

SIB EX6316R

P066965SM:HRG/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 14717945.1, pubblicazione n° 2970456

a nome di Translate Bio, Inc.

di 29 Hartwell Avenue, Lexington, Massachusetts 02421, U.S.A.

* * * * *

"Metodi e composizioni per il rilascio di anticorpi codificati da mRNA"

DESCRIZIONE

FONDAMENTO

Gli anticorpi sono noti per avere potenti effetti terapeutici e sono attualmente utilizzati per il trattamento di una serie di malattie tra cui cancro, malattie autoimmuni, malattie cardiovascolari e rigetto del trapianto. Tradizionalmente, gli anticorpi terapeutici sono prodotti mediante tecnologia ricombinante, formulati e poi somministrati a pazienti che necessitano di terapia anticorpale. Tuttavia, la produzione e la formulazione di anticorpi è molto costosa. Inoltre, molti anticorpi hanno solo un'emivita molto breve *in vivo* e quindi, potrebbero non raggiungere il loro antigene bersaglio o tessuto bersaglio prima di essere degradati. Per ottenere l'efficacia desiderata, la terapia anticorpale richiede spesso dosi elevate e somministrazioni frequenti.

La terapia genica e la vaccinazione genetica, nota anche come vaccinazione al DNA, forniscono approcci alternativi per la somministrazione di grandi quantità di anticorpi *in vivo*. Tuttavia, l'uso del DNA come agente nella terapia genica e nella vaccinazione genetica può causare alcuni problemi di sicurezza. Ad esempio, il DNA viene degradato lentamente nel flusso sanguigno. Può verificarsi la formazione di anticorpi anti-DNA (Gilkeson et al., J. Clin. Invest. 1995, 95: 1398-1402). L'eventuale persistenza di DNA (estraneo) nell'organismo può quindi portare ad un'iperattivazione del sistema immunitario, che era noto per provocare splenomegalia nei topi (Montheith et al., Anticancer Drug Res. 1997, 12(5): 421-432). Inoltre, l'integrazione del DNA può causare mutazioni nel genoma dell'ospite perturbando un gene intatto.

WO 2012/170930 insegna che mRNA che codifica per una proteina secreta può essere caricato in nanoparticelle lipidiche e rilasciato a cellule bersaglio *in vivo*. Le cellule bersaglio agiscono quindi come una fonte di deposito per la produzione di proteine solubili e secrete nel sistema circolatorio a livelli terapeutici. WO 2008/083949 insegna che un singolo mRNA, che codifica per la catena pesante e per la catena leggera di un anticorpo, può essere introdotto in forma nuda o come complesso con opportuni vettori (es. liposomi) in un organismo. US 2012/237975 descrive la trasfezione delle cellule dell'ovaio di criceto cinese (CHO) e del rene embrionale umano (HEK) con RNA utilizzando complessi RNAiMax (vedere paragrafo [0208]). RNAiMax è una lipofectamina™, un agente di trasfezione usato per aumentare l'efficienza di trasfezione dell'RNA in colture

cellulari *in vitro* mediante lipofezione e consiste in una formulazione di liposomi cationici (Mamoru Nakanishi et al., *Pharmaceutics* Vol. 5, n. 3: 411-420, 2013). Stanley T. Crooke (Capitolo 9.1: Liposomal Formulations for Nucleic Acid Delivery, *Antisense Drug Technology*, 2008, ISBN: 978-0-8493-8796-8) discute l'incapsulamento liposomiale di siRNA per l'uso nella terapia antisense. Pisani et al. (*Neutral Liposomes and DNA Transfection, Non-Viral Gene Therapy*, Prof. Xubo Yuan (Ed.), 2011, ISBN: 978-953-307-538-9) discute l'incapsulamento in liposomi di DNA per la trasfezione *in vitro* di linee cellulari di fibroblasti di topo, per uso in terapia genica. Martinon et al. (*Eur J Immunol.* 1993 Jul;23(7):1719-22) discute l'incapsulamento in liposomi di mRNA per uso in vaccini a RNA. Geall et al. (*Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Sep 4;109(36):14604-9) discute l'incapsulamento in liposomi di RNA auto-amplificante per uso in vaccini a RNA. Philippot et al. (*Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* Volume 734, fascicolo 2, 12 ottobre 1983, Pagine 137-143) discute l'incapsulamento di mRNA in liposomi molto grandi (1000nm). Love et al. (*Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Feb 2;107(5):1864-9) discute l'incapsulamento liposomiale di siRNA per l'uso nella terapia a interferenza dell'RNA.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce una composizione per un rilascio più sicuro ed efficace di anticorpi *in vivo* basato sulla tecnologia di rilascio dell'RNA messaggero (mRNA). La presente invenzione si basa, in parte, sulla sorprendente scoperta che è possibile ottenere la produzione di anticorpi multi-catena completamente assemblati *in vivo* rilasciando mRNA esogeni che codificano una catena pesante e una catena leggera dell'anticorpo, anche quando la catena pesante e la catena leggera sono rilasciate da mRNA separati. Come illustrato dagli esempi non limitativi descritti nella sezione degli Esempi di seguito, quando gli aggregati di mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere, incapsulati in liposomi, sono stati iniettati per via endovenosa nei topi, è possibile rilevare quantità significative di anticorpo codificato da mRNA nel siero di topo entro sei ore post-iniezione con un picco dopo 72 o 96 ore. L'espressione sistemica dell'anticorpo persisteva anche dopo tre settimane dall'iniezione. Pertanto, i presenti inventori hanno dimostrato con successo che gli anticorpi terapeutici multi-catena possono essere somministrati dagli mRNA e prodotti dal corpo stesso del paziente, il che rende possibile eliminare il processo di produzione dell'anticorpo ricombinante altamente costoso. Inoltre, contrariamente alla

natura transitoria e vulnerabile degli mRNA, gli anticorpi prodotti dagli mRNA sono sorprendentemente di lunga durata e possono ottenere una distribuzione sistemica efficiente. La natura transitoria degli mRNA può anche ridurre al minimo i problemi di sicurezza tipicamente associati agli acidi nucleici estranei. Pertanto, la presente invenzione fornisce un approccio di rilascio di anticorpi più sicuro, più economico e più efficace per usi terapeutici.

L'invenzione riguarda una composizione comprendente un primo mRNA che codifica per la catena pesante di un anticorpo e un secondo mRNA che codifica per la catena leggera dell'anticorpo con un rapporto molare compreso tra 2:1 e 1:2 per l'uso in terapia in un paziente, in cui il primo mRNA e il secondo mRNA (i) comprendono ciascuno una struttura a cappuccio 5', una coda 3' poli-A, una regione 5' non tradotta e una regione 3' non tradotta e (ii) sono incapsulati all'interno di liposomi comprendenti un lipide cationico, un lipide neutro, un lipide a base di colesterolo e un lipide modificato con PEG e aventi una dimensione non superiore a 150 nm, in cui il primo mRNA che codifica per la catena pesante e il secondo mRNA che codifica per la catena leggera sono incapsulati nello stesso liposoma, in cui l'anticorpo è un tetramero e ciascun tetramero è composto da due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avente una catena leggera di circa 25 kD e una catena pesante di circa 50-70 kD e in cui la composizione viene somministrata per via endovenosa al paziente e l'anticorpo è espresso per via sistemica nel paziente.

In alcune realizzazioni, un mRNA che codifica per catena pesante o catena leggera comprende una sequenza che codifica un peptide segnale. In alcune realizzazioni, un mRNA che codifica per catena pesante o catena leggera comprende una sequenza che codifica un peptide segnale dell'ormone della crescita umano (hGH) (ad esempio, SEQ. ID. N.: 9 o SEQ. ID. N.: 10). In alcune realizzazioni, la sequenza codificante una sequenza peptidica segnale (ad esempio, SEQ. ID. N.:9 o SEQ. ID. N.:10) è collegata, direttamente o indirettamente, alla sequenza di mRNA codificante per catena pesante o catena leggera all'N-terminale.

In alcune realizzazioni, il primo mRNA che codifica per la catena pesante e il secondo mRNA che codifica per la catena leggera sono presenti con un rapporto molare compreso tra 2:1 e 1:2. In alcune realizzazioni, il primo mRNA che codifica per la catena pesante e il secondo mRNA che codifica per la catena leggera sono presenti in

un rapporto molare di 1:1.

In alcune realizzazioni, i liposomi comprendono uno o più tra lipidi cationici, lipidi neutri, lipidi a base di colesterolo e lipidi modificati con PEG. In alcune realizzazioni, i liposomi comprendono lipidi cationici, lipidi neutri, lipidi a base di colesterolo e lipidi modificati con PEG.

In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione non maggiore di circa 150 nm (ad esempio, non maggiore di circa 125 nm, 100 nm, 75 nm o 50 nm). In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione non superiore a circa 125 nm. In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione non superiore a circa 100 nm. In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione non superiore a circa 75 nm. In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione non superiore a circa 50 nm.

In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione compresa tra circa 150 - 10 nm (ad esempio, compresa tra circa 125 - 10 nm, 100 - 10 nm, 75 - 10 nm o 50 - 10 nm). In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione compresa tra circa 150 - 100 nm (ad esempio, compresa tra circa 125 e 100 nm). In alcune realizzazioni, i liposomi hanno una dimensione che va da circa 100 - 10 nm (ad esempio, che va da circa 90 - 10 nm, 80 - 10 nm, 70 - 10 nm, 60 - 10 nm o 50 - 10 nm).

In alcune realizzazioni, gli mRNA vengono modificati per migliorare la stabilità. In alcune realizzazioni, gli mRNA vengono modificati per includere un nucleotide modificato.

In alcune realizzazioni, gli mRNA vengono somministrati per via endovenosa.

In alcune realizzazioni, l'espressione sistemica dell'anticorpo è rilevabile almeno circa 6 ore, 12 ore, 24 ore, 36 ore, 48 ore, 60 ore, 72 ore, 96 ore, 120 ore, 144 ore, 156 ore, 168 ore, o 180 ore dopo la somministrazione (ad es. dopo una singola somministrazione). In alcune realizzazioni, l'espressione sistemica dell'anticorpo è rilevabile almeno circa 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, 7 giorni, 8 giorni, 9 giorni, 10 giorni, 11 giorni, 12 giorni, 13 giorni, 14 giorni, 15 giorni, 20 giorni, 22 giorni, 25 giorni o 30 giorni dopo la somministrazione (ad es. dopo una singola somministrazione). In alcune realizzazioni, l'espressione sistemica dell'anticorpo è rilevabile almeno circa 0,5 settimane, 1 settimana, 1,5 settimane, 2 settimane, 2,5 settimane, 3 settimane, 3,5 settimane, 4 settimane, 4,5 settimane, 5 settimane, 5,5 settimane, 6 settimane, 6,5 settimane, 7

settimane, 7,5 settimane o 8 settimane dopo la somministrazione (ad es. dopo una singola somministrazione). In alcune realizzazioni, l'espressione sistemica dell'anticorpo è rilevabile almeno circa 1 mese, 2 mesi, 3 mesi o 4 mesi dopo la somministrazione (ad esempio, dopo una singola somministrazione).

In alcune realizzazioni, l'anticorpo è una IgG.

In alcune realizzazioni, l'anticorpo è scelto dal gruppo costituito da anti-CCL2, anti-lisil ossidasi-simile-2 (LOXL2), anti-Fit-1, anti-TNF- α , anti-recettore dell'interleuchina-2R α (CD25), anti-TGF β , anti-fattore di attivazione delle cellule B, anti-integrina alfa-4, anti-BAGE, anti- β -catenina/m, anti-Bcr-abl, anti-C5, anti-CA125, anti-CAMEL, anti-CAP-1, anti-CASP-8, anti-CD4, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD25, anti-CDC27/m, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD52, anti-CD56, anti-CD80, anti-CDK4/m, anti-CEA, anti-CT, anti-CTL4, anti-Cyp-B, anti-DAM, anti-EGFR, anti-ErbB3, anti-ELF2M, anti-EMMPRIN, anti-EpCam, anti-ETV6-AML1, anti-HER2, anti-G250, anti-GAGE, anti-GnT-V, anti-Gp100, anti-HAGE, anti-HER-2/neu, anti-HLA-A*0201-R170I, anti-IGF-1R, anti-IL-2R, anti-IL-5, anti-MC1R, anti-miosina/m, anti-MUC1, anti-MUM-1, -2, -3, anti-proteinasi-3, anti-p190 bcr-abl minore, anti-Pml/RAR α , anti-PRAMS, anti-PSA, anti-PSM, anti-PSMA, anti-RAGE, anti-RANKL, anti-RU1 o RU2, anti-SAGE, anti-SART-1 o anti-SART-3, anti-survivina, anti-TEL/AML1, anti-TPI/m, anti-TRP-1, anti-TRP-2, anti-TRP-2/INT2, e anti-VEGF o anti-recettore VEGF.

Tra l'altro, la presente invenzione fornisce anche mRNA illustrativi codificanti una catena pesante e una catena leggera di anticorpi specifici come, ad esempio, un anticorpo anti-CCL2, e composizioni contenenti gli stessi. In alcune realizzazioni, la presente invenzione fornisce un mRNA che codifica una catena pesante di un anticorpo anti-CCL2 avente una sequenza identica per almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a SEQ. ID. N.:1 o SEQ. ID. N.:2, come qui descritto. In alcune realizzazioni specifiche, la presente invenzione fornisce un mRNA che codifica una catena pesante di un anticorpo anti-CCL2 avente una sequenza di SEQ. ID. N.:1 o SEQ. ID. N.:2, come qui descritto. In alcune realizzazioni, la presente invenzione fornisce un mRNA che codifica una catena leggera di un anticorpo anti-CCL2 avente una sequenza identica per almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a SEQ. ID. N.:3 o SEQ. ID. N.:4, come qui descritto. In alcune realizzazioni specifiche, la presente invenzione fornisce un mRNA

che codifica una catena leggera di un anticorpo anti-CCL2 avente una sequenza di SEQ. ID. N.:3 o SEQ. ID. N.:4, come qui descritto.

Come usati in questa domanda, i termini "circa" e "approssimativamente" sono usati come equivalenti. Qualsiasi numero usato in questa domanda con o senza circa/approssimativamente è destinato a coprire qualsiasi normale fluttuazione comprese da un esperto ordinario nella tecnica pertinente.

Altre caratteristiche, scopi e vantaggi della presente invenzione sono evidenti nella descrizione dettagliata che segue. Si deve comprendere, tuttavia, che la descrizione dettagliata, pur indicando realizzazioni della presente invenzione, è data solo a titolo illustrativo, non limitativo.

BREVE DESCRIZIONE DEL DISEGNO

Le seguenti figure sono solo a scopo illustrativo e non limitativo.

Figura 1 mostra un grafico a barre illustrativo dei livelli di proteine IgG, come determinato da ELISA, osservati dopo il trattamento delle cellule HCL1 con mRNA usando i metodi forniti.

Figura 2 mostra un grafico a barre illustrativo dei livelli di proteine IgG, come determinato da ELISA, osservati dopo il trattamento delle cellule con mRNA usando i metodi forniti.

Figura 3 illustra i risultati di un "western blot" esaminando i livelli proteici risultanti dall'introduzione di mRNA, secondo i metodi forniti, in cellule HCL1 dopo 24 e 48 ore.

Figura 4 mostra un grafico a barre illustrativo dei livelli di anticorpi CCL2 determinati tramite ELISA nel siero di topi esposti all'mRNA secondo i metodi forniti per 6, 24, 48 o 72 ore.

Figura 5 mostra un grafico a barre illustrativo dei livelli di anticorpi α -VEGF come determinato tramite ELISA nel siero di topi dopo una singola dose di mRNA di α -VEGF.

Figura 6 mostra un grafico a barre illustrativo dei livelli di anticorpi α -VEGF come determinato tramite ELISA nel siero di topi identificati individualmente dopo una singola dose di mRNA di α -VEGF.

Figura 7 mostra un grafico a barre illustrativo della produzione *in vivo* di un anticorpo anti-VEGF umano in topi di tipo selvatico 24 ore dopo la somministrazione di nanoparticelle lipidiche (LNP) cKK-E12 caricate con mRNA di α -VEGF. I topi sono stati dosati tramite iniezione nella vena della coda o iniezione sottocutanea (SC).

DEFINIZIONI

Affinché la presente invenzione possa essere compresa più facilmente, alcuni termini vengono per prima cosa definiti di seguito. Definizioni aggiuntive per i seguenti termini e altri termini sono stabilite in tutta la descrizione.

Amminoacido: Come qui usato, il termine "amminoacido", nel suo senso più ampio, si riferisce a qualsiasi composto e/o sostanza che può essere incorporato in una catena polipeptidica. In alcune realizzazioni, un amminoacido ha la struttura generale $H_2N-C(H)(R)-COOH$. In alcune realizzazioni, un amminoacido è un amminoacido presente in natura. In alcune realizzazioni, un amminoacido è un amminoacido sintetico; in alcune realizzazioni, un amminoacido è un d-amminoacido; in alcune realizzazioni, un amminoacido è un l-amminoacido. "Amminoacido standard" si riferisce a uno qualsiasi dei venti l-amminoacidi standard che si trovano comunemente nei peptidi naturali. "Amminoacido non standard" si riferisce a qualsiasi amminoacido, diverso dagli amminoacidi standard, indipendentemente dal fatto che sia preparato sinteticamente o ottenuto da una fonte naturale. Come usato nella presente, "amminoacido sintetico" comprende amminoacidi chimicamente modificati, inclusi ma non limitati a sali, derivati di amminoacidi (come ammidi) e/o sostituzioni. Gli amminoacidi, inclusi gli amminoacidi carbossi- e/o ammino-terminali nei peptidi, possono essere modificati mediante metilazione, ammidazione, acetilazione, gruppi protettivi e/o sostituzione con altri gruppi chimici che possono modificare l'emivita circolante del peptide senza influire negativamente la loro attività. Gli amminoacidi possono partecipare a un legame disolfuro. Gli amminoacidi possono comprendere una o più modificazioni post-traduzione, come l'associazione con una o più entità chimiche (ad esempio, gruppi metilici, gruppi acetato, gruppi acetile, gruppi fosfato, gruppi formilici, gruppi isoprenoidi, gruppi solfato, gruppi di polietilenglicole, gruppi lipidici, porzioni di carboidrati, porzioni di biotina, ecc.). Il termine "amminoacido" è usato in modo equivalente con "residuo amminoacidico" e può riferirsi ad un amminoacido libero e/o ad un residuo amminoacidico di un peptide. Risulterà evidente dal contesto in cui il termine viene usato se si riferisce ad un amminoacido libero o ad un residuo di un peptide.

Animale: Come qui usato, il termine "animale" si riferisce a qualsiasi membro del regno animale. In alcune

realizzazioni, "animale" si riferisce agli esseri umani, in qualsiasi fase dello sviluppo. In alcune realizzazioni, "animale" si riferisce ad animali non umani, in qualsiasi stadio di sviluppo. In alcune realizzazioni, l'animale non umano è un mammifero (*ad es.*, un roditore, un topo, un ratto, un coniglio, una scimmia, un cane, un gatto, una pecora, un bovino, un primate e/o un maiale). In alcune realizzazioni, gli animali includono, ma non sono limitati a, mammiferi, uccelli, rettili, anfibi, pesci, insetti e/o vermi. In alcune realizzazioni, un animale può essere un animale transgenico, un animale geneticamente modificato e/o un clone.

Anticorpo: Come qui usato, il termine "anticorpo" si riferisce a un "anticorpo" intatto, che è un'immunoglobulina che si lega in modo specifico a un particolare antigene. Un anticorpo può appartenere a qualsiasi classe di immunoglobuline, inclusa una qualsiasi delle classi umane: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. È noto che una tipica unità strutturale di immunoglobulina (anticorpo) come compresa nella tecnica comprende un tetramero. Ogni tetramero è composto da due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avente una catena "leggera" (circa 25 kD) e una catena "pesante" (circa 50-70 kD). L'N-terminale di ciascuna catena definisce una regione variabile di circa 100-110 o più amminoacidi principalmente responsabili del riconoscimento dell'antigene. I termini "catena leggera variabile" (VL) e "catena pesante variabile" (VH) si riferiscono rispettivamente a queste catene leggere e pesanti. Ogni regione variabile è ulteriormente suddivisa in regioni ipervariabili (HV) e regioni strutturali (FR). Le regioni ipervariabili comprendono tre aree di sequenza di ipervariabilità chiamate regioni determinanti la complementarità (CDR 1, CDR 2 e CDR 3), separate da quattro regioni strutturali (FR1, FR2, FR3 e FR4) che formano una struttura a foglietto beta e fungono da impalcatura per tenere in posizione le regioni HV. Il C-terminale di ciascuna catena pesante e leggera definisce una regione costante costituita da un dominio per la catena leggera (CL) e tre per la catena pesante (CH1, CH2 e CH3). I termini "anticorpo intatto" o "anticorpo completamente assemblato" sono usati in riferimento ad un anticorpo per significare che esso contiene due catene pesanti e due catene leggere, opzionalmente associate da legami disolfuro come avviene con anticorpi prodotti naturalmente. Come usato nella presente, un "frammento di anticorpo" include una porzione di un anticorpo intatto, come, per esempio, la regione che si lega all'antigene o variabile di un anticorpo. Esempi di frammenti di anticorpo includono frammenti Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; e

anticorpi multispecifici formati da frammenti di anticorpi. Ad esempio, i frammenti di anticorpo includono frammenti isolati, frammenti "Fv", costituiti dalle regioni variabili delle catene pesanti e leggere.

Approssimativamente o circa: Come qui usato, il termine "approssimativamente" o "circa", applicato a uno o più valori di interesse, si riferisce a un valore che è simile a un valore di riferimento dichiarato. In alcune realizzazioni, il termine "approssimativamente" o "circa" si riferisce a un intervallo di valori che rientrano entro il 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o inferiore in entrambe le direzioni (maggiore o minore) del valore di riferimento indicato se non diversamente affermato o altrimenti evidente dal contesto (tranne dove tale numero supera il 100% di un possibile valore).

Biodisponibilità: Come qui usato, il termine "biodisponibilità" si riferisce generalmente alla percentuale della dose somministrata che raggiunge il flusso sanguigno di un soggetto.

