

TRADUZIONE

Brevetto Europeo n° EP 3 590 949

Domanda di Brevetto Europeo n° 19177059.3

Depositata in data 03 Ottobre 2011

5 Titolo: **“ACIDI RIBONUCLEICI CONTENENTI N1-METIL-PSEUDOURACILI E LORO USI”**

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

10 **DESCRIZIONE**


RIVENDICAZIONE DI PRIORITÀ

[0001] Si rivendica la priorità dalla domanda provvisoria statunitense n. di serie 61/404.413, depositata in data 1 ottobre 2010.

CONTESTO

15 [0002] 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 [Rozenki, J, Crain, P e McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: Aggiornamento 1999. Nucl
20 Acids Res 27: 196-197]. Il ruolo delle modificazioni nucleosidiche sul potenziale immunostimolante, sulla stabilità e sull'efficienza di traduzione dell'RNA, e i conseguenti benefici per potenziare l'espressione proteica e produrre sostanze terapeutiche, tuttavia, non sono chiari.

[0003] Esistono molteplici problemi con le metodologie di effettuazione dell'espressione proteica precedenti. Ad esempio, l'acido deossiribonucleico (DNA) eterologo introdotto in una cellula può essere ereditato dalle cellule figlie (indipendentemente dal fatto che il DNA eterologo si sia
25 integrato o meno nel cromosoma) o dalla progenie. Il DNA introdotto può integrarsi nel DNA


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

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
5 tradotto in proteina. Questa necessità di più fasi di elaborazione crea scarti temporali 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 tassi o concentrazioni ragionevoli. Questo può essere un problema specifico quando il DNA viene introdotto in cellule come cellule primarie o linee cellulari modificate.

10 **[0004]** Nella tecnica sussiste la necessità di modalità biologiche per affrontare la modulazione della traduzione intracellulare degli acidi nucleici.

[0005] WO 2007/024708 A2 si riferisce a RNA comprendente determinati nucleosidi modificati, in particolare la pseudouridina, che è stato scoperto ridurre l'immunogenicità dell'RNA.

SOMMARIO

15 **[0006]** La presente invenzione è definita nelle rivendicazioni e fornisce quindi un metodo per sintetizzare un mRNA, comprendente le fasi di:

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

20 b) selezionare un nucleotide che è noto per il fatto di interrompere il legame di un partner di legame del solco maggiore con un acido nucleico, in cui il nucleotide ha ridotta affinità di legame con il partner di legame del solco maggiore;

c) mettere a contatto il cDNA fornito e il nucleotide selezionato con una RNA polimerasi in condizioni tali che l'mRNA venga sintetizzato,

in cui il nucleotide comprende N1-metil-pseudouridina, e

25 in cui il 100% dei nucleotidi comprendenti uracile nell'RNA viene sostituito con nucleotidi


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

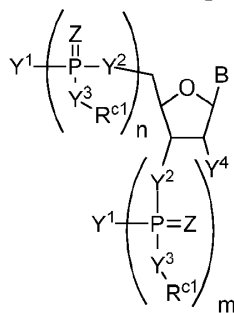
comprendenti N1-metil-pseudouridina.

[0007] L'invenzione fornisce anche un mRNA in cui il 100% dei nucleotidi comprendenti uracile nell'mRNA è sostituito con nucleotidi comprendenti N1-metil-pseudouridina.

[0008] La presente descrizione si riferisce, tra l'altro, a nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati che possono mostrare una risposta immunitaria innata ridotta quando introdotti in una popolazione di cellule, sia *in vivo* sia *ex vivo*. Inoltre, questi nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati qui descritti possono interrompere il legame con l'acido nucleico di un partner che interagisce con il solco maggiore. A causa della ridotta immunogenicità e della diminuzione delle interazioni con il solco maggiore, questi nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati possono essere più efficienti durante la produzione di proteine rispetto, ad esempio, agli acidi nucleici non modificati.


[0009] Pertanto casi, la presente descrizione si riferisce a composti comprendenti nucleotidi che sono in grado di interrompere il legame di un partner 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.

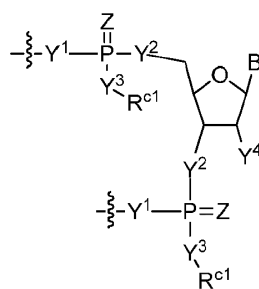
[0010] La presente descrizione si riferisce inoltre i composti aventi Formula I:



in cui le variabili costituenti sono qui fornite.

[0011] La presente descrizione si riferisce inoltre a sequenze di acido nucleico di almeno due nucleotidi comprendenti un composto di Formula I-d:


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



I-d

in cui le variabili costituenti sono qui fornite.

5 [0012] La presente descrizione si riferisce inoltre a composizioni che comprendono almeno un composto di Formula I.

[0013] La presente descrizione si riferisce inoltre a composizioni farmaceutiche che comprendono un composto di Formula I.

[0014] La presente descrizione si riferisce inoltre a metodi di preparazione di sequenze di acido nucleico di almeno due nucleotidi di un composto di Formula I-d.

10 [0015] La presente descrizione si riferisce inoltre a metodi di amplificazione di sequenze di acido nucleico di almeno due nucleotidi comprendenti un composto di Formula I-d.

[0016] La presente descrizione si riferisce inoltre a kit che comprendono un composto di Formula I.

15 [0017] Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati nel presente contesto hanno lo stesso significato comunemente inteso dall'esperto della tecnica alla quale appartiene la presente invenzione. Metodi e materiali sono qui descritti per l'uso correlato alla presente invenzione; 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.

20 [0018] In caso di conflitto con i riferimenti qui menzionati, prevarrà la presente descrizione, incluse le definizioni.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

[0019]


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

Le **Figure 1A e 1B** raffigurano immagini di gel di agarosio non denaturanti di ciascun RNA modificato trascritto *in vitro*.

5 Le **Figure 2A e 2B** raffigurano le immagini di un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) umano di cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* con ciascun modRNA indicato che codifica per il G-CSF umano e la linea indica un livello di saturazione del limite massimo rilevabile di G-CSF secreto nel saggio.


10 Le **Figure 3A-N** raffigurano i grafici a linee di una serie di saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) umano secreto da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* in diversi punti temporali con ciascun modRNA indicato che codifica per il G-CSF umano alle dosi indicate. La linea indica un livello di saturazione del limite massimo rilevabile di G-CSF secreto nel saggio.

15 Le **Figure 4A e 4B** rappresentano grafici a barre di una serie di saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) umano cellulare endogeno secreto da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* a 24 ore con ciascun modRNA indicato codificante per hu-G-CSF a dosi crescenti.

20 Le **Figure 4C e 4D** rappresentano grafici a barre di una serie di saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per l'interferone- β (IFN- β) umano cellulare endogeno secreto da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* a 24 ore con ciascun modRNA indicato che codifica per hu-G-CSF a dosi crescenti.

Le **Figure 4E e 4F** rappresentano grafici a barre di una serie di saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per G-CSF umano secreto da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* a 24 ore con ciascun modRNA indicato codificante per hu-G-CSF a dosi crescenti.

25 La **Figura 5A** è una tabella che mostra i risultati di un saggio di immunoassorbimento


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

enzimatico (ELISA) per il G-CSF umano secreto da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* campionate da singoli pozzetti in una piastra di coltura tissutale da 24 pozzetti di co-coltura 42 ore dopo la trasfezione con 750 ng di ciascun modRNA indicato che codifica per hu-G-CSF.

5 **La Figura 5B** raffigura un'immagine di un gel di agarosio di prodotti di RT-PCR di modRNA di hu-G-CSF da estratti cellulari di co-coltura 42 ore dopo la trasfezione dello strato alimentare di cheratinociti umani con modRNA di hu-G-CSG e le cellule di coltura di inserto Kasumi-1 e KG-1 non trasfettate.


10 **Le Figure 5C e 5D** raffigurano grafici dei risultati di un saggio di proliferazione cellulare indotto da modRNA di hu-G-CSF di cellule Kasumi-1 (Figura 5C) e KG-1 (Figura 5D) normalizzate in cellule non trasfettate. È indicata l'identità del modRNA di Hu-G-CSF trasfettata in cellule alimenterici di cheratinociti umani.

Le Figure 6A-L raffigurano grafici degli spettri di assorbanza UV per molecole di modRNA esemplificative che incorporano il nucleotide modificato indicato.

15 **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

[0020] La presente descrizione si riferisce, tra l'altro, a nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati che mostrano una risposta immunitaria innata ridotta quando introdotti in una popolazione di cellule. 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 maggiore, che causano le risposte immunitarie innate.

[0021] In generale, gli acidi nucleici esogeni non modificati, in particolare gli acidi nucleici virali, introdotti nelle cellule inducono una risposta immunitaria innata, con conseguente produzione di citochine e interferone (IFN) e morte cellulare. Tuttavia, è di grande interesse per le terapie, la diagnostica, i reagenti e per i saggi biologici rilasciare un acido nucleico, ad esempio un acido


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


ribonucleico (RNA) all'interno di una cellula, *in vivo* o *ex vivo*, tale da causare la traduzione intracellulare dell'acido nucleico e la produzione della proteina codificata. Di particolare importanza è il rilascio e la funzione di un acido nucleico non integrativo, poiché gli acidi nucleici caratterizzati dall'integrazione in una cellula bersaglio sono generalmente imprecisi nei loro livelli
5 di espressione, dannosamente trasferibili alla progenie e alle cellule vicine e soffrono del sostanziale rischio di provocare mutazione. Nel presente contesto vengono descritti in parte acidi nucleici che codificano polipeptidi utili in grado di modulare la funzione e/o l'attività di una cellula e metodi per produrre e utilizzare questi acidi nucleici e polipeptidi. Come qui descritto, questi acidi nucleici sono in grado di ridurre l'attività immunitaria innata di una popolazione di
10 cellule in cui vengono introdotti, aumentando così l'efficienza della produzione proteica in quella popolazione cellulare. Inoltre, vengono descritte una o più vantaggiose attività e/o proprietà degli acidi nucleici e delle proteine della presente descrizione.

[0022] Inoltre, i nucleosidi modificati, i nucleotidi modificati e gli acidi nucleici modificati qui descritti possono essere modificati sulla faccia del solco maggiore. Queste importanti
15 modificazioni del solco maggiore possono consentire alterazioni, ad esempio una diminuzione, nell'interazione dei nucleosidi modificati, dei nucleotidi modificati e degli acidi nucleici modificati con un partner di legame del solco.

[0023] Di conseguenza, in un primo aspetto, la presente descrizione descrive composti comprendenti un nucleotide che può interrompere il legame di un solco maggiore che interagisce,
20 ad esempio legando, il partner con un acido nucleico, in cui il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con i partner di interazione, ad esempio di legame, del solco maggiore.

[0024] In un altro aspetto, la presente descrizione descrive composti comprendenti un nucleotide che contiene modificazioni chimiche, in cui il nucleotide può avere un legame alterato con i partner di interazione, ad esempio di legame, del solco maggiore.

25 [0025] In alcuni casi, le modificazioni chimiche si trovano sulla faccia del solco maggiore della


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

base azotata, e in cui le modificazioni chimiche possono includere il cambio o la sostituzione di un atomo di una base azotata di pirimidina con un'ammina, un SH, un alchile (ad esempio, metile o etile) o un alogeno (ad esempio, cloro o fluoro).

5 [0026] In alcuni casi, le modificazioni chimiche possono essere situate sulla faccia del solco maggiore della base azotata, e in cui la modificazione chimica può includere il cambio o la sostituzione di un atomo di una base azotata di pirimidina con un'ammina, un SH, un metile o etile, o un cloro o fluoro.

[0027] In alcuni casi, le modificazioni chimiche possono essere situate sulla frazione zuccherina del nucleotide.

10 [0028] In alcuni casi, le modificazioni chimiche possono essere situate sulla catena principale di fosfato del nucleotide.

[0029] In alcuni casi, le modificazioni chimiche barattolo possono alterare l'elettrochimica sulla faccia del solco maggiore del nucleotide.

15 [0030] In un altro aspetto, la presente descrizione si riferisce a 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.

[0031] In un altro aspetto, la presente descrizione si riferisce a sequenze di acido nucleico comprendenti almeno due nucleotidi, la sequenza di acido nucleico comprendendo un nucleotide che interrompe il legame di un partner di interazione con il solco maggiore con la sequenza di
20 acido nucleico, in cui il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con il principale partner di legame del solco maggiore.

[0032] In un altro aspetto, la presente descrizione si riferisce a composizioni comprendenti un composto come descritto nel presente contesto.

[0033] In alcuni casi, la composizione è una miscela di reazione.

25 [0034] In alcuni casi, la composizione è una composizione farmaceutica.


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

[0035] In alcuni casi, la composizione è una coltura cellulare.

[0036] In alcuni casi, le composizioni comprendono inoltre una RNA polimerasi e uno stampo di cDNA.

5 [0037] In alcuni casi, le composizioni comprendono inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo costituito da adenosina, citosina, guanosina e uracile.

[0038] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione si riferisce a metodi per sintetizzare un acido nucleico farmaceutico, comprendente la fornitura di un acido desossiribonucleico complementare (cDNA) che codifica per una proteina farmaceutica di interesse; selezionare un nucleotide che è noto per il fatto di interrompere un legame di un partner di legame del solco maggiore con un
10 acido nucleico, in cui il nucleotide ha una ridotta affinità di legame con il partner di legame del solco maggiore; e mettere a contatto il cDNA fornito e il nucleotide selezionato con una RNA polimerasi, in condizioni tali che l'acido nucleico farmaceutico sia sintetizzato.

[0039] In alcuni casi, l'acido nucleico farmaceutico è un acido ribonucleico (RNA).

15 [0040] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione si riferisce a metodi per realizzare una formulazione farmaceutica comprendente una proteina secreta fisiologicamente attiva, comprendente la trasfezione di una prima popolazione di cellule umane con un acido nucleico farmaceutico prodotto con i metodi descritti nel presente contesto, in cui la proteina secreta è attiva su una seconda popolazione di cellule umane.

20 [0041] In alcuni casi, la proteina secreta è in grado di interagire, ad esempio, con un recettore sulla superficie di almeno una cellula presente nella seconda popolazione.

[0042] In alcuni casi, la proteina secreta è il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF).

[0043] In alcuni casi, la seconda popolazione contiene cellule mieloblasti che esprimono il recettore del G-CSF.

25 [0044] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione si riferisce a metodi per realizzare una formulazione farmaceutica comprendente cellule umane comprendenti una proteina secreta


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

fisiologicamente attiva, comprendente la trasfezione di una prima popolazione di cellule umane con un acido nucleico farmaceutico prodotto con i metodi descritti nel presente contesto, in cui la proteina secreta è attiva su una seconda popolazione di cellule umane.

Definizioni

- 5 [0045] 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 ogni singola sottocombinazione dei membri di tali gruppi e gamme. Ad esempio, il termine “alchile C₁₋₆” è specificamente inteso a descrivere singolarmente metile, etile, alchile C₃, alchile C₄, alchile C₅ e alchile C₆.
- 10 [0046] Si intende inoltre che i composti della presente descrizione sono stabili. 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.
- [0047] È inoltre chiaro che determinate caratteristiche della presente descrizione, che sono, per
15 chiarezza, descritte separatamente, possono anche essere fornite in combinazione.
- [0048] Al contrario, varie caratteristiche della presente descrizione, che sono, per brevità, descritte nel contesto di un singolo aspetto, possono essere anche fornite separatamente o in qualsiasi sottocombinazione adatta.
- [0049] Come utilizzato nel presente documento, il termine “alchile” intende fare riferimento a un
20 gruppo idrocarburico saturo che è a catena lineare o ramificato. Gruppi alchile esemplificativi includono metile (Me), etile (Et), propile (ad esempio n-propile e isopropile), butile (ad es. n-butile, isobutile, t-butile), pentile (ad esempio n-pentile, isopentile, neopentile) e simili. Un gruppo alchile può contenere da 1 a circa 20, da 2 a circa 20, da 1 a circa 12, da 1 a circa 8, da 1 a circa 6, da 1 a circa 4 o da 1 a circa 3 atomi di carbonio.
- 25 [0050] Come utilizzato nel presente contesto, “alchenile” si riferisce a un gruppo alchile avente


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

uno o più doppi legami carbonio-carbonio. Gruppi alchenile esemplificativi includono etenile, propenile, e simili.

[0051] Come utilizzato nel presente contesto, "alcossi" si riferisce a un gruppo -O-alcile. Gruppi alcossi esemplificativi includono metossi, etossi, propossi (ad esempio n-propossi e isopropossi),
5 t-butossi e simili.

[0052] Come utilizzato nel presente contesto, "alchinile" si riferisce a un gruppo alcile avente uno o più tripli legami carbonio-carbonio. Gruppi alchinile esemplificativi includono etinile, propinile e simili.

[0053] Come utilizzato nel presente contesto, "arile" si riferisce a idrocarburi monociclici o
10 policiclici aromatici (ad esempio aventi 2, 3 o 4 anelli fusi) come, ad esempio, fenile, naftile, antracenile, fenantrenile, indenile e simili. In alcuni casi, i gruppi arile hanno da 6 a circa 20 atomi di carbonio.

[0054] Come utilizzato nel presente contesto, "alo" o "alogeno" include fluoro, cloro, bromo e iodo.

15 [0055] Come utilizzato nel presente contesto, 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.

[0056] Come utilizzato nel presente contesto, il termine "animale" si riferisce a qualsiasi membro del regno animale. In alcuni casi, "animale" si riferisce a esseri umani in qualsiasi fase dello
20 sviluppo. In alcuni casi, "animale" si riferisce ad animali non umani in qualsiasi fase dello 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
25 modificato o un clone.


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

[0057] Come utilizzato nel presente contesto, "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 tra il 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%,
5 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o meno in entrambe le direzioni (maggiore o minore) del valore di riferimento indicato se non diversamente indicato o altrimenti evidente dal contesto (a meno che tale numero non superi il 100% di un valore possibile).

[0058] Come utilizzati nel presente contesto, "associato a", "coniugato", "collegato", "attaccato" e "legato", quando utilizzati rispetto a due o più frazioni, significano che le frazioni sono
10 fisicamente associate o collegate tra loro, direttamente o tramite una o più frazioni aggiuntive che fungono da agente legante, per formare una struttura sufficientemente stabile in modo che le frazioni rimangano fisicamente associate nelle condizioni in cui la struttura viene utilizzata, ad esempio condizioni fisiologiche.

[0059] Come utilizzato nel presente contesto, "biologicamente attivo/a" si riferisce a una
15 caratteristica di qualsiasi sostanza che abbia attività in un sistema e/o in un organismo biologico. Ad esempio, una sostanza che quando somministrata a un organismo, ha un effetto biologico su quell'organismo, è considerata biologicamente attiva. In casi particolari, in cui un acido nucleico è biologicamente attivo, una porzione di tale acido nucleico che condivide almeno un'attività biologica dell'intero acido nucleico viene tipicamente indicata come porzione "biologicamente
20 attiva".

[0060] Come utilizzato nel presente contesto, "conservato" si riferisce a nucleotidi o residui
amminoacidici, rispettivamente, di una sequenza polinucleotidica o di una sequenza amminoacidica che sono quelli che sono presenti inalterati nella stessa posizione di due o più
sequenze correlate confrontate. I nucleotidi o gli amminoacidi che sono relativamente conservati
25 sono quelli che sono conservati tra le sequenze più correlate rispetto ai nucleotidi o agli



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

amminoacidi che compaiono altrove nelle sequenze. In alcuni casi, si dice che due o più sequenze sono "completamente conservate" se sono identiche al 100% l'una all'altra. In alcuni casi, si dice che due o più sequenze sono "altamente conservate" se sono almeno per il 70% identiche, almeno per l'80% identiche, almeno per il 90% identiche, o almeno per il 95% identiche l'una all'altra. In
5 alcuni casi, si dice che due o più sequenze sono "altamente conservate" se sono per 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, si dice che due o più sequenze sono "conservate" se sono almeno per il 30%, almeno per il 40% identiche, almeno per il 50% identiche, almeno per il 60% identiche, almeno per il 70% identiche, almeno per l'80% identiche, almeno per il 90% identiche
10 o almeno per il 95% identiche l'una all'altra. In alcuni casi, si dice che due o più sequenze sono "conservate" se sono per 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% identiche, circa il 95% identiche, circa il 98% identiche o circa il 99% identiche l'una all'altra.

[0061] Come utilizzato nel presente contesto, "espressione" di una sequenza di acido nucleico si
15 riferisce a uno o più dei seguenti eventi: (1) produzione di uno stampo di RNA da una sequenza di DNA (ad esempio mediante trascrizione); (2) elaborazione di un trascritto di RNA (ad esempio mediante splicing, editing, formazione del cap in 5' e/o elaborazione dell'estremità 3'); (3) traduzione di un RNA in un polipeptide o una proteina; e (4) modificazione post-traduzionale di un polipeptide o una proteina.

20 **[0062]** Come utilizzato nel presente contesto, una molecola biologica "funzionale" è una molecola biologica in una forma in cui mostra una proprietà e/o un'attività da cui è caratterizzata.

[0063] Come utilizzato nel presente contesto, "*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 coltura cellulare, in una piastra di Petri, ecc., piuttosto che all'interno di un organismo (ad esempio,
25 animale, pianta o microbo).


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


[0064] Come utilizzato nel presente contesto, "in vivo" si riferisce a eventi che si verificano all'interno di un organismo (ad esempio, animale, pianta o microbo).

[0065] Come utilizzato nel presente contesto, "isolato" si riferisce a una sostanza o entità che è stata (1) separata da almeno alcuni dei componenti con cui era associata quando inizialmente prodotta (indipendentemente da se lo fosse stato in natura o in un contesto sperimentale) e/o (2) prodotta, preparata e/o fabbricata dalla mano dell'uomo. 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 il 80%, circa il 90%, o più degli altri componenti con cui erano inizialmente associate. In alcune forme di realizzazione, gli agenti isolati sono puri per 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 il 98%, circa il 99%, o più di circa il 99%. Come utilizzato nel presente contesto, una sostanza è "pura" se è sostanzialmente priva di altri componenti.


[0066] Come qui utilizzato, "soggetto" o "paziente" si riferisce a qualsiasi organismo a cui può essere somministrata una composizione in conformità con la presente descrizione, ad esempio per scopi sperimentali, diagnostici, profilattici e/o terapeutici. Soggetti tipici includono animali (ad esempio mammiferi come topi, ratti, conigli, primati non umani ed esseri umani) e/o piante.

[0067] Come qui utilizzato, "sostanzialmente" si riferisce alla condizione qualitativa di mostrare l'estensione o il grado totale o quasi totale di una caratteristica o proprietà di interesse. Un esperto con competenza ordinaria nelle tecniche biologiche comprenderà che fenomeni chimici e biologici raramente, se non mai, vengono completati e/o procedono fino a 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.

[0068] Un individuo che "è affetto da" una malattia, un disturbo e/o una condizione ha ricevuto una diagnosi o mostra uno o più sintomi di una malattia, un disturbo e/o una condizione.


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

- [0069] Un individuo che è "predisposto a" una malattia, disturbo e/o condizione non ha ricevuto una diagnosi e/o potrebbe non manifestare sintomi della malattia, del disturbo e/o della condizione. In alcune forme di realizzazione, un individuo che è predisposto a una malattia, un disturbo e/o una condizione (ad esempio cancro) può essere caratterizzato da uno o più dei seguenti: (1) una mutazione genetica associata allo sviluppo della malattia, disturbo e/o condizione; (2) un polimorfismo genetico associato allo sviluppo della malattia, disturbo e/o condizione; (3) aumentata e/o diminuita espressione e/o attività di una proteina e/o acido nucleico associata/o 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 e/o infezione con un microbo associato allo sviluppo della malattia, disturbo e/o condizione. In alcuni casi, un individuo che è predisposto a una malattia, un disturbo e/o una condizione svilupperà la malattia, il disturbo e/o la condizione. In alcuni casi, un individuo che è predisposto a una malattia, un disturbo e/o una condizione non svilupperà la malattia, il disturbo e/o la condizione.
- [0070] Come qui utilizzato, "quantità terapeutamente 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 affetto da o predisposto a una malattia, disturbo e/o condizione, per trattare, migliorare i sintomi, diagnosticare, prevenire e/o ritardare l'insorgenza della malattia, disturbo e/o condizione.
- [0071] Come qui utilizzato, "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 unitamente ad altre proteine. Alcuni fattori 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


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

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.

[0072] Come qui utilizzato, "trattamento" si riferisce ad attenuare, migliorare, alleviare, ritardare l'insorgenza, inibire la progressione, ridurre la gravità e/o ridurre l'incidenza di uno o più sintomi

5 o caratteristiche di una particolare malattia disturbo e/o condizione in modo parziale o completo.

Ad esempio, "trattare" il cancro può riferirsi all'inibizione della sopravvivenza, della crescita e/o della diffusione di un tumore. Il trattamento può essere somministrato a un soggetto che non presenta segni di una malattia, disturbo e/o condizione e/o a un soggetto che presenta solo segni precoci di una malattia, disturbo e/o condizione allo scopo di ridurre il rischio di sviluppare la


10 patologia associata alla malattia, disturbo e/o condizione. In alcuni casi, il trattamento comprende la somministrazione di una proteina associata ad un acido nucleico terapeuticamente attivo a un soggetto che ne ha bisogno.

[0073] Come qui utilizzato, "non modificato" si riferisce a un acido nucleico prima di essere modificato, ad esempio adenosina, guanosina, citosina, timidina e uracile, o un amminoacido

15 presente in natura. I composti descritti nel presente contesto possono essere asimmetrici (ad esempio, aventi uno o più stereocentri). Sono intesi tutti gli stereoisomeri, come enantiomeri e diastereomeri, salvo diversamente indicato. I composti della presente descrizione che contengono atomi di carbonio sostituiti asimmetricamente possono essere isolati in forme otticamente attive o racemiche. Metodi su come preparare forme otticamente attive da materiali di partenza

20 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 geometrici cis e trans dei composti della presente descrizione sono descritti e possono essere isolati come una miscela di isomeri o come

25 forme isomeriche separate.


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

[0074] I composti della presente descrizione includono anche forme tautomeriche. Le forme tautomeriche derivano dallo scambio di un singolo legame con un doppio legame adiacente insieme alla concomitante migrazione di un protone. Le forme tautomeriche includono tautomeri prototropici che sono stati di protonazione isomerica aventi la stessa formula empirica e carica totale. Tautomeri prototropici esemplificativi includono coppie chetone-enolo, coppie ammid-acido imidico, coppie lattame-lattime, coppie ammid-acido imidico, coppie enammina-immina e forme ad anello in cui un protone può occupare due o più posizioni di un sistema eterociclico, ad esempio, 1H- e 3H-imidazolo, 1H-, 2H- e 4H-1,2,4-triazolo, 1H- e 2H-isoindolo e 1H- e 2H-pirazolo. Le forme tautomeriche possono essere in equilibrio o stericamente bloccate in una forma mediante appropriata sostituzione.

[0075] I composti della presente descrizione possono anche includere tutti gli isotopi di atomi che sono presenti negli intermedi o nei composti finali. Gli isotopi includono quegli atomi aventi lo stesso numero atomico ma numeri di massa diversi. Ad esempio, gli isotopi di idrogeno includono trizio e deuterio.

[0076] Il termine "composto", come qui utilizzato, intende includere tutti gli stereoisomeri, gli isomeri geometrici, i tautomeri e gli isotopi delle strutture rappresentate.

[0077] I composti della presente descrizione possono essere sostanzialmente isolati. Per "sostanzialmente isolato" si intende che il composto è almeno parzialmente o sostanzialmente separato dall'ambiente in cui è stato formato o rilevato. La separazione parziale può includere, ad esempio, una composizione arricchita del 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%, almeno circa il 97%, o almeno circa il 99% in peso del composto della presente descrizione, o suo sale. I metodi per isolare composti e loro sali sono ordinari nella tecnica.

[0078] I composti della presente descrizione, e i loro sali, possono anche essere preparati in


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

combinazione con molecole di solvente o acqua per formare solvati e idrati con metodi di routine.

[0079] La presente descrizione include anche sali farmaceuticamente accettabili dei composti qui descritti. Come utilizzato nel presente contesto, “sali farmaceuticamente accettabili” si riferisce a derivati dei composti descritti in cui il composto progenitore viene modificato convertendo una
5 frazione acida o basica esistente nella sua forma salina. Esempi di sali farmaceuticamente accettabili includono, tuttavia senza limitazioni, sali di acidi minerali oppure organici di residui basici quali ammine; sali alcalini oppure organici di residui acidi quali acidi carbossilici e simili. I sali farmaceuticamente accettabili della presente descrizione includono i sali non tossici tradizionali del composto progenitore formato, ad esempio, da acidi inorganici oppure organici non tossici. I sali farmaceuticamente accettabili della presente descrizione possono essere
10 sintetizzati dal composto progenitore che contiene una frazione basica o acida mediante metodi chimici tradizionali. 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
15 non acquosi come etere, etilacetato, etanolo, isopropanolo o acetonitrile sono preferiti. Un elenco di sali adatti si trova in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a edizione, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pagina 1418 e Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977).

[0080] L’espressione “farmaceuticamente accettabile” viene impiegata nel presente contesto per riferirsi a quei/quelle composti, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che sono,
20 nell’ambito di un valido giudizio medico, adatti/e all’uso a contatto con i tessuti di esseri umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica o altro problema o complicanza, proporzionali a un ragionevole rapporto benefici/rischi.

