

TRADUZIONE

Brevetto Europeo n° EP 3 682 905

Domanda di Brevetto Europeo n°19216461.4

Depositata in data 03 ottobre 2012

5 Titolo: “**NUCLEOSIDI, NUCLEOTIDI E ACIDI NUCLEICI MODIFICATI E LORO
USI**”

Titolare: **ModernaTX, Inc.**, con sede in 200 Technology Square, Cambridge, MA 02139 /
STATI UNITI

10

DESCRIZIONE

RIFERIMENTO INCROCIATO A DOMANDE DI BREVETTO CORRELATE

[0001] La presente domanda di brevetto rivendica la priorità alla domanda di brevetto provvisoria U.S. n. 61/542.533, depositata il 3 ottobre 2011, intitolata Modified Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, and Uses Thereof.

15

CAMPO TECNICO

[0002] La presente descrizione fornisce composizioni e metodi che utilizzano acidi nucleici modificati per modulare la funzione cellulare. Gli acidi nucleici modificati della descrizione possono codificare peptidi, polipeptidi o proteine multiple. Le molecole codificate possono essere usate come composti terapeutici e/o diagnostici.

20

CONTESTO

[0003] Gli RNA presenti in natura sono sintetizzati da quattro ribonucleotidi di base: ATP, CTP, UTP e GTP, ma possono contenere nucleotidi modificati post-trascrizionalmente. Inoltre, nell'RNA sono state identificate circa cento diverse modificazioni nucleosidiche [Rozenski, J, Crain, P e McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res
25 27: 196-197]. Il ruolo delle modificazioni nucleosidiche sul potenziale immunostimolante e


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sull'efficienza di traduzione dell'RNA, tuttavia, non è chiaro.

- [0004]** Esistono molteplici problemi con le metodologie precedenti per effettuare l'espressione proteica. Ad esempio, il DNA eterologo introdotto in una cellula può essere ereditato dalle cellule figlie (indipendentemente dal fatto che il DNA eterologo si sia integrato o meno nel cromosoma) o dalla progenie. Il DNA introdotto può integrarsi nel DNA genomico della cellula ospite a una certa frequenza, provocando alterazioni e/o danni al DNA genomico della cellula ospite. Inoltre, devono verificarsi più fasi prima che venga prodotta una proteina. Una volta all'interno della cellula, il DNA deve essere trasportato nel nucleo dove viene trascritto in RNA. L'RNA trascritto dal DNA deve quindi entrare nel citoplasma dove viene tradotto in proteina. Questa necessità di più fasi di elaborazione crea tempi di ritardo prima della generazione di una proteina di interesse. Inoltre, è difficile ottenere l'espressione del DNA nelle cellule; spesso il DNA entra nelle cellule ma non è espresso o non è espresso a velocità o concentrazioni ragionevoli. Questo può essere un problema specifico quando il DNA viene introdotto in cellule come cellule primarie o linee cellulari modificate.
- [0005]** Nella tecnica sono necessarie modalità biologiche per affrontare la modulazione della traduzione intracellulare degli acidi nucleici.

SOMMARIO

- [0006]** La presente invenzione fornisce un polinucleotide isolato che codifica un polipeptide di interesse, detto polinucleotide isolato comprendendo:
- (a) una sequenza di n numero di nucleosidi o nucleotidi collegati comprendente almeno un nucleoside o nucleotide modificato rispetto alla struttura chimica di un nucleoside o nucleotide A, G, U o C,
 - (b) una 5'-UTR;
 - (c) una 3'-UTR, e
 - (d) almeno una struttura cap in 5',

in cui l' almeno un nucleoside o nucleotide modificato comprende 1-metilpseudouridina e non è pseudouridina o 5-metil-citidina;

in cui il polinucleotide mostra una risposta immunitaria innata cellulare ridotta quando introdotto in una popolazione di cellule, rispetto all'immunità innata cellulare indotta da un corrispondente
5 acido nucleico non modificato.

[0007] Ulteriori aspetti dell'invenzione sono definiti anche nelle rivendicazioni. La divulgazione nella descrizione seguente fornisce sia informazioni relative all'oggetto coperto dalle definizioni delle rivendicazioni sia informazioni aggiuntive che non sono l'oggetto delle rivendicazioni. Nella
10 descrizione che segue, quando si fa riferimento a forme di realizzazione o aspetti, tali forme di realizzazione o aspetti sono da intendersi come forme di realizzazione della descrizione in generale, mentre l'ambito dell'invenzione è definito nelle rivendicazioni. La descrizione di qualsiasi oggetto non coperto dalle rivendicazioni è fornita solo a titolo informativo.

[0008] La presente descrizione fornisce, *tra l'altro*, nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati che possono mostrare una risposta immunitaria innata ridotta quando
15 introdotti in una popolazione di cellule, sia *in vivo* sia *ex vivo*.

[0009] La presente descrizione fornisce polinucleotidi che possono essere isolati o purificati. Questi polinucleotidi codificano uno o più polipeptidi di interesse e comprendono una sequenza di n numero di nucleosidi o nucleotidi collegati comprendenti almeno un nucleoside o nucleotide modificato rispetto alla struttura chimica di un nucleoside o nucleotide A, G, U o C. I
20 polinucleotidi comprendono anche una 5'-UTR comprendente almeno una sequenza di Kozak, una 3'-UTR e almeno una struttura cap in 5'. I polinucleotidi isolati possono inoltre comprendere una coda di poli-A e possono essere purificati.

[0010] I polinucleotidi isolati della descrizione comprendono anche almeno una struttura cap in 5' selezionata dal gruppo costituito da Cap0, Cap1, ARCA, inosina, N1-metil-guanosina,
25 2'fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-osso-guanosina, 2-ammino-guanosina, LNA-


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

guanosina e 2-azido-guanosina.

[0011] Le modificazioni dei polinucleotidi della descrizione possono essere sulla base nucleosidica e/o sulla porzione di zucchero dei nucleosidi che compongono il polinucleotide.

5 [0012] Nel presente contesto, un polinucleotide secondo l'invenzione comprende, la modificazione N1-metilpseudouridina ed è ulteriormente definito nelle rivendicazioni.

[0013] Il nucleoside modificato non è la pseudouridina (ψ) o la 5-metil-citidina (m5C).

[0014] In alcune forme di realizzazione, modificazioni multiple sono incluse nell'acido nucleico modificato o in uno o più nucleosidi o nucleotidi singoli. Ad esempio, le modificazioni a un nucleoside possono includere una o più modificazioni alla base azotata e allo zucchero.

10 [0015] In alcune forme di realizzazione sono forniti nuovi elementi costitutivi, ad esempio nucleosidi e nucleotidi per la preparazione di polinucleotidi modificati e il loro metodo di sintesi e produzione.

[0016] La presente descrizione prevede anche composizioni farmaceutiche comprendenti i polinucleotidi modificati descritti nel presente contesto. Questi possono inoltre includere uno o
15 più eccipienti farmaceuticamente accettabili selezionati da un solvente, solvente acquoso, solvente non acquoso, mezzi di dispersione, diluente, dispersione, coadiuvante di sospensione, agente tensioattivo, agente isotonico, agente addensante o emulsionante, conservante, lipide, liposomi lipidoidi, nanoparticelle lipidiche, nanoparticelle nucleo-guscio, polimeri, peptidi lipoplessi, proteine, cellule, ialuronidasi e loro miscele.

20 [0017] Vengono anche forniti metodi per l'utilizzo dei polinucleotidi e degli acidi nucleici modificati della descrizione. In questo caso, i polinucleotidi possono essere formulati con qualsiasi mezzo noto nella tecnica o somministrati attraverso una qualsiasi delle diverse vie inclusa l'iniezione mediante mezzi intradermici, sottocutanei o intramuscolari.

[0018] La somministrazione degli acidi nucleici modificati della descrizione può avvenire tramite
25 due o più dosi divise uguali o disuguali. In alcuni casi, il livello del polipeptide prodotto dal


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

soggetto somministrando dosi divise del polinucleotide è maggiore dei livelli prodotti somministrando la stessa dose giornaliera totale di polinucleotide come singola somministrazione.

[0019] Il rilevamento degli acidi nucleici modificati o dei polipeptidi codificati può essere
5 eseguito nel fluido corporeo del soggetto o del paziente in cui il fluido corporeo è selezionato dal gruppo costituito da sangue periferico, siero, plasma, ascite, urina, liquido cerebrospinale (liquido cerebrospinale), espettorato, saliva, midollo osseo, liquido sinoviale, umore acqueo, liquido amniotico, cerume, latte materno, liquido di lavaggio broncoalveolare, sperma, liquido prostatico, liquido di cowper o liquido pre-eiaculatorio, sudore, materia fecale, capelli, lacrime, liquido
10 cistico, liquido pleurico e peritoneale, liquido pericardico, linfa, chimo, chilo, bile, liquido interstiziale, mestruazioni, pus, sebo, vomito, secrezioni vaginali, secrezione mucosa, acqua fecale, succo pancreatico, liquidi di lavaggio da cavità sinusali, aspirati broncopulmonari, liquido della cavità blastocilica e sangue del cordone ombelicale.

[0020] In alcuni casi, la somministrazione avviene secondo un regime di dosaggio che avviene
15 nel corso di ore, giorni, settimane, mesi o anni e può essere ottenuta utilizzando uno o più dispositivi selezionati da sistemi di iniezione multi-ago, catetere o sistemi lumen e sistemi a ultrasuoni, elettrici o basati su radiazioni.

[0021] Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici usati nel presente contesto hanno lo stesso significato comunemente compreso dall'esperto della tecnica alla quale appartiene
20 la presente descrizione. Metodi e materiali sono qui descritti per l'uso nella presente descrizione; possono anche essere usati altri metodi e materiali adatti noti nella tecnica. I materiali, i metodi e gli esempi sono soltanto illustrativi e non sono intesi a essere limitativi.

[0022] Altre caratteristiche e vantaggi della presente descrizione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle rivendicazioni.

25 **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0023] Questi e altri scopi, caratteristiche e vantaggi risulteranno evidenti dalla seguente descrizione di forme di realizzazioni specifiche della descrizione, come illustrato nei disegni allegati, in cui analoghi caratteri di riferimento si riferiscono alle stesse parti nelle diverse viste. I disegni non sono necessariamente in scala, essendo invece posto l'accento sull'illustrazione dei principi di varie forme di realizzazione della descrizione.

La FIG. 1 fornisce lo spettro e i grafici dei risultati analitici per N4-Me-CTP (NTP del composto 1). La Figura 1A fornisce lo spettro di risonanza magnetica nucleare (nuclear magnetic resonance, NMR) in DMSO e la Figura 1B fornisce lo spettro NMR in D₂O, la Figura 1C fornisce i risultati della spettrometria di massa (mass spectrometry, MS) e la Figura 1D riguarda i risultati della cromatografia liquida ad alte prestazioni (high performance liquid chromatography, HPLC) per N4-metilcitidina (N4-Me-citidina, composto 1).

La FIG. 2 mostra i risultati HPLC per N4-Me-CTP (NTP del composto 1).

La FIG.3 fornisce i risultati analitici per 2'-OMe-N, N-di-Me-CTP (NTP del composto 2). La Figura 3A fornisce lo spettro NMR. La Figura 3B fornisce i risultati di MS. La Figura 3C fornisce i risultati HPLC per 2'-O-metil-N⁴,N⁴-dimetilcitidina (2'-OMe-N, N-di-Me-citidina, composto 2).

La FIG. 4 fornisce i risultati HPLC per 2'-OMe-N, N-di-Me-CTP (NTP del composto 2).

La FIG. 5 fornisce i risultati HPLC per 5-metossicarbonilmetossi-UTP (NTP del composto 3).

La FIG. 6 fornisce i risultati analitici della 3-metil pseudouridina (composto 4). La Figura 6A fornisce lo spettro NMR della 3-metil pseudouridina (composto 4) e la Figura 6B fornisce i risultati HPLC per la 3-metilpseudouridina (composto 4).

La FIG. 7 fornisce i risultati analitici di 5-TBDMS-OCH₂-citidina (composto 6). La Figura 7A fornisce lo spettro NMR, la Figura 7B fornisce i risultati MS e la Figura 7C fornisce i risultati HPLC per 5-TBDMS-OCH₂-citidina (composto 6).

La FIG. 8 fornisce i risultati analitici della 5-trifluorometil uridina (composto 8). La Figura 8A fornisce lo spettro NMR, la Figura 8B fornisce i risultati MS e la Figura 8C fornisce i risultati


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

HPLC per 5-trifluorometil uridina (composto 8).

La FIG. 9 fornisce i risultati dello spettro NMR per la 5-(metossicarbonil)metil uridina (composto 9).

La FIG. 10 fornisce un grafico che mostra la variabilità dell'espressione di proteine (GCSF; linea B) e citochine (interferone-alfa (IFN α); linea A e fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF α); linea C) in funzione della modificazione percentuale.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

[0024] La presente descrizione fornisce, *tra l'altro*, nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati che mostrano proprietà terapeutiche migliorate tra cui, ma non solo, una risposta immunitaria innata ridotta quando introdotti in una popolazione di cellule.

[0025] Poiché nella tecnica sussiste la necessità di modalità terapeutiche per affrontare la miriade di barriere che circondano l'efficace modulazione della traduzione intracellulare e l'elaborazione degli acidi nucleici che codificano polipeptidi o frammenti di essi, gli inventori hanno dimostrato che alcune sequenze di mRNA modificate hanno il potenziale come terapeutici con benefici che vanno oltre il semplice eludere, evitare o diminuire la risposta immunitaria.

[0026] La presente descrizione risponde a questa esigenza fornendo composti a base di acido nucleico o polinucleotidi che codificano un polipeptide di interesse (ad esempio, mRNA modificato) e che hanno caratteristiche strutturali e/o chimiche che evitano uno o più dei problemi della tecnica, ad esempio, caratteristiche utili per ottimizzare le terapie a base di acido nucleico mantenendo l'integrità strutturale e funzionale, superare la soglia di espressione, migliorare i tassi di espressione, l'emivita e/o le concentrazioni proteiche, ottimizzare la localizzazione delle proteine ed evitare dannose biorisposte come la risposta immunitaria e/o i percorsi di degradazione.

[0027] Nel presente contesto, in parte, sono forniti polinucleotidi che codificano polipeptidi di interesse che sono stati modificati chimicamente per migliorare una o più tra la stabilità e/o


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

clearance nei tessuti, la captazione dei recettori e/o la cinetica, l'accesso cellulare da parte delle composizioni, l'impegno con macchinario traduzionale, l'emivita dell'mRNA, l'efficienza di traduzione, l'evasione immunitaria, la capacità di produzione di proteine, l'efficienza di secrezione (se applicabile), l'accessibilità alla circolazione, l'emivita proteica e/o la modulazione dello stato, la funzione e/o l'attività di una cellula.

[0028] I nucleosidi, i nucleotidi e gli acidi nucleici modificati della descrizione, inclusa la combinazione di modificazioni insegnate nel presente contesto, hanno proprietà superiori che li rendono più adatti come modalità terapeutiche.

[0029] È stato determinato che il modello "tutto o niente" nella tecnica è estremamente insufficiente per descrivere i fenomeni biologici associati all'utilità terapeutica dell'mRNA modificato. I presenti inventori hanno determinato che per migliorare la produzione di proteine, si può considerare la natura della modificazione, o della combinazione di modificazioni, la modificazione percentuale ed lo studio di più di una citochina o della metrica per determinare l'efficacia e il profilo di rischio di un mRNA modificato specifico.

[0030] In un aspetto della descrizione, i metodi per determinare l'efficacia di un mRNA modificato rispetto a quello non modificato implicano la misurazione e l'analisi di una o più citochine la cui espressione è innescata dalla somministrazione dell'acido nucleico esogeno della descrizione. Questi valori vengono confrontati con la somministrazione di un acido nucleico non modificato o con una metrica standard come la risposta alle citochine, PolyIC, R-848 o altro standard noto nella tecnica.

[0031] Un esempio di metrica standard è la misura del rapporto tra il livello o la quantità di polipeptide (proteina) codificato prodotto nella cellula, nel tessuto o nell'organismo rispetto al livello o alla quantità di una o più (o un pannello) delle citochine la cui espressione è innescata nella cellula, nel tessuto o nell'organismo a seguito della somministrazione o del contatto con l'acido nucleico. Tali rapporti sono indicati nel presente documento come il rapporto proteine:


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

citochine o rapporto "PC". Maggiore è il rapporto PC, più efficace è l'acido nucleico modificato (polinucleotide codificante la proteina misurata). Rapporti PC preferiti, mediante citochine, della presente descrizione possono essere maggiori di 1, maggiori di 10, maggiori di 100, maggiori di 1000, maggiori di 10.000 o più. Sono preferiti acidi nucleici modificati con rapporti PC più elevati rispetto a ad acidi nucleici modificati di un costrutto diverso o non modificato.

[0032] Il rapporto PC può essere ulteriormente qualificato dalla modificazione percentuale presente nel polinucleotide. Ad esempio, normalizzata a un acido nucleico modificato al 100%, è possibile determinare la produzione di proteine in funzione della citochina (o il rischio) o del profilo di citochine.

[0033] In un aspetto, la presente descrizione fornisce un metodo per determinare, attraverso chimica, citochine o modificazione percentuale, l'efficacia relativa di qualsiasi polinucleotide modificato specifico confrontando il rapporto PC dell'acido nucleico modificato (polinucleotide).

[0034] In un altro aspetto, gli mRNA modificati chimicamente sono sostanzialmente non tossici e non mutageni.

[0035] In un caso, i nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati possono essere modificati chimicamente sulla faccia del solco maggiore, interrompendo così le interazioni principali del partner di legame del solco, che possono causare risposte immunitarie innate. Inoltre, questi nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati possono essere utilizzati per fornire un carico utile, ad esempio un agente rilevabile o terapeutico, a un bersaglio biologico. Ad esempio, gli acidi nucleici possono essere legati in modo covalente a un carico utile, ad esempio un agente rilevabile o terapeutico, attraverso un linker attaccato alla base azotata o alla frazione dello zucchero. Le composizioni e i metodi descritti nel presente contesto possono essere utilizzati, *in vivo* e *in vitro*, sia a livello extracellulare sia intracellulare, nonché in saggi come saggi privi di cellule.

[0036] In alcuni casi, la presente descrizione fornisce composti comprendenti un nucleotide che


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

interrompe il legame di un solco maggiore che interagisce, ad esempio legando, il partner con un acido nucleico, in cui il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con i partner di interazione del solco maggiore.

5 [0037] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce nucleotidi che contengono modificazioni chimiche, in cui il nucleotide ha un legame alterato con i principali partner di interazione del solco.

10 [0038] In alcuni casi, le modificazioni chimiche si trovano sulla faccia del solco maggiore della base azotata, e in cui le modificazioni chimiche possono includere il cambio o la sostituzione di un atomo di una base azotata pirimidinica con un'ammina, un SH, un alchile (ad esempio, metile o etile) o un alo (ad esempio, cloro o fluoro).

[0039] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce modificazioni chimiche localizzate sulla porzione dello zucchero del nucleotide.

[0040] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce modificazioni chimiche localizzate sulla catena principale fosfatica dell'acido nucleico.

15 [0041] In alcuni casi, le modificazioni chimiche alterano l'elettrochimica sulla faccia del solco maggiore dell'acido nucleico.

[0042] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce nucleotidi che contengono modificazioni chimiche, in cui il nucleotide riduce la risposta immunitaria innata cellulare, rispetto all'immunità innata cellulare indotta da un corrispondente acido nucleico non modificato.

20 [0043] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce sequenze di acido nucleico comprendenti almeno due nucleotidi, la sequenza di acido nucleico comprendendo un nucleotide che interrompe il legame di un partner che interagisce con il solco maggiore con la sequenza di acido nucleico, in cui il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con il principale partner di legame del solco maggiore.

25 [0044] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce composizioni che includono un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

composto come descritto nel presente contesto. In alcune forme di realizzazione, la composizione è una composizione farmaceutica.

[0045] In alcuni casi, la composizione comprende inoltre una RNA polimerasi e un modello di cDNA. In alcuni casi, la composizione comprende inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo
5 costituito da adenosina, citosina, guanosina e uracile.

[0046] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per realizzare una formulazione farmaceutica comprendente una proteina secreta fisiologicamente attiva, comprendente la trasfezione di una prima popolazione di cellule umane con l'acido nucleico farmaceutico prodotto con i metodi descritti nel presente contesto, in cui la proteina secreta è
10 attiva su una seconda popolazione di cellule umane.

[0047] In alcuni casi, la proteina secreta è in grado di interagire con un recettore sulla superficie di almeno una cellula presente nella seconda popolazione.

[0048] In alcuni casi, la proteina secreta è il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF).

[0049] In alcuni casi, la seconda popolazione contiene cellule mieloblastiche che esprimono il
15 recettore del G-CSF.

[0050] In alcuni aspetti, nel presente contesto vengono fornite terapie combinate contenenti uno o più acidi nucleici modificati contenenti regioni traducibili che codificano una proteina o proteine che potenziano l'immunità di un soggetto mammifero insieme a una proteina che induce tossicità cellulare anticorpo-dipendente. Ad esempio, sono fornite terapie contenenti uno o più acidi
20 nucleici che codificano trastuzumab e il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF). In particolare, tali terapie combinate sono utili nei pazienti affetti da carcinoma mammario Her2+ che sviluppano una resistenza indotta al trastuzumab. [Si veda, ad esempio, Albrecht, Immunotherapy. 2(6):795-8 (2010)].

[0051] In un aspetto, si intende che i composti della presente descrizione siano stabili. È inoltre
25 chiaro che determinate caratteristiche della presente descrizione, che sono, per chiarezza, descritte


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

nel contesto di forme di realizzazione separate, possono anche essere fornite in combinazione in un'unica forma di realizzazione. Al contrario, varie caratteristiche della presente descrizione, che sono, per brevità, descritte nel contesto di una singola forma di realizzazione, possono essere anche fornite separatamente o in qualsiasi sottocombinazione adatta.

5 **Nucleotidi, nucleosidi e polinucleotidi modificati della descrizione**

[0052] Nel presente contesto, in un nucleotide, nucleoside o polinucleotide (come gli acidi nucleici della descrizione, ad esempio la molecola di mRNA), i termini "modificazione" o, a seconda dei casi, "modificato/a" si riferiscono a una modificazione rispetto ai ribonucleotidi A, G, U o C. In generale, nel presente contesto, questi termini non intendono riferirsi alle
10 modificazioni ribonucleotidiche nelle frazioni di cap di mRNA 5'-terminali presenti in natura. In un polipeptide, il termine "modificazione" si riferisce a una modificazione rispetto all'insieme canonico di 20 amminoacidi.

[0053] Le modificazioni possono essere varie modificazioni distinte. In alcuni casi, in cui l'acido nucleico è un mRNA, la regione codificante, le regioni fiancheggianti e/o le regioni terminali
15 possono contenere una, due o più (opzionalmente diverse) modificazioni nucleosidiche o nucleotidiche. In alcune forme di realizzazione, un polinucleotide modificato, introdotto in una cellula può mostrare una degradazione ridotta nella cellula, rispetto a un polinucleotide non modificato.

[0054] I polinucleotidi possono includere qualsiasi modificazione utile, come allo zucchero, alla
20 base azotata o al legame internucleosidico (ad esempio a un legame fosfato/a un legame fosfodiesterale/alla catena principale di fosfodiesterale). Ad esempio, il solco maggiore di un polinucleotide o la faccia del solco maggiore di una base azotata può comprendere una o più modificazioni. Uno o più atomi di una base pirimidinica (ad esempio sulla faccia del solco maggiore) possono essere cambiati o sostituiti con ammino opzionalmente sostituito, tiolo
25 opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito (ad esempio metile o etile), o alo (ad


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

esempio cloro o fluoro). In determinati casi, sono presenti modificazioni (ad esempio una o più modificazioni) in ciascuno tra lo zucchero e il legame internucleosidico. Le modificazioni secondo la presente descrizione possono essere modificazioni degli acidi ribonucleici (RNA) in acidi desossiribonucleici (DNA) ad esempio la sostituzione del 2'-OH dell'anello ribofuranosile con 2'-H, acidi nucleici di treosio (TNA), acidi nucleici di glicole (GNA), acidi nucleici peptidici (PNA), acidi nucleici bloccati (LNA) o loro ibridi). Ulteriori modificazioni sono descritte nel presente contesto.

[0055] Come descritto nel presente contesto, i polinucleotidi della descrizione non inducono sostanzialmente una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto il polinucleotide (ad esempio, l'mRNA). Le caratteristiche di una risposta immunitaria innata indotta includono 1) aumento dell'espressione di citochine proinfiammatorie, 2) attivazione di PRR intracellulari (RIG-I, MDA5, ecc. e/o 3) terminazione o riduzione della traduzione proteica.

[0056] In determinati casi, può essere desiderabile che una molecola di acido nucleico modificata introdotta nella cellula venga degradata a livello intracellulare. Ad esempio, la degradazione di una molecola di acido nucleico modificata può essere preferibile se si desidera una tempistica precisa della produzione di proteine. Pertanto, in alcuni aspetti, la descrizione fornisce una molecola di acido nucleico modificato contenente un dominio di degradazione su cui è possibile agire in modo diretto all'interno di una cellula. In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce polinucleotidi comprendenti un nucleoside o nucleotide che possono interrompere il legame di un solco maggiore che interagisce, ad esempio legando, il partner con il polinucleotide (ad esempio, dove il nucleotide modificato ha una ridotta affinità di legame con il partner di interazione del solco maggiore, come rispetto a un nucleotide non modificato).

[0057] I polinucleotidi possono includere opzionalmente altri agenti (ad esempio, agenti che inducono RNAi, agenti RNAi, siRNA, shRNA, miRNA, RNA antisense, ribozimi, DNA catalitico, tRNA, RNA che inducono la formazione della tripla elica, aptameri, vettori, eccetera).

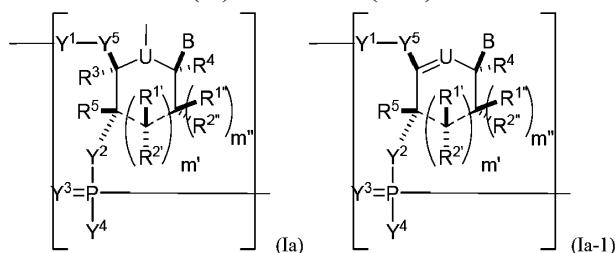

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

In alcuni casi, i polinucleotidi possono includere uno o più RNA messaggeri (mRNA) aventi uno o più nucleosidi o nucleotidi modificati (vale a dire molecole di mRNA modificate). Seguono i dettagli per questi polinucleotidi.

Polinucleotidi

5 [0058] I polinucleotidi della descrizione includono una prima regione di nucleosidi collegati che codificano un polipeptide di interesse, una prima regione fiancheggiante situata in corrispondenza del terminale 5' della prima regione e una seconda regione fiancheggiante situata in corrispondenza del terminale 3' della prima regione.

[0059] In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione
10 fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (Ia) o Formula (Ia-1):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui U è O, S, N(R^U)_{nu}, o C(R^U)_{nu},
in cui nu è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^U è, indipendentemente, H, alo o alchile
15 opzionalmente sostituito;

--- è un legame singolo o assente;

ciascuno di R¹, R², R^{1'}, R^{2'}, R^{1''}, R^{2''}, R¹, R², R³, R⁴ e R⁵ è, indipendentemente, se presente, H, alogeno,
idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi
opzionalmente sostituito, alchililossi opzionalmente sostituito, amminoalcoli opzionalmente
20 sostituito, alcossilalcoli opzionalmente sostituito, idrossialcoli opzionalmente sostituito,
ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile
opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchenile

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

opzionalmente sostituito, o assente; in cui la combinazione di R^3 con uno o più di $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, o R^5 (ad esempio, la combinazione di $R^{1'}$ e R^3 , la combinazione di $R^{1''}$ e R^3 , la combinazione di $R^{2'}$ e R^3 , la combinazione di $R^{2''}$ e R^3 , o la combinazione di R^5 e R^3) può unirli a formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchenile opzionalmente sostituito e, presi insieme agli
5 atomi di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio un eterociclile biciclicico, triciclico o tetraciclico); in cui la combinazione di R^5 con uno o più di $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$ o $R^{2''}$ (ad esempio, la combinazione di $R^{1'}$ e R^5 , la combinazione di $R^{1''}$ e R^5 , la combinazione di $R^{2'}$ e R^5 , o la combinazione di $R^{2''}$ e R^5) può unirli a formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, e, presi insieme con gli atomi
10 di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio un eterociclile biciclicico, triciclico o tetraciclico); e in cui la combinazione di R^4 e uno o più di $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, R^3 o R^5 può unirli a formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito e, presi insieme all'atomo di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio un eterociclile biciclicico, triciclico o
15 tetraciclico);
ciascuno di m' e m'' è indipendentemente un numero intero da 0 a 3 (ad esempio da 0 a 2, da 0 a 1, da 1 a 3, o da 1 a 2);
ciascuno di Y^1 , Y^2 e Y^3 , è, indipendentemente, O, S, Se, $—NR^{N1}—$, alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente
20 sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile opzionalmente sostituito o assente;
ciascun Y^4 è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, boranile, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, tioalcossi
25 opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente

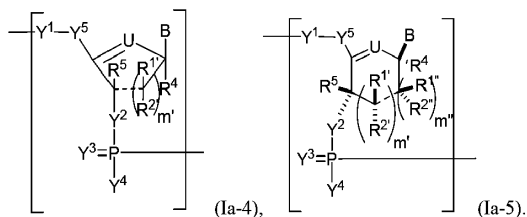
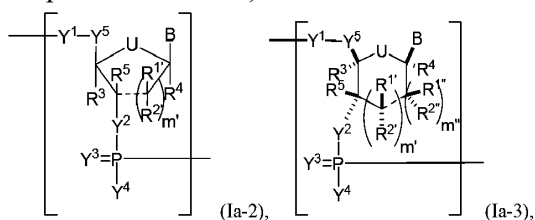

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sostituito;

ogni Y⁵ è, indipendentemente, O, S, Se, alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio metilene),
o eteroalchilene opzionalmente sostituito; e

n è un numero intero da 1 a 100.000; e

- 5 B è una base azotata (ad esempio una purina, una pirimidina o loro derivati), in cui la
combinazione di B e R^{1'}, la combinazione di B e R^{2'}, la combinazione di B e R^{1''} o la combinazione
di B e R^{2''} presi insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati, opzionalmente possono
formare un gruppo biciclico (ad esempio un eterociclile biciclico) o in cui la combinazione di B,
R^{1''} e R³ o la combinazione di B, R^{2''} e R³ possono opzionalmente formare un gruppo triciclico o
10 tetraciclico (ad esempio, un eterociclile triciclico o tetraciclico, come nella Formula (IIo)-(IIp)
nel presente contesto).

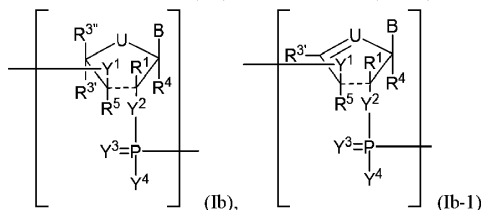


- 15 **[0060]** In alcuni casi, il polinucleotide include un ribosio modificato. In alcuni casi, il
polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda
regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi legati aventi Formula (Ia-2)-(Ia-5) o un
suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile.

- [0061]** In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione
20 fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

aventi Formula (Ib) o Formula (Ib-1):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

U è O, S, N(R^U)_{nu}, o C(R^U)_{nu}, in cui nu è un numero intero compreso da 0 a 2 e ciascun R^U è,

5 indipendentemente, H, alo o alchile opzionalmente sostituito;

--- è un legame singolo o assente;

ciascuno di R¹, R³, R^{3'} e R⁴ è, indipendentemente, H, alo, idrossi, alchile opzionalmente sostituito,

alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi

opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente

10 sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile

opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile

opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, o assente; e in cui la

combinazione di R¹ e R³ o la combinazione di R¹ e R^{3'} possono essere presi insieme per formare

alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito (ad esempio, per

15 produrre un acido nucleico bloccato);

ciascun R⁵ è, indipendentemente, H, alo, idrossi, alchile opzionalmente sostituito, alcossi

opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente

sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, o

assente;

20 ciascuno di Y¹, Y² e Y³, è, indipendentemente, O, S, Se, NR^{N1}—, alchilene opzionalmente

sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente

sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile

opzionalmente sostituito;

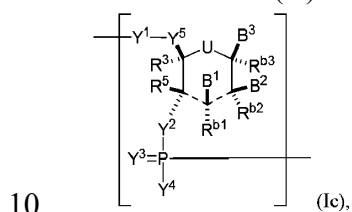

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

ciascun Y^4 è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, boranile, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito;

5 n è un numero intero da 1 a 100.000; e

B è una base azotata.

[0062] In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (Ic):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

U è O, S, $N(R^U)_{nu}$, o $C(R^U)_{nu}$, in cui nu è un numero intero compreso da 0 a 2 e ciascun R^U è, indipendentemente, H, alo o alchile opzionalmente sostituito;

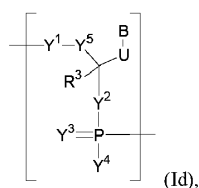
--- è un legame singolo o assente;

15 ciascuno di B^1 , B^2 e B^3 è, indipendentemente, una base azotata (ad esempio, una purina, una pirimidina, o loro derivati, come descritto nel presente contesto), H, alo, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito, in cui uno e solo uno di B^1 , B^2 e B^3 è una base azotata;

20 ciascuno di R^{b1} , R^{b2} , R^{b3} , R^3 e R^5 è, indipendentemente, H, alogeno, idrossi, tiolo, alchile

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

- opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, opzionalmente alcossialcossi sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito,
- 5 amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito;
- ciascuno di Y^1 , Y^2 e Y^3 , è, indipendentemente, O, S, Se, $\text{---NR}^{\text{N1}}\text{---}$, alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile opzionalmente sostituito;
- 10 ciascun Y^4 è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, boranile, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, tioalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito;
- 15 ogni Y^5 è, indipendentemente, O, S, Se, alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio metilene), o eteroalchilene opzionalmente sostituito; e
- n è un numero intero da 1 a 100.000; e
- in cui l'anello che include U può includere uno o più doppi legami.
- [0063]** In specifiche forme di realizzazione, l'anello includente U non ha un doppio legame tra U-
- 20 $\text{CB}^3\text{R}^{\text{b3}}$ o tra $\text{CB}^3\text{R}^{\text{b3}}\text{-C}^{\text{B2}}\text{R}^{\text{b2}}$.
- [0064]** In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (Id):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui U è O, S, N(R^U)_{nu}, o C(R^U)_{nu}, in cui nu è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^U è, indipendentemente, H, alo o alchile opzionalmente sostituito;

- 5 ciascun R³ è, indipendentemente, H, alogeno, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, opzionalmente alcossialcossi sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito;

10 ciascuno di Y¹, Y² e Y³, è, indipendentemente, O, S, Se, —NR^{N1}—, alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile opzionalmente sostituito;

- 15 ciascun Y⁴ è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, boranile, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, tioalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito;

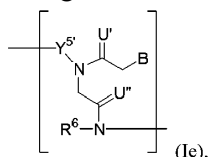
- 20 ogni Y⁵ è, indipendentemente, O, S, alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio metilene), o eteroalchilene opzionalmente sostituito;

n è un numero intero da 1 a 100.000; e

B è una base azotata (ad esempio, una purina, una pirimidina o loro derivati).

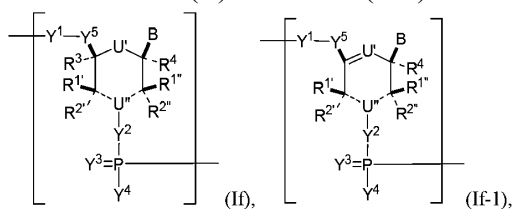
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0065] In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (Ie):



- 5 o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile.
- in cui ciascuno di U' e U'' indipendentemente è O, S, N(R^U)_{nu}, o C(R^U)_{nu}, in cui nu è un numero intero compreso da 0 a 2 e ciascun R^U è, indipendentemente, H, alogeno o alchile opzionalmente sostituito;
- ciascun R⁶ è, indipendentemente, H, alogeno, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito,
- 10 alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, opzionalmente alcossialcossi sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito;
- 15 ogni Y⁵ è, indipendentemente, O, S, alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio metilene o etilene), o eteroalchilene opzionalmente sostituito;
- n è un numero intero da 1 a 100.000; e
- B è una base azotata (ad esempio, una purina, una pirimidina o loro derivati).

[0066] In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (If) o Formula (If-1):



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile.

in cui ciascuno di U' e U'' indipendentemente è O, S, N, N(R^U)_{nu}, o C(R^U)_{nu}, in cui nu è un numero intero compreso da 0 a 2 e ciascun R^U è, indipendentemente, H, alogeno o alchile opzionalmente sostituito /ad esempio U' è O e U'' è N);

5 --- è un legame singolo o assente;

ciascuno di R¹, R², R^{1''}, R^{2''}, R³ e R⁴ è, indipendentemente, H, alogeno, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalcoli opzionalmente sostituito, alcossialcoli opzionalmente sostituito, idrossialcoli opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente

10 sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito o assente;

e in cui la combinazione di R¹ e R³, la combinazione di R^{1''} e R³, la combinazione di R² e R³ o la combinazione di R^{2''} e R³ possono essere presi insieme per formare alchilene opzionalmente sostituiti o eteroalchilene opzionalmente sostituito (ad esempio, per produrre un acido nucleico

15 bloccato); ciascuno di m' e m'' è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 3 (ad esempio, da 0 a 2, da 0 a 1, da 1 a 3, o da 1 a 2);

ciascuno di Y¹, Y² e Y³, è, indipendentemente, O, S, Se, —NR^{N1}—, alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile

20 opzionalmente sostituito o assente;

ciascun Y⁴ è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, boranile, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, tioalcoli opzionalmente sostituito, alcossialcoli opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente

25 sostituito;


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

ogni Y^5 è, indipendentemente, O, S, Se, alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio metilene),
o eteroalchilene opzionalmente sostituito; e

n è un numero intero da 1 a 100.000; e

B è una base azotata (ad esempio, una purina, una pirimidina o loro derivati).

5 **[0067]** In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], l'anello comprendendo U ha uno o due doppi legami.

[0068] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], ciascuno di R^1 , R^1 , e
10 R^1 , se presente, è H. In ulteriori forme di realizzazione, ciascuno di R^2 , R^2 e R^2 , se presente, è, indipendentemente, H, alo (ad esempio fluoro), idrossi, alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi o etossi) o alcossialcossi opzionalmente sostituito. In aspetti specifici, l'alcossialcossi è $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio, da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a
15 10 (ad esempio da 0 a 4 da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} . In alcuni aspetti, $s2$ è 0, $s1$ è 1 o 2, $s3$ è 0 o 1 e R' è alchile C_{1-6} .

[0069] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], ciascuno di R^2 , R^2 , e
20 R^2 , se presente, è H. In ulteriori aspetti, ciascuno di R^1 , R^1 e R^1 , se presente, è, indipendentemente, H, alo (ad esempio fluoro), idrossi, alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi o etossi) o alcossialcossi opzionalmente sostituito. In aspetti specifici, l'alcossialcossi è $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio, da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a
25 10 (ad esempio da 0 a 4 da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} . In alcuni aspetti, $s2$ è 0, $s1$ è 1 o 2, $s3$ è 0 o 1 e R' è alchile C_{1-6} .


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0070] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], ciascuno di R^3 , R^4 , e R^5 è, indipendentemente, H, alo (ad esempio fluoro), idrossi, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi o etossi) o alcossialcossi opzionalmente sostituito.

5 In aspetti specifici, R^3 è H, R^4 è H, R^5 è H, oppure R^3 , R^4 e R^5 sono tutti H. In aspetti specifici, R^3 è alchile C_{1-6} , R^4 è alchile C_{1-6} , R^5 è alchile C_{1-6} , oppure R^3 , R^4 e R^5 sono tutti alchile C_{1-6} . In aspetti specifici, R^3 e R^4 sono entrambi H, e R^5 è alchile C_{1-6} .

[0071] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], R^3 e R^5 si uniscono per
10 formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito e, presi insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio, un eterociclile biciclico, triciclico o tetraciclico, come gli analoghi trans-3',4', in cui R^3 e R^5 si uniscono per formare eteroalchilene [ad esempio, -
(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-, in cui ciascuno di b1, b2 e b3 sono, indipendentemente, un numero
15 intero da 0 a 3).

[0072] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], R^3 e uno o più di R^1 , R^1 , R^2 , R^2 o R^5 si uniscono per formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito e, presi insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati, forniscono
20 un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio, un eterociclile biciclico, triciclico o tetraciclico, R^3 e uno o più di R^1 , R^1 , R^2 , R^2 o R^5 si uniscono per formare eteroalchilene (ad esempio, -
(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-, in cui ciascuno di b1, b2 e b3 è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 3).

[0073] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], R^5 e uno o più di R^1 ,
25


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

$R^{1'}$, $R^{2'}$ o $R^{2''}$ si uniscono per formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito e, presi insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio un eterociclile biciclico, triciclico o tetraciclico, R^5 e uno o più di $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$ o $R^{2''}$ si uniscono per formare eteroalchilene (ad esempio, 5 $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, in cui ciascuno di $b1$, $b2$ e $b3$ sono, indipendentemente, un numero intero da 0 a 3).

[0074] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], ogni Y^2 è, indipendentemente, O, S o $-NR^{N1}$, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito o arile opzionalmente sostituito. In 10 specifiche forme di realizzazione, Y^2 è NR^{N1} , in cui R^{N1} è H o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, alchile C_{1-6} , come metile, etile, isopropile o n-propile).

[0075] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], ciascun Y^3 è 15 indipendentemente O o S.

[0076] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], R^1 è H; ogni R^2 è, indipendentemente, H, alo (ad esempio fluoro), idrossi, alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi o etossi), o alcossialcossi opzionalmente sostituito (ad esempio - 20 $(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , come in cui $s2$ è 0, $s1$ è 1 o 2, $s3$ è 0 o 1, e R' è alchile C_{1-6}); ogni Y^2 è, indipendentemente, O o $-NR^{N1}$, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito o 25 arile opzionalmente sostituito [ad esempio, in cui R^{N1} è H o alchile opzionalmente sostituito (ad


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

esempio, alchile C_{1-6} , come metile, etile, isopropile o n-propile)]; e ogni Y^3 è, indipendentemente, O o S (ad esempio, S). In ulteriori aspetti, R^3 è H, alo (ad esempio fluoro), idrossi, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi o etossi) o alcossialcossi opzionalmente sostituito. In ancora ulteriori aspetti, ogni Y^1 è, indipendentemente,
5 O o $-NR^{N1}$ -, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito o arile opzionalmente sostituito [ad esempio, in cui R^{N1} è H o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, alchile C_{1-6} , come metile, etile, isopropile o n-propile)]; e ciascun Y^4 è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, tioalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi
10 opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito.

[0077] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], ciascun R^1 è indipendentemente, H, alo (ad esempio fluoro), idrossi, alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi o etossi), o alcossialcossi opzionalmente sostituito (ad esempio -
15 $(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , come in cui $s2$ è 0, $s1$ è 1 o 2, $s3$ è 0 o 1, e R' è alchile C_{1-6}); R^2 è H, ciascun Y^2 è, indipendentemente, O o $-NR^{N1}$ -, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente
20 sostituito o arile opzionalmente sostituito [ad esempio, in cui R^{N1} è

[0078] H o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, alchile C_{1-6} , come metile, etile, isopropile o n-propile)]; e ogni Y^3 è, indipendentemente, O o S (ad esempio, S). In ulteriori aspetti, R^3 è H, alo (ad esempio fluoro), idrossi, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi o etossi) o alcossialcossi opzionalmente sostituito. In ancora
25 ulteriori aspetti, ogni Y^1 è, indipendentemente, O o $-NR^{N1}$ -, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito o arile opzionalmente sostituito [ad esempio, in cui R^{N1} è H o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, alchile C_{1-6} , come metile, etile, isopropile o n-propile)]; e ciascun Y^4 è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, tioalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito.

[0079] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], l'anello includendo U si trova nella configurazione β -D (ad esempio, β -D-ribo).

10 **[0080]** In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], l'anello includendo U si trova nella configurazione α -L (ad esempio, α -L-ribo).

[0081] In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], uno o più B è non pseudouridina (ψ) o 5-metil-citidina (m^5C).

[0082] In alcuni aspetti, da circa il 10% a circa il 100% di n numero di basi azotate B non è ψ o m^5C (ad esempio, dal 10% al 20%, dal 10% al 35%, dal 10% al 50%, dal 10% al 60%, dal 10% al 75%, dal 10% al 90%, dal 10% al 95%, dal 10% al 98%, dal 10% al 99%, dal 20% al 35%, dal 20% al 50%, dal 20% al 60%, dal 20% al 75%, dal 20% al 90%, dal 20% al 95%, dal 20% al 98%, dal 20% al 99%, dal 20% al 100%, dal 50% al 60%, dal 50% al 75%, dal 50% al 90%, dal 50% al 95%, dal 50% al 98%, dal 50% al 99%, da 50 % al 100%, dal 75% al 90%, dal 75% al 95%, dal 75% al 98%, dal 75% al 99% e dal 75% al 100% di n numero di B non è ψ o m^5C). In alcuni aspetti, B non è ψ o m^5C .

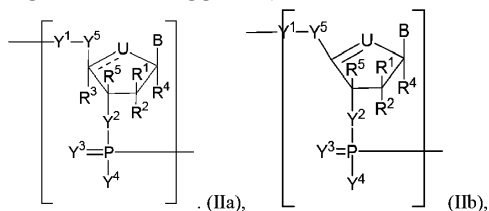
25 **[0083]** In alcuni aspetti dei polinucleotidi [ad esempio, Formule (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr)], quando B è una base


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

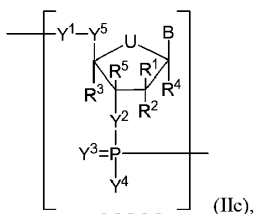
azotata non modificata selezionata tra citosina, guanina, uracile e adenina, quindi almeno una di Y^1 , Y^2 o Y^3 non è O.

[0084] In alcuni casi, il polinucleotide include un ribosio modificato. In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda

5 regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIa-IIc):



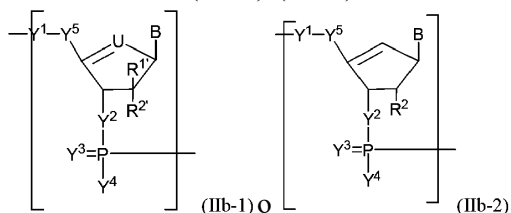
o



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile. In casi specifici, U è O o $C(R^U)_{nu}$,
 10 in cui nu è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^U è, indipendentemente, H, alo o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, U è $-CH_2-$ o $-CH-$). In altre forme di realizzazione, ciascuno di R^1 , R^2 , R^3 , R^4 e R^5 è, indipendentemente, H, alo, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchililossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente
 15 sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, o assente (ad esempio, ogni R^1 e R^2 è, indipendentemente H, alo, idrossi, alchile opzionalmente sostituito o alcossi opzionalmente sostituito; ciascun R^3 e R^4 è, indipendentemente, H o alchile opzionalmente
 20 sostituito; e R^5 è H o idrossi), e e è
 è un legame singolo o doppio legame.

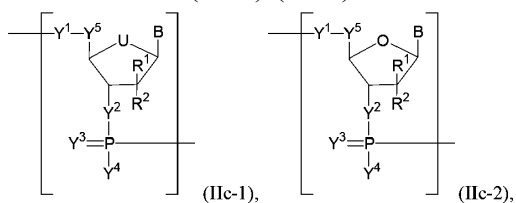
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0085] In casi specifici, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIb-1)-(IIb-2):



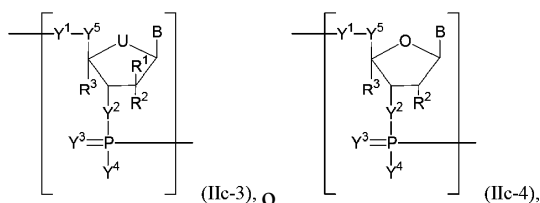
5 o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile. In alcuni casi, U è O o C(R^U)_{nu}, in cui nu è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^U è, indipendentemente, H, alo o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, U è —CH₂— o —CH—). In altri casi, ciascuno di R¹ e R² è, indipendentemente, H, alo, idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito,
 10 amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito o assente (ad esempio, ciascun R¹ e R² è, indipendentemente, H, alo, idrossi, alchile opzionalmente sostituito o alcossi opzionalmente
 15 sostituito, ad esempio H, alo, idrossi, alchile o alcossi). In casi specifici, R² è idrossi o alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi, etossi o qualsiasi descritto nel presente contesto).

[0086] In casi specifici, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIc-1)-(IIc-4):



20

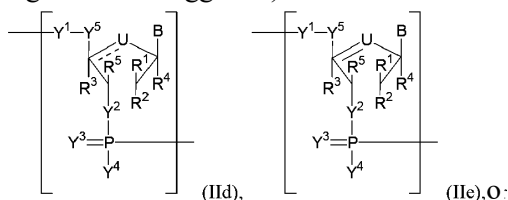
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile.

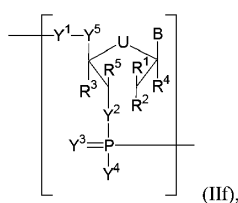
[0087] In alcuni casi, U è O o C(R^U)_{nu}, in cui nu è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^U è, indipendentemente, H, alo o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, U è —CH₂— o —CH—). In alcuni casi, ciascuno di R¹, R², e R³ è, indipendentemente, H, alo, idrossi, tiolo, alchile sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, o assente (ad esempio, ogni R¹ e R² è, indipendentemente, H, alo, idrossi, alchile opzionalmente sostituito o alcossi opzionalmente sostituito, ad esempio H, alo, idrossi, alchile o alcossi; e ciascun R³ è, indipendentemente, H o alchile opzionalmente sostituito). In casi specifici, R² è alcossi opzionalmente sostituito (ad esempio metossi, etossi o qualsiasi descritto nel presente contesto). In casi specifici, R¹ è alchile opzionalmente sostituito e R² è idrossi. In altri casi, R¹ è idrossi e R² è alchile opzionalmente sostituito. In ulteriori casi, R³ è alchile opzionalmente sostituito.

[0088] In alcuni casi, il polinucleotide include un ribosio aciclico modificato. In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIId)-(IIIf):



20

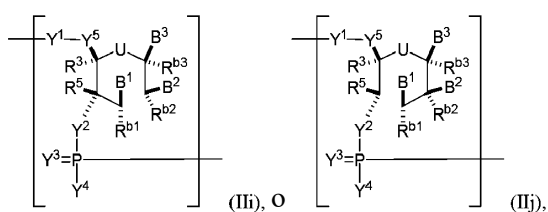
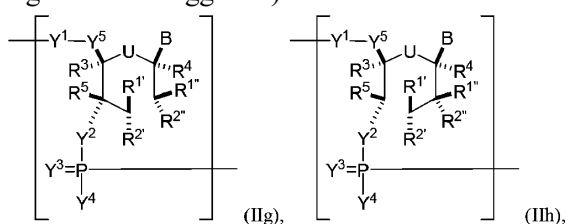
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile.

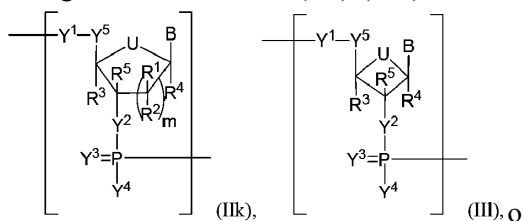
[0089] In alcuni casi, il polinucleotide include un esitolo aciclico modificato. In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda

5 regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIg)-(IIj):

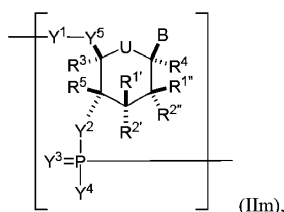


o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile.

10 [0090] In alcuni casi, il polinucleotide include una frazione dello zucchero avente un anello di ribosio contratto o espanso. In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIIk)-(IIIm):

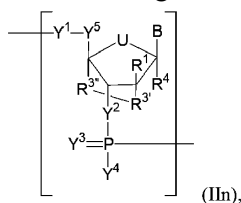


15



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui ciascuno di R¹, R^{1'}, R² e R^{2'} è, indipendentemente, H, alo, idrossi, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito o assente; e in cui la combinazione di R² e R³ o la combinazione di R^{2''} e R³ possono essere presi insieme per formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito.

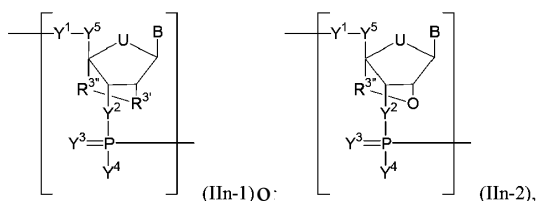
[0091] In alcuni casi, il polinucleotide include un ribosio modificato bloccato. In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIn):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui R^{3'} è O, S o -NR^{N1}-, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito o arile opzionalmente sostituito e R^{3''} è alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio -CH₂-, -CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂-) o eteroalchilene opzionalmente sostituito (ad esempio -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂-, o -CH₂CH₂OCH₂-) (ad esempio, R^{3'} è O e R^{3''} è alchilene opzionalmente sostituito [ad esempio, -CH₂-, -CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂-]).

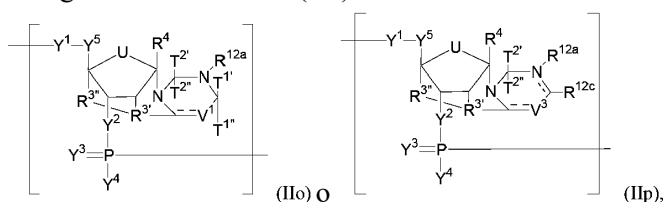
[0092] In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (II-n1)-(II-n2):

Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui $R^{3'}$ è O, S o $-NR^{N1-}$, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito o arile opzionalmente sostituito e $R^{3''}$ è alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, o $-CH_2CH_2CH_2-$) o eteroalchilene opzionalmente sostituito (ad esempio $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2OCH_2-$, o $-CH_2CH_2OCH_2-$) [ad esempio $R^{3'}$ è O e $R^{3''}$ è alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, o $-CH_2CH_2CH_2-$)].

[0093] In alcuni casi, il polinucleotide include un ribosio modificato bloccato che forma un eterociclile tetraciclico. In alcuni casi, il polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione fiancheggiante) include n numero di nucleosidi collegati aventi Formula (IIo):

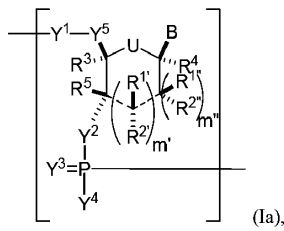


o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui R^{12a} , R^{12c} , T^1 , $T^{1''}$, T^2 , $T^{2''}$, V^1 e V^3 sono come descritti nel presente contesto.

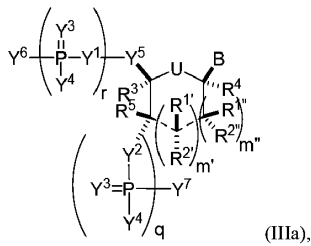
[0094] Qualsiasi formula per i polinucleotidi può includere una o più basi azotate descritte nel presente contesto [ad esempio, Formule (b1)-(b43)].

[0095] In un aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per preparare un polinucleotide comprendente almeno un nucleotide che interrompe il legame di un partner di interazione del solco maggiore con l'acido nucleico, in cui il polinucleotide comprende un numero n di nucleosidi aventi Formula (Ia), come definito nel presente contesto:

Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



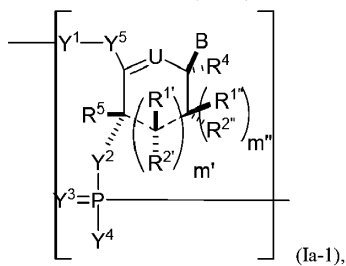
il metodo comprendendo la reazione di un composto di Formula (IIIa), come definito nel presente contesto:



5 con una RNA polimerasi e un modello di cDNA.

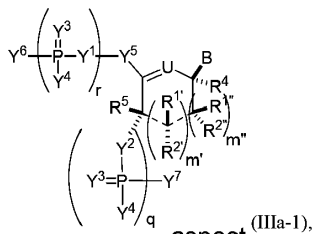
[0096] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per amplificare un polinucleotide comprendente almeno un nucleotide che interrompe il legame di un partner di legame del solco maggiore con la sequenza polinucleotidica, il metodo comprendendo: far reagire un composto di Formula (IIIa), come definito nel presente contesto, con un primer, un modello di cDNA e una RNA polimerasi.

[0097] In un aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per preparare un polinucleotide comprendente almeno un nucleotide che interrompe il legame di un partner di interazione del solco maggiore con l'acido nucleico, in cui il polinucleotide comprende un numero n di nucleosidi aventi Formula (Ia-1), come definito nel presente contesto:



il metodo comprendendo la reazione di un composto di Formula (IIIa-1), come definito nel presente contesto:

Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



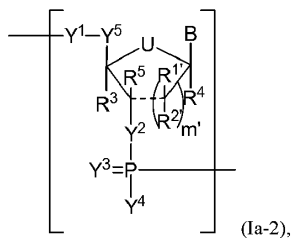
con una RNA polimerasi e un modello di cDNA.

[0098] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per amplificare un polinucleotide comprendente almeno un nucleotide (ad esempio, molecola di mRNA modificata) che interrompe il legame di un partner di legame del solco maggiore con la sequenza polinucleotidica, il metodo comprendendo: far reagire un composto di Formula (IIIa-1), come

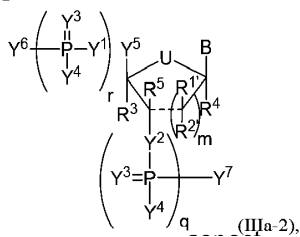
5

[0099] In un aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per preparare un polinucleotide comprendente almeno un nucleotide che interrompe il legame di un partner di interazione del solco maggiore con la sequenza di acido nucleico, in cui il polinucleotide comprende un numero

10



il metodo comprendendo la reazione di un composto di Formula (IIIa-2), come definito nel presente contesto:



15

con una RNA polimerasi e un modello di cDNA.

[0100] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per amplificare un

Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

polinucleotide comprendente almeno un nucleotide (ad esempio, molecola di mRNA modificata) che interrompe il legame di un partner di legame del solco maggiore con la sequenza polinucleotidica, il metodo comprendendo far reagire un composto di Formula (IIIa-2), come definito nel presente contesto, con un primer, un modello di cDNA e una RNA polimerasi.

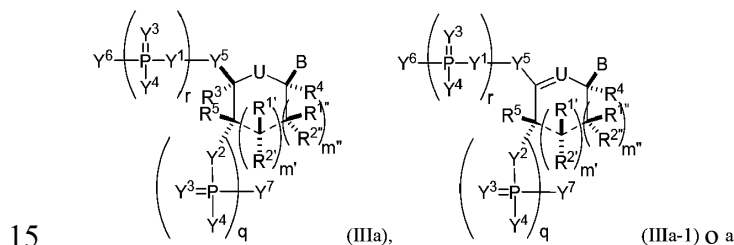
5 [0101] In alcuni aspetti, la reazione può essere ripetuta da 1 a circa 7.000 volte. In uno qualsiasi degli aspetti del presente contesto, B può essere una base azotata di Formula (b1)-(b43).

[0102] I polinucleotidi possono includere opzionalmente regioni fiancheggianti in 5' e/o in 3', che sono descritte nel presente contesto.

Nucleotidi e nucleosidi modificati

10 [0103] La presente descrizione include anche gli elementi costitutivi, ad esempio, ribonucleosidi modificati, ribonucleotidi modificati, dei polinucleotidi, ad esempio, molecole di RNA (o mRNA) modificate. Ad esempio, questi elementi costitutivi possono essere utili per preparare i polinucleotidi dei casi della descrizione.

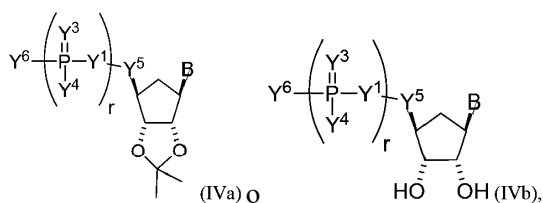
[0104] In alcuni casi, la molecola costitutiva ha la Formula (IIIa) o (IIIa-1):



un suo sale farmaceuticamente accettabile o stereoisomero, in cui i sostituenti sono come descritti nel presente contesto [ad esempio, per la Formula (Ia) e (Ia-1)], e in cui B è una base azotata non modificata selezionata tra citosina, guanina, uracile e adenina, quindi a almeno uno di Y¹, Y² o Y³ non è O.

20 [0105] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, ha la Formula (IVa)-(IVb):

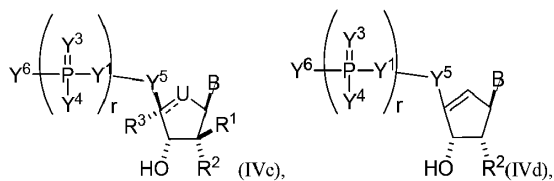
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



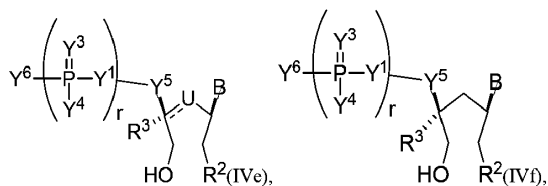
o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui B è come descritto nel presente documento [ad esempio, uno qualsiasi di (b1)-(b43)].

[0106] In casi specifici, la formula (IVa) o (IVb) è combinata con un uracile modificato [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b1)-(b9), (b21)-(b23) e (b28)-(b31), come la Formula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)]. In casi specifici, la Formula (IVa) o (IVb) è combinata con una citosina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b10)-(b14), (b24), (b25) e (b32)-(b36), come i casi di formula (b10) o (b32)]. In casi specifici, la Formula (IVa) o (IVb) è combinata con una guanina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b15)-(b17) e (b37)-(b40)]. In casi specifici, la Formula (IVa) o (IVb) è combinata con un'adenina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b18)-(b20) e (b41)-(b43)].

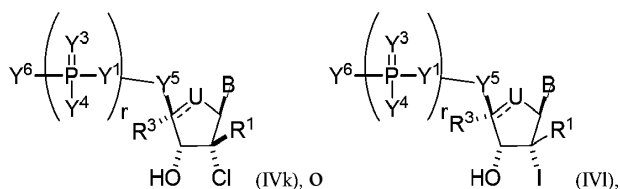
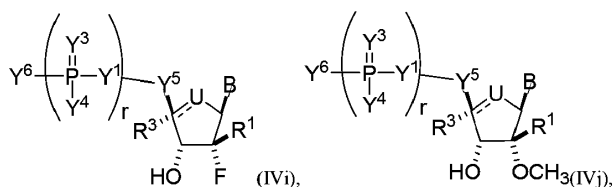
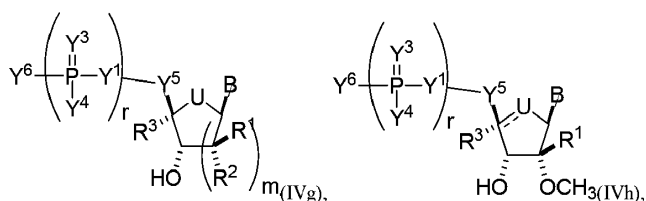
[0107] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, ha la Formula (IVc)-(IVk):



15



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



5

o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui B è come descritto nel presente documento [ad esempio, uno qualsiasi di (b1)-(b43)].

[0108] In casi specifici, una delle Formule (IVc) o (IVk) è combinata con un uracile modificato [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b1)-(b9), (b21)-(b23) e (b28)-(b31), come la Formula

10

[0109] In casi specifici, una delle Formule (IVc)-(IVk) è combinata con una citosina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b10)-(b14), (b24), (b25) e (b32)-(b36), come la Formula (b10) o (b32)].

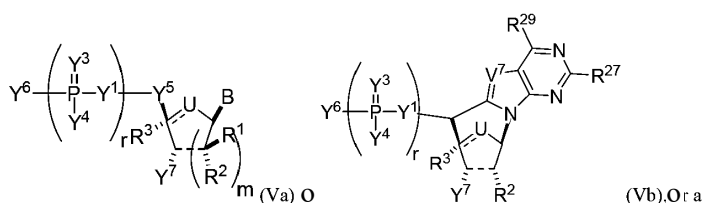
[0110] In casi specifici, una delle formule (IVc)-(IVk) è combinata con una guanina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b15)-(b17) e (b37)-(b40)].

15

[0111] In casi specifici, una delle Formule (IVc)-(IVk) è combinata con un'adenina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b18)-(b20) e (b41)-(b43)].

[0112] In altri casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, ha la Formula (Va)-(Vb):

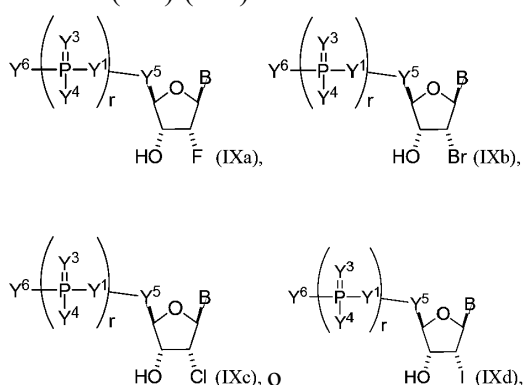
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui B è come descritto nel presente documento [ad esempio, uno qualsiasi di (b1)-(b43)].

[0113] In altri casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, ha la

5 Formula (IXa)-(IXd):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui B è come descritto nel presente documento [ad esempio, uno qualsiasi di (b1)-(b43)]. [In casi specifici, una delle

Formule (IXa) o (IXd) è combinata con un uracile modificato [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b1)-(b9), (b21)-(b23) e (b28)-(b31), come la Formula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)].

In casi specifici, una delle Formule (IXa)-(IXd) è combinata con una citosina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b10)-(b14), (b24), (b25) e (b32)-(b36), come la Formula

15 (b10) o (b32)].

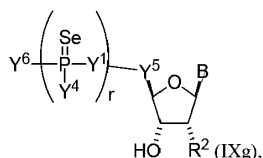
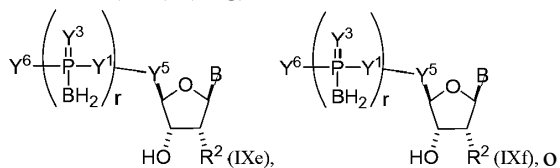
[0114] In casi specifici, una delle formule (IXa)-(IXd) è combinata con una guanina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b15)-(b17) e (b37)-(b40)].

[0115] In casi specifici, una delle Formule (IXa)-(IXd) è combinata con un'adenina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b18)-(b20) e (b41)-(b43)].

20 [0116] In altri casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, ha la

Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

Formula (IXe)-(IXg):



5 o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui B è come descritto nel presente documento [ad esempio, uno qualsiasi di (b1)-(b43)].

[0117] In casi specifici, una delle Formule (IXe) o (IXg) è combinata con un uracile modificato [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b1)-(b9), (b21)-(b23) e (b28)-(b31), come i casi di Formula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)].

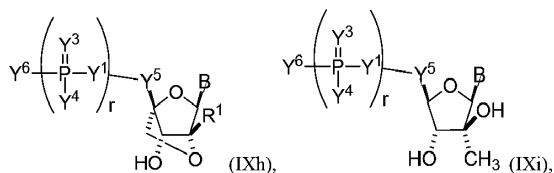
10 [0118] In casi specifici, una delle Formule (IXe)-(IXg) è combinata con una citosina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b10)-(b14), (b24), (b25) e (b32)-(b36), come la Formula (b10) o (b32)].

[0119] In casi specifici, una delle formule (IXe)-(IXg) è combinata con una guanina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b15)-(b17) e (b37)-(b40)].

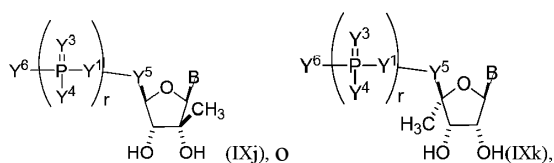
15 [0120] In casi specifici, una delle Formule (IXe)-(IXg) è combinata con un'adenina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b18)-(b20) e (b41)-(b43)].

[0121] In altri casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, ha la

Formula (IXh)-(IXk):



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R



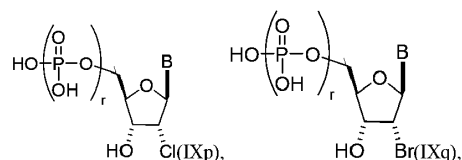
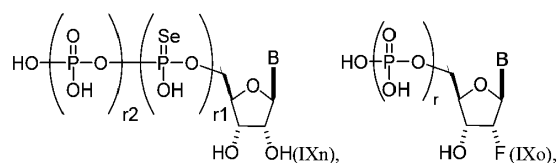
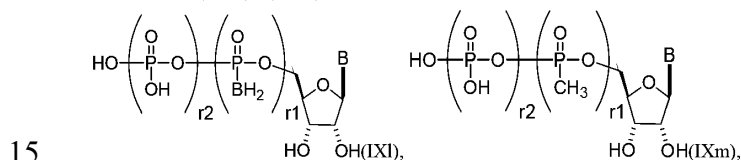
o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui B è come descritto nel presente documento [ad esempio, uno qualsiasi di (b1)-(b43)]. [In casi specifici, una delle Formule (IXh) o (IXk) è combinata con un uracile modificato [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b1)-(b9), (b21)-(b23) e (b28)-(b31), come la Formula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)].

5 In casi specifici, una delle Formule (IXh)-(IXk) è combinata con una citosina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b10)-(b14), (b24), (b25) e (b32)-(b36), come la Formula (b10) o (b32)].

[0122] In casi specifici, una delle formule (IXh)-(IXk) è combinata con una guanina modificata

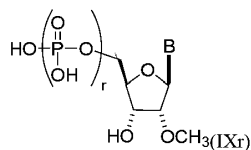
10 [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b15)-(b17) e (b37)-(b40)]. In casi specifici, una delle Formule (IXh)-(IXk) è combinata con un'adenina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b18)-(b20) e (b41)-(b43)].

[0123] In altri casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, ha la Formula (IXI)-(IXr):




 Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

o



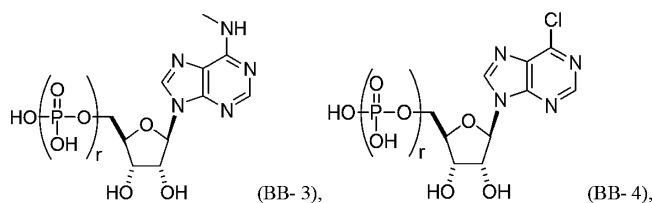
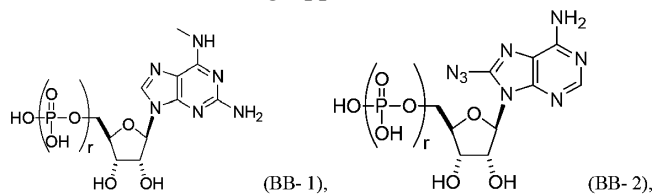
o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui ogni r1 e r2 è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5 (ad esempio, da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5) e B è come descritto nel presente contesto [ad esempio, uno qualsiasi di (b1)-(b43)].

[0124] In casi specifici, una delle Formule (IXI) o (IXr) è combinata con un uracile modificato [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b1)-(b9), (b21)-(b23) e (b28)-(b31), come la Formula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)].

[0125] In casi specifici, una delle Formule (IXI)-(IXr) è combinata con una citosina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b10)-(b14), (b24), (b25) e (b32)-(b36), come la Formula (b10) o (b32)].

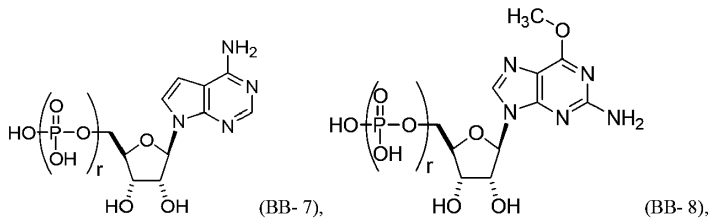
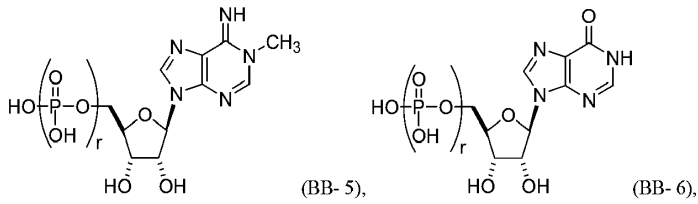
[0126] In casi specifici, una delle formule (IXI)-(IXr) è combinata con una guanina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b15)-(b17) e (b37)-(b40)]. In casi specifici, una delle Formule (IXI)-(IXr) è combinata con un'adenina modificata [ad esempio, una qualsiasi delle Formule (b18)-(b20) e (b41)-(b43)].

[0127] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, può essere selezionata dal gruppo costituito da:

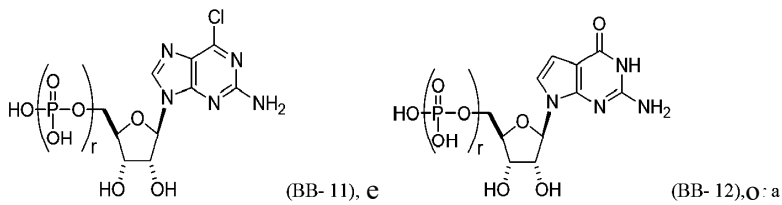
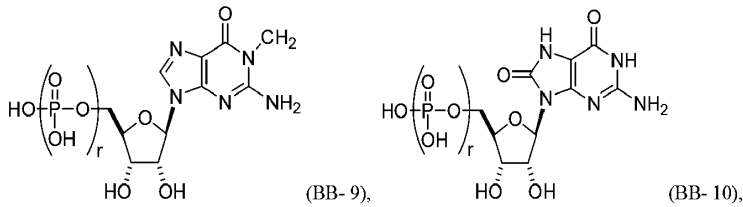


20

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

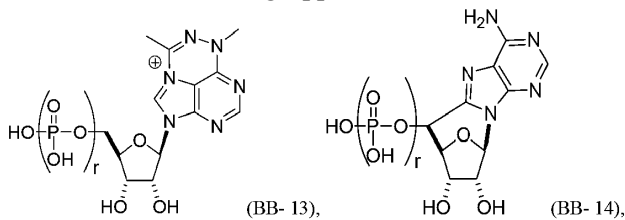


5

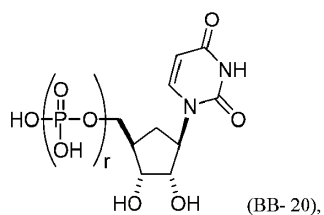
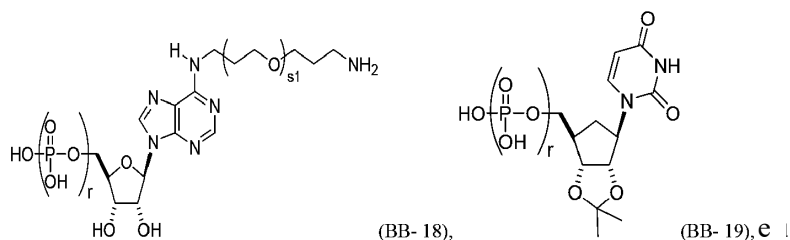
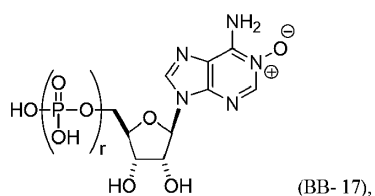
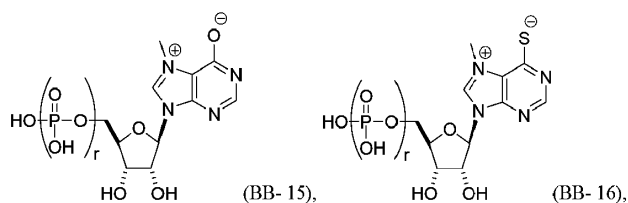


un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui r è, indipendentemente, un
10 numero intero da 0 a 5 (ad esempio, da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5).

[0128] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, può essere selezionata dal gruppo costituito da:

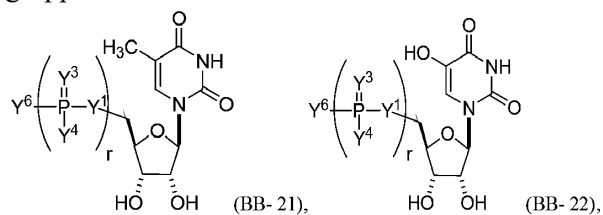


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

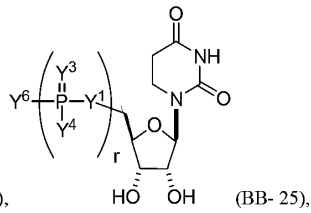
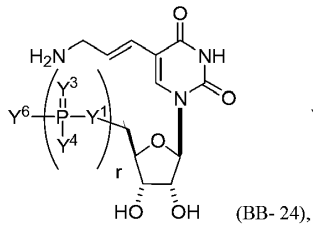
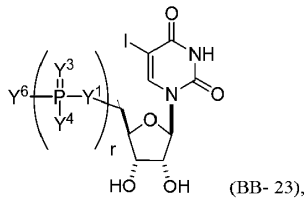


o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5 (ad esempio, da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5) e s1 è come descritto nel presente contesto.

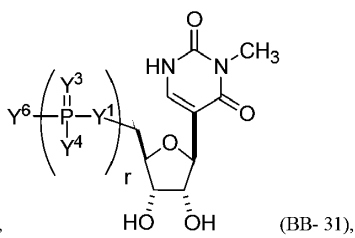
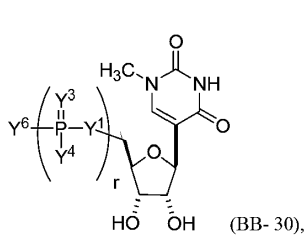
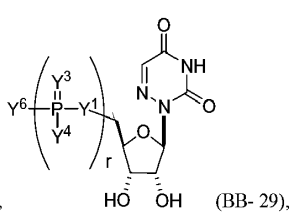
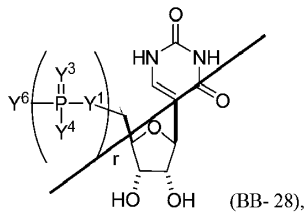
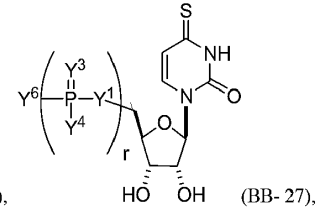
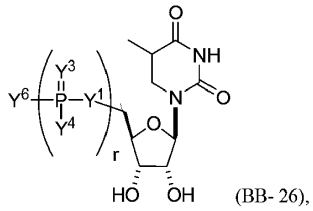
[0129] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un acido nucleico (ad esempio, RNA, mRNA, polinucleotide), è un'uridina modificata (ad esempio, selezionata dal gruppo costituito da:



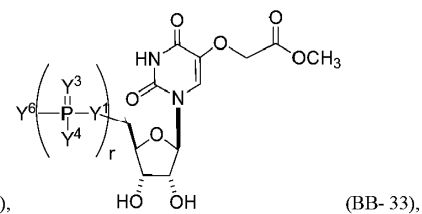
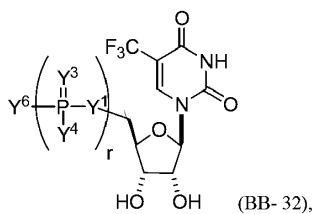
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

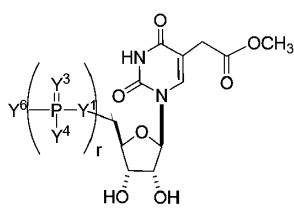


5

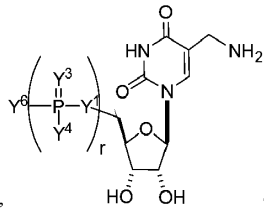


10

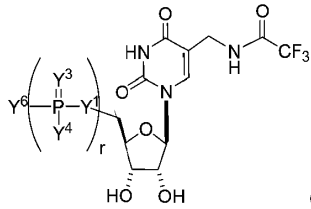




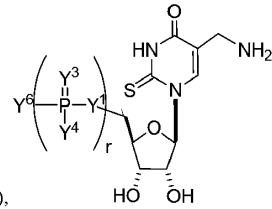
(BB- 34),



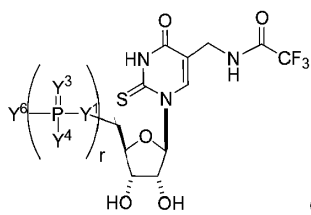
(BB- 35),



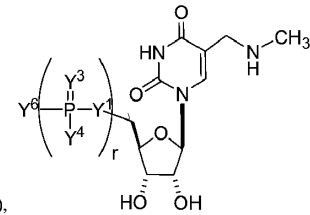
(BB- 36),



(BB- 37),

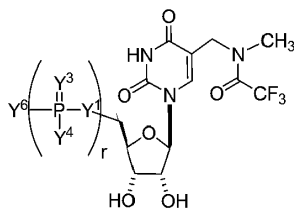


(BB- 38),

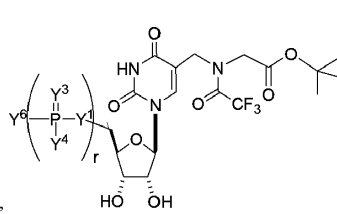


(BB- 39),

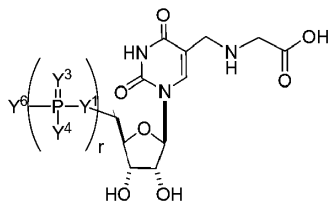
5



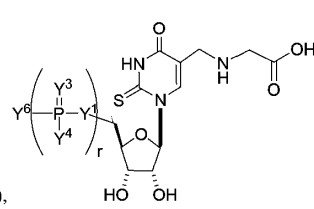
(BB- 40),



(BB- 41),

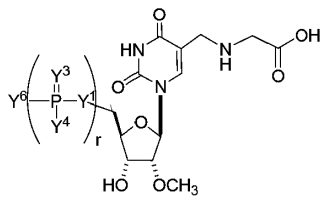


(BB- 42),

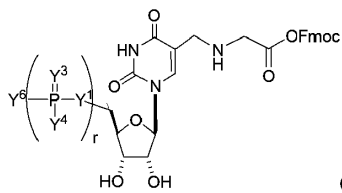


(BB- 43),

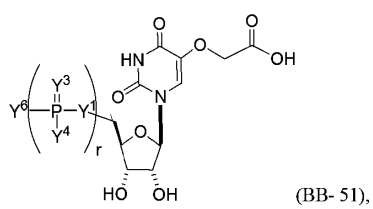
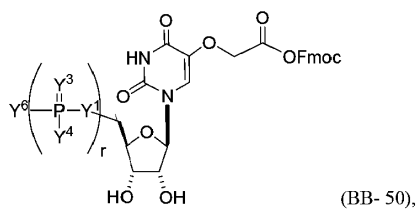
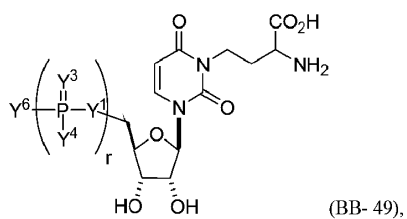
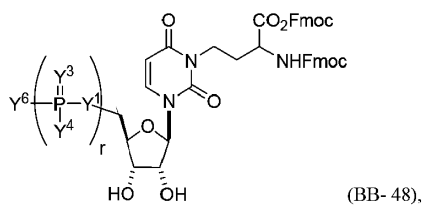
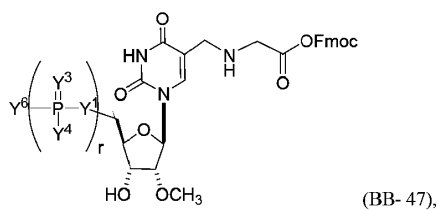
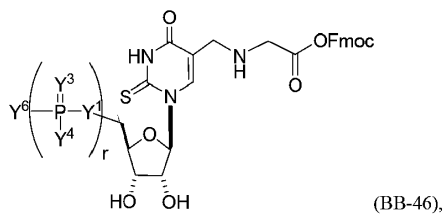
10

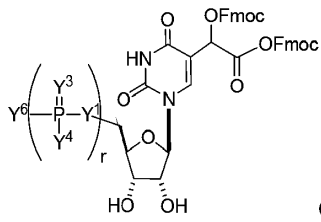


(BB- 44),

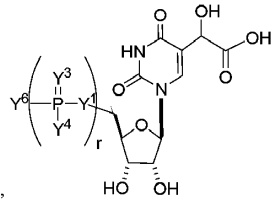


(BB- 45),

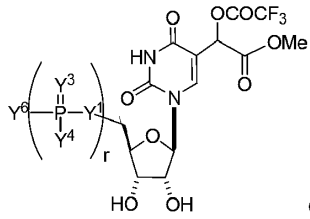




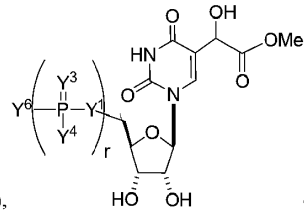
(BB-52),



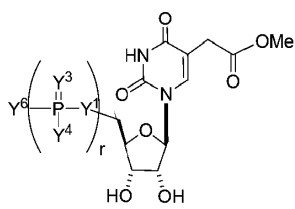
(BB-53),



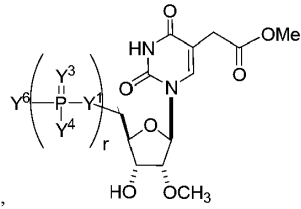
(BB-54),



(BB-55),

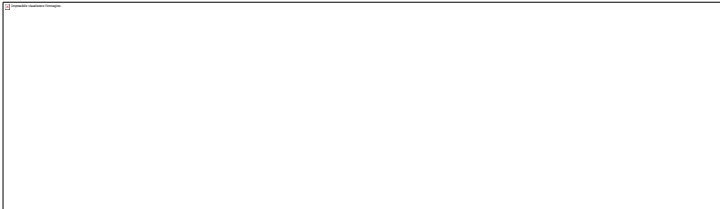


(BB-56),

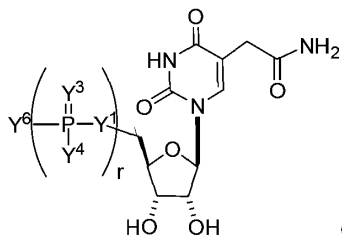


(BB-57),

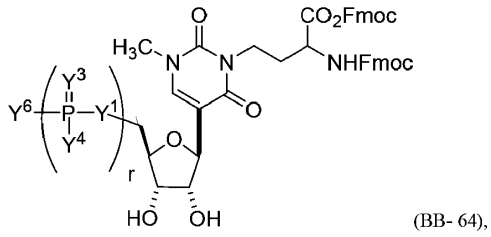
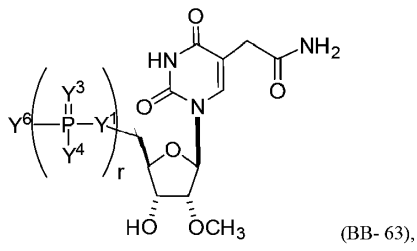
5



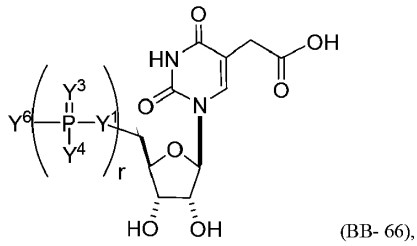
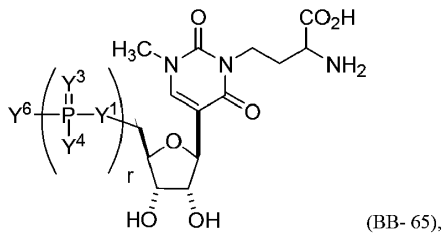
10



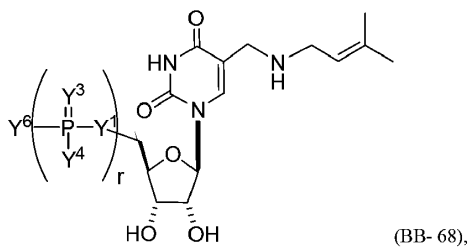
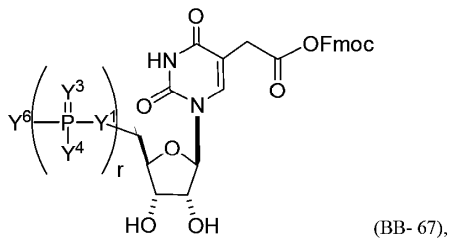
(BB-62),

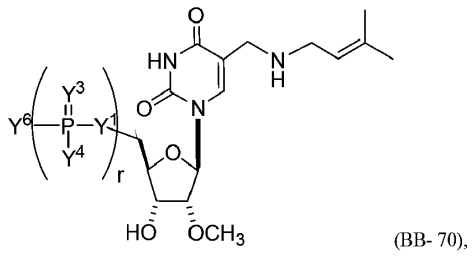
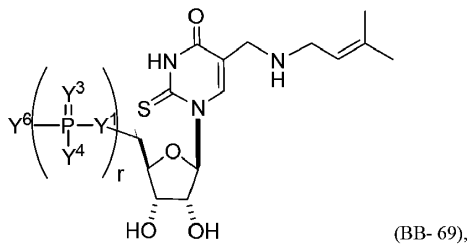


5

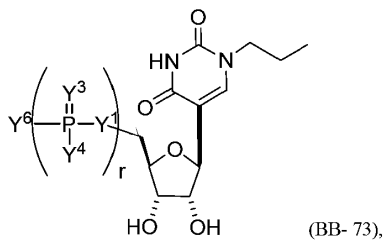
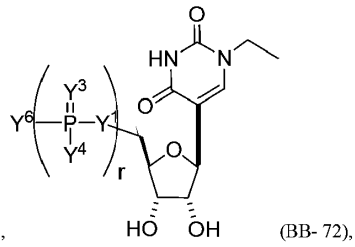
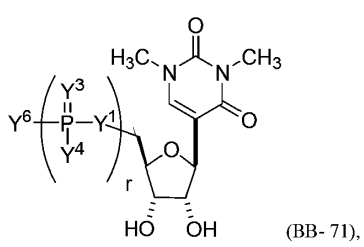


10

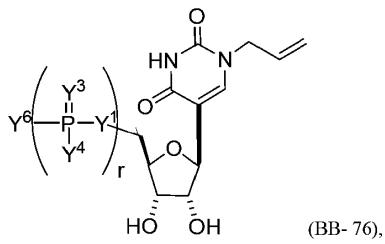
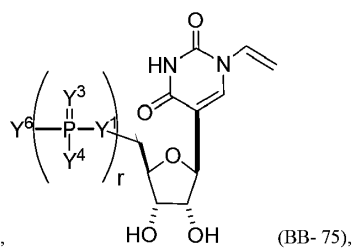
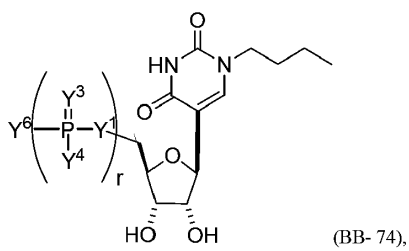


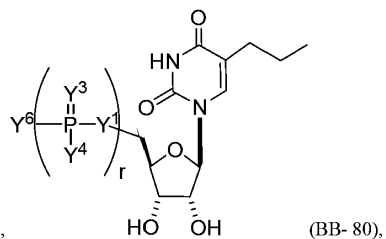
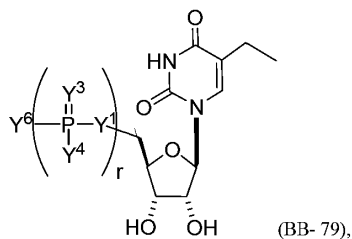
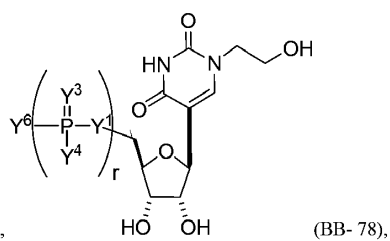
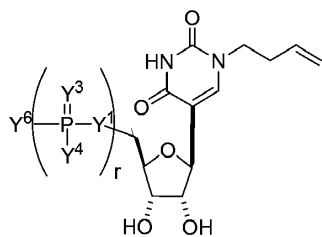


5

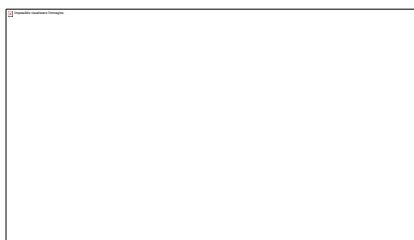
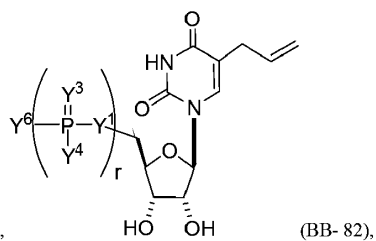
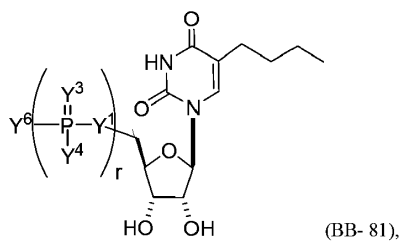


10



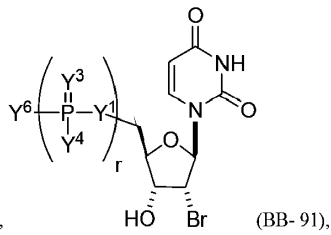
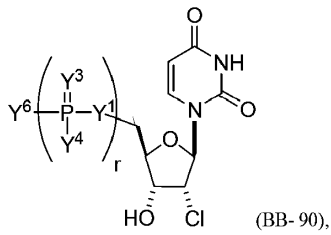
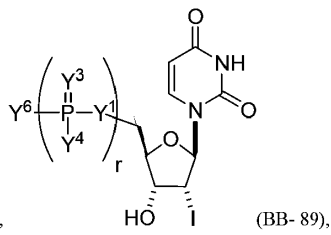
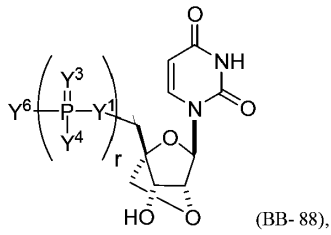


5

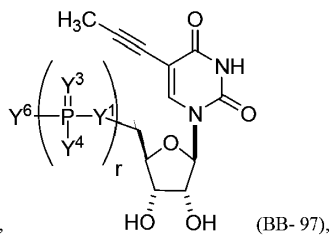
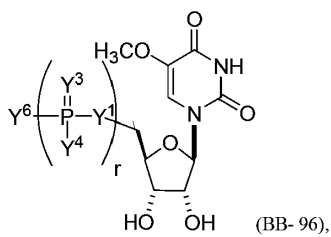
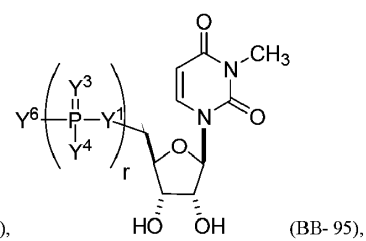
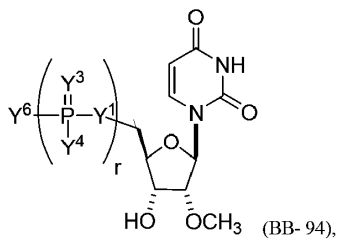
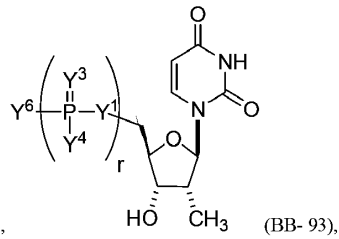
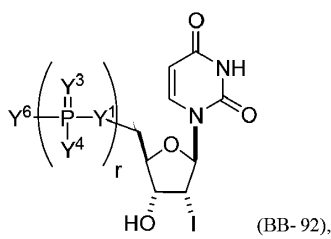


10

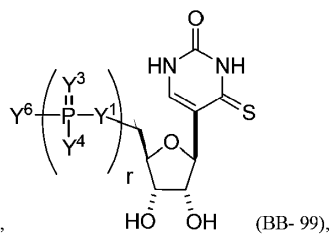
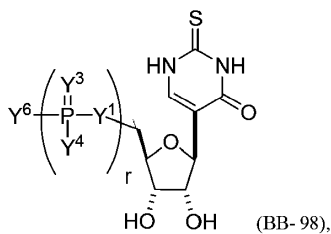


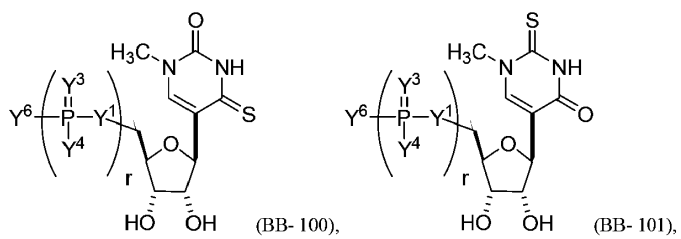


5

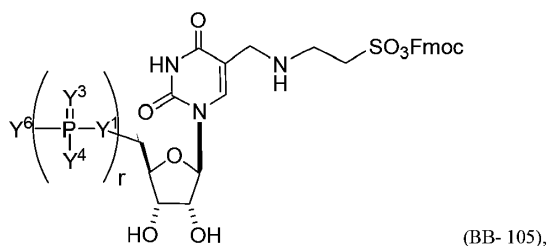
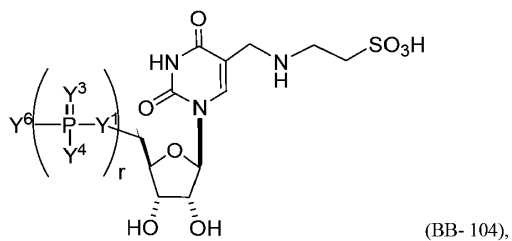


10

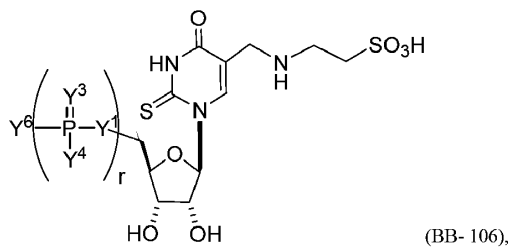


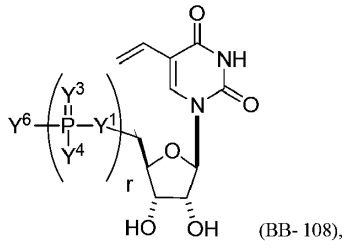
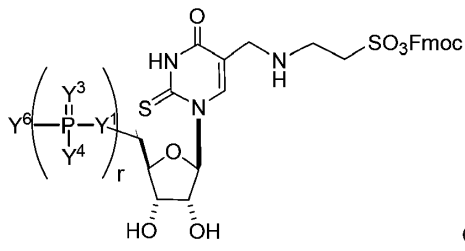


5

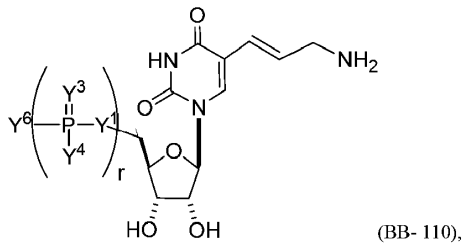
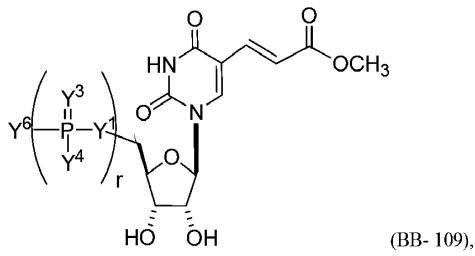


10

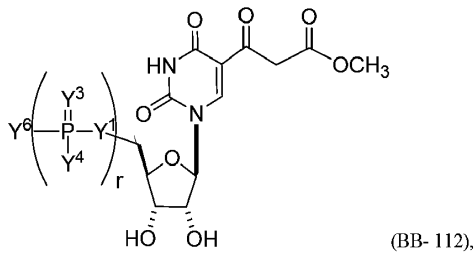
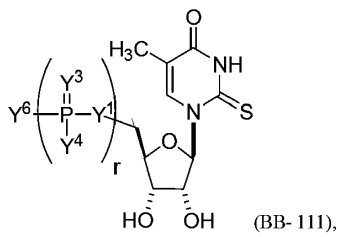


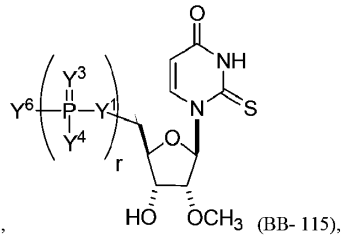
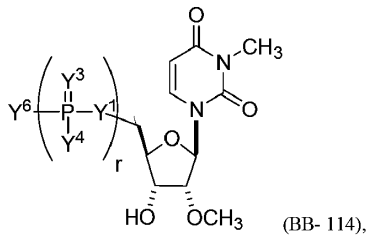
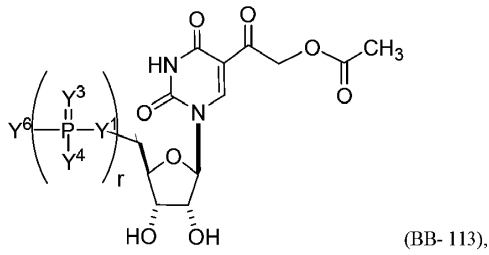


5

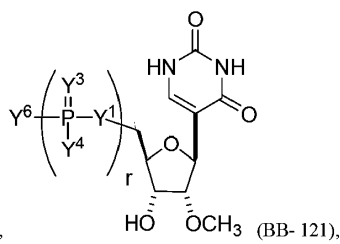
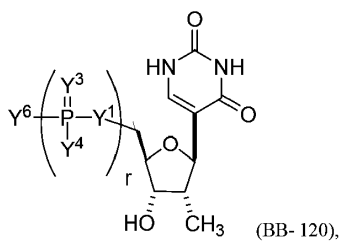
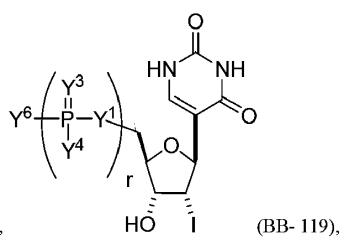
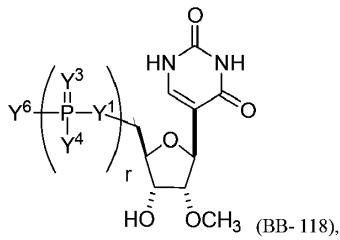
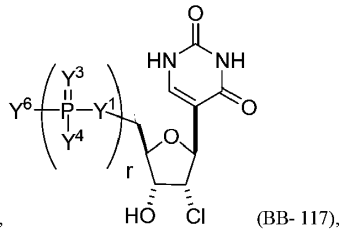
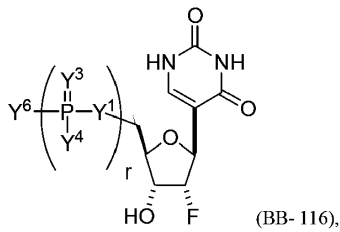


10

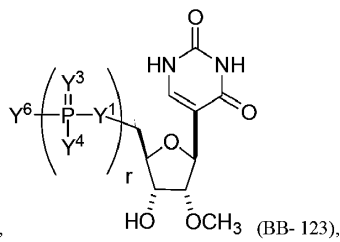
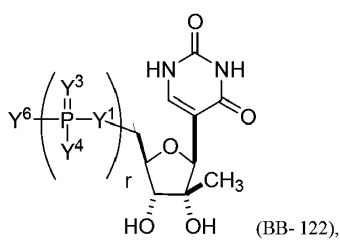




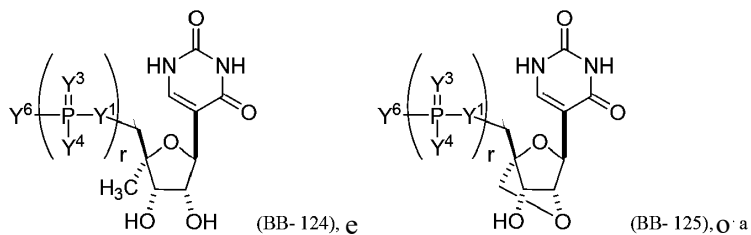
5



10

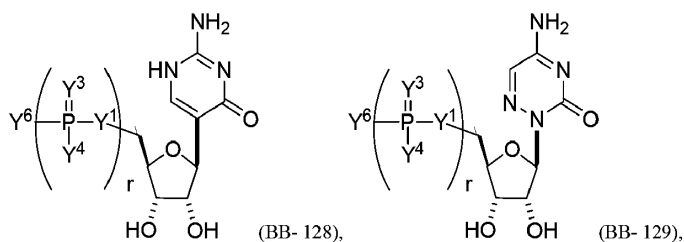
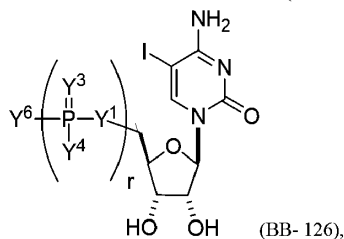


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

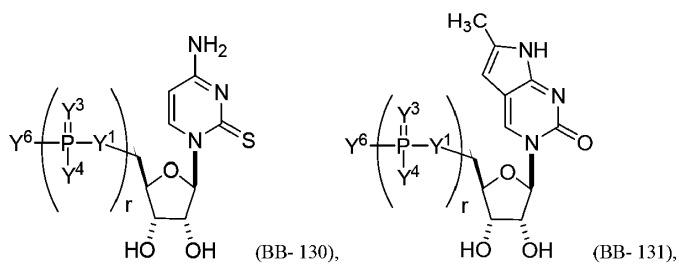


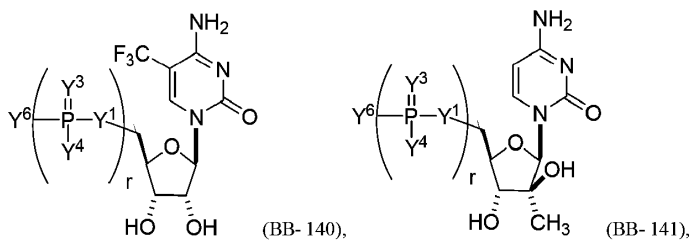
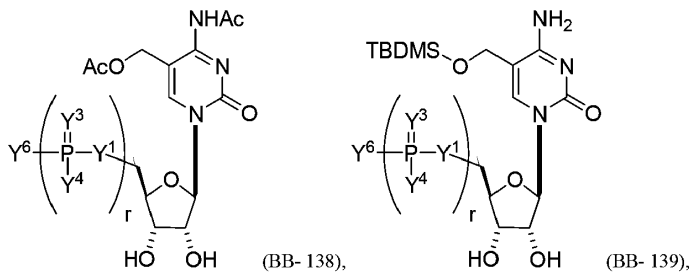
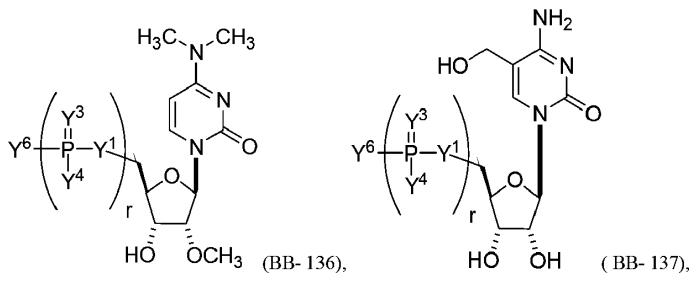
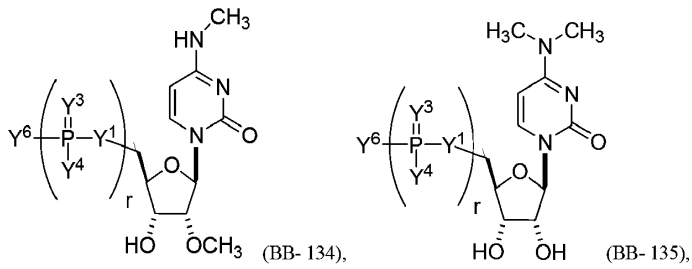
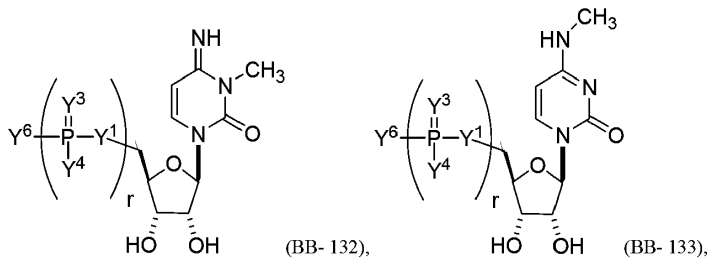
un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶ e r sono come descritto nel presente contesto (ad esempio, ogni r è indipendentemente un numero intero da 0 a 5, come da 0 a 3, da 1 a 3 o da 1 a 5)].