Biologicamente attivo: Come qui usata, la frase "biologicamente attivo" si riferisce a una caratteristica di qualsiasi agente che ha attività in un sistema biologico, e particolarmente in un organismo. Ad esempio, un agente che, quando somministrato a un organismo, ha un effetto biologico su quell'organismo, è considerato biologicamente attivo.

Espressione: Come usato nella presente, "espressione" di una sequenza di acido nucleico si riferisce alla traduzione di un mRNA in un polipeptide (ad esempio, catena pesante o catena leggera di anticorpo), assemblaggio di più polipeptidi (ad esempio, catena pesante o catena leggera di anticorpo) in una proteina intata (es. anticorpo) e/o modifica post-traduzione di un polipeptide o proteina completamente assemblata (es. anticorpo). In questa domanda, i termini "espressione" e "produzione" e l'equivalente grammaticale sono usati in modo equivalente.

Funzionale: Come usato nella presente, una molecola biologica "funzionale" è una molecola biologica in una forma in cui mostra una proprietà e/o un'attività da cui è caratterizzata.

Contenuto di GC: Come usato nella presente, il "contenuto di GC" è la frazione o percentuale di residui di nucleobasi totali in una sequenza di acido nucleico che sono residui di guanina, residui di citosina, o loro analoghi. Ad esempio, una sequenza di 100 nt che contiene esattamente 30 citosine, esattamente 30 guanine,

esattamente un analogo della citosina, e esattamente un analogo di guanina ha una ricchezza in GC del 62%.

Emivita: Come qui usato, il termine "emivita" è il tempo necessario affinché una quantità come la concentrazione o l'attività proteica scenda alla metà del suo valore misurato all'inizio di un periodo di tempo.

Migliorare, aumentare o ridurre: Come qui usati, i termini "migliorare", "aumentare" o "ridurre" o equivalenti grammaticali, indicano valori relativi a una misurazione di base, come una misurazione nello stesso individuo prima dell'inizio del trattamento qui descritto, o una misurazione in un soggetto di controllo (o soggetto di controllo multiplo) in assenza del trattamento qui descritto. Un "soggetto di controllo" è un soggetto affetto dalla stessa forma di malattia del soggetto in trattamento, che ha circa la stessa età del soggetto in trattamento.

In vitro: Come usato nella presente, il termine "*in vitro*" si riferisce a eventi che si verificano in un ambiente artificiale, *ad es.*, in provetta o recipiente di reazione, in coltura cellulare, *ecc.*, piuttosto che all'interno di un organismo multicellulare.

In vivo: Come usato nella presente, il termine "*in vivo*" si riferisce a eventi che si verificano all'interno di un organismo multicellulare, come un animale umano e non umano. Nel contesto dei sistemi basati su cellule, il termine può essere usato per riferirsi a eventi che si verificano all'interno di una cellula vivente (al contrario, ad esempio, di sistemi *in vitro*).

Isolato: Come qui usato, il termine "isolato" si riferisce a una sostanza e/o entità che è stata (1) separata da almeno alcuni dei componenti a cui era associata quando inizialmente prodotta (in natura e/o in un ambiente sperimentale), e/o (2) prodotta, preparata e/o fabbricata per mano dell'uomo. Sostanze e/o entità isolate possono essere separate da circa 10%, circa 20%, circa 30%, circa 40%, circa 50%, circa 60%, circa 70%, circa 80%, circa 90%, circa 91%, circa 92%, circa 93%, circa 94%, circa 95%, circa 96%, circa 97%, circa 98%, circa 99% o più di circa 99% degli altri componenti a cui erano inizialmente associate. In alcune realizzazioni, gli agenti isolati sono puri per circa 80%, circa 85%, circa 90%, circa 91%, circa 92%, circa 93%, circa 94%, circa 95%, circa 96%, circa 97%, circa 98%, circa 99% o più di circa 99%. Come usato nella presente, una sostanza è "pura" se è sostanzialmente priva di altri componenti. Come usato nella presente, il calcolo della purezza percentuale di sostanze e/o entità isolate non deve includere eccipienti (ad es. tampone, solvente, acqua, *ecc.*).

Associatore: Come usato nella presente, il termine "associatore" si riferisce, in una proteina di fusione, a una sequenza di amminoacidi diversa da quella che appare in una posizione particolare nella proteina naturale ed è generalmente progettata per essere flessibile o per interporre una struttura, come un α -elica, tra due porzioni proteiche. Un associatore viene anche chiamato distanziatore. Un associatore o un distanziatore in genere non ha una funzione biologica da solo.

Distribuzione o rilascio locale: Come qui usati, i termini "distribuzione locale", "rilascio locale" o equivalente grammaticale, si riferiscono al rilascio o distribuzione specifica per tessuto. Tipicamente, la distribuzione o rilascio locale richiede che una proteina (ad esempio un anticorpo) codificata da mRNA sia tradotta ed espressa a livello intracellulare o con una secrezione limitata che eviti di entrare nel sistema circolatorio del paziente.

RNA messaggero (mRNA): Come qui usato, il termine "RNA messaggero (mRNA)" si riferisce a un polinucleotide che codifica almeno un polipeptide. L'mRNA può contenere una o più regioni codificanti e non codificanti.

Acido nucleico: Come qui usato, il termine "acido nucleico", nel suo senso più ampio, si riferisce a qualsiasi composto e/o sostanza che è o può essere incorporato in una catena polinucleotidica. In alcune realizzazioni, un acido nucleico è un composto e/o una sostanza che è o può essere incorporata in una catena polinucleotidica tramite un legame fosfodiesterico. "Acido nucleico" si riferisce a singoli residui di acido nucleico (*ad es.*, nucleotidi e/o nucleosidi). "Acido nucleico" si riferisce a una catena polinucleotidica comprendente singoli residui di acido nucleico. "Acido nucleico" comprende RNA così come DNA e/o cDNA a singolo e/o doppio filamento. Inoltre, i termini "acido nucleico", "DNA", "RNA" e/o termini simili includono analoghi dell'acido nucleico, *cioè*, analoghi aventi uno scheletro diverso da fosfodiesterico. Gli "acidi peptido-nucleici" hanno legami peptidici invece di legami fosfodiesterei nella spina dorsale. Il termine "sequenza nucleotidica codificante una sequenza amminoacidica" include tutte le sequenze nucleotidiche che sono versioni degenerate l'una dell'altra e/o codificano la stessa sequenza amminoacidica. Le sequenze nucleotidiche che codificano per proteine e/o RNA possono includere introni. Gli acidi nucleici possono essere purificati da fonti naturali, prodotti usando sistemi di espressione ricombinanti e opzionalmente purificati, sintetizzati chimicamente, *ecc.* Ove opportuno, *ad es.*, nel

caso di molecole sintetizzate chimicamente, gli acidi nucleici possono comprendere analoghi nucleosidici come analoghi aventi basi o zuccheri chimicamente modificati, modificazioni dello scheletro, *ecc.* Una sequenza di acido nucleico è presentata nella direzione da 5' a 3' se non diversamente indicato. In alcune realizzazioni, un acido nucleico è o comprende nucleosidi naturali (*ad es.*, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desossadenosina, desossitimidina, desossiguanosina e desossicitidina); analoghi nucleosidici (*ad es.*, 2-amminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-amminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-iodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-amminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-ossoadenosina, 8-ossoguanosina, O(6)-metilguanina e 2-tiocitidina); basi chimicamente modificate; basi biologicamente modificate (*ad es.*, basi metilate); basi intercalate; zuccheri modificati (*ad es.*, 2'-fluororibosio, ribosio, 2'-desossiribosio, arabinosio ed esoso); e/o gruppi fosfato modificati (*ad es.*, fosforotioati e legami 5'-N-fosforammidito). In alcune realizzazioni, la presente invenzione è specificamente diretta a "acidi nucleici non modificati", che significa acidi nucleici (*ad es.*, polinucleotidi e residui, inclusi nucleotidi e/o nucleosidi) che non sono stati modificati chimicamente per facilitare o ottenere il rilascio.

Paziente: Come usato nella presente, il termine "paziente" o "soggetto" si riferisce a qualsiasi organismo a cui può essere somministrata una composizione fornita, *ad es.*, per scopi sperimentali, diagnostici, profilattici, cosmetici e/o terapeutici. Pazienti tipici includono animali (*ad es.*, mammiferi come topi, ratti, conigli, primati non umani e/o umani). In alcune realizzazioni, un paziente è un essere umano.

Accettabile farmaceuticamente: Il termine "accettabile farmaceuticamente" come qui usato, si riferisce a sostanze che, nell'ambito di un ponderato giudizio medico, sono adatte per l'uso a contatto con i tessuti di esseri umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica o altri problemi o complicazione, in maniera commisurata a un ragionevole rapporto rischio/beneficio.

Distribuzione o rilascio sistemico: Come qui usati, i termini "distribuzione sistemica", "rilascio sistemico" o equivalente grammaticale, si riferiscono a un meccanismo o approccio di rilascio o distribuzione che interessa l'intero corpo o un intero organismo. Tipicamente, la distribuzione o la rilascio sistemica viene realizzata tramite

il sistema di circolazione del corpo, ad esempio il flusso sanguigno. Confrontare con la definizione di "distribuzione o rilascio locale".

Soggetto: Come qui usato, il termine "soggetto" si riferisce a un animale umano o non umano (ad esempio topo, ratto, coniglio, cane, gatto, bovino, suino, pecora, cavallo o primate). Un essere umano include forme pre e post-natale. In molte realizzazioni, un soggetto è un essere umano. Un soggetto può essere un paziente, che si riferisce a un essere umano che si presenta a un medico per la diagnosi o il trattamento di una malattia. Il termine "soggetto" è qui usato in modo equivalente con "individuo" o "paziente". Un soggetto può essere affetto o è suscettibile a una malattia o disturbo, ma può o meno mostrare i sintomi della malattia o del disturbo.

Sostanzialmente: Come qui usato, il termine "sostanzialmente" si riferisce alla condizione qualitativa di esibire l'entità o grado totale o quasi totale di una caratteristica o proprietà di interesse. Una persona di ordinaria abilità nelle tecniche biologiche capirà che i fenomeni biologici e chimici raramente, se non mai, vanno a completamento e/o procedono a completezza o raggiungono o evitano un risultato assoluto. Il termine "sostanzialmente" viene quindi qui usato per cogliere la potenziale mancanza di completezza insita in molti fenomeni biologici e chimici.

Tessuti bersaglio: Come qui usato, il termine "tessuti bersaglio" si riferisce a qualsiasi tessuto che è affetto da una malattia da trattare. In alcune realizzazioni, i tessuti bersaglio includono quei tessuti che mostrano patologia, sintomo o caratteristica associati alla malattia.

Quantità terapeuticamente efficace: Come qui usato, il termine "quantità terapeuticamente efficace" di un agente terapeutico indica una quantità sufficiente, quando somministrata a un soggetto affetto o suscettibile a una malattia, disturbo e/o condizione, per trattare, diagnosticare, prevenire e/o ritardare l'insorgenza dei sintomi della malattia, del disturbo e/o della condizione. Gli esperti nella tecnica comprenderanno che una quantità terapeuticamente efficace viene tipicamente somministrata tramite un regime di dosaggio comprendente almeno una dose unitaria.

Trattamento: Come qui usato, il termine "trattare", "trattamento" o "trattando" si riferisce a qualsiasi metodo usato per alleviare, migliorare, alleviare, inibire, prevenire, ritardare l'insorgenza, ridurre la gravità e/o ridurre

l'incidenza di, parzialmente o completamente, uno o più sintomi o caratteristiche di una particolare malattia, disturbo e/o condizione. Il trattamento può essere somministrato a un soggetto che non mostra segni di malattia e/o mostra solo segni precoci della malattia allo scopo di ridurre il rischio di sviluppare patologie associate alla malattia.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

La presente invenzione fornisce una composizione per rilasciare anticorpi *in vivo* basata sulla tecnologia di rilascio dell'mRNA. In particolare, l'invenzione fornisce una composizione comprendente un primo mRNA che codifica per la catena pesante di un anticorpo e un secondo mRNA che codifica per la catena leggera dell'anticorpo con un rapporto molare compreso tra 2:1 e 1:2, per l'uso nel trattamento di un paziente con una malattia o disturbo che necessita della somministrazione di detto anticorpo, in cui il primo mRNA e il secondo mRNA sono incapsulati all'interno di liposomi comprendenti un lipide cationico, un lipide neutro, un lipide a base di colesterolo e un lipide modificato con PEG e avente una dimensione non superiore a 150 nm, in cui il primo mRNA che codifica per la catena pesante e il secondo mRNA che codifica per la catena leggera sono incapsulati nello stesso liposoma, in cui l'anticorpo è un tetramero e ciascun tetramero è composto da due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avente una catena leggera di circa 25 kD e una catena pesante di circa 50-70 kD, e in cui la composizione viene somministrata al paziente per via endovenosa o sottocutanea. Gli anticorpi codificati da mRNA possono essere espressi localmente (ad esempio, in modo specifico per tessuto) o per via sistemica al soggetto.

Vari aspetti dell'invenzione sono descritti in dettaglio nelle sezioni seguenti.

Anticorpi codificati da mRNA

La presente invenzione viene usata per rilasciare anticorpi. Un "anticorpo" intatto è un'immunoglobulina che si lega specificamente a un particolare antigene. Un anticorpo può appartenere a qualsiasi classe di immunoglobuline, inclusa una qualsiasi delle classi umane: IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Un anticorpo intatto è un tetramero. Ogni tetramero è composto da due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avente una catena "leggera" (circa 25 kD) e una catena "pesante" (circa 50-70 kD). L'N-terminale di ciascuna catena

definisce una regione variabile di circa 100-110 o più amminoacidi principalmente responsabili del riconoscimento dell'antigene. I termini "catena leggera variabile" (VL) e "catena pesante variabile" (VH) si riferiscono rispettivamente a queste regioni corrispondenti sulla catena leggera e pesante. Ogni regione variabile può essere ulteriormente suddivisa in regioni ipervariabili (HV) e regioni strutturali (FR). Le regioni ipervariabili comprendono tre aree di sequenza di ipervariabilità chiamate regioni determinanti la complementarità (CDR 1, CDR 2 e CDR 3), separate da quattro regioni strutturali (FR1, FR2, FR2 e FR4) che formano una struttura a foglietto beta e fungono da impalcatura per tenere in posizione le regioni HV. Il C-terminale di ciascuna catena pesante e leggera definisce una regione costante costituita da un dominio per la catena leggera (CL) e tre per la catena pesante (CH1, CH2 e CH3). Una catena leggera di immunoglobuline può essere ulteriormente differenziata negli isotipi *kappa* e *lambda*.

I termini "anticorpo intatto" o "anticorpo completamente assemblato" sono usati in riferimento ad un anticorpo che contiene due catene pesanti e due catene leggere, opzionalmente legate da legami disolfuro come avviene con anticorpi prodotti naturalmente.

Come usato nella presente, un "frammento di anticorpo" include una porzione di un anticorpo intatto, come, per esempio, la regione di legame all'antigene di un anticorpo. Esempi di frammenti di anticorpo includono frammenti Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; e anticorpi multispecifici formati da frammenti di anticorpi. Ad esempio, i frammenti di anticorpo includono frammenti isolati, frammenti "Fv", costituiti dalle regioni variabili delle catene pesanti e leggere. Un frammento di anticorpo contiene una sequenza sufficiente dell'anticorpo progenitore di cui è un frammento che si lega allo stesso antigene dell'anticorpo progenitore; un frammento si lega all'antigene con un'affinità confrontabile a quella dell'anticorpo progenitore e/o compete con l'anticorpo progenitore per legarsi all'antigene. Esempi di frammenti leganti l'antigene di un anticorpo includono, ma non sono limitati a, frammento Fab, frammento Fab', frammento F(ab')₂ e frammento Fv.

Anticorpi illustrativi includono, ma non sono limitati a, anti-chemioquina (motivo C-C) ligando 2 (CCL2), anti-lisil ossidasi-simile-2 (LOXL2), anti-Fit-1, anti-TNF- α , anti-Recettore dell'interleuchina-2R α (CD25), anti-TGF β , anti-fattore di attivazione delle cellule B, anti-integrina alfa-4, anti-BAGE, anti- β -catenina/m, anti-Bcr-

abl, anti-C5, anti-CA125, anti-CAMEL, anti-CAP-1, anti-CASP-8, anti-CD4, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD25, anti-CDC27/m, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD52, anti-CD56, anti-CD80, anti-CDK4/m, anti-CEA, anti-CT, anti-CTL4, anti-Cyp-B, anti-DAM, anti-EGFR, anti-ErbB3, anti-ELF2M, anti-EMMPRIN, anti-EpCam, anti-ETV6-AML1, anti-HER2, anti-G250, anti-GAGE, anti-GnT-V, anti-Gp100, anti-HAGE, anti-HER-2/neu, anti-HLA-A*0201-R170I, anti-IGF-IR, anti-IL-2R, anti-IL-5, anti-MCIR, anti-miosina/m, anti-MUC1, anti-MUM-1, -2, -3, anti-proteinasi-3, anti-p190 bcr-abl minore, anti-Pm1/RAR α , anti-PRAMS, anti-PSA, anti-PSM, anti-PSMA, anti-RAGE, anti-RANKL, anti-RUI o RU2, anti-SAGE, anti-SART-1 o anti-SART-3, anti-survivina, anti-TEL/AML1, anti-TPI/m, anti-TRP-1, anti-TRP-2, anti-TRP-2/INT2, e anti-VEGF o anti-recettore di VEGF.

mRNA che codificano per catene pesanti e catene leggere

Secondo la presente invenzione, gli anticorpi possono essere prodotti in una cellula o organismo vivente attraverso la traduzione di mRNA esogeno all'interno della cellula e dell'organismo vivente. In particolare, secondo la presente invenzione, la produzione di anticorpi multi-catena completamente assemblati può essere realizzata in una cellula o organismo vivente rilasciando mRNA esogeni che codificano una catena pesante e una catena leggera dell'anticorpo. Nello specifico, viene prodotto un tetramero contenente due catene pesanti e due catene leggere.

Come usato nella presente, il termine "catena pesante" comprende tutti i tipi di catene pesanti naturali di diverse classi di immunoglobuline, incluse, ma non limitate a, IgM (μ), IgD (δ), IgG (γ), IgA (α), e IgE (ϵ), e loro varianti biologicamente attive. Tipicamente, una catena pesante secondo la presente invenzione contiene la regione variabile N-terminale responsabile del riconoscimento dell'antigene, tipicamente comprendente CDR 1, CDR 2 e CDR 3, separate da quattro regioni strutturali (FR1, FR2, FR2 e FR4). Tipicamente, la regione variabile N-terminale contiene da circa 100 a 110 o più amminoacidi. In alcune realizzazioni, una catena pesante secondo la presente invenzione contiene uno o più domini costanti (ad esempio, C_{H1}, C_{H2}, e/o C_{H3}). In alcune realizzazioni, un mRNA che codifica una catena pesante di un anticorpo è maggiore o uguale a 0,3 kb, 0,5 kb, 0,75 kb, 1,0 kb, 1,25 kb, 1,5 kb, 1,75 kb, 2,0 kb, 2,5 kb, 3,0 kb, 3,5 kb, 4,0 kb di lunghezza.

Come usato nella presente, il termine "catena leggera" comprende tutti i tipi di catene leggere naturali di diverse classi di immunoglobuline, inclusi ma non limitati agli isotipi κ o λ e loro varianti biologicamente attive. Tipicamente, una catena leggera secondo la presente invenzione comprende un dominio variabile N-terminale (V_L). In alcune realizzazioni, una catena leggera secondo la presente invenzione contiene un dominio costante C-terminale (C_L). In alcune realizzazioni, un mRNA che codifica una catena leggera di un anticorpo è maggiore o uguale a 0,1 kb, 0,2 kb, 0,3 kb, 0,4 kb, 0,5 kb, 0,6 kb, 0,7 kb, 0,8 kb, 0,9 kb, 1,0 kb, 1,25 kb, 1,5 kb, 1,75 kb, 2,0 kb, 2,5 kb o 3,0 kb di lunghezza.

Tipicamente, un anticorpo tetramerico contenente due catene pesanti e due catene leggere codificate da mRNA, ciascuna legata insieme da un ponte disolfuro.

Secondo la presente invenzione, una catena pesante e una catena leggera di un anticorpo sono codificate e rilasciate da mRNA separati. L'mRNA che codifica per la catena pesante (noto anche come il primo mRNA) e l'mRNA che codifica per la catena leggera (noto anche come il secondo mRNA) vengono rilasciati con un rapporto molare compreso tra 2:1 e 1:2. In alcune realizzazioni, l'mRNA codificante per la catena pesante (indicato anche come il primo mRNA) e l'mRNA codificante per la catena leggera (indicato anche come secondo mRNA) vengono rilasciati con un rapporto molare di 2:1 o 1:1. In alcune realizzazioni, l'mRNA codificante per la catena pesante (indicato anche come primo mRNA) e l'mRNA codificante per catena leggera (indicato anche come secondo mRNA) vengono rilasciati in un rapporto di circa 1:1 (cioè equimolare). In alcune realizzazioni, l'mRNA codificante per la catena pesante (indicato anche come primo mRNA) e l'mRNA codificante per catena leggera (indicato anche come secondo mRNA) vengono rilasciati in un rapporto diverso da 1:1 (equimolare). Ad esempio, la catena pesante che codifica l'mRNA (noto anche come il primo mRNA) e la catena leggera che codifica l'mRNA (noto anche come il secondo mRNA) vengono rilasciati con un rapporto maggiore di 1 (ad es., compreso tra 2:1 e 1:1). In alternativa, la catena pesante che codifica l'mRNA (noto anche come il primo mRNA) e la catena leggera che codifica l'mRNA (noto anche come il secondo mRNA) vengono rilasciati con un rapporto inferiore a 1 (ad esempio, compreso tra 1:1 e 1:2).