[0081] La presente descrizione include anche profarmaci dei composti qui descritti. Come utilizzato nel presente contesto, “profarmaci” si riferisce a qualsiasi veicolo tipicamente
25 covalentemente legato che rilascia il farmaco progenitore attivo quando somministrato a un


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

soggetto mammifero. I profarmaci possono essere preparati modificando i gruppi funzionali presenti nei composti in modo tale che le modificazioni siano scisse, in manipolazione regolare 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

5 soggetto mammifero, si scinde a formare rispettivamente un gruppo idrossile, amminico, solfidrile o carbossile libero. Esempi di profarmaci comprendono, tuttavia senza limitazioni, derivati di acetato, formiato e benzoato di alcol e gruppi amminofunzionali nei composti della presente descrizione. La preparazione e l'uso dei profarmaci sono discussi in T. Higuchi e V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 dell'A.C.S. Symposium Series e in

10 Bioreversible Carriers in Drug Design, a cura di Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Nucleosidi e nucleotidi modificati

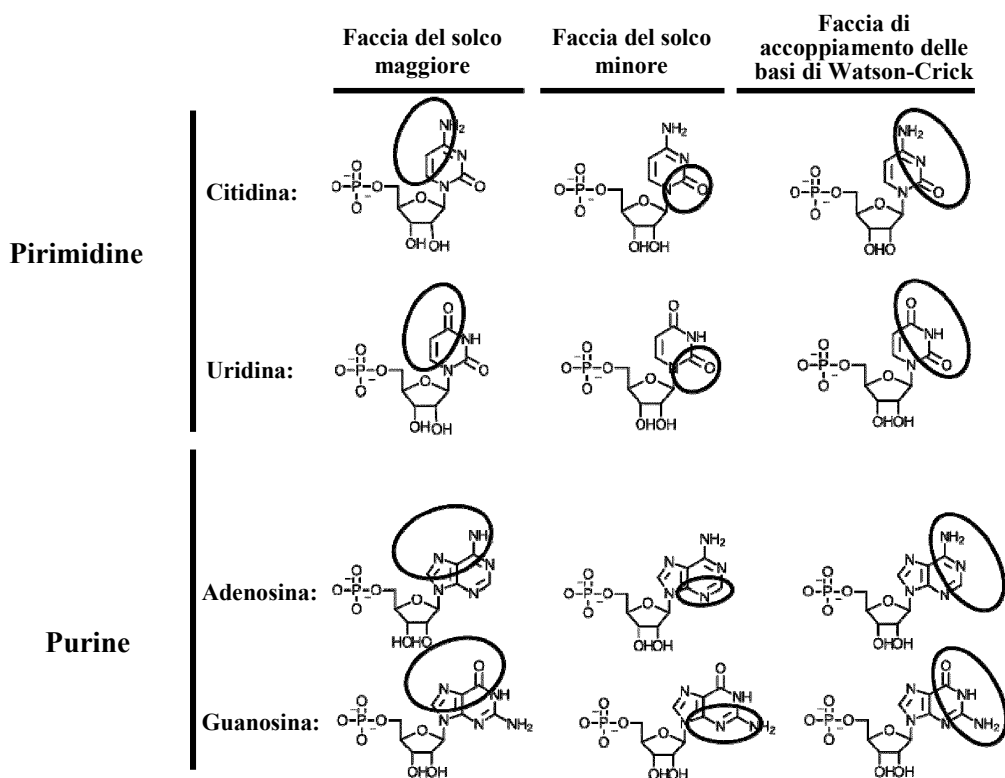
[0082] La presente descrizione riguarda nucleosidi e nucleotidi modificati. Come descritto nella presente "nucleoside" è definito come un composto contenente una molecola di zucchero a cinque

15 atomi di carbonio (un pentosio o ribosio) o un suo derivato e una base organica, purina o pirimidina, o un suo derivato. Come descritto nella presente, "nucleotide" è definito come un nucleoside che è costituito da un gruppo fosfato. I nucleosidi e i nucleotidi descritti nel presente contesto sono generalmente modificati chimicamente sulla faccia del solco maggiore. In alcuni casi, le modificazioni chimiche del solco maggiore possono includere un gruppo ammino, un

20 gruppo tiolo, un gruppo alchile o un gruppo alogeno.

[0083] La Tabella 1 di seguito identifica le facce chimiche di ciascun nucleotide canonico. I cerchi identificano gli atomi che comprendono le rispettive regioni chimiche.


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



[0084] I nucleosidi modificati includono ribonucleoside di piridin-4-one, 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-taurinometil-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 e 4-metossi-2-tio-pseudouridina.

[0085] I nucleosidi modificati includono 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-


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

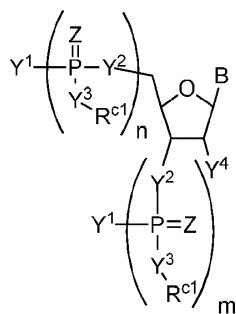
metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metossi-citidina, 2-metossi-5-metil-citidina, 4-metossi-pseudoisocitidina e 4-metossi-1-metil-pseudoisocitidina.

[0086] I nucleosidi modificati includono 2-amminopurina, 2, 6-diamminopurina, 7-deaza-adenina, 5 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-10 adenina e 2-metossi-adenina.

[0087] I nucleosidi modificati includono 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-8-15 osso-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina e N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

[0088] Il nucleotide può essere modificato sulla faccia del solco maggiore e può includere la sostituzione dell'idrogeno su C-5 dell'uracile con un gruppo metile o un gruppo alogeno.

[0089] Il nucleoside e il nucleotide possono essere un composto di Formula I:



I

20

in cui:

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

Z è O o S;

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

ciascuno di Y^2 è indipendentemente scelto tra O, NR^a , S o un linker comprendente uno atomo scelto dal gruppo costituito da C, O, N e S;

5 ciascuno di Y^3 è indipendentemente scelto da O e S;

Y^4 è scelto tra H, $-OR^a$, $-SR^a$ e $-NHR^a$;

n è 0, 1, 2 o 3;

m è 0, 1, 2 oppure 3;

B è una base azotata;

10 R^a è H, alchile C_{1-20} , alchenile C_{2-20} , alchinile C_{2-20} o arile C_{6-20} ;

R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un controione; e

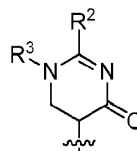
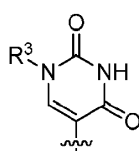
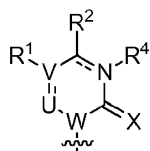
$-Y^3-R^{c1}$ è OH o SH a un pH di circa 1 o $-Y^3-R^{c1}$ è O^- o S^- a pH fisiologico;

oppure $-Y^3-R^{c1}$ è alcossi C_{1-20} , -O-alchenile C_{2-20} oppure -O-alchinile C_{1-20} ;

in cui quando B è una base azotata non modificata scelta tra citosina, guanina, uracile e adenina,

15 allora almeno uno tra Z, Y^1 o Y^2 non è O o OH.

[0090] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula II-a, II-b o II-c:



in cui:


20 indica un legame singolo o doppio;

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} , alogeno o $-OR^c$, in


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

cui alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ sono ciascuno opzionalmente sostituito con -OH, -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 R¹ è assente;


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

- 5 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 opzionalmente sostituito con 1-4 sostituenti scelti tra alogeno, -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;

R⁴ è H o alchile C₁₋₂₀; in cui, quando

10

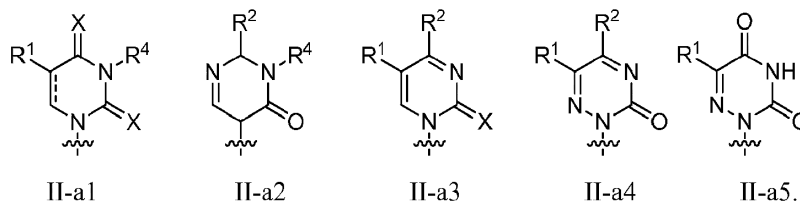
 indica un doppio legame, R⁴ è assente, oppure N-R⁴, presi insieme, forma un N positivamente carico sostituito con alchile C₁₋₂₀;

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

15

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

[0091] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:




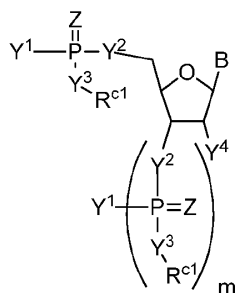
20

[0092] In alcuni casi, B è una base azotata scelta dal gruppo costituito da citosina, guanina, adenina e uracile.

[0093] In alcuni casi, B è una pirimidina o un suo derivato.

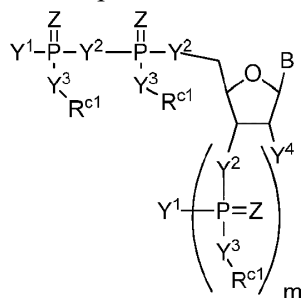
[0094] In alcuni casi il nucleotide è un composto di Formula I-a:


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



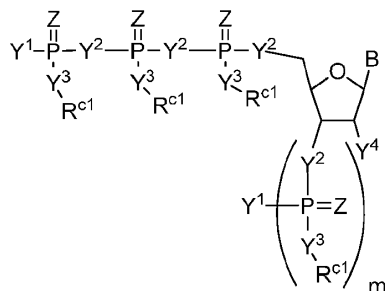
I-a.

[0095] In alcuni casi il nucleotide è un composto di Formula I-b;



I-b.

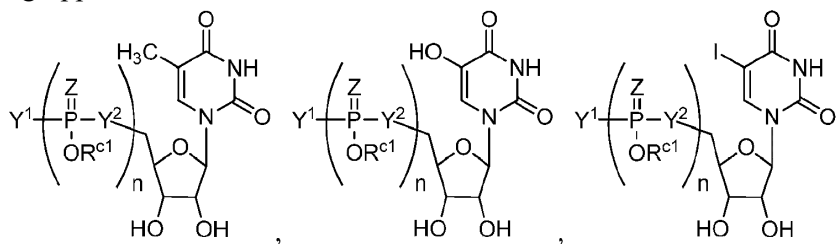
[0096] Formula I-c;



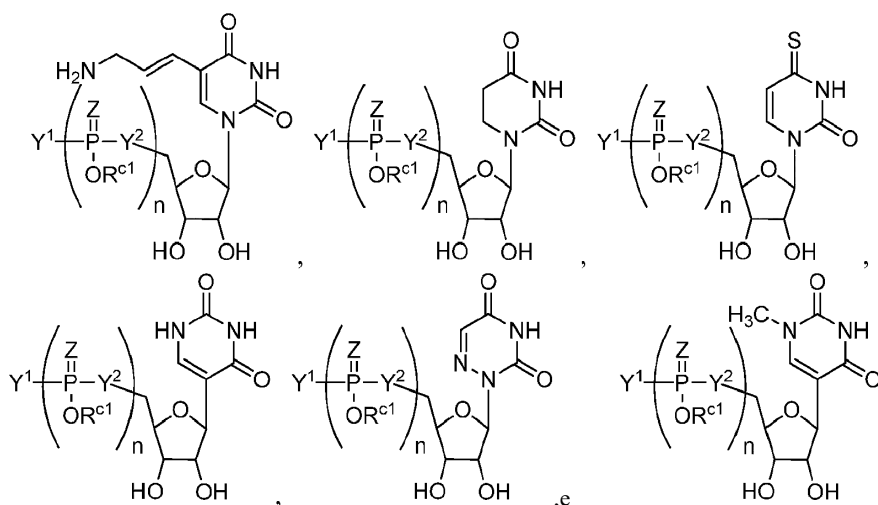
I-c.

5

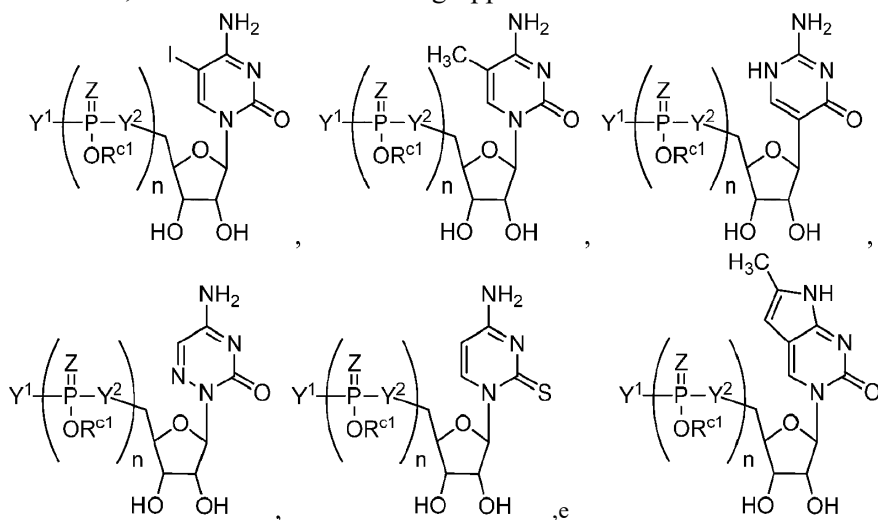
o è scelto dal gruppo costituito da:



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

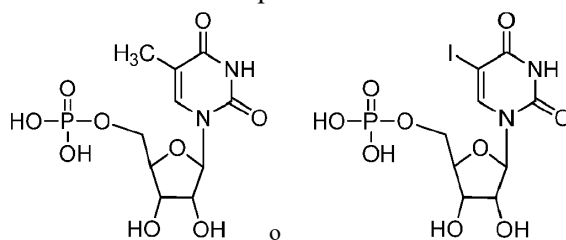


[0097] In alcuni casi, il nucleotide è scelto dal gruppo costituito da:



5

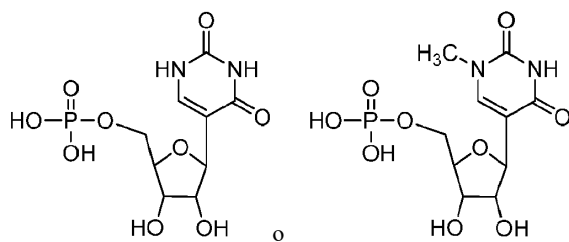
[0098] Ad esempio, il nucleotide modificato può essere:



[0099] In alcuni casi, la modificazione chimica del solco maggiore può includere la sostituzione del gruppo C-H in corrispondenza di C-5 con un gruppo -NH- o un gruppo -NH(CH₃)-.

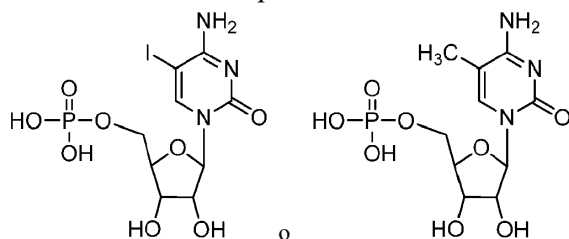
10 [0100] Ad esempio, il nucleotide modificato può essere:

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



[0101] In un altro caso, la modificazione chimica del solco maggiore può includere la sostituzione dell'idrogeno in corrispondenza di C-5 di citosina con un gruppo alogeno o un gruppo metile.

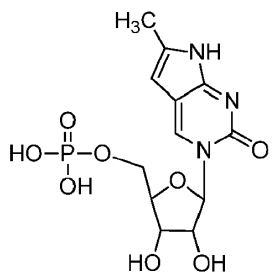
[0102] Ad esempio, il nucleotide modificato può essere:



5

[0103] In ancora un altro caso, la modificazione chimica del solco maggiore può includere un anello fuso formato dall'NH₂ in corrispondenza della posizione C-4 e dall'atomo di carbonio in corrispondenza della posizione C-5.

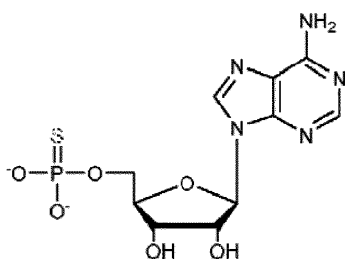
[0104] Ad esempio, il nucleotide modificato può essere:



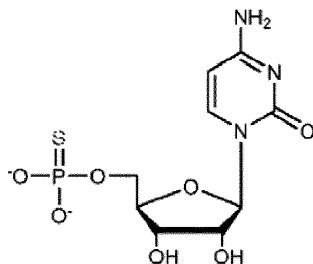
10

[0105] In alcuni casi, un nucleotide modificato è 5'-O-(1-Tiofosfato)-Adenosina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Citidina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Guanosina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Uridina o 5'-O-(1-Tiofosfato)-Pseudouridina.

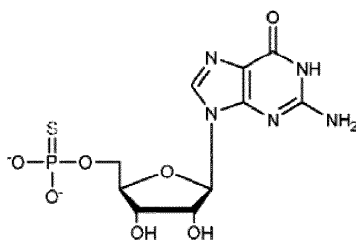

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R



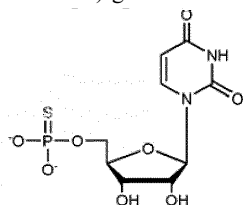
5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina



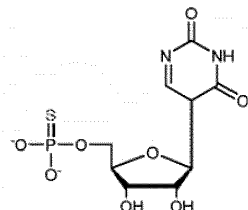
5'-O-(1-tiofosfato)-citidina



5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina



5'-O-(1-tiofosfato)-uridina



5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina

5

[0106] La frazione fosfato α -tio-sostituita viene fornita per conferire stabilità ai polimeri di RNA e DNA attraverso i legami non naturali della catena principale di fosforotioato. Il DNA e l'RNA


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

del fosforotioato hanno una maggiore resistenza alla nucleasi e, di conseguenza, un'emivita più lunga in un ambiente cellulare. Ci si aspetta che gli acidi nucleici legati al fosforotioato riducano anche la risposta immunitaria innata attraverso un legame/attivazione più debole delle molecole immunitarie innate cellulari.

- 5 [0107] Ulteriori esempi di nucleotidi modificati e combinazioni di nucleotidi modificati sono forniti di seguito nella Tabella 2.

Tabella 2


<u>Nucleotide modificato</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>
6-aza-citidina	α -tio-citidina / 5-iodo-uridina
2-tio-citidina	α -tio-citidina / N1-metil-pseudo-uridina
α -tio-citidina	α -tio-citidina / α -tio-uridina
Pseudo-iso-citidina	α -tio-citidina / 5-metil-uridina
5-amminoallil-uridina	α -tio-citidina / pseudo-uridina
5-iodo-uridina	Pseudo-iso-citidina / 5-iodo-uridina
N1-metil-pseudouridina	Pseudo-iso-citidina / N1-metil-pseudo-uridina
5,6-diidrouridina	Pseudo-iso-citidina / α -tio-uridina
α -tio-uridina	Pseudo-iso-citidina / 5-metil-uridina
4-tio-uridina	Pseudo-iso-citidina / Pseudo-uridina
6-aza-uridina	Pirrolo-citidina
5-idrossi-uridina	Pirrolo-citidina / 5-iodo-uridina
Desossi-timidina	Pirrolo-citidina / N1-metil-pseudo-uridina
Pseudo-uridina	Pirrolo-citidina / α -tio-uridina
Inosina	Pirrolo-citidina / 5-metil-uridina
α -tio-guanosina	Pirrolo-citidina/Pseudo-uridina
8-osso-guanosina	5-metil-citidina / 5-iodo-uridina
O6-metil-guanosina	5-metil-citidina / N1-metil-pseudo-uridina
7-deaza-guanosina	5-metil-citidina / α -tio-uridina
Nessuna modificazione	5-metil-citidina / 5-metil-uridina
N1-metil-adenosina	5-metil-citidina / Pseudo-uridina
2-ammino-6-Cloro-purina	5-metil-citidina


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

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>
N6-metil-2-amminopurina	25% Pseudo-iso-citidina
6-Cloro-purina	25% N1-metil-pseudo-uridina
N6-metil-adenosina	25% N1-Metil-pseudo-uridina / 75%-pseudo-uridina
α -tio-adenosina	5-metil-uridina
8-azido-adenosina	5-iodo-citidina
7-deaza-adenosina	

Sintesi di nucleotidi modificati

- [0108] 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 siano fornite condizioni di processo tipiche o preferite (vale a dire, temperature di reazione, tempi, rapporti molari di reagenti, solventi, pressioni, ecc.), 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.
- 5
- [0109] I processi descritti nel presente contesto 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 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.
- 10
- [0110] La preparazione di nucleosidi e nucleotidi modificati può prevedere 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
- 15
- 20 Groups in Organic Synthesis, 2a edizione, Wiley & Sons, 1991.


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


[0111] Le reazioni dei processi descritti nel presente contesto possono essere eseguite in solventi adatti che possono essere facilmente scelti da un esperto della tecnica di 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

5 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. La risoluzione di miscele racemiche di nucleosidi e nucleotidi modificati può essere effettuata mediante uno qualsiasi dei numerosi metodi noti nella tecnica.

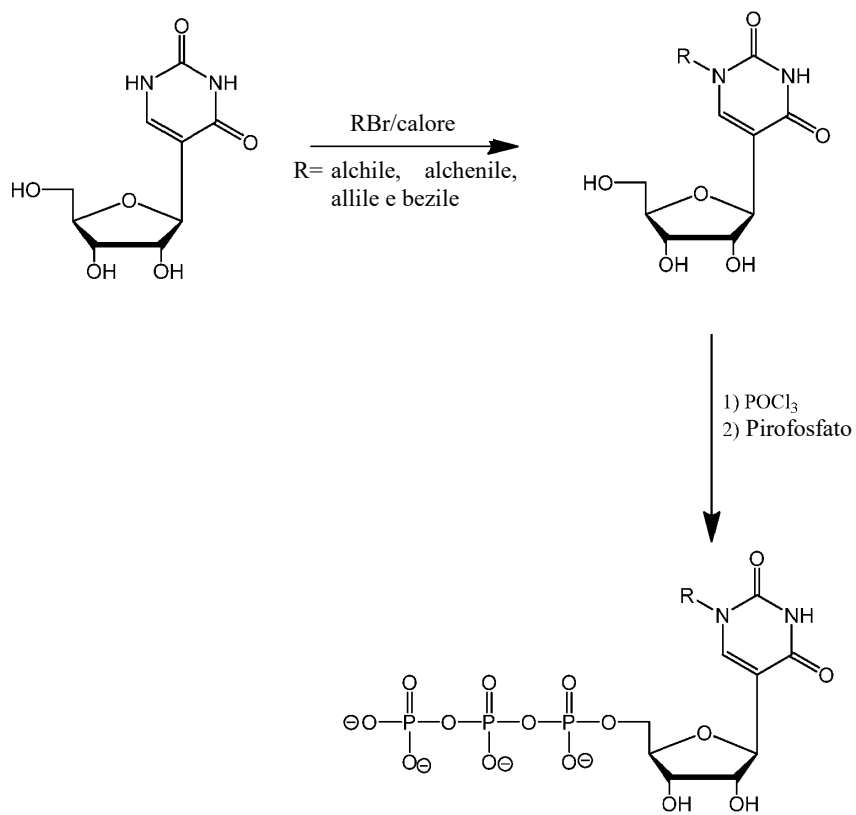
10 Un metodo esemplificativo include la ricristallizzazione frazionaria utilizzando un “acido risolvente chirale” che è un acido organico formante sale otticamente attivo. Agenti risolventi adatti per i metodi di ricristallizzazione frazionaria sono, ad esempio, acidi otticamente attivi, come le forme D e L di acido tartarico, acido diacetiltartarico, acido dibenzoiltartarico, acido mandelico, acido malico, acido lattico o i vari acidi canforsolfonici otticamente attivi. La

15 risoluzione delle miscele 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.

[0112] Di seguito, negli Schemi 1 e 2, sono fornite sintesi esemplificative di nucleotidi modificati.

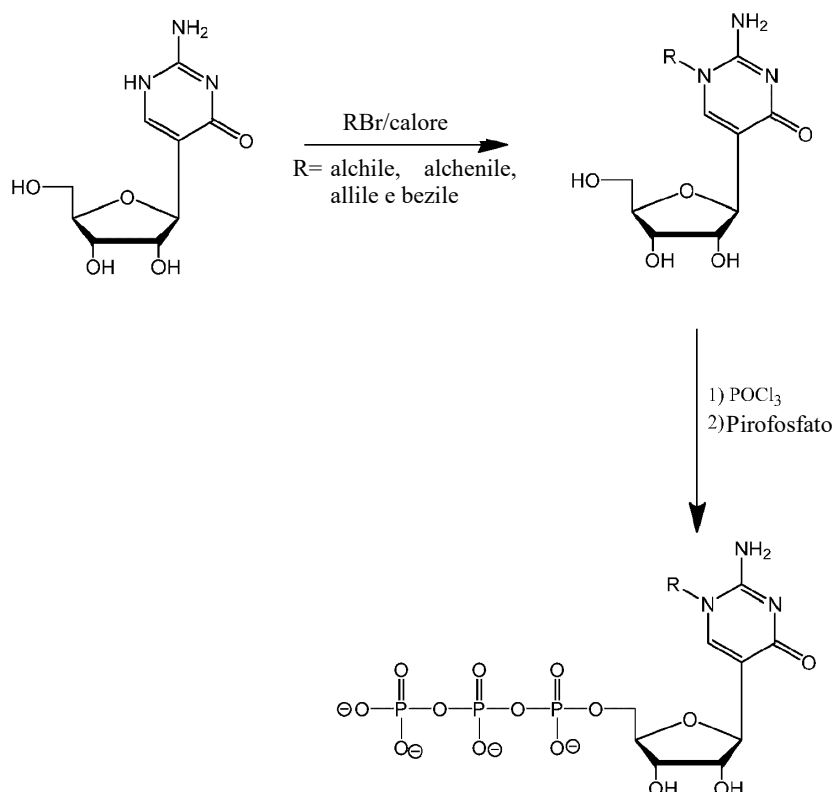

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Schema 1



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

Schema 2



[0113] 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; Purnal 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.

Acidi nucleici modificati

[0114] La presente descrizione si riferisce ad acidi nucleici, inclusi RNA come mRNA che contengono uno o più nucleosidi modificati (denominati "acidi nucleici modificati") o nucleotidi modificati come descritto nel presente contesto, che hanno proprietà utili inclusa la significativa riduzione o mancanza di una induzione sostanziale della risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto l'mRNA, o la sua soppressione. Poiché questi acidi nucleici modificati potenziano l'efficienza della produzione proteica, la ritenzione intracellulare degli acidi nucleici e la vitalità delle cellule a contatto, oltre a possedere un'immunogenicità ridotta, di questi acidi

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

nucleici rispetto agli acidi nucleici non modificati, aventi queste proprietà sono qui chiamati “acidi nucleici potenziati”.

[0115] Inoltre, la presente descrizione fornisce acidi nucleici, che hanno una ridotta affinità di legame con un partner che interagisce, ad esempio si lega, con il solco maggiore. Ad esempio, gli
5 acidi nucleici sono costituiti da almeno un nucleotide che è stato modificato chimicamente sulla faccia del solco maggiore come descritto nel presente contesto.

[0116] 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. Acidi nucleici per l'uso secondo la presente descrizione includono, tuttavia senza limitazioni, uno o più tra DNA, RNA
10 incluso mRNA messaggero (mRNA), loro ibridi, agenti che inducono RNAi, agenti di RNAi, siRNA, shRNA, miRNA, RNA antisense, ribozimi, DNA catalitico, RNA che inducono la formazione di tripla elica, aptameri, vettori, ecc., descritti nel presente contesto in dettaglio.

[0117] Sono descritti acidi nucleici modificati contenenti una regione traducibile e una, due o più di due diverse modificazioni nucleosidiche. In alcuni casi, l'acido nucleico modificato mostra una
15 degradazione ridotta in una cellula in cui viene introdotto l'acido nucleico, rispetto a un corrispondente acido nucleico non modificato. Acidi nucleici esemplificativi includono acidi ribonucleici (RNA), acidi desossiribonucleici (DNA), acidi nucleici con treosio (TNA), acidi nucleici con glicole (GNA), acidi nucleici bloccati (LNA) o un loro ibrido. Nell'invenzione, l'acido nucleico modificato è RNA messaggero (mRNA). Come descritto nel presente contesto,
20 gli acidi nucleici della presente descrizione non inducono sostanzialmente una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto l'mRNA.

[0118] 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
25 contenente un dominio di degradazione, su cui è possibile agire in modo diretto all'interno di una


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

cellula.

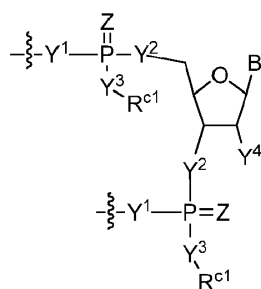
[0119] Altri componenti di acido nucleico sono opzionali e sono benefici in alcuni casi. Ad esempio, sono fornite una regione non tradotta (UTR) in 5' e/o una 3'UTR, in cui una o entrambe possono contenere indipendentemente una o più modificazioni nucleosidiche diverse. In tali casi, 5 nella regione traducibile possono essere presenti anche modificazioni nucleosidiche. Sono anche descritti acidi nucleici contenenti una sequenza di Kozak.

[0120] Inoltre, sono descritti acidi nucleici contenenti una o più sequenze nucleotidiche introniche in grado di essere asportate dall'acido nucleico.

[0121] Inoltre, sono descritti acidi nucleici contenenti un sito di ingresso del ribosoma interno 10 (internal ribosome entry site, IRES). Un IRES può agire come unico sito di legame ribosomiale, o può fungere da uno dei molteplici siti di legame ribosomiale 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, può inoltre opzionalmente essere prevista una 15 seconda regione traducibile. Esempi di sequenze IRES che possono essere utilizzate secondo la presente descrizione includono, senza limitazione, quelle dai picornavirus (ad esempio FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus dell'encefalomiocardite (ECMV), virus dell'afta epizootica (FMDV), virus dell'epatite C (HCV), virus della febbre suina classica (CSFV), virus della leucemia murina (MLV), virus dell'immunodeficienza delle scimmie (SIV) o virus della 20 paralisi del grillo (CrPV).

[0122] In alcuni casi, l'acido nucleico comprende un composto di Formula I-d:


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



I-d

in cui:

Z è O o S;

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

5 ciascuno di Y² è indipendentemente scelto tra O, NR^a, S o un linker comprendente uno atomo scelto dal gruppo costituito da C, O, N e S;

ciascuno di Y³ è indipendentemente scelto da O e S;

Y⁴ è scelto tra H, -OR^a, -SR^a e -NHR^a;

B è una base azotata;

10 R^a è H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ o arile C₆₋₂₀;

R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un controione; e

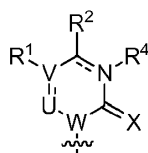
-Y³-R^{c1} è OH o SH a un pH di circa 1 o -Y³-R^{c1} è O⁻ o S⁻ a pH fisiologico;

oppure -Y³-R^{c1} è alcossi C₁₋₂₀, -O-alchenile C₂₋₂₀ oppure -O-alchinile C₁₋₂₀;

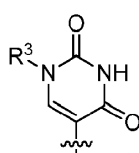
in cui quando B è una base azotata non modificata scelta tra citosina, guanina, timidina,

15 uracile e adenina, allora almeno uno tra Z, Y¹ o Y² non è O o OH.

