

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3445850

DAL TITOLO:

“PROCEDIMENTI PER FORNIRE RNA A SINGOLO FILAMENTO”

Depositata il:

** * **

CAMPO TECNICO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda procedimenti per fornire RNA a singolo filamento (ssRNA).

SFONDO DELL'INVENZIONE

Durante la sintesi di mRNA mediante trascrizione *in vitro* (IVT) utilizzando l'RNA polimerasi T7 (si confronti Yin et al., Cell 116 (2004), 393-404), vengono prodotte quantità significative di prodotti aberranti, compresi RNA a doppio filamento (dsRNA) a causa dell'attività non convenzionale dell'enzima (si confronti Triana-Alonso et al., JBC 270 (1995), 6298-6307; Cazenave et al., PNAS USA 91 (1994), 6972-6976; Gong et al., JBC 281 (2006), 23533-23544). Poiché l'RNA a doppio filamento induce citochine infiammatorie e attiva enzimi effettori (si confronti Karikó et al., Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 10 (2007), 523-532) conducendo all'inibizione della sintesi proteica, è importante rimuovere l'RNA a doppio filamento dall'mRNA IVT che sarà utilizzato come sostanza terapeutica.

Ad oggi, sono stati descritti due procedimenti differenti per la rimozione dell'RNA a doppio filamento dall'mRNA IVT. Un procedimento è la purificazione di mRNA IVT mediante un'HPLC a fase inversa in coppia ionica utilizzando una matrice di polistirene-divinilbenzene (PS-DVB) C-18 non porosa (si confronti Weissman et al., Methods Mol. Biol. 969 (2013), 43-54) o porosa (si confronti US 8,383,340 B2). Tuttavia, i procedimenti che utilizzano l'HPLC per purificare RNA hanno diversi svantaggi quali l'attrezzatura complessa; l'uso di solventi tossici quale acetonitrile; la lunga durata di una corsa di purificazione standard; il difficile aumento in scala; i costi; e la degradazione dell'RNA lungo dovuta al taglio.

In alternativa, un procedimento a base di enzimi è stato stabilito utilizzando l'RNasi III di *E. coli*, che idrolizza specificamente l'RNA a doppio filamento ma non l'RNA a singolo filamento, eliminando quindi i contaminanti di RNA a doppio filamento dalle preparazioni di mRNA IVT (si confronti WO2013/102 203 A1). Tuttavia, è possibile che l'RNasi III induca reazioni indesiderate (quale una reazione immunitaria indesiderata) nel paziente da trattare con l'RNA. Così, prima di somministrare l'RNA al paziente, è necessario rimuovere l'enzima aumentando quindi la complessità e il costo del procedimento. Inoltre, l'uso di RNasi III spesso conduce a una degradazione parziale dell'RNA a singolo filamento, specialmente

per esempio mediante l'oggetto delle rivendicazioni allegate.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

In un primo aspetto, la presente invenzione fornisce un procedimento per fornire RNA a singolo filamento, comprendente (i) il produrre una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento mediante trascrizione *in vitro*; (ii) il mettere a contatto la preparazione di RNA con un materiale cellulosico in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento (dsRNA) al materiale cellulosico e non permettano il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico; e (iii) il separare l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettano il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico, in cui nel passaggio (ii) la preparazione di RNA viene fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e un primo tampone e/o il materiale cellulosico viene fornito come sospensione in un primo tampone, in cui il primo tampone comprende acqua, etanolo e un sale a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e che non permette il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico; e la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 20% (v/v) e la concentrazione del sale nel primo tampone è da 15 a 70mM.

Così, nel primo aspetto, i passaggi (ii) e (iii) sono condotti in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettano il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico (questo primo aspetto è qualche volta indicato qui come procedura di purificazione "negativa", poiché essa permette il legame selettivo dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico, mentre l'RNA a singolo filamento rimane non legato).

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione negativa, il passaggio (ii) comprende il miscelare la preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento con il materiale cellulosico con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione negativa, nel passaggio (ii) il sale compreso nel primo tampone è cloruro di sodio. In una forma di realizzazione, la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 16% (v/v). In una forma di realizzazione, la concentrazione del sale nel primo tampone è da 20 a 60mM. In una forma di realizzazione, il primo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione negativa, nel passaggio (ii) e/o (iii) la miscela della preparazione di RNA, del materiale cellulosico, e del primo tampone viene fornita in una provetta e il passaggio (iii) comprende (1) l'applicare la gravità o la forza centrifuga

alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate; e (2) il raccogliere il sumatante comprendente l'RNA a singolo filamento o il rimuovere il materiale celluloso. In una forma di realizzazione alternativa, nel passaggio (ii) e/o (iii) la miscela della preparazione di RNA, del materiale celluloso, e del primo tampone viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro e il passaggio (iii) comprende (1') l'applicare la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate; e (2') il raccogliere il primo eluato comprendente l'RNA a singolo filamento.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione negativa, i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti una volta o due o più volte, in cui la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo e nel passaggio (ii) di ciascun ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzato materiale celluloso fresco.

In un secondo aspetto, la presente invenzione fornisce un procedimento per fornire RNA a singolo filamento, comprendente: (i) il produrre una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento mediante trascrizione *in vitro*; (ii) il mettere a contatto la preparazione di RNA con un materiale celluloso in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale celluloso; e (iii) il separare l'RNA a singolo filamento dal materiale celluloso in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale celluloso e non permettano il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale celluloso, in cui il passaggio (iii) comprende: (1) il miscelare il materiale celluloso a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati con un primo tampone con mescolamento e/o agitazione, in cui il primo tampone comprende acqua, etanolo e un sale a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale celluloso e non permette il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale celluloso; e (2) il separare la fase liquida comprendente l'RNA a singolo filamento dal materiale celluloso; e la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 20% (v/v) e la concentrazione del sale nel primo tampone è da 15 a 70mM.

Così, nel secondo aspetto, il passaggio (ii) è condotto in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale celluloso; e il passaggio (iii) è condotto in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale celluloso e non permettano il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale celluloso (questo secondo aspetto è qualche volta indicato qui come procedura di purificazione "positiva", poiché, per prima cosa, l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati al materiale celluloso, e quindi l'RNA a singolo filamento viene selettivamente rilasciato dal materiale celluloso, mentre l'RNA a doppio filamento rimane legato).

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, il passaggio (ii) comprende (1) il miscelare la preparazione di RNA

comprendente l'RNA a singolo filamento con il materiale cellulosico con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti; e (2) il separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dal resto.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, nel passaggio (ii) la preparazione di RNA viene fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e un secondo tampone e/o il materiale cellulosico viene fornito come sospensione in un secondo tampone, in cui il secondo tampone comprende acqua, etanolo e un sale, preferibilmente cloruro di sodio, a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. In una forma di realizzazione, la concentrazione di etanolo nel secondo tampone è almeno il 35% (v/v), preferibilmente dal 38 al 42% (v/v). In una forma di realizzazione, la concentrazione del sale nel secondo tampone è da 15 a 70mM, preferibilmente da 20 a 60mM. In una forma di realizzazione, il secondo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, nel passaggio (ii)(1) e/o (ii)(2) la miscela della preparazione di RNA e del materiale cellulosico ottenuta nel passaggio (ii)(1) viene fornita in una provetta e il passaggio (ii)(2) comprende (2a) l'applicare la gravità o la forza centrifuga alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate; e (2b) il rimuovere il supernatante o il raccogliere il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati. In una forma di realizzazione alternativa, nel passaggio (ii)(1) e/o (ii)(2) la miscela della preparazione di RNA e del materiale cellulosico ottenuta nel passaggio (ii)(1) viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro e il passaggio (ii)(2) comprende (2a') l'applicare la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate; e (2b') lo smaltimento del primo eluato.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, il passaggio (ii) comprende inoltre (3) l'aggiungere un'aliquota del secondo tampone al materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati; (4) l'incubare la miscela risultante con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti; e (5) il separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dalla fase liquida; e facoltativamente (6) il ripetere i passaggi da (3) a (5) una volta o due o più volte.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, nel passaggio (iii)(1) il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati viene miscelato con il primo tampone con mescolamento e/o agitazione per almeno 5 minuti, preferibilmente per almeno 10 minuti. In una forma di realizzazione, il sale compreso nel primo tampone è cloruro di sodio. In una forma di

realizzazione, la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 16% (v/v). In una forma di realizzazione, la concentrazione del sale nel primo tampone è da 20 a 60mM. In una forma di realizzazione, il primo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, nel passaggio (iii) la miscela del materiale cellulosico e del primo tampone viene fornita in una provetta e il passaggio (iii)(2) comprende (2a) l'applicare la gravità o la forza centrifuga alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate; e (2b) il raccogliere il sumatante comprendente l'RNA a singolo filamento o il rimuovere il materiale cellulosico. In una forma di realizzazione alternativa, nel passaggio (iii) la miscela del materiale cellulosico e del primo tampone viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro e il passaggio (iii)(2) comprende (2a') l'applicare la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro; e (2b') il raccogliere il primo eluato comprendente l'RNA a singolo filamento.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti una volta o due o più volte, in cui la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo e nel passaggio (ii) di ciascun ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzato materiale cellulosico fresco.

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, nel passaggio (ii) il materiale cellulosico viene fornito in una colonna, il passaggio (ii) comprende il caricare la preparazione di RNA sulla colonna in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico, e il passaggio (iii) comprende l'eluire l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettano il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. In una forma di realizzazione, nel passaggio (ii) la preparazione di RNA viene fornita e caricata sulla colonna come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e un secondo tampone, in cui il secondo tampone comprende acqua, etanolo e un sale, preferibilmente cloruro di sodio, a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. In una forma di realizzazione, la concentrazione di etanolo nel secondo tampone è almeno il 35% (v/v), preferibilmente dal 38 al 42% (v/v). In una forma di realizzazione, la concentrazione del sale nel secondo tampone è da 15 a 70mM, preferibilmente da 20 a 60mM. In una forma di realizzazione, il secondo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA. In una forma di realizzazione, il passaggio (iii) è condotto utilizzando il primo tampone come eluente, in cui preferibilmente il sale compreso nel primo tampone è cloruro di sodio. In una forma di realizzazione, la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 16% (v/v). In una forma di realizzazione, la concentrazione del sale nel primo tampone è da 20 a 60mM. In una forma di

realizzazione, il primo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA.

In una forma di realizzazione del primo e del secondo aspetto, la preparazione di RNA viene prodotta utilizzando un'RNA polimerasi scelta nel gruppo consistente delle RNA polimerasi T3, T7 e SP6.

In una forma di realizzazione del primo e del secondo aspetto, prima del passaggio (ii) la preparazione di RNA viene sottoposta ad almeno un trattamento di pre-purificazione. In una forma di realizzazione, l' almeno un trattamento di pre-purificazione comprende uno o più dei seguenti: la precipitazione di acidi nucleici, utilizzando preferibilmente cloruro di litio; il legame di acidi nucleici a sfere magnetiche; l'ultrafiltrazione; e la degradazione del DNA, utilizzando preferibilmente una nucleasi specifica per i duplex (DSN).

In una forma di realizzazione del primo e del secondo aspetto, l'RNA a singolo filamento è mRNA o un RNA inibitorio (quale un RNA antisenso, un siRNA, o un miRNA).

In una forma di realizzazione del primo e del secondo aspetto, l'RNA a singolo filamento ha una lunghezza di almeno 2.700 nucleotidi, preferibilmente almeno 2.800 nucleotidi, almeno 2.900 nucleotidi, almeno 3.000 nucleotidi, almeno 3.100 nucleotidi, almeno 3.200 nucleotidi, almeno 3.300 nucleotidi, almeno 3.400 nucleotidi, come almeno 3.500 nucleotidi, almeno 3.600 nucleotidi, almeno 3.700 nucleotidi, almeno 3.800 nucleotidi, almeno 3.900 nucleotidi, almeno 4.000 nucleotidi, almeno 4.100 nucleotidi, almeno 4.200 nucleotidi, almeno 4.300 nucleotidi, almeno 4.400 nucleotidi, o almeno 4.500 nucleotidi.

In una forma di realizzazione del primo e del secondo aspetto, il materiale cellulosico comprende fibre di cellulosa, preferibilmente fibre di cellulosa di un grado adatto per l'uso come reagente per la cromatografia di partizione. In una forma di realizzazione, prima di essere messo a contatto con la preparazione di RNA nel passaggio (ii), il materiale cellulosico viene fornito come materiale cellulosico lavato. In una forma di realizzazione, il lavaggio del materiale cellulosico comprende (i) il miscelare il materiale cellulosico con una soluzione di lavaggio con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti; e (II) il rimuovere il liquido o il raccogliere il materiale cellulosico; e facoltativamente (III) il ripetere i passaggi (I) e (II) una volta o due o più volte. In una forma di realizzazione, la soluzione di lavaggio ha la composizione di (A) il primo tampone come definito sopra o sotto se il passaggio (ii) è condotto in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico lavato e non permettano il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico lavato (cioè nelle forme di realizzazione della procedura di purificazione "negativa"), o (B) il secondo tampone come definito sopra o sotto se il passaggio (ii) è condotto in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al

state caricate sulla membrana per il dot blot. I segnali di ibridazione sono stati quantificati mediante densitometria, e i valori vengono espressi come percentuale di RNA a doppio filamento rimosso dall'RNA non purificato. Per controllare l'integrità dell'RNA, 80 ng degli RNA sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi.

Figura 4: Confronto delle prestazioni di tipi differenti di cellulosa nel rimuovere l'RNA a doppio filamento dall'RNA IVT. Le frazioni non legate e legate di 100 µg di RNA IVT modificato con m1Ψ di 1.500 nucleotidi di lunghezza dopo 1 ciclo di purificazione utilizzando differenti cellulose (Sigma, C6288; Macherey-Nagel, MN 100 e MN 2100), colonne da microcentrifuga e tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH sono state analizzate mediante dot blot. I campioni da 80 ng, 400 ng e 2.000 ng di RNA sono stati analizzati per i contaminanti di RNA a doppio filamento utilizzando un anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. Per un confronto, la stessa quantità di RNA non purificato (RNA di controllo) è stata caricata sulla membrana per il dot blot. I segnali di ibridazione sono stati quantificati mediante densitometria, e i valori vengono espressi come percentuale di RNA a doppio filamento rimosso dall'RNA non purificato. Per monitorare l'integrità dell'RNA, 80 ng degli RNA sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi.

Figura 5: Il procedimento di purificazione mediante cellulosa è aumentabile in scala. 5 mg di RNA IVT incappucciato con D1 di 1.900 nucleotidi di lunghezza sono stati purificati 1x o 2x mediante cellulosa utilizzando dispositivi di filtro a vuoto e tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH. 40 ng, 200 ng e 1.000 ng di RNA purificato mediante cellulosa sono stati analizzati per i contaminanti di RNA a doppio filamento mediante dot blot utilizzando un anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. Per un confronto, le stesse quantità di RNA non purificato (RNA di controllo) sono state caricate sulla membrana per il dot blot. I segnali di ibridazione sono stati quantificati mediante densitometria, e i valori vengono espressi come percentuale di RNA a doppio filamento rimosso dall'RNA non purificato. Per controllare l'integrità dell'RNA, 80 ng degli RNA sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi. Vengono indicati i tassi di recupero dell'RNA per entrambi i campioni.

Figura 6: Purificazione di RNA IVT con lunghezza differente utilizzando una procedura di purificazione "positiva". 400 µg di RNA IVT incappucciato con D1 di >10.000 nucleotidi di lunghezza, RNA IVT incappucciato con D2 di 1.300 nucleotidi di lunghezza (A) e RNA IVT di 2.500 nucleotidi di lunghezza (non incappucciato) (B) sono stati utilizzati per 2 cicli di purificazione mediante cellulosa. Nessuno degli RNA conteneva modifiche dei nucleosidi. Durante il primo ciclo, gli RNA sono stati completamente legati alla cellulosa utilizzando STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH prima dell'eluizione con tampone contenente il 16% (v/v) e il trasferimento a una seconda colonna da microcentrifuga contenente un materiale cellulosico (purificazione "positiva"). Le quantità indicate degli RNA purificati sono state analizzate per i contaminanti di

RNA a doppio filamento mediante dot blot utilizzando un anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. Per un confronto, le stesse quantità di RNA non purificato sono state caricate sulle membrane per il dot blot. Per monitorare l'integrità dell'RNA, 80 ng degli RNA sono stati caricati su gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi.

Figura 7: Purificazione dell'RNA IVT utilizzando tamponi con forza ionica differente. 250 µg (A) o 160 µg (B) di RNA IVT modificato con m1Ψ di 1.300 nucleotidi di lunghezza sono stati purificati mediante cellulosa utilizzando tamponi STE 1x contenenti NaCl da 25 a 150mM (A) o NaCl da 0 a 50mM (B). Prima dell'eluizione con i tamponi corrispondenti contenenti EtOH al 16% (v/v), cui è seguita l'eluizione con tamponi con EtOH allo 0% (v/v), l'RNA è stato completamente legato alla cellulosa in presenza di EtOH al 40% (v/v). 40 ng, 200 ng, 1.000 ng e 3.000 ng degli RNA eluiti sono stati analizzati per i contaminanti di RNA a doppio filamento mediante dot blot utilizzando un anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. A causa del basso recupero, solo 40 ng, 200 ng e 1.000 ng dell'RNA eluito con lo 0% (v/v) di EtOH hanno potuto essere caricati per l'analisi dot blot in (B). Per un confronto, le stesse quantità di RNA non purificato (RNA di controllo) sono state caricate sulle membrane per il dot blot. I segnali di ibridazione sono stati quantificati mediante densitometria, e i valori vengono espressi come percentuale di RNA a doppio filamento rimosso dall'RNA non purificato. Per monitorare l'integrità dell'RNA, 80 ng degli RNA sono stati caricati su gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi.

Figura 8: Purificazione mediante cellulosa dell'RNA IVT mediante FPLC. (A) Viene mostrato un cromatogramma di FPLC di 500 µg di RNA IVT modificato con m1Ψ di 1.300 nucleotidi di lunghezza, in cui l'RNA è stato caricato su una colonna XK 16/20 impaccata con 4 g di un materiale celluloso. Il legame è stato eseguito con STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH, i contaminanti di RNA a singolo filamento e di RNA a doppio filamento sono stati eluiti diminuendo la concentrazione di EtOH del tampone di corsa al 16% (v/v) e allo 0% (v/v), rispettivamente. Le frazioni indicate da un riquadro grigio nel cromatogramma sono state raccolte (F1: eluato con EtOH al 16%, F2: eluato con EtOH allo 0%). (B) 40 ng, 200 ng, 1.000 ng e 3.000 ng dell'RNA recuperato dalle frazioni F1 e F2 sono stati analizzati per i contaminanti di RNA a doppio filamento mediante dot blot utilizzando un anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. Per un confronto, le stesse quantità di RNA non purificato (RNA di controllo) sono state caricate sulla membrana per il dot blot. I segnali di ibridazione sono stati quantificati mediante densitometria, e i valori vengono espressi come percentuale di RNA a doppio filamento rimosso dall'RNA non purificato. Per monitorare l'integrità dell'RNA, 80 ng degli RNA sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi.

Figura 9: Purificazione dell'RNA IVT utilizzando differenti concentrazioni di EtOH per l'eluizione dell'RNA a singolo filamento. 200 µg di RNA IVT incappucciato con D1 di 1.500 nucleotidi di lunghezza sono stati purificati mediante cellulosa utilizzando un tampone STE 1x contenente

il 6%, il 10%, il 12%, il 14%, il 16%, il 18%, il 20% o il 24% (v/v) di EtOH per eluire l'RNA a singolo filamento. Prima dell'eluizione, l'RNA è stato completamente legato alla cellulosa in presenza di EtOH al 40% (v/v). 200 ng, 1.000 ng e 3.000 ng degli RNA a singolo filamento eluiti sono stati analizzati per i contaminanti di RNA a doppio filamento mediante dot blot utilizzando un anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento (A). Per un confronto, le stesse quantità di RNA non purificato (RNA di controllo) sono state caricate sulla membrana per il dot blot. Per monitorare l'integrità dell'RNA, 80 ng degli RNA sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi. (B) I segnali di ibridazione sono stati quantificati mediante densitometria e i valori (espressi come percentuale di RNA a doppio filamento rimosso dall'RNA non purificato) sono stati messi su grafico in funzione delle concentrazioni di EtOH utilizzate per l'eluizione (linea continua) e confrontati con i tassi di RNA recuperato dai singoli eluati (linea tratteggiata).

Figura 10: Determinazione della capacità di legame all'RNA della cellulosa. 0,1 g di cellulosa (Sigma, C6288) sono stati incubati con 25 µg, 50 µg, 100 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1.000 µg o 1.500 µg di RNA IVT incappucciato con D1 di 1.500 nucleotidi di lunghezza in 500 µl di STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH in una colonna da microcentrifuga. Dopo la separazione dell'RNA non legato mediante centrifugazione, l'RNA legato a cellulosa è stato eluito in passaggi, prima con STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH e infine con H₂O (con lo 0% (v/v) di EtOH). Dopo la precipitazione, le quantità di RNA recuperato dal primo eluato (A, B; EtOH al 40% (v/v), linea continua), dall'eluato con EtOH al 16% (v/v) (A, B; linea tratteggiata) e dall'eluato con lo 0% (v/v) di EtOH (A, B; linea tratteggiata) sono state determinate mediante spettrofotometria e messe su grafico in funzione della quantità totale di RNA utilizzato per la purificazione. I valori vengono presentati come tasso di recupero rispetto alla quantità totale di RNA utilizzato (A) o come resa totale dell'RNA recuperato (B). 200 ng, 1.000 ng e 3.000 ng di RNA recuperato dagli eluati al 16% (v/v) sono stati analizzati per i contaminanti di RNA a doppio filamento mediante dot blot utilizzando un anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento (C). Per un confronto, le stesse quantità di RNA non purificato (RNA di controllo) sono state caricate sulla membrana per il dot blot. Per monitorare l'integrità dell'RNA, 80 ng di questi RNA sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,4% (p/v) e separati mediante l'elettroforesi. I segnali di ibridazione sono stati quantificati mediante densitometria e i valori (espressi come percentuale di RNA a doppio filamento rimosso dall'RNA non purificato) sono stati messi su grafico in funzione della quantità totale di RNA utilizzato per la purificazione (D; linea continua) e confrontati con i tassi di RNA recuperato dai singoli eluati con EtOH al 16% (v/v) (D; linea tratteggiata).

Figura 11: Impatto della purificazione mediante cellulosa dell'RNA IVT sulla sua traducibilità e immunogenicità. Un RNA IVT incappucciato con D1 (200 µg) codificante eritropoietina murina (EPO) è stato lasciato non purificato o è stato purificato mediante una procedura a due passaggi utilizzando 2 colonne da centrifuga, ciascuna riempita con un materiale cellulosico: prima colonna: purificazione positiva dell'RNA

IVT (cioè, legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento utilizzando un tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH; eluizione dell'RNA a singolo filamento utilizzando un tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH); seconda colonna: purificazione negativa dell'eluato dalla prima colonna (cioè l'eluato contenente RNA a singolo filamento e ottenuto dalla prima colonna utilizzando un tampone STE 1x contenente EtOH al 16%). Il primo eluato ottenuto dalla seconda colonna è stato fatto precipitare con isopropanolo/acetato di sodio e ridisciolto in H₂O. In seguito alla formulazione con TransIt (Mirus Bio), gli RNA IVT sono stati iniettati per via intraperitoneale in topi (n=4) a una dose di 3 µg di RNA/animale. Il sangue è stato prelevato a 2, 6 e 24 ore dopo l'iniezione e sono stati raccolti campioni di plasma. Ai topi di controllo è stato iniettato TransIt da solo. I livelli di interferone alfa murino (A) ed EPO murina (B) sono stati misurati utilizzando saggi ELISA specifici (ELISA specifico per l'interferone alfa murino (eBioscience); kit di sviluppo dell'ELISA specifico per l'EPO murina DuoSet (R&D)).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELLA PRESENTE INVENZIONE

Sebbene la presente invenzione venga ulteriormente descritta sotto in maggior dettaglio, si deve intendere che questa invenzione non è limitata alle metodologie, ai protocolli e ai reagenti specifici descritti qui poiché questi possono variare. Si deve anche intendere che la terminologia utilizzata qui è allo scopo di descrivere solo forme di realizzazione particolari, e non è intesa limitare l'ambito della presente invenzione che sarà limitato solo dalle rivendicazioni allegate. Se non definiti diversamente, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati qui hanno gli stessi significati intesi comunemente da una persona esperta nell'arte.

Nella seguente, verranno descritti gli elementi della presente invenzione in maggior dettaglio. Questi elementi vengono elencati con forme di realizzazione specifiche, tuttavia, dovrebbe essere inteso che essi possono essere combinati in qualsiasi modo e in qualsiasi numero per creare ulteriori forme di realizzazione. Gli esempi variamente descritti e le forme di realizzazione preferite non dovrebbero essere intesi limitare la presente invenzione solo alle forme di realizzazione descritte esplicitamente. Dovrebbe essere inteso che questa descrizione supporti e comprenda forme di realizzazione che combinano le forme di realizzazione descritte esplicitamente con qualsiasi numero di elementi descritti e/o preferiti. Inoltre, qualsiasi permutazione e combinazione di tutti gli elementi descritti in questa domanda dovrebbero essere considerate descritte dalla descrizione della presente domanda, a meno che il contesto non indichi diversamente. Per esempio, se in una forma di realizzazione preferita l'RNA a singolo filamento comprende una coda di poli(A) consistente di 120 nucleotidi e in un'altra forma di realizzazione preferita la molecola di RNA a singolo filamento comprende un analogo del cappuccio al 5', allora in una forma di realizzazione preferita, l'RNA a singolo filamento comprende la coda di poli(A) consistente di 120 nucleotidi e l'analogo del cappuccio al 5'. In modo simile, se in una forma di realizzazione preferita la concentrazione di EtOH nel primo tampone è dal 14 al 16% (v/v) e in un'altra forma di realizzazione preferita la concentrazione di un agente

chelante nel primo tampone è da 15 a 40mM, allora in una forma di realizzazione preferita, il primo tampone comprende EtOH a una concentrazione dal 14 al 16% (v/v) e l'agente chelante a una concentrazione da 15 a 40mM.

Preferibilmente, i termini utilizzati qui vengono definiti come descritto in "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", a cura di H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, e H. Kölbl, Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Svizzera, (1995).

La pratica della presente invenzione impiegherà, se non indicato diversamente, procedimenti convenzionali di chimica, biochimica, e tecniche del DNA ricombinante che sono spiegati nella letteratura nel campo (si confronti, per esempio, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, seconda edizione, a cura di J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

In ogni punto di questa descrizione e nelle rivendicazioni che seguono, a meno che il contesto non richieda diversamente, il termine "comprendere", e variazioni quali "comprende" e "comprendente", saranno intesi implicare l'inclusione di uno specifico membro, numero intero o passaggio o gruppo di membri, di numeri interi o di passaggi, ma non l'esclusione di alcun altro membro, numero intero o passaggio o gruppo di membri, di numeri interi o di passaggi. L'espressione "costituito essenzialmente da" significa l'esclusione di altri membri, numeri interi o passaggi di qualsiasi significatività essenziale. Il termine "comprendente" comprende l'espressione "consistente essenzialmente da" che, a sua volta, comprende il termine "consistente di". Così, in ciascuna occorrenza nella presente domanda, il termine "comprendente" può essere sostituito con l'espressione "consistente essenzialmente di" o "consistente di". In modo simile, in ciascuna occorrenza nella presente domanda, l'espressione "consistente essenzialmente di" può essere sostituito con il termine "consistente di".

I termini "un", "uno/a" e "il/la" e riferimenti simili utilizzati nel contesto della descrizione dell'invenzione (specialmente nel contesto delle rivendicazioni) devono essere intesi comprendere sia il singolare che il plurale, se non indicato diversamente qui o chiaramente contraddetto dal contesto. L'elenco di intervalli di valori qui è solamente inteso servire come procedimento abbreviato per riferirsi singolarmente a ciascun valore separato che ricade nell'intervallo. Se non indicato diversamente qui, ciascun valore singolo è incorporato nella descrizione come se fosse stato qui elencato singolarmente. Tutti i procedimenti descritti qui possono essere eseguiti in qualsiasi ordine adatto se non indicato diversamente qui o altrimenti chiaramente contraddetto dal contesto. L'uso di qualsiasi e di tutti gli esempi, o del linguaggio degli esempi (per esempio "quale"), fornito qui è inteso solamente illustrare meglio l'invenzione e non porre una limitazione all'ambito dell'invenzione rivendicato altrimenti. Nessun linguaggio nella descrizione dovrebbe essere inteso come indicante qualsiasi elemento non rivendicato essenziale alla pratica dell'invenzione.

Diversi documenti sono citati in ogni parte del testo di questa descrizione. Nulla qui deve essere inteso come ammissione che l'invenzione non è autorizzata ad anticipare tale descrizione in virtù della precedente invenzione.

L'espressione "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico" come utilizzata qui significa condizioni che favoriscono (per esempio aumentano) l'attacco (preferibilmente l'attacco o l'adsorbimento non covalente) dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico, inibiscono il rilascio dell'RNA a doppio filamento legato al materiale cellulosico dal materiale cellulosico, e/o riducono la quantità di RNA a doppio filamento libero (cioè di RNA a doppio filamento che non è legato al materiale cellulosico). Queste condizioni possono essere tali da permettere o non permettere il legame di RNA diverso dall'RNA a doppio filamento (per esempio RNA a singolo filamento) al materiale cellulosico. Così, in una forma di realizzazione, l'espressione "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico" sono "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettono il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico". In questa forma di realizzazione, le condizioni (i) favoriscono (per esempio aumentano) l'attacco (preferibilmente l'attacco o l'adsorbimento non covalente) dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico, inibiscono il rilascio dell'RNA a doppio filamento legato al materiale cellulosico dal materiale cellulosico, e/o riducono la quantità di RNA a doppio filamento libero (cioè la quantità di RNA a doppio filamento non legato al materiale cellulosico), e (ii) favoriscono (per esempio aumentano) lo stato non legato dell'RNA a singolo filamento (cioè lo stato dell'RNA a singolo filamento non attaccato o adsorbito sul materiale cellulosico), riducono la quantità di RNA a singolo filamento attaccato (preferibilmente, non attaccato o adsorbito covalentemente) al materiale cellulosico, e/o inibiscono l'attacco (preferibilmente, l'attacco o l'adsorbimento non covalente) dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. In una forma di realizzazione alternativa, l'espressione "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico" sono "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico". In questa forma di realizzazione alternativa, le condizioni favoriscono (per esempio aumentano) l'attacco (preferibilmente l'attacco o l'adsorbimento non covalente) dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico, inibiscono il rilascio dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento legato al materiale cellulosico dal materiale cellulosico, e/o riducono la quantità di RNA a doppio filamento libero e di RNA a singolo filamento (cioè la quantità di RNA a doppio filamento e di RNA a singolo filamento non legato al materiale cellulosico).

Le suddette condizioni che permettono o non permettono il legame dell'RNA a doppio filamento/RNA a singolo filamento al materiale cellulosico possono essere controllate dalla composizione del mezzo (quale la composizione di un tampone) in cui la preparazione di RNA comprendente RNA a doppio filamento/RNA a singolo filamento viene disciolta o che viene aggiunto al materiale cellulosico. A questo proposito, "composizione" significa il tipo e la quantità dei componenti contenuti nel mezzo (per esempio nel tampone).

Così, in una forma di realizzazione, le "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettono

il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico" possono essere ottenute mediante un primo mezzo (per esempio un primo tampone) comprendente acqua, etanolo e un sale a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e che non permette il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. Quindi, allo scopo di soddisfare queste condizioni, nel passaggio (ii) la preparazione di RNA può essere fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il primo mezzo (per esempio il primo tampone); il materiale cellulosico può essere fornito come sospensione nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone) (quale, per esempio, il materiale cellulosico lavato, in cui il primo mezzo (per esempio il primo tampone) è stato utilizzato come soluzione di lavaggio); la preparazione di RNA può essere fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il primo mezzo (per esempio il primo tampone) e il materiale cellulosico può essere fornito come sospensione nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone); o la preparazione di RNA può essere fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il primo mezzo (per esempio il primo tampone) e il materiale cellulosico può essere fornito come materiale cellulosico lavato (in cui il primo mezzo (per esempio il primo tampone) è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone).

L'espressione "in una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e che non permette il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico" significa che la concentrazione dei componenti (in particolare acqua, etanolo e un sale) nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone) è sufficiente per (i) favorire (per esempio aumentare) l'attacco (preferibilmente l'attacco o l'adsorbimento non covalente) dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico, inibire il rilascio dell'RNA a doppio filamento legato al materiale cellulosico dal materiale cellulosico nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone), e/o ridurre la quantità di RNA a doppio filamento libero (cioè la quantità di RNA a doppio filamento non legato al materiale cellulosico) nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone), e (ii) favorire (per esempio aumentare) lo stato non legato dell'RNA a singolo filamento (cioè lo stato dell'RNA a singolo filamento non attaccato o adsorbito sul materiale cellulosico), ridurre la quantità di RNA a singolo filamento attaccato (preferibilmente, non attaccato o adsorbito covalentemente) al materiale cellulosico, e/o inibire l'attacco (preferibilmente, l'attacco o l'adsorbimento non covalente) dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico.

Inoltre, in una forma di realizzazione, le "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico" possono essere ottenute mediante un secondo mezzo (per esempio un secondo tampone) comprendente acqua, etanolo e un sale a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. Quindi, allo scopo di soddisfare queste condizioni, nel passaggio (ii) la preparazione di RNA può essere fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo

filamento e il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone); il materiale cellulosico può essere fornito come sospensione nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone) (quale, per esempio, il materiale cellulosico lavato, in cui il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) è stato utilizzato come soluzione di lavaggio); la preparazione di RNA può essere fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) e il materiale cellulosico può essere fornito come sospensione nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone); o la preparazione di RNA può essere fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) e il materiale cellulosico può essere fornito come materiale cellulosico lavato (in cui il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone).

L'espressione "in una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico" significa che la concentrazione dei componenti (in particolare acqua, etanolo e un sale) nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone) è sufficiente per favorire (per esempio aumentare) l'attacco (preferibilmente l'attacco o l'adsorbimento non covalente) dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico, inibire il rilascio dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento legato al materiale cellulosico dal materiale cellulosico nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone), e/o ridurre la quantità di RNA a doppio filamento libero e di RNA a singolo filamento (cioè la quantità di RNA a doppio filamento e di RNA a singolo filamento non legato al materiale cellulosico) nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone).

