

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992208** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.10.22

(54) **ЛЕЧЕНИЕ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ мРНК**

(31) 61/894,303

(32) 2013.10.22

(33) US

(62) 201690581; 2014.10.22

(71) Заявитель:
ТРАНСЛЕЙТ БИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дероза Франк, Хартлейн Майкл, Диаз
Ануша (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению, в числе прочего, предложены способы лечения фенилкетонурии (ФКУ), которые включают введение субъекту, нуждающемуся в указанном лечении, композиции, содержащей мРНК, кодирующую фенилаланингидроксилазу (ФАГ), в эффективной дозировке и с эффективным интервалом введения, благодаря чему достигается снижение интенсивности, тяжести, частоты или задержка возникновения по меньшей мере одного симптома или признака ФКУ. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК инкапсулирована в липосому, которая содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более ПЭГ-модифицированных липидов.

A1

201992208

201992208

A1

ЛЕЧЕНИЕ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ мРНК

ПЕРЕКРЁСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США под серийным № 61/894303, поданной 22 октября 2013 года, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Настоящая заявка ссылается на перечень последовательностей (представленный в электронном виде как файл в формате .txt под названием «2006685-0692_SL.txt» 22 октября 2014 года). Файл в формате .txt был создан 20 октября 2014 года и имеет размер 18455 байт. Полное содержание перечня последовательностей включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Фенилкетонурия (ФКУ) представляет собой метаболическое генетическое заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу, характеризующееся мутацией в гене, кодирующем фермент печени фенилаланингидроксилазу (ФАГ), которая приводит к отсутствию активности указанного фермента. ФАГ необходима для метаболического превращения аминокислоты фенилаланина (Phe) в аминокислоту тирозин. При снижении активности ФАГ фенилаланин накапливается в организме и превращается в фенилпироват (также известный как фенилкетон). При отсутствии лечения ФКУ может привести к умственной отсталости, судорожным припадкам и другим серьезным медицинским проблемам. В настоящее время заболевание неизлечимо, и стандартное лечение заключается в назначении диеты, ограничивающей до минимума продукты с высоким содержанием белка.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Согласно настоящему изобретению предложены, в числе прочего, способы и композиции для эффективного лечения фенилкетонурии (ФКУ) на основе мРНК-терапии.

Настоящее изобретение основано, в частности, на успешном исследовании на животных в экспериментальной модели болезни ФКУ. Например, как подробнее описано в разделе примеров ниже, введение заключенной в липосому мРНК, кодирующей человеческий белок ФАГ, приводит к эффективному производству белка в сыворотке, печени и других клинически значимых тканях *in vivo*. Более важно и неожиданно, что лечение мышей с нокаутом ФАГ, модели заболевания ФКУ, при помощи мРНК ФАГ, может эффективно снижать уровни фенилаланина до уровней, характерных для дикого типа, в течение *шести часов* после введения дозы. Таким образом, авторы настоящего изобретения показали, что лечение с применением мРНК согласно настоящему описанию может быть весьма эффективной для лечения ФКУ.

[5] Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, предложен способ лечения ФКУ, который включает введение субъекту, нуждающемуся в указанном лечении, фармацевтической композиции, содержащей мРНК, кодирующую фенилаланингидроксилазу (ФАГ), в эффективной дозировке и с эффективным интервалом введения, благодаря чему достигается снижение интенсивности, тяжести, частоты, или задержка возникновения по меньшей мере одного симптома или признака ФКУ.

[6] Согласно другому аспекту настоящего изобретения, предложены композиции для лечения фенилкетонурии (ФКУ), содержащие мРНК, кодирующую фенилаланингидроксилазу (ФАГ), в эффективной дозировке, инкапсулированную в липосому.

[7] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК инкапсулирована в липосому. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более ПЭГ-модифицированных липидов.

[8] В некоторых вариантах реализации изобретения один или более катионных липидов выбраны из группы, состоящей из C12-200, MC3, DLinDMA, DLinkC2DMA, cKK-E12, ICE (на основе имидазола), HGT5000, HGT5001, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA и DMDMA, DODAC, DLenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, HGT4003 и комбинаций указанных соединений.

[9] В некоторых вариантах реализации изобретения один или более катионных липидов содержат соединение с формулой **I-c1-a**:

дипальмитоилфосфатидилглицерина (DPPG), диолеоилфосфатидилэтанолamina (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолamina (POPE), диолеоилфосфатидилэтанолamin 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилата (DOPE-mal), дипальмитоил-фосфатидилэтанолamina (DPPE), димиристоилфосфоэтанолamina (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолamina (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтанолamina (SOPE) или смеси указанных соединений.

[12] В некоторых вариантах реализации изобретения один или более липидов на основе холестерина выбраны из холестерина, ПЭГилированного холестерина и DC-Chol (N,N-диметил-N-этилкарбоксамидоchoлестерин), 1,4-бис-(3-N-олеиламинопропил)-пиперазина.

[13] В некоторых вариантах реализации липосома дополнительно содержит один или более ПЭГ-модифицированных липидов. В некоторых вариантах реализации один или более ПЭГ-модифицированных липидов могут включать цепочку поли-(этилен)-гликоля длиной до 5 кДа, ковалентно присоединенную к липиду посредством алкильной цепи (цепей) длиной C₆-C₂₀. В некоторых вариантах реализации ПЭГ-модифицированный липид представляет собой дериватизированный керамид, такой как N-октаноил-сфингозин-1-[сукцинил-(метоксиполиэтиленгликоль)-2000]. В некоторых вариантах реализации изобретения ПЭГ-модифицированный или ПЭГилированный липид представляет собой ПЭГилированный холестерин или димиристоилглицерин (ДМГ)-ПЭГ-2К.

[14] В некоторых вариантах реализации изобретения липосома содержит сКК-Е12, DOPE, холестерин и DMG-PEG2K.

[15] В некоторых вариантах реализации изобретения катионный липид (например, сКК-Е12) составляет примерно 30-60 % (например, примерно 30-55 %, примерно 30-50 %, примерно 30-45 %, примерно 30-40 %, примерно 35-50 %, примерно 35-45 % или примерно 35-40 %) от липосомы в мольном отношении. В некоторых вариантах реализации изобретения катионный липид (например, сКК-Е12) составляет примерно 30 %, примерно 35 %, примерно 40 %, примерно 45 %, примерно 50 %, примерно 55 % или примерно 60 % от липосомы в мольном отношении.

[16] В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-Е12) к некатионному липиду (например, DOPE) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K)

может составлять между примерно 30-60:25-35:20-30:1-15, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12) к некатионному липиду (например, DOPE) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K) составляет

5 приблизительно 40:30:20:10, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12) к некатионному липиду (например, DOPE) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K) составляет приблизительно 40:30:25:5, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12) к некатионному липиду (например, DOPE) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду

10 (например, DMG-PEG2K) составляет приблизительно 40:32:25:3, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12) к некатионному липиду (например, DOPE) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду

15 (например, DMG-PEG2K) составляет приблизительно 50:25:20:5, соответственно.

[17] В некоторых вариантах реализации изобретения размер липосомы определяют как длину наибольшего диаметра липосомной частицы. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер менее примерно 500 нм, 400 нм, 300 нм, 250 нм, 200 нм, 150 нм, 100 нм, 75 нм или 50 нм. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер менее примерно 100 нм, 90 нм, 80 нм, 70 нм или 60 нм.

20

[18] В некоторых вариантах реализации изобретения предложенную композицию вводят внутривенно. В некоторых вариантах реализации изобретения предложенную композицию вводят посредством доставки через легкие. В некоторых вариантах реализации доставки через легкие осуществляют путем введения аэрозоля, ингаляции, распыления или инстилляции. В некоторых вариантах реализации изобретения предложенные композиции составлены как вдыхаемые частицы, распыляемый липид или ингалируемый сухой порошок.

25

[19] В некоторых вариантах реализации предложенные композиции вводят один раз в сутки, один раз в неделю, один раз в две недели, два раза в месяц, один раз в месяц. В некоторых вариантах реализации изобретения предложенные композиции вводят один раз в 7 дней, один раз в 10 дней, один раз в 14 дней, один раз в 28 дней или один раз в 30 дней.

30

[20] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК вводят в дозировке в диапазоне от примерно 0,1 – 5,0 мг/кг массы тела, например, примерно 0,1 – 4,5, 0,1 – 4,0, 0,1 – 3,5, 0,1 – 3,0, 0,1 – 2,5, 0,1 – 2,0, 0,1 – 1,5, 0,1 – 1,0, 0,1 - 0,5, 0,1 - 0,3, 0,3 – 5,0, 0,3 - 4,5, 0,3 – 4,0, 0,3 – 3,5, 0,3 – 3,0, 0,3 – 2,5, 0,3 – 2,0, 0,3 – 1,5, 0,3 – 1,0, 0,3 - 0,5, 0,5 – 5,0, 0,5-4,5, 0,5 – 4,0, 0,5 – 3,5, 0,5 – 3,0, 0,5 – 2,5, 0,5 – 2,0, 0,5 – 1,5 или 0,5 – 1,0 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК вводят в дозировке, равной или меньшей примерно 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 мг/кг массы тела.

[21] В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка ФАГ обнаруживается в печени, почке, сердце, селезенке, сыворотке, головном мозге, скелетной мышце, лимфатических узлах, коже и/или цереброспинальной жидкости.

[22] В некоторых вариантах реализации изобретения введение предложенной композиции обеспечивает уровень экспрессии белка ФАГ, равный или больший примерно 100 нг/мг, примерно 200 нг/мг, примерно 300 нг/мг, примерно 400 нг/мг, примерно 500 нг/мг, примерно 600 нг/мг, примерно 700 нг/мг, примерно 800 нг/мг, примерно 900 нг/мг, примерно 1000 нг/мг, примерно 1200 нг/мг или примерно 1400 нг/мг от общего белка в печени.

[23] В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка ФАГ обнаруживается через 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 и/или 72 часа после введения. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка ФАГ обнаруживается по истечении 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней и/или 7 дней после введения. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка ФАГ обнаруживается по истечении 1 недели, 2 недель, 3 недель и/или 4 недель после введения. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка ФАГ обнаруживается через месяц после введения.

[24] В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции являются повышенные уровни белка ФАГ в сыворотке. В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции является повышение уровня белка ФАГ в сыворотке по меньшей мере на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или 95 % по сравнению с исходным уровнем белка ФАГ перед лечением.

[25] В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции является сниженный уровень фенилаланина в сыворотке по сравнению с исходным уровнем фенилаланина перед лечением. В некоторых вариантах

реализации изобретения введение предложенной композиции обеспечивает снижение уровня фенилаланина до примерно 1500 мкмоль/л или менее, примерно 1000 мкмоль/л или менее, примерно 900 мкмоль/л или менее, примерно 800 мкмоль/л или менее, примерно 700 мкмоль/л или менее, примерно 600 мкмоль/л или менее, примерно 500 мкмоль/л или менее, примерно 400 мкмоль/л или менее, примерно 300 мкмоль/л или менее, примерно 200 мкмоль/л или менее, примерно 100 мкмоль/л или менее или примерно 50 мкмоль/л или менее в сыворотке или плазме. В конкретном варианте реализации регулярное введение терапевтически эффективной дозы обеспечивает снижение уровней фенилаланина до примерно 120 мкмоль/л или менее в сыворотке или плазме.

10 [26] В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции является снижение уровней фенилаланина в биологическом образце (например, образце сыворотки, плазмы или мочи) по меньшей мере на примерно 5 %, по меньшей мере на примерно 10 %, по меньшей мере на примерно 15 %, по меньшей мере на примерно 20 %, по меньшей мере на примерно 25 %, по меньшей мере на примерно 30 %, по
15 меньшей мере на примерно 35 %, по меньшей мере на примерно 40 %, по меньшей мере на примерно 45 %, по меньшей мере на примерно 50 %, по меньшей мере на примерно 55 %, по меньшей мере на примерно 60 %, по меньшей мере на примерно 65 %, по меньшей мере на примерно 70 %, по меньшей мере на примерно 75 %, по меньшей мере на примерно 80 %, по меньшей мере на примерно 85 %, по меньшей мере на примерно 90 % или по меньшей мере на
20 примерно 95 % по сравнению с исходными уровнями фенилаланина перед лечением.

[27] В некоторых вариантах реализации мРНК, кодирующая ФАГ, является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах реализации кодон-оптимизированная мРНК содержит последовательность SEQ ID NO:3 (соответствующую последовательности кодон-оптимизированной мРНК ФАГ человека). В некоторых вариантах реализации мРНК содержит
25 последовательность 5'-нетранслируемой области SEQ ID NO:4 (соответствующую последовательности 5'-нетранслируемой области X). В некоторых вариантах реализации мРНК содержит последовательность 3'-нетранслируемой области SEQ ID NO:5 (соответствующую последовательности 3'-нетранслируемой области Y). В некоторых вариантах реализации мРНК содержит последовательность 3'-нетранслируемой области SEQ ID NO:6 (соответствующую
30 последовательности 3'-нетранслируемой области Y). В некоторых вариантах реализации кодон-оптимизированная мРНК содержит последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8

(соответствующую последовательности кодон-оптимизированной мРНК ФАГ человека с последовательностями 5'-нетранслируемой области и 3'-нетранслируемой области).

[28] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержит один или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более модифицированных нуклеотидов содержит псевдоуридин, N-1-метилпсевдоуридин, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирроло-пиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C5-пропинилцитидин, C5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин и/или 2-тиоцитидин. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК является немодифицированной.

[29] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложены композиции для лечения фенилкетонурии (ФКУ), содержащие мРНК, кодирующую фенилаланингидроксилазу (ФАГ), в эффективной дозировке, инкапсулированную в липосому, причем мРНК содержит последовательность SEQ ID NO:3, причем липосома содержит катионный или некатионный липид, липид на основе холестерина и ПЭГ-модифицированный липид.

[30] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложены композиции для лечения фенилкетонурии (ФКУ), содержащие мРНК, кодирующую фенилаланингидроксилазу (ФАГ), в эффективной дозировке, инкапсулированную в липосому, причем мРНК содержит последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, причем липосома содержит катионный или некатионный липид, липид на основе холестерина и ПЭГ-модифицированный липид.

[31] Другие признаки и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания, чертежей и формулы изобретения. Однако необходимо понимать, что подробное описание, чертежи и формула изобретения, в которых показаны варианты реализации настоящего изобретения, приведены только для иллюстрации и не являются ограничивающими. Различные изменения и модификации в рамках объема настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники.

30

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

- [32] Чертежи приведены только в целях наглядности и никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.
- [33] **Фигура 1** иллюстрирует типовые уровни белка ФАГ в клетках НЕК293 после трансфекции липосомами согласно настоящему изобретению.
- 5 [34] **Фигура 2** иллюстрирует типовой график уровней белка ФАГ, наблюдаемых в печени мышей дикого типа после воздействия липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, в различные моменты времени после введения.
- [35] **Фигура 3** иллюстрирует типовой график уровней белка ФАГ, наблюдаемых в печени мышей с нокаутом ФАГ после воздействия липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, через 6, 12 и 24 часа после введения, по сравнению с интактными мышами дикого типа и интактными мышами с нокаутом ФАГ.
- 10 [36] **Фигура 4** иллюстрирует типовой график уровней фенилаланина в сыворотке мышей с нокаутом ФАГ через 6, 12, и 24 часа после введения липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, по сравнению с интактными мышами дикого типа и интактными мышами с нокаутом ФАГ.
- 15 [37] **Фигуры 5А-5I** показывают детектирование *in situ* мРНК ФАГ человека в ткани печени мышей через (А) 30 минут, (В) 3 часа, (С) 6 часов, (D) 12 часов, (Е) 24 часа, (F) 48 часов, (G) 72 часа или (H) 7 дней после обработки 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, или интактных мышей (I).
- 20 [38] **Фигура 6** иллюстрирует типовой график уровней белка ФАГ человека, детектируемых в печени мышей с нокаутом ФАГ, получивших однократную дозу 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, или солевого раствора.
- [39] **Фигура 7** иллюстрирует типовой график уровней фенилаланина, детектируемых в сыворотке мышей с нокаутом ФАГ перед обработкой и после введения однократной дозы 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, или солевого раствора.
- 25 [40] **Фигура 8** иллюстрирует типовой график уровней белка ФАГ человека, детектируемых в печени мышей с нокаутом ФАГ, получивших 0,5 мг/кг или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, один раз в неделю на
- 30

протяжении одного месяца, или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, один раз в две недели на протяжении одного месяца, или солевой раствор.

[41] **Фигура 9** иллюстрирует типовой график уровней фенилаланина, детектируемых в сыворотке мышей с нокаутом ФАГ перед обработкой и после введения 0,5 мг/кг или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, один раз в неделю на протяжении одного месяца, или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, один раз в две недели на протяжении одного месяца, или солевого раствора.

10

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[42] Для упрощения понимания настоящего изобретения ниже приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения следующих терминов и иных терминов изложены в тексте подробного описания. Публикации и другие справочные материалы, на которые ссылаются для описания уровня техники настоящего изобретения и для обеспечения дополнительных подробностей, касающихся практической реализации настоящего изобретения, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

15

[43] *Алкил*: В данном контексте термин «алкил» обозначает радикал линейной или разветвленной насыщенной углеводородной группы, содержащей от 1 до 15 атомов углерода («С₁₋₁₅ алкил»). В некоторых вариантах реализации изобретения алкильная группа содержит от 1 до 3 атомов углерода («С₁₋₃ алкил»). Примеры С₁₋₃ алкильных групп включают метил (С₁), этил (С₂), *n*-пропил (С₃) и изопропил (С₃). В некоторых вариантах реализации изобретения алкильная группа содержит от 8 до 12 атомов углерода («С₈₋₁₂ алкил»). Примеры С₈₋₁₂ алкильных групп включают, без ограничения, *n*-октил (С₈), *n*-нонил (С₉), *n*-децил (С₁₀), *n*-ундецил (С₁₁), *n*-додецил (С₁₂) и т.п. Префикс «*n*-» (нормальный) указывает на неразветвленные алкильные группы. Например, *n*-С₈ алкил указывает на -(СН₂)₇СН₃, *n*-С₁₀ алкил указывает на -(СН₂)₉СН₃, и т.д.

