

**TRADUZIONE**

**Brevetto Europeo n° EP 4 108 671**

Domanda di Brevetto Europeo n° 22173763.8

Depositata in data 03 Ottobre 2011

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

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

\*\*\*

10 **DESCRIZIONE**

**Contesto**

Gli RNA presenti in natura sono sintetizzati da quattro ribonucleotidi di base: ATP, CTP, UTP e GTP, ma possono contenere nucleotidi modificati post-trascrizionalmente. Inoltre, nell'RNA sono state identificate circa cento diverse modificazioni nucleosidiche [Rozenski, J,  
15 Crain, P e McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: Aggiornamento 1999. Nucl 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.

20 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 integrato o meno nel cromosoma) o dalla progenie. Il DNA introdotto può integrarsi nel DNA genomico della cellula ospite a una certa frequenza, provocando alterazioni  
25 e/o danni al DNA genomico della cellula ospite. Inoltre, devono verificarsi più fasi prima che

venga prodotta una proteina. Una volta all'interno della cellula, il DNA deve essere trasportato nel nucleo dove viene trascritto in RNA. L'RNA trascritto dal DNA deve quindi entrare nel citoplasma dove viene tradotto in proteina. Questa necessità di più fasi di elaborazione crea 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.

Nella tecnica sussiste la necessità di modalità biologiche per affrontare la modulazione della traduzione intracellulare degli acidi nucleici.

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

La presente invenzione rende disponibile un mRNA, comprendente 1-metil-pseudouridina per l'uso come medicinale, in cui il 100% dei nucleotidi comprendenti uracile nell'mRNA viene sostituito con nucleotidi comprendenti N1-metil-pseudouridina.

Ulteriori aspetti dell'invenzione sono resi disponibili nelle rivendicazioni.

Nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati possono mostrare una risposta immunitaria innata ridotta quando introdotti in una popolazione di cellule, sia *in vivo* sia *ex vivo*. Questi nucleosidi modificati, nucleotidi modificati e acidi nucleici modificati 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.

1-metil-pseudouridina può interrompere il legame di un partner di legame del solco maggiore con mRNA.

La presente descrizione inoltre rende disponibili composizioni farmaceutiche comprendenti

5 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; 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. In caso di conflitto, prevarrà la presente  
10 descrizione, incluse le definizioni.

Altre caratteristiche ed altri vantaggi dell'invenzione risulteranno evidenti dalla descrizione dettagliata e dalle figure che seguono, nonché dalle rivendicazioni.

#### **Breve descrizione dei disegni**

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

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  
20 secreto nel saggio.

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  
25 linea indica un livello di saturazione del limite massimo rilevabile di G-CSF secreto nel saggio.

Le **Figure 4A e 4B** rappresentano grafici a barre di una serie di saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 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.

5 Le **Figure 4C e 4D** rappresentano grafici a barre di una serie di saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per l'interferone- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) 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.

10 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.

15 La **Figura 5A** è una tabella che mostra i risultati di un 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 indicato che codifica per hu-G-CSF.

20 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.

25 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 alimentatrici 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.

#### **Descrizione dettagliata**

L'mRNA per l'uso della presente invenzione mostra una risposta immunitaria innata  
5 ridotta quando introdotti in una popolazione di cellule. 1-metil-pseudouridina ha un gruppo –  
NH(CH)- sulla faccia del solco maggiore, che interrompe le interazioni del partner di legame  
del solco maggiore, che altrimenti causano le risposte immunitarie innate.

In generale, gli acidi nucleici esogeni non modificati, in particolare gli acidi nucleici  
virali, introdotti nelle cellule inducono una risposta immunitaria innata, con conseguente  
10 produzione di citochine e interferone (IFN) e morte cellulare. Tuttavia, è di grande interesse per  
le terapie, per rilasciare un mRNA all'interno di una cellula, *in vivo* o come per causare la  
traduzione intracellulare dell'mRNA e la produzione della proteina codificata. Di particolare  
importanza è il rilascio e la funzione di un mRNA non integrativo, poiché gli acidi nucleici  
caratterizzati dall'integrazione in una cellula bersaglio sono generalmente imprecisi nei loro  
15 livelli di espressione, dannosamente trasferibili alla progenie e alle cellule vicine e soffrono del  
sostanziale rischio di provocare mutazione. Nel presente contesto vengono resi disponibili in  
parte mRNA che codificano polipeptidi utili in grado di modulare la funzione e/o l'attività di  
una cellula e metodi per produrre e utilizzare questi. Come qui descritto, questi mRNA sono in  
grado di ridurre l'attività immunitaria innata di una popolazione di cellule in cui vengono  
20 introdotti, aumentando così l'efficienza della produzione proteica in quella popolazione  
cellulare. Inoltre, vengono descritte una o più vantaggiose attività e/o proprietà degli mRNA  
della presente descrizione.

Inoltre, modificazioni del solco maggiore possono consentire alterazioni, ad esempio  
una diminuzione, nell'interazione dei nucleosidi modificati, dei nucleotidi modificati e degli  
25 acidi nucleici modificati con un partner di legame del solco.

Di conseguenza, in un primo aspetto, la presente descrizione fornisce l'mRNA per l'uso secondo le rivendicazioni allegate.

L'mRNA può comprendere un ulteriore 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.

In alcune forme di realizzazione, le modificazioni chimiche si trovano sulla faccia del solco maggiore della base azotata, e in cui le modificazioni chimiche possono includere il cambio o la sostituzione di un atomo di una base azotata di citidina con un'ammina, un SH, un alchile (ad esempio, metile o etile) o un alogeno (ad esempio, cloro o fluoro).

In alcune forme di realizzazione, 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 citidina con un'ammina, un SH, un metile o etile, o un cloro o fluoro.

In alcune forme di realizzazione, le modificazioni chimiche possono essere situate sulla frazione zuccherina del nucleotide.

In alcune forme di realizzazione, le modificazioni chimiche possono essere situate sulla catena principale di fosfato del nucleotide.

In alcune forme di realizzazione, le modificazioni chimiche barattolo possono alterare l'elettrochimica sulla faccia del solco maggiore del nucleotide.

In alcune forme di realizzazione, l'mRNA è compreso in una composizione farmaceutica.

### ***Definizioni***

In vari punti della presente specifica, i sostituenti dei composti 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 C<sub>1-6</sub>" è

specificamente inteso a descrivere singolarmente metile, etile, alchile C<sub>3</sub>, alchile C<sub>4</sub>, alchile C<sub>5</sub> e alchile C<sub>6</sub>.

Si intende inoltre che i composti sono stabili. Come usato qui, "stabile" si riferisce a un composto che è sufficientemente robusto per sopravvivere all'isolamento fino a un grado di  
5 purezza utile da una miscela di reazione, e preferibilmente in grado di essere formulato in un agente terapeutico efficace.

È inoltre chiaro che determinate caratteristiche della presente descrizione, che sono, per chiarezza, descritte nel contesto di forme di realizzazione separate, possono anche essere fornite in combinazione in una singola forma di realizzazione. Al contrario, varie caratteristiche della  
10 presente descrizione, che sono, per brevità, descritte nel contesto di una singola forma di realizzazione, possono essere anche fornite separatamente o in qualsiasi sottocombinazione adatta.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "alchile" intende fare riferimento a un gruppo idrocarburico saturo che è a catena lineare o ramificato. Gruppi alchile  
15 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.

Come utilizzato nel presente contesto, "alchenile" si riferisce a un gruppo alchile avente  
20 uno o più doppi legami carbonio-carbonio. Gruppi alchenile esemplificativi includono etenile, propenile, e simili.

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

25 Come utilizzato nel presente contesto, "alchinile" si riferisce a un gruppo alchile avente

uno o più tripli legami carbonio-carbonio. Gruppi alchinile esemplificativi includono etinile, propinile e simili.

Come utilizzato nel presente contesto, "arile" si riferisce a idrocarburi monociclici o policiclici aromatici (ad esempio aventi 2, 3 o 4 anelli fusi) come, ad esempio, fenile, naftile, 5 antracenile, fenantrenile, indenile e simili. In alcune forme di realizzazione, i gruppi arile hanno da 6 a circa 20 atomi di carbonio.

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

Come utilizzato nel presente contesto, il termine "agente terapeutico" si riferisce a 10 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.

Come utilizzato nel presente contesto, il termine "animale" si riferisce a qualsiasi membro del regno animale. In alcune forme di realizzazione, "animale" si riferisce a esseri umani in qualsiasi fase dello sviluppo. In alcune forme di realizzazione, "animale" si riferisce ad 15 animali non umani in qualsiasi fase dello sviluppo. In alcune forme di realizzazione, 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 alcune forme di realizzazione, 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 20 modificato o un clone.

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 alcune forme di realizzazione, 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%, 25 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 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).

Come utilizzati nel presente contesto, "associato a", "coniugato", "collegato", "attaccato" e "legato", quando utilizzati rispetto a due o più frazioni, significano che le frazioni  
5 sono 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.

Come utilizzato nel presente contesto, "biologicamente attivo/a" si riferisce a una  
10 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 particolari forme di realizzazione, 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  
15 "biologicamente attiva".

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  
20 sono quelli che sono conservati tra le sequenze più correlate rispetto ai nucleotidi o agli amminoacidi che compaiono altrove nelle sequenze. In alcune forme di realizzazione, si dice che due o più sequenze sono "completamente conservate" se sono identiche al 100% l'una all'altra. In alcune forme di realizzazione, 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  
25 90% identiche, o almeno per il 95% identiche l'una all'altra. In alcune forme di realizzazione, 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 alcune forme di realizzazione, 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 o almeno per il 95% identiche l'una all'altra. In alcune forme di realizzazione, 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.

Come utilizzato nel presente contesto, "espressione" di una sequenza di acido nucleico si 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.

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.

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, animale, pianta o microbo).

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).

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.

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.

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.

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.

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  
5 condizione; (2) un polimorfismo genético 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  
10 della malattia, disturbo e/o condizione. In alcune forme di realizzazione, un individuo che è predisposto a una malattia, un disturbo e/o una condizione svilupperà la malattia, il disturbo e/o la condizione. In alcune forme di realizzazione, un individuo che è predisposto a una malattia, un disturbo e/o una condizione non svilupperà la malattia, il disturbo e/o la condizione.

Come qui utilizzato, "quantità terapeutamente efficace" indica una quantità di un  
15 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.

20 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  
25 di trascrizione legano una o più sequenze bersaglio specifiche molto simili a una sequenza

consenso specifica in una regione regolatoria di un gene bersaglio. I fattori di trascrizione possono regolare la trascrizione di un gene bersaglio da solo o in un complesso con altre molecole.

5 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 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  
10 presenta solo segni precoci di una malattia, disturbo e/o condizione allo scopo di ridurre il rischio di sviluppare la patologia associata alla malattia, disturbo e/o condizione. In alcune forme di realizzazione, il trattamento comprende la somministrazione di una proteina associata ad un acido nucleico terapeutamente attivo a un soggetto che ne ha bisogno.

15 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 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 che contengono atomi di carbonio sostituiti asimmetricamente possono essere isolati in forme otticamente attive o racemiche.  
20 Metodi su come preparare forme otticamente attive da materiali di partenza 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. Gli isomeri geometrici cis e trans dei composti sono descritti e possono essere isolati come una  
25 miscela di isomeri o come forme isomeriche separate.

I composti 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 ammido-acido imidico, coppie lattame-lattime, coppie ammido-acido imidico, coppie enammina-immmina 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.

I composti 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.

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

In alcune forme di realizzazione, i composti della presente descrizione sono 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.

I composti e i loro sali, possono anche essere preparati in combinazione con molecole di solvente o acqua per formare solvati e idrati con metodi di routine.

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 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 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 non acquosi come etere, etilacetato, etanolo, isopropanolo o acetone 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).

L’espressione “farmaceuticamente accettabile” viene impiegata nel presente contesto per riferirsi a quei/quelle composti, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che sono, 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.

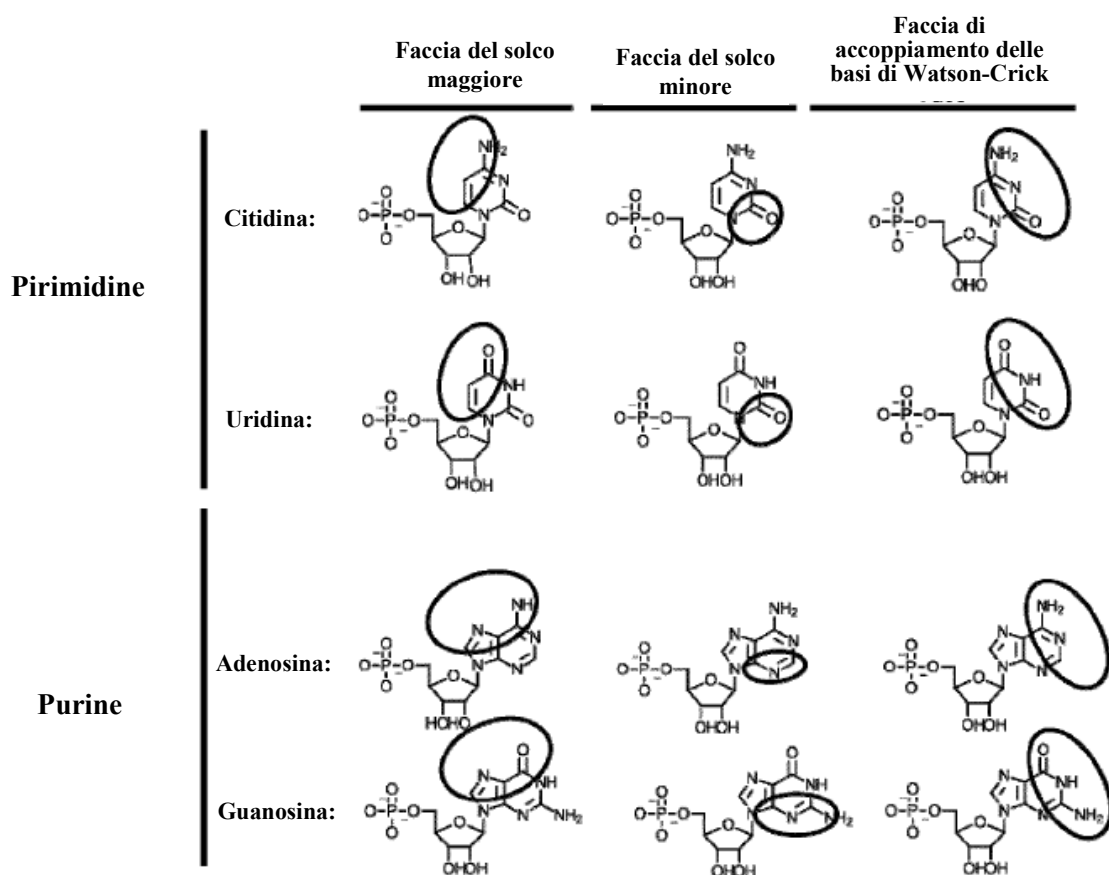
Come utilizzato nel presente contesto, “profarmaci” si riferisce a qualsiasi veicolo

tipicamente covalentemente legato che rilascia il farmaco progenitore attivo quando somministrato a un 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 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 Bioreversible Carriers in Drug Design, a cura di Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

#### **Nucleosidi e nucleotidi modificati**

Come descritto nella presente "nucleoside" è definito come un composto contenente una molecola di zucchero a cinque 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.

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



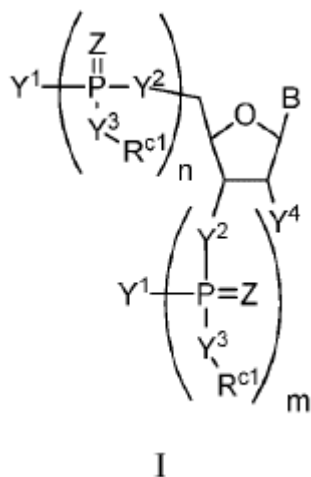
In alcune forme di realizzazione, nucleosidi modificati includono 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-idrossimetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-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.

In altre forme di realizzazione, nucleosidi modificati includono 2-amminopurina, 2, 6-diamminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza- 2-amminopurina, 7-deaza-8-aza-2-amminopurina, 7-deaza-2,6-diamminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diamminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6- isopenteniladenosina, N6-(cis-

idrossiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-idrossiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina e 2-metossi-adenina.

- 5 In alcune forme di realizzazione, nucleosidi modificati includono inosina, 1-metilinosina, 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-metilguanosa, N2-metilguanosa, N2,N2-dimetilguanosa, 8-osso-guanosina, 7-metil-8-osso-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-  
10 metil-6-tio-guanosina e N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

Un ulteriore nucleoside e nucleotide può essere un composto di Formula I:



in cui:

Z è O o S;

- 15 ciascuno di Y<sup>1</sup> è indipendentemente scelto tra -OR<sup>a1</sup>, -NR<sup>a1</sup>R<sup>b1</sup> e -SR<sup>a1</sup>;

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

ciascuno di Y<sup>3</sup> 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;

5  $R^a$  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

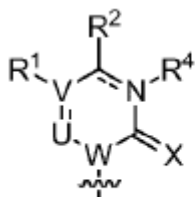
$-Y^3-R^{c1}$  è OH o SH a un pH di circa 1 o  $-Y^3-R^{c1}$  è  $O^-$  o  $S^-$  a pH fisiologico;

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

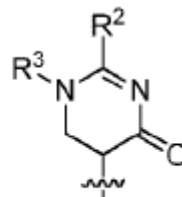
in cui quando B è una base azotata non modificata scelta tra citosina, guanina e adenina,

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

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




II-a



II-c

in cui:

 indica un legame singolo o doppio;

15 X è O o S;

U e W sono ciascuno indipendentemente C o N;

V è O, S, C o N;

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


20 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  $R^1$  è assente;

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

oppure quando V è C allora R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> 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<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, alchinile C<sub>2-20</sub>, alcossi C<sub>1-20</sub> o tioalchile C<sub>1-20</sub>;

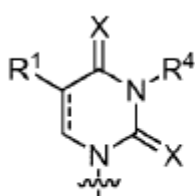
5 R<sup>3</sup> è H o alchile C<sub>1-20</sub>;

R<sup>4</sup> è H o alchile C<sub>1-20</sub>; in cui, quando  indica un doppio legame, R<sup>4</sup> è assente, oppure N-R<sup>4</sup>, presi insieme, forma un N positivamente carico sostituito con alchile C<sub>1-20</sub>;

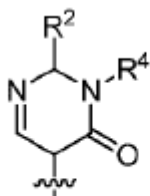
10 R<sup>a</sup> e R<sup>b</sup> sono ciascuno indipendentemente H, alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, alchinile C<sub>2-20</sub> o arile C<sub>6-20</sub>; e

R<sup>c</sup> è H, alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole.

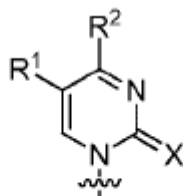
In alcune forme di realizzazione, B è una base azotata di Formula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



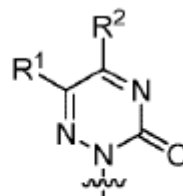
II-a1



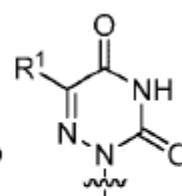
II-a2



II-a3



II-a4



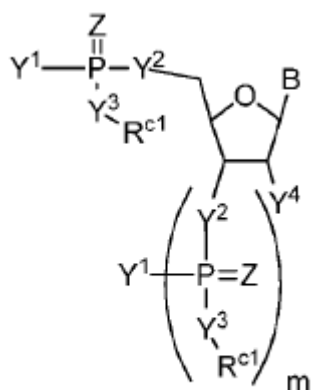
II-a5..

15

In alcune forme di realizzazione, B è una base azotata scelta dal gruppo costituito da citosina, guanina e adenina.