I presenti inventori hanno sorprendentemente trovato che l'RNA a doppio filamento, ma non l'RNA a singolo filamento, viene legato selettivamente a un materiale cellulosico in presenza di etanolo a una concentrazione dal 14 al 20% (v/v). Così, le "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettono il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico" vengono ottenute mediante il primo mezzo (cioè il primo tampone) come specificato sopra, che contiene etanolo a una concentrazione dal 14 al 20% (v/v), preferibilmente dal 14 al 19% (v/v), più preferibilmente dal 14 al 18% (v/v), quale dal 14 al 17% (v/v), dal 14 al 16% (v/v), dal 15 al 19% (v/v), dal 15 al 18% (v/v), dal 15 al 17% (v/v), dal 16 al 19% (v/v), o dal 16 al 18% (v/v). Il primo mezzo (per esempio il primo tampone) comprende, oltre all'etanolo nei suddetti intervalli descritti, il sale a una concentrazione da 15 a 70mM. In una forma di realizzazione, il primo mezzo (per esempio il primo tampone) comprende, oltre all'etanolo nei suddetti intervalli descritti, il sale a una concentrazione da 20 a 60mM quale da 25 a 50mM o da 30 a 50mM. Il sale nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone) è preferibilmente cloruro di sodio. Tuttavia, sulla base delle informazioni e dei dati forniti nella presente domanda, la persona esperta può determinare facilmente altri sali e loro concentrazioni che sono

adatte per il primo mezzo (per esempio il primo tampone) da utilizzare nei procedimenti della presente invenzione. Altri eventuali componenti del primo mezzo (per esempio del primo tampone) comprendono una sostanza tamponante (preferibilmente TRIS o HEPES, più preferibilmente TRIS), e/o un agente chelante (preferibilmente EDTA oppure acido nitrilotriacetico, più preferibilmente EDTA). In una forma di realizzazione, la concentrazione della sostanza tamponante nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone) è da 5 a 40mM, preferibilmente da 6 a 30mM, quale da 8 a 20mM o da 10 a 15mM. In una forma di realizzazione, il pH del primo mezzo (per esempio del primo tampone) è da 6,5 a 8,0, preferibilmente da 6,7 a 7,8, quale da 6,8 a 7,2 (per esempio quando TRIS è la sostanza tamponante) o da 7,3 a 7,7 (per esempio quando HEPES è la sostanza tamponante). In una forma di realizzazione, la concentrazione dell'agente chelante nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone) è da 10 a 50mM, preferibilmente da 15 a 40mM quale da 20 a 30mM.

In una forma di realizzazione, il primo mezzo (per esempio il primo tampone) comprende acqua, etanolo, TRIS ed EDTA (quale acqua, etanolo, il sale (preferibilmente cloruro di sodio), TRIS ed EDTA), preferibilmente nelle concentrazioni specificate sopra per il primo mezzo (per esempio il primo tampone). Tuttavia, sulla base delle informazioni e dei dati forniti nella presente domanda, la persona esperta può determinare facilmente sostanze tamponanti diverse dal TRIS e/o chelanti diversi dall'EDTA e/o sali diversi dal cloruro di sodio così come loro concentrazioni che sono adatte per il primo mezzo (per esempio il primo tampone) da utilizzare nei procedimenti della presente invenzione. Per esempio, in una forma di realizzazione, il primo mezzo (per esempio il primo tampone) comprende, oltre all'etanolo nei suddetti intervalli descritti (cioè dal 14 al 20% (v/v), ecc.), TRIS in una quantità da 5 a 40mM e il sale (preferibilmente cloruro di sodio) in una quantità da 15 a 70mM. In un'altra forma di realizzazione, il primo mezzo (per esempio il primo tampone) comprende, oltre all'etanolo nei suddetti intervalli descritti (cioè dal 14 al 20% (v/v), ecc.), HEPES in una quantità da 5 a 40mM e il sale (preferibilmente cloruro di sodio) in una quantità da 100 a 150mM (per esempio da 110 a 140mM o da 120 a 130mM).

In una forma di realizzazione, le "condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico" possono essere ottenute mediante il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) come specificato sopra, che contiene etanolo a una concentrazione almeno del 35% (v/v), preferibilmente almeno del 36% (v/v), almeno del 37% (v/v), almeno del 38% (v/v), almeno del 39% (v/v), almeno del 40% (v/v), quale dal 35 al 45% (v/v), dal 36 al 45% (v/v), dal 37 al 45% (v/v), dal 38 al 45% (v/v), dal 38 al 42% (v/v), o dal 39 al 41% (v/v). In una forma di realizzazione, il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) comprende, oltre all'etanolo nei suddetti intervalli descritti (cioè almeno il 35% (v/v), almeno il 36% (v/v), almeno il 37% (v/v), almeno il 38% (v/v), ecc.), il sale a una concentrazione da 15 a 70mM, preferibilmente da 20 a 60mM quale da 25 a 50mM o da 30 a 50mM. Il sale nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone) è

preferibilmente cloruro di sodio. Tuttavia, sulla base delle informazioni e dei dati forniti nella presente domanda, la persona esperta può determinare facilmente altri sali e loro concentrazioni che sono adatte per il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) da utilizzare nei procedimenti della presente invenzione. Altri eventuali componenti del secondo mezzo (per esempio del secondo tampone) comprendono una sostanza tamponante (preferibilmente TRIS o HEPES, più preferibilmente TRIS), e/o un agente chelante (preferibilmente EDTA oppure acido nitrilotriacetico, più preferibilmente EDTA). In una forma di realizzazione, la concentrazione della sostanza tamponante nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone) è da 5 a 40mM, preferibilmente da 6 a 30mM, quale da 8 a 20mM o da 10 a 15mM. In una forma di realizzazione, il pH del secondo mezzo (per esempio del secondo tampone) è da 6,5 a 8,0, preferibilmente da 6,7 a 7,8, quale da 6,8 a 7,2 (per esempio quando TRIS è la sostanza tamponante) o da 7,3 a 7,7 (per esempio quando HEPES è la sostanza tamponante). In una forma di realizzazione, la concentrazione dell'agente chelante nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone) è da 10 a 50mM, preferibilmente da 15 a 40mM quale da 20 a 30mM.

In una forma di realizzazione, il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) comprende acqua, etanolo, TRIS ed EDTA (quale acqua, etanolo, il sale (preferibilmente cloruro di sodio), TRIS ed EDTA), preferibilmente nelle concentrazioni specificate sopra per il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone). Tuttavia, sulla base delle informazioni e dei dati forniti nella presente domanda, la persona esperta può determinare facilmente sostanze tamponanti diverse dal TRIS e/o chelanti diversi dall'EDTA e/o sali diversi dal cloruro di sodio così come loro concentrazioni che sono adatte per il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) da utilizzare nei procedimenti della presente invenzione. In una forma di realizzazione, il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) comprende, oltre all'etanolo nei suddetti intervalli descritti (cioè almeno il 35% (v/v), almeno il 36% (v/v), almeno il 37% (v/v), almeno il 38% (v/v), ecc.), TRIS in una quantità da 5 a 40mM e il sale (preferibilmente cloruro di sodio) in una quantità da 15 a 70mM. In un'altra forma di realizzazione, il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) comprende, oltre all'etanolo nei suddetti intervalli descritti (cioè almeno il 35% (v/v), almeno il 36% (v/v), almeno il 37% (v/v), almeno il 38% (v/v), ecc.), HEPES in una quantità da 5 a 40mM e il sale (preferibilmente cloruro di sodio) in una quantità da 100 a 150mM (per esempio da 110 a 140mM o da 120 a 130mM).

In una forma di realizzazione, il primo e il secondo mezzo (cioè il primo e il secondo tampone) differiscono non solo nella concentrazione di etanolo ma anche nel tipo e/o nella concentrazione di uno o più degli altri componenti (quali il sale, l'eventuale sostanza tamponante, e/o l'eventuale agente chelante). In una forma di realizzazione preferita, il primo e il secondo mezzo (cioè il primo e il secondo tampone) hanno la stessa composizione (cioè in relazione al tipo e alla concentrazione dei componenti diversi dall'acqua, quali il sale, l'eventuale sostanza tamponante e l'eventuale agente chelante) con l'eccezione della concentrazione di etanolo.

L'espressione "separare l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico in condizioni che permettano il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico" come utilizzata qui significa che la fase comprendente l'RNA a singolo filamento (la suddetta fase essendo preferibilmente liquida) deve essere isolata dal materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento è legato. Tale isolamento/separazione può essere realizzato/a in diversi modi noti alla persona esperta, per esempio, rimuovendo selettivamente solo il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento è legato (per esempio utilizzando, come materiale cellulosico, una cellulosa che è accoppiata covalentemente a sfere magnetiche e utilizzando un magnete) o raccogliendo solo la fase comprendente l'RNA a singolo filamento (per esempio utilizzando una pipetta).

Per esempio, in una forma di realizzazione, la miscela della preparazione di RNA, del materiale cellulosico, e del primo tampone viene fornita in una provetta (in questa forma di realizzazione, si preferisce che (α) la preparazione di RNA venga fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il primo tampone e/o (β) il materiale cellulosico venga fornito come materiale cellulosico lavato (in cui il primo tampone è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone), e/o (γ) la preparazione di RNA, il materiale cellulosico, e il primo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti, quale per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti); è il più preferito che (α) la preparazione di RNA venga fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il primo tampone, (β) il materiale cellulosico venga fornito come materiale cellulosico lavato (in cui il primo tampone è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone), e (γ) la preparazione di RNA, il materiale cellulosico, e il primo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione, per esempio, per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti). In questa forma di realizzazione, è preferibile che il passaggio (iii) comprenda (1) l'applicare la gravità o la forza centrifuga (per esempio da 10.000 x g a 15.000 x g per da 1 a 5 minuti) alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate); e (2) il raccogliere il supernatante comprendente l'RNA a singolo filamento (per esempio utilizzando una pipetta) o il rimuovere il materiale cellulosico (per esempio utilizzando, come materiale cellulosico, una cellulosa che è accoppiata covalentemente a sfere magnetiche e utilizzando un magnete). I passaggi (ii) e (iii) possono essere ripetuti una volta o due o più volte (quale una volta, due volte o tre volte). Se i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti, la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo (cioè immediatamente seguente) e in ciascun ciclo viene utilizzato materiale cellulosico fresco (preferibilmente materiale cellulosico fresco lavato).

In una forma di realizzazione alternativa, la miscela della preparazione di RNA, del materiale cellulosico, e del primo tampone viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro (in questa forma di realizzazione, si preferisce che (α) la preparazione di RNA venga fornita come

liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il primo tampone e/o (β) il materiale celluloso venga fornito come materiale celluloso lavato (in cui il primo tampone è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone), e/o (γ) la preparazione di RNA, il materiale celluloso, e il primo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti, quale per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti); è il più preferito che (α) la preparazione di RNA venga fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il primo tampone, (β) il materiale celluloso venga fornito come materiale celluloso lavato (in cui il primo tampone è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone), e (γ) la preparazione di RNA, il materiale celluloso, e il primo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione, per esempio, per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti). In questa forma di realizzazione, è preferibile che il passaggio (iii) comprenda (1') l'applicare la gravità, la forza centrifuga (per esempio da 10.000 x g a 15.000 x g per da 1 a 5 minuti), la pressione (per esempio da 1.000 hPa a 3.000 hPa), o il vuoto (per esempio da 100 hPa a 900 hPa, quale da 200 hPa a 800 hPa) alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate); e (2') il raccogliere il primo eluato comprendente l'RNA a singolo filamento. I passaggi (ii) e (iii) possono essere ripetuti una volta o due o più volte (quale una volta, due volte o tre volte). Se i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti, la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo (cioè immediatamente seguente) e in ciascun ciclo viene utilizzato materiale celluloso fresco (preferibilmente materiale celluloso fresco lavato).

L'espressione "separare il materiale celluloso a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dal resto" come utilizzato qui significa che la fase solida (cioè il materiale celluloso) a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono attaccati (preferibilmente attaccati o adsorbiti non covalentemente) deve essere isolata dall'altra fase (la suddetta altra fase essendo preferibilmente liquida). Tale isolamento/separazione può essere realizzato/a in diversi modi noti alla persona esperta, per esempio, raccogliendo selettivamente solo il materiale celluloso a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati (per esempio utilizzando, come materiale celluloso, una cellulosa che è accoppiata covalentemente a sfere magnetiche e utilizzando un magnete) o rimuovendo selettivamente solo l'altra fase (per esempio utilizzando una pipetta).

Per esempio, in una forma di realizzazione, la miscela della preparazione di RNA, del materiale celluloso, e del secondo tampone viene fornita in una provetta (in questa forma di realizzazione, si preferisce che (α') la preparazione di RNA venga fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il secondo tampone e/o (β') il materiale celluloso venga fornito come materiale celluloso lavato (in cui il secondo tampone è

stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone), e/o (γ') la preparazione di RNA, il materiale cellulosico, e il secondo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti, quale per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti); è il più preferito che (α') la preparazione di RNA venga fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il secondo tampone, (β') il materiale cellulosico venga fornito come materiale cellulosico lavato (in cui il secondo tampone è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone), e (γ') la preparazione di RNA, il materiale cellulosico, e il secondo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione, per esempio, per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti). In questa forma di realizzazione, è preferibile che il passaggio (ii)(2) (cioè, il "separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dal resto") comprenda (2a) l'applicare la gravità o la forza centrifuga (per esempio da 10.000 x g a 15.000 x g per da 1 a 5 minuti) alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate); e (2b) il rimuovere il sumatante (per esempio utilizzando una pipetta) o il raccogliere il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati (per esempio utilizzando, come materiale cellulosico, una cellulosa che è accoppiata covalentemente a sfere magnetiche e utilizzando un magnete). Il passaggio (ii) può inoltre comprendere (3) l'aggiungere un'aliquota del secondo tampone (preferibilmente l'aliquota essendo da 0,5 a 3 volte (quale da 1 a 2 volte) il volume del materiale cellulosico) al materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati; (4) l'incubare la miscela risultante con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per da 5 a 20 minuti o da 10 minuti a 15 minuti); e (5) il separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dalla fase liquida (preferibilmente la separazione viene condotta nello stesso modo come definito nei passaggi (2a) e (2b), sopra); e facoltativamente (6) il ripetere i passaggi da (3) a (5) una volta o due o più volte (quale una volta, due volte o tre volte). Il passaggio (iii) comprende (1) il miscelare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati con il primo tampone come specificato sopra (cioè avente una concentrazione di EtOH dal 14 al 20% (v/v), preferibilmente dal 14 al 16% (v/v)) con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti, quale per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti); e (2) il separare la fase liquida comprendente l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico (preferibilmente il passaggio di separazione della fase liquida comprendente l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico è condotto come specificato sopra, per esempio, applicando la gravità o la forza centrifuga (per esempio da 10.000 x g a 15.000 x g per da 1 a 5 minuti) alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate); e (2) il raccogliere il sumatante comprendente l'RNA a singolo filamento (per esempio utilizzando una pipetta) o il rimuovere il materiale cellulosico

(per esempio utilizzando, come materiale cellulosico, una cellulosa che è accoppiata covalentemente a sfere magnetiche e utilizzando un magnete). I passaggi (ii) e (iii) possono essere ripetuti una volta o due o più volte (quale una volta, due volte o tre volte). Se i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti, la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo (cioè immediatamente seguente) e in ciascun ciclo viene utilizzato materiale cellulosico fresco (preferibilmente materiale cellulosico fresco lavato).

In una forma di realizzazione alternativa, la miscela della preparazione di RNA, del materiale cellulosico, e del secondo tampone viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro (in questa forma di realizzazione, si preferisce che (α') la preparazione di RNA venga fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il secondo tampone e/o (β') il materiale cellulosico venga fornito come materiale cellulosico lavato (in cui il secondo tampone è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone), e/o (γ') la preparazione di RNA, il materiale cellulosico, e il secondo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti, quale per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti); è il più preferito che (α') la preparazione di RNA venga fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il secondo tampone, (β') il materiale cellulosico venga fornito come materiale cellulosico lavato (in cui il secondo tampone è stato utilizzato come soluzione di lavaggio), in forma anidra o come sospensione nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone), e (γ') la preparazione di RNA, il materiale cellulosico, e il secondo tampone vengano miscelati con mescolamento e/o agitazione, per esempio, per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti). In questa forma di realizzazione, è preferibile che il passaggio (ii)(2) (cioè, il "separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dal resto") comprenda (2a') l'applicare la gravità, la forza centrifuga (per esempio da 10.000 x g a 15.000 x g per da 1 a 5 minuti), la pressione (per esempio da 1.000 hPa a 3.000 hPa), o il vuoto (per esempio da 100 hPa a 900 hPa, quale da 200 hPa a 800 hPa) alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate; e (2b') lo smaltimento del primo eluato. Il passaggio (ii) può inoltre comprendere (3) l'aggiungere un'aliquota del secondo tampone (preferibilmente l'aliquota essendo da 0,5 a 3 volte (quale da 1 a 2 volte) il volume del materiale cellulosico) al materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati; (4) l'incubare la miscela risultante con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per da 5 a 20 minuti o da 10 minuti a 15 minuti); e (5) il separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dalla fase liquida (preferibilmente la separazione viene condotta nello stesso modo come definito nei passaggi (2a') e (2b'), sopra); e facoltativamente (6) il ripetere i passaggi da (3) a (5) una volta o due o più volte (quale una volta, due volte o tre volte). Il passaggio (iii) comprende

(1) il miscelare il materiale celluloso a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati con il primo tampone come specificato sopra (cioè avente una concentrazione di EtOH dal 14 al 20% (v/v), preferibilmente dal 14 al 16% (v/v)) con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti, quale per da 5 a 30 minuti o da 10 a 20 minuti); e (2) il separare la fase liquida comprendente l'RNA a singolo filamento dal materiale celluloso (preferibilmente il passaggio di separazione della fase liquida comprendente l'RNA a singolo filamento dal materiale celluloso è condotto come specificato sopra, per esempio, applicando la gravità, la forza centrifuga (per esempio da 10.000 x g a 15.000 x g per da 1 a 5 minuti), la pressione (per esempio da 1.000 hPa a 3.000 hPa), o il vuoto (per esempio da 100 hPa a 900 hPa, quale da 200 hPa a 800 hPa) alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate); e raccogliendo il primo eluato comprendente l'RNA a singolo filamento. I passaggi (ii) e (iii) possono essere ripetuti una volta o due o più volte (quale una volta, due volte o tre volte). Se i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti, la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo (cioè immediatamente seguente) e in ciascun ciclo viene utilizzato materiale celluloso fresco (preferibilmente materiale celluloso fresco lavato).

In una forma di realizzazione della procedura di purificazione positiva, il materiale celluloso viene fornito in una colonna (in questa forma di realizzazione, si preferisce che il materiale celluloso venga fornito come materiale celluloso lavato, in cui un secondo tampone come specificato sopra (cioè avente una concentrazione di EtOH almeno del 35% (v/v), almeno del 36% (v/v), almeno del 37% (v/v), almeno del 38% (v/v), ecc.) è stato utilizzato come soluzione di lavaggio). In questa forma di realizzazione, è preferibile che, prima che la preparazione di RNA venga caricata sulla colonna nel passaggio (ii), la colonna comprendente il materiale celluloso venga equilibrata (cioè lavata) con il secondo tampone come specificato sopra (per esempio con un'aliquota del suddetto secondo tampone). In seguito, la preparazione di RNA (che viene fornita preferibilmente come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e il suddetto secondo tampone) viene caricata sulla colonna (preferibilmente mediante iniezione) e preferibilmente la colonna viene lavata con il suddetto secondo tampone (per esempio con un'ulteriore aliquota del suddetto secondo tampone, preferibilmente da 0,5 a 2 volte il volume del materiale celluloso contenuto nella colonna). Si preferisce questo passaggio di lavaggio, poiché esso può lavare via i contaminanti diversi dall'RNA (tali contaminanti includono particolarmente i materiali di partenza utilizzati per generare l'RNA IVT (che è facoltativamente modificato) e i loro prodotti di degradazione, per esempio, uno stampo di DNA; un'RNA polimerasi (quale T7, T3 o SP6); monoribonucleotidi in forma non modificata (per esempio rATP, rGTP, rCTP, rUTP, e loro analoghi aventi solo uno o due gruppi fosfato) o in forma modificata (per esempio r(ImΨ)TP o rΨTP e loro analoghi aventi solo uno o due gruppi fosfato); pirofosfato;

un reagente di incappucciamento (cioè un reagente per introdurre un cappuccio al 5' o un analogo del cappuccio al 5'); e additivi utilizzati per generare l'RNA IVT (per esempio agenti tamponanti, sali, agenti antiossidanti, poliammine (quale la spermidina)). Il passaggio (iii) viene condotto utilizzando preferibilmente un primo tampone come specificato sopra (cioè avente una concentrazione di EtOH dal 14 al 20% (v/v), preferibilmente dal 14 al 16% (v/v)) come eluente, quindi rilasciando l'RNA a singolo filamento dal materiale celluloso. I composti (in particolare l'RNA a singolo filamento, facoltativamente anche l'RNA a doppio filamento) che sono eluiti o lavati dalla colonna possono essere rilevati e/o monitorati utilizzando mezzi convenzionali (per esempio un rivelatore di UV/VIS quale un rivelatore a serie di diodi), per esempio, a una lunghezza d'onda di 260 nm (per il rilevamento di acidi nucleici) e/o 215 nm (per il rilevamento di peptidi/proteine) e/o 280 nm (per il rilevamento di peptidi/proteine contenenti amminoacidi aromatici).

L'RNA a singolo filamento ottenuto mediante qualsiasi procedimento della presente invenzione (in particolare indipendentemente dal fatto che sia stata utilizzata la procedura di purificazione "negativa" o "positiva") può essere sottoposto ad ulteriori trattamenti, quali precipitazione e/o modifica. Per esempio, l'RNA a singolo filamento ottenuto mediante i procedimenti della presente invenzione può essere fatto precipitare utilizzando procedimenti convenzionali (per esempio utilizzando il procedimento di precipitazione con "acetato di sodio/isopropanolo" o il procedimento di precipitazione con "LiCl") risultando in una preparazione di RNA a singolo filamento in forma essiccata. L'RNA a singolo filamento fatto essiccare può essere conservato (per esempio a -70°C) o può essere disciolto in un solvente appropriato (per esempio acqua o tampone TE (TRIS 10mM, EDTA 1mM)) e quindi conservato (per esempio a -70°C) o ulteriormente utilizzato (per esempio per la preparazione di una composizione farmaceutica). In alternativa o in aggiunta, l'RNA a singolo filamento può essere modificato ulteriormente, per esempio, rimuovendo i trifosfati al 5' senza cappuccio e/o aggiungendo una struttura di incappucciamento, prima di essere conservato (per esempio a -70°C) o utilizzato (per esempio per la preparazione di una composizione farmaceutica).

Come dimostrato negli esempi della presente domanda, i procedimenti dell'invenzione forniscono diversi vantaggi, quali uno o più dei seguenti. Per esempio, i procedimenti della presente invenzione offrono un ampio spettro di differenti tecniche di purificazione, compresi passaggi di centrifugazione semplice, colonne da microcentrifuga, sistemi a filtro a vuoto, e FPLC. In confronto ai procedimenti di HPLC, i procedimenti della presente invenzione sono economici e semplici (non c'è bisogno di attrezzatura complessa), evitano sostanze tossiche (quale l'acetonitrile), e forniscono RNA a singolo filamento in una purezza e resa relativamente elevate. Inoltre, poiché la cellulosa è un prodotto naturale, ci si può attendere che un procedimento della presente invenzione che è basato sulla cellulosa e che è efficace nella purificazione dell'RNA a singolo filamento (in particolare dell'RNA a singolo filamento IVT) vada incontro a meno complessità quando trasferito in ambienti regolati da GMP.

Inoltre, è stato dimostrato nella presente domanda che i procedimenti della presente invenzione possono essere facilmente aumentabili in scala e richiedono meno tempo rispetto ai procedimenti convenzionali in HPLC. A questo proposito, si nota che i procedimenti convenzionali in HPLC (quali quelli descritti in Weissman et al., sopra) sono in generale limitati dalla dimensione della colonna e dal problema di contropressione compreso nell'utilizzo di colonne grandi. Questo non è il caso dei procedimenti della presente invenzione. Per esempio, come dimostrato nella presente domanda (si confronti l'esempio 5), la purificazione di da 50 a 100 mg di RNA IVT può essere ottenuta in meno di 2 ore quando si utilizzano i procedimenti della presente invenzione. Al contrario, la colonna per HPLC utilizzata nell'esempio 3 (Semi-Prep RNASep 100 x 21,1 mm, Transgenomic) con un volume di colonna di 35 ml ha una capacità di legame massima di 1 mg di RNA IVT. Poiché una corsa di purificazione standard che utilizza una tale colonna per HPLC richiede più di 60 minuti, la purificazione di 50 mg di RNA IVT richiederebbe circa 50 ore in confronto a solo 2 ore utilizzando i procedimenti della presente invenzione. Inoltre, la purificazione di RNA IVT lungo utilizzando procedimenti basati sull'HPLC convenzionale causa problemi e spesso conduce a (a) elevata perdita di RNA IVT (in particolare, quando l'RNA IVT ha una lunghezza di circa almeno 2.700 nucleotidi (preferibilmente almeno 2.800 nucleotidi, almeno 2.900 nucleotidi, almeno 3.000 nucleotidi, almeno 3.100 nucleotidi, almeno 3.200 nucleotidi, almeno 3.300 nucleotidi, almeno 3.400 nucleotidi, più preferibilmente almeno 3.500 nucleotidi, almeno 3.600 nucleotidi, almeno 3.700 nucleotidi, almeno 3.800 nucleotidi, almeno 3.900 nucleotidi, almeno 4.000 nucleotidi, almeno 4.100 nucleotidi, almeno 4.200 nucleotidi, almeno 4.300 nucleotidi, almeno 4.400 nucleotidi, più preferibilmente almeno 4.500 nucleotidi, almeno 4.600 nucleotidi, almeno 4.700 nucleotidi, almeno 4.800 nucleotidi, almeno 4.900 nucleotidi, almeno 5.000 nucleotidi), poiché gli RNA IVT aventi una tale lunghezza non eluiscono in procedimenti basati sull'HPLC convenzionale come un picco stretto definito, ma eluiscono come un picco largo, richiedendo quindi la raccolta dell'eluato (comprendente l'RNA a singolo filamento) per un periodo di tempo prolungato allo scopo di minimizzare la perdita di RNA a singolo filamento) e/o, in maniera più importante, (b) la degradazione dell'RNA IVT (in particolare, quando l'RNA IVT lungo (per esempio avente una dimensione di almeno 3.500 nucleotidi, quale almeno 4.000 nucleotidi, almeno 4.500 nucleotidi, almeno 5.000 nucleotidi, almeno 5.500 nucleotidi, almeno 6.000 nucleotidi, almeno 6.500 nucleotidi, almeno 7.000 nucleotidi, almeno 7.500 nucleotidi, almeno 8.000 nucleotidi, almeno 8.500 nucleotidi, almeno 9.000 nucleotidi, o almeno 9.500 nucleotidi) deve essere purificato probabilmente a causa di taglio durante il passaggio dell'RNA lungo attraverso il materiale della colonna saldamente impaccato). Al contrario, come dimostrato nella presente domanda, l'uso dei procedimenti della presente invenzione per purificare RNA IVT avente una dimensione di circa 10.000 nucleotidi o maggiore non risulta nella degradazione dell'RNA. Inoltre, è stato trovato che utilizzando i procedimenti della presente invenzione, è possibile eluire gli RNA a singolo filamento IVT (in particolare gli RNA a singolo filamento IVT aventi una lunghezza di circa almeno 2.700 nucleotidi (preferibilmente

almeno 2.800 nucleotidi, almeno 2.900 nucleotidi, almeno 3.000 nucleotidi, almeno 3.100 nucleotidi, almeno 3.200 nucleotidi, almeno 3.300 nucleotidi, almeno 3.400 nucleotidi, più preferibilmente almeno 3.500 nucleotidi, almeno 3.600 nucleotidi, almeno 3.700 nucleotidi, almeno 3.800 nucleotidi, almeno 3.900 nucleotidi, almeno 4.000 nucleotidi, almeno 4.100 nucleotidi, almeno 4.200 nucleotidi, almeno 4.300 nucleotidi, almeno 4.400 nucleotidi, più preferibilmente almeno 4.500 nucleotidi, almeno 4.600 nucleotidi, almeno 4.700 nucleotidi, almeno 4.800 nucleotidi, almeno 4.900 nucleotidi, almeno 5.000 nucleotidi)) dal materiale cellulosico in un picco stretto definito, riducendo quindi la quantità (cioè il volume) di eluato (comprendente l'RNA a singolo filamento) da raccogliere al minimo. Infine, l'integrità dell'RNA purificato rende i procedimenti della presente invenzione superiori in confronto a procedimenti convenzionali che utilizzano RNasi III di *E. coli*, che spesso risultano in una degradazione parziale dell'RNA a singolo filamento, specialmente dell'RNA a singolo filamento lungo, durante l'incubazione (probabilmente a causa dell'idrolisi catalizzata da RNasi III di strutture secondarie a doppio filamento contenute nell'RNA a singolo filamento).

Il termine "mescolamento e/o agitazione" come utilizzato qui significa qualsiasi azione che è adatta per miscelare (preferibilmente miscelare accuratamente) una miscela, per esempio, una miscela comprendente una fase solida (quale un materiale cellulosico) e una fase liquida (quale un mezzo (per esempio un tampone), una soluzione di lavaggio, o una preparazione di RNA disciolta in un mezzo (per esempio un tampone)). I dispositivi tipici per ottenere "mescolamento e/o agitazione" sono noti alla persona esperta e includono un agitatore, un miscelatore (per esempio un miscelatore vorticante o un miscelatore statico), un agitatore magnetico (comprendente una barretta agitatrice), e una bacchetta per agitazione, che sono disponibili in dimensioni differenti in relazione al volume della miscela da miscelare. Il mescolamento e/o l'agitazione della miscela può essere eseguito/a per un tempo sufficiente per ottenere una miscelazione completa, per esempio, per un tempo di almeno 1 minuto (quale almeno 2 minuti, almeno 3 minuti, almeno 4 minuti, almeno 5 minuti, almeno 8 minuti, almeno 10 minuti). Il tempo massimo per il mescolamento e/o l'agitazione della miscela può essere fino a 40 minuti (quale fino a 35 minuti, fino a 30 minuti, fino a 28 minuti, fino a 26 minuti, fino a 24 minuti, fino a 22 minuti, o fino a 20 minuti). Così, gli intervalli di tempo esemplificativi per il mescolamento e/o l'agitazione della miscela sono da 5 a 40 minuti, da 5 a 30 minuti, da 5 a 20 minuti, da 10 a 40 minuti, da 10 a 30 minuti, da 10 a 20 minuti, da 15 a 40 minuti, da 15 a 30 minuti, o da 15 a 20 minuti. Generalmente, la durata del mescolamento e/o dell'agitazione dipenderà da fattori quali l'uso desiderato (per esempio, il lavaggio di un materiale cellulosico o il legame di RNA a un materiale cellulosico) e la quantità di solido da miscelare. Per esempio, per il lavaggio di un materiale cellulosico, la durata del mescolamento e/o dell'agitazione può essere nell'intervallo da 1 a 15 minuti, quale da 5 a 10 minuti. Per il legame di RNA a un materiale cellulosico, la durata del mescolamento e/o dell'agitazione può essere nell'intervallo da 5 a 20 minuti (quale da 10 a 20 minuti) quando viene utilizzato fino a 1 g di materiale cellulosico, o nell'intervallo da 10 a 30 minuti (quale da 15 a 30 minuti) quando viene utilizzato più

di 1 g di materiale cellulosico. In modo simile, per il rilascio dell'RNA (in particolare RNA a singolo filamento) legato a un materiale cellulosico dal materiale cellulosico, la durata del mescolamento e/o dell'agitazione può essere nell'intervallo da 5 a 20 minuti (quale da 10 a 20 minuti) quando viene utilizzato fino a 1 g di materiale cellulosico, o nell'intervallo da 10 a 30 minuti (quale da 15 a 30 minuti) quando viene utilizzato più di 1 g di materiale cellulosico.

Il termine "sale" come utilizzato in relazione al primo e al secondo mezzo (per esempio il primo e il secondo tampone) significa qualsiasi composto ionico che risulta dalla reazione di neutralizzazione di un acido e una base. Preferibilmente, il sale (i) non è una sostanza tamponante, (ii) non è un agente chelante, o (iii) non è né una sostanza tamponante né un agente chelante. Gli acidi tipici includono acidi inorganici (quali acido cloridrico, acido bromidrico, acido iodidrico, acido solforico, acido nitrico, acido fosforico, acido borico, e acido perclorico) e acidi organici (per esempio acidi monocarbossilici, preferibilmente quelli aventi da 1 a 5 (quali 1, 2 o 3) atomi di carbonio, per esempio, acido formico, acido acetico, e acido propionico), preferibilmente acidi inorganici. Le basi esemplari includono basi inorganiche (quali NH_3 , idrossido d'ammonio (NH_4OH) e gli ossidi ed idrossidi metallici, preferibilmente gli ossidi ed idrossidi di metalli alcalini, terrosi, e alcalino terrosi (per esempio gli ossidi ed idrossidi di Li, Na, K, Rb, Be, Mg, Ca, Sr, Al, e Zn)) e basi organiche (quali ammine, per esempio, monoalchilammine, dialchilammine o trialchilammine), preferibilmente basi inorganiche, più preferibilmente gli ossidi ed idrossidi di Li, Na, K, Mg, Ca, Al, e Zn, più preferibilmente gli ossidi ed idrossidi di Li, Na, K, e Zn, quali gli ossidi ed idrossidi di Li, Na, e K. I sali tipici che possono essere utilizzati in relazione al primo e al secondo mezzo (per esempio il primo e il secondo tampone) includono LiCl, NaCl e KCl, e un sale specialmente preferito a tal riguardo è NaCl. Preferibilmente, il sale viene utilizzato nel primo e nel secondo mezzo (per esempio il primo e il secondo tampone) a una concentrazione che non risulta nella precipitazione dell'RNA nel suddetto mezzo. La concentrazione del sale nel primo mezzo (per esempio nel primo tampone) è da 15 a 70mM, per esempio, da 20 a 60mM, da 25 a 50mM o da 30 a 50mM, in particolare se la sostanza tamponante è TRIS. In una forma di realizzazione, la concentrazione del sale nel secondo mezzo (per esempio nel secondo tampone) è da 15 a 70mM, per esempio, da 20 a 60mM, da 25 a 50mM o da 30 a 50mM, in particolare se la sostanza tamponante è TRIS. In una forma di realizzazione, la concentrazione del sale nel primo e/o nel secondo mezzo (per esempio nel primo e/o nel secondo tampone) è da 100 a 200mM, per esempio, da 110 a 190mM, da 120 a 180mM, da 130 a 170mM, da 140 a 160mM o da 145 a 155mM, in particolare se la sostanza tamponante è HEPES.