20

25

[44] *Аминокислота*: В данном контексте термин «аминокислота» в его самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которые могут быть включены в полипептидную цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота имеет общую структуру H₂N-C(H)(R)-COOH. В некоторых вариантах

30

реализации изобретения аминокислота представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой синтетическую аминокислоту; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой d-аминокислоту; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой l-аминокислоту. Термин «стандартная аминокислота» относится к любой из двадцати стандартных l-аминокислот, содержащихся в природных пептидах. Термин «нестандартная аминокислота» относится к любой аминокислоте, кроме стандартных аминокислот, независимо от того, является ли она синтезированной или полученной из природного источника. В данном контексте термин «синтетическая аминокислота» охватывает химически модифицированные аминокислоты, включая, без ограничения, соли, производные аминокислот (такие как амиды) и/или замещения. Аминокислоты, в том числе карбокси- и/или аминоконцевые аминокислоты в пептидах, могут быть модифицированы путем метилирования, амидирования, ацетилирования, групповой защиты и/или замещения другими химическими группами, что может изменить период полувыведения пептида из крови без отрицательного влияния на активность. Аминокислоты могут участвовать в образовании дисульфидной связи. Аминокислоты могут содержать одну из посттрансляционных модификаций, таких как ассоциации с одним или более химическим компонентом (*например*, метильные группы, ацетатные группы, ацетильные группы, фосфатные группы, формильные фрагменты, изопреноидные группы, сульфатные группы, фрагменты полиэтиленгликоля, липидные фрагменты, углеводные фрагменты, фрагменты биотина *и т.д.*). Термин «аминокислота» используется взаимозаменяемо с термином «аминокислотный остаток» и может относиться к свободной аминокислоте и/или к аминокислотному остатку пептида. Из контекста, в котором используется термин, будет понятно, относится ли он к свободной аминокислоте или остатку пептида.

25 [45] *Животное*: В данном контексте термин «животное» относится к любому представителю царства животных. В некоторых вариантах реализации изобретения термин «животное» относится к человеческим особям на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации изобретения термин «животное» обозначает не принадлежащих к человеческому роду животных на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации изобретения животное, не принадлежащее к человеческому роду, представляет собой млекопитающее (*например*, грызун, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, овца, крупный рогатый скот, примат и/или свинья). В некоторых вариантах реализации изобретения

животные включают, без ограничения, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах реализации изобретения животное может собой представлять трансгенное животное, генетически сконструированное животное и/или клон.

5 [46] *Приблизительно или примерно:* В данном контексте термины «приблизительно» или «примерно», применительно к одному или более рассматриваемым значениям, относятся к значению, аналогичному установленному эталонному значению. В некоторых вариантах реализации изобретения термины «приблизительно» или «примерно» относятся к диапазону значений, попадающих в 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % или меньше в любом направлении (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если иное не указано или не очевидно из контекста (кроме случаев, когда такое количество будет превышать 100 % от возможного значения).

15 [47] *Биологически активный:* В данном контексте словосочетание «биологически активный» относится к характеристике любого агента, который обладает активностью в биологической системе и, в частности, в организме. Например, если при введении агент оказывает биологическое воздействие на организм, он рассматривается как биологически активный.

20 [48] *Доставка:* В данном контексте термин «доставка» охватывает как локальную, так и системную доставку. Например, доставка мРНК охватывает такие ситуации, в которых мРНК доставляют в целевую ткань, и кодируемый ею белок экспрессируется и удерживается в целевой ткани (также называемые «локальным распределением» или «локальной доставкой»), и такие ситуации, в которых мРНК доставляют в целевую ткань, и кодируемый ею белок экспрессируется и секретируется в кровотоке пациента (например, сыворотку), 25 распределяется системно и поглощается другими тканями (также называемые «системным распределением» или «системной доставкой»).

[49] *Экспрессия:* В данном контексте термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к трансляции мРНК в полипептид, сборке множества полипептидов в интактный белок (например, фермент) и/или пост-трансляционной 30 модификации полипептида или полностью собранного белка (например, фермента). В

настоящей заявке термины «экспрессия» и «производство» и их грамматические эквиваленты используются как взаимозаменяемые.

5 [50] *Функциональный*: В данном контексте термин «функциональная» биологическая молекула означает форму биологической молекулы, в которой она обладает свойством и/или активностью, которыми она характеризуется.

[51] *Период полувыведения*: В данном контексте термин «период полувыведения» означает время, необходимое для того, чтобы такой параметр, как концентрация белка или активность, снизился на половину от своего значения, измеренного в начале временного периода.

10 [52] *Улучшение, увеличение или уменьшение*: В данном контексте термины «улучшение», «увеличение» или «уменьшение», или их грамматические эквиваленты, указывают на изменения параметров относительно исходного измерения, такого как измерение у того же индивидуума до начала воздействия, описанного в настоящем документе, или измерение у контрольного субъекта (или множества контрольных субъектов) при отсутствии
15 лечения, описанного в настоящем документе. «Контрольным субъектом» является субъект, имеющий ту же форму заболевания, что и субъект, лечение которого осуществляют, и примерно тот же возраст, что и субъект, лечение которого осуществляют.

[53] *In vitro*: В данном контексте термин «*in vitro*» относится к явлениям, происходящим в искусственной среде, *например*, в пробирке или реакционном сосуде, в
20 клеточной культуре *и т.д.*, но не в многоклеточном организме.

[54] *In vivo*: В данном контексте термин «*in vivo*» относится к явлениям, происходящим в многоклеточном организме, таком как человек и животное, не принадлежащее к человеческому роду. В контексте клеточных систем, термин может быть использован для обозначения явлений, происходящих в живой клетке (в отличие от, например,
25 систем *in vitro*).

[55] *Изолированный*: В данном контексте термин «изолированный» относится к веществу, и/или объекту, которые были (1) отделены по меньшей мере от некоторых из компонентов, с которыми они были связаны, когда впервые были получены (будь то естественные и/или экспериментальные условия), и/или (2) получены, приготовлены и/или
30 изготовлены человеком. Изолированные вещества и/или объекты могут быть отделены от примерно 10 %, примерно 20 %, примерно 30 %, примерно 40 %, примерно 50 %, примерно

60 %, примерно 70 %, примерно 80 %, примерно 90 %, примерно 91 %, примерно 92 %, примерно 93 %, примерно 94 %, примерно 95 %, примерно 96 %, примерно 97 %, примерно 98 %, примерно 99 % или более чем примерно 99 % других компонентов, с которыми они были первоначально связаны. В некоторых вариантах реализации изобретения изолированные агенты характеризуются чистотой примерно 80 %, примерно 85 %, примерно 90 %, примерно 91 %, примерно 92 %, примерно 93 %, примерно 94 %, примерно 95 %, примерно 96 %, примерно 97 %, примерно 98 %, примерно 99 % или более чем примерно 99 %. Вещество в данном документе называется «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов. При расчете процента чистоты, который используется в данном документе, изолированные вещества и/или объекты не должны содержать наполнители (*например*, буфер, растворитель, вода и т.д.).

[56] *Локальное распределение или доставка*: В данном контексте термины «локальное распределение», «локальная доставка» или грамматические эквиваленты обозначают тканеспецифическую доставку или распределение. Как правило, для локального распределения или доставки необходим белок (*например*, фермент), кодируемый мРНК, которая транслируется и экспрессируется внутриклеточно или имеет ограниченную секрецию, что позволяет избежать поступления в систему циркуляции пациента.

[57] *Матричная РНК (мРНК)*: В данном контексте термин «матричная РНК (мРНК)» относится к полинуклеотиду, который кодирует по меньшей мере один полипептид. В данном контексте термин мРНК охватывает модифицированную и немодифицированную РНК. мРНК может содержать одну или более кодирующих и некодирующих областей. мРНК может быть выделена в чистом виде из естественных источников, получена с использованием рекомбинантных экспрессионных систем и, факультативно, очищена, химически синтезирована и т.д. По необходимости, *например*, в случае химически синтезированных молекул, мРНК может содержать нуклеозидные аналоги, такие как аналоги, содержащие химически модифицированные основания или сахара, модификации главной цепи и т.д. Последовательность мРНК представлена в направлении от 5' к 3', если не указано иное. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК представляет собой или содержит природные нуклеозиды (*например*, аденозин, тимидин, гуанозин, цитидин, уридин); аналоги нуклеозидов (*например*, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирроло-пиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C5-пропинилцитидин, C5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропинилуридин, C5-

пропинилцитидин, С5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, О-(6)-метилгуанин и 2-тиоцитидин); химически модифицированные основания; биологически модифицированные основания (*например*, метилированные основания); интеркалированные основания; модифицированные сахара (5 *например*, 2'-фторрибоза, рибоза, 2'-дезоксирибоза, арабиноза и гексоза); и/или модифицированные фосфатные группы (*например*, фосфоротиоаты и 5'-N-фосфорамидитные связи).

[58] *Нуклеиновая кислота*: В данном контексте термин «нуклеиновая кислота» в его самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которые могут быть 10 включены в полинуклеотидную цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которое включено или может быть включено в полинуклеотидную цепь посредством фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах реализации изобретения «нуклеиновая кислота» относится к индивидуальным остаткам нуклеиновой кислоты (*например*, нуклеотиды и/или нуклеозиды). 15 В некоторых вариантах реализации изобретения «нуклеиновая кислота» относится к полинуклеотидной цепи, содержащей индивидуальные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения «нуклеиновая кислота» включает РНК, а также одноцепочечную и/или двухцепочечную ДНК и/или кДНК.

[59] *Пациент*: В некоторых вариантах реализации изобретения термин «пациент» 20 или «субъект» относится к любому организму, которому можно вводить предложенную композицию, *например*, для целей эксперимента, диагностики, профилактики, косметического воздействия и/или лечения. Типичные пациенты включают животных (*например*, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, обезьяны и/или люди). В некоторых вариантах реализации изобретения пациент представляет собой человеческое существо. 25 Человеческое существо включает пре- и постнатальные стадии развития.

[60] *Фармацевтически приемлемый*: В данном контексте термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществам, которые, с медицинской точки зрения, пригодны для 30 использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с приемлемым соотношением польза/риск.

[61] *Фармацевтически приемлемая соль*: Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, S. M. Berge et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в *J. Pharmaceutical Sciences* (1977) 66:1-19. Подходящие фармацевтически приемлемые соли соединений согласно настоящему изобретению включают соли, которые могут быть получены с использованием подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминогруппы, образованные с помощью неорганических кислот, таких как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с помощью органических кислот, таких как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с помощью других способов, известных в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают соли адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогептаноат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, пара-толуолсульфонат, ундеканат, валерат и подобные соли. Соли, полученные из подходящих оснований, включают соли щелочного металла, щелочноземельного металла, аммония и $N^+(C_{1-4} \text{ алкил})_4$. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п. Другие фармацевтически приемлемые соли включают, если это уместно, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, образованные с участием таких противоионов, как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, сульфонат и арилсульфонат. Другие фармацевтически приемлемые соли включают соли, полученные путем кватернизации амина при помощи подходящего электрофила, например, алкилгалогенида, с образованием соли кватернизованного алкилированного амина.

[62] *Системное распределение или доставка*: В данном контексте термины «системное распределение», «системная доставка» или грамматические эквиваленты относятся к механизму или способу доставки или распределения, которые воздействуют на все

тело или на весь организм. Обычно системное распределение или доставку осуществляют через систему циркуляции организма, например, кровотока. Сравните с определением «локальное распределение или доставка».

5 [63] *Субъект*: В данном контексте термин «субъект» относится к человеческому существу или к любому животному, не относящемуся к человеческому роду (например, мышь, крыса, кролик, собака, кошка, крупный рогатый скот, свинья, овца, лошадь или примат). Человеческое существо включает пре- и пост-натальные стадии развития. Во многих вариантах реализации изобретения субъект представляет собой человеческое существо. Субъектом может являться пациент, который представляет собой человека, обратившегося в медицинское учреждение для диагностики или лечения заболевания. В данном контексте термин «субъект» 10 используют взаимозаменяемо с терминами «индивидуум» или «пациент». Субъект может страдать или являться предрасположенным к заболеванию или нарушению, и может иметь или не иметь симптомов заболевания или нарушения.

15 [64] *По существу*: В данном контексте термин «по существу» относится к качественному состоянию проявления полного или практически полного объема или степени рассматриваемой характеристики или свойства. Среднему специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические явления редко, если это вообще случается, доходят до завершения и/или протекают полностью, или достигают или избегают абсолютного результата. Следовательно, термин «по существу» в данном контексте направлен на то, чтобы 20 охватить возможное отсутствие полноты, присущее многим биологическим и химическим явлениям.

[65] *Ткани-мишени*: В данном контексте термин «ткани-мишени» относится к любой ткани, пораженной заболеванием, которое подлежит лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения ткани-мишени включают те ткани, в которых проявляется патология, 25 симптом или функция, ассоциированные с заболеванием.

[66] *Терапевтически эффективное количество*: В данном контексте термин «терапевтически эффективное количество» терапевтического агента, означает количество, которое является достаточным, при введении субъекту, страдающему от заболевания, нарушения и/или состояния, или предрасположенному к ним, с целью лечения, диагностики, 30 профилактики и/или приостановления развития симптома (симптомов) заболевания, нарушения и/или состояния. Средним специалистам в данной области техники должно быть

понятно, что терапевтически эффективное количество обычно вводят согласно схеме применения, содержащей по меньшей мере одну единичную дозу.

[67] *Лечение:* В данном контексте термин «лечить», «лечение» или «воздействие» относится к любому способу, применяемому для частичного или полного облегчения, улучшения, ослабления, ингибирования, предотвращения, задержки развития, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или состояния. Лечение может получать субъект, который не имеет признаков заболевания, и/или у которого проявляются лишь первые признаки заболевания, с целью снижения риска развития патологии, ассоциированной с заболеванием.

10

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[68] Согласно настоящему изобретению предложены, среди прочего, способы и композиции для лечения фенилкетонурии (ФКУ) на основе мРНК-терапии. Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, предложен способ лечения ФКУ, который включает введение субъекту, нуждающемуся в указанном лечении, композиции, содержащей мРНК, кодирующую фенилаланингидроксилазу (ФАГ), в эффективной дозировке и с эффективным интервалом введения, благодаря чему достигается снижение интенсивности, тяжести, частоты, или задержка возникновения по меньшей мере одного симптома или признака ФКУ. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК инкапсулирована в липосому. В данном контексте термин «липосома» относится к любой однослойной, многослойной или твердой липидной наноразмерной везикуле. Обычно липосома, в данном контексте, может быть образована путем смешивания одного или более липидов или путем смешивания одного или более липидов и полимера (полимеров). Следовательно, в данном контексте термин «липосома» охватывает как липидные наночастицы, так и наночастицы на основе полимеров. В некоторых вариантах реализации изобретения липосома, подходящая для настоящего изобретения, содержат катионный или некаатионный липид (липиды), липид (липиды) на основе холестерина и ПЭГ-модифицированный липид (липиды).

20

25

Фенилкетонурия (ФКУ)

[69] Настоящее изобретение можно использовать для лечения субъекта, страдающего или предрасположенного к фенилкетонурии (ФКУ). ФКУ представляет собой метаболическое

30

генетическое заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу, характеризующееся мутацией в гене, кодирующем фермент печени фенилаланингидроксилазу (ФАГ), приводящей к отсутствию активности указанного фермента. ФАГ необходима для метаболического превращения аминокислоты фенилаланина (Phe) в аминокислоту тирозин. При снижении активности ФАГ фенилаланин накапливается в организме и превращается в фенилпируват (также известный как фенилкетон), который может быть обнаружен в моче.

[70] Фенилаланин представляет собой большую нейтральную аминокислоту (БНАК). БНАК конкурируют за проникновение сквозь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) посредством транспортера больших нейтральных аминокислот (нейтрального транспортера). Избыток Phe в крови приводит к насыщению транспортера и вызывает снижение уровней других БНАК в головном мозге. Поскольку некоторые из указанных других аминокислот необходимы для синтеза белков и нейротрансмиттеров, накопление Phe задерживает развитие головного мозга и может вызвать умственную отсталость.

[71] Кроме задержки развития головного мозга, клинические проявления заболевания могут включать различные симптомы, включая судорожные припадки, альбинизм, гиперактивность, задержку роста, высыпания на коже (экзема), микроцефалию и/или «затхлый» запах пота и мочи ребенка, обусловленный фенилацетатом, одним из образующихся кетонов. При отсутствии лечения дети обычно выглядят нормальными при рождении, но демонстрируют задержку развития психических и социальных навыков, имеют размер головы значительно ниже нормы, и часто демонстрируют прогрессирующее нарушение мозговой функции. По мере роста и развития детей наблюдается тенденция к появлению дополнительных симптомов, включая гиперактивность, прерывистые движения рук и ног, аномалии ЭЭГ, высыпания на коже, дрожание, судорожные припадки и тяжелые затруднения при обучении. Тем не менее, в большинстве стран ФКУ обычно включают в рутинное скрининговое обследование новорожденных, которое обычно проводят на 2-7 день после рождения.

[72] При достаточно ранней диагностике ФКУ страдающий ей новорожденный может вырасти с относительно нормальным развитием головного мозга, но только благодаря управлению и контролю уровней Phe при помощи диеты или комбинации диеты и медикаментов. Все пациенты с ФКУ должны придерживаться специальной диеты с низким содержанием Phe для оптимального развития головного мозга. Диета требует строгого ограничения или исключения продуктов с высоким содержанием Phe, таких как мясо, курица,

рыба, яйца, орехи, сыр, бобовые, молоко и другие молочные продукты. Количество крахмалистой пищи, такой как картофель, хлеб, макаронные изделия и зерновые, необходимо контролировать. Младенцы могут находиться на грудном вскармливании для получения всех преимуществ, обеспечиваемых грудным молоком, но необходимо будет также контролировать количество молока и вводить добавки для обеспечения недостающих питательных веществ. Также следует избегать подсластителя аспартама, который присутствует во многих диетических продуктах и безалкогольных напитках, поскольку аспартам содержит фенилаланин.