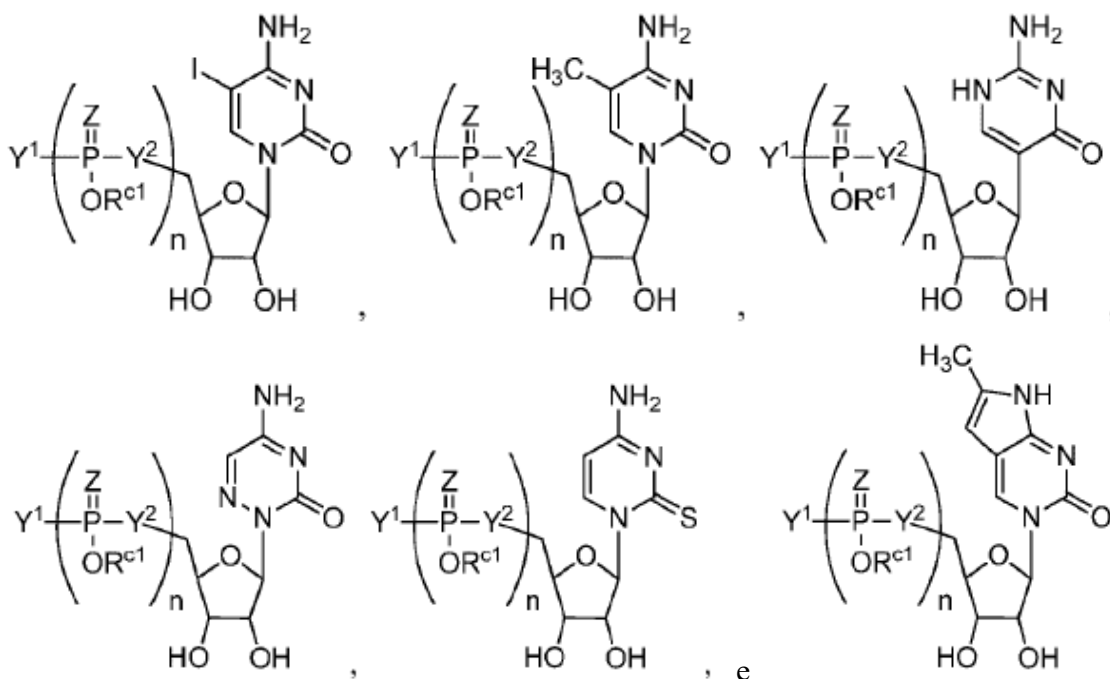
In alcune forme di realizzazione, B è una citidina o un suo derivato.

In alcune forme di realizzazione l'ulteriore nucleotide è un composto di Formula I-a:



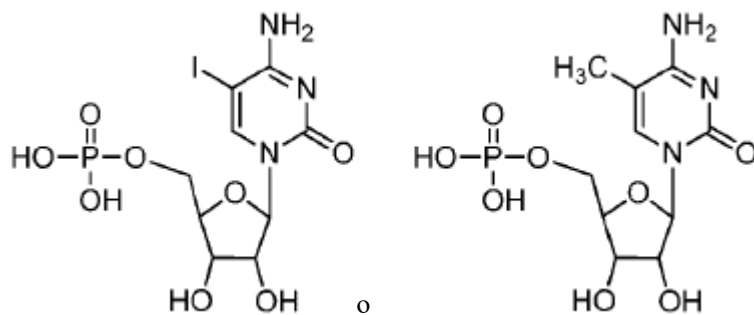
I-a.

In alcune forme di realizzazione l'ulteriore nucleotide è scelto dal gruppo costituito da:



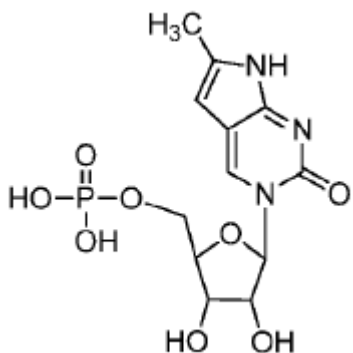
5 In alcune forme di realizzazione, la modificazione chimica del solco maggiore può includere la sostituzione dell'idrogeno in corrispondenza di C-5 di citosina con un gruppo alogeno o un gruppo metile.

Ad esempio, il nucleotide modificato può essere:

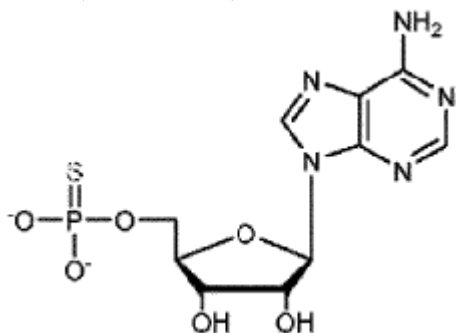


In un'altra forma di realizzazione, la modificazione chimica del solco maggiore può includere un anello fuso formato dall'NH<sub>2</sub> in corrispondenza della posizione C-4 e dall'atomo di carbonio in corrispondenza della posizione C-5.

5 Ad esempio, il nucleotide modificato può essere:

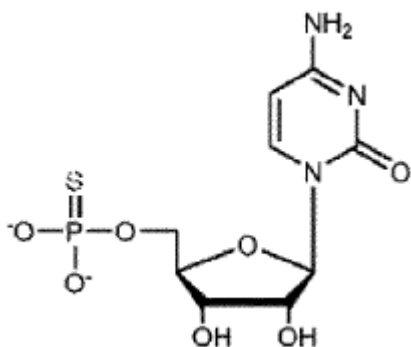


In alcune forme di realizzazione, un nucleotide modificato è 5'-O-(1-Tiofosfato)-Adenosina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Citidina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Guanosina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Uridina o 5'-O-(1-Tiofosfato)-Pseudouridina.

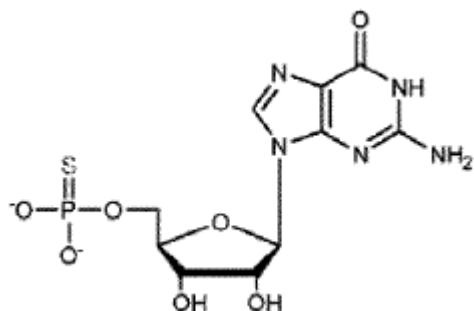


10

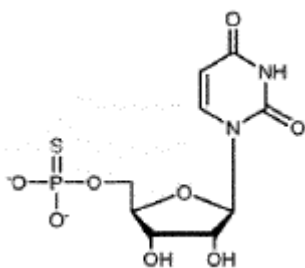
5'-O-(1-Tiofosfato)-Adenosina



5'-O-(1-Tiofosfato)-Citidina

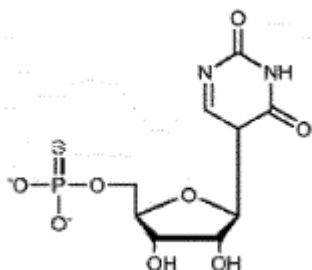


5'-O-(1-Tiofosfato)-Guanosina



5

5'-O-(1-Tiofosfato)-Uridina



5'-O-(1-Tiofosfato)-Pseudouridina

La frazione fosfato  $\alpha$ -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 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

5 debole delle molecole immunitarie innate cellulari.

Nucleotidi modificati e combinazioni di nucleotidi modificati sono forniti di seguito nella Tabella 2.

**Tabella 2**

<b><u>Nucleotide modificato</u></b>	<b><u>Combinazione di nucleotidi modificati</u></b>
6-aza-citidina	$\alpha$ -tio-citidina / 5-iodo-uridina
2-tio-citidina	$\alpha$ -tio-citidina / N1-metil-pseudo-uridina
$\alpha$ -tio-citidina	$\alpha$ -tio-citidina / $\alpha$ -tio-uridina
Pseudo-iso-citidina	$\alpha$ -tio-citidina / 5-metil-uridina
5-amminoallil-uridina	$\alpha$ -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 / ct-tio-uridina
$\alpha$ -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 / $\alpha$ -tio-uridina
Inosina	Pirrolo-citidina / 5-metil-uridina
$\alpha$ -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 / $\alpha$ -tio-uridina
Nessuna modificazione	5-metil-citidina / 5-metil-uridina
N1-metil-adenosina	5-metil-citidina / Pseudo-uridina

<b><u>Nucleotide modificato</u></b>	<b><u>Combinazione di nucleotidi modificati</u></b>
2-ammino-6-Cloro-purina	5-metil-citidina
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
$\alpha$ -tio-adenosina	5-metil-uridina
8-azido-adenosina	5-iodo-citidina
7-deaza-adenosina	

### **Sintesi di nucleotidi modificati**

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.

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,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), 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.

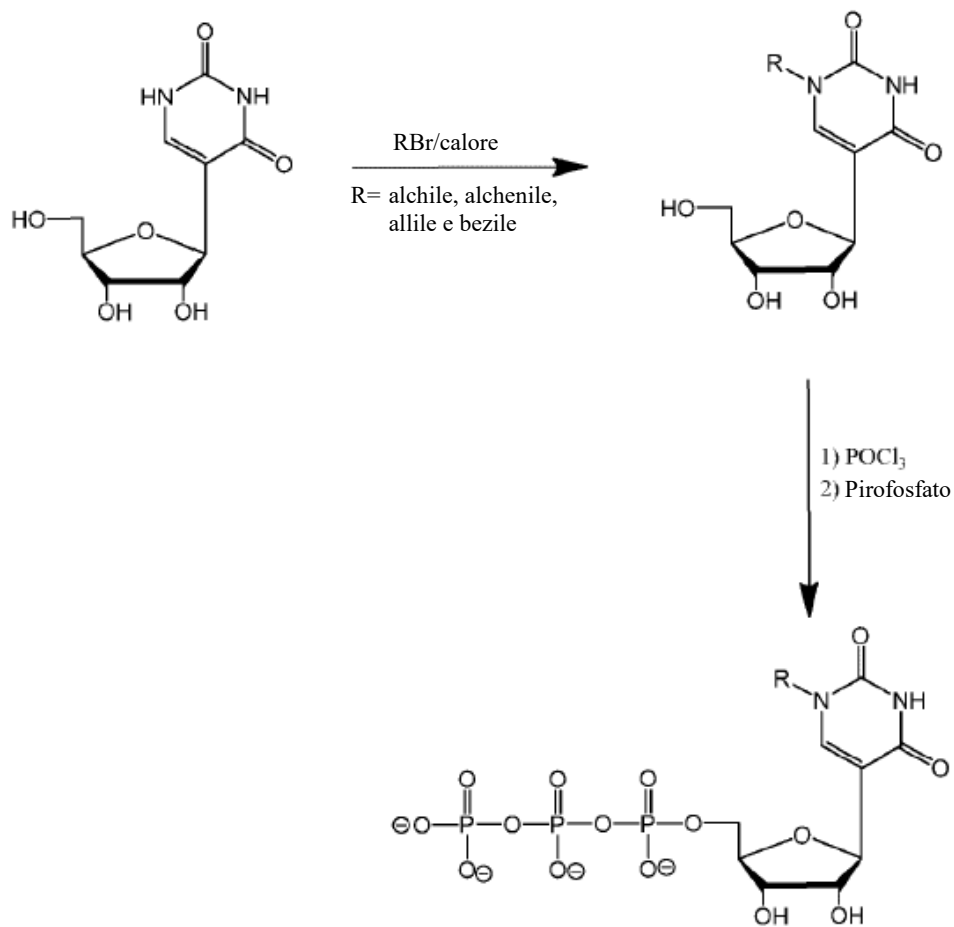
La preparazione di nucleosidi e nucleotidi modificati può prevedere la protezione e la deprotezione di vari gruppi chimici. La necessità di protezione e deprotezione e la selezione di gruppi protettivi appropriati possono essere facilmente determinate da un esperto della tecnica. La chimica dei gruppi protettivi può essere riscontrata, ad esempio, in Greene, et al., Protective

Groups in Organic Synthesis, 2a edizione, Wiley & Sons, 1991.

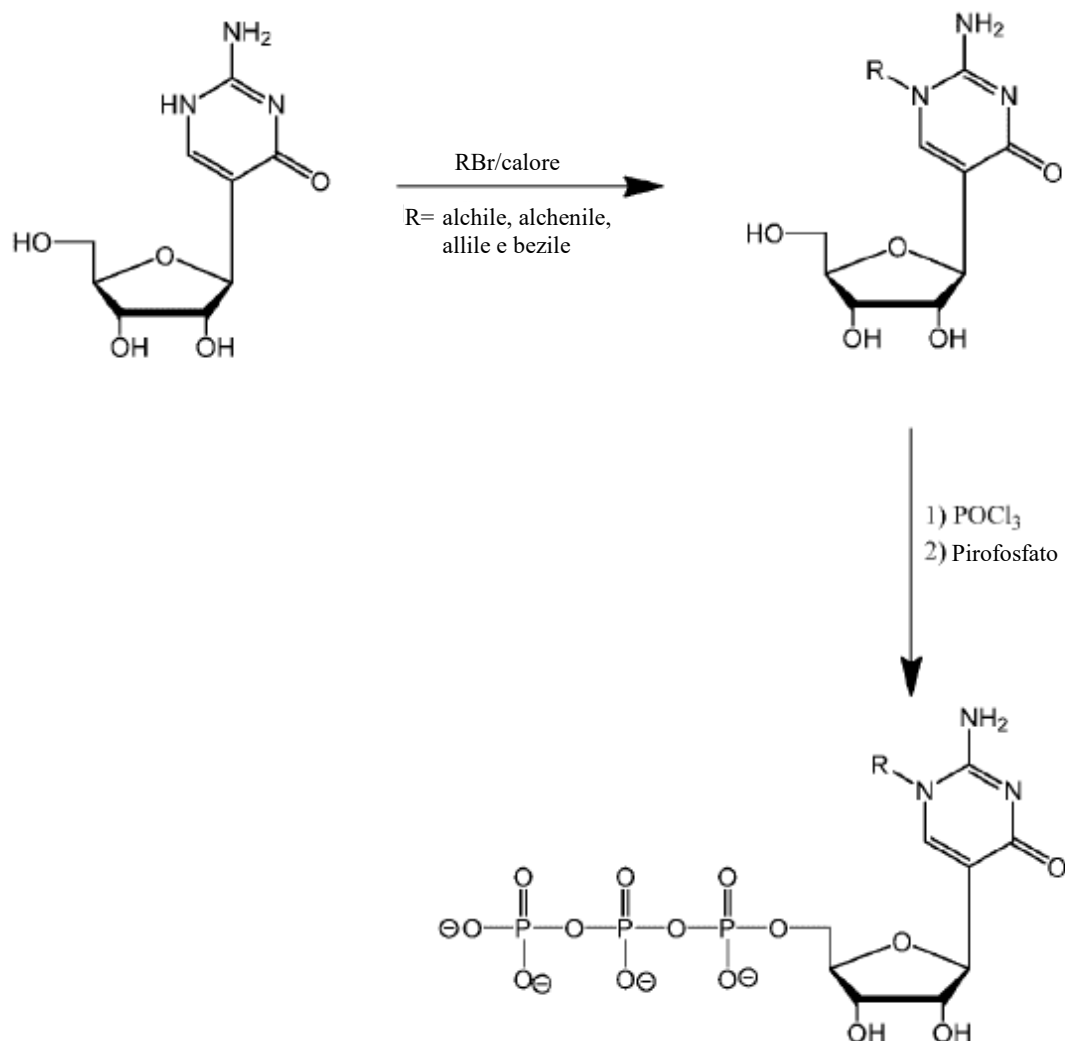
Le reazioni dei processi descritti nel presente contesto possono essere eseguite in solventi adatti che possono essere facilmente scelti da un esperto della tecnica di sintesi organica. Solventi adatti possono essere sostanzialmente non reattivi con i materiali di partenza  
5 (reagenti), gli intermedi 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. La risoluzione di miscele  
10 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 acido tartarico, acido diacetiltartarico,  
15 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.

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

**Schema 1**



**Schema 2**



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; Purmal et al.

- 5 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

Le proprietà utili qui descritte inclusa la significativa riduzione o mancanza di una induzione sostanziale della risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto

- 10 l'mRNA, o la sua soppressione. Poiché questi mRNA modificati potenziano l'efficienza della

produzione proteica, la ritenzione intracellulare degli mRNA e la vitalità delle cellule a contatto, oltre a possedere un'immunogenicità ridotta, di questi mRNA rispetto agli mRNA non modificati, aventi queste proprietà sono qui chiamati "mRNA potenziati".

Il termine "acido nucleico", nel suo senso più ampio, include qualsiasi composto e/o  
5 sostanza che è o può essere incorporato/a in una catena oligonucleotidica. Acidi nucleici per l'uso secondo la presente descrizione sono mRNA.

Sono resi disponibili acidi nucleici modificati contenenti una regione traducibile e una, due o più di due diverse modificazioni nucleosidiche. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico modificato mostra una degradazione ridotta in una cellula in cui viene introdotto  
10 l'acido nucleico, rispetto a un corrispondente acido nucleico non modificato. Come descritto nel presente contesto, gli acidi nucleici della presente descrizione non inducono sostanzialmente una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto l'mRNA.

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

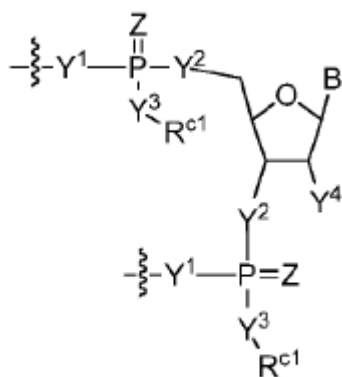
Altri componenti di acido nucleico sono opzionali e sono benefici in alcune forme di realizzazione. Ad esempio, sono fornite una regione non tradotta (UTR) in 5' e/o una 3'UTR.  
20 Sono anche resi disponibili acidi nucleici contenenti una sequenza di Kozak.

Inoltre, sono resi disponibili acidi nucleici contenenti una o più sequenze nucleotidiche introniche in grado di essere asportate dall'acido nucleico.

Inoltre, sono resi disponibili acidi nucleici contenenti un sito di ingresso del ribosoma interno (internal ribosome entry site, IRES). Un IRES può agire come unico sito di legame  
25 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, è inoltre opzionalmente prevista una seconda regione traducibile. Esempi di sequenze IRES che possono essere  
5 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 paralisi del grillo (CrPV).

10 In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico comprende un composto di Formula I-d:  
d:



I-d

in cui:

Z è O o S;

15 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;

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

B è una base azotata;

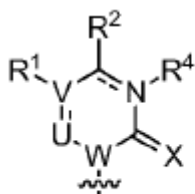
R<sup>a</sup> è H, alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, alchinile C<sub>2-20</sub> o arile C<sub>6-20</sub>;

R<sup>a1</sup> e R<sup>b1</sup> sono ciascuno indipendentemente H o un controione; e -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> è OH o SH a un pH di circa 1 o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> è O<sup>-</sup> o S<sup>-</sup> a pH fisiologico;

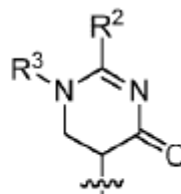
5 oppure -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> è alcossi C<sub>1-20</sub>, -O-alchenile C<sub>2-20</sub> oppure -O-alchinile C<sub>1-20</sub>;

in cui quando B è una base azotata non modificata scelta tra citosina, guanina e adenina, allora almeno uno tra Z, Y<sup>1</sup> o Y<sup>2</sup> non è O o OH.

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



II-a



II-c

10 in cui:

 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;

15 in cui quando V è C allora R<sup>1</sup> è H, alchile C<sub>1-6</sub>, alchenile C<sub>1-6</sub>, alchinile C<sub>1-6</sub>, alogeno o -OR<sup>c</sup>, in cui alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, alchinile C<sub>2-20</sub> sono ciascuno opzionalmente sostituito con -OH, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SH, -C(O)R<sup>c</sup>, -C(O)OR<sup>c</sup>, -NHC(O)R<sup>c</sup> o -NHC(O)OR<sup>c</sup>;


e in cui quando V è O, S o N allora R<sup>1</sup> è assente;

R<sup>2</sup> è H, -OR<sup>c</sup>, -SR<sup>c</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> o alogeno;

20 oppure quando V è C allora R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> 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<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, alchinile C<sub>2-20</sub>, alcossi C<sub>1-20</sub> o tioalchile

C<sub>1-20</sub>;

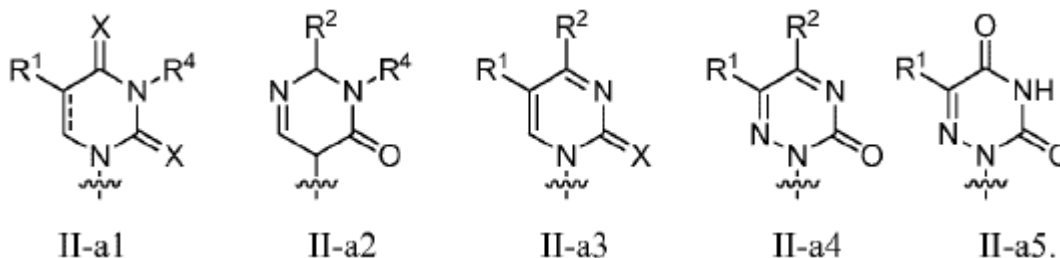
R<sup>3</sup> è H o alchile C<sub>1-20</sub>;

R<sup>4</sup> è H o alchile C<sub>1-20</sub>; in cui quando  indica un doppio legame, R<sup>4</sup> è assente, oppure N-R<sup>4</sup>, presi insieme, forma un N positivamente carico sostituito con alchile C<sub>1-20</sub>;

R<sup>a</sup> e R<sup>b</sup> sono ciascuno indipendentemente H, alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, alchinile C<sub>2-20</sub> o arile C<sub>6-20</sub>; e

R<sup>c</sup> è H, alchile C<sub>1-20</sub>, alchenile C<sub>2-20</sub>, fenile, benzile, un gruppo polietilenglicole o un gruppo ammino-polietilenglicole.