I termini "sostanza tamponante" e "agente tamponante" come utilizzati qui significano una miscela di composti in grado di mantenere il pH di una soluzione quasi costante anche se viene aggiunto/a un acido o una base forte alla soluzione. In una forma di realizzazione, la sostanza tamponante o l'agente tamponante è una miscela di un acido debole e la sua base coniugata. In un'altra forma di realizzazione, la sostanza tamponante o l'agente

tamponante è una miscela di una base debole e il suo acido coniugato. Preferibilmente, la sostanza tamponante non è un agente chelante. Gli esempi di sostanze tamponanti adatte per il primo e il secondo mezzo (per esempio il primo e il secondo tampone) includono tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinetasolfonico (HEPES), acido 3-morfolin-2-idrossipropansolfonico (MOPSO), acido 3-(N-morfolin)propansolfonico (MOPS), acido N,N-bis(2-idrossietil)-2-amminoetasolfonico (BES), acido 2-[(2-idrossi-1,1-bis(idrossimetil)etil)ammino]etansolfonico (TES), piperazin-N,N'-bis(acido 2-etansolfonico) (PIPES), e acido 3-(N,N-bis[2-idrossietil]ammino)-2-idrossipropansolfonico (DIPSO), preferibilmente TRIS o HEPES, più preferibilmente TRIS. Il valore di pH desiderato (quale pH da 6,5 a 8,0, preferibilmente pH da 6,6 a 7,8, quale pH da 6,8 a 7,6, pH da 6,8 a 7,2, pH da 6,9 a 7,5, pH da 6,9 a 7,3, pH da 7,0 a 7,7, pH da 7,0 a 7,5, pH da 7,0 a 7,3, pH da 7,3 a 7,8, pH da 7,3 a 7,7, o pH da 7,3 a 7,6) può essere ottenuto aggiungendo una quantità sufficiente di acido (per esempio di un acido inorganico quale acido cloridrico) alla base corrispondente (per esempio TRIS) o aggiungendo una quantità sufficiente di base (per esempio di una base inorganica quale idrossido di sodio) all'acido corrispondente (per esempio PIPES se si desidera un pH sopra la sua pKa di 6,76 (quale un pH di 7,0 o da 7,3 a 7,7)). In una forma di realizzazione, la concentrazione della sostanza tamponante nel primo e/o nel secondo mezzo (per esempio nel primo e/o nel secondo tampone) è da 5 a 40mM, per esempio, da 6 a 30mM, da 8 a 20mM o da 10 a 15mM.

Il termine "agente chelante" come utilizzato qui in relazione al primo e al secondo mezzo (per esempio il primo e il secondo tampone) significa un composto (preferibilmente un composto organico) che è un ligando polidentato e che è in grado di formare due o più (preferibilmente tre o più, quali quattro o più) legami di coordinazione a un singolo atomo centrale (preferibilmente un singolo catione di un metallo quale Ca^{2+} o Mg^{2+}). A questo proposito, "polidentato" si riferisce a un ligando avente più di uno (cioè due o più, preferibilmente tre o più, quali quattro o più) gruppi donatori in una singola molecola ligando, in cui i gruppi donatori includono preferibilmente atomi aventi coppie di elettroni liberi (per esempio O, =O, $-\text{NH}_2$, $-\text{NRH}$ (in cui R è un gruppo funzionale organico quale alchile, in particolare C_{1-3} alchile), e $-\text{NR}_2$ (in cui ciascun R è indipendentemente un gruppo funzionale organico quale alchile, in particolare C_{1-3} alchile)). Preferibilmente, l'agente chelante non è una sostanza tamponante. Gli esempi di chelanti includono EDTA, acido nitrilotriacetico, sali citrato (per esempio citrato di sodio), acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA), acido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacetico (NOTA), acido 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien-3,6,9-triacetico (PCTA) e acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triacetico (DO3A), preferibilmente EDTA oppure acido nitrilotriacetico, più preferibilmente EDTA. In una forma di realizzazione, la concentrazione dell'agente chelante nel primo e/o nel secondo mezzo (per esempio nel primo e/o nel secondo tampone) è da 10 a 50mM, per esempio, da 15 a 40mM o da 20 a 30mM.

Il termine "materiale cellulosico" come utilizzato qui si riferisce a qualsiasi fibra di cellulosa, avente preferibilmente un grado adatto per l'uso come

reagente per la cromatografia di partizione. Gli esempi particolari di materiale cellulosico adatto per i procedimenti dell'invenzione includono polvere di cellulosa CF-11 e di una cellulosa disponibile in commercio quali quelle da Sigma-Aldrich (per esempio, numero di catalogo C6288) e Macherey-Nagel (per esempio MN 100 o MN 2100). In una forma di realizzazione, il materiale cellulosico viene lavato prima dell'uso nei procedimenti della presente invenzione. Così, in una forma di realizzazione preferita dei procedimenti della presente invenzione, il materiale cellulosico viene fornito come materiale cellulosico lavato, per esempio, in forma anidra o come sospensione in una soluzione di lavaggio (in cui la suddetta soluzione di lavaggio può essere il primo o il secondo mezzo (per esempio il primo o il secondo tampone) come specificato qui). Il lavaggio del materiale cellulosico può includere (i) il miscelare il materiale cellulosico con una soluzione di lavaggio con mescolamento e/o agitazione (preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti, quale per da 5 a 10 minuti); e (II) il rimuovere il liquido (per esempio utilizzando una pipetta) o il raccogliere il materiale cellulosico (per esempio utilizzando, come materiale cellulosico, una cellulosa che è accoppiata covalentemente a sfere magnetiche e utilizzando un magnete); e facoltativamente (III) il ripetere i passaggi (I) e (II) una volta o due o più volte (quale una volta, due volte, o tre volte). Per esempio, quando la miscela del materiale cellulosico e della soluzione di lavaggio viene fornita in una provetta, è preferibile che venga applicata la gravità o la forza centrifuga (per esempio da 4.000 x g a 15.000 x g, quale da 5.000 x g a 10.000 x g per da 1 a 5 minuti) alla provetta, in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate) e che il supernatante venga rimosso (per esempio utilizzando una pipetta) o il materiale cellulosico venga raccolto (per esempio utilizzando, come materiale cellulosico, una cellulosa che è accoppiata covalentemente a sfere magnetiche e utilizzando un magnete). In alternativa, quando la miscela del materiale cellulosico e della soluzione di lavaggio viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro, è preferibile che venga applicata/o la gravità, la forza centrifuga (per esempio da 4.000 x g a 15.000 x g, quale da 5.000 x g a 10.000 x g per da 1 a 5 minuti), la pressione (per esempio da 1.000 hPa a 3.000 hPa), o il vuoto (per esempio da 100 hPa a 900 hPa, quale da 200 hPa a 800 hPa) alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro, in modo tale che le fasi liquide e solide siano separate (preferibilmente completamente separate) e che il primo eluato venga eliminato. La composizione del tampone di lavaggio dipende preferibilmente dalla modalità desiderata di legame selettivo degli RNA al materiale cellulosico lavato: (1) se solo l'RNA a doppio filamento deve essere selettivamente legato al materiale cellulosico lavato, mentre l'RNA a singolo filamento deve rimanere non legato, la soluzione di lavaggio dovrebbe essere tale da permettere il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e da non permettere il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. Così, in una forma di realizzazione preferita di (1), la soluzione di lavaggio ha la composizione del primo mezzo (per esempio del primo tampone) come specificato sopra. (2) Se entrambi l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento devono essere legati al materiale cellulosico lavato, la soluzione di lavaggio dovrebbe essere tale da

permettere il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico. Così, in una forma di realizzazione preferita di (2), la soluzione di lavaggio ha la composizione del secondo mezzo (per esempio del secondo tampone) come specificato sopra.

Dopo il lavaggio, il materiale cellulosico lavato può essere conservato (o utilizzato nei procedimenti della presente invenzione) come prodotto anidro (cioè, dopo che la soluzione di lavaggio è stata completamente rimossa dalla cellulosa lavata come specificato qui) o come sospensione nella soluzione di lavaggio. Tuttavia, se il materiale cellulosico lavato conservato nella soluzione di lavaggio deve essere utilizzato nei procedimenti dell'invenzione, è preferibile che, prima che il materiale cellulosico lavato debba essere messo a contatto con la preparazione di RNA, la fase liquida (cioè la soluzione di lavaggio in cui il materiale cellulosico viene sospeso per l'immagazzinamento) venga rimossa dal materiale cellulosico lavato (per esempio applicando la gravità o la forza centrifuga (come specificato sopra in relazione al lavaggio del materiale cellulosico) se la cellulosa lavata viene fornita in una provetta, o applicando la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto (come specificato sopra in relazione al lavaggio del materiale cellulosico) se la cellulosa lavata viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro) e il materiale cellulosico lavato risultante viene quindi utilizzato come tale (cioè in forma anidra) nei procedimenti dell'invenzione o viene sospeso in una soluzione di lavaggio (in cui la suddetta soluzione di lavaggio può essere il primo o il secondo mezzo (per esempio il primo o il secondo tampone) come specificato qui) e viene quindi utilizzato nei procedimenti dell'invenzione.

Il termine "materiale cellulosico fresco" come utilizzato qui significa che il suddetto materiale cellulosico fresco non è stato portato a contatto con una preparazione di RNA. Tale materiale cellulosico fresco può essere non lavato o lavato. In una forma di realizzazione preferita, il materiale cellulosico fresco viene fornito come materiale cellulosico lavato come specificato sopra (per esempio in forma anidra o come sospensione nella soluzione di lavaggio). Così, in relazione all'uso che si intende fare del materiale cellulosico lavato fresco (cioè per legare selettivamente (1) l'RNA a doppio filamento ma non l'RNA a singolo filamento o (2) l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento), il materiale cellulosico lavato fresco è stato ottenuto utilizzando (1) il primo mezzo (per esempio il primo tampone) come specificato sopra o (2) il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) come specificato sopra.

Il rapporto tra l'RNA (contenuto nella preparazione di RNA) e il materiale cellulosico nel passaggio (ii) dei procedimenti dell'invenzione è tale che la capacità di legame all'RNA del materiale cellulosico non è superata. In una forma di realizzazione preferita, la quantità di RNA per 100 mg di materiale cellulosico è al massimo 250 µg, più preferibilmente al massimo 200 µg, quale al massimo 150 µg. Così, in una forma di realizzazione, la quantità di RNA per 100 mg di materiale cellulosico è nell'intervallo da 10 a 250 µg, quale da 20 a 220 µg, da 30 a 200 µg, da 40 a 180 µg, da 50 a 160 µg, da 60 a 140 µg, da 70 a 120 µg, da 80 a 110 µg, o da 90 a 100 µg. Quindi, in una forma di realizzazione, la quantità di materiale cellulosico

per 1 µg di RNA può essere almeno 0,4 mg, preferibilmente almeno 0,5 mg, quale almeno 0,67 mg. Per esempio, la quantità di materiale cellulosico per 1 µg di RNA può essere nell'intervallo da 0,4 a 10 mg, quale da 0,45 a 5 mg, da 0,5 a 3,3 mg, da 0,56 a 2,5 mg, da 0,63 a 2 mg, da 0,71 a 1,67 mg, da 0,83 a 1,43 mg, da 0,91 a 1,25 mg, o da 1 a 1,11 mg.

Il termine “provetta” come utilizzato qui si riferisce a un contenitore, in particolare un contenitore allungato, avente solo un'apertura in modo tale che composti e/o liquidi possano essere introdotti in e/o rimossi dal contenitore. In una forma di realizzazione preferita, l'apertura della provetta è configurata in modo tale che essa possa essere chiusa mediante un mezzo adatto, quale un coperchio di copertura che è avvitabile o che si adatta nell'apertura in modo tale da sigillare saldamente l'apertura. In una forma di realizzazione, la provetta è configurata in modo tale che possa essere applicata la gravità o la forza centrifuga alla provetta (allo scopo di separare i contenuti nella provetta in relazione alla loro densità relativa) senza rovesciare alcuno dei contenuti e senza danneggiare l'integrità della provetta.

I termini “colonna da centrifuga” e “dispositivo di filtro” come utilizzati qui si riferiscono a un contenitore, in particolare un contenitore allungato, avente due aperture su lati opposti e una frittta o un filtro, in cui la prima apertura è tale che composti e/o liquidi possano essere introdotti in e/o rimossi dal contenitore, mentre la seconda apertura è separata dalla prima apertura mediante la frittta o il filtro in modo tale che i composti solidi (in particolare il materiale cellulosico) siano trattenuti all'interno del contenitore mediante la frittta o il filtro, ma che i liquidi possano passare attraverso la frittta o il filtro e la seconda apertura. La frittta o il filtro ha preferibilmente una dimensione dei pori al massimo di 1 µm, quale al massimo di 0,8 µm, al massimo di 0,6 µm, per esempio, nell'intervallo da 0,30 a 0,60 µm, quale da 0,35 a 0,55 µm. In una forma di realizzazione preferita, almeno la prima apertura della colonna per centrifuga o del dispositivo di filtro (preferibilmente ciascuna delle aperture) è configurata in modo tale che essa possa essere chiusa mediante un mezzo adatto, quale un coperchio di copertura che è avvitabile o che si adatta nella prima o seconda apertura in modo tale da sigillare saldamente l'apertura. In una forma di realizzazione, la colonna per centrifuga o il dispositivo di filtro è configurata/o in modo tale che possa essere applicata/o la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro (allo scopo di separare i contenuti nella colonna per centrifuga o nel dispositivo di filtro) senza danneggiare l'integrità della colonna per centrifuga o del dispositivo di filtro. Gli esempi di colonne da centrifuga adatte includono colonne da microcentrifuga (quali quelle disponibili da Macherey-Nagel, per esempio, NucleoSpin Filters (numero di catalogo #740606)), e gli esempi di dispositivi di filtro adatti includono dispositivi di filtro a vuoto monouso (quali quelli disponibili da Merck Chemicals GmbH/Millipore, per esempio, Steriflip-HV, con dimensione dei pori di 0,45 µm, PVDF (numero di catalogo #SE1M003M00)).

I termini “liquido” e “fase liquida” come utilizzati qui si riferiscono a un fluido in condizioni standard. Gli esempi particolari di un liquido

includono un mezzo (per esempio un tampone), una soluzione di lavaggio, e una preparazione di RNA disciolta in un mezzo (per esempio un tampone). I termini “solido” e “fase solida” come utilizzati qui si riferiscono a una sostanza o una miscela di sostanze che ha una forma e un volume definiti ma che è non liquida e non gassosa in condizioni standard. Un esempio particolare di un solido comprende un materiale cellulosico.

Il termine “condizioni standard” come utilizzato qui si riferisce a una temperatura di 20°C e una pressione assoluta di 1.013,25 hPa.

Il termine “sumatante” come utilizzato qui si riferisce alla fase superiore che viene generata quando una fase liquida e una fase solida vengono miscelate e la miscela viene fatta separare (per esempio applicando la gravità o la forza centrifuga). Nel caso in cui la fase solida abbia una densità relativa superiore in confronto alla fase liquida, la fase liquida sarà il sumatante.

Il termine “primo eluato” come utilizzato qui si riferisce alla fase liquida che passa attraverso una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro.

Il termine “aliquota” come utilizzato qui significa un volume di un liquido che deve essere aggiunto a un solido o che deve essere caricato sulla fase stazionaria di una colonna, in cui il volume dell'aliquota è in generale da 0,1 a 10 volte (quale da 0,5 a 5 volte, da 1 a 4 volte, da 1 a 3 volte, o da 1 a 2 volte) il volume del solido o della fase stazionaria. In una forma di realizzazione, il liquido è un mezzo (per esempio un tampone) (quale il primo, il secondo o il terzo mezzo (per esempio il primo, il secondo, o il terzo tampone) come specificato qui) o una soluzione di lavaggio. In una forma di realizzazione, il solido è un materiale cellulosico quale un materiale cellulosico lavato.

Il termine “applicazione della gravità” come utilizzato qui significa che un contenitore, quale una provetta, una colonna per centrifuga, o un dispositivo di filtro, viene sottoposto solo alla forza gravitazionale terrestre “normale” (circa 1 x g), cioè, non viene applicata alcuna forza gravitazionale oltre alla forza gravitazionale terrestre “normale” al contenitore (per esempio, ad un mezzo è permesso di fluire passivamente attraverso la fase stazionaria di una colonna, in cui la colonna è disposta in modo tale che l'asse longitudinale della colonna (cioè la linea attraverso entrambe le aperture della colonna) punti al centro del globo terrestre). In una forma di realizzazione, la gravità viene applicata al contenitore per una durata sufficiente per separare (preferibilmente per separare completamente) le fasi (quali una fase liquida e una fase solida) contenute nel contenitore.

Il termine “applicazione della forza centrifuga” come utilizzato qui significa che un contenitore, quale una provetta, una colonna per centrifuga, o un dispositivo di filtro, viene sottoposto a un multiplo della forza gravitazionale terrestre normale (cioè più di 1 x g, quale almeno 2 x g, almeno 10 x g, almeno 100 x g, e fino a 20.000 x g, quale fino a 15.000 x g, fino a 10.000 x g, fino a 5.000 x g, o fino a 4.000 x g). Un dispositivo adatto in grado di generare tale forza centrifuga comprende una centrifuga. In una forma di realizzazione, viene applicata la forza centrifuga al contenitore per una durata sufficiente per separare (preferibilmente per separare completamente) le fasi (quali una fase liquida e una fase solida) contenute nel

contenitore. Le durate tipiche sono nell'intervallo da 1 minuto a 30 minuti (quale da 1, 2, 3, 4 o 5 minuti a 25 minuti, da 5, 6, 7, 8, 9, o 10 minuti a 20 minuti o da 10 minuti a 15 minuti). Generalmente, il livello e la durata della forza centrifuga applicata dipenderanno da fattori quali l'uso desiderato (per esempio, il lavaggio di un materiale cellulosico, il legame di RNA a un materiale cellulosico, o il rilascio di RNA da un materiale cellulosico) e il volume e il peso del contenitore (compreso il suo contenuto). Per esempio, la forza centrifuga elevata (quale da 10.000 x g a 20.000 x g) applicata per una breve durata (per esempio da 1 a 5 minuti) può essere sufficiente per una separazione (completa), mentre la forza centrifuga bassa (quale fino a 100 x g) può richiedere una maggiore durata (quale da 20 a 30 minuti) per una separazione (completa). In modo simile, per un volume e un peso piccoli (per esempio fino a un volume di circa 2 ml e un peso di circa 2 g), la forza centrifuga elevata (quale da 10.000 x g a 20.000 x g) applicata per una breve durata (per esempio da 1 a 5 minuti) può essere sufficiente per una separazione (completa), mentre per un volume e/o un peso maggiori, dove può essere applicata solo la forza centrifuga inferiore (quale da 200 x g a 10.000 x g), una durata più lunga (per esempio per da 20 a 30 minuti) può essere necessaria allo scopo di ottenere una separazione (completa).

Il termine "applicazione di pressione" come utilizzato qui significa che un contenitore, quale una colonna per centrifuga, un dispositivo di filtro, o una colonna, viene sottoposto a una forza positiva (in confronto a condizioni standard) applicata a un'apertura del contenitore. In particolare, quando il contenitore è una colonna, l'applicazione di pressione significa che un liquido (quale un mezzo o un tampone) viene pompato attraverso il contenitore, per esempio, utilizzando una o più pompe. La pressione applicata nei procedimenti della presente invenzione è molto più bassa in confronto alla pressione applicata in procedimenti di HPLC e preferibilmente è al massimo 2 MPa (quale al massimo 1 MPa, al massimo 5.000 hPa, al massimo 4.000 hPa, al massimo 3.000 hPa, al massimo 2.000 hPa).

Il termine "applicazione di vuoto" come utilizzato qui significa che un contenitore, quale una colonna per centrifuga, un dispositivo di filtro, o una colonna, viene sottoposto a una pressione negativa (in confronto alle condizioni standard), in cui la pressione negativa viene preferibilmente applicata a un'apertura del contenitore. Preferibilmente, una pressione negativa è al massimo 900 hPa, quale al massimo 800 hPa, al massimo 700 hPa, al massimo 600 hPa, al massimo 500 hPa, al massimo 400 hPa, al massimo 300 hPa, al massimo 200 hPa, o al massimo 100 hPa. In una forma di realizzazione, viene applicato il vuoto al contenitore per una durata sufficiente per separare (preferibilmente per separare completamente) le fasi (quali una fase liquida e una fase solida) contenute nel contenitore. I dispositivi per generare una pressione negativa sono noti alla persona esperta e includono una pompa a vuoto a getto d'acqua.

L'espressione "ripetuto una volta o due o più volte" come utilizzato qui significa che il passaggio o i passaggi corrispondente/i sono condotti almeno una volta, quale due o più volte, tre o più volte, quattro o più volte, ecc., preferibilmente una volta, due volte o tre volte.

L'espressione "un ciclo di passaggi (ii) e (iii)" come utilizzata qui significa che i passaggi (ii) e (iii) sono ciascuno condotto solo una volta. Se un ciclo di passaggi (ii) e (iii) è completato, facoltativamente può essere condotto un ulteriore ciclo (indicato qui anche con "ciclo successivo") di passaggi (ii) e (iii). Per esempio, nel passaggio (ii) di un tale ciclo successivo di passaggi (ii) e (iii), la preparazione di RNA ottenuta dopo il passaggio (iii) del ciclo precedente di passaggi (ii) e (iii) (cioè una preparazione di RNA che comprende preferibilmente RNA a doppio filamento in una minore quantità in confronto alla preparazione di RNA utilizzata nel passaggio (ii) del ciclo precedente) viene utilizzata come preparazione di RNA. È preferibile che in ciascun ciclo di passaggi (ii) e (iii) venga utilizzato materiale cellulosico fresco (allo scopo di evitare la contaminazione, per esempio con RNA a doppio filamento). Così, conducendo i passaggi (ii) e (iii) e facoltativamente ripetendo questi passaggi una volta o due o più volte, è possibile rimuovere l'RNA a doppio filamento dalla preparazione di RNA a singolo filamento a un grado tale che l'RNA a singolo filamento ottenuto alla fine sia sostanzialmente privo di RNA a doppio filamento e/o sostanzialmente privo di DNA, preferibilmente sostanzialmente privo di RNA a doppio filamento e DNA.

L'espressione "preparazione di RNA che comprende RNA a doppio filamento in una minore quantità in confronto alla preparazione di RNA utilizzata nel passaggio (ii) del ciclo precedente" significa che il condurre un ciclo di passaggi (ii) e (iii) è efficace nel rimuovere l'RNA a doppio filamento, in modo tale che la quantità totale di RNA a doppio filamento nella preparazione di RNA ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo sia inferiore rispetto alla quantità totale di RNA a doppio filamento nella preparazione di RNA utilizzata nel passaggio (ii) del ciclo precedente. Preferibilmente, il primo ciclo di passaggi (ii) e (iii) è efficace nel rimuovere almeno il 70%, più preferibilmente almeno il 75% (quale almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%) del contenuto di RNA a doppio filamento nella preparazione di RNA utilizzata nel passaggio (ii) del primo ciclo di passaggi (ii) e (iii). In una forma di realizzazione preferita, il condurre un totale di due, tre o quattro cicli di passaggi (ii) e (iii) è efficace nel rimuovere almeno il 95%, più preferibilmente almeno il 96% (quale almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99%) del contenuto di RNA a doppio filamento nella preparazione di RNA utilizzata nel passaggio (ii) del primo ciclo di passaggi (ii) e (iii).

Il termine "eluente" come utilizzato qui significa un liquido che è in grado di alterare le proprietà di legame di un composto (quale RNA a doppio filamento o RNA a singolo filamento) in relazione a una fase stazionaria (quale un materiale cellulosico). "Alterare le proprietà di legame" significa aumentare o diminuire la capacità di un composto (quale RNA a doppio filamento o RNA a singolo filamento) di legarsi a una fase stazionaria (quale un materiale cellulosico). Preferibilmente, un eluente è in grado di diminuire la capacità di un composto (quale RNA a doppio filamento o RNA a singolo filamento) di legarsi a una fase stazionaria (quale un materiale cellulosico). Così, in questa forma di realizzazione preferita, (1) se il composto è legato alla fase stazionaria, il passaggio del portare la fase stazionaria a contatto con l'eluente risulta nel rilascio del composto dalla fase

stazionaria, o (2) se il composto è disciolto nell'eluente, l'eluente diminuisce la capacità di legame di un composto alla fase stazionaria, preferibilmente l'eluente impedisce il legame del composto alla fase stazionaria. Il termine "eluire" come utilizzato qui significa applicare o caricare un eluente (su) ad una colonna (compresa una colonna per centrifuga) contenente una fase stazionaria (quale un materiale cellulosico) su cui è legato un composto (quale RNA a singolo filamento), allo scopo di rilasciare il composto dalla fase stazionaria. Un eluente preferito per RNA a singolo filamento legato a un materiale cellulosico è il primo mezzo (per esempio il primo tampone) come specificato sopra, mentre un eluente preferito per RNA a doppio filamento legato a un materiale cellulosico è un terzo mezzo (per esempio un terzo tampone) che può avere la stessa composizione del primo o del secondo mezzo (per esempio del primo o del secondo tampone) ma che non contiene EtOH (per esempio il terzo mezzo può essere acqua). Una soluzione di lavaggio preferita che non rilascia RNA a doppio filamento o RNA a singolo filamento legato a un materiale cellulosico è il secondo mezzo (per esempio il secondo tampone) come specificato sopra.

Il termine "eluato" come utilizzato qui si riferisce al liquido che esce da una colonna, quando un eluente viene applicato o caricato sulla colonna.

Il termine "colonna" come utilizzato qui si riferisce a un contenitore, in particolare un contenitore cilindrico, avente due aperture su lati opposti, almeno una frittata, e una fase stazionaria (quale un materiale cellulosico), in cui la prima apertura è configurata in modo tale da permettere l'introduzione di liquidi (quali un mezzo, per esempio, una soluzione di lavaggio o un mezzo, per esempio, un primo o un secondo tampone) nel contenitore, mentre la seconda apertura è separata dalla prima apertura e dalla fase stazionaria mediante la frittata in modo tale che (i) la fase stazionaria è trattenuta all'interno della colonna mediante la frittata ma (ii) ai liquidi è permesso passare attraverso la frittata e la seconda apertura. Le colonne possono essere configurate per essere utilizzabili in procedimenti di HPLC o in procedimenti di FPLC. Tuttavia, le colonne da utilizzare nei procedimenti della presente invenzione sono preferibilmente configurate per essere utilizzabili in procedimenti di FPLC.

Il termine "HPLC" come utilizzato qui significa cromatografia liquida a pressione elevata, in cui una fase liquida è pompata sotto pressione elevata (tipicamente almeno 5 MPa, quale da 5 a 35 MPa) attraverso una colonna per separare, identificare, e/o quantificare almeno un componente in una miscela.

Il termine "FPLC" come utilizzato qui significa cromatografia ionica liquida a prestazione veloce, in cui ad una fase liquida è permesso di fluire attraverso una colonna per separare, identificare, e/o quantificare almeno un componente in una miscela. Il flusso del liquido attraverso la colonna per FPLC può essere ottenuto applicando la gravità o la pressione, in cui la pressione preferibilmente è al massimo 2 MPa (quale al massimo 1 MPa, al massimo 5.000 hPa, al massimo 4.000 hPa, al massimo 3.000 hPa, al massimo 2.000 hPa, o al massimo 1.000 hPa).

Il termine "trattamento di pre-purificazione" come utilizzato qui in relazione a una preparazione di RNA significa una procedura allo scopo di

rimuovere parzialmente o completamente i contaminanti della preparazione di RNA, in cui i contaminanti includono preferibilmente tutti i composti diversi dall'RNA, quali i materiali di partenza utilizzati per generare l'RNA IVT (che è facoltativamente modificato) e i loro prodotti di degradazione, per esempio, uno stampo di DNA; un'RNA polimerasi (quale T7, T3 o SP6); monoribonucleotidi in forma non modificata (per esempio rATP, rGTP, rCTP, rUTP, e loro analoghi aventi solo uno o due gruppi fosfato) o in forma modificata (per esempio r(1mΨ)TP o rΨTP e loro analoghi aventi solo uno o due gruppi fosfato); pirofosfato; un reagente di incappucciamento (cioè un reagente per introdurre un cappuccio al 5' o un analogo del cappuccio al 5'); e additivi utilizzati per generare l'RNA IVT (per esempio agenti tamponanti, sali, agenti antiossidanti, e poliammine (quale la spermidina)). Gli esempi di trattamenti di pre-purificazione adatti che sono noti alla persona esperta includono la precipitazione di acidi nucleici (utilizzando preferibilmente cloruro di litio); il legame di acidi nucleici (in particolare RNA) a sfere magnetiche (per esempio, i contaminanti che non si legano alle sfere magnetiche possono quindi essere rimossi mediante lavaggio utilizzando un mezzo appropriato); l'ultrafiltrazione; e la degradazione del DNA, utilizzando preferibilmente una nucleasi specifica per i duplex (DSN). Per esempio, l'RNA può essere fatto precipitare utilizzando il procedimento di precipitazione con "acetato di sodio/isopropanolo" o il procedimento di precipitazione con "LiCl" (preferibilmente mediante il procedimento di precipitazione con "LiCl"), che risultano entrambi in una preparazione di RNA in forma essiccata. In ciascun caso, l'RNA precipitato e fatto essiccare così ottenuto può essere disciolto in una quantità adatta d'acqua o di tampone TE (TRIS 10mM, EDTA 1mM), i quali sono entrambi preferibilmente privi di RNasi.

Il procedimento di precipitazione con "acetato di sodio/isopropanolo" comprende i seguenti passaggi: aggiungere 0,1 volumi di acetato di sodio 3M (pH 4,0) e 1 volume di isopropanolo a una preparazione di RNA, miscelare la miscela risultante, incubare la miscela a -20°C per 1 ora, applicare la forza centrifuga (per esempio 14.000 x g per 10 minuti), rimuovere il supernatante dal precipitato di RNA, lavare il precipitato di RNA con 200 µl di EtOH al 70% (v/v) raffreddato con ghiaccio (cioè aggiungere 200 µl di EtOH al 70% (v/v) raffreddato con ghiaccio al precipitato di RNA, applicare la forza centrifuga (per esempio 14.000 x g per 5 minuti), e rimuovere il supernatante dal precipitato di RNA), e far essiccare (preferibilmente far essiccare all'aria) il precipitato di RNA (preferibilmente in modo tale da rimuovere l'etanolo).

Il procedimento di precipitazione con "LiCl" comprende i seguenti passaggi: aggiungere cloruro di litio (LiCl) a una preparazione di RNA in modo tale che la concentrazione finale di LiCl sia 2,5M, incubare la miscela a -20°C per 30 minuti, applicare la forza centrifuga (per esempio 14.000 x g per 10 minuti), rimuovere il supernatante dal precipitato di RNA, lavare il precipitato di RNA con 200 µl di EtOH al 70% (v/v) raffreddato con ghiaccio (cioè aggiungere 200 µl di EtOH al 70% (v/v) raffreddato con ghiaccio al precipitato di RNA, applicare la forza centrifuga (per esempio 14.000 x g per 5 minuti), e rimuovere il supernatante dal precipitato di RNA), e far essiccare (preferibilmente far essiccare all'aria) il precipitato di

RNA (preferibilmente in modo tale da rimuovere l'etanolo).

Il termine "RNA polimerasi" come utilizzato qui si riferisce ad un'RNA polimerasi dipendente dal DNA che produce il trascritto primario di RNA.

Gli esempi dell'RNA polimerasi adatti per generare l'RNA IVT secondo la presente invenzione comprendono le RNA polimerasi T7, T3 e SP6.

Un'RNA polimerasi preferita è l'RNA polimerasi T7.

Il termine "sostanzialmente privo di RNA a doppio filamento" come utilizzato qui in combinazione con un RNA a singolo filamento o una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento, in cui il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione, significa che la quantità di RNA a doppio filamento nell'RNA a singolo filamento o nella preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento è stata diminuita almeno del 70% (preferibilmente almeno del 75%, almeno dell'80%, almeno dell'82%, almeno dell'84%, almeno dell'86%, almeno dell'88%, almeno del 90%, almeno del 91%, almeno del 92%, almeno del 93%, almeno del 94%, almeno del 95%, almeno del 96%, almeno del 97%, almeno del 98%, almeno del 99%) in confronto alla quantità di RNA a doppio filamento contenuto nell'RNA a singolo filamento o nella preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento prima che il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento fosse sottoposto/a al procedimento della presente invenzione. Preferibilmente, il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento che è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione ha un contenuto di RNA a doppio filamento tale che il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento, quando somministrato/a a un soggetto, non induca sostanzialmente una risposta indesiderata (quale un'induzione indesiderata di citochine infiammatorie (per esempio IFN- α) e/o un'attivazione indesiderata dell'enzima effettore che conduce a un'inibizione della sintesi proteica dall'RNA a singolo filamento descritto qui) nel suddetto soggetto. Per esempio, i termini "sostanzialmente privo di RNA a doppio filamento" e "non induce sostanzialmente una risposta indesiderata" possono significare che, quando somministrato/a a un soggetto, un RNA a singolo filamento o una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento, in cui il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione, induce citochine infiammatorie (in particolare IFN- α) in una quantità che è ridotta di almeno il 60% (per esempio di almeno il 62%, almeno il 64%, almeno il 66%, almeno il 68%, almeno il 70%, almeno il 72%, almeno il 74%, almeno il 76%, almeno il 78%, almeno l'80%) rispetto a un RNA a singolo filamento di controllo (cioè un RNA a singolo filamento o una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento che non è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione). Preferibilmente, i termini "sostanzialmente privo di RNA a doppio filamento" e "non induce sostanzialmente una risposta indesiderata" significano

che, quando somministrato/a a un soggetto, un RNA a singolo filamento o una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento, in cui il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione e il suddetto RNA a singolo filamento codifica un peptide o una proteina, risulta nella traduzione dell'RNA a singolo filamento nel peptide o nella proteina per almeno 10 ore (per esempio per almeno 12 ore, almeno 14 ore, almeno 16 ore, almeno 18 ore, almeno 20 ore, almeno 22 ore, o almeno 24 ore) dopo la somministrazione. Per esempio, il contenuto di RNA a doppio filamento in un RNA a singolo filamento o in una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento, in cui il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione, può essere al massimo il 5% in peso (preferibilmente al massimo il 4% in peso, al massimo il 3% in peso, al massimo il 2% in peso, al massimo l'1% in peso, al massimo lo 0,5% in peso, al massimo lo 0,1% in peso, al massimo lo 0,05% in peso, al massimo lo 0,01% in peso, al massimo lo 0,005% in peso, al massimo lo 0,001% in peso), in base al peso totale del suddetto RNA a singolo filamento o della suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento.

Il termine "sostanzialmente privo di DNA" come utilizzato qui in combinazione con un RNA a singolo filamento o una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento, in cui il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione, significa che la quantità di RNA a doppio filamento nell'RNA a singolo filamento o nella preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento può essere al massimo il 5% in peso (preferibilmente al massimo il 4% in peso, al massimo il 3% in peso, al massimo il 2% in peso, al massimo l'1% in peso, al massimo lo 0,5% in peso, al massimo lo 0,1% in peso, al massimo lo 0,05% in peso, al massimo lo 0,01% in peso, al massimo lo 0,005% in peso, al massimo lo 0,001% in peso), in base al peso totale del suddetto RNA a singolo filamento o della suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento.