[73] На протяжении всей жизни пациент может использовать дополнительные детские смеси, пилюли или специально разработанные продукты питания для получения аминокислот и других необходимых питательных веществ, нехватку которых он иначе испытывал бы при диете с низким содержанием фенилаланина. Некоторое количество Phe необходимо для синтеза многих белков и для соответствующего роста, но его уровни у пациентов с ФКУ необходимо строго контролировать. Кроме того, пациентам с ФКУ необходимо принимать добавки, содержащие тирозин, который в норме образуется из фенилаланина. Другие добавки могут включать рыбий жир, для замены длинноцепочечных жирных кислот, отсутствующих в стандартной диете без Phe, и для улучшения развития нервной системы, и железо или карнитин. Другой возможной терапией ФКУ является тетрагидробиоптерин (BH4), кофактор окисления Phe, который может снижать уровни Phe в крови у некоторых пациентов. Пациенты, восприимчивые к терапии BH4, также имеют возможность увеличивать количество природного белка, который они могут получать с пищей.

Фенилаланингидроксилаза (ФАГ)

[74] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы и композиции для доставки субъекту мРНК, кодирующей ФАГ, для лечения фенилкетонурии (ФКУ). Подходящая мРНК, кодирующая ФАГ, кодирует любую полную длину, фрагмент или часть белка ФАГ, который может представлять собой заместитель для природной активности белка ФАГ и/или снижать интенсивность, тяжесть и/или частоту одного или более симптомов, связанных с ФАГ.

[75] В некоторых вариантах реализации подходящая последовательность мРНК согласно настоящему изобретению содержит последовательность мРНК, кодирующую белок

ФАГ человека. мРНК природного белка ФАГ человека и соответствующая аминокислотная последовательность показаны в Таблице 1:

Таблица 1. ФАГ человека

ФАГ человека (мРНК)	<p>CAGCUGGGGGUAAGGGGGGCGGAUUAUUCAUAUAAUUGUUAUACCAGACGG UCGCAGGCUUAGUCCAAUUGCAGAGAACUCGCUUCCAGGCUUCUGAGAGUC CCGGAAGUGCCUAAACCUUGUCUAAUCGACGGGGCUUGGGUUGGCCCGUCGCUC CCUGGCUUCUCCCUUUACCCAGGGCGGGCAGCGAAGUGGUGCCUCCUGCGU CCCCCACACCCUCCUCAGCCCCUCCCUCCGGCCCCGUCUGGGCAGGUGACC UGGAGCAUCCGGCAGGCUGCCCUGGCCUCCUGCGUCAGGACAAGCCCACGAG GGGCGUUAUCUGUGCGGAGAUGCACCACGCAAGAGACACCCUUUGUAACUCUC UUCUCCUCCUAGUGCGAGGUUAAAACCUUCAGCCCCACGUCUGUUUGCAA ACCUGCCUGUACCUGAGGCCCUAAAAAGCCAGAGACCUCACUCCGGGGAGC CAGCAUGUCCACUGCGGUCCUGGAAAACCCAGGCUUGGGCAGGAAACUCUCU GACUUUGGACAGGAAACAAGCUAUAUUGAAGACAACUGCAAUCAAAAUGGU GCCAUAUCACUGAUCUUCACUCAAGAAGAAGUUGGUGCAUUGGCCAAA GUAUUGCGCUUAUUUGAGGAGAAUGAUGUAAACCUGACCCACAUUGAAUCU AGACCUUCUGUUUAAAGAAAGAUGAGUAUGAAUUUUUCACCCAUUUGGAU AAACGUAGCCUGCCUGCUCUGACAAACAUCAUCAAGAUCUUGAGGCAUGAC AUUGGUGCCACUGUCCAUGAGCUUUCACGAGUAAGAAGAAAGACACAGUG CCCUGGUUCCCAAGAACCAUUAAGAGCUGGACAGAUUUGCCAAUCAGAUUC UCAGCUAUGGAGCGGAACUGGAUGCUGACCACCCUGGUUUUAAAGAUCUG UGUACCGUGCAAGACGGAAGCAGUUUGCUGACAUUGCCUACAACUACCGCCA UGGGCAGCCAUCCUCGAGUGGAAUACAUGGAGGAAGAAAAGAAAACAUG GGGCACAGUGUUAAGACUCUGAAGUCCUUGUAUAAAACCCAUGCUUGCUA UGAGUACAAUCACAUUUUCCACUUCUUGAAAAGUACUGUGGCUUCCAUGA AGAUAAAUUCCCGAGCUGGAAGACGUUUCUCAAUUCUGCAGACUUGCACU GGUUUCGCGCUCGACCUGUGGCUGGCCUGCUUUCUCUGGGAAUUUCUUGG GUGGCCUGGCCUUCGAGUCUCCACUGCACACAGUACAUCAGACAUGGAUC CAAGCCAUUGUAUACCCCGAACCUGACAUCUGCCAUGAGCUGUUGGGACAU GUGCCCUUGUUUCAGAUUCGACGUUUGCCCAGUUUUCAGGAAAUUGGCC UUGCCUCUCUGGGUGCACCUGAUGAAUACAUUGAAAAGCUCGCCACAUUU ACUGGUUUACUGUGGAGUUUGGGCUCUGCAAACAAGGAGACUCCAUAAGG CAUAUGGUGCUGGGCUCCUGUCAUCCUUGGUGAAUUACAGUACUGCUUAU CAGAGAAGCCAAAGCUUCUCCCCUGGAGCUGGAGAAGACAGCCAUCCAAAA UACACUGUCACGGAGUUCAGCCCCUGUAUUACGUGGCAGAGAGUUUUAA UGAUGCCAAGGAGAAAGUAAGGAACUUUGCUGCCACAUAACCUCGGCCU CUCAGUUCGCUACGACCCAUAACCCAAAGGAUUGAGGUCUUGGACAUAACC CAGCAGCUUAAAGAUUUUGGCUGAUCCAUAACAGUGAAAUUGGAAUCCU UGCAGUGCCCUCCAGAAAAUAAAGUAAAGCCAUGGACAGAAUGUGGUCUG CAGCUGUGAAUCUGUUGAUGGAGAUCCAACUAUUUCUUAUCAAGAAAAAG UCCGAAAAGCAAACCUUAAUUGAAAUAACAGCCUAAAUCCUUUACAAGA UGGAGAAACAACAAUAAGUCAAAAUAUCUGAAAUGACAGGAUAUGAGUA CAUACUCAAGAGCAUAAUGGUAAAUCUUUUGGGGUCAUCUUUGAUUUAGAG AUGAUAAUCCCAUACUCUCAAUUGAGUUAAAUCAGUAAUCUGUCGCAUUUC AUCAAGAUUAAUUAUUUUUGGGACCUGCUUCAUUAAGCUUCAUAUAUGC UUUGCAGAGAACUCAUAAAGGAGCAUAUAAGGCUAAAUGUAAAACACAAGA CUGUCAUUAGAAUUGAAUUUUUGGGCUAAAUAUAAAUCGUAAACCUAUGAAG UUUUUUUUCUAUUUUAGUUAAACUAUGAUUCCAUAUACUUAUGUUUAUGU ACCUAAGUAAAUUUCUUUAGGUCAGAAGCCAUUAAAUAUGUUACAAGCA UUGAACUUCUUUAGUAUUUAUUAAUAUAAAACAUUUUUGUAUGUUUUUAU</p>
------------------------------------	--

	UGUAAUCAUAAAACUGCUGUAUAAGGUAUAAAACUCUGCACCUAUCCC CAUAACUCCAGUAUCAUUUCCAAUUAUUAUCAAGUCUGUUUUGGGAAA CACUUUGAGGACAUUUUAUGAUGCAGCAGAUGUUGACUAAAGGCUUGGUUGG UAGAUUUUCAGGAAAUGUUCACUGAAUAAAUAAGUAAAUAUUAUUGAAA AGCAAUCUGUAUAAAUGUGAAAUUUUUAUUUGUAUUAGUAAUAAAACAUU AGUAGUUUA (SEQ ID NO:1)
ФАГ человека (Аминок ислотная последов ательнос ть)	MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETS YIEDNCNQNQAISLIFSLKEEV GALAKVLR LFEE NDVNLTHIESRPSRLKKDEYEFFTHLDRSLPALTNIILRHDIGATVHELSDK DTVPWFPRTIQELDRFANQILSYGAELDADHPGFKDPVYRARRKQFADIA YNYRH GQIPRVEYMEEEEKKTWGT VFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPLLEK YCGFHEDNIPQ LEDVSQFLQTCTGFRLRPVAGLLSSRDFLGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEDI CHELLGHVPLFSDRSFAQFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATIIYWFTVEFGLCKQGDSI KAYGAGLLSSFGE LQYCLSEKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYVAESFNDAK EKVRNFAATIPRPFVRYDPYTQRIEVL DNTQQLKILADSINSEIGILCSALQKIK (SEQ ID NO:2)

[76] В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая мРНК представляет собой последовательность мРНК чФАГ дикого типа (SEQ ID NO:1). В некоторых вариантах реализации подходящая мРНК может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность мРНК чФАГ, такую как последовательность, показанная ниже:

5 AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGGGCCGCAAGCUGAGCGACUUCGGC
CAGGAGACCAGCUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCCAUCAGCCUGAUC
UUCAGCCUGAAGGAGGAGGUGGGCGCCUGGCCAAGGUGCUGCGCCUGUUCGAGGA
GAACGACGUGAACCCUGACCCACAUCGAGAGCCGCCCCAGCCGCCUGAAGAAGGACGA
GUACGAGUUCUUCACCCACCCUGGACAAGCGCAGCCUGCCC GCCUGACCAACAUCAU
10 CAAGAUCUGCGCCACGACAUCGGCGCCACCGUGCACGAGCUGAGCCGCGACAAGAA
GAAGGACACCGUGCCCUGGUUCCCCCGCACCAUCCAGGAGCUGGACCGCUUCGCCAA
CCAGAUCCUGAGCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCAAGGACCC
CGUGUACCGCGCCC GCCGCAAGCAGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGCCACGG
CCAGCCCAUCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGAAGACCUGGGGCACCGU
15 GUUCAAGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAACCACAU
CUUCCCCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCUUCCACGAGGACAACAUCCCCCAGCUGGA
GGACGUGAGCCAGUUCUGCAGACCUGCACCGGCUUCCGCCUGCGCCCCGUGGCCGG
CCUGCUGAGCAGCCGCGACUUCUGGGCGGCCUGGCCUUCGCGUGUUCACUGCAC
CCAGUACAUCGCCACGGCAGCAAGCCAUUGUACACCCCGAGCCCGACAUCUGCCA
20 CGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGCAGCUUCGCCAGUUCAGCCA
GGAGAUCGGCCUGGCCAGCCUGGGCGCCCCGACGAGUACAUCGAGAAGCUGGGCCAC
CAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGC
CUACGGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAA
GCCCAAGCUGCUGCCCCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUACACCGUGAC
25 CGAGUUCAGCCCCUGUACUACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGU
GCGCAACUUCGCCGCCACCAUCCCCCGCCCCUUCAGCGUGCGCUACGACCCCUACACC
CAGCGCAUCGAGGUGCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCUGGCCGACAGCAUC
AACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCAGCGCCUGCAGAAGAUCAAGUAA (SEQ ID
NO:3)

30 [77] Дополнительные примеры последовательностей мРНК описаны в разделе Примеров, такие как SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, обе из которых включают 5'- и 3'-

нетранслируемые области, обрамляющие кодон-оптимизированную последовательность мРНК.

[78] В некоторых вариантах реализации подходящая последовательность мРНК может представлять собой последовательность мРНК, кодирующую гомолог или аналог белка ФАГ человека. В настоящем описании гомолог или аналог белка ФАГ человека может представлять собой модифицированный белок ФАГ человека, содержащий одно или более аминокислотных замещений, делеций и/или вставок, по сравнению с диким типом или природным белком ФАГ человека, при сохранении, по существу, активности белка ФАГ. В некоторых вариантах реализации подходящая мРНК согласно настоящему изобретению кодирует аминокислотную последовательность, гомологичную по меньшей мере на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более последовательности SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах реализации подходящая последовательность мРНК согласно настоящему изобретению кодирует белок, по существу, идентичный белку ФАГ человека. В некоторых вариантах реализации мРНК согласно настоящему изобретению кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более последовательности SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах реализации подходящая мРНК согласно настоящему изобретению кодирует фрагмент или часть белка ФАГ человека. В некоторых вариантах реализации подходящая мРНК согласно настоящему изобретению кодирует фрагмент или часть белка ФАГ человека, причем указанный фрагмент или часть белка сохраняет активность ФАГ, аналогичную белку дикого типа. В некоторых вариантах реализации подходящая мРНК согласно настоящему изобретению имеет нуклеотидную последовательность, идентичную по меньшей мере на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

[79] В некоторых вариантах реализации подходящая мРНК согласно настоящему изобретению кодирует слитый белок, содержащий полную длину, фрагмент или часть белка ФАГ, слитую с другим белком (например, слияние по N- или C-концу). В некоторых вариантах реализации изобретения белок, слитый с мРНК, кодирующей полную длину, фрагмент или часть белка ФАГ, кодирует сигнальную или клеточно-направленную последовательность.

Средства доставки

[80] Согласно настоящему изобретению мРНК, кодирующую белок ФАГ (*например*, полную длину, фрагмент или часть белка ФАГ), описанную в настоящем документе, можно доставлять в виде открытой РНК (без оболочки) или с помощью средств доставки. В данном контексте термины «средство доставки», «носитель», «наночастица» или их грамматические эквиваленты используются как взаимозаменяемые.

[81] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК, кодирующие белок ФАГ, могут быть доставлены с помощью одного средства доставки. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК, кодирующие белок ФАГ, могут быть доставлены с помощью одного или более средств доставки, каждое из которых имеет различную композицию. Согласно различными вариантами реализации изобретения, подходящие средства доставки включают, без ограничения, носители на основе полимера, такие как полиэтиленимин (PEI), липидные наночастицы и липосомы, нанолипосомы, церамид-содержащие нанолипосомы, протеолипосомы, природные и синтетические экзосомы, природные, синтетические и полусинтетические ламеллярные тельца, наночастицы, наночастицы фосфор-силиката кальция, наночастицы фосфата кальция, наночастицы диоксида кремния, нанокристаллические частицы, полупроводниковые наночастицы, поли-(D-аргинин), золь-гели, нанодендримеры, системы доставки на основе крахмала, мицеллы, эмульсии, ниосомы, мультидоменные блок-полимеры (виниловые полимеры, полимеры полипропилакриловой кислоты, динамические поликонъюгаты), сухие порошковые составы, плазмиды, вирусы, нуклеотиды фосфата кальция, аптамеры, пептиды и другие векторные маркеры.

Липосомальные средства доставки

[82] В некоторых вариантах реализации изобретения подходящее средство доставки представляет собой липосомальное средство доставки, *например*, липидную наночастицу. В данном контексте липосомальные средства доставки, *например*, липидные наночастицы, как правило, характеризуются как микроскопические пузырьки, имеющие внутреннее водное пространство, изолированное от внешней среды мембраной, состоящей из одного или более бислоев. Двухслойные мембраны липосом, как правило, состоят из амфифильных молекул, таких как липиды синтетического или природного происхождения, которые содержат пространственно разделенные гидрофильные и гидрофобные домены (Lasic, Trends

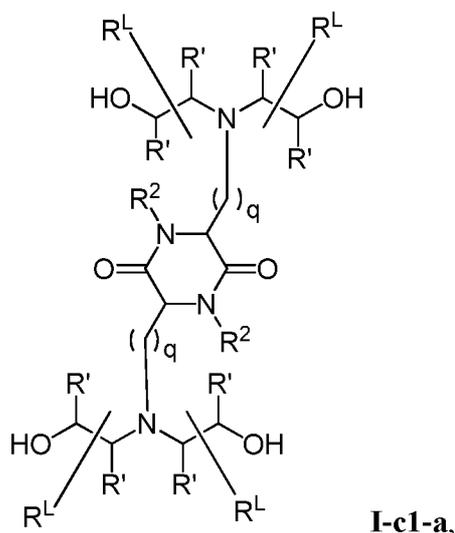
Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Двухслойные мембраны липосом также могут быть образованы амфифильными полимерами и поверхностно-активными веществами (например, полимеросомами, ниосомами и т.д.). В контексте настоящего изобретения, липосомальное средство доставки, как правило, служит для транспортировки желаемой мРНК в клетку-мишень или
5 ткань-мишень. Процесс включения желаемой мРНК в липосому часто называют «нагрузкой». Типовые способы описаны в Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Нуклеиновые кислоты, включенные в липосомы, могут быть полностью или частично расположены во внутреннем пространстве липосомы, в двухслойной мембране липосомы или связаны с внешней поверхностью липосомной
10 мембраны. Включение нуклеиновой кислоты в липосомы также называется в данном документе «инкапсуляцией», когда нуклеиновая кислота полностью содержится во внутреннем пространстве липосомы. Зачастую, целью включения мРНК в средство доставки, такое как липосома, является защита нуклеиновой кислоты от влияния окружающей среды, которая может содержать ферменты или химические вещества, разрушающие нуклеиновые
15 кислоты и/или системы или рецепторы, которые вызывают быстрое выделение нуклеиновых кислот. Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения подходящее средство доставки способно усиливать стабильность мРНК, содержащейся в нем, и/или содействовать доставке мРНК в клетку-мишень или ткань-мишень.

20 Катионные липиды

[83] В некоторых вариантах реализации изобретения липосомы могут содержать один или более катионных липидов. В данном контексте словосочетание «катионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые обладают суммарным положительным зарядом при выбранном рН, таком как физиологический рН. Некоторые катионные липиды
25 были описаны в литературе, многие из них являются коммерчески доступными. Особо подходящие катионные липиды для использования в композициях и способах согласно настоящему изобретению, включают липиды, описанные в международных патентных публикациях WO 2010/053572 (и, в частности, CI2-200, описанный в пункте [00225]) и WO 2012/170930, которые обе включены в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых
30 вариантах реализации настоящего изобретения в композициях и способах настоящего изобретения используют липидные наночастицы, содержащие способный к ионизации катионный липид, описанный в предварительной заявке на патент США 61/617468, поданной

29 марта 2012 года (включенной в настоящее описание посредством ссылки), такой как, например, (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-тетракоза-15,18-диен-1-амин (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-тетракоза-4,15,18-триен-1-амин (HGT5001) и (15Z, 18Z)-N,N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-тетракоза-5,15,18-триен-1-амин (HGT5002).

