

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042676**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.13

(51) Int. Cl. *C12N 9/10* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892576

(22) Дата подачи заявки
2017.06.13

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ МАТРИЧНОЙ РНК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ОРНИТИНТРАНСКАРБАМИЛАЗЫ**

(31) **62/349,331; 62/509,568**

(32) **2016.06.13; 2017.05.22**

(33) **US**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/US2017/037237**

(87) **WO 2017/218524 2017.12.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТРАНСЛЕЙТ БИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Дероза Франк, Хартлейн Майкл,
Смит Лианн, Карв Шриран (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) DATABASE Geneseq [Online] 5 December 2013 (2013-12-05), from WO2013151666: "Human diseases associated protein encoding optimized ORF, SEQ ID 1529.", XP002772768, retrieved from EBI, accession no. GSN:BAW43135, Database accession no. BAW43135, sequence
WO-A2-2016070166

& DATABASE Geneseq [Online] 30 June 2016 (2016-06-30), "Human ornithine transcarbamylase mRNA, SEQ ID 136.", retrieved from EBI

accession no. GSN:BCQ29476, Database accession no. BCQ29476, sequence

WO-A1-2011068810

LILI WANG ET AL.: "Preclinical evaluation of a clinical candidate AAV8 vector for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency reveals functional enzyme from each persisting vector genome", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 105, no. 2, 31 October 2011 (2011-10-31), pages 203-211, XP028447650, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2011.10.020 [retrieved on 2011-11-07] the whole document

L. WANG ET AL.: "Sustained correction of OTC deficiency in spf^{ash} mice using optimized self-complementary AAV2/8 vectors", GENE THERAPY, vol. 19, no. 4, 18 August 2011 (2011-08-18), pages 404-410, XP055190744, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2011.111, the whole document

MOSCIANI ET AL.: "Long-Term Correction of Ammonia Metabolism and Prolonged Survival in Ornithine Transcarbamylase-Deficient Mice Following Liver-Directed Treatment with Adeno-associated Viral Vectors", MOLECULAR THE, ACADEMIC PRESS, US, vol. 14, no. 1, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 25-33, XP005560368, ISSN: 1525-0016, the whole document

(57) В изобретении предусмотрены, в числе прочего, способы лечения недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении, композиции, содержащей mRNA, кодирующую белок, представляющий собой орнитинтранскарбамилазу (ОТС), в эффективной дозе и с некоторым интервалом введения, за счет чего по меньшей мере один симптом или характеристика недостаточности ОТС уменьшается по интенсивности, тяжести или частоте или характеризуется отсроченным проявлением. В некоторых вариантах осуществления mRNA инкапсулирована в липосому, содержащую один или более катионных липидов, один или более некатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов.

B1**042676****042676****B1**

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с предварительной заявкой США с серийным номером 62/349331, поданной 13 июня 2016 г., и предварительной заявкой США с серийным номером 62/509568, поданной 22 мая 2017 г., раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

В настоящем описании дается ссылка на перечень последовательностей (поданный в электронном виде в виде файла с расширением .txt под названием "SLMRT-1243US" 13 июня 2017 г. Файл с расширением .txt был создан 13 июня 2017 г., и его размер составляет 22141 байт. Полное содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки.

Предпосылки изобретения

Недостаточность орнитинтранскарбамилазы (ОТС) представляет собой сцепленное с X-хромосомой генетическое нарушение, характеризующееся мутациями в гене ОТС. Мутации в гене ОТС приводят к устранению или ослаблению способности фермента ОТС катализировать синтез цитруллина (в печени и тонком кишечнике) из карбамоилфосфата и орнитина. В результате этого избыток азота в форме аммония накапливается в крови и направляется к нервной системе, что приводит к симптомам, ассоциированным с недостаточностью ОТС. Мутации, которые вызывают устранение активности ОТС полностью, приводят к тяжелой форме с началом заболевания в неонатальном периоде, в то время как мутации, которые вызывают сниженную активность ОТС, приводят к проявлению фенотипов с поздним началом заболевания.

Недостаточность ОТС представляет собой наиболее распространенный тип нарушения цикла обмена мочевины, и частота заболеваемости составляет примерно 1/56500-1/77000 живорожденных. Младенцы мужского пола с тяжелой формой с началом заболевания в неонатальном периоде являются здоровыми при рождении, однако через несколько дней у них появляются слабый сосательный рефлекс, гипотония и летаргия, которые быстро прогрессируют в сонливость и кому. Также могут присутствовать судорожные припадки и гипервентиляция. При отсутствии лечения будет развиваться тяжелая энцефалопатия с высоким риском летального исхода. Пациенты с более умеренной формой могут встречаться в любом возрасте. У грудных детей симптомы могут быть вызваны при переводе с грудного молока на цельное молоко. У детей и взрослых стрессогенные факторы среды (т.е. голодание, диета с высоким содержанием белка, беременность и послеродовой период, случайное заболевание, хирургическое вмешательство) могут вызывать эпизоды гипераммониемической энцефалопатии с тошнотой, рвотой, головными болями, хаотичным поведением, делирием и агрессивностью. Эти эпизоды также могут приводить к гипераммониемической коме. Неврологические осложнения гипераммониемической комы включают в себя задержку развития и (иногда) тяжелое когнитивное расстройство. Многие женщины-носители не проявляют симптомов заболевания; однако они могут быть поражены в той же степени, что и мужчины, если степень инактивации X-хромосомы в аллеле, связанном с заболеванием, является неблагоприятной. Коагулопатия часто наблюдается во время метаболической декомпенсации и иногда перерастает в острую печеночную недостаточность.

В настоящее время лечение недостаточности ОТС отсутствует, а длительная терапия включает пожизненное ограничение потребления белка и терапию, направленную на устранение азота (с помощью фенилацетата натрия или фенлибутирата натрия и/или бензоата натрия). Трансплантацию печени можно также рассматривать у пациентов с тяжелой недостаточностью ОТС с началом в неонатальном периоде (обычно выполняемую в возрасте 6 месяцев) или у пациентов с частыми гипераммониемическими эпизодами.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены, в числе прочего, улучшенные способы и композиции для лечения недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), основанные на терапевтическом средстве на основе mRNA. Настоящее изобретение охватывает наблюдение, согласно которому введение mRNA, кодирующей человеческий белок ОТС, инкапсулированный в липосоме, приводило к высокоэффективной и длительной выработке белка *in vivo* и, например, успешному снижению уровней оротовой кислоты в моче, клинически значимого маркера заболевания.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении, композиции, содержащей mRNA, кодирующую белок, представляющий собой орнитинтранскарбамилазу (ОТС), в эффективной дозе и с некоторым интервалом введения, за счет чего по меньшей мере один симптом или характеристика недостаточности ОТС уменьшается по интенсивности, тяжести или частоте или характеризуется отсроченным проявлением. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 6. В неко-

торых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, не представляет собой SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления mRNA дополнительно содержит последовательность не-транслируемой 5'-области (UTR) под SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления mRNA дополнительно содержит последовательность не-транслируемой 3'-области (UTR) под SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления mRNA инкапсулирована в липосоме. В некоторых вариантах осуществления липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов. В некоторых вариантах осуществления один или более катионных липидов представляют собой катионный липид, выбранный из группы, состоящей из C12-200, MC3, DLinDMA, DLmkC2DMA, cKK-E12, ICE (на основе имидазола), HGT5000, HGT5001, OF-02, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA и DMDMA, DODAC, DLenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DO-carbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-ХТС2-DMA, HGT4003 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления один или более некаатионных липидов выбраны из группы, состоящей из DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина), DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин), DOPC (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфотидилхолина), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламина), DMPE (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламина), DOPG (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерина)) и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления один или более липидов на основе холестерина представляют собой холестерин и/или пегилированный холестерин.

В некоторых вариантах осуществления липосома имеет размер менее приблизительно 100 нм.

В некоторых вариантах осуществления mRNA вводят в эффективной дозе в диапазоне от приблизительно 0,01 до 5,0 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления mRNA вводят в эффективной дозе в диапазоне от приблизительно 0,01 до 3,0 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления mRNA вводят в эффективной дозе в диапазоне от приблизительно 0,01 до 1,0 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления mRNA вводят в эффективной дозе в диапазоне от приблизительно 0,01 до 0,5 мг/кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят два раза в месяц.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят один раз в 14 дней. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят один раз в месяц.

В некоторых вариантах осуществления введение композиции приводит к повышению уровня экспрессии или активности белка ОТС в сыворотке крови у субъекта по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень представляет собой исходный уровень экспрессии или активности белка ОТС в сыворотке крови у субъекта до лечения. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень представляет собой эталонный уровень, отражающий средний уровень экспрессии или активности белка ОТС в сыворотке крови у пациентов с недостаточностью ОТС без лечения. В некоторых вариантах осуществления введение композиции приводит к пониженному уровню оротовой кислоты в моче у субъекта по сравнению с контрольным уровнем оротовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень оротовой кислоты представляет собой исходный уровень оротовой кислоты в моче у субъекта до лечения. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень оротовой кислоты представляет собой эталонный уровень, отражающий средний уровень оротовой кислоты в моче у пациентов с недостаточностью ОТС без лечения. В некоторых вариантах осуществления, где введение композиции приводит к повышению уровня цитруллина в сыворотке крови у субъекта по сравнению с контрольным уровнем цитруллина. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень цитруллина представляет собой исходный уровень цитруллина в сыворотке крови у субъекта до лечения. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень цитруллина представляет собой эталонный уровень цитруллина в сыворотке крови, отражающий средний уровень цитруллина у пациентов с недостаточностью ОТС без лечения.

В некоторых вариантах осуществления mRNA содержит один или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более модифицированных нуклеотидов представляют собой псевдоуридин, N-1-метилпсевдоуридин, 2-аминоадеозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладеозин, 5-метилцитидин, C-5-пропинилцитидин, C-5-пропинилуридин, 2-аминоадеозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоадеозин, 7-дезазаадеозин, 7-дезазагуанозин, 8-оксоадеозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин и/или 2-тиоцитидин.

В некоторых вариантах осуществления mRNA является немодифицированной.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции для ле-

чения недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), содержащие mRNA, кодирующую белок, представляющий собой орнитинтранскарбамилазу (ОТС), и где mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит последовательность, на по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, не представляет собой SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления mRNA дополнительно содержит последовательность нетранслируемой 5'-области (UTR) под SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления mRNA дополнительно содержит последовательность нетранслируемой 3'-области (UTR) под SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующая белок ОТС, инкапсулирована в липосоме. В некоторых вариантах осуществления липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некаатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов. В некоторых вариантах осуществления липосома имеет размер менее приблизительно 100 нм.

Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения являются очевидными из следующих подробного описания, графических материалов и формулы изобретения. Однако следует понимать, что подробное описание, графические материалы и формула изобретения, хотя в них указаны варианты осуществления настоящего изобретения, приведены лишь с целью иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема настоящего изобретения станут очевидны специалистам в данной области.

Краткое описание графических материалов

Графические материалы приведены лишь в целях иллюстрации, а не для ограничения.

На фиг. 1 в качестве примера представлено иммуногистохимическое выявление человеческого белка ОТС с помощью вестерн-блоттинга в течение двухнедельного периода после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС.

На фиг. 2А представлена в качестве примера выработка цитруллина у мышей в течение двухнедельного периода после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС.

На фиг. 2В представлена в качестве примера активность белка hОТС у мышей в виде процентной доли от активности дикого типа в течение двухнедельного периода после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС.

На фиг. 3А представлено в качестве примера иммуногистохимическое выявление человеческого белка ОТС с помощью вестерн-блоттинга после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС.

На фиг. 3В представлено в качестве примера иммуногистохимическое выявление человеческого белка ОТС с помощью вестерн-блоттинга после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС.

Используемые липидные наночастицы отличались от таковых, используемых на фиг. 3А.

На фиг. 4 представлена в качестве примера выработка цитруллина у мышей через 24 ч после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС. Активность hОТС не наблюдалась у мышей, обработанных липидными наночастицами с mRNA с нонсенс-мутациями (STOP).

На фиг. 5 изображены в качестве примера уровни оротовой кислоты в моче у мышей после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС.

На фиг. 6А представлена в качестве примера схема дозирования и исследования у мышей Spf^{ash}, которая включала в себя аммонийное воздействие.

На фиг. 6В изображены в качестве примера уровни аммония в плазме крови у мышей Spf^{ash} после обработки липидными наночастицами, нагруженными mRNA hОТС, после аммонийного воздействия с использованием NH₄Cl.

На фиг. 7 представлена в качестве примера выработка цитруллина в печени мышей Spf^{ash} после обработки липидными наночастицами, нагруженными mRNA hОТС, в виде процентной доли от активности дикого типа.

На фиг. 8 представлена в качестве примера активность hОТС, измеренная по выработке цитруллина, в печени мышей Spf^{ash} после обработки липидными наночастицами, нагруженными mRNA hОТС, в течение 8 недель в виде процентной доли от активности дикого типа.

На фиг. 9А представлена в качестве примера активность hОТС, измеренная по выработке цитруллина, у мышей Spf^{ash} после еженедельной обработки липидными наночастицами, нагруженными mRNA hОТС, в течение одного месяца.

На фиг. 9В представлено в качестве примера иммуногистохимическое выявление человеческого белка ОТС с помощью вестерн-блоттинга после еженедельного введения (1,0 мг/кг) липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС.

Определения

С целью облегчения понимания настоящего изобретения ниже сперва определены некоторые термины. Дополнительные определения следующих терминов и других терминов изложены во всем описании. Публикации и другие ссылочные материалы, приводимые в данном документе для описания уровня техники настоящего изобретения и для предоставления дополнительных подробностей касательно его практической реализации, включены в данный документ посредством ссылки.

Алкил. Используемый в данном документе термин "алкил" относится к радикалу насыщенной углеводородной группы с прямой цепью или разветвленной цепью, имеющей от 1 до 15 атомов углерода ("C₁₋₁₅алкил"). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 3 атомов углерода ("C₁₋₃алкил"). Примеры C₁₋₃алкильных групп включают в себя метил (C₁), этил (C₂), н-пропил (C₃) и изо-пропил (C₃). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 8 до 12 атомов углерода ("C₈₋₁₂алкил"). Примеры C₈₋₁₂алкильных групп включают без ограничения н-октил (C₈), н-нонил (C₉), н-децил (C₁₀), н-ундецил (C₁₁), н-додецил (C₁₂) и т.п. Префикс "н-" (нормальный) относится к неразветвленным алкильным группам. Например, н-C₃алкил относится к -(CH₂)₂CH₃, н-C₁₀алкил относится к -(CH₂)₉CH₃ и т.д.

Аминокислота. Используемый в данном документе термин "аминокислота" в своем самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которое может быть включено в полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет общую структуру H₂N-C(H)(R)-COOH. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой синтетическую аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой d-аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой l-аминокислоту. Термин "стандартная аминокислота" относится к любой из двадцати стандартных l-аминокислот, широко распространенных во встречающихся в природе пептидах. Термин "нестандартная аминокислота" относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, вне зависимости от того, получена она синтетическим путем или получена из природного источника. Используемый в данном документе термин "синтетическая аминокислота" охватывает химически модифицированные аминокислоты, в том числе без ограничения соли, производные (такие как амиды) и/или замены аминокислот. Аминокислоты, в том числе аминокислоты на карбокси- и/или аминоконцах в пептидах могут быть модифицированы путем метилирования, амидирования, ацетилирования, защитных групп и/или замены другими химическими группами, что может изменить период полужизни пептида в кровотоке без нежелательного влияния на его активность. Аминокислоты могут участвовать в образовании дисульфидной связи. Аминокислоты могут содержать одну или более посттрансляционных модификаций, таких как ассоциация с одним или более химических фрагментов (например, с металльными группами, ацетатными группами, ацетильными группами, фосфатными группами, формильными фрагментами, изопреноидными группами, сульфатными группами, полиэтиленгликолевыми фрагментами, липидными фрагментами, углеводными фрагментами, биотиновыми фрагментами и т.д.). Термин "аминокислота" используется взаимозаменяемо с "аминокислотным остатком" и может относиться к свободной аминокислоте и/или к аминокислотному остатку пептида. Будет очевидно из контекста, в котором термин используется, относится ли он к свободной кислоте или к остатку пептида.

Животное. Используемый в данном документе термин "животное" относится к любому представителю царства животных. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к людям на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к животным, отличным от человека, на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления животное, отличное от человека, представляет собой млекопитающее (например, грызуна, мышь, крысу, кролика, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примата и/или свинью). В некоторых вариантах осуществления животные включают без ограничения млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может представлять собой трансгенное животное, животное, полученное с помощью методов генной инженерии, и/или клон.

