti e i componenti descritti qui.

#### ESEMPIO 1

##### **Preparazione della 7-metilguanosa 5'-difosfato (pp<sup>7m</sup>G) dalla guanosa 5'-difosfato (Figura 1)**

Ad una soluzione agitata di guanosa 5'-difosfato (2,5 mmol) in 40,0 mL di acqua, viene aggiunto acido acetico per regolare il pH della soluzione a 4,0. A questa miscela il dimetilsolfato (4,0 mL) viene aggiunto a goccia per un periodo di 30 minuti e la miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente per 4 ore mantenendo il pH della miscela di reazione a circa 4,0 usando una soluzione di NaOH 0,1M. Dopo 4 ore, la miscela di reazione viene estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL) per rimuovere il solfato di dimetile non reagito. Lo strato acquoso viene diluito con acqua fino a 500 mL, regolato a pH 6,5 con 1M TEAB e caricato su una colonna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). Il prodotto viene eluito utilizzando un gradiente lineare di 0-1 M TEAB, pH 7.5 (3 L). Le frazioni contenenti pp<sup>7m</sup>G puro (sale di trietilammonio) vengono riunite, fatta evaporare ed essiccate sotto alto vuoto per dare una polvere bianca fine (resa: 80%). Una procedura simile è descritta in *Bioorgan. Med. Chem., Letters* 17:5295-5299 (2007)).

#### ESEMPIO 2

##### **Preparazione di 7-metilguanosa 5'-difosfato imidazolide (Im-pp<sup>7m</sup>G) da pp<sup>7m</sup>G (Figura 2)**

Il sale di trietilammonio di pp<sup>7m</sup>G (0,4 mmol) viene fatto reagire con imidazolo (4 mmol), trifetilfosfina (2 mmol) e 2,2'-dipiridildisolfuro (2 mmol) in DMF anidro (20 mL) per 8 ore. Crude Im-pp<sup>7m</sup>G è fatto precipitare versando la miscela di reazione in 250 mL di una soluzione di perclorato di sodio 0,2 M. La miscela viene raffreddata a -20°C e il precipitato risultante viene raccolto per centrifugazione, lavato con acetone (3 x 50 mL) ed essiccato sotto alto vuoto. La resa isolata di Im-pp<sup>7m</sup>G è circa il 100%. Una procedura simile è descritta in *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* 24:1131-1134 (2005) e *J. Org. Chem.*, 64:5836-5840 (1999).

#### ESEMPIO 3

##### **Preparazione di 3'-O-Metilguanosa 5'-fosfato (pG<sub>(3'OMe)</sub>) da 3'-O-metilguanosa**

##### **(Figura 3)**

La 3'-O-metilguanosa (10 mmol) è sciolta in trietilfosfato (40 mL) a 60-70°C. La miscela viene raffreddata a 0°C in un bagno di acqua e ghiaccio, viene aggiunto ossicloruro di fosforo (30 mmol) e la miscela viene agitata sotto argon per 3 ore a temperatura ambiente. La reazione viene spenta con una lenta aggiunta di 1M TEAB (100 mL; pH 8.5) con agitazione. La miscela viene agitata per 8 ore e diluita con 1L di acqua. La soluzione risultante viene caricata su una colonna DEAE Sephadex (3 x 40 cm) e il prodotto viene eluito con un gradiente lineare da 0,05 a 1,0M (3L) di

TEAB (pH 7,5). Le frazioni contenenti il prodotto puro sono combinate, fatte evaporare in un residuo solido e fatte co-evaporare con metanolo (4 x 50 mL) per dare pG<sub>(3'Ome)</sub> (sale di trietilammonio) come un solido bianco (resa 60%). Una procedura simile è descritta nella Domanda di brevetto U.S. n. di serie 2012/0156751.

#### ESEMPIO 4

**Preparazione di 3'-O-Metilguanosina 5'-fosforimidazolide (Im-pG<sub>(3'Ome)</sub>) da pG<sub>(3'Ome)</sub>**

(Figura 4)

Il sale di trietilammonio di pG<sub>(3'Ome)</sub> (0,5 mmol) viene fatto reagire con imidazolo (5 mmol), trifetilfosfina (2,5 mmol) e 2,2'-dipiridildisolfuro (2,5 mmol) in DMF secco (25 mL) per 5 ore. Crude Im-pG<sub>(3'Ome)</sub> è fatto precipitare versando la miscela di reazione in 400 mL di perclorato di sodio 0,2 M in soluzione di acetone. La miscela viene raffreddata a -20°C e il precipitato risultante viene raccolto per centrifugazione, lavato con acetone (3 x 60 mL) ed essiccato sotto alto vuoto (resa: 100%). Una procedura simile è descritta nella Domanda di brevetto U.S. n. di serie 2012/0156751.

#### ESEMPIO 5

**Preparazione di 3'-O-Metilguanosina 5'-difosfato (ppG<sub>(3'Ome)</sub>) da Im-pG<sub>(3'Ome)</sub>**

(Figura 5)

Il cloruro di zinco solido (14,0 mmol) viene aggiunto a piccole porzioni a una soluzione di Im-pG<sub>(3'Ome)</sub> (7,0 mmol) in DMF anidro (40 mL). La miscela viene agitata per 15 minuti sotto argon fino a quando tutti i solidi sono dissolti. Si aggiunge una soluzione di fosfato di tributilammonio 1M in DMF (40 mL) e si agita la miscela a temperatura ambiente. Dopo 5 ore la miscela viene diluita con 200 mL di acqua ed estratta con diclorometano (2 x 200 mL). Lo strato acquoso viene diluito con acqua (1L), caricato su una colonna DEAE Sephadex (5 x 40 cm) ed eluito con gradiente lineare da 0,05 a 1,0M (6L) TEAB (pH 7.5). Le frazioni contenenti il prodotto puro sono combinate, fatte evaporare e co-evaporare con metanolo (4 x 50 mL) per dare ppG<sub>(3'Ome)</sub> (sale di trietilammonio) come un solido bianco (resa: 60%). Una procedura simile è descritta nella Domanda di brevetto U.S. n. di serie 2012/0156751.

#### ESEMPIO 6

**Preparazione di 7-metil-3'-O-metilguanosina 5'-difosfato (pp<sup>7m</sup>G<sub>(3'Ome)</sub>) da ppG<sub>(3'Ome)</sub>**

(Figura 6)

Si prepara una soluzione di ppG<sub>(3'Ome)</sub> (sale di trietilammonio; 3,0 mmol) in 50 mL di acqua e si aggiunge acido acetico glaciale per regolare il pH della soluzione a 4.0. Il solfato di dimetile (10,0 mL) viene aggiunto a questa miscela a goccia per un periodo di 30 minuti e la miscela di reazione

viene agitata a temperatura ambiente per 4 ore mantenendo un pH di  $4.0 \pm 0.5$  usando una soluzione di NaOH 0,1M. Dopo 4 ore, la miscela di reazione viene estratta con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 150 mL) per rimuovere il solfato di dimetile non reagito. Lo strato acquoso viene regolato a pH 5.5, diluito con acqua (500 mL) e caricato su una colonna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). Il prodotto viene eluito utilizzando un gradiente lineare di 0-1,0M TEAB, pH 7.5 (3 L). Le frazioni contenenti  $\text{pp}^{7\text{m}}\text{G}_{3'\text{Ome}}$  puro (sale di trietilammonio) vengono riunite, fatte evaporare ed essiccate sotto alto vuoto per dare una polvere bianca fine (resa: 80%). Una procedura simile è divulgata in *RNA* 9:1108-1122(2003) *Nucleoside Nucleotides & Nucleic acids* 25:337-340 (2006); e nella Domanda di brevetto U.S. n. di serie 2012/0156751.

#### ESEMPIO 7

**Preparazione di 7-metil-3'-O-metilguanosa 5-difosfato imidazolido (Im- $\text{pp}^{7\text{m}}\text{G}_{3'\text{Ome}}$ ) da  $\text{pp}^{7\text{m}}\text{G}_{3'\text{Ome}}$**

(Figura 7)

Il protocollo descritto nell'Esempio 1 è utilizzato per la preparazione di Im- $\text{pp}^{7\text{m}}\text{G}_{3'\text{Ome}}$ . Una procedura simile è divulgata in *RNA* 14:1119-1131 (2008).

#### ESEMPIO 8

**Procedura generale per la preparazione di dinucleotidi  $\text{pN}_{(2'\text{-OR}_1)}\text{pN}$  ( $\text{R}_1 = \text{H o Me}$ )**

(Figura 8)

Fosforammidite monomero (i) (1,0 mmol) e 2',3', N-protetto nucleoside (ii) (1,0 mmol) sono fatti reagire in 10 mL di acetonitrile contenente 2,5 molar equivalenti di attivatore (tetrazolo). Dopo 60 minuti di agitazione a temperatura ambiente il prodotto intermedio viene ossidato dallo stato P(III) a P(V) con iodio ed estratto con diclorometano (200 mL) e salamoia (200 mL). Lo strato organico è anidrificato con solfato di sodio e viene fatto evaporare fino a diventare una schiuma solida (intermedio (iii)).

Per rimuovere il gruppo DMT-protettivo, l'intermedio (iii) viene sciolto in 10 mL di acido acetico all'80% e, a reazione completata (circa 1-2 ore), la miscela viene fatta evaporare e co-evaporare con metanolo (5 x 30 mL) per rimuovere l'acido acetico. Il dimero 5'-OH grezzo (iv) viene isolato e purificato mediante cromatografia su gel di silice utilizzando il 5% di metanolo in diclorometano come eluente.

Il dimero 5'-OH (iv) (1,0 mmol) è fosforilato con 2 equivalenti di bis-cianoetil-N,N-diisopropil-fosforammidite e 2 equivalenti di attivatore (tetrazolo) in 10 mL di acetonitrile. Dopo 30 minuti di agitazione a temperatura ambiente il dimero 5'-fosforilato viene ossidato dallo stato P(III) a P(V) con lo iodio ed estratto con diclorometano (150 mL) e soluzione salina (150 mL). Lo strato organico viene fatto evaporare fino ad un residuo oleoso, fatto co-evaporare con metanolo (2 x 30 mL), sciolto in 12 mL di metanolo e viene aggiunta ammoniaca concentrata (12 mL). La miscela

viene mantenuta a temperatura ambiente per oltre 48 ore fino a quando la deprotezione del dimero  $pN_{2OR_1}pN(v)$  è completa. La miscela viene fatta evaporare e co-evaporare con metanolo (2 x 30 mL).

Quando R = metile il dimero grezzo (v) viene purificato direttamente mediante cromatografia a scambio anionico e a fase inversa (Fase 5). Le frazioni sono fatte evaporare ottenendo un dimero finale  $pN_{2OR_1}pN(v)$  (v;  $R_1$  = metile; sale di trietilammonio) come un solido bianco (35% resa complessiva).

Quando R = TBDMS il dimero grezzo (v) viene trattato (Fase 4B) con HF-3TEA miscela per rimuovere 2'-OTBDMS gruppo protettivo (*Org. Biomol. Chem.*, 3:3851-3868 (2005) e *Nucl. Acids Res.* 22:2430-2431 (1994)). Quando la reazione è completa, la miscela viene diluita con 0,05M TEAB e purificata mediante cromatografia a scambio anionico e fase inversa (Fase 5). Le frazioni sono fatte evaporare ottenendo un dimero finale  $pN_{2OR_1}pN(v)$  ( $R_1$  = H; sale di trietilammonio) come un solido bianco (30% di resa complessiva).

#### ESEMPIO 9

**Procedura generale per la sintesi di oligonucleotidi di inizio con strutture Cap 0, Cap 1 o Cap 2 (nell'esempio viene usato un dinucleotide 5'-fosforilato)**

#### (Figura 9)

##### A. Approccio 1:

Ad una sospensione di Im-pp<sup>7m</sup>G<sub>(3'OMe)</sub> o Im-pp<sup>7m</sup>G (2 mmol; forma di sale di sodio) e dinucleotide 5'-fosforilato (1 mmol; sale di trietilammonio) in DMF (50 mL), viene aggiunto lentamente ZnCl<sub>2</sub> anidro (1 g) mentre la miscela viene agitata a 35°C. Dopo 24 ore la reazione viene fermata con l'aggiunta di una soluzione di EDTA 25 mM in acqua (500 mL) e neutralizzata da una soluzione 1M di bicarbonato di sodio. La miscela viene diluita a 1L con acqua e caricata su una colonna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). Il prodotto viene eluito utilizzando un gradiente lineare di bicarbonato di ammonio 0-1 M, pH 7.2 (2 L). Le frazioni contenenti il prodotto puro vengono raggruppate, fatte evaporare ed essiccate sotto alto vuoto per dare una polvere bianca fine (resa: 60%). Un approccio simile è divulgato nella Domanda di brevetto statunitense seriale n. 2012/0156751 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17:5295-5299 (2007) e *RNA* 14:1119-1131 (2008).