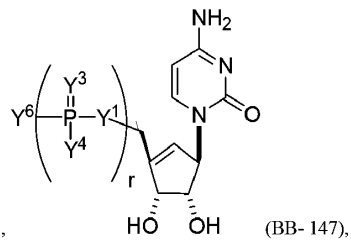
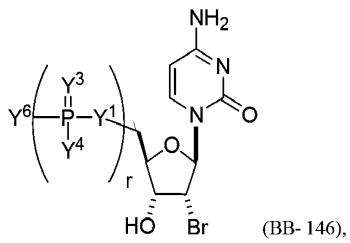
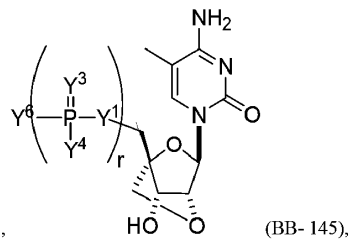
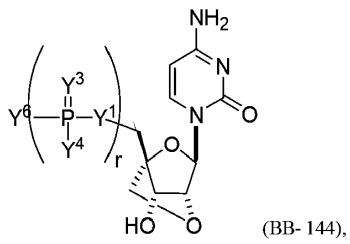
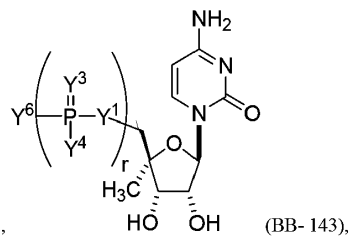
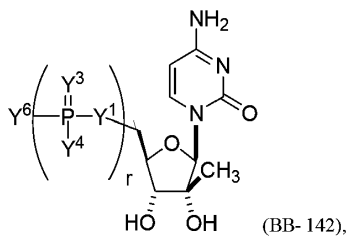
[0130] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, è una citidina modificata (ad esempio selezionata dal gruppo costituito da:



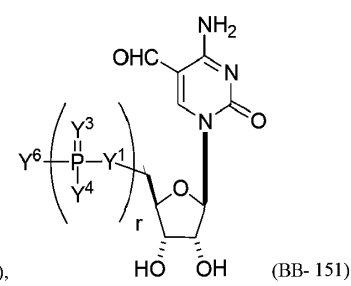
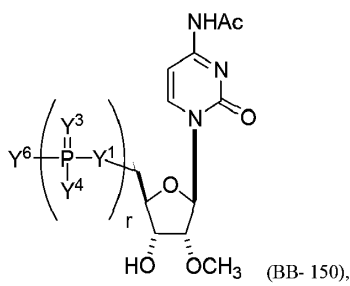
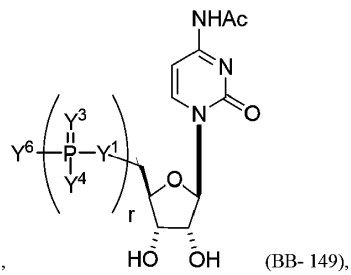
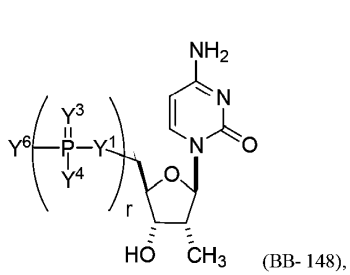
10



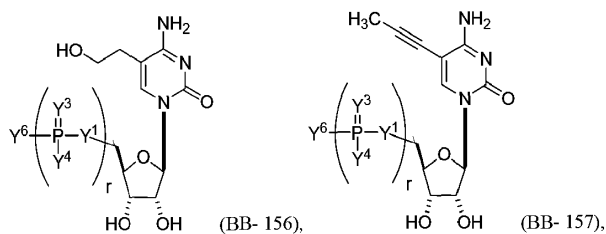
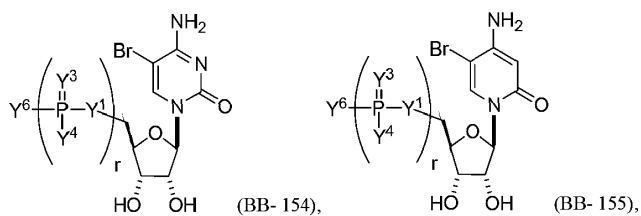
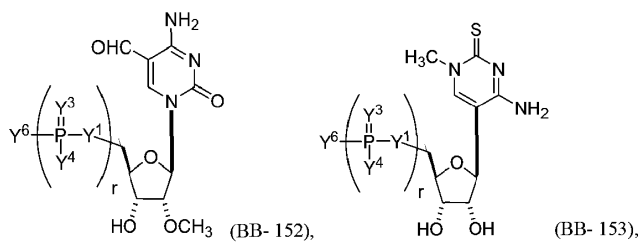




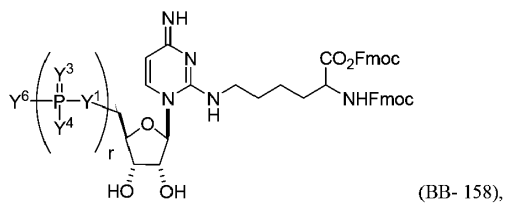
5



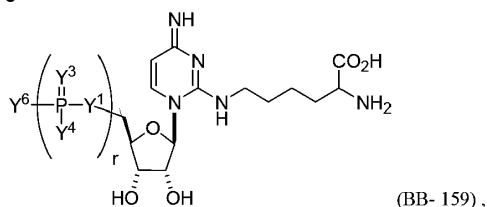
10



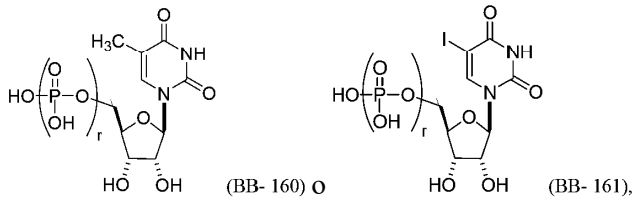
5



e



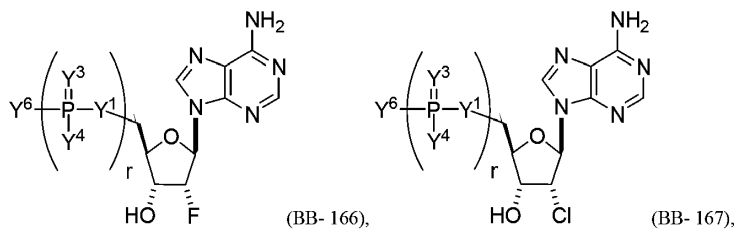
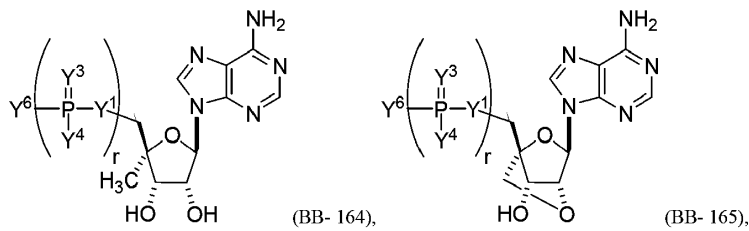
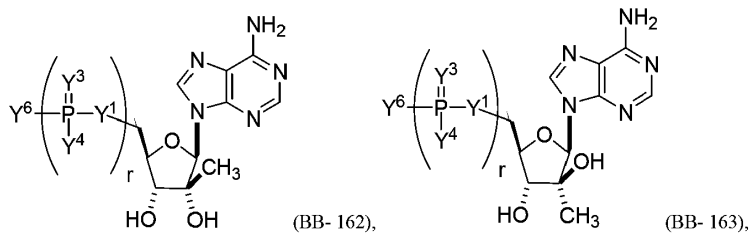
- 10 o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶, e r sono come descritto nel presente contesto (ad esempio, ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5, come da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5)]. Ad esempio, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide può essere:



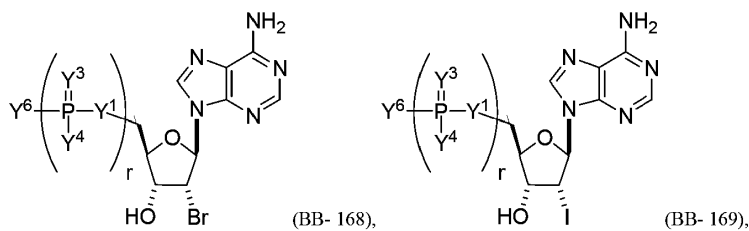
un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5 (ad esempio, da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5).

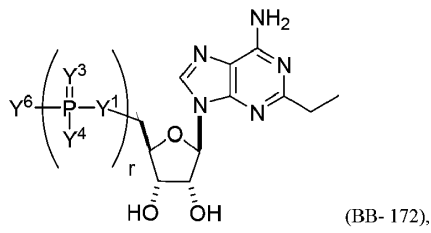
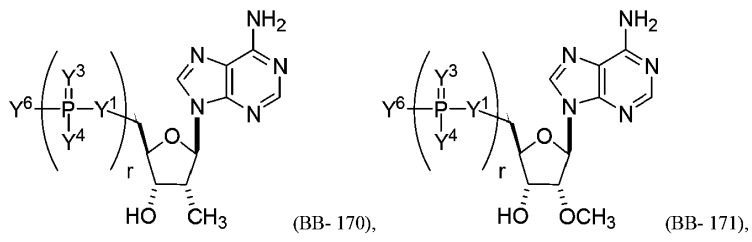
[0131] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, è

5 una adenosina modificata (ad esempio selezionata dal gruppo costituito da:

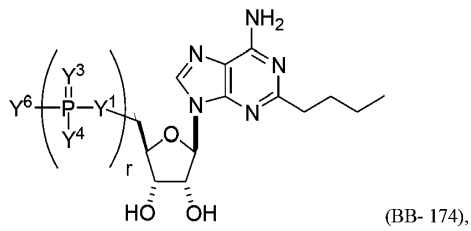
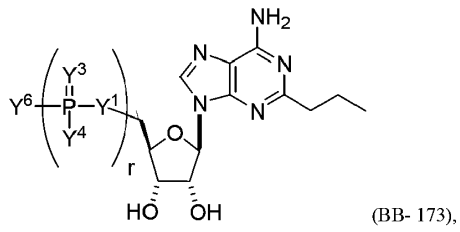


10

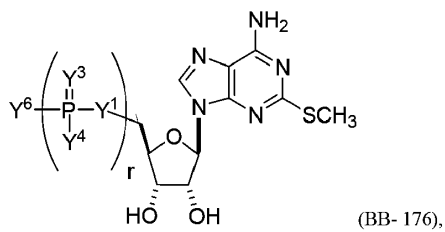
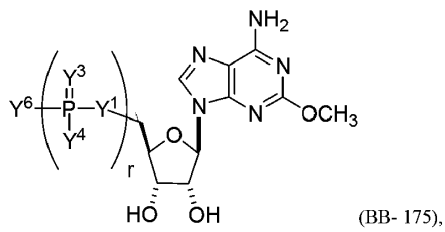


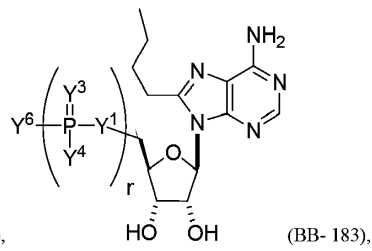
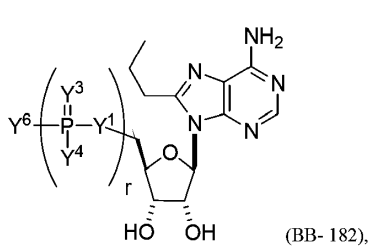
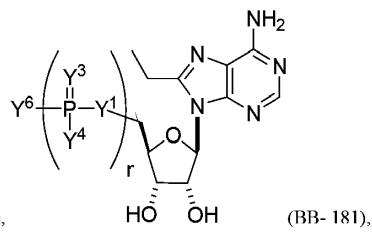
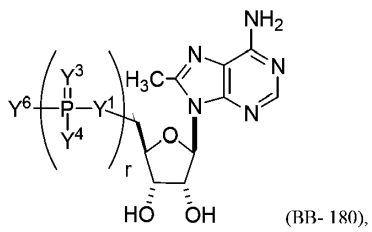
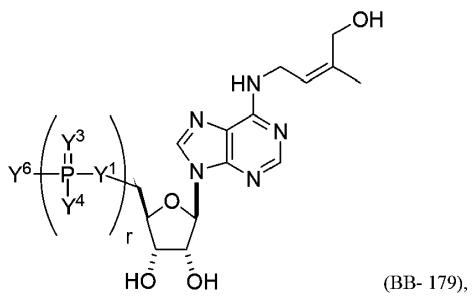
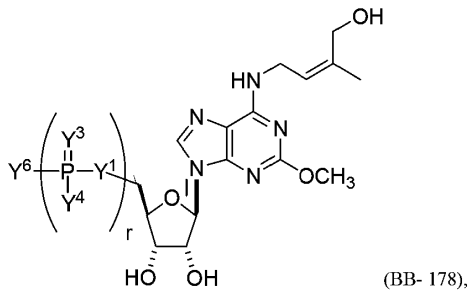
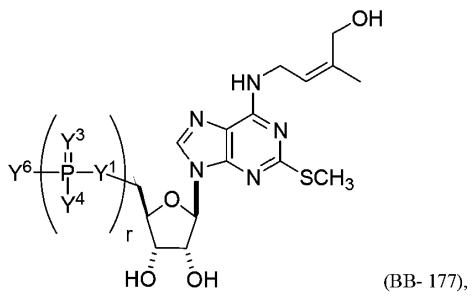


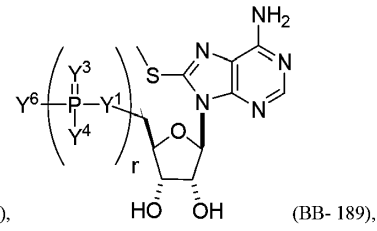
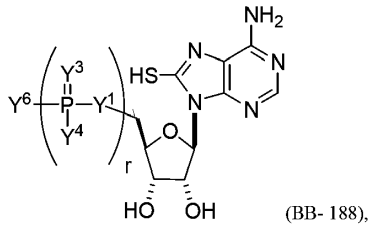
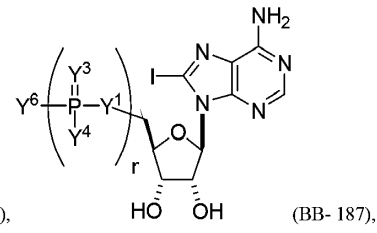
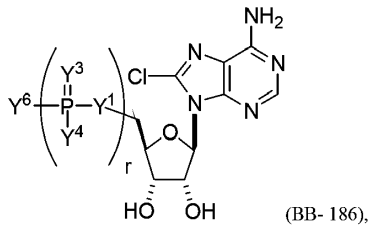
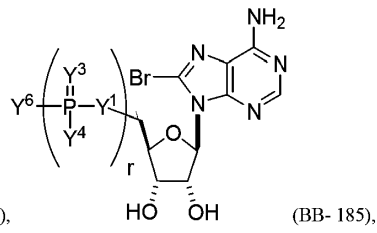
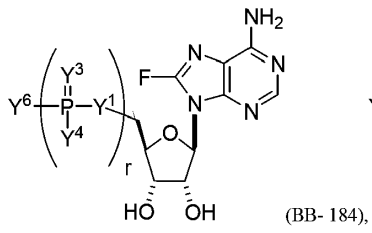
5



10







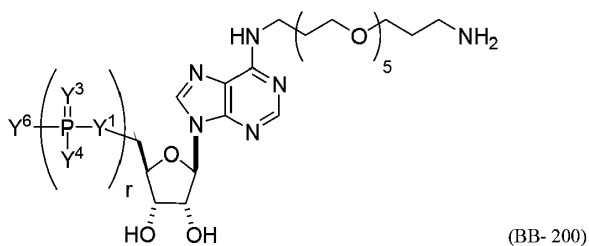
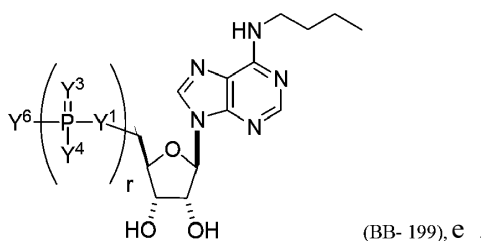
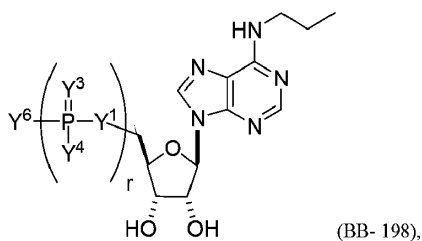
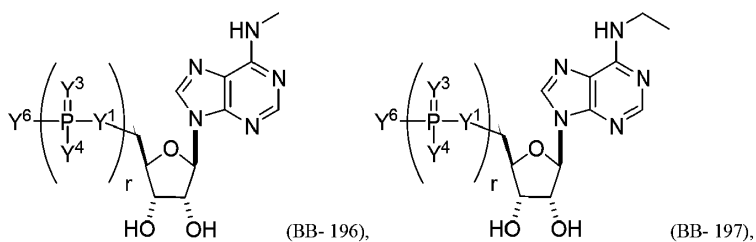
5



10

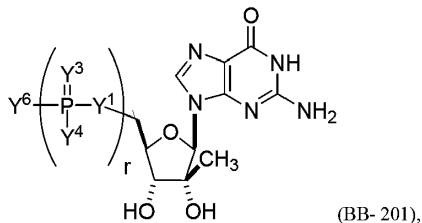



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

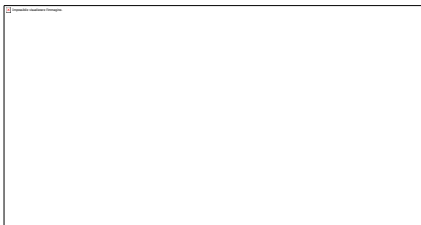
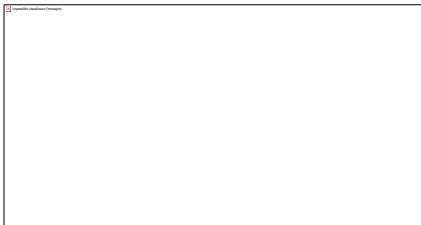
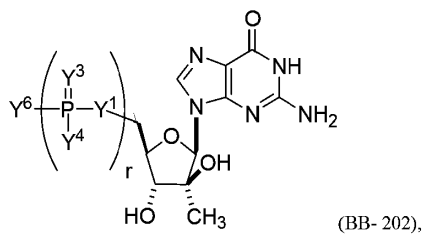


o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶, e r sono come descritto nel presente contesto (ad esempio, ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5, come da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5)].

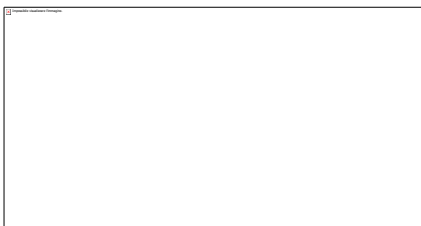
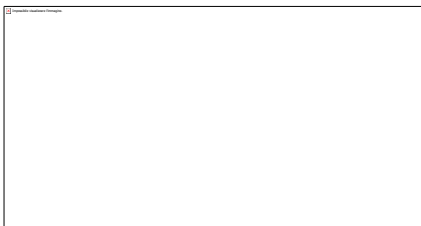
[0132] In alcuni casi, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide, è una guanosina modificata (ad esempio selezionata dal gruppo costituito da:



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

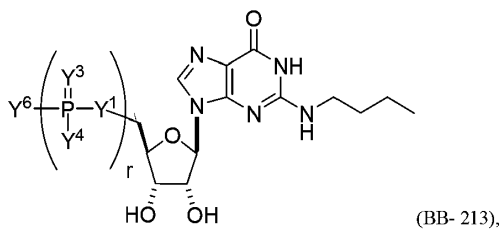
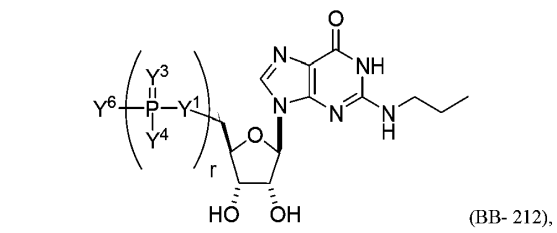
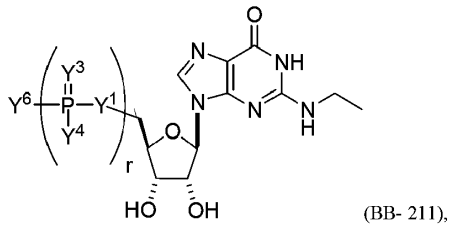
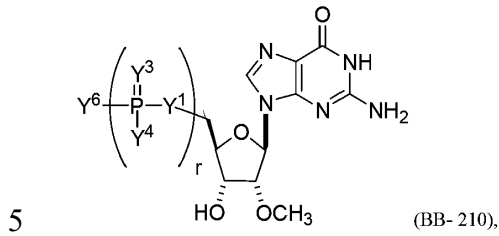
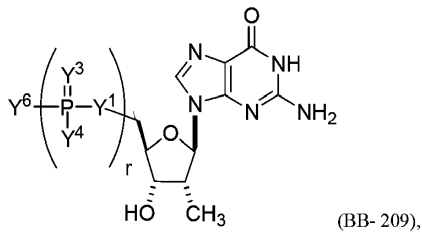
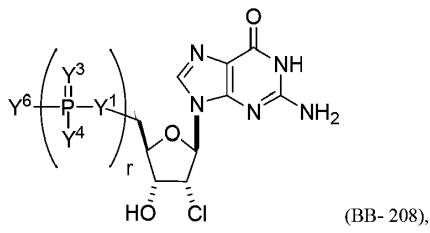


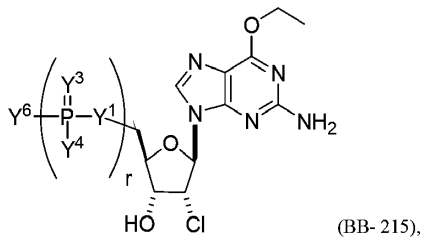
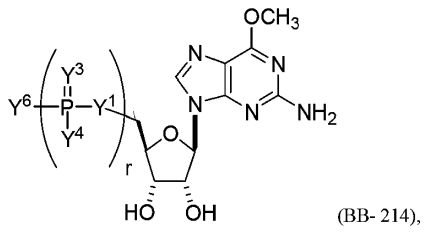
5



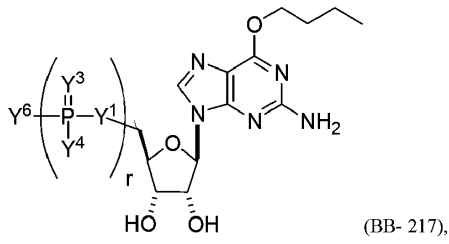
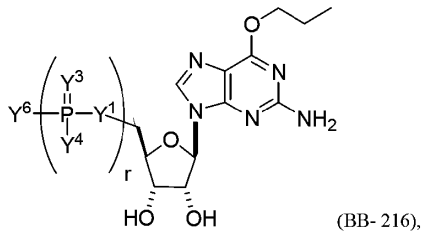
10



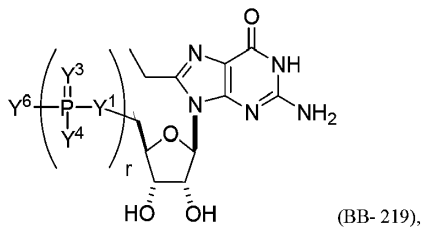
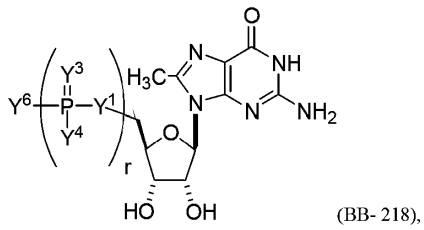


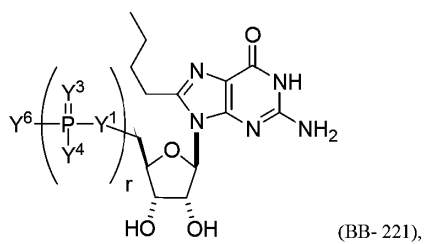
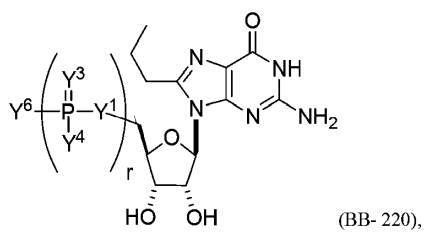


5

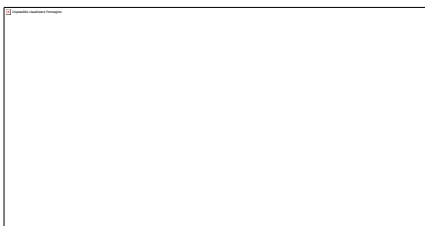
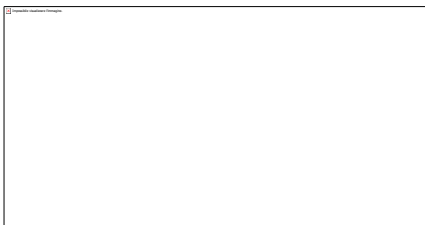


10



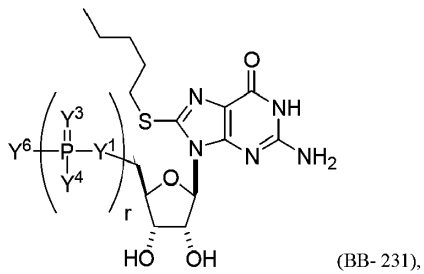
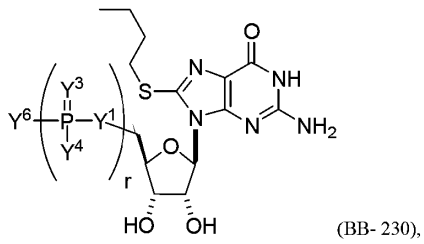
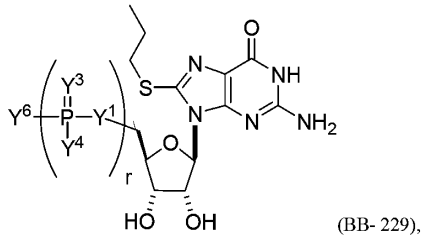
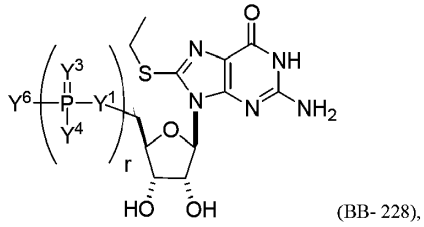
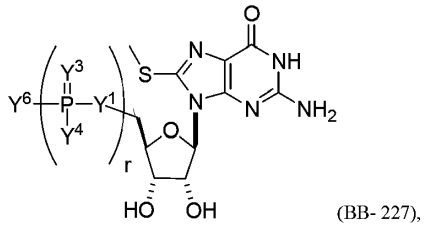
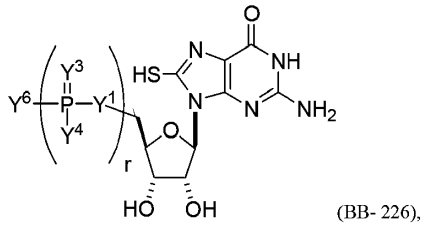


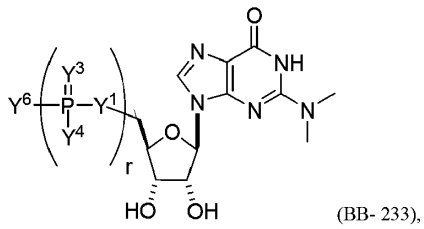
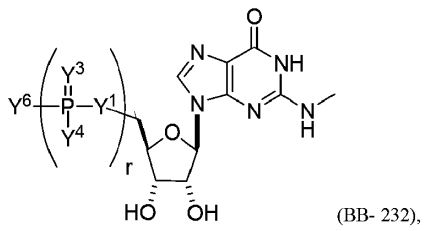
5



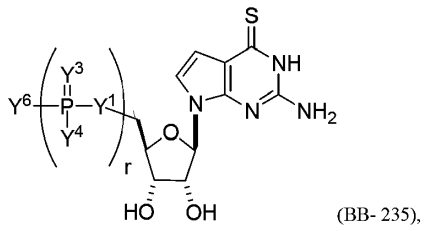
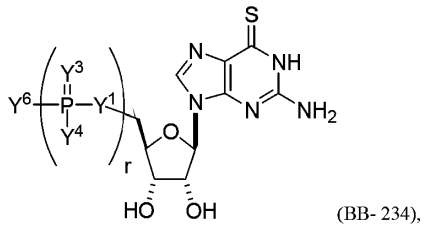
10



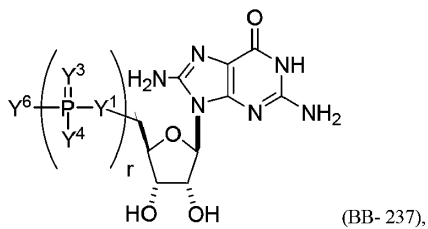
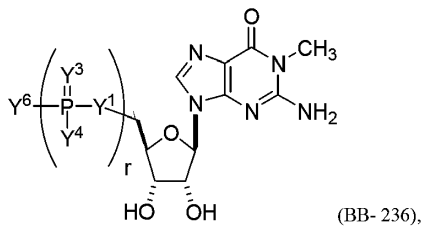




5



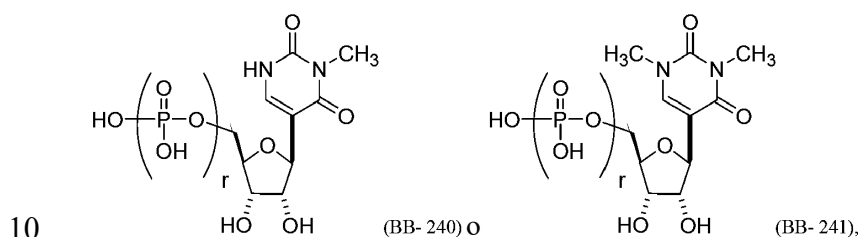
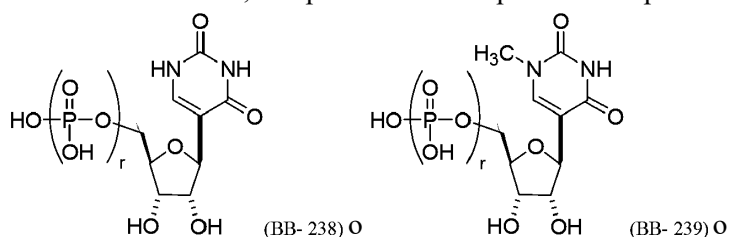
10



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶, e r sono come

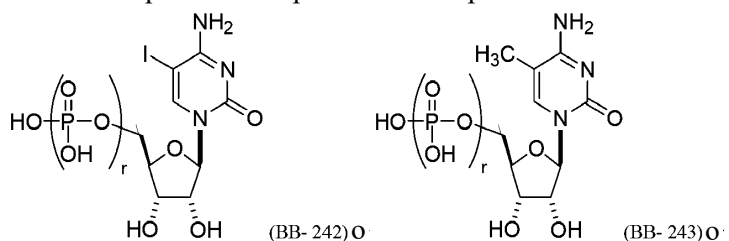
descritti nel presente contesto [ad esempio, ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5, come da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5)].

[0133] In alcuni casi, la modificazione chimica del solco maggiore può includere la sostituzione del gruppo C in corrispondenza di C-5 dell'anello (ad esempio, per un nucleoside pirimidinico, come la citosina o l'uracile) con N (ad esempio, la sostituzione del gruppo $>CH$ in corrispondenza di C-5 con il gruppo $>NR^{N1}$, in cui R^{N1} è H o alchile opzionalmente sostituito). Ad esempio, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide può essere:

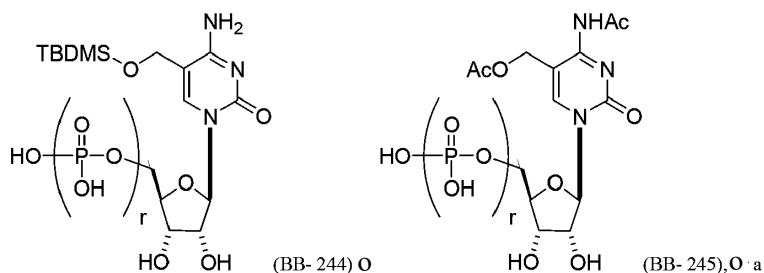


un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5 (ad esempio, da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5).

[0134] In un altro caso, la principale modificazione chimica del solco può includere la sostituzione dell'idrogeno in corrispondenza di C-5 della citosina con alo (ad esempio, Br, Cl, F o I) o alchile opzionalmente sostituito (ad esempio, metile). Ad esempio, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide può essere:

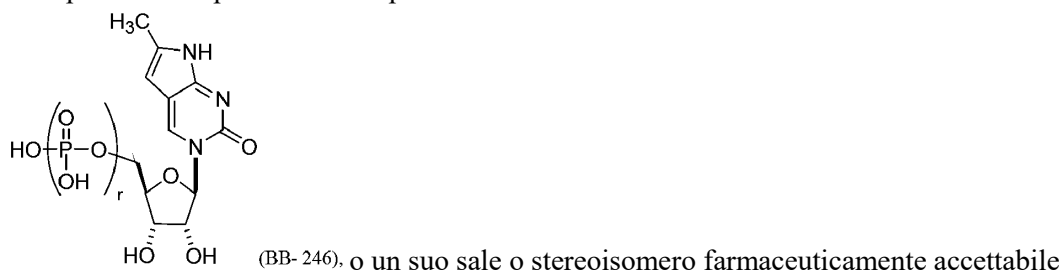



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5 (ad esempio, da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5).

- 5 [0135] In ancora un altro caso, la modificazione chimica del solco maggiore può includere un anello fuso formato dall' NH_2 in corrispondenza della posizione C-4 e dall'atomo di carbonio in corrispondenza della posizione C-5. Ad esempio, la molecola costitutiva, che può essere incorporata in un polinucleotide può essere:



- 10 di esso, in cui ogni r è, indipendentemente, un numero intero da 0 a 5 (ad esempio, da 0 a 3, da 1 a 3, o da 1 a 5).

Modificazioni sullo zucchero

- 15 [0136] I nucleosidi e i nucleotidi modificati (ad esempio molecole costitutive), che possono essere incorporati in un polinucleotide (ad esempio RNA o mRNA, come descritto nel presente contesto), possono essere modificati sullo zucchero dell'acido ribonucleico. Ad esempio, il gruppo idrossile in 2' (OH) può essere modificato o sostituito con un numero di sostituenti differenti. Sostituzioni esemplificative in posizione 2' includono, tuttavia senza limitazioni, H, alo, alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito; alcossi C_{1-6} opzionalmente sostituito; arilossi C_{6-10} opzionalmente sostituito; cicloalchile C_{3-8} opzionalmente sostituito; cicloalchilossi C_{3-8} opzionalmente sostituito;

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

arilossi C_{6-10} opzionalmente sostituito; aril-alcossi C_{6-10} -alcossi C_{1-6} opzionalmente sostituito, (eterocicli)ossi C_{1-12} opzionalmente sostituito; uno zucchero (ad esempio ribosio, pentosio o qualsiasi altro descritto nel presente contesto); un polietilenglicole (PEG), $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, dove R è H o alchile opzionalmente sostituito, e n è un numero intero
5 compreso tra 0 e 20 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 8, da 0 a 10, da 0 a 16, da 1 a 4, da 1 a 8, da 1 a 10, da 1 a 16, da 1 a 20, da 2 a 4, da 2 a 8, da 2 a 10, da 2 a 16, da 2 a 20, da 4 a 8, da 4 a 10, da 4 a 16 e da 4 a 20); acidi nucleici "bloccati" (LNA) in cui il 2'-idrossile è collegato da un ponte alchilene C_{1-6} o eteroalchilene C_{1-6} al carbonio-4' dello stesso zucchero ribosio, dove ponti esemplificativi includevano ponti di metilene, propilene, etere o ammino; amminoalchile, come
10 definito nel presente contesto; amminoalcossi, come definito nel presente contesto; ammino come definito nel presente contesto; e amminoacido, come definito nel presente contesto

[0137] In generale, l'RNA include il gruppo zucchero ribosio, che è un anello a 5 elementi avente un atomo di ossigeno. I nucleotidi modificati esemplificativi e non limitativi includono la sostituzione dell'ossigeno nel ribosio (ad esempio, con S, Se o alchilene, come metilene o etilene);
15 aggiunta di un doppio legame (ad esempio, per sostituire il ribosio con ciclopentenile o cicloesenile); contrazione dell'anello di ribosio (ad esempio, per formare un anello a 4 membri di ciclobutano o ossoetano); espansione dell'anello di ribosio (ad esempio, per formare un anello a 6 o 7 membri avente un carbonio o eteroatomo aggiuntivo, come per anidroestolo, altritolo, mannitolo, cicloesanile, cicloesenile e morfolino che hanno anche una catena principale di
20 fosforamidato); forme multicicliche (ad esempio, triciclo; e forme "sbloccate", come l'acido glicole nucleico (GNA) (ad esempio, R-GNA o S-GNA, dove il ribosio è sostituito da unità di glicole attaccate a legami fosfodiesteri), acido treosio nucleico [TNA, dove il ribosio viene sostituito con α -L-treofuranosil-(3'→2')] e acido nucleico peptidico (PNA, dove i legami 2-ammino-etil-glicina sostituiscono la catena principale di ribosio e fosfodiesteri). Il gruppo di
25 zucchero può anche contenere uno o più atomi di carbonio che possiedono la configurazione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

stereochimica opposta a quella del corrispondente carbonio nel ribosio. Pertanto, una molecola polinucleotidica può includere nucleotidi contenenti, ad esempio, arabinosio, come zucchero.

Modificazioni sulla base azotata

5 [0138] La presente descrizione fornisce nucleosidi e nucleotidi modificati. Come descritto nel presente contesto "nucleoside" è definito come un composto contenente una molecola di zucchero (ad esempio un pentosio o un ribosio) o un suo derivato in combinazione con una base organica (ad esempio una purina o pirimidina) o un suo derivato (anche indicato come "base azotata"). Come qui descritto, "nucleotide" è definito come un nucleoside che include un gruppo fosfato. In alcuni casi, i nucleosidi e i nucleotidi descritti nel presente contesto sono generalmente modificati chimicamente sulla faccia del solco maggiore. Modificazioni esemplificative non limitative 10 includono un gruppo ammino, un gruppo tiolo, un gruppo alchile, un gruppo alo o qualsiasi altro descritto nel presente contesto. I nucleotidi modificati possono essere sintetizzati mediante qualsiasi metodo utile, come qui descritto (ad esempio chimicamente, enzimaticamente o ricombinantemente per includere uno o più nucleosidi modificati o non naturali).

15 [0139] L'accoppiamento di basi nucleotidiche modificato comprende non solo le coppie di basi standard adenosina-timina, adenosina-uracile o guanosina-citosina, ma anche coppie di basi formate tra nucleotidi e/o nucleotidi modificati comprendenti basi non standard o modificate, in cui la disposizione dei donatori di legame idrogeno e accettori di legame idrogeno consente il legame idrogeno tra una base non standard e una base standard o tra due strutture di base non standard complementari. Un esempio di tale accoppiamento di basi non standard è 20 l'accoppiamento di basi tra il nucleotide modificato inosina e adenina, citosina o uracile.

[0140] I nucleosidi e i nucleotidi modificati possono includere una base azotata modificata. Esempi di basi azotate presenti nell'RNA includono, ma non sono limitati a, adenina, guanina, citosina e uracile. Esempi di basi azotate presenti nel DNA includono, ma non sono limitati a, 25 adenina, guanina, citosina e timina. Queste basi azotate possono essere modificate o

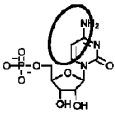
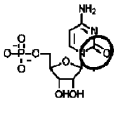
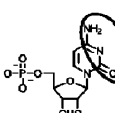
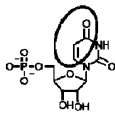
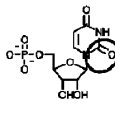
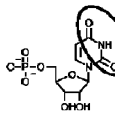
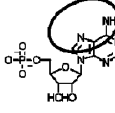
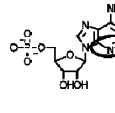
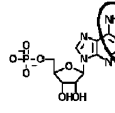
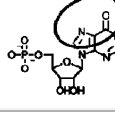
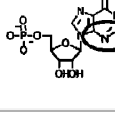
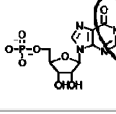

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

completamente sostituite per fornire molecole polinucleotidiche con proprietà potenziate, ad esempio resistenza alle nucleasi, stabilità, e queste proprietà possono manifestarsi attraverso l'interruzione del legame di un importante partner di legame del solco. Ad esempio, i nucleosidi e i nucleotidi descritti possono essere modificati chimicamente sulla faccia del solco maggiore.

- 5 In alcuni casi, le modificazioni chimiche del solco maggiore possono includere un gruppo ammino, un gruppo tiolo, un gruppo alchile o un gruppo alo.

[0141] La Tabella 1 di seguito identifica le facce chimiche di ciascun nucleotide canonico. I cerchi identificano gli atomi che compongono le rispettive regioni chimiche.

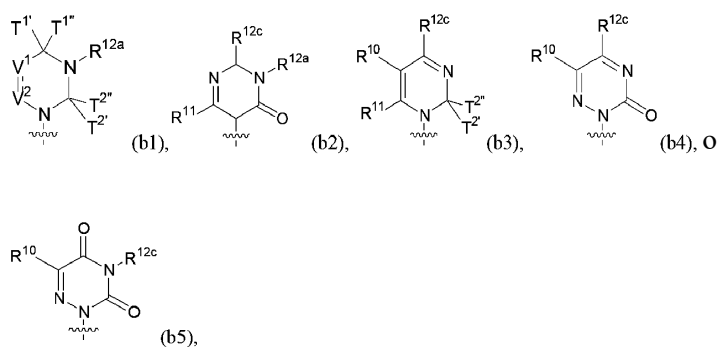
Tabella 1

		Faccia del solco maggiore	Faccia del solco minore	Faccia di accoppiamento delle basi di Watson-Crick
Pirimidine	Citidina:			
	Uridina:			
Purine	Adenosina:			
	Guanosina:			

10

[0142] In alcuni casi, B è un uracile modificato. Esempi di uracili modificati includono quelli aventi la Formula (b1)-(b5):

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



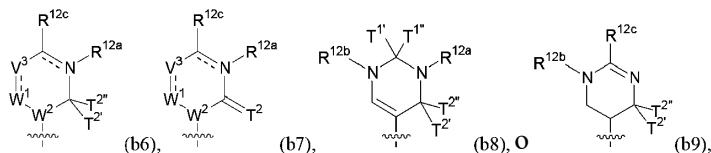
o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

- 5 è un legame singolo o doppio;
- ciascuno di T^{1'}, T^{1''}, T^{2'} e T^{2''} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito o tioalcossi opzionalmente sostituito, o la combinazione di T^{1'} e T^{1''} o La combinazione di T^{2'} e T^{2''} si uniscono (ad esempio, come in T²) per formare O (osso), S (tio) o Se (seleno);
- 10 ciascuno di V¹ e V² è, indipendentemente, O, S, N(R^{Vb})_{nv}, o C(R^{Vb})_{nv}, dove nv è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^{Vb} è, indipendentemente, H, alo, amminoacido opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, aloalchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito,
- 15 idrossialchinile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio trifluoroacetile), amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, acilamminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio,
- 20 trifluoroacetile), alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente sostituito, alcossicarbonio opzionalmente sostituito achinile, o alcossicarbonilalcossi opzionalmente sostituito [ad esempio, opzionalmente sostituito con qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto, come quelli scelti da (1)-(21) per alchile];

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

- R¹⁰ è H, alo, amminoacido opzionalmente sostituito, idrossi, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, aminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchinile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalcossi opzionalmente sostituito, carbossialcossi opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito o carbamoilalchile opzionalmente sostituito; R¹¹ è H o un alchile opzionalmente sostituito;
- 10 R^{12a} è H, alchile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio, opzionalmente sostituito con idrossi), carbossialcossi opzionalmente sostituito, carbossiamminoalchile opzionalmente sostituito o carbamoilalchile opzionalmente sostituito; e
- 15 R^{12c} è H, alo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, tioalcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito o
- 20 amminoalchinile opzionalmente sostituito.

[0143] Altri uracili modificati esemplificativi includono quelli aventi la Formula (b6)-(b9):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui è un legame singolo o doppio;

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

ciascuno di T^1 , $T^{1'}$, T^2 e $T^{2'}$ è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito o tioalcossi opzionalmente sostituito, o la combinazione di T^1 e $T^{1'}$ si uniscono insieme (ad esempio, come in T^1) o la combinazione di T^2 e $T^{2'}$ si uniscono (ad esempio, come in T^2) per formare O (osso), S (tio) o Se (seleno), o ogni T^1 e T^2 è, indipendentemente, O (osso), S (tio) o Se (seleno);

ciascuno di W^1 e W^2 è, indipendentemente, $N(R^{Wa})_{nw}$ o $C(R^{Wa})_{nw}$, dove nw è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^{Wa} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, o alcossi opzionalmente sostituito;

ogni V^3 è, indipendentemente, O, S, $N(R^{Va})_{nv}$, o $C(R^{Va})_{nv}$, dove nv è un intero da 0 a 2 e ogni R^{Va} è, indipendentemente, H, alo, amminoacido opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, eterociclile opzionalmente sostituito, alcheterociclile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito o alchinilossi opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio trifluoroacetile o sulfoalchile), amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, acilamminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio trifluoroacetile), alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchinile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalcossi opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio opzionalmente sostituiti con idrossi e/o un gruppo O-protettivo), carbossialchile opzionalmente sostituito [ad esempio opzionalmente sostituiti con qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto, come quelli selezionati da (1)-(21) per


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

alchile], e in cui R^{Va} e R^{12c} presi insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati possono formare cicloalchile opzionalmente sostituito, arile opzionalmente sostituito, o eterociclice opzionalmente sostituito (ad esempio, un anello a 5 o 6 elementi);

R^{12a} è H, alchile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio, opzionalmente sostituito con idrossi e/o un gruppo O-protettivo), carbossialcossi opzionalmente sostituito, carbossiamminoalchile opzionalmente sostituito o carbamoilalchile opzionalmente sostituito, o
10 assente;

R^{12b} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, alcarile opzionalmente sostituito, eterociclice opzionalmente sostituito, opzionalmente alcheterociclice sostituito, amminoacido opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalossi opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalossi opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchinile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalossi opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito (ad
15 esempio, opzionalmente sostituito con idrossi e/o un gruppo O-protettivo), carbossialcossi opzionalmente sostituito, carbossiamminoalchile opzionalmente sostituito o carbamoilalchile opzionalmente sostituito,

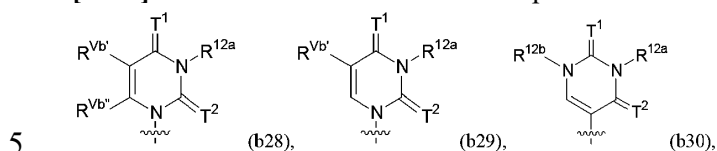
in cui la combinazione di R^{12b} e $T^{1'}$ o la combinazione di R^{12b} e R^{12c} possono unirsi per formare eterociclice opzionalmente sostituito; e

25 R^{12c} è H, alogeno, alchile opzionalmente sostituito, alossi opzionalmente sostituito, tioalossi

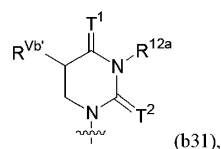

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito.

[0144] Ulteriori uracili modificati esemplificativi includono quelli aventi la Formula (b28)-(b31):



o



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

ciascuno di T¹ e T² è, indipendentemente, O (osso), S (tio) o Se (seleno);

- 10 ciascun R^{Vb'} e R^{Vb''} è, indipendentemente, H, alo, amminoacido opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, aloalchile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, opzionalmente alcossi sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito,
- 15 amminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio, trifluoroacetile o solfoalchile), amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, acilamminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio, trifluoroacetile),
- 20 alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchinile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilacile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalcossi opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio, opzionalmente sostituito con idrossi e/o un gruppo O-protettivo),


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

carbossilalchile opzionalmente sostituito, carbossiamminoalchile opzionalmente sostituito, o carbamoilalchile opzionalmente sostituito [ad esempio, opzionalmente sostituito con qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto, come quelli selezionati da (1)-(21) per alchile] (ad esempio, R^{Vb} è alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito o

5 amminoalchile opzionalmente sostituito, ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio, trifluoroacetile, o solfoalchile);

R^{12a} è H, alchile opzionalmente sostituito, carbossiamminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio sostituito con un gruppo N-protettivo. Come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio trifluoroacetile o solfoalchile)

10 amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito; e

R^{12b} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito (ad

15 esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio trifluoroacetile o solfoalchile), alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchinile opzionalmente sostituito, carbossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, carbossilalchile opzionalmente

20 sostituito, o carbamoilalchile opzionalmente sostituito.

[0145] In casi specifici, T^1 è O (osso) e T^2 è S (tio) o Se (seleno). In altre forme di realizzazione, T^1 è S (tio) e T^2 è O (osso) o Se (seleno). In alcuni casi, R^{Vb} è H, alchile opzionalmente sostituito o alcossi opzionalmente sostituito.

[0146] In altri casi, ciascun R^{12a} e R^{12b} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito o idrossialchile

25


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

opzionalmente sostituito. In casi specifici, R^{12a} è H. In altri casi, sia R^{12a} sia R^{12b} sono H.

[0147] In alcuni casi, ciascun $R^{Vb'}$ di R^{12b} è, indipendentemente, amminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio trifluoroacetile o solfoalchile), amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, o acilamminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo N-protettivo, come uno qualsiasi descritto nel presente contesto, ad esempio, trifluoroacetile). In alcuni casi, l'ammino e/o l'alchile dell'amminoalchile opzionalmente sostituito viene sostituito con uno o più tra alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, solfoalchile opzionalmente sostituito, carbossile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo O-protettivo), idrossi opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo O-protettivo), carbossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo O-protettivo), alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo O-protettivo) o gruppo N-protettivo. In alcuni casi, l'amminoalchile opzionalmente sostituito viene sostituito con un solfoalchile opzionalmente sostituito o alchenile opzionalmente sostituito. In casi specifici, R^{12a} e $R^{Vb'}$ sono entrambi H. In casi specifici, T^1 è O (osso) e T^2 è S (tio) o Se (seleno).

[0148] In alcuni casi, $R^{Vb'}$ è alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito o carbamoilalchile opzionalmente sostituito.

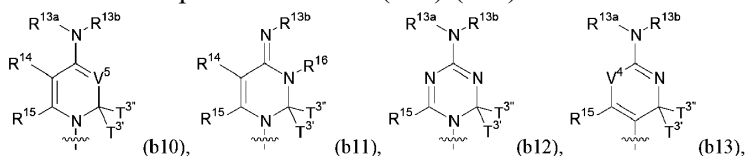
[0149] casi

[0150] In casi specifici, il sostituito opzionale per R^{12a} , R^{12b} , R^{12c} , o R^{Va} è un gruppo polietilenglicole [ad esempio, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio, da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20}], o un gruppo ammino-polietilenglicole [ad esempio $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, in

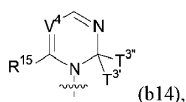

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

cui s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è, indipendentemente, idrogeno o alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito).

- 5 [0151] In alcuni casi, B è una citosina modificata. Le citosine modificate esemplificative includono composti di Formula (b10)-(b14):



O



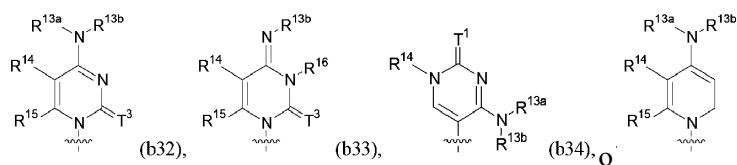
- 10 o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui ciascuno di T^3 e $T^{3''}$ è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito o tioalcossi opzionalmente sostituito, o la combinazione di T^3 e $T^{3''}$ si uniscono (ad esempio, come in T^3) per formare O (osso), S (tio) o Se (seleno);
- ogni V^4 è, indipendentemente, O, S, $N(R^{Vc})_{nv}$, o $C(R^{Vc})_{nv}$, in cui nv è un numero intero da 0 a 2 e
- 15 ogni R^{Vc} è, indipendentemente, H, alo, amminoacido opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, eterocicliche opzionalmente sostituito, alcheterocicliche opzionalmente sostituito o alchinilossi opzionalmente sostituito [ad esempio, opzionalmente sostituito con qualsiasi sostituente descritto nel presente
- 20 contesto, come quelli selezionati da (1)-(21) per alchile], in cui la combinazione di R^{13b} e R^{Vc} può essere presa insieme per formare eterocicliche opzionalmente sostituito;
- ogni V^5 è, indipendentemente, $N(R^{Vd})_{nv}$, o $C(R^{Vd})_{nv}$, dove nv è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^{Vd} è, indipendentemente, H, alo, amminoacido opzionalmente sostituito, opzionalmente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

- sostituito alchile, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, eterociclile opzionalmente sostituito, alcheterociclile opzionalmente sostituito o alchinilossi opzionalmente sostituito [ad esempio, opzionalmente sostituito con qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto, come
- 5 quelli selezionati da (1)- (21) per alchile] (ad esempio, V^5 è $-\text{CH}$ o N);
- ciascuno di R^{13a} e R^{13b} è, indipendentemente, H, acile opzionalmente sostituito, acilossialchile opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito o alcossi opzionalmente sostituito, in cui la combinazione di R^{13b} e R^{14} può essere presa insieme per formare eterociclile opzionalmente sostituito;
- 10 ogni R^{14} è, indipendentemente, H, alo, idrossi, tiolo, acile opzionalmente sostituito, amminoacido opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, aloalchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo O-protettivo), idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente
- 15 sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, aminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, acilossialchile opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito (ad esempio, $-\text{NHR}$, in cui R è H, alchile, arile o fosforile), azido, arile opzionalmente sostituito, eterociclile opzionalmente sostituito, alcheterociclile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito,
- 20 amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito; e
- ciascuno di R^{15} e R^{16} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito o alchinile opzionalmente sostituito.

[0152] Ulteriori citosine modificate esemplificative includono quelle aventi la Formula (b32)-(b35):


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



(b35), o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

ciascuno di T¹ e T³ è, indipendentemente, O (osso), S (tio) o Se (seleno);

ciascuno di R^{13a} e R^{13b} è, indipendentemente, H, acile opzionalmente sostituito, acilossialchile

5 opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito o alcossi opzionalmente sostituito, in cui la combinazione di R^{13b} e R¹⁴ può essere presa insieme per formare eterocicli opzionalmente sostituito;

ogni R¹⁴ è, indipendentemente, H, alo, idrossi, tiolo, acile opzionalmente sostituito, amminoacido opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, aloalchile opzionalmente sostituito,

10 alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo O-protettivo), idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, aminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, acilossialchile opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito (ad esempio, -NHR, in cui R è H, alchile, arile o fosforile), azido, arile opzionalmente sostituito, eterocicli opzionalmente sostituito, alcheterocicli opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito (ad esempio, idrossialchile, alchile, alchenile o alchinile), amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito; e

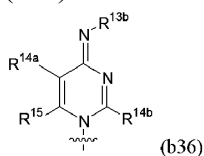
20 ciascuno di R¹⁵ e R¹⁶ è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito o alchinile opzionalmente sostituito (ad esempio, R¹⁵ è H, e R¹⁶ è H o alchile opzionalmente sostituito).

[0153] In alcuni casi, R¹⁵ è H e R¹⁶ è H o alchile opzionalmente sostituito. In casi specifici, R è H, acile o idrossialchile. In alcuni casi, R è alo. In alcuni casi, sia R¹⁴ sia R¹⁵ sono H. In alcuni

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

casi, sia R¹⁵ sia R¹⁶ sono H. In alcuni casi, ciascuno di R¹⁴ e R¹⁵ e R¹⁶ è H. In altri casi, ciascuno di R^{13a} e R^{13b} è indipendentemente H o alchile opzionalmente sostituito.

[0154] Ulteriori esempi non limitativi di citosine modificate includono composti di Formula (b36):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

ogni R^{13b} è, indipendentemente, H, acile opzionalmente sostituito, acilossialchile opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito o alcossi opzionalmente sostituito, in cui la combinazione di R^{13b} e R^{14b} può essere presa insieme per formare eterociclile opzionalmente sostituito;

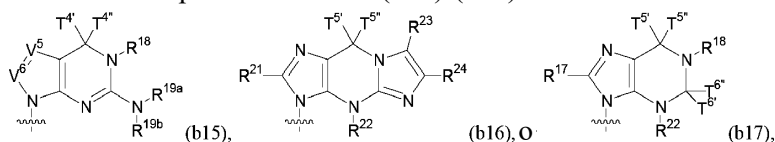
ogni R^{14a} e R^{14b} sono, indipendentemente, H, alo, idrossi, tiolo, acile opzionalmente sostituito, aminoacido opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, aloalchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito (ad esempio, sostituito con un gruppo O-protettivo), idrossialchenile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, aminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, acilossialchile opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito (ad esempio, -NHR, in cui R è H, alchile, arile, fosforile, aminoalchile opzionalmente sostituito o carbossiamminoalchile opzionalmente sostituito), azido, arile opzionalmente sostituito, eterociclile opzionalmente sostituito, alcheterociclile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito o amminoalchinile opzionalmente sostituito; e

ciascuno di R¹⁵ è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito o alchinile opzionalmente sostituito.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0155] In casi specifici, R^{14b} è un amminoacido opzionalmente sostituito (ad esempio, lisina opzionalmente sostituita). In alcuni casi, R è H.

[0156] In alcuni casi, B è una guanina modificata. Le guanine modificate esemplificative includono composti di Formula (b15)-(b17):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

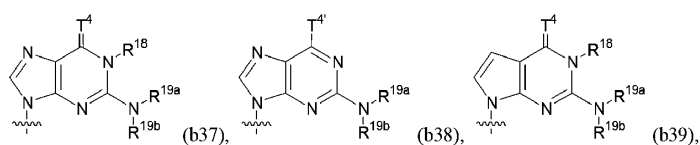
Ciascuno di T^{4'}, T^{4''}, T^{5'}, T^{5''}, T^{6'} e T^{6''} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, o alcossi opzionalmente sostituito, e in cui la combinazione di T^{4'} e T^{4''} (ad esempio come in T^{4'}) o la combinazione di T^{5'} e T^{5''} (ad esempio come in T^{5'}) o la combinazione di T^{6'} e T^{6''} si uniscono (ad esempio come in T^{6'}) formano O (osso), S (tio) o Se (seleno);

10 ciascuno di V⁵ e V⁶ è, indipendentemente, O, S, N(R^{Vd})_{nv}, o C(R^{Vd})_{nv}, dove nv è un intero da 0 a 2 e ogni R^{Vd} è, indipendentemente, H, alo, tiolo, amminoacido opzionalmente sostituito, ciano, ammidina, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito [ad esempio opzionalmente sostituito con qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto, come quelli scelti da (1)-(21) per alchile], tioalcossi opzionalmente sostituito, o ammino opzionalmente sostituito; e

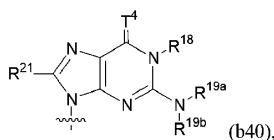
15 20 ciascuno di R¹⁷, R¹⁸, R^{19a}, R^{19b}, R²¹, R²², R²³ e R²⁴ è, indipendentemente, H, alo, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, tioalcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito o amminoacido opzionalmente sostituito.

[0157] Le guanosine modificate esemplificative includono composti di Formula (b37)-(b40):


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



O



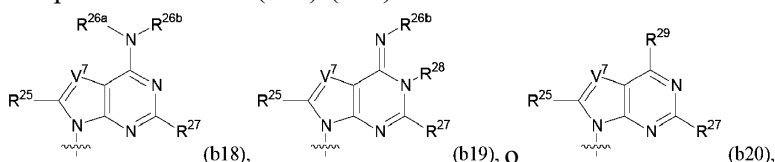
o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

5 ciascuno di T^4 è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, o alcossi opzionalmente sostituito, e ciascun T^4 è, indipendentemente, O (osso), S (tio) o Se (seleno);

ciascuno di R^{18} , R^{19a} , R^{19b} e R^{21} è, indipendentemente, H, alo, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, tioalcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito o amminoacido opzionalmente
10 sostituito.

[0158] In alcuni casi, R^{18} è H o alchile opzionalmente sostituito. In ulteriori casi, T^4 è osso. In alcuni casi, ciascuno di R^{19a} e R^{19b} è, indipendentemente, H o alchile opzionalmente sostituito.

[0159] In alcuni casi, B è un'adenina modificata. Le adenine modificate esemplificative includono composti di Formula (b18)-(b20):



15

o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

ogni V^7 è, indipendentemente, O, S, $N(R^{Vc})_{nv}$, o $C(R^{Vc})_{nv}$, dove nv è un numero intero da 0 a 2 e ogni R^{Vc} è, indipendentemente, H, alo, amminoacido opzionalmente sostituito, opzionalmente sostituito alchile, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi
20 opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito o alchinilossi opzionalmente sostituito [ad esempio, opzionalmente sostituito con qualsiasi sostituente descritto nel presente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

contesto, come quelli selezionati da (1)- (21) per alchile];

ciascun R^{25} è, indipendentemente, H, alogeno, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, tioalcoosi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito;

- 5 ciascuno di R^{26a} e R^{26b} è, indipendentemente, H, acile opzionalmente sostituito, amminoacido opzionalmente sostituito, carbamoilalchile opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, alcoosi opzionalmente sostituito o gruppo polietilenglicole [ad esempio, -
- 10 $(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20}]; o un gruppo ammino-polietilenglicole [ad esempio $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un
- 15 intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è, indipendentemente, idrogeno o alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito];

ogni R^{27} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcoosi opzionalmente sostituito, tioalcoosi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito;

- 20 ogni R^{28} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito o alchinile opzionalmente sostituito; e

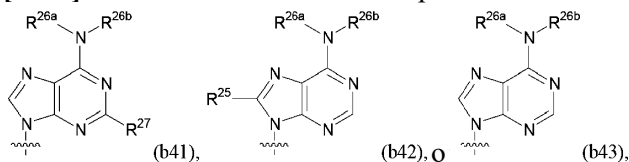
ogni R^{29} è, indipendentemente, H, acile opzionalmente sostituito, amminoacido opzionalmente sostituito, carbamoilalchile opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, alcoosi opzionalmente sostituito o ammino

25


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

opzionalmente sostituito.

[0160] Le adenine modificate esemplificative includono composti di Formula (b41)-(b43):



o un suo sale o stereoisomero farmaceuticamente accettabile, in cui

5 ciascun R^{25} è, indipendentemente, H, alogeno, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, tioalcoosi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito;

ciascuno di R^{26a} e R^{26b} è, indipendentemente, H, acile opzionalmente sostituito, amminoacido opzionalmente sostituito, carbamoilalchile opzionalmente sostituito, alchile opzionalmente
10 sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, idrossialchile opzionalmente sostituito, idrossialchenile opzionalmente sostituito, idrossialchinile opzionalmente sostituito, alcoosi opzionalmente sostituito o gruppo polietilenglicole [ad esempio, -
(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR', in cui s1 è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da
da 1 a 4), ciascuno di s2 e s3, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0
15 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C₁₋₂₀]; o un gruppo ammino-
polietilenglicole [ad esempio -NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}, in cui s1 è un numero
intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s2 e s3, indipendentemente, è un
intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è,
indipendentemente, idrogeno o alchile C₁₋₆ opzionalmente sostituito]; e

20 ogni R^{27} è, indipendentemente, H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente
sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcoosi opzionalmente sostituito, tioalcoosi
opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente sostituito.

[0161] In alcuni casi, R^{26a} è H e R^{26b} è alchile opzionalmente sostituito. In alcuni casi, ciascuno
di R^{26a} e R^{26b} è, indipendentemente, alchile opzionalmente sostituito. In casi specifici, R^{27} è alchile

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito o tioalcossi opzionalmente sostituito.

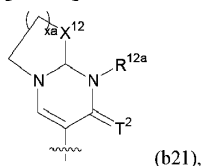
In altri casi, R^{25} è alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito o tioalcossi opzionalmente sostituito.

[0162] In casi specifici, il sostituito opzionale per R^{26a} , R^{26b} o R^{29} è un gruppo polietilenglicole

5 [ad esempio, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio, da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20}), o un gruppo ammino-polietilenglicole [ad esempio $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, in cui $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente,

10 è un numero intero da 0 a 10 (ad esempio da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è, indipendentemente, idrogeno o alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito).

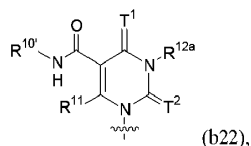
[0163] In alcuni casi, B può avere la Formula (b21):



in cui X^{12} è, indipendentemente, O, S, alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio metilene),

15 o eteroalchilene opzionalmente sostituito, x_a è un numero intero da 0 a 3, e R^{12a} e T^2 sono come descritti nel presente contesto.

[0164] In alcuni casi, B può avere la Formula (b22):



in cui $R^{10'}$ è, indipendentemente, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente

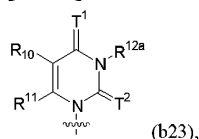
20 sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile opzionalmente sostituito, eterocicliche opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sostituito, alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchinile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalcoosi opzionalmente sostituito, carbossialcoosi opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito o carbamoilalchile opzionalmente sostituito e R^{11} , R^{12a} ,

5 T^1 e T^2 sono come descritti nel presente contesto.

[0165] In alcuni casi, B può avere la Formula (b23):



in cui R^{10} è eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio furile opzionalmente sostituito, tienile opzionalmente sostituito o pirrolile opzionalmente sostituito), arile opzionalmente
10 sostituito (ad esempio fenile opzionalmente sostituito o nafile opzionalmente sostituito) o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto (ad esempio per R^{10}); e in cui R^{11} (ad esempio H o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto), R^{12a} (ad esempio H o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto), T^1 (ad esempio osso o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto) e T^2 (ad esempio osso o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto)

15 sono come descritti nel presente contesto.

[0166] In alcuni casi, B può avere la Formula (b24):

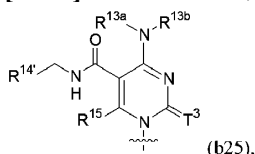


in cui R^{14} è, indipendentemente, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile opzionalmente sostituito, eterociclile opzionalmente sostituito, alcarile opzionalmente sostituito, alcheterociclile opzionalmente
20 sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, alcoosi opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalchenile opzionalmente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

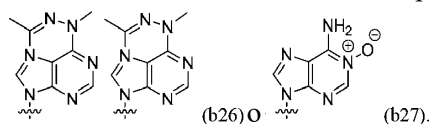
sostituito, alcossicarbonilalchinile opzionalmente sostituito, alcossicarbonilalcoosi opzionalmente sostituito, carbossialcoosi opzionalmente sostituito, carbossialchile opzionalmente sostituito o carbamoilalchile opzionalmente sostituito e R^{13a} , R^{13b} , R^{15} T^3 sono come descritti nel presente contesto.

5 [0167] In alcuni casi, B può avere la Formula (b25):



in cui $R^{14'}$ è eterociclice opzionalmente sostituito (ad esempio furile opzionalmente sostituito, tienile opzionalmente sostituito o pirrolile opzionalmente sostituito), arile opzionalmente sostituito (ad esempio fenile opzionalmente sostituito o naftile opzionalmente sostituito) o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto (ad esempio per R^{14} o $R^{14'}$); e in cui R^{13a} (ad esempio H o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto), R^{13b} (ad esempio H o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto), R^{15} (ad esempio H o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto) e T^3 (ad esempio osso o qualsiasi sostituente descritto nel presente contesto) sono come descritti nel presente contesto.

15 [0168] In alcuni casi, B è una base azotata selezionata dal gruppo costituito da citosina, guanina, adenina e uracile. In alcuni casi, B può essere:



[0169] In alcuni casi, la base azotata modificata è un uracile modificato. Basi azotate e nucleosidi esemplificativi aventi un uracile modificato includono piridin-4-one ribonucleoside, 5-aza-uridina, 6-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-uridina (s^2U), 4-tio-uridina (s^4U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-idrossi-uridina (ho^5U), 5-aminoallil-uridina, 5-alo-uridina (ad esempio, 5-iodo-uridina o 5-bromo-uridina), 3-metil-uridina (m^3U), 5-metossi-uridina (mo^5U), acido uridina 5-ossiacetico (cmo^5U), metilestere di acido uridina 5-ossiacetico

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(mcm⁵U), 5-carbossimetil-uridina (cm⁵U), 1-carbossimetil-pseudouridina, 5-carbossiidrossimetil-uridina (chm⁵U), 5-carbossiidrossimetil-uridina metil estere (mchm⁵U), 5-metossicarbonilmetil-uridina (mcm⁵U), 5-metossicarbonilmetil-2-tio-uridina (mcm⁵s²U), 5-aminometil-2-tio-uridina (nm⁵s²U), 5-metilaminometil-uridina (mnm⁵U), 5-metilaminometil-2-tio-uridina (mnm⁵s²U), 5-metilaminometil-2-seleno-uridina (mnm⁵se²U), 5-carbamoilmetil-uridina (ncm⁵U), 5-carbossimetilaminometil-uridina (cmnm⁵U), 5-carbossimetilaminometil-2-tio-uridina (cmnm⁵s²U), 5-propynil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometil-uridina (τm⁵U), 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina (τm⁵s²U), 1-taurinometil-4-tio-pseudouridina, 5-metil-uridina (m⁵U, cioè, avente la base azotata di deossitimina), 1-metil-pseudouridina (m¹ψ), 5-metil-2-tio-uridina (m⁵s²U), 1-metil-4-tio-pseudouridina (m¹s⁴ψ), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina (m³ψ), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, diidrouridina (D), diidropseudouridina, 5,6-diidrouridina, 5-metil-diidrouridina (m⁵D), 2-tio-diidrouridina, 2-tio-diidropseudouridina, 2-metossi-uridina, 2-metossi-4-tio-uridina, 4-metossi-pseudouridina, 4-metossi-2-tio-pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 3-(3-ammino-3-carbossipropil)uridina (acp³U), 1-metil-3-(3-ammino-3-carbossipropil)pseudouridina (acp³ψ), 5-(isopentenilamminometil)uridina (inm⁵U), 5-(isopentenilamminometil)-2-tio-uridina (inm⁵s²U), α-tio-uridina, 2'-O-metil-uridina (Um), 5,2'-O-dimetil-uridina (m⁵Um), 2'-O-metil-pseudouridina (ψm), 2-tio-2'-O-metil-uridina (s²Um), 5-metossicarbonilmetil-2'-O-metil-uridina (mcm⁵Um), 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-uridina (ncm⁵Um), 5-carbossimetilamminometil-2'-O-metil-uridina (cmnm⁵Um), 3,2'-O-dimetil-uridina (m³Um), e 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metil-uridina (inm⁵Um), 1-tio-uridina, deossitimidina, 2'-F-ara-uridina, 2'-F-uridina, 2'-OH-ara-uridina, 5-(2-carbometossivinil) uridina, e 5-[3-(1-E-propenilamino)uridina.

[0170] In alcuni casi, la base azotata modificata è una citosina modificata. Le basi azotate e i nucleosidi esemplificativi con citosina modificata includono 5-aza-citidina, 6-aza-citidina,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

pseudoisocitidina, 3-metil-citidina (m^3C), N4-acetil-citidina (ac^4C), 5-formil-citidina (f^5C), N4-metil-citidina (m^4C), 5-alo-citidina (ad esempio, 5-iodo-citidina), 5-idrossimetil-citidina (hm^5C), 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina (s^2C), 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio -zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metossi-citidina, 2-metossi-5-metil-citidina, 4-metossi-pseudoisocitidina, 4-metossi-1-metil-pseudoisocitidina, lisidina (k_2C), α -tio-citidina, 2'-O-metil-citidina (Cm), 5,2'-O-dimetil-citidina (m^5Cm), N4-acetil-2'-O-metil-citidina (ac^4Cm), N4,2'-O-dimetil-citidina (m^4Cm), 5-formil-2'-O-metil-citidina (f^5Cm), N4, N4,2'-O-trimetil-citidina (m^4_2Cm), 1-tio-citidina, 2'-F-ara-citidina, 2'-F-citidina, e 2'-OH-ara-citidina.

[0171] In alcuni casi, la base azotata modificata è un'adenina modificata. Le basi azotate e i nucleosidi esemplificativi con adenina modificata includono 2-ammino-purina, 2, 6-diaminopurina, 2-ammino-6-alo-purina (ad esempio, 2-ammino-6-cloro-purina), 6-alo-purina (ad esempio, 6-cloro-purina), 2-ammino-6-metil-purina, 8-azido-adenosina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza -2-ammino-purina, 7-deaza-8-aza-2-ammino-purina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metil-adenosina (m^1A), 2-metil-adenina (m^2A), N6-metil-adenosina (m^6A), 2-metiltio-N6-metil-adenosina (ms^2m^6A), N6-isopentenil-adenosina (i^6A), 2-metiltio-N6-isopentenil-adenosina (ms^2i^6A), N6-(cis-idrossiisopentenil)adenosina (io^6A), 2-metiltio-N6- (cis-idrossiisopentenil) adenosina (ms^2io^6A), N6-glicinilcarbamoil-adenosina (g^6A), N6-treonilcarbamoil-adenosina (t^6A), N6-metil-N6-treonilcarbamoil-adenosina (m^6t^6A), 2-metiltio- N6-treonilcarbamoil-adenosina (ms^2g^6A), N6, N6-dimetil-adenosina ($m^6_2 A$), N6-idrossinorvalilcarbamoil-adenosina (hn^6A), 2-metiltio-N6-idrossinorvalilcarbamoil-adenosina (ms^2hn^6A), N6-acetil-adenosina (ac^6A), 7-metil-adenina, 2-metiltio-adenina, 2-metossi-adenina, α -tio-adenosina, 2'-O-metil-adenosina (Am), N6,2'-O-dimetil-adenosina (m^6Am), N6, N6,2'-O-trimetil-adenosina (m^6_2Am), 1,2'-O-dimetil-adenosina


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(m¹Am), 2'-O-ribosiladenosina (fosfato) (Ar(p)), 2-ammino-N6-metil-purina, 1-tio-adenosina, 8-azido-adenosina, 2'-F-ara-adenosina, 2'-F-adenosina, 2'-OH-ara-adenosina e N6-(19-ammino-pentaossanonadecil)-adenosina.

[0172] In alcuni casi, la base azotata modificata è una guanina modificata. Le basi azotate e i
5 nucleosidi esemplificativi aventi una guanina modificata includono inosina (I), 1-metil-inosina (m¹I), wyosina (imG), metilwyosina (mimG), 4-demetil-wyosina (imG-14), isowyosina (imG2), wybutosina (yW), perossidossibutosina (o₂yW), idrossiwybutosina (OHyW), idrossivibutosina non modificata (OHyW*), 7-deaza-guanosina, cheuosina (Q), epossicheuosina (oQ), galattosil-cheuosina (galQ), mannosil-cheuosina (manQ), 7-ciano-7-deaza-guanosina (preQ₀), 7-
10 amminometil-7-deaza-guanosina (preQ₁), archeosina (G⁺), 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina (m⁷G), 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metil-inosina, 6-metossi-guanosina, 1-metil-guanosina (m¹G), N2-metil-guanosina (m²G), N2, N2-dimetil-guanosina (m²₂G), N2,7-dimetil-guanosina (m^{2,7}G), N2, N2,7-dimetil-guanosina (m^{2,2,7}G), 8-osso-guanosina, 7-metil-8-osso-guanosina, 1-metil-6-tio-
15 guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina, α-tio-guanosina, 2'-O-metil-guanosina (Gm), N2-metil-2'-O-metil-guanosina (m²Gm), N2, N2-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m²₂Gm), 1-metil-2'-O-metil-guanosina (m¹Gm), N2,7-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m^{2,7}Gm), 2'-O-metil-inosina (Im), 1,2'-O-dimetil-inosina (m¹Im), 2'-O-ribosilguanosina (fosfato) (Gr(p)), 1-tio-guanosina, O6-metil-guanosina, 2'-F-ara-guanosina e 2'-F-guanosina.

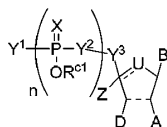
20 [0173] In alcuni casi, il nucleotide può essere modificato sulla faccia del solco maggiore. Ad esempio, tali modificazioni includono la sostituzione dell'idrogeno su C-5 di uracile o citosina con alchile (ad esempio metile) o alo.

[0174] La base azotata del nucleotide può essere selezionata indipendentemente da una purina, una pirimidina, un analogo della purina o della pirimidina. Ad esempio, la base azotata può essere
25 scelta indipendentemente da adenina, citosina, guanina, uracile o ipoxantina. In un'altra forma di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

realizzazione, la base azotata può anche includere, ad esempio, derivati naturali e sintetici di una base, inclusi pirazolo[3,4-d]pirimidine, 5-idrossimetil citosina, xantina, ipoxantina, 2-amminoadenina, 6-metile e altri derivati alchilici di adenina e guanina, 2-propile e altri derivati alchilici di adenina e guanina, 2-tiouracile, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-propinil uracile e
5 citosina, 6-azouracile, citosina e timina, 4-tiouracile, 8-alo (ad esempio, 8-bromo), 8-ammino, 8-tiolo, 8-tioalchile, 8-idrossi e altre 8-adenine e guanine sostituite, 5-alo in particolare 5-bromo, 5-trifluorometile e altri uracili e citosine 5-sostituiti, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, deazaguanina, 7-deazaguanina, 3- deazaguanina, deazaadenina, 7-deazaadenina, 3-deazaadenina, pirazolo[3,4-d]pirimidina, imidazo[1,5-a]1,3,5 triazinoni, 9-deazapurine,
10 imidazo[4,5-d]pirazine, tiazolo[4,5-d]pirimidine, pirazin-2-oni, 1,2,4-triazina, piridazina; o 1,3,5 triazina. Quando i nucleotidi sono rappresentati usando l'abbreviazione A, G, C, T o U, ogni lettera si riferisce alla base rappresentativa e/o ai suoi derivati, ad esempio A include adenina o analoghi dell'adenina, ad esempio 7-deaza adenina).

[0175] In alcuni casi il nucleotide modificato è un composto di Formula XI:



15 XI

in cui:

\equiv indica un legame singolo o doppio;

--- indica un legame singolo opzionale;

U è O, S, -NR^a-, o -CR^aR^b- quando \equiv

20 indica un singolo legame, o U è -CR^a- quando indica un doppio legame;

Z è H, alchile C₁₋₁₂ o arile C₆₋₂₀ o Z è assente quando \equiv

indica un doppio legame; e

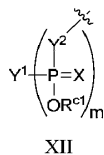
Z può essere -CR^aR^b- e formare un legame con A;

A è H, OH, NHR in cui R= alchile o arile o fosforile, solfato, -NH₂, N₃, azido, -SH, N un

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

amminoacido o un peptide comprendente da 1 a 12 amminoacidi;

D è H, OH, NHR in cui R= alchile o arile o fosforile, -NH₂, -SH, un amminoacido, un peptide comprendente da 1 a 12 amminoacidi o un gruppo di Formula XII:



5 oppure A e D insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati formano un anello a 5 elementi;

X è O o S;

ciascuno di Y¹ è selezionato indipendentemente da -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} e -SR^{a1};

ciascuno di Y² e Y³ sono selezionati indipendentemente da O, -CR^a R^b-, NR^c, S o un linker comprendente uno o più atomi selezionati dal gruppo costituito da C, O, N e S;

10 n è 0, 1, 2 o 3;

m è 0, 1, 2 o 3;

B è una base azotata;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂, alchinile C₂₋₁₂ o arile C₆₋₂₀;

15 R^c è H, alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole;

R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un contro-ione; e

—OR^{cl} è OH a un pH di circa 1 oppure —OR^{cl} è O⁻ a pH fisiologico;

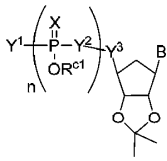
a condizione che l'anello che racchiude le variabili A, B, D, U, Z, Y² e Y³ non possa essere ribosio.

20 [0176] In alcuni casi, B è una base azotata selezionata dal gruppo costituito da citosina, guanina, adenina e uracile.

[0177] In alcuni casi, la base azotata è una pirimidina o un suo derivato.

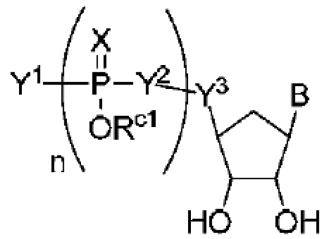
[0178] In alcuni casi, i nucleotidi modificati sono un composto di Formula XI-a:

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



XI-a.

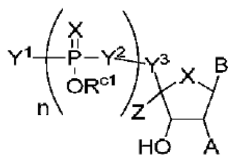
[0179] In alcuni casi, i nucleotidi modificati sono un composto di Formula XI-b:



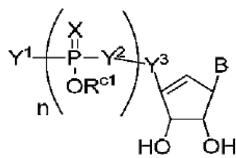
XI-b.

[0180] In alcuni casi, i nucleotidi modificati sono un composto di Formula XI-c1, XI-c2 o XI-c3:

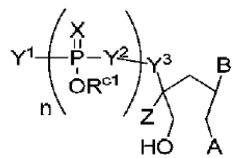
5



XI-c1

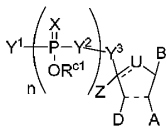


XI-c2



XI-c3

[0181] In alcuni casi i nucleotidi modificati sono un composto di Formula XI:



XI

10 in cui:

≡ indica un legame singolo o doppio;

--- indica un legame singolo opzionale;

U è O, S, -NR^a-, o -CR^aR^b- quando ≡ indica un singolo legame, o U è -CR^a- quando ≡≡ indica

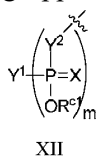
15 un doppio legame;

Z è H, alchile C₁₋₁₂ o arile C₆₋₂₀ o Z è assente quando \equiv indica un doppio legame; e

Z può essere -CR^aR^b- e formare un legame con A;

A è H, OH, solfato, -NH₂, -SH, un amminoacido o un peptide comprendente da 1 a 12 amminoacidi;

- 5 D è H, OH, -NH₂, -SH, un amminoacido, un peptide comprendente da 1 a 12 amminoacidi o un gruppo di Formula XII:

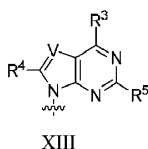


oppure A e D insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati formano un anello a 5 elementi;

X è O o S;

- 10 ciascuno di Y¹ è selezionato indipendentemente da -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} e -SR^{a1};
- ciascuno di Y² e Y³ sono selezionati indipendentemente da O, -CR^aR^b-, NR^c, S o un linker comprendente uno o più atomi selezionati dal gruppo costituito da C, O, N e S;
- n è 0, 1, 2 o 3;
- m è 0, 1, 2 o 3;

- 15 B è una base azotata di Formula XIII:



in cui:

V è N o NR^c con carica positiva;

R³ è NR^cR^d, -OR^a, o -SR^a;

- 20 R⁴ è H o può eventualmente formare un legame con Y³;

R⁵ è H, -NR^cR^d, oppure -OR^a;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂, alchinile C₂₋₁₂ o arile C₆₋₂₀;

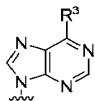
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

R^c è H, alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole;

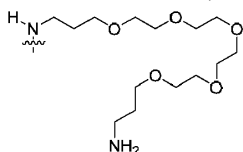
R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un contro-ione; e

—OR^{c1} è OH a un pH di circa 1 oppure —OR^{c1} è O⁻ a pH.