[84] В некоторых вариантах реализации изобретения предложены липосомы, содержащие катионный липид, описанный в WO 2013063468 и в предварительной заявке на патент США, озаглавленной «Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA», поданной одновременно с настоящей заявкой в ту же дату, которые обе включены в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения катионный липид содержит соединение с формулой **I-c1-a**:



или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения, где:

каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_{1-3} алкил;

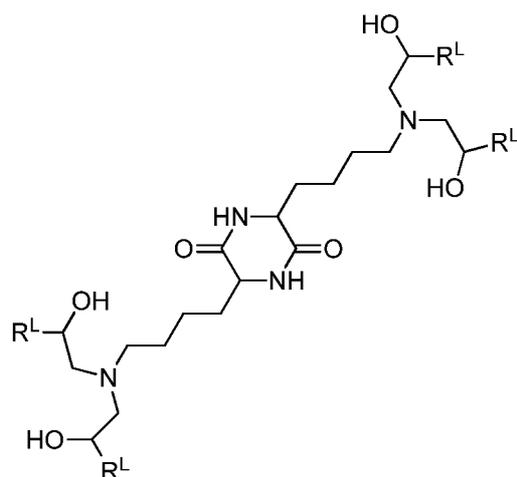
каждый q независимо составляет от 2 до 6;

каждый R' независимо представляет собой водород или C_{1-3} алкил;

и каждый R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил.

[85] В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^2 независимо представляет собой водород, метил или этил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^2 независимо представляет собой водород или метил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^2 представляет собой водород.

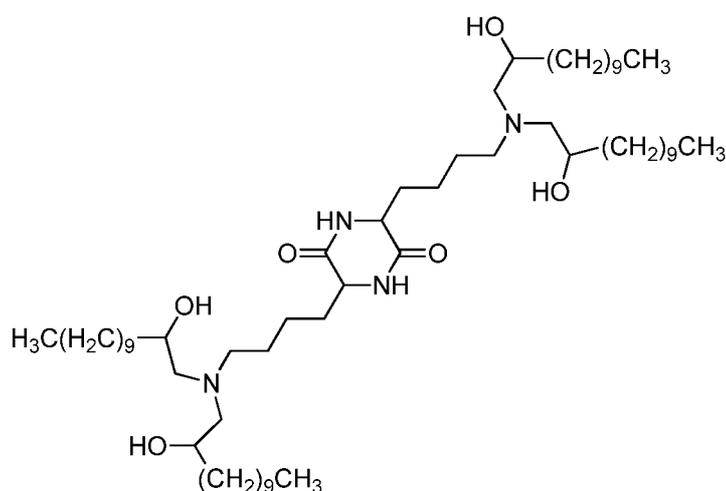
- [86] В некоторых вариантах реализации изобретения каждый q независимо составляет от 3 до 6. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый q независимо составляет от 3 до 5. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый q составляет 4.
- [87] В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R' независимо представляет собой водород, метил или этил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R' независимо представляет собой водород или метил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R' независимо представляет собой водород.
- [88] В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой n - C_{8-12} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой C_{9-11} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой n - C_{9-11} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой C_{10} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой n - C_{10} алкил.
- [89] В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^2 независимо представляет собой водород или метил; каждый q независимо составляет от 3 до 5; каждый R' независимо представляет собой водород или метил; и каждый R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил.
- [90] В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^2 представляет собой водород; каждый q независимо составляет от 3 до 5; каждый R' представляет собой водород; и каждый R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил.
- [91] В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^2 представляет собой водород; каждый q составляет 4; каждый R' представляет собой водород; и каждый R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил.
- [92] В некоторых вариантах реализации изобретения катионный липид содержит соединение с формулой **I-g**:



I-g,

или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой *n*- C_{8-12} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой C_{9-11} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой *n*- C_{9-11} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L независимо представляет собой C_{10} алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый R^L представляет собой *n*- C_{10} алкил.

[93] В конкретных вариантах реализации липосомы согласно настоящему изобретению включают катионный липид сКК-Е12 или (3,6-бис-(4-(бис-(2-гидроксидодецил)-амино)-бутил)-пиперазин-2,5-дион). Структура сКК-Е12 представлена ниже:



[94] Как описано ниже в разделе Примеров, авторы настоящего изобретения обнаружили, что липосомы на основе указанного конкретного класса катионных липидов, таких как липиды, имеющие структуру формулы **I-c1-a** или формулы **I-g** согласно настоящему описанию (например, сКК-E12), оказались неожиданно эффективными для доставки мРНК и производства кодируемого ей белка *in vivo*. Хотя в качестве примера в настоящей заявке используют мРНК, кодирующую белок ФАГ, полагают, что указанный класс катионных липидов, имеющих структуру формулы **I-c1-a** или формулы **I-g** согласно настоящему описанию (например, сКК-E12), могут быть полезны для доставки любой мРНК для высокоэффективного и замедленного производства белка (например, терапевтического белка) *in vivo*. Например, катионные липиды, имеющие структуру формулы **I-c1-a** или формулы **I-g** согласно настоящему описанию (например, сКК-E12), могут быть полезны для доставки мРНК, кодирующей один или более природных пептидов или один или более модифицированных или синтетических пептидов. В некоторых вариантах реализации, катионные липиды, имеющие структуру формулы **I-c1-a** или формулы **I-g** согласно настоящему описанию (например, сКК-E12), можно применять для доставки мРНК, кодирующей внутриклеточные белки, включая, без ограничения, цитозольный белок (например, белок-шаперон, внутриклеточный фермент (например, мРНК, кодирующая фермент, связанный с циклом мочевины лизосомными болезнями накопления)), белок, связанный с актиновым цитоскелетом, белок, связанный с плазматической мембраной, околядерный белок, ядерный белок (например, фактор транскрипции), и любые другие белки, участвующие в клеточном метаболизме, репарации ДНК, транскрипции и/или трансляции). В некоторых вариантах реализации, катионные липиды, имеющие структуру формулы **I-c1-a** или формулы **I-g** согласно настоящему описанию (например, сКК-E12), можно применять для доставки мРНК, кодирующей трансмембранный белок, такой как белок ионного канала. В некоторых вариантах реализации, катионные липиды, имеющие структуру формулы **I-c1-a** или формулы **I-g** согласно настоящему описанию (например, сКК-E12), можно применять для доставки мРНК, кодирующей внеклеточный белок, включая, без ограничения, белок, связанный с внеклеточным матриксом, секретированный белок (например, гормоны и/или нейротрансмиттеры).

[95] В некоторых вариантах реализации изобретения один или более катионных липидов, подходящих для настоящего изобретения, могут представлять собой N-[1-(2,3-диолеилокси)-пропил]-N,N,N-триметиламмонийхлорид или «DOTMA». (Feigner et al. (Proc.

Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); патент США № 4897355). DOTMA может, отдельно или в комбинации с нейтральным липидом, диолеилфосфатидилэтаноламином или «DOPE», или другими катионными или некатонными липидами, входить в состав липосомального средства доставки или липидной наночастицы, и такие липосомы могут быть использованы для
5 улучшения доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Другие подходящие катионные липиды включают, например, 5-карбокиспермилглицинооктадециламид или «DOGS», 2,3-диолеилокси-N-[2-(спермин-карбоксамидо)-этил]-N,N-диметил-1-пропанаминий или «DOSPA» (Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); патент США № 5171678; Патент США. № 5334761), 1,2-диолеил-3-диметиламмоний-пропан или «DODAP», 1,2-диолеил-3-
10 триметиламмоний-пропан или «DOTAP».

[96] Дополнительные примеры катионных липидов также включают 1,2-дистеарилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или «DSDMA», 1,2-диолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или «DODMA», 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или «DLinDMA», 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметил-3-аминопропан или «DLinDMA», N-диолеил-N,N-диметиламмонийхлорид или «DODAC», N,N-дистеарил-N,N-диметиламмонийбромид или «DDAB», N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмонийбромид или «DMRIE», 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадекадиеноксид)-пропан или «CLinDMA», 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-диметил-1-(цис,цис-9',1-2'-октадекадиеноксид)-пропан
20 или «CpLinDMA», N,N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин «DMOVA», 1,2-N,N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или «DOcarbDAP», 2,3-дилинолеилокси-N,N-диметилпропиламин или «DLinDAP», 1,2-N,N'-дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или «DLincarbDAP», 1,2-дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или «DLinCDAP», 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан или «DLin- DMA», 2,2-дилинолеил-4-
25 диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан или «DLin-K-XTC2-DMA» и 2-(2,2-ди-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N,N-диметилэтанамин (DLin-KC2-DMA)) (см. WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), или их смеси. (Heyes, J., et al., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); публикация PCT WO2005/121348A1). В некоторых вариантах реализации изобретения
30 один или более катионных липидов содержат по меньшей мере один из следующих фрагментов: имидазол, диалкиламино или гуанидиний.

[97] В некоторых вариантах реализации изобретения, один или более катионных липидов могут быть выбраны из ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан), МСЗ (((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)-бутаноат), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)-тетрагидро-
5 ЗаН-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин)), NC98-5 (4,7,13-трис-(3-оксо-3-(ундециламино)-пропил)-N1,N16-диундецил-4,7,10,13-тетраазагексадекан-1,16-диамид), DODAP (1,2-диолеил-3-диметиламмонийпропан), HGT4003 (WO 2012/170889, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки), ICE (WO 2011/068810, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки), HGT5000
10 (предварительная заявка на патент США № 61/617468, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки) или HGT5001 (цис или транс) (предварительная заявка на патент № 61/617468), липоиды, содержащие аминокспирт, такие как описанные в WO2010/053572, DOTAP (1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан), DOTMA (1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмонийпропан), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. “Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids” J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple, S.C. et al. «Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery» Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, K.T. et al. “Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing” PNAS 2010, 107, 1864-1869).

[98] В некоторых вариантах реализации изобретения процентное содержание катионного липида в липосоме может составлять более 10 %, более 20 %, более 30 %, более 20
40 %, более 50 %, более 60 % или более 70 %. В некоторых вариантах реализации катионный липид (липиды) составляет (составляют) примерно 30-50 % (например, примерно 30-45 %, примерно 30-40 %, примерно 35-50 %, примерно 35-45 % или примерно 35-40 %) от массы липосомы. В некоторых вариантах реализации катионный липид (например, сКК-E12)
25 составляет примерно 30 %, примерно 35 %, примерно 40 %, примерно 45 % или примерно 50 % липосомы в мольном отношении.

Некатионные/вспомогательные липиды

[99] В некоторых вариантах реализации изобретения предложены липосомы, содержащие один или более некатионных («вспомогательных») липидов. В данном контексте словосочетание «некатионный липид» относится к любому нейтральному, цвиттерионному
30

или анионному липиду. В данном контексте словосочетание «анионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые имеют суммарный отрицательный заряд при выбранном Н, таком как физиологический рН. Некатионные липиды включают, без ограничения, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC),
5 дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин
10 (DMPE), дистеароил-фосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил PE, 16-О-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE) или смесь указанных соединений.

[100] В некоторых вариантах реализации такие неcatiонные липиды могут быть использованы по отдельности, но предпочтительно их используют в комбинации с другими
15 наполнителями, например, катионными липидами. При использовании в сочетании с катионным липидом, неcatiонный липид может иметь мольное отношение к общему содержанию липидов в липосоме от примерно 5 % до примерно 90 %, или предпочтительно от примерно 10 % до примерно 70 %. В некоторых вариантах реализации изобретения неcatiонный липид представляет собой нейтральный липид, т.е. липид, который не имеет
20 суммарного заряда в условиях, при которых составляют и/или вводят композицию. В некоторых вариантах реализации изобретения процентное содержание неcatiонного липида в липосоме может составлять больше 5 %, больше 10 %, больше 20 %, больше 30 % или больше 40 %.

25 Липиды на основе холестерина

[101] В некоторых вариантах реализации изобретения предложенные липосомы содержат один или более липидов на основе холестерина. Например, подходящие катионные липиды на основе холестерина включают, например, DC-Chol (N,N-диметил-N-этилкарбоксамидохолестерин), 1,4-бис-(3-N-олеиламинопропил)-пиперазин (Gao, et al.
30 Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); патент США № 5744335) или ICE. В некоторых вариантах реализации изобретения липид на основе

холестерина может содержаться в липосоме в мольном отношении от примерно 2 % до примерно 30 % или от примерно 5 % до примерно 20 % от общего содержания липидов. В некоторых вариантах реализации изобретения процентное содержание липида на основе холестерина в липидной наночастице может составлять более 5 %, 10 %, более 20 %, более 30 % или более 40 %.

ПЭГирированные липиды

[102] В некоторых вариантах реализации изобретения липосомы содержат один или более ПЭГирированных липидов. Например, настоящее изобретение также предполагает использование полиэтиленгликоль (ПЭГ)-модифицированных фосфолипидов и дериватизированных липидов, таких как дериватизированные церамиды (ПЭГ-CER), в том числе N-октаноил-сфингозин-1-[сукцинил-(метокси-полиэтиленгликоль)-2000] (C8 ПЭГ-2000 церамид), в комбинации с одним или более катионными липидами, и, в некоторых вариантах реализации, с другими липидами, составляющими липосому. Предполагаемые ПЭГ-модифицированные липиды включают, без ограничения, полиэтиленгликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с липидом с помощью алкильной цепи (цепей) длиной C₆-C₂₀. В некоторых вариантах реализации изобретения ПЭГ-модифицированный липид или ПЭГирированный липид представляет собой ПЭГирированный холестерин или ПЭГ-2К. Добавление таких компонентов может предотвратить агрегацию комплекса, а также может обеспечить возможность увеличения времени жизни в кровотоке и увеличения доставки композиции липидов и нуклеиновых кислот в клетку-мишень (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237) или они могут быть выбраны для быстрого обмена из состава *in vivo* (см. Патент США № 5885613).

[103] В некоторых вариантах реализации особенно полезными заменяемыми липидами являются ПЭГ-церамиды, содержащие короткие ацильные цепочки (например, C₁₄ или C₁₈). ПЭГ-модифицированный фосфолипид и дериватизированные липиды согласно настоящему изобретению могут содержаться в мольном отношении к общему содержанию липидов в липосоме от примерно 0 % до примерно 15 %, от примерно 0,5 % до примерно 15 %, от примерно 1 % до примерно 15 %, от примерно 4 % до примерно 10 %, или примерно 2 %

30

Полимеры

[104] В некоторых вариантах реализации изобретения подходящее средство доставки составляют с использованием полимера в качестве носителя, отдельно или в комбинации с другими носителями, включая липиды согласно настоящему описанию. Следовательно, в некоторых вариантах реализации липосомальное средство доставки, в данном контексте, также охватывает наночастицы, содержащие полимеры. Подходящие полимеры могут включать, например, полиакрилаты, полиалкицианоакрилаты, полилактид, полилактид-полигликолидные сополимеры, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, протамин, ПЭГилированный протамин, PLL, ПЭГилированный PLL и полиэтиленимин (PEI). При наличии PEI, он может представлять собой разветвленный PEI с молекулярной массой в диапазоне от 10 до 40 кДа, например, разветвленный PEI 25 кДа (Sigma # 408727).

[105] Согласно различным вариантам реализации изобретения, выбор катионных липидов, некаатионных липидов, ПЭГ-модифицированных липидов и/или полимеров, составляющих липидную наночастицу, а также относительное молярное отношение таких липидов друг к другу, основан на характеристиках выбранного липида (липидов)/полимеров, природе предполагаемых клеток-мишеней и характеристиках мРНК, которая должна быть доставлена. Дополнительные факторы включают, например, насыщенность алкильной цепи, а также размер, заряд, рН, рКа, фузогенность и токсичность выбранного липида (липидов). Следовательно, молярные соотношения можно соответствующим образом регулировать.

[106] В некоторых вариантах реализации изобретения катионные липиды, некаатионные липиды, липиды на основе холестерина и ПЭГ-модифицированные липиды можно комбинировать в различных молярных отношениях. Например, отношение катионного липида (например, сКК-E12, C12-200 и т.д.) к некаатионному липиду (например, DOPE и т.д.) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K) может составлять между примерно 30-60:25-35:20-30:1-15, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12, C12-200 и т.д.) к некаатионному липиду (например, DOPE и т.д.) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K) составляет приблизительно 40:30:20:10, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12, C12-200 и т.д.) к некаатионному липиду (например, DOPE и т.д.) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K)

составляет приблизительно 40:30:25:5, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12, C12-200 и т.д.) к неcatiонному липиду (например, DOPE и т.д.) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K) составляет приблизительно 40:32:25:3, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение катионного липида (например, сКК-E12, C12-200 и т.д.) к неcatiонному липиду (например, DOPE и т.д.) к липиду на основе холестерина (например, холестерин) к ПЭГилированному липиду (например, DMG-PEG2K) составляет приблизительно 50:25:20:5, соответственно.

10

Синтез мРНК

[107] Согласно настоящему изобретению мРНК могут быть синтезированы с использованием любого из множества известных способов. Например, согласно настоящему изобретению мРНК могут быть синтезированы посредством транскрипции *in vitro* (IVT). Вкратце, IVT, как правило, выполняют с использованием кольцевой или линейной матрицы ДНК, содержащей промотор, пула трифосфатов рибонуклеотидов, буферной системы, которая может включать DTT и ионы магния, и соответствующей РНК-полимеразы (например, T3, T7 или РНК-полимераза SP6), ДНКазы I, пирофосфатазы и/или ингибитора РНКазы. Точные условия могут варьироваться в зависимости от конкретного применения.

[108] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, для получения мРНК согласно настоящему изобретению транскрипцию матрицы ДНК осуществляют *in vitro*. Подходящая матрица ДНК, как правило, включает промотор, например, промотор T3, T7 или SP6, для транскрипции *in vitro*, за которым следует желаемая нуклеотидная последовательностью для желаемой мРНК и сигнал терминации.