##### B. Approccio 2:

Im-pp<sup>7m</sup>G<sub>(3'OMe)</sub> o Im-pp<sup>7m</sup>G (2 mmol) è sciolto in tampone N-metil morfolina (0,2 M, pH 7.0, 10 mL) contenente MnCl<sub>2</sub> (2 mmol) e aggiunto al 5'-fosforilato dinucleotide solido (1 mmol; sale di trietilammonio). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente. Dopo 24-40 ore la reazione viene fermata con 10 mL di soluzione 0,25M di EDTA. La miscela viene caricata su una colonna DEAE Sephadex (3 x 50 cm). Il prodotto viene

eluito utilizzando un gradiente lineare di bicarbonato di ammonio 0-1,0M, pH 7.2 (2 L). Le frazioni contenenti il prodotto puro vengono raggruppate, fatte evaporare ed essiccate sotto alto vuoto ottenendo una polvere bianca fine (resa 50%). Un approccio simile è descritto in *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21:7921-7928 (2013), *Nucleic Acids Research* 37:1925-1935 (2009); *J. Org. Chem.*, 64:5836-5840 (1999). (Nota: 1. Un oligonucleotide trimero, tetramero, pentamero, esamero, eptamero, ottamero, nanomero o decamero 5'-fosforilato può essere utilizzato invece di dinucleotide 5'-fosforilato come illustrato nell'Esempio 9. 2. Per preparare l'oligonucleotide con cap di inizio con Cap 0, l'oligonucleotide 5'-fosforilato non ha gruppi 2'-O-metile sui primi residui 5'-nucleosidici, *per esempio* pApG. 3. Per preparare l'oligonucleotide con cap di inizio con Cap 1, l'oligonucleotide 5'-fosforilato porta un gruppo 2'-O-metile sul primo residuo 5'-nucleoside, *ad esempio* pA(2'Ome)pG. 4. Per preparare l'oligonucleotide con cap di inizio con Cap 2, l'oligonucleotide 5'-fosforilato porta due gruppi 2'-O-metilici sul primo e sul secondo residuo nucleosidico 5', *ad esempio* pA(2'Ome)pG(2'Ome)pG).

#### ESEMPIO 10

##### Strutture di primer oligonucleotidici con cap di inizio secondo la Formula I

La Figura 10 mostra le strutture dei primer oligonucleotidici con cap di inizio usati negli esempi secondo la Struttura I. A)  ${}^{m7}G_3'OmepppG$ , B)  ${}^{m7}GpppG_2'OmepG$ , C)  ${}^{m7}G_3'OmepppG_2'OmepG$ , D)  ${}^{m7}GpppA_2'OmepG$ , E)  ${}^{m7}G_3'OmepppA_2'OmepG$ , F)  ${}^{m7}GpppC_2'OmepG$ , G)  ${}^{m7}G_3'OmepppC_2'OmepG$ , H)  ${}^{m7}GpppA_2'OmepG_2'OmepG$ .

#### ESEMPIO 11

##### Trascrizione *in vitro* con primer ARCA

Uno stampo di trascrizione di DNA a doppio filamento che codifica la luciferasi di lucciola è stato generato mediante reazione a catena della polimerasi. Il nucleotide di riferimento +1 era la 2'-deossicitidina. Le reazioni di trascrizione sono state assemblate con 25 ug/mL di stampo di trascrizione, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 27 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidina, 10 mM DTT, 0,002% Triton X-100, 1000 unità/mL inibitore di RNasi murino (New England Biolabs N. di catalogo M0314), 2 unità/mL pirofosfatasi inorganica (New England Biolabs catalogo N. M2403), 4000 unità/mL T7 RNA polimerasi (New England Biolabs N. catalogo M0251), 6 mM ARCA ( ${}^{m7}G_3'OmepppGG$ ), 1,5 mM GTP, 7,5 mM ATP, 7,5 mM CTP e 7,5 mM UTP. Le trascrizioni sono state incubate a 37°C per 2 ore. Le reazioni sono state integrate con 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 100 unità/mL DNasi I (New England Biolabs catalogo N. M0303) e incubate per 1 ora a 37°C. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen catalogo N. 75162) secondo le istruzioni del produttore. mRNA sono stati eluiti in acqua e defosforilati regolando la soluzione a 50 mM Bis-Tris-Propano HCl (pH 6.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> e 250 unità / ml di fosfatasi Antarctic

(New England Biolabs N. catalogo M0289). La reazione è stata incubata a 37°C per 1 ora. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen N. catalogo 75162) secondo le istruzioni del produttore.

#### ESEMPIO 12

##### Trascrizione *in vitro* con primer oligonucleotidici trimerici di inizio con cap

Alcuni primer oligonucleotidici con cap di inizio che sono utilizzati nelle trascrizioni sono indicati in Tabella 1. Uno stampo di trascrizione di DNA a doppio filamento di luciferasi di specifico per ogni trimero è generato mediante reazione a catena della polimerasi. Questi stampi differivano per i nucleotidi +1 e +2. Per un dato trimero, il nucleotide +1 stampo era complementare a B<sub>1</sub> (il nucleotide destinato a diventare il nucleotide +1 del trascritto). Allo stesso modo il nucleotide stampo +2 era complementare a B<sub>10</sub> (il nucleotide destinato a diventare il nucleotide +2 della trascrizione; vedi Esempio 10)). Le reazioni di trascrizione sono assemblate con 25 ug/mL di stampo di trascrizione, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 27 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidina, 10 mM DTT, 0,002% Triton X-100, 1000 unità/mL inibitore di RNasi murino (New England Biolabs catalogo N. M0314), 2 unità/mL pirofosfatasi inorganica (New England Biolabs N. catalogo M2403), 4000 unità/mL T7 RNA polimerasi (New England Biolabs catalogo N. M0251) e 6 mM di primer oligonucleotide con cap di inizio, 1,5 mM GTP e 7,5 mM ciascuno di ATP, CTP e UTP. Negli esempi successivi, questa formulazione primer/NTP sarà indicata come Primer/NTP Formulazione 1. È chiaro a un esperto nell'arte che altre polimerasi come T7, T3 o SP6 RNA polimerasi potrebbero essere usate invece di T7 RNA polimerasi per eseguire la stessa funzione usando i loro rispettivi promotori. Le miscele di reazione di trascrizione sono incubate a 37°C per 2 ore. Le reazioni sono integrate con 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 100 unità/mL DNasi I (New England Biolabs catalogo N. M0303) e incubato per 1 ora a 37°C. Gli mRNA risultanti sono purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen catalogo N. 75162) secondo le istruzioni del produttore. mRNA sono eluiti in acqua e defosforilati regolando la soluzione a 50 mM Bis-Tris-Propano HCl (pH 6.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> e 250 unità/ml fosfatasi Antarctic (New England Biolabs catalogo N. M0289). La reazione viene incubata a 37°C per 1 ora. Gli mRNA risultanti sono purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen catalogo N. 75162) secondo le istruzioni del produttore. Gli mRNA sono eluiti in acqua.

#### ESEMPIO 13

##### Trascrizione *in vitro* con primer oligonucleotidici tetrameric di inizio con cap



Per la trascrizione sono stati utilizzati primer oligonucleotidici con cap di inizio  ${}^7\text{mG}_3\text{'OmePPP}A_2\text{'OmePG}_2\text{'OmePG}$ . La trascrizione è stata effettuata come nell'Esempio 11 con le seguenti modifiche. Uno stampo di trascrizione del DNA a doppio filamento specifico per il tetramero è stato generato dalla

reazione a catena della polimerasi. Il nucleotide stampo +1 (2'-deossitimidina) era complementare all'adenosina (il primo nucleotide del primer destinato a diventare un nucleotide trascritto +1). Allo stesso modo il nucleotide stampo +2 (2'-deossicitidina) era complementare alla guanosina (il secondo nucleotide del primer destinato a diventare il nucleotide +2 trascritto). Allo stesso modo il nucleotide +3 stampo (2'-deossicitidina) era complementare alla guanosina (il terzo nucleotide del primer destinato a diventare il nucleotide +3 trascritto). Le reazioni di trascrizione sono state assemblate con 25 ug/mL di stampo di trascrizione, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 27 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidina, 10 mM DTT, 0,002% Triton X-100, 1000 unità/mL inibitore RNasi murino (New England Biolabs catalogo N. M0314), 2 unità/mL pirofosfatasi inorganica (New England Biolabs catalogo N. M2403), 4000 unità/mL T7 RNA polimerasi (New England Biolabs N. catalogo M0251), 6 mM di di inizio oligonucleotide primer con cap <sup>7m</sup>G<sub>3</sub>OmepppA<sub>2</sub>OmeP G<sub>2</sub>OmeP G, 1,5 mM di GTP, 7,5 mM di ATP, 7,5 mM di UTP e 7,5 mM di CTP. È chiaro a un esperto nella tecnica che altre polimerasi come T7, T3 o SP6 RNA polimerasi potrebbero essere usate invece di T7 RNA polimerasi per eseguire la stessa funzione usando i loro rispettivi promotori. Miscele di reazione di trascrizione sono stati incubati a 37°C per 2 ore, Le reazioni sono state integrate con 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 100 unità/ml DNasi I (New England Biolabs N. catalogo M0303) e incubato per 1 ora a 37°C. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen N. catalogo 75162) secondo le istruzioni del produttore. mRNA sono stati eluiti in acqua e defosforilati regolando la soluzione a 50 mM Bis-Tris-Propano HCl (pH 6.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> e 250 unità/ml di fosfatasi Antarctic (New England Biolabs N. catalogo M0289). La reazione è stata incubata a 37°C per 1 ora. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen N. catalogo 75162) secondo le istruzioni del produttore.

#### ESEMPIO 14

**Trascrizione *in vitro* con <sup>m7</sup>GpppA<sub>2</sub>OmeP G primer oligonucleotidico con cap di inizio uno stampo di trascrizione con residui 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina in posizioni stampo +1 e +2, rispettivamente.**

È stato utilizzato uno stampo di trascrizione del DNA di luciferasi di lucciola a doppio filamento con residui di 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina nelle posizioni +1 e +2 dello stampo, rispettivamente. Due reazioni di trascrizione sono state assemblate con 25 ug/mL di stampo di trascrizione, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 27 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidina, 10 mM DTT, 0,002% Triton X-100, 1000 unità/mL inibitore RNasi murino (New England Biolabs catalogo N. M0314), 2 unità/mL pirofosfatasi inorganica (New England Biolabs N. catalogo M2403), 4000 unità/mL T7 RNA polimerasi (New England Biolabs N. catalogo M0251). Le due trascrizioni differivano nella quantità di oligonucleotide con cap di inizio, nella quantità di NTP e nell'identità degli NTP. La prima trascrizione è stata progettata per imitare le condizioni di trascrizione di Ishicawa *et al.* (Nucleic Acids Symposium Series No. 53:129 (2009)). Questa reazione di trascrizione conteneva 6 mM di primer oligonucleotidico con cap <sup>m7</sup>GpppA<sub>2</sub>OmeP G

di inizio, 0,9 mM di GTP e 7,5 mM di ATP, CTP e UTP. Negli esempi successivi questa formulazione primer/NTP sarà indicata come Primer/NTP Formulazione 2. In questa formulazione, il primer oligonucleotidico di inizio era in eccesso di più di 6 volte rispetto al GTP. La seconda trascrizione ha utilizzato 5 mM di primer oligonucleotidico con cap <sup>m7</sup>GpppA<sub>2'</sub>OmpG, 5 mM di GTP, ATP, CTP e pseudouridina trifosfato (ΨTP). Negli esempi successivi questa formulazione primer/NTP sarà indicata come Primer/NTP Formulazione 3. Nella formulazione Primer/NTP 3, la concentrazione di GTP è stata aumentata per produrre quantità di RNA commercialmente utili. È chiaro a un esperto nella tecnica che altre polimerasi come T7, T3 o SP6 RNA polimerasi potrebbero essere usate invece di T7 RNA polimerasi per eseguire la stessa funzione usando i loro rispettivi promotori. Le miscele di reazione di trascrizione sono incubate a 37°C per 2 ore. Le reazioni sono state integrate con 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 100 unità/mL DNasi I (New England Biolabs catalogo N. M0303) e incubate per 1 ora a 37°C. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen catalogo N. 75162) secondo le istruzioni del produttore. mRNA sono stati eluiti in acqua e defosforilati regolando la soluzione a 50 mM Bis-Tris-Propano HCl (pH 6,0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> e 250 unità / ml di fosfatasi Antarctic (New England Biolabs N. catalogo M0289). La reazione è stata incubata a 37°C per 1 ora per il Primer/NTP Formulazione 2 e 3 ore per il Primer/NTP Formulazione 3. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen N. catalogo 75162) secondo le istruzioni del produttore. I rendimenti di trascrizione purificati con la formulazione Primer/NTP 2 e 3 erano rispettivamente 0,7 milligrammi/millilitro di reazione di trascrizione (mg/mL) e 3,9 mg/mL di reazione di trascrizione. La resa con il Primer/NTP Formulazione 3 è stata notevolmente superiore a quella ottenuta con il Primer/NTP Formulazione 2.

