

SIB EX4393R

P064565SM:HRG/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo
domanda n° 10835016.6, pubblicazione n° 2506857

a nome di Translate Bio, Inc.,

di 200 Sidney Street, Suite 310, Cambridge, Massachusetts 02139, U.S.A.

"RILASCIO DI MRNA PER L'AUMENTO DI PROTEINE ED ENZIMI IN MALATTIE
GENETICHE UMANE"

DESCRIZIONE

FONDAMENTO DELL'INVENZIONE

Sono ancora necessari nuovi approcci e nuove terapie per il trattamento di carenze proteiche ed enzimatiche, in particolare strategie e terapie che superino le sfide e i limiti associati alla somministrazione di acidi nucleici e alla trasfezione di cellule target. Approcci aggiuntivi che modulano o che integrano l'espressione di una proteina o enzima carente e pertanto migliorano la carenza alla base sarebbero utili nello sviluppo di terapie adeguate per disturbi associati.

Ad esempio, i disturbi metabolici del ciclo dell'urea rappresentano carenze proteiche ed enzimatiche per cui attualmente non vi sono cure disponibili. Il ciclo dell'urea è una serie di reazioni biochimiche che avvengono in molti animali che producono urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) dall'ammoniaca (NH_3) e, nei mammiferi avviene soltanto nel fegato. In particolare, il ciclo dell'urea consiste in una serie di cinque reazioni biochimiche e assolve due funzioni primarie: l'eliminazione dell'azoto come urea e la sintesi di arginina. Difetti nel ciclo dell'urea determinano l'accumulo di ammoniaca e dei suoi amminoacidi precursori (glutamina, acido glutammico, acido aspartico e glicina). I livelli elevati risultanti di ammoniaca sono neurotossici, e la triade di iperammoniemia, encefalopatia, e alcalosi respiratoria caratterizza i disturbi del ciclo dell'urea.

La carenza di ornitina transcarbamilasi (OTC) rappresenta un tale disturbo genetico del ciclo dell'urea. Tipicamente, un soggetto con carenza di OTC ha un livello ridotto dell'enzima OTC. Nella forma grave classica di carenza di OTC, entro i primi giorni di vita, i pazienti presentano letargia, convulsioni, coma e grave iperammoniemia che rapidamente determinano un deterioramento ed esito fatale in caso di mancato intervento medico adeguato. Se lasciate non trattate, le complicanze della deficienza di OTC possono includere ritardo di sviluppo, ritardo mentale e/o morte.

Il trattamento di pazienti con carenze di OTC principalmente implica la regolazione dell'ammonica sierica e l'emodialisi rimane l'unico mezzo efficace per ridurre rapidamente i livelli sierici di ammoniaca. In generale, lo scopo del trattamento dei disturbi metabolici del ciclo dell'urea è di fornire sufficienti proteina e arginina per la crescita, lo sviluppo e l'energia prevenendo al contempo lo sviluppo di iperammoniemia e di iperglutammminemia. Approcci terapeutici che sono attualmente disponibili per il controllo terapeutico dei disturbi metabolici del ciclo dell'urea quali carenze di OTC si basano fortemente sul controllo della dieta. Non sono attualmente disponibili trattamenti o cure a lungo termine per i disturbi metabolici del ciclo dell'urea. Nuove terapie che aumentano il livello o la produzione di una proteina o enzima affetto in cellule target, quali epatociti, o che modulano l'espressione di acidi nucleici che codificano la proteina o l'enzima affetto potrebbero fornire un trattamento o anche una cura per i disturbi metabolici, inclusi i disturbi metabolici quali la carenza di OTC.

WO 90/11092 descrive il rilascio e l'espressione di sequenze polinucleotidiche esogene in un vertebrato.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Sono descritti metodi di rilascio intracellulare di acidi nucleici che sono in grado di correggere difetti genetici esistenti e/o fornire funzioni benefiche ad una o più cellule target. Successivamente al rilascio con successo in tessuti e cellule target, le composizioni della presente invenzione trasfettano tale cellula target e gli acidi nucleici (ossia mRNA) possono essere tradotti nel prodotto genico di interesse (ossia una proteina funzionale).

In particolare, l'invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente un veicolo di trasferimento, un eccipiente farmaceuticamente accettabile e almeno una molecola di mRNA codificante una proteina, il veicolo di trasferimento comprendendo uno o più lipidi cationici, uno o più lipidi non-cationici, e uno o più lipidi PEG-modificati, in cui il veicolo di trasferimento è un liposoma e la dimensione del veicolo di trasferimento è inferiore a 100nm e

l'uso di tali composizioni farmaceutiche nel trattamento di una malattia in un soggetto che risulta dalla produzione carente di una proteina, in cui la composizione farmaceutica si distribuisce preferibilmente in cellule epatiche dopo somministrazione al soggetto e la proteina codificata è espressa nelle cellule epatiche del soggetto.

Le composizioni fornite nella presente sono utili nella gestione e nel trattamento di un gran numero di malattie che risultano da carenze proteiche. Individui che soffrono di tali malattie possono avere difetti genetici alla base che determinano l'espressione compromessa di una proteina, incluse, ad esempio, la non-sintesi della proteina, la sintesi ridotta della proteina, o la sintesi di una proteina priva di o avente attività biologica ridotta. In particolare, le composizioni fornite nella presente sono utili per il trattamento dei disturbi metabolici del ciclo dell'urea che si verificano come risultato di uno o più difetti della biosintesi di enzimi coinvolti nel ciclo dell'urea. I metodi e le composizioni descritti nella presente sono anche utili in varie applicazioni *in vitro* e *in vivo* in cui il rilascio di un acido nucleico (ad es., mRNA) ad una cellula target e trasfezione di tale cellula target sono desiderate.

In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende un mRNA e un veicolo di trasferimento come definito nelle rivendicazioni. In alcune forme di realizzazione, l'mRNA codifica un enzima del ciclo dell'urea. In forme di realizzazione, l'mRNA può comprendere una o più modificazioni che conferiscono stabilità all'mRNA (ad es., rispetto al tipo selvatico o alla versione nativa dell'mRNA) e può anche comprendere una o più modificazioni relative al tipo selvatico che corregge un difetto coinvolto nell'espressione aberrante associata della proteina. Ad esempio, gli acidi nucleici della presente invenzione possono comprendere modificazioni ad una o entrambe le regioni non tradotte 5' e 3'. Tali modificazioni possono includere, ma senza limitazione, l'inclusione di una sequenza parziale di un gene immediato-precoce 1 (IE1) del citomegalovirus (CMV), una coda poli A, una struttura Cap1 o una sequenza codificante l'ormone della crescita umano (hGH)).

Metodi di trattamento di un soggetto, in cui il soggetto ha una carenza proteica o enzimatica sono anche descritti. I metodi possono comprendere la somministrazione di una composizione fornita nella presente. Sono descritti, ad esempio, metodi di trattamento o prevenzione di condizioni in cui la produzione di una particolare proteina e/o l'uso di una particolare proteina è inadeguato o compromesso. In una forma di realizzazione, i metodi descritti nella presente possono essere usati per trattare un soggetto che presenta una carenza di uno o più enzimi del ciclo dell'urea. Il metodo può comprendere la messa a contatto e la trasfezione di cellule o tessuti target (quali epatociti che sono carenti di uno o più enzimi del ciclo dell'urea) con una composizione fornita nella presente, in cui l'acido nucleico codifica un enzima del ciclo dell'urea carente. In questo modo, l'espressione dell'enzima carente nella cellula target è aumentata, il che a sua volta dovrebbe migliorare gli effetti della carenza dell'enzima sottostante. La proteina espressa dalla cellula target dall'mRNA tradotto può essere mantenuta all'interno del citosol della cellula target o in alternativa può essere secreta a livello extracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'mRNA comprende una modificazione che conferisce stabilità al codice dell'mRNA (ad es., rispetto alla versione di tipo selvatico o nativa dell'mRNA). Ad esempio, l'mRNA codificante un enzima funzionale può comprendere una o più modificazioni a una o più regioni non tradotte in 5' e 3'.

L'mRNA fornito nella presente è formulato in un veicolo di trasferimento lipidico o liposomiale per facilitare il rilascio nelle cellule target e/o stabilizzare gli acidi nucleici contenuti all'interno. Veicoli di trasferimento comprendono uno o più lipidi cationici, lipidi non cationici e lipidi PEG-modificati. Ad esempio, il veicolo di trasferimento può comprendere una miscela di lipidi CHOL, DOPE, DLinDMA e DMG-PEG-2000. In altre forme di realizzazione, il veicolo di trasferimento può comprendere lipidi ICE, DOPE e DMG-PEG-2000. In un'altra forma di realizzazione, il veicolo di trasferimento può comprendere uno o più lipidi selezionati dal gruppo costituito da ICE, DSPC, CHOL,

DODAP, DOTAP e C8-PEG-2000-ceramide. Il veicolo di trasferimento è un liposoma che è in grado di distribuirsi preferibilmente nelle cellule e nei tessuti target *in vivo*.

La cellula target è messa a contatto con una composizione comprendente un mRNA e un veicolo di trasferimento. In seguito all'espressione della proteina o dell'enzima codificato dall'mRNA, la proteina o l'enzima espressi possono essere trattenuti all'interno del citosol della cellula target o in alternativa possono essere secreti a livello extracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'mRNA codifica un enzima del ciclo dell'urea. In alcune forme di realizzazione, l'mRNA può comprendere una o più modificazioni che conferiscono stabilità all'mRNA e possono anche comprendere una o più modificazioni rispetto al tipo selvatico che corregge un difetto coinvolto nell'espressione aberrante associata della proteina. In alcune forme di realizzazione, le composizioni della presente invenzione si basano su cellule target per esprimere la proteina funzionale codificata dall'mRNA somministrato a livello esogeno. Poiché la proteina codificata dall'mRNA esogeno è tradotta dalla cellula target, le proteine e gli enzimi espressi possono essere caratterizzati come meno immunogeni rispetto alle loro controparti preparate in modo ricombinante. La presente descrizione contempla l'uso di ligandi di targeting in grado di potenziare l'affinità di una composizione per una o più cellule target. In una forma di realizzazione, il ligando di targeting è apolipoproteina-B o apolipoproteina-E e le cellule target corrispondenti esprimono recettori della lipoproteina a bassa densità, facilitando così il riconoscimento del ligando di targeting.

Le caratteristiche sopra descritte e molte altre caratteristiche e vantaggi associati della presente invenzione risulteranno meglio compresi con riferimento alla seguente descrizione dettagliata dell'invenzione quando considerata unitamente agli esempi allegati.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La FIG. 1 illustra la sintesi del lipide imidazolo colesterolestere ICE.

La FIG. 2 illustra la presenza dell'attività luciferasi di lucciola prodotta dal rilascio di mRNA

esogeno nei fegati e nelle milze di topi CD-1 trattati e non trattati.

La FIG. 3 illustra l'ibridazione *in situ* dell'mRNA di luciferasi di lucciola con codone ottimizzato in fegati di topi di controllo e trattati (B1 e B2) osservata su pellicola per raggi X con ingrandimento ridotto (2X). (A) rappresenta la colorazione con viola di cresile di sezioni di fegato di controllo (Ct) e trattate di topi B1 e B2; (B) rappresenta rivelazione mediante autoradiografia su pellicola per raggi X mediante sonda antisenso di mRNA di luciferasi di CO-FF in fegati di topi B1 e B2; e (C) rappresenta l'ibridazione controllo (senso). Le abbreviazioni "cv", "as" e "s" corrispondono a viola di cresile, antisenso e senso, rispettivamente.

La FIG. 4 illustra la marcatura dell'mRNA di luciferasi di lucciola con codone ottimizzato in fegati trattati (B1) e di controllo. (A) rappresenta la rivelazione mediante autoradiografia in emulsione di mRNA di luciferasi di CO-FF in una sezione di fegato B1 osservata come marcatura luminosa con illuminazione in campo scuro; (B) rappresenta la stessa regione di (A) osservata con illuminazione in campo luminoso usando viola di cresile come controcolorante; (C) rappresenta la sezione di fegato B1 trattata con la ribosonda di controllo di luciferasi di CO-FF (senso) che stabilisce il livello della marcatura non-specifica; (D) rappresenta la stessa regione di (C) osservata con illuminazione in campo luminoso; (E) rappresenta la sezione di fegato di controllo non trattata trattata con sonda antisenso di luciferasi di CO-FF, non si è rivelato alcun segnale; (F) rappresenta la stessa regione di (E) osservata con illuminazione in campo luminoso; (G) rappresenta la sezione di fegato di controllo trattata con la ribosonda di controllo di luciferasi CO-FF (senso) che stabilisce il livello di marcatura non specifica; e (H) rappresenta la stessa regione di (G) osserva con illuminazione in campo luminoso. Le abbreviazioni "BD", "HA", "H", "PV", "as", e "s" corrispondono a dotto biliare, arteria epatica, vena porta, antisenso e senso rispettivamente. Ingrandimento: 100X.

La FIG. 5 illustra la colorazione immunoistochimica di fegati di topi per la rivelazione della proteina luciferasi di lucciola. (A) rappresenta la colorazione di luciferasi negativa per il fegato di controllo di topi trattati con 1 x PBS (20X); (B) rappresenta la rivelazione della proteina luciferasi positiva tramite metodi basati sulla fluorescenza immunoistochimica che dimostrano che la proteina luciferasi di lucciola è osservata negli epatociti (20X) nonché un numero ridotto di cellule endoteliali sinusoidali che erano positive anche per la proteina luciferasi; (C) rappresenta una colorazione della proteina luciferasi di lucciola positiva mostrata ad un ingrandimento superiore (40X). La proteina luciferasi è osservata in tutto il citoplasma degli epatociti. Le abbreviazioni (S) e (H) corrispondono alle cellule sinusoidali e agli epatociti, rispettivamente.

La FIG. 6 mostra la sequenza nucleotidica dell'mRNA di luciferasi di CO-FF (SEQ ID NO: 1).

La FIG. 7 mostra le sequenze nucleotidiche di una sequenza di CMV in 5' (SEQ ID NO: 2) e una sequenza di hGH in 3' (SEQ ID NO: 3) che possono essere usate per fiancheggiare una sequenza di mRNA di interesse.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Nella presente sono descritte composizioni che facilitano il rilascio di acidi nucleici a, e la successiva trasfezione di celle target. Le composizioni fornite nella presente sono utili per il trattamento di malattie che risultano dalla produzione carente di proteine. Ad esempio, malattie adeguate che possono essere trattate sono quelle in cui una mutazione genetica in un particolare gene determina che le cellule affette non esprimano, abbiano espressione ridotta di, o esprimano una proteina non funzionale. La messa a contatto di tali cellule target con le composizioni della presente invenzione in modo tale che le cellule target siano trasfettate con un acido nucleico codificante una versione funzionale della proteina consente la produzione di una proteina funzionale che è utile nel trattamento di una tale carenza.