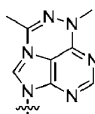
5 [0182] In alcuni casi, B è:



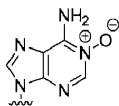
in cui R³ è —OH, —SH, o



10 [0183] In alcuni casi, B è:

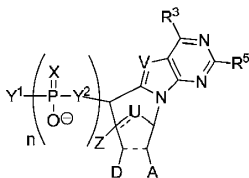


[0184] In alcuni casi, B è:



15

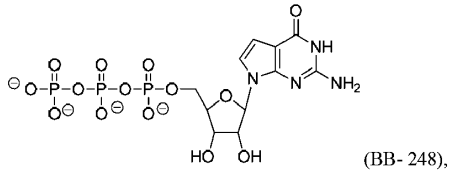
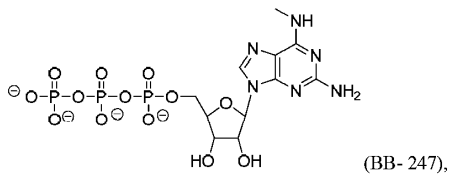
[0185] In alcuni casi i nucleotidi modificati sono un composto di Formula I-d:



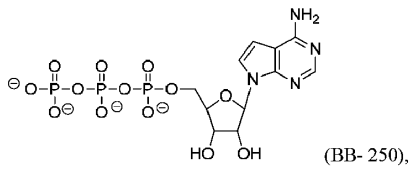
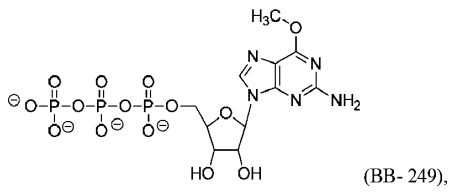
[0186] In alcuni casi, i nucleotidi modificati sono un composto selezionato dal gruppo costituito

20 da:

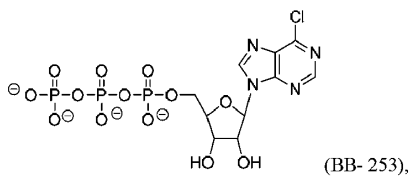
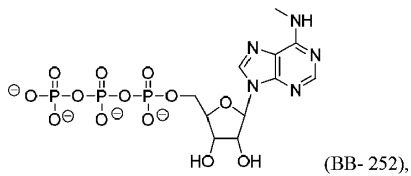
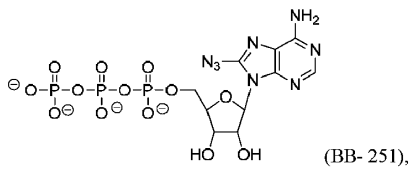
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



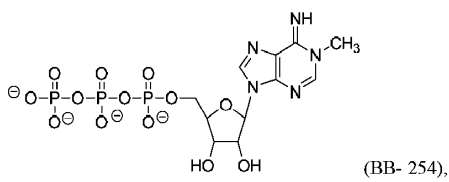
5

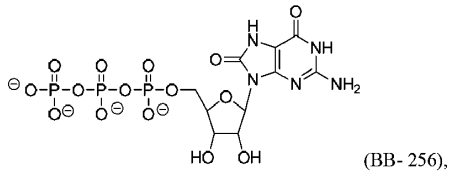
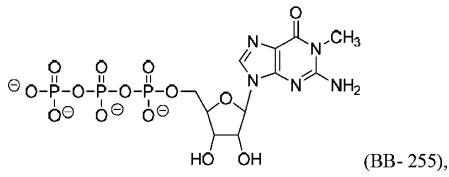


10

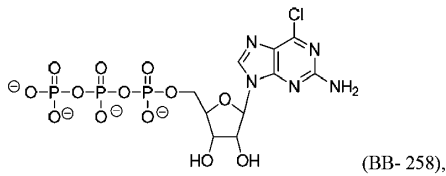
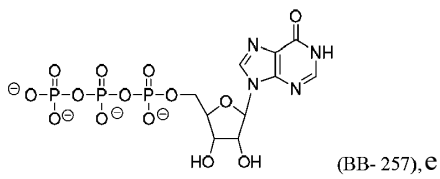


15





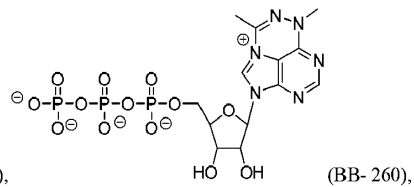
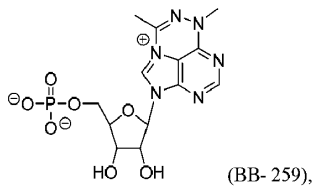
5



o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

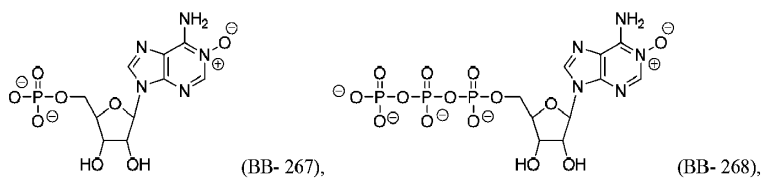
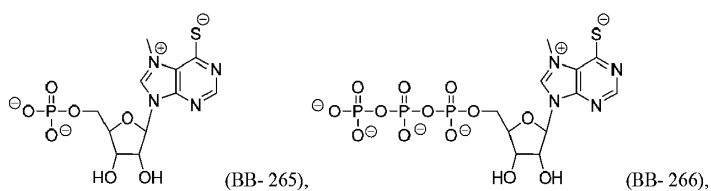
10 [0187] In alcuni casi, i nucleotidi modificati sono un composto selezionato dal gruppo costituito

da:

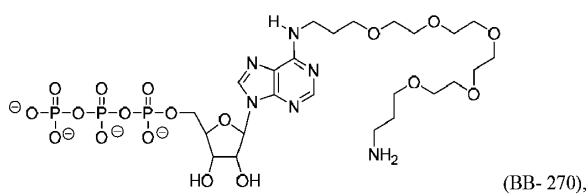
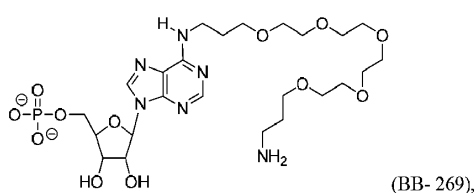


15

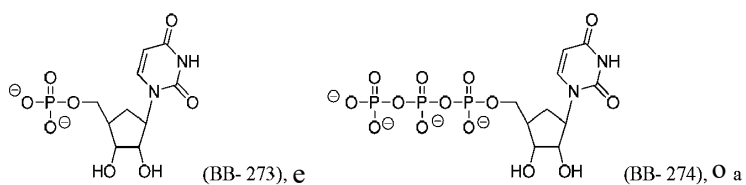
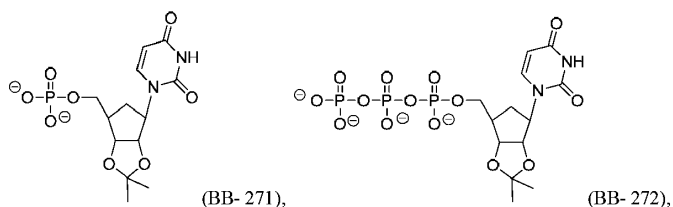




5




10



un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Modificazioni sul legame internucleosidico

- 15 [0188] I nucleotidi modificati, che possono essere incorporati in una molecola polinucleotidica, possono essere modificati sul legame internucleosidico (ad esempio, catena principale di fosfato). Nella presente, nel contesto della catena principale polinucleotidica, le espressioni "fosfato" e


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

"fosfodiesteri" sono usate in modo intercambiabile. I gruppi fosfato della catena principale possono essere modificati sostituendo uno o più atomi di ossigeno con un sostituto diverso. Inoltre, i nucleosidi e i nucleotidi modificati possono includere la sostituzione completa di una frazione fosfato non modificata con un altro legame internucleosidico come descritto nel presente

5 contesto. Esempi di gruppi fosfato modificati includono, tuttavia senza limitazioni, fosforotioato, fosforoselenati, boranofosfati, esteri boranofosfato, idrogenofosfonati, fosforammidati, fosforodiammidati, alchil- o arilfosfonati e fosfotriesteri. I fosforoditioati hanno entrambi gli atomi di ossigeno non leganti sostituiti dallo zolfo. Il linker fosfato può anche essere modificato sostituendo un ossigeno di legame con azoto (fosforammidati a ponte), zolfo (fosforotioati a

10 ponte) e carbonio (fosfonati di metilene a ponte).

[0189] La frazione fosfato α -tio-sostituita viene fornita per conferire stabilità ai polimeri di RNA e DNA attraverso i legami innaturali della catena principale di fosforotioato. Il DNA e l'RNA del fosforotioato hanno una maggiore resistenza alla nucleasi e, di conseguenza, un'emivita più lunga in un ambiente cellulare. Sebbene non si desideri essere vincolati dalla teoria, si prevede che le

15 molecole polinucleotidiche legate al fosforotioato riducano anche la risposta immunitaria innata attraverso un legame/attivazione più debole delle molecole immunitarie innate cellulari.

[0190] In casi specifici, un nucleoside modificato include un alfa-tio-nucleoside (ad esempio, 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina (α -tio-citidina), 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina).

20 [0191] Nel presente contesto vengono descritti altri legami internucleosidici che possono essere impiegati secondo la presente descrizione, inclusi i legami internucleosidici che non contengono un atomo di fosforo di seguito.

Combinazioni di zuccheri modificati, basi azotate e legami internucleosidici

[0192] I polinucleotidi della descrizione possono includere una combinazione di modificazioni

25 allo zucchero, alla base azotata e/o al legame internucleosidico. Queste combinazioni possono


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

includere una o più modificazioni qui descritte. Ad esempio, uno qualsiasi dei nucleotidi descritti nel presente contesto nelle Formule (Ia), (Ia-1)-(Ia-3), (Ib)-(If), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) e (IXa)-(IXr) possono essere combinati con qualsiasi delle basi azotate descritte nel presente contesto [ad esempio, nelle Formule (b1)-(b43) o qualsiasi altra
5 descritta nel presente contesto].

Sintesi di molecole polinucleotidiche

[0193] Le molecole polinucleotidiche da utilizzare secondo la descrizione possono essere preparate secondo qualsiasi tecnica utile come descritta nel presente contesto. I nucleosidi e nucleotidi modificati usati nella sintesi di molecole polinucleotidiche descritte nel presente
10 contesto possono essere preparati da materiali di partenza prontamente disponibili usando i seguenti metodi e procedure generali. Laddove siano fornite condizioni di processo tipiche o preferite (ad esempio, temperature di reazione, tempi, rapporti molari di reagenti, solventi, pressioni, ecc.), un esperto della tecnica sarebbe in grado di ottimizzare e sviluppare condizioni di processo aggiuntive. Le condizioni di reazione ottimali possono variare con i reagenti o solventi
15 specifici utilizzati, ma tali condizioni possono essere determinate da un esperto della tecnica mediante procedure di ottimizzazione ordinarie.

[0194] I processi qui descritti possono essere monitorati secondo qualsiasi metodo adatto noto nella tecnica. Ad esempio, la formazione del prodotto può essere monitorata mediante mezzi spettroscopici, come la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (ad esempio, ^1H o ^{13}C), la
20 spettroscopia a infrarossi, la spettrofotometria (ad esempio, UV-visibile) o la spettrometria di massa, o mediante cromatografia come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) o cromatografia su strato sottile.

[0195] La preparazione di molecole polinucleotidiche della presente descrizione può comportare la protezione e la deprotezione di vari gruppi chimici. La necessità di protezione e deprotezione
25 e la selezione di gruppi protettivi appropriati possono essere facilmente determinate da un esperto


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

della tecnica. La chimica dei gruppi protettivi può essere riscontrata, ad esempio, in Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 2a. Ed., Wiley & Sons, 1991.

[0196] Le reazioni dei processi descritti nel presente contesto possono essere condotte in solventi adatti, che possono essere facilmente selezionati da un esperto della tecnica della sintesi organica.

5 Solventi adatti possono essere sostanzialmente non reattivi con i materiali di partenza (reagenti), gli intermedi o i prodotti alle temperature a cui le reazioni vengono eseguite, vale a dire, temperature che possono essere comprese tra la temperatura di congelamento del solvente e la temperatura di ebollizione del solvente. Una data reazione può essere eseguita in un solvente o una miscela di più di un solvente. A seconda della fase di reazione specifica, possono essere scelti
10 solventi adatti per una fase di reazione specifica.

[0197] La risoluzione di miscele racemiche di polinucleotidi o acidi nucleici modificati (ad esempio, molecole di mRNA modificate) può essere effettuata mediante uno qualsiasi dei numerosi metodi noti nella tecnica. Un metodo esemplificativo include la ricristallizzazione frazionata usando un "acido di risoluzione chirale" che è un acido organico formante sale
15 otticamente attivo. Agenti risolventi adatti per metodi di ricristallizzazione frazionata sono, ad esempio, acidi otticamente attivi, come le forme D e L di acido tartarico, acido diacetiltartarico, acido dibenzoiltartarico, acido mandelico, acido malico, acido lattico o i vari acidi canforsolfonico otticamente attivi. La risoluzione delle miscele racemiche può anche essere eseguita mediante l'eluizione su una colonna impaccata con un agente di risoluzione otticamente attivo (ad esempio,
20 dinitrobenzoilfenilglicina). Una composizione di solvente di eluizione adatta può essere determinata da un esperto della tecnica.

[0198] Nucleosidi e nucleotidi modificati (ad esempio, molecole costitutive) possono essere preparati secondo i metodi sintetici descritti in Ogata et al., J. Org. Chem. 74:2585-2588 (2009); Purmal et al., Nucl. Acids Res. 22(1): 72-78, (1994); Fukuhara et al., Biochemistry, 1(4):
25 563-568 (1962); e Xu et al., Tetrahedron, 48(9): 1729-1740 (1992).


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0199] I polinucleotidi della descrizione possono o non possono essere modificati uniformemente lungo l'intera lunghezza della molecola. Ad esempio, uno o più o tutti i tipi di nucleotidi (ad esempio, purina o pirimidina o uno o più o tutti A, G, U, C) possono o non possono essere uniformemente modificati in un polinucleotide della descrizione, o in una data sua regione di sequenza predeterminata. In alcuni casi, tutti i nucleotidi X in un polinucleotide della descrizione (o in una data regione di sequenza) sono modificati, in cui X può essere uno qualsiasi dei nucleotidi A, G, U, C, o una qualsiasi delle combinazioni A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C o A+G+C.

[0200] In varie posizioni del polinucleotide possono esistere diverse modificazioni dello zucchero, modificazioni nucleotidiche e/o legami internucleosidici (ad esempio, strutture di catena principale). Un esperto della tecnica con competenza ordinaria comprenderà che gli analoghi nucleotidici o altra/e modificazione/i possono trovarsi in corrispondenza di qualsiasi posizione/i di un polinucleotide in modo tale che la funzione del polinucleotide non sia sostanzialmente ridotta. Una modificazione può anche essere una modificazione del terminale 5' o 3'. Il polinucleotide può contenere da circa l'1% a circa il 100% di nucleotidi modificati (o in relazione al contenuto complessivo di nucleotidi, o in relazione a uno o più tipi di nucleotidi, vale a dire uno o più tra A, G, U o C) o qualsiasi percentuale intervenuta (ad es. dall'1% al 20%, dall'1% al 25%, dall'1% al 50%, dall'1% al 60%, dall'1% al 70%, dall'1% al 80%, dall'1% al 90%, dall'1% al 95%, dal 10% al 20%, dal 10% al 25%, dal 10% al 50%, dal 10% al 60%, dal 10% al 70%, dal 10% al 80%, dal 10% al 90%, dal 10% al 95%, dal 10% al 100%, dal 20% al 25%, dal 20% al 50%, dal 20% al 60%, dal 20% al 70%, dal 20% al 80%, dal 20% al 90%, dal 20% al 95%, dal 20% al 100%, dal 50% al 60%, dal 50% al 70%, dal 50% all'80%, dal 50% al 90%, dal 50% al 95%, dal 50% al 100%, dal 70% al 80%, dal 70% al 90%, dal 70% al 95%, dal 70% al 100%, dall'80% al 90%, dall'80% al 95%, dall'80% al 100%, dal 90% al 95%, dal 90% al 100% e dal 95% al 100%.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

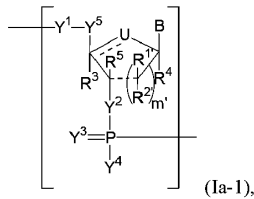
[0201] In alcuni casi, il polinucleotide include una pirimidina modificata (ad esempio uracile/uridina/U modificata o citosina/citidina/C modificata). In alcune forme di realizzazione, l'uracile o l'uridina (generalmente: U) nella molecola polinucleotidica può essere sostituito/a da circa l'1% a circa il 100% di uracile modificato o uridina modificata (ad esempio, dall'1% al 20%, dall'1% al 25%, dall'1% al 50%, dall'1% al 60%, dall'1% al 70%, dall'1% all'80%, dall'1% al 90%, dall'1% al 95%, dal 10% al 20%, dal 10% al 25%, dal 10% al 50%, dal 10% al 60%, dal 10% al 70%, dal 10% all'80%, dal 10% al 90%, dal 10% al 95%, dal 10% al 100%, dal 20% al 25%, dal 20% al 50%, dal 20% al 60%, dal 20% al 70%, dal 20% all'80%, dal 20% al 90%, dal 20% al 95%, dal 20% al 100%, dal 50% al 60%, dal 50% al 70%, dal 50% all'80%, dal 50% al 90%, dal 50% al 95%, dal 50% al 100%, dal 70% all'80%, dal 70% al 90%, dal 70% al 95%, dal 70% al 100%, dall'80% al 90%, dall'80% al 95%, dall'80% al 100%, dal 90% al 95%, dal 90% al 100% e dal 95% al 100% di un uracile modificato o di un'uridina modificata). L'uracile o l'uridina modificati possono essere sostituiti da un composto avente un'unica struttura singola o da una pluralità di composti aventi strutture differenti (ad esempio 2, 3, 4 o più strutture singole, come qui descritto). In alcuni casi, la citosina o la citidina (generalmente: C) nella molecola polinucleotidica può essere sostituito da circa l'1% a circa il 100% di una citosina modificata o citidina modificata (ad esempio, dall'1% al 20%, dall'1% al 25%, dall'1% al 50%, dall'1% al 60%, dall'1% al 70%, dall'1% all'80%, dall'1% al 90%, dall'1% al 95%, dal 10% al 20%, dal 10% al 25%, dal 10% al 50%, dal 10% al 60%, dal 10% al 70%, dal 10% all'80%, dal 10% al 90%, dal 10% al 95%, dal 10% al 100%, dal 20% al 25%, dal 20% al 50%, dal 20% al 60%, dal 20% al 70%, dal 20% all'80%, dal 20% al 90%, dal 20% al 95%, dal 20% al 100%, dal 50% al 60%, dal 50% al 70%, dal 50% all'80%, dal 50% al 90%, dal 50% al 95%, dal 50% al 100%, dal 70% all'80%, dal 70% al 90%, dal 70% al 95%, dal 70% al 100%, dall'80% al 90%, dall'80% al 95%, dall'80% al 100%, dal 90% al 95%, dal 90% al 100% e dal 95% al 100% di una citosina modificata o di una citidina modificata). La citosina o la citidina modificata può essere sostituita da un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

composto avente un'unica struttura singola o da una pluralità di composti aventi strutture differenti (ad esempio 2, 3, 4 o più strutture singole, come qui descritto).

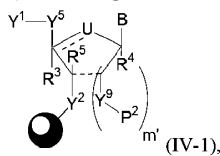
[0202] In alcuni casi, la presente descrizione fornisce metodi per sintetizzare un polinucleotide (ad esempio, la prima regione, la prima regione fiancheggiante o la seconda regione

5 fiancheggiante) includente un n numero di nucleosidi legati aventi Formula (Ia-1):

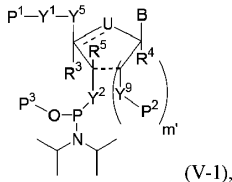


comprendente:

a) far reagire un nucleotide di Formula (IV-1):



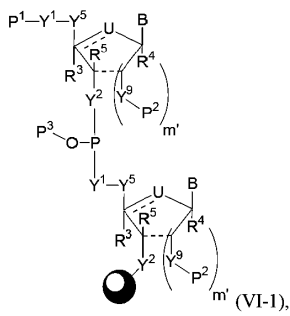
10 con un composto fosforamiditico di Formula (V-1):



in cui Y⁹ è H, idrossi, fosforile, pirofosfato, solfato, ammino, tiolo, amminoacido opzionalmente sostituito, o un peptide (ad esempio, comprendente da 2 a 12 amminoacidi); e ciascun P¹, P² e P³ è, indipendentemente, un gruppo protettivo adatto e

15 ● indica un supporto solido;

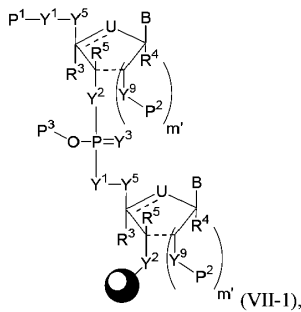
per fornire un polinucleotide di Formula (VI-1):



e

b) ossidare o solforare il polinucleotide di Formula (V) per produrre un polinucleotide di Formula

(VII-1):



5

e

c) rimuovere i gruppi protettivi per ottenere il polinucleotide di Formula (Ia).

[0203] In alcuni casi, le fasi a) e b) vengono ripetute da 1 a circa 10.000 volte. In alcune forme di realizzazione, i metodi comprendono inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo costituito da A, C, G e U adenosina, citosina, guanosina e uracile. In alcune forme di realizzazione, la base azotata può essere una pirimidina o un suo derivato. In alcuni casi, il polinucleotide è traducibile.

10

[0204] Altri componenti di polinucleotidi sono opzionali e sono utili in alcune forme di realizzazione. Ad esempio, sono fornite una regione 5'-non tradotta (UTR) e/o una 3'UTR, in cui una o entrambe possono contenere indipendentemente una o più modificazioni nucleotidiche diverse. In tali casi, nella regione traducibile possono essere presenti anche modificazioni nucleotidiche. Sono inoltre forniti polinucleotidi contenenti una sequenza di Kozak.

15

Combinazioni di nucleotidi

[0205] Ulteriori esempi di nucleotidi modificati e combinazioni di nucleotidi modificati sono

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

forniti di seguito nella Tabella 2. Queste combinazioni di nucleotidi modificati possono essere usate per formare i polinucleotidi della descrizione. Salvo diversa indicazione, i nucleotidi modificati possono essere completamente sostituiti con i nucleotidi naturali dei polinucleotidi della descrizione. A titolo di esempio non limitativo, l'uridina nucleotidica naturale può essere
5 sostituita con un nucleoside modificato qui descritto. In un altro esempio non limitativo, il nucleotide naturale uridina può essere parzialmente sostituito (ad esempio circa lo 0,1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45 %, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99,9%) con almeno uno dei nucleosidi modificati qui descritti.

Tabella 2

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>
α -tio-citidina	α -tio-citidina/5-iodo-uridina
	α -tio-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
	α -tio-citidina/ α -tio-uridina
	α -tio-citidina/5-metil-uridina
	α -tio-citidina/pseudo-uridina
	circa il 50% delle citosine sono α -tio-citidina
pseudoisocitidina	pseudoisocitidina/5-iodo-uridina
	pseudoisocitidina/N1-metil-pseudouridina
	pseudoisocitidina/ α -tio-uridina
	pseudoisocitidina/5-metil-uridina
	circa il 25% delle citosine sono pseudoisocitidina
pirrolo-citidina	pirrolo-citidina/5-iodo-uridina
	pirrolo-citidina/N1-metil-pseudouridina
	pirrolo-citidina/ α -tio-uridina
	pirrolo-citidina/5-metil-uridina
	circa il 50% delle citosine sono pirrolo-citidina
N4-acetil-citidina	N4-acetil-citidina/5-iodo-uridina
	N4-acetil-citidina/N1-metil-pseudouridina
	N4-acetil-citidina/a-tio-uridina


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>
	N4-acetil-citidina/5-metil-uridina
	circa il 50% delle citosine sono N4-acetil-citidina
	circa il 25% delle citosine sono N4-acetil-citidina
	N4-acetil-citidina/5-metossi-uridina
	N4-acetil-citidina/5-bromo-uridina
	N4-acetil-citidina/2-tio-uridina
	circa il 50% delle citosine sono N4-acetil-citidina/circa il 50% delle uridine sono 2-tio-uridina

[0206] I presenti inventori hanno esplorato determinati nucleotidi modificati e combinazioni di nucleotidi. Questi risultati sono descritti nella domanda di brevetto provvisoria U.S. n. 61/404.413, depositata il 1 ottobre 2010, intitolata Engineered Nucleic Acids and Methods of Use Thereof, domanda di brevetto U.S. n. 13/251.840, depositata il 3 ottobre 2011, intitolata Modified Nucleotides, and Nucleic Acids, and Uses Thereof, adesso abbandonata, la domanda di brevetto U.S. n. 13/481.127, depositata il 25 maggio 2012, intitolata Modified Nucleotides, and Nucleic Acids, and Uses Thereof, la pubblicazione della domanda di brevetto internazionale n. WO2012045075, depositata il 3 ottobre 2011, intitolata Modified Nucleosides, Nucleotides, And Nucleic Acids, and Uses Thereof, la domanda di brevetto U.S. n. US20120237975 depositata il 3 ottobre 2011, intitolata Engineered Nucleic Acids and Method of Use Thereof, e la domanda di brevetto internazionalen. WO2012045082,

[0207] Ulteriori esempi di combinazioni di nucleotidi modificati sono forniti di seguito nella Tabella 3. Queste combinazioni di nucleotidi modificati possono essere usate per formare i polinucleotidi della descrizione.

15 **Tabella 3**

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>
citidina modificata avente una o più basi azotate di Formula (b10)	citidina modificata con (b10)/N1-metil-pseudouridina
	citidina modificata con (b10)/5-metossi-uridina
	citidina modificata con (b10)/5-metil-uridina

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>
	citidina modificata con (b10)/5-bromo-uridina
	citidina modificata con (b10)/2-tio-uridina
	circa il 50% della citidina sostituita con citidina modificata (b10)/circa il 50% delle uridine sono 2-tio-uridina
citidina modificata avente una o più basi azotate di Formula (b32)	citidina modificata con (b32)/N1-metil-pseudouridina
	citidina modificata con (b32)/5-metossi-uridina
	citidina modificata con (b32)/5-metil-uridina
	citidina modificata con (b32)/5-bromo-uridina
	citidina modificata con (b32)/2-tio-uridina
	circa il 50% della citidina sostituita con citidina modificata (b32)/circa il 50% delle uridine sono 2-tio-uridina
uridina modificata avente una o più basi azotate di Formula (b1)	uridina modificata con (b1)/N4-acetil-citidina
uridina modificata avente una o più basi azotate di Formula (b8)	uridina modificata con (b8)/N4-acetil-citidina
uridina modificata avente una o più basi azotate di Formula (b28)	uridina modificata con (b28)/N4-acetil-citidina
uridina modificata avente una o più basi azotate di Formula (b29)	uridina modificata con (b29)/N4-acetil-citidina
uridina modificata avente una o più basi azotate di Formula (b30)	uridina modificata con (b30)/N4-acetil-citidina

[0208] In alcuni casi, almeno il 25% delle citosine è sostituito da un composto di Formula (b10)-(b14), (b24), (b25) o (b32)-(b35) [ad esempio, almeno circa il 30%, almeno circa il 35%, almeno circa il 40%, almeno circa il 45%, almeno circa il 50%, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%, almeno circa il 65%, almeno circa 70 %, almeno circa il 75%, almeno circa l'80%, almeno circa l'85%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%, o circa il 100%, ad esempio, di un composto di Formula (b10) o (b32)].

[0209] In alcuni casi, almeno il 25% degli uracili è sostituito da un composto di Formula (b1)-(b6), (b21)-(b23) o (b28)-(b31) [ad esempio, almeno circa il 30%, almeno circa il 35%, almeno

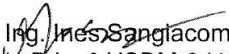
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

circa il 40%, almeno circa il 45%, almeno circa il 50%, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%, almeno circa il 65%, almeno circa il 70 %, almeno circa il 75%, almeno circa l'80%, almeno circa l'85%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%, o circa il 100%, ad esempio, di un composto di Formula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)].

5 [0210] In alcuni casi, almeno il 25% delle citosine è sostituito da un composto di Formula (b10)-(b14), (b24), (b25) o (b32)-(b35) [ad esempio Formula (b10) o (b32)], e almeno il 25% degli uracili è sostituito da un composto di Formula (b1)-(b9), (b21)-(b23), o (b28)-(b31) [ad esempio Formula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)] (ad esempio almeno circa il 30%, almeno circa il 35%, almeno circa il 40%, almeno circa il 45%, almeno circa il 50%, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%, almeno circa il 65%, almeno circa il 70%, almeno circa il 75%, almeno circa l'80%, almeno circa l'85%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%, o circa il 100%).

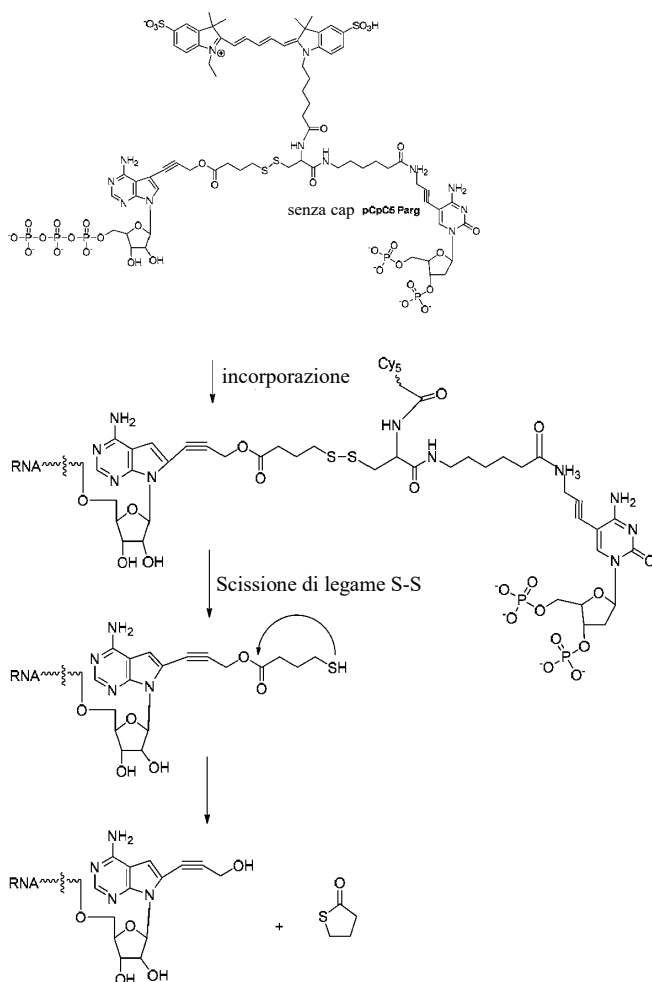
Modificazioni includenti linker e un carico utile

15 [0211] La base azotata del nucleotide può essere legata in modo covalente in qualsiasi posizione chimicamente appropriata a un carico utile, ad esempio un agente rilevabile o un agente terapeutico. Ad esempio, la base azotata può essere deaza-adenosina o deaza-guanosina e il linker può essere attaccato alle posizioni C-7 o C-8 della deaza-adenosina o deaza-guanosina. In altri casi, la base azotata può essere citosina o uracile e il linker può essere attaccato alle posizioni N-3 o C-5 della citosina o dell'uracile. Lo Schema 1 di seguito raffigura un nucleotide modificato esemplificativo in cui la base azotata, l'adenina, è attaccata a un linker al carbonio C-7 della deaza adenina. Inoltre, lo Schema 1 descrive il nucleotide modificato con il linker e il carico utile, ad esempio un agente rilevabile, incorporato nell'estremità 3' dell'mRNA. La scissione del disolfuro e l'aggiunta di 1,2 del gruppo tiolo sull'estere propargilico rilascia l'agente rilevabile. La struttura rimanente (raffigurata, ad esempio, come pApC5Parg nello Schema 1) è l'inibitore. Il fondamento logico per la struttura dei nucleotidi modificati è che l'inibitore legato interferisce stericamente con la capacità della polimerasi di incorporare una seconda base. Pertanto, è


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

fondamentale che l'attacco sia abbastanza lungo da influenzare questa funzione e che l'inibitore sia in un orientamento stereochimico che inibisca o proibisca il secondo e segua i nucleotidi nel filamento polinucleotidico in crescita.

Schema 1



5 Linker

[0212] Come usato nel presente contesto, un linker si riferisce a un gruppo di atomi, ad esempio 10-1.000 atomi, e può essere costituito da atomi o gruppi come, tuttavia senza limitazioni, carbonio, ammino, alchilammino, ossigeno, zolfo, solfossido, solfonile, carbonile e immina. Il linker può essere attaccato a un nucleoside o nucleotide modificato sulla base azotata o sulla
10 frazione dello zucchero in corrispondenza di una prima estremità, e a un carico utile, ad esempio,

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

un agente rilevabile o terapeutico, ad esempio, in corrispondenza di una seconda estremità. Il linker è di una lunghezza sufficiente da non interferire con l'incorporazione in una sequenza di acido nucleico.

[0213] Esempi di gruppi chimici che possono essere incorporati nel legante includono, tuttavia
5 senza limitazioni, un alchile, un alchene, un alchino, un ammido, un etere, un tioetere o un gruppo di estere. La catena di linker può anche comprendere parte di un anello saturo, insaturo o aromatico, inclusi anelli policiclici ed eteroaromatici in cui l'anello eteroaromatico è un gruppo arile contenente da uno a quattro eteroatomi, N, O o S. Esempi specifici di collegamenti includono, tuttavia senza limitazioni, alcani insaturi, polietilenglicoli e polimeri di destrano.

10 [0214] Ad esempio, il linker può includere unità monomeriche di etilene o glicole propilenico, ad esempio dietilenglicole, dipropilenglicole, trietilenglicole, tripropilenglicole, tetraetilenglicole o tetraetilenglicole. In alcune forme di realizzazione, il linker può includere una frazione alchile, alchenile e/o alchinile bivalente. Il linker può includere una frazione di estere, ammidica o di etere.

15 [0215] Altri esempi includono frazioni scindibili all'interno del linker, come, ad esempio, un legame disolfuro (-S-S-) o un legame azo (-N=N-), che possono essere scissi usando un agente riducente o fotolisi. Un legame scindibile incorporato nel linker e attaccato a un nucleotide modificato, quando scisso, provoca, ad esempio, un breve "segno" o una modificazione chimica sul nucleotide. Ad esempio, dopo la scissione, il segno risultante su una base nucleotidica, che
20 faceva parte del nucleotide modificato ed è incorporata in un filamento polinucleotidico, non è reattivo e non ha bisogno di essere neutralizzato chimicamente. Questo aumenta la facilità con cui un successivo nucleotide può essere incorporato durante il sequenziamento di un modello polimerico di acido nucleico. Ad esempio, le condizioni includono l'uso di tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP), ditiotreitolo (DTT) e/o altri agenti riducenti per la scissione di un
25 legame disolfuro. Un legame separabile selettivamente che include un legame ammidico può


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

essere tagliato ad esempio mediante l'uso di TCEP o altri agenti riducenti e/o fotolisi. Un legame separabile selettivamente che include un legame estere può essere scisso ad esempio mediante idrolisi acida o basica.

Carico utile

5 [0216] I metodi e le composizioni descritti nel presente contesto sono utili per fornire un carico utile a un bersaglio biologico. Il carico utile può essere utilizzato, *ad esempio*, per la marcatura (ad esempio, un agente rilevabile come un fluoroforo) o per scopi terapeutici (ad esempio, una citotossina o altro agente terapeutico).

Carico utile: Agenti terapeutici

10 [0217] In alcuni casi il carico utile è un agente terapeutico come una citotossina, uno ione radioattivo, un chemioterapico o un altro agente terapeutico. Una citotossina o un agente citotossico include qualsiasi agente che è dannoso per le cellule. Esempi includono taxolo, citocalasina B, gramicidina D, etidio bromuro, emetina, mitomicina, etoposide, tenoposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidrossi antracina dione,
15 mitoxantrone, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, puromicina, maytansinoidi, ad es. maytansinolo (si veda il brevetto U.S. 5.208.020), CC-1065 (si veda il brevetto U.S. n. 5.475.092, 5.585.499, 5.846.545) e loro analoghi oppure omologhi. Gli ioni radioattivi includono, tuttavia senza limitazioni, iodio (ad esempio, iodio 125 o iodio 131), stronzio 89, fosforo, palladio, cesio, iridio, fosfato, cobalto,
20 ittrio 90, samario 153 e praseodimio. Altri agenti terapeutici includono, tuttavia senza limitazioni, antimetaboliti [ad esempio metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agenti alchilanti (ad esempio mecloretammina, tiotepa clorambucile, CC-1065, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamide, busulfan, dibromomannitolo, streptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiammina platino (II) (DDP)
25 cisplatino], antracicline [ad esempio, daunorubicina (prima daunomicina) e doxorubicina],


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

antibiotici [ad esempio, dactinomicina (prima actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramycin (AMC)] e agenti anti-mitotici (ad esempio, vincristina, vinblastina, taxolo e maytansinoidi).

Carico utile: agenti rilevabili

5 [0218] Esempi di sostanze rilevabili includono varie piccole molecole organiche, composti inorganici, nanoparticelle, enzimi o substrati enzimatici, materiali fluorescenti, materiali luminescenti, materiali bioluminescenti, materiali chemiluminescenti, materiali radioattivi e agenti di contrasto. Tali marcature rilevabili otticamente includono, ad esempio, senza limitazione, acido 4-acetammido-4'-isotiocianatostilbene-2,2'-disolfonico; acridina e derivati:
10 acridina, isotiocianato di acridina; acido 5-(2'-amminoetil)amminonaftalen-1-solfonico (EDANS); 4-ammino-N-[3-vinilsolfonil]fenil]naftalimmide-3,5 disolfonato; N-(4-anilino-1-naftil)maleimmide; antranilammide; BODIPY; giallo brillante; cumarina e derivati; cumarina, 7-ammino-4-metilcumarina (AMC, Coumarin 120), 7-ammino-4-trifluorometilcouluarina (Coumaran 151); coloranti alla cianina; cianosina; 4',6-diamminidino-2-fenilindolo (DAPI); 5'5'-
15 dibromopirogallol-solfonaftaleina (rosso di bromopirogallolo); 7-dietilammino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; dietilentriammina pentaacetato; acido 4,4'-diisotiocianatodidro-stilbene-2,2'-disolfonico; acido 4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-disolfonico; cloruro di 5-[dimetilammino]-naftalene-1-solfonile (DNS, dansilcloruro); 4-dimetilamminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina e derivati; eosina, eosina
20 isotiocianato, eritrosina e derivati; eritrosina B, eritrosina, isotiocianato; etidio; fluoresceina e derivati; 5-carbossifluoresceina (FAM), 5-(4,6-diclorotriazina-2-il)amminofluoresceina (DTAF), 2',7 -dimetossi-4'5'-dicloro-6-carbossifluoresceina, fluoresceina, isotiocianato di fluoresceina, QFITC, (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato di verde malachite; 4-metilumbelliferoneorto cresolftaleina; nitrotirosina; pararosanilina; rosso fenolo; B-ficoeritrina;
25 o-ftaldialdeide; pirene e derivati: pirene, pirene butirrato, succinimidil 1-pirene; punti quantici di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

butirrato; Reactive Red 4 (Cibacron™ Brilliant Red 3B-A) rodamina e derivati: 6-carbossi-X-rodamina (ROX), 6-carbossirrodamina (R6G), lissamina rodamina B sulfonil cloruro rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, solforodamina B, solforodamina 101, sulfonil cloruro derivato della soforodamina 101 (rosso del Texas); N,N,N',N'tetrametil-6-
5 carbossirrodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato di tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; acido rosolico; derivati chelati di terbio; cianina-3 (Cy3); cianina-5 (Cy5); cianina-5,5 (Cy5,5), cianina-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa 647; La Jolta Blu; ftalocianina; e naftalocianina. In alcuni casi, la marcatura rilevabile è un colorante fluorescente, come Cy5 e Cy3.

10 [0219] Esempi di materiale luminescente include luminolo; esempi di materiali bioluminescenti includono luciferasi, luciferina e aequorina.

[0220] Esempi di materiale radioattivo adatto includono ^{18}F , ^{67}Ga , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, ^{82}Rb , ^{111}In , ^{123}I , ^{133}Xe , ^{201}Tl , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ad esempio, come pertecnetato [tecnetato (VII), TcO_4^-] direttamente o indirettamente, o altro radioisotopo rilevabile mediante conteggio diretto delle
15 radioemissioni o conteggio per scintillazione.

[0221] Inoltre, possono essere utilizzati agenti di contrasto, ad esempio agenti di contrasto per la risonanza magnetica o la risonanza magnetica nucleare, per la TC a raggi X, l'imaging Raman, la tomografia a coerenza ottica, l'imaging ad assorbimento, l'imaging a ultrasuoni o l'imaging termico. Agenti di contrasto esemplificativi includono oro (ad esempio nanoparticelle d'oro),
20 gadolinio

[0222] (ad esempio, Gd chelato), ossidi di ferro [ad esempio, ossido di ferro superparamagnetico (SPIO), nanoparticelle di ossido di ferro monocristallino (MION) e ossido di ferro superparamagnetico ultrapiccolo (USPIO)], chelati di manganese (ad esempio, Mn-DPDP), solfato di bario, mezzi di contrasto iodati (iohexol), microbolle o possono essere utilizzati anche
25 perfluorocarburi.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0223] In alcuni casi, l'agente rilevabile è un precursore non rilevabile che diventa rilevabile al momento dell'attivazione. Gli esempi includono costrutti fluorogeni di tetrazina-fluoroforo (ad esempi tetrazina-BODIPY FL, tetrazina-Oregon Green 488 o tetrazina-BODIPY TMR-X) o agenti fluorogenici attivabili da enzimi [ad esempio PROSENSE (VisEn Medical)].

5 [0224] Quando i composti sono marcati enzimaticamente con, ad esempio, perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina o luciferasi, la marcatura enzimatica viene rilevata mediante determinazione della conversione di un substrato appropriato in prodotto.

[0225] I saggi *in vitro* in cui queste composizioni possono essere utilizzate includono saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), immunoprecipitazioni, immunofluorescenza, saggio
10 immunoenzimatico (EIA), saggio radioimmunologico (RIA) e analisi Western blot.

[0226] Le marcature diverse da quelle descritte nel presente contesto sono contemplate dalla presente descrizione, incluse altre marcature rilevabili otticamente. Le marcature possono essere attaccate al nucleotide modificato della presente descrizione in qualsiasi posizione usando prodotti chimici standard in modo tale che la marcatura possa essere rimossa dalla base
15 incorporata al momento della scissione del linker scindibile.

Carico utile. Carichi utili che penetrano le cellule

[0227] In alcuni casi, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati possono anche includere un carico utile che può essere una frazione o un agente che penetra nelle cellule che migliora il rilascio intracellulare delle composizioni. Ad esempio, le composizioni possono
20 includere una sequenza peptidica che penetra nelle cellule che facilita il rilascio nello spazio intracellulare, ad esempio peptide TAT, penetratine, trasportatori o peptidi penetranti nelle cellule derivati dall'HIV, si veda, ad esempio, Caron et al., (2001) Mol Ther. 3(3):310-8; Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL 2002); El-Andaloussi et al., (2005) Curr Pharm Des. 11(28):3597-611; e Deshayes et al., (2005) Cell Mol
25 Life Sci. 62(16):1839-49. Le composizioni possono anche essere formulate per includere un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

agente di penetrazione cellulare, ad esempio liposomi, che migliorano il rilascio delle composizioni nello spazio intracellulare.

Carico utile. Bersagli biologici

5 [0228] I nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto possono essere utilizzati per fornire un carico utile a qualsiasi bersaglio biologico per il quale esiste o può essere generato un ligando specifico. Il ligando può legarsi al bersaglio biologico in modo covalente o non covalente.

10 [0229] Bersagli biologici esemplificativi includono biopolimeri, ad esempio anticorpi, acidi nucleici come RNA e DNA, proteine, enzimi; proteine esemplificative includono enzimi, recettori e canali ionici. In alcuni casi, il bersaglio è un marcatore specifico del tessuto o del tipo cellulare, ad esempio una proteina espressa specificamente su un tessuto o tipo cellulare selezionato. In alcuni casi, il bersaglio è un recettore, come, tuttavia senza limitazioni, recettori della membrana plasmatica e recettori nucleari; esempi più specifici includono recettori accoppiati alla proteina G, proteine dei pori cellulari, proteine trasportatrici, anticorpi espressi in superficie, proteine
15 HLA, proteine MHC e recettori dei fattori di crescita.

Sintesi di nucleotidi modificati

[0230] I nucleosidi e i nucleotidi modificati descritti nel presente contesto possono essere preparati da materiali di partenza prontamente disponibili utilizzando i seguenti metodi e procedure generali. È chiaro che laddove condizioni di processo tipiche o preferite (vale a dire, temperature di reazione, tempi, rapporti molari di reagenti, solventi, pressioni, eccetera) siano
20 date, possono essere utilizzate anche altre condizioni di processo salvo diversamente indicato. Le condizioni di reazione ottimali possono variare con i reagenti o solventi specifici utilizzati, ma tali condizioni possono essere determinate da un esperto della tecnica mediante procedure di ottimizzazione ordinarie.

25 [0231] I processi descritti del presente contesto possono essere monitorati secondo qualsiasi


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

metodo adatto noto nella tecnica. Ad esempio, la formazione del prodotto può essere monitorata mediante mezzi spettroscopici, come la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (ad esempio, ^1H o ^{13}C), la spettroscopia a infrarossi, la spettrofotometria (ad esempio, UV-visibile) o la spettrometria di massa, o mediante cromatografia come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) o cromatografia su strato sottile.

[0232] La preparazione di nucleosidi e nucleotidi modificati può comportare la protezione e la deprotezione di vari gruppi chimici. La necessità di protezione e deprotezione e la selezione di gruppi protettivi appropriati possono essere facilmente determinate da un esperto della tecnica. La chimica dei gruppi protettivi può essere riscontrata, ad esempio, in Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991.

[0233] Le reazioni dei processi descritti nel presente contesto possono essere condotte in solventi adatti, che possono essere facilmente selezionati da un esperto della tecnica della sintesi organica. Solventi adatti possono essere sostanzialmente non reattivi con i materiali di partenza (reagenti), gli intermedi o i prodotti alle temperature a cui le reazioni vengono eseguite, vale a dire, temperature che possono essere comprese tra la temperatura di congelamento del solvente e la temperatura di ebollizione del solvente. Una data reazione può essere eseguita in un solvente o una miscela di più di un solvente. A seconda della fase di reazione specifica, possono essere scelti solventi adatti per una fase di reazione specifica.

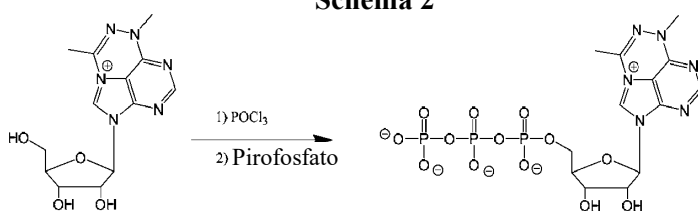
[0234] La risoluzione di miscele racemiche di nucleosidi e nucleotidi modificati può essere effettuata mediante uno qualsiasi dei numerosi metodi noti nella tecnica. Un metodo esemplificativo include la ricristallizzazione frazionata usando un "acido di risoluzione chirale" che è un acido organico formante sale otticamente attivo. Agenti risolventi adatti per metodi di ricristallizzazione frazionata sono, ad esempio, acidi otticamente attivi, come le forme D e L di acido tartarico, acido diacetiltartarico, acido dibenzoiltartarico, acido mandelico, acido malico, acido lattico o i vari acidi canforsolfonico otticamente attivi. La risoluzione delle miscele


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

racemiche può anche essere eseguita mediante l'eluizione su una colonna impaccata con un agente di risoluzione otticamente attivo (ad esempio, dinitrobenzoilfenilglicina). Una composizione di solvente di eluizione adatta può essere determinata da un esperto della tecnica.

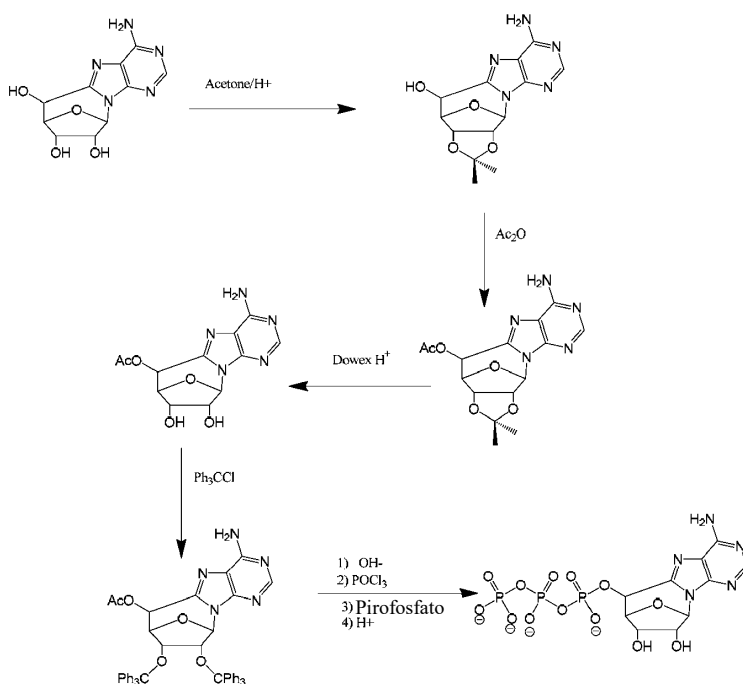
[0235] Sintesi esemplificative di nucleotidi modificati, che sono incorporati in polinucleotidi, ad esempio RNA o mRNA, sono fornite di seguito dallo Schema 2 allo Schema 12. Lo Schema 2 fornisce un metodo generale per la fosforilazione dei nucleosidi, inclusi i nucleosidi modificati.

Schema 2



[0236] Per controllare la reazione possono essere utilizzati vari gruppi protettivi. Ad esempio, lo Schema 3 prevede l'uso di più fasi di protezione e deprotezione per promuovere la fosforilazione in corrispondenza della posizione 5' dello zucchero, piuttosto che nei gruppi ossidrilici in 2' e in 3'.

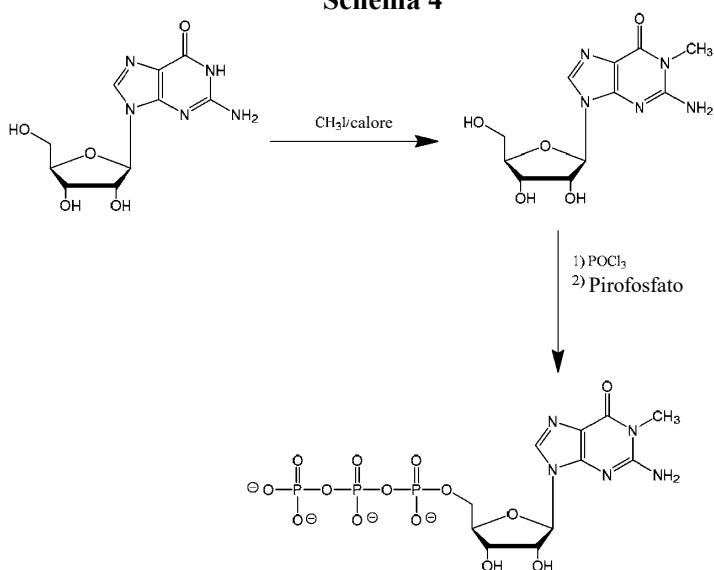
Schema 3



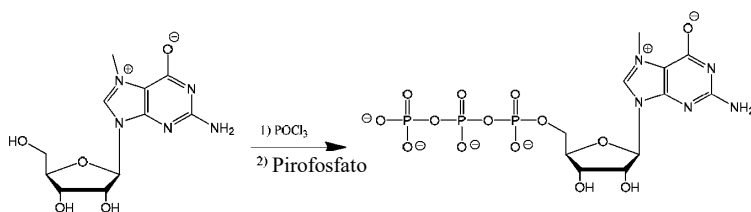
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0237] I nucleotidi modificati possono essere sintetizzati in qualsiasi modo utile. Gli Schemi 4, 5 e 8 forniscono metodi esemplificativi per sintetizzare nucleotidi modificati aventi una base azotata purinica modificata; e gli Schemi 6 (per riferimento) e 7 forniscono metodi esemplificativi per sintetizzare nucleotidi modificati aventi rispettivamente una pseudouridina o una pseudoisocitidina modificata.

Schema 4

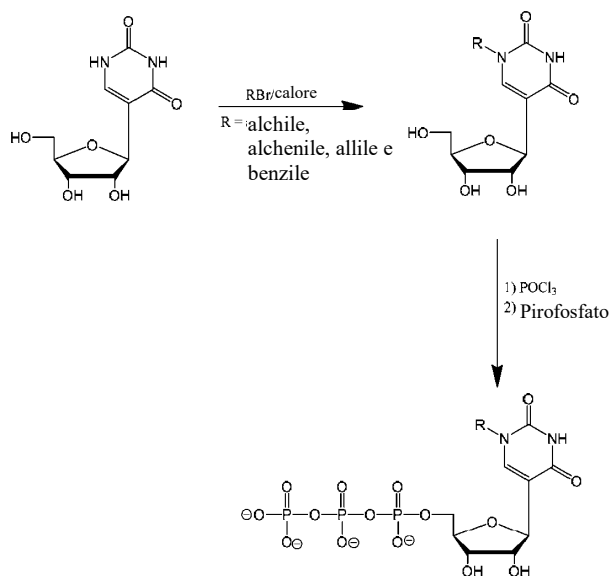


Schema 5

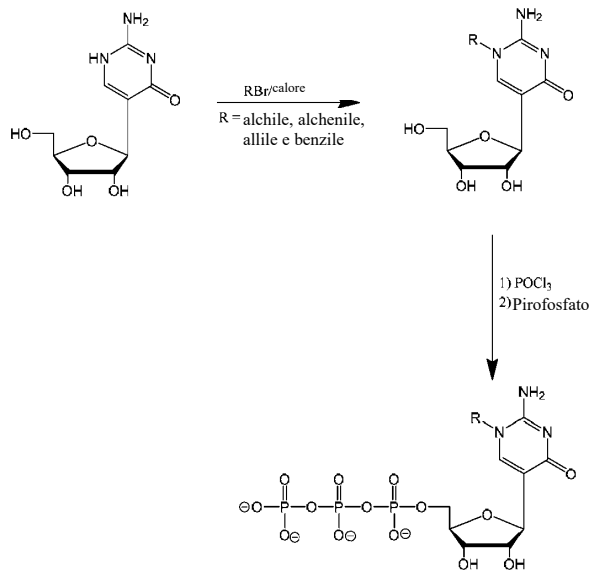


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

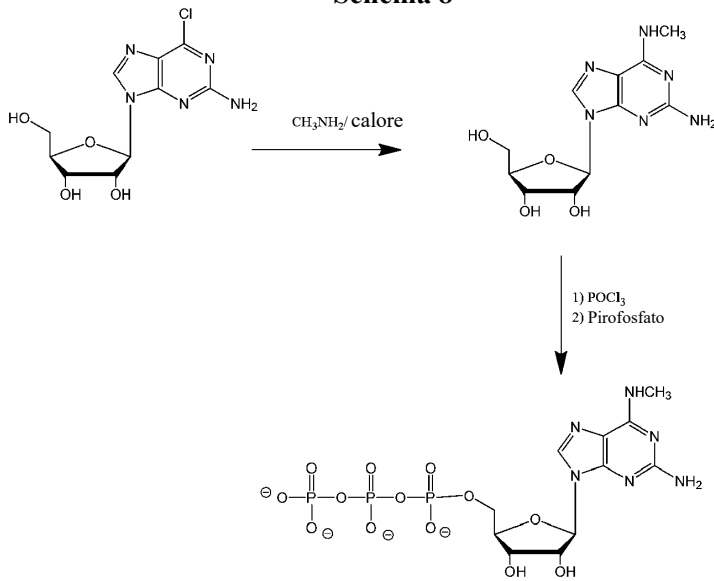
Schema 6 di riferimento



Schema 7

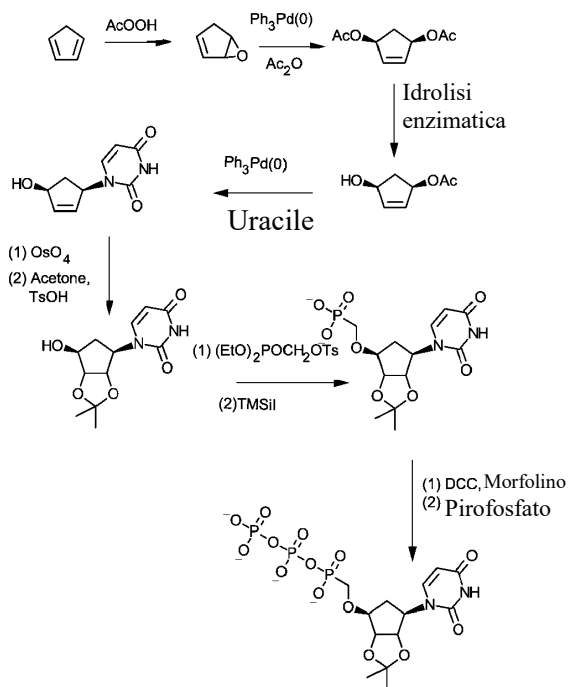


Schema 8

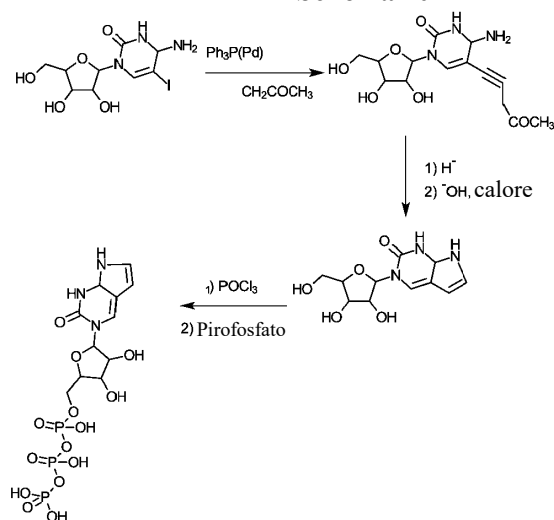


[0238] Gli Schemi 9 e 10 forniscono sintesi esemplificative di nucleotidi modificati. Lo Schema 11 fornisce un metodo biocatalitico non limitativo per la produzione di nucleotidi.

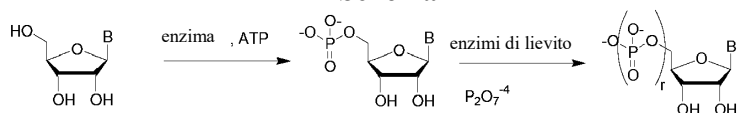
Schema 9



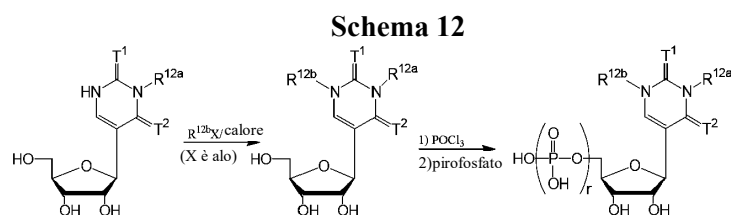
Schema 10



Schema 11



- 5 [0239] Lo Schema 12 fornisce una sintesi esemplificativa di un uracile modificato, in cui la posizione N1 sulla faccia del solco maggiore viene modificata con R^{12b} , come previsto altrove, e la posizione 5' del ribosio viene fosforilata. T^1 , T^2 , R^{12a} , R^{12b} e r sono forniti nel presente contesto. Questa sintesi, così come le sue versioni ottimizzate, può essere utilizzata per modificare la superficie del solco maggiore di altre basi azotate pirimidiniche e basi azotate puriniche [si
- 10 vedano, ad esempio Formule (b1)-(b43)] e/o per installare uno o più gruppi fosfato (ad esempio in corrispondenza della posizione 5' dello zucchero). Questa reazione alchilante può anche essere utilizzata per includere uno o più gruppi alchile opzionalmente sostituiti in qualsiasi gruppo reattivo (ad esempio, gruppo ammino) in qualsiasi base azotata descritto nel presente contesto (ad esempio, i gruppi ammino nella faccia di accoppiamento di basi Watson-Crick per citosina,
- 15 uracile, adenina e guanina).



[0240] I nucleosidi e i nucleotidi modificati possono anche essere preparati secondo i metodi sintetici descritti in Ogata et al. Journal of Organic Chemistry 74:2585-2588, 2009; Pural et al. Nucleic Acids Research 22(1): 72-78, 1994; Fukuhara et al. Biochemistry 1(4): 563-568, 1962; e Xu et al. Tetrahedron 48(9): 1729-1740, 1992, ciascuno dei quali

Acidi nucleici modificati

[0241] La presente descrizione fornisce acidi nucleici (o polinucleotidi), inclusi RNA come mRNA che contengono uno o più nucleosidi modificati (denominati "acidi nucleici modificati") o nucleotidi come descritto nel presente contesto, che hanno proprietà utili inclusa la mancanza di una induzione sostanziale della risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto l'mRNA. Poiché questi acidi nucleici modificati migliorano l'efficienza della produzione di proteine, la ritenzione intracellulare degli acidi nucleici e la vitalità delle cellule a contatto, oltre a possedere un'immunogenicità ridotta, questi acidi nucleici aventi queste proprietà sono anche chiamati "acidi nucleici potenziati" nel presente contesto.

[0242] Inoltre, la presente descrizione fornisce acidi nucleici, che hanno una ridotta affinità di legame con un solco maggiore che interagisce, ad esempio legandosi, con il partner. Ad esempio, gli acidi nucleici sono costituiti da almeno un nucleotide che è stato modificato chimicamente sulla faccia del solco maggiore come descritto nel presente contesto.

[0243] Il termine "acido nucleico", nel suo senso più ampio, include qualsiasi composto e/o sostanza che è o può essere incorporato/a in una catena oligonucleotidica. Nel presente contesto, il termine acido nucleico è usato come sinonimo di polinucleotide. Acidi nucleici per l'uso secondo la presente descrizione includono, tuttavia senza limitazioni, uno o più tra DNA, RNA


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

incluso mRNA messaggero (mRNA), loro ibridi, agenti che inducono RNAi, agenti RNAi, siRNA, shRNA, miRNA, RNA antisenso, ribozimi, DNA catalitico, RNA che inducono la formazione di tripla elica, aptameri, vettori, eccetera, descritti nel presente contesto in dettaglio.

[0244] Sono forniti acidi nucleici modificati contenenti una regione traducibile e una, due o più di due diverse modificazioni nucleosidiche. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico modificato mostra una degradazione ridotta in una cellula in cui viene introdotto l'acido nucleico, rispetto a un corrispondente acido nucleico non modificato. Esempi di acidi nucleici includono acidi ribonucleici (RNA), acidi desossiribonucleici (DNA), acidi nucleici treosi (TNA), acidi nucleici glicolici (GNA) o un loro ibrido. In aspetti preferiti, l'acido nucleico modificato include RNA messaggeri (mRNA). Come descritto nel presente contesto, gli acidi nucleici della presente descrizione non inducono sostanzialmente una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto l'mRNA.

[0245] In determinati casi, è desiderabile degradare intracellularmente un acido nucleico modificato introdotto nella cellula, ad esempio, se si desidera una tempistica precisa della produzione di proteine. Pertanto, la presente descrizione fornisce un acido nucleico modificato contenente un dominio di degradazione, su cui è possibile agire in modo diretto all'interno di una cellula.

[0246] Altri componenti di un acido nucleico sono opzionali e sono utili per alcuni casi. Ad esempio, sono fornite una regione 5'-non tradotta (UTR) e/o una 3'UTR, in cui una o entrambe possono contenere indipendentemente una o più modificazioni nucleosidiche diverse. In tali casi, nella regione traducibile possono essere presenti anche modificazioni nucleosidiche. Sono inoltre forniti acidi nucleici contenenti una sequenza di Kozak.

[0247] Inoltre, sono forniti acidi nucleici contenenti una o più sequenze nucleotidiche introniche in grado di essere asportate dall'acido nucleico.

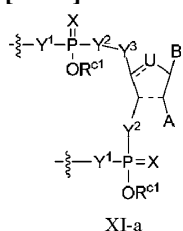
[0248] Inoltre, sono forniti acidi nucleici contenenti un sito di ingresso del ribosoma interno


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(internal ribosome entry site, IRES). Un IRES può agire come unico sito di legame del ribosoma, o può servire come uno dei molteplici siti di legame del ribosoma di un mRNA. Un mRNA contenente più di un sito di legame del ribosoma funzionale può codificare diversi peptidi o polipeptidi che sono tradotti indipendentemente dai ribosomi ("mRNA multicistronico"). Quando gli acidi nucleici sono provvisti di un IRES, è inoltre opzionalmente prevista una seconda regione traducibile. Esempi di sequenze IRES che possono essere utilizzate secondo la presente descrizione includono, senza limitazione, quelle da picornavirus (ad esempio FMDV), virus dei parassiti (CFFV), virus della poliomielite (PV), virus dell'encefalomiocardite (ECMV), virus dell'afta epizootica (FMDV), virus dell'epatite C (HCV), virus della peste suina classica (CSFV), virus della leucemia murina (MLV), virus dell'immunodeficienza delle scimmie (SIV) o virus della paralisi del grillo (CrPV).

[0249] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce sequenze di acido nucleico comprendenti almeno due nucleotidi, la sequenza di acido nucleico comprendendo un nucleotide che interrompe il legame di un partner che si lega con il solco maggiore con la sequenza di acido nucleico, in cui il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con il principale partner di legame del solco maggiore.

[0250] In alcuni casi, l'acido nucleico è un composto di Formula XI-a:



in cui:

20 --- indica un doppio legame opzionale;

--- indica un legame singolo opzionale;

U è O, S, -NR^a-, o -CR^aR^b- quando --- indica un singolo legame, o U è -CR^a- quando = indica un doppio legame;

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

A è H, OH, fosforile, pirofosfato, solfato, -NH₂, -SH, un amminoacido, o un peptide comprendente da 2 a 12 amminoacidi;

X è O o S;

ciascuno di Y¹ è selezionato indipendentemente da -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} e -SR^{a1};

5 ciascuno di Y² e Y³ sono selezionati indipendentemente da O, -CR^aR^b-, NR^c, S o un linker comprendente uno o più atomi selezionati dal gruppo costituito da C, O, N e S;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂, alchinile C₂₋₁₂ o arile C₆₋₂₀;

[00407] R^c è H, alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un

10 gruppo ammino-polietilenglicole;

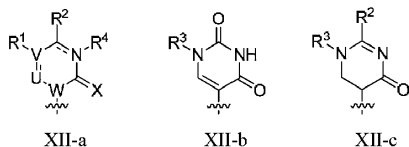
R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un contro-ione;

—OR^{c1} è OH a un pH di circa 1 oppure —OR^{c1} è O⁻ a pH fisiologico; e

B è una base azotata;

a condizione che l'anello che racchiude le variabili A, B, D, U, Z, Y² e Y³ non possa essere ribosio.

15 [0251] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula XII-a, XII-b o XII-c:



in cui:

indica un legame singolo o doppio;

X è O o S;

20 U e W sono ciascuno indipendentemente C o N;

V è O, S, C o N;

in cui quando V è C allora R¹ è H, alchile C₁₋₆, alchenile C₁₋₆, alchinile C₁₋₆, alo o -OR^c, in cui alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ sono opzionalmente sostituiti ciascuno con -OH, -NR^aR^b, -SH, -C(O)R^c, -C(O)OR^c, -NHC(O)R^c o -NHC(O)OR^c;

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R


e in cui quando V è O, S o N allora R¹ è assente;

R² è H, -OR^c, -SR^c, -NR^aR^b, o alo;

oppure quando V è C allora R¹ e R² insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati possono formare un anello a 5 o 6 elementi eventualmente sostituito con 1-4 sostituenti scelti da alo, - OH,

5 -SH, -NR^aR^b, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀, alcossi C₁₋₂₀ o tioalchile C₁₋₂₀;

R³ è H o alchile C₁₋₂₀;

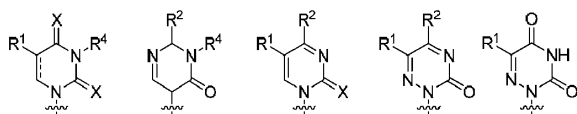
R⁴ è H o alchile C₁₋₂₀; in cui quando  indica un doppio legame quindi R⁴ è assente, oppure N-R⁴, preso insieme, forma un N caricato positivamente sostituito con alchile C₁₋₂₀;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₆₋₂₀ o arile

10 C₆₋₂₀; e

R^c è H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole.

[0252] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4 o XII-a5:



15

XII-a1 XII-a2 XII-a3 XII-a4 XII-a5.

[0253] In alcuni casi, la base azotata è una pirimidina o un suo derivato.

[0254] In alcuni casi, l'acido nucleico contiene una pluralità di composti strutturalmente unici di

20 Formula XI-a.

[0255] In alcuni casi, almeno il 25% delle citosine è sostituito da un composto di Formula XI-a (ad esempio, almeno circa il 30%, almeno circa il 35%, almeno circa il 40%, almeno circa il 45%, almeno circa il 50%, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%, almeno circa il 65%, almeno circa il 70%, almeno circa il 75%, almeno circa l'80%, almeno circa l'85%, almeno circa il 90%, almeno


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

circa il 95%, o circa il 100%).

[0256] In alcuni casi, almeno il 25% degli uracili è sostituito da un composto di Formula XI-a (ad esempio, almeno circa il 30%, almeno circa il 35%, almeno circa il 40%, almeno circa il 45%, almeno circa il 50%, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%, almeno circa il 65%, almeno circa
5 il 70%, almeno circa il 75%, almeno circa l'80%, almeno circa l'85%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%, o circa il 100%).

[0257] In alcuni casi, almeno il 25% delle citosine e il 25% degli uracili sono sostituiti da un composto di Formula XI-a (ad esempio, almeno circa il 30%, almeno circa il 35%, almeno circa il 40% almeno circa il 45%, almeno circa il 50%, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%,
10 almeno circa il 65%, almeno circa il 70%, almeno circa il 75%, almeno circa l'80%, almeno circa l'85%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95% o circa il 100%).

[0258] In alcuni casi, l'acido nucleico è traducibile.

[0259] In alcuni casi, quando l'acido nucleico include un nucleotide modificato con un linker e un carico utile, ad esempio, come descritto nel presente contesto, il nucleotide modificato con un
15 linker e un carico utile si trova sull'estremità 3' dell'acido nucleico.

Partner di interazione del solco maggiore

[0260] Come descritto nel presente contesto, l'espressione "partner di interazione del solco maggiore" si riferisce a recettori di riconoscimento dell'RNA che rilevano e rispondono ai ligandi di RNA attraverso interazioni, *ad esempio* legandosi, con la faccia del solco maggiore di un
20 nucleotide o di un acido nucleico. In quanto tali, i ligandi di RNA comprendenti nucleotidi o acidi nucleici modificati come descritto nel presente contesto riducono le interazioni con i partner di legame del solco maggiore e quindi diminuiscono una risposta immunitaria innata, o l'espressione e la secrezione di citochine pro-infiammatorie, o entrambe.

[0261] Partner di interazione del solco maggiore esemplificativi, ad esempio mediante il legame,
25 includono, tuttavia senza limitazioni, le seguenti nucleasi ed elicasi. All'interno delle membrane,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

i TLR (Toll-like receptors, recettori toll-simili) 3, 7 e 8 possono rispondere a RNA a singolo e doppio filamento. All'interno del citoplasma, i membri della classe della superfamiglia 2 di DE X (D/H) elicasi e ATPasi possono rilevare gli RNA per avviare risposte antivirali. Queste elicasi includono il RIG-I (retinoic acid-inducible gene I, gene I acido retinoico-inducibile) e MDA5 (5 melanoma differentiation-associated gene 5, gene 5 associato alla differenziazione del melanome). Altri esempi includono il laboratorio di genetica e fisiologia 2 (LGP2), proteine contenenti dominio HIN-200 o proteine contenenti dominio elicasi.

Prevenzione o riduzione della risposta immunitaria cellulare innata

[0262] Il termine "risposta immunitaria innata" include una risposta cellulare ad acidi nucleici esogeni a singolo filamento, generalmente di origine virale o batterica, che comporta l'induzione dell'espressione e del rilascio di citochine, in particolare gli interferoni, e la morte cellulare. La sintesi proteica è ridotta anche durante la risposta immunitaria cellulare innata. Sebbene sia vantaggioso eliminare la risposta immunitaria innata in una cellula che è innescata dall'introduzione di acidi nucleici esogeni, la presente descrizione fornisce acidi nucleici 15 modificati come mRNA che riducono sostanzialmente la risposta immunitaria, inclusa la segnalazione dell'interferone, senza eliminare completamente tale risposta. In alcune forme di realizzazione, la risposta immunitaria è ridotta del 10%, del 20%, del 30%, del 40%, del 50%, del 60%, del 70%, dell'80%, del 90%, del 95%, del 99%, del 99,9% o più del 99,9 % rispetto alla risposta immunitaria indotta da un corrispondente acido nucleico non modificato. Tale riduzione 20 può essere misurata dall'espressione o dal livello di attività degli interferoni di tipo 1 o dall'espressione di geni regolati dall'interferone come i recettori toll-simili (ad esempio TLR7 e TLR8). La riduzione o la mancanza di induzione della risposta immunitaria innata può essere misurata anche dalla diminuzione della morte cellulare a seguito di una o più somministrazioni di RNA modificati a una popolazione cellulare; ad esempio, la morte cellulare è del 10%, del 25%, 25 del 50%, del 75%, dell'85%, del 90%, del 95% o più del 95% in meno rispetto alla frequenza di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

morte cellulare osservata con un corrispondente acido nucleico non modificato. Inoltre, la morte cellulare può interessare meno del 50%, del 40%, del 30%, del 20%, del 10%, del 5%, dell'1%, dello 0,1%, dello 0,01% o meno dello 0,01% delle cellule a contatto con gli acidi nucleici modificati.

- 5 [0263] In alcuni casi, gli acidi nucleici modificati, inclusi polinucleotidi e/o molecole di mRNA, sono modificati in modo tale da non indurre, o indurre solo in minima parte, una risposta immunitaria da parte della cellula o dell'organismo ricevente. Tale elusione o evitamento di un innesco o attivazione di una risposta immunitaria è una nuova caratteristica dei polinucleotidi modificati della presente descrizione
- 10 [0264] La presente descrizione fornisce l'introduzione ripetuta (ad esempio, trasfezione) di acidi nucleici modificati in una popolazione di cellule bersaglio, ad esempio *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La fase di contatto con la popolazione cellulare può essere ripetuta una o più volte (ad esempio due, tre, quattro, cinque o più di cinque volte). In alcuni casi, la fase di mettere a contatto la popolazione cellulare con gli acidi nucleici modificati viene ripetuta un numero di volte
- 15 sufficiente tale da ottenere un'efficienza predeterminata di traduzione proteica nella popolazione cellulare. Data la ridotta citotossicità della popolazione cellulare bersaglio fornita dalle modificazioni di acido nucleico, tali trasfezioni ripetute sono realizzabili in una vasta gamma di tipi di cellula *in vitro* e/o *in vivo*.

Varianti polipeptidiche

- 20 [0265] Vengono forniti acidi nucleici che codificano polipeptidi varianti, che hanno una certa identità con una sequenza polipeptidica di riferimento. Il termine "identità" come noto nella tecnica, si riferisce a una relazione tra le sequenze di due o più peptidi, determinata dal confronto delle sequenze. Nella tecnica, "identità" significa anche il grado di correlazione di sequenza tra peptidi, come determinato dal numero di corrispondenze tra stringhe di due o più residui di
- 25 amminoacidi. La "identità" misura la percentuale di corrispondenze identiche tra la più piccola di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

due o più sequenze con allineamenti gap (se presenti) indirizzate da uno specifico modello matematico o programma per computer (vale a dire "algoritmi"). L'identità dei peptidi correlati può essere facilmente calcolata mediante metodi noti. Tali metodi includono, ma non sono limitati a, quelli descritti in Computational Molecular Biology, Lesk, AM, ed., Oxford University Press, New York, 1988; Bioinformatica: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., ed., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., ed., M. Stockton Press, New York, 1991; e Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 1988.

5
10 **[0266]** In alcuni casi, la variante polipeptidica ha la stessa attività o un'attività simile al polipeptide di riferimento. In alternativa, la variante ha un'attività alterata (ad esempio, aumentata o diminuita) rispetto a un polipeptide di riferimento. In generale, le varianti di uno specifico polinucleotide o polipeptide della presente descrizione hanno almeno circa il 40%, il 45%, il 50%, il 55%, il 60%, il 65%, il 70%, il 75%, l'80%, l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il
15 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99% o più di identità di sequenza per quel polinucleotide o polipeptide di riferimento specifico come determinato dai programmi di allineamento di sequenza e dai parametri qui descritti e noti agli esperti della tecnica.

[0267] Come riconosciuto dagli esperti della tecnica, anche i frammenti proteici, i domini proteici funzionali e le proteine omologhe rientrano nell'ambito della presente descrizione. Ad esempio,
20 nel presente contesto viene fornito un qualsiasi frammento proteico di una proteina di riferimento (che significa una sequenza polipeptidica con almeno un residuo amminoacidico più corto di una sequenza polipeptidica di riferimento ma per il resto identico) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o più di 100 amminoacidi di lunghezza. In un altro esempio, qualsiasi proteina che includa un allungamento di circa 20, circa 30, circa 40, circa 50 o circa 100 amminoacidi che sono circa il
25 40%, circa il 50%, circa il 60%, circa il 70%, circa l'80%, circa il 90%, circa il 95% o circa il


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

100% identici a una qualsiasi delle sequenze qui descritte può essere utilizzato secondo la presente descrizione. In determinati casi, una sequenza proteica da utilizzare secondo la presente descrizione include 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più mutazioni come mostrato in una qualsiasi delle sequenze qui fornite o citate.

5 **Librerie polipeptidiche**

[0268] Sono inoltre fornite librerie di polinucleotidi contenenti modificazioni nucleosidiche, in cui i polinucleotidi contengono singolarmente una prima sequenza di acido nucleico che codifica un polipeptide, come un anticorpo, un partner di legame proteico, una proteina scaffold e altri polipeptidi noti nella tecnica. Preferibilmente, i polinucleotidi sono mRNA in una forma adatta per l'introduzione diretta in una cellula bersaglio ospite, che a sua volta sintetizza il polipeptide codificato.

[0269] In certi casi, vengono prodotte e testate più varianti di una proteina, ciascuna con diverse modificazioni amminoacidiche, per determinare la migliore variante in termini di farmacocinetica, stabilità, biocompatibilità e/o attività biologica o proprietà biofisica come il livello di espressione. Tale libreria può contenere 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ o oltre 10⁹ possibili varianti (incluse sostituzioni, eliminazioni di uno o più residui e inserimento di uno o più residui).

Complessi polipeptide-acido nucleico

[0270] Una corretta traduzione delle proteine implica l'aggregazione fisica di un certo numero di polipeptidi e acidi nucleici associati all'mRNA. Sono forniti dalla presente descrizione i complessi proteina-acido nucleico, contenenti un mRNA traducibile avente una o più modificazioni nucleosidiche (ad esempio, almeno due diverse modificazioni nucleosidiche) e uno o più polipeptidi legati all'mRNA. Generalmente, le proteine sono fornite in una quantità efficace per prevenire o ridurre una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto il complesso.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Acidi nucleici modificati intraducibili

[0271] Come descritto nel presente contesto, sono forniti mRNA aventi sequenze che sostanzialmente non sono traducibili. Tale mRNA è efficace come un vaccino quando somministrato a un soggetto mammifero.

- 5 [0272] Sono inoltre forniti acidi nucleici modificati che contengono una o più regioni non codificanti. Tali acidi nucleici modificati generalmente non sono tradotti, ma sono in grado di legarsi e sequestrare uno o più componenti della macchina traduzionale come una proteina ribosomiale o un RNA di trasferimento (tRNA), riducendo così efficacemente l'espressione proteica nella cellula. L'acido nucleico modificato può contenere un piccolo RNA nucleolare
- 10 (sno-RNA), un micro RNA (miRNA), un piccolo RNA interferente (siRNA) o un RNA che interagisce con Piwi (piRNA).

Sintesi di acidi nucleici modificati

- [0273] Gli acidi nucleici per l'uso in conformità con la presente descrizione possono essere preparati secondo qualsiasi tecnica disponibile inclusa, a titolo esemplificativo ma non esaustivo,
- 15 sintesi chimica, sintesi enzimatica, che è generalmente definita trascrizione *in vitro*, scissione enzimatica o chimica di un precursore più lungo, ecc. I metodi di sintesi degli RNA sono noti nella tecnica (si veda, *ad esempio*, Gait, MJ (a cura di) Sintesi degli oligonucleotidi: un approccio pratico, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; e Herdewijn, P. (ed.) Oligonucleotide synthesis: methods and applications, Methods in Molecular Biology, v. 288
- 20 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005

- [0274] Gli acidi nucleici modificati non devono essere modificati uniformemente lungo l'intera lunghezza della molecola. Diverse modificazioni nucleotidiche e/o strutture della catena principale possono esistere in varie posizioni nell'acido nucleico. Un esperto della tecnica con competenza ordinaria comprenderà che gli analoghi nucleotidici o altra/e modificazione/i possono
- 25 trovarsi in corrispondenza di qualsiasi posizione/i di un acido nucleico in modo tale che la


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

funzione dell'acido nucleico non sia sostanzialmente ridotta. Una modificazione può anche essere una modificazione del terminale 5' o 3'. Gli acidi nucleici possono contenere minimo uno e al massimo il 100% di nucleotidi modificati, o qualsiasi percentuale intermedia, come almeno il 5% di nucleotidi modificati, almeno il 10% di nucleotidi modificati, almeno il 25% di nucleotidi modificati, almeno il 50 % di nucleotidi modificati, almeno l'80% di nucleotidi modificati o almeno il 90% di nucleotidi modificati. Ad esempio, gli acidi nucleici possono contenere una pirimidina modificata come uracile o citosina. In alcuni casi, almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 25%, almeno il 50%, almeno l'80%, almeno il 90% o il 100% dell'uracile nell'acido nucleico viene sostituito con un uracile modificato. L'uracile modificato può essere sostituito da un composto avente un'unica struttura unica, oppure può essere sostituito da una pluralità di composti aventi strutture diverse (ad esempio, 2, 3, 4 o più strutture uniche). In alcuni casi, almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 25%, almeno il 50%, almeno l'80%, almeno il 90% o il 100% della citosina nell'acido nucleico viene sostituito con una citosina modificata. La citosina modificata può essere sostituita da un composto avente un'unica struttura unica, oppure può essere sostituita da una pluralità di composti aventi strutture diverse (ad esempio, 2, 3, 4 o più strutture uniche).

[0275] In generale, la lunghezza più breve di un mRNA della presente descrizione può essere la lunghezza della sequenza di mRNA che è sufficiente per codificare un dipeptide. In un altro caso, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un tripeptide. In un'altra, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un tetrapeptide. In un altro caso, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un pentapeptide. In un altro caso la lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un esapeptide. In un altro caso, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un eptapeptide. In un altro caso, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un octapeptide. In un altro caso la lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un nonapeptide. In un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

altro caso la lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un decapeptide.

[0276] Esempi di dipeptidi per i quali le sequenze di acido nucleico modificato possono codificare includono, ma non sono limitati a, carnosina e anserina.

[0277] In un ulteriore caso, l'mRNA ha una lunghezza maggiore di 30 nucleotidi. In un altro caso, la molecola di RNA ha una lunghezza maggiore di 35 nucleotidi. In un altro, la lunghezza è di almeno 40 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 45 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 55 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 60 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 60 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 80 nucleotidi. In un altro caso la lunghezza è di almeno 90 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 100 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 120 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 140 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 160 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 180 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 200 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 250 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 300 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 350 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 400 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 450 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 500 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 600 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 700 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 800 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 900 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1000 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1100 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1200 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1300 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1400 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1500 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1600 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 1800 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 2000 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 2500 nucleotidi. In un altro caso, la

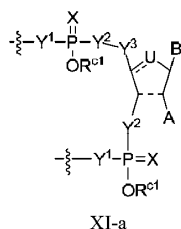

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

lunghezza è di almeno 3000 nucleotidi. In un altro caso, la lunghezza è di almeno 4000 nucleotidi.

In un altro caso, la lunghezza è di almeno 5000 nucleotidi, o maggiore di 5000 nucleotidi.

[0278] Ad esempio, gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto possono essere preparati utilizzando metodi noti agli esperti nella tecnica della sintesi di acido nucleico.

- 5 [0279] In alcuni aspetti, la presente descrizione fornisce metodi, ad esempio enzimatici, per preparare una sequenza di acido nucleico comprendente un nucleotide che interrompe il legame di un partner di legame del solco maggiore con la sequenza di acido nucleico, in cui la sequenza di acido nucleico comprende un composto di Formula XI-a:



- 10 in cui:

il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con il partner di legame del solco maggiore;

\Rightarrow indica un doppio legame opzionale;

\cdots indica un legame singolo opzionale;

U è O, S, $-NR^a$, o $-CR^aR^b$ - quando \cdots indica un singolo legame, o U è $-CR^a$ - quando \Rightarrow indica

- 15 un doppio legame;

A è H, OH, fosforile, pirofosfato, solfato, $-NH_2$, $-SH$, un amminoacido, o un peptide comprendente da 2 a 12 amminoacidi;

X è O o S;

ciascuno di Y^1 è selezionato indipendentemente da $-OR^{a1}$, $-NR^{a1}R^{b1}$ e $-SR^{a1}$;

- 20 ciascuno di Y^2 e Y^3 sono selezionati indipendentemente da O, $-CR^aR^b$, NR^c , S o un linker comprendente uno o più atomi selezionati dal gruppo costituito da C, O, N e S;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , alchinile C_{2-12} o arile

C_{6-20} ;

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

R^c è H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole;

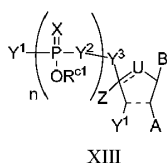
R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un contro-ione;

$-OR^{c1}$ è OH a un pH di circa 1 oppure $-OR^{c1}$ è O^- a pH fisiologico; e

5 B è una base azotata;

a condizione che l'anello comprendente le variabili A, B, D, U, Z, Y^2 e Y^3 non possa essere ribosio,

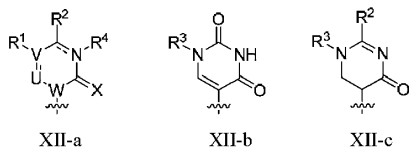
il metodo comprendendo la reazione di un composto di Formula XIII:



con una RNA polimerasi e un modello di cDNA.

10 [0280] In alcuni casi, la reazione viene ripetuta da 1 a circa 7.000 volte.

[0281] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula XII-a, XII-b o XII-c:



in cui:

indica un legame singolo o doppio;

15 X è O o S;

U e W sono ciascuno indipendentemente C o N;

V è O, S, C o N;

in cui quando V è C allora R^1 è H, alchile C_{1-6} , alchenile C_{1-6} , alchinile C_{1-6} , alo o $-OR^c$, in cui alchile C_{1-20} , alchenile C_{2-20} , alchinile C_{2-20} sono opzionalmente sostituiti ciascuno con $-OH$, -

20 NR^aR^b , $-SH$, $-C(O)R^c$, $-C(O)OR^c$, $-NHC(O)R^c$ o $-NHC(O)OR^c$;

e in cui quando V è O, S o N allora R^1 è assente;

R^2 è H, $-OR^c$, $-SR^c$, $-NR^aR^b$, o alo;

oppure quando V è C allora R¹ e R² insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati possono formare un anello a 5 o 6 elementi eventualmente sostituito con 1-4 sostituenti scelti da alo, -OH, -SH, -NR^aR^b, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀, alcossi C₁₋₂₀ o tioalchile C₁₋₂₀;

R³ è H o alchile C₁₋₂₀;

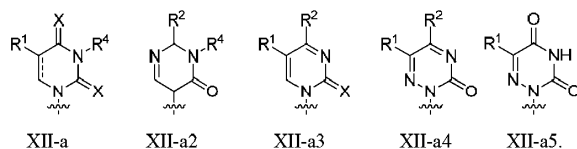
- 5 R⁴ è H o alchile C₁₋₂₀; in cui quando $\overset{\text{+}}{\text{N}}$ indica un doppio legame quindi R⁴ è assente, oppure NR⁴, preso insieme, forma un N caricato positivamente sostituito con alchile C₁₋₂₀;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ o arile C₆₋₂₀; e

R^c è H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo

- 10 ammino-polietilenglicole.

[0282] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4 o XII-a5:

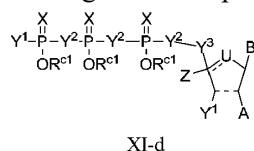


[0283] In alcuni casi, i metodi comprendono inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo
15 costituito da adenosina, citosina, guanosina e uracile.

[0284] In alcuni casi, la base azotata è una pirimidina o un suo derivato.

[0285] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce metodi per amplificare una sequenza di acido nucleico comprendente un nucleotide che interrompe il legame di un partner di legame del solco maggiore con la sequenza di acido nucleico, il metodo comprendendo:

- 20 far reagire un composto di Formula XI-d:



in cui:

il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con il partner di legame del solco maggiore;

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

\equiv indica un legame singolo o doppio;

--- indica un legame singolo opzionale;

U è O, S, $-NR^a$ -, o $-CR^aR^b$ - quando \equiv indica un singolo legame, o U è $-CR^a$ - quando \equiv indica un doppio legame;

5 Z è H, alchile C_{1-12} o arile C_{6-20} o Z è assente quando \equiv indica un doppio legame; e

Z può essere $-CR^aR^b$ - e formare un legame con A;

A è H, OH, fosforile, pirofosfato, solfato, $-NH_2$, $-SH$, un amminoacido, o un peptide comprendente da 1 a 12 amminoacidi;

X è O o S;

10 ciascuno di Y^1 è selezionato indipendentemente da $-OR^{a1}$, $-NR^{a1}R^{b1}$ e $-SR^{a1}$;

ciascuno di Y^2 e Y^3 sono selezionati indipendentemente da O, $-CR^aR^b$ -, NR^c , S o un linker comprendente uno o più atomi selezionati dal gruppo costituito da C, O, N e S;

n è 0, 1, 2 o 3;

m è 0, 1, 2 o 3;

15 B è una base azotata;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , alchinile C_{2-12} o arile C_{6-20} ,

R^c è H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole;

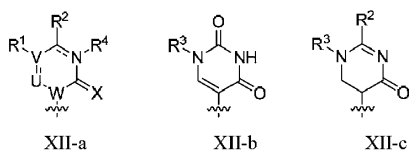
20 R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un contro-ione; e

$-OR^{c1}$ è OH a un pH di circa 1 oppure $-OR^{c1}$ è O^- a pH fisiologico;

a condizione che l'anello che comprende le variabili A, B, D, U, Z, Y^2 e Y^3 non possa essere ribosio con un primer, un modello di cDNA e una RNA polimerasi.

[0286] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula XII-a, XII-b o XII-c:

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



in cui:

indica un legame singolo o doppio;

X è O o S;

5 U e W sono ciascuno indipendentemente C o N;

V è O, S, C o N;

in cui quando V è C allora R¹ è H, alchile C₁₋₆, alchenile C₁₋₆, alchinile C₁₋₆, alo o -OR^c, in cui alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ sono opzionalmente sostituiti ciascuno con -OH, -NR^aR^b, -SH, -C(O)R^c, -C(O)OR^c, -NHC(O)R^c o -NHC(O)OR^c;

10 e in cui quando V è O, S o N allora R¹ è assente;

R² è H, -OR^c, -SR^c, -NR^aR^b, o alo;

oppure quando V è C allora R¹ e R² insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati possono formare un anello a 5 o 6 elementi eventualmente sostituito con 1-4 sostituenti scelti da alo, -OH, -SH, -NR^aR^b, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀, alcossi C₁₋₂₀ o tioalchile C₁₋₂₀;

15 R³ è H o alchile C₁₋₂₀;

R⁴ è H o alchile C₁₋₂₀; in cui quando



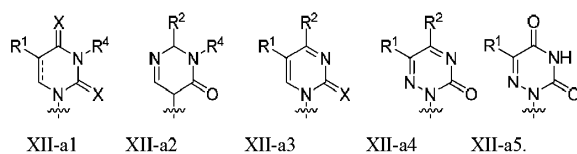
indica un doppio legame quindi R⁴ è assente, oppure N-R⁴, preso insieme, forma un N caricato positivamente sostituito con alchile C₁₋₂₀;

20 R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ o arile C₆₋₂₀; e

R^c è H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole.

[0287] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4 o XII-a5:

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



[0288] In alcuni casi, i metodi comprendono inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo costituito da adenosina, citosina, guanosina e uracile.

5 [0289] In alcuni casi, la base azotata è una pirimidina o un suo derivato.

[0290] In alcuni casi, la presente descrizione prevede metodi per sintetizzare un acido nucleico farmaceutico, comprendenti le fasi di:

a) fornire un acido desossiribonucleico complementare (cDNA) che codifica una proteina farmaceutica di interesse;

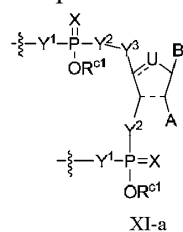
10 b) selezionare un nucleotide noto per interrompere un legame di un partner di legame del solco maggiore con un acido nucleico, in cui il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con il partner di legame del solco maggiore; e

c) mettere a contatto il cDNA fornito e il nucleotide selezionato con una RNA polimerasi, in condizioni tali che l'acido nucleico farmaceutico sia sintetizzato.

15 [0291] In ulteriori aspetti, l'acido nucleico farmaceutico è un acido ribonucleico (RNA).

[0292] In ancora un ulteriore aspetto della presente descrizione, gli acidi nucleici modificati possono essere preparati utilizzando metodi di sintesi in fase solida.