Peptide segnale

Un mRNA che codifica una catena pesante e/o una catena leggera incorpora una sequenza nucleotidica che codifica un peptide segnale. Come qui usato, il termine "peptide segnale" si riferisce a un peptide presente in una proteina appena sintetizzata che può indirizzare la proteina verso la via di secrezione. Tipicamente, il peptide segnale viene scisso dopo la traslocazione nel reticolo endoplasmatico in seguito alla traduzione dell'mRNA. Il peptide segnale è indicato anche come sequenza segnale, sequenza *leader* o peptide *leader*. Tipicamente, un peptide segnale è un peptide corto (ad es. lungo 5-30, 5-25, 5-20, 5-15 o 5-10 amminoacidi). Un peptide segnale può essere presente all'N-terminale di una proteina appena sintetizzata. Senza voler essere vincolati da alcuna teoria particolare, l'incorporazione di una sequenza codificante per il peptide segnale su un mRNA codificante per catena pesante e/o catena leggera può facilitare la secrezione e/o la produzione dell'anticorpo prodotto dall'mRNA *in vivo*.

Un peptide segnale adatto per la presente invenzione può essere una sequenza eterogenea derivata da varie proteine eucariotiche e procariotiche, in particolare proteine secrete. In alcune realizzazioni, un peptide segnale adatto è una sequenza ricca di leucina, come descritto in Yamamoto Y et al. (1989), *Biochemistry*, 28:2728-2732. Un peptide segnale adatto può essere derivato da un ormone della crescita umano (hGH), preproteina dell'albumina sierica, precursore della catena leggera Ig kappa, preproteina dell'Azurocidina, precursore della cistatina-S, precursore del tripsinogeno 2, bloccante del canale del potassio, alfa conotossina Ip1.3, alfa conotossina, alfa-galattosidasi, cellulosa, proteinasi aspartica nepenthesina-1, chitinasi acida, prepro-tossina K28, precursore della zigocina della tossina killer, e tossina del colera. Sequenze di peptidi segnale illustrative sono descritte in Kober, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 110: 1164-73, 2012.

In alcune realizzazioni, un mRNA codificante per catena pesante e/o catena leggera può incorporare una sequenza codificante un peptide segnale derivato dall'ormone della crescita umano (hGH), o un suo frammento.

Di seguito è mostrata una sequenza nucleotidica non limitante che codifica un peptide segnale hGH.

Sequenza 5' dell'ormone della crescita umano (hGH) (SEQ. ID. N.:9):

AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUGCCUGC
CCUGGUUGCAAGAAGGAUCGGCUUCCCGACCAUCCACUCUCC

Sequenza alternativa 5' dell'ormone della crescita umano (hGH) (SEQ. ID. N.:10):

AUGGCAACUGGAUCAAGAACCUCUCCUCCUGCUCGCAUUCGGCCUGCUCUGUCUCC
CAUGGCUCCAAGAAGGAAGCGCGUUCUCCACUAUCCCCUCUCG

In alcune realizzazioni, un mRNA secondo la presente invenzione può incorporare una sequenza codificante del peptide segnale avente almeno il 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più di identità a SEQ. ID. N.:9 o SEQ. ID. N.:10.

Sintesi di mRNA

Gli mRNA secondo la presente invenzione possono essere sintetizzati secondo uno qualsiasi di una varietà di metodi noti. Ad esempio, gli mRNA secondo la presente invenzione possono essere sintetizzati tramite trascrizione *in vitro* (IVT). In breve, l'IVT viene in genere eseguita con uno stampo di DNA lineare o circolare contenente un promotore, una raccolta di ribonucleotidi trifosfati, un sistema tampone che può includere DTT e ioni magnesio e un'appropriata RNA polimerasi (ad es. T3, T7 o SP6 RNA polimerasi), DNAsi I, pirofosfatasi e/o inibitore dell'RNAsi. Le condizioni esatte variano a seconda dell'applicazione specifica.

In alcune realizzazioni, per la preparazione di mRNA codificante anticorpo secondo l'invenzione, viene trascritto uno stampo di DNA *in vitro*. Un modello di DNA adatto ha tipicamente un promotore, ad esempio un promotore T3, T7 o SP6, per trascrizione *in vitro*, seguita dalla sequenza nucleotidica desiderata per mRNA codificante l'anticorpo desiderato (ad esempio, codificante la catena pesante o catena leggera) e un segnale di terminazione.

La sequenza di mRNA che codifica per l'anticorpo desiderato (per esempio, codificante per catena pesante o catena leggera) secondo l'invenzione può essere determinata e incorporata in uno stampo di DNA usando metodi standard. Ad esempio, partendo da una sequenza amminoacidica desiderata (ad esempio, una sequenza di catena pesante o leggera desiderata), viene eseguita una traduzione inversa virtuale basata sul codice genetico degenero.

Gli algoritmi di ottimizzazione possono quindi essere usati per la selezione di codoni adatti. Tipicamente, il contenuto di G/C può essere ottimizzato per ottenere il più alto contenuto di G/C possibile da un lato, tenendo nel miglior conto possibile la frequenza dei tRNA in base all'uso del codone dall'altro. La sequenza di RNA ottimizzata può essere stabilita e visualizzata, ad esempio, con l'ausilio di un dispositivo di visualizzazione appropriato e confrontata con la sequenza originale (di tipo selvatico). Una struttura secondaria può anche essere analizzata per calcolare proprietà stabilizzanti e destabilizzanti o, rispettivamente, regioni dell'RNA.

L'mRNA secondo la presente invenzione può essere sintetizzato come mRNA non modificato o modificato. In genere, gli mRNA vengono modificati per migliorare la stabilità. Le modifiche dell'mRNA possono includere, per esempio, modifiche dei nucleotidi dell'RNA. Un mRNA modificato secondo l'invenzione può quindi includere, per esempio, modifiche dello scheletro, modifiche dello zucchero o modifiche della base. In alcune realizzazioni, mRNA codificanti per anticorpi (ad esempio, mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere) possono essere sintetizzati da nucleotidi naturali e/o analoghi nucleotidici (nucleotidi modificati) inclusi, ma non limitati a, purine (adenina (A), guanina (G)) o pirimidine (timina (T), citosina (C), uracile (U)), e come analoghi nucleotidici modificati o derivati di purine e pirimidine, come ad es. 1-metil-adenina, 2-metil-adenina, 2-metiltio-N-6-isopentenil-adenina, N6-metil-adenina, N6-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metil-citosina, 4-acetil-citosina, 5-metil-citosina, 2,6-diamminopurina, 1-metil-guanina, 2-metil-guanina, 2,2-dimetil-guanina, 7-metil-guanina, inosina, 1-metil-inosina, pseudouracile (5-uracile), diidro-uracile, 2-tio-uracile, 4-tio-uracile, 5-carbossimetilamminometil-2-tio-uracile, 5-(carbossiidrossimetil)-uracile, 5-fluoro-uracile, 5-bromo-uracile, 5-carbossimetilamminometil-uracile, 5-metil-2-tio-uracile, 5-metil-uracile, acido N-uracil-5-ossiacetico metil estere, 5-metilamminometil-uracile, 5-metossiamminometil-2-tio-uracile, 5'-metossicarbonilmetil-uracile, 5-metossi-uracile, acido uracil-5-ossiacetico metil estere, acido uracil-5-ossiacetico (v), 1-metil-pseudouracile, queosina, β -D-mannosil-queosina, wybutoxosina, e fosforammidati, fosforotioati, nucleotidi peptidici, metilfosfonati, 7-deazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. La preparazione di tali analoghi è nota a una persona esperta nella tecnica, ad es. da Brevetto U.S.A. N. 4,373,071, Brevetto U.S.A. N. 4,401,796, Brevetto U.S.A. N. 4,415,732, Brevetto U.S.A. N. 4,458,066, Brevetto U.S.A. N. 4,500,707, Brevetto U.S.A. N. 4,668,777, Brevetto U.S.A. N. 4,973,679, Brevetto U.S.A. N. 5,047,524, Brevetto U.S.A. N. 5,132,418, Brevetto U.S.A. N. 5,153,319, brevetti U.S.A. N. 5,262,530 e 5,700,642, la cui descrizione è qui inclusa per intero come riferimento. In alcune realizzazioni, l'mRNA codificante l'anticorpo (ad esempio, mRNA codificante per catena pesante e catena leggera) può contenere modificazioni dello scheletro dell'RNA. Tipicamente, una modifica dello scheletro è una modifica in cui i fosfati dello scheletro dei nucleotidi contenuti nell'RNA vengono modificati chimicamente. Modifiche illustrative dello scheletro tipicamente includono, ma non sono limitate a, modifiche

dal gruppo costituito da metilfosfonati, metilfosforamidati, fosforamidati, fosforotioati (ad esempio citidina 5'-O-(1-tiofosfato)), boranofosfati, gruppi guanidinio caricati positivamente, ecc., che significa sostituire il legame fosfodiesterico con altri gruppi anionici, cationici o neutri.

In alcune realizzazioni, l'mRNA codificante l'anticorpo (ad esempio, mRNA codificante per catena pesante e catena leggera) può contenere modificazioni dello zucchero. Una tipica modifica dello zucchero è una modifica chimica dello zucchero dei nucleotidi che contiene, incluse, ma non limitate a, modificazioni dello zucchero scelte dal gruppo costituito da 2'-desossi-2'-fluoro-oligoribonucleotide (2'-fluoro-2'-desossicitidina 5'-trifosfato, 2'-fluoro-2'-desossiuridina 5'-trifosfato), 2'-desossi-2'-deamina-oligoribonucleotide (2'-ammino-2'-desossicitidina 5'-trifosfato, 2'-ammino-2'-desossiuridina 5'-trifosfato), 2'-O-alchiloligoribonucleotide, 2'-desossi-2'-C-alchiloligoribonucleotide (2'-O-metilcitidina 5'-trifosfato, 2'-metiluridina 5'-trifosfato), 2'-C-alchiloligoribonucleotide e suoi isomeri (2'-aracitidina 5'-trifosfato, 2'-arauridina 5'-trifosfato), o azidotrifosfati (2'-azido-2'-desossicitidina 5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desossiuridina 5'-trifosfato).

In alcune realizzazioni, l'mRNA codificante l'anticorpo (per esempio, mRNA codificante per catena pesante e catena leggera) può contenere modifiche delle basi dei nucleotidi (modifiche della base). Un nucleotide modificato che contiene una modifica della base è anche chiamato nucleotide modificato sulla base. Esempi di tali nucleotidi modificati sulla base includono, ma non sono limitati a, 2-ammino-6-cloropurina riboside 5'-trifosfato, 2-amminoadenosina 5'-trifosfato, 2-tiocitidina 5'-trifosfato, 2-tiouridina 5'-trifosfato, 4-tiouridina 5'-trifosfato, 5-amminoallilcitidina 5'-trifosfato, 5-amminoalliluridina 5'-trifosfato, 5-bromocitidina 5'-trifosfato, 5-bromouridina 5'-trifosfato, 5-iodocitidina 5'-trifosfato, 5-iodouridina 5'-trifosfato, 5-metilcitidina 5'-trifosfato, 5-metiluridina 5'-trifosfato, 6-azacitidina 5'-trifosfato, 6-azauridina 5'-trifosfato, 6-cloropurina riboside 5'-trifosfato, 7-deazaadenosina 5'-trifosfato, 7-deazaguanosina 5'-trifosfato, 8-azaadenosina 5'-trifosfato, 8-azidoadenosina 5'-trifosfato, benzimidazole riboside 5'-trifosfato, N1-metiladenosina 5'-trifosfato, N1-metilguanosina 5'-trifosfato, N6-metiladenosina 5'-trifosfato, O6-metilguanosina 5'-trifosfato, pseudouridina 5'-trifosfato, puromicina 5'-trifosfato o xantosina 5'-trifosfato.

Tipicamente, la sintesi dell'mRNA include l'aggiunta di un "cappuccio" all'estremità N-terminale (5') e di una

"coda" all'estremità C-terminale (3'). La presenza del cappuccio è importante nel fornire resistenza alle nucleasi presenti nella maggior parte delle cellule eucariotiche. La presenza di una "coda" serve a proteggere l'mRNA dalla degradazione da esonucleasi.

Gli mRNA codificanti per anticorpi (ad esempio, mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere) includono una struttura a cappuccio 5'. Un cappuccio 5' viene tipicamente aggiunto come segue: in primo luogo, una fosfatasi terminale dell'RNA rimuove uno dei gruppi fosfato terminali dal nucleotide 5', lasciando due fosfati terminali; guanosina trifosfato (GTP) viene quindi aggiunta ai fosfati terminali tramite una guanilil transferasi, producendo un legame 5'5' trifosfato; e il 7-azoto della guanina viene poi metilato da una metiltransferasi. Esempi di strutture di cappuccio includono, ma non sono limitati a, m⁷G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A e G(5')ppp(5')G.

Gli mRNA codificanti per anticorpi (ad esempio, mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere) includono una struttura di coda 3' poli(A). Una coda di poli-A all'estremità 3' dell'mRNA include tipicamente da 10 a 300 nucleotidi di adenosina (ad es., da circa 10 a 200 nucleotidi di adenosina, da circa 10 a 175 nucleotidi di adenosina, da circa 10 a 150 nucleotidi di adenosina, da circa 10 a 125 di adenosina nucleotidi, da 10 a 100 nucleotidi di adenosina, da circa 10 a 75 nucleotidi di adenosina, da circa 20 a 70 nucleotidi di adenosina o da circa 20 a 60 nucleotidi di adenosina). In alcune realizzazioni, gli mRNA codificanti per anticorpi (ad esempio, mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere) includono una struttura di coda di poli(C) in 3'. Una coda poli-C adatta all'estremità 3' dell'mRNA include tipicamente da 10 a 200 nucleotidi di citosina (ad es., da 10 a 150 nucleotidi di citosina, da 10 a 100 nucleotidi di citosina, da 20 a 70 nucleotidi di citosina, da 20 a 60 nucleotidi, o circa 10-40 nucleotidi di citosina). La coda di poli-C può essere aggiunta alla coda di poli-A o può sostituire la coda di poli-A.

Gli mRNA codificanti per anticorpi (ad esempio, mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere) includono una regione 5' e 3' non tradotta. In alcune realizzazioni, una regione 5' non tradotta include uno o più elementi che influenzano la stabilità o la traduzione di un mRNA, per esempio, un elemento sensibile al ferro. In alcune realizzazioni, una regione 5' non tradotta può avere una lunghezza compresa tra circa 50 e 500 nucleotidi

(ad esempio, circa 50 e 400 nucleotidi di lunghezza, circa 50 e 300 nucleotidi di lunghezza, circa 50 e 200 nucleotidi di lunghezza, o circa 50 e 100 nucleotidi di lunghezza).

Una regione 5' di mRNA codificanti per anticorpi (ad es., mRNA codificanti per catena pesante e catena leggera) include una sequenza codificante un peptide segnale, come quelli qui descritti. In particolari realizzazioni, un peptide segnale derivato dall'ormone della crescita umano (hGH) (ad esempio SEQ. ID. N.:9) è incorporato nella regione 5'. Tipicamente, una sequenza codificante per il peptide segnale (ad esempio, la sequenza codificante per il peptide segnale di hGH come SEQ. ID. N.:9) è collegata, direttamente o indirettamente, alla sequenza codificante per la catena pesante o per la catena leggera all'N-terminale.

mRNA illustrativi che codificano la catena pesante e la catena leggera di anti-CCL2

Come esempio non limitativo, gli mRNA che codificano la catena pesante e la catena leggera di un anticorpo anti-CCL2 sono descritti nell'Esempio 1. La catena pesante che codifica l'mRNA senza e con le sequenze 5' e 3' UTR è mostrata di seguito come SEQ. ID. N.:1 e SEQ. ID. N.:2, rispettivamente. La catena leggera che codifica l'mRNA senza e con le sequenze 5' e 3' UTR è mostrata di seguito come SEQ. ID. N.:3 e SEQ. ID. N.:4, rispettivamente.

mRNA di catena pesante anti-CCL2 (HC- α CCL2) senza 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:1):

AUGGAAUUCGGCCUGAGCUGGCUGUUCUGGUGGCCAUCCUGAAGGGCGUGCAG
 UGCCAGGUCCAGCUGGUGCAGUCUGGGCGCCGAAGUGAAGAAACCCGGCUCCUCCG
 UGAAGGUGUCCUGCAAGGCCUCCGGCGGCACCUUCUCCAGCUACGGCAUCUCCUG
 GGUCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCUGGAAUGGAUGGGCGGCAUCAUCCCCAUC
 UUCGGCACCGCCAACUACGCCCAGAAAUUCAGGGCAGAGUGACCAUCACCGCCG
 ACGAGUCCACCUCCACCGCCUACAUGGAACUGUCCUCCUGCGGAGCGAGGACAC
 CGCCGUGUACUACUGCGCCAGAUACGACGGCAUCUACGGCGAGCUGGACUUCUGG
 GGCCAGGGCACCCUGGUCACCGUGUCCUCUGCCAAGACCACCCCCCCCUCGGUGU
 ACCCUCUGGCCCCCUGGCUCUGCCGCCAGACCAACUCUAUGGUCACCCUGGGCUG
 CCUGGUCAAGGGCUACUUCGCCGAGCCCGUGACCGUGACCUGGAACUCCGGCUCC
 CUGUCCUCCGGCGUGCACACCUUCCUGCCGUGCUGCAGUCCGACCUUCACACCC
 UGUCCAGCAGCGUGACCGUGCCUCCUCCACCGUGGCCUCCGAGACAGUGACCUG
 CAACGUGGGCCACCCCGCCUCCAGCACCAAGGUGGACAAGAAAAUCGUGCCCCGG
 GACUGCGGCUGCAAGCCCUGCAUCUGUACCGUGCCCAGGUGUCCUCCGUGUUA
 UCUUCCACCCAAGCCCAAGGACGUGCUGACCAUCACACUGACCCCCAAAGUGAC
 CUGCGUGGUGGUGGACAUCUCCAAGGACGACCCCGAGGUGCAGUUCAGUUGGUUC
 GUGGACGACGUGGAAGUGCACACCGCUCAGACCCAGCCCAGAGAGGAACAGUUA
 ACUCCACCUUCAGAUCCGUGUCCGAGCUGCCCAUCAUGCACCAGGACUGGCUGAA
 CGGCAAAGAAUUAAGUGCAGAGUGAACUCCGCCGCCUUCCCAGCCCCAUCGAA
 AAGACCAUCUCCAAGACCAAGGGCAGACCCAAGGCCCCCCAGGUCUACACCAUCC
 CCCCACCAAAGAACAGAUGGCCAAGGACAAGGUGUCCUUGACCUGCAUGAUCAC
 CGAUUUCUUCCCAGAGGACAUCACCGUGGAAUGGCAGUGGAACGGCCAGCCCGCC
 GAGAACUACAAGAACACCCAGCCAUCAUGGACACCGACGGCUCCUACUUCGUGU
 ACUCCAAGCUGAACGUGCAGAAGUCCAACUGGGAGGCCGGCAACACCUUCACCUG
 UAGCGUGCUGCACGAGGGCCUGCACAACCACCACACCGAGAAGUCCUGUCCAC
 UCCCCGGCAAGUGA

mRNA di catena pesante anti-CCL2 (HC- α CCL2) con 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:2):

(Le sequenze 5' e 3' UTR sono sottolineate)

GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUCCCCCG

UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGAAUUCGGCCUGAGCUGGCUGU
UCCUGGUGGCCAUCCUGAAGGGCGUGCAGUGCCAGGUCCAGCUGGUGCAGUCUGG
 CGCCGAAGUGAAGAAACCCGGCUCCUCCGUGAAGGUGUCCUGCAAGGCCUCCGGC
 GGCACCUUCUCCAGCUACGGCAUCUCCUGGGUCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCC
 UGGAAUGGAUGGGCGGCAUCAUCCCAUCUUCGGCACCGCCAACUACGCCCAGAA
 AUUCCAGGGCAGAGUGACCAUACCCGCCGACGAGUCCACCUCACCGCCUACAUG
 GAACUGUCCUCCUGCGGAGCGAGGACACCGCCGUGUACUACUGCGCCAGAUACG
 ACGGCAUCUACGGCGAGCUGGACUUCUGGGGCCAGGGCACCCUGGUCACCGUGUC
 CUCUGCCAAGACCACCCCCCUCCGUGUACCCUCUGGCCCCUGGCUCUGCCGCC
 AGACCAACUCUAUGGUCACCCUGGGCUGCCUGGUCAAGGGCUACUCCCCGAGCC
 CGUGACCGUGACCUGGAACUCCGGCUCCUUGUCCUCCGGCGUGCACACCUUCCU
 GCCGUGCUGCAGUCCGACCUCUACACCCUGUCCAGCAGCGUGACCGUGCCUCCU
 CCACCUGGCCUCCGAGACAGUGACCUGCAACGUGGCCACCCCGCCUCCAGCACC
 AAGGUGGACAAGAAAUCGUGCCCCGGGACUGCGGCUGCAAGCCUGCAUCUGUA
 CCGUGCCCCGAGGUGUCCUCCGUGUUAUCUUCACCCAAGCCAAGGACGUGCU
 GACCAUCACACUGACCCCCAAAGUGACCUGCGUGGUGGUGGACAUCUCCAAGGAC
 GACCCCGAGGUGCAGUUCAGUUGGUUCGUGGACGACGUGGAAGUGCACACCGCUC
 AGACCCAGCCAGAGAGGAACAGUUAACUCCACCUUCAGAUCCGUGUCCGAGCU
 GCCCAUCAUGCACCAGGACUGGCUGAACGGCAAAGAAUUCAAGUGCAGAGUGAAC
 UCCGCCGCCUCCCCAGCCCCAUCGAAAAGACCAUCUCCAAGACCAAGGGCAGAC
 CCAAGGCCCCCCAGGUCUACACCAUCCCCCACCAAAGAACAGAUGGCCAAGGA
 CAAGGUGUCCUGACCUGCAUGAUCACCGAUUUCUUCACAGAGGACAUCACCGUG
 GAAUGGCAGUGGAACGGCCAGCCCGCCGAGAACUACAAGAACACCCAGCCCAUCA
 UGGACACCGACGGCUCCUACUUCGUGUACUCCAAGCUGAACGUGCAGAAGUCCAA
 CUGGGAGGCCGGCAACACCUUACCCUGUAGCGUGCUGCACGAGGGCCUGCACAAC
 CACCACACCGAGAAGUCCUGUCCACUCCCCGGCAAGUGACGGGUGGCAUCCC
UGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCA
CCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU

mRNA di catena leggera anti-CCL2 (LC- α 7CL2) senza 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:3):