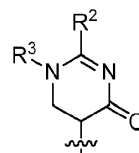
[0123] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula II-a, II-b o II-c:



II-a



II-b



II-c

in cui:

==

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

indica un legame singolo o doppio;

X è O oppure S;

U e W sono ciascuno indipendentemente C o N;

V è O, S, C o N;

- 5 in cui quando V è C allora R¹ è H, alchile C₁₋₆, alchenile C₁₋₆, alchinile C₁₋₆, alogeno o -OR^c, in cui alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ sono ciascuno opzionalmente sostituito con -OH, -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 R¹ è assente;

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

- 10 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 opzionalmente sostituito con 1-4 sostituenti scelti tra alogeno, -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;

R⁴ è H o alchile C₁₋₂₀; in cui quando

15

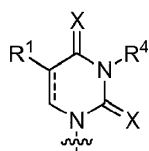
indica un doppio legame, R⁴ è assente, oppure N-R⁴, presi insieme, forma un N positivamente carico sostituito con alchile C₁₋₂₀;

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

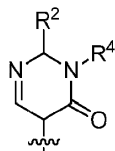
20

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

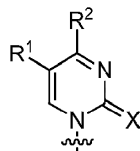
[0124] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



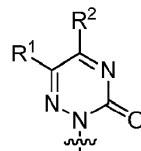
II-a1



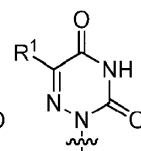
II-a2



II-a3



II-a4



II-a5.

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

[0125] In alcuni casi, almeno il 25% delle citosine è sostituito da un composto di Formula I-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
5 circa il 95%, o circa il 100%).

[0126] In alcuni casi, almeno il 25% degli uracili è sostituito da un composto di Formula I-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
10 circa il 95%, o circa il 100%).

[0127] In alcuni casi, almeno il 25% delle citosine e il 25% degli uracili sono sostituiti da un composto di Formula I-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%,
15 almeno circa il 90%, almeno circa il 95% o circa il 100%).

Partner di interazione del solco maggiore

[0128] 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 legame, con la faccia del solco maggiore di un
20 nucleotide o di un acido nucleico. Pertanto, 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.

[0129] Partner di interazione, ad esempio legame, del solco maggiore esemplificativi includono,
25 tuttavia senza limitazioni, le seguenti nucleasi ed elicasi. All'interno delle membrane, i TLR


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

(recettori toll-like) 3, 7 e 8 possono rispondere a RNA a singolo e doppio filamento. All'interno del citoplasma, i membri della classe della superfamiglia 2 delle elicasi DEX(D/H) e delle ATPasi possono rilevare gli RNA per avviare risposte antivirali. Queste elicasi includono il RIG-I (gene I inducibile dell'acido retinoico) e l'MDA5 (gene 5 associato alla differenziazione del melanoma).

5 Altri esempi includono il laboratorio di genetica e fisiologia 2 (LGP2), proteine contenenti dominio HIN-200 o proteine contenenti dominio elicasi.

Prevenzione o riduzione dell'attivazione della risposta immunitaria cellulare innata utilizzando acidi nucleici modificati

[0130] Il termine "risposta immunitaria innata" include una risposta cellulare ad acidi nucleici esogeni, acidi nucleici 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. Anche la sintesi proteica è ridotta durante la risposta immunitaria cellulare innata. Sebbene sia vantaggioso eliminare la risposta immunitaria innata in una cellula, la presente descrizione fornisce mRNA modificati 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 di più del 99,9% rispetto alla risposta immunitaria indotta da un corrispondente acido nucleico non modificato. Tale riduzione 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-like (ad esempio, TLR7 e TLR8). La riduzione della risposta immunitaria innata può essere misurata anche dalla ridotta morte cellulare a seguito di una o più somministrazioni di RNA modificati a una popolazione cellulare; ad esempio, la morte cellulare è del 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% o di oltre il 95% inferiore alla frequenza di morte cellulare osservata con un corrispondente acido nucleico non modificato. Inoltre, la morte cellulare può interessare meno del 50%, del 40%, del 30%, del

10
15
20
25


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

20%, del 10%, del 5%, dell'1%, dello 0,1%, dello 0,01% o meno dello 0,01% delle cellule messe a contatto con gli acidi nucleici modificati.

[0131] Nel presente contesto viene descritta 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 messa a contatto della popolazione cellulare può essere ripetuta una o più volte (come due, tre, quattro, cinque o più di cinque volte). La fase di messa a contatto della popolazione cellulare con gli acidi nucleici modificati può essere ripetuta un numero di volte sufficiente tale da ottenere un'efficienza predeterminata di traduzione proteica nella popolazione cellulare. Data la ridotta citotossicità della popolazione cellulare bersaglio fornita dalle modificazioni dell'acido nucleico, tali trasfezioni ripetute sono realizzabili in una vasta gamma di tipi cellulari.

Varianti polipeptidiche

[0132] Vengono descritti acidi nucleici che codificano polipeptidi varianti, che hanno una determinata 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, come determinato 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 amminoacidici. La "identità" misura la percentuale di corrispondenze identiche tra la più piccola di due o più sequenze con allineamenti di gap (se presenti) risolti da uno specifico modello matematico o programma informatico (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, A. M., a cura di, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., a cura di, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., e Griffin, H. G., a cura di, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer,


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

Gribskov, M. e Devereux, J., a cura di, M. Stockton Press, New York, 1991 e Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

[0133] 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 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99% o più di identità di sequenza con quello specifico polinucleotide o polipeptide di riferimento come determinato dai programmi di allineamento di sequenze e dai parametri qui descritti e noti agli esperti della tecnica.

[0134] Vengono anche descritti frammenti proteici, domini di proteine funzionali e proteine omologhe, ad esempio, qualsiasi frammento proteico di una proteina di riferimento (che indica una sequenza polipeptidica di almeno un residuo amminoacidico più corta di una sequenza polipeptidica di riferimento ma per il resto identica) 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 tratto di circa 20, circa 30, circa 40, circa 50 o circa 100 amminoacidi che sono per circa il 40%, circa il 50%, circa il 60%, circa il 70%, circa l'80%, circa il 90%, circa il 95% o circa il 100% identici a una qualsiasi delle sequenze qui descritte può essere utilizzata secondo la presente descrizione. In determinati casi, una sequenza proteica da utilizzare secondo la attuale 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.

Librerie di polipeptidi

[0135] Sono inoltre descritte 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


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

polipeptidi noti nella tecnica. Preferibilmente, i polinucleotidi sono mRNA dell'invenzione in una forma adatta per l'introduzione diretta in una cellula bersaglio ospite, che a sua volta sintetizza il polipeptide codificato.

5 [0136] Possono essere prodotte e testate più varianti di una proteina, ciascuna con una o più diverse modificazioni amminoacidiche, per determinare la migliore variante in termini di farmacocinetica, stabilità, biocompatibilità e/o attività biologica o una proprietà biofisica come il livello di espressione. Tale libreria può contenere 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o oltre 10^9 possibili varianti (incluse sostituzioni, eliminazioni di uno o più residui e inserimento di uno o più residui).

10 **Complessi polipeptide-acido nucleico**

[0137] Una corretta traduzione delle proteine implica l'aggregazione fisica di un certo numero di polipeptidi e acidi nucleici associati all'mRNA. Nel presente contesto sono descritti 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 15 prevenire o ridurre una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto il complesso.

Acidi nucleici modificati intraducibili

20 [0138] Inoltre nel presente contesto sono descritti mRNA aventi sequenze che sono sostanzialmente non traducibili. Tale mRNA è efficace come vaccino quando somministrato a un soggetto mammifero.

[0139] Sono inoltre descritti acidi nucleici modificati che contengono una o più regioni non codificanti. Tali acidi nucleici modificati sono generalmente non tradotti, ma sono in grado di legarsi a e sequestrare uno o più componenti della macchina traduzionale come una proteina 25 ribosomiale o un RNA di trasferimento (tRNA), riducendo così efficacemente l'espressione


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

proteica nella cellula. L'acido nucleico modificato può contenere un piccolo RNA nucleolare (sno-RNA), un micro RNA (miRNA), un piccolo RNA interferente (siRNA) o un RNA che interagisce con Piwi (piRNA).

Sintesi di acidi nucleici modificati

5 [0140] 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, 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, M.J. (a cura di) *Oligonucleotide synthesis: a practical*
10 *approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984 e Herdewijn, P. (a cura di) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005].

[0141] I nucleosidi e i nucleotidi modificati descritti nel presente contesto possono essere preparati da materiali di partenza prontamente disponibili utilizzando i seguenti metodi e
15 procedure generali. È chiaro che laddove siano fornite condizioni di processo tipiche o preferite (vale a dire, temperature di reazione, tempi, rapporti molari di reagenti, solventi, pressioni, ecc.), 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
20 ottimizzazione ordinarie.

[0142] I processi descritti nel presente contesto 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 spettroscopia a infrarossi, la spettrofotometria (ad esempio, UV-visibile) o
25 la spettrometria di massa, o mediante cromatografia come la cromatografia liquida ad alte


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

prestazioni (HPLC) o cromatografia su strato sottile.

[0143] La preparazione di nucleosidi e nucleotidi modificati può prevedere 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.

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

[0144] Le reazioni dei processi descritti nel presente contesto possono essere eseguite in solventi adatti che possono essere facilmente scelti da un esperto della tecnica di 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.

15 **[0145]** 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 frazionaria utilizzando un “acido risolvente chirale” che è un acido organico formante sale otticamente attivo. Agenti risolventi adatti per i metodi di ricristallizzazione frazionaria sono, ad esempio, acidi otticamente attivi, come le forme D e L di
20 acido tartarico, acido diacetiltartarico, acido dibenzoiltartarico, acido mandelico, acido malico, acido lattico o i vari acidi canforsolfonici 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, dinitrobenzoilfenilglicina). Una composizione di solvente di eluizione adatta può essere determinata da un esperto della tecnica. Gli acidi nucleici
25 modificati non devono essere necessariamente modificati uniformemente lungo l’intera lunghezza


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

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 trovarsi in corrispondenza di qualsiasi posizione/i di un acido nucleico in modo tale che la funzione
5 dell'acido nucleico non sia sostanzialmente ridotta. Una modificazione può anche essere una modificazione del terminale 5' o 3'. Gli acidi nucleici descritti nel presente contesto 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
10 nucleotidi modificati o almeno il 90% di nucleotidi modificati. Ad esempio, gli acidi nucleici possono contenere una pirimidina modificata come uracile o citosina. Nell'invenzione, il 100% dell'uracile nell'acido nucleico viene sostituito con un uracile modificato, vale a dire utilizzando N1-metil-pseudouridina.

[0146] In alcune forme di realizzazione, almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 25%, almeno il
15 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 una singola struttura unica o può essere sostituita da una pluralità di composti aventi strutture differenti (ad esempio 2, 3, 4 o più strutture uniche).

[0147] In generale, la lunghezza più breve di un mRNA della presente descrizione può essere la
20 lunghezza della sequenza di mRNA che è sufficiente per codificare un dipeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare per un tripeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un tetrapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un pentapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la
25 lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un esapeptide. In un'altra forma


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

di realizzazione, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un eptapeptide.

In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un octapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un nonapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la

5 lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un decapeptide.

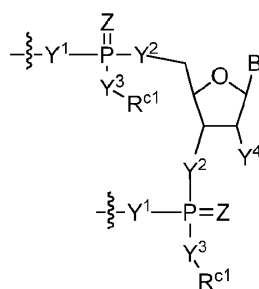
[0148] Esempi di dipeptidi per i quali le sequenze di acido nucleico modificato possono codificare includono, ma non sono limitati a, carnosina e anserina.

[0149] In un'ulteriore forma di realizzazione, l'mRNA ha una lunghezza maggiore di 30 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la molecola di RNA ha una lunghezza superiore a
10 35 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 40 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 45 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 55 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 60 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 60 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 80 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione,
15 la lunghezza è di almeno 90 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 100 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 120 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 140 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 160 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 180 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno
20 200 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 250 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 300 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 350 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 400 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 450 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 500 nucleotidi. In
25 un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 600 nucleotidi. In un'altra forma di


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

realizzazione, la lunghezza è di almeno 700 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 800 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 900 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1100 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1200 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1300 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1400 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1600 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1800 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 2000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 2500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 3000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 4000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 5000 nucleotidi, o maggiore di 5000 nucleotidi.

15 [0150] La presente descrizione si riferisce a metodi 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 cui la sequenza di acido nucleico comprende un composto di Formula I-d:



I-d

20 in cui:

Z è O o S;


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

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

ciascuno di Y^2 è indipendentemente scelto tra O, NR^a , S o un linker comprendente uno atomo scelto dal gruppo costituito da C, O, N e S;

ciascuno di Y^3 è indipendentemente scelto da O e S;

5 Y^4 è scelto tra H, $-OR^a$, $-SR^a$ e $-NHR^a$;

B è una base azotata;

R^a è H, alchile C_{1-20} , alchenile C_{2-20} , alchinile C_{2-20} o arile C_{6-20} ;

R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un controione; e

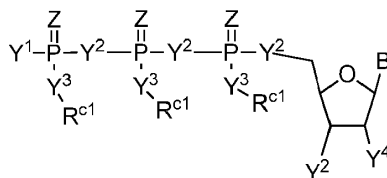
$-Y^3-R^{c1}$ è OH o SH a un pH di circa 1 o $-Y^3-R^{c1}$ è O^- o S^- a pH fisiologico;

10 oppure $-Y^3-R^{c1}$ è alcossi C_{1-20} , $-O$ -alchenile C_{2-20} oppure $-O$ -alchinile C_{1-20} ;

in cui quando B è una base azotata non modificata scelta tra citosina, guanina, uracile e adenina, allora almeno uno tra Z, Y^1 o Y^2 non è O o OH;

il metodo comprendendo:

far reagire un composto di Formula I-c:



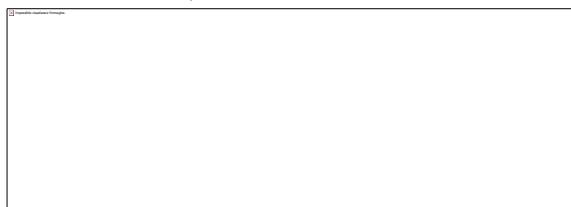
15

I-c

con una RNA polimerasi e uno stampo di cDNA.

[0151] In alcune forme di realizzazione, la reazione viene ripetuta da 1 a circa 7.000 volte.

[0152] In alcune forme di realizzazione, B è una base azotata di Formula II-a, II-b o II-c:



20 in cui:



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

indica un legame singolo o doppio;

X è O o S;

U e W sono ciascuno indipendentemente C o N;

V è O, S, C o N;

- 5 in cui quando V è C allora R¹ è H, alchile C₁₋₆, alchenile C₁₋₆, alchinile C₁₋₆, alogeno o -OR^c, in cui alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ sono ciascuno opzionalmente sostituito con -OH, -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 R¹ è assente;

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

- 10 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 opzionalmente sostituito con 1-4 sostituenti scelti tra alogeno, -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;

R⁴ è H o alchile C₁₋₂₀; in cui quando

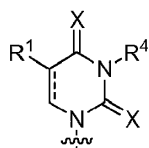
15

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

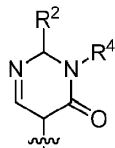
R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ o arile C₆₋₂₀; e

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

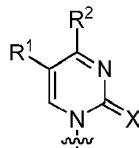
[0153] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



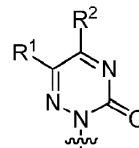
II-a1



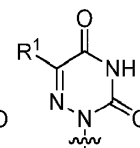
II-a2



II-a3



II-a4



II-a5.

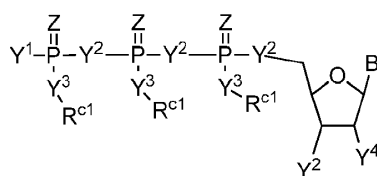
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0154] In alcuni casi, i metodi comprendono inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo costituito da adenosina, citosina, guanosina e uracile.

[0155] In alcuni casi, la base azotata è una pirimidina o un suo derivato.

[0156] In un ulteriore aspetto, la presente descrizione include 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:

far reagire un composto di Formula I-c:



I-c

Z è O o S;

10 ciascuno di Y¹ è indipendentemente scelto tra -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} e -SR^{a1};

ciascuno di Y² è indipendentemente scelto tra O, NR^a, S o un linker comprendente uno atomo scelto dal gruppo costituito da C, O, N e S;

ciascuno di Y³ è indipendentemente scelto da O e S;

Y⁴ è scelto tra H, -OR^a, -SR^a e -NHR^a;

15 B è una base azotata;

R^a è H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ o arile C₆₋₂₀;

R^{a1} e R^{b1} sono ciascuno indipendentemente H o un controione; e

-Y³-R^{c1} è OH o SH a un pH di circa 1 o -Y³-R^{c1} è O⁻ o S⁻ a pH fisiologico;

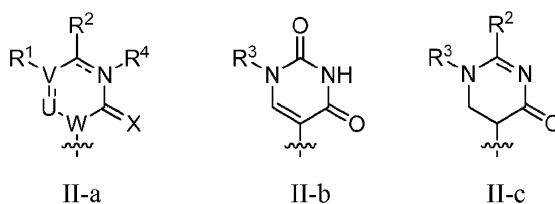
oppure -Y³-R^{c1} è alcossi C₁₋₂₀, -O-alchenile C₂₋₂₀ oppure -O-alchinile C₁₋₂₀;

20 in cui quando B è una base azotata non modificata scelta tra citosina, guanina, uracile e adenina, allora almeno uno tra Z, Y¹ o Y² non è O o OH;

con un primer, uno stampo di cDNA e una RNA polimerasi.

[0157] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula II-a, II-b o II-c:

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



in cui:

≡

indica un legame singolo o doppio;

- 5 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 R¹ è H, alchile C₁₋₆, alchenile C₁₋₆, alchinile C₁₋₆, alogeno o -OR^c, in cui alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ sono ciascuno opzionalmente sostituito con -OH,

- 10 -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 R¹ è assente;

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

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 opzionalmente sostituito con 1-4 sostituenti scelti tra alogeno,

- 15 -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;

 R⁴ è H o alchile C₁₋₂₀; in cui quando

≡

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

20

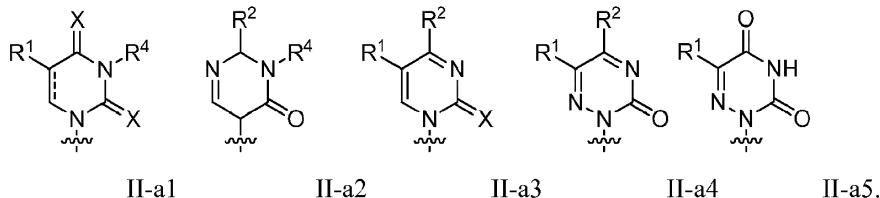
R^a e R^b sono ciascuno indipendentemente H, alchile C₁₋₂₀, alchenile C₂₋₂₀, alchinile C₂₋₂₀ o arile C₆₋₂₀; e

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

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

gruppo ammino-polietilenglicole.

[0158] In alcuni casi, B è una base azotata di Formula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



[0159] In alcune forme di realizzazione, i metodi comprendono inoltre un nucleotide selezionato dal gruppo costituito da adenosina, citosina, guanosina e uracile.

[0160] In alcune forme di realizzazione, la base azotata è una pirimidina o un suo derivato.

Usi di acidi nucleici modificati

Agenti terapeutici

[0161] L'mRNA modificato dell'invenzione e le proteine da esso tradotte possono essere utilizzati come agenti terapeutici. Ad esempio, un mRNA modificato dell'invenzione può essere somministrato a un soggetto, in cui l'acido nucleico modificato viene tradotto *in vivo* per produrre un peptide terapeutico nel soggetto. Di conseguenza, l'mRNA può essere utilizzato in composizioni, metodi, kit e reagenti per il trattamento o la prevenzione di una malattia o condizioni negli esseri umani e in altri mammiferi. Gli agenti terapeutici attivi della presente divulgazione descrizione includono mRNA modificato, cellule contenenti mRNA modificato o polipeptidi tradotti dall'mRNA modificato, polipeptidi tradotti da mRNA modificato e cellule a contatto con cellule contenenti mRNA modificato o polipeptidi tradotti dall'mRNA modificato.

[0162] Sono fornite terapie combinate contenenti uno o più mRNA modificati contenenti regioni traducibili che codificano per 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 mRNA 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

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

trastuzumab [Si veda, ad esempio, Albrecht, Immunotherapy. 2(6):795-8 (2010)]. L'mRNA dell'invenzione è utile nei metodi per indurre la traduzione di un polipeptide ricombinante in una popolazione cellulare. 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

5 contenente l'mRNA codificante per il polipeptide ricombinante. La messa a contatto della popolazione avviene in condizioni tali che l'mRNA sia localizzato in una o più cellule della popolazione cellulare e il polipeptide ricombinante sia tradotto nella cellula dall'acido nucleico.

[0163] 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 fisiche

10 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, più efficiente di una composizione contenente un corrispondente acido nucleico non modificato. Una maggiore efficienza può essere dimostrata dall'aumentata

15 trasfezione cellulare (cioè, la percentuale di cellule trasfettate con l'acido nucleico), dall'aumentata traduzione proteica dall'acido nucleico, dalla diminuita degradazione dell'acido nucleico (come dimostrato, ad esempio, dall'aumentata durata della traduzione proteica da un acido nucleico modificato), o dalla ridotta risposta immunitaria innata della cellula ospite.

[0164] Vengono anche descritti metodi per indurre la traduzione *in vivo* di un polipeptide ricombinante in un soggetto mammifero che ne ha bisogno. In essi, una quantità efficace di una

20 composizione contenente un acido nucleico che ha almeno una modifica nucleosidica e una regione traducibile codificante il polipeptide ricombinante viene somministrata al soggetto usando i metodi di rilascio qui descritti. L'acido nucleico viene fornito in una quantità e in altre condizioni tali che l'acido nucleico sia localizzato in una cellula del soggetto e il polipeptide ricombinante sia tradotto nella cellula dall'acido nucleico. La cellula in cui è localizzato l'acido

25 nucleico o il tessuto in cui è presente la cellula possono essere presi di mira con uno o più cicli di


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


somministrazione di acido nucleico.

[0165] Altri aspetti della presente descrizione riguardano il trapianto di cellule contenenti acidi nucleici modificati in un soggetto mammifero. La somministrazione di cellule a soggetti mammiferi è nota agli esperti della tecnica con competenza ordinaria, come l'impianto locale (ad esempio, somministrazione 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, intranasale, sottocutanea, endoscopica, transdermica o intratecale. In alcuni casi, la composizione è formulata per il rilascio prolungato.

[0166] Il soggetto a cui viene somministrato l'agente terapeutico è affetto da o rischia di sviluppare una malattia, un disturbo o una condizione deleteria.

[0167] L'acido nucleico modificato somministrato può dirigere 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.

[0168] In altri casi, 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 alla mutazione genetica del gene codificante o della sua via regolatoria. 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 alterazione dell'attività o della localizzazione. Inoltre, il polipeptide ricombinante antagonizza, direttamente o indirettamente, l'attività di una frazione biologica presente nella, sulla


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

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 basso peso molecolare.

[0169] Le proteine ricombinanti descritte nella presente sono ingegnerizzate per la localizzazione
5 all'interno della cellula, potenzialmente all'interno di un compartimento specifico come il nucleo, o sono ingegnerizzate per la secrezione dalla cellula o per la traslocazione alla membrana plasmatica della cellula.

[0170] Come descritto nel presente contesto, una caratteristica utile dell'mRNA modificato della presente invenzione è la capacità di ridurre la risposta immunitaria innata di una cellula a un acido
10 nucleico esogeno. Ciò consente di 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 che include una regione traducibile e almeno una modificazione nucleosidica, e viene determinato il livello della risposta immunitaria innata della cellula al primo acido
15 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 con una prima dose di un secondo acido nucleico esogeno. Il secondo acido nucleico esogeno può contenere uno o più nucleosidi modificati, che
20 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 messa a contatto della cellula con la prima composizione e/o la seconda composizione possono essere ripetute una o più volte. Inoltre, l'efficienza della produzione proteica (ad esempio, la traduzione proteica) nella cellula viene opzionalmente determinata e la cellula può essere nuovamente trasfettata
25 ripetutamente con la prima e/o la seconda composizione fino a raggiungere un'efficienza di


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

produzione di proteine bersaglio.

Terapie per malattie e condizioni

[0171] L'mRNA dell'invenzione come definito nelle rivendicazioni può essere utilizzato in 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.

[0172] 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. L'mRNA dell'invenzione come definito nelle rivendicazioni può essere utilizzato in un metodo per il trattamento di tali condizioni o malattie in un soggetto introducendo sostanze terapeutiche a base di acidi nucleici o cellule contenenti l'mRNA modificato qui fornito, in cui gli acidi nucleici modificati codificano una proteina che antagonizza o altrimenti risolve l'attività proteica aberrante presente nella cellula del soggetto. Esempi specifici di una proteina disfunzionale sono le varianti di mutazione missenso del gene del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che producono una variante proteica disfunzionale della proteina CFTR, che causa la fibrosi cistica.

[0173] Molteplici malattie sono caratterizzate dalla mancanza dell'attività proteica (o da un'attività sostanzialmente ridotta tale che non si verifica una corretta funzione proteica). Tali proteine potrebbero non essere presenti o sono essenzialmente non funzionali. L'mRNA dell'invenzione come definito nelle rivendicazioni può essere utilizzato in un metodo per il


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

trattamento di tali condizioni o malattie in un soggetto introducendo sostanze terapeutiche a base di cellule o mRNA contenenti l'mRNA, in cui l'mRNA codifica per una proteina che sostituisce l'attività proteica mancante dalle cellule bersaglio del soggetto. Esempi specifici di una proteina disfunzionale sono le varianti di mutazione senza senso del gene del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che producono una variante proteica non funzionale della proteina CFTR, che causa la fibrosi cistica.

5
[0174] Pertanto, metodi per trattare la fibrosi cistica in un soggetto mammifero possono includere la messa a contatto di una cellula del soggetto con mRNA 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 tessuto bersaglio; vale a dire, per il rilascio polmonare, le molecole di RNA vengono formulate per la somministrazione mediante inalazione.

10
[0175] Viene anche descritto un metodo per trattare l'iperlipidemia in un soggetto, introducendo in una popolazione cellulare del soggetto una molecola di mRNA modificato che codifica la Sortilina, una proteina recentemente caratterizzata 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 *lpl3* del gene *SORT1* che li predispone ad avere bassi livelli di lipoproteina a bassa densità (LDL) e lipoproteina a densità molto bassa (VLDL). Ciascuna copia dell'allele minore, presente in circa il 30% delle persone, modifica il colesterolo LDL di 8 mg/dL, mentre due copie dell'allele minore, presenti in circa il 5% della popolazione, abbassano 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 murino

25

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

ha portato a livelli di colesterolo LDL significativamente ridotti, fino all'80% in meno, e che silenziando SORT1 il colesterolo LDL è aumentato 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).

5 **Metodi di rilascio cellulare di acido nucleico**

[0176] I metodi descritti nel presente contesto potenziano il rilascio di acido nucleico in una 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 composto che aumenta l'efficienza della captazione di acido nucleico potenziato 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 alcune forme di realizzazione, è almeno circa del 50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200% o più del 200% maggiore della ritenzione 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.

20 [0177] 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, oppure l'acido nucleico potenziato viene rilasciato prima del rilascio dell'uno o più acidi nucleici aggiuntivi. Gli ulteriori 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
25 induce sostanzialmente una risposta immunitaria innata della popolazione cellulare e, inoltre, che


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

la risposta immunitaria innata non sarà attivata dalla successiva presenza degli acidi nucleici non modificati. A questo proposito, l'acido nucleico potenziato può non contenere di per sé una regione traducibile, se la proteina che si desidera sia presente nella popolazione di cellule bersaglio viene tradotta dagli acidi nucleici non modificati.

5 **Frazioni di bersagliamento**

[0178] In alcuni casi, 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, *in vivo* o *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 altre frazioni biologiche.

Silenziamento permanente dell'espressione genica

[0179] 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 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.

Composizioni farmaceutiche

[0180] Le proteine possono essere generate da mRNA modificati. Le composizioni farmaceutiche possono opzionalmente comprendere una o più sostanze terapeuticamente attive aggiuntive. Viene descritto un metodo per somministrare composizioni farmaceutiche comprendenti una o più proteine da rilasciare in 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 una proteina o a un complesso contenente proteine come qui descritto.


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

[0181] 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
5 modifica 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 modifica con la semplice sperimentazione ordinaria, se necessaria. I soggetti per i quali è contemplata la somministrazione delle composizioni farmaceutiche includono, tuttavia senza
10 limitazione, esseri umani e/o altri primati; mammiferi, inclusi mammiferi commercialmente rilevanti come bovini, suini, cavalli, pecore, gatti, cani, topi e/o ratti; e/o uccelli, inclusi uccelli commercialmente rilevanti come polli, anatre, oche e/o tacchini.

[0182] Le formulazioni delle composizioni farmaceutiche qui descritte possono essere preparate con qualsiasi metodo noto o di seguito sviluppato nella tecnica della farmacologia. In generale,
15 tali metodi preparatori includono la fase di portare il principio attivo in associazione con un eccipiente e/o uno o più altri ingredienti accessori e poi, se necessario e/o desiderabile, modellare e/o confezionare il prodotto in un'unità mono- o multidose.

[0183] Una composizione farmaceutica secondo la presente descrizione può essere preparata, confezionata e/o venduta sfusa, come una singola dose unitaria e/o come una pluralità di singole
20 dosi unitarie. Come utilizzato nella presente, una "monodose" 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 opportuna di tale dosaggio come, ad esempio, metà o un terzo di tale dosaggio.