10 In alcune forme di realizzazione, B è una base azotata di Formula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



In alcune forme di realizzazione, 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 circa il 95%, o circa il 100%).

### Partner di interazione del solco maggiore

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 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.

Partner di interazione, ad esempio legame, del solco maggiore esemplificativi  
5 includono, tuttavia senza limitazioni, le seguenti nucleasi ed elicasi. All'interno delle membrane, i TLR (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  
10 il RIG-I (gene I inducibile dell'acido retinoico) e l'MDA5 (gene 5 associato alla differenziazione del melanoma). 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**

Il termine "risposta immunitaria innata" include una risposta cellulare ad acidi nucleici  
15 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  
20 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  
25 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  
5 corrispondente acido nucleico non modificato. Inoltre, la morte cellulare può interessare meno del 50%, del 40%, del 30%, del 20%, del 10%, del 5%, dell'1%, dello 0,1%, dello 0,01% o meno dello 0,01% delle cellule messe a contatto con gli acidi nucleici modificati.

La presente descrizione rende disponibile l'introduzione ripetuta (ad esempio, trasfezione) di acidi nucleici modificati in una popolazione di cellule bersaglio *in vivo*. La fase  
10 di messa a contatto della popolazione cellulare può essere ripetuta una o più volte (come due, tre, quattro, cinque o più di cinque volte). In alcune forme di realizzazione, la fase di messa a contatto della popolazione cellulare con gli acidi nucleici modificati è 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  
15 dalle modificazioni dell'acido nucleico, tali trasfezioni ripetute sono realizzabili in una vasta gamma di tipi cellulari.

### **Varianti polipeptidiche**

Vengono resi disponibili acidi nucleici che codificano polipeptidi varianti, che hanno una determinata identità con una sequenza polipeptidica di riferimento. Il termine "identità"  
20 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  
25 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;  
5 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, 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).

In alcune forme di realizzazione, la variante polipeptidica ha la stessa attività o  
10 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  
15 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.

Come riconosciuto dai tecnici del ramo, frammenti proteici, domini di proteine funzionali e proteine omologhe, sono anche considerati essere all'interno dell'ambito di tutela di  
20 questa presente descrizione. Per esempio, viene reso disponibile qui 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  
25 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 determinate forme di realizzazione, 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  
5 qui fornite o citate.

### **Complessi polipeptide-acido nucleico**

Una corretta traduzione delle proteine implica l'aggregazione fisica di un certo numero di polipeptidi e acidi nucleici associati all'mRNA. L'mRNA può essere legato a uno o più polipeptidi. Generalmente, le proteine sono fornite in una quantità efficace per prevenire o  
10 ridurre una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto il complesso.

### **Sintesi di acidi nucleici modificati**

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*,  
15 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 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].

20 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.  
25 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.

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  
5 mediante mezzi spettroscopici, come la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (ad esempio,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), 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.

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

Le reazioni dei processi descritti nel presente contesto possono essere eseguite in  
15 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  
20 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. Un metodo  
esemplificativo include la ricristallizzazione frazionaria utilizzando un “acido risolvente  
25 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 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 modificati non devono essere necessariamente modificati uniformemente lungo l'intera lunghezza della molecola. Diverse modificazioni nucleotidiche e/o strutture della catena principale possono esistere in varie posizioni nell'acido nucleico. Un esperto della tecnica con competenza ordinaria comprenderà che gli analoghi nucleotidici o altra/e modificazione/i possono trovarsi in corrispondenza di qualsiasi posizione/i di un acido nucleico in modo tale che la funzione dell'acido nucleico non sia sostanzialmente ridotta. Una modificazione può anche essere una modificazione del terminale 5' o 3'.

Gli acidi nucleici possono contenere un modificato In alcune forme di realizzazione, almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 25%, almeno il 50%, almeno l'80%, almeno il 90% o il 100% della citosina nell'acido nucleico viene sostituito con una citosina modificata. La citosina modificata può essere sostituita da un composto avente 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).

In generale, la lunghezza più breve di un mRNA della presente descrizione può essere la lunghezza della sequenza di mRNA che è sufficiente per codificare un dipeptide. In un'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

lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un esapeptide. In un'altra forma 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  
5 sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un nonapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza di una sequenza di mRNA è sufficiente per codificare un decapeptide.

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

10 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 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  
15 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, 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  
20 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 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  
25 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 un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 600 nucleotidi. In un'altra forma di 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.

### **Usi di acidi nucleici modificati**

#### **Agenti terapeutici**

L'acido nucleico modificato descritto qui 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, vengono resi disponibili qui 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 acidi nucleici modificati o cellule contenenti acidi nucleici modificati.

In alcune forme di realizzazione, sono rese disponibili terapie combinate contenenti uno o più acidi nucleici 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  
5 o più acidi nucleici che codificano trastuzumab e il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF). In particolare, tali terapie combinate sono utili nei pazienti affetti da carcinoma mammario Her2+ che sviluppano una resistenza indotta al trastuzumab [Si veda, ad esempio, Albrecht, Immunotherapy. 2(6):795-8 (2010)].

La traduzione di un polipeptide ricombinante in una popolazione cellulare usando gli  
10 acidi nucleici modificati descritti qui può essere indotta. La popolazione cellulare viene messa a contatto con una quantità efficace di una composizione contenente un acido nucleico secondo le rivendicazioni di regione traducibile codificante per il polipeptide ricombinante. La messa a contatto della popolazione avviene in condizioni tali che l'acido nucleico sia localizzato in una o più cellule della popolazione cellulare e il polipeptide ricombinante sia tradotto nella cellula  
15 dall'acido nucleico.

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 dell'acido nucleico (ad esempio, dimensione ed estensione dei nucleosidi modificati), e altri determinanti. In generale, una quantità efficace della composizione fornisce  
20 una produzione proteica efficiente nella cellula, preferibilmente più efficiente di una composizione contenente un corrispondente acido nucleico non modificato. Una maggiore efficienza può essere dimostrata dall'aumentata 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  
25 durata della traduzione proteica da un acido nucleico modificato), o dalla ridotta risposta

immunitaria innata della cellula ospite.

Aspetti della presente descrizione sono diretti a 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 composizione contenente un acido nucleico secondo le rivendicazioni  
5 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 nucleico o il tessuto in cui è presente la cellula possono essere presi di mira con uno o più cicli di  
10 somministrazione di acido nucleico.

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  
15 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 alcune forme di realizzazione, la composizione è formulata per il rilascio prolungato.

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

In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico modificato somministrato dirige la produzione di uno o più polipeptidi ricombinanti che forniscono un'attività funzionale che è sostanzialmente assente nella cellula in cui viene tradotto il polipeptide ricombinante. Ad  
25 esempio, l'attività funzionale mancante può essere di natura enzimatica, strutturale o di

regolazione genica.

In altre forme di realizzazione, 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 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.

Le proteine ricombinanti descritte nella presente sono ingegnerizzate per la localizzazione 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.

Come descritto nel presente contesto, una caratteristica utile degli acidi nucleici modificati della presente descrizione è la capacità di ridurre la risposta immunitaria innata di una cellula a un acido nucleico esogeno.

### **Terapie per malattie e condizioni**

In alcune forme di realizzazione, l'mRNA dell'invenzione è per l'uso 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, gli mRNA 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  
5 vantaggiosa in quanto è possibile ottenere un'accurata titolazione della produzione di proteine.

Le malattie caratterizzate da attività proteica disfunzionale o aberrante includono, tuttavia senza limitazioni, cancro e malattie proliferative, malattie genetiche (ad esempio, fibrosi cistica), malattie autoimmuni, diabete, malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari e malattie metaboliche. La presente descrizione consente il trattamento di tali condizioni o  
10 malattie in un soggetto introducendo sostanze terapeutiche a base di acidi nucleici o cellule contenenti gli acidi nucleici modificati qui forniti, 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),  
15 che producono una variante proteica disfunzionale della proteina CFTR, che causa la fibrosi cistica.

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. La presente  
20 descrizione consente il trattamento di tali condizioni o malattie in un soggetto introducendo sostanze terapeutiche a base di acido nucleico o cellule contenenti gli acidi nucleici modificati resi disponibili qui, in cui gli acidi nucleici modificati codificano 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  
25 della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che producono una variante

proteica non funzionale della proteina CFTR, che causa la fibrosi cistica.

Il trattamento della fibrosi cistica in un soggetto mammifero può essere conseguito mediante la messa a contatto di una cellula del soggetto con acido nucleico modificato avente una regione traducibile che codifica un polipeptide CFTR funzionale, in condizioni tali che una  
5 quantità efficace del polipeptide CTFR 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.

In un'altra forma di realizzazione, la presente descrizione consente il trattamento di  
10 iperlipidemia in un soggetto, introducendo in una popolazione cellulare del soggetto una molecola di mRNA modificato che codifica lla 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  
15 nucleotide, rs12740374, nel locus 1p13 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  
20 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 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).

## 25 **Metodi di rilascio cellulare di acido nucleico**

L'erogazione *in vivo* di un acido nucleico può essere potenziata. Per esempio una composizione che contiene un acido nucleico potenziato 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.

In alcune forme di realizzazione, 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 induce sostanzialmente una risposta immunitaria innata della popolazione cellulare e, inoltre, che 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.

### **Frazioni di bersagliamento**

In alcune forme di realizzazione, 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.

## 5 Silenziamento permanente dell'espressione genica

L'mRNA può essere per l'uso in un metodo per silenziare epigeneticamente l'espressione genica in un soggetto mammifero, comprendente l'mRNA 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

Le composizioni farmaceutiche possono opzionalmente comprendere una o più sostanze terapeuticamente attive aggiuntive. In alcune forme di realizzazione le composizioni vengono somministrate agli esseri umani. Ai fini della presente descrizione, l'espressione "principio attivo" si riferisce generalmente a un complesso contenente proteina come qui descritto.

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 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 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.

5 Le formulazioni delle composizioni farmaceutiche qui descritte possono essere preparate con qualsiasi metodo noto o di seguito sviluppato nella tecnica della farmacologia. In generale, 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.

10 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 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  
15 somministrato a un soggetto e/o una frazione opportuna di tale dosaggio come, ad esempio, metà o un terzo di tale dosaggio.

Le quantità relative del principio attivo, dell'eccipiente farmaceuticamente accettabile e/o 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  
20 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.

Le formulazioni farmaceutiche possono inoltre comprendere un eccipiente farmaceuticamente accettabile, che, come utilizzato nel presente contesto, include tutti i  
25 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) descrive vari eccipienti utilizzati nella formulazione  
5 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, il suo uso è contemplato essere all'interno dell'ambito di tutela di questa presente descrizione.

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

Gli eccipienti farmaceuticamente accettabili utilizzati nella produzione di composizioni farmaceutiche includono, ma non sono limitati a, diluenti inerti, agenti disperdenti e/o  
20 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 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.

25 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 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.

5           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, 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(vinilpirrolidone) reticolato (crospovidone), carbossimetilamido sodico (sodio amido glicolato),  
10 carbossimetilcellulosa, carbossimetilcellulosa sodica reticolata (croscarmellosa), metilcellulosa, amido pregelatinizzato (amido 1500), amido microcristallino, amido insolubile in acqua, carbossimetilcellulosa di calcio, silicato di magnesio e alluminio (Veegum), sodio laurilsolfato, composti di ammonio quaternario, ecc., e/o loro combinazioni.

          Esempi di agenti tensioattivi e/o emulsionanti includono, ma non sono limitati a,  
15 emulsionanti naturali (ad esempio acacia, agar, acido alginico, alginato di sodio, gomma adragante, condru, colesterolo, xantano, pectina, gelatina, tuorlo d'uovo, caseina, grasso di lana, colesterolo, cera e lecitina), argille colloidali (ad esempio bentonite [silicato di alluminio] e Veegum® [silicato di magnesio e alluminio]), derivati di amminoacidi a catena lunga, alcoli ad alto peso molecolare (ad esempio alcol stearilico, alcol cetilico, alcol oleilico, triacetina  
20 monostearato, etilenglicole distearato, gliceril monostearato e propilenglicole monostearato, alcol polivinilico), carbomeri (ad esempio carbossipolimetilene, acido poliacrilico, polimero di acido acrilico e polimero carbossivinilico), carragenina, derivati cellulosici (ad esempio carbossimetilcellulosa sodica, cellulosa in polvere, idrossimetilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, metilcellulosa), esteri di acidi grassi del sorbitano (ad esempio  
25 monolaurato di poliossietilene sorbitano [Tween®20], poliossietilene sorbitano [Tween®60],

polioossietilene sorbitano monooleato [Tween<sup>®</sup>80], sorbitano monopalmitato [Span<sup>®</sup>40], sorbitano monostearato [Span<sup>®</sup>60], sorbitano tristearato [Span<sup>®</sup>65], gliceril monooleato [Span<sup>®</sup>80]), esteri di polioossietilene (ad esempio monostearato di polioossietilene [Myrj<sup>®</sup>45], olio di ricino idrogenato polioossietilene, olio di ricino polietossilato, stearato di polioossimetilene e Solutol<sup>®</sup>), esteri di acidi grassi di saccarosio, esteri di acidi grassi di polietilenglicole (ad esempio Cremophor<sup>®</sup>), eteri di polioossietilene, (ad esempio polioossietilene lauril etere [Brij<sup>®</sup>30]), poli(vinil-pirrolidone), dietilenglicole monolaurato, trietanolammina oleato, sodio oleato, potassio oleato, etil oleato, acido oleico, etil laurato, sodio laurilsolfato, Pluronic<sup>®</sup> F 68, Poloxamer<sup>®</sup> 188, bromuro di cetrimonio, cloruro di cetilpiridinio, cloruro di benzalconio, sodio docusato, ecc. e/o loro combinazioni.

Agenti leganti esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, amido (ad esempio 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, poli(vinil-pirrolidone), silicato di magnesio-alluminio (Veegum<sup>®</sup>) e arabogalattano di larice); alginati; ossido di polietilene; polietilenglicole; sali di calcio inorganici; acido silicico; polimetacrilati; cere; acqua; alcol; ecc.; e loro combinazioni.

Conservanti esemplificativi possono includere, ma non sono limitati a, antiossidanti, agenti chelanti, conservanti antimicrobici, conservanti antifungini, conservanti alcolici, 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 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

5 benzilico, bronopol, cetrimide, cetilpiridinio cloruro, clorexidina, clorobutanolo, clorocresolo, cloroxilenolo, cresolo, alcol etilico, glicerina, esetidina, imidurea, fenolo, fenossietanolo, alcol 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,

10 benzoato di sodio, propionato di sodio e/o acido sorbico. Conservanti alcolici esemplificativi 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

15 acido fitico. Altri conservanti includono, tuttavia senza limitazioni, tocoferolo, tocoferolo acetato, deterossima mesilato, cetrimide, idrossianisolo butilato (BHA), idrossitoluene butilato (BHT), etilendiammina, sodio laurilsolfato (SLS), sodio laurileteresolfato (SLES), bisolfito di sodio, metabisolfito di sodio, solfito di potassio, metabisolfito di potassio, Glydant Plus<sup>®</sup>, Phenonip<sup>®</sup>, metilparabene, Germall<sup>®</sup>115, Germaben<sup>®</sup>II, Neolone<sup>™</sup>, Kathon<sup>™</sup> e/o Euxyl<sup>®</sup>.

20 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

25 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.

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.

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, 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, butilstearato, trigliceride caprilico, trigliceride caprico, ciclometicone, dietil sebacato, dimeticone 360, isopropil miristato, olio minerale, ottildodecanolo, alcol oleico, olio di silicone e/o loro combinazioni.

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, etilacetato, alcol benzilico, benzilbenzoato, propilenglicole, 1,3-butilenglicole, 5 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, aromatizzanti e/o agenti di profumazione. In determinate forme di realizzazione per 10 la somministrazione parenterale, le composizioni vengono miscelate con agenti solubilizzanti come Cremophor<sup>®</sup>, alcoli, oli, oli modificati, glicoli, polisorbati, ciclodestrine, polimeri e/o loro combinazioni.

Preparati iniettabili, ad esempio, sospensioni acquose o oleose iniettabili sterili, possono essere formulati secondo la tecnica nota usando agenti disperdenti, agenti umettanti e/o agenti 15 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 sodio. Oli fissi sterili sono tradizionalmente impiegati come solvente o mezzo di sospensione. A 20 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.

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

mezzo iniettabile sterile prima dell'uso.

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  
5 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  
10 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.

15 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.

20 Forme di dosaggio solide per la somministrazione orale includono capsule, compresse, 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,  
25 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  
5 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.

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  
10 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  
15 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.

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

forme di dosaggio possono essere preparate, ad esempio, dissolvendo e/o erogando il composto nel mezzo 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.

5           Dispositivi adatti per l'uso nel rilascio di composizioni farmaceutiche intradermiche qui 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  
10 pubblicazione PCT WO 99/34850 e relativi equivalenti funzionali. Dispositivi di iniezione a getto che rilasciano composizioni liquide nel derma tramite un iniettore a getto di liquido e/o tramite un ago che 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;  
15 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 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  
20 intradermica mantoux.

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

Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata e/o venduta in una  
5 formulazione adatta per la somministrazione polmonare attraverso la cavità buccale. Una tale formulazione può comprendere particelle secche che comprendono il principio attivo e che hanno un diametro nell'intervallo da circa 0,5 nm a circa 7 nm da circa 1 nm a circa 6 nm. Tali composizioni sono opportunamente sotto forma di polveri secche per la somministrazione utilizzando un dispositivo comprendente un serbatoio di polvere secca a cui può essere diretto  
10 un flusso di propellente per disperdere la polvere e/o utilizzando un contenitore di erogazione di solvente/polvere autopropellente come un dispositivo comprendente il principio attivo disciolto e/o sospeso in un propellente a basso punto di ebollizione in un contenitore sigillato. Tali polveri comprendono particelle in cui almeno il 98% delle particelle in peso ha un diametro superiore a 0,5 nm almeno il 95% delle particelle in numero ha un diametro inferiore a 7 nm. In  
15 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 una forma di dose unitaria.

I propellenti a basso punto di ebollizione generalmente includono propellenti liquidi  
20 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 ingredienti aggiuntivi come un tensioattivo non ionico liquido e/o anionico solido e/o un diluente solido (che può avere una granulometria dello stesso ordine delle  
25 particelle che comprendono il principio attivo).

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 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  
5 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, un agente tamponante, un agente tensioattivo e/o un conservante come il metilidrossibenzoato. Le goccioline fornite con questa via di somministrazione possono avere  
10 un diametro medio nell'intervallo da circa 0,1 nm a circa 200 nm.

Le formulazioni descritte nella presente come utili per la somministrazione polmonare sono utili per la somministrazione intranasale di una composizione farmaceutica. Un'altra formulazione adatta per la somministrazione intranasale è una polvere grossolana comprendente il principio attivo e avente una particella media da circa 0,2  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ . Tale formulazione  
15 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.

Le formulazioni adatte per la somministrazione nasale possono, ad esempio, comprendere da circa lo 0,1% (p/p) e fino al 100% (p/p) del principio attivo e possono  
20 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 principio attivo, il resto comprendendo una composizione  
25 oralmente solubile e/o degradabile e, 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 granulometria e/o dimensione delle goccioline media  
5 nell'intervallo da circa 0,1 nm a circa 200 nm, e possono inoltre comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente.

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  
10 del 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  
15 nell'ambito della presente descrizione.

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.

### **Somministrazione**

20 La presente descrizione consente la somministrazione di complessi secondo la presente descrizione a un soggetto che ne ha bisogno. I complessi, o le loro composizioni farmaceutiche o profilattiche, possono essere somministrati a un soggetto utilizzando qualsiasi quantità e qualsiasi via di somministrazione efficace per prevenire o trattare una malattia, un disturbo e/o una condizione (ad esempio una malattia, un disturbo e/o una condizione relativa a deficit della  
25 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 in conformità con la presente descrizione sono tipicamente formulate in forma di unità di dosaggio per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. Risulterà  
5 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  
10 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. In alcune forme di realizzazione, i complessi e/o le loro  
15 composizioni farmaceutiche o profilattiche vengono somministrati mediante iniezione endovenosa sistemica. In forme di realizzazione specifiche, i complessi e/o le loro composizioni farmaceutiche o profilattiche possono essere somministrati per via endovenosa e/o orale. In forme di realizzazione specifiche, i complessi e/o le loro composizioni farmaceutiche o profilattiche possono essere somministrati in un modo che consente alla proteina o al complesso  
20 di attraversare la barriera ematoencefalica, la barriera vascolare o altra barriera epiteliale.