Примерно или приблизительно. Используемый в данном документе термин "примерно" или "приблизительно", применяемый в отношении одного или более значений, представляющих интерес, относится к значению, сходному с указанным эталонным значением. В определенных вариантах осуществления термин "примерно" или "приблизительно" относится к диапазону значений, находящихся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3%, 2, 1% или меньше в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

Биологически активный.

Используемая в данном документе фраза "биологически активный" относится к характеристике любого средства, обладающего активностью в биологической системе и, в частности, в организме. Напри-

мер, средство, которое при введении в организм оказывает биологический эффект на этот организм, считается биологически активным.

Доставка. Используемый в данном документе термин "доставка" охватывает как локальную, так и системную доставку. Например, доставка mRNA охватывает ситуации, в которых mRNA доставляется в ткань-мишень и кодируемый белок экспрессируется и сохраняется в ткани-мишени (также называется "локальное распределение" или "локальная доставка"), и ситуации, в которых mRNA доставляется в ткань-мишень и кодируемый белок экспрессируется и секретируется в кровеносную систему пациентов (например, сыворотку крови) и распределяется и захватывается другими тканями (также называется "системное распределение" или "системная доставка").

Экспрессия. Используемый в данном документе термин "экспрессия" последовательности нуклеиновой кислоты относится к трансляции mRNA в полипептид, сборке нескольких полипептидов в интактный белок (например, фермент) и/или к посттрансляционной модификации полипептида или полностью собранного белка (например, фермента). В настоящей заявке термины "экспрессия" и "выработка" и грамматические эквиваленты используются взаимозаменяемо.

Функциональный. Используемый в данном документе термин "функциональная" биологическая молекула представляет собой биологическую молекулу в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, которыми она характеризуется.

Период полужизни. Используемый в данном документе термин "период полужизни" означает период времени, требуемый для того, чтобы такая величина, как концентрация или активность белка, уменьшилась наполовину от своего значения, измеренного в начале периода времени.

Улучшать, повышать или снижать. Используемые в данном документе термины "улучшать", "повышать" или "снижать" или их грамматические эквиваленты указывают на значения относительно измерения исходного уровня, такого как измерение у того же самого индивидуума до начала лечения, описанного в данном документе, или измерение у контрольного субъекта (или нескольких контрольных субъектов) при отсутствии лечения, описанного в данном документе. "Контрольный субъект" является субъектом, пораженным той же формой заболевания, что и субъект, подвергаемый лечению, который имеет приблизительно такой же возраст, что и субъект, подвергаемый лечению.

In vitro. Используемый в данном документе термин "in vitro" относится к явлениям, которые происходят в искусственной среде, например, в тестовой пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и т.д., а не в многоклеточном организме.

In vivo. Используемый в данном документе термин "in vivo" относится к явлениям, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек и животное, отличное от человека. В контексте клеточных систем данный термин можно использовать в отношении явлений, которые происходят в живой клетке (в отличие от, например, систем in vitro).

Выделенный. Используемый в данном документе термин "выделенный" относится к веществу и/или фрагменту, который был (1) отделен от по меньшей мере некоторых из компонентов, с которыми он был ассоциирован, когда изначально образовался (в природных и/или экспериментальных условиях), и/или (2) образован, получен и/или изготовлен человеческой рукой. Выделенные вещества и/или фрагменты могут быть отделены от приблизительно 10%, от приблизительно 20%, от приблизительно 30%, от приблизительно 40%, от приблизительно 50%, от приблизительно 60%, от приблизительно 70%, от приблизительно 80%, от приблизительно 90%, от приблизительно 91%, от приблизительно 92%, от приблизительно 93%, от приблизительно 94%, от приблизительно 95%, от приблизительно 96%, от приблизительно 97%, от приблизительно 98%, от приблизительно 99% или от более чем приблизительно 99% других компонентов, с которыми они были изначально ассоциированы. В некоторых вариантах осуществления выделенные средства являются на приблизительно 80%, на приблизительно 85%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98%, на приблизительно 99% или более чем на приблизительно 99% чистыми. Используемое в данном документе вещество является "чистым", если оно по сути не содержит других компонентов. Используемый в данном документе расчет процентной чистоты выделенных веществ и/или фрагментов не должен включать вспомогательные вещества (например, буфер, растворитель, воду и др.).

Локальное распределение или доставка. Используемые в данном документе термины "локальное распределение", "локальная доставка" или грамматический эквивалент относятся к тканеспецифическим доставке или распределению. Как правило, для локальных распределения или доставки требуется, чтобы белок (например, фермент), кодируемый mRNA, транслировался или экспрессировался внутриклеточно или с ограниченной секрецией, что предупреждает проникновение в кровеносную систему пациента.

Матричная РНК (mRNA). Используемый в данном документе термин "матричная РНК (mRNA)" относится к полирибонуклеотиду, который кодирует по меньшей мере один полипептид. Используемая в данном документе mRNA охватывает как модифицированную, так и немодифицированную РНК. mRNA может содержать одну или более кодирующих и некодирующих областей. mRNA может быть очищена из природных источников, получена с помощью рекомбинантных систем экспрессии и необязательно очищена, транскрибирована in vitro, химически синтезирована и т.д. При необходимости, например, в

случае химически синтезированных молекул, mRNA может содержать аналоги нуклеозидов, такие как аналоги, имеющие химически модифицированные основания или сахара, модификации остовов и т.д. Последовательность mRNA представлена в направлении от 5' к 3', если не указано иное. В некоторых вариантах осуществления mRNA представляет собой природные нуклеозиды (например, аденозин, гуанозин, цитидин, уридин); аналоги нуклеозидов (например, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C-5-пропинилцитидин, C-5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезаденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин и 2-тиоцитидин); химически модифицированные основания; биологически модифицированные основания (например, метилированные основания); интеркалированные основания; модифицированные сахара (например, 2'-фторрибоза, рибоза, 2'-дезоксирибоза, арабиноза и гексоза); и/или модифицированные группы (например, фосфотиоатные и 5'-N-фосфорамидитные связи); или содержит их.

Нуклеиновая кислота. Используемый в данном документе термин "нуклеиновая кислота" в своем самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которое содержится в полинуклеотидной цепи или может быть включено в нее. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которое содержится в полинуклеотидной цепи или может быть включено в нее посредством фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к отдельным остаткам нуклеиновой кислоты (например, нуклеотидам и/или нуклеозидам). В некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к полинуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления термин "нуклеиновая кислота" охватывает РНК, а также одно- и/или двухнитевую ДНК и/или cDNA.

Пациент. Используемый в данном документе термин "пациент" или "субъект" относится к любому организму, которому может быть введена предусмотренная композиция, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических, косметических и/или терапевтических целей. Типичные пациенты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, отличные от человека, и/или люди). В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой человека. Человек включает людей в пре- и постнатальных формах.

Фармацевтически приемлемый. Термин "фармацевтически приемлемый", используемый в данном документе, относится к веществам, которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением пользы/риска.

Фармацевтически приемлемая соль. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, S.M. Berge et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences 1977, 66:1-19. Фармацевтически приемлемые соли соединений по настоящему изобретению включают в себя таковые, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей присоединения кислоты являются соли аминогруппы, образованные с помощью неорганических солей, таких как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная 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, применяемых в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмиат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиопианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, соли валериановой кислоты и т.п. Соли, полученные из подходящих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочно-земельных металлов, аммония и соли $N^+(C_{1-4} \text{ алкил})_4$. Типичные соли щелочных или щелочно-земельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т.п. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, образованные при помощи противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, сульфат и арилсульфонат. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают в себя соли, образованные в результате кватернизации амина с помощью подходящего электролита, например, алкилгалогенида, с образованием кватернизированной алкилированной соли аминокислоты.

Системные распределение и доставка. Используемые в данном документе термины "системное распределение", "системная доставка" или грамматические эквиваленты относятся к механизму или подходу при доставке или распределении, которые обеспечивают воздействие на все тело или весь организм. Обычно системные распределение или доставка осуществляются с помощью системы кровообращения,

например, кровотока, при сравнении с определением "локальные распределение или доставка".

Субъект. Используемый в данном документе термин "субъект" относится к человеку или любому животному, отличному от человека (например, мыши, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату). Человек включает людей в пре- и постнатальных формах. Во многих вариантах осуществления субъектом является человек. Субъектом может являться пациент, который означает человека, поступившего в медицинское учреждение для постановки диагноза или лечения заболевания. Термин "субъект" используется в данном документе взаимозаменяемо с терминами "индивидуум" или "пациент". Субъект может быть поражен заболеванием или нарушением или являться подверженным им, но может демонстрировать симптомы заболевания или нарушения или не демонстрировать их.

Практически. Как используется в данном документе, термин "практически" относится к качественному состоянию, при котором характеристика или свойство, представляющие интерес, демонстрируются в полном или почти полном объеме или степени. Обычному специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические явления редко, если это вообще имеет место, протекают до конца и/или продолжаются до завершенности или характеризуются достижением или отсутствием абсолютного результата. Термин "практически" используется, таким образом, в данном документе для охвата потенциального отсутствия завершенности, присущего многим биологическим и химическим явлениям.

Ткани-мишени. Используемый в данном документе термин "ткани-мишени" относится к любой ткани, которая поражена заболеванием, подлежащим лечению. В некоторых вариантах осуществления ткани-мишени включают в себя те ткани, которые демонстрируют патологический процесс, симптом или признак, ассоциированные с заболеванием.

Терапевтически эффективное количество. Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" терапевтического средства означает количество, которое является достаточным при введении субъекту, страдающему заболеванием, нарушением и/или состоянием или подверженному им, для лечения, диагностики, предупреждения и/или отсрочки начала проявления симптома(симптомов) заболевания, нарушения и/или состояния. Обычному специалисту в данной области будет понятно, что терапевтически эффективное количество, как правило, вводится с соблюдением режима дозирования, предусматривающего по меньшей мере одну стандартную дозу.

Лечение. Используемый в данном документе термин "лечить", "лечение" или "осуществление лечения" относится к любому способу, применяемому для частичного или полного облегчения, уменьшения интенсивности, ослабления, подавления, предупреждения, отсрочки начала проявления, снижения степени тяжести и/или снижения частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или состояния. Средство лечения можно вводить субъекту, который не демонстрирует признаков заболевания и/или демонстрирует только ранние признаки заболевания, с целью снижения риска развития патологического процесса, ассоциированного с заболеванием.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены, в числе прочего, способы и композиции для лечения недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), основанные на терапевтическом средстве на основе mRNA. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения недостаточности ОТС с помощью введения субъекту, нуждающемуся в лечении, композиции, содержащей mRNA, кодирующую орнитинтранскарбамилазу (ОТС), в эффективной дозе и с некоторым интервалом введения, за счет чего по меньшей мере один симптом или характеристика недостаточности ОТС уменьшается по интенсивности, тяжести или частоте или характеризуется отсроченным проявлением. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы лечения недостаточности ОТС, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей mRNA, кодирующую ОТС, для лечения гипераммониемии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления mRNA инкапсулирована в одной или более липосоме. Используемый в данном документе термин "липосома" относится к любой однослойной, многослойной или твердой везикуле, представляющей собой наночастицу. Обычно липосома, используемая в данном документе, может быть образована с помощью смешивания одного или более липидов или с помощью смешивания одного или более липидов и полимера(полимеров). Таким образом, термин "липосома", используемый в данном документе, охватывает наночастицы как на основе липидов, так и полимеров. В некоторых вариантах осуществления липосома, подходящая для настоящего изобретения, содержит катионный(катионные) или некаатионный(некатионные) липид(липиды), липид(липиды) на основе холестерина и PEG-модифицированный(модифицированные) липид(липиды).

Недостаточность орнитинтранскарбамилазы (ОТС).

Настоящее изобретение может применяться для лечения субъекта, который страдает от недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС) или подвержен ей. Недостаточность ОТС представляет собой генетическое нарушение, сцепленное с X-хромосомой, характеризующееся мутациями в гене фермента, представляющего собой орнитинтранскарбамилазу (ОТС). Фермент ОТС также известен как митохондриальная орнитинкарбамоилтрансфераза. Ген ОТС также известен как MGC129967, MGC129968, OSTD, предшественник орнитинкарбамоилтрансферазы, орнитинтранскарбамилаза и OTC_HUMAN. Более 300

мутаций, которые вызывают недостаточность ОТС, были идентифицированы в гене ОТС. Многие из мутаций в гене ОТС, вероятно, влияют на структуру образующегося в результате белка и снижают его активность.

Композиции и способы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения по меньшей мере одного симптома или признака недостаточности ОТС. В частности, композиции и способы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения гипераммониемии.

Мутации в гене ОТС приводят к устранению или ослаблению способности фермента ОТС катализировать синтез цитруллина (в печени и тонком кишечнике) из карбамоилфосфата и орнитина. В результате этого избыток азота в форме аммония накапливается в крови и направляется к нервной системе, что приводит к симптомам, ассоциированным с недостаточностью ОТС. Накопление аммония может приводить к поражению головного мозга и летальному исходу. Мутации, которые вызывают устранение активности ОТС полностью, приводят к тяжелой форме с началом заболевания в неонатальном периоде, в то время как мутации, которые вызывают сниженную активность ОТС, приводят к проявлению фенотипов с поздним началом заболевания.

Орнитинтранскарбамилаза (ОТС).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы и композиции для доставки mRNA, кодирующей ОТС, субъекту для лечения недостаточности ОТС. Подходящая mRNA ОТС кодирует любой из полноразмерного белка ОТС, его фрагмента или части, который может быть замещен активностью встречающегося в природе белка ОТС, и/или может снижать интенсивность, тяжесть и/или частоту одного или более симптомов, ассоциированных с недостаточностью ОТС.

В некоторых вариантах осуществления подходящая последовательность mRNA представляет собой последовательность mRNA, кодирующую белок ОТС человека. Встречающаяся в природе mRNA ОТС человека и соответствующая аминокислотная последовательность представлены в табл. 1.

Таблица 1

ОТС человека

ОТС человека (последовательность, кодирующая mRNA)	(SEQ ID NO: 1)
	AUGCUGUUUAAUCUGAGGAUCCUGUUAAACAAUGCAGCUUUUA
	GAAAUUGGUCACAACUUCUUGGUUCGAAAUUUUCGGUGUGGACA
	ACCACUACAAAAUAAAGUGCAGCUGAAGGGCCGUGACCUUCUCA
	CUCUAAAAAACUUUACCGGAGAAGAAAUAAAAUUAUGCUAUG
	GCUAUCAGCAGAUUCUGAAAUUAGGAUAAAACAGAAAGGAGAG
	UAUUUGCCUUUAUUGCAAGGGAAGUCCUAGGCAUGAUUUUUG
	AGAAAAGAAGUACUCGAACAAGAUUGUCUACAGAAACAGGCUU
	UGCACUUCUGGGAGGACAUCUUGUUUCUUACCACACAAGAUUA
	UUCAUUUGGGUGUGAAUGAAAGUCUCACGGACACGGCCCGUGUA
	UUGUCUAGCAUUGGCAGAUAGCAGUUAUUGGCUCGAGUGUAUAAAC
	AAUCAGAUUUGGACACCCUGGCUAAAGAAGCAUCCAUCCCAAUU
	AUCAUUGGGCUGUCAGAUUUGUACCAUCCAUCCAGAUCCUGGC
	UGAUUACCUCACGCUCCAGGAACACUAUAGCUCUCUGAAAGGUC
	UUACCCUCAGCUGGAUCGGGAUGGGAACAAUUAUCCUGCACUCC
	AUCAUGAUGAGCGCAGCGAAAUUCGGAUAGCACCUUCAGGCAGC
	UACUCCAAAGGGUUUAUGAGCCGGAUGCUAGUGUAACCAAGUUGG
	CAGAGCAGUAUGCAAAGAGAAUGGUACCAAGCUGUUGCUGACA
	AAUGAUCCAUUGGAAGCAGCGCAUGGAGGCAUUGUAUUAAUUA
	CAGACACUUGGAUAGCAUGGGACAAGAAGAGGAGAAGAAAAA
	GCGGCUCCAGGCUUCCAAGGUUACCAGGUUACAAUGAAGACUG