25 [0184] Le quantità relative del principio attivo, dell'eccipiente farmaceuticamente accettabile e/o



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

di eventuali ingredienti aggiuntivi in una composizione farmaceutica in conformità con la presente descrizione varieranno, a seconda dell'identità, delle dimensioni e/o della condizione del soggetto trattato e ulteriormente a seconda della via attraverso la quale deve essere somministrata la composizione. A titolo di esempio, la composizione può comprendere tra lo 0,1% e il 100% (p/p) di principio attivo.

[0185] 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 tensioattivi, agenti isotonici, agenti addensanti o emulsionanti, conservanti, leganti solidi e lubrificanti e simili, adatti alla particolare forma di dosaggio desiderata. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21a edizione, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)

[0186] descrive vari eccipienti utilizzati nella formulazione di composizioni farmaceutiche e tecniche note per la loro preparazione. Salvo nella misura in cui 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 nella presente descrizione.

[0187] Un eccipiente farmaceuticamente accettabile può essere puro per almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99% o 100%. In alcuni casi, 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, un eccipiente soddisfa gli standard della Farmacopea statunitense (USP), della Farmacopea europea (EP), della Farmacopea britannica e/o della Farmacopea internazionale.



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

[0188] 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 opzionalmente essere inclusi in
5 formulazioni farmaceutiche. Nella composizione possono essere presenti, a giudizio del formulatore, eccipienti quali burro di cacao e cere per supposte, coloranti, agenti di rivestimento, edulcoranti, aromatizzanti e/o profumanti.

[0189] Diluenti esemplificativi includono, ma non sono limitati a, carbonato di calcio, carbonato di sodio, fosfato di calcio, fosfato dicalcico, solfato di calcio, calcio idrogeno fosfato, sodio
10 fosfato lattosio, saccarosio, cellulosa, cellulosa microcristallina, caolino, mannitolo, sorbitolo, inositolo, cloruro di sodio, amido secco, amido di mais, zucchero a velo, ecc., e/o loro combinazioni.

[0190] Agenti di granulazione e/o disperdenti esemplificativi includono, ma non sono limitati a, fecola di patate, amido di mais, amido di tapioca, sodio amido glicolato, argille, acido alginico,
15 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) reticolato (crospovidone), carbossimetilamido sodico (sodio amido glicolato), carbossimetilcellulosa, carbossimetilcellulosa sodica reticolata (croscarmellosa), metilcellulosa, amido pregelatinizzato (amido 1500), amido microcristallino, amido insolubile in acqua,
20 carbossimetilcellulosa di calcio, silicato di magnesio e alluminio (Veegum), sodio laurilsolfato, composti di ammonio quaternario, ecc., e/o loro combinazioni.

[0191] 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,
25 colesterolo, cera e lecitina), argille colloidali (ad esempio bentonite [silicato di alluminio] e


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

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
5 acrilico e polimero carbossivinilico), carragenina, derivati cellulosici (ad esempio carbossimetilcellulosa sodica, cellulosa in polvere, idrossimetilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, metilcellulosa), esteri di acidi grassi del sorbitano (ad esempio monolaurato di poliossietilene sorbitano [Tween®20], poliossietilene sorbitano [Tween®60], poliossietilene sorbitano monooleato [Tween®80], sorbitano monopalmitato [Span®40], sorbitano
10 monostearato [Span®60], sorbitano tristearato [Span®65], gliceril monooleato [Span®80]), esteri di poliossietilene (ad esempio monostearato di poliossietilene [Myrj®45], olio di ricino idrogenato poliossietilene, olio di ricino polietossilato, stearato di poliossimetilene e Solutol®), esteri di acidi grassi di saccarosio, esteri di acidi grassi di polietilenglicole (ad esempio Cremophor®), eteri di poliossietilene, (ad esempio poliossietilene lauril etere [Brij®30]), poli(vinil-pirrolidone),
15 dietilenglicole monolaurato, trietanolammina oleato, sodio oleato, potassio oleato, etil oleato, acido oleico, etil laurato, sodio laurilsolfato, Pluronic® F 68, Poloxamer® 188, bromuro di cetrimonio, cloruro di cetilpiridinio, cloruro di benzalconio, sodio docusato, ecc. e/o loro combinazioni.

[0192] Agenti leganti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, amido (ad esempio
20 amido di mais e pasta di amido); gelatina; zuccheri (ad esempio saccarosio, glucosio, 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,
25 poli(vinil-pirrolidone), silicato di magnesio-alluminio (Veegum®) e arabogalattano di larice);


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

alginati; ossido di polietilene; polietilenglicole; sali di calcio inorganici; acido silicico; polimetacrilati; cere; acqua; alcol; ecc.; e loro combinazioni.

[0193] Conservanti esemplificativi possono includere, ma non sono limitati a, antiossidanti, agenti chelanti, conservanti antimicrobici, conservanti antifungini, conservanti alcolici, 5 conservanti acidi e/o altri conservanti. Antiossidanti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, alfa tocoferolo, acido ascorbico, ascorbil palmitato, idossianisolo butilato, 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 10 monoidrato, disodio edetato, dipotassio edetato, acido edetico, acido fumarico, acido malico, acido fosforico, sodio edetato, acido tartarico e trisodio edetato. 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, esetidina, imidurea, fenolo, fenossietanolo, alcol 15 feniletilico, nitrato fenilmercurico, propilenglicole e/o thimerosal. Conservanti antifungini esemplificativi 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. Conservanti alcolici esemplificativi 20 includono, tuttavia senza limitazione, etanolo, polietilenglicole, fenolo, composti fenolici, bisfenolo, clorobutanolo, idrossibenzoato, e/o alcool feniletilico. Conservanti acidi esemplificativi includono, tuttavia senza limitazione, 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, tuttavia senza limitazioni, tocoferolo, tocoferolo acetato, 25 deterossima mesilato, cetrimide, idossianisolo butilato (BHA), idrossitoluene butilato (BHT), etilendiammina, sodio laurilsolfato (SLS), sodio laurileteresolfato (SLES), bisolfito di sodio,


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

metabisolfito di sodio, solfito di potassio, metabisolfito di potassio, Glydant Plus[®], Phenonip[®], metilparabene, Germall[®]115, Germaben[®]II, Neolone[™], Kathon[™] e/o Euxyl[®].

[0194] Agenti tamponanti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, soluzioni di tampone citrato, soluzioni di tampone acetato, soluzioni di tampone fosfato, cloruro di ammonio, carbonato di calcio, cloruro di calcio, citrato di calcio, glubionato di calcio, gluceptato di calcio, gluconato di calcio, acido d-gluconico, glicerofosfato di calcio, lattato di calcio, acido propanoico, levulinato di calcio, acido pentanoico, fosfato di calcio dibasico, acido fosforico, fosfato di calcio tribasico, idrossido di calcio 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, 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, ecc., e loro combinazioni.

[0195] Agenti lubrificanti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, magnesio stearato, calcio stearato, acido stearico, silice, talco, malto, gliceril beenato, oli vegetali idrogenati, polietilenglicole, sodio benzoato, sodio acetato, sodio cloruro, leucina, magnesio laurilsolfato, sodio laurilsolfato, ecc., e loro combinazioni.

[0196] Oli esemplificativi includono, ma non sono limitati a, olio di mandorla, nocciolo di albicocca, avocado, babassu, bergamotto, semi di ribes nero, borragine, cade, camomilla, canola, cumino, camauba, ricino, cannella, burro di cacao, cocco, fegato di merluzzo, caffè, mais, semi di cotone, emu, eucalipto, enotera, pesce, semi di lino, geraniolo, zucca, semi d'uva, nocciola, issopo, miristato isopropilico, jojoba, noce kukui, lavandino, lavanda, limone, litsea cubeba, noci di macademia, malva, semi di mango, semi di prato, visone, noce moscata, oliva, arancia, pesce specchio atlantico, palma, palmisti, nocciolo di pesca, arachidi, semi di papavero, semi di zucca, colza, crusca di riso, rosmarino, cartamo, legno di sandalo, sasquana, santoreggia, olivello spinoso,


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

sesamo, burro di karitè, silicone, soia, girasole, tea tree, cardo, tsubaki, vetiver, noce e germe di grano. Oli esemplificativi includono, ma non sono limitati a, butilsteurato, trigliceride caprilico, trigliceride caprico, ciclometicone, dietil sebacato, dimeticone 360, isopropil miristato, olio minerale, ottildodecanolo, alcol oleico, olio di silicone e/o loro combinazioni.

5 [0197] Le forme di dosaggio liquide per la somministrazione orale e parenterale includono, tuttavia senza limitazione, 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 solventi, agenti solubilizzanti ed emulsionanti quali alcol etilico, alcol isopropilico, etilcarbonato, 10 etilacetato, alcol benzilico, benzilbenzoato, propilenglicole, 1,3-butilenglicole, dimetilformammide, oli (in particolare oli di semi di cotone, di arachidi, di mais, di germe, di oliva, di ricino e di sesamo), glicerolo, alcol tetraidrofurfurilico, polietilenglicoli ed esteri di acido grasso di sorbitano e loro miscele. Oltre a diluenti inerti, le composizioni orali possono anche includere adiuvanti come agenti umettanti, agenti emulsionanti e sospensivanti, agenti edulcoranti, 15 aromatizzanti e/o agenti di profumazione. In determinate forme di realizzazione per la somministrazione parenterale, le composizioni vengono miscelate con agenti solubilizzanti come Cremophor[®], alcoli, oli, oli modificati, glicoli, polisorbati, ciclodestrine, polimeri e/o loro combinazioni.

[0198] Preparati iniettabili, ad esempio, sospensioni acquose o oleose iniettabili sterili, possono 20 essere formulati secondo la tecnica nota usando agenti disperdenti, agenti umettanti e/o agenti sospensivanti adatti. I preparati iniettabili sterili possono essere soluzioni, sospensioni e/o emulsioni iniettabili sterili in diluenti e/o solventi non tossici parenteralmente accettabili, ad esempio, come una soluzione in 1,3-butandiolo. Tra i veicoli e solventi accettabili che possono essere impiegati vi sono acqua, soluzione di Ringer, U.S.P. e soluzione isotonica di cloruro di 25 sodio. Oli fissi sterili sono tradizionalmente impiegati come solvente o mezzo di sospensione. A


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

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.

5 [0199] 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 composizioni solide sterili che possono essere disciolte o disperse in acqua sterile o altro mezzo iniettabile sterile prima dell'uso.

10 [0200] 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 depot iniettabili sono realizzate formando matrici microincapsulate del farmaco in polimeri 15 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.

20 [0201] 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 alla temperatura corporea e quindi si sciolgono nel retto o nella cavità vaginale e rilasciano il principio attivo.

25 [0202] Forme di dosaggio solide per la somministrazione orale includono capsule, compresse,


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

pillole, polveri e granuli. In tali forme di dosaggio solide, un principio attivo viene miscelato con almeno un eccipiente inerte farmaceuticamente accettabile come citrato di sodio o fosfato dicalcico e/o cariche o diluenti (ad esempio amidi, lattosio, saccarosio, glucosio, mannitolo e acido silicico), leganti (ad esempio carbossimetilcellulosa, alginati, gelatina, polivinilpirrolidinone, saccarosio e acacia), umettanti (ad esempio glicerolo), agenti disgreganti (ad esempio agar, carbonato di calcio, amido di patata o di tapioca, acido alginico, determinati silicati e carbonato di sodio), agenti ritardanti di soluzione (ad esempio paraffina), acceleratori di assorbimento (ad esempio composti di ammonio quaternario), agenti umettanti (ad esempio alcol cetilico e glicerolo monostearato), assorbenti (ad esempio caolino e argilla bentonite), e lubrificanti (ad esempio talco, stearato di calcio, stearato di magnesio, polietilenglicoli solidi, sodio laurilsolfato) e loro miscele. Nel caso di capsule, compresse e pillole, le forme di dosaggio possono comprendere agenti tamponanti.

[0203] 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.

[0204] Le forme di dosaggio per la somministrazione topica e/o transdermica di una composizione


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

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
5 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 adatto. In alternativa o in aggiunta, la velocità può essere controllata fornendo una membrana di controllo della velocità e/o disperdendo il composto una matrice e/o gel polimerica/o.

[0205] Dispositivi adatti per l'uso nel rilascio di composizioni farmaceutiche intradermiche qui
10 descritti includono dispositivi ad aghi corti come quelli descritti nei brevetti statunitensi 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 relativi equivalenti funzionali. Dispositivi di iniezione a getto che rilasciano
15 composizioni liquide nel derma tramite un iniettore a getto di liquido e/o tramite un ago che 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. 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 nelle
20 pubblicazioni 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.

[0206] Le formulazioni adatte per la somministrazione topica includono, tuttavia senza
25 limitazioni, preparazioni liquide e/o semiliquide come linimenti, lozioni, emulsioni olio in acqua


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

e/o acqua in olio come creme, unguenti e/o paste, e/o soluzioni e/o sospensioni. Le formulazioni somministrabili per via topica possono, ad 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 nella presente.

5 **[0207]** 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
10 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
15 comprendono particelle in cui almeno il 98% delle particelle in peso ha un diametro superiore a 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 superiore a 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
20 una forma di dose unitaria.

[0208] I propellenti a basso punto di ebollizione generalmente includono propellenti liquidi aventi un punto di ebollizione inferiore a circa 18 °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
25 ingredienti aggiuntivi come un tensioattivo non ionico liquido e/o anionico solido e/o un diluente


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

solido (che può avere una granulometria dello stesso ordine delle particelle che comprendono il principio attivo).

[0209] Le composizioni farmaceutiche formulate per il rilascio polmonare possono fornire un principio attivo sotto forma di goccioline di una soluzione e/o sospensione. Tali formulazioni
5 possono essere preparate, confezionate e/o vendute come soluzioni e/o sospensioni acquose e/o alcoliche diluite, 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 volatile,
10 un agente tamponante, un agente tensioattivo e/o un conservante come il metilidrossibenzoato. Le goccioline fornite con questa via di somministrazione possono avere un diametro medio nell'intervallo da circa 0,1 nm a circa 200 nm.

[0210] Le formulazioni descritte nella presente come utili per la somministrazione polmonare sono utili per la somministrazione intranasale di una composizione farmaceutica. Un'altra
15 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 assume il tabacco da fiuto, vale a dire mediante inalazione rapida attraverso il passaggio nasale da un contenitore della polvere tenuto vicino al naso.

[0211] Le formulazioni adatte per la somministrazione nasale possono, ad esempio, comprendere
20 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 con metodi tradizionali e possono [comprendere], ad esempio, dallo 0,1% al 20% (p/p) del
25 principio attivo, il resto comprendendo una composizione oralmente solubile e/o degradabile e,


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

opzionalmente, uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente. In alternativa, le formulazioni adatte per la somministrazione buccale possono comprendere una polvere e/o una soluzione e/o sospensione aerosolizzata e/o atomizzata comprendente il principio attivo. Tali formulazioni in polvere, aerosolizzate e/o aerosolizzate, quando disperse, possono avere una

5 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 nella presente.

[0212] 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

10 principio attivo allo 0,1/1,0% (p/p) in un eccipiente liquido acquoso o oleoso. Tali gocce possono inoltre comprendere agenti tamponanti, sali e/o uno o più eventuali ingredienti aggiuntivi descritti nella presente. Altre formulazioni somministrabili oftalmicamente che sono utili 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

15 descrizione.

[0213] Considerazioni generali nella formulazione e/o produzione di agenti farmaceutici si possono trovare, ad esempio, in Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21a edizione, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

[0214] Le proteine o i complessi di somministrazione secondo la presente descrizione possono

20 essere utilizzati in metodi che comprendono la somministrazione di proteine o complessi secondo la presente descrizione a un soggetto che ne ha bisogno. Le proteine o i complessi, o le loro composizioni farmaceutiche, di imaging, diagnostiche o profilattiche, possono essere somministrati a un soggetto utilizzando qualsiasi quantità e qualsiasi via di somministrazione efficace per prevenire, trattare, diagnosticare o visualizzare per immagini una malattia, un

25 disturbo e/o una condizione (ad esempio una malattia, un disturbo e/o una condizione relativa a



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

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 malattia, della specifica composizione, della sua modalità di somministrazione, della sua modalità di attività, e simili. Le composizioni 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. Lo specifico livello di dose terapeuticamente efficace, profilatticamente efficace, o di imaging appropriato per qualsiasi paziente specifico dipenderà da una varietà di fattori, incluso il disturbo trattato e la gravità del disturbo; l'attività del composto specifico impiegato; la composizione specifica impiegata; l'età, il peso corporeo, lo stato di salute generale, il sesso e l'alimentazione del paziente; il tempo di somministrazione, la via di somministrazione e la velocità di escrezione del composto specifico impiegato; la durata del trattamento; i farmaci utilizzati in associazione o contemporaneamente al composto specifico impiegato; e fattori simili ben noti nelle tecniche mediche.

15 **[0215]** Le proteine da rilasciare e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging possono essere somministrate ad animali, come mammiferi (ad esempio, esseri umani, animali domestici, gatti, cani, topi, ratti, ecc.). Le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging possono essere somministrate agli esseri umani.

20 **[0216]** Le proteine da rilasciare e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging secondo la possono essere somministrate mediante qualsiasi via. Le proteine e/o le loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging possono essere somministrate 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 esempio, con

25 polveri, unguenti, creme, gel, lozioni e/o gocce), mucosale, nasale, buccale, enterale, vitrea,


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

intratumorale, sublinguale; per instillazione intratracheale, instillazione bronchiale e/o 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 ematoencefalica, la barriera vascolare o altra barriera epiteliale.

10 [0217] Tuttavia, la presente descrizione riguarda il rilascio di proteine o complessi e/o loro composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging, attraverso qualsiasi via appropriata, tenendo in considerazione i probabili progressi nelle scienze del rilascio di farmaci.

[0218] In generale, la via di somministrazione più appropriata dipenderà da una varietà di fattori, inclusa la natura della proteina o del complesso comprendente le proteine associate ad almeno un agente da rilasciare (ad esempio, la sua stabilità nell'ambiente del tratto gastrointestinale, nel 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 riguarda il rilascio delle composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging mediante qualsiasi via appropriata prendendo in considerazione i probabili progressi nelle scienze del rilascio di farmaci.

20 [0219] 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 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
25 l'effetto terapeutico, diagnostico, profilattico o di imaging desiderato. Il dosaggio desiderato può


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

essere erogato 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 o ogni quattro settimane. Il dosaggio desiderato può essere erogato utilizzando molteplici somministrazioni (ad esempio, due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, quattordici o più
5 somministrazioni).

[0220] 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 intende implicare che gli agenti debbano essere somministrati contemporaneamente e/o formulati per essere rilasciati insieme, sebbene questi metodi di rilascio rientrino nell'ambito della presente
10 descrizione. Le composizioni possono essere somministrate contemporaneamente con, prima di o successive a una o più altre sostanze terapeutiche o procedure mediche desiderate. In generale, ciascun agente sarà somministrato a una dose e/o con uno schema temporale determinato per quell'agente. In alcuni casi, la presente descrizione comprende il rilascio di composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging in combinazione con agenti che
15 migliorano la loro biodisponibilità, riducono e/o modificano il loro metabolismo, ne inibiscono l'escrezione e/o ne modificano la distribuzione all'interno del corpo.

[0221] Si apprezzerà inoltre che gli agenti attivi dal punto di vista terapeutico, profilattico, diagnostico o di imaging utilizzati in combinazione possono essere somministrati insieme in un'unica composizione o somministrati separatamente in composizioni diverse. In generale, ci si
20 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.

[0222] La specifica combinazione di terapie (sostanze terapeutiche o procedure) da impiegare in un regime di combinazione terrà conto della compatibilità delle sostanze terapeutiche e/o delle
25 procedure desiderate e dell'effetto terapeutico desiderato da ottenere. Si comprenderà anche che


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

le terapie impiegate possono ottenere un effetto desiderato per lo stesso disturbo (ad esempio una composizione utile per il trattamento del cancro secondo la presente descrizione può essere somministrata contemporaneamente a un agente chemioterapico) o che possono ottenere effetti diversi (ad esempio il controllo di eventuali effetti negativi).

5 **Kit**

[0223] Viene descritta anche una varietà di kit per eseguire opportunamente e/o efficacemente i metodi della presente descrizione. Tipicamente i kit comprendono quantità e/o numeri di componenti sufficienti per consentire a un utente di eseguire molteplici trattamenti di uno o più soggetti e/o di eseguire molteplici esperimenti.

10 [0224] In un aspetto sono descritti kit per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile e una modificazione dell'acido nucleico, in cui l'acido nucleico è in grado di eludere una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto il primo acido nucleico isolato, e confezione e istruzioni.

15 [0225] In un aspetto vengono descritti 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 nucleico inibitorio, fornito in una quantità efficace per inibire sostanzialmente la risposta immunitaria innata della cellula; e confezione e istruzioni.

20 [0226] In un aspetto, vengono descritti 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 cellulare, e confezione e istruzioni.

25 [0227] In un aspetto, vengono descritti kit per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato comprendente una regione traducibile e almeno due diverse modificazioni


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


nucleosidiche, in cui l'acido nucleico mostra una degradazione ridotta mediante una nucleasi cellulare, e confezione e istruzioni.

[0228] In un aspetto, vengono descritti 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 mediante una nucleasi cellulare; un secondo acido nucleico comprendente un acido nucleico inibitorio; e confezione e istruzioni.

[0229] Il primo acido nucleico isolato può comprendere RNA messaggero (mRNA). L'mRNA può comprendere almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da ribonucleoside di piridin-
10 4-one, 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-taurinometil-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-
15 1-metil-1-deaza-pseudouridina, diidrouridina, diidropseudouridina, 2-tio-diidrouridina, 2-tio-diidropseudouridina, 2-metossiuridina, 2-metossi-4-tio-uridina, 4-metossi-pseudouridina e 4-metossi-2-tio-pseudouridina.

[0230] L'mRNA può comprendere almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da 5-azacitidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina,
20 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, zebularina, 5-azazebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metossi-citidina, 2-metossi-5-metil-citidina, 4-metossi-pseudoisocitidina e 4-metossi-1-metil-pseudoisocitidina.

25 [0231] L'mRNA può comprendere almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da 2-


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

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-
5 glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonil
carbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina e 2-metossi-
adenina.

[0232] L'mRNA può comprendere almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da inosina,
1-metil-inosina, wyosina, wybutosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-
10 guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-
metil-guanosina, 7-metilosina, 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 e N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

[0233] In un altro aspetto vengono descritte composizioni per la produzione di proteine,
15 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 regione traducibile del primo acido
nucleico. L'invenzione fornisce un mRNA in cui il 100% dei nucleotidi comprendenti uracile è
sostituito con nucleotidi comprendenti N1-metil-pseudouridina.

20 ESEMPI

Esempio 1. Trascrizione *in vitro* di mRNA modificato

Materiali e metodi

[0234] Gli mRNA modificati (modRNA) sono stati realizzati utilizzando metodi e materiali di
laboratorio standard per la trascrizione *in vitro*, con l'eccezione che la miscela di nucleotidi
25 conteneva nucleotidi modificati. La cornice di lettura aperta (ORF) del gene di interesse è


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

affiancata da una regione non tradotta (UTR) in 5' contenente un forte segnale di inizio di traduzione di Kozak e una 3'-UTR di alfa-globina che termina con una sequenza di oligo(dT) per aggiunta con stampo di una coda di poliA per modRNA che non incorporano analoghi dell'adenosina. I modRNA contenenti adenosina sono stati sintetizzati senza una sequenza di oligo (dT) per consentire il tailing della poli (A) polimerasi poli-(A) post-trascrizione. I modRNA sono stati modificati incorporando nucleotidi chimicamente modificati indicati nella Tabella 3 (sotto) durante la trascrizione in vitro con sostituzione del 100% del corrispondente nucleotide naturale o parziale sostituzione del corrispondente nucleotide naturale alla percentuale indicata.

[0235] La Tabella 3 indica l'identità chimica di ciascun nucleotide modificato chimicamente distinto incorporato in un mRNA modificato con il numero di designazione della composizione chimica dato.

Tabella 3

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>N. Comp. chimica</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>	<u>N. Comp. chimica</u>
6-aza-citidina	Comp. chimica 1	α -tio-citidina / 5-iodo-uridina	Comp. chimica 29
2-tio-citidina	Comp. chimica 2	α -tio-citidina / N1-metil-pseudo-uridina	Comp. chimica 30
α -tio-citidina	Comp. chimica 3	α -tio-citidina / α -tio-uridina	Comp. chimica 31
Pseudo-iso-citidina	Comp. chimica 4	α -tio-citidina / 5-metil-uridina	Comp. chimica 32
5-amminoallil-uridina	Comp. chimica 5	α -tio-citidina / pseudo-uridina	Comp. chimica 33
5-iodo-uridina	Comp. chimica 6	Pseudo-iso-citidina / 5-iodo-uridina	Comp. chimica 34
N1-metil-pseudouridina	Comp. chimica 7	Pseudo-iso-citidina / N1-metil-pseudo-uridina	Comp. chimica 35
5,6-diidrouridina	Comp. chimica 8	Pseudo-iso-citidina / α -tio-uridina	Comp. chimica 36
α -tio-uridina	Comp. chimica 9	Pseudo-iso-citidina / 5-metil-uridina	Comp. chimica 37
4-tio-uridina	Comp. chimica 10	Pseudo-iso-citidina / Pseudo-uridina	Comp. chimica 38


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

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>N. Comp. chimica</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>	<u>N. Comp. chimica</u>
6-aza-uridina	Comp. chimica 11	Pirrolo-citidina	Comp. chimica 39
5-idrossi-uridina	Comp. chimica 12	Pirrolo-citidina / 5-iodo-uridina	Comp. chimica 40
Desossi-timidina	Comp. chimica 13	Pirrolo-citidina / N1-metil-pseudo-uridina	Comp. chimica 41
Pseudo-uridina	Comp. chimica 14	Pirrolo-citidina / α -tio-uridina	Comp. chimica 42
Inosina	Comp. chimica 15	Pirrolo-citidina / 5-metil-uridina	Comp. chimica 43
α -tio-guanosina	Comp. chimica 16	Pirrolo-citidina/Pseudo-uridina	Comp. chimica 44
8-osso-guanosina	Comp. chimica 17	5-metil-citidina / 5-iodo-uridina	Comp. chimica 45
O6-metil-guanosina	Comp. chimica 18	5-metil-citidina / N1-metil-pseudo-uridina	Comp. chimica 46
7-deaza-guanosina	Comp. chimica 19	5-metil-citidina / α -tio-uridina	Comp. chimica 47
Nessuna modificazione	Comp. chimica 20	5-metil-citidina / 5-metil-uridina	Comp. chimica 48
N1-metil-adenosina	Comp. chimica 21	5-metil-citidina / Pseudo-uridina	Comp. chimica 49
2-ammino-6-Cloro-purina	Comp. chimica 22	5-metil-citidina	Comp. chimica 50
N6-metil-2-amminopurina	Comp. chimica 23	25% Pseudo-iso-citidina	Comp. chimica 51
6-Cloro-purina	Comp. chimica 24	25% N1-metil-pseudo-uridina	Comp. chimica 52
N6-metil-adenosina	Comp. chimica 25	25% N1-Metil-pseudo-uridina / 75%-pseudo-uridina	Comp. chimica 53
α -tio-adenosina	Comp. chimica 26	5-metil-uridina	Comp. chimica 54
8-azido-adenosina	Comp. chimica 27	5-iodo-citidina	Comp. chimica 55
7-deaza-adenosina	Comp. chimica 28		

[0236] Elettroforesi su gel di agarosio del modRNA: Singoli modRNA modificati (200-400 ng in un volume di 20 μ l) sono stati caricati in un pozzetto su un E-Gel di agarosio all'1,2% non denaturante (Invitrogen, Carlsbad, CA) ed eseguiti per 12-15 minuti secondo il protocollo del


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

5 produttore (Figura 1A). Le Tabelle 4 e 5 seguenti indicano il nucleotide modificato (Tabella 4) o l'acido nucleico (Tabella 5) caricato in ciascuna colonna. Questi dati indicano quali nucleotidi chimicamente modificati sono stati trascritti in mRNA modificati chimicamente e la qualità di ogni singolo modRNA. Questi dati dimostrano che i nucleotidi con modificazioni chimiche sul solco maggiore e sulla faccia del solco minore del nucleotide erano in grado di essere trascritti in un modRNA.

Tabella 4

Colonna	NTP modificato
1	α -tio-citidina
2	Pseudo-iso-citidina
3	5-amminoallil-uridina
4	5-iodo-uridina
5	N1-metil-pseudo-uridina
6	α -tio-uridina
7	4-tio-uridina
8	5-idrossi-uridina
9	Desossi-timidina
10	Pseudo-uridina
11	Inosina
12	α -tio-guanosina
13	8-osso-guanosina
14	N1-metil-guanosina
15	O6-metil-guanosina
16	Nessuna modificazione
17	N1-metil-adenosina
18	2-ammino-6-Cloro-purina
19	N6-metil-2-ammino-purina
20	6-Cloro-purina
21	α -tio-adenosina
22	8-azido-adenosina
23	7-deaza-adenosina
24	6-aza-citidina
25	2-tio-citidina
26	5,6-diidro-uridina
27	6-aza-uridina
28	7-deaza-guanosina
29	N6-metil-adenosina


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

Tabella 5

Colonna	Combinazione NTP modificati
1	α -tio-citidina / 5-iodo-uridina
2	α -tio-citidina / N1-metil-pseudouridina
3	α -tio-citidina / α -tio-uridina
4	α -tio-citidina / 5-metil-uridina
5	α -tio-citidina / pseudouridina
6	5-iodo-citidina / 5-iodo-uridina
7	5-iodo-citidina / N1-metil-pseudouridina
8	5-iodo-citidina / α -tio-uridina
9	5-iodo-citidina / 5-metil-uridina
10	5-iodo-citidina / pseudouridina
11	Pseudo-iso-citidina / 5-iodo-uridina
12	Pirrolo-citidina
13	Pirrolo-citidina / 5-iodo-uridina
14	Pirrolo-citidina/N1-metil-pseudouridina
15	Pirrolo-citidina / α -tio-uridina
16	Pirrolo-citidina / 5-metil-uridina
17	Pirrolo-citidina / pseudouridina
18	5-metil-citidina / 5-iodo-uridina
19	5-metil-citidina / N1-metil-uridina
20	5-metil-citidina / α -tio-uridina
21	5-metil-citidina / 5-metil-uridina
22	5-metil-citidina / pseudouridina
23	Pseudo-iso-citidina / N1-metil-pseudouridina
24	Pseudo-iso-citidina / α -tio-uridina
25	Pseudo-iso-citidina / 5-metil-uridina
26	Pseudo-iso-citidina / pseudouridina
27	5-metil-citidina
28	25% pseudo-iso-citidina
29	25% N1-metil-pseudouridina
30	25% N1-metil-pseudouridina / 75% pseudouridina

[0237] Elettroforesi su gel di agarosio di prodotti di RT-PCR: I singoli prodotti di PCR con trascrizione inversa (200-400 ng) sono stati caricati in un pozzetto di un E-Gel di agarosio all'1,2% non denaturante (Invitrogen, Carlsbad, CA) e sottoposti a ciclo per 12-15 minuti secondo il protocollo del produttore (Figura 1B). La Tabella 5 di seguito indica il nucleotide modificato


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

caricato in ciascuna colonna.