Il termine "sostanzialmente privo di RNA a doppio filamento e DNA" come utilizzato qui in combinazione con un RNA a singolo filamento o una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento, in cui il suddetto RNA a singolo filamento o la suddetta preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento è stato/a sottoposto/a a un procedimento della presente invenzione, significa che il suddetto RNA a singolo filamento o una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento è sostanzialmente privo/a di RNA a doppio filamento come specificato sopra (per esempio la traduzione dura almeno 10 ore dopo la somministrazione e/o il contenuto di RNA a doppio filamento è al massimo il 5% in peso) ed è sostanzialmente privo/a di DNA come specificato sopra (per esempio il contenuto di DNA è al massimo il 5% in peso).

Nel contesto della presente invenzione, il termine "RNA" riguarda una molecola che comprende residui ribonucleotidici e preferibilmente è completamente o sostanzialmente costituita da residui ribonucleotidici. "Ribonucleotide" indica un nucleotide con un gruppo idrossile in posizione

2' di un gruppo β -D-ribofuranosile. Il termine "RNA" comprende RNA isolato quale RNA parzialmente o completamente purificato, RNA essenzialmente puro, RNA sintetico, e RNA generato per via ricombinante e comprende RNA modificato che si differenzia dall'RNA presente in natura per l'aggiunta, la delezione, la sostituzione e/o l'alterazione di uno o più nucleotidi. Tali alterazioni possono includere l'aggiunta di materiale non nucleotidico, quale alla/e estremità di un RNA o internamente, per esempio a uno o più nucleotidi dell'RNA. I nucleotidi nelle molecole di RNA possono comprendere anche nucleotidi non standard, quali nucleotidi non presenti in natura o nucleotidi o deossinucleotidi sintetizzati chimicamente. Questi nucleotidi alterati/modificati possono essere indicati come analoghi di nucleotidi presenti in natura, e gli RNA corrispondenti contenenti tali nucleotidi alterati/modificati (cioè gli RNA alterati/modificati) possono essere indicati come analoghi di RNA presenti in natura. Una molecola è "sostanzialmente costituita da residui ribonucleotidici" se il contenuto dei residui ribonucleotidici nella molecola è almeno il 40% (quale almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99%), in base al numero totale dei residui nucleotidici nella molecola. Il numero totale dei residui nucleotidici in una molecola è la somma di tutti i residui nucleotidici (indipendentemente dal fatto che i residui nucleotidici siano residui nucleotidici standard (cioè presenti in natura) o loro analoghi).

L'RNA può essere isolato dalle cellule, può essere fatto da uno stampo di DNA, o può essere sintetizzato chimicamente utilizzando procedimenti noti nell'arte. Nelle forme di realizzazione preferite, l'RNA è sintetizzato *in vitro* da uno stampo di DNA. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, l'RNA, in particolare l'RNA a singolo filamento quale mRNA o un RNA a singolo filamento inibitorio (per esempio RNA antisense, siRNA o miRNA), viene generato mediante trascrizione *in vitro* da uno stampo di DNA. La metodologia di trascrizione *in vitro* è nota alla persona esperta; si confronti, per esempio, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, seconda edizione, a cura di J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989. Inoltre, vi è una varietà di kit per la trascrizione *in vitro* disponibili in commercio, per esempio, da Thermo Fisher Scientific (quali il kit con T7 TranscriptAid™, il kit con T7 MEGAscript®, MAXIscript®), New England BioLabs Inc. (quali il kit con T7 HiScribe™, il kit con T7 per mRNA ARCA HiScribe™), Promega (quali i sistemi RiboMAX™, HeLaScribe®, Riboprobe®), Jena Bioscience (quali i kit di trascrizione con SP6 o T7), ed Epicentre (quale AmpliScribe™). In una forma di realizzazione particolarmente preferita, l'RNA è RNA trascritto *in vitro* (RNA IVT). Per fornire RNA modificati, possono essere incorporati in modo corrispondente nucleotidi modificati, quali nucleotidi presenti in natura modificati, nucleotidi non presenti in natura e/o nucleotidi non presenti in natura modificati, durante la sintesi (preferibilmente nella trascrizione *in vitro*), o possono essere effettuate e/o aggiunte modifiche all'RNA dopo la trascrizione.

Secondo l'invenzione, sono preferiti come RNA oligonucleotidi sintetici da 6 a 100, preferibilmente da 10 a 50, in particolare da 15 a 30 o da 15 a

20 nucleotidi o trascritti più lunghi di più di 50 nucleotidi, preferibilmente da 100 a 15.000, più preferibilmente da 50 a 10.000, più preferibilmente da 100 a 5.000, in particolare da 200 a 1.000 nucleotidi.

Secondo l'invenzione, "RNA" comprende mRNA, tRNA, rRNA, snRNA, RNA a singolo filamento, RNA a doppio filamento, ed RNA inibitorio.

Secondo l'invenzione, "RNA a singolo filamento" comprende mRNA ed RNA a singolo filamento inibitorio (quale RNA antisense a singolo filamento, siRNA, o miRNA).

"ssRNA" significa RNA a singolo filamento. Gli RNA a singolo filamento possono contenere sequenze autocomplementari che permettono a parti dell'RNA di ripiegarsi e accoppiarsi con se stesse per formare doppie eliche. La dimensione dell'RNA a singolo filamento può variare da 6 nucleotidi a 15.000, preferibilmente da 10 a 12.000, in particolare da 100 a 10.000, da 150 a 8.000, da 200 a 7.000, da 250 a 6.000, o da 300 a 5.000 nucleotidi. In una forma di realizzazione, l'RNA a singolo filamento ha una lunghezza di almeno 2.700 nucleotidi (quale almeno 2.800, almeno 2.900, almeno 3.000, almeno 3.100, almeno 3.200, almeno 3.300, almeno 3.400, almeno 3.500, almeno 3.600, almeno 3.700, almeno 3.800, almeno 3.900, almeno 4.000, almeno 4.100, almeno 4.200, almeno 4.300, almeno 4.400, almeno 4.500, almeno 4.600, almeno 4.700, almeno 4.800, almeno 4.900, almeno 5.000 nucleotidi). RNA a singolo filamento lungo come utilizzato qui significa RNA a singolo filamento avente una dimensione di almeno 3.500 nucleotidi (quale almeno 3.600, almeno 3.700, almeno 3.800, almeno 3.900, almeno 4.000, almeno 4.100, almeno 4.200, almeno 4.300, almeno 4.400, almeno 4.500, almeno 4.600, almeno 4.700, almeno 4.800, almeno 4.900, almeno 5.000, almeno 5.500, almeno 6.000, almeno 6.500, almeno 7.000, almeno 7.500, almeno 8.000, almeno 8.500, almeno 9.000, almeno 9.500 nucleotidi), preferibilmente fino a 15.000, quale fino a 14.000, fino a 13.000 o fino a 12.000 nucleotidi.

Secondo l'invenzione, "dsRNA" significa RNA a doppio filamento ed è RNA con due filamenti parzialmente o completamente complementari. La dimensione dei filamenti può variare da 6 nucleotidi a 10.000, preferibilmente da 10 a 8.000, in particolare da 200 a 5.000, da 200 a 2.000 o da 200 a 1.000 nucleotidi.

Secondo la presente invenzione, il termine "mRNA" significa "RNA messaggero" e riguarda un "trascritto" che può essere generato utilizzando uno stampo di DNA e può codificare un peptide o una proteina. Tipicamente, un mRNA comprende un'UTR al 5', una regione codificante una proteina, e un'UTR al 3'. Nel contesto della presente invenzione, l'mRNA è preferibilmente generato mediante trascrizione *in vitro* da uno stampo di DNA. Come esposto sopra, la metodologia di trascrizione *in vitro* è nota alla persona esperta, ed è disponibile in commercio una varietà di kit per la trascrizione *in vitro*. La dimensione dell'mRNA può variare da circa 1.000 nucleotidi a 15.000, preferibilmente da 2.000 a 12.000, in particolare da 2.700 a 11.000, da 3.000 a 10.000, da 3.500 a 9.000, da 4.000 a 9.000, da 4.500 a 7.000, o da 5.000 a 8.000 nucleotidi. In una forma di

realizzazione, l'mRNA ha una lunghezza di almeno 2.700 nucleotidi (quale almeno 2.800, almeno 2.900, almeno 3.000, almeno 3.100, almeno 3.200, almeno 3.300, almeno 3.400, almeno 3.500, almeno 3.600, almeno 3.700, almeno 3.800, almeno 3.900, almeno 4.000, almeno 4.100, almeno 4.200, almeno 4.300, almeno 4.400, almeno 4.500, almeno 4.600, almeno 4.700, almeno 4.800, almeno 4.900, almeno 5.000 nucleotidi). mRNA lungo significa mRNA avente una dimensione di almeno 3.500 nucleotidi (quale almeno 3.600, almeno 3.700, almeno 3.800, almeno 3.900, almeno 4.000, almeno 4.100, almeno 4.200, almeno 4.300, almeno 4.400, almeno 4.500, almeno 4.600, almeno 4.700, almeno 4.800, almeno 4.900, almeno 5.000, almeno 5.500, almeno 6.000, almeno 6.500, almeno 7.000, almeno 7.500, almeno 8.000, almeno 8.500, almeno 9.000, almeno 9.500 nucleotidi), preferibilmente fino a 15.000, quale fino a 14.000, fino a 13.000, fino a 12.000, fino a 11.000, o fino a 10.000 nucleotidi.

L'mRNA possiede solo un'emivita limitata nelle cellule e *in vitro*. Così, secondo l'invenzione, la stabilità e l'efficienza della traduzione dell'RNA possono essere modificate come richiesto. Per esempio, l'mRNA può essere stabilizzato e la sua traduzione può essere aumentata mediante una o più modifiche aventi un effetto stabilizzante e/o aumentante l'efficienza della traduzione dell'mRNA. Tali modifiche vengono descritte, per esempio, in WO 2007/036366. Allo scopo di incrementare l'espressione dell'mRNA descritto qui, esso può essere modificato all'interno della regione codificante, cioè, la sequenza codificante il peptide o la proteina espresso/a, preferibilmente senza alterare la sequenza del peptide o della proteina espresso/a, in modo tale da incrementare il contenuto in GC per aumentare la stabilità dell'mRNA e per eseguire un'ottimizzazione dei codoni e, così, aumentare la traduzione nelle cellule.

Il termine "modifica" nel contesto dell'RNA, preferibilmente dell'RNA a singolo filamento (quale un mRNA) descritto qui comprende qualsiasi modifica di un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) che non è naturalmente presente nel suddetto RNA.

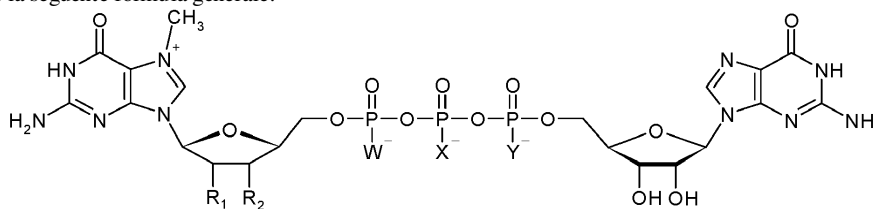
In una forma di realizzazione dell'invenzione, l'RNA a singolo filamento (preferibilmente l'mRNA) descritto qui non ha trifosfati al 5' senza cappuccio. La rimozione di tali trifosfati al 5' senza cappuccio può essere ottenuta trattando l'RNA a singolo filamento (preferibilmente l'mRNA) con una fosfatasi.

L'RNA a singolo filamento (preferibilmente l'mRNA) descritto qui può avere ribonucleotidi modificati allo scopo di incrementare la sua stabilità e/o di diminuire la citotossicità. Per esempio, in una forma di realizzazione, nell'RNA a singolo filamento (preferibilmente l'mRNA) descritto qui, la 5-metilcitidina è sostituita parzialmente o completamente, preferibilmente completamente, al posto della citidina. In alternativa o in aggiunta, in una forma di realizzazione, nell'RNA a singolo filamento (preferibilmente l'mRNA) descritto qui, la pseudouridina o l'N(1)metilpseudouridina è sostituita parzialmente o completamente, preferibilmente completamente, al posto dell'uridina. Un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento quale un mRNA) che viene modificato mediante la pseudouridina (che viene sostituita parzialmente o completamente, preferibilmente

completamente, al posto dell'uridina) è indicato qui come “modificato con Ψ”, mentre il termine “modificato con 1mΨ” significa che l'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento quale mRNA) contiene N(1)metilpseudouridina (che viene sostituita parzialmente o completamente, preferibilmente completamente, al posto dell'uridina).

In una forma di realizzazione, il termine “modifica” riguarda il fornire un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) con un cappuccio al 5' o con un analogo del cappuccio al 5'. Il termine “cappuccio al 5'” si riferisce a una struttura di incappucciamento che si trova all'estremità al 5' di una molecola di RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) e, in generale, consiste di un nucleotide guanosina connesso all'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) attraverso un legame trifosfato insolito dal 5' al 5'. In una forma di realizzazione, questa guanosina è metilata in posizione 7. Il termine “cappuccio al 5' convenzionale” si riferisce a un cappuccio al 5' di RNA presente in natura, preferibilmente al cappuccio di 7-metilguanosina (m7G). Nel contesto della presente invenzione, il termine “cappuccio al 5'” comprende un analogo del cappuccio al 5' che assomiglia alla struttura a cappuccio dell'RNA e viene modificato per possedere la capacità di stabilizzare l'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) e/o aumentare la traduzione dell'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) se attaccato ad esso, preferibilmente *in vivo* e/o in una cellula.

Preferibilmente, l'estremità al 5' dell'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) comprende una struttura di incappucciamento avente la seguente formula generale:



in cui R_1 e R_2 sono indipendentemente idrossi o metossi e W , X e Y sono indipendentemente ossigeno, zolfo, selenio, o BH_3 . In una forma di realizzazione preferita, R_1 e R_2 sono idrossi e W , X e Y sono ossigeno. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, uno tra R_1 e R_2 , preferibilmente R_1 , è idrossi e l'altro è metossi e W , X e Y sono ossigeno. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, R_1 e R_2 sono idrossi e uno tra W , X e Y , preferibilmente X , è zolfo, selenio, o BH_3 , preferibilmente zolfo, mentre gli altri sono ossigeno. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, uno tra R_1 e R_2 , preferibilmente R_2 , è idrossi e l'altro è metossi e uno tra W , X e Y , preferibilmente X , è zolfo, selenio, o BH_3 , preferibilmente zolfo, mentre gli altri sono ossigeno.

Nella suddetta formula, il nucleotide sul lato destro è connesso alla catena dell'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) attraverso il suo gruppo al 3'.

Quelle strutture a cappuccio in cui almeno uno tra W , X e Y è zolfo, cioè, che hanno un gruppo funzionale fosforotioato, esistono in differenti

forme diastereoisomeriche, tutte le quali sono qui comprese. Inoltre, la presente invenzione comprende tutti i tautomeri e gli stereoisomeri della suddetta formula.

Per esempio, la struttura a cappuccio avente la suddetta struttura, in cui R_1 è metossi, R_2 è idrossi, X è zolfo e W ed Y sono ossigeno esiste in due forme diastereoisomeriche (Rp e Sp). Queste possono essere risolte mediante HPLC a fase inversa e vengono chiamate D1 e D2 secondo il loro ordine di eluizione dalla colonna dell'HPLC a fase inversa. Secondo l'invenzione, l'isomero D1 di $m_2^{7,2'-O}Gpp_pG$ è particolarmente preferito. Conseguentemente, il termine "incappucciato con D1" come utilizzato qui si riferisce a un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento quale un mRNA) che è incappucciato con l'isomero D1 di $m_2^{7,2'-O}Gpp_pG$ come specificato sopra. In modo simile, il termine "incappucciato con D2" come utilizzato qui si riferisce a un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento quale un mRNA) che è incappucciato con l'isomero D2 di $m_2^{7,2'-O}Gpp_pG$ come specificato sopra. Ulteriori esempi di strutture di incappucciamento sono noti alla persona esperta e includono quelli descritti in WO2008/157688.

Il fornire un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) con un cappuccio al 5' o con un analogo del cappuccio al 5' può essere ottenuto mediante trascrizione *in vitro* di uno stampo di DNA in presenza del suddetto cappuccio al 5' o analogo del cappuccio al 5', in cui il suddetto cappuccio al 5' è incorporato a livello cotrascrizionale nel filamento di RNA generato (preferibilmente RNA a singolo filamento, quale mRNA), o l'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) può essere generato, per esempio, mediante trascrizione *in vitro*, e il cappuccio al 5' può essere attaccato all'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) dopo la trascrizione utilizzando enzimi di incappucciamento, per esempio, enzimi di incappucciamento del virus del vaiolo vaccino.

L'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) può comprendere ulteriori modifiche. Per esempio, un'ulteriore modifica dell'RNA a singolo filamento descritto qui può essere un'estensione o un troncamento della coda di poli(A) presente in natura o un'alterazione delle regioni non tradotte al 5' o al 3' (chiamate anche "non tradotte al 5' o al 3'") (UTR).

Un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) avente una sequenza di poliA non mascherata è tradotto più efficientemente rispetto ad un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) avente una sequenza di poliA mascherata. Il termine "coda di poli(A)" o "sequenza di poliA" riguarda una sequenza di residui di adenosina (in particolare adenilile) (A) che tipicamente è posizionata all'estremità al 3' di una molecola di RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) e "sequenza di poliA non mascherata" significa che la sequenza di poliA all'estremità al 3' di una molecola di RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) finisce con un'A della sequenza di poliA e non è seguita da nucleotidi diversi dall'A localizzata all'estremità al 3', cioè, a valle, della

sequenza di poliA. Inoltre, una sequenza di poliA lunga avente una lunghezza di circa 120 nucleotidi risulta in una stabilità e un'efficienza ottimali della traduzione dei trascritti di un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA).

Quindi, allo scopo di incrementare la stabilità e/o l'espressione di un RNA, preferibilmente dell'RNA a singolo filamento (quale un mRNA) descritto qui, esso può essere modificato in modo tale da essere presente in combinazione con una sequenza di poliA, avente preferibilmente una lunghezza da 10 a 500, più preferibilmente da 30 a 300, ancora più preferibilmente da 65 a 200 e specialmente da 100 a 150 residui di adenosina (in particolare adenilile). In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la sequenza di poliA ha una lunghezza di approssimativamente 120 residui di adenosina (in particolare adenilile). Per incrementare ulteriormente la stabilità e/o l'espressione dell'RNA, preferibilmente dell'RNA a singolo filamento (quale un mRNA) descritto qui, la sequenza di poliA può essere non mascherata.

Inoltre, l'incorporazione di un'UTR al 3' nella regione non tradotta al 3' di una molecola di RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA) può portare a un potenziamento dell'efficienza della traduzione. Un effetto sinergico può essere ottenuto incorporando due o più di tali UTR al 3'. Le UTR al 3' possono essere autologhe o eterologhe all'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento, quale un mRNA) in cui esse vengono introdotte. In una forma di realizzazione particolare, l'UTR al 3' è derivata da un gene o un mRNA della globina, quale un gene o un mRNA di alfa-2-globina, alfa-1-globina, o beta-globina, preferibilmente beta-globina, più preferibilmente beta-globina umana.

Una combinazione delle suddette modifiche, cioè, incorporazione di una sequenza di poliA, smascheramento di una sequenza di poliA, incorporazione di una o più UTR al 3' e sostituzione di uno o più nucleotidi presenti in natura con nucleotidi sintetici (per esempio 5-metilcitidina al posto della citidina e/o pseudouridina (Ψ) o N(1)metilpseudouridina ($1m\Psi$) al posto dell'uridina), ha un'influenza sinergica sulla stabilità dell'RNA (preferibilmente dell'RNA a singolo filamento, quale di un mRNA) e sull'incremento dell'efficienza della traduzione.

Il termine "RNA inibitorio" come utilizzato qui significa un RNA che si ibrida selettivamente a e/o è specifico per l'mRNA bersaglio, inibendo quindi (per esempio riducendo) la sua trascrizione e/o traduzione. Un RNA inibitorio comprende molecole di RNA aventi sequenze nell'orientamento antisense rispetto all'mRNA bersaglio. Gli oligonucleotidi inibitori adatti variano tipicamente in lunghezza da cinque a diverse centinaia nucleotidi, più tipicamente da circa 20 a 70 nucleotidi di lunghezza o più brevi, ancora più tipicamente da circa 10 a 30 nucleotidi di lunghezza. Gli esempi di RNA inibitorio includono RNA antisense, ribozima, iRNA, siRNA e miRNA.

Il termine "RNA antisense" come utilizzato qui si riferisce a un RNA che si ibrida in condizioni fisiologiche a DNA comprendente un gene particolare o ad un mRNA del suddetto gene, inibendo quindi la trascrizione del suddetto gene e/o la traduzione del suddetto mRNA. Un trascritto antisense di un acido nucleico o di una sua parte può formare un duplex con un mRNA presente in natura e così impedire l'accumulo o la

traduzione dell'mRNA. Un'altra possibilità è l'uso di ribozimi per inattivare un acido nucleico. L'RNA antisenso può ibridarsi con un sito amminoternale o a monte al 5' quale un sito di inizio della traduzione, un sito di inizio della trascrizione o un sito del promotore. In ulteriori forme di realizzazione, l'RNA antisenso può ibridarsi con una regione non tradotta al 3' o un sito di splicing dell'mRNA.

La dimensione dell'RNA antisenso può variare da 15 nucleotidi a 15.000, preferibilmente da 20 a 12.000, in particolare da 100 a 10.000, da 150 a 8.000, da 200 a 7.000, da 250 a 6.000, da 300 a 5.000 nucleotidi, quale da 15 a 2.000, da 20 a 1.000, da 25 a 800, da 30 a 600, da 35 a 500, da 40 a 400, da 45 a 300, da 50 a 250, da 55 a 200, da 60 a 150, o da 65 a 100 nucleotidi. In una forma di realizzazione, l'RNA antisenso ha una lunghezza di almeno 2.700 nucleotidi (quale almeno 2.800, almeno 2.900, almeno 3.000, almeno 3.100, almeno 3.200, almeno 3.300, almeno 3.400, almeno 3.500, almeno 3.600, almeno 3.700, almeno 3.800, almeno 3.900, almeno 4.000, almeno 4.100, almeno 4.200, almeno 4.300, almeno 4.400, almeno 4.500, almeno 4.600, almeno 4.700, almeno 4.800, almeno 4.900, almeno 5.000 nucleotidi). RNA antisenso lungo come utilizzato qui significa un RNA antisenso avente una dimensione di almeno 3.500 nucleotidi (quale almeno 3.600, almeno 3.700, almeno 3.800, almeno 3.900, almeno 4.000, almeno 4.100, almeno 4.200, almeno 4.300, almeno 4.400, almeno 4.500, almeno 4.600, almeno 4.700, almeno 4.800, almeno 4.900, almeno 5.000, almeno 5.500, almeno 6.000, almeno 6.500, almeno 7.000, almeno 7.500, almeno 8.000, almeno 8.500, almeno 9.000, almeno 9.500 nucleotidi), preferibilmente fino a 15.000, quale fino a 14.000, fino a 13.000, fino a 12.000, fino a 11.000, o fino a 10.000 nucleotidi.

La stabilità di un RNA antisenso può essere modificata come richiesto. Per esempio, un RNA antisenso può essere stabilizzato mediante una o più modifiche aventi un effetto stabilizzante. Tali modifiche includono legami fosfodiesterici modificati (quali legami metilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato o fosforammidato anziché legami fosfodiesterici presenti in natura) e sostituzioni al 2' (per esempio 2'-fluoro, 2'-O-alchile (quale 2'-O-metile, 2'-O-propile, o 2'-O-pentile) e 2'-O-allile). Per esempio, in una forma di realizzazione dell'RNA antisenso, i legami fosforotioato vengono sostituiti parzialmente al posto dei legami fosfodiesterici. In alternativa o in aggiunta, in una forma di realizzazione dell'RNA antisenso, il residuo di ribosio è sostituito parzialmente in posizione 2' con O-alchile (quale 2'-O-metile).

Un RNA antisenso può essere indirizzato a qualsiasi tratto di approssimativamente da 19 a 25 nucleotidi contigui in qualsiasi delle sequenze bersaglio dell'mRNA (la "sequenza bersaglio"). Generalmente, una sequenza bersaglio sull'mRNA bersaglio può essere scelta da una data sequenza di cDNA corrispondente all'mRNA bersaglio, preferibilmente che ha inizio da 50 a 100 nucleotidi a valle (cioè nella direzione 3') dal codone di inizio. La sequenza bersaglio può, tuttavia, essere localizzata nelle regioni non tradotte al 5' o al 3', o nella regione nelle vicinanze del codone di inizio.

L'RNA antisenso può essere ottenuto utilizzando un certo numero di tecniche note a coloro che sono esperti nell'arte. Per esempio, l'RNA

antisense può essere sintetizzato chimicamente o prodotto per via ricombinante utilizzando procedimenti noti nell'arte. Preferibilmente, l'RNA antisense è trascritto da plasmidi a DNA ricombinanti circolari o lineari utilizzando qualsiasi promotore adatto.

La selezione di plasmidi adatti ad esprimere l'RNA antisense, i procedimenti per inserire sequenze nucleotidiche per esprimere l'RNA antisense nel plasmide, e i procedimenti IVT di trascrizione *in vitro* del suddetto RNA antisense sono all'interno dell'esperienza nell'arte.

Un "RNA antisense a singolo filamento" riguarda un RNA antisense come specificato sopra che è a singolo filamento.

Con "piccolo RNA interferente" o "siRNA" come utilizzato qui si intende una molecola di RNA, preferibilmente superiore a 10 nucleotidi di lunghezza, più preferibilmente superiore a 15 nucleotidi di lunghezza, e il più preferibilmente di 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleotidi di lunghezza che è in grado di legarsi specificamente a una porzione di un mRNA bersaglio. Questo legame induce un processo, in cui la suddetta porzione dell'mRNA bersaglio è tagliata o degradata e quindi l'espressione genica del suddetto mRNA bersaglio è inibita. Un intervallo da 19 a 25 nucleotidi è la dimensione più preferita per i siRNA. Sebbene, in principio, i filamenti senso ed antisense degli siRNA possano comprendere due molecole di RNA a singolo filamento complementari, i siRNA descritti qui comprendono una molecola singola in cui due porzioni complementari sono appaiate per le basi e sono legate covalentemente da un'area a "forcina" a singolo filamento. Vale a dire, la regione senso e la regione antisense possono essere covalentemente connesse attraverso una molecola di collegamento. La molecola di collegamento può essere un gruppo di collegamento polinucleotidico o non nucleotidico, ma è preferibilmente un gruppo di collegamento polinucleotidico. Senza voler esser vincolati ad alcuna teoria, si ritiene che l'area a forcina della molecola di siRNA a singolo filamento venga scissa a livello intracellulare mediante la proteina "DICER" (o un suo equivalente) per formare un siRNA di due singole molecole di RNA appaiate per le basi.

Il siRNA può anche comprendere una sporgenza al 3'. Come utilizzato qui, una "sporgenza al 3'" si riferisce ad almeno un nucleotide non accoppiato che si estende dall'estremità al 3' di un filamento di RNA. Così, in una forma di realizzazione, il siRNA comprende almeno una sporgenza al 3' da 1 a circa 6 nucleotidi (che comprende ribonucleotidi o deossinucleotidi) di lunghezza, preferibilmente da 1 a circa 5 nucleotidi di lunghezza, più preferibilmente da 1 a circa 4 nucleotidi di lunghezza, e in modo particolarmente preferibile da circa 2 a circa 4 nucleotidi di lunghezza. Nella forma di realizzazione in cui entrambi i filamenti della molecola di siRNA (cioè dopo che la molecola di siRNA a singolo filamento viene scissa a livello intracellulare da parte della proteina "DICER") comprendono una sporgenza al 3', la lunghezza delle sporgenze può essere uguale o diversa per ciascun filamento. In una forma di realizzazione più preferita, la sporgenza al 3' è presente su entrambi i filamenti del siRNA, ed è di 2 nucleotidi di lunghezza. Per esempio, ciascun filamento del siRNA può comprendere sporgenze al 3' di acido dideossitimidilico ("TT") o acido diuridilico ("uu").

Allo scopo di aumentare la stabilità del siRNA, le sporgenze al 3' possono essere anche stabilizzate nei confronti della degradazione. In una forma di realizzazione, le sporgenze sono stabilizzate includendo nucleotidi purinici, quali nucleotidi adenosinici o guanosinici. In alternativa, la sostituzione di nucleotidi pirimidinici mediante analoghi modificati, per esempio, la sostituzione di nucleotidi uridinici nelle sporgenze al 3' con 2'-deossitimidina, è tollerata e non influenza l'efficienza della degradazione dell'RNAi. In particolare, l'assenza di un 2'-idrossile nella 2'-deossitimidina accresce significativamente la resistenza nucleasica della sporgenza al 3' nel terreno di coltura per tessuti.

Come utilizzato qui, "mRNA bersaglio" si riferisce a una molecola di RNA che è un bersaglio di sottoregolazione.

I siRNA descritti qui possono essere indirizzati a qualsiasi tratto di approssimativamente da 19 a 25 nucleotidi contigui in qualsiasi delle sequenze bersaglio dell'mRNA (la "sequenza bersaglio"). Le tecniche per selezionare sequenze bersaglio per siRNA sono fornite, per esempio, in Tuschl T. et al., "The siRNA User Guide", riveduta, 11 ottobre 2002. "The siRNA User Guide" è disponibile su internet a un sito web tenuto dal Dott. Thomas Tuschl, Laboratorio di Biologia Molecolare dell'RNA, Università di Rockefeller, New York, Stati Uniti, e può essere trovata mediante l'accesso al sito web dell'Università di Rockefeller e cercando la parola chiave "siRNA". Ulteriori indicazioni in relazione alla selezione di sequenze bersaglio e/o la progettazione di siRNA si possono trovare sulle pagine web di Protocol Online (www.protocol-online.com) utilizzando la parola chiave "siRNA". Così, in una forma di realizzazione, il filamento senso del siRNA descritto qui comprende una sequenza nucleotidica sostanzialmente identica a qualsiasi tratto contiguo da circa 19 a circa 25 nucleotidi nell'mRNA bersaglio.

In generale, una sequenza bersaglio sull'mRNA bersaglio può essere scelta da una data sequenza di cDNA corrispondente all'mRNA bersaglio, preferibilmente che ha inizio da 50 a 100 nucleotidi a valle (cioè nella direzione 3') dal codone di inizio. La sequenza bersaglio può, tuttavia, essere localizzata nelle regioni non tradotte al 5' o al 3', o nella regione nelle vicinanze del codone di inizio.

Il siRNA può essere ottenuto utilizzando un certo numero di tecniche note a coloro che sono esperti nell'arte. Per esempio, il siRNA può essere sintetizzato chimicamente o prodotto per via ricombinante utilizzando procedimenti noti nell'arte, quale il sistema *in vitro* di *Drosophila* descritto nella domanda US no. 2002/0086356 di Tuschl et al. Il siRNA può essere espresso da vettori di espressione della polimerasi III senza una modifica nel sito di indirizzamento a bersaglio, dal momento che si ritiene che l'espressione di RNA da promotori della polimerasi III sia efficiente solo quando il primo nucleotide trascritto è una purina.

Preferibilmente, il siRNA è trascritto da plasmidi a DNA ricombinanti circolari o lineari utilizzando qualsiasi promotore adatto. I promotori opportuni per trascrivere il siRNA descritto qui da un plasmide includono, per esempio, le sequenze promotrici dell'RNA polimerasi III U6 o H1 e il promotore del citomegalovirus. La selezione di altri promotori adatti è all'interno dell'esperienza nell'arte.

La selezione di plasmidi adatti per trascrivere siRNA, i procedimenti per inserire sequenze nucleotidiche per esprimere il siRNA nel plasmide, e i procedimenti IVT di trascrizione *in vitro* del suddetto siRNA sono all'interno dell'esperienza nell'arte.

Il termine "miRNA" (microRNA) come utilizzato qui riguarda RNA non codificanti che hanno una lunghezza da 21 a 25 (quale da 21 a 23, preferibilmente 22) nucleotidi e che inducono la degradazione e/o impediscono la traduzione degli mRNA bersaglio. I miRNA si trovano tipicamente nelle piante, negli animali e in alcuni virus, in cui essi sono codificati dal DNA nucleare eucariotico nelle piante e negli animali e dal DNA virale (nel virus il cui genoma è basato su DNA), rispettivamente. I miRNA sono regolatori post-trascrizionali che si legano a sequenze complementari su trascritti di RNA messaggeri bersaglio (mRNA), solitamente risultando nella repressione traduzionale o nella degradazione e nel silenziamento genico del bersaglio.

Il miRNA può essere ottenuto utilizzando un certo numero di tecniche note a coloro che sono esperti nell'arte. Per esempio, l'RNA antisense può essere sintetizzato chimicamente o prodotto per via ricombinante utilizzando procedimenti noti nell'arte (per esempio utilizzando i kit disponibili in commercio quale il kit di sintesi di cDNA mediante miRNA venduto da Applied Biological Materials Inc.). Preferibilmente, l'RNA antisense è trascritto da plasmidi a DNA ricombinanti circolari o lineari utilizzando qualsiasi promotore adatto. Le tecniche per predire la struttura secondaria di RNA sono fornite, per esempio, in Sato et al. (Nucleic Acids Res. 37(2009):W277-W280), Hamada et al. (Nucleic Acids Res. 39(2011):W100-W106 2011), e Reuter e Mathews (BMC Bioinformatics 11(2010):129).

Il termine "nucleoside" riguarda composti che possono essere pensati come nucleotidi senza un gruppo fosfato. Mentre un nucleoside è una base nucleotidica legata a uno zucchero (per esempio ribosio o deossiribosio), un nucleotide è costituito da un nucleoside e uno o più gruppi fosfato. Gli esempi di nucleosidi includono citidina, uridina, adenosina, e guanosina.

I cinque nucleosidi standard che costituiscono gli acidi nucleici sono uridina, adenosina, timidina, citidina e guanosina. I cinque nucleosidi sono comunemente abbreviati con i loro codici a una lettera U, A, T, C e G, rispettivamente. Tuttavia, la timidina è più comunemente scritta come "dT" ("d" rappresenta "deossi") dal momento che essa contiene un gruppo funzionale 2'-deossiribofuranosio piuttosto che l'anello di ribofuranosio trovato nell'uridina. Questo avviene poiché la timidina si trova nell'acido deossiribonucleico (DNA) e non nell'acido ribonucleico (RNA). Al contrario, l'uridina si trova nell'RNA e non nel DNA. I rimanenti tre nucleosidi possono essere trovati sia nell'RNA che nel DNA. Nell'RNA, essi sarebbero rappresentati come C e G, mentre nel DNA essi sarebbero rappresentati come dA, dC e dG.

Il termine "stabilità" dell'RNA (preferibilmente dell'RNA a singolo filamento, quale mRNA) riguarda l'"emivita" dell'RNA. L'"emivita" riguarda il periodo di tempo che è richiesto per eliminare metà dell'attività, della quantità o del numero delle molecole. Nel contesto della presente

invenzione, l'emivita di un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA o un RNA a singolo filamento inibitorio) è indicativa della stabilità del suddetto RNA.