Tuttavia, la presente descrizione comprende il rilascio di complessi e/o loro composizioni farmaceutiche o profilattiche attraverso qualsiasi via appropriata, tenendo in considerazione i probabili progressi nelle scienze del rilascio di farmaci.

In generale, la via di somministrazione più appropriata dipenderà da una varietà di  
25 fattori, inclusa la natura 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 comprende il rilascio delle composizioni farmaceutiche o profilattiche mediante qualsiasi via appropriata prendendo in  
5 considerazione i probabili progressi nelle scienze del rilascio di farmaci.

In alcune forme di realizzazione, 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 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  
10 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 l'effetto terapeutico o profilattico desiderato. Il dosaggio desiderato può 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. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio desiderato può essere  
15 erogato utilizzando molteplici somministrazioni (ad esempio, due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, quattordici o più somministrazioni).

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  
20 essere rilasciati insieme, sebbene questi metodi di rilascio rientrino nell'ambito della presente 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 alcune forme di realizzazione, la presente descrizione comprende il rilascio di  
25 composizioni farmaceutiche, profilattiche, diagnostiche o di imaging in combinazione con

agenti che 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.

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 aspetta che gli agenti utilizzati in combinazione siano utilizzati a livelli che non superano i livelli a cui essi sono utilizzati singolarmente. In alcune forme di realizzazione, i livelli utilizzati in combinazione saranno inferiori rispetto a quelli utilizzati singolarmente.

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 procedure desiderate e dell'effetto terapeutico desiderato da ottenere. Si comprenderà anche che 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).

### **Kit**

La presente descrizione rende disponibile una varietà di kit per eseguire opportunamente e/o efficacemente la 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.

L'mRNA per l'uso dell'invenzione può essere compreso in uno qualsiasi dei seguenti kit. In un aspetto, la descrizione rende disponibili kit per la produzione di proteine, comprendenti un primo acido nucleico isolato secondo le rivendicazioni, 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.

In alcune forme di realizzazione, l'mRNA comprende inoltre almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-idrossimetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 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.

In alcune forme di realizzazione, l'mRNA comprende inoltre almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da 2-amminopurina, 2, 6-diamminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-amminopurina, 7-deaza-8-aza-2-amminopurina, 7-deaza-2,6-diamminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diamminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-idrossiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-idrossiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina e 2-metossi-adenina.

In alcune forme di realizzazione, l'mRNA comprende inoltre almeno un nucleoside scelto dal gruppo costituito da inosina, 1-metil-inosina, wyosina, wybutosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metossi-guanosina, 1-metilguanosa, N2-metilguanosa, N2,N2-dimetilguanosa, 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.

### Esempi

L'invenzione è ulteriormente descritta nei seguenti esempi, che non limitano l'ambito di

tutela dell'invenzione descritto nelle rivendicazioni.

### **Esempio 1. Trascrizione *in vitro* di mRNA modificato**

#### ***Materiali e metodi***

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 conteneva nucleotidi modificati. La cornice di lettura aperta (ORF) del gene di interesse è 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.

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**

<b><u>Nucleotide modificato</u></b>	<b><u>N. Comp. chimica</u></b>	<b><u>Combinazione di nucleotidi modificati</u></b>	<b><u>N. Comp. chimica</u></b>
6-aza-citidina	Comp. chimica 1	$\alpha$ -tio-citidina / 5-iodo-uridina	Comp. chimica 29
2-tio-citidina	Comp. chimica 2	$\alpha$ -tio-citidina / N1-metil-pseudo-uridina	Comp. chimica 30
$\alpha$ -tio-citidina	Comp. chimica 3	$\alpha$ -tio-citidina / $\alpha$ -tio-uridina	Comp. chimica 31
Pseudo-iso-citidina	Comp. chimica 4	$\alpha$ -tio-citidina / 5-metil-uridina	Comp. chimica 32
5-amminoallil-	Comp. chimica 5	$\alpha$ -tio-citidina / pseudo-uridina	Comp. chimica 33

<b><u>Nucleotide modificato</u></b>	<b><u>N. Comp. chimica</u></b>	<b><u>Combinazione di nucleotidi modificati</u></b>	<b><u>N. Comp. chimica</u></b>
uridina			
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 / $\alpha$ -tio-uridina	Comp. chimica 36
$\alpha$ -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
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 / $\alpha$ -tio-uridina	Comp. chimica 42
Inosina	Comp. chimica 15	Pirrolo-citidina / 5-metil-uridina	Comp. chimica 43
$\alpha$ -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 / $\alpha$ -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

<u>Nucleotide modificato</u>	<u>N. Comp. chimica</u>	<u>Combinazione di nucleotidi modificati</u>	<u>N. Comp. chimica</u>
$\alpha$ -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		

**Elettroforesi su gel di agarosio del modRNA:** Singoli modRNA modificati (200-400 ng in un volume di 20  $\mu$ 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 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**

<b>Colonna</b>	<b>NTP modificato</b>
1	$\alpha$ -tio-citidina
2	Pseudo-iso-citidina
3	5-amminoallil-uridina
4	5-iodo-uridina
5	N1-metil-pseudo-uridina
6	$\alpha$ -tio-uridina
7	4-tio-uridina
8	5-idrossi-uridina
9	Desossi-timidina
10	Pseudo-uridina
11	Inosina
12	$\alpha$ -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	$\alpha$ -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

**Tabella 5**

<b>Colonna</b>	<b>Combinazione NTP modificati</b>
1	$\alpha$ -tio-citidina / 5-iodo-uridina
2	$\alpha$ -tio-citidina / N1-metil-pseudouridina
3	$\alpha$ -tio-citidina / $\alpha$ -tio-uridina
4	$\alpha$ -tio-citidina / 5-metil-uridina
5	$\alpha$ -tio-citidina / pseudouridina
6	5-iodo-citidina / 5-iodo-uridina
7	5-iodo-citidina / N1-metil-pseudouridina
8	5-iodo-citidina / $\alpha$ -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 / $\alpha$ -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 / $\alpha$ -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 / $\alpha$ -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

**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  
5 modificato caricato in ciascuna colonna.

**Quantificazione del modRNA Nanodrop e dati spettrali UV:** i modRNA nel tampone TE (1 µl) 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  
10 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  
15 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  
20 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**

**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  $1 \times 10^5$ . Per gli esperimenti eseguiti in una piastra di coltura tissutale rivestita con collagene a 5 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.

**Trasfezione diretta:** In una piastra di coltura tissutale rivestita con collagene a 24 10 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 confluenza di  $>70\%$  per oltre 24 ore. Per ciascun modRNA da trasfettare, modRNA: RNAiMAX è stato preparato come descritto e trasfettato sulle cellule 15 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**

Le Figure 2A e 2B mostrano un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il fattore stimolante le colonie di granulociti umani (hu-G-CSF) di cellule di cheratinociti umani 20 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 con 300 ng di modRNA complessato con RNAiMAX di Invitrogen. Il complesso di 25 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 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 Systems (Minneapolis, MN) seguendo le istruzioni consigliate dai produttori.

5

10

15

Questi dati 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 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**

Le Figure 3A-N mostrano un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il 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.

20

25

La concentrazione di huG-CSF secreto nel mezzo di coltura è stata 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 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 hu-G-CSF sono costituiti da 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 modificato contenente nucleotidi modificati 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 e che 750 ng di modRNA stimolano i più elevati livelli di hu-G-CSF secreto.

### **Esempio 3. Risposta immunitaria innata cellulare a modRNA**

#### **15 ELISA di IFN- $\beta$ ed ELISA di TNF- $\alpha$ :**

Le Figure 4A-F mostrano un test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il fattore di necrosi tumorale umano- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Figure 4A e 4B); interferone- $\beta$  umano (IFN- $\beta$ ) (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 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- $\alpha$  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 i protocolli del produttore.

Nelle Figure 4C e 4D, l'IFN- $\beta$  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  
5 concentrazione di hu-G-CSF secreto nello stesso terreno di coltura è stata misurata a 24 ore dalla trasfezione per 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  
10 contenenti nucleotidi modificati erano in grado di suscitare una risposta immunitaria innata cellulare ridotta rispetto ai nucleotidi naturali e ad altri nucleotidi modificati chimicamente misurando citochine di tipo I TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$  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- $\alpha$  e IFN- $\beta$  secreti nel  
15 terreno di coltura cellulare pur mantenendo alti livelli di secrezione di hu-G-CSF codificante modRNA nel terreno di coltura cellulare.

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

Le Figure 5A-D mostrano che hu-G-CSF codificante modRNA prodotto da uno strato  
20 cellulare alimentare 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 sono separate da una membrana semipermeabile.

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,  
25 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 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  
5 membrana in poliestere semipermeabile con pori di 0,4 µm 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 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  
10 ciascun modRNA codificante hu-G-CSF indicato.

Cellule mieloblasti umani, cellule Kasumi-1 (Figura 5C) o KG-1 (Figura 5D) ( $0,2 \times 10^5$  cellule) sono state seminate nel pozzetto dell'insero e la proliferazione cellulare è stata 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  
15 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'insero di cheratinociti e mieloblasti è stata misurata a 42 ore dall'inizio della co-coltura per ciascun modRNA in duplicato. La secrezione del fattore  
20 stimolante le colonie di granulociti umani (G-CSF) è stata quantificata utilizzando un kit ELISA di Invitrogen seguendo le istruzioni consigliate dai produttori.

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)  
25 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
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
37	Vuoto	Vuoto
38	Vuoto	Vuoto
39	Vuoto	Vuoto
40	Vuoto	Vuoto
41	Vuoto	Vuoto
42	Vuoto	Vuoto
43	Vuoto	Vuoto
44	Vuoto	Vuoto

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:**

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  
5 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 trasfettati viene quantificata utilizzando un kit ELISA di  
10 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.

#### **Esempio 6. Co-coltura**

L'mRNA modificato composto da nucleotidi modificati chimicamente distinti che  
15 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  
20 altamente trasfettabile consentendo la produzione e la secrezione della proteina G-CSF nell'ambiente extracellulare dove il G-CSF agisce in modo simil-paracrina 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  
25 rischio di infezioni opportunistiche.

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.

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

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 esposte nel presente contesto. La ORF è stata digerita per restrizione utilizzando XbaI e utilizzata per la sintesi del cDNA utilizzando la PCR con o senza coda. Il prodotto cDNA della  
10 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  
15 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  
20 di capping del virus vaccinico 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  
25 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.

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

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'-O-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G; G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A; m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). Il capping di modRNA in 5' può essere completato post-  
10 trascrizionalmente utilizzando un enzima di capping del virus vaccिनico per generare la struttura "Cap 0": m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La struttura di Cap 1 può essere generata utilizzando sia l'enzima di capping del virus Vaccinia che una 2'-O metil-transferasi per generare: m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G-2'-O-metile. La struttura Cap 2 può essere generata  
15 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 derivati da una fonte ricombinante.

**Sequenze:**

20 **cDNA di G-CSF:**

agctttggaccctctgacagaagctaatacactcactatagggaaataagagagaaaagaagagtaagaagaatataagag  
ccacatggccgggtcccgcgacccaaagcccatgaaacttatggccctgcagttgctgctttggcactcggccctctggacagtccaaga  
agcgactcctctcggacctgcctcatcgttggcgcagtcattcctttgaaagtctctggagcagggtgcgaaagattcagggcgatggagccg  
cactcaagagaagctctcgcgcacatacaaaactttgccatcccaggagctcgtactgctcgggcacagcttggggattccctgggctcc  
tctctcgtctgtccgtcgcaggttgcagttggcaggggtgctttcccagctccactccggttgttctctgfatcagggactgctgcaagccc  
ttgaggaatctcgcagaattgggcccgcagctggacacgttgcagctcgcagctggcggatftcgcaacaaccatctggcagcagatgg  
aggaactggggatggcaccgcgctgcagcccacgcaggggcaatgccggcctttgctccgcttfcagcgcagggcgggtggagt  
cctcgtagcagccacctcaatcattttggaagtctcgtaccgggtgctgagacatcttgcgcagccgtgaagcgtgccttctcgggggc  
ttgccttctggccatgcccttctctccttgcacctgtaccttggctttgataaaagcctgagtaggaaggcggccctcgcagcatgca  
tctagagggccaattcgcctattcgaagtcg (SEQ ID NO: 1)

**mRNA di G-CSF:**

agcuuuuggaccucguacagaagcuauuacgacucacuaauagggaaauaagagagaaaagaagaguagaagaagaaau  
auaagagccaccauaggccgguccgcgacccaaagcccaugaaacuauaggccucgaguugcugcuuuuggcacucggcccu  
cuggacaguccaagaagcgacuccucucggaccugccucaucguugccgcagucuuuccuuuugaagugucuggagcaggug  
cgaaagauucagggcgauaggagccgcacuccaagagaagcucugcgcgacauacaacuugccaucccgaggagcucguacu  
gcuugggcacagcuuuggggaauuccugggcuccucucucgucuccuguccgucgagccuuugcaguuggcagggugccuuuc  
ccagcuccacuccgguuuuguuucuaucaggggacugcugcaagcccuugagggaucucgccagaauugggcccgcgucg  
gacagcuugcagcucgacgugggggaauucgcaacaaccaucuggcagcagauggaggaacuggggauggcaccgcgucg  
agcccacgcagggggcaaugccggccuuugcugccgcuuucagcgcagggcggguggaguccucguagcagccaccuuca  
aucauuuuuggaagucucguaccgggugcugagacauucgagcgcgugaagcgcugccuucugcggggcuugccuuuc  
ggccaugcccuucucucccuugcaccuugcaccuugcuccuuugaauaaagccugaguaggaaggcggccgcgucgagca  
ugcaucuagagggcccauucgcccuaucgaagucg (SEQ ID NO: 2)

**Proteina G-CSF:**

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI  
QGDGAALQEKLVSECATYKLCHEPELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHS  
GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPA  
FASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS YRVLRLHLAQP (SEQ ID NO: 3)

5

**Primer di sintesi del cDNA:**

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<sub>(120)</sub>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)

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

5 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)

**Altre forme di realizzazione**

Resta inteso che, sebbene l'invenzione sia stata descritta unitamente alla sua descrizione  
dettagliata, la descrizione precedente ha lo scopo di illustrare e non limitare l'ambito di tutela  
10 dell'invenzione, che è definito dall'ambito di tutela delle rivendicazioni allegate. Altri aspetti,  
vantaggi e modifiche rientrano nell'ambito di tutela delle seguenti rivendicazioni.

### RIVENDICAZIONI

1. mRNA, comprendente N1-metil-pseudouridina per l'uso come medicinale, in cui il 100% dei nucleotidi comprendenti uracile nell'mRNA viene sostituito con nucleotidi comprendenti N1-metil-pseudouridina.
2. L'mRNA per l'uso della rivendicazione 1, in cui l'uso è per il trattamento o la prevenzione di una malattia o condizione in un mammifero.
3. L'mRNA per l'uso di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'uso è per il trattamento o la prevenzione di una malattia o condizione in un essere umano.
4. L'mRNA per l'uso di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'mRNA è ottenibile mediante trascrizione in vitro, in cui gli unici NTP utilizzati per preparare l'mRNA in detta trascrizione in vitro sono N1-metil-pseudouridina trifosfato, ATP, CTP e GTP.

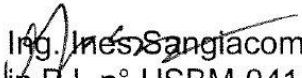
\* \* \* \*

Seguono n° 31 tavole di disegno.