	CUAAAGUUGCUGCCUCUGACUGGACAUUUUUACACUGCUUGCCC AGAAAGCCAGAAGAAGUGGAUGAUGAAGUCUUUUUUCUCCUC GAUCACUAGUGUCCCAGAGGCAGAAAACAGAAAGUGGACAAUC AUGGCUGUCAUGGUGUCCUGCUGACAGAUUACUCACCUCAGCU CCAGAAGCCUAAAUUUUGA
ОТС человека (последо- ватель- ность ДНК)	(SEQ ID NO: 2) ATGCTGTTTAATCTGAGGATCCTGTAAACAATGCAGCTTTTAGAA ATGGTCACAACCTCATGGTTCGAAATTTTCGGTGTGGACAACCACT ACAAAATAAAGTGACAGCTGAAGGGCCGTGACCTTCTACTCTAAA AAACTTTACCGGAGAAGAAATTAATATATGCTATGGCTATCAGC AGATCTGAAATTTAGGATAAAACAGAAAGGAGAGTATTGTCCTTT ATTGCAAGGGAAGTCCTTAGGCATGATTTTGGAGAAAAGAAGTAC TCGAACAAGATTGTCTACAGAAACAGGCTTTGCACTTCTGGGAGG ACATCCTGTTTCTTACCACACAAGATATTCATTTGGGTGTGAAT GAAAGTCTCACGGACACGGCCCGTATTGTCTAGCATGGCAGAT GCAGTATTGGCTCGAGTGTATAACAATCAGATTTGGACACCCTG GCTAAAGAAGCATCCATCCCAATTATCAATGGGCTGTCAGATTTGT ACCATCCTATCCAGATCCTGGCTGATTACCTCACGCTCCAGGAACA CTATAGCTCTCTGAAAGGTCTTACCCTCAGCTGGATCGGGGATGGG AACAATATCCTGCACCTCATCATGATGAGCGCAGCGAAATTCGGA ATGCACCTTCAGGCAGCTACTCCAAGGGTTATGAGCCGGATGCT AGTGTAAACCAAGTTGGCAGAGCAGTATGCCAAAGAGAATGGTACC AAGCTGTTGCTGACAAATGATCCATTGGAAGCAGCGCATGGAGGC AATGTATTAATTACAGACACTTGGATAAGCATGGGACAAGAAGAG GAGAAGAAAAGCGGCTCCAGGCTTCCAAGGTTACCAGTTACA ATGAAGACTGCTAAAGTTGCTGCCTCTGACTGGACATTTTACACT GCTTGCCAGAAAGCCAGAAGAAGTGGATGATGAAGTCTTTTATT CTCCTCGATCACTAGTGTCCAGAGGCAGAAAACAGAAAGTGA CAATCATGGCTGTCATGGTGTCCCTGCTGACAGATTACTACCTCA GCTCCAGAAGCCTAAATTTGA
Последо- ватель- ность белка ОТС человека	(SEQ ID NO: 5) MLFNLRIILLNNAEFRNGHFMVRNFRFCGQPLQNKVQLKGRDLLTLK NFTGEEIKYMLWLSADLKFRKQKGEYLPPLQKSLGMIFEKRSTRTR LSTETGFALLGGHPCFLTQDIHLGVNESLTDARVLSMMAVAVLARV YKQSDLDTLAKEASIPHINGLSDLYHPIQLADYLTQEHYSSLKGLTSL WIGDGNLHSHIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAK ENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLITDWTWISMGQEEKKRLQAFQGYQ VTMKTAKVAASDWTFHLHCLPRKPEEVDDEVFYSRSLVFPEAENRK WTIMAVMVSLTLDYSPQLQPKF

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA представляет собой mRNA ОТС человека дикого типа последовательности (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность hОТС. В некоторых вариантах осуществления подходящая кодон-оптимизированная mRNA может кодировать аминокислотную последовательность ОТС, представленную в табл. 1 под SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 5. Иллюстративные подходящие кодон-оптимизированные последовательности mRNA описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3

```
AUGCUGUUAACCUUCGGAUCUUGCUGAACAACGCUGCGUCCGGAU
GGUCACAACUUAUGGUCCGGAACUUCAGAU GCGGCCAGCCGCUCCAGAACA
AGGUGCAGCUCAAGGGGAGGGACCUCCACCCUGAAAAACUUCACCGGAGA
AGAGAUCAAGUACAUGCUGUGGUCUGCAGCCGACCUAAAUCCGGAUCAAG
CAGAAGGGCGAAUACCUUCCUUGCUGCAGGAAAGUCCUGGGGAUGAUUC
UCGAGAAGCGCAGCACUCGCACUAGACUGUCAACUGAAACCGGCUUCGCGCU
GCUGGGAGGACACCCUGCUUCCUGACCACCCAAGAUUCCAUCUGGGUGUG
AACGAAUCCUCACCGACACAGCGGGUGUCUGUCUCCAUGGCAGACGCGG
UCCUCGCCCCGUGUACAAGCAGUCUGAUCUGGACACUCUGGCCAAGGAAGC
```

CUCCAUCCUAUCAUUAUGGAUUGUCCGACCUCUACCAUCCCAUCCAGAAU
 CUGGCCGAUUAUCUGACUCUGCAAGAACAUAACAGCUCUCCUGAAGGGGCUUA
 CCCUUUCUGUGGAUCGGGACGGCAACAUAUCUGCACAGCAUUAUGAUGAG
 CGCUGCCAAGUUUGGAAUGCACCUCUACAGCAGCAGCCCGAAGGGAUACGAG
 CCAGACGCCUCCGUGACGAAGCUGGCUGAGCAGUACGCCAAGGAGAACGGCA
 CUAAGCUGCUGCUCACCAACGACCCUCUCGAAGCCGCCACGGUGGCAACGU
 GCUGAUCACCGAUACCGGAUCUCCAUGGGACAGGAGGAGAAAAGAAGAAG
 CGCCUGCAAGCAUUCAGGGGUACCAGGUGACUAUGAAAACCGCCAAGGUCG
 CCGCCUCGGACUGGACCUUCUUGCACUGUCUGCCAGAAAGCCCGAAGAGGU
 GGACGACGAGGUGUUCUACAGCCCGGGUCGUGGUCUUUCCGGAGGCCGAA
 AACAGGAAGUGGACUAUCAUGGCCGUGAUGGUGUCCUGCUGACCGAAUACU
 CCCCAGCUGCAGAAACCAAGUUCUGA (SEQ ID NO: 3)

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6

AUGCUUUUCAACCGAGAAUUCUGCUGAACAACGACGCCUCCGCAAC
 GGACACAACUUAUGGUCCGGAACUUCAGAUCCGACAAACCGCUGCAGAACA
 AGGUCCAGCUCAAGGGUCGGGACCUGUUGACUCUUAAGAAUUUACCGGAGA
 AGAAUCAAGUACAUGCUGUGGCUGUCCGCCACCUGAAGUUUCGAUCAAG
 CAGAAGGGGAGUACCUCCCCUGCUGCAAGGAAAGUCCUGGGAUGAAUUU
 UCGAGAAGCGCUCCACCCGACUAGACUUUCCACCGAAACCGGCUUCGCUCU
 GCUGGGCGGACAUCCUUGCUUUCUGACGACUCAGGACAUCCACCUCGGAGUG
 AACGAAUCCUCACCGAUACCGCCAGGGUGCUGAGCAGCAUGGCCGACGCUG
 UGCUGGCUCGGGUGUACAAGCAGUCCGACCUCGACACCUCGGCCAAGGAAGC
 CUCGAUCCCUAUCAUCAAUGGCCUGUCAGACCUGUACCACCCAAUCCAGAAU
 CUGGCCGACUACCUGACUCUCCAAGAGCACUACAGCAGCCUCAAGGGGCUCA
 CAUUGUCCUGGAUCGGGACGGCAACAACAUCCUUCACUCCAUAUGAUGUC
 GGCCGCCAAAUUCGGGAUGCAUCUGCAGGCAGCCACCCUAAAGGGAUACGAG
 CCCGAUGCCUCCGUGACCAAGCUCGCCGAACAGUAUGCGAAGGAGAACGGCA
 CCAAGCUCUCCUGCUCACUAACGAUCCGUUGGAAGCUGCCACGGCGGAAACGU
 GCUGAAUACCGACACCUGGAUCAGCAUGGGGACGGAAGAAGAGAAGAAGAAG
 CGGCUGCAGGGGUUUCAGGGUUACCAAGUCACCAUGAAAACUGCCAAAGUCG
 CGCAUCCGACUGGACUUUCCUGCACUGUCUGCCGAGGAAACAGAGGAAGU
 GGAUGACGAAGUGUUCUACUCACCCCGGUCGUGGUGUUCGGGAAGCGGAG
 AACCGGAAGUGGACCAUCAUGGCCGUGAUGGUGUCGUCGUCACCGAAUACU
 CUCCGCAACUGCAGAAGCCCAAGUUCUGA (SEQ ID NO: 6)

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7

AUGCUUUUAACCGAGAAUUCUGCUGAACAACGCGCGUUCAGGAAAC
 GGCCACAUUUAUGGUCCGCAACUUUAGAUGCGGACAGCCUCUCCAAAACA
 AGGUCCAGCUCAAGGGGCGGACUUGCUGACCCUUAAGAACUUUACCGGCGA
 AGAGAUCAGUACAUGCUGUGGUUGUCAGCGGACCUGAAGUUCGCAUCAAG
 CAGAAAGGGGAGUUCUGCCGUGCUCCAAGGAAAGUCGUCGGCAUGAUCU
 UCGAGAAGCGCUCGACCAGAACCCGGCUGUCCACUGAAACUGGUUUCGCCC
 UCUGGGUGGACACCCUUGUUCUCCUGACAACCCAGGACAUCCAUCUGGGCGUG
 AACGAAAGCCUCACUGACACCGCCAGGGUGCUGAGCUCAUGGCCGACGCUG
 UCCUUGCCCGGGUGUACAAGCAGUCCGAUCUGGACACUCUGGCAAGGAAGC
 GUCCAUCCGUAUUAACGGACUUGCCGACCUGUACCACCCGAUCCAGAAU
 CUGGCCGACUACCUGACCUUGCAAGAGCACUACAGCUCACUGAAGGGCUUGA
 CCCUGAGCUGGAUCGGGACGGAACAACAUAUCUGCAUUCGAUCAUGAUGUC
 CGCGGCAAGUUCGGAUUGCAUCUGCAGGCCCAACUCCAAAGGGAUACGAA
 CCUGAUGCGUCCGUGACUAAGCUGGCCGAGCAGUACGAAAGGAAAACGGCA
 CCAAGCUGCUGCUGACCAACGACCCGUCGAAGCUGCCCACGGAGGGAACGU
 GCUCAUUAACCGACACUUGGAUCUCCAUGGGGACGGAAGAAGAGAAGAAGAAG
 CGGCUCACCGAAUCCAGGGUUAACAGGUCACCAUGAAAACGGCCAAAGUGG
 CCGCUUCGGAUUGGACUUUCCUCCACUGCCUUCGCCAAACCGAGGAAGU
 GGAUGAUGAAGUGUUCUACUCCCCACGCUCUCCUGGUGUUCGCCGAGGCCGAG
 AAUCGGAAGUGGACCAUUAUGGCCGUGAUGGUGUCACUGCUGACCGACUACA
 GCCCCAACUGCAAAAGCCGAAGUUCUGA (SEQ ID NO: 7)

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8

AUGCUGUUCAACCCUGGAUCCUCCAACAACGCCGCGUUCGCAACG
GCCACAACUUCUAUGGUCCGGAUUUCCGAUGCGGACAGCCACUGCAGAACA
GGUCCAGCUGAAGGGCCGGGACUUGCUGACUCUCAAGAACUUUACCGGGGAA
GAAUCAAGUACAUGCUGUGGCUUUCCGCCGACCUGAAGUUCAGAAUCAAGC
AGAAGGGCGAAUUCUCCCCUGCUGCAAGGAAAGAGCCUGGGCAUGAUUUU
CGAGAAGAGAUCGACACGCACCCGGCUGUCCACCGAGACUGGGUUUGCCUG
CUGGGAGGACACCCGUGUUUCCUGACCACCAAGAUUCCAUCUCGGAGUGA
ACGAAUCCCUACUGACACUGCCCGCGUGUUGUCCUCAUGGCUGAUGCAGU
GCUCGCUCGGGUGUACAAGCAGAGCGACCUGGACACUCUGGCGAAGGAAGCC
UCAAUUCCUAUCAUUAACGGGCUGUCGGACCUGUACCACCCGAUCCAGAUUC
UGGCCGACUACCUGACCCUGCAAGAACACUACUCAAGCCUGAAGGGUUCUAC
CCUGUCCUGGAUCGGCGACGGCAACAACUCCUGCACUCCAUCAUGAUGUCG
GCCGCGAAGUUCGGAUUGCACCUCUCCAAGCAGCGACUCCGAAGGGUUCGAGC
CAGAUGCCUCCGUGACCAAGCUGGGCGGAGCAGUACGCUAAGGAAAACGGAAC
CAAGCUGCUGCUCACUAACGACCCGUUGGAAGCCGCCAUGGGGAAAUGUG
CUGAUCACGGAUACCUGGAUCAGCAUGGGCCAGGAGGAAGAGAAGAAGAAA
GGUCCAGGCCUCCAAGGGUACCAGGUCACCAUGAAAACCGCCAAAAGUCGC
CGAUCCGAUUGGACCUUCCUCCACUGCCUGCCUCGGAAGCCUGAAGAGGUC
GACGACGAAGUGUUCUACUCUCCCCGCUCCUUGUGUUCGCCGAGCCGAGA
ACAGGAAGUGGACCAUUAUGGCCGUGAUGGUGUCGCUCCUGACCGACUACAG
CCCGCAGCUGCAGAAGCCCAAGUUCUGA (SEQ ID NO: 8)

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9

AUGCUGUUCAUUCUGGAUCCUGCUGAACAACGCCGCCUUUCGGAAC
GGGCACAACUUCUAUGGUCCGCAACUUCGCGUGGACAGCCGUCGAGAACA
AGGUCCAGCUUAAGGGCCGGGACUCCUGACCCUGAAGAACUUUACCGGAGA
AGAAAUCAAGUACAUGCUCUGGCUGAGCGCCGACCUCAAGUUCGGAUUAA
CAGAAGGGGGAGUACCUCCCGUGCUUCAAGGAAAGUCCUUGGGGAUGAUCU
UCGAGAAGCGGAGCACUAGGACCAGGCUGUCGACCGAAACGGGCUUUGCACU
GCUGGGUGGACACCAUGCUUCCUGACCACCAAGAUUUAUCUCGCGGUG
AACGAAUCCUUGACUGACACUGCGCGGUCUCCUCUACUGAUGGCUGAUGCCG
UGUUGGCUAGAGUGUACAAGCAGUCAGACCUGGACACUCUGGCUAAGGAAG
CUCCAUUCGUAUCAACGGCCUGUCCGACCUGUACCACCCGAUUCAGAUU
CUGGCCGACUACCUGACCUGCAAGAGCACUAUUCGAGCCUUAAGGGUUGA
CCCUGUCCUGGAUCGGCGACGGAAACAUAUCUUGCACUCCAUAUGAUGUC
CGCCGCAAGUUCGGCAUGCAUCUCCAAGCCGCGACUCCUUAAGGGUUCGAG
CCCGACGAUCCGUGACAAAACUGGCCGAGCAGUACGCGAAGGAAAACGGUA
CCAAGCUCUCCUGACCAUAUGAUCCUCUGAGGCUGCGCACGGAGGAAACGU
GCUAUCACCGACACCUGGAUCAGCAUGGGACAGGAAGAGGAAAAGAAAAAG
CGCCUGCAGGAUUCAGGGCUACCAAGUCACUAUGAAAACCGCCAAAGUGG
CCGCCUCGGAUUGGACCUUCCUACUGCCUGCCAAGAAAGCCUGAGGAAGU
GGACGACGAAGUGUUCUACUCCCCCGCUCUCUGUGUUCGCCGAGGCCGAG
AACCGGAAGUGGACCAUCAUGGCCGUGAUGGUGUCACUGCUCACUGACUACA
GCCCCGAGCUGCAGAAGCCCAAGUUCUA (SEQ ID NO: 9)

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA может представлять собой кодон-оптимизированную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10

AUGCUGUUCAACCCUGGAUUCUGCUGAACAACGCCGCUUUCGCAACG
GCCACAACUUCUAUGGUCCGGAACUUCAGAUCCGGCCAGCCGUUCGAGAACA
GGUCCAGCUUAAGGGACGCGAUCUGCUGACCCUGAAGAACUUCACCGGAGAG
GAAAUCAAGUAUUGCUGUGGCUCUCGGCCGACCUGAAGUUCAGGAUCAAGC
AGAAGGGGGAGUACCUCCCGCUGUUGCAAGGAAAGUCCUUGGGCAUGAUUUU
CGAGAAGCGCUCAACUCGCACCAGGCUCUCCACCGAAAACUGGUUUUGCCCUU
CUGGGCGGUAUCCUUGCUUUCUGACGACCCAGGACAUUACCUCGGAGUGA
AUGAGAGCCUGACCGACACUGCCAGAGUGCUGUCCUCAUGGCGGAUGCAGU
GUUGGCGGGGUGUACAAGCAGUCAGACCUGGACACCCUGGCGAAGGAAGCG

UCAAUCCCAUCAUUAACGGACUGAGCGACCUGUACCACCCGAUCCAGAUC
 UCGCCGACUACCUGACUCUCCAAGAACACUACUCGUCCUGAAAGGGGUGAC
 CUUGAGCUGGAUCGGCGACGGCAACAACUCCUGCAUCCAUGAUGAGC
 GCCCAAGUUCGGAUUGCACCUUCAAGCCGCAACCCGAAGGGCUACGAGC
 CGGAUGCCUCGGUGACCAAGCUGGCCGAGCAGUACGCCAAGGAAAACGGGAC
 CAAGCUGCUGCUCACUAACGACCCUCUGGAAGCUGCUCACGGGGAAAACGUG
 CUGAUCACCGACACCUGGAUUCCAUGGGACAGGAAGAAGAGAAAAAGAAGC
 GGCUUCAGGGUUCAGGGUACCAAGUCACCAUGAAAACCGCCAAAGUGGC
 AGCCAGCGACUGGACUUUCCUGCAUUGUCUCCUCGGAAGCCUGAGGAAGUG
 GAUGACGAAGUGUUUACUCUCCCCGUCUCCUGGUGUCCCGGAGGCCGAGA
 ACCGGAAGUGGACUAUCAUGGCCGUGAUGGUGUCCUCCUGACCGAUUACUC
 CCCACAACUGCAGAAGCCCAAGUUCUGA (SEQ ID NO: 10)

Дополнительные иллюстративные последовательности mRNA описаны в разделе "Примеры" ниже, например, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, все из которых содержат нетранслируемые 5'- и 3'-области, обрамляющие кодон-оптимизированную ОТС-кодирующую mRNA.