Ovviamente, se secondo la presente invenzione si desidera diminuire la stabilità di un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento quale un mRNA o un RNA a singolo filamento inibitorio), è possibile modificare l'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento quale un mRNA o un RNA a singolo filamento inibitorio) in modo tale da interferire con la funzione degli elementi come descritto sopra aumentando la stabilità dell'RNA (preferibilmente l'RNA a singolo filamento quale un mRNA o un RNA a singolo filamento inibitorio).

In una forma di realizzazione, l'RNA a singolo filamento qui descritto è un RNA a singolo filamento (modificato), in particolare un mRNA (modificato), codificante un peptide o una proteina. Secondo l'invenzione, il termine "RNA a singolo filamento codificante un peptide o una proteina" significa che l'RNA a singolo filamento, se presente nell'ambiente appropriato, preferibilmente all'interno di una cellula, può dirigere il gruppo di amminoacidi per produrre, cioè, esprimere, il peptide o la proteina durante il processo di traduzione. Preferibilmente, l'RNA a singolo filamento (quale un mRNA) qui descritto è in grado di interagire con il meccanismo cellulare di traduzione permettendo la traduzione del peptide o della proteina.

Il termine "espressione" viene utilizzato secondo l'invenzione nel suo significato più generale e comprende la produzione di RNA e/o peptidi o proteine, per esempio, mediante trascrizione e/o traduzione. Riguardo l'RNA, il termine "espressione" o "traduzione" riguarda in particolare la produzione di peptidi o proteine. Esso comprende anche l'espressione parziale di acidi nucleici. Inoltre, l'espressione può essere transitoria o stabile.

Nel contesto della presente invenzione, il termine "trascrizione" riguarda un processo, in cui il codice genetico in una sequenza di DNA è trascritto nell'RNA. Successivamente, l'RNA può essere tradotto in proteina. Secondo la presente invenzione, il termine "trascrizione" comprende la "trascrizione *in vitro*", in cui il termine "trascrizione *in vitro*" riguarda un processo, in cui un RNA, in particolare un RNA a singolo filamento quale un mRNA, è sintetizzato *in vitro* in un sistema privo di cellule, utilizzando preferibilmente estratti cellulari appropriati. Preferibilmente, vengono applicati vettori di clonaggio per la generazione di trascritti. Questi vettori di clonaggio sono in generale indicati come vettori di trascrizione e sono secondo la presente invenzione compresi dal termine "vettore". Secondo la presente invenzione, la preparazione di RNA comprende RNA a singolo filamento prodotto mediante trascrizione *in vitro*, in particolare mediante trascrizione *in vitro* di un modello appropriato di DNA. Il promotore per controllare la trascrizione può essere qualsiasi promotore per qualsiasi RNA polimerasi. Gli esempi particolari dell'RNA polimerasi sono le RNA polimerasi T7, T3 ed SP6. Preferibilmente, la trascrizione *in vitro* viene controllata da un promotore T7, T3, o SP6. Uno stampo di DNA per la

trascrizione *in vitro* può essere ottenuto mediante la clonazione di un acido nucleico, in particolare un cDNA, ed introducendolo in un vettore appropriato per la trascrizione *in vitro*. Il cDNA può essere ottenuto mediante la trascrizione inversa dell'RNA.

Lo stampo del vettore contenente il cDNA può comprendere vettori che recano differenti inserti di cDNA, il che, in seguito alla trascrizione, risulta in una popolazione di molecole differenti di RNA facoltativamente in grado di esprimere peptidi o proteine differenti, o può comprendere vettori che recano solo una specie di inserto di cDNA, il che, in seguito alla trascrizione, risulta in una sola popolazione di una specie di RNA in grado di esprimere solo un peptide o una proteina. Così, è possibile produrre RNA in grado di esprimere solo un singolo peptide o una singola proteina, oppure produrre composizioni di differenti RNA, quali librerie a RNA, ed RNA dell'intera cellula in grado di esprimere più di un peptide o di una proteina, per esempio, una composizione di peptidi o proteine. La presente invenzione prevede l'introduzione di tutti tali RNA nelle cellule.

Il termine "traduzione" secondo l'invenzione riguarda un processo nei ribosomi di una cellula mediante il quale un filamento di mRNA dirige l'assemblamento di una sequenza amminoacidica per fare un peptide o una proteina.

Il termine "peptide" come utilizzato qui comprende oligopeptidi e polipeptidi e si riferisce a sostanze comprendenti due o più, preferibilmente 3 o più, preferibilmente 4 o più, preferibilmente 6 o più, preferibilmente 8 o più, preferibilmente 10 o più, preferibilmente 13 o più, preferibilmente 16 o più, preferibilmente 21 o più e fino a preferibilmente 8, 10, 20, 30, 40 o 50, in particolare 100 amminoacidi uniti covalentemente mediante legami peptidici. Il termine "proteina" si riferisce preferibilmente a peptidi grandi, preferibilmente a peptidi con più di 100 residui amminoacidici, ma in generale i termini "peptide" e "proteina" sono sinonimi e vengono utilizzati qui in modo intercambiabile.

Secondo la presente invenzione, un RNA a singolo filamento quale un mRNA può codificare un peptide o una proteina. Conseguentemente, un RNA a singolo filamento può contenere una regione codificante (fase di lettura aperta (ORF)) codificante un peptide o una proteina. Per esempio, un RNA a singolo filamento può codificare ed esprimere un antigene o un peptide o una proteina farmaceuticamente attivo/a come principio immunologicamente attivo (che preferibilmente non è un antigene). A questo proposito, una "fase di lettura aperta" o "ORF" è un tratto di codoni continuo che ha inizio con un codone di inizio e finisce con un codone di terminazione.

Il termine "peptide o proteina farmaceuticamente attivo/a" comprende un peptide o una proteina che può essere utilizzato/a nel trattamento di un soggetto dove l'espressione di un peptide o di una proteina sarebbe vantaggiosa, per esempio, nel miglioramento dei sintomi di una malattia o di un disturbo. Per esempio, una proteina farmaceuticamente attiva può sostituire o aumentare l'espressione della proteina in una cellula che normalmente non esprime una proteina o che esprime in modo alterato una proteina, per esempio, una proteina farmaceuticamente attiva può compensare una mutazione fornendo una proteina desiderabile. Inoltre, un/a "peptide o proteina farmaceuticamente attivo/a" può produrre un risultato vantaggioso

in un soggetto, per esempio, può essere utilizzato/a per produrre una proteina contro cui vaccinare un soggetto nei confronti di una malattia infettiva. Preferibilmente, un/a “peptide o proteina farmaceuticamente attivo/a” ha un effetto positivo o benefico sulla condizione o sullo stato patologico di un soggetto quando somministrato/a al soggetto in una quantità terapeuticamente efficace. Preferibilmente, un peptide o una proteina farmaceuticamente attivo/a ha proprietà curative o palliative e può essere somministrato/a per migliorare, attenuare, alleviare, annullare, ritardare la comparsa di o ridurre la gravità di uno o più sintomi di una malattia o di un disturbo. Un peptide o una proteina farmaceuticamente attivo/a può avere proprietà profilattiche e può essere utilizzato/a per ritardare la comparsa di una malattia o per ridurre la gravità di tale malattia o condizione patologica. Il termine “peptide o proteina farmaceuticamente attivo/a” comprende proteine o polipeptidi interi, e può anche riferirsi a loro frammenti farmaceuticamente attivi. Può includere anche analoghi farmaceuticamente attivi di un peptide o di una proteina. Il termine “peptide o proteina farmaceuticamente attivo/a” comprende peptidi e proteine che sono antigeni, cioè, il peptide o la proteina scatena una risposta immunitaria in un soggetto che può essere terapeutica o parzialmente o completamente protettiva.

Gli esempi di proteine farmaceuticamente attive includono, ma non sono limitati a, citochine e proteine del sistema immunitario quali composti immunologicamente attivi (per esempio interleuchine, fattore stimolante le colonie (FCS), fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), fattore stimolante le colonie di granulociti e di macrofagi (GM-CSF), eritropoietina, fattore di necrosi tumorale (TNF), interferoni, integrine, addressine, selectine, recettori di localizzazione, recettori dei linfociti T, immunoglobuline, antigeni solubili del complesso maggiore di istocompatibilità, antigeni immunologicamente attivi quali antigeni batterici, parassitari, o virali, allergeni, antigeni self, anticorpi), ormoni (insulina, ormone tiroideo, catecolamina, gonadotrofina, ormoni trofici, prolattina, ossitocina, dopamina, somatotropina bovina, leptina e simili), ormoni della crescita (per esempio ormone della crescita umano), fattori di crescita (per esempio fattore di crescita epidermico, fattore di crescita nervoso, fattore di crescita simile all'insulina e simili), recettori dei fattori di crescita, enzimi (attivatore tissutale del plasminogeno, streptochinasi, colesterolo biosintetico o degradativo, enzimi steroidogenici, chinasi, fosfodiesterasi, metilasi, demetilasi, deidrogenasi, cellulasi, proteasi, lipasi, fosfolipasi, aromatasi, citocromi, adenilato o guanilato ciclasti, neuramidasi e simili), recettori (recettori degli ormoni steroidei, recettori peptidici), proteine leganti (proteine leganti ormoni della crescita o fattori di crescita e simili), fattori di trascrizione e di traduzione, proteine che sopprimono la crescita tumorale (per esempio proteine che inibiscono l'angiogenesi), proteine strutturali (quali collagene, fibroina, fibrinogeno, elastina, tubulina, actina, e miosina), e proteine del sangue (trombina, albumina sierica, fattore VII, fattore VIII, insulina, fattore IX, fattore X, attivatore tissutale del plasminogeno, proteina C, fattore di von Willebrand, antitrombina III, glucocerebrosidasi, eritropoietina fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) o fattore VIII modificato, anticoagulanti e simili).

In una forma di realizzazione, la proteina farmaceuticamente attiva è una citochina che è coinvolta nel regolare l'omeostasi linfoide, preferibilmente una citochina che è coinvolta in e induce preferibilmente o accresce lo sviluppo, l'attivazione, l'espansione, la differenziazione e/o la sopravvivenza dei linfociti T. In una forma di realizzazione, la citochina è un'interleuchina. In una forma di realizzazione, la proteina farmaceuticamente attiva è un'interleuchina scelta nel gruppo consistente di IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, e IL-21.

Il termine "principio immunologicamente attivo" riguarda qualsiasi composto che altera una risposta immunitaria, preferibilmente inducendo e/o sopprimendo la maturazione delle cellule immunitarie, inducendo e/o sopprimendo la biosintesi di citochine, e/o alterando l'immunità umorale stimolando la produzione di anticorpi dai linfociti B. I composti immunologicamente attivi possiedono potente attività immunostimolante comprendente, ma senza limitazione, l'attività antivirale e antitumorale, e possono anche sottoregolare altri aspetti della risposta immunitaria, per esempio spostando la risposta immunitaria via da una risposta immunitaria TH2, il che è utile per trattare un'ampia varietà di malattie mediate da TH2. I composti immunologicamente attivi possono essere utili come adiuvanti di vaccini.

In una forma di realizzazione, un RNA a singolo filamento (quale un mRNA) che codifica un antigene quale un antigene associato alla malattia viene somministrato a un mammifero, in particolare se si desidera trattare un mammifero avente una malattia riguardante o esprimente l'antigene (antigene associato alla malattia). L'RNA a singolo filamento è preferibilmente assorbito all'interno delle cellule presentanti l'antigene del mammifero (monociti, macrofagi, cellule dendritiche o altre cellule). Si forma un prodotto antigenico di traduzione dell'RNA a singolo filamento e il prodotto viene mostrato sulla superficie delle cellule per il riconoscimento da parte dei linfociti T. In una forma di realizzazione, l'antigene o un prodotto preparato dal suo eventuale processamento viene mostrato sulla superficie cellulare in associazione a molecole dell'MHC per il riconoscimento da parte dei linfociti T attraverso il loro recettore dei linfociti T, conducendo alla loro attivazione.

Gli interferoni sono importanti citochine caratterizzate da attività antivirali, antiproliferative ed immunomodulatorie. Gli interferoni sono proteine che modificano e regolano la trascrizione di geni all'interno di una cellula legandosi a recettori dell'interferone sulla superficie delle cellule regolate, prevenendo quindi la replicazione virale all'interno delle cellule. Gli interferoni possono essere raggruppati in due tipi. L'IFN-gamma è l'unico interferone di tipo II; tutti gli altri sono interferoni di tipo I. Gli interferoni di tipo I e di tipo II differiscono nella struttura del gene (i geni degli interferoni di tipo II hanno tre esoni; di tipo I, uno), nella posizione nel cromosoma (nell'uomo, il tipo II è localizzato sul cromosoma 12; i geni degli interferoni di tipo I sono legati e sono sul cromosoma 9), e i tipi di tessuti dove essi vengono prodotti (gli interferoni di tipo I vengono sintetizzati ubiquitariamente, quelli di tipo II dai linfociti). Gli interferoni di tipo I inibiscono in modo competitivo il legame l'uno dell'altro ai recettori cellulari, mentre l'interferone di tipo II ha un recettore distinto. Secondo l'invenzione, il termine "interferone" o "IFN" riguarda

preferibilmente interferoni di tipo I, in particolare IFN-alfa e IFN-beta.

In una forma di realizzazione, l'RNA, in particolare l'RNA che deve essere espresso in una cellula, è un RNA autoreplicante a singolo filamento. In una forma di realizzazione, l'RNA autoreplicante è un RNA a singolo filamento di senso positivo. In una forma di realizzazione, l'RNA autoreplicante è RNA virale o RNA derivato da RNA virale. In una forma di realizzazione, l'RNA autoreplicante è RNA genomico alfavirale o è derivato da RNA genomico alfavirale. In una forma di realizzazione, l'RNA autoreplicante è un vettore di espressione di un gene virale. In una forma di realizzazione, il virus è il virus della foresta Semliki. In una forma di realizzazione, l'RNA autoreplicante contiene uno o più transgeni che in una forma di realizzazione, se l'RNA è RNA virale, possono sostituire parzialmente o completamente le sequenze virali quali le sequenze virali codificanti le proteine strutturali.

Il termine "preparazione di RNA" come utilizzato qui si riferisce a qualsiasi composizione comprendente almeno un tipo dei vari tipi di RNA specificati sopra (cioè mRNA, tRNA, rRNA, snRNA, RNA a singolo filamento, RNA a doppio filamento, ed RNA a singolo filamento inibitorio (quale RNA antisense, siRNA, o miRNA)). Il termine "preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento" come utilizzato qui si riferisce a qualsiasi composizione comprendente almeno RNA a singolo filamento (tuttavia, la suddetta composizione può anche comprendere RNA a doppio filamento). Il termine "preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento prodotto mediante trascrizione *in vitro*" si riferisce a qualsiasi composizione comprendente almeno RNA a singolo filamento, in cui il suddetto RNA a singolo filamento è stato generato mediante trascrizione *in vitro*.

Il termine "trascrizione *in vitro*" o "IVT" come utilizzato qui significa che la trascrizione (cioè la generazione di RNA) è condotta in una maniera senza cellule. Vale a dire, l'IVT non usa cellule viventi/sottoposte a coltura ma piuttosto il macchinario di trascrizione estratto dalle cellule (per esempio lisati cellulari o loro componenti isolati, comprendenti un'RNA polimerasi (preferibilmente polimerasi T7, T3 o SP6)).

I termini "facoltativo" o "facoltativamente" come utilizzati qui significano che l'evento, la circostanza o la condizione successivamente descritto/a può o non può avvenire, e che la descrizione comprende esempi in cui il suddetto evento, la suddetta circostanza, o condizione avviene ed esempi in cui esso/a non si verifica.

Gli "isomeri" sono composti aventi la stessa formula molecolare ma differiscono nella struttura ("isomeri strutturali") o nell'orientamento geometrico dei gruppi funzionali e/o degli atomi ("stereoisomeri"). Gli "enantiomeri" sono una coppia di stereoisomeri che sono immagini speculari non sovrapponibili l'uno dell'altro. Una "miscela racemica" o "racemato" contiene una coppia di enantiomeri in quantità uguali ed è indicata/o dal prefisso (\pm). I "diastereoisomeri" sono stereoisomeri che sono immagini speculari non sovrapponibili l'una dell'altra. I "tautomeri"

sono isomeri strutturali della stessa sostanza chimica che si interconvertono spontaneamente l'uno con l'altro, anche quando puri.

Termini quali "diminuire", "ridurre" o "inibire" riguardano la capacità di causare una riduzione complessiva, preferibilmente del 5% o superiore, del 10% o superiore, del 20% o superiore, più preferibilmente del 50% o superiore, e il più preferibilmente del 75% o superiore, nel livello. Questo comprende anche una diminuzione completa o essenzialmente completa, cioè una riduzione a zero o essenzialmente a zero.

Termini quali "accrescere", "aumentare", o "prolungare" riguardano preferibilmente un aumento, un potenziamento, o un prolungamento di circa almeno il 10%, preferibilmente almeno il 20%, preferibilmente almeno il 30%, preferibilmente almeno il 40%, preferibilmente almeno il 50%, preferibilmente almeno l'80%, preferibilmente almeno il 100%, preferibilmente almeno il 200% e in particolare almeno il 300%. Questi termini possono riguardare anche un aumento, un potenziamento, o un prolungamento da zero o da un livello non misurabile o non rilevabile a un livello maggiore di zero o a un livello che è misurabile o rilevabile.

Il termine "presente in natura" come utilizzato qui si riferisce al fatto che un oggetto si può trovare in natura. Per esempio, una proteina oppure un acido nucleico che è presente in un organismo (compresi virus), che può essere isolata/o da una fonte in natura e non è stata/o intenzionalmente modificata/o dall'uomo in laboratorio è presente in natura.

L'RNA a singolo filamento descritto qui può essere marcato con un isotopo, cioè, uno o più atomi dell'RNA a singolo filamento sono sostituiti con un atomo corrispondente avente lo stesso numero di protoni ma differente nel numero di neutroni. Per esempio, un atomo di idrogeno può essere sostituito con un atomo di deuterio. Gli isotopi tipici che possono essere utilizzati nell'RNA a singolo filamento descritto qui includono deuterio, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸F, ³²S, ³⁶Cl, e ¹²⁵I. L'RNA a singolo filamento marcato con un isotopo può essere prodotto utilizzando nucleotidi marcati isotopicamente in modo corrispondente durante la trascrizione *in vitro* o aggiungendo tali nucleotidi marcati isotopicamente in modo corrispondente dopo la trascrizione.

Viene inoltre descritta qui una composizione farmaceutica comprendente un RNA a singolo filamento ottenuto mediante un procedimento dell'invenzione e uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili. In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende un RNA a singolo filamento ottenuto mediante un procedimento dell'invenzione, uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili e uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi.

Viene inoltre qui descritto un RNA a singolo filamento come specificato sopra o una composizione farmaceutica come specificato qui per l'uso in terapia.

Per esempio, l'RNA a singolo filamento e le composizioni farmaceutiche descritti qui possono essere utilizzati nel trattamento (compreso il

trattamento profilattico) di una condizione, un disturbo o una malattia scelta/o nel gruppo consistente di malattie infettive (per esempio quelle causate da virus, batteri, funghi o altri microrganismi); un'inflammatione indesiderata (quale un disturbo immunitario); e cancro.

Così, anche è descritto (i) un RNA a singolo filamento descritto qui (o una composizione farmaceutica che comprende tale RNA a singolo filamento facoltativamente insieme a un eccipiente farmaceuticamente accettabile) per l'uso in un procedimento di trattamento di una condizione, un disturbo o una malattia come specificato qui, in particolare una malattia scelta nel gruppo consistente di malattie infettive (per esempio quelle causate da un virus, un batterio, un fungo o un altro microrganismo); un'inflammatione indesiderata; e cancro; e (ii) un procedimento di trattamento di un individuo che lo necessita, comprendente la somministrazione di una quantità farmaceuticamente efficace di un RNA a singolo filamento descritto qui (o una composizione farmaceutica che comprende tale RNA a singolo filamento facoltativamente insieme a un eccipiente farmaceuticamente accettabile), all'individuo. In una forma di realizzazione, l'individuo soffre di, o è sensibile a o è a rischio di, una o più delle condizioni, dei disturbi o delle malattie descritti qui. La condizione, il disturbo o la malattia può essere scelta/o nel gruppo consistente di malattie infettive (per esempio quelle causate da un virus, un batterio, un fungo o un altro microrganismo); un'inflammatione indesiderata; e cancro. Inoltre, l'individuo è preferibilmente un mammifero e più preferibilmente un uomo.

Il cancro (termine medico: neoplasma maligno) è una classe di malattie in cui un gruppo di cellule mostrano crescita incontrollata (divisione oltre i limiti normali), invasione (intrusione e distruzione di tessuti adiacenti), e qualche volta metastasi (diffusione in altre posizioni nell'organismo attraverso la linfa o il sangue). Queste tre proprietà maligne dei carcinomi li differenziano dai tumori benigni, i quali sono autolimitati, e non invadono o metastatizzano. La maggior parte dei carcinomi forma un tumore, cioè, un rigonfiamento o una lesione formato/a da una crescita anormale di cellule (chiamate cellule neoplastiche o cellule tumorali), ma alcuni, quale la leucemia, non lo fanno. Il termine "cancro" secondo l'invenzione comprende leucemie, seminomi, melanomi, teratomi, linfomi, neuroblastomi, gliomi, cancro rettale, cancro dell'endometrio, cancro del rene, cancro del surrene, cancro della tiroide, cancro del sangue, cancro della pelle, cancro del cervello, cancro del collo dell'utero, cancro intestinale, cancro del fegato, cancro del colon, cancro dello stomaco, cancro dell'intestino, cancro della testa e del collo, cancro gastrointestinale, cancro dei linfonodi, cancro dell'esofago, cancro del colon-retto, cancro del pancreas, cancro di orecchio, naso e gola (ENT), cancro della mammella, cancro della prostata, cancro dell'utero, cancro ovarico e cancro del polmone e le loro metastasi. I loro esempi sono carcinomi polmonari, carcinomi della mammella, carcinomi della prostata, carcinomi del colon, carcinomi a cellule renali, carcinomi cervicali, o metastasi dei tipi di cancro o di tumore descritti sopra. Il termine cancro secondo l'invenzione comprende anche metastasi tumorali.

Gli esempi di tumori trattabili con l'RNA a singolo filamento e le composizioni farmaceutiche descritti qui includono melanoma maligno, tutti i tipi

di carcinoma (del colon, delle cellule renali, della vescica, della prostata, carcinoma polmonare non a piccole cellule e a piccole cellule, ecc.), linfomi, sarcomi, blastomi, gliomi, ecc.

Il melanoma maligno è un tipo di cancro della pelle grave. È causato dalla crescita incontrollata delle cellule del pigmento, chiamate melanociti.

Secondo l'invenzione, un "carcinoma" è un tumore maligno derivato da cellule epiteliali. Questo gruppo rappresenta i tumori più comuni, comprese le forme comuni di cancro della mammella, della prostata, del polmone e del colon.

Il linfoma e la leucemia sono tumori maligni derivati dalle cellule ematopoietiche (che formano il sangue).

Un sarcoma è un cancro che emerge da cellule trasformate in uno di diversi tessuti che si sviluppano dal mesodermia embrionale. Così, i sarcomi includono tumori di tessuti ossei, cartilaginei, grassi, muscolari, vascolari ed ematopoietici.

Un tumore blastico o blastoma è un tumore (solitamente maligno) che somiglia a un tessuto immaturo o embrionale. Molti di questi tumori sono maggiormente comuni nei bambini.

Un glioma è un tipo di tumore che ha inizio nel cervello o nel midollo spinale. Viene chiamato glioma poiché esso emerge dalle cellule gliali. Il sito più comune dei gliomi è il cervello.

Con "metastasi" si intende la diffusione di cellule cancerose dal loro sito originale a un'altra parte del corpo. La formazione di metastasi è un processo molto complesso e dipende dal distacco di cellule maligne dal tumore primario, dall'invasione della matrice extracellulare, dalla penetrazione delle membrane basali endoteliali per entrare nella cavità e nei vasi corporei, e quindi, dopo essere state trasportate dal sangue, dall'infiltrazione di organi bersaglio. Infine, la crescita di un nuovo tumore, cioè, un tumore secondario o un tumore metastatico, al sito bersaglio dipende dall'angiogenesi. La metastasi tumorale spesso si presenta anche dopo la rimozione del tumore primario poiché possono rimanere cellule o componenti tumorali e sviluppare un potenziale metastatico. In una forma di realizzazione, il termine "metastasi" secondo l'invenzione riguarda una "metastasi a distanza" che riguarda una metastasi che è distante dal tumore primario e dal sistema linfonodale regionale.

I disturbi immunitari tipici includono, ma non sono limitati a, malattie autoimmuni (per esempio diabete mellito, artrite (comprese artrite reumatoide, artrite reumatoide giovanile, osteoartrite e artrite psoriasica), sclerosi multipla, encefalomielite, miastenia grave, lupus eritematoso sistemico, tiroidite autoimmune, dermatite (comprese dermatite atopica e dermatite eczematosa), psoriasi, sindrome di Sjögren, malattia di Crohn, ulcera aftosa, irite, congiuntivite, cheratocongiuntivite, colite ulcerosa, asma, asma allergica, sepsi e shock settico, disturbo intestinale infiammatorio, lupus eritematoso cutaneo, sclerodermia, vaginite, proctite, eruzioni da farmaci, reazioni inverse alla lebbra, eritema nodoso leproso, uveite autoimmune, encefalomielite allergica, encefalopatia emorragica necrotizzante acuta, perdita dell'udito sensorineurale progressiva bilaterale

idiopatica, anemia aplastica, anemia eritrocitaria pura, trombocitopenia idiopatica, policondrite, granulomatosi di Wegener, epatite cronica attiva, sindrome di Stevens-Johnson, glomerulonefrite, sprue idiopatica, lichen planus, malattia di Graves, sarcoidosi, cirrosi biliare primaria, uveite posteriore, e fibrosi polmonare interstiziale), malattia del trapianto contro l'ospite, casi di trapianto, ed allergia, quale allergia atopica.

I virus tipici includono, ma non sono limitati a, virus dell'immunodeficienza umana (HIV), virus di Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV) (per esempio CMV5), herpesvirus umani (HHV) (per esempio HHV6, 7 o 8), virus dell'herpes simplex (HSV), virus dell'herpes bovino (BHV) (per esempio BHV4), virus dell'herpes equino (EHV) (per esempio EHV2), virus della leucemia dei linfociti T umani (HTLV)5, virus della varicella zoster (VZV), virus del morbillo, papovavirus (JC e BK), virus dell'epatite (per esempio HBV o HCV), virus del mixoma, adenovirus, parvovirus, virus del polioma, virus dell'influenza, papillomavirus e poxvirus quale il virus del vaiolo vaccino, e virus del mollusco contagioso (MCV), e lyssavirus. Tali virus possono o meno esprimere un inibitore dell'apoptosi. Le malattie tipiche causate da infezione virale includono, ma non sono limitate a, varicella, infezioni da citomegalovirus, herpes genitale, epatite B e C, influenza, e fuoco di Sant'Antonio, e rabbia.

I batterici tipici includono, ma non sono limitati a, *Campylobacter jejuni*, specie di *Enterobacter*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (per esempio *E. coli* 0157:H7), streptococchi del gruppo A, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, listeria, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus epidermidis*, e *Borrelia* e *Rickettsia*. Le malattie tipiche causate da infezione batterica includono, ma non sono limitate a, antrace, colera, difterite, malattie di origine alimentare, lebbra, meningite, malattia peptica ulcerosa, polmonite, sepsi, shock settico, sifilide, tetano, tubercolosi, febbre tifoide, e infezione del tratto urinario, e malattia di Lyme e febbre maculosa delle montagne rocciose.

Gli esempi particolari di malattie infettive trattabili con l'RNA a singolo filamento e le composizioni farmaceutiche descritti qui includono malattie infettive virali, quali AIDS (HIV), epatite A, B o C, herpes, herpes zoster (varicella), morbillo tedesco (virus della rosolia), febbre gialla, febbre dengue; malattie infettive causate da flavivirus; influenza; malattie infettive emorragiche (virus Marburg o Ebola); malattie infettive batteriche (quali malattia del legionario (*Legionella*), ulcera gastrica (*Helicobacter*), colera (*Vibrio*), infezioni da parte di *E. coli*, stafilococchi, *Salmonella* o streptococchi (tetano); infezioni da parte di agenti patogeni protozoici quali malaria, malattia del sonno, leishmaniosi, toxoplasmosi, cioè infezioni da parte di *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Toxoplasma*; o infezioni fungine, che sono causate, per esempio, da *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* o *Candida albicans*.

L'RNA a singolo filamento e le composizioni farmaceutiche descritti qui possono essere utilizzati da soli o in combinazione con uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi che possono essere somministrati prima, simultaneamente o dopo la somministrazione dell'RNA a singolo

filamento o della composizione farmaceutica descritto/a qui. Tali uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi includono farmaci chemioterapici per pazienti oncologici (per esempio gemcitabina, Etopophos, cisplatino, carboplatino), agenti antivirali, agenti antiparassitari, agenti antibatterici, agenti immunoterapici (per esempio antigeni o loro frammenti (in particolare loro frammenti immunogenici)), e adiuvanti, e, se somministrati simultaneamente con l'RNA a singolo filamento descritto qui, possono essere presenti in una composizione farmaceutica descritta qui.

In particolare, l'uno o i più composti attivi ulteriori/aggiuntivi possono comprendere un agente immunoterapico, preferibilmente un agente immunoterapico che induce o causa una reazione immunitaria bersaglio, cioè, specifica. Così, in una forma di realizzazione, l'RNA a singolo filamento e le composizioni farmaceutiche descritti qui possono essere utilizzati in combinazione con un agente immunoterapico, preferibilmente un agente immunoterapico che induce o causa una reazione immunitaria bersaglio, cioè, specifica. Tali agenti immunoterapici includono agenti diretti nei confronti di un antigene associato alla malattia, quali anticorpi terapeutici, oppure agenti inducenti una risposta immunitaria diretta nei confronti di un antigene associato alla malattia o di cellule esprimenti un antigene associato alla malattia. Gli agenti immunoterapici utili includono proteine o peptidi inducenti una risposta dei linfociti B o dei linfociti T nei confronti dell'antigene associato alla malattia o delle cellule esprimenti l'antigene associato alla malattia. Queste proteine o peptidi possono comprendere una sequenza essenzialmente corrispondente a o che è identica alla sequenza dell'antigene associato alla malattia oppure uno o più suoi frammenti. In una forma di realizzazione, la proteina o il peptide comprende la sequenza di un peptide presentato dall'MHC derivato dall'antigene associato alla malattia. Anziché somministrare la proteina o il peptide, è possibile anche somministrare un acido nucleico, preferibilmente un mRNA, codificante la proteina o il peptide. L'RNA codificante la proteina o il peptide può essere l'RNA a singolo filamento descritto qui. In alternativa o in aggiunta, l'RNA codificante la proteina o il peptide può essere un RNA differente non secondo la presente invenzione, il quale RNA può essere somministrato simultaneamente con (in questo caso l'RNA può far parte di una composizione farmaceutica descritta qui) e/o prima di e/o dopo la somministrazione di una composizione farmaceutica descritta qui. Conseguentemente, la composizione farmaceutica descritta qui può essere utilizzata nella vaccinazione genetica, in cui una risposta immunitaria è stimolata mediante l'introduzione in un soggetto di una molecola adatta di acido nucleico (DNA o mRNA) che codifica un antigene o un suo frammento.

In una forma di realizzazione, un antigene associato alla malattia è un antigene associato al tumore. In questa forma di realizzazione, l'RNA a singolo filamento e le composizioni farmaceutiche descritti qui possono essere utili nel trattamento del cancro o delle metastasi tumorali. Preferibilmente, l'organo o il tessuto malato è caratterizzato da cellule malate quali le cellule tumorali esprimenti un antigene associato alla malattia e/o che sono caratterizzate dall'associazione di un antigene associato alla malattia con la loro superficie. L'immunizzazione con un antigene

associato al tumore intatto o sostanzialmente intatto o suoi frammenti quali peptidi dell'MHC di classe I e classe II o acidi nucleici, in particolare mRNA, codificanti tale antigene o un frammento rende possibile il provocare una risposta di tipo dell'MHC di classe I e/o di classe II e così, lo stimolare i linfociti T quali i linfociti T CD8+ citotossici, che sono in grado di lisare le cellule cancerose, e/o i linfociti T CD4+. Tale immunizzazione può anche provocare una risposta immunitaria umorale (risposta dei linfociti B) che risulta nella produzione di anticorpi diretti all'antigene associato al tumore. Inoltre, le cellule presentanti l'antigene (APC) quali le cellule dendritiche (CD) possono essere caricate con peptidi presentati dall'MHC di classe I, direttamente o mediante la trasfezione con acidi nucleici codificanti antigeni tumorali o peptidi antigenici tumorali *in vitro*, e somministrate a un paziente.

Secondo la presente invenzione, un antigene associato al tumore comprende preferibilmente qualsiasi antigene che è caratteristico per tumori o carcinomi così come per cellule tumorali o cancerose, in relazione al tipo e/o al livello di espressione. In una forma di realizzazione, il termine "antigene associato al tumore" riguarda proteine che sono in condizioni normali, cioè, in un soggetto sano, specificamente espresse in un numero limitato di organi e/o tessuti o in stadi specifici dello sviluppo, per esempio, l'antigene associato al tumore può essere in condizioni normali specificamente espresso nel tessuto dello stomaco, preferibilmente nella mucosa gastrica, in organi riproduttivi, per esempio, nei testicoli, nel tessuto trofoblastico, per esempio, nella placenta, o in cellule della linea germinale, ed essere espresso o espresso in modo aberrante in uno o più tessuti tumorali o cancerosi. In questo contesto, "un numero limitato" significa preferibilmente non più di 3, più preferibilmente non più di 2 o 1. Gli antigeni associati ai tumori nel contesto della presente invenzione includono, per esempio, antigeni di differenziazione, preferibilmente antigeni di differenziazione specifici per il tipo cellulare, cioè, proteine che in condizioni normali vengono specificamente espresse in un certo tipo cellulare a un certo stadio di differenziazione, antigeni del cancro/testicolo, cioè, proteine che in condizioni normali vengono specificamente espresse nei testicoli e qualche volta nella placenta, e antigeni specifici della linea germinale. Nel contesto della presente invenzione, l'antigene associato al tumore è associato preferibilmente alla superficie cellulare di una cellula cancerosa e non è preferibilmente o solo raramente espresso in tessuti normali. Preferibilmente, l'antigene associato al tumore o l'espressione aberrante dell'antigene associato al tumore identifica cellule cancerose. Nel contesto della presente invenzione, l'antigene associato al tumore che è espresso da una cellula cancerosa in un soggetto, per esempio, un paziente che soffre di una malattia oncologica, è preferibilmente una proteina propria nel suddetto soggetto. Nelle forme di realizzazione preferite, l'antigene associato al tumore nel contesto della presente invenzione viene espresso in condizioni normali specificamente in un tessuto o in un organo che non è essenziale, cioè, tessuti od organi che quando danneggiati dal sistema immunitario non conducono alla morte del soggetto, o in organi o in strutture del corpo che non sono, o sono solo difficilmente, accessibili dal sistema immunitario. In una forma di realizzazione, la sequenza

amminoacidica dell'antigene associato al tumore è identica tra l'antigene associato al tumore che è espresso in tessuti normali e l'antigene associato al tumore che è espresso in tessuti cancerosi. Preferibilmente, un antigene associato al tumore è presentato in associazione a molecole dell'MHC da parte di una cellula cancerosa in cui viene espresso.