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

Brescia, 17 dicembre 2024

In Fede,

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

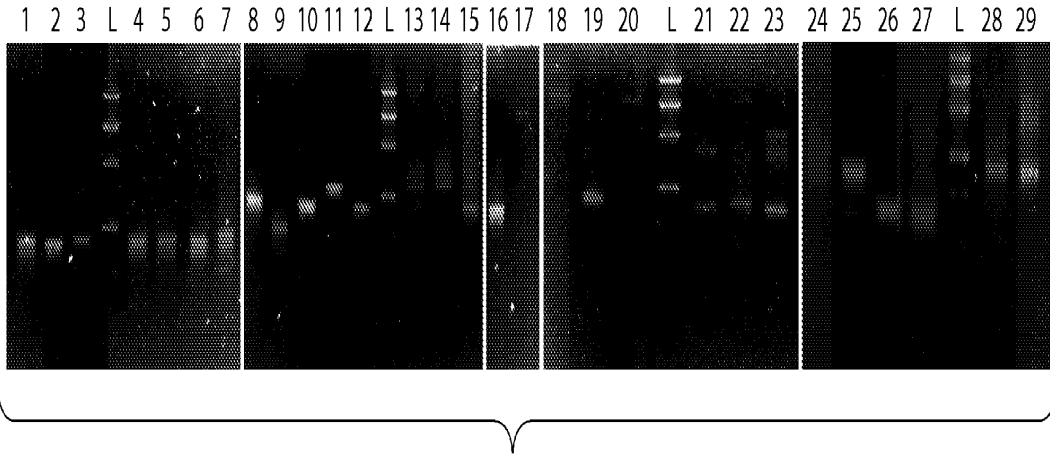


Fig. 1A

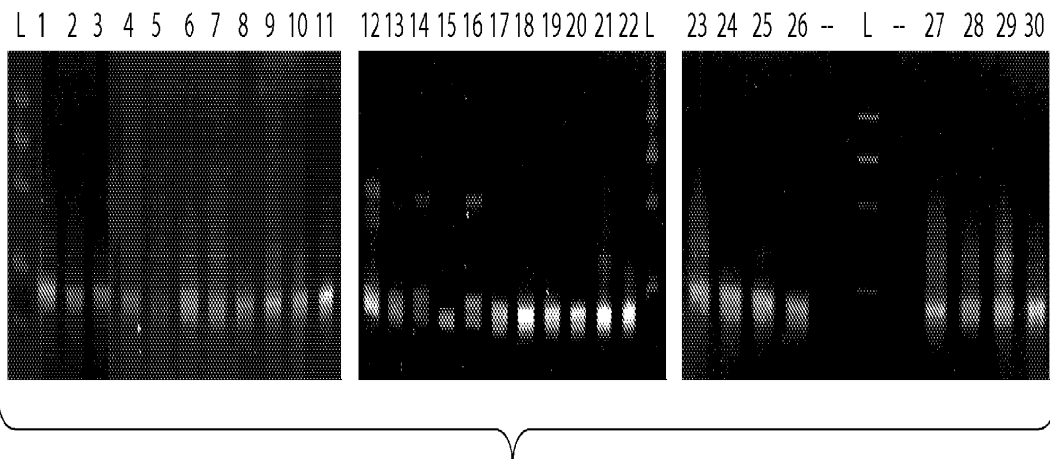


Fig. 1B

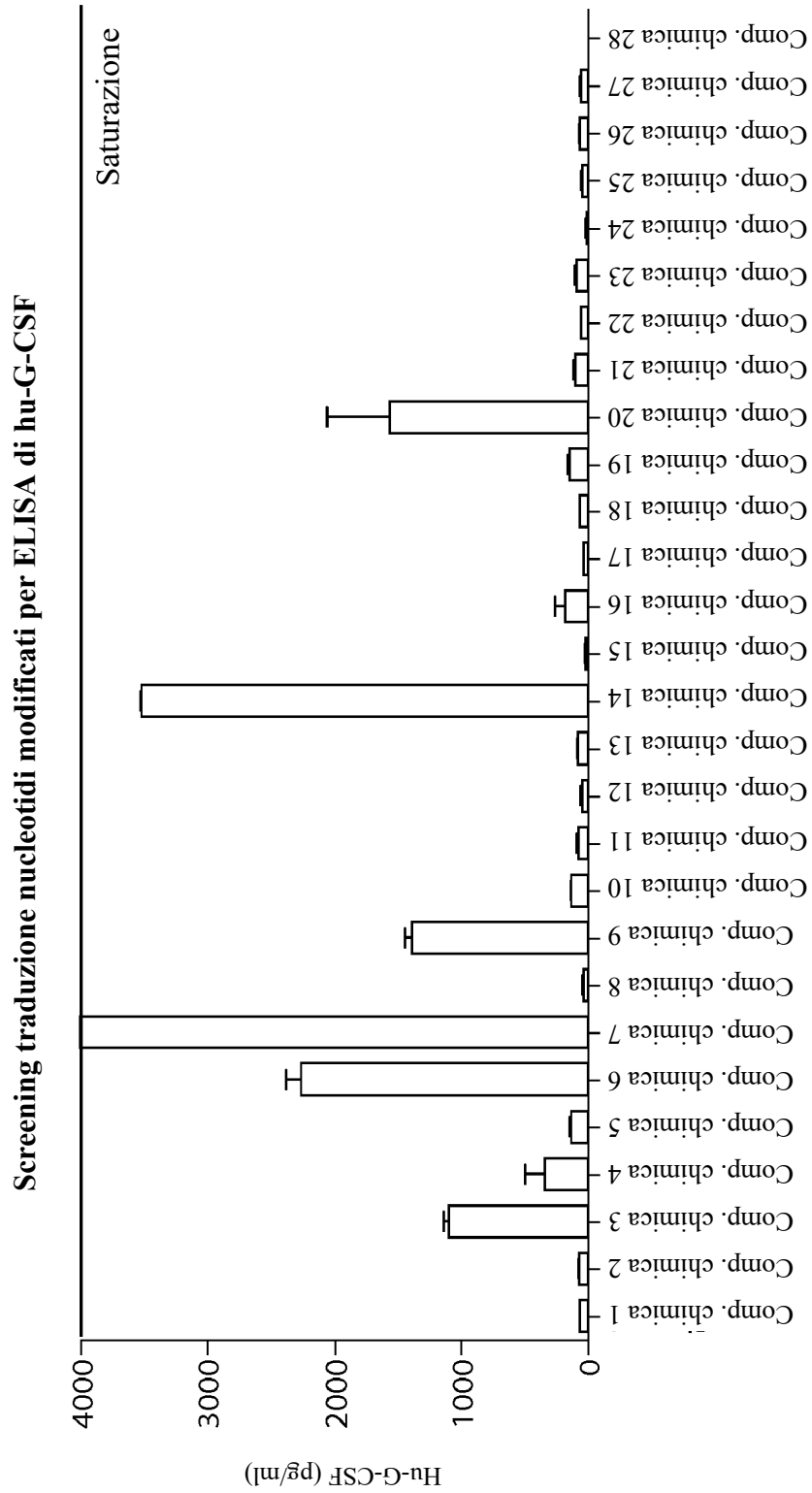


Fig. 2A

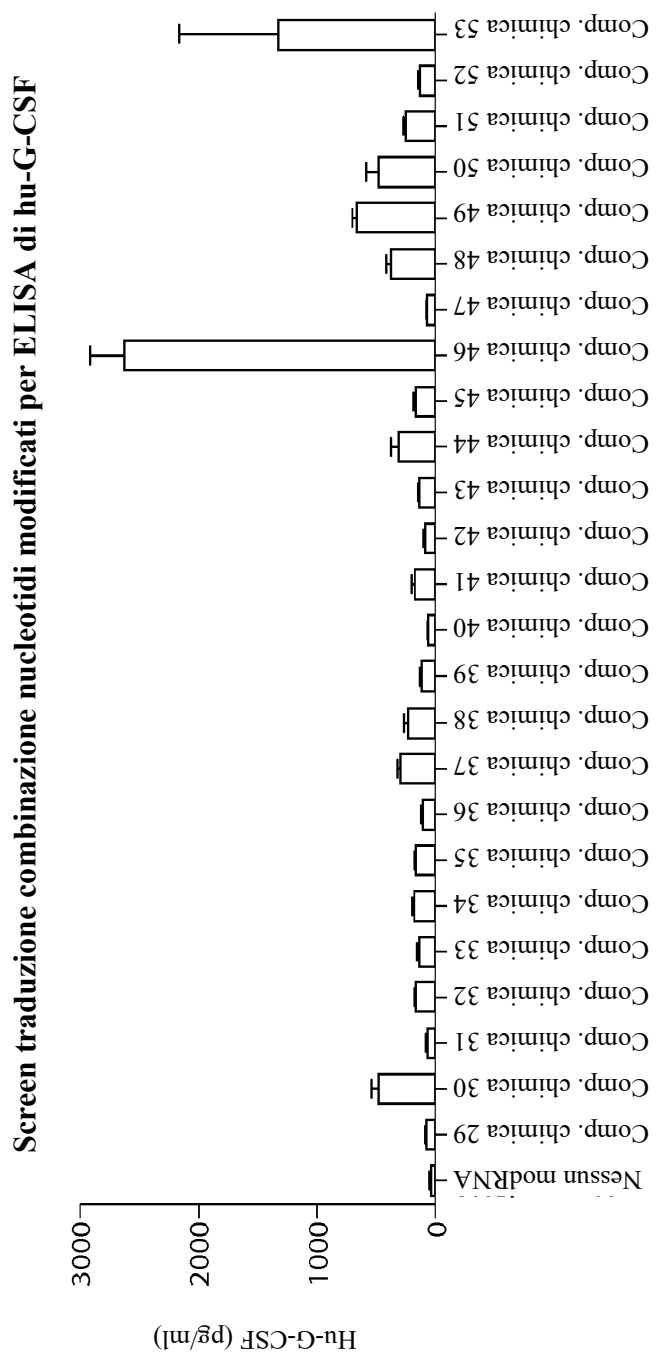


Fig. 2B

## Comp. chimica 3

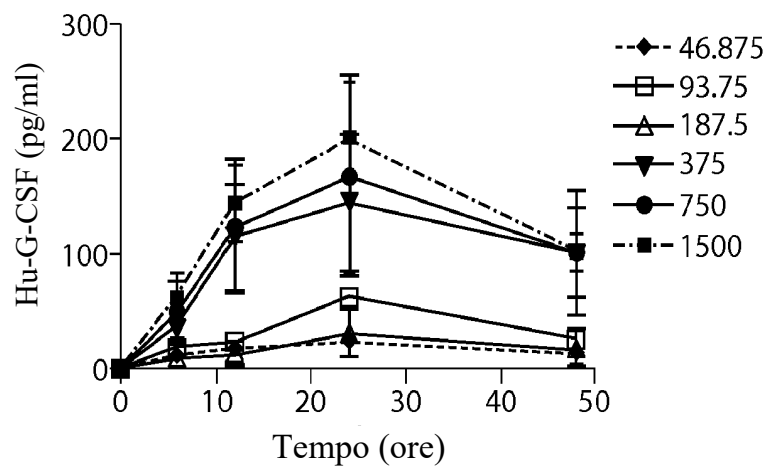


Fig. 3A

## Comp. chimica 4

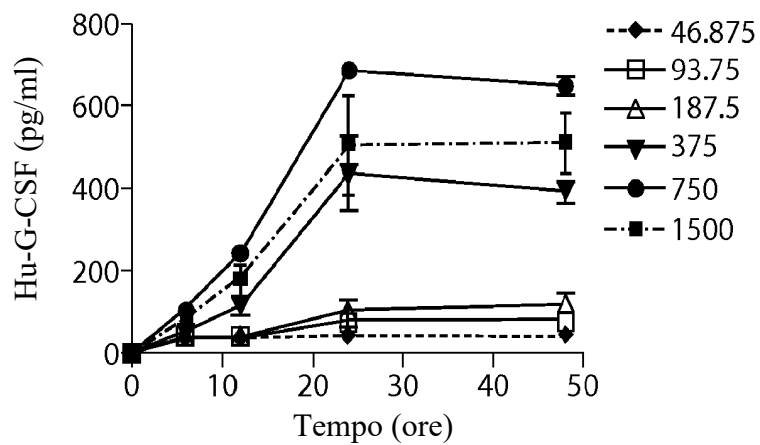


Fig. 3B

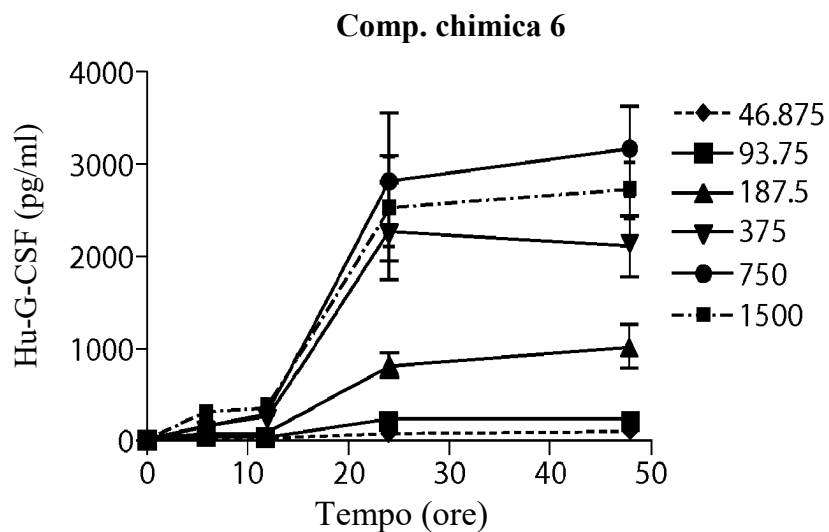


Fig. 3C

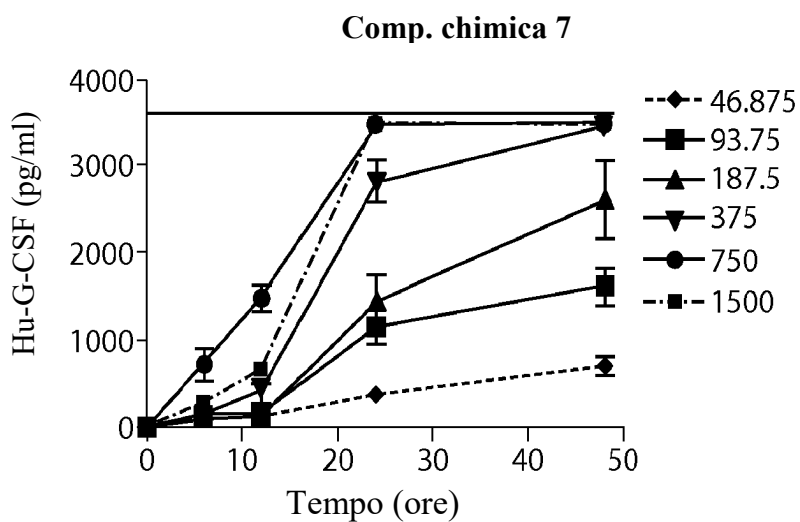


Fig. 3D

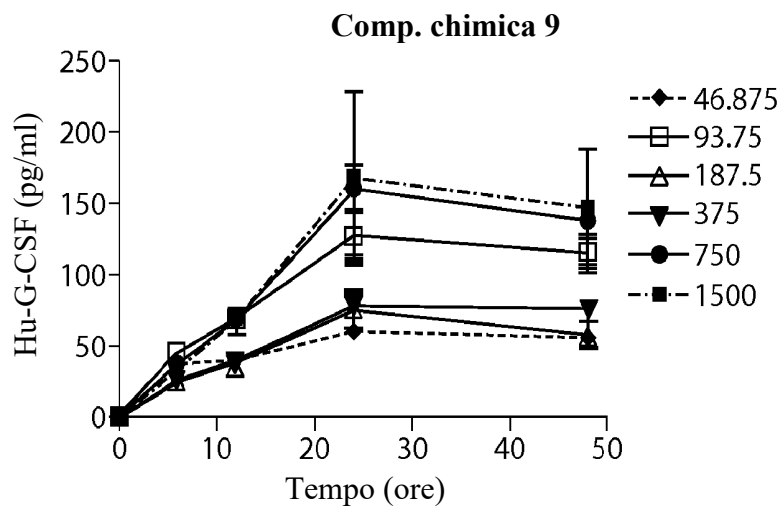


Fig. 3E

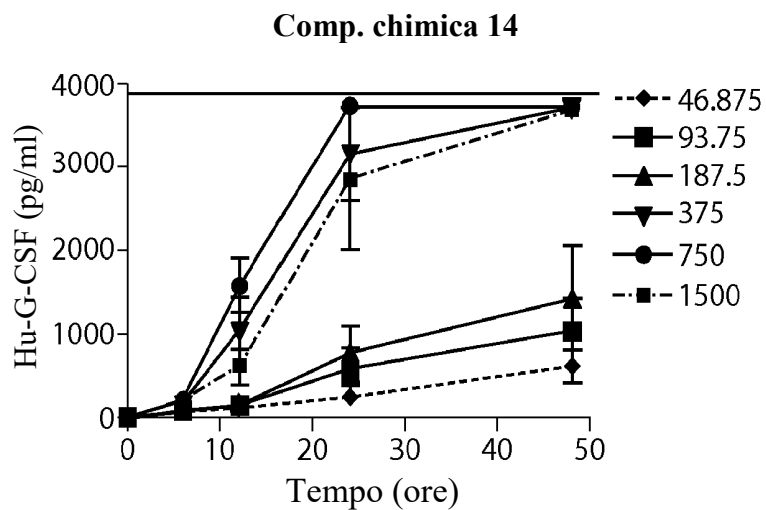


Fig. 3F

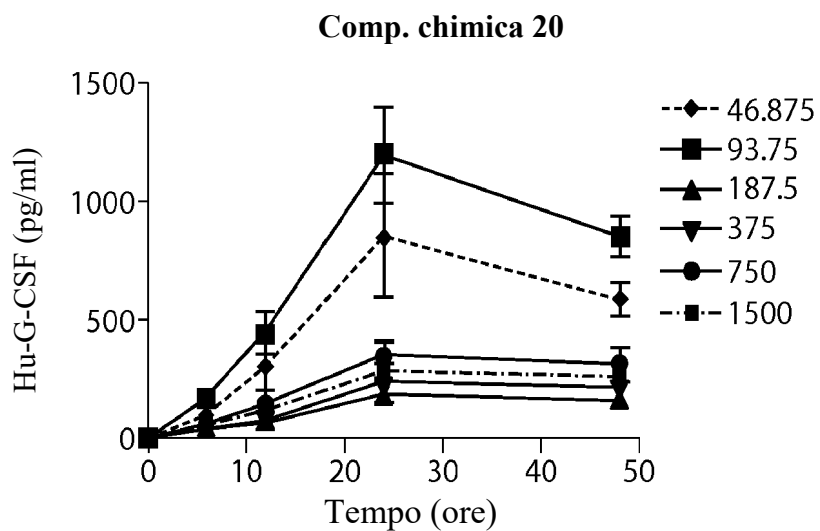


Fig. 3G

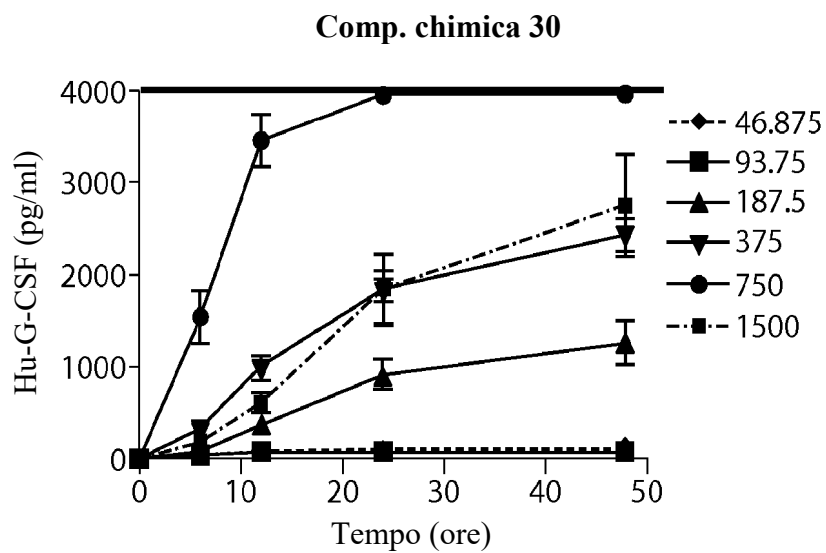


Fig. 3H