In particolare, l'invenzione è relativa ad una composizione farmaceutica comprendente un veicolo di trasferimento, un eccipiente farmaceuticamente accettabile e almeno una molecola di mRNA codificante una proteina, il veicolo di trasferimento comprendendo uno o più lipidi cationici, uno o più lipidi non-cationici e uno o più lipidi PEG-modificati, in cui il veicolo di trasferimento è un liposoma e la dimensione del veicolo di trasferimento è inferiore a 100 nm e l'uso di tali composizioni farmaceutiche nel trattare una malattia in un soggetto che risulta dalla produzione carente di una proteina, in cui la composizione farmaceutica si distribuisce preferibilmente nelle cellule epatiche dopo la somministrazione al soggetto e la proteina codificata è espressa nelle cellule epatiche del soggetto.

L'mRNA codifica, ad esempio, un enzima del ciclo dell'urea funzionale. In alcune forme di realizzazione, l'mRNA della composizione può essere modificato per conferire stabilità potenziata (ad es., rispetto alla versione di tipo selvatico dell'mRNA e/o la versione dell'mRNA trovato a livello endogeno nella cellula target). Ad esempio, l'mRNA della composizione può includere una modificazione rispetto ad una versione di tipo selvatico dell'mRNA, in cui la modificazione conferisce stabilità all'mRNA della composizione.

In alcune forme di realizzazione, l'mRNA della composizione è più stabile rispetto alla versione di tipo selvatico dell'mRNA e/o più stabile rispetto alla versione dell'mRNA trovato a livello endogeno nella cellula target.

Sono descritti metodi di trattamento di un soggetto con una carenza del ciclo dell'urea. I metodi comprendono la somministrazione di una composizione comprendente un mRNA e un veicolo di trasferimento, in cui l'mRNA codifica un enzima del ciclo dell'urea. In alcune forme di realizzazione, l'mRNA della composizione è più stabile rispetto alla versione di tipo selvatico dell'mRNA e/o più stabile rispetto alla versione dell'mRNA trovato a livello endogeno nel target.

Come usato nella presente, il termine "acido nucleico" si riferisce a materiale genetico (ad es.,

oligonucleotidi o polinucleotidi comprendenti DNA o RNA). L'acido nucleico delle composizioni dell'invenzione è mRNA.

La presente invenzione descrive l'uso di mRNA o di mRNA stabilizzato come sostanza terapeutica in grado di facilitare l'espressione di un enzima o proteina funzionale di cui un soggetto è carente (ad es., un enzima del ciclo dell'urea). Il termine "funzionale", come usato nella presente per classificare una proteina o enzima, indica che la proteina o l'enzima ha attività biologica, o in alternativa in grado di eseguire la stessa o una simile funzione della proteina o dell'enzima nativo o che funziona normalmente. Le composizioni della presente invenzione sono utili per il trattamento di vari disturbi metabolici o genetici, e in particolare i disturbi genetici o metabolici che implicano la non-espressione o l'errata espressione o carenza di una proteina.

Nel contesto della presente invenzione, il termine "espressione" è usato nel suo senso più ampio per far riferimento o alla trascrizione di un gene specifico o di acido nucleico in almeno un trascritto di mRNA o la traduzione di almeno un mRNA o acido nucleico in una proteina o enzima. Le composizioni della presente invenzione sono composizioni che comprendono uno o più acidi nucleici di mRNA che codificano proteine funzionali o enzimi, e nel contesto di tali acidi nucleici di mRNA, l'espressione si riferisce alla traduzione di tale mRNA per produrre la proteina o l'enzima codificato con esso.

L'acido nucleico può essere espresso (la trascrizione dell'mRNA da un gene) e tradotto (la traduzione di una proteina codificata da un trascritto di mRNA sintetico o esogeno). L'acido nucleico può codificare, ad esempio, un ormone, un enzima, un recettore, un polipeptide, un peptide o altra proteina di interesse. In una forma di realizzazione della presente invenzione, l'acido nucleico (ad es., mRNA codificante una proteina carente) può opzionalmente avere modificazioni chimiche o biologiche che, ad esempio, migliorano la stabilità e/o l'emi-vita di tale acido nucleico o che migliorano o facilitano in altro modo la traduzione.

È anche contemplato dalla presente invenzione il co-rilascio di uno o più acidi nucleici unici a cellule target, ad esempio, combinando due acidi nucleici unici in un singolo veicolo di trasferimento. In una forma di realizzazione della presente invenzione, un primo acido nucleico terapeutico, quale mRNA codificante galattosio 1-fosfato uridiltrasferasi (GALT), ed un secondo acido nucleico terapeutico, quale un mRNA codificante la galattochinasi (GALK), possono essere formulati in un singolo veicolo di trasferimento e somministrati (ad es., per il trattamento della galattosemia). La presente invenzione contempla anche il co-rilascio e/o la co-somministrazione di un primo acido nucleico terapeutico e un secondo acido nucleico così da facilitare e/o potenziare la funzione o il rilascio del primo acido nucleico terapeutico. Ad esempio, un tale secondo acido nucleico (ad es., mRNA esogeno o sintetico) può codificare una proteina di trasporto di membrana che in seguito all'espressione (ad es., traduzione dell'mRNA esogeno o sintetico) facilita il rilascio o potenzia l'attività biologica del primo acido nucleico. In alternativa, il primo acido nucleico terapeutico può essere somministrato con un secondo acido nucleico che funziona come "chaperone" ad esempio per guidare il ripiegamento o del primo acido nucleico terapeutico o di acidi nucleici endogeni.

È anche contemplato il rilascio di uno o più acidi nucleici terapeutici per trattare una singola carenza proteica, in cui ognuno di tali acidi nucleici terapeutici funziona mediante un meccanismo d'azione diverso. Ad esempio, le composizioni della presente invenzione possono comprendere un primo acido nucleico terapeutico che è somministrato per correggere una carenza proteica endogena e che è accompagnato da un secondo acido nucleico che è somministrato per inattivare o effettuare il "knock-down" di un acido nucleico endogeno malfunzionante e il suo prodotto proteico o enzimatico. Tali acidi nucleici possono codificare, ad esempio, mRNA e siRNA.

Mentre gli acidi nucleici trascritti *in vitro* (ad es., mRNA) possono essere trasfettati in cellule target, tali acidi nucleici sono facilmente ed efficientemente degradati dalla cellula *in vivo*,

rendendo così detti acidi nucleici inefficaci. Inoltre, alcuni acidi nucleici sono instabili nei fluidi corporei (in particolare nel siero umano) e possono essere degradati anche prima di raggiungere una cellula target. Inoltre, all'interno di una cellula, un mRNA naturale può avere un decadimento con un'emi-vita tra 30 minuti e parecchi giorni.

Gli acidi nucleici mRNA forniti nella presente mantengono almeno una certa capacità di essere tradotti, producendo così una proteina funzionale all'interno di una cellula target. Di conseguenza, la presente invenzione è relativa alla somministrazione di un acido nucleico stabilizzato (mRNA che è stato stabilizzato contro digestione o degradazione di nucleasi *in vivo*) che modula l'espressione di un gene o la traduzione di una proteina funzionale all'interno di una cellula target. In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, l'attività dell'acido nucleico (mRNA codificante una proteina funzionale) è prolungata rispetto ad un periodo di tempo esteso. Ad esempio, l'attività degli acidi nucleici può essere prolungata in modo tale che le composizioni della presente invenzione siano somministrate ad un soggetto su base semi-settimanale o bi-settimanale o più preferibilmente su base mensile, bi-mensile, trimestrale o annuale. L'attività estesa o prolungata delle composizioni della presente invenzione, ed in particolare dell'mRNA compreso in esse, è direttamente associata alla quantità di proteina o enzima funzionale tradotto da tale mRNA. Similmente, l'attività delle composizioni della presente invenzione può essere ulteriormente estesa o prolungata mediante modificazioni effettuate per migliorare o potenziare la traduzione degli acidi nucleici mRNA. Ad esempio, la sequenza consenso di Kozac svolge una funzione nell'iniziazione della traduzione proteica, e l'inclusione di una tale sequenza consenso di Kozac negli acidi nucleici mRNA della presente invenzione può ulteriormente estendere o prolungare l'attività degli acidi nucleici mRNA. Inoltre, la quantità di proteina funzionale tradotta dalla cellula target è una funzione della quantità dell'acido nucleico (ad es., mRNA) rilasciata alle cellule target e la stabilità di tale acido nucleico. Nella misura in cui la stabilità

della composizione della presente invenzione può essere migliorata o potenziata, l'emi-vita, l'attività della proteina tradotta e la frequenza di dosaggio della composizione possono essere ulteriormente estese.

Di conseguenza, in una forma di realizzazione preferita, gli acidi nucleici forniti nella presente comprendono almeno una modificazione che conferisce stabilità aumentata o potenziata all'acido nucleico, inclusa, per esempio, resistenza migliorata alla digestione con nucleasi *in vivo*. Come usati nella presente, i termini "modificazione" e "modificato" come tali termini si riferiscono agli acidi nucleici forniti nella presente, includono almeno una alterazione che potenzia preferibilmente la stabilità e rende l'acido nucleico più stabile (ad es., resistente alla digestione da parte della nucleasi) rispetto alla versione di tipo selvatico o naturale dell'acido nucleico. Come usati nella presente, i termini "stabile" e "stabilità" come tali termini si riferiscono agli acidi nucleici della presente invenzione, ed in particolare rispetto all'mRNA, si riferiscono alla resistenza aumentata o potenziata alla degradazione, ad esempio, da parte di nucleasi (ossia, endonucleasi o esonucleasi) che sono normalmente in grado di degradare tale RNA. La stabilità aumentata può includere, ad esempio, minore sensibilità all'idrolisi o altra disgregazione da parte di enzimi endogeni (ad es., endonucleasi o esonucleasi) o condizioni all'interno della cellula o del tessuto target, aumentando o potenziando così la permanenza di tali acidi nucleici nella cellula, tessuto, soggetto e/o citoplasma target. Le molecole di acido nucleico stabilizzate fornite nella presente dimostrano emi-vite più lunghe rispetto alle loro controparti naturali non-modificate (ad es., la versione di tipo selvatico dell'acido nucleico). Con i termini "modificazione" e "modificato", come tali termini si riferiscono agli acidi nucleici della presente invenzione, sono contemplate anche alterazioni che migliorano o potenziano la traduzione di acidi nucleici mRNA, inclusi, ad esempio, l'inclusione di sequenze che funzionano nell'iniziazione della traduzione proteica (ad es., sequenza consenso di Kozac). (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20): 8125-48 (1987)).

In alcune forme di realizzazione, gli acidi nucleici della presente invenzione sono sottoposti a modificazione chimica o biologica per renderli più stabili. Modificazioni esemplificative all'acido nucleico includono l'impoverimento di una base (ad es., mediante delezione o mediante la sostituzione di un nucleotide con un altro) o la modificazione di una base, ad esempio, la modificazione chimica di una base. La frase "modificazioni chimiche" come usata nella presente, include modificazioni che introducono chimiche che differiscono da quelle osservate in acidi nucleici naturali, ad esempio, modificazioni covalenti quale l'introduzione di nucleotidi modificati, (ad es., analoghi nucleotidici) o l'inclusione di gruppi laterali che non si trovano naturalmente in tali molecole di acidi nucleici.

Inoltre, modificazioni adeguate includono alterazioni in uno o più nucleotidi di un codone in modo tale che il codone codifichi lo stesso amminoacido ma sia più stabile rispetto al codone trovato nella versione di tipo selvatico dell'acido nucleico. Ad esempio, una relazione inversa tra la stabilità dell'RNA e un numero superiore di residui di citidina (C) e/o di uridina (U) è stato dimostrato, e l'RNA privo di residui di C e U è risultato essere stabile alla maggior parte di RNasi (Heidenreich, *et al.*, J. Biol. Chem. 269, 2131-8 (1994)). In alcune forme di realizzazione, il numero di residui di C e/o U in una sequenza di mRNA è ridotto. in un'altra forma di realizzazione, il numero di residui di C e/o U è ridotto mediante sostituzione di un codone codificante un particolare amminoacido ad un altro codone codificante lo stesso amminoacido o un amminoacido affine. Le modificazioni agli acidi nucleici mRNA contemplate della presente invenzione includono anche l'incorporazione di pseudouridine. L'incorporazione di pseudouridine negli acidi nucleici mRNA della presente invenzione può potenziare la stabilità e la capacità traduzionale nonché ridurre l'immunogenicità *in vivo*. (Si veda, ad es., Karikò, K., et al., Molecular Therapy 16 (11): 1833-1840 (2008)). Le sostituzioni e le modificazioni degli acidi nucleici della presente invenzione possono essere effettuate mediante metodi noti facilmente ad un esperto ordinario nella tecnica.

I vincoli alla riduzione del numero di residui di C e U in una sequenza sarà probabilmente maggiore entro la regione codificante di un mRNA rispetto alla regione non tradotta, (ossia, non sarà probabilmente possibile eliminare tutti i residui di C e U presenti nel messaggio mantenendo al contempo la capacità del messaggio di codificare la sequenza amminoacidica desiderata). La degenerazione del codice genetico presenta, tuttavia, un'opportunità per consentire di ridurre il numero di residui di C e/o U che sono presenti nella sequenza, mantenendo al contempo la stessa capacità codificante (ossia, a seconda di quale amminoacido sia codificato da un codone, parecchie diverse possibilità per la modificazione delle sequenze di RNA possono essere possibili). Ad esempio, i codoni per Gly possono essere alterati in GGA o GGG al posto di GGU o GGC.

Il termine modificazione include anche, ad esempio, l'incorporazione di legami non nucleotidici o di nucleotidi modificati nelle sequenze di acido nucleico della presente invenzione (ad es., modificazione a una o entrambe le estremità 3' e 5' di una molecola di mRNA codificante una proteina o enzima funzionale). Tali modificazioni includono l'aggiunta di basi ad una sequenza di acido nucleico (ad es., l'inclusione di una coda poli A o una coda poli A più lunga), l'alterazione della 3' UTR o della 5' UTR, complessando l'acido nucleico con un agente (ad es., una proteina o una molecola di acido nucleico complementare), e l'inclusione di elementi che variano la struttura di una molecola di acido nucleico (ad es., che formano strutture secondarie).