Gli esempi degli antigeni di differenziazione che idealmente soddisfano i criteri per gli antigeni associati ai tumori come contemplati dalla presente invenzione come strutture bersaglio nell'immunoterapia dei tumori, in particolare, nella vaccinazione contro i tumori, sono le proteine delle superficie cellulare della famiglia delle claudine, quali CLDN6 e CLDN18.2. Questi antigeni di differenziazione vengono espressi in tumori di varie origini, e sono particolarmente adatti come strutture bersaglio in associazione all'immunoterapia oncologica mediata da anticorpi a causa grazie alla loro espressione selettiva (nessuna espressione rilevante per la tossicità in un tessuto normale) e localizzazione alla membrana plasmatica.

Ulteriori esempi di antigeni che possono essere utili nella presente invenzione sono p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferibilmente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, BCR-abL minore di p190, Pm1/RARa, PRAME, proteinasi 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE e WT, preferibilmente WT-1.

Si deve intendere che un "antigene" significhi qualsiasi struttura che può causare la formazione di anticorpi e/o l'attivazione di una risposta cellulare immunitaria. Gli esempi di antigeni sono polipeptidi, proteine, cellule, estratti cellulari, carboidrati/polisaccaridi, coniugati polisaccaridici, lipidi, e glicolipidi. Questi antigeni possono essere antigeni tumorali o antigeni o allergeni virali, batterici, fungini e protozoologici. Il termine "antigene" comprende anche antigeni derivatizzati come sostanza secondaria che diventa antigenica - e sensibilizzante - solo attraverso la trasformazione (per esempio in posizione intermedia nella molecola, mediante completamento con una proteina dell'organismo), e antigeni coniugati che, attraverso l'incorporazione artificiale di gruppi atomici (per esempio isocianati, sali di diazonio), mostrano una nuova specificità costitutiva. L'antigene può essere presente nel vaccino descritto qui in forma di aptene accoppiato a un veicolante adatto. I veicolanti adatti sono noti a chi di abilità ordinaria nell'arte e includono per esempio albumina sierica umana (HSA), polietilenglicoli (PEG). L'aptene può essere accoppiato al veicolante mediante processi ben noti nello stato dell'arte, per esempio, nel caso di un veicolante polipeptidico attraverso un legame ammidico a un residuo di Lys.

Il termine “immunogenicità” si riferisce alla capacità di una particolare sostanza, in particolare di un RNA (preferibilmente un RNA a singolo filamento, quale un mRNA), di provocare una risposta immunitaria nel corpo di un soggetto quale un uomo. In altre parole, l’immunogenicità è la capacità di indurre una risposta immunitaria.

“Indurre una risposta immunitaria” può significare che non vi è stata alcuna risposta immunitaria prima di indurre una risposta immunitaria, ma esso può anche significare che vi è stato un certo livello di risposta immunitaria prima di indurre una risposta immunitaria e che, dopo l’induzione di una risposta immunitaria, la suddetta risposta immunitaria è aumentata. Così, “indurre una risposta immunitaria” comprende “aumentare una risposta immunitaria”. Preferibilmente, dopo l’induzione di una risposta immunitaria in un soggetto, il suddetto soggetto è protetto dallo sviluppo di una malattia quale un cancro o una malattia infettiva o la condizione patologica è migliorata inducendo una risposta immunitaria.

Il termine “immunoterapia” riguarda un trattamento comprendente preferibilmente una reazione immunitaria specifica e/o (una) funzione/i immunitaria/e effettrice/i.

Il termine “immunizzazione” o “vaccinazione” descrive il processo di trattamento di un soggetto per ragioni terapeutiche o profilattiche.

I termini “soggetto”, “paziente”, o “individuo”, riguardano vertebrati. Per esempio, i vertebrati nel contesto della presente invenzione sono mammiferi, uccelli (per esempio pollame), rettili, anfibi, pesci ossei, e pesci cartilaginei, in particolare animali addomesticati di qualsiasi dei precedenti, così come animali in cattività quali animali da zoo, e sono preferibilmente mammiferi. I mammiferi nel contesto della presente invenzione includono, ma senza limitazione, l’uomo, primati diversi dall’uomo, mammiferi addomesticati, quali cani, gatti, pecore, bovini, capre, maiali, cavalli ecc., mammiferi da laboratorio quali topi, ratti, conigli, cavie, ecc. così come mammiferi in cattività quali mammiferi da zoo. Il termine “soggetto” come utilizzato qui comprende anche l’uomo.

Termini quali “trasferire”, “trasfettare” o “introdurre in cellule” vengono utilizzati qui in modo intercambiabile e riguardano l’introduzione di acidi nucleici, in particolare acidi nucleici esogeni o eterologhi, in particolare RNA a singolo filamento in una cellula. Secondo la presente invenzione, la cellula può far parte di un organo, di un tessuto e/o di un organismo.

Le composizioni farmaceutiche descritte qui vengono generalmente applicate in “quantità farmaceuticamente accettabili” e in “preparazioni farmaceuticamente accettabili”. Il termine “farmaceuticamente accettabile” si riferisce alla non tossicità di un materiale che non interagisce con l’azione del/i principio/principi attivo/i della composizione farmaceutica.

Secondo la presente invenzione, la somministrazione di un acido nucleico (quale un RNA a singolo filamento) è ottenuta come acido nucleico nudo o in combinazione con uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili. Preferibilmente, la somministrazione di acidi nucleici è in forma di acidi

nucleici nudi. Preferibilmente, l'RNA viene somministrato in combinazione con sostanze stabilizzanti quali inibitori di RNasi. La presente invenzione prevede anche l'introduzione ripetuta di acidi nucleici nelle cellule per permettere l'espressione prolungata per periodi di tempo prolungati.

Le cellule possono essere trasfettate con qualsiasi eccipiente (in particolare veicolante) con cui l'RNA a singolo filamento può essere associato, per esempio, formando complessi con l'RNA a singolo filamento o formando vescicole in cui l'RNA a singolo filamento è accluso o incapsulato, risultando in una stabilità aumentata dell'RNA a singolo filamento in confronto all'RNA a singolo filamento nudo. Gli eccipienti (in particolare veicolanti) utili secondo l'invenzione includono, per esempio, veicolanti contenenti lipidi quali lipidi cationici, liposomi, in particolare liposomi cationici, e micelle, e nanoparticelle. I lipidi cationici possono formare complessi con acidi nucleici caricati negativamente. Qualsiasi lipide cationico può essere utilizzato secondo l'invenzione. Inoltre, le cellule possono essere prese da un soggetto, le cellule possono essere trasfettate con un RNA a singolo filamento o una composizione farmaceutica descritto/a qui, e le cellule trasfettate possono essere inserite nel soggetto.

Preferibilmente, l'introduzione di un RNA a singolo filamento che codifica un peptide o un polipeptide in una cellula, in particolare in una cellula presente *in vivo*, porta all'espressione del suddetto peptide o polipeptide nella cellula. In forme di realizzazione particolari, si preferisce l'indirizzamento a bersaglio degli acidi nucleici a cellule particolari. In tali forme di realizzazione, un veicolante che viene applicato per la somministrazione dell'acido nucleico a una cellula (per esempio un retrovirus o un liposoma), mostra una molecola di indirizzamento al bersaglio. Per esempio, una molecola, quale un anticorpo, che è specifica per una proteina superficiale di membrana sulla cellula bersaglio o un ligando per un recettore sulla cellula bersaglio può essere incorporata nel veicolante dell'acido nucleico o può essere legata ad esso. Nel caso in cui l'acido nucleico venga somministrato mediante liposomi, possono essere incorporate nella formulazione liposomiale proteine che si legano a una proteina superficiale di membrana che è associata all'endocitosi allo scopo di permettere l'indirizzamento a bersaglio e/o l'assorbimento. Tali proteine comprendono proteine del capsido o loro frammenti che sono specifici per un tipo cellulare particolare, anticorpi contro proteine che sono internalizzate, proteine che sono dirette verso una posizione intracellulare, ecc.

Il termine "eccipiente" quando utilizzato qui è inteso indicare tutte le sostanze in una composizione farmaceutica che non sono principi attivi (per esempio che sono componenti terapeuticamente non attivi che non mostrano alcun effetto terapeutico nella quantità/concentrazione utilizzata) quali, per esempio, sali, veicolanti, leganti, lubrificanti, addensanti, tensioattivi, agenti disperdenti, conservanti, emulsionanti, agenti tamponanti, agenti umettanti, agenti aromatizzanti, coloranti, agenti stabilizzanti (quali inibitori di RNasi) o antiossidanti, tutti i quali sono preferibilmente farmaceuticamente accettabili.

I “sali farmaceuticamente accettabili” comprendono, per esempio, sali da addizione di acidi che, per esempio, possono essere formati utilizzando un acido farmaceuticamente accettabile quale acido cloridrico, acido solforico, acido fumarico, acido maleico, acido succinico, acido acetico, acido benzoico, acido citrico, acido tartarico, acido carbonico oppure acido fosforico. Inoltre, i sali farmaceuticamente accettabili adatti possono includere sali di metalli alcalini (per esempio sali di sodio o di potassio); sali di metalli alcalino terrosi (per esempio sali di calcio o magnesio); ammonio (NH_4^+); e sali formati con leganti organici adatti (per esempio ammonio quaternario e cationi amminici formati utilizzando controanioni quali alogenuro, idrossido, carbossilato, solfato, fosfato, nitrato, solfonato alchilico ed arilsolfonato). Gli esempi illustrativi dei sali farmaceuticamente accettabili includono, ma non sono limitati a, acetato, adipato, alginato, arginato, ascorbato, aspartato, benzensolfonato, benzoato, bicarbonato, bisolfato, bitartrato, borato, bromuro, butirrato, calcio edetato, canforato, canfosolfonato, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, clavulanato, ciclopentanpropionato, digluconato, dicloridrato, dodecilsolfato, edetato, edisilato, estolato, esilato, etansolfonato, formiato, fumarato, galattato, galatturonato, gluceptato, glucoeptonato, gluconato, glutammato, glicerofosfato, glicolilarsanilato, emisolfato, eptanoato, esanoato, esilresorcinato, idrabamina, bromidrato, cloridrato, iodidrato, 2-idrossietansolfonato, idrossinaftoato, ioduro, isobutirrato, isotionato, lattato, lattobionato, laurato, laurilsolfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metansolfonato, metilsolfato, mucato, 2-naftalensolfonato, napsilato, nicotinato, nitrato, sale di N-metilglucammina d'ammonio, oleato, ossalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, pectinato, persolfato, 3-fenilpropionato, fosfato/difosfato, ftalato, picrato, pivalato, poligalatturonato, propionato, salicilato, stearato, solfato, suberato, succinato, tannato, tartrato, teoclato, tosilato, triioduro, undecanoato, valerato, e simili (si veda, per esempio, S. M. Berge et al., “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci., 66, p. 1-19 (1977)). I sali che non sono farmaceuticamente accettabili possono essere utilizzati per preparare i sali farmaceuticamente accettabili e sono inclusi nell'invenzione.

Le composizioni descritte qui possono comprendere un veicolante farmaceuticamente accettabile. Come utilizzato qui, “veicolante farmaceuticamente accettabile” comprende qualsiasi e tutti i solventi, i mezzi di dispersione, i rivestimenti, gli agenti isotonici e ritardanti l'assorbimento, e simili che sono fisiologicamente compatibili. Il “veicolante farmaceuticamente accettabile” può avere la forma di solido, semisolido, liquido, o loro combinazioni.

I veicolanti farmaceuticamente accettabili includono soluzioni o dispersioni acquose sterili, soluzioni non acquose sterili o dispersioni e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o di dispersioni iniettabili sterili. L'uso di tali mezzi e agenti per principi farmaceuticamente attivi è noto nell'arte. Eccetto nel caso in cui qualsiasi mezzo o agente convenzionale sia incompatibile con il principio attivo, il suo uso nelle composizioni farmaceutiche descritte qui è contemplato. I veicolanti farmaceuticamente accettabili tipici per una formulazione iniettabile includono

acqua, una soluzione salina isotonica tamponata (per esempio Ringer o lattato di Ringer), etanolo, polioli (per esempio glicerolo), polialchilenglicoli (per esempio propilenglicole e polietilenglicole liquido), naftaleni idrogenati, e, in particolare, polimeri di lattide biocompatibili (per esempio copolimeri di lattide/glicolide o copolimeri di poliossietilene/poliossipropilene).

Gli esempi di antiossidanti farmaceuticamente accettabili includono: (1) antiossidanti idrosolubili, quali acido ascorbico, cloridrato di cisteina, bisolfato di sodio, metabisolfito di sodio, solfito di sodio, e simili; (2) antiossidanti solubili in olio, quali palmitato di ascorbilo, butilidrossianisolo (BHA), butilidrossitoluene (BHT), lecitina, gallato di propile, alfa-tocoferolo, e simili; e (3) metalli chelanti, quali acido citrico, acido etilendiamminotetracetico (EDTA), sorbitolo, acido tartarico, acido fosforico, e simili.

Gli agenti tamponanti adatti per l'uso nelle composizioni farmaceutiche descritte qui includono acido acetico in un sale, acido citrico in un sale, acido borico in un sale e acido fosforico in un sale.

I conservanti adatti per l'uso nelle composizioni farmaceutiche descritte qui includono vari agenti antibatterici e antifungini, quali cloruro di benzalconio, clorobutanolo, parabene, acido sorbico, e timerosal. La prevenzione della presenza di microrganismi può anche essere assicurata mediante procedure di sterilizzazione (per esempio filtrazione per sterilizzazione, in particolare microfiltrazione per sterilizzazione).

La composizione farmaceutica descritta qui può essere somministrata a un individuo mediante qualsiasi via, preferibilmente per via parenterale. Le espressioni "somministrazione parenterale" e "somministrato per via parenterale" come utilizzate qui significano modalità di somministrazione diverse dalla somministrazione enterale ("somministrazione enterale" e "somministrato per via enterale" come utilizzati qui significano che il farmaco somministrato è assorbito dallo stomaco e/o dall'intestino). La somministrazione parenterale è solitamente per iniezione e/o infusione e include, senza limitazione, la somministrazione endovenosa, intramuscolare, endoarteriosa, intratecale, intracapsulare, intraossea, intraorbitale, intracardiaca, intradermica, intraperitoneale, transtracheale, sottocutanea, subcuticolare, intr articolare, subcapsulare, intracerebrale, intracerebroventricolare, subaracnoidea, intraspinale, epidurale, intrasternale, e topica.

L'RNA a singolo filamento o la composizione farmaceutica descritto/a qui può essere somministrato/a mediante una varietà di procedimenti noti nell'arte. Come sarà compreso da parte del tecnico esperto, la via e/o la modalità di somministrazione varieranno in relazione ai risultati desiderati.

I principi attivi (cioè l'RNA a singolo filamento descritto qui e facoltativamente uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi) possono essere preparati con veicolanti che proteggeranno i composti nei confronti del rilascio rapido, quale una formulazione a rilascio controllato, compresi impianti, cerotti transdermici, e sistemi di rilascio microincapsulati. Possono essere utilizzati polimeri biodegradabili biocompatibili, quali etilene e vinilacetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri, e acido polilattico. I procedimenti per la preparazione di tali formulazioni

sono generalmente noti a coloro che sono esperti nell'arte. Si veda, per esempio, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, a cura di J. R. Robinson., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Per somministrare il principio attivo (cioè l'RNA a singolo filamento descritto qui e facoltativamente uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi) mediante certe vie di somministrazione, può essere necessario ricoprire il principio attivo con, o co-somministrare il composto con, un materiale per prevenire la sua inattivazione e/o incrementare l'efficacia del principio attivo (in particolare l'RNA a singolo filamento descritto qui) da tradurre. Per esempio, il principio attivo può essere somministrato a un individuo in un veicolante appropriato, per esempio, in veicolanti contenenti lipidi (in particolare lipidi cationici), liposomi (quali emulsioni di CGF acqua in olio in acqua così come liposomi convenzionali (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7: 27 (1984)), in particolare liposomi cationici), micelle, nanoparticelle in cui l'RNA a singolo filamento è accluso o incapsulato, o un diluente. I diluenti farmaceuticamente accettabili includono soluzione salina e soluzioni acquose tamponate.

Le composizioni farmaceutiche tipicamente devono essere sterili e stabili nelle condizioni di produzione e di conservazione. La composizione può essere formulata come soluzione, microemulsione, liposoma, o altra struttura ordinata adatta alla concentrazione elevata di farmaco. Il veicolante può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, un poliolo (per esempio glicerolo, propilenglicole e polietilenglicole liquido, e simili), loro miscele adatte, oli vegetali, quale olio d'oliva, ed esteri organici iniettabili, quale oleato di etile. La fluidità opportuna può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un materiale di rivestimento quale lecitina, mediante il mantenimento della granulometria richiesta nel caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. In molti casi, sarà preferibile includere agenti isotonici, per esempio, zuccheri, polialcoli quali mannitolo, sorbitolo, o cloruro di sodio nella composizione farmaceutica. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere veicolato comprendendo nella composizione un agente che ritarda l'assorbimento, per esempio, sali di monostearato e gelatina.

In generale, le dispersioni vengono preparate incorporando il principio attivo in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione basico e gli altri componenti richiesti da quelli elencati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i procedimenti di preparazione preferiti sono l'essiccamento sottovuoto e il crioesiccamento (liofilizzazione) che forniscono una polvere del principio attivo oltre a qualsiasi ulteriore ingrediente desiderato da una loro soluzione sterile filtrata precedentemente.

I regimi di trattamento vengono regolati per fornire la risposta ottimale desiderata (per esempio una risposta terapeutica). Per esempio, può essere somministrato un singolo bolo, diverse dosi suddivise possono essere somministrate nel tempo o la dose può essere ridotta o aumentata in proporzione come indicato dalle esigenze della situazione terapeutica. È specialmente vantaggioso formulare le composizioni farmaceutiche in

forma di dosaggio unitario per facilità di somministrazione e per uniformità di dosaggio. La forma di dosaggio unitario come utilizzata qui si riferisce a unità fisicamente separate adatte come dosaggi unitari per gli individui da trattare; ciascuna unità contiene una quantità predeterminata di principio attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in associazione con il veicolante farmaceutico richiesto. La descrizione per le forme di dosaggio unitario qui descritte è dettata da e direttamente dipendente da (a) le caratteristiche uniche del principio attivo e il particolare effetto terapeutico da ottenere, e (b) le limitazioni intrinseche nell'arte del miscelare un tale principio attivo per il trattamento della sensibilità negli individui. La quantità di principio attivo (in particolare, la quantità di RNA a singolo filamento) che può essere combinata con un materiale veicolante per produrre una composizione farmaceutica (quale una forma di dosaggio singola) varierà in relazione all'individuo che viene trattato, e alla particolare modalità di somministrazione. La quantità di principio attivo che può essere combinata con un materiale veicolante per produrre una forma monodose sarà in generale quella quantità della composizione che produce un effetto terapeutico.

In generale, sul 100% (per le formulazioni/composizioni farmaceutiche), la quantità di principio attivo (in particolare, la quantità dell'RNA a singolo filamento descritto qui, facoltativamente insieme a uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi, se presenti nelle formulazioni/composizioni farmaceutiche) varierà da circa lo 0,01% a circa il 99%, preferibilmente da circa lo 0,1% a circa il 70%, il più preferibilmente da circa l'1% a circa il 30%, in cui il resto è preferibilmente costituito dell'uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili.

La quantità di principio attivo, per esempio, di un RNA a singolo filamento descritto qui, in una forma di dosaggio unitario e/o quando somministrato a un individuo o utilizzato in terapia, può variare da circa 0,001 mg a circa 1.000 mg (per esempio da circa 0,01 mg a circa 500 mg, da circa 0,1 mg a circa 100 mg quale da circa 1 mg a circa 50 mg) per unità, somministrazione o terapia. In alcune forme di realizzazione, una quantità adatta di tale principio attivo può essere calcolata utilizzando la massa o l'area di superficie corporea dell'individuo, comprese quantità tra circa 0,1 mg/kg e 10 mg/kg (quale tra circa 0,2 mg/kg e 5 mg/kg), o tra circa 0,1 mg/m² e circa 400 mg/m² (quale tra circa 0,3 mg/m² e circa 350 mg/m² o tra circa 1 mg/m² e circa 200 mg/m²).

Indipendentemente dalla via di somministrazione selezionata, i principi attivi (cioè l'RNA a singolo filamento e facoltativamente uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi), che possono essere utilizzati in una forma idratata adatta, e/o le composizioni farmaceutiche descritte qui, vengono formulati/e in forme di dosaggio farmaceuticamente accettabili mediante procedimenti convenzionali noti a coloro che sono esperti nell'arte (si confrontino, per esempio, Remington, "The Science and Practice of Pharmacy" a cura di Allen, Loyd V., Jr., ventiduesima edizione, Pharmaceutical Sciences, settembre 2012; Ansel et al., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", settima edizione, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999).

I livelli di dosaggio effettivi dei principi attivi nelle composizioni farmaceutiche descritte qui possono essere variati in modo tale da ottenere una quantità del principio attivo che è efficace per ottenere la risposta terapeutica desiderata per un paziente, una composizione, e una modalità di somministrazione particolari, senza essere tossica per il paziente. Il livello di dosaggio scelto dipenderà da una varietà di fattori farmacocinetici comprendenti l'attività delle particolari composizioni descritte qui impiegate, la via di somministrazione, il tempo di somministrazione, la velocità di escrezione del particolare principio attivo che viene impiegato, la durata del trattamento, altri farmaci, composti e/o materiali utilizzati in combinazione con le particolari composizioni impiegate, l'età, il sesso, il peso, la condizione, la salute generale e l'anamnesi precedente del paziente che viene trattato, e fattori simili ben noti nell'arte medica.

Un medico o un veterinario aventi abilità ordinaria nell'arte possono determinare e prescrivere facilmente la quantità efficace della composizione farmaceutica richiesta. Per esempio, il medico o il veterinario potrebbe cominciare con dosi dei principi attivi impiegate nella composizione farmaceutica a livelli inferiori di quelle richieste allo scopo di ottenere l'effetto terapeutico desiderato, e incrementare gradualmente il dosaggio fino ad ottenere l'effetto desiderato. In generale, una dose giornaliera adatta di una composizione farmaceutica descritta qui sarà quella quantità del principio attivo che è la minore dose efficace per produrre un effetto terapeutico. Tale dose efficace dipenderà in generale dai fattori descritti sopra. Si preferisce che la somministrazione sia parenterale, quale endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, o sottocutanea, preferibilmente somministrata in modo prossimale al sito del bersaglio. La somministrazione può anche essere intratumorale. Se si desidera, la dose giornaliera efficace di una composizione farmaceutica può essere somministrata come due, tre, quattro, cinque, sei o più sottodosi somministrate separatamente a intervalli appropriati durante tutto il giorno, facoltativamente, in forme di dosaggio unitario. Anche se è possibile somministrare un principio attivo (in particolare un RNA a singolo filamento) descritto qui da solo, si preferisce somministrare il principio attivo come formulazione/composizione farmaceutica.

In una forma di realizzazione, l'RNA a singolo filamento o le composizioni farmaceutiche descritti qui possono essere somministrati mediante infusione, preferibilmente un'infusione lenta continua per un periodo lungo, quale superiore a 24 ore, allo scopo di ridurre gli effetti collaterali tossici. La somministrazione può essere eseguita anche mediante infusione continua nell'arco da 2 a 24 ore, quale da 2 a 12 ore. Tale regime può essere ripetuto una o più volte come necessario, per esempio, dopo 6 mesi o 12 mesi.

La composizione farmaceutica descritta qui può essere formulata per la somministrazione parenterale mediante iniezione, per esempio, mediante l'iniezione in bolo o mediante l'infusione continua. Le formulazioni per iniezione possono essere presentate nella forma di dosaggio unitario (per esempio in fiala, in contenitore multi-dose), e con l'aggiunta di un conservante. La composizione farmaceutica descritta qui può prendere forme

quali sospensioni, soluzioni oppure emulsioni in veicoli oleosi o acquosi e può contenere agenti di formulazione quali agenti sospendenti, stabilizzanti, oppure disperdenti. In alternativa, l'agente può avere la forma di polvere per la ricostituzione con un veicolo adatto (per esempio acqua sterile priva di pirogeni) prima dell'uso. Tipicamente, le composizioni farmaceutiche per somministrazione endovenosa sono soluzioni in tampone acquoso isotonico sterile. Dove necessario, la composizione farmaceutica può anche comprendere un agente solubilizzante e un anestetico locale quale lignocaina per lenire il dolore al sito dell'iniezione. Generalmente, i componenti vengono forniti separatamente o miscelati insieme in forma di dosaggio unitario per esempio, come polvere essiccata liofilizzata o come concentrato privo d'acqua in un contenitore sigillato ermeticamente quale una fiala o una bustina indicante la quantità di principio attivo. Dove la composizione farmaceutica deve essere somministrata mediante infusione, essa può essere distribuita con una bottiglia da infusione contenente acqua o soluzione salina sterile di grado farmaceutico. Nel caso in cui la composizione venga somministrata per iniezione, può essere fornita una fiala d'acqua per iniezioni o di soluzione salina sterile così che i componenti possano essere miscelati prima della somministrazione.

Le composizioni farmaceutiche possono essere somministrate con dispositivi medici noti nell'arte. Per esempio, in una forma di realizzazione preferita, una composizione farmaceutica descritta qui può essere somministrata con un dispositivo di iniezione ipodermica senza ago, quali i dispositivi descritti in US 5,399,163; US 5,383,851; US 5,312,335; US 5,064,413; US 4,941,880; US 4,790,824; o US 4,596,556. Gli esempi di impianti e moduli ben noti utili nella presente descrizione includono quelli descritti in: US 4,487,603, che descrive una pompa per microinfusione impiantabile per dispensare un medicamento a una velocità controllata; US 4,486,194, che descrive un dispositivo terapeutico per somministrare medicinali attraverso la pelle; US 4,447,233, che descrive una pompa per infusione di un medicamento per rilasciare un medicamento a una velocità di infusione precisa; US 4,447,224, che descrive un apparecchio per infusione impiantabile a flusso variabile per il rilascio continuo del farmaco; US 4,439,196, che descrive un sistema di rilascio osmotico di farmaci avente compartimenti a camere multiple; e US 4,475,916, che descrive un sistema di rilascio osmotico di farmaci.

Molti altri impianti, sistemi di rilascio, e moduli simili sono noti a coloro che sono esperti nell'arte. In alcune forme di realizzazione, l'RNA a singolo filamento o le composizioni farmaceutiche descritti qui possono essere formulati per garantire una distribuzione opportuna *in vivo*. Per esempio, la barriera ematoencefalica (BEE) esclude molti composti altamente idrofilici. Per garantire che l'RNA a singolo filamento o le composizioni farmaceutiche descritti qui attraversino la BEE (se desiderato), essi possono essere formulati, per esempio, in liposomi. Per i procedimenti di preparazione dei liposomi, si vedano, per esempio, US 4,522,811; US 5,374,548; e US 5,399,331. I liposomi possono comprendere uno o più gruppi funzionali che vengono trasportati selettivamente in cellule o in organi specifici, e così aumentano il rilascio del farmaco

indirizzato a bersaglio (si veda, per esempio, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). I gruppi funzionali di indirizzamento a bersaglio esemplificativi includono folato o biotina (si veda, per esempio, US 5,416,016 di Low et al.); mannosidi (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticorpi (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); e recettore della proteina A del surfattante (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134).

L'RNA a singolo filamento descritto qui può essere formulato in liposomi. In una forma di realizzazione più preferita, i liposomi includono un gruppo funzionale di indirizzamento a bersaglio. In una forma di realizzazione più preferita, l'RNA a singolo filamento nei liposomi viene rilasciato mediante iniezione in bolo a un sito prossimale all'area desiderata. Tale composizione a base di liposomi dovrebbe essere fluida al grado in cui esista una facile applicazione con una siringa, dovrebbe essere stabile nelle condizioni di produzione e di conservazione e dovrebbe essere preservata nei confronti dell'azione contaminante di microrganismi quali batteri e funghi.

Un "dosaggio terapeuticamente efficace" per il trattamento può essere misurato mediante risposte obiettive che possono essere complete o parziali. Una risposta completa (CR) viene definita come nessuna prova clinica, radiologica o altra prova di una condizione, un disturbo o una malattia. Una risposta parziale (PR) risulta da una riduzione nella malattia maggiore del 50%. Il tempo medio di progressione è una misura che caratterizza la durevolezza della risposta oggettiva.

Un "dosaggio terapeuticamente efficace" per il trattamento può anche essere misurato mediante la sua capacità di stabilizzare la progressione di una condizione, un disturbo o una malattia, per esempio, utilizzando sistemi di modelli animali e/o saggi *in vitro* appropriati noti alla persona esperta. Una quantità terapeuticamente efficace di un principio attivo si riferisce alla quantità che ottiene una reazione desiderata o un effetto desiderato da sola o insieme ad ulteriori dosi. Nel caso del trattamento di una malattia particolare o di una condizione particolare, la reazione desiderata riguarda preferibilmente l'inibizione del decorso della malattia. Questo comprende il rallentamento della progressione della malattia e, in particolare, l'interruzione o l'inversione della progressione della malattia. La reazione desiderata in un trattamento di una malattia o di una condizione può anche essere il ritardo della comparsa o una prevenzione della comparsa della suddetta malattia o della suddetta condizione. Così, una quantità terapeuticamente efficace di un principio attivo può curare, guarire, alleviare, attenuare, modificare, risolvere, migliorare, ottimizzare o influenzare la condizione, il disturbo o la malattia o i sintomi della condizione, del disturbo o della malattia o la predisposizione verso la condizione, il disturbo o la malattia in un individuo. Una persona esperta nell'arte sarebbe in grado di determinare tali quantità sulla base di fattori quali la malattia, il disturbo o la condizione da trattare, la gravità della malattia, del disturbo o della condizione, i parametri degli individui da trattare (compresi età, condizione fisiologica, dimensione e peso), la durata del trattamento, il tipo di terapia di accompagnamento (se presente), la specifica via di

somministrazione e fattori simili. Conseguentemente, le dosi somministrate dei principi attivi descritti qui possono dipendere da vari parametri tra questi. Nel caso in cui una reazione in un individuo/paziente sia insufficiente con una dose iniziale, possono essere utilizzate dosi più elevate (o dosi efficacemente più elevate ottenute attraverso una via di somministrazione differente, più localizzata).

La composizione farmaceutica descritta qui può assumere la forma di una preparazione di vaccino comprendente l'RNA a singolo filamento descritto qui e almeno un antigene quale un antigene come discusso sopra o un suo frammento (in particolare un suo frammento immunogenico), o un acido nucleico, in particolare un RNA, codificante il suddetto antigene o un frammento.

La composizione farmaceutica descritta qui può anche, se si desidera, essere presentata in una confezione, un kit o un dispositivo dosatore che può contenere una o più forme di dosaggio unitario contenenti il principio attivo (cioè l'RNA a singolo filamento e facoltativamente uno o più composti attivi ulteriori/aggiuntivi). La confezione può comprendere, per esempio, un foglio di metallo o di plastica, quale una confezione blister. La confezione, il kit o il dispositivo dosatore può essere accompagnata/o dalle istruzioni per la somministrazione.

L'uno o i più composti attivi ulteriori/aggiuntivi possono comprendere un agente immunomodulatore quale anti-CTL-A4 o anti-PD1 o anti-PDL1 o reagenti anti-linfociti T regolatori quali un anticorpo anti-CD25 o ciclofosfamide.

Le composizioni farmaceutiche descritte qui possono essere somministrate insieme a sostanze supplementari che potenziano l'immunità, quali uno o più adiuvanti, e possono comprendere una o più sostanze che potenziano l'immunità per incrementare ulteriormente la loro efficacia, preferibilmente per raggiungere un effetto sinergico di immunostimolazione.

Il termine "adiuvante" riguarda composti che prolungano o aumentano o accelerano una risposta immunitaria. A tal riguardo sono possibili diversi meccanismi, in relazione ai vari tipi di adiuvanti. Per esempio, i composti che permettono la maturazione delle DC, per esempio i lipopolisaccaridi o il ligando di CD40, formano una prima classe di adiuvanti adatti. Generalmente, qualsiasi agente che influenza il sistema immunitario del tipo di un "segnale di pericolo" (LPS, GP96, RNA a doppio filamento ecc.) o citochine, quale GM-CSF, può essere utilizzato come adiuvante che fa sì che una risposta immunitaria sia intensificata e/o influenzata in un modo controllato. Possono facoltativamente anche essere utilizzati oligodeossinucleotidi CpG in questo contesto, sebbene i loro effetti collaterali che si presentano in certe circostanze, come spiegato sopra, debbano essere considerati. Nel caso in cui l'RNA a singolo filamento (preferibilmente l'mRNA) descritto qui in una forma di realizzazione possa codificare un agente immunostimolante e il suddetto agente immunostimolante codificato dal suddetto RNA a singolo filamento debba agire come immunostimolante primario, tuttavia, è necessaria solo una quantità relativamente piccola di DNA con CpG (in confronto all'immunostimolazione con solo DNA con CpG). Gli adiuvanti particolarmente preferiti sono citochine, quali monochine, linfocine, interleuchine o chemochine, per

esempio IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, LT- α , o fattori di crescita, per esempio hGH.

Anche i lipopeptidi, quale Pam3Cys, sono adatti per l'uso come adiuvanti nelle composizioni farmaceutiche descritte qui.

Il trattamento può essere fornito a casa, nell'ufficio del medico, in clinica, nel reparto ambulatoriale di un ospedale, o in un ospedale. Il trattamento in generale comincia sotto sorveglianza medica così che il personale medico possa osservare gli effetti del trattamento strettamente e fare qualsiasi regolazione che sia richiesta. La durata del trattamento dipende dall'età e dalla condizione del paziente, così come da come il paziente risponde al trattamento.

Una persona avente un maggior rischio di sviluppare una condizione, un disturbo o una malattia può ricevere il trattamento profilattico per inibire o per ritardare i sintomi della condizione, del disturbo o della malattia.