В некоторых вариантах осуществления подходящая последовательность mRNA может представлять собой последовательность mRNA гомолога или аналога белка ОТС человека. Например, гомолог или аналог белка ОТС человека может представлять собой модифицированный белок ОТС человека, содержащий одну или более замен, делеций и/или вставок аминокислот при сравнении с принадлежащим к дикому типу или встречающимся в природе белком ОТС с сохранением при этом по сути активности белка ОТС. В некоторых вариантах осуществления mRNA, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше гомологичную SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления mRNA, подходящая для настоящего изобретения, кодирует белок, практически идентичный белку ОТС человека. В некоторых вариантах осуществления mRNA, подходящая для настоящего изобретения, кодирует аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентичную SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления mRNA, подходящая для настоящего изобретения, кодирует фрагмент или часть белка, практически идентичного белку ОТС человека. В некоторых вариантах осуществления mRNA, подходящая для настоящего изобретения, кодирует фрагмент или часть белка ОТС человека, при этом фрагмент или часть белка все еще сохраняют активность ОТС, аналогичную таковой белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления mRNA, подходящая для настоящего изобретения, имеет нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентичную SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления подходящая mRNA кодирует слитый белок, представляющий собой полноразмерный белок ОТС, его фрагмент или часть, слитые с другим белком (например, слияние на N- или C-конце). В некоторых вариантах осуществления белок, слитый с mRNA, кодирующей полноразмерный белок ОТС, его фрагмент или часть, кодирует сигнальную или нацеливающуюся на клетки последовательность.

Средства доставки.

В соответствии с настоящим изобретением, mRNA, кодирующая белок ОТС, (например, полноразмерный белок ОТС, его фрагмент или часть), описанная в данном документе, может быть доставлена в виде "голой" РНК (неупакованной) или с помощью средств доставки. Используемые в данном документе термины "средство доставки", "средство переноса", "наночастица" или грамматические эквиваленты используются взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующие белок ОТС, могут быть доставлены с помощью одного средства доставки. В некоторых вариантах осуществления mRNA, кодирующие белок ОТС, могут быть доставлены с помощью одного или более средств доставки, каждое из которых имеет разный состав. В соответствии с различными вариантами осуществления подходящие средства доставки включают без ограничения носители на основе полимеров, такие как полиэтилениминовые (PEI), липидные наночастицы и липосомы, нанолипосомы, церамидсодержащие нанолипосомы, протеолипосомы, как природные, так и синтетически полученные экзосомы, природные, синтетические и полусинтетические однослойные тельца, наночастицы, наночастицы на основе кальций-фосфор-силикатов, наночастицы на основе фосфата кальция, наночастицы на основе диоксида кремния, нанокристаллические частицы, полупроводниковые наночастицы, поли(D-аргинин), золь-гели, нанодендримеры, системы доставки на основе крахмала, мицеллы, эмульсии, ниосомы, многодоменные блок-полимеры (виниловые полимеры, полимеры на основе полипропила и акриловой кислоты, динамические поликонъюгаты), составы на основе сухого порошка, плазмиды, вирусы, нуклеотиды на основе фосфата кальция, аптамеры, пептиды и другие векторные метки.

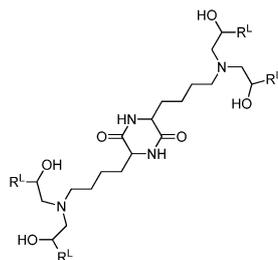
антах осуществления каждый из R^L независимо представляет собой C_{10} алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый из R^L независимо представляет собой $n-C_{10}$ алкил.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R^2 независимо представляет собой водород или метил; каждый из q независимо равняется 3-5; каждый из R^1 независимо представляет собой водород или метил; и каждый из R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R^2 представляет собой водород; каждый из q независимо равняется 3-5; каждый из R^1 представляет собой водород; и каждый из R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R^2 представляет собой водород; каждый из q равняется 4; каждый из R^1 представляет собой водород; и каждый из R^L независимо представляет собой C_{8-12} алкил.

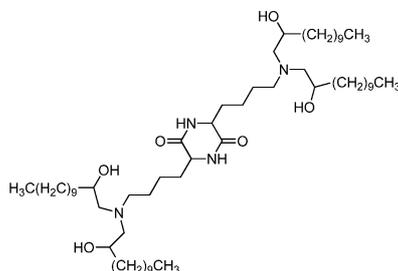
В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой соединение формулы I-g



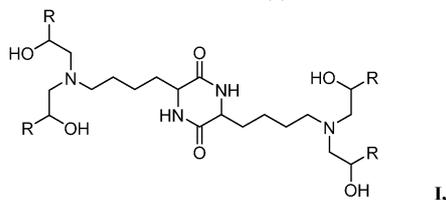
I-g.

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

В конкретных вариантах осуществления предусмотренные липосомы включают в себя катионный липид сКК-Е12 или (3,6-бис-(4-(бис-(2-гидроксидодецил)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион). Структура сКК-Е12 представлена ниже.



Дополнительные иллюстративные катионные липиды включают таковые формулы I



I,

и их фармацевтически приемлемые соли,

где R представляет собой ("OF-00"),

R представляет собой ("OF-01"),

R представляет собой ("OF-02") или

R представляет собой ("OF-03")

(см., например, Fenton, Owen S., et al. "Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery". *Advanced materials* (2016)).

В некоторых вариантах осуществления один или более катионных липидов могут представлять собой N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония хлорид или "DOTMA" (Feigner et al. (*Proc. Nat'l Acad. Sci.* 84, 7413 (1987); патент США № 4897355). DOTMA может быть составлен отдельно или может быть объединен с нейтральным липидом, диолеилфосфатидилэтаноломином или "DOPE", или другими катионными или некаатионными липидами в липосомальном средстве переноса или липидной наночастице, и такие липосомы можно применять для улучшения доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Другие подходящие катионные липиды включают, например, 5-карбоксии-

спермилглициндиокадещиламид, или "DOGS", 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)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-диолеоил-3-диметиламмония пропан, или "DODAP", 1,2-диолеоил-3-триметиламмония пропан, или "DOTAP".

Дополнительные иллюстративные катионные липиды 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-дилинолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан, или "DLenDMA", N-диолеил-N,N-диметиламмония хлорид, или "DODAC", N,N-диастерил-N,N-диметиламмония бромид, или "DDAB", N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония бромид, или "DMRIE", 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(пис,цис-9,12-октадекадиенокси)пропан, или "CLinDMA", 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-диметил-1-1-(цис,цис-9',1-2'-октадекадиенокси)пропан, или "CpLinDMA", N,N-диметил-3,4-диолеилксбензиламин, или "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-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан, или "DLin-K-ХТС2-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, D.V., et al., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); публикация согласно РСТ WO2005/121348A1). В некоторых вариантах осуществления один или более катионных липидов содержат по меньшей мере один фрагмент имидазола, диалкиламино или гуанидина.

В некоторых вариантах осуществления один или более катионных липидов могут быть выбраны из ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана), МСЗ (((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-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-диамида), DODAP (1,2-диолеил-3-диметиламмония пропана), HGT4003 (WO 2012/170889, идеи которой включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), ICE (WO 2011/068810, идеи которой включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), HGT5000 (предварительная заявка на патент США № 61/617468, идеи которой включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) или HGT5001 (цис или транс) (предварительная заявка на патент США № 61/617468), аминоксольлипидоидов, таких как раскрытые в WO 2010/053572, DOTAP (1,2-диолеил-3-триметиламмония пропана), DOTMA (1,2-ди-О-октадещенил-3-триметиламмония пропана), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Brenner, 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).

В некоторых вариантах осуществления процентное содержание катионного липида в липосоме может составлять более 10%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60% или более 70%. В некоторых вариантах осуществления катионный(катионные) липид(липиды) составляет(составляют) приблизительно 30-50% (например, приблизительно 30-45%, приблизительно 30-40%, приблизительно 35-50%, приблизительно 35-45% или приблизительно 35-40%) липосомы по весу. В некоторых вариантах осуществления катионный липид (например, сКК-Е12) составляет приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% липосомы по молярному соотношению.

Некатионные/вспомогательные липиды.

В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы содержат один или более некатионных ("вспомогательных") липидов. Используемая в данном документе фраза "некатионный липид" относится к любому нейтральному, цвиттер-ионному или анионному липиду. Используемая в данном документе фраза "анионный липид" относится к любому из ряда липидных молекул, которые несут суммарный отрицательный заряд при определенном значении pH, таком как физиологическое значение pH. Некатионные липиды включают без ограничения дистеарилолфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфэтаноламин (DMPE), дистеарилолфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеарилол-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE) или их смесь.

В некоторых вариантах осуществления такие некатионные липиды могут применяться отдельно,

однако применяются предпочтительно с другими вспомогательными веществами, например, катионными липидами. В некоторых вариантах осуществления некаатионный липид может составлять от приблизительно 5% до приблизительно 90% или от приблизительно 10% до приблизительно 70% в молярном соотношении от всех липидов, присутствующих в липосоме. В некоторых вариантах осуществления некаатионный липид представляет собой нейтральный липид, т.е. липид, который не несет суммарного заряда в условиях, при которых композицию составляют и/или вводят. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание некаатионного липида в липосоме может составлять более 5%, более 10%, более 20%, более 30% или более 40%.

Липиды на основе холестерина.

В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы содержат один или более липидов на основе холестерина. Например, подходящие катионные липиды на основе холестерина включают в себя, например, DC-Choi (N,N-диметил-N-этилкарбоксамидоcholesterol), 1,4-бис-(3-N-олеиламинопропил)пиперазин (Gao, et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179, 280 (1991); Wolf et al. *Bio-Techniques* 23, 139 (1997); патент США № 5744335) или ICE. В некоторых вариантах осуществления липид на основе холестерина может составлять от приблизительно 2% до приблизительно 30% или от приблизительно 5% до приблизительно 20% в молярном соотношении от всех липидов, присутствующих в липосоме. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание липида на основе холестерина в липидной наночастице может составлять более 5%, более 10%, более 20%, более 30% или более 40%.

Пегилированные липиды.

В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы содержат один или более пегилированных липидов. Например, применение полиэтиленгликоль(PEG)-модифицированных фосфолипидов и дериватизированных липидов, таких как дериватизированные церамиды (PEG-CER), в том числе N-октаноилсфингозин-1-[сукцинил(метоксиполиэтиленгликоль)-2000] (церамид C8 PEG-2000), также предусмотрено настоящим изобретением в комбинации с одним или более катионных и, в некоторых вариантах осуществления, других липидов, которые вместе составляют липосому. Предусмотренные PEG-модифицированные липиды включают без ограничения полиэтиленгликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с алкильной(алкильными) цепью (цепями), длиной C₆-C₂₀. В некоторых вариантах осуществления PEG-модифицированный или пегилированный липид представляет собой пегилированный холестерин или PEG-2K. Добавление таких компонентов может обеспечивать предупреждение агрегации комплексов и может также обеспечивать средства для увеличения времени полужизни и повышения доставки композиции на основе липида и нуклеиновой кислоты 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).

В некоторых вариантах осуществления особенно пригодные подлежащие обмену липиды представляют собой PEG-церамиды, имеющие более короткие ацильные цепи (например, C₁₄ или C₁₈). PEG-модифицированные фосфолипиды и дериватизированные липиды по настоящему изобретению могут составлять от приблизительно 0% до приблизительно 15%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 15%, от приблизительно 1% до приблизительно 15%, от приблизительно 4% до приблизительно 10% или приблизительно 2% в молярном соотношении от всех липидов, присутствующих в липосоме.

В соответствии с различными вариантами осуществления выбор катионных липидов, некаатионных липидов и/или PEG-модифицированных липидов, которые составляют липидную наночастицу, а также относительное молярное соотношение таких липидов друг к другу основаны на характеристиках определенного(определенных) липида (липидов), на природе предполагаемых клеток-мишеней, на характеристиках mRNA, подлежащей доставке. Дополнительные факторы включают, например, насыщение алкильной цепи, а также размер, заряд, значение pH, pKa, фузогенность и токсичность выбранного(выбранных) липида (липидов). Таким образом, молярные соотношения могут быть отрегулированы соответствующим образом.

Полимеры.

В некоторых вариантах осуществления подходящее средство доставки составлено с использованием полимера в качестве носителя отдельно или в комбинации с другими носителями, в том числе различными липидами, описанными в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления липосомальные средства доставки, применяемые в данном документе, также охватывают полимерсодержащие наночастицы. Подходящие полимеры могут включать, например, полиакрилаты, полиалкилпианоакрилаты, полиактид, сополимеры полиактида и полигликолида, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, протамин, пегилированный протамин, PLL, пегилированный PLL и полиэтиленмин (PEI). При наличии PEI он может представлять собой разветвленный PEI с молекулярным весом от 10 до 40 кДа, например, разветвленный PEI размером 25 кДа (Sigma, № 408727).

Подходящая липосома для настоящего изобретения может содержать один или более любых из катионных липидов, некаатионных липидов, липидов на основе холестерина, пегилированных липидов и/или полимеров, описанных в данном документе, в различных соотношениях. В качестве неограничивающих примеров подходящий состав липосом может включать комбинацию, выбранную из сКК-E12,

DOPE, холестерина и DMG-PEG2K; C12-200, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K; HGT4003, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K; или ICE, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K.

В различных вариантах осуществления катионные липиды (например, сКК-E12, C12-200, ICE и/или HGT4003) составляют приблизительно 30-60% (например, приблизительно 30-55%, приблизительно 30-50%, приблизительно 30-45%, приблизительно 30-40%, приблизительно 35-50%, приблизительно 35-45% или приблизительно 35-40%) в молярном соотношении от липосомы. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание катионных липидов (например, сКК-E12, C12-200, ICE и/или HGT4003) составляет или составляет более приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55% или приблизительно 60% в молярном соотношении от липосомы.

В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов) к некатионному(некатионным) липиду(липидам) и к пегилированному(пегилированным) липиду(липидам) может составлять приблизительно 30-60:25-35:20-30:1-15 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов) к некатионному(некатионным) липиду(липидам), к липиду(липидам) на основе холестерина и к пегилированному(пегилированным) липиду(липидам) составляет примерно 40:30:20:10 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов) к некатионному(некатионным) липиду(липидам), к липиду(липидам) на основе холестерина и к пегилированному(пегилированным) липиду(липидам) составляет примерно 40:30:25:5 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов) к некатионному(некатионным) липиду(липидам), к липиду(липидам) на основе холестерина и к пегилированному(пегилированным) липиду(липидам) составляет примерно 40:32:25:3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления соотношение катионного(катионных) липида(липидов) к некатионному(некатионным) липиду(липидам), к липиду(липидам) на основе холестерина и к пегилированному(пегилированным) липиду(липидам) составляет примерно 50:25:20:5.

Синтез mRNA.

mRNA в соответствии с настоящим изобретением могут быть синтезированы в соответствии с любым из множества известных способов. Например, mRNA в соответствии с настоящим изобретением могут быть синтезированы с помощью транскрипции *in vitro* (IVT). Вкратце, IVT обычно осуществляют с помощью линейной или кольцевой матрицы ДНК, содержащей промотор, пула рибонуклеотидтрифосфатов, буферной системы, которая может содержать ДТТ и ионы магния, и соответствующей РНК-полимеразы (например, РНК-полимеразы Т3, Т7 или SP6), ДНКазы I, пирофосфатазы и/или ингибитора РНКазы. Точные условия будут варьировать в зависимости от конкретного применения.