#### ESEMPIO 15

##### **Trascrizione *in vitro* con primer oligonucleotidici con cap <sup>m7</sup>GpppA<sub>2'</sub>OmpG di inizio su uno stampo di trascrizione con residui citidina nelle posizioni +1 e +2 stampo**

È stato utilizzato uno stampo di trascrizione del DNA della luciferasi di lucciola a doppio filamento in cui i nucleotidi +1 e +2 dello stampo erano citidine e quindi non completamente complementari al primer oligonucleotidico con cap <sup>m7</sup>GpppA<sub>2'</sub>OmpG di inizio. Due reazioni di trascrizione sono state assemblate con 25 ug/mL di stampo di trascrizione, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 27 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidina, 10 mM DTT, 0,002% Triton X-100, 1000 unità/mL inibitore RNasi murino (New England Biolabs N. catalogo M0314), 2 unità/mL pirofosfatasi inorganica (New England Biolabs N. catalogo M2403), 4000 unità/mL T7 RNA polimerasi (New England Biolabs N. catalogo M0251). Le due trascrizioni differivano nella quantità di oligonucleotide con cap di inizio e di NTP. La prima trascrizione è stata progettata per imitare le condizioni di trascrizione di Ishikawa *et al.* (Nucleic Acids Symposium Series No. 53: 129 (2009)). Questa reazione di trascrizione conteneva Primer/NTP

Formulazione 2. La seconda trascrizione ha utilizzato il Primer/NTP Formulazione 3. È chiaro a un esperto nella tecnica che altre polimerasi come T7, T3 o SP6 RNA polimerasi potrebbero essere usate invece di T7 RNA polimerasi per eseguire la stessa funzione usando i loro rispettivi promotori. Le miscele di reazione di trascrizione sono state incubate a 37°C per 2 ore. Le reazioni sono state integrate con 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 100 unità/mL DNasi I (New England Biolabs N. catalogo M0303) e incubate per 1 ora a 37°C. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen N. catalogo 75162) secondo le istruzioni del produttore o mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa. mRNA sono stati defosforilati regolando la soluzione a 50 mM Bis-Tris-Propano HCl (pH 6.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> e 250 unità/mg di fosfatasi Antarctic (New England Biolabs N. catalogo M0289). La reazione è stata incubata a 37°C per 1 ora per il Primer/NTP Formulazione 2 e 3 ore per il Primer/NTP Formulazione 3. Gli mRNA risultanti sono stati purificati utilizzando un kit RNeasy Maxi (Qiagen N. catalogo 75162) secondo le istruzioni del produttore. Le rese di trascrizione purificate con le formulazioni Primer/NTP 2 e 3 erano rispettivamente 0,6 milligrammi/millilitro di reazione di trascrizione (mg/mL) e 3,9 mg/mL di reazione di trascrizione. La resa con il Primer/NTP Formulazione 3 è stata notevolmente superiore a quella ottenuta con il Primer/NTP Formulazione 2.

#### **ESEMPIO 16**

##### **Traduzione di mRNA nelle cellule Huh-7**

**(Figura 11)**

L'attività traduzionale degli mRNA di luciferasi generati con primer oligonucleotidici con cap di inizio è stata valutata in epatociti coltivati in triplicato. Le cellule Huh-7 sono state coltivate in DMEM integrato con 10% FBS, L-glutamina, amminoacidi non essenziali e penicillina/streptomina a 37°C sotto un'atmosfera di 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state trasfettate con 400 ng di mRNA. Per confronto, le cellule sono state anche trasfettate con un mRNA di luciferasi Cap 0 generato dall'iniziazione con ARCA. A 20 ore, le cellule sono state raccolte e l'attività della luciferasi è stata misurata utilizzando un kit ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega N. catalogo E6120) secondo le raccomandazioni del produttore. La luminescenza è stata misurata utilizzando uno strumento GloMax-Multi+Detection System secondo le raccomandazioni del produttore. L'attività della luciferasi è stata rilevata per tutti gli mRNA testati (Figura 11). Il fatto che gli mRNA generati con primer oligonucleotidici con cap di inizio o primer oligonucleotidici con cap 3'-O-metilati di inizio traducono con efficienze simili agli RNA con cap ARCA indica che sono efficientemente sottoposti a capping co-trascrizionale.

#### **ESEMPIO 17**

**Saggio per determinare l'efficienza di capping dell'mRNA generato mediante capping co-trascrizionale con ARCA o primer**

**oligonucleotidico con cap di inizio usando la formulazione Primer/NTP 1.**

**(Figure 12A-12H)**

Per ogni primer oligonucleotidico con cap di inizio testato, quantità sufficienti di mRNA da rilevare con la cromatografia liquida spettroscopia di massa (LC-MS) sono state sottoposte a un test di capping. In questo test, un piccolo frammento è stato tagliato dall'estremità 5' di un mRNA completo e analizzato da LC-MS. Prima del taglio dell'mRNA, è stato trattato con fosfatasi Antarctic (New England Biolabs catalogo N. M0289) per convertire monofosfati, difosfati e trifosfati senza cap in un 5' OH per facilitare l'analisi. L'mRNA trattato con fosfatasi è stato poi scisso e purificato. L'RNA purificato è stato sottoposto ad analisi LC-MS. La Figura 12 mostra le tracce LC. I picchi LC corrispondenti un senza cap (5' OH dopo il trattamento con fosfatasi) e Cap 1 sono indicati con le masse osservate. L'insero schematico mostra l'allineamento del primer oligonucleotidico di inizio sullo stampo di trascrizione. Si noti che "|" indica una coppia di basi del nucleotide di inizio con cap con il nucleotide stampo nello schema. Il pedice "m" indica un gruppo 2'-O-metile e il pedice "m7" indica una metilazione di base. Per confronto, un mRNA co-trascrizionalmente con cap con ARCA è stato sottoposto al test di capping. Una stima dell'efficienza di capping è stata fatta usando la seguente formula (intensità dei picchi con cap)/[(intensità del picco con cap)+(intensità del picco 5' OH)]. La % di osservata in Figura 12 era A)  ${}^m7G_3OmepppG = 79\%$ , B)  ${}^m7GpppG_2OmepG = 89\%$ , C)  ${}^m7G_3OmepppG_2OmepG = 87\%$ , D)  ${}^m7GpppA_2OmepG = 99\%$ , E)  ${}^m7G_3OmepppA_2OmepG = 99\%$ , F)  ${}^m7GpppC_2OmepG = 98\%$ , G)  ${}^m7G_3OmepppC_2OmepG = 97\%$ , H)  ${}^m7GpppA_2OmepG_2OmepG = 50\%$ . In ogni caso, l'efficienza di capping delle trascrizioni sottoposte a capping co-trascrizionalmente con primer oligonucleotidici con cap trimerici di inizio era maggiore di quella osservata con  ${}^m7G_3OmepppG$  (ARCA).

### **Esempio 18**

**Confronto di capping con  ${}^m7GpppA_2OmepG$  oligonucleotide con cap di inizio su uno stampo di trascrizione con residui 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina in posizioni stampo +1 e +2 rispetto uno stampo di trascrizione con residui citidina in posizioni stampo +1 e +2**

**(Figure 13A-13D)**

Gli mRNA prodotti negli Esempi 14 e 15 sono stati sottoposti a un test di capping per determinare l'efficienza relativa e la specificità del capping dei trascritti con residui di 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina nelle posizioni +1 e +2 dello stampo rispetto a uno stampo di trascrizione con residui citidina nelle posizioni +1 e +2 dello stampo. Quantità sufficienti di mRNA da rilevare mediante cromatografia liquida spettroscopia di massa (LC-MS) sono state sottoposte a un saggio di capping. In questo test, un piccolo frammento è stato tagliato dall'estremità 5' di un mRNA completo e analizzato mediante LC-MS. Prima del taglio dell'mRNA, è stato trattato con fosfatasi Antarctic (New England Biolabs N. catalogo M0289) per

convertire monofosfati, difosfati e trifosfati senza cap in un 5' OH per facilitare l'analisi. L'mRNA trattato con fosfatasi è stato poi tagliato e purificato. L'RNA purificato è stato sottoposto ad analisi LC-MS. La Figura 13 mostra i tracciati LC. I picchi LC corrispondenti a senza cap e Cap 1 sono indicati con le masse osservate. L'insero schematico mostra l'allineamento del primer oligonucleotidico di inizio sullo stampo di trascrizione. Il pedice "m" indica un gruppo 2'-O-metile e il pedice "m7" indica una metilazione di base. Trascritti delle Figure 13A e 13B sono stati trascritti da stampi con 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina ai nucleotidi stampo +1 e +2, rispettivamente, usando le formulazioni Primer/NTP 2 e 3, rispettivamente. Le Figure 13C e 13D sono trascritti, trascritti da stampi con 2'-deossicitidina ai nucleotidi dello stampo +1 e +2 usando le formulazioni Primer/NTP 2 e 3, rispettivamente. Quando l'oligonucleotide di inizio  $m^7GpppA_{2'Ome}pG$  era completamente complementare ai nucleotidi +1 e +2, il prodotto principale osservato era il desiderato trascritto Cap 1 iniziato con  $m^7GpppA_{2'Ome}pG...$  (Figure 13A e 13B). Per le Figure 13A e 13B, una stima dell'efficienza di capping è stata fatta usando la seguente formula (intensità dei picchi con cap)/[intensità del picco con cap)+(intensità del picco 5' OH)] e l'efficienza di capping con la formulazione Primer/NTP 2 e Primer/NTP Formulazione 3 era rispettivamente del 99% e del 96%. Sono stati rilevati solo prodotti di iniziazione aberranti minori. Al contrario, quando i nucleotidi stampo +1 e +2 sono la citidina, non c'è perfetta complementarità tra l'oligonucleotide di inizio  $m^7GpppA_{2'Ome}pG$  e questi nucleotidi stampo. Le Figure 13C e 13D mostrano che l'oligonucleotide con cap iniziava in due registri. Nel primo registro, il residuo oligonucleotidico con cap 3' guanosina di inizio si appaia con la citidina +1 stampo per produrre un trascritto con un'ulteriore adenosina 5' non trascritta (Cap 1 + A). Si noti che "|" indica una coppia di basi del nucleotide di inizio con cap con il nucleotide stampo nello schema. È indicata la posizione del nucleotide stampo. Nel secondo registro, il 3' residuo oligonucleotidico con cap di inizio guanosina appaiato alla citidina stampo +2 e l'adenosina dell'oligonucleotide con cap di inizio +1 non forma un ibrido completo con il nucleotide stampo +1. Questo produce una trascrizione in cui la guanosina 5' trascritta è stata sostituita con un'adenosina non trascritta (Cap 1 G-A). Una stima dell'efficienza di capping è stata fatta usando la seguente formula (intensità dei picchi con cap "Cap1 + A" + "Cap1 G-A")/[intensità dei picchi con cap "Cap1 + A" "Cap1 + G-A)+(intensità del picco 5'OH)]. L'efficienza di capping calcolata nelle Figure 13C e 13D era del 97 e 77%. Si evidenzia la sorprendente scoperta che l'efficienza di capping e la fedeltà di inizio della trascrizione da stampo erano molto più alte quando il primer oligonucleotidico con cap di inizio era completamente complementare ai corrispondenti nucleotidi +1 e +2 stampo. Inoltre, con il nostro metodo, la capping efficiente può essere ottenuta senza ridurre la concentrazione di un NTP per guidare la capping, permettendo rese di trascrizione molto più grandi. Così il metodo di capping che descriviamo è distinto e superiore a quello di Ishikawa *et al.*

#### Esempio 19

(Figure 14A-14B)