[0293] In alcuni aspetti, la presente descrizione fornisce metodi per sintetizzare un acido nucleico comprendente un composto di Formula XI-a:



20

in cui:

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

= indica un doppio legame opzionale;

-- indica un legame singolo opzionale;

U è O, S, -NR^a -, o $\text{-CR}^a\text{R}^b$ - quando = indica un singolo legame, o U è -CR^a - quando = indica un doppio legame;

5 A è H, OH, fosforile, pirofosfato, solfato, -NH_2 , -SH , un amminoacido, o un peptide comprendente da 2 a 12 amminoacidi;

X è O o S;

ciascuno di Y^1 è selezionato indipendentemente da -OR^{a1} , $\text{-NR}^{a1}\text{R}^{b1}$ e --SR^{a1} ;

ciascuno di Y^2 e Y^3 sono selezionati indipendentemente da O, $\text{-CR}^a\text{R}^b$ -, NR^c , S o un linker

10 comprendente uno o più atomi selezionati dal gruppo costituito da C, O, N e S;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , alchinile C_{2-12} o arile C_{6-20} ;

R^c è H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole;

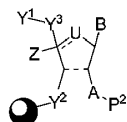
15 R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un contro-ione;

--OR^{c1} è OH a un pH di circa 1 oppure --OR^{c1} è O^- a pH fisiologico; e

B è una base azotata;

a condizione che l'anello che racchiude le variabili A, B, U, Z, Y^2 e Y^3 non possa essere ribosio; comprendente:

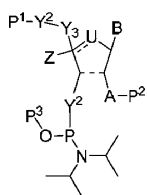
20 a) far reagire un nucleotide di Formula XIII-a:



XIII-a

con un composto fosforamiditico di Formula XIII-b:

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



XXIII-b

in cui:



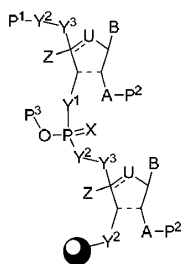
indica un supporto solido; e

- 5 P¹, P² e P³ sono ciascuno indipendentemente gruppi protettivi adatti;

per fornire un acido nucleico di Formula XIV-a:

XIV-a e b) ossidare o solforare l'acido nucleico di Formula XIV-a per ottenere un acido nucleico

di Formula XIVb:

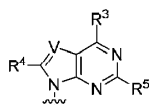


XIV-b

- 10 e c) rimuovere i gruppi protettivi per ottenere l'acido nucleico di Formula XI-a.

[0294] In alcuni casi, i metodi comprendono inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo costituito da adenosina, citosina, guanosina e uracile.

[0295] In alcuni casi, B è una base azotata della Formula XIII:



XIII

- 15 in cui:

V è N o NR^c con carica positiva;

R³ è NR^cR^d, -OR^a, o -SR^a;

R⁴ è H o può eventualmente formare un legame con Y³;

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

R^5 è H, $-NR^cR^d$, oppure $-OR^a$;

R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , alchinile C_{2-12} o arile C_{6-20} ; e

5 R^c è H, alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} , fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole.

[0296] In alcuni casi, le fasi a) e b) vengono ripetute da 1 a circa 10.000 volte.

Usi degli acidi nucleici modificati

Agenti terapeutici

10 [0297] Gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto possono essere usati come agenti terapeutici. Ad esempio, un acido nucleico modificato descritto nel presente contesto può essere somministrato a un animale o soggetto, in cui l'acido nucleico modificato viene tradotto in vivo per produrre un peptide terapeutico nell'animale o nel soggetto. Di conseguenza, nel presente contesto vengono forniti composizioni, metodi, kit e reagenti per il trattamento o la prevenzione di malattie o condizioni negli esseri umani e in altri mammiferi. Gli agenti terapeutici attivi della
15 presente descrizione includono acidi nucleici modificati, cellule contenenti acidi nucleici modificati o polipeptidi tradotti dagli acidi nucleici modificati, polipeptidi tradotti da acidi nucleici modificati, cellule a contatto con cellule contenenti acidi nucleici modificati o polipeptidi tradotti dagli acidi nucleici modificati, tessuti contenenti cellule contenenti acidi nucleici modificati e organi contenenti tessuti contenenti cellule contenenti acidi nucleici modificati.

20 [0298] Sono forniti metodi per indurre la traduzione di un polinucleotide sintetico o ricombinante per produrre un polipeptide in una popolazione cellulare utilizzando gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto. Tale traduzione può essere *in vivo*, *ex vivo*, *in coltura* o *in vitro*. La popolazione cellulare viene messa a contatto con una quantità efficace di una composizione contenente un acido nucleico che ha almeno una modificazione nucleosidica e una regione
25 traducibile che codifica il polipeptide. La messa a contatto della popolazione avviene in


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

condizioni tali che l'acido nucleico sia localizzato in una o più cellule della popolazione cellulare e il polipeptide ricombinante sia tradotto nella cellula dall'acido nucleico.

[0299] Viene fornita una "quantità efficace" della composizione basata, almeno in parte, sul tessuto bersaglio, sul tipo di cellula bersaglio, sui mezzi di somministrazione, sulle caratteristiche
5 fisiche dell'acido nucleico (ad esempio, dimensione ed estensione dei nucleosidi modificati), e altri determinanti. In generale, una quantità efficace della composizione fornisce una produzione proteica efficiente nella cellula, preferibilmente più efficiente di una composizione contenente un corrispondente acido nucleico non modificato. Una maggiore efficienza può essere dimostrata da una maggiore trasfezione cellulare (vale a dire, la percentuale di cellule trasfettate con il l'acido
10 nucleico), una maggiore traduzione proteica dall'acido nucleico, una diminuzione della degradazione dell'acido nucleico (come dimostrato, ad esempio, dall'aumentata durata della traduzione delle proteine da un acido nucleico modificato), o una ridotta risposta immunitaria innata della cellula ospite o un'utilità terapeutica migliorata.

[0300] Gli aspetti della presente descrizione si riferiscono ai metodi per indurre la traduzione in vivo di un polipeptide ricombinante in un soggetto mammifero che ne ha bisogno. In esso, una
15 quantità efficace di una composizione contenente un acido nucleico che ha almeno una modificazione nucleosidica e una regione traducibile codificante il polipeptide viene somministrata al soggetto usando i metodi di somministrazione descritti nel presente contesto. L'acido nucleico viene fornito in una quantità e in altre condizioni tali che l'acido nucleico sia
20 localizzato in una o più cellule del soggetto e il polipeptide ricombinante sia tradotto nella cellula dall'acido nucleico. La cellula in cui è localizzato l'acido nucleico o il tessuto in cui è presente la cellula possono essere presi di mira con uno o più cicli di somministrazione di acido nucleico.

[0301] Altri aspetti della presente descrizione riguardano il trapianto di cellule contenenti acidi nucleici modificati in un soggetto mammifero. La somministrazione di cellule a soggetti
25 mammiferi è nota agli esperti della tecnica, come l'impianto locale (ad esempio, somministrazione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

topica o sottocutanea), il rilascio in un organo o l'iniezione sistemica (ad esempio, iniezione endovenosa o inalazione), così come la formulazione di cellule in veicolo farmaceuticamente accettabile. Composizioni contenenti acidi nucleici modificati sono formulate per la somministrazione per via intramuscolare, transarteriosa, intraperitoneale, endovenosa, 5 intranasale, sottocutanea, endoscopica, transdermica o intratecale. In alcune forme di realizzazione, la composizione è formulata per il rilascio prolungato.

[0302] Il soggetto a cui viene somministrato l'agente terapeutico è affetto da o rischia di sviluppare una malattia, un disturbo o una condizione deleteria. Vengono forniti metodi per identificare, diagnosticare e classificare i soggetti su queste basi, che possono includere diagnosi clinica, livelli 10 di biomarcatori, studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) e altri metodi noti nell'arte.

[0303] In certi casi, l'acido nucleico modificato somministrato dirige la produzione di uno o più polipeptidi ricombinanti che forniscono un'attività funzionale che è sostanzialmente assente nella cellula in cui viene tradotto il polipeptide ricombinante. Ad esempio, l'attività funzionale mancante può essere di natura enzimatica, strutturale o di regolazione genica.

15 **[0304]** In altri aspetti, l'acido nucleico modificato somministrato dirige la produzione di uno o più polipeptidi ricombinanti che sostituiscono un polipeptide (o più polipeptidi) che è sostanzialmente assente nella cellula in cui viene tradotto il polipeptide ricombinante. Tale assenza può essere dovuta a una mutazione genetica del gene codificante o al suo percorso regolatorio. In altri casi, l'acido nucleico modificato somministrato dirige la produzione di uno o 20 più polipeptidi ricombinanti per integrare la quantità di polipeptide (o più polipeptidi) che è presente nella cellula in cui viene tradotto il polipeptide ricombinante. In alternativa, il polipeptide ricombinante funziona per antagonizzare l'attività di una proteina endogena presente nella, sulla superficie della, o secreta dalla cellula. Solitamente l'attività della proteina endogena è deleteria per il soggetto; ad esempio, a causa della mutazione della proteina endogena con conseguente 25 alterazione dell'attività o della localizzazione. Inoltre, il polipeptide ricombinante antagonizza,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

direttamente o indirettamente, l'attività di una frazione biologica presente nella, sulla superficie della o secreta dalla cellula. Esempi di frazioni biologiche antagonizzate includono lipidi (ad esempio, colesterolo), una lipoproteina (ad esempio, lipoproteina a bassa densità), un acido nucleico, un carboidrato o una tossina a piccola molecola.

5 [0305] Le proteine ricombinanti descritte nel presente contesto vengono ingegnerizzate per la localizzazione all'interno della cellula, potenzialmente all'interno di un compartimento specifico come il nucleo, o sono progettate per la secrezione dalla cellula o la traslocazione verso la membrana plasmatica della cellula.

[0306] Come descritto nel presente contesto, una caratteristica utile degli acidi nucleici modificati
10 della presente descrizione è la capacità di ridurre, eludere, evitare o eliminare la risposta immunitaria innata di una cellula a un acido nucleico esogeno. Sono forniti metodi per eseguire la titolazione, la riduzione o l'eliminazione della risposta immunitaria in una cellula o in una popolazione di cellule. In alcuni casi, la cellula viene messa a contatto con una prima composizione che contiene una prima dose di un primo acido nucleico esogeno comprendente
15 una regione traducibile e almeno una modificazione nucleosidica, e viene determinato il livello della risposta immunitaria innata della cellula al primo acido nucleico esogeno. Successivamente, la cellula viene messa a contatto con una seconda composizione, che include una seconda dose del primo acido nucleico esogeno, la seconda dose contenendo una quantità minore del primo acido nucleico esogeno rispetto alla prima dose. In alternativa, la cellula viene messa a contatto
20 con una prima dose di un secondo acido nucleico esogeno. Il secondo acido nucleico esogeno può contenere uno o più nucleosidi modificati, che possono essere uguali o diversi dal primo acido nucleico esogeno o, in alternativa, il secondo acido nucleico esogeno può non contenere nucleosidi modificati. Le fasi di contatto della cellula con la prima composizione e/o la seconda composizione possono essere ripetute una o più volte. Inoltre, l'efficienza della produzione di
25 proteine (ad esempio, la traduzione delle proteine) nella cellula è facoltativamente determinata, e

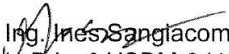

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

la cellula può essere ritrasfettata con la prima e/o la seconda composizione ripetutamente fino a raggiungere un'efficienza di produzione di proteine desiderata.

Terapie per malattie e condizioni

5 [0307] Vengono forniti metodi per trattare o prevenire un sintomo di malattie caratterizzate da attività proteica mancante o aberrante, sostituendo l'attività proteica mancante o risolvendo l'attività proteica aberrante. A causa del rapido inizio della produzione di proteine dopo l'introduzione di mRNA modificati, rispetto ai vettori di DNA virale, i composti della presente descrizione sono particolarmente vantaggiosi nel trattamento di malattie acute come sepsi, ictus e infarto del miocardio. Inoltre, la mancanza di regolazione trascrizionale degli mRNA modificati della presente descrizione è vantaggiosa in quanto è possibile ottenere un'accurata titolazione della produzione di proteine. Molteplici malattie sono caratterizzate da attività proteica mancante (o sostanzialmente ridotta in modo tale che la corretta funzione proteica non si verifica). Tali proteine possono non essere presenti, essere presenti in quantità molto basse o essere essenzialmente non funzionali. La presente descrizione fornisce un metodo per il trattamento di 10 tali condizioni o malattie in un soggetto mediante l'introduzione di acido nucleico o terapie cellulari contenenti gli acidi nucleici modificati forniti nel presente contesto, in cui gli acidi nucleici modificati codificano una proteina che sostituisce l'attività proteica mancante dalle cellule bersaglio del soggetto.

20 [0308] Le malattie caratterizzate da attività proteica disfunzionale o aberrante includono, tuttavia senza limitazioni, cancro e malattie proliferative, malattie genetiche (ad esempio, fibrosi cistica), malattie autoimmuni, diabete, malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari e malattie metaboliche. La presente descrizione fornisce un metodo per il trattamento di tali condizioni o malattie in un soggetto introducendo acido nucleico o terapie a base di cellule contenenti gli acidi nucleici qui forniti, in cui gli acidi nucleici modificati codificano una proteina che antagonizza o 25 altrimenti risolve l'attività proteica aberrante presente nella cellula del soggetto.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0309] Esempi specifici di una proteina disfunzionale sono le varianti di mutazione missenso o non senso del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che producono una variante proteica disfunzionale o non funzionale, rispettivamente, della proteina CFTR, che causa la fibrosi cistica.

5 [0310] Pertanto, vengono forniti metodi per trattare la fibrosi cistica in un soggetto mammifero mettendo a contatto una cellula del soggetto con un acido nucleico modificato avente una regione traducibile che codifica un polipeptide CFTR funzionale, in condizioni tali che una quantità efficace del polipeptide CFTR sia presente nella cellula. Le cellule bersaglio preferite sono le cellule epiteliali, come il polmone, e i metodi di somministrazione sono determinati a seconda del
10 tessuto bersaglio; vale a dire, per il rilascio polmonare, le molecole di RNA vengono formulate per la somministrazione mediante inalazione.

[0311] In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce un metodo per il trattamento dell'iperlipidemia in un soggetto, introducendo in una popolazione cellulare del soggetto una molecola di mRNA modificata che codifica la sortilina, una proteina recentemente caratterizzata
15 da studi genomici, migliorando così l'iperlipidemia in un soggetto. Il gene SORT1 codifica una proteina transmembrana della rete trans-Golgi (TGN) chiamata Sortilina. Studi genetici hanno dimostrato che un individuo su cinque presenta un polimorfismo a singolo nucleotide, rs12740374, nel locus 1p13 del gene SORT1 che lo predispone ad avere bassi livelli di lipoproteina a bassa densità (LDL) e lipoproteina a densità molto bassa (VLDL). Ogni copia
20 dell'allele minore, presente in circa il 30% delle persone, altera il colesterolo LDL di 8 mg/dL, mentre due copie dell'allele minore, presente in circa il 5% della popolazione, riducono il colesterolo LDL di 16 mg/dL. È stato anche dimostrato che i portatori dell'allele minore hanno un rischio ridotto del 40% di infarto del miocardio. Studi funzionali in vivo sui topi descrivono che la sovraespressione di SORT1 nel tessuto epatico del topo ha portato a livelli di colesterolo
25 LDL significativamente più bassi, fino all'80% in meno, e che il silenziamento di SORT1 ha


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

aumentato il colesterolo LDL di circa il 200% (Musunuru K et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. Nature 2010; 466: 714-721).

Metodi di rilascio cellulare di acido nucleico

[0312] I metodi della presente descrizione migliorano il rilascio di acido nucleico in una
5 popolazione cellulare, *in vivo*, *ex vivo* o *in coltura*. Ad esempio, una coltura cellulare contenente
una pluralità di cellule ospite (ad esempio cellule eucariotiche come cellule di lievito o di
mammifero) viene messa a contatto con una composizione che contiene un acido nucleico
potenziato avente almeno una modificazione nucleosidica e, opzionalmente, una regione
traducibile. La composizione contiene anche generalmente un reagente di trasfezione o altro
10 composto che aumenta l'efficienza della captazione di un acido nucleico nelle cellule ospite.
L'acido nucleico potenziato mostra una maggiore ritenzione nella popolazione cellulare, rispetto
a un corrispondente acido nucleico non modificato. La ritenzione dell'acido nucleico potenziato
è maggiore della ritenzione dell'acido nucleico non modificato. In alcuni casi, è almeno circa il
50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200% o più del 200% maggiore della conservazione
15 dell'acido nucleico non modificato. Tale vantaggio di ritenzione può essere ottenuto mediante
un ciclo di trasfezione con l'acido nucleico potenziato, oppure può essere ottenuto dopo ripetuti
cicli di trasfezione.

[0313] In alcuni casi, l'acido nucleico potenziato viene somministrato a una popolazione di cellule
bersaglio con uno o più acidi nucleici aggiuntivi. Tale rilascio può avvenire contemporaneamente,
20 oppure l'acido nucleico viene rilasciato prima del rilascio dell'uno o più acidi nucleici aggiuntivi.
L'ulteriore uno o più acidi nucleici possono essere acidi nucleici modificati o acidi nucleici non
modificati. Resta inteso che la presenza iniziale degli acidi nucleici potenziati non induce
sostanzialmente una risposta immunitaria innata della popolazione cellulare e, inoltre, e che la
risposta immunitaria innata non sarà attivata dalla successiva presenza degli acidi nucleici non
25 modificati. A questo proposito, l'acido nucleico potenziato può non contenere di per sé una


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

regione traducibile, se la proteina che si desidera sia presente nella popolazione cellulare bersaglio viene tradotta dagli acidi nucleici non modificati.

Frazioni di bersagliamento

5 [0314] In aspetti della presente descrizione, vengono forniti acidi nucleici modificati per esprimere un partner di legame proteico o un recettore sulla superficie della cellula, che funziona per indirizzare la cellula verso uno spazio tissutale specifico o per interagire con una frazione specifica, sia in vivo sia in vitro. I partner di legame proteico adatti includono anticorpi e loro frammenti funzionali, proteine scaffold o peptidi. Inoltre, gli acidi nucleici modificati possono essere impiegati per dirigere la sintesi e la localizzazione extracellulare di lipidi, carboidrati o
10 altre frazioni biologiche.

Silenziamento dell'espressione genica permanente

[0315] Un metodo per silenziare epigeneticamente l'espressione genica in un soggetto mammifero, comprendente un acido nucleico in cui la regione traducibile codifica un polipeptide o polipeptidi in grado di dirigere la metilazione dell'istone H3 specifica per sequenza per avviare
15 la formazione di eterocromatina e ridurre la trascrizione genica attorno a geni specifici con lo scopo di silenziare il gene. Ad esempio, una mutazione con guadagno di funzione nel gene Janus chinasi 2 è responsabile della famiglia delle malattie mieloproliferative.

Rilascio di un agente rilevabile o terapeutico a un bersaglio biologico

[0316] I nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati descritti nel
20 presente contesto possono essere utilizzati in una serie di diversi scenari in cui si desidera il rilascio di una sostanza (il "carico utile") a un bersaglio biologico, ad esempio il rilascio di sostanze rilevabili per il rilevamento del bersaglio o la somministrazione di un agente terapeutico. I metodi di rilevamento possono includere metodi di imaging sia *in vitro* che *in vivo*, ad esempio immunoistochimica, imaging a bioluminescenza (BLI), imaging a risonanza magnetica (MRI),
25 tomografia a emissione di positroni (PET), microscopia elettronica, tomografia computerizzata a


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

raggi X, imaging Raman, tomografia a coerenza ottica, imaging ad assorbimento, imaging termico, imaging a riflettanza a fluorescenza, microscopia a fluorescenza, imaging tomografico molecolare a fluorescenza, imaging a risonanza magnetica nucleare, imaging a raggi X, imaging a ultrasuoni, imaging fotoacustico, saggio di laboratorio o in qualsiasi situazione in cui tag/colorazione/imaging è richiesto/a.

[0317] Ad esempio, i nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto possono essere utilizzati nella riprogrammazione delle cellule staminali pluripotenti indotte (cellule iPS), che possono quindi essere utilizzate per tracciare direttamente le cellule che vengono trasfettate rispetto alle cellule totali nel gruppo. In un altro esempio, un farmaco che è attaccato all'acido nucleico modificato tramite un linker ed è marcato in modo fluorescente può essere utilizzato per tracciare il farmaco *in vivo*, ad esempio a livello intracellulare. Altri esempi includono l'uso di un acido nucleico modificato nel rilascio reversibile di farmaco nelle cellule.

[0318] I nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto possono essere utilizzati nel bersagliamento intracellulare di un carico utile, ad esempio, un agente rilevabile o terapeutico, a un organello specifico. Bersagli intracellulari esemplificativi possono includere la localizzazione nucleare per l'elaborazione avanzata dell'mRNA o una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) collegata all'mRNA contenente un inibitore.

[0319] Inoltre, i nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto possono essere utilizzati per somministrare agenti terapeutici a cellule o tessuti, ad esempio negli animali vivi. Ad esempio, i nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati descritti nel presente contesto possono essere utilizzati per fornire agenti chemioterapici altamente polari per uccidere le cellule tumorali. Gli acidi nucleici modificati attaccati all'agente terapeutico attraverso un linker possono facilitare la


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

permeazione dell'elemento consentendo all'agente terapeutico di viaggiare in una cellula per raggiungere un bersaglio intracellulare.

[0320] In un altro esempio, i nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati possono essere attaccati a un peptide inibitorio virale (VIP) attraverso un linker scindibile. Il linker scindibile rilascerà il VIP e si colorerà nella cellula. In un altro esempio, i nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati possono essere attaccati attraverso il linker a un ribosilato ADP, che è responsabile delle azioni di alcune tossine batteriche, come la tossina del colera, la tossina della difterite e la tossina della pertosse. Queste proteine tossiche sono ADP-ribosiltransferasi che modificano le proteine bersaglio nelle cellule umane. Ad esempio, la tossina del colera ADP-ribosilata le proteine G, causando una massiccia secrezione di liquidi dal rivestimento dell'intestino tenue, con conseguente diarrea che mette in pericolo di vita.

Composizioni farmaceutiche

[0321] La presente descrizione fornisce proteine generate da mRNA modificati. Le composizioni farmaceutiche possono opzionalmente comprendere una o più sostanze terapeuticamente attive aggiuntive. In accordo con alcuni aspetti, viene fornito un metodo per somministrare composizioni farmaceutiche comprendenti un acido nucleico modificato codificante una o più proteine da somministrare a un soggetto che ne ha bisogno. In alcuni casi, le composizioni vengono somministrate agli esseri umani. Ai fini della presente descrizione, l'espressione "principio attivo" si riferisce generalmente a un complesso proteico, codificante per proteine o contenente proteine come qui descritto.

[0322] Sebbene le descrizioni delle composizioni farmaceutiche fornite nel presente contesto siano principalmente destinate a composizioni farmaceutiche che sono adatte alla somministrazione agli esseri umani, risulta evidente agli esperti della tecnica che tali composizioni sono generalmente adatte alla somministrazione ad animali di tutti i tipi. La


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

modificazione di composizioni farmaceutiche adatte per la somministrazione agli esseri umani al fine di rendere le composizioni adatte per la somministrazione a vari animali è ben compresa e il farmacologo veterinario esperto con competenza ordinaria può progettare e/o eseguire tale modificazione con la semplice sperimentazione ordinaria, se presente. I soggetti ai quali è
5 contemplata la somministrazione delle composizioni farmaceutiche comprendono, tuttavia senza limitazioni, umani e/o altri primati; mammiferi, compresi mammiferi commercialmente rilevanti come bovini, suini, cavalli, pecore, gatti, cani, topi e/o ratti; e/o uccelli, compresi gli uccelli commercialmente rilevanti come galline, anatre, oche e/o tacchini.

[0323] Le formulazioni delle composizioni farmaceutiche qui descritte possono essere preparate
10 con qualsiasi metodo noto o di seguito sviluppato nella tecnica della farmacologia. In generale, tali metodi preparatori includono la fase di associazione del principio attivo con un eccipiente e/o uno o più altri ingredienti secondari, quindi, se necessario e/o desiderabile, la modellatura e/o l'imballaggio del prodotto in un'unità singola o multi-dose desiderata.

[0324] Una composizione farmaceutica secondo la presente descrizione può essere preparata,
15 confezionata e/o venduta sfusa, come una singola dose unitaria e/o come una pluralità di singole dosi unitarie. Come utilizzata nel presente contesto, una "dose unitaria" è una quantità discreta della composizione farmaceutica comprendente una quantità predeterminata del principio attivo. La quantità del principio attivo è generalmente uguale al dosaggio del principio attivo che verrebbe somministrato a un soggetto e/o una frazione conveniente di tale dosaggio come, ad
20 esempio, metà o un terzo di tale dosaggio.

[0325] Le quantità relative del principio attivo, dell'eccipiente farmaceuticamente accettabile e/o di eventuali principi aggiuntivi in una composizione farmaceutica in conformità con la presente descrizione varieranno, a seconda dell'identità, delle dimensioni e/o delle condizioni del soggetto trattato e ulteriormente a seconda della via attraverso la quale deve essere somministrata la
25 composizione. A titolo di esempio, la composizione può comprendere tra lo 0,1% e il 100% (p/p)


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

del principio attivo.

[0326] Le formulazioni farmaceutiche possono inoltre comprendere un eccipiente farmaceuticamente accettabile, che, come utilizzato nel presente contesto, include tutti i solventi, mezzi di dispersione, diluenti o altri veicoli liquidi, adiuvanti di dispersione o sospensione, agenti
5 tensioattivi, agenti isotonici, agenti addensanti o emulsionanti, conservanti, leganti solidi e lubrificanti e simili, come adatti alla particolare forma di dosaggio desiderata. The Science and Practice of Pharmacy di Remington, 21a edizione, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) descrive vari supporti utilizzati nella formulazione di composizioni farmaceutiche e tecniche note per la loro preparazione. Salvo nella misura in cui
10 qualsiasi mezzo eccipiente tradizionale sia incompatibile con una sostanza o suoi derivati, ad esempio producendo qualsiasi effetto biologico indesiderabile o altrimenti interagendo in modo dannoso con qualsiasi altro uno o più componenti della composizione farmaceutica, si prevede che il suo uso rientri nei limiti l'ambito della presente descrizione.

[0327] In alcuni casi, un eccipiente farmaceuticamente accettabile è puro almeno al 95%, almeno
15 al 96%, almeno al 97%, almeno al 98%, almeno al 99% o al 100%. In alcune forme di realizzazione, un eccipiente è approvato per l'uso negli esseri umani e per l'uso veterinario. In alcuni casi, un eccipiente è approvato dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti. In alcuni casi, un eccipiente è di qualità farmaceutica. In alcuni casi, l'eccipiente soddisfa gli standard della Farmacopea statunitense (USP), della Farmacopea europea (EP), della Farmacopea
20 britannica, e/o la Farmacopea internazionale.

[0328] Gli eccipienti farmaceuticamente accettabili utilizzati nella produzione di composizioni farmaceutiche includono, ma non sono limitati a, diluenti inerti, agenti disperdenti e/o granulanti, agenti tensioattivi e/o emulsionanti, agenti disgreganti, agenti leganti, conservanti, agenti tampone, agenti lubrificanti e/o oli. Tali eccipienti possono eventualmente essere inclusi in
25 formulazioni farmaceutiche. Nella composizione possono essere presenti, a giudizio del


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

formulatore, eccipienti quali burro di cacao e cere per supposte, coloranti, agenti di rivestimento, edulcoranti, aromatizzanti e/o profumanti.

[0329] Diluenti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, carbonato di calcio, carbonato di sodio, fosfato di calcio, fosfato dicalcico, solfato di calcio, calcio idrogeno fosfato, sodio fosfato lattosio, saccarosio, cellulosa, cellulosa microcristallina, caolino, mannitolo, sorbitolo, inositolo, cloruro di sodio, amido secco, amido di mais, zucchero in polvere, ecc., e/o loro combinazioni.

[0330] Agenti di granulazione e/o disperdenti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, fecola di patate, amido di mais, amido di tapioca, glicolato di amido di sodio, argille, acido alginico, gomma di guar, polpa di agrumi, agar, bentonite, cellulosa e prodotti del legno, spugna naturale, resine a scambio cationico, carbonato di calcio, silicati, carbonato di sodio, poli(vinil-pirrolidone) (crospovidone) reticolato, carbossimetilamido sodico (glicolato di amido di sodio), carbossimetilcellulosa, carbossimetilcellulosa sodica reticolata (croscarmellosa), metilcellulosa, amido pregelatinizzato (amido 1500), amido microcristallino, amido insolubile in acqua, carbossimetilcellulosa di calcio, silicato di magnesio e alluminio (Veegum), sodio laurilsolfato, composti di ammonio quaternario, ecc., e/o loro combinazioni.

[0331] Esempi di agenti tensioattivi e/o emulsionanti includono, ma non sono limitati a, emulsionanti naturali (ad esempio acacia, agar, acido alginico, alginato di sodio, gomma adragante, condruce, colesterolo, xantano, pectina, gelatina, tuorlo d'uovo, caseina, grasso di lana, colesterolo, cera e lecitina), argille colloidali (ad esempio bentonite [silicato di alluminio] e Veegum® [silicato di magnesio e alluminio]), derivati di amminoacidi a catena lunga, alcoli ad alto peso molecolare (ad esempio alcol stearilico, alcol cetilico, alcol oleilico, triacetina monostearato, etilenglicole distearato, gliceril monostearato e propilenglicole monostearato, alcol polivinilico), carbomeri (ad esempio carbossipolimetilene, acido poliacrilico, polimero di acido acrilico e polimero carbossivinilico), carragenina, derivati della cellulosa (ad esempio


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

idrossimetilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, metilcellulosa), esteri di acidi grassi del sorbitano (ad esempio monolaurato di polioossietilene sorbitano [Tween[®]20], polioossietilene sorbitano [Tween[®]60], polioossietilene sorbitano monooleato [Tween[®]80], sorbitano monopalmitato [Span[®]40], sorbitano monostearato [Span[®]60], sorbitano tristearato [Span[®]65], gliceril monooleato [Span[®]80]), esteri di polioossietilene (ad esempio monostearato di polioossietilene [Myrj[®]45], olio di ricino idrogenato polioossietilene, olio di ricino polietossilato, stearato di polioossietilene e Solutol[®]), esteri di acidi grassi di saccarosio, esteri di acidi grassi di glicole polietilenico (ad esempio Cremophor[®]), eteri di polioossietilene, (ad esempio polioossietilene lauril etere [Brij[®]30]), poli(vinil-pirrolidone), dietilenglicole monolaurato, 5 trietanolammina oleato, sodio oleato, potassio oleato, etil oleato, acido oleico, etil laurato, sodio laurilsolfato, Pluorinc[®] F 68, Poloxamer[®] 188, bromuro di cetrimonio, cloruro di cetilpiridinio, cloruro di benzalconio, sodio docusato, eccetera e/o loro combinazioni. 10

[0332] Agenti leganti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, amido (ad esempio amido di mais e pasta di amido); gelatina; zuccheri (ad esempio saccarosio, glucosio, 15 destrosio, destrina, melassa, lattosio, lattitolo, mannitolo); gomme naturali e sintetiche (ad esempio acacia, alginato di sodio, estratto di muschio irlandese, gomma panwar, gomma ghatti, mucillagine di gusci di isapolo, carbossimetilcellulosa, metilcellulosa, etilcellulosa, idrossietilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, cellulosa microcristallina, acetato di cellulosa, poli(vinil-pirrolidone), silicato di magnesio-alluminio (Veegum[®]) e 20 arabogalattano di larice); alginati; ossido di polietilene; polietilenglicole; sali di calcio inorganici; acido silicico; polimetacrilati; cere; acqua; alcol; eccetera; e loro combinazioni.

[0333] I conservanti esemplificativi possono includere, tuttavia senza limitazioni, antiossidanti, agenti chelanti, conservanti antimicrobici, conservanti antifungini, conservanti alcolici, conservanti acidi e/o altri conservanti. Antiossidanti esemplificativi includono, tuttavia senza 25 limitazioni, alfa tocoferolo, acido ascorbico, acorbil palmitato, idrossianisolo butilato,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

idrossitoluene butilato, monotioglicerolo, metabisolfito di potassio, acido propionico, propil
gallato, ascorbato di sodio, bisolfito di sodio, metabisolfito di sodio e/o solfito di sodio. Agenti
chelanti esemplificativi includono acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), acido citrico
monoidrato, disodio edetato, dipotassio edetato, acido edetico, acido fumarico, acido malico,
5 acido fosforico, sodio edetato, acido tartarico e trisodio edetato. I conservanti antimicrobici
esemplificativi includono, ma non sono limitati a, benzalconio cloruro, benzetonio cloruro, alcol
benzilico, bronopol, cetrimide, cetilpiridinio cloruro, clorexidina, clorobutanolo, clorocresolo,
cloroxilenolo, cresolo, alcol etilico, glicerina, etanolo, esetidina, imidurea, alcol feniletilico,
nitrato fenilmercurico, propilenglicole e/o thimerosal. Conservanti antifungini esemplificativi
10 includono, ma non sono limitati a, butilparabene, metilparabene, etilparabene, propilparabene,
acido benzoico, acido idrossibenzoico, benzoato di potassio, sorbato di potassio, benzoato di
sodio, propionato di sodio e/o acido sorbico. I conservanti di alcol esemplificativi includono, ma
non sono limitati a, etanolo, polietilenglicole, fenolo, composti fenolici, bisfenolo, clorobutanolo,
idrossibenzoato e/o alcol feniletilico. I conservanti acidi esemplificativi includono, ma non sono
15 limitati a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-carotene, acido citrico, acido acetico, acido
deidroacetico, acido ascorbico, acido sorbico e/o acido fitico. Altri conservanti includono, ma non
sono limitati a, tocoferolo, tocoferolo acetato, deterossima mesilato, cetrimide, idrossianisolo
butilato (BHA), idrossianisolo butilato (BHT), etilendiammina, sodio lauril solfato (SLS), sodio
lauril etere solfato (SLES), sodio bisolfito, metabisolfito di sodio, solfito di potassio, metabisolfito
20 di potassio, GLYDANT PLUS[®], Fenonip[®], metilparaben, GERMALL[®]115, GERMABEN[®]II,
NEOLONE[™], Kathon[™] e/o EUXYL[®].

[0334] Agenti tamponanti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, soluzioni tampone
a base di citrato, soluzioni tampone a base di acetato, soluzioni tampone a base di fosfato, cloruro
di ammonio, carbonato di calcio, cloruro di calcio, citrato di calcio, gluconato di calcio,
25 gluceptato di calcio, gluconato di calcio, acido D-gluconico, glicerofosfato di calcio, lattato di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

calcio, acido propanoico, levulinato di calcio, acido pentanoico, calcio fosfato dibasico, acido fosforico, calcio fosfato tribasico, calcio idrossido fosfato, acetato di potassio, cloruro di potassio, gluconato di potassio, miscele di potassio, fosfato di potassio dibasico, fosfato di potassio monobasico, miscele di fosfato di potassio, acetato di sodio, bicarbonato di sodio, cloruro di sodio, 5 citrato di sodio, lattato di sodio, fosfato di sodio dibasico, fosfato di sodio monobasico, miscele di fosfato di sodio, trometamina, idrossido di magnesio, idrossido di alluminio, acido alginico, acqua apirogena, soluzione salina isotonica, soluzione di Ringer, alcol etilico, *eccetera*, e loro combinazioni.

[0335] Agenti lubrificanti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, magnesio stearato, 10 calcio stearato, acido stearico, silice, talco, malto, gliceril beenato, oli vegetali idrogenati, polietilenglicole, sodio benzoato, sodio acetato, sodio cloruro, leucina, magnesio lauril solfato, sodio lauril solfato, *eccetera*, e loro combinazioni.

[0336] Oli esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, mandorla, nocciolo di albicocca, avocado, babassu, bergamotto, semi di ribes nero, borragine, cade, camomilla, canola, cumino, 15 carnauba, ricino, cannella, burro di cacao, cocco, fegato di merluzzo, caffè, mais, semi di cotone, emu, eucalipto, enagra, pesce, semi di lino, geraniolo, cucurbitacea, vinacciolo, nocciola, issopo, isopropil miristato, jojoba, olio di noci kukui, lavandino, lavanda, limone, litsea cubeba, noce di macadamia, malva, semi di mango, semi di schiuma dei prati, minerale, visone, noce moscata, oliva, arancia, pesce specchio, palma, nocciolo di palma, nocciolo di pesca, arachidi, semi di 20 papavero, semi di zucca, colza, crusca di riso, rosmarino, zafferanone, legno di sandalo, sasquana, savoury, ramno di mare, sesamo, burro di karitè, silicone, soia, girasole, melaleuca, cardo, tsubaki, vetiver, noci, e oli germe di cereale. Oli esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, butil stearato, trigliceride caprilico, trigliceride caprico, ciclometicone, dietil sebacato, dimeticone 360, isopropil miristato, olio minerale, ottildodecanolo, alcol oleico, olio di 25 silicone e/o loro combinazioni.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0337] Le forme di dosaggio liquide per la somministrazione orale e parenterale includono, tuttavia senza limitazioni, emulsioni, microemulsioni, soluzioni, sospensioni, sciroppi e/o elisir farmaceuticamente accettabili. In aggiunta ai principi attivi, le forme di dosaggio liquide possono comprendere diluenti inerti comunemente utilizzati nella tecnica come, ad esempio, acqua o altri
5 solventi, agenti solubilizzanti ed emulsionanti quali alcol etilico, alcol isopropilico, etilcarbonato, etilacetato, alcol benzilico, benzilbenzoato, propilenglicole, 1,3-butilenglicole, oli (in particolare oli di semi di cotone, di arachidi, di mais, di germe, di oliva, di ricino e di sesamo), glicerolo, alcol di tetraidrofurfurile, polietilenglicoli ed esteri di acido grasso di sorbitano e loro miscele. Oltre a diluenti inerti, le composizioni orali possono anche includere adiuvanti come agenti
10 umettanti, agenti emulsionanti e sospensivanti, agenti edulcoranti, aromatizzanti e/o profumazione. In determinati aspetti per somministrazione parenterale, le composizioni vengono miscelate con agenti solubilizzanti come Cremophor[®], alcoli, oli, oli modificati, glicoli, polisorbati, ciclodestrine, polimeri e/o loro combinazioni.

[0338] Preparazioni iniettabili, ad esempio, sospensioni acquose o oleose iniettabili sterili
15 possono essere formulate secondo la tecnica nota usando agenti disperdenti o umettanti e agenti sospensivanti adatti. I preparati iniettabili sterili possono essere soluzioni iniettabili sterili, sospensioni e/o emulsioni in diluenti e/o solventi parenteralmente accettabili non tossici, ad esempio, come soluzione in 1,3-butandiolo. Tra i veicoli e solventi accettabili che possono essere impiegati vi sono acqua, soluzione di Ringer, USP e soluzione isotonica di cloruro di sodio. Oli
20 fissi sterili sono tradizionalmente impiegati come solvente o terreno di sospensione. A questo scopo può essere impiegato qualsiasi olio fisso blando inclusi mono- o digliceridi sintetici. Acidi grassi come l'acido oleico possono essere utilizzati nella preparazione di iniettabili.

[0339] Le formulazioni iniettabili possono essere sterilizzate ad esempio mediante filtrazione attraverso un filtro di trattenimento dei batteri e/o incorporando agenti sterilizzanti sotto forma di
25 composizioni solide sterili che possono essere disciolte o disperse in acqua sterile o altro terreno


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

iniettabile sterile prima dell'uso.

[0340] Al fine di prolungare l'effetto di un principio attivo, è spesso desiderabile rallentare l'assorbimento del principio attivo dall'iniezione sottocutanea o intramuscolare. Questo può essere compiuto mediante l'uso di una sospensione liquida di materiale cristallino o amorfo con scarsa idrosolubilità. La velocità di assorbimento del farmaco quindi dipende dalla sua velocità di dissoluzione che, a sua volta, può dipendere dalla dimensione dei cristalli e dalla forma cristallina. In alternativa, l'assorbimento ritardato di una forma di farmaco somministrata per via parenterale viene ottenuto dissolvendo o sospendendo il farmaco in un veicolo oleoso. Le forme di deposito iniettabili sono realizzate formando matrici di microincapsula del farmaco in polimeri biodegradabili come polilattide-poliglicolide. A seconda del rapporto tra farmaco e polimero e della natura dello specifico polimero impiegato, è possibile controllare la velocità di rilascio del farmaco. Esempi di altri polimeri biodegradabili includono poli(ortoesteri) e poli(anidridi). Formulazioni iniettabili di deposito vengono preparate intrappolando il farmaco in liposomi o microemulsioni che sono compatibili con i tessuti corporei.

[0341] Le composizioni per la somministrazione rettale o vaginale sono tipicamente supposte che possono essere preparate mescolando le composizioni con eccipienti non irritanti adatti come burro di cacao, polietilenglicole o una cera per supposte che sono solidi a temperatura ambiente ma liquidi a temperatura corporea e quindi si sciolgono nel retto o nella cavità vaginale e rilasciano il principio attivo.

[0342] Forme di dosaggio solide per la somministrazione orale includono capsule, compresse, pillole, polveri e granuli. In tali forme di dosaggio solide, un ingrediente attivo viene miscelato con almeno un eccipiente inerte farmaceuticamente accettabile come citrato di sodio o fosfato dicalcico e/o cariche o estensori (ad es. amidi, lattosio, saccarosio, glucosio, mannitolo e acido silicico), leganti (ad es. carbossimetilcellulosa, alginati, gelatina, polivinilpirrolidone, saccarosio e acacia), umettanti (ad es. glicerolo), agenti disgreganti (ad es. agar, carbonato di

calcio, amido di patate o tapioca, acido alginico, alcuni silicati e carbonato di sodio), ritardanti di soluzione agenti (ad es. paraffina), acceleratori di assorbimento (*ad es.* composti di ammonio quaternario), agenti umettanti (*ad es.* alcool cetilico e glicerolo monostearato), assorbenti (ad es. caolino e argilla bentonitica), e lubrificanti (*ad es.* talco, stearato di calcio, stearato di magnesio, glicoli polietilenici solidi, sodio laurilsolfato) e loro miscele. Nel caso di capsule, compresse e pillole, le forme di dosaggio possono comprendere agenti tamponanti.

[0343] Composizioni solide di tipo simile possono essere impiegate come riempitivi in capsule di gelatina con riempimento molli e dure utilizzando tali eccipienti come lattosio o zuccheri del latte nonché polietilenglicoli dall'elevato peso molecolare e simili. Forme di dosaggio solide di compresse, confetti, capsule, pillole e granuli possono essere preparate con rivestimenti e gusci come rivestimenti enterici e altri rivestimenti ben noti nella tecnica della formulazione farmaceutica. Possono opzionalmente comprendere agenti opacizzanti e possono essere di una composizione tale da rilasciare solo l'uno o più principi attivi, o preferenzialmente, in una determinata parte del tratto intestinale, opzionalmente, in un modo ritardato. Esempi di composizioni incorporanti che possono essere utilizzate includono sostanze polimeriche e cere. Composizioni solide di tipo simile possono essere impiegate come riempitivi in capsule di gelatina con riempimento molle e duro utilizzando tali eccipienti come lattosio o zuccheri del latte nonché polietilenglicoli dall'elevato peso molecolare e simili.

[0344] Le forme di dosaggio per la somministrazione topica e/o transdermica di una composizione possono includere unguenti, paste, creme, lozioni, gel, polveri, soluzioni, spray, inalanti e/o cerotti. Generalmente, un principio attivo è miscelato in condizioni sterili con un eccipiente farmaceuticamente accettabile e/o possono essere richiesti eventuali conservanti e/o tamponi necessari. Inoltre, la presente descrizione contempla l'uso di cerotti transdermici, che spesso hanno l'ulteriore vantaggio di fornire il rilascio controllato di un composto al corpo. Tali forme di dosaggio possono essere preparate, ad esempio, dissolvendo e/o erogando il composto nel mezzo


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

adatto. In alternativa o in aggiunta, la velocità può essere controllata fornendo una membrana di controllo della velocità e/o disperdendo il composto in una matrice e/o gel polimerica/o.

[0345] Dispositivi adatti per l'uso nella somministrazione di composizioni farmaceutiche intradermiche qui descritti includono dispositivi ad aghi corti come quelli descritti nei brevetti

5 U.S. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; e 5.417.662.

Le composizioni intradermiche possono essere somministrate da dispositivi che limitano la lunghezza di penetrazione effettiva di un ago nella pelle, come quelli descritti nella pubblicazione PCT WO 99/34850 e loro equivalenti funzionali. Dispositivi di iniezione a getto che rilasciano composizioni liquide nel derma tramite un iniettore a getto di liquido e/o tramite un ago che

10 perfora lo strato corneo e produce un getto che raggiunge il derma. I dispositivi di iniezione a getto sono descritti, ad esempio, nei brevetti U.S. nn. 5,480,381; 5,599,302; 5,334,144; 5,993,412;

5,649,912; 5,569,189; 5,704,911; 5,383,851; 5,893,397; 5,466,220; 5,339,163; 5,312,335; 5,503,627; 5,064,413; 5,520,639; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 4,940,460; e le pubblicazioni

15 PCT WO 97/37705 e WO 97/13537. Sono adatti dispositivi balistici di rilascio di polvere/particelle che utilizzano gas compresso per accelerare il vaccino in polvere attraverso gli strati esterni della pelle fino al derma. In alternativa o in aggiunta, si possono utilizzare siringhe tradizionali nel metodo classico di somministrazione intradermica mantoux.

[0346] Le formulazioni adatte per la somministrazione topica includono, tuttavia senza limitazioni, preparazioni liquide e/o semiliquide come linimenti, lozioni, emulsioni olio in acqua

20 e/o acqua in olio come creme, unguenti e/o paste, e /o soluzioni e/o sospensioni. Le formulazioni somministrabili per via topica possono, per esempio, comprendere da circa l'1% a circa il 10%

(p/p) di principio attivo, sebbene la concentrazione del principio attivo possa essere elevata quanto il limite di solubilità del principio attivo nel solvente. Le formulazioni per la somministrazione topica possono inoltre comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nel presente

25 contesto.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0347] Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata e/o venduta in una formulazione adatta per la somministrazione polmonare attraverso la cavità buccale. Una tale formulazione può comprendere particelle secche che comprendono il principio attivo e che hanno un diametro nell'intervallo da circa 0,5 nm a circa 7 nm da circa 1 nm a circa 6 nm. Tali composizioni sono opportunamente sotto forma di polveri secche per la somministrazione utilizzando un dispositivo comprendente un serbatoio di polvere secca a cui può essere diretto un flusso di propellente per disperdere la polvere e/o utilizzando un contenitore di erogazione di solvente/polvere autopropellente come un dispositivo comprendente il principio attivo disciolto e/o sospeso in un propellente a basso punto di ebollizione in un contenitore sigillato. Tali polveri comprendono particelle in cui almeno il 98% delle particelle in peso ha un diametro maggiore di 0,5 nm almeno il 95% delle particelle in numero ha un diametro inferiore a 7 nm. In alternativa, almeno il 95% delle particelle in peso ha un diametro maggiore di 1 nm almeno il 90% delle particelle in numero ha un diametro inferiore a 6 nm. Le composizioni in polvere secca possono includere un diluente solido in polvere fine come lo zucchero e sono opportunamente fornite in una forma di dose unitaria.

[0348] I propellenti a basso punto di ebollizione generalmente includono propellenti liquidi aventi un punto di ebollizione inferiore a 18,3 °C (65 °F) a pressione atmosferica. Generalmente il propellente può costituire dal 50% al 99,9% (p/p) della composizione e il principio attivo può costituire dallo 0,1% al 20% (p/p) della composizione. Un propellente può inoltre comprendere ingredienti aggiuntivi come un liquido non ionico e/o tensioattivo anionico solido e/o un diluente solido (che può avere una granulometria dello stesso ordine delle particelle che comprendono il principio attivo).

[0349] Le composizioni farmaceutiche formulate per il rilascio polmonare possono fornire principio attivo sotto forma di goccioline di una soluzione e/o sospensione. Tali formulazioni possono essere preparate, confezionate, e/o vendute come soluzioni acquose e/o alcoliche diluite

e/o sospensioni, opzionalmente sterili, comprendenti il principio attivo, e possono essere opportunamente somministrate utilizzando qualsiasi dispositivo di nebulizzazione e/o atomizzazione. Tali formulazioni possono inoltre comprendere uno o più ingredienti aggiuntivi inclusi, tuttavia senza limitazioni, un agente aromatizzante come saccarina sodica, un olio
5 volatile, un agente tamponante, un agente tensioattivo, e/o un conservante come il metilidrossibenzoato. Le goccioline fornite da questa via di somministrazione possono avere un diametro medio nell'intervallo da circa 0,1 µm a circa 200 µm.

[0350] Le formulazioni descritte nel presente contesto essendo utili per la somministrazione polmonare sono utili per la somministrazione intranasale di una composizione farmaceutica.

10 Un'altra formulazione adatta per la somministrazione intranasale è una polvere grossolana comprendente il principio attivo e avente una particella media da circa 0,2 µm a 500 µm. Tale formulazione viene somministrata nel modo in cui si prende il tabacco da fiuto, *vale a dire* mediante inalazione rapida attraverso il passaggio nasale da un contenitore della polvere tenuto vicino al naso.

15 **[0351]** Le formulazioni adatte per la somministrazione nasale possono, ad esempio, comprendere da circa lo 0,1% (p/p) e fino al 100% (p/p) del principio attivo e possono comprendere uno o più dei principi aggiuntivi descritti nel presente contesto. Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata, e/o venduta in una formulazione adatta alla somministrazione buccale. Tali formulazioni possono, ad esempio, essere sotto forma di compresse e/o pastiglie realizzate
20 con metodi tradizionali e possono, ad esempio, dallo 0,1% al 20% (p/p) del principio attivo, l'equilibrio comprendente una composizione solubile per via orale e/o degradabile e, opzionalmente, uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nel presente contesto. In alternativa, le formulazioni adatte per la somministrazione buccale possono comprendere una polvere e/o una soluzione aerosolizzata e/o atomizzata e/o sospensione comprendente il principio
25 attivo. Tali formulazioni in polvere, aerosolizzate e/o aerosolizzate, quando disperse, possono


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

avere una granulometria e/o dimensione delle goccioline media nell'intervallo da circa 0,1 nm a circa 200 nm, e possono inoltre comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nel presente contesto.

5 [0352] Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata, e/o venduta in una formulazione adatta alla somministrazione oftalmica. Tali formulazioni possono, per esempio, essere sotto forma di gocce oculari comprendenti, ad esempio, una soluzione e/o sospensione del principio attivo allo 0.1/1.0% (p/p) in un eccipiente liquido acquoso oppure oleoso. Tali gocce possono inoltre comprendere agenti tamponanti, sali, e/o uno o più altri ingredienti aggiuntivi descritti nel presente contesto. Altre formulazioni somministrabili oftalmicamente che sono utili
10 includono quelle che comprendono il principio attivo in forma microcristallina e/o in una preparazione liposomiale. Gocce auricolari e/o gocce oculari sono contemplate come rientranti nell'ambito della presente descrizione.

[0353] Considerazioni generali nella formulazione e/o produzione di agenti farmaceutici si possono trovare, ad esempio, in Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21a ed.,
15 Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Somministrazione

[0354] La presente descrizione fornisce metodi comprendenti la somministrazione di complessi in conformità con la presente descrizione a un soggetto che ne ha bisogno. Proteine o complessi o loro composizioni farmaceutiche, di imaging, diagnostiche o profilattiche, possono essere
20 somministrati a un soggetto utilizzando qualsiasi quantità e qualsiasi via di somministrazione efficace per prevenire, trattare, diagnosticare o visualizzare per immagini una malattia, un disturbo e/o una condizione (ad es. una malattia, un disturbo e/o una condizione relativa a deficit della memoria di lavoro). La quantità esatta necessaria varierà da soggetto a soggetto, a seconda della specie, dell'età e della condizione generale del soggetto, della gravità della patologia, della
25 specifica composizione, della sua modalità di somministrazione, della sua modalità di attività.,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Le composizioni secondo la presente descrizione sono tipicamente formulate in forma di unità di dosaggio per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. Risulterà chiaro, tuttavia, che l'uso quotidiano totale dei composti e delle composizioni della presente descrizione sarà deciso da parte del medico curante nell'ambito di un affidabile giudizio medico. Il livello di dose
5 terapeuticamente efficace, profilatticamente efficace, o livello di imaging appropriato specifico per qualsiasi paziente specifico dipenderà da una varietà di fattori, inclusi: a) il disturbo trattato e la gravità del disturbo; b) l'attività del composto specifico impiegato; c) la composizione specifica impiegata; l'età, il peso corporeo, lo stato di salute generale, il sesso e l'alimentazione del paziente; d) il periodo della somministrazione, la via di somministrazione e la velocità di escrezione del
10 composto specifico impiegato; e) la durata del trattamento; f) i farmaci utilizzati in associazione o contemporaneamente al composto specifico impiegato; e fattori simili ben noti nelle tecniche mediche.

[0355] Proteine da somministrare e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging possono essere somministrati ad animali, come mammiferi (ad
15 esempio, esseri umani, animali domestici, gatti, cani, topi, ratti, ecc.). In alcuni casi, le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging vengono somministrate agli esseri umani.

[0356] Proteine da erogare e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging secondo la presente descrizione possono essere somministrati mediante qualsiasi via.
20 In alcune forme di realizzazione, le proteine e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging vengono somministrati attraverso una o più di una varietà di vie, incluse orale, endovenosa, intramuscolare, intra-arteriosa, intramidollare, intratecale, sottocutanea, intraventricolare, transdermica, interdermica, rettale, intravaginale, intraperitoneale, topica (ad es., con polveri, unguenti, creme, gel, lozioni e/o gocce), mucosale, nasale, buccale, enterale,
25 vitrea, intratumorale, sublinguale; per instillazione intratracheale, instillazione bronchiale e/o


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

inalazione; come spray orale, spray nasale e/o aerosol e/o attraverso un catetere della vena porta. In alcuni casi, le proteine o i complessi e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging vengono somministrati mediante iniezione endovenosa sistemica. In casi specifici, le proteine o i complessi e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging possono essere somministrati per via endovenosa e/o orale. In casi specifici, le proteine o i complessi e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging possono essere somministrati in un modo che consente alla proteina o al complesso di attraversare la barriera emato-encefalica, la barriera vascolare o altra barriera epiteliale.

10 [0357] Tuttavia, la presente descrizione comprende il rilascio di proteine o complessi e/o loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging, attraverso qualsiasi via appropriata, tenendo in considerazione gli eventuali progressi nelle scienze della somministrazione di farmaci.

[0358] In generale, la via di somministrazione più appropriata dipenderà da una varietà di fattori, inclusa la natura della proteina o del complesso, comprendendo le proteine associate ad almeno un agente da somministrare (ad esempio, la sua stabilità nell'ambiente del tratto gastrointestinale, del flusso sanguigno, ecc.), la condizione del paziente (ad esempio, se il paziente è in grado di tollerare specifiche vie di somministrazione), ecc. la presente descrizione comprende il rilascio delle composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging mediante qualsiasi via appropriata prendendo in considerazione gli eventuali progressi nelle scienze della somministrazione di farmaci.

[0359] In determinati casi, le composizioni secondo la presente descrizione possono essere somministrate a livelli di dosaggio sufficienti per rilasciare da circa 0,0001 mg/kg a circa 100 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 50 mg/kg, da da circa 0,1 mg/kg a circa 40 mg/kg, da circa 0,5 mg/kg a circa 30 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0,1 mg/kg a circa 10


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

mg/kg, o da circa 1 mg/kg a circa 25 mg/kg, del peso corporeo del soggetto al giorno, una o più volte al giorno, per ottenere l'effetto terapeutico, diagnostico, profilattico o di imaging desiderato.

Il dosaggio desiderato può essere rilasciato tre volte al giorno, due volte al giorno, una volta al giorno, a giorni alterni, ogni tre giorni, ogni settimana, ogni due settimane, ogni tre settimane

5 oppure ogni quattro settimane. In determinati casi, il dosaggio desiderato può essere erogato usando più somministrazioni (ad esempio due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, quattordici o più amministrazioni).

[0360] Le proteine o i complessi possono essere utilizzati in combinazione con uno o più altri agenti terapeutici, profilattici, diagnostici o di imaging. Con "in combinazione con", non si

10 intende implicare che gli agenti debbano essere somministrati contemporaneamente e/o formulati per il rilascio insieme, sebbene questi metodi di rilascio rientrino nell'ambito della presente descrizione. Le composizioni possono essere somministrate contemporaneamente con, prima di

o successive a uno o più altre sostanze terapeutiche o procedure mediche desiderate. In generale, ciascun agente sarà somministrato a una dose e/o una programmazione determinata per

15 quell'agente. In alcuni aspetti, la presente descrizione comprende la somministrazione di composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging in combinazione con agenti

che migliorano la loro biodisponibilità, riducono e/o modificano il loro metabolismo, inibiscono la loro escrezione e/o modificano la loro distribuzione all'interno del corpo.

[0361] Si comprenderà inoltre che gli agenti attivi terapeutici, profilattici, diagnostici o di imaging

20 utilizzati in combinazione possono essere somministrati insieme in un'unica composizione o somministrati separatamente in composizioni diverse. In generale, ci si aspetta che gli agenti

utilizzati in combinazione siano utilizzati a livelli che non superano i livelli a cui essi sono utilizzati singolarmente. In alcuni casi, i livelli utilizzati in combinazione saranno inferiori rispetto

a quelli utilizzati singolarmente.

25 **[0362]** La specifica combinazione di terapie (sostanze terapeutiche o procedure) da impiegare in


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

un regime di combinazione terrà conto della compatibilità delle terapie e/o procedure desiderate e dell'effetto terapeutico desiderato da raggiungere. Si comprenderà anche che le terapie impiegate possono ottenere l'effetto desiderato per lo stesso disturbo (ad esempio una composizione utile per il trattamento del cancro in conformità alla presente descrizione può essere
5 somministrata contemporaneamente a un agente chemioterapico) o che possono ottenere effetti diversi (ad es. il controllo di eventuali effetti collaterali).

Kit

[0363] La presente descrizione fornisce una varietà di kit per eseguire convenientemente e/o efficacemente i metodi della presente descrizione. Tipicamente i kit comprendono quantità e/o
10 numero di componenti sufficienti per consentire a un utente di eseguire più trattamenti di uno o più soggetti e/o di eseguire più esperimenti.

[0364] In un aspetto, la descrizione fornisce kit per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile e una modif'acido nucleico è in grado di eludere o evitare l'induzione di una risposta immunitaria innata di una cellula in cui il
15 viene introdotto il primo acido nucleico isolato, la confezione e le istruzioni.

[0365] In un aspetto, la descrizione fornisce kit per la produzione di proteine, comprendenti: un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile, fornito in una quantità efficace per produrre una quantità desiderata di una proteina codificata dalla regione traducibile quando introdotta in una cellula bersaglio; un secondo acido nucleico comprendente un acido
20 nucleico inibitorio, fornito in una quantità efficace per inibire sostanzialmente la risposta immunitaria innata della cellula; e la confezione e le istruzioni.

[0366] In un aspetto, la descrizione fornisce kit per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile e una modificazione nucleosidica, in cui l'acido nucleico mostra una degradazione ridotta mediante una nucleasi
25 cellulare, e la confezione e le istruzioni.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0367] In un aspetto, la descrizione fornisce kit per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile e almeno due diverse modificazioni nucleosidiche, in cui l'acido nucleico mostra una degradazione ridotta mediante una nucleasi cellulare, e la confezione e le istruzioni.

5 [0368] In un aspetto, la descrizione fornisce kit per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile e almeno una modificazione nucleosidica, in cui l'acido nucleico mostra una degradazione ridotta da parte di una nucleasi cellulare; un secondo acido nucleico comprendente un acido nucleico inibitorio; e la confezione e le istruzioni.

10 [0369] In alcuni casi, il primo acido nucleico isolato comprende RNA messaggero (mRNA). In alcuni casi l'mRNA comprende almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da piridin-4-one ribonucleoside, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-idrossiuridina, 3-metiluridina, 5-carbossimetil-uridina, 1-carbossimetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometile -2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1 -metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, diidrouridina, diidropseudouridina, 2-tio-diidrouridina, 2-tio-diidropseudouridina, 2-metossiuridina, 2-metossi-4-tio-uridina, 4-metossi-pseudouridina, 4-metossi-2-tio-pseudouridina o uno qualsiasi descritto
15
20 nel presente contesto.

[0370] In alcuni casi, l'mRNA comprende almeno un nucleoside selezionato dal gruppo costituito da 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-idrossimetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina,
25


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metossi-citidina, 2-metossi-5-metil-citidina, 4-metossi-pseudoisocitidina, 4-metossi-1-metil-pseudoisocitidina o uno qualsiasi descritto nel presente contesto.

[0371] In alcuni casi, l'mRNA comprende almeno un nucleoside selezionato dal gruppo costituito da 2-amminopurina, 2, 6-diamminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-amminopurina, 7-deaza-8-aza-2-amminopurina, 7-deaza-2,6-diamminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diamminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6- isopenteniladenosina, N6-(cis-idrossiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-idrossiisopentenil) adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina, 2-metossi-adenina o uno qualsiasi descritto nel presente contesto.

[0372] In alcuni casi, l'mRNA comprende almeno un nucleoside selezionato dal gruppo costituito da inosina, 1-metil-inosina, wyosina, wybutosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6- tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6- tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metossi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-osso-guanosina, 7-metil-8-osso-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6- tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina o uno qualsiasi descritto nel presente contesto.

[0373] In un altro aspetto, la descrizione fornisce composizioni per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile e una modificazione nucleosidica, in cui l'acido nucleico mostra una degradazione ridotta mediante una nucleasi cellulare e una cellula di mammifero adatta per la traduzioneacido nucleico.

Definizioni

[0374] In vari punti della presente specifica, i sostituenti dei composti della presente descrizione sono divulgati in gruppi o in intervalli. È specificamente inteso che la presente descrizione includa


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

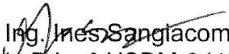
ogni singola sottocombinazione dei membri di tali gruppi e gamme. Ad esempio, il termine "alchile C₁₋₆" è specificamente inteso a descrivere individualmente metile, etile, alchile C₃, alchile C₄, alchile C₅ e alchile C₆.

[0375] *Circa*: come usato qui, il termine "circa" significa +/- 10% del valore recitato.

5 [0376] *Somministrato in combinazione*: come usato qui, il termine "somministrato in combinazione" o "somministrazione combinata" significa che due o più agenti sono somministrati a un soggetto contemporaneamente o entro un intervallo tale che potrebbe esserci una sovrapposizione di un effetto di ciascun agente sul paziente. In alcuni casi, vengono somministrati entro circa 60, 30, 15, 10, 5 o 1 minuto l'uno dall'altro. In alcuni casi, le somministrazioni degli
10 agenti sono sufficientemente distanziate tra loro in modo tale da ottenere un effetto combinatorio (ad esempio, un effetto sinergico).

[0377] *Animale*: Come qui utilizzato, il termine "animale" si riferisce a qualsiasi membro del regno animale. In alcuni casi, "animale" si riferisce agli esseri umani in qualsiasi fase dello sviluppo. In alcuni casi, "animale" si riferisce ad animali non umani in qualsiasi fase dello
15 sviluppo. In alcuni casi, l'animale non umano è un mammifero (ad esempio un roditore, un topo, un ratto, un coniglio, una scimmia, un cane, un gatto, una pecora, un bovino, un primate o un maiale). In alcuni casi, gli animali includono, ma non sono limitati a, mammiferi, uccelli, rettili, anfibi, pesci e vermi. In alcuni casi, l'animale è un animale transgenico, un animale geneticamente modificato o un clone.

20 [0378] *Antigeni di interesse o antigeni desiderati*: come qui utilizzati, i termini "antigeni di interesse" o "antigeni desiderati" includono quelle proteine e altre biomolecole qui fornite che sono legate immunospecificamente dagli anticorpi e frammenti, mutanti, varianti e alterazioni degli stessi qui descritti. Esempi di antigeni di interesse includono, tuttavia senza limitazioni, insulina, fattore di crescita simile all'insulina, hGH, tPA, citochine, come interleuchine (IL), ad
25 esempio, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferone (IFN) alfa, IFN beta, IFN gamma, IFN omega o IFN tau, fattore di necrosi tumorale (TNF), come TNF alfa e TNF beta, TNF gamma, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 e VEGF.

5 [0379] *Approssimativamente*: come qui utilizzato, il termine "approssimativamente" o "circa", applicati a uno o più valori di interesse, si riferiscono a un valore simile a un valore di riferimento dichiarato. In alcuni casi, il termine "approssimativamente" o "circa" si riferisce a un intervallo di valori che rientrano nel 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o meno in entrambe le direzioni (maggiore o minore di) di quanto indicato valore di riferimento se non diversamente indicato o altrimenti evidente dal
10 contesto (tranne quando tale numero supererebbe il 100% di un possibile valore).

[0380] *Associato a*: Come qui usati, i termini "associato a", "coniugato", "collegato", "attaccato" e "legato", quando usati in relazione a due o più frazioni, significano che le frazioni sono fisicamente associate o collegate tra loro, direttamente o tramite una o più frazioni aggiuntive che fungono da agente di collegamento, per formare una struttura sufficientemente stabile in modo
15 che le frazioni rimangano fisicamente associate nelle condizioni in cui la struttura viene utilizzata, ad esempio condizioni fisiologiche. Non è necessario che una "associazione" avvenga strettamente attraverso un legame chimico covalente diretto. Può anche suggerire un legame ionico o idrogeno o una connettività basata sull'ibridazione sufficientemente stabile in modo tale che le entità "associate" rimangano fisicamente associate.

20 [0381] *Biocompatibile*: Come qui utilizzato, il termine "biocompatibile" significa compatibile con cellule, tessuti, organi o sistemi viventi che presentano un rischio minimo o nullo di lesioni, tossicità o rigetto da parte del sistema immunitario.

[0382] *Biodegradabile*: Come qui utilizzato, il termine "biodegradabile" significa in grado di essere scomposto in prodotti innocui dall'azione degli esseri viventi.

25 [0383] *Biologicamente attivo*: Come usata qui, la frase "biologicamente attivo" si riferisce a una


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

caratteristica di qualsiasi sostanza che ha attività in un sistema e/o organismo biologico. Ad esempio, una sostanza che quando somministrata a un organismo, ha un effetto biologico su quell'organismo, è considerato essere biologicamente attivo. In casi specifici, un polinucleotide della presente descrizione può essere considerato biologicamente attivo se anche una porzione del polinucleotide è biologicamente attiva o imita un'attività considerata biologicamente rilevante.

5 [0384] *Termini chimici*: Quanto segue fornisce la definizione di vari termini chimici da "acile" a "tiolo".

[0385] Il termine "acile", come qui utilizzato, rappresenta un idrogeno o un gruppo alchile (ad esempio un gruppo aloalchile), come qui definito, che è attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un gruppo carbonile, come qui definito, ed è esemplificato da formole (vale a dire un gruppo carbossialdeide), acetile, trifluoroacetile, propionile, butanoile e simili. Esempi di gruppi acile non sostituiti includono da 1 a 7, da 1 a 11 o da 1 a 21 atomi di carbonio. In alcuni casi, il gruppo alchile è ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui descritto.

10 [0386] Il termine "acilammino", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo acile, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare genitore tramite un gruppo ammino, come definito nel presente contesto (vale a dire, $-\text{N}(\text{R}^{\text{N}1})-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, dove R è H o un gruppo alchile C_{1-6} , C_{1-10} o C_{1-20} opzionalmente sostituito (ad esempio, aloalchile) e $\text{R}^{\text{N}1}$ è come definito nel presente contesto). Gruppi acilammino non sostituiti esemplificativi includono da 1 a 41 atomi di carbonio (ad es. da 1 a 7, da 1 a 13, da 1 a 21, da 2 a 7, da 2 a 13, da 2 a 21, o da 2 a 41 atomi di carbonio). In alcuni casi, il gruppo alchile è ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui descritto, e/o il gruppo ammino è $-\text{NH}_2$ o $-\text{NHR}^{\text{N}1}$, in cui $\text{R}^{\text{N}1}$ è, indipendentemente, OH, NO_2 , NH_2 , $\text{NR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{OR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{R}^{\text{N}2}$, $\text{SOR}^{\text{N}2}$, alchile, arile, acile (ad esempio acetile, trifluoroacetile o altri qui descritti), o alcossicarbonilalchile, e ciascun $\text{R}^{\text{N}2}$ può essere H, alchile o arile.

25 [0387] Il termine "acilamminoalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

gruppo acile, come definito nel presente contesto, attaccato a un gruppo ammino che a sua volta è attaccato al gruppo molecolare progenitore tramite un gruppo alchile, come definito nel presente contesto (vale a dire, —alchile-N(R^{N1})-C(O)-R, dove R è H o un gruppo alchile C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ facoltativamente sostituito (ad esempio, aloalchile) e R^{N1} è come definito nel presente contesto).

5 Gruppi acilammino non sostituiti esemplificativi includono da 1 a 41 atomi di carbonio (ad es. da 1 a 7, da 1 a 13, da 1 a 21, da 2 a 7, da 2 a 13, da 2 a 21, o da 2 a 41 atomi di carbonio). In alcuni casi, il gruppo alchile è ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui descritto, e/o il gruppo ammino è -NH₂ o —NHR^{N1}, in cui R^{N1} è, indipendentemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alchile, arile, acile (ad esempio acetile, trifluoroacetile o altri qui
10 descritti), o alcossicarbonilalchile, e ciascun R^{N2} può essere H, alchile o arile.

[0388] Il termine "acilossi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo acile, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un atomo di ossigeno [vale a dire, "-O-C(O)-R, dove R è H o facoltativamente gruppo alchile C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ sostituito]. Esempi di gruppi acilossi non sostituiti includono da 1 a 21 atomi di
15 carbonio (ad esempio da 1 a 7 o da 1 a 11 atomi di carbonio). In alcuni casi, il gruppo alchile è ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui descritto.

[0389] Il termine "acilossalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo acile, come definito nel presente contesto, attaccato a un atomo di ossigeno che a sua volta è attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un gruppo alchile [vale a dire, -alchil-O-
20 C(O)-R, dove R è H o un gruppo alchile C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opzionalmente sostituito]. Gruppi acilossalchile non sostituiti esemplificativi includono da 1 a 21 atomi di carbonio (ad esempio da 1 a 7 o da 1 a 11 atomi di carbonio). In alcuni casi, il gruppo alchile è inoltre indipendentemente sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come descritto nel presente contesto.

[0390] Il termine "alcarile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo arile, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un
25


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

gruppo alchilene, come definito nel presente contesto. Gruppi alcarile esemplificativi non
sostituiti sono da 7 a 30 atomi di carbonio (ad esempio da 7 a 16 o da 7 a 20 atomi di carbonio,
come alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀, alc C₁₋₁₀-arile C₆₋₁₀, o alc C₁₋₂₀-arile C₆₋₁₀). In alcuni casi, l'alchilene e
l'arile possono essere ulteriormente sostituiti ciascuno con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui
5 definito per i rispettivi gruppi. Altri gruppi preceduti dal prefisso "alc-" sono definiti allo stesso
modo, dove "alc" si riferisce a un alchilene C₁₋₆, se non diversamente indicato, e la struttura
chimica attaccata è come definita nel presente contesto.

[0391] Il termine "alc-cicloalchile" rappresenta un gruppo cicloalchile, come definito nel presente
contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un gruppo alchilene, come
10 definito nel presente contesto (ad esempio, un gruppo alchilene da 1 a 4, da 1 a 6, da 1 a 10, o da
1 a 20 atomi di carbonio). In alcuni casi, l'alchilene e il cicloalchile possono essere ulteriormente
sostituiti ciascuno con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito per il rispettivo gruppo.

[0392] Il termine "alchenile", come qui utilizzato, rappresenta gruppi monovalenti a catena
lineare o ramificata di, se non diversamente specificato, da 2 a 20 atomi di carbonio (ad esempio,
15 da 2 a 6 o da 2 a 10 atomi di carbonio) contenenti uno o più doppi legami carbonio-carbonio ed è
esemplificato da etenile, 1-propenile, 2-propenile, 2-metil-1-propenile, 1-butenile, 2-butenile e
simili. Gli alchenili includono sia gli isomeri cis che trans. I gruppi alchenile possono essere
opzionalmente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti che sono selezionati, indipendentemente,
da ammino, arile, cicloalchile o eterociclile (ad esempio eteroarile), come qui definito, o uno
20 qualsiasi dei gruppi sostituenti alchile esemplificativi qui descritti.

[0393] Il termine "alchenilossi" rappresenta un sostituyente chimico di formula -OR, dove R è un
gruppo alchenile C₂₋₂₀ (ad esempio, alchenile C₂₋₆ o C₂₋₁₀), salvo diversamente specificato. Gruppi
alchenilossi esemplificativi includono etenilossi, propenilossi e simili. In alcuni casi, il gruppo
alchenile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito
25 (ad esempio, un gruppo idrossi).


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0394] Il termine "alcheteroarile" si riferisce a un gruppo eteroarile, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un gruppo alchilene, come definito nel presente contesto. Esempi di gruppi alcheteroarilalchile non sostituiti sono da 2 a 32 atomi di carbonio (ad esempio da 2 a 22, da 2 a 18, da 2 a 17, da 2 a 16, da 3 a 15, da 2 a 14, da 2 a 13, o da 2 a 12 atomi di carbonio, come alc C₁₋₆-eteroarile C₁₋₁₂, alc C₁₋₁₀-eteroarile C₁₋₁₂, o alc C₁₋₂₀-eteroarile C₁₋₁₂). In alcuni casi, l'alchilene e l'eteroarile possono essere ulteriormente sostituiti ciascuno con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito per il rispettivo gruppo. I gruppi alcheteroarile sono un sottoinsieme dei gruppi alcheterocicilile.

[0395] Il termine "alcheterocicilile" rappresenta un gruppo eterocicilile, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un gruppo alchilene, come definito nel presente contesto. Gruppi eteroarilalchile esemplificativi non sostituiti sono da 2 a 32 atomi di carbonio (ad esempio da 2 a 22, da 2 a 18, da 2 a 17, da 2 a 16, da 3 a 15, da 2 a 14, da 2 a 13, o da Da 2 a 12 atomi di carbonio, come alc C₁₋₆-eteroarile C₁₋₁₂, alc C₁₋₁₀-eteroarile C₁₋₁₂, o alc C₁₋₂₀-eteroarile C₁₋₁₂). In alcuni casi, l'alchilene e l'eterocicilile possono essere ulteriormente sostituiti ciascuno con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito per il rispettivo gruppo.

[0396] Il termine "alcossi" rappresenta un sostituente chimico di formula -OR, dove R è un gruppo alchile C₁₋₂₀ (ad esempio, alchile C₁₋₆ o C₁₋₁₀), salvo diversamente specificato. Gruppi alcossi esemplificativi includono metossi, etossi, propossi (ad esempio n-propossi e isopropossi), t-butossi e simili. In alcuni casi, il gruppo alchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito (ad esempio, idrossi o alcossi).

[0397] Il termine "alcossialcossi" rappresenta un gruppo alcossi che viene sostituito con un gruppo alcossi. Gruppi alcossialcossile esemplificativi non sostituiti includono da 2 a 40 atomi di carbonio (ad esempio, da 2 a 12 o da 2 a 20 atomi di carbonio, come alcossi C₁₋₆-alcossi C₁₋₆, alcossi C₁₋₁₀-alcossi C₁₋₁₀, o alcossi C₁₋₂₀-alcossi C₁₋₂₀). In alcuni casi, ciascun gruppo alcossi può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0398] Il termine "alcossialchile" rappresenta un gruppo alchile che viene sostituito con un gruppo alcossi. Gruppi alcossialchile esemplificativi non sostituiti includono da 2 a 40 atomi di carbonio (ad esempio, da 2 a 12 o da 2 a 20 atomi di carbonio, come alcossi C₁₋₆-alchile C₁₋₆, alcossi C₁₋₁₀-alchile C₁₋₁₀, o alcossi C₁₋₂₀-alchile C₁₋₂₀). In alcuni casi, l'alchile e l'alcossi ciascuno possono essere ulteriormente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito per il rispettivo gruppo.

[0399] Il termine "alcossicarbonile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un alcossi, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un atomo di carbonile [ad es., "-C(O)-OR, dove R è H o gruppo alchile C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opzionalmente sostituito]. Gruppi alcossicarbonile non sostituiti esemplificativi includono da 1 a 21 atomi di carbonio (ad esempio da 1 a 11 o da 1 a 7 atomi di carbonio). In alcune forme di realizzazione, il gruppo alcossi è ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui descritto.

[0400] Il termine "alcossicarbonilacile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo acile, come definito nel presente contesto, che è sostituito con un gruppo alcossicarbonile, come definito nel presente contesto [ad esempio, -C(O)-alchil-C(O)-OR, dove R è un gruppo alchile C₁₋₆ opzionalmente sostituito, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀]. Alcossicarbonilacili non sostituiti esemplificativi includono da 3 a 41 atomi di carbonio (ad esempio, da 3 a 10, da 3 a 13, da 3 a 17, da 3 a 21, o da 3 a 31 atomi di carbonio, come alcossicarbonile C₁₋₆-acile C₁₋₆, alcossicarbonile C₁₋₁₀-acile C₁₋₁₀, o alcossicarbonile C₁₋₂₀-acile C₁₋₂₀). In alcuni casi, ciascun gruppo alcossi e alchile è ulteriormente sostituito indipendentemente con 1, 2, 3 o 4 sostituenti, come descritto qui (ad esempio, un gruppo idrossile) per ciascun gruppo.

[0401] Il termine "alcossicarbonilalcossi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alcossi, come definito nel presente contesto, che è sostituito con un gruppo alcossicarbonile, come definito nel presente contesto [ad esempio, -(O)-alchil-C(O)-OR, dove R


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

è un gruppo alchile C_{1-6} , C_{1-10} o C_{1-20} opzionalmente sostituito]. Gruppi eterociclicalchile non sostituiti esemplificativi sono da 3 a 41 atomi di carbonio (ad esempio da 3 a 10, da 3 a 13, da 3 a 17, da 3 a 21, da 3 a 31 atomi di carbonio, come alcossicarbonile C_{1-6} -alcossi C_{1-6} , alcossicarbonile C_{1-10} -alcossi C_{1-10} o alcossicarbonile C_{1-20} -alcossi C_{1-20}). In alcuni casi, ciascun
5 gruppo alcossi è ulteriormente sostituito indipendentemente con 1, 2, 3 o 4 sostituenti, come descritto qui (ad esempio, un gruppo idrossi).

[0402] Il termine "alcossicarbonilalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, che è sostituito con un gruppo alcossicarbonile, come definito nel presente contesto [ad esempio, -alchil-C(O)-OR, dove R è un
10 gruppo alchile C_{1-20} , C_{1-10} o C_{1-6} opzionalmente sostituito]. Gruppi alcossicarbonilalchile non sostituiti esemplificativi includono da 3 a 41 atomi di carbonio (ad esempio, da 3 a 10, da 3 a 13, da 3 a 17, da 3 a 21, o da 3 a 31 atomi di carbonio, come alcossicarbonile C_{1-6} -alchile C_{1-6} , alcossicarbonile C_{1-10} -alchile C_{1-10} , o alcossicarbonile C_{1-20} -alchile C_{1-20}). In alcuni casi, ciascun
15 gruppo alchile e alcossi viene ulteriormente sostituito indipendentemente con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come descritto nel presente contesto (ad esempio, un gruppo idrossi).

[0403] Il termine "alcossicarbonilalchenile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchenile, come definito nel presente contesto, che è sostituito con un gruppo alcossicarbonile, come definito nel presente contesto [ad esempio, -alchenil-C(O)-OR, dove R è un gruppo alchile C_{1-20} , C_{1-10} o C_{1-6} facoltativamente sostituito]. Gruppi alcossicarbonilalchenile
20 non sostituiti esemplificativi includono da 4 a 41 atomi di carbonio (ad esempio, da 4 a 10, da 4 a 13, da 4 a 17, da 4 a 21, o da 4 a 31 atomi di carbonio, come alcossicarbonile C_{1-6} -alchenile C_{2-6} , alcossicarbonile C_{1-10} -alchenile C_{2-10} , o alcossicarbonile C_{1-20} -alchenile C_{2-20}). In alcuni casi, ciascun gruppo alchile, alchenile e alcossi viene ulteriormente sostituito indipendentemente con
1, 2, 3 o 4 sostituenti come descritto nel presente contesto (ad esempio un gruppo idrossi).

25 **[0404]** Il termine "alcossicarbonilalchinile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

gruppo alchinile, come definito nel presente contesto, che è sostituito con un gruppo alcossicarbonile, come definito nel presente contesto [ad esempio, -alchinil-C(O)-OR, dove R è un gruppo alchile C₁₋₂₀, C₁₋₁₀ o C₁₋₆ facoltativamente sostituito]. Gruppi alcossicarbonilalchinile non sostituiti esemplificativi includono da 4 a 41 atomi di carbonio (ad esempio, da 4 a 10, da 4 a 13, da 4 a 17, da 4 a 21, o da 4 a 31 atomi di carbonio, come alcossicarbonile C₁₋₆-alchinile C₂₋₆, alcossicarbonile C₁₋₁₀-alchinile C₂₋₁₀ o alcossicarbonile C₁₋₂₀-alchinile C₂₋₂₀). In alcuni casi, ciascun gruppo alchile, alchinile e alcossi viene ulteriormente sostituito indipendentemente con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come descritto nel presente contesto (ad esempio un gruppo idrossi).

[0405] Il termine "alchile", come utilizzato nel presente contesto comprende sia i gruppi saturi a catena lineare che ramificata da 1 a 20 atomi di carbonio (ad esempio, da 1 a 10 o da 1 a 6), salvo diversamente specificato. I gruppi alchile sono esemplificati da metile, etile, n- e iso-propile, n-, sec-, iso- e terz-butile, neopentile e simili, e possono essere opzionalmente sostituiti con uno, due, tre o, nel caso di gruppi alchile di due o più atomi di carbonio, quattro sostituenti indipendentemente scelti dal gruppo costituito da: (1) alcossi C₁₋₆; (2) alchilsolfonile C₁₋₆; (3) ammino, come qui definito (ad esempio, ammino non sostituito (vale a dire, -NH₂) o un ammino sostituito [vale a dire, -N(R^{N1})₂, dove R^{N1} è come definito per ammino]; (4) arile C₆₋₁₀-alcossi C₁₋₆; (5) azido; (6) alo; (7) (C₂₋₉eterocicli)ossi; (8) idrossi, opzionalmente sostituito con un gruppo O-protettivo; (9) nitro; (10) osso (ad esempio carbossialdeide o acile); (11) spirociclile C₁₋₇; (12) tioalcossi; (13) tiolo; (14) -CO₂R^A, opzionalmente sostituito con un gruppo O-protettivo e dove R^A è selezionato dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₂₀ (ad esempio alchile C₁₋₆), (b) alchenile C₂₋₂₀ (ad esempio, alchenile C₂₋₆), (c) arile C₆₋₁₀, (d) idrogeno, (e) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀, (f) ammino-alchile C₁₋₂₀, (g) polietilenglicole di -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', in cui s1 è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s2 e s3, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C₁₋₂₀, e (h) amminopolietilenglicole di -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, in cui s1 è un numero


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, oppure da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è, indipendentemente, idrogeno o alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito; (15) $-C(O)NR^B R^C$, dove ciascuno di R^B e R^C è, indipendentemente, selezionato dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C_{1-6} , (c) arile C_{6-10} , e (d) alc C_{1-6} arile C_{6-10} ; (16) $-SO_2R^D$, dove R^D è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C_{1-6} , (b) arile C_{6-10} , (c) alc C_{1-6} arile C_{6-10} e (d) idrossi; (17) $-SO_2NR^E R^F$, dove ciascuno di R^E e R^F è, indipendentemente, selezionato dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C_{1-6} , (c) arile C_{6-10} e (d) alc C_{1-6} arile C_{6-10} ; (18) $-C(O)R^G$, dove R^G è selezionato dal gruppo costituito da (a) alchile C_{1-20} (ad esempio alchile C_{1-6}), (b) alchenile C_{2-20} (ad esempio, alchenile C_{2-6}), (c) arile C_{6-10} , (d) idrogeno, (e) alc C_{1-6} arile C_{6-10} , (f) ammino-alchile C_{1-20} , (g) polietilenglicole di $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$, in cui s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , e (h) amminopolietilenglicole di $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$, in cui s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, oppure da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è, indipendentemente, idrogeno o alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito; (19) $-NR^H C(O)R^I$, in cui R^H è scelto dal gruppo costituito da (a1) idrogeno e (b1) alchile C_{1-6} , e R^I è scelto dal gruppo costituito di (a2) alchile C_{1-20} (ad es. alchile C_{1-6}), (b2) alchenile C_{2-20} (ad es. alchenile C_{2-6}), (c2) arile C_{6-10} , (d2) idrogeno, (e2) alc C_{1-6} arile C_{6-10} , (f2) ammino-alchile C_{1-20} , (g2) polietilenglicole di $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$, dove s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , e (h2) amminopolietilenglicole di $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$, dove s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è indipendentemente idrogeno oppure alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito; (20) $-NR^J C(O)OR^K$, in cui R^J è scelto dal gruppo costituito da (a1) idrogeno e (b1) alchile C_{1-6} , e R^K è scelto dal gruppo costituito di (a2) alchile C_{1-20} (ad es. alchile C_{1-6}), (b2) alchenile C_{2-20} (ad es. alchenile C_{2-6}), (c2) arile C_{6-10} , (d2) idrogeno, (e2) alc C_{1-6} arile C_{6-10} , (f2) ammino-alchile C_{1-20} , (g2) polietilenglicole di $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, dove $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , e (h2) amminopolietilenglicole di $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, dove $s1$ è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di $s2$ e $s3$, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} indipendentemente, idrogeno oppure alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito: e (21) ammidina. In alcuni casi, ciascuno di questi gruppi può essere ulteriormente sostituito come descritto nel presente contesto. Ad esempio, il gruppo alchilene di un C_1 -alcarile può essere ulteriormente sostituito con un gruppo osso per fornire il rispettivo sostituito ariloile.

[0406] Il termine "alchilene", e il prefisso "alc-" come qui utilizzato, rappresenta un gruppo idrocarburo bivalente saturo derivato da un idrocarburo saturo a catena lineare o ramificata mediante la rimozione di due atomi di idrogeno, ed è esemplificato da metilene, etilene, isopropilene e simili. Il termine "alchilene C_{x-y} " e il prefisso "alc C_{x-y} " rappresentano gruppi alchilene aventi tra x e y atomi di carbonio. I valori esemplificativi per x sono 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e i valori esemplificativi per y sono 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 (ad esempio, alchilene C_{1-6} , C_{1-10} , C_{2-20} , C_{2-6} , C_{2-10} o C_{2-20}). In alcuni casi, l'alchilene può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito per un gruppo alchile.

[0407] Il termine "alchilsolfonile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un gruppo $-S(O)-$. Gruppi


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

alchilsolfinile non sostituiti esemplificativi sono da 1 a 6, da 1 a 10 o da 1 a 20 atomi di carbonio. In alcuni casi, il gruppo alchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito.

5 **[0408]** Il termine "alchilsolfinilalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo alchilsolfinile. Gruppi alchilsolfinilalchile non sostituiti esemplificativi sono da 2 a 12, da 2 a 20 o da 2 a 40 atomi di carbonio. In alcuni casi, ciascun gruppo alchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito.

10 **[0409]** Il termine "alchinile", come qui utilizzato, rappresenta gruppi monovalenti a catena lineare o ramificata da 2 a 20 atomi di carbonio (ad esempio, da 2 a 4, da 2 a 6, o da 2 a 10 atomi di carbonio) contenenti un triplo legame carbonio-carbonio ed è esemplificato da etinile, 1-propinile e simili. I gruppi alchinile possono essere opzionalmente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti che sono selezionati, indipendentemente, da arile, cicloalchile o eterociclice (ad esempio eteroarile), come qui definito, o uno qualsiasi dei gruppi sostituenti alchile esemplificativi qui
15 descritti.

[0410] Il termine "alchinilossi" rappresenta un sostituito chimico di formula -OR, dove R è un gruppo alchinile C₂₋₂₀ (ad esempio, alchinile C₂₋₆ o C₂₋₁₀), salvo diversamente specificato. Gruppi alchinilossi esemplificativi includono etinilossi, propinilossi e simili. In alcuni casi, il gruppo alchinile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito
20 (ad esempio, un gruppo idrossi).

[0411] Il termine "ammidina", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo —C(=NH)NH₂.

[0412] Il termine "ammino", come qui utilizzato, rappresenta —N(R^{N1})₂, in cui ciascun R^{N1} è, indipendentemente, H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, un gruppo N-protettivo,
25 alchile, alchenile, alchinile, alcossi, arile, alcarile, cicloalchile, alc-cicloalchile, carbossialchile


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(ad esempio, opzionalmente sostituito con un gruppo O-protettivo, come gruppi arilalcoossicarbonile facoltativamente sostituiti o qualsiasi descritto nel presente contesto), solfoalchile, acile (ad esempio acetile, trifluoroacetile o altri qui descritti), alcoossicarbonilalchile (ad esempio, opzionalmente sostituito con un gruppo O-protettivo, come gruppi arilalcoossicarbonile opzionalmente sostituiti o qualsiasi descritto nel presente contesto), eterociclile (ad esempio eteroarile) o alcheterociclile (ad esempio alcheteroarile), in cui ciascuno di questi gruppi R^{N1} recitati possono essere opzionalmente sostituiti, come qui definito per ciascun gruppo; o due R^{N1} si combinano per formare un eterociclile o un gruppo N-protettivo, e in cui ciascun R^{N2} è, indipendentemente, H, alchile o arile. I gruppi ammino della descrizione possono essere un ammino non sostituito (vale a dire, $-NH_2$) o un ammino sostituito [vale a dire, $-N(R^{N1})_2$]. In una forma di realizzazione preferita, l'ammino è $-NH_2$ o $-NHR^{N1}$, in cui R^{N1} è, indipendentemente, OH, NO_2 , NH_2 , NR^{N2} , SO_2OR^{N2} , SO_2R^{N2} , SOR^{N2} , alchile, carbossialchile, solfoalchile, acile (ad esempio acetile, trifluoroacetile o altri qui descritti), alcoossicarbonilalchile (ad esempio t-butossicarbonilalchile) o arile, e ciascun R^{N2} può essere H, alchile C_{1-20} (ad esempio alchile C_{1-6}), o arile C_{6-10} .

[0413] Il termine "amminoacido", come descritto nel presente contesto, si riferisce a una molecola avente una catena laterale, un gruppo ammino e un gruppo acido (ad esempio, un gruppo carbossile di $-CO_2H$ o un gruppo solfo di $-SO_3H$), in cui l'amminoacido è attaccato al gruppo molecolare progenitore dalla catena laterale, dal gruppo ammino o dal gruppo acido (ad esempio, la catena laterale). In alcuni casi, l'amminoacido è attaccato al gruppo molecolare originario mediante un gruppo carbonile, dove la catena laterale o il gruppo ammino è attaccato al gruppo carbonile. Catene laterali esemplificative includono un alchile, arile, eterociclile, alcarile, alcheterociclile, amminoalchile, carbamoilalchile e carbossialchile facoltativamente sostituiti. Amminoacidi esemplificativi includono alanina, arginina, asparagina, acido aspartico, cisteina, acido glutammico, glutamina, glicina, istidina, idrossinorvalina, isoleucina, leucina, lisina,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

metionina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, pirrolisina, selenocisteina, serina, taurina, treonina, triptofano, tirosina e valina. I gruppi di amminoacidi possono essere opzionalmente sostituiti con uno, due, tre o, nel caso di gruppi di amminoacidi di due o più atomi di carbonio, quattro sostituenti scelti indipendentemente dal gruppo costituito da: (1) alcossi C₁₋₆; (2) 5 alchilsolfonile C₁₋₆; (3) ammino, come qui definito (ad esempio, ammino non sostituito (vale a dire, -NH₂) o un ammino sostituito [vale a dire, -N(R^{NI})₂, dove R^{NI} è come definito per ammino]; (4) arile C₆₋₁₀-alcossi C₁₋₆; (5) azido; (6) alo; (7) (C₂₋₉eterocicli)ossi; (8) idrossi; (9) nitro; (10) osso (ad esempio carbossilaldeide o acile); (11) spirocicli C₁₋₇; (12) tioalcossi; (13) tiolo; (14) -CO₂R^A, dove R^A è selezionato dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₂₀ (ad esempio alchile C₁₋₆), 10 (b) alchenile C₂₋₂₀ (ad esempio, alchenile C₂₋₆), (c) arile C₆₋₁₀, (d) idrogeno, (e) alc C₁₋₆ arile C₆₋₁₀, (f) ammino-alchile C₁₋₂₀, (g) polietilenglicole di -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', in cui s1 è un numero intero da 1 a 10 (ad esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s2 e s3, indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C₁₋₂₀, e (h) amminopolietilenglicole di -NR^{NI}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{NI}, in cui s1 15 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s2 e s3, indipendentemente, è un intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, oppure da 1 a 10), e ciascun R^{NI} è, indipendentemente, idrogeno o alchile C₁₋₆ opzionalmente sostituito; (15) -C(O)NR^BR^C, dove ciascuno di R^B e R^C è, indipendentemente, selezionato dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C₁₋₆, (c) arile C₆₋₁₀, e (d) alc C₁₋₆ arile C₆₋₁₀; (16) -SO₂R^D, dove R^D è scelto dal gruppo 20 costituito da (a) alchile C₁₋₆, (b) arile C₆₋₁₀, (c) alc C₁₋₆ arile C₆₋₁₀ e (d) idrossi; (17) -SO₂NR^ER^F, dove ciascuno di R^E e R^F è, indipendentemente, selezionato dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C₁₋₆, (c) arile C₆₋₁₀ e (d) alc C₁₋₆ arile C₆₋₁₀; (18) -C(O)R^G, dove R^G è selezionato dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₂₀ (ad esempio alchile C₁₋₆), (b) alchenile C₂₋₂₀ (ad esempio, alchenile C₂₋₆), (c) arile C₆₋₁₀, (d) idrogeno, (e) alc C₁₋₆ arile C₆₋₁₀, (f) ammino-alchile C₁₋₂₀, (g) 25 polietilenglicole di -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', in cui s1 è un numero intero da 1 a 10 (ad


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

esempio da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , e (h) amminopolietilenglicole di $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, in cui s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, oppure da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è, indipendentemente, idrogeno o alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito; (19) $-NR^H C(O)R^I$, in cui R^H è scelto dal gruppo costituito da (a1) idrogeno e (b1) alchile C_{1-6} , e R^I è scelto dal gruppo costituito di (a2) alchile C_{1-20} (ad es. alchile C_{1-6}), (b2) alchenile C_{2-20} (ad es. alchenile C_{2-6}), (c2) arile C_{6-10} , (d2) idrogeno, (e2) alc C_{1-6} arile C_{6-10} , (f2) ammino-alchile C_{1-20} , (g2) polietilenglicole di $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, dove s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , e (h2) amminopolietilenglicole di $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, dove s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} è indipendentemente idrogeno oppure alchile C_{1-6} opzionalmente sostituito; (20) $-NR^J C(O)OR^K$, in cui R^J è scelto dal gruppo costituito da (a1) idrogeno e (b1) alchile C_{1-6} , e R^K è scelto dal gruppo costituito di (a2) alchile C_{1-20} (ad es. alchile C_{1-6}), (b2) alchenile C_{2-20} (ad es. alchenile C_{2-6}), (c2) arile C_{6-10} , (d2) idrogeno, (e2) alc C_{1-6} arile C_{6-10} , (f2) ammino-alchile C_{1-20} , (g2) polietilenglicole di $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, dove s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e R' è H o alchile C_{1-20} , e (h2) amminopolietilenglicole di $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, dove s_1 è un numero intero da 1 a 10 (ad es. da 1 a 6 o da 1 a 4), ciascuno di s_2 e s_3 , indipendentemente, è un numero intero da 0 a 10 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 6, da 1 a 4, da 1 a 6, o da 1 a 10), e ciascun R^{N1} indipendentemente, idrogeno oppure alchile


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

C₁₋₆ opzionalmente sostituito: e (21) ammidina. In alcuni casi, ciascuno di questi gruppi può essere ulteriormente sostituito come descritto nel presente contesto.

5 [0414] Il termine "amminoalcoosi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alcoosi, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo ammino, come definito nel presente contesto. L'alchile e l'ammino ciascuno possono essere ulteriormente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui per il rispettivo gruppo (ad esempio CO₂R^{A'}, dove R^{A'} è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₆, (b) arile C₆₋₁₀, (c) idrogeno e (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀, ad esempio carbossi).