В некоторых вариантах осуществления для получения mRNA в соответствии с настоящим изобретением матрицу ДНК транскрибируют *in vitro*. Подходящая матрица ДНК обычно имеет промотор, например, промотор Т3, Т7 или SP6, для транскрипции *in vitro*, за которым следуют необходимая нуклеотидная последовательность для требуемой mRNA и сигнал терминации.

Модифицированная mRNA.

В некоторых вариантах осуществления mRNA в соответствии с настоящим изобретением может быть синтезирована в виде немодифицированной или модифицированной mRNA. Обычно mRNA модифицируют для повышения стабильности. Модификации mRNA могут включать в себя, например, модификации нуклеотидов РНК. Таким образом, модифицированная mRNA в соответствии с настоящим изобретением может включать, например, модификации остова, модификации сахаров или модификации оснований. В некоторых вариантах осуществления mRNA могут быть синтезированы из встречающихся в природе нуклеотидов и/или аналогов нуклеотидов (модифицированных нуклеотидов), в том числе без ограничения пуринов (аденина (А), гуанина (G)) или пиримидинов (тимина (Т), цитозина (С), урацила (U)), и в виде модифицированных аналогов нуклеотидов или производных пуринов и пиримидинов, таких как, например, 1-метиладенин, 2-метиладенин, 2-метилтио-N-6-изопентиладенин, 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-метилюридин, псевдоурацил (5-урацил), дигидроурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-(карбоксихидроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-броморурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-метилурацил, N-урацил-3-оксиуксусной кислоты сложный метиловый эфир, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 5'-метоксикарбонилметилурацил, 5-метоксиурацил, урацил-5-оксиуксусной кислоты сложный метиловый эфир, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), 1-метилпсевдоурацил, квеозин, бета-D-маннозилквеозин, вибутоксоин и фосфорамидаты, фосфотиоаты, пептидные нуклеотиды, метилфосфонаты, 7-дезазагуозин, 5-метилхитозин и инозин. Получение таких аналогов известно специалисту в данной области, 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, раскрытия которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

сигнала полиаденилирования, связывающего участка белков, которые оказывают влияние на стабильность положения mRNA в клетке или одного или более связывающих участков miRNA. В некоторых вариантах осуществления нетранслируемая 3'-область может иметь длину от 50 до 500 нуклеотидов или больше.

Кэп-структура.

В некоторых вариантах осуществления mRNA содержат 5'-кэп-структуру. Обычно добавление 5'-кэп-структуры происходит следующим образом: во-первых, РНК-концевая фосфатаза удаляет одну из концевых фосфатных групп из 5'-нуклеотида, оставляя два концевых фосфата; затем гуанозинтрифосфат (GTP) добавляется к концевым фосфатам с помощью гуанилилтрансферазы, что приводит к образованию 5'5'-трифосфатной связи; а азот в положении 7 гуанина затем метилируется метилтрансферазой. Примеры кэп-структур включают без ограничения $m^7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A$ и $G(5')ppp(5')G$.

Встречающиеся в природе кэп-структуры содержат 7-метилгуанозин, который связан с помощью трифосфатного мостика с 5'-концом первого транскрибируемого нуклеотида, что приводит к образованию динуклеотидного кэпа $m^7G(5')ppp(5')N$, где N представляет собой любой нуклеозид. In vivo кэп добавляется ферментативным путем. Кэп добавляется в ядре и катализируется с помощью фермента гуанилилтрансферазы. Добавление кэпа к 5'-концевому участку РНК происходит непосредственно после инициации транскрипции. Концевой нуклеозид обычно представляет собой гуанозин и находится в обратной ориентации по отношению ко всем другим нуклеотидам, т.е. $G(5')ppp(5')GpNpNp$.

Распространенной кэп-структурой для mRNA, образующейся в результате in vitro транскрипции, является $m^7G(5')ppp(5')G$, которая применялась в качестве динуклеотидной кэп-структуры при транскрипции с помощью РНК-полимеразы T7 или SP6 in vitro с получением РНК, имеющих кэп-структуру на своих 5'-концах. В преобладающем способе синтеза in vitro кэпированной mRNA применяется предварительно образованный динуклеотид в форме $m^7G(5')ppp(5')G$ (" m^7GpppG ") в качестве инициатора транскрипции.

К настоящему времени обычной формой синтетического динуклеотидного кэпа, применяемого в экспериментах с трансляцией in vitro, является аналог кэп-структур для прямой ориентации ("ARCA"), или модифицированный ARCA, который, как правило, представляет собой модифицированный аналог кэп-структур, в котором 2'- или 3'-ОН-группа замещена $-OCH_3$.

Дополнительные аналоги кэп-структур включают без ограничения химические структуры, выбранные из группы, состоящей из m^7GpppG , m^7GpppA , m^7GpppC ; неметилированные аналоги кэп-структур (например, $GpppG$); диметилированный аналог кэп-структур (например, $m^{2,7}GpppG$), триметилированный аналог кэп-структур (например, $m^{2,2,7}GpppG$), диметилированные симметричные аналоги кэп-структур (например, m^7Gpppm^7G) или аналоги кэп-структур для прямой ориентации (например, ARCA; $m^{7,2'OMe}GpppG$, $m^{7,2'd}GpppG$, $m^{7,3'OMe}GpppG$, $m^{7,3'd}GpppG$ и их тетрафосфатные производные) (см., например, Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

В некоторых вариантах осуществления подходящий кэп представляет собой 7-метилгуанилат (" m^7G "), связанный с помощью трифосфатного мостика с 5'-концом первого транскрибируемого нуклеотида, что приводит к образованию $m^7G(5')ppp(5')N$, где N представляет собой любой нуклеозид. Предпочтительным вариантом осуществления m^7G -кэпа, применяемого в вариантах осуществления по настоящему изобретению, является $m^7G(5')ppp(5')G$.

В некоторых вариантах осуществления кэп представляет собой Cap0-структуру. Cap0-структуры характеризуются отсутствием остатка рибозы, представляющего собой 2'-О-метил, присоединенного к основаниям 1 и 2. В некоторых вариантах осуществления кэп представляет собой Cap1-структуру. Cap1-структуры имеют остаток, представляющий собой 2'-О-метил, в основании 2. В некоторых вариантах осуществления кэп представляет собой Cap2-структуру. Cap2-структуры имеют остаток, представляющий собой 2'-О-метил, присоединенный к обоим из оснований 2 и 3.

Ряд аналогов кэп-структур m^7G известен в данной области, многие из которых являются коммерчески доступными. Они включают m^7GpppG , описанный выше, а также аналоги кэп-структур ARCA 3'- OCH_3 и 2'- OCH_3 (Jemielity, J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Дополнительные аналоги кэп-структур для применения в вариантах осуществления по настоящему изобретению включают N7-бензилированные динуклеозидтетрафосфатные аналоги (описанные в Grudzien, E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004)), фосфотиоатные аналоги кэп-структур (описанные в Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007)) и аналоги кэп-структуры (в том числе биотинилированные аналоги кэп-структур), описанные в патентах США №№ 8093367 и 8304529, включенных в данный документ посредством ссылки.

"Хвостовая" структура.

Обычно наличие "хвоста" предназначено для защиты mRNA от разрушения экзонуклеазами. Считается, что поли-А-хвост стабилизирует природные матричные и синтетические смысловые РНК. Таким образом, в определенных вариантах осуществления длинный поли-А-хвост может быть добавлен к молекуле mRNA, что делает таким образом РНК более стабильной. Поли-А-хвосты могут быть добавлены с помощью ряда известных в данной области методик. Например, длинные поли-А-хвосты могут быть добавлены к синтетической или транскрибируемой in vitro РНК с помощью 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 могут быть добавлены с помощью транскрипции непосредственно из продуктов ПЦР. Поли-А также может быть лигирован с 3'-концом смысловой РНК с помощью РНК-лигазы (см., например, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991 edition)).

В некоторых вариантах осуществления mRNA содержат 3'-поли(А)-хвостовую структуру. Обычно длина поли-А-хвоста может составлять по меньшей мере приблизительно 10, 50, 100, 200, 300, 400, по меньшей мере 500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления поли-А-хвост на 3'-конце mRNA обычно содержит от приблизительно 10 до 300 нуклеотидов, представляющих собой аденозин (например, от приблизительно 10 до 200 нуклеотидов, представляющих собой аденозин, от приблизительно 10 до 150 нуклеотидов, представляющих собой аденозин, от приблизительно 10 до 100 нуклеотидов, представляющих собой аденозин, от приблизительно 20 до 70 нуклеотидов, представляющих собой аденозин или от приблизительно 20 до 60 нуклеотидов, представляющих собой аденозин). В некоторых вариантах осуществления mRNA содержат структуру 3'-поли(С)-хвоста. Подходящий поли-С-хвост на 3'-конце mRNA обычно содержит от приблизительно 10 до 200 нуклеотидов, представляющих собой цитозин (например, от приблизительно 10 до 150 нуклеотидов, представляющих собой цитозин, от приблизительно 10 до 100 нуклеотидов, представляющих собой цитозин, от приблизительно 20 до 70 нуклеотидов, представляющих собой цитозин, от приблизительно 20 до 60 нуклеотидов, представляющих собой цитозин или от приблизительно 10 до 40 нуклеотидов, представляющих собой цитозин). Поли-С-хвост может быть добавлен к поли-А-хвосту или может замещать поли-А-хвост.

В некоторых вариантах осуществления длина поли-А- или поли-С-хвоста регулируется для контроля стабильности модифицированной молекулы смысловой mRNA по настоящему изобретению и, таким образом, транскрипции белка. Например, поскольку длина поли-А-хвоста может влиять на период полужизни молекулы смысловой mRNA, то длину поли-А-хвоста можно регулировать для модификации степени устойчивости mRNA к нуклеазам и, тем самым, контроля динамики экспрессии полинуклеотидов и/или выработки полипептидов в клетке-мишени.

Нетранслируемая 5'- и 3'-область.

В некоторых вариантах осуществления mRNA содержат нетранслируемую 5'- и/или 3'-область. В некоторых вариантах осуществления нетранслируемая 5'-область содержит один или более элементов, которые оказывают влияние на стабильность или трансляцию mRNA, например, железосвязывающий элемент. В некоторых вариантах осуществления нетранслируемая 5'-область может иметь длину от приблизительно 50 до 500 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления нетранслируемая 3'-область содержит один или более из сигнала полиаденилирования, связывающего участка белков, которые оказывают влияние на стабильность положения mRNA в клетке или одного или более связывающих участков miRNA. В некоторых вариантах осуществления нетранслируемая 3'-область может иметь длину от 50 до 500 нуклеотидов или больше.

Иллюстративные 3'- и/или 5'-последовательности UTR могут быть получены из молекул mRNA, которые являются стабильными (например, глобина, актина, GAPDH, тубулина, гистона или ферментов цикла лимонной кислоты), с целью повышения стабильности молекулы смысловой mRNA. Например, 5'-последовательность UTR может содержать часть последовательности немедленно-раннего гена 1 (IE1) CMV или его фрагмента для повышения устойчивости к нуклеазам и/или увеличения периода полужизни полинуклеотида. Также предусмотрено включение последовательности, кодирующей гормон роста человека (hGH) или ее фрагмента, в 3'-конец или нетранслируемый участок полинуклеотида (например, mRNA) с целью дополнительной стабилизации полинуклеотида. Как правило, такие модификации повышают стабильность и/или фармакокинетические свойства (например, период полужизни) полинуклеотида относительно немодифицированных аналогов, и включают, например, модификации, осуществленные для повышения устойчивости таких полинуклеотидов к расщеплению нуклеазами *in vivo*.

Образование липосом.

Липосомальные средства переноса для применения в композициях по настоящему изобретению можно получать с помощью различных методик, которые известны в настоящее время в данной области. Липосомы для применения в предусмотренных композициях можно получать с помощью различных методик, которые известны в настоящее время в данной области. Например, многослойные везикулы (MLV) можно получать в соответствии со стандартными методиками, такими как отложение выбранного липида на внутренней стенке подходящей емкости или сосуда с помощью растворения липида в подходящем растворе, а затем испарения растворителя с образованием тонкой пленки на внутренней стороне сосуда, или с помощью распылительного высушивания. Затем в сосуд можно добавлять водную фазу при перемешивании на вортексе, в результате чего образуются MLV. Затем могут быть образованы однослойные везикулы (ULV) с помощью гомогенизации, обработки ультразвуком или экструзии многослойных везикул. Кроме того, однослойные везикулы могут быть образованы с помощью методик удаления детергентов.

В определенных вариантах осуществления предусмотренные композиции содержат липосому, где

mRNA как связана с поверхностью липосомы, так и инкапсулирована в той же липосоме. Например, во время получения композиций по настоящему изобретению катионные липосомы могут связываться с mRNA посредством электростатических взаимодействий. Например, во время получения композиций по настоящему изобретению катионные липосомы могут связываться с mRNA посредством электростатических взаимодействий.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению содержат mRNA, инкапсулированную в липосоме. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул mRNA могут быть инкапсулированы в одной и той же липосоме. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул mRNA могут быть инкапсулированы в разных липосомах. В некоторых вариантах осуществления mRNA инкапсулирована в одной или более липосом, которые отличаются по своему липидному составу, молярному соотношению липидных компонентов, размеру, заряду (зета-потенциалу), нацеливающим лигандам и/или их комбинациям. В некоторых вариантах осуществления одна или более липосом могут иметь разный состав катионных липидов, нейтрального липида, PEG-модифицированного липида и/или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления одна или более липосом могут характеризоваться разным молярным соотношением катионного липида, нейтрального липида, холестерина и PEG-модифицированного липида, применяемых для образования липосомы.

Процесс включения необходимой mRNA в липосому часто называется "загрузкой". Иллюстративные способы описаны в Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992, которая включена в данный документ посредством ссылки. Включенные в липосому нуклеиновые кислоты могут полностью или частично находиться во внутреннем пространстве липосомы, в бислойной мембране липосомы или связаны с наружной поверхностью мембраны липосомы. Включение нуклеиновой кислоты в липосому также называется в данном документе "инкапсулированием", при этом нуклеиновая кислота полностью содержится во внутреннем пространстве липосомы. Целью включения mRNA в средство переноса, такое как липосома, часто является защита нуклеиновой кислоты от окружающей среды, в которой могут содержаться ферменты или химические соединения, которые разрушают нуклеиновые кислоты, и/или системы или рецепторы, которые вызывают быструю экскрецию нуклеиновых кислот. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления подходящее средство доставки способно повышать стабильность mRNA, содержащейся в нем, и/или облегчать доставку mRNA в клетку-мишень или ткань-мишень.

Размер липосом.

Подходящие липосомы в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены с разными размерами. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы могут быть получены меньшего размера, чем ранее известные липосомы, инкапсулирующие mRNA. В некоторых вариантах осуществления уменьшение размера липосом связано с более эффективной доставкой mRNA. При выборе подходящего размера липосом можно принимать во внимание участок клетки-мишени или ткани-мишени и степень, в которой осуществляется применение липосомы.

В некоторых вариантах осуществления подходящий размер липосомы выбран для облегчения системного распределения антитела, кодируемого mRNA. В некоторых вариантах осуществления может быть желательным ограничение трансфекции mRNA в определенные клетки или ткани. Например, для нацеливания на гепатоциты размер липосомы может быть таким, что ее размерные параметры будут меньше, чем фенестрации эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды в печени; в таких случаях липосома могла бы легко проникать через такие фенестрации эндотелия для достижения гепатоцитов-мишеней.

Альтернативно или дополнительно размер липосомы может быть таким, что размерные параметры липосомы предусматривают достаточный диаметр для ограничения или явным образом избежания распределения в определенные клетки или ткани. Например, размер липосомы может быть таким, что ее размерные параметры являются больше, чем фенестрации эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды, с ограничением, тем самым, распределения липосом в гепатоциты.

В некоторых вариантах осуществления размер липосомы определяется по длине от наибольшего диаметра липосомальной частицы. В некоторых вариантах осуществления подходящая липосома имеет размер не более приблизительно 250 нм (например, не более приблизительно 225 нм, 200 нм, 175 нм, 150 нм, 125 нм, 100 нм, 75 нм или 50 нм). В некоторых вариантах осуществления подходящая липосома имеет размер в диапазоне приблизительно 10-250 нм (например, в диапазоне приблизительно 10-225 нм, 10-200 нм, 10-175 нм, 10-150 нм, 10-125 нм, 10-100 нм, 10-75 нм или 10-50 нм). В некоторых вариантах осуществления подходящая липосома имеет размер в диапазоне приблизительно 100-250 нм (например, в диапазоне приблизительно 100-225 нм, 100-200 нм, 100-175 нм, 100-150 нм). В некоторых вариантах осуществления подходящая липосома имеет размер в диапазоне приблизительно 10-100 нм (например, варьирующий в диапазоне приблизительно 10-90 нм, 10-80 нм, 10-70 нм, 10-60 нм или 10-50 нм). В определенном варианте осуществления подходящая липосома имеет размер приблизительно 100 нм.