Il termine "trattamento" è noto alla persona di abilità ordinaria, e comprende l'applicazione o la somministrazione di un principio attivo (per esempio una composizione farmaceutica comprendente il suddetto principio attivo) o di una procedura a un individuo/paziente o l'applicazione o la somministrazione di un principio attivo (per esempio una composizione farmaceutica comprendente il suddetto principio attivo) o di una procedura a una cellula, una coltura cellulare, una linea cellulare, un campione, un tessuto oppure un organo isolato da un soggetto, che ha una condizione, un disturbo o una malattia, un sintomo della condizione, del disturbo o della malattia o una predisposizione verso una condizione, un disturbo o una malattia, allo scopo di curare, guarire, alleviare, attenuare, modificare, risolvere, migliorare, ottimizzare, influenzare o impedire la condizione, il disturbo o la malattia, i sintomi della condizione, del disturbo o della malattia o la predisposizione verso la condizione, il disturbo o la malattia (per esempio prevenire o eliminare una malattia, compresa la riduzione della dimensione di un tumore o del numero di tumori in un soggetto; arrestare o rallentare una malattia in un soggetto; inibire o rallentare lo sviluppo di una nuova malattia in un soggetto; diminuire la frequenza o la gravità dei sintomi e/o delle recidive in un soggetto che attualmente ha o che precedentemente ha avuto una malattia; e/o prolungare, cioè incrementare la durata della vita del soggetto). In particolare, il termine "trattamento di una malattia" comprende curare, ridurre la durata, migliorare, prevenire, rallentare o inibire la progressione o il peggioramento, o prevenire o ritardare la comparsa di una malattia o dei suoi sintomi. Quindi, il termine "trattamento" può includere il trattamento profilattico di una condizione, un disturbo o una malattia, o il sintomo di una condizione, un disturbo o una malattia. Un principio attivo, quando utilizzato nel trattamento, comprende l'RNA a singolo filamento descritto qui così come l'uno o i più composti attivi ulteriori/aggiuntivi descritti qui e include, ma senza limitazione, altri composti terapeuticamente attivi che possono essere piccole molecole, peptidi, peptidomimetici, polipeptidi/proteine, anticorpi, altri polinucleotidi quali DNA o RNA a doppio filamento, cellule, virus, ribozimi, ed oligonucleotidi antisense.

La presente invenzione viene illustrata dagli esempi seguenti che mostrano forme di realizzazione preferite dell'invenzione e non dovrebbero essere interpretati come limitanti l'ambito della presente invenzione come definita nelle rivendicazioni. Quegli esempi che non sono coperti dalle rivendicazioni successive vengono forniti solo per scopi comparativi.

ESEMPI

Abbreviazioni

EtOH:	etanolo
h:	ora/e
hPa:	ettopascal
min:	minuto/i
mM:	millimolare (10^{-3} mol/l)
MPa:	megapascal
nt:	nucleotide/i
sec:	secondo/i
v/v:	% in volume

Procedure sperimentali

Purificazione mediante cellulosa dell'RNA IVT

Se non indicato diversamente, polvere di cellulosa consistente di fibre di dimensione media (Sigma-Aldrich, numero di catalogo #C6288) e tampone STE 1x (TRIS 10mM, pH 7,0, NaCl 50mM, EDTA 20mM) sono stati utilizzati per le procedure di purificazione. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati a temperatura ambiente.

Procedura di purificazione "negativa"

La procedura di purificazione "negativa" è basata sull'incubazione di RNA IVT con cellulosa in tampone STE 1x contenente EtOH al 16%. Questa condizione permette il legame selettivo dell'RNA a doppio filamento alla cellulosa mentre l'RNA a singolo filamento rimane nella frazione solubile.

La cellulosa è stata prima sospesa in tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH a una concentrazione di 0,2 g di cellulosa/ml e incubata per

10 minuti in agitazione vigorosa. Dopo la centrifugazione per 5 minuti a 4.000 x g, la cellulosa è stata risospesa in tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH a una concentrazione di 0,2 g di cellulosa/ml (cellulosa lavata).

Per gli esperimenti di precipitazione, 500 µl di impasto di cellulosa lavata sono stati trasferiti in una provetta da 1,5 ml e centrifugati per 5 minuti a 14.000 x g. Dopo la rimozione del sumatante, 50 µg di RNA IVT in 100 µl di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH sono stati aggiunti alla cellulosa e incubati per 15 minuti in agitazione vigorosa. Dopo la centrifugazione per 5 minuti a 14.000 x g, il sumatante è stato rimosso e gli acidi nucleici sono stati fatti precipitare. La cellulosa è stata quindi incubata per 15 minuti con 100 µl di tampone STE 1x non contenente EtOH in agitazione vigorosa per rilasciare gli acidi nucleici legati. Dopo la centrifugazione per 5 minuti a 14.000 x g, il sumatante è stato rimosso e gli acidi nucleici eluiti sono stati fatti precipitare.

Per la purificazione mediante cellulosa utilizzando colonne da microcentrifuga (NucleoSpin Filters, Macherey-Nagel, numero di catalogo #740606), 600 µl di impasto di cellulosa prelavata (0,12 g di cellulosa) sono stati trasferiti a una colonna per centrifuga e centrifugati per 60 secondi a 14.000 x g. Il primo eluato è stato eliminato e 500 µl di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH sono stati aggiunti alla colonna per centrifuga e incubati per 5 minuti in agitazione vigorosa per risospesare la cellulosa. Dopo la centrifugazione per 60 secondi a 14.000 x g, il primo eluato è stato eliminato e l'RNA IVT (50-500 µg) in 300-500 µl di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH è stato aggiunto alla colonna per centrifuga e incubato per 20 minuti in agitazione vigorosa per risospesare la cellulosa. La colonna per centrifuga è stata quindi centrifugata per 60 secondi a 14.000 x g e il primo eluato è stato raccolto per la precipitazione degli acidi nucleici. Quando sono stati eseguiti cicli multipli di purificazione mediante cellulosa, il primo eluato è stato direttamente trasferito a una colonna da centrifuga con cellulosa preparata di fresco e la procedura è stata ripetuta. Infine, aggiungendo 300-500 µl di tampone STE 1x, gli acidi nucleici legati alla cellulosa sono stati rilasciati durante l'incubazione per 20 minuti in agitazione vigorosa e sotto centrifugazione della colonna per centrifuga per 60 secondi a 14.000 x g.

L'aumento in scala del procedimento di purificazione è stato eseguito in provette da 50 ml utilizzando 1,5 g di cellulosa e 5 mg di RNA IVT in 15 ml di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH. L'RNA è stato aggiunto alla cellulosa secca e incubato in agitazione magnetica per 30 minuti. Gli acidi nucleici non legati sono stati recuperati mediante filtrazione utilizzando un dispositivo di filtro a vuoto monouso (Steriflip-HV, dimensione dei pori di 0,45 µm, PVDF, Merck Chemicals GmbH/ Millipore, numero di catalogo #SE1M003M00). Dove indicato, il filtrato è stato utilizzato per un secondo ciclo di purificazione aggiungendo 1,5 g di cellulosa fresca e ripetendo il processo. Infine, gli acidi nucleici nel filtrato sono stati fatti precipitare aggiungendo un volume uguale di isopropanolo.

Procedura di purificazione "positiva"

Il principio della procedura di purificazione “positiva” è il legare prima tutti gli RNA alla cellulosa mediante l’incubazione dell’RNA IVT con la cellulosa in tampone STE 1x contenente EtOH al 40%. In un secondo passaggio, l’RNA a singolo filamento viene selettivamente rilasciato mediante incubazione in tampone STE 1x contenente EtOH al 16%, mentre in queste condizioni l’RNA a doppio filamento rimane legato alle fibre di cellulosa.

Prima dell’uso, la cellulosa è stata sospesa in tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH a una concentrazione di 0,2 g di cellulosa/ml e incubata per 10 minuti in agitazione vigorosa. Dopo la centrifugazione per 5 minuti a 4.000 x g, la cellulosa è stata risospesa in tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH a una concentrazione di 0,2 g di cellulosa/ml (cellulosa lavata).

Per la purificazione mediante cellulosa utilizzando colonne da microcentrifuga (NucleoSpin Filters, Macherey-Nagel, numero di catalogo #740606), 600 µl di impasto di cellulosa lavata (0,12 g di cellulosa) sono stati trasferiti a una colonna per centrifuga e centrifugati per 60 secondi a 14.000 x g. Il primo eluato è stato eliminato e 500 µl di tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH sono stati aggiunti alla colonna per centrifuga e incubati per 5 minuti in agitazione vigorosa per risospendere la cellulosa. Dopo la centrifugazione a 14.000 x g per 60 secondi, il primo eluato è stato eliminato e l’RNA IVT (50-500 µg) in 300-500 µl di tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH è stato aggiunto alla colonna per centrifuga e incubato per 20 minuti in agitazione vigorosa per risospendere la cellulosa. La colonna per centrifuga è stata quindi centrifugata a 14.000 x g per 60 secondi e il primo eluato è stato raccolto per la precipitazione degli acidi nucleici. Aggiungendo 300-500 µl di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH, l’RNA a singolo filamento è stato rilasciato dalla cellulosa durante l’incubazione per 20 minuti in agitazione vigorosa e sotto centrifugazione della colonna per centrifuga per 60 secondi a 14.000 x g. Quando sono stati eseguiti cicli multipli di purificazione mediante cellulosa, il primo eluato è stato direttamente trasferito a una colonna da centrifuga con cellulosa preparata di fresco e la procedura è stata ripetuta. Infine, aggiungendo 300-500 µl di tampone STE 1x, gli acidi nucleici legati alla cellulosa sono stati rilasciati durante l’incubazione per 20 minuti in agitazione vigorosa e sotto centrifugazione della colonna per centrifuga per 60 secondi a 14.000 x g.

Per l’FPLC utilizzando la cellulosa come fase stazionaria, prima è stato preparato un impasto di cellulosa (0,2 g/ml) in tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH e mantenuto in agitazione per 30 minuti. 20 ml di questo impasto (4 g di cellulosa) sono stati utilizzati per impaccare una colonna XK 16/20 (GE Healthcare Life Sciences, numero di catalogo #28-9889-37). Il letto della colonna aveva un’altezza finale di circa 5 cm. La cromatografia è stata eseguita utilizzando un sistema AKTA Avant 25 (GE Healthcare Life Sciences) e monitorando l’assorbanza UV (260 nm). Come tampone di legame, è stato utilizzato il tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH (tampone B) e come tampone di eluizione il tampone STE 1x (tampone A). La colonna è stata equilibrata per 15 minuti con il tampone B al 100% a una velocità di flusso di 2 ml/minuto. Dopo

l'iniezione di 500 µg di RNA (volume del campione: 500 µl) la velocità di flusso è stata ridotta a 1 ml/min per 40 minuti. L'RNA a singolo filamento è stato eluito utilizzando il tampone B al 40% (EtOH al 16% (v/v)) per 40 minuti a una velocità di flusso di 2 ml/minuto. Infine, variando la composizione del tampone allo 0% di tampone B (EtOH allo 0%) l'RNA a doppio filamento è stato eluito dalla colonna. I picchi cromatografici sono stati raccolti e gli acidi nucleici sono stati fatti precipitare per ulteriori analisi.

Precipitazione con isopropanolo di acidi nucleici

L'RNA ottenuto dalle purificazioni mediante cellulosa è stato fatto precipitare aggiungendo 0,1 volumi di acetato di sodio 3M (pH 4,0) e 1 volume di isopropanolo. Dopo averli mantenuti in agitazione su Vortex, i campioni sono stati incubati per 1 ora a -20°C, cui è seguita la centrifugazione per 10 minuti a 14.000 x g. L'RNA precipitato è stato lavato con 200 µl di EtOH al 70% (v/v) raffreddato con ghiaccio, fatto essiccare all'aria e disciolto in un volume adatto di H₂O priva di nucleasi. Le concentrazioni di RNA sono state misurate spettrofotometricamente utilizzando il sistema Nanodrop (Eppendorf).

Analisi dot blot

Per determinare la quantità di RNA a doppio filamento e di contaminanti ibridi di RNA-DNA, sono state preparate diluizioni seriali di campioni di RNA con concentrazioni differenti e quantità crescenti di RNA (solitamente 40 ng, 200 ng e 1.000 ng) sono state depositate in piccoli punti (0,5 µl) su una membrana da blotting di nylon (membrana da blotting di nylon Nytran SuPerCharge (SPC) (GE Healthcare Life Sciences, numero di catalogo #10416216)). La membrana è stata quindi bloccata per 1 ora in tampone TBS-T (TRIS 20mM a pH 7,4, NaCl 137mM, TWEEN-20 allo 0,1% (v/v)) contenente il 5% (p/v) di latte scremato in polvere. Per il rilevamento dell'RNA a doppio filamento, la membrana è stata incubata per 1 ora con il mAb J2 di topo specifico per l'RNA a doppio filamento (English & Scientific Consulting, Szirák, Ungheria) diluito in un rapporto di 1:10.000 in tampone TBS-T contenente l'1% (p/v) di latte scremato in polvere. Dove indicato, il mAb di topo S9.6 specifico per gli ibridi di RNA-DNA IgG2a (KeraFAST, numero di catalogo #ENH001) diluito in un rapporto di 1:10.000 è stato utilizzato per rilevare i contaminanti ibridi di RNA-DNA. Dopo il lavaggio con TBS-T, la membrana è stata incubata per 1 ora con IgG di asino anti-topo coniugata con HRP (Jackson ImmunoResearch, numero di catalogo #715-035-150) diluita in un rapporto di 1:10.000 in tampone TBS-T contenente l'1% (p/v) di latte scremato in polvere, lavata con TBS-T e sviluppata utilizzando il reagente di rilevamento per il Western blotting Amersham ECL Prime (Fisher Scientific, numero di catalogo RPN2232) e il sistema di visualizzazione ChemiDoc MP (BIO-RAD). Dove indicato, le intensità del segnale di ibridazione sono state quantificate mediante densitometria utilizzando il programma Image Lab 5.1 (BIO-RAD).

Elettroforesi su gel di agarosio

Per monitorare l'integrità dell'RNA purificato e per verificare le quantità caricate sul dot blot, è stata utilizzata l'elettroforesi su gel di agarosio. Sono state analizzate quantità uguali di RNA (per esempio 2 µl) della diluizione seriale di RNA di 40 ng/µl preparata per il dot blot. I campioni di RNA sono stati denaturati secondo Masek et al. (Anal. Biochem. 336 (2005), 46-50) miscelando 2 µl di RNA (80 ng) con 6 µl di formammide e incubandoli per 5 minuti a 65°C prima del caricamento su un gel di agarosio all'1,4% (p/v) contenente lo 0,005% (v/v) di colorante in gel per acidi nucleici GelRed™ (Biotium Inc., numero di catalogo #41003). L'elettroforesi è stata eseguita a 100 V per 20 minuti utilizzando TAE (TRIS acetato 40mM, EDTA 1mM) come tampone di corsa, cui è seguita l'analisi delle immagini del gel utilizzando il sistema riproduttore di immagini Gel Doc™ EZ (BIO-RAD).

Esempio 1 - Precipitazione dell'RNA a doppio filamento dall'RNA IVT utilizzando cellulosa

Per verificare la fattibilità dell'applicazione di cellulosa per rimuovere i contaminanti di RNA a doppio filamento dall'RNA IVT, per prima cosa è stato eseguito un esperimento di precipitazione semplice. 50 µg di un RNA IVT modificato con N1-metil-pseudouridina (m1Ψ) di 2.500 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato mediante precipitazione con cloruro di litio (LiCl) dalla reazione di IVT, sono stati incubati con 0,1 g di cellulosa in presenza di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH. Dopo la centrifugazione, l'RNA non legato nel sumatante è stato fatto precipitare. L'RNA legato a cellulosa è stato recuperato mediante risospensione della cellulosa in STE 1x non contenente EtOH, centrifugazione e precipitazione del sumatante. Il contenuto di RNA a doppio filamento dell'RNA da entrambe le frazioni così come del materiale di RNA di partenza è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. L'integrità dell'RNA è stata monitorata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

L'analisi dot blot mostra che, rispetto all'RNA IVT di controllo non trattato, il contenuto di RNA a doppio filamento nella frazione di RNA non legato dopo l'incubazione con cellulosa è fortemente ridotto (figura 1). Questa è dovuto al legame selettivo dell'RNA a doppio filamento contaminante al materiale celluloso in presenza di EtOH al 16% (v/v) che permette la separazione dell'RNA a doppio filamento dall'RNA a singolo filamento mediante sedimentazione della cellulosa. Dopo la separazione, i contaminanti di RNA a doppio filamento possono essere rilasciati dalla cellulosa utilizzando un tampone che non contiene EtOH. Questo è confermato dimostrando quantità significative di RNA reattivo a J2 nella frazione di RNA legato (figura 1). Inoltre, l'elettroforesi dell'RNA dimostra che l'integrità dell'RNA è preservata durante questa procedura di purificazione mediante cellulosa. Questo esempio dimostra l'uso riuscito della cellulosa per rimuovere i contaminanti di RNA a doppio filamento dall'RNA IVT.

Esempio 2 - Impatto di concentrazioni differenti di EtOH sull'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento dall'RNA IVT mediante

cellulosa

In un passaggio successivo, il suddetto procedimento di purificazione (si confronti l'esempio 1) è stato adattato per utilizzare colonne da microcentrifuga per separare l'RNA non legato dalla cellulosa. Il vantaggio di questa tecnica è la rimozione completa del liquido e dunque dell'RNA non legato dalla cellulosa mediante centrifugazione. Inoltre, è stato testato se l'aumento della concentrazione di EtOH durante l'incubazione dell'RNA IVT con cellulosa fino al 18% (v/v) o al 20% (v/v) aumentasse l'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento. Innanzitutto, 50 µg di RNA IVT modificato con pseudouridina (Ψ) e incappucciato con D2 di 1.500 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato dalla reazione di IVT mediante sfere magnetiche, sono stati incubati in una colonna da microcentrifuga con 0,1 g di cellulosa in presenza di tampone STE 1x contenente EtOH al 16% (v/v), al 18% (v/v) o al 20% (v/v). Dopo la centrifugazione, l'RNA non legato è stato raccolto mediante centrifugazione della colonna e fatto precipitare. L'RNA legato a cellulosa è stato recuperato aggiungendo STE 1x non contenente EtOH alla colonna, mediante risospensione della cellulosa con agitazione vigorosa e infine mediante centrifugazione e precipitazione. Il contenuto di RNA a doppio filamento dell'RNA da entrambe le frazioni così come del materiale di RNA di partenza è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. Una seconda membrana è stata caricata con le stesse quantità delle differenti frazioni di RNA e ibridata con l'anticorpo S9.6 specifico per gli ibridi di RNA/DNA per testare se anche questi contaminanti dell'RNA IVT possono essere rimossi mediante la purificazione mediante cellulosa.

Rispetto all'RNA IVT non purificato, il contenuto di RNA a doppio filamento in tutte le frazioni di RNA non legato (primo eluato) è fortemente ridotto dopo l'incubazione con cellulosa (figura 2). La quantità di ibridi di RNA/DNA in queste frazioni, tuttavia, è diminuita solo leggermente, dimostrando che gli ibridi di RNA/DNA non si legano efficientemente alla cellulosa nelle condizioni testate e così non possono essere rimossi dall'RNA IVT utilizzando la cellulosa. L'aumento della concentrazione di EtOH dal 16% (v/v) al 18% (v/v) o al 20% (v/v) non incrementa significativamente l'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento. La quantità elevate di RNA reattivo a J2 nelle frazioni di RNA legato indicano l'arricchimento in RNA a doppio filamento (figura 2), confermando la separazione dei contaminanti di RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento mediante questo procedimento. Questo risultato mostra ulteriormente il riuscito adattamento della procedura di purificazione "negativa" mediante cellulosa a un formato di colonna da microcentrifuga.

Esempio 3 - Confronto tra la purificazione mediante cellulosa e il trattamento con RNasi III e la purificazione mediante HPLC

Per testare se cicli multipli di purificazione mediante cellulosa secondo il suddetto procedimento (si confronti l'esempio 2) utilizzando colonne da microcentrifuga aumentano l'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento, 100 µg di RNA IVT modificato con m1 Ψ di 2.500 nucleotidi

di lunghezza, che è stato pre-purificato mediante precipitazione con cloruro di litio (LiCl) dalla reazione di IVT, sono stati purificati 1x, 2x o 3x come descritto sopra utilizzando un tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH. Inoltre, gli RNA purificati mediante cellulosa sono stati confrontati con l'RNA IVT che è stato trattato con RNasi III di *E. coli* (0,2 U/100 µg di RNA) per 30 minuti a 37°C o purificato mediante HPLC secondo il protocollo descritto da Weissman et al. (sopra). Il contenuto di RNA a doppio filamento di tutti gli RNA è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento e quantificato mediante l'analisi densitometrica dei segnali di ibridazione. L'integrità dell'RNA è stata monitorata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

L'aumento del numero di cicli di purificazione mediante cellulosa aumenta la quantità di RNA a doppio filamento rimossa dall'RNA IVT (figura 3). Mentre un ciclo di purificazione rimuove circa il 90% dei contaminanti di RNA a doppio filamento, questa quantità è aumentata fino al 95% e al 97%, quando si eseguono 2 e 3 cicli di purificazione, rispettivamente. In modo interessante, un ciclo di purificazione mediante cellulosa elimina quasi la stessa quantità di RNA a doppio filamento del trattamento dell'RNA IVT con RNasi III. Inoltre, la conduzione di 3 cicli di purificazione mediante cellulosa si avvicina molto all'efficienza della purificazione mediante HPLC. Così, l'efficienza della purificazione mediante cellulosa varia tra quella del trattamento con RNasi III e quella della purificazione mediante HPLC.

Esempio 4 - Confronto delle prestazioni di marche differenti di cellulosa nel rimuovere l'RNA a doppio filamento dall'RNA IVT

Per testare se la rimozione dei contaminanti di RNA a doppio filamento è limitata a una specifica marca di cellulosa utilizzata nel suddetto esperimento (Sigma-Aldrich, numero di catalogo #C6288) o se può anche essere utilizzata cellulosa da altri fornitori, abbiamo testato le prestazioni di altri due tipi di cellulosa da Macherey-Nagel (MN 100, MN 2100). Per prima cosa, 100 µg di RNA IVT modificato con m¹Ψ di 1.500 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato mediante precipitazione con cloruro di litio (LiCl) dalla reazione di IVT, sono stati incubati in una colonna da microcentrifuga con 0,15 g dei tipi differenti di cellulosa in presenza di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH. Dopo la centrifugazione, l'RNA non legato è stato raccolto centrifugando la colonna e precipitando l'RNA nel primo eluato. L'RNA legato a cellulosa è stato recuperato aggiungendo STE 1x alla colonna, cui è seguita la risospensione della cellulosa con agitazione vigorosa e infine la centrifugazione e la precipitazione. Il contenuto di RNA a doppio filamento di tutti i campioni di RNA è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento e quantificato mediante l'analisi densitometrica dei segnali di ibridazione. L'integrità dell'RNA è stata monitorata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

Indipendentemente dalla cellulosa utilizzata per la purificazione, il contenuto di RNA a doppio filamento in tutte le frazioni di RNA non legato è fortemente ridotto rispetto all'RNA di controllo non purificato (figura 4). Le quantità elevate di RNA reattivo a J2 nelle frazioni di RNA legato

indicano l'arricchimento in RNA a doppio filamento, confermando la separazione dei contaminanti di RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento mediante tutti i tipi di cellulosa testati.

Esempio 5 - Scalabilità del procedimento di purificazione mediante cellulosa

Un punto importante è stato il testare se il procedimento di purificazione mediante cellulosa è aumentabile in scala. Quindi, è stato eseguito un esperimento per rimuovere i contaminanti di RNA a doppio filamento da 5 mg di RNA IVT incappucciato con D1 di 1.900 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato dalla reazione di IVT mediante sfere magnetiche. L'RNA è stato incubato con 1,5 g di cellulosa (Sigma, numero di catalogo #C6288) in 15 ml di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH. L'RNA non legato è stato separato dalla cellulosa mediante un dispositivo di filtro a vuoto (dimensione dei pori di 0,45 µm) e fatto precipitare. Con altri 5 mg dello stesso RNA, sono stati eseguiti 2 cicli di purificazione. Il contenuto di RNA a doppio filamento di entrambi gli RNA purificati è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento e quantificato mediante l'analisi densitometrica dell'intensità dei segnali di ibridazione. L'integrità dell'RNA è stata monitorata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

Il risultato dell'analisi dot blot mostra che dopo 1 ciclo di purificazione con 1,5 g di cellulosa, il 72% dei contaminanti di RNA a doppio filamento viene rimosso da 5 mg di RNA IVT. L'efficienza di purificazione può essere aumentata ulteriormente fino all'83% mediante un secondo ciclo di purificazione con 1,5 g di cellulosa fresca. Come atteso, il tasso di recupero dell'RNA diminuisce dal 67% dopo 1 ciclo di purificazione al 53% dopo il secondo ciclo, che è ancora accettabile ed è paragonabile al tasso di recupero di circa il 50% ottenuto tramite il protocollo di purificazione mediante HPLC descritto da Weismann et al. (sopra). Questo risultato dimostra chiaramente che il procedimento di purificazione mediante cellulosa della presente invenzione può essere aumentato in scala per rimuovere i contaminanti di RNA a doppio filamento da diversi mg di RNA IVT in una purificazione a singolo lotto.

Esempio 6 - Purificazione di RNA IVT con lunghezza differente utilizzando una procedura di purificazione "positiva"

In un passaggio successivo, è stato testato se è realizzabile il legare prima tutti i componenti di RNA di una preparazione di RNA IVT alla cellulosa in presenza di elevate concentrazioni di EtOH, prima di rilasciare selettivamente la frazione di RNA a singolo filamento diminuendo la concentrazione di EtOH al 16% (v/v). In questa condizione, i contaminanti di RNA a doppio filamento dovrebbero rimanere legati al materiale celluloso e così essere separati dall'RNA a singolo filamento (purificazione "positiva"). Questa procedura sarebbe vantaggiosa rispetto alla purificazione "negativa" poiché essa permetterebbe anche la rimozione dei contaminanti non acidi nucleici (per esempio proteine, nucleotidi liberi), che non si legano alla cellulosa in presenza di EtOH. Quindi, sono stati eseguiti esperimenti in cui 400 µg di tre RNA IVT con differenti lunghezze

(1.300 nucleotidi, 2.500 nucleotidi e >10.000 nucleotidi) e strutture di incappucciamento (D1, D2, nessun cappuccio) sono stati legati completamente a 0,12 g di cellulosa in una colonna da microcentrifuga utilizzando un tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH. Gli RNA a singolo filamento sono stati eluiti con tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH e trasferiti a una seconda colonna per centrifuga contenente 1,2 mg di cellulosa fresca. Dopo l'incubazione in agitazione vigorosa e dopo la centrifugazione, gli RNA nel primo eluato sono stati fatti precipitare e analizzati per i contaminanti di RNA a doppio filamento mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. Le integrità degli RNA sono state monitorate mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

Indipendentemente dalla lunghezza dell'RNA, il contenuto di RNA a doppio filamento di tutti gli RNA IVT è ridotto significativamente a un livello appena rilevabile dopo la purificazione mediante cellulosa (figura 6) dimostrando la fattibilità della suddetta procedura di purificazione "positiva". Inaspettatamente, anche l'RNA IVT lungo >10.000 nucleotidi ha potuto essere purificato con successo dai contaminanti di RNA a doppio filamento (figura 6A). Questo mostra che la purificazione non è ristretta all'RNA più breve (quale da 1.300 - 2.500 nucleotidi) e suggerisce che la lunghezza dell'RNA non è un fattore limitante per una purificazione riuscita. Tuttavia, in confronto al tasso di recupero di entrambi gli RNA lunghi 1.300 nucleotidi e 2.500 nucleotidi (recupero del 45-55%), il tasso di recupero dell'RNA IVT lungo è inferiore (recupero del 35%). Sebbene l'integrità dell'RNA IVT lungo >10.000 nucleotidi sia inferiore a quella di entrambi gli RNA IVT più brevi, essa non è influenzata negativamente dal procedimento di purificazione mediante cellulosa secondo la presente invenzione. Poiché gli RNA utilizzati per questi esperimenti recavano strutture di incappucciamento al 5' differenti (10.000 nucleotidi: cappuccio D1, 1.300 nucleotidi: cappuccio D2, 2.500 nucleotidi: nessun cappuccio), i suddetti esempi dimostrano che questa caratteristica strutturale non è un fattore critico per la purificazione riuscita di RNA IVT mediante cellulosa.

Esempio 7 - Purificazione dell'RNA IVT utilizzando tamponi con forza ionica differente

La stabilità degli acidi nucleici a doppio filamento è influenzata dalla forza ionica dell'ambiente. Mentre concentrazioni saline elevate promuovono la formazione di strutture a doppio filamento, la loro dissociazione ad acidi nucleici a singolo filamento è aumentata sotto concentrazioni saline basse. Per analizzare l'impatto della forza ionica del tampone sull'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento mediante cellulosa, un RNA IVT modificato con m¹Ψ di 1.300 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato mediante precipitazione con cloruro di litio (LiCl) dalla reazione di IVT, è stato incubato in una provetta da 1,5 ml con 0,1 g di cellulosa in 500 μl di tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH e concentrazioni differenti di NaCl (0-150mM). Dopo la centrifugazione, il sumatante è stato rimosso e la cellulosa è stata risospesa in 500 μl dei tamponi STE 1x corrispondenti contenenti EtOH al 16% (v/v) per rilasciare l'RNA a singolo filamento. Dopo la centrifugazione, il sumatante è

stato raccolto e l'RNA è stato recuperato mediante precipitazione. In un passaggio finale, la cellulosa è stata risospesa in 500 µl dei tamponi STE 1x corrispondenti non contenenti EtOH, centrifugata e l'RNA è stato recuperato mediante la precipitazione del sumatante. Il contenuto di RNA a doppio filamento dell'RNA da entrambe le frazioni (eluato con EtOH al 16%, eluato con EtOH allo 0%) così come del materiale di RNA di partenza (RNA IVT) è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento e quantificato mediante l'analisi densitometrica dei segnali di ibridazione. L'integrità dell'RNA è stata monitorata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

L'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento mediante cellulosa è influenzata dalla concentrazione di NaCl nel tampone STE. In presenza di NaCl 25mM o 50mM, il 94%-98% dei contaminanti di RNA a doppio filamento viene eliminato dall'eluato con EtOH al 16% (figure 7A, B). Sia l'aumento della concentrazione di NaCl a 75mM (figura 7A) che la diminuzione a 10mM (figura 7B) riducono l'efficienza di purificazione. Le concentrazioni di NaCl maggiori di 125mM conducono a una riduzione significativa nell'efficienza di purificazione (figura 7A). Questo risultato dimostra che la concentrazione di NaCl del tampone STE utilizzato può influenzare l'efficienza di purificazione, che è superiore in un intervallo tra 25 e NaCl 50mM. La forte reattività di tutti gli eluati con EtOH allo 0%, tranne che per il campione con NaCl 150mM (figura 7A), con l'anticorpo contro J2 riflette l'arricchimento in contaminanti di RNA a doppio filamento in questi campioni.

Esempio 8 - Purificazione mediante cellulosa dell'RNA IVT mediante FPLC

Poiché la separazione dell'RNA a singolo filamento dai contaminanti di RNA a doppio filamento mediante cellulosa utilizzando una procedura di purificazione "positiva" è realizzabile (si confrontino gli esempi 6 e 7), si è cercato di adattare il protocollo di purificazione per l'FPLC. 4 g di cellulosa sono stati utilizzati come fase stazionaria per impaccare una colonna XK 16/20. Dopo l'equilibramento con il tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH, 500 µg di RNA IVT modificato con m¹Ψ di 1.300 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato mediante precipitazione con cloruro di litio (LiCl) dalla reazione di IVT, sono stati caricati sulla colonna. L'RNA a singolo filamento e l'RNA a doppio filamento legati sono stati eluiti riducendo la concentrazione di EtOH del tampone al 16% (v/v) e allo 0% (v/v), rispettivamente, e le frazioni sono state raccolte. L'RNA è stato recuperato mediante precipitazione e il contenuto di RNA a doppio filamento dell'RNA da entrambe le frazioni (F1: eluato con EtOH al 16%, F2: eluato con EtOH allo 0%) così come il materiale di RNA di partenza (RNA di controllo) è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento. L'integrità dell'RNA è stata monitorata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

Il profilo di eluizione (assorbanza a 260 nm) del cromatogramma mostra che un'elevata percentuale dell'RNA IVT caricato si lega al materiale cellulosico in presenza di EtOH al 40% (v/v). Solo piccole quantità di RNA rimangono non legate ed eluiscono dalla colonna in queste condizioni

(figura 8A). A seguito della diminuzione della concentrazione di EtOH al 16% (v/v), la maggior parte dell'RNA eluisce, indicato da un singolo picco stretto nell'assorbanza UV. Questo picco è stato raccolto (frazione F1) e contiene l'RNA a singolo filamento purificato. Rispetto all'RNA di controllo non purificato, circa l'88% del contenuto di RNA a doppio filamento è stato rimosso da questa frazione (figura 8B). Dopo la riduzione della concentrazione di EtOH del tampone ulteriormente allo 0% (v/v), solo piccole quantità di RNA sono eluite dalla colonna (frazione F2). L'analisi dot blot ha rivelato che l'RNA a doppio filamento è arricchito in questa frazione di RNA (figura 8B). Questo conferma la separazione dell'RNA a singolo filamento dall'RNA a doppio filamento e dimostra l'uso riuscito della cellulosa come fase stazionaria per la purificazione mediante FPLC dell'RNA IVT per rimuovere i contaminanti di RNA a doppio filamento.

Esempio 9 - Purificazione dell'RNA IVT utilizzando differenti concentrazioni di EtOH per l'eluizione dell'RNA a singolo filamento

Per ottimizzare il protocollo della procedura di purificazione "positiva" mediante cellulosa, è stato testato l'impatto di differenti concentrazioni di EtOH sull'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento e del recupero dell'RNA. 200 µg di RNA IVT incappucciato con D1 di 1.500 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato dalla reazione di IVT mediante sfere magnetiche, sono stati incubati con 0,1 g di cellulosa lavata in 500 µl di tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH in una colonna da microcentrifuga. L'RNA a singolo filamento legato alla cellulosa è stato eluito con tampone STE 1x contenente il 6, il 10, il 12, il 14, il 16, il 18, il 20 o il 24% (v/v) di EtOH e recuperato dall'eluato mediante precipitazione. Il contenuto di RNA a doppio filamento dell'RNA ottenuto dai differenti eluati così come del materiale di RNA di partenza (RNA di controllo) è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento e quantificato mediante l'analisi densitometrica dei segnali di ibridazione. L'integrità dell'RNA è stata confermata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

L'intervallo ottimale di concentrazioni di EtOH per l'eluizione dell'RNA a singolo filamento durante una procedura di purificazione "positiva" è dal 14 al 16% (v/v) (figura 9A, B). A queste concentrazioni di EtOH, l'83-84% dell'RNA a doppio filamento rimaneva legato alla cellulosa e il 58-64% dell'RNA a singolo filamento è recuperato dagli eluati corrispondenti. L'aumento dell'EtOH al 18% (v/v) o al 20% (v/v) migliora ulteriormente l'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento (l'85% o il 90%, rispettivamente) ma riduce significativamente il tasso di recupero dell'RNA (il 47% o il 36%, rispettivamente). Al contrario, la diminuzione della concentrazione di EtOH al 12% (v/v) deteriora l'efficienza di purificazione (il 63% dell'RNA a doppio filamento rimosso) senza migliorare significativamente il recupero dell'RNA. Questo risultato dimostra che l'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento e il tasso di recupero di RNA dagli eluati sono inversamente correlati. Inoltre, la purezza relativa dell'RNA a singolo filamento per quanto riguarda i contaminanti di RNA a doppio filamento può essere controllata mediante la concentrazione di EtOH utilizzata per l'eluizione. Concentrazioni di EtOH più elevate conducono a una rimozione più efficiente dell'RNA a doppio

filamento, tuttavia, al costo di un ridotto recupero dell'RNA a singolo filamento. Quindi, regolando la concentrazione di EtOH per l'eluizione dell'RNA a singolo filamento, il rapporto tra contaminanti di RNA a doppio filamento/recupero dell'RNA può essere regolato per soddisfare i requisiti di purezza/costo dell'RNA IVT per differenti applicazioni.