[109] Согласно настоящему изобретению, желаемая последовательность (последовательности) мРНК может быть определена и включена в матрицу ДНК с использованием стандартных способов. Например, начиная от желаемой аминокислотной последовательности (например, желаемой последовательности фермента), осуществляют фактическую обратную трансляцию на основе вырожденного генетического кода. Для выбора подходящих кодонов могут быть использованы алгоритмы оптимизации. Как правило,

30

содержание G/C может быть оптимизировано, с одной стороны, для достижения максимально возможного содержания G/C, и с другой стороны, с учетом оптимальной частоты тРНК, соответствующей использованию кодонов. Оптимизированную последовательность РНК можно создавать и отображать, например, с помощью соответствующего устройства отображения, и сравнивать с исходной последовательностью (дикого типа). Также можно анализировать вторичную структуру с целью определения стабилизирующих и дестабилизирующих свойств или, соответственно, участков РНК.

Модифицированная мРНК

[110] Согласно некоторым вариантам реализации, мРНК согласно настоящему изобретению может быть синтезирована как немодифицированная или модифицированная мРНК. Как правило, мРНК модифицируют для повышения стабильности. Модификации мРНК могут включать, например, модификации нуклеотидов РНК. Согласно настоящему изобретению модифицированные мРНК могут, таким образом, включать, например, модификации главной цепи, модификации сахаров или модификации оснований. В некоторых вариантах реализации мРНК можно синтезировать из природных нуклеотидов и/или аналогов нуклеотидов (модифицированных нуклеотидов), включая, без ограничения, пурины (аденин (А), гуанин (G)) или пиримидины (тимин (Т), цитозин (С), урацил (U)), и в качестве модифицированных нуклеотидов аналоги или производные пуринов и пиримидинов, такие как, например, 1-метиладенин, 2-метиладенин, 2-метилтио-N-6-изопентениладенин, N6-метиладенин, N6-изопентениладенин, 2-тиоцитозин, 3-метилцитозин, 4-ацетилцитозин, 5-метилцитозин, 2,6-диаминопурин, 1-метилгуанин, 2-метилгуанин, 2,2-диметилгуанин, 7-метилгуанин, инозин, 1-метилюнозин, псевдоурацил (5-урацил), дигидроурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-(карбоксихидроксиметил)-урацил, 5-фторурацил, 5-бромуррацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-метилурацил, N-урацил-5-оксиуксусной кислоты метиловый эфир, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 5'-метоксикарбонилметилурацил, 5-метоксиурацил, урацил-5-оксиуксусной кислоты метиловый эфир, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), 1-метилпсевдоурацил, квеуозин, .бета.-D-маннозилквеуозин, вибутоксозин, и фосфорамидаты, фосфоротиоаты, пептидные нуклеотиды, метилфосфонаты, 7-деазагуанозин, 5-метилцитозин и инозин. Получение таких аналогов известно специалисту в данной области техники, например, из Патента США № 4373071, Патента США № 4401796, Патента США № 4415732, Патента США № 4458066, Патента США

№ 4500707, Патента США № 4668777, Патента США № 4973679, Патента США № 5047524, Патента США № 5132418, Патента США № 5153319, Патентов США №№ 5262530 и 5700642, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

5 [111] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (*например*, мРНК, кодирующие ФАГ) могут содержать модификации главной цепи РНК. Как правило, модификация главной цепи представляет собой модификацию, в которой фосфаты главной цепи нуклеотидов, входящих в состав РНК, модифицируют химически. Примеры модификаций главной цепи, как правило, включают, без ограничения, модификации из 10 группы, состоящей из метилфосфонатов, метилфосфорамидатов, фосфорамидатов, фосфоротиоатов (например 5'-О-(1-тиофосфат) цитидина), боранофосфатов, положительно заряженных групп гуанидиния и т.д., посредством чего осуществляется замена фосфодиэфирной связи другими анионными, катионными или нейтральными группами.

[112] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (*например*, мРНК, кодирующие ФАГ) могут содержать модификации сахаров. Типичная модификация сахара 15 представляет собой химическую модификацию сахара, содержащегося в нуклеотидах, включая, без ограничения, модификации сахаров, выбранные из группы, состоящей из 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-олигорибонуклеотида (2'-фтор-2'-дезоксидезоксицитидин-5'-трифосфат, 2'-фтор-2'-дезоксидезоксиуридин-5'-трифосфат), 2'-дезоксидезамин-олигорибонуклеотида (2'-амино-2'-дезоксидезоксицитидин-5'-трифосфат, 2'-амино-2'-дезоксидезоксиуридин-5'-трифосфат), 2'-О- 20 алкилолигорибонуклеотида, 2'-дезоксидезокси-2'-С- алкилолигорибонуклеотида (2'-О-метилцитидин-5'-трифосфат, 2'-метилуридин-5'-трифосфат), 2'-С-алкилолигорибонуклеотида и соответствующих изомеров (2'-арацитидин-5'-трифосфат, 2'-арауридин-5'-трифосфат) или азидотрифосфатов (2'-азидо-2'-дезоксидезоксицитидин-5'-трифосфат, 2'-азидо-2'-дезоксидезоксиуридин-5'-трифосфат).

25 [113] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (*например*, мРНК, кодирующие ФАГ), могут содержать модификации оснований нуклеотидов (модификации оснований). Модифицированный нуклеотид, который содержит модификацию основания, также называют нуклеотидом с модифицированным основанием. Примеры таких нуклеотидов с модифицированным основанием включают, без ограничения, 2-амино-6-хлорпуридин-рибозид- 30 5'-трифосфат, 2-аминоаденозин-5'-трифосфат, 2-тиоцитидин-5'-трифосфат, 2-тиоуридин-5'-трифосфат, 4-тиоуридин-5'-трифосфат, 5-аминоаллилцитидин-5'-трифосфат, 5-аминоаллилуридин-5'-трифосфат, 5-бромцитидин-5'-трифосфат, 5-бромурин-5'-трифосфат,

5-йодцитидин-5'-трифосфат, 5-йодуридин-5'-трифосфат, 5-метилцитидин-5'-трифосфат, 5-метилуридин-5'-трифосфат, 6-азацитидин-5'-трифосфат, 6-азауридин-5'-трифосфат, 6-хлорпуридинрибозид-5'-трифосфат, 7-дезааденозин-5'-трифосфат, 7-дезагуанозин-5'-трифосфат, 8-азааденозин-5'-трифосфат, 8-азидоаденозин-5'-трифосфат, бензимидазолрибозид-5'-трифосфат, N1-метиладенозин-5'-трифосфат, N1-метилгуанозин-5'-трифосфат, N6-метиладенозин-5'-трифосфат, O6-метилгуанозин-5'-трифосфат, псевдоуридин-5'-трифосфат, пурамицин-5'-трифосфат или ксантозин-5'-трифосфат.

[114] Как правило, синтез мРНК включает добавление «кэпа» на N-терминальный (5')-конец и «хвоста» на С-терминальный (3')-конец. Наличие кэпа играет важную роль в обеспечении устойчивости к действию нуклеаз, присущих большинству эукариотических клеток. Наличие «хвоста» служит для защиты от экзонуклеазного расщепления мРНК.

[115] Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (*например*, мРНК, кодирующие ФАГ), включают структуру 5'-кэпа. Добавление 5'-кэпа происходит, как правило, следующим образом: во-первых, концевая фосфатаза РНК удаляет одну из концевых фосфатных групп от 5'-нуклеотида, оставляя два концевых фосфата; затем к концевым фосфатам с помощью гуанилилтрансферазы добавляют гуанозинтрифосфат (ГТФ) с образованием 5'5'5-трифосфатной связи; и затем метилируют 7-азот гуанина с помощью метилтрансферазы. Примеры структур кэпа включают, без ограничения, m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A и G(5')ppp(5')G.

[116] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК (*например*, мРНК, кодирующие ФАГ), включают 3'-поли-(А)-хвостовую структуру. Поли-(А)-хвост на 3'-конце мРНК, как правило, содержит примерно от 10 до 300 нуклеотидов аденозина (SEQ ID NO:9) (*например*, примерно от 10 до 200 нуклеотидов аденозина, примерно от 10 до 150 нуклеотидов аденозина, примерно от 10 до 100 нуклеотидов аденозина, примерно от 20 до 70 нуклеотидов аденозина или примерно от 20 до 60 нуклеотидов аденозина). В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК включают 3'-поли-(С)-хвостовую структуру. Подходящий поли-С-хвост на 3'-конце мРНК, как правило, содержит примерно от 10 до 200 нуклеотидов цитозина (SEQ ID NO:10) (*например*, примерно от 10 до 150 нуклеотидов цитозина, примерно от 10 до 100 нуклеотидов цитозина, примерно от 20 до 70 нуклеотидов цитозина, примерно от 20 до 60 нуклеотидов цитозина или примерно от 10 до 40 нуклеотидов цитозина). Поли-С-хвост может быть добавлен к поли-А-хвосту или может заменять поли-А-хвост.

[117] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК включают 5'- и/или 3'-нетранслируемую область. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-нетранслируемая область включает один или более элементов, которые влияют на стабильность или трансляцию мРНК, например, железосвязывающий элемент. В некоторых вариантах реализации длина 5'-нетранслируемой области может составлять примерно 50-500 нуклеотидов.

[118] В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-нетранслируемая область включает один или более сигналов полиаденилирования, центр связывания с белками, влияющими на стабильность размещения мРНК в клетке, или один или более центров связывания с микроРНК. В некоторых вариантах реализации длина 3'-нетранслируемой области составляет примерно 50-500 нуклеотидов.

Структура кэпа

[119] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК включают структуру 5'-кэпа. Добавление 5'-кэпа происходит, как правило, следующим образом: во-первых, концевая фосфатаза РНК удаляет одну из концевых фосфатных групп от 5'-нуклеотида, оставляя два концевых фосфата; затем к концевым фосфатам с помощью гуанилилтрансферазы добавляют гуанозинтрифосфат (ГТФ) с образованием 5'5'-трифосфатной связи; и затем метилируют 7-азот гуанина с помощью метилтрансферазы. Примеры структур кэпа включают, без ограничения, $m^7G(5')ppp(5')A$ и $G(5')ppp(5')G$.

[120] Природные структуры кэпа включают 7-метил гуанозин, который связан через трифосфатный мостик с 5'-концом первого транскрибированного нуклеотида, с образованием динуклеотидного кэпа $m^7G(5')ppp(5')N$, где N представляет собой любой нуклеозид. *In vivo*, кэп вводят под воздействием ферментов. Кэп вводят в ядро и катализируют при помощи фермента гуанилилтрансферазы. Добавление кэпа к 5'-концевой области РНК происходит сразу же после инициации транскрипции. Конечный нуклеозид, как правило, является гуанозином, и находится в обратной ориентации ко всем прочим нуклеотидам, т.е. $G(5')ppp(5')GpNpNp$.

[121] Обычный кэп для мРНК, образованный посредством *in vitro* транскрипции, представляет собой $m^7G(5')ppp(5')G$, который использовали в качестве динуклеотидного кэпа в транскрипции с использованием T7 или SP6 РНК-полимеразы *in vitro* для получения РНК, содержащих структуры кэпа на 5'-концах. Преимущественный способ *in vitro* синтеза

кэпированной мРНК включает применение предварительно сформированного динуклеотида вида $m^7G(5')ppp(5')G$ (« m^7GpppG ») в качестве инициатора транскрипции.

[122] На настоящий момент обычной формой синтетического динуклеотидного кэпа, применяемого в *in vitro* экспериментах по трансляции, является против-обратный аналог кэпа (Anti-Reverse Cap Analog, или «ARCA») или модифицированный ARCA который, как правило, представляет собой модифицированный аналог кэпа, в котором 2'- или 3'-ОН группа замещена на $-OCH_3$.

[123] Дополнительные аналоги кэпа включают, без ограничения, химические структуры, выбранные из группы, состоящей из m^7GpppG , m^7GpppA , m^7GpppC ; неметилированных аналогов кэпа (например, $GpppG$); диметилированных аналогов кэпа (например, $m^{2,7}GpppG$), триметилированных аналогов кэпа (например, $m^{2,2,7}GpppG$), диметилированных симметричных аналогов кэпа (например, m^7Gpppm^7G) или анти-обратных аналогов кэпа (например, ARCA; $m^7,2'OmeGpppG$, $m^{7,2'd}GpppG$, $m^{7,3'OmeGpppG}$, $m^{7,3'd}GpppG$ и соответствующих тетрафосфатных производных) (см., например, Jemielity, J. et al., “*Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties*”, RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

[124] В некоторых вариантах реализации подходящий кэп представляет собой 7-метилгуанилат (“ m^7G ”), который связан через трифосфатный мостик с 5'-концом первого транскрибированного нуклеотида, с образованием $m^7G(5')ppp(5')N$, где N представляет собой любой нуклеозид. Предпочтительным вариантом реализации m^7G кэпа, применяемого в вариантах реализации настоящего изобретения, является $m^7G(5')ppp(5')G$.

[125] В некоторых вариантах реализации кэп представляет собой структуру Кэп-0. В Кэп-0 структурах отсутствует 2'-О-метильный остаток рибозы, соединенный с основаниями 1 и 2. В некоторых вариантах реализации кэп представляет собой Кэп-1 структуру. Кэп-1 структуры содержат 2'-О-метильный остаток на основании 2. В некоторых вариантах реализации кэп представляет собой Кэп-2 структуру. Кэп-2 структуры содержат 2'-О-метильный остаток, прикрепленный к обоим основаниям 2 и 3.

[126] В данной области техники известно множество m^7G кэп-аналогов, многие из которых являются коммерчески доступными. Указанные аналоги включают m^7GpppG , описанный выше, а также кэп-аналоги ARCA 3'- OCH_3 и 2'- OCH_3 (Jemielity, J. et al, RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Дополнительные кэп-аналоги для применения в вариантах реализации настоящего изобретения включают N7-бензилированные динуклеозид-тетрафосфатные

аналоги (описаны в Grudzien, E. et al, RNA, 10: 1479-1487 (2004)), фосфоротиоатные кэп-аналоги (описаны в Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007)), и кэп-аналоги (включая биотинилированные кэп-аналоги), описанные в патентах США №№ 8093367 и 8304529, включенных в настоящий документ посредством ссылки.

5

Структура хвоста

[127] Наличие «хвоста» обычно служит для защиты от экзонуклеазного расщепления мРНК. Полагают, что поли-А-хвост стабилизирует природные матричные РНК и синтетические смысловые РНК. Следовательно, в некоторых вариантах реализации в молекулу мРНК можно вводить длинный поли-А-хвост, что делает РНК более стабильной. Поли-А-хвосты можно вводить с применением различных методик, известных в данной области техники. Например, длинные поли-А-хвосты можно вводить в синтетическую или транскрибированную *in vitro* РНК при помощи поли-А-полимеразы (Yokoe, *et al.* Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Вектор транскрипции также может кодировать длинные поли-А-хвосты. Кроме того, поли-А-хвосты можно вводить путем транскрипции непосредственно из продуктов ПЦР. Поли-А также может быть связан с 3'-концом смысловой РНК при помощи РНК-лигазы (см., например, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2-е изд., под ред. Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: издание 1991 года)).

20 [128] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК включают 3'-поли-(А)-хвостовую структуру. В некоторых вариантах реализации длина поли-(А)-хвоста может составлять по меньшей мере примерно 10, 50, 100, 200, 300, 400, по меньшей мере 500 нуклеотидов (SEQ ID NO:11). В некоторых вариантах реализации поли-(А)-хвост на 3'-конце мРНК, как правило, содержит примерно от 10 до 300 нуклеотидов аденозина (SEQ ID NO:9) (например, примерно от 10 до 200 нуклеотидов аденозина, примерно от 10 до 150 нуклеотидов аденозина, примерно от 10 до 100 нуклеотидов аденозина, примерно от 20 до 70 нуклеотидов аденозина или примерно от 20 до 60 нуклеотидов аденозина). В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК включают 3'-поли-(С)-хвостовую структуру. Подходящий поли-С-хвост на 3'-конце мРНК, как правило, содержит примерно от 10 до 200 нуклеотидов цитозина (SEQ ID NO:10) (например, примерно от 10 до 150 нуклеотидов цитозина, примерно от 10 до 100 нуклеотидов цитозина, примерно от 20 до 70 нуклеотидов цитозина, примерно от

20 до 60 нуклеотидов цитозина или примерно от 10 до 40 нуклеотидов цитозина). Поли-С-хвост может быть добавлен к поли-А-хвосту или может заменять поли-А-хвост.

[129] В некоторых вариантах реализации изобретения длину поли-А или поли-С-хвоста регулируют для управления стабильностью молекулы модифицированной смысловой РНК и, следовательно, транскрипцией белка. Например, поскольку длина поли-А-хвоста может влиять на период полувыведения молекулы смысловой мРНК, длину поли-А-хвоста можно регулировать для модификации степени стойкости мРНК к нуклеазам и, следовательно, управления зависимостью от времени экспрессии полинуклеотида и/или производства полипептида в клетке-мишени.

10

5'- и 3'-нетранслируемая область.

[130] В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК включают 5'- и/или 3'-нетранслируемую область. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-нетранслируемая область включает один или более элементов, которые влияют на стабильность или трансляцию мРНК, например, железосвязывающий элемент. В некоторых вариантах реализации длина 5'-нетранслируемой области может составлять примерно 50-500 нуклеотидов.

[131] В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-нетранслируемая область включает один или более сигналов полиаденилирования, центр связывания с белками, влияющими на стабильность размещения мРНК в клетке, или один или более центров связывания с микроРНК. В некоторых вариантах реализации длина 3'-нетранслируемой области составляет примерно 50-500 нуклеотидов.