**Confronto della traduzione in cellule THP-1 differenziate di mRNA prodotto con <sup>m7</sup>GpppA<sub>2'</sub>OmepG oligonucleotide con cap di inizio su uno stampo di trascrizione con residui 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina in posizioni stampo +1 e +2 rispetto uno stampo di trascrizione con residui citidina in posizioni stampo +1 e +2**

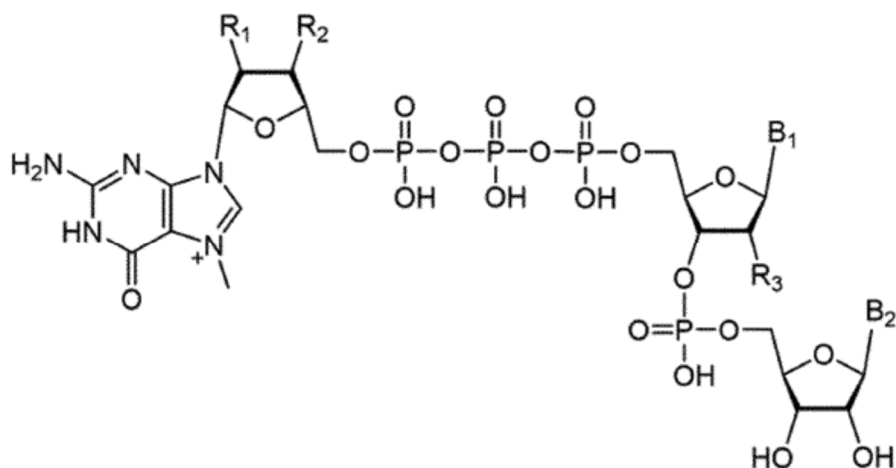
Per valutare l'espressione degli mRNA di luciferasi generati negli Esempi 14 e 15, gli mRNA sono stati trasfettati in cellule THP-1 (ATCC, N. catalogo TIB-202) con sei repliche. Le cellule THP-1 sono state coltivate in RPMI-1640 formulato ATCC (ATCC, N. Catalogo 30-2001) integrato con 10% FBS, sodio piruvato e penicillina/streptomicina a 37°C sotto un'atmosfera di 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state seminate a 2E+05 cellule per pozzetto in una piastra a 24 pozzetti in presenza del forbol estere 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA; Cell Signaling Technologies, N. catalogo 4174) per indurre la differenziazione. Le cellule sono state trasfettate con 100 ng di mRNA per pozzetto 72 ore dopo la semina. Per confronto, le cellule sono state anche trasfettate con un mRNA di luciferasi Cap 0 generato dall'iniziazione con ARCA. A 20 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte e l'attività della luciferasi è stata misurata utilizzando un kit ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega N. Catalogo E6120) secondo le raccomandazioni del produttore. La luminescenza è stata misurata utilizzando uno strumento GloMax-Multi+ Detection System secondo le raccomandazioni del produttore. I dati sono stati riprodotti in grafico come la media di sei replicati +/- la deviazione standard dalla media. I dati sono stati analizzati utilizzando il t-test non appaiato per generare valori p come misura di significatività. È indicato il valore p tra le coppie. La traduzione è stata confrontata in cellule THP-1 per trascritti sono stati generati con <sup>m7</sup>GpppA<sub>2'</sub>OmepG iniziando oligonucleotide con cap e uno stampo comprendente residui 2'-deossitimidina e 2'-deossicitidina alle posizioni stampo +1 e +2 (stampo "TC") rispetto uno stampo di trascrizione con residui citidina nelle posizioni stampo +1 e +2 (stampo "CC"). A) La trascrizione è stata condotta con le formulazioni Primer/NTP 2 o B) Primer/NTP 3. Con entrambe le formulazioni, la traduzione in cellule coltivate THP-1 era significativamente superiore quando il primer oligonucleotidico con cap di inizio <sup>m7</sup>GpppA<sub>2'</sub>OmepG era completamente complementare ai nucleotidi del stampo +1 e +2 (stampo "TC") come descritto nella presente invenzione. Nella Figura 14B, abbiamo anche valutato l'attività di un mRNA realizzato con lo stampo "TC" e con cap con ARCA (Cap 0). Questo è l'attuale standard industriale per la generazione di mRNA sottoposti a capping co-trascrizionalmente. L'RNA con cap ARCA aveva un'attività significativamente inferiore rispetto ai trascritti fatti dove prodotti quando il primer oligonucleotidico con cap di inizio <sup>m7</sup>GpppA<sub>2'</sub>OmepG era completamente complementare ai nucleotidi stampo stamp +1 e +2 (stampo "TC").

In sintesi, gli esempi mostrati qui dimostrano che, rispetto ai metodi precedentemente pubblicati, i metodi descritti qui generano RNA con una combinazione di 1) alta resa, 2) alta entità di capping, 3) alta fedeltà di trascrizione da stampo e 4) attività superiore in cellule.

Le invenzioni qui descritte illustrativamente possono essere opportunamente praticate in assenza di qualsiasi elemento o elementi, limitazione o limitazioni, non specificamente descritti qui. Così, per esempio, i termini "un" e "uno" e "il" e riferimenti simili nel contesto della descrizione dell'invenzione (specialmente nel contesto delle seguenti rivendicazioni) devono essere interpretati per coprire sia il singolare che il plurale, a meno che non sia diversamente indicato qui o chiaramente contraddetto dal contesto. I termini "comprendente", "avente", "che include", "contenente", ecc. devono essere letti in modo espansivo e senza limitazioni (*ad esempio*, significa "comprendente, ma non limitato a"). La citazione delle gamme di valori qui sono intese soltanto per servire come metodo di abbreviazione indicando individualmente ogni valore separato che rientra nell'intervallo, a meno che diversamente indicato qui, ed ogni valore separato è incorporato nella descrizione come se fosse individualmente citato qui. Tutti i metodi qui descritti possono essere eseguiti in qualsiasi ordine adatto, a meno che non sia indicato diversamente o sia chiaramente contraddetto dal contesto. L'uso di qualsiasi e tutti gli esempi, o la terminologia esemplificativa ad esempio, "come") fornito qui, è inteso semplicemente per chiarire meglio l'invenzione e non pone una limitazione sulla portata dell'invenzione, a meno che non sia rivendicato diversamente. Nessuna terminologia nella descrizione dovrebbe essere interpretato come indicante qualsiasi elemento non rivendicato come essenziale alla pratica dell'invenzione.

## RIVENDICAZIONI

1. Complesso che comprende un primer oligonucleotidico con cap di inizio e uno stampo di DNA, il primer oligonucleotidico con cap di inizio comprendendo la seguente struttura:



in cui:

B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> sono indipendentemente una base nucleosidica naturale, modificata o non naturale;

R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> sono indipendentemente OH o O-metile; e

R<sub>3</sub> è OH o OMe,

in cui il DNA stampo comprende una regione promotore che comprende un sito di inizio trascrizione con un primo nucleotide in posizione nucleotidica +1 e un secondo nucleotide in posizione nucleotidica +2; e in cui B<sub>1</sub> è completamente complementare alla base nucleosidica sullo stampo di acido nucleico in posizione stampo di trascrizione +1 e B<sub>2</sub> ibrida con il nucleotide in posizione +2.

2. Complesso secondo la rivendicazione 1, in cui B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> sono basi nucleosidiche naturali.

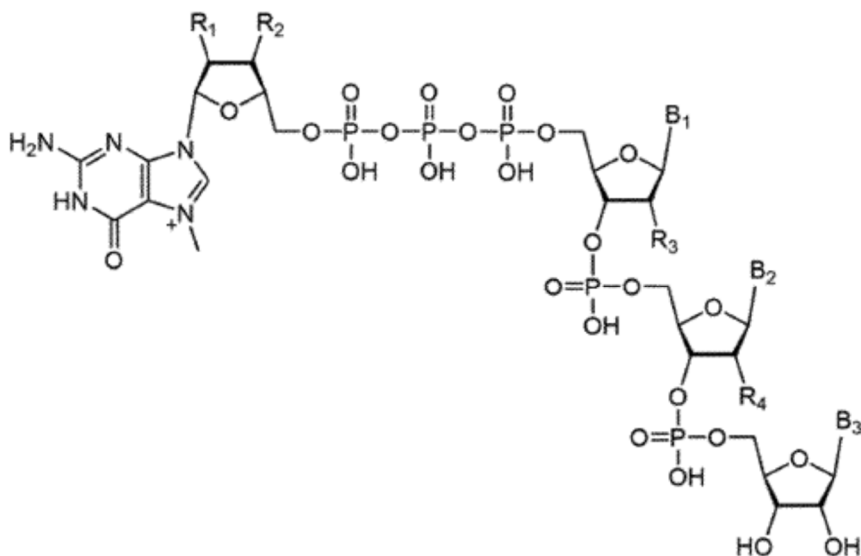
3. Complesso secondo la rivendicazione 1, in cui B<sub>1</sub> è adenina e B<sub>2</sub> è guanina.

4. Complesso secondo la rivendicazione 1, in cui B<sub>1</sub> è guanina e B<sub>2</sub> è guanina.

5. Complesso secondo la rivendicazione 1, in cui R<sub>3</sub> è O-metile.

6. Complesso secondo la rivendicazione 1, in cui almeno uno tra R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> è O-metile, B<sub>1</sub> è adenina e B<sub>2</sub> è guanina.

7. Complesso secondo la rivendicazione 1, in cui almeno uno tra  $R_1$  e  $R_2$  è O-metile, e  $B_1$  e  $B_2$  sono guanina.
8. Complesso secondo la rivendicazione 1, in cui  $R_1$  e  $R_2$  sono OH,  $R_3$  è O-metile,  $B_1$  è adenina e  $B_2$  è guanina.
9. Complesso che comprende un primer oligonucleotide con cap di inizio e uno stampo di DNA, dove il primer oligonucleotide con cap di inizio comprende una struttura:



in cui  $B_1, B_2$  e  $B_3$  sono indipendentemente una base nucleosidica naturale, modificata o innaturale; e

$R_1, R_2, R_3$  e  $R_4$  sono indipendentemente OH o O-metile;

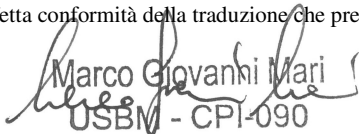
in cui lo stampo di DNA comprende una regione promotore che comprende un sito di inizio trascrizione con un primo nucleotide in posizione nucleotidica +1, un secondo nucleotide in posizione nucleotidica +2, e un terzo nucleotide in posizione nucleotidica +3; e in cui  $B_1$  è completamente complementare alla base nucleosidica sullo stampo di acido nucleico in posizione stampo di trascrizione +1,  $B_2$  si ibrida al nucleotide in posizione +2 e  $B_3$  si ibrida al nucleotide in posizione +3.

10. Complesso secondo la rivendicazione 9, in cui  $R_3$  e  $R_4$  sono O-metile.
11. Complesso secondo la rivendicazione 9, in cui  $R_4$  è O-metile.
12. Complesso secondo la rivendicazione 9, in cui almeno uno tra  $R_1$  e  $R_2$  è O-metile,  $R_3$  è O-metile e  $R_4$  è O-metile.
13. Complesso secondo la rivendicazione 9, in cui  $B_1, B_2$  e  $B_3$  sono basi nucleosidiche naturali.