Ряд альтернативных способов, известных в данной области, доступен для определения размеров в группе липосом. Один такой способ определения размеров описан в патенте США № 4737323, включенном в данный документ посредством ссылки. Обработка ультразвуком суспензии липосом с помощью или ультразвуковой ванны, или обработки ультразвуком с зондированием, приводит к прогрессивному

снижению размера до образования небольших ULV с диаметром, составляющим менее приблизительно 0,05 микрон. Гомогенизация представляет собой другой способ, который основан на применении энергии сдвига с целью фрагментации крупных липосом на более мелкие липосомы. При типичной процедуре гомогенизации MLV рециркулируют через стандартный эмульсионный гомогенизатор до тех пор, пока не будут наблюдаться липосомы определенных размеров, обычно от приблизительно 0,1 до 0,5 микрон. Размер липосомы можно определять с помощью квазиэлектрического светового рассеяния (QELS), описанного в Bloomfield, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:421-150 (1981), включенного в данный документ посредством ссылки. Средний диаметр липосом можно уменьшать с помощью обработки ультразвуком образованных липосом. Периодические циклы обработки ультразвуком могут чередоваться с оценкой QELS для контроля эффективного синтеза липосом.

Фармацевтические композиции.

Для облегчения экспрессии mRNA *in vivo* средства доставки, такие как липосомы, можно составлять в комбинации с одной или более дополнительных нуклеиновых кислот, носителей, нацеливающих лигандов или стабилизирующих реагентов, или в фармакологических композициях, в которых они смешаны с подходящими вспомогательными веществами. Методики для разработки и введения лекарственных средств могут быть обнаружены в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., самое последнее издание.

Предусмотренные инкапсулированные в липосомы или ассоциированные mRNA и композиции, содержащие их, можно вводить и дозировать согласно действующей медицинской практике, принимая во внимание клиническое состояние субъекта, участок и способ введения, схему введения, возраст, пол, массу тела субъекта и другие факторы, имеющие значение для обычных лечащих врачей в данной области. Термин "эффективное количество" для целей данного документа может быть определен с помощью таких соответствующих факторов, которые известны обычным специалистам в области экспериментальных клинических исследований, фармакологии, клинической практики и медицины. В некоторых вариантах осуществления вводимое количество является эффективным для достижения по меньшей мере некоторой стабилизации, облегчения или устранения симптомов и других показаний, выбранных в качестве подходящих показателей прогрессировать, регрессии или облегчения заболевания специалистами в данной области. Например, подходящее количество и схема дозирования представляют собой такие, которые вызывают по меньшей мере временную выработку белка (например, фермента).

Подходящие пути введения включают, например, пероральный, ректальный, вагинальный, трансмукозальный, легочный, в том числе интратрахеальный или ингаляционный, или кишечное введение; парентеральную доставку, в том числе внутривенную, трансдермальную (местную), внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные инъекции, а также интратекальный, прямой интравентрикулярный, внутривенный, интраперитонеальный или интраназальный. В конкретных вариантах осуществления внутримышечное введение осуществляется в мышцу, выбранную из группы, состоящей из скелетной мышцы, гладкой мышцы и сердечной мышцы. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к доставке mRNA в клетку мышцы. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к доставке mRNA в гепатоцит (т.е. клетку печени). В конкретном варианте осуществления внутримышечное введение приводит к доставке mRNA в клетку мышцы.

Альтернативно или дополнительно инкапсулированные в липосомы mRNA и композиции по настоящему изобретению можно вводить локальным, а не системным образом, например, посредством инъекции фармацевтической композиции непосредственно в ткань-мишень, предпочтительно в составе с пролонгированным высвобождением. На локальную доставку можно оказывать влияние множеством путей, в зависимости от ткани, подлежащей целенаправленному воздействию. Например, аэрозоли, содержащие композиции по настоящему изобретению, можно вдыхать (для назальной, трахеальной или бронхиальной доставки); композиции по настоящему изобретению можно вводить инъекцией, например, в участок повреждения, проявления заболевания или боли; композиции можно предусматривать в таблетках для рассасывания для перорального, трахеального или эзофагального применения; можно обеспечивать в жидкой, таблетированной или капсульной форме для введения в желудок или кишечник, можно обеспечивать в форме суппозитория для ректального или вагинального применения; или даже можно доставлять в глаз с применением кремов, капель или даже инъекции. Составы, содержащие предусмотренные композиции, объединенные с терапевтическими молекулами или лигандами, можно вводить даже хирургическим путем, например, в связи с полимером или другой структурой или веществом, которое может обеспечивать диффузию композиций из участка имплантации в окружающие клетки. Альтернативно их можно применять хирургическим путем без применения полимеров или подложек.

Предусмотренные способы по настоящему изобретению охватывают однократные, а также многократные введения терапевтически эффективного количества терапевтических средств (например, mRNA, кодирующей ОТС), описанных в данном документе. Терапевтические средства можно вводить с равными интервалами в зависимости от характера, тяжести и степени выраженности состояния субъекта (например, недостаточности ОТС). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество терапевтических средств (например, mRNA, кодирующей белок ОТС) по настоящему изобретению можно периодически вводить интратекально с равными интервалами (например, один раз в

год, один раз в шесть месяцев, один раз в пять месяцев, один раз в три месяца, каждые два месяца (один раз в два месяца), ежемесячно (один раз в месяц), один раз в 30 дней, один раз в 28 дней, один раз в 14 дней, один раз в 10 дней, один раз в 7 дней, еженедельно, дважды в неделю, ежедневно или непрерывно).

В некоторых вариантах осуществления предусмотренные липосомы и/или композиции составлены таким образом, что они являются подходящими для пролонгированного высвобождения mRNA, содержащейся в них. Такие композиции для пролонгированного высвобождения можно удобно вводить субъекту с пролонгированными интервалами введения дозы. Например, в одном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению вводят субъекту два раза в день, ежедневно или через день. В предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению вводят субъекту два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в 7 дней, один раз в 10 дней, один раз в 14 дней, один раз в 28 дней, один раз в 30 дней, один раз в две недели, один раз в три недели или более предпочтительно один раз в четыре недели, один раз в месяц, два раза в месяц, один раз в шесть недель, один раз в восемь недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца, один раз в шесть месяцев, один раз в восемь месяцев, один раз в девять месяцев или один раз в год. Также предусмотрены композиции и липосомы, которые составлены для депо-введения (например, внутримышечно, подкожно, интравитреально) либо для доставки, либо для высвобождения mRNA в течение пролонгированных периодов времени. Предпочтительно применяемые средства для пролонгированного высвобождения объединяют с модификациями, осуществленными в отношении mRNA для повышения стабильности.

Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" в широком смысле определяется как общее количество терапевтического средства, содержащегося в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Как правило, терапевтически эффективное количество является достаточным для достижения значимого благоприятного эффекта у субъекта (например, лечения, модулирования, излечения, предупреждения и/или уменьшения интенсивности недостаточности ОТС). Например, терапевтически эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для достижения необходимого терапевтического и/или профилактического эффекта. Как правило, количество терапевтического средства (например, mRNA, кодирующей белок ОТС), вводимого субъекту, нуждающемуся в этом, будет зависеть от характеристик субъекта. Такие характеристики включают в себя состояние, тяжесть заболевания, общее состояние здоровья, возраст, пол и массу тела субъекта. Средний специалист в данной области с легкостью сможет определить соответствующие дозы в зависимости от этих и других взаимосвязанных факторов. В дополнение, как объективные, так и субъективные анализы можно необязательно применять для определения оптимальных диапазонов доз.

Терапевтически эффективное количество обычно вводят согласно схеме дозирования, которая может предусматривать несколько стандартных доз. Что касается любого конкретного терапевтического белка, терапевтически эффективное количество (и/или соответствующую стандартную дозу в рамках эффективной схемы дозирования) может варьироваться, например, в зависимости от пути введения, от комбинации с другими фармацевтическими средствами. Кроме того, конкретное терапевтически эффективное количество (и/или стандартная доза) любого конкретного пациента может зависеть от ряда факторов, включающих нарушение, подлежащее лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого фармацевтического средства; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента; время введения, путь введения и/или скорость экскреции или метаболизма конкретного используемого белка; продолжительность лечения и тому подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза находится в диапазоне от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 500 мг/кг массы тела, например, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 400 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 300 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 200 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 100 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 90 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 80 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 70 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 60 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 50 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 40 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 30 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 25 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 15 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет более приблизительно 0,1 мг/кг массы тела, более приблизительно 0,5 мг/кг массы тела, более приблизительно 1,0 мг/кг массы тела, более приблизительно 3 мг/кг массы тела, более приблизительно 5 мг/кг массы тела, более приблизительно 10 мг/кг массы тела, более приблизительно 15 мг/кг массы тела, более приблизительно 20 мг/кг массы тела, более приблизительно 30 мг/кг массы тела, более приблизительно 40 мг/кг массы тела, более приблизительно 50 мг/кг массы тела, более приблизительно 60 мг/кг массы тела, более приблизительно 70 мг/кг массы тела, более приблизительно 80 мг/кг массы тела, более приблизительно 90 мг/кг массы тела, более приблизительно 100 мг/кг массы тела, более приблизительно 150 мг/кг массы

тела, более приблизительно 200 мг/кг массы тела, более приблизительно 250 мг/кг массы тела, более приблизительно 300 мг/кг массы тела, более приблизительно 350 мг/кг массы тела, более приблизительно 400 мг/кг массы тела, более приблизительно 450 мг/кг массы тела, более приблизительно 500 мг/кг массы тела. В конкретном варианте осуществления терапевтически эффективная доза составляет 1,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективную дозу 1,0 мг/кг вводят внутримышечно или внутривенно.

Также в данном документе предусмотрены лиофилизированные фармацевтические композиции, содержащие одну или более липосом, раскрытых в данном документе и при связанных способах для применения таких композиций, раскрытых, например, в международной заявке на патент PCT/US12/41663, поданной 8 июня 2012 г., идеи которого включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, лиофилизированные фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением можно повторно разводить перед введением или можно повторно разводить *in vivo*. Например, лиофилизированную фармацевтическую композицию можно составлять в подходящей лекарственной форме (например, лекарственной форме для интрадермального применения, такой как диск, стержень или мембрана) и вводить таким образом, что лекарственная форма регидратируется в течение времени *in vivo* с помощью биологических жидкостей индивидуума.

Предусмотренные липосомы и композиции можно вводить в любую подходящую ткань. В некоторых вариантах осуществления mRNA ОТС, доставляемая с помощью предусмотренных липосом или композиций, экспрессируется в ткани, в которую вводят липосомы и/или композиции. В некоторых вариантах осуществления доставляемая mRNA экспрессируется в ткани, отличной от ткани, в которую вводят липосомы и/или композиции. Иллюстративные ткани, в которые доставляемая mRNA может быть доставлена и/или в которых может экспрессироваться, включают без ограничения печень, почку, сердце, селезенку, сыворотку крови, головной мозг, скелетную мышцу, лимфатические узлы, кожу и/или спинномозговую жидкость.

В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня экспрессии mRNA ОТС в биологическом образце от субъекта по сравнению с исходным уровнем экспрессии до лечения. Обычно исходный уровень измеряют непосредственно перед лечением. Биологические образцы включают, например, цельную кровь, сыворотку крови, плазму, мочу и образцы тканей (например, мышцу, печень, фибробласты кожи). В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня экспрессии mRNA ОТС на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 95% по сравнению с исходным уровнем непосредственно до лечения. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня экспрессии mRNA ОТС по сравнению с уровнем экспрессии mRNA ОТС у субъектов, которые не подвергаются лечению.

В соответствии с настоящим изобретением терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к повышению уровня экспрессии или активности белка ОТС у субъекта по сравнению с исходным уровнем экспрессии или активности белка ОТС до лечения. Обычно уровень экспрессии или активности белка ОТС измеряют в биологическом образце, полученном от субъекта, таком как кровь, плазма или сыворотка крови, моча или экстракты плотных тканей. Исходный уровень измеряют непосредственно до лечения. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня экспрессии или активности белка ОТС в биологическом образце (например, в плазме/сыворотке крови или моче) на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% по сравнению с исходным уровнем до лечения. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня экспрессии или активности белка ОТС в биологическом образце (например, в плазме/сыворотке крови или моче) на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% по сравнению с исходным уровнем до лечения в течение по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере в течение 48 ч, по меньшей мере в течение 72 ч, по меньшей мере в течение 3 дней, по меньшей мере в течение 4 дней, по меньшей мере в течение 5 дней, по меньшей мере в течение 6 дней, по меньшей мере в течение 7 дней, по меньшей мере в течение 8 дней, по меньшей мере в течение 9 дней, по меньшей мере в течение 10 дней, по меньшей мере в течение 11 дней, по меньшей мере в течение 12 дней, по меньшей мере в течение 13 дней, по меньшей мере в течение 14 дней или по меньшей мере в течение 15 дней.

В соответствии с различными вариантами осуществления время экспрессии доставляемых mRNA можно регулировать для удовлетворения определенной медицинской потребности. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка, кодируемого доставляемой mRNA, подлежит выявлению через 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч, 1 неделю, 2 недели или 1 месяц после введения предусмотренных липосом и/или композиций.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к повышенной выработке цитруллина у субъекта по сравнению с исходной выработкой цитруллина до лечения. Обычно уровень цитруллина до или после лечения можно измерять в биологическом образце, полученном от субъекта, таком как, кровь, плазма или сыворотка крови или экстракты плотной ткани. В некоторых вариантах осуществления лечение в соответст-

вии с настоящим изобретением приводит к повышению уровня цитруллина в биологическом образце (например, плазме, сыворотке крови или моче) на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%, в 1 раз, в 1,5 раза, в 2 раза, в 2,5 раза или в 3 раза по сравнению с исходным уровнем цитруллина соответственно.

В соответствии с настоящим изобретением терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к тому, что по меньшей мере один симптом или характеристика недостаточности ОТС уменьшается по интенсивности, тяжести или частоте или характеризуется отсроченным появлением. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к снижению уровня оротовой кислоты у субъекта по сравнению с исходным уровнем оротовой кислоты до лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к снижению уровня аммония у субъекта по сравнению с исходным уровнем аммония до лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к снижению уровня глутамина у субъекта по сравнению с исходным уровнем глутамина до лечения.

Обычно уровень оротовой кислоты, аммония или глутамина до или после лечения можно измерять в биологическом образце, полученном от субъекта, таком как кровь, плазма или сыворотка крови или экстракты плотных тканей. Исходный уровень оротовой кислоты, аммония или глутамина измеряют непосредственно перед лечением. В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии с настоящим изобретением приводит к снижению уровня оротовой кислоты, аммония или глутамина в биологическом образце (например, крови, сыворотке крови или моче), полученном от субъекта, на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% по сравнению с исходным уровнем оротовой кислоты, аммония или глутамина соответственно. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к снижению уровня аммония в плазме до менее приблизительно 500 мкмоль/л, 400 мкмоль/л, 300 мкмоль/л, 200 мкмоль/л, 150 мкмоль/л или 100 мкмоль/л. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к снижению уровня глутамина в плазме до менее приблизительно 800 мкмоль/л, 700 мкмоль/л или 600 мкмоль/л. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза предусмотренной композиции при регулярном введении приводит к снижению уровня оротовой кислоты до менее приблизительно 20 мкмоль/ммоль креатинина, 15 мкмоль/ммоль креатинина или 10 мкмоль/ммоль креатинина.

В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в печени субъекта по сравнению с исходным уровнем до лечения. Обычно исходный уровень измеряют непосредственно перед лечением. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в печени на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% по сравнению с исходным уровнем до лечения. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в печени по сравнению с уровнем белка ОТС в печени субъектов, которые не подвергаются лечению.

В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в клетке печени (например, гепатоците) субъекта по сравнению с исходным уровнем до лечения. Обычно исходный уровень измеряют непосредственно перед лечением. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в клетке печени на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% по сравнению с исходным уровнем до лечения. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в клетке печени по сравнению с уровнем белка ОТС в клетке печени субъектов, которые не подвергаются лечению.