10 [0415] Il termine "amminoalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo ammino, come definito nel presente contesto. L'alchile e l'ammino ciascuno possono essere ulteriormente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui per il rispettivo gruppo (ad esempio CO₂R^{A'}, dove R^{A'} è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₆, (b) arile C₆₋₁₀, (c) idrogeno e (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀, ad esempio carbossi e/o un gruppo *N*-protettivo).

15 [0416] Il termine "amminoalchenile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchenile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo ammino, come definito nel presente contesto. L'alchenile e l'ammino ciascuno possono essere ulteriormente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui per il rispettivo gruppo (ad esempio CO₂R^{A'}, dove R^{A'} è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₆, (b) arile C₆₋₁₀, (c) idrogeno e
20 (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀, ad esempio carbossi e/o un gruppo *N*-protettore).

[0417] Il termine "amminoalchinile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchinile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo ammino, come definito nel presente contesto. L'alchinile e l'ammino ciascuno possono essere ulteriormente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui per il rispettivo gruppo (ad esempio
25 CO₂R^{A'}, dove R^{A'} è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₆, (b) arile C₆₋₁₀, (c) idrogeno e


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀, ad esempio carbossi e/o un gruppo *N*-protettivo).

[0418] Il termine "arile", come usato qui, rappresenta un sistema ad anello carbociclico mono-,
biciclico o multiciclico avente uno o due anelli aromatici ed è esemplificato da fenile, naftile, 1,2-
diidronaftile, 1,2,3,4-tetraidronaftile, antracene, fenantrene, fluorene, indanile, indenile e
5 simili, e può essere opzionalmente sostituito con 1, 2, 3, 4 o 5 sostituenti indipendentemente scelti
dal gruppo costituito da: (1) acile C₁₋₇ (ad esempio, carbossialdeide); (2) alchile C₁₋₂₀ (ad esempio,
alchile C₁₋₆, alcossi C₁₋₆-alchile C₁₋₆, alchilsolfinile C₁₋₆-alchile C₁₋₆, ammino-alchile C₁₋₆, azido-
alchile C₁₋₆, (carbossialdeide)-alchile C₁₋₆, alogeno-alchile C₁₋₆ (ad esempio, perfluoroalchile),
idrossi-alchile C₁₋₆, nitro-alchile C₁₋₆ o tioalcossi C₁₋₆-alchile C₁₋₆); (3) alcossi C₁₋₂₀ (ad esempio,
10 alcossi C₁₋₆, come perfluoroalcossi); (4) alchilsolfinile C₁₋₆; (5) arile C₆₋₁₀; (6) ammino; (7) alc C₁₋₆-
arile C₆₋₁₀; (8) azido; (9) cicloalchile C₃₋₈; (10) alc C₁₋₆-cicloalchile C₃₋₈; (11) alogeno; (12)
eterociclice C₁₋₁₂ (ad esempio, eteroarile C₁₋₁₂); (13) (eterociclice C₁₋₁₂)ossi; (14) idrossi; (15) nitro;
(16) tioalcossi C₁₋₂₀ (ad esempio, tioalcossi C₁₋₆); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$, dove q è un numero intero
da zero a quattro, e R^A è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₆, (b) arile C₆₋₁₀, (c) idrogeno,
15 e (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀; (18) $-(CH_2)_qCONR^BR^C$, dove q è un numero intero da zero a quattro e
dove R^B e R^C sono indipendentemente scelti dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C₁₋₆,
(c) arile C₆₋₁₀, e (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$, dove q è un numero intero da zero
a quattro e dove R^D è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile, (b) arile C₆₋₁₀ e (c) alc-arile C₆₋₁₀;
(20) $-(CH_2)_qSO_2NR^ER^F$, dove q è un numero intero da zero a quattro e dove ciascuno tra R^E e
20 R^F è, indipendentemente, scelto dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C₁₋₆, (c) arile C₆₋₁₀,
e (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀; (21) tiolo; (22) arilossi C₆₋₁₀; (23) cicloalcossi C₃₋₈; (24) arile C₆₋₁₀-
alcossi C₁₋₆; (25) alc C₁₋₆-eterociclice C₁₋₁₂ (ad esempio, alc C₁₋₆-eteroarile C₁₋₁₂); (26) alchenile
C₂₋₂₀; e (27) alchinile C₂₋₂₀. In alcuni casi, ciascuno di questi gruppi può essere ulteriormente
sostituito come descritto nel presente contesto. Ad esempio, il gruppo alchilene di un alcarile-C₁
25 o di un alcheterociclice-C₁ può essere ulteriormente sostituito con un gruppo osso per fornire il


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

rispettivo gruppo sostituyente ariloile ed (eterocicli)oile.

[0419] Il termine "arilalcoffi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alcarilico, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso un atomo di ossigeno. Gruppi arilalcoffi non sostituiti esemplificativi includono da 7 a 5 30 atomi di carbonio (ad esempio, da 7 a 16 o da 7 a 20 atomi di carbonio, come arile C₆₋₁₀-alcoffi C₁₋₆, arile C₆₋₁₀-alcoffi C₁₋₁₀, o arile C₆₋₁₀-alcoffi C₁₋₂₀). In alcuni casi, il gruppo arilalcoffi può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui definito

[0420] Il termine "arilalcofficarbonile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo arilalcoffi, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare 10 progenitore attraverso un carbonile (ad esempio, -C(O)-O-alchil-arile). Gruppi arilalcoffi non sostituiti esemplificativi includono da 8 a 31 atomi di carbonio (ad esempio da 8 a 17 o da 8 a 21 atomi di carbonio, come arile C₆₋₁₀-alcoffi-carbonile C₁₋₆, arile C₆₋₁₀-alcoffi-carbonile C₁₋₁₀, o arile C₆₋₁₀-alcoffi-carbonile C₁₋₂₀). In alcuni casi, il gruppo arilalcofficarbonile può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui definito.

15 [0421] Il termine "arilossi" rappresenta un sostituyente chimico di formula -OR', dove R' è un gruppo arile di casi da 6 a 18 atomi di carbonio, salvo diversamente specificato. In alcuni casi, il gruppo arile può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui definito.

[0422] Il termine "ariloile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo arile, come definito nel presente contesto, che è attaccato al gruppo molecolare progenitore attraverso 20 un gruppo carbonile. I gruppi ariloile non sostituiti esemplificativi hanno da 7 a 11 atomi di carbonio. In alcuni casi, il gruppo arile può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui definito.

[0423] Il termine "azido" rappresenta un gruppo —N₃, che può anche essere rappresentato come -N=N=N.

25 [0424] Il termine "biciclico", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a una struttura


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

avente due anelli, che possono essere aromatici o non aromatici. Le strutture bicicliche includono gruppi spirocicliche, come qui definiti, e due anelli che condividono uno o più ponti, dove tali ponti possono includere un atomo o una catena comprendente due, tre o più atomi. Gruppi biciclici esemplificativi includono un gruppo carbociclice biciclico, dove il primo e il secondo anello sono

5 gruppi carbocicliche, come qui definito; un gruppo arile biciclico, in cui il primo e il secondo anello sono gruppi arile, come qui definito; gruppi eterocicliche biciclici, dove il primo anello è un gruppo eterociclice e il secondo anello è un gruppo carbociclice (ad esempio arile) o eterociclice (ad esempio eteroarile); e gruppi eteroarile biciclici, dove il primo anello è un gruppo eteroarile e il secondo anello è un gruppo carbociclice (ad esempio arile) o eterociclice (ad esempio eteroarile).

10 In alcuni casi, il gruppo biciclico può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come qui definito per gruppi cicloalchile, eterocicliche e arile.

[0425] Il termine "boranile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta $\text{—B(R}^{\text{B1}}\text{)}_3$, dove ogni R^{B1} è, indipendentemente, selezionato dal gruppo costituito da H e alchile opzionalmente sostituito. In alcuni casi, il gruppo boranile può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti come

15 qui definito per alchile.

[0426] I termini "carbociclico" e "carbociclice", come utilizzati nel presente contesto, si riferiscono a una struttura C_{3-12} monociclica, biciclica o tricyclica facoltativamente sostituita in cui gli anelli, che possono essere aromatici o non aromatici, sono formati da atomi di carbonio. Le strutture carbocicliche includono gruppi cicloalchile, cicloalchenile e arile.

20 [0427] Il termine "carbamoile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta $\text{—C(O)—N(R}^{\text{N1}}\text{)}_2$, dove il significato di ciascun R^{N1} si trova nella definizione di "ammino" fornita nel presente contesto.

[0428] Il termine "carbamoilalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo carbamoile, come definito

25 nel presente contesto. Il gruppo alchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sostituenti come descritto qui.

[0429] Il termine "carbamide", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a un gruppo carbammato avente la struttura $-NR^{N1}C(=O)OR$ oppure $-OC(=O)N(R^{N1})_2$, dove il significato di ciascun R^{N1} si trova nella definizione di "ammino" qui fornita, e R è alchile, cicloalchile, alccicloalchile, arile, alcarile, eterociclice (ad esempio eteroarile) o alcheterociclice (ad esempio alcheteroarile), come qui definito.

[0430] Il termine "carbonile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo $C(O)$, che può anche essere rappresentato come $C=O$.

[0431] Il termine "carbossialdeide" rappresenta un gruppo acile avente la struttura $-CHO$.

10 [0432] Il termine "carbossilico", come utilizzato nel presente contesto, significa $-CO_2H$.

[0433] Il termine "carbossialcossi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alcossi, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo carbossi, come definito nel presente contesto. Il gruppo alcossile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui per il gruppo alchile, e il gruppo carbossile può essere
15 opzionalmente sostituito con uno o più gruppi O-protettivi.

[0434] Il termine "carbossialchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo carbossi, come definito nel presente contesto. Il gruppo alchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui descritto, e il gruppo carbossile può essere facoltativamente sostituito con
20 uno o più gruppi O-protettivi.

[0435] Il termine "carbossiamminoalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo amminoalchile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo carbossi, come definito nel presente contesto. Il carbossile, l'alchile e l'ammino ciascuno possono essere ulteriormente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui per il rispettivo gruppo
25 (ad esempio CO_2R^A , dove R^A è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C_{1-6} , (b) arile C_{6-10} , (c)


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

idrogeno e (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀, ad esempio carbossi e/o un gruppo *N*-protettivo, e/o un gruppo *O*-protettivo).

[0436] Il termine "ciano", come usato nel presente contesto, rappresenta un gruppo -CN.

5 [0437] Il termine "cicloalossi" rappresenta un sostituente chimico di formula -OR, dove R è un gruppo cicloalchilico C₃₋₈, come definito nel presente contesto, salvo diversamente specificato. Il gruppo cicloalchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui. Gruppi cicloalossi non sostituiti esemplificativi sono da 3 a 8 atomi di carbonio. In
10 alcuni casi, il gruppo cicloalchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui descritto.

[0438] Il termine "cicloalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo idrocarburico ciclico non aromatico monovalente saturo o insaturo da tre a otto atomi di carbonio, se non diversamente specificato, ed è esemplificato da ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile, cicloeptile, eptile biciclico e simili. Quando il gruppo cicloalchile include un doppio
15 legame carbonio-carbonio, il gruppo cicloalchile può essere indicato come un gruppo "cicloalchenile". Gruppi cicloalchenile esemplificativi includono ciclopentenile, cicloesenile e simili. I gruppi cicloalchilici della presente descrizione possono essere opzionalmente sostituiti con: (1) acile C₁₋₇ (ad esempio, carbossialdeide); (2) alchile C₁₋₂₀ (ad esempio, alchile C₁₋₆, alcossi C₁₋₆-alchile C₁₋₆, alchilsolfinile C₁₋₆-alchile C₁₋₆, ammino-alchile C₁₋₆, azido-alchile C₁₋₆,
20 (carbossialdeide)-alchile C₁₋₆, alogeno-alchile C₁₋₆ (ad esempio, perfluoroalchile), idrossi-alchile C₁₋₆, nitro-alchile C₁₋₆ o tioalossi C₁₋₆-alchile C₁₋₆); (3) alcossi C₁₋₂₀ (ad esempio, alcossi C₁₋₆, come perfluoroalcossi); (4) alchilsolfinile C₁₋₆; (5) arile C₆₋₁₀; (6) ammino; (7) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀; (8) azido; (9) cicloalchile C₃₋₈; (10) alc C₁₋₆-cicloalchile C₃₋₈; (11) alogeno; (12) eterociclile C₁₋₁₂ (ad esempio, eteroarile C₁₋₁₂); (13) (eterociclile C₁₋₁₂)ossi; (14) idrossi; (15) nitro; (16) tioalossi
25 C₁₋₂₀ (ad esempio, tioalossi C₁₋₆); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$, dove q è un numero intero da zero a


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

quattro, e R^A è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C_{1-6} , (b) arile C_{6-10} , (c) idrogeno, e (d) alc C_{1-6} -arile C_{6-10} ; (18) $-(CH_2)_qCONR^B R^C$, dove q è un numero intero da zero a quattro e dove R^B e R^C sono indipendentemente scelti dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C_{6-10} , (c) arile C_{6-10} , e (d) alc C_{1-6} -arile C_{6-10} ; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$, dove q è un numero intero da zero a quattro e dove R^D è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C_{6-10} , (b) arile C_{6-10} e (c) alc C_{1-6} -arile C_{6-10} ; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^E R^F$, dove q è un numero intero da zero a quattro e d dove ciascuno tra R^E e R^F è, indipendentemente, scelto dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C_{6-10} , (c) arile C_{6-10} , e (d) alc C_{1-6} -arile C_{6-10} ; (21) tiolo; (22) arilossi C_{6-10} ; (23) cicloalcoisi C_{3-8} ; (24) arile C_{6-10} -alcoisi C_{1-6} ; (25) alc C_{1-6} -eterocicliche C_{1-12} (ad esempio, alc C_{1-6} -eteroarile C_{1-12}); (26) osso; (27) alchenile C_{2-20} ; e (28) alchinile C_{2-20} . In alcuni casi, ciascuno di questi gruppi può essere ulteriormente sostituito come descritto nel presente contesto. Ad esempio, il gruppo alchilene di un alcarile- C_1 o di un alcheterocicliche- C_1 può essere ulteriormente sostituito con un gruppo osso per fornire il rispettivo gruppo sostituito ariloile ed (eterociclico)ole.

[0439] Il termine "diastereomero", come usato nel presente contesto, indica stereoisomeri che non sono immagini speculari l'uno dell'altro e non sono sovrapponibili l'uno all'altro.

[0440] Il termine "quantità efficace" di un agente, come usato nel presente contesto, è quella quantità sufficiente per ottenere risultati benefici o desiderati, ad esempio risultati clinici, e, come tale, una "quantità efficace" dipende dal contesto in cui viene applicato. Ad esempio, nel contesto della somministrazione di un agente che tratta il cancro, una quantità efficace di un agente è, ad esempio, una quantità sufficiente per ottenere il trattamento, come definito nel presente documento, del cancro, rispetto alla risposta ottenuta senza somministrazione dell'agente.

[0441] Il termine "enantiomero", come usato nel presente contesto, indica ogni singola forma otticamente attiva di un composto della descrizione, avente una purezza ottica o un eccesso enantiomerico (come determinato dai metodi standard della tecnica) di almeno l'80% (vale a dire, almeno il 90% di un enantiomero e al massimo il 10% dell'altro enantiomero), preferibilmente


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

almeno il 90% e più preferibilmente almeno il 98%.

[0442] Il termine "alo", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un alogeno selezionato tra bromo, cloro, iodio o fluoro.

[0443] Il termine "aloalcoosi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo
5 alcoosi, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo alogeno (vale a dire, F, Cl, Br o I). Un aloalcoosi può essere sostituito con uno, due, tre o, nel caso di gruppi alchile di due o più atomi di carbonio, quattro alogeni. I gruppi aloalcoosi includono perfluoroalcoosi (ad esempio, -OCF₃), -OCHF₂, -OCH₂F, -OCCl₃, -OCH₂CH₂Br, -OCH₂CH(CH₂CH₂Br)CH₃, e -OCHICH₃. In
alcuni casi, il gruppo aloalcoosi può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi
10 sostituenti come descritto qui per i gruppi alchile.

[0444] Il termine "aloalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo
alchile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo alogeno (vale a dire, F, Cl,
Br o I). Un aloalchile può essere sostituito con uno, due, tre o, nel caso di gruppi alchile di due o
più atomi di carbonio, quattro alogeni. I gruppi aloalchile includono perfluoroalchili (ad esempio,
15 -CF₃), -CHF₂, -CH₂F, -CCl₃, -CH₂CH₂Br, -CH₂CH(CH₂CH₂Br) CH₃, e -CHICH₃. In alcuni casi,
il gruppo aloalchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come
descritto qui per i gruppi alchile.

[0445] Il termine "eteroalchilene", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a un gruppo
alchilene, come definito nel presente contesto, in cui uno o due degli atomi di carbonio costituenti
20 sono stati sostituiti ciascuno da azoto, ossigeno o zolfo. In alcuni casi, il gruppo eteroalchilene
può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come descritto qui per i gruppi
alchilene.

[0446] Il termine "eteroarile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta quel sottoinsieme
di eterocicli, come definito nel presente contesto, che sono aromatici: vale a dire, contengono
25 $4n + 2$ pi elettroni all'interno del sistema di anelli mono o multicyclico. Gruppi eteroarile non


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sostituiti esemplificativi sono da 1 a 12 (ad esempio, da 1 a 11, da 1 a 10, da 1 a 9, da 2 a 12, da 2 a 11, da 2 a 10 o da 2 a 9). In alcuni casi, l'eteroarile è sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come definito per un gruppo eterociclice.

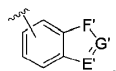
[0447] Il termine "eterociclice", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un anello a 5, 6 o 7 elementi, salvo diversamente specificato, contenente uno, due, tre o quattro eteroatomi selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da azoto, ossigeno, e zolfo. L'anello a 5 elementi ha da zero a due doppi legami e gli anelli a 6 e 7 membri hanno da zero a tre doppi legami. Gruppi eterociclici non sostituiti esemplificativi sono da 1 a 12 (ad esempio, da 1 a 11, da 1 a 10, da 1 a 9, da 2 a 12, da 2 a 11, da 2 a 10 o da 2 a 9). Il termine "eterociclice" rappresenta anche un composto eterociclico avente una struttura multiciclica a ponte in cui uno o più atomi di carbonio e/o eteroatomi collegano due membri non adiacenti di un anello monociclico, ad esempio un gruppo chinuclidinile. Il termine "eterociclice" include gruppi biciclici, tricyclici e tetracyclici in cui uno qualsiasi degli anelli eterociclici di cui sopra è fuso con uno, due o tre anelli carbociclici, ad esempio un anello arile, un anello cicloesano, un anello cicloesene, un anello ciclopentano, un anello ciclopentene, o un altro anello eterociclico monociclico, come indolile, chinolile, isochinolile, tetraidrochinolile, benzofurile, benzotriazinile e simili. Esempi di eterociclici fusi includono tropani e 1,2,3,5,8,8a-esaidroindolizina. Eterociclici includono pirrolile, pirrolidinile, pirazolile, pirazolinile, pirazolidinile, imidazolile, imidazolinile, imidazolidinile, piridile, piperidinile, omopiperidinile, pirazinile, piperazinile, pirimidinile, piridazinile, ossazolile, ossazolidinile, isossazolile, isossazolidinile, morfolinile, tiomorfolinile, tiazolile, tiazolidinile, isotiazolile, isotiazolidinile, indolile, indazolile, chinolile, isochinolile, chinossalile, diidrochinossalinile, chinazolinile, cinnolinile, ftalazinile, benzimidazolile, benzotiazolile, benzossazolile, benzotiadiazolile, furile, tienile, tiazolidinile, isotiazolile, triazolike, tetrazolile, ossadiazolile (ad esempio, 1,2,3-ossadiazolile), purinile, tiadiazolile (ad esempio 1,2,3-tiadiazolile), tetraidrofurano, diidrofuranile, tetraidrotinile, diidrotinile,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

diidroindolile, diidrochinolile, tetraidrochinolile, tetraidroisochinolile, diidroisochinolile, piranile, diidropiranile, ditiazolile, benzofuranile, isobenzofuranile e simili, incluse forme diidro e tetraidro di questi, in cui uno o più doppi legami sono ridotti e sostituiti con atomi di idrogeno. Ancora altri eterociclici esemplificativi includono: 2,3,4,5-tetraidro-2-osso-ossazolile; 2,3-diidro-
5 2-osso-1H-imidazolile; 2,3,4,5-tetraidro-5-osso-1H-pirazolile (ad esempio, 2,3,4,5-tetraidro-2-fenil-5-osso-1H-pirazolile); 2,3,4,5-tetraidro-2,4-diosso-1H-imidazolile (ad esempio, 2,3,4,5-tetraidro-2,4-diosso-5-metil-5-fenil-1H-imidazolile); 2,3-diidro-2-tiosso-1,3,4-ossadiazolile (ad esempio, 2,3-diidro-2-tiosso-5-fenil-1,3,4-ossadiazolile); 4,5-diidro-5-osso-1H-triazolile (ad esempio, 4,5-diidro-3-metil-4-amino 5-osso-1H-triazolile); 1,2,3,4-tetraidro-2,4-diossopiridinile
10 (ad esempio, 1,2,3,4-tetraidro-2,4-diosso-3,3-dietilpiridinile); 2,6-diosso-piperidinile (ad esempio, 2,6-diosso-3-etil-3-fenilpiperidinile); 1,6-diidro-6-ossopiridiminile; 1,6-diidro-4-ossopirimidinile (ad esempio, 2-(metiltio)-1,6-diidro-4-osso-5-metilpirimidin-1-ile); 1,2,3,4-tetraidro-2,4-diossopirimidinile (ad esempio, 1,2,3,4-tetraidro-2,4-diosso-3-etilpirimidinile); 1,6-diidro-6-osso-piridazinile (ad esempio, 1,6-diidro-6-osso-3-etilpiridazinile); 1,6-diidro-6-osso-
15 1,2,4-triazinile (ad esempio, 1,6-diidro-5-isopropil-6-osso-1,2,4-triazinile); 2,3-diidro-2-osso-1H-indolile (ad esempio, 3,3-dimetil-2,3-diidro-2-osso-1H-indolile e 2,3-diidro-2-osso-3,3'-spiropropan-1H-indol-1-ile); 1,3-diidro-1-osso-2H-iso-indolile; 1,3-diidro-1,3-diosso-2H-iso-indolile; 1H-benzopirazolile (ad esempio, 1-(etossicarbonil)-1H-benzopirazolile); 2,3-diidro-2-osso-1H-benzimidazolile (ad esempio, 3-etil-2,3-diidro-2-osso-1H-benzimidazolile); 2,3-diidro-
20 2-osso-benzossazolile (ad esempio, 5-chloro-2,3-diidro-2-osso-benzossazolile); 2,3-diidro-2-osso-benzossazolile; 2-osso-2H-benzopiranile; 1,4-benzodiossanile; 1,3-benzodiossanile; 2,3-diidro-3-osso,4H-1,3-benzotiazinile; 3,4-diidro-4-osso-3H-chinazolinile (ad esempio, 2-metil-3,4-diidro-4-osso-3H-quinazolinile); 1,2,3,4-tetraidro-2,4-diosso-3H-chinazolile (ad esempio, 1-etil-1,2,3,4-tetraidro-2,4-diosso-3H-quinazolile); 1,2,3,6-tetraidro-2,6-diosso-7H-purinile (ad
25 esempio, 1,2,3,6-tetraidro-1,3-dimetil-2,6-diosso-7 H -purinile); 1,2,3,6-tetraidro-2,6-diosso-


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

1 H -purinile (ad esempio, 1,2,3,6-tetraidro-3,7-dimetil-2,6-diosso-1 H -purinile); 2-
ossobenz[c,d]indolile; 1,1-diosso-2H-naft[1,8-c,d]isotiazolile; e 1,8-naftilendicarbossamido.
Ulteriori eterociclici includono 3,3a,4,5,6,6a-esaidro-pirrolo[3,4-b]pirrolo-(2H)-ile, e 2,5-
diazabicciclo[2.2.1]eptan-2-ile, omopiperazinile (o diazepanile), tetraidropiranile, ditiazolile,
5 benzofuranile, benzotinile, ossepanile, tiepanile, azocanile, ossecanile e tiocanile. I gruppi
eterociclici includono anche i gruppi della formula



dove

[0448] E' è scelto dal gruppo costituito da -N- e -CH-; F' è scelto dal gruppo costituito da -N=CH-
10 , -NH-CH₂-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -
CH₂O-, -OCH₂-, -O- e -S-; e G' è scelto dal gruppo costituito da -CH- e -N-. Uno qualsiasi dei
gruppi eterociclici menzionati nel presente contesto può essere opzionalmente sostituito con uno,
due, tre, quattro o cinque sostituenti selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da: (1)
acile C₁₋₇ (ad esempio, carbossialdeide); (2) alchile C₁₋₂₀ (ad esempio, alchile C₁₋₆, alcossi C₁₋₆-
15 alchile C₁₋₆, alchilsolfonile C₁₋₆-alchile C₁₋₆, ammino-C₁₋₆ alchile, azido-alchile C₁₋₆,
(carbossialdeide)-alchile C₁₋₆, alo-alchile C₁₋₆ (ad esempio, perfluoroalchile), idrossi-alchile C₁₋₆,
nitro-alchile C₁₋₆, o tioalcossi C₁₋₆-alchile C₁₋₆); (3) alcossi C₁₋₂₀ (ad esempio, alcossi C₁₋₆, come
perfluoroalcossi); (4) C₁₋₆ alchilsolfinile; (5) arile C₆₋₁₀; (6) ammino; (7) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀; (8)
azido; (9) cicloalchile C₃₋₈; (10) alc C₁₋₆-cicloalchile C₃₋₈; (11) alogeno; (12) eterociclice C₁₋₁₂ (ad
20 esempio, eteroarile C₂₋₁₂); (13) (eterociclice C₁₋₁₂)ossi; (14) idrossi; (15) nitro; (16) tioalcossi C₁-
20 (ad esempio, tioalcossi C₁₋₆); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, dove q è un numero intero da zero a quattro,
e R^{A'} è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C₁₋₆, (b) arile C₆₋₁₀, (c) idrogeno, e (d) alc C₁₋₆-
arile C₆₋₁₀; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}, dove q è un numero intero da zero a quattro e dove R^{B'} e R^{C'}
sono indipendentemente scelti dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C₁₋₆, (c) arile C₆-
25 10, e (d) alc C₁₋₆-arile C₆₋₁₀; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'}, dove q è un numero intero da zero a quattro e

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

dove $R^{D'}$ è scelto dal gruppo costituito da (a) alchile C_{1-6} , (b) arile C_{6-10} , e (c) alc C_{1-6} -arile C_{6-10} ;
(20) $-(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$, dove q è un numero intero da zero a quattro e dove ciascuno tra $R^{E'}$ e $R^{F'}$
è, indipendentemente, scelto dal gruppo costituito da (a) idrogeno, (b) alchile C_{1-6} , (c) arile C_{6-10} ,
e (d) alc C_{1-6} -arile C_{6-10} ; (21) tiolo; (22) arilossi C_{6-10} ; (23) cicloalcooli C_{3-8} ; (24) arilalcooli; (25)
5 alc C_{1-6} - C_{1-12} eterocicliche (ad esempio, alc C_{1-6} -eteroarile C_{1-12}); (26) osso; (27) (eterocicliche C_{1-12})
immino; (28) alchenile C_{2-20} ; e (29) alchinile C_{2-20} . In alcuni casi, ciascuno di questi gruppi può
essere ulteriormente sostituito come descritto nel presente contesto. Ad esempio, il gruppo
alchilene di un alcarile- C_1 o di un alcheterocicliche- C_1 può essere ulteriormente sostituito con un
gruppo osso per fornire il rispettivo gruppo sostituito ariloile ed (eterocicliche)ole.

10 **[0449]** Il termine "(eterocicliche)immino", come usato nel presente contesto, rappresenta un gruppo
eterocicliche, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore
attraverso un gruppo immino. In alcune forme di realizzazione, il gruppo eterocicliche può essere
sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito.

15 **[0450]** Il termine "(eterocicliche)ossi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo
eterocicliche, come definito nei casi del presente contesto, attaccato al gruppo molecolare
progenitore attraverso un atomo di ossigeno. In alcuni casi, il gruppo eterocicliche può essere
sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito.

20 **[0451]** Il termine "(eterocicliche)ole", come usato nel presente contesto, rappresenta un gruppo
eterocicliche, come definito nel presente contesto, attaccato al gruppo molecolare progenitore
attraverso un gruppo carbonile. In alcuni casi, il gruppo eterocicliche può essere sostituito con 1, 2,
3 o 4 gruppi sostituenti come qui definito.

[0452] Il termine "idrocarburo", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo
costituito solo da atomi di carbonio e idrogeno.

25 **[0453]** Il termine "idrossi", come usato nel presente contesto, rappresenta un gruppo -OH. In
alcuni casi, il gruppo idrossi può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti (ad esempio,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

gruppi O-protettivi) come qui definito per un alchile.

[0454] Il termine "idrossialchenile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchenile, come definito nel presente contesto, sostituito da uno a tre gruppi idrossi, a condizione che non più di un gruppo idrossi può essere attaccato a un singolo atomo di carbonio del gruppo alchile, ed è esemplificato da diidrossipropenile e idrossiisopentenile e simili. In alcuni casi, il gruppo idrossialchenile può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti (ad esempio gruppi O-protettivi) come qui definito per un alchile.

[0455] Il termine "idrossialchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, sostituito da uno a tre gruppi ossidrile, a condizione che non più di un gruppo idrossile possa essere attaccato a un singolo atomo di carbonio del gruppo alchile, ed è esemplificato da idrossimetile, diidrossipropile e simili. In alcuni casi, il gruppo idrossialchile può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti (ad esempio, gruppi O-protettivi) come qui definito per un alchile.

[0456] Il termine "idrossialchinile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchinile, come definito nel presente contesto, sostituito da uno a tre gruppi idrossi, a condizione che non più di un gruppo idrossi possa essere attaccato a un singolo atomo di carbonio del gruppo alchile. In alcuni casi, il gruppo idrossialchinile può essere sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti (ad esempio gruppi O-protettivi) come definito nel presente contesto per un alchile.

[0457] Il termine "isomero", come usato nel presente contesto, indica qualsiasi tautomero, stereoisomero, enantiomero o diastereomero di qualsiasi composto della descrizione. È riconosciuto che i composti della descrizione possono avere uno o più centri chirali e/o doppi legami e, quindi, esistere come stereoisomeri, come isomeri a doppio legame (vale a dire isomeri geometrici E/Z) o diastereomeri {ad esempio, enantiomeri [vale a dire, (+) o (-)] o isomeri cis/trans}. Secondo la descrizione, le strutture chimiche illustrate nel presente contesto, e quindi i composti della descrizione, comprendono tutti i corrispondenti stereoisomeri, cioè sia la forma


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

stereomericamente pura (ad esempio, geometricamente pura, enantiomericamente pura o diastereomericamente pura) e enantiomerica e miscele stereoisomeriche, ad esempio racemati. Le miscele enantiomeriche e stereoisomeriche dei composti della descrizione possono essere tipicamente risolte nei loro componenti enantiomeri o stereoisomeri mediante metodi ben noti, come la gascromatografia in fase chirale, la cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase chirale, la cristallizzazione del composto come un complesso di sale chirale, o cristallizzare il composto in un solvente chirale. Enantiomeri e stereoisomeri possono anche essere ottenuti da intermedi stereomericamente o enantiomericamente puri, reagenti e catalizzatori mediante metodi sintetici asimmetrici ben noti.

10 [0458] Il termine "ammino *N*-protetto", come usato nel presente contesto, si riferisce a un gruppo ammino, come definito nel presente contesto, a cui sono attaccati uno o due gruppi *N*-protettivi, come definito nel presente contesto.

[0459] Il termine "gruppo *N*-protettivo", come qui utilizzato, rappresenta quei gruppi destinati a proteggere un gruppo ammino da reazioni indesiderabili durante procedure sintetiche. I gruppi *N*-protettivi comunemente usati sono descritti in Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3a edizione (John Wiley & Sons, New York, 1999). I gruppi *N*-protettivi includono gruppi acile, ariloile o carbamile come formile, acetile, propionile, pivaloile, t-butilacetile, 2-cloroacetile, 2-bromoacetile, trifluoroacetile, tricloroacetile, ftalile, o-nitrofenossiacetile, α -clorobutirile, benzoile, 4-clorobenzoile, 4-bromobenzoile, 4-nitrobenzoile e ausiliari chirali come D, L o D, L-amminoacidi protetti o non protetti come alanina, leucina e fenilalanina e simili; gruppi contenenti solfonile come benzensolfonile e p-toluensolfonile; gruppi che formano carbammato come benzilossicarbonile, p-clorobenzilossicarbonile, p-metossibenzilossicarbonile, p-nitrobenzilossicarbonile, 2-nitrobenzilossicarbonile, p-bromobenzilossicarbonile, 3,4-dimetossibenzilossicarbonile, 3,5-dimetossibenzilossicarbonile, 2,4-dimetossibenzilossicarbonile, 4-metossibenzilossicarbonile, 2 -nitro-4,5-


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

dimetossibenzilossicarbonile, 3,4,5-trimetossibenzilossicarbonile, 1-(p-bifenil)-1-
metiletossicarbonile, α,α -dimetil-3,5-dimetossibenzilossicarbonile, benzidrilossi carbonile, t-
butilossicarbonile, diisopropilmetossicarbonile, isopropilossicarbonile, etossicarbonile,
metossicarbonile, allilossicarbonile, 2,2,2-tricloroetossicarbonile, fenossicarbonile, 4-
5 nitrofenossi carbonile, fluorenil-9-metossicarbonile, ciclopentilossicarbonile,
adamantilossicarbonile e cicloesilossicarbonile, feniltiocarbonile, gruppi alcarile come benzile,
trifenilmetile e gruppi benzilossimetile, silile, come trimetilsilile. Gruppi *N*-protettivi preferiti
sono formile, acetile, benzoile, pivaloile, t-butilacetile, alanile, fenilsolfonile, benzile, t-
butilossicarbonile (Boc) e benzilossicarbonile (Cbz).

10 [0460] Il termine "nitro" come utilizzato nel presente contesto si riferisce a un gruppo —NO₂.

[0461] Il termine "gruppo *O*-protettivo", come qui utilizzato, rappresenta quei gruppi destinati a
proteggere un gruppo contenente ossigeno (ad esempio fenolo, idrossile o carbonile) da reazioni
indesiderabili durante procedure sintetiche. Gruppi *O*-protettivi comunemente utilizzati sono
descritti in Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3a edizione (John Wiley & Sons,
15 New York, 1999). Gruppi *O*-protettivi esemplificativi includono gruppi acile, ariloile o carbamile,
come formile, acetile, propionile, pivaloile, t-butilacetile, 2-cloroacetile, 2-bromoacetile,
trifluoroacetile, tricloroacetile, ftalile, o-nitrofenossiacetile, α -clorobutirile, benzoile, 4-
clorobenzoile, 4-bromobenzoile, t-butildimetilsilile, tri-iso-propilsililossimetile, 4,4'-
dimetossitritile, isobutirile, fenossiacetile, 4-isopropilpeenossiacetile, dimetilformammidino e 4-
20 nitrobenzoile; gruppi alchilcarbonile, come acile, acetile, propionile, pivaloile e simili; gruppi
arilcarbonile facoltativamente sostituiti, come benzoile; gruppi silile, come trimetilsilile (TMS),
tertbutildimetilsilile (TBDMS), tri-iso-propilsililossimetile (TOM), triisopropilsilile (TIPS) e
simili; gruppi formanti etere con l'idrossile, tale metile, metossimetile, tetraidopiranile, benzile,
p-metossibenzile, tritile e simili; alcossicarbonili, come metossicarbonile, etossicarbonile,
25 isopropossicarbonile, n-isopropossicarbonile, n-butilossicarbonile, isobutilossicarbonile, sec-


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

butilossicarbonile, t-butilossicarbonile, 2-etilesilossicarbonile, cicloesilossicarbonile, metilossicarbonile e simili; gruppi alcossialcossicarbonile, come metossimetossicarbonile, etossimetossicarbonile, 2-metossietossicarbonile, 2-etossietossicarbonile, 2-butossietossicarbonile, 2-metossietossimetossicarbonile, allilossicarbonile, propargilossicarbonile, 2-butenossicarbonile, 3-metil-2-butenossicarbonile e simili; 5 aloalcossicarbonili, come 2-cloroetossicarbonile, 2-cloroetossicarbonile, 2,2,2-tricloroetossicarbonile e simili; gruppi arilalcossicarbonile facoltativamente sostituiti, come benzilossicarbonile, p-metilbenzilossicarbonile, p-metossibenzilossicarbonile, p-nitrobenzilossicarbonile, 2,4-dinitrobenzilossicarbonile, 3,5-dimetilbenzilossicarbonile, p-10 clorobenzilossicarbonile, p-bromobenzilossicarbonile, fluorenilmetilossicarbonile e simili; e gruppi arilossicarbonilici eventualmente sostituiti, come fenossicarbonile, p-nitrofenossicarbonile, o-nitrofenossicarbonile, 2,4-dinitrofenossicarbonile, p-metilfenossicarbonile, m-metilfenossicarbonile, o-bromofenossicarbonile, 3,5-dimetilfenossicarbonile, p-clorofenossicarbonile, 2-cloro-4-nitrofenossi-carbonile e simili); eteri 15 alchilici, arilici e alcarilici sostituiti (ad esempio tritile; metiltiomtile; metossimetile; benzilossimetile; silossimetile; 2,2,2-tricloroetossimetile; tetraidropiranile; tetraidrofurane; etossietile; 1-[2-(trimetilsilil)etossi]etile; 2-trimetilsililetile; t-butiletere; p-clorofenile, p-metossifenile, p-nitrofenile, benzile, p-metossibenzile e nitrobenzile); silileteri (ad esempio trimetilsilile; trietilsilile; triisopropilsilile; dimetilisopropilsilile; t-butildimetilsilile; t-butildifenilsilile; tribenzilsilile; trifenilsilile; e difenilmtilsilile); carbonati (ad esempio metile, 20 metossimetile, 9-fluorenilmetile; etile; 2,2,2-tricloroetile; 2-(trimetilsilil)etile; vinile, allile, nitrofenile; benzile; metossibenzile; 3,4-dimetossibenzile; e nitrobenzile); gruppi carbonile-protettivi (ad esempio gruppi acetale e chetale, come dimetilacetale, 1,3-diossolano e simili; gruppi acile; e gruppi ditiano, come 1,3-ditiani, 1,3-ditiolano e simili); gruppi acido carbossilico-25 protettivi (ad esempio gruppi estere, come metil estere, benzil estere, t-butil estere, ortoesteri e


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

simili; e gruppi ossazolina.

[0462] Il termine "osso" come utilizzato nel presente contesto, rappresenta =O.

[0463] Il termine "perfluoroalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, in cui ciascun radicale idrogeno legato al gruppo alchile è stato sostituito da un radicale fluoruro. I gruppi perfluoroalchile sono esemplificati da trifluorometile, pentafluoroetile e simili.

[0464] Il termine "perfluoroalcossi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alcossi, come definito nel presente contesto, in cui ciascun radicale idrogeno legato al gruppo alcossi è stato sostituito da un radicale fluoruro. I gruppi perfluoroalcossi sono esemplificati da trifluorometossi, pentafluoroetossi e simili.

[0465] Il termine "spirociclile", come qui utilizzato, rappresenta un biradiale alchilene C₂₋₇, le cui due estremità sono legate allo stesso atomo di carbonio del gruppo progenitore per formare un gruppo spirociclico, e anche un biradiale eteroalchilene C₁₋₆, le cui due estremità sono legate allo stesso atomo. Il radicale eteroalchilene che forma il gruppo spirociclile può contenere uno, due, tre o quattro eteroatomi scelti indipendentemente dal gruppo costituito da azoto, ossigeno e zolfo. In alcune forme di realizzazione, il gruppo spirociclile include da uno a sette atomi di carbonio, escluso l'atomo di carbonio a cui è attaccato il biradiale. I gruppi spirociclile della descrizione possono essere opzionalmente sostituiti con 1, 2, 3 o 4 sostituenti qui forniti come sostituenti facoltativi per gruppi cicloalchile e/o eterociclile.

[0466] Il termine "stereoisomero", come usato nel presente documento, si riferisce a tutte le possibili diverse forme isomeriche e conformazionali che un composto può possedere (ad esempio, un composto di qualsiasi formula descritta nel presente documento), in particolare tutte le possibili forme isomeriche stereochimiche e conformazionali, tutti i diastereomeri, enantiomeri e/o conformeri della struttura molecolare di base. Alcuni composti della presente descrizione possono esistere in diverse forme tautomeriche, tutte queste ultime essendo incluse nell'ambito


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

della presente descrizione.

[0467] Il termine "solfoalchile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un gruppo alchile, come definito nel presente contesto, sostituito da un gruppo solfo di $\text{—SO}_3\text{H}$. In alcune forme di realizzazione, il gruppo alchile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi
5 sostituenti come qui descritto, e il gruppo solfo può essere ulteriormente sostituito con uno o più gruppi O-protettivi (ad esempio, come descritto nel presente contesto).

[0468] Il termine "solfonile", come usato nel presente contesto, rappresenta un gruppo $\text{—S(O)}_2\text{—}$.


[0469] Il termine "tioalcarile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un sostituyente chimico di formula —SR , dove R è un gruppo alcarile. In alcuni casi, il gruppo alcarile può essere
10 ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui descritto.

[0470] Il termine "tioalcheterociclile", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un sostituyente chimico di formula —SR , dove R è un gruppo alcheterociclile. In alcuni casi, il gruppo alcheterociclile può essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui descritto.

15 [0471] Il termine "tioalcoosi", come utilizzato nel presente contesto, rappresenta un sostituyente chimico di formula —SR , dove R è un gruppo alchile, come definito nel presente contesto. In alcuni casi, il gruppo alchile essere ulteriormente sostituito con 1, 2, 3 o 4 gruppi sostituenti come qui descritto.

[0472] *Composto*: Come qui utilizzato, il termine "composto" intende includere tutti gli
20 stereoisomeri, gli isomeri geometrici, i tautomeri e gli isotopi delle strutture illustrate.

[0473] I composti descritti nel presente contesto possono essere asimmetrici (ad esempio, avere uno o più stereocentri). Tutti gli stereoisomeri, come enantiomeri e diastereomeri, sono intesi se non diversamente indicato. I composti della presente descrizione che contengono atomi di carbonio sostituiti asimmetricamente possono essere isolati in forme otticamente attive o
25 racemiche. Metodi su come preparare forme otticamente attive da materiali di partenza


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

otticamente attivi sono noti nella tecnica, come mediante risoluzione di miscele racemiche o mediante sintesi stereoselettiva. Molti isomeri geometrici di olefine, doppi legami C=N e simili possono anche essere presenti nei composti qui descritti, e tutti questi isomeri stabili sono contemplati nella presente descrizione. Gli isomeri cis e trans geometrici dei composti della
5 presente descrizione sono descritti e possono essere isolati come una miscela di isomeri o come forme isomeriche separate.

[0474] I composti della presente descrizione includono anche forme tautomeriche. Le forme tautomeriche derivano dallo scambio di un singolo legame con un doppio legame adiacente e dalla concomitante migrazione di un protone. Le forme tautomeriche includono tautomeri
10 prototropici che sono stati di protonazione isomerici aventi la stessa formula empirica e la stessa carica totale. Esempi di tautomeri prototropici includono coppie chetone - enolo, coppie ammidi - acido imidico, coppie lattame - lattime, coppie ammidi - acido imidico, coppie enammina - immina e forme anulari in cui un protone può occupare due o più posizioni di un sistema eterociclico, come, 1H- e 3H-imidazolo, 1H-, 2H- e 4H-1,2,4-triazolo, 1H- e 2H-isoindolo e 1H-
15 e 2H-pirazolo. Le forme tautomeriche possono essere in equilibrio o stericamente bloccate in una forma mediante appropriata sostituzione.

[0475] I composti della presente descrizione includono anche tutti gli isotopi degli atomi presenti nei composti intermedi o finali. "Isotopi" si riferisce ad atomi aventi lo stesso numero atomico ma diversi numeri di massa risultanti da un diverso numero di neutroni nei nuclei. Ad esempio,
20 gli isotopi di idrogeno includono trizio e deuterio.

[0476] I composti e i sali della presente descrizione possono essere preparati in combinazione con molecole di solvente o acqua per formare solvati e idrati con metodi di routine.

[0477] *Conservato*: Come qui utilizzato, il termine "conservato" si riferisce a nucleotidi o residui amminoacidici di una sequenza polinucleotidica o di una sequenza polipeptidica, rispettivamente,
25 che sono quelli che si presentano inalterati nella stessa posizione di due o più sequenze che

vengono confrontate. I nucleotidi o gli amminoacidi che sono relativamente conservati sono quelli che sono conservati tra le sequenze più correlate rispetto ai nucleotidi o agli amminoacidi che compaiono altrove nelle sequenze.

[0478] In alcuni casi, si dice che due o più sequenze sono "completamente conservate" se sono
5 identiche al 100% l'una all'altra. In alcuni casi, due o più sequenze si dicono "altamente conservate" se sono identiche almeno al 70%, identiche almeno all'80%, identiche almeno al 90% o identiche almeno al 95% tra loro. In alcuni casi, due o più sequenze si dicono "altamente conservate" se sono circa il 70% identiche, circa l'80% identiche, circa il 90% identiche, circa il 95%, circa il 98% o circa il 99% identiche l'una all'altra. In alcuni casi, due o più sequenze si
10 dicono "conservate" se sono identiche almeno al 30%, identiche almeno al 40%, identiche almeno al 50%, identiche almeno al 60%, identiche almeno al 70%, almeno 80% identici, almeno il 90% identici o almeno il 95% identici tra loro. In alcuni casi, due o più sequenze si dicono "conservate" se sono circa il 30% identiche, circa il 40% identiche, circa il 50% identiche, circa il 60% identiche, circa il 70% identiche, circa l'80% identiche, circa il 90% identici, circa il 95% identici,
15 circa il 98% identici o circa il 99% identici tra loro. La conservazione della sequenza può applicarsi all'intera lunghezza di un oligonucleotide o polipeptide o può applicarsi a una sua porzione, regione o caratteristica.

[0479] *Ciclico o ciclizzato*: Come qui utilizzato, il termine "ciclico" si riferisce alla presenza di un'ansa continua. Le molecole cicliche non devono essere circolari, solo unite per formare una
20 catena ininterrotta di subunità. Le molecole cicliche come l'mRNA della presente descrizione possono essere singole unità o multimeri o comprendere uno o più componenti di una struttura complessa o di ordine superiore.

[0480] *Citostatico*: Come usato qui, "citostatico" si riferisce all'inibizione, riduzione, soppressione della crescita, divisione o moltiplicazione di una cellula [ad esempio una cellula di
25 mammifero (ad esempio una cellula umana)], batterio, virus, fungo, protozoo, parassita, prione,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

o una loro combinazione.

[0481] *Citotossico*: Come usato qui, "citotossico" si riferisce all'uccisione o al provocare effetti dannosi, tossici o mortali su una cellula [ad esempio una cellula di mammifero (ad esempio una cellula umana)], batteri, virus, funghi, protozoi, parassiti, prioni o una loro combinazione.

5 [0482] *Rilascio*: Come qui utilizzato, "rilascio" si riferisce all'atto o al modo di consegnare un composto, una sostanza, un'entità, una frazione, un carico o un carico utile.

[0483] *Agente di rilascio*: Come usato qui, "agente di rilascio" si riferisce a qualsiasi sostanza che facilita, almeno in parte, il rilascio *in vivo* di un polinucleotide a cellule bersagliate.

10 [0484] *Destabilizzato*: Come qui utilizzato, il termine "destabilizzabile", "destabilizzante" o "regione destabilizzante" indica una regione o molecola che è meno stabile di una forma iniziale, di tipo selvatico o nativa della stessa regione o molecola.

[0485] *Marcatura rilevabile*: Come usato qui, "marcatura rilevabile" si riferisce a uno o più marcatori, segnali o frazioni che sono attaccati, incorporati o associati a un'altra entità che viene facilmente rilevata con metodi noti nella tecnica tra cui radiografia, fluorescenza, chemiluminescenza, attività enzimatica, assorbanza e simili. Marcature rilevabili includono radioisotopi, fluorofori, cromofori, enzimi, coloranti, ioni metallici, ligandi come biotina, avidina, streptavidina e apteni, punti quantici e simili. Marcature rilevabili possono essere localizzate in qualsiasi posizione nei peptidi o nelle proteine qui divulgate. Possono essere all'interno degli amminoacidi, dei peptidi o delle proteine, o localizzati ai terminali N o C.

20 [0486] *Digesto*: Come qui utilizzato, il termine "digerire" significa scomporre in pezzi o componenti più piccoli. Quando si parla di polipeptidi o proteine, la digestione porta alla produzione di peptidi.

[0487] *Distale*: Come qui utilizzato, il termine "distale" significa situato lontano dal centro o lontano da un punto o regione di interesse.

25 [0488] *Segnale di scissione della proteina codificata*: Come qui utilizzato, "segnale di scissione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

della proteina codificata" si riferisce alla sequenza nucleotidica che codifica per un segnale di scissione proteica.

[0489] *Ingegnerizzato*: Come qui utilizzato, gli aspetti della descrizione sono "ingegnerizzati" quando sono progettati per avere una caratteristica o proprietà, strutturale o chimica, che varia da
5 un punto di partenza, molecola di tipo selvatico o nativa.

[0490] *Espressione*: Come usato qui, "espressione" di una sequenza di acido nucleico si riferisce a uno o più dei seguenti eventi: (1) produzione di un modello di RNA da una sequenza di DNA (ad es. mediante trascrizione); (2) elaborazione di un trascritto di RNA (ad es. mediante splicing, editing, formazione del cap 5' e/o elaborazione dell'estremità 3'); (3) traduzione di un RNA in un
10 polipeptide o una proteina; e (4) modificazione post-traduzionale di un polipeptide o una proteina.

[0491] *Caratteristica*: Come qui utilizzato, una "caratteristica" si riferisce a una caratteristica, una proprietà o un elemento distintivo.

[0492] *Formulazione*: Come qui utilizzato, una "formulazione" include almeno un polinucleotide e un agente di rilascio.

15 [0493] *Frammento*: Un "frammento", come usato qui, si riferisce a una porzione. Ad esempio, frammenti di proteine possono comprendere polipeptidi ottenuti digerendo proteine a lunghezza intera isolate da cellule coltivate.

[0494] *Funzionale*: Come usato qui, una molecola biologica "funzionale" è una molecola biologica in una forma in cui mostra una proprietà e/o un'attività da cui è caratterizzata.

20 [0495] *Omologia*: Come utilizzato nel presente contesto, il termine "omologia" si riferisce alla relazione complessiva tra molecole polimeriche, *ad esempio* tra molecole di acido nucleico (*ad esempio* molecole di DNA e/o molecole di RNA) e/o tra molecole polipeptidiche. In alcune forme di realizzazione, le molecole polimeriche sono considerate "omologhe" tra loro se le loro sequenze sono per almeno il 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%,
25 90%, 95% o 99% identiche o simili. Il termine "omologo" si riferisce necessariamente a un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

confronto tra almeno due sequenze (sequenze polinucleotidiche o polipeptidiche). In conformità con la descrizione, due sequenze polinucleotidiche sono considerate omologhe se i polipeptidi che esse codificano sono almeno circa il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90%, il 95% o anche il 99% identiche per almeno un tratto di almeno circa 20 amminoacidi. In alcune forme di
5 realizzazione, le sequenze polinucleotidiche omologhe sono caratterizzate dalla capacità di codificare un tratto di almeno 4-5 amminoacidi specificati in modo univoco. Per sequenze polinucleotidiche di lunghezza inferiore a 60 nucleotidi, l'omologia è determinata dalla capacità di codificare un tratto di almeno 4-5 amminoacidi specificati in modo univoco. In conformità con la descrizione, due sequenze proteiche sono considerate omologhe se le proteine sono almeno
10 circa il 50%, il 60%, il 70%, l'80% o il 90% identiche per almeno un tratto di almeno circa 20 amminoacidi.

[0496] *Identità*: Come qui utilizzato, il termine "identità" si riferisce alla relazione complessiva tra molecole polimeriche, *ad esempio* tra molecole oligonucleotidiche (*ad esempio* molecole di DNA e/o molecole di RNA) e/o tra molecole polipeptidiche. Il calcolo dell'identità percentuale di
15 due sequenze di polinucleotide, ad esempio, può essere eseguito allineando le due sequenze a scopo di confronto ottimale (ad esempio è possibile introdurre dei gap in una o entrambe una prima e una seconda sequenza amminoacidica o di acido nucleico per un allineamento ottimale e le sequenze non identiche possono essere ignorate a scopo di confronto). In determinati casi, la lunghezza di una sequenza allineata a scopo di confronto è almeno il 30%, preferibilmente almeno
20 il 40%, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80%, almeno il 90%, almeno il 95% o il 100% della lunghezza della sequenza di riferimento. I nucleotidi in corrispondenza delle posizioni nucleotidiche corrispondenti vengono poi confrontati. Quando una posizione nella prima sequenza è occupata dallo stesso nucleotide della posizione corrispondente nella seconda sequenza, allora le molecole in corrispondenza di quella posizione sono identiche. L'identità
25 percentuale tra le due sequenze è una funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sequenze, prendendo in considerazione il numero di gap e la lunghezza di ciascun gap, che necessita di essere introdotta per l'allineamento ottimale delle due sequenze. Il confronto di sequenze e la determinazione dell'identità percentuale tra due sequenze possono essere eseguiti utilizzando un algoritmo matematico. Ad esempio, l'identità percentuale tra due sequenze nucleotidiche può essere determinata utilizzando metodi come quelli descritti in Computational Molecular Biology, Lesk, AM, ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., e Griffin, H. G., a cura di, Humana Press, New Jersey, 10 1994; e Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., a cura di, M Stockton Press, New York, 1991.

[0497] Ad esempio, l'identità percentuale tra due sequenze nucleotidiche può essere determinata utilizzando l'algoritmo di Meyers e Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), che è stato incorporato nel programma ALIGN (versione 2.0) utilizzando una tabella di residui di peso PAM120, una penalità di lunghezza di gap di 12 e una penalità di gap di 4. L'identità percentuale tra due sequenze nucleotidiche può in alternativa essere determinata utilizzando il programma GAP nel pacchetto software GCG utilizzando una matrice NWSgapdna.CMP. I metodi comunemente impiegati per determinare l'identità percentuale tra le sequenze includono, tuttavia senza limitazioni quelli descritti in Carillo, H., e Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988). Le tecniche per determinare l'identità sono codificate in programmi per computer disponibili al pubblico. Software esemplificativo per computer per determinare l'omologia tra due sequenze includono, ma non sono limitati a, pacchetto di programmi GCG, [Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984), BLASTP, BLASTN e FASTA Altschul, SF et al., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990)].

25 [0498] *Inibire l'espressione di un gene*: Come usata qui, la frase "inibire l'espressione di un gene"


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

significa provocare una riduzione della quantità di un prodotto di espressione del gene. Il prodotto di espressione può essere un RNA trascritto dal gene (ad esempio, un mRNA) o un polipeptide tradotto da un mRNA trascritto dal gene. Tipicamente una riduzione del livello di un mRNA determina una riduzione del livello di un polipeptide tradotto da esso. Il livello di espressione può essere determinato utilizzando tecniche standard per misurare mRNA o proteine.

[0499] *In vitro*: Come qui utilizzato, il termine "*in vitro*" si riferisce a eventi che si verificano in un ambiente artificiale, ad esempio in una provetta o in un recipiente di reazione, in una coltura cellulare, in una piastra di Petri, ecc., piuttosto che all'interno di un organismo (ad esempio, animali, piante o microbi).

[0500] *In vivo*: Come usato qui, il termine "*in vivo*" si riferisce a eventi che si verificano all'interno di un organismo (ad esempio, animale, pianta o microbi o loro cellule o tessuti).

[0501] Isolato: Come qui usato, il termine "isolato" si riferisce a una sostanza o entità che è stata separata da almeno alcuni dei componenti a cui è stata associata (sia in natura che in un ambiente sperimentale). Le sostanze isolate possono avere diversi livelli di purezza in riferimento alle sostanze a cui sono state associate. Sostanze e/o entità isolate possono essere separate da almeno circa il 10%, circa il 20%, circa il 30%, circa il 40%, circa il 50%, circa il 60%, circa il 70%, circa l'80%, circa il 90%, o più degli altri componenti con cui esse sono inizialmente associate. In alcuni casi, gli agenti isolati sono più di circa l'80%, circa l'85%, circa il 90%, circa il 91%, circa il 92%, circa il 93%, circa il 94%, circa il 95%, circa il 96%, circa il 97%, circa 98%, circa il 99% o più del 99% puro. Come qui usato, una sostanza è "pura" se è sostanzialmente priva di altri componenti. *Sostanzialmente isolato*: Per "sostanzialmente isolato" si intende che il composto è sostanzialmente separato dall'ambiente in cui si è formato o rilevato. La separazione parziale può includere, ad esempio, una composizione arricchita nel composto della presente descrizione. La separazione sostanziale può includere composizioni contenenti almeno circa il 50%, almeno circa il 60%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

almeno circa il 97%, o almeno circa il 99% in peso del composto della presente descrizione, o suo sale. I metodi per isolare i composti e i loro sali sono di routine nella tecnica.

[0502] *Linker*: Come usato qui, un linker si riferisce a un gruppo di atomi, ad esempio 10-1,000 atomi, e può essere costituito da atomi o gruppi come, ma non limitati a, carbonio, ammino, 5 alchilammino, ossigeno, zolfo, solfossido, solfonile, carbonile e immina. Il linker può essere attaccato a un nucleoside o nucleotide modificato sulla base azotata o sulla porzione zuccherina a una prima estremità, e a un carico utile, ad esempio, un agente rilevabile o terapeutico, a una seconda estremità. Il legante può essere di lunghezza sufficiente da non interferire con l'incorporazione in una sequenza di acido nucleico. Il linker può essere utilizzato per qualsiasi 10 scopo utile, come formare multimeri (ad esempio, attraverso il legame di due o più polinucleotidi) o coniugati, nonché per somministrare un carico utile, come descritto nel presente contesto. Esempi di gruppi chimici che possono essere incorporati nel legante includono, ma non sono limitati a, alchile, alchenile, alchinile, ammido, ammino, etere, tioetere, estere, alchilene, eteroalchilene, arile o eterociclice, ciascuno dei quali può essere opzionalmente sostituito, come 15 qui descritto. Esempi di linker includono, ma non sono limitati a, alcani insaturi, glicoli polietilenici (ad es. unità monomeriche di glicole etilenico o propilenico, ad es. glicole dietilenico, glicole dipropilenico, glicole trietilenico, glicole tripropilenico, glicole tetraetilenico o glicole tetraetilenico) e destrano polimeri, Altri esempi includono, ma non sono limitati a, frazioni scindibili all'interno del legante, come, ad esempio, un legame disolfuro (-S-S-) o un legame azo 20 (-N=N-), che può essere scisso utilizzando un agente riducente o fotolisi. Esempi non limitativi di un legame separabile selettivamente includono un legame ammidico che può essere scisso ad esempio mediante l'uso di tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP), o altri agenti riducenti, e/o fotolisi, nonché un legame estere può essere scisso ad esempio mediante idrolisi acida o basica.

[0503] *Modificato*: Come qui utilizzato, "modificato" si riferisce a uno stato o struttura modificata 25 di una molecola della descrizione. Le molecole possono essere modificate in molti modi, incluso


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

chimicamente, strutturalmente e funzionalmente. In un caso, le molecole di mRNA della presente descrizione sono modificate dall'introduzione di nucleosidi e/o nucleotidi non naturali, ad esempio, in relazione ai ribonucleotidi naturali A, U, G e C. Nucleotidi non canonici come le strutture di cap non sono considerate "modificate" sebbene differiscano dalla struttura chimica dei ribonucleotidi A, C, G, U.

[0504] *Presente in natura:* Come usato qui, "presente in natura" significa esistente in natura senza aiuti artificiali.

[0505] *Vertebrato non umano:* Come qui utilizzato, un "vertebrato non umano" include tutti i vertebrati eccetto l'*Homo sapiens*, inclus le specie selvatiche e domestiche. Esempi di vertebrati non umani includono, ma non sono limitati a, mammiferi, come alpaca, banteng, bisonte, cammello, gatto, bestiame, cervo, cane, asino, gay, capra, cavia, cavallo, lama, mulo, maiale, coniglio, renna, bufalo d'acqua di pecora e yak.

[0506] *Fuori bersaglio:* Come usato qui, "fuori bersaglio" si riferisce a qualsiasi effetto non intenzionale su uno o più tra un bersaglio, un gene o un trascritto cellulare.

[0507] *Cornice di lettura aperta:* Come usato qui, "cornice di lettura aperta" oppure "ORF" si riferisce a una sequenza che non contiene un codone di arresto in una data cornice di lettura.

[0508] *Collegato operativamente:* Come usato qui, l'espressione "collegato operativamente" si riferisce a una connessione funzionale tra due o più molecole, costrutti, trascritti, entità, frazioni o simili.

[0509] *Paratopo:* Come usato qui, un "paratopo" si riferisce al sito di legame dell'antigene di un anticorpo.

[0510] *Paziente:* Come utilizzato nel presente contesto, "paziente" si riferisce a un soggetto che può cercare o avere bisogno di cure, richiede un trattamento, sta ricevendo un trattamento, riceverà un trattamento o un soggetto che è curato da un professionista qualificato per una particolare malattia o condizione.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0511] *Opzionalmente sostituito*: Qui una frase della forma "X opzionalmente sostituito" (ad esempio, alchile opzionalmente sostituito) è intesa essere equivalente a "X, in cui X è sostituito opzionalmente" (ad esempio, "alchile, in cui detto alchile è opzionalmente sostituito"). Non intende significare che la caratteristica "X" (*ad es.* alchile) di *per sé* sia opzionale.

5 [0512] *Peptide*: Come usato qui, "peptide" è lungo meno di o uguale a 50 amminoacidi, ad esempio, lungo circa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 amminoacidi.

[0513] *Farmaceuticamente accettabile*: L'espressione "farmaceuticamente accettabile" viene impiegata nel presente contesto per fare riferimento a quei composti, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che sono, nell'ambito di un valido giudizio medico, adatti all'uso a contatto
10 con i tessuti di esseri umani e animali senza tossicità, irritazione, risposta allergica eccessiva o altro problema o complicanza, proporzionali a un ragionevole rapporto benefici/rischi.

[0514] *Eccipienti farmaceuticamente accettabili*: L'espressione "eccipiente farmaceuticamente accettabile", come usata nel presente contesto, si riferisce a qualsiasi ingrediente diverso dai composti qui descritti (ad esempio, un veicolo in grado di sospendere o dissolvere il composto
15 attivo) e avere le proprietà di essere sostanzialmente non tossico e non infiammatorio in un paziente. Gli eccipienti possono includere, ad esempio: antiaderenti, antiossidanti, leganti, rivestimenti, ausili di compressione, disintegranti, coloranti (colori), emollienti, emulsionanti, riempitivi (diluenti), formatori o rivestimenti di film, aromi, fragranze, antiagglomeranti (potenziatori di flusso), lubrificanti, conservanti, stampa inchiostri, assorbenti, agenti sospensivi
20 o disperdenti, dolcificanti e acque di idratazione. Eccipienti esemplificativi includono, ma non sono limitati a: idrossitoluene butilato (BHT), carbonato di calcio, fosfato di calcio (dibasico), stearato di calcio, croscarmellosio, polivinilpirrolidone reticolato, acido citrico, crospovidone, cisteina, etilcellulosa, gelatina, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, lattosio, magnesio stearato, maltitolo, mannitolo, metionina, metilcellulosa, metilparabene, cellulosa
25 microcristallina, polietilenglicole, polivinilpirrolidone, povidone, amido pregelatinizzato,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

propilparabene, retinilpalmitato, shellac, biossido di silicone, cellulosa di carbossimetile di sodio, citrato di sodio, glicolato di amido di sodio, sorbitolo, amido (mais), acido stearico, saccarosio, talco, biossido di titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C e xilitolo.

[0515] *Sali farmaceuticamente accettabili:* La presente descrizione include anche sali
5 farmaceuticamente accettabili dei composti qui descritti. Come qui utilizzato, "sali
farmaceuticamente accettabili" si riferisce a derivati dei composti divulgati in cui il composto
genitore viene modificato convertendo un acido esistente o una frazione di base nella sua forma
salina (ad esempio, facendo reagire il gruppo di base libero con un acido organico adatto). Esempi
di sali farmaceuticamente accettabili includono, tuttavia senza limitazioni, sali di acidi minerali
10 oppure organici di residui basici quali ammine; sali alcalini oppure organici di residui acidi quali
acidi carbossilici e simili. Sali di addizione con acidi rappresentativi includono acetato, adipato,
alginato, ascorbato, aspartato, benzensolfonato, benzoato, bisolfato, borato, butirrato, canforato,
canfosolfonato, citrato, ciclopentanepropionato, digluconato, dodecilsolfato, etansolfonato,
fumarato, glucoptonato, glicerofosfato, emisolfato, eptonato, esanoato, idrobromuro, cloridrato,
15 idrodiuro, 2-idrossi-etansolfonato, lattobionato, lattato, laurato, lauril solfato, malato, maleato,
malonato, metanesolfonato, 2-naftalensolfonato, nicotinato, nitrato, oleato, ossalato, palmitato,
pamoato, pectinato, persolfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, stearato,
succinato, solfato, tartrato, tiocianato, toluensolfonato, undecanoato, sali di valerato e simili. Sali
rappresentativi di metalli alcalini o alcalino terrosi comprendono sodio, litio, potassio, calcio,
20 magnesio e simili, nonché ammonio non tossico, ammonio quaternario e cationi amminici,
inclusi, ma non limitati a, ammonio, tetrametilammonio, tetraetilammonio, metilammina,
dimetilammina, trimetilammina, trietilammina, etilammina e simili. I sali farmaceuticamente
accettabili della presente descrizione includono i sali non tossici convenzionali del composto
genitore formato, ad esempio, da acidi inorganici o organici non tossici. I sali farmaceuticamente
25 accettabili della presente descrizione possono essere sintetizzati dal composto genitore che


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

contiene una frazione basica o acida mediante metodi chimici convenzionali. Generalmente, tali sali possono essere preparati facendo reagire le forme libere di acido o di base di questi composti con una quantità stechiometrica della base o dell'acido appropriato in acqua o in un solvente organico o in una miscela dei due; generalmente, terreni non acquosi come etere, etilacetato, etanolo, isopropanolo o acetonitrile sono preferiti. Elenchi di sali adatti si trovano in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Sali farmaceutici: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (a cura di), Wiley-VCH, 2008, e Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977).

[0516] *Farmacocinetica*: Come usato qui, "farmacocinetico" si riferisce a una o più proprietà di una molecola o composto in relazione alla determinazione del destino di sostanze somministrate a un organismo vivente. La farmacocinetica è suddivisa in diverse aree tra cui l'entità e la velocità di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione. Questo è comunemente indicato come ADME dove: (A) L'assorbimento è il processo di una sostanza che entra nella circolazione sanguigna; (D) la distribuzione è la dispersione o disseminazione di sostanze nei fluidi e nei tessuti del corpo; (M) il metabolismo (o biotrasformazione) è la trasformazione irreversibile dei composti progenitori in metaboliti figli; e (E) l'escrezione (o eliminazione) si riferisce all'eliminazione delle sostanze dal corpo. In rari casi, alcuni farmaci si accumulano irreversibilmente nei tessuti del corpo.

[0517] *Solvato farmaceuticamente accettabile*: Il termine "solvato farmaceuticamente accettabile", come qui utilizzato, indica un composto della descrizione in cui le molecole di un solvente adatto sono incorporate nel reticolo cristallino. Un solvente adatto è fisiologicamente tollerabile al dosaggio somministrato. Ad esempio, i solvati possono essere preparati mediante cristallizzazione, ricristallizzazione o precipitazione da una soluzione che include solventi organici, acqua o una loro miscela. Esempi di solventi adatti sono etanolo, acqua (ad esempio mono-, di-, e tri-idrati), N -metilpirrolidinone (NMP), dimetilsolfossido (DMSO), N,N'-


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

dimetilformammide (DMF), N,N'-dimetilacetammide (DMAC), 1,3-dimetil-2-imidazolidinone (DMEU), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2-(1H)-pirimidinone (DMPU), acetonitrile (ACN), propilenglicole, etilacetato, alcol benzilico, 2-pirrolidone, benzilbenzoato e simili. Quando l'acqua è il solvente, il solvato viene chiamato "idrato".

5 **[0518]** *Fisicochimico*: Come qui utilizzato, "fisicochimico" significa o relativo a una proprietà fisica e/o chimica.

[0519] *Prevenire*: Come qui utilizzato, il termine "prevenire" si riferisce a ritardare parzialmente o completamente l'insorgenza di un'infezione, malattia, disturbo e/o condizione; ritardare parzialmente o completamente l'insorgenza di uno o più sintomi, caratteristiche o manifestazioni
10 cliniche di una particolare infezione, malattia, disturbo e/o condizione; ritardare parzialmente o completamente l'insorgenza di uno o più sintomi, caratteristiche o manifestazioni di una particolare infezione, malattia, disturbo e/o condizione; ritardare parzialmente o completamente la progressione di un'infezione, una particolare malattia, disturbo e/o condizione; e/o diminuire il rischio di sviluppare patologie associate all'infezione, malattia, disturbo e/o condizione.

15 **[0520]** *Profarmaco*: La presente descrizione include anche profarmaci dei composti qui descritti. Come qui usato, "profarmaci" si riferisce a qualsiasi sostanza, molecola o entità che è in una forma che presuppone che quella sostanza, molecola o entità agisca come terapeutico in caso di alterazione chimica o fisica. I profarmaci possono essere legati in modo covalente o sequestrati in qualche modo e che rilasciano o vengono convertiti nella frazione attiva del farmaco prima,
20 dopo o dopo la somministrazione a un soggetto mammifero. I profarmaci possono essere preparati modificando gruppi funzionali presenti nei composti in modo tale che le modificazioni siano scisse, nella manipolazione ordinaria o *in vivo*, nei composti progenitori. I profarmaci includono composti in cui gruppi idrossile, amminico, solfidrile o carbossile sono legati a qualsiasi gruppo che, quando somministrato a un soggetto mammifero, si scinde a formare rispettivamente un
25 gruppo idrossile, amminico, solfidrile o carbossile libero. La preparazione e l'uso dei profarmaci


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sono discussi in T. Higuchi e V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 dell'ACS Symposium Series, e in Bioreversible Carriers in Drug Design, a cura di Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

5 [0521] *Proliferare*: Come usato qui, il termine "proliferare" significa crescere, espandersi o aumentare o far crescere, espandere o aumentare rapidamente. "Proliferativo" significa avere la capacità di proliferare. "Anti-proliferativo" significa avere proprietà contrarie o inopportune alle proprietà proliferative.

10 [0522] *Sito di scissione delle proteine*: Come qui utilizzato, "sito di scissione proteica" si riferisce a un sito in cui la scissione controllata della catena amminoacidica può essere realizzata mediante mezzi chimici, enzimatici o fotochimici.

[0523] *Segnale di scissione delle proteine*: Come qui utilizzato, "segnale di scissione proteica" si riferisce ad almeno un amminoacido che segnala o contrassegna un polipeptide per la scissione.

15 [0524] *Proteina di interesse*: Come qui utilizzati, i termini "proteine di interesse" o "proteine desiderate" includono quelle fornite nella presente e frammenti, mutanti, varianti e loro alterazioni.

[0525] *Prossimale*: Come qui usato, il termine "prossimale" significa situato più vicino al centro o ad un punto o regione di interesse.

20 [0526] *Purificato*: Come qui usato, "purificare", "purificato", "purificazione" significa rendere sostanzialmente puro o chiaro da componenti indesiderati, contaminazione del materiale, mescolanza o imperfezione.

[0527] *Campione*: Come usato qui, il termine "campione" o "campione biologico" si riferisce a un sottoinsieme dei suoi tessuti, cellule o parti componenti (ad esempio fluidi corporei, inclusi ma non limitati a sangue, muco, fluido linfatico, fluido sinoviale, fluido cerebrospinale, saliva, liquido amniotico, sangue del cordone amniotico, urina, liquido vaginale e sperma). Un campione
25 può inoltre includere un omogenato, lisato o estratto preparato da un intero organismo o un


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sottoinsieme dei suoi tessuti, cellule o parti componenti, o una frazione o parte di essi, inclusi ma non limitati a, ad esempio, plasma, siero, fluido spinale, fluido linfatico, sezioni esterne della pelle, vie respiratorie, intestinali e genito-urinarie, lacrime, saliva, latte, cellule del sangue, tumori, organi. Un campione si riferisce inoltre a un mezzo, come un brodo nutriente o un gel,
5 che può contenere componenti cellulari, come proteine o molecole di acido nucleico.

[0528] *Sequenze di segnale*: Come usata qui, la frase "sequenze di segnale" si riferisce a una sequenza che può dirigere il trasporto o la localizzazione di una proteina.

[0529] *Significativo o in modo significativo*: Come qui usati, i termini "significativo" o "in modo significativo" sono usati come sinonimi del termine "sostanzialmente".

10 [0530] *Dose unitaria singola*: Come usato qui, una "singola dose unitaria" è una dose di qualsiasi terapia somministrata in una dose/in una volta/via singola/punto di contatto singolo, vale a dire, singolo evento di somministrazione.

[0531] *Somiglianza*: Come utilizzato nel presente contesto, il termine "somiglianza" si riferisce alla correlazione complessiva tra molecole polimeriche, ad esempio, tra molecole
15 polinucleotidiche (ad esempio molecole di DNA e/o molecole di RNA) e/o tra molecole polipeptidiche. Il calcolo della somiglianza percentuale di molecole polimeriche tra loro può essere eseguito nello stesso modo di un calcolo dell'identità percentuale tranne per il fatto che il calcolo di somiglianza percentuale prende in considerazione sostituzioni conservative come compreso nella tecnica.

20 [0532] *Dose divisa*: Come usato qui, una "dose divisa" è la divisione della singola dose unitaria o della dose giornaliera totale in due o più dosi.

[0533] *Stabile*: Come usato qui, "stabile" si riferisce a un composto che è sufficientemente robusto per sopravvivere all'isolamento fino a un grado di purezza utile da una miscela di reazione, e preferibilmente in grado di essere formulato in un agente terapeutico efficace.

25 [0534] *Stabilizzato*: Come qui utilizzato, il termine "stabilizzare", "stabilizzato", "regione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

stabilizzata" significa rendere stabile o diventare stabile.

[0535] *Soggetto*: Come qui utilizzato, il termine "soggetto" o "paziente" si riferisce a qualsiasi organismo a cui può essere somministrata una composizione secondo la descrizione, ad esempio per scopi sperimentali, diagnostici, profilattici e/o terapeutici. Soggetti tipici includono animali
5 (ad esempio mammiferi come topi, ratti, conigli, primati non umani ed esseri umani) e/o piante.

[0536] *Sostanzialmente*: Come qui utilizzato, il termine "sostanzialmente" si riferisce alla condizione qualitativa di esibire l'estensione totale o quasi totale o il grado di una caratteristica o proprietà di interesse. Un esperto della tecnica ordinaria nella tecnica biologica comprenderà che fenomeni chimici e biologici raramente, se presenti, vengono completati e/o procedono fino a
10 completezza o raggiungono o evitano un risultato assoluto. Il termine "sostanzialmente" di conseguenza viene utilizzato nel presente contesto per catturare la potenziale mancanza di completezza intrinseca di molti fenomeni biologici e chimici.

[0537] *Sostanzialmente uguale*: Come usato nel presente contesto in relazione alle differenze di tempo tra le dosi, il termine significa più/meno del 2%.

15 [0538] *Sostanzialmente contemporaneamente*: Come usato qui e in relazione a una pluralità di dosi, il termine significa entro 2 secondi.

[0539] *Essere affetto da*: Un individuo che "è affetto da" una malattia, un disturbo e/o una condizione è stato diagnosticato o mostra uno o più sintomi di una malattia, un disturbo e/o una condizione.

20 [0540] *Suscettibile a*: Un individuo che è "suscettibile a" una malattia, disturbo e/o condizione non è stato diagnosticato e/o potrebbe non manifestare sintomi della malattia, disturbo e/o condizione ma ha una propensione a sviluppare una malattia o i suoi sintomi. In alcuni casi, un individuo che è suscettibile a una malattia, disturbo e/o condizione (ad esempio, cancro) può essere caratterizzato da uno o più dei seguenti: (1) una mutazione genetica associata allo sviluppo
25 della malattia, disturbo e/o condizione; (2) un polimorfismo genetico associato allo sviluppo della


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

malattia, disturbo e/o condizione; (3) aumentata e/o diminuita espressione e/o attività di una proteina e/o acido nucleico associata alla malattia, disturbo e/o condizione; (4) abitudini e/o stili di vita associati allo sviluppo della malattia, disturbo e/o condizione; (5) una storia familiare della malattia, disturbo e/o condizione; e (6) esposizione a e/o infezione con un microbo associata allo sviluppo della malattia, disturbo e/o condizione. In alcuni casi, un individuo suscettibile a una malattia, disturbo e/o condizione svilupperà la malattia, il disturbo e/o la condizione. In alcuni casi, un individuo suscettibile a una malattia, disturbo e/o condizione non svilupperà la malattia, il disturbo e/o la condizione.

[0541] *Sintetico*: Il termine "sintetico" significa prodotto, preparato e/o fabbricato dalla mano dell'uomo. La sintesi di polinucleotidi o polipeptidi o altre molecole della presente descrizione può essere chimica o enzimatica.

[0542] *Cellule bersagliate*: Come qui utilizzato, "cellule bersagliate" si riferisce a una o più cellule di interesse. Le cellule possono essere trovate *in vitro*, *in vivo*, *in situ* o nel tessuto o organo di un organismo. L'organismo può essere un animale, preferibilmente un mammifero, più preferibilmente un essere umano e più preferibilmente un paziente.

[0543] *Agente terapeutico*: Il termine "agente terapeutico" si riferisce a qualsiasi agente che, quando somministrato a un soggetto, ha un effetto terapeutico, diagnostico e/o profilattico e/o suscita un desiderato effetto biologico e/o farmacologico.

[0544] *Quantità terapeuticamente efficace*: Come usato qui, il termine "quantità terapeuticamente efficace" indica una quantità di un agente da somministrare (ad esempio, acido nucleico, farmaco, agente terapeutico, agente diagnostico, agente profilattico, ecc.) che è sufficiente, quando somministrato a un soggetto che è affetto da o è suscettibile a un'infezione, malattia, disturbo e/o condizione, per trattare, migliorare i sintomi di, diagnosticare, prevenire e/o ritardare l'insorgenza dell'infezione, della malattia, del disturbo e/o della condizione.

[0545] *Esito terapeuticamente efficace*: Come qui utilizzato, il termine "esito terapeuticamente


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

efficace" indica un risultato che è sufficiente in un soggetto affetto da o suscettibile a un'infezione, malattia, disturbo e/o condizione, per trattare, migliorare i sintomi, diagnosticare, prevenire e/o o ritardare l'insorgenza dell'infezione, della malattia, del disturbo e/o della condizione.

5 [0546] *Dose giornaliera totale*: Come usato qui, una "dose giornaliera totale" è una quantità data o prescritta in un periodo di 24 ore. Può essere somministrato come singola dose unitaria.

[0547] *Fattore di trascrizione*: Come qui utilizzato, il termine "fattore di trascrizione" si riferisce a una proteina legante il DNA che regola la trascrizione del DNA in RNA, ad esempio, mediante attivazione o repressione della trascrizione. Alcuni fattori di trascrizione agiscono solo sulla regolazione della trascrizione, mentre altri agiscono di concerto con altre proteine. Alcuni fattori
10 di trascrizione possono sia attivare che reprimere la trascrizione in determinate condizioni. In generale, i fattori di trascrizione legano una o più sequenze bersaglio specifiche molto simili a una sequenza consenso specifica in una regione regolatoria di un gene bersaglio. I fattori di trascrizione possono regolare la trascrizione di un gene bersaglio da solo o in un complesso con altre molecole.

15 [0548] *Trattamento*: Come qui usato, il termine "trattamento" si riferisce ad alleviare parzialmente, completamente, migliorare, potenziare, migliorare, ritardare l'insorgenza, inibire la progressione, ridurre la gravità e/o ridurre l'incidenza di uno o più sintomi o caratteristiche di una infezione, una malattia, un disturbo e/o una condizione specifici. Ad esempio, "trattare" il cancro può riferirsi all'inibizione della sopravvivenza, della crescita e/o della diffusione di un tumore. Il
20 trattamento può essere somministrato a un soggetto che non presenta segni di una malattia, un disturbo e/o una condizione e/o a un soggetto che presenta solo segni precoci di una malattia, un disturbo e/o una condizione allo scopo di ridurre il rischio di sviluppare patologie associate a malattia, disturbo e/o condizione.

[0549] *Non modificato*: Come qui utilizzato, "non modificato" si riferisce a qualsiasi sostanza,
25 composto o molecola prima di essere modificato in alcun modo. Non modificato può, ma non


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sempre, fare riferimento al tipo selvatico o alla forma nativa di una biomolecola. Le molecole possono subire una serie di modificazioni in base alle quali ciascuna molecola modificata può fungere da molecola di partenza "non modificata" per una successiva modifica.

Equivalenti e ambito

5 [0550] Gli esperti nella tecnica riconosceranno, o saranno in grado di accertare utilizzando non più della sperimentazione di routine, molti equivalenti degli aspetti specifici in conformità con la descrizione fornita nel presente contesto. L'ambito della presente descrizione non è inteso essere limitato alla descrizione di cui sopra, ma è piuttosto come indicato nelle rivendicazioni allegate.

[0551] Nelle rivendicazioni gli articoli come "un," "una," e "il" possono indicare uno o più di uno,
10 salvo diversamente indicato, al contrario o altrimenti evidente dal contesto. Le rivendicazioni o le descrizioni che includono "o" tra uno o più elementi di un gruppo sono considerati soddisfatti se uno, più di uno, o tutti gli elementi del gruppo sono presenti, impiegati in o altrimenti rilevanti in un dato prodotto o processo salvo diversamente indicato al contrario o altrimenti evidente dal contesto. La descrizione include aspetti in cui è esattamente presente un membro del gruppo,
15 impiegato in o altrimenti rilevante per un determinato prodotto o processo. La descrizione include aspetti in cui più di uno o tutti i membri del gruppo sono presenti, impiegati in o altrimenti rilevanti per un determinato prodotto o processo.

[0552] Si noti inoltre che il termine "comprendente" è inteso come aperto e consente ma non richiede l'inclusione di elementi o passaggi aggiuntivi. Quando il termine "comprendente" è usato
20 nel presente contesto, anche il termine "costituito da" viene così compreso e descritto.

[0553] Laddove siano indicati intervalli, sono inclusi i punti finali. Inoltre, si deve comprendere che, se non diversamente indicato o altrimenti evidente dal contesto e dalla comprensione di un'abilità ordinaria nella tecnica, i valori che sono espressi come intervalli possono assumere qualsiasi valore specifico o sottointervallo all'interno degli intervalli dichiarati in diversi aspetti
25 della descrizione, al decimo dell'unità del limite inferiore dell'intervallo, a meno che il contesto


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

non stabilisca chiaramente diversamente.

[0554] Inoltre, è chiaro che qualsiasi aspetto specifico della presente descrizione che rientri nella tecnica anteriore può essere esplicitamente esclusa da una o più delle rivendicazioni. Poiché tali aspetti sono ritenuti note a un esperto della tecnica con competenza ordinaria, esse possono essere escluse anche se l'esclusione non è espressamente prevista nel presente contesto. Qualsiasi aspetto specifico delle composizioni della divulgazione (*ad esempio*, qualsiasi acido nucleico o proteina in esso codificata; qualsiasi metodo di produzione; qualsiasi metodo di utilizzo; *ecc.*) può essere escluso da una o più rivendicazioni, per qualsiasi motivo, sia o non connesso all'esistenza della tecnica nota.

10 **ESEMPI**

[0555] La presente descrizione è ulteriormente descritta nei seguenti esempi, che non limitano l'ambito della descrizione descritta nelle rivendicazioni.

Esempio 1. Trascrizione *in vitro* di mRNA modificato

A. Materiali e metodi

15 [0556] Gli mRNA modificati secondo la descrizione sono realizzati utilizzando metodi e materiali di laboratorio standard per la trascrizione *in vitro* con l'eccezione che la miscela di nucleotidi contiene nucleotidi modificati. La cornice di lettura aperta (ORF) del gene di interesse viene affiancata da una regione 5'-non tradotta (UTR) contenente un forte segnale di inizio traduzionale di Kozak e un'alfa-globina 3'UTR che termina con una sequenza oligo(dT) per aggiunta su
20 modello di una coda di poliA per mRNA che non incorporano analoghi dell'adenosina. Gli mRNA contenenti adenosina vengono sintetizzati senza una sequenza di oligo (dT) per consentire il tailing della poli (A) polimerasi poli-(A) post-trascrizione.

[0557] Gli mRNA modificati possono essere modificati per ridurre la risposta immunitaria innata cellulare.

25 [0558] L'ORF può anche includere varie aggiunte a monte o a valle (come, a titolo


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

esemplificativo, β -globina, tag, ecc.) che possono essere ordinate da un servizio di ottimizzazione come, a titolo esemplificativo, DNA2.0 (Menlo Park, CA) e possono contenere più siti di clonazione che possono avere il riconoscimento XbaI. Al ricevimento del costrutto, può essere ricostituito e trasformato in *E. coli* chimicamente competente.

5 [0559] Per la presente descrizione, vengono utilizzati l'*E. coli* competente NEB DH5- α . Le trasformazioni vengono eseguite secondo le istruzioni NEB utilizzando 100 ng di plasmide. Il protocollo è il seguente:

Scongela una provetta di cellule di *E. coli* NEB 5- α competenti in ghiaccio per 10 minuti.

10 Aggiungere 1-5 μ l contenente 1 pg-100 ng di DNA plasmidico alla miscela cellulare. Colpire con attenzione la provetta 4-5 volte per mescolare cellule e DNA. Non agitare in vortice.

Mettere il composto in ghiaccio per 30 minuti. Non mescolare.

Shock termico a 42 °C per 30 secondi esatti. Non mescolare.

Mettere in ghiaccio per 5 minuti. Non mescolare.

Pipettare 950 μ l di SOC a temperatura ambiente nella miscela.

15 Mettere a 37 °C per 60 minuti. Agitare energicamente (250 giri/min) o ruotare.

Riscaldare le piastre di selezione a 37 °C.

Mescolare accuratamente le cellule scuotendo la provetta e capovolgendola.

Distribuire 50-100 μ l di ciascuna diluizione su una piastra di selezione e incubare per una notte a 37 °C. In alternativa, incubare a 30 °C per 24-36 ore o a 25 °C per 48 ore.

20 [0560] Una singola colonia viene quindi utilizzata per inoculare 5 ml di terreno di crescita LB utilizzando l'antibiotico appropriato e quindi lasciata crescere (250 giri/min, 37 °C) per 5 ore. Questo viene quindi utilizzato per inoculare un mezzo di coltura da 200 mL e lasciato crescere per una notte nelle stesse condizioni.

[0561] Per isolare il plasmide (fino a 850 μ g), viene eseguita una maxi preparazione utilizzando
25 il kit Invitrogen PURELINK™ HiPure Maxiprep (Carlsbad, CA), seguendo le istruzioni del


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

produttore.

[0562] Per generare cDNA per la trascrizione *in vitro* (IVT), il plasmide (un esempio del quale è mostrato nella Figura 3) viene prima linearizzato utilizzando un enzima di restrizione come XbaI.

Una tipica digestione di restrizione con XbaI comprenderà quanto segue: plasmide da 1,0 µg; 10×

5 di Tampone da 1,0 µl; XbaI da 1,5 µL; dH₂O fino a 10 µl; incubato a 37 °C per 1 ora. Se si esegue su scala di laboratorio (< 5 µg), la reazione viene purificata utilizzando il kit micro PCR PURELINK™ di Invitrogen (Carlsbad, CA) secondo le istruzioni del produttore. Può essere necessario eseguire purificazioni su larga scala con un prodotto che ha una capacità di carico maggiore come il kit PCR PURELINK™ di Invitrogen (Carlsbad, CA). Dopo la pulizia, il vettore
10 linearizzato viene quantificato utilizzando il NanoDrop e analizzato per confermare la linearizzazione utilizzando l'elettroforesi su gel di agarosio.

B. Elettroforesi su gel di agarosio di mRNA modificato

[0563] Singoli mRNA modificati (200-400 ng in un volume di 20 µl) vengono caricati in un pozzetto su un E-Gel di agarosio all'1,2% non denaturante (Invitrogen, Carlsbad, CA) ed eseguiti

15 per 12-15 minuti secondo il protocollo del produttore.

C. Elettroforesi su gel di agarosio di prodotti RT-PCR

[0564] I singoli prodotti di PCR con trascrizione inversa (200-400 ng) vengono caricati in un pozzetto di un E-Gel di agarosio all'1,2% non denaturante (Invitrogen, Carlsbad, CA) ed eseguiti per 12-15 minuti secondo il protocollo del produttore.

20 D. Quantificazione dell'mRNA modificato Nanodrop e dati spettrali UV

[0565] Gli mRNA modificati nel tampone TE (1 µl) vengono utilizzati per le letture dell'assorbanza UV Nanodrop per quantificare la resa di ciascun mRNA alternativo da una reazione di trascrizione *in vitro* (le tracce di assorbanza UV non sono mostrate).

Esempio 2. Trasfezione di mRNA modificato

25 A. Trasfezione inversa


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0566] Per gli esperimenti eseguiti in una piastra di coltura tissutale rivestita di collagene a 24 pozzetti, i cheratinociti vengono seminati a una densità cellulare di 1×10^5 . Per gli esperimenti eseguiti in una piastra di coltura tissutale rivestita di collagene a 96 pozzetti, i cheratinociti vengono seminati a una densità cellulare di $0,5 \times 10^5$. Per ogni mRNA modificato da trasfettare, l'mRNA modificato: RNAIMAX™ vengono preparati come descritto e miscelati con le cellule nella piastra multi-pozzetto entro 6 ore dalla semina cellulare prima che le cellule aderiscano alla piastra di coltura tissutale.

B. Trasfezione diretta

[0567] In una piastra di coltura tissutale rivestita di collagene a 24 pozzetti, i cheratinociti vengono seminati a una densità cellulare di $0,7 \times 10^5$. Per gli esperimenti eseguiti in una piastra di coltura tissutale rivestita di collagene a 96 pozzetti, i cheratinociti vengono seminati a una densità cellulare di $0,3 \times 10^5$. I cheratinociti vengono quindi fatti crescere fino a una confluenza di $>70\%$ per oltre 24 ore. Per ogni mRNA modificato da trasfettare, l'mRNA modificato: RNAIMAX™ vengono preparati come descritto e trasfettati sulle cellule nella piastra multi-pozzetto oltre 24 ore dopo la semina cellulare e l'adesione alla piastra di coltura tissutale.

C. Screening di traduzione dell'mRNA modificato: G-CSF ELISA

[0568] I cheratinociti vengono coltivati in mezzo EpiLife con Supplemento S7 di Invitrogen a una confluenza di $>70\%$. I cheratinociti vengono trasfettati inversamente con 300 ng dell'mRNA modificato chimicamente indicato complessato con RNAIMAX™ di Invitrogen. In alternativa, i cheratinociti vengono trasfettati in avanti con 300 ng di mRNA modificato complessato con RNAIMAX™ di Invitrogen. L'RNA: Il complesso RNAIMAX™ si forma incubando prima l'RNA con un mezzo EPILIFE® senza supplementi in una diluizione volumetrica 5X per 10 minuti a temperatura ambiente.

[0569] In una seconda fiala, il reagente RNAIMAX™ incubato con mezzi EPILIFE® senza supplemento in una diluizione volumetrica 10X per 10 minuti a temperatura ambiente. La fiala di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

RNA viene quindi miscelata con la fiala di RNAIMAX™ e incubata per 20-30 a temperatura ambiente prima di essere aggiunta alle cellule a gocce. La concentrazione di huG-CSF secreto nel mezzo di coltura viene misurata a 18 ore dopo la trasfezione per ciascuno degli mRNA chimicamente modificati in triplicato. La secrezione del fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) dai cheratinociti umani trasfettati viene quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) seguendo le istruzioni consigliate dai produttori.

D. Dose e durata dell'mRNA modificato: ELISA di G-CSF

[0570] I cheratinociti vengono coltivati in mezzo EPILIFE® con Supplemento S7 di Invitrogen a una confluenza di >70%. I cheratinociti vengono trasfettati inversamente con mRNA modificato da 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375ng, 750 ng o 1500 ng in complesso con RNAIMAX™ di Invitrogen. L'mRNA modificato: Il complesso RNAIMAX™ si forma come descritto. La concentrazione di huG-CSF secreto nel mezzo di coltura viene misurata a 0, 6, 12, 24 e 48 ore dopo la trasfezione per ciascuna concentrazione di ciascun mRNA modificato in triplicato. La secrezione del fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) dai cheratinociti umani trasfettati viene quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen o R&D Systems seguendo le istruzioni consigliate dai produttori.

Esempio 3. Risposta immunitaria innata cellulare agli acidi nucleici modificati: ELISA di IFN-beta ed ELISA di TNF-alfa

[0571] Un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il fattore di necrosi tumorale umano- α (TNF- α), l'interferone- β umano (IFN- β) e il fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) secreti da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* sono testate per il rilevamento di una risposta immunitaria innata cellulare.

[0572] I cheratinociti vengono coltivati in mezzo EPILIFE® con supplemento di crescita umana in assenza di idrocortisone da Invitrogen a una confluenza di >70%. I cheratinociti vengono trasfettati inversamente con 0 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1500 ng o 3000 ng


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

dell'mRNA chimicamente modificato indicato in complesso con RNAIMAX™ di Invitrogen come descritto in triplicato. Il TNF- α secreto nel mezzo di coltura viene misurato 24 ore dopo la trasfezione per ciascuno degli mRNA chimicamente modificati utilizzando un kit ELISA di Invitrogen secondo i protocolli del produttore.

5 [0573] L'IFN- β secreto viene misurato 24 ore dopo la trasfezione per ciascuno degli mRNA chimicamente modificati utilizzando un kit ELISA di Invitrogen secondo i protocolli del produttore. La concentrazione secreta di hu-G-CSF viene misurata a 24 ore dopo la trasfezione per ciascuno degli mRNA chimicamente modificati. La secrezione del fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) dai cheratinociti umani trasfettati viene quantificata
10 utilizzando un kit ELISA di Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) seguendo le istruzioni consigliate dai produttori. Questi dati indicano quale mRNA modificato è in grado di suscitare una risposta immunitaria innata cellulare ridotta rispetto a polinucleotidi naturali e altri polinucleotidi chimicamente modificati o composti di riferimento misurando citochine di tipo 1 esemplificative come TNF-alfa e IFN-beta.

15 **Esempio 4. Saggio di proliferazione cellulare indotta da mRNA modificato con fattore stimolante le colonie dei granulociti umani**

[0574] I cheratinociti umani vengono coltivati in mezzo EPILIFE® con Supplemento S7 di Invitrogen a una confluenza di >70% in una piastra di coltura tissutale TRANSWELL® (Corning, Lowell, MA) rivestita di collagene a 24 pozzetti. I cheratinociti vengono trasfettati inversamente
20 con 750ng dell'mRNA modificato chimicamente indicato complessato con RNAIMAX™ di Invitrogen come descritto in triplicato. L'mRNA modificato: Il complesso RNAIMAX™ si forma come descritto. Il mezzo dei cheratinociti viene scambiato 6-8 ore dopo la trasfezione. 42 ore dopo la trasfezione, l'insero della piastra TRANSWELL® a 24 pozzetti con una membrana in poliestere semipermeabile con pori di 0,4 μ m viene inserito nella piastra di coltura contenente
25 cheratinociti trasfettati con mRNA modificato con hu-G-CSF.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0575] Le cellule mieloblastiche umane, le cellule Kasumi-1 o KG-1 ($0,2 \times 10^5$ cellule), vengono seminate nel pozzetto dell'inserito e la proliferazione cellulare viene quantificata 42 ore dopo l'inizio della co-coltura utilizzando il CyQuant Direct Cell Proliferation Assay (Invitrogen) in un volume di 100-120 μ l microlitri in una piastra da 96 pozzetti. La proliferazione cellulare del mieloblasto indotta da hu-G-CSF con codifica di mRNA modificato è espressa come una percentuale di proliferazione cellulare normalizzata in pozzetti di controllo della co-coltura di cheratinociti/mieloblasti non trasfettati. La concentrazione secreta di hu-G-CSF nei pozzetti di co-coltura dell'inserito di cheratinociti e mieloblasti viene misurata a 42 ore dall'inizio della co-coltura per ciascun mRNA modificato in duplicato. La secrezione del fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) viene quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen seguendo le istruzioni consigliate dal produttore.