14. Complesso secondo la rivendicazione 9, in cui B<sub>1</sub> è adenina, citosina, timina o uracile.

\* \* \* \* \*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

  
Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

## LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

### TAVOLA 1/24

Figure 1 = Figura 1

"Dimethyl sulfate" = dimetil solfato

"Aqueous HOAc" = HOAc acquoso

Figure 2 = Figura 2

"2,2'-dipyridyl disulfide" = 2,2'-dipiridil disolfuro

"Imidazole" = Imidazolo

### TAVOLA 2/24

Figure 3 = Figura 3

Figure 4 = Figura 4

"Imidazole" = imidazolo

"2,2'-dipyridyl disulfide" = 2,2'-dipiridil disolfuro

Figure 5 = Figura 5

"Tributylammonium phosphate" = Tributillammonio fosfato

Figure 6 = Figura 6

"Dimethyl sulfate" = dimetil solfato

"Aqueous HOAc" = HOAc acquoso

### TAVOLA 3/24

Figure 7 = Figura 7

"2,2'-dipyridyl disulfide" = 2,2'-dipiridil disolfuro

"Imidazole" = Imidazolo

### TAVOLA 4/24

Figure 8 = Figura 8

"1. Activator in ACN" = Attivatore in ACN

"2. Iodine/Pyridine/THF/Water" = Iodio/piridina/THF/acqua

"3. Extraction (DCM/Brine)" = Estrazione (DCM/soluzione salina)

"80% Acetic acid" = 80% acido acetico

"Silica gel chromatography" = cromatografia su gel di silice

"1. Phosphitylating reagent and activator in ACN" = reagent di fosforilazione e attivatore in ACN

"2. Iodine/Pyridine/THF/Water" = Iodio/piridina/THF/acqua

"3. Extraction (DCM/Brine)" = Estrazione (DCM/soluzione salina)

"4. Ammonia deprotection" = deprotezione con ammoniaca

"4B. Deprotection of TBDMS group" = deprotezione del Gruppo TBDMS

"5. Anion exchange and reverse phase chromatography" = cromatografia a scambio anionico e a fase inversa

"B1 and B2 are appropriately protected or unprotected nucleoside bases" = B1 e B2 sono basi nucleosidiche protette in modo adatto o non protette

"R = Me or TBDMS; R<sub>1</sub> = Me or H" = "Me o TBDMS; R<sub>1</sub> = me o H

TAVOLA 5/24

Figure 9 = Figura 9

"0.2M N-Methyl-morpholine, pH 7.0" = 0,2M N-metil-morfolina, pH 7.0

"Or" = oppure

TAVOLA 6/24

Figure 10A = Figura 10A

Figure 10B = Figura 10B

TAVOLA 7/24

Figure 10C = Figura 10C

Figure 10D = Figura 10D

TAVOLA 8/24

Figure 10E = Figura 10E

Figure 10F = Figura 10F

TAVOLA 9/24

Figure 10G = Figura 10G

Figure 10H = Figura 10H

TAVOLA 10/24

Figure 11 = Figura 11

"raw luciferase units" = unità di luciferasi relativa

"cap1 GG trimer.2" = cap1 GG trimero.2

"cap1 arca GG trimer.2" = cap1 arca GG trimero.2

"cap1 AG trimer" = cap1 AG trimero

"cap1 arca AG trimer" = cap1 arca AG trimero

"cap1 CG trimer" = cap1 CG trimero

"cap1 arca CG trimer" = cap1 arca CG trimero

"cap1 GG trimer.1" = cap1 GG trimero.1

"cap1 arca GG trimer.1" = cap1 arca GG trimero.1

"neg ctrl" = ctrl neg

TAVOLA 11/24

Figure 12A = Figura 12A

"Template 3'...ATAT/CCC...5'" = Stampo 3'...ATAT/CCC...5'

"3'-O-methyl Cap 0" = 3'-O-metile Cap 0

"Absorbance" = Assorbanza

"Time (min)"=

TAVOLA 12/24

Figure 12B = Figura 12B

"Template 3'...ATAT/CCC...5'" = Stampo 3'...ATAT/CCC...5'

"Absorbance" = Assorbanza

"Time (min)"= Tempo (min)

TAVOLA 13/24

Figure 12C = Figura 12C

"3'-O-methyl Cap 1" =3'-O-metile Cap 1

"Template 3'...ATAT/C CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/C CC...5'

"Absorbance" = Assorbanza

"Time (min)"=Temp (min)o

TAVOLA 14/24

Figure 12D = Figura 12D

"Template 3'...ATAT/T CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/T CC...5'

"Absorbance" = Assorbanza

"Time (min)"=Tempo (min)

TAVOLA 15/24

Figure 12E = Figura 12E

"3'-O-methyl Cap 1" = 3'-O-metile Cap 1

"Template 3'...ATAT/T CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/T CC...5'

"Absorbance" = Assorbanza

"Time (min)"=Tempo (min)

TAVOLA 16/24

Figure 12F = Figura 12F

"Template 3'...ATAT/G CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/G CC...5'

"Absorbance" = Assorbanza

"Time (min)"=Tempo (min)

TAVOLA 17/24

Figure 12G = Figura 12G

"3'-O-methyl Cap 1" = 3'-O-metile Cap 1

"Template 3'...ATAT/G CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/G CC...5'

"Absorbance" = Assorbanza

"Time (min)"=Tempo (min)

TAVOLA 18/24

Figure 12H = Figura 12H

"Absorbance" = Assorbanza

"Template 3'...ATAT/T C C...5'" = Stampo 3'...ATAT/T C C...5'

"3'-O-methyl Cap 2" = 3'-O-metile Cap 2

"Time (min)"=Tempo (min)

TAVOLA 19/24

Figure 13A = Figura 13A

"Absorbance" =Assorbanza

"Template 3'...ATAT/T C C...5'" = Stampo 3'...ATAT/T C C...5'

"Time (min)"= Tempo (min)

TAVOLA 20/24

Figure 13B = Figura 13B

"Absorbance" =Assorbanza

"Template 3'...ATAT/T CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/T CC...5'

"Time (min)"=Tempo (min)

TAVOLA 21/24

Figure 13C = Figura 13C

"Absorbance" =Assorbanza

"Template 3'...ATAT/C CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/C CC...5'

"Template 3'...ATAT/CCC...5'" = Stampo 3'...ATAT/C CC...5'

"Time (min)"= Tempo (min)

TAVOLA 22/24

Figure 13D = Figura 13D

"Absorbance" =Assorbanza

"Template 3'...ATAT/C CC...5'" = Stampo 3'...ATAT/C CC...5'

"Template 3'...ATAT/CCC...5'" = Stampo 3'...ATAT/C CC...5'

"Time (min)"= Tempo (min)

TAVOLA 23/24

Figure 14A = Figura 14A

"THP-1 Cell transfections (100 ng FLuc mRNA)" = trasfezioni in cellule THP-1 (100 ng FLuc mRNA)

"raw light units" =unità di luce relativa

"13A ("TC" template)" = 13A ("TC" stampo)

"13C ("CC" template)" =

"11A("CC" template ARCA)" = 11A("CC" stampo ARCA)

"neg ctrl" = ctrl neg

TAVOLA 24/24

Figure 14B = Figura 14B

"THP-1 Cell transfections (100 ng FLuc mRNA)" = trasfezioni in cellule THP-1 (100 ng FLuc mRNA)

"raw light units" = unità di luce relativa

"13B ("TC" template)" = 13B ("TC" stampo)

"13D ("CC" template)" =13D ("CC" stampo)

"neg ctrl" = ctrl neg

\* \* \* \* \*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

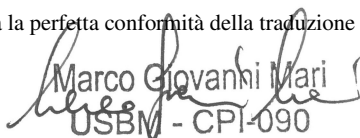
  
Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Figure 1

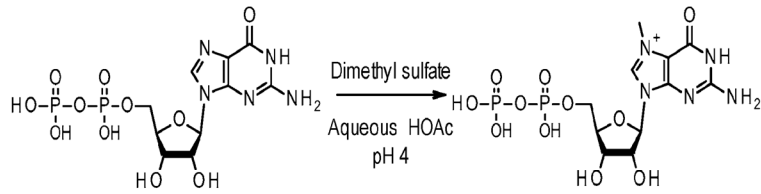


Figure 2

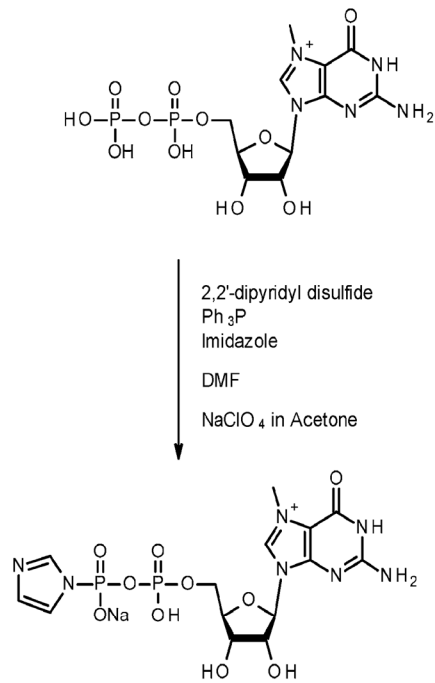


Figure 3

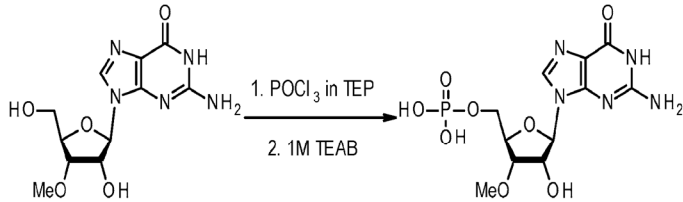


Figure 4

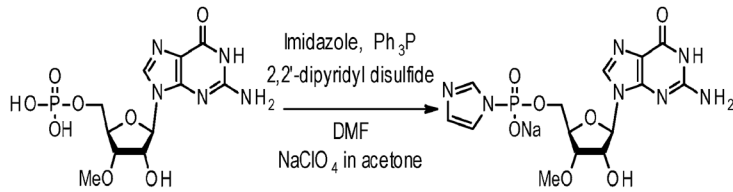


Figure 5

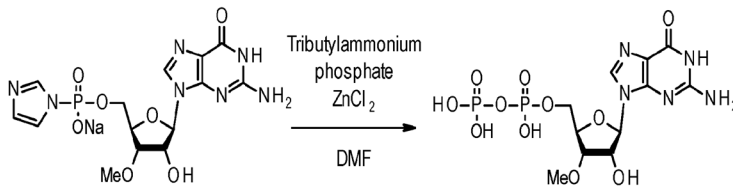


Figure 6

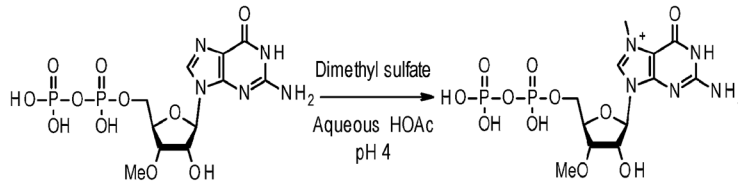


Figure 7

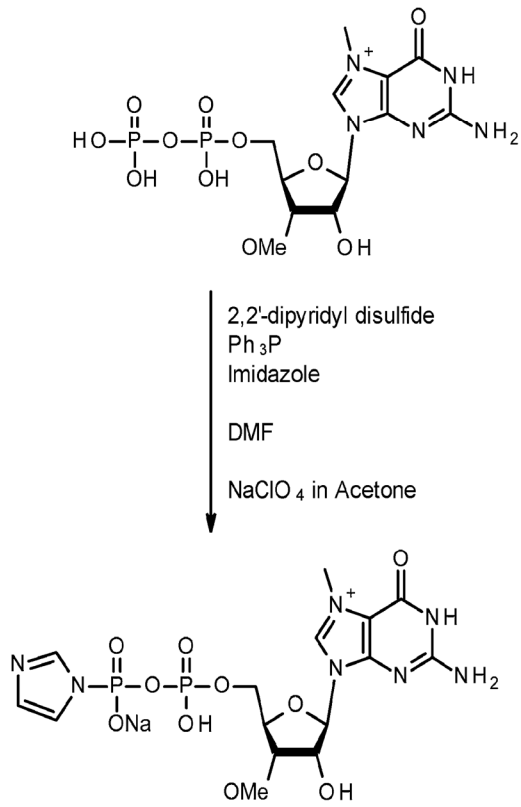
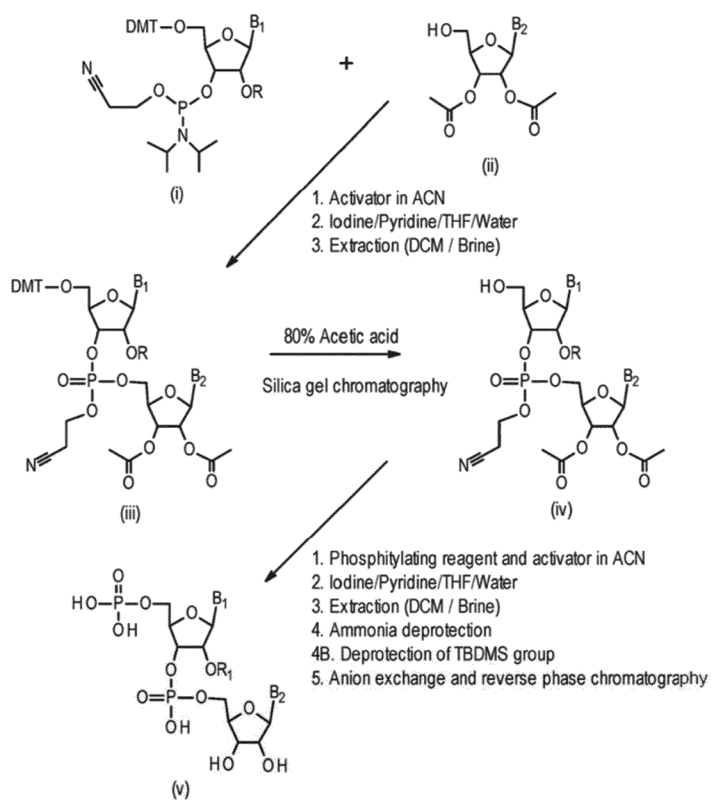