[0238] Quantificazione del modRNA Nanodrop e dati spettrali UV: i modRNA nel tampone TE (1 μ l) sono stati utilizzati per le letture dell'assorbanza UV Nanodrop per quantificare la resa di ciascun modRNA da una reazione di trascrizione *in vitro* (le tracce di assorbanza UV sono mostrate nelle Figure 6A-6L). Questi dati indicano quali nucleotidi chimicamente modificati sono stati trascritti in mRNA chimicamente modificati. Anche questi dati dimostrano che i nucleotidi con modificazioni chimiche sul solco maggiore e sulla faccia del solco minore del nucleotide erano in grado di essere trascritti in un modRNA. Questi dati dimostrano inoltre che i nucleotidi della presente invenzione sono competenti per la trascrizione e compatibili con l'incorporazione in un modRNA, che può avere spettri UV alterati a causa della presenza di un dato nucleotide modificato. Ad esempio, i modRNA contenenti Pirrolo-C hanno un aumento dell'assorbanza UV a una lunghezza d'onda inferiore a causa della presenza dell'anello pirrolo del nucleotide C modificato. In un altro esempio, i modRNA contenenti nucleotide 2-ammino-adenina hanno un aumento dell'assorbanza dei raggi UV a una lunghezza d'onda maggiore a causa della presenza di un'ammina esociclica fuori dall'anello di purina. I nucleotidi che non sono competenti per la trascrizione e non possono essere incorporati in un modRNA hanno uno spettro UV mescolato che indica l'assenza di prodotto dalla reazione di trascrizione.

Esempio 2. Trasfezione di RNA modificato


[0239] Trasfezione inversa: Per gli esperimenti eseguiti in una piastra di coltura tissutale rivestita con collagene a 24 pozzetti, i cheratinociti sono stati seminati a una densità cellulare di 1×10^5 . Per gli esperimenti eseguiti in una piastra di coltura tissutale rivestita con collagene a 96 pozzetti, i cheratinociti sono stati seminati a una densità cellulare di $0,5 \times 10^5$. Per ciascun modRNA da trasfettare, modRNA: RNAiMAX è stato preparato come descritto e miscelato con le cellule nella piastra multi-pozzetto entro un periodo di tempo, ad esempio 6 ore, dalla semina cellulare prima che le cellule aderiscano alla piastra di coltura tissutale.


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

[0240] Trasfezione diretta: In una piastra di coltura tissutale rivestita con collagene a 24 pozzetti, i cheratinociti sono stati seminati a una densità cellulare di $0,7 \times 10^5$. Per gli esperimenti eseguiti in una piastra di coltura tissutale rivestita con collagene a 96 pozzetti, i cheratinociti sono stati seminati a una densità cellulare di $0,3 \times 10^5$. I cheratinociti sono stati poi fatti crescere fino a una
5 confluenza di $>70\%$ per oltre 24 ore. Per ciascun modRNA da trasfettare, modRNA: RNAiMAX è stato preparato come descritto e trasfettato sulle cellule nella piastra multi-pozzetto oltre 24 ore dopo la semina cellulare e l'adesione alla piastra di coltura tissutale.

Screening di traduzione di modRNA: ELISA di G-CSF

[0241] Le Figure 2A e 2B mostrano un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il
10 fattore stimolante le colonie di granulociti umani (hu-G-CSF) di cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro*. I cheratinociti sono stati fatti crescere in terreno EpiLife con Supplemento S7 di Invitrogen a una confluenza di $>70\%$. Nella Figura 2A i cheratinociti sono stati sottoposti a trasfezione inversa con 300 ng dell'mRNA modificato chimicamente indicato complessato con RNAiMAX di Invitrogen. Nella Figura 2B i cheratinociti sono stati sottoposti a trasfezione diretta
15 con 300 ng di modRNA complessato con RNAiMAX di Invitrogen. Il complesso di RNA:RNAiMAX è stato formato incubando innanzitutto l'RNA con terreni EpiLife senza supplemento in una diluizione volumetrica 5X per 10 minuti a temperatura ambiente. In una seconda fiala, il reagente RNAiMAX viene incubato con terreni EpiLife senza supplemento in una diluizione volumetrica 10X per 10 minuti a temperatura ambiente. La fiala di RNA è stata
20 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 terreno di coltura è stata misurata a 18 ore dalla 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 è stata quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen o R&D
25 Systems (Minneapolis, MN) seguendo le istruzioni consigliate dai produttori. Questi dati


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

mostrano che i modRNA di huG-CSF sono costituiti da analoghi nucleotidici chimicamente
distinti (SEQ ID NO: 2) è in grado di essere tradotto in cellule di cheratinociti umani e che huG-
CSF viene trasportato fuori dalle cellule e rilasciato nell'ambiente extracellulare. Questi dati
indicano quali nucleotidi modificati sono stati tradotti in proteine quando incorporati in un mRNA
5 modificato chimicamente. Questi dati mostrano che l'RNA modificato contenente nucleotidi con
modificazioni chimiche sulla faccia del solco maggiore degli analoghi di pirimidina ha i livelli
più alti di hu-G-CSF secreto nel terreno di coltura cellulare.

Dose di modRNA e durata: ELISA di G-CSF

[0242] Le Figure 3A-N mostrano un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il
10 fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) di cellule di cheratinociti umani
trasfettate *in vitro*. I cheratinociti sono stati fatti crescere in terreno EpiLife con Supplemento S7
di Invitrogen a una confluenza di >70%. I cheratinociti sono stati sottoposti a trasfezione inversa
con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375ng, 750 ng o 1500 ng di modRNA complessato con
RNAiMAX di Invitrogen. Il complesso modRNA:RNAiMAX è stato formato come descritto. La
15 concentrazione di huG-CSF secreto nel mezzo di coltura è stata misurata a 0, 6, 12, 24 e 48 ore
dala trasfezione per ciascuna concentrazione di ciascun modRNA in triplicato. La secrezione del
fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) dai cheratinociti umani trasfettati è
stata quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen o R&D Systems seguendo le istruzioni
consigliate dai produttori. Questi dati mostrano che i modRNA di huG-CSF sono costituiti da
20 analoghi nucleotidici chimicamente distinti (SEQ ID NO: X e Tabella 6) hanno secreto la proteina
hu-G-CSF in modo dipendente dalla dose di modRNA dalle cellule di cheratinociti umani e che
l'huG-CSF viene trasportato fuori dalle cellule e rilasciato nell'ambiente extracellulare. Questi dati
indicano quali RNA modificati contenenti analoghi nucleotidici modificati sostengono
l'espressione di hu-G-CSF per i livelli più lunghi e più elevati. Questi dati mostrano che l'RNA
25 modificato contenente nucleotidi modificati con modificazioni chimiche sulla faccia del solco


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

maggiore degli analoghi di pirimidina ha i livelli più alti di hu-G-CSF secreto nel terreno di coltura cellulare e che 750 ng di modRNA stimolano i più elevati livelli di hu-G-CSF secreto.

Esempio 3. Risposta immunitaria innata cellulare a modRNA

ELISA di IFN- β ed ELISA di TNF- α :

5 [0243] Le Figure 4A-F mostrano un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il
fattore di necrosi tumorale umano- α (TNF- α) (Figure 4A e 4B); interferone- β umano (IFN- β)
(Figure 4C e 4D); e fattore stimolante le colonie di granulociti umano (G-CSF) (Figure 4E e 4F)
secreti da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro*. I cheratinociti sono stati fatti crescere
in terreno EpiLife con supplemento di crescita di cheratinociti umani in assenza di idrocortisone
10 da Invitrogen a una confluenza di >70%. Nelle Figure 4A e 4B, i cheratinociti sono stati sottoposti
a trasfezione inversa con 0 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1500 ng o 3000 ng dell'mRNA
chimicamente modificato indicato complessato con RNAiMAX di Invitrogen come descritto in
triplicato. Il TNF- α secreto nel terreno di coltura è stato misurato 24 ore dopo la trasfezione per
ciascuno degli mRNA chimicamente modificati utilizzando un kit ELISA di Invitrogen secondo
15 i protocolli del produttore.

[0244] Nelle Figure 4C e 4D, l'IFN- β secreto nello stesso terreno di coltura è stato misurato 24
ore dopo la trasfezione per ciascuno degli mRNA chimicamente modificati utilizzando un kit
ELISA di Invitrogen secondo i protocolli del produttore. Nelle Figure 4E e 4F, la concentrazione
di hu-G-CSF secreto nello stesso terreno di coltura è stata misurata a 24 ore dalla trasfezione per
20 ciascuno degli mRNA chimicamente modificati. La secrezione del fattore stimolante le colonie
di granulociti umani (G-CSF) dai cheratinociti umani trasfettati è stata quantificata utilizzando un
kit ELISA di Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) seguendo le istruzioni consigliate
dai produttori. Questi dati indicano quali RNA modificati contenenti nucleotidi modificati erano
in grado di suscitare una risposta immunitaria innata cellulare ridotta rispetto ai nucleotidi naturali
25 e ad altri nucleotidi modificati chimicamente misurando citochine di tipo I TNF- α e IFN- β


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

esemplificative. Questi dati mostrano che gli RNA modificati contenenti nucleotidi modificati con modificazioni chimiche sulla faccia del solco maggiore degli analoghi di pirimidina hanno i livelli più bassi di TNF- α e IFN- β secreti nel terreno di coltura cellulare pur mantenendo alti livelli di secrezione di hu-G-CSF codificante modRNA nel terreno di coltura cellulare.

5 **Esempio 4. Saggio di proliferazione cellulare indotta da RNA modificato con fattore stimolante le colonie dei granulociti umano**

[0245] Le Figure 5A-D mostrano che hu-G-CSF codificante modRNA prodotto da uno strato cellulare alimentatore di cheratinociti umani ha indotto la proliferazione sia di cellule mieloblasti umani KG-1 sia Kasumi-1 che esprimono il recettore per G-CSF in cui le popolazioni cellulari
10 sono separate da una membrana semipermeabile.

[0246] I cheratinociti umani sono stati coltivati in terreno 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 sono stati sottoposti a trasfezione inversa con 750 ng dell'mRNA modificato chimicamente indicato complessato con RNAiMAX
15 di Invitrogen come descritto in triplicato. Il complesso modRNA:RNAiMAX è stato formato come descritto. Il terreno di cheratinociti è stato 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 è stato posto nella piastra di coltura contenente cheratinociti trasfettati con modRNA con hu-G-CSF. La Figura 5A è una tabella che mostra i risultati di un
20 saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il G-CSF umano secreto da cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* campionate da singoli pozzetti in una piastra di coltura tissutale da 24 pozzetti di co-coltura 42 ore dopo la trasfezione con 750 ng di ciascun modRNA codificante hu-G-CSF indicato.

[0247] Cellule mieloblasti umani, cellule Kasumi-1 (Figura 5C) o KG-1 (Figura 5D) ($0,2 \times 10^5$
25 cellule) sono state seminate nel pozzetto dell'insero e la proliferazione cellulare è stata


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

quantificata 42 ore dopo l'inizio della co-coltura utilizzando il saggio di proliferazione cellulare CyQuant Direct (Invitrogen) in un volume di 100-120 µl in una piastra da 96 pozzetti. La proliferazione di cellule mieloblasti indotta da hu-G-CSF codificante modRNA è stata espressa come percentuale di proliferazione cellulare normalizzata rispetto a pozzetti di controllo di co-coltura di cheratinociti/mieloblasti non trasfettati. La concentrazione di hu-G-CSF secreto nei pozzetti di co-coltura dell'inserito di cheratinociti e mieloblasti è stata misurata a 42 ore dall'inizio della co-coltura per ciascun modRNA in duplicato. La secrezione del fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) è stata quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen seguendo le istruzioni consigliate dai produttori.

10 **[0248]** Il modRNA di hu-G-CSF trasfettato in cellule alimentatrici di cheratinociti umani e cellule mieloblasti umani non trasfettate è stato rilevato mediante RT-PCR. L'RNA totale dalle cellule campione è stato estratto e lisato utilizzando il kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) secondo le istruzioni del produttore. L'RNA totale estratto è stato sottoposto a RT-PCR per l'amplificazione specifica del modRNA-G-CSF utilizzando il kit per *Taq* RT-PCR ProtoScript® M-MuLV (New England BioLabs, Ipswich, MA) secondo le istruzioni del produttore con primer specifici per hu-G-CSF (si veda di seguito). I prodotti della RT-PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% (Figura 5B). La Tabella 6 di seguito mostra quali modRNA sono stati sottoposti a ciclo sul gel di agarosio.

Tabella 6

<u>Colonna</u>	<u>Tipo di cellula</u>	<u>Bersaglio modRNA di hu-G-CSF RT-PCR</u>
1	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Veicolo
2	Alimentatore di cheratinociti KG-1	RNA scramble
3	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Nessuna modificazione
4	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Comp. chimica 7
5	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Comp. chimica 6


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

6	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Comp. chimica 37
7	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Veicolo
8	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	RNA scramble
9	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Nessuna modificazione
10	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Comp. chimica 7
11	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Comp. chimica 6
12	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Comp. chimica 37
13	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Comp. chimica 46
14	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Comp. chimica 48
15	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Comp. chimica 49
16	Alimentatore di cheratinociti KG-1	Comp. chimica 53
17	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Comp. chimica 46
18	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Comp. chimica 48
19	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Comp. chimica 49
20	Alimentatore di cheratinociti Kasumi-1	Comp. chimica 53
21	Kasumi-1	Veicolo
22	KG-1	Veicolo
23	Kasumi-1	Veicolo
24	Kasumi-1	RNA scramble
25	Kasumi-1	Nessuna modificazione
26	Kasumi-1	Comp. chimica 7
27	Kasumi-1	Comp. chimica 6
28	Kasumi-1	Comp. chimica 37
29	Kasumi-1	Comp. chimica 46
30	Kasumi-1	Comp. chimica 48
31	Kasumi-1	Comp. chimica 49
32	Kasumi-1	Comp. chimica 53
33	KG-1	Veicolo
34	KG-1	RNA scramble
35	KG-1	Nessuna modificazione
36	KG-1	Comp. chimica 7


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

37	Vuoto	Vuoto
38	Vuoto	Vuoto
39	Vuoto	Vuoto
40	Vuoto	Vuoto
41	Vuoto	Vuoto
42	Vuoto	Vuoto
43	Vuoto	Vuoto
44	Vuoto	Vuoto

[0249] Questi dati mostrano che le cellule di cheratinociti umani contenenti modRNA di hu-G-CSF costituiti da analoghi nucleotidici chimicamente distinti hanno secreto la proteina hu-G-CSF e che l'hu-G-CSF secreto era fisiologicamente attivo nell'indurre la proliferazione delle cellule mieloblasti umani che esprimono il recettore di G-CSF. Questi dati mostrano anche che la proteina hu-G-CSF secreta era permeabile attraverso una membrana semipermeabile e agiva su una diversa popolazione cellulare non produttrice G-CSF. Inoltre, questi dati mostrano che il modRNA di hu-G-CSF trasfettato in cellule di cheratinociti umani in un ambiente di co-coltura era presente solo nelle cellule di cheratinociti trasfettate e non nelle cellule di mieloblasti non trasfettate. Inoltre, questi dati mostrano che la composizione chimica del nucleotide modificato del modRNA di hu-G-CSF non ha influenzato l'attività proteica risultante.

Esempio 5. L'effetto del modRNA sulla vitalità cellulare

Citotossicità e apoptosi:

[0250] Questo esperimento dimostra la vitalità cellulare, la citotossicità e l'apoptosi per distinte cellule di cheratinociti umani trasfettate *in vitro* con modRNA. I cheratinociti sono stati fatti crescere in terreno EpiLife con supplemento di crescita di cheratinociti umani in assenza di idrocortisone da Invitrogen a una confluenza di >70%. I cheratinociti sono sottoposti a trasfezione inversa con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1500 ng, 3000 ng o 6000 ng di modRNA complessato con RNAiMAX di Invitrogen. Il complesso modRNA:RNAiMAX viene formato. La concentrazione di huG-CSF secreto nel mezzo di coltura viene misurata a 0, 6, 12, 24 e 48 ore dalla trasfezione per ciascuna concentrazione di ciascun modRNA in triplicato. La secrezione del fattore stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) dai cheratinociti umani


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

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 dalla trasfezione utilizzando il kit ApoToxGlo di Promega (Madison, WI) secondo le istruzioni del produttore.

5 **Esempio 6. Co-coltura**

[0251] 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 per la trasfezione in un ambiente di co-coltura. La co-coltura include un tipo cellulare altamente trasfettabile come un cheratinocita umano e un tipo cellulare incompetente per la 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 simil-paracrino per stimolare i globuli bianchi che esprimono il recettore G-CSF a proliferare. La popolazione leucocitaria ampliata può essere utilizzata per trattare pazienti immunocompromessi o ricostituire parzialmente la popolazione leucocitaria di un paziente immunosoppresso e quindi ridurre il rischio di infezioni opportunistiche.

[0252] Un altro esempio, una cellula altamente trasfettabile come un fibroblasto può essere trasfettata con determinati fattori di crescita per supportare e simulare la crescita, il mantenimento o la differenziazione di cellule staminali embrionali scarsamente trasfettabili o cellule staminali pluripotenti indotte.

Esempio 7. Capping di 5'-Guanosina su acidi nucleici modificati (modRNA)


[0253] La clonazione, la sintesi genica e il sequenziamento del vettore sono stati eseguiti mediante DNA2.0 Inc. (Menlo Park, CA). La sequenza e la sequenza di inserimento sono espresse nel presente contesto. La ORF è stata digerita per restrizione utilizzando XbaI e utilizzata per la sintesi


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

del cDNA utilizzando la PCR con o senza coda. Il prodotto cDNA della PCR con coda è stato utilizzato come stampo per la reazione di sintesi dell'mRNA modificato utilizzando miscela da 25 mM di ciascun nucleotide modificato (tutti i nucleotidi modificati sono 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 di sintesi dell'mRNA completo CellScript MegaScript™ (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). La reazione di trascrizione *in vitro* è stata eseguita per 4 ore a 37 °C. I modRNA che incorporano analoghi dell'adenosina sono con coda di poli (A) usando la poli(A) polimerasi di lievito (Affymetrix, Santa Clara, CA). La reazione PCR ha utilizzato HiFi PCR 2X Master Mix™ (Kapa Biosystems, Woburn, MA). I modRNA sono stati dotati di cap post-trascrizionalmente utilizzando l'enzima di capping del virus vaccinicco 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 3 possono essere generate utilizzando 2'-O-metiltransferasi aggiuntive. Il prodotto dell'mRNA trascritto *in vitro* è stato sottoposto a ciclo su un gel di agarosio e visualizzato. Il modRNA è stato purificato con il kit di purificazione MEGAClear RNA™ di Ambion/Applied Biosystems (Austin, TX). La PCR ha utilizzato il kit di purificazione PCR PureLink™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Il prodotto è stato quantificato su Nanodrop™ UV Absorbance (ThermoFisher, Waltham, MA). La qualità, la qualità dell'assorbanza UV e la visualizzazione del prodotto sono state eseguite su un gel di agarosio all'1,2%. Il prodotto è stato risospeso in tampone TE.

Struttura dell'acido nucleico modificato (mRNA) con capping in 5':

[0254] Il capping del modRNA in 5' può essere completato in concomitanza durante la reazione di trascrizione *in vitro* utilizzando i seguenti analoghi chimici del cap di RNA per generare la struttura cap di guanosina in 5' secondo i protocolli del produttore: 3'-0-Me-m⁷G(5')ppp(5')G;


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

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 capping di modRNA in 5' può essere completato post-trascrizionalmente utilizzando un enzima di capping del virus vaccinico per generare la struttura "Cap 0": m⁷G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La struttura di Cap 1 può essere generata
5 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 Cap 2 può essere generata dalla struttura Cap 1 seguita dalla 2'-O-metilazione del terzultimo nucleotide 5' utilizzando una 2'-O metil-transferasi. La struttura Cap 3 può essere generata dalla struttura Cap 2 seguita dalla 2'-O-metilazione del preterzultimo nucleotide 5' usando una 2'-O metil-transferasi. Gli enzimi sono preferibilmente
10 derivati da una fonte ricombinante.


Sequenze:

[0255]

cDNA di G-CSF:

agcttttgaccctcgtacagaagctaatacgaactcactatagggaaataagagagaaaagaagagtaagaagaatataagag
ccaccatggccgggtcccgcgacccaaagcccatgaaacttatggccctgcagttgctgctttggcactcggccctctggacagtccaaga
agcgactcctcctggacctgcctcatcgttgcgcagtcattcctttgaaagtctcggagcaggtgcgaaagattcagggcgatggagccg
cactccaagagaagctctgcgcgacatacaaaacttgccatcccaggagctcgtactgctcgggcacagcttggggattccctgggctcc
tctcctcctgctccgtcgcaggcttgcagttggcaggggtcctttccagctccactccggtttgttctgtatcagggactgctgcaagccc
ttgagggaaatcctgccagaattgggcccgcgctggacacggtgcactcgcagctggcggatttcgcaacaaccatctggcagcagatgg
aggaactggggatggcaccgcgctgcagcccacgcagggggcaatgccggcctttgcgtccgcgttcagcgcagggcgggtggagt
cctcgtagcagaccctcaatcattttggaagtctcgtaccgggtgctgagacatcttgcgcagccgtgaagcgtcctctgcggggg
ttgcttctggccatgcccttctctccttgcacctgtaccttggctttgaataaagcctgagtaggaaggcggccgctcgagcatgca
15 tctagagggcccaattcgcctattcgaagtcg (SEQ ID NO: 1)

mRNA di G CSF:


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

agcuuuuggaccucguacagaagcuaauacgacucacuaauagggaauaagagagaaaagaagaguaagaagaaau
auaagagccaccauggccgguccgcgacccaaaagcccaugaacuuauaggccucgaguugcugcuuuggcacucggcccu
cuggacaguccaagaagcgacuccucugcgaccucgcucaucguugccgagucacuuuuuagaugucuggagcaggug
cgaaagauucagggcgauaggagccgcacuccaagagaagcucugcgcgacauacaacuuugccaucgccgaggagcucguacu
gcucgggacagcuuggggauucccugggucuccucucgucuccugcgcagggcuuugcaguuggcaggguccuuuc
ccagcuccacuccgguuuuguuucguauacagggacugcugcaagcccuugagggaucucgccagaauugggcccgcgcug
gacacguugcagcucgacguggcggaauucgcaacaaccaucuggcagcagauaggaggaacuggggauggcaccgcgcugc
agcccacgcagggggcaaugccggccuuugcugccgcuuucagcgcagggcggguggaguccucguagcagccaccuuca
aucauuuuuggaagucucguaccgggucgagacacuuugcgcagccgugaagcgcugccuucugcggggcuugccuuuc
ggccaugcccuucucuccuugcaccuguaaccuugguuuuagaauaaagccugaguagggaagggcgccgcucgagca
ugcaucuaagaggcccaauucgcccauucgaagucg (SEQ ID NO: 2)

Proteina G-CSF:

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI
QGDGAALQEKLVSECATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHS
GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPA
FASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP (SEQ ID NO: 3)

Primer di sintesi del cDNA:

5 Primer diretto: 5'- TTG GAC CCT CGT ACA GAA GCT AAT ACG (SEQ ID NO: 4)


Primer inverso per il tailing di poli (A) stampo: 5'- T₍₁₂₀₎CT TCC TAC TCA GGC TTT
ATT CAA AGA CCA (SEQ ID NO: 5)

Primer inverso per il tailing poli (A) polimerasi post-trascrizionale: 5'- CTT CCT ACT
CAG GCT TTA TTC AAA GAC CA (SEQ ID NO: 6)

10 **Primer di RT-PCR di modRNA di G-CSF:**

Primer diretto: 5'- TGG CCG GTC CCG CGA CCC AA (SEQ ID NO: 7)

Primer inverso: 5'- GCT TCA CGG CTG CGC AAG AT (SEQ ID NO: 8)


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

ELENCO DELLE SEQUENZE

[0256]

<110> SCHRUM, JASON

<120> NUCLEOSIDI, NUCLEOTIDI E ACIDI NUCLEICI MODIFICATI E LORO
5 USI

<130> M2107-7008WO

<140> PCT/US2011/054617

<141> 03/10/2011

<150> 61/404,413

10 <151> 01/10/2010

<160> 8

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 852

15 <212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione di sequenza artificiale: Polinucleotide sintetico

<400> 1


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

agcttttggg ccctcgtaca gaagctaata cgactcacta tagggaaata agagagaaaa 60
gaagagtaag aagaaatata agagccacca tggccggtcc cgcgacccaa agcccatga 120
aacttatggc cctgcagttg ctgctttggc actcggccct ctggacagtc caagaagcga 180
ctcctctcgg acctgcctca tcgttgccgc agtcattcct tttgaagtgt ctggagcagg 240
tgcgaaagat tcagggcgat ggagccgcac tccaagagaa gctctgcgag acatacaaac 300
tttgccatcc cgaggagctc gtactgctcg ggcacagctt ggggattccc tgggctcctc 360
tctcgtcctg tccgtcgcag gctttgcagt tggcagggtg cctttcccag ctccactccg 420
gtttgttctt gtatcagggg ctgctgcaag cccttgaggg aatctcgcca gaattgggcc 480
cgacgctgga cacgttgcaag ctgcagctgg cggatttcgc aacaaccatc tggcagcaga 540
tggaggaact ggggatggca cccgcgctgc agcccacgca gggggcaatg ccggcctttg 600
cgtcgcgctt tcagcgcagg gcgggtggag tctcgtagc gagccacctt caatcatttt 660
tggaggtctc gtaccgggtg ctgagacatc ttgcgagcc gtgaagcgt gccttctgag 720
gggcttgctt tctggccatg cccttcttct ctcccttgca cctgtacctc ttggtctttg 780
aataaagcct gagtaggaag gcggccgctc gagcatgcat ctgaggggcc caattcgccc 840
tattcgaagt cg 852

<210> 2

<211> 852

<212> RNA

5

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione di sequenza artificiale: Polinucleotide sintetico

<400> 2


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

agcuuuugga cccucguaca gaagcuaaua cgacucacua uagggaaaua agagagaaaa 60
gaagaguaag aagaaauaua agagccacca uggccggucc cgcgacccaa agccccauga 120
aacuuauugc ccugcaguug cugcuuuggc acucggcccu cuggacaguc caagaagcga 180
cuccucucgg accugccuca ucguugccgc agucauuccu uuugaagugu cuggagcagg 240
ugcgaaagau ucagggcgau ggagccgcac uccaagagaa gcucugcgcg acauacaaac 300
uuugccaucc cgaggagcuc guacugcucg ggcacagcuu ggggauuccc ugggcuccuc 360
ucucguccug uccgucgcag gcuuugcagu uggcagggug ccuuucccag cuccacuccg 420
guuuguucu guaucagga cugcugcaag cccuugaggg aaucucgcca gaaauuggcc 480
cgacgcugga cacguugcag cucgacgugg cggauuucgc aacaaccauc uggcagcaga 540
uggaggaacu ggggauuggca cccgcgcugc agcccacgca gggggcaaug ccggccuuug 600
cguccgcguu ucagcgcagg gcggguggag uccucguagc gagccaccuu caaucauuu 660
uggaagucuc guaccgggug cugagacauc uugcgcagcc gugaagcgcu gccuucugcg 720
ggcuuugccu ucuggccaug cccuucuucu cucccuugca ccuguaccuc uuggucuuug 780
aauaaagccu gaguaggaag gcggccgcuc gagcaugcau cuagagggcc caauucgcc 840
uauucgaagu cg 852

<210> 3

<211> 207

<212> PRT

5 <213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione di sequenza artificiale: Polipeptide sintetico

<400> 3

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
1 5 10 15
Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro
20 25 30
Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
35 40 45
Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
50 55 60


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

Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
65 70 75 80

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
85 90 95

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
100 105 110

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
115 120 125

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
130 135 140

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
145 150 155 160

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
165 170 175

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
180 185 190

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
195 200 205

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

5 <213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Descrizione di sequenza artificiale: Primer sintetico

<400> 4

ttgacccctc gtacagaagc taatagc 27

10 <210> 5

<211> 149

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale


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

<220>
<223> Descrizione di sequenza artificiale: Primer sintetico
<400> 5
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120
5 ctcctactc aggtttatt caagacca 149
<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
10 <220>
<223> Descrizione di sequenza artificiale: Primer sintetico
<400> 6
ctcctactc aggtttatt caagacca 29
<210> 7
15 <211> 20
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> Descrizione di sequenza artificiale: Primer sintetico
20 <400> 7
tggccgtcc cgcacccaa 20
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
25 <213> Sequenza artificiale



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

<220>

<223> Descrizione di sequenza artificiale: Primer sintetico

<400> 8

gcttcacggc tgcgcaagat 20


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

Rivendicazioni

1. Metodo di sintesi di un mRNA, comprendente le fasi di:

- a) fornire un acido desossiribonucleico complementare (cDNA) che codifica per una proteina di interesse;
- b) selezionare un nucleotide che è noto per il fatto di interrompere il legame di un partner di legame del solco maggiore con un acido nucleico, in cui il nucleotide ha ridotta affinità di legame con il partner di legame del solco maggiore;
- c) mettere a contatto il cDNA fornito e il nucleotide selezionato con una RNA polimerasi in condizioni tali che l'mRNA venga sintetizzato,

in cui il nucleotide comprende N1-metil-pseudouridina, e

in cui il 100% dei nucleotidi comprendenti uracile nell'RNA viene sostituito con nucleotidi comprendenti N1-metil-pseudouridina.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il partner di legame del solco maggiore è scelto dal gruppo costituito da recettore Toll-like (TLR) 3, TLR7, TLR8, gene I inducibile per l'acido retinoico (RIG-I), gene 5 associato alla differenziazione del melanoma (MDA5) e laboratorio di genetica e fisiologia 2 (LGP2).