В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в плазме или сыворотке крови субъекта по сравнению с исходным уровнем до лечения. Обычно исходный уровень измеряют непосредственно перед лечением. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в плазме или сыворотке крови на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% по сравнению с исходным уровнем до лечения. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению уровня белка ОТС в плазме или сыворотке крови по сравнению с уровнем белка ОТС в плазме или сыворотке крови у субъектов, которые не подвергаются лечению.

В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению активности фермента ОТС в биологическом образце от субъекта по сравнению с исходным уровнем до лечения. Обычно исходный уровень измеряют непосредственно перед лечением. Биологические образцы включают например, цельную кровь, сыворотку крови, плазму крови, мочу и образцы тканей (например, печени). В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышенной активности фермента ОТС на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50,

60, 70, 80, 90, или 95% по сравнению с исходным уровнем непосредственно до лечения. В некоторых вариантах осуществления введение предусмотренной композиции приводит к повышению активности фермента ОТС по сравнению с активностью фермента у субъектов, которые не подвергаются лечению.

В соответствии с различными вариантами осуществления время экспрессии доставляемых mRNA можно регулировать для удовлетворения определенной медицинской потребности. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка, кодируемого доставляемой mRNA, подлежит выявлению через 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72 и/или 96 ч после введения предусмотренных липосом и/или композиций. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка, кодируемого доставляемой mRNA, подлежит выявлению через 1 неделю, две недели и/или 1 месяц после введения.

Примеры

Хотя определенные соединения, композиции и способы по настоящему изобретению были конкретно описаны в соответствии с определенными вариантами осуществления, следующие примеры служат лишь в качестве иллюстрации соединений по настоящему изобретению и не предназначены для их ограничения.

Пример 1. Иллюстративные составы липосом для доставки и экспрессии mRNA ОТС.

В данном примере предусмотрены иллюстративные составы липосом для эффективной доставки и экспрессии mRNA ОТС *in vivo*.

Липидные вещества.

Составы, описанные в данном документе, содержат многокомпонентную липидную смесь, характеризующуюся различными соотношениями, предусматривающую один или более катионных липидов, вспомогательных липидов (например, некатионных липидов и/или липидов на основе холестерина) и пегилированных липидов, предназначенных для инкапсулирования mRNA, кодирующей белок ОТС. Катионные липиды могут включать (но не исключительно) DOTAP (1,2-диолеил-3-триметиламмония пропан), DODAP (1,2-диолеил-3-диметиламмония пропан), DOTMA (1,2-ди-О-октадецил-3-триметиламмония пропан), 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), сКК-Е12 (3,6-бис-(4-(бис-(2-гидроксидодецил)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион), HGT5000, HGT5001, HGT4003, ICE, OF-02, соединения на основе диалкиламино, на основе имидазола, на основе гуанидиния и др. Вспомогательные липиды включают в себя (но не исключительно) DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DOPC (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфотидилхолин), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DMPE (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DOPG (2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин)), холестерин и др. пегилированные липиды могут включать (но не исключительно) полиэтиленгликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с алкильной(алкильными) цепью(цепями), длиной C₆-C₂₀.

Кодон-оптимизированную матричную РНК орнитинтранскарбамилазы (ОТС) человека синтезировали с помощью транскрипции *in vitro* из матрицы ДНК плазмиды, кодирующей ген, с последующим добавлением 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, определенной с помощью гель-электрофореза. Нетранслируемые 5'- и 3'-области, присутствующие в каждом продукте mRNA, представлены как X и Y соответственно и определены, как указано (см. ниже).

Иллюстративные кодон-оптимизированные mRNA орнитинтранскарбамилазы (ОТС) человека.

Схема конструкции.

X-SEQ ID NO: 3-Y

X-SEQ ID NO: 7-Y

5'- и 3'-последовательности UTR X (5'-последовательность UTR) =

GGACAGAUCCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUGACCUCCAUAAGA
AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGC
GGAUUCGCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO: 11)

Y (3'-последовательность UTR) =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAA
GUUGCCACUCCAGUGCCCACCGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCA
AGCU (SEQ ID NO: 12)

или

GGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAAG
UUGCCACUCCAGUGCCCACCGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCA
AGCU (SEQ ID NO: 13)

Иллюстративная кодон-оптимизированная последовательность mRNA ОТС человека содержит SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 7, описанные подробно в разделе "Описание".

Иллюстративная полноразмерная кодон-оптимизированная последовательность матричной РНК орнитинтранскарбамилазы (ОТС) человека представлена ниже

```

GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUGACCUCAUAGA
AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGC
GGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGCUGUUAAC
CUUCGGAUUCUUGCUGAACAACGCUGCGUUCGGAAUGGUCACAACUUAUGG
UCCGGAACUUCAGAUGCAGGCCAGCCGUCCAGAACAAGGUGCAGCUAAGGG
GAGGGACCUCCUACCCUGAAAAACUUCACCGGAGAAGAGAUAAGUACAUG
CUGUGGCUGUCAGCCGACCUCAAAUCCGGAUCAAGCAGAAGGGCGAAUACC
UUCCUUUGCUGCAGGAAAGUCCUGGGGAUGAUCUUCGAGAAGCGCAGCAC
UCGCACUAGACUGUCAACUGAAAACCGGUUCGCGCUGCUGGGAGGACACCCC
UGCUUCCUGACCACCAAGAUUCCAUCUGGGUGUGAACGAUCCCUACCCG
ACACAGCGCGGGUGCUGUCGUCCAUGGCAGACGCGGUCCUCGCCCGCGUGUA
CAAGCAGUCUGAUCUGGACACUCUGGCCAAGGAAGCCUCCAUCCUAUCAUU
AAUGGAUUGUCCGACCUCUACCAUCCCAUCCAGAUUCUGGCCGAUUAUCUGA
CUCUGCAAGAACAUAACAGCUCCUGAAGGGGCUUACCCUUCUGGGAUCGG
CGACGGCAACAACAUUCGCACAGCAUUAUGAUGAGCGCUGCCAAGUUUGGA
AUGCACCUCCAAGCAGGACCCCGAAGGGAUACGAGCCAGACGCCUCCGUGA
CGAAGCUGGCUGAGCAGUACGCCAAGGAGAACGGCACUAAGCUGCUGCUCAC
CAACGACCCUCUCGAAGCCGCCACGGUGGCAACGUGCUGAUCACCGAUACC
UGGAUCUCCAUGGGACAGGAGGAGAAAAGAAGAAGCGCCUGCAAGCAUUUC
AGGGGUACCAGGUGACUAUGAAAACCGCCAAGGUCGCCGCCUCGGACUGGAC
CUUCUUGCACUGUCUGCCAGAAAAGCCGAAAGAGGUGGACGACGAGGUGUUC
UACAGCCCGCGGUCGUCUGUCUUUCCGGAGGCCGAAAACAGGAAGUGGACUA
UCAUGGCCGUGAUGGUGUCCUGCUGACCGAUUACUCCCGCAGCUGCAGAA
ACCAAAGUUCUGA
CGGGUGGCAUCCUUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUU
GCCACUCCAGUCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGC
U(SEQ ID NO: 14).

```

В другом примере полноразмерная кодон-оптимизированная последовательность матричной РНК орнитинтранскарбамилазы (ОТС) человека представлена ниже

```

GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUGACCUCAUAGA
AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGC
GGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGCUGUUAAC
CUUCGGAUUCUUGCUGAACAACGCUGCGUUCGGAAUGGUCACAACUUAUGG
UCCGGAACUUCAGAUGCAGGCCAGCCGUCCAGAACAAGGUGCAGCUAAGGG
GAGGGACCUCCUACCCUGAAAAACUUCACCGGAGAAGAGAUAAGUACAUG
CUGUGGCUGUCAGCCGACCUCAAAUCCGGAUCAAGCAGAAGGGCGAAUACC
UUCCUUUGCUGCAGGAAAGUCCUGGGGAUGAUCUUCGAGAAGCGCAGCAC
UCGCACUAGACUGUCAACUGAAAACCGGUUCGCGCUGCUGGGAGGACACCCC

```

UGCUUCCUGACCACCCAAGAUUCCAUCUGGGUGUGAACGAAUCCUCACCG
 ACACAGCGCGGGUGCUGUCGUCCAUGGCAGACGCGGUCCUCGCCCUGUGUA
 CAAGCAGUCUGAUCUGGACACUCUGGCCAAGGAAGCCUCCAUCCUAUCAU
 AAUGGAUUGUCCGACCUCUACCAUCCCAUCCAGAUUCUGGCCGAUUUUCUGA
 CUCUGCAGAACAUAUACAGCUCCUGAAGGGGCUUACCCUUUCUGUGGACGG
 CGACGGCAACAACAUUCUGCACAGCAUUUGAUGAGCGCUGCCAAGUUUGGA
 AUGCACCUCCAAGCAGCGACCCGAAGGGAUACGAGCCAGACGCCUCCGUGA
 CGAAGCUGGCUGAGCAGUACGCCAAGGAGAACGGCACUAAGCUGCUGCUCAC
 CAACGACCCUCUGAAGCCGCCACGGUGGCAACGUGCUGAUCACCGAUACC
 UGGAUCUCCAUGGGACAGGAGGAGGAAAAGAAGAGCGCCUGCAAGCAUUUC
 AGGGGUACCAGGUGACUAUGAAAACGCCAAGGUCGCCGCCUCGGACUGGAC
 CUUCUUGCACUGUCUGCCCAGAAAGCCGAAGAGGUGGACGACGAGGUGUUC
 UACAGCCCUGCUGCUGGUCUUUCCGGAGGCCGAAAACAGGAAGUGGACUA
 UCAUGGCCGUGAUGGUGUCCUGCUGACCGAUUACUCCCCGACGUCGAGAA
 ACCAAAGUUCUGA
 GGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUG
 CCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUUAGUUGCAUCAAGC
 U (SEQ ID NO: 15).

В другом примере полноразмерная кодон-оптимизированная последовательность матричной РНК орнитинтранскарбамилазы (ОТС) человека представлена ниже

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGA
 AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGGCGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGC
 GGAUUCGCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGCUGUUUAC
 CUGAGAAUUCUGCUGAACAACGCCCGUUCAGGAACGGCCACAUAUUUUAUGG
 UCCGCAACUUUAGAUGCGGACGCCUCUCCAAAACAAGGUCCAGCUCUAGGG
 GCGGGACUUGCUGACCCUUAAGAACUUUACCGGCGAAGAGAUCAAGUACAUG
 CUGUGGUUGUCAGCGGACCUGAAGUCCGCAUCAAGCAGAAAGGGGAGUAUC
 UGCCGUGCUCCAAGGAAAGUCGUCGGCAUGAUCUUCGAGAAGCGCUCGAC
 CAGAACCCGGCUGUCCACUGAAACUGGUUUCGCCUUCUGGGUGGACCCCU
 UGUUUUCUGACAACCCAGGACAUCCAUCUGGGCGUGAACGAAAGCCUCACUG
 ACACCGCCAGGGUGCUGAGCUCCAUGGCCGACGCUGUCCUUGCCCGGGUGUA
 CAAGCAGUCCGAUCUGGACACUCUGGCCAAGGAAGCGUCCAUCCCGAUCAU
 AACGGACUGUCCGACCUGUACCACCCGAUCCAGAUUCUGGCCGACUACCUGA
 CCUUGCAAGAGCACUACAGCUCACUGAAGGGCUUGACCCUGAGCUGGAUCGG
 CGACGGAAACAACAUUCUGCAUUCGAUCAUGAUGUCCGCGCCAAGUUCGGA
 AUGCAUCUGCAGGCCGCAACUCCCAAGGGAUACGAACCUGAUGCGUCCGUGA
 CUAAGCUGGCCGAGCAGUACGCAAAGGAAAACGGCACCAAGCUGCUGCUGAC
 CAACGACCCGUCGAAGCUGCCACGGAGGGAACGUGCUCAUUACCGACACU
 UGGAUCUCCAUGGGGACGGAAGAAGAGAAGAAGAGCGGCCUCCAGGCAUCC
 AGGGUUACCAGGUCACCAUGAAAACGGCCAAAGUGGCCGCUUCGGAUUGGAC
 UUUCUCCACUGCCUCCCCGCAAACCUGAGGAAGUGGAUGAUGAAGUGUUC
 UACUCCCCACGCUCCUCGUGUCCCCGAGGCCGAGAAUCGGAAGUGGACCA
 UUAUGGCCGUGAUGGUGUCACUGCUGACCGACUACAGCCCCAACUGCAAAA
 GCCGAAGUUCUGA
 CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUU
 GCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUUAGUUGCAUCAAGC
 U (SEQ ID NO: 4)

Иллюстративные протоколы составов.

А. сКК-Е12.

Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов сКК-Е12, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K смешивали и разбавляли этанолом до получения конечного объема 3 мл. Отдельно получали водный забуференный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) mRNA ОТС из 1 мг/мл исходного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор mRNA и встряхивали с получением конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтровали, диафильтровали с помощью 1× PBS (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8°C. Определяли конечную концентрацию, Z_{ave} , $Dv_{(50)}$ и $Dv_{(90)}$ инкапсулированной mRNA ОТС.

20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтровали, диафильтровали с помощью $1 \times$ PBS (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8°C. Определяли конечную концентрацию, Z_{ave} , $DV_{(50)}$ и $DV_{(90)}$ инкапсулированной mRNA ОТС.

Пример 2. Внутривенное введение наночастиц в форме липосом, нагруженных mRNA ОТС.

В данном примере представлены в качестве примера способы введения наночастиц в форме липосом, нагруженных mRNA ОТС, и способы анализа mRNA ОТС в различных тканях-мишенях *in vivo*.

Все исследования проводили с применением мышей spf^{ash} . Мышей обрабатывали липидными наночастицами на основе сКК-E12, нагруженными mRNA ОТС человека, с помощью однократной болюсной инъекции в дозе 0,5 мг/кг в хвостовую вену. Мышей умерщвляли и проводили перфузию солевым раствором через 24 ч, 72 ч, 8 дней, 11 дней и 15 дней.

Ткани, такие как печень, каждой мыши извлекали, разделяли на отдельные части и хранили либо в 10% нейтральном забуференном формалине, либо мгновенно замораживали или хранили при -80°C для анализа.

Выявление белка ОТС с применением вестерн-блоттинга в гомогенате печени мыши.

Образцы гомогенизировали с помощью буфера для лизиса HEPES и замораживали/оттаивали дважды с обеспечением полного лизиса клеток. Дебрис осаждали центрифугированием, а гомогенат оценивали на общее количественное содержание белка с помощью анализа BCA. 10 нг общего белка с восстанавливающим средством NuPage и красителем для загрузки инкубировали в течение 5 мин при 95°C с последующим разделением белков на геле SDS-PAGE с 8-16% трис/глицина. Белки переносили на мембрану PVDF, блокировали с помощью 2% раствора i-Block в PBST и затем инкубировали с запатентованным антителом к ОТС (22A03). Гели промывали, инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с HRP, повторно промывали и обрабатывали с помощью субстрата ECL-Prime на пленочном процессоре SRX-101a Konika Minolta.

Количественная оценка белка ОТС в гомогенате печени мышей с помощью ELISA.

Образцы гомогенизировали с помощью буфера для лизиса HEPES и замораживали/оттаивали дважды с обеспечением полного лизиса клеток. Остаток осаждали центрифугированием, а супернатант собирали для анализа. Запатентованным антителом к ОТС (25D11) покрывали планшет Nunc MaxiSorb при 1 мкг/мл в течение 1 ч в 50 мМ растворе бикарбоната натрия, pH 9,6. Планшет промывали с помощью DPBS и промывочного буфера Tween-20, затем блокировали в течение 1 ч с помощью казеинового блокирующего буфера Surmodics. Планшеты повторно промывали, а затем добавляли образцы и стандарт в двойной повторности и инкубировали в течение еще 1 ч. Планшет промывали и затем добавляли конъюгированное с HRP Ab для выявления (21C02) в планшет при разбавлении 1:5500 и инкубировали в течение 1 ч. После окончательной промывки планшет обрабатывали с помощью субстрата TMB Surmodics, останавливали с помощью 1н. HCl и считывали при 450 нм минус 650 нм на спектрофотометре.

Анализ активности цитруллина с применением гомогенатов печени мыши.

Гомогенат печени мыши получали, как описано ранее. Гомогенаты разбавляли в $1 \times$ DPBS до необходимой концентрации, затем добавляли в воду UltraPure в 96-луночном планшете. Стандарт цитруллина добавляли в предварительно определенных количествах для применения в качестве калибраторов. Реакционную смесь, содержащую карбамоилфосфат, орнитин и триэтанолламин добавляли в каждую лунку и обеспечивали протекание реакции при температуре 37°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали с помощью смеси фосфорной и серной кислоты и в каждую лунку добавляли диацетилмоноксим. Планшет инкубировали при 85°C в течение 30 мин, быстро охлаждали и считывали при 490 нм на спектрофотометре.