Figure 8



B1 and B2 are appropriately protected or unprotected nucleoside bases  
 R = Me or TBDMS; R<sub>1</sub> = Me or H

Figure 9

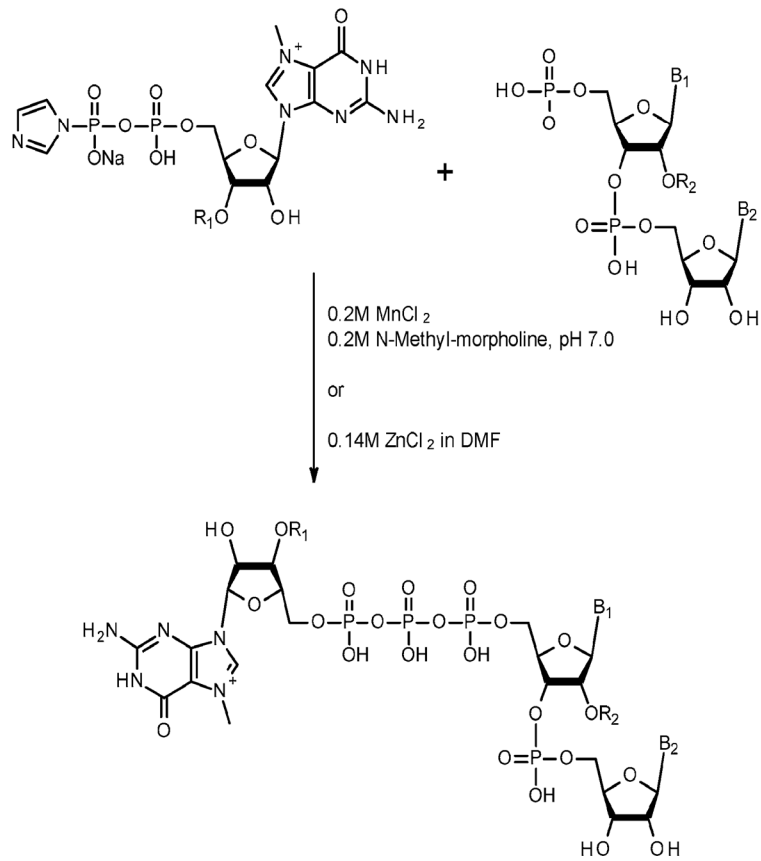


Figure 10A

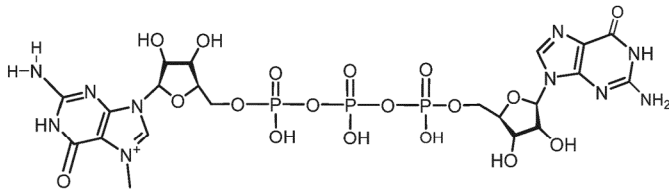


Figure 10B

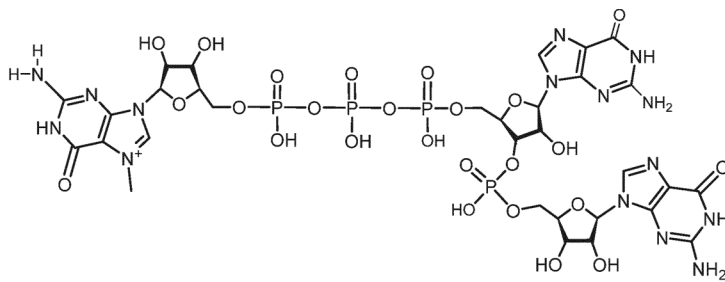


Figure 10C

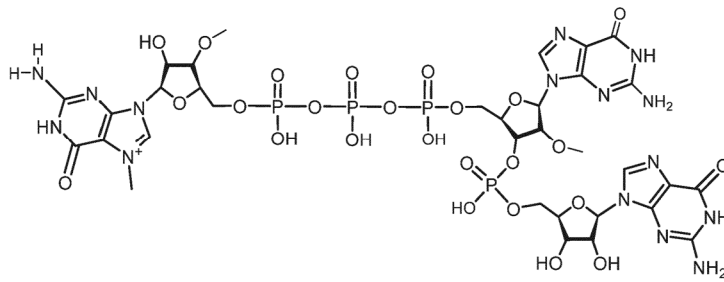


Figure 10D

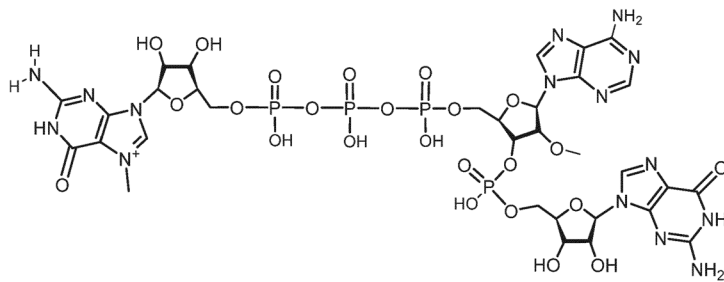


Figure 10E

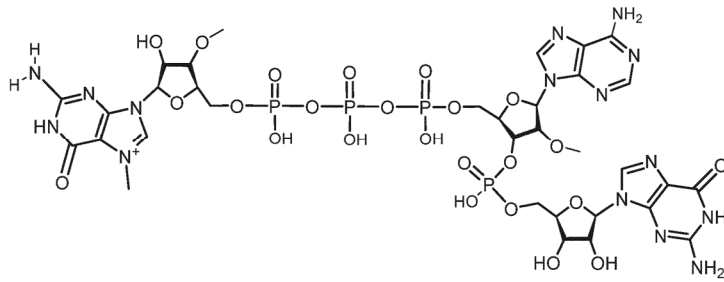


Figure 10F

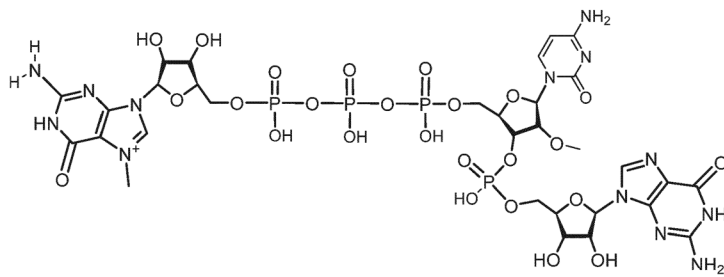


Figure 10G

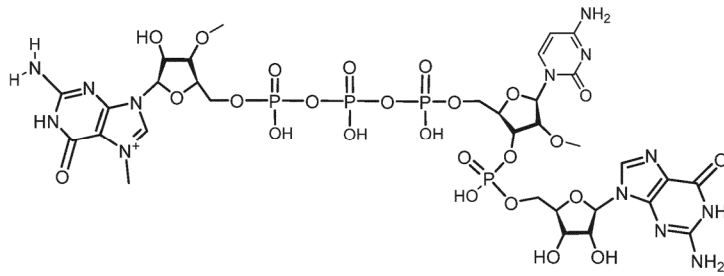


Figure 10H

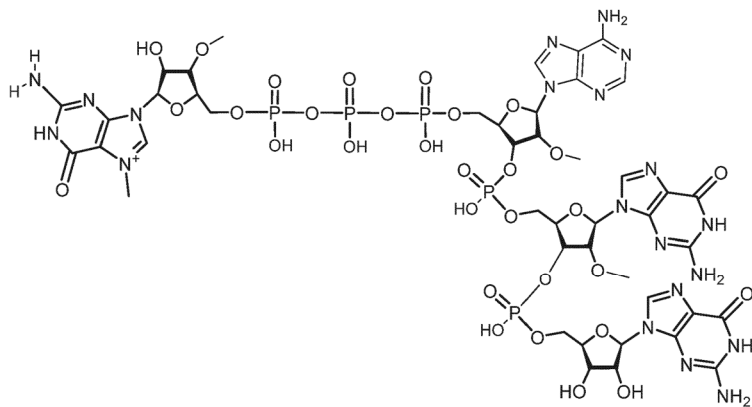
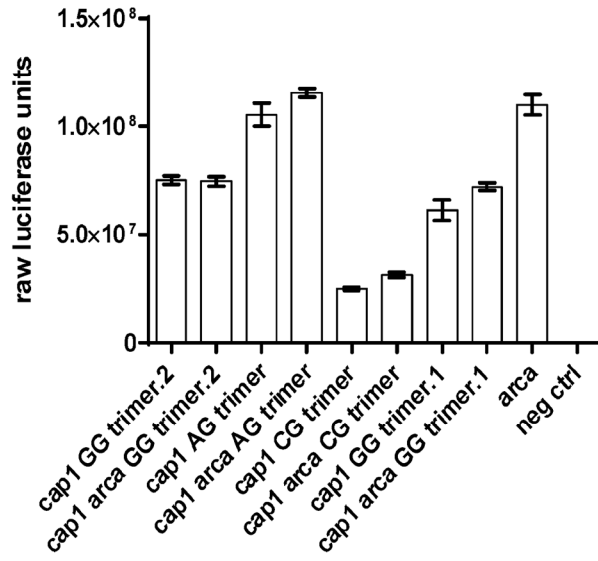
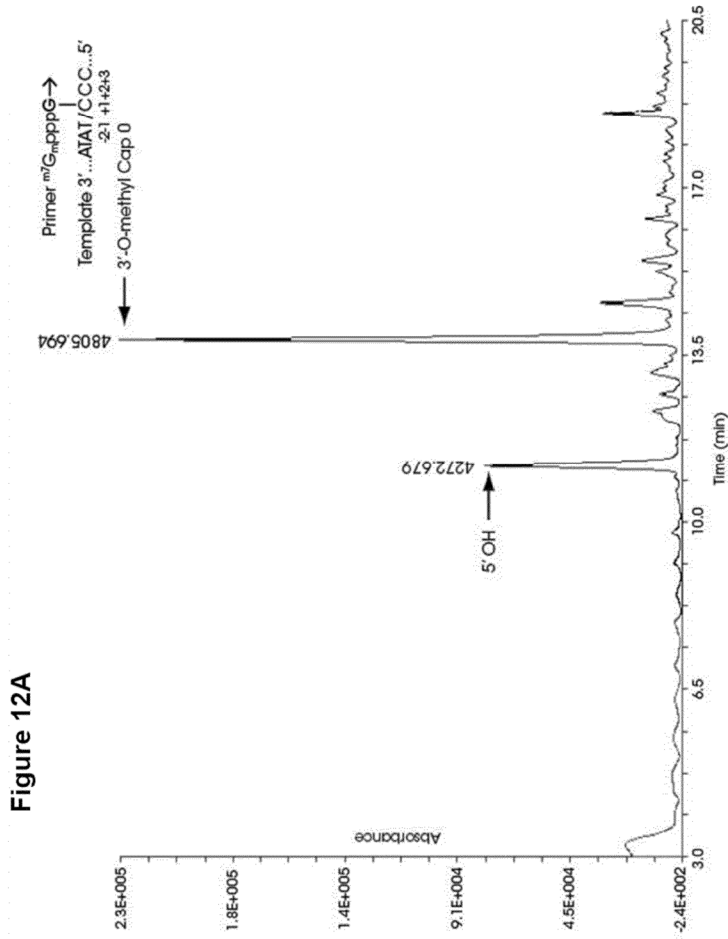