[0576] L'mRNA modificato di hu-G-CSF trasfettato in cellule nutritive di cheratinociti umani e cellule mieloblastiche umane non trasfettate viene rilevato mediante RT-PCR. L'RNA totale dalle cellule campione viene estratto e lisato utilizzando il kit RNeasy[®] (Qiagen, Valencia, CA) secondo le istruzioni del produttore. L'RNA totale estratto viene sottoposto a RT-PCR per l'amplificazione specifica dell'mRNA-G-CSF modificato utilizzando il kit PROTOSCRIPT[®] M-MuLV *Taq* RT-PCR (New England BioLabs, Ipswich, MA) secondo le istruzioni del produttore con hu-G-CSF-primer specifici. I prodotti RT-PCR sono visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,2%.

20 **Esempio 5. Citotossicità e apoptosi**

[0577] Questo esperimento dimostra la vitalità cellulare, la citotossicità e l'apoptosi per distinte cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* con mRNA modificato. I cheratinociti vengono coltivati in mezzo EPILIFE[®] con supplemento di crescita dei cheratinociti umani in assenza di idrocortisone da Invitrogen a una confluenza di >70%. I cheratinociti vengono trasfettati inversamente con mRNA modificato con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

1500 ng, 3000 ng o 6000ng in complesso con RNAIMAX™ di Invitrogen. L'mRNA modificato: Si forma il complesso RNAIMAX™. La concentrazione di huG-CSF secreto nel mezzo di coltura viene misurata a 0, 6, 12, 24 e 48 ore dopo la trasfezione per ciascuna concentrazione di ciascun mRNA modificato in triplicato. La secrezione del fattore stimolante le colonie di granulociti
5 umani (G-CSF) dai cheratinociti umani trasfettati viene quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen o R&D Systems seguendo le istruzioni consigliate dai produttori. La vitalità cellulare, la citotossicità e l'apoptosi vengono misurate a 0, 12, 48, 96 e 192 ore dopo la trasfezione utilizzando il kit APOTOX-GLO™ di Promega (Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore.

10 **Esempio 6. Ambiente di co-coltura**

[0578] L'mRNA modificato composto da nucleotidi modificati chimicamente distinti che codificano il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) umano può stimolare la proliferazione cellulare di una cellula incompetente alla trasfezione in un ambiente di co-coltura. La co-coltura include un tipo cellulare altamente trasfettabile come un cheratinocita umano e un
15 tipo cellulare incompetente alla trasfezione come un globulo bianco (white blood cell, WBC). L'mRNA modificato che codifica il G-CSF può essere trasfettato nella cellula altamente trasfettabile consentendo la produzione e la secrezione della proteina G-CSF nell'ambiente extracellulare dove il G-CSF agisce in modo paracrino per stimolare i globuli bianchi che esprimono il recettore G-CSF a proliferare. La popolazione leucocitaria ampliata può essere
20 utilizzata per trattare pazienti immunocompromessi o ricostituire parzialmente la popolazione leucocitaria di un paziente immunosoppresso e quindi ridurre il rischio di infezioni opportunistiche.

[0579] In un altro esempio, una cellula altamente trasfettabile come un fibroblasto viene trasfettata con determinati fattori di crescita per supportare e simulare la crescita, il mantenimento
25 o la differenziazione di cellule staminali embrionali scarsamente trasfettabili o cellule staminali


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

pluripotenti indotte.

Esempio 7. Capping di 5'-Guanosina su acidi nucleici modificati (mRNA modificati)

A. Materiali e metodi

[0580] La clonazione, la sintesi genica e il sequenziamento del vettore sono stati eseguiti mediante
5 DNA2.0 Inc. (Menlo Park, CA). L'ORF è stata digerita con restrizione utilizzando XbaI e
utilizzato per la sintesi del cDNA utilizzando la tailed-o tail-less-PCR. Il prodotto cDNA della
tailed-PCR è stato utilizzato come modello per la reazione di sintesi dell'mRNA modificato
utilizzando 25 mM per ciascuna miscela di nucleotidi modificata (tutti i nucleotidi modificati sono
10 stati sintetizzati su misura o acquistati da TriLink Biotech, San Diego, CA eccetto il pirrolo-C
trifosfato acquistato da Glen Research, Sterling VA; i nucleotidi non modificati sono stati
acquistati da Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) e il kit completo di sintesi dell'mRNA
CellScript MEGASCRIPTM (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). La reazione di
trascrizione *in vitro* viene eseguita per 4 ore a 37 °C. Gli mRNA modificati che incorporano
15 analoghi dell'adenosina sono poli A) con coda usando la poli(A) polimerasi di lievito (Affymetrix,
Santa Clara, CA). La reazione PCR utilizzata HiFi PCR 2X MASTER MIXTM (Kapa Biosystems,
Woburn, MA). Gli mRNA modificati sono stati bloccati post-trascrizionalmente utilizzando
l'enzima di capping del virus vaccino ricombinante (New England BioLabs, Ipswich, MA) e una
2'-o-metiltransferasi ricombinante (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) per generare la
struttura Cap1 di 5'-guanosina. La struttura Cap 2 e le strutture Cap 2 possono essere generate
20 utilizzando 2'-o-metiltransferasi aggiuntive. Il prodotto di mRNA trascritto *in vitro* è stato
eseguito su un gel di agarosio e visualizzato. L'mRNA modificato è stato purificato con il kit di
purificazione MEGAClear RNATM di Ambion/Applied Biosystems (Austin, TX). La PCR ha
utilizzato il kit di purificazione PCR PURELINKTM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Il prodotto è stato
quantificato su NANODROPTM UV Absorbance (ThermoFisher, Waltham, MA). La qualità, la
25 qualità di assorbimento dei raggi UV e la visualizzazione del prodotto sono state eseguite su un

gel di agarosio all'1,2%. Il prodotto è stato risospeso nel tampone TE.

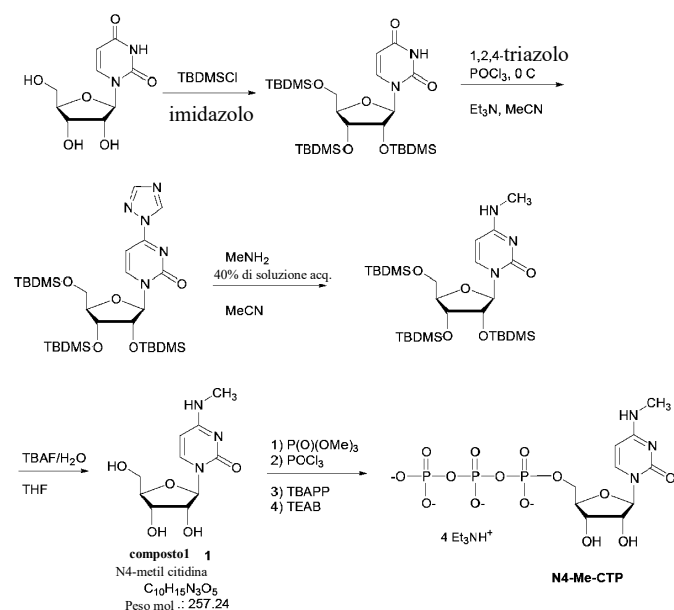
B. Struttura dell'acido nucleico modificato (mRNA) con 5'-capping.

[0581] Il 5'-capping dell'mRNA modificato può essere completato in concomitanza durante la reazione di trascrizione *in vitro* utilizzando i seguenti analoghi chimici del cap dell'RNA per generare la struttura del cap 5'-guanosina secondo i protocolli del produttore: 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G (il cap di ARCA); G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m⁷G(5')ppp(5')A; m⁷G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). Il 5'-capping dell'mRNA modificato può essere completato post-trascrizionalmente utilizzando un enzima di capping del virus vaccino per generare la struttura "Cap 0": m⁷ G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La struttura di Cap 1 può essere generata utilizzando sia l'enzima di capping del virus Vaccinia che una 2'-O metil-transferasi per generare: m⁷G(5')ppp(5')G-2'-O-metile. La struttura di Cap 2 può essere generata dalla struttura Cap 1 seguita dalla 2'-O-metilazione del 5'-terzultimo nucleotide usando una 2'-O metil-transferasi. La struttura di Cap 3 può essere generata dalla struttura Cap 2 seguita dalla 2'-O-metilazione del 5'-quartultimo nucleotide usando una 2'-O metil-transferasi. Gli enzimi sono preferibilmente derivati da una fonte ricombinante.

[0582] Quando trasfettati in cellule di mammifero, gli mRNA modificati hanno una stabilità compresa tra 12-18 ore o più di 18 ore, ad esempio 24, 36, 48, 60, 72 o più di 72 ore.

Esempio 8. Sintesi di N4-metil citidina (composto 1) e N4-metil CTP (NTP di detto composto)

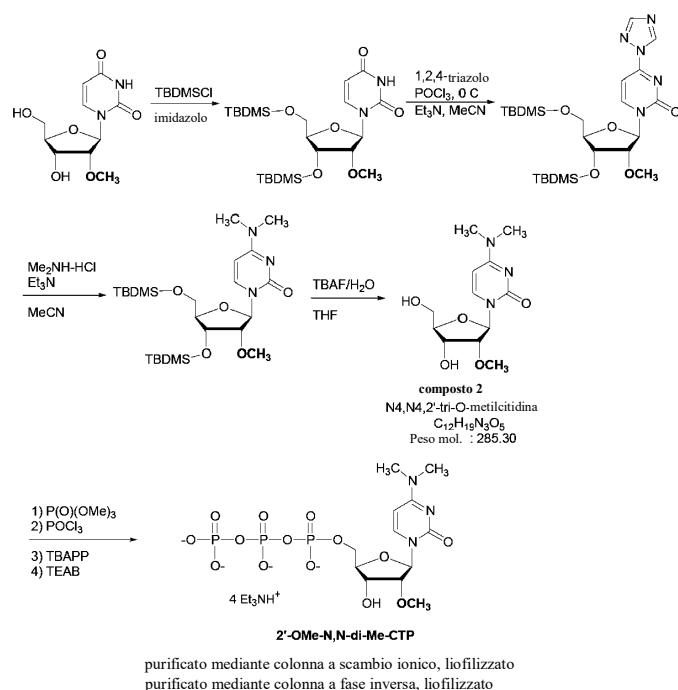
20 [0583]



[0584] L'uridina è stata silylata per fornire un composto trisilylato, che è stato purificato mediante colonna, attivato con POCl₃/triazolo ridistillato in condizione anidra, e quindi seguito da sostituzione nucleofila con una soluzione acquosa di metilammina al 40%. Dopo la purificazione cromatografica è stata così ottenuta N4-metil-2',3',5'-tri-O-TBDMS-citidina. Il prodotto risultante è stato deprotetto con TBAF e quindi purificato con un sistema solvente etanolo-acetato di etile (3:1) per ottenere il composto 1. Il prodotto finale è stato caratterizzato da NMR (in DMSO); MS: 258 (M + H)⁺, 280 (M + Na)⁺ e 296 (M + K)⁺; e HPLC: purezza, 99,35% (FIGG. 1A-1D). HPLC, purezza 98% (FIG. 2).

10 **Esempio 9. Sintesi di 2'-OMe-N,N-di-Me-citidina (composto 2) e 2'-OMe-N,N-di-Me-CTP (NTP di detto composto)**

[0585]



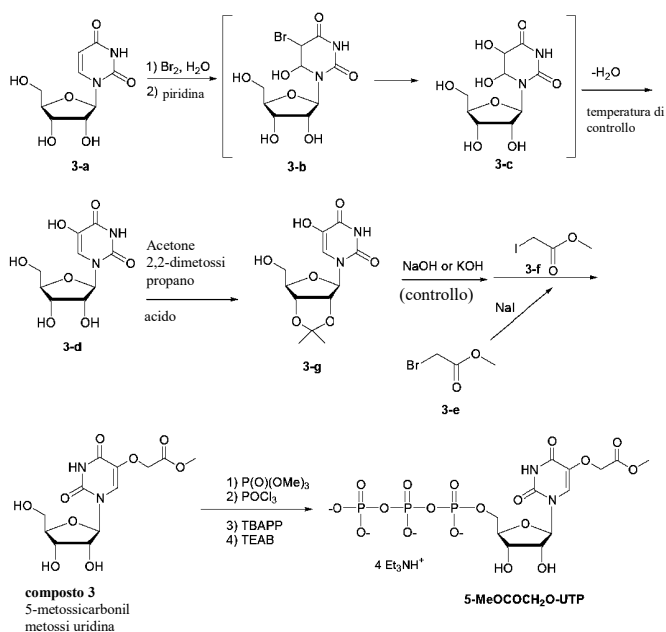
[0586] La 2'-O-metiluridina è stata silitata per dare il composto disilitato. L'uridina 2'-O-metil-3',5'-di-O-TBDMS purificata è stata attivata con POCl₃ ri-distillato e imidazolo in condizioni anidre, seguita dalla sostituzione nucleofila con dimetilammina cloridrato in ambiente trietilammina per intrappolare HCl. L'uridina del composto intermedio N₄,N₄,2'-tri-O-metil-3',5'-bis-O-TBDMS è stata purificata mediante cromatografia flash e ottenuta come schiuma bianca. Il composto risultante è stato deproteetto con TBAF e quindi purificato per fornire ~400 mg di composto 2 del prodotto finale come schiuma bianca. ES MS: m/z 308 (M + Na)⁺, 386 (M + H)⁺; HPLC: purezza, 99,49% (FIGG. 3A-3C).

10 [0587] Per sintetizzare il corrispondente NTP, 70 mg di composto nucleosidico 2 hanno fornito 23 mg di 2'-OMe-N,N-di-Me-CTP dopo la purificazione tramite colonne a scambio ionico e a fase inversa. HPLC: purezza, 95% (FIG. 4).

Esempio 10. Sintesi di 5-metossicarbonilmetossi uridina (composto 3) e 5-metossicarbonilmetossi-UTP (NTP di detto composto)

15 [0588]

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



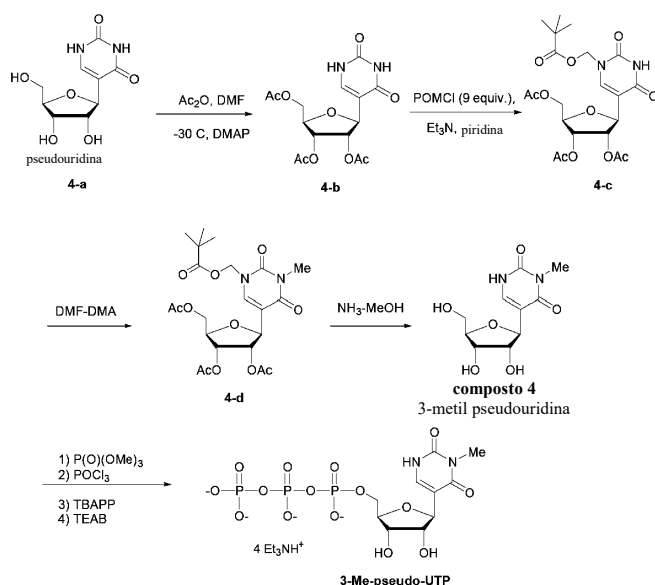
[0589] L'uridina 3-a in acqua è stata trattata con una quantità eccessiva di bromo e quindi pulita all'aria per rimuovere il bromo. La miscela di reazione è stata trattata con piridina a velocità e temperatura controllate. Durante la reazione, il bromo-intermedio instabile 3-b si è gradualmente convertito nell'intermedio diidrossile 3-c, che presumibilmente si è disidratato nella 5-idrossiuridina 3-d stabile. Quindi, la 5-idrossiuridina è stata protetta con un gruppo 2',3'-isopropilidene per fornire il composto 3-g. La reazione con il composto 3-f ha fornito il composto 3.

[0590] 60-70 mg del nucleoside hanno fornito >21 mg del trifosfato desiderato dopo due fasi di purificazione della colonna HPLC e due fasi di liofilizzazione. HPLC: purezza, 98% (FIG. 5).

Esempio 11. Sintesi di 3-metil pseudouridina (composto 4) e 3-metil pseudo-UTP (NTP di detto composto)

[0591]

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

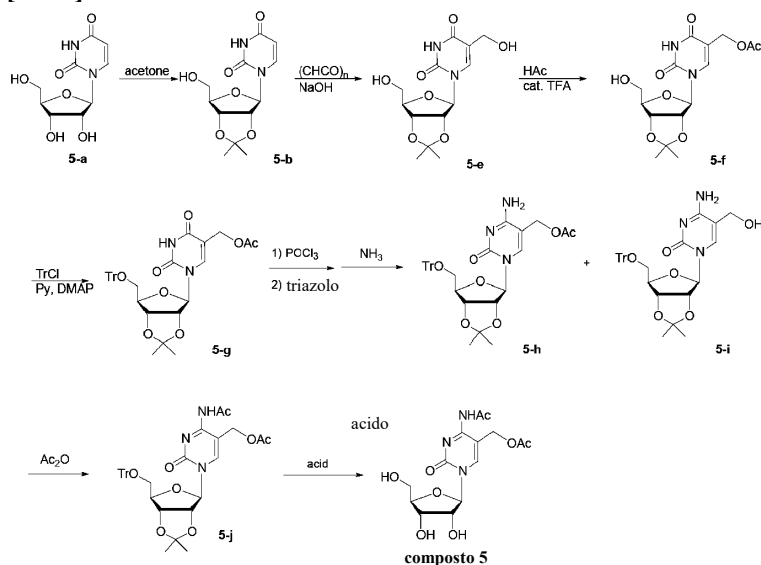


- [0592] La pseudouridina 4-a è stata fatta reagire con AC_2O per fornire la pseudouridina 4-b protetta con acetile. Quindi, N1 è stato protetto selettivamente con POM per fornire il composto 4-c. La metilazione di N3, seguita dal composto 4 deprotetto e fornito (~400 mg). Formula molecolare: $C_{10}H_{14}N_2O_6$, peso molecolare: 258,23 g/mol; aspetto: solido bianco; condizioni di conservazione: conservare a 25 °C; HPLC: purezza, 98,51%; 1H NMR (DMSO- d_6): δ 11,17 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz), 7,56 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 4,91 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 4,79 (t, 1H, $J = 4,2$ Hz), 4,70 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz), 4,49 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz), 3,82-3,88 (m, 2H), 3,66-3,67 (m, 1H), 3,57-3,61 (m, 1H), 3,40-3,47 (m, 1H), 3,09 (s, 3H); MS: 281 [(M + Na) $^+$] (FIGG. 6A e 6B).
- 10 [0593] Si potrebbero applicare vie alternative per ottenere il composto 4. Ad esempio, la pseudouridina potrebbe essere fatta reagire con un gruppo O-protettivo (ad esempio, come descritto nel presente contesto, come TMS) e reagita con un gruppo N-protettivo (ad esempio, come descritto nel presente contesto, come acetile in N1). Quindi, N3 della base azotata potrebbe essere fatto reagire con un agente alchilante (ad esempio, dimetilammina/dimetossimetile) per
- 15 fornire il composto 4 avente gruppi N- oppure O-protettivi. Infine, il composto risultante verrebbe deprotetto (ad esempio, in condizioni basiche, come $NH_3/MeOH$) per fornire il composto 4.

Esempio 12. Sintesi di N-Ac, 5-Ac-OCH₂-citidina (composto 5)

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0594]



[0595] L'uridina 5-a è stata protetta per ottenere il composto isopropilidenico 5-b, che è stato fatto reagire con $(\text{CHCO})_n$. È stato impiegato acido acetico con una quantità di catalizzatore di TFA per ottenere il composto 5-f acilato selettivamente desiderato (resa del 30%). Un'ulteriore tritilazione del gruppo 5'-OH ha dato come risultato il composto protetto ortogonalmente 5-g desiderato.

[0596] Il composto 5-g è stato trattato con POCl_3 e triazolo per fornire il composto 5-h insieme al composto deacilato 5-i. L'acetilazione di questi due composti ha fornito il composto 5-j diacilato e completamente protetto. La deprotezione del composto 5-j con acido acetico in condizioni di riscaldamento ha prodotto tre prodotti, uno dei quali era il composto 5.

[0597] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

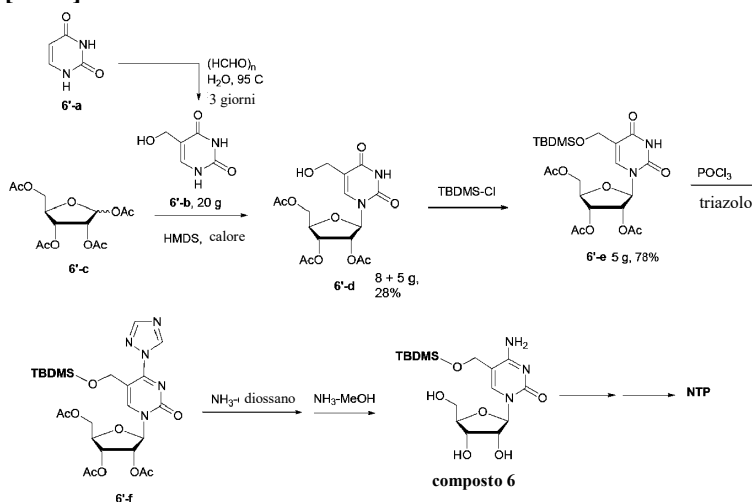
[0598] Si potrebbero applicare vie alternative per ottenere il composto 5, ad esempio iniziando con citidina come materiale di partenza. In tali metodi, la posizione 5 potrebbe essere fatta reagire con un alogeno o un agente di alogenazione (ad esempio, qualsiasi descritto nel presente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

documento, come l'acido I₂/meta-cloroperossibenzoico), che può essere spostato con un agente alchilante. Inoltre, tali metodi potrebbero includere l'uso di uno o più gruppi N- oppure O-protettivi (ad esempio, qualsiasi descritto nel presente contesto, come sililazione o acetilazione) per proteggere il gruppo amminico di citidina e/o gruppi ossidrilici della porzione zuccherina.

5 Esempio 13. Sintesi di 5-TBDMS-OCH₂-citidina (composto 6)

[0599]



[0600] Un composto 5-idrossiuracile 'b è stato glicosilato per ottenere il composto 6'-d (resa del 28%), che è stato sililato per fornire il composto 6'-e. L'attivazione dell'uridina protetta ha fornito il composto 6 desiderato dopo ulteriore amminazione e deprotezione (800 mg del composto finale). Formula molecolare: C₁₆H₂₉N₃O₆Si; peso molecolare: 387,50 g/mol; aspetto: solido bianco; condizioni di conservazione: conservare a 25 °C; HPLC: purezza, 97,57%; ¹H NMR (CDCl₃): δ 7,81 (s, 1H), 7,40 (bs, 1H), 6,49 (bs, 1H), 5,79 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 5,3-5,32 (m, 1H), 5,00-5,07 (m, 2H), 4,30—4,45 (m, 2H), 3,90—3,94 (m, 2H), 3,80—3,83 (m, 1H), 3,50-3,70 [m, 2H), 0,87 (s, 9H), 0,05 (s, 6H); MS: 388 (M + H)⁺, 410 (M + Na)⁺] (FIGG. 7A-7C).

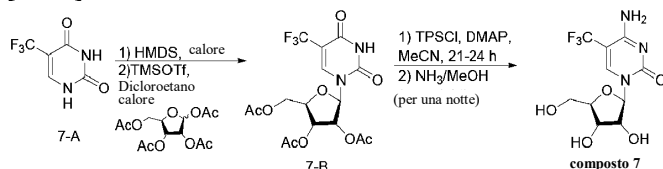
[0601] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(ad esempio, da EtOH).

Esempio 14. Sintesi di 5-trifluorometil citidina (composto 7)

[0602]

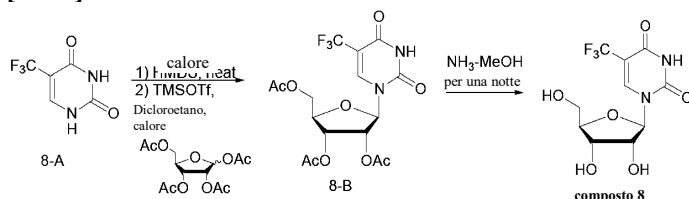


- 5 [0603] Il composto 7-A è stato glicosilato per fornire il composto 7-B, che è stato trattato con 2,4,6-triisopropilbenzen sulfonil cloruro (TPSCI) per attivare il gruppo carbonile e promuovere l'amminazione riduttiva. Composto 7 fornito dalla deprotezione. Al posto del TPSCI possono essere usati agenti attivanti alternativi, come il 2,4,6-trimetilbenzen solfonil cloruro.

- 10 [0604] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 15. Sintesi di 5-trifluorometil uridina (composto 8)

[0605]



- 15 [0606] Il 5-trifluorometiluracile 8-A è stato glicosilato con tetra-O-acetil ribosio e la 5-trifluorometiluridina 8-B triprotetta desiderata è stata ottenuta con una buona resa. Un'ulteriore deprotezione ha dato il composto 8 desiderato, che è stato caratterizzato con risultati NMR, MS e HPLC. MS: 313 (M + H)⁺, 335 (M + Na)⁺; HPLC: purezza, 98,87%, [(FIGURE 8A-8C).

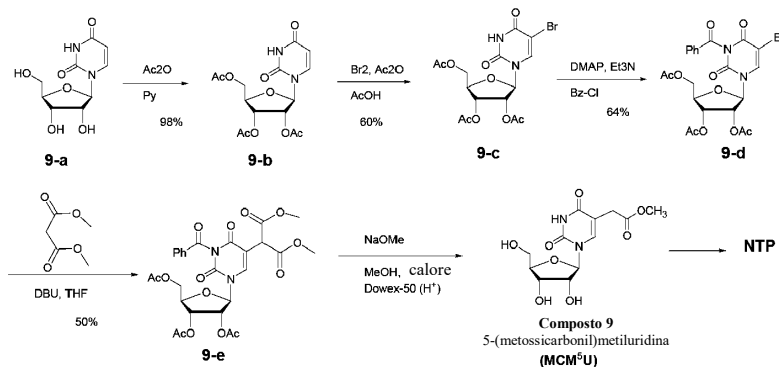
- 20 [0607] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(ad esempio, da EtOH).

Esempio 16. Sintesi di 5-(metossicarbonil)metiluridina (composto 9)

[0608]

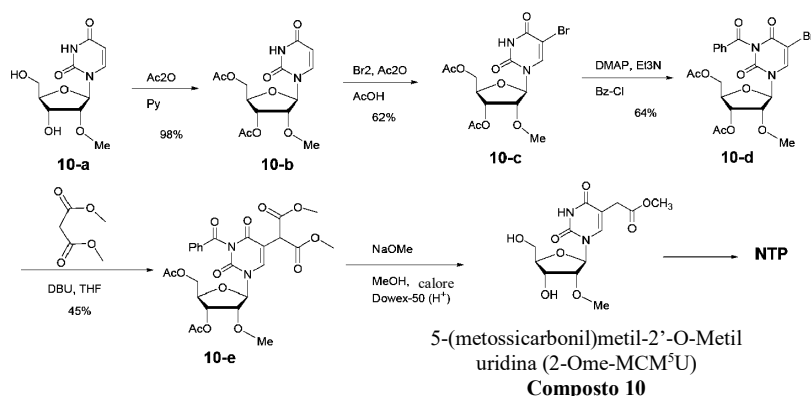


5 [0609] L'uridina 9-a è stata protetta per fornire il composto 9-b (resa del 98%). Questo composto è stato bromurato con bromo in eccesso in presenza di anidride acetica e acido acetico. L'analogo 5-bromo 9-c è stato ottenuto (60% di resa) e ulteriormente benzoilato per fornire il composto desiderato 9-d (64% di resa). Il composto 5-bromo 9-d è stato condensato con dimetil malonato in condizioni basiche per dare il malonato arilato e il diestere 9-e completamente protetto (resa del 50%). Dopo decarbossilazione e deprotezione, si ottiene il composto 9 verificato mediante NMR (FIG. 9).

[0610] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 17. Sintesi di 5-(metossicarbonil)metil-2'-O-metil uridina (2-OMe-MCM5U) (composto 10)

[0611]

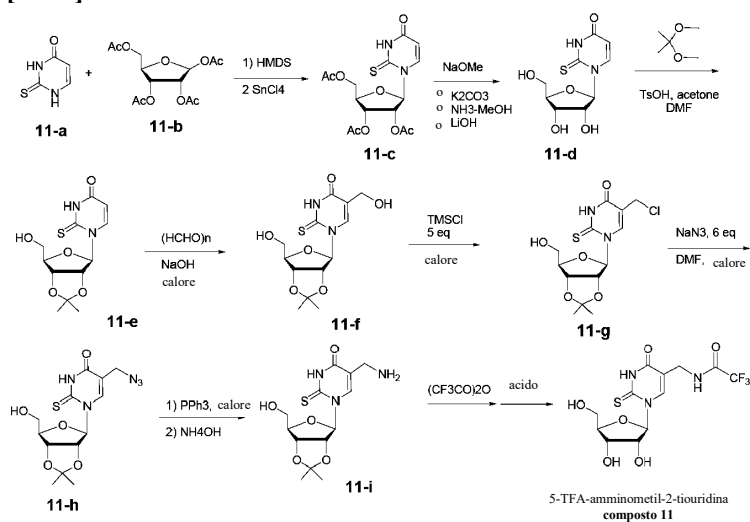


[0612] Strategia simile alla sintesi del composto 9 di cui sopra, la 2'-O-metiluridina 10-a è stata acilata e bromurata per ottenere il composto 10-c. Un'ulteriore benzoilazione ha fornito l'analogo 5-bromo 10-d, che è stato condensato con dimetil malonato per fornire il prodotto desiderato 10-e (resa del 45%). La decarbossilazione e la deprotezione hanno fornito il composto 10.

[0613] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

10 Esempio 18. Sintesi di 5-trifluoroacetil-amminometil-2-tiouridina (composto 11)

[0614]



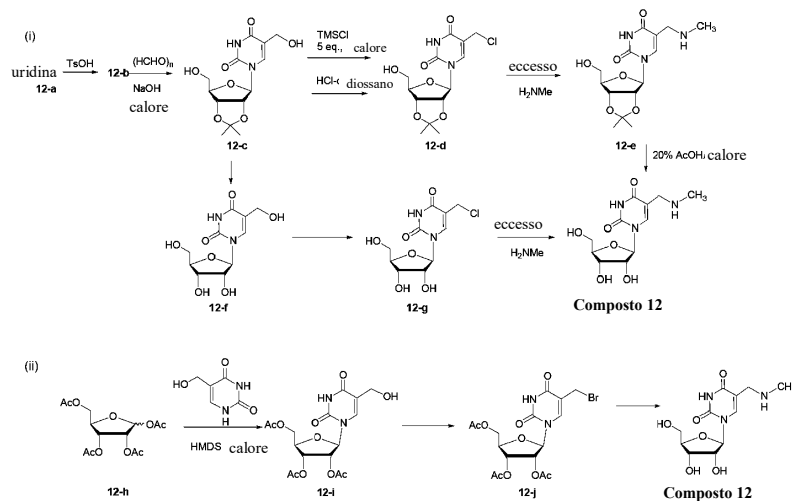
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0615] La glicosilazione del 2-tiouracile 11-a ha fornito il composto 11-c, che può essere deproteetto con qualsiasi utile reagente di deprotezione. In particolare, LiOH ha fornito il prodotto desiderato 11-d (80-90% di resa). La protezione dell'isopropilidene ha fornito il composto 11-e (resa del 90%). Un'ulteriore 5-idrossimetilazione ha fornito il composto 11-f. Clorurazione, azidazione e ulteriore riduzione hanno fornito il composto 11-i di metilammina, che è stato acetilato per fornire il composto 11 fornito.

[0616] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 19. Sintesi di 5-metilamminometil-2-uridina (composto 12)

[0617]



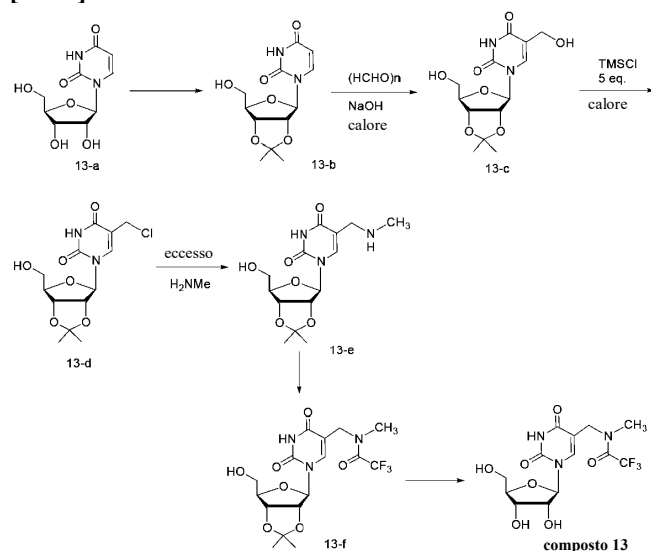
[0618] Il composto 12 può essere ottenuto con qualsiasi metodo utile [ad esempio, si vedano gli schemi (i) e (ii) sopra]. Ad esempio, l'uracile protetto può essere glicosilato e successivamente amminato per fornire il composto 12. Se necessario, è possibile eseguire ulteriori fasi di protezione, deprotezione e attivazione. Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto).


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 20. Sintesi di 5-TFA-metilamminometil-2-uridina (composto 13)

[0619]



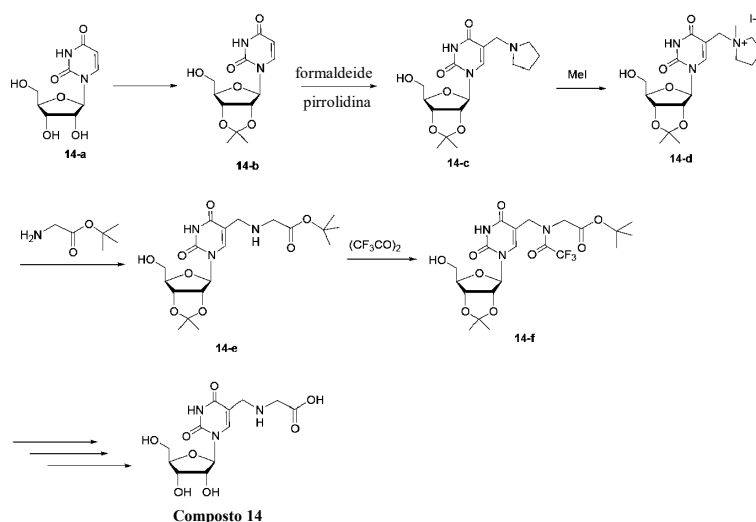
[0620] L'uridina 13-a è stata protetta con isopropilidene per fornire il composto 13-b e quindi 5-idrossimetilata per fornire il composto 13-c. La clorurazione e la successiva amminazione hanno fornito il composto 13-e, che può essere protetto fino al 13-f fornito. La successiva deprotezione ha fornito il composto 13.

10 [0621] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 21. Sintesi di 5-carbossimetilamminometil uridina (composto 14)

15 [0622]

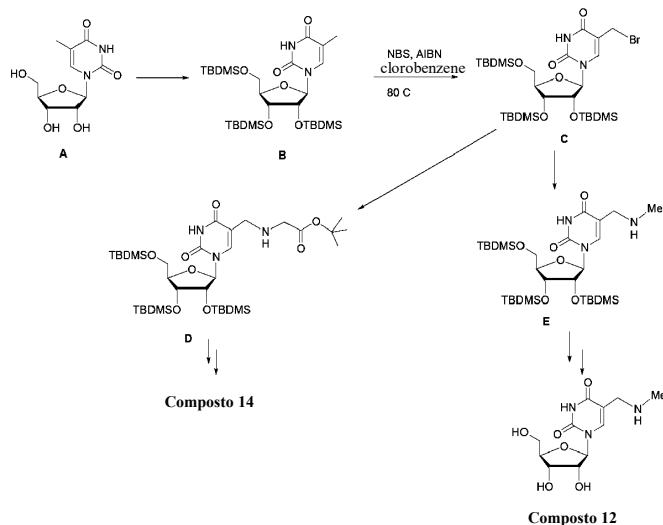
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



[0623] L'uridina 14-a è stata protetta con isopropilidene per fornire il composto 14-b e quindi 5-amminoalchilata con la reazione di Mannich per fornire il composto 14-c. La metilazione ha fornito ammina quaternaria 14-d. Le successive fasi di amminazione e deprotezione possono essere utilizzate per fornire il composto 14. Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

10 **Esempio 22. Sintesi alternativa di 5-metilamminometil-2-uridina (composto 12) e 5-carbossimetilamminometil-2-uridina (composto 14)**

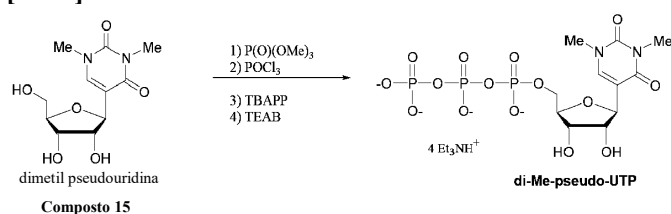
[0624]



[0625] Oltre a quelle strategie fornite sopra per i composti 12 e 14, può essere implementata anche la seguente strategia. La 5-metiluridina A può essere sililata per fornire il composto B. Dopo la monobromurazione radicalica, il risultante bromuro intermedio C può essere utilizzato per la preparazione del composto 12 e degli analoghi del composto 14. La successiva alchilamminazione del composto bromuro C potrebbe fornire i composti D ed E, che possono essere deprotetti per fornire rispettivamente i composti 14 e 12. Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 23. Sintesi di dimetil-pseudouridina (composto 15) e dimetil-pseudo-UTP (NTP di detto composto)

[0626]



[0627] I nucleosidi possono essere fosforilati mediante qualsiasi metodo utile. Ad esempio, come mostrato sopra, i nucleosidi possono essere fatti reagire con ossicloruro di fosforo e

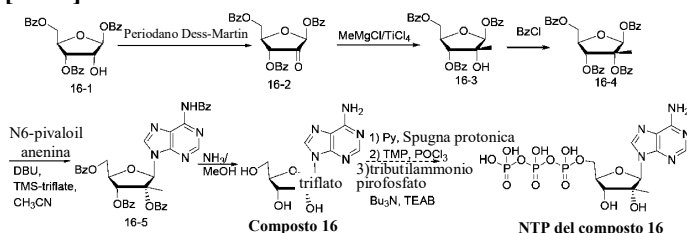
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

successivamente trattati con un intermedio monofosfato con bis(tributilammonio)pirofosfato (TBAPP) per dare il trifosfato.

Esempio 24. Sintesi di 2'-C-metil adenosina (composto 16) e 2'-C-metil ATP (NTP di detto composto)

5

[0628]

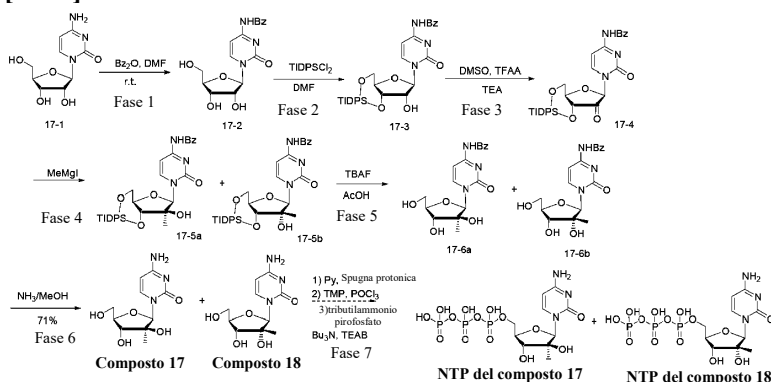


[0629] Circa 5 g del composto 16-2 sono stati preparati da 5 g del composto 16-1 tramite una reazione di periodano Dess-Martin. Il composto 16-2 è stato fatto reagire con MeMgI/TiCl₄/-78 °C per fornire il composto 16-3, e il composto grezzo 16-3 (6 g) è stato fatto reagire direttamente con benzilcloruro per preparare il composto 16-4. La reazione con la base azotata e la deprotezione hanno fornito il composto 16 (0,56 g).

10

Esempio 25. Sintesi di isomeri 2'-C-metil-citidina (composto 17 e composto 18) e 2'-C-metil UTP (NTP di detti composti)

[0630]



15

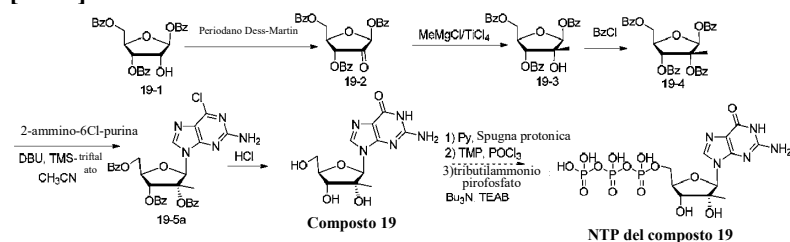
[0631] Circa 17,4 g del composto 17-3 sono stati preparati da 20 g del composto 17-1. Quindi, la 2'-ossidazione e l'alchilazione con MeMgI hanno fornito 300 mg di composto 17-5a e 80 mg di composto 17-5b. Circa 9 g di composto 17-5a (puro al 90% circa) e 2,1 g di composto 17-5b

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(puro) sono stati preparati da 17,4 g di composto 17-3 in 2 lotti. La deprotezione N e O ha fornito i composti 17 e 18.

Esempio 26. Sintesi di 2'-C-metilguanosina (composto 19) e 2'-C-metil GTP (NTP di detto composto)

5 [0632]

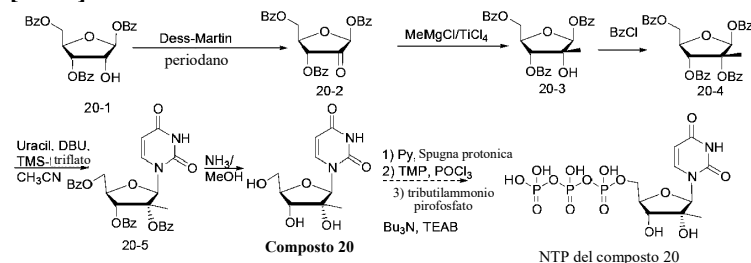


[0633] La 2'-ossidazione del ribosio 19-1 protetto e la successiva alchilazione con MeMgCl hanno fornito il composto 19-3. Il composto risultante è stato ulteriormente protetto per fornire il composto 19-4 e sono stati preparati 1,56 g del composto 19-5a da 3,1 g del composto 19-4. La
10 successiva ossidazione e la deprotezione hanno fornito il composto 19 (circa il 90% puro, 50 mg).

[0634] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

15 **Esempio 27. Sintesi di 2'-C-metil uridina (composto 20) e 2'-C-metil UTP (NTP di detto composto)**

[0635]



[0636] La 2'-ossidazione del ribosio 20-1 protetto e la successiva alchilazione con MeMgCl hanno
20 fornito il composto 20-3. Il composto risultante è stato ulteriormente protetto per fornire il

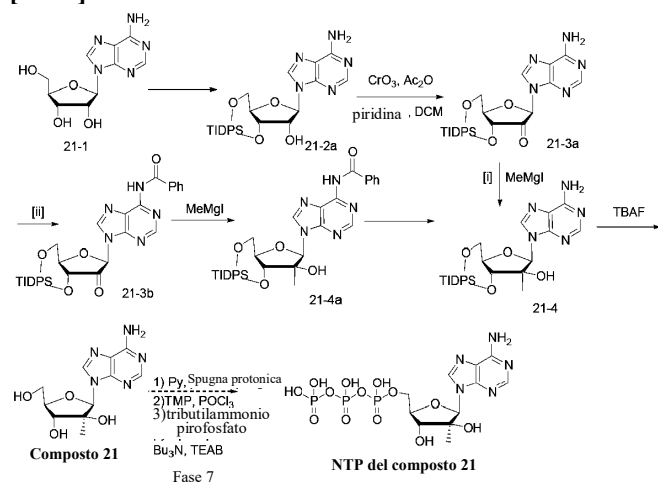
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

composto 20-4. La reazione con l'uracile e la deprotezione hanno fornito il composto puro 20 (50 mg).

[0637] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 28. Sintesi di (S)-2'-C-metil adenosina (composto 21) e (S)-2'-C-metil ATP (NTP di detto composto)

[0638]



10

[0639] Il composto 21-1 (5g) è stato protetto per formare il composto 21-2a e l'ossidazione del cromo ha fornito il composto 21-3a. L'alchilazione per via [i] (5eq. MeMgI in etere a -50 °C) ha fornito il composto 21-4. Opzionalmente, la resa potrebbe essere migliorata tramite la via [ii] proteggendo il gruppo ammino per fornire il composto 21-3b e quindi alchilando nella posizione 2'-C per fornire il composto 21-4a. Il composto 21-3a è stato alchilato per fornire il composto grezzo 21-4 (3 g, 20% del composto 3a in questo prodotto grezzo), dove il prodotto può essere facoltativamente purificato. La deprotezione del composto 21-4 ha fornito il composto 21 (resa del 50%).

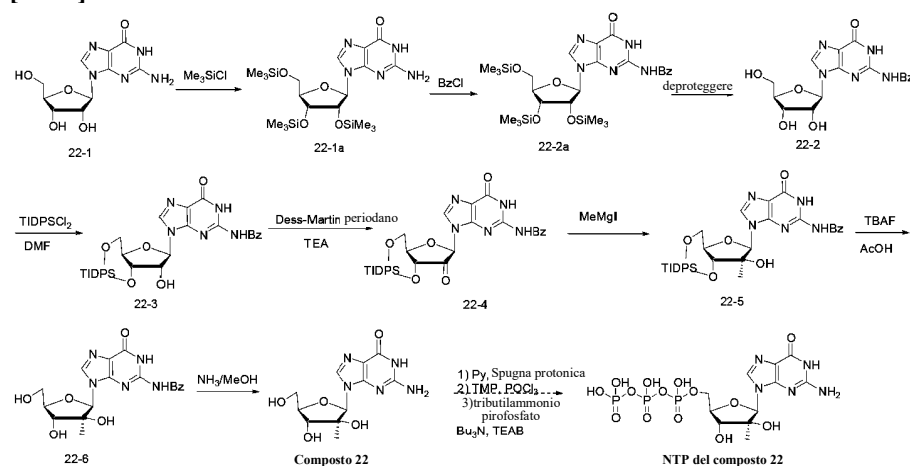
[0640] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 29. Sintesi di (S)-2'-C-metil guanosina (composto 22) e (S)-2'-metil GTP (NTP di detto composto)

[0641]



[0642] Circa 30 g del composto 22-1 sono stati silylati per fornire il composto 22-2 in tre fasi.

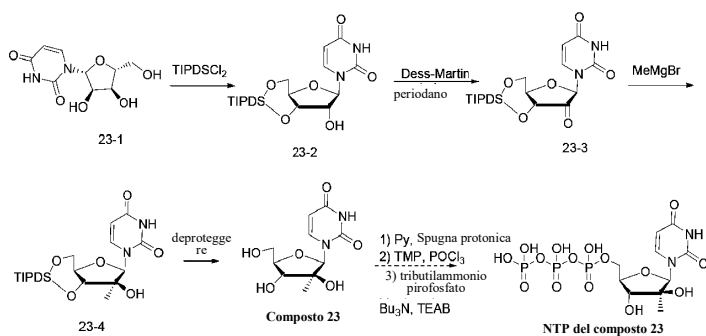
Un'ulteriore protezione ha fornito il composto 22-3 e l'ossidazione del periodano Dess-Martin ha fornito il composto 22-4 (1,6 g) in due lotti. L'alchilazione 2'-C (5eq. MeMgI in etere, da -50 °C a TA) ha fornito il composto 22-5 e ulteriori fasi di deprotezione hanno fornito il composto 22.

[0643] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 30. Sintesi di (S)-2'-C-metil uridina (composto 23) e (S)-2'-C-metil UTP (NTP di detto composto)

[0644]

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



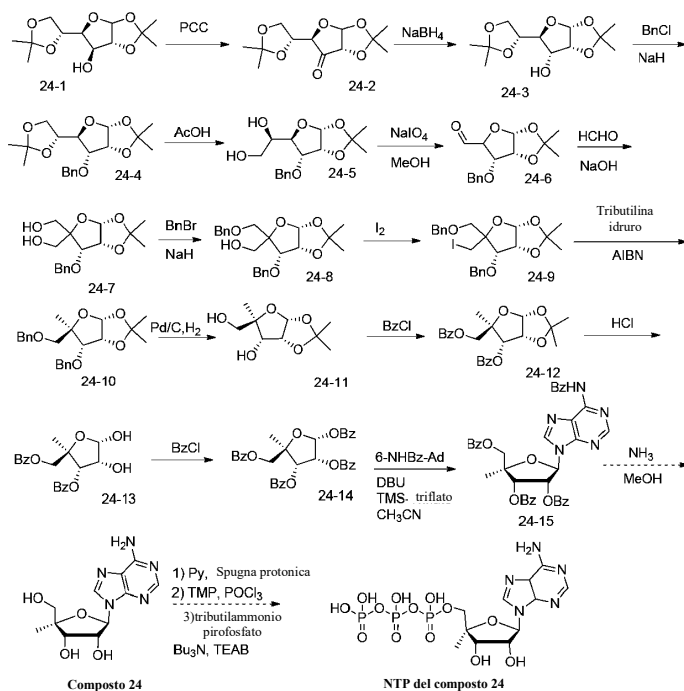
[0645] L'uridina 23-1 (2,0 g) è stata protetta con TIPDSCl₂ (1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisilossano) per fornire il composto 23-2. L'ossidazione ha fornito il composto 23-3 e l'alchilazione 2'-C ha fornito il composto 23-4, che può essere opzionalmente purificato con
5 Prep-HPLC prima della fase successiva. Quindi, la deprotezione ha fornito il composto 23 desiderato.

[0646] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato
10 (ad esempio, da EtOH).

Esempio 31. Sintesi di 4'-C-metil adenosina (composto 24) e 4'-C-metil ATP (NTP di detto composto)

[0647]

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



[0648] L'1,2:5,6-Di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosio 24-1 è stato convertito tramite fasi di ossidazione, riduzione e protezione sequenziali per fornire il composto 24-4. La prima fase di ossidazione per fornire il composto 24-2 può essere implementata con qualsiasi reagente utile, come 0,75 eq. di piridinio dicromato (PDC) con 1 eq. Ac₂O o 1,2 eq. di periodano Dess-Martin. La successiva deprotezione, la formilazione e la riduzione hanno fornito il composto 24-7, che è stato seguito da fasi di protezione e deossigenazione per fornire il composto 24-10. Circa 0,4 g del composto 24-14 sono stati preparati da 1 g del composto 24-10 attraverso fasi di protezione e deprotezione sequenziali. L'aggiunta di N6-benzoiladenina e la successiva deprotezione hanno fornito il composto 24.

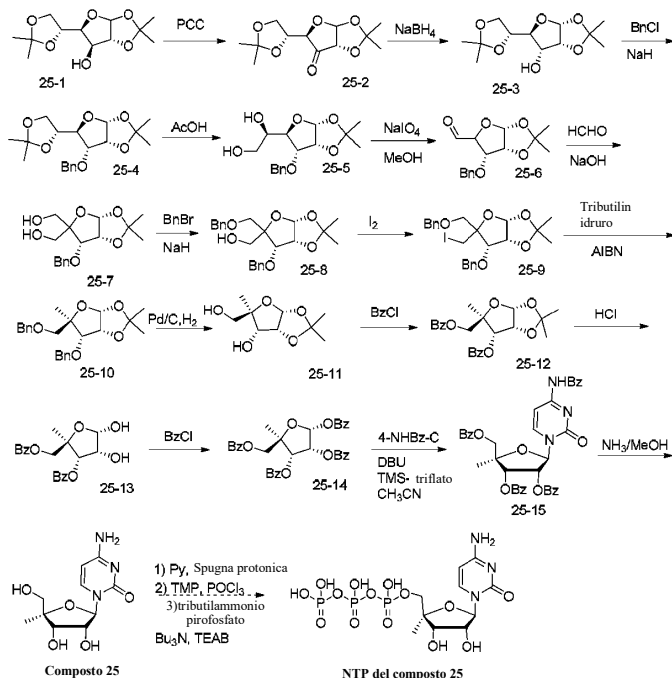
[0649] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

15 **Esempio 32. Sintesi di 4'-C-metil citidina (composto 25) e 4'-C-metil CTP (NTP di detto**

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

composto)

[0650]



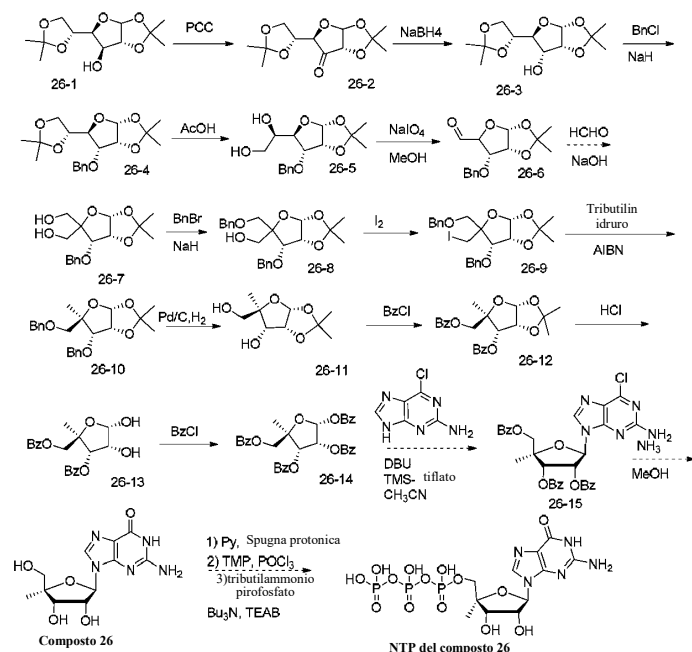
[0651] Simile alla strategia fornita sopra per il composto 24, il composto 25-14 è stato prodotto con il composto 25-1. L'aggiunta di citidina e la successiva deprotezione hanno fornito il composto 25.

[0652] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 33. Sintesi di 4'-C-metilguanosina (composto 26) e 4'-C-metil GTP (NTP di detto composto)

[0653]

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

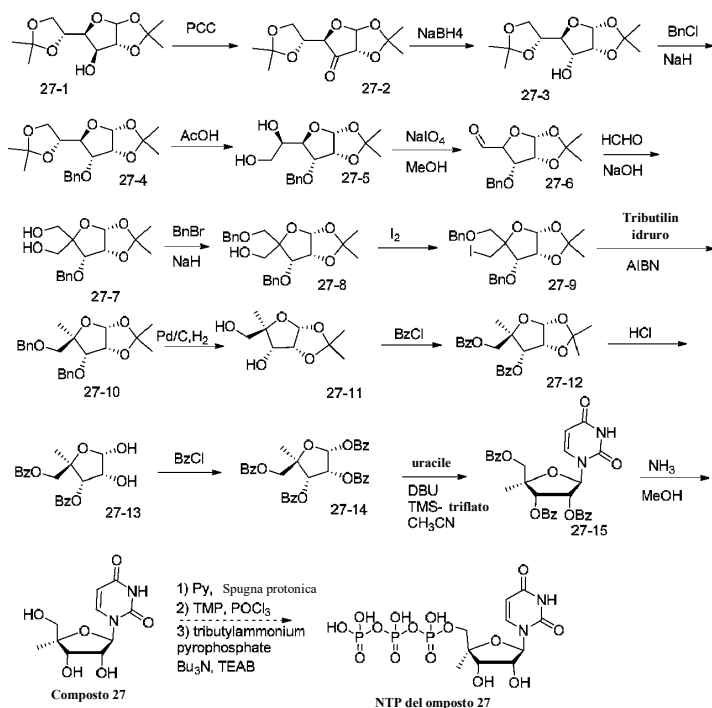


[0654] Simile alla strategia fornita sopra per il composto 24, il composto 26-14 è stato prodotto con il composto 26-1. L'aggiunta di 2-ammino-6-cloropurina, la successiva ossidazione e quindi la deprotezione hanno fornito il composto 26.

- 5 [0655] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 34. Sintesi di 4'-C-metil uridina (composto 27) e 4'-C-metil UTP (NTP di detto composto)

[0656]



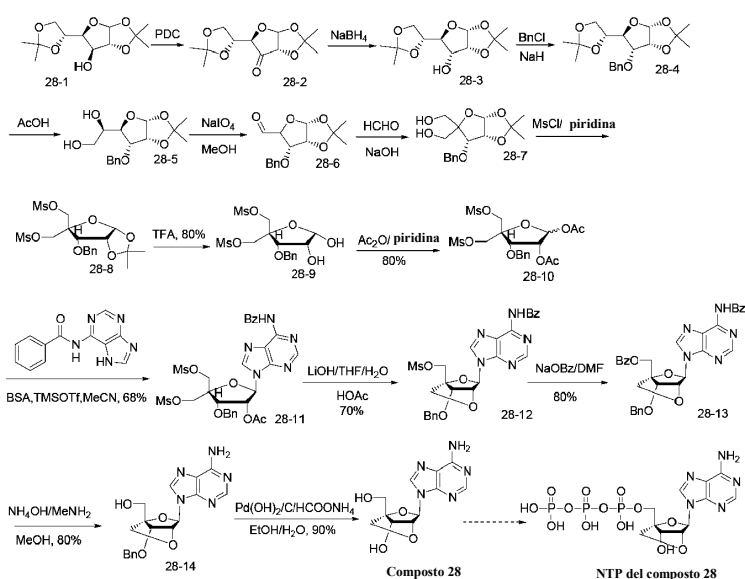
[0657] Simile alla strategia fornita sopra per il composto 24, il composto 27-14 è stato prodotto con il composto 27-1. L'aggiunta di uracile e la successiva deprotezione hanno fornito il composto 27.

- 5 [0658] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 35. Sintesi di 2'-O,4'-C-metilene adenosina (composto 28) e 2'-O,4'-C-metilene

10 **ATP (NTP di detto composto)**

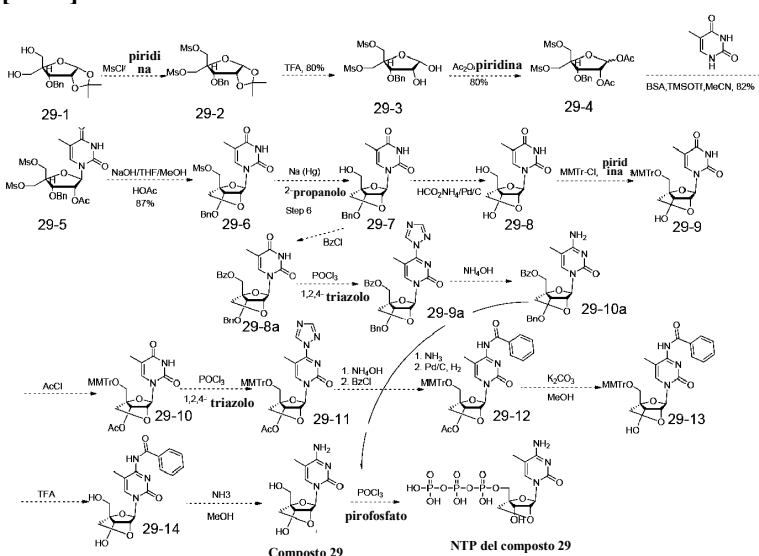
[0659]



[0660] Simile alla strategia fornita sopra per il composto 24, il composto 28-7 è stato prodotto con il composto 28-1. La mesilazione, la deprotezione e l'acetilazione successive hanno fornito il composto 28-10, che è stato seguito dall'aggiunta di N6-benzoiladenina e dalla successiva ciclizzazione interna. Varie fasi di protezione e deprotezione hanno fornito il composto 28.

Esempio 36. Sintesi di 5-metil-2'-O,4'-C-metilene citidina (composto 29) e 5-metil-2'-O,4'-C-metilene CTP (NTP di detto composto)

[0661]



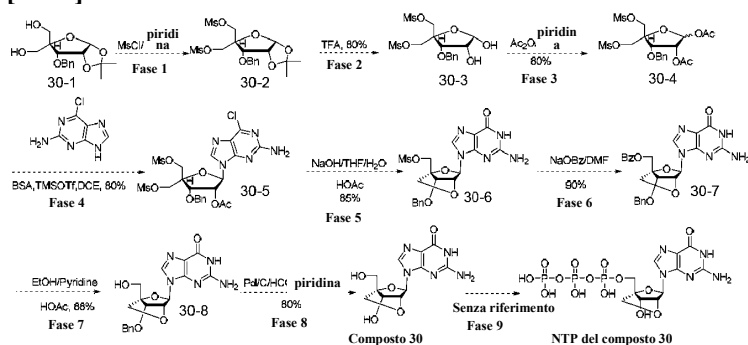
10 [0662] Il composto di aldofuranosio 29-1 è stato fatto reagire attraverso vari passaggi di

Ing. *M. Sangiacomo*
Consulente in P.I. n° USBM-041R

protezione, quindi è stato aggiunto 5-metiluracile per fornire il composto 29-5. Le successive fasi di ciclizzazione interna, deprotezione, protezione e amminazione hanno fornito il composto 29.

Esempio 37. Sintesi di 2'-O,4'-C-metilene guanosina (composto 30) e 2'-O,4'-C-metilene GTP (NTP di detto composto)

5 [0663]



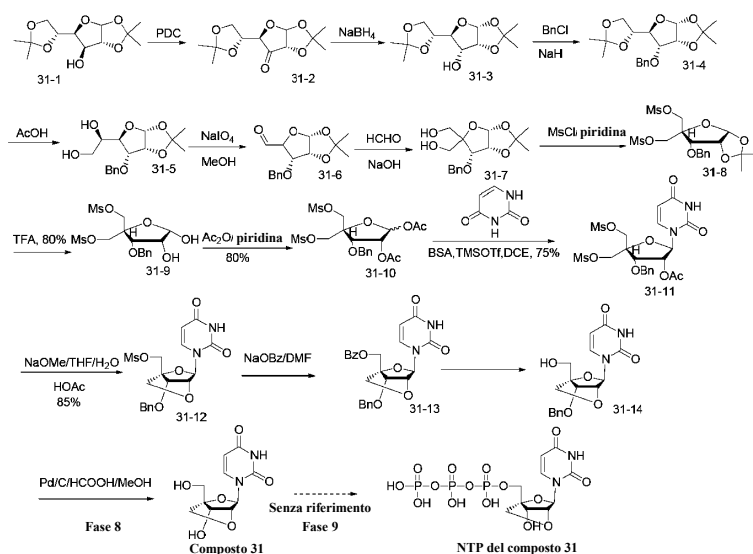
[0664] Simile alla strategia fornita sopra per il composto 29, il composto 30-1 dell'aldofuranosio è stato fatto reagire attraverso varie fasi di protezione, quindi è stata aggiunta la 2-ammino-6-cloropurina per fornire il composto 30-5. Le successive fasi di ciclizzazione interna, amminazione e deprotezione hanno fornito il composto 30.

[0665] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

15 **Esempio 38. Sintesi di 2'-O,4'-C-metilene uridina (composto 31) e 2'-O,4'-C-metilene UTP (NTP di detto composto)**

[0666]

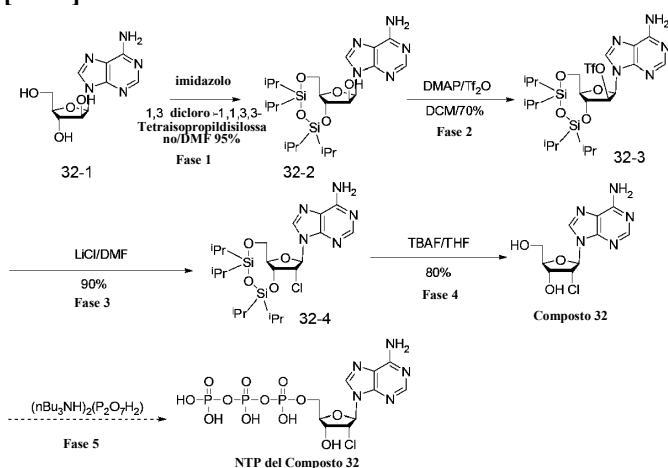
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



[0667] Simile alla strategia fornita sopra per il composto 24, il composto 31-7 è stato prodotto con il composto 31-1. La mesilazione, la deprotezione e l'acetilazione successive hanno fornito il composto 30-10. L'aggiunta di uracile e la successiva ciclizzazione interna hanno fornito il composto 31-12 e varie fasi di protezione e deprotezione hanno fornito il composto 31. Una successiva reazione di trifosfato (ad esempio, come qui descritto) ha fornito l'NTP del composto 31, che può essere opzionalmente purificato (ad esempio con HPLC).

Esempio 39. Sintesi di 2'-cloro adenosina (composto 32) e 2'-cloro ATP (NTP di detto composto)

10 [0668]

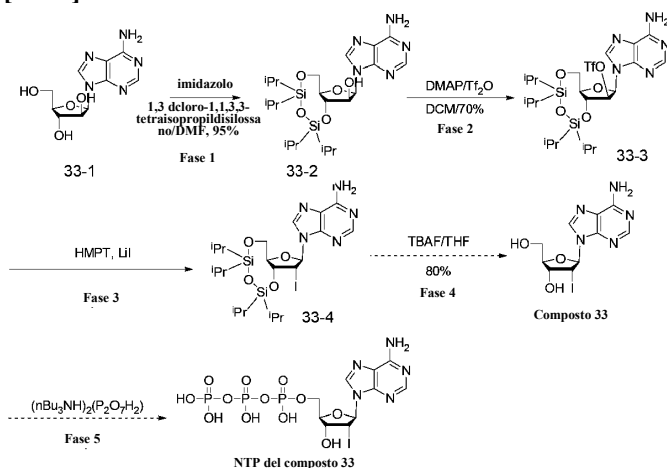


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0669] L'arabinoadenosina 32-1 è stata protetta tramite le fasi 1 e 2 e quindi clorurata per fornire il composto 32-4. La successiva deprotezione ha fornito il composto 32 e la reazione del trifosfato ha fornito l'NTP del composto 32.

Esempio 40. Sintesi di 2'-iodo adenosina (composto 33) e 2'-iodo ATP (NTP di detto composto)

[0670]

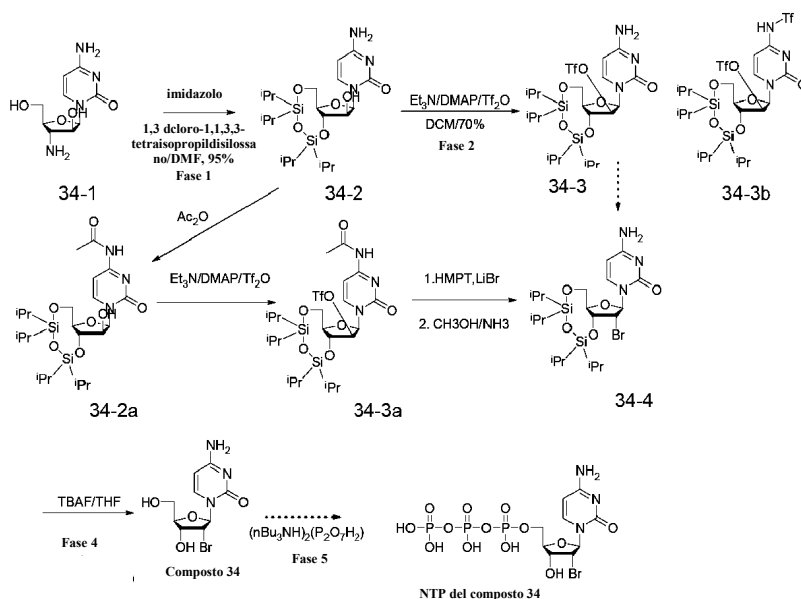


[0671] L'arabinoadenosina 33-1 è stata protetta tramite le fasi 1 e 2 e quindi iodata per fornire il composto 33-4. La successiva deprotezione ha fornito il composto 33 e la reazione del trifosfato in DMF ha fornito l'NTP del composto 33.

Esempio 41. Sintesi di 2'-bromo citidina (composto 34) e 2'-bromo CTP (NTP di detto composto)

[0672]

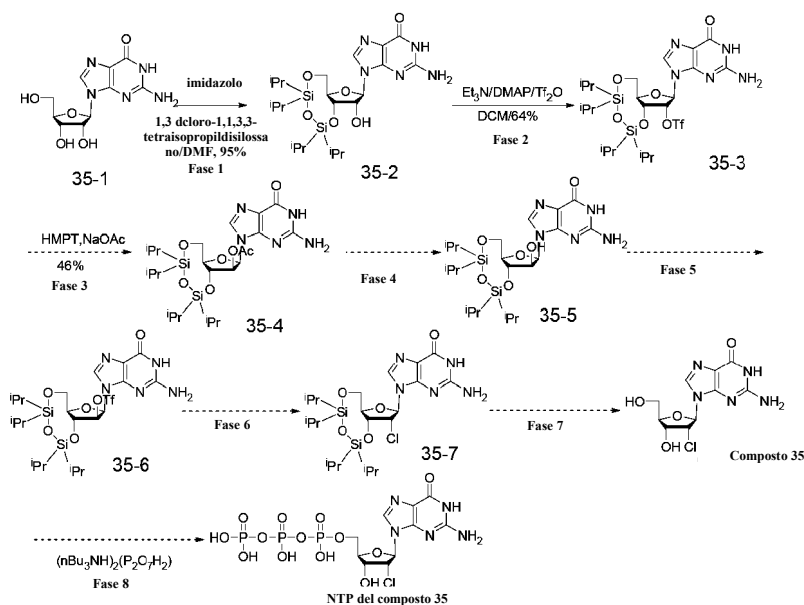
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



[0673] L'arabinocitidina 34-1 è stata protetta in varie condizioni e quindi bromurata per fornire il composto 34-4. Opzionalmente, la reazione può fornire il composto 34-4 tramite il composto 34-3a in qualsiasi reazione di protezione utile, come (i) 1,5 eq. Et_3N , 1 eq. DMAP, 1,2 eq. TfCl , in DCM (10mL); (ii) 3 eq. DMAP, 1,2 eq. TfCl in DCM (15mL); o (iii) 15 eq. DMAP, 1,5 eq. Tf_2O , in DCM (15 mL) da $-10\text{ }^\circ\text{C}$ a $0\text{ }^\circ\text{C}$ per 2 ore. In particolare, dalla condizione di reazione (iii) sono stati ottenuti 55 mg del composto 34-3a. La successiva deprotezione ha fornito il composto 34 e la reazione del trifosfato in DMF ha fornito l'NTP del composto 34. Il prodotto grezzo 34 potrebbe essere opzionalmente purificato prima della fosforilazione.

10 **Esempio 42. Sintesi di 2'-cloro guanosina (composto 35) e 2'-cloro GTP (NTP di detto composto)**

[0674]

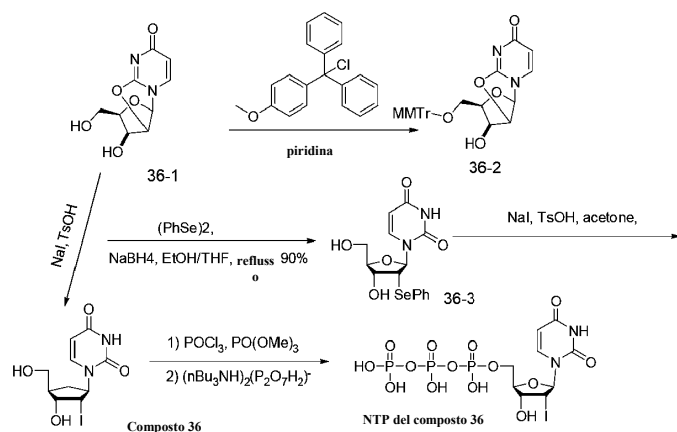


[0675] La guanosina 35-1 è stata protetta in varie condizioni e quindi acetilata per fornire il composto 35-4. La reazione dal composto 35-2 al composto 35-3 è stata condotta con 2 eq. DMAP, 2 eq. Et₃N, 3 eq. Tf₂O in 1,2-dicloroetano (10 mL) a 40 °C per 4 ore. Dopo la purificazione sono stati ottenuti circa 55 mg del composto 35-3.

[0676] Il composto 35 desiderato può essere ottenuto con qualsiasi metodo utile. Ad esempio, come mostrato sopra, il composto 35-4 può essere trattato con successive fasi di protezione, clorazione e deprotezione per fornire il composto 35. Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 43. Sintesi di 2'-iodo uridina (composto 36) e 2'-iodo UTP (NTP di detto composto)

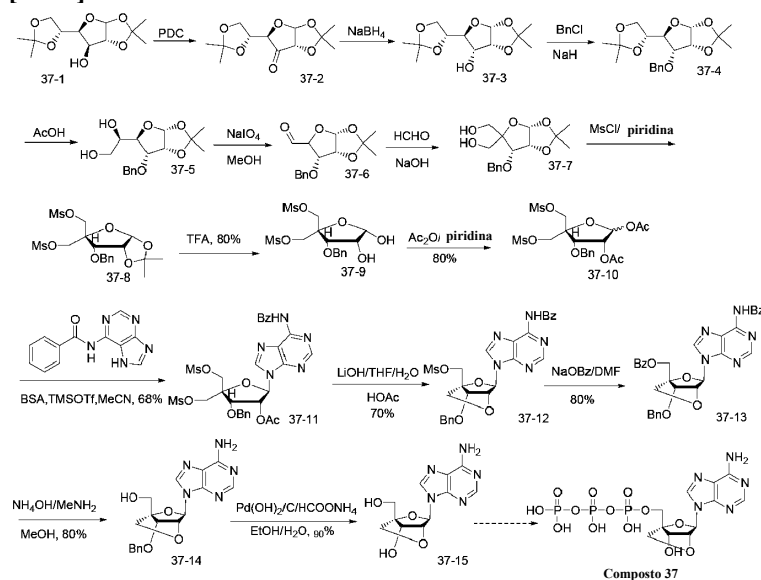
[0677]



[0678] L'O²,2'-ciclouridina 36-1 è stata protetta per fornire il composto 36-2. La successiva iodurazione, opzionalmente mediata con selenio, ha fornito il composto 36. È stata condotta una reazione di trifosfato per fornire l'NTP del composto 36. Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 44. Sintesi di 2'-O,4'-C-metilene adenosina (composto 37) e 2'-O,4'-C-metilene ATP (NTP di detto composto)

[0679]



10

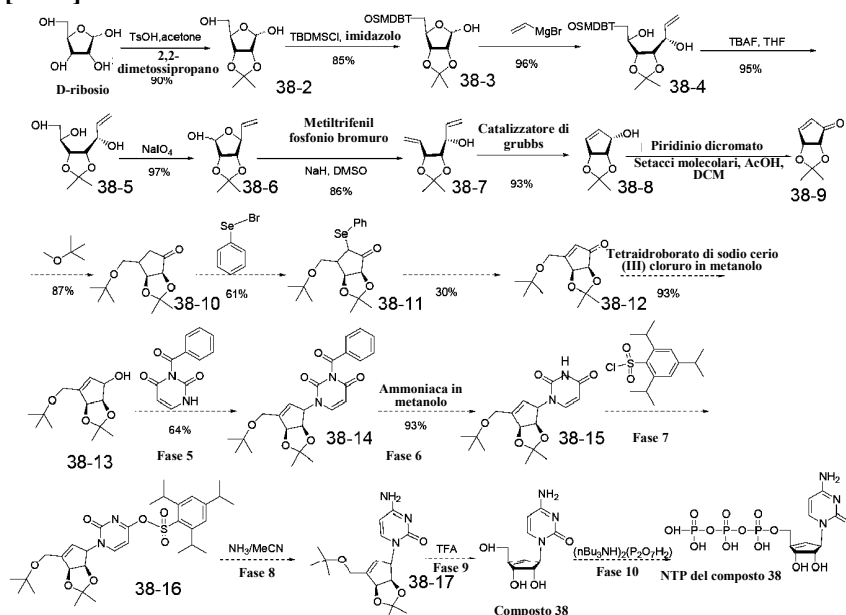
[0680] Simile alla strategia fornita sopra per il composto 24, il composto 37-7 è stato prodotto con il composto 37-1. La mesilazione, la deprotezione e l'acetilazione successive hanno fornito il composto 37-10. L'aggiunta di uracile e la successiva ciclizzazione interna hanno fornito il composto 37-12. Varie fasi di protezione e deprotezione hanno fornito il composto 37.

- 5 [0681] Per ottenere il corrispondente NTP, può essere condotta una reazione di trifosfato (ad esempio, una qualsiasi descritta nel presente contesto). Opzionalmente, l'NTP può essere purificato (ad esempio, utilizzando una colonna Sephadex DEAE-A25), liofilizzato o evaporato (ad esempio, da EtOH).

Esempio 45. Sintesi di ciclopentene diol citidina (composto 38) e ciclopentene diolo CTP

10 **(NTP di detto composto)**

[0682]



[0683] Il D-ribosio è stato protetto e quindi allilato per fornire il composto 38-4, che è stato successivamente ciclizzato e ridotto per fornire il composto 38-7. La metatesi dell'olefina e la successiva ossidazione hanno fornito il composto 38-9 e le ulteriori reazioni di riduzione e l'aggiunta di N-benzoiluracile hanno fornito il composto 38-14. Ulteriori reazioni di deprotezione e protezione hanno fornito il composto 38 e la reazione di trifosfato (ad esempio con qualsiasi

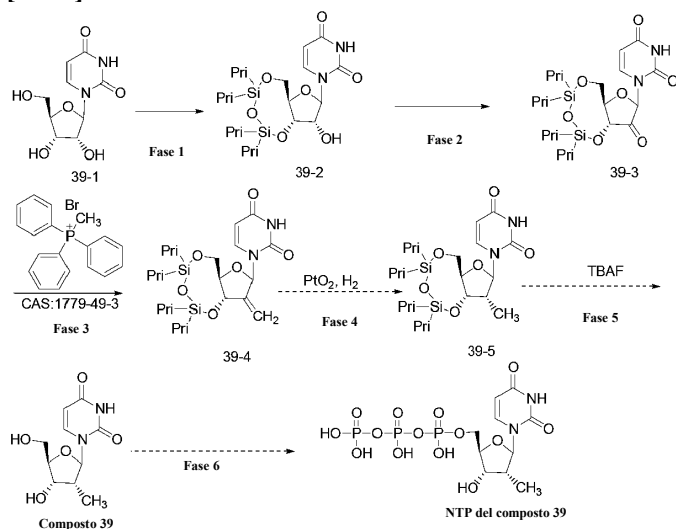
15

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

condizione di reazione utile, come quelle descritte qui o nel brevetto U.S. n. 7.893.227,) ha fornito l'NTP del composto 38.

Esempio 46. Sintesi di 2'-metil uridina (composto 39) e 2'-metil UTP (NTP di detto composto)

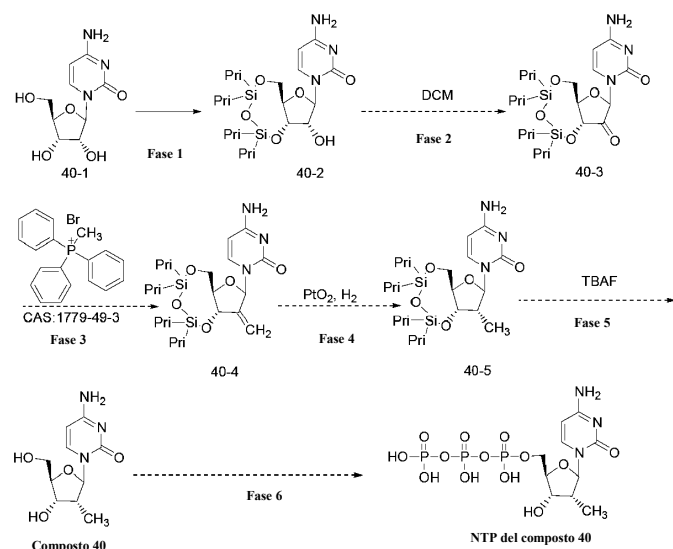
5 [0684]



[0685] L'uridina 39-1 è stata protetta e quindi ossidata con 2 eq. di periodano Dess-Martin per fornire il composto 39-3. Le successive fasi di reazione, idrogenazione e deprotezione di Wittig hanno fornito il composto 39.

10 **Esempio 47. Sintesi di 2'-metil citidina (composto 40) e 2'-metile CTP (NTP di detto composto)**

[0686]

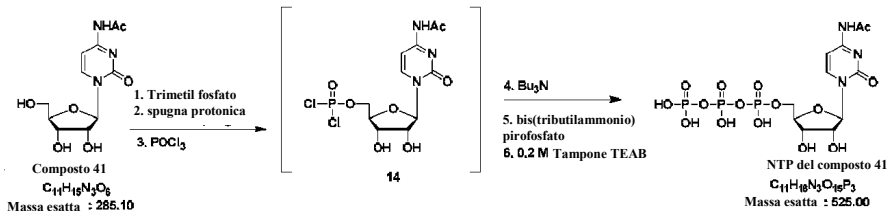


[0687] La citidina 40-1 è stata protetta e quindi ossidata per fornire il composto 40-3. Le successive fasi di reazione, idrogenazione e deprotezione di Wittig hanno fornito il composto 40.

Esempio 48. Sintesi di N-acetil citidina (composto 41) e N-acetile CTP (NTP di detto

5 composto)

[0688]



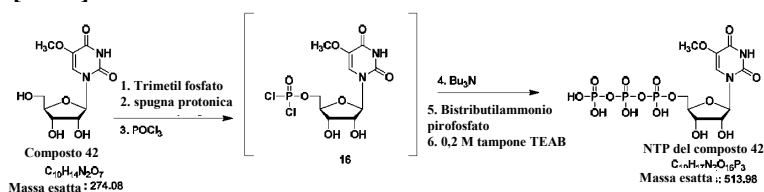
[0689] Una soluzione di N-acetil-citidina (composto 41) (103,0 mg, 0,36 mmol) è stata aggiunta alla spugna protonica (115,72 mg, 0,54 mmol, 1,50 equiv) in 1,0 mL di trimetilfosfato (TMP) e 10 1,0 mL di tetraidrofurano anidro (THF). La soluzione è stata agitata per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto goccia a goccia ossicloruro di fosforo ($POCl_3$) (67,2 ul, 0,72 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N_2 . Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (1,28 g, 2,34 mmol, 6,5 equiv.) e tributilammina (350,0 ul, 1,45 mmol, 4,0 equiv.) 15 in 2,5 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 24,0 mL

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 16,81-17,80 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per produrre l'NTP del composto 41. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N₂. I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P₂O₅ sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 49. Sintesi di 5-metossi uridina (composto 42) e 5-metossi UTP (NTP di detto composto)

[0690]



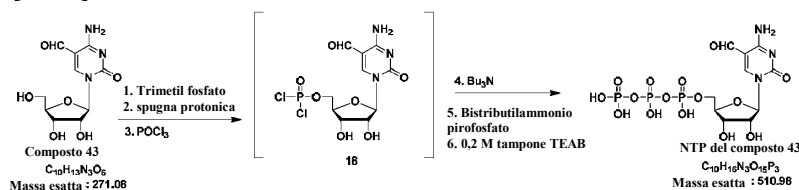
[0691] Una soluzione di 5-metossiuridina (composto 42) (69,0 mg, 0,25 mmol, più calore per renderla solubile) è stata aggiunta alla spugna protonica (80,36 mg, 0,375 mmol, 1,50 equivalente) in 0,7 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto a gocce ossicloruro di fosforo (POCl₃) (46,7 ul, 0,50 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N₂. Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (894,60 mg, 1,63 mmol, 6,50 Equiv.) e tributuilammina (243,0 ul, 1,00 mmol, 4,0 equiv.) in 2,0 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 17,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in F.I. n° USBM-041R

per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 16,57-17,51 5 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per produrre l'NTP del composto 42. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N₂. I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P₂O₅ sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

10 **Esempio 50. Sintesi di 5-formil citidina (composto 43) e 5-formile CTP (NTP di detto composto)**

[0692]



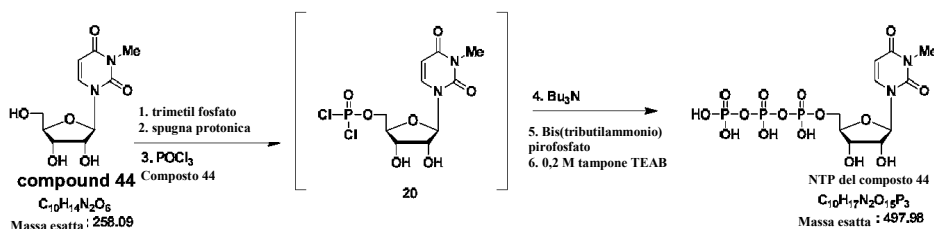
[0693] Una soluzione di 5-formil citidina (composto 43) (48,4 mg, 0,18 mmol, più calore per renderla solubile) è stata aggiunta alla spugna protonica (57,86 mg, 0,27 mmol, 1,50 equivalente) in 0,7 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto a gocce ossicloruro di fosforo (POCl₃) (33,6 ul, 0,36 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N₂. Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (642,0 15 mg, 1,17 mmol, 6,50 Equiv.) e tributilammina (175,0 ul, 0,72 mmol, 4,0 equiv.) in 1,7 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 12,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza 20

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in F.I. n° USBM-041R

è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 17,04-17,87 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per fornire l'NTP del composto 43. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N₂. I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P₂O₅ sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 51. Sintesi di 3-metil uridina (composto 44) e 3-metile UTP (NTP di detto composto)

[0694]



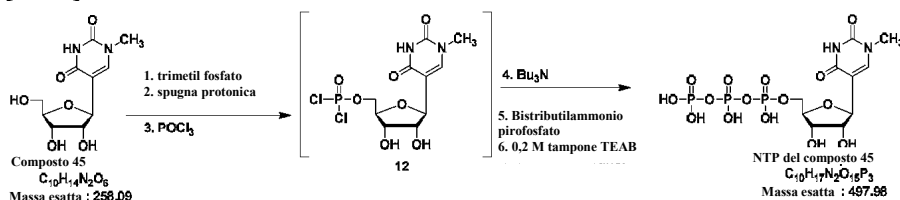
[0695] Una soluzione di 3-metil uridina (composto 44) (45,80 mg, 0,18 mmol) è stata aggiunta alla spugna protonica (57,86 mg, 0,27 mmol, 1,50 equivalente) in 0,5 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto a gocce ossicloruro di fosforo (POCl₃) (33,6 ul, 0,36 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N₂. Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di dibutilammonio pirofosfato (TBAPP o (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (652,0 mg, 1,19 mmol, 6,60 Equiv.) e tributilammina (175,0 ul, 0,72 mmol, 4,0 equiv.) in 1,3 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 12,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 18,52-19,57 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per fornire l'NTP del composto 44. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N₂. I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P₂O₅ sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 52. Sintesi di N1-metil pseudouridina (composto 45) e N1-metil pseudo UTP (NTP di detto composto)

[0696]



10

[0697] Una soluzione di N1-metil pseudouridina (composto 45) (96,6 mg, 0,374 mmol, più calore per renderla solubile) è stata aggiunta alla spugna protonica (120,0 mg, 0,56 mmol, 1,50 equiv.) in 0,8 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto a gocce ossicloruro di fosforo (POCl₃) (70,0 ul, 0,75 mmoli, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N₂. Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (1,36g, 2,47 mmol, 6,60 Equiv.) e tributilammina (362,0 ul, 1,5 mmol, 4,0 equiv.) in 2,5 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 17,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 15,91-17,01

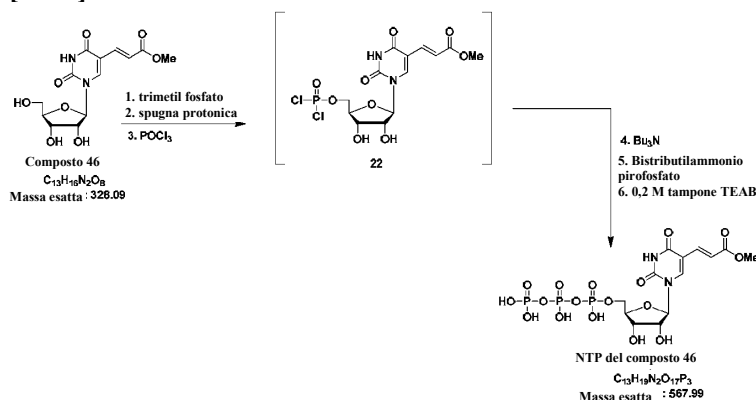
20

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate sono state sottoposte a una reazione di trifosforilazione per fornire l'NTP del composto 45. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N₂. I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P₂O₅ sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 53. Sintesi di 5-metossicarboniletenuil uridina (composto 46) e 5-metossicarboniletenuile UTP (NTP di detto composto)

[0698]



10 [0699] Una soluzione di 5-metossicarboniletenuil uridina (composto 46) (102,0 mg, 0,31 mmol) è stata aggiunta alla spugna protonica (99,65 mg, 0,46 mmol, 1,50 equivalente) in 0,8 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto a
15 gocce ossicloruro di fosforo (POCl₃) (57,8 ul, 0,62 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N₂. Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una
20 miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (1,12g, 2,05 mol, 6,60 Equiv.) e tributilammina (300,0 ul, 1,24 mmol, 4,0 equiv.) in 2,5 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 20,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0

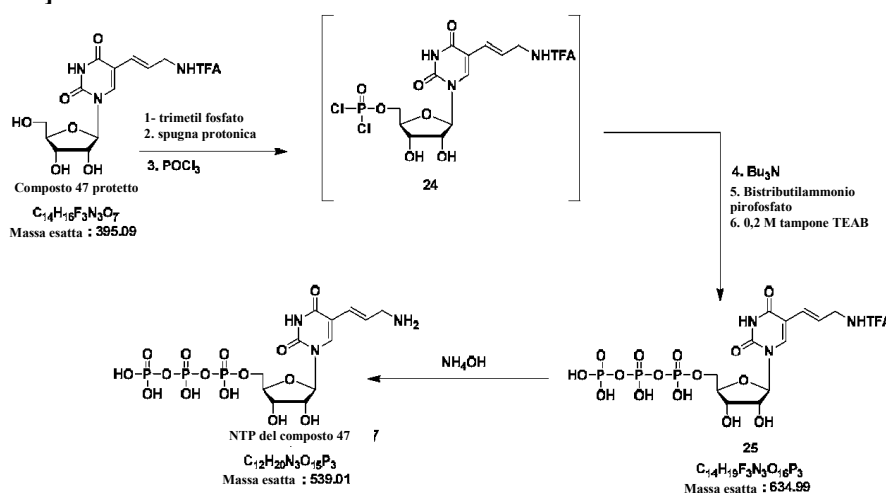
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 21,56-23,21 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per fornire l'NTP del composto 46. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N₂. I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P₂O₅ sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 54. Sintesi di 5-amminopropenil uridina (composto 47) e 5-amminopropenile UTP

(NTP di detto composto)

[0700]



10

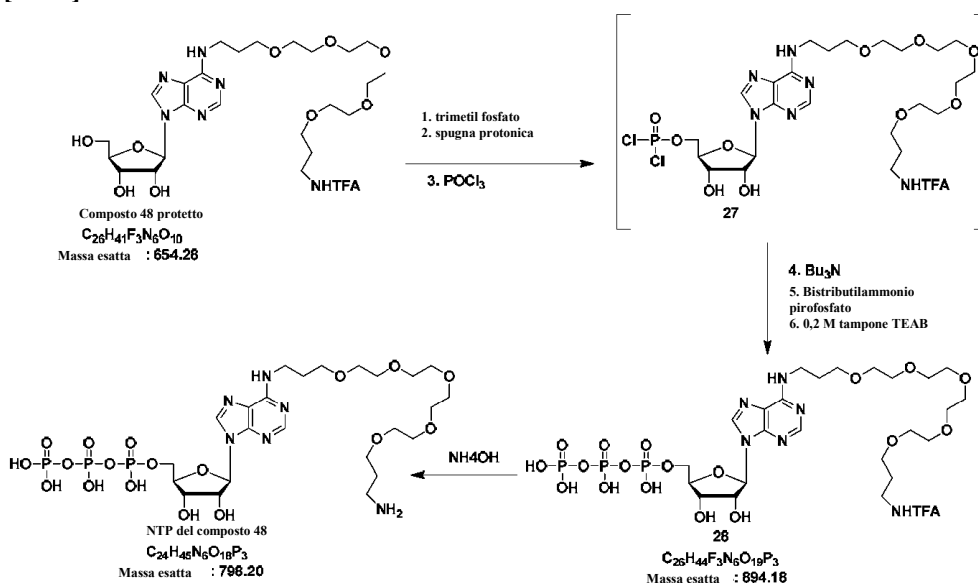
[0701] 5-amminopropenil uridina 47 è stata protetta e una soluzione di composto 47 protetto (86,0 mg, 0,22 mmol) è stata aggiunta alla spugna protonica (70,7 mg, 0,33 mmol, 1,50 equiv.) in 0,7 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto a gocce ossicloruro di fosforo ($POCl_3$) (41,1 ul, 0,44 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N₂. Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (784,6 mg, 1,43 mmol, 6,50 Equiv.) e tributilammina (213,0 ul, 0,88 mmol, 4,0 equiv.) in 1,6 mL di dimetilformamide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 15,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. 18,0

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

mL di idrossido di ammonio concentrato sono stati aggiunti alla miscela di reazione per rimuovere il gruppo trifluoroacetile. È stato quindi conservato agitando per una notte. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micron; 5 gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 16,14-17,02 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per fornire l'NTP del composto 47. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N₂. I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P₂O₅ sotto vuoto per una notte prima 10 dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 55. Sintesi di adenosina N-PEG (composto 48) e N-PEG ATP (NTP di detto composto)

[0702]



15 [0703] Adenosina N-PEG 48 è stata protetta e una soluzione del composto 48 protetto (100,0 mg, 0,15 mmol) è stata aggiunta alla spugna protonica (49,3 mg, 0,23 mmol, 1,50 equiv.) in 0,65 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0 °C. Alla soluzione è stato aggiunto a

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

gocce ossicloruro di fosforo (POCl_3) (28,0 ul, 0,3 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N_2 . Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (537,7 mg, 0,98 mmol, 6,50 Equiv.) e tributilammina (146,0 ul, 0,6 mmol, 4,0 equiv.) in 1,2 mL di dimetilformamide.