3. mRNA in cui il 100% dei nucleotidi comprendenti uracile nell'mRNA viene sostituito con nucleotidi comprendenti N1-metil-pseudouridina.


4. mRNA secondo la rivendicazione 3, in cui l'mRNA ha una lunghezza di almeno 300 nucleotidi.

5. mRNA secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3 o 4 comprendente una coda di poliA.

6. mRNA secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3-5, in cui il partner di legame del solco maggiore è RIG-I, MDA5 o LGP2.

7. mRNA secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3-5, in cui il partner di legame del solco maggiore è TLR3, TLR7 o TLR8.

* * * *


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

Seguono n° 31 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 28 luglio 2022

In Fede,


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


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

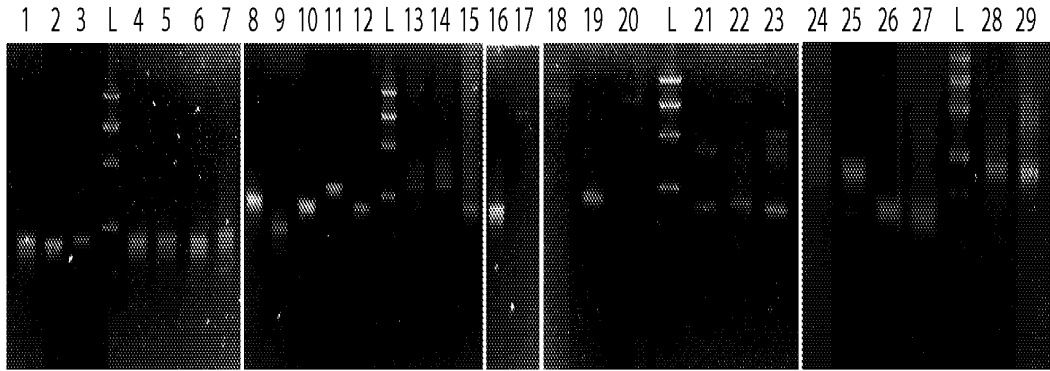


Fig. 1A

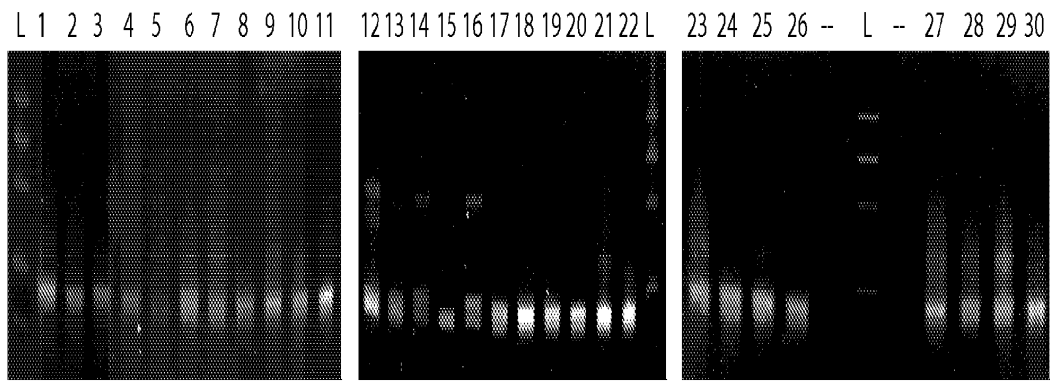


Fig. 1B

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

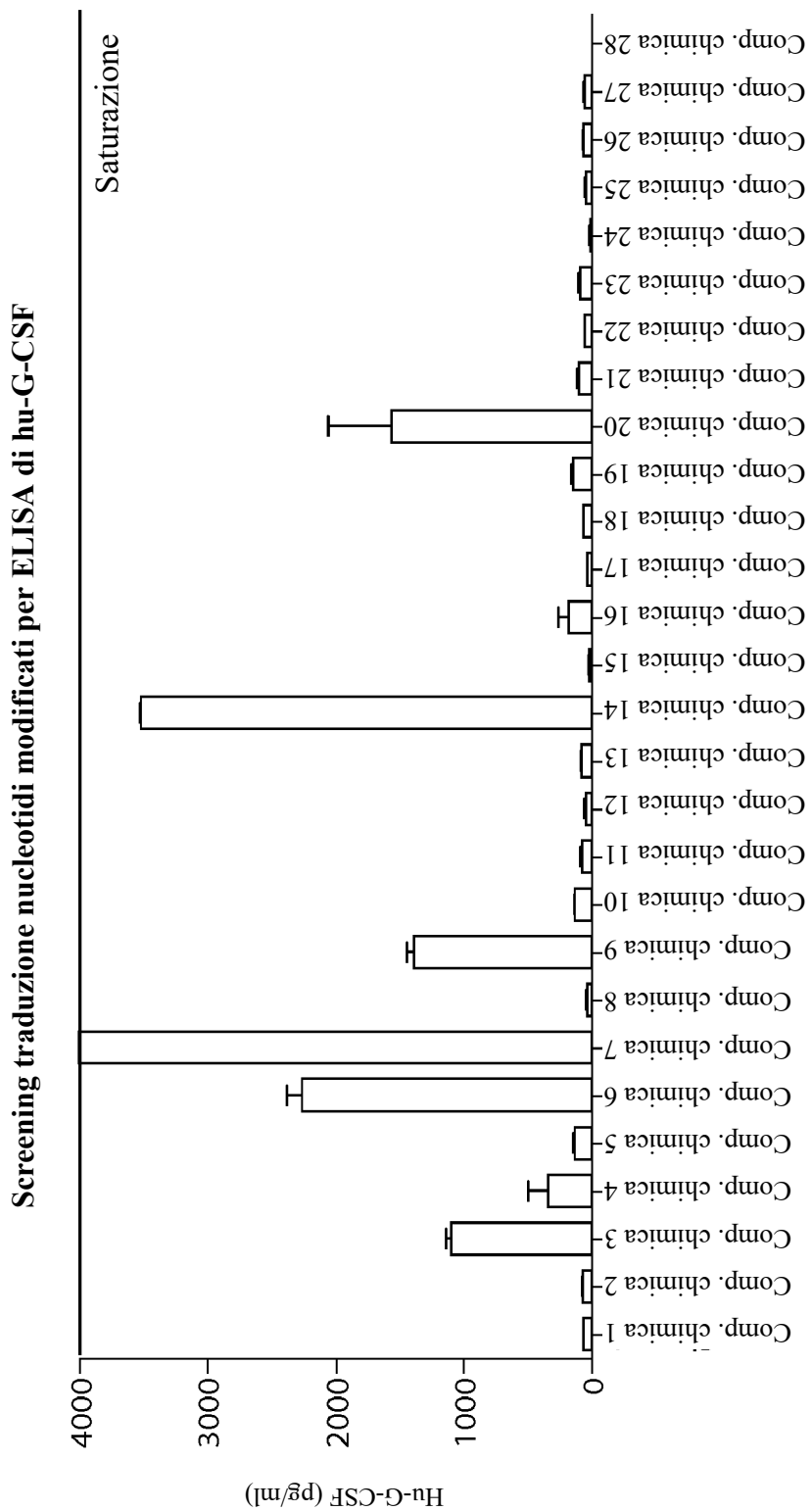


Fig. 2A

Ing. *[Signature]* Sangiacomo
Consulente in F.I. n° USBM-041R

Screen traduzione combinazione nucleotidi modificati per ELISA di hu-G-CSF

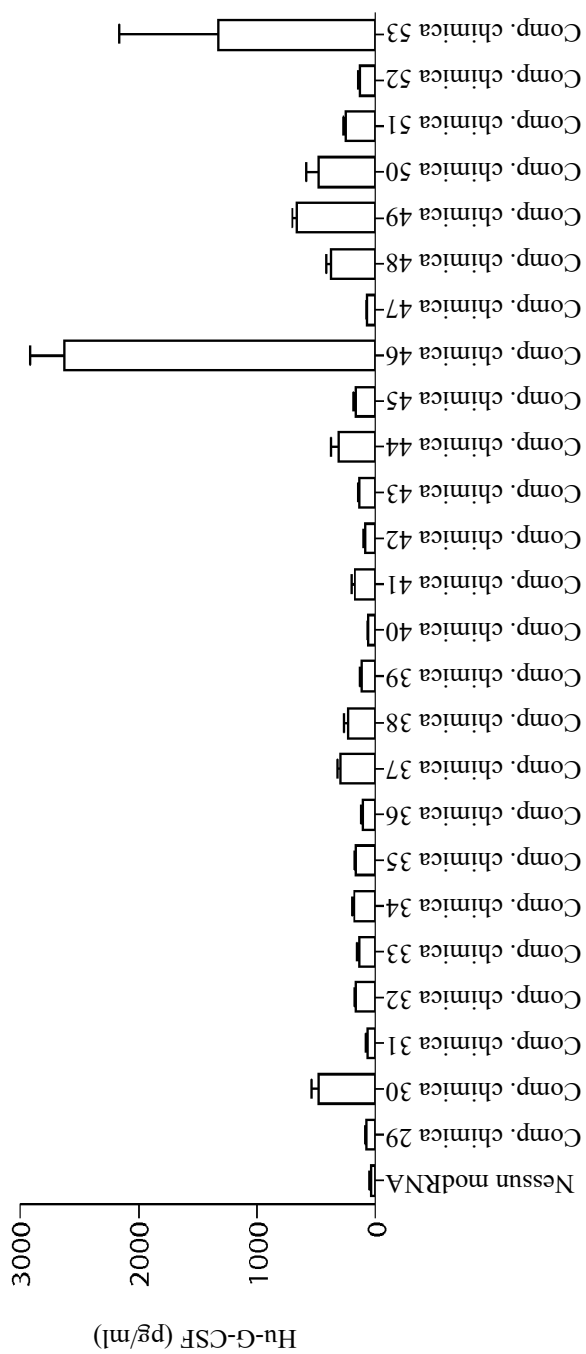


Fig. 2B

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

Comp. chimica 3

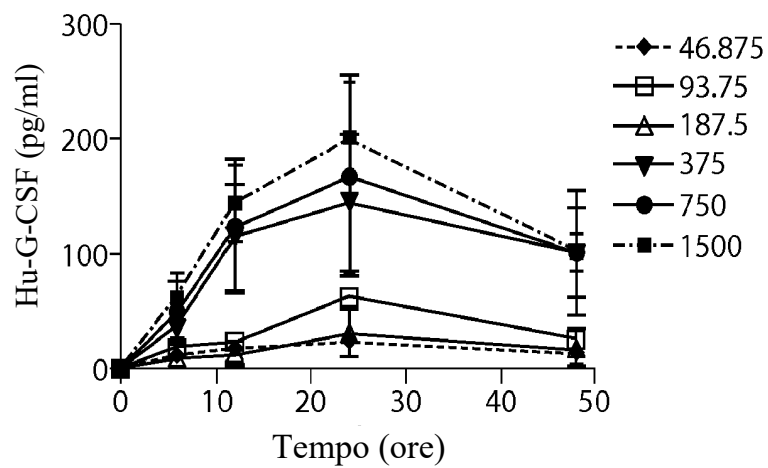


Fig. 3A

Comp. chimica 4

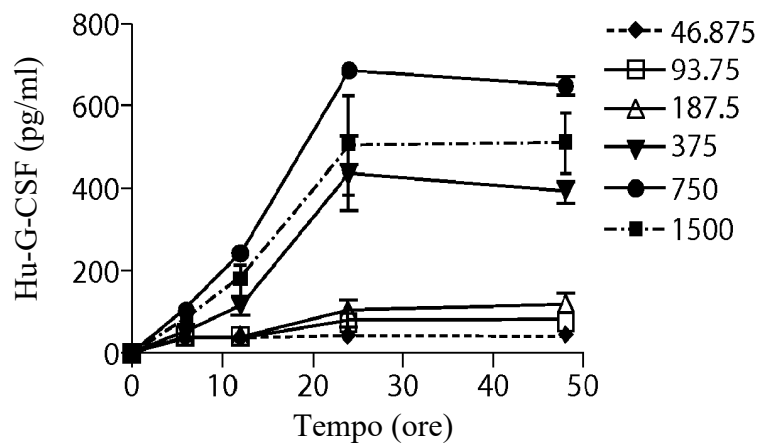


Fig. 3B

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

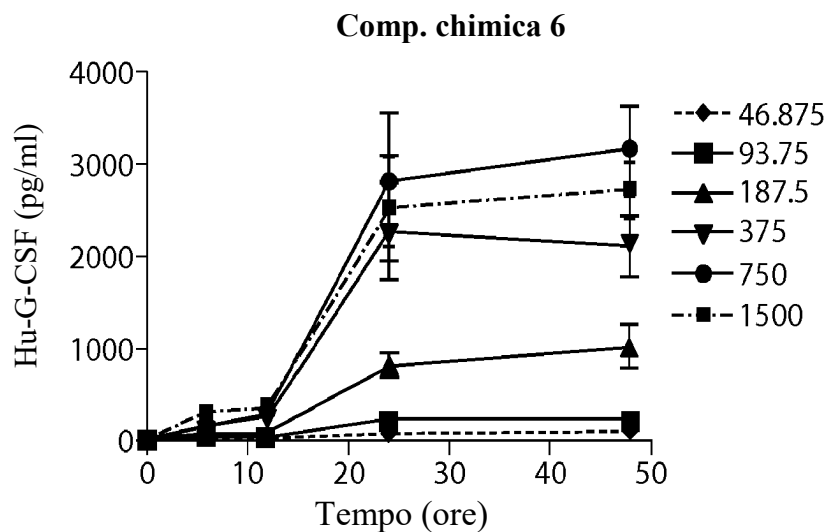


Fig. 3C

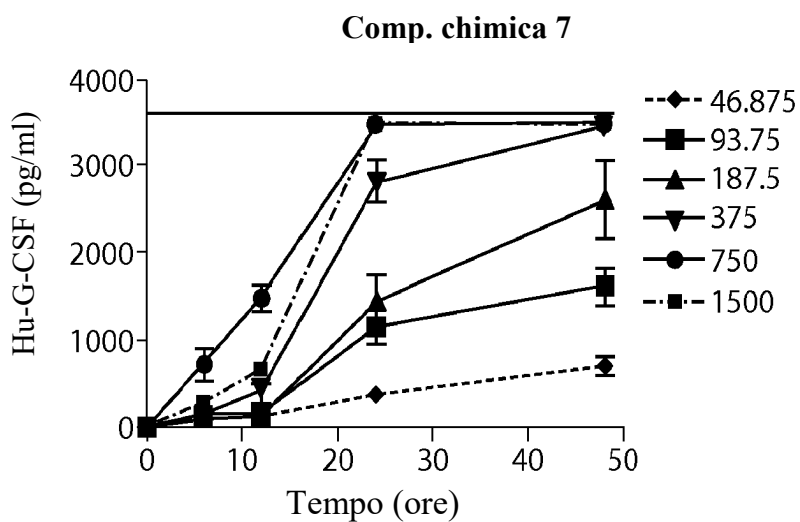


Fig. 3D

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

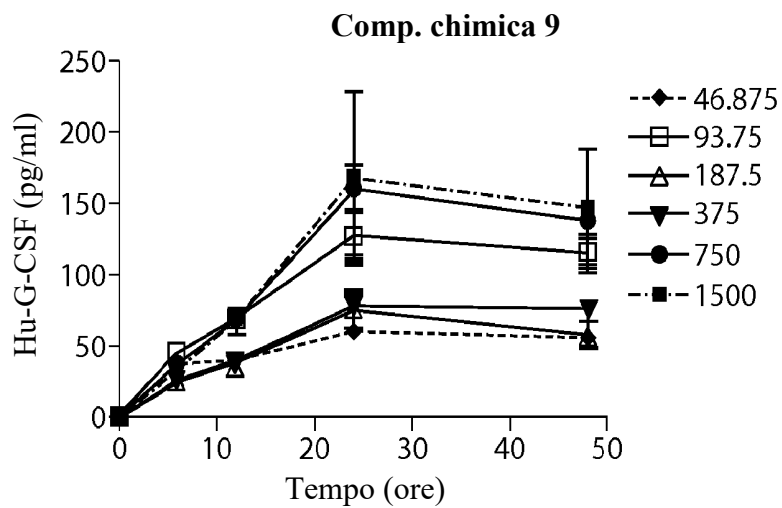


Fig. 3E

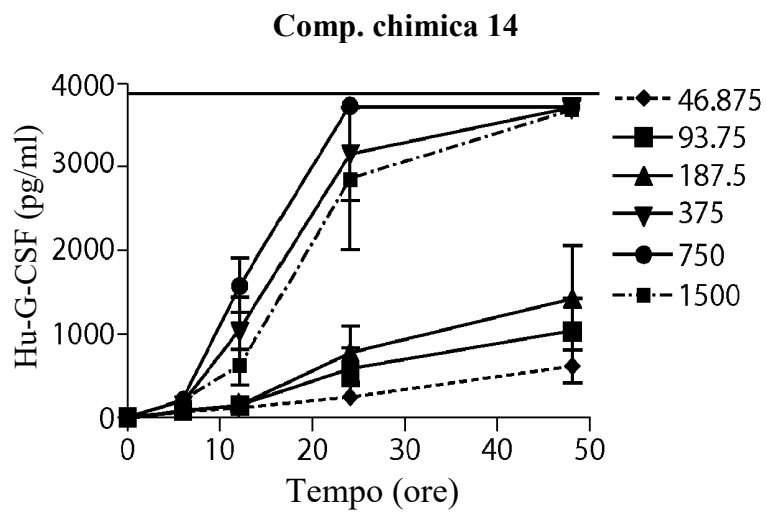


Fig. 3F


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

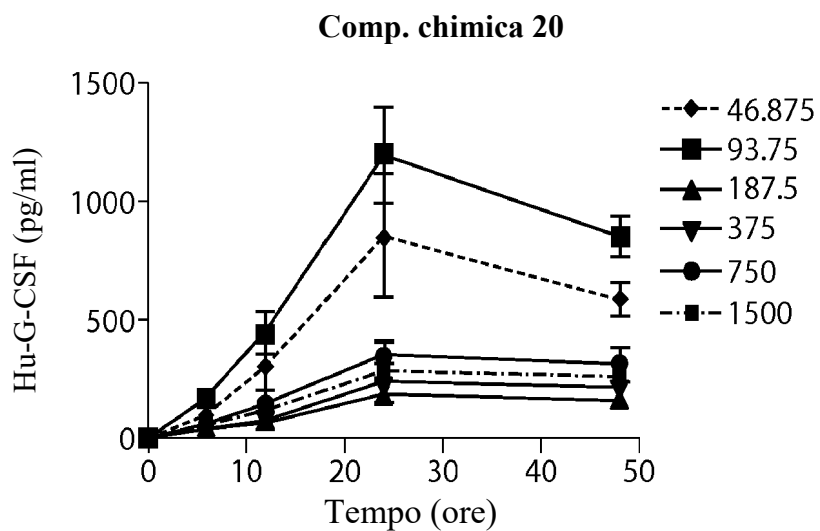


Fig. 3G

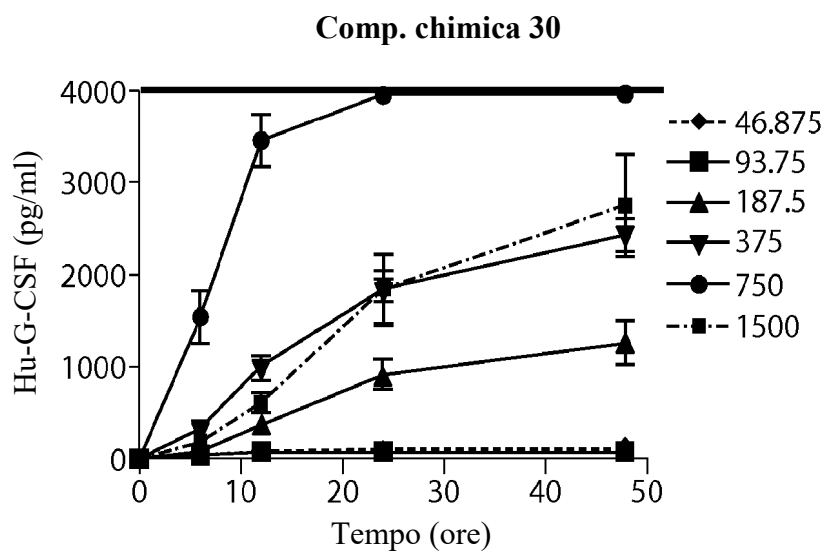


Fig. 3H


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

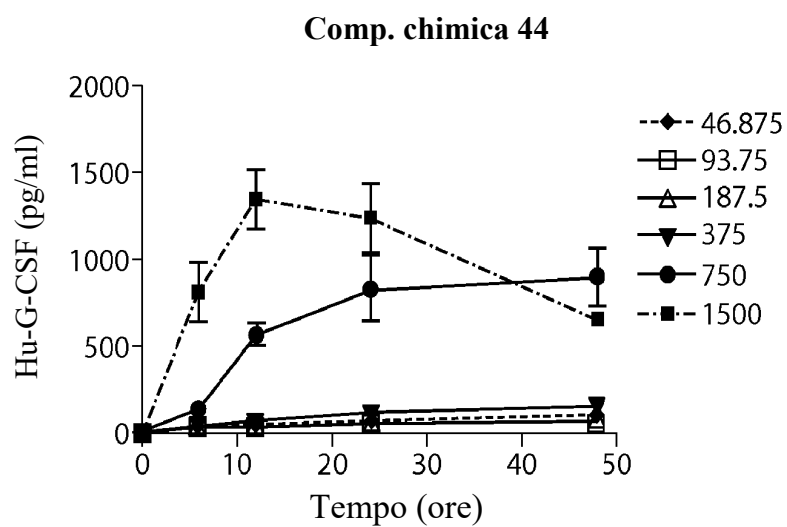


Fig. 3I

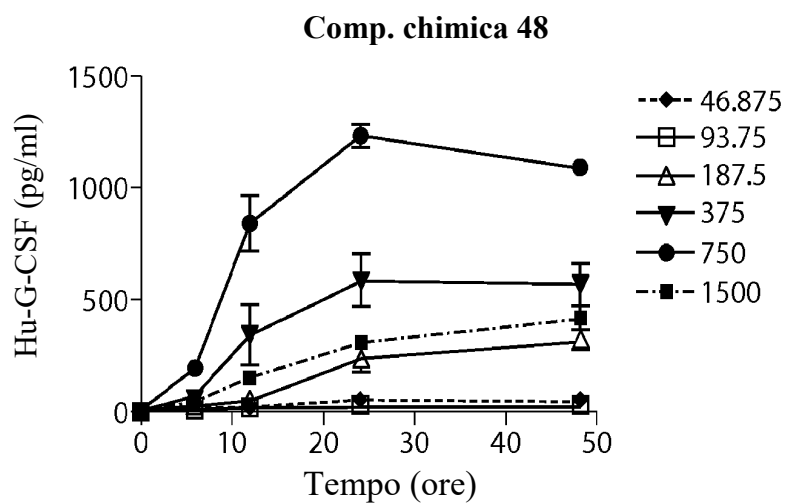


Fig. 3J

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

Comp. chimica 49

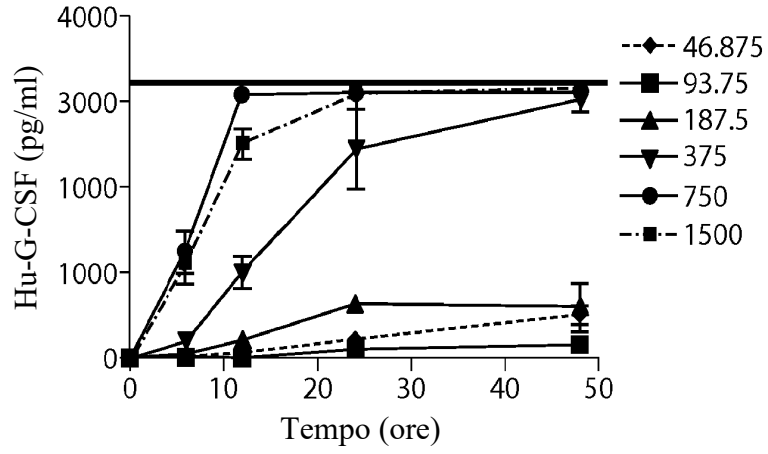


Fig. 3K

Comp. chimica 50

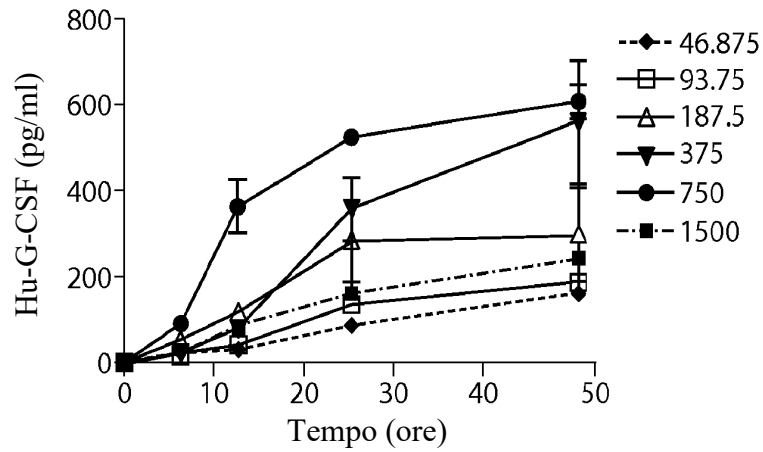


Fig. 3L

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

Comp. chimica 54

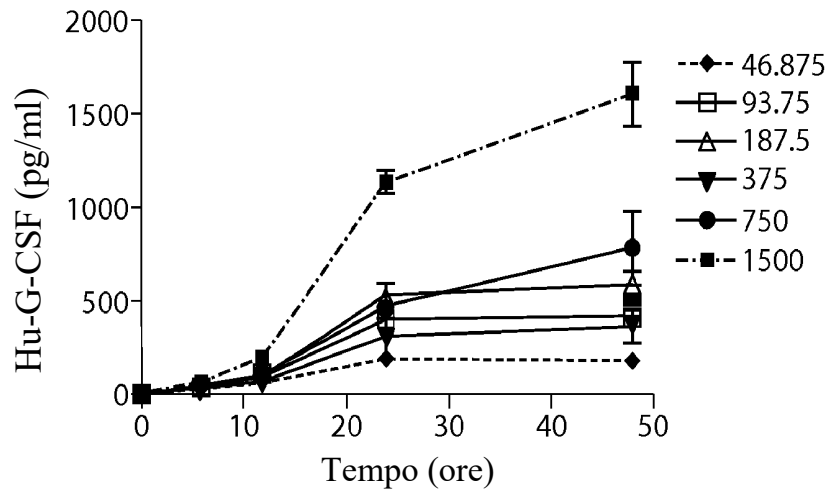


Fig. 3M

Comp. chimica 55

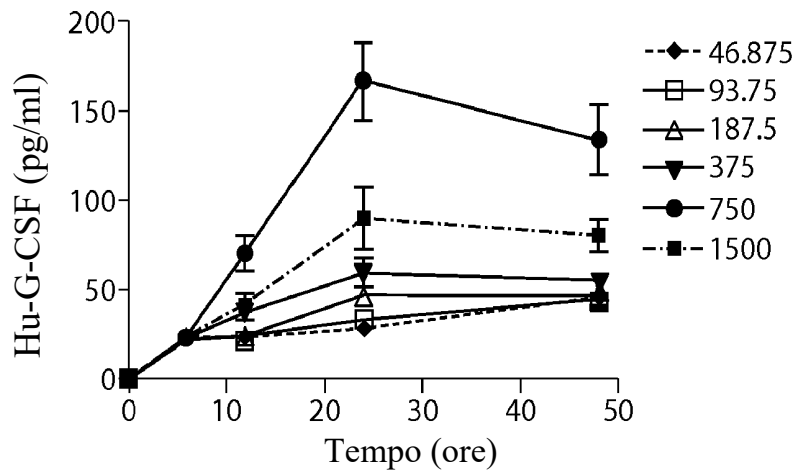


Fig. 3N