La coda poli A è considerata stabilizzare i messaggeri naturali e l'RNA senso sintetico. Pertanto, in una forma di realizzazione, una coda poli A lunga può essere aggiunta ad una molecola di mRNA rendendo così più stabile l'RNA. Code poli A possono essere aggiunte usando una varietà di tecniche riconosciute nella tecnica. Ad esempio, code poli A lunghe possono essere aggiunte a RNA sintetico o trascritto *in vitro* usando la poli A polimerasi (Yokoe, *et al.*, Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Un vettore di trascrizione può

anche codificare code poli A lunghe. Inoltre, code poli A possono essere addizionate mediante trascrizione direttamente da prodotti di PCR. Poli A può anche essere ligata all'estremità 3' di un RNA senso con una RNA ligasi (si veda, ad es., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2^a ed. edito da Sambrook, Fritsch e Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edizione 1991)). In una forma di realizzazione, la lunghezza della coda poli A è di almeno circa 90, 200, 300, 400 almeno 500 nucleotidi. In una forma di realizzazione, la lunghezza della coda poli A è regolata per controllare la stabilità di una molecola di mRNA senso modificata dell'invenzione, e pertanto, la trascrizione della proteina. Ad esempio, poiché la lunghezza della coda poli A può influenzare l'emi-vita di una molecola di mRNA senso, la lunghezza della coda poli A può essere regolata per modificare il livello di resistenza dell'mRNA alle nucleasi e pertanto controllare l'andamento temporale dell'espressione proteica in una cellula. In una forma di realizzazione, le molecole di acido nucleico stabilizzate sono sufficientemente resistenti alla degradazione *in vivo* (ad es., mediante nucleasi), in modo tale che possano essere rilasciate nella cellula target senza un veicolo di trasferimento.

In una forma di realizzazione, un acido nucleico codificante una proteina può essere modificato mediante l'incorporazione di sequenze 3' e/o 5' non tradotte (UTR) che non si trovano naturalmente nell'acido nucleico di tipo selvatico. In una forma di realizzazione, le sequenze fiancheggiatrici in 3' e/o 5' che fiancheggiano naturalmente un mRNA e codificano una seconda proteina non affine possono essere incorporate nella sequenza nucleotidica di una molecola di mRNA codificante una proteina terapeutica o funzionale al fine di modificarla. Ad esempio, le sequenze 3' o 5' di molecole di mRNA che sono stabili (ad es., globina, actina, GAPDH, tubulina, istone o enzimi del ciclo dell'acido citrico) possono essere incorporate nella regione 3' e/o 5' di una molecola di acido nucleico mRNA senso per aumentare la stabilità della molecola di mRNA senso.

Sono anche contemplate dalla presente invenzione modificazioni alle sequenze di acido

nucleico effettuate a una o entrambe le estremità 3' e 5' dell'acido nucleico. Ad esempio, la presente invenzione contempla le modificazioni all'estremità 5' dell'mRNA per includere una sequenza parziale di un gene immediato-precocce 1 (IE1) di CMV o un suo frammento (ad es., SEQ ID NO: 2) per migliorare la resistenza alla nucleasi e/o migliorare l'emi-vita dell'acido nucleico. Oltre ad aumentare la stabilità della sequenza di acido nucleico mRNA, si è scoperto in modo sorprendente che l'inclusione di una sequenza parziale di un gene immediato-precocce 1 (IE1) di CMV potenzia la traduzione dell'mRNA e l'espressione della proteina o enzima funzionale. È anche contemplata l'inclusione di una sequenza codificante l'ormone della crescita umano (hGH), o un suo frammento (ad es., SEQ ID NO: 3) in una o entrambe le estremità 3' e 5' dell'mRNA per stabilizzare ulteriormente l'acido nucleico. In generale, modificazioni preferite migliorano la stabilità e/o le proprietà farmacocinetiche (ad es., emi-vita) dell'acido nucleico rispetto alle loro controparti non modificate e includono, ad esempio, modificazioni effettuate per migliorare tale resistenza dell'acido nucleico ad una digestione da parte di nucleasi *in vivo*.

In alcune forme di realizzazione, la composizione può comprendere un reagente stabilizzante. Le composizioni possono includere uno o più reagenti di formulazione che si legano direttamente o indirettamente a, e stabilizzano l'acido nucleico, potenziando così il tempo di permanenza nel citoplasma di una cellula target. Tali reagenti determinano preferibilmente un emi-evita migliorata di un acido nucleico nelle cellule target. Ad esempio, la stabilità di un mRNA e l'efficienza di traduzione possono essere aumentate dall'incorporazione di "reagenti stabilizzanti" che formano complessi con l'mRNA che si trova naturalmente all'interno di una cellula (si veda ad es., brevetto U.S. n. 5.677.124). L'incorporazione di un reagente stabilizzante può essere effettuata ad esempio, combinando poli A e la proteina con l'mRNA da stabilizzare *in vitro* prima di caricare o incapsulare l'mRNA all'interno di un veicolo di trasferimento. Reagenti stabilizzanti esemplificativi includono una o più proteine, peptidi,

aptameri, proteine accessorie traduzionali, proteine leganti l'mRNA e/o fattori di iniziazione della traduzione.

La stabilizzazione delle composizioni può anche essere migliorata dall'uso di parti caratteristiche inibenti l'opsonizzazione, che sono tipicamente grandi polimeri idrofili che si legano chimicamente o fisicamente al veicolo di trasferimento (ad es., mediante intercalazione di una ancora solubile in lipidi alla membrana stessa, o che si legano direttamente a gruppi attivi dei lipidi di membrana). Questi polimeri idrofili che inibiscono l'opsonizzazione formano uno strato di superficie protettivo che diminuisce significativamente l'assorbimento dei liposomi da parte dei sistemi dei macrofagi-monociti e del sistema reticolo-endoteliale (ad es., come descritto nel brevetto U.S. n. 4.920.016). Veicoli di trasferimento modificati con parti di inibizione dell'opsonizzazione, rimangono pertanto in circolazione molto più a lungo rispetto alle loro controparti non modificate.

Quando l'RNA è ibridato con una molecola di acido nucleico complementare (ad es., DNA o RNA) può essere protetto dalle nucleasi. (Krieg, *et al.*, Melton. *Methods in Enzymology*. 1987; 155, 397-415). La stabilità dell'mRNA ibridato è probabilmente dovuta alla specificità del singolo filamento intrinseco della maggior parte delle RNasi. In alcune forme di realizzazione, il reagente stabilizzante selezionato per complessare un acido nucleico è una proteina eucariotica (ad es., una proteina di mammifero). In un'ulteriore forma di realizzazione, l'mRNA per l'uso nella terapia può essere modificato mediante ibridazione con una seconda molecola di acido nucleico. Se un'intera molecola di mRNA fosse ibridata con una molecola di acido nucleico complementare, l'iniziazione della traduzione potrebbe essere ridotta. In alcune forme di realizzazione, la regione non tradotta in 5' e la regione di inizio AUG della molecola di mRNA possono opzionalmente essere lasciate non ibridate. Successivamente all'iniziazione della traduzione, l'attività di svolgimento del complesso ribosomiale può funzionare anche su duplex ad elevata affinità cosicché la traduzione può

procedere. (Liebhaber. J. Mol. Biol. 1992; 226: 2-13; Monia *et al.*, J. Biol. Chem. 1993; 268: 14514-22).

Si comprenderà che uno qualsiasi dei metodi sopra descritti per potenziare la stabilità degli acidi nucleici può essere usato o da solo o in combinazione con uno o più di uno qualsiasi degli altri metodi e/o delle composizioni sopra descritti.

In una forma di realizzazione, le composizioni della presente invenzione facilitano il rilascio di acidi nucleici nelle cellule target. In alcune forme di realizzazione, la facilitazione del rilascio nelle cellule target include l'aumento della quantità di acido nucleico che giunge a contatto con le cellule target. In alcune forme di realizzazione, la facilitazione del rilascio nelle cellule target include la riduzione della quantità di acido nucleico che giunge a contatto con le cellule non-target. In alcune forme di realizzazione, la facilitazione del rilascio nelle cellule target include consentire la trasfezione di almeno alcune cellule target con l'acido nucleico. In alcune forme di realizzazione, il livello di espressione del prodotto codificato dall'acido nucleico rilasciato è aumentato nelle cellule target.

Gli acidi nucleici della presente invenzione possono essere opzionalmente combinati con un gene reporter (ad es., a monte o a valle della regione codificante dell'acido nucleico) che, ad esempio, facilita la determinazione del rilascio di acido nucleico alle cellule o tessuti target. Geni reporter adeguati possono includere, ad esempio, mRNA della proteina fluorescente verde (GFP mRNA), mRNA di Luciferasi di *Renilla* (Luciferasi mRNA), mRNA di Luciferasi di lucciola o loro combinazioni. Ad esempio GFP mRNA può essere fuso con un acido nucleico codificante OTC mRNA per facilitare la conferma della posizione dell'mRNA nelle cellule, tessuti o negli organi target.

Come usati nella presente, i termini "trasfettare" o "trasfezione" indicano l'introduzione intracellulare di un acido nucleico in una cellula, o preferibilmente in una cellula target. L'acido nucleico introdotto può essere stabilmente o transitoriamente mantenuto nella cellula

target. Il termine "efficienza di trasfezione" si riferisce alla quantità relativa di acido nucleico prelevata dalla cellula target che è soggetta alla trasfezione. In pratica, l'efficienza di trasfezione è stimata dalla quantità di un prodotto di acido nucleico reporter espresso dalle cellule target successivamente alla trasfezione. Sono preferite composizioni con elevate efficienze di trasfezione e in particolare quelle composizioni che riducono al minimo gli effetti negativi che sono mediati dalla trasfezione di cellule e tessuti non-target. Le composizioni della presente invenzione che dimostrano elevate efficienze di trasfezione migliorano la probabilità che dosaggi adeguati dell'acido nucleico saranno rilasciati al sito della patologia, riducendo al minimo i potenziali effetti avversi sistemici.

Come fornite nella presente, le composizioni includono un veicolo di trasferimento comprendente uno o più lipidi cationici, uno o più lipidi non-cationici e uno o più lipidi PEG-modificati, in cui il veicolo di trasferimento è un liposoma e la dimensione del veicolo di trasferimento è inferiore a 100nm. Come usato nella presente, il termine "veicolo di trasferimento" include qualsiasi veicolante, diluente, eccipiente farmaceutico standard e simili che sono generalmente intesi per l'uso in relazione alla somministrazione di agenti biologicamente attivi, inclusi acidi nucleici. Le composizioni ed in particolare i veicoli di trasferimento descritti nella presente sono in grado di rilasciare acidi nucleici di varie dimensioni nelle loro cellule o tessuti target. In una forma di realizzazione della presente invenzione, i veicoli di trasferimento della presente invenzione sono in grado di rilasciare grandi sequenze di acido nucleico (ad es., acidi nucleici di almeno 1 kDa, 1,5 kDa, 2 kDa, 2,5 kDa, 5 kDa, 10kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, o più). Gli acidi nucleici possono essere formulati con uno o più reagenti accettabili che forniscono un veicolo per il rilascio di tali acidi nucleici nelle cellule target. Reagenti adeguati sono generalmente selezionati in relazione ad un numero di fattori che includono, tra le altre cose, le proprietà biologiche o chimiche degli acidi nucleici (ad es., la carica), la via desiderata di

somministrazione, l'ambiente biologico anticipato a cui detti acidi nucleici saranno esposti e le proprietà specifiche delle cellule target intese. In alcune forme di realizzazione, i veicoli di trasferimento quali liposomi, incapsulano gli acidi nucleici senza compromettere l'attività biologica. In alcune forme di realizzazione, il veicolo di trasferimento dimostra il legame preferenziale e/o sostanziale alla cellula target rispetto alle cellule non-target. In una forma di realizzazione preferita, il veicolo di trasferimento rilascia il suo contenuto nella cellula target in modo tale che gli acidi nucleici siano rilasciati nello scomparto subcellulare adeguato, quale il citoplasma. Il veicolo di trasferimento dell'invenzione è una vescicola liposomiale per facilitare il trasferimento di un acido nucleico nelle cellule e nei tessuti target. Lipidi sono usati come componente del veicolo di trasferimento. Esempi di lipidi adeguati includono, ad esempio, i composti fosfatidile (ad es., fosfatidilglicerolo, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, sfingolipidi, cerebrosidi e gangliosidi).

Il veicolo di trasferimento può essere selezionato e/o preparato per ottimizzare il rilascio dell'acido nucleico nella cellula, nel tessuto o organo target. Ad esempio, le proprietà del veicolo di trasferimento (ad es., dimensione, carica e/o pH) possono essere ottimizzate per rilasciare efficacemente tale veicolo di trasferimento nella cellula o organo target, ridurre la clearance immunitaria e/o favorire la ritenzione nell'organo target.

I liposomi (ad es., nanoparticelle lipidiche liposomiali) sono generalmente utili in una varietà di applicazioni nella ricerca, nell'industria, e nella medicina, in particolare per il loro uso come veicoli di trasferimento di composti diagnostici o terapeutici *in vivo* (Lisci, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998; Drummond *et al.*, Pharmacol. Rev., 51: 691-743, 1999) e sono solitamente caratterizzati come vescicole microscopiche aventi uno spazio di liquido interno sequestrato da un mezzo esterno da una membrana di uno o più doppi strati. Le membrane a doppio strato di liposomi sono tipicamente formate da molecole amfifiliche, quali lipidi di origine sintetica o naturale che comprendono domini idrofili e idrofobi

spazialmente separati (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Membrane a doppio strato dei liposomi possono anche essere formate da polimeri amfifilici e tensioattivi (ad es., polimerosomi, niosomi, ecc.).

Nel contesto della presente invenzione, un veicolo di trasferimento liposomiale serve tipicamente a trasportare l'acido nucleico nella cellula target. Agli scopi della presente invenzione, i veicoli di trasferimento liposomiale sono preparati per contenere gli acidi nucleici desiderati. Il processo di incorporazione di un acido nucleico desiderato in un liposoma è spesso indicato come "carico" (Lasic, *et al.*, FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Gli acidi nucleici incorporati nel liposoma possono essere completamente o parzialmente situati nello spazio interno del liposoma, all'interno della membrana a doppio strato del liposoma o associati alla superficie esterna della membrana liposomiale. L'incorporazione di un acido nucleico nei liposomi è indicata nella presente come "incapsulamento" in cui l'acido nucleico è interamente contenuto all'interno dello spazio del liposoma.

Lo scopo dell'incorporazione di un acido nucleico in un veicolo di trasferimento, quale un liposoma è spesso per proteggere l'acido nucleico dall'ambiente che può contenere enzimi o sostanze chimiche che degradano gli acidi nucleici e/o i sistemi o i recettori che causano una rapida secrezione di acidi nucleici. Di conseguenza, in una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, il veicolo di trasferimento selezionato è in grado di potenziare la stabilità dell'acido nucleico (degli acidi nucleici) (mRNA codificante una proteina funzionale) contenuta al suo interno. Il liposoma può consentire all'acido nucleico incapsulato di raggiungere la cellula target e/o può preferibilmente consentire all'acido nucleico incapsulato di raggiungere la cellula target o in alternativa limitare il rilascio di tali acidi nucleici ad altri siti o cellule in cui la presenza dell'acido nucleico somministrato può essere inutile o indesiderabile. Inoltre, l'incorporazione degli acidi nucleici in un veicolo di trasferimento, quale ad esempio, un liposoma cationico, facilita anche il rilascio di tali acidi nucleici in una

cellula target.