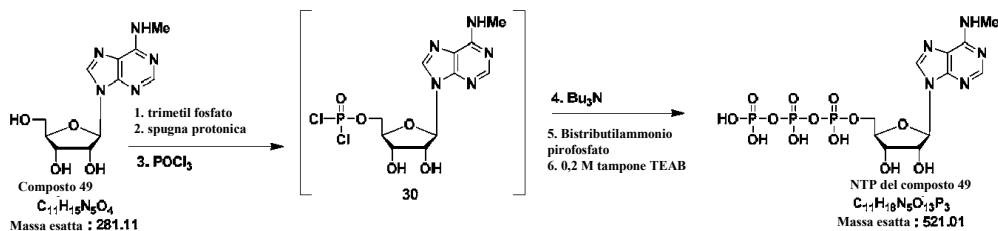
5 Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 10,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. 18,0 mL di idrossido di ammonio concentrato sono stati aggiunti alla miscela di reazione per rimuovere il gruppo trifluoroacetile. È stato quindi conservato agitando per una notte. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC

10 (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, $250 \times 21,20$ mm, 10,0 micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 24,5-25,5 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per fornire l'NTP del composto 48. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera

15 di N_2 . I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P_2O_5 sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 56. Sintesi di N-metil adenosina (composto 49) e N-metile ATP (NTP di detto composto)

[0704]



20

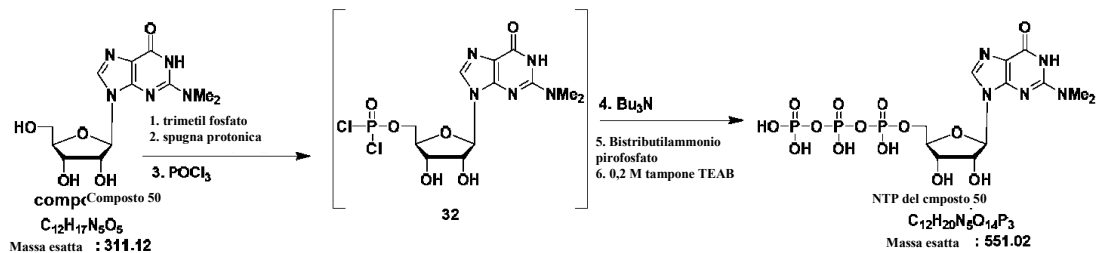
[0705] Una soluzione di N-metil adenosina (composto 49) (70,0 mg, 0,25 mmol) è stata aggiunta alla spugna protonica (79,29 mg, 0,37 mmol, 1,50 equivalente) in 0,7 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0°C . Alla soluzione è stato aggiunto a gocce ossicloruro di

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

fosforo (POCl_3) (46,66 ul, 0,50 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N_2 . Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (888,85 mg, 1,62 mmol, 6,50 Equiv.) e tributilammina (241,0 ul, 1,0 mmol, 4,0 equiv.) in 1,3 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 16,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, $250 \times 21,20$ mm, 10,0 micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 19,62-20,14 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per fornire l'NTP del composto 49. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N_2 . I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P_2O_5 sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

15 **Esempio 57. Sintesi di N,N-dimetil guanosina (composto 50) e N,N-dimetile GTP (NTP di detto composto)**

[0706]



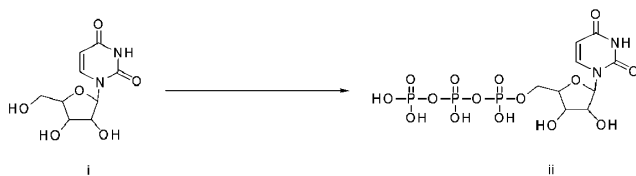
20 [0707] Una soluzione di N,N-dimetil guanosina (composto 50) (65,8 mg, 0,21 mmol) è stata aggiunta alla spugna protonica (68,58 mg, 0,32 mmol, 1,50 equivalente) in 0,7 mL di trimetilfosfato (TMP) ed è stato agitato per 10 minuti a 0°C . Alla soluzione è stato aggiunto a

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

gocce ossicloruro di fosforo (POCl_3) (39,20 ul, 0,42 mmol, 2,0 equiv.) prima di essere mantenuto in agitazione per 2 ore sotto atmosfera di N_2 . Dopo 2 ore la soluzione è stata fatta reagire con una miscela di bistributilammonio pirofosfato (TBAPP o $(\text{n-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (751,67 mg, 1,37 mmol, 6,50 Equiv.) e tributilammina (204,0 ul, 0,84 mmol, 4,0 equiv.) in 1,5 mL di dimetilformammide. Dopo circa 15 minuti, la reazione è stata spenta con 14,0 mL di bicarbonato di trietilammonio (TEAB) da 0,2 M e la soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione è stata liofilizzata per una notte e la miscela di reazione grezza è stata purificata mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan, colonna preparativa Phenomenex C18, $250 \times 21,20$ mm, 10,0 micron; gradiente: 100% A per 3,0 min, quindi 1% B/min, A = tampone TEAB 100 mM, B = ACN; Portata: 10,0 mL/min; tempo di ritenzione: 19,27-19,95 minuti). Le frazioni contenenti il composto desiderato sono state riunite e liofilizzate per fornire l'NTP del composto 50. Le reazioni di trifosforilazione sono state condotte in un pallone a due colli essiccato alla fiamma in atmosfera di N_2 . I nucleosidi e la spugna proteica sono stati essiccati su P_2O_5 sotto vuoto per una notte prima dell'uso. La formazione di monofosfati è stata monitorata mediante LCMS.

Esempio 58. Metodi generali per la sintesi del trifosfato di NTPS

[0708]



[0709] Il nucleoside **i** può essere fosforilato mediante qualsiasi metodo utile per fornire un composto trifosfato **ii**. Ad esempio, il nucleoside può essere aggiunto alla spugna protonica e al trimetilfosfato (TMP) e raffreddato (ad esempio, a -40 °C). L'ossicloruro di fosforo (POCl_3) può essere aggiunto goccia a goccia prima di reagire con pirofosfato di bistributilammonio (TBAPP o $(\text{n-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) e tributilammina. La reazione può quindi essere rapidamente spenta con


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

bicarbonato di trietilammonio (TEAB). Condizioni esemplificative sono fornite nel brevetto U.S. n. 7,893,227.

[0710] Dopo la reazione di fosforilazione, la miscela di reazione può essere opzionalmente liofilizzata, purificata (ad esempio, mediante cromatografia a scambio ionico e/o HPLC) o
5 convertita in un sale di sodio (ad esempio, dissolvendo in MeOH e aggiungendo perclorato di sodio in acetone).

Esempio 59: PCR per la produzione di cDNA

[0711] Le procedure PCR per la preparazione del cDNA vengono eseguite utilizzando 2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix di Kapa Biosystems (Woburn, MA). Questo sistema include 2x
10 KAPA ReadyMix 12,5 µl; Primer diretto (10 uM) 0,75 µl; Primer inverso (10 uM) 0,75 µl; cDNA stampo; 100 ng; e dH₂O diluito a 25,0 µl. Le condizioni di reazione sono a 95 °C per 5 min e 25 cicli di 98 °C per 20 sec, poi 58 °C per 15 sec, poi 72 °C per 45 sec, poi 72 °C per 5 min poi 4 °C al termine.

[0712] Il primer inverso della presente descrizione incorpora un poli-T₁₂₀ per un poli-A₁₂₀
15 nell'mRNA. Altri primer inversi con tratti di poli-T più o meno lunghi possono essere utilizzati per regolare la lunghezza della coda di poli-A nell'mRNA.

[0713] La reazione viene purificata utilizzando il Micro Kit PURELINK™ PCR di Invitrogen (Carlsbad, CA) secondo le istruzioni del produttore (fino a 5 µg). Reazioni più grandi
20 richiederanno una pulizia utilizzando un prodotto con una capacità maggiore. Dopo la pulizia, il cDNA viene quantificato utilizzando il NanoDrop e analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio per confermare che il cDNA è della dimensione prevista. Il cDNA viene quindi sottoposto all'analisi di sequenziamento prima di procedere alla reazione di trascrizione *in vitro*.

Esempio 60. Trascrizione in vitro (IVT)

[0714] La reazione di trascrizione *in vitro* genera mRNA contenente nucleotidi alternativi o RNA
25 modificato. La miscela di nucleotide trifosfato (NTP) viene prodotta internamente utilizzando


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

NTP naturali e non naturali.

[0715] Una tipica reazione di trascrizione *in vitro* include quanto segue:

Modello cDNA	1,0 µg
Tampone di trascrizione 10x (400 mM di Tris-HCl a pH 8,0, 190 mM di MgCl ₂ , 50 mM di DTT, 10 mM di Spermidina)	2,0 µL
NTP personalizzati (25 mm ciascuno)	7,2 µL
Inibitore dell'RNasi	20 U
T7 RNA polimerasi	3000 U
dH ₂ O	Fino a 20,0 µL

[0716] Incubazione a 37 °C per 3 ore-5 ore.

[0717] La miscela IVT grezza può essere conservata a 4 °C durante la notte per essere pulita il
5 giorno successivo. 1 U di DNasi priva di RNasi viene quindi utilizzata per digerire lo stampo
originale. Dopo 15 minuti di incubazione a 37 °C, l'mRNA viene purificato utilizzando il kit
MEGACLEAR™ di Ambion (Austin, TX) seguendo le istruzioni del produttore. Questo kit può
purificare fino a 500 µg di RNA. Dopo la pulizia, l'RNA viene quantificato utilizzando il
NanoDrop e analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio per confermare che l'RNA è della
10 dimensione corretta e che non si è verificata alcuna degradazione dell'RNA.

[0718] La T7 RNA polimerasi può essere selezionata tra T7 RNA polimerasi, T3 RNA polimerasi
e polimerasi mutanti come, ma non solo, le nuove polimerasi in grado di incorporare NTP
modificati nonché quelle polimerasi descritte da Liu [Esvelt et al. (Nature (2011) 472(7344):499-
503 e pubblicazione USA n. 20110177495] che riconoscono promotori alternativi, Ellington
15 [Chelliserrykattil and Ellington, Nature Biotechnology (2004) 22(9):1155-1160] che descrive una
T7 RNA polimerasi variante per trascrivere 2'-O-metil RNA e Sousa [Padilla e Sousa, Nucleic
Acids Research (2002) 30(24): e128] che descrive un doppio mutante T7 RNA polimerasi.

Esempio 61. Capping enzimatico dell'mRNA

[0719] Il capping dell'mRNA viene eseguito come segue quando la miscela include: IVT RNA


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

60 µg-180 µg e dH₂O fino a 72 µl. La miscela viene incubata a 65 °C per 5 minuti per denaturare l'RNA e quindi trasferita immediatamente in ghiaccio.

[0720] Il protocollo prevede quindi la miscelazione di 10x tampone Capping [0,5 M di Tris-HCl (pH 8,0), 60 mM di KCl, 12,5 mM di MgCl₂] (10,0 µl); 20 mM di GTP (5,0 µl); S-Adenosil Metionina da 20 mM (2,5 µl); inibitore dell'RNasi (100 U); 2'-O-metiltransferasi (400U); enzima capping di vaccinia (Guanilil transferasi) (40 U); dH₂O (fino a 28 µl); e incubazione a 37 °C per 30 minuti per 60 µg di RNA o fino a 2 ore per 180 µg di RNA.

[0721] L'mRNA viene quindi purificato utilizzando il kit MEGACLEAR™ di Ambion (Austin, TX) seguendo le istruzioni del produttore. Dopo la pulizia, l'RNA viene quantificato utilizzando il NANODROP™ (ThermoFisher, Waltham, MA) e analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio per confermare che l'RNA è della dimensione corretta e che non si è verificata alcuna degradazione dell'RNA. Il prodotto dell'RNA può anche essere sequenziato eseguendo una PCR a trascrizione inversa per generare il cDNA per il sequenziamento.

Esempio 62. Reazione di tailing di Poli-A

[0722] Senza una poli-T nel cDNA, è necessario eseguire una reazione di tailing poli-A prima di pulire il prodotto finale. Questo viene fatto mescolando IVT RNA sottoposto a capping (100 µl); inibitore della RNasi (20 U); 10x tampone di tailing [0,5 M di Tris-HCl (pH 8,0), 2,5 M di NaCl, 100 mM di MgCl₂](12,0 µl); 20 mM di ATP (6,0 µl); poli-A polimerasi (20 U); dH₂O fino a 123,5 µl e incubazione a 37 °C per 30 min. Se la coda di poli-A è già nel trascritto, la reazione di tailing può essere saltata per procedere direttamente alla pulizia con il kit MEGACLEAR™ di Ambion (Austin, TX) (fino a 500 µg). La poli-A polimerasi è preferibilmente un enzima ricombinante espresso nel lievito.

[0723] Per gli studi eseguiti e descritti nel presente documento, la coda di poli-A è codificata nel modello IVT per comprendere 160 nucleotidi di lunghezza. Tuttavia, dovrebbe essere chiaro che la processività o l'integrità della reazione di tailing poli-A potrebbe non comportare sempre


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

esattamente 160 nucleotidi. Quindi code poli-A di approssimativamente 160 nucleotidi, circa 150-165, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 o 165 rientrano nell'ambito della descrizione.

Esempio 63. Metodo di screening per l'espressione proteica

5 **A. Ionizzazione elettrospray**

[0724] Un campione biologico che può contenere proteine codificate da RNA modificato somministrato al soggetto viene preparato e analizzato secondo il protocollo del produttore per la ionizzazione elettrospray (ESI) utilizzando 1, 2, 3 o 4 analizzatori di massa. Un campione biologico può anche essere analizzato utilizzando un sistema di spettrometria di massa ESI
10 tandem.

[0725] I modelli di frammenti proteici, o proteine intere, vengono confrontati con controlli noti per una data proteina e l'identità viene determinata per confronto.

B. Desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice

[0726] Un campione biologico che può contenere proteine codificate da RNA modificato
15 somministrato al soggetto viene preparato e analizzato secondo il protocollo del produttore per il desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI).

[0727] I modelli di frammenti proteici, o proteine intere, vengono confrontati con controlli noti per una data proteina e l'identità viene determinata per confronto.

C. Cromatografia liquida-Spettrometria di massa-Spettrometria di massa

20 [0728] Un campione biologico, che può contenere proteine codificate da RNA modificato, può essere trattato con un enzima tripsina per digerire le proteine contenute al suo interno. I peptidi risultanti vengono analizzati mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa-spettrometria di massa (LC/MS/MS). I peptidi sono frammentati nello spettrometro di massa per produrre modelli diagnostici che possono essere abbinati a database di sequenze proteiche tramite algoritmi
25 informatici. Il campione digerito può essere diluito per ottenere 1 ng o meno di materiale di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

partenza per una data proteina. I campioni biologici contenenti un semplice tampone di fondo (ad es. acqua o sali volatili) possono essere digeriti direttamente in soluzione; sfondi più complessi (ad es. detergente, sali non volatili, glicerolo) richiedono un'ulteriore fase di pulizia per facilitare l'analisi del campione.

- 5 [0729] I modelli di frammenti proteici, o proteine intere, vengono confrontati con controlli noti per una data proteina e l'identità viene determinata per confronto.

Esempio 64. Studio sulle citochine: PBMC

A. Isolamento e coltura di PBMC

10 [0730] 50 mL di sangue umano da due donatori sono stati ricevuti da Research Blood Components (lotti KP30928 e KP30931) in provette con eparina sodica. Per ciascun donatore, il sangue è stato riunito e diluito a 70 mL con DPBS (SAFC Bioscience 59331C, lotto 071M8408) e suddiviso in modo uniforme tra due provette coniche da 50 mL. 10 mL di Ficoll Paque (GE Healthcare 17-5442-03, lotto 10074400) sono stati dispensati delicatamente sotto lo strato di sangue. Le provette sono state centrifugate a 2000 giri/min per 30 minuti con basse accelerazioni e frenate. Le provette sono state rimosse e gli strati di PBMC dello strato leucocitario pistrinico (buffy coat) sono stati trasferiti delicatamente in un conico da 50 mL fresco e lavati con DPBS. Le provette sono state centrifugate a 1450 giri/min per 10 minuti.

15 [0731] Il surnatante è stato aspirato e i pellet di PBMC sono stati risospesi e lavati in 50 mL di DPBS. Le provette sono state centrifugate a 1250 giri/min per 10 minuti. Questa fase di lavaggio è stata ripetuta e i pellet di PBMC sono stati risospesi in 19 mL di Optimem I (Gibco 11058, lotto 1072088) e contati. Le sospensioni cellulari sono state regolate a una concentrazione di $3,0 \times 10^6$ cellule/mL di cellule vive.

20 [0732] Queste cellule sono state quindi piastrate su cinque piastre a fondo tondo trattate con coltura tissutale da 96 pozzetti (Costar 3799) per donatore a 50 ul per pozzetto. Entro 30 minuti, le miscele di trasfezione sono state aggiunte a ciascun pozzetto a un volume di 50 ul per pozzetto.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Dopo 4 ore dopo la trasfezione, il terreno è stato integrato con 10 ul di siero fetale bovino (Gibco 10082, lotto 1012368)

B. Preparazione della trasfezione

[0733] mRNA modificato che codifica per il G-CSF umano (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) (contenente (1) NTP naturali, (2) sostituzione al 100% con 5-metil citidina e pseudouridina o (3) sostituzione al 100% con 5-metil citidina e N1-metil pseudouridina; mRNA codificante la luciferasi (Sequenza cDNA IVT mostrata in SEQ ID NO: 2; sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3, coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza, 5'cap, Cap1, completamente modificata con 5-metilcitosina in ciascuna citosina e sostituzione della pseudouridina in ciascun sito dell'uridina) (contenente (1) NTP naturali o (2) 100% sostituzione con 5-metil citidina e pseudouridina) e l'agonista TLR R848 (Invivogen tlr1-r848) sono stati diluiti a 38,4 ng/uL in un volume finale di 2500 ul Optimem I.

[0734] Separatamente, 110 ul di Lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-027, lotto 1070962) sono stati diluiti con 6,76 mL di Optimem I. In una piastra da 96 pozzetti nove aliquote di 135 ul di ciascun mRNA, controllo positivo (R-848) o negativo il controllo (Optimem I) è stato aggiunto a 135 ul di Lipofectamina 2000 diluita. La piastra contenente il materiale da trasfettare è stata incubata per 20 minuti. Le miscele di trasfezione sono state quindi trasferite a ciascuna delle piastre di PBMC umane a 50 ul per pozzetto. Le piastre sono state quindi incubate a 37 °C. A 2, 4, 8, 20 e 44 ore ciascuna piastra è stata rimossa dall'incubatrice e i surnatanti sono stati congelati.

[0735] Dopo che l'ultima piastra è stata rimossa, i surnatanti sono stati analizzati utilizzando un kit ELISA per G-CSF umano (Invitrogen KHC2032) e un kit ELISA per IFN-alfa umano (Thermo Scientific 41105-2). Ogni condizione è stata eseguita in duplicato.

C. Analisi della risposta immunitaria innata e proteica

[0736] Nel tempo è stata valutata la capacità dell'mRNA non modificato e modificato di produrre


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

la proteina codificata (produzione di G-CSF), così come la capacità dell'mRNA di attivare il riconoscimento immunitario innato misurato dalla produzione di interferone-alfa. L'uso di colture di PBMC *in vitro* è un modo accettato per misurare il potenziale immunostimolante degli oligonucleotidi (Robbins et al., Oligonucleotides 2009 19:89-102).

5 [0737] I risultati sono stati interpolati rispetto alla curva standard di ciascuna piastra ELISA utilizzando un adattamento della curva logistica a quattro parametri. Nelle Tabelle 4 e 5 sono mostrate la media di 3 donatori PBMC separati della produzione nel tempo di G-CSF, interferone-alfa (IFN-alfa) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa), misurata mediante ELISA specifico.

[0738] Nell'ELISA di G-CSF, il segnale di fondo dalla condizione non trattata della lipofectamina 10 2000 (LF2000) è stato sottratto in ogni punto temporale. I dati hanno dimostrato che la produzione specifica della proteina di G-CSF umana da parte del mononucleare del sangue periferico umano è stata osservata con mRNA di G-CSF contenente NTP naturali, sostituzione del 100% con 5-metil citidina e pseudouridina o sostituzione del 100% con 5-metil citidina e N1-metil pseudouridina. La produzione di G-CSF è stata significativamente aumentata attraverso l'uso di

15 5-metil citidina e mRNA modificato con N1-metil pseudouridina rispetto all'mRNA modificato con 5-metil citidina e pseudouridina.

[0739] Per quanto riguarda il riconoscimento immunitario innato, mentre entrambe le sostanze chimiche modificate di mRNA hanno ampiamente impedito la produzione di IFN-alfa e TNF-alfa rispetto ai controlli positivi [R848, p(I)p(C)], esistevano differenze significative tra le sostanze

20 chimiche. L'mRNA modificato con 5-metil citidina e pseudouridina ha prodotto livelli bassi ma rilevabili di produzione di IFN-alfa e TNF-alfa, mentre l'mRNA modificato con 5-metil citidina e N1-metil pseudouridina non ha prodotto alcuna produzione rilevabile di IFN-alfa e TNF-alfa.

[0740] Di conseguenza, è stato determinato che, oltre alla necessità di rivedere più di un marcatore citochinico dell'attivazione della risposta immunitaria innata, è stato sorprendentemente scoperto

25 che combinazioni di modificazioni forniscono livelli differenti di risposta cellulare (produzione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

di proteine e attivazione immunitaria). La modificazione, N1-metil pseudouridina, in questo studio ha dimostrato di conferire una protezione aggiuntiva rispetto alla combinazione standard di 5-metilcitosina/pseudouridina esplorata da altri dando come risultato una quantità doppia di proteine e una riduzione di quasi 150 volte dell'attivazione immunitaria (TNF-alfa).

- 5 [0741] Dato che le PBMC contengono una vasta gamma di sensori di riconoscimento dell'RNA immunitario innato e sono anche in grado di tradurre le proteine, si offre un sistema utile per testare l'interdipendenza di questi due percorsi. È noto che la traduzione dell'mRNA può essere influenzata negativamente dall'attivazione di tali vie immunitarie innate [Kariko et al. Immunity (2005) 23:165-175; Warren et al. Cell Stem Cell (2010) 7:618-630]. Utilizzando PBMC come
- 10 sistema di saggio in vitro è possibile stabilire una correlazione tra la traduzione (in questo caso la produzione di proteine di G-CSF) e la produzione di citochine (in questo caso esemplificata dalla produzione di proteine IFN-alfa e TNF-alfa). Una migliore produzione di proteine è correlata a una minore induzione della via di attivazione immunitaria innata e nuove chimiche possono essere giudicate favorevolmente sulla base di questo rapporto (Tabella 6).
- 15 [0742] In questo studio, il rapporto PC per le due modificazioni chimiche, pseudouridina e N1-metil pseudouridina, entrambe con 5-metilcitosina era $4742/141=34$ rispetto a $9944/1=9944$ per la citochina IFN-alfa. Per la citochina, TNF-alfa, le due sostanze chimiche avevano rapporti PC di 153 e 1243, rispettivamente, suggerendo che per entrambe le citochine, la N1-metilpseudouridina è la modificazione superiore. Nelle Tabelle 4 e 5, "NT" significa non testato.

20 **Tabella 4. G-CSF**

G-CSF: Media di 3 donatori (pg/mL)	
G-CSF	4742
5-metil citosina/ pseudouridina	
G-CSF	9944
5-metilcitosina/ N1-metilpseudouridina	


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

G-CSF: Media di 3 donatori (pg/mL)	
Luciferasi	18
LF2000	16

Tabella 5. IFN-alfa e TNF-alfa

	IFN-alfa: Media di 3 donatori (pg/mL)	TNF-alfa: Media di 3 donatori (pg/mL)
G-CSF	141	31
5-metil-citidina/pseudouridina		
G-CSF	1	8
5-metilcitosina/ N1-metilpseudouridina		
P(I)P(C)	1104	NT
R-848	NT	1477
LF2000	17	25

Tabella 6. Rapporti tra G-CSF e citochine

	G-CSF/IFN-alfa (rapporto)		G-CSF/TNF-alfa (rapporto)	
	5-metil-citidina/pseudouridina	5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina	5-metil-citidina/pseudouridina	5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina
Rapporto PC	34	9944	153	1243

Esempio 65. Intervalli di modificazione chimica dell'mRNA modificato

[0743] È stato dimostrato che nucleosidi modificati come, ma non solo, le modificazioni chimiche 5-metilcitosina e pseudouridina riducono la risposta immunitaria innata e aumentano l'espressione dell'RNA nelle cellule di mammifero. Sorprendentemente e non precedentemente noti, gli effetti manifestati da queste modificazioni chimiche possono essere titolati quando la quantità di modificazione chimica di un nucleotide specifico è inferiore al 100%. In precedenza, si riteneva che il beneficio della modificazione chimica potesse essere derivato utilizzando una sostituzione

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

non completa di un nucleoside modificato e i rapporti pubblicati suggeriscono che non vi fosse alcuna perdita di beneficio fino a quando il livello di sostituzione con un nucleoside modificato non fosse inferiore al 50% [Kariko et al., Immunità (2005) 23:165-175].

[0744] Tuttavia, è stato ora dimostrato che i benefici della modificazione chimica sono direttamente correlati al grado di modificazione chimica e devono essere considerati in vista di più di una singola misura della risposta immunitaria. Tali vantaggi includono una maggiore produzione di proteine o traduzione di mRNA e la riduzione o l'evitamento di stimolare la risposta immunitaria innata misurata dai profili delle citochine e dalle metriche dei fattori scatenanti della risposta immunitaria.

10 [0745] Una migliore traduzione dell'mRNA e una riduzione o mancanza di stimolazione immunitaria innata si osservano con la sostituzione del 100% con un nucleoside modificato. Percentuali minori di sostituzione determinano una minore traduzione dell'mRNA e una maggiore stimolazione immunitaria innata, con l'mRNA non modificato che mostra la traduzione più bassa e la più alta stimolazione immunitaria innata.

15 **Studi su PBMC *in vitro*: Modificazione percentuale**

[0746] 480 ng di mRNA di G-CSF modificato con 5-metilcitosina (5 mC) e pseudouridina (pseudoU) o di mRNA di G-CSF non modificato sono stati trasfettati con 0,4 ul di Lipofectamina 2000 in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) da tre donatori di sangue normali (D1, D2 e D3). L'mRNA del G-CSF (SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) è stato completamente modificato con 5mC e pseudo (modifica del 100%), non modificato con 5mC e pseudo (modificazione dello 0%) o è stato parzialmente modificato con 5mC e pseudoU in modo che l'mRNA contenga il 75% di modificazione, il 50% di modificazione o 25% di modificazione. Un campione di controllo di Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1; 5mC completamente modificato e


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

pseudoU) è stato anche analizzato per l'espressione di G-CSF. Per i campioni di controllo TNF-alfa e IFN-alfa di Lipofectamina 2000, LPS, R-848, Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1; sono stati anche analizzati 5mC e pseudo completamente modificati) e P(I)P(C). Il surnatante è stato raccolto ed eseguito mediante ELISA 22 ore dopo la trasfezione per determinare l'espressione proteica. L'espressione di G-CSF è mostrata nella Tabella 7 e l'espressione di IFN-alfa e TNF-alfa è mostrata nella Tabella 8. L'espressione di IFN-alfa e TNF-alfa può essere un effetto secondario della trasfezione dell'mRNA del G-CSF. Le Tabelle 7, 8 e la FIG. 10 mostrano che la quantità di modificazioni chimiche di G-CSF, interferone alfa (IFN-alfa) e fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-alfa) è titolabile quando l'mRNA non è completamente modificato e l'andamento titolabile non è lo stesso per ogni bersaglio.

[0747] Come menzionato in precedenza, utilizzando PBMC come sistema di saggio in vitro è possibile stabilire una correlazione tra la traduzione (in questo caso la produzione di proteine di G-CSF) e la produzione di citochine (in questo caso esemplificata dalla produzione di proteine IFN-alfa). Una migliore produzione di proteine è correlata a una minore induzione del percorso di attivazione immunitaria innata e la modificazione percentuale di una chimica possono essere giudicate favorevolmente sulla base di questo rapporto (Tabella 9). Come calcolato dalle Tabelle 7 e 8 e mostrato nella Tabella 9, la modificazione completa con 5-metilcitosina e pseudouridina mostra un rapporto molto migliore di produzione di proteine/citochine rispetto a senza alcuna modificazione (mRNA naturale di G-CSF) (100 volte per IFN-alfa e 27 volte per TNF-alfa). La modificazione parziale mostra una relazione lineare con una modificazione sempre minore che si traduce in un rapporto proteine/citochine più basso.

Tabella 7. Espressione di G-CSF

	Espressione di G-CSF (pg/mL)		
	D1	D2	D3
Modificazione al 100%.	1968,9	2595,6	2835,7


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

	Espressione di G-CSF (pg/mL)		
	D1	D2	D3
Modificazione al 75%.	566,7	631,4	659,5
Modificazione al 50%.	188,9	187,2	191,9
Modificazione al 25%.	139,3	126,9	102,0
Modificazione al 0%.	194,8	182,0	183,3
Luciferasi	90,2	0,0	22,1

Tabella 8. Espressione di IFN-alfa e TNF-alfa

	Espressione di IFN-alfa (pg/mL)			Espressione di TNF-alfa (pg/mL)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Modificazione al 100%.	336,5	78,0	46,4	115,0	15,0	11,1
Modificazione al 75%.	339,6	107,6	160,9	107,4	21,7	11,8
Modificazione al 50%.	478,9	261,1	389,7	49,6	24,1	10,4
Modificazione al 25%.	564,3	400,4	670,7	85,6	26,6	19,8
Modificazione al 0%.	1421,6	810,5	1260,5	154,6	96,8	45,9
LPS	0,0	0,6	0,0	0,0	12,6	4,3
R-848	0,5	3,0	14,1	655,2	989,9	420,4
P(I)P(C)	130,8	297,1	585,2	765,8	2362,7	1874,4
Solo lipidi	1952,2	866,6	855,8	248,5	82,0	60,7

Tabella 9. Rapporto PC ed effetto della percentuale di modificazione

% di modificazione	G-CSF medio (pg/mL)	IFN-a medio (pg/mL)	TNF-a medio (pg/mL)	G-CSF/IFN-alfa (rapporto PC)	G-CSF/TNF-alfa (rapporto PC)
100	2466	153	47	16	52
75	619	202	47	3,1	13
50	189	376	28	0,5	6,8
25	122	545	44	0,2	2,8
0	186	1164	99	0,16	1,9

Esempio 66. RNA modificato trasfettato in PBMC

[0748] 500 ng di mRNA di G-CSF modificato con 5-metilcitosina (5 mC) e pseudouridina

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(pseudoU) o di mRNA di G-CSF non modificato sono stati trasfettati con 0,4 ul di Lipofectamina 2000 in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) da tre donatori di sangue normali (D1, D2 e D3). L'mRNA del G-CSF (SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) è stato completamente modificato con 5mC e pseudo (modificazione del 100%), non modificato con 5mC e pseudo (modificazione dello 0%) o è stato parzialmente modificato con 5mC e pseudoU in modo che l'mRNA contenga il 50% di modificazione, il 25% di modificazione, il 10% di modificazione, il 5% di modificazione, l'1% di modificazione o lo 0,1% di modificazione. Un campione di controllo di mCherry (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 6; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1; 5meC completamente modificato e pseudouridina) e G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (controllo G-CSF) sono stati anche analizzati per l'espressione di G-CSF. Per i campioni di controllo del fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-alfa) e dell'interferone-alfa (IFN-alfa) di Lipofectamina 2000, LPS, R-848, Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1; sono stati anche analizzati 5mC e pseudo completamente modificati) e P(I)P(C). Il surnatante è stato raccolto 6 ore e 18 ore dopo la trasfezione ed eseguito mediante ELISA per determinare l'espressione proteica. L'espressione di G-CSF, IFN-alfa e TNF-alfa per il Donatore 1 è mostrata nella Tabella 10, per il Donatore 2 è mostrata nella Tabella 11 e per il Donatore 3 è mostrata nella Tabella 12.

[0749] La modificazione completa del 100% con 5-metilcitosina e pseudouridina ha determinato la maggior traduzione proteica (G-CSF) e la minor quantità di citochine prodotte in tutti e tre i donatori umani di PBMC. La diminuzione delle quantità di modificazione si traduce in una maggiore produzione di citochine (IFN-alfa e TNF-alfa), evidenziando così ulteriormente l'importanza della modificazione completa per ridurre le citochine e migliorare la traduzione delle proteine (come evidenziato qui dalla produzione di G-CSF).


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Tabella 10. Donatore 1

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore
Mod. al 100%	1815	2224	1	13	0	0
Mod. al 75%	591	614	0	89	0	0
Mod. al 50%	172	147	0	193	0	0
Mod. al 25%	111	92	2	219	0	0
Mod. al 10%	138	138	7	536	18	0
Mod. al 1%	199	214	9	660	18	3
Mod. allo 0,1%	222	208	10	597	0	6
Mod. allo 0 %	273	299	10	501	10	0
G-CSF di controllo	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
Non trattato	N/D	N/D	0	0	1	1

Tabella 11. Donatore 2

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore
Mod. allo 100%	2184	2432	0	7	0	11
Mod. allo 75%	935	958	3	130	0	0
Mod. allo 50%	192	253	2	625	7	23
Mod. allo 25%	153	158	7	464	6	6
Mod. allo 10%	203	223	25	700	22	39
Mod. allo 1%	288	275	27	962	51	66
Mod. allo 0,1%	318	288	33	635	28	5
Mod. allo 0 %	389	413	26	748	1	253
G-CSF di controllo	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
Non trattato	N/D	N/D	1	0	0	0

Tabella 12. Donatore 3

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore
Mod. allo 100%	6086	7549	7	658	11	11

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore	6 ore	18 ore
Mod. allo 75%	2479	2378	23	752	4	35
Mod. allo 50%	667	774	24	896	22	18
Mod. allo 25%	480	541	57	1557	43	115
Mod. allo 10%	838	956	159	2755	144	123
Mod. allo 1%	1108	1197	235	3415	88	270
Mod. allo 0,1%	1338	1177	191	2873	37	363
Mod. allo 0 %	1463	1666	215	3793	74	429
G-CSF di controllo	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
Non trattato	N/D	N/D	1	1	0	8

Esempio 67. Screening della mutazione inversa MicroAmes delle modificazioni

Contesto e metodi

[0750] Lo screening MicroAmes è una versione del test di preincubazione di Ames completo. Esso rileva mutazioni frameshift e la sostituzione della coppia di basi utilizzando quattro ceppi tester di *Salmonella* (TA97a, TA98, TA100 e TA1535) e un ceppo di *Escherichia coli* (WP2 *uvrA pKM101*). I ceppi TA97a e TA98 rilevano mutazioni frameshift e TA100, TA1535 e WP2 *uvrA pKM101* rilevano mutazioni di sostituzione della coppia di basi. Questo test di Ames in scala ridotta utilizza un composto minimo, viene condotto con e senza attivazione metabolica (frazione S9) e utilizza piastre multipozzetti. Questo test è un saggio microbico per rilevare il potenziale mutageno dei composti di test.

[0751] Lo screening microAmes per l'articolo di test 5-metilcitolina, pseudouridina o N¹-metilpseudouridina è stato testato in duplicato con i ceppi TA97a, TA98, TA100, TA1535 e WP2 *uvrA pKM101* in presenza e assenza di un sistema di attivazione metabolica (frazione microsomiale S9 di fegato di ratto indotta da AROCLOR™ 1254) a 0,25, 2,5, 12,5, 25, 75 e 250 ug/pozzetto. I composti di controllo positivi sono stati utilizzati a 4 diverse concentrazioni per garantire che il sistema di saggio fosse sensibile ai composti mutageni noti. DMSO è stato


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

utilizzato come controllo del veicolo. I controlli positivi e del veicolo hanno prodotto i risultati attesi, dimostrando che lo screening microAmes è sufficientemente sensibile per rilevare i mutageni.

Risultati

5 [0752] Per la 5-metilcitosina, non sono stati osservati precipitati con nessun ceppo tester con o senza attivazione metabolica. La citotossicità (riduzione del terreno di fondo e/o numero di revertanti) non è stata osservata in nessun ceppo con o senza attivazione metabolica. Non vi è stato alcun aumento del numero di colonie revertanti rispetto al controllo del veicolo in nessun ceppo con o senza attivazione metabolica. Pertanto, la 5-metilcitosina non era mutagena fino a
10 250 ug/pozzetto nei ceppi TA97a, TA98, TA100, TA1535 e WP2 uvrA pKM101 con o senza attivazione metabolica nelle condizioni dello screening microAmes.

[0753] Non sono stati osservati precipitati con nessun ceppo tester con o senza attivazione metabolica per la pseudouridina. La citotossicità (riduzione del numero di revertanti) è stata osservata con il ceppo TA100 senza attivazione metabolica. La citotossicità (riduzione del
15 terreno di fondo e/o numero di retromutanti) non è stata osservata in nessun altro ceppo con o senza attivazione metabolica. Non vi è stato alcun aumento del numero di colonie revertanti rispetto al controllo del veicolo in nessun ceppo con o senza attivazione metabolica. Pertanto, la pseudouridina non è risultata mutagena fino a 75 µg/pozzetto nel ceppo TA100 senza attivazione metabolica e fino a 250 µg/pozzetto nei ceppi TA97a, TA98, TA1535 e WP2 uvrA pKM101 con
20 o senza attivazione metabolica e ceppo TA100 senza attivazione metabolica nelle condizioni di questo screening microAmes.

[0754] Per la modificazione, la N1-metilpseudouridina, non sono stati osservati precipitati con nessun ceppo tester con o senza attivazione metabolica. La citotossicità (riduzione del terreno di
25 fondo e/o numero di revertanti) non è stata osservata in nessun ceppo con o senza attivazione metabolica. Non vi è stato alcun aumento del numero di colonie revertanti rispetto al controllo


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

del veicolo in nessun ceppo con o senza attivazione metabolica. N1-metilpseudouridina non è risultata mutagenica fino a 250 µg/pozzetto nei ceppi TA97a, TA98, TA100, TA1535 e WP2 uvrA pKM101 con o senza attivazione metabolica nelle condizioni di questo screening microAmes. La N1-metilpseudouridina è risultata meno mutagenica della pseudouridina.

5 [0755] Il confronto in questo test microAMES di 5 metilcitosina, pseudouridina e N1-metilpseudouridina rivela che generalmente non sono mutagene. Di particolare rilievo, tuttavia, è stata la differenza tra pseudouridina e N1-metilpseudouridina, dove la pseudouridina ha mostrato una risposta citotossica in un ceppo batterico in cui N1-metilpseudouridina non lo ha fatto. Questi test microAMES vengono utilizzati di routine come parte della valutazione preclinica della
10 sicurezza del composto ed evidenziano un'importante differenza tra N1-metilpseudouridina e pseudouridina.

Esempio 68. Tossicità dei nucleosidi trifosfati (NTP)

[0756] La citotossicità dei nucleosidi trifosfati (NTP) naturali e modificati, da soli o in combinazione con altre basi, è stata analizzata in cellule di rene embrionale umano 293 (HEK293)
15 in assenza di reagente di trasfezione. Le cellule HEK293 sono state seminate su piastre da 96 pozzetti a una densità di 30.000 cellule per pozzetto con 0,75 ul di RNAiMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) per pozzetto con un volume totale del pozzetto di 100 ul. 10 ul degli NTP descritti nella Tabella 12 sono stati combinati con 10 ul di diluizione lipidica e incubati per 30 minuti per formare un complesso prima che 80 ul della sospensione cellulare HEK293 fossero aggiunti al
20 complesso NTP.

[0757] Gli NTP naturali e modificati sono stati trasfettati a una concentrazione di 2,1 nM, 21 nM, 210 nM, 2,1 µM, 21 µM, 210 µM o 2,1 mM. Gli NTP in combinazione sono stati trasfettati a una concentrazione totale di NTP di 8,4 nM, 84 nM, 840 nM, 8,4 µM, 84 µM, 840 µM e 8,4 mM. Come controllo, mRNA di G-CSF modificato (SEQ ID NO: 1; coda di poliA di
25 approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1; 5-metilcitosina e

pseudouridina completamente modificati) è stato trasfettato in cellule HEK293 a una concentrazione di 8,4 nM. La citotossicità degli NTP e dell'mRNA di G-CSF modificato è stata analizzata a 4, 24, 48 e 72 ore dopo l'aggiunta alle cellule HEK293 utilizzando un test CYTO TOX-GLO™ di Promega (Madison, WI) seguendo il protocollo del produttore eccetto per il pipettaggio che è stato utilizzato per lisare le cellule invece di agitare le piastre.

[0758] Le Tabelle 13 e 14 mostrano la percentuale di cellule vitali per ciascuno degli NTP, combinazioni di NTP e controlli testati. Non è stata osservata tossicità con i singoli NTP rispetto alle cellule non trattate. Questi dati dimostrano che l'introduzione di singoli NTP, tra cui 5-metilcitosina, pseudouridina e N1-metilpseudouridina, nelle cellule di mammifero non è tossica a dosi 1.000.000 di volte una dose efficace quando introdotta come mRNA modificato.

Tabella 13. Citotossicità dei singoli NTP

Citotossicità di NTP singolo								
	Tempo	Dose						
		2,1 mM	210 uM	21 uM	2,1 uM	210 nM	21 nM	2,1 nM
Adenina	4 ore	90,03	85,97	91,20	90,23	90,36	93,21	93,48
	24 ore	88,42	87,31	86,86	86,81	86,94	87,19	86,44
	48 ore	93,71	90,55	89,94	89,80	89,17	91,13	92,12
	72 ore	97,49	94,81	93,83	94,58	92,22	93,88	95,74
Cisteina	4 ore	90,51	89,88	91,41	90,49	88,95	93,11	93,34
	24 ore	86,92	86,33	85,72	86,70	86,12	86,16	85,78
	48 ore	94,23	87,81	87,28	87,73	85,36	88,95	88,99
	72 ore	97,15	92,34	92,22	88,93	88,22	91,80	94,22
Guanina	4 ore	90,96	90,14	91,36	90,60	90,00	92,84	93,33
	24 ore	86,37	85,86	85,93	86,13	86,35	85,50	85,41
	48 ore	93,83	87,05	88,18	87,89	85,31	87,92	89,57
	72 ore	97,04	91,41	92,39	92,30	92,19	92,55	93,72
Uracile	4 ore	90,97	89,60	91,95	90,90	91,05	92,90	93,15
	24 ore	87,68	86,48	85,89	86,75	86,52	87,23	87,63
	48 ore	94,39	88,98	89,11	89,44	88,33	88,89	91,28

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Citotossicità di NTP singolo								
	Tempo	Dose						
		2,1 mM	210 uM	21 uM	2,1 uM	210 nM	21 nM	2,1 nM
	72 ore	96,82	93,45	93,63	94,60	94,50	94,53	95,51
Pseudouridina	4 ore	92,09	92,37	91,35	92,02	92,84	91,96	92,26
	24 ore	88,38	86,68	86,05	86,75	85,91	87,59	87,31
	48 ore	88,62	87,79	87,73	87,66	87,82	89,03	91,99
	72 ore	96,87	89,82	94,23	93,54	92,37	94,26	94,25
5-metilcitosina	4 ore	92,01	91,54	91,16	91,31	92,31	91,40	92,23
	24 ore	87,97	85,76	84,72	85,14	84,71	86,37	86,35
	48 ore	87,29	85,94	85,74	86,18	86,44	87,10	88,18
	72 ore	96,08	88,10	92,26	90,92	89,97	92,10	91,93
N1-metil pseudouridina	4 ore	92,45	91,43	91,48	90,41	92,15	91,44	91,89
	24 ore	88,92	86,48	85,17	85,72	85,89	86,85	87,79
	48 ore	89,84	86,02	87,52	85,85	87,38	86,72	87,81
	72 ore	96,80	93,03	93,83	92,25	92,40	92,84	92,98
Non trattato	4 ore	92,77	--	--	--	--	--	--
	24 ore	87,52	--	--	--	--	--	--
	48 ore	92,95	--	--	--	--	--	--
	72 ore	96,97	--	--	--	--	--	--

Tabella 14. Citotossicità degli NTP in combinazione


Citotossicità combinata di NTP								
	Tempo	Dose						
		8,4 mM	840 uM	84 uM	8,4 uM	840 nM	84 nM	8,4 nM
Pseudouridina/5-metilcitosina/adenina/guanina	4 ore	92,27	92,04	91,47	90,86	90,87	91,10	91,50
	24 ore	88,51	86,90	86,43	88,15	88,46	86,28	87,51
	48 ore	88,30	87,36	88,58	88,13	87,39	88,72	90,55
	72 ore	96,53	94,42	94,31	94,53	94,38	94,36	93,65
N1-metil pseudouridina/5-metilcitosina/adenina/guanina	4 ore	92,31	91,71	91,36	91,15	91,30	90,86	91,38
	24 ore	88,19	87,07	86,46	87,70	88,13	85,30	87,21
	48 ore	87,17	86,53	87,51	85,85	84,69	87,73	86,79

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Citotossicità combinata di NTP								
	Tempo	Dose						
		8,4 mM	840 uM	84 uM	8,4 uM	840 nM	84 nM	8,4 nM
	72 ore	96,40	94,88	94,40	93,65	94,82	92,72	93,10
mRNA modificato con G-CSF	4 ore	nd	nd	nd	nd	nd	nd	92,63
	24 ore	nd	nd	nd	nd	nd	nd	87,53
	48 ore	nd	nd	nd	nd	nd	nd	91,70
	72 ore	nd	nd	nd	nd	nd	nd	96,36

Esempio 69. Studio sulla risposta immunitaria innata nei fibroblasti BJ

[0759] I fibroblasti primari umani del prepuzio (fibroblasti BJ) sono stati ottenuti dall'American Type Culture Collection (ATCC) (catalogo n. CRL-2522) e fatti crescere in Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC, catalogo n. 30-2003) integrato con il 10% di siero fetale di bovino a 37 °C, sotto il 5% di CO₂. I fibroblasti BJ sono stati seminati su una piastra da 24 pozzetti a una densità di 300.000 cellule per pozzetto in 0,5 mL di terreno di coltura. 250 ng di mRNA di G-CSF modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (Gen1) o completamente modificato con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (Gen2) con Cap0, Cap1 o senza cap è stato trasfettato utilizzando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, catalogo n. 11668- 019), seguendo il protocollo del produttore. Anche i campioni di controllo di poli I:C (PIC), Lipofectamina 2000 (Lipo), mRNA della luciferasi naturale (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) e l'mRNA naturale di G-CSF sono stati trasfettati. Le cellule sono state raccolte dopo 18 ore, l'RNA totale è stato isolato e DNASE® trattato utilizzando il micro kit RNeasy (catalogo n. 74004) seguendo il protocollo del produttore. 100 ng di RNA totale sono stati utilizzati per la sintesi di cDNA utilizzando il kit di trascrizione inversa di cDNA ad alta capacità (catalogo n. 4368814) seguendo


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

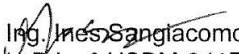
il protocollo del produttore. Il cDNA è stato quindi analizzato per l'espressione dei geni della risposta immunitaria innata mediante PCR quantitativa in tempo reale utilizzando SybrGreen in uno strumento Biorad CFX 384 seguendo il protocollo del produttore. La Tabella 15 mostra il livello di espressione delle trascrizioni della risposta immunitaria innata rispetto al gene di mantenimento HPRT (ipoxantina fosforibositransferasi) ed è espresso come induzione in numero di volte rispetto all'HPRT. Nella tabella, il pannello delle metriche standard include: RIG-I è il gene inducibile dell'acido retinoico 1, IL6 è l'interleuchina-6, OAS-1 è l'oligoadenilato sintetasi 1, IFN β è l'interferone-beta, AIM2 è assente nel melanoma-2, IFIT-1 è una proteina indotta dall'interferone con ripetizioni del tetratricopeptide 1, PKR è la proteina chinasi R, TNF α è il fattore di necrosi tumorale alfa e IFN α è l'interferone alfa.

Tabella 15. Livelli del trascritto della risposta immunitaria innata

Formulazione	RIG-I	IL6	OAS-1	IFN β	AIM2	IFIT-1	PKR	TNF α	IFN α
Luciferasi naturale	71,5	20,6	20,778	11,404	0,251	151,218	16,001	0,526	0,067
G-CSF naturale	73,3	47,1	19,359	13,615	0,264	142,011	11,667	1,185	0,153
PIC	30,0	2,8	8,628	1,523	0,100	71,914	10,326	0,264	0,063
G-CSF Gen1-UC	0,81	0,22	0,080	0,009	0,008	2,220	1,592	0,090	0,027
G-CSF Gen1-Cap0	0,54	0,26	0,042	0,005	0,008	1,314	1,568	0,088	0,038
G-CSF Gen1-Cap1	0,58	0,30	0,035	0,007	0,006	1,510	1,371	0,090	0,040
G-CSF Gen2-UC	0,21	0,20	0,002	0,007	0,007	0,603	0,969	0,129	0,005
G-CSF Gen2-Cap0	0,23	0,21	0,002	0,0014	0,007	0,648	1,547	0,121	0,035
G-CSF Gen2-Cap1	0,27	0,26	0,011	0,004	0,005	0,678	1,557	0,099	0,037
Lipo	0,27	0,53	0,001	0	0,007	0,954	1,536	0,158	0,064

Esempio 70. Rilevamento *in vivo* della risposta immunitaria innata

[0760] Nel tentativo di distinguere l'importanza della diversa modificazione chimica dell'mRNA


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

sulla produzione di proteine *in vivo* e sulla risposta delle citochine *in vivo*, i topi BALB/C femmine (n=5) vengono iniettati per via intramuscolare con l'mRNA del G-CSF (GCSF mRNA non mod.) (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza;) con un 5'cap di Cap1, mRNA di G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (mRNA di GCSF 5mc/pU), mRNA di G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina con (GCSF mRNA 5mc/N1pU) o senza cap da 5' (GCSF mRNA 5mc/N1 pU senza cap) o un controllo di R848 o saccarosio al 5% come descritto nella Tabella 16.

Tabella 16. Grafico di dosaggio

Formulazione	Via	Dose (μ g/topo)	Dose (ul)
GCSF mRNA non mod	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5 mc/pU	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/N1pU	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/N1pU senza cap	I.M.	200	50
R848	I.M.	75	50
5% di saccarosio	I.M.	-	50
Non trattato	I.M.	-	-

10 **[0761]** Il sangue viene raccolto 8 ore dopo la somministrazione. Utilizzando ELISA i livelli proteici di G-CSF, TNF-alfa e IFN-alfa sono determinati mediante ELISA. 8 ore dopo la somministrazione, il muscolo viene raccolto dal sito di iniezione e la reazione a catena della polimerasi quantitativa in tempo reale (QPCR) viene utilizzata per determinare i livelli di mRNA di RIG-I, PKR, AIM-2, IFIT-1, OAS-2, MDA- 5, IFN-beta, TNF-alfa, IL-6, G-CSF, CD45 nel
15 muscolo.

Esempio 71. Rilevamento *in vivo* dello studio sulla risposta immunitaria innata

[0762] Topi BALB/C femmine (n=5) sono stati iniettati per via intramuscolare con mRNA di G-CSF (mRNA di GCSF non mod.) (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza;) con un 5'cap di Cap1, mRNA


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

di G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (mRNA di GCSF 5mc/pU), mRNA di G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina con (GCSF mRNA 5mc/N1pU) o senza cap da 5' (GCSF mRNA 5mc/N1 pU senza cap) o un controllo di R848 o saccarosio al 5% come descritto nella Tabella 17. Il sangue
5 viene raccolto 8 ore dopo la somministrazione e utilizzando ELISA i livelli proteici di G-CSF e interferone-alfa (IFN-alfa) sono determinati mediante ELISA e sono mostrati nella Tabella 17.

[0763] Come mostrato nella Tabella 17, l'mRNA di G-CSF modificato, 5mc/pU e 5mc/N1pU modificato ha determinato l'espressione di G-CSF umano nel siero di topo. L'mRNA di G-CSF modificato 5mC/N1pU senza cap non ha mostrato espressione di G-CSF umano nel siero,
10 evidenziando l'importanza di avere una struttura del cap 5' per la traduzione delle proteine.

[0764] Come previsto, nessuna proteina di G-CSF umano è stata espressa nei gruppi R848, solo saccarosio al 5% e gruppi non trattati. È importante sottolineare che sono state osservate differenze significative nella produzione di citochine misurata dall'IFN-alfa di topo nel siero. Come previsto, l'mRNA del G-CSF non modificato ha dimostrato una robusta risposta alle
15 citochine *in vivo* (maggiore del controllo positivo R848). L'mRNA di G-CSF modificato 5mc/pU ha mostrato una risposta alle citochine bassa ma rilevabile *in vivo*, mentre l'mRNA modificato 5mc/N1pU non ha mostrato IFN-alfa rilevabile nel siero (e come gli animali veicolo o non trattati).

[0765] Inoltre, la risposta dell'mRNA modificato 5mc/N1pU era la stessa indipendentemente dal
20 fatto che fosse con cap o meno. Questi risultati *in vivo* rafforzano la conclusione che 1) che l'mRNA non modificato produce una robusta risposta immunitaria innata, 2) che questa viene ridotta, ma non abolita, attraverso l'incorporazione del 100% della modificazione di 5 mc/pU e 3) che l'incorporazione delle modificazioni di 5 mc/N1 pU non determinano una risposta rilevabile delle citochine.

25 [0766] Infine, dato che queste iniezioni sono in saccarosio al 5% (che di per sé non ha alcun


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

effetto), questi risultati dovrebbero riflettere accuratamente il potenziale immunostimolante di queste modificazioni.

[0767] Dai dati è evidente che le molecole modificate con N1pU producono più proteine mentre contemporaneamente hanno scarso o nessun effetto sull'espressione di IFN-alfa. È anche evidente che il capping è necessario per la produzione di proteine per questa modificazione chimica. La proteina: Il rapporto di citochine di 748 rispetto al rapporto PC per l'mRNA non modificato (PC = 9) indica che questa modificazione chimica è di gran lunga superiore in relazione agli effetti o alle implicazioni biologiche associate all'IFN-alfa.


Tabella 17. G-CSF umano e IFN-alfa di topo nel siero

Formulazione	Via	Dose (µg/topo)	Dose (ul)	Proteina di G-CSF (pg/mL)	Espressione di IFN-alfa (pg/mL)	Rapporto PC
GCSF mRNA non mod	I.M.	200	50	605,6	67,01	9
GCSF mRNA 5 mc/pU	I.M.	200	50	356,5	8,87	40
GCSF mRNA5mc/N1pU	I.M.	200	50	748,1	0	748
GCSF mRNA5mc/N1pU senza cap	I.M.	200	50	6,5	0	6,5
R848	I.M.	75	50	3,4	40,97	.08
5% di saccarosio	I.M.	-	50	0	1,49	0
Non trattato	I.M.	-	-	0	0	0

10 **Esempio 72: Rilascio *in vivo* utilizzando lipoplessi**

A. RNA modificato con G-CSF umano

[0768] Una formulazione contenente 100 µg di una delle due versioni di mRNA di G-CSF umano modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) (G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (G-CSF) o G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

e N1-metil-pseudouridina (G-CSF-N1) lipoplexato con 30% in volume di RNAIMAX™ e somministrato in 150 ul per via intramuscolare (I.M.) e in 225 ul per via endovenosa (I.V.) a topi C57/BL6.

[0769] A tre gruppi di controllo sono stati somministrati 100 µg di mRNA della luciferasi modificato (sequenza di cDNA dell'IVT mostrata in SEQ ID NO: 2; sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3, coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza, 5' cap, Cap1, completamente modificato con 5-metilcitosina in corrispondenza di ogni sostituzione di citosina e pseudouridina in corrispondenza di ogni sito di uridina) per via intramuscolare (Luc-unsp I.M.) o 150 µg di mRNA della luciferasi modificato per via endovenosa (Luc-unsp IV) o 150 ul del tampone di formulazione per via intramuscolare (tampone I.M.). 6 ore dopo la somministrazione di una formulazione, il siero è stato raccolto per misurare la quantità di proteina G-CSF umana nel siero di topo mediante ELISA G-CSF umano e i risultati sono mostrati nella Tabella 18.

[0770] Questi risultati dimostrano che sia l'mRNA di G-CSF umano modificato con 5-metilcitosina/pseudouridina che con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina può determinare un'espressione specifica della proteina G-CSF umana nel siero quando somministrato tramite la via di somministrazione I.V. o I.M. in un formulazione lipoplex.

Tabella 18. G-CSF umano nel siero (I.M. e I.V. via di iniezione)

Formulazione	Via	G-CSF (pg/mL)
G-CSF	I.M.	85,6
G-CSF-N1	I.M.	40,1
G-CSF	E.V.	31,0
G-CSF-N1	E.V.	6,1
Luc-unsp	I.M.	0,0
Luc-unsp	E.V.	0,0
Tampone	I.M.	0,0

B. Confronto dell'RNA modificato con G-CSF umano

[0771] Una formulazione contenente 100 µg di mRNA di G-CSF umano modificato lipoplexato con il 30% in volume di RNAIMAX™ con una modificazione di 5-metilcitosina (5mc) e una pseudouridina (ψ) (G-CSF-Gen1-Lipoplex), mRNA di G-CSF umano modificato con una
5 modificazione di 5mc e ψ in soluzione salina (G-CSF-Gen1-Saline), mRNA di G-CSF umano modificato con una N1-5-metilcitosina (N1-5mc) e una modificazione di ψ lipoplexato con il 30% in volume di RNAIMAX™ (G-CSF-Gen2-Lipoplex), mRNA umano modificato di G-CSF con una modificazione di N1-5mc e ψ in soluzione salina (G-CSF-Gen2-Saline), luciferasi modificata con una modificazione di 5mc e ψ lipoplexato con il 30% in volume di RNAIMAX™ (Luc-
10 Lipoplex), o l'mRNA della luciferasi completamente modificato con modificazioni di 5mc e ψ in soluzione salina (Luc-Saline) è stato somministrato per via intramuscolare (I.M.) o sottocutanea (S.C.) e un gruppo di controllo per ciascun metodo di la somministrazione stava dando una dose di 80 ul del tampone di formulazione (tampone f.) a topi C57/BL6. 13 ore dopo l'iniezione, il siero e il tessuto dal sito di iniezione sono stati raccolti da ciascun topo e analizzati mediante ELISA di
15 G-CSF per confrontare i livelli di proteina di G-CSF umano. I risultati della proteina di G-CSF umano nel siero di topo dalla somministrazione intramuscolare e i risultati della somministrazione sottocutanea sono mostrati nella Tabella 19.

[0772] Questi risultati dimostrano che l'mRNA di G-CSF umano modificato con 5-metilcitosina/pseudouridina e con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina può determinare
20 un'espressione specifica della proteina di G-CSF umano nel siero quando somministrato tramite la via di somministrazione I.V. o I.M in una formulazione lipoplex. Come mostrato nella Tabella 19, l'mRNA del G-CSF umano modificato con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina generalmente dimostra una maggiore produzione di proteina G-CSF umana rispetto all'mRNA del G-CSF umano modificato con 5-metilcitosina/pseudouridina.

25 **Tabella 19. Proteina di G-CSF umano nel siero di topo**


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Formulazione	G-CSF (pg/mL)	
	I.M. via di iniezione)	S.C. via di iniezione)
G-CSF-Gen1-Lipoplex	13,988	42,855
GCSF - Gen1-salina	9,375	4,614
GCSF-Gen2-lipoplex	75,572	32,107
GCSF-Gen2-salina	20,190	45,024
Luc lipoplex	0	3,754
Luc salina	0,0748	0
Tampone f.	4,977	2,156

Esempio 73. Somministrazione multisito: Intramuscolare e sottocutanea

[0773] mRNA modificato con G-CSF umano (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) modificato come Gen1 o Gen2 (5-metilcitosina (5mc) e una modificazione della pseudouridina (ψ), G-CSF-Gen1; o N1-5-metilcitosina (N1-5mc) e una modificazione ψ , G -CSF-Gen2) e formulati in soluzione fisiologica sono stati somministrati ai topi tramite iniezione intramuscolare (I.M.) o sottocutanea (S.C.). È stata eseguita l'iniezione di quattro dosi o 2 x 50ug (due siti) al giorno per tre giorni (intervallo di 24 ore). La quarta dose è stata somministrata 6 ore prima della raccolta del sangue e dell'analisi CBC. I controlli includevano luciferasi (sequenza cDNA per IVT mostrata in SEQ ID NO: 2; sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3, coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza, 5'cap, Cap1, completamente modificata con 5-metilcitosina in corrispondenza di ogni sostituzione di citosina e pseudouridina incorrispondenza di ogni sito di uridina) o il tampone di formulazione (tampone f.). I topi sono stati dissanguati 72 ore dopo la prima iniezione di mRNA (6 ore dopo l'ultima dose di mRNA) per determinare l'effetto del G-CSF umano codificato con mRNA sulla conta dei neutrofili. Il regime di dosaggio è mostrato nella Tabella 20 così come la conta dei neutrofili risultante (migliaia/uL). Nella Tabella 20, gli asterischi (*) indicano la significatività statistica a $p < 0,05$.

[0774] Per la somministrazione intramuscolare, i dati rivelano un aumento di quattro volte della conta dei neutrofili al di sopra del controllo al giorno 3 per l'mRNA del G-CSF Gen1 e un aumento di due volte per l'mRNA del G-CSF Gen2. Per la somministrazione sottocutanea, i dati rivelano un aumento di due volte della conta dei neutrofili al di sopra del controllo al giorno 3 per l'mRNA Gen2 di G-CSF.


[0775] Questi dati dimostrano che sia la 5-metilcitidina/pseudouridina che l'mRNA modificato con 5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina possono essere biologicamente attivi, come evidenziato da specifici aumenti della conta dei neutrofili nel sangue.

Tabella 20. Regime di dosaggio

Gr.	Trattamento	Via	N =	Dose (µg/topo)	Dose (µl/topo)	Vol. Veicolo di dosaggio	Neutrofili migliaia/uL
1	G-CSF (Gen1)	I.M.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	840*
2	G-CSF (Gen1)	S.C.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	430
3	G-CSF (Gen2)	I.M.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	746*
4	G-CSF (Gen2)	S.C.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	683
5	Luc (Gen1)	I.M.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	201
6	Luc (Gen1)	S.C.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	307
7	Luc (Gen2)	I.M.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	336
8	Luc (Gen2)	S.C.	5	2×50ug (quattro dosi)	50	Tampone f.	357
9	Tampone f.	I.M.	4	0 (quattro dosi)	50	Tampone f.	245
10	Tampone f.	S.C.	4	0 (quattro dosi)	50	Tampone f.	509
11	Non trattato	-	4			-	312

10 **Esempio 74. Somministrazione endovenosa**

[0776] mRNA modificato con G-CSF umano (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1;


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) modificato con 5-metilcitosina (5mc) e una modificazione pseudouridina (ψ) (Gen1); o senza modificazioni e formulati in lipoplex al 10% (RNAIMAX™) sono stati somministrati ai topi alla dose di 50 ug di RNA e in un volume di 100 ul tramite iniezione endovenosa (IV) ai giorni 0, 2 e 4. I neutrofili sono stati misurati ai giorni 1, 5 e 8. I controlli includevano RNA di mammifero non specifico o il solo tampone di formulazione (tampone f.). I topi sono stati dissanguati ai giorni 1, 5 e 8 per determinare l'effetto del G-CSF umano codificato con mRNA per aumentare la conta dei neutrofili. Il regime di dosaggio è mostrato nella Tabella 21 così come la conta dei neutrofili risultante (migliaia/uL; K/uL).

10 [0777] Per la somministrazione endovenosa, i dati rivelano un aumento da quattro a cinque volte della conta dei neutrofili al di sopra del controllo al giorno 5 con mRNA modificato con G-CSF ma non con mRNA di G-CSF non modificato o controlli non specifici. L'emocromo è tornato al valore basale quattro giorni dopo l'ultima iniezione. Non sono stati osservati altri cambiamenti nelle popolazioni di leucociti.

15 [0778] Nella Tabella 21, un asterisco (*) indica la significatività statistica a $p < 0,001$ rispetto al tampone.

[0779] Questi dati dimostrano che l'mRNA 5-metilcitosina/pseudouridina-modificato formulato con lipoplex può essere biologicamente attivo, quando somministrato attraverso una via di somministrazione I.V., come evidenziato da aumenti specifici della conta dei neutrofili nel sangue. Nessun altro sottoinsieme di cellule è stato significativamente alterato. L'mRNA di G-CSF non modificato somministrato in modo simile non ha mostrato alcun effetto farmacologico sulla conta dei neutrofili.

Tabella 21. Regime di dosaggio

Gr.	Trattamento	N	Dose (μ l/topo)	Vol.	Veicolo di dosaggio	Neutrofili K/uL
1	G-CSF (Gen1) Giorno 1	5	100		10% di lipoplex	2,91


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Gr.	Trattamento	N	Dose (µl/topo)	Vol.	Veicolo di dosaggio	Neutrofili K/uL
2	G-CSF (Genl) Giorno 5	5	100		10% di lipoplex	5,32*
3	G-CSF (Genl) Giorno 8	5	100		10% di lipoplex	2,06
4	G-CSF (nessuna modificazione) Giorno 1	5	100		10% di lipoplex	1,88
5	G-CSF (nessuna modificazione) Giorno 5	5	100		10% di lipoplex	1,95
6	G-CSF (nessuna modificazione) Giorno 8	5	100		10% di lipoplex	2,09
7	Controllo dell'RNA Giorno 1	5	100		10% di lipoplex	2,90
8	Controllo dell'RNA Giorno 5	5	100		10% di lipoplex	1,68
9	Controllo dell'RNA Giorno 8	4	100		10% di lipoplex	1,72
10	Tampone f. Giorno 1	4	100		10% di lipoplex	2,51
11	Tampone f. Giorno 5	4	100		10% di lipoplex	1,31
12	Tampone f. Giorno 8	4	100		10% di lipoplex	1,92

Esempio 75: Vie di somministrazione

[0780] Sono stati condotti studi per studiare il dosaggio frazionato utilizzando diverse vie di somministrazione. Sono stati progettati ed eseguiti studi che utilizzano più siti di iniezione sottocutanea o intramuscolare contemporaneamente per studiare i modi per aumentare l'esposizione al farmaco mRNA modificato e migliorare la produzione di proteine. Oltre al rilevamento del prodotto proteico espresso, è stata determinata anche una valutazione della funzione fisiologica delle proteine attraverso l'analisi di campioni dell'animale testato.

[0781] Sorprendentemente, è stato determinato che il dosaggio diviso di mRNA modificato produce una maggiore produzione di proteine e risposte fenotipiche rispetto a quelle prodotte da schemi di dosaggio unitario o multi-dosaggio.

[0782] La progettazione di un esperimento a dose divisa prevedeva l'utilizzo di mRNA modificato con eritropoietina umana (EPO) (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 5; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) o mRNA modificato con luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) somministrato in tampone da solo o formulato con lipoplex al 30% (RNAIMAX™). Il veicolo di dosaggio (tampone) era costituito da NaCl da 150 mM, CaCl₂ da 2mM, Na⁺-fosfato da 2 mM (fosfato di sodio monobasico da 1,4 mM; fosfato di sodio bibasico da 0,6 mM) e EDTA da 0,5 mM, pH 6,5.

5 Il pH è stato regolato usando idrossido di sodio e la soluzione finale è stata sterilizzata su filtro. L'mRNA è stato modificato con 5metilC (5meC) in corrispondenza di ogni sostituzione di citosina e pseudouridina in ciascun sito di uridina.

[0783] 4 topi per gruppo sono stati dosati per via intramuscolare (I.M.), endovenosa (I.V.) o sottocutanea (S.C.) secondo la tabella di dosaggio delineata nella Tabella 22. Il siero è stato
10 raccolto 13 ore dopo l'iniezione da tutti i topi, il tessuto è stato raccolto dal sito di iniezione dal gruppo intramuscolare e sottocutaneo e la milza, il fegato e i reni sono stati raccolti dal gruppo endovenoso. I risultati del gruppo intramuscolare e del gruppo sottocutaneo sono mostrati nella Tabella 23.

Tabella 22. Grafico di dosaggio

Gruppo	Trattamento	Via	Dose di mRNA modificato	Dose totale	Veicolo di dosaggio
1	mRNA modificato con lipoplex-EPO umano	I.M.	4 × 100 ug + 30% Lipoplex	4×70 ul	Lipoplex
2	mRNA modificato con lipoplex-EPO umano	I.M.	4 × 100 ug	4×70 ul	Tampone
3	mRNA modificato con lipoplex-EPO umano	S.C.	4 × 100 ug + 30% Lipoplex	4×70 ul	Lipoplex
4	mRNA modificato con lipoplex-EPO umano	S.C.	4 × 100 ug	4×70 ul	Tampone
5	mRNA modificato con lipoplex-EPO umano	E.V.	200 ug + 30% Lipoplex	140 uL	Lipoplex
6	mRNA modificato con lipoplex-luciferasi	I.M.	100 ug + 30% Lipoplex	4×70 ul	Lipoplex
7	mRNA modificato con lipoplex-luciferasi	I.M.	100 ug	4×70 ul	Tampone
8	mRNA modificato con	S.C.	100 ug + 30%	4×70 ul	Lipoplex


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Gruppo	Trattamento	Via	Dose di mRNA modificato	Dose totale	Veicolo di dosaggio
	lipoplex-luciferasi		Lipoplex		
9	mRNA modificato con lipoplex-luciferasi	S.C.	100 ug	4×70 ul	Tampone
10	mRNA modificato con lipoplexato-EPO umano	E.V.	200 ug + 30% Lipoplex	140 uL	Lipoplex
11	Tampone di formulazione	I.M.	Multi-dosaggio 4x	4×70 ul	Tampone

Tabella 23. Proteina EPO umana nel siero di topo (I.M. via di iniezione)

Formulazione	EPO (pg/mL)	
	I.M. via di iniezione)	S.C. via di iniezione)
Epo-Lipoplex	67,1	2,2
Luc-Lipoplex	0	0
Epo-soluzione salina	100,9	11,4
Luc-soluzione salina	0	0
Tampone di formulazione	0	0

Esempio 76: Rilascio *in vivo* utilizzando rapporti lipidici variabili

[0784] L'mRNA modificato è stato consegnato a topi C57/BL6 per valutare i rapporti lipidici variabili e l'espressione proteica risultante. Formulazioni di 100µg di mRNA di EPO umano modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 5; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1; completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina) lipoplexati con il 10%, il 30% o il 50% di RNAIMAX™, 100 µg di mRNA di luciferasi modificato (sequenza di cDNA IVT mostrata in SEQ ID NO: 2; sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3, coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza, 5'cap, Cap1, completamente modificata con 5-metilcitosina in corrispondenza di ogni sostituzione di citosina e pseudouridina in corrispondenza di ogni sito di uridina) lipoplexato con 10%, 30% o 50% di RNAIMAX™ o un tampone di formulazione è stato somministrato per via intramuscolare ai topi in una singola dose da 70 µl. Il siero è stato raccolto 13 ore dopo l'iniezione per essere sottoposto a un EPO ELISA umano per determinare il livello


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

di proteina EPO umana in ciascun topo. I risultati dell'EPO ELISA umano, mostrati nella Tabella 24, mostrano che l'EPO umano modificato espresso nel muscolo viene secreto nel siero per ciascuna delle diverse percentuali di RNAiMAX™.


Tabella 24. Proteina EPO umana nel siero di topo (via di iniezione I.M.)

Formulazione	EPO (pg/mL)
Epo + 10% RNAiMAX	11,4
Luc + 10% RNAiMAX	0
Epo + 30% RNAiMAX	27,1
Luc + 30% RNAiMAX	0
Epo + 50% RNAiMAX	19,7
Luc + 50% RNAiMAX	0
Tampone f.	0

5 **Esempio 77: Rilascio *in vivo* di RNA modificato nei ratti**

[0785] La produzione proteica dell'mRNA modificato è stata valutata somministrando mRNA di G-CSF modificato o mRNA del Fattore IX modificato a ratti Sprague Dawley femmine (n=6). Ai ratti sono stati iniettati 400 ug in 100 ul di mRNA di G-CSF (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (G-CSF Gen1), mRNA del G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (G-CSF Gen2) o mRNA del Fattore IX (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 6; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (fattore IX Gen1) ricostituito dalla forma liofilizzata in saccarosio al 5%. Il sangue è stato raccolto 8 ore dopo l'iniezione e il livello di proteina G-CSF nel siero è stato misurato mediante ELISA. La Tabella 25 mostra i livelli di proteina di G-CSF nel siero dopo 8 ore.

[0786] Questi risultati dimostrano che sia l'mRNA modificato di G-CSF Gen 1 sia G-CSF Gen 2 possono produrre la proteina di G-CSF umano in un ratto dopo una singola iniezione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

intramuscolare e che la produzione della proteina di G-CSF umano è migliorata quando si utilizza la chimica Gen 2 rispetto alla chimica Gen 1.

Tabella 25. Proteina di G-CSF nel siero di ratto (I.M. via di iniezione)


Formulazione	Proteina di G-CSF (pg/mL)
G-CSF GenI	19,37
G-CSF Gen2	64,72
Fattore IX Gen 1	2,25

Esempio 78. Modificazione chimica: Studi *in vitro*

5 A. Screening *in vitro* in PBMC

[0787] 500 ng di G-CSF (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) mRNA completamente modificato con la modificazione chimica delineata nelle Tabelle 26 e 27 è stato trasfettato con 0,4 ul di Lipofectamina 2000 in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) da tre donatori di sangue normali. Campioni di controllo di LPS, R848, P(I)P(C) e mCherry (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 4; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza, 5'cap, Cap1; completamente modificati con 5-metilcitosina e pseudouridina) sono stati anche analizzati. Il surnatante è stato raccolto e conservato congelato fino all'analisi mediante ELISA per determinare l'espressione della proteina G-CSF e l'induzione delle citochine interferone-alfa (IFN- α) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α). L'espressione proteica di G-CSF è mostrata nella Tabella 26 e l'espressione di IFN- α e TNF- α è mostrata nella Tabella 27.

[0788] I dati nella Tabella 26 dimostrano che molte, ma non tutte, le modificazioni chimiche possono essere utilizzate per produrre in modo produttivo G-CSF umano in PBMC. Da notare, la sostituzione al 100% con N1-metilpseudouridina dimostra il livello più alto di produzione di G-CSF umano (quasi 10 volte superiore alla stessa pseudouridina). Quando la N1-metilpseudouridina viene utilizzata in combinazione con la 5-metilcitosina, viene prodotto anche


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

un livello elevato di proteina di G-CSF umano (questo è anche superiore rispetto a quando la pseudouridina viene utilizzata in combinazione con la 5 metilcitidina).

[0789] Data la relazione inversa tra la produzione di proteine e la produzione di citochine in PBMC, una tendenza simile si vede anche nella Tabella 27, dove la sostituzione del 100% con

5 N1-metilpseudouridina non determina l'induzione di citochine (simile ai controlli di sola trasfezione) e la pseudouridina mostra un'induzione di citochine rilevabile che è menzionata nel contesto precedente.

[0790] Altre modificazioni come la N6-metiladenosina e l' α -tiocitidina sembrano aumentare la stimolazione delle citochine.

10 **Tabella 26. Modificazioni chimiche ed espressione della proteina di G-CSF**

Modificazioni chimiche	Espressione proteica di G-CSF (pg/mL)		
	Donatore 1	Donatore 2	Donatore 3
Pseudouridina	2477	1.909	1.498
5-metiluridina	318	359	345
N1-metilpseudouridina	21.495	16.550	12.441
2-tiouridina	932	1.000	600
4-tiouridina	5	391	218
5-metossiuridina	2.964	1.832	1.800
5-metilcitosina e pseudouridina (1° serie)	2.632	1.955	1.373
5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (1° serie)	10.232	7.245	6.214
2' Fluoroguanosina	59	186	177
2' fluorouridina	118	209	191
5-metilcitosina e pseudouridina (2° serie)	1.682	1.382	1.036
5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (2° serie)	9.564	8.509	7.141
5-bromouridina	314	482	291
5-(2-carbometossivinil)uridina	77	286	177
5-[3(1-E-propenilammino)uridina	541	491	550


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazioni chimiche	Espressione proteica di G-CSF (pg/mL)		
	Donatore 1	Donatore 2	Donatore 3
α -tiocitidina	105	264	245
5-metilcitosina e pseudouridina (3° serie)	1.595	1.432	955
N1-metiladenosina	182	177	191
N6-metiladenosina	100	168	200
5-metilcitidina	291	277	359
N4-acetilcitidina	50	136	36
5-formilcitidina	18	205	23
5-metilcitosina e pseudouridina (4° serie)	264	350	182
5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (4° serie)	9.505	6.927	5.405
LPS	1.209	786	636
mCherry	5	168	164
R848	709	732	636
P(I)P(C)	5	186	182

Tabella 27. Modificazioni chimiche ed espressione di citochine

	Modificazioni chimiche			Espressione di IFN- α (pg/mL)	Espressione di TNF- α (pg/mL)		
	Donatore 1	Donatore 2	Donatore 3	Donatore 1	Donatore 2	Donatore 3	
Pseudouridina	120	77	171	36	81	126	
5-metiluridina	245	135	334	94	100	157	
N1-metilpseudouridina	26	75	138	101	106	134	
2-tiouridina	100	108	154	133	133	141	
4-tiouridina	463	258	659	169	126	254	
5-metossiuridina	0	64	133	39	74	111	
5-metilcitosina e pseudouridina (1° serie)	88	94	148	64	89	121	


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (1° serie)	0	60	136	54	79	126
2' Fluoroguanosina	107	97	194	91	94	141
2' fluorouridina	158	103	178	164	121	156
5-metilcitosina e pseudouridina (2° serie)	133	92	167	99	111	150
5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (2° serie)	0	66	140	54	97	149
5-bromouridina	95	86	181	87	106	157
5-(2-carbometossivinil)uridina	0	61	130	40	81	116
5-[3(1-E-propenilammino)uridina	0	58	132	71	90	119
α -tociidina	1.138	565	695	300	273	277
5-metilcitosina e pseudouridina (3° serie)	88	75	150	84	89	130
N1-metiladenosina	322	255	377	256	157	294
N6-metiladenosina	1.935	1.065	1.492	1.080	630	857
5-metilcitidina	643	359	529	176	136	193
N4-acetilcitidina	789	593	431	263	67	207
5-formilcitidina	180	93	88	136	30	40
5-metilcitosina e pseudouridina (4° serie)	131	28	18	53	24	29
5-metilcitosina e N1-metilpseudourid	0	0	0	36	14	13


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

ina (4° serie)						
LPS	0	67	146	7.004	3.974	4.020
mCherry	100	75	143	67	100	133
R848	674	619	562	11.179	8.546	9.907
P(I)P(C)	470	117	362	249	177	197

B. Screening *in vitro* in cellule HeLa

[0791] Il giorno prima della trasfezione, 20.000 cellule HeLa (ATCC n. CCL-2; Manassas, VA) sono state raccolte mediante trattamento con una soluzione di tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) e seminate in un volume totale di 100 ul di terreno EMEM (integrato con 10% di FCS e 1x Glutamax) per pozzetto in una piastra di coltura cellulare a 96 pozzetti (Corning, Manassas, VA). Le cellule sono state coltivate a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5% durante la notte. Il giorno successivo, 83 ng di RNA modificato con luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) con la modificazione chimica descritta nella Tabella 28, sono stati diluiti in 10 ul volume finale di OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). La lipofectamina 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) è stata utilizzata come reagente di trasfezione e 0,2 ul sono stati diluiti in 10 ul di volume finale di OPTI-MEM. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, entrambe le soluzioni sono state combinate e incubate per altri 15 minuti a temperatura ambiente. Quindi la soluzione combinata di 20 ul è stata aggiunta al mezzo di coltura cellulare da 100 ul contenente le cellule HeLa e incubata a temperatura ambiente.

[0792] Dopo 18-22 ore di incubazione, le cellule che esprimono la luciferasi sono state lisate con 100 ul di Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore. Le aliquote dei lisati sono state trasferite su piastre da 96 pozzetti di polistirene bianco opaco (Coming, Manassas, VA) e combinate con 100 ul di soluzione di analisi completa della luciferasi (Promega, Madison, WI). I volumi del lisato sono stati regolati o diluiti fino a quando non sono state rilevate più di 2 milioni di unità di luce relativa (RLU) per pozzetto per i campioni che


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

producono segnali più forti e le RLU per ciascuna chimica testata sono mostrate nella Tabella 28.

Il lettore di piastre era un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). Il segnale di fondo delle piastre senza reagente era di circa 200 unità di luce relative per pozzetto.

[0793] Questi risultati dimostrano che molte, ma non tutte, le modificazioni chimiche possono essere utilizzate per produrre in modo produttivo G-CSF umano nelle cellule HeLa. Da notare, la sostituzione al 100% N1-metilpseudouridina dimostra il livello più alto di produzione umana di G-CSF.

Tabella 28. Unità di luce relative della luciferasi

Modificazione chimica	RLU
N6-metiladenosina (m6a)	534
5-metilcitidina (m5c)	138.428
N4-acetilcitidina (ac4c)	235.412
5-formilcitidina (f5c)	436
5-metilcitosina/pseudouridina, test A 1	48.659
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prova A1	190.924
Pseudouridina	655.632
1-metilpseudouridina (mlu)	1.517.998
2-tiouridina (s2u)	3387
5-metossiuridina (mo5u)	253.719
5-metilcitosina/pseudouridina, test B1	317.744
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test B 1	265.871
5-bromo-uridina	43.276
5 (2 carbovinil) uridina	531
5 (3-1E propenil ammino) uridina	446
5-metilcitosina/pseudouridina, test A2	295.824
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prova A2	233.921
5-metiluridina	50.932
α -tio-citidina	26.358
5-metilcitosina/pseudouridina, test B2	481.477
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prova B2	271.989


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	RLU
5-metilcitosina/pseudouridina, test A3	438.831
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prova A3	277.499
Luciferasi non modificata	234.802

C. Screening *in vitro* nei lisati di reticolociti di coniglio

[0794] mRNA Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) è stato modificato con la modificazione chimica elencata nella Tabella 29 e sono stati diluiti in acqua sterile priva di nucleasi fino a una quantità finale di 250 ng in 10 ul. La luciferasi diluita è stata aggiunta a 40 ul di lisato di reticolociti di coniglio appena preparato e la reazione di traduzione *in vitro* è stata eseguita in una provetta di reazione in polipropilene standard da 1,5 mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 30 °C in un blocco riscaldante a secco. Il saggio di traduzione è stato eseguito con il kit Rabbit Reticulocyte Lysate (trattato con nucleasi) (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore. Il tampone di reazione è stato integrato con una miscela uno a uno di soluzioni madre di amminoacidi fornite prive di leucina o metionina dando come risultato una miscela di reazione contenente quantità sufficienti di entrambi gli amminoacidi per consentire un'efficace traduzione *in vitro*.

[0795] Dopo 60 minuti di incubazione, la reazione è stata interrotta ponendo le provette di reazione sul ghiaccio. Le aliquote della reazione di traduzione *in vitro* contenente RNA modificato con luciferasi sono state trasferite su piastre a 96 pozzetti di polistirene bianco opaco (Corning, Manassas, VA) e combinate con 100 ul di soluzione di analisi completa della luciferasi (Promega, Madison, WI). I volumi delle reazioni di traduzione *in vitro* sono stati regolati o diluiti fino a quando non sono state rilevate più di 2 milioni di unità di luce relativa (RLU) per pozzetto per i campioni che producono segnali più forti e le RLU per ciascuna chimica testata sono mostrate nella Tabella 29. Il lettore di piastre era un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). Il segnale di fondo delle piastre senza reagente era di circa 200 unità di luce relative per pozzetto.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0796] Questi risultati di traduzione senza cellule sono molto ben correlati con i risultati di produzione di proteine in HeLa, con le stesse modificazioni che generalmente funzionano o non funzionano in entrambi i sistemi. Un'eccezione degna di nota è l'mRNA della luciferasi modificato con 5-formilcitidina che ha funzionato nel sistema di traduzione senza cellule, ma non nel sistema di trasfezione basato sulle cellule HeLa. Una differenza simile tra i due saggi è stata osservata anche con l'mRNA di G-CSF modificato con 5-formilcitidina.

Tabella 29. Unità di luce relative della luciferasi

Modificazione chimica	RLU
N6-metiladenosina (m6a)	398
5-metilcitidina (m5c)	152.989
N4-acetilcitidina (ac4c)	60.879
5-formilcitidina (f5c)	55.208
5-metilcitosina/pseudouridina, test A1	349.398
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test A1	205.465
Pseudouridina	587.795
1-metilpseudouridina (mlu)	589.758
2-tiouridina (s2u)	708
5-metossiuridina (mo5u)	288.647
5-metilcitosina/pseudouridina, test B1	454.662
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prova B1	223.732
5-bromo-uridina	221.879
5 (2 carbovinil) uridina	225
5 (3-1E propenil ammino) uridina	211
5-metilcitosina/pseudouridina, test A2	558.779
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test A2	333.082
5-metiluridina	214.680
α -tio-citidina	123.878
5-metilcitosina/pseudouridina, test B2	487.805
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prova B2	154.096


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	RLU
5-metilcitosina/pseudouridina, test A3	413.535
5-metilcitosina/NI-metilpseudouridina, test A3	292.954
Luciferasi non modificata	225.986

Esempio 79. Modificazione chimica: Studi *in vivo*

A. Screening *in vivo* dell'mRNA modificato con G-CSF

[0797] I topi Balb-C (n=4) vengono iniettati per via intramuscolare in ciascuna gamba con mRNA di G-CSF modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1), completamente modificato con le modificazioni chimiche descritte nella Tabella 30, è formulato in 1xPBS. Un controllo dell'mRNA modificato con luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1; completamente modificati con pseudouridina e 5-metilcitosina) e anche un controllo di PBS vengono testati. Dopo 8 ore il siero viene raccolto per determinare i livelli di proteine G-CSF, i livelli di citochine mediante ELISA.

Tabella 30. G-CSF

mRNA	Modificazioni chimiche
G-CSF	Pseudouridina
G-CSF	5-metiluridina
G-CSF	2-tiouridina
G-CSF	4-tiouridina
G-CSF	5-metossiuridina
G-CSF	2'-fluorouridina
G-CSF	5-bromouridina
G-CSF	5-[3(1-E-propenilammino)uridina)
G-CSF	alfa-tio-citidina
G-CSF	5-metilcitidina
G-CSF	N4-acetilcitidina
G-CSF	Pseudouridina e 5-metilcitosina

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

mRNA	Modificazioni chimiche
G-CSF	N1-metilpseudouridina e 5-metilcitosina
Luciferasi	Pseudouridina e 5-metilcitosina
PBS	Assente

B. Screening *in vivo* dell'mRNA modificato con luciferasi

[0798] A topi Balb-C (n=4) sono stati iniettati per via sottocutanea 200 µl contenenti da 42 a 103 µg di mRNA della luciferasi modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1), completamente modificato con le modificazioni chimiche descritte nella Tabella 31, è stato formulato in 1xPBS. È stato anche testato un controllo di PBS. I dosaggi dell'mRNA della luciferasi modificato sono anche descritti nella Tabella 31. 8 ore dopo la somministrazione, i topi sono stati ripresi per determinare l'espressione della luciferasi. Venti minuti prima dell'imaging, i topi sono stati iniettati per via intraperitoneale con una soluzione di D-luciferina a 150 mg/kg. Gli animali sono stati quindi anestetizzati e le immagini sono state acquisite con un sistema di imaging IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminescenza è stata misurata come flusso totale (fotoni/secondo) dell'intero topo.

[0799] Come dimostrato nella Tabella 31, tutte le sostanze chimiche modificate con mRNA della luciferasi hanno dimostrato attività *in vivo*, ad eccezione della 2'-fluorouridina. Inoltre, l'mRNA modificato con 1-metilpseudouridina ha dimostrato un'espressione molto elevata della luciferasi (espressione 5 volte maggiore rispetto alla pseudouridina contenente mRNA).

Tabella 31. Screening della luciferasi

mRNA	Modificazioni chimiche	Dose (µg) di mRNA	Volume della dose (mL)	Espressione della luciferasi (fotone/secondo)
Luciferasi	5-metilcitosina	83	0,72	1,94E+07
Luciferasi	N4-acetilcitosina	76	0,72	1.11E07
Luciferasi	Pseudouridina	95	1,20	1,36E+07
Luciferasi	1-metilpseudouridina	103	0,72	7,40E+07

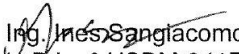

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

mRNA	Modificazioni chimiche	Dose (ug) di mRNA	Volume della dose (mL)	Espressione della luciferasi (fotone/secondo)
Luciferasi	5-metossiuridina	95	1,22	3,32+07
Luciferasi	5-metiluridina	94	0,86	7.42E+06
Luciferasi	5-bromouridina	89	1,49	3.75E+07
Luciferasi	2'-Fluoroguanosina	42	0,72	5,88E+05
Luciferasi	2'-fluorocitidina	47	0,72	4,21E+05
Luciferasi	2'-fluorouridina	59	0,72	3,47E+05
PBS	Assente	-	0,72	3,16E+05

Esempio 80. Screening *in vivo* dell'mRNA modificato con luciferasi in combinazione

[0800] A topi Balb-C (n=4) sono stati iniettati per via sottocutanea 200 μ l contenenti 100 ug di mRNA della luciferasi modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1), completamente modificato con le modificazioni chimiche descritte nella Tabella 32, è stato formulato in 1x PBS. È stato anche testato un controllo di PBS. I dosaggi dell'mRNA della luciferasi modificato sono anche descritti nella Tabella 29. 8 ore dopo la somministrazione, i topi sono stati ripresi per determinare l'espressione della luciferasi. Venti minuti prima dell'imaging, i topi sono stati iniettati per via intraperitoneale con una soluzione di D-luciferina a 150 mg/kg. Gli animali sono stati quindi anestetizzati e le immagini sono state acquisite con un sistema di imaging IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminescenza è stata misurata come flusso totale (fotoni/secondo) dell'intero topo.

[0801] Come dimostrato nella Tabella 32, tutte le sostanze chimiche modificate con mRNA della luciferasi (in combinazione) hanno dimostrato attività *in vivo*. Inoltre, la presenza di N1-metilpseudouridina nell'mRNA modificato (con N4-acetilcitidina o 5 metilcitidina) ha dimostrato un'espressione più elevata rispetto a quando le stesse combinazioni sono state testate utilizzandole con pseudouridina. Presi insieme, questi dati dimostrano che la N1-metilpseudouridina contenente l'mRNA della luciferasi si traduce in una migliore espressione proteica *in vivo* se usata


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

da sola (Tabella 31) o quando usata in combinazione con altri nucleotidi modificati (Tabella 32).

Tabella 32. Combinazioni di screening della luciferasi

mRNA	Modificazioni chimiche	Espressione della luciferasi (fotone/secondo)
Luciferasi	N4-acetilcitidina/pseudouridina	4,18E+06
Luciferasi	N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	2,88E+07
Luciferasi	5-metilcitidina/5-metossiuridina	3,48E+07
Luciferasi	5-metilcitidina/5-metiluridina	1,44E+07
Luciferasi	5-metilcitidina/dove il 50% dell'uridina viene sostituito con 2-tiouridina	2,39E+06
Luciferasi	5-metilcitidina/pseudouridina	2,36E+07
Luciferasi	5-metilcitidina/N 1-metil-pseudouridina	4,15E+07
PBS	Assente	3,59E+05

Esempio 81. Stabilità dell'RNA modificato

A. Conservazione dell'RNA modificato

5 [0802] Sono stati condotti esperimenti di stabilità per ottenere una migliore comprensione delle condizioni di conservazione per mantenere l'integrità dell'RNA modificato. mRNA di G-CSF modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1), l'mRNA di G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina e l'mRNA di G-CSF completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina lipoplexato con lo 0,75% in volume di RNAIMAX™ è stato conservato a 50 °C, 40 °C, 37 °C, 25 °C, 4 °C o -20 °C. Dopo che l'mRNA è stato conservato per 0 ore, 2 ore, 6 ore, 24 ore, 48 ore, 5 giorni e 14 giorni, l'mRNA è stato analizzato mediante elettroforesi su gel utilizzando un sistema Bio-Rad EXPERION™. L'mRNA di G-CSF modificato, non modificato e lipoplexato è stato anche conservato in RNASTABLE® (Biomatrica, Inc. San Diego, CA) a 40 °C o acqua a -80 °C o 40 °C per 35 giorni prima di essere analizzato mediante elettroforesi su gel.

15 [0803] Tutti i campioni di mRNA senza stabilizzante erano stabili dopo 2 settimane dalla


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

conservazione a 4 °C o -20 °C. L'mRNA del G-CSF modificato, con o senza lipoplex, era più stabile del G-CSF non modificato se conservato a 25 °C (stabile fino a 5 giorni contro 48 ore), a 37 °C (stabile fino a 24 ore rispetto a 6 ore) e a 50 °C (stabile fino a 6 ore rispetto a 2 ore). L'mRNA di G-CSF non modificato, l'mRNA di G-CSF modificato con o senza lipoplex ha
5 tollerato 12 cicli di congelamento/scongelamento.

[0804] I campioni di mRNA conservati nello stabilizzatore a 40 °C hanno mostrato una stabilità simile ai campioni di mRNA conservati in acqua a -80 °C dopo 35 giorni, mentre l'mRNA conservato in acqua a 40 °C ha mostrato una forte degradazione dopo 18 giorni.

Esempio 82. Vitalità cellulare nei fibroblasti BJ

10 **[0805]** I fibroblasti primari umani del prepuzio (fibroblasti BJ) sono stati ottenuti dall'American Type Culture Collection (ATCC) (catalogo n. CRL-2522) e fatti crescere in Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC, catalogo n. 30-2003) integrato con il 10% di siero fetale di bovino a 37 °C, sotto il 5% di CO₂. I fibroblasti BJ sono stati seminati su una piastra da 24 pozzetti a una
15 densità di 130.000 cellule per pozzetto in 0,5 mL di terreno di coltura. 250 ng di mRNA di G-CSF modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (Gen1) o completamente modificato con 5-
20 metilcitosina e N1-metilpseudouridina (Gen2) è stato trasfettato utilizzando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat. n. 11668-019), seguendo il protocollo del produttore. Sono stati anche trasfettati
campioni di controllo di Lipofectamina 2000 (LF2000) e mRNA di G-CSF non modificato. L'mRNA modificato o i campioni di controllo sono stati trasfettati quotidianamente per 4 giorni. La vitalità delle cellule dopo la trasfezione è stata valutata 6 ore e 24 ore dopo la prima trasfezione (T1, 6 ore o T1, 24 ore) e 24 ore dopo la seconda (T2, 24 ore) e la quarta trasfezione (T4, 24 ore).

[0806] Per determinare la vitalità cellulare, il mezzo di coltura è stato completamente rimosso e
25 le cellule sono state lavate una volta con 600 ul di PBS sterile senza Ca²⁺/Mg²⁺ (Gibco/Life


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Technologies, Manassas, VA) al fine di risciacquare le cellule attaccate liberamente. Il PBS è stato rimosso e scartato. I fibroblasti puliti in ciascun pozzetto sono stati trattati con 220 ul di una soluzione madre diluita di CELL TITER GLO® (Promega, catalogo n. G7570) (la soluzione madre di CELL TITER GLO® è stata ulteriormente diluita 1:1 con una pari quantità di PBS sterile). È stato utilizzato un puntale sterile per rimuovere le cellule dalla piastra e accelerare il processo di lisi.

5 [0807] Per due intervalli di tempo, T1, 24 ore e T2, 24 ore, è stato applicato un protocollo alternativo. Le cellule sono state lavate con PBS, come descritto sopra, e successivamente tripsinizzate con una soluzione di tripsina/EDTA (Gibco/Life Technologies, Manassas, VA). Le
10 cellule sono state staccate e raccolte in 500 ul di terreno contenente un inibitore della tripsina. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 1200 ref per 5 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in 500 ul di PBS. Questa sospensione cellulare è stata mantenuta su ghiaccio e 100 ul di questa è stata combinata con 100 ul di soluzione Cell Titer Glo non diluita.

15 [0808] Tutti i lisati CELL TITER GLO® sono stati quindi incubati a temperatura ambiente per 20 minuti. 20 ul dei lisati sono stati trasferiti su una piastra bianca opaca a 96 pozzetti di polistirene (Corning, Manassas, VA) e combinati con 100 ul di soluzione CELL TITER GLO® diluita. Il lettore di piastre utilizzato proveniva da BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT) e i valori assoluti sono stati normalizzati per segnalare i fibroblasti BJ non trattati al 100% di vitalità cellulare. La percentuale di vitalità per i fibroblasti BJ è mostrata nella Tabella 33.

20 [0809] È importante sottolineare che tutti questi esperimenti sono condotti in assenza di qualsiasi interferone o altri inibitori delle citochine e rappresentano quindi una misura accurata della citotossicità del diverso mRNA.

[0810] Questi risultati dimostrano che la trasfezione ripetuta di fibroblasti BJ con mRNA non modificato provoca una perdita di vitalità cellulare che è evidente già 24 ore dopo la prima
25 trasfezione (T1, 24 ore) e continua a essere evidente e più pronunciata nei momenti successivi


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

punti.