Esempio 10 - Determinazione della capacità di legame all'RNA della cellulosa

Per l'aumento in scala della procedura di purificazione "positiva" mediante cellulosa, è importante conoscere la capacità di legame all'RNA della cellulosa per minimizzare la perdita di RNA causata dal sovraccarico. Per determinare la capacità di legame all'RNA, incubiamo una quantità fissa di cellulosa lavata (100 mg, Sigma, C6288) con 25 µg, 50 µg, 100 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1.000 µg o 1.500 µg di RNA IVT incappucciato con D1 di 1.500 nucleotidi di lunghezza, che è stato pre-purificato dalla reazione di IVT mediante sfere magnetiche, in 500 µl di tampone STE 1x contenente il 40% (v/v) di EtOH in una colonna da microcentrifuga. Dopo la centrifugazione, l'RNA a singolo filamento è stato eluito con 500 µl di tampone STE 1x contenente il 16% (v/v) di EtOH. Infine, l'RNA che era ancora legato alla cellulosa è stato rilasciato mediante incubazione con H₂O (con lo 0% (v/v) di EtOH). L'RNA nel primo eluato (EtOH al 40% (v/v)) e in entrambi gli eluati al 16% (v/v) e allo 0% (v/v) è stato recuperato mediante precipitazione, e la quantità di RNA recuperato è stata determinata mediante spettrofotometria. Inoltre, il contenuto di RNA a doppio filamento dell'RNA ottenuto dagli eluati con EtOH al 16% (v/v) così come del materiale di RNA di partenza (RNA di controllo) è stato analizzato mediante dot blot utilizzando l'anticorpo J2 specifico per l'RNA a doppio filamento per monitorare l'efficienza della rimozione dell'RNA a doppio filamento nei singoli campioni. L'integrità di questi RNA è stata monitorata mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

La capacità di legame all'RNA massima della cellulosa testata (Sigma, C6288) varia tra 100 µg e 250 µg di RNA per 100 mg di cellulosa, che corrispondono a 1-2,5 mg RNA per 1 g di cellulosa. Questo trova riscontro nel fatto che il tasso di recupero dell'RNA (figura 10A) e la resa dell'RNA (figura 10B) recuperato dal primo eluato con EtOH al 40% (v/v), che rappresenta la frazione di RNA non legato, aumentano uniformemente quando vengono utilizzati 250 µg o più di RNA per la purificazione con 100 mg di cellulosa. La quantità di RNA legato negli eluati con EtOH al 16% (v/v) e con EtOH allo 0% (v/v), tuttavia, non incrementa conseguentemente quando vengono utilizzati 250 µg o più RNA per la purificazione, il che conduce conseguentemente a un tasso di recupero dell'RNA diminuito da entrambe le frazioni (figura 10A, B). Il tasso di recupero dell'RNA massimo dall'eluato con EtOH al 16% (v/v) si ottiene quando sono stati utilizzati 100 µg di RNA per la purificazione con 100 mg di cellulosa (recupero del 68% dell'RNA). Inoltre, a questo rapporto di RNA:cellulosa, si raggiunge l'efficienza di purificazione superiore di rimozione dell'88% dell'RNA a doppio filamento (figura 10C, D). In modo interessante, la quantità relativa di RNA a doppio filamento rimossa dall'RNA IVT non diminuisce significativamente quando la capacità di legame all'RNA della cellulosa è superata.

Inoltre, la figura 11B mostra che una preparazione di RNA IVT codificante l'EPO che è stata sottoposta a un procedimento della presente invenzione, mancando così dell'RNA a doppio filamento inibitorio della sintesi proteica, è stata tradotta in modo molto efficiente, risultando in elevati livelli di EPO nel plasma perfino dopo 24 ore dalla somministrazione dell'RNA IVT purificato secondo la presente invenzione. Al contrario, una preparazione di RNA IVT codificante l'EPO che non è stata sottoposta a un procedimento della presente invenzione ma che è stato lasciato non purificato, è stata tradotta in modo meno efficiente a causa dell'inibizione della sintesi proteica mediante effetti diretti e mediati dall'IFN- α dell'RNA a doppio filamento.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per fornire RNA a singolo filamento (ssRNA), comprendente:

- (i) il produrre una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento mediante trascrizione *in vitro*;
- (ii) il mettere a contatto la preparazione di RNA con un materiale cellulosico in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento (dsRNA) al materiale cellulosico e non permettono il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico; e
- (iii) il separare l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettono il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico,

in cui

nel passaggio (ii) la preparazione di RNA viene fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e un primo tampone e/o il materiale cellulosico viene fornito come sospensione in un primo tampone, in cui il primo tampone comprende acqua, etanolo e un sale a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e che non permette il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico; e

la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 20% (v/v) e la concentrazione del sale nel primo tampone è da 15 a 70mM.

2. Procedimento per fornire RNA a singolo filamento (ssRNA), comprendente:

- (i) il produrre una preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento mediante trascrizione *in vitro*;
- (ii) il mettere a contatto la preparazione di RNA con un materiale cellulosico in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento (dsRNA) e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico; e
- (iii) il separare l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettono il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico,

in cui

il passaggio (iii) comprende:

(1) il miscelare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati con un primo tampone con mescolamento e/o agitazione, in cui il primo tampone comprende acqua, etanolo e un sale a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permette il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico; e

(2) il separare la fase liquida comprendente l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico;

e

la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 20% (v/v) e la concentrazione del sale nel primo tampone è da 15 a 70mM.

3. Procedimento della rivendicazione 1, in cui il passaggio (ii) comprende il miscelare la preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento con il materiale cellulosico con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti.

4. Procedimento della rivendicazione 3, in cui

(a) il sale compreso nel primo tampone è cloruro di sodio; e/o

(b) la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 16% (v/v); e/o

(c) la concentrazione del sale nel primo tampone è da 20 a 60mM; e/o

(d) il primo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA; e/o

(e) nel passaggio (iii)

(α) la miscela della preparazione di RNA, del materiale cellulosico, e del primo tampone viene fomita in una provetta e il passaggio (iii) comprende

(1) l'applicare la gravità o la forza centrifuga alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide sono separate; e (2) il raccogliere il sumatante comprendente l'RNA a singolo filamento o il rimuovere il materiale cellulosico; o

(β) la miscela della preparazione di RNA, del materiale cellulosico, e del primo tampone viene fomita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro e il passaggio (iii) comprende (1') l'applicare la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro in modo tale che le fasi liquide e solide sono separate; e (2') il raccogliere il primo eluato comprendente l'RNA a singolo filamento.

5. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 1, 3, e 4, in cui i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti una volta o due o più volte, in cui la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo e nel passaggio (ii) di ciascun ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzato materiale cellulosico fresco.

6. Procedimento della rivendicazione 2, in cui il passaggio (ii) comprende

(1) il miscelare la preparazione di RNA comprendente l'RNA a singolo filamento con il materiale cellulosico con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti; e

(2) il separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dal resto.

7. Procedimento della rivendicazione 6, in cui nel passaggio (ii) la preparazione di RNA viene fornita come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e un secondo tampone e/o il materiale cellulosico viene fornito come sospensione in un secondo tampone, in cui il secondo tampone comprende acqua, etanolo e un sale, preferibilmente cloruro di sodio, a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico.

8. Procedimento della rivendicazione 7, in cui

(a) la concentrazione di etanolo nel secondo tampone è almeno il 35% (v/v), preferibilmente dal 38 al 42% (v/v); e/o

(b) la concentrazione del sale nel secondo tampone è da 15 a 70mM, preferibilmente da 20 a 60mM; e/o

(c) il secondo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA; e/o

(d) nel passaggio (ii)(2)

(α) la miscela della preparazione di RNA e del materiale cellulosico ottenuta nel passaggio (ii)(1) viene fornita in una provetta e il passaggio (ii)(2) comprende (2a) l'applicare la gravità o la forza centrifuga alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide sono separate; e (2b) il rimuovere il supernatante o il raccogliere il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati; o

(β) la miscela della preparazione di RNA e del materiale cellulosico ottenuta nel passaggio (ii)(1) viene fornita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro e il passaggio (ii)(2) comprende (2a') l'applicare la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro in modo tale che le fasi liquide e solide sono separate; e (2b') lo smaltire il primo eluato; e/o

(e) il passaggio (ii) comprende inoltre (3) l'aggiungere un'aliquota del secondo tampone al materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati; (4) l'incubare la miscela risultante con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti, più preferibilmente per almeno 10 minuti; e (5) il separare il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati dalla fase liquida; e facoltativamente (6) il ripetere i passaggi da (3) a (5) una volta o due o più volte.

9. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 2 e da 6 a 8, in cui

(a) nel passaggio (iii)(1) il materiale cellulosico a cui l'RNA a doppio filamento e l'RNA a singolo filamento sono legati viene miscelato con il primo tampone con mescolamento e/o agitazione per almeno 5 minuti, preferibilmente per almeno 10 minuti; e/o

(b) il sale compreso nel primo tampone è cloruro di sodio; e/o

- (c) la concentrazione di etanolo nel primo tampone è dal 14 al 16% (v/v); e/o
- (d) la concentrazione del sale nel primo tampone è da 20 a 60mM; e/o
- (e) il primo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente chelante, preferibilmente EDTA; e/o
- (f) nel passaggio (iii)
- (α) la miscela del materiale cellulosico e del primo tampone viene fomita in una provetta e il passaggio (iii)(2) comprende (2a) l'applicare la gravità o la forza centrifuga alla provetta in modo tale che le fasi liquide e solide sono separate; e (2b) il raccogliere il sumatante comprendente l'RNA a singolo filamento o il rimuovere il materiale cellulosico; o
- (β) la miscela del materiale cellulosico e del primo tampone viene fomita in una colonna per centrifuga o un dispositivo di filtro e il passaggio (iii)(2) comprende (2a') l'applicare la gravità, la forza centrifuga, la pressione, o il vuoto alla colonna per centrifuga o al dispositivo di filtro; e (2b') il raccogliere il primo eluato comprendente l'RNA a singolo filamento; e/o
- (g) i passaggi (ii) e (iii) sono ripetuti una volta o due o più volte, in cui la preparazione dell'RNA a singolo filamento ottenuta dopo il passaggio (iii) di un ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzata come preparazione di RNA nel passaggio (ii) del ciclo successivo e nel passaggio (ii) di ciascun ciclo di passaggi (ii) e (iii) viene utilizzato materiale cellulosico fresco.
10. Procedimento della rivendicazione 2, in cui nel passaggio (ii) il materiale cellulosico viene fomito in una colonna, il passaggio (ii) comprende il caricare la preparazione di RNA sulla colonna in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico, e il passaggio (iii) comprende l'eluire l'RNA a singolo filamento dal materiale cellulosico in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico e non permettono il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico.
11. Procedimento della rivendicazione 10, in cui nel passaggio (ii) la preparazione di RNA viene fomita e caricata sulla colonna come liquido comprendente l'RNA a singolo filamento e un secondo tampone, in cui il secondo tampone comprende acqua, etanolo e un sale, preferibilmente cloruro di sodio, a una concentrazione che permette il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico.
12. Procedimento della rivendicazione 11, in cui
- (a) la concentrazione di etanolo nel secondo tampone è almeno il 35% (v/v), preferibilmente dal 38 al 42% (v/v); e/o
- (b) la concentrazione del sale nel secondo tampone è da 15 a 70mM, preferibilmente da 20 a 60mM; e/o
- (c) il secondo tampone comprende inoltre una sostanza tamponante, preferibilmente tris(idrossimetil)amminometano (TRIS), e/o un agente

chelante, preferibilmente EDTA; e/o

(d) il passaggio (iii) è condotto utilizzando il primo tampone come eluente, in cui il primo tampone è preferibilmente il primo tampone definito nella rivendicazione 9(b), nella rivendicazione 9(c), nella rivendicazione 9(d), e/o nella rivendicazione 9(e).

13. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui

(a) la preparazione di RNA viene prodotta utilizzando un'RNA polimerasi scelta nel gruppo consistente delle RNA polimerasi T3, T7 e SP6; e/o

(b) prima del passaggio (ii) la preparazione di RNA viene sottoposta ad almeno un trattamento di pre-purificazione, in cui l' almeno un trattamento di pre-purificazione comprende preferibilmente uno o più dei seguenti: precipitazione di acidi nucleici; legame di acidi nucleici a sfere magnetiche; ultrafiltrazione; e degradazione del DNA; e/o

(c) l'RNA a singolo filamento è mRNA o un RNA inibitorio, quale RNA antisenso, siRNA, o miRNA; e/o

(d) l'RNA a singolo filamento ha una lunghezza di almeno 2.700 nucleotidi, preferibilmente almeno 3.000 nucleotidi, più preferibilmente almeno 3.500 nucleotidi, più preferibilmente almeno 4.500 nucleotidi; e/o

(e) il materiale cellulosico comprende fibre di cellulosa, preferibilmente fibre di cellulosa di un grado adatto per l'uso come reagente per la cromatografia di partizione; e/o

(f) prima di essere messo a contatto con la preparazione di RNA nel passaggio (ii) il materiale cellulosico viene fornito come materiale cellulosico lavato.

14. Procedimento della rivendicazione 13(f), in cui il lavaggio del materiale cellulosico include

(i) il miscelare il materiale cellulosico con una soluzione di lavaggio con mescolamento e/o agitazione, preferibilmente per almeno 5 minuti; e

(II) il rimuovere il liquido o il raccogliere il materiale cellulosico; e facoltativamente

(III) il ripetere i passaggi (I) e (II) una volta o due o più volte.

15. Procedimento della rivendicazione 14, in cui

(A) se il passaggio (ii) è condotto in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento al materiale cellulosico lavato e non permettono il legame dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico lavato, la soluzione di lavaggio ha la composizione del primo tampone definito nella rivendicazione 1, nella rivendicazione 4(a), nella rivendicazione 4(b), nella rivendicazione 4(c), e/o nella rivendicazione 4(d), o

(B) se il passaggio (ii) è condotto in condizioni che permettono il legame dell'RNA a doppio filamento e dell'RNA a singolo filamento al materiale cellulosico lavato, la soluzione di lavaggio ha la composizione del secondo tampone definito nella rivendicazione 7, nella rivendicazione 8(a), nella

rivendicazione 8(b), e/o nella rivendicazione 8(c).

* * * * *

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1/9

FIGURA 1

“Fig. 1” = figura 1

“IVT RNA” = RNA trascritto in vitro

“Input” = controllo

“Cellulose” = cellulosa

“Unbound” = non legato

“Bound” = legato

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

TAVOLA 2/6

FIGURA 2

“Fig. 2” = figura 2

“EtOH concentration” = concentrazione di EtOH

“IVT RNA” = RNA trascritto in vitro

“Input” = controllo

“Cellulose” = cellulosa

“Unbound” = non legato

“Bound” = legato

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“Dot blot S9.6 anti-RNA/DNA-hybrid antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-ibridi di RNA/DNA S9.6

TAVOLA 2/9

FIGURA 3

“Fig. 3” = figura 3

“RNase III” = RNasi III

“# of cellulose purification cycles” = numero di cicli di purificazione mediante cellulosa

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“dsRNA removed” = RNA a doppio filamento rimosso

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

FIGURA 4

“Fig. 4” = figura 4

“Cellulose supplier” = fornitore di cellulosa

“Cat #” = numero di catalogo

“IVT RNA” = RNA trascritto in vitro

“Input RNA” = RNA di controllo

“Cellulose” = cellulosa

“Unbound” = non legato

“Bound” = legato

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“dsRNA removed” = RNA a doppio filamento rimosso

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

TAVOLA 3/9

FIGURA 5

“Fig. 5” = figura 5

“Input RNA” = RNA di controllo

“Cellulose” = cellulosa

“Unbound” = non legato

“Bound” = legato

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“Cycles of purification” = cicli di purificazione

“dsRNA removed” = RNA a doppio filamento rimosso

“RNA recovery” = recupero dell’RNA

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

TAVOLA 4/9

FIGURA 6

“Fig. 6” = figura 6

“RNA length” = lunghezza dell’RNA

“Nt” = nucleotidi

“Cellulose purification” = purificazione mediante cellulosa

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

TAVOLA 5/9

FIGURA 7

“Fig. 7” = figura 7

“Eluted with EtOH” = eluito con EtOH

“Input RNA” = RNA di controllo

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“dsRNA removed” = RNA a doppio filamento rimosso

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

TAVOLA 6/9

FIGURA 8

“Fig. 8” = figura 8

“40% EtOH” = EtOH al 40%

“16% EtOH” = EtOH al 16%

“0% EtOH” = EtOH allo 0%

“Input RNA” = RNA di controllo

“Fraction” = frazione

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“dsRNA removed” = RNA a doppio filamento rimosso

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

TAVOLA 7/9

FIGURA 9

“Fig. 9” = figura 9

“Eluate [(v/v) EtOH]” = eluato [(v/v) di EtOH]

“Input RNA” = RNA di controllo

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

“RNA recovery” = recupero dell’RNA

“dsRNA removed” = RNA a doppio filamento rimosso

TAVOLA 8/9

FIGURA 10

“Fig. 10” = figura 10

“RNA recovery” = recupero dell’RNA

“ μ g RNA per 0,1 g cellulose” = μ g di RNA per 0,1 g di cellulosa

“RNA yield” = resa di RNA

“40% (v/v) EtOH” = EtOH al 40% (v/v)

“16% (v/v) EtOH” = EtOH al 16% (v/v)

“0% (v/v) EtOH” = EtOH allo 0% (v/v)

“Input RNA” = RNA di controllo

“Dot blot J2 anti-dsRNA antibody” = dot blot con l’anticorpo anti-RNA a doppio filamento J2

“RNA electrophoresis” = elettroforesi dell’RNA

“dsRNA removed” = RNA a doppio filamento rimosso

TAVOLA 9/9

FIGURA 11

“Fig. 11” = figura 11

“Cellulose purification” = purificazione mediante cellulosa

“Postinjection time” = tempo dopo l’iniezione

“H” = ore

“IVT RNA” = RNA trascritto in vitro

“No RNA” = no RNA

“Plasma EPO” = EPO plasmatica

“Level of detection” = livello di rilevamento

* * * * *

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


USBM - CPI-090

Fig. 1

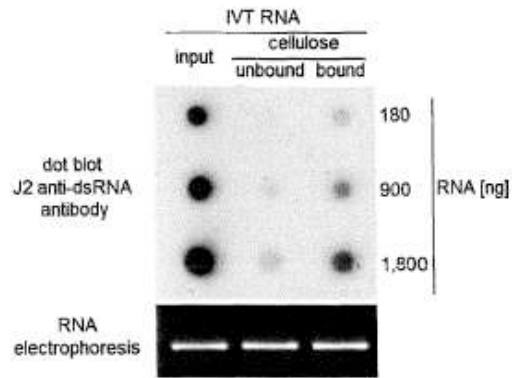


Fig. 2

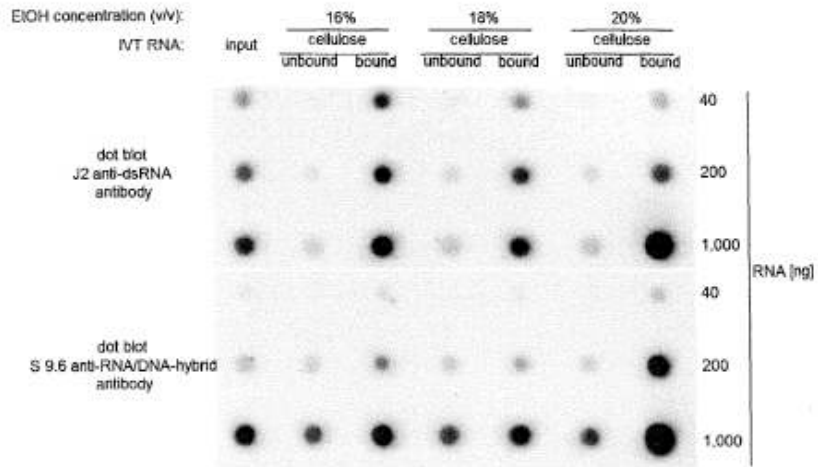


Fig. 3

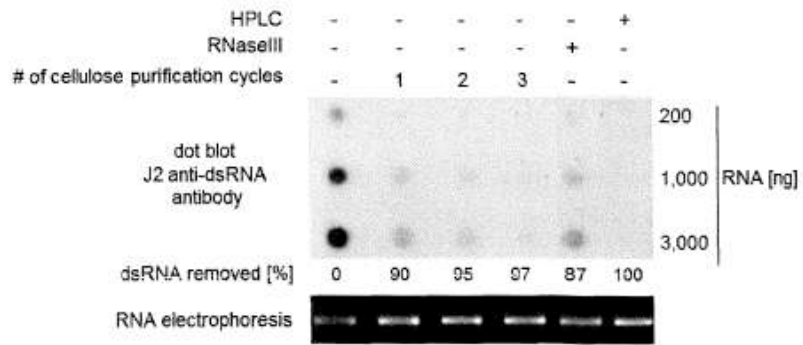


Fig. 4

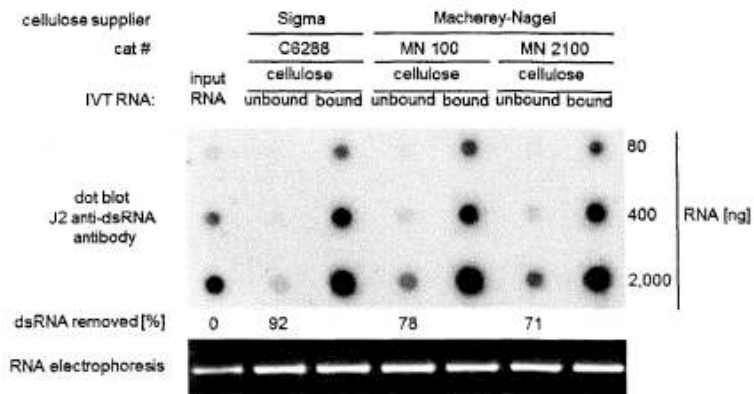


Fig. 5

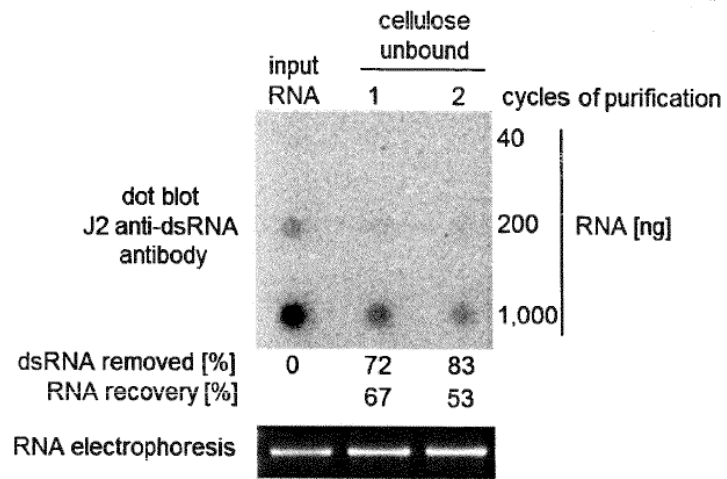


Fig. 6

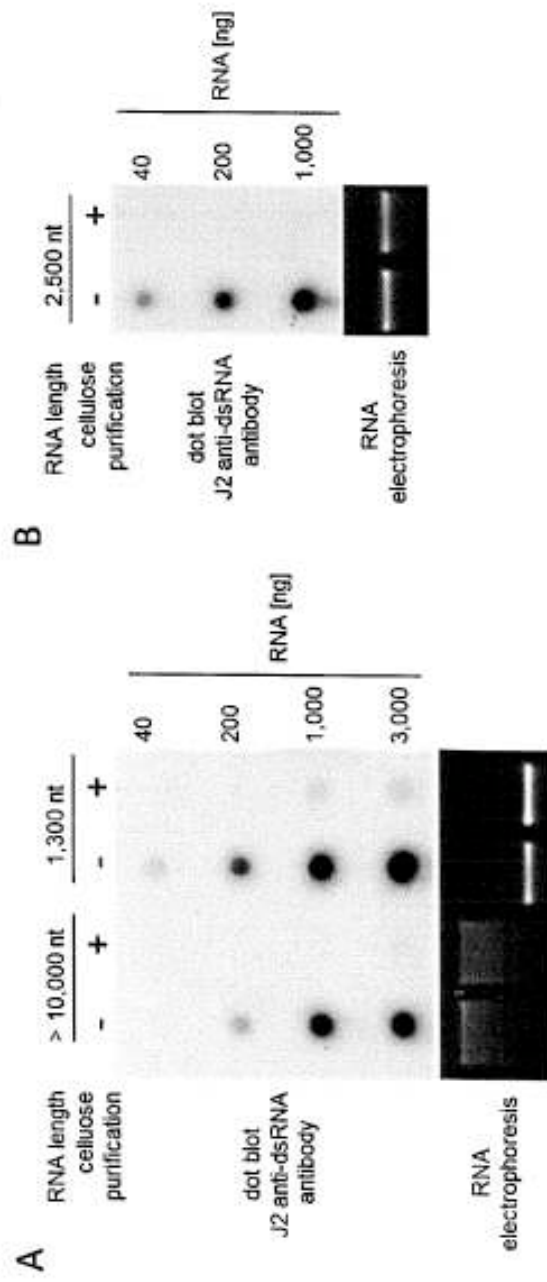


Fig. 7

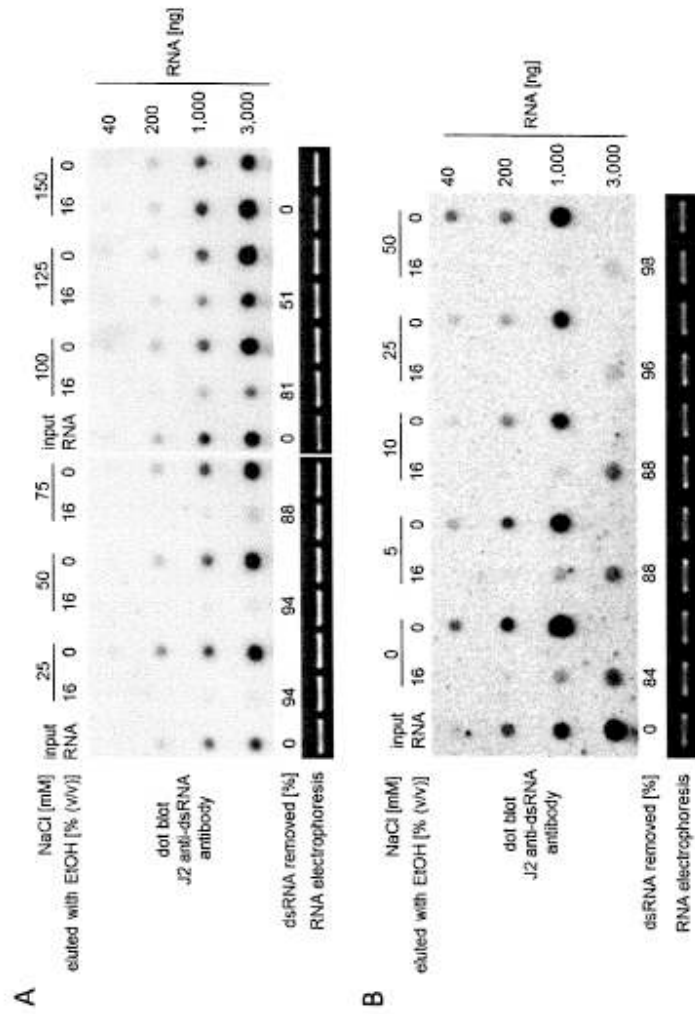


Fig. 8

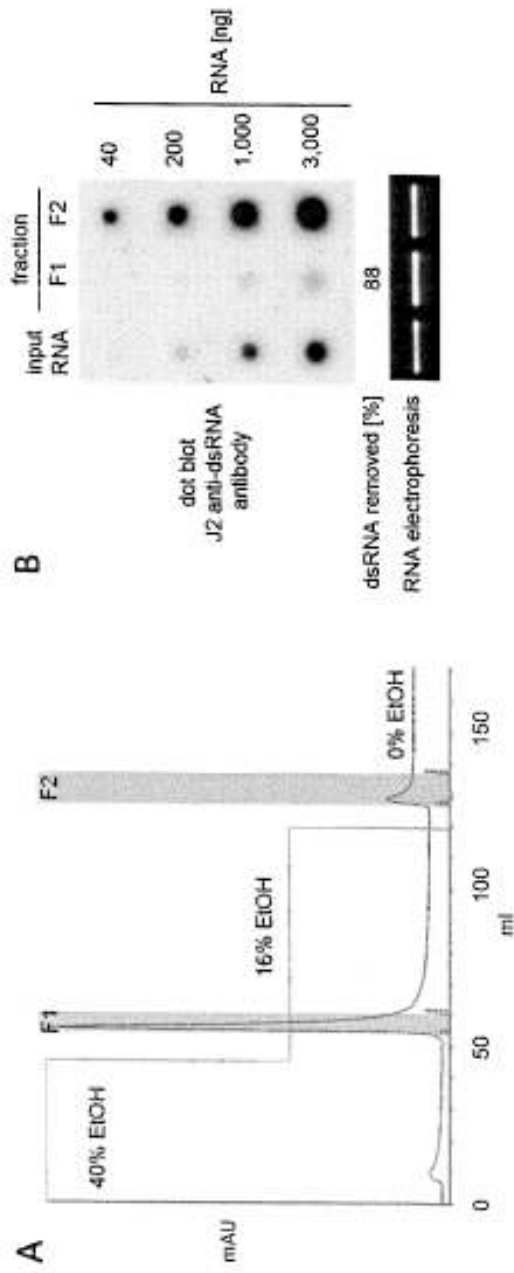


Fig. 9

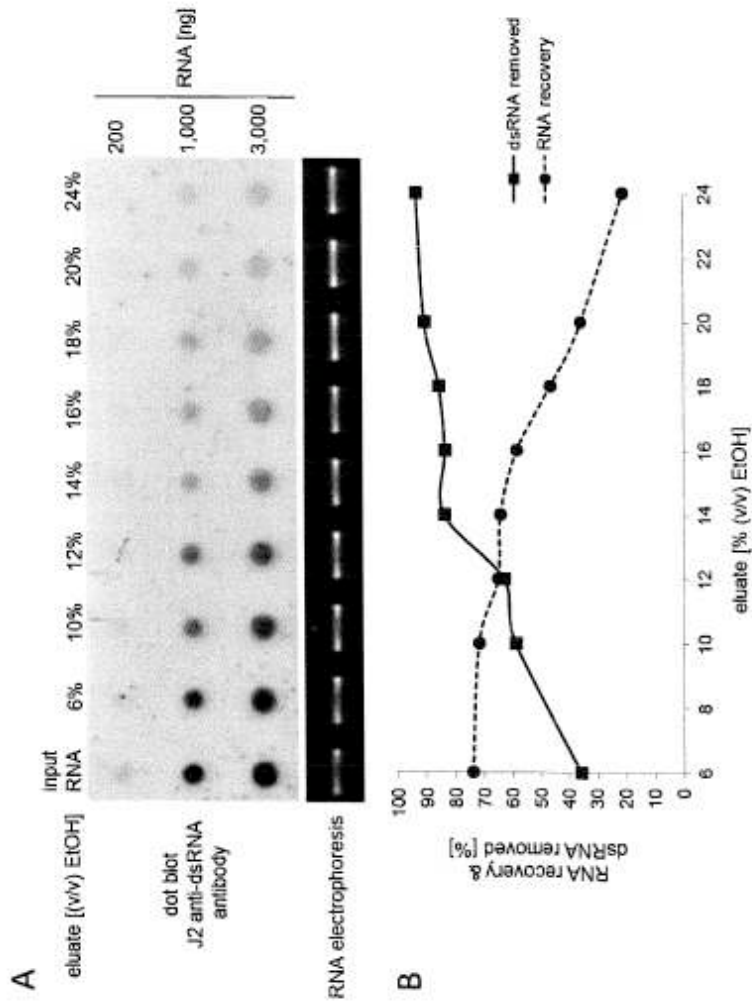


Fig. 10

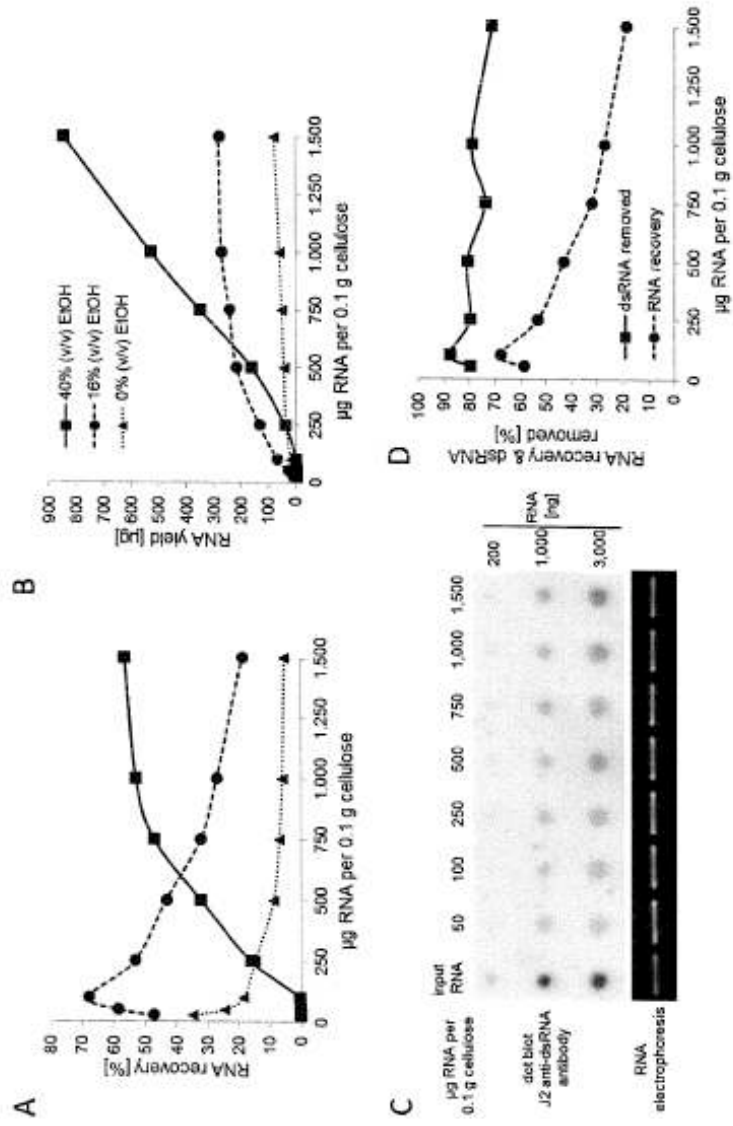


Fig. 11