Idealmente, i veicoli di trasferimento liposomiali sono preparati per incapsulare uno o più acidi nucleici desiderati (ad es., mRNA codificante un enzima del ciclo dell'urea) in modo tale che le composizioni dimostrino una elevata efficienza di trasfezione e stabilità aumentata. Mentre i liposomi possono facilitare l'introduzione degli acidi nucleici nelle cellule target, l'aggiunta di policationi (ad es., poli L-lisina e protamina), come un copolimero può facilitare, e in alcuni casi potenziare fortemente l'efficienza della trasfezione di parecchi tipi di liposomi cationici di 2-28 volte in un numero di linee cellulari sia *in vitro*, sia *in vivo*. (Si vedano N.J. Caplen, *et al.*, *Gene Ther.* 1995; 2: 603; S. Li, *et al.*, *Gene Ther.* 1997; 4, 891).

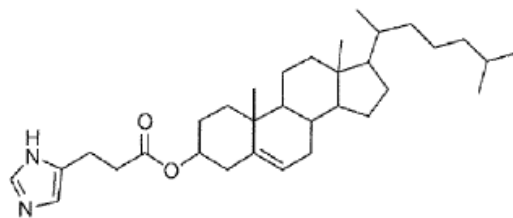
I lipidi cationici e i liposomi sono usati per incapsulare e/o potenziare il rilascio di acidi nucleici nelle loro cellule e nei loro tessuti target. Come usata nella presente, la frase "lipide cationico" si riferisce a qualsiasi numero di specie lipidiche che portano una carica positiva netta su un pH selezionato, quale un pH fisiologico. I veicoli di trasferimento liposomiale contemplati e le nanoparticelle lipidiche possono essere preparati includendo le miscele di lipidi multi-componente di vari rapporti impiegando uno o più lipidi cationici, lipidi non-cationici e lipidi PEG-modificati. Parecchi lipidi cationici sono stati descritti in letteratura, molti dei quali sono disponibili in commercio. In alcune forme di realizzazione, il lipide cationico N-[1-(2,3-dioleilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio cloruro o "DOTMA" è utilizzato. (Feigner *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 84, 7413 (1987); brevetto U.S. n. 4.897.355). DOTMA può essere formulato da solo o può essere combinato con dioleoilfosfatidiletanolamina o "DOPE" o altri lipidi cationici o non-cationici in un veicolo di trasferimento liposomiale o una nanoparticella lipidica, e tali liposomi possono essere usati per potenziare il rilascio di acidi nucleici nelle cellule target. Altri lipidi cationici adeguati includono, ad esempio, 5-carbossispermilglicindiotadecilammide o "DOGS", 2,3-dioleilossi-N-[2-(spermina-carbossammido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamminio o "DOSPA" (Behr *et al.*

Proc Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); brevetto U.S. n. 5.171.678; brevetto U.S. n. 5.334.761), 1,2-dioleoil-3-dimetilammonio-propano o "DODAP", 1,2-dioleoil-3-trimetilammonio-propano o "DOTAP". Lipidi cationici contemplati includono anche 1,2-distearilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoileilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoilenilossi- N,N-dimetil-3-amminopropano o "DLenDMA", N-dioleil-N,N-dimetilammonio cloruro o "DODAC", N,N-distearil-N,N-dimetilammonio bromuro o "DDAB", N-(1,2-dimiristolossiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-idrossietilammonio bromuro o "DMRIE", 3-dimetilammino-2-(colest-5-en-3-beta-ossibutan-4-ossi)-1-(cis,cis-9,12-ottadecadienossi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-ossi)-3'-ossapentossi]-3-dimeti-1-1-(cis,cis-9', 1-2'-ottadecadienossi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetil-3,4-dioleilossibenzilammina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilamminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-dilinoileilossi-N,N-dimetilpropilammina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-dilinoileilcarbammil-3-dimetilamminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-dilinoileilcarbammil-3-dimetilamminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoileil-4-dimetilamminometil-[1,3]-diossolano o "DLin-K-DMA", 2,2-dilinoileil-4-dimetilamminoetil-[1,3]-diossolano o "DLin-K-XTC2-DMA", o loro miscele. (Heies, J., *et al.*, J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., *et al.*, Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); Pubblicazione PCT WO2005/121348A1).

L'uso di lipidi cationici a base di colesterolo è anche contemplato dalla presente invenzione. Tali lipidi cationici a base di colesterolo possono essere usati in combinazione con altri lipidi cationici e non-cationici. Lipidi cationici a base di colesterolo adeguati includono, ad esempio, DC-Chol (N,N-dimetil-N-etilcarbrossammidocolesterolo), 1,4-bis(3-N-oleilamminopropil)piperazina(Gao, *et al.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 179,280 (1991); Wolf *et al.* BioTechniques 23, 139 (1997); brevetto U.S. n. 5.744.335).

Inoltre, parecchi reagenti sono disponibili in commercio per potenziare l'efficienza di trasfezione. Esempi adeguati includono LIPOFECTIN (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), LIPOFECTAMINE (DOSPA:DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINE2000 (Invitrogen), FUGENE, TRANSFECTAM (DOGS) e EFFECTENE.

Sono anche contemplati lipidi cationici quali lipidi a base di dialchilammino, a base di imidazolo e a base di guanidinio. Ad esempio, alcune forme di realizzazione riguardano una composizione comprendente uno o più lipidi cationici a base di imidazolo, ad esempio, il lipide imidazolo colesterol estere o "ICE" (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-dimetil-17-((R)-6-metileptan-2-il)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il-3-(1H-imidazol-4-il)propanoato, come rappresentato dalla struttura (1) che segue. In una forma di realizzazione preferita, un veicolo di trasferimento per il rilascio di mRNA, ad esempio una quantità terapeutica di mRNA, può comprendere uno o più lipidi cationici a base di imidazolo, ad esempio, il lipide imidazolo colesterol estere o "ICE" ((3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-dimetil-17-((R)-6-metileptan-2-il)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il-(1H-imidazol-4-il)propanoato come rappresentato dalla struttura (1).



(1)

Senza voler essere vincolati ad una particolare teoria, si ritiene che la fusogenicità del lipide cationico a base di imidazolo ICE sia associata alla disgregazione endosomiale che è facilitata dal gruppo imidazolo, che ha un pKa inferiore rispetto ai lipidi cationici tradizionali. La disgregazione endosomiale a sua volta favorisce il rigonfiamento osmotico e la disgregazione

della membrana liposomiale, seguita dalla trasfezione o dal rilascio intracellulare del contenuto dell'acido nucleico (degli acidi nucleici) caricati al suo interno nella cellula target. I lipidi cationici a base di imidazolo sono anche caratterizzati dalla loro tossicità ridotta rispetto ad altri lipidi cationici. I lipidi cationici a base di imidazolo (ad es., ICE) possono essere usati come il solo lipide cationico nel veicolo di trasferimento, o in alternativa possono essere combinati con lipidi cationici tradizionali (ad es., DOPE, DC-Chol), lipidi non-cationici, lipidi PEG-modificati e/o lipidi helper. Il lipide cationico può comprendere un rapporto molare da circa 1% a circa 90%, da circa 2% a circa 70%, da circa 5% a circa 50%, da circa 10% a circa 40% dei lipidi totali presenti nel veicolo di trasferimento, o preferibilmente da circa 20% a circa 70% dei lipidi totali presenti nel veicolo di trasferimento. L'uso di fosfolipidi modificati con glicole polietilenico (PEG) e lipidi derivatizzati quali ceramidi derivatizzate (PEG-CER), comprendenti N-ottanoil-sfingosina-1-[succinil(metossi polietilene glicole)-2000] (CS PEG-2000 ceramide) è anche contemplato dalla presente invenzione, o da solo o preferibilmente unitamente ad altre formulazioni lipidiche che comprendono il veicolo di trasferimento. I lipidi PEG-modificati contemplati, includono, senza limitazione, una catena di glicole polietilenico con lunghezza fino a 5 kDa attaccata in modo covalente ad un lipide con catena(e) alchilica(alchiliche) di lunghezza C₆-C₂₀. L'aggiunta di tali componenti può prevenire l'aggregazione del complesso e può anche fornire un mezzo per aumentare la durata in circolazione e aumentare il rilascio della composizione lipide-acido nucleico nei tessuti target (Klibanov *et al.*, (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), oppure possono essere selezionati per scambiarsi rapidamente fuori dalla formulazione *in vivo* (si veda il brevetto U.S: N. 5.885.613). Lipidi scambiabili particolarmente utili sono PEG-ceramidi aventi catene acile più corte (ad es., C14 o C18). Il fosfolipide PEG-modificato e i lipidi derivatizzati della presente invenzione possono comprendere un rapporto molare da circa 0% a circa 20%, da circa 0,5% a circa 20%, da circa

1% a circa 15%, da circa 4% a circa 10%, o da circa 2% del lipide presente nel veicolo di trasferimento liposomiale.

La presente invenzione contempla anche l'uso di lipidi non-cationici. Come usato nella presente, la frase "lipide non-cationico" si riferisce a qualsiasi lipide neutro, zwitterionico o anionico. Come usato nella presente, la frase "lipide anionico" si riferisce a qualsiasi tra una serie di specie lipidiche che portano una carica negativa netta, ad un pH selezionato, quale un pH fisiologico. Lipidi non-cationici includono, senza limitazione, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerolo (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerolo (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoil-fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimmidometil)-cicloesan-1-carbossilato(DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-stearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), colesterolo, o una loro miscela. Tali lipidi non-cationici sono usati in combinazione con altri eccipienti, ossia, lipidi cationici e lipidi non-cationici. Quando usato in combinazione con un lipide cationico, il lipide non-cationico può comprendere un rapporto molare dal 5% a circa il 90%, preferibilmente da circa il 10% a circa il 70% del lipide totale presente nel veicolo di trasferimento.

Il veicolo di trasferimento è preparato combinando molteplici componenti lipidici e/o polimerici. Ad esempio, un veicolo di trasferimento può essere preparato usando DSPC/CHOL/DODAP/C8-ceramide PEG-5000 in un rapporto molare da circa 1 a 50: 5 a 65 : 5 a 90 : 1 a 25, rispettivamente. Un veicolo di trasferimento può essere costituito da ulteriori combinazioni lipidiche in vari rapporti, inclusi ad esempio, DSPC/CHOL/DODAP/mPEG-5000 (ad es., combinati in un rapporto molare di circa 33:40:25:2), DSPC/CHOL/DODAP/C8

PEG-2000-Cer (ad es., combinati in un rapporto molare di circa 31:40:25:4), POPC/DODAP/CS-PEG-2000-Cer (ad es., combinati in un rapporto molare di circa 75-87:3-14:10) o DSPC/CHOL/DOTAP/C8 PEG-2000-Cer (ad es., combinati in un rapporto molare di circa 31:40:25:4) . La selezione dei lipidi cationici, dei lipidi non-cationici e dei lipidi PEG-modificati che comprende il veicolo di trasferimento o la nanoparticella lipidica, nonché il rapporto molare relativo di tali lipidi l'uno con l'altro, si basa sulle caratteristiche del lipide(dei lipidi) selezionato(i), la natura delle cellule o dei tessuti target intesi e le caratteristiche degli acidi nucleici da rilasciare mediante il veicolo di trasferimento liposomiale. Considerazioni aggiuntive includono, ad esempio, la saturazione della catena alchilica, nonché la dimensione, la carica, il pH, il pKa, la fusogenicità e la tossicità del lipide(dei lipidi) selezionato(i).

I veicoli di trasferimento liposomiale per l'uso nella presente invenzione possono essere preparati mediante varie tecniche che sono attualmente note nella tecnica. Vescicole multilamellari (MLV) possono essere preparati secondo tecniche convenzionali, ad esempio, depositando un lipide selezionato sulla parete interna di un contenitore o recipiente adeguato dissolvendo il lipide in un solvente adeguato e quindi facendo evaporare il solvente per lasciare un film sottile sull'interno del recipiente o mediante essiccazione per spruzzatura. Una fase acquosa può quindi essere addizionata al recipiente con un movimento di vorticazione che determina la formazione di MLV. Vescicole unilamellari (ULV) possono quindi essere formate mediante omogeneizzazione, sonicazione o estrusione delle vescicole multilamellari. Inoltre, vescicole unilamellari possono essere formate mediante tecniche di rimozione con detergente.

In alcune forme di realizzazione della presente invenzione, le composizioni della presente invenzione comprendono un veicolo di trasferimento in cui l'mRNA terapeutico (ad es., mRNA codificante OTC) è associato sia sulla superficie del veicolo di trasferimento (ad es.,

un liposoma) sia incapsulato all'interno dello stesso veicolo di trasferimento. Ad esempio, durante la preparazione delle composizioni della presente invenzione, veicoli di trasferimento liposomiali cationici possono associarsi all'mRNA attraverso interazioni elettrostatiche con tale mRNA terapeutico.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni della presente invenzione possono essere caricate con radionuclide diagnostico, materiali fluorescenti o altri materiali che sono rivelabili sia in applicazione *in vitro* sia in applicazione *in vivo*. Ad esempio, materiali diagnostici adeguati per l'uso nella presente invenzione possono includere rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamina (Rh-PE), mRNA di proteina fluorescente verde (GFP mRNA), mRNA di luciferasi di *Renilla* e mRNA di luciferasi di lucciola.

Durante la preparazione di veicoli di trasferimento liposomiale, agenti veicolanti idrosolubili possono essere incapsulati nell'interno acquoso includendoli nella soluzione di idratazione, e molecole lipofile possono essere incorporate nel doppio strato lipidico mediante inclusione nella formulazione lipidica. Nel caso di determinate molecole (ad es., acidi nucleici lipofili cationici o anionici), caricamento dell'acido nucleico in liposomi preformati può essere effettuato, ad esempio, mediante i metodi descritti nel brevetto U.S. N. 4.946.683. In seguito all'incapsulamento dell'acido nucleico, i liposomi possono essere processati così da rimuovere mRNA non incapsulato tramite procedimenti quali cromatografia, diafiltrazione o ultrafiltrazione. Ad esempio, se si desidera rimuovere l'acido nucleico esternamente legato dalla superficie della formulazione di veicolo di trasferimento liposomiale, tali liposomi possono essere sottoposti ad una colonna SEPHACEL di dietilamminoetile.

Oltre all'acido nucleico incapsulato, uno o più agenti terapeutici o diagnostici possono essere inclusi nel veicolo di trasferimento. Ad esempio, tali agenti terapeutici aggiuntivi possono essere associati alla superficie del liposoma, possono essere incorporati nel doppio strato lipidico di un liposoma mediante inclusione nella formulazione lipidica o carico in liposomi

preformati (si vedano i brevetti U.S. n. 5.194.654 e 5.223.263).

Vi sono parecchi metodi per ridurre la dimensione, o "il dimensionamento" dei veicoli di trasferimento liposomiale e uno qualsiasi di questi metodi può generalmente essere impiegato quando il dimensionamento è usato come parte dell'invenzione. Il metodo di estrusione è un metodo preferito per il dimensionamento liposomiale (Hope, M J *et al.*, Reduction of Liposome Size and Preparation of Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques. In: *Liposome Technology* (G. Gregoriadis, Ed.) Vol. 1. pag. 123 (1993). Il metodo consiste nell'estrusione di liposomi attraverso una membrana di policarbonato a piccoli pori o una membrana ceramica asimmetrica per ridurre le dimensioni dei liposomi ad una distribuzione di dimensione relativamente ben definita. Tipicamente, la sospensione è fatta circolare attraverso la membrana una o più volte fino a quando si ottiene la distribuzione della dimensione dei liposomi desiderata. I liposomi possono essere estrusi attraverso membrane a pori successivamente più piccoli per ottenere una riduzione graduale della dimensione dei liposomi.