## Comp. chimica 44

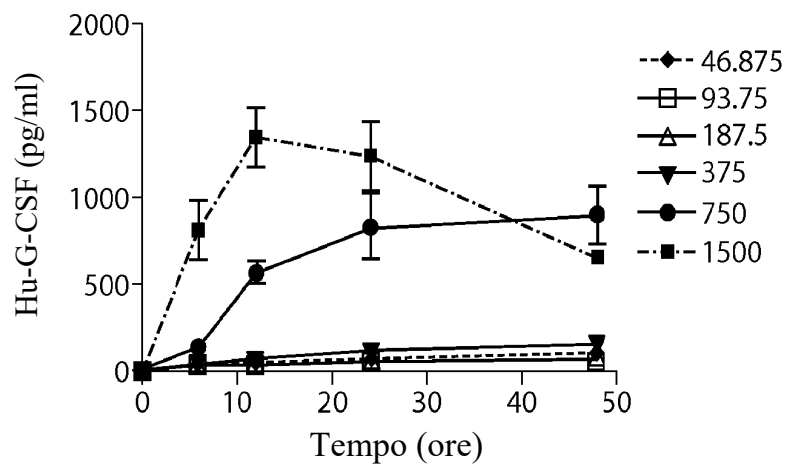


Fig. 3I

## Comp. chimica 48

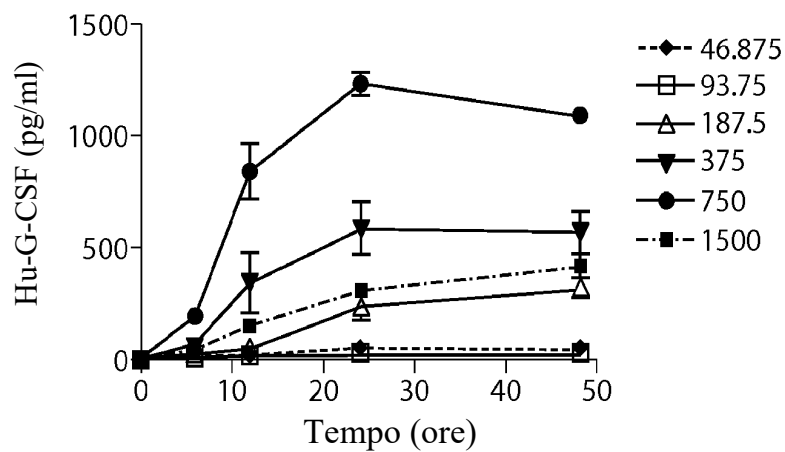


Fig. 3J

Comp. chimica 49

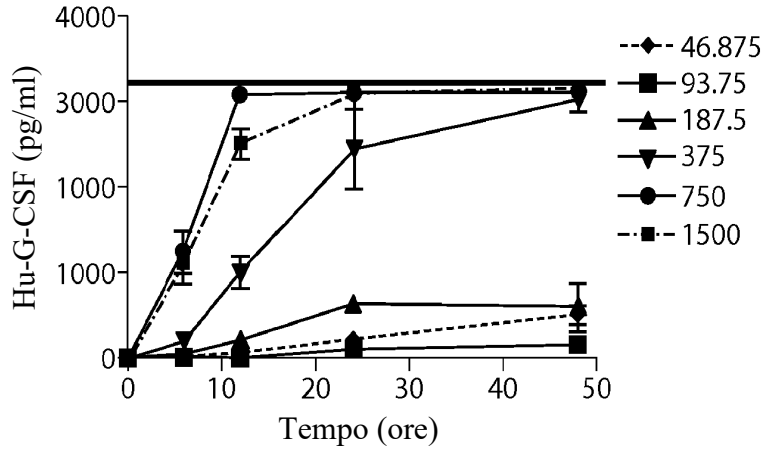


Fig. 3K

Comp. chimica 50

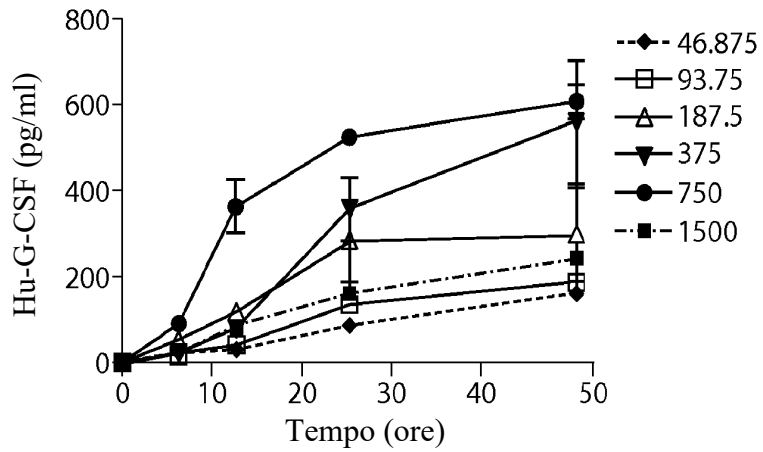


Fig. 3L

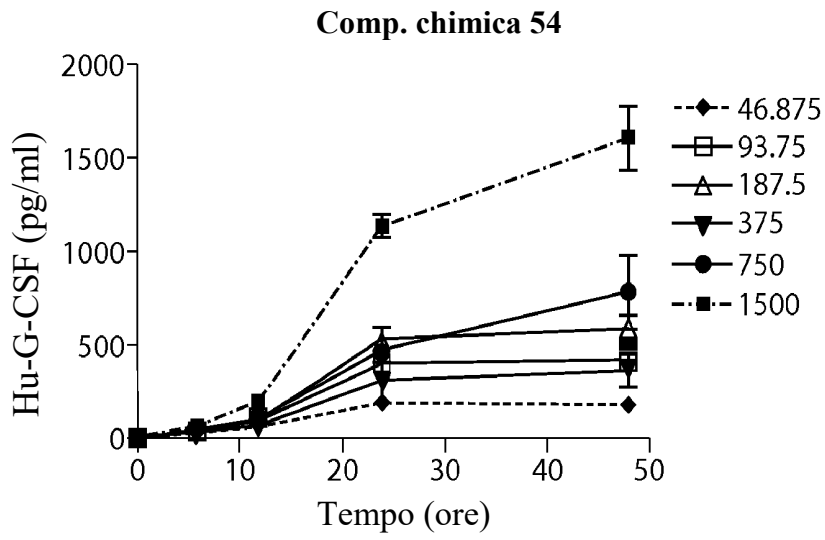


Fig. 3M

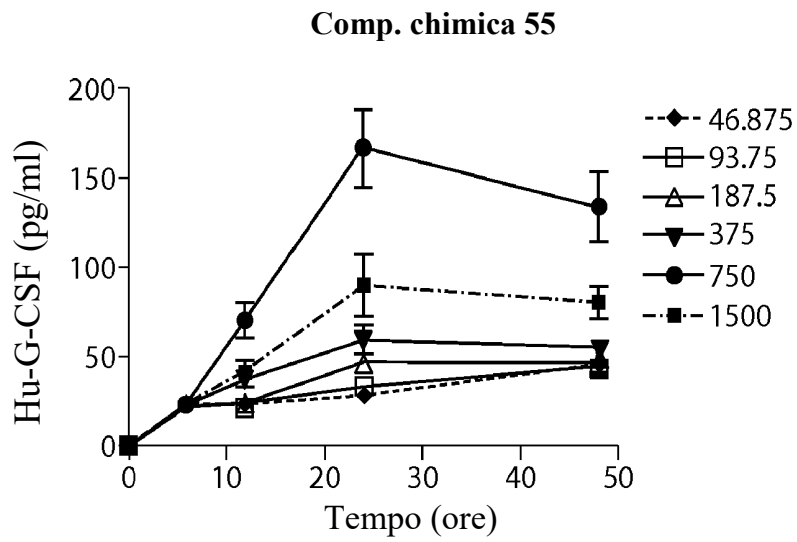


Fig. 3N

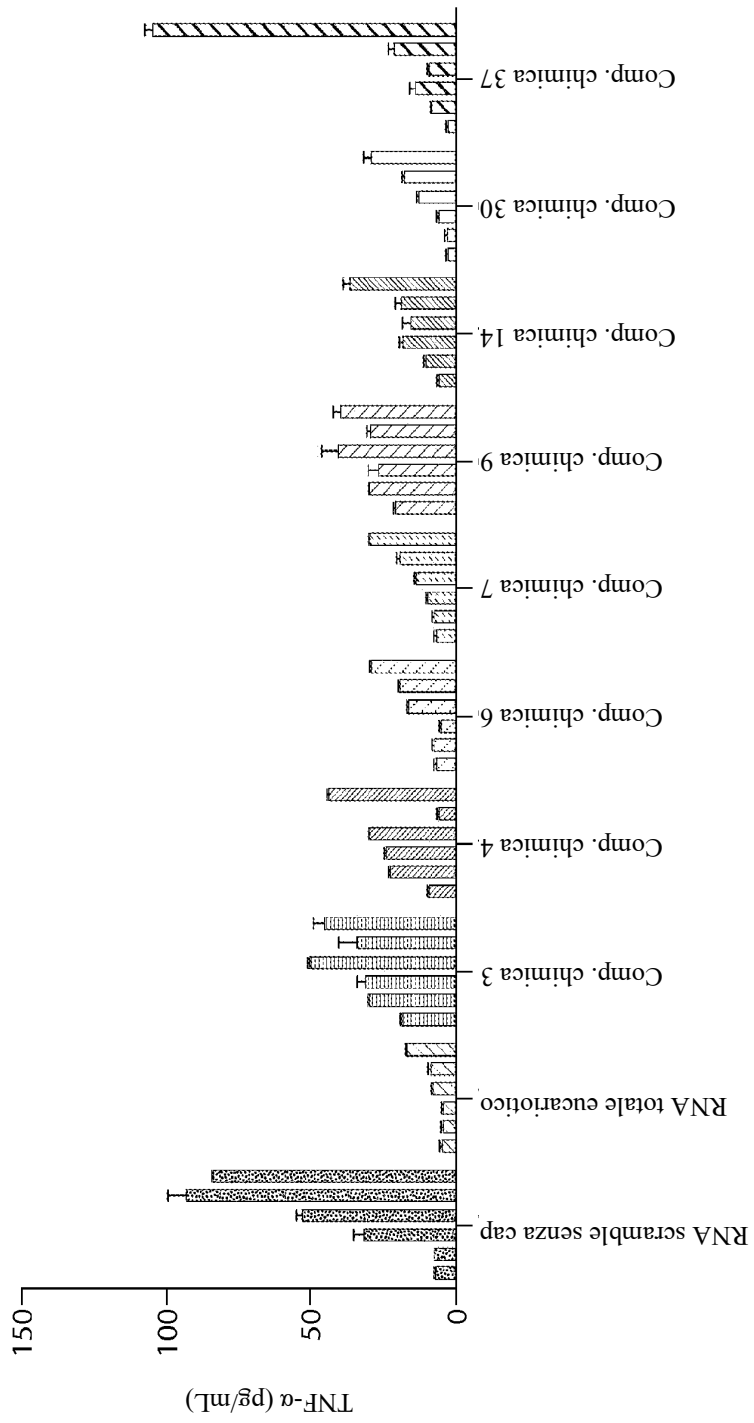


Fig. 4A

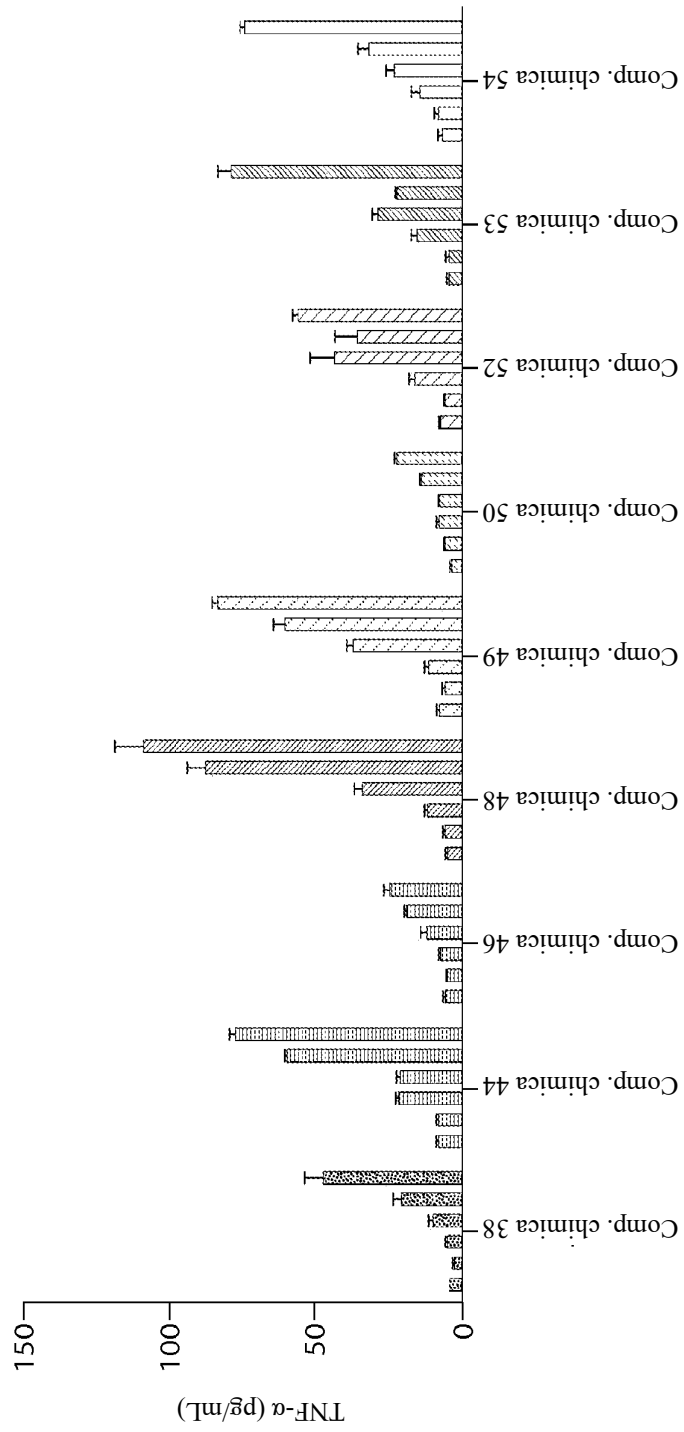


Fig. 4B

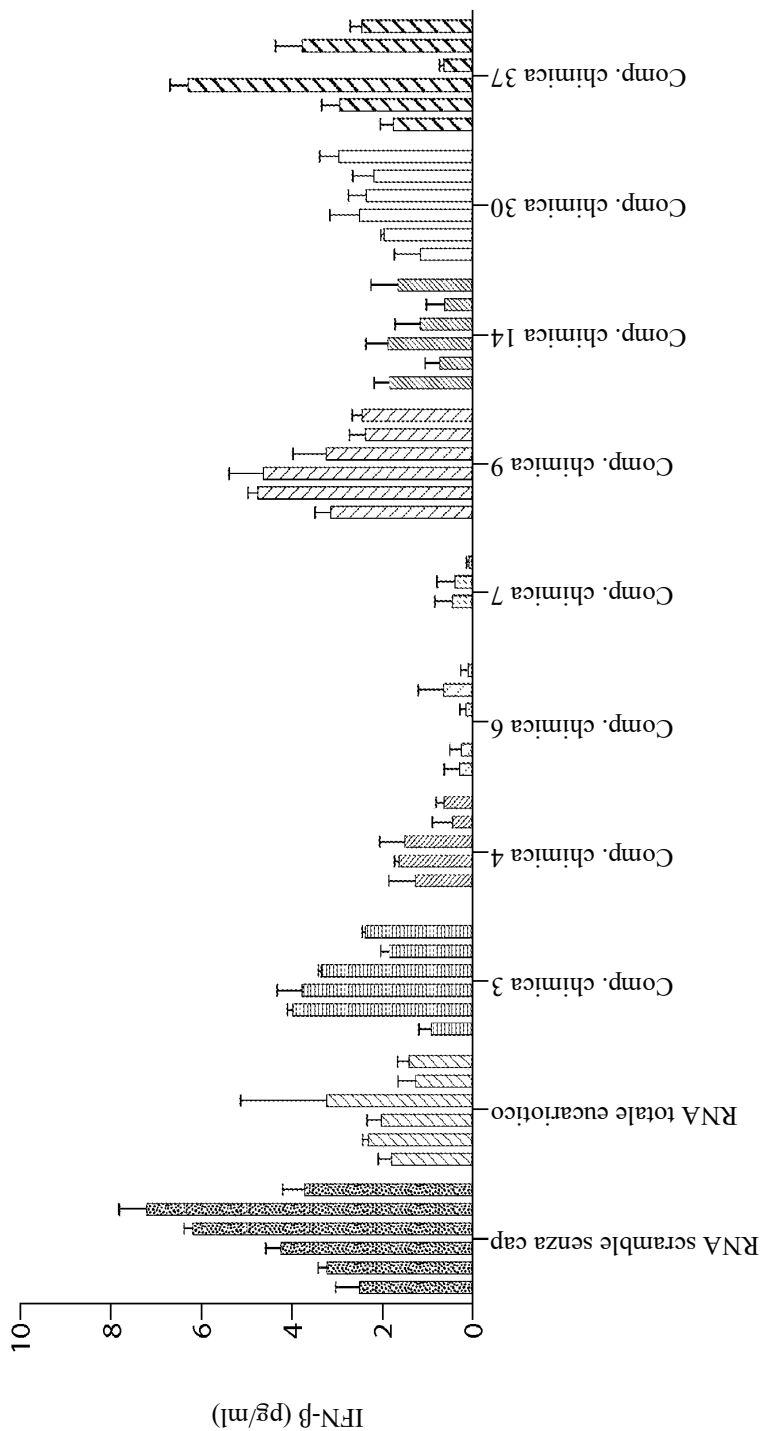


Fig. 4C

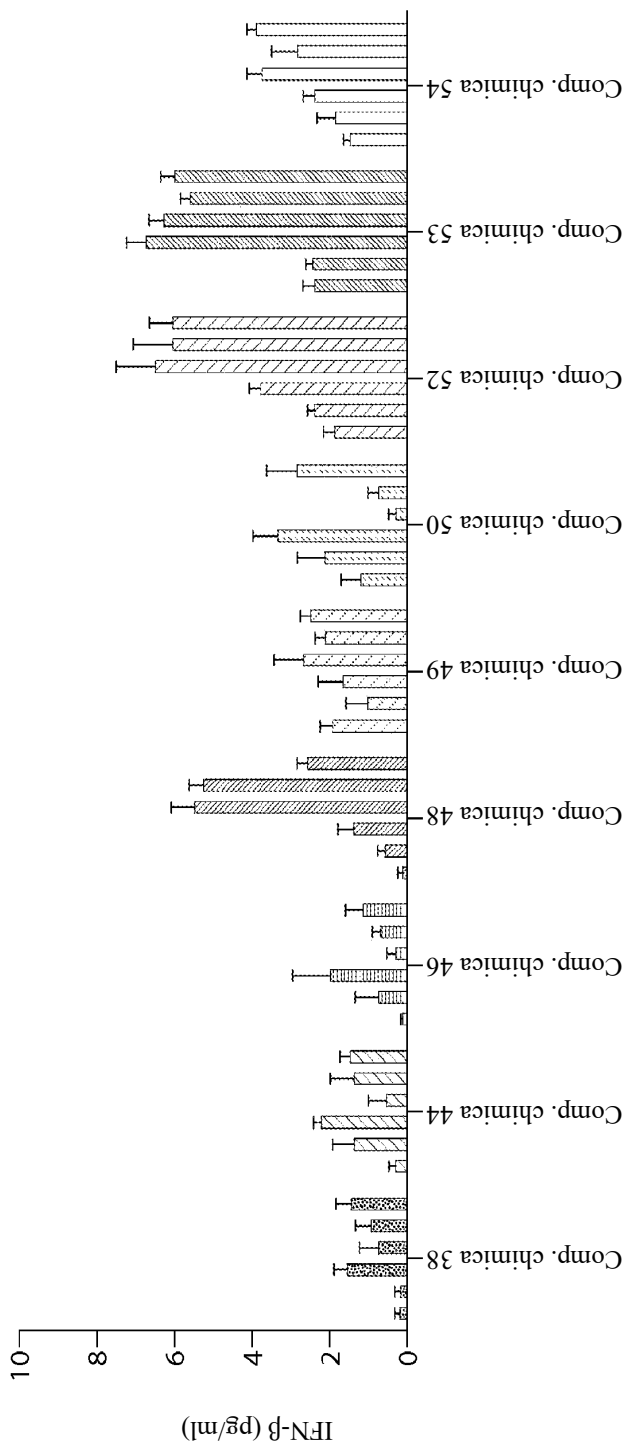


Fig. 4D

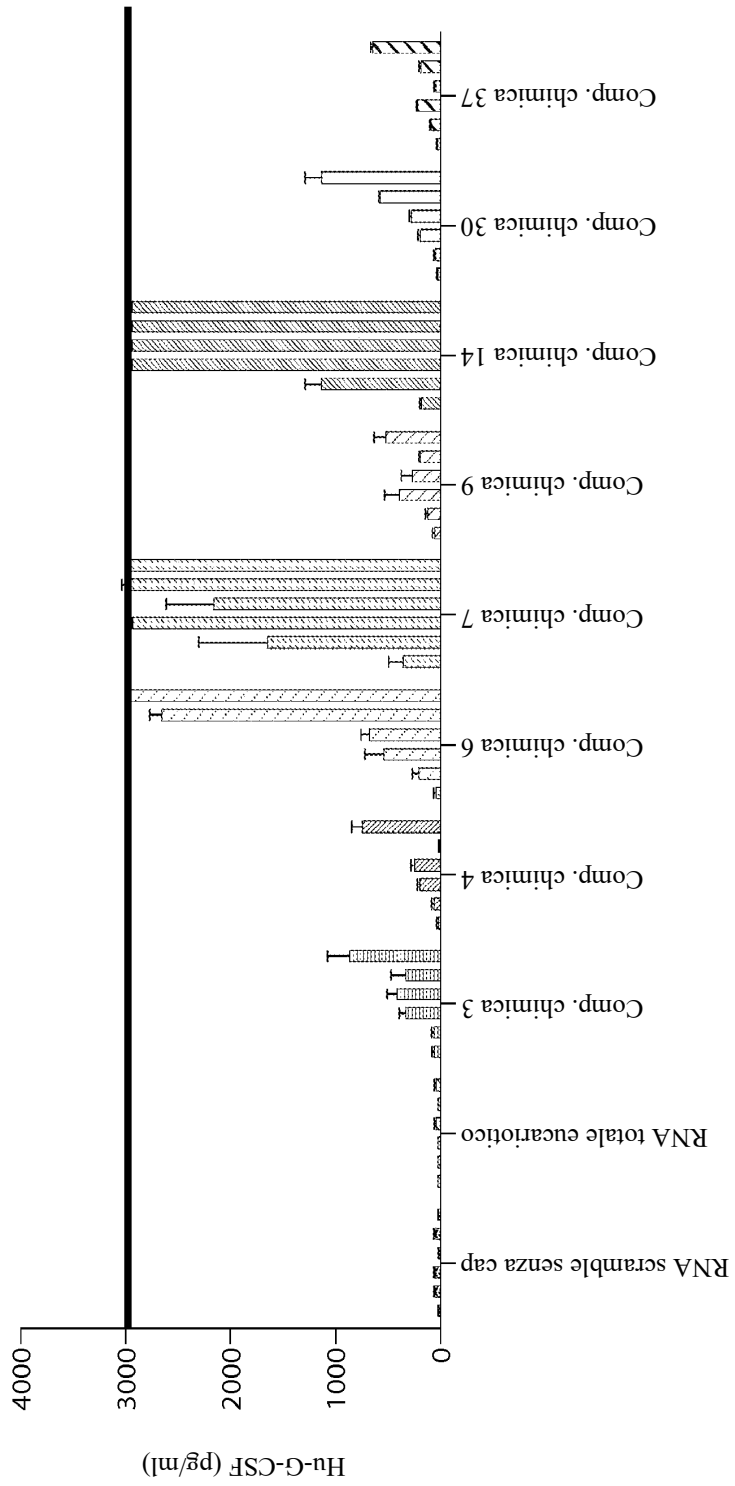


Fig. 4E

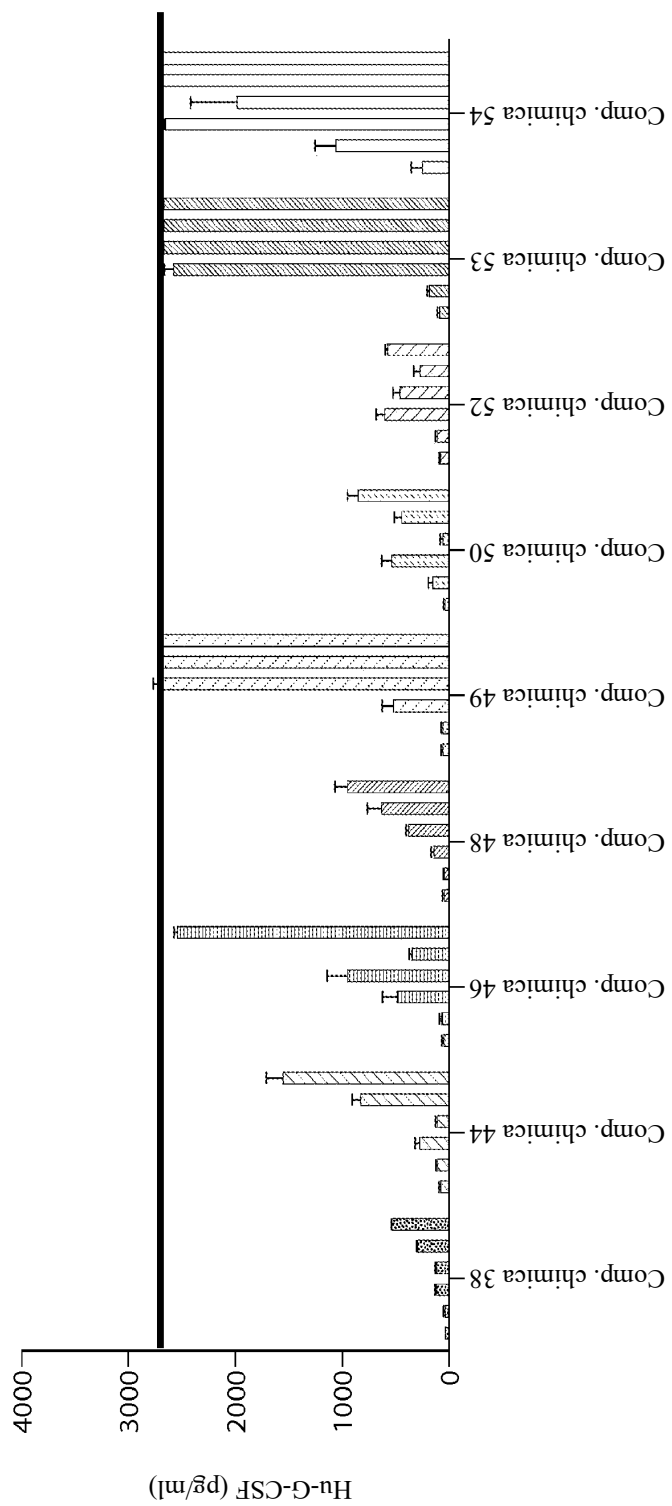


Fig. 4F

<b>modRNA di Hu-G-CSF</b>	<b>Pozzetto di cheratinociti hu-G-CSF (ng/ml)</b>	<b>Pozzetto KG-1 hu-G-CSF (ng/ml)</b>
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