AUGGAAACCCUGCCCAGCUGCUGUUCUGCUGCUGCUGUGGCUGCCUGAUACCA
 CCGGCGAAAUCGUGCUGACCCAGUCCCCGCCACCCUGUCUCUGAGCCUUGGCGA
 GAGAGCCACCCUGAGCUGCAGAGCCUCCAGUCCGUGUCCGACGCCUACCUGGCC
 UGGUAUCAGCAGAAGCCCAGGCCAGGCCUCCGGCUGCUGAUCUACGACGCCUCCU
 CUAGAGCCACCGGCGUGCCCGCCAGAUUCUCCGGCUCUGGCUCUGGCACCGACU
 CACCCUGACCAUCUCCAGCCUGGAACCCGAGGACUUCGCCGUGUACUACUGCCAC
 CAGUACAUCCAGCUGCACAGCUUCACCUUCGGCCAGGGCACCAAGGUGGAAUUA
 AGGCCGAUGCCGCCCUACCGUGUCCAUCUUCACCCUCCAGCGAGCAGCUGAC
 CUCUGGCGGCGUCCGUCGUGUCCUGAACAACUUCUACCCCAAGGACAUC
 AACGUGAAGUGGAAGAUCGACGGCUCGAGCGGCAGAACGGCGUGCUGAACUCCU
 GGACCGACCAGGACUCCAAGGACAGCACCUACUCCAUGUCCUCCACCCUGACCCU
 GACCAAGGACGAGUACGAGCGGCACAACUCCUAUACCUGCGAGGCCACCCACAAG
 ACCUCCACCUCCCCAUCGUGAAGUCCUUAACCGGAACGAGUGCUGA

mRNA di catena leggera anti-CCL2 (LC- α CCL2) con 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:4):

(Le sequenze 5' e 3' UTR sono sottolineate)

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCCG
UGCCAAGAGUGACUCACCCGUCCUUGACACGAUGGAAACCTCCUGCCCAGCUGCUGU
UCCUGCUGCUGCUGUGGCUGCCUGAUACCACCGGCGAAAUCGUGCUGACCCAGUC
CCCCGCCACCCUGUCUCUGAGCCCUGGCGAGAGAGCCACCCUGAGCUGCAGAGCC
UCCCAGUCCGUGUCCGACGCCUACCUGGCCUGGUAUCAGCAGAAGCCCAGGCCAGG
CCCCUCGGCUGCUGAUCUACGACGCCUCCUCUAGAGCCACCGGCGUGCCCAGCAG
AUUCUCCGGCUCUGGCUCUGGCACCGACUUCACCCUGACCAUCUCCAGCCUGGAA
CCCAGGACUUCGCCGUGUACUACUGCCACCAGUACAUCAGCUGCACAGCUUCA
CCUUCGGCCAGGGACCAAGGUGGAAAUCAAGGCCGAUGCCGCCCCUACCGUGUC
CAUCUCCCCACCCUCCAGCGAGCAGCUGACCUCUGGCGGCGCUUCCGUCGUGUC
UCCUGAACAACUUCUACCCCAAGGACAUCAACGUGAAGUGGAAGAUCGACGGCU
CCGAGCGGCAGAACGGCGUGCUGAACUCCUGGACCGACCAGGACUCCAAGGACAG
CACCUACUCCAUGUCCUCCACCCUGACCCUGACCAAGGACGAGUACGAGCGGCAC
AACUCCUAUACCUGCGAGGCCACCCACAAGACCUCACCUCCTCCCAUCGUGAAGU
CCUUAACCGGAACGAGUGCUGACGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGC
CUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAA
AUUAAGUUGCAUCAAGCU

Tra l'altro, la presente invenzione fornisce anche mRNA codificanti una catena pesante e catena leggera di un anticorpo anti-CCL2 sostanzialmente identici o simili alle sequenze descritte nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena pesante di un anticorpo anti-CCL2 ha una sequenza nucleotidica identica per almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più a SEQ. ID. N.:1 o SEQ. ID. N.:2 come descritto nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena pesante di un anticorpo anti-CCL2 ha una sequenza nucleotidica codificante per una sequenza amminoacidica identica o omologa per almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più a SEQ. ID. N.:1 come descritto nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena leggera di un anticorpo anti-CCL2 ha una sequenza nucleotidica identica per almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più a SEQ. ID. N.:3 o SEQ. ID. N.:4 come descritto nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena leggera di un anticorpo anti-CCL2 ha una sequenza nucleotidica codificante per una sequenza amminoacidica identica o omologa per almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più a SEQ. ID. N.:3 come descritto nella presente.

In certe realizzazioni, mRNA fornito nella presente contiene uno o più nucleotidi modificati come quelli descritti nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena pesante o catena leggera di un anticorpo anti-CCL2 può contenere almeno 10%, almeno 20%, almeno 30%, almeno 40%, almeno 50%, almeno 60%, almeno 70%, almeno 75%, almeno 80%, almeno 85%, almeno 90%, o almeno 95% di nucleotidi modificati di tutti i nucleotidi modificabili della sequenza.

mRNA codificanti per catena pesante e catena leggera illustrativi di anti-VEGF

mRNA di catena pesante anti-VEGF (HC- α VEGF) senza 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:5):

AUGGCAACUGGAUCAAGAACCUCUCCUCCUGCUCGCAUUCGGCCUCCUGUCUCUCC
 CAUGGCUCCAAGAAGGAAGCGCGUCCCCACUAUCCCCUCUCGAGGUUCAGCU
 GGUCGAAAGCGGGGGCGGCCUCGUCCAGCCAGGUGGAUCCUCCGCCUGAGCUCG
 GCCGCGUCCGGAUACACUUACCAACUACGGCAUGAACUGGGUCCGCCAGGCGC
 CGGGAAAGGGACUGGAAUGGGUCGGCUGGAUCAAUACCUACACUGGAGAGCCUA
 CCUACGCCGUGACUUUAGAGGGCGGUACUUUCACUGGAUACUCCAAGUC
 AACCGCUUACCUUCAGAUGAAUCCCUGCGCGCCGAGGAUACCGCAGUGUAUUAC
 UGCGCCAAAUACCCGCAUUACUACGGCUCACGCCACUGGUACUUUGACGUGUGGG
 GUCAAGGAACCCUGGUGACUGUGUCGUCCGUUCCACCAAGGGACCAAGCGUGUU
 UCCACUCGCCCCGAGCUCAAAUCGACGUCGGGAGGUACUGCCGCACUGGGGUGC
 UUGGUCAAGGACUACUUUCCAGAGCCGGUGACUGUUUCCUGGAACAGCGGAGCGC
 UCACCUCGGGCGUGCACACCUUCCCUGCGGUGUUGCAGUCAUCUGGACUGUACUC
 GCUGUCCAGCGUGGUCACGGUCCCGAGCUCGUCGUCGGGACCCAAACCUACA
 UUGCAAUGUCAACCACAAGCCAUCGAACACCAAGUUCGACAAGAAGGUGGAACCGA
 AGUCGUGCGACAAGACUCAUACGUGCCCACCGUGUCCGGCUCGGAACUGUUGGG
 GGGCCCCUCCGUGUUCUUUCCCGCCAAAGCCUAAGGACACUCUCAUGAUCUCA
 CGGACGCCAGAAGUGACCUGUGUGGUCGUGGAUGUGUCACAUGAGGAUCCGGAA
 GUCAAAUUAACUGGUAUGUGGACGGGGUGGAAGUGCAUAAUGCCAAAACCAAA
 CCUCGCGAGGAGCAGUACAACUCAACCUACCGGGUGGUGUCCGUGUCUGACUGUC
 UGCACCAGGACUGGCUGAAUGGAAAGGAGUACAAAUGCAAGGUCAGCAACAAGG
 CCCUCCCCGCCCAAUCGAAAAGACGAUCUCGAAGGCCAAAGGUCAGCCGCGAGA
 GCCUCAAGUGUACACUCUGCCGCCGUCAAGAGAAGAAAUGACUAAGAACCAAGUU
 UCCUCACUUGCCUGGUGAAGGGCUUCUACCCCAGCGACAUCGCAGUGGAAUGGG
 AGAGCAACGGACAGCCGAAAACAACUAUAAGACCACCCUCCUGUGUUGGACUC
 GGAUGGUUCCUUCUCCUUACAGCAAGCUGACCGUGGAUAAAUCGCGGUGGCA
 GCAAGGAAAUGUGUUUCAUGCUCAGUCAUGCACGAGGCGCUGCACAUCACUAC
 ACUCAGAAGUCCCUGUCGUCGUCGCCAGGAAAAUAA

mRNA di catena pesante anti-VEGF (HC- α VEGF) con 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:6):

(Le sequenze 5' e 3' UTR sono sottolineate, sequenze di peptide segnale sono in corsivo e grassetto)

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGCAACUGGAUCAAGAACCUC
UCCUGCUCGCAUUCGGCCUGCUCUGUCUCCAUGGCUCAAGAAGGAAGCGCGUUC
CCCACUAUCCCCUCUCGGAGGUUCAGCUGGUCGAAAGCGGGGGCGGCCUCGUCC
AGCCAGGUGGAUCCCUCCGCCUGAGCUGCGCCGCGUCCGGAUACACUUACACAA
CUACGGCAUGAACUGGGUCCGCCAGGCGCCGGGAAAGGGACUGGAAUGGGUCGGC
UGGAUCAAUACCUACACUGGAGAGCCUACCUACGCCGCGUACUUUAAGAGGCGGU
UCACUUUCACUGGAUACUUCCAAGUCAACCGCUUACCUUCAGAUGAAUCCCU
GCGCGCCGAGGAUACCGCAGUGUAUUACUGCGCCAAAUACCCGCAUUCACGGC
UCCAGCCACUGGUACUUUGACGUGUGGGGUCAAGGAACCCUGGUGACUGUGUCG
UCCGCUUCCACCAAGGGACCAAGCGUGUUUCCACUCGCCCCGAGCUCAAAAUCGA
CGUCGGGAGGUACUGCCGCACUGGGGUGCUUGGUCAAGGACUACUUUCCAGAGCC
GGUGACUGUUUCCUGGAACAGCGGAGCGCUCACCUCGGGCGUGCACACCUUCCCU
GCGGUGUUGCAGUCAUCUGGACUGUACUCGCUUCCAGCGUGGUCACGGUCCCGA
GCUCGUCGCUCCGGACCCAAACCUACAUUUGCAAUGUCAACCACAAGCCAUCGAA
CACCAAAGUCGACAAGAAGGUGGAACCGAAGUCGUGCGACAAGACUCAUACGUGC
CCACCGUGUCCGGCUCCCGGAACUGUUGGGGGGCCCCUCCGUGUUCUUUCCCGC
CAAAGCCUAAGGACACUCUCAUGAUCACGGACGCCAGAAGUGACCUGUGUGGU
CGUGGAUGUGUCACAUGAGGAUCCGGAAGUCAAAUUAACUGGUAUGUGGACGG
GGUGGAAGUGCAUAAUGCCAAAACCAACCUCGCGAGGAGCAGUACAACUCAACC
UACCGGGUGGUGUCCGUGCUGACUGUGCUGCACCAGGACUGGCUGAAUGGAAAG
GAGUACAAAUGCAAGGUCAGCAACAAGGCCCUUCCCGCCCCAAUCGAAAAGACGA
UCUCGAAGGCCAAAGGUCAGCCGCGAGAGCCUCAAGUGUACACUCUGCCGCCGUC
AAGAGAAGAAAUGACUAAGAACCAAGUUUCCUCACUUGCCUGGUGAAGGGCUU
CUACCCAGCGACAUCGCAGUGGAAUGGGAGAGCAACGGACAGCCGGAACAAC
UAUAAGACCACCCUCCUGUGUUGGACUCGGAUGGUUCCUUCUUCUUACAGCA
AGCUGACCGUGGAUAAAUCGCGGUGGCAGCAAGGAAAUGUGUUUUAUGCUCAG
UCAUGCACGAGGCGCUGCACAUCACUCAGAAAGUCCUGUCGUCGUGGCC
AGGAAAUAACGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCU
GGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC
AAGCU

mRNA di catena leggera anti-VEGF (HC- α VEGF) senza 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:7):

AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUGCCUGC
 CCUGGUUGCAAGAAGGAUCGGCUUUCCTGACCAUCCACUCUCCGACAUUCAAAU
 GACGCAGUCCCCAUCGAGCCUCUCAGCAUCAGUGGGGGGAUCGCGUGACUAUCACU
 UGCUCGGCGAGCCAGGAUAUCAGCAAUUACCUGAACUGGUAUCAGCAAAAGCCUG
 GAAAGGCACCGAAGGUGCUGAUCUACUACCUCAAGCCUCCAUUCGGGUGUCCC
 GUCCCGCUUCAGCGGCUCGGCUCAGGCACUGACUUCACCCUGACUAUCUCCUCG
 CUGCAACCGGAAGAUUUCGCCACUACUACUGUCAGCAGUACUCCACCGUGCCUU
 GGACGUUCGGACAGGGAACCAAGUUGAGAUUAAGCGGACGGUCGCGGCCCCUC
 CGUGUUUAUCUUUCCGCCUUCGGACGAGCAGCUGAAGUCGGGAACCGCCUCUGUC
 GUGUGCCUCCUGAACAACUUCUACCCGCGGGAAGCCAAGGUGCAGUGGAAAGUGG
 AUAACGCGCUUCAGAGCGGCAAUUCGCAAGAGUCCGUGACCGAAGAGGACUCGAA
 GGACUCAACCUACUCCUCAGCUCAACCCUCACUUUGUCGAAGGCCGACUACGAG
 AAGCACAAGUCUACGCAUGCGAAGUCACCCACCAGGGUCUGUCGAGCCCAGUGA
 CUAUAUCCUCAAUAGGGGGGAUGUUAA

mRNA di catena leggera anti-VEGF (HC- α VEGF) con 5' e 3' UTR (SEQ. ID. N.:8):

(Le sequenze 5' e 3' UTR sono sottolineate, sequenze di peptide segnale sono in corsivo e grassetto)

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG**AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCAC**
UGCUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUGCCUGCCUGGGUUGCAAGAAGGAUCGGC
UUUCCCAGCAUUCAAAUGACGCAGUCCCCAUCGAGCCUCUCAG
CAUCAGUGGGGGAUCGCGUGACUAUCACUUGCUCGGCGAGCCAGGAUAUCAGCAA
UUACCUGAACUGGUAUCAGCAAAAGCCUGGAAAGGCACCGAAGGUGCUGAUCUA
CUUCACCUCAAGCCUCCAUUCGGGUGUCCCGUCCCGCUUCAGCGGCUCCTGGCUCA
GGCACUGACUUCACCCUGACUAUCUCCUCGUCGCAACCGGAAGAUUUCGCCACUU
ACUACUGUCAGCAGUACUCCACCGUGCCUUGGACGUUCGGACAGGGAACCAAAGU
UGAGAUUAAGCGGACGGUCGCGGCCCCUCCGUGUUUAUCUUUCGCCUUCGGAC
GAGCAGCUGAAGUCGGGAACCGCCUCUGUCGUGUGCCUCCUGAACAACUUCUACC
CGCGGGAAGCCAAGGUGCAGUGGAAAGUGGAUAACGCGCUUCAGAGCGGCAAUU
CGCAAGAGUCCGUGACCGAAGAGGACUCGAAGGACUCAACCUACUCCUCAGCUC
AACCCUCACUUUGUCGAAGGCCGACUACGAGAAGCACAAAGUCUACGCAUGCGAA
GUCACCCACCAGGGUCUGUCGAGCCCAGUGACUAAAUCCUUCAAUAGGGGGGAAU
GUUAACGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAAG
UUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU

Tra l'altro, la presente invenzione fornisce anche mRNA codificanti una catena pesante e catena leggera di un anticorpo anti-VEGF sostanzialmente identici o simili alle sequenze descritte nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena pesante di un anticorpo anti-VEGF ha una sequenza nucleotidica identica per almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più a SEQ. ID. N.:5 o SEQ. ID. N.:6 come descritto nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena pesante di un anticorpo anti-VEGF ha una sequenza nucleotidica codificante per una sequenza amminoacidica almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più identica o omologa a SEQ. ID. N.:5 come descritto nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena leggera di un anticorpo anti-VEGF ha una sequenza nucleotidica almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più identica a SEQ. ID. N.:7 o SEQ. ID. N.:8 come descritto nella presente. In certe realizzazioni, un mRNA codificante per la catena leggera di un anticorpo anti-VEGF ha una sequenza nucleotidica codificante per una sequenza amminoacidica almeno 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più identica o omologa a SEQ. ID. N.:7 come descritto nella presente.

In alcune realizzazioni, l'mRNA qui fornito contiene uno o più nucleotidi modificati come quelli qui descritti. In alcune realizzazioni, un mRNA che codifica per la catena pesante o la catena leggera di un anticorpo anti-VEGF può contenere almeno il 10%, almeno il 20%, almeno il 30%, almeno il 40%, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno 70%, almeno 75%, almeno 80%, almeno 85%, almeno 90%, o almeno 95% di nucleotidi modificati di tutti i nucleotidi modificabili della sequenza.

Come usato nella presente, il termine "identità" si riferisce alla relazione complessiva tra molecole polimeriche, *ad es.*, tra molecole di acido nucleico (*ad es.*, molecole di DNA e/o molecole di RNA) e/o tra molecole polipeptidiche. Il calcolo dell'identità percentuale di due sequenze di acidi nucleici, ad esempio, può essere eseguito allineando le due sequenze per scopi di confronto ottimali (*ad es.*, lacune possono essere introdotte in una o entrambe di una prima e una seconda sequenza di acido nucleico per un allineamento ottimale e sequenze non identiche possono essere ignorate a scopo di confronto). In alcune realizzazioni, la lunghezza di una sequenza allineata a scopo di confronto è di almeno il 30%, almeno il 40%, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80%, almeno il 90%, almeno il 95%, o sostanzialmente il 100% della lunghezza della sequenza di riferimento. I nucleotidi nelle corrispondenti posizioni nucleotidiche vengono poi confrontati. Quando una posizione nella prima sequenza è occupata dallo stesso nucleotide della posizione corrispondente nella seconda sequenza, allora le molecole sono identiche in quella posizione. L'identità percentuale tra le due sequenze è funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze, tenendo conto del numero di lacune e della lunghezza di ogni lacuna, che deve essere introdotta per l'allineamento ottimale delle due sequenze. Il confronto delle sequenze e la determinazione dell'identità percentuale tra due sequenze può essere eseguita usando un algoritmo matematico. Ad esempio, l'identità percentuale tra due sequenze nucleotidiche può essere determinata usando l'algoritmo di Meyers e Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), che è stato incorporato nel programma ALIGN (versione 2.0) usando una tabella dei residui di peso PAM120, una penalità di lunghezza di lacuna di 12, e una penalità di lacuna di 4. L'identità percentuale tra due sequenze nucleotidiche può, in

alternativa, essere determinata usando il programma GAP nel pacchetto software GCG usando una matrice NWSgapdna.CMP.

Veicoli di rilascio liposomiali

Gli mRNA che codificano una catena pesante e una catena leggera di un anticorpo possono essere rilasciati tramite un singolo veicolo di rilascio liposomiale.

Come qui usati, i veicoli di rilascio liposomiali sono solitamente caratterizzati come vescicole microscopiche aventi uno spazio acquoso interno sequestrato da un mezzo esterno tramite una membrana di uno o più doppi strati. Le membrane a doppio strato dei liposomi sono tipicamente formate da molecole anfifile, come lipidi di origine sintetica o naturale che comprendono domini idrofili e idrofobici spazialmente separati (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Le membrane a doppio strato dei liposomi possono essere formate anche da polimeri anfifili e tensioattivi (ad esempio, polimeri, niosomi, ecc.). Nel contesto della presente invenzione, un veicolo di somministrazione liposomiale serve a trasportare un mRNA desiderato a una cellula o tessuto bersaglio. Il processo di incorporazione di un mRNA desiderato in un liposoma viene spesso definito "caricamento". I metodi illustrativi sono descritti in Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992. Gli acidi nucleici incorporati nel liposoma possono essere localizzati completamente o parzialmente nello spazio interno del liposoma, all'interno della membrana a doppio strato del liposoma, o associati alla superficie esterna della membrana del liposoma. L'incorporazione di un acido nucleico nei liposomi è anche qui indicata come "incapsulamento" in cui l'acido nucleico è interamente contenuto all'interno dello spazio interno del liposoma. Lo scopo di incorporare un mRNA in un veicolo di trasferimento, come un liposoma, è spesso quello di proteggere l'acido nucleico da un ambiente che può contenere enzimi o sostanze chimiche che degradano gli acidi nucleici e/o sistemi o recettori che causano la rapida escrezione dell'acido nucleico. Di conseguenza, in alcune realizzazioni, un veicolo di rilascio adatto è in grado di migliorare la stabilità dell'mRNA contenuto in esso e/o facilitare il rilascio di mRNA alla cellula o al tessuto bersaglio.

Un veicolo di somministrazione liposomiale adatto è formulato come nanoparticella lipidica. Come usato nella presente, la frase "nanoparticella lipidica" si riferisce a un veicolo di somministrazione comprendente un lipide

cationico, un lipide non cationico, un lipide a base di colesterolo e un lipide modificato con PEG). Le nanoparticelle lipidiche possono essere preparate includendo miscele lipidiche multicomponente di rapporti variabili che impiegano lipidi cationici, non cationici, a base di colesterolo e modificati con PEG.