Una varietà di metodi alternativi noti nella tecnica è disponibile per il dimensionamento di una popolazione di veicoli di trasferimento liposomiale. Un tale metodo di dimensionamento è descritto nel brevetto U.S. N. 4.737.323. La sonicazione di una sospensione liposomiale o mediante sonicazione in bagno o sonda produce una riduzione della dimensione progressiva fino ad un ULV piccolo di meno di circa 0,05 micron di diametro. L'omogeneizzazione è un altro metodo che si basa sull'energia di taglio per frammentare grandi liposomi in liposomi più piccoli. In una procedura di omogeneizzazione tipica, MLV sono fatti ricircolare attraverso un omogeneizzatore per emulsione standard fino a quando si osservano le dimensioni dei liposomi selezionate, tipicamente tra circa 0,1 e 0,5 micron. La dimensione delle vescicole liposomiali può essere determinata mediante diffusione della luce quasi elettrica (QELS) come descritto in Bloomfield, *Ann. Rev. Biophys, Bioeng.*, 10:421-450 (1981).

Il diametro liposomiale medio può essere ridotto mediante sonicazione dei liposomi formati. Cicli di sonicazione intermittenti possono essere alternati con valutazione QELS per guidare una sintesi liposomiale efficiente.

La selezione della dimensione adeguata di un veicolo di trasferimento liposomiale deve prendere in considerazione il sito della cellula o del tessuto target e in una certa misura l'applicazione per la quale è formato il liposoma. E' auspicabile limitare la trasfezione degli acidi nucleici in alcune cellule o in alcuni tessuti. Il fegato rappresenta l'organo target per le composizioni della presente invenzione in parte a causa del suo ruolo centrale nel metabolismo e nella produzione di proteine e di conseguenza malattie che sono causate da difetti in prodotti genici specifici del fegato (ad es., i disturbi del ciclo dell'urea) possono trarre beneficio dal targeting specifico di cellule (ad es. epatociti). Le caratteristiche strutturali del tessuto target sono sfruttate per guidare la distribuzione del veicolo di trasferimento liposomiale in tali tessuti target. Per mirare epatociti, un veicolo di trasferimento liposomiale può essere dimensionato in modo tale che le sue dimensioni siano più piccole rispetto alle fenestrazioni dei sinusoidi epatici del rivestimento dello strato endoteliale nel fegato; di conseguenza, il veicolo di trasferimento liposomiale può facilmente penetrare tali fenestrazioni endoteliali per raggiungere gli epatociti target.

La dimensione del veicolo di trasferimento è inferiore a 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm.

Le composizioni della presente invenzione si distribuiscono nelle cellule e nei tessuti del fegato per facilitare il rilascio e la successiva espressione degli acidi nucleici (ad es., mRNA) compresi, al loro interno dalle cellule e tessuti del fegato (ad es., epatociti). Sebbene tali composizioni possano preferibilmente distribuirsi all'interno delle cellule e dei tessuti del fegato, gli effetti terapeutici degli acidi nucleici espressi non devono essere limitati alle cellule e ai tessuti target. Ad esempio, gli epatociti target possono funzionare come

"serbatoio" o "deposito" in grado di esprimere o produrre, e secernere a livello sistemico una proteina o enzima funzionale. Di conseguenza, in una forma di realizzazione della presente invenzione, il veicolo di trasferimento liposomiale può mirare epatociti e/o distribuirsi preferenzialmente nelle cellule e nei tessuti del fegato in seguito al rilascio. Successivamente alla trasfezione degli epatociti target, l'acido nucleico (gli acidi nucleici) mRNA caricati nel veicolo liposomiale sono tradotti e un prodotto proteico funzionale espresso, secreto e distribuito a livello sistemico. In alcune forme di realizzazione, le composizioni della presente invenzione comprendono una o più molecole aggiuntive (ad es., proteine, peptidi, aptameri o oligonucleotidi) che facilitano il trasferimento degli acidi nucleici dal veicolo di trasferimento in uno scomparto intracellulare della cellula target. In una forma di realizzazione, la molecola aggiuntiva facilita il rilascio degli acidi nucleici all'interno, ad esempio, nel citosol, nel lisosoma, nel mitocondrio, nel nucleo, nel nucleolo o nel proteasoma di una cellula target. Sono anche inclusi agenti che facilitano il trasporto della proteina di interesse tradotta dal citoplasma alla sua ubicazione intercellulare normale (ad es., nel mitocondrio) per trattare carenze in tale organello. In alcune forme di realizzazione, l'agente è selezionato dal gruppo costituito da una proteina, un peptide, un aptamero e un oligonucleotide.

Le composizioni della presente invenzione facilitano una produzione endogena del soggetto di una o più proteine funzionali, e in particolare la produzione di proteine che dimostrano meno immunogenicità rispetto alle loro controparti preparate in modo ricombinante. In seguito alla distribuzione delle composizioni nei tessuti target e alla successiva trasfezione di tali cellule target, l'mRNA esogeno caricato nel veicolo di trasferimento liposomiale può essere tradotto *in vivo* per produrre una proteina funzionale codificata dall'mRNA somministrato in modo esogeno (ossia, una proteina di cui il soggetto è carente). Di conseguenza, le composizioni della presente invenzione sfruttano la capacità di un soggetto di tradurre mRNA preparato in modo esogeno o ricombinante per produrre una proteina o un enzima tradotti a livello

endogeno e produrre pertanto (e laddove applicabile secernere) una proteina o un enzima funzionale. Le proteine o gli enzimi espressi o tradotti possono anche essere caratterizzati dall'inclusione *in vivo* di modificazioni post-traduzionali native che spesso possono essere assenti in proteine o enzimi preparati in modo ricombinante, riducendo così ulteriormente l'immunogenicità della proteina o dell'enzima tradotti.

La somministrazione di mRNA codificante una proteina o un enzima carenti evitano la necessità di rilasciare gli acidi nucleici in organelli specifici all'interno di una cellula target (ad es., mitocondri). Piuttosto, in seguito alla trasfezione di una cellula target e al rilascio degli acidi nucleici nel citoplasma della cellula target, il contenuto dell'mRNA di un veicolo di trasferimento può essere tradotto e una proteina o un enzima funzionale può essere espresso.

La presente invenzione contempla anche il targeting discriminatorio di cellule e tessuti target mediante mezzi di targeting passivi ed attivi. Il fenomeno del targeting passivo sfrutta i pattern di distribuzione naturali di un veicolo di trasferimento *in vivo* senza basarsi sull'uso di eccipienti aggiuntivi o mezzi per potenziare il riconoscimento del veicolo di trasferimento mediante cellule target. Ad esempio, i veicoli di trasferimento che sono soggetti a fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale probabilmente si accumulano nel fegato o nella milza, e di conseguenza possono fornire mezzi per guidare in modo passivo il rilascio delle composizioni a tali cellule target.

In alternativa, la presente invenzione contempla il targeting attivo, che implica l'uso di eccipienti aggiuntivi, indicati nella presente come "ligandi di targeting" che possono essere legati (in modo covalente o non-covalente) al veicolo di trasferimento per favorire la localizzazione di tale veicolo di trasferimento in determinate cellule target o determinati tessuti target. Ad esempio, il targeting può essere mediato dall'inclusione di uno o più ligandi di targeting endogeni (ad es., apolipoproteina E) in o sul veicolo di trasferimento per favorire

la distribuzione alle cellule o ai tessuti target. Il riconoscimento del ligando di targeting da parte dei tessuti target, facilita attivamente la distribuzione tissutale e l'assorbimento cellulare del veicolo di trasferimento e/o del suo contenuto nella cellula e nei tessuti target (ad es., l'inclusione di un ligando di targeting dell'apolipoproteina-E in o sul veicolo di trasferimento favorisce il riconoscimento e il legame del veicolo di trasferimento ai recettori della lipoproteina a bassa densità endogena espressi dagli epatociti). Come fornito nella presente, la composizione può comprendere un ligando in grado di potenziare l'affinità della composizione per la cellula target. I ligandi di targeting possono essere associati al doppio strato esterno della particella lipidica durante la formulazione o la post-formulazione. Questi metodi sono ben noti nella tecnica. Inoltre, alcune formulazioni di particelle lipidiche possono impiegare polimeri fusogenici quali PEAA, emoagglutinina, altri lipopeptidi (si vedano le domande di brevetto U.S. n. di serie 08/835.281 e 60/083.294) e altre caratteristiche utili per il rilascio *in vivo* e/o intracellulare. In alcune altre forme di realizzazione, le composizioni della presente invenzione dimostrano efficacia di trasfezione migliorata e/o dimostrano selettività potenziata per le cellule o i tessuti target. Sono pertanto contemplate composizioni che comprendono uno o più ligandi (ad es., peptidi, aptameri, oligonucleotidi, una vitamina o altre molecole) che sono in grado di potenziare l'affinità delle composizioni e il loro contenuto di acido nucleico per cellule o tessuti target. Ligandi adeguati possono opzionalmente essere legati o attaccati alla superficie del veicolo di trasferimento. In alcune forme di realizzazione, il ligando di targeting può coprire la superficie di un veicolo di trasferimento o essere incapsulato all'interno del veicolo di trasferimento. Ligandi adeguati sono selezionati in base alle loro proprietà fisiche, chimiche o biologiche (ad es., affinità selettiva e/o riconoscimento di marker o caratteristiche della superficie della cellula target). Siti target cellulo-specifici e loro corrispondente ligando di targeting possono variare ampiamente. Ligandi di targeting adeguati sono selezionati in modo tale che le uniche caratteristiche di una cellula target siano

sfruttate, consentendo così alla composizione di distinguere tra cellule target e non-target. Ad esempio, composizioni della presente invenzione possono portare marker di superficie (ad es., apolipoproteina-B o apolipoproteina-E) che potenziano selettivamente il riconoscimento di, o l'affinità per gli epatociti (ad es., mediante il riconoscimento recettore-mediato di e il legame a tali marker di superficie). In aggiunta, l'uso di galattosio come ligando di targeting ci si aspetterebbe che guidi le composizioni della presente invenzione negli epatociti parenchimali, o in alternativa l'uso di residui di zuccheri contenenti mannosio come ligando di targeting ci si aspetterebbe che guidi le composizioni della presente invenzione in cellule endoteliali epatiche (ad es., residui di zucchero contenenti mannosio che possono legarsi preferenzialmente al recettore asialoglicoproteina presente negli epatociti). (Si veda Hillery AM, *et. al.* "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.). La presentazione di tali ligandi di targeting che sono stati coniugati alle parti caratteristiche presenti nel veicolo di trasferimento facilita pertanto il riconoscimento e l'assorbimento delle composizioni della presente invenzione in cellule e tessuti target. Esempi di ligandi di targeting adeguati includono uno o più peptidi, proteine, aptameri, vitamine e oligonucleotidi.

Come usato nella presente, il termine "soggetto" si riferisce a qualsiasi animale (ad es., un mammifero), inclusi, senza limitazione, umani, primati non-umani, roditori e simili, a cui le composizioni della presente invenzione sono somministrate. Tipicamente, i termini "soggetto" e "paziente" sono usati in modo intercambiabile nella presente in riferimento ad un soggetto umano.

Come usata nella presente, l'espressione "cellula target" si riferisce ad una cellula o un tessuto a cui è diretta o indirizzata una composizione dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, le cellule target sono carenti di una proteina o un enzima di interesse. Poiché si desidera rilasciare un acido nucleico in un epatocita, l'epatocita rappresenta la cellula target.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni della presente invenzione trasfettano le cellule target su base discriminatoria (ossia, non trasfettano le cellule non-target). Le composizioni della presente invenzione sono preparate per mirare preferenzialmente gli epatociti.

Successivamente alla trasfezione di una o più cellule target da parte delle composizioni e degli acidi nucleici della presente invenzione, l'espressione della proteina codificata da tale acido nucleico può preferibilmente essere simulata e la capacità di tali cellule target di esprimere la proteina di interesse è potenziata. Ad esempio, la trasfezione di una cellula target con un OTC mRNA consentirà l'espressione del prodotto proteico OTC successivamente alla traduzione dell'acido nucleico.

I disturbi metabolici del ciclo dell'urea e le carenze proteiche generalmente possono essere soggetti al trattamento con le composizioni fornite nella presente. Gli acidi nucleici delle composizioni fornite nella presente codificano una proteina e preferibilmente codificano un prodotto di cui si desidera la produzione *in vivo*.

I disturbi metabolici del ciclo dell'urea rappresentano esempi di carenze proteiche ed enzimatiche che possono essere trattate usando i metodi e le composizioni descritti nella presente. Tali disturbi metabolici del ciclo dell'urea includono carenze di OTC, carenza dell'argininosuccinato sintetasi (ASD) e carenza dell'argininosuccinato liasi (ALD). Pertanto, in alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico dei metodi e delle composizioni descritti nella presente codifica un enzima coinvolto nel ciclo dell'urea, incluso, ad esempio, ornitina transcarbamilasi (OTC), carbammilfosfato sintetasi (CPS), argininosuccinato sintetasi 1 (ASS1), argininosuccinato liasi (ASL), e arginasi (ARG).

Cinque disturbi metabolici che risultano dai difetti della biosintesi degli enzimi coinvolti nel ciclo dell'urea sono stati descritti e includono carenza di ornitina transcarbamilasi (OTC, carenza di carbammilfosfato sintetasi (CPS), carenza di argininosuccinato sintetasi 1 (ASS1)

(citrullinemia), carenza di argininosuccinato liasi (ASL) e carenza di arginasi (ARG). Di questi cinque disturbi metabolici, la carenza di OTC rappresenta la più comune che si presenta in una stima di una su 80.000 nascite.

L'OTC è un enzima mitocondriale omotrimerico che è espresso quasi esclusivamente nel fegato e che codifica una proteina OTC precursore che è tagliata in due passaggi in seguito all'incorporazione nella matrice mitocondriale (Horwich AL., *et al.*, Cell 1986; 44: 451-459). La carenza di OTC è un disturbo genetico che determina una forma mutata e biologicamente inattiva dell'enzima ornitina transcarbamilasi. La carenza di OTC diventa spesso evidente nei primi giorni di vita, tipicamente dopo ingestione di proteina. Nella forma grave classica di carenza di OTC, entro i primi giorni di vita i pazienti presentano letargia, convulsioni, coma e grave iperammoniemia, che determina rapidamente un deterioramento e un esito fatale in caso di mancato intervento medico adeguato. (Monish S., *et al.*, Genetics for Pediatricians; Remedica, Cold Spring Harbor Laboratory (2005)). Se trattate in modo inadeguato o non trattate, le complicanze di carenza di OTC possono includere ritardo dello sviluppo e ritardo mentale. Soggetti derivanti da carenza di OTC possono anche presentare progressivo danno epatico, lesioni cutanee e capelli fragili. In alcuni individui affetti, i segni e i sintomi di carenza di OTC possono essere meno gravi e non comparire successivamente nella vita.