<b>modRNA di Hu-G-CSF</b>	<b>Pozzetto di cheratinociti hu-G-CSF (ng/ml)</b>	<b>Pozzetto Kasumi-1 hu-G-CSF (ng/ml)</b>
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

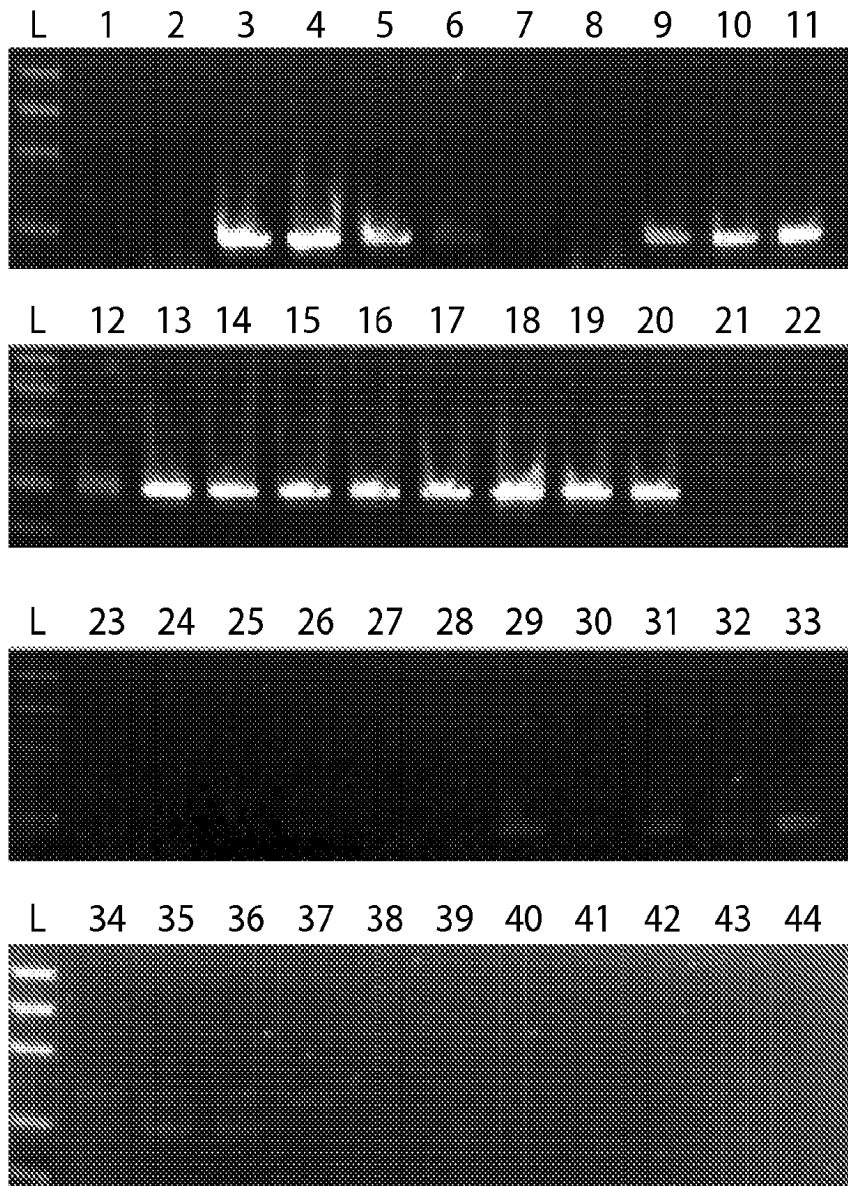


Fig. 5B

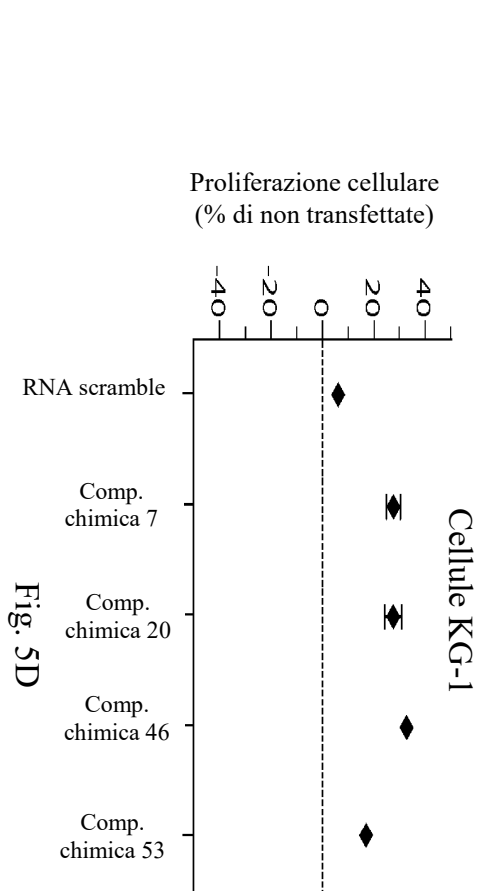


Fig. 5D

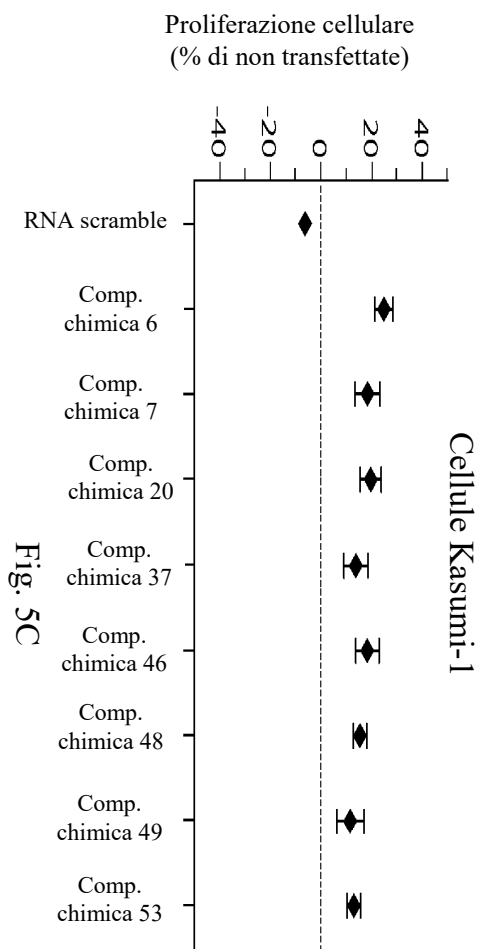


Fig. 5C

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/μl	39,990	17,841	2,24	2,41	RNA	40,00