In alcune realizzazioni, un veicolo di somministrazione liposomiale adatto contiene un lipide cationico. Come usato nella presente, la frase "lipidi cationici" si riferisce a una qualsiasi di una serie di specie lipidiche che hanno una carica netta positiva ad un pH selezionato, come pH fisiologico. In letteratura sono stati descritti diversi lipidi cationici, molti dei quali disponibili in commercio. Lipidi cationici particolarmente adatti per l'uso nelle composizioni e nei metodi dell'invenzione includono quelli descritti nelle pubblicazioni di brevetti internazionali WO 2010/053572 (e in particolare, CI 2-200 descritto al paragrafo [00225]) e WO 2012/170930. In alcune realizzazioni, le composizioni dell'invenzione impiegano nanoparticelle lipidiche comprendenti un lipide cationico ionizzabile descritto in domanda di brevetto U.S.A. provvisoria 61/617.468, depositata il 29 marzo 2012, come ad esempio (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-15,18-dien-1-ammina (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-4,15,18-trien-1-ammina (HGT5001), e (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-5,15,18-trien-1-ammina (HGT5002).

In alcune realizzazioni, viene usato il lipide cationico N-[1-(2,3-dioleilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio cloruro o "DOTMA". (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); Brevetto U.S.A. N. 4,897,355). DOTMA può essere formulato da solo o può essere combinato con il lipide neutro, la dioleoilfosfatidil-etanolammina 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 migliorare la rilascio di acidi nucleici nelle cellule bersaglio. Altri lipidi cationici adatti includono, per esempio, 5-carbossispermilglicina diottadecilammide o "DOGS", 2,3-dioleilossi-N-[2(spermina-carbossammido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio o "DOSPA" (Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); Brevetto U.S.A. N. 5,171,678; Brevetto U.S.A. 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-

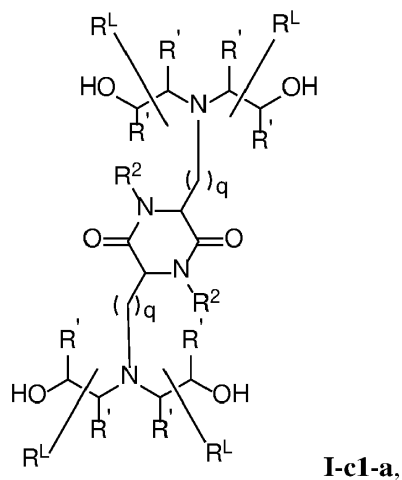
diioleilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoleilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinolenilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano o "DLenDMA", N-dioleil-N,N-dimetilammonio cloruro o "DODAC", N,N-distearil-N,N-dimetilammonio bromuro o "DDAB", N-(1,2-dimiristolossiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-idrossietil ammonio 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-dimetil-1-(cis,cis-9',1-2'-ottadecadienossi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetil-3,4-dioleilossibenzilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilamminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-Dilinoleoilossi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-Dilinoleilcarbamil-3-dimetilamminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-Dilinoleoilcarbamil-3-dimetilamminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoleil-4-dimetilamminometil-[1,3]-diossolano o "DLin- DMA", 2,2-dilinoleil-4-dimetilamminoetil-[1,3]-diossolano o "DLin-K-XTC2-DMA", e 2-(2,2-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)-1,3-diossolan-4-il)-N,N-dimetiletanammina (DLin-KC2-DMA)) (Vedere, WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), o loro miscele. (Heyes, 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).

In alcune realizzazioni, uno o più dei lipidi cationici presenti in una tale composizione comprendono almeno una porzione di imidazolo, dialchilamina o guanidinio.

In alcune realizzazioni, uno o più dei lipidi cationici presenti in tale composizione sono scelti tra XTC (2,2-Dilinoleil-4-dimetilamminoetil-[1,3]-diossolano), MC3 (((6Z,9Z,28Z,31Z)-eptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilammino)butanoato), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dienil)tetraidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]diossolo-5-ammina)), NC98-5 (4,7,13-tris(3-osso-3-(undecilammino)propil)-N1,N16-diundecil-4,7,10,13-tetraaesaedecan-1,16-diammide), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilammonio propano), HGT4003 (WO 2012/170889), ICE (WO 2011/068810), HGT5000 (domanda di brevetto U.S.A. provvisoria N. 61/617,468) o HGT5001 (cis o trans) (domanda di brevetto provvisorio n.61/617,468), lipidoidi amminoalcolici come quelli descritti in WO2010/053572, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilammonio propano), DOTMA (1,2-di-O-ottadecenil-3-trimetilammonio propano), DLinDMA (Heyes, J.;

Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple, S.C. et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, K.T. et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869).

In alcune realizzazioni, un lipide cationico presente in tale composizione è un lipide cationico descritto in WO 2013063468 e in domanda U.S.A. provvisoria n. di serie 61/894,299, intitolata "Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA" depositata il 22 ottobre 2013. In alcune realizzazioni, un lipide cationico comprende un composto di formula **I-c1-a**:



o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in cui:

ogni R^2 indipendentemente è idrogeno o C_{1-3} alchile;

ogni q indipendentemente è 2 fino a 6;

ogni R' indipendentemente è idrogeno o C_{1-3} alchile;

e ogni R^L indipendentemente è C_{8-12} alchile.

In certe realizzazioni, ogni R^2 indipendentemente è idrogeno, metile o etile. In certe realizzazioni, ogni R^2 indipendentemente è idrogeno o metile. In certe realizzazioni, ogni R^2 è idrogeno.

In certe realizzazioni, ogni q indipendentemente è di 3 fino a 6. In certe realizzazioni, ogni q indipendentemente è 3 fino a 5. In certe realizzazioni, ogni q è 4.

In certe realizzazioni, ogni R' indipendentemente è idrogeno, metile o etile. In certe realizzazioni, ogni R' indipendentemente è idrogeno o metile. In certe realizzazioni, ogni R' indipendentemente è idrogeno.

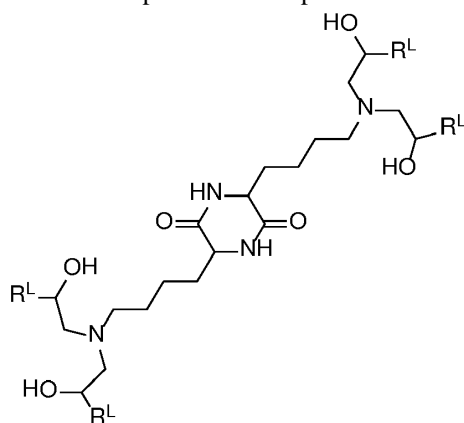
In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è C₈₋₁₂ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è *n*-C₈₋₁₂ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è C₉₋₁₁ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è *n*-C₉₋₁₁ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è C₁₀ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è *n*-C₁₀ alchile.

In certe realizzazioni, ogni R² indipendentemente è idrogeno o metile; ogni q indipendentemente è 3 fino a 5; ogni R' indipendentemente è idrogeno o metile; e ogni R^L indipendentemente è C₈₋₁₂ alchile.

In certe realizzazioni, ogni R² è idrogeno; ogni q indipendentemente è 3 fino a 5; ogni R' è idrogeno; e ogni R^L indipendentemente è C₈₋₁₂ alchile.

In certe realizzazioni, ogni R² è idrogeno; ogni q è 4; ogni R' è idrogeno; e ogni R^L indipendentemente è C₈₋₁₂ alchile.

In certe realizzazioni, un lipide cationico comprende un composto di formula **I-g**:

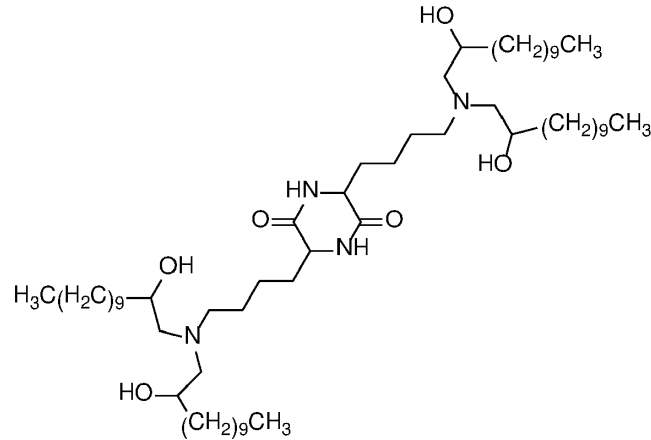


I-g,

o un suo sale accettabile farmaceuticamente, in cui ogni R^L indipendentemente è C₈₋₁₂ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è *n*-C₈₋₁₂ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è C₉₋₁₁ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è *n*-C₉₋₁₁ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L indipendentemente è C₁₀ alchile. In certe realizzazioni, ogni R^L è *n*-C₁₀ alchile.

In particolari realizzazioni, le composizioni fornite includono un lipide cationico cKK-E12, o (3,6-bis(4-(bis(2-

idrossidodecil)ammino)butil)piperazin-2,5-dione). La struttura di cKK-E12 è mostrata di seguito:



In alcune realizzazioni, un veicolo di somministrazione liposomiale adatto contiene un lipide non cationico. In alcune realizzazioni, un lipide non cationico è un lipide neutro, cioè un lipide che non porta una carica netta nelle condizioni in cui la composizione è formulata e/o somministrata. Tali lipidi non cationici o neutri illustrativi possono essere scelti tra DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerolo)), e colesterolo.

Lipidi cationici a base di colesterolo adatti includono, per esempio, DC-Choi (N,N-dimetil-N-etilcarbrossammidocolesterolo), 1,4-bis(3-N-oleilammino-propil)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); Brevetto U.S.A. N. 5,744,335), o ICE.

In altre realizzazioni, nanoparticelle lipidiche adatte comprendenti uno o più lipidi scindibili, come, ad esempio, uno o più lipidi o composti cationici che comprendono un gruppo funzionale disolfuro scindibile (S-S) (ad esempio HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 e HGT4005), come inoltre descritto in Domanda provvisoria U.S.A. n.: 61/494,745.

Inoltre, sono disponibili in commercio diversi reagenti per migliorare l'efficacia della trasfezione. Esempi adatti includono LIPOFECTIN (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, California), LIPOFECTA INE

(DOSPA:DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINE2000. (Invitrogen), FUGENE, TRANSFECTAM (DOGS) ed EFFECTENE.

In alcune realizzazioni, 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% del lipide totale presente nel veicolo di trasferimento, o preferibilmente da circa 20% a circa 70% del lipide totale presente nel veicolo di trasferimento.

L'uso di fosfolipidi modificati con polietilenglicole (PEG) e lipidi derivatizzati come ceramidi derivatizzate (PEG-CER), inclusa N-Ottanoil-Sfingosina-1-[Succinil(Metossi Polietilenglicole)-2000] (C8 PEG-2000 ceramide) è in combinazione con altri lipidi insieme che costituiscono il veicolo di trasferimento liposomiale. I lipidi modificati con PEG contemplati includono, ma non sono limitati a, una catena di polietilenglicole di lunghezza fino a 5 kDa attaccata in modo covalente a un lipide con una catena alchilica di lunghezza C6-C20. L'aggiunta di tali componenti può prevenire l'aggregazione in complessi e può anche fornire un mezzo per aumentare la durata in circolazione e aumentare il rilascio della composizione di lipidi-acidi nucleici alla cellula bersaglio, (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), oppure possono essere selezionati per essere rapidamente scambiati dalla formulazione in vivo (vedi Brevetto U.S.A. N. 5,885,613).

Lipidi scambiabili particolarmente utili sono le PEG-ceramidi aventi catene aciliche più corte (ad esempio, C14 o C18). Il fosfolipide modificato con PEG 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 circa 2% dei lipidi totali presenti nel veicolo di trasferimento liposomiale.

Come usata nella presente, l'espressione "lipidi non cationici" si riferisce a qualsiasi lipide neutro, zwitterionico o anionico. Come usata nella presente, la frase "lipide anionico" si riferisce a una qualsiasi di un certo numero di specie lipidiche che portano una carica negativa netta ad un pH selezionato, come il pH fisiologico. I lipidi non cationici includono, ma non sono limitati a, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerolo (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerolo (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoil-fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-cicloesan-1-carbossilato

(DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-stearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), colesterolo, o una loro miscela. Tali lipidi non cationici possono essere usati da soli, ma sono preferibilmente usati in combinazione con altri eccipienti, per esempio lipidi cationici. Quando usato in combinazione con un lipide cationico, il lipide non cationico può comprendere un rapporto molare dal 5% a circa 90%, o preferibilmente da circa 10% a circa 70% del lipide totale presente nel veicolo di trasferimento.

In particolari realizzazioni, un veicolo di trasferimento liposomiale adatto viene preparato combinando più componenti lipidici e/o polimerici. Ad esempio, un veicolo di trasferimento liposomiale può essere preparato usando C 12-200, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K a un rapporto molare di 40:30:25:5 o DODAP, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K a un rapporto molare di 18:56:20:6, o HGT5000, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K con un rapporto molare di 40:20:35:5, o HGT5001, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K con un rapporto molare di 40:20:35:5. La scelta di lipidi cationici, lipidi non cationici e lipidi modificati con PEG che costituiscono la nanoparticella lipidica, nonché il relativo rapporto molare di tali lipidi tra loro, si basa sulle caratteristiche dei lipidi scelti, la natura delle cellule bersaglio previste, le caratteristiche dell'mRNA da rilasciare. Altre considerazioni includono, per esempio, la saturazione della catena alchilica, nonché la dimensione, la carica, il pH, il pKa, la fusogenicità e la tossicità dei lipidi selezionati. Pertanto i rapporti molari possono essere regolati di conseguenza. Ad esempio, in alcune realizzazioni, la percentuale di lipide cationico nella nanoparticella lipidica può essere maggiore del 10%, maggiore del 20%, maggiore del 30%, maggiore del 40%, maggiore del 50%, maggiore del 60% o maggiore di 70%. La percentuale di lipidi non cationici nella nanoparticella lipidica può essere maggiore del 5%, maggiore del 10%, maggiore del 20%, maggiore del 30% o maggiore del 40%. La percentuale di colesterolo nella nanoparticella lipidica può essere maggiore del 10%, maggiore del 20%, maggiore del 30% o maggiore del 40%. La percentuale di lipidi modificati con PEG nella nanoparticella lipidica può essere maggiore dell'1%, maggiore del 2%, maggiore del 5%, maggiore del 10% o maggiore del 20%.

In alcune realizzazioni, nanoparticelle lipidiche adatte dell'invenzione comprendono almeno uno dei seguenti

lipidi cationici: C12-200, DLin-KC2-DMA, DODAP, HGT4003, ICE, HGT5000 o HGT5001. In alcune realizzazioni, un veicolo di trasferimento liposomiale adatto comprende colesterolo e/o un lipide modificato con PEG. In alcune realizzazioni, veicoli di trasferimento adatti comprendono DMG-PEG2K. In alcune realizzazioni, un veicolo di trasferimento liposomiale adatto comprende una delle seguenti combinazioni lipidiche: C12-200, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K; DODAP, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K; HGT5000, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K; HGT5001, DOPE, colesterolo, DMG-PEG2K; XTC, DSPC, colesterolo, PEG-DMG; MC3, DSPC, colesterolo, PEG-DMG; e ALNY-100, DSPC, colesterolo, PEG-DSG.

I veicoli di trasferimento liposomiali da usare nelle composizioni dell'invenzione possono essere preparati mediante varie tecniche attualmente note nella tecnica. Le vescicole multilamellari (MLV) possono essere preparate con tecniche convenzionali, ad esempio depositando un lipide selezionato sulla parete interna di un contenitore o recipiente adatto, sciogliendo il lipide in un solvente appropriato e quindi evaporando il solvente per lasciare un film sottile all'interno del recipiente, o mediante essiccazione a spruzzo. Una fase acquosa può quindi essere aggiunta al recipiente con un movimento a vortice che porta alla formazione di MLV. Le vescicole uni-lamellari (ULV) possono quindi essere formate mediante omogeneizzazione, sonicazione o estrusione delle vescicole multi-lamellari. Inoltre, le vescicole unilamellari possono essere formate mediante tecniche di rimozione del detergente.

In alcune realizzazioni della presente invenzione, le composizioni della presente invenzione comprendono un veicolo di trasferimento liposomiale in cui l'mRNA è associato sia sulla superficie del veicolo di trasferimento liposomiale che incapsulato all'interno dello stesso veicolo di trasferimento liposomiale. Ad esempio, durante la preparazione delle composizioni della presente invenzione, veicoli di trasferimento cationico liposomiale possono associarsi all'mRNA attraverso interazioni elettrostatiche.

Adatti veicoli di somministrazione liposomiale secondo la presente invenzione possono essere realizzati in varie dimensioni. La selezione di una dimensione appropriata può prendere in considerazione il sito della cellula o del tessuto bersaglio e in una certa misura l'applicazione per la quale viene realizzato il liposoma. In alcune realizzazioni, viene selezionata una dimensione appropriata dei veicoli di somministrazione liposomiali per

facilitare la distribuzione sistemica dell'anticorpo codificato dall'mRNA. In alcune realizzazioni, può essere desiderabile limitare la trasfezione dell'mRNA a determinate cellule o tessuti. Ad esempio, per indirizzare gli epatociti, un veicolo di trasferimento liposomiale può essere dimensionato in modo tale che le sue dimensioni siano inferiori alle finestre dello strato endoteliale che riveste i sinusoidi epatici nel fegato; di conseguenza il veicolo di trasferimento liposomiale può facilmente penetrare tali finestre endoteliali per raggiungere gli epatociti bersaglio. In alternativa, un veicolo di trasferimento liposomiale può essere dimensionato in modo tale che le dimensioni del liposoma siano di diametro sufficiente per limitare o evitare espressamente la distribuzione in determinate cellule o tessuti. Ad esempio, un veicolo di trasferimento liposomiale può essere dimensionato in modo tale che le sue dimensioni siano maggiori delle finestre dello strato endoteliale che riveste i sinusoidi epatici per limitare in tal modo la distribuzione del veicolo di trasferimento liposomiale agli epatociti.

In alcune realizzazioni, un veicolo di somministrazione liposomiale adatto ha una dimensione non maggiore di circa 150 nm (ad esempio, non maggiore di circa 125 nm, 100 nm, 75 nm o 50 nm). In alcune realizzazioni, un veicolo di somministrazione liposomiale adatto ha una dimensione che va da circa 150 - 10 nm (ad esempio, che va da circa 125 - 10 nm, 100 - 10 nm, 75 - 10 nm o 50 - 10 nm). In alcune realizzazioni, un veicolo di somministrazione liposomiale adatto ha una dimensione compresa tra circa 150 e 100 nm (ad esempio, compresa tra circa 125 e 100 nm). In alcune realizzazioni, un veicolo di somministrazione liposomiale adatto ha una dimensione che va da circa 100 - 10 nm (ad esempio, variabile da circa 90 - 10 nm, 80 - 10 nm, 70 - 10 nm, 60 - 10 nm o 50 - 10 nm).

Vari metodi alternativi noti nella tecnica sono disponibili per il dimensionamento di una popolazione di veicoli di trasferimento liposomiale. Un tale metodo di dimensionamento è descritto in Brevetto U.S.A. N. 4,737,323. La sonicazione di una sospensione liposomiale mediante sonicazione a bagno o con sonda produce una riduzione progressiva delle dimensioni fino a piccoli ULV inferiori a circa 0,05 micron di diametro. L'omogeneizzazione è un altro metodo che si basa sull'energia di taglio per frammentare i grandi liposomi in quelli più piccoli. In una tipica procedura di omogeneizzazione, le MLV vengono fatte ricircolare attraverso un omogeneizzatore di emulsione standard fino a quando si osservano dimensioni di liposomi selezionate, tipicamente tra circa 0,1 e 0,5

micron. La dimensione delle vescicole liposomiali può essere determinata mediante diffusione quasi elastica della luce (QELS) come descritto in Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioing., 10:421-150 (1981). Il diametro medio dei liposomi può essere ridotto dalla sonicazione dei liposomi formati. I cicli di sonicazione intermittenti possono essere alternati alla valutazione QELS per guidare una sintesi efficiente dei liposomi.

Espressione di anticorpi codificati da RNA in vivo

Secondo la presente invenzione, mRNA codificanti per anticorpi (cioè mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere) vengono rilasciati tramite veicoli di rilascio liposomiali a un soggetto che necessita di rilascio, in modo tale che venga espresso un anticorpo desiderato completamente assemblato *in vivo*.

Un anticorpo desiderato codificato da mRNA è espresso per via sistemica nel soggetto. Ciò può essere ottenuto secernendo anticorpi completamente assemblati da una cellula o tessuto in cui l'anticorpo è inizialmente espresso nel sistema circolatorio del soggetto. Le composizioni dell'invenzione contenenti mRNA codificanti per anticorpi e veicoli liposomiali si distribuiscono nelle cellule del fegato per facilitare il rilascio e la successiva espressione dell'mRNA in esso contenuto dalle cellule del fegato (ad es. epatociti). Gli epatociti mirati possono funzionare come "serbatoio" biologico o "deposito" in grado di produrre ed espellere un anticorpo desiderato completamente assemblato, con conseguente distribuzione sistemica dell'anticorpo. Cellule diverse dagli epatociti (ad es. polmone, milza, cuore, occhi, o cellule del sistema nervoso centrale) possono fungere da deposito per la produzione di proteine. Tipicamente, la produzione e la secrezione prolungate di anticorpi completamente assemblati dal serbatoio o dalle cellule di deposito determina un'efficace distribuzione sistemica.

In alcune realizzazioni, l'espressione sistemica di mRNA codificanti per l'anticorpo desiderato nel siero del paziente (cioè sangue) è rilevabile per più di 1 ora, più di 4 ore, più di 6 ore, più di 12 ore, più di 18 ore, più di 24 ore, più di 30 ore, più di 36 ore, più di 42 ore, più di 48 ore, più di 54 ore, più di 60 ore, più di 66 ore, più di 72 ore, più di 96 ore, più di 120 ore, più di 144 ore, più di 168 ore, più di 2 settimane, più di 3 settimane, più di 1 mese o più di 2 mesi dopo la somministrazione. In alcune realizzazioni, la concentrazione sierica dell'anticorpo codificato dagli mRNA raggiunge un livello di picco di circa 6 ore, 12 ore, 18 ore, 24 ore, 30 ore, 36 ore, 42 ore, 48 ore, 54 ore, 60 ore, 66 ore, 72 ore, 78 ore, 84 ore, 90 ore o 96 ore dopo la somministrazione. In

alcune realizzazioni, si osserva una circolazione sostenuta dell'anticorpo desiderato codificato da mRNA. Ad esempio, l'espressione sistemica dell'anticorpo codificato dagli mRNA nel siero del paziente (cioè sangue) può essere rilevata per più di 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane, 1 mese, 2 mesi o più dopo la somministrazione.