Il gene *OTC*, che è situato sul braccio corto del cromosoma X all'interno della banda Xp21.1, copre più di 85 kb ed è costituito da 10 esoni codificanti una proteina da 1062 amminoacidi (Lindgren V., *et al.* Science 1984; 226: 698-7700; Horwich, AL., *et al.* Science 224: 1068-1074, 1984; Horwich, AL. *et al.*, Cell 44: 451-459, 1986; Hata, A., *et al.*, J. Biochem. 100: 717-725, 1986. L'enzima OTC catalizza la conversione di ornitina e carbammilfosfato in citrullina. Poiché *OTC* è sul cromosoma X, le femmine sono principalmente portatrici mentre i maschi con mutazioni non conservative sopravvivono raramente oltre le 72 ore dalla nascita. In soggetti sani, *OTC* è espresso quasi esclusivamente nei mitocondri epatocellulari. Sebbene

non espresso nel cervello di soggetti sani, la carenza di OTC può determinare disturbi neurologici. Ad esempio, uno dei sintomi consueti della carenza di OTC, che è eterogenea nella sua presentazione è il coma da iperammoniemia (Gordon, N., Eur J. Paediatr Neurol 2003; 7:115-121).

La carenza di OTC è molto eterogenea, con oltre 200 mutazioni uniche riportate e grandi delezioni che rappresentano circa il 10-15% di tutte le mutazioni, mentre la parte restante comprende generalmente mutazioni puntiformi missenso con numeri più piccoli di mutazioni nonsense sul sito di splicing e di piccola delezione. (Monish A., *et al.*). Il fenotipo della carenza di OTC è estremamente eterogeneo, il che può variare da un coma da iperammoniemia neonatale acuta ad adulti emizigoti asintomatici (Gordon N. Eur J Paediatr Neurol 2003; 7: 115-121). Tali mutazioni che risultano in una grave malattia neonatale e di minaccia per la vita sono raggruppate in domini strutturali e funzionali importanti all'interno della proteina sui siti dell'attività enzimatica o sulla superficie intercatena, mentre le mutazioni associate alla malattia ad insorgenza tardiva sono situate sulla superficie della proteina (Monish A., *et al.*). Pazienti con forme più lievi o parziali di carenza da OTC possono avere una insorgenza della malattia successivamente nella vita, che può presentarsi come vomito ricorrente, variazioni neurocomportamentali o attacchi associati all'iperammoniemia.

Le composizioni della presente invenzione sono ampiamente applicabili al rilascio di acidi nucleici, ed in particolare di mRNA per trattare una serie di disturbi. Le composizioni della presente invenzione sono adeguate per il trattamento di malattie o disturbi relativi alla carenza di proteine. In una forma di realizzazione, gli acidi nucleici della presente invenzione codificano proteine o enzimi funzionali che sono escrete o secrete dalla cellula target nel fluido extracellulare circostante (ad es., mRNA codificante ormoni e neurotrasmettitori). In alternativa, in un'altra forma di realizzazione, gli acidi nucleici della presente invenzione

codificano proteine o enzimi funzionali che rimangono nel citosol della cellula target (ad es., mRNA codificante disturbi metabolici del ciclo dell'urea). Altri disturbi per cui la presente invenzione è utile includono disturbi quali atrofia muscolare spinale associata a SMNI (SMA); sclerosi laterale amiotrofica (SLA); galattosemia GALT-associata; fibrosi cistica (CF); disturbi associati a SLC3A1 inclusa cistinuria; disturbi associati a COL4A5 inclusa sindrome di Alport; carenze di galattocerebrosidasi; adrenoleucodistrofia X-associata e adrenomielloneuropatia; atassia di Friedreich; malattia di Pelizaeus-Merzbacher, sclerosi tuberosa associata a TSC1 e TSC2; sindrome B di Sanfilippo (MPS IIIB); cistinosi CTNS-associata; disturbi FMR1-associati che includono sindrome dell'X fragile, sindrome di tremore /atassia associata all'X fragile e sindrome da insufficienza ovarica prematura da X fragile; sindrome di Prader-Willi; telangiectasia emorragica ereditaria (AT); malattia di Niemann-Pick di tipo C1; malattie associate a lipofuscinosi ceroidi neuronale incluse lipofuscinosi ceroidi neuronale giovanile (JNCL), , malattia di Batten giovanile, malattia di Santavuori-Haltia, malattia di Jansky-Bielschowsky, e carenze di PTT-1 e TPP1; atassia infantile associata a EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 e EIF2B5 con ipomielinizzazione del sistema nervoso centrale/sostanza bianca evanescente; atassia episodica di tipo 2 associata a CACNA1A e CACNB4; disturbi associati a MECP2 inclusa sindrome di Rett classica, encefalopatia neonatale severa associata a MECP2 e sindrome di PPM-X; sindrome di Rett atipica associata a CDKL5; malattia di Kennedy (SBMA); arteriopatia dominante autosomiale cerebrale associata a Notch-3 con infarti subcorticali e leucoencefalopatia (CADASIL); disturbi di attacchi associati a SCN1A e SCN1B; disturbi associati a polimerasi G che includono sindrome di Alpers-Huttenlocher, neuropatia atassica sensitiva associata a POLG, disartria e oftalmoparesi e oftalmoplegia esterna progressiva dominante e recessiva autosomiale con delezioni di DNA mitocondriale; ipoplasia surrenale X-associata; agammaglobulinemia X-associata; e malattia di Wilson. In una forma di realizzazione, gli

acidi nucleici ed in particolare l'mRNA della presente invenzione possono codificare proteine o enzimi funzionali. Ad esempio, le composizioni della presente invenzione possono includere mRNA codificante eritropoietina, α -1-antitripsina, carbosipeptidasi N o ormone della crescita umana.

In alternativa, gli acidi nucleici possono codificare anticorpi a lunghezza completa o anticorpi più piccoli (ad es., sia catene pesanti sia catene leggere) per conferire immunità ad un soggetto. Sebbene una forma di realizzazione della presente invenzione sia relativa a composizioni utili per conferire immunità ad un soggetto (ad es., tramite la traduzione degli acidi nucleici mRNA codificanti anticorpi funzionali), le invenzioni descritte nella presente e contemplate con essa sono ampiamente applicabili. In una forma di realizzazione alternativa, le composizioni della presente invenzione codificano anticorpi che possono essere usati per esercitare in modo transitorio o cronico una risposta funzionale in soggetti. Ad esempio, gli acidi nucleici mRNA della presente invenzione possono codificare un anticorpo monoclonale o policlonale funzionale che in seguito alla traduzione (e come applicabile, l'escrezione sistemica dalle cellule target) può essere utile per il targeting /o l'inattivazione di un target biologico (ad es., citochina stimolatoria quale un fattore di necrosi tumorale). Similmente, gli acidi nucleici mRNA della presente invenzione possono codificare, ad esempio, anticorpi anti-fattore nefritico funzionali utili per il trattamento della glomerulonefrite membranoproliferativa di tipo II o la sindrome uremica emolitica acuta o in alternativa possono codificare anticorpi anti-fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) utili per il trattamento di malattie VEGF-mediate, quali il cancro.

Le composizioni della presente invenzione possono essere somministrate ad un soggetto. In alcune forme di realizzazione, la composizione è formulata in combinazione con uno o più acidi nucleici aggiuntivi, veicolanti, ligandi di targeting o reagenti stabilizzanti, o in composizioni farmacologiche in cui è miscelata con eccipienti adeguati. Ad esempio, in una

forma di realizzazione, le composizioni della presente invenzione possono essere preparate per rilasciare mRNA codificante due o più proteine o enzimi distinti. In alternativa, le composizioni della presente invenzione possono essere preparate per rilasciare un singolo acido nucleico e due o più popolazioni o tali composizioni possono essere combinate in una singola forma farmaceutica o co-somministrate ad un soggetto. Tecniche per la formulazione e la somministrazione di farmaci possono essere trovate in "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., ultima edizione.

Le composizioni della presente invenzione possono essere somministrate e dosate secondo la pratica clinica attuale, prendendo in considerazione la condizione clinica del soggetto, il sito e il metodo di somministrazione, la programmazione della somministrazione, l'età, il sesso, il peso corporeo e altri fattori del soggetto e altri fattori rilevanti per i medici con una comune esperienza nella tecnica. La "quantità efficace" agli scopi della presente può essere determinata da tali considerazioni rilevanti che sono note ai comuni esperti nella tecnica nella ricerca clinica sperimentale, nelle tecniche farmacologiche, cliniche e mediche. In alcune forme di realizzazione, la quantità somministrata è efficace ad ottenere almeno una certa stabilizzazione, un certo miglioramento o eliminazione dei sintomi e altri indicatori selezionati come misure adeguate del progredire, della regressione o del miglioramento della malattia da parte degli esperti nella tecnica. Ad esempio, una quantità adeguata e un regime di dosaggio sono quelli che determinano almeno una espressione transitoria dell'acido nucleico nella cellula target.

In una forma di realizzazione, le composizioni della presente invenzione sono formulate in modo tale da essere adeguate per il rilascio prolungato degli acidi nucleici contenuti all'interno. Tali composizioni a rilascio prolungato possono adeguatamente essere somministrate ad un soggetto ad intervalli di dosaggio prolungati. Ad esempio, in una forma di realizzazione, le composizioni della presente invenzione sono somministrate ad un soggetto

due volte al giorno, giornalmente o a giorni alterni. In una forma di realizzazione preferita, le composizioni della presente invenzione sono somministrate ad un soggetto due volte la settimana, una volta la settimana, ogni dieci giorni, ogni due settimane, ogni tre settimane o in modo maggiormente preferibile ogni quattro settimane, una volta al mese, ogni sei mesi, ogni otto mesi, a mesi alterni, ogni tre mesi, ogni quattro mesi, ogni sei mesi, ogni otto mesi, ogni nove mesi o annualmente. Preferibilmente, i mezzi di rilascio prolungati impiegati sono combinati con modificazioni effettuate all'acido nucleico per potenziare la stabilità.

Sebbene altre composizioni della presente invenzione siano state descritte con specificità secondo alcune forme di realizzazione, i seguenti esempi servono soltanto ad illustrare le composizioni dell'invenzione e non intendono limitare la stessa.

Gli articolo "un" e "uno" come usati nella presente nella descrizione e nelle rivendicazioni, a meno che non sia chiaramente indicato il contrario, dovrebbero essere intesi includere referenti plurali. Descrizioni che includono "o" tra uno o più membri di un gruppo sono considerate soddisfatte se uno, più di uno o tutti i membri del gruppo sono presenti in, impiegati in, o diversamente rilevanti in un dato prodotto o procedimento a meno che non sia indicato il contrario o sia diversamente evidente dal contesto.

Quando gli elementi sono presentati come elenchi (ad es., nel gruppo Markush o formato simile) occorre intendere che ogni sottogruppo degli elementi è anche descritto, e qualsiasi elemento può essere rimosso dal gruppo. Si dovrebbe comprendere che, in generale, quando l'invenzione o gli aspetti dell'invenzione è/sono indicati come comprendenti particolari elementi, caratteristiche ecc., alcune forme di realizzazione dell'invenzione o alcuni aspetti dell'invenzione consistono o consistono, sostanzialmente, di tali elementi, caratteristiche, ecc. Per scopi di semplicità, tali forme di realizzazione in ogni caso non sono state espresse in modo specifico in così tante parole nella presente.

ESEMPI

Esempio 1

Preparazione generale di veicoli di trasferimento mediante tecnica di diluizione in solvente.

Questo esempio illustra in generale un procedimento per la fabbricazione di piccole formulazioni liposomiali (<100 nm) contenenti mRNA e mezzi per valutare la quantità di mRNA incapsulato. Parametri, che possono essere modificati per ottimizzare ulteriormente l'efficienza di trasfezione includono, senza limitazione, la selezione di lipide, il rapporto dei lipidi, il rapporto molare dei lipidi contenenti PEG, la lunghezza dell'ancora lipidica del lipide contenente PEG e il dimensionamento dei veicoli di trasferimento liposomiale.

Quantità adeguate di lipidi (ad es., DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG2000-Cer) per costruire un veicolo di trasferimento di un rapporto lipidico desiderato (ad es., un rapporto molare di 31:40:25:4) sono stati pesati e dissolti in etanolo assoluto a 70°C per ottenere i rapporti e le concentrazioni di lipidi desiderati. Al fine di monitorare il lipide, una quantità ridotta (tipicamente 0,05% in mole) di rodamina-dioleoilfosfatidiletanolammina (Rh-PE) è stata aggiunta di routine alla soluzione lipidica.

mRNA, ad esempio, codificante GFP, OTC o luciferasi è stato denaturato mediante riscaldamento per 10 minuti a 70°C, seguito da raffreddamento su ghiaccio. Questa soluzione è stata analizzata per confermare la concentrazione di mRNA prima della formulazione. Un'aliquota di mRNA è stata diluita con acqua e quindi combinata con uno stesso volume di tampone citrato 10 mM pH 5.0 in modo tale che il contenuto di citrato finale successivo all'aggiunta di lipidi (dal solvente) fosse di 4 mM.

Le soluzioni di mRNA/tampone citrato sono state quindi riscaldate a 90°C per 5 minuti per denaturare completamente l'mRNA. Agitando o vorticando l'mRNA denaturato, la soluzione lipidica etanolica (a 70°C) è stata aggiunta all'mRNA per generare vescicole multilamellari (MLV). Le MLV sono state quindi raffreddate a 70°C prima dell'estrusione. Per campioni preparati a concentrazioni elevate di solvente (> 20%), le MLV sono state diluite con tampone

citrato 5 mM pH 5.0 (a 70°C) per produrre una concentrazione di solvente del 20% prima dell'estrusione per generare vescicole unilamellari grandi (LUY).

Le MLV sono state estruse a 70°C attraverso 3 filtri di policarbonato da 80 nm impilati, usando un estrusore con termo-rivestimento. Cinque passaggi sono stati usati normalmente per generare grandi vescicole unilamellari (LUV) dell'intervallo di dimensioni desiderate. Successivamente all'estrusione, le formulazioni sono state filtrate attraverso un filtro per siringa da 0,2 µm per rimuovere ridotte quantità di materiale particellare che tendeva ad interferire con la determinazione della dimensione della vescicola.

L'mRNA che non si era associato ai liposomi o che si era associato alla superficie esterna dei liposomi contenenti DODAP è stato rimosso mediante scambio anionico, in modo tale che tutto l'mRNA associato restante fosse incapsulato nei liposomi. Due metodi adeguati includono l'uso di scambio anionico con l'uso di unità Acrodisc con membrane MUSTANG Q (Pall Life Sciences), o scambio anionico con l'uso di DEAE-SEPHACEL (Sigma-Aldrich, sospensione in 20% di etanolo). Queste tecniche hanno consentito una rimozione efficiente dell'mRNA non incapsulato senza diluizione significativa delle formulazioni.