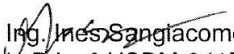
[0811] Vi è anche una perdita di vitalità con la trasfezione ripetuta di mRNA modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina che è evidente a 24 ore dalla quarta trasfezione giornaliera (T4, 24 ore). Nessuna perdita di vitalità cellulare nel corso di questo esperimento è stata osservata utilizzando mRNA modificato con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina. Questi risultati dimostrano che 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina contenenti mRNA hanno una migliore vitalità cellulare quando analizzati in trasfezione ripetuta. La capacità di somministrare ripetutamente mRNA modificato è importante nella maggior parte delle applicazioni terapeutiche e come tale è importante anche la capacità di farlo senza citotossicità. Sebbene non desideri essere vincolati dalla teoria, si ritiene che i geni di risposta a seguito di una singola trasfezione possano portare a una diminuzione della produzione di proteine, all'induzione di citochine e alla fine alla perdita della vitalità cellulare. Questi risultati sono coerenti con l'mRNA contenente N1-metilpseudouridina che mostra un profilo migliorato sotto questo aspetto rispetto sia all'mRNA non modificato sia all'mRNA modificato con pseudouridina.

15 **Tabella 33. Percentuale di vitalità**

	T1, 6 ore	T1, 24 ore	T2, 24 ore	T4, 24 ore
Gen 1 G-CSF	81	108	91	65
Gen 2 G-CSF	99	102	128	87
G-CSF non modificato	101	72	74	42
LF2000	99	80	114	106
Non trattato	100	100	100	100

Esempio 83. Risposta immunitaria innata nei fibroblasti BJ

[0812] I fibroblasti primari umani del prepuzio (fibroblasti BJ) sono ottenuti dall'American Type Culture Collection (ATCC) (catalogo n. CRL-2522) e fatti crescere in Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC, catalogo n. 30-2003) integrato con il 10% di siero fetale di bovino a 37 °C, sotto il 5% di CO₂. I fibroblasti BJ sono seminati su una piastra da 24 pozzetti a una densità di 130.000


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

cellule per pozzetto in 0,5 mL di terreno di coltura. 250 ng di mRNA di G-CSF modificato (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) completamente modificato con 5-metilcitosina e pseudouridina (Gen1) o completamente modificato con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina (Gen2) viene trasfettato utilizzando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat. n. 11668- 019), seguendo il protocollo del produttore. Vengono anche trasfettati campioni di controllo di Lipofectamina 2000 e mRNA di G-CSF non modificato (G-CSF naturale). Le cellule vengono trasfettate per cinque giorni consecutivi. I complessi di trasfezione vengono rimossi quattro ore dopo ogni ciclo di trasfezione.

10 [0813] Il surnatante di coltura viene analizzato per GCSF secreto (sistemi di ricerca e sviluppo, catalogo n. DCS50), fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-alfa) e interferone alfa (IFN-alfa) mediante ELISA ogni giorno dopo la trasfezione seguendo i protocolli del produttore. Le cellule vengono analizzate per verificarne la vitalità utilizzando CELL TITER GLO® (Promega, catalogo n. G7570) 6 ore e 18 ore dopo il primo ciclo di trasfezione e a giorni alterni successivi. Allo stesso
15 tempo dalle cellule raccolte, l'RNA totale viene isolato e trattato con DNASE® utilizzando il micro kit RNAEASY (catalogo n. 74004) seguendo il protocollo del produttore. 100 ng di RNA totale vengono utilizzati per la sintesi di cDNA utilizzando il kit di trascrizione inversa di cDNA ad alta capacità (Applied Biosystem, cat. n. 4368814) seguendo il protocollo del produttore. Il cDNA viene quindi analizzato per l'espressione dei geni della risposta immunitaria innata mediante PCR
20 quantitativa in tempo reale utilizzando SybrGreen in uno strumento Biorad CFX 384 seguendo il protocollo del produttore.

Esempio 84. Trascrizione *in vitro* con polimerasi T7 di tipo selvatico

[0814] mRNA Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) e mRNA di G-CSF
25 (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R


nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) sono stati completamente modificati con diverse sostanze chimiche e combinazioni chimiche elencate nelle Tabelle 34-37 utilizzando la polimerasi T7 di tipo selvatico come descritto in precedenza.

5 [0815] La resa delle reazioni di traduzione è stata determinata mediante misurazione spettrofometrica (OD260) e la resa per la luciferasi è mostrata nella Tabella 34 e il G-CSF è mostrato nella Tabella 36.

10 [0816] Anche la luciferasi e l'mRNA modificato con G-CSF sono stati sottoposti a una reazione di capping enzimatica e ciascuna reazione di capping dell'mRNA modificata è stata valutata per la resa mediante misurazione spettrofometrica (OD260) e la dimensione corretta valutata utilizzando il bioanalizzatore. La resa dalla reazione di capping per la luciferasi è mostrata nella Tabella 35 e G-CSF è mostrato nella Tabella 37.

Tabella 34. Chimica di trascrizione *in vitro* per Luciferasi

Modificazione chimica	Resa (mg)
N6-metiladenosina	0,99
5-metilcitidina	1,29
N4-acetilcitidina	1,0
5-formilcitidina	0,55
Pseudouridina	2,0
N1-metilpseudouridina	1,43
2-tiouridina	1,56
5-metossiuridina	2,35
5-metiluridina	1,01
α -tio-citidina	0,83
5-Br-uridina (5Bru)	1,96
5 (2 carbometossivinil)uridina	0,89
5 (3-1E propenil ammino) uridina	2,01
N4-acetilcitidina/pseudouridina	1,34
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	1,26
5-metilcitidina/5-metossiuridina	1,38


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	Resa (mg)
5-metilcitidina/5-bromouridina	0,12
5-metilcitidina/5-metiluridina	2,97
5-metilcitidina/metà delle uridine vengono modificate con 2-tiouridina	1,59
5-metilcitidina/2-tiouridina	0,90
5-metilcitidina/pseudouridina	1,83
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,33

Tabella 35. Chimica del capping e resa per mRNA modificato con luciferasi

Modificazione chimica	Resa (mg)
5-metilcitidina	1,02
N4-acetilcitidina	0,93
5-formilcitidina	0,55
Pseudouridina	2,07
N1-metilpseudouridina	1,27
2-tiouridina	1,44
5-metossiuridina	2
5-metiluridina	0,8
α -tio-citidina	0,74
5-Br-uridina (5Bru)	1,29
5 (2 carbometossivinil)uridina	0,54
5 (3-1E propenil ammino) uridina	1,39
N4-acetilcitidina/pseudouridina	0,99
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	1,08
5-metilcitidina/5-metossiuridina	1,13
5-metilcitidina/5-metiluridina	1,08
5-metilcitidina/metà delle uridine vengono modificate con 2-tiouridina	1,2
5-metilcitidina/2-tiouridina	1,27
5-metilcitidina/pseudouridina	1,19
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,04

Tabella 36. Chimica di trascrizione *in vitro* e resa per mRNA modificato con G-CSF

Modificazione chimica	Resa (mg)
N6-metiladenosina	1,57

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	Resa (mg)
5-metilcitidina	2,05
N4-acetilcitidina	3,13
5-formilcitidina	1,41
Pseudouridina	4,1
N1-metilpseudouridina	3,24
2-tiouridina	3,46
5-metossiuridina	2,57
5-metiluridina	4,27
4-tiouridina	1,45
2'-F-uridina	0,96
α -tio-citidina	2,29
2'-F-guanosina	0,6
N-1-metiladenosina	0,63
5-Br-uridina (5Bru)	1,08
5 (2 carbometossivinil)uridina	1,8
5 (3-1E propenil ammino) uridina	2,09
N4-acetilcitidina/pseudouridina	1,72
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	1,37
5-metilcitidina/5-metossiuridina	1,85
5-metilcitidina/5-metiluridina	1,56
5-metilcitidina/metà delle uridine vengono modificate con 2-tiouridina	1,84
5-metilcitidina/2-tiouridina	2,53
5-metilcitidina/pseudouridina	0,63
N4-acetilcitidina/2-tiouridina	1,3
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	1,37
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,25
N4-acetilcitidina/pseudouridina	2,24

Tabella 37. Chimica del capping e resa per mRNA modificato con G- CSF

Modificazione chimica	Resa (mg)
N6-metiladenosina	1,04
5-metilcitidina	1,08

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	Resa (mg)
N4-acetilcitidina	2,73
5-formilcitidina	0,95
Pseudouridina	3,88
N1-metilpseudouridina	2,58
2-tiouridina	2,57
5-metossiuridina	2,05
5-metiluridina	3,56
4-tiouridina	0,91
2'-F-uridina	0,54
α -tio-citidina	1,79
2'-F-guanosina	0,14
5-Br-uridina (5Bru)	0,79
5 (2 carbometossivinil)uridina	1,28
5 (3-IE propenil ammino) uridina	1,78
N4-acetilcitidina/pseudouridina	0,29
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	0,33
5-metilcitidina/5-metossiuridina	0,91
5-metilcitidina/5-metiluridina	0,61
5-metilcitidina/metà delle uridine vengono modificate con 2-tiouridina	1,24
5-metilcitidina/pseudouridina	1,08
N4-acetilcitidina/2-tiouridina	1,34
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	1,22
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,56

Esempio 85. Trascrizione *in vitro* con polimerasi T7 mutante

[0817] mRNA Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) e mRNA di G-CSF (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) sono stati completamente modificati con diverse sostanze chimiche e combinazioni chimiche elencate nelle Tabelle 38-41 utilizzando la polimerasi


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

T7 mutante [kit di trascrizione T7 Durascribe® (cat. n. DS010925) (Epicentre®, Madison, WI).

[0818] La resa delle reazioni di traduzione è stata determinata mediante misurazione spettrofometrica (OD260) e la resa per la luciferasi è mostrata nella Tabella 38 e il G-CSF è mostrato nella Tabella 40.

- 5 [0819] Anche la luciferasi e l'mRNA modificato con G-CSF sono stati sottoposti a una reazione di capping enzimatica e ciascuna reazione di capping dell'mRNA modificata è stata valutata per la resa mediante misurazione spettrofometrica (OD260) e la dimensione corretta valutata utilizzando il bioanalizzatore. La resa dalla reazione di capping per la luciferasi è mostrata nella Tabella 39 e G-CSF è mostrata nella Tabella 41.

10 **Tabella 38. Chimica di trascrizione *in vitro* e resa per mRNA modificato con Luciferasi**

Modificazione chimica	Resa (ug)
2' Fluorocitosina	71,4
2' fluorouridina	57,5
5-metilcitosina/pseudouridina, test A	26,4
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test A	73,3
N1-acetilcitidina/2-fluorouridina	202,2
5-metilcitidina/2-fluorouridina	131,9
2-fluorocitosina/pseudouridina	119,3
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	107,0
2-fluorocitosina/2-tiouridina	34,7
2-fluorocitosina/5-bromouridina	81,0
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	80,4
2-fluoroguanina/5-metilcitosina	61,2
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	65,0
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	41,2
2-fluoroguanina/pseudouridina	79,1
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	74,6
5-metilcitidina/pseudouridina, test B	91,8
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina, test B	72,4
2'fluoroadenosina	190,98



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Tabella 39. Chimica del capping e resa per mRNA modificato con luciferasi

Modificazione chimica	Resa (ug)
2 'Fluorocitosina	19,2
2' fluorouridina	16,7
5-metilcitosina/pseudouridina, test A	7,0
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test A	21,5
N1-acetilcitidina/2-fluorouridina	47,5
5-metilcitidina/2-fluorouridina	53,2
2-fluorocitosina/pseudouridina	58,4
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	26,2
2-fluorocitosina/2-tiouridina	12,9
2-fluorocitosina/5-bromouridina	26,5
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	35,7
2-fluoroguanina/5-metilcitosina	24,7
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	32,3
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	31,3
2-fluoroguanina/pseudouridina	20,9
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	29,8
5-metilcitidina/pseudouridina, test B	58,2
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test B	44,4

Tabella 40. Chimica di trascrizione *in vitro* e resa per mRNA modificato con G-CSF

Modificazione chimica	Resa (ug)
2 'Fluorocitosina	56,5
2' fluorouridina	79,4
5-metilcitosina/pseudouridina, test A	21,2
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test A	77,1
N1-acetilcitidina/2-fluorouridina	168,6
5-metilcitidina/2-fluorouridina	134,7
2-fluorocitosina/pseudouridina	97,8
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	103,1
2-fluorocitosina/2-tiouridina	58,8
2-fluorocitosina/5-bromouridina	88,8

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	Resa (ug)
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	93,9
2-fluoroguanina/5-metilcitosina	97,3
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	96,0
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	82,0
2-fluoroguanina/pseudouridina	68,0
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	59,3
5-metilcitidina/pseudouridina, test B	58,7
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina, test B	78,0

Tabella 41. Chimica del capping e resa per mRNA modificato con G- CSF

Modificazione chimica	Resa (ug)
2' Fluorocitosina	16,9
2' fluorouridina	17,0
5-metilcitosina/pseudouridina, test A	10,6
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, test A	22,7
N1-acetilcitidina/2-fluorouridina	19,9
5-metilcitidina/2-fluorouridina	21,3
2-fluorocitosina/pseudouridina	65,2
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	58,9
2-fluorocitosina/2-tiouridina	41,2
2-fluorocitosina/5-bromouridina	35,8
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	36,7
2-fluoroguanina/5-metilcitosina	36,6
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	37,3
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	30,7
2-fluoroguanina/pseudouridina	29,0
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	22,7
5-metilcitidina/pseudouridina, test B	60,4
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina, test B	33,0

Esempio 86. Composti 2'O-metile e 2'Fluoro

[0820] mRNA Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) sono stati prodotti come versioni completamente modificate con le sostanze chimiche nella Tabella 42 e trascritti utilizzando la polimerasi T7 mutante (Kit di trascrizione Durascribe[®] T7 (Cat. n. DS010925) (Epicentre[®], Madison, WI). L'mRNA contenente 2'fluoro è stato prodotto utilizzando Durascribe T7, tuttavia, l'mRNA contenente 2'Ometilw non può essere trascritto utilizzando Durascribe T7.

[0821] L'incorporazione dell'mRNA 2'Ometile modificato potrebbe essere realizzata utilizzando altre polimerasi T7 mutanti [Nat Biotechnol. (2004) 22:1155-1160; Nucleic Acids Res. (2002) 30:e138]. In alternativa, le modificazioni 2'OMe potrebbero essere introdotte post-trascrizionalmente utilizzando mezzi enzimatici.

10 [0822] L'introduzione di modificazioni sul gruppo 2' dello zucchero presenta molti potenziali vantaggi. È noto che le sostituzioni 2'OMe, come le sostituzioni 2' fluoro, proteggono dalle nucleasi e hanno anche dimostrato di abolire il riconoscimento immunitario innato quando incorporate in altri acidi nucleici come siRNA e Crooke, ed. Antisense Drug Technology, 2nd edition; Boca Raton: CRC press).

15 [0823] L'mRNA modificato con 2'Fluoro è stato quindi trasfettato in cellule HeLa per valutare la produzione di proteine in un contesto cellulare e lo stesso mRNA è stato anche valutato in un sistema reticolocitario di coniglio privo di cellule. Un controllo della luciferasi non modificata (luciferasi naturale) è stato utilizzato per entrambi gli esperimenti di trascrizione, è stato anche analizzato un controllo del non trattato e del finto trasfettato (solo lipofectamina 2000) per la
20 trasfezione HeLa e un controllo dell'assenza di RNA è stato analizzato per i reticolati di coniglio.

[0824] Il giorno prima della trasfezione, 20.000 cellule HeLa (ATCC n. CCL-2; Manassas, VA) sono state raccolte mediante trattamento con una soluzione di tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) e seminate in un volume totale di 100 ul di terreno EMEM (integrato con 10% di FCS e 1x Glutamax) per pozzetto in una piastra di coltura cellulare a 96 pozzetti (Corning, Manassas, VA). Le cellule sono state coltivate a 37oG in atmosfera di CO₂ al 5% durante la notte.
25


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Il giorno successivo, 83 ng dell'RNA modificato dalla luciferasi contenente 2'fluoro (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) con la modificazione chimica descritta nella Tabella 42, sono stati diluiti in 10 ul volume finale di OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). La lipofectamina 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) è stata utilizzata come reagente di trasfezione e 0,2 ul sono stati diluiti in 10 ul di volume finale di OPTI-MEM. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, entrambe le soluzioni sono state combinate e incubate per altri 15 minuti a temperatura ambiente. Quindi la soluzione combinata di 20 ul è stata aggiunta al mezzo di coltura cellulare da 100 ul contenente le cellule HeLa e incubata a temperatura ambiente. Dopo 18-22 ore di incubazione, le cellule che esprimono la luciferasi sono state lisate con 100 ul di Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore. Le aliquote dei lisati sono state trasferite su piastre da 96 pozzetti di polistirene bianco opaco (Corning, Manassas, VA) e combinate con 100 ul di soluzione di analisi completa della luciferasi (Promega, Madison, WI). I volumi del lisato sono stati regolati o diluiti fino a quando non sono state rilevate più di 2 milioni di unità di luce relativa (RLU) per pozzetto per i campioni che producono segnali più forti e le RLU per ciascuna chimica testata sono mostrate nella Tabella 42. Il lettore di piastre era un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). Il segnale di fondo delle piastre senza reagente era di circa 200 unità di luce relative per pozzetto.

[0825] Per il saggio del lisato dei reticolociti di coniglio, l'mRNA della luciferasi contenente 2'-fluoro è stato diluito in acqua sterile priva di nucleasi fino a una quantità finale di 250 ng in 10 ul e aggiunto a 40 ul di lisato di reticolociti di coniglio appena preparato e la reazione di traduzione *in vitro* è stata eseguita in una provetta di reazione in polipropilene standard da 1,5 mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 30 °C in un blocco riscaldante a secco. Il saggio di traduzione è stato eseguito con il kit Rabbit Reticulocyte Lysate (trattato con nucleasi) (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore. Il tampone di reazione è stato integrato con una miscela


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

uno a uno di soluzioni madre di amminoacidi fornite prive di leucina o metionina dando come risultato una miscela di reazione contenente quantità sufficienti di entrambi gli amminoacidi per consentire un'efficace traduzione *in vitro*. Dopo 60 minuti di incubazione, la reazione è stata interrotta ponendo le provette di reazione sul ghiaccio.

5 [0826] Le aliquote della reazione di traduzione *in vitro* contenente RNA modificato con luciferasi sono state trasferite su piastre a 96 pozzetti di polistirene bianco opaco (Corning, Manassas, VA) e combinate con 100 ul di soluzione di analisi completa della luciferasi (Promega, Madison, WI). I volumi delle reazioni di traduzione *in vitro* sono stati regolati o diluiti fino a quando non sono state rilevate più di 2 milioni di unità di luce relativa (RLU) per pozzetto per i campioni che
10 producono segnali più forti e le RLU per ciascuna chimica testata sono mostrate nella Tabella 43. Il lettore di piastre era un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). Il segnale di fondo delle piastre senza reagente era di approssimativamente 160 unità di luce relative per pozzetto.

[0827] Come si può vedere nelle Tabelle 42 e 43, più composti contenenti 2'fluoro sono attivi *in vitro* e producono la proteina della luciferasi.

15 **Tabella 42. Cellule HeLa**

Modificazione chimica	Concentrazione (ug/mL)	Volume (uL)	Resa (ug)	RLU
2'Fluoroadenosina	381,96	500	190,98	388,5
2 'Fluorocitosina	654,56	500	327,28	2420
2' Fluoroguanina	541.795	500	270,90	11.705,5
2'fluorouridina	944,005	500	472,00	6767,5
Luciferasi naturale	N/D	N/D	N/D	133.853,5
Simulato	N/D	N/D	N/D	340
Non trattato	N/D	N/D	N/D	238

Tabella 43. Reticoli di coniglio

Modificazione chimica	RLU
2'Fluoroadenosina	162
2 'Fluorocitosina	208


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	RLU
2' Fluoroguanina	371.509
2'fluorouridina	258
Luciferasi naturale	2.159.968
Nessun RNA	156

Esempio 87. Luciferasi in cellule HeLa utilizzando una combinazione di modificazioni

[0828] Per valutare l'utilizzo dell'mRNA modificato con 2'fluoro in combinazione con altre modificazioni, una serie di mRNA è stata trascritta utilizzando la polimerasi T7 di tipo selvatico (composti non contenenti fluoro) o utilizzando polimerasi T7 mutanti (composti contenenti fluoro) come descritto nell'Esempio 86. Tutti gli mRNA modificati sono stati testati mediante trasfezione in vitro in cellule HeLa.

[0829] Il giorno prima della trasfezione, 20.000 cellule HeLa (ATCC n. CCL-2; Manassas, VA) sono state raccolte mediante trattamento con una soluzione di tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) e seminate in un volume totale di 100 ul di terreno EMEM (integrato con 10% di FCS e 1x Glutamax) per pozzetto in una piastra di coltura cellulare a 96 pozzetti (Corning, Manassas, VA). Le cellule sono state coltivate a 37oG in atmosfera di CO₂ al 5% durante la notte. Il giorno successivo, 83 ng di RNA modificato con luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) con la modificazione chimica descritta nella Tabella 44, sono stati diluiti in 10 ul volume finale di OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). La lipofectamina 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) è stata utilizzata come reagente di trasfezione e 0,2 ul sono stati diluiti in 10 ul di volume finale di OPTI-MEM. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, entrambe le soluzioni sono state combinate e incubate per altri 15 minuti a temperatura ambiente. Quindi la soluzione combinata di 20 ul è stata aggiunta al mezzo di coltura cellulare da 100 ul contenente le cellule HeLa e incubata a temperatura ambiente.

[0830] Dopo 18-22 ore di incubazione, le cellule che esprimono la luciferasi sono state lisate con


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

100 ul di Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore. Le aliquote dei lisati sono state trasferite su piastre da 96 pozzetti di polistirene bianco opaco (Coming, Manassas, VA) e combinate con 100 ul di soluzione di analisi completa della luciferasi (Promega, Madison, WI). I volumi del lisato sono stati regolati o diluiti fino a quando non sono state rilevate più di 2 milioni di unità di luce relativa (RLU) per pozzetto per i campioni che producono segnali più forti e le RLU per ciascuna chimica testata sono mostrate nella Tabella 44. Il lettore di piastre era un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). Il segnale di fondo delle piastre senza reagente era di circa 200 unità di luce relative per pozzetto.

[0831] Come evidenziato nella Tabella 44, la maggior parte delle combinazioni di modificazioni ha prodotto mRNA che ha prodotto la proteina della luciferasi funzionale, inclusi tutti i composti non contenenti fluoro e molte delle combinazioni contenenti modificazioni del 2'fluoro.

Tabella 44. Luciferasi

Modificazione chimica	RLU
N4-acetilcitidina/pseudouridina	113.796
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	316.326
5-metilcitidina/5-metossiuridina	24.948
5-metilcitidina/5-metiluridina	43.675
5-metilcitidina/metà delle uridine modificate con 2-tiouridina al 50%	41.601
5-metilcitidina/2-tiouridina	1.102
5-metilcitidina/pseudouridina	51.035
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	152.151
N4-acetilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	288
5-metilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	269
2'Fluorocitosina trifosfato/pseudouridina	260
2'Fluorocitosina trifosfato/N1-metilpseudouridina	412
2'Fluorocitosina trifosfato/2-tiouridina	427
2'Fluorocitosina trifosfato/5-bromouridina	253
2'Fluorocitosina trifosfato /2'Fluorouridina trifosfato	184
2'Fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina	321


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	RLU
2'Fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina/Pseudouridina	207
2'Fluoroguanina/5-metilcitidina/N1 metilpseudouridina	235
2'fluoroguanina/pseudouridina	218
2'Fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	247
5-metilcitidina/pseudouridina, test A	13.833
5-metilcitidina/N-metilpseudouridina, test A	598
2'Fluorocitosina trifosfato	201
2'F fluorouridina trifosfato	305
5-metilcitidina/pseudouridina, test B	115.401
5-metilcitidina/N-metilpseudouridina, test B	21.034
Luciferasi naturale	30.801
Non trattato	344
Simulato	262

Esempio 88. Trascrizione *in vitro* di G-CSF

[0832] Per valutare l'attività di tutte le nostre diverse modificazioni chimiche nel contesto di una seconda cornice di lettura aperto, abbiamo replicato esperimenti precedentemente condotti utilizzando l'mRNA della luciferasi, con l'mRNA del G-CSF umano. mRNA di G-CSF modificato
5 (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) sono stati completamente modificati con le sostanze chimiche nelle Tabelle 45 e 46 utilizzando la polimerasi T7 di tipo selvatico (per tutti i composti non contenenti fluoro) o la polimerasi T7 mutante (per tutti i composti contenenti fluoro). La polimerasi T7 mutante è stata ottenuta commercialmente (Kit di trascrizione
10 Durascribe® T7 (Cat. n. DS010925) (Epicentre®, Madison, WI).

[0833] L'RNA modificato nelle Tabelle 45 e 46 è stato trasfettato *in vitro* in cellule HeLa o aggiunto a reticolati di coniglio (250 ng di mRNA modificato) come indicato. Un controllo di G-CSF non trattato, finto trasfettato (reagente di trasfezione da solo), completamente modificato con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina o controllo della luciferasi (sequenza di mRNA mostrata



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza, 5'cap, Cap1) completamente modificati con 5-metilcitosina e N1-metilpseudouridina sono stati anche analizzati. L'espressione della proteina di G-CSF è stata determinata mediante ELISA e i valori sono mostrati nelle Tabelle 45 e 46. Nelle Tabelle 45, "NT" significa non testato.

- 5 [0834] Come mostrato nella Tabella 45, molte, ma non tutte, le modificazioni chimiche hanno portato alla produzione di proteina di G-CSF umano. Questi risultati dei sistemi di traduzione basati su cellule e senza cellule sono correlati molto bene con le stesse modificazioni che generalmente funzionano o non funzionano in entrambi i sistemi. Un'eccezione degna di nota è l'mRNA della G-CSF modificato con 5-formilcitosina che ha funzionato nel sistema di traduzione
- 10 senza cellule, ma non nel sistema di trasfezione basato sulle cellule HeLa. Una differenza simile tra i due saggi è stata osservata anche con l'mRNA di luciferasi modificata con 5-formilcitosina.
- [0835] Come dimostrato nella Tabella 46, molti, ma non tutti, i prodotti chimici modificati con mRNA del G-CSF (se usati in combinazione) hanno dimostrato attività *in vivo*. Inoltre, la presenza di N1-metilpseudouridina nell'mRNA modificato (con N4-acetilcitosina o 5
- 15 metilcitosina) ha dimostrato un'espressione più elevata rispetto a quando le stesse combinazioni sono state testate utilizzandole con pseudouridina. Presi insieme, questi dati dimostrano che N1-metilpseudouridina contenente l'mRNA di G-CSF si traduce in una migliore espressione proteica *in vitro*.

Tabella 45. Espressione di G-CSF

Modificazione chimica	Cellule HeLa della proteina di G-CSF (pg/mL).	Cellule di reticoli di coniglio della proteina di G-CSF (pg/mL)
Pseudouridina	1.150.909	147.875
5-metiluridina	347.045	147.250
2-tiouridina	417.273	18.375
N1-metilpseudouridina	NT	230.000
4-tiouridina	107.273	52.375
5-metossiuridina	1.715.909	201.750


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	Cellule HeLa della proteina di G-CSF (pg/mL).	Cellule di reticoli di coniglio della proteina di G-CSF (pg/mL)
5-metilcitosina/pseudouridina, Test A	609.545	119.750
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, Test A	1.534.318	110.500
2'-Fluoroguanosina	11.818	0
2'-Fluoro-uridina	60.455	0
5-metilcitosina/pseudouridina, Test B	358.182	57.875
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, Test B	1.568.636	76.750
5-bromo-uridina	186.591	72.000
5-(2carbometossivinil)uridina	1.364	0
5-[3(1-E-propenilammino)uridina)	27.955	32.625
α -tio-citidina	120.455	42.625
5-metilcitosina/pseudouridina, Test C	882.500	49.250
N1-metil-adenosina	4.773	0
N6-metil-adenosina	1.591	0
5-metil-citidina	646.591	79.375
N4-acetilcitidina	39.545	8.000
5-formil-citidina	0	24.000
5-metilcitosina/pseudouridina, Test D	87.045	47.750
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, Test D	1.168.864	97.125
Simulato	909	682
Non trattato	0	0
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, controllo	1.106.591	NT

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Modificazione chimica	Cellule HeLa della proteina di G-CSF (pg/mL).	Cellule di reticoli di coniglio della proteina di G-CSF (pg/mL)
Controllo della luciferasi	NT	0

Tabella 46. Chimiche in combinazione in cellule HeLa

Modificazione chimica	Cellule HeLa della proteina di G-CSF (pg/mL).
N4-acetilcitidina/pseudouridina	537.273
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	1.091.818
5-metilcitidina/5-metossipuridina	516.136
5-metilcitidina/5-bromouridina	48.864
5-metilidme/5-metiluridina	207.500
5-metilcitidina/2-tiouridina	33.409
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	211.591
N4-acetilcitidina/2-tiouridina	46.136
5-metilcitosina/pseudouridina	301.364
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina	1.017.727
N4-acetilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	62.273
5-metilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	49.318
2'Fluorocitosina trifosfato/pseudouridina	7.955
2'Fluorocitosina trifosfato/N1-metilpseudouridina	1.364
2'Fluorocitosina trifosfato/2-tiouridina	0
2'Fluorocitosina trifosfato/5-bromouridina	1.818
2'Fluorocitosina trifosfato /2'Fluorouridina trifosfato	909
2'Fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina	0
2'Fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina/Pseudouridina	0
2'Fluoroguanime trifosfato/5-metilcitidina/N1 metilpseudouridina	1.818
2'Fluoroguanina trifosfato/pseudouridina	1.136
2'Fluoroguanina trifosfato/2'Fluorocitosina trifosfato/N1-metilpseudouridina	0
5-metilcitidina/pseudouridina	617.727
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	747.045

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R


Modificazione chimica	Cellule HeLa della proteina di G-CSF (pg/mL).
5-metilcitidina/pseudouridina	475.455
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	689.091
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, controllo 1	848.409
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, controllo 2	581.818
Simulato	682
Non trattato	0
Luciferasi 2'Fuorocitosina trifosfato	0
Luciferasi 2'fluorouridina trifosfato	0

Esempio 89. Screening di Chimica

[0836] Le tabelle elencate di seguito (Tabelle 47-49) riassumono gran parte dei dati di screening *in vitro* e *in vivo* con i diversi composti presentati negli esempi precedenti. Esiste una buona correlazione tra saggi di traduzione basati su cellule e senza cellule. Le stesse sostituzioni chimiche generalmente mostrano una buona concordanza se testate nel contesto della luciferasi o dell'mRNA del G-CSF. Infine, l'N1-metilpseudouridina contenente mRNA mostra un livello molto elevato di espressione proteica con poca o nessuna stimolazione delle citochine rilevabile *in vitro* e *in vivo* ed è superiore all'mRNA contenente pseudouridina sia *in vitro* che *in vivo*.

[0837] mRNA Luciferasi (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 3; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) e mRNA di G-CSF (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) sono stati modificati con sostanze chimiche naturali e non naturali descritte nelle Tabelle 47 e 48 o combinazioni chimiche descritte nella Tabella 48 e testate usando i metodi qui descritti.

[0838] Nelle Tabelle 47 e 48, "*" si riferisce alla reazione di trascrizione *in vitro* utilizzando una polimerasi T7 mutante (Kit di trascrizione Durascribe® T7 (Cat. n. DS010925) (Epicentre®, Madison, WI); "*" si riferisce al secondo risultato della reazione di trascrizione *in vitro* utilizzando una polimerasi T7 mutante (Kit di trascrizione Durascribe® T7 (Cat. n. DS010925)


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(Epicentre®, Madison, WI); "****" si riferisce alla produzione vista in traduzioni libere da cellule (lisati di reticolociti di coniglio); la produzione proteica di HeLa è giudicata da "+", "+/-" e "-"; quando si fa riferimento a PBMC di G-CSF "++++" significa maggiore di 6.000 pg/mL di G-CSF, "+++ " significa maggiore di 3.000 pg/mL di G-CSF, "++" significa maggiore di 1.500 pg/ mL di G-CSF, "+" significa maggiore di 300 pg/mL di G-CSF, "+/-" significa 150-300 pg/mL di G-CSF e il fondo era di circa 110 pg/mL; quando si fa riferimento alla citochina PBMC "++++" significa maggiore di 1.000 pg/mL di interferone-alfa (IFN-alfa), "+++ " significa maggiore di 600 pg/mL di IFN-alfa, "++" significa maggiore di 300 pg/mL di IFN-alfa, "+" significa maggiore di 100 pg/mL di IFN-alfa, "-" significa meno di 100 pg/mL e lo sfondo era di circa 70 pg/mL; e "NT" significa non testato. Nella Tabella 48, la produzione proteica è stata valutata utilizzando una polimerasi T7 mutante (Kit di trascrizione Durascribe® T7 (Cat. n. DS010925) (Epicentre®, Madison, WI).

Tabella 47. Presente in natura

Denominazione comune (simbolo)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteina (Luc; HeLa)	Proteina (G-CSF; HeLa)	Proteina (G-CSF; PBMC)	Citochina (G-CSF; PBMC)	Proteina in vivo (Luc)	Proteina in vivo (G-CSF)
1-metiladenosina (m ¹ A)	Non riuscito	Riuscito	NT	-	+/-	++	NT	NT
N ⁶ -metiladenosina (m ⁶ A)	Riuscito	Riuscito	-	-	+/-	++++	NT	NT
2'-O-metiladenosina (Am)	Non riuscito*	Non effettuato	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-metilcitidina (m ⁵ C)	Riuscito	Riuscito	+	+	+	++	+	NT


Consulente in P.I. n° USBM-041R

Denominazione comune (simbolo)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteina (Luc; HeLa)	Proteina (G-CSF; HeLa)	Proteina (G-CSF; PBMC)	Citochina (G-CSF; PBMC)	Proteina in vivo (Luc)	Proteina in vivo (G-CSF)
2'-O-metilcitidina (Cm)	Non riuscito*	Non effettuato	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-tiocitidina (s ² C)	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
N ⁴ -acetilcitidina (ac ⁴ C)	Riuscito	Riuscito	+	+	+/-	+++	+	NT
5-formilcitidina (f ⁵ C)	Riuscito	Riuscito	-***	-***	-	+	NT	NT
2'-O-metilguanosina (Gm)	Non riuscito*	Non effettuato	NT	NT	NT	NT	NT	NT
inosina (I)	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
pseudouridina (Y)	Riuscito	Riuscito	+	+	++	+	+	NT
5-metiluridina (m ⁵ U)	Riuscito	Riuscito	+	+	+/-	+	NT	NT
2'-O-metiluridina (Um)	Non riuscito*	Non effettuato	NT	NT	NT	NT	NT	NT
1-metilpseudouridina (m ¹ Y)	Riuscito	Riuscito	+	Non effettuato	++++	-	+	NT
2-tiouridina (s ² U)	Riuscito	Riuscito	-	+	+	+	NT	NT
4-tiouridina (s ⁴ U)	Non riuscito	Riuscito		+	+/-	++	NT	NT

Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

Denominazione comune (simbolo)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteina (Luc; HeLa)	Proteina (G-CSF; HeLa)	Proteina (G-CSF; PBMC)	Citochine (G-CSF; PBMC)	Proteina in vivo (Luc)	Proteina in vivo (G-CSF)
5-metossiuridina (mo ⁵ U)	Riuscito	Riuscito	+	+	++	-	+	NT
3-metiluridina (m ³ U)	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Tabella 48. Non presente in natura

Denominazione comune	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteina (Luc; HeLa)	Proteina (G-CSF; HeLa)	Proteina (G-CSF; PBMC)	Citochine (G-CSF; PBMC)	Proteina in vivo (Luc)	Proteina in vivo (G-CSF)
2'-F-ara-guanosina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-adenosina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-citidina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-uridina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-guanosina	Non riuscito/Riuscito **	Riuscito/Non riuscito **	+ **	+/-	-	+	+	NT
2'-F-adenosina	Non riuscito/Passato **	Non riuscito/Non riuscito **	- **	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-citidina	Non riuscito/Riuscito **	Fallito/Riuscito **	+ **	NT	NT	NT	+	NT

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Denominazione comune	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteina (Luc; HeLa)	Proteina (G-CSF; HeLa)	Proteina (G-CSF; PBMC)	Citochine (G-CSF; PBMC)	Proteina in vivo (Luc)	Proteina in vivo (G-CSF)
2'-F-uridina	Non riuscito/Riuscito **	Riuscito/Riuscito **	+ **	+	+/-	+	-	NT
2'-OH-ara-guanosina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-adenosina	Non effettuato	Non effettuato	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-citidina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-uridina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-Br-Uridina	Riuscito	Riuscito	+	+	+	+	+	
5-(2-carbometossivinil)uridina	Riuscito	Riuscito	-	-	+/-	-		
5-[3-(1-E-propenilammino)uridina (anche chiamata Chem 5)	Riuscito	Riuscito	-	+	+	-		
N6-(19-amminopentaossanonadecile) A	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-Dimetilammino guanosina	Non riuscito	Non riuscito	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-aza-	Non	Non	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Denominazione comune	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteina (Luc; HeLa)	Proteina (G-CSF; HeLa)	Proteina (G-CSF; PBMC)	Citochine s (G-CSF; PBMC)	Proteina in vivo (Luc)	Proteina in vivo (G-CSF)
citidina	riuscito	riuscito						
a-tio-citidina	Riuscito	Riuscito	+	+	+/-	+++	NT	NT
Pseudo-isocitidina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-iodo-uridina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-tio-uridina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-aza-uridina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Desossitimidina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-Tio guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8-osso-guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
O6-metil-guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-deaza-guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-cloro-purina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-tio-adenosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-deaza-adenosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-iodo-citidina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[0839] Nella Tabella 49, la produzione proteica di HeLa è giudicata da "+", "+/-" e "-"; quando si fa riferimento a PBMC di G-CSF "++++" significa maggiore di 6.000 pg/mL di G-CSF, "+++" significa maggiore di 3.000 pg/mL di G-CSF, "++" significa maggiore di 1.500 pg/mL di G-CSF, "+" significa maggiore di 300 pg/mL di G-CSF, "+/-" significa 150-300 pg/mL di G-CSF e il


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

fondo era di circa 110 pg/ml; quando si fa riferimento alla citochina PBMC "++++" significa maggiore di 1.000 pg/mmL di interferone-alfa (IFN-alfa), "+++" significa maggiore di 600 pg/mL di IFN-alfa, "++" significa maggiore di 300 pg/mL di IFN-alfa, "+" significa maggiore di 100 pg/mL di IFN-alfa, "-" significa meno di 100 pg/mL di e lo sfondo era di circa 70 pg/mL; "WT" si riferisce alla polimerasi T7 di tipo selvatico, "MT" si riferisce alla polimerasi T7 mutante (Kit di trascrizione Durascribe® T7 (Cat. n. DS010925) (Epicentre®, Madison, WI) e "NT" significano non testato.

Tabella 49. Chimica combinata

Analogo della citidina	Analogo dell'uridina	Purina	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteina (Luc; HeLa)	Proteina (G-CSF; HeLa)	Proteina (G-CSF; PBMC)	Citochine (G-CSF; PBMC)	Proteina in vivo (Luc)
N4-acetilcitidina	pseudouridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	+	+	NT	NT	+
N4-acetilcitidina	N1-metilpseuduridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	+	+	NT	NT	+
5-metilcitidina	5-metossouridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	+	+	NT	NT	+
5-metilcitidina	5-bromouridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	Non effettuato	+	NT	NT	
5-metilcitidina	5-metiluridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	+	+	NT	NT	+
5-metilcitidina	50% di 2-tiouridina; 50% di uridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	+	NT	NT	NT	+
5-metilcitidina	100% di 2-tiouridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	-	+	NT	NT	
5-metilcitidina	pseudouridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	+	+	++	+	+
5-metilcitidina	N1-metilpseuduridina	A,G	Riuscito WT	Riuscito WT	+	+	++++	-	+
N4-acetilcitidina	2-tiouridina	A,G	Non effettuato	Riuscito WT	Non effettuato	+	NT	NT	NT

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

N4-acetilciticidina	5-bromouridina	A, G	Non effettuato	Riuscito WT	Non effettuato	+	NT	NT
N4-acetilciticidina	2 Fluorouridina trifosfato	A, G	Riuscito	Riuscito	-	+	NT	NT
5-metilciticidina	2 Fluorouridina trifosfato	A, G	Riuscito	Riuscito	-	+	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	pseudouridina	A, G	Riuscito	Riuscito	-	+	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	N1-metilpseudouridina	A, G	Riuscito	Riuscito	-	+/-	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	2-tiouridina	A, G	Riuscito	Riuscito	-	-	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	5-bromouridina	A, G	Riuscito	Riuscito	-	+/-	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	2 Fluorouridina trifosfato	A, G	Riuscito	Riuscito	-	+/-	NT	NT
5-metilciticidina	uridina	A,2 Fluoro GTP	Riuscito	Riuscito	-	-	NT	NT
5-metilciticidina	pseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Riuscito	Riuscito	-	-	NT	NT
5-metilciticidina	N1-metilpseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Riuscito	Riuscito	-	+/-	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	pseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Riuscito	Riuscito	-	+/-	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	N1-metilpseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Riuscito	Riuscito	-	-	NT	NT

Esempio 90. Chimica di 2'Fluoro in PBMC

[0840] La capacità di mRNA umano modificato con G-CSF (sequenza di mRNA mostrata in SEQ ID NO: 1; coda di poliA di approssimativamente 160 nucleotidi non mostrati in sequenza; 5'cap, Cap1) per innescare una risposta immunitaria innata è stato determinato misurando la produzione di interferone-alfa (IFN-alfa) e fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-alfa). L'uso di colture di PBMC *in vitro* è un modo accettato per misurare il potenziale immunostimolante degli oligonucleotidi (Robbins et al., Oligonucleotides 2009 19:89-102) e i metodi di trasfezione sono descritti nel presente contesto. Nella Tabella 50 sono mostrate la media di 2 o 3 donatori di PBMC separati della produzione nel tempo di interferone-alfa (IFN-alfa) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa), misurata mediante ELISA specifico. Sono stati analizzati anche i controlli di R848, P(I)P(C), LPS e Lipofectamina 2000 (L2000).

[0841] Per quanto riguarda il riconoscimento immunitario innato, mentre entrambe le sostanze chimiche modificate dell'mRNA hanno ampiamente impedito la produzione di IFN-alfa e TNF-alfa rispetto ai controlli positivi [R848, P(I)P(C)], i composti 2'fluoro riducono l'IFN-alfa e la produzione di TNF-alfa anche inferiore rispetto ad altre combinazioni e le combinazioni N4-acetilcitidina hanno aumentato il profilo delle citochine.

Tabella 50. IFN-alfa e TNF-alfa

	IFN-alfa: Media di 3 donatori (pg/mL)	TNF-alfa: Media di 2 donatori (pg/mL)
L2000	1	361
P(I)P(C)	482	544
R848	45	8.235
LPS	0	6.889
N4-acetilcitidina/pseudouridina	694	528
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	307	283
5-metilcitidina/5-metossiuridina	0	411


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

	IFN-alfa: Media di 3 donatori (pg/mL)	TNF-alfa: Media di 2 donatori (pg/mL)
5-metilcitidina/5-bromouridina	0	270
5-metilcitidina/5-metiluridina	456	428
5-metilcitidina/2-tiouridina	274	277
N4-acetilcitidina/2-tiouridina	0	285
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	44	403
5-metilcitidina/pseudouridina	73	332
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	31	280
N4-acetilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	35	32
5-metilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	24	0
2'Fluorocitidina trifosfato/N1-metilpseudouridina	0	11
2'fluorocitidinetrifosfato/2-tiouridina	0	0
2'fluorocitidina/trifosfato5-bromouridina	12	2
2'Fluorocitidina trifosfato /2'Fluorouridina trifosfato	11	0
2'Fluorocitidina trifosfato/5-metilcitidina	14	23
2'Fluorocitidina trifosfato/5-metilcitidina/Pseudouridina	6	21
2'Fluorocitidina trifosfato/5-metilcitidina/N1 metilpseudouridina	3	15
2'Fluorocitidina trifosfato/pseudouridina	0	4

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

	IFN-alfa: Media di 3 donatori (pg/mL)	TNF-alfa: Media di 2 donatori (pg/mL)
2'Fluorocitidina trifosfato/N1- metilpseudouridina	6	20
5- metilcitidina/pseudouridina	82	18
5-metilcitidina/N1- metilpseudouridina	35	3

ELENCO DELLE SEQUENZE

[0842]

<110> MODERNA THERAPEUTICS

<120> NUCLEOSIDI, NUCLEOTIDI E ACIDI NUCLEICI MODIFICATI E LORO USI

<130> 219703

<150> 61/542,533

<151> 03/10/2011

<160> 6

<170> FastSEQ per Windows versione 4.0

<210> 1

<211> 758

<212> RNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

```
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug gccggucccg 60
cgacccaaag cccaugaaa cuuauggccc ugcaguugcu gcuuuggcac ucggcccucu 120
ggacagucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugccgcag ucauuccuuu 180
ugaagugucu ggagcaggug cgaaagauuc agggcgauug agccgcacuc caagagaagc 240
ucugcgcgac auacaaacu ugccaucccg aggagcucgu acugcucggg cacagcuugg 300
ggauucccug ggcuccucuc ucguccuguc cgucgcaggc uuugcaguug gcagggugcc 360
uuucccagcu ccacuccggu uuguucuugu aucagggacu gcugcaagcc cuugagggaa 420
ucucgccaga auugggcccg acgcuggaca cguugcagcu cgacguggcg gauuucgcaa 480
caaccaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgcgcugcag cccacgcagg 540
ggccaaugcc ggccuuugcg uccgcguuuc agcgcagggc ggguggaguc cucguagega 600
gccaccuua aucauuuuug gaagucucgu accgggugcu gagacaucuu gcgcagccgu 660
gaagcgcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 720
uguaccucu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 758
```

<210> 2

<211> 1838

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

```
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggaa gatgcgaaga acatcaagaa gggacctgcc ccgttttacc ctttggagga 120
cggtagacga ggagaacagc tccacaaggc gatgaaacgc tacgccctgg tccccggaac 180
gattgctgtt accgatgcac atattgaggt agacatcaca tacgcagaat acttcgaaat 240
gtcggtagag ctggcggaaag cgatgaagag atatggtctt aacactaatc accgcatcgt 300
ggtgtgttcg gagaactcat tgcagttttt catgccggtc cttggagcac ttttcatcgg 360
ggtcgcagtc gcgccagcga acgacatcta caatgagcgg gaactcttga atagcatggg 420
aatctcccag ccgacggctc tgtttgtctc caaaaagggg ctgcagaaaa tcctcaacgt 480
gcagaagaag ctccccatta ttcaaaagat catcattatg gatagcaaga cagattacca 540
agggttccag tcgatgtata cctttgtgac atcgcatttg ccgccagggt ttaacgagta 600
tgacttcgtc cccgagtcac ttgacagaga taaaaccatc gcgctgatta tgaattcctc 660
gggtagcacc ggtttgcaa agggggtggc gttgcccac cgactgctt gtgtgcggtt 720
ctcgcacgct agggatccta tctttggtaa tcagatcatt cccgacacag caatcctgtc 780
cgtggtacct tttcatcacg gttttggcat gttcacgact ctcggtatt tgatttgcgg 840
tttcagggtc gtacttatgt atcggttcga ggaagaactg tttttgagat ccttgcaaga 900
ttacaagatc cagtcggccc tccttgtgcc aacgcttttc tcattctttg cgaaatcgac 960
acttattgat aagtatgacc tttccaatct gcatgagatt gcctcagggg gagcgccgct 1020
tagcaaggaa gtcggggagg cagtggccaa gcgcttccac cttcccggaa ttcggcaggg 1080
atcggggtc acggagacaa catccgcgat cttatcacg cccgagggtg acgataagcc 1140
gggagccgtc ggaaaagtgg tccccttctt tgaagccaag gtcgtagacc tcgacacggg 1200
aaaaaccctc ggagtgaacc agaggggcca gctctgcgtg agagggcca tgatcatgtc 1260
aggttacgtg aataaccctg aagcgacgaa tgcgctgatc gacaaggatg ggtggttgca 1320
ttcgggagac attgcctatt gggatgagga tgagcacttc tttatcgtag atcgacttaa 1380
gagcttgatc aaatacaaag gctatcaggt agcgcctgcc gagctcgagt caatcctgct 1440
ccagcacccc aacattttcg acgccggagt ggccgggtg cccgatgacg acgcgggtga 1500
gctgccagcg gccgtggtag tcctcgaaca tgggaaaaca atgaccgaaa aggagatcgt 1560
ggactacgta gcatcacaag tgacgactgc gaagaaactg aggggagggg tagtctttgt 1620
ggacgaggtc ccgaaaaggct tgactgggaa gcttgacgct cgcaaaatcc gggaaatcct 1680
gattaaggca aagaaaggcg ggaaaatcgc tgtctgataa gctgccttct gcggggcttg 1740
ccttctggcc atgccttct tctctccctt gcacctgtac ctcttggctt ttgaataaag 1800
cctgagtagg aaggcgccg ctcgagcatg catctaga 1838
```

<210> 3

<211> 1796

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

gggaaauaag	agagaaaaga	agaguaagaa	gaaauuaag	agccaccaug	gaagaugcga	60
agaacaucaa	gaagggaccu	gccccguuuu	acccuuugga	ggacgguaa	gcaggagaac	120
agcuccacaa	ggcgaugaaa	cgcuacgcc	ugguccccgg	aacgauugcg	uuuaccgaug	180
cacauauuga	gguagacauc	acauacgcag	aaucuuucga	aaugucggug	aggcugggcg	240
aagcgaugaa	gagauauggu	cuuaacacua	aucaccgcau	cguggugugu	ucggagaacu	300
cauugcaguu	uuucaugccg	guccuuggag	cacuuuucan	cggggucgca	gucgcgccag	360
cgaacgacau	cuacaaugag	cggaacucu	ugaauagcau	gggaucucc	cagccgacgg	420
ucguguuuu	cuccaaaaag	ggcugcgaga	aaucuccaa	cgucgagaag	aagcucccca	480
uuauucaaaa	gaucaucauu	auggauagca	agacagauua	ccaagggau	cagcugaugu	540
auaccuuugu	gacaucgcau	uugccgccag	gguuuaacga	guaugacuuc	gucuccgagu	600
cauuugacag	agauaaaacc	aucgcgcuga	uuauagaauc	cucggguagc	accgguuugc	660
caaagggggu	ggcguugccc	caccgcacug	cuugugugcg	guucucgcac	gcuagggau	720
cuaucuuug	uaaucagauc	auccccgaca	cagcaauccu	guccguggua	ccuuuucan	780
acgguuuuug	cauguucacg	acucucggcu	auuugauuug	cgguuucagg	gucguacuua	840
uguaucgguu	cgaggaagaa	cuguuuuuga	gaucuuugca	agauuacaag	auccagucgg	900
cccuccuuu	gccaacgcuu	uucucauucu	uugcgaaauc	gacacuuau	gauaaguaug	960
accuuuccaa	ucugcaugag	auugccucag	ggggagcgcc	gcuuagcaag	gaagucgggg	1020
aggcaguggc	caagcgcuuc	caccuucccg	gaauucggca	gggauacggg	cucacggaga	1080
caacaucgc	gaucuuuau	acgcccagag	gugacgaa	gccgggagcc	gucggaaaag	1140
ugguccccuu	cuuugaagcc	aaggucguag	accucgacac	gggaaaacc	cucggaguga	1200
accagagggg	cgagcucugc	gugagagggc	cgaugaucau	gucagguuac	gugaauaacc	1260
cugaagcgac	gaaucgcug	aucgacaag	augggugguu	gcauucggga	gacauugccu	1320
auugggaua	ggauagcac	uucuuuau	uagaucgacu	uaagagcuug	aucaauuaca	1380
aaggcuauca	gguagcgccu	gccgagcucg	agucaauccu	gcuccagcac	cccaacauuu	1440
ucgacgccgg	agugcgccgg	uugcccgaug	acgacgcggg	ugagcugcca	gcccgcgugg	1500
uaguccucga	acaugggaaa	acaugaccg	aaaaggagau	cguggacuac	guagcaucac	1560
aagugacgac	ugcgaagaaa	cugaggggag	ggguagucuu	uguggacgag	gucccgaaaag	1620
gcuugacug	gaagcuugac	gcucgcaaaa	uccgggaaa	ccugauuaag	gcaaagaaaag	1680
gcgggaaaa	cgugucuga	uaagcugccu	ucugcggggc	uugccuucug	gccaugcccu	1740
ucuuucucc	cuugcaccug	uaccucuugg	ucuuugaaua	aagccugagu	aggaag	1796

<210> 4

<211> 854

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gggaaauaag	agagaaaaga	agaguaagaa	gaaauuaag	agccaccaug	gaaucgaag	60
gggagggagg	caacaugcg	aucaucaagg	aguucaugcg	auucaaggug	cacauggaag	120
guucgguca	cggacacgaa	uuugaaaucg	aaggagagg	ugaaggaag	cccaugaag	180
ggacacagac	cgcgaaaacuc	aagguacgca	aagggggacc	acuuccuuuc	gccugggaca	240
uucuuucg	ccaguuuau	uacgggucca	aagcauau	gaagcaucc	gccgauauuc	300
cugacuaucu	gaaacucagc	uuucccgagg	gauucaagug	ggagcggguc	augaacuuug	360
aggacggggg	uguagucacc	guaacccaag	acucaagccu	ccaagacggc	gaguucaucu	420
acaaggucaa	acugcggggg	acuaacuuuc	cgucggau	gccggugaug	cagaagaaaa	480
cgaugggau	ggaagcguca	ucggagagga	uguaccaga	agauggugca	uugaaggggg	540
agaucaagca	gagacugaag	uugaaagau	ggggacauua	ugaugccgag	gugaaaacga	600
cauacaaagc	gaaaaagccg	gugcagcuuc	ccggagcgua	uaaugugaau	aucaaguugg	660
auauuacuuc	acacaaugag	gacuacacaa	uugucgaaca	guacgaacgc	gcugagggua	720
gacacucgac	gggagggcaug	gacgaguugu	acaaaugaua	agcugccuuc	ugcggggcuu	780
gccuucuggc	caugcccuuc	uucucuccu	ugcaccugua	ccucuuugguc	uuugaauaaa	840
gccugaguag	gaag					854

<210> 5

<211> 725

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```
gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug ggagugcagc 60
agugucccg gugguugugg uugcugcugu cgcucuugag ccucccacug ggacugccug 120
ugcuggggggc accaccaga uugaucugcg acucacgggu acuugagagg uaccuucuug 180
aagccaaaga agccgaaaac aucacaaccg gaugcgccga gcacugcucc cucaaugaga 240
acauuacugu accggauaca aaggucaauu ucuaugcaug gaagagaug gaaguaggac 300
agcaggccgu cgaagugugg caggggcucg cgcuuuuguc ggaggcggug uugcgggguc 360
aggccuccu cguaacuca ucacagccgu gggagcccu ccaacucau gucgauaaag 420
cggugcggg gcuccgcagc uugacgacgu ugcuuccggc ucugggcgca caaaaggagg 480
cuauuuccg gccugacgag gccuccggg caccucccg aacgaucacc gcggacacgu 540
uuaggaagcu uuuuagagug uacagcaauu uccuccggg aaagcugaaa uuguauacug 600
gugaagcgu uaggacagg gaucgugau aagcugccu cugcggggcu ugccuucug 660
ccaugccuu cuucucucc uugcaccugu acccuuggu cuuugaaua agccugagua 720
ggaag 725
```

<210> 6

<211> 1536

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```
gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccau gcagcgcguc 60
aacaugauua uggccgaauc gccgggacuc aucacaauu gccucuuggg uuauucucuug 120
ucggcagaa guaccguguu cuuggaucac gaaaacgcga acaaaauucu uauucgccc 180
aagcgguaa acuccgggaa acuugaggag uuugucagg gcaacuuga acgagagugc 240
auggaggaga aaugcuccu ugaggaggcg agggaagugu uugaaaacac agagcgaaca 300
accggauuuu ggaagcaaua cguagaugg gaccagugug agucgaaucc guggccucaa 360
gggggaucau guaaagauga caucaauagc uaugaaugcu ggugcccguu uggguuuuga 420
gggaagaacu gugagcugga ugugacgugc acaucaaaa acggacgcug ugagcaguuu 480
uguaagaacu cggcugacaa uaagguagua ugcucgugca cagagggaau ccggcugcgc 540
gagaaccaa aaucgugcga gcccgaguc ccguuccuu gugggagggg gagcguguca 600
cagacuagca aguugacgag agcgggagcu guauucccg acguggacua cguaacacag 660
accgaagccg aaacaauccu cguaaaucau acgcagagca cucaguccu caaugacu 720
acgagggucg uaggugguga ggacgcgaaa cccggucagu ucccuggca ggugguauug 780
aacgaaaag ucgaugccu uuguggaggu uccauuguca acgagaagug gauugucaca 840
gcggcacacu gcguagaaac aggagugaaa aucacgguag uggcgggaga gcauaacau 900
gaagagacag agcacagg acaaaagcga aaugucauca gaaucauucc acaccuaac 960
uauaacgcgg caaucaaua guacaaucau gacaucgac uuuuggagcu ugacgaaccu 1020
uuggugcuua auucguacgu caccuauu uguauugccg acaaagagua uacaaacau 1080
uucuuuagaa ucggcuccg guacguaucg ggcuggggca gaguguucca uaaggguga 1140
uccgacacug uguugcaua ccucagggug cccucgugg aucgagccac uugcugcgg 1200
uccacaaa ucacaauca caacaauaug uucugucgg gauuccauga agggggaga 1260
gauagcugcc agggagacuc agggggucc cagugacgg aagucgagg gacgucauu 1320
cugacgggaa uuauucaug gggagaggaa ugugcgauga aggggaaau uggcaucua 1380
acuaaagugu cacgguaugu caauuggauc aaggaaaaga cgaacucac gugaucagcc 1440
agcgcugccu ucugcggggc uugccuucg gccaugccu ucuucucucc cuugcaccug 1500
uaccuugug ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1536
```


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Rivendicazioni

1. Polinucleotide isolato che codifica un polipeptide di interesse,
in cui detto polinucleotide isolato è un mRNA comprendente 1-metilpseudouridina,
in cui il polinucleotide non comprende pseudouridina o 5-metil-citidina;
in cui il polinucleotide mostra una risposta immunitaria innata cellulare ridotta quando
introdotto in una popolazione di cellule, rispetto alla risposta immunitaria innata cellulare
indotta da un corrispondente acido nucleico non modificato.
2. Il polinucleotide isolato della rivendicazione 1, comprendente inoltre una coda di poli-A.
3. Il polinucleotide isolato della rivendicazione 1 o 2 che è purificato.
4. I polinucleotidi isolati di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, comprendenti almeno una
struttura di cap in 5' selezionata dal gruppo costituito da Cap0, Cap1, ARCA, inosina, N1-
metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-osso-guanosina, 2-ammino-
guanosina, LNA-guanosina e 2-azido-guanosina.
5. Il polinucleotide isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui l'acido nucleico
modificato mostra una degradazione ridotta in una cellula in cui viene introdotto l'acido
nucleico, rispetto a un corrispondente acido nucleico non modificato.
6. Il polinucleotide isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2-5, in cui la regione poli-
A è lunga da 150 a 165 nucleotidi.
7. Il polinucleotide isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui l'uridina nel
polinucleotide è sostituita a circa il 100% con l'1-metilpseudouridina.
8. Composizione farmaceutica comprendente il polinucleotide isolato di una qualsiasi delle
rivendicazioni 1-7 e un veicolo farmaceuticamente accettabile.
9. Il polinucleotide isolato di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7 o la composizione
farmaceutica della rivendicazione 8, per l'uso in terapia.
10. Il polinucleotide isolato per l'uso o la composizione farmaceutica per l'uso della


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

rivendicazione 9, in cui in detto uso l'mRNA viene somministrato a un soggetto, in cui l'mRNA viene tradotto in vivo per produrre un peptide terapeutico nel soggetto.

11. Il polinucleotide isolato per l'uso o la composizione farmaceutica per l'uso della rivendicazione 9 o 10, in cui la terapia è un metodo per il trattamento o la prevenzione di una malattia o condizione in un mammifero.

12. Il polinucleotide isolato per l'uso o la composizione farmaceutica per l'uso delle rivendicazioni 9, 10 o 11, in cui nel metodo i livelli del polipeptide di interesse nel siero del mammifero sono almeno di 50 pg/mL almeno due ore dopo la somministrazione, o preferibilmente rimanere al di sopra di 50 o più preferibilmente al di sopra di 60 pg/mL per almeno 72 ore dopo la somministrazione.

* * * *

Seguono n° 15 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 30 maggio 2022

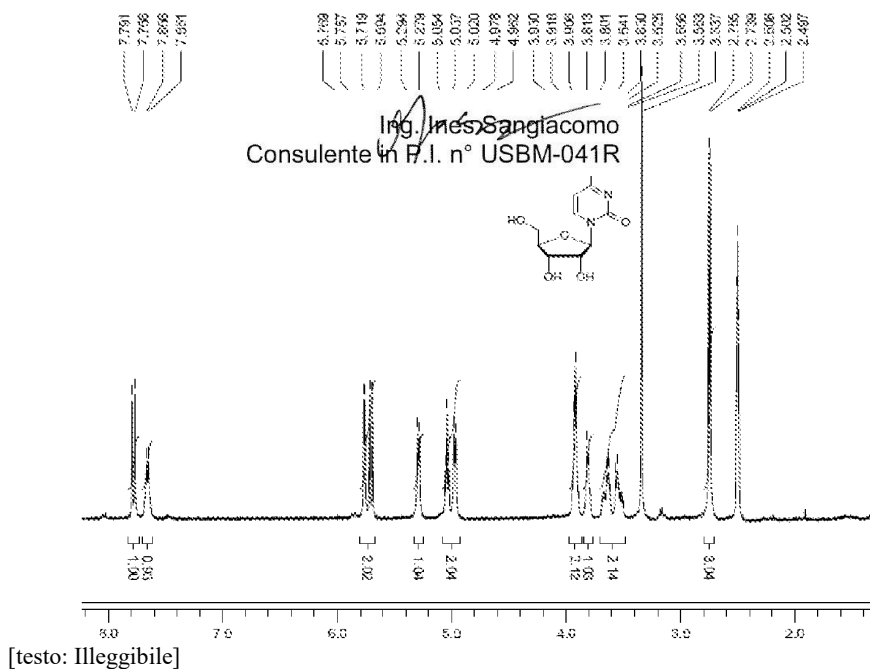
In Fede,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in F.I. n° USBM-041R

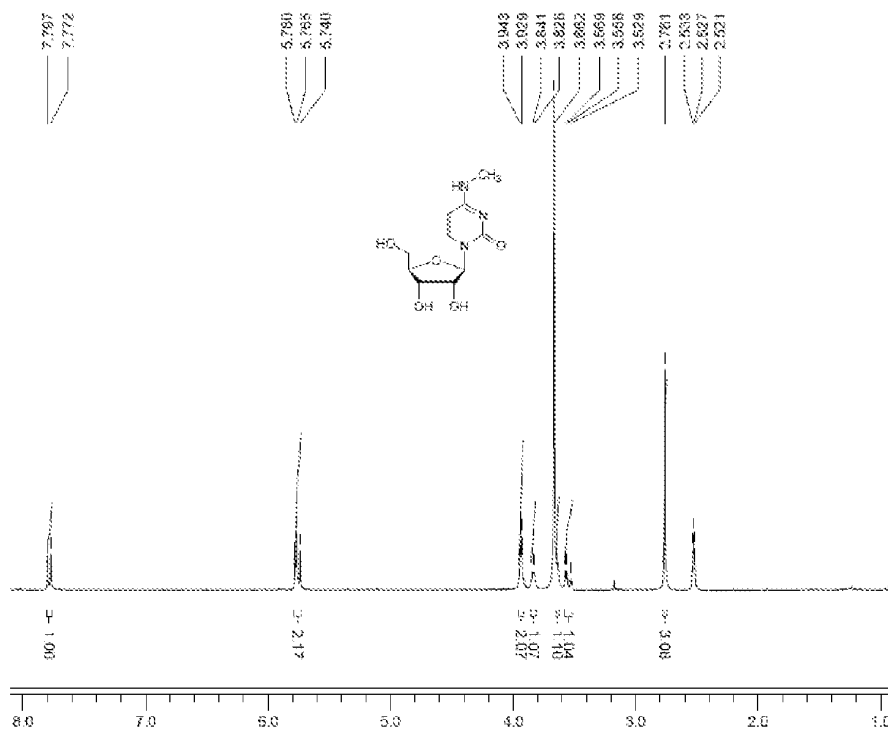

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in F.I. n° USBM-041R

Figura 1

A.



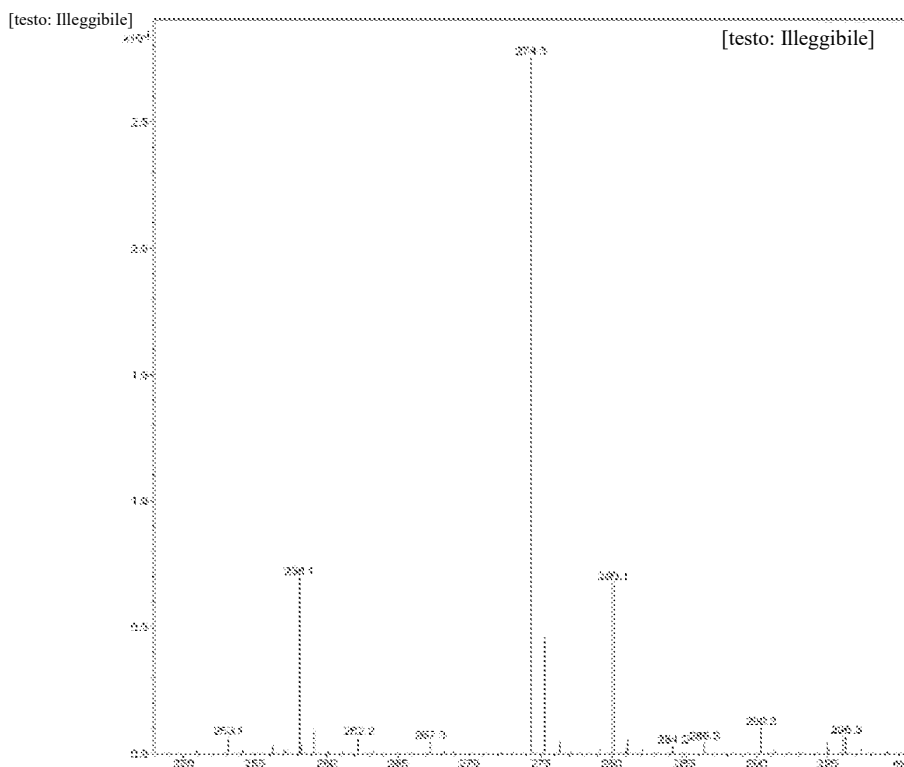
B.



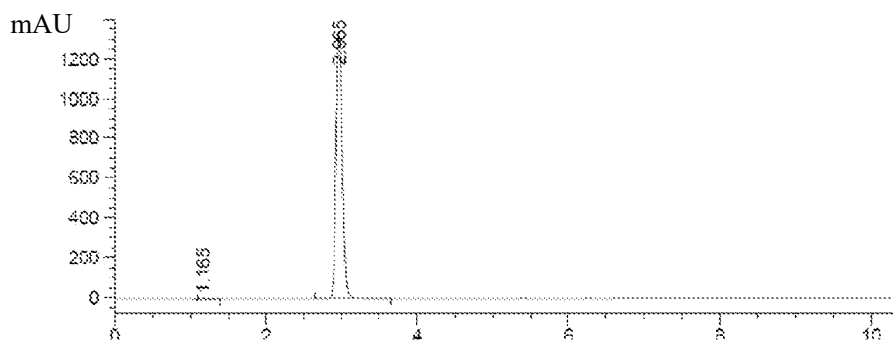
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Figura 1 cont.

C.



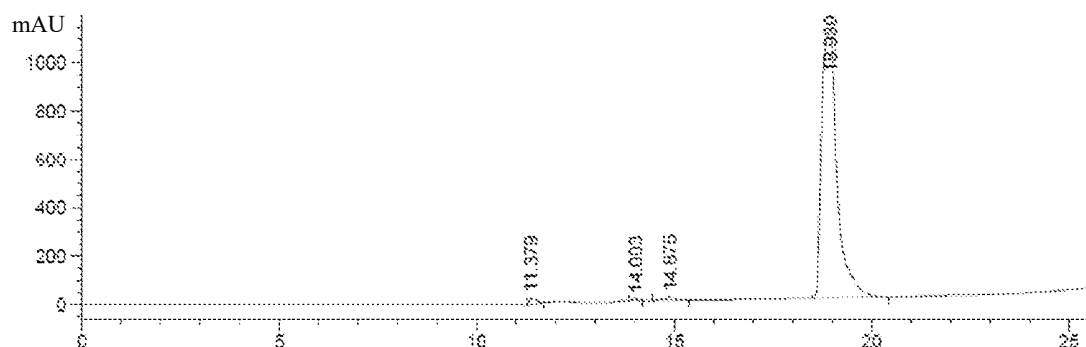
D.



N. picco	Tempo di rit. [min]	Tipo	Ampiezza a [min]	Area mAU	*S [mAU]	Altezza	Area %
1	1.165	BB	0.0854	49.00038	7.90421	0.6403	
2	2.965	BB	0.0880	7603.66650	1340.77930	99.3597	

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

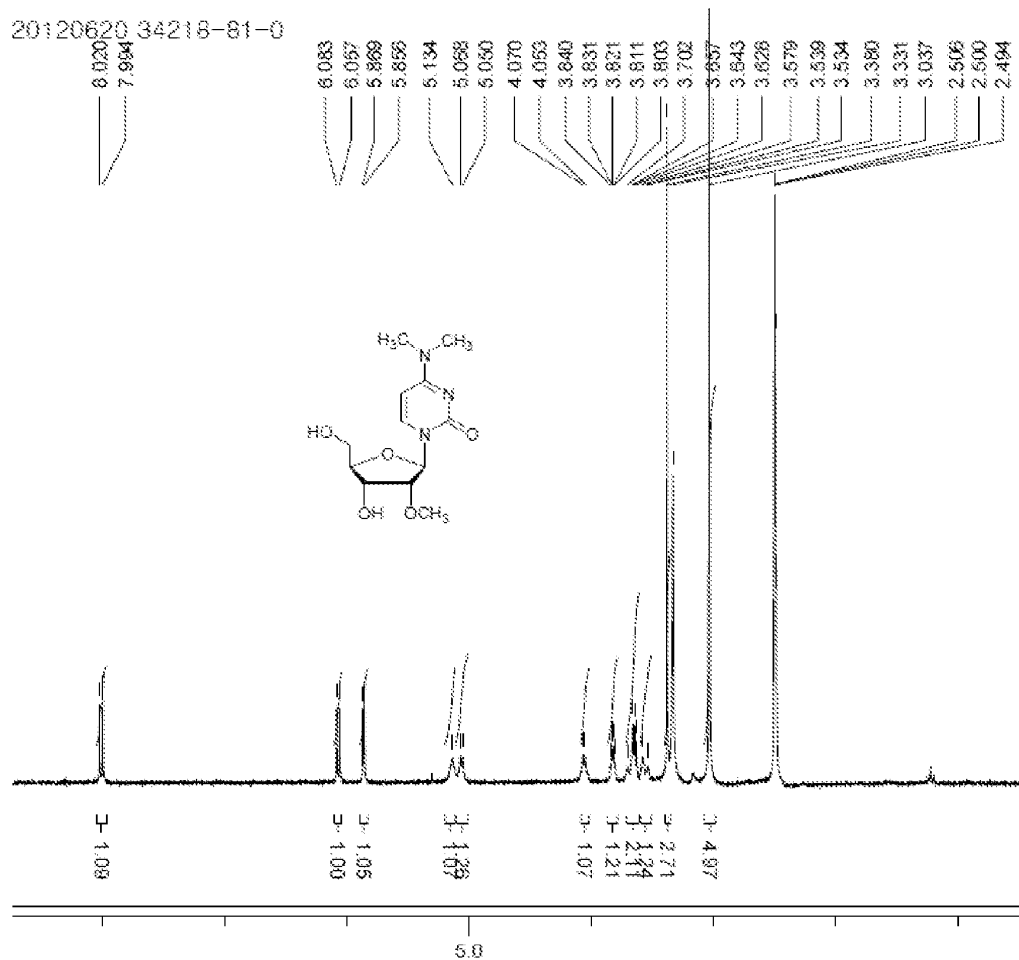
Figura 2



Picco N.	Tempo di rit. [min]	Tipo	Ampiezza [min]	Area mAU S	* Altezza [mAU]	Area %
1	11.379	BB	0.1425	300.16064	27.69099	0.9734
2	14.003	BB	0.1065	71.24556	10.35608	0.2311
3	14.875	BB	0.2088	222.77209	15.20542	0.7225
4	18.939	BB	0.3630	3.02414e4	1115.21118	98.0731
Totale:				3.08355e4	1168.46368	

Figura 3

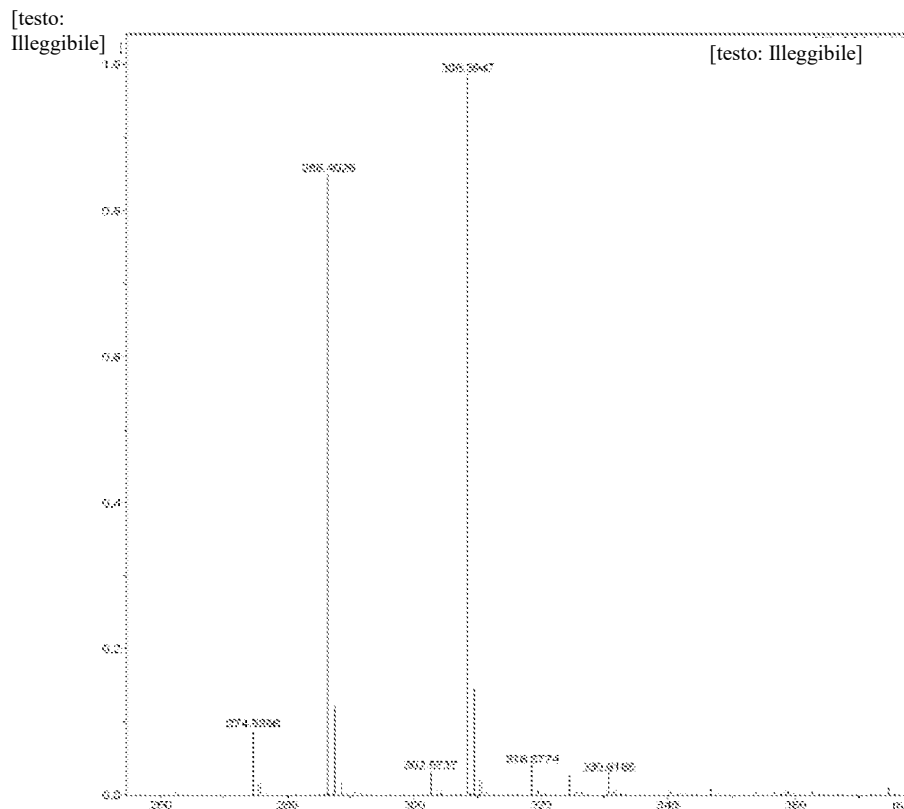
A.



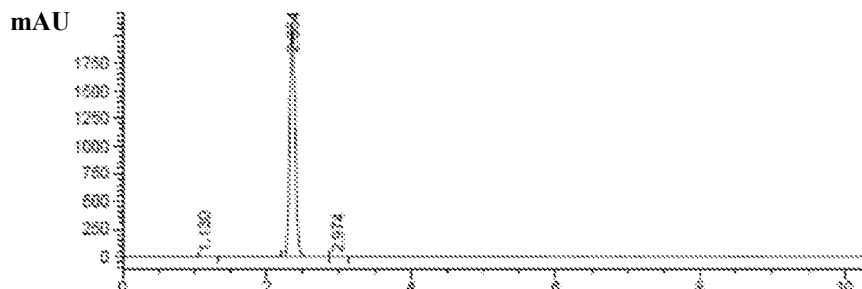
Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.I. n° USBM-041R

Figura 3 cont.

B.



C.

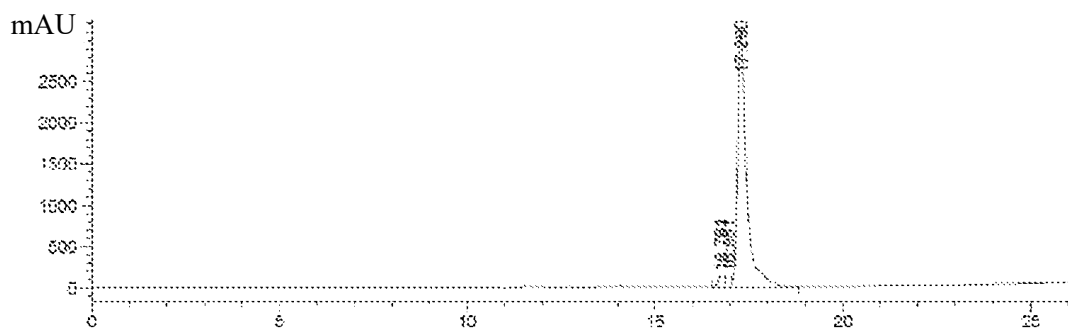


Segnale 1: VWD1 a. Lunghezza d'onda= 220 nm

N. picco	Tempo di rit. [min]	Tipo	Larghezza [min]	Area mAU	*S	Altezza [mAU]	Area %
1	1.130	BB	0.0661	37.51406		8.03561	0.3570
2	2.354	BB	0.0769	1.04566e4		2102.98633	99.4990
3	2.974	BB	0.0923	15.14040		2.56062	0.1441

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

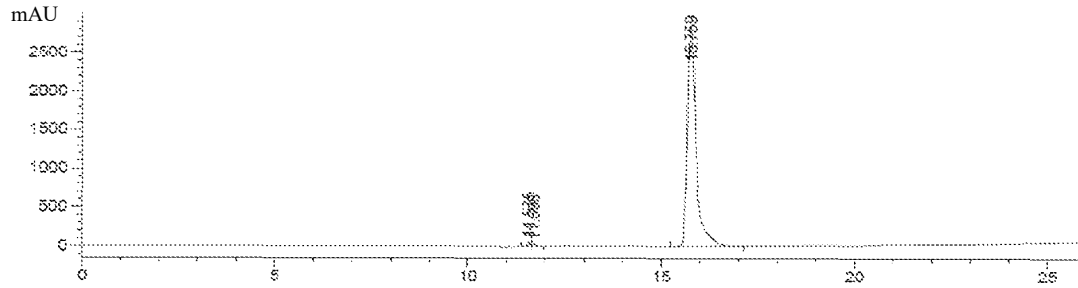
Figura 4



Segnale 1: VWD1 A, lunghezza d'onda = 230 nm

Picco N.	Tempo di rit. [min]	Tipo	Larghezza [min]	Area mAU S	Altezza [mAU]	Area %
1	16.761	BV	0.1576	1363.03906	131.20972	2.5836
2	16.951	vv	0.1547	1289.82593	122.70110	2.4448
3	17.290	VB	0.2391	5.01047e4	3083.80176	94.9716
Totale:				5.27575e4	3337.71257	

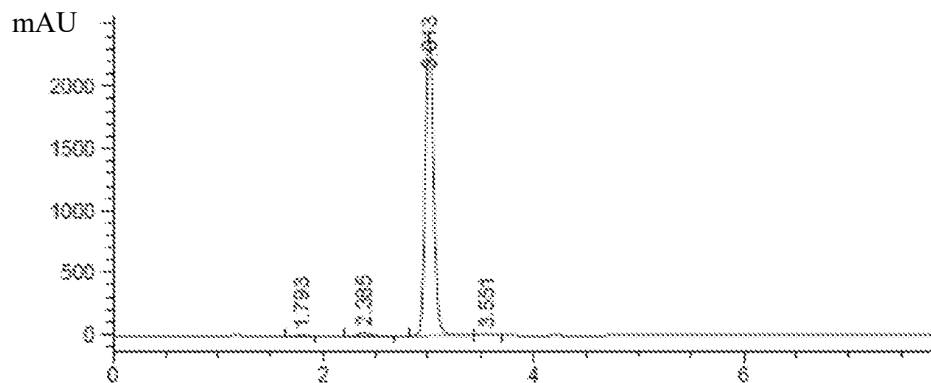
Figura 5



N. picco	Tempo di rit. [min]	Tipo	Larghezza [min]	Area mAU	*S	Altezza [mAU]	Area %
1	11.575	BV	0,0803	323.32678		57.39472	0.7124
2	11.698	VB	0,1234	239.96255		29.24231	0.5287
3	15.759	BB	0,2395	4.48198e4		2839.69604	98.7588
Totale:				4.53831e4		2926.33308	

Figura 6 cont.

B.

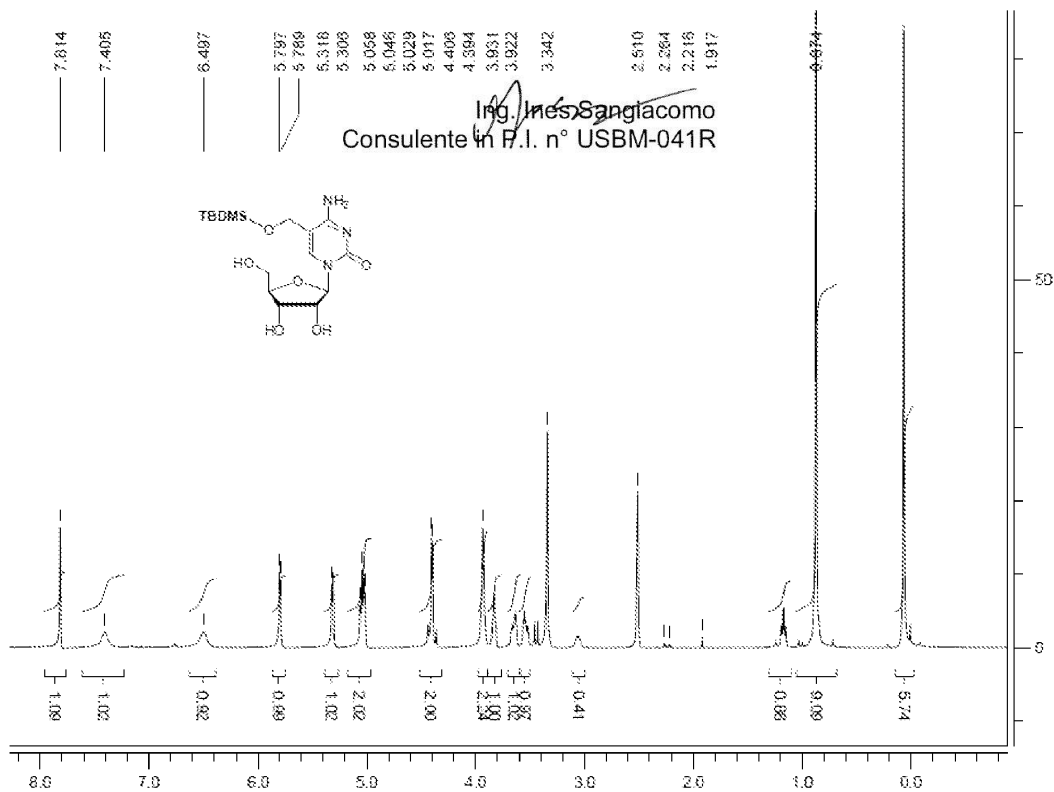


Segnale 1: VWD1 A. Lunghezza d'onda = 220 nm

Picco N.	Tempo di rit. [min]	Tipo	Larghezza [min]	Area mAU S	Altezza * [mAU]	Area %
1	1.793	BB	0.0688	14.03317	3.01915	0.1020
2	2.385	BB	0.0754	123.03405	25.44002	0.8940
3	3.013	BB	0.0865	1.35581e4	2446.08813	98.5128
4	3.551	BB	0.0945	67.61845	11.31690	0.4913
Totale:				1.37628e4	2485.86420	

Figura 7

A.

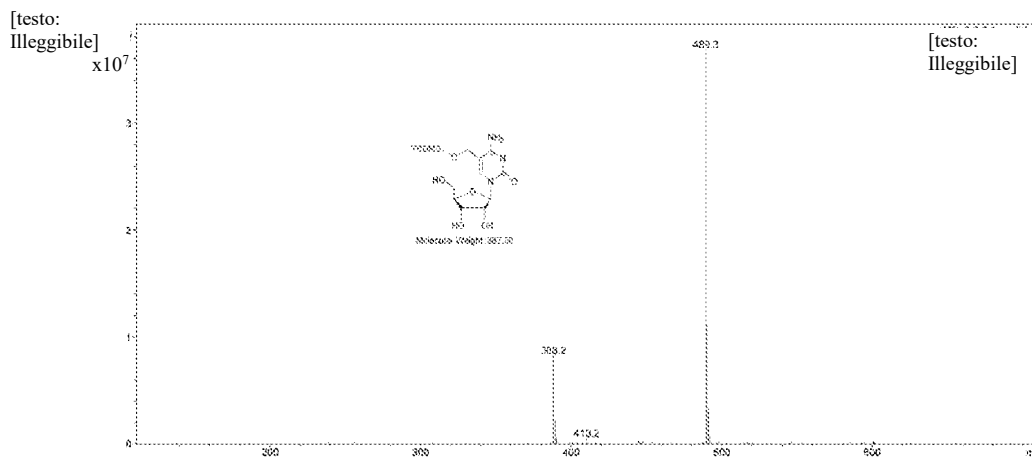


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

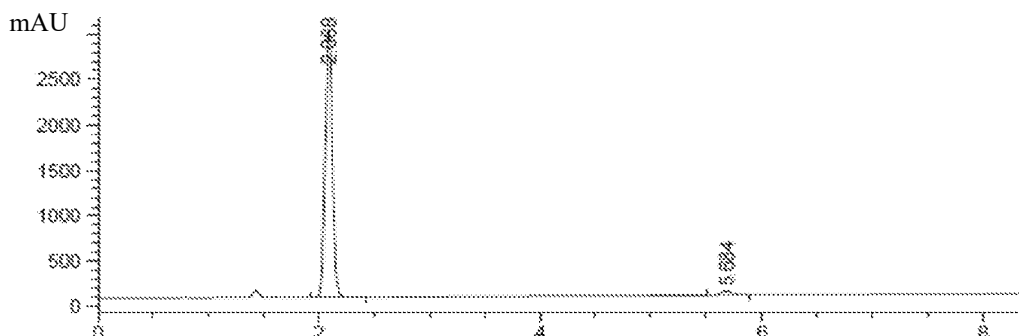
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Figura 7 cont.

B.



C.

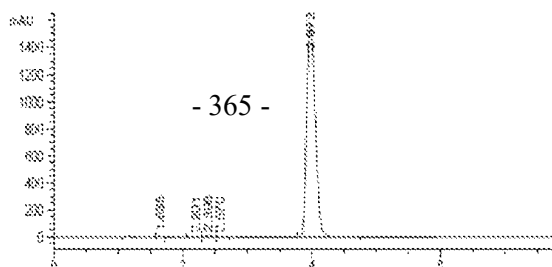


Segnale 1: VWD1 A, lunghezza d'onda = 220 nm

Picco N.	Tempo di rit. [min]	Tipo	Larghezza [min]	Area mAU	*S	Altezza [mAU]	Area %
1	2.088	BB	0.0704	1.33371e4		2942.27563	97.5729
2	5.684	BB	0.1060	331.75055		48.51453	2.4271
Totale:				1.36689e4		2990,79016	

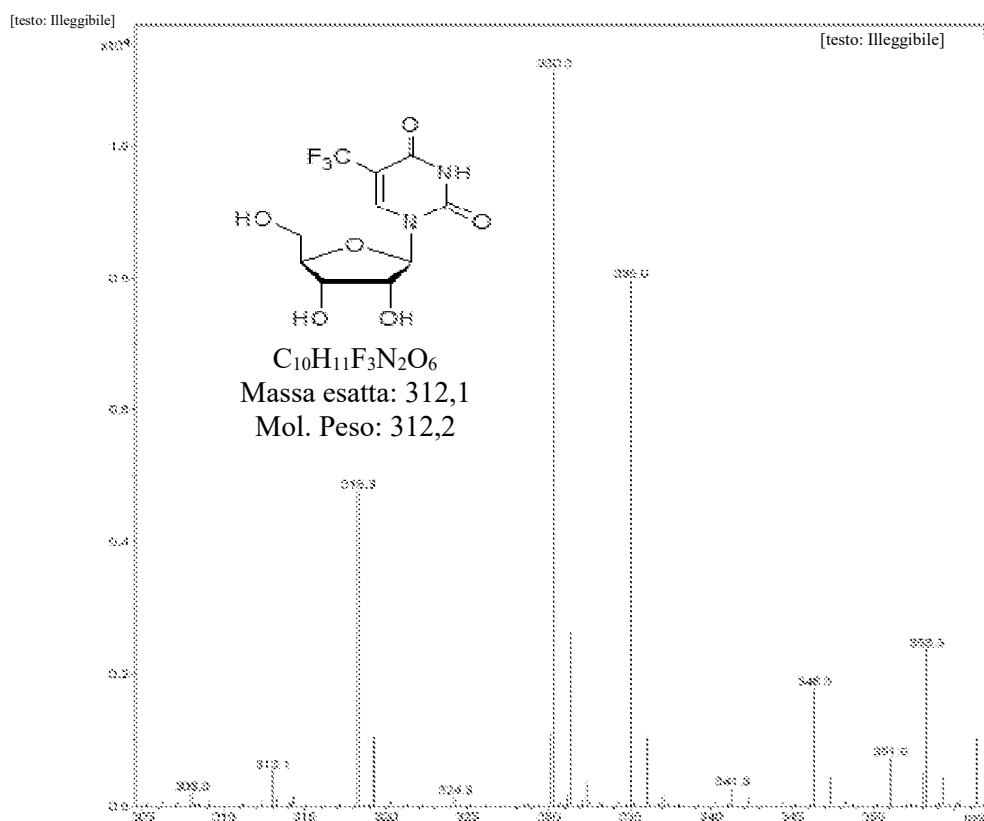
Figura 8 cont.

B.



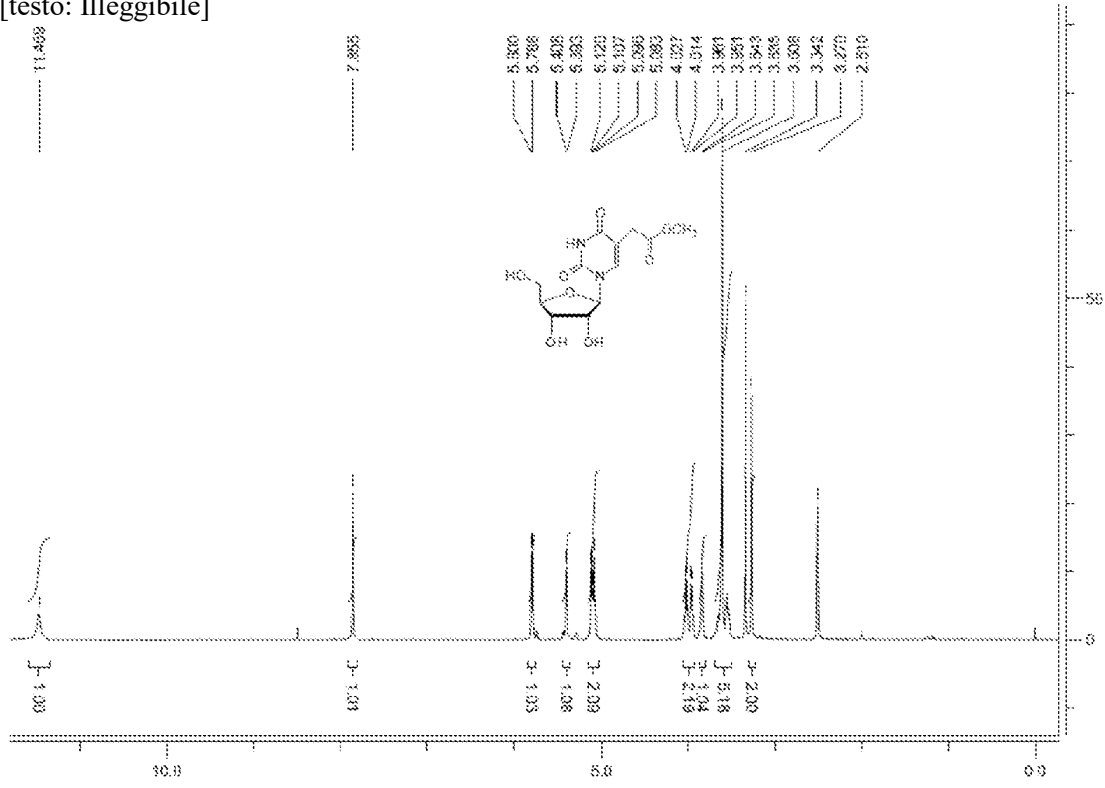
Picco N.	Tempo di rit. [min]	Tipo	Larghezza [min]	Area mAU *S	Altezza [mAU]	Area %
1	1.635	BB	0.0537	40.34452	12.01330	0.2667
2	2.201	BV	0.0917	20.69230	3.38361	0.1368
3	2.396	vv	0.1050	92.96643	14.01738	0.6145
4	2.570	VB	0.0828	16.71805	3.05518	0.1105
5	3.972	BB	0.1558	1.49571e4	1577.24438	98.8715
Totale:				1.51279e4	1609.71385	

C.



[testo: Illeggibile]

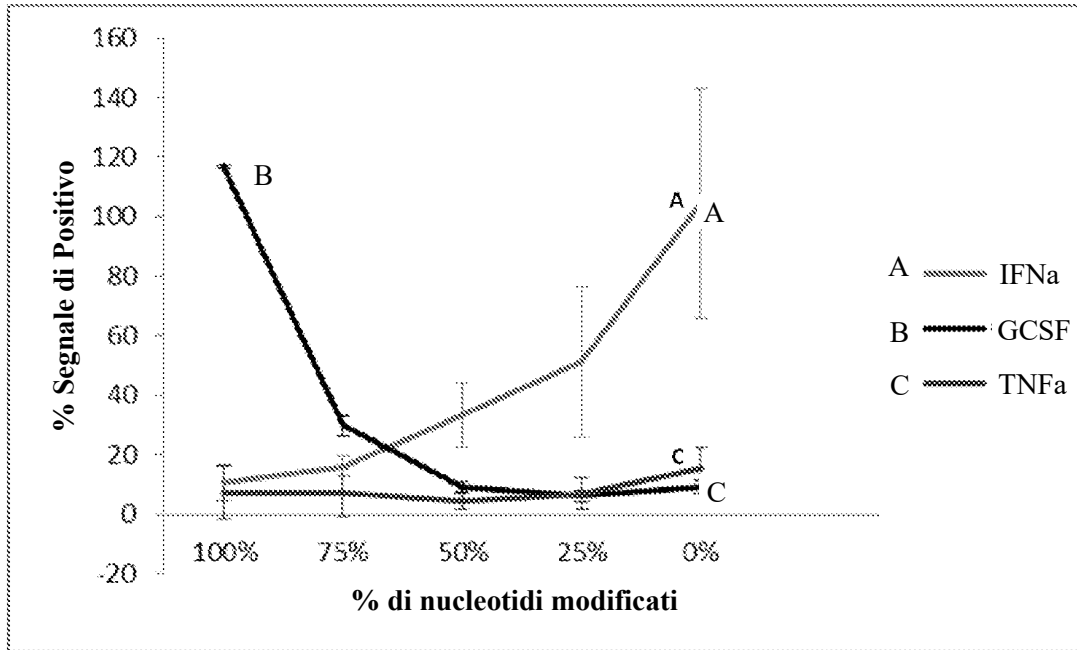
Figura 9



Ing. Ines Sangiacomo

Consulente in P.I. n° USBM-041R

Figura 10



Ing. Ines Sangiacomo

Consulente in P.I. n° USBM-041R