Gli mRNA che codificano la catena pesante e la catena leggera di un anticorpo possono essere rilasciati a cellule o tessuti bersaglio per l'espressione intracellulare o la distribuzione locale dell'anticorpo. Tipicamente, la distribuzione locale si verifica quando un anticorpo completamente assemblato viene prodotto e secreto da una cellula bersaglio al fluido extracellulare circostante senza entrare nel sistema di circolazione, come il flusso sanguigno. Come usato nella presente, il termine "cellula bersaglio" o "tessuto bersaglio" si riferisce a una cellula o tessuto a cui lo (gli) mRNA codificante per l'anticorpo deve essere diretto o mirato. Ad esempio, quando si desidera fornire un mRNA a un epatocita, l'epatocita rappresenta la cellula bersaglio. mRNA codificanti per gli anticorpi (ad es., mRNA che codificano per catene pesanti e catene leggere) qui descritti possono essere somministrati a una varietà di cellule o tessuti bersaglio inclusi, ma non limitati a, epatociti, cellule epiteliali, cellule emopoietiche, cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule polmonari, cellule ossee, cellule staminali, cellule mesenchimali, cellule neurali (ad es., meningi, astrociti, motoneuroni, cellule dei gangli della radice dorsale e motoneuroni del corno anteriore), cellule fotorecetrici (ad es., bastoncelli e coni), cellule epiteliali pigmentate della retina, cellule secretorie, cellule cardiache, adipociti, cellule muscolari lisce vascolari, cardiomiociti, cellule muscolari scheletriche, cellule beta, cellule ipofisarie, cellule del rivestimento sinoviale, cellule ovariche, cellule testicolari, fibroblasti, cellule B, cellule T, reticolociti, leucociti, granulociti e cellule tumorali.

Il rilascio di mRNA a cellule e tessuti bersaglio può essere ottenuta con mezzi di indirizzamento sia passivi che attivi. Il fenomeno dell'indirizzamento passivo sfrutta i modelli di distribuzione naturali di un veicolo di trasferimento *in vivo* senza fare affidamento sull'uso di eccipienti o mezzi aggiuntivi per migliorare il riconoscimento del veicolo di trasferimento da parte delle cellule bersaglio. Ad esempio, è probabile che veicoli di trasferimento soggetti a fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale si accumulino nel

fegato o nella milza, e di conseguenza possono fornire mezzi per dirigere passivamente la somministrazione delle composizioni a tali cellule bersaglio.

In alternativa, la somministrazione di mRNA a cellule e tessuti bersaglio può essere ottenuta mediante indirizzamento attivo, che comporta l'uso di eccipienti aggiuntivi, qui indicati come "ligandi di indirizzamento" che possono essere legati (covalentemente o non covalentemente) al veicolo di trasferimento a incoraggiare la localizzazione di tale veicolo di trasferimento in determinate cellule bersaglio o tessuti bersaglio. Ad esempio, l'indirizzamento può essere mediato dall'inclusione di uno o più ligandi di indirizzamento endogeni (ad esempio apolipoproteina E) nel o sul veicolo di trasferimento per favorire la distribuzione alle cellule o ai tessuti bersaglio. Il riconoscimento del ligando bersaglio da parte dei tessuti bersaglio facilita attivamente la distribuzione tissutale e l'assorbimento cellulare del veicolo di trasferimento e/o del suo contenuto nelle cellule e nei tessuti bersaglio (ad esempio, l'inclusione di un ligando bersaglio dell'apolipoproteina-E nel o sul veicolo di trasferimento favorisce riconoscimento e legame del veicolo di trasferimento ai recettori endogeni delle lipoproteine a bassa densità espressi dagli epatociti). Come previsto nella presente, la composizione può comprendere un ligando in grado di potenziare l'affinità della composizione con la cellula bersaglio. I ligandi mirati possono essere collegati 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 fusogeni come PEAA, emoagglutinina, altri lipopeptidi (vedere domande di brevetto U.S.A. n. di serie 08/835,281, e 60/083,294) e altre caratteristiche utili per la rilascio in vivo e/o intracellulare. Sono contemplate composizioni che comprendono uno o più ligandi (ad esempio peptidi, aptameri, oligonucleotidi, una vitamina o altre molecole) che sono in grado di aumentare l'affinità delle composizioni e il loro contenuto di acido nucleico per le cellule o i tessuti bersaglio. Ligandi adatti possono essere opzionalmente legati o associati alla superficie del veicolo di trasferimento. In alcune realizzazioni, il ligando di indirizzamento può attraversare la superficie di un veicolo di trasferimento o essere incapsulato all'interno del veicolo di trasferimento. Ligandi adatti sono scelti in base alle loro proprietà fisiche, chimiche o biologiche (ad esempio, affinità selettiva e/o riconoscimento di marcatori o caratteristiche della superficie cellulare bersaglio). I siti

bersaglio specifici delle cellule e il loro ligando di indirizzamento corrispondente possono variare ampiamente. Ligandi di indirizzamento adatti sono scelti in modo tale da sfruttare le caratteristiche uniche di una cellula bersaglio, consentendo così alla composizione di discriminare tra cellule bersaglio e non bersaglio. Ad esempio, le composizioni possono includere marcatori di superficie (ad esempio, apolipoproteina-B o apolipoproteina-E) che migliorano selettivamente il riconoscimento o l'affinità con gli epatociti (ad esempio, mediante riconoscimento mediato dal recettore e legame con tali marcatori di superficie). Inoltre, ci si aspetterebbe che l'uso del galattosio come ligando di indirizzamento diriga le composizioni agli epatociti parenchimali o, in alternativa, l'uso di residui di zucchero contenenti mannosio come ligando di indirizzamento per dirigere le composizioni alle cellule endoteliali del fegato (ad esempio, mannosio contenente residui di zucchero che possono legarsi preferenzialmente al recettore dell'asialoglicoproteina o al recettore del mannosio presenti negli epatociti). (Vedere Hillery AM, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.) La presentazione di tali ligandi mirati che sono stati coniugati a frazioni presenti nel veicolo di trasferimento (ad esempio, una nanoparticella lipidica) può facilitare il riconoscimento e l'assorbimento delle composizioni nelle cellule e nei tessuti bersaglio. Esempi di ligandi mirati adatti includono uno o più peptidi, proteine, aptameri, vitamine e oligonucleotidi.

Come usato nella presente, il termine "soggetto" si riferisce a qualsiasi animale (ad esempio un mammifero), inclusi, ma non limitati a, esseri umani, primati non umani, roditori e simili, a cui gli mRNA e le composizioni della presente invenzione sono somministrati. Tipicamente, i termini "soggetto" e "paziente" sono qui usati in modo equivalente in riferimento a un soggetto umano.

Composizione farmaceutica e somministrazione

Per facilitare l'espressione degli anticorpi *in vivo*, mRNA codificanti per anticorpi (ad esempio, mRNA codificanti per catene pesanti e catene leggere) e veicoli di rilascio possono essere formulati in combinazione con uno o più acidi nucleici aggiuntivi, vettori, ligandi mirati o reagenti stabilizzanti, o in composizioni farmacologiche in cui sono miscelati con eccipienti adatti. Le tecniche per la formulazione e la somministrazione dei farmaci si possono trovare in "Remington's Pharmaceutical Sciences, "Mack Publishing Co., Easton, Pa.,

ultima edizione.

Gli mRNA codificanti per anticorpi e le composizioni contenenti gli stessi possono essere somministrati e dosati secondo la pratica medica corrente, tenendo conto delle condizioni cliniche del soggetto, della sede e della modalità di somministrazione, della posologia della somministrazione, dell'età, del sesso, del peso corporeo del soggetto, e altri fattori rilevanti per i medici di ordinaria esperienza nella tecnica. La "quantità effettiva" per gli scopi della presente può essere determinata da considerazioni pertinenti che sono note a coloro di ordinaria esperienza nella ricerca clinica sperimentale, farmacologica, clinica e nella tecnica medica. In alcune realizzazioni, la quantità somministrata è efficace per ottenere almeno una certa stabilizzazione, miglioramento o eliminazione dei sintomi e altri indicatori selezionati come misure appropriate di progresso, regressione o miglioramento della malattia da parte degli esperti nella tecnica. Ad esempio, una quantità e un regime di dosaggio adeguati sono quelli che provocano una produzione di anticorpi almeno transitoria.

In una realizzazione, le composizioni sono formulate in modo tale da essere adatte per il rilascio prolungato dell'mRNA in esse contenuto. Tali composizioni a rilascio prolungato possono essere convenientemente somministrate a un soggetto a intervalli di dosaggio estesi. Ad esempio, in una realizzazione, le composizioni vengono somministrate a un soggetto due volte al giorno, giornalmente o a giorni alterni. In una realizzazione preferita, le composizioni vengono somministrate a un soggetto due volte alla settimana, una volta alla settimana, ogni dieci giorni, ogni due settimane, ogni tre settimane, o più preferibilmente ogni quattro settimane, una volta al mese, ogni sei settimane, ogni otto settimane, ogni due mesi, ogni tre mesi, ogni quattro mesi, ogni sei mesi, ogni otto mesi, ogni nove mesi o annualmente. Sono anche contemplate composizioni e veicoli liposomiali che sono formulati per la somministrazione di deposito per erogare o rilasciare un mRNA per lunghi periodi di tempo. Preferibilmente, i mezzi a rilascio prolungato impiegati sono combinati con modifiche apportate all'mRNA per aumentare la stabilità.

Nella presente sono contemplate anche composizioni farmaceutiche liofilizzate comprendenti una o più delle nanoparticelle liposomiali qui descritte e metodi correlati per l'uso di tali composizioni liofilizzate come descritto, ad esempio, nella domanda provvisoria U.S.A. n.61/494,882, depositata l'8 giugno 2011. Ad esempio,

le composizioni farmaceutiche liofilizzate secondo l'invenzione possono essere ricostituite prima della somministrazione o possono essere ricostituite *in vivo*. Ad esempio, una composizione farmaceutica liofilizzata può essere formulata in una forma di dosaggio appropriata (ad esempio, una forma di dosaggio intradermica come un disco, un'asta o una membrana) e somministrata in modo tale che la forma di dosaggio venga reidratata nel tempo in vivo dai fluidi corporei dell'individuo.

Espressione di anticorpi codificati da RNA in vitro

mRNA codificanti per gli anticorpi (ad es., mRNA che codificano per catene pesanti e catene leggere) possono essere usati per produrre anticorpi *in vitro*. Ad esempio, le cellule possono essere trasfettate da mRNA codificanti per anticorpi (ad esempio, mRNA che codificano per catene pesanti e catene leggere) e coltivate in condizioni di coltura cellulare che consentono la produzione dell'anticorpo da parte delle cellule. In alternativa, l'anticorpo è espresso a livello intracellulare. In alternativa, l'anticorpo viene secreto dalle cellule in modo tale che l'anticorpo possa essere raccolto dal supernatante.

Possono essere usate cellule di mammifero. Esempi non limitativi di cellule di mammifero includono la linea di mieloma di topo BALB/c (NSO/1, N. ECACC: 85110503); retinoblasti umani (PER.C6, CruCell, Leiden, Paesi Bassi); linea CV1 di rene di scimmia trasformata da SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linea renale embrionale umana (cellule HEK293 o 293 subclonate per la crescita in coltura in sospensione, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); linea cellulare di fibrosarcoma umano (ad es. HT1080); cellule renali di criceto (BHK21, ATCC CCL 10); cellule ovariche di criceto cinese +/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); cellule del Sertoli di topo (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); cellule renali di scimmia (CV1 ATCC CCL 70); cellule renali di scimmia verde africana (VERO-76, ATCC CRL-1 587); cellule di carcinoma cervicale umano (HeLa, ATCC CCL 2); cellule renali canine (MDCK, ATCC CCL 34); cellule epatiche di ratto *Buffalo* (BRL 3A, ATCC CRL 1442); cellule polmonari umane (W138, ATCC CCL 75); cellule epatiche umane (Hep G2, HB 8065); tumore mammario di topo (MMT 060562, ATCC CCL51); cellule TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); MRC 5 celle; celle FS4; e una linea di epatoma umano (Hep G2).

I mezzi e le condizioni di coltura cellulare standard possono essere usati per coltivare cellule trasfettate e produrre gli anticorpi desiderati codificati dagli mRNA.

ESEMPI

Esempio 1. Produzione di mRNA

Il ligando 2 anti-chemiochina (motivo C-C) di catena pesante (HC- α CCL2, SEQ. ID. N.: 1) e anti-CCL2 di catena leggera (LC- α CCL2, SEQ. ID. N.: 2) sono stati sintetizzati da trascrizione *in vitro* da uno stampo di DNA plasmidico codificante il gene, a cui è seguita l'aggiunta di una struttura a cappuccio 5' (Cap1) secondo metodi noti (*vedere* Fechter, P.; Brownlee, G.G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) e una coda 3' di poli(A) di circa 200 nucleotidi di lunghezza come determinato mediante elettroforesi su gel. Le sequenze per HC- α CCL2 e LC- α CCL2 erano come mostrate di seguito, e le regioni non tradotte 5' e 3' presenti in ciascun prodotto di mRNA sono rappresentate rispettivamente come X e Y, e definite di seguito:

mRNA di catena pesante anti-CCL2 (HC- α CCL2):

```
X1AUGGAAUUCGGCCUGAGCUGGCUGUUCUGGGCCAUCCUGAAGGGCGUGCA
GUGCCAGGUCCAGCUGGUGCAGUCUGGCGCCGAAGUGAAGAAACCCGGCUCCUCC
GUGAAGGUGUCCUGCAAGGCCUCCGGCGGCACCUUCUCCAGCUACGGCAUCUCCU
GGGUCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCUGGAAUGGAUGGGCGGCAUCAUCCCAU
CUUCGGCACCGCCAACUACGCCCAGAAAUCCAGGGCAGAGUGACCAUCACCGCC
GACGAGUCCACCUCCACCGCCUACAUGGAACUGUCCUCCUGCGGAGCGAGGACA
CCGCCGUGUACUACUGCGCCAGAUACGACGGCAUCUACGGCGAGCUGGACUUCUG
GGGCCAGGGCACCCUGGUCACCGUGUCCUCUGCCAAGACCACCCCCCCCUCGGUG
UACCCUCUGGGCCCCUGGCUCUGCCGCCAGACCAACUCUAUGGUCACCCUGGGCU
GCCUGGUCAAGGGCUACUUCCCCCGAGCCCGUGACCGUGACCUUGGAACUCCGGCUC
CCUGUCCUCCGGCGUGCACACCUUCCUGCCGUGCUGCAGUCCGACCUCUACACCC
UGUCCAGCAGCGUGACCGUGCCCUCCUCCACCUUGGCCUCCGAGACAGUGACCUG
```


CAACGUGGCCACCCCGCCUCCAGCACCAAGGUGGACAAGAAAAUCGUGCCCCGG
 GACUGCGGCUGCAAGCCCUGCAUCUGUACCGUGCCCCGAGGUGUCCUCCGUGUUA
 UCUUCCACCCAAGCCCAAGGACGUGCUGACCAUCACACUGACCCCCAAAGUGAC
 CUGCGUGGUGGUGGACAUCUCCAAGGACGACCCCGAGGUGCAGUUCAGUUGGUUC
 GUGGACGACGUGGAAGUGCACACCCGUCAGACCCAGCCCAGAGAGGAACAGUUA
 ACUCCACCUUCAGAUCCGUGUCCGAGCUGCCCAUCAUGCACCAGGACUGGCUGAA
 CGGCAAAGAAUUAAGUGCAGAGUGAACUCCGCCGCCUUCCAGCCCCAUCGAA
 AAGACCAUCUCCAAGACCAAGGGCAGACCCAAGGCCCCCCAGGUCUACACCAUCC
 CCCCACCAAAGAACAGAUUGGCCAAGGACAAGGUGUCCUGACCUGCAUGAUCAC
 CGAUUUCUCCAGAGGACAUCACCGUGGAAUGGCAGUGGAACGGCCAGCCCGCC
 GAGAACUACAAGAACACCCAGCCAUCAUGGACACCCAGGCUCUACUUCGUGU
 ACUCCAAGCUGAACGUGCAGAAGUCCAACUGGGAGGCCGCAACACCUUCACCUG
 UAGCGUGCUGCACGAGGGCCUGCACAACCACCACCCGAGAAGUCCUGUCCAC
 UCCCCGGCAAGUGAY₁

mRNA di catena leggera anti-CCL2 (LC- α CCL2):

X₁AUGGAAACCCUGCCCAGCUGCUGUUCUGCUGCUGCUGUGGCUGCCUGAUAC
 CACCGGCGAAAUUCGUGCUGACCCAGUCCCCGCCACCCUGUCUCUGAGCCUGGC
 GAGAGAGCCACCCUGAGCUGCAGAGCCUCCCAGUCCGUGUCCGACGCCUACCGG
 CCUGGUAUCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCUCGGCUGCUGAUCUACGACGCCUC
 CUCUAGAGCCACCGGCUGCCCCGCCAGAUUCUCCGGCUCUGGCUCUGGCACCGAC
 UUCACCCUGACCAUCUCCAGCCUGGAACCCGAGGACUUCGCCGUGUACUACUGCC
 ACCAGUACAUCAGCUGCACAGCUUACCUUCGGCCAGGGCACCAAGGUGGAAAU
 CAAGGCCGAUGCCGCCCUACCGUGUCCAUCUCCCACCCUCCAGCGAGCAGCUG
 ACCUCUGGCGGCUCUCCGUCGUGUCUUCUGAACAACUUCUACCCCAAGGACA
 UCAACGUGAAGUGGAAGAUCGACGGCUCCGAGCGGCAGAACGGCGUGCUGAACUC
 CUGGACCGACAGGACUCCAAGGACAGCACCUCUCCAUGUCCUCCACCCUGACC
 CUGACCAAGGACGAGUACGAGCGGCACAACUCCUAUACCUGCGAGGCCACCCACA
 AGACCUCCACCUCCCCAUCGUGAAGUCCUUAACCGGAACGAGUGCUGAY₁

Sequenze 5' e 3' UTR:

X₁ =

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUCCCCG
 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG

Y₁ =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCC
 ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU

Esempio 2. Materiali e condizioni di trasfezione dell'mRNA *in vitro*

A. Materiali lipidici illustrativi

Le formulazioni lipidiche usate per la trasfezione nei presenti esempi consistevano in uno o più lipidi o una miscela lipidica multicomponente di rapporti variabili che impiegavano uno o più lipidi cationici, lipidi ausiliari

e lipidi PEGilati progettati per incapsulare vari materiali a base di acido nucleico. I lipidi cationici possono includere (ma non esclusivamente) DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilammonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilammonio propano), DOTMA (1,2-di-O-ottadecenil-3)-trimetilammonio propano), DLinDMA (*vedere* Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" *J. Contr. Rel.* 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (*vedere* Semple, S.C. et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" *Nature Biotech.* 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, K.T. et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" *PNAS* 2010, 107, 1864-1869), HGT4003, ICE, a base dialchilamminica, a base di imidazolo, a base di guanidinio, ecc. I lipidi ausiliari possono includere (ma non esclusivamente) DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1, 2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerolo)), colesterolo, ecc. I lipidi PEGilati possono includere (ma non esclusivamente) una catena di poli(etilene)glicole fino a 5 kDa di lunghezza legata covalentemente a un lipide con catena(e) alchilica lunga C₆-C₂₀.

B. Formulazioni sperimentali

In questi esperimenti, aliquote di soluzioni etanoliche da 50 mg/mL di C12-200, DOPE, colesterolo e DMG-PEG2K sono state miscelate e diluite con etanolo fino a un volume finale di 3 mL. Separatamente, è stata preparata una soluzione acquosa tamponata (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) di mRNA HC- α CCL2 e mRNA LC- α CCL2 (1:1 peso:peso) aggiungendo 500 microgrammi di ciascun aggregato da una madre di 1 mg/ml. La soluzione lipidica è stata iniettata rapidamente nella soluzione acquosa di mRNA e agitata per ottenere una sospensione finale in etanolo al 20%. La sospensione di nanoparticelle risultante è stata filtrata, diafiltrata con 1x PBS (pH 7,4), concentrata e conservata a 2-8°C. Concentrazione finale = 1,35 mg/mL α CCL2 mRNA (incapsulato). Z_{Ave} = 89,2 nm ($D_{V(50)}$ = 64,0 nm; $D_{V(90)}$ = 115nm).

Esempio 3. Rilevamento di anticorpi dopo Trasfezione dell'mRNA *in vitro*

A. Tramite ELISA

In questo esempio, piastre F96 MaxiSorp Nunc-Immuno sono state rivestite con 100 μ l di 1 μ g/ml di IgG1 anti-topo di capra (Invitrogen A10538) in tampone di carbonato di sodio, pH 9,6 e incubate per 1 ora a 37°C. Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio (1xPBS, 0,05% Tween 20), i pozzetti sono stati bloccati con 320 μ l di tampone bloccante (1xPBS, 0,05% Tween 20, 2% BSA) per 1 ora a 37°C. Diluizioni seriali di standard IgG monoclonali sono state preparate in tampone bloccante nell'intervallo 250-0 ng/ml. Diluizioni seriali dei campioni sono state preparate in tampone bloccante per essere nell'intervallo della curva standard (da 1:100 a 1:10,000). Sia i campioni che gli standard sono stati incubati per 1 ora a 37°C. Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio, anticorpo secondario coniugato con HRP IgG Fc di capra anti-topo (Pierce 31439) è stato usato a una diluizione 1:40.000 e incubato a 37°C per 1 ora. Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio TMB EIA, il reagente del substrato è stato preparato secondo le istruzioni del produttore. Dopo 15 min di incubazione a 37°C, la reazione è stata interrotta aggiungendo 2N H₂SO₄ e la piastra letta a 450 nm.