Количественная оценка оротовой кислоты в моче мыши.

Количественную оценку оротовой кислоты в образцах мочи животных осуществляли с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) с применением ионообменной колонки. Вкратце, образцы мочи разводили в два раза с помощью воды, не содержащей РНКазы, и часть загружали в колонку Thermo Scientific 100x. Подвижная фаза, содержащая ацетонитрил и 25 мМ ацетата аммония, обеспечивала разделение и количественную оценку оротовой кислоты с выявлением на основе поглощения при 280 нм.

Количественная оценка аммония в плазме крови мыши.

Аликвоту цельной крови собирали в пробирки для плазмы с литий-гепарином и перерабатывали до получения плазмы. Образцы свежей плазмы анализировали с помощью анализатора IDEXX Catalyst Dx.

Результаты.

Выявление белка ОТС в печени обработанных мышей осуществляли с помощью иммуногистохимических способов (например, вестерн-блоттинга). Как изображено на фиг. 1, экзогенный белок ОТС человека выявляли через 24 ч, 72 ч, 8 дней, 11 дней и 15 дней.

Кроме того, также было показано, что белок ОТС, полученный с помощью mRNA, являлся ферментативно активным, как продемонстрировано с помощью измерения уровней выработки цитруллина с применением специально разработанного анализа активности *ex vivo*. Белок hОТС, образовавшийся у мышей с применением липидных наночастиц, нагруженных mRNA hОТС, был активным в течение двух

недель после введения однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hOTC (фиг. 2А). Как изображено на фиг. 2В, введение однократной дозы 0,5 мг/кг липидных наночастиц, нагруженных mRNA hOTC, приводило к активности белка hOTC выше минимального терапевтического целевого диапазона, составляющего 10-15% от нормальной активности. Помимо этого, активность, продемонстрированная через две недели после введения, обеспечивала уровни цитруллина в примерно 3 раза выше по сравнению с исходными уровнями.

Белок hOTC, полученный с помощью mRNA, также образовывался у мышей spf^{ash} при применении нескольких составов с липидными наночастицами на основе mRNA hOTC (фиг. 3А и 3В). Два отдельных состава получали с помощью способов, описанных выше, в которых mRNA CO-hOTC инкапсулировали с применением различных количеств липидов. В N:P 4 применяли общее содержание липидов в два раза больше, чем в составах N:P 2. Также применение аналогичных контрольных составов (STOP N:P 2 и STOP N:P 4), содержащих mRNA hOTC с нонсенс-мутациями, при введении spf^{ash} , не приводило к образованию какого-либо выявляемого белка hOTC. Отдельно в данном эксперименте использовали солевой раствор в качестве еще одной контрольной обработки. Выделенную печень гомогенизировали и определяли выработку и активность белка hOTC, как описано выше. На фиг. 3А и 3В изображен анализ типичной печени мышей из каждой группы с применением иммуноблоттинга. Положительное выявление белка ОТС человека наблюдалось в случае обоих составов, содержащих mRNA hOTC. Белок hOTC не наблюдался ни в контрольной группе на основе mRNA с нонсенс-мутациями, ни в случае мышей, обработанных солевым раствором (необработанных).

На фиг. 4 представлена активность hOTC, наблюдаемая в отношении каждой группы. Значительная активность hOTC наблюдалась в обеих группах, обработанных LNP на основе mRNA hOTC, в то время как повышение активности не подлежало измерению в контрольных группах с применением mRNA с нонсенс-мутациями по сравнению с мышами, обработанными солевым раствором (необработанными). Такую активность можно связать с успешной активной выработкой белка, полученного с помощью доставленной LNP mRNA hOTC. На фиг. 4 показано, что mRNA hOTC приводила к образованию активного белка hOTC, способного вызывать выработку цитруллина, в то время как применение контрольных составов, которые не приводили к образованию выявляемого белка hOTC, не характеризовалось какой-либо активностью, связанной с выработкой цитруллина, относительно исходных уровней.

Кроме того, эффективность в этой модели заболевания была показана посредством нормализации уровней оротовой кислоты в моче обработанных мышей. В частности, образцы мочи получали через 24 ч после введения всех составов (и солевого контроля, "необработанные") и определяли количественное содержание оротовой кислоты. Активность белка hOTC, полученного с помощью mRNA, у мышей spf^{ash} определяли с помощью контроля оротовой кислоты, известного биомаркера недостаточности ОТС (фиг. 5). Отчетливое снижение уровней оротовой кислоты в моче наблюдали у мышей, обработанных липидными наночастицами, нагруженными mRNA hOTC, в то время как не наблюдали значимого снижения оротовой кислоты в случае, когда мышам вводили контрольные составы, которые содержали mRNA hOTC с нонсенс-мутациями.

В отдельном исследовании мышей spf^{ash} обрабатывали двумя различными составами на основе LNP с mRNA hOTC (N/P=2, N/P=4) при двух уровнях дозы (0,50 мг/кг, 1,0 мг/кг). Исследуемые препараты вводили в виде однократной внутривенной дозы. Как изображено на фиг. 6А, через 24 ч (после введения) мышей подвергали воздействию аммония, при этом вводили болюсную инъекцию хлорида аммония (NH_4Cl) интраперитонеально. Это проводили в целях представления гипераммониемического эпизода, который мог испытывать пациент, страдающий от недостаточности ОТС. Уровни аммония в плазме контролировали 40 мин после воздействия NH_4Cl .

На фиг. 6В проведено сравнение уровней аммония в плазме крови обработанных мышей с уровнями как у необработанных мышей spf^{ash} , так и у мышей дикого типа. Полную защиту от гипераммониемического эпизода достигали при всех вводимых дозах составов на основе LNP с mRNA hOTC при нормализации относительно уровней аммония у мышей дикого типа (необработанных). Необработанные мыши spf^{ash} характеризовались параметрами выраженного повышения содержания аммония в плазме крови в идентичных условиях. Для подтверждения того, что это происходило в результате присутствия активного белка hOTC в печени этих мышей, печень извлекали и анализировали в отношении активности ОТС (фиг. 7). Все вводимые дозы приводили к уровням активности в диапазоне 35-103% от нормальной активности по сравнению с уровнями активности у мышей дикого типа.

Пример 3. Многодозовое введение наночастиц в форме липосом, нагруженных mRNA ОТС.

В данном примере представлены иллюстративные способы введения наночастиц в форме липосом, нагруженных mRNA ОТС, в течение длительного периода времени и способы анализа mRNA ОТС в различных тканях-мишенях *in vivo*.

Исследование выполняли с использованием мышей spf^{ash} . Мышей обрабатывали, как описано в примере 2, но в многодозовом формате. В частности, проводили многодозовое исследование у мышей spf^{ash} , которое подразумевало введение внутривенно 8 еженедельных доз LNP, нагруженных mRNA hOTC, при 0,60 мг/кг. Когорту мышей умерщвляли каждую неделю, и анализировали печень в отношении активности hOTC и сравнивали с уровнями активности ОТС дикого типа. Исследуемый препарат

хорошо переносился, и ферменты печени оставались в нормальных диапазонах при всех дозах. На фиг. 8 представлена активность ОТС человека, образовавшегося у таких обработанных мышей, в виде процентной доли от уровней дикого типа. Уровень, составляющий по меньшей мере примерно 36% от уровней дикого типа, поддерживался в течение всех 8 недель введения дозы.

Дополнительное многодозовое исследование проводили, как описано в примере 2, однако животным вводили 4 еженедельные дозы 1,0 мг/кг LNP, нагруженных mRNA hОТС. На фиг. 9А представлена активность ОТС человека, образовавшегося у таких обработанных мышей, в виде процентной доли от уровней дикого типа у мышей $sp1^{fash}$, которым вводили еженедельно дозы 1,0 мг/кг LNP, нагруженных mRNA hОТС. Применение многодозовой схемы приводило к получению терапевтических уровней активного белка hОТС у мышей с недостаточностью ОТС в течение трех недель. Как изображено на фиг. 9В, экзогенный белок ОТС человека выявляли в 1-й день, в 8-й день, в 15-й день и в 22-й день.

Эквиваленты.

Специалист в данной области поймет или сможет определить с помощью не более чем обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения приведенным выше описанием, но соответствует изложенному в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей мРНК, кодирующую белок орнитинтранскарбамилазу (ОТС), в лечении недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), причем указанную композицию вводят субъекту в эффективной дозе и с интервалом введения, за счет чего по меньшей мере один симптом или признак недостаточности ОТС уменьшается по интенсивности, тяжести или частоте или характеризуется отсроченным проявлением, причем мРНК, кодирующая белок ОТС, является кодон-оптимизированной и содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

2. Применение композиции по п.1, где мРНК, кодирующая белок ОТС, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, причем необязательно мРНК, кодирующая белок ОТС, содержит:

(а) полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7; или

(б) SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, причем необязательно мРНК, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 7.

3. Применение композиции по п.1, где мРНК, кодирующая белок ОТС, не является SEQ ID NO: 1.

4. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, где мРНК дополнительно содержит:

(а) последовательность нетранслируемой 5'-области (UTR) SEQ ID NO: 11 и/или

(б) последовательность нетранслируемой 3'-области (UTR) SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

5. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, где мРНК инкапсулирована в липосому, причем необязательно:

(а) липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов, причем необязательно:

(i) один или более катионных липидов включают катионный липид, выбранный из группы, состоящей из C12-200, MC3, DLinDMA, DLinkC2DMA, cKK-E12, ICE (на основе имидазола), HGT5000, HGT5001, OF-02, 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 их комбинаций,

(ii) один или более некатионных липидов выбраны из группы, состоящей из DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина), DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина), DOPC (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфотидилхолина), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина), DMPE (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина), DOPG (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерина)) и их комбинаций; и/или

(iii) один или более липидов на основе холестерина представляют собой холестерин и/или пегилированный холестерин; и/или

(б) липосома характеризуется размером менее приблизительно 100 нм.

6. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, где:

(а) мРНК вводят в эффективной дозе в диапазоне от приблизительно 0,01 до 5,0 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,01 до 3,0 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,01 до 1,0 мг/кг массы тела,

от приблизительно 0,01 до 0,5 мг/кг массы тела; и/или

(б) композицию вводят внутривенно.

7. Применение композиции по любому из пп.1-6, где композицию вводят:

(а) один раз в неделю,

(б) два раза в месяц,

(в) один раз каждые 14 дней или

(г) один раз в месяц.

8. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, где введение композиции обеспечивает:

(а) повышение уровня экспрессии или активности белка ОТС в сыворотке крови у субъекта по сравнению с контрольным уровнем, причем необязательно контрольный уровень представляет собой:

(i) исходный уровень экспрессии или активности белка ОТС в сыворотке крови у субъекта до лечения; или

(ii) референсный уровень, отражающий средний уровень экспрессии или активности белка ОТС в сыворотке крови у пациентов с недостаточностью ОТС без лечения; и/или

(б) снижение уровня оротовой кислоты в моче у субъекта по сравнению с контрольным уровнем оротовой кислоты, причем необязательно контрольный уровень оротовой кислоты представляет собой:

(i) исходный уровень оротовой кислоты в моче у субъекта до лечения или

(ii) референсный уровень, отражающий средний уровень оротовой кислоты в моче у пациентов с недостаточностью ОТС без лечения; и/или

(в) повышение уровня цитруллина в сыворотке крови у субъекта по сравнению с контрольным уровнем цитруллина, причем необязательно контрольный уровень цитруллина представляет собой:

(i) исходный уровень цитруллина в сыворотке крови у субъекта до лечения, или

(ii) референсный уровень, отражающий средний уровень цитруллина в сыворотке крови у пациентов с недостаточностью ОТС без лечения.

9. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, где мРНК содержит один или более модифицированных нуклеотидов, причем необязательно один или более модифицированных нуклеотидов включают псевдоуридин, N-1-метилпсевдоуридин, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C-5-пропинилцитидин, C-5-пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезазагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин и/или 2-тиоцитидин.

10. Применение композиции по любому из пп.1-9, где мРНК является немодифицированной.

11. Фармацевтическая композиция для лечения недостаточности орнитинтранскарбамилазы (ОТС), содержащая мРНК, кодирующую белок орнитинтранскарбамилазу (ОТС), и где мРНК, кодирующая белок ОТС, содержит полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, где мРНК, кодирующая белок ОТС, содержит:

(а) полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7; или

(б) SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, причем необязательно мРНК, кодирующая белок ОТС, содержит SEQ ID NO: 7; или

(в) не является SEQ ID NO: 1.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11 или 12, где:

(а) мРНК дополнительно содержит последовательность нетранслируемой 5'-области (UTR) SEQ ID NO: 11 и/или

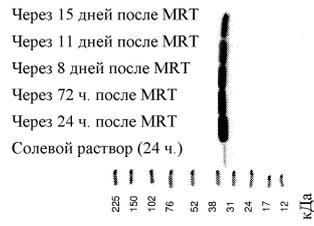
(б) мРНК дополнительно содержит последовательность нетранслируемой 3'-области (UTR) SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-13, где мРНК, кодирующая белок ОТС, инкапсулирована в липосому, причем необязательно:

(а) липосома содержит один или более катионных липидов, один или более некатионных липидов, один или более липидов на основе холестерина и один или более PEG-модифицированных липидов и/или

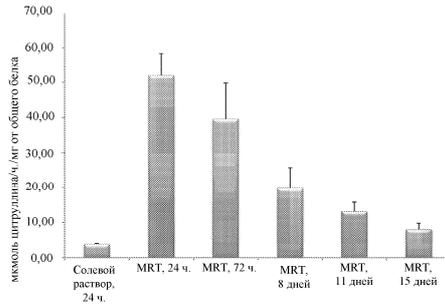
(б) липосома характеризуется размером менее приблизительно 100 нм.

042676

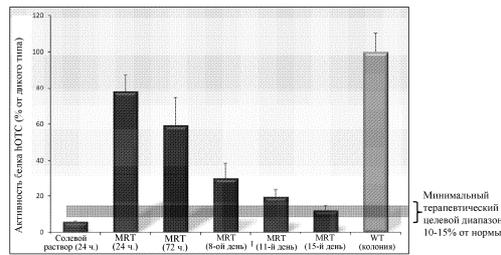


Фиг. 1

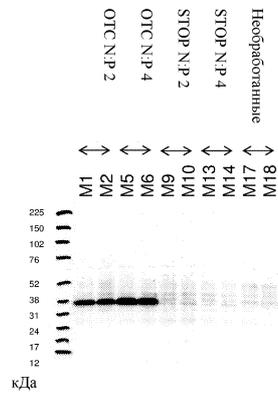
Активность ОТС человека (образование цитруллина) в течение двух недель после однократной дозы LNP, нагруженных mRNA ЮТС



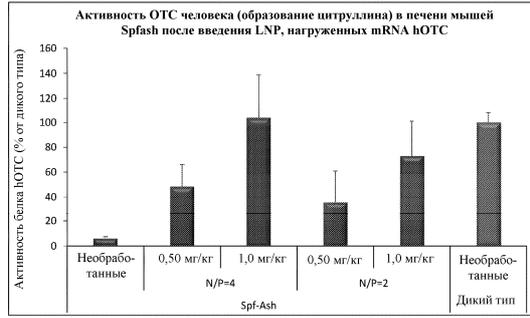
Фиг. 2А



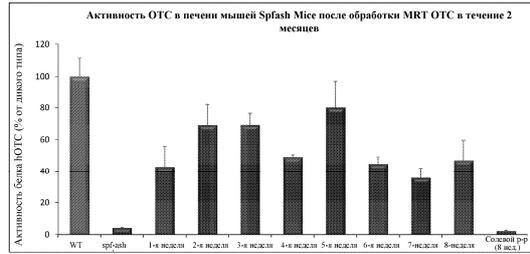
Фиг. 2В



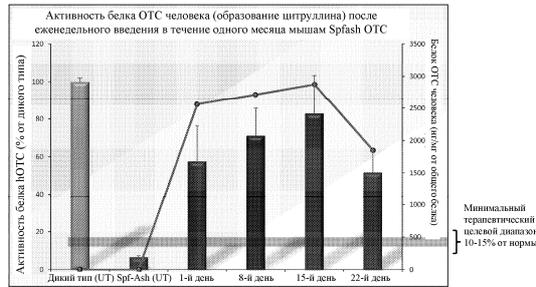
Фиг. 3А



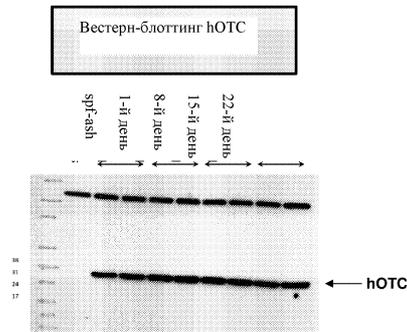
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9А



Фиг. 9В