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

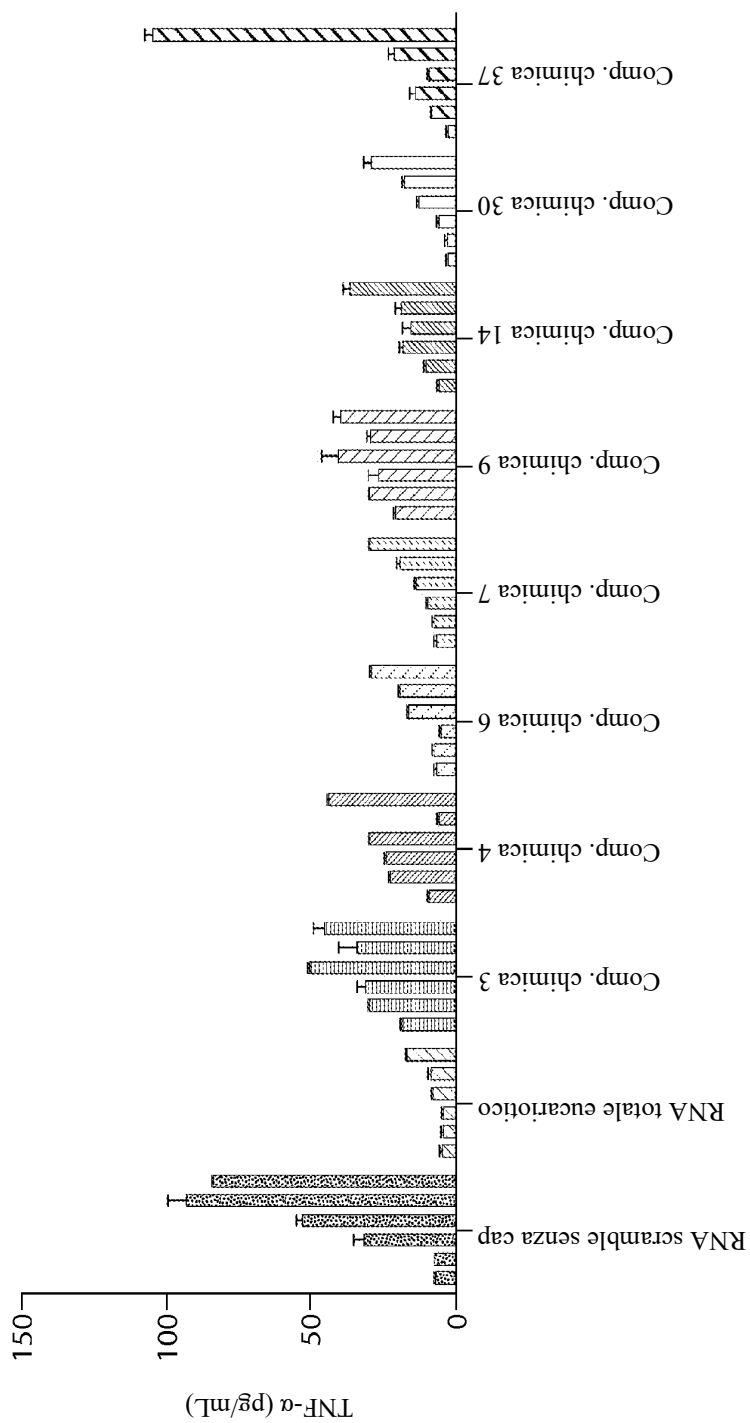


Fig. 4A

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

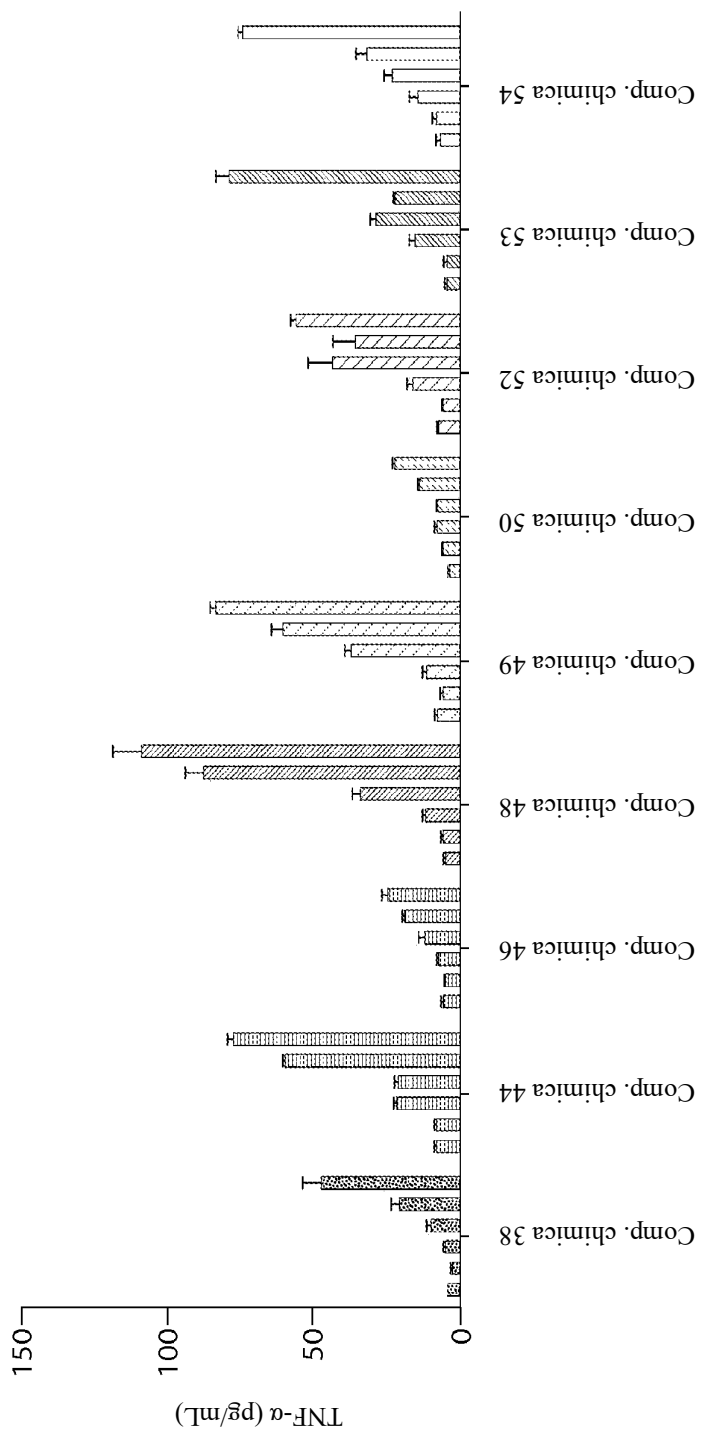


Fig. 4B

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

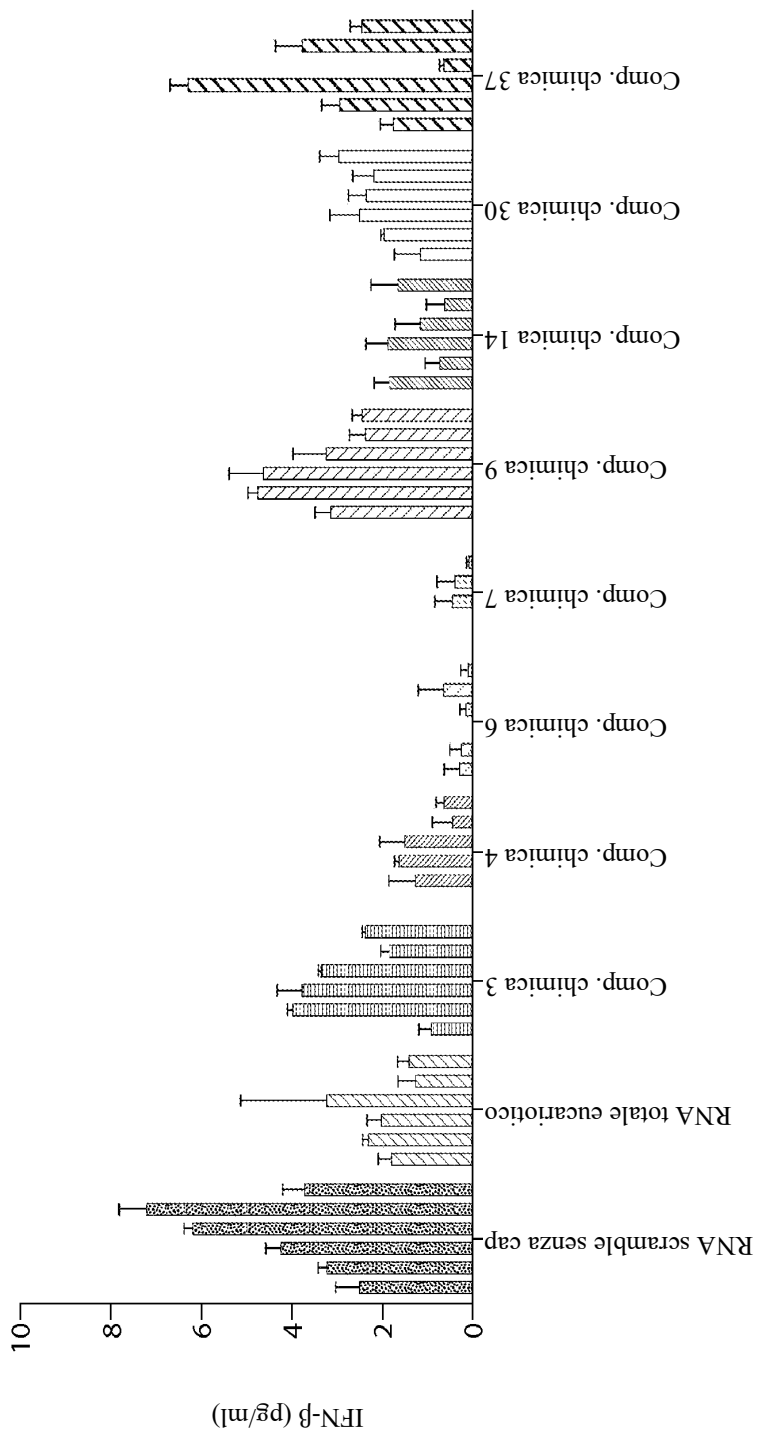


Fig. 4C

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

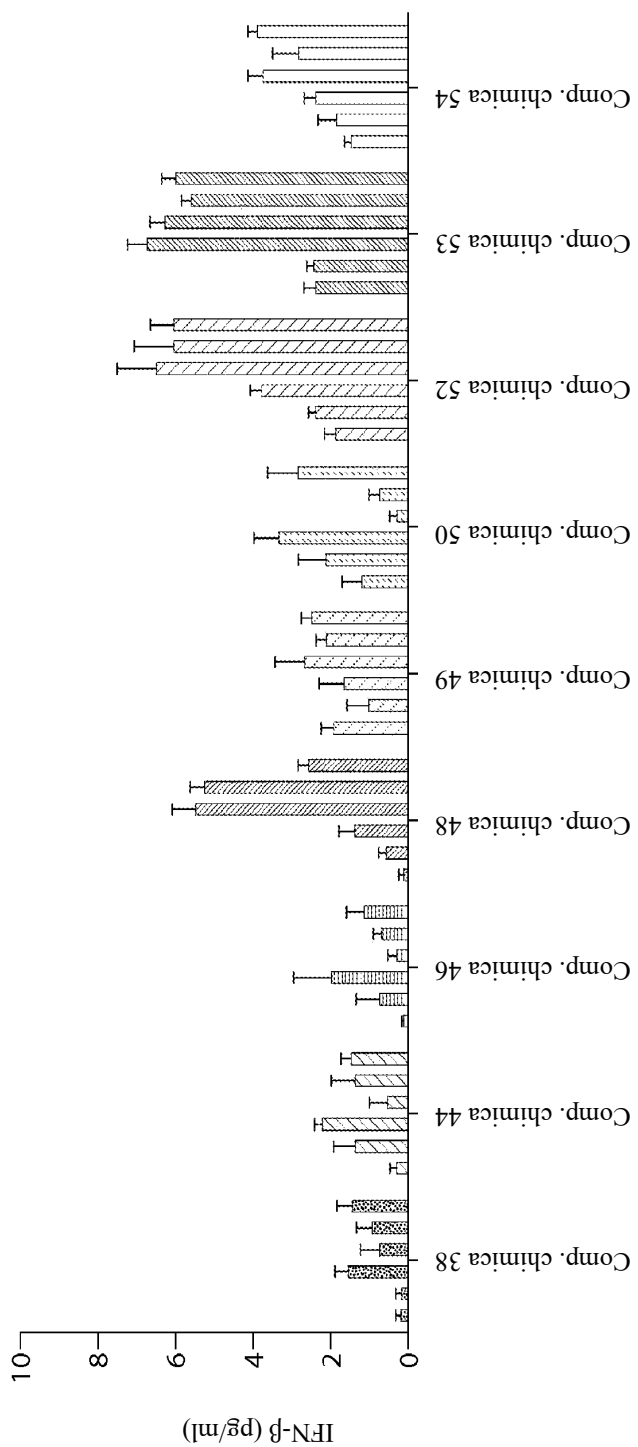


Fig. 4D

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

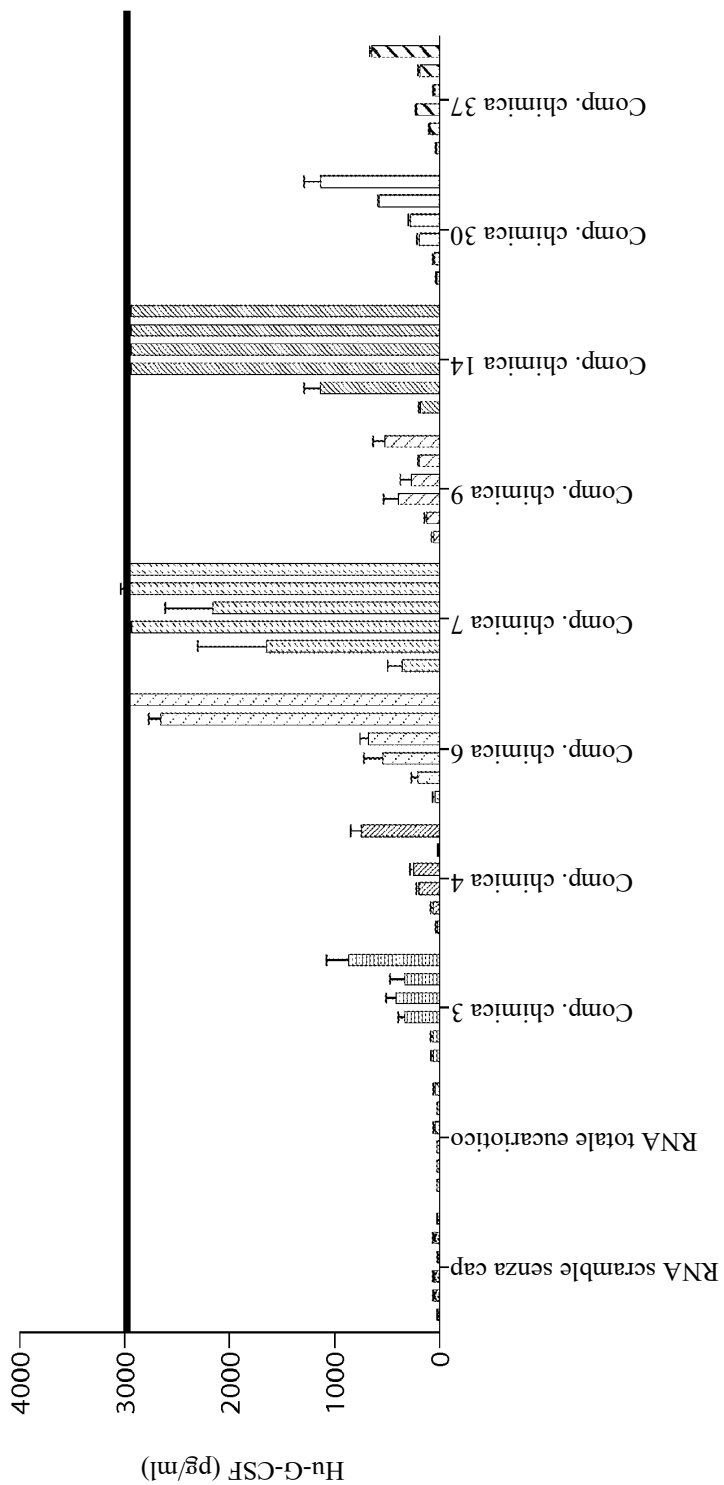


Fig. 4E

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

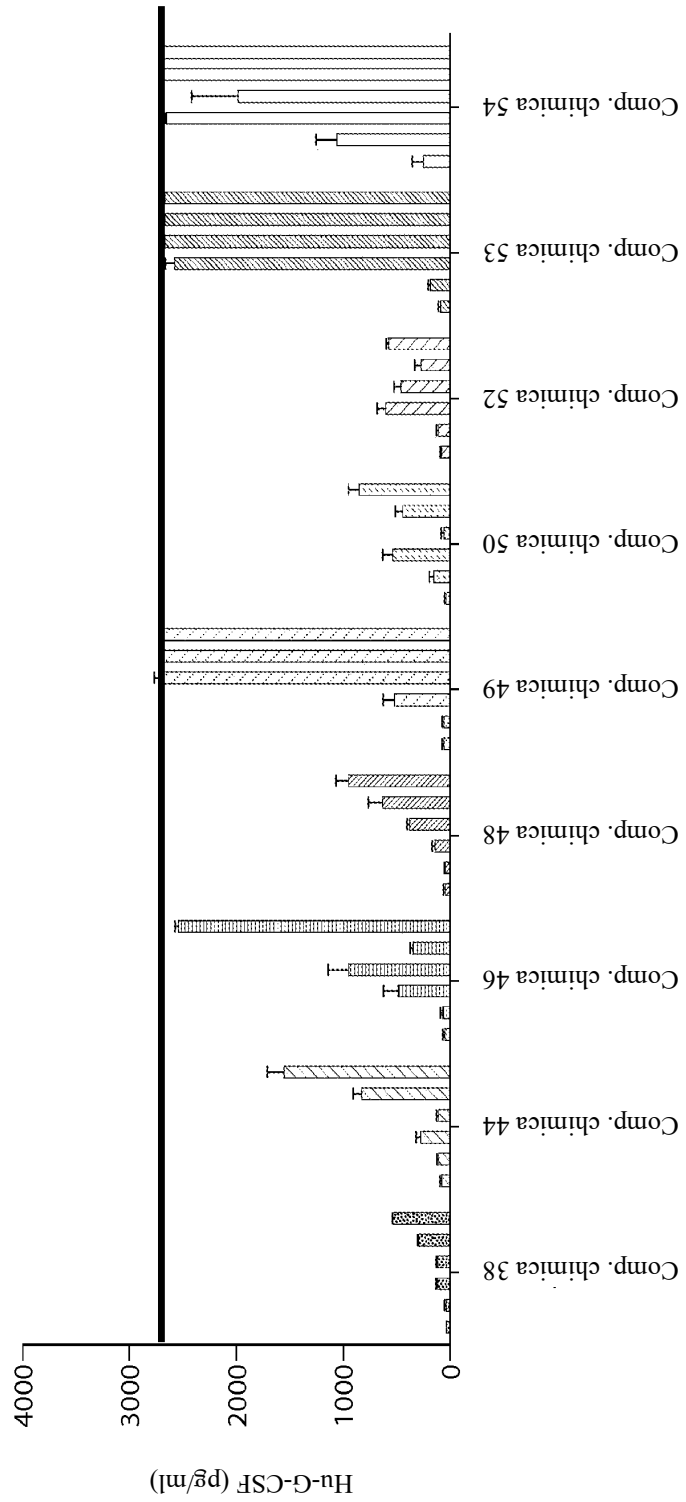


Fig. 4F

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

modRNA di Hu-G-CSF	Pozzetto di cheratinociti hu-G-CSF (ng/ml)	Pozzetto KG-1 hu-G-CSF (ng/ml)
Veicolo	0,0177	0,0189
Scramble	0,6217	0,0086
Comp. chimica 7	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 20	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 46	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 53	≥ 5	≥ 5

modRNA di Hu-G-CSF	Pozzetto di cheratinociti hu-G-CSF (ng/ml)	Pozzetto Kasumi-1 hu-G-CSF (ng/ml)
Veicolo	0,0434	0,0256
Scramble	0,0655	0,3317
Comp. chimica 6	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 7	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 20	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 37	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 46	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 48	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 49	≥ 5	≥ 5
Comp. chimica 53	≥ 5	≥ 5

Fig. 5A


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

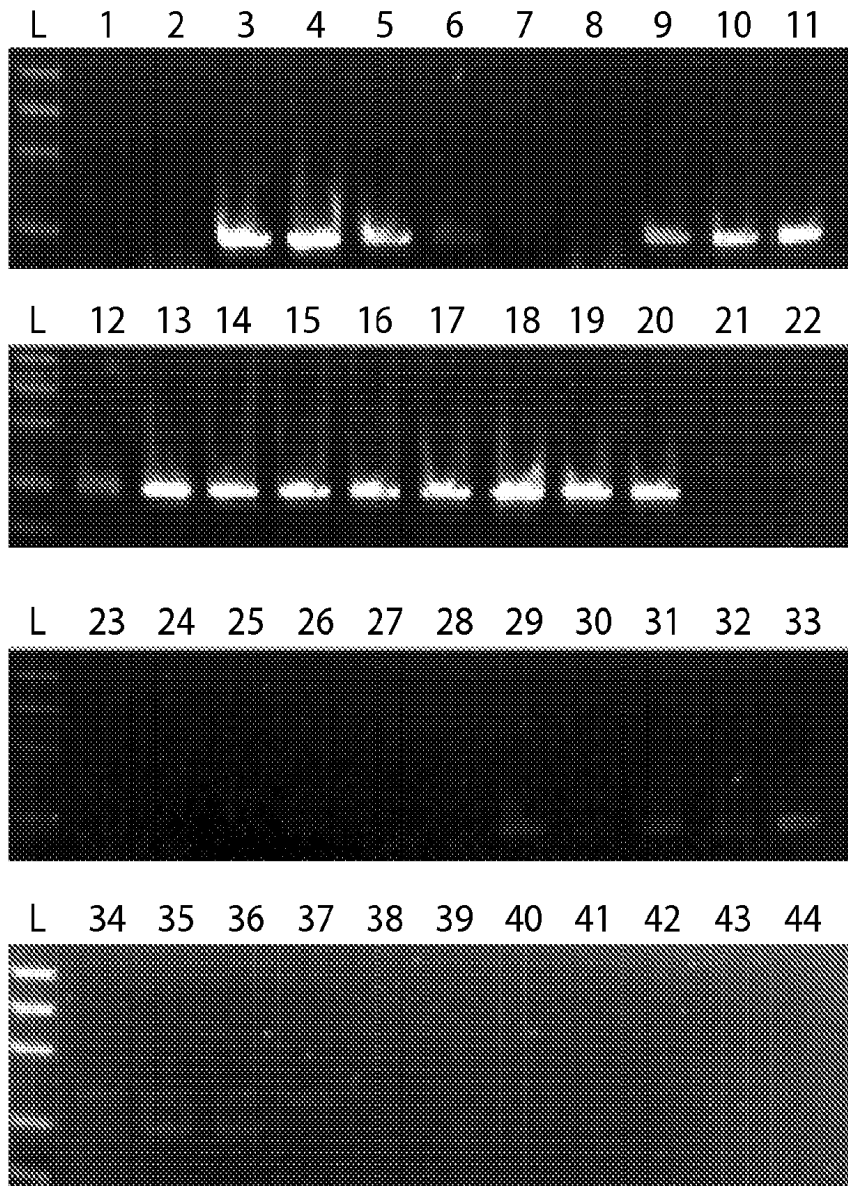
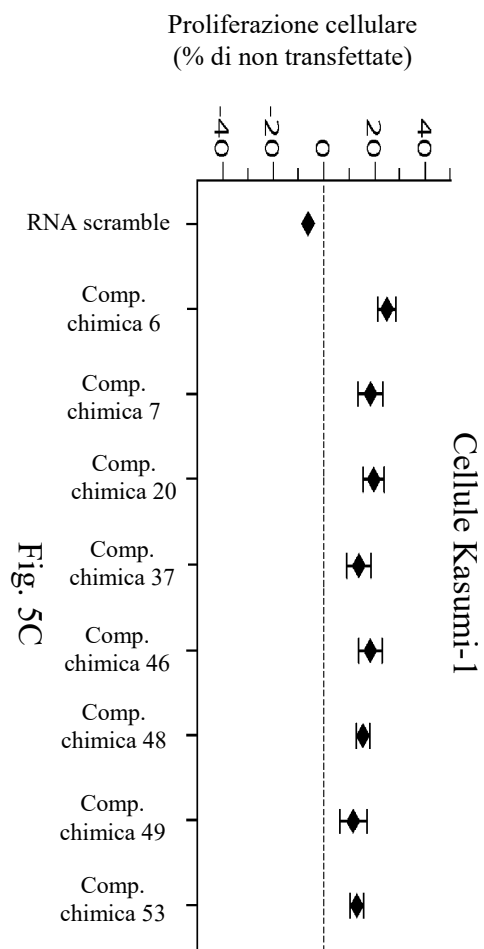
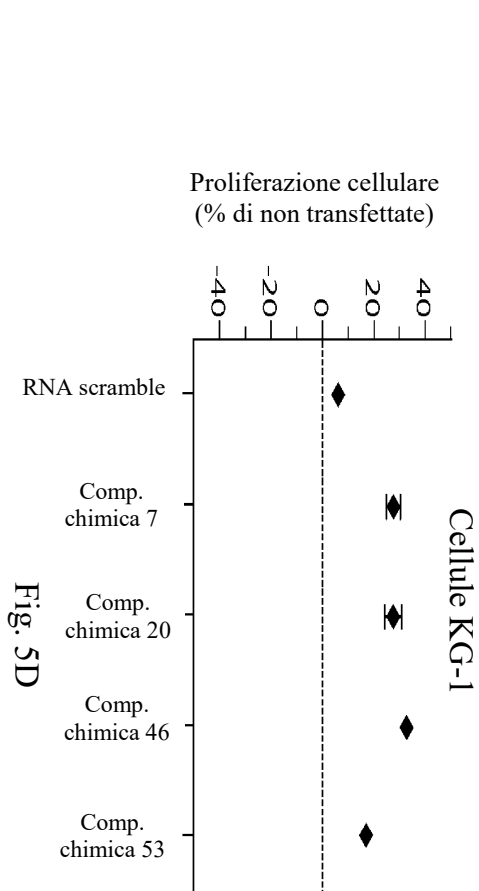


Fig. 5B

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



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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione:	Fattore
21	NTP NON MODIFICATI	lab	15/08/2011 11:45:55	1599,6	ng/ μ l	39,990	17,841	2,24	2,41	RNA	40,00

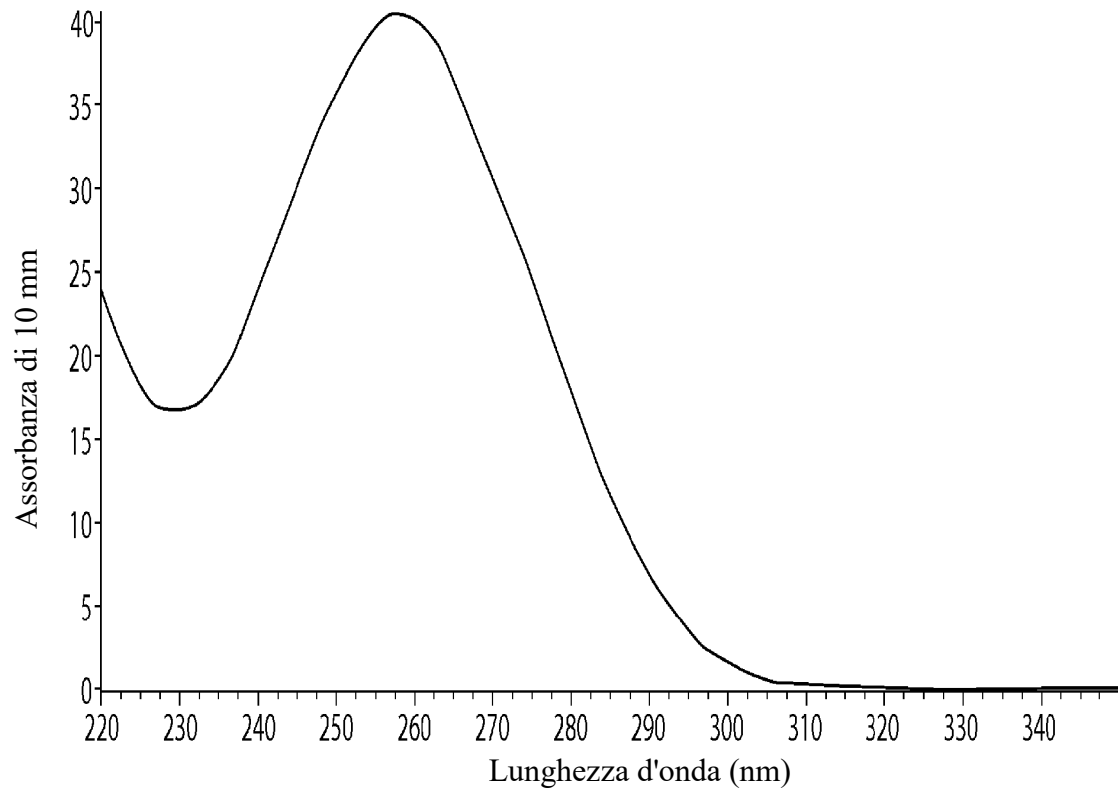


Fig. 6A

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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione	Fattore
2	N1-metil-A	lab	16/08/2011 11:35:49	20,1	ng/μl	0,503	0,288	1,75	0,92	RNA	40,00

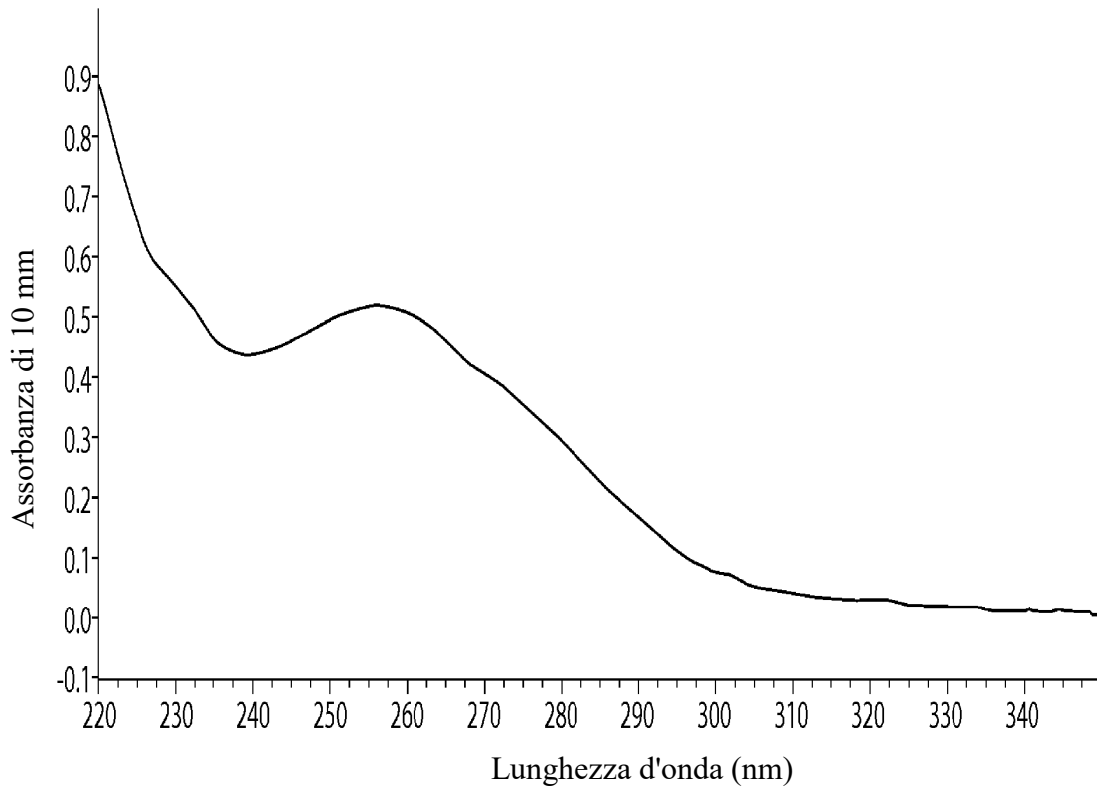


Fig. 6B

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

ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione:	Fattore
N6-metil-2-ammino Purina	lab	16/08/2011 11:38:29	1112,4	ng/μl	27,811	17,607	1,58	1,40	RNA	40,00