B. Tramite Western Blot

In questo esempio, mezzo condizionato da cellule 293T trasfettate o cellule HCL2 elettroporate è stato frazionato mediante SDS-PAGE e trasferito su una membrana di polivinilidene difluoruro usando un apparato di trasferimento secondo le istruzioni del produttore (Invitrogen). Dopo incubazione con latte in polvere scremato al 5% in TBST (10 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20) per 1 ora, la membrana è stata lavata tre volte con PBST e incubata con IgG1 anti-topo di capra (Invitrogen A10538) per 1 ora a TA. Le membrane sono state lavate tre volte in PBST e incubate con una diluizione 1:5000 di anticorpo secondario anti-topo coniugato con perossidasi di rafano (Promega W4021) per 1 ora a temperatura ambiente. I *blot* sono stati lavati in PBST altre tre volte e sviluppati con il sistema ECL (Amersham Bioscience) secondo le istruzioni del produttore.

Esempio 4. Analisi *in vitro* dell'anticorpo α CCL2 prodotto da trasfezione di HC- α CCL2 e LC- α CCL2

Entrambi gli mRNA di HC- α CCL2 e LC- α CCL2 sono stati prodotti come descritto sopra nell'Esempio 1. Successivamente, secondo l'Esempio 2A e B, mRNA di HC- α CCL2 e LC- α CCL2 sono stati trasfettati in cellule HCL1 (cioè, linea cellulare umana 1) o cellule HCL2 in vari rapporti (peso:peso) secondo metodi noti.

I risultati di questi studi in cellule HCL1 e in cellule HCL2 sono mostrati in **Figure 1** e **2**, rispettivamente. Varie

miscele di aggregati di mRNA di α -CCL2 (chemiochina (motivo C-C) ligando 2) catena pesante e catena leggera sono state mescolate (peso:peso) e trasfettate in entrambe le cellule HCL1 (**Figura 1**) o cellule HCL2 (**Figura 2**). I supernatanti cellulari sono stati raccolti in punti temporali selezionati dopo la trasfezione e analizzati per la presenza di IgG anti-topo usando metodi basati su ELISA come descritto sopra in **Esempio 3A**.

Come mostrato in **figure 1 e 2**, la variazione del rapporto tra catena pesante e catena leggera (peso:peso) ha prodotto una differenza significativa nella produzione di proteine come determinato tramite ELISA. Mentre una miscela 1:1 (peso:peso) di catena pesante:catena leggera α -CCL2 mRNA ha fornito un segnale forte nelle cellule HCL2, un rapporto 4:1 (peso:peso) ha fornito una maggiore produzione di proteine nelle cellule HCL1. Sebbene vi fossero differenze tra i vari rapporti, è stata osservata una forte produzione di proteine per tutti i rapporti provati. Inoltre, in entrambi i casi, 48 ore dopo la trasfezione (giorno 2, o D2) forniva il segnale più forte della proteina desiderata in questo esempio.

Per confermare inoltre la presenza dell'anticorpo esogeno derivato dall'mRNA, sono state impiegate tecniche di immunoblot (Western) per una caratterizzazione aggiuntiva (vedi **Figura 3**) di campioni derivati da HCL1. Frammenti di catena pesante e catena leggera sono stati rilevati con successo nel supernatante di cellule HCL1 trasfettate con mRNA usando metodi *western blot* come descritto nell'esempio 3B. I campioni sono stati analizzati 24 e 48 ore dopo la trasfezione di varie miscele di aggregati di mRNA di catena pesante e catena leggera di α -CCL2 (peso:peso). Le intensità di banda osservate riflettevano i rapporti di mRNA impiegati in ciascun esempio.

Esempio 5. Analisi *in vivo* dell'anticorpo α CCL2 prodotto da nanoparticelle caricate di mRNA somministrate per via endovenosa

In questo esempio, la produzione di anticorpi completamente elaborati *in vivo* è stata ottenuta attraverso il rilascio di RNA messaggero esogeno, in particolare, aggregati di mRNA di catena pesante e leggera di α -CCL2 (HC- α CCL2:LC- α CCL2 mRNA, 1:1 (peso:peso)) sono stati incapsulati in nanoparticelle lipidiche cationiche come descritto nell'Esempio 2A e somministrati a topi come un singolo bolo, iniezione endovenosa.

In breve, sono stati usati topi CD-1 maschi di circa 6-8 settimane di età all'inizio di ciascun esperimento.

Campioni di HC- α CCL2 mRNA e LC- α CCL2 mRNA (1:1 peso:peso) incapsulati sono stati introdotti mediante una singola iniezione in bolo nella vena caudale di una dose totale equivalente di 30 microgrammi. I topi sono stati sacrificati e perfusi con soluzione salina nei punti temporali designati.

Il fegato e la milza di ciascun topo sono stati raccolti, suddivisi in tre parti e conservati in formalina tamponata neutra al 10% o congelati istantaneamente e conservati a -80°C per l'analisi.

Tutti gli animali sono stati soppressi mediante asfissia con CO_2 in determinati punti temporali dopo la somministrazione della dose seguita da toracotomia e raccolta di sangue cardiaco terminale. Il sangue intero (volume massimo ottenibile) è stato raccolto tramite puntura cardiaca su animali soppressi in provette con separatore di siero, lasciato coagulare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti, centrifugato a $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ a 9300 g per 10 minuti, e il siero è stato estratto. Per i prelievi di sangue provvisori, sono stati raccolti circa 40-50 μl di sangue intero tramite puntura della vena facciale o taglio della coda. I campioni raccolti da animali non trattati sono stati usati come livelli di riferimento per il confronto con gli animali in studio.

Per l'analisi ELISA della produzione di anticorpi α CCL2, piastre F96 MaxiSorp Nunc-Immuno sono state rivestite con 100 μl di 1 mg/ml di anticorpo monoclonale purificato di coniglio ricombinante MCP-1 in tampone carbonato, pH 9,6 e incubate per 1 ora a 37°C . Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio (1xPBS, 0,05% Tween 20), i pozzetti sono stati bloccati con 320 μl di tampone bloccante (1xPBS, 0,05% Tween 20, 2% BSA) per 1 ora a 37°C . Circa 100 ng/ml di proteina ricombinante umana o murina MCP-1 è stata aggiunta a ciascun pozzetto e incubata per 1 ora a 37°C . Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio, sono state aggiunte diluizioni seriali dei campioni (da 1:5 a 1:200) e incubate per 1 ora a 37°C . Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio, l'anticorpo secondario coniugato con IgG Fc HRP anti-topo di capra è stato usato alla diluizione 1:40.000 e incubato a 37°C per 1 ora. Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio TMB EIA, il reagente del substrato è stato preparato secondo le istruzioni del produttore. Dopo 15 min di incubazione a 37°C , la reazione è stata interrotta aggiungendo 2N H_2SO_4 e la piastra letta a 450 nm.

I livelli sierici dei topi trattati sono stati monitorati in momenti selezionati dopo la somministrazione (6 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore). I livelli di anticorpo α -umano CCL2 completamente formato presenti nel siero di topo sono

stati quantificati usando metodi basati su ELISA (vedi **Figura 4**). Un aumento significativo dell'anticorpo esogeno derivato dall'mRNA α -CCL2 desiderato può essere osservato entro sei ore dalla somministrazione con un picco dopo 24 ore.

Esempio 6. Produzione *in vivo* di anticorpi α -VEGF

In questo esempio, è stata realizzata la produzione di anticorpo α -VEGF completamente elaborato *in vivo* attraverso la rilascio di RNA messaggero esogeno.

Le sequenze per HC- α VEGF e LC- α VEGF sono mostrate di seguito e le regioni non tradotte 5' e 3' presenti in ciascun prodotto di mRNA sono rappresentate rispettivamente come X e Y e definite di seguito:

mRNA anti-VEGF di catena pesante (HC- α VEGF):

X₁AUGGCAACUGGAUCAAGAACCUCUCCUGCUCGCAUUCGGCCUGCUCUGUCUC
 CCAUGGCUCCAAGAAGGAAGCGCGUUCUCCACUAUCCCCUCUCGGAGGUUCAGC
 UGGUCGAAAGCGGGGGCGGCCUCGUCCAGCCAGGUGGAUCCUCCGCCUGAGCUG
 CGCCGCUCCGGAUACACUUUCACCAACUACGGCAUGAACUGGGUCCGCCAGGCG
 CCGGAAAGGGACUGGAAUGGGUCGGCUGGAUCAAUACCUACACUGGAGAGCCU
 ACCUACGCCGUCACUUUAAGAGGCGGUUCACUUUCUCACUGGAUACUCCAAGU
 CAACCGCUUACCUUCAGAUGAAUUCUCCUGCGCGCCGAGGAUACCGCAGUGUAUUA
 CUGCGCCAAAUACCCGCAUUACUACGGCUCCAGCCACUGGUACUUUGACGUGUGG
 GGUCAAGGAACCCUGGUGACUGUGUCGUCCGCUUCCACCAAGGGACCAAGCGUGU
 UUCCACUCGCCCCGAGCUAAAUCGACGUCGGGAGGUACUGCCGCACUGGGGUG
 CUUGGUCAAGGACUACUUCCAGAGCCGGUGACUGUUUCCUGGAACAGCGGAGCG
 CUCACCUCGGGCGUGCACACCUUCCUCCUGCGGUGUUGCAGUCAUCUGGACUGUACU
 CGCUGUCCAGCGUGGUCACGGUCCCGAGCUCGUCGCUCGGGACCCAAACCUACAU
 UUGCAAUGUCAACCACAAGCAUCGAACACCAAGUCGACAAGAAGGUGGAACCG
 AAGUCGUGCGACAAGACUCAUACGUGCCCACCGUGUCCGGCUCCGGAACUGUUG
 GGGGCCUCCUGUUCUUUCCCGCCAAAGCCUAAGGACACUCUCAUGAUCUC
 ACGGACGCCAGAAGUGACCUGUGUGGUCGUGGAUGUGUCACAUGAGGAUCCGGA
 AGUCAAAUUAACUGGUAUGUGGACGGGGUGGAAGUGCAUAAUGCCAAAACCAA
 ACCUCGCGAGGAGCAGUACAACUCAACCUACCGGGUGGUGUCCGUGCUGACUGUG
 CUGCACCAGGACUGGCUGAAUGGAAAGGAGUACAAAUGCAAGGUCAGCAACAAG
 GCCUUCUCCGCCCAAUCGAAAAGACGAUCUCGAAGGCCAAAGGUCAGCCGCGAG
 AGCCUCAAGUGUACACUCUGCCGCCGUAAGAGAAGAAAUGACUAGAACCAAGU
 UCCCCUACUUGCCUGGUGAAGGGCUUCUACCCAGCGACAUCGCAGUGGAAUGG
 GAGAGCAACGGACAGCCGGAACAACUAUAAGACCACCCUCCUGUGUUGGACU
 CGGAUGGUUCCUUCUCCUUACAGCAAGCUGACCGUGGAUAAAUCGCGGUGGCA
 GCAAGGAAAUGUGUUUCAUGCUCAGUCAUGCACGAGGCGCUGCACAAUCACUAC
 ACUCAGAAGUCCUGUCGCUGUCGCCAGGAAAAUAAY₁

mRNA di catena leggera anti-VEGF (LC- α VEGF):

X₁AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUGCCU
 GCCCUGGUUGCAAGAAGGAUCGGCUUUCCCGACCAUCCCACUCUCCGACAUUCAA
 AUGACGCAGUCCCCAUCGAGCCUCUCAGCAUCAGUGGGGGGAUCGCGUGACUAUCA
 CUUGCUCGGCGAGCCAGGAUAUCAGCAAUUACCUGAACUGGUAUCAGCAAAAGCC
 UGGAAAGGCACCGAAGGUGCUGAUCUACUUCACCUCAAGCCUCCAUUCGGGUGUC
 CCGUCCCGCUUCAGCGGCUCGCGCUCAGGCACUGACUUCACCCUGACUAUCUCCU
 CGCUGCAACCGGAAGAUUUCGCCACUACUACUGUCAGCAGUACUCCACCGUGCC
 UUGGACGUUCGGACAGGGAACCAAGUUGAGAUUAAGCGGACGGUCGCGGCCCCC
 UCCGUGUUUAUCUUUCCGCCUUCGGACGAGCAGCUGAAGUCGGGAACCGCCUCUG
 UCGUGUGCCUCCUGAACAACUUCUACCCGCGGGAAGCCAAGGUGCAGUGGAAAGU
 GGAUAACGCGCUUCAGAGCGGCAAUUCGCAAGAGUCCGUGACCGAAGAGGACUCG
 AAGGACUCAACCUACUCCUCAGCUCAACCCUCACUUUGUCGAAGGCCGACUACG
 AGAAGCACAAAGUCUACGCAUGCGAAGUCACCCACCAGGGUCUGUCGAGCCAGU
 GACUAAAUCCUUCAAUAGGGGGGAAUGUUAAY₁

Sequenze 5' e 3' UTR:

X₁ (sequenza 5' UTR) =

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCA UAGAAGACACC
 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCCCG
 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG

Y₁ (sequenza 3' UTR) =

CGGGUGGCAUCCCUUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCC
 ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU

Aggregati di mRNA della catena pesante e della catena leggera di α -VEGF (HC- α -VEGF:LC- α -VEGF mRNA, 1:1 (peso:peso)) sono stati incapsulati in nanoparticelle lipidiche cationiche come descritto di seguito:

In questi esperimenti, aliquote di soluzioni etanoliche da 50 mg/mL di cKK-E12, DOPE, colesterolo e DMG-PEG2K sono state miscelate e diluite con etanolo fino a un volume finale di 3 mL. Separatamente, è stata preparata una soluzione acquosa tamponata (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) di mRNA di HC- α VEGF e mRNA di LC- α VEGF (1:1 peso:peso) aggiungendo 500 microgrammi di ciascun aggregato da una madre di 1 mg/ml. La soluzione lipidica è stata iniettata rapidamente nella soluzione acquosa di mRNA e agitata per ottenere una sospensione finale in etanolo al 20%. La sospensione di nanoparticelle risultante è stata filtrata, diafiltrata con 1x PBS (pH 7,4), concentrata e conservata a 2-8°C. Concentrazione finale = 0,20 mg/mL mRNA di α VEGF (incapsulato). Z_{Ave} = 81,0 nm (PDI = 0,16).

Le nanoparticelle lipidiche caricate con mRNA di HC- α -VEGF e LC- α -VEGF sono state somministrate a topi di tipo selvatico mediante una singola iniezione endovenosa nella vena caudale o per iniezione sottocutanea alla

dose di 1,0 mg/kg ed è stata monitorata la produzione di anticorpi anti-VEGF nel tempo nel siero tramite ELISA. In breve, sono stati usati topi CD-1 maschi di circa 6-8 settimane di età all'inizio di ciascun esperimento. Campioni di HC- α -VEGF mRNA e LC- α -VEGF mRNA (1:1 peso:peso) incapsulati sono stati introdotti mediante una singola iniezione in bolo nella vena caudale di una dose totale equivalente di 1,0 mg/kg (circa 30 microgrammi). I topi sono stati sacrificati e perfusi con soluzione fisiologica nei punti temporali designati (0,50 ore, 3 ore, sei ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane dopo la somministrazione.

Tutti gli animali sono stati soppressi con asfissia da CO₂ in determinati momenti dopo la somministrazione della dose seguita da toracotomia e raccolta di sangue cardiaco terminale. Il sangue intero (volume massimo ottenibile) è stato raccolto tramite puntura cardiaca su animali soppressi in provette con separatore di siero, lasciato coagulare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti, centrifugato a 22°C \pm 5°C a 9300 g per 10 minuti, e il siero è stato estratto. Per i prelievi di sangue provvisori, sono stati raccolti circa 40-50 μ l di sangue intero tramite puntura della vena facciale o taglio della coda. I campioni raccolti da animali non trattati sono stati usati come livelli di riferimento per il confronto con gli animali di studio.

Per l'analisi ELISA della produzione di anticorpi α -VEGF, la piastra F96 MaxiSorp Nunc-Immuno è stata rivestita con 100 microlitri di 0,50 microgrammi/mL/pozzetto di proteina VEGF umana ricombinante (Invitrogen #PHC9391) in tampone di rivestimento (50 mM NaHCO₃, pH9,6). Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio, i pozzetti sono stati bloccati usando un tampone bloccante (1X DPBS, 2% BSA, 0,05% Tween-20) per un'ora a 37°C. Dopo un ulteriore lavaggio come descritto sopra, il siero di topo raccolto dai topi iniettati è stato aggiunto a ciascun pozzetto, e l'anticorpo secondario coniugato con HRP anti-IgG Fc umano di coniglio (Pierce # PA-28587) è stato usato a una diluizione di 1:10.000 e incubato a 37°C per 1 ora. Dopo aver lavato 3 volte con tampone di lavaggio TMB EIA, il reagente substrato è stato preparato secondo le istruzioni del produttore. Dopo 10 min di incubazione a 37°C, la reazione è stata interrotta aggiungendo 2N H₂SO₄ e la piastra letta a 450 nm. I livelli sierici dei topi trattati sono stati monitorati in momenti selezionati dopo la somministrazione (ad esempio, 0,5 ore, 3 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore, 8 giorni e 15 giorni). **Figura 5** mostra risultati

esemplari che illustrano l'anticorpo α -VEGF rilevato nel siero di topi di tipo selvatico dopo una singola dose di nanoparticelle caricate di mRNA di HC- α -VEGF e di mRNA di LC- α -VEGF. Un aumento significativo dell'anticorpo esogeno desiderato derivato dall'mRNA di α -VEGF può essere osservato entro sei ore dalla somministrazione con un picco dopo 24 ore e continuato fino a 2 settimane dopo una singola dose di mRNA di α -VEGF. **Figura 6** mostra gli stessi risultati illustrativi di **Figura 5**, ma graficati per numero di topo specifico. **Figura 7** mostra un confronto dei livelli di anticorpo α -VEGF presente nel siero di topi iniettati per via endovenosa o sottocutanea dopo 24 ore.

Questo esempio fornisce un'ulteriore conferma che la terapia a base di mRNA può essere usata in modo efficace nella produzione *in vivo* di anticorpi.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente un primo mRNA che codifica per la catena pesante di un anticorpo e un secondo mRNA che codifica per la catena leggera dell'anticorpo ad un rapporto molare variabile tra 2:1 e 1:2 per l'uso in terapia in un paziente, in cui il primo mRNA e il secondo mRNA (i) comprendono ciascuno una struttura a cappuccio 5', una coda 3' poli-A, una regione 5' non tradotta e una regione 3' non tradotta e (ii) sono incapsulati all'interno di liposomi comprendenti un lipide cationico, un lipide neutro, un lipide a base di colesterolo, e un lipide modificato con PEG e aventi una dimensione non superiore a 150 nm, in cui il primo mRNA che codifica per la catena pesante e il secondo mRNA che codifica per la catena leggera sono incapsulati nello stesso liposoma, in cui l'anticorpo è un tetramero e ciascun tetramero è composto da due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avente una catena leggera di circa 25 kD e una catena pesante di circa 50-70 kD, e in cui la composizione viene somministrata per via endovenosa al paziente e l'anticorpo viene distribuito per via sistemica nel paziente.
2. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il primo mRNA e il secondo mRNA hanno un rapporto molare di 1:1.
3. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui i liposomi hanno una dimensione non maggiore di circa 100 nm o 75 nm.
4. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui i liposomi hanno una dimensione compresa tra 10 nm e 100 nm.
5. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui gli mRNA sono (i) modificati per migliorare la stabilità, in cui gli mRNA sono modificati per includere analoghi nucleosidici, basi modificate chimicamente o biologicamente, basi intercalate, gruppi fosfato modificati e/o zuccheri modificati, o (ii) non modificati chimicamente.
6. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui gli mRNA sono sintetizzati da (i) nucleotidi naturali adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) e uracile (U), o analoghi nucleotidici modificati scelti dal gruppo costituito da 1-metiladenina, 2-metil-adenina, 2-metil-uracile, 2-metil-uracile-N-6-

isopentenil-adenina, N-6-metil-adenina, N-6-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metil-citosina, 4-acetil-citosina, 5-metil-citosina, 2,6-diamminopurina, 1-metil-guanina, 2-metil-guanina, 2,2-dimetil-guanina, 7-metilguanina, inosina, 1-metil-inosina, pseudouracile (5-uracile), diidro-uracile, 2-tio-uracile, 4-tiouracile, 5-carbossimetilamminometil-2-tio-uracile, 5-(carbossiidrossimetil)-uracile, 5-fluorouracile, 5-bromo-uracile, 5-carbossimetilamminometil-uracile, 5-metil-2-tio-uracile, 5-metiluracile, acido N-uracil-5-ossiacetico metil estere, 5-metilamminometil-uracile, 5-metossiamminometil-2-tio-uracile, 5-metossicarbonilmetil-uracile, 5-metossi-uracile, acido uracil-5-ossiacetico metil estere, acido uracil-5-ossiacetico (v), 1-metil-pseudouracile, queosina, β -D-mannosil-queosina, wybutoxosina, e fosforammidati, fosforotioati, nucleotidi peptidici, metilfosfonati, 7-deazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina.

7. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo è una IgG.

8. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo è scelto dal gruppo costituito da anti-CCL2, anti-lisil ossidasi-simile-2 (LOXL2), anti-Flt-1, anti-TNF- α , anti-recettore di Interleuchina-2R α (CD25), anti-TGF β , anti-fattore attivante cellule B, anti-alfa-4 integrina, anti-BAGE, anti- β -catenina/m, anti-Bcr-abl, anti-C5, anti-CA125, anti-CAMEL, anti-CAP-1, anti-CASP-8, anti-CD4, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD25, anti-CDC27/m, anti-CD 30, anti-CD33, anti-CD52, anti-CD56, anti-CD80, anti-CDK4/m, anti-CEA, anti-CT, anti-CTL4, anti-Cyp-B, anti-DAM, anti-EGFR, anti-ErbB3, anti-ELF2M, anti-EMMPRIN, anti-EpCam, anti-ETV6-AML1, anti-HER2, anti-G250, anti-GAGE, anti-GnT-V, anti-Gp100, anti-HAGE, anti-HER-2/neu, anti-HLA-A*0201-R170I, anti-IGF-1R, anti-IL-2R, anti-IL-5, anti-MC1R, anti-miosina/m, anti-MUC1, anti-MUM-1, -2, -3, anti-proteinasi-3, anti-p190 bcr-abl minore, anti-Pml/RAR α , anti-PRAMS, anti-PSA, anti-PSM, anti-PSMA, anti-RAGE, anti-RANKL, anti-RU1 o RU2, anti-SAGE, anti-SART-1 o anti-SART-3, anti-survivina, anti-TEL/AML1, anti-TPI/m, anti-TRP-1, anti-TRP-2, anti-TRP-2/INT2, anti-VEGF, e anti-recettore di VEGF.