[132] Типичные 3'- и/или 5'-нетранслируемые последовательности могут быть получены из молекул мРНК, которые являются стабильными (например, глобин, актин, GAPDH, тубулин, гистон или ферменты цикла лимонной кислоты), для увеличения стабильности молекулы смысловой мРНК. Например, 5'-нетранслируемая последовательность может включать частичную последовательность предраннего гена 1 CMV (IE1), или фрагмент указанной последовательности, для улучшения стойкости к нуклеазе и/или улучшения срока полувыведения полинуклеотида. Также предлагают включение последовательности, кодирующей гормон роста человека (hGH) или ее фрагмента, на 3'-конец или нетранслируемую область полинуклеотида (например, мРНК) для дополнительной

30

стабилизации полинуклеотида. В целом, указанные модификации улучшают стабильность и/или фармакокинетические свойства (например, время полувыведения) полинуклеотида по сравнению с немодифицированными аналогами, и включают, например, модификации, осуществленные для улучшения стойкости таких полинуклеотидов к расщеплению нуклеазой *in vivo*.

Создание липосом

[133] Липосомальные средства доставки для применения согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью различных методик, которые в настоящее время известны в данной области техники. Липосомы для применения в композициях согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью различных методик, которые в настоящее время известны в данной области техники. Например, многослойные везикулы (МСВ (MLV)) могут быть получены с помощью обычных методик, например, путем нанесения выбранного липида на внутреннюю стенку подходящего контейнера или сосуда путем растворения липида в подходящем растворителе, с последующим выпариванием растворителя до образования тонкой пленки внутри сосуда, или путем распылительной сушки. Затем в сосуд при интенсивном перемешивании может быть добавлена водная фаза, что приводит к образованию МСВ. Однослойные везикулы (ОСВ (ULV)) могут быть получены путем гомогенизации, обработки ультразвуком или экструзии многослойных везикул. Кроме того, однослойные везикулы могут быть получены с помощью методик удаления детергента.

[134] В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат липосому, в которой мРНК одновременно связана на поверхности липосомы и инкапсулирована в ту же липосому. Например, при получении композиций согласно настоящему изобретению, катионные липосомы могут вступать в ассоциацию с мРНК посредством электростатических взаимодействий.

[135] В некоторых вариантах реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению включают мРНК, инкапсулированную в липосому. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более видов мРНК могут быть инкапсулированы в одну липосому. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более видов мРНК могут быть инкапсулированы в различные липосомы. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК инкапсулирована в одну или более липосом, которые отличаются по

липидному составу, мольному отношению липидных компонентов, размеру, заряду (дзета-потенциал), нацеливающим лигандам и/или комбинации указанных свойств. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более липосом могут включать различную композицию катионных липидов, нейтрального липида, ПЭГ-модифицированного липида и/или комбинации указанных липидов. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более липосом могут иметь различное мольное отношение катионного липида, нейтрального липида, холестерина и ПЭГ-модифицированного липида, использованных для создания липосомы.

[136] Процесс включения желаемой мРНК в липосому часто называют «нагрузкой». Типовые способы описаны в Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Нуклеиновые кислоты, включенные в липосомы, могут быть полностью или частично расположены во внутреннем пространстве липосомы, в двухслойной мембране липосомы или связаны с внешней поверхностью липосомной мембраны. Включение нуклеиновой кислоты в липосомы также называется в данном документе «инкапсуляцией», когда нуклеиновая кислота полностью содержится во внутреннем пространстве липосомы. Зачастую, целью включения мРНК в средство доставки, такое как липосома, является защита нуклеиновой кислоты от влияния окружающей среды, которая может содержать ферменты или химические вещества, разрушающие нуклеиновые кислоты и/или системы или рецепторы, которые вызывают быстрое выделение нуклеиновых кислот. Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения подходящее средство доставки способно усиливать стабильность мРНК, содержащейся в нем, и/или содействовать доставке мРНК в клетку-мишень или ткань-мишень.

Размер липосомы

[137] Подходящие липосомальные средства доставки согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в различных размерах. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые липосомы могут быть меньше, чем ранее известные липосомы для инкапсулирования мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшенный размер липосом ассоциируется с более эффективной доставкой мРНК. При выборе соответствующего размера липосомы можно учитывать место клетки-мишени или ткани-мишени и, в некоторой степени, применение, для которого создана липосома.

5 [138] В некоторых вариантах реализации изобретения соответствующий размер липосом выбирают так, чтобы содействовать системному распределению белка ФКУ, кодируемого мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть желательным ограничить трансфекцию мРНК в определенные клетки или ткани. Например, для воздействия на гепатоциты, размеры липосомы можно задать таким образом, чтобы они были меньше, чем фенестрации эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды в печени; в этом случае липосома может легко проникать через такие эндотелиальные фенестрации и достигать гепатоцитов-мишеней.

10 [139] В альтернативном или дополнительном варианте, размеры липосомы можно задать таким образом, чтобы размеры липосомы имели достаточный диаметр с целью ограничения или полного предотвращения распределения в определенных клетках или тканях. Например, размеры липосомы можно задать таким образом, чтобы ее размеры были больше, чем фенестрации эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды, чтобы тем самым ограничить распределение липосом в гепатоциты.

15 [140] В некоторых вариантах реализации изобретения размер липосомы определяют как длину наибольшего диаметра липосомной частицы. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер не больше чем примерно 250 нм (*например*, не больше чем примерно 225 нм, 200 нм, 175 нм, 150 нм, 125 нм, 100 нм, 75 нм или 50 нм). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер в диапазоне примерно 10 – 250 нм (*например*, в диапазоне примерно 10 – 225 нм, 10 – 200 нм, 10 – 175 нм, 20 10 – 150 нм, 10 – 125 нм, 10 – 100 нм, 10 – 75 нм или 10 – 50 нм). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер в диапазоне примерно 100 – 250 нм (*например*, в диапазоне примерно 100 – 225 нм, 100 – 200 нм, 100 – 175 нм, 100 – 150 нм). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липосома имеет размер 25 в диапазоне примерно 10 – 100 нм (*например*, в диапазоне примерно 10 – 90 нм, 10 – 80 нм, 10 – 70 нм, 10 – 60 нм или 10 – 5 нм).

30 [141] Существует целый ряд альтернативных способов оптимизации размеров совокупности липосом, известных в данной области техники. Один из таких способов оптимизации размеров описан в патенте США № 4737323, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Ультразвуковая обработка липосомной суспензии в ванне или с помощью зонда для ультразвуковой обработки обеспечивает возрастающее измельчение с образованием небольших однослойных везикул (ОСВ), менее чем примерно 0,05 мкм в

диаметре. Еще одним способом фрагментации больших липосом на более мелкие является гомогенизация, которая основана на энергии сдвига. В типичной методике гомогенизации МСВ рециркулируют через стандартный эмульсионный гомогенизатор до тех пор, пока размеры липосом не будут находиться в выбранном диапазоне, как правило, между примерно 0,1 и 0,5 мкм. Размер липосом можно измерять при помощи квазиупругого светорассеяния (QELS), как описано в Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-150 (1981), включенном в настоящий документ посредством ссылки. Средний диаметр липосом может быть уменьшен путем ультразвуковой обработки созданных липосом. Периодические циклы ультразвуковой обработки могут чередоваться с оценкой QELS для управления эффективным синтезом липосом.

Фармацевтические композиции

[142] Для облегчения экспрессии мРНК *in vivo*, средства доставки, такие как липосомы, могут быть составлены в комбинации с одной или более дополнительными нуклеиновыми кислотами, носителями, нацеливающими лигандами или стабилизирующими реагентами, или в фармакологических композициях, в которых их смешивают с подходящими наполнителями. Методики изготовления и введения лекарственного средства можно найти в «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Publishing Co., Easton, Pa., последнее издание.

[143] Предлагаемые мРНК, инкапсулированные в липосому или связанные с липосомой, и композиции, содержащие их, можно вводить и дозировать согласно обычной медицинской практике с учетом клинического состояния субъекта, места и пути введения, схемы введения, возраста, пола, массы тела субъекта и других факторов, имеющих значение для клиницистов, являющихся средними специалистами в своей области. «Эффективное количество» для целей настоящего изобретения можно определить с учетом важных аспектов, которые известны средним специалистам в области экспериментальных клинических исследований, фармакологической, клинической и медицинской областях. В некоторых вариантах реализации изобретения вводимое количество является эффективным для достижения по меньшей мере некоторой стабилизации, улучшения или устранения симптомов и других показателей, которые выбраны специалистами в данной области техники в качестве соответствующих критериев прогрессирования, обратного развития или положительной динамики заболевания. Например, подходящим количеством и подходящей схемой

применения являются те, которые вызывают по меньшей мере временную продукцию белка (например, фермента).

5 [144] Подходящие пути введения включают, например, пероральный, ректальный, вагинальный, чресслизистый, легочный, включая интратрахеальный или ингаляторный способы, или введение в кишечник; парентеральное введение, включая внутрикожное, трансдермальное (топическое), внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные инъекции, а также интратекальное, прямое внутрижелудочковое, внутривенное, внутрибрюшинное или интраназальное введение.

10 [145] В качестве альтернативы или дополнительно, инкапсулированные в липосомы мРНК и композиции согласно настоящему изобретению можно вводить местно, а не системно, например, с помощью инъекции фармацевтической композиции непосредственно в ткань-мишень, предпочтительно в виде состава с замедленным высвобождением. Локальную доставку можно осуществлять различными способами, в зависимости от ткани-мишени. Например, аэрозоли, содержащие композиции согласно настоящему изобретению, могут быть
15 ингаляционными (для назального, трахеального или бронхиального введения); композиции согласно настоящему изобретению можно вводить, например, путем инъекции в место поражения, проявления заболевания или боли; композиции могут быть представлены в виде пастилок для воздействия в полости рта, трахее или пищеводе; могут поставляться в форме жидкости, таблетки или капсулы для введения в желудок или кишечник, могут поставляться
20 форме суппозитория для ректального или вагинального применения; или их можно даже вводить в глаз с помощью кремов, капель или даже инъекции. Составы, содержащие композиции согласно настоящему изобретению в виде комплекса с терапевтическими молекулами или лигандами, можно вводить даже хирургическим путем, например, в сочетании с полимером или другой структурой или веществом, которые могут обеспечивать возможность
25 диффузии композиции от места имплантации в окружающие клетки. В альтернативном варианте их можно применять хирургическим путем без использования полимеров или носителей.

[146] Способы согласно настоящему изобретению включают как однократное, так и многократное введение терапевтически эффективного количества терапевтических агентов
30 (например, мРНК, кодирующей белок ФАГ) согласно настоящему описанию. Терапевтические агенты можно вводить через регулярные интервалы, в зависимости от природы, тяжести и степени состояния субъекта (например, ФКУ). В некоторых вариантах реализации

терапевтически эффективное количество терапевтических агентов (*например*, мРНК, кодирующей белок ФАГ) согласно настоящему изобретению можно вводить интратекально, периодически через регулярные интервалы (*например*, один раз в год, один раз в шесть месяцев, один раз в пять месяцев, один раз в три месяца, двухмесячно (*например*, один раз в два месяца), ежемесячно (*например*, один раз в месяц), двухнедельно (*например*, один раз в две недели, через неделю), еженедельно, ежедневно или непрерывно)

[147] В некоторых вариантах реализации изобретения липосомы и/или композиции согласно настоящему изобретению составляют таким образом, чтобы они были пригодны для пролонгированного высвобождения содержащейся в них мРНК. Такие композиции с пролонгированным высвобождением могут быть удобными для введения субъекту при длительных интервалах применения. *Например*, в одном варианте реализации изобретения, композиции согласно настоящему изобретению вводят субъекту два раза в день, ежедневно или через день. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиции согласно настоящему изобретению вводят субъекту два раза в неделю, один раз в неделю, каждые 7 дней, каждые 10 дней, каждые 14 дней, каждые 28 дней, каждые 30 дней, каждые две недели (*например*, через неделю), один раз в три недели или, более предпочтительно, каждые четыре недели, один раз в месяц, каждые шесть недель, каждые восемь недель, каждый следующий месяц, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые шесть месяцев, каждые восемь месяцев, каждые девять месяцев или один раз в год. Также рассматривают композиции и липосомы, которые составлены для депонированного введения (*например*, внутримышечно, подкожно) с целью доставки или высвобождения мРНК в течение длительных периодов времени. Предпочтительно комбинировать используемые способы пролонгированного высвобождения с модификациями, внесенными в мРНК для повышения стабильности.

[148] В настоящем описании термин «терапевтически эффективное количество» определяют широко, на основании общего количества терапевтического агента, содержащегося в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. В целом, терапевтически эффективное количество является достаточным для обеспечения значимой пользы для субъекта (*например*, лечения, модулирования, выздоровления, предотвращения и/или облегчения ФКУ). *Например*, «терапевтически эффективное количество» может представлять собой количество, которого достаточно для достижения заданного терапевтического и/или профилактического действия. В целом, количество терапевтического агента (*например*, мРНК, кодирующей белок ФАГ), вводимое субъекту, нуждающемуся в этом,

будет зависеть от характеристик субъекта. Указанные характеристики включают состояние, тяжесть заболевания, состояние здоровья, возраст, пол и массу тела субъекта. Специалистам в данной области техники будет несложно определить соответствующие дозировки в зависимости от указанных и других связанных факторов. Кроме того, факультативно можно
5 применять как объективные, так и субъективные тесты для определения оптимальных диапазонов дозировки.

[149] Терапевтически эффективное количество обычно вводят согласно схеме применения, которая может включать множество стандартных доз. Для любого конкретного терапевтического белка терапевтически эффективное количество (и/или соответствующая
10 стандартная доза в эффективной схеме применения) может варьироваться, например, в зависимости от пути введения, от комбинации с другими фармацевтическими агентами. Также конкретное терапевтически эффективное количество (и/или стандартная доза) для любого конкретного пациента может зависеть от различных факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть указанного расстройства; активность конкретного
15 применяемого фармацевтического агента; конкретную применяемую композицию; возраст, массу тела, состояние здоровья, пол и рацион питания пациента; время введения, путь введения и/или скорость экскреции или метаболизма конкретного применяемого белка; продолжительность лечения; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

[150] Согласно настоящему изобретению, терапевтически эффективная доза предлагаемой композиции, при регулярном введении, приводит к повышенной экспрессии
20 белка ФАГ печени, по сравнению с исходными уровнями до лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения введение предложенной композиции обеспечивает уровень экспрессии белка ФАГ, равный или больший примерно 100 нг/мг, примерно 200 нг/мг, примерно 300 нг/мг, примерно 400 нг/мг, примерно 500 нг/мг, примерно 600 нг/мг, примерно
25 700 нг/мг, примерно 800 нг/мг, примерно 900 нг/мг, примерно 1000 нг/мг, примерно 1200 нг/мг или примерно 1400 нг/мг от общего белка в печени.

[151] В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции являются повышенные уровни белка ФАГ в сыворотке. В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной
30 композиции является повышение уровня белка ФАГ в сыворотке по меньшей мере на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или 95 % по сравнению с исходным уровнем

белка ФАГ перед лечением. Обычно исходный уровень белка ФАГ в сыворотке измеряют непосредственно перед лечением.

[152] В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции являются пониженные уровни фенилаланина в биологической 5 пробе. «Проба» или «биологическая проба» включает, например, цельную кровь, плазму, сыворотку, мочу или цереброспинальную жидкость. В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции является снижение уровней фенилаланина в биологической пробе (например, пробе сыворотки, плазмы или мочи) по 10 меньшей мере на примерно 5 %, по меньшей мере на примерно 10 %, по меньшей мере на примерно 15 %, по меньшей мере на примерно 20 %, по меньшей мере на примерно 25 %, по меньшей мере на примерно 30 %, по меньшей мере на примерно 35 %, по меньшей мере на примерно 40 %, по меньшей мере на примерно 45 %, по меньшей мере на примерно 50 %, по 15 меньшей мере на примерно 55 %, по меньшей мере на примерно 60 %, по меньшей мере на примерно 65 %, по меньшей мере на примерно 70 %, по меньшей мере на примерно 75 %, по меньшей мере на примерно 80 %, по меньшей мере на примерно 85 %, по меньшей мере на примерно 90 % или по меньшей мере на примерно 95 % по сравнению с исходными уровнями перед лечением. Обычно исходный уровень фенилаланина измеряют непосредственно перед лечением.

[153] В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения 20 терапевтически эффективной дозы предложенной композиции, при регулярном введении, является сниженный уровень фенилаланина в сыворотке или плазме по сравнению с исходным уровнем фенилаланина непосредственно перед лечением. В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения терапевтически эффективной дозы предложенной композиции, при регулярном введении, является сниженный уровень фенилаланина в 25 сыворотке или плазме по сравнению с исходным уровнем фенилаланина у субъектов, не получавших лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения введение терапевтически эффективной дозы предложенной композиции, при регулярном введении, обеспечивает снижение уровня фенилаланина до примерно 1500 мкмоль/л или менее, примерно 1000 мкмоль/л или менее, примерно 900 мкмоль/л или менее, примерно 30 800 мкмоль/л или менее, примерно 700 мкмоль/л или менее, примерно 600 мкмоль/л или менее, примерно 500 мкмоль/л или менее, примерно 400 мкмоль/л или менее, примерно 300 мкмоль/л или менее, примерно 200 мкмоль/л или менее, примерно 100 мкмоль/л или менее

или примерно 50 мкмоль/л или менее в сыворотке или плазме. В конкретном варианте реализации регулярное введение терапевтически эффективной дозы обеспечивает снижение уровней фенилаланина до примерно 120 мкмоль/л или менее в сыворотке или плазме.

5 [154] В некоторых вариантах реализации изобретения результатом введения предложенной композиции являются пониженные уровни фенилаланина и/или метаболитов фенилаланина (*например*, фенилкетон, фенилпируват) в моче.

10 [155] В некоторых вариантах реализации для определения терапевтически эффективной дозы можно применять один или более нейропсихиатрических тестов. В некоторых вариантах реализации улучшение результатов одного или более нейропсихиатрических тестов на по меньшей мере 10 %, 20 %, 30 %, 40 % или 50 % по сравнению или с тем же индивидуумом до лечения, или с интактным контрольным индивидуумом, указывает на то, что конкретная доза представляет собой терапевтически эффективное количество. В некоторых вариантах реализации подходящий нейропсихиатрический тест может представлять собой часть, относящуюся к дефициту
15 внимания, тестов Attention Deficit and Hyperactivity Disorder Rating Scale (ADHD-RS) и/или the Profile of Mood States (POMS).