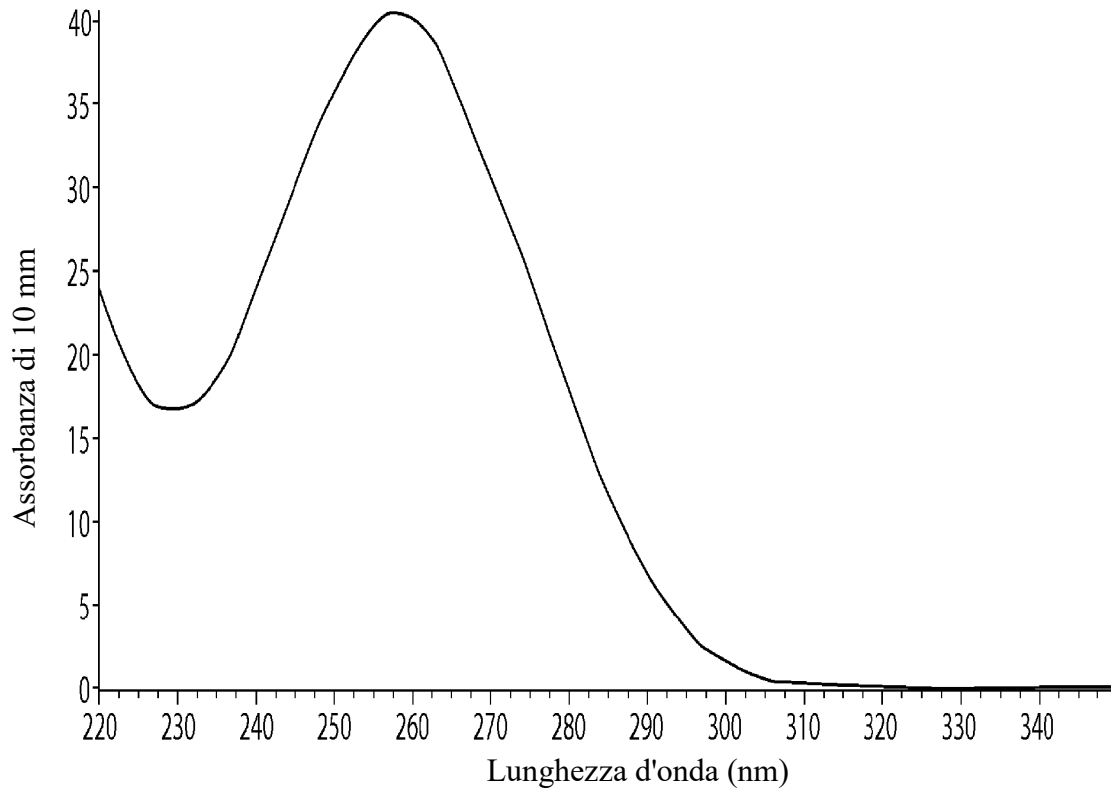


Fig. 6A

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

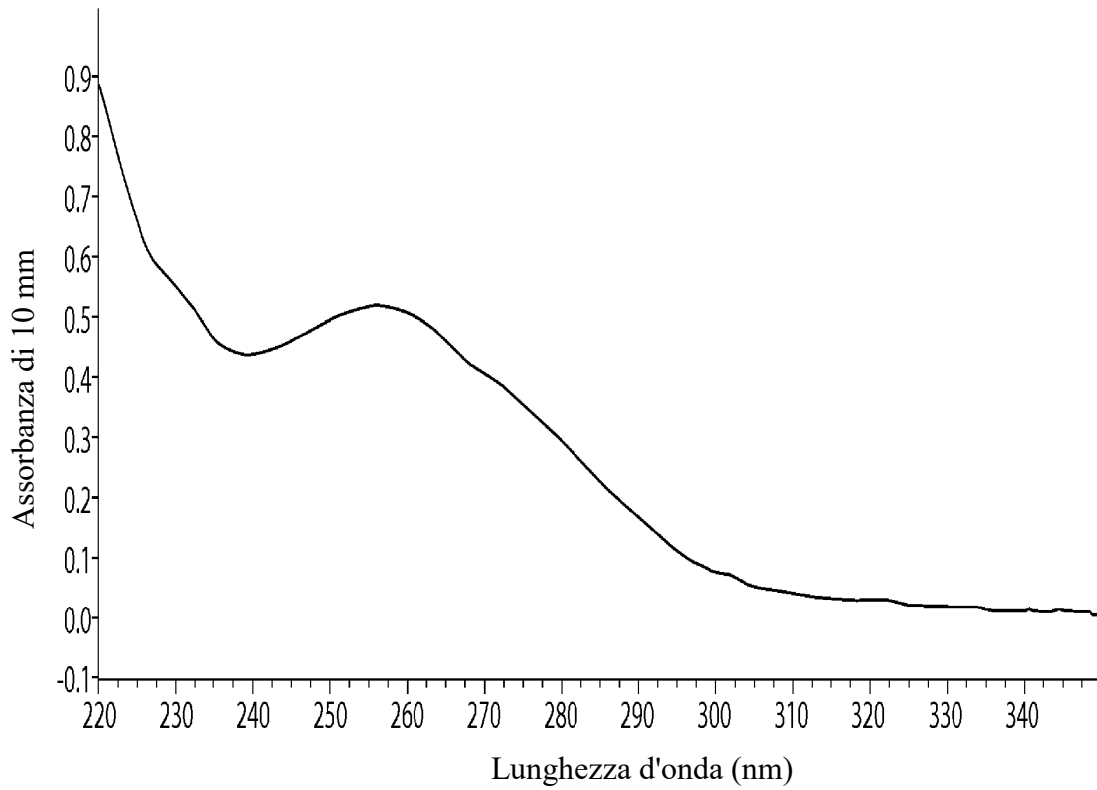


Fig. 6B

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

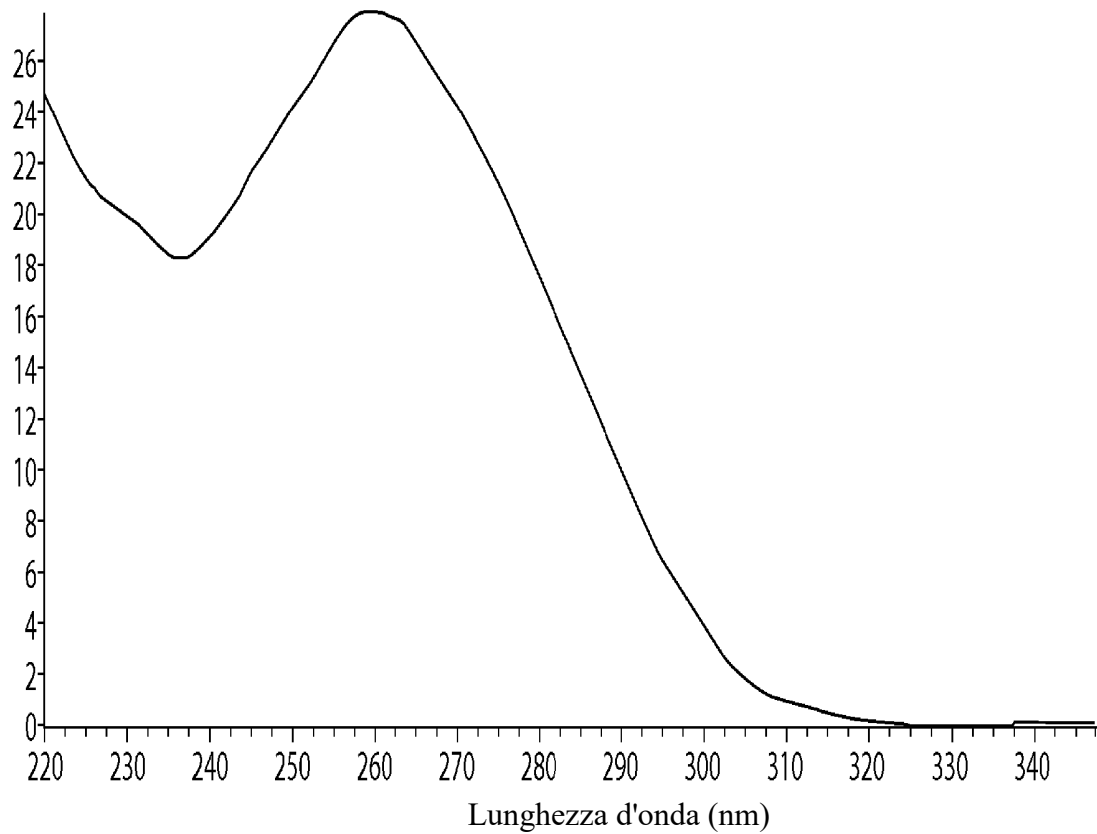


Fig. 6C

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

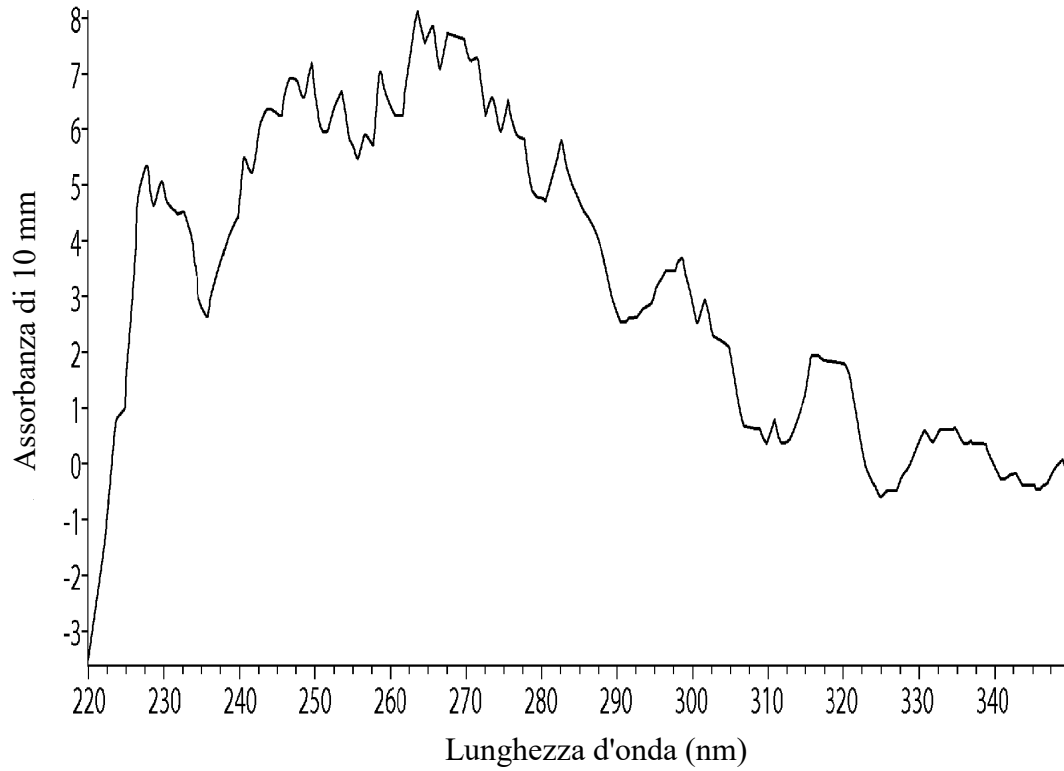


Fig. 6D

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

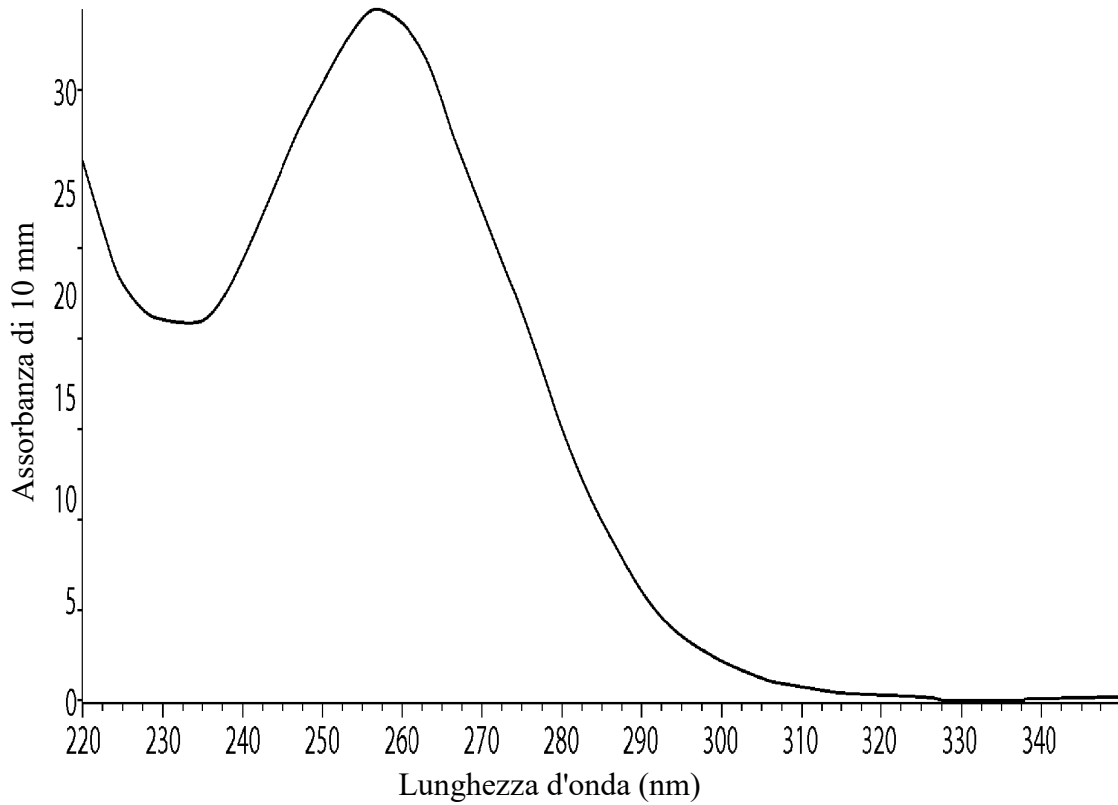


Fig. 6E

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

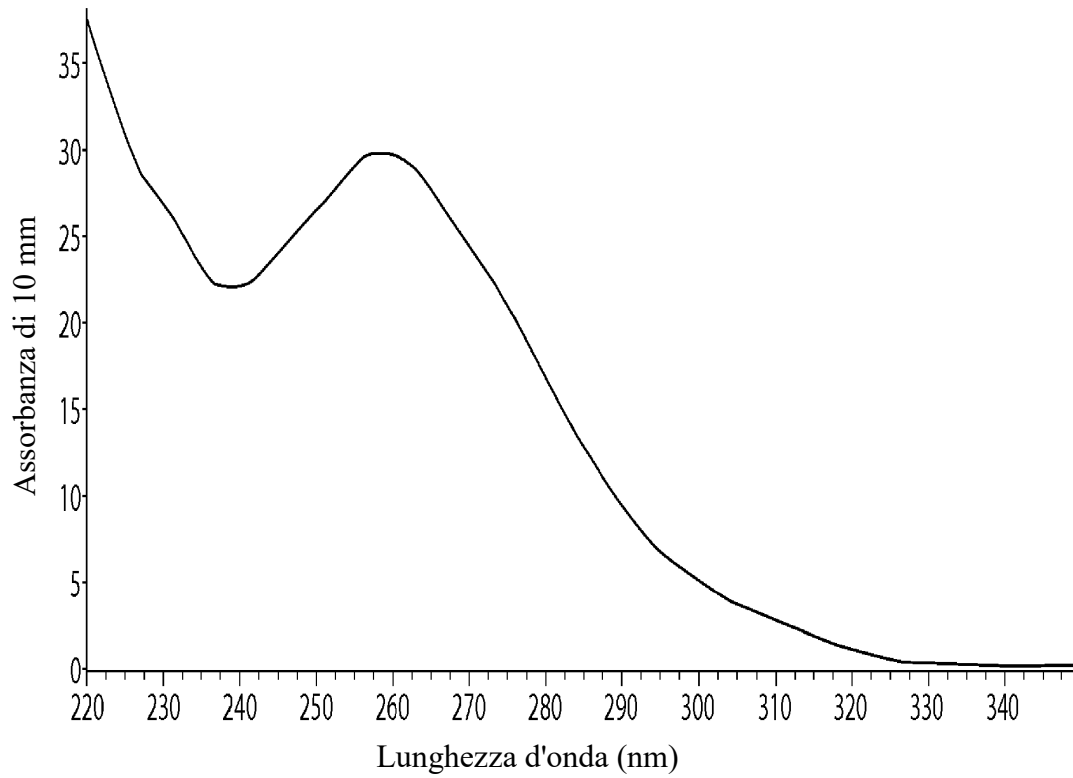


Fig. 6F

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

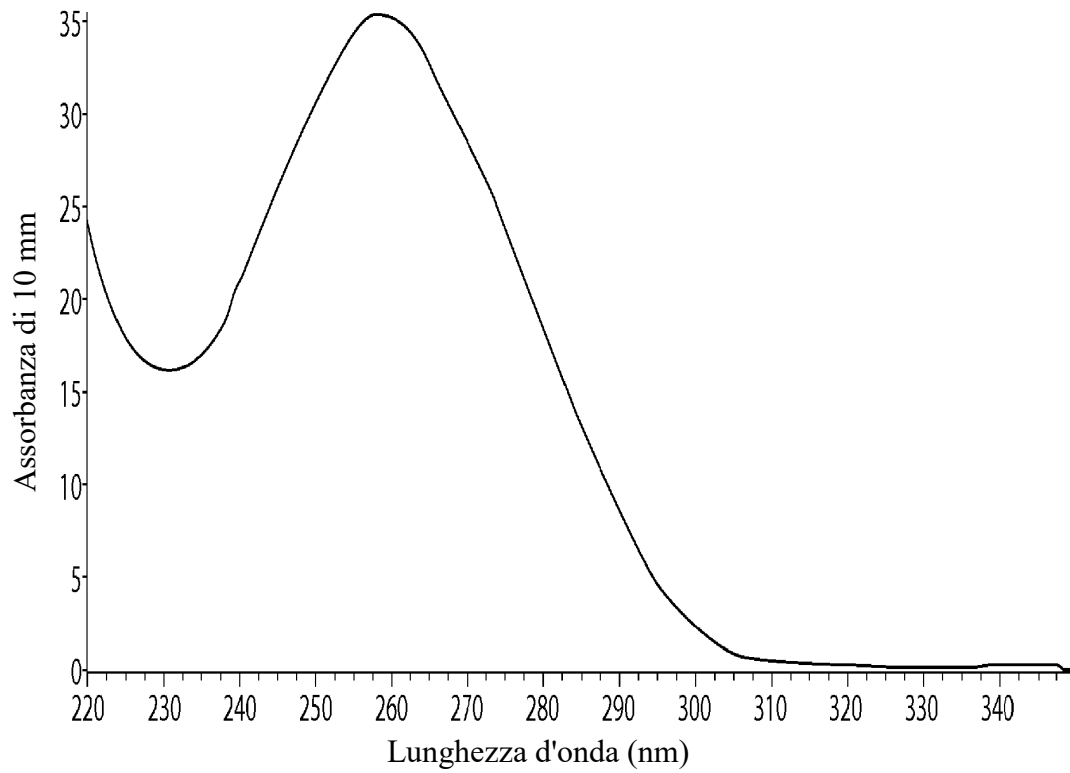


Fig. 6G

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/ $\mu$ l	5,628	5,781	0,97	1,05	RNA	40,00

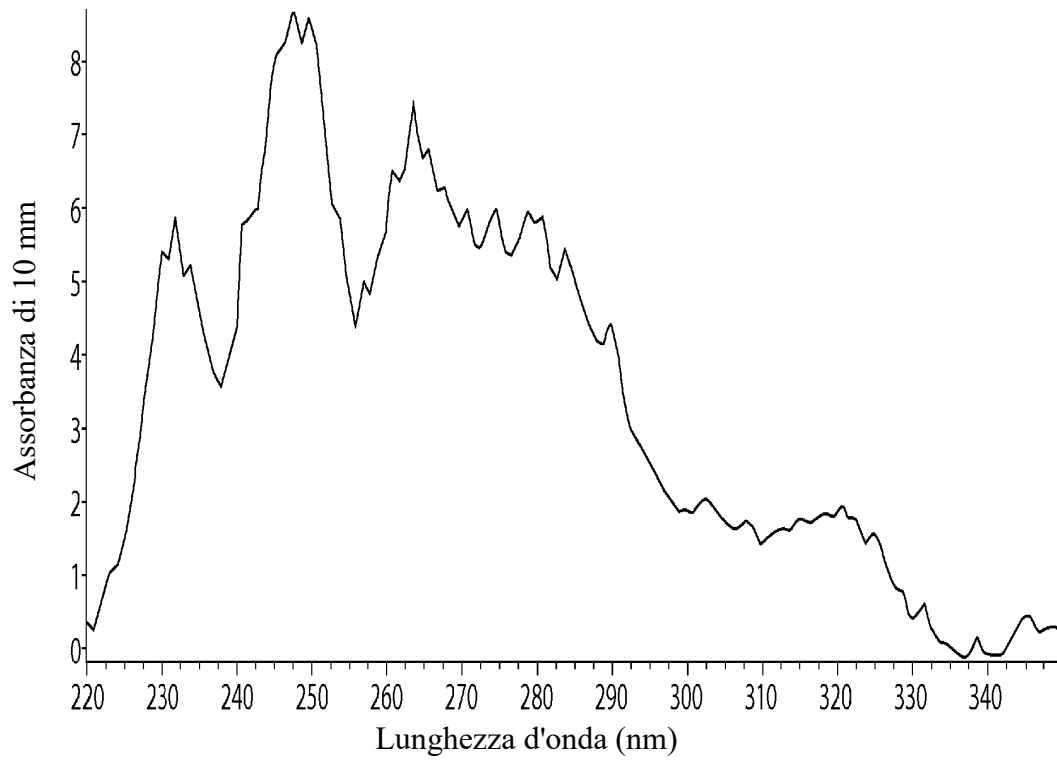


Fig. 6H

n.	ID campione	Nome utente	Data e ora	Conc. acido nucleico	Unità	A260	A280	260/280	260/230	Tipo di campione:	Fattore
18	N1-metil-GTP	lab	15/08/2011 11:43:10	161,5	ng/μl	4,036	2,917	1,38	0,67	RNA	40,00

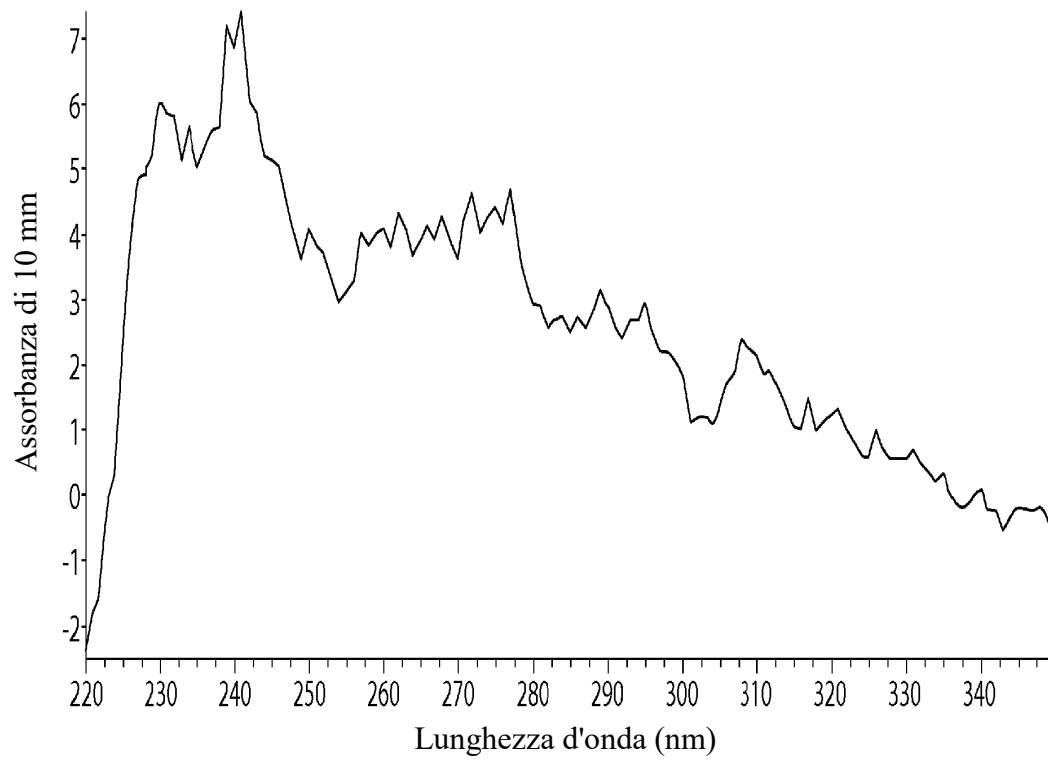


Fig. 6I

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/ $\mu$ l	31,707	17,208	1,84	1,64	RNA	40,00

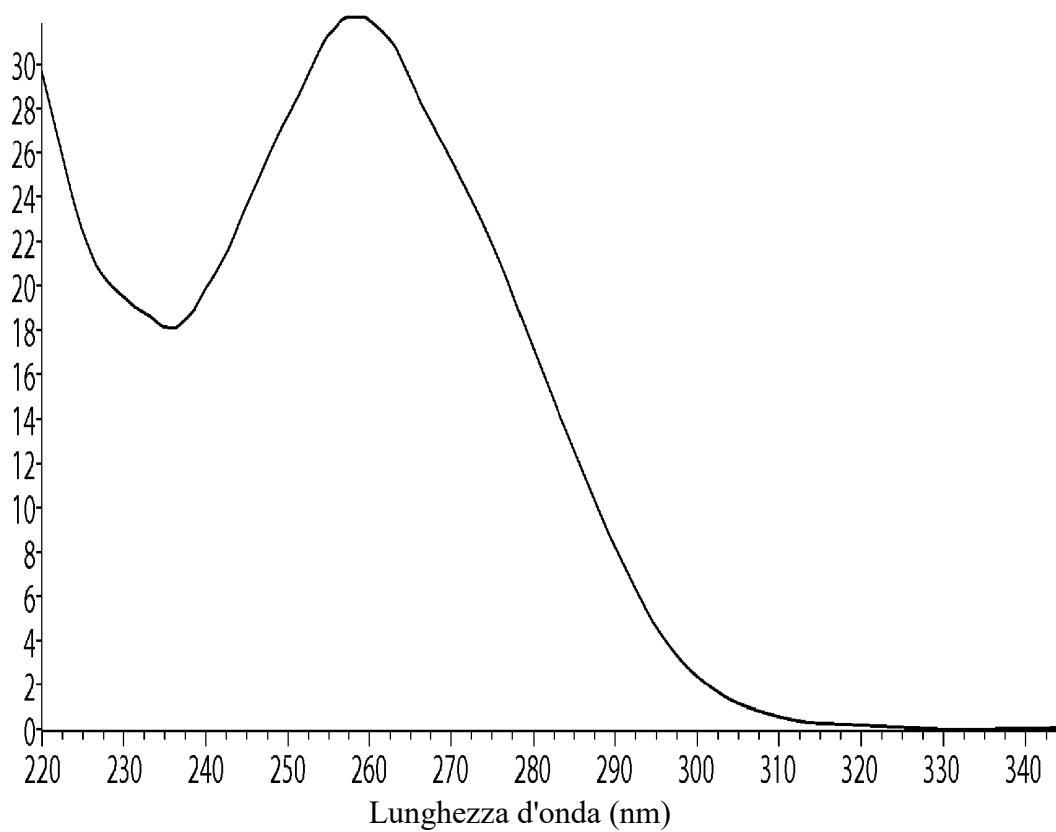


Fig. 6J

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

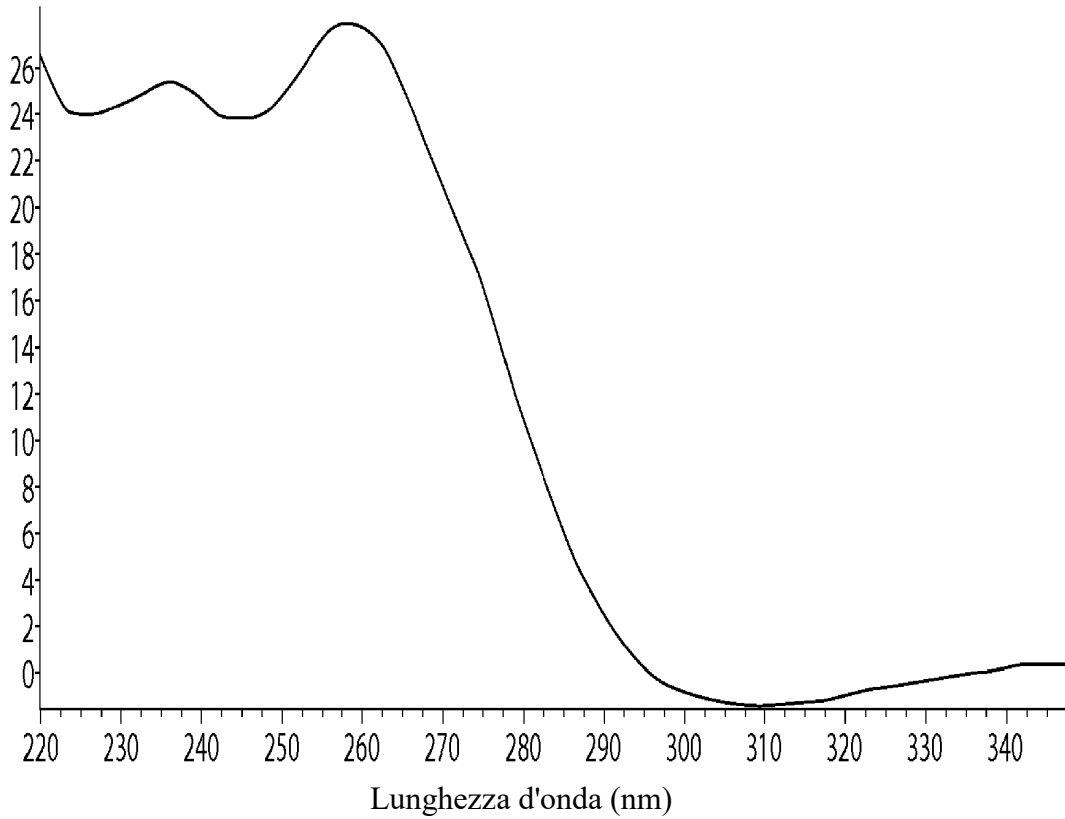
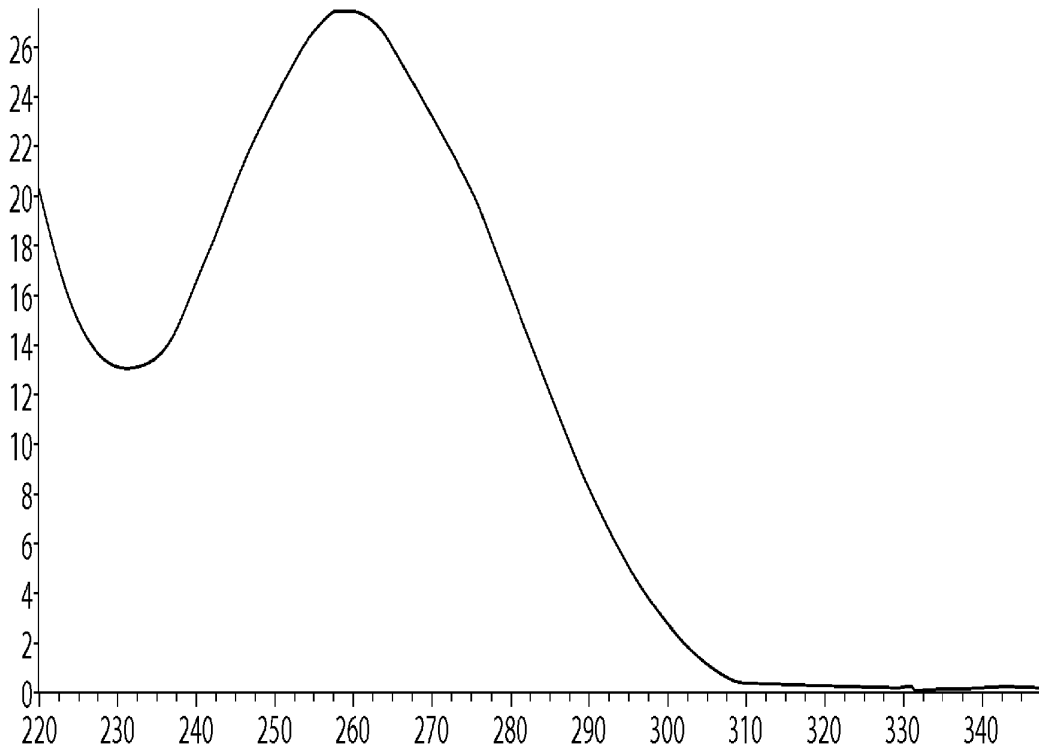


Fig. 6K

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/ $\mu$ l	27,358	16,135	1,70	2,11	RNA	40,00



Lunghezza d'onda (nm)

Fig. 6L