IgG ELISA on cells transfected with CCL2 HC and LC mRNA

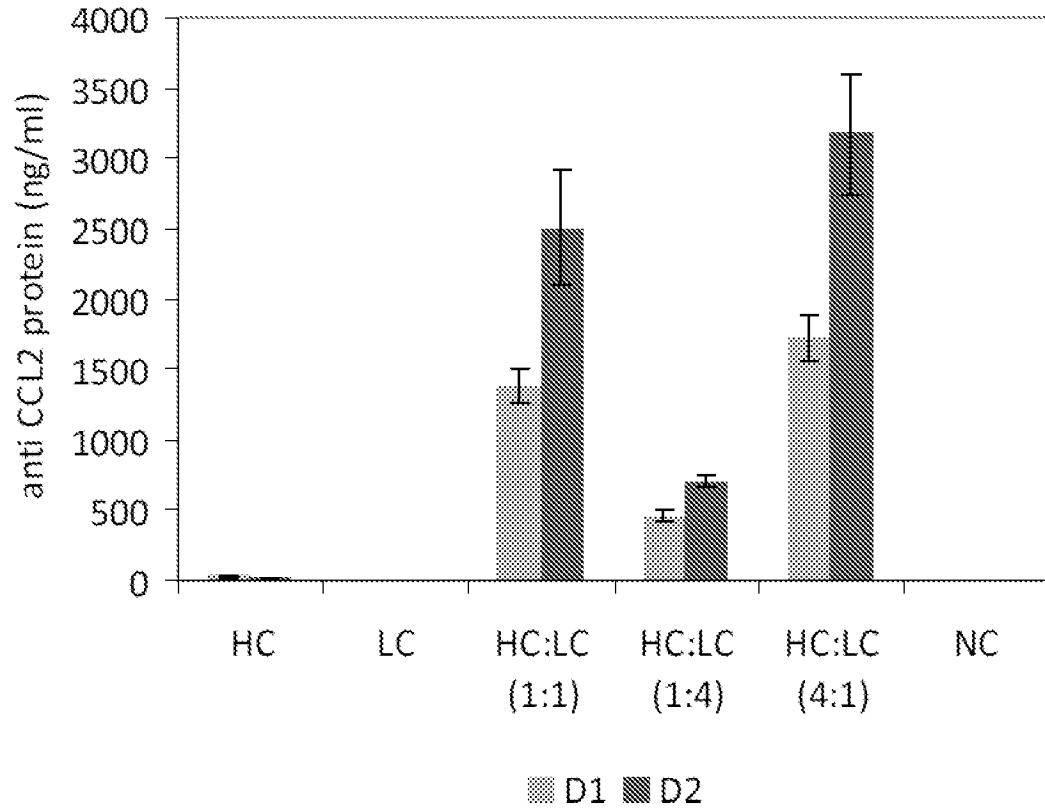


Figure 1

IgG ELISA on electroporated cells with anti-CCL2 HC and anti CCL2
LC mRNA

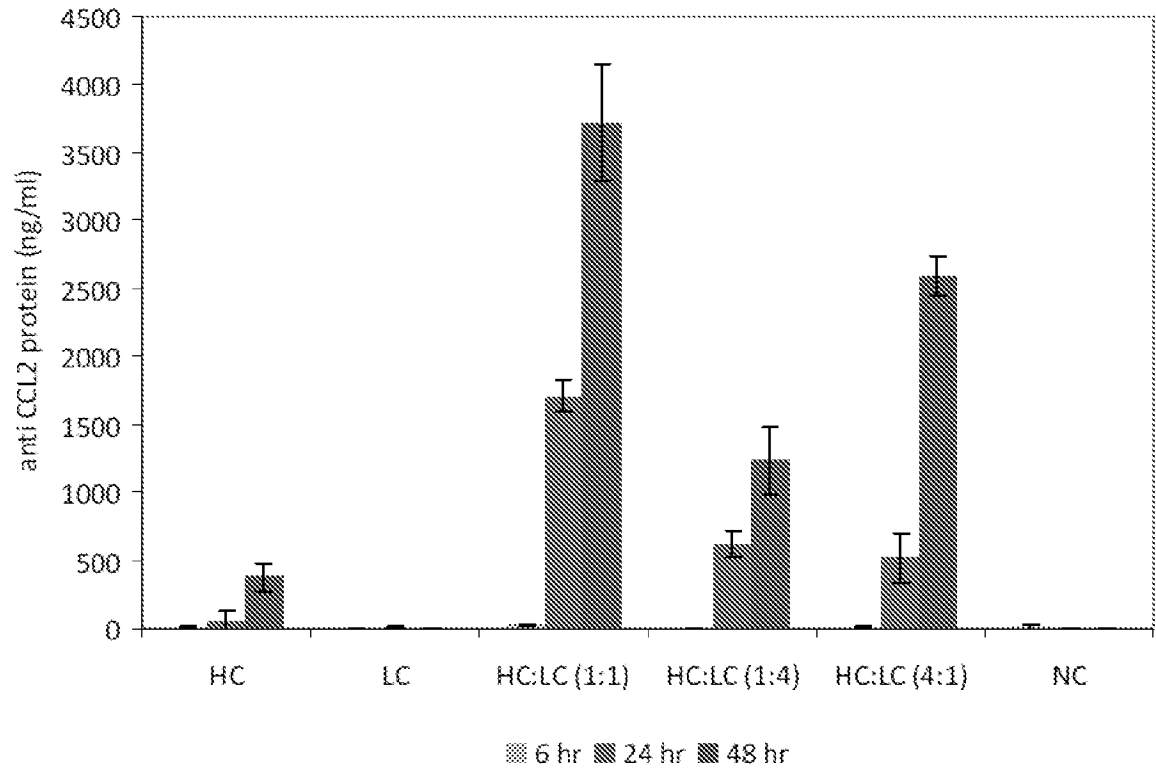


Figure 2

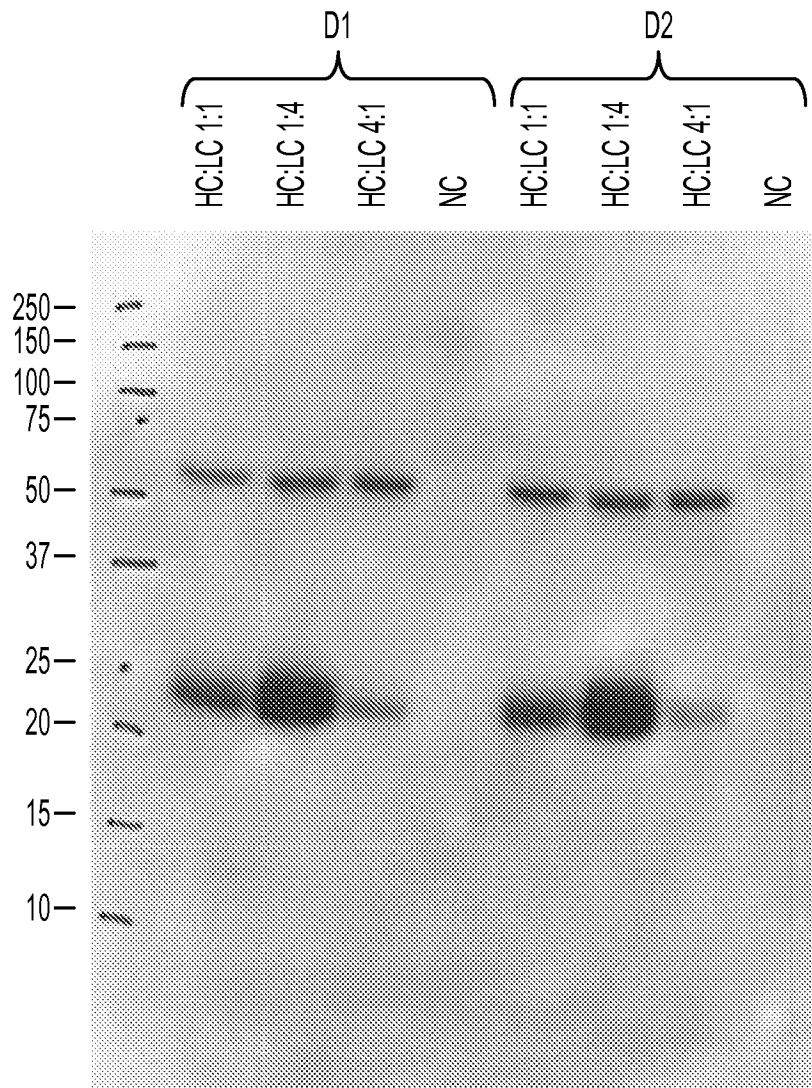


Figure 3

ELISA of CIT 13-08 CCL2 mouse serum

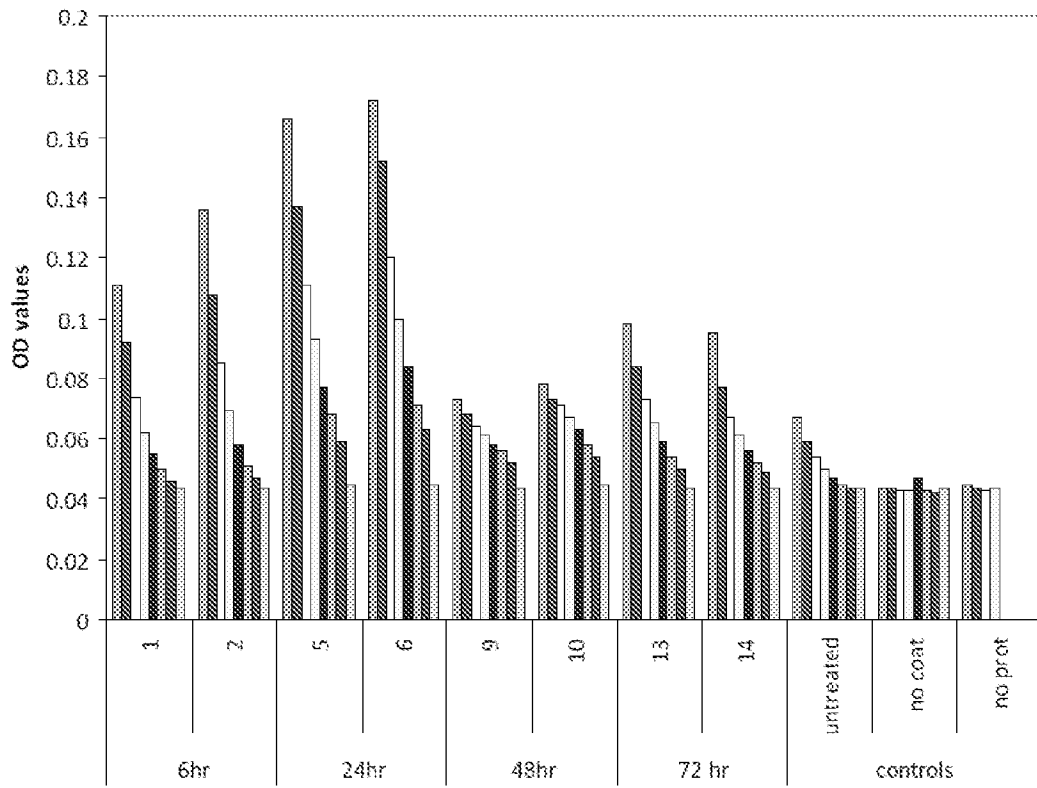


Figure 4

**α -VEGF Antibody Detected in Serum of WT Mice After
Treatment of α -VEGF MRT**

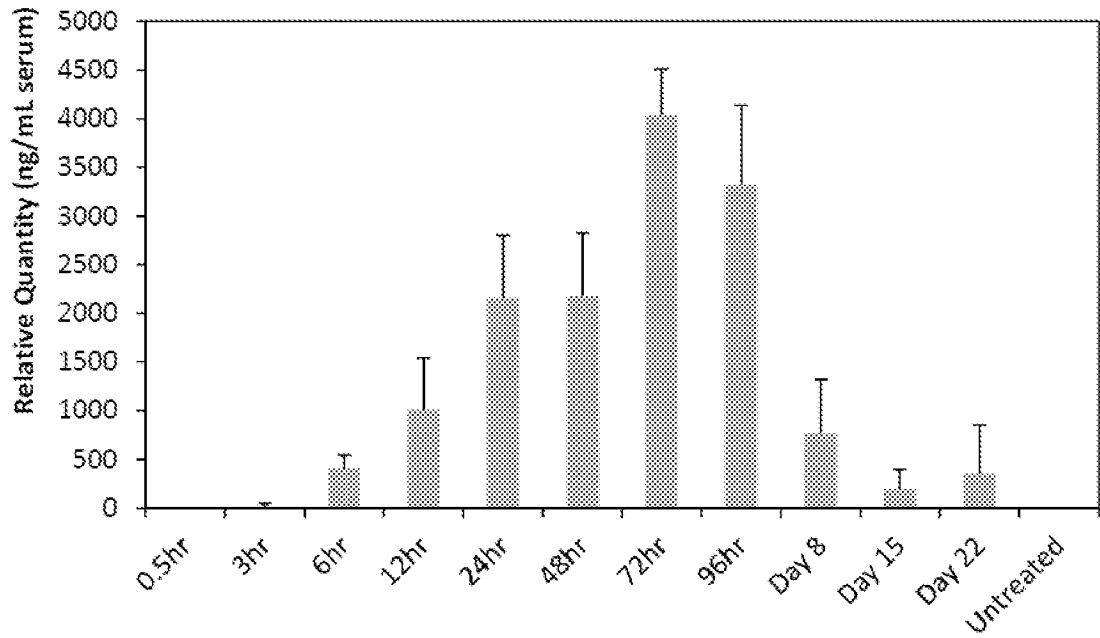


Figure 5

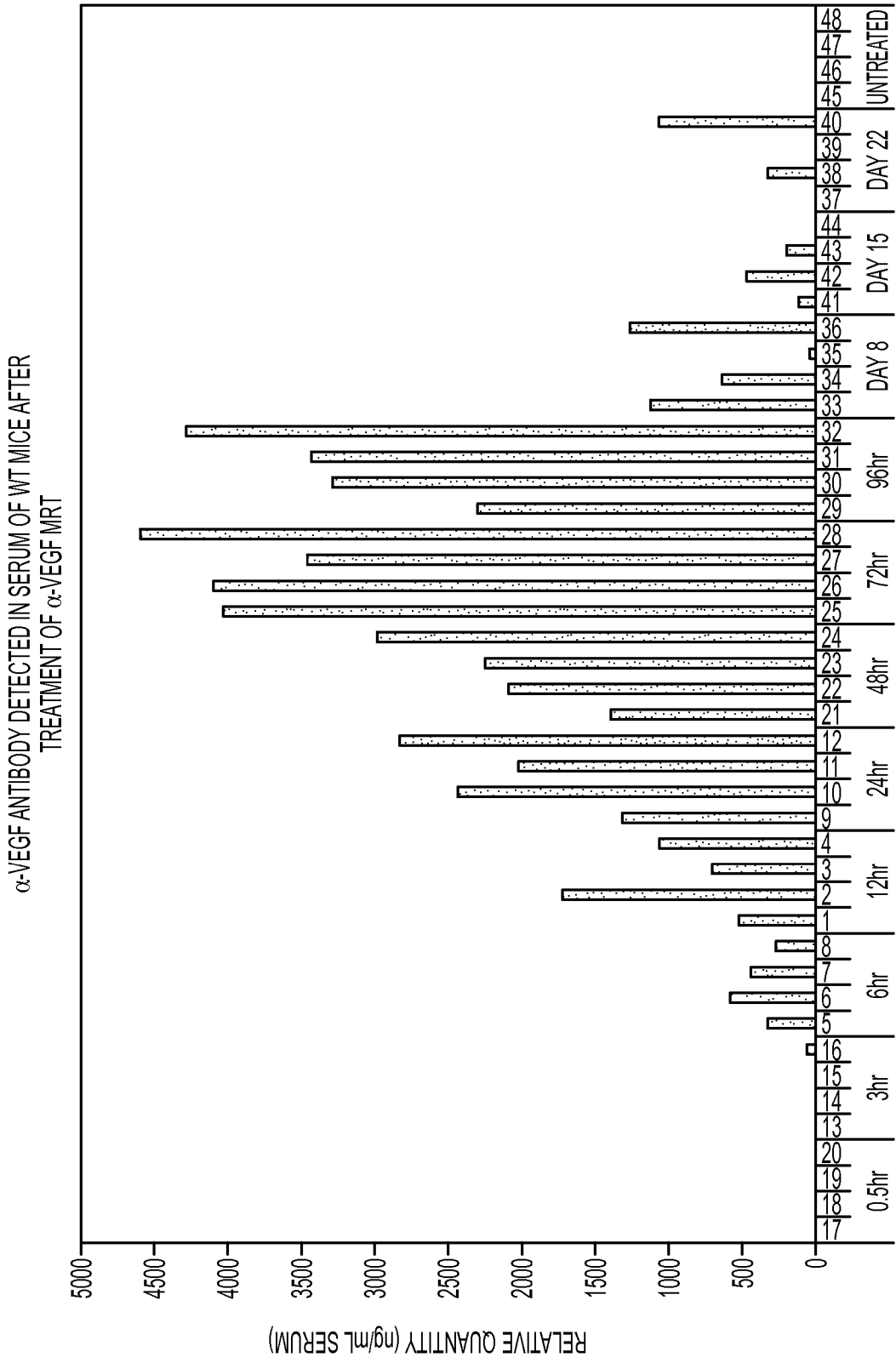


Figure 6

**Relative Quantity of α -hVEGF Ab Detected in WT
Mouse serum After Treatment via α VEGF MRT**

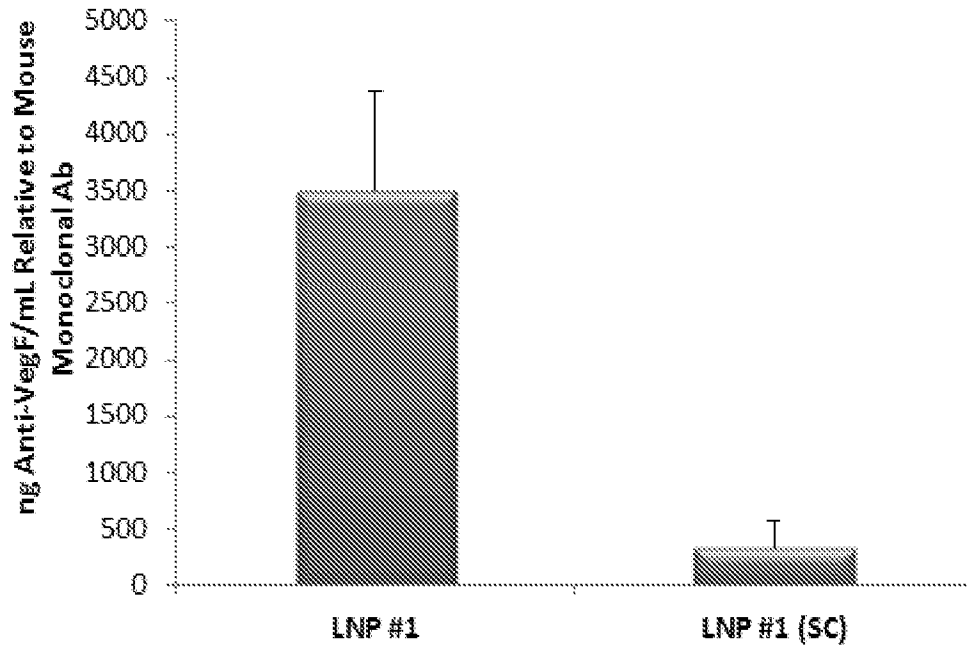


Figure 7

EX6316R - TRADUZIONE LEGENDE DISEGNI

Fig. 1

IgG ELISA on cells transfected with CCL2 HC and LC mRNA	ELISA di IgG su cellule trasfettate con mRNA di CCL2 HC e LC
Anti CCL2 protein	Anti-proteina CCL2

Fig. 2

IgG ELISA on electroporated cells with anti-CCL2 HC and anti CCL2 LC mRNA	ELISA di IgG su cellule elettroporate con mRNA anti-CCL2 HC e anti-CCL2 LC
Anti CCL2 protein	Anti-proteina CCL2
Hr	Ore

Fig. 4

OD values	Valori di DO
ELISA of CIT 13-08 CCL2 mouse serum	ELISA di siero di topo CIT 13-08 CCL2
Untreated	Non trattate
No coat	Nessun rivestimento
No prot	Nessuna proteina
Controls	Controlli
Hr	Ore

Fig. 5

α -VEGF antibody detected in serum of WT mice after treatment of α -VEGF MRT	Anticorpo per α -VEGF rivelato nel siero di topi di tipo selvatico dopo trattamento di α -VEGF MRT
Relative quantity	Quantità relativa
ng/mL serum	ng/mL di siero
Hr	Ore
Day	Giorno
Untreated	Non trattate

Fig. 6

α -VEGF antibody detected in serum of WT mice after	Anticorpo per α -VEGF rivelato nel siero di topi di tipo
--	---

treatment of α -VEGF MRT	selvatico dopo trattamento di α -VEGF MRT
Relative quantity	Quantità relativa
ng/mL serum	ng/mL di siero
Hr	Ore
Day	Giorno
Untreated	Non trattate

Fig. 7

Relative quantity of α -hVEGF Ab detected in WT mouse serum after treatment via α VEGF MRT	Quantità relativa di anticorpo per α -hVEGF rivelato nel siero di topi di tipo selvatico dopo trattamento tramite α -VEGF MRT
ng Anti-VegF/mL relative to mouse monoclonal Ab	ng anti-VEGF/mL rispetto ad anticorpo monoclonale di topo