[156] В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективная дозировка варьируется примерно от 0,005 до 500 мг/кг массы тела, например, примерно от 0,005 до 400 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 300 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 200 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 100 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 90 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 80 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 70 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 60 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 50 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 40 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 30 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 25 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 20 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 15 мг/кг массы тела, примерно от 0,005 до 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК вводят в дозировке в диапазоне примерно 0,1 – 5,0 мг/кг массы тела, например, примерно 0,1 – 4,5, 0,1 – 4,0, 0,1 – 3,5, 0,1 – 3,0, 0,1 – 2,5, 0,1 – 2,0, 0,1 – 1,5, 0,1 – 1,0, 0,1 – 0,5, 0,1 – 0,3, 0,3 – 5,0, 0,3 – 4,5, 0,3 – 4,0, 0,3 – 3,5, 0,3 – 3,0, 0,3 – 2,5, 0,3 – 2,0, 0,3 – 1,5, 0,3 – 1,0, 0,3 – 0,5, 0,5 – 5,0, 0,5 – 4,5, 0,5 – 4,0, 0,5 – 3,5, 0,5 – 3,0, 0,5 – 2,5, 0,5 – 2,0, 0,5 – 1,5
30 или 0,5 – 1,0 мг/кг массы тела.

[157] В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективная дозировка составляет или превышает примерно 0,1 мг/кг массы тела, примерно 0,5 мг/кг массы тела, примерно 1,0 мг/кг массы тела, примерно 3 мг/кг массы тела, примерно 5 мг/кг массы тела, примерно 10 мг/кг массы тела, примерно 15 мг/кг массы тела, примерно 20 мг/кг массы тела, примерно 30 мг/кг массы тела, примерно 40 мг/кг массы тела, примерно 50 мг/кг массы тела, примерно 60 мг/кг массы тела, примерно 70 мг/кг массы тела, примерно 80 мг/кг массы тела, примерно 90 мг/кг массы тела, примерно 100 мг/кг массы тела, примерно 150 мг/кг массы тела, примерно 200 мг/кг массы тела, примерно 250 мг/кг массы тела, примерно 300 мг/кг массы тела, примерно 350 мг/кг массы тела, примерно 400 мг/кг массы тела, примерно 450 мг/кг массы тела, или примерно 500 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективную дозировку вводят в дозировке, равной или меньшей примерно 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 мг/кг массы тела.

[158] Также настоящее изобретение включает лиофилизированные фармацевтические композиции, содержащие одну или больше липосом, описанных в настоящей заявке, и способы, связанные с применением указанных композиций, как описано, например, в предварительной заявке на патент США № 61/494882, поданной 8 июня 2011 года, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Например, лиофилизированные фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть восстановлены перед введением или могут быть восстановлены *in vivo*. Например, лиофилизированная фармацевтическая композиция может быть составлена в соответствующей дозированной лекарственной форме (например, в дозированной лекарственной форме для внутривенного применения, такой, как диск, стержень или мембрана) и введена таким образом, что происходит регидратация дозированной лекарственной формы биологическими жидкостями индивидуума в течение продолжительного периода *in vivo*.

[159] Предложенные липосомы и композиции можно вводить в любую желаемую ткань. В некоторых вариантах реализации мРНК, доставку которой осуществляют при помощи липосом или композиций согласно настоящему изобретению, экспрессируется в той ткани, в которую вводят липосомы и/или композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения доставленная мРНК экспрессируется в ткани, отличной от той ткани, в которую вводили липосомы и/или композиции. Примеры тканей, в которые может быть доставлена и/или

экспрессирована доставленная мРНК, включают, без ограничения, печень, почку, сердце, селезенку, сыворотку, головной мозг, скелетную мышцу, лимфатические узлы, кожу и/или цереброспинальную жидкость.

5 [160] Согласно различным вариантам реализации изобретения, время экспрессии доставленной мРНК можно регулировать для удовлетворения конкретной медицинской потребности. В некоторых вариантах реализации экспрессия белка ФАГ, кодируемого доставленной мРНК, обнаруживается через 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 и/или 72 часа в сыворотке или ткани-мишени после однократного введения липосом или композиций согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка ФАГ, кодируемого мРНК, обнаруживается по истечении 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней и/или 7 дней в сыворотке или ткани-мишени после однократного введения липосом или композиций согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка ФАГ, кодируемого мРНК, обнаруживается по истечении 1 недели, 2 недель, 3 недель и/или 4 недель в сыворотке или ткани-мишени после однократного введения липосом или композиций согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия белка, кодируемого мРНК, обнаруживается через месяц или более после однократного введения липосом или композиций согласно настоящему изобретению.

20

ПРИМЕРЫ

[161] Тогда как некоторые соединения, композиции и способы, описанные в настоящем документе, были подробно описаны в соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения, следующие примеры служат лишь для иллюстрации соединений, описанных в настоящем документе, и не должны рассматриваться как ограничения.

25

Пример 1. Примеры составов липосом для доставки и экспрессии мРНК чФАГ.

[162] В настоящем примере приведены примеры составов липосом для эффективной доставки и экспрессии мРНК чФАГ *in vivo*.

30

Липидные материалы

[163] Составы, описанные в следующих примерах, если не указано иное, содержали многокомпонентную смесь липидов в различных соотношениях, с использованием одного или более катионных липидов, вспомогательных липидов (например, некаатионных липидов и/или липидов на основе холестерина) и ПЭГилированных липидов, разработанную для инкапсуляции мРНК фенилаланингидроксилазы (ФАГ). Если не указано иное, многокомпонентная смесь липидов, применяемая в следующих примерах, представляла собой растворы в этаноле сКК-E12 (катионный липид), DOPE (некаатионный липид), холестерина и DMG-PEG2K.

Материал матричной РНК

10 [164] Кодон-оптимизированная матричная РНК фенилаланингидроксилазы (ФАГ) человека была синтезирована при помощи транскрипции *in vitro* из матрицы плазмидной ДНК, кодирующей соответствующий ген, с последующим введением 5'-кэп структуры (Кэп-1) (Fechter, P.; Brownlee, G.G. «Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins» *J. Gen. Virology* **2005**, *86*, 1239-1249) и 3'-поли-(А)-хвоста длиной примерно 250 нуклеотидов (SEQ ID NO:12) как определено с помощью гель-электрофореза. 5'- и 3'-нетранслируемые области, присутствующие в каждом продукте мРНК, представлены в виде X и Y, соответственно, и определены как указано (*vide infra*).

Кодон-оптимизированная мРНК фенилаланингидроксилазы человека (ФАГ):

X – SEQ ID NO:3 - Y

20 *5'- и 3'-нетранслируемые последовательности*

X (5'-нетранслируемая последовательность) =

GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGG
GACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUCCCCGUGCC
AAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG [SEQ ID NO.:4]

25 Y (3'-нетранслируемая последовательность) =

GGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACU
CCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU [SEQ ID
NO.:5]

ИЛИ

30 CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCAC
UCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID
NO.:6)

[165] Например, кодон-оптимизированная матричная РНК ФАГ человека содержит:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUC CAUAGAAGACACCGG
GACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCGUGGCC
AAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAAC CCGGCC
5 UGGGCCGCAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGGACAACUGCA
ACCAGAACGGCGCCAUCAGCCUGAUCUUCAGCCUGAAGGAGGAGGUGGGCGCC CUGG
CCAAGGUGCUGCGCCUGUUCGAGGAGAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAGCC
GCCCCAGCCGCCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCUUCACCCACCUUGGACAAGCGCA
GCCUGCCC GCCUGACCAACAUCAUCAAGAUCUGCGCCACGACAUCGGCGCCACCG
10 UGCACGAGCUGAGCCGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGCCCUUGGUUCCCCGCACCA
UCCAGGAGCUGGACCGCUUCGCCAACAGAUCCUGAGCUACGGCGCCGAGCUGGACG
CCGACCACCCCGGCUUCAAGGACCCCGUGUACCGCGCCCGCCGCAAGCAGUUCGCCG
ACAUCGCCUACAACUACCGCCACGGCCAGCCAUCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGG
AGGAGAAGAAGACCUUGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACCC
15 ACGCCUGCUACGAGUACAACCACAUCUUC CCGCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCCUUC
ACGAGGACAACAUC CCGCAGCUGGAGGACGUGAGCCAGUUC CUGCAGACCUGCACCG
GCUUC CCGCUGCGCCCGUGGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGCGACUUC CUGGGCGGCC
UGGCCUUC CCGUGUUCACUGCACCAGUACAUC CCGCCACGGCAGCAAGCCCAUGU
ACACCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCG
20 ACCGCAGCUUCGCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCCAGCCUGGGCGCCCCCG
ACGAGUACAUCGAGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGGCCUGU
GCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCG
AGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGCCCCUGGAGCUGGAGAAGA
CCGCCAUCCAGAACUACACCGUGACCGAGUUC CAGCCCGUACUACGUGGCCGAGA
25 GCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCGCAACUUCGCCGCCACCAUC CCGGCCCU
UCAGCGUGCGCUACGACCCCUACACCCAGCGCAUCGAGGUGCUGGACAACACCCAGC
AGCUGAAGAUC CUGGCCGACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCAGCGCCC
UGCAGAAGAUCAAGUAAGGGUGGCAUCC CUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUC CUGG
30 CCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCAC CAGCCUUGUCCUAAUAAA AUUAAGUUGCA
UCAAGCU (SEQ ID NO:7)

[166] В другом примере, кодон-оптимизированная матричная РНК ФАГ человека содержит:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUC CAUAGAAGACACCGG
GACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCGUGGCC
35 AAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAAC CCGGCC
UGGGCCGCAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGGACAACUGCA
ACCAGAACGGCGCCAUCAGCCUGAUCUUCAGCCUGAAGGAGGAGGUGGGCGCC CUGG
CCAAGGUGCUGCGCCUGUUCGAGGAGAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAGCC
GCCCCAGCCGCCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCUUCACCCACCUUGGACAAGCGCA
40 GCCUGCCC GCCUGACCAACAUCAUCAAGAUCUGCGCCACGACAUCGGCGCCACCG
UGCACGAGCUGAGCCGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGCCCUUGGUUCCCCGCACCA
UCCAGGAGCUGGACCGCUUCGCCAACAGAUCCUGAGCUACGGCGCCGAGCUGGACG
CCGACCACCCCGGCUUCAAGGACCCCGUGUACCGCGCCCGCCGCAAGCAGUUCGCCG
ACAUCGCCUACAACUACCGCCACGGCCAGCCAUCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGG
45 AGGAGAAGAAGACCUUGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACCC

ACGCCUGCUACGAGUACAACCACAUCUUCSCCCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCCUCC
ACGAGGACAACAUCSCCCAGCUGGAGGACGUGAGCCAGUCCUGCAGACCUGCACCCG
GCUUCCGCCUGCGSCCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGCGACUUCUGGGCGGCC
UGGCCUUCGCGUGUUCACUGCACCCAGUACAUCGCCACGGCAGCAAGCCCAUGU
5 ACACSCCCGAGSCCCGACAUCUGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGSCCCUGUUCAGCG
ACCGCAGCUUCGCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCCAGCCUGGGCGSCCCCG
ACGAGUACAUCGAGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGGCCUGU
GCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCG
AGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGSCCCUGGAGCUGGAGAAGA
10 CCGCCAUCCAGAACUACACCGUGACCGAGUUCAGSCCCUGUACUACGUGGCCGAGA
GCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCGCAACUUCGCCGCCACCAUCCSCCCGCCCCU
UCAGCGUGCGCUACGACSCCCUACACCCAGCGCAUCGAGGUGCUGGACAACACCCAGC
AGCUGAAGAUCCUGGCCGACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCAGCGCCC
UGCAGAAGAUCAAGUAACGGGUGGCAUCCUGUGACSCCCUCCSCCAGUGCCUCUCCUG
15 GSCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGSCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGC
AUCAAGCU (SEQ ID NO: 8)

[167] Синтетическую кодон-оптимизированную мРНК ФАГ человека
трансфицировали в клетки НЕК293Т и анализировали через 24 часа. После лизирования и
обработки клеток, ФАГ человека успешно детектировали при помощи вестерн-блоттинга (см.
20 Фигуру 1).

Протокол изготовления состава

[168] Аликвоты 50 мг/мл растворов в этаноле сКК-Е12, DOPE, холестерина и DMG-
PEG2K смешивали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили
водный буферный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) мРНК ФАГ из маточного
25 раствора 1 мг/мл. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор мРНК и перемешивали
встряхиванием для получения готовой суспензии в 20 % этаноле. Полученную суспензию
наночастиц фильтровали, диафильтровали с 1х ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при
2-8 °С. Конечная концентрация = 1,28мг/мл мРНК ФАГ (инкапсулированной). $Z_{ave} = 79$ нм; PDI
= 0,12.

30

Пример 2. Введение липосомных наночастиц, нагруженных мРНК чФАГ

[169] В настоящем примере показаны примеры способов введения липосомных
наночастиц, нагруженных мРНК чФАГ, и анализа доставленной мРНК и экспрессированного
впоследствии белка чФАГ в различных тканях-мишенях *in vivo*.

35 [170] Все исследования проводили на самцах мышей CD-1 или мышей с нокаутом
ФАГ в возрасте приблизительно 6-8 недель на начало каждого эксперимента. Образцы вводили

путем однократной болюсной инъекции в хвостовую вену в разовой дозе, эквивалентной общей дозе 1,0 мг/кг (или иной указанной) инкапсулированной мРНК ФАГ. Мышей умерщвляли и осуществляли перфузию солевым раствором в заданные моменты времени.

Выделение тканей органов для анализа

- 5 [171] У каждой мыши извлекали печень, селезенку, почку и сердце, разделяли на части и хранили или в 10 % нейтральном буферном формалине, или мгновенно замораживали и хранили при -80 °С для анализа.

Выделение плазмы для анализа

- 10 [172] Всех животных подвергали эвтаназии путем удушения CO₂ через заданные промежутки времени после введения дозы ($\pm 5\%$), после чего проводили торакотомию и терминальный забор крови из сердца. Цельную кровь (максимальный полученный объем) собирали путем пункции сердца эвтаназированных животных в пробирки для отделения сыворотки, оставляли свернуться при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 минут, центрифугировали при 22 °С \pm 5 °С при 9300 g в течение 10 минут и извлекали сыворотку. Для промежуточного забора крови, около 40-50 мкл цельной крови отбирали 15 путем прокола лицевой вены или через надрез хвоста. Образцы, взятые у животных, не получавших воздействия, использовали в качестве исходных уровней фенилаланина для сравнения с исследуемыми животными.

Анализ фенилаланина

- 20 [173] Уровни фенилаланина измеряли при помощи коммерчески доступного набора (BioAssay Systems EPHE-100) согласно протоколам производителя.

Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) - ELISA чФАГ

- 25 [174] После стандартных процедур ELISA применяли поликлональное антитело козы к чФАГ (Novus NBP1-52084) в качестве захватывающего антитела, с поликлональным антителом кролика к чФАГ (Sigma (HPA02807) в качестве вторичного (детекторного) антитела. Конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) IgG козы к антигенам кролика применяли для активации раствора субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ). Реакцию останавливали при помощи 2N H₂SO₄ через 20 минут. Определение контролировали путем абсорбции (450 нм) на приборе Molecular Device Flex Station. Необработанную печень мыши и белок ФАГ

человека использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

Пример 3. Производство белка *in vivo* и клиническая эффективность

5 [175] В настоящем примере показано, что результатом введения мРНК чФАГ является успешное производство белка и клиническая эффективность *in vivo*.

[176] Для определения, происходит ли успешная трансляция мРНК в белок *in vivo*, проводили количественный анализ на белок ФАГ человека в печени обработанных мышей при помощи способов на основе ELISA (Фигура 2). На Фигуре 3 дополнительно показано, что 10 явное производство белка ФАГ человека наблюдалось при отсутствии перекрестной реакции с гомологом соответствующего белка мыши, что подтверждалось на печени необработанных мышей дикого типа. Между 6 и 12 часами после введения детектировали приблизительно 300 нг белка чФАГ на мг общего содержания белка в образце (см. Фигуру 3).

[177] Для определения клинической эффективности оценивали воздействие введения 15 мРНК на уровни фенилаланина в сыворотке мышей с нокаутом ФАГ, модели заболевания ФКУ. Уровни фенилаланина у необработанных мышей с нокаутом ФАГ были крайне повышены по сравнению с мышами дикого типа (~1450 мкМ по сравнению с ~50 мкМ). Как показано на Фигуре 4, после обработки мРНК ФАГ указанных мышей с нокаутом ФАГ уровни фенилаланина понижались до уровней, характерных для мышей дикого типа, в течение 20 *шести часов* после введения дозы. Полученные данные показали, что терапия мРНК ФАГ очень эффективна для лечения ФКУ.

Пример 4. Обнаружение мРНК чФАГ *in vivo*

[178] В настоящем примере показано, что после введения мРНК чФАГ можно 25 обнаружить мРНК ФАГ в печени мыши в течение по меньшей мере 72 часов.

[179] Мышам вводили однократную дозу (1,0 мг/кг) липидных наночастиц на основе сКК-E12, нагруженных мРНК чФАГ, или солевого раствора (*m.e.*, контроль), как описано выше в Примере 2. Мышей умерщвляли через 30 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 7 дней после введения мРНК чФАГ и извлекали печень. Осуществляли 30 гибридизацию печени *in situ* для определения присутствия мРНК чФАГ (Фигуры 5A-5I).

Присутствие мРНК чФАГ обнаруживалось в течение по меньшей мере 72 часов после введения (Фигуры 5А-5G). мРНК чФАГ обнаруживалась как в синусоидных клетках, так и в гепатоцитах. Полученные данные показали, что возможно определить присутствие мРНК чФАГ в печени в течение по меньшей мере 72 часов после введения.

5

Пример 5. Уровни белка ФАГ человека и уровни фенилаланина в сыворотке мышей с нокаутом ФАГ после дозозависимого воздействия мРНК чФАГ.

[180] В настоящем примере показана связь «доза-отклик» между количеством введенной мРНК чФАГ и количеством экспрессированного в печени белка ФАГ человека и
10 уровнями фенилаланина в сыворотке.