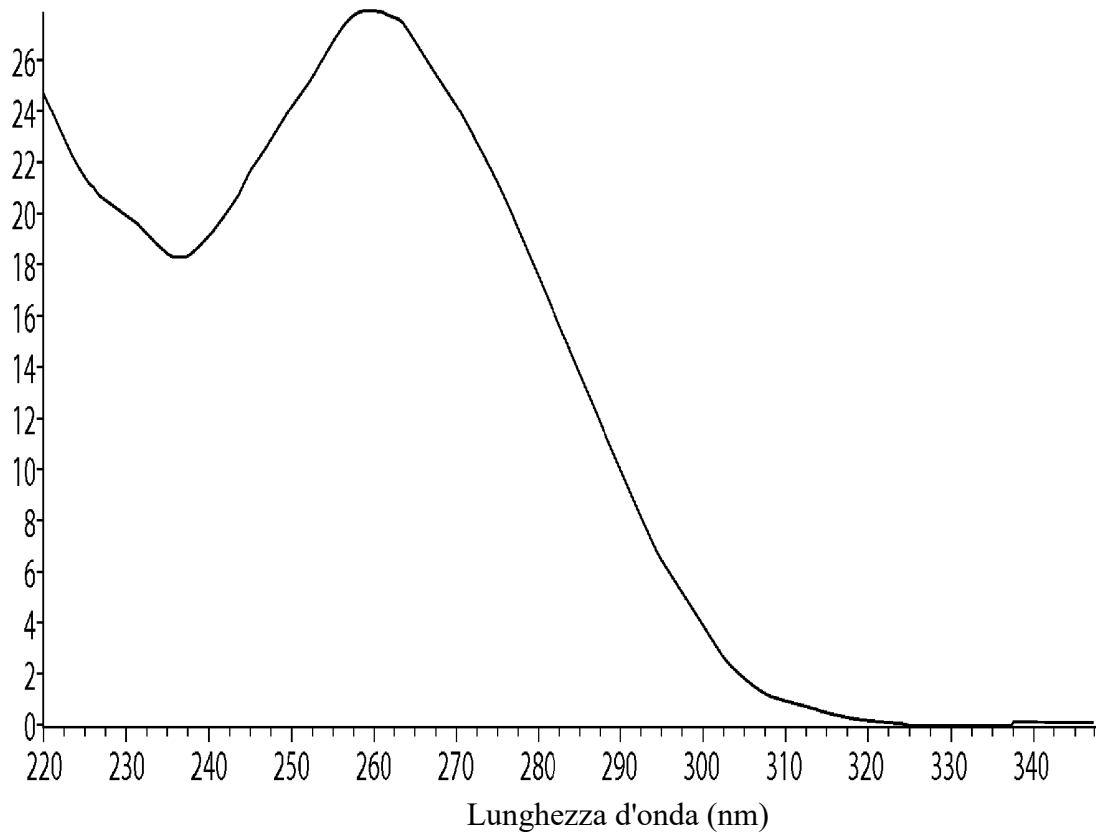


Fig. 6C

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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione:	Fattore
2	2-tio-CTP	lab	15/08/2011 11:26:59	259,2	ng/μl	6,479	4,719	1,37	1,30	RNA	40,00

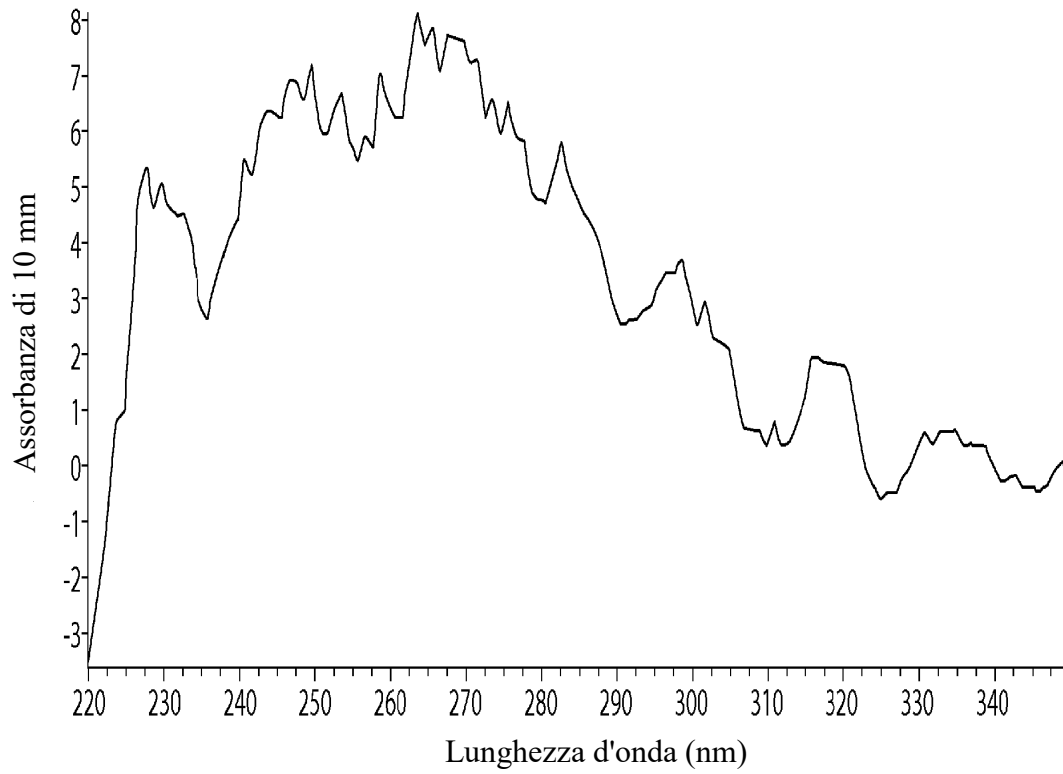


Fig. 6D

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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione	Fattore
4	pseudo-iso-CTP	lab	15/08/2011 11:29:10	1332,5	ng/μl	33,311	13,674	2,44	1,79	RNA	40,00

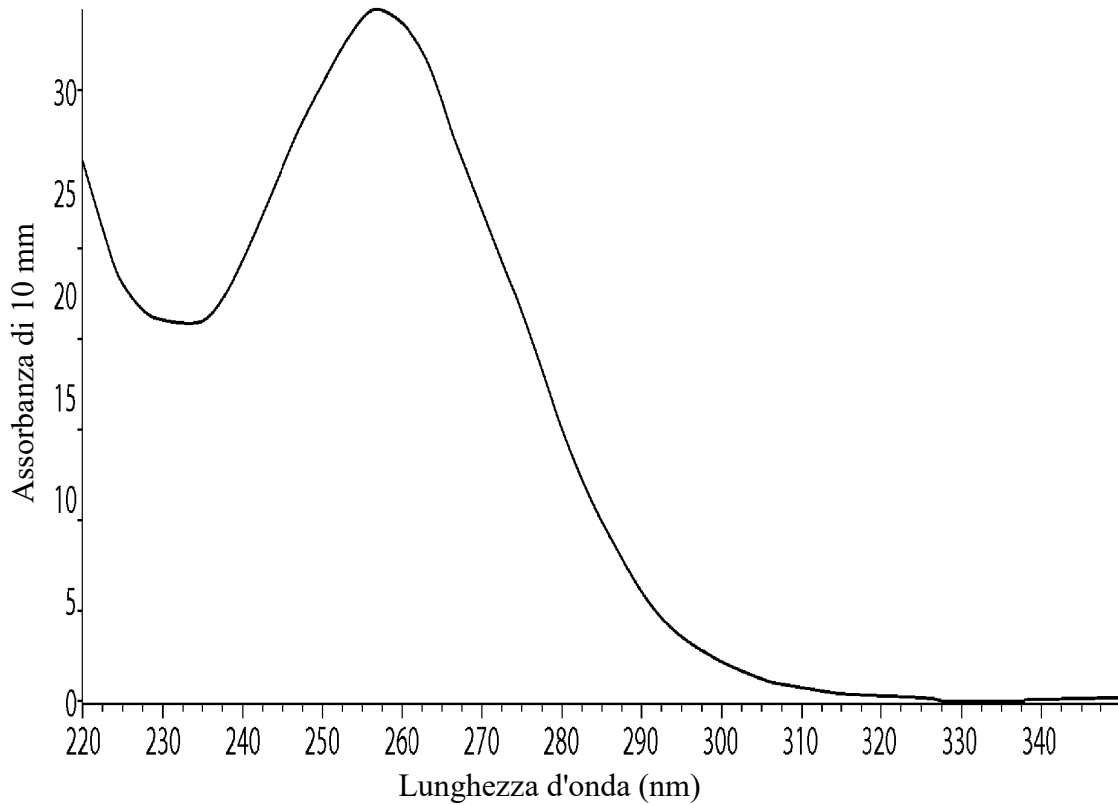


Fig. 6E

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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione	Fattore
6	5-Iodo-UTP	lab	15/08/2011 11:31:06	1179,4	ng/μl	29,486	16,726	1,76	1,10	RNA	40,00

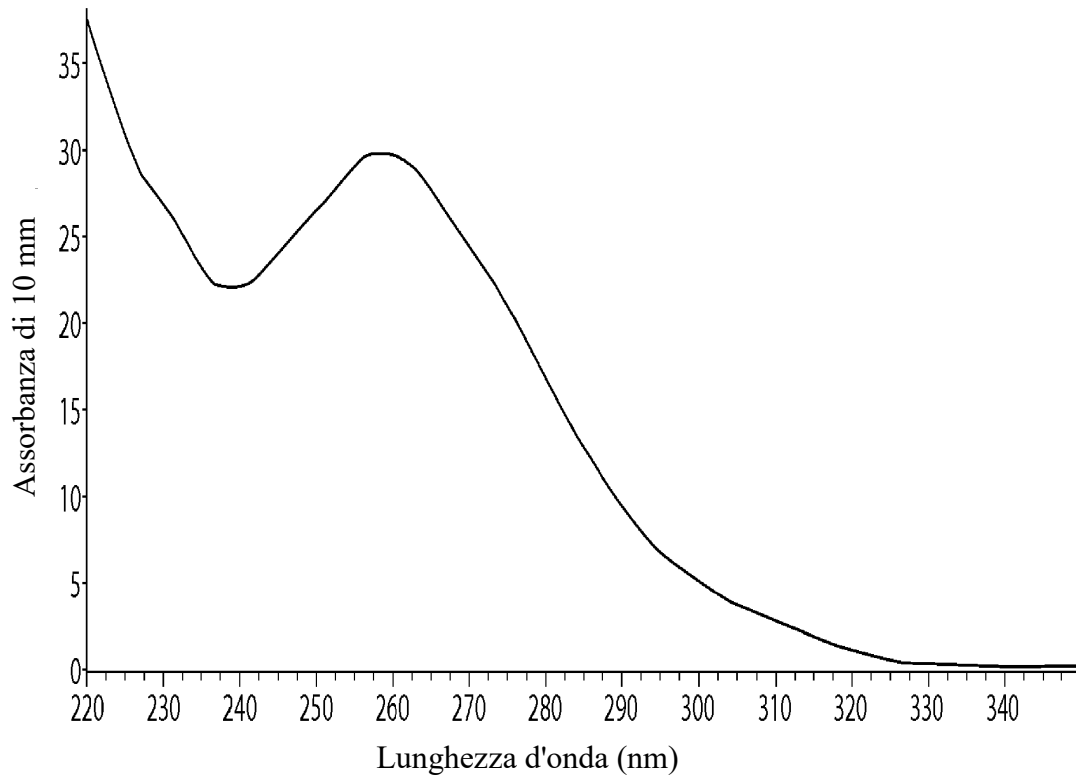


Fig. 6F

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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione	Fattore
7	N1 metil-pseudoUTP	lab	15/08/2011 11:32:15	1408,1	ng/μl	35,202	18,565	1,90	2,17	RNA	40,00

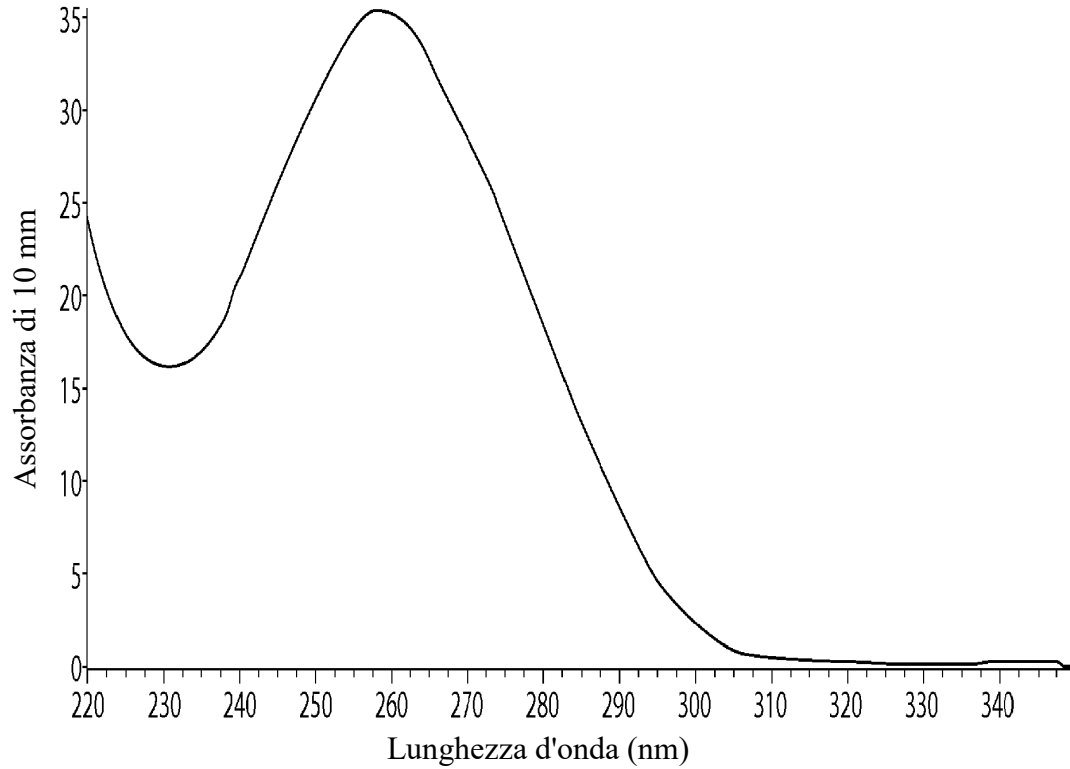


Fig. 6G

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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione	Fattore
15	ITP	lab	15/08/2011 11:40:05	225,1	ng/μl	5,628	5,781	0,97	1,05	RNA	40,00

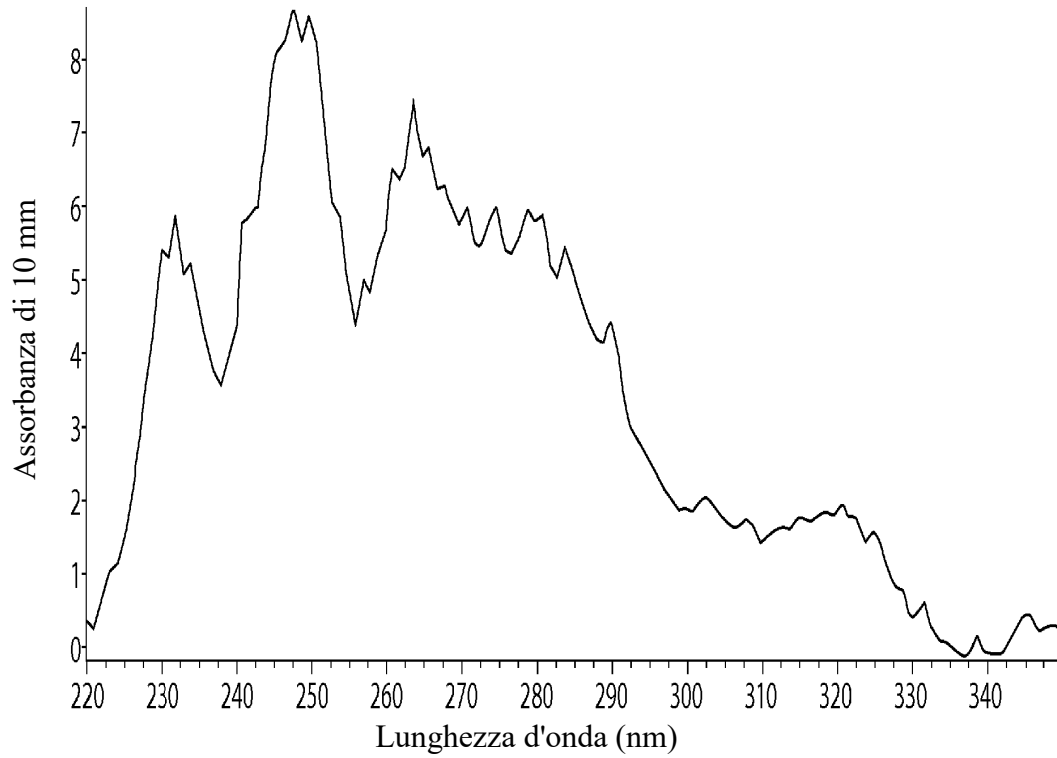


Fig. 6H

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

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/300	Tipo di campione:	Fattore
18	N1-metil-GTP	lab	15/08/2011 11:43:10	161,5	ng/ μ l	4,036	2,917	1,38	0,67	RNA	40,00

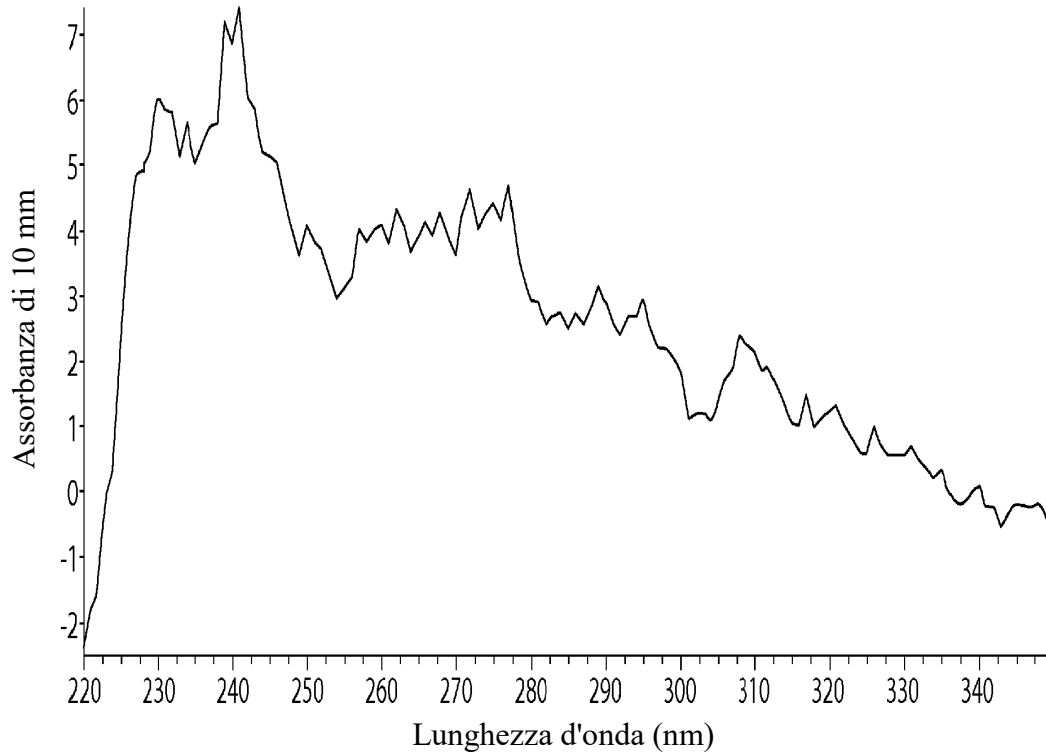


Fig. 6I

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

ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione :	Fattore
pseudo-iso-CTP / N1-metil-pseudo-UTP	lab	02/09/2011 15:48:37	1268,3	ng/ μ l	31,707	17,208	1,84	1,64	RNA	40,00

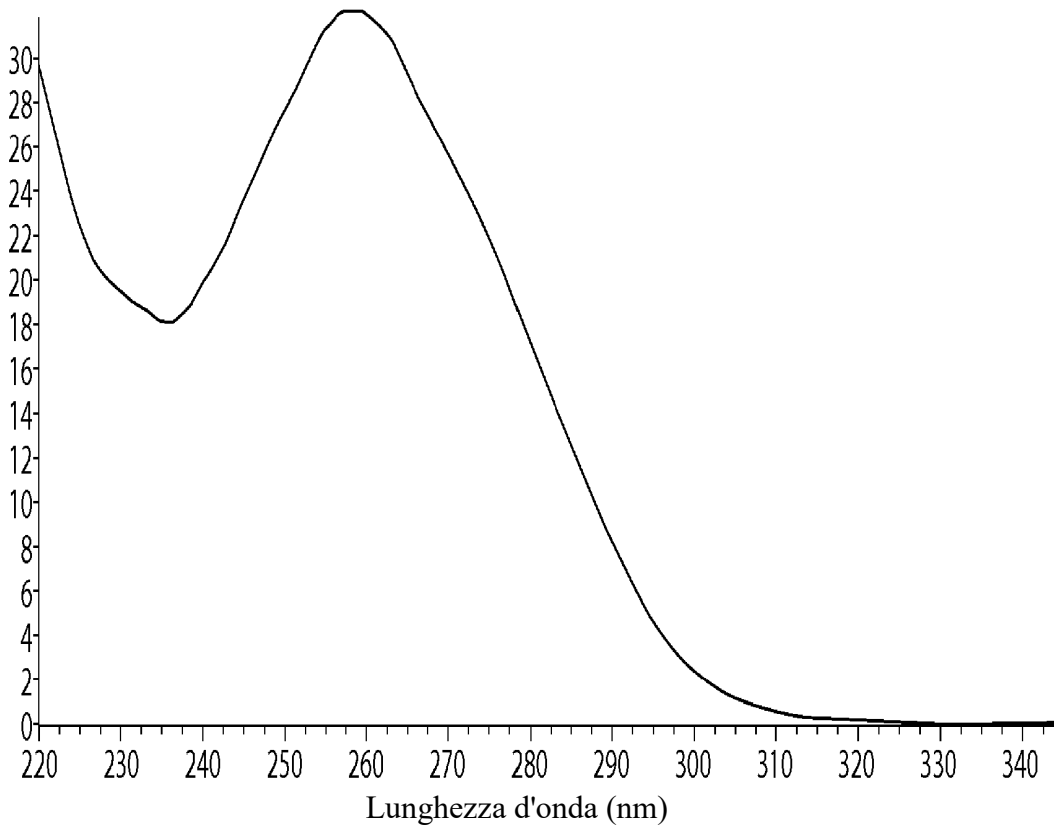


Fig. 6J

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

ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione	Fattore
Pir-CTP	lab	12/09/2011 14:03:00	1103,7	ng/μl	27,592	11,101	2,49	1,14	RNA	40,00

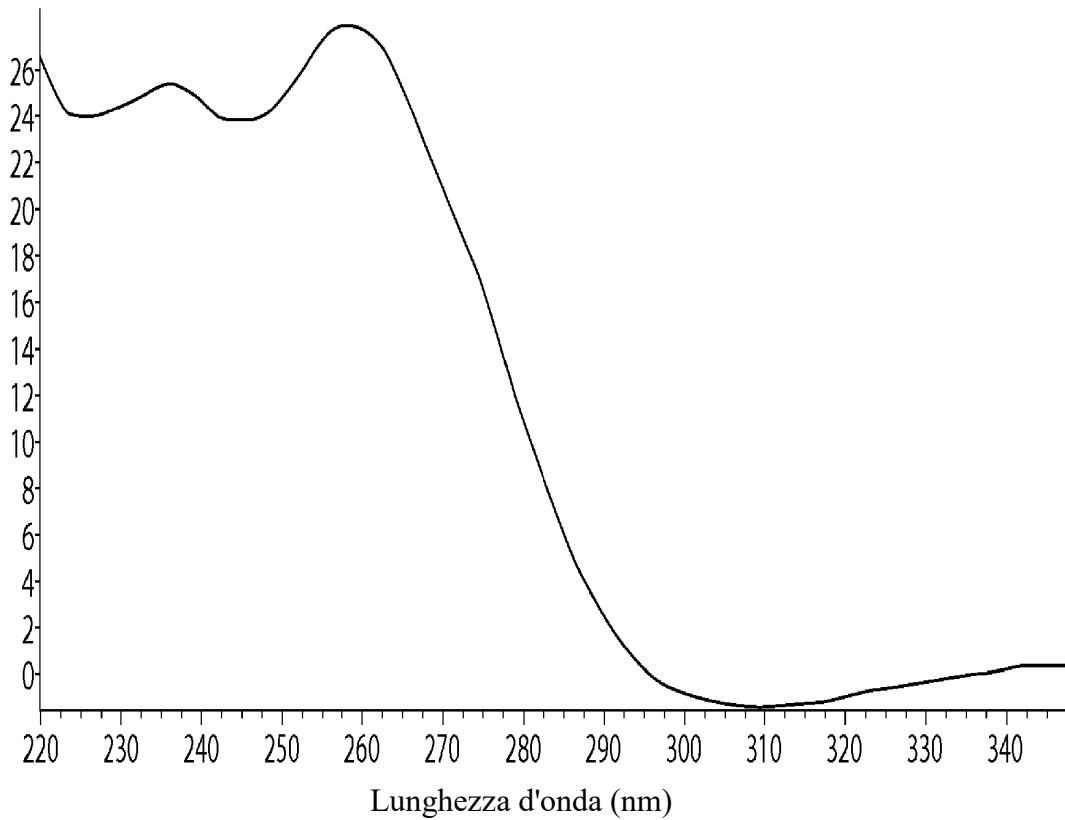


Fig. 6K

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

ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione :	Fattore
5-Me-CTP/N1-Me-pseudo-UTP	lab	12/09/2011 15:47:12	1094,3	ng/μl	27,358	16,135	1,70	2,11	RNA	40,00

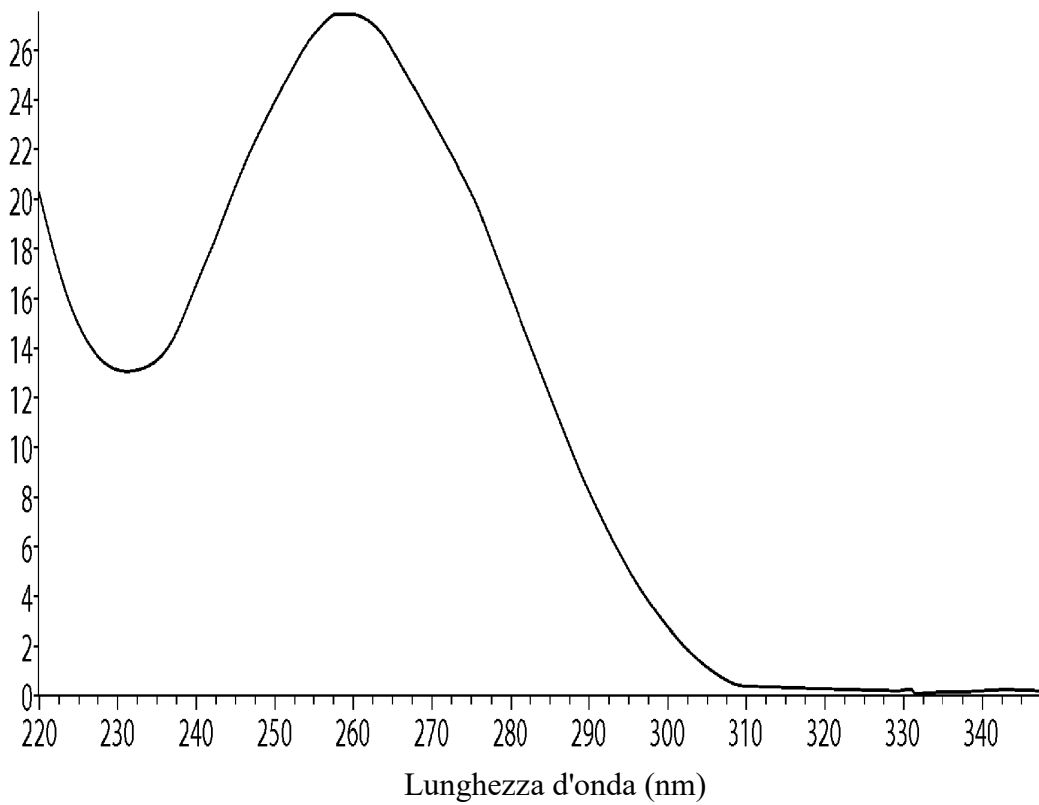


Fig. 6L

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