Dopo la rimozione dell'mRNA esterno, il tampone potrebbe essere sostituito mediante l'uso di colonne di filtrazione su gel PD-10 (SEPHADEX G-25, GE Healthcare) usando un protocollo di centrifugazione che consente a costituenti a basso peso molecolare (quali solvente e borato) nella formulazione liposomiale di essere trattenuti nel gel e sostituiti dal tampone di equilibratura, senza significativa diluizione del campione. In alternativa, in alcuni esperimenti, il solvente può essere rimosso e il tampone sostituito usando una cartuccia di diafiltrazione Spectrum 500.000 MWCO. I campioni sono stati ultrafiltrati a 2-10 ml, quindi diafiltrati contro 10 volumi di lavaggio del tampone finale desiderato per rimuovere il solvente e scambiare il tampone. Il campione è stato talvolta ulteriormente concentrato mediante ultrafiltrazione dopo il procedimento di diafiltrazione.

Per quantificare l'mRNA in campioni con bassi rapporti lipide:mRNA, si è preparata una curva standard di mRNA diluendo la soluzione stock con acqua per ottenere standard nell'intervallo di 0-200 µg/ml. I campioni sono stati diluiti (in base alle concentrazioni di mRNA attese) con il tampone adeguato per produrre concentrazioni di mRNA all'interno dell'intervallo standard. Aliquote da 180 µl degli standard o dei campioni sono state combinate con 300 µl di SDS al 5% e 120 µl di etanolo. I campioni sono stati incubati per 10 min a 50°C per dissolvere il lipide. Dopo raffreddamento, i campioni sono stati trasferiti in duplicato (aliquote da 250 µl) nei pozzetti di una micropiastra trasparente agli UV. È stata misurata l'assorbanza a 260 nm e la concentrazione dell'mRNA nei campioni calcolata dalla curva standard. In campioni in cui il rapporto lipide:mRNA (peso: peso) era di 10:1 (rapporto target) o meno, l'interferenza dai lipidi con l'assorbanza a 260 nm era relativamente ridotta e ha potuto essere ignorata.

Nei campioni in cui il rapporto lipide:mRNA (peso:peso) era superiore a 10:1, l'interferenza lipidica diventava più significativa all'aumentare della quantità di lipide, e pertanto il lipide doveva essere rimosso al fine di quantificare precisamente il contenuto di mRNA. Si è preparata una curva standard di mRNA diluendo la soluzione stock con acqua per ottenere standard nell'intervallo di 0-250 µg/ml. I campioni da valutare sono stati diluiti (in base alle concentrazioni di mRNA attese) con il tampone adeguato per produrre concentrazioni di mRNA entro l'intervallo standard. 180 µl degli standard o dei campioni sono stati combinati con 20 µl di borato di sodio 0,1 M (per aumentare il pH, neutralizzando pertanto la carica su DODAP nei campioni liposomiali, e determinando la dissociazione dell'mRNA da DODAP). 600 µl di cloroformio : metanolo (1:2, v:v) sono stati addizionati ad ogni standard o campione e i campioni sono stati vorticati. 200 µl di cloroformio sono stati addizionati vorticando con successiva addizione di 200 µl di acqua. I campioni sono stati vigorosamente vorticati e quindi centrifugati per 2 min. a 1000xg per separare le fasi. Aliquote da 250 µl della fase

superiore (acquosa) sono state trasferite (in duplicato) nei pozzetti di una micropiastra trasparente agli UV ed è stata misurata l'assorbanza a 260 nm. La concentrazione di mRNA nei campioni è stata calcolata dalla curva standard. Si noti che, per i campioni liposomiali contenenti DOTAP (o qualsiasi altro lipide cationico che non può essere neutralizzato mediante incubazione a pH elevato), questo saggio è inadeguato per determinare la concentrazione di mRNA in quanto l'mRNA non può essere dissociato da DOTAP e una percentuale di mRNA tende ad essere estratta nella fase solvente (CHCl_3) unitamente al lipide.

L'incapsulamento dell'mRNA è stato determinato mediante separazione dei campioni su colonne DEAE-SEPHACEL (gel a scambio anionico) come segue. Usando pipette Pasteur di vetro da 2 ml tappate con lana di vetro, colonne di DEAE-SEPHACEL sono state riempite ed equilibrate con 5 volumi (~10 ml) di cloruro di sodio 145 mM e tampone borato 10 mM pH 8.0. 0,5 ml del campione sono stati caricati su una colonna e si è raccolto l'eluato. Le colonne sono state lavate con aliquote da 7x0,5 ml di cloruro di sodio 145 mM-tampone borato 10 mM pH 8.0, raccogliendo ogni frazione eluita separatamente. Il campione iniziale e ogni aliquota sono stati testati per l'mRNA e il lipide come descritto sopra. La % di incapsulamento è stata calcolata per $100 \times (\text{mRNA/lipide})$ di materiale eluito dalla colonna / $(\text{mRNA} / \text{lipide})$ del campione iniziale). In base alla concentrazione dell'mRNA calcolata dalle analisi di estrazione sopra descritte i campioni di mRNA liposomiali sono stati diluiti ad una concentrazione di mRNA desiderato (1 μg) in un volume totale di 5 μl (ossia 0,2 mg/ml).

Esempio 2

Preparazione di DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-2000 ceramide (rapporto molare di 31:40:25:4) / mRNA di luciferasi di Renilla (Formulazione 1)

La Formulazione 1 è stata preparata dissolvendo le masse adeguate di DSPC, CHOL; DODAP e C8-PEG-2000 ceramide in etanolo assoluto, aggiungendo quindi questo ad una

soluzione di mRNA di Luciferasi di *Renilla* in tampone per produrre MLV a 10,8 mg/ml di lipide, 250 µg/ml di mRNA, 20% di solvente. Le MLV sono state estruse per produrre LUV e quindi fatte passare attraverso un filtro da 0,2 µm. Il pH è stato aumentato combinando con un volume uguale di NaCl 100 mM – borato 50 mM pH 8.0 e l'mRNA esterno rimosso mediante scambio anionico usando il metodo di centrifugazione DEAE-SEPHACEL, come descritto nell'Esempio 1. Il solvente è stato rimosso, il tampone esterno sostituito e il campione concentrato mediante diafiltrazione/ultrafiltrazione. Il campione concentrato è stato quindi fatto passare attraverso un filtro da 0,2 µm e le aliquote sono state trasferite in provette e conservate a 2-8°C.

Esempio 3

Preparazione di DSPC/CHOL/DOTAP/C8-PEG-2000 ceramide (rapporto molare di 31:40:25:4) / mRNA di Luciferasi di Renilla (Formulazione 2)

La Formulazione 2 è stata preparata usando una metodologia simile alla Formulazione 1 con minori variazioni. In breve, le masse adeguate di DSPC, CHOL, DOTAP e C8-PEG-2000 ceramide sono state dissolte in etanolo assoluto e quindi addizionate ad una soluzione di mRNA di Luciferasi di *Renilla* in tampone per produrre MLV a 10,8 mg/ml di lipide, 250 µg/ml di mRNA, 20% di solvente. Le MLV sono state estruse per produrre LUV. Poiché DOTAP è stato usato in questa formulazione, l'mRNA esterno non ha potuto essere efficacemente rimosso mediante scambio anionico e pertanto questo passaggio è stato omissso. Il solvente è stato rimosso, il tampone esterno è stato sostituito e il campione concentrato mediante diafiltrazione / ultrafiltrazione. Il campione concentrato è stato quindi fatto passare attraverso un filtro da 0,2 µm e aliquote sono state trasferite in provette e conservate a 2-8°C.

Esempio 4

Preparazione di DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-2000 ceramide (rapporto molare di

31:40:25:4) / mRNA di luciferasi di lucciola (Formulazione 3)

Per preparare la Formula 3, le masse adeguate di DSPC, CHOL, DODAP e C8-PEG-2000 ceramide sono state dissolte in etanolo assoluto, quindi addizionate ad una soluzione di mRNA di luciferasi di lucciola in tampone per produrre MLV a 10,8 mg/ml di lipide, 250 µg/ml di mRNA, 20% di solvente. Le MLV sono state estruse per produrre LUV e quindi fatte passare attraverso un filtro da 0,2 µm. Il pH è stato aumentato combinando con 0,1 volumi di sodio borato 0,1 M e l'mRNA esterno è stato rimosso mediante scambio anionico usando il metodo della colonna DEAE-Sephacel descritto nell'Esempio 1. Il solvente è stato rimosso, il tampone esterno è stato sostituito e il campione concentrato mediante diafiltrazione / ultrafiltrazione. Il campione concentrato è stato quindi fatto passare attraverso un filtro da 0,2 µm e aliquote sono state trasferite nelle provette e conservate a 2-8°C.

Esempio 5

Preparazione di DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-2000 ceramide (rapporto molare di 31:40:2:4) / mRNA di OTC murino (Formulazione 4)

La Formulazione 4 è stata preparata dissolvendo la massa adeguata di DSPC, CHOL, DODAP e C8-PEG-2000 ceramide in etanolo assoluto, quindi addizionando questa ad una soluzione di OTC di mRNA murino in tampone per produrre MLV a 10,8 mg/ml di lipide, 250 µg/ml di mRNA, 20% di solvente. Le MLV sono state estruse per produrre LUV e quindi fatte passare attraverso un filtro da 0,2 µm. Il pH è stato aumentato combinando con volumi di sodio borato 0,1 M e l'mRNA esterno è stato rimosso mediante scambio anionico usando il metodo della colonna DEAE-sephacel come descritto nell'Esempio 1. Il solvente è stato rimosso, il tampone esterno sostituito e il campione concentrato mediante diafiltrazione / ultrafiltrazione. Il campione concentrato è stato quindi fatto passare attraverso un filtro da 0,2 µm e aliquote sono state trasferite in provette e conservate a 2-8°C.

Esempio 6

Preparazione e caratterizzazione del lipide di imidazolo colesterolestere (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-dimetil-17-((R)-6-metileptan-2-il)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il-3-(1-H-imidazol-4-il)propanoato; Imidazolo Colesterol Estere (ICE)

La FIG. 1 illustra lo schema di reazione per la sintesi di ICE. Una miscela di tritil-deamminostidina **(1)**, (1,97 g, 5,15 mmol), colesterolo **(2)**, (1,97 g, 5,1 mmol), dicicloesilcarbodiimmide **(DCC)**, (2,12 g, 5,2 mmol) e dimetilamminopiridina **(DMAP)**, (0,13 g, 1,0 mmol) in benzene anidro (100 ml) è stata agitata a temperatura ambiente per due giorni. La sospensione risultante è stata filtrata attraverso Celite e il filtrato è stato rimosso sotto pressione ridotta. La schiuma risultante è stata essiccata sotto alto vuoto per una notte per produrre l'estere grezzo **(3)** che è stato usato nel passaggio successivo senza purificazione. L'estere grezzo **(3)** è stato dissolto in diclorometano anidro **(DCM)**, (200 ml) e acido trifluoroacetico **(TFA)**, (50 ml) sono stati addizionati a temperatura ambiente. La soluzione risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore. NaHCO₃ saturo acquoso (250 ml) è stato addizionato attentamente, seguito da Na₂CO₃ solido fino a quando leggermente basico. Le fasi sono state separate e lo strato acquoso è stato estratto con DCM (200 ml). Le fasi organiche sono state lavate con soluzione salina (200 ml), anidificate (Na₂SO₄) e filtrate. Il filtrato risultante è stato fatto evaporare e il residuo è stato essiccato sotto alto vuoto per una notte. Purificazione mediante cromatografia flash (gel di silice, 0-10% metanolo in cloroformio) ha fornito il prodotto puro desiderato **(4)** (1,07 g, 37% di resa per due passaggi) come sostanza solida bianca (p.f.: 192-194°C).

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.66 (s, 3H), 0.84-1.64 (m, 33H), 1.76-2.05 (m, 5H), 2.29 (d, 2H), 2.63 (t, 2H), 2.90 (t, 2H), 4.61 (m, 1H), 5.36 (d, 1H), 6.80 (s, 1H), 7.53 (s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 11.9, 18.8, 19.4, 21.1, 21.6, 22.6, 22.9, 23.9, 24.4, 27.8, 28.1, 28.3, 31.9, 34.5, 35.9, 36.3, 36.7, 37.0, 38.2, 39.6, 39.8, 42.4, 50.1, 56.2, 56.8, 74.1, 122.8, 134.7, 139.6, 173.4.

APCI(+)-MS (m/z): Calc. 509, Trovato 509. Anal. Elem. (C,H,N): Calc. 77.90, 10.30, 5.51; Trovato 77.65, 10.37, 5.55.

Esempio 7

Protocollo di Formulazione

Un RNA messaggero di luciferasi di lucciola con codone ottimizzato rappresentato da SEQ ID NO: 1 (mRNA di FFL) è stato sintetizzato mediante trascrizione *in vitro* da uno stampo di DNA plasmidico codificante il gene, che è stato seguito mediante addizione di una struttura cap in 5' (Cap1) e una coda poli(A) 3' di circa 200 nucleotidi di lunghezza come determinato mediante elettroforesi su gel. (Si veda, *ad es.*, Fechter, P. *et al.*, J. Gen. Virology, 86, 1239-1249 (2005)).

Le regioni non tradotte 5' e 3' presenti nel prodotto mRNA di FFL sono sottolineate (SEQ ID NO: 1).

Veicoli di trasferimento nanoparticellari sono stati formati tramite metodi di iniezione di etanolo standard. (Si veda, *ad es.*, Ponsa, M., *et al.*, Ing. J. Pharm. 95, 51-56 (1993)). Soluzioni stock etanoliche dei lipidi sono state preparate precedentemente ad una concentrazione di 50 mg/ml e conservate a -20°C.

mRNA di FFL è stato conservato in acqua ad una concentrazione finale di 1 mg/ml a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Tutte le concentrazioni di mRNA sono state determinate tramite il saggio Ribogreen (Invitrogen). L'incapsulamento dell'mRNA è stato calcolato eseguendo il saggio Ribogreen sia con sia senza la presenza di 0,1% Triton-X 100. Le granulometrie (diffusione della luce dinamica (DLS)) e i potenziali zeta sono stati determinati usando uno strumento Malvern Zetasizer in soluzioni 1 x PBS e KCl 1 mM, rispettivamente.