Figure 11





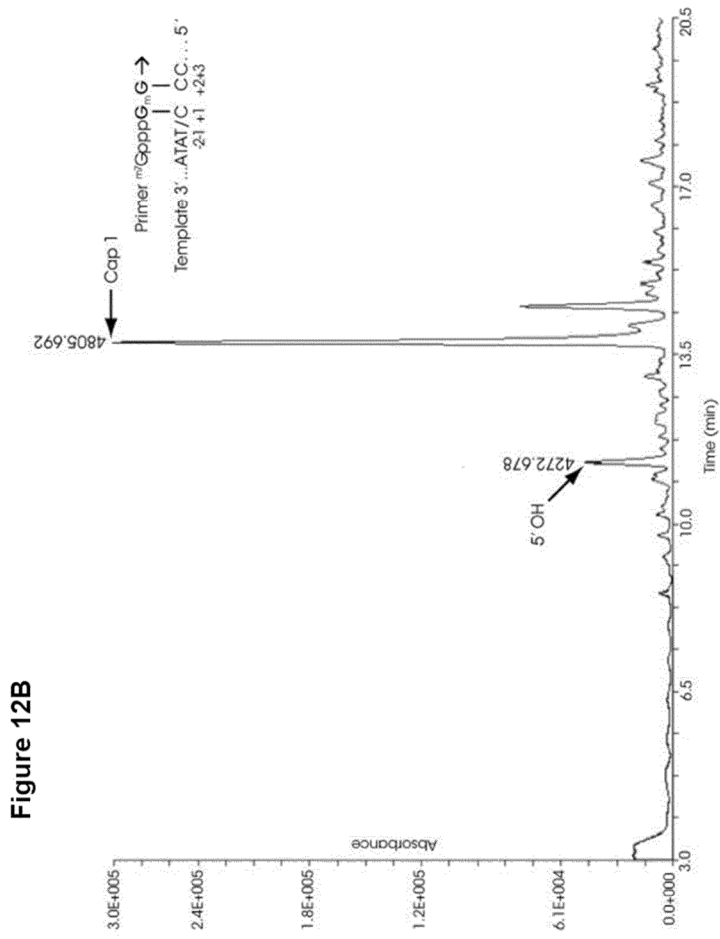


Figure 12B

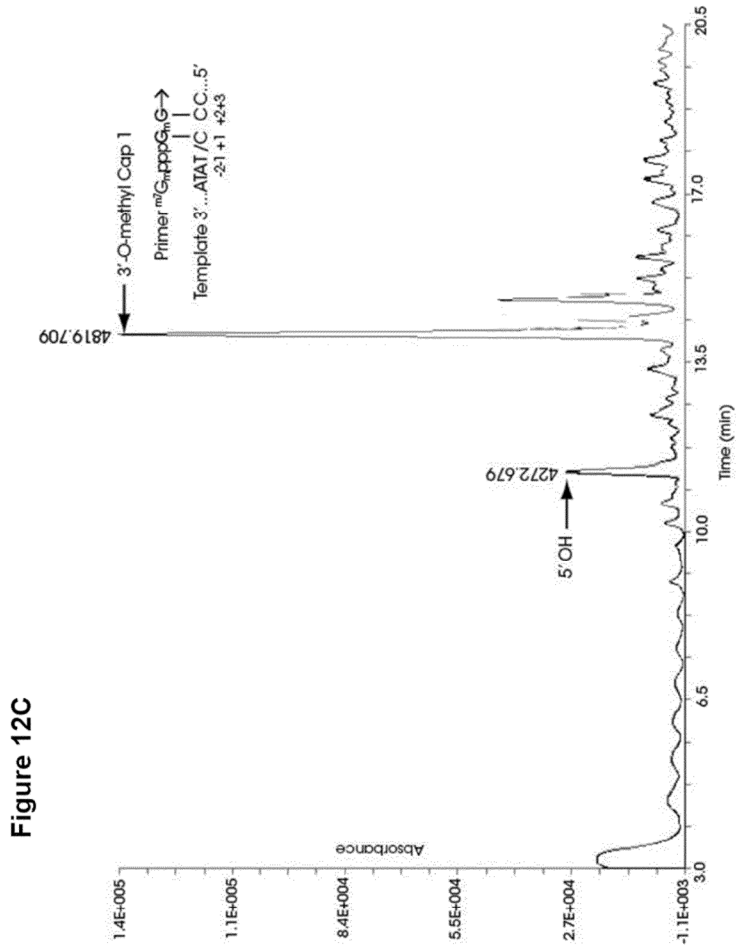
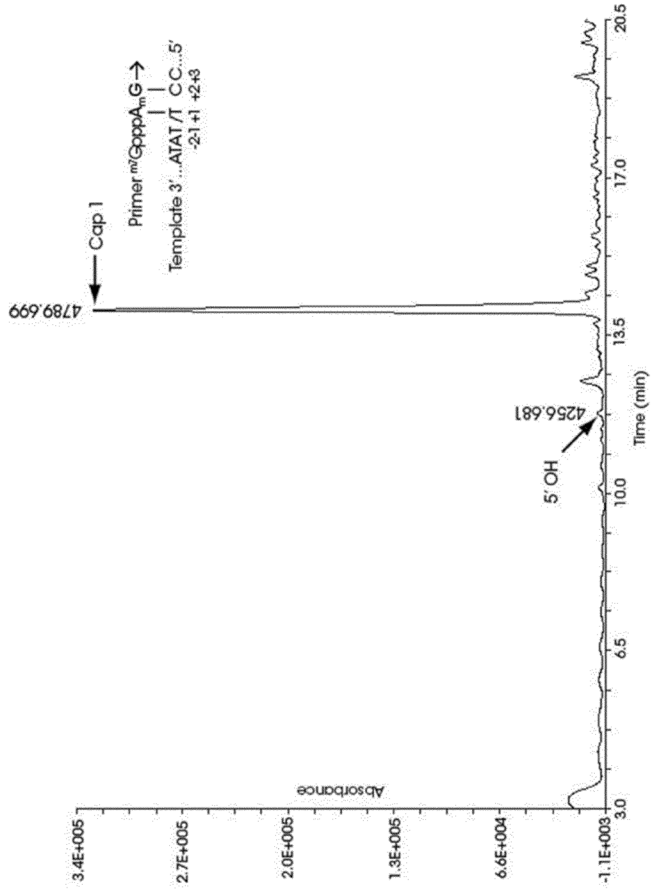