[181] Мышам с нокаутом ФАГ вводили однократную дозу 0,25 мг/кг, 0,50 мг/кг, 0,75 мг/кг или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК чФАГ, или солевого раствора (*т.е.* контроль) как описано выше в Примере 2. У мышей брали пробы сыворотки до введения дозы (*т.е.* перед дозой) и через 6 часов после введения дозы (*т.е.* после
15 дозы). Мышей умерщвляли через 72 часа после введения и извлекали печень.

[182] Уровни белка ФАГ человека в печени определяли с помощью ELISA. Полученные данные показали, что для всех доз были обнаружены повышенные уровни белка чФАГ по сравнению с контролем (Фигура 6). Полученные данные также показали наличие зависимости «доза-отклик» между количеством введенной мРНК чФАГ и количеством белка
20 ФАГ, экспрессированного в печени. Например, мыши, получившие 1,0 мг/кг мРНК чФАГ, экспрессировали приблизительно 1000 нг ФАГ/мг общего белка, в то время как мыши, получившие 0,25 мг/кг мРНК чФАГ, экспрессировали приблизительно 200 нг ФАГ/мг общего белка.

[183] Уровни фенилаланина в сыворотке количественно определяли в пробах до
25 воздействия и после воздействия (Фигура 7). Полученные данные показали снижение уровней фенилаланина в сыворотке для всех доз при воздействии по сравнению с контролем перед дозой, а также зависимость «доза-отклик». Например, мыши, получившие 1,0 мг/кг мРНК чФАГ, показали более низкие уровни фенилаланина (*т.е.*, менее 500 мкМ), чем мыши, получившие 0,25 мг/кг (*т.е.*, менее 1500 мкМ).

30

Пример 6. Уровни белка ФАГ человека и уровни фенилаланина в сыворотке мышей с нокаутом ФАГ после лечения мРНК чФАГ в течение одного месяца

[184] В настоящем примере показано, что результатом лечения мРНК чФАГ в течение более одного месяца являются повышенные уровни белка чФАГ в печени и пониженные уровни фенилаланина в сыворотке.

[185] Мышам с нокаутом РАН вводили однократную дозу 0,5 мг/кг или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, один раз в неделю в течение одного месяца или 1,0 мг/кг липидных наночастиц на основе сКК-Е12, нагруженных мРНК ФАГ, через неделю в течение одного месяца, или солевой раствор (*т.е.*, контроль), как описано выше в Примере 2. У мышей брали сыворотку перед первой дозой (*т.е.* перед дозой) и через шесть часов после каждой дозы. Мышей умерщвляли через 6 часов после введения последней дозы на 29 день и извлекали печень.

[186] Уровни белка ФАГ человека в печени определяли при помощи ELISA. Полученные данные показали, что для всех доз были отмечены повышенные уровни белка чФАГ по сравнению с контролем (Фигура 8).

[187] Уровни фенилаланина в сыворотке определяли количественно в образцах до лечения и после лечения (Фигура 9). Полученные данные показали снижение уровней фенилаланина в сыворотке для всех вводимых доз по сравнению с контрольными образцами перед дозой. Полученные результаты также показали, что в результате введения более высокой дозы (*т.е.* 1,0 мг/кг) наблюдаются более низкие уровни фенилаланина в сыворотке, даже при введении мРНК чФАГ через неделю.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[188] Специалисты в данной области техники поймут или будут способны определить, используя только лишь рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в настоящем документе. Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен приведенным выше описанием, но является таким, как изложено в следующей формуле изобретения:

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения фенилкетонурии (ФКУ), содержащая инкапсулированную в липосоме мРНК, кодирующую фенилаланин-гидроксилазу (ПАУ), в количестве эффективной дозы,

где указанная липосома имеет размер менее 100 нм,

причём уровень фенилаланина в сыворотке крови снижен по сравнению с исходными уровнем фенилаланина в сыворотке крови до лечения.

2. Композиция по п.1, в которой мРНК содержит SEQ ID NO: 3.

3. Композиция по п.1 или 2, в которой указанная липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более липидов, модифицированных ПЭГ.

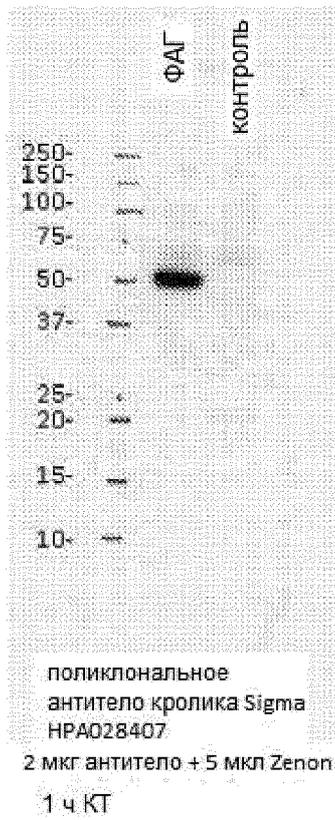
4. Способ лечения фенилкетонурии (ФКУ), включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, композиции, содержащей инкапсулированную в липосому мРНК, кодирующую фенилаланин-гидроксилазу (ПАУ), в количестве эффективной дозы,

где указанная липосома имеет размер менее 100 нм,

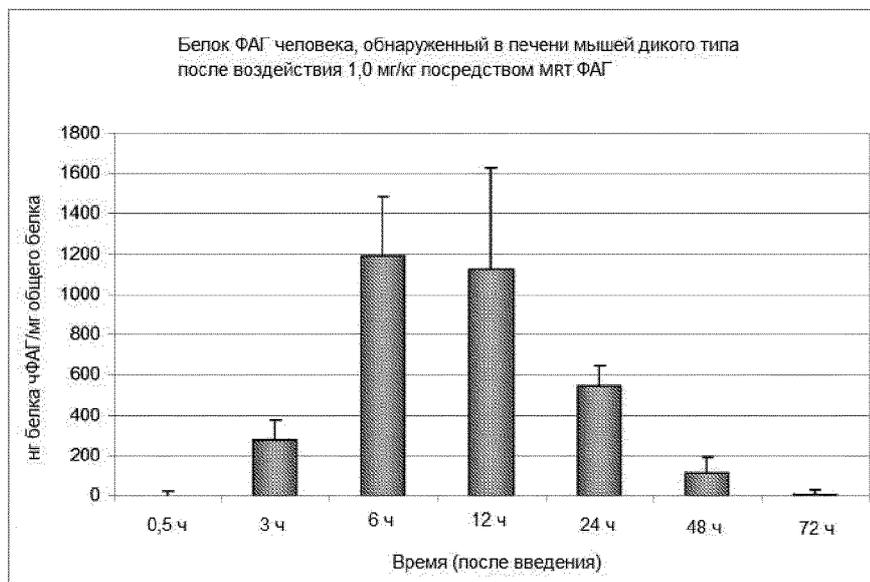
причём уровень фенилаланина в сыворотке крови снижен по сравнению с исходными уровнем фенилаланина в сыворотке крови до лечения.

5. Способ по п.4, согласно которому мРНК содержит SEQ ID NO: 3.

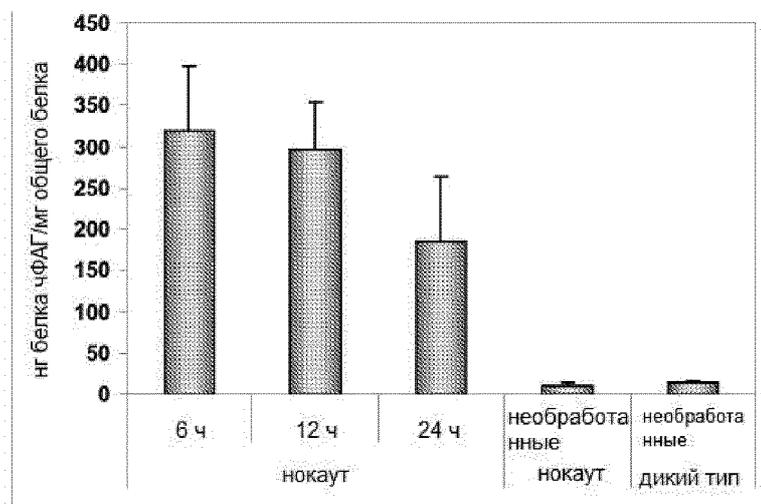
6. Способ по п.4 или 5, согласно которому указанная липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более липидов, модифицированных ПЭГ.



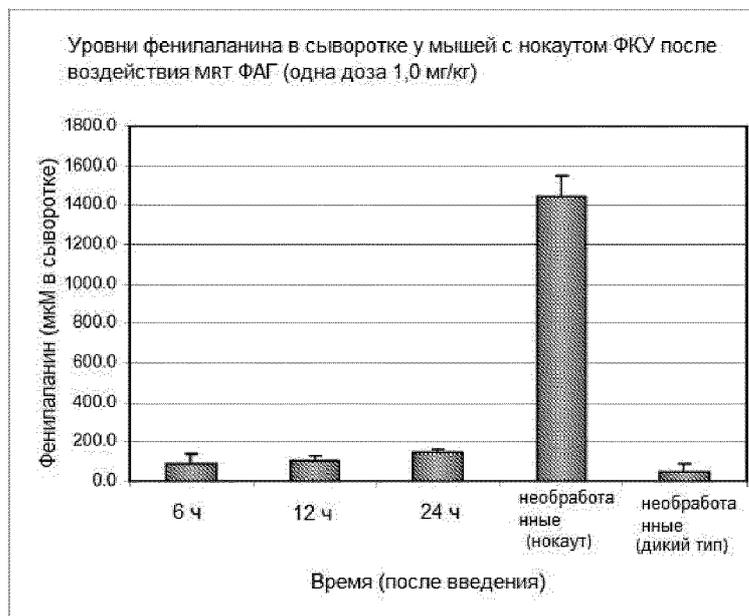
ФИГ. 1



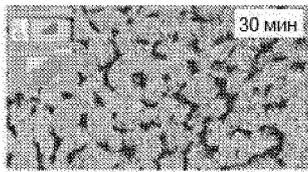
ФИГ. 2



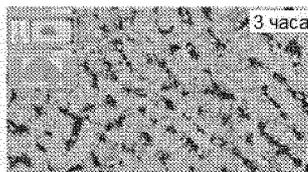
ФИГ. 3



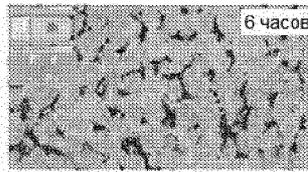
ФИГ. 4



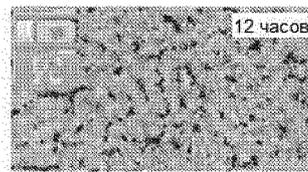
ФИГ. 5А



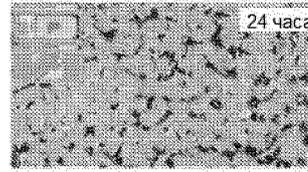
ФИГ. 5В



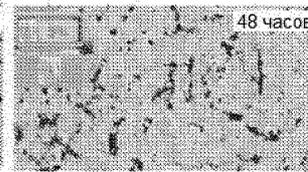
ФИГ. 5С



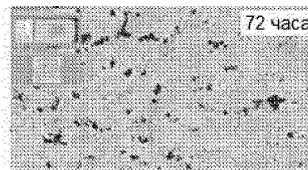
ФИГ. 5Д



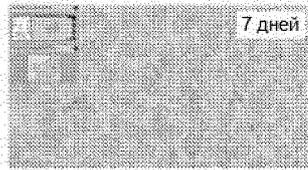
ФИГ. 5Е



ФИГ. 5Е



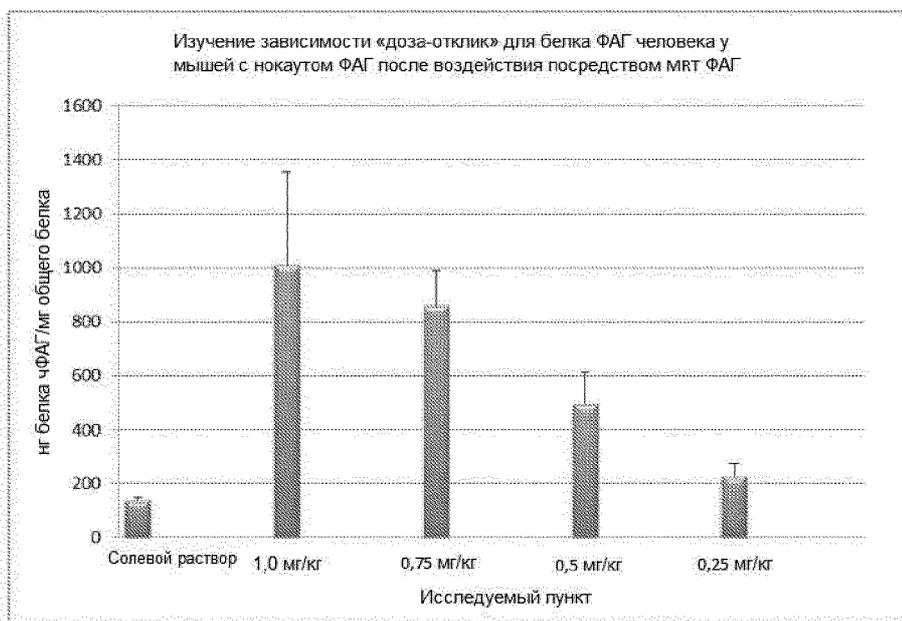
ФИГ. 5Г



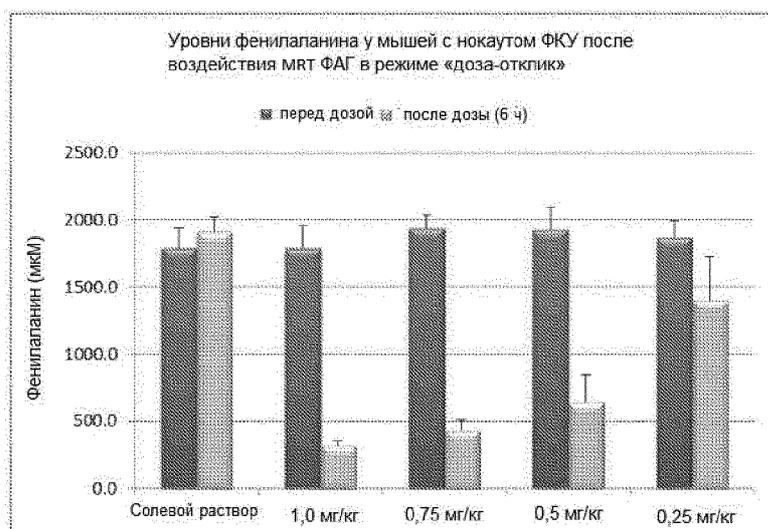
ФИГ. 5Н



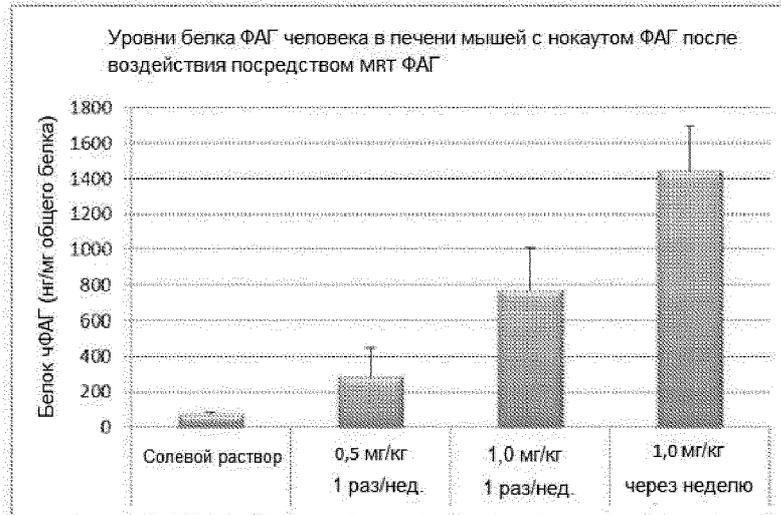
ФИГ. 5И



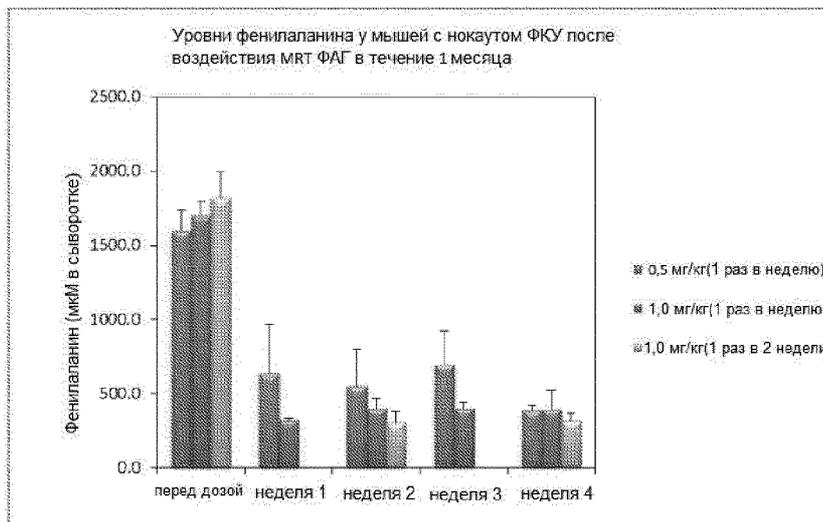
ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201992208

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 38/41; A61K 48/0033; A61K 48/005; A61K 9/1272, A61P 13/02, A61P 25/00, A61P 3/00, C12N 9/0071, C12Y 14/1601

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, PATENTSCOPE, ESPACENET

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	VIECELLI HIU MAN ET AL. Gene Therapy for Liver Diseases Using Non-Viral Minicircle-DNA Vector. MOLECULAR THERAPY, vol.21, no. Suppl. 1, 2013, p S136 .	1-6
Y	YAMAMOTO A ET AL. Current prospects for mRNA gene delivery" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, NL, vol. 71, no.3, 2009, p 484-489.	1-6

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **27/05/2020**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины

 А.В.Чебан