Aliquote di soluzioni etanoliche da 50 mg/ml di un lipide imidazolo colesterolo estere (ICE), DOPE e DMG-PEG-2000 sono stati miscelate e diluite con etanolo ad un volume finale di 3

ml. Il rapporto molare del veicolo di trasferimento ICE:DOPE:DMG-PEG-2000 preparato era di 70:25:5. Separatamente, una soluzione tamponata acquosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4.5) di mRNA di FFL è stata preparata da uno stock 1 mg/ml. La soluzione lipidica è stata iniettata rapidamente nella soluzione di mRNA acquosa e agitata per fornire una sospensione finale in 20% di etanolo. La sospensione nanoparticellare risultante è stata filtrata, diafiltrata con 1 x PBS (pH 7.4), concentrata e conservata a 2-8°C. La concentrazione finale era pari a 1,73 mg/ml CO-FF mRNA (incapsulato), Z_{medio} era pari a 68,0 nm (con un $Dv_{(50)}$ di 41:8 nm, e un $Dv_{(90)}$ di 78,0 nm) e il potenziale Zeta era pari a +25,7 mV.

Analisi della biodistribuzione

Tutti gli studi sono stati eseguiti usando topi CD-1 femmina di circa 3 settimane all'inizio di ogni esperimento. I campioni sono stati introdotti mediante una singola iniezione nella vena caudale in bolo di una dose totale equivalente di 200 µg di mRNA di FFL incapsulato. Quattro ore post-iniezione i topi sono stati sacrificati e perfusi con soluzione salina.

Il fegato e la milza di ogni topo sono stati prelevati, frazionati in tre parti, e conservati in, o (i) 10% di formalina a tampone neutro, (ii) congelati rapidamente e conservati a -80°C per l'analisi della bioluminescenza (si veda di seguito) o per studi di ibridazione *in situ*, o (iii) sezioni epatiche sono state isolate in un bagno di isopentano (2-metilbutano), mantenute a -35°C, risciacquate con 1 x PBS, leggermente tamponate con una salvietta per rimuovere eventuale fluido in eccesso, collocate nel bagno per circa 5-7 minuti, dopodichè il fegato è stato rimosso, avvolto in pellicola e conservato in un piccolo sacchetto di plastica sterile a -80°C fino a quando pronti per il saggio.

Il saggio di bioluminescenza è stato eseguito usando un Promega Luciferase Assay System (Articolo N. E1500 Promega). La preparazione tissutale è stata eseguita come segue:

Porzioni del campione tissutale desiderato (congelato rapidamente) sono state scongelate, lavate con acqua RODI e collocate in una provetta per omogeneizzazione con perla in

ceramica. Il tessuto è stato trattato con tampone di lisi e omogeneizzato. In seguito all'esecuzione di cinque cicli di congelamento/scongelo seguiti da centrifugazione a 4°, il surnatante è stato trasferito in nuove provette per microcentrifuga. Ripetere e conservare gli estratti tissutali a -80°C.

Il Luciferase Assay Reagent è stato preparato aggiungendo 1 OmL di Luciferase Assay Buffer a Luciferase Assay Substrate e miscelando mediante vortex. 20 µl di campioni omogenati sono stati caricati su una piastra da 96 pozzetti seguiti da 20 µl di controllo di piastra per ogni campione. Separatamente, 120 µl di Luciferase Assay Reagent (preparato come descritto sopra) sono stati caricati su ogni pozzetto di una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti. Ogni piastra è stata inserita nelle camere adeguate usando uno strumento Molecular Device Flex Station e si è misurata la luminescenza (misurata in unità di luce relative (RLU)).

Ibridazione in situ

Preparazione di vetrini di tessuto

La preparazione e l'analisi di vetrini di tessuto sono state eseguite come segue: ogni fegato è stato congelato a -35°C secondo la procedura precedentemente descritta. I fegati congelati sono stati tagliati in 6 sezioni micrometriche e montati su vetrini per microscopi in vetro. Prima dell'ibridazione *in situ*, le sezioni sono state fissate in formaldeide al 4% in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), trattate con trietanolamina/anidride acetica e lavate e disidratate tramite una serie di soluzioni di etanolo.

Preparazione di sonde di cRNA

Si sono progettati stampi di DNA costituiti dal vettore pBSK11+ contenente EcoRI e da siti di restrizione XbaI per la generazione di filamenti antisenso e senso, rispettivamente. Trascritti di cRNA sono stati sintetizzati da questi stampi di DNA (filamenti antisenso e senso, ognuno di 700bp) con RNA polimerasi di T3 e T7, rispettivamente. Gli stampi sono stati convalidati mediante sintesi della sonda di RNA fredda prima di creare ribosonde con ³⁵S-UTP. Le

ribosonde radiomarcate sia antisenso sia senso sono state sintetizzate *in vitro* secondo il protocollo del produttore (Ambion) e marcate con 35S-UTP (>1.000 Ci/mmol).

Procedure di ibridazione e lavaggio

Le sezioni sono state ibridate per una notte a 55°C in formammide deionizzata, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), EDTA 5 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, 10% di destransolfato, 1X reagente di Denhardt, 50 µg/ml di lievito totale e 50-80.000 cpm/µl 35S sonda di cRNA marcata. I tessuti sono stati sottoposti a lavaggio stringente a 65°C in 50% di formammide, 2X SSC, DTT 10 mM e lavati in PBS prima del trattamento con 20 µg/ml di RNAsi A a 37°C per 30 minuti. Dopo i lavaggi in 2X SSC e 0,1X SSC per 10 minuti a 37°C, i vetrini sono stati disidratati ed esposti a pellicola per raggi X Kodak BioMaxMR per 90 minuti, quindi sottoposti ad autoradiografia in emulsione per tempi di esposizione di 11 e 24 ore.

Formazioni in immagini delle sezioni di fegato

Lo sviluppo fotografico è stato eseguito in Kodak D-19. Le sezioni sono state controcolorate leggermente con viola di cresile e analizzate usando microscopia a campo chiaro e a campo scuro. Ribosonde senso (controllo) hanno stabilito il livello del segnale di fondo.

Risultati di bioluminescenza in vivo

Gli animali sono stati sottoposti ad una iniezione endovenosa con una singola dose di 200 µg di mRNA incapsulato e sacrificati dopo quattro ore. L'attività della proteina luciferasi di lucciola espressa nei fegati e nelle milze è stata determinata in un saggio di bioluminescenza. Come dimostrato in FIG. 2, il segnale rivelabile sul basale è stato osservato in ogni animale testato. La presenza di un segnale luminescente rispetto allo sfondo interferisce con l'espressione della proteina luciferasi di lucciola dall'mRNA esogeno. La luminescenza osservata nel fegato era potenziata rispetto a segnali simili osservati nella milza.

Risultati di ibridazione in situ

Studi di ibridazione *in situ* sono stati eseguiti su fegato prelevato da due diversi animali dal gruppo di topi trattati usando un veicolo di trasferimento ICE:DOPE:DMG-PEG-2000 (preparato come precedentemente descritto) e un fegato di controllo dal gruppo di topi non trattato. L'autoradiografia su pellicola per raggi X è stata impiegata per la rivelazione dell'mRNA di luciferasi di lucciola con codone ottimizzato tramite ribosonde marcate con ³⁵S-U. (Si veda, Wilcox, J.N. J. Histochem. Cytochem. 41, 1725-1733)). La FIG. 3 dimostra sia l'illuminazione a campo chiaro (controcolorazione con viola cresile) sia l'illuminazione a campo scuro di fegati di controllo e trattati ad ingrandimento ridotto (2X). L'mRNA di luciferasi CO-FF è stato rivelato in entrambi i fegati trattati (B1 e B2, frecce sottili) ma non nel fegato di controllo (Ct) quando si è usata la ribosonda antisenso (FIG. 38). La marcatura dell'mRNA di elevato livello è stata osservata nella banda di tessuto marginale epatico (freccia grande). Non si è rivelato alcun segnale in nessun fegato applicando la ribosonda di controllo (senso) (FIG. 3C).

Con una illuminazione a campo scuro, mRNA di FFL marcato è stato rivelato come macchie luminose (ingrandimento 100X) nei fegati di animali a cui erano state effettuate le iniezioni mediante ibridazione di una sonda antisenso di mRNA di FFL (FIG. 4A), mentre lo stesso fegato presentava poche macchie luminose quando si è usata una sonda di filamento senso di mRNA di FFL per l'ibridazione (FIG. 4C). Un fegato di controllo prelevato da un animale che non aveva ricevuto nanoparticelle mediante iniezione non ha prodotto alcun segnale significativo con illuminazione a campo scuro quando si sono usate per l'ibridazione o la sonda antisenso (FIG. 4E) o la sonda senso (FIG. 4G).

Esempio 8

Risultati di analisi immunostochimica

L'mRNA di FFL è stato confezionato e fornito attraverso una formulazione di veicoli di trasferimento lipidico costituita da colesterolo, DOPE, DLinDMA, e DMG-PEG2000 in un modo simile a quello *sopra* descritto.

La traduzione dell'mRNA di FFL nella sua rispettiva proteina è stata identificata con successo tramite analisi immunostochimica (FIG. 5). Usando un anticorpo anti anticorpo di lucciola, la rivelazione della proteina di lucciola espressa può essere osservata negli epatociti di topi trattati (FIG 5B e 5C). L'analisi dei topi di controllo trattati con 1x PBS non ha dimostrato alcuna proteina di lucciola rivelabile (FIG. 5A).

Discussione

Un RNA messaggero sintetico incapsulato in materiali a base di lipidi può essere usato per il rilascio e l'espressione di geni *in vivo* nel fegato inclusi epatociti. Le miscele di lipidi cationici, non-cationici e PEG-modificati sono stati usati per esprimere una molecola di proteina reporter. ICE lipidico cationico a base di imidazolo ha determinato un rilascio arricchito di mRNA nel fegato rispetto alla milza *in vivo*. L'osservazione di un segnale bioluminescente dimostra che una molecola reporter proteica è stata tradotta dall'mRNA esogeno che è stato rilasciato in una nanoparticella lipidica in vivo. Studi di ibridazione *in situ* hanno dimostrato la rivelazione diretta dell'mRNA esogeno tramite marcatura con ribosonda ³⁵S-U. L'autoradiografia dell'emulsione ha prodotto un segnale che può essere usato localizzare l'mRNA nel tessuto epatico e più in particolare negli epatociti presenti nei fegati degli animali trattati (si vedano, FIGG. 3 e 4). mRNA di FFL non è stato rivelato nei fegati di topi di controllo non trattati.

Il rilascio con successo di tale mRNA nel fegato ed in particolare negli epatociti supporta la conclusione che formulazioni e composizioni della presente invenzione possono essere usate per il trattamento e la correzione di errori intrinseci del metabolismo che sono localizzati nel fegato. Ad esempio, malattie quali carenze di ASD, ARO, CPS, ASS1 e OTC, nonché altri

disturbi possono essere trattati tramite terapia con sostituzione dell'mRNA di un gene mancante o malfunzionante. La zonazione metabolica del ciclo dell'urea negli epatociti indica che la sostituzione dell'attività enzimatica mancante in queste cellule migliorerebbe fortemente il processamento biochimico in soggetti affetti da una carenza enzimatica ed in particolare in soggetti affetti da un disturbo del ciclo dell'urea.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica per l'uso in un metodo di trattamento di una malattia in un soggetto che deriva da una carenza proteica, la composizione farmaceutica comprendendo: un veicolo di trasferimento e almeno una molecola di mRNA codificante detta proteina, il veicolo di trasferimento comprendendo uno o più lipidi cationici, uno o più lipidi non-cationici, e uno o più lipidi PEG-modificati, in cui il veicolo di trasferimento è un liposoma e la dimensione del veicolo di trasferimento è inferiore a 100 nm, in cui la composizione farmaceutica si distribuisce preferenzialmente nelle cellule epatiche dopo somministrazione al soggetto e la proteina codificata è espressa nelle cellule epatiche del soggetto.
2. Composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui uno o più lipidi cationici è/sono selezionati tra ICE, DOTMA, DC-Chol, DOGS, DOSPA, DODAP, DOTAP, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, DODAC, DDAB, DMRIE, CLinDMA, CplindDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLindDAP, DLincarbDAP, DlinCDAP, Dlin-K-DMA, e/o Dlin-K-XTC2-DMA.
3. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'uno o più lipidi non-cationici è/sono selezionati tra DSPC, DOPC, DOPG, DPPC, DPPG, DOPE, POPC, POPE, DOPE-mal, DPPE, DMPE, DSPE, o SOPE.
4. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il veicolo di trasferimento comprende uno o più lipidi cationici a base di colesterolo.
5. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il lipide PEG-modificato è un lipide PEG-modificato comprendente una catena PEG con una lunghezza fino a 5 kDa attaccata in modo covalente ad un lipide con catena(e) alchilica(alchiliche) di lunghezza C₆-C₂₀, un fosfolipide PEG-modificato o una ceramide PEG-modificata.

6. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'uno o più lipidi PEG-modificati è/sono presenti in un rapporto molare tra 0% e 20% del lipide totale presente nel veicolo di trasferimento.
7. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'uno o più lipidi cationici è/sono presenti in un rapporto molare dal 20% al 70% del lipide totale presente nel veicolo di trasferimento.
8. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui, la molecola di mRNA comprende una o più delle modificazioni che conferiscono stabilità aumentata o potenziata rispetto alla sua controparte naturale, non modificata.
9. Composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 8, in cui l'una o più modificazioni è selezionata tra: incorporazione dei legami non-nucleotidici o nucleotidici modificati; una alterazione della regione non tradotta in 5' o 3'; inclusione di una coda poli-A o una coda poli-A più lunga; l'inclusione di una struttura Cap1; o una modificazione chimica di una base nucleotidica.
10. Composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 8, in cui l'mRNA è modificato mediante incorporazione di pseudouridine.
11. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui l'mRNA ha un peso molecolare di almeno 1 kDa, 1,5 kDa, 2 kDa, 2,5 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, o più.
12. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'mRNA codifica due o più proteine distinte.
13. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la proteina è un ormone, un enzima, un recettore, o un anticorpo.
14. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui la malattia è causata da difetti in un prodotto genico specifico del fegato.

15. Composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 14, in cui la malattia è un disturbo metabolico del ciclo dell'urea, opzionalmente in cui la proteina è selezionata tra ornitina transcarbamilasi (OTC), carbammil fosfato sintetasi (CPS), argininosuccinato sintetasi 1 (ASS 1), argininosuccinato liasi (ASL) e arginasi (ARG).

16. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-13, in cui la proteina è escreta o secreta dalle cellule epatiche nel fluido extracellulare circostante, opzionalmente in cui la proteina è distribuita a livello sistemico in seguito all'escrezione.

17. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-15, in cui la proteina rimane nel citosol delle cellule epatiche.

18. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione farmaceutica è somministrata al soggetto per via endovenosa.

19. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione farmaceutica è somministrata al soggetto due volte la settimana, una volta la settimana, ogni dieci giorni, ogni due settimane, ogni tre settimane, ogni quattro settimane o una volta al mese.

20. Composizione farmaceutica comprendente:

un veicolo di trasferimento, un eccipiente farmaceuticamente accettabile e almeno una molecola di mRNA codificante una proteina,

il veicolo di trasferimento comprendente uno o più lipidi cationici, uno o più lipidi non-cationici, e uno o più lipidi PEG-modificati, in cui il veicolo di trasferimento è un liposoma e la dimensione del veicolo di trasferimento è inferiore a 100 nm.