Figure 12C

Figure 12D



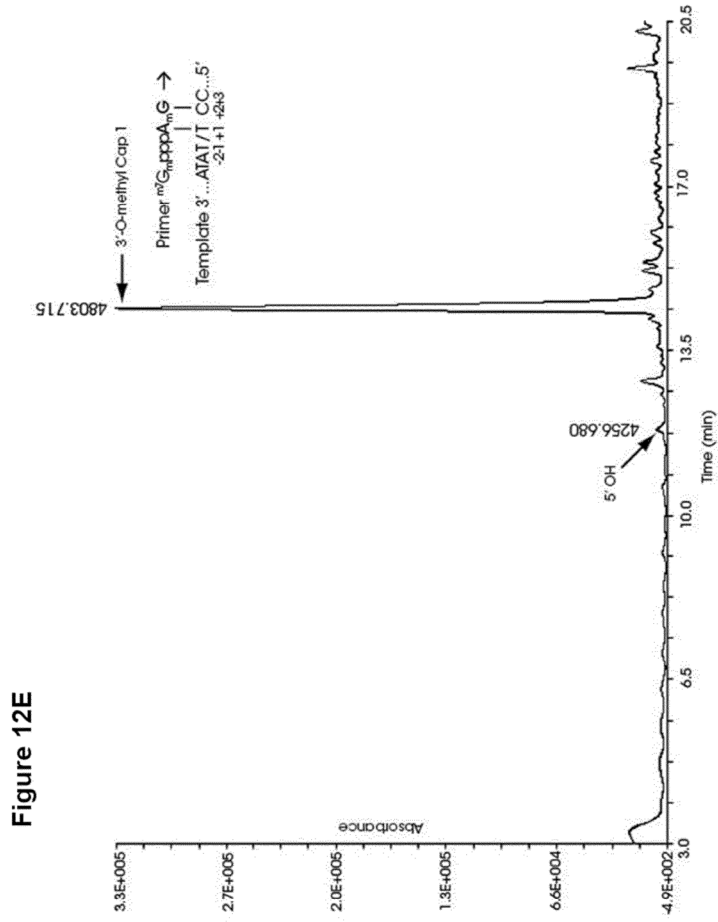


Figure 12E

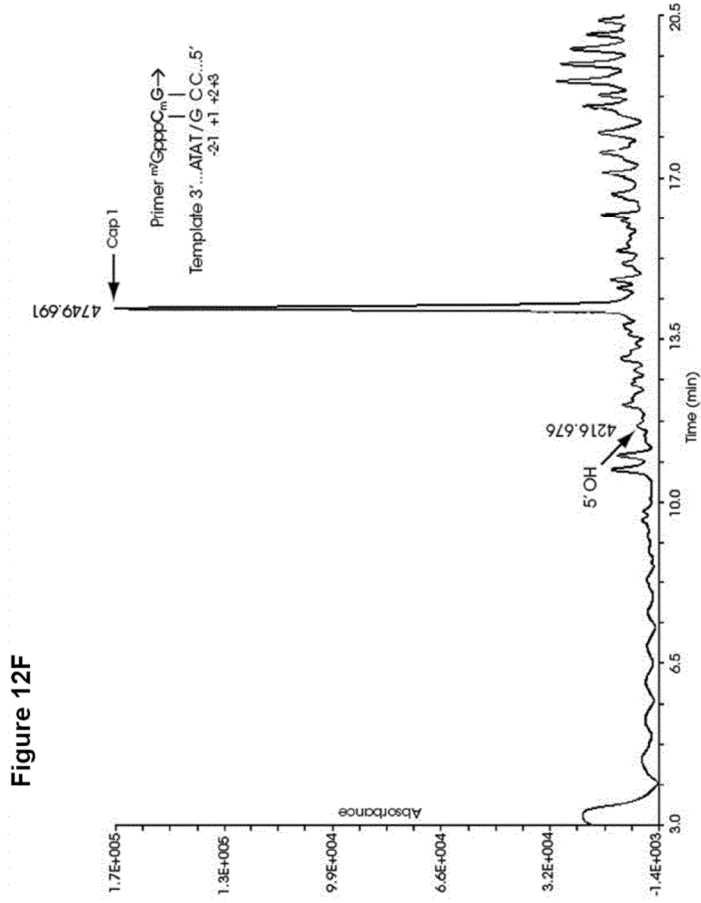


Figure 12F

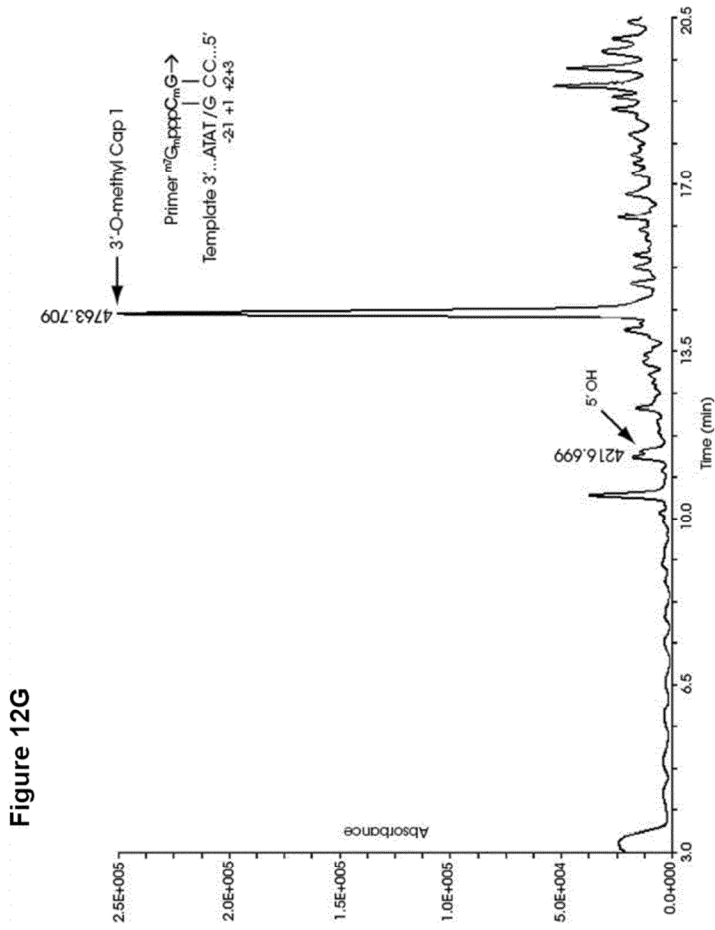


Figure 12H

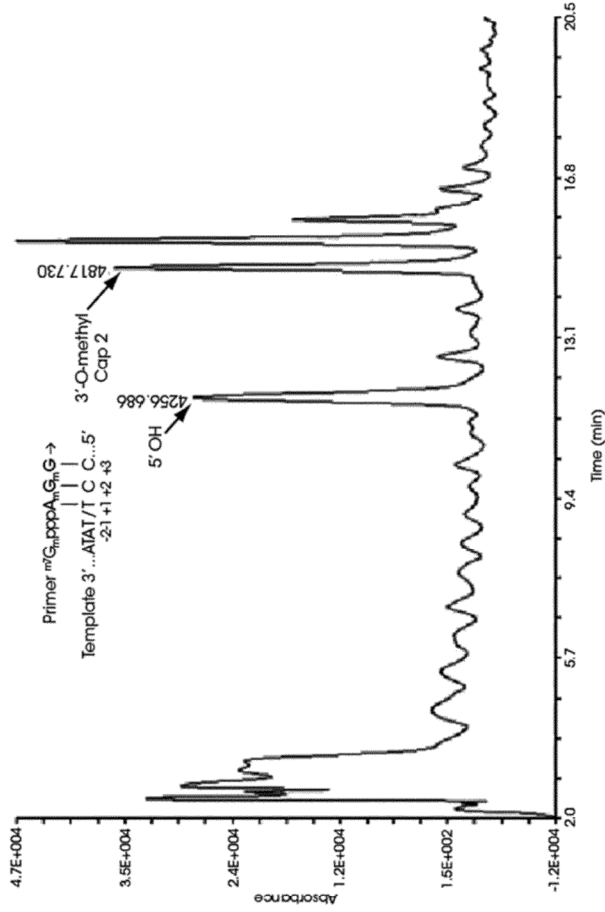


Figure 13A

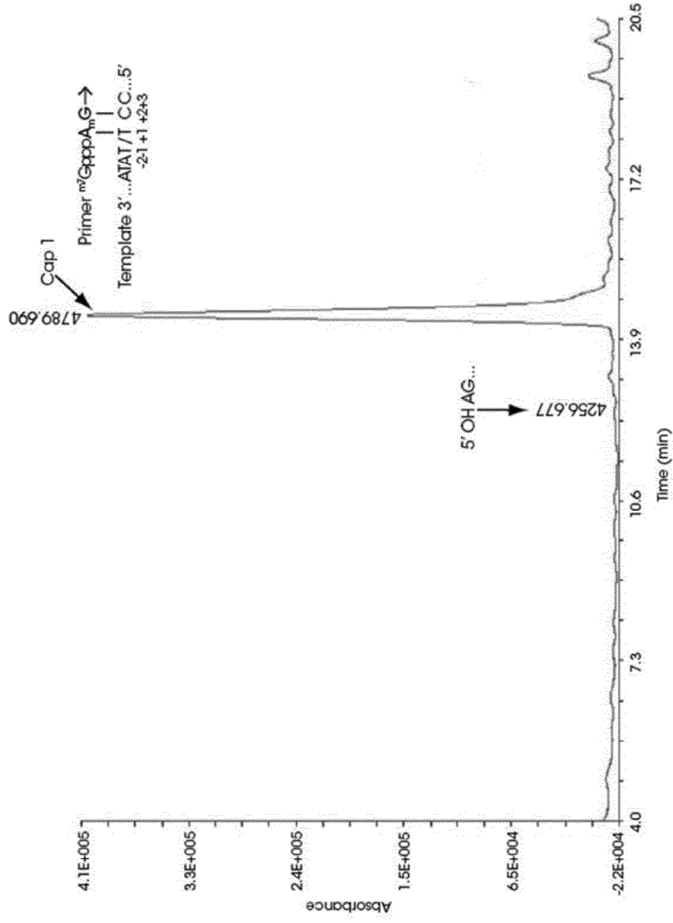
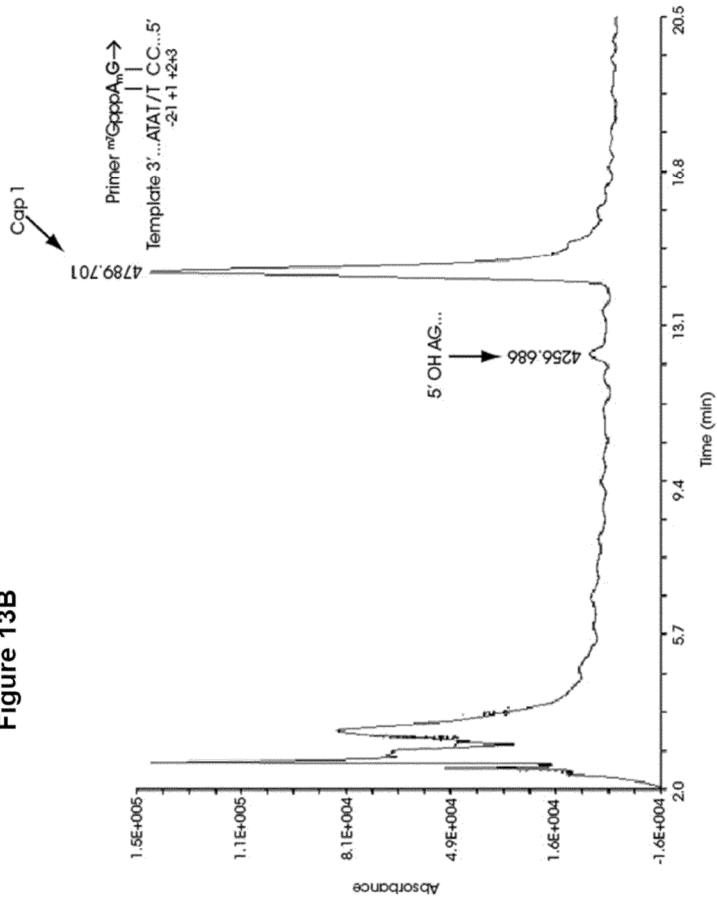


Figure 13B



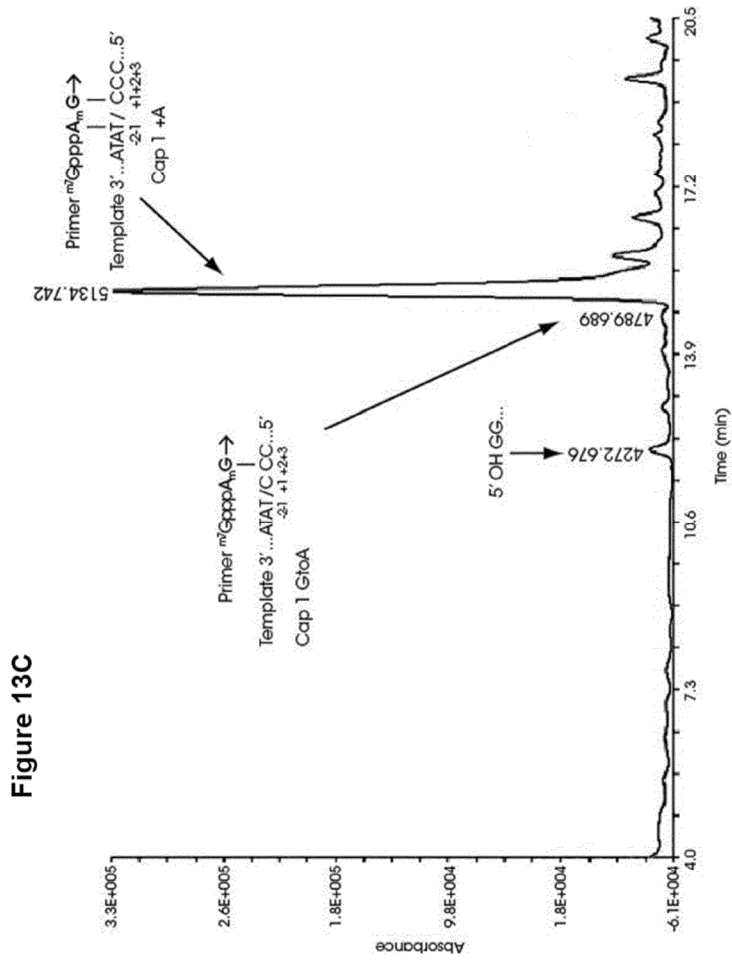


Figure 13C

Figure 13D

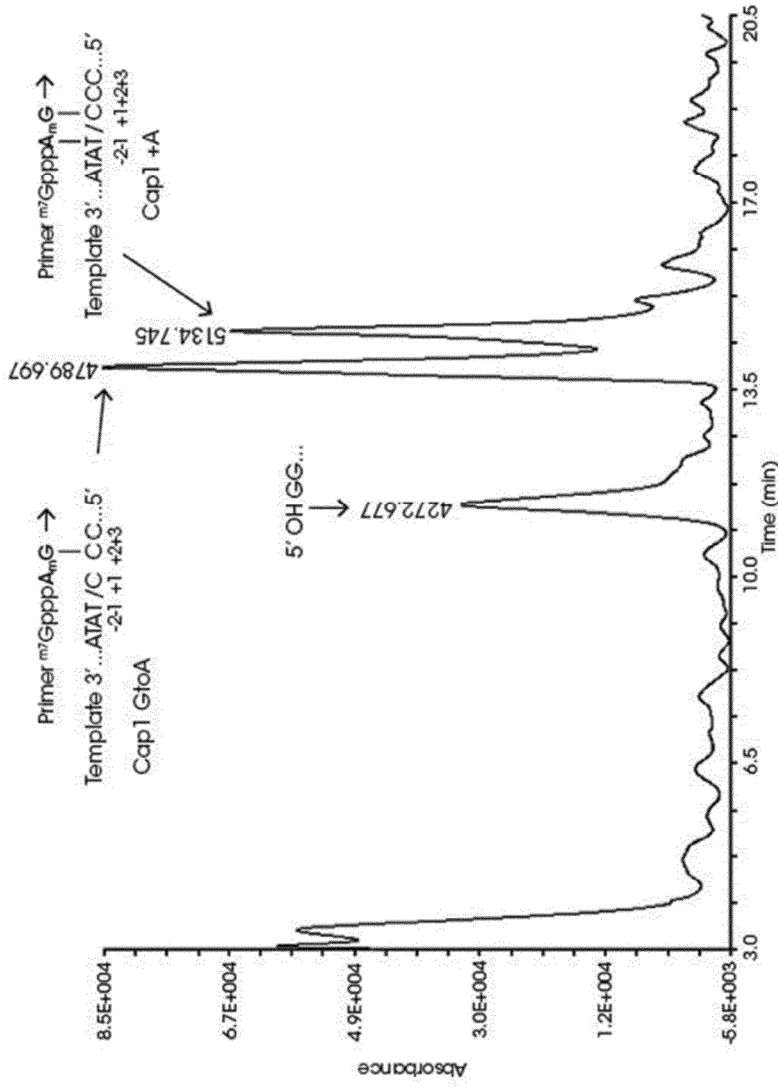


Figure 14A

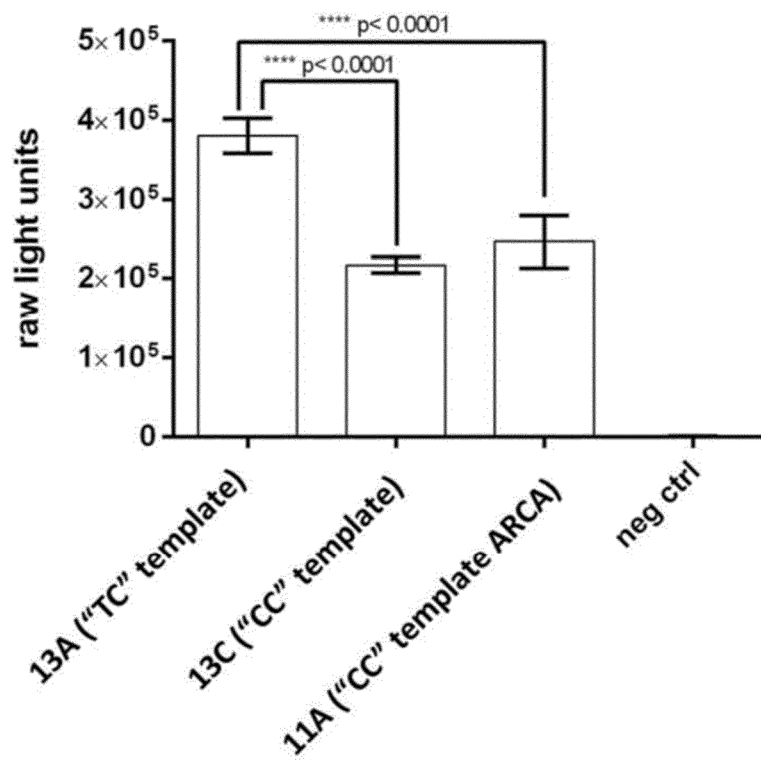
**THP-1 Cell Transfections  
(100 ng FLuc mRNA)**

Figure 14B

THP-1 Cell Transfections  
(100 ng FLuc